



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115919996 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 07

(21) 申请号 202210970186.8

A61P 27/02 (2006.01)

(22) 申请日 2016.04.29

A61P 27/06 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 7/06 (2006.01)

62/156,127 2015.05.01 US

C07K 14/47 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201680023972.X 2016.04.29

(71) 申请人 雅利斯塔制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 H·许

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/17 (2006.01)

权利要求书6页 说明书34页

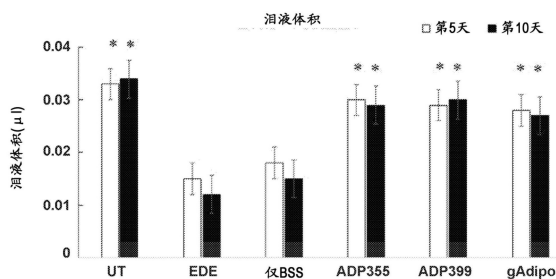
序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

用于治疗眼科疾病的脂联素拟肽

(57) 摘要

本文提供了用于治疗有需要的受试者的干眼症或与炎症相关的眼科疾病的组合物和方法。治疗性组合物包含脂联素拟肽化合物和药学上可接受的载体。还提供了用于缓解有需要的受试者的干眼症或与炎症相关的眼科疾病的一种或多种症状或临床体征的方法。



* p值 vs. EDE: <0.05

1. 一种用于治疗有需要的受试者的干眼症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物以治疗所述受试者的干眼症,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜注射、肌内注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。

3. 权利要求1-2任一项所述的方法,其中所述干眼症选自:泪液分泌过少、泪液缺乏症、眼球干燥症、干燥综合征型干眼症、非干燥综合征型干眼症、干燥性角结膜炎、水性泪液缺乏型干眼症(ADDE)、蒸发型干眼症(EDE)、环境干眼症、Stevens-Johnson综合征、眼天疱疮、睑缘炎、眼睑闭合失败、感觉神经麻痹、过敏性结膜炎相关干眼症、病毒性结膜炎干眼症、白内障术后干眼症、VDT手术相关干眼症和隐形眼镜佩戴相关干眼症。

4. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述组合物每天一次、每天两次、每天三次或更经常地向受试者施用。

5. 权利要求1-3任一项所述的方法,其中所述组合物每隔一天或更不经常地施用。

6. 权利要求1-5任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt)。

7. 权利要求1-6任一项所述的方法,其中所述组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。

8. 权利要求1-7任一项所述的方法,进一步包括施用包含以下的组合物:环孢素、人工泪液、皮质类固醇、消炎药或其任何组合。

9. 权利要求1-8任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

$X-M_1-SEQ \text{ ID NO:} 1-M_2-Z \text{ (I)}$;

其中SEQ ID NO:1是 $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$,

其中:

Xaa_1 是Asn或非天然氨基酸;

Xaa_2 是Gly或非天然氨基酸;

Xaa_3 是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa_4 是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa_5 是没有氨基酸、 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$;

其中 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 或 Xaa_4 中的至少一个是非天然氨基酸;

X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

M_1 是任选存在的单键或连接基团;和

M_2 是任选存在的单键或连接基团;

其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。

10. 权利要求9所述的方法,其中 Xaa_1 是D-Asn,且 Xaa_4 是D-Ser。

11. 权利要求9所述的方法,其中 Xaa_2 是正缬氨酸(Nva)。

12. 权利要求9所述的方法,其中 Xaa_3 是D-Ser。

13. 权利要求9所述的方法,其中Xaa₂是Nva,且Xaa₃是D-Ser。
14. 权利要求9所述的方法,其中Xaa₁是D-Asn,Xaa₂是Nva,Xaa₃是D-Ser,且Xaa₄是D-Ser。
15. 权利要求9所述的方法,其中Xaa₅是β-Ala或β-Ala-NH₂。
16. 权利要求1-9任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:
Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅ (SEQ ID NO:2) (II);
其中C末端氨基酸任选是酰胺化的。
17. 权利要求16所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)₂-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7)、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐。
18. 权利要求17所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。
19. 权利要求1-18任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含两种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。
20. 一种用于缓解有需要的受试者的干眼症的至少一种症状或临床体征的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物以缓解所述受试者的干眼症的至少一种症状或临床体征,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。
21. 权利要求20所述的方法,其中所述组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜注射、肌内注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。
22. 权利要求20-21任一项所述的方法,其中所述干眼症的至少一种症状选自:眼睛发红、分泌、过度流泪、无法产生眼泪、干燥、刺激、瘙痒、疼痛、不适、炎症、疲劳、异物感、光敏感、视力模糊、及其任何组合。
23. 权利要求20-22任一项所述的方法,其中所述干眼症的至少一种临床体征选自:泪液分泌的变化、泪液清除率的变化、眼表损伤、角膜上皮缺陷、眼表细胞的变化、泪膜稳定性的变化、泪液体积的变化、泪膜组成的变化、泪液渗透压的变化及其任何组合。
24. 权利要求20-23任一项所述的方法,其中所述组合物每天一次、每天两次、每天三次或更经常地向受试者施用。
25. 权利要求20-23任一项所述的方法,其中所述组合物每隔一天或更不经常地施用。
26. 权利要求20-25任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt)。
27. 权利要求20-26任一项所述的方法,其中所述组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。
28. 权利要求20-27任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

X-M₁-SEQ ID NO:1-M₂-Z (I) ;

其中SEQ ID NO:1是Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅,

其中:

Xaa₁是Asn或非天然氨基酸;

Xaa₂是Gly或非天然氨基酸;

Xaa₃是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa₄是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa₅是没有氨基酸、β-Ala或β-Ala-NH₂;

其中Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃或Xaa₄中的至少一个是非天然氨基酸;

X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

M₁是任选存在的单键或连接基团;和

M₂是任选存在的单键或连接基团;

其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。

29. 权利要求28所述的方法,其中Xaa₁是D-Asn,且Xaa₄是D-Ser。

30. 权利要求28所述的方法,其中Xaa₂是正缬氨酸(Nva)。

31. 权利要求28所述的方法,其中Xaa₃是D-Ser。

32. 权利要求28所述的方法,其中Xaa₂是Nva,且Xaa₃是D-Ser。

33. 权利要求28所述的方法,其中Xaa₁是D-Asn, Xaa₂是Nva, Xaa₃是D-Ser, 且Xaa₄是D-Ser。

34. 权利要求28所述的方法,其中Xaa₅是β-Ala或β-Ala-NH₂。

35. 权利要求20-27任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物或其药学上可接受的盐:

Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅ (SEQ ID NO:2) (II) ;

其中C末端氨基酸任选是酰胺化的。

36. 权利要求35所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)₂-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7)、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐。

37. 权利要求36所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。

38. 权利要求20-37任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含两种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。

39. 一种用于治疗有需要的受试者的与炎症相关眼科疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物以治疗所述受试者的与炎症相关眼科疾病,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

40. 权利要求39所述的方法,其中所述组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜

下注射、结膜注射、肌内注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。

41. 权利要求39-40任一项所述的方法,其中所述与炎症相关的眼科疾病选自:葡萄膜炎、巩膜炎、眼睛术后炎症、角膜移植、角膜伤口愈合、结膜炎、视网膜病、青光眼、高眼压症、翼状胬肉及其组合。

42. 权利要求39-41任一项所述的方法,其中所述组合物每天一次、每天两次、每天三次或更经常地向受试者施用。

43. 权利要求39-41任一项所述的方法,其中所述组合物每隔一天或更不经常地施用。

44. 权利要求39-43任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt)。

45. 权利要求39-44任一项所述的方法,其中所述组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。

46. 权利要求39-45任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

$X-M_1-SEQ \text{ ID NO:1}-M_2-Z \text{ (I)}$;

其中SEQ ID NO:1是 $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$,

其中:

Xaa_1 是Asn或非天然氨基酸;

Xaa_2 是Gly或非天然氨基酸;

Xaa_3 是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa_4 是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa_5 是没有氨基酸、 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$;

其中 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 或 Xaa_4 中的至少一个是非天然氨基酸;

X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

M_1 是任选存在的单键或连接基团;和

M_2 是任选存在的单键或连接基团;

其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。

47. 权利要求46所述的方法,其中 Xaa_1 是D-Asn,且 Xaa_4 是D-Ser。

48. 权利要求46所述的方法,其中 Xaa_2 是正缬氨酸(Nva)。

49. 权利要求46所述的方法,其中 Xaa_3 是D-Ser。

50. 权利要求46所述的方法,其中 Xaa_2 是Nva,且 Xaa_3 是D-Ser。

51. 权利要求46所述的方法,其中 Xaa_1 是D-Asn, Xaa_2 是Nva, Xaa_3 是D-Ser,且 Xaa_4 是D-Ser。

52. 权利要求46所述的方法,其中 Xaa_5 是 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$ 。

53. 权利要求39-45任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

$Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5 \text{ (SEQ ID NO:2) (II)}$;

其中C末端氨基酸任选是酰胺化的。

54. 权利要求53所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)₂-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7)、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐。

55. 权利要求54所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。

56. 权利要求39-55任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含两种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。

57. 一种眼用组合物,其包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

58. 权利要求57所述的眼用组合物,其中所述脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

$X-M_1-SEQ\ ID\ NO:1-M_2-Z(I)$;

其中SEQ ID NO:1是Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅,

其中:

Xaa₁是Asn或非天然氨基酸;

Xaa₂是Gly或非天然氨基酸;

Xaa₃是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa₄是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa₅是没有氨基酸、β-Ala或β-Ala-NH₂;

其中Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃或Xaa₄中的至少一个是非天然氨基酸;

X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

M₁是任选存在的单键或连接基团;和

M₂是任选存在的单键或连接基团;

其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。

59. 权利要求58所述的眼用组合物,其中Xaa₁是D-Asn,且Xaa₄是D-Ser。

60. 权利要求58所述的眼用组合物,其中Xaa₂是正缬氨酸(Nva)。

61. 权利要求58所述的眼用组合物,其中Xaa₃是D-Ser。

62. 权利要求58所述的眼用组合物,其中Xaa₂是Nva,且Xaa₃是D-Ser。

63. 权利要求58所述的眼用组合物,其中Xaa₁是D-Asn,Xaa₂是Nva,Xaa₃是D-Ser,且Xaa₄是D-Ser。

64. 权利要求58所述的眼用组合物,其中Xaa₅是β-Ala或β-Ala-NH₂。

65. 权利要求57所述的眼用组合物,其中所述脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅ (SEQ ID NO:2) (II);

其中C末端氨基酸任选是酰胺化的。

66. 权利要求65所述的眼用组合物,其中所述脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)₂-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7)、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐。

67. 权利要求66所述的眼用组合物,其中所述脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。

68. 权利要求57-67任一项所述的眼用组合物,其中所述组合物包含两种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。

用于治疗眼科疾病的脂联素拟肽

[0001] 本申请是申请日为2016年04月29日、申请号为201680023972.X、名称为“用于治疗眼科疾病的脂联素拟肽”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2015年5月1日提交的美国临时申请号62/156,127的优先权,出于所有目的,其全部内容通过引用并入本文。

[0004] 参考光盘上提交的“序列列表”、表格或计算机程序列表附件本申请包括于2016年4月28日创建的名为“SEQLIST_098102-000110PC-1006637_ST25.txt”的作为文本文件的序列列表,其包含5295个字节。出于所有目的,该文本文件包含的材料以其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0005] 眼表系统由角膜、结膜、泪腺、睑板腺、鼻泪管及其相关的泪液和结缔组织基质以及眼睑和睫毛组成,其全部由连续上皮和相互关联的神经、内分泌、免疫和血管系统整合在一起。人的泪液由泪腺产生。泪液通过眨眼发出,从眼表面蒸发出来,然后通过鼻泪管排出。泪液包括三层:最内层的亲水粘蛋白,其是由覆盖眼睛表面上皮的杯状细胞产生的粘性物质;由泪腺产生的水性泪液层,其漂浮在粘蛋白层上且约为0.9%盐水;和由睑板腺产生的浅表薄脂质层,其有助于均匀的泪液扩散和减缓泪液蒸发。这三层结构使泪膜稳定,并且使泪膜能够保持眼睛湿润,产生用于光线穿过眼睛的光滑表面,滋养眼睛的前部,并提供保护免受伤害和感染。干扰眼表系统的微妙体内平衡的因素可能不利地影响泪膜的稳定性和渗透压,导致渗透、机械和炎症损伤。眼表上皮细胞暴露于升高的泪液渗透压激活炎症通路,包括释放促炎性细胞因子。这可能导致免疫细胞向眼表募集和渗透,尤其是抗原呈递细胞和T细胞。

[0006] 干眼病(DED或干眼症)也称为干燥性角结膜炎,是泪液和眼表的多因素疾病。其特征在于包括以下的症状:眼睛干燥刺激、眼睛过度湿润、烧灼感和刺痛感、光敏感、异物感、疼痛和发红、眼睛疲劳和/或视力模糊。在干眼症中,眼表上皮发生鳞状上皮化生,表现为杯状细胞损失、粘蛋白缺乏和角质化,导致泪膜不稳定。不利地影响泪膜稳定性和渗透压的因素可以诱导眼表损伤,并引发产生先天性和适应性免疫反应的炎症级联反应。这些免疫-炎症反应导致进一步的眼表损伤,并发展自我持续的炎症循环(Stevenson等, Arch Ophthalmol. 2012, 130 (i) :90-100)。

[0007] 干眼症的主要类型是水性泪液缺乏型干眼症(ADDE)和蒸发型干眼症(EDE)。ADDE是由泪腺分泌泪液失败引起,这种类型可以进一步细分为干燥综合征型干眼症(泪腺和唾液腺通过自身免疫过程例如类风湿关节炎靶向)和非干燥综合征型干眼症(泪腺功能障碍,但排除干燥综合征的全身性自身免疫性特征,例如年龄相关的干眼症)。EDE是由于在泪腺分泌功能正常的情况下从暴露的眼表损失过多水分。它的起因可能是内在的(由影响眼睑结构或动力学的内在疾病引起,如睑板腺功能障碍)或外在的(由一些外在暴露引起发生眼表疾病,例如维生素A缺乏)。患有睑板腺功能障碍时,泪液的脂质层被改变,造成泪液蒸发

增加。参见例如“The Definition and Classification of Dry Eye Disease:Guidelines from the 2007International Dry Eye Work Shop,”*Ocul Surf*,2007,5(2):75-92。在两种干眼症中,最终结果是自我持续的刺激和炎症循环。

[0008] 据估计,近500万50岁及其以上的美国人患有DED,还有数百万经历干眼症的发作性症状;其中约三分之二是女性。DED的患病率随着年龄的增加而显著上升。干眼症可以阻碍日常生活活动的进行,且DED与整体生活质量下降有关。

[0009] 存在几种用于诊断和评估患者干眼症严重程度的技术或临床措施,包括眼表疾病指数(OSDI)调查问卷、干眼症症状评估(SADE)、泪膜破裂时间(TBUT)、眼表的重要染料染色、泪液凹面高度分析、泪膜渗透压分析、Schirmer测试等。TBUT测试测量三层泪膜破裂所需的时间。TBUT测试时间缩短表明泪液质量下降,并指示干眼症。Schirmer测试测量产生的泪液体积,并通过以下进行:在每只眼睛的下眼睑(结膜囊)内放置一小条滤纸几分钟,使泪液通过毛细管作用被吸入滤纸。然后移除滤纸,以毫米测量水分含量。通常,测量值小于5mm表示干眼症。

[0010] 治疗慢性DED患者的眼科医生必须处理眼表炎症的症状。除了降低视力,这种炎症的症状还包括结膜和眼睑发红、疼痛、肿胀、水肿(结膜水肿)。在DED中,刺激性症状可能是由以下引起:眼表上促炎性细胞因子的释放(Lam等,*Am J Ophthalmol*,2009,147:198-205; Albersmeyer等,*Exp Eye Res*,2010,90(3):444-451)和infiltration of inflammatory cells(Kunert等,*Arch Ophthalmol*,2000,118-(11):1489-96),以及支配眼表的神经纤维的刺激,其导致眼表组织损伤。炎症还导致上皮病,这是在DED中鉴定的关键临床体征。

[0011] 目前的干眼疗法是保守治疗,重点是更换泪液以减轻症状。轻度和中度干眼症病例的常规治疗包括补充润滑。每几个小时应用眼用制剂如治疗性滴眼剂和人造泪液可有助于维持和加强眼表上的泪膜并提供临时缓解。也使用润滑泪液软膏。泪液软膏包含白凡士林、矿物油和类似的润滑剂,并作为润滑剂和缓和剂。尽管这些保守治疗在短期内有益处,它们对于干眼症的长期控制治疗用途有限。

[0012] **RESTASIS®** (环孢素A)是干眼治疗的第一种处方药。环孢素A通过几种途径发挥免疫抑制活性,且环孢素A的免疫调节活性用于治疗基于免疫的疾病,例如移植排斥反应、牛皮癣、溃疡性结肠炎、类风湿关节炎和DED。已经表明,局部施用环孢素A能增加泪液分泌,可能通过促进副交感神经系统相关神经递质的局部释放。环孢素A在治疗DED中的有益效果是公认的;然而,很明显,很多DED患者对局部环孢素A并没有显示一致的治疗反应。

[0013] 因此,对于大多数患有干眼症和与炎症相关的眼科疾病的患者,目前几乎没有有效的治疗方案。因此,对于有效的安全的治疗有很高的未满足的需求。本发明满足这种需求,并提供其他优势。

[0014] 发明简述

[0015] 在一个方面,本文提供了用于治疗有需要的受试者的干眼症的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物以治疗受试者的干眼症,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。在一个实施方案中,组合物包括两种或更多种不同的,例如2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。

