



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118475344 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 09

(21) 申请号 202280085037.1

(22) 申请日 2022.12.22

(30) 优先权数据

21217735.6 2021.12.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/087581 2022.12.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/118487 EN 2023.06.29

(71) 申请人 多姆皮制药公司

地址 意大利

(72) 发明人 伊拉里亚·马基

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉

(51) Int.Cl.

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 38/13 (2006.01)

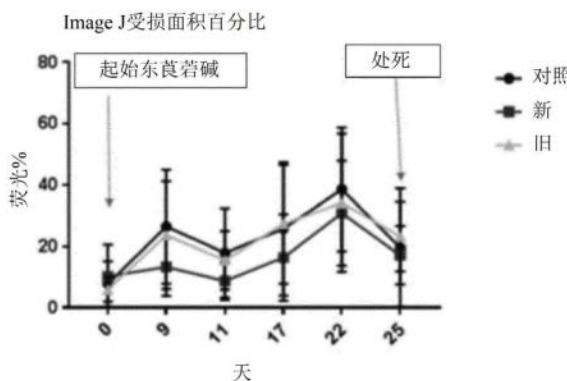
权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

用于眼疾病表面治疗的异环孢菌素A

(57) 摘要

本发明涉及用于眼部表面使用的异环孢菌素A、其盐和眼用组合物,其用于在个体中预防或治疗眼科炎性和/或自身免疫性疾病,优选选自角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病以及眼睑缘炎性疾病。



1. 用于眼部表面使用的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐,其用于在个体中预防或治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病。

2. 根据权利要求1所述的用于眼部表面使用的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐,其中所述炎性和/或自身免疫性眼科疾病选自角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病以及眼睑缘炎性疾病。

3. 根据权利要求1或2所述的用于眼部表面使用的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐,其中所述角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病选自春季角膜结膜炎(VKC)、特应性角膜结膜炎(AKC)、变应性结膜炎、眼红斑痤疮、葡萄膜炎、干眼病(DED)、眼瘢痕性类天疱疮(OCP)、眼移植抗宿主病(GVHD)和免疫性角膜溃疡。

4. 根据权利要求1或2所述的用于眼部表面使用的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐,其中所述眼睑缘炎性疾病选自发热的翼状胬肉和慢性睑缘炎。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的用于眼部表面使用的异环孢菌素A的眼科可接受的盐,其中所述盐选自异环孢菌素A的乙酸盐、己二酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环己基氨基磺酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、谷氨酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、2-羟基乙基磺酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、羟基马来酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、硝酸盐、草酸盐、巴莫酸盐、过硫酸盐、苯乙酸盐、磷酸盐、二磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、奎宁酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、氨基磺酸盐、磺胺酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐(对甲苯磺酸盐)、三氟乙酸盐和十一烷酸盐。

6. 眼用制剂,其包含异环孢菌素A或其眼科可接受的盐以及至少一种眼科可接受的赋形剂或稀释剂。

7. 根据权利要求6所述的眼用制剂,其是液体眼用制剂,优选滴眼剂液体制剂。

8. 根据权利要求6所述的眼用制剂,其是半固体眼用制剂,优选乳膏剂、软膏剂或凝胶剂。

9. 根据权利要求6所述的眼用制剂,其是固体眼用制剂,所述固体眼用制剂用于通过在施用之前添加眼科可接受的稀释剂来临时制备根据权利要求7或8所述的液体眼用制剂或半固体眼用制剂。

10. 根据权利要求6至8中任一项所述的眼用制剂,其pH为6至8,优选6.4至7.8,更优选6.5至7.5。

11. 根据权利要求6至10中任一项所述的眼用制剂,其用于在个体中预防或治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病。

12. 根据权利要求11所述应用的眼用制剂,其中所述炎性和/或自身免疫性眼科疾病选自角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病以及眼睑缘炎性疾病。

13. 根据权利要求6至10中任一项所述的眼用制剂,其还包含至少一种适合于治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病的药物,优选还包含皮质类固醇。

用于眼疾病表面治疗的异环孢菌素A

技术领域

[0001] 本发明涉及异环孢菌素A、其盐和药物组合物,以及它们在个体中预防或治疗炎症性和/或自身免疫性眼科疾病中的用途。

背景技术

[0002] 环孢菌素A是从真菌膨大弯颈霉 (*Tolypocladium Inflatum*) 获得的中性、亲脂性、环状十一肽,其含有七个N-甲基氨基酸残基并在第1位处含有罕见氨基酸 (4R)-4-([E]-2-丁烯基)-4-N-甲基-(L)-苏氨酸 (MeBmt)。

[0003] 环孢菌素首次被批准用作用于预防移植器官的器官排斥的免疫抑制剂。

[0004] 在眼科学中,环孢菌素A最初被研究用于角膜移植移植之后施用,但后来显示对许多眼炎症性疾病(例如葡萄膜炎、春季角膜结膜炎 (vernal keratoconjunctivitis, VKC)、角膜结膜炎 (AKC) 和干眼病 (dry eye disease, DED)) 也有效 (Feroze et al, J Ophthalmol 2019, 31:182-190; Prabhu et al, British Journal of Ophthalmology 2016, 100:345-347)。

[0005] 该分子由于其疏水性,最初还通过全身途径(例如通过静脉内注射或经口施用)来施用以用于眼科适应症。这些施用途径允许活性物在眼内流体(房水或玻璃体液)和眼外器官或附件(角膜、结膜和泪腺)中达到治疗浓度。然而,严重的全身副作用(例如肾毒性和高血压)的发生促使研究适合于表面施用该分子的制剂 (Lallemand et al, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2003, 56:307-318)。

