



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107920990 A

(43)申请公布日 2018.04.17

(21)申请号 201680047370.8

(22)申请日 2016.06.13

(30)优先权数据

62/175,961 2015.06.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/037174 2016.06.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/205109 EN 2016.12.22

(71)申请人 塔米尔生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 L·斯奎克拉 J·萨利

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 9/00(2006.01)

A61K 38/46(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

A61P 31/12(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

A61P 31/22(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

序列表3页 附图4页

(54)发明名称

用于治疗眼睛的病毒性感染的药物

(57)摘要

眼睛的病毒性感染,特别是疱疹病毒科和腺病毒科的病毒性感染,可以通过施用由酶活性核糖核酸酶和媒介物组成的药物来治疗。有利的是,所述酶活性核糖核酸酶是豹蛙酶(ranpiRNA酶),且所述媒介物是水溶液。

1. RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其用于治疗人眼睛的病毒性感染,其中所述病毒性感染由如下引起:来自疱疹病毒科病毒的病毒,选自下组的腺病毒:3、4、7、8、19、29和37,选自肠道病毒70、柯萨奇病毒A24的小核糖核酸病毒,或传染性软疣、人免疫缺陷病毒、登革热、西尼罗病毒或淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒。

2. 权利要求1的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述来自疱疹病毒科病毒的病毒为:

- a. 人巨细胞病毒;或
- b. 单纯疱疹病毒。

3. 权利要求1或2的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述RNA酶具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID No.1、2、3和4。

4. 权利要求1或2的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述RNA酶具有根据SEQ ID No.1的氨基酸序列。

5. 权利要求1至4中任一项的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述RNA酶是对眼睛无刺激性的,如使用如下确定的:

- a. 分类评价标准的全球统一系统,和
- b. 欧洲经济共同体的眼睛评价标准。

6. 权利要求1至5中任一项的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述RNA酶是局部施用的。

7. RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其用于治疗病毒性结膜炎。

8. 权利要求7的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述病毒性结膜炎由腺病毒引起。

9. RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其用于治疗病毒性角膜炎。

10. 权利要求9的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述病毒性角膜炎由单纯疱疹病毒引起。

11. RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其用于治疗脉络膜视网膜炎。

12. 权利要求13的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述脉络膜视网膜炎由如下引起:巨细胞病毒(CMV)、水痘-带状疱疹病毒(HZV)、登革热病毒、基孔肯雅(Chikungunya)病毒、西尼罗病毒或淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)。

13. 权利要求7至13中任一项的用于所述用途的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物,其中所述RNA酶具有根据SEQ ID No.1的氨基酸序列。

14. 一种药物组合物,其用于治疗人眼睛的病毒性感染,所述药物组合物包含:

- a. 对眼睛无刺激性的RNA酶A超家族的RNA酶或其功能性衍生物;和
- b. 药学可接受的赋形剂,

其中所述病毒性感染由如下引起:来自疱疹病毒科病毒的病毒或选自下组的腺病毒:3、4、7、8、19、29和37。

15. 权利要求14的用于所述用途的药物组合物,其中所述RNA酶具有选自下组的氨基酸序列:SEQ ID No.1、2、3和4。

16. 权利要求14的用于所述用途的药物组合物,其中所述RNA酶具有根据SEQ ID No.1的氨基酸序列。

17. 权利要求14至16中任一项的用于所述用途的药物组合物,其中所述病毒为

- a. 人巨细胞病毒;或
- b. 单纯疱疹病毒。

18. 权利要求14至17中任一项的用于所述用途的药物组合物,其中所述药学可接受的赋形剂为水溶液。

19. 权利要求14至18中任一项的用于所述用途的药物组合物,其中所述药物组合物是局部施用的。

用于治疗眼睛的病毒性感染的药物

[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及眼睛的病毒性感染,并且更具体地涉及用于治疗眼睛的病毒性感染的方法和药物。从最直接的意义讲,本发明涉及治疗由疱疹病毒科病毒(包括但不限于人巨细胞病毒、带状疱疹(herpes zoster)病毒和水痘带状疱疹(varicella zoster)病毒)和腺病毒科病毒引起的人眼睛感染。

[0003] 眼睛的病毒性疾病可具有重大后果。1型单纯疱疹病毒可引起结膜炎和角膜炎,人巨细胞病毒可引起视网膜炎,8、19、29和37型腺病毒可引起流行性角膜结膜炎,且3、4和7型腺病毒可引起咽结膜热(pharyngoconjunctival fever)。带状疱疹病毒(HZV),其为疱疹病毒科的成员,能够在影响三叉神经区时引起严重的眼病。眼带状疱疹(Herpes zoster ophthalmicus),其为急性带状疱疹的一种严重形式,由三叉(第五颅)神经中的水痘带状疱疹病毒(VZV)(疱疹病毒科的又一个成员)的再活化产生。尽管三叉神经第一分支内的额支是最常见涉及的,但是该神经的任何分支都可受到影响。这个额支支配几乎所有的眼睛的和眼周的结构。在这个特定位置的眼带状疱疹会导致失明并且需要快速且有效的治疗方法。