[0016] 在一个实施方案中,组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜

注射、肌肉注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。在一些实施方案中,干眼症选自:泪液分泌过少、泪液缺乏症、眼球干燥症、干燥综合征型干眼症、非干燥综合征型干眼症、干燥性角结膜炎、水性泪液缺乏型干眼症 (ADDE)、蒸发型干眼症 (EDE)、环境干眼症、Stevens-Johnson综合征、眼天疱疮、睑缘炎、眼睑闭合失败、感觉神经麻痹、过敏性结膜炎相关干眼症、病毒性结膜炎干眼症、白内障术后干眼症、VDT手术相关干眼症和隐形眼镜佩戴相关干眼症。

[0017] 在一些情况下,每天一次、每天两次、每天三次或更经常(更频繁地)向受试者施用组合物。在其他情况下,每隔一天或更不经常(较不频繁地)施用组合物。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt)。在一些实施方案中,组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。

[0018] 在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物: $X-M_1-SEQ ID NO: 1-M_2-Z(I)$;其中SEQ ID NO:1是 $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$,其中: Xaa_1 是Asn或非天然氨基酸; Xaa_2 是Gly或非天然氨基酸; Xaa_3 是Tyr或非天然氨基酸; Xaa_4 是Tyr或非天然氨基酸; Xaa_5 是没有氨基酸、 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$;其中 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 或 Xaa_4 中的至少一个是非天然氨基酸; X 是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域; Z 是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域; M_1 是任选存在的单键或连接基团; M_2 是任选存在的单键或连接基团;其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的;其变体;其衍生物;或其药学上可接受的盐。在一些情况下, Xaa_1 是D-Asn,且 Xaa_4 是D-Ser。在其他情况下, Xaa_2 是正缬氨酸(Nva)。还在其他情况下, Xaa_3 是D-Ser。在一些实施方案中, Xaa_2 是Nva,且 Xaa_3 是D-Ser。在其他实施方案中, Xaa_1 是D-Asn, Xaa_2 是Nva, Xaa_3 是D-Ser,且 Xaa_4 是D-Ser。还在其他实施方案中, Xaa_5 是 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$ 。

[0019] 在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物: $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$ (SEQ ID NO:2) (II);其中C末端氨基酸任选是酰胺化的;其变体;其衍生物;或其药学上可接受的盐。在一些情况下,脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)-2-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7,其中Dab表示2,3-二氨基丁酸),其变体,其衍生物,或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。

[0020] 在另一个方面,本文提供用于缓解有需要的受试者的干眼症的至少一种症状或临床体征的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物以缓解受试者的干眼症的至少一种症状或临床体征,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。在一个实施方案中,组合物包括两种或更多种不同的,例如2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。在

一些实施方案中,干眼症的至少一种症状选自:眼睛发红、分泌、过度流泪、无法产生眼泪、干燥、刺激、瘙痒、疼痛、不适、炎症、疲劳、异物感、光敏感、视力模糊、及其任何组合。在一些实施方案中,干眼症的至少一种临床体征选自:泪液分泌的变化、泪液清除率的变化、泪液渗透压的变化、眼表损伤、角膜上皮缺陷、眼表细胞的变化、泪膜稳定性的变化、泪液体积的变化、泪膜组成的变化、杯状细胞或睑板腺或泪腺生理、外观、数量或功能的变化,及其任何组合。

[0021] 在一些实施方案中,组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜注射、肌内注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。在一些情况下,每天一次、每天两次、每天三次或更经常(更频繁地)向受试者施用组合物。在其他情况下,每隔一天或更不经常(较不频繁地)施用组合物。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt)。在一些实施方案中,组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。

[0022] 在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物: $X-M_1-SEQ ID NO:1-M_2-Z(I)$;其中SEQ ID NO:1是 $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$,其中: Xaa_1 是Asn或非天然氨基酸; Xaa_2 是Gly或非天然氨基酸; Xaa_3 是Tyr或非天然氨基酸; Xaa_4 是Tyr或非天然氨基酸; Xaa_5 是没有氨基酸、 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$;其中 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 或 Xaa_4 中的至少一个是非天然氨基酸; X 是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域; Z 是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域; M_1 是任选存在的单键或连接基团; M_2 是任选存在的单键或连接基团;其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的;其变体;其衍生物;或其药学上可接受的盐。在一些情况下, Xaa_1 是D-Asn,且 Xaa_4 是D-Ser。在其他情况下, Xaa_2 是正缬氨酸(Nva)。还在其他情况下, Xaa_3 是D-Ser。在一些实施方案中, Xaa_2 是Nva,且 Xaa_3 是D-Ser。在其他实施方案中, Xaa_1 是D-Asn, Xaa_2 是Nva, Xaa_3 是D-Ser,且 Xaa_4 是D-Ser。还在其他实施方案中, Xaa_5 是 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$ 。

[0023] 在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物: $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$ (SEQ ID NO:2) (II);其中C末端氨基酸任选是酰胺化的;其变体;其衍生物;或其药学上可接受的盐。在一些情况下,脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)-2-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7,其中Dab表示2,3-二氨基丁酸),其变体,其衍生物,或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。

[0024] 还在另一个方面,本文提供用于治疗有需要的受试者的与炎症相关的眼科疾病的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的组合物以治疗受试者的与炎症相关的眼科疾病,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。在

一个实施方案中,组合物包括两种或更多种不同的,例如2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,与炎症相关的眼科疾病选自:葡萄膜炎、巩膜炎、眼睛术后炎症、角膜移植、角膜伤口愈合、结膜炎、视网膜病、青光眼、高眼压症、翼状胬肉及其组合。

[0025] 在一些实施方案中,组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜注射、肌肉注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。在一些情况下,每天一次、每天两次、每天三次或更经常(更频繁地)向受试者施用组合物。在其他情况下,每隔一天或更不经常(较不频繁地)施用组合物。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt)。在一些实施方案中,组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。

[0026] 在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物: $X-M_1-SEQ ID NO:1-M_2-Z(I)$;其中SEQ ID NO:1是 $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$,其中: Xaa_1 是Asn或非天然氨基酸; Xaa_2 是Gly或非天然氨基酸; Xaa_3 是Tyr或非天然氨基酸; Xaa_4 是Tyr或非天然氨基酸; Xaa_5 是没有氨基酸、 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$;其中 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 或 Xaa_4 中的至少一个是非天然氨基酸; X 是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域; Z 是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域; M_1 是任选存在的单键或连接基团; M_2 是任选存在的单键或连接基团;其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的;其变体;其衍生物;或其药学上可接受的盐。在一些情况下, Xaa_1 是D-Asn,且 Xaa_4 是D-Ser。在其他情况下, Xaa_2 是正缬氨酸(Nva)。还在其他情况下, Xaa_3 是D-Ser。在一些实施方案中, Xaa_2 是Nva,且 Xaa_3 是D-Ser。在其他实施方案中, Xaa_1 是D-Asn, Xaa_2 是Nva, Xaa_3 是D-Ser,且 Xaa_4 是D-Ser。还在其他实施方案中, Xaa_5 是 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$ 。

[0027] 在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物: $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$ (SEQ ID NO:2) (II);其中C末端氨基酸任选是酰胺化的;其变体;其衍生物;或其药学上可接受的盐。在一些情况下,脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)-2-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7,其中Dab表示2,3-二氨基丁酸),其变体,其衍生物,或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。

[0028] 还在另一个方面,本文提供眼用组合物,其包含一定量的有效缓解干眼症的至少一种症状的脂联素拟肽化合物和药学上可接受的载体。

[0029] 在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物: $X-M_1-SEQ ID NO:1-M_2-Z(I)$;其中SEQ ID NO:1是 $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$,其中: Xaa_1 是Asn或非天然氨基酸; Xaa_2 是Gly或非天然氨基酸; Xaa_3 是Tyr或非天然氨基酸;

Xaa₄是Tyr或非天然氨基酸;Xaa₅是没有氨基酸、β-Ala或β-Ala-NH₂;其中Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃或Xaa₄中的至少一个是非天然氨基酸;X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;M₁是任选存在的单键或连接基团;M₂是任选存在的单键或连接基团;其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的;其变体;其衍生物;或其药学上可接受的盐。在一些情况下,Xaa₁是D-Asn,且Xaa₄是D-Ser。在其他情况下,Xaa₂是正缬氨酸(Nva)。还在其他情况下,Xaa₃是D-Ser。在一些实施方案中,Xaa₂是Nva,且Xaa₃是D-Ser。在其他实施方案中,Xaa₁是D-Asn,Xaa₂是Nva,Xaa₃是D-Ser,且Xaa₄是D-Ser。还在其他实施方案中,Xaa₅是β-Ala或β-Ala-NH₂。

[0030] 在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物:Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅(SEQ ID NO:2)(II);其中C末端氨基酸任选是酰胺化的;其变体;其衍生物;或其药学上可接受的盐。在一些情况下,脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser(SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala(SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂(SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂(SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)-2-Dab-NH₂(SEQ ID NO:7,其中Dab表示2,3-二氨基丁酸),其变体,其衍生物,或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。

[0031] 在一些实施方案中,眼用组合物包括两种或更多种不同的,例如2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。

[0032] 从下面的详细描述和附图,本发明的其它目的、特征和优点对于本领域技术人员是显而易见的。

[0033] 本申请还包括以下项目。

[0034] 1.一种用于治疗有需要的受试者的干眼症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物以治疗所述受试者的干眼症,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

[0035] 2.项目1所述的方法,其中所述组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜注射、肌内注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。

[0036] 3.项目1-2任一项所述的方法,其中所述干眼症选自:泪液分泌过少、泪液缺乏症、眼球干燥症、干燥综合征型干眼症、非干燥综合征型干眼症、干燥性角结膜炎、水性泪液缺乏型干眼症(ADDE)、蒸发型干眼症(EDE)、环境干眼症、Stevens-Johnson综合征、眼天疱疮、睑缘炎、眼睑闭合失败、感觉神经麻痹、过敏性结膜炎相关干眼症、病毒性结膜炎干眼症、白内障术后干眼症、VDT手术相关干眼症和隐形眼镜佩戴相关干眼症。

[0037] 4.项目1-3任一项所述的方法,其中所述组合物每天一次、每天两次、每天三次或更经常地向受试者施用。

[0038] 5.项目1-3任一项所述的方法,其中所述组合物每隔一天或更不经常地施用。

[0039] 6.项目1-5任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量为约0.0001%(wt)至约90%(wt)。

[0040] 7. 项目1-6任一项所述的方法,其中所述组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。

[0041] 8. 项目1-7任一项所述的方法,进一步包括施用包含以下的组合物:环孢素、人工泪液、皮质类固醇、消炎药或其任何组合。

[0042] 9. 项目1-8任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

[0043] $X-M_1-SEQ\ ID\ NO:1-M_2-Z(I)$;

[0044] 其中SEQ ID NO:1是 $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$,

[0045] 其中:

[0046] Xaa_1 是Asn或非天然氨基酸;

[0047] Xaa_2 是Gly或非天然氨基酸;

[0048] Xaa_3 是Tyr或非天然氨基酸;

[0049] Xaa_4 是Tyr或非天然氨基酸;

[0050] Xaa_5 是没有氨基酸、 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$;

[0051] 其中 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 或 Xaa_4 中的至少一个是非天然氨基酸;

[0052] X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

[0053] Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

[0054] M_1 是任选存在的单键或连接基团;和

[0055] M_2 是任选存在的单键或连接基团;

[0056] 其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。

[0057] 10. 项目9所述的方法,其中 Xaa_1 是D-Asn,且 Xaa_4 是D-Ser。

[0058] 11. 项目9所述的方法,其中 Xaa_2 是正缬氨酸(Nva)。

[0059] 12. 项目9所述的方法,其中 Xaa_3 是D-Ser。

[0060] 13. 项目9所述的方法,其中 Xaa_2 是Nva,且 Xaa_3 是D-Ser。

[0061] 14. 项目9所述的方法,其中 Xaa_1 是D-Asn, Xaa_2 是Nva, Xaa_3 是D-Ser,且 Xaa_4 是D-Ser。

[0062] 15. 项目9所述的方法,其中 Xaa_5 是 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$ 。

[0063] 16. 项目1-9任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

[0064] $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5(SEQ\ ID\ NO:2)(II)$;

[0065] 其中C末端氨基酸任选是酰胺化的。

[0066] 17. 项目16所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser(SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala(SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂(SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂(SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)₂-Dab-NH₂(SEQ ID NO:7)、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐。

[0067] 18. 项目17所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上

可接受的盐。

[0068] 19. 项目1-18任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含两种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。

[0069] 20. 一种用于缓解有需要的受试者的干眼症的至少一种症状或临床体征的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物以缓解所述受试者的干眼症的至少一种症状或临床体征,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

[0070] 21. 项目20所述的方法,其中所述组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜注射、肌内注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。

[0071] 22. 项目20-21任一项所述的方法,其中所述干眼症的至少一种症状选自:眼睛发红、分泌、过度流泪、无法产生眼泪、干燥、刺激、瘙痒、疼痛、不适、炎症、疲劳、异物感、光敏感、视力模糊、及其任何组合。

[0072] 23. 项目20-22任一项所述的方法,其中所述干眼症的至少一种临床体征选自:泪液分泌的变化、泪液清除率的变化、眼表损伤、角膜上皮缺陷、眼表细胞的变化、泪膜稳定性的变化、泪液体积的变化、泪膜组成的变化、泪液渗透压的变化及其任何组合。

[0073] 24. 项目20-23任一项所述的方法,其中所述组合物每天一次、每天两次、每天三次或更经常地向受试者施用。

[0074] 25. 项目20-23任一项所述的方法,其中所述组合物每隔一天或更不经常地施用。

[0075] 26. 项目20-25任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量约为0.0001% (wt) 至约90% (wt)。

[0076] 27. 项目20-26任一项所述的方法,其中所述组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。

[0077] 28. 项目20-27任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

[0078] $X-M_1-SEQ ID NO:1-M_2-Z(I)$;

[0079] 其中SEQ ID NO:1是 $Xaa_1-Ile-Pro-Xaa_2-Leu-Tyr-Xaa_3-Phe-Ala-Xaa_4-Xaa_5$,

[0080] 其中:

[0081] Xaa_1 是Asn或非天然氨基酸;

[0082] Xaa_2 是Gly或非天然氨基酸;

[0083] Xaa_3 是Tyr或非天然氨基酸;

[0084] Xaa_4 是Tyr或非天然氨基酸;

[0085] Xaa_5 是没有氨基酸、 $\beta-Ala$ 或 $\beta-Ala-NH_2$;

[0086] 其中 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 或 Xaa_4 中的至少一个是非天然氨基酸;

[0087] X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

[0088] Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;

[0089] M_1 是任选存在的单键或连接基团;和

[0090] M_2 是任选存在的单键或连接基团;

[0091] 其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。

- [0092] 29. 项目28所述的方法,其中Xaa₁是D-Asn,且Xaa₄是D-Ser。
- [0093] 30. 项目28所述的方法,其中Xaa₂是正缬氨酸(Nva)。
- [0094] 31. 项目28所述的方法,其中Xaa₃是D-Ser。
- [0095] 32. 项目28所述的方法,其中Xaa₂是Nva,且Xaa₃是D-Ser。
- [0096] 33. 项目28所述的方法,其中Xaa₁是D-Asn,Xaa₂是Nva,Xaa₃是D-Ser,且Xaa₄是D-Ser。
- [0097] 34. 项目28所述的方法,其中Xaa₅是β-Ala或β-Ala-NH₂。
- [0098] 35. 项目20-27任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物或其药学上可接受的盐:
- [0099] Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅ (SEQ ID NO:2) (II);
- [0100] 其中C末端氨基酸任选是酰胺化的。
- [0101] 36. 项目35所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)₂-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7)、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐。
- [0102] 37. 项目36所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。
- [0103] 38. 项目20-37任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含两种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。
- [0104] 39. 一种用于治疗有需要的受试者的与炎症相关眼科疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物以治疗所述受试者的与炎症相关眼科疾病,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。
- [0105] 40. 项目39所述的方法,其中所述组合物通过以下施用:局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜注射、肌内注射、皮下注射、静脉内注射、前房内注射、或植入受试者的眼睛。
- [0106] 41. 项目39-40任一项所述的方法,其中所述与炎症相关的眼科疾病选自:葡萄膜炎、巩膜炎、眼睛术后炎症、角膜移植、角膜伤口愈合、结膜炎、视网膜病、青光眼、高眼压症、翼状胬肉及其组合。
- [0107] 42. 项目39-41任一项所述的方法,其中所述组合物每天一次、每天两次、每天三次或更经常地向受试者施用。
- [0108] 43. 项目39-41任一项所述的方法,其中所述组合物每隔一天或更不经常地施用。
- [0109] 44. 项目39-43任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物在最终组合物中存在的量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt)。
- [0110] 45. 项目39-44任一项所述的方法,其中所述组合物是选自以下的制剂:溶液、悬浮液、糖浆、液体、凝胶、水凝胶、乳剂、脂质体、气雾剂、雾、膜、悬浮液、栓塞、聚合物、植入物、隐形眼镜、眼插入物、纳米颗粒、微粒、缓释制剂和适于眼科医疗设备的制剂。
- [0111] 46. 项目39-45任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