[0006] 用于眼部表面使用的环孢菌素A滴眼剂制剂的开发受到该分子的疏水性和极低水溶性 (6.6mg/ml) 的阻碍,这不允许基于常用的水性眼科载体来制备制剂。

[0007] 环孢菌素A最初是以基于油的溶剂(例如蓖麻油或玉米油)中的溶液的形式配制的,但后来这些被水包油乳剂和基于胶束的溶液剂所替代 (de Oliveira et al, Clinical Ophthalmology 2019:13 1115-1122)。

[0008] 然而,已发现表面活性剂在后者制剂中的必要存在对角膜具有有害作用并导致视力模糊。此外,尽管乳剂具有施加之后快速眼部扩散的优点,但来自乳剂的亲脂性药物的低生物利用度仍然限制了在已具有挑战性的水性眼部环境中可用的活性成分的量 (Jerkins et al, Clinical Ophthalmology 2020:14 481-489)。

[0009] 环孢菌素的溶解性差并且目前可获得的大多数眼用制剂中存在对角膜具有有害作用的表面活性剂,这是环孢菌素在眼科治疗背景中使用的主要限制,可能也是临床试验中报道的耐受性差和响应变异性高的原因。

[0010] 异环孢菌素A是环孢菌素A的异构体,其与后者的不同之处在于第1位处的残基 (N-甲基-(4R)-4-丁-2E-烯-1-基-4-甲基-(L) 苏氨酰基 (N-methyl-(4R)-4-but-2E-en-1-yl-4-methyl-(L) threonyl)) 通过3'-O原子而不是N原子来与第11位处的残基连接。异环孢菌素A最初被鉴定为通过酸处理环孢菌素A形成的重排降解产物。异环孢菌素A已被描述为本身没有任何生物活性,并且当全身施用时,在体内非常缓慢地转化为相应的活性环孢菌素

形式(WO1993017039A1,第5页和第15页)。特别地,已表明该分子在pH高于5时经历向环孢菌素A的定量转化。详细地,异环孢菌素的异构化速率在pH为8至10时最大(Oliyai R,Stella VJ,Pharm Res,1992,May;9(5):617-22),而在6至8的pH范围内观察到最慢的转化速率。特别地,在pH 7.4时转化最小,其中转化半衰期为21.7小时(参见Bundgaard et al,International Journal of Pharmaceutics,82(1992):85-90)。

[0011] 鉴于异环孢菌素A能够缓慢转化为环孢菌素A并且在水中具有较高的溶解度,已建议将异环孢菌素A用作环孢菌素A的前药用于经口施用,以便提高稳定性并避免与环孢菌素血液浓度峰值相关的副作用。

[0012] 在这方面中,WO 1993017039A1描述了异环孢菌素(包括异环孢菌素A)的酸加成盐,其提供了改善的盖仑特征(galenic characteristic),例如增强的溶解度和稳定性。该文献公开了这些盐作为前药特别可用于环孢菌素的经口施用,因为当经口施用,它们以缓慢的速率释放活性分子,维持血液中环孢菌素的恒定水平。

[0013] 然而,异环孢菌素A的局部眼部使用被认为是不可行的,鉴于该分子在该环境中的转化速率缓慢。

[0014] 事实上,异环孢菌素A与环孢菌素A相互转化的速率非常低,以至于在该分子于眼表停留时间期间,基本上不形成环孢菌素A。如上所述,已经描述了在pH值为6至8时转化最慢,并且特别是在pH 7.4时,从异环孢菌素A至环孢菌素A的50%转化的时间为21.7小时(Bundgaard et al,International Journal of Pharmaceutics,82(1992):85-90)。

[0015] 鉴于以上,据本申请人所知,异环孢菌素A从未被认为是用于局部眼部应用的环孢菌素A的可行替代品,因为预计其不会发挥任何药理活性。

发明内容

[0016] 本申请人现已出乎意料地发现,异环孢菌素A当表面施用于眼时,意外地显示出与其转化为环孢菌素A无关的生物活性。如上所述,该发现是基于背景文献完全不可预测的。

[0017] 甚至更出乎意料的是,如在炎症性眼表疾病的相关动物模型上进行的体内测试的实验部分中所示,本申请人观察到与环孢菌素A相比,异环孢菌素A处理在数个药理学相关参数上显示出更高的效力。

[0018] 本发明人还发现异环孢菌素A能够抑制TRPV3和TRPML2离子通道的活性,文献中已经描述了这些离子通道与炎性和变应性疾病的症状相关(Takahiro Yamada et al,Exp Eye Res.2010Jan;90(1):121-129;MP Cuajungco et al,Pflugers Arch.2016Feb;468(2):177-92;和Eva Plesch et al,eLife.2018;7:e39720)。此外,与环孢菌素A相反,异环孢菌素A不刺激由TRPC4通道激活所诱导的上皮细胞过度增殖,该上皮细胞过度增殖在炎性和变应性眼疾病中是不期望的。

[0019] 因此,本发明的第一个目的是用于眼部表面使用的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐,以预防或治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病。

[0020] 优选地,所述炎性和/或自身免疫性眼科疾病选自角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病以及眼睑缘炎性疾病。

[0021] 本发明的第二个目的是眼用制剂,其包含异环孢菌素A或其眼科可接受的盐以及至少一种眼科可接受的赋形剂或稀释剂。

[0022] 本发明的另一个目的是用于预防或治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病的方法,所述炎性和/或自身免疫性眼科疾病优选选自角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病以及眼睑缘炎性疾病,所述方法包括向有此需要的个体表面施用有效量的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐和/或其眼用制剂。