[0004] 人巨细胞病毒(CMV)是疱疹病毒科的又一个成员。至少有60%的美国人群已被暴露于CMV,在高危组(例如母亲在怀孕期间感染了CMV的未出生婴儿、患有HIV的人和移植接受者)中,流行性超过90%。

[0005] CMV视网膜炎是患有AIDS或药理学诱导的免疫抑制的人中最常见的机会性感染之一。患有CMV视网膜炎的个体代表性地表现视敏度逐渐下降,其可进展为失明。长期CMV治疗是必要的以防止视网膜炎复发。

[0006] 在HAART(高活性抗逆转录病毒治疗)开始后,患有CMV视网膜炎的HIV感染患者的16%-63%中报道了免疫重建综合征(IRIS)。CMV IRIS可显示无痛的飞蚊症、视力模糊、光适应(photopia)、视敏度下降或眼睛疼痛。有些患者可发生黄斑水肿,其导致视力丧失或增生性玻璃体视网膜病变、自发性玻璃体出血和视网膜脱离。

[0007] 用阿昔洛韦治疗病毒性眼睛感染是已知的,但是这种治疗并不完全令人满意。局部阿昔洛韦必须频繁施用,并引起眼睛的刺激。口服阿昔洛韦引起显著不良的副作用。其他抗病毒药物如丙氧鸟苷、伐昔洛韦和缬更昔洛韦用于治疗病毒性眼睛感染,并且这些治疗也不是完全令人满意的。丙氧鸟苷通过静脉施用,因此不能在例如医院环境(hospital setting)之外使用。口服抗病毒药物如伐昔洛韦和缬更昔洛韦具有缺点;已知它们引起发烧、皮疹、腹泻和血液学效应(例如嗜中性粒细胞减少症、贫血、血小板减少症)。在一些情况下,嗜中性粒细胞减少症可对降低剂量或使用刺激通过骨髓产生中性粒细胞的药物(如粒细胞集落刺激因子[G-CSF]或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子[GM-CSF])有响应。这些毒性效应可为难以控制的。

[0008] 因此提供用于在人中治疗病毒性眼睛感染的更好的方法和更好的药物会是有利的。

[0009] 已知多种酶活性核糖核酸酶(包括豹蛙酶和与其高度同源的其它蛋白质)具有抗

病毒活性,并具有针对疱疹病毒科中的病毒(具体包括但不限于单纯疱疹病毒1型和2型以及人巨细胞病毒)以及还针对2型腺病毒的活性。然而,已知蛋白质由于T细胞介导的强烈炎症反应而对眼睛是高度刺激的。由于此原因,尽管已经调查了豹蛙酶和其他相关蛋白质用于抵抗多种病毒性感染,但是还没有调查它们用于抵抗眼睛的病毒性感染的用途。

[0010] 尽管预期蛋白质豹蛙酶会引起眼中的刺激,但在兔子模型中研究了局部施用的豹蛙酶在眼睛中的刺激。在此实验中,如使用分类评价标准的全球统一系统(Globally Harmonized System of Classification Evaluation Criteria)和欧洲经济共同体眼睛评价标准(the European Economic Community Ocular Evaluation Criteria)所确定的,证明豹蛙酶是无刺激性的。这是值得注意的结果,因为外来蛋白质向眼睛的施用可产生角膜刺激。结果,预期豹蛙酶和与其高度同源的其它蛋白质可用于治疗人眼睛的病毒性疾病。

[0011] 附图简述

[0012] 参考以下示例性和非限制性附图将更好地理解本发明,其中:

[0013] 图1显示用于评分经过Draize测试的兔中观察到的眼睛损伤的数值范围;

[0014] 图2显示Draize测试的结果,其中将豹蛙酶溶液施用于三只兔子的右眼;

[0015] 图3显示图2的Draize测试的结果,其中每只兔子的左眼未经处理;和

[0016] 图4显示使用欧洲经济共同体眼睛评价标准以分类在Draize测试中由测试物引起的眼睛刺激。

[0017] 优选实施方案的详述

[0018] 豹蛙酶是一种的蛋白质酶活性核糖核酸酶,其在美国专利号5,559,212中公开并要求保护。美国专利号5,728,805、6,239,257、7,229,824和US 8,518,399公开了与豹蛙酶高度同源的三种其它蛋白质酶活性核糖核酸酶:

