



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104220087 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201280069247. 8

A61K 9/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 08. 20

A61P 27/02 (2006. 01)

A61P 27/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/569, 604 2011. 12. 12 US

61/600, 377 2012. 02. 17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/051562 2012. 08. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/089835 EN 2013. 06. 20

(71) 申请人 美国伊利诺大学理事会

地址 美国伊利诺州

(72) 发明人 S·贾音

(74) 专利代理机构 北京汇智英财专利代理事务
所(普通合伙) 11301

代理人 陈践实

(51) Int. Cl.

A61K 38/43 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书21页

序列表1页 附图11页

(54) 发明名称

用于治疗核酸相关眼病的组合物及方法

(57) 摘要

本文提供一种用于治疗核酸相关眼病的组合物及方法。

1. 一种用于治疗核酸相关眼病的组合物,其中,该组合物包含核酸酶以及眼用赋形剂。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,该核酸酶是去氧核糖核酸酶(DNase)、核糖核酸酶(RNase)或其组合。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中,该Dnase是核酸内切酶或核酸外切酶。
4. 根据权利要求2所述的组合物,其中,该Dnase是选自由以下所组成的群组:去氧核糖核酸酶I(DNase I)、去氧核糖核酸酶II(DNase II)、去氧核糖核酸酶III(DNase III)、微球菌核酸酶、及重组DNase。
5. 根据权利要求4所述的组合物,其中,该重组DNase I为去氧核糖酶 α (dornase alpha) (PULMOZYME[®])。
6. 根据权利要求2所述的组合物,其中,该Rnase是选自以下所组成的群组:核糖核酸酶A(RNase A)、核糖核酸酶H(RNase H)、核糖核酸酶I(RNase I)、核糖核酸酶II(RNase II)、核糖核酸酶III(RNase III)、核糖核酸酶D(RNase D)、核糖核酸酶L(RNase L)、核糖核酸酶P(RNase P)、核糖核酸酶PH(RNase PH)、核糖核酸酶PhyM(RNase PhyM)、核糖核酸酶R(RNase R)、核糖核酸酶T(RNase T)、核糖核酸酶T1(RNase T1)、核糖核酸酶T2(RNase T2)、核糖核酸酶U2(RNase U2)、核糖核酸酶V1(RNase V1)、核糖核酸酶V(RNase V)、寡核糖核酸酶(Oligoribonuclease)、核糖核酸外切酶I、核糖核酸外切酶II、及重组核糖核酸酶。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其中,该眼用赋形剂是选自由以下所组成的群组:缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、抗氧化剂、及前述的组合。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其中,还包含选自由以下所组成的群组的拮抗剂或抑制剂:抗生素化合物、toll样受体拮抗剂(toll-like receptor antagonist)、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑制剂(cathelicidin inhibitor)、MyD88抑制剂、类固醇、抗过敏化合物、及嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂(neutrophil elastase inhibitor)、及前述的组合。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其中,该组合物的形式是固体、软膏、凝胶、液体、气溶胶、薄雾、聚合物、隐形眼镜、膜、乳液或悬浮液。
10. 一种用于治疗核酸相关眼病的方法,其包括向眼睛投予有效治疗该核酸相关眼病的量的根据权利要求1所述的组合物。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中,该眼睛的眼表(ocular surface)是含有泪膜。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中,该泪膜是生物膜或黏液膜。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中,该生物膜或粘液膜含有核酸。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中,该核酸是细胞外核酸。
15. 根据权利要求13所述的方法,其中,该核酸是DNA、RNA或其组合。
16. 根据权利要求10所述的方法,其中,该组合物的有效量含有5奈克/毫升至3毫克/毫升的该核酸酶。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中,该组合物的有效量含有1毫克/毫升至3毫克/毫升的该核酸酶。
18. 根据权利要求10所述的方法,其中,该核酸相关眼病是选自由以下所组成的群组:干眼病、板层角膜炎、隐形眼镜相关角膜炎、眼内炎、感染性结晶状角膜病变、眼疤痕性类天

疮疮(ocular cicatricial pemphigoid, OCP)、干性角膜结膜炎(keratoconjunctivitis sicca, KCS)、修格连氏症候群(Sjogren syndrome, SS)、修格连氏症候群相关的干性角膜结膜炎(Sjogren syndrome associated keratoconjunctivitis sicca)、非修格连氏症候群相关的干性角膜结膜炎(non-Sjogren syndrome associated keratoconjunctivitis sicca)、干性角膜炎、干性症候群、干眼症、泪膜失调(tear film disorder)、泪液产生减少、水样泪液缺乏性干眼症(aqueous tear deficiency, ATD)、及睑腺功能失调(meibomian gland dysfunction, MGD)。

19. 一种用于治疗眼细菌感染的方法,其包括向眼睛投予有效治疗该感染的量的根据权利要求 1 所述的组合物。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,该组合物是经注射至眼睛中。

21. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,该感染是在眼睛上或在眼睛中形成细菌生物膜的结果。

22. 一种用于判断受检者是否患有核酸相关眼病的方法,其包括:

- (a) 自受检者收集一眼泪样本;
- (b) 使该眼泪样本与去氧核糖核酸酶(DNase)接触;
- (c) 使(a)或(b)的样本与结合至 DNA 的染料接触;
- (d) 测量色彩强度;
- (e) 与正常对照样本中的染料荧光强度相比较;

其中,当步骤(a)或步骤(b)的样本中的染料荧光强度水平与对照组相比增加,显示为生物膜相关的眼病。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中,该核酸相关眼病是选自由以下所组成的群组:干眼病、弥漫性板层角膜炎、隐形眼镜相关角膜炎、眼内炎、感染性结晶状角膜病变、眼疤痕性类天疱疮(OCP)、干性角膜结膜炎(KCS)、修格连氏症候群(SS)、修格连氏症候群相关的干性角膜结膜炎(Sjogren syndrome associated keratoconjunctivitis sicca)、非修格连氏症候群相关的干性角膜结膜炎(non-Sjogren syndrome associated keratoconjunctivitis sicca)、干性角膜炎、干性症候群、干眼症、泪膜失调(tear film disorder)、泪液产生减少、水样泪液缺乏性干眼症(ATD)、及睑腺功能失调(MGD)。

用于治疗核酸相关眼病的组合物及方法

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请案主张 2012 年 2 月 17 日申请的美国临时专利申请案第 61/600,377 号及 2011 年 12 月 12 日申请的美国临时专利申请案第 61/569,604 号的优先权,其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表的简要说明

[0004] 本申请包括根据美国 37C. F. R § § 1.821-1.825 之序列表。所述序列表系包含于文件名称“11738468_1.txt”中(790 字节,建立于 8 月 14 日,2012 年),该序列表以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0005] 本发明关于一种用于治疗核酸相关眼病的组合物及方法。

背景技术

[0006] 眼表上皮经历连续动态更新(turnover),此是正常脱落过程的一部分。此更新在罹患各种形式核酸相关眼病(例如干眼病(dry eye disease, DED))的个体中增加。浅层角膜细胞脱落至角膜前泪膜中。角膜上皮细胞脱落过程或脱屑是由凋亡机制来调节。死亡细胞与垂死细胞释放核酸,其是一种损伤相关分子样式的分子,其可刺激先天性免疫系统并使其与适应性免疫系统相连结。例如,在角膜丝状体中已报导有胞外 DNA 链,其经常存在于 DED 患者的角膜中。角膜前泪膜中的脱屑细胞是胞外 DNA 的潜在来源。泪液含有若干种嗜中性白血球胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)组分。嗜中性白血球在眼表上经历低水平增补,且在眼表发炎期间泪膜中存在大量嗜中性白血球,此对于症状发展及扩增具有显著作用。泪液中亦经报导为有嗜中性白血球弹性蛋白酶及组蛋白。该等报导证明在泪液中存在胞外 DNA、组蛋白、嗜中性白血球、嗜中性白血球弹性蛋白酶及核酸酶且可能显示用于在泪膜中连续产生及清除胞外 DNA 所存在的机制。

[0007] 泪膜(例如眼生物膜及黏液膜)中的胞外 DNA 可在与核酸相关眼病相关联的病变中具有作用。可与眼粘液膜及/或生物膜的形成相关联的核酸相关眼病呈现潜在的失能病状,其对与视力相关的生活品质造成不利的影晌。其可导致眼部不适及/或视觉功能退化,例如阅读速度及对比敏感度。

[0008] 尽管核酸相关眼病具有高发病率,但目前尚无针对该等病状的相符的有效治疗。由于传统上认为高渗血症(hyperosmolarity)及发炎是干眼病的主要病因,因此目前治疗例如集中于使用眼睑卫生、局部抗生素、口服四环素(tetracycline)、消炎药及/或皮质类固醇。该等治疗时常无效或有效性不定。因此,需要新的治疗形态来治疗例如可由结合眼粘液膜及/或生物膜产生/形成核酸所导致的核酸相关眼病,例如 DED。

发明内容

[0009] 本文提供一种用于治疗核酸相关眼病的组合物。该等疾病可能与眼泪品质不良有

关,其可与眼睛表面上或眼睛内部的核酸生物膜 / 粘液膜形成相关。所述核酸可为胞外。此疾病的一者为干眼病 (DED)。该组合物可包含核酸酶以及眼用赋形剂。核酸酶可为去氧核糖核酸酶 (DNase) 或核糖核酸酶 (RNase) 或其组合。核酸酶可为核酸内切酶或核酸外切酶。DNase 可为去氧核糖核酸酶 I (DNase I)、去氧核糖核酸酶 II (DNase II)、去氧核糖核酸酶 III 或微球菌核酸酶。RNase 可为核糖核酸酶 A (RNase A)、核糖核酸酶 H (RNase H)、核糖核酸酶 I (RNase I)、核糖核酸酶 II (RNase II)、核糖核酸酶 III (RNase III)、核糖核酸酶 D (RNase D)、核糖核酸酶 L (RNase L)、核糖核酸酶 P (RNase P)、核糖核酸酶 PH (RNase PH)、核糖核酸酶 PhyM (RNase PhyM)、核糖核酸酶 R (RNase R)、核糖核酸酶 T (RNase T)、核糖核酸酶 T1 (RNase T1)、核糖核酸酶 T2 (RNase T2)、核糖核酸酶 U2 (RNase U2)、核糖核酸酶 V1 (RNase V1)、核糖核酸酶 V (RNase V)、寡核糖核酸酶、核糖核酸外切酶 I 或核糖核酸外切酶 II。所述 DNase 或 RNase 可为重组的。组合物可更包含拮抗剂或抑制剂。拮抗剂或抑制剂可选自由以下所组成的群组: 抗生素化合物、toll 样受体拮抗剂 (toll-like receptor antagonist)、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑制剂、MyD88 抑制剂、类固醇、抗过敏化合物、及嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂及前述的组合。

[0010] 本文亦提供一种治疗核酸酶相关眼病的方法。该方法可包括向眼睛投予有效治疗眼病的量的上述核酸酶组合物与眼用赋形剂。眼睛的眼表可含有泪膜,其可为生物膜或粘液膜。生物膜或黏液膜可含有核酸。所述核酸可为胞外核酸。所述核酸可为 DNA、RNA 或其组合。泪膜在投予组合物之前可含有小于 3.14 奈克 / 毫升的核酸酶。泪膜在投予组合物之前可含有小于 0.05 孔尼兹单位 (Kunitz unit) 的核酸酶活性。有效量的组合物可含有 5 奈克 / 毫升与 3 毫克 / 毫升之间的核酸酶。有效量的组合物可含有 100 奈克 / 毫升与 200 奈克 / 毫升之间的核酸酶。

[0011] 核酸相关眼病可为 DED、弥漫性板层角膜炎 (diffuse lamellar keratitis)、隐形眼镜相关角膜炎、眼内炎或感染性结晶状角膜病变、眼疤痕性类天疱疮 (ocular cicatricial pemphigoid, OCP)、干性角膜结膜炎 (keratoconjunctivitis sicca, KCS)、修格连氏症候群 (Sjogren syndrome, SS)、修格连氏症候群相关的干性角膜结膜炎 (Sjogren syndrome associated keratoconjunctivitis sicca)、非修格连氏症候群相关的干性角膜结膜炎 (non-Sjogren syndrome associated keratoconjunctivitis sicca)、干性角膜炎、干性症候群、干眼症、泪膜失调 (tear film disorder)、泪液产生减少、水样泪液缺乏性干眼症 (aqueous tear deficiency, ATD)、及睑腺功能失调 (meibomian gland dysfunction, MGD)。DED 例如可为自体免疫 DED 或与修格连氏症候群相关的 DED。DED 可归因于一或多种病因,包括: 衰老、使用隐形眼镜及使用药物。抗生素可为安比西林 (ampicillin)、阿莫西林 (amoxicillin) / 克拉维酸 (clavulanate)、甲硝唑 (metronidazole)、克林达霉素 (clindamycin)、红霉素 (erythromycin)、正大霉素 (gentamicin)、万古霉素 (vancomycin)、环丙沙星 (ciproflaxin)、克林达霉素、四环素、抗焦虑剂或其组合。toll 样受体拮抗剂可为包含序列 TTAGGG 的寡核苷酸。寡核苷酸可由序列 TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (SEQ ID NO:1) 组成。第一型干扰素拮抗剂可为拮抗或竞争性地抑制第 I 型干扰素与其受体 (例如受体次单元 IFNAR-1 及 / 或 IFNR-2) 结合的任何化合物。该化合物可为抗-IFN α 抗体。抗菌肽抑制剂可为细菌胞外多醣。嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂可选自由以下所组成的群组: ONO-5046、MR-889、L-694、458、CE-1037、

GW-311616TEI-8362、ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200, 880、ZD-0892 及 ZD-8321。

[0012] 本文亦提供一种判断受检者是否患有核酸酶相关眼病的方法。该方法可包括自受检者收集眼泪样本。可使此样本与结合 DNA 的染料（例如 picogreen）接触。作为另一选择，可使样本与去氧核糖核酸酶接触，且随后与染料接触。测量色彩强度并与标准对照样本中的染料荧光强度进行比较。与对照组相比，样本中的染料荧光强度水平增加可指示干眼病。

[0013] 本文亦提供一种治疗眼部细菌感染的方法。该方法包括向眼睛投予有效治疗此感染的量的包含核酸酶的组合物。组合物可经注射至眼睛中。

附图说明

[0014] 图 1 显示 DED 的生物学示意图。在受 DED 影响的眼睛的眼表上发现胞外 DNA。此胞外 DNA 可来自两种主要来源：嗜中性白血球及结膜与其他角膜细胞。嗜中性白血球胞外 DNA 形成嗜中性白血球胞外诱捕网（NET）。该等 NET 具有发炎性及血管生成性分子，例如抗菌肽、嗜中性白血球弹性蛋白酶及与其相关的组蛋白。来自结膜细胞以及 NET 中的胞外 DNA 作为「损伤相关分子样式」（damaged associated molecule patterns, DAMPs）。DAMPs 触发并维持发炎。DNA DAMPs 是通过 toll 样受体 9 (TLR9) 而增加第一型干扰素，这使得更多地出现若干种发炎介体。

[0015] 图 2 显示转移至经硅烷涂布的粘性载片上且经苏木精及伊红（eosin）染色的细胞。核及链是经苏木精染色，分别显示存在胞内及胞外 DNA，这进一步指示 NET 的存在。

[0016] 图 3 显示经用于核酸的 DAPI 染色剂染色的间接免疫荧光的共轭焦影像（63 倍）。染色剂由细胞核以及胞外 DNA 链吸收。图 3 显示存在胞外 DNA，此对于 NET 的形成而言是重要的。

[0017] 图 4 显示存在来自细胞的嗜中性白血球及链作为胞外 DNA。首先以间接免疫荧光对细胞染色。(B) 显示展现核与胞外 DNA 的胞外链样结构。随后洗涤该等细胞，并以苏木精及伊红染色以证明存在来自细胞的嗜中性白血球及链，由此证明 NET 的存在。

[0018] 图 5 显示一种共轭焦影像，藉此针对嗜中性白血球弹性蛋白酶、组蛋白及 DAPI 的一级抗体对细胞进行间接免疫荧光检查。为嗜中性白血球弹性蛋白酶染色的颗粒与组蛋白及核酸具有共同定位。

[0019] 图 6 显示眼表上存在 NET (A)。在以去氧核糖核酸酶处理后，链状胞外 DNA 消失，但仍维持细胞完整性 (B)。自同一受检者收集二种样本 (A) 与 (B)。将样本 A 以 PBS 处理 20 分钟，随后以 DAPI 染色。将样本 B 以去氧核糖核酸酶（100 国际单位 / 毫升 (IU/ 毫升)）处理 20 分钟，随后以 DAPI 染色。