附图说明

[0023] 图1示出了,在东莨菪碱(scopolamine)处理之后第0天、第9天、第11天、第17天、第22天和第25天,作为每组测量值的平均值报道的荧光百分比,如实施例1中所述。

[0024] 图2示出了,在东莨菪碱处理之后22天(上图)和25天(下图)在三个实验组中测量的泪液分泌的mm,如实施例1中所述。

具体实施方式

[0025] 本发明的第一个目的是用于眼部表面使用的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐,以在个体中预防或治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病。

[0026] 优选地,所述炎性和/或自身免疫性疾病选自角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病以及眼睑缘炎性疾病。

[0027] 角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病是以局部炎性状态诱导的覆盖角膜和结膜的上皮的损伤为特征的疾病。

[0028] 眼睑缘炎性疾病是以眼睑的常见和持续性炎症为特征的疾病。

[0029] 特别地,根据本发明,所述眼科炎性和/或自身免疫性疾病选自春季角膜结膜炎(VKC)、特应性角膜结膜炎(atopic keratoconjunctivitis,AKC)、变应性结膜炎、眼红斑痤疮、葡萄膜炎、干眼病(DED)、眼瘢痕性类天疱疮(ocular cicatricial pemphigoid,OCP)、眼移植植物抗宿主病(graft-versus-host disease,GVHD)、免疫性角膜溃疡、发炎的翼状胬肉和慢性睑缘炎。

[0030] 根据本发明,所述异环孢菌素A或其盐表面施用于所述个体的眼。

[0031] 根据本发明,术语“预防”是指在病症或病理事件建立或发生之前部分或完全预防该病症或病理事件。

[0032] 根据本发明的一个实施方案,预防是完全预防,其中病症或病理事件被完全阻断。

[0033] 根据本发明的一个替代实施方案,预防是部分预防,其中病症或病理事件的发生被延迟和/或其严重程度被降低。

[0034] 根据本发明,术语“治疗”是指在病症或病理事件已经建立或发生之后,完全逆转或减轻该病症或病理事件的严重程度或进展。

[0035] 根据本发明,术语“个体”是指人或动物,优选指人。

[0036] 优选地,可使用异环孢菌素A或其眼科可接受的盐治疗的所述炎性和/或自身免疫性眼科疾病是在用可的松(cortisone)和类似皮质类固醇治疗之后表现出改善或恢复的眼科疾病。

[0037] 可使用异环孢菌素A或其眼科可接受的盐治疗的角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病优选选自春季角膜结膜炎(VKC)、特应性角膜结膜炎(AKC)、变应性结膜炎、眼红斑痤疮、葡萄膜炎、干眼病(DED)、眼瘢痕性类天疱疮(OCP)、眼移植植物抗宿主病(GVHD)和免疫性

角膜溃疡。优选地,所述变应性结膜炎是季节性或常年性变应性结膜炎。

[0038] 可使用异环孢菌素A或其眼科可接受的盐治疗的眼睑缘炎性疾病是例如发炎的翼状胬肉和慢性睑缘炎。

[0039] 根据本发明,优选地,所述异环孢菌素A或其眼科可接受的盐可用于预防和治疗一种、两种或更多种上述炎性和/或自身免疫性眼科疾病。

[0040] 根据本发明,所述异环孢菌素A或其所述盐表面施加在所述个体的眼的眼表上或者眼睑缘上。

[0041] 根据一个优选实施方案,所述异环孢菌素A或其所述盐通过眼用液体或半液体制剂表面施加于所述个体的眼的眼表上,如将在下文中描述。

[0042] 优选地,所述异环孢菌素A或其所述盐每天一次、两次、三次、四次或更多次施用,这取决于医疗环境和待治疗疾病的严重程度。

[0043] 根据本发明的一个优选实施方案,所述眼科可接受的盐是异环孢菌素A的酸加成盐。

[0044] 优选地,所述异环孢菌素A的眼科可接受的盐选自异环孢菌素A的乙酸盐、己二酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环己基氨基磺酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、谷氨酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、2-羟基乙基磺酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、羟基马来酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、硝酸盐、草酸盐、巴莫酸盐(pamoate)、过硫酸盐、苯乙酸盐、磷酸盐、二磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、奎宁酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、氨基磺酸盐、磺胺酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐(对甲苯磺酸盐)、三氟乙酸盐和十一烷酸盐。

[0045] 更优选地,所述盐是异环孢菌素A的盐酸盐或三氟乙酸盐。

[0046] 本发明的酸加成盐优选在异环孢菌素A的第1位残基的 α -N原子处形成。

[0047] 根据本发明的盐的制备方法是公知的并且在例如专利申请W01993017039A1中进行了描述。

[0048] 本发明的第二个目的是眼用制剂,其包含如上所限定的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐作为活性成分,以及至少一种眼科可接受的赋形剂或稀释剂。

[0049] 根据一个优选实施方案,所述眼用制剂是液体眼用制剂,优选滴眼剂液体制剂。

[0050] 上述液体眼用制剂可以是单相液体制剂,优选溶液剂,更优选水性溶液剂,或者双相液体制剂,优选乳剂,更优选微乳剂。

[0051] 上述液体眼用制剂优选含有生理盐水溶液作为载剂。

[0052] 根据另一个优选实施方案,所述眼用制剂是半固体眼用制剂,优选乳膏剂、软膏剂或凝胶剂。

[0053] 根据又一个优选实施方案,所述眼用制剂是固体眼用制剂,所述固体眼用制剂用于通过在施用之前添加眼科可接受的稀释剂来临时制备如上所述的液体或半固体眼用制剂。