- [0112] X-M₁-SEQ ID NO:1-M₂-Z (I) ;
- [0113] 其中SEQ ID NO:1是Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅,
- [0114] 其中:
- [0115] Xaa₁是Asn或非天然氨基酸;
- [0116] Xaa₂是Gly或非天然氨基酸;
- [0117] Xaa₃是Tyr或非天然氨基酸;
- [0118] Xaa₄是Tyr或非天然氨基酸;
- [0119] Xaa₅是没有氨基酸、β-Ala或β-Ala-NH₂;
- [0120] 其中Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃或Xaa₄中的至少一个是非天然氨基酸;
- [0121] X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;
- [0122] Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;
- [0123] M₁是任选存在的单键或连接基团;和
- [0124] M₂是任选存在的单键或连接基团;
- [0125] 其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。
- [0126] 47. 项目46所述的方法,其中Xaa₁是D-Asn,且Xaa₄是D-Ser。
- [0127] 48. 项目46所述的方法,其中Xaa₂是正缬氨酸(Nva)。
- [0128] 49. 项目46所述的方法,其中Xaa₃是D-Ser。
- [0129] 50. 项目46所述的方法,其中Xaa₂是Nva,且Xaa₃是D-Ser。
- [0130] 51. 项目46所述的方法,其中Xaa₁是D-Asn, Xaa₂是Nva, Xaa₃是D-Ser, 且Xaa₄是D-Ser。
- [0131] 52. 项目46所述的方法,其中Xaa₅是β-Ala或β-Ala-NH₂。
- [0132] 53. 项目39-45任一项所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:
- [0133] Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅ (SEQ ID NO:2) (II) ;
- [0134] 其中C末端氨基酸任选是酰胺化的。
- [0135] 54. 项目53所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)₂-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7)、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐。
- [0136] 55. 项目54所述的方法,其中所述脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。
- [0137] 56. 项目39-55任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含两种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。
- [0138] 57. 一种眼用组合物,其包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。
- [0139] 58. 项目57所述的眼用组合物,其中所述脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:

- [0140] X-M₁-SEQ ID NO:1-M₂-Z (I) ;
- [0141] 其中SEQ ID NO:1是Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅,
- [0142] 其中:
- [0143] Xaa₁是Asn或非天然氨基酸;
- [0144] Xaa₂是Gly或非天然氨基酸;
- [0145] Xaa₃是Tyr或非天然氨基酸;
- [0146] Xaa₄是Tyr或非天然氨基酸;
- [0147] Xaa₅是没有氨基酸、β-Ala或β-Ala-NH₂;
- [0148] 其中Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃或Xaa₄中的至少一个是非天然氨基酸;
- [0149] X是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;
- [0150] Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域;
- [0151] M₁是任选存在的单键或连接基团;和
- [0152] M₂是任选存在的单键或连接基团;
- [0153] 其中当式I化合物包含C末端氨基酸时,所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。
- [0154] 59. 项目58所述的眼用组合物,其中Xaa₁是D-Asn,且Xaa₄是D-Ser。
- [0155] 60. 项目58所述的眼用组合物,其中Xaa₂是正缬氨酸(Nva)。
- [0156] 61. 项目58所述的眼用组合物,其中Xaa₃是D-Ser。
- [0157] 62. 项目58所述的眼用组合物,其中Xaa₂是Nva,且Xaa₃是D-Ser。
- [0158] 63. 项目58所述的眼用组合物,其中Xaa₁是D-Asn,Xaa₂是Nva,Xaa₃是D-Ser,且Xaa₄是D-Ser。
- [0159] 64. 项目58所述的眼用组合物,其中Xaa₅是β-Ala或β-Ala-NH₂。
- [0160] 65. 项目57所述的眼用组合物,其中所述脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐:
- [0161] Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅ (SEQ ID NO:2) (II) ;
- [0162] 其中C末端氨基酸任选是酰胺化的。
- [0163] 66. 项目65所述的眼用组合物,其中所述脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro)₂-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7)、其变体、其衍生物或其药学上可接受的盐。
- [0164] 67. 项目66所述的眼用组合物,其中所述脂联素拟肽化合物是ADP355、ADP399或其药学上可接受的盐。
- [0165] 68. 项目57-67任一项所述的眼用组合物,其中所述组合物包含两种或更多种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。

附图说明

[0166] 图1表明与对照未处理EDE小鼠相比,向实验干眼症(EDE)小鼠模型施用脂联素拟肽增加了泪液体积。在开始处理后第5天和第10天测量泪液体积。在脂联素拟肽处理动物中

的泪液体积与未处理正常小鼠类似。并且,与对照未处理EDE小鼠相比,处理EDE小鼠中的泪液体积显著提高。“UT”表示未处理(正常)小鼠;“EDE”表示未处理的实验干眼症对照小鼠;“仅BSS”表示仅用平衡的盐溶液处理的实验干眼症小鼠;“ADP355”表示用脂联素拟肽处理的实验干眼症小鼠;“ADP399”表示用脂联素拟肽(直链支化二聚体)处理的实验干眼症小鼠;和“dAdipo”表示用重组小鼠全长球形脂联素处理的实验干眼症小鼠。

[0167] 图2表明与对照未处理EDE小鼠相比,脂联素拟肽处理最小化或降低实验干眼症小鼠模型中的角膜表面不规则性。使用荧光素染色来评估角膜表面的光滑度。在开始EDE之后第5天和第10天分析角膜表面。“UT”表示未处理(正常)小鼠;“EDE”表示未处理的实验干眼症对照小鼠;“仅BSS”表示仅用平衡的盐溶液处理的实验干眼症小鼠;“ADP355”表示用脂联素拟肽处理的实验干眼症小鼠;“ADP399”表示用脂联素拟肽(直链支化二聚体)处理的实验干眼症小鼠;和“dAdipo”表示用重组小鼠全长球形脂联素处理的实验干眼症小鼠。

[0168] 发明详述

[0169] I、引言

[0170] 本文提供了用于治疗有需要的受试者的干眼症或与炎症相关的眼科疾病的组合物、方法和试剂盒。该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。本文还提供了用于缓解受试者的干眼症的至少一种症状或临床体征的方法。在一些实施方案中,治疗有效的组合物包含至少两种不同的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐。本发明一部分是基于以下发现:向眼睛施用脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐增加患有干眼症的受试者的泪液体积,并降低角膜表面不规则性。

[0171] II. 定义

[0172] 如本文所用,除非另有说明,以下术语具有赋予其的含义。

[0173] 如本文所用,术语“一”、“一个”或“所述”不仅包括具有一个成员的方面,也包括具有超过一个成员的方面。例如,除非上下文明确另有说明,单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数指代。因此,例如,“一个细胞”包括这种细胞的复数,“所述试剂”包括本领域技术人员已知的一个或多个试剂,以此类推。

[0174] 术语“干眼症”是指泪液和眼表(包括角膜、结膜和眼睑)的多因素疾病,造成的症状是不适、视力模糊和对眼表具有潜在损伤的泪膜不稳定,如“The Definition and Classification of Dry Eye Disease:Guidelines from the 2007International Dry Eye Work Shop,”Ocul Surf,2007,5(2):75-92)所定义。干眼症可能伴随泪膜渗透压增加和眼表炎症。干眼症包括干眼综合征、干燥性角结膜炎(KCS)、功能障碍性泪液综合征、泪角结膜炎、蒸发性泪液缺乏症、水性泪液缺乏症和LASIK-诱导的神经上皮病(LE)。

[0175] 术语“与炎症相关的眼科疾病”是指其中炎症对眼表系统造成损伤的眼睛疾病或病症。如本文所用,“眼表系统”包括角膜、结膜、泪腺、睑板腺、鼻泪管及其相关的泪液和结缔组织基质,以及眼睑和睫毛,其全部由连续上皮和相互关联的神经、内分泌、免疫和血管系统整合在一起。

[0176] 术语“症状”是指对患者经历或感觉到的病症或疾病的主观指征或观察。

[0177] 术语“临床体征”是指可能由临床医生检测或解释的病症或疾病的客观指征、观察或证据。

[0178] 术语“脂联素”是指主要源自脂肪细胞的多肽。脂联素多肽由244个氨基酸残基组成,其包含一个短的非胶原性N末端区段(约130个氨基酸),之后是胶原样序列(Maeda等, BBRC, 1996, 221: 286-289)。人脂联素多肽的氨基酸序列可发现于例如NCBI参考序列号NP 004788.1或UniPro参考号Q15848。脂联素可以形成同源三聚体,其大小和整体结构与补体蛋白C1q类似,与C1q在C末端球形结构域具有特别高的同源性(约65-70%同源性)。认为这种球形结构域(约130个氨基酸)对于自然(天然)脂联素的生物活性是必需的。脂联素的晶体结构显示,该相同球形结构域与TNF α 之间具有更高的结构相似性(约60%同源性)。

[0179] 术语“脂联素拟肽”是指模拟脂联素蛋白的活性或功能的肽化合物。脂联素拟肽可以具有与一个或多个脂联素受体(AdipoR1和AdipoR2)或其变体结合或相互作用的能力。拟肽可以是骨架修饰的肽、与肽类似的任何聚酰胺或其他聚合物结构、包含非天然氨基酸残基的肽或肽衍生物。

[0180] 术语“肽”是指包含由肽键共价连接的两个或多个氨基酸的链的有机化合物。肽可以表示为构成氨基酸的数量,即,二肽包含两个氨基酸残基,三肽包含三个,等等。

[0181] 如本文所用,术语“氨基酸”是指包含碱性氨基和酸性羧基两者的有机化合物。该术语包括天然氨基酸(例如L-氨基酸)、修饰和非常规氨基酸(例如D-氨基酸),和已知以游离或组合形式生物出现但通常不以蛋白形式出现的氨基酸。该术语包括修饰和非常规氨基酸,例如在其全文通过引用并入本文的Roberts and Vellaccio(1983) *The Peptides*, 5: 342-429中所公开的那些。天然蛋白质中存在的氨基酸包括但不限于:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸和缬氨酸。天然的非蛋白质氨基酸包括但不限于:精氨酸琥珀酸、瓜氨酸、半胱氨酸亚磺酸、3,4-二羟基苯丙氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、鸟氨酸、3-碘酪氨酸、3,5-二碘酪氨酸、3,5,5'-三碘甲腺原氨酸、3,3',5,5'-四碘甲腺原氨酸。可用于实施本发明的修饰或非常规氨基酸包括但不限于:D-氨基酸、羟基赖氨酸、4-羟基脯氨酸、N-Cbz-保护的氨基酸、2,4-二氨基丁酸、高精氨酸、N-甲基-精氨酸、正亮氨酸、N-甲氨基丁酸、萘基丙氨酸、苯基甘氨酸、 β -苯基脯氨酸、叔亮氨酸、4-氨基环己基丙氨酸、N-甲基-正亮氨酸、正缬氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、N,N-二甲氨基甘氨酸、N-甲氨基甘氨酸、4-氨基哌啶-4-羧酸、6-氨基己酸、反式-4-(氨基甲基)-环己基甲酸、2-,3-和4-(氨基甲基)-苯甲酸、1-氨基环戊基甲酸、1-氨基环丙基甲酸和2-苄基-5-氨基戊酸。

[0182] 术语“疏水残基”包括:缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸及其功能等同物。

[0183] 术语“极性残基”包括:天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、丝氨酸及其功能等同物。

[0184] 术语“肽键”是指共价酰胺键,由一个氨基酸的羧基和第二个氨基酸的氨基之间失去一分子水形成。

[0185] 术语“肽骨架”是指包含羧酰胺基团的肽原子链,其是由连接氨基酸的羧基和氨基的氨基酸原子(通常是 α -氨基酸的 α -碳)结合在一起的肽。

[0186] 术语“侧链”是指与肽骨架连接的基团,通常是指与 α -氨基酸的 α -碳连接的基团。例如,蛋白氨基酸的侧链包括:甲基(丙氨酸)、羟甲基(猪)、苄基(苯丙氨酸)、巯甲基(半胱氨酸)和羧甲基(天冬氨酸)。

[0187] 对包含肽链的化合物应用的术语“衍生物”是指其中肽侧链的一个或多个氨基、羟基或羧基,或末端氨基或羧基被修饰为衍生的功能基团的化合物。氨基可以衍生为酰胺(例如烷基酰胺、乙酰胺)、氨基甲酸酯(如烷基氨基甲酸酯,诸如氨基甲酸甲酯或氨基甲酸叔丁基酯)或尿素。羟基可以衍生为酯(例如链烷酸酯,如乙酸酯、丙酸酯,或芳烃羧酸酯,如苯甲酸酯)、氨基甲酸酯(例如氨基甲酸烷基酯,如氨基甲酸甲酯)、碳酸酯(例如碳酸烷基酯,如碳酸乙酯)。羧基可以衍生为酯(例如烷基酯,如乙基酯)或酰胺(例如伯甲酰胺、N-烷基仲甲酰胺或N,N-二烷基甲酰胺)。本领域技术人员将理解,预期肽衍生物保留亲本肽的性质,因为衍生基团的引入没有改变肽的性质,或衍生基团在体内被移除(例如,经由代谢)。本发明的优选实施方案是其中三个或更少的氨基、羧基和羟基,优选两个或更少,或一个,或没有被修饰为衍生功能基团的那些。术语“衍生物”还包括盐,包括衍生物的盐。

[0188] 术语“非天然氨基酸”是指其本身在自然中不存在的氨基酸,其是由人合成的或生成的。非天然氨基酸的实例包括:碘化酪氨酸、甲基化酪氨酸、糖基化丝氨酸、糖基化苏氨酸、氮杂环丁烷-2-羧酸、3,4-脱氢脯氨酸、perthiaproline、刀豆氨酸、乙硫氨酸、正亮氨酸、硒代蛋氨酸、氨基己酸、碲基蛋氨酸、同型烯丙基甘氨酸和同型炔丙基甘氨酸。D-氨基酸也是非天然氨基酸的实例。

[0189] “Nva”是指非天然氨基酸正缬氨酸,也称为2(L)-氨基戊酸。“NvaNH₂”是指2(L)-氨基戊酰胺。“Acp”是指非天然氨基酸6-氨基己酸,也称为6-氨基-己酸。“AcpH₂”是指6-氨基癸酰胺,也称为6-氨基-己酰胺。“Dpr(Ac)”是指N₂(3)-乙酰基-二氨基丙酸。“Dbu”是指2,4-二氨基丁酸。“Glc”是指葡萄糖。“βGlc”是指β-葡萄糖。“SerP(Glc)”是指在醇羟基上用β-葡萄糖残基糖基化的丝氨酸。“Thr(NAcGal)”是指在醇羟基上用N-乙酰基半乳糖胺基残基糖基化的苏氨酸。“Tyr(I₂)”是指3,5-二碘酪氨酸。“N-MeArg”是指N-甲基-精氨酸。“βAla”是指β-丙氨酸,也称为3-氨基丙酸。“βAla-NH₂”是指β-丙氨酸的酰胺衍生物,也称为3-氨基丙酰胺。“(D)-Ser”是指D-丝氨酸。“Apa”是指氨基戊酸。“AlloThr”是指别苏氨酸,也称为(2S,3S)-2-氨基-3-羟基丁酸。“3Hyp”是指3-羟基脯氨酸。“4Hyp”是指4-羟基脯氨酸。

[0190] 如本文所用,术语“羟基化无环氨基酸”是指在其结构中包含至少一个醇羟基的无环氨基酸。羟基化无环氨基酸的优选但非限制性实例是:丝氨酸、(D)-丝氨酸、苏氨酸、(D)-苏氨酸、(L)-别苏氨酸、(D)-别苏氨酸、(L)-异丝氨酸、(D)-异丝氨酸、(L)-β-高丝氨酸、(D)-β-高丝氨酸、(L)-高丝氨酸和(D)-高丝氨酸。

[0191] 如本文所用,术语“脂族氨基酸”是指其中碳链本质上是脂族的氨基酸。脂族氨基酸的非限制性实例是:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、Nva、Nva-NH₂、Acp、Acp-NH₂、Dpr(Ac)、Dbu、N-MeArg、βAla、βAla-NH₂、Apa和AlloThr。本发明优选的脂族氨基酸是βAla、βAla-NH₂、Acp和Acp-NH₂。

[0192] 术语“肽转导结构域”用于指能够跨越细胞膜,并且能够指导将与蛋白质转导结构域相关的肽、蛋白质或分子从细胞外通过细胞的质膜转运入细胞的细胞质的肽或其衍生物。

[0193] 连接两个肽所引用的术语“偶联”是指两个肽彼此共价连接。连接可以通过在一个肽的羧基和另一个肽的氨基之间形成酰胺键直接完成,或通过连接基团完成,所述连接基团与各个肽的共价结合。例如,连接基团可以是肽链、氨基酸、或具有至少两个功能基团且