[0020] 图 7 显示证明眼表上存在 NET 并使其自黏液分化。以 DAPI 染色来自结膜表面的粘液检体。对核进行染色；但不染色黏液。

[0021] 图 8 进一步证明存在来自获得图 7 中的检体的同一受检者的粘液。以希夫过碘酸 (Periodic Acid Schiff, PAS) 对检体染色。染色显示存在粘液链。

[0022] 图 9 显示在误差柱中的标准偏差下，干眼（席尔默测试 (Schirmer's Test) <5) 与正常眼泪产生（席尔默测试 >5) 相比之图。干眼病中胞外 DNA 的光学密度与正常眼泪产生相比存在显著差异。干眼中的光学密度 (17834.14) 大于正常眼泪产生中的光学密度

(12609.86)。因此,在干眼病中,由席尔默滤纸获得的胞外 DNA 的量与正常眼泪产生时的席尔默量相比而言较大。

[0023] 图 10 显示与具有正常眼泪产生的人类(无干眼)相比,在具有严重干眼细胞的人类中与干扰素 α 1、干扰素 β 、TLR-9 及 Myd88 基因的含量相关的定量即时 PCR 数据。该等基因的含量在具有干眼及眼泪缺乏的患者的结膜中增加数倍。该等途径(TLR-9 及 Myd88)受胞外 DNA 刺激,因此提供支持胞外 DNA 刺激眼表发炎的受体及转录资料。下游发炎介体(干扰素 α 及 β)在干眼患者中亦增加。

[0024] 图 11 显示来自席尔默试条压印的材料。(A1、A2):使用席尔默试条(A1,箭头)及经硅烷涂布的玻璃载片(A2)的压印细胞学方法。(B):H&E 染色显示脱落的表面细胞。(C):在 DAPI 染色结膜压印材料后的宽视场荧光显微镜影像展现正常受检者(C1)中的短且稀疏的胞外 DNA (eDNA)链(箭头)与 DED 患者(箭头)中的多个长 eDNA 链(C2)。(D):在 DAPI 染色后的共轭焦免疫荧光影像显示多个链(箭头)及具有多叶核的嗜中性白血球。(E):共轭焦免疫荧光染色影像显示组蛋白(E1,绿色)、嗜中性白血球弹性蛋白酶(E2,红色)及 eDNA(E3,蓝色)是 NET 的分子组分(E4,叠加)。箭头指示 NET 链。E2 中的插图显示具有经 DAPI 染色的多叶形细胞核(multilobed nucleus)的嗜中性白血球。比例尺:B、C1、C2 及 D(50 微米);E1 及 E2 插图(10 微米)。

[0025] 图 12 显示粘液膜中的 eDNA 及嗜中性白血球胞外诱捕网(NET)。(A):患有严重眼泪缺乏 DED 的患者眼睛的临床相片。箭头指示角膜与球结膜(A1)及下穹窿(A2)上的黏液膜。插图显示粘液膜的放大图。(B):粘液膜的细胞学检查。(B1):H&E 染色显示表面上皮细胞及多个嗜中性白血球。(B2):DAPI 染色显示存在 eDNA 链(箭头)及嗜中性白血球的多叶核。(B3):嗜中性白血球弹性蛋白酶免疫染色(红色)证明存在嗜中性白血球。(C):共轭焦免疫荧光染色影像显示嗜中性白血球弹性蛋白酶(C1,红色)、组蛋白(C2,绿色)及 eDNA(C3,蓝色)是 NET 的分子组分(C4,叠加)。箭头指示 NET 链。(D):进行激光捕获显微剖检(Laser capture microdissection,LCM)以捕获经 DAPI 染色的链,从而证明其中存在 DNA。在 D1 中,箭头指示 eDNA 链。在 D2 中,星号占据链中 LCM 后的区域。(03):eDNA 链分道中的 GAPDH PCR 产物证明存在 DNA 物质。比例尺:B1、B2 及 B3(20 微米);C、D1 及 D2(50 微米)。

[0026] 图 13 显示嗜中性白血球(A1-A4):在黏液膜(A1,箭头)及 eDNA 链(A1,箭头)中存在抗菌肽(绿色)。抗菌肽与嗜中性白血球弹性蛋白酶(A2,红色)及 DAPI 核染色剂(A3,蓝色)具有共同定位。(B1-B4):嗜中性白血球(B1,箭头)中存在抗菌肽(绿色)且其与嗜中性白血球弹性蛋白酶(B2,红色)及 DAPI(B3,蓝色)具有共同定位。(C1-C4):抗菌肽(C1,箭头)及经 DAPI 染色的核物质(C3,箭头)自嗜中性白血球挤出形成 NET。比例尺:10 微米。

[0027] 图 14 显示 DED 患者与对照物中的基因表现。(A):使用席尔默 I 测试的测量的平均水样泪液的产量在 DED 患者中显著较低。(B):将席尔默条压印于玻璃载片上后,测量 eDNA 的长度。eDNA 的长度在 DED 患者中显著较大。(C):使用 Picogreen 检定测量席尔默条上的 eDNA 的量。DED 患者具有显著较大的 eDNA 的量。(D):eDNA 信号转导途径中的基因在来自 DED 患者的脱落结膜细胞中显著过度表现。(E):发炎基因表现在 DED 患者中亦显著增加。 $*p<0.05$ 。

[0028] 图 15 显示泪液 (A1-A6) 中存在核酸酶及去氧核糖核酸酶 I:免疫荧光显微镜影像显示人类泪腺中的去氧核糖核酸酶 1(A1-A3, 红色)。通过肽竞争 (peptide competition) (A4-A6) 及同型对照染色 (isotype control staining) (未显示) 证明染色的特异性。(B): 正常受检者眼泪中的核酸酶活性。去氧核糖核酸酶 I ELISA 显示其在正常泪液中的浓度为 3.14 奈克 / 毫升。在去氧核糖核酸酶检测套组 (DNase Detection Kit) 中, 正常眼泪完全降解 DNA (眼泪分道)。因此, 泪液核酸酶活性大于 0.05 孔尼兹单位。(C): 使用 FRET 检定定量眼泪中的核酸酶活性。对比 DED 患者 (蓝色) 与健康个体 (绿色) 中的核酸酶活性的代表图显示 DED 患者中的核酸酶活性降低。(D): DED 患者中的核酸酶活性与健康个体相比显著较低。* $p < 0.05$, 比例尺: 20 米。

[0029] 图 16 显示涂于细菌培养盘上的粘液膜。患有严重泪液缺乏干眼病的患者的眼表上可具有粘液膜。使用无菌 eSwab 自眼表提起黏液膜。观测革兰氏阳性球菌 (Gram positive cocci) 的生长, 将其鉴别为凝固酶阴性葡萄球菌物种。(A) 血液琼脂培养盘显示钉头细菌群落。(B) 对来自培养群落的涂片进行背光活 / 死染色显示活球菌 (绿色) 与死球菌 (红色) 混杂。该等实验证明在干眼患者的眼表上的粘液膜中存在细菌。

具体实施方式

[0030] 本发明者惊人地发现, 在存在或不存在抗生素的情形下, 可通过核酸酶以及眼用赋形剂来治疗核酸相关眼病, 例如 DED 及 DED 相关病状。此发现的中心在于在患有核酸相关眼病 (例如 DED) 的受检者的眼表面上存在嗜中性白血球胞外诱捕网 (NET)。NET 是由染色质 (其包括核酸, 例如 DNA)、嗜中性白血球弹性蛋白酶、组蛋白及颗粒蛋白组成的胞外结构。NET 可提供抗微生物活性的局部浓度, 且因此在发炎位点是普遍的。

[0031] 1. 定义

[0032] 本文所用的术语仅为描述特定实施例的目的且不欲具限制性。如说明书及随附的申请专利范围中所用, 除非上下文另外明确指示, 否则单数形式的「一」及「该」是指包括复数个提及物。

[0033] a. 对照

[0034] 本文所用的「对照」可意谓已知未患有干眼病或未受细菌感染的组合物或样本 (阴性对照)。阳性对照可意谓患有核酸相关眼病或受细菌感染的样本。任何对照均可包含已知量的胞外 DNA。

[0035] 为详述本文的数字范围, 明确涵盖其间具有相同精确度的每个中介数字。举例言之, 对于 6 至 9 的范围而言, 除 6 与 9 之外涵盖数字 7 与 8, 且对于范围 6.0 至 7.0 而言, 明确涵盖数字 6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 及 7.0。

[0036] 2. 基于核酸酶的组合物

[0037] 本文提供一种基于核酸酶的组合物 (“核酸酶组合物”), 其能够自眼睛表面或眼睛内部移除核酸。核酸可为胞外的。核酸酶组合物可含有一或多种核酸酶。核酸酶可为去氧核糖核酸酶或核糖核酸酶。核酸酶组合物也可含有眼用赋形剂。核酸酶组合物可更含有一或多种抗生素化合物、抗病毒化合物、消炎剂、 to11 样受体拮抗剂、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑制剂、MyD88 抑制剂、类固醇、抗过敏化合物及 / 或嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂。作为另一选择, 核酸酶组合物可不含抗生素化合物、抗病毒化合物、消炎剂、 to11 样受

体拮抗剂、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑制剂及 / 或嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂中的任一者,而是以与抗生素化合物、toll 样受体拮抗剂、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑制剂及 / 或嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂中一或多者的组合形式来使用。

[0038] 可在使用之前适当地调节核酸酶组合物的 pH 及 / 或容积渗透浓度。核酸酶组合物的 pH 可在 4 与 9 之间、5 与 8 之间、6 与 7 之间或 6.5 与 7.5 之间。核酸酶组合物的 pH 可为 4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.9 或 9.0。核酸酶的 pH 可为 7.4。

[0039] 核酸酶组合物的容积渗透浓度可为低渗透浓度或等张渗透浓度。举例言之,去氧核糖核酸酶组合物可具有介于 100 毫渗透压莫耳 / 升与 500 毫渗透压莫耳 (mOsm) / 升之间、150 毫渗透压莫耳 / 升与 450 毫渗透压莫耳 / 升之间、200 毫渗透压莫耳 / 升与 400 毫渗透压莫耳 / 升之间、250 毫渗透压莫耳 / 升与 350 毫渗透压莫耳 / 升之间、275 毫渗透压莫耳 / 升与 325 毫渗透压莫耳 / 升之间、100 毫渗透压莫耳 / 升与 150 毫渗透压莫耳 / 升之间、150 毫渗透压莫耳 / 升与 200 毫渗透压莫耳 / 升之间、150 毫渗透压莫耳 / 升与 300 毫渗透压莫耳 / 升之间、200 毫渗透压莫耳 / 升与 300 毫渗透压莫耳 / 升之间、0 毫渗透压莫耳 / 升与 100 毫渗透压莫耳 / 升之间、25 毫渗透压莫耳 / 升与 75 毫渗透压莫耳 / 升之间、50 毫渗透压莫耳 / 升与 125 毫渗透压莫耳 / 升之间或 0 毫渗透压莫耳 / 升与 50 毫渗透压莫耳 / 升之间的容积渗透浓度。

[0040] a. 核酸酶

[0041] 本发明所涵盖的核酸酶是包括去氧核糖核酸酶及核糖核酸酶。

[0042] 去氧核糖核酸酶可为催化 DNA 主链中的磷酸二酯键水解裂解的任何酶。此酶的一者为去氧核糖核酸酶。去氧核糖核酸酶的例子包括 (但不限于):去氧核糖核酸酶 I (DNase I)、去氧核糖核酸酶 II (DNase II) 及微球菌核酸酶。去氧核糖核酸酶可为重组人类去氧核糖核酸酶或动物来源形式 (例如,牛) 或微生物来源形式。重组 DNase I 可为去氧核糖核酸酶 α , 其可以商标名称 **PULMOZYME[®]** 购自 Genentech, Inc。去氧核糖核酸酶变体可通过例如移除信号肽、突变受质结合位点或氨基酸取代来改变其遗传组成以产生过度活跃变体或更稳定变体而产生。举例言之,可组合或单独使用 DNase II 或其变体 DNase 样 I、II 或 III。

[0043] 核糖核酸酶可为催化 RNA 主链中的磷酸二酯键水解裂解的任何酶。一种此酶为核糖核酸酶。核糖核酸酶的例子包括 (但不限于):核糖核酸酶 A (RNase A)、核糖核酸酶 H (RNase H)、核糖核酸酶 I (RNase I)、核糖核酸酶 II (RNase II)、核糖核酸酶 III (RNase III)、核糖核酸酶 D (RNase D)、核糖核酸酶 L (RNase L)、核糖核酸酶 P (RNase P)、核糖核酸酶 PH (RNase PH)、核糖核酸酶 PhyM (RNase PhyM)、核糖核酸酶 R (RNase R)、核糖核酸酶 T (RNase T)、核糖核酸酶 T1 (RNase T1)、核糖核酸酶 T2 (RNase T2)、核糖核酸酶 U2 (RNase U2)、核糖核酸酶 V1 (RNase V1)、核糖核酸酶 V (RNase V)、寡核糖核酸酶、核糖核酸外切酶 I 及核糖核酸外切酶 II。核糖核酸酶可为重组人类核糖核酸酶或动物或微生物来源形式 (例如,牛)。核糖核酸酶变体可通过例如移除信号肽、突变受质结合位点或氨基酸取代来改变其遗传组成以产生过度活跃变体或更稳定变体而产生。

[0044] 核酸酶可仅裂解核酸分子末端的残基 (去氧核糖核酸外切酶或核糖核酸外切酶,

核酸外切酶的类型)。核酸酶可为核酸内切酶,其可单独使用或与另一种核酸酶组合使用。核酸内切酶的例子为脂质运载蛋白及 RNase A。核酸酶可沿链在任何位置裂解(去氧核糖核酸内切酶或核糖核酸内切酶,核酸内切酶的子集)。核酸酶关于其切割的 DNA 序列可不加区别。核酸酶可具序列特异性。核酸酶可仅裂解双链核酸、仅裂解单链核酸,或裂解双链与单链核酸二者。

[0045] 核酸酶剂量可由医生例如不经过度实验而确定。倘若存在任何相反适应症、耐受性或类似病状,则可调整剂量。熟习此项技术者可容易地评估该等因素,且基于此资讯来确定欲如本文所述使用的核酸酶的特定有效浓度。核酸酶存在于核酸酶组合物中的量可介于 5 奈克/毫升与 3 毫克/毫升之间、1 毫克/毫升与 3 毫克/毫升之间、2 毫克/毫升与 3 毫克/毫升之间、10 奈克/毫升与 900 奈克/毫升之间、20 奈克/毫升与 800 奈克/毫升之间、30 奈克/毫升与 700 奈克/毫升之间、40 奈克/毫升与 600 奈克/毫升之间、50 奈克/毫升与 600 奈克/毫升之间、60 奈克/毫升与 500 奈克/毫升之间、70 奈克/毫升与 400 奈克/毫升之间、80 奈克/毫升与 300 奈克/毫升之间、90 奈克/毫升与 200 奈克/毫升之间、50 奈克/毫升与 250 奈克/毫升之间、100 奈克/毫升与 200 奈克/毫升之间、150 奈克/毫升与 250 奈克/毫升之间、100 奈克/毫升与 150 奈克/毫升之间或 90 奈克/毫升与 100 奈克/毫升之间。核酸酶存在于核酸酶组合物中的量可为 10 奈克/毫升、20 奈克/毫升、30 奈克/毫升、40 奈克/毫升、50 奈克/毫升、60 奈克/毫升、70 奈克/毫升、80 奈克/毫升、90 奈克/毫升、100 奈克/毫升、110 奈克/毫升、150 奈克/毫升、200 奈克/毫升、250 奈克/毫升、300 奈克/毫升、350 奈克/毫升、400 奈克/毫升、450 奈克/毫升、500 奈克/毫升、550 奈克/毫升、600 奈克/毫升、650 奈克/毫升、700 奈克/毫升、750 奈克/毫升、800 奈克/毫升、850 奈克/毫升、900 奈克/毫升、950 奈克/毫升、1 毫克/毫升、2 毫克/毫升或 3 毫克/毫升。如本文中更详细描述,组合物可以合适剂型(例如,滴眼剂)经手动传递至眼睛,或借助通常提供定量药物的合适微滴或喷雾装置来传递。

[0046] (1) 眼用赋形剂

[0047] 所述眼用赋形剂可为任何眼用赋形剂。眼用赋形剂可为缓冲剂、张力调节剂、湿润剂及/或抗氧化剂。缓冲剂可为硼酸及/或磷酸。缓冲剂可使核酸酶组合物的 pH 变化最小化。张力调节剂可提供等张环境且可包括氯化钠、氯化钾、氯化镁及/或硼酸。抗氧化剂例如包括偏亚硫酸氢钠及 EDTA。抗氧化剂可用于辅助稳定核酸酶组合物。湿润剂(其包括聚乙烯醇(PVA)及聚山梨醇酯 80)使得核酸酶组合物可展布于眼睛上。其他眼用赋形剂包括苯扎氯铵(BAK)、乙二胺四乙酸(EDTA)、碳酸钠(purite)、氯丁醇、过硼酸钠及山梨酸、过硼酸钠、碳酸钠、多元醇、甘油、聚山梨醇酯 80、葡聚糖 70、丙二醇及聚乙二醇(例如 PEG-400)。眼用赋形剂可为软膏,例如矿物油、白石蜡脂、白软膏或羊毛脂。类似于水性媒剂,石蜡脂及矿物油可充当软膏调配物中的媒剂以增加眼部接触时间。该等成分可有助于在眼球表面上形成一闭塞性膜且通过增强粘液素及水性层来改良泪膜的组成。眼用赋形剂可提供粘液素样特性及/或减少由于蒸发而损失水性层。眼用赋形剂可充当载剂,例如如下文所述的医药学上可接受的载剂。