[0054] 优选地,所述固体眼用制剂为粉末形式,更优选其为冻干粉末形式。

[0055] 优选地,所述液体或半固体眼用制剂的pH为6至8,更优选6.4至7.8,甚至更优选6.5至7.5。事实上,已知在这些条件下,异环孢菌素A与环孢菌素A相互转化的速率是最小

的,因此保证了最终产物的稳定性(在pH 7.4,37°C下,50%转化花费21.7小时,Bundgaard et al,International Journal of Pharmaceutics,82(1992):85-90)。

[0056] 优选地,所述液体或半固体眼用制剂含有能够将制剂维持在期望pH的缓冲剂。

[0057] 缓冲剂优选选自但不限于乙酸盐缓冲剂、碳酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂和硼酸盐缓冲剂。根据需要,可使用酸或碱来调节这些制剂的pH。

[0058] 优选地,根据本发明的眼用制剂还含有一种或更多种选自眼科可接受的表面活性剂、防腐剂、稳定剂、张力调节剂、黏度调节剂、抗氧化剂和螯合剂的赋形剂。

[0059] 表面活性剂可用于帮助溶解赋形剂或活性剂、将固体或液体分散在组合物中、增强润湿、改变微滴尺寸或者许多其他目的。

[0060] 优选地,根据本发明的眼用制剂中含有的表面活性剂选自醇、氧化胺、嵌段聚合物、羧化醇或烷基酚乙氧基化物、羧酸/脂肪酸、乙氧基化醇、乙氧基化烷基酚、乙氧基化芳基酚、乙氧基化脂肪酸、乙氧基化脂肪酯或油(动物的和植物的)、脂肪酯、脂肪酸甲酯乙氧基化物、甘油酯、乙二醇酯、基于羊毛脂的衍生物、卵磷脂和卵磷脂衍生物、木质素和木质素衍生物、甲酯、单甘油酯和衍生物、聚合物表面活性剂、丙氧基化和乙氧基化脂肪酸、烷基酚、基于蛋白质的表面活性剂、肌氨酸衍生物、脱水山梨糖醇衍生物、蔗糖和葡萄糖酯及衍生物。

[0061] 优选地,根据本发明的眼用制剂中含有的防腐剂选自阳离子防腐剂,优选季铵化合物,更优选苯扎氯铵或聚季铵盐(polyquad);基于胍的防腐剂,优选PHMB或氯己定;氯丁醇;汞防腐剂,优选选自硫柳汞、乙酸苯汞和硝酸苯汞;氧化性防腐剂,优选稳定的氧氯复合物,更优选稳定的二氧化氯,例如商业产品 **Purite®**;对羟基苯甲酸酯,例如对羟基苯甲酸甲酯和聚对羟基苯甲酸丙酯。

[0062] 根据一个实施方案,根据本发明的眼用制剂不含防腐剂。

[0063] 优选地,根据本发明的眼用制剂中含有的张力调节剂选自盐,优选氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、山梨糖醇、海藻糖、甘露糖醇和甘油。

[0064] 优选地,根据本发明的眼用制剂在室温下的黏度为25至50cps。可将黏度调节剂添加至制剂以达到期望的黏度。

[0065] 优选地,根据本发明的眼用液体制剂中含有的黏度调节剂选自聚乙烯醇、泊洛沙姆(poloxamer)、透明质酸、卡波姆(carbomer)、丙烯酸酯、纤维素衍生物、葡聚糖、聚丙烯酸、聚维酮、聚乙二醇、丙二醇、壳聚糖、结冷胶和黄原胶。优选地,所述纤维素衍生物选自羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素和羟乙基纤维素。

[0066] 优选地,根据本发明的眼用制剂中含有的抗氧化剂选自柠檬酸盐、L-甲硫氨酸、半胱氨酸、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、乙酰半胱氨酸、丁基化羟基茴香醚和丁基化羟基甲苯。

[0067] 优选地,根据本发明的眼用制剂中含有的螯合剂是依地酸二钠。

[0068] 优选地,当所述液体眼用制剂为乳剂时,其还含有一种或更多种油。

[0069] 优选地,所述油选自茴香油、蓖麻油、丁香油、肉桂油(cassia oil)、肉桂油(cinnamon oil)、杏仁油、玉米油(corn oil)、花生油(arachis oil)、棉籽油、红花油、玉米油(maize oil)、亚麻籽油、菜籽油、大豆油、橄榄油、葛缕子油、迷迭香油、花生油(peanut oil)、薄荷油、向日葵油、桉树油和芝麻油。

[0070] 根据一个优选实施方案,根据本发明的制剂不含乙醇。

[0071] 根据本发明的眼用制剂还可包含一种或更多种用于预防或治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病的药物和/或环孢菌素。

[0072] 本发明的另一个目的是用于眼部表面使用的上述制剂,以在个体中预防或治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病,所述炎性和/或自身免疫性眼科疾病选自角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病以及眼睑缘炎性疾病,如上所限定。

[0073] 本说明书还涉及用于预防或治疗至少一种炎性和/或自身免疫性眼科疾病的方法,所述炎性和/或自身免疫性眼科疾病选自角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病以及眼睑缘炎性疾病,所述方法包括向有此需要的个体表面施用有效量的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐和/或眼用制剂,如上所述。

[0074] 可使用异环孢菌素A或其眼科可接受的盐治疗的角膜和眼表炎性和/或自身免疫性疾病优选选自春季角膜结膜炎 (VKC)、特应性角膜结膜炎 (AKC)、变应性结膜炎、眼红斑痤疮、葡萄膜炎、干眼病 (DED)、眼瘢痕性类天疱疮 (OCP)、眼移植抗宿主病 (GVHD) 和免疫性角膜溃疡。