[0019] a) 美国专利号5,728,805中的SEQ ID NO:2的RNA酶,在本文中称为“805变体”;

[0020] b) 专利号US 6,239,257中的SEQ ID NO:2的RNA酶,在本文中称为“两栖酶(Amphinase) 2”;和;

[0021] c) 专利号US 7,229,824的SEQ ID NO:59的RNA酶,在本文中称为“重组两栖酶(rAmphinase) 2”。

[0022] 专利号US 8,518,399公开了所述豹蛙酶、所述‘805变体,和重组两栖酶2具有抵抗疱疹病毒科病毒(具体包括但不限于1型和2型单纯疱疹病毒和人巨细胞病毒)的抗病毒活性。基于它与这三种酶活性核糖核酸酶的相似性,相信两栖酶2也会具有这些活性。

[0023] 进一步地,国际专利申请WO 2015/148768A2公开了豹蛙酶针对多种病毒(包括2型腺病毒)具有抗病毒活性。

[0024] RNA酶A超家族的RNA酶是嘧啶特异性内切核酸酶,其大量见于某些哺乳动物和一些爬行动物的胰腺中。它们涉及核苷酸内切割以具有2',3'-环状磷酸酯中间体的C-P或U-P结尾的3'-磷酸单核苷酸和3'-磷酸寡核苷酸。此超家族的成员包括豹蛙酶及其变体、两栖酶,重组两栖酶-2、牛精囊和脑核糖核酸酶;肾非分泌型核糖核酸酶;肝型核糖核酸酶,血管生成素;嗜曙红细胞阳离子蛋白质和来自不同物种的胰腺核糖核酸酶,包括人和牛胰核糖核酸酶。

[0025] 豹蛙酶是一种从美洲豹蛙(*Rana pipiens*)的卵母细胞分离的RNA酶,其公开于美国专利号5,559,212中,并且以前称为ONCONASE®。豹蛙酶的氨基酸序列在SEQ ID NO:

1中提供。豹蛙酶已被测试并发现由于其针对RNA的酶活性而对癌细胞具有细胞毒性。

[0026] 豹蛙酶的变体公开于美国专利号5,728,805(以下简称“’805变体”)。所述’805变体也是一种RNA酶,且已同样地发现对一些癌细胞具有细胞毒性。所述’805变体是豹蛙酶的一个紧密的变体(a close variant);其氨基酸序列与豹蛙酶的氨基酸序列相同,除了其在豹蛙酶氨基酸序列的位置11处具有缬氨酸而非异亮氨酸,在位置20处具有天冬酰胺而非天冬氨酸,和在位置103处具有精氨酸而非丝氨酸。在一些实施方案中,所述’805变体被称为“Val11,Asn20,Arg103-豹蛙酶”。所述’805变体的氨基酸序列在SEQ ID NO:2中提供。

[0027] 两栖酶2也是一种RNA酶。它是在美国专利号6,239,257中鉴定为2325p4的蛋白质,并且它也被发现对癌细胞具有细胞毒性。两栖酶2的氨基酸序列在SEQ ID NO:3中提供。

[0028] 重组两栖酶2(“重组两栖酶2”)与两栖酶2相似,但在位置-1处具有Met残基,并且缺少位于两栖酶2在位置第27和91处的聚糖部分。美国专利号7,229,824中描述了重组两栖酶2。重组两栖酶2的氨基酸序列在SEQ ID NO:4中提供。

[0029] 术语“其功能等同物”意欲包含通过缺失、添加或取代一个或多个氨基酸而不同于任何天然存在的RNA酶,但保留RNA酶活性的蛋白质。例如,上面讨论的所述’805变体可被认为是豹蛙酶的功能性衍生物,因为它包含与豹蛙酶氨基酸序列相比的三个氨基酸取代,但是仍然具有RNA酶活性。

[0030] 在一个实施方案中,术语“RNA酶A超家族的RNA酶”还包括RNA酶(特别是豹蛙酶)与另一种蛋白质如抗体或抗体片段的融合蛋白。WO 2005/080586 A1中描述了这种融合蛋白。在一个替换的实施方案中,术语“RNA酶A超家族的RNA酶”不包括这样的融合蛋白,意指RNA酶是用于治疗眼睛的病毒性感染的仅有的活性蛋白质。

[0031] 美国专利号5,559,212、5,728,805、6,239,257、7,229,824、8,518,399号、8,663,964以及美国公开号2012-0003266和2014-0037610通过提述以其整体并入本文用于全部目的。

