



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105101958 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201480014719. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 01. 14

A61K 31/075(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/195(2006. 01)

61/752, 909 2013. 01. 15 US

A61K 38/43(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/011531 2014. 01. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/113404 EN 2014. 07. 24

(71) 申请人 纽斯尔特科学公司

地址 美国田纳西州

(72) 发明人 麦克·泽梅尔 安提亚·布鲁克鲍尔

布鲁克·巴格特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 郑霞

权利要求书2页 说明书24页 附图7页

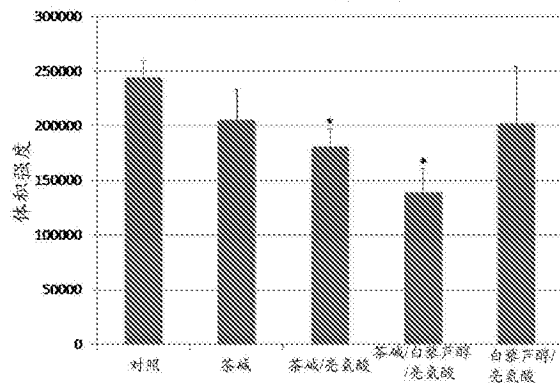
(54) 发明名称

治疗肺病状

(57) 摘要

本文提供了可用于治疗肺病状的组合物、方法和药剂盒。这样的组合物可以含有与亮氨酸和/或亮氨酸代谢物和白藜芦醇组合的协同量的非特异性磷酸二酯酶抑制剂,如甲基黄嘌呤。

MLEC中的NFκB蛋白质表达



1. 一种组合物,其包含:
  - (a) 亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物 ;和
  - (b) 甲基黄嘌呤 ;其中该组合物包含至少约 250mg 亮氨酸和 / 或至少约 10mg 所述一种或多种亮氨酸代谢物。
2. 如权利要求 1 所述的组合物,其进一步包含白藜芦醇。
3. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物包含至少约 500mg 亮氨酸。
4. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物包含约 250-1500mg 亮氨酸。
5. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物包含至少约 200mg 亮氨酸代谢物。
6. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物包含约 10-750mg 亮氨酸代谢物。
7. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述甲基黄嘌呤选自茶碱和可可碱。
8. 如权利要求 7 所述的组合物,其中该组合物包含至少约 5mg 茶碱。
9. 如权利要求 7 所述的组合物,其中该组合物包含约 1-100 或 5-50mg 茶碱。
10. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物包含亚治疗量的所述甲基黄嘌呤。
11. 如权利要求 7 所述的组合物,其中该组合物包含亚治疗量的茶碱。
12. 如权利要求 2 所述的组合物,其中该组合物包含至少约 35mg 白藜芦醇。
13. 如权利要求 2 所述的组合物,其中该组合物包含约 5-500 或 30-250mg 白藜芦醇。
14. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物基本上不含非支链氨基酸。
15. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物中的氨基酸基本上不含非支链氨基酸。
16. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物中非支链氨基酸相对于总氨基酸的百分比小于约 0.1%、1% 或 10%。
17. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物是单位剂量。
18. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物被配制用于口服给药、吸入或静脉内递送。
19. 如权利要求 1 所述的组合物,其中该组合物被配制用于持续释放,以便经至少约 4、6、12、24、36 或 48 小时的时间段达到大于所需循环水平的循环水平。
20. 如权利要求 19 所述的组合物,其中所述持续释放制剂以在受试者中达到大于约 1  $\mu$ M 的甲基黄嘌呤循环水平持续所述时间段。
21. 一种组合物,其包含:
  - (a) 亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物 ;和
  - (b) 甲基黄嘌呤 ;其中 (a) 与 (b) 的质量比为至少约 15、25、50、75 或 100,且其中该组合物包含至少约 5mg 所述甲基黄嘌呤。
22. 如权利要求 20 所述的组合物,其进一步包含至少约 10mg 白藜芦醇。
23. 如权利要求 20 所述的组合物,其中所述甲基黄嘌呤是茶碱或可可碱。
24. 一种组合物,其包含:
  - (a) 亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的

一种或多种亮氨酸代谢物 ;和

(b) 甲基黄嘌呤 ;

其中 (a) 与 (b) 的摩尔比为至少约 400、500、750 或 1000, 且

其中该组合物包含至少约 0.05  $\mu\text{g}$  所述甲基黄嘌呤。

25. 如权利要求 24 所述的组合物, 其进一步包含至少约 0.01  $\mu\text{g}$  白藜芦醇。

26. 如权利要求 24 所述的组合物, 其中所述甲基黄嘌呤是茶碱或可可碱。

27. 如权利要求 24 所述的组合物, 其中该组合物被配制为用于吸入的单位剂量。

28. 如权利要求 27 所述的组合物, 其中该组合物被包装在吸入器中。

29. 如权利要求 28 所述的组合物, 其中所述吸入器可以包含至少约 20、50、200 或 1000 单位剂量的该组合物。

30. 一种组合物, 其包含 :

(a) 亮氨酸 ;和

(b) 甲基黄嘌呤 ,

其中组分 (a) 和 (b) 以在受试者中有效达到约 0.3-2mM 亮氨酸和约 0.5-10  $\mu\text{M}$  甲基黄嘌呤的循环水平的量存在。

31. 如权利要求 24 所述的组合物, 其中选择 (a) 和 (b) 的量以在受试者中诱导约 0.7-2mM 亮氨酸和约 0.7-3  $\mu\text{M}$  甲基黄嘌呤的循环水平。

32. 如权利要求 24 所述的组合物, 其中所述受试者是人、驯养动物或家畜。

33. 一种组合物, 其包含 :

(a) 亮氨酸 ;和

(b) 甲基黄嘌呤 ,

其中组分 (a) 和 (b) 以有效提高肺内皮细胞中选自 NF  $\kappa$  B、嗜酸细胞活化趋化因子、IL1- $\beta$  和 IL6 的一种或多种炎症标志物的表达水平或分泌或者降低肺内皮细胞中选自脂连蛋白受体 1 和脂连蛋白受体 2 的一种或多种抗炎症标志物的表达水平或分泌的量存在。

34. 如权利要求 33 所述的组合物, 其中 (b) 的存在量低于达到约 40  $\mu\text{M}$  的循环水平所需的量。

35. 一种治疗需要治疗的受试者中的肺病状的方法, 其包括向受试者施用前述权利要求中任一项的组合物。

36. 一种提高选自 NF  $\kappa$  B、嗜酸细胞活化趋化因子、IL1- $\beta$  和 IL6 的炎症标志物的表达水平或分泌或者降低选自脂连蛋白受体 1 和脂连蛋白受体 2 的抗炎症标志物的表达水平或分泌的方法, 该方法包括使肺内皮细胞与前述权利要求中任一项的组合物接触, 以实现所述炎症标志物或所述抗炎症标志物的表达水平或分泌的所述降低和 / 或提高。

37. 如权利要求 36 所述的方法, 其中所述受试者是人、驯养动物或家畜。

38. 如权利要求 20、24 或 33 所述的组合物, 其中该组合物被配制为单位剂量。

39. 一种药剂盒, 其包含权利要求 1、20、24 或 33 的组合物单位剂量的多日供应, 以及指导经多日的时间段施用所述多日供应的说明书。

## 治疗肺病状

### 交叉引用

[0001] 本申请要求 2013 年 1 月 15 日提交的美国临时申请号 61/752,909 的权益,该临时申请为了所有目的通过引用以其整体并入本文。

### 背景技术

[0002] 肺疾病或病状涵盖一系列肺相关的疾病,包括哮喘和慢性阻塞性肺疾病 (COPD),其影响到全世界的数百万人。

[0003] 例如,全球有超过 3 亿人患有哮喘。据预测,在下一个十年,患病率将增加至约 4 亿人。哮喘是一种根据复发性喘鸣和间歇性气流限制来确定的慢性气道病症。其特征在于气道炎症、粘液分泌过多和气道高反应性 (AHR)。研究表明,这些临床表现至少部分地是由 2 型 T 辅助 (Th2) 细胞连同肥大细胞、B 细胞和嗜酸性粒细胞以及许多炎性细胞因子和趋化因子一起介导的炎症应答。

[0004] 目前,有三种抗炎剂用于控制哮喘,其包括吸入性类固醇、半胱氨酰 - 白三烯受体拮抗剂和色甘酸。然而,半胱氨酰 - 白三烯受体拮抗剂和色甘酸的治疗效果是高度变化的,并且可能仅限于患者的某些亚组。另外,5-10% 的哮喘患者不能被目前的药物治疗很好地控制,他们在加重期间需要口服类固醇。口服类固醇的使用通常与多种不良反应相关联,最明显的是食欲增加、胃溃疡、睡眠困难 (失眠)、情绪和行为改变、面部潮红 (发红) 以及由水潴留增多引起的短期体重增加。如果长时间服用,类固醇的使用可导致青光眼、白内障、高血压、心脏疾病、糖尿病、肥胖、胃酸反流 /GERD、骨质疏松症、肌病、某些类型的感染的增加和库欣综合征 (cushing syndrome)。

[0005] COPD 是一种通常被认为包括慢性支气管炎和肺气肿之一种或两种的医学病状。慢性支气管炎的特征在于并非由医学上定义的原因如微生物感染或癌引起的持久的 (如一年以上) 排痰性咳嗽。肺气肿是位于终末细支气管远侧的气室的异常永久性非均匀扩大,包括气室壁的破坏。COPD 由有毒颗粒或气体 (最常见地来自吸烟) 引起,这触发肺中的异常炎症应答。COPD 的自然进程的特征在于偶发的突然症状恶化,被称为急性加重,其中大多数由感染或空气污染引起。

[0006] 目前对 COPD 还没有治愈方法,已经证实能降低死亡率的仅有的措施是戒烟和补氧。COPD 用支气管扩张剂如  $\beta$ -2 激动剂和 / 或抗胆碱能药治疗。 $\beta$ -2 激动剂刺激  $\beta$ -2 受体,而抗胆碱能药阻断来自胆碱能神经的刺激,两者都是放松气道周围的平滑肌从而增加气流的药物。虽然这些药剂可以在一定程度上改善某些症状,但是它们对于阻止 COPD 的进展无效。

[0007] 甲基黄嘌呤 (黄嘌呤和生物碱的一类衍生物) 已经常用作支气管扩张剂。甲基黄嘌呤松弛平滑肌,刺激中枢神经系统,刺激心肌,并作用于肾脏以促进利尿。它们在促进支气管平滑肌松弛中的效用对于哮喘的控制是有益的。

[0008] 甲基黄嘌呤茶碱是一种用于治疗呼吸道阻塞性疾病的已确定的药物。茶碱是几种类型的磷酸二酯酶 (降解 cAMP 的酶) 的竞争性但非选择性抑制剂。浓度提高的 cAMP 可以

介导观察到的支气管扩张。所提出的茶碱的其他作用机制包括抑制细胞内钙的释放和支气管收缩剂腺苷的竞争性拮抗作用。

[0009] 茶碱是一种相对低成本的治疗,并且可以在给予约 12 小时持续时间的持续释放制剂中施用。然而,茶碱具有许多副作用。茶碱的胃肠不良反应包括恶心、呕吐、腹痛、绞痛和腹泻。中枢神经系统不良反应包括失眠、头痛、头晕、紧张和癫痫发作,这些往往在儿童中更严重。癫痫发作可能会作为茶碱毒性的初始体征而发生,而没有任何其他前述体征和症状。已经报道了患者的优势手的震颤增加。心血管和肺的不良反应包括心动过速、心律不齐和呼吸急促。由于这些毒性,茶碱通常用作二线或三线哮喘药物。

## 发明内容

[0010] 对于能够有效且安全地治疗肺病状的低成本疗法仍然存在相当大的需求。本发明满足了这种需求,并且还提供了相关的优点。

[0011] 本申请提供了可用于治疗包括但不限于哮喘、慢性阻塞性肺疾病的肺病状的组合物、方法和药剂盒。本发明组合物在降低炎症标志物的表达和 / 或分泌或者提高与在哮喘或慢性阻塞性肺疾病的发作期间引发的炎症应答相关的抗炎症标志物的表达和 / 或分泌方面特别有效。

[0012] 在本发明的一个方面,本发明组合物包含亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物 ; 和甲基黄嘌呤,其中该组合物包含至少约 250mg 亮氨酸和 / 或至少约 100mg 所述一种或多种亮氨酸代谢物。在本发明的一个方面,本发明组合物包含亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物 ; 和甲基黄嘌呤,其中该组合物包含至少约 250mg 亮氨酸和 / 或至少约 10 或 50mg 所述一种或多种亮氨酸代谢物。该组合物可以进一步包含白藜芦醇。

[0013] 在一些实施方案中,该组合物包含至少约 500mg 亮氨酸。该组合物可以包含约 250-1500mg 亮氨酸。该组合物可以包含至少约 200mg 亮氨酸代谢物。该组合物可以包含约 100-750mg 亮氨酸代谢物。该组合物可以包含约 10-750 或 50-750mg 亮氨酸代谢物。

[0014] 在另一实施方案中,所述甲基黄嘌呤选自茶碱和可可碱。该甲基黄嘌呤可以以亚治疗量存在。该组合物可以包含至少约 5mg 茶碱。该组合物可以包含约 1-100 或 5-50mg 茶碱。该组合物可以包含亚治疗量的茶碱。

[0015] 在一个实施方案中,该组合物包含至少约 35mg 白藜芦醇。该组合物可以包含约 5-500 或 30-250mg 白藜芦醇。

[0016] 在又一实施方案中,该组合物基本上不含非支链氨基酸。该组合物中的氨基酸可以基本上不含非支链氨基酸。该组合物中的非支链氨基酸相对于总氨基酸的百分比可以小于约 0.1%、1% 或 10%。

[0017] 在一些实施方案中,该组合物是单位剂量。该组合物可以配制用于口服给药、吸入或静脉内递送。该组合物可以配制用于在至少约 1、4、6、12、24、36 或 48 小时的一段时间内持续释放。持续释放制剂可以在至少约 1、4、6、12、24、36 或 48 小时的一段时间内维持该组合物的一种或多种组分的所需循环水平。持续释放制剂可以经至少约 4、6、12、24、36 或 48 小时的一段时间达到高于所需循环水平的循环水平。所需循环水平可以针对于该组合物的

任何组分。该组分可以是甲基黄嘌呤,如茶碱。在一些实施方案中,持续释放组合物使甲基黄嘌呤的水平维持在大于约  $1\ \mu\text{M}$  持续指定的时间段。持续释放制剂可以在受试者中达到大于约  $1\ \mu\text{M}$  的甲基黄嘌呤循环水平持续该时间段。持续释放制剂可以在受试者中达到约 1-10、1-20、1-30 或 1-40  $\mu\text{M}$  的甲基黄嘌呤循环水平持续该时间段。

[0018] 在本发明的另一方面,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物;和 (b) 甲基黄嘌呤,其中 (a) 与 (b) 的质量比为至少约 15、25、50、75 或 100,且其中该组合物包含至少约 5mg 该甲基黄嘌呤。该组合物可以进一步包含至少约 10mg 白藜芦醇。在一些实施方案中,该甲基黄嘌呤是茶碱或可可碱。该组合物可以配制为单位剂量。

[0019] 在本发明的一个方面,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物;和 (b) 甲基黄嘌呤,其中 (a) 与 (b) 的摩尔比为至少约 400、500、750 或 1000,且其中该组合物包含至少约 0.05、0.1、0.5、1 或  $2\ \mu\text{g}$  该甲基黄嘌呤。该组合物可以包含至少约 0.05、0.1、0.5、1 或 2mg 该甲基黄嘌呤。该组合物可以进一步包含至少约 15、30、50、100 或  $500\ \mu\text{g}$  亮氨酸。该组合物可以进一步包含至少约 5、10、15、30、50、100 或 500mg 亮氨酸。该组合物可以进一步包含至少约 0.01、0.05、0.1、0.5 或  $1\ \mu\text{g}$  白藜芦醇。该组合物可以进一步包含至少约 0.01、0.05、0.1、0.5 或 1mg 白藜芦醇。在一些实施方案中,该甲基黄嘌呤是茶碱或可可碱。该组合物可以配制为用于吸入的单位剂量。该组合物可以包装在吸入器中。该吸入器可以包含至少约 20、50、200 或 1000 单位剂量的该组合物。