[0075] 优选地,所述变应性结膜炎是季节性或常年性变应性结膜炎。

[0076] 可使用异环孢菌素A或其眼科可接受的盐治疗的眼睑缘炎性疾病是发炎的翼状胬肉和慢性睑缘炎。

[0077] 根据本发明,治疗方法包括眼部表面施用如上所述的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐和/或眼用制剂,以用于预防和治疗一种、两种或更多种上述炎性和/或自身免疫性眼科疾病。

[0078] 优选地,所述异环孢菌素A或其所述盐、或眼用制剂表面施加在所述个体的眼的眼表上或者眼睑缘上。

[0079] 根据一个优选实施方案,所述异环孢菌素A或其所述盐通过眼用液体或半液体制剂表面施加在所述个体的眼的眼表上。

[0080] 优选地,所述异环孢菌素A或其所述盐每天一次、两次、三次、四次或更多次施用,这取决于医疗环境和待治疗疾病的严重程度。

[0081] 根据一个实施方案,治疗方法包括眼部表面施用如上所述的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐和/或眼用制剂,以及一起施用一种或更多种用于预防或治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病的药物。

[0082] 通常用于治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病的药物是皮质类固醇和本领域已知的其他抗炎、免疫抑制和/或免疫调节药物。

[0083] 在一个实施方案中,治疗方法包括施用如上所述的异环孢菌素A或其眼科可接受的盐和/或眼用制剂,以及一起施用环孢菌素。

[0084] 眼部表面施用异环孢菌素A或其眼科可接受的盐或眼用制剂可在施用一种或更多种通常用于治疗炎性和/或自身免疫性眼科疾病的药物之前、同时或之后进行。

[0085] 根据一个特别优选的实施方案,可使用异环孢菌素A或其眼科可接受的盐和/或其眼用制剂治疗的所述炎性和/或自身免疫性眼科疾病是在用可的松和类似皮质类固醇治疗之后表现出改善或恢复的眼科疾病。

[0086] 因此,根据该优选实施方案,异环孢菌素A或其眼科可接受的盐或者包含异环孢菌素A和至少一种眼科可接受的赋形剂或稀释剂的眼用制剂在用可的松和类似皮质类固醇治

疗之前、同时或之后施用。

[0087] 实验部分

[0088] 实施例1——角膜荧光素染色

[0089] 在东莨菪碱诱导的角膜上皮损伤的小鼠模型中评估了异环孢菌素A滴眼剂制剂的效力。

[0090] 具体而言,在基线时将15只小鼠(每组N=5)随机分配至3组并通过用0.5mg/0.2ml 氢溴酸东莨菪碱的皮下注射方案处理来诱导干眼,如先前所描述的(Yeh S et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1):124-9)。

[0091] 实验组包括未接受任何滴眼剂处理的对照组(“CTRL”组)和两个处理组,一个处理组用含有具有2%吐温80的磷酸盐缓冲液中的0.05%环孢菌素A三氟乙酸盐的传统环孢菌素A三氟乙酸盐眼用混悬剂处理(“旧”组),并且另一个处理组用含有具有2%吐温80的磷酸盐缓冲液中的0.05%异环孢菌素A三氟乙酸盐的相应的异环孢菌素A三氟乙酸盐眼用溶液剂处理(“新”组)。

[0092] 在处理组中,在第一次东莨菪碱注射之后第1天开始,每天三次将十微升测试制剂滴注在每只小鼠的双眼中,持续25天。将该处理编码并且施用处理的技术人员和评估实验结果的研究人员对组分配不知情。在分析结束时揭露组标识。

[0093] 在东莨菪碱处理之后第0天、第9天、第11天、第17天、第22天和第25天对每组进行体内荧光素染色,以确定任何角膜上皮缺损。

[0094] 角膜荧光素染色是评估上皮生存力的有价值的临床工具。

[0095] 在裂隙灯下用钴蓝光获得放大10×的数字图像,使用ImageJ软件以半自动方式分析荧光素染色。

[0096] 如图1所示,与用环孢菌素A处理的组(旧)或未处理的组相比,在用异环孢菌素A眼用溶液剂处理的组(新)中观察到较低的上皮损伤(如通过角膜荧光素染色所示)。

[0097] 令人感兴趣的是,这种作用在研究的前17天更大,在第9天达到统计学显著性,这表明异环孢菌素制剂对角膜上皮愈合的直接作用,其与长期润滑无关。

[0098] 还在第22天和第25天通过改良的Schirmer测试在所有动物中测量了泪液分泌,如在Rossi S. et al. Arch Ital Biol. 2012Mar; 150(1):15-21中所述。

[0099] 如在图2中可看出,在不同经处理组之间在两个时间点的泪液分泌方面也均观察到了显著差异,其中经异环孢菌素处理组的水平显著更高。

[0100] 在动物样品中,还评估了眼组织中吸收的环孢菌素和异环孢菌素的水平。在3只小鼠/组的亚组中在三个不同时间点,即第1天(第一次处理之后5分钟)、第2天(第一次处理之后5分钟)和第7天(第一次处理之后5分钟)获取相关组织的活检。

[0101] 将组织离心、均质化、冻干。在室温下用EtOAc (0.5ml) 提取1mg冻干组织,并通过HPLC来分析有机溶液以评估环孢菌素A和异环孢菌素A的组织浓度和相对量。

[0102] HPLC分析的色谱条件在下表A和表B中报道:

[0103] 表A

HPLC	具有PDA检测器的HPLC Alliance
柱	X Bridge C18, 5 μ m 150*4.6mm

[0104]

注入体积	10 μ L
检测器	210 nm
流量	1.50 ml/ 分钟
运行时间	26 分钟
柱温	65°C \pm 5°C
样品温度	24°C \pm 5°C
用于纯度的浓度	在乙腈中 0.5 mg/ml
用于测定的浓度	在乙腈中 0.2 mg/ml
样品制备	未经任何处理（按原样注入）