[0032] 如之前所讨论的,已发现RNA酶A超家族的RNA酶(特别是豹蛙酶)可用于治疗眼睛的病毒性疾病。“眼睛的病毒性疾病”是主要在受试者的眼睛中显示症状且由病毒而不是由细菌引起的疾病。眼睛疾病的症状包括发痒、过度流泪、结膜的红色或粉红色、疼痛、眼睛干涩、光敏感、眼睛肿胀、眼睛排泄(eye discharge)和视力模糊。眼睛的病毒性疾病包括但不限于结膜炎和角膜炎、脉络膜视网膜炎、视网膜炎、角膜结膜炎、咽结膜热和CMV视网膜炎。

[0033] 病毒性结膜炎(也称为红眼病)特征在于眼睛的白色部分的最外层和眼睑的内表面的炎症。它会使眼睛呈现粉红色或微红色。还可存在疼痛,灼痛,瘙痒感或发痒。病毒性结膜炎通常由腺病毒引起。可导致结膜感染的其他病毒包括单纯疱疹病毒(HSV)、水痘-带状疱疹病毒(VZV)、肠道病毒70、柯萨奇病毒A24、传染性软疣(molluscum contagiosum)和人类免疫缺陷病毒(HIV)。

[0034] 病毒性角膜炎是主要由单纯疱疹病毒引起的角膜的炎症。此病况通常伴有中度到强烈的疼痛,且通常涉及以下一种或多种症状:疼痛、视力受损、畏光 and 红眼。

[0035] 脉络膜视网膜炎是眼睛的脉络膜(眼睛的薄色素血管膜)和视网膜的炎症。这是后葡萄膜炎的一种形式。症状可包括存在漂浮的黑点、视力模糊、眼睛疼痛或发红、对光敏感或过度流泪。脉络膜视网膜炎可由感染巨细胞病毒(CMV)、水痘-带状疱疹(HZV)、登革热、西尼罗病毒或淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)引起。

[0036] 具体地,眼睛的病毒性疾病是由如下引起:来自疱疹病毒科病毒的病毒或由选自下组的腺病毒:3、4、7、8、19、29和37。

[0037] 疱疹病毒科是具有分类在巴尔的摩(Baltimore) I类中的双链线性DNA基因组的病毒。引起眼的病毒性疾病的来自疱疹病毒科病毒的病毒包括但不限于I型单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒和带状疱疹病毒,特别是眼带状疱疹。

[0038] 腺病毒科是分类在巴尔的摩I类的双链DNA病毒。腺病毒类型8、19、29和37可引起流行性角膜结膜炎,而且腺病毒类型3、4和7可引起咽结合膜热(pharyngoconjunctival fever),类型8、19、29和37可引起流行性角膜结膜炎,而且腺病毒类型3、4和7可引起咽结合膜热。

[0039] 如本文中使用的,术语“治疗(treating/treatment)”指向患有眼睛的病毒性感染的受试者施用治疗有效量的RNA酶如豹蛙酶,豹蛙酶变体例如'805变体、两栖酶2或重组两栖酶2。如本文中使用的,术语“治疗”涵盖眼睛的病毒性感染的任何导致期望的药理学和/或生理学作用的治疗,包括阻止疾病发展,导致疾病消退,限制病毒从个体内的一个细胞传播到另一个,限制病毒在个体中的复制,限制病毒进入个体的细胞,以及减少个体或此个体的组织中的病毒的数量。

[0040] 术语“治疗有效量”在本文中术语“治疗有效剂量”可互换使用,并且指导致要治疗的疾病或病况的症状的改善或补救的RNA酶的量。在一个实施方案中,治疗有效量的RNA酶如豹蛙酶,'805变体、两栖酶2或重组两栖酶2延迟受试者中眼睛的病毒性感染或使其发病最小化,或加速或增加受试者从眼睛的病毒性感染的恢复。在一个实施方案中,RNA酶降低感染的受试者的眼睛中的病毒滴度。在另一个实施方案中,RNA酶防止感染的受试者眼睛中的病毒滴度增加。在一个实施方案中,治疗有效量的RNA酶在眼睛的病毒性感染的治疗或管理中提供治疗益处。在一个实施方案中,治疗有效量的RNA酶减少病毒从一个细胞传播到另一个。治疗有效量还可预防疾病和/或减轻症状的严重性。

[0041] 治疗有效量可由本领域技术人员作为常规实验确定。药物组合物的治疗有效剂量可由本领域技术人员,例如,从动物研究,容易地确定。另外,本领域技术人员可进行人类临床研究以确定对于人优选的有效剂量。这样的临床研究是常规的并且是本领域已知的。采用的精确的剂量也将取决于施用路径。有效剂量可从由体外或动物测试系统得到的剂量-响应曲线外推。RNA酶可向需要其的受试者以单剂量或多剂量施用。在一个实施方案中,RNA酶每天一次,或每天多次施用于需要其的受试者。在一个实施方案中,将RNA酶施用于受试者直到症状解决和/或直到受试者不再处于病毒性感染的风险。