[0020] 在本发明的又一方面,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸;和 (b) 甲基黄嘌呤,其中组分 (a) 和 (b) 以在受试者中有效达到约 0.3-2mM 亮氨酸和约 0.5-10  $\mu\text{M}$  甲基黄嘌呤的循环水平的量存在。可以选择 (a) 和 (b) 的量以在受试者中诱导约 0.7-2mM 亮氨酸和约 0.7-3  $\mu\text{M}$  甲基黄嘌呤的循环水平。该受试者可以是人、驯养动物或家畜。

[0021] 在另一方面,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸;和 (b) 甲基黄嘌呤,其中组分 (a) 和 (b) 以通过降低肺内皮细胞中选自 NF  $\kappa$  B、嗜酸细胞活化趋化因子 (eotaxin)、IL1- $\beta$  和 IL6 的一种或多种炎症标志物的表达水平或分泌或者提高肺内皮细胞中选自脂连蛋白受体 1 和脂连蛋白受体 2 的一种或多种抗炎症标志物的表达水平或分泌而有效改善肺病状的量存在。

[0022] 在又一方面,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸;和 (b) 甲基黄嘌呤,其中组分 (a) 和 (b) 以有效降低肺内皮细胞中选自 NF  $\kappa$  B、嗜酸细胞活化趋化因子、IL1- $\beta$  和 IL6 的一种或多种炎症标志物的表达水平或分泌或者提高肺内皮细胞中选自脂连蛋白受体 1 和脂连蛋白受体 2 的一种或多种抗炎症标志物的表达水平或分泌的量存在。(b) 的量可以是亚治疗量。或者,(b) 的量可以低于达到约 40  $\mu\text{M}$  的循环水平所需的量。

[0023] 本发明还提供一种治疗需要治疗的受试者中的肺病状的方法,其包括向受试者施用本发明组合物中的任一种的组合物。

[0024] 在另一方面,本发明提供一种降低选自 NF  $\kappa$  B、嗜酸细胞活化趋化因子、IL1- $\beta$  和 IL6 的炎症标志物的表达水平或分泌或者提高选自脂连蛋白受体 1 和脂连蛋白受体 2 的抗炎症标志物的表达水平或分泌的方法,其包括使肺内皮细胞与本文所述的本发明组合物中任一种的组合物接触,以实现所述炎症标志物或所述抗炎症标志物的表达水平或分泌的所

述降低或提高。该受试者可以是人、驯养动物或家畜。

[0025] 在又一方面,本发明提供了一种药剂盒,其包含本文所述的本发明组合物的单位剂量的多日供应,以及指导经多日的时间段施用所述多日供应的说明书。

#### 援引并入

[0026] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均在此通过引用并入本文,其程度如同特别地和单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。

#### 附图说明

[0027] 本发明的新特征在随附的权利要求中具体阐述。通过参考以下对在其中利用到本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,在附图中:

[0028] 图 1 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇对小鼠肺内皮细胞中的 NF  $\kappa$  B 蛋白质表达的交互影响。 $*p < 0.02$  相对于对照。

[0029] 图 2 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇 (200nM) 条件化脂肪细胞培养基对小鼠肺内皮细胞中的 NF  $\kappa$  B 蛋白质表达的交互影响。

[0030] 图 3 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇条件化脂肪细胞培养基对小鼠肺内皮细胞中的磷酸 -NF  $\kappa$  B 蛋白质表达的交互影响。

[0031] 图 4 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇对来自小鼠肺内皮细胞的 IL1- $\beta$  的交互影响。 $*p < 0.001$ , 相对于所有其他处理。使用 TNF  $\alpha$  作为阳性对照来刺激细胞因子的分泌; \*\* 表示相对于所有其他处理显著增加 ( $p < 0.01$ )。

[0032] 图 5 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇对小鼠肺内皮细胞的嗜酸细胞活化趋化因子分泌的交互影响。 $*p < 0.05$ , 相对于所有其他处理。使用 TNF  $\alpha$  作为阳性对照来刺激细胞因子的分泌。

[0033] 图 6 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇条件化脂肪细胞培养基对小鼠肺内皮细胞的嗜酸细胞活化趋化因子分泌的交互影响。

[0034] 图 7 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇对小鼠肺内皮细胞中的细胞 IL6 含量的交互影响。 $*p < 0.02$ , 相对于对照。

[0035] 图 8 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇对小鼠肺内皮细胞的 IL 6 分泌的交互影响。 $*p < 0.0001$ , 相对于所有其他处理。使用 TNF  $\alpha$  作为阳性对照来刺激细胞因子的分泌; \*\* 表示相对于所有其他处理显著增加。

[0036] 图 9 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇条件化脂肪细胞培养基对小鼠肺内皮细胞的 IL 6 分泌的交互影响。

[0037] 图 10 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇对小鼠肺内皮细胞中的脂连蛋白受体 1 蛋白质表达的交互影响。

[0038] 图 11 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇对小鼠肺内皮细胞中的脂连蛋白受体 2 蛋白质表达的交互影响。

[0039] 图 12 显示茶碱与亮氨酸和白藜芦醇条件化脂肪细胞培养基对小鼠肺内皮细胞中的脂连蛋白受体 2 蛋白质表达的交互影响。 $*p = 0.018$ , 相对于所有其他处理。

[0040] 图 13 显示可可碱与亮氨酸和白藜芦醇条件化脂肪细胞培养基对小鼠肺内皮细

胞中的脂连蛋白受体 1 蛋白质表达的交互影响。\* $p = 0.03$ , 相对于所有其他处理 ; \*\* $p = 0.0005$ , 相对于所有其他处理。

[0041] 图 14 显示可可碱与亮氨酸和白藜芦醇条件化脂肪细胞培养基对小鼠肺内皮细胞中的脂连蛋白受体蛋白质表达的交互影响。\* $p = 0.0001$ , 相对于所有其他处理。

### 具体实施方式

[0042] 本发明的几个方面参考用于说明的应用示例描述如下。应当理解, 为了提供对本发明的完整理解, 阐述了很多具体的细节、关系和方法。然而, 相关领域普通技术人员将会容易认识到, 可以不使用一种或多种所述具体细节或者可以用其他方法来实施本发明。除非另有说明, 否则本发明不限于所述的行为或事件的顺序, 因为一些行为可能以不同的顺序发生和 / 或与其他行为或事件同时发生。此外, 并非需要所有描述的行为或事件来实施根据本发明的方法。所公开的组合物中多种组分的浓度是示例性的, 并不意味着被限制于所提及的浓度本身。

[0043] 如本文使用的, 术语“受试者”或“个体”包括哺乳动物。哺乳动物的非限制性实例包括人和小鼠, 包括转基因和非转基因小鼠。本文描述的方法可用于人类治疗、临床前和兽医应用。在一些实施方案中, 受试者为哺乳动物, 在一些实施方案中, 受试者为人。其他哺乳动物包括但不限于, 猿、黑猩猩、猩猩、猴子; 驯养动物 ( 宠物 ), 如狗、猫、豚鼠、仓鼠、小鼠、大鼠、兔和雪貂; 驯养家畜, 如牛、水牛、野牛、马、驴、猪、绵羊和山羊; 或通常在动物园中见到的野生动物, 例如熊、狮、虎、豹、象、河马、犀牛、长颈鹿、羚羊、树懒、瞪羚、斑马、角马、草原犬鼠、无尾熊、袋鼠、熊猫、大熊猫、鬣狗、海豹、海狮和海象。

[0044] 术语“施用”和“给药”被定义为通过本领域已知的途径向受试者提供组合物, 该途径包括但不限于静脉内、动脉内、口服、经鼻、吸入、肠胃外、颊部、局部、经皮、直肠、肌肉内、皮下、骨内、经粘膜或腹膜内给药途径。在本申请的某些实施方案中, 施用组合物的口服途径可能是优选的。

[0045] 如本文使用的, “药剂”或“生物活性剂”是指生物学、药学或化学化合物或其他部分。非限制性的实例包括简单或复杂的有机或无机分子、肽、蛋白质、肽核酸 (PNA)、寡核苷酸 ( 包括, 例如, 适体和多核苷酸)、抗体、抗体衍生物、抗体片段、维生素衍生物、碳水化合物、毒素或化疗化合物。可以合成各种化合物, 例如, 小分子和低聚物 ( 例如, 寡肽和寡核苷酸 ), 以及基于多种核心结构的合成有机化合物。另外, 多种天然来源也可以提供用于筛选的化合物, 例如植物或动物提取物等。熟练技术人员可以容易地认识到, 对于本发明的药剂的结构性质没有限制。

[0046] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指本文所述的化合物的量, 其足以实现预期的应用, 包括但不限于如下定义的疾病治疗。治疗有效量可根据预期的应用 ( 体外或体内 ) 或所治疗的受试者和疾病状况 ( 例如, 受试者的体重和年龄、病情的严重程度、给药方式等 ) 而不同, 其可以由本领域普通技术人员容易地确定。该术语也适用于将会诱导靶细胞中的特定应答 ( 例如, 增殖的减少或靶蛋白活性的下调 ) 的剂量。具体剂量将根据所选的具体化合物、要遵循的给药方案、其是否与其他化合物联合施用、给药时机、其所施用到的组织和携带它的物理递送系统而变化。

[0047] 当应用于本发明组合物的组分 ( 这样的组分包括例如甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂 ( 包



括但不限于茶碱和可可碱)、亮氨酸和亮氨酸代谢物(包括HMB、KIC和 $\alpha$ -羟基-异己酸)和白藜芦醇)时,术语“分离的”是指缺乏至少一些其他组分的物质的制品,这些组分还可能存在于该物质或类似物质天然存在或最初获得之处。亮氨酸或其代谢物在本发明组合物中使用时通常为其游离形式并且不作为多肽或生物分子的部分。分离的物质可通过使用纯化技术从来源混合物中富集该物质来制备。富集可基于绝对量来测量,例如每单位体积的溶液的重量,或者其可相对于来源混合物中存在的第二、潜在干扰性的物质来测量。本发明实施方案的越来越高的富集是逐渐更优选的。因此,例如,2倍富集是优选的,10倍富集是更优选的,100倍富集是更加优选的,1000倍富集是甚至更加优选的。物质还可以通过人工组装过程(如通过化学合成)以分离的状态提供。

[0048] 途径的“调节剂”是指调节定位(mapped)到相同的特定信号转导途径的一种或多种细胞蛋白质的活性或表达的物质或药剂。调节剂可以增强或抑制信号分子的活性和/或表达水平或模式。调节剂可以通过直接与途径中的组分结合来激活该组分。调节剂也可以通过与一种或多种相关组分相互作用来间接地激活途径中的组分。途径的输出可以依照蛋白质的表达或活性水平来测量。途径中的蛋白质的表达水平可以由相应的mRNA或相关转录因子的水平以及该蛋白质在亚细胞定位中的水平来反映。例如,某些蛋白质通过在特定的亚细胞组分内部或外部改变位置而被激活,该亚细胞组分包括但不限于细胞核、线粒体、核内体、溶酶体或细胞的其他膜性结构。途径的输出也可以依照生理效应如线粒体生物发生、脂肪酸氧化或葡萄糖摄取来测量。

[0049] “激活剂”是指以增加途径输出的方式影响途径的调节剂。特定靶标的激活可以是直接的(例如,通过与靶标相互作用)或间接的(例如,通过与包含靶标的信号传导途径中的靶标上游的蛋白质相互作用)。

[0050] “抑制剂”可以是以减少途径输出的方式影响途径的调节剂。

[0051] 如本文使用的术语“基本上不含”是指具有少于约10%、少于约5%、少于约1%、少于约0.5%、少于0.1%或更少的特定组分的组合物。例如,基本上不含非支链氨基酸的组合物可以含有少于约1%的非支链氨基酸赖氨酸。百分比可以确定为总组合物的百分比或组合物的子集的百分比。例如,基本上不含非支链氨基酸的组合物可以具有少于1%的非支链氨基酸,其作为总组合物的百分比或作为该组合物中的该氨基酸的百分比。百分比可以是质量、摩尔或体积百分比。

[0052] 药剂、激活剂或治疗剂的“亚治疗量”是这样的量:其小于该药剂、激活剂或治疗剂用于预期应用的有效量,但是当与有效量或亚治疗量的另一种药剂或治疗剂联合时,由于例如得到的有效作用中的协同效应和/或减少的副作用,可以产生期望的结果。

[0053] “协同的”或“协同”效应可以是这样的,其使得联合组合物的一种或多种效应大于每种单独组分的一种或多种效应,或者其可以大于单独的每种组分的一种或多种效应之和。协同效应可以比单独使用其中一种组分时对受试者的效应或当每种组分分别施用时的叠加效应高大约或大于约10%、20%、30%、50%、75%、100%、110%、120%、150%、200%、250%、350%或500%或甚至更多。该效应可以是本文描述的任何可测量的效应。

[0054] 组合物

[0055] 本发明组合物包含以下组分的组合:(i)非特异性PDE抑制剂,如甲基黄嘌呤,和(ii)亮氨酸和/或一种或多种亮氨酸代谢物。该组合物还可包含白藜芦醇。这些组分的组

合可用于治疗肺病状,包括但不限于哮喘和慢性阻塞性肺疾病。该组合在降低炎症标志物的表达和 / 或分泌或者提高与在哮喘或慢性阻塞性肺疾病的发作期间引发的炎症应答相关的抗炎症标志物的表达和 / 或分泌方面特别有效。在一些实施方案中,配制该组分以提供协同效应,包括但不限于给药量降低从而导致对受试者的副作用降低和 / 或治疗成本降低。在其他实施方案中,该协同效应可允许获得通过任何其他常规治疗无法获得的结果。

[0056] 在一个实施方案中,本发明组合物包含亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物 ; 和甲基黄嘌呤,其中该组合物包含至少约 250mg 亮氨酸和 / 或至少约 100mg 所述一种或多种亮氨酸代谢物。

[0057] 在另一实施方案中,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物 ; 和 (b) 甲基黄嘌呤,其中 (a) 与 (b) 的质量比为至少约 15、25、50、75 或 100,且其中该组合物包含至少约 5mg 该甲基黄嘌呤。如本文所述,至少约 5mg 甲基黄嘌呤的剂量可以提供亚治疗剂量,其在与足够质量比的亮氨酸或亮氨酸代谢物联合时可以是有效的。

[0058] 在本发明的一个方面,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸和 / 或选自酮 - 异己酸 (KIC)、 $\alpha$  - 羟基 - 异己酸和羟甲基丁酸盐 (HMB) 的一种或多种亮氨酸代谢物 ; 和 (b) 甲基黄嘌呤,其中 (a) 与 (b) 的摩尔比是至少约 400、500、750 或 1000,且其中该组合物包含至少约 0.05、0.1、0.5、1 或 2  $\mu$ g 该甲基黄嘌呤。该组合物可以包含至少约 0.05、0.1、0.5、1 或 2mg 该甲基黄嘌呤。该组合物可以包含至多大约 0.001、0.01、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、5、10 或 20 克该甲基黄嘌呤,该甲基黄嘌呤可以是茶碱和 / 或可可碱。该组合物可以进一步包含至少约 15、30、50、100 或 500  $\mu$ g 亮氨酸。该组合物可以进一步包含至少约 5、10、15、30、50、100 或 500mg 亮氨酸。该组合物可以包含至多约 0.001、0.01、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、5、10 或 20 克亮氨酸和 / 或亮氨酸代谢物。该组合物可以进一步包含至少约 0.01、0.05、0.1、0.5 或 1  $\mu$ g 白藜芦醇。该组合物可以进一步包含至少约 0.01、0.05、0.1、0.5 或 1mg 白藜芦醇。在一些实施方案中,该甲基黄嘌呤是茶碱或可可碱。该组合物可以配制为用于吸入的单位剂量。

[0059] 在一些实施方案中,该组合物容纳在设计用于容纳至少约 20、50、200 或 1000 单位剂量的吸入器内。该吸入器可以包含每单位剂量至少约 0.05、0.1、0.5、1 或 2  $\mu$ g 的甲基黄嘌呤。该吸入器可以包含每单位剂量至少约 15、30、50、100 或 500 的亮氨酸。该吸入器可以包含每单位剂量至少约 0.01、0.05、0.1、0.5 或 1  $\mu$ g 的白藜芦醇。

[0060] 在又一个实施方案中,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸 ; 和 (b) 甲基黄嘌呤,其中组分 (a) 和 (b) 以在受试者中有效达到约 0.3-2mM 亮氨酸和约 0.5-10  $\mu$ M 甲基黄嘌呤的循环水平的量存在。这些目标循环水平对应于本文描述的已证明在受试者中对肺病状提供有益效果的治疗浓度 (参见实施例)。