[0105] 表B:流动相(梯度)

[0106]

	时间 (分钟)	流量 (ml/分钟)	H ₂ O 中 0.05% TFA (A)	CH ₃ CN 中 0.05% TFA (B)
1	0.00	1.50	60.0	40.0
2	0.50	1.50	60.0	40.0
3	15.00	1.50	20.0	80.0
4	19.00	1.50	20.0	80.0
5	20.00	1.50	60.0	40.0
6	25.00	1.50	60.0	40.0

[0107] 流动相A:

[0108] 溶于1000ml水中的0.5ml三氟乙酸(trifluoroacetic acid,TFA)。

[0109] 流动相B:

[0110] 溶于1000ml乙腈中的0.5ml三氟乙酸(TFA)。

[0111] 获得的数据显示,与环孢菌素A相比,异环孢菌素A在眼表和眼内组织中的生物分布更高(>10倍),并且在相同处理下的不同动物中的变化性显著更低。

[0112] 在角膜、结膜和眼内组织(巩膜和葡萄膜)中检测到的异环孢菌素A和环孢菌素A的平均水平(ng/mg)在下表C中报道:

[0113] 表C

[0114] 异环孢菌素A和环孢菌素A在角膜、结膜和眼内组织中的生物分布

	角膜	结膜	眼内组织 (组合)
--	----	----	--------------

[0115]

异环孢菌素A	15 ± 5 ng/mg	20 ± 7 ng/mg	2 ± 1 ng/mg
环孢菌素A	1 ± 1 ng/mg	2 ± 1 ng/mg	未检测到

[0116] 在解剖期间未分离的巩膜和葡萄膜上评价了异环孢菌素A和环孢菌素A在眼内组织中的生物分布。因此,上表C中的术语“组合”是指在解剖期间未分离的巩膜和葡萄膜中的生物分布水平的评价。

[0117] 还测量了在眼组织中随时间推移异环孢菌素A向环孢菌素A的转化,并且在单剂量和重复剂量二者之后,异环孢菌素A向环孢菌素A的转化如预期的那样极小。

[0118] 获得的数据表明,异环孢菌素A的直接作用清楚地解释了观察到的效力,从而引发了新的且独立的作用机制。

[0119] 实施例2——在大鼠眼部碱烧伤模型中表面施加异环孢菌素A滴眼剂的抗炎特性

[0120] 还在急性大鼠眼部碱烧伤模型中测试了实施例1的异环孢菌素A三氟乙酸盐制剂。这是通过将浸有1N NaOH的滤纸盘施加在角膜上10秒钟来诱导的。

[0121] 实验组(每组n=6)包括未接受任何滴眼剂处理的对照组(“CTRL”组)和用上述异环孢菌素眼用溶液剂处理的组(“新”组),通过向每只小鼠滴注十微升测试制剂三次,持续24小时。

[0122] 然后在处理结束时测量结膜的炎性浸润。

[0123] 与未经处理组相比,在经处理组中观察到炎性浸润显著降低,从而进一步确定了表面施加的异环孢菌素滴眼剂的活性抗炎特性。

[0124] 此外,还在这些动物中,如上所述,评价了异环孢菌素A向环孢菌素A的转化,并且在眼表和/或眼内组织二者中都没有观察到显著的相互转化。

[0125] 实施例3——Draize眼刺激测试

[0126] 在6只健康兔(每组3只)的右眼中进行典型的Draize眼刺激测试,以比较异环孢菌素A相对于环孢菌素A表面眼用制剂的耐受性(Draize, J.H., et al, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics(1944), 82:377-390)。

[0127] 两组中均未观察到例如揉眼(eye rubbing)的行为反应和眼刺激的体征(即结膜反应、肿胀和/或排出物)。

[0128] 然而,由于在经环孢菌素A处理的动物中观察到提高的眨眼率,因此还进行了Li et al描述的兔眨眼方法(Li et al., Int. J Pharm, 2008; 363(1-2):177-182):将滴剂施用至眼之后10秒钟,记录兔眨眼的频率,持续2分钟。

[0129] 与异环孢菌素A组(5 ± 1)相比,环孢菌素A组(9 ± 1)中的频率更高, p < 0.05。

[0130] 实施例4——FLIPR测定

[0131] 异环孢菌素A和环孢菌素A调节参与多种炎性和/或变应性眼疾病的离子通道的激活的能力已在FLIPR测定中进行了测试。

[0132] FLIPR测定用于使用可透过膜的荧光染料来筛选离子通道靶标。特别地,具有显著

Ca穿透性的离子通道靶标产生胞内钙的提高,这可使用钙敏感染料进行测量 (Michelle R.Arkin et al.FLIPR™ Assays for GPCR and Ion Channel Targets.Assay Guidance Manual[Internet].Bethesda (MD):Eli Lilly&Company and the National Center for Advancing Translational Sciences;2004)。

[0133] 具体而言,在FLIPR测定中测试了上述含有浓度为30 μ M的异环孢菌素A或环孢菌素A的制剂激活或抑制离子通道TRPV3、TRPML2或TRPC4的能力。TRPV3是在瘙痒和炎症中发挥重要作用的离子通道,瘙痒和炎症是眼表疾病(例如VKC和AKC)的两个特征性方面。