[0048] (2) 抗生素

[0049] 所述抗生素可为任何抗生素。抗生素可为安比西林、阿莫西林/克拉维酸、甲硝唑、克林达霉素、红霉素、正大霉素、万古霉素、环丙沙星、克林达霉素、四环素、抗焦虑剂、阿米

卡星 (amikacin)、卡那霉素 (kanamycin)、新霉素 (neomycin)、奈替米星 (netilmicin)、链霉素 (streptomycin)、托普霉素 (tobramycin)、替考拉宁 (teicoplanin)、万古霉素、阿奇霉素 (azithromycin)、克拉霉素 (clarithromycin)、克拉霉素 (clarithromycin)、地红霉素 (dirithromycin)、红霉素、罗红霉素 (roxithromycin)、醋竹桃霉素 (troleandomycin)、阿莫西林、安比西林、阿洛西林 (azlocillin)、羧苄西林 (carbenicillin)、氯扎西林 (cloxacillin)、双氯西林 (dicloxacillin)、氟氯西林 (flucozxacillin)、美洛西林 (mezlocillin)、萘夫西林 (nafcillin)、盘尼西林 (penicillin)、呱拉西林 (piperacillin)、替卡西林 (ticarcillin)、杆菌肽 (bacitracin)、黏杆菌素 (colistin)、多黏菌素 B (polymyxin B)、环丙沙星 (ciprofloxacin)、依诺沙星 (enoxacin)、加替沙星 (gatifloxacin)、左氧氟沙星 (levofloxacin)、洛美沙星 (lomefloxacin)、莫西沙星 (moxifloxacin)、诺氟沙星 (norfloxacin)、氧氟沙星 (ofloxacin)、曲伐沙星 (trovafloxacin)、磺胺米隆 (mafenide)、乙酰磺胺 (sulfacetamide)、磺胺甲二唑 (sulfamethizole)、柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine)、磺胺异恶唑 (sulfisoxazole)、三甲氧苄二氨嘧啶 (trimethoprim)、磺胺甲基异恶唑 (cotrimoxazole)、地美环素 (demeclocycline)、强力霉素 (soxycycline)、二甲胺四环素 (minocycline)、多西环素 (doxycycline) 或氧四环素 (oxytetracycline)。所述抗生素可为一眼科上可接受的抗生素。

[0050] (3) 抗病毒物

[0051] 所述抗病毒化合物可为任何抗病毒物。抗病毒化合物可为阿巴卡韦 (abacavir)、阿昔洛韦 (acyclovir)、阿德福韦 (adefovir)、金刚烷胺 (amantadine)、安普那韦 (amprenavir)、安普利近 (ampligen)、阿比朵尔 (arbidol)、阿扎那韦 (atazanavir)、阿曲派拉 (atrilpa)、波西普韦 (boceprevir)、西多福韦 (cidofovir)、地瑞纳韦 (darunavir)、地拉夫定 (delavirdine)、地达诺新 (didanosine)、二十二醇 (docosanol)、依度尿苷 (edoxudine)、依法韦仑 (efavirenz)、恩曲他滨 (emtricitabine)、恩夫韦地 (enfuvirtide)、恩替卡韦 (entecavir)、泛昔洛韦 (famcyclovir)、福米韦生 (fomivirsen)、福沙那韦 (fosamprenavir)、更昔洛韦 (gancyclovir)、伊巴他滨 (ibacitabine)、伊木那韦 (imunovir)、碘苷 (idoxuridine)、咪喹莫特 (imiquimod)、茚地那韦 (indinavir)、拉米夫定 (lamivudine)、洛匹那韦 (lopinavir)、洛韦胺 (loviride)、马拉韦罗 (maraviroc)、吗啉胍 (moroxydine)、喷昔洛韦 (pencyclovir)、呱雷米韦 (peremivir)、普可那利 (pleconaril)、利巴韦林 (ribavirin)、利托那韦 (ritonavir)、沙奎那韦 (saquinavir)、特拉匹韦 (telaprevir)、替诺福韦 (tenofovir)、特鲁瓦达 (truvada)、伐昔洛韦 (valacyclovir)、缬更昔洛韦 (valgancyclovir) 或扎那米韦 (zanamivir)。所述抗病毒物可为一眼科上可接受的抗病毒物。

[0052] (4) 消炎药

[0053] 所述消炎药可为非类固醇或类固醇消炎药。消炎药可为环孢灵 (cyclosporine) 或环孢灵 A。环孢灵 A 可为 0.05% 浓度的环孢灵 A (例如, **RESTASIS**[®])。所述消炎药可为一眼科上可接受的消炎药。

[0054] (5) Toll 样受体-9 拮抗剂

[0055] 所述 Toll 样受体 9 (TLR9) 可识别区别微生物 DNA 与哺乳动物 DNA 的特异性未甲基

化 CpG 寡核苷酸 (ODN) 序列。tol1 样受体拮抗剂可为可中和 CpGODN 的刺激作用的任何寡核苷酸。该等寡核苷酸可由 C 或 A 的三个连续 G 下游来表征。此外,添加第四个 G (G-四分体) 可增加 ODN 的抑制能力。最有效的抑制序列为含有 TTAGGG 的序列,例如 (TTAGGG)₄ (SEQ ID NO:1)。例如参见图 1。拮抗剂寡核苷酸可通过例如在内体小泡中干扰 CpG ODN 与 TLR9 的共同定位来起作用。所述 tol1 样受体-9 拮抗剂可为一眼科上可接受的 tol1 样受体-9 拮抗剂。

[0056] (6) 第一型干扰素拮抗剂

[0057] 所述第一型干扰素是对病毒感染及某些胞内寄生虫的防御反应的一部分。同时,该等蛋白具有针对某些病毒疾病、肿瘤及多发性硬化症的治疗用途。在某些疾病状态中可不当地产生第一型干扰素。

[0058] 第一型干扰素拮抗剂可为拮抗或竞争性地抑制第 I 型干扰素的任何化合物。该化合物例如可为抗-干扰素 α 抗体。该化合物可拮抗或抑制结合其受体的第一型干扰素。该化合物可拮抗或抑制结合其受体次单元 (IFNAE-1 或 IFNR-2) 的第一型干扰素。拮抗剂或竞争性抑制剂可阻断原生干扰素的生物学活性。所述第一型干扰素拮抗剂可为一眼科上可接受的第一型干扰素拮抗剂。

[0059] (7) 抗菌肽抑制剂

[0060] 所述抗菌肽抑制剂可为能够阻断或减小抗菌肽的生物学活性的任何抑制剂,其可稳定眼睛眼表上的胞外 DNA。抗菌肽抑制剂的例子为细菌胞外多醣。所述抗菌肽抑制剂可为一眼科上可接受的抗菌肽抑制剂。

[0061] (8) MyD88 抑制剂

[0062] 所述 MyD88 抑制剂可为可抑制或减小 MyD88 的生物学活性或表现的任何化合物。MyD88 抑制剂可为抑制 MyD88 均二聚作用的肽或小分子,例如 ST2825 (Sigma Tau, 波梅齐亚, 意大利)、合成寡肽 IMG2205 (Imgenex Corporation, 圣地亚哥, 加利福尼亚州) 及 / 或 MyD88 抑制肽 (MIP)。MyD88 抑制剂可抑制 MyD88 结合信号转导搭配物。所述 MyD88 抑制剂可为一显性阴性 MyD88 蛋白。所述 MyD88 抑制剂可为一抑制 MyD88 表现的反义 siRNA 或 shRNA 分子。

[0063] (9) 嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂

[0064] 所述嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂可为可抑制或减小嗜中性白血球弹性蛋白酶的生物学活性的任何化合物,其是在发炎期间由嗜中性白血球所分泌的丝胺酸蛋白酶。举例言之,所述抑制剂可为合成的、天然的、可逆的或不可逆的。举例言之,所述嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂可为 ONO-5046、MR-889、L-694, 458、CE-1037、GW-311616 或 TEI-8362。所述嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂可为 ONO-6818、AE-3763、FK-706、ICI-200, 880、ZD-0892 或 ZD-8321。参见例如调研药物专家评论 (Expert Opinion on Investigational Drugs), 2002 年 7 月, 第 11 卷, 第 7 期: 第 965-980 页 (作为 COPD 的治疗的嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂, Hiroyuki Ohbayashi)。所述嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂可为一眼科上可接受的嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂。

[0065] b. 医药学上可接受的载剂

[0066] 核酸酶化合物可并入适合授予受检者 (例如患者, 可为人类或非人类) 的医药组合物中。核酸酶组合物通常包含适合眼科传递的医药学上可接受的载剂。熟习此项技术者

已知合适的药用载体且所有该等现有载体均可用于本发明中。可用于促进且加速局部组合物经皮传递至眼睛或附件组织中的合适的载体包括（但不限于）醇（乙醇、丙醇及壬醇）、脂肪醇（月桂醇）、脂肪酸（戊酸、己酸及癸酸）、脂肪酸酯（肉豆蔻酸异丙酯及正己酸异丙酯）、烷基酯（乙酸乙酯及乙酸丁酯）、多元醇（丙二醇、丙二酮及己三醇）、亚砷（二甲亚砷及癸基甲基亚砷）、酰胺（脲、二甲基乙酰胺及吡咯啉酮衍生物）、界面活性剂（月桂基硫酸钠、鲸蜡基三甲基溴化铵、泊洛沙姆（polaxamer）、司盘类（spans）、吐温类（tweens）、胆盐及卵磷脂）、萜烯（d- 柠檬烯、 α - 萜品醇、1,8- 桉醚及薄荷酮）及烷酮（N- 庚烷及 N- 壬烷）。此外，经局部投予的组合物包含表面粘附性分子调节剂，其包括（但不限于）钙黏蛋白拮抗剂、选择素拮抗剂及整合素拮抗剂。组合物视情况更含有选自以下所组成的群组的化合物：生理学上可接受的盐、泊洛沙姆（poloxamer）类似物与卡波普（carbopol）、卡波普 / 羟丙基甲基纤维素（HPMC）、卡波普 - 甲基纤维素、羧甲基纤维素（CMC）、玻尿酸、环糊精及石油。此外，经局部投予的组合物可包含表面粘附性分子调节剂，其包括（但不限于）钙黏蛋白拮抗剂、选择素拮抗剂及整合素拮抗剂。因此，特定载体可采用无菌药用软膏、乳霜、凝胶、溶液或分散液的形式。合适的药用载体亦包括缓释聚合物（例如，“Ocusert”聚合物、“Hydron”聚合物等）。

[0067] 亦可使用稳定剂，例如螯合剂，例如 EDTA。也可使用抗氧化剂，例如亚硫酸氢钠、硫代亚硫酸钠、8- 羟基喹啉或抗坏血酸。对于水性调配物而言，通常将由现有药用防腐剂来维持无菌性，例如氯丁醇（chlorbutanol）、苯扎氯铵、鲸蜡基氯化吡啶、苯基汞盐、硫柳汞等，且以无毒且一般在水溶液重量的约 0.001 至约 0.1% 之间变化的量来使用。用于软膏的现有防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯。典型软膏基质包括白石蜡脂及矿物油或液体石蜡脂。然而，经防腐的水性载体更佳。溶液可以合适剂型（例如，滴眼剂）经手动传递至眼睛，或借助通常提供定量药物的合适微滴或喷雾装置来传递。合适药用载体的例子包括含有微量（亦即，小于约 5 重量%）羟丙基甲基纤维素、聚乙烯醇、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、甘油及 EDTA 的无菌、实质上等张的水溶液。溶液更佳是维持在实质上中性的 pH，且与适当量的现有缓冲剂（例如，磷酸盐、硼酸盐、乙酸盐、三羟甲基氨基甲烷（tris））等张。

[0068] 医药学上可接受的药用载体可更包含大量辅助物质，例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂，其可增强核酸酶、抗生素化合物、抗病毒化合物、toll 样受体拮抗剂、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑制剂及 / 或嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂的存放期或有效性。

[0069] 有多种传递系统为已知且可用于投予本文所述的适用于治疗或缓解核酸相关眼病或其一或多种症状的组合物，例如囊封于脂质体、微粒、微囊中。可通过注射投予组合物。举例言之，可将组合物注射至眼睛中。核酸酶组合物可为液体滴眼剂、凝胶或软膏形式，其可直接涂覆至受影响眼睛的眼表。滴剂、凝胶或软膏可根据医生说明及 / 或根据剂量推荐来涂覆。举例言之，一滴含有 100 奈克 / 毫升与 200 奈克 / 毫升之间核酸酶的组合物可每天投予 1 至 10 次、每天投予 1 至 7 次、每天投予 1 至 4 次或每天投予 1 至 3 次。

[0070] 本文所述的核酸酶组合物可通过隐形眼镜而传递至眼睛。举例言之，可将组合物并入镜片或涂布于镜片上。组合物是由隐形眼镜聚合物化学结合或物理包埋（entrapped）。作为另一选择，由以与治疗性药物组合物相同速率释放的聚合物组合物化学结合或物理包埋着色添加剂，从而使该着色添加剂的强度变化指示保持结合或包埋于聚合

物内的治疗性药物组合物的量或剂量变化。作为另一选择,或着额外地,于隐形眼镜聚合物中化学结合或物理包埋紫外线(UV)吸附剂。所述隐形眼镜是疏水性或亲水性的。

[0071] 用于促进疏水性镜片传递本发明组合物的例示性物质包括(但不限于)阿美福康A(amefocon A)、阿昔福康A(amsilfocon A)、尔奎那福康A(aquilafocon A)、阿福康A(arfocon A)、开布福康A(cabufucocon A)、开布福康B(cabufucocon B)、卡布昔福康A(carbosilfocon A)、奎福康A(crilfocon A)、奎福康B(crilfocon B)、地美福康A(dimefocon A)、因伏福康A(enflucocon A)、因伏落福康B(enflofocon B)、艾瑞福康A(erifocon A)、伏欧落福康A(fluorofucocon A)、伏昔福康A(flusilfocon A)、伏昔福康B(flusilfocon B)、伏昔福康C(flusilfocon C)、伏昔福康D(flusilfocon D)、伏昔福康E(flusilfocon E)、黑沙福康A(hexafocon A)、后佛福康A(hofocon A)、亥布福康A(hybufocon A)、依他必思伏欧落福康A(itabisfluorofucocon A)、依他伏欧落福康A(itafluorofucocon A)、依他福康A(itafocon A)、依他福康B(itafocon B)、可福康A(kolfocon A)、可福康B(kolfocon B)、可福康C(kolfocon C)、可福康D(kolfocon D)、落提福康A(lotifocon A)、落提福康B(lotifocon B)、落提福康C(lotifocon C)、美拉福康A(melafocon A)、米嘎福康A(migafocon A)、奈福康A(nefocon A)、奈福康B(nefocon B)、奈福康C(nefocon C)、央昔福康A(onsifocon A)、欧匹福康A(oprifucocon A)、歐可喜伏福康A(oxyflufucocon A)、帕伏福康B(paflucocon B)、帕伏福康C(paflucocon C)、帕伏福康D(paflucocon D)、帕伏福康E(paflucocon E)、帕伏福康F(paflucocon F)、帕昔福康A(pasifocon A)、帕昔福康B(pasifocon B)、帕昔福康C(pasifocon C)、帕昔福康D(pasifocon D)、帕昔福康E(pasifocon E)、配迷福康A(pemufucocon A)、包罗福康A(porofucocon A)、包罗福康B(porofucocon B)、落伏福康A(roflucocon A)、落伏福康B(roflucocon B)、落伏福康C(roflucocon C)、落伏福康D(roflucocon D)、落伏福康E(roflucocon E)、落昔福康A(rosilfocon A)、沙他福康A(satafocon A)、昔伏福康A(siflufucocon A)、西拉福康A(silafocon A)、丝特若福康A(sterafocon A)、苏洛福康A(sulfocon A)、苏洛福康B(sulfocon B)、特拉福康A(telafocon A)、替昔福康A(tisilfocon A)、妥洛福康A(tolofucocon A)、催福康A(trifocon A)、乌尼福康A(unifocon A)、维纳福康A(vinafocon A)及威洛福康A(wilofucocon A)。

