



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110248657 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201780079533.5

(22)申请日 2017.12.14

(30)优先权数据

16206207.9 2016.12.22 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/082739 2017.12.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/114557 EN 2018.06.28

(71)申请人 诺瓦利克有限责任公司

地址 德国海德尔堡

(72)发明人 伯恩哈德·金特 迪特尔·谢勒

徐和平

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠 张静

(51)Int.Cl.

A61K 31/436(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

A61K 47/06(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书17页 附图4页

(54)发明名称

用于治疗眼内炎性眼病的包含他克莫司的组合物

(57)摘要

本发明涉及一种供使用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,其包含:治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体。

1. 一种供使用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,其包含:治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体。
2. 根据权利要求1所述的供使用的组合物,其中所述眼内炎性眼病选自葡萄膜炎、视网膜炎症、巩膜炎和视神经炎或其组合。
3. 根据权利要求1或2所述的供使用的组合物,其中所述眼内炎性眼病选自葡萄膜炎、视网膜炎症及其组合。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中所述眼内炎性眼病是葡萄膜炎。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中所述葡萄膜炎是前葡萄膜炎和/或中间葡萄膜炎和/或后葡萄膜炎。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中所述半氟化烷烃是式F(CF₂)_n(CH₂)_mH化合物,其中n和m是独立地选自3至10范围内的整数。
7. 根据前述权利要求中任一项的用途的组合物,其中所述半氟化烷烃选自F4H5、F4H6、F6H6和F6H8。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中所述组合物以溶液、悬浮液或乳液的形式配制。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中所述组合物局部施用于眼睛、眼睑、眼囊、眼表面或眼组织。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中所述组合物以单滴剂形式施用,每只眼睛每剂量为约5至50 μ l的体积。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中所述组合物每天施用最多4次。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中将所述组合物施用于用炎性眼病的一线治疗进行治疗的患者。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中将所述组合物施用于用类固醇作为一线治疗进行治疗的患者。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的供使用的组合物,其中所述组合物包含0.01% (w/v) 至0.05% (w/v) 的他克莫司、0.2% 至1.4% (w/w) 的乙醇,并且所述半氟化烷烃是F4H5。
15. 一种试剂盒,其包含根据前述权利要求中任一项所述的供使用的药物组合物和用于容纳所述组合物的容器,其中所述容器优选包括适于将所述组合物局部施用于眼睛表面,优选下眼睑内,施用于泪囊或施用于眼组织的分配装置。

用于治疗眼内炎性眼病的包含他克莫司的组合物

背景技术

[0001] 炎性眼病包括可影响眼睛的任何部分或周围组织的各种类型的炎症。广泛的已知炎症性眼病包括,例如,非常常见的病症,例如由花粉症引起的过敏性结膜炎,或更罕见和危险的病症,例如葡萄膜炎、巩膜炎、视神经炎、角膜炎、视网膜血管炎或慢性血管炎,所有这些有可能危及患者的视力。

[0002] 一些炎性眼病用皮质类固醇(例如地塞米松)有效治疗。然而,长期使用地塞米松可能会导致严重的副作用,这通常是长期使用皮质类固醇治疗所常见的。与皮质类固醇(例如地塞米松)的给药相关的常见副作用是白内障或青光眼的发展。在治疗已经存在的炎性眼病的情况下,白内障或青光眼发展的风险增加尤其成问题。

[0003] 葡萄膜炎是眼睛葡萄膜的一种炎症。临床上,根据受影响的葡萄膜部分,它可分为前葡萄膜炎、中间葡萄膜炎、后葡萄膜炎和全葡萄膜炎。前葡萄膜炎占有葡萄膜炎病例的60%至80%。在美国,葡萄膜炎仍然是工作年龄人口失明的重要原因,占失明总数的10%至15%。

[0004] 葡萄膜炎可能具有传染性或非传染性(自身免疫)病因。自身免疫性葡萄膜炎由视网膜抗原特异性T淋巴细胞(其包括Th1和Th17细胞)介导,皮质类固醇仍然是这种病症的主要治疗方法。前葡萄膜炎通常用局部类固醇治疗,但如果患者还有其他全身性自身免疫疾病,则可能需要全身免疫抑制。对于后葡萄膜炎,除了全身免疫抑制外,现在通常使用玻璃体内注射类固醇(例如,地塞米松、曲安西龙和氟轻松)。

[0005] 还开发了各种眼内植入物以改善眼内药物递送。尽管玻璃体内注射类固醇可以更好地控制炎症并引起有限的全身副作用,但局部副作用仍然是主要问题。例如,30%至50%的患者在玻璃体内注射曲安奈德后出现青光眼;几乎所有通过Retisert植入物接受玻璃体内注射氟轻松的患者均有青光眼,其中40%需要手术来控制压力。白内障是另一种常见的副作用,特别是在接受多次玻璃体内注射类固醇的患者中常见。显然,葡萄膜炎迫切需要更有效和更安全的治疗方法。

[0006] 他克莫司(FK506)是一种从真菌筑波链霉菌(*streptomyces tsukubaensis*)中分离出来的大环内酯类内酯,其是一种有效的免疫抑制药物。他克莫司具有与环孢菌素相同的抑制T淋巴细胞信号转导和细胞增殖的机制作用,但强度高100倍。据报道,他克莫司通过全身给药被用作葡萄膜炎的第二线治疗药物,并且被证明是有效的,特别是在类固醇抗性或不耐受患者中。

[0007] 他克莫司由于其物理化学性质而在局部给药时具有较差的穿透组织屏障的能力(Tamura et al., 2002, J. Pharm. Sci. 91, 719-729)。

[0008] US 2003/0018044 A1描述了含有他克莫司以治疗眼病如干眼病(DED)以及其他眼病的制剂。他克莫司可以溶解在含水溶剂如0.9%生理盐水或5%右旋糖,或有机溶剂,如二甲基亚砜(DMSO)或醇中。

[0009] W02011/073134A1提供了用于治疗干燥性角膜结膜炎的药物组合物,其包含含有一种或多种半氟化烷烃的液体载体。该组合物含有选自大环内酯类免疫抑制剂的活性成

分。它们可以局部施用于眼睛。

[0010] W02012/160179A2描述了用于局部给药的液体或半固体药物组合物,其包含半氟化烷烃。该组合物可用于将活性成分递送到皮肤深层或皮肤附属器中。可以掺入各种活性成分,例如免疫抑制剂、抗感染剂、抗真菌剂、抗炎剂和类视黄醇。

[0011] W02012/160180A2描述了用于对人的手指或脚趾甲局部给药的半固体或液体药物组合物。该组合物可用于将活性成分递送深入到指甲中。可以掺入各种活性成分,例如抗真菌剂、抗感染剂、抗炎剂、免疫抑制剂、局部麻醉剂和类视黄醇。

[0012] 本发明的一个目的是提供一种药物组合物,该组合物可在广泛的眼内炎性眼病的治疗中使用并且是有效的,且可局部给药。

[0013] 本发明的另一个目的是提供一种药物组合物,其使得能安全处理、精确给药和方便且易于遵循给药方案,以支持需要这种治疗的患者的常规给药和总体依从性。

[0014] 本发明的另一个目的是提供一种用于治疗眼内炎性眼病的药物组合物,该药物组合物可有效地作为这种眼病的常见一线治疗的补充或替代,并且不显示标准类固醇治疗的关于眼内压升高方面的副作用。

发明内容

[0015] 本发明提供了一种供使用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,其包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体。

[0016] 本发明进一步提供了试剂盒,其包含:供使用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,所述药物组合物包含药学上有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体;和用于容纳所述组合物的容器,其中所述容器优选包括适于将所述组合物局部施用于眼睛表面,优选下眼睑,施用于泪囊或施用于眼组织的分配装置。

附图说明

[0017] 图1:他克莫司/SFA滴眼液处理对内毒素诱导的葡萄膜炎(EIU)小鼠模型的临床表现的影响。

[0018] 图2:不同组小鼠中EIU的组织病理学。

[0019] 图3:他克莫司/SFA滴眼液治疗对实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎(EAU)的临床表现的影响。

[0020] 图4:不同组小鼠中EAU的组织病理学。

[0021] 图5:正常小鼠眼睛的玻璃体(图5A)、脉络膜/巩膜(图5B)、视网膜(图5C)和全血(图5D)中的他克莫司水平。

[0022] 图6A-D:有和没有葡萄膜炎的小鼠眼玻璃体中的他克莫司水平。

[0023] 图7:在EIU研究中使用流式细胞术浸润视网膜中的免疫细胞。

具体实施方式

[0024] 在第一方面,本发明涉及提供了一种供使用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,其包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体。

[0025] 本发明的药物组合物包含治疗有效量的他克莫司。他克莫司(也称为FK-506或富

士霉素;CAS 104987-11-3)是大环内酯类内酯,具有式 $C_{44}H_{69}NO_{12}$,分子量为804.018g/mol。

[0026] 他克莫司可从细菌筑波链霉菌(streptomyces tsukubaensis)的发酵液中分离,并且可商购获得,例如,从中国浙江海正化工有限公司商购获得,通常以固体一水合物或储备溶液形式提供。本文所用的术语他克莫司的“治疗有效量”是指他克莫司的剂量、浓度或强度,其可用于产生所需的药理学作用,更具体地说,用于治疗眼内炎性眼病的药理学作用,详见下文。

[0027] 在优选的实施方案中,本发明的药物组合物是液体制剂。如本文所用的术语“液体制剂”是指任何不完全是固体的制剂。根据本发明的液体制剂可以是自由流动的液体或换句话说具有低粘度,或者可以是具有中等或高粘度的液体,例如乳膏或糊剂或凝胶。然而,优选地,本发明的药物组合物是至少在生理温度下的自由流动液体,其可以逐滴施用。

[0028] 本发明的药物组合物可以配制成溶液、悬浮液或乳液的形式。优选地,将本发明的药物组合物配制成溶液,甚至更优选配制成澄清溶液。

[0029] 如上所述和本文所理解的,术语“澄清溶液”是指其中所有溶质在室温条件即15至25°C下完全可溶解或已溶解的液体溶液。澄清溶液不包含任何颗粒或固相组分,并且优选在室温下具有接近水的折射率(即1.333)。