[0061] 在又一个实施方案中,本发明组合物包含 (a) 亮氨酸 ; 和 (b) 甲基黄嘌呤,其中组分 (a) 和 (b) 以有效降低肺内皮细胞中选自 NF  $\kappa$  B、嗜酸细胞活化趋化因子、IL1- $\beta$  和 IL6 的一种或多种炎症标志物的表达水平或分泌或者提高选自脂连蛋白受体 1 和脂连蛋白受体 2 的一种或多种抗炎症标志物的表达水平或分泌的量存在。(b) 的量可以是亚治疗量。或者,(b) 的量可以低于达到约 40  $\mu$ M 的循环水平所需的量。如实施例所述,亮氨酸和甲基黄嘌呤的组合可以组合成对降低肺内皮细胞中的一种或多种炎症标志物如 NF  $\kappa$  B、嗜酸

细胞活化趋化因子、IL1- $\beta$  和 IL6 的表达水平或分泌或者提高选自脂连蛋白受体 1 和脂连蛋白受体 2 的一种或多种抗炎症标志物的表达水平或分泌具有有益效果的量。

#### [0062] 磷酸二酯酶抑制剂

[0063] 在一些实施方案中,所述组合物可以包含磷酸二酯酶 (PDE) 抑制剂,如非选择性 PDE 抑制剂。PDE 抑制剂可以是天然存在的或非天然存在的(例如制造的),并且可以以包含 PDE 抑制剂的天然来源或其提取物(例如纯化的)的形式提供。非选择性 PDE 抑制剂的实例包括但不限于咖啡因、茶碱、可可碱、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、己酮可可碱 (3,7-二氢-3,7-二甲基-1-(5-氧代己基)-1H-嘌呤-2,6-二酮)、氨茶碱、副黄嘌呤及其盐、衍生物、代谢物、分解代谢物、合成代谢物、前体及类似物。PDE 抑制剂的天然来源的非限制性实例包括咖啡、茶、瓜拉那、巴拉圭茶、可可和巧克力(例如黑巧克力)。在多个实施方案中,配制组合物以使其不含(或排除)一种或多种以下成分:咖啡因、绿茶提取物或瓜拉那种子或瓜拉那植物提取物。可以在本发明组合物中使用的磷酸二酯酶抑制剂的实例在 2012 年 7 月 13 日提交的美国专利申请号 13/549,381 中描述,该申请通过引用以其整体并入本文。

[0064] PDE 抑制剂也可以是甲基黄嘌呤。甲基黄嘌呤的实例包括咖啡因、麻黄碱、胆茶碱、氨茶碱、副黄嘌呤、IBMX、己酮可可碱、可可碱和茶碱。氨茶碱制剂的实例包括氨茶碱 Boehringer (Boehringer Ingelheim GmbH)。麻黄碱制剂的实例包括 bronkaid® (Bayer AG)、broncholate (Sanofi-Aventis)、primatene® (Wyeth)、tedral SA® 和 marax (Pfizer Inc)。茶碱制剂的实例包括 euphyllin (Nycomed International Management GmbH) 和 theo-dur (Pfizer Inc, Teva Pharmaceutical Industries Ltd)。胆茶碱制剂的实例包括 Cholelyl SA (Pfizer Inc)。

#### [0065] 亮氨酸和亮氨酸代谢物

[0066] 本发明提供了包含亮氨酸和/或亮氨酸代谢物的组合物。该亮氨酸和/或亮氨酸代谢物可以以游离形式使用。术语“游离”,当在本文中 with 组分结合使用时,表示该组分未引入较大分子复合物中。例如,组合物可以包含未引入蛋白质中的游离亮氨酸或游离羟甲基丁酸盐。该亮氨酸可以是 L-亮氨酸。

[0067] 不受理论限制,支链氨基酸如亮氨酸的摄取能够刺激抗衰老酶信号传导,包括 Sirt1 和 Sirt3,以及 AMPK 信号传导,其中一个或多个可以有利地调节炎症性细胞因子谱。在一些实施方案中,本文描述的任意组合物可以包含亮氨酸的盐、衍生物、代谢物、分解代谢物、合成代谢物、前体和类似物。例如,该代谢物可以包括羟甲基丁酸盐 (HMB)、酮-异己酸 (KIC) 和酮异己酸盐。HMB 可以是多种形式,包括 3-羟基-3-甲基丁酸钙水合物。

[0068] 在本发明的某些实施方案中,可以配制本文公开的任意组合物以使它们不含(或排除)一种或多种选自赖氨酸、谷氨酸、脯氨酸、精氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、苏氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、组氨酸、丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、牛磺酸、肉碱、胱氨酸和半胱氨酸的氨基酸。

[0069] 在一些实施方案中,该组合物可以基本上不含一种或多种或全部的非支链氨基酸。例如,该组合物可以不含丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸和/或

酪氨酸。在一些实施方案中,该组合物可以基本上不含异亮氨酸和 / 或缬氨酸。该组合物可以基本上不含任何非支链氨基酸。非支链氨基酸的质量或摩尔量可以小于总组合物或该组合物中总氨基酸的约 0.01%、0.1%、0.5%、1%、2%、5% 或 10%。

#### [0070] 药学活性剂

[0071] 本发明组合物可以进一步包含一种或多种除甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂外的药学活性剂。治疗活性剂的实例包括布洛芬、aldoril 和吉非贝齐、维拉帕米、maxzide、双氯芬酸和美托洛尔、马普替林、三唑仑和米诺地尔。例如,联合组合物可包含药学活性抗糖尿病剂、体重减轻剂或钙调节剂。美国专利号 7,109,198 和美国专利申请号 20090142336 描述了适于包含在本文描述的联合组合物中的多种药学活性剂或治疗活性剂。抗糖尿病剂的实例包括双胍(如二甲双胍)、噻唑烷二酮和氯茴苯酸(如瑞格列奈、吡格列酮和罗格列酮)、 $\alpha$  葡萄糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖)、磺脲类(如甲苯磺丁脲、醋酸己脲、妥拉磺脲、氯磺丙脲、格列吡嗪、格列本脲、格列美脲、格列齐特)、肠降血糖素、麦角生物碱(例如溴隐亭)和 DPP 抑制剂(如西他列汀、维格列汀、沙格列汀、利格列汀(lingliptin)、度格列汀、吉格列汀、阿格列汀和小檗碱)。抗糖尿病剂可以是口服抗糖尿病剂。抗糖尿病剂也可以是可注射的抗糖尿病药物,包括胰岛素、糊精类似物(例如普兰林肽)和肠降血糖素模拟物(例如艾塞那肽和利拉鲁肽)。抗肥胖治疗剂的实例包括脂肪酶抑制剂(例如奥利司他)、多巴胺、去甲肾上腺素和血清素化合物、大麻素受体拮抗剂(例如利莫那班)、艾塞那肽、普兰林肽和 CNS 剂(如 topimera)。提供这些实例仅出于讨论的目的,并且旨在证明本发明的适用性范围广至众多的药物。并不意味着以任何方式限制本发明的范围。

[0072] 在一些实施方案中,甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂可以与如下一对药学活性剂组合:格列吡嗪和二甲双胍;格列本脲和二甲双胍;吡格列酮和格列美脲;吡格列酮和二甲双胍;瑞格列奈和二甲双胍;罗格列酮和格列美脲;罗格列酮和二甲双胍;以及西他列汀和二甲双胍。

[0073] 本文描述的联合组合物中使用的药物剂或任意其他组分的量可以是以亚治疗量使用。在一些实施方案中,使用亚治疗量的药剂或组分能够减少药剂的副作用。亚治疗量的使用仍然可以是有效的,特别是当与其他药剂或组分协同使用时。

[0074] 亚治疗量的药剂或组分可以是这样的,以使其量低于被认为是治疗性的量。例如,FDA 指南可能建议了治疗特定病状的特定给药水平,而亚治疗量就是低于 FDA 建议的给药水平的任何水平。亚治疗量可以比被认为是治疗量的量低约 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、50%、75%、90% 或 95%。可以对个体受试者或成组受试者评估治疗量。成组受试者可以是全部的潜在受试者或具有特定特征如年龄、体重、种族、性别或生理活性水平的受试者。

[0075] 以盐酸二甲双胍为例,医师建议起始剂量为每天 1000mg,受试者特定的给药范围为每天 500mg 到最大 2500mg(盐酸二甲双胍缓释片标签 [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2008/021574s0101b1.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/021574s0101b1.pdf))。对受试者的特定给药可以由临床医师通过对剂量进行滴定和测定治疗应答来确定。治疗给药水平可以通过测定空腹血浆葡萄糖水平和测定糖化血红蛋白来确定。亚治疗量可以是低于推荐的二甲双胍剂量的任何水平。例如,如果受试者的治疗给药水平被确定为 700mg 每天,则 600mg 的剂量就是亚治疗量。或者,亚治疗量可以相对于一组受试者而非个体受试者来确定。例如,如果对于体重超

过 300lbs 的受试者,二甲双胍的平均治疗量是 2000mg,那么亚治疗量可以是低于 2000mg 的任何量。在一些实施方案中,该给药可以由包括但不限于患者的医生、护士、营养师、药剂师或其他健康护理专业人员的医疗保健提供者推荐。卫生保健专业人员可包括与卫生保健系统相关的个人或实体。卫生保健专业人员的实例可包括外科医生、牙医、听力学家、言语病理学家、内科医生(包括全科医生和专科医生)、助理医师、护士、助产士、药师/药剂师、营养师、治疗师、心理学家、物理治疗师、刺络医师、职业治疗师、验光师、脊医、临床医务人员、紧急医疗技术人员、护理人员、医疗化验员、放射技师、医疗假肢技师社会工作者,以及众多的经过培训以便提供某种类型的医疗保健服务的其他人力资源。

[0076] 对于甲基黄嘌呤,甲基黄嘌呤的治疗有效水平可以是约 44-111  $\mu\text{M}$  的循环水平,其相当于约 10-20  $\mu\text{g/mL}$ 。甲基黄嘌呤如茶碱或可可碱的亚治疗水平可以是低于约 110、100、90、80、70、60、50、44、40、35、30、20、10、5 或 1  $\mu\text{M}$  或 10  $\mu\text{g/mL}$  的任何循环水平。配制用于给药的本发明组合物中的甲基黄嘌呤如茶碱或可可碱的亚治疗水平可以低于约 1、5、10、20、30、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200 或 250mg 甲基黄嘌呤。

[0077] 本文描述的任何组分,包括亮氨酸、HMB、KIC、茶碱、可可碱和白藜芦醇,可以在本发明组合物中以游离形式、从天然来源纯化和/或从合成来源纯化或制备的形式使用。天然来源可以是动物来源或植物来源。该组分可以纯至至少约 95%、97%、99%、99.5%、99.9%、99.99% 或 99.999%。

#### [0078] 给药量

[0079] 本发明提供作为分离的组分的组合的组合物,该分离的组分已从一种或多种来源中分离出来,如亮氨酸、亮氨酸代谢物,如 HMB、甲基黄嘌呤如茶碱和可可碱,和白藜芦醇。本发明提供富含亮氨酸、亮氨酸代谢物如 HMB、甲基黄嘌呤如茶碱和可可碱和/或白藜芦醇的组合物。该组分可从天然来源中分离或由合成来源制备,然后富集以提高该组分的纯度。例如,茶碱可以由合成来源制备,然后通过一种或多种纯化方法进行富集。此外,亮氨酸可以从天然来源中分离出来,然后通过一种或多种分离方法进行富集。分离并富集的组分,如西地那非和亮氨酸,然后可以进行组合并配制以供施用给受试者。

[0080] 在一些实施方案中,组合物包含一定量的甲基黄嘌呤或 PDE 抑制剂(例如,包括但不限于茶碱或可可碱)。甲基黄嘌呤的量可以是亚治疗量,和/或与该组合物中的一种或多种其他化合物或与该组合物同时或在相近时间施用的一种或多种化合物协同的量。在一些实施方案中,甲基黄嘌呤或 PDE 抑制剂以低剂量、中等剂量或高剂量施用,这描述了两种剂量之间的关系,而通常不限定任何具体的剂量范围。可以向受试者施用该组合物,以使得该受试者施用选定的总日剂量的该组合物。总日剂量可以由在 24 小时时间段内施用的剂量的总和来确定。

[0081] 可以是单位剂量的剂量可以包含大约、多于约或少于约 200、250、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1250 或更多 mg 的亮氨酸。该亮氨酸可以是游离亮氨酸。在一些实施方案中,单位剂量可以包含至少约 1000mg 游离亮氨酸。该组合物可以包含约 10-1250、200-1250 或 500-1250mg 亮氨酸。可以是单位剂量的剂量可以包含大约、多于约或少于约 50、100、200、250、400、500、600、700、800、900、1000 或更多 mg 的亮氨酸代谢物,如 HMB 或 KIC。该亮氨酸代谢物可以是游离亮氨酸代谢物。该组合物可以包含约 10-900、50-750 或 400-650mg 亮氨酸代谢物,如 HMB 或 KIC。在一些实施方案中,单位剂量可以包含至少约

400mg 游离 HMB。

[0082] 在一些实施方案中,亮氨酸的日剂量可以是大约、小于约或大于约 0.5 - 3.0g/ 天 (例如 0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3 或更多 g/ 天)。HMB 的日剂量可以是大约、小于约或大于约 0.20 - 3.0g/ 天 (例如 0.2、0.4、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3 或更多 g/ 天)。KIC 的日剂量可以是大约、小于约或大于约 0.2 - 3.0g/ 天 (例如 0.2、0.4、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.5、3 或更多 g/ 天)。

[0083] 可以是单位剂量的剂量可以包含甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂,如茶碱或可可碱,其可以是大约、多于约或少于约 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5、10、20、40、60、80、100、200、400、800、1000 或 1500mg 的甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂。该组合物可以包含约 1-100、5-50 或 10-20mg 甲基黄嘌呤,如茶碱或可可碱。在一些实施方案中,单位剂量可以包含至少约 20mg 茶碱或可可碱。在一些实施方案中,单位剂量可以包含至少约 20mg 茶碱。

[0084] 在一些实施方案中,该组合物包含茶碱和可可碱两者,且茶碱和可可碱的总量可以是大约、多于约或少于约 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5、10、20、40、60、80、100、200、400、800、1000 或 1500mg。

[0085] 在其他实施方案中,甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂如茶碱或可可碱的日剂量可以是大约、高于约或低于约 0.0001mg/kg (mg 甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂 /kg 接受该剂量的受试者)、0.005mg/kg、0.01mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、12.5mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 或更高。

[0086] 可以是单位剂量的剂量可以包含大约、少于约或多于约 1、5、10、25、35、50、51、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500 或更多 mg 的白藜芦醇。该组合物可以包含约 5-500、30-250 或 35-100mg 白藜芦醇。在一些实施方案中,单位剂量可以包含至少约 35mg 白藜芦醇。

[0087] 白藜芦醇的低日剂量可以包含大约、小于约或大于约 0.5mg/kg (mg 白藜芦醇 /kg 接受该剂量的受试者)、1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg、12.5mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 或更高;白藜芦醇的中等日剂量可以包含大约、小于约或大于约 20mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、250mg/kg 或更高;且白藜芦醇的高日剂量可以包含大约、小于约或大于约 150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、225mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、350mg/kg、400mg/kg 或更高。

[0088] 在一些实施方案中,可以配制为单位剂量的组合物可以包含 (a) 至少约 250mg 亮氨酸和 / 或至少约 100mg 所述一种或多种亮氨酸代谢物且 (b) 包含至少约 5mg 甲基黄嘌呤,如茶碱或可可碱。该组合物可以进一步包含至少约 35mg 白藜芦醇。

[0089] 在其他实施方案中,配制为单位剂量的组合物可以包含 (a) 约 250-1500mg 亮氨酸或 100-750mg 亮氨酸代谢物和 (b) 1-100mg 甲基黄嘌呤,如茶碱或可可碱。在其他实施方案中,配制为单位剂量的组合物可以包含 (a) 约 250-1500mg 亮氨酸,10-750mg 亮氨酸代谢物,和 / 或 50-750mg 亮氨酸代谢物,和 (b) 1-100mg 甲基黄嘌呤,如茶碱或可可碱。在一些实施方案中,该甲基黄嘌呤是茶碱且该组合物包含约 5-50mg 茶碱。

[0090] 在本发明的一些实施方案中,该联合组合物可以具有指定比例的亮氨酸氨基酸 / 或其代谢物与甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂。该指定比例可以提供对肺病状有效的和 / 或协同