[0072] 用于促进亲水性眼镜传递本发明组合物的例示性物质包括(但不限于)阿巴菲康A(abafilcon A)、阿考菲康A(acofilcon A)、阿考菲康B(acofilcon B)、艾克库菲康A(acquafilcon A)、阿洛菲康A(alofilcon A)、阿尔法菲康A(alphafilcon A)、阿姆菲康A(amfilcon A)、阿替菲康A(astifilcon A)、阿拉菲康A(atlafilcon A)、巴拉菲康A(balafilcon A)、必思菲康A(bisfilcon A)、巴菲康A(bufilecon A)、库菲康A(comfilcon A)、克罗菲康A(crofilecon A)、环菲康A(cyclofilecon A)、达菲康A(darfilecon A)、德他菲康A(deltafilecon A)、德他菲康B(deltafilecon B)、地莫费尔康A(dimefilecon A)、卓克斯菲康A(droxfilecon A)、依拉菲康A(elastofilcon A)、依匹昔菲康A(epsilfilecon A)、艾司菲康A(esterifilcon A)、爱他非尔康A(etafilcon A)、福可菲康A(focofilcon A)、咖弗康A(galyfilecon A)、珍菲康A(genfilecon A)、戈伐菲康A(govafilcon A)、海菲康A(hefilecon A)、海菲康B(hefilecon B)、海菲康C(hefilecon C)、海拉菲康A(hilafilcon A)、海拉菲康B(hilafilcon B)、海西菲康A(hioxifilcon A)、海西菲康B(hioxifilcon B)、海

西菲康 C(hioxifilcon C)、氢菲康 A(hydrofilcon A)、利诺菲康 A(lenefilcon A)、利克菲康 A(licryfilcon A)、利克菲康 B(licryfilcon B)、利多菲康 A(lidofilcon A)、利多菲康 B(lidofilcon B)、若他拉菲康 A(lotrafilcon A)、若他拉菲康 B(lotrafilcon B)、马菲康 A(mafilcon A)、马沙菲康 A(mesafilcon A)、美他菲康 B(methafilcon B)、米帕菲康 A(mipafilcon A)、奈弗康 A(nefilcon A)、奈曲福康 A(netrafilcon A)、奥库菲康 A(ocufilcon A)、奥库菲康 B、C(ocufilcon B、C)、奥库菲康 D(ocufilcon D)、奥库菲康 E(ocufilcon E)、奥菲康 A(ofilcon A)、奥马菲康 A(omafilcon A)、奥昔菲康 A(oxyfilcon A)、喷他菲康 A(pentafilcon A)、波菲尔康 A(perfilcon A)、哌菲康 A(pevafilcon A)、菲莫菲尔康 A(phemfilcon A)、聚麦康 (polymacon)、斯弗康 A(senofilcon A)、西拉费尔康 (silafilcon A)、西欧可喜菲康 (siloxifyfilcon A)、舒菲康 A(surfilcon A)、替菲康 A(tefilcon A)、他爪菲康 A(tetrafilcon A)、催菲康 A(trilfilcon A)、维菲康 A(vifilcon A)、维菲康 B(vifilcon B) 及赛洛菲康 A(xylofilcon A)。

[0073] 组合物可以固体、糊剂、软膏、凝胶、液体、气雾剂、薄雾、聚合物、薄膜、乳液或悬浮液的形式授予。此外,组合物可并入或涂布于隐形眼镜或药物传递装置上,由此可自眼镜或装置扩散一或多个分子或以暂时受控的方式释放一或多个分子。隐形眼镜组合物可保留于眼表上,例如若视力矫正需要镜片时,或者隐形眼镜是随时间而溶解,同时向紧密并置的组织中释放组合物。类似地,所述药物传递装置是在各种实施态样中视情况为生物可降解或是永久性的。

[0074] 具体而言,一或多种核酸酶组合物例如可封装于气密性密封的容器中,例如指示核酸酶的量的安瓿或扁囊剂。在一实施例中,一或多种核酸酶组合物以在气密性密封容器中的干燥杀菌冻干粉末或无水浓缩物形式供应且可复原(例如,以水或盐水)至适当浓度以用于向受检者投药。在一实施态样中,一或多种组合物是以在气密性密封容器中的干燥无菌冻干粉末形式以至少 0.01 毫克、0.05 毫克、0.1 毫克、0.25 毫克、0.5 毫克、1 毫克、1.5 毫克、2.0 毫克、5 毫克的单位剂量来供应,例如至少 10 毫克、至少 15 毫克、至少 25 毫克、至少 35 毫克、至少 45 毫克、至少 50 毫克、至少 75 毫克或至少 100 毫克。冻干组合物应于初始容器中储存于 2°C 至 8°C 之间,且组合物应在复原后 1 周内、例如 5 天内、72 小时内、48 小时内、24 小时内、12 小时内、6 小时内、5 小时内、3 小时或 1 小时内授予。在另一实施态样中,液体形式的投药核酸酶组合物是在气密性密封容器中以至少 0.25 毫克/毫升,例如至少 0.5 毫克/毫升、至少 1 毫克/毫升、至少 2.5 毫克/毫升、至少 5 毫克/毫升、至少 8 毫克/毫升、至少 10 毫克/毫升、至少 15 毫克/kg、至少 25 毫克/毫升、至少 50 毫克/毫升、至少 75 毫克/毫升或至少 100 毫克/毫升供应。液体形式应于其初始容器中储存于 2°C 至 8°C 之间。

[0075] 医药组合物可包括“治疗有效量”或“预防有效量”的核酸酶。“治疗有效量”是指在达成所需治疗结果所必要的剂量及时间方面有效的量。组合物的治疗有效量可由熟习此项技术者来确定且可根据例如个体的疾病状态、年龄、性别及体重以及组合物在个体中引发所需反应的能力等因素而变化。治疗有效量亦为治疗有益作用超过核酸酶的任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指在达成所需预防结果所必要的剂量及时间方面有效的量。通常由于在疾病之前或在疾病的较早期阶段使用预防剂量,因此预防有效量将小于治疗有效量。

[0076] c. 受检者

[0077] 受检者可为哺乳动物,其可为人类或非人类。受检者可为需要治疗核酸相关眼病。

[0078] 3. 治疗核酸相关眼病的方法

[0079] 本文提供一种治疗核酸相关眼病(例如 DED)的方法。核酸酶组合物可与罹患核酸相关眼病(例如 DED)的受检者的眼睛接触。

[0080] a. 核酸酶组合物与眼睛接触

[0081] 核酸酶组合物可借助任何方式与眼睛接触。与眼睛接触的方式可使得将核酸酶组合物局部涂覆或注射至眼睛中。如本文所述,当局部投予或注射时,可以熟习此项技术者熟知的多种方式来调配组合物,参见例如雷明顿(Remington)所著的由位于宾夕法尼亚州伊斯顿的由麦克出版有限公司(Mack Pub. Co., Easton, Pa.)于1995年出版的《医药科学与对药物剂型的介绍》(Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms)第19版。核酸酶组合物可与如本文所述的医药学上可接受的载剂一起调配。例如参见章节3(b)。

[0082] 上文在标题为“医药学上可接受的载剂”的章节下也描述剂量、有效量及使去氧核糖核酸酶组合物与眼睛接触的其他投药途径。

[0083] b. 核酸相关眼病

[0084] 核酸相关眼病可因自体免疫病状、眼泪产生减少、微生物感染、眼泪组成变化及/或环境条件而导致。该等病状例如可减小眨眼速率及/或导致眼睛润滑不足。受检者可通过检测选自由干燥、刺痒、毛刺、发痒、灼热或压迫感、刺激、疼痛、发红、发炎、流泪及泪水过度所组成的群组的征象或症状而识别为罹患核酸相关眼病或相关病症。受检者的眼泪组合物可能不足以用于适当的眼睛组织润滑。核酸相关眼病可在眼睛上、眼睛中或眼睛周围为发炎、细菌增殖及/或细菌感染提供环境。核酸相关眼病可因眼睛上或眼睛中的泪膜(例如生物膜或黏液膜)而导致。泪膜可在与眼睛接触的物质(例如隐形眼镜)或植入眼睛中的物质(例如巩膜压扣、眼内镜片、人工角膜移植及青光眼排水植入物)上形成。

[0085] 核酸相关眼病可为核酸产生及清除机制失调所导致,泪液及泪膜核酸酶的含量及/或活性因此不足,例如使得胞外DNA及嗜中性白血球胞外诱捕网(NETS)在泪膜中积聚并促使眼表发炎。核酸相关疾病可因与正常受检者相比眼泪中的核酸酶活性减小或核酸酶含量减小而导致。

[0086] 核酸相关眼病可为干眼病、眼疤痕性类天疱疮(OCP)、干性角膜结膜炎(KCS)、修格连氏症候群(SS)、修格连氏症候群相关的干性角膜结膜炎、非修格连氏症候群相关的干性角膜结膜炎、干性角膜炎、干性症候群、干眼症、泪膜失调、泪液产生减少、水样泪液缺乏性干眼症(ATD)、睑腺功能失调(MGD)及蒸发损失、弥漫性板层角膜炎、隐形眼镜相关角膜炎、眼内炎或感染性结晶状角膜病变。核酸相关眼病可为过敏性眼睛病状。过敏性眼睛病状可因存在NETS或嗜酸性白血球胞外诱捕网而产生。

[0087] 患有核酸相关疾病的受检者的眼泪或泪膜中的核酸酶含量可小于3.14奈克/毫升核酸酶。举例言之,患有核酸相关疾病的受检者的眼泪中的核酸酶含量可小于3.00奈克/毫升核酸酶、小于2.50奈克/毫升核酸酶、小于2.00奈克/毫升核酸酶、小于1.50奈克/毫升核酸酶、小于1.00奈克/毫升核酸酶、小于3.00奈克/毫升核酸酶、小于0.50奈克/毫升核酸酶或小于0.25奈克/毫升核酸酶。患有核酸相关疾病的受检者的眼泪或泪膜

中的核酸酶活性水平可等于或小于 0.05 孔尼兹单位。患有核酸相关疾病的受检者的眼泪中的核酸酶活性水平可小于 0.04 孔尼兹单位、小于 0.03 孔尼兹单位、小于 0.02 孔尼兹单位、小于 0.01 孔尼兹单位或小于 0.05 孔尼兹单位。一个孔尼兹单位可定义为在指定条件下,在 25°C 及 pH 5.0 下作用于高度聚合 DNA 时,使 260 奈米下的吸光度每毫升增加 0.001 的核酸酶量。

[0088] (1) 泪膜

[0089] 可含有核酸与 NET 积聚的泪膜可为生物膜或粘液膜。生物膜可由细菌产生。粘液膜可由眼睛的结膜产生。在过敏性眼睛病状中可存在粘液膜或生物膜。患有核酸相关眼病的受检者的眼表上或眼睛中的生物膜及粘液膜可含有胞外 DNA、NETS 及 / 或嗜中性白血球。NETS 可含有胞外 DNA、组蛋白、抗菌肽及 / 或嗜中性白血球弹性蛋白酶。

[0090] (a) 干眼病 (DED)

[0091] DED 可为可归因于多种因素中任一者的任何眼睛疾病或病症。在某些变化形式中,待治疗的 DED 是由除了同种免疫反应以外的任何病状所引起的 DED。例如在某些角膜移植患者中可产生同种免疫反应 (alloimmune response)。更具体而言,在某些变化形式中,待治疗的 DED 是自体免疫 DED 或与修格连氏症候群相关的 DED。DED 可是由于眼表上存在胞外 DNA、眼泪过度快速蒸发 (蒸发性干眼) 及 / 或眼泪产生不足。亦参见图 1 及其描述。在某些变化形式中,干眼病归因于一或多种选自以下的病因:衰老、使用隐形眼镜及使用药物。在某些变化形式中,干眼病系 LASIK 屈光手术的并发症。在其他变化形式中,在未经历任何种类眼睛手术的受检者中产生 DED,例如治疗 DED 并非由 LASIK 手术、角膜移植手术或其他眼部手术导致的受检者。

[0092] 在 DED 受检者的眼表上可存在胞外 DNA、NET 及嗜中性白血球且在黏液膜及 / 或生物膜中大量存在。NET 可由胞外 DNA、组蛋白、抗菌肽及嗜中性白血球弹性蛋白酶组成。泪液核酸酶活性在 DED 受检者中可显著减小,而眼表上胞外 DNA 的量可增加。胞外 DNA 信号转导下游的基因表现 (例如 TLR9、MyD88 及第 I 型干扰素) 以及发炎性细胞激素介白素 -6 及肿瘤坏死因子 α 在 DED 患者中亦可增加。核酸酶活性缺乏可使得胞外 DNA 及 NET 在泪膜 (例如角膜前泪膜、粘液泪膜或生物膜) 中积聚且可导致眼表发炎。

[0093] 4. 治疗眼部感染的方法

[0094] 胞外核酸是泪膜的一种组分。本文所述的核酸酶组合物可用于治疗眼表上或眼睛内 (眼内) 的细菌感染及与生物膜形成相关的发炎。

[0095] 本文提供一种治疗眼部感染及 / 或眼部发炎的方法。核酸酶组合物可与罹患感染的受检者的眼睛接触。感染可为细菌感染或病毒感染。可如上文所述 (参见章节 3(a)) 使组合物与眼睛接触,例如藉由向眼表局部涂覆或通过注射至眼睛中。因此,该组合物可在眼内使用。

[0096] 5. 套组

[0097] 本文提供一种套组,其可用于治疗或诊断核酸相关眼病。该套组可包含核酸酶。核酸酶可为包含眼用赋形剂的核酸酶组合物。组合物可在容器中含有抗生素化合物、抗病毒化合物、toll 样受体拮抗剂、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑制剂及 / 或嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂中之一或多者,以用于治疗受影响的眼睛。该套组可在二个或二个以上容器中包含核酸酶组合物及抗生素化合物、toll 样受体拮抗剂、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑

制剂及 / 或嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂中之一或多个者,以用于治疗受影响的眼睛。该套组可包含滴管或滤纸作为样本收集构件。滴管或滤纸可用于自眼睛表面收集眼泪。二个或二个以上容器可一起封装于(例如)纸板箱中。该套组亦可包括一组使用说明书,其提及核酸酶组合物及(若存在)抗生素化合物、抗病毒化合物、toll 样受体拮抗剂、第一型干扰素拮抗剂、抗菌肽抑制剂及 / 或嗜中性白血球弹性蛋白酶抑制剂。说明书可描述如何进行及 / 或监控本文所述的方法。

[0098] 6. 诊断方法

[0099] 本文提供一种判断受检者是否患有核酸相关眼病的方法。该方法可包含自受检者收集眼泪样本。可通过使用上述套组来获得样本。此样本可与结合核酸的染料(例如, picogreen) 接触。作为另一选择,样本可与核酸接触且随后与染料接触。可测量色彩强度且与标准对照样本中的染料荧光强度相比较。与对照组相比,样本中的染料荧光强度水平增加可指示干眼病。染料强度可指示眼睛表面上的胞外核酸的含量。染料强度且因此胞外核酸的含量可指示疾病的严重程度。举例言之,若使用 picogreen,则尤其较对照组(亦即,阴性对照组)更高的绿色色彩强度可指示受检者患有严重的干眼病。视所用染料类型而定,也可使用此方法来确定眼睛表面上的核酸酶含量。

[0100] 本发明具有多个方面,由以下非限制性实施例加以说明。

[0101] 实施例

[0102] 实施例 1

[0103] 测定眼表上的胞外 DNA 的方法(也参见图 2- 图 9 及其描述)

[0104] 使用席尔默试纸自干眼患者收集样本。席尔默测试是在眼睛检查期间进行的常规测试。席尔默测试是由将薄条滤纸置于下方侧眼睑下 5 分钟而组成。随后取出纸条且测量纸的润湿量。以毫米计测量。若此值小于 5,则诊断为干眼病。通常在测试后丢弃此纸条。然而,在本发明的研究中,使用此纸而非将其丢弃。

[0105] 在纸触碰眼睑及球结膜时,来自该等区域的细胞粘附至滤纸。在来自 Tekdon 公司的经硅烷涂布粘着剂涂布的载片上收集来自该纸的细胞。在此方法中,自每一患者获得四个载片。将载片储存于 10% 甲醛中至少半小时后,进行染色。随后以苏木精及伊红对该等载片染色,以嗜中性白血球弹性蛋白酶、组蛋白及髓过氧化酶抗体进行免疫染色以确定 NET 的存在。随后以半胱天冬酶 3 抗体对载片进行免疫染色用于细胞凋亡。

[0106] 关于苏木精及伊红染色,将细胞在 10% 甲醛中固定至少半小时。将载片在苏木精中浸渍 7 分钟,继而洗涤。随后将载片在洗酸剂中浸渍 4 次,继而洗涤且随后在染蓝剂中浸渍 2 分钟。将载片简单洗涤,继而以伊红浸渍 2 分钟。洗涤后,将载片在室温下风干、以盖玻片覆盖且在光学显微镜下观测。