能够与两条肽链中的每一个形成共价键的任何基团。

[0194] 如本文所用,“乙酰化氨基酸”用于指在其侧链中具有乙酰基部分的氨基酸。

[0195] 如本文所用,“药学上可接受的”是指在合理的医疗判断范围内,适合用于接触人和动物的组织,而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题并发症的具有合理收益/风险比的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0196] 术语“药学上可接受的盐”是指所公开化合物的衍生物,其中亲本化合物通过制备其酸盐或碱盐(包括酸加成盐和碱加成盐)来修饰。药学上可接受的盐的实例包括但不限于:碱性残基(例如胺)的矿物盐或有机酸盐;酸性残基(例如羧酸)的碱性盐或有机盐;等。术语“酸加成盐”是指通过加入酸制备的亲本化合物的相应的盐衍生物。药学上可接受的盐包括例如从无机或有机酸形成的亲本化合物的常规盐或季铵盐。例如,这种常规盐包括但不限于从例如以下无机酸衍生的那些:盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等;和从例如以下有机酸制备的盐:乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、扑酸、己二酸、褐藻酸、天冬氨酸、羧基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、甲基磺酸、2-萘磺酸、乙二磺酸、草酸、羧基乙磺酸、葡庚酸、甘油磷酸、半磺酸、庚酸、己酸、盐酸、氢溴酸、氢碘酸、2-羟乙磺酸、2-萘磺酸、果胶质酸、磷酸、硫酸、3-苯丙酸、苦味酸、新戊酸、异硫氰酸、对甲苯磺酸、丁酸、樟脑酸、樟脑磺酸、二葡萄糖酸、环戊烷丙酸、双硫酸、十二烷基硫酸、乙磺酸和十一酸等。因此,术语“碱加成盐”是指通过加入碱制备的亲本化合物的相应的盐衍生物。并且,可以用如以下的试剂将碱性含氮基团季铵化:低卤代烷,例如甲基、乙基、丙基和丁基氯、溴、碘;二烷基硫酸盐,例如二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸盐;长链卤化物,例如癸基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、硬脂酰基氯化物、溴化物和碘化物;芳烷基卤化物,例如苄基和苯乙基溴化物和其他。药学上可接受的盐包括例如从无机或有机碱形成的亲本化合物的常规盐或季铵盐。这种常规盐包括但不限于从例如以下无机碱衍生的那些:氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化镁和氢氧化铵,和从例如以下有机胺制备的盐:甲基胺、乙基胺、异丙醇胺、哌啶、哌嗪、吡咯烷、乙醇胺、吗啉、二氮杂(diazapine)、乙二胺、吡啶、喹啉、奎宁等。

[0197] 如上所述,术语“治疗有效量”、“有效量”或“治疗有效剂量”是指足以缓解病症的治疗剂的量。例如,对于给定参数,治疗有效量将显示治疗效果增加或降低至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%。治疗效果也可以表示为“-倍”增加或降低。例如,治疗有效量可以具有与对照相比至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更好的效果。在本发明上下文中,脂联素拟肽化合物的有效量可以根据其他治疗的共施用或个体的疾病谱(其他因素如年龄、疾病严重程度等)而变化。

[0198] 术语“疗法”、“治疗”和“缓解”是指症状严重程度的任何降低。在治疗眼科疾病(例如干眼症)的情况下,该术语可以是指增加人工泪液、保存泪液、减少泪液蒸发、增加泪液分泌、减轻眼睑或眼表炎症、减少干眼症的眼部体征等。如本文所用,术语“治疗”和“预防”并不意欲是指绝对术语。治疗可以是指发作的任何延迟、症状缓解、患者生活质量的改善等。治疗的效果可以与没有接受治疗的个体或个体集合、治疗之前的同一患者或治疗期间的不同时间相比较。在一些方面,与例如施用之前的个体或没有进行治疗的对照个体相比,疾病的严重程度降低至少10%。在一些方面,疾病的严重程度降低至少25%、50%、75%、80%或

90%，或在一些情况下，用标准诊断技术不再检测到。

[0199] 术语“治疗”是指治疗患者，例如哺乳动物（尤其是人或动物）的疾病或医学病症（例如干眼症或与炎症相关的眼科疾病），其包括：缓解患者的疾病或医学病症，即消除疾病或医学病症或造成其衰退；抑制患者的疾病或医学病症，即减缓或阻止疾病或医学病症的发展；或减轻患者疾病或医学病症的一个或多个症状。该术语包括预防性治疗疾病或病症以预防或降低获得或发展特定疾病或病症的风险，或预防或降低复发风险。

[0200] 如本文所用，“剂量单位”是指是指适合作为待治疗的特定患者的单位剂量的物理上离散的单位。每个单位可以包括计算以与所需的药学载体一起能产生所需治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的剂量单位形式的说明书可以由以下来规定：(a) 活性化合物的独特特征和要实现的具体治疗效果，和 (b) 本领域中固有的复合这种活性化合物的限制。

[0201] 术语“受试者”、“个体”或“患者”通常包括人，但也可以包括其他动物，例如诸如其他灵长类动物、啮齿类动物、犬科动物、猫科动物、马科动物、绵羊、猪等。

[0202] III. 实施方案的详细描述

[0203] A. 脂联素拟肽化合物

[0204] 脂联素是主要由脂肪组织分泌的244个氨基酸长的多肽蛋白质。这个相对较大的30kDa的蛋白质在结构上与肿瘤坏死因子 α (TNF α) 类似。

[0205] 目前还没有获得基于脂联素蛋白的生物调节剂，部分原因是难以将全长脂联素蛋白转化为可行的系统性调节剂。脂联素蛋白的非药物能力的主要原因是C末端结构域及其较大肽片段的极度不溶性。此外，其相对较大的尺寸以及其形成改变其受体结合亲和力的更高级复合物的倾向，对医药制造构成重大挑战。

[0206] 在本发明的一个方面，本文提供脂联素拟肽化合物。在一些实施方案中，脂联素拟肽化合物是由式I表示的化合物： $X-M_1-SEQ ID NO:1-M_2-Z(I)$ ；其中SEQ ID NO:1是Xaa₁-Ile-Pro-Xaa₂-Leu-Tyr-Xaa₃-Phe-Ala-Xaa₄-Xaa₅。在一些实施方案中，Xaa₁是Asn或非天然氨基酸；Xaa₂是Gly或非天然氨基酸；Xaa₃是Tyr或非天然氨基酸；Xaa₄是Tyr或非天然氨基酸；Xaa₅是没有氨基酸、 β -Ala或 β -Ala-NH₂。在一些情况下，Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃或Xaa₄中的至少一个是非天然氨基酸。例如，Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃或Xaa₄是非天然氨基酸。在一些实施方案中，Xaa₁和Xaa₂、Xaa₁和Xaa₃、Xaa₁和Xaa₄、Xaa₂和Xaa₃、Xaa₂和Xaa₄以及Xaa₃和Xaa₄是相同或不同的非天然氨基酸。在其他实施方案中，Xaa₁和Xaa₂和Xaa₃、Xaa₁和Xaa₂和Xaa₄、Xaa₁和Xaa₃和Xaa₄以及Xaa₂和Xaa₃和Xaa₄是相同或不同的非天然氨基酸。还在其他实施方案中，Xaa₁和Xaa₂和Xaa₃和Xaa₄是相同或不同的非天然氨基酸。在一些实施方案中，X是任选存在的1-10个氨基酸的肽（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的肽）、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域。在一些实施方案中，Z是任选存在的1-10个氨基酸的肽（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的肽）、聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域。在一些实施方案中，M₁是任选存在的单键或连接基团。在一些实施方案中，M₂是任选存在的单键或连接基团。在一些实施方案中，式I化合物包含C末端氨基酸，且所述C末端氨基酸任选是酰胺化的。在一些实施方案中，任何由式I表示的化合物是其药学上可接受的盐。

[0207] 在一些实施方案中，Xaa₁是D-Asn，且Xaa₄是D-Ser。在一些实施方案中，Xaa₂是Nva。在一些实施方案中，Xaa₃是D-Ser。在一些实施方案中，Xaa₂是Nva，且Xaa₃是D-Ser。在一些实施方案中，Xaa₁是D-Asn，Xaa₂是Nva，Xaa₃是D-Ser，且Xaa₄是D-Ser。

[0208] 在一些实施方案中,X和/或Z是1-10个氨基酸的肽,例如1个氨基酸的肽、2个氨基酸的肽、3个氨基酸的肽、4个氨基酸的肽、5个氨基酸的肽、6个氨基酸的肽、7个氨基酸的肽、8个氨基酸的肽、9个氨基酸的肽或10个氨基酸的肽。在一些情况下,肽的长度和包含X和Z肽的取代氨基酸的身份独立选择。

[0209] 在一些实施方案中, Xaa_5 是 β -Ala或 β -Ala-NH₂。在一些方面,式I化合物选自ADP355、ADP355- β Ala、ADP355- β Ala-NH₂、ADP355-NH₂、ADP399、其变体、其衍生物和其药学上可接受的盐。ADP355、ADP399和其他有用的脂联素拟肽的详细描述可以在例如出于所有目的其全文通过引用并入本文的美国专利号9,073,965和Otvos等,Frontiers in Chemistry,2014,2(93):1-15,doi:10.3386/fchem.2014.00093中找到。

[0210] 在一些实施方案中,X或Z是聚合物分子、亲脂性化合物或肽转导结构域。在一些实施方案中,聚合物是直链或支链聚乙二醇。在其他实施方案中,聚合物的分子量为1kDa-200kDa,例如1kDa-200kDa、50kDa-200kDa、100kDa-200kDa、1kDa-100kDa、1kDa-50kDa、50kDa-100kDa、1kDa、50kDa、100kDa、150kDa或200kDa。还在其他实施方案中,聚合物的分子量为2kDa-95kDa,例如2kDa-95kDa、10kDa-95kDa、20kDa-95kDa、30kDa-95kDa、40kDa-95kDa、50kDa-95kDa、60kDa-95kDa、70kDa-95kDa、80kDa-95kDa、2kDa-90kDa、2kDa-80kDa、2kDa-70kDa、2kDa-60kDa、2kDa-50kDa、2kDa-40kDa、2kDa-30kDa、2kDa-20kDa、2kDa-15kDa、2kDa-10kDa、2kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa、80kDa、85kDa或90kDa。在一些实施方案中,聚合物的分子量为5kDa-80kDa,例如5kDa-80kDa、5kDa-70kDa、5kDa-60kDa、5kDa-50kDa、5kDa-40kDa、5kDa-30kDa、5kDa-20kDa、5kDa-10kDa、70kDa-80kDa、60kDa-80kDa、50kDa-80kDa、40kDa-80kDa、30kDa-80kDa、20kDa-80kDa或10kDa-80kDa、5kDa、10kDa、15kDa、20kDa、25kDa、30kDa、35kDa、40kDa、45kDa、50kDa、55kDa、60kDa、65kDa、70kDa、75kDa或80kDa。在其他实施方案中,聚合物的分子量为12kDa-60kDa,例如12kDa-40kDa、20kDa-40kDa、12kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa或60kDa。X和Z聚合物分子独立选择,且可以相同或不同。

[0211] 在一些实施方案中,聚合物分子是甲氧基PEG马来酰亚胺(mPEG(MAL))、甲氧基PEG叉状马来酰亚胺(mPEG₂(MAL))、甲氧基PEG邻吡啶基二硫化物(mPEG-OPSS)、PEG-乙烯基砜或与甲氧基PEG醛(mPEG-ALD)组合的邻吡啶基二硫化物-PEG-醛(OPSS-PEG-醛)。在其他实施方案中,聚合物分子选自:5k-mPEG(MAL)、20k-mPEG(MAL)、40k-mPEG₂(MAL)、5k-mPEG-OPSS、10k-mPEG-OPSS、20k-mPEG-OPSS或与mPEG₃₀kD-ALD组合的OPSS-PEG₂k-醛。

[0212] 本领域技术人员将理解,当X不存在时, M_1 将不存在。本领域技术人员将理解,当Z不存在时, M_2 将不存在。本领域技术人员将理解,如果式I化合物具有包含氨基酸的C-末端,例如其中C末端包含Z(如果存在且包含肽或转导结构域)、 Xaa_5 (如果存在)或 Xaa_4 ,该氨基酸任选是酰胺化的。本领域技术人员将理解,肽(例如具有两个氨基酸 Xaa_1 和 Xaa_2 的二肽)可以表示为:H- Xaa_1 - Xaa_2 -OH,其中H是肽的游离氨基末端的一部分,OH是肽的游离羧基末端的一部分;或肽可以表示为: Xaa_1 - Xaa_2 ,其中作为肽的游离氨基末端的一部分的H和肽的游离羧基末端的一部分的OH在肽的公式中没有显示,但应理解为存在。

[0213] 在其他实施方案中,脂联素拟肽化合物是由式II表示的化合物: Xaa_1 -Ile-Pro- Xaa_2 -Leu-Tyr- Xaa_3 -Phe-Ala- Xaa_4 - Xaa_5 (SEQ ID NO:2)(II);其中C末端氨基酸任选是酰胺化的;或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物选自:D-Asn-Ile-

Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser (SEQ ID NO:3)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala (SEQ ID NO:4)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-p-Ala-NH₂ (SEQ ID NO:5)、D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-NH₂ (SEQ ID NO:6)、(D-Asn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-D-Ser-Phe-Ala-D-Ser-His-Pro) 2-Dab-NH₂ (SEQ ID NO:7,其中Dab表示2,3-二氨基丁酸),其变体,其衍生物,或其药学上可接受的盐。

[0214] 有用的脂联素拟肽化合物描述于出于所有目的其全文通过引用并入本文的美国专利号9,073,965和0tvos等,Frontiers in Chemistry,2014,2(93):1-15,doi:10.3386/fchem.2014.00093。

[0215] 本文所述的一种或多种脂联素拟肽化合物可以包括于治疗有效的组合物(例如眼用组合物)中。在一些实施方案中,组合物中可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种不同的脂联素拟肽化合物。各脂联素拟肽化合物的量可以相同(或相等)或不同。各脂联素拟肽化合物的活性可以相同或不同。

[0216] 1.连接基团(M₁和M₂)

[0217] 在式I化合物中用于连接X或Z的连接基团(M₁或M₂)可以是至少双功能的任何部分,前提是所得的X或Z和N末端或C末端氨基酸或非天然氨基酸之间的连接是稳定的。合适的连接基团包括双功能和多功能的烷基、芳基、芳烷基或肽类部分,烷基、芳基或芳烷基醛、酸、酯和酸酐,巯基或羧基,例如马来酰亚胺基苯甲酸衍生物、马来酰亚胺基丙酸衍生物和丁二酰亚胺衍生物,或可以衍生自三聚氰胺或三聚氯氰、羰二咪唑、琥珀酰亚胺酯或磺酸基卤化物等(Fischer等,美国专利号6,472,507,其全文通过引用并入本文)。接头部分的功能基团可以包括氨基、胍基、羟基、巯基、马来酰亚胺基、羰基和羧基。

[0218] 任选地,选择接头基团以使其具有足够的不稳定性(例如,通过存在于靶组织中的酶进行酶切割),从而在本发明的肽转运后将其切割,从而释放肽。示例性的不稳定连接描述于Low等,美国专利号5,108,921,其全文通过引用并入本文。也可以通过活性剂和本发明的肽之间的化学切割的方式来分离肽-活性剂递送系统。在其中接头部分包括氨基酸残基的实施方案中,这种切割可以发生在接头部分本身之内。

[0219] 如果由连接基团M₁形成的连接是在Xaa₁和X的羧基(例如,如果X是标签元件、肽标签元件的末端羧基或分子的末端羧基)之间,任何氨基酸(包括但不限于 α -氨基酸,包括但不限于蛋白氨基酸)或肽链可以形成Xaa₁和X之间的连接。

[0220] 在一些实施方案中,如果M₁或M₂基团和肽之间的键是酰胺键,可以通过能够在Xaa₁或Xaa₅和末端(或其他)羧基的-C(=O)-基团(或末端或其他-NH-基团,或分别X或Z的任何其他功能基团)之间形成键的任何功能基团形成连接。在其他实施方案中,如果由连接基团M₁形成的连接是在Xaa₁和X的氨基或羧基之间,任何氨基酸或肽链可以形成Xaa₁和X之间的连接。在其他实施方案中,如果由连接基团M₂形成的连接是在Xaa₅和Z的氨基或羧基之间,任何氨基酸或肽链可以形成Xaa₅和Z之间的连接。用于连接例如Xaa₁和X的羧基、Xaa₁和X的氨基、Xaa₅和Z的羧基、Xaa₅和Z的氨基的合适的连接基团M₁和M₂的实例描述于美国专利申请公开号2014/0057833,其全文出于所有目的通过引用并入本文。

[0221] 2.肽转导结构域

[0222] 在一些实施方案中,X和/或Z可以包含蛋白转导结构域。蛋白转导结构域包括能够

跨越细胞膜,并且能够指导将与蛋白质转导结构域相关的肽、蛋白质或分子从细胞外通过细胞的质膜转运入细胞的细胞质的肽。在一些情况下,蛋白转导结构域包含相对较短的序列,其衍生自例如以下的天然存在的蛋白质:HIV的TAT蛋白、果蝇的触角蛋白和来自单纯疱疹病毒的VP22蛋白。合适的蛋白转导结构域的非限制性实例描述于例如Ulo Langel (主编)的Handbook of Cell-Penetrating Peptides (CRC Press,2nd Edition,2006);Ulo Langel (主编)的Cell-Penetrating Peptides:Process and Applications (CRC Press, 1.sup.st Edition,2002);E.L.Snyder等,Pharm.Res.,2004,21 (3),389-93;Beerens等,Current Gene Therapy,2003,3 (5),486-94;Hudec等,Med.Res.Rev.,2005,25 (6),679-736。有用的蛋白转导结构域的详细描述可发现于例如美国专利申请公开号2014/0057833,其全文出于所有目的通过引用并入本文。

[0223] 3. 制备脂联素拟肽化合物

[0224] 本发明的拟肽化合物可以是天然肽、重组肽或合成肽。它们也可以使用例如固相合成法来化学合成。此外,本发明的肽涉及的肽转导结构域可以是天然或合成的肽,且可以通过从天然来源分离或通过合成来制备。