的治疗,例如,该治疗可以作为 NF  $\kappa$  B 蛋白质表达的降低、嗜酸细胞活化趋化因子分泌的减少、IL1- $\beta$  分泌的减少、细胞 IL6 含量或分泌的减少、脂连蛋白受体 1 蛋白质表达的降低和脂连蛋白受体 2 蛋白质表达的降低来测量。亮氨酸氨基酸和 / 或其代谢物与选择性 PDE 抑制剂激活剂的比例可以是质量比、摩尔比或体积比。

[0091] 在一些实施方案中,组合物可以包含 (a) 亮氨酸和 / 或其代谢物 (包括 HMB) 和 (b) 甲基黄嘌呤 (包括茶碱和可可碱),其中 (a) 与 (b) 的质量比可以是大约、小于约或大于约 0.1、0.5、1、2、5、10、15、25、50、75、100、200、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750 或 800。在一些实施方案中,(a) 与 (b) 的质量比为至少约 50。该组合物还可包含最小量的甲基黄嘌呤,如 5、10 或 50mg 甲基黄嘌呤,或一定范围的甲基黄嘌呤量,如 5-250mg 甲基黄嘌呤。

[0092] 在其他实施方案中,组合物可以包含 (a) 甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂 (包括茶碱和可可碱) 和 (b) 白藜芦醇,其中 (a) 与 (b) 的质量比可以是大约、小于约或大于约 0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、5、10、50、100、200、300、350、400、450、500、550、600 或 650。

[0093] 在一些实施方案中,该组合物可以配制用于吸入。配制用于吸入的组合物可以配制为液体。配制用于吸入的组合物可以容纳在吸入器或雾化器内。该吸入器或雾化器可以容纳至少约 10、20、40、100、500、1000 或 2000 单位剂量。本发明组合物的单位剂量可以具有大约或至少约 0.1、0.25、0.5、1 或 5mL 的体积。本发明组合物的单位剂量可以具有约 0.5-5mL 的体积,其可以在约 1-10 次吸入中施用。

[0094] 配制用于吸入的组合物可以配制成包含至少约、大约或低于约 0.25、0.5、0.75、1mM 或更多的亮氨酸的液体形式。

[0095] 配制用于吸入的组合物可以配制成包含至少约、大约或低于约 0.1、0.25、0.5、0.75、1、10、20、40、60  $\mu$ M 或更多的亮氨酸代谢物 (如 HMB) 的液体形式。配制用于吸入的组合物可以配制成包含至少约、大约或低于约 0.25、0.5、0.75、1mM 或更多的 KIC 的液体形式。

[0096] 配制用于吸入的组合物可以配制成包含至少约、大约或低于约 0.1、0.25、0.5、0.75、1、10、20、40、60、80、100、120、200 或 400  $\mu$ M 或更多的甲基黄嘌呤如茶碱或可可碱的液体形式。

[0097] 在一些实施方案中,可以设计亮氨酸、亮氨酸的任何代谢物、PDE 抑制剂 (如甲基黄嘌呤) 和白藜芦醇的剂量,以达到亮氨酸、亮氨酸代谢物、甲基黄嘌呤和 / 或白藜芦醇的指定生理浓度或循环水平。该生理浓度可以是在受试者的血流中测得的循环水平。该受试者可以是人或动物。选择的剂量可以根据受试者的特征如体重、能量代谢速率、遗传学、种族、身高或任何其他特征而改变。

[0098] 在一些实施方案中,可以将选定剂量的组合物施用至受试者,使得该受试者达到该组合物的所需循环水平。组分的所需循环水平可以是治疗有效水平或亚治疗水平。

[0099] 组合物的所需循环水平可以是至少约 0.25、0.5、0.75、1mM 或更多的亮氨酸。组合物的所需循环水平可以是至少约、小于约或大于约 0.1、0.25、0.5、0.75、1、10、20、40、60  $\mu$ M 或更多的亮氨酸代谢物 (如 HMB)。组合物的所需循环水平可以是至少约 0.25、0.5、0.75、1mM 或更多的 KIC。

[0100] 组合物的所需循环水平可以是至少约、小于约或大于约 0.1、0.25、0.5、0.75、1、10、20、40、60、80、100、120、200 或 400  $\mu$ M 或更多的甲基黄嘌呤,如茶碱或可可碱。茶碱的治

疗有效水平可以是 44-111  $\mu\text{M}$ , 其相当于大约 10-20  $\mu\text{g/mL}$ 。茶碱的亚治疗水平可以是低于约 110、100、90、80、70、60、50、44、40、35、30、20、10、5 或 1  $\mu\text{M}$  或 10  $\mu\text{g/mL}$  的任何水平。

[0101] 组合物的所需循环水平可以是至少约、小于约或大于约 40、60、80、100、120、150、200、300、400、800、1600、3000 或 5000nM 或更多的白藜芦醇。选择的剂量可以基于受试者的特征如体重、身高、种族或遗传学进行选择。

[0102] 在一些实施方案中, 组合物以在受试者中有效达到约 0.3-2mM 亮氨酸和约 0.5-10  $\mu\text{M}$  甲基黄嘌呤的循环水平的量包含亮氨酸和甲基黄嘌呤。

[0103] 约 1, 125mg 亮氨酸的口服剂量可以在受试者中达到约 0.5mM 亮氨酸的亮氨酸循环水平。约 300mg 亮氨酸的口服剂量可以在受试者中达到约 0.25mM 的亮氨酸循环水平。

[0104] 约 500mg HMB 的口服剂量可以在受试者中达到约 5  $\mu\text{M}$  HMB 的 HMB 循环水平。约 100mg HMB 的口服剂量可以在受试者中达到约 0.8  $\mu\text{M}$  HMB 的 HMB 循环水平。

[0105] 约 1000mg 茶碱的口服剂量可以在受试者中达到约 110  $\mu\text{M}$  茶碱的茶碱循环水平。约 25-30mg 茶碱的口服剂量可以在受试者中达到约 1  $\mu\text{M}$  茶碱的茶碱循环水平。

[0106] 约 1000mg 可可碱的口服剂量可以在受试者中达到约 110  $\mu\text{M}$  可可碱的可可碱循环水平。约 25-30mg 可可碱的口服剂量可以在受试者中达到约 1  $\mu\text{M}$  可可碱的茶碱循环水平。

[0107] 约 1100mg 白藜芦醇的口服剂量可以在受试者中达到约 0.5mM 白藜芦醇的白藜芦醇循环水平。约 50mg 白藜芦醇的口服剂量可以在受试者中达到约 200nM 白藜芦醇的白藜芦醇循环水平。

[0108] 为吸入而准备的剂量, 其可以是液体形式, 可以制备成比所需循环浓度大约 1、1.5、2、2.5 或 3 倍更高的浓度。例如, 用于吸入的制剂可以包含约 0.5、1 或 0.5-1mM 亮氨酸, 其可以在受试者的肺组织中达到约 0.5mM 的亮氨酸循环水平。用于吸入的制剂可以包含约 200、400 或 200-400nM 白藜芦醇, 其可以在受试者的肺组织中达到约 200nM 的白藜芦醇循环水平。用于吸入的制剂可以包含约 1、2 或 1-2  $\mu\text{M}$  甲基黄嘌呤, 其可以在受试者的肺组织中达到约 1  $\mu\text{M}$  的甲基黄嘌呤循环水平。

[0109] 在一些实施方案中, 可以配制组合物以在对受试者施用一种或多种组合物后达到所需的循环摩尔比或质量比。该组合物可以是本文描述的联合组合物。可以调节摩尔比以利于联合组合物的一种或多种组分的生物利用度、摄取和代谢加工。例如, 如果一种组分的生物利用度低, 那么该组分的摩尔量可以相对于联合组合物中的其他组分增加。在一些实施方案中, 循环摩尔比或质量比在施用后约 0.1、0.5、0.75、1、3、5 或 10、12、24 或 48 小时内达到。循环摩尔比或质量比可维持大约或长于约 0.1、1、2、5、10、12、18、24、36、48、72 或 96 小时的一段时间。

[0110] 在一些实施方案中, 亮氨酸与甲基黄嘌呤的循环摩尔比为大约、小于约或大于约 1、5、10、50、100、500、1000、5000 或 10000。在一些实施方案中, HMB 与甲基黄嘌呤的循环摩尔比为大约或大于约或小于约 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50 或 100。在一些实施方案中, 甲基黄嘌呤与白藜芦醇的循环摩尔比为大约、小于约或大于约 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50 或 100。

[0111] 在一些实施方案中, 组合物可以包含有效改善细胞中一种或多种炎症或抗炎症标志物的表达水平或分泌的量的亮氨酸和甲基黄嘌呤, 该标志物选自 (a) NF  $\kappa$  B 蛋白质表达, (b) 嗜酸细胞活化趋化因子, (c) IL1- $\beta$ , 和 (d) 细胞 IL6 含量或分泌, (e) 脂连蛋白受体 1



蛋白质表达,和(f)脂连蛋白受体2蛋白质表达。该组合物可以具有低于达到约40 μM的循环水平所需的量的甲基黄嘌呤量。该组合物可以具有有效达到约0.1-40 μM的循环水平的甲基黄嘌呤量。甲基黄嘌呤的量也可以高于至少约5mg。

#### [0112] 剂型

[0113] 本文描述的组合物可以配制成多种不同的剂型。其可以作为片剂、可咀嚼片剂、囊片、胶囊、软明胶胶囊、锭剂或溶液口服使用。或者,该组合物可以配制用于吸入或用于静脉内递送。该组合物也可以配制成喷鼻剂或当为溶液形式时用于注射。在一些实施方案中,该组合物可以是适于口服的液体组合物。

[0114] 配制用于吸入的组合物可以使用本领域已知的技术包装在吸入器中。吸入器可以设计成每次吸入分配0.25、0.5或1个单位剂量。吸入器可以具有容纳配制用于吸入的本发明组合物的筒罐,允许在每次致动时分配计量量的制剂的计量阀,和允许操作该装置并将本发明组合物引导至受试者肺内的致动器或衔口。配制的组合物可以包含液化气体推进剂和可能的稳定赋形剂。该致动器可以具有连接至筒罐的配合排出喷嘴和用来防止污染致动器的防尘帽。一经致动,本发明组合物可以挥发,这导致形成本发明组合物的小滴。该小滴可以快速蒸发,从而产生微米大小的颗粒,随后被受试者吸入。

[0115] 经由吸入的治疗方案可以包括制备颗粒大小为3至8 μm的预定质量中值气体动力学直径(MMAD)的气雾剂,其采用喷射、超声波、电子、振动多孔板、振荡筛网雾化器或赋能的干粉吸入器,在具有或不具有超压的情况下,主要递送到导通和中心肺。喷射或电子雾化器可以进一步与气流控制组合,并且气雾剂可以采用超压施用。雾化装置和系统可以允许将递送的体积流量和蒸发的气雾剂连同控制的气流和气流超压条件一起个性化成适于治疗包括炎性肺疾病在内的多种病状的治疗方案。

[0116] 雾化系统可以包括组件,例如喷射或电子雾化器、压缩机和电子控制装置,该电子控制装置累积地具有通过在吸入期间维持正压力(也称为NIPPV)而能够控制呼吸型的特性。该压力可以减少COPD患者对主动呼吸的需要,这导致更有效和更容易地向呼吸困难或不能在无氧情况下呼吸的COPD患者中肺递送药物组合。

[0117] 吸入器和用于配制吸入组合物的方法在美国专利号5,069,204、7,870,856和美国申请号2010/0324002中描述,这些专利和申请通过引用以其整体并入本文。

[0118] 适合于口服给药的本发明的组合物可以呈现为离散的剂型,如各自含有作为粉末或颗粒的预定量的活性成分的胶囊、扁囊剂或片剂,或液体或气雾喷雾剂,溶液,水性或非水性液体中的悬浮液,水包油乳剂或油包水液体乳剂,包括液体剂型(例如,悬浮液或浆液),和口服固体剂型(例如,片剂或散装粉末)。口服剂型可以配制成片剂、丸剂、锭剂、胶囊剂、乳剂、亲脂和亲水性悬浮液、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等,用于待治疗的个体或患者口服摄入。这样的剂型可以通过任何配制方法来制备。例如,活性成分可以与构成一种或多种必要成分的载体联合。适合于口服给药的胶囊包括由明胶制成的推入配合(push-fit)胶囊,以及由明胶和增塑剂(如甘油或山梨糖醇)制成的软密封胶囊。推入配合胶囊可以包含与填充剂(例如乳糖)、粘合剂(如淀粉)和/或润滑剂(如滑石或硬脂酸镁)和任选的稳定剂混合的活性成分。任选地,可通过将组合物与固体赋形剂混合,任选地通过研磨得到混合物,并在加入合适的助剂(如果需要)后加工颗粒混合物以获得片剂或糖衣丸芯,来获得用于口服的本发明的组合物。合适的赋形剂尤其是填充剂,如糖,包括乳

糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇；纤维素制剂，例如，玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄耆胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和 / 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。通常，通过将活性成分与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀地且紧密地混合，然后，如果需要，将产品成型为所需的形式，来制备组合物。例如，片剂可以通过任选地与一种或多种辅助成分一起压制或模制来制备。压制片剂可通过在合适的机器中压缩自由流动形式如粉末或颗粒的活性成分来制备，该活性成分任选地与赋形剂混合，该赋形剂例如但不限于粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂和 / 或表面活性剂或分散剂。模制片剂可通过在合适的机器中对用惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物的混合物进行模制来制备。

[0119] 可引入本文公开的制剂以供口服或通过注射施用的液体形式包括水溶液、适当调味的糖浆、水或油悬浮液和调味的含食用油如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油的乳液以及酞剂和类似的药物载体。用于水性悬浮液的合适的分散剂或悬浮剂包括合成的天然树胶如黄耆胶、阿拉伯胶、藻酸盐、葡聚糖、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或明胶。

[0120] 可以用可注射组合物和口服组合物的组合治疗受试者。

[0121] 用于口服的液体制剂可采用例如溶液、糖浆或悬浮液的形式，或者它们可以呈现为干产品，以供在使用前用水或其他合适的载体进行重建。这类液体制剂可以通过常规手段用药学上可接受的添加剂如悬浮剂（例如，山梨糖醇糖浆、甲基纤维素或氢化食用脂肪）、乳化剂（如卵磷脂或阿拉伯胶）、非水性载体（例如，杏仁油、油酯或乙醇）、防腐剂（例如，对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸）以及人造的或天然的增色剂和 / 或甜味剂来制备。

[0122] 本发明的药物组合物（包括口服和吸入制剂）的制备可以按照普遍接受的药物制剂制备程序进行。参见，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 18 版 (1990)，E. W. Martin 编，Mack Publishing Co., PA。根据预期用途和施用方式，可能需要在药物组合物的制备中进一步处理镁 - 平衡离子化合物。合适的处理可以包括与适当的非毒性和非干扰性组分混合、灭菌、分成剂量单位并包入递送装置内。

[0123] 本发明进一步包括含有活性成分的无水组合物和剂型，因为水可以促进一些化合物的降解。例如，本领域中可以采用加水（例如 5%）作为模拟长期贮存的手段，以确定诸如贮存期限或制剂随时间的稳定性等特性。本发明的无水组合物和剂型可以使用无水或低含水成分在低水分或低湿度条件下制备。如果在制造、包装和 / 或储存过程中预期到会与水分和 / 或潮湿大量接触，那么可将含有乳糖的本发明的组合物和剂型制成无水的。可以制备和贮存无水组合物，使其无水性质得以保持。因此，无水组合物可以使用已知能防止暴露于水的材料来包装，使得它们可以包含在合适的处方药剂盒中。合适的包装的实例包括但不限于密封的箔、塑料等、单位剂量容器、泡罩包装和条状包装。

[0124] 本文所述的成分可以按照常规药物配制技术与药物载体在紧密掺合物中进行组合。取决于施用所需的制剂形式，载体可以采取多种形式。在制备用于口服剂型的组合物时，任何常用的药物介质都可用作载体，例如，在口服液体制剂（如悬浮液、溶液剂和酞剂）或气雾剂的情况下采用水、二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等；或者在口服固体制剂的情况下可以使用诸如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂等载体，在一些实施方案中不使用乳糖。例如，对于固体口服制剂，合适的载体包括粉末、胶囊和片剂。如果需要，片剂可以通过标准含水或非含水技术来包衣。