[0107] 使用针对 (a) 嗜中性白血球弹性蛋白酶 (Dakocytomation- 单克隆小鼠抗 - 人类嗜中性白血球弹性蛋白酶) 及组蛋白 (圣克鲁兹生物技术公司,圣克鲁兹,加利福尼亚州 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)) 以及 4',6- 二甲脒基 -2- 苯基吡啶 (亦即, DAPI (Vector 实验室,伯林盖姆,加利福尼亚州 (Burlingame, CA)))、(b) 髓过氧化酶及组蛋白 (Santa Cruz Biotechnology, 圣克鲁斯,加利福尼亚州) 以及 DAPI 的抗体进行双重免疫染色以证实在眼表上存在 NET。使经硅烷涂布的载片上的细胞在 10% 甲醛中固定至少半小时。随后使用 PBS+0.025% Triton-X 100 将载片洗涤二次,震荡 5 分钟。随后在室温

下,以 PBS 中的 10% 标准血清 +1% BSA 阻断细胞 2 小时。对于嗜中性白血球弹性蛋白酶,以 1:400 的比率使用 PBS 稀释一级抗体,且对于组蛋白,则以 1:200 的比率,使用 PBS 稀释一级抗体。且将具有一级抗体的载片在 4°C 下培育隔夜。在隔夜培育后,使用 PBS+0.025% Triton 将细胞洗涤二次,震荡 5 分钟。在下一步骤中,添加针对嗜中性白血球弹性蛋白酶(红色)及针对组蛋白(绿色)的二级抗体,将其使用 PBS+1% BSA 稀释且在室温下培育 1 小时。1 小时后,将载片在 PBS 中冲洗三次历时 5 分钟且以 DAPI (Vector Labs, 伯灵格姆,加利福尼亚州) 进行对比染色。随后,在倒置显微镜(卡尔蔡司股份有限公司,汉堡,德国(Carl Zeiss Meditec GmbH, 汉堡,德国)) 下观测载片。

[0108] 为定量胞外 DNA,以 100U/毫升 DNaseI (来自 Fermentas 生命科学公司,汉诺威市,MD) 培育含有胞外 DNA 及细胞的滤纸。随后添加 0.5 莫耳/升 (M) EDTA 以终止核酸酶活性且收集上清液。添加 Picogreen (英杰公司,卡尔斯巴德,加利福尼亚州 (Invitrogen, Carlsbad, CA)) (一种 DNA 荧光 DNA 染料) 且由荧光光谱测定法定量 DNA 含量。

[0109] 去氧核糖核酸酶处理:对于每位患者而言收集来自结膜的四个样本且进行处理:样本 1- 以 DAPI 染色(对照);样本 2- 以去氧核糖核酸酶处理(100IU/毫升,历时 20 分钟)并以 DAPI 染色;样本 3- 以热失活去氧核糖核酸酶处理(100IU/毫升,历时 20 分钟)并以 DAPI 染色;样本 4- 浸泡于 PBS 中并以 DAPI 染色。

[0110] 随后在倒置显微镜(Carl Zeiss Meditec GmbH, 汉堡,德国) 下观测样本。通过使用 Axiovision 及 Neurolucida 软体获取影像来进行定量。计算值并使用 Microsoft Excel 绘图。参见图 9 及其描述。

[0111] 实施例 2

[0112] 用于实施例 3 及 4 的方法

[0113] 研究群体:登记症状性眼泪缺乏 DED 患者及眼泪正常产生的无症状(asymptomatic) 健康个体,并为提供其在机构审查委员会(Institutional Review Board) 批准协议下根据 Helsinki 陈述的书面知情同意。若患者主诉任何 DED 症状(干燥、刺激、砂粒感、光敏性或异物感) 且另外具有严重水样泪液缺乏,则包括该等患者,定义为在 5 分钟内席尔默 I 值 ≤ 5 毫米(无麻醉)。若个体无眼部症状且在 5 分钟内的席尔默 I 值 ≥ 12 毫米(无麻醉),则包括在对照组中。

[0114] 结膜脱落细胞及粘液膜分析:通过在下眼睑边缘上方、侧向及中间第三个接合点处放置席尔默试条(Haag-Streit, 埃塞克斯,英国 (Essex, UK)) 历时 5 分钟来进行无局部麻醉的席尔默 I 测试。以毫米计来记录试条湿润。由于试条接触眼睑及球结膜,因此该等区域的细胞在移除试条时脱落。将粘附至试条的细胞转移至经硅烷涂布的粘附性载片。即刻将载片在中性缓冲 10% 甲醛(Sigma-Aldrich, 圣路易斯,密苏里州 (St. Louis, MO)) 中固定 30 分钟后,进一步分析。使用一次性微毛细管玻璃管(5 微升 (μ l) 体积;Sigma-Aldrich) 在球结膜上或自下结膜穹窿收集粘液膜。将粘液膜扩散于经硅烷涂布的载片上且进行处理。

[0115] 苏木精及伊红(H&E) 染色:将具有结膜脱落细胞的载片($n = 15$) 或具有粘液膜的载片($n = 10$) 以苏木精(H-3401, Vector Labs, 伯灵格姆,加利福尼亚州) 染色、在酸中冲洗、浸渍于染蓝溶液中且以伊红(赛默飞世尔科技公司,沃尔瑟姆,马塞诸塞州 (Thermo Scientific, Waltham, MA)) 进行对比染色。使用直立 Axioscope 100 显微镜(Carl Zeiss Meditec GmbH, 汉堡,德国) 检查载片、使用 Zeiss MRc 彩色照相机成像并使用 Zeiss

Axiovision 进行分析。

[0116] 免疫染色与共轭焦显微法：进行免疫荧光染色及共轭焦显微法以定位如前所述的 NET 及胞外 DNA (eDNA) 的分子组分。使载片在 0.025% Triton X-100 中渗透 5 分钟且在室温下以 PBS 中 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 及 10% 标准驴血清阻断 2 小时。将载片在 4°C 下以于阻断溶液中稀释 (1:200) 的一级抗体培育隔夜。将载片在 PBS 中洗涤四次 (每次 15 分钟) 并以经阻断溶液稀释 (1:200) 的二级抗体培育 1 小时。将含有 4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶 (DAPI; 目录号 H-1200, Vector Labs) 的 Vectashield mounting 培养基置放于载片上且以玻璃盖玻片覆盖。所用一级抗体为：(1) 小鼠单克隆抗-人类嗜中性白血球弹性蛋白酶 (纯系 NP57, DAKO, 格洛斯楚普, 丹麦 (Glostrup, Denmark)); (2) 山羊多克隆抗-组蛋白 H2B (目录号 SC-8650, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, 加利福尼亚州) 及 (3) 兔多克隆抗-抗菌肽 (目录号 ab64892, Abcam, 坎布里奇, 马塞诸塞州 (Cambridge, MA))。所用二级抗体对于嗜中性白血球弹性蛋白酶而言为 Dylight 594 结合的抗-小鼠免疫球蛋白 G (IgG) (1:1000, 杰克逊免疫研究实验室, 西树林, 宾夕法尼亚州 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA)) 且对于组蛋白及抗菌肽而言为 FITC 480 抗-山羊 IgG (1:200, Jackson Immunoresearch Laboratories)。使用 LSM 710META 共轭焦显微镜 (Carl Zeiss Meditec GmbH, 汉堡, 德国) 分析检体。首先使患者样本成像以最优优化荧光信号, 之后, 立即使用相同设定使阴性对照载片 (省略一级抗体) 成像。先前已证实一级抗体抗-嗜中性白血球弹性蛋白酶及抗-抗菌肽的特异性。

[0117] 泪腺 DNase I 免疫染色：由存档非炎性及非恶性泪腺活体组织切片 (n = 5) 获得泪腺切片 (6-8 微米)。将切片在 56°C 下脱蜡 30 分钟, 继而进行等级醇连续处理。处理切片以如上所述进行染色。所用一级抗体为兔多克隆抗-DNase I (1:50, 目录号 HPA010703, Sigma Prestige, St. Louis, MO)。二级抗体为 Dylight 594-结合的抗-兔 IgG。阴性对照为：(1) 省略一级抗体、(2) 兔多克隆 IgG 同型对照物 (目录号 ab27427, Abcam) 及 (3) 以一级抗体预培育的肽 (目录号为 HPA010703 的肽, Atlas 抗体 AB, 斯德哥尔摩, 瑞典 (Stockholm, Sweden))。如上所述进行成像及分析。

[0118] eDNA 链的激光捕获显微剖检：如上所述在膜载片 (目录号 11505158, Leica, 索尔姆斯, 德国 (Solms, 德国)) 上进行席尔默试条压印。将载片在 10% 甲醛中固定 30 分钟, 并在 1×PBS 中洗涤。将载片以 DAPI 染色、在 PBS 中简单洗涤, 并在 37°C 下干燥 30 分钟。观测经 DAPI 染色的 eDNA 链、解剖, 并使用 PALM 激光捕获显微剖检显微镜 (Carl Zeiss, Thomwood, NY) 捕获。将捕获的链收集在粘附性盖中, 并使用 DNAzol1 (目录号 1-0503-027, Invitrogen, Carlsbad, 加利福尼亚州) 根据制造商的实验方案提取 DNA。使用 GoTaq PCR 套组 (目录号 M7122, 普洛麦格, 麦迪逊, 威斯康星州 (Promega, Madison, WI)) 根据制造商的实验方案进行 PCR。使用基因特异性引子扩增人类 GAPDH 基因 (目录号 PPH00150F, SA 生物学, 弗雷德里克, 马里兰州 (SA Biosciences, Frederick, MD))。使 PCR 产物进行电泳, 并在经 2% 溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶上观测。

[0119] 眼表 eDNA 的定量：我们使用两种策略来计算眼表上 eDNA 的量。首先, 在来自玻璃载片上的席尔默试条压印的脱落材料中测定 eDNA 链的总长度。其次, 使用 DNase I 自席尔默试条提取 eDNA, 并使用 picogreen DNA 荧光染料测定荧光强度。

[0120] eDNA 长度：固定具有席尔默试条压印的载片, 并以 DAPI 进行染色。使用倒置显微

镜 (Axio Observer, Zeiss) 成像 5 个随机的 $20\times$ 物镜视场, 并使用 NeuroLucida 软体 (MBF 生物科学公司, 威利斯顿, VT) 进行分析。追踪 eDNA 纤维, 并使用如前文关于角膜神经所述的 Neuroexplorer (MBF Bioscience) 来计算长度。将干眼患者 ($n = 10$) 中的平均总 eDNA 长度与标准对照组 ($n = 10$) 相比较。

[0121] Picogreen 检定: 如前所述进行 Picogreen 检定。将接触结膜的席尔默试条的折叠末端收集于微量离心管 (Eppendorf tube) 中, 并添加 200 微升的 100U/毫升 DNase I (目录号 EN0521, Fermentas Life Sciences, Hanover, MD)。20 分钟后, 以 0.5 毫莫耳/升 (mM) EDTA 终止核酸酶活性, 并移除席尔默试条末端。添加 Picogreen DNA 荧光染料 (目录号 P7589, Invitrogen 检测科技), 并使用酶标仪 (Synergy H1, BioTek, Winooski, VT) 测定荧光强度。平均各数值, 并在 DED 患者 ($n = 10$) 与标准对照组 ($n = 10$) 之间进行比较。

[0122] 脱落结膜细胞基因表现: 自来自 DED 患者 ($n = 20$) 及标准对照组 ($n = 16$) 的席尔默试条上的脱落结膜细胞提取 RNA。将席尔默试条的折叠末端直接置于 TRIzol (Invitrogen) 中, 以供 RNA 提取, 此系根据制造商的实验方案来进行的。使用 RT² 第一链 eDNA 合成套组 (RT²First Strand eDNA Synthesis Kit) (SABiosciences), 以 1000 奈克总 RNA 进行逆转录。将所得 eDNA 使用 RT²Nano PreAMP 套组根据制造商的说明进行预扩增。使用 7900HT ABI 即时仪器, 以 SYBR 进行即时定量 PCR (qPCR)。经由即时 qPCR 分析 eDNA 信号转导基因表现及发炎性细胞激素。

[0123] 除非另外说明, 否则所有引子及试剂均购自 SABiosciences。所用引子为 toll 样受体 9 (TLR 9; 目录号 PPH01809A)、干扰素 α (INFA; 目录号 PPH01321A)、MyD88 (目录号 PPH00911A)、干扰素 β (INFB; 目录号 PPH00384E)、IL-6 (目录号 PPH00560B)、TNF- α (目录号 PPH00341E) 及甘油醛-3-磷酸盐脱氢酶 (GAPDH; 目录号 PPH00150F)。使用以下循环条件, 以 25 微升的总体积检定样本, 实验进行二重复: 在 95°C 下 10 分钟, 在 95°C 下 15 秒钟进行 40 个循环及在 60°C 下 60 秒钟。使用人类染色体组 DNA 污染对照来证实扩增试剂未受染色体组 DNA 污染。对于资料分析而言, 将 DED 患者每个基因的循环阈值 (CT) 标准化为正常受检者的相应值, 并使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法来计算倍数变化。

[0124] 泪液中的核酸酶活性及 DNase I: 使用狭缝灯生物显微镜, 使用一次性微毛细管玻璃管来收集眼泪。将管置于下结膜穹窿中, 且通过毛细作用收集眼泪。将眼泪转移至无氧核糖核酸酶的微量离心管中, 以供分析。

[0125] 正常泪液中的核酸酶活性: 根据制造商的说明, 使用 DNA 消化检定 (去氧核糖核酸酶检测套组, MO-BIO Laboratories, Carlsbad, 加利福尼亚州) 定量 DED 患者 ($n = 5$) 与标准对照组 ($n = 5$) 中的泪膜核酸酶活性。使眼泪样本及 DNA 标准物 (1-kb DNA 梯) 在经 2% 溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶上电泳, 并使用 UV-透照器进行拍照。通过将 DNA 标准物的带强度及样式与眼泪样本相比较来评估去氧核糖核酸酶活性。若泪液中存在核酸酶, 则存在拖尾且样本泳道中的带强度减小。若 DNA 梯完全降解, 则核酸酶活性大于 0.05 孔尼兹单位, 此是以此方法检测的上限。

[0126] 泪液中的核酸酶活性: 使用基于荧光共振能转移 (FRET) 的检定来比较来自 DED 患者 ($n = 17$) 与标准对照组 ($n = 15$) 的泪液中的总核酸酶活性。进行 FRET 核酸酶检定。FRET 受质 (一种 PRIMETIME™ qPCR 探针) 是购自集成 DNA 科技公司 (Integrated DNA Technologies) (克勒尔维尔, 爱荷华州 (Coralville, IA))。其是由在 5' 末端经 Cy3 荧光

团改质且在 3' 末端经黑洞抑止剂 2 (Black Hole Quencher 2, BHQ2) 改质的短 (15mer) 的单链寡核苷酸组成。寡核苷酸受质的序列为 5' CCC CGG ATC CAC CCC 3' (SEQ ID NO:2)。当寡核苷酸完整时, Cy3 与 BHQ2 足够接近以抑止荧光。在寡核苷酸裂解时, Cy3 荧光与裂解量成正比且可用于定量核酸酶活性。观测到三种等级的 HPLC 纯化 FRET 受质的产量的相当大的变化 (对于 250 奈莫耳合成等级而言为 21.1 及 35.8 奈莫耳, 且对于 1 微莫耳合成等级而言为 124.5 奈莫耳), 因此我们尚未汇集资料并报导以 1 微莫耳等级进行的泪液核酸酶活性分析。产量变化来自于 HPLC 纯化过程且与 FRET 受质纯度反向相关。如上所述收集眼泪样本。在冰上培育样本直至进行检定。在样本收集 3 小时内进行检定。向微量滴定盘中添加眼泪样本 (5 微升)。向含有眼泪样本的孔中添加 FRET 受质 (2.5 奈莫耳, 于 50 微升缓冲溶液中)。在 37°C、激发光 552 奈米及发散光 580 奈米下使用酶标仪 (Synergy H1, BioTek) 测量发射的荧光 (RFU) 及荧光变化速率。在读数前将培养盘搅动 5 秒钟, 并以 3 秒钟的间隔获取读数历时 30 分钟。对于分析, 平均每位患者在 30 分钟内的动态 RFU 测量值。

[0127] 泪液中的 DNase I 定量: 我们使用市售的人类 DNase I ELISA 套组 (目录号 E0100214, 生命科学先进科技公司 (Life Sciences Advanced Tech), 圣彼德斯堡, 佛罗里达州 (St. Petersburg, FL)) 来测定泪液中 DNase I 的量。自健康受检者收集 25 微升泪液 ($n = 5$) 及 0.5 毫升唾液 ($n = 5$)。将唾液在 4°C 下以 15,000rpm (每分钟转数) 离心 5 分钟, 并分析 25 微升上清液。向抗体预涂布微量滴定盘中的适当孔中添加标准物或样本 (25 微升), 并根据制造商的说明进行检定。此检定的灵敏度为 0.1 奈克 / 毫升。