[0030] 因此,如上所述的他克莫司可以溶解或悬浮或乳化在本发明药物组合物的液体载体中。本文所用的术语“液体载体”是指连续(或连贯)相,通常是本发明的药物组合物的溶剂或不同溶剂的混合物,其中他克莫司溶解或悬浮或乳化。

[0031] 本发明药物组合物的关键优点中的一些是通过在本发明药物组合物的液体载体中存在半氟化烷烃(其起液体悬浮载体的作用或在溶液的情况下起溶剂的作用)而产生。

[0032] 本文所使用的术语“半氟化烷烃”(在本文中也称为“SFA”)是指由至少一个全氟化链段(F-链段)和至少一个非氟化烃链段(H-链段)组成的直链或支链化合物。更优选地,半氟化烷烃是由一个全氟化链段(F-链段)和一个非氟化烃链段(H-链段)组成的直链或支链化合物。优选地,所述半氟化烷烃是至少在4°至40°C的温度范围内的一个温度下以液态存在的化合物。在一个实施方案中,所述SFA的全氟化链段和/或烃链段任选地包含环状烃链段或由环状烃链段组成,或任选地所述SFA包含在烃链段内的不饱和部分。

[0033] 优选地,直链或支链SFA的F-链段包含介于3至10个之间的碳原子。还优选H链段包含介于3至10个之间的碳原子。特别优选F-和H-链段彼此独立地包含介于3至10个之间的碳原子。优选地,每个链段独立于另一个链段具有3至10个碳原子。

[0034] 进一步优选的是,直链或支链SFA的F-链段包含介于4至10个之间的碳原子和/或H-链包含介于4至10个之间的碳原子。特别进一步优选的是,F-和H-链段彼此独立地包含4-10个碳原子。优选地,每个链段独立于另一个链段具有4-10个碳原子。

[0035] 因此,在本发明的一优选的实施方案中,液体载体包含至少一种半氟化烷烃,其为化合物,优选为式 $F(CF_2)_n(CH_2)_mH$ 的直链化合物,其中n和m是独立地选自3至10的范围内的整数,优选选自4至10的范围内的整数,甚至更优选选自4至8个碳原子的范围。

[0036] 任选地,直链或支链SFA可包含支链非氟化烃链段,其包含一个或多个选自 $-CH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 $-C_3H_7$ 和 $-C_4H_9$ 的烷基,和/或直链或支链SFA可包含支链全氟化烃链段,其包含一个或多个选自 $-CF_3$ 、 $-C_2F_5$ 、 $-C_3F_7$ 和 $-C_4F_9$ 的全氟化烷基。进一步优选的是,所述直链或支链SFA的F-链段和H-链段的碳原子的比率(所述比率通过将F-链段中的碳原子数除以H-链段中的碳原

子数得到；例如对于1-全氟己基辛烷 (F6H8)，比率为0.75) ≥ 0.5 ，更优选所述比率 ≥ 0.6 。进一步优选的是，F-链段和H-链段的碳原子的比率是在0.6和3.0之间的范围内，更优选地，所述比率是在0.6和1.0之间。

[0037] 在本发明的一个优选实施方案中，半氟化烷烃是指由至少一个全氟化链段 (F-链段) 和至少一个烃链段 (H-链段) 组成的直链化合物。更优选地，所述半氟化烷烃是由一个全氟化链段 (F-链段) 和一个烃链段 (H-链段) 组成的直链化合物。

[0038] 优选地，直链SFA的F链段包含3至10个碳原子。还优选H链段包含3至10个碳原子。特别优选F-和H-链段彼此独立地包含3-10个碳原子。优选地，每个链段独立于另一个链段具有3至10个碳原子。

[0039] 进一步优选的是，直链SFA的F链段包含在4至10个碳原子和/或H-链段包含4-10个碳原子，甚至更优选4-8个碳原子。特别进一步优选的是，F-和H-链段彼此独立地包含4-10个碳原子，甚至更优选4-8个碳原子。优选地，每个链段独立于另一个链段具有4至10个，优选4至8个碳原子。

[0040] 根据另一种命名法，本发明中使用的直链半氟化烷烃可以称为 F_nH_m ，其中F表示全氟化烃链段，H表示非氟化烃链段，n、m是相应链段的碳原子数。例如，F4H5用于1-全氟丁基戊烷。

[0041] 在本发明的特别优选的实施方案中，根据本发明的供使用的药物组合物的液体载体包含至少一种选自由以下项组成的群组中的直链半氟化烷烃：F4H4、F4H5、F4H6、F4H7、F4H8、F5H4、F5H5、F5H6、F5H7、F5H8、F6H2、F6H4、F6H6、F6H7、F6H8、F6H9、F6H10、F6H12、F8H8、F8H10、F8H12和F10H10。

[0042] 更优选地，根据本发明的药物组合物的液体载体包含至少一种直链半氟化烷烃，所述直链半氟化烷烃选自：F4H4、F4H5、F4H6、F5H4、F5H5、F5H6、F5H7、F5H8、F6H2、F6H4、F6H6、F6H7、F6H8、F6H9、F6H10、F8H8、F8H10、F8H12和F10H10，甚至更优选地，直链SFA选自：F4H4、F4H5、F4H6、F5H4、F5H5、F5H6、F5H7、F5H8、F6H4、F6H6、F6H7、F6H8、F6H9、F6H10、F8H8、F8H10、F8H12和F10H10，更优选地，直链SFA选自：F4H4、F4H5、F4H6、F5H5、F5H6、F5H7、F5H8、F6H6、F6H7、F6H8、F6H9、F6H10、F8H8、F8H10、F8H12和F10H10，甚至更优选直链SFA选自：F4H4、F4H5、F4H6、F5H5、F5H6、F5H7、F5H8、F6H6、F6H7、F6H8、F6H9、F6H10和F8H8。

[0043] 在进一步优选的实施方案中，根据本发明的药物组合物的液体载体包含至少一种直链SFA，所述直链SFA选自：F4H5、F4H6、F5H6、F5H7、F6H6、F6H7和F6H8。

[0044] 在甚至更优选的实施方案中，根据本发明的液体载体包含至少一种直链SFA，优选至少一种选自F4H5、F4H6和F6H8的直链SFA。甚至更优选地，根据本发明的液体载体包含至少一种选自F4H5和F6H8的直链SFA。最优选地，在本发明中，液体载体包含F4H5 (1-全氟丁基-戊烷) 作为唯一的半氟化烷烃。

[0045] 在另一实施方案中，包含在液体载体中的半氟化烷烃可以作为两种或更多种不同的如上所述的半氟化烷烃的混合物使用。因此，本发明的药物组合物可包含超过一种的SFA。例如，可能有用的是，组合不同的SFA，以便实现特定的目标性质，例如一定的密度或粘度。如果使用两种或更多种不同SFA的混合物，则进一步优选该混合物包含F4H5、F4H6、F6H4、F6H6、F6H8和F6H10中的至少一种，特别是F4H5、F6H6和F6H8中的一种。在另一实施方案中，混合物包含选自F4H5、F4H6、F6H4、F6H6、F6H8和F6H10的至少两种成员，特别是选自

F4H5、F6H6和F6H8的至少两种成员。

[0046] 液体SFA在化学和生理上是惰性的、无色且稳定的。它们的典型密度范围为 $1.1\text{g}/\text{cm}^3$ 至 $1.7\text{g}/\text{cm}^3$ ，它们的表面张力可低至 $19\text{mN}/\text{m}$ 。FnHm类型的SFA不溶于水，但也具有一定的两亲性，亲脂性增加与非氟化链段的尺寸增加相关。

[0047] 在另一实施方案中，本发明药物组合物的液体载体包含至少一种在室温下为液体的半氟化烷烃，例如F4H4、F4H5、F4H6、F5H5、F5H6、F5H7、F5H8、F6H6、F6H7、F6H8、F6H9、F6H10和F8H8。

[0048] 由本发明药物组合物的液体载体包含的特别优选的半氟化烷烃是1-全氟丁基-戊烷，一种具有化学式 $\text{F}(\text{CF}_2)_4(\text{CH}_2)_5\text{H}$ 的半氟化烷烃。它是惰性、水不溶性液体，在 25°C 下密度为 $1.284\text{g}/\text{cm}^3$ ，在 20°C 下折射率为1.3204。该化合物的替代命名法包括F4H5，其中F表示包含4个碳原子的直链全氟化烷烃链段，并且其中H表示5个碳原子的直链和非氟化烷烃链段。

[0049] 根据本发明的供使用的药物组合物包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体，而在一实施方案中，基于最终药物组合物(最终剂型)的重量计算，本发明的药物组合物包含或包括至少75重量%，优选至少80重量%，更优选至少85重量%，甚至更优选至少90重量%，最优选至少95重量%的包含至少一种半氟化烷烃的液体载体。包含他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的药物组合物可任选地包含其他溶剂和赋形剂，如下文详述。

[0050] 在一优选的实施方案中，基于最终组合物的重量计算，本发明的药物组合物包含约95至约99.999重量%，更优选约95至约99.99重量%，更优选99至99.99重量%，甚至更优选99.95至99.99重量%，并且最优选约99.96至约99.98重量%的包含至少一种如上所述的半氟化烷烃的液体载体。

[0051] 在一些优选的实施方案中，根据本发明的供使用的药物组合物包含至多 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的他克莫司，优选至多 $0.5\text{mg}/\text{ml}$ 的他克莫司，更优选至多 $0.3\text{mg}/\text{ml}$ 的他克莫司(基于最终组合物的体积(最终剂型)计算)。

[0052] 因此，根据本发明的供使用的药物组合物的优选实施方案包含约0.01% (w/v) 至0.1% (w/v) (相当于0.1至 $1\text{mg}/\text{ml}$)的他克莫司。然而，在优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含约0.01%至0.05% (w/v) (对应于0.1至 $0.5\text{mg}/\text{ml}$)，甚至更优选约0.02%至约0.04% (w/v) (相当于0.2至 $0.4\text{mg}/\text{ml}$)的他克莫司。