[0225] 本发明的肽可以用肽合成法从头合成。在该方法中,通过其中向生长的肽链以所需顺序添加构成氨基酸的一系列偶联反应来制备肽链。各种N-保护基团例如苄氧羰基或叔丁氧羰基、各种偶联剂例如二环己基碳二亚胺或羰二咪唑、各种活性酯例如N-羟基邻苯二甲酰亚胺或N-羟基-琥珀酰亚胺的酯,以及各种切割试剂例如三氟乙酸(TFA)、二氧六环中的HCl、硼三-(三氟醋酸)和溴化氰的使用,以及具有分离和纯化中间体的溶液中的反应是本领域技术人员熟知的方法。反应可以用溶液中的肽或与固相支持物连接的肽进行。在固相法中,合成完成后,从固相支持物释放肽。

[0226] 在一些实施方案中,肽合成法可以遵循Merrifield固相程序。参见例如Merrifield,J.Am.Chem.Soc.,1963,85,2149-54。关于固相合成程序的其他信息可以从例如以下获得:E.Atherton和R.C.Sheppard的Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach(Oxford University Press,1989)、J.M.Stewart和J.D.Young的Solid phase peptide synthesis(2nd edition,Pierce Chemical Company,Rockford,1984),和R.Merrifield在F.F.Nold主编的Advances in Enzymology 32:221-296 (Interscience Publishers,New York,1969)中的综述章节,以及B.W.Erickson和R.Merrifield在Neurath和Hill主编的The Proteins Vol.2,pp.255et seq.(Academic Press,New York,1976)中的综述章节。肽合成可以遵循例如以下所示出的合成技术:Fields等,Introduction至Peptide Synthesis,Current Protocols in Molecular Biology(Chapter 11,Unit 11.15;John Wiley and Sons,2008)和Amblard等(2006,Molecular Biotechnology,33:239-254)。

[0227] 通过溶液法的肽合成描述于例如Neurath等主编的The Proteins,Vol.11(3rd Edition,Academic Press 1976)。肽合成的其他一般参考文献包括:M.W.Pennington和Ben M.Dunn主编的Peptide Synthesis Protocols(Humana Press 1994)、Miklos Bodanszky主编的Principles of Peptide Synthesis(2nd edition,Springer-Verlag,1993)、Paul Lloyd-Williams,F.Albericio,E.Giralt主编的Chemical Approaches至the Synthesis of Peptides and Proteins(CRC Press 1997),和G.Grant主编的Synthetic Peptides:A

User's Guide (Oxford University Press, 2002)。

[0228] 或者,肽可以使用重组DNA技术来制备,其包括:将编码式I或II的肽的核酸整合入合适的载体,将所得载体插入合适的宿主细胞,回收随后由宿主细胞产生的肽,和纯化回收的多肽。所需的重组DNA技术和蛋白质技术是本领域技术人员熟知的。克隆和表达重组分子的一般方法描述于Sambrook等的Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratories, Second Ed., 1989) 和Ausubel的Current Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1987)。

[0229] 编码所需肽的核酸可以可操作连接至一个或多个调控区。调控区包括启动子、聚腺苷酸信号、翻译起始信号 (Kozak区)、终止密码子、肽切割位点和增强子。所用的调控序列必须在其中施用它们的脊椎动物细胞内是功能性的。合适的一个或多个调控区的选择是本领域技术人员水平内的常规方法。

[0230] 本发明的化合物,无论通过化学合成或重组DNA技术制备,均可以用已知技术,例如制备型HPLC、FPLC、亲和层析以及其他色谱方法来纯化。然后,可以根据本文所述的方法以及本领域技术人员已知的任何方法来评估分离化合物的生物活性。

[0231] 对于合成技术,肽可以通过公认的固相肽合成程序来制备。简言之,该程序需要将适当的氨基酸顺次装配到所需序列的肽中,而生长肽的末端与不溶性支持物连接。通常,肽的羧基末端与聚合物连接,当用切割试剂处理时,所述肽可以从该聚合物释放。

[0232] 氨基酸Xaa₁、Xaa₅或Xaa₄ (当Xaa₅是没有氨基酸时)可以与包含X或Z的亲脂性化合物直接偶联或通过使用接头偶联。亲脂性化合物可以是天然化合物,例如饱和或不饱和的脂肪酸、脂肪酸二酮、萜烯、前列腺素、维生素、类胡萝卜素或类固醇,或合成化合物,例如具有一个或多个烷基、芳基、烯基的碳酸、醇、胺和磺酸,或其他多种不饱和化合物。氨基酸和亲脂性化合物之间的偶联(任选通过接头)可以根据本领域已知的方法,例如Bodanszky在Peptide Synthesis, John Wiley, New York, 1976和在W0 96/12505中所述的方法进行。

[0233] 为了将聚合物分子共价连接至本文所述的化合物的氨基酸,聚合物分子的末端羟基必须以活性形式提供,即,具有活性功能基团,例如伯氨基、酰肼(HZ)、巯基、琥珀酸(SUC)、琥珀酸琥珀酰亚胺(SS)、琥珀酰亚胺琥珀酰胺(SSA)、琥珀酰亚胺丙酸(SPA)、琥珀酰亚胺羧甲基酯(SCM)、苯并三唑碳酸酯(BTC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、醛、硝基苯基碳酸酯(NPC)和三氟乙磺酸(TRES)。活性PEG聚合物的具体实例包括以下直链PEG: NETS-PEG (例如SPA-PEG, 琥珀酸丙酸琥珀酰亚胺酯-PEG (SSPA-PEG)、SBA-PEG、SS-PEG、SSA-PEG、碳酸琥珀酰亚胺酯-PEG (SC-PEG)、戊二酸琥珀酰亚胺酯-PEG (SG-PEG), 和SCM-PEG和NOR-PEG)、BTC-PEG、环氧-PEG (EPDX-PEG)、异氰酸酯-PEG (NCO-PEG)、NPC-PEG、羰基咪唑-PEG (CDI-PEG)、醛-PEG (ALD-PEG)、TRES-PEG、VS-PEG、碘代-PEG和马来酰亚胺-PEG (MAL-PEG), 和支链PEG, 例如PEG2-NHS和其全文通过引用并入本文的美国专利号5,932,462和美国专利号5,643,575中公开的那些。PEG化可以指向特定的连接基团,例如N末端氨基(美国专利号5,985,265)。此外,偶联可以一步或逐步实现(例如W099/55377所述)。

[0234] B. 适合用脂联素拟肽化合物治疗的眼科疾病

[0235] 本文所述的脂联素拟肽化合物可用于治疗眼科疾病或病症,包括干眼症或与炎症相关的眼科疾病。

[0236] 干眼症疾病或干燥性角结膜炎(KCS)可以由各种病症导致或与其相关,所述病症

包括但不限于:干燥综合征、眼瘢痕性天疱疮、先天性无泪、睑缘炎、泪腺摘除、年龄相关性泪腺缺乏、无泪(例如, Triple A或Allgrove综合征和Riley-Day综合征)、泪腺浸润(例如, 结节病、淋巴瘤和AIDS)、泪腺管阻塞、睑板腺疾病、翼状胬肉、结膜慢性炎症、反射阻碍、带状疱疹、眼部过敏、自身免疫性疾病、慢性移植物抗宿主病、自然老化过程、糖尿病、长期配戴隐形眼镜、干燥的环境、过度使用电脑屏幕、涉及角膜切口或切除角膜神经的手术(例如白内障手术、屈光手术、视网膜手术、眼部肿瘤治疗、药物治疗、眨眼减少(眨眼率低)、眼睑孔径或眼睑/眼球动力学紊乱、怀孕、多囊卵巢综合征、酒糟鼻、狼疮、硬皮病、结节病、Stevens-Johnson综合征、帕金森病、甲状腺疾病、整容手术、吸烟、放射治疗、维生素A缺乏和更年期。

[0237] 干眼症也可以由以下导致:营养障碍和缺陷、药物的副作用、眼脸上和周围的皮肤病、眼应力和腺体和组织破坏、暴露于烟雾的环境、吸烟、空气过于干燥、空气携带的微粒、自身免疫性和其他免疫缺陷型病症。在干眼症中,眼表上皮经历鳞状化生,表现为杯状细胞损失、粘蛋白缺乏和角质化。这些变化导致泪膜不稳定,其导致干眼综合征的临床症状。

[0238] 干眼症的症状包括:眼睛刺痛、灼热或搔痒感;眼部干燥或砂砾;在眼睛中或周围的睫状粘液;眼睛刺激增加;眼睛疲劳;对光敏感(畏光);眼睛发红;过度流泪;视力模糊发作;眼中的异物感;眼中或眼周围疼痛或酸痛;情绪紧张时不能哭;需要持续视觉注意的活动的耐受性降低;及其任何组合。干眼症的症状可以用例如眼表疾病指数(OSDI)问卷来定量,所述问卷列出了12种症状及其1-4级的等级。可以通过例如以下来评估干眼症的临床体征:进行印迹细胞学(例如眼表染色)、测量泪膜破裂时间(TBUT)、进行Schirmer测试、进行酚红线状泪液测试和测量泪液组分(例如分析泪液蛋白或泪膜渗透压)。渗透压升高(高渗透压)可能导致泪膜规则性减少、对眼表的损伤增加,和在一些情况下,眼睛炎症增加。

[0239] 与炎症相关的眼科疾病包括但不限于:葡萄膜炎、干眼症、角膜炎、过敏性眼部疾病、感染性角膜炎、疱疹性角膜炎、角膜血管新生、淋巴管新生、葡萄膜炎、翼状胬肉、视网膜炎、脉络膜炎、急性多灶性鳞状色素上皮病、Behcet病、术后角膜伤口愈合、激光引起的病症、光动力疗法引起的病症、湿性和干性年龄相关性黄斑变性(ARMD)、影响眼后部的病症、黄斑病变、视网膜变性、非渗出性年龄相关性黄斑变性、渗出性年龄相关性黄斑变性、脉络膜新生血管、糖尿病性视网膜病(增生性)、早产儿视网膜病(ROP)、急性黄斑神经视网膜病、中心性浆液性脉络膜视网膜病、囊性黄斑水肿和糖尿病性黄斑水肿、散射状视网膜脉络膜病变、传染病(梅毒、莱姆病、肺结核、弓形体病)、中间葡萄膜炎(扁平部睫状体炎)、多灶性脉络膜炎、多数消散性白点综合征(mewds)、眼结节病、后巩膜炎、匍行性脉络膜炎、视网膜下纤维化和葡萄膜炎综合征、Vogt-Koyanagi和Harada综合征、视网膜动脉阻塞性疾病、视网膜中央静脉阻塞、囊性黄斑水肿、弥散性血管内凝血病、视网膜静脉分支阻塞、高血压眼底变化、眼缺血综合征、视网膜动脉微动脉瘤、Coat病、旁中心凹毛细血管扩张、半视网膜静脉阻塞、视乳头静脉炎、视网膜中央动脉阻塞、视网膜动脉分支阻塞、颈动脉疾病(CAD)、树枝状视网膜血管炎、镰状红细胞性视网膜病和其他血红蛋白病、血管样条纹症、家族性渗出性玻璃体视网膜病、和Eales病、交感性眼炎、葡萄膜炎视网膜病、视网膜脱离、创伤、光动力疗法引起的病症、光凝术、手术期间灌注不足、放射性视网膜病、和骨髓移植视网膜病、增生性玻璃体视网膜病和视网膜前膜、增生型糖尿病性视网膜病、眼组织胞浆菌病、眼弓蛔虫病、眼假组织胞浆菌病综合征(PONS)、眼内炎、弓形体病、与HIV感染相关的视网膜病、与HIV

感染相关的脉络膜疾病、与HIV感染相关的葡萄膜炎性疾病、病毒性视网膜炎、急性视网膜坏死、进行性外层视网膜坏死、真菌性视网膜疾病、眼梅毒、眼结核、弥漫性单侧亚急性视神经视网膜炎、蝇蛆病、视网膜色素变性、伴有视网膜营养不良的全身性疾病、先天性静止性夜盲、锥体营养不良、Stargardt疾病、眼底黄斑症、Best病、视网膜色素上皮的模式营养不良、X-连锁的视网膜劈裂症、Sorsby眼底营养不良、良性同心性黄斑病变、Bietti结晶状营养不良、弹力纤维性假黄瘤、视网膜脱离、黄斑裂孔、巨大视网膜裂孔、与肿瘤相关的视网膜疾病、视网膜色素上皮的先天性肥大、后葡萄膜黑色素瘤、脉络膜血管瘤、脉络膜骨瘤、脉络膜转移癌、视网膜和视网膜色素上皮组合错构瘤、视网膜母细胞瘤、眼底的血管增生性肿瘤、视网膜星形细胞瘤、眼内淋巴样肿瘤、其他影响眼后部的疾病、点状内层脉络膜病、急性后部多灶性鳞状色素上皮病、近视性视网膜变性、急性视网膜色素上皮炎、术后角膜炎症、角膜移植、睑缘炎、MGD、青光眼、高眼压、分支静脉阻塞、视网膜疾病、Best卵黄样黄斑变性、视网膜色素变性、增生性玻璃体视网膜病(PVR)和任何其他感光细胞或视网膜色素上皮细胞(RPE)的变性疾病。

[0240] 与炎症相关的眼科疾病的症状或临床体征包括但不限于：泪膜不稳定、慢性高渗应力、蒸发性泪液损失、润滑性降低、导致眼睛促炎性反应增加的其他泪液缺乏症、炎症，及其任何组合。

[0241] C. 药物组合物

[0242] 可以使用脂联素拟肽化合物并将其配置成任何一种药物组合物，包括在以下所描述的那些：United States Pharmacopeia (U.S.P.)，Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. sup. th Ed., McGraw Hill, 2001; Katzung, Ed., Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton&Lange, 8th ed., Sep. 21, 2000; Physician's Desk Reference (Thomson Publishing; and/or The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th ed., 2006, Beers and Berkow, Eds., Merck Publishing Group; 或在动物的情况下，The Merck Veterinary Manual, 9th ed., Kahn Ed., Merck Publishing Group, 2005。

[0243] 眼用药物组合物可以包含一种或多种赋形剂或其他物质，例如防腐剂、抗氧化剂、pH调节剂、缓冲剂、胶凝剂、粘度增强剂、表面活性剂、溶解剂、润滑剂、盐、共溶剂、稀释剂、载体、佐剂、油、保湿剂、缓和剂、稳定剂、乳化剂和/或分散剂。出于各种目的，组合物可以使用其他试剂。举例而言，可注射组合物可以包含各种赋形剂或其他物质，例如防腐剂、抗氧化剂、pH调节剂、缓冲剂、盐、乳化剂和/或分散剂。防腐剂，例如水溶性防腐剂的非限制性实例包括亚硫酸氢钠、硫酸氢钠、硫代硫酸钠、苯扎氯铵异丁醇、硫柳汞、乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、聚乙烯醇、苯甲醇和苯乙醇。眼用可接受的抗氧化剂的实例包括但不限于：亚硫酸氢钠、硫代硫酸钠、乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、硫代甘油、亚硫酸钠、丙酮亚硫酸氢钠、二硫赤藓糖醇、二硫苏糖醇、硫脲和异抗坏血酸。眼用可接受的pH调节剂(例如酸、碱和/或缓冲液)的有用实例包括但不限于：酸，例如醋酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸、硫酸和盐酸；碱，例如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、醋酸钠、乳酸钠和三羟甲基氨基甲烷、三乙醇胺；和/或缓冲液，例如柠檬酸盐/葡萄糖、碳酸氢钠和氯化铵或氨基酸。以足以将组合物的pH调节至眼用可接受的范围的量包括这些酸、碱和/或缓冲液。

[0244] 可以将组合物配制用于局部眼部应用，例如以溶液、软膏、霜剂、洗液、眼膏，最优

选滴眼剂或眼凝胶的形式,且可以在软膏和霜剂中包含适当的常规添加剂,包括例如防腐剂、有助于药物渗透的溶剂和缓和剂。眼用介质包括但不限于:盐水溶液、水聚醚如聚乙二醇、乙烯聚合物如聚乙烯醇和聚维酮、纤维素衍生物如甲基纤维素和羟丙基甲基纤维素、石油衍生物如矿物油和白凡士林、动物脂肪如羊毛脂、丙烯酸的聚合物如羧基聚亚甲基凝胶、植物脂肪如花生油和多糖如葡聚糖,以及糖胺聚糖如透明质酸钠和盐,如氯化钠和氯化钾。

[0245] 作为游离碱或药学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以在与表面活性剂(如羟丙基纤维素)适当混合的水中制备。也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备分散体。在储存和使用的通常条件下,这些制剂可以包含防腐剂以预防微生物生长。

[0246] 包含本发明化合物的药物组合物可以是适于局部使用的形式,例如作为油性悬浮液、在水性液体或非水性液体中的溶液或悬浮液、或水包油或油包水液体乳剂。或者,可以将组合物配制用于向眼睛注射,例如玻璃体内注射、结膜下注射和注射到眼睛的前房内。在其他情况下,组合物可以是适于移植使用的形式,例如包封于微胶囊中。活性成分还可以包封于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。这种技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)。组合物也可以是眼用长效制剂,例如用于结膜下施用。脂联素拟肽可以包埋于生物相容的药学可接受的聚合物中或脂质包封剂中。可以调整长效制剂以在延长的时间段内释放所有或基本上所有的活性物质。可以调整聚合物或脂质基质(如果存在)以在所有或基本上所有的活性物质释放后充分降解以从施用位点输送。长效制剂可以是液体制剂,其包含药学上可接受的聚合物和溶解或分散的活性剂,注射后,聚合物通过例如凝胶化或沉淀在注射位点形成储库。组合物可以包含固体制品,其可以插入到眼睛中的适当位置,例如眼睛和眼睑之间或在结膜囊中,其中制品释放活性剂。适合以这种方式植入眼睛的固体制品通常包含聚合物,并且可以是生物降解的或不可生物降解的。