[0125] 可以充当药学上可接受的载体的材料的一些实例包括：(1) 糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4) 黄耆胶粉；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石；(8) 赋形剂，如可可脂和栓剂蜡；(9) 油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二元醇，如丙二醇；(11) 多元醇，如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇；(12) 酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液；(19) 乙醇；(20) 磷酸盐缓冲溶液；和 (21) 在药物制剂中使用的其他无毒的相容性物质。

[0126] 适用于剂型中的粘合剂包括但不限于玉米淀粉、马铃薯淀粉或其他淀粉、明胶、天然和合成树胶如阿拉伯胶、藻酸钠、藻酸、其他藻酸盐、黄耆胶粉、瓜尔豆胶、纤维素及其衍生物（例如乙基纤维素、醋酸纤维素、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠）、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、预胶化淀粉、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素，以及它们的混合物。

[0127] 可用于形成本发明的组合物和剂型的润滑剂包括但不限于硬脂酸钙、硬脂酸镁、矿物油、轻质矿物油、甘油、山梨糖醇、甘露醇、聚乙二醇、其他二醇、硬脂酸、十二烷基硫酸钠、滑石粉、氢化植物油（例如花生油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油）、硬脂酸锌、油酸乙酯、月桂酸乙酯、琼脂，或它们的混合物。其他的润滑剂包括，例如，syloid 硅胶、合成二氧化硅的凝聚型气溶胶或其混合物。可任选地加入少于组合物的约 1 重量%的润滑剂。

[0128] 润滑剂还可以与组织屏障结合使用，该组织屏障包括但不限于多糖、多聚糖、生物膜、interceed 和透明质酸。

[0129] 崩解剂可用于本发明的组合物中，以提供当暴露于水性环境中时发生崩解的片剂。太多的崩解剂可能会产生在瓶中可崩解的片剂。太少可能不足以导致崩解的发生，并因此可能改变活性成分从剂型中释放的速率和程度。因此，可以使用既不太多也不会有害地改变活性成分的释放的足量的崩解剂，以形成本文所公开的化合物的剂型。所用的崩解剂的量可以根据制剂类型和施用方式而变化，并且本领域普通技术人员可以容易地辨别。在药物组合物中可使用约 0.5% 至约 15%（重量）的崩解剂或约 1% 至约 5%（重量）的崩解剂。可用于形成本发明的组合物和剂型的崩解剂包括但不限于琼脂、藻酸、碳酸钙、微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、聚克立林钾、羟基乙酸淀粉钠、马铃薯或木薯淀粉、其他淀粉、预胶化淀粉、其他淀粉、粘土、其他藻胶、其他纤维素、树胶或其混合物。

[0130] 用于本文所公开的组合物和剂型的合适的填充剂的实例包括但不限于滑石、碳酸钙（例如颗粒或粉末）、微晶纤维素、粉状纤维素、葡聚糖结合剂、高岭土、甘露醇、硅酸、山梨糖醇、淀粉、预胶化淀粉，以及它们的混合物。

[0131] 当期望使用水性悬浮液和 / 或酞剂进行口服时，其中的活性成分可以与多种甜味剂或调味剂、着色物质或染料组合，并且如果需要的话，可以与乳化剂和 / 或悬浮剂以及稀释剂如水、乙醇、丙二醇、甘油及其各种组合进行组合。

[0132] 片剂可以不包衣或通过已知的技术包衣以延迟在胃肠道中的崩解和吸收，并由此在较长时期内提供持续作用。例如，可采用延时材料如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。供口服使用的制剂还可以呈现为硬明胶胶囊，其中活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸

钙、磷酸钙或高岭土混合,或者作为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油介质例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0133] 在一个实施方案中,该组合物可包含增溶剂以确保本发明的化合物的良好的溶解和/或溶出,并使本发明的化合物的沉淀最小化。这对于非口服使用的组合物,例如,用于注射的组合物是特别重要的。也可加入增溶剂来增加亲水性药物和/或其他组分如表面活性剂的溶解度,或者维持该组合物作为稳定或均一的溶液或分散液。

[0134] 该组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的添加剂和赋形剂。这样的添加剂和赋形剂包括但不限于防粘剂、消泡剂、缓冲剂、聚合物、抗氧化剂、防腐剂、螯合剂、粘度调节剂(viscomodulators)、张力调节剂(tonicifier)、调味剂、着色剂、增味剂、遮光剂、助悬剂、粘合剂、填充剂、增塑剂、润滑剂及其混合物。赋形剂的实例的非穷举列表包括单酰甘油、硬脂酸镁、改性食用淀粉、明胶、微晶纤维素、甘油、硬脂酸、二氧化硅、黄蜂蜡、卵磷脂、羟丙基纤维素、交联羧甲基纤维素钠和交聚维酮。

[0135] 本文描述的组合物也可以配制成延长释放、持续释放或定时释放,以使得一种或多种组分随时间而释放。延迟释放可通过将该一种或多种组分配制在各种材料的基质中或通过微囊化来实现。该组合物可以配制为经1、4、6、8、12、16、20、24、36或48小时的时间段释放一种或多种组分。一种或多种组分的释放可以以恒定的或变化的速率进行。

[0136] 在一些实施方案中,本文所述的本发明组合物可以配制成基质颗粒剂(matrix pellet),其中本发明组合物的颗粒包埋在水不溶性塑料的基质中,并且被含有嵌入的乳糖颗粒的水不溶性塑料的膜包裹,产生并维持本发明组合物在目标治疗范围内的血浆水平。在其他实施方案中,本发明组合物可配制成通过以下方式获得的持续释放片剂:向主要由本发明组合物组成的核心颗粒上涂覆一层由疏水性材料和塑料赋形剂组成并任选地含有肠溶聚合物材料的包衣膜,以形成包衣颗粒,然后将包衣颗粒与崩解赋形剂压缩在一起。持续释放制剂在美国专利号4,803,080和6,426,091中描述,其通过引用以其整体并入本文。

[0137] 使用本文提供的控制释放剂型,一种或多种辅因子在其剂型中可以比在组分量相同的立即释放制剂中所观察到的更慢的速率释放。在一些实施方案中,对于控制释放制剂根据从施用至其最大浓度的规定时间段上的浓度变化所测得的生物样品的改变速率小于立即释放制剂速率的约80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%。此外,在一些实施方案中,浓度随时间的改变速率小于立即释放制剂速率的约80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%或10%。

[0138] 在一些实施方案中,通过以相对成比例的方式增加达到最大浓度的时间来降低浓度随时间的改变速率。例如,达到最大浓度的时间增加2倍可使浓度改变速率降低约2倍。因此,可以提供一种或多种辅因子从而使其以显著低于立即释放制剂的速率达到其最大浓度。可将本发明的组合物配制为到24小时、16小时、8小时、4小时、2小时或至少1小时时提供最大浓度的改变。浓度改变速率的相关减少可以是约0.05、0.10、0.25、0.5或至少0.8倍。在某些实施方案中,这通过在这种施用后的1小时内向循环系统释放少于约30%、50%、75%、90%或95%的该一种或多种辅因子来实现。

[0139] 任选地,控制释放制剂表现出的血浆浓度曲线具有小于含相同剂量的相同辅因子的立即释放制剂的75%、50%、40%、30%、20%或10%的起始(例如,施用后2小时至施用后4小时)斜率。

[0140] 在一些实施方案中,在最初 1、2、4、6、8、10 或 12 小时,溶出研究中测定的辅因子释放速率小于含相同辅因子的立即释放制剂的约 80%、70%、60%、50%、40%、30%、20% 或 10%。

[0141] 本文提供的控制释放制剂可采用多种形式。在一些实施方案中,该制剂为口服剂型,包括液体剂型(例如,悬浮液或浆液)和口服固体剂型(例如,片剂或整装粉剂),例如但不限于本文描述的那些剂型。

[0142] 本文公开的制剂的控制释放片剂可以是基质、贮库(reservoir)或渗透系统的。虽然三个系统都适用,但是后两个系统可具备更优的包封相对较大质量的能力,例如用于容纳大量的单一辅因子或容纳多种辅因子,其取决于个体的遗传构成。在一些实施方案中,缓释片剂基于贮库系统,其中包含一种或多种辅因子的核心被多孔膜包衣包裹,该包衣在水化时允许该一种或多种辅因子扩散通过。由于有效成分的组合质量通常是克级数量,所以有效的递送系统能够提供最优的结果。

[0143] 因此,片剂或丸剂也可以被包衣或以其他方式复合,以提供具有延长作用的优点的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内剂量和外剂量组分,后者为在前者之上的包被的形式。这两种组分可被肠溶层隔开,肠溶层在胃中能够抵抗崩解并允许内部组分完整地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于这样的肠溶层或包衣,这些材料包括多种聚合酸和聚合酸与诸如紫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素这样的材料的混合物。在一些实施方案中,含有多种辅因子的制剂可以具有以不同速率或在不同时间释放的不同辅因子。例如,可以存在夹杂有肠溶层的额外的辅因子层。

[0144] 制备持续释放片剂的方法是本领域已知的,例如参见美国专利公开 2006/051416 和 2007/0065512 或本文公开的其他参考文献。例如在美国专利号 4,606,909、4,769,027、4,897,268 和 5,395,626 中描述的方法可用于制备由个体的遗传构成决定的一种或多种辅因子的持续释放制剂。在一些实施方案中,使用例如在美国专利号 6,919,373、6,923,800、6,929,803 和 6,939,556 中描述的 **OROS®** 技术来制备制剂。例如在美国专利号 6,797,283、6,764,697 和 6,635,268 中描述的其他方法也可用于制备本文公开的制剂。

[0145] 在一些实施方案中,所述组合物可以配制在食物组合物中。例如,该组合物可以是饮料或其他液体、固体食品、半固体食品,其含有或不含食物载体。例如,该组合物可以包括补充有本文描述的任意组合物的红茶。该组合物可以是补充有本文描述的任意组合物的乳制品。在一些实施方案中,该组合物可以配制在食物组合物中。例如,该组合物可以包含饮料、固体食品、半固体食品或食物载体。

[0146] 在一些实施方案中,可以使用液体食物载体,如作为饮料的形式,如补充性果汁、咖啡、茶、汽水、加味水等。例如,该饮料可以包含制剂以及液体组分,如各种除臭剂或存在于常规饮料中的天然碳水化合物。天然碳水化合物的实例包括但不限于:单糖,如葡萄糖和果糖;二糖,如麦芽糖和蔗糖;传统糖,如糊精和环糊精;和糖醇,如木糖醇和赤藓糖醇。也可使用天然除臭剂如索马甜、甜叶菊提取物、莱包迪昔 A(levauidoside A)、甘草苷,和合成的除臭剂如糖精和天冬甜素。也可以使用例如调味剂、着色剂以及其他试剂。例如,也可使用果胶酸及其盐、藻酸及其盐、有机酸、保护性胶体粘合剂、pH 调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇或碳化剂。也可以在制备含有本文讨论的制剂的食品或饮料中使用水果和蔬菜。

[0147] 备选地,所述组合物可以是补充有本文所述的任何组合物的小吃棒。例如,该小吃

棒可以是巧克力棒、燕麦 (granola) 棒或什锦杂果 (trail mix) 棒。在另一个实施方案中, 本发明的膳食补充剂或食物组合物被配制成具有合适的和期望的口感、质地和粘度以供消费。任何合适的食物载体可在本发明的食物组合物中使用。本发明的食物载体包括几乎任何食品。这类食物载体的实例包括但不限于食物棒 (燕麦棒, 蛋白棒、糖果棒等)、谷物制品 (燕麦片、早餐麦片、燕麦等)、烘焙食品 (面包、甜甜圈、饼干、百吉饼、糕点、蛋糕等)、饮料 (牛奶为主的饮料、运动饮料、果汁、酒精饮料、瓶装水)、面食、谷物 (大米、玉米、燕麦、黑麦、小麦、面粉等)、蛋制品、零食 (糖果、薯片、口香糖、巧克力等)、肉类、水果和蔬菜。在一个实施方案中, 本文所采用的食物载体可掩盖不良的味道 (例如苦味)。当需要时, 本文中所提出的食物组合物比本文描述的任何组分表现出更理想的质地和香味。例如, 根据本发明可以使用液体食物载体来获得本发明的食物组合物的饮料形式, 如补充性果汁、咖啡、茶等。在其他实施方案中, 可以根据本发明使用固体食物载体来获得代餐形式的本发明食物组合物, 如补充性小吃棒、面食、面包等。在其他实施方案中, 可以根据本发明使用半固体食物载体来获得本发明的食物组合物的口香糖、咀嚼糖果或零食等形式。

[0148] 联合组合物的给药可以每天施用大约、少于约或多于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 次或更多次。受试者可以在大约、少于约或大于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或更多天、周或月内接受给药。单位剂量可以是日剂量的一部分, 例如日剂量除以每天待施用的单位剂量数。单位剂量可以是日剂量的一部分, 其为日剂量除以每天待施用的单位剂量数, 再除以每次施用的单位剂量数 (例如片数)。每次施用的单位剂量数可以为大约、少于约或多于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多。每天的剂量数可以为大约、少于约或多于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多。每天的单位剂量数可以通过用日剂量除以单位剂量来确定, 且其可以为大约、少于约或多于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、6、17、18、19、20 或更多单位剂量每天。例如, 单位剂量可以是约  $1/2$ 、 $1/3$ 、 $1/4$ 、 $1/5$ 、 $1/6$ 、 $1/7$ 、 $1/8$ 、 $1/9$ 、 $1/10$ 。单位剂量可以是每日量的约三分之一并对受试者每天施用三次。单位剂量可以是每日量的约二分之一并对受试者每天施用两次。单位剂量可以是每日量的约四分之一并对受试者每天施用两次, 每次两个单位剂量。在一些实施方案中, 单位剂量包含大约、少于约或多于约 50mg 白藜芦醇。在一些实施方案中, 单位剂量包含大约、少于约或多于约 550mg 亮氨酸。在一些实施方案中, 单位剂量包含大约、少于约或多于约 200mg 的一种或多种亮氨酸代谢物。

[0149] 在一些实施方案中, 单位剂量 (例如包含一种或更多亮氨酸代谢物如 HMB 的单位剂量) 每天施用两次, 每次一个单位剂量。单位剂量可以包含多于一个胶囊、片剂、小瓶或实体。

[0150] 本文公开的组合物可以进一步包含增香剂, 并且可以是固体、液体、凝胶或乳液。

#### [0151] 方法

[0152] 本发明组合物尤其可用于改善在肺病状发作期间引发的炎症应答。在一个实施方案中, 本发明提供了降低包括但不限于 NF- $\kappa$ B、嗜酸细胞活化趋化因子、IL1- $\beta$  和 IL6 的炎症标志物的表达水平或分泌或者提高包括但不限于脂连蛋白受体 1 和脂连蛋白受体 2 的炎症标志物的表达水平或分泌的方法, 其包括使肺内皮细胞与本发明的任何组合物接触。

[0153] 在本发明的多个实施方案中, 以递送足以治疗受试者肺病状的协同量的亮氨酸和 / 或其代谢物、甲基黄嘌呤 PDE 抑制剂和 / 或白藜芦醇的量向受试者施用组合物。

[0154] 在一些实施方案中,如果单独地以及在在没有亮氨酸、亮氨酸代谢物或白藜芦醇的情况下施用至受试者,所述组合中甲基黄嘌呤如茶碱或可可碱的量将对受试者没有治疗效果。另外,如果在没有甲基黄嘌呤的情况下施用至受试者,亮氨酸、亮氨酸代谢物或白藜芦醇的量将对受试者没有治疗效果。然而,当甲基黄嘌呤与亮氨酸、亮氨酸代谢物或白藜芦醇一起施用,观察到治疗效果。

[0155] 据此,本发明提供了一种施用组合物的方法,该组合物包含 (a) 亮氨酸和 / 或一种或多种其代谢物,和 (b) 以亚治疗量存在的甲基黄嘌呤,其中与单独使用时的组分 (b) 相比,该组合物有效地使治疗肺病状增强至少约 5 倍。该组合物中亮氨酸的量也可以是亚治疗量。

[0156] 本发明还提供一种施用组合物的方法,该组合物包含 (a) 亮氨酸和 / 或一种或多种其代谢物, (b) 以亚治疗量存在的甲基黄嘌呤,和 (c) 白藜芦醇,其中与单独使用时的组分 (b) 相比,该组合物有效地使治疗肺病状增强至少约 5 倍。