[0053] 本发明的药物组合物还可包含一种或多种其他赋形剂作为任选的和另外的组分。如本文所用的术语“赋形剂”是指可以加入到本发明的药物组合物中的任何药学上可接受的天然或合成物质，更具体地是指药物组合物的液体载体，以增强或改变其物理或化学组成或稳定性或治疗性质。本发明的药物组合物可任选地包含一种或多种赋形剂，例如抗氧化剂、防腐剂、脂质或油性赋形剂、表面活性剂或润滑剂或其至少2种赋形剂的组合。

[0054] 适用于本发明药物组合物的抗氧化剂包括，例如：丁基化羟基甲苯(BHT)、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、叔丁基氢醌(TBHQ)、维生素E、维生素E衍生物(即 α -生育酚乙酸酯)和/或抗坏血酸。

[0055] 适用于本发明的药物组合物中的脂质或油性赋形剂包括，例如，甘油三酯油(即大豆油、橄榄油、芝麻油、棉籽油、蓖麻油、甜杏仁油)、甘油三酯、矿物油(即凡士林和液体石蜡)、中链甘油三酯(MCT)、油性脂肪酸、肉豆蔻酸异丙酯、油性脂肪醇、山梨糖醇和脂肪酸的

酯、油性蔗糖酯、或眼睛生理上耐受的任何其他油性物质。

[0056] 适用于本发明的药物组合物中的润滑剂包括，例如，羧甲基纤维素及其钠盐(CMC，羧甲基纤维素)、聚乙烯醇、羟丙基甲基纤维素(HPMC、羟丙甲纤维素)、透明质酸及其钠盐和羟丙基瓜尔胶。

[0057] 根据本发明的药物组合物可以包含或不包含药学上合适的天然或合成防腐剂，例如苯扎氯铵和氯己定。然而，在优选的实施方案中，根据本发明的药物组合物不包含药学上可接受的防腐剂。

[0058] 除了如上所述的赋形剂作为任选组分之外，本发明药物组合物的液体载体还可包含一种或多种其他溶剂。如本文所用的术语“其他溶剂”是指除了液体载体的至少一种半氟化烷烃之外的溶剂或两种或更多种不同溶剂的混合物。合适的其他溶剂可以选自，例如，醇，如乙醇、异丙醇或其他生理上可被眼睛耐受的溶剂。

[0059] 一种优选的溶剂是乙醇，基于最终组合物(最终剂型)的液体载体的总重量，乙醇可以以至多约1.4重量%(相当于1.4%(w/w))或更少，优选至多约1.0重量%，例如0.2至1.0重量%(对应于0.2%至1.0%(w/w))或0.5至1.0重量%(对应于0.5至1.0%(w/w))的量存在于根据本发明的供使用的药物组合物中。更优选地，根据本发明的供使用的药物组合物的液体载体包含1.0重量%的乙醇(另外包含如上所述的至少一种半氟化烷烃)。最优选地，根据本发明的供使用的药物组合物的液体载体包含1.4重量%的乙醇(另外包含如上所述的至少一种半氟化烷烃)。

[0060] 在另一实施方案中，水也可以存在于本发明的药物组合物中，然而，其优选以小的量存在，所述量基于最终组合物(最终剂型)计算，为最多1.0重量%或甚至最多0.1重量%或更少的。在一优选的实施方案中，本发明的药物组合物基本上不含水，而残留的水可归因于他克莫司的潜在残留的水含量。本文所用的术语“基本上”是指如果以痕量或剩余量存在，则例如对本发明的目的不提供技术优势或相关性。

[0061] 例如，在本发明的一些实施方案中，作为优选的半氟化烷烃的1-全氟丁基-戊烷(F4H5)不包含任何水，或具有的水含量不超过1-全氟丁基-戊烷中水的最大溶解度，例如，通过本领域已知的用于水分分析的方法，例如Karl-Fischer滴定法，测定水含量小于 1.6×10^{-4} mg/ml。

[0062] 在另一优选的实施方案中，本发明的药物组合物(基本上)不含水和/或不含防腐剂。

[0063] 在另一优选的实施方案中，根据本发明的供使用的药物组合物包含0.01%至0.05%(w/v)的他克莫司、0.2至1.4%(w/w)的乙醇(基于半氟化烷烃的量计)，并且液体载体中包含的半氟化烷烃选自F4H5和F6H8。在另一优选的实施方案中，根据本发明的供使用的药物组合物包含0.01%至0.05%(w/v)的他克莫司、0.2至1.4%(w/w)的乙醇(基于半氟化烷烃的量计)，并且液体载体中包含的半氟化烷烃是F4H5。在另一优选的实施方案中，本发明的组合物的液体载体由0.2至1.4%(w/w)的乙醇(基于半氟化烷烃的量计)和选自F4H5和F6H8的半氟化烷烃组成，优选半氟化烷烃是F4H5。

[0064] 在进一步优选的实施方案中，本发明的药物组合物包含0.03%(w/v)的他克莫司、1.4%(w/w)的乙醇，并且半氟化的烷烃是F4H5。在一个特别优选的实施方案中，本发明的药物组合物基本上由0.03%(w/v)的他克莫司、1.4%(w/w)乙醇和F4H5组成，所有这些都基于

最终组合物(最终剂型)的重量计算。

[0065] 在进一步优选的实施方案中,本发明的药物组合物包含0.03% (w/v) 他克莫司、1.0% (w/w) 乙醇,并且半氟化烷烃是F4H5。在一特别优选的实施方案中,本发明的药物组合物基本上由0.03% (w/v) 的他克莫司、1.0% (w/w) 乙醇和F4H5组成,所有这些都基于最终组合物(最终剂型)的重量计算。

[0066] 根据第一方面,本发明涉及用于治疗眼内炎性眼病的方法的药物组合物,该药物组合物包含:治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体。如本文所使用的术语“眼内炎性眼病”是指眼睛中间层和眼睛后部的任何类型的炎症。具体地,涉及角膜和结膜的炎性眼病不包括在本文所用的眼内炎性眼病的定义中。

[0067] 如本文所使用的,术语“炎性眼病”是指影响眼睛的任何部分或周围组织的炎症。涉及眼睛的炎症可以从花粉症的过敏性结膜炎到诸如葡萄膜炎、巩膜炎、视神经炎、角膜炎、视网膜血管炎和慢性结膜炎之类的罕见的可能致盲的病症。

[0068] 在优选的实施方案中,眼内炎性眼病选自葡萄膜炎、视网膜炎、巩膜炎、视神经炎及其组合。

[0069] 如上所述的葡萄膜炎及其下面进一步定义的不同类型是眼内的炎症,即,眼内炎性眼病,其特别影响构成葡萄膜的眼睛的三个部分中的一个或多个。

[0070] 如本文所使用的,术语“葡萄膜炎”广义上是指葡萄膜(由虹膜、睫状体和脉络膜组成的眼睛的中间层)的炎症。葡萄膜夹在巩膜(眼睛的白色部分)和眼睛内部的神经组织(视网膜)之间。葡萄膜炎的类型通常根据葡萄膜中炎症发生的位置进行分类。葡萄膜炎通常用类固醇治疗。

[0071] 本文所用的术语“前葡萄膜炎”是指虹膜的炎症(虹膜炎)或虹膜和虹膜体的炎症(虹膜睫状体炎)。虹膜炎的主要治疗法是使用类固醇眼药水。这种治疗的主要副作用在于降低眼睛抵抗感染的能力,并且它们可能加速某些患者的青光眼和白内障。

[0072] 如本文所用的术语“中间葡萄膜炎”是指在睫状体和玻璃体胶冻样物(vitreous jelly)后面的区域的炎症。

[0073] 本文所用的术语“后葡萄膜炎”是指眼后部、脉络膜和视网膜的炎症。

[0074] 此外,本文所用的术语“弥漫性葡萄膜炎”(也称为“全葡萄膜炎”)是指葡萄膜的所有区域的炎症。

[0075] 视网膜炎是眼内炎性眼病的另一示例。本文所使用的术语“视网膜炎”是指眼内侧的后壁组织中的肿胀。视网膜炎可能由白内障手术、糖尿病、黄斑皱褶、全身性疾病,创伤引起,或者可能根本没有可辨别的原因引起。如本文所使用的,术语“视网膜炎”还包括具有炎症成分的视网膜疾病,例如糖尿病性视网膜病和年龄相关性黄斑变性(AMD)。

[0076] 另一种示例性眼内炎性眼病是巩膜炎。本文所用的术语“巩膜炎”是指巩膜的炎症。巩膜是眼睛的坚硬的白色外涂层,其为眼睛提供刚性结构支撑。巩膜炎的治疗取决于炎症的严重程度。患有严重形式的巩膜炎的人通常需要使用类固醇治疗。

[0077] 然而,根据本发明的另一种眼内炎性眼病是视神经炎。如本文所使用的术语“视神经炎”是指视神经的炎症。主要治疗法通常包括施用皮质类固醇。视神经乳头的炎症称为视神经乳头炎或眼内视神经炎。因此,本文使用的术语“视神经乳头炎”是指特定类型的视神经炎。此外,神经眼眶部分的炎症称为球后视神经炎或眼眶视神经炎。

[0078] 包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种如上所述的半氟化烷烃的液体载体的药物组合物可用于治疗或处理或用于改善与眼内炎性眼病相关的症状,所述眼内炎性眼病选自葡萄膜炎、视网膜炎、巩膜炎和视神经炎或其组合以下组成的组。

[0079] 在另一实施方案中,本发明因此涉及供使用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,所述药物组合物包含:治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体,所述眼内炎性眼病选自葡萄膜炎、视网膜炎、巩膜炎和视神经炎或其组合。在本发明的另一实施方案中,眼内炎性眼病选自葡萄膜炎、视网膜炎及其组合。如上所述,眼内炎性眼病的组合是可能的。这意味着,在同一时间,在患者中可发生仅一种所述眼内炎性眼病,或者上述四种疾病中的两种、三种或全部可在同一时间在患者中发生并且可以用根据本发明的药物组合物成功地治疗。