[0247] 药物组合物可以通过组合治疗有效量的至少一种根据本发明的化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分和常规的眼用可接受的药学赋形剂,并通过制备适于眼部使用的单位剂量来制备。通常,液体制剂中的治疗有效量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt), 优选约0.0001% (wt) 至约50% (wt)。

[0248] 或者,可以经由脂质体向眼睛应用活性化合物。进一步的,活性化合物可以经由泵-导管系统注入泪膜。在一些实施方案中,活性化合物包含在连续的或选择性释放的装置内,例如膜,例如但不限于在匹鲁卡品(Ocusert™)系统(Alza Corp., Palo Alto, Calif.)中采用的那些。在一些实施方案中,活性化合物包含在隐形眼镜内,由隐形眼镜携带或附着于隐形眼镜,所述隐形眼镜置于眼睛上。在其他实施方案中,活性化合物包含在可以向眼表应用的拭子或海绵内。在另一种实施方案中,活性化合物包含在可以向眼表应用的液体喷雾内。在另一种实施方案中,活性化合物直接注射到泪腺组织中或眼睛表面上。

[0249] 当用于治疗干眼症的药物组合物作为眼用溶液使用时,它以用于眼用溶液的任何剂量形式提供,例如水性滴眼剂,如水性眼用溶液、水性悬浮眼用溶液、粘性眼用溶液和溶解的眼用溶液,或非水性眼用溶液,如非水性眼用溶液和非水性悬浮眼用溶液。其中,优选水性眼用溶液。

[0250] 当用于治疗干眼症的药物组合物制备成水性眼用溶液时,其中常规包含一般用于水性眼用溶液的各种添加剂,只要其对本发明的目的没有不利影响。这种添加剂的实例包括缓冲液、等渗剂、防腐剂、增溶剂(稳定剂)、pH调节剂、渗透压调节剂、增稠剂和螯合剂。

[0251] 缓冲液可以选自但不限于:磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、酒石酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液(例如醋酸钠)和氨基酸。等渗剂可以选自但不限于:山梨醇、葡萄糖和甘露醇、多元醇如甘油、聚乙二醇和聚丙二醇和盐如氯化钠。防腐剂可以选自但不限于:苯扎氯铵、苄索氯铵、烷基对羟基苯甲酸盐如甲基对羟基苯甲酸盐和乙基对羟基苯甲酸盐、苯甲醇、苯乙醇、山梨酸及其盐、硫柳汞和氯丁醇。增溶剂(稳定剂)可以选自但不限于:环糊精及其衍生物、水溶性聚合物如聚(乙烯基吡咯烷酮)和表面活性剂,如聚山梨酯80(商品名:Tween 80)。pH调节剂可以选自但不限于:盐酸、乙酸、磷酸、氢氧化钠、氢氧化钾和氢氧化铵。增稠剂可以选自但不限于:羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素和羧甲基纤维素及其盐。螯合剂可以选自但不限于:乙二胺四乙酸钠、柠檬酸钠和缩聚磷酸盐。

[0252] 对于眼部应用,优选生理盐水溶液作为主要介质来制备溶液。优选合适的缓冲液系统将这种眼用溶液的pH保持在4.5-8.0;约5-7.5;优选6-7,中性pH是优选的但不是必需的。酸的实例包括:醋酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸、盐酸等,碱的实例包括:氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、醋酸钠、乳酸钠、氨基丁三醇、THAM(三羟甲基氨基甲烷)等。盐和缓冲液包括柠檬酸/葡萄糖、碳酸氢钠、氯化铵,以及上述酸和碱的混合物。

[0253] 水性眼用组合物的渗透压通常为约200至约400毫渗摩尔(mOsm),更优选260-340mOsm。可以使用适量的生理和眼用可接受的离子或非离子试剂来调节渗透压。氯化钠是优选的离子试剂,且氯化钠的量为约0.01%到约1%(w/v),优选为约0.05%到约0.45%(w/v)。由阳离子如钾、铵等和阴离子如氯化物、柠檬酸盐、抗坏血酸盐、硼酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐、硫酸盐、硫代硫酸盐、硫酸氢盐、硫酸氢钠、硫酸铵等组成的等量的一种或多种盐可以除了或代替氯化钠使用,以实现上述范围内的渗透压。此外,非离子试剂如甘露醇、右旋糖、山梨醇、葡萄糖等也可以用于调节渗透压。

[0254] 可以根据需要或方便添加张力调节剂。它们包括但不限于盐,特别是氯化钠、氯化钾、甘露醇和甘油,或任何其他合适的眼用可接受的张力调节剂。可以使用各种缓冲液和调节pH的方式,只要所得制剂是眼用可接受的。因此,缓冲液包括醋酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和硼酸盐缓冲液。本发明所用的眼用可接受的抗氧化剂包括但不限于:焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、乙酰半胱氨酸、丁基羟基苯甲醚和丁基羟基甲苯。

[0255] 当用于治疗干眼症的药物组合物制备成眼膏时,必须存在基质化合物。眼膏的基质可以选自但不限于:纯化的羊毛脂、VASELINE®、plastibase、液体石蜡和聚乙烯乙二醇。

[0256] 制剂还可以包含常规的药学上可接受的防腐剂、稳定剂和表面活性剂。可用于本发明的药物组合物的优选防腐剂包括但不限于:苯扎氯铵、氯丁醇、硫柳汞、醋酸苯汞、硝酸苯汞。优选的表面活性剂是例如Tween80。同样地,本发明的眼用制剂可使用各种优选的介质。这些介质包括但不限于:聚乙烯醇、聚维酮、羟丙基甲基纤维素、泊洛沙姆、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、环糊精和纯净水。

[0257] 或者,本发明的组合物可以用药学上可接受的压片赋形剂(包括乳糖、微晶纤维

素、玉米淀粉、硬脂酸等) 配制为用于口服施用。口服施用还可以包含在水、甘油、油、醇等中配制的液体组合物。

[0258] 脂联素拟肽化合物可以配制成基于脂质的纳米载体, 例如固体脂质纳米颗粒、纳米结构的脂质载体、脂质-药物偶联物和涂覆的脂质体。

[0259] 将本发明的制剂常规包装为适于计量应用的形式(例如在配备有滴管的容器中) 以促进向眼睛应用。适用于逐滴应用的容器通常由合适的惰性无毒塑料材料制成, 且通常包含约0.5至约15ml溶液。一个包装可以包含一个或多个单位剂量。特别地, 无防腐剂的溶液通常配制在含有最多约10个, 优选最多约5个单位剂量的非密封容器中, 其中典型的单位剂量为1至约8滴, 优选1至约3滴。一滴的体积一般为约20-35 μ l。

[0260] 制剂可以是无菌溶液或悬浮液的形式。溶液或悬浮液可以用于局部或可注射应用。它可以是无菌可注射制剂, 例如液体或悬浮液制剂。在一些实施方案中, 它可以根据已知方法, 使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂来配制。无菌可注射制剂还可以是在无毒的眼内或玻璃体内可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液。根据需要, 也可以包括缓冲液、防腐剂、抗氧化剂等。

[0261] 本文提供含有本文所述的眼用组合物或制剂的试剂盒。在一个实施方案中, 试剂盒还包括用于施用组合物或制剂的说明书。在一些情况下, 组合物或制剂包装成适于计量应用的形式。在其他情况中, 组合物或制剂包装用于单个单位剂量施用。

[0262] D. 施用方法

[0263] 本文提供的组合物可以向眼睛施用。在一些实施方案中, 组合物应用于眼睛的眼睑部分, 例如眼睛的上眼睑和下眼睑的外部、内眦和外眦和/或眼表。在一些情况中, 组合物可以施用于患病的眼结膜囊。在一些实施方案中, 组合物通过以下施用: 局部、玻璃体内注射、结膜下注射、结膜注射、肌内注射、皮下注射、静脉注射、前房内注射, 或植入受试者的眼睛。在一些情况中, 施用包括玻璃体内储库植入或描述于例如Edelhauser等, Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (11) : 5403-5420的其他眼用药物递送方法。眼睛包括但不限于: 眼睛中或眼睛周围的组织、腺体、血管、晶状体、肌肉、神经或其他结构, 例如眼组织、眼表、眼腔、眼睑、鼻泪管, 睑板腺、泪腺。

[0264] 组合物可以配制用于眼部应用, 例如以溶液、软膏、霜剂、洗液、眼药膏, 最优选滴眼剂或眼凝胶的形式, 且可以在软膏和霜剂中包含适当的常规添加剂, 包括例如防腐剂、有助于药物渗透的溶剂和缓和剂。这种局部制剂可以包含相容的常规载体, 例如霜剂或软膏基质, 以及用于洗液的乙醇或油醇。

[0265] 组合物可以任何合适的方式向患者的眼睛施用, 但优选以滴剂、喷雾或凝胶形式的液体或凝胶悬浮液施用。在一个实施方案中, 制剂是滴剂形式, 且滴到眼表上。在另一个实施方案中, 制剂包含在可以向眼表应用的拭子或海绵内。在另一种实施方案中, 制剂包含在可以向眼表应用的液体喷雾或软膏内。在另一种实施方案中, 制剂注射到眼睛中, 例如注射到泪腺组织中或眼睛表面上。在进一步的实施方案中, 首先将制剂施用于指尖或其它施用器上, 然后直接施用或摩擦到眼睑边缘或眼角上。或者, 脂联素拟肽化合物可以经由胶体剂型(例如纳米颗粒、纳米胶束、脂质体和微乳) 施用于眼睛。进一步的, 组合物可以经由泵-导管系统注入泪膜。另一个实施方案涉及包含在连续的或选择性释放的装置(例如膜) 内的脂联素拟肽化合物。作为其他实施方案, 脂联素拟肽化合物可以包含在置于眼睛上或眼睛

周围的隐形眼镜或其他相容的受控释放材料内,由隐形眼镜或其他相容的受控释放材料携带,或附着于隐形眼镜或其他相容的受控释放材料。

[0266] 在一些实施方案中,组合物通过局部、眼内、前房内、眶内、眼周、玻璃体内、结膜下、结膜、肌内、皮下、静脉内、前房内或经由其他途径施用到眼睛中或周围。本文所述的治疗性组合物的非限制性递送途径包括水性溶液、油性溶液、例如软膏、胶体载体例如胶束、乳液、脂质体、纳米颗粒、固体形式例如基于胶原的壳(shield)和/或颗粒和载药准时塞、载药小管塞、隐形眼镜、植入物和插入物。

[0267] 具体施用途径的合适性将部分取决于药物组合物、其组分、正在治疗的疾病和需要治疗的受试者。

[0268] E. 剂量

[0269] 向患者施用的治疗剂的剂量将根据各种因素而变化。例如,基本上,需要向人提供比较小动物更大的剂量。剂量将取决于患者的尺寸、年龄、性别、体重、病史和病症、其他治疗的使用、正在施用的物质的效力和施用频率。

[0270] 脂联素拟肽化合物的有效量将取决于患者的年龄、性别和体重、患者的当前医学病症和被治疗的干眼症疾病的性质。技术人员将能够根据这些和其他因素确定合适的剂量。例如,当药物组合物作为用于治疗有需要的受试者的干眼症的眼用溶液使用时,期望水性溶液滴眼剂包含的脂联素拟肽化合物的含量为约0.0001% (wt) 至90% (wt),例如约0.0001% (wt)、约0.0005% (wt)、约0.001% (wt)、约0.005% (wt)、约0.01% (wt)、约0.02% (wt)、约0.03% (wt)、约0.04% (wt)、约0.05% (wt)、约0.06% (wt)、约0.07% (wt)、约0.08% (wt)、约0.09% (wt)、约0.1% (wt)、约0.2% (wt)、约0.3% (wt)、约0.4% (wt)、约0.5% (wt)、约0.6% (wt)、约0.7% (wt)、约0.8% (wt)、约0.9% (wt)、约1% (wt)、约2% (wt)、约3% (wt)、约4% (wt)、约5% (wt)、约6% (wt)、约7% (wt)、约8% (wt)、约9% (wt)、约10% (wt)、约11% (wt)、约12% (wt)、约13% (wt)、约14% (wt)、约15% (wt)、约16% (wt)、约17% (wt)、约18% (wt)、约19% (wt)、约20% (wt)、约21% (wt)、约22% (wt)、约23% (wt)、约24% (wt)、约25% (wt)、约26% (wt)、约27% (wt)、约28% (wt)、约29% (wt)、约、约30% (wt)、约31% (wt)、约33% (wt)、约33% (wt)、约34% (wt)、约35% (wt)、约36% (wt)、约37% (wt)、约38% (wt)、约39% (wt)、约40% (wt)、约41% (wt)、约42% (wt)、约43% (wt)、约44% (wt)、约45% (wt)、约46% (wt)、约47% (wt)、约48% (wt)、约49% (wt)、约50% (wt)、约51% (wt)、约52% (wt)、约53% (wt)、约54% (wt)、约55% (wt)、约56% (wt)、约57% (wt)、约58% (wt)、约59% (wt)、约60% (wt)、约61% (wt)、约62% (wt)、约63% (wt)、约64% (wt)、约66% (wt)、约66% (wt)、约67% (wt)、约68% (wt)、约69% (wt)、约70% (wt)、约71% (wt)、约72% (wt)、约73% (wt)、约74% (wt)、约75% (wt)、约76% (wt)、约77% (wt)、约78% (wt)、约79% (wt)、约80% (wt)、约81% (wt)、约82% (wt)、约83% (wt)、约84% (wt)、约85% (wt)、约86% (wt)、约87% (wt)、约88% (wt)、约89% (wt)、约或90% (wt)。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物的含量为约0.0001% (wt) 至约90% (wt),例如约0.0001% (wt) 至约90% (wt)、约0.001% (wt) 至约90% (wt)、约0.005% (wt) 至约90% (wt)、约0.01% (wt) 至约90% (wt)、约0.1% (wt) 至约90% (wt)、约1% (wt) 至约90% (wt)、约10% (wt) 至约90% (wt)、约20% (wt) 至约90% (wt)、约30% (wt) 至约90% (wt)、约40% (wt) 至约90% (wt)、约50% (wt) 至约90% (wt)、约60% (wt) 至约90% (wt)、约70% (wt) 至约90% (wt)、约80% (wt) 至约90%

(wt)、约10% (wt) 至约50% (wt)、约10% (wt) 至约40% (wt)、约10% (wt) 至约30% (wt)、约10% (wt) 至约20% (wt)、约0.0001% (wt) 至约10% (wt)、0.0001% (wt) 至约1% (wt)、0.0001% (wt) 至约0.1% (wt)、0.0001% (wt) 至约0.01% (wt)、0.0001% (wt) 至约0.001% (wt)、约0.001% (wt) 至约10% (wt)、约0.001% (wt) 至约1% (wt)、约0.001% (wt) 至约0.1% (wt)、0.01% (wt) 至约0.1% (wt)、0.01% (wt) 至约1% (wt) 等。当施用时,组合物可以给予每天一次或每天多次剂量,例如每天两次、每天三次和每天四次。在一些实施方案中,组合物每天一次、每隔一天一次或更不频繁地施用。当受试者具有干眼症或眼科疾病的一种或多种症状时,可以施用组合物。在一些情况中,给予的组合物剂量为1-5滴或更多,例如1滴、2滴、3滴、4滴、5滴或更多。

[0271] 当药物组合物作为眼药膏使用时,期望眼药膏包含的脂联素拟肽化合物的含量为约0.0001% (wt) 至90% (wt),例如约0.0001% (wt)、约0.0005% (wt)、约0.001% (wt)、约0.005% (wt)、约0.01% (wt)、约0.02% (wt)、约0.03% (wt)、约0.04% (wt)、约0.05% (wt)、约0.06% (wt)、约0.07% (wt)、约0.08% (wt)、约0.09% (wt)、约0.1% (wt)、约0.2% (wt)、约0.3% (wt)、约0.4% (wt)、约0.5% (wt)、约0.6% (wt)、约0.7% (wt)、约0.8% (wt)、约0.9% (wt)、约1% (wt)、约2% (wt)、约3% (wt)、约4% (wt)、约5% (wt)、约6% (wt)、约7% (wt)、约8% (wt)、约9% (wt)、约10% (wt)、约11% (wt)、约12% (wt)、约13% (wt)、约14% (wt)、约15% (wt)、约16% (wt)、约17% (wt)、约18% (wt)、约19% (wt)、约20% (wt)、约21% (wt)、约22% (wt)、约23% (wt)、约24% (wt)、约25% (wt)、约26% (wt)、约27% (wt)、约28% (wt)、约29% (wt)、约、约30% (wt)、约31% (wt)、约33% (wt)、约33% (wt)、约34% (wt)、约35% (wt)、约36% (wt)、约37% (wt)、约38% (wt)、约39% (wt)、约40% (wt)、约41% (wt)、约42% (wt)、约43% (wt)、约44% (wt)、约45% (wt)、约46% (wt)、约47% (wt)、约48% (wt)、约49% (wt)、约50% (wt)、约51% (wt)、约52% (wt)、约53% (wt)、约54% (wt)、约55% (wt)、约56% (wt)、约57% (wt)、约58% (wt)、约59% (wt)、约60% (wt)、约61% (wt)、约62% (wt)、约63% (wt)、约64% (wt)、约66% (wt)、约66% (wt)、约67% (wt)、约68% (wt)、约69% (wt)、约70% (wt)、约71% (wt)、约72% (wt)、约73% (wt)、约74% (wt)、约75% (wt)、约76% (wt)、约77% (wt)、约78% (wt)、约79% (wt)、约80% (wt)、约81% (wt)、约82% (wt)、约83% (wt)、约84% (wt)、约85% (wt)、约86% (wt)、约87% (wt)、约88% (wt)、约89% (wt)、约or 90% (wt)。在一些实施方案中,脂联素拟肽化合物的含量为0.0001% (wt) 至约90% (wt),例如约0.0001% (wt) 至约90% (wt)、约0.001% (wt) 至约90% (wt)、约0.005% (wt) 至约90% (wt)、约0.01% (wt) 至约90% (wt)、约0.1% (wt) 至约90% (wt)、约1% (wt) 至约90% (wt)、约10% (wt) 至约90% (wt)、约20% (wt) 至约90% (wt)、约30% (wt) 至约90% (wt)、约40% (wt) 至约90% (wt)、约50% (wt) 至约90% (wt)、约60% (wt) 至约90% (wt)、约70% (wt) 至约90% (wt)、约80% (wt) 至约90% (wt)、约10% (wt) 至约50% (wt)、约10% (wt) 至约40% (wt)、约10% (wt) 至约30% (wt)、约10% (wt) 至约20% (wt)、约0.0001% (wt) 至约10% (wt)、0.0001% (wt) 至约1% (wt)、0.0001% (wt) 至约0.1% (wt)、0.0001% (wt) 至约0.01% (wt)、0.0001% (wt) 至约0.001% (wt)、约0.001% (wt) 至约10% (wt)、约0.001% (wt) 至约1% (wt)、约0.001% (wt) 至约0.1% (wt)、0.01% (wt) 至约0.1% (wt)、0.01% (wt) 至约1% (wt) 等。当施用时,组合物可以给予每天一次或每天多次剂量,例如每天两次、每天三次、每天四次、每天5次或更多。在一些实施方案中,组合物施用的频率低于每天一次。例如,组合物可