[0157] 治疗效果的定量可以表明,包含 (a) 甲基黄嘌呤和 (b) 亮氨酸或亮氨酸代谢物的组合物的效果大于假设 (a) 和 (b) 为简单的叠加效应时预测的单独施用 (a) 或 (b) 的效果,因此该效应是协同性的。协同效应可以被定量为高于该组合物组分的预测简单叠加效应的测量到的效应。例如,如果组分 (a) 的单独施用相对于对照产生 10% 的效果,组分 (b) 的单独施用相对于对照产生 15% 的效果,而包含 (a) 和 (b) 的组合物的施用相对于对照产生 60% 的效果,则协同效应将是  $60\% - (15\% + 10\%)$  或 35%。

[0158] 在体外水平下,组合物的有益效果可以在用相应浓度的本文所述组合物处理的经培养的肺内皮细胞如小鼠原代肺内皮细胞上测量。细胞的分析可允许有益效果的定量。例如,可以进行 Western 印迹分析或 ELISA 测定以测量细胞中由本文所述组合物处理引起的以下的量:(a) NF  $\kappa$  B 蛋白质表达的降低, (b) 嗜酸细胞活化趋化因子分泌, (c) IL1- $\beta$  分泌的减少, (d) 细胞 IL6 含量或分泌的减少, (e) 脂连蛋白受体 1 蛋白质表达的提高,和 / 或 (f) 脂连蛋白受体 2 蛋白质表达的提高。

[0159] 因此,本文所述的多组分组合物(如茶碱 / 亮氨酸、茶碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇、可可碱 / 亮氨酸和可可碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇)可以对以下方面具有协同效应:(a) NF  $\kappa$  B 蛋白质表达的降低, (b) 嗜酸细胞活化趋化因子分泌, (c) IL1- $\beta$  分泌的减少, (d) 细胞 IL6 含量或分泌的减少, (e) 脂连蛋白受体 1 蛋白质表达的提高,和 / 或 (f) 脂连蛋白受体 2 蛋白质表达提高,其为至少约 10%、20%、50%、100%、200% 或 300%。

[0160] 在受试者中实现的途径的输出和有益效果可以使用本文公开的和 / 或本领域已知的一种或多种方法来测量。例如,COPD 和哮喘的测量可以使用呼吸量测定法、呼吸量测定法的细化如 FEV6 和深吸气量的测量、功能结果的测量如呼吸困难指数和运动试验以及全临床结果的测量如生活质量问卷调查和急性加重频率和严重程度的评价来进行。在一些实施方案中,向受试者施用本文所述的组合物可以在受试者中实现相对于不施用该组合物或施用该组合物前改善至少约 10%、30%、50%、100%、200% 或 300% 的呼吸量测定值、肺容量和功能结果测量值。这些效应也可以是至少约 10%、20%、50%、100%、200% 或 300% 的协同效应。

[0161] 该组合物可以通过口服或通过其他任何方法施用至受试者。口服方法包括施用作液体、固体或半固体的组合物,其可以采用膳食补充剂或食品的形式。

[0162] 该组合物可以定期施用。例如,该组合物可以每天施用 1、2、3、4 次或更频繁。可以每隔 1、2、3、4、5、6 或 7 天向受试者进行施用。在一些实施方案中,该组合物每天施用 3 次。该施用可以与受试者的用餐时间同时。治疗或饮食补充的周期可以是约 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 天、2 周、1-11 个月或 1 年、2 年、5 年或甚至更久。在本发明的一些实施方案中,治疗周期中向受试者施用的剂量可以变化或保持不变。例如,可以在施用周期中增加或减少每日给药量。

[0163] 施用时间段的长度和 / 或给药量可以由医师或任何其他类型的临床医生来确定。医师或临床医生可以观察受试者对施用的组合物的应答,并基于受试者的表现来调节给药。例如,可以对显示出能量调节效果减弱的受试者增加给药水平以达到所需结果。

[0164] 在一些实施方案中,可以针对给定的受试者优化向该受试者施用的组合物。例如,可以调节支链氨基酸与抗衰老酶途径激活剂的比例或联合组合物中的特定组分。可以在向受试者施用具有不同的支链氨基酸与抗衰老酶途径激活剂的比例或不同的联合组合物组分的一种或多种组合物后对受试者进行评估,然后选择该比例和 / 或特定组分。

[0165] 本发明的另一方面提供了在施用本文描述的联合组合物指定的时间段后在一个或多个受试者中获得所需的效果。例如,在向受试者施用该组合物 1、2、3、4、6、8、10、12、24 或 52 周后可以观察到本文所述的组合物的有益效果。

[0166] 本发明提供了一种治疗受试者的方法,其包括鉴别适合治疗的一批受试者。该鉴别步骤可以包括一种或多种筛查测试或分析。例如,可选择被鉴别为哮喘、糖尿病或具有超过平均值或显著大于平均值的体重指数和 / 或体重的受试者进行治疗。该鉴别步骤可以包括遗传检测,其鉴别一种或多种提示受试者适合治疗的遗传变异。然后可以用一种或多种本文描述的组合物治疗经鉴别的受试者。例如,可以用包含抗衰老酶途径激活剂和支链氨基酸的联合组合物对其进行治疗。

[0167] 本发明还提供了制备本文描述的组合物方法。在一些实施方案中,本文描述的组合物制备包括混合或组合两种或更多种组分。这些组分可以包括 PDE 抑制剂或抗衰老酶或 AMPK 途径激活剂(例如多酚或多酚前体如白藜芦醇或甲基黄嘌呤)和亮氨酸或其代谢物(如 HMB 或 KIC)。组分的量或比例可以是本文所述的量或比例。例如,亮氨酸与白藜芦醇相比的质量比可以大于约 80。

[0168] 在一些实施方案中,所述组合物还可以与药学活性剂、载体和 / 或赋形剂组合或混合。本文描述了此类组分的实例。联合组合物可配制为诸如片剂、胶囊、凝胶胶囊、缓释片剂等单位剂量。

[0169] 在一些实施方案中,制备组合物以获得包含一种或多种组分的基本上均质的混合物的固体组合物,从而该一种或多种组分均匀分散于该组合物中,使得能够将该组合物容易地细分为同样有效的单位剂型,如片剂、丸剂和胶囊。

#### [0170] 药剂盒

[0171] 本发明还提供了药剂盒。该药剂盒包括处于适当包装中的本文所述的一种或多种组合物,并且可以进一步包括可以包括使用说明、临床研究的讨论、副作用列表等的书面材料。这样的药剂盒还可以包括诸如科学参考文献、包装说明书材料、临床试验结果和 / 或这些的摘要等信息,这些信息表明或确立该组合物的活性和 / 或优势,和 / 或描述给药、施用、副作用、药物相互作用或对医疗保健提供者有用的其他信息。这样的信息可以基于多种研



究的结果,例如,使用涉及体内模型的实验动物的研究和基于人类临床试验的研究的结果。药剂盒可以包含本文描述的一种或多种单位剂量。在一些实施方案中,药剂盒包含大约、少于约或多于约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、31、60、90、120、150、180、210 或更多的单位剂量。使用说明书可以包含给药说明,如每天施用 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 次或更多次的说明。例如,药剂盒可以包含作为片剂供应的单位剂量,每个片剂单独包装,根据每次施用单位剂量的数目,多个片剂单独包装(例如成对的片剂),或者所有片剂包装在一起(例如在瓶子中)。作为另一个实例,药剂盒可以包含作为瓶装饮料供应的单位剂量,该药剂盒包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、24、28、36、48、72 个或更多个瓶子。

[0172] 该药剂盒可进一步包含另一种药剂。在一些实施方案中,本发明的化合物和药剂作为药剂盒内单独的容器中的单独组合物来提供。在一些实施方案中,本发明的化合物和药剂作为药剂盒的容器中的单一组合物来提供。合适的包装和附加用品(例如,用于液体制剂的量杯、使空气暴露最小化的箔包装等)是本领域已知的并且可以包括在药剂盒中。可以将本文所述的药剂盒提供、销售和/或推销给医疗服务提供者,包括医生、护士、药剂师、处方官员等。在一些实施方案中,药剂盒也可以直接销售给消费者。

### 实施例

[0173] 实施例 1 - 亮氨酸、茶碱、可可碱和白藜芦醇对肺病状指标的影响

[0174] 技术

[0175] 细胞培养:小鼠原代肺内皮细胞(MLEC)从 Cell Biologics(Chicago, IL)获得。细胞在用 0.2% 明胶预包被的 T75 培养瓶中生长至汇合。细胞在含有生长因子补充物(Cell Biologics#M1166)的 Dulbecco 改良 eagle 培养基(DMEM)中在 37°C 下和 5% CO<sub>2</sub> 中生长,该生长因子补充物包含 5% 胎牛血清(FBS)、肝素、EGF、氢化可的松、L-谷氨酰胺和抗生素。

[0176] 脂肪细胞条件培养基实验:3T3L1 脂肪细胞(传代 11 至 13 代)在 6 孔板上生长并分化,并用在“结果”部分中所述的处理方法处理 48h。然后对每个处理组收集培养基并合并在一起。然后使用合并的培养基处理汇合的 MLEC 24h 代替直接处理。收集来自每个细胞重复物的 MLEC 培养基,整分,并储存在 -20°C 下以供进一步的实验。细胞(MLEC 和脂肪细胞)用冰冷的 HBSS 洗涤一次,然后用冰冷的 RIPA 缓冲液加蛋白酶洗涤,并加入磷酸酶抑制剂(Sigma)。然后将细胞提取物在冰上孵育 10min,刮下,转移到新的微量离心管中,匀浆 5sec,然后在 4°C 下以 12,000x g 离心 10min。然后,将来自每个细胞重复物的澄清上清液整分并储存在 -20°C 下以供如下所述的进一步的实验。

[0177] Western 印迹分析:NF κ B 和磷酸-NF κ B 抗体获自 Cell Signaling(Danvers, MA)。如结果部分所述处理细胞,并使用标准方法制备细胞级分。蛋白质通过 BCA 试剂盒(Thermo Scientific)测定。对于 Western 印迹分析,将 2 μg(对于 NF κ B)或 4 μg(对于磷酸-NF κ B)来自细胞裂解物的蛋白质在 10% Tris/HCL 聚丙烯酰胺凝胶上解析(标准预制凝胶, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA),转移至 PVDF 膜(NF κ B 和磷酸-NF κ B),在封闭缓冲液(含 3% BSA 的 TBS)中孵育,然后与第一抗体孵育,洗涤,并与辣根过氧化物酶偶联的第二抗体孵育。使用 BioRad ChemiDoc 设备和软件(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)进行可视化和化学发光检测,并用 Image Lab 4.0(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)评价条带强度,其中针对背景和加载的对照进行校正。NF κ B

在 60kDA 处检测,而磷酸 -NF $\kappa$ B 在 52-59kDA 处检测。

[0178] **细胞因子:**白细胞介素 1- $\beta$ 、嗜酸细胞活化趋化因子和白细胞介素 6 均通过酶联免疫吸附测定来测量,其中使用针对每种细胞因子的特异性抗体 (Abcam, Cambridge, MA) 和基于辣根过氧化物酶的第二抗体检测系统,使用微孔板读取仪 (Synergy HT, BioTek Instruments, Winooski, VT) 在 450nm 下进行发色检测。

[0179] 结果

[0180] 用茶碱 (1  $\mu$ M)、可可碱 (1  $\mu$ M)、亮氨酸 (0.5mM) 和白藜芦醇 (200nM) 的组合处理小鼠原代肺内皮细胞。茶碱、可可碱、亮氨酸和白藜芦醇中的每一种可以以指定形式或指定形式的盐购自合适的供应商。处理后,对 MLEC 进行 Western 印迹分析或 ELISA 测定以确定气道疾病的各种指标的水平,如 NF $\kappa$ B 蛋白质表达、嗜酸细胞活化趋化因子分泌、IL1- $\beta$  分泌、细胞 IL6 含量或分泌、脂连蛋白受体 1 蛋白质表达和脂连蛋白受体 2 蛋白质表达。

[0181] 用 0.5mM 亮氨酸处理相当于通过对人类受试者口服施用约 1,125mg 亮氨酸所达到的相同摩尔浓度的循环水平。用 0.25mM 亮氨酸处理相当于通过对人类受试者口服施用约 300mg 亮氨酸所达到的相同摩尔浓度的循环水平。

[0182] 用 110  $\mu$ M 茶碱处理相当于通过对人类受试者口服施用约 1000mg 茶碱所达到的相同摩尔浓度的循环水平。用 1  $\mu$ M 茶碱处理相当于通过对人类受试者口服施用约 25-30mg 茶碱所达到的相同摩尔浓度的循环水平。

[0183] 用 0.5mM 白藜芦醇处理相当于通过对人类受试者口服施用约 1100mg 白藜芦醇所达到的相同摩尔浓度的循环水平。用 200nM 白藜芦醇处理相当于通过对人类受试者口服施用约 50mg 白藜芦醇所达到的相同摩尔浓度的循环水平。

[0184] 相对于对照,茶碱对 NF $\kappa$ B 蛋白质表达不发挥独立的影响 (图 1Error ! Reference source not found.),但是茶碱 / 亮氨酸和茶碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇组合导致 NF $\kappa$ B 显著减少 ( $p < 0.02$ );在茶碱 / 亮氨酸与茶碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇处理之间没有显著差异。相对于对照,用白藜芦醇和亮氨酸的组合处理 MLEC 对 NF $\kappa$ B 水平没有影响。磷酸 -NF $\kappa$ B 表现出类似的趋势。如该数据所示,茶碱与亮氨酸和茶碱与亮氨酸和白藜芦醇的组合具有协同效应,因为用 (a) 茶碱或 (b) 亮氨酸和白藜芦醇单独处理对 NF $\kappa$ B 或磷酸 -NF $\kappa$ B 水平没有影响。组合茶碱与亮氨酸或亮氨酸和白藜芦醇的协同效应是相对于基线 (用单独的茶碱或单独的亮氨酸和白藜芦醇处理) 改善至少约 22%。

[0185] 对 NF $\kappa$ B 和磷酸 -NF $\kappa$ B 的这些效果在条件培养基实验中没有再现 (recapitulated) (图 2 和图 3),表明这些是对 MLEC 的直接效果,并且不被脂肪细胞的细胞因子分泌的改变所介导。条件培养基实验采用由用以上所示浓度的对照、茶碱、茶碱 / 亮氨酸、白藜芦醇 / 亮氨酸和茶碱 / 白藜芦醇 / 亮氨酸处理的脂肪细胞制备的培养基。

[0186] 相反,尽管这种低浓度的茶碱对所研究的任何炎症介质均不发挥显著的独立影响,但是相对于对照,亮氨酸 / 茶碱和亮氨酸 / 茶碱 / 白藜芦醇组合导致 IL1- $\beta$  分泌明显减少 ( $\sim 70\%$ ) ( $p < 0.001$ ; 图 4),对于不存在茶碱的亮氨酸 / 白藜芦醇组合观察到较小的减少 ( $p < 0.01$ )。使用 TNF $\alpha$  作为阳性对照来刺激细胞因子的分泌,并且当用 TNF $\alpha$  处理 MLEC 时观察到 IL1- $\beta$  分泌的增加 ( $p < 0.01$ )。

[0187] 如图 4 中可见,茶碱与 (a) 亮氨酸或 (b) 亮氨酸和白藜芦醇的联合处理对 IL1- $\beta$  分泌产生协同效应。单独茶碱处理相对于对照没有效果,而亮氨酸 / 白藜芦醇处理相对于

对照具有大约 20% 的效果。相比之下,茶碱与 (a) 亮氨酸或 (b) 亮氨酸和白藜芦醇的联合处理相对于基线具有约 70% 的改善。在这种情况下,协同效应相对于对照为至少约 50%。

[0188] 类似地,亮氨酸 / 茶碱组合引发趋化因子嗜酸细胞活化趋化因子向培养基内的分泌相对于对照显著减少 44% ( $p < 0.05$ ; 图 5), 而其他处理 (单独的茶碱, 茶碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇, 亮氨酸 / 白藜芦醇, 和  $TNF\alpha$ ) 不发挥显著影响。由此可见, 相对于对照, 茶碱 / 亮氨酸的联合处理对嗜酸细胞活化趋化因子分泌具有至少约 70% 的协同效应。

[0189] 图 5 中显示的效果是对 MLEC 的直接效果, 因为条件培养基实验对嗜酸细胞活化趋化因子不产生显著影响 (图 6)。

[0190] IL 6 的细胞表达不受茶碱影响, 但是茶碱 / 亮氨酸和茶碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇处理引起适度的、显著的降低 ( $p < 0.02$ ; 图 7)。

[0191] 类似地, 茶碱 / 亮氨酸和茶碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇处理均使 IL 6 向培养基中的分泌减少 ~ 50% ( $p < 0.0001$ ; 图 8)。