[0128] 统计学分析: 对于 DED 患者及正常受检者计算平均值及平均标准误差, 并使用学生 t 测试 (Student t-test) 进行分析。使用 Microsoft Excel office 统计学软件封装进行分析及绘图。 $p \leq 0.05$ 认为系统统计学显著的。

[0129] 实施例 3

[0130] 眼表上存在 eDNA 及嗜中性白血球胞外诱捕网 (NET)

[0131] 研究群体包括 DED 患者 ($n = 37$ 位患者, 73 只眼睛), 其平均水样泪液产量为 2.76 ± 0.35 毫米。正常个体 ($n = 18$ 位个体, 36 只眼睛) 的平均水样泪液产量为 19.1 ± 1.25 毫米, 显著大于 DED 患者 ($p < 0.001$)。患者患有非修格连氏干眼 ($n = 33$) (其包括例如特发性、LASIK 后、神经营养性及眼疤痕性类天疱疮的病源) 及修格连氏疾病 ($n = 4$)。

[0132] 眼表上存在 eDNA 及嗜中性白血球胞外诱捕网 (NETs): 在来自严重 DED 患者的结膜细胞上进行 H&E 及免疫荧光染色。细胞源自玻璃载片上进行席尔默 I 测试后的试条压印 (图 11, A1, A2)。H&E 染色显示存在单一或成组的脱落结膜细胞。细胞为圆形或卵形, 其具有嗜酸性细胞质及均一圆形嗜碱性核 (图 11, B)。DAPI 核染色展现正常受检者中的少量稀疏 eDNA 链 (图 11, C1) 及 DED 患者中的大量长 eDNA 链 (图 11, C2)。共轭焦显微法展现在 eDNA 链之间存在嗜中性白血球 (图 11, D)。组蛋白 (图 11, E1) 及嗜中性白血球弹性蛋白酶 (图 11, E2) 与经 DAPI 染色的 eDNA 链共同定位, 证明该等为 NET (图 11, E4)。为排除 eDNA 可为压印细胞学的人工制品的可能性, 对使用相同方法获得的脱落颊粘膜细胞进行分析。未观测到 eDNA 链 (数据未显示)。

[0133] 在球结膜 / 角膜 (图 12, A1) 上或下穹窿中 (图 12, A2) 存在的粘液膜上进行 H&E 及免疫荧光染色。粘液膜呈现为泡沫性白色粘液状聚集, 有时因眨眼而分散。使用微毛细管提起该等粘液膜用于分析。在某些情况下, 在微毛细管中抽取混浊白色流体。然而, 分析仍

展现类似结果。H&E 显示在粘液膜内存在大量嗜中性白血球及脱落细胞 (图 12, B1)。DAPI 染色显示 eDNA (图 12, B2) 及大量嗜中性白血球弹性蛋白酶阳性嗜中性白血球 (图 12, B3)。嗜中性白血球弹性蛋白酶 (图 12, C1) 及组蛋白 (图 12, C2) 与经 DAPI 染色的 eDNA 链共同定位, 证明该等是 NET (图 12, C4)。

[0134] 为证明经 DAPI 染色的链含有 DNA, 使用激光捕获显微剖检显微镜自膜载片捕获经 DAPI 染色的链 (图 12, D1 及 D2)。如由 GAPDH 基因产物 PCR 扩增所示, 胞外经 DAPI 染色的链含有 DNA (图 12, D3)。

[0135] 研究 NET 中存在抗菌肽: 抗菌肽存在于粘液膜内 (图 13, A1) 且与嗜中性白血球弹性蛋白酶及经 DAPI 染色的核物质共同定位 (图 13, A4)。抗菌肽亦存在于嗜中性白血球内 (图 13, B4)。抗菌肽、核物质及嗜中性白血球弹性蛋白酶自嗜中性白血球挤出而形成 NET (图 13, C1-4)。

[0136] 关于眼表上 eDNA 的量, DED 患者与正常受检者相比具有显著较低的水样泪液产量 (图 14, A)。与正常受检者 (1.58 ± 0.47 毫米) 相比, DED 患者中的 eDNA 链长度 (15.0 ± 4.2 毫米) 显著较大 ($p = 0.002$) (图 14, B)。如由 Picogreen 检定所测量, 与对照组相比 (13055.5 ± 1787.2 RFU), DED 患者中眼表上 eDNA 的量 (20137.2 ± 1507.3 RFU) 亦显著较大 ($p = 0.006$) (图 14, B)。

[0137] 实施例 4

[0138] eDNA 信号转导路径基因表现

[0139] 在脱落结膜细胞上进行 qPCR 以确定 eDNA 信号转导下游的基因表现的倍数变化 (图 14, D)。在来自 DED 患者的结膜细胞中, TLR9、Myd88 及 IFN- 第 I 型 (IFNA 与 IFNB) 的表现以及发炎性基因 IL-6 与 TNF- α 显著增加。所观测 DED 患者中的基因表现的倍数增加为: TLR9 (5.57 ± 1.6 , $p = 0.003$)、Myd88 (4.20 ± 6 , $p < 0.0001$)、IFNA (3.09 ± 0.5 , $p = 0.0003$)、IFNB (4.18 ± 0.6 , $p < 0.0001$)、TNF- α (20.6 ± 10.0 , $p = 0.03$) 及 IL-6 (17.3 ± 3.1 , $p < 0.0001$)。

[0140] 实施例 5

[0141] DED 患者中的核酸酶缺乏

[0142] 泪液中存在核酸酶及 DNase I。使用 DNase I 特异性抗体使泪腺切片免疫染色。DNase I 定位于泪腺腺泡内层的上皮细胞内 (图 15, A)。在眼泪样本上进行 ELISA 以确定眼泪及唾液中 DNase I 的量 (图 15, B1)。眼泪中的 DNase I 浓度为 3.14 ± 0.49 奈克 / 毫升, 且唾液中的 DNase I 浓度为 4.21 ± 1.14 奈克 / 毫升。使用去氧核糖核酸酶检测套组检定定量眼泪中的核酸酶活性 (图 15, B2)。正常受检者与 DED 患者的眼泪中的核酸酶活性大于 0.05 孔尼兹单位。此检定无法用于定量及比较 DED 患者与正常受检者的泪液核酸酶活性, 因为 0.05 孔尼兹单位是此方法的检测上限。因此, 使用基于 FRET 的核酸酶活性检定来比较 DED 患者与正常受检者之间的总核酸酶活性 (图 15, C1)。与对照组 (52843.6 ± 724.4 RFU) 相比, DED 患者中的总核酸酶活性 (36749.2 ± 3898.6 RFU, $p = 0.003$) 显著较低 (图 15, C2)。

[0143] 实施例 6

[0144] 经核酸酶介导的 NET 溶解

[0145] 为证实核酸酶治疗对于治疗与 DED 相关的 eDNA 链的治疗价值, 以 DNase I 处理源自 DED 患者的席尔默条压印的脱落材料。如图 6 (A) 中所示, 在自 DED 患者眼睛的眼表取样

的未经处理脱落材料中发现大量 eDNA 链。然而,在以 DNase I 将如图 6A 中所示的相同物质培育 20 分钟后,无可辨识的 eDNA 链(图 6(B))。此结果显示,眼表 eDNA 链可经 DNase I 处理而溶解。

[0146] 实施例 7

[0147] 泪膜中的细菌

[0148] 患有严重眼泪缺乏的干眼病患者的眼表中可能具有粘液膜。使用无菌 eSwab 自眼表提起黏液膜。观测革兰氏阳性球菌的生长,将其鉴别为凝固酶阴性葡萄球菌物种。参见图 16A 及图 16B。

[0001]

序列表

<110> 美国伊利诺大学理事会
 <120> 用于治疗核酸相关眼病的组合物及方法
 <130> 092334-9007 (DF055/PCT)
 <140> 新国际申请案
 <141> 2012-08-20
 <150> US 61/569,604
 <151> 2011-12-12
 <150> US 61/600,377
 <151> 2012-02-17
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <400> 1
 ttagggtttag ggttagggtt aggg 24
 <210> 2
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成寡核苷酸
 <400> 2
 cccccgatcc acccc 15