[0080] 在本发明的一优选实施方案中,眼内炎性眼病是葡萄膜炎。因此,在一实施方案中,本发明涉及用于治疗葡萄膜炎的方法中的药物组合物,其包含:治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体。

[0081] 在一具体实施方案中,本发明因此涉及供使用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,所述药物组合物包含:治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体,所述眼内炎性眼病优选葡萄膜炎,葡萄膜炎选自前葡萄膜炎、中间葡萄膜炎和后葡萄膜炎或其组合。换句话说,本发明的优选实施方案涉及供使用于治疗前葡萄膜炎和/或中间葡萄膜炎和/或后葡萄膜炎的方法中的药物组合物,所述药物组合物包含:治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体。

[0082] 当葡萄膜炎在治疗后迅速消退时,葡萄膜炎可能是急性的,或当重复的发作间隔开几个月的间隙时,其是反复发作的,或者当病情持续长的期间或需要长期药物来控制它时,例如当病情持续超过三个月时,其是慢性的。本发明的其他实施方案涉及供使用于治疗急性或慢性眼内炎性眼病(例如葡萄膜炎和/或视网膜炎)的方法中的药物组合物。本发明进一步优选的实施方案涉及供使用于治疗葡萄膜炎的方法中的药物组合物,所述药物组合物包含:治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体,其中葡萄膜炎是慢性或急性的。

[0083] 在另一实施方案中,本发明涉及如上所述的供使用于治疗葡萄膜炎的方法中的药物组合物,其中葡萄膜炎是难治性葡萄膜炎。

[0084] 如前所述,待用本发明的药物组合物治疗的所有提及的眼内炎性眼病可以单独发生或与如上所述的一种或两种或多种不同的其它眼内炎性眼病一起发生。在一特别优选的实施方案中,本发明涉及如上所述的供使用于治疗葡萄膜炎或特定类型的葡萄膜炎,例如前葡萄膜炎、中间葡萄膜炎和/或后葡萄膜炎并组合治疗视网膜炎的药物组合物。应当注意,可能与其他组合发生的所有眼内炎性眼病可能是也可能不是慢性的或急性的。例如,慢性葡萄膜炎可与急性视网膜炎一起发生,反之亦然。

[0085] 本发明的药物组合物尤其可用作眼用组合物,并且可优选局部施用于患者的眼睛、眼睑、眼囊、眼表和/或眼组织。然而,优选地,本发明的药物组合物可以局部施用于患者眼睛的外表面或施用于可由患者或由将该药物组合物施用于有需要的患者的眼睛的另一人容易地接近的眼组织。

[0086] 药物组合物,特别是当用作低粘度或高粘度(通常在1至3.5mPa·s范围内)的液体

时,可以有利地以滴剂的形式或通过喷雾或通过注射(例如玻璃体内注射或眼周注射)施用。然而,最优选地,本发明的液体药物组合物可以滴剂形式施用,更具体地作为待局部施用于眼睛的滴眼剂。

[0087] 取决于疾病的蔓延或者待治疗的患者的双眼是否受到感染,本发明的眼用药物组合物的滴剂或滴眼剂可以仅施用于患者的一只眼睛或两只眼睛。主要由于包含在本发明药物组合物的液体载体中的半氟化烷烃的特定物理特性,例如高密度和低表面张力,液滴的体积范围通常为约 $5\mu\text{l}$ 至约 $50\mu\text{l}$ 。这种小液滴尺寸通常有利于滴加,并且还有助于本发明药物组合物的精确给药。因此,本发明的眼用药物组合物以单滴剂形式给药,每只眼睛每剂量约 $5\mu\text{l}$ 至 $50\mu\text{l}$ 的体积,优选每只眼睛每剂量约 $8\mu\text{l}$ 至 $15\mu\text{l}$ 的体积,更优选每只眼睛每剂量约 $8\mu\text{l}$ 至 $12\mu\text{l}$ 的体积,并且最优选每只眼睛每剂量约 $10\mu\text{l}$ 的体积。

[0088] 本发明的药物组合物可以每天施用一次或每天施用几次,通常每天施用至多8次或至多5次,优选以更长或更短的等间隔施用。在许多情况下,本发明的药物组合物优选每天施用多达4次,例如每天仅一次或每天两次或每天三次或四次。

[0089] 在一优选的实施方案中,本发明的药物组合物可以施用于用炎性眼病的一线治疗来治疗的患者或优选甚至用眼内炎性眼病的一线治疗来治疗的患者。本文所使用的术语“一线治疗”是指用除了本发明的包含他克莫司和包含半氟化烷烃的液体载体的药物组合物之外的活性化合物或组合物治疗炎性眼病,或者更具体地治疗眼内炎性眼病。因此,根据本发明的用于治疗眼内炎性眼病的本发明的药物组合物的施用可以提供作为二线疗法或辅助疗法或治疗,具体取决于所选择的一线疗法或治疗是否在二线治疗开始之前已经停止了,或者在辅助疗法或治疗的情况下仍在进行。

[0090] 根据优选的实施方案,将本发明的药物组合物施用于用类固醇或皮质类固醇(例如地塞米松、曲安西龙和氟轻松,优选地塞米松)作为一线治疗法治疗的患者。这些甾体化合物通常用作许多炎性眼病的一线治疗,特别是许多眼内炎性眼病,例如如上所述的葡萄膜炎和视网膜炎的一线治疗。然而,优选地,将包含他克莫司和至少一种包含半氟化烷烃的液体载体的用于本发明所述用途的药物组合物(作为二线治疗)施用于用类固醇作为葡萄膜炎的一线治疗法治疗的患者。

[0091] 本发明的药物组合物提供了用类固醇或皮质类固醇的标准治疗的临床替代方案,但是没有引起作为用类固醇或皮质类固醇治疗的常见副作用的眼内压的增加,这种眼内压的增加增加了诸如青光眼或白内障之类的进一步的并发症的风险。此外,本发明的药物组合物提供了可以局部自我给药的二线治疗的所有优点。

[0092] 此外,令人惊讶地发现,本发明的药物组合物可有效减少浸润到视网膜中的免疫细胞的数量。因此,本发明还涉及减少患有炎性眼病或更具体地眼内炎性眼病的患者的视网膜中的浸润性免疫细胞的数量,所述方法包括局部施用包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的药物组合物。此外,本发明还涉及减少患有涉及视网膜的具有炎性成分的疾病(例如糖尿病性视网膜病和年龄相关性黄斑)的患者的视网膜中的浸润性免疫细胞的数量,其包括局部施用包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的药物组合物。

[0093] 在另一方面,本发明提供治疗眼内炎性眼病的方法,其包括向眼睛施用包含他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的组合物。

[0094] 在又一方面,本发明涉及包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的药物组合物在治疗眼内炎性眼病的方法中的用途。

[0095] 在又一方面,本发明涉及包含他克莫司(优选以治疗有效量)和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的药物组合物在制备用于治疗眼内炎性眼病的药物中的用途。

[0096] 在又一方面,本发明涉及一种试剂盒,其包含:

i. 用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,其包含药学上有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体;和

ii. 用于容纳所述组合物的容器,其中所述容器优选包括适于将所述组合物局部施用于眼睛表面,优选下眼睑内,施用于泪囊或施用于眼组织的分配装置;以及

iii. 任选地关于药物组合物在治疗、处理、预防或改善眼内炎性眼病或病症中的使用说明或说明书。

[0097] 根据本发明该方面中的项i,药物试剂盒包含药物组合物,其包含如上针对本发明第一方面所述的治疗有效量的他克莫司。

[0098] 与本发明该方面的项ii一起使用的容器可以任何合适的形式作为容纳单剂量药物组合物的单次使用的容器,或作为容纳多个单剂量的多次使用的容器提供。优选地,容器包括分配装置,其使得能将药物组合物逐滴局部施用于患者的眼表。在一实施方案中,包括分配装置的容器可以是具有合适的分配装置的传统滴管瓶(例如由玻璃或热塑性弹性体制成的滴管瓶),或一次性滴管。

[0099] 在本发明该方面的另一优选实施方案中,分配装置包括具有一定尺寸以便分配体积为约8至15 μ l,优选约8至12 μ l,更优选约10 μ l的液滴的滴管。通过小的液滴体积,可以实现对眼睛的精确剂量给药(避免过量给药),并且可以避免在给药后从眼睛中过量排出大部分组合物。

[0100] 在一优选的实施方案中,根据本发明该方面的试剂盒另外包含作为项iii的使用说明。

[0101] 根据本发明该方面的项iii的药物组合物的使用说明或说明书可以以任何合适的形式提供,例如作为印刷或其他可读形式的或在任何其他合适的载体上提供的所附的标签或说明书。替代地,使用说明可以以电子或计算机可读形式提供,例如以条形码或QR码提供。

[0102] 根据项iii的使用说明书可包括本发明的药物组合物在用于治疗、医治、预防或改善眼内炎性眼病或病症(优选用于治疗选自葡萄膜炎、视网膜炎、巩膜炎和视神经炎或其组合的眼内炎性眼病)的说明书。

[0103] 以下是本发明所包含的带编号的实施方案:

[0104] 1. 一种用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,其包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体,或

一种治疗眼内炎性眼病的方法,其包括给眼睛施用包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的组合物,或

包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的药物组合物在治疗眼内炎性眼病的方法中的用途,或

[0105] 包含(优选治疗有效量的)他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体的药

物组合物在制备用于治疗眼内炎性眼病的药物中的用途,或

试剂盒,其包含i.用于治疗眼内炎性眼病的方法中的药物组合物,其包含治疗有效量的他克莫司和包含至少一种半氟化烷烃的液体载体;和ii.用于容纳所述组合物的容器,其中所述容器优选包括适于将所述组合物局部施用于眼睛表面,优选下眼睑内,施用于泪囊或施用于眼组织的分配装置,