[0042] 在一些实施方案中,与未用RNA酶处理但感染病毒的对照相比,施用治疗有效量的RNA酶,特别是豹蛙酶,使眼睛中的病毒滴度降低至少10%、优选至少15%、或优选至少20%、且最优选至少25%。

[0043] 在一些实施方案中,施用治疗有效量的RNA酶,特别是豹蛙酶,导致病毒滴度降低至低于检测水平。病毒滴度的确定例如在Reischl(1996) *Front Biosci.* 1:e 72-7, Application of molecular biology-based methods to the diagnosis of infectious diseases (将基于分子生物学的方法应用于传染性疾病的诊断)中讨论。

[0044] 在一些实施方案中,RNA酶,特别是豹蛙酶,可在眼睛的病毒性感染的第一症状已经变得明显后的6小时内施用。在其他实施方案中,RNA酶可在眼睛的病毒性感染的第一症

状变得明显后的8、10、12、15、18或24小时内施用,或在眼睛的病毒性感染的第一症状变得明显后的2、3、4或5天内施用。

[0045] 在一些实施方案中,施用多剂量的RNA酶,特别是豹蛙酶。这些多剂量的施用频率可变化,取决于因素如症状的严重性。例如,RNA酶可每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每隔一天、每天一次、每天两次或每天三次施用。

[0046] RNA酶,特别是豹蛙酶的施用持续时间,即施用RNA酶的期间,可取决于因素如症状的严重性、患者响应等而变化。例如,RNA酶可在一天,三天、七天、两周、四周、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月或更长的期间中施用。

[0047] RNA酶,特别是豹蛙酶或包含RNA酶,特别是豹蛙酶的药物组合物优选局部施用于眼睛,意味着RNA酶或包含RNA酶的药物组合物直接施用于眼睛而非施用于身体的另一个位置。局部施用可通过滴眼剂、悬浮液、乳液、软膏、溶液、凝胶、脂质体、纳米颗粒、微乳液、纳米乳液、纳米悬浮液、泡囊(niosomes)、树状聚合物和水凝胶进行。

[0048] 局部施用的豹蛙酶的作用部位可为角膜、结膜、巩膜以及前段的其他组织如虹膜和睫状体(前眼色素层(anterior uvea))的不同层。

[0049] 可替换地,RNA酶,优选豹蛙酶,或包含RNA酶优选豹蛙酶的药物组合物可通过玻璃体内,眼前房内,结膜下,眼球下,眼球后或巩膜下(posterior juxtasceral)路径施用。

[0050] 含有RNA酶优选豹蛙酶的药物组合物必须是无菌的以施用于眼睛。

[0051] 用于眼科药物组合物的合适的赋形剂包括但不限于防腐剂如苯扎氯铵,聚季铵盐-1 (polyquaternium-1 (Polyquad))、过硼酸钠、氯氧络合物(Purite®)、氯丁醇、苄索氯铵(benzethonium chloride)、十六烷基吡啶鎓氯化物(cetyl pyridinium chloride)、苄基溴、EDTA,聚氨基丙基双胍、硝酸苯汞(phenylmercury nitrate)、乙酸苯汞(phenylmercury acetate)、硫柳汞(thimerosal)、硫柳汞(merthiolate)、乙酸和苯基汞硼酸盐(acetate and phenylmercury borate)、多粘菌素B硫酸盐(polymyxin B sulphate)、氯己定(chlorhexidine)、对羟基苯甲酸甲酯和丙酯(methyl and propyl parabens)、苯乙醇(phenylethyl alcohol)、氯化季铵(quaternary ammonium chloride)、苯甲酸钠、丙酸钠、山梨酸和SofZia。

[0052] 待向眼睛施用的药物组合物中的另外的赋形剂可用于控制所述组合物的粘度,并包括聚维酮、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素和羧甲基纤维素。

[0053] 表面活性剂可添加到所述药物组合物中用于分散不溶成分或帮助溶解。优选地,使用非离子表面活性剂,如聚山梨醇酯包括聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20。其他合适的表面活性剂包括聚氧乙烯40硬脂酸酯(polyoxyl 40 stearate)和聚乙二醇。

[0054] 通常,药物组合物还含有调节组合物的pH并在一定的pH范围内缓冲的成分。药物组合物可具有5.0至7.5的pH。硼酸媒介物或Sorensen氏修饰的磷酸盐缓冲液可用作缓冲液。

[0055] 进一步地,可使用调节组合物的张力(tonicity)的张度剂(tonicity agent)。合适的张力调节成分包括但不限于氯化钠、硝酸钠、硫酸钠、氯化钾、右旋糖、甘油、丙二醇和甘露糖醇。