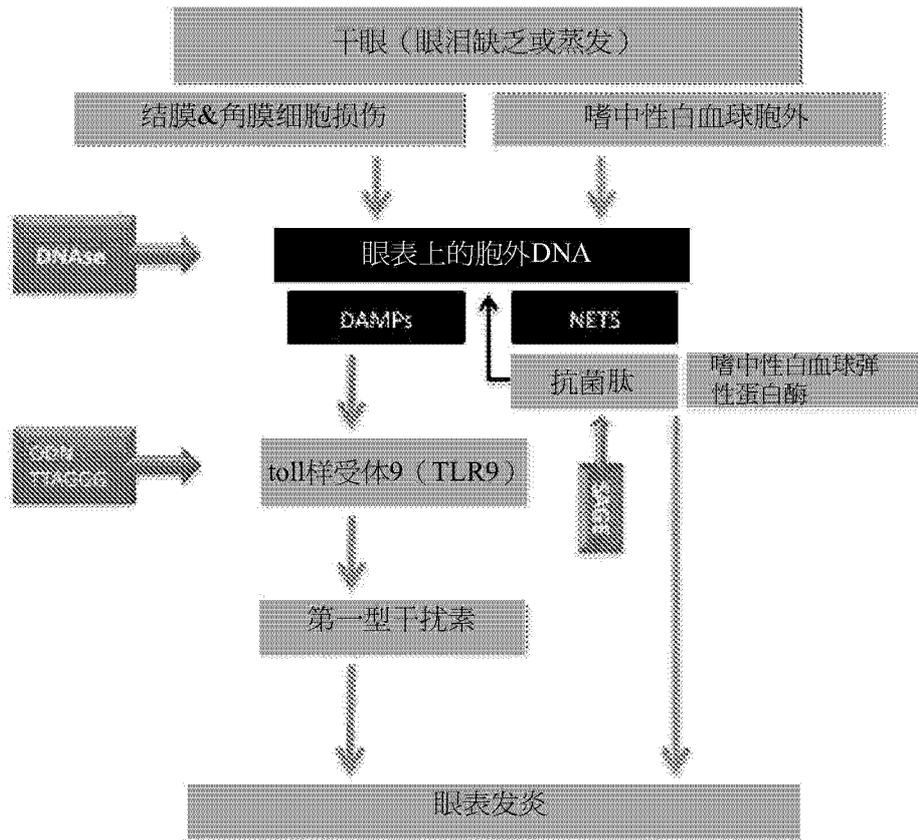


图 1

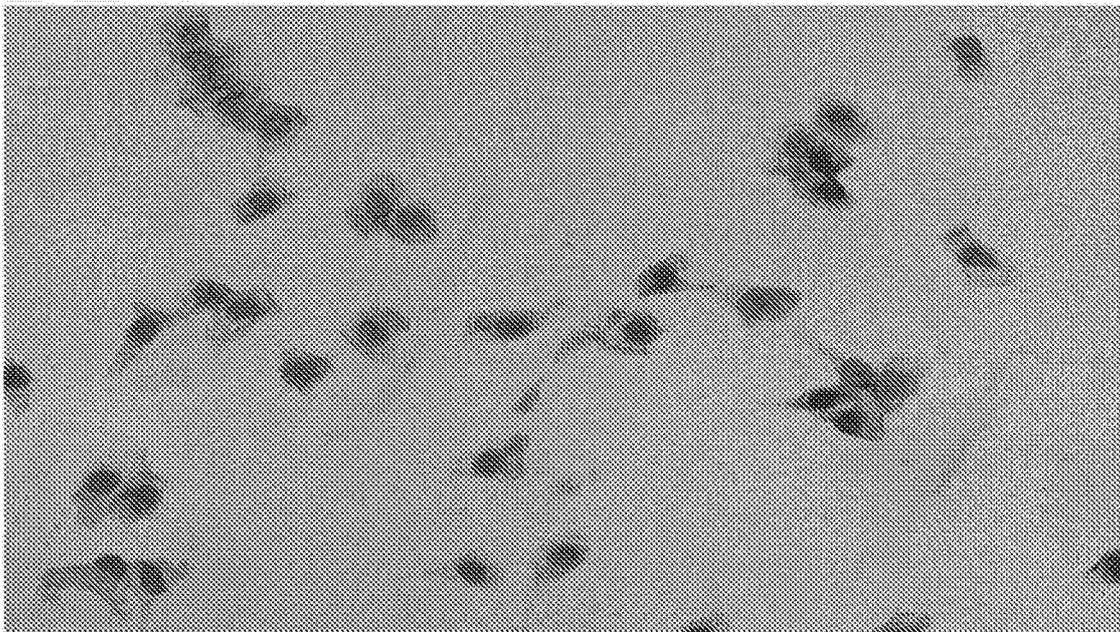


图 2

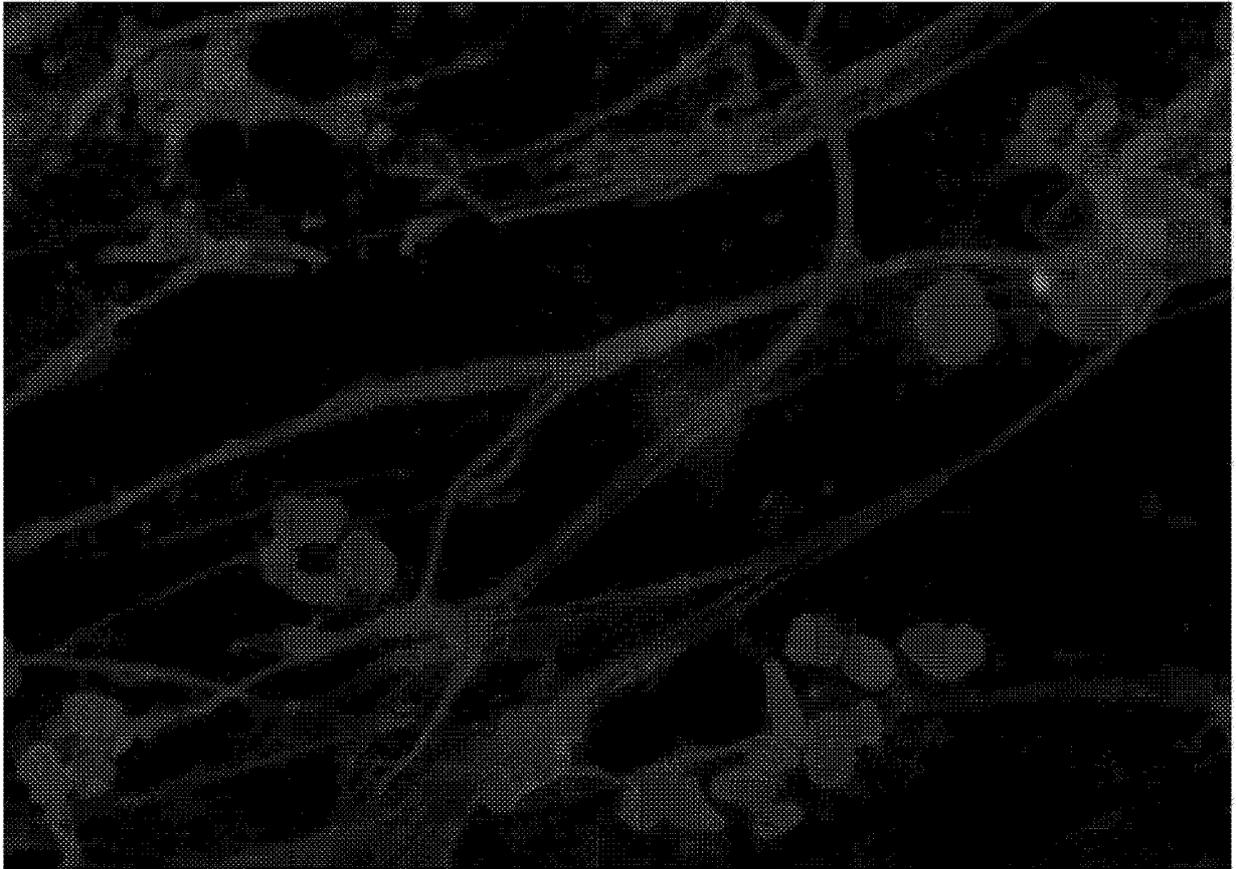


图 3

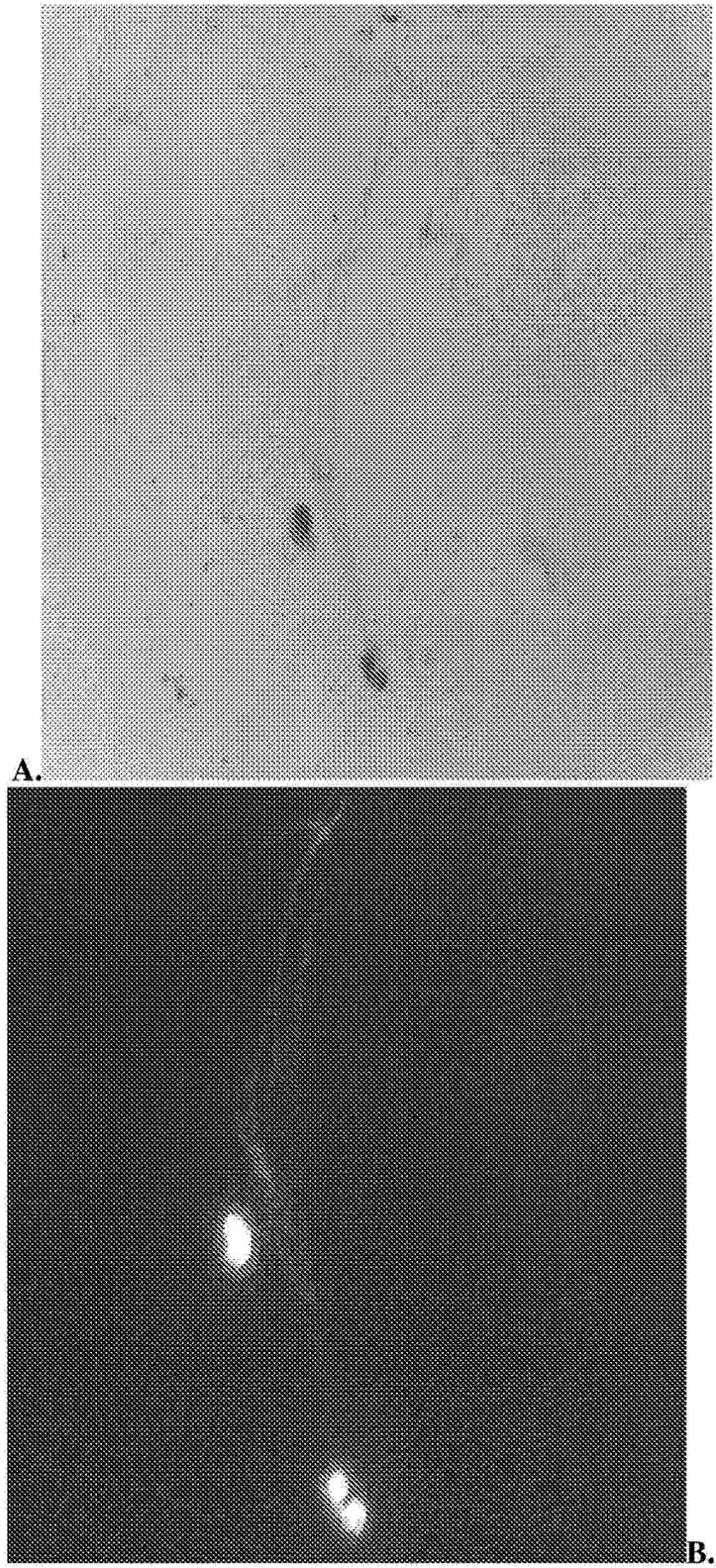


图 4

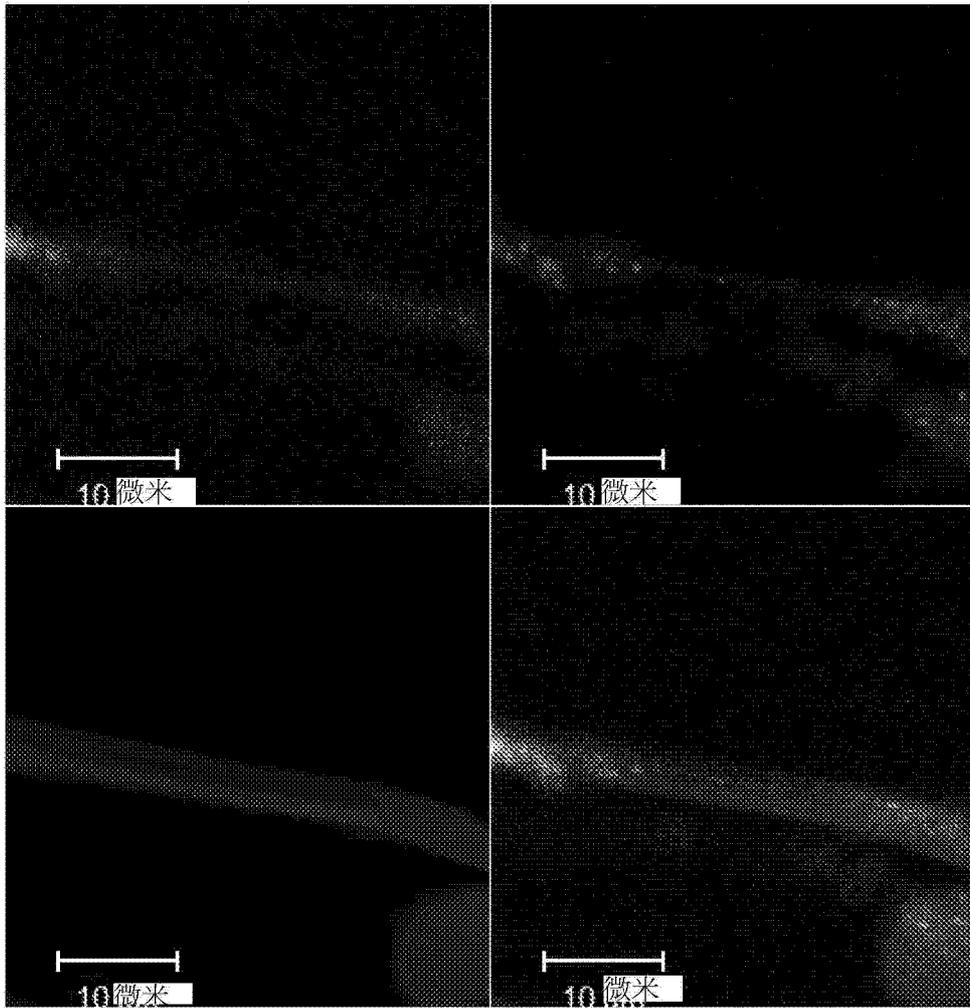
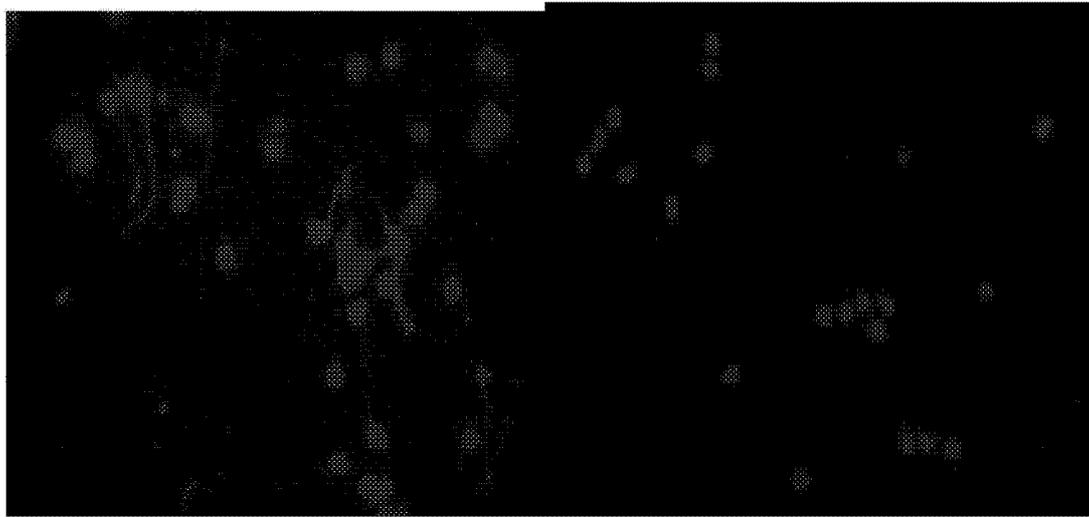


图 5



A.

B.