其中眼内炎性眼病选自葡萄膜炎、视网膜炎、巩膜炎和视神经炎或其组合。

[0106] 2.根据实施方案1的实施方案,其中眼内炎性眼病选自葡萄膜炎、视网膜炎及其组合。

[0107] 3.根据实施方案2的实施方案,其中眼内炎性眼病是葡萄膜炎。

[0108] 4.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中葡萄膜炎是难治性葡萄膜炎。

[0109] 5.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中葡萄膜炎是前葡萄膜炎和/或中间葡萄膜炎和/或后葡萄膜炎。

[0110] 6.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中葡萄膜炎是慢性或急性的。

[0111] 7.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中所述半氟化烷烃是式 $F(CF_2)_n(CH_2)_mH$ 的化合物,其中n和m是独立地选自范围为3至10的整数。

[0112] 8.根据实施方案7的实施方案,其中所述半氟化烷烃选自F4H5、F4H6、F6H6、F6H8,优选其中所述半氟化烷烃选自F4H5、F6H8,更优选所述半氟化烷烃为F4H5。

[0113] 9.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中所述组合物包含至多1mg/ml的他克莫司,优选至多0.5mg/ml的他克莫司,更优选至多0.3mg/ml的他克莫司。

[0114] 10.根据前述实施方案中任一项的实施方案,所述组合物包含有机赋形剂,优选乙醇,更优选至多1.4重量%的乙醇。

[0115] 11.根据前述实施方案中任一项的实施方案,该组合物是液体制剂。

[0116] 12.根据实施方案11的实施方案,其中液体制剂不含水和/或不含防腐剂。

[0117] 13.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中所述组合物以溶液、悬浮液或乳液的形式配制,优选将所述组合物配制成溶液。

[0118] 14.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中将所述组合物局部施用于眼、眼睑、眼囊、眼表或眼组织。

[0119] 15.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中所述组合物以滴剂形式或通过喷雾或通过注射施用。

[0120] 16.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中所述组合物以单滴剂施用,单滴剂的体积为约5至50 μ l/眼,优选约8至15 μ l/眼,更优选约10 μ l/眼,每天最多4次。

[0121] 17.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中将所述组合物施用于用一线治疗法治疗的患者。

[0122] 18.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中将所述组合物施用于用类固醇作为第一线治疗法治疗的患者。

[0123] 19.根据实施方案17或18的实施方案,其中炎性疾病是葡萄膜炎。

[0124] 20.根据前述实施方案中任一项的实施方案,所述组合物包含0.03%w/v的他克莫司、1.4%w/w乙醇,并且半氟化烷烃是F4H5。

[0125] 21.根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中所述组合物还包含一种或多种

其他赋形剂。

[0126] 22. 根据前述实施方案中任一项的实施方案,其中组合物主要由0.03% (w/v) 的他克莫司、1.4% (w/w) 乙醇组成,并且半氟化烷烃是F4H5。

附图说明

[0127] 图1显示了他克莫司/SFA滴眼液处理对内毒素诱导的葡萄膜炎 (EIU) 小鼠模型的临床表现的影响。如下所述,通过玻璃体内注射200ng/ μ l/眼LPS在小鼠中诱导EIU。LPS注射后,立即用0.1%地塞米松/PBS (DXM) 或0.03%他克莫司/PBS (Tacro/PBS) 或0.03%他克莫司/SFA (Tacro/SFA) 滴眼液处理小鼠,每天3次。之后48小时进行包括眼底图像的临床评估。图1A-E显示来自未处理 (A,C)、用他克莫司/PBS处理 (C)、用DXM处理 (D) 和用他克莫司/SFA处理 (E) 的小鼠的眼底图像。图1 (F) 显示了不同组中视网膜炎症的临床评分;根据Mann-Whitney检验的统计。

[0128] 图2显示了不同组小鼠中EIU的组织病理学。在诱导EIU后第0天至第2天,每天用0.1%地塞米松/PBS (DXM) 或0.03%他克莫司/PBS或0.03%他克莫司/SFA滴眼液处理EIU小鼠3次。在第2天收集眼睛并处理以用于H-E染色 (苏木精和曙红染色)。图2A-D显示来自未处理的EIU小鼠 (A) 作为对照,用他克莫司/PBS处理的小鼠 (B),用DXM处理的小鼠 (C) 和用他克莫司/SFA处理的小鼠 (D) 的光学显微图像。图2E显示了视网膜炎症的组织病理学评分。一个图表示一只小鼠的得分 (即小鼠两只眼睛的平均得分);根据Mann-Whitney检验的统计 (“AC”表示前房;“CB”表示睫状体;“Ir”表示虹膜;“Vi”表示玻璃体;Re表示视网膜)。

[0129] 图3显示了在实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎 (EAU) 后他克莫司/SFA滴眼液治疗对临床表现的影响。使用IRBP₁₋₂₀肽免疫在C57BL/6J小鼠中诱导EAU。在免疫后 (p. i.) 第14天,每天用不同的滴眼液处理小鼠3次。眼底图像是在p. i. 第25天从对照未处理的EAU小鼠 (A)、用0.03%他克莫司/PBS处理的小鼠 (B)、用0.1%地塞米松 (DXM) 处理的小鼠 (C) 和用0.03%他克莫司/SFA处理的小鼠 (D) 拍摄的。图3E显示了从p. i. 第14天到p. i. 第25天在不同的组中的EAU临床评分的变化 (根据Wilcoxon匹配对检验的统计)。图3F显示了p. i. 第25天在不同的组中EAU的临床评分的比较 (根据Mann-Whitney检验的统计)。

[0130] 图4显示了不同组小鼠中EAU的组织病理学。从p. i. 第14天至第24天,每天用0.1%地塞米松 (DXM) 或0.03%他克莫司/SFA滴眼液处理EAU小鼠3次。在p. i. 第25天收集眼睛,并处理以用于H-E染色。图4A-4D显示对照未处理的EAU小鼠 (A)、用地塞米松 (DXM) 处理的小鼠 (B)、用他克莫司/PBS处理的小鼠 (c) 和用他克莫司/SFA处理的小鼠 (D) 的光学显微图像。图4E显示了视网膜炎症的组织病理学评分。一个图表示一只小鼠的得分 (即,小鼠的两只眼睛的平均得分) (根据Mann-Whitney检验的统计)。

[0131] 图5显示正常小鼠眼睛的玻璃体 (图5A)、脉络膜/巩膜 (图5B)、视网膜 (图5C) 和全血 (图5D) 中的他克莫司水平。小鼠用他克莫司/SFA或他克莫司/PBS滴眼液每天处理3次,持续3天。在最后一次滴眼处理后的不同时间 (15分钟,30分钟,1小时,2小时,4小时,6小时),收集样品并处理以使用液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 法测量他克莫司。将他克莫司的水平标准化为视网膜和脉络膜/巩膜中的组织重量。平均值 \pm SD. N=4,与在相同时间点的用他克莫司/PBS治疗的眼睛相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001 (双因素ANOVA),与在相同时间点的用他克莫司/PBS治疗的眼睛相比,+P<0.05,++P<0.01 (非配对t检验);“#”表示低于测定中可检测性的值。

[0132] 图6A-D显示了有和没有葡萄膜炎的小鼠眼睛的玻璃体中的他克莫司水平。对照非葡萄膜炎小鼠和葡萄膜炎小鼠用他克莫司/SFA滴眼液每天处理3次,持续3天。在最后一次滴眼处理后的不同时间(15分钟,30分钟,1小时,2小时,4小时,6小时)收集样品。图6A显示玻璃体中的他克莫司水平。图6B显示脉络膜/巩膜组织中的他克莫司水平。图6C显示视网膜组织中的他克莫司水平,图6d显示全血中的他克莫司水平。将他克莫司的水平标准化为视网膜和脉络膜/巩膜中的组织重量。平均值±SD,N=4;与相同时间点的对照非葡萄膜炎眼睛相比,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001(双因素ANOVA);与相同时间点的非葡萄膜炎眼睛相比,+P<0.05,++P<0.01(非配对t检验);“#”表示他克莫司水平低于测定中的可检测值。

[0133] 图7显示了在内毒素诱导的葡萄膜炎(EIU)小鼠模型中观察到的免疫细胞浸润。在此,使用流式细胞术测量视网膜中的浸润性免疫细胞。当使用0.03%(w/v)他克莫司/SFA滴眼液时,在视网膜中观察到较低水平的浸润性免疫细胞。(对照=未处理,Dex=0.1%的在PBS中的地塞米松,Tacro/SFA=他克莫司SFA,Tacro/PBS=0.1%的在PBS中的他克莫司;浸润免疫细胞标记物:Gr1+=粒细胞标记物阳性细胞;LFA1+=在所有T细胞上并且还在B细胞、巨噬细胞和中性粒细胞上发现的淋巴细胞功能相关抗原1;CD62L+=在淋巴细胞上发现L-选择蛋白(CD62L)阳性细胞粘附分子;CCR2+=CC趋化因子受体2型阳性炎症单核细胞)

[0134] 以下实施例用于说明本发明,但这些实施例不应理解为限制本发明的范围。

实施例

[0135] 通用:

[0136] 使用的组合物:

[0137] 配制含有1.4%(w/w)乙醇的他克莫司[0.3mg/ml]溶解在F4H5中的0.03%w/v的溶液以包含并递送该高亲脂性药物,以眼药水形式局部施用,每天施加3次(1滴/眼)。该制剂在本文中缩写为“Tacro/SFA”或者替代为“他克莫司/SFA”或“Tac/SFA”。

[0138] 将他克莫司悬浮在PBS(磷酸盐缓冲盐水,0.03%)中的制剂用作对照。该制剂在本文中缩写为“Tacro/PBS”或者替代为“他克莫司/PBS”或“Tac/PBS”。

[0139] 另外,将0.1%的地塞米松(DXM)(Sigma-Aldrich,UK)悬浮在PBS中的制剂用作标准治疗对照。该制剂在本文中缩写为“DXM”或者替代为“Dex”或缩写为“0.1%地塞米松/PBS”。