[0056] 如本文中使用的,术语“药物组合物”涵盖适于向受试者,如哺乳动物,特别是人施用

的组合物。通常，“药物组合物”是无菌的，且不含能够在所述受试者内诱发不合意的响应的污染物。

[0057] 如本文中使用的术语“药理学可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、覆层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。这样的介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域已知的。这些药剂通常是安全的、无毒的，且既非生物学上不合意的也非其他方面不合意的。

[0058] 也可将补充活性成分并入药物组合物中。本文提供的RNA酶，特别是豹蛙酶和豹蛙酶变体可与其它生物活性剂一起施用。可替换地，RNA酶，优选豹蛙酶，是药物组合物中仅有的生物活性剂。

[0059] 使用分类评价标准的全球统一系统和使用欧洲经济共同体眼睛评价标准，能在Draize测试中确定RNA酶是否对眼睛无刺激性。在Draize测试中，将RNA酶置于兔眼的结膜囊中，并在设置豹蛙酶后1、24、48和72小时检查眼睛。所评价的标准是角膜混浊、虹膜损伤、结膜发红和结膜水肿。如果这些标准中的每一个的评分为零，则认为RNA酶是对眼睛无刺激性的。有关评价的进一步信息可得自图1至4。

[0060] 如上所述，在本发明之前，本领域的普通技术人员不会向眼睛施用豹蛙酶或其他三种上面鉴定的蛋白质酶活性核糖核酸酶的任何一种。然而，已经使用Draize测试对豹蛙酶的这种施用进行建模，且此实验的结果证明豹蛙酶是无刺激性的，如通过两个公认标准所定义的。

实施例

[0061] 将由在用作媒介物的专有水溶液中的0.1%豹蛙酶组成的0.1% mL溶液用作测试物。使用三只兔子；每只都是雄性新西兰白兔，实验时其约为16周龄，且重3.3至3.4公斤。

[0062] 向每只兔子双眼的角膜表面施用两滴丁卡因(tetracaine)前驱麻醉剂之后，通过轻轻地从眼球拉开下眼睑，将测试物置于每只兔子右眼的结膜囊中；将眼睑轻轻地保持在一起约一秒以限制测试物的损失。每只兔子的左眼保持未处理并充当对照。在测试物设置后1(±15分钟)、24、48和72小时(±1小时)检查动物的眼睛。在每次检查时手动记录根据Draize(图1)的眼睛反应分数(grades of ocular reaction)(图2和3)。从图2中可见，在测试物设置后一小时，每只动物都有眼睛反应，但是在每种情况下，该反应在24小时及其后都完全消除。

[0063] 为了使用欧洲经济共同体眼睛评价标准确定由测试物引起的刺激程度(图4)，对于角膜混浊、虹膜损伤、结膜发红和结膜水肿，单独添加在24、48和72小时检查的总眼睛刺激分数，并将这些评分参数的平均分数与欧洲经济共同体的眼睛评价标准进行比较。因为所有这些分数(以及因此计算的平均分数)都是零，所以将所述测试受试物认为是非刺激性的，如通过欧洲经济共同体眼睛评价标准所定义的。

[0064] 为了使用分类评价标准的全球统一系统确定由测试物引起的刺激程度，分别为每只动物添加24-、48-和72-小时的分数，并且每个总数除以3(三个时间点)以产生每只动物的个体平均分数。由于所有这些分数(因此计算的商数)都是零，所以将测试受试物认为是非刺激性的，如通过分类评价标准的全球统一系统所定义的。

[0065] 因此，这些测试数据证明了一个新的和出乎意料的结果：尽管豹蛙酶是一种蛋白

质(预期其对眼睛是刺激性的),但在水溶液中递送到眼睛的豹蛙酶是非刺激性的,如通过分类评价标准的全球统一系统和通过欧洲经济共同体的眼睛评价标准所定义的。

[0066] 虽然这个实验是使用专有含水媒介物中的豹蛙酶溶液进行的,但是本领域普通技术人员会认为可能的是:三种上面鉴定的(above-identified)蛋白性酶活性核糖核酸酶的溶液因为它们与豹蛙酶在活性和同源性方面的相似性而会以相同方式表现/起作用。

[0067] 尽管以上已经描述了本发明的至少一个优选的实施方案,但是此描述不是限制性的而仅仅是示例性的。本发明的范围仅由所附的权利要求限定。

Glu Asp Trp Leu Thr Phe Gln Lys Lys His Val Thr Asn Thr Arg Asp
 1 5 10 15
 Val Asp Cys Asn Asn Ile Met Ser Thr Asn Leu Phe His Cys Lys Asp
 20 25 30
 Lys Asn Thr Phe Ile Tyr Ser Arg Pro Glu Pro Val Lys Ala Ile Cys
 35 40 45
 Lys Gly Ile Ile Ala Ser Lys Asn Val Leu Thr Thr Ser Glu Phe Tyr
 50 55 60
 Leu Ser Asp Cys Asn Val Thr Ser Arg Pro Cys Lys Tyr Lys Leu Lys
 65 70 75 80
 Lys Ser Thr Asn Lys Phe Cys Val Thr Cys Glu Asn Gln Ala Pro Val
 85 90 95
 His Phe Val Gly Val Gly Arg Cys
 100