[0192] 这些直接影响在条件培养基实验中没有再现 (图 9), 证明这种抗炎症效果不是由脂肪细胞细胞因子产生的改变介导的。

[0193] 任何处理对脂连蛋白受体 -1 (图 10) 或脂连蛋白受体 2 (图 11) 的 MLEC 表达都没有直接影响。

[0194] 然而, 用茶碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇组合处理脂肪细胞产生条件培养基, 当应用于 MLEC 时, 该条件培养基引发 MLEC 中抗炎症脂连蛋白 -2 受体的表达的显著增加 ( $p = 0.0018$ , 图 12)。如图 12 中可见, 仅有茶碱 / 白藜芦醇 / 亮氨酸处理相对于对照产生改善, 提示在所有这三种组分之间存在协同效应。对于该组合, 协同效应为大约 100%。

[0195] 类似地, 当用可可碱代替茶碱时, 另一种甲基黄嘌呤 / 非特异性 PDE 抑制剂, 可可碱 / 亮氨酸和亮氨酸 / 白藜芦醇组合刺激脂连蛋白受体 1 的适度的、显著的增加 ( $p < 0.03$ , 图 13), 可可碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇组合具有进一步的更稳健的增加 ( $p < 0.0005$ , 图 13)。

[0196] 可可碱 / 亮氨酸和可可碱 / 亮氨酸 / 白藜芦醇组合均刺激脂连蛋白受体 2 表达的稳健提高 ( $p < 0.0001$ , 图 14)。如图 14 中所见, 可可碱与亮氨酸或亮氨酸 / 白藜芦醇的组合产生大约 100% 的协同效应。

[0197] 这些数据证明了非特异性 PDE 抑制剂茶碱和可可碱与亮氨酸之间在减弱导致气道疾病 (包括哮喘) 的炎症应答和促进抗炎症应答方面的显著的协同作用。值得注意的是, 这些效果是在茶碱的亚治疗剂量 (治疗有效水平的 1-2%) 下实现的。

[0198] 从上文应当可以理解, 尽管已经示出和描述了特定实施方案, 但仍可以对其作出各种修改, 这些修改也是本文所设想到的。也并不打算由说明书中提供的具体实例来限制本发明。虽然本发明已参照前述说明书进行了描述, 但本文优选的实施方案的描述和图示并不意味着以限制的意义来解释。此外, 应当理解, 本发明的所有方面都不限于本文提出的具体描述、构造或相对比例, 其取决于多种条件和变量。对本发明的实施方案的形式和细节的各种修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。因此, 可以预期, 本发明还应当涵盖任何这样的修改、变化和等同方案。