[0140] 动物:

[0141] 遵照针对动物在眼科和视力研究中的使用的1986年家庭办公室动物(科学程序)法案(英国)(Home Office Regulations for Animal(Scientific Procedures)Act 1986(UK))和视觉和眼科研究协会声明(Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement)处理10至12周龄的C57BL/6J小鼠。所有方案均由主管伦理委员会批准。

[0142] 眼部炎症的临床评估:

[0143] 通过异氟醚吸入(Vet Tech Solutions Ltd,英国)麻醉动物,并使用1%的阿托品和2.5%的去氧肾上腺素(Minims,Bausch and Lomb,英国)扩张瞳孔。考虑到前部炎症和后部炎症,在显微镜下(通过使用眼底成像系统进行眼底检查)评估眼部炎症的严重程度。根据先前定义的评分系统(0至4级)对前葡萄膜炎的临床评分进行分级(Goureau et al., 1995,J.Immunol.154,6518-6523):

- 0级,无炎症反应;
- 1级,虹膜和结膜血管的离散炎症;
- 2级,虹膜和结膜血管扩张,前房有中度眩光;
- 3级,虹膜充血与前房中的廷德尔效应有关;和
- 4级,与3级相同的临床症状加上纤维蛋白或粘连的存在。

[0144] 为了评估后部炎症,使用如前所述的局部内窥镜眼底成像 (TEFI) 系统从每只小鼠摄取眼底图像 (Xu et al., 2008, Exp. Eye Res. 87, 319-326)。分析来自每只眼睛的数字图像,并且由两位独立研究人员使用我们之前开发的标准分级系统评估临床评分 (Xu et al., 2008, Exp. Eye Res. 87, 319-326)。

[0145] 组织学:

[0146] 在如下所述诱导实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎 (EAU) 后第25天或在诱导内毒素诱导的葡萄膜炎 (EIU) 小鼠后第2天收集眼睛,用于如下所述的组织学检查。将所有眼睛固定在2.5% (w/v) 戊二醛 (Agar Scientific Ltd, Stansted, 英国) 中至少24小时。然后将眼睛包埋在石蜡中并处理以用于苏木精和曙红 (H&E) 染色。对于每只眼睛,根据先前描述的标准对来自四个不同层的四个切片进行分级 (Agarwal et al., 2012, Methods Mol. Biol. 900, 443-469)。

[0147] 实施例1:内毒素诱导的葡萄膜炎 (EIU) 小鼠模型

[0148] 诱导内毒素诱导的葡萄膜炎 (EIU) 作为人急性前葡萄膜炎的模型:

[0149] 使用先前描述的方案 (Rosenbaum et al., 2011, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 52, 6472-6477) 经如下略微修改,通过玻璃体内注射LPS (脂多糖) 在C57BL/6J小鼠中诱导EIU:大肠杆菌055:B5LPS (Sigma, 英国) 溶解于无热原的磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 中。在重复分配器 (PB600-1, Hamilton, Nevada, 美国) 中使用30号针头和25 μ L注射器以200ng/眼给小鼠玻璃体内注射1 μ L的LPS。通过玻璃体内注射在LPS攻击后4至6小时开始眼内炎症,并在24至48小时达到峰值。然后炎症在3天后开始消退。眼睛可在一周内恢复正常 (Rosenbaum et al., 2011, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 52, 6472-6477)。

[0150] 处理EIU:

[0151] 在EIU研究中将小鼠随机分成四组:第1组:对照 (无滴眼液), n=6只小鼠;第2组:用0.1%地塞米松处理, n=6只小鼠;第3组:用0.03%他克莫司/PBS处理, n=6只小鼠;第4组:用0.03%他克莫司/SFA处理, n=8只小鼠。在玻璃体内注射LPS后立即开始每天三次用滴眼液处理所有小鼠,持续两天。该研究重复两次。

[0152] 他克莫司/SFA滴眼液处理EIU的效果:

[0153] 临床研究显示:在48小时,未处理以及用他克莫司-PBS处理的EIU小鼠的前房和玻璃体中结膜血管充血、大量免疫细胞浸润 (参见图1A, B; 箭头)。在玻璃体的下部更频繁地观察到浸润细胞 (图1B)。在有严重炎症的眼睛中观察到视网膜脱离和出血 (图1C)。与对照和用他克莫司/PBS处理组相比,在用地塞米松 (图1D) 或他克莫司/SFA (图1E) 处理后眼内炎症的严重程度降低 (图1F)。

[0154] 与临床症状一致,组织学分析显示EIU的显著特征,其特征在于未经处理 (图2A) 或用他克莫司/PBS滴眼液处理 (图2B) 的小鼠的前房 (AC)、玻璃体腔 (Vi) 和睫状体 (CB) 区域中

积累免疫细胞。还观察到与大量视网膜免疫细胞浸润相关的严重视网膜破坏(视网膜脱离、紊乱的视网膜层、出血)(图2A和2B中的箭头)。在用0.1%地塞米松或他克莫司/SFA滴眼液处理的眼中观察到玻璃体和视网膜中的轻度细胞浸润,并且视网膜层的整体结构保持完整(图2C,图2D)。用地塞米松和他克莫司/SFA处理的眼的组织病理学评分显著低于未处理的对照EIU眼(图2E)。另外两组小鼠的重复研究显示了类似的结果。

[0155] 总之,用他克莫司/SFA滴眼液处理降低了内毒素诱导的葡萄膜炎(EIU)小鼠模型中急性葡萄膜炎的严重程度:在临床评分和组织学评分中观察到减少。此外,观察到(位于眼睛后部的)视网膜中的较低水平的浸润性免疫细胞。

[0156] 实施例2:实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎(EAU)

[0157] 实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎(EAU)小鼠后葡萄膜炎模型的诱导:

[0158] 如Chen et al.,2012和Xu et al.,2005所述,诱导EAU。用在完全弗氏(Freund's)佐剂(CFA,H37Ra,Difco Laboratories,Detroit,MI,美国)中乳化的500 μ g的IRPB肽1-20(GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD;GL(Biochem)Shanghai Ltd,中国)皮下免疫C57BL/6J小鼠。给小鼠施用另外的腹膜内注射的100 μ l(1.5 μ g)百日咳博德特氏菌毒素(Tocris Bioscience,英国)。视网膜炎在免疫后(p.i.)第12天至第14天发生,并在p.i.第22天至第25天达到峰值。炎症的严重程度在高峰期后下降,然而,超过4个月,视网膜炎仍然活跃(Chen et al.,2012)。

[0159] 处理EAU:

[0160] 在p.i.第14天,根据炎症的临床评分将EAU小鼠分成四组,每组的评分相当。第1组:对照(无处理,n=7只小鼠);第2组:0.1%地塞米松(DXM)滴眼液(n=7只小鼠);第3组:0.03%他克莫司/PBS滴眼液(n=7只小鼠);第4组:0.03%他克莫司/SFA滴眼液(n=7只小鼠)。从p.i.第14天到p.i.第25天,第2组至第4组中的所有小鼠每天三次接受滴眼液处理。

[0161] 他克莫司/SFA滴眼液在后葡萄膜炎(EAU)小鼠模型中的处理作用:

[0162] 已显示用他克莫司/SFA滴眼液处理抑制EIU中的炎症,其处理效果在EAU(后葡萄膜炎的小鼠模型)中进一步评估。在葡萄膜炎发作后(即p.i.第14天)开始局部施用滴眼液。在处理前(即第14天),研究组之间的EAU临床评分相当。在未处理和用他克莫司/PBS处理的EAU小鼠中观察到严重的视网膜炎,其特征在于广泛的视网膜浸润(发白的病变,参见图3A和3B)、血管套(vascular cuffing)(箭头,图3A)和线型病变(linear lesion)(短箭头,图3A)。在用地塞米松和他克莫司/SFA处理的眼睛中观察到轻度炎症,其特征在于离散的小浸润物、轻度血管套和视神经乳头肿胀(图3C和3D)。在所有组中,视网膜炎的严重程度从p.i.第14天至p.i.第25天增加,但是与用他克莫司/SFA和用地塞米松处理的组相比,未处理组和用他克莫司/PBS处理的组的增量更为显著(图3E)。在p.i.第25天,用地塞米松和他克莫司/SFA处理的组的临床评分显著低于未处理小鼠的临床评分(图3F)。

[0163] 组织学检查显示来自未处理(图4A)和用他克莫司/PBS处理(图4C)的小鼠眼睛中的视网膜和玻璃体中的大量免疫细胞浸润。视网膜层在这些眼睛中混乱。在用地塞米松(图4B)和用他克莫司/SFA(图4D)处理的眼睛中观察到少量免疫细胞浸润和肉芽肿病变(箭头,图4),但是视网膜结构在这些小鼠中基本上完整。与未处理的对照相比,在用地塞米松处理的和用他克莫司/SFA处理的小鼠中EAU的总体组织病理学评分显著更低(图4E)。我们的研究结果表明,他克莫司/SFA滴眼液可有效控制EAU中持续的眼部炎症。

[0164] 总之,用他克莫司/SFA滴眼液处理减少了实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎(EAU)小鼠模型中的视网膜炎:在临床评分和组织学评分中观察到减少。

[0165] 实施例3:他克莫司/SFA滴眼液的药代动力学和吸收研究

[0166] 眼药水处理和组:

[0167] 他克莫司/SFA滴眼液的药代动力学在正常小鼠和EIU小鼠中进行(如上所述)。将正常C57BL/6J小鼠或EIU小鼠(LPS注射后立即)用0.03%他克莫司/SFA或0.03%他克莫司/PBS滴眼液(60 μ L/滴)每天处理三次,持续三天。在最后一次滴眼处理后的不同时间(15分钟,30分钟,1小时,2小时,4小时和6小时),处死动物并收集以下样品用于测量他克莫司:(1)玻璃体液,(2)视网膜,(3)脉络膜/巩膜,和(4)血液。每组使用4只小鼠,将20只未接受任何滴眼液处理的正常小鼠和8只EIU小鼠用作对照。