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> 豹蛙 (*Rana pipiens*)

<400> 3

Lys Pro Lys Glu Asp Arg Glu Trp Glu Lys Phe Lys Thr Lys His Ile
 1 5 10 15
 Thr Ser Gln Ser Val Ala Asp Phe Asn Cys Asn Arg Thr Met Asn Asp
 20 25 30
 Pro Ala Tyr Thr Pro Asp Gly Gln Cys Lys Pro Ile Asn Thr Phe Ile
 35 40 45
 His Ser Thr Thr Gly Pro Val Lys Glu Ile Cys Arg Arg Ala Thr Gly
 50 55 60
 Arg Val Asn Lys Ser Ser Thr Gln Gln Phe Thr Leu Thr Thr Cys Lys
 65 70 75 80
 Asn Pro Ile Arg Cys Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Thr Thr Asn Phe Ile
 85 90 95
 Cys Ile Thr Cys Arg Asp Asn Tyr Pro Val His Phe Val Lys Thr Gly
 100 105 110

Lys Cys

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 重组两栖酶2 (rAmphinase 2)

<400> 4

Met Lys Pro Lys Glu Asp Arg Glu Trp Glu Lys Phe Lys Thr Lys His

1 5 10 15

Ile Thr Ser Gln Ser Val Ala Asp Phe Asn Cys Asn Arg Thr Met Asn

20 25 30

Asp Pro Ala Tyr Thr Pro Asp Gly Gln Cys Lys Pro Ile Asn Thr Phe

35 40 45

Ile His Ser Thr Thr Gly Pro Val Lys Glu Ile Cys Arg Arg Ala Thr

50 55 60

Gly Arg Val Asn Lys Ser Ser Thr Gln Gln Phe Thr Leu Thr Thr Cys

65 70 75 80

Lys Asn Pro Ile Arg Cys Lys Tyr Ser Gln Ser Asn Thr Thr Asn Phe

85 90 95

Ile Cys Ile Thr Cys Arg Asp Asn Tyr Pro Val His Phe Val Lys Thr

100 105 110

Gly Lys Cys

115

用于评分眼睛损伤的量表

角膜	
A. 混浊-密度等级 (取最密区域读数)	
无溃疡或混浊.....	0
散布或弥漫的混浊区域(除了轻微的正常光泽变淡), 虹膜的细节清晰可见.....	**1
容易辨别的半透明区域, 虹膜的细节轻微模糊.....	2
乳白色的区域, 没有可见的虹膜细节, 瞳孔的大小几乎不可辨别.....	3
不透明, 虹膜不可见.....	4
B. 涉及的角膜面积	
四分之一(或更少), 但不为 0.....	1
大于四分之一, 但少于一半.....	2
大于一半, 但少于四分之三.....	3
大于四分之三, 多至整个区域.....	4
分数=A×B×5	总的最大值=80
虹膜	
A. 值	
正常.....	0
显著加深的褶皱、充血, 肿胀, 中度角膜周边充血(hyperemia)或充血(injection), 或其任何组合; 虹膜仍对光线有反应(迟钝反应为阳性).....	**1
对光无反应、出血、严重破坏(这些中的任一或所有).....	2
分数=A×5	总的最大值=10
结膜	
A. 发红(意指眼睑和球结膜, 不包括角膜和虹膜)	
血管正常.....	0
明确超过正常充血的血管.....	1
更弥漫, 深红色, 个别血管不易辨别.....	**2
弥漫像牛肉的红色.....	3
B. 结膜水肿	
无肿胀.....	0
任何超过正常的肿胀(包括瞬膜).....	1
具有眼睑部分外翻的明显肿胀.....	**2
具有眼睑约一半闭合的肿胀.....	3
具有眼睑的约一半闭合至完全闭合的肿胀.....	4
C. 排出	
无排出.....	0
任何不同于正常的量(不包括正常动物的内眼角中观察到的小量).....	1
使眼睑和眼睑附近的毛发湿润的排出.....	2
使眼睑和毛发以及眼睛周围相当大的区域湿润的排出.....	3
分数=(A+B+C)×2	总的最大值=20
角膜+虹膜+结膜分数	总的最高分可能=110