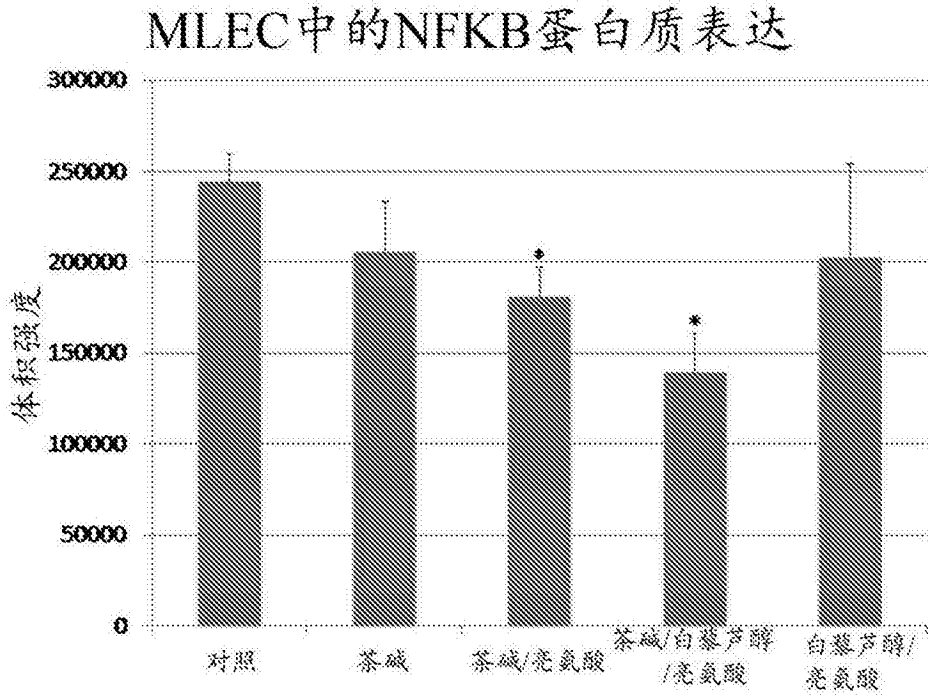


图 1

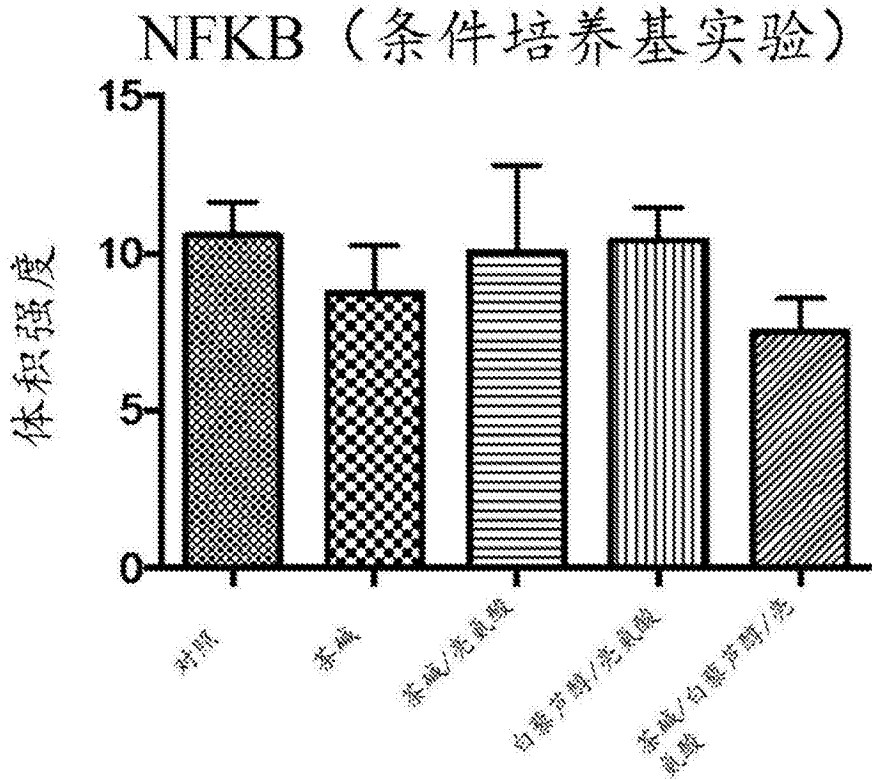


图 2

### MLEC中的P-NFKB；条件培养基实验

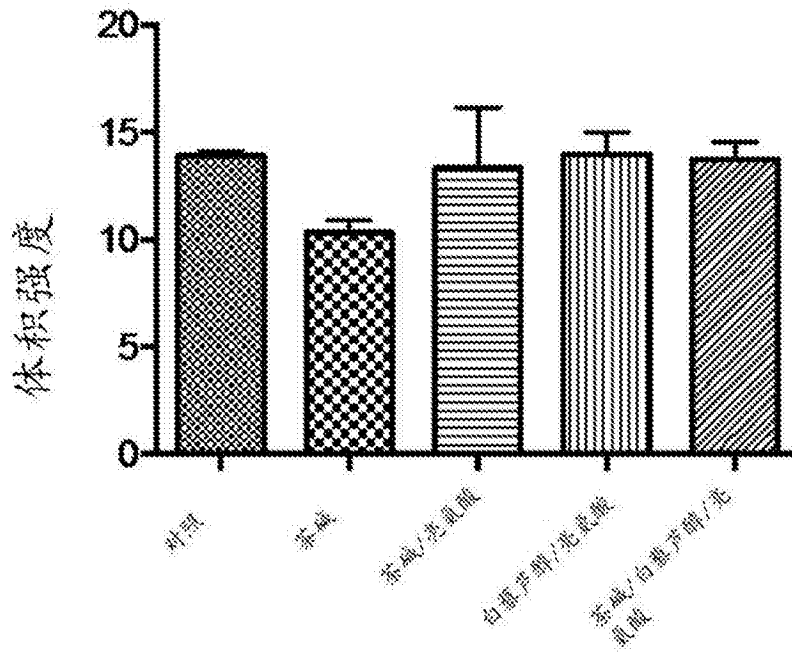


图 3

### IL1 $\beta$ 释放

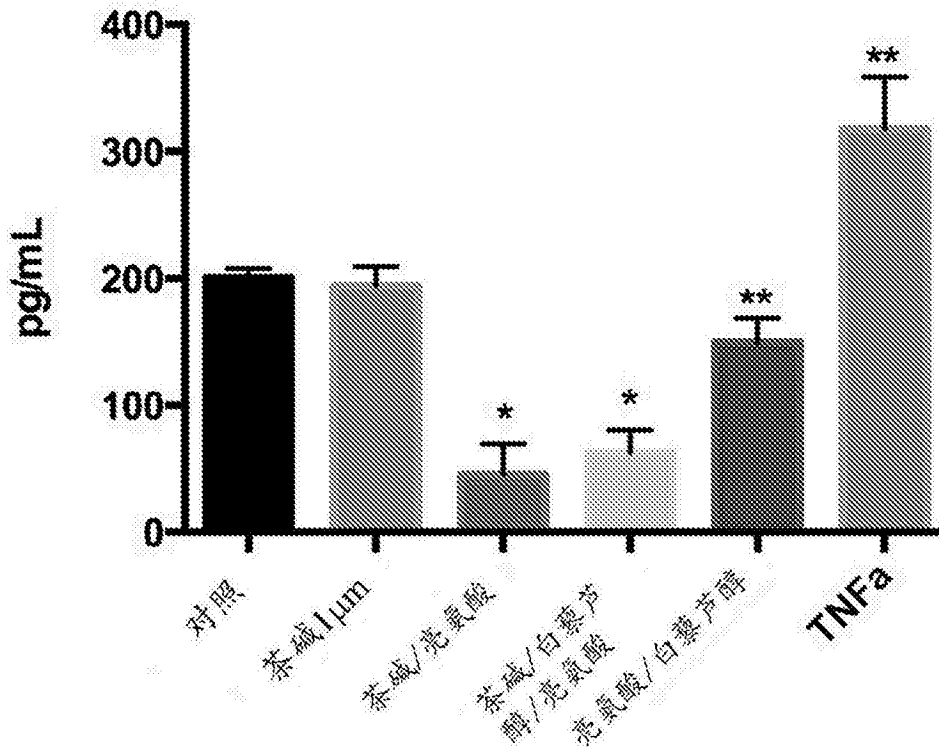


图 4

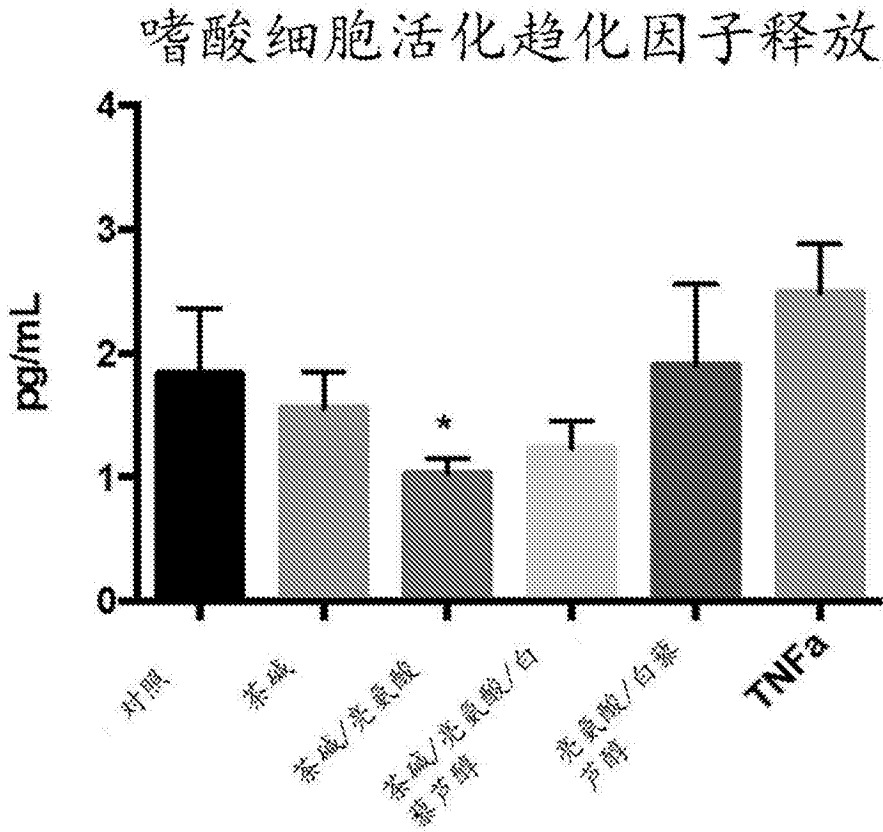


图 5

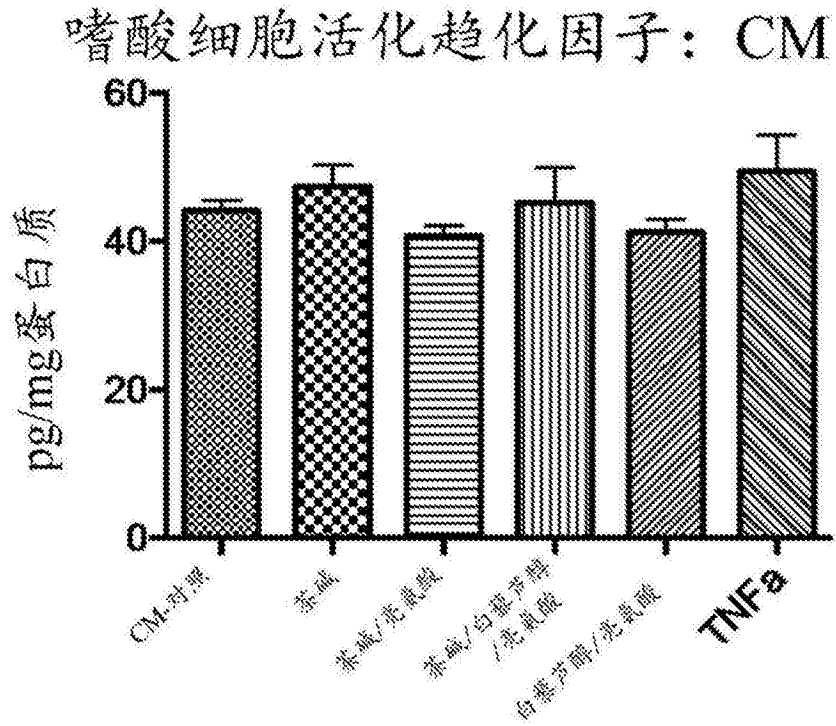


图 6

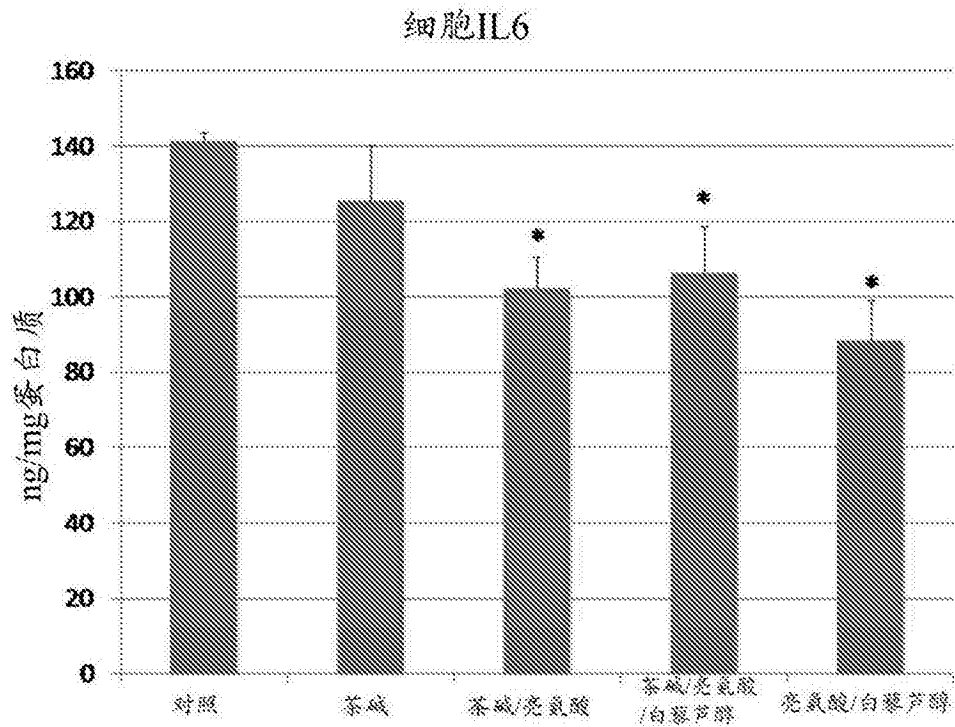


图 7

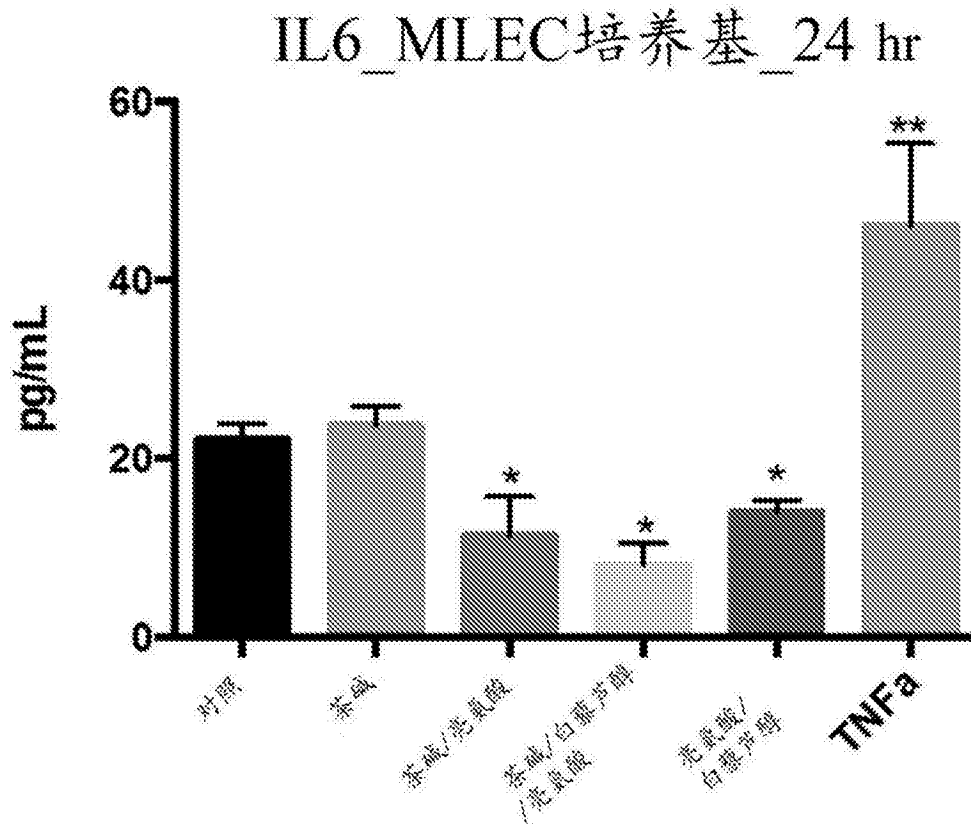


图 8

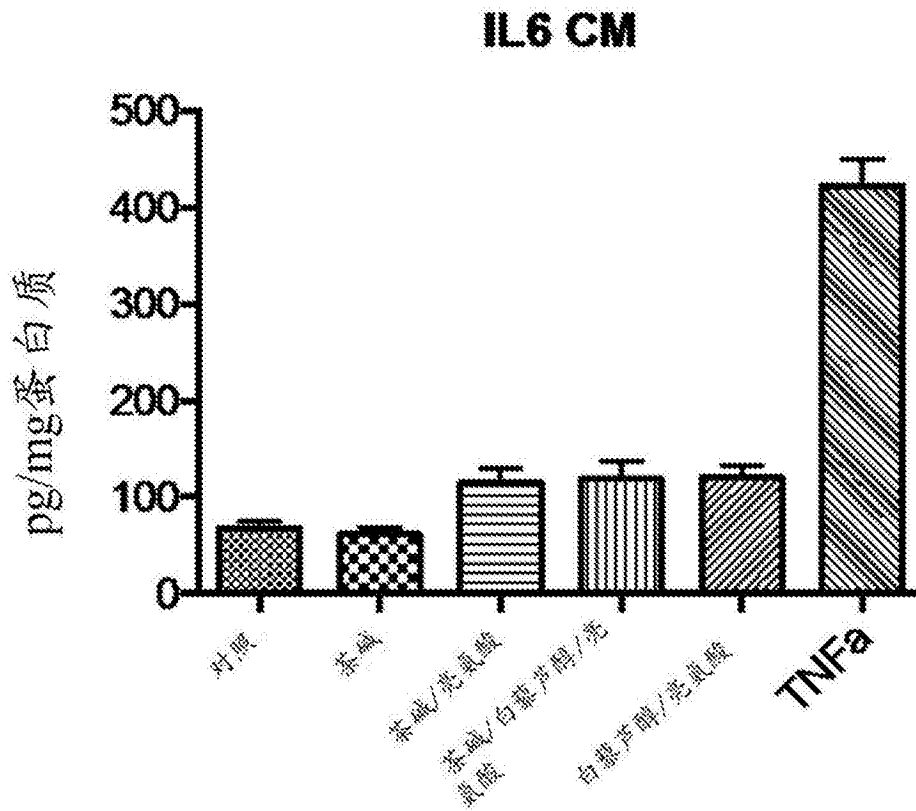


图 9

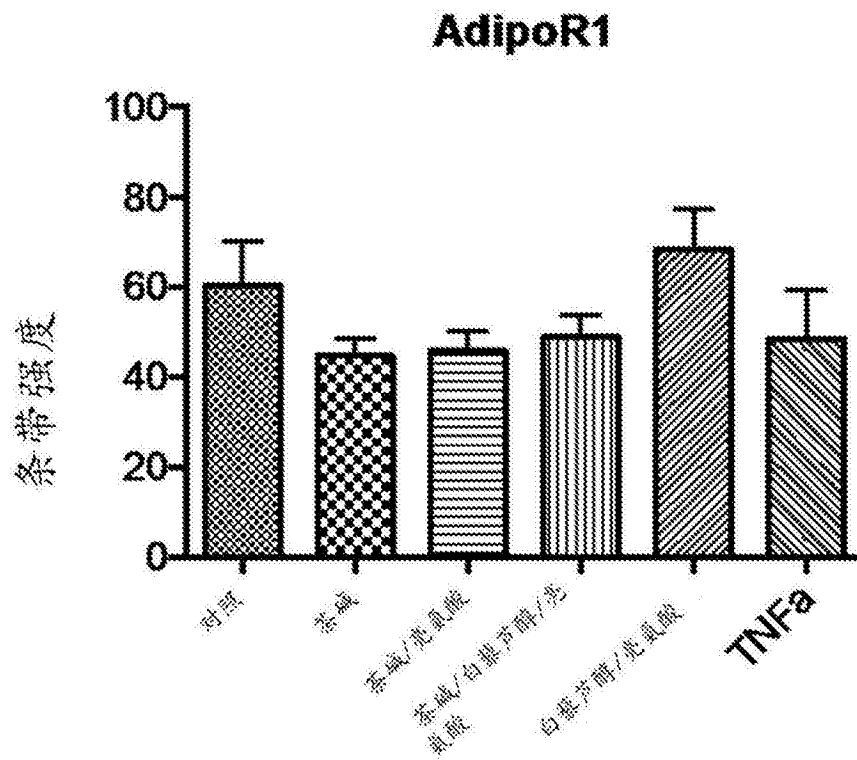


图 10



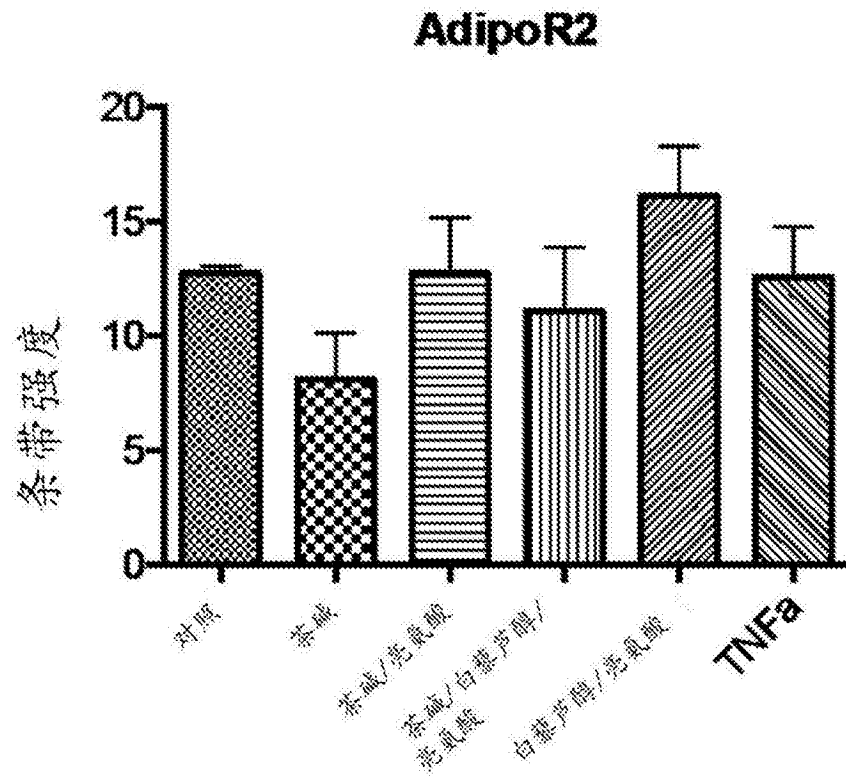


图 11

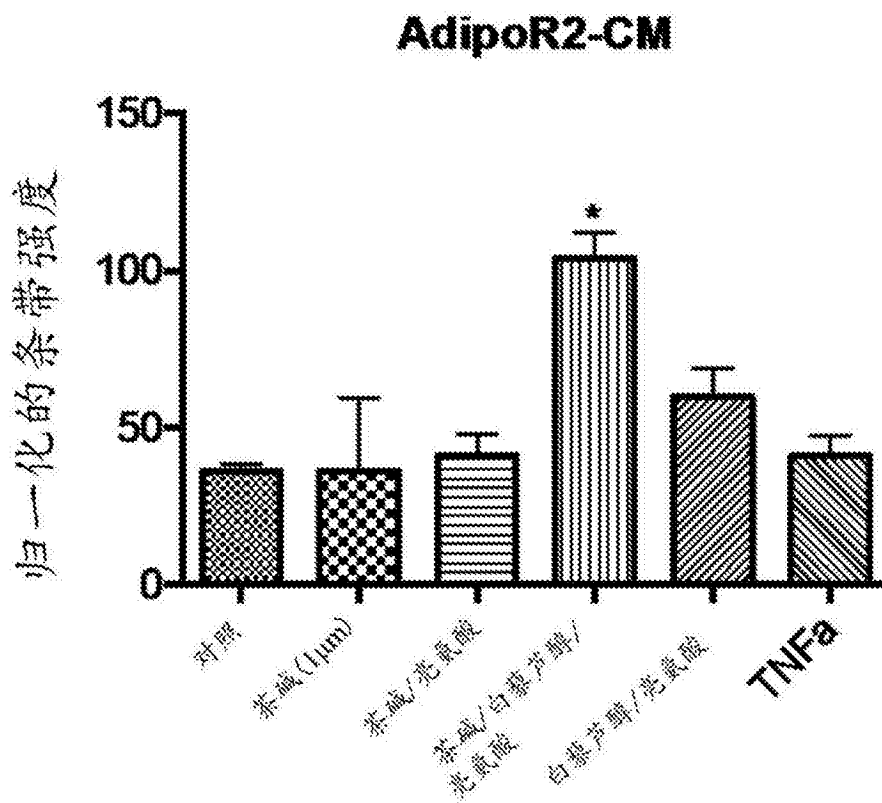


图 12

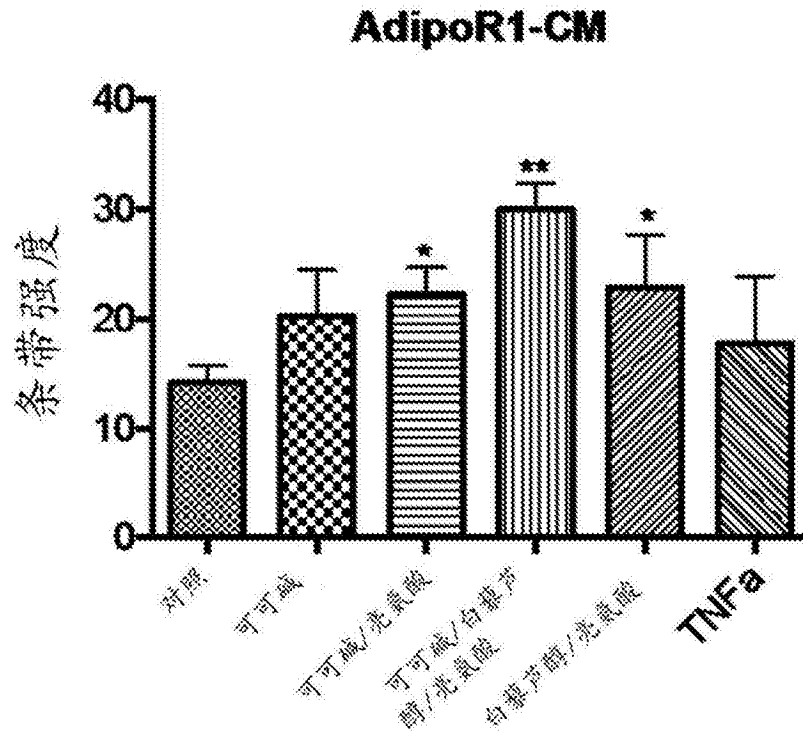


图 13

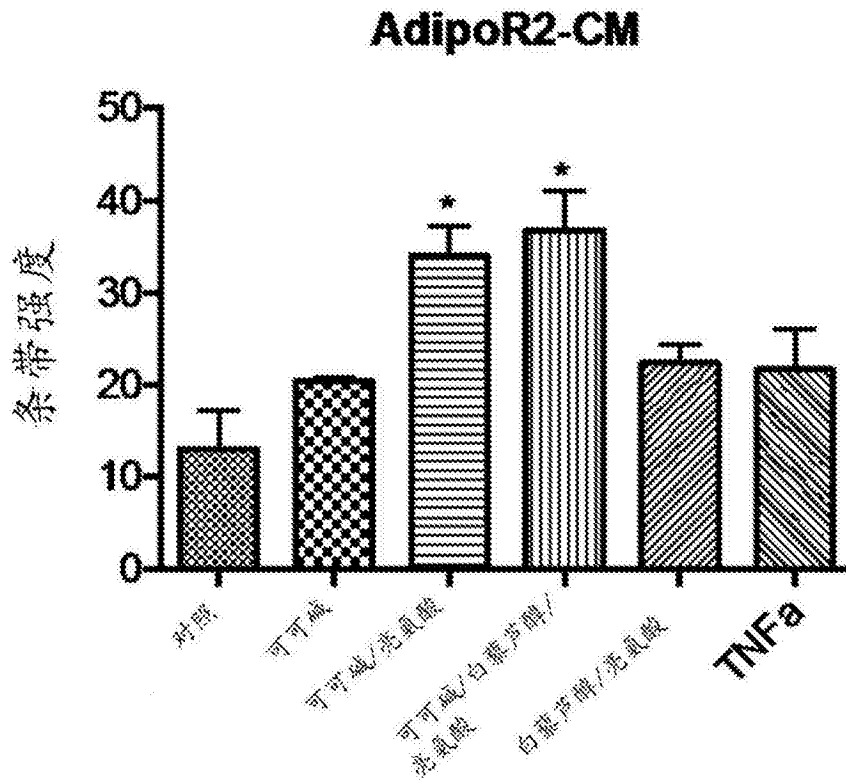


图 14