[0168] 样品采集和处理:

[0169] 从每只小鼠收集6至8 μ L玻璃体液。在处死动物后立即解剖视网膜组织并称重,并放入Eppendorf管中。在处死动物后立即解剖脉络/巩膜组织并称重,并放入Eppendorf管中。将来自每只小鼠的200至500 μ L全血收集到EDTA包被的管中。

[0170] 将所有样品储存在-20 $^{\circ}$ C,然后通过液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)方法定量测定他克莫司,其在样品分析之前适合于各自的基质。血液的定量下限为0.25ng/ml,视网膜和脉络膜/巩膜匀浆的定量下限为0.05ng/ml,玻璃体的定量下限为1.25ng/ml。

[0171] 他克莫司滴眼液在正常非发炎小鼠中的药代动力学和吸收:

[0172] 在他克莫司/SFA滴眼液处理后15分钟至2小时收集的玻璃体液中他克莫司的水平为2ng/ml至6ng/ml之间。到4小时和6小时,他克莫司的水平在他克莫司/SFA处理的小鼠的大多数样品中低于可检测水平。在他克莫司/PBS处理的小鼠中,除了1小时之外,所有样品中他克莫司水平都低于可检测水平。给药后1小时他克莫司/SFA组的玻璃体中他克莫司的水平显著高于他克莫司/PBS组的他克莫司的水平(图5A)。

[0173] 在脉络膜/巩膜中,在他克莫司/SFA滴眼液给药后15分钟至1小时检测到高水平的他克莫司(276ng/g组织至337ng/g组织,图5B)。然后在2小时水平降至150ng/g组织,在6小时时降低至70ng/g组织(图5B)。在用他克莫司/PBS处理的眼中,在15分钟和1小时之间检测到他克莫司为23ng/g组织和34ng/g组织,并且在6小时内水平降低至8.45ng/g组织(图5B)。在所有时间点,他克莫司/SFA组中的脉络膜/巩膜中的他克莫司的水平显著高于他克莫司/PBS组(图5B)。

[0174] 他克莫司/SFA中的视网膜中的他克莫司的水平在滴眼液给药后15分钟为48ng/g组织,并且在1小时增加至90ng/g组织(图5C)。在滴眼液处理后,在2小时后,他克莫司的水平略有下降,但在6小时后仍保持在53ng/g组织(图5C)。在用他克莫司/PBS处理的眼中,他克莫司的水平在所有时间点在2ng/g组织至7ng/g组织之间,并且显著低于用他克莫司/SFA处理的眼中的他克莫司水平(图5C)。

[0175] 用他克莫司/SFA处理的正常小鼠血液中他克莫司的水平从处理后15min时的35ng/ml增加到处理后30min时的118ng/ml,然后从处理后1h开始减少,但在处理后2h仍保持在62ng/ml(图5D)。在用他克莫司/PBS滴眼液处理的小鼠的血液中检测到较低水平的他克莫司(2ng/ml至40ng/ml)。用他克莫司/PBS处理的和未处理的对照之间没有差异(图5D)。他克莫司/SFA组的血液中的他克莫司的水平在30分钟、1小时和4小时时间点显著高于他克

莫司/PBS组(图5D)。

[0176] 结果表明,他克莫司/SFA具有比他克莫司/PBS更大的渗透性,并且可以快速穿透正常小鼠眼中的眼屏障,并且在滴眼液给药后迅速(在15至30分钟内)分布到所有眼组织以及血液循环中。

[0177] 他克莫司滴眼液在葡萄膜炎小鼠中的药代动力学和吸收:

[0178] 由于在葡萄膜炎眼中仅测试了他克莫司/SFA,因此比较了他克莫司/SFA滴眼液在葡萄膜炎眼和非葡萄膜炎眼之间的药代动力学。葡萄膜炎的小鼠玻璃体中他克莫司的水平在15min和30min分别为24ng/ml和14ng/ml,显著高于非葡萄膜炎小鼠的那些他克莫司水平(分别为2.5ng/ml和2.3ng/ml)。滴眼液给药后6小时,在葡萄膜炎眼玻璃体中检测到10ng/ml的他克莫司,而相比在非葡萄膜炎眼中则为1.1ng/ml(图6A)。

[0179] 与正常小鼠中的276ng/g组织相比,在葡萄膜炎小鼠中,在滴眼液后15分钟,脉络膜/巩膜中他克莫司的水平为855.5ng/g组织(图6B)。他克莫司的浓度在葡萄膜炎眼中在30分钟和1小时下降至与非葡萄膜炎眼相当的水平。在2小时和6小时,与正常的非发炎小鼠相比,葡萄膜炎小鼠具有显著更高水平的他克莫司(图6B)。

[0180] 与非葡萄膜炎小鼠相比,给药后15分钟(102ng/g组织对比48ng/g组织)和2h(115ng/g组织对比61ng/g组织)后,在葡萄膜炎小鼠的视网膜中检测到显著更高水平的他克莫司(图6C)。在葡萄膜炎眼中,在第6小时的视网膜他克莫司的水平为在第15分钟的视网膜他克莫司的水平约67%(图6C)。

[0181] 给药后15分钟,葡萄膜炎小鼠中他克莫司的血液水平为280ng/ml,显著高于非葡萄膜炎小鼠(35ng/ml)(图6D)。然后在滴眼液处理后葡萄膜炎小鼠中的水平在30分钟时降至143ng/ml,并且在6小时降至73ng/ml。在非发炎小鼠中,他克莫司的血液水平在30分钟时增加至118ng/ml,并且在其他时间点保持与葡萄膜炎小鼠相当的水平(图6D)。

[0182] 目前的药代动力学研究显示,他克莫司/SFA,但不是他克莫司/PBS,在局部给药后迅速(在15分钟内)穿透组织屏障(例如,上皮、细胞膜和内皮屏障)并以显著水平到达正常的小鼠的眼组织,如脉络膜/巩膜。

[0183] 当眼睛发炎时,进入眼组织(如脉络膜/巩膜和视网膜)的渗透率大大增加,在给药后15分钟,葡萄膜炎小鼠的脉络膜/巩膜中他克莫司的水平比非葡萄膜炎小鼠高3和8倍。

[0184] 此外,他克莫司/SFA不仅可以穿透一般的组织屏障,还可以穿透眼部屏障。局部给药后,在第15分钟,在玻璃体和视网膜中检测到显著含量的他克莫司,并且该药物在正常小鼠眼中保持在视网膜中至少6小时。在给药后15分钟,葡萄膜炎眼中在玻璃体和视网膜中他克莫司的水平比非葡萄膜炎眼中高2倍和10倍。

[0185] 数据表明,他克莫司/SFA能够穿透小鼠的眼部屏障(例如脉络膜/巩膜),以治疗水平到达眼内组织(例如视网膜)并抑制视网膜炎症。结果表明,在EIU和EAU模型中,0.03%的他克莫司/SFA滴眼液抑制了眼内炎症。他克莫司/PBS在EIU和EAU模型中未显示出任何抑制作用,并且它不能穿透眼屏障。