图 6

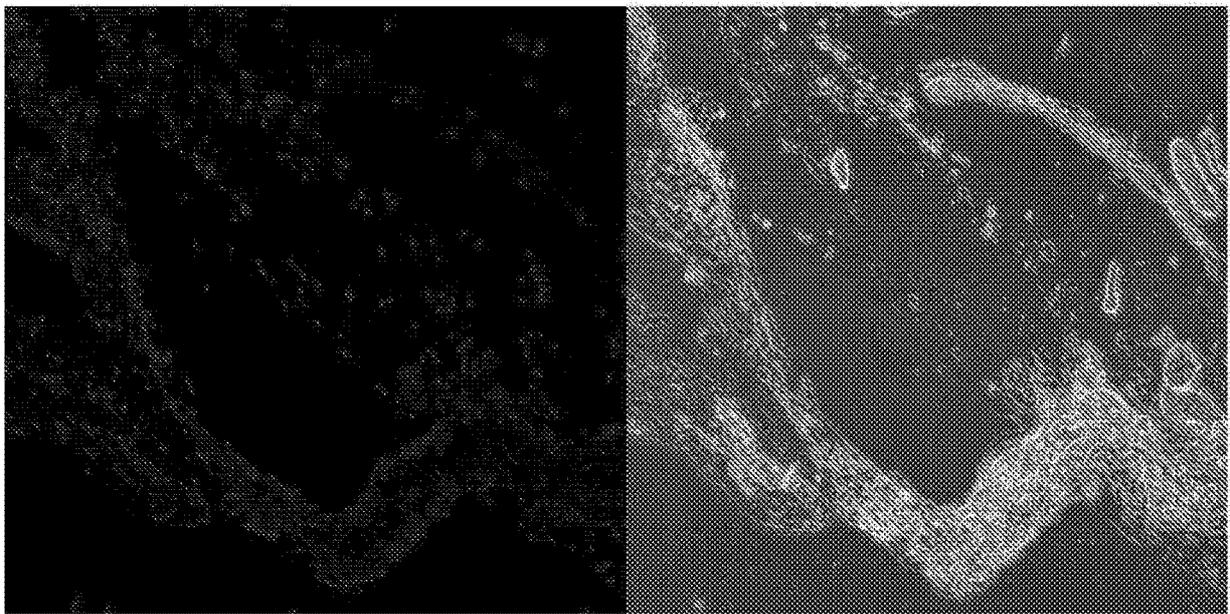


图 7



图 8

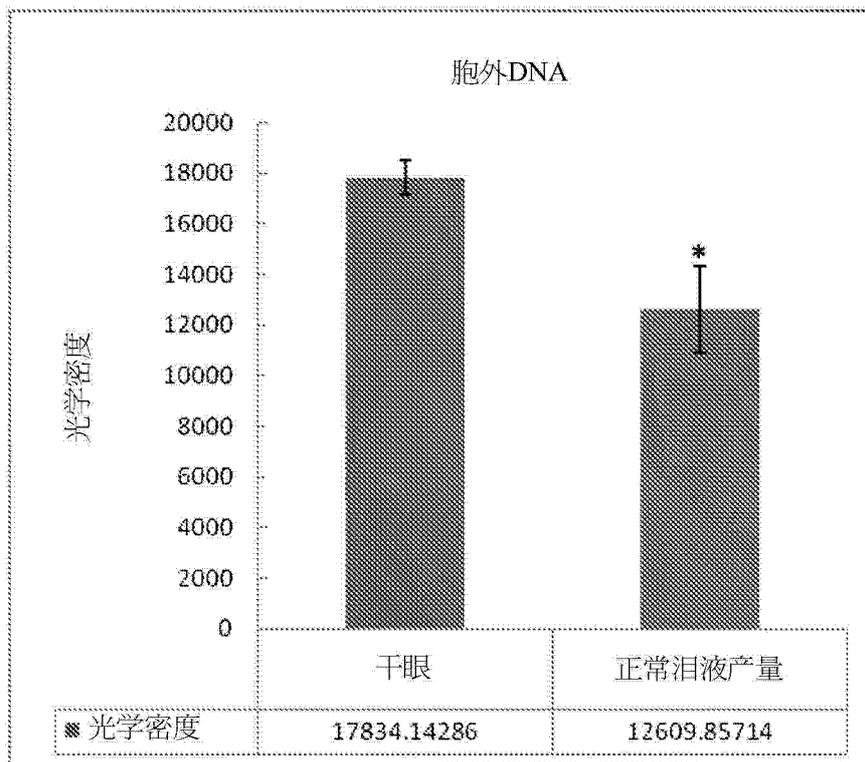


图 9

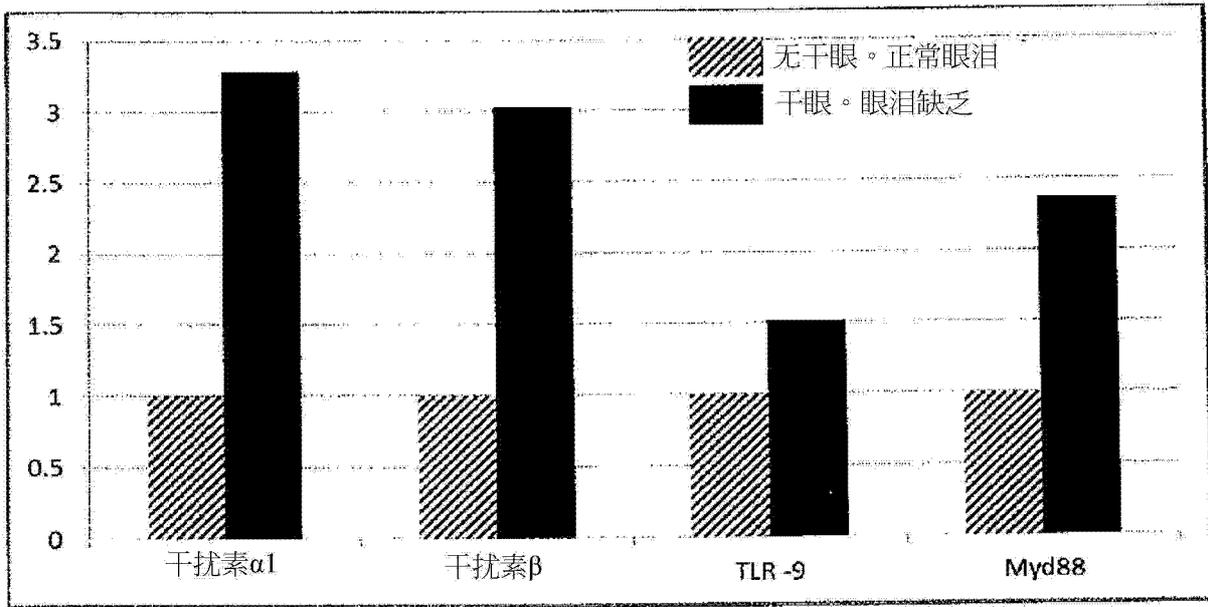


图 10

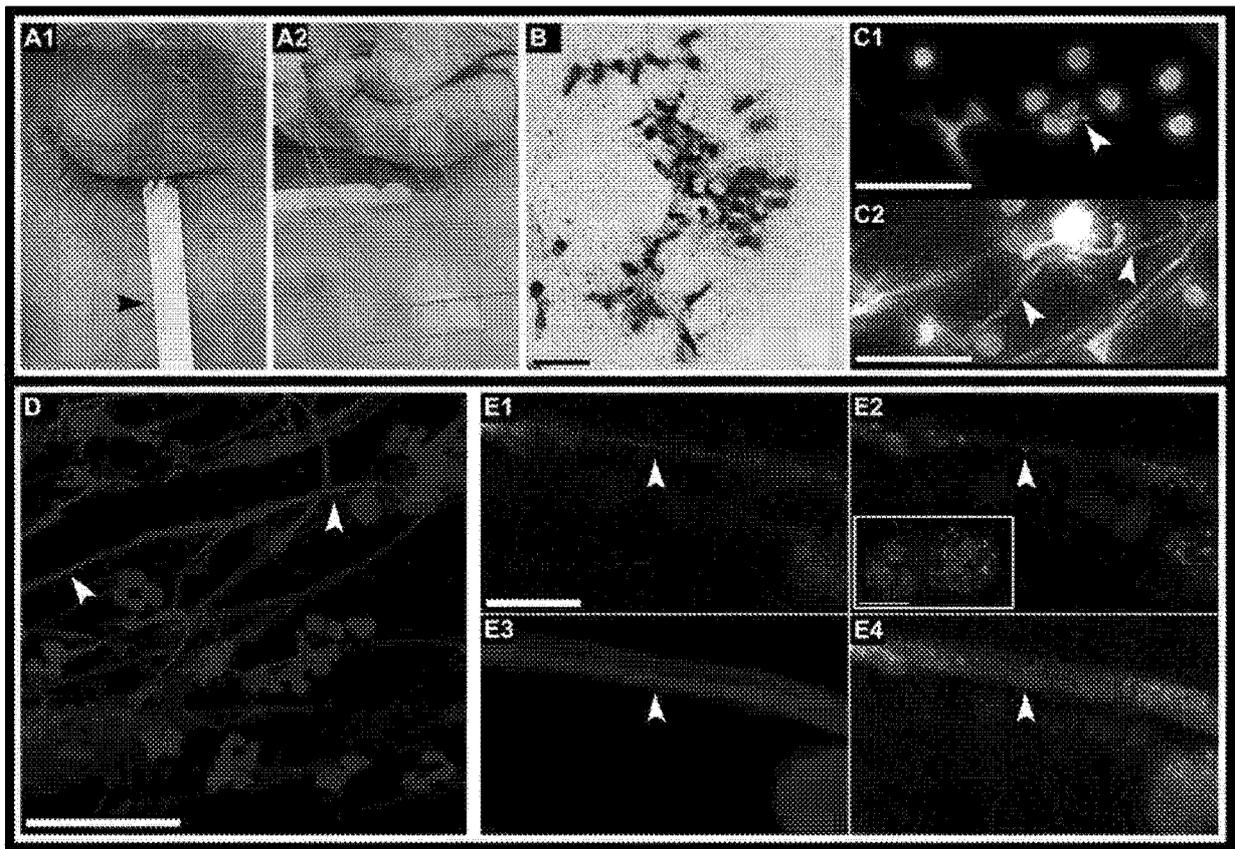


图 11

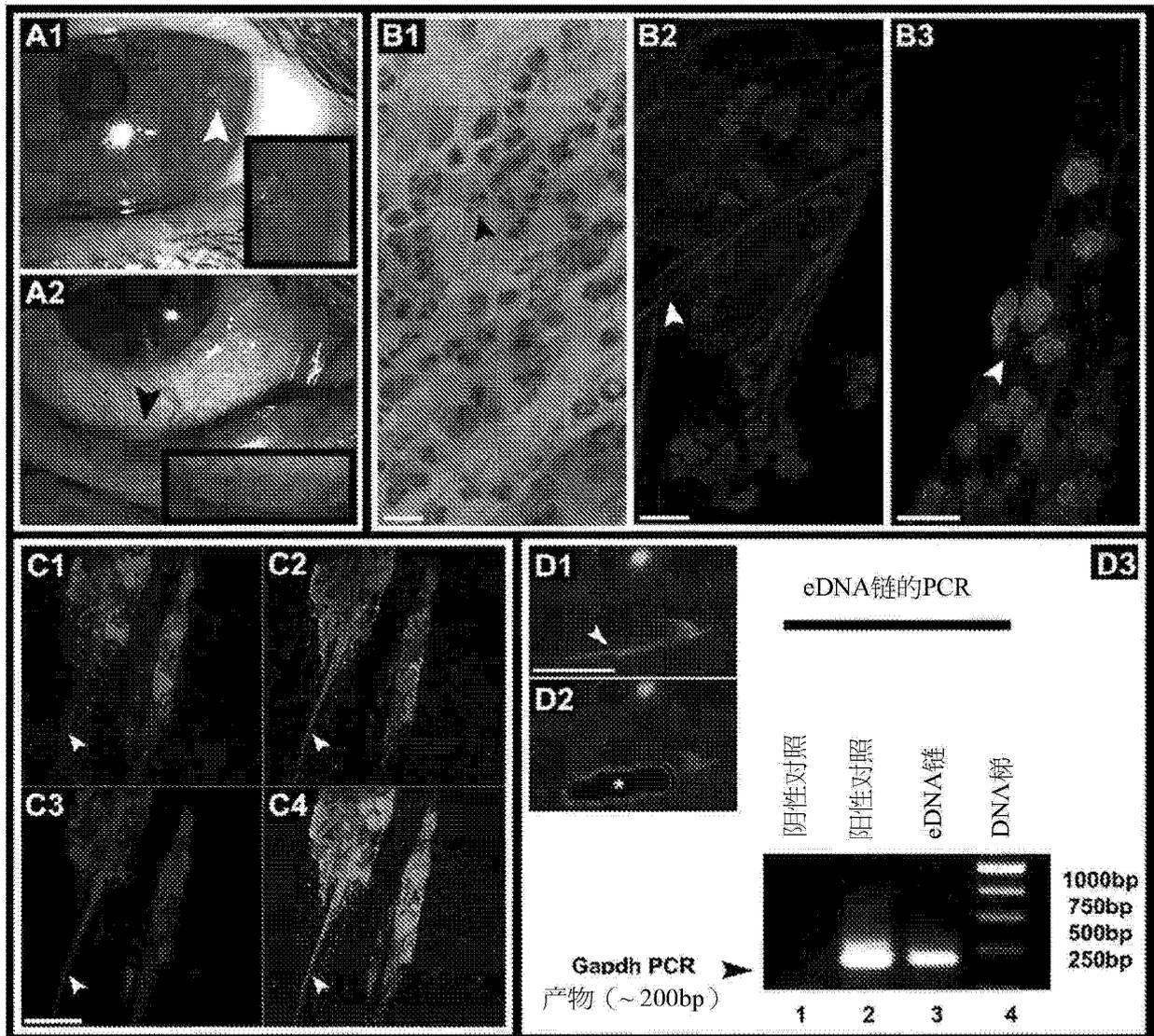


图 12

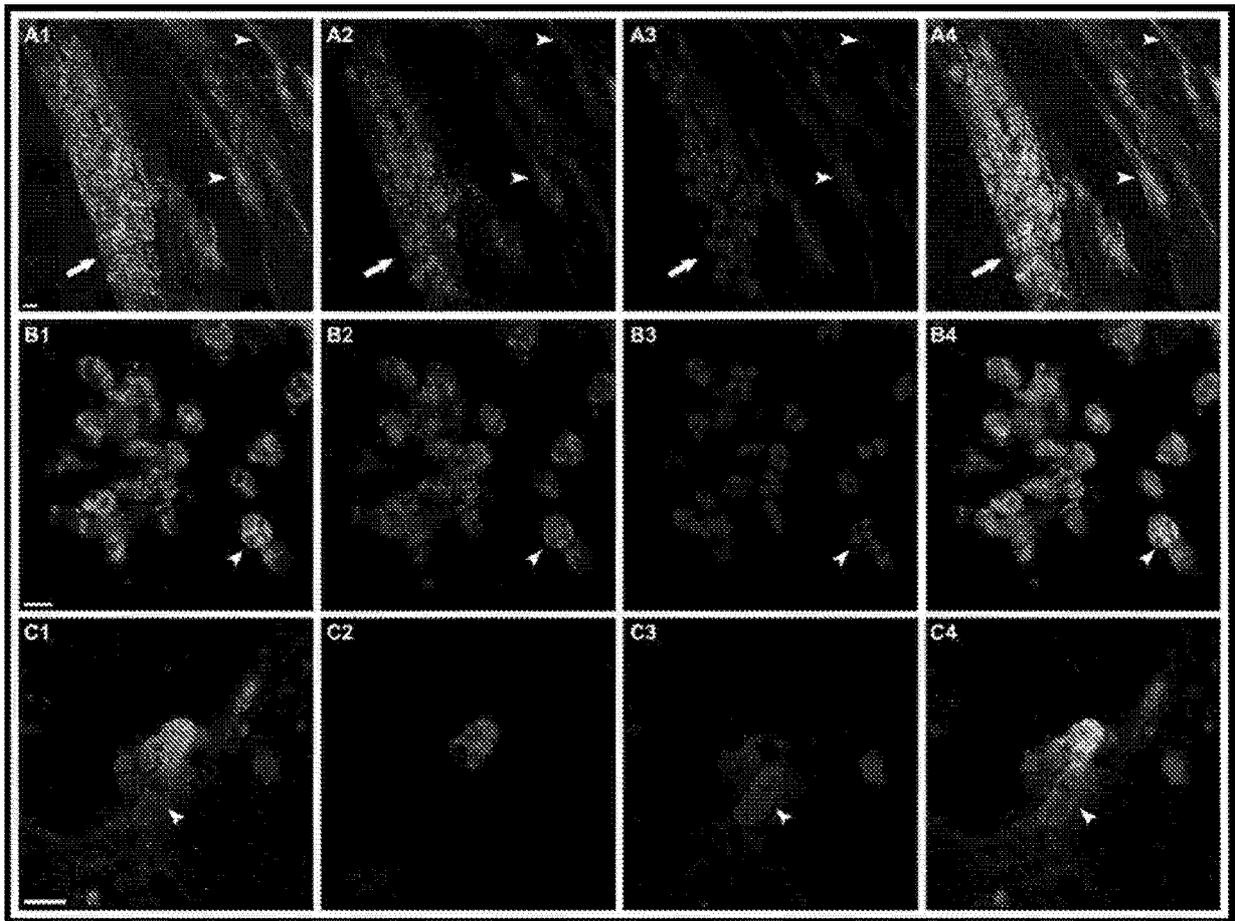


图 13

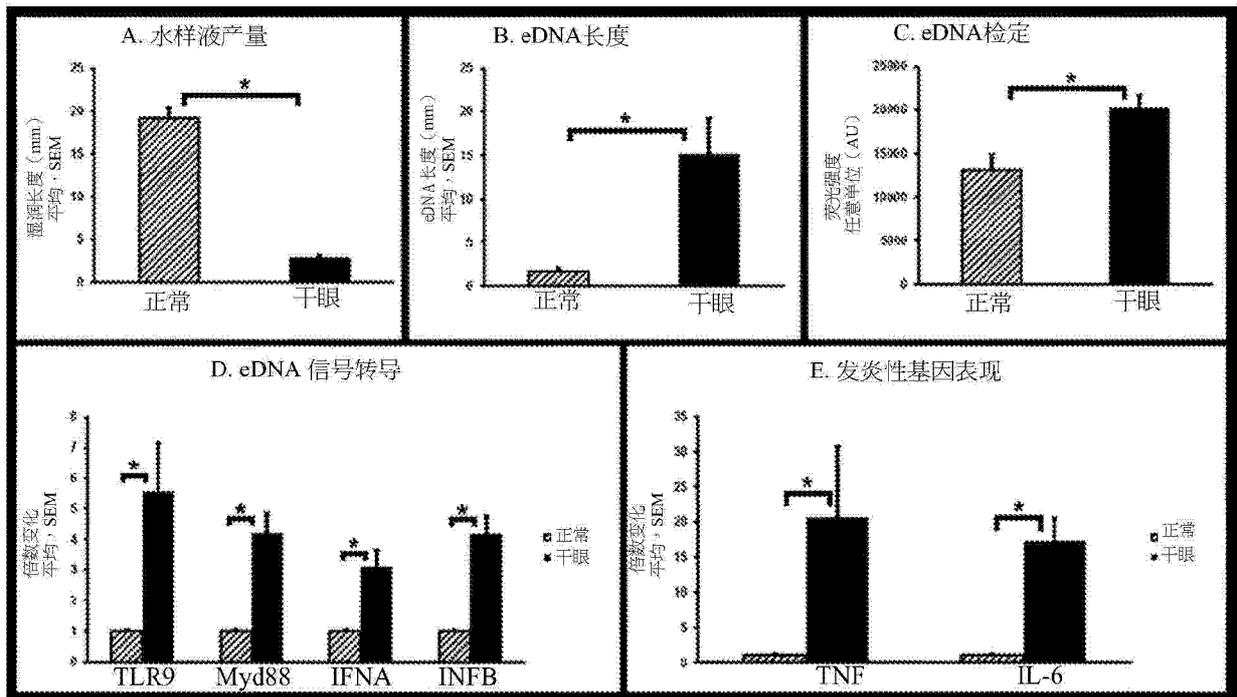


图 14

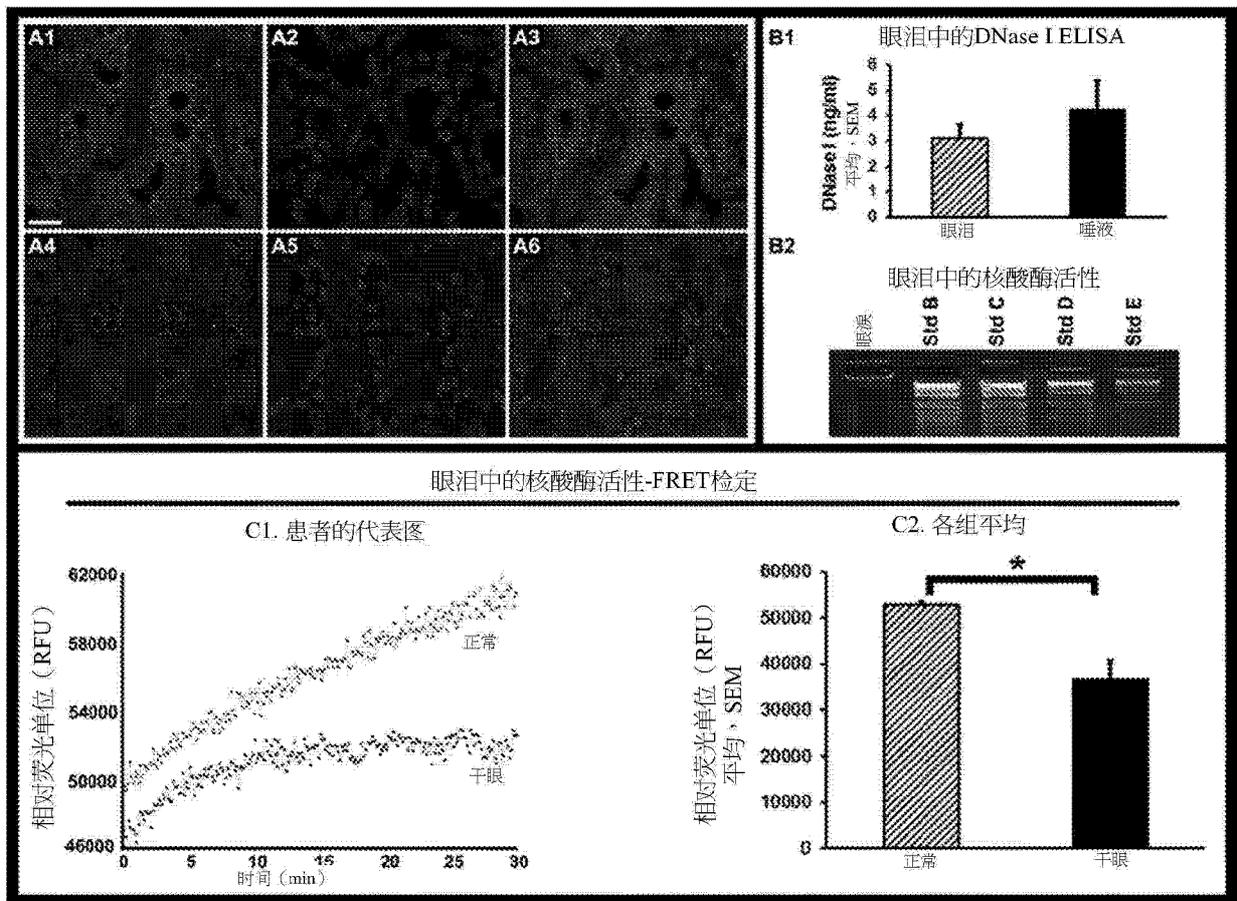


图 15

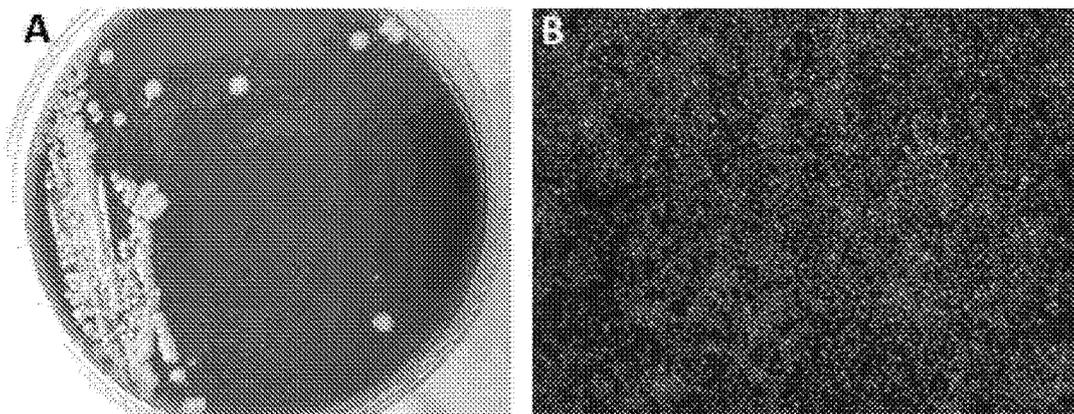


图 16