[0134] TRPML2是在免疫和炎性响应的背景中具有重要作用的离子通道。

[0135] TRPC4是由角膜上皮表达的离子通道,并且其在上皮细胞的增殖和迁移中发挥作用。

[0136] 具体而言,将人TRP细胞进行胰蛋白酶化、计数并以50,000个细胞/孔的密度接种于黑色透明底的96孔板中,并孵育过夜。第二天,从细胞板除去培养基并添加25 μ l测定缓冲液。将红色膜电位或钙5染料溶液(10 μ l)添加至孔,并在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。使用膜电位染料测试TRPV3、TRPML2和TRPC4。

[0137] 将染料溶液在测定缓冲液中配制。在100% DMSO或dH2O中进行化合物稀释,然后在临添加至细胞板之前短时间(<10分钟)转移至中间稀释液(5% DMSO/测定缓冲液或者5% dH2O/测定缓冲液)。

[0138] 对于激动剂测试:在与染料孵育之后,将板置于FLIPR中,并且每1.52秒监测荧光。在20秒之后,将IsoCsA、CsA或标准激动剂添加至孔,并在ex./em.(激发/发射波长):488nm/510nm至570nm下监测荧光5分钟。

[0139] 对于拮抗剂测试:在与染料孵育之后,使用手动多通道添加异环孢菌素A或环孢菌素A并在室温下孵育10分钟。将板置于FLIPR中,并且每1.52秒监测荧光。在20秒之后,添加10 μ l适当的标准激动剂,并在ex/em:488nm/510nm至570nm下监测荧光5分钟。

[0140] 已针对每个通道测试了参考激动剂和拮抗剂,以检查该值在可接受的范围内,从而验证测定。

[0141] 已评价了测试化合物和参考化合物的激活和抑制值百分比。

[0142] 未检测到显著的激动剂活性,然而观察到异环孢菌素A与环孢菌素A相比具有显著的抑制作用。抑制测定的结果在下表1至3中报道。

[0143] 表1报道了异环孢菌素A、环孢菌素A和参考化合物对TRPV3的抑制百分比。

[0144] 从下面的数据可看出,异环孢菌素A(表中的IsoCsA)拮抗该通道的能力是环孢菌素A(表中的CsA)的超过4倍高。

[0145] 表1-TRPV3的抑制百分比

TRPV3					
测试化合物	浓度	抑制 %			
		n=1	n=2	平均值	SD
[0146] Iso-CsA	30 μ M	63.7	56.5	60.1	5.1
CsA	30 μ M	19.7	8.6	14.2	7.8
参考	56 μ M 2-APB	0	0	0	0
	100 μ M RR	90.2	93.2	91.7	2.1

[0147] 其中2-APB是2-氨基乙氧基二苯基硼酸酯(2-aminoethoxy diphenyl borate) (激动剂),并且RR是钆红(拮抗剂)。由于2-APB是参考标准激动剂,即引起受体的激活以产生生物响应,因此其对TRPV3的抑制%被认为等于0%。

[0148] 表2报道了异环孢菌素A、环孢菌素A和参考化合物对TRPML2的抑制百分比。

[0149] 从下面的数据可看出,异环孢菌素A(表中的Iso-CsA)拮抗该通道的能力是环孢菌素A(表中的CsA)的超过两倍。

[0150] 表2-TRPML2的抑制百分比

TRPML2					
测试化合物	浓度	抑制 %			
		n=1	n=2	平均值	SD
[0151] Iso-CsA	30 μ M	63.9	78.5	71.2	10.3
CsA	30 μ M	21.0	38.8	29.9	12.5
参考	2 μ M CaCl ₂	0	0	0	0
	4mM Gd ³⁺	88.2	90.9	89.6	1.9

[0152] 其中CaCl₂是激动剂,并且钆Gd³⁺是拮抗剂。

[0153] 由于CaCl₂充当激动剂,即引起受体的激活以产生生物响应,因此其对TRPML2的抑制%被认为等于0%。

[0154] TRPC4是由角膜上皮表达的离子通道,并且其在上皮细胞的增殖和迁移中发挥作用(Hua Yang et al, J Biol Chem. 2005 Sep 16; 280(37):32230-7)。春季角膜结膜炎(VKC)和特应性角膜结膜炎(AKC)的特征在于眼表的过度增生现象。因此,在这些病理状况中,可促进上皮生长和迁移的分子可能是有害的。

[0155] 表3报道了异环孢菌素A、环孢菌素A和参考化合物对TRPC4的激活百分比。

[0156] 从下面的数据可看出,虽然异环孢菌素A(表中的Iso-CsA)对该通道的激活没有任何作用,但环孢菌素A(表中的CsA)充当激动剂,并因此由于其激活而具有不期望的副作用。

[0157] 表3-TRPC4的激活百分比

TRPC4					
测试化合物	浓度	抑制 %			
		n=1	n=2	平均值	SD
[0158] Iso-CsA	30 μ M	2.5	0.8	1.7	1.2
CsA	30 μ M	33.5	32.9	33.2	0.4
参考	200nM 恩格林 A	69.4	72.1	70.8	1.9
	25mM GD3	0	0	0	0