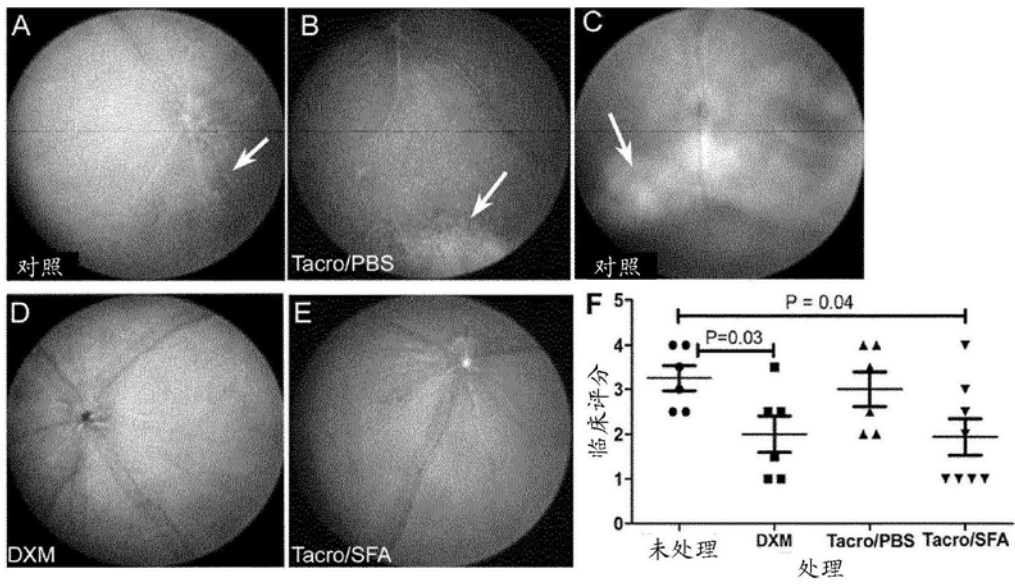


图1

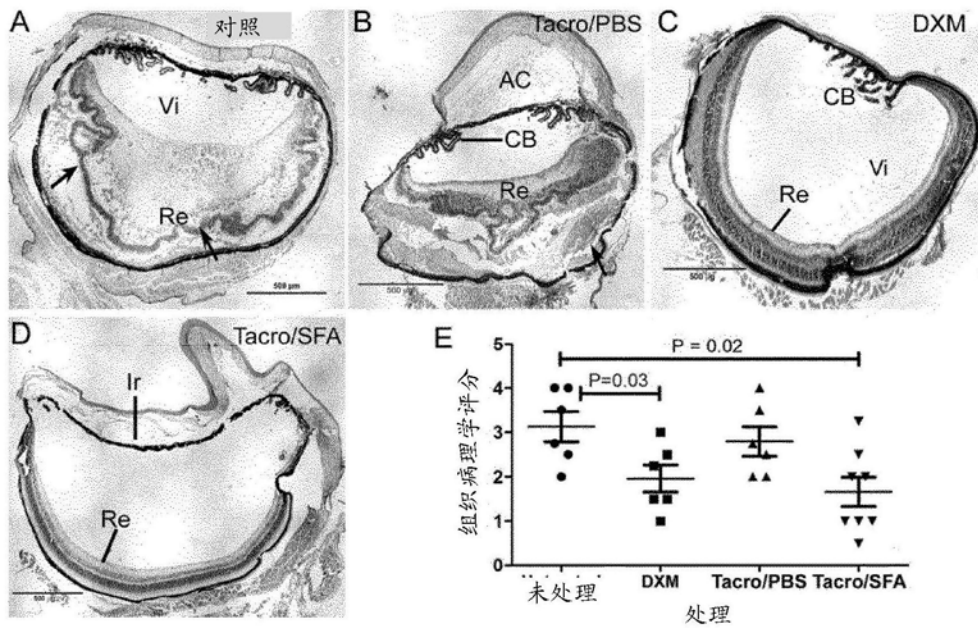


图2

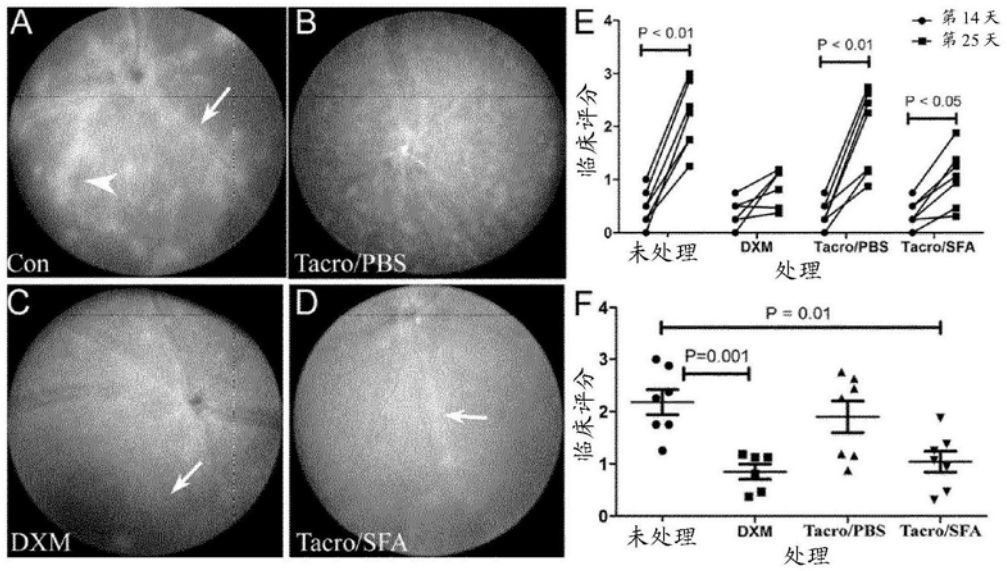


图3

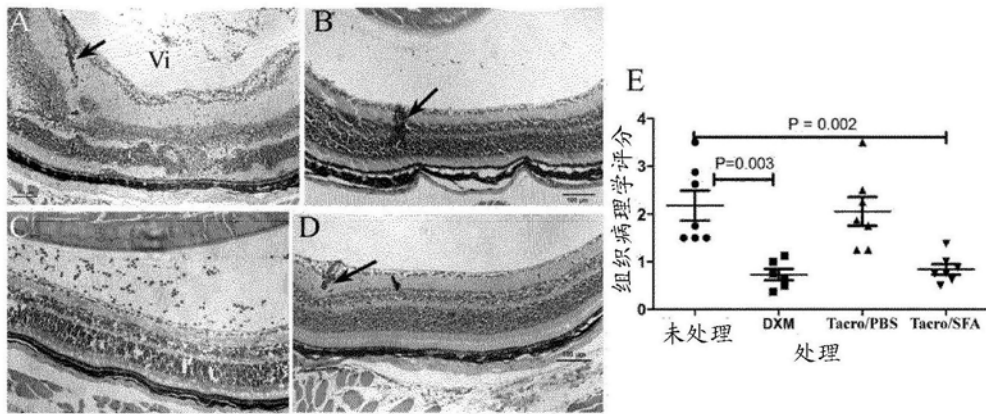


图4

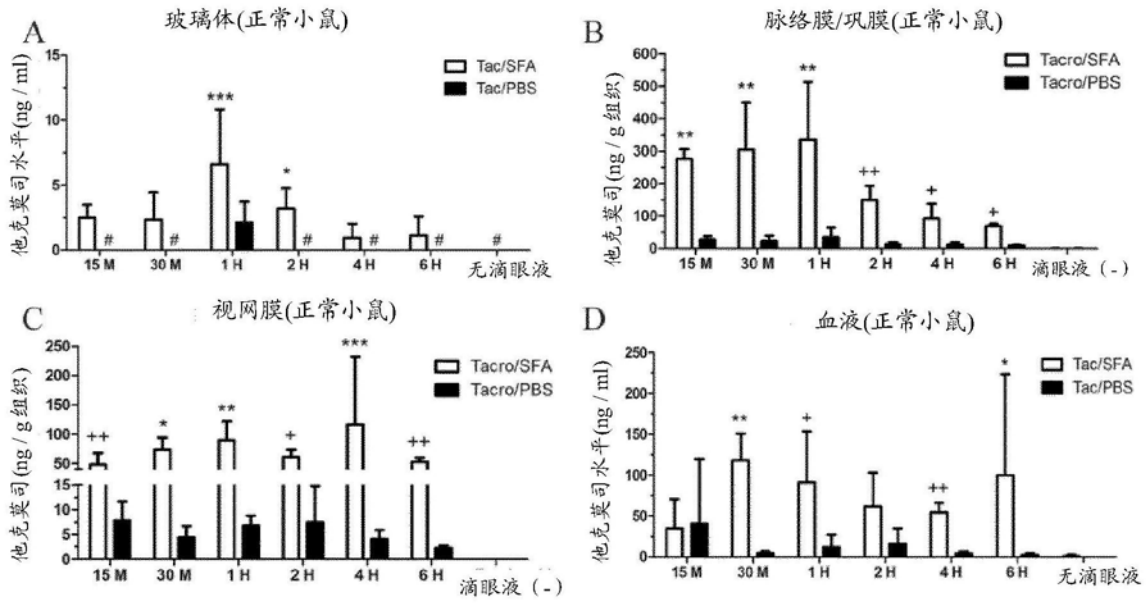


图5

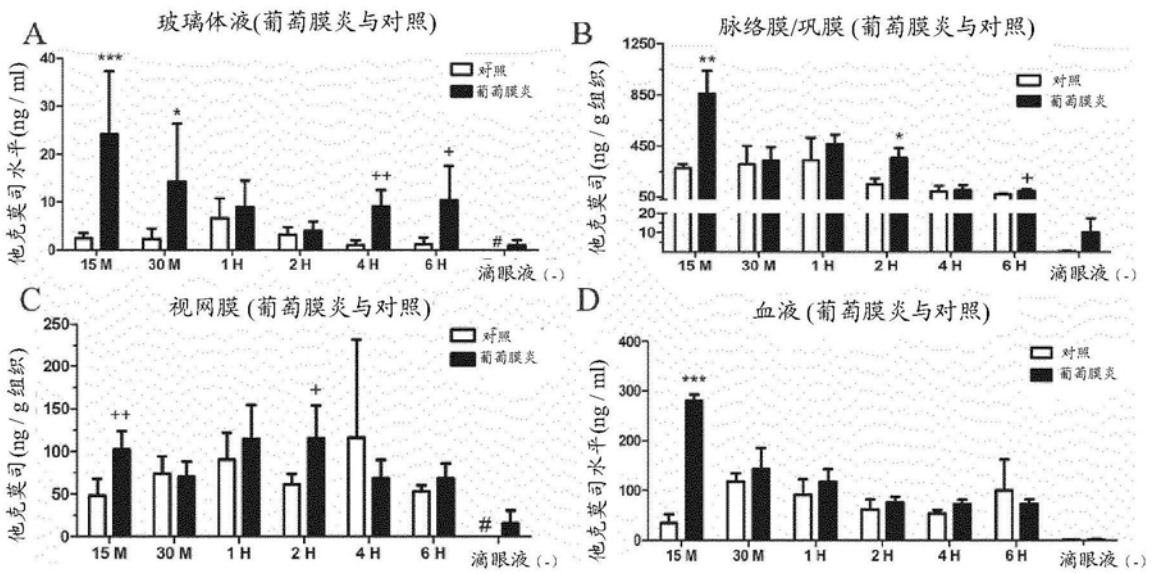


图6

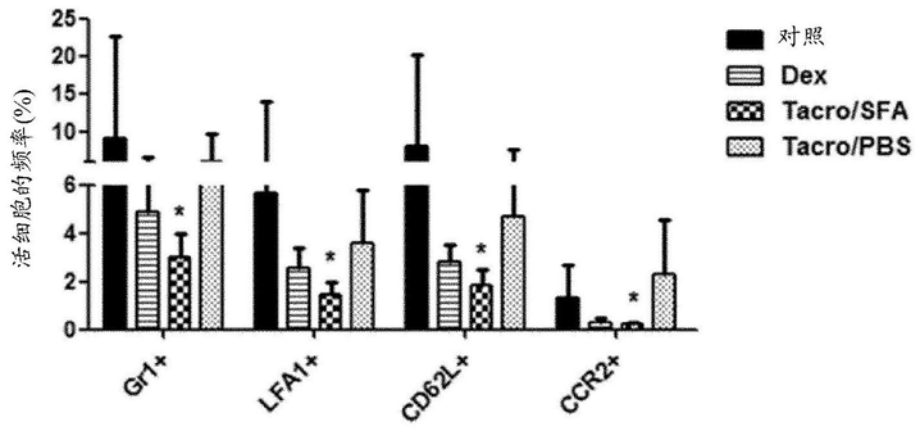


图7