以每周、每2周、每3周、每4周、每6周、每7周、每8周或更不频繁地施用。在一些实施方案中，根据受试者经历的症状的严重程度施用组合物。

[0272] 对于局部施用(例如作为滴眼剂或软膏)或用于眶内或眼周注射的脂联素拟肽，示例性剂量为约0.001至约100mg，例如为约0.1至约10mg，例如每天一次、每天两次或更频繁地施用。对于前房内或玻璃体内注射，考虑剂量为约0.01至约10mg，优选约0.1至约1mg。

[0273] 已经表明在剂量方面存在差异性，认为本领域技术人员可以通过施用相对较少的量来确定合适的剂量并监测患者的治疗效果。如果需要，剂量可以递增，直到获得所需的结果。通常，治疗以较小的剂量开始，其可以小于治疗剂的最佳剂量。之后，以小增量增加剂量，直到达到情况下的最佳效果。如果需要，每日总剂量可分为小部分并每日施用。

[0274] 药物制剂可以包装或制备成单位剂量形式。在这种形式中，例如根据治疗剂的剂量，制剂再分成含有适量活性组分的单位剂量。单位剂量形式可以是包装的制剂，所述包装包含离散量的制剂。如果需要，组合物也可以包含其他相容的治疗剂。

[0275] 本发明提供用于治疗 and/或缓解有需要的受试者的干眼症或与炎症相关的眼科疾病的方法。治疗过程最好根据个体的具体特征决定。可以每天、每天两次、每天三次、每隔一天、每两周、每周、每月或以治疗有效的任何适用的基础向受试者施用治疗。治疗可以单独施用，或与例如靶标相同的眼科疾病或相关症状的至少一种其他治疗剂组合施用。其他试剂可以与脂联素拟肽化合物同时施用、在不同时间施用，或以完全不同的治疗方案施用(例如，脂联素拟肽化合物可以每天施用，而其他试剂每周施用)。

[0276] F. 与治疗剂的共施用

[0277] 在一些实施方案中，本文提供的方法包括将脂联素拟肽化合物与一种或多种其他治疗剂共施用。术语“共施用”是指施用第一含量的脂联素拟肽化合物或其药学上可接受的盐和第二含量的至少一种其他治疗剂，例如用于治疗眼科疾病的另一种治疗剂，或解决相关症状(例如炎症)的治疗剂。在一些情况中，脂联素拟肽化合物和其他治疗剂同时或基本上同时施用。脂联素拟肽化合物和其他治疗剂可以在单个药物组合物中，或在多个药物组合物中。在其他情况中，脂联素拟肽化合物和其他治疗剂顺序施用。在顺序给药中，脂联素拟肽化合物和其他治疗剂施用的时间足够近以获得所需治疗效果。例如，可以产生所需治疗效果的每次施用之间的时间可以从几分钟到几小时，且可以根据各化合物的性质，例如效力、溶解度、生物利用度、血浆半衰期和动力学曲线来确定。组合施用包括共施用(施用分开的制剂或单个药物制剂)和任何顺序的连续施用，其中优选两种(或所有)活性剂同时发挥其生物活性一段时间。

[0278] 在一些实施方案中，一种或多种其他治疗剂包括准噻塞、局部类固醇、局部四环素、局部非甾体抗炎药(NSAIDs，例如外用双氯芬酸和局部酮咯酸)、IL-1拮抗剂、其他炎症通路拮抗剂或抑制剂、血管生成抑制肽、血管生成抑制类固醇、VEGF或FGF的调节剂/抑制剂、糖皮质激素、白三烯调节剂、抗组胺剂、细胞因子调节剂/抑制剂、生长因子调节剂/抑制剂、T细胞抑制剂、口服或局部匹罗卡品、维生素A、视黄酸(例如，所有反式维甲酸)、多西环素、环孢菌素A(例如 **RESTASIS®** (Allergan)、阿奇霉素、粘蛋白刺激剂(例如 Diquafasol (Inspire Pharmaceuticals) 15-(S)-HETE (Alcon)、瑞巴派特(Otsuka)和依卡倍特(ISTA))、激素和泪腺刺激剂(例如雄激素泪液(Allergan))和泪液替代物(例如，人工泪液)。在一些情况中，本文所述的组合物与以下组合施用：孕酮、合成孕酮、醋酸甲羟孕酮、

炔诺酮、醋酸炔诺酮、醋酸甲地孕酮、17- α -己酸羟孕酮、18-甲基炔诺酮,及其衍生物。其他治疗剂包括立他司特、EBI-005 (Eleven Biotherapeutics)、阿那白滞素 (Amgen)、MIM-D3 (Mimitogen Pharmaceuticals)、瑞巴派特 (Otsuka Pharmaceuticals)、托法替尼 (Pfizer)、磷酸地塞米松 (EyeGate Pharmaceuticals)、RGN-259 (RegeneRx)、KPI-121 (氯替泼诺碳酸乙酯;Kala Pharmaceuticals)、溴芬酸 (ISTA Pharmaceuticals)、地夸磷索四钠 (Merck and Co.,Inc.)、羟氯喹 (Sanofi-Aventis)、瑞巴派特 (Acucela Inc.)、CF101 (Can-Fite BioPharma)、立他司特 (Shire)、EBI-005 (Eleven Biotherapeutics)、环孢菌素 (haporine-S;DH Bio Co.,Ltd.)、瑞美松龙 (Alcon Research)、依卡倍特钠 (Bausch&Lomb Incorporated)、利妥昔单抗 (IDEC Pharmaceuticals)、塔西单抗 (Hoffman-La Roche Ltd.)、skQI (Mitotech,SA)、顺式-UCA (Herantis Pharma PLC)、LME636 (Alcon Research)、AGN-223575 (Allergan)、ISV-101 (InSite Vision)、OTX-DP (Ocular Therapeutix,Inc.)、利格列酮 (Santen Pharmaceutical Co.)、mapracorat (Bausch&Lomb Incorporated)、resolvin (Resolvix)、他索西替尼/托法替尼 (Pfizer)、RU-101 (R-Tech Ueno,Ltd.)、DNase (Genentech,Inc.)、voclosporin (Lux Biosciences)、P-321 (Parion Sciences)、ACCS (Stemnion,Inc.)、AGN-232411 (Allergan) 和描述于例如Ridder和Karsolia,Clinical Optometry,2015,2015 (7) :91-102中的那些。

[0279] 脂联素拟肽化合物和另一种治疗剂的组合可以引起眼科疾病治疗中具有增强效果的协同作用。与任何单个活性剂的剂量相比,这种协同性允许组合中的活性剂剂量降低。降低的剂量有助于减少可能出现的任何副作用。因此,在组合治疗中,其他(第二)治疗剂和有效量的脂联素拟肽化合物的有效量能一起有效降低眼科疾病的症状/效果。

[0280] 通过考虑患者的状态、推荐剂量、疾病的严重程度以及脂联素拟肽化合物的协同作用,医学上的技术人员可以最好地确定其他治疗剂的适当剂量。

[0281] G. 测定治疗效果的方法

[0282] 可以进行各种方法来评估受试者对本文提供的组合物的治疗反应。在一些情况中,可以进行化验、测试或测量来测定本文所述的方法是否已经缓解干眼症或与炎症相关的眼科疾病的至少一种症状或临床体征。用于测量或评估本文提供的干眼症或眼科疾病的症状或临床体征的方法的详细描述可以发现于例如Pult等,Eye (Lond),2011,25 (4) :502-510,Bhatnagar等,Int J Ophthalmol,2015,8 (1) :174-81,Messmer,Dtsch Arztebl Int,2015,112 (5) :71-82。

[0283] 可以通过以下来评估泪液分泌的变化:Schirmer测试、酚红线状泪液测试 (PRTT) 和测定泪液产生的速率和量的其他方法。可以通过荧光素清除测试和荧光光度法来评估泪液清除的变化。可以通过重要的染料染色,如荧光素、玫瑰红和丽丝胺绿染色来评估眼表损伤和角膜上皮缺损。可通过印迹细胞学、刷状细胞学、流式细胞仪和共聚焦显微镜来分析眼表的细胞学。可以使用泪膜稳定性分析系统 (TSA)、波前像差仪、激光扫描显微镜,功能性视力和泪膜干涉成像法通过分析泪膜破裂时间来检查泪膜稳定性。可以通过泪液半月板测量来评估泪液体积的变化。可以通过泪膜干涉成像法、睑板测量仪 (meibometry) 和红外线睑板腺成像 (meibography) 来评估泪膜的脂质层变化。可以通过蒸发器、闭室和通风室进行泪液蒸发评估。可以通过泪液渗透压、凝固点降低、蒸汽压渗透压和电导率 (Ocusense) 来评估泪膜化学性质的改善。泪液组成的生化分析可以包括黏蛋白和脂质分析。可以通过使用染

料(例如荧光素、丽丝胺绿和玫瑰红)并观察较不规则的形态(与基线相比)和染色角膜或结膜上皮使眼表的改善可视化。

[0284] 可以通过将治疗后症状或临床体征的程度与治疗前相同症状或临床样品的程度相比较来测定眼科疾病(例如干眼症和与炎症相关的眼科疾病)的至少一种症状或临床体征的缓解。如果治疗后症状或临床体征的程度降低,则指示改善或缓解。

IV. 实施例

[0285] 以下实施例是说明但不限制本发明。

[0286] 实施例1. 治疗干眼症动物模型的脂联素拟肽化合物

[0287] 本研究的目的是使用干眼症的东莨菪碱模型来研究本文所述的脂联素拟肽化合物的效力。

[0288] A. 治疗方案

[0289] 从Charles River (Wilmington, Mass.) 获得重量为300g-350g的雄性Sprague-Dawley大鼠。在恒定的室温($22 \pm 1^\circ\text{C}$)、光照条件(12-h光照/12-h黑暗循环)和湿度(40-60%)下将动物饲养在动物宿舍内。在手术实验和临床检查前用异氟烷麻醉动物。

[0290] 用经由渗透泵(2ML4 Alzet®; CedarLane, Burlington, Ontario)连续且系统性向动物递送的东莨菪碱(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.)诱导干眼症,所述渗透泵填充有东莨菪碱且皮下植入到肩胛骨之间的中背部。用2-3个伤口夹闭合伤口。手术后,第二天,再次向动物皮下注射Carprofen (0.5mg/100g),一种啮齿类动物的非甾体抗炎药和强效长效镇痛药。在手术泵植入之前和在所有临床终点试验之前,将动物麻醉在异氟烷99.9% USP (Abraxis Bioscience, Richmond Hill, Ontario)室中。东莨菪碱以12.5mg/天递送,且出于技术原因,在第14天评估数据。

[0291] 在盐水(0.9%)中制备0.175g/mL氢溴酸东莨菪碱(Sigma-Aldrich, St. Louis Mo.)的无菌溶液,并用0.22 μm 注射器末端过滤器(Millex-GC, Millipore Corp., Bedford, Mass.)过滤。根据制造商的说明,用2mL 0.175g/mL的东莨菪碱溶液填充2ML4 Alzet®泵。

[0292] 测试的大鼠眼睛的组如下:第1组:对照大鼠(来自6只大鼠的n=12只眼睛);第2组:通过连续地系统性施用东莨菪碱诱导大鼠(来自6只大鼠的n=12只眼睛)的干眼症,并在第14天获取荧光素染色的测量值;第3组:通过连续地系统性施用东莨菪碱诱导大鼠(来自7只大鼠的n=14只眼睛)的干眼症,并在第8天用盐水局部处理一次;第4组:通过连续地系统性施用东莨菪碱诱导大鼠(来自7只大鼠的n=14只眼睛)的干眼症,并在第8天用5 μl 滴注的1% (10mg/mL)的本文所述的脂联素拟肽化合物局部处理一次。

[0293] B. 干眼症的临床终点和结果

[0294] 角膜染色:通过角膜荧光素浸渍评价角膜干燥的临床体征。在麻醉动物的结膜囊中滴注1滴在无菌盐水中制成的1%荧光素钠(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.)溶液。然后,在滴注荧光素三分钟后,使用具有钴蓝色滤光片(Reichert Ophthalmic Instruments, Depew, N.Y.)的Portable Slit Lamp检眼镜在蓝光下观察角膜。对于每只动物,以盲法记录眼表的点状荧光阳性区。该试验的得分分为0-4级,其中0=没有染色,1=<25%表面染色,2=25-50%表面染色,3=50-75%表面染色和4=>75%表面染色。

[0295] Schirmer测试:用Zone-Quick标准化的酚红丝线(FCI Ophthalmics,Marshfield Hills,Mass.)测量泪液产生。用异氟烷轻轻地镇静动物。将丝线插入侧下眼角,并原地放置30秒。用精确度为1mm的丝线的刻度测量丝线的染湿部分的长度,表示为毫米。

[0296] 泪液荧光素清除:用(Afonso,A A.等,Ophthalmology,1999,106:803-810,用于人)和(Chen,W.et al.,Cornea,2007,26:1101-1106,改良的用于动物)所述的评估泪液荧光素清除的临床测试。用异氟烷轻轻地镇静动物,并向结膜囊下部施用2ml 1%的荧光素钠(Sigma-Aldrich,St.Louis,Mo.)溶液(在无菌盐水中)。2分钟内使动物醒来。15分钟后,再次镇静动物,并用酚红棉丝线(如上对于Schirmer试验所述)收集荧光素染色的泪液。将丝线立即密封在避光的1.5mL聚丙烯Eppendorf试管中,直到荧光光度法分析。棉线湿润的长度(mm)决定收集的泪液的体积。然后,加入100 μ l磷酸盐缓冲的盐水(PBS),以12,000rpm旋转试管5分钟,并将液体转移至96孔聚苯乙烯微孔板。在各板上制备标准孔,其由置于含有2 μ l 1%的荧光素钠溶液的100 μ l PBS中的酚红丝线组成。将标准孔设定增益后,立即使用荧光酶标仪测量荧光。从以下计算泪液的荧光素浓度:荧光单位(FU)除以棉线湿润的mm(FU/mm)。

[0297] 用平均值和标准偏差(SD)来表征各研究组的数据。用GraphPad Prism 4.0C(GraphPad Software Inc.,La Jolla,Calif.),对每次观察的处理组的体重和眼部体征进行单因素方差分析(ANOVA)。当通过检查日分级时,当处理组统计学上显著($p < 0.05$,双尾)时,进行成对比较。对于与未处理对照(第1组或组A)的比较,使用Dunnett检验的调整。对于多重比较,没有校正。计算组之间的P值,并报告一对平均值(P值报告为 > 0.05 、 < 0.05 、 < 0.01 或 < 0.001)之间的差异。

[0298] 实施例2.局部滴注脂联素拟肽化合物后,天然大鼠中的泪液黏蛋白产生

[0299] 本研究的目的是研究本文所述的脂联素拟肽化合物在泪液黏蛋白产生中的效力。在刺激天然大鼠(*naïve rat*)中的粘蛋白产生中,对本文所述的脂连蛋白拟肽化合物的局部滴注进行剂量范围研究。

[0300] 将30只雄性Sprague Dawley大鼠分成5组,每组6只大鼠,并用以下试剂每小时双侧处理一次,连续6小时:盐水、0.04%的脂联素拟肽化合物、0.4%的脂联素拟肽化合物、1.0%的脂联素拟肽化合物、2.5%的脂联素拟肽化合物。一旦麻醉,使用校准微量移液器,使每只动物的两只眼睛的结膜囊下部接受5 μ L局部滴注的测试化合物。

[0301] 在处理之前和6小时的盐水和化合物滴注之后,合并并收集来自两只眼睛的泪液冲洗物。通过酶联凝集素测定法(ELLA)评估所有泪液冲洗物的黏蛋白浓度。

[0302] 用平均值和标准偏差(SD)来表征数据。用处理的减去大鼠组的基线来计算黏蛋白浓度的差异。用配对t检验来评估两组之间从基线的连续黏蛋白变化。用方差分析来分析超过两个处理组之间的黏蛋白变化。用Wilcoxon秩和检验将处理组之间的中值黏蛋白变化与理论中值0进行比较。认为双侧检验 $P < 0.05$ 是统计学上显著的。用GraphPad Prism 4.0C(GraphPad Software Inc.,La Jolla,CA)进行统计分析。

[0303] 与未处理大鼠相比,本文所述的示例性脂联素拟肽化合物增加了处理大鼠中的黏蛋白浓度。

[0304] 实施例3.治疗用东莨菪碱和干燥环境的组合的干眼症小鼠模型的脂联素拟肽化合物

[0305] 这些实验使用6周至8周大的雌性C57BL/6小鼠。如之前所述,每天皮下注射0.5mg/0.2mL氢溴酸东莨菪碱(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)四次(8AM、11AM、2PM和5PM),并暴露于空气通风和30%环境湿度来诱导实验性干眼症(EDE)。在这些实验期间,不限制动物的行为、食物和水摄取。根据施用的局部处理,将小鼠随机分为如下6组:(1)未暴露于干燥应力或局部处理的未处理(UT)对照小鼠;(2)没有接受滴眼剂的EDE对照小鼠;(3)用平衡的盐溶液(BSS;Alcon,Fort Worth,TX)处理的EDE小鼠;(4)用0.001%脂联素拟肽处理的EDE小鼠;(5)用0.01%脂联素拟肽处理的EDE小鼠;和(6)用0.1%脂联素拟肽处理的EDE小鼠。所有处理组接受2毫升滴眼剂,每天四次。在处理第5天和第10天测量泪液体积和角膜光滑度。处理后10天,将小鼠安乐死,并进行多重免疫小珠试验、组织学、免疫组织化学和流式细胞仪。每组由5只动物组成,对四组独立小鼠进行实验。

[0306] 如之前所述,用酚红浸渍的棉线(Zone-Quick;Oasis,Glendora,CA)测量泪液体积。将丝线置于外眦20秒。用SMZ 1500显微镜(Nikon,Tokyo,Japan)测量泪液润湿的丝线距离。获得标准曲线以将距离转化为体积。

[0307] 角膜表面不规则性的严重程度通过两个蒙面观察者从立体变焦显微镜(SMZ 1500;Nikon)的光纤环照明器测量的白环变形来分级。根据反映环中的变形象限使用6点量表(0-5)来计算角膜的不规则性严重程度评分,如下:0,没有变形;1,环的一个象限变形;2,两个象限变形;3,三个象限变形;4,全部四个象限变形;5,严重变形,其中不能识别环。

[0308] 使用多重免疫小珠试验(Luminex 200;Luminex Corp.,Austin,TX)来测量结膜和泪腺中由于干扰素-c(MIG)诱导的IL-1b、IL-6、TNF-a、IFN-c和单核因子的浓度。将组织收集并合并含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中30分钟。将细胞提取物于48°C在14,000g离心15分钟,并将上清液储存在-70°C直到使用。将上清液添加至含有适当的细胞因子小珠混合物的孔(包括IL-1b、IL-6、TNF-a、IFN-c和MIG特异性的小鼠单克隆抗体)中60分钟。用试验缓冲液洗涤三次后,在黑暗中于室温下施用生物素化的第二细胞因子抗体混合物30分钟。加入链霉亲和素-藻红蛋白后,用分析系统(xPONENT,Austin,TX)检测反应。从已知浓度的重组小鼠细胞因子的标准曲线计算组织中这些因子的浓度。

[0309] 手术切除眼及附属器,4%甲醛固定,并且石蜡包埋。用高碘酸-Schiff(PAS)试剂染色6微米的切片。用配置有数码相机(F2;Foculus,Finning,Germany)的显微镜(BX53;Olympus,Tokyo,Japan)检查切片并拍照。用图像分析软件(Media Cybernetics,Silver Spring,MD)测量来自每只眼睛的三个切片的上下结膜的杯状细胞密度,并表示为杯状细胞数/固定区域。进行免疫组化分析以检测正常眼睛的结膜中脂联素受体AdipoR1和AdipoR2的表达和实验性干眼的结膜和泪腺的TNF-a的表达。向切片顺序施用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的过氧化氢(H₂O₂,0.3%)和PBS中的20%血清。将来自UT对照小鼠的结膜切片与山羊抗脂联素受体AdipoR1和AdipoR2抗体(Vector Laboratories,Burlingame,CA)一起孵育。将来自EDE小鼠的结膜和泪腺切片与山羊单克隆抗小鼠TNF-a抗体(Santa Cruz Biotechnology,Santa Cruz,CA)一起孵育。洗涤后,施用合适的第二抗体。样品用抗生物素蛋白-过氧化物酶孵育,然后用3,3'-二氨基联苯胺过氧化物酶底物孵育,并用Mayer苏木精复染。

[0310] 进行流式细胞术以定量来自结膜和泪腺的CD4⁺CXCR3⁺T细胞。梳理组织,并于37°C将其用0.5mg/mL D型胶原酶摇匀。用注射器研磨并通过细胞过滤器后,获得细胞,将其离

心,并重悬于含有1%牛血清白蛋白的PBS中。洗涤后,将样品与荧光素偶联的抗CD4抗体(BD Biosciences, San Jose, CA)、藻红蛋白偶联的抵抗CXCR3抗体(BD Biosciences)和同种型对照抗体于37°C一起孵育30分钟。通过具有CellQuest软件的FACSCalibur流式细胞仪(BD Biosciences)计数CD4⁺CXCR3⁺T细胞的数量。

[0311] 用事后分析,通过单因素ANOVA评估泪液体积和角膜不规则性得分结果的统计学差异。使用Kruskal-Wallis和Mann-Whitney检验来比较组之间的细胞因子水平、杯状细胞密度和流式细胞。认为p值<0.05是统计学显著的。

[0312] 施用本文所述的脂联素拟肽能增加泪液体积、降低角膜表面不规则性的严重度,和/或降低干眼症小鼠模型的眼睛中和眼睛周围的炎症反应细胞的数量。

[0313] 实施例4. 局部施用脂联素拟肽改善泪液产生和由于干眼症引起的角膜表面不规则性

[0314] 本实施例说明使用脂联素拟肽例如ADP355和ADP399来治疗有需要的受试者的干眼症。ADP355的序列为: DAsn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-DSer-NH₂ (SEQ ID NO: 6)。ADP399是ADP355的直链支化二聚体,其序列为: (DAsn-Ile-Pro-Nva-Leu-Tyr-DSer-Phe-Ala-DSer-His-Pro) 2-Dab-NH₂ (SEQ ID NO: 7)。Nva是指正缬氨酸,Dab是指2,3-二氨基丁酸。ADP355和ADP399的详细描述可发现于例如美国专利号9,073,965和Otvos等, *Frontiers in Chemistry*, 2014, 2 (93): 1-15, doi:10.3386/fchem.2014.00093, 出于所有目的其全文通过引用并入文本。

[0315] 通过每天三次(9AM, 1:30PM和6PM)皮下注射0.5mg/0.2mL氢溴酸东莨菪碱(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)在8周龄雌性C57BL/6小鼠中诱导实验性干眼症(EDE)。每次注射施用0.3mL氢溴酸东莨菪碱的剂量。还将小鼠暴露于空气通风和30%环境湿度。在本研究中使用的6个实验组包括: (1) 未处理对照小鼠(UT; 没有干眼症处理且没有局部处理); (2) 未处理EDE对照小鼠(EDE; 没有接受局部施用); (3) EDE对照小鼠接受平衡盐水溶液(BSS); (4) EDE小鼠接受BSS中的0.01%单链脂联素拟肽(ADP355); (5) EDE小鼠接受BSS中的0.01%肽二聚体脂联素拟肽(ADP399); 和(6) EDE小鼠接受BSS中的0.01%重组球形脂联素(gAdipo)。每个组包括5只小鼠。用BSS处理的EDE小鼠每只眼睛接受局部双侧施用2μl, 每天3次。用ADP355处理的EDE小鼠每只眼睛接受局部双侧施用2μl, 每天3次。用ADP399处理的EDE小鼠每只眼睛接受局部双侧施用2μl, 每天3次。gAdipo处理小鼠作为阳性处理对照。处理开始后第5天和第10天, 评估在基线的小鼠。在一些实验中, 将ADP355、ADP-399和gAdipo重悬于0.01%BSA中。

[0316] 用酚红丝线泪液测试来测量泪液体积。简言之, 用珠宝商的镊子夹住其尖端用酚红处理的棉线(Zone-Quick; Oasis, Glendora, CA), 并将其置于外眦的泪液凹面20秒以接触泪液。使用显微镜测量毫米表示的丝线的红色部分(湿润部分)的长度。获得标准曲线, 以将距离测量值转化为泪液体积。

[0317] 图1示出了与未处理或BSS处理的EDE小鼠相比, 脂联素拟肽处理的EDE小鼠中通过泪液体积测量的泪液产生更高(ADP355 vs. EDE的p值<0.05, ADP399 vs. EDE的p值<0.05)。处理和未处理EDE小鼠之间观察到统计学显著的泪液体积差异。用ADP355、ADP399和球形脂联素处理的那些之间没有泪液体积的显著差异。所有组处理开始后第10天的泪液体积与第5天的类似。

[0318] 通过角膜荧光素染色评估角膜上皮损伤的严重程度。简言之,向眼睛滴注1%荧光素染料(1 μ l),然后用盐水洗涤眼睛。施用染料10分钟后,用钴蓝光,用裂隙灯显微镜对眼睛拍照。通过两个盲观察者使用评分系统对染色区域进行分级。根据每个区域0-4的得分,评估角膜的五个不同区域(中央、上、下、鼻和颞区域):得分0表示没有或不存在染色;得分1表示点状染色少于30个点;得分2表示点状染色超过30个点,但没有弥漫;得分3表示重度弥漫性染色,但没有或不存在阳性斑;和得分4表示具有阳性荧光斑的重度弥漫性染色。记录五个区域的平均得分。图2表明,与未处理EDE小鼠相比,用脂联素拟肽例如ADP355和ADP-399处理的EDE小鼠呈现较少的角膜染色(较少的角膜不规则性)(ADP355 vs. EDE的p值<0.05, ADP-399 vs. EDE的p值<0.05)。与未处理组相比,在脂联素拟肽处理组中观察到统计学显著改善的角膜荧光染色得分。此外,脂联素处理的小鼠(ADP355和ADP-399)的角膜表面与未处理正常小鼠(UT)和阳性对照球形脂联素处理的小鼠(gAdipo)的角膜表面类似。所有组第10天的角膜表面得分与处理开始后第5天的类似。

[0319] 本研究表明,局部施用脂联素拟肽降低或消除干眼症的临床体征,例如泪液产生和眼表不规则性。施用含有脂联素拟肽(包括单链脂联素拟肽(例如ADP355)和肽二聚体脂联素拟肽(例如ADP399))的滴眼剂对EDE的泪液产生和眼表具有有益效果。因此,向眼睛局部施用脂联素拟肽有助于治疗有需要的受试者的干眼症。

[0320] 虽然为了清楚理解的目的,已经通过说明和实例的方式对前述发明进行了详细描述,但是本领域技术人员将会理解,在所附权利要求的范围内可以实施某些改变和修改。此外,本文提供的每个参考文献通过引用整体并入本文,就像每个参考文献通过引用单独并入一样。

序列表

- <110> 雅利斯塔制药公司
Hsu, Henry
- <120> 用于治疗眼科疾病的脂联素拟肽
- <130> 098102-000110PC-1006637
- <150> US 62/156, 127
<151> 2015-05-01
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 化学合成的肽

[0001]

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 位置 1 的 Xaa 可以是 Asn 或非天然氨基酸
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> 前提是位置 1、4、7 或 10 的至少一个是非天然氨基酸
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 位置 4 的 Xaa 可以是 Gly 或非天然氨基酸
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 位置 7 的 Xaa 可以是 Tyr 或非天然氨基酸
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(11)
<223> 当位置 10 的 Xaa 或位置 11 的 Xaa 是 C-末端氨基酸时, 所述 C-末端氨基酸任选是酰

胺化的

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> 位置 10 的 Xaa 可以是 Tyr 或非天然氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> 位置 11 的 Xaa 可以缺失, 或是 bAla 或 bAlaNH2

<400> 1

Xaa Ile Pro Xaa Leu Tyr Xaa Phe Ala Xaa Xaa

1

5

10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

[0002]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 位置 1 的 Xaa 是 Asn 或非天然氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> 前提是位置 1 的 Xaa、位置 4 的 Xaa、位置 7 的 Xaa 或位置 10 的 Xaa 的至少一个是非天然氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> 其中 C-末端氨基酸任选是酰胺化的

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> 位置 4 的 Xaa 是 Gly 或非天然氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)
 <223> 位置 7 的 Xaa 是 Tyr 或非天然氨基酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> 位置 10 的 Xa 是 Tyr 或非天然氨基酸

<400> 2

Xaa Ile Pro Xaa Leu Tyr Xaa Phe Ala Xaa
 1 5 10

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 化学合成的肽

[0003]

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 位置 1 的 Xaa 是 D-Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> 位置 4 的 Xaa 是 Nva

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> 位置 7 的 Xaa 是 D-Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> 位置 10 的 Xaa 是 D-Ser

<400> 3

Xaa Ile Pro Xaa Leu Tyr Xaa Phe Ala Xaa
 1 5 10

<210> 4
 <211> 11

- <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 化学合成的肽
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 位置 1 的 Xaa 是 D-Asn
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> 位置 4 的 Xaa 是 Nva
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> 位置 7 的 Xaa 是 D-Ser
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 [0004] <223> 位置 10 的 Xaa 是 D-Ser
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> 位置 11 的 Xaa 是 bAla
- <400> 4
- Xaa Ile Pro Xaa Leu Tyr Xaa Phe Ala Xaa Xaa
 1 5 10
- <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 化学合成的肽
- <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 位置 1 的 Xaa 是 D-Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4).. (4)
 <223> 位置 4 的 Xaa 是 Nva

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7).. (7)
 <223> 位置 7 的 Xaa 是 D-Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10).. (10)
 <223> 位置 10 的 Xaa 是 D-Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11).. (11)
 <223> 位置 11 的 Xaa 是 bAlaNH₂

<400> 5

Xaa Ile Pro Xaa Leu Tyr Xaa Phe Ala Xaa Xaa
 1 5 10

[0005]

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 化学合成的肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (1)
 <223> 位置 1 的 Xaa 是 D-Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4).. (4)
 <223> 位置 4 的 Xaa 是 Nva

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7).. (7)
 <223> 位置 7 的 Xaa 是 D-Ser

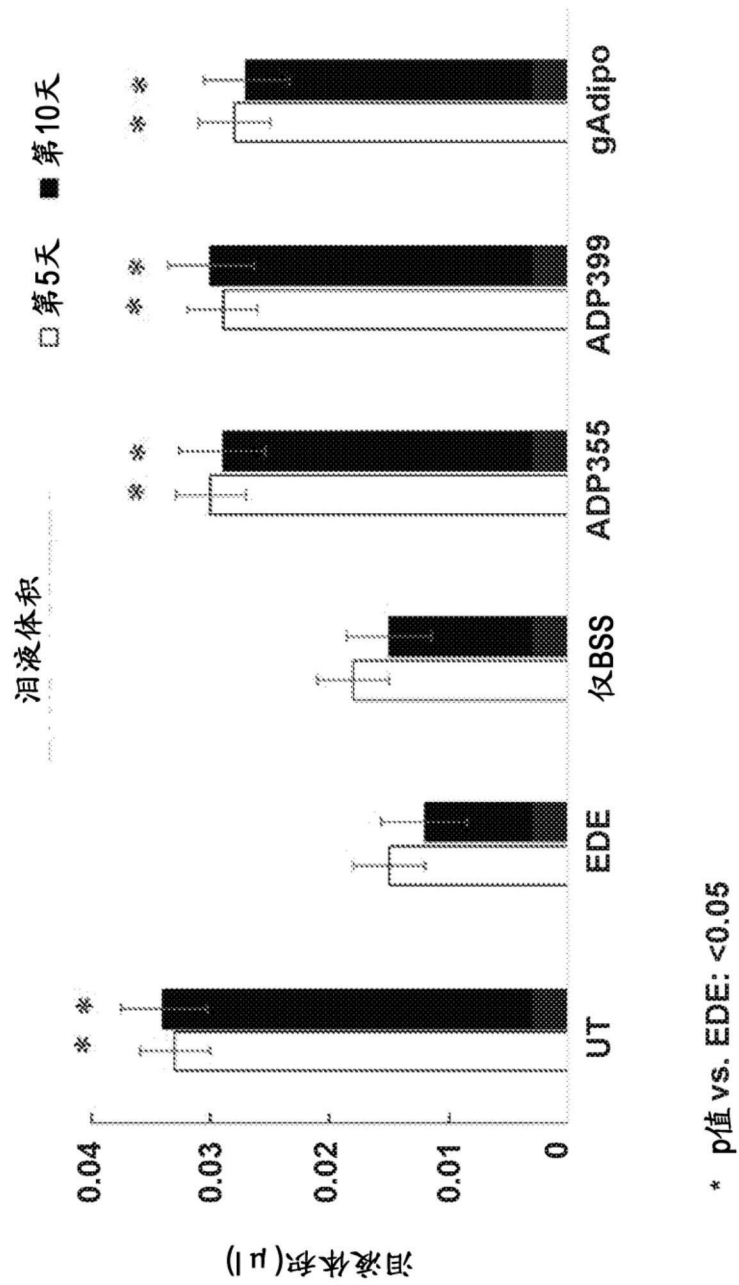


图1