[0159] 其中恩格林A(Englerin A)是激动剂,并且钷GD3是拮抗剂。

[0160] 由于GD3充当拮抗剂,即引起受体的抑制以产生生物响应,因此其对TRPC4的激活%被认为等于0%。

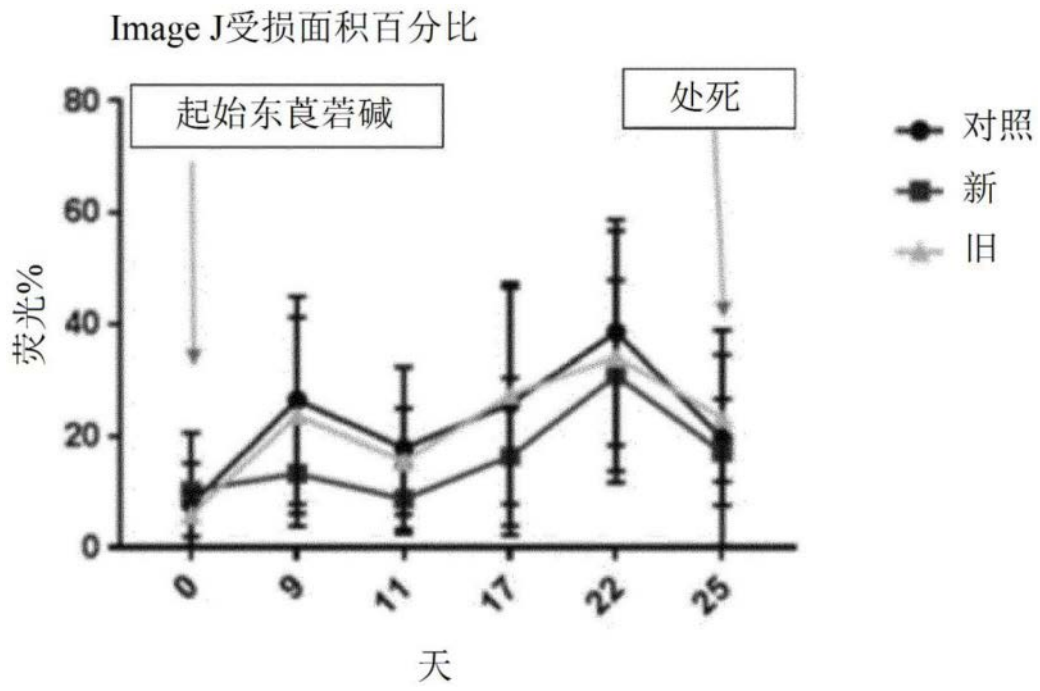
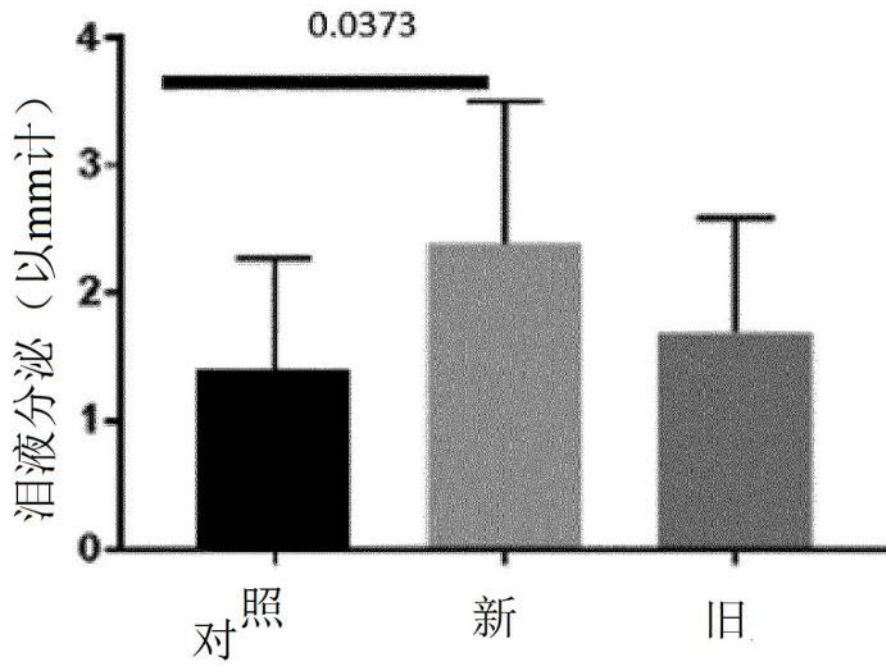


图1

第22天组间泪液分泌



第25天组间泪液分泌

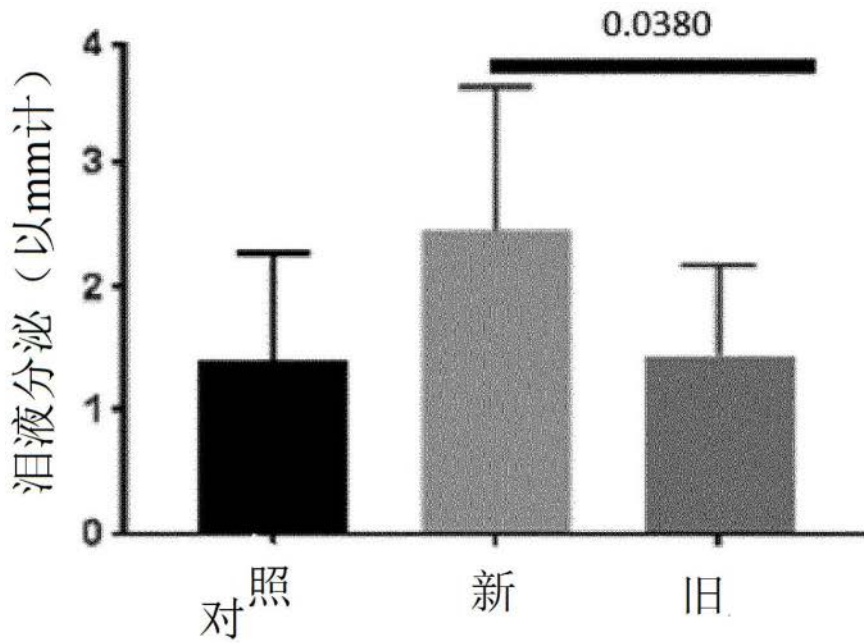


图2