**数字指示按照美国健康影响测试指南(1998)OPPTS 870.2400 认为是阳性的最低分

图1

眼睛观察/治疗后-处理的测试物质

动物#/性别		施用前	1 小时	24 小时	48 小时	72 小时
2671 雄性	角膜					
	A. 混浊-等级	0	0	0	0	0
	B. 涉及区域	0	0	0	0	0
	A×B×5=	0	0	0	0	0
	虹膜					
	A. 值	0	0	0	0	0
	A×5=	0	0	0	0	0
	结膜					
	A. 发红	0	1	0	0	0
	B. 混浊	0	1	0	0	0
	C. 排出	0	1	0	0	0
(A+B+C)×2=	0	6	0	0	0	
总分数	0	6	0	0	0	
动物#/性别		施用前	1 小时	24 小时	48 小时	72 小时
2672 雄性	角膜					
	A. 混浊-等级	0	0	0	0	0
	B. 涉及区域	0	0	0	0	0
	A×B×5=	0	0	0	0	0
	虹膜					
	A. 值	0	0	0	0	0
	A×5=	0	0	0	0	0
	结膜					
	A. 发红	0	1	0	0	0
	B. 混浊	0	0	0	0	0
	C. 排出	0	1	0	0	0
(A+B+C)×2=	0	4	0	0	0	
总分数	0	4	0	0	0	
动物#/性别		施用前	1 小时	24 小时	48 小时	72 小时
2673 雄性	角膜					
	A. 混浊-等级	0	0	0	0	0
	B. 涉及区域	0	0	0	0	0
	A×B×5=	0	0	0	0	0
	虹膜					
	A. 值	0	0	0	0	0
	A×5=	0	0	0	0	0
	结膜					
	A. 发红	0	1	0	0	0
	B. 混浊	0	0	0	0	0
	C. 排出	0	1	0	0	0
(A+B+C)×2=	0	4	0	0	0	
总分数	0	4	0	0	0	

图2

眼睛观察/治疗后-未处理						
动物#/性别		施用前	1 小时	24 小时	48 小时	72 小时
2671 雄性	角膜					
	A. 混浊-等级	0	0	0	0	0
	B. 涉及区域	0	0	0	0	0
	$A \times B \times 5 =$	0	0	0	0	0
	虹膜					
	A. 值	0	0	0	0	0
	$A \times 5 =$	0	0	0	0	0
	结膜					
	A. 发红	0	0	0	0	0
	B. 混浊	0	0	0	0	0
	C. 排出	0	0	0	0	0
$(A+B+C) \times 2 =$	0	0	0	0	0	
总分数	0	0	0	0	0	
动物#/性别		施用前	1 小时	24 小时	48 小时	72 小时
2672 雄性	角膜					
	A. 混浊-等级	0	0	0	0	0
	B. 涉及区域	0	0	0	0	0
	$A \times B \times 5 =$	0	0	0	0	0
	虹膜					
	A. 值	0	0	0	0	0
	$A \times 5 =$	0	0	0	0	0
	结膜					
	A. 发红	0	0	0	0	0
	B. 混浊	0	0	0	0	0
	C. 排出	0	0	0	0	0
$(A+B+C) \times 2 =$	0	0	0	0	0	
总分数	0	0	0	0	0	
动物#/性别		施用前	1 小时	24 小时	48 小时	72 小时
2673 雄性	角膜					
	A. 混浊-等级	0	0	0	0	0
	B. 涉及区域	0	0	0	0	0
	$A \times B \times 5 =$	0	0	0	0	0
	虹膜					
	A. 值	0	0	0	0	0
	$A \times 5 =$	0	0	0	0	0
	结膜					
	A. 发红	0	0	0	0	0
	B. 混浊	0	0	0	0	0
	C. 排出	0	0	0	0	0
$(A+B+C) \times 2 =$	0	0	0	0	0	
总分数	0	0	0	0	0	

图3

EEC 眼睛评价标准

评分参数	EEC 风险短语	平均眼刺激评分 (6 只动物) 或 2/3 动物 (3 只动物) 中的个体平均眼刺激评分	刺激等级
角膜混浊	-	0.00-1.99	无刺激性的
	刺激眼睛	2.00-2.99	刺激的
	对眼睛严重损害的风险	≥ 3.00	严重损害
虹膜损伤	-	0.00-0.99	无刺激性的
	刺激眼睛	1.00-1.99*	刺激的
	对眼睛严重损害的风险	$\geq 2.00^*$	严重损害
结膜发红	-	0.00-2.49	无刺激性的
	刺激眼睛	≥ 2.50	刺激的
结膜水肿	-	0.00-1.99	无刺激性的
	刺激眼睛	≥ 2.00	刺激的

*针对 6 只动物的 1.5 而非针对 3 只动物的 1.99。

**针对 6 只动物的 1.50 而非针对 3 只动物的 ≥ 2.00 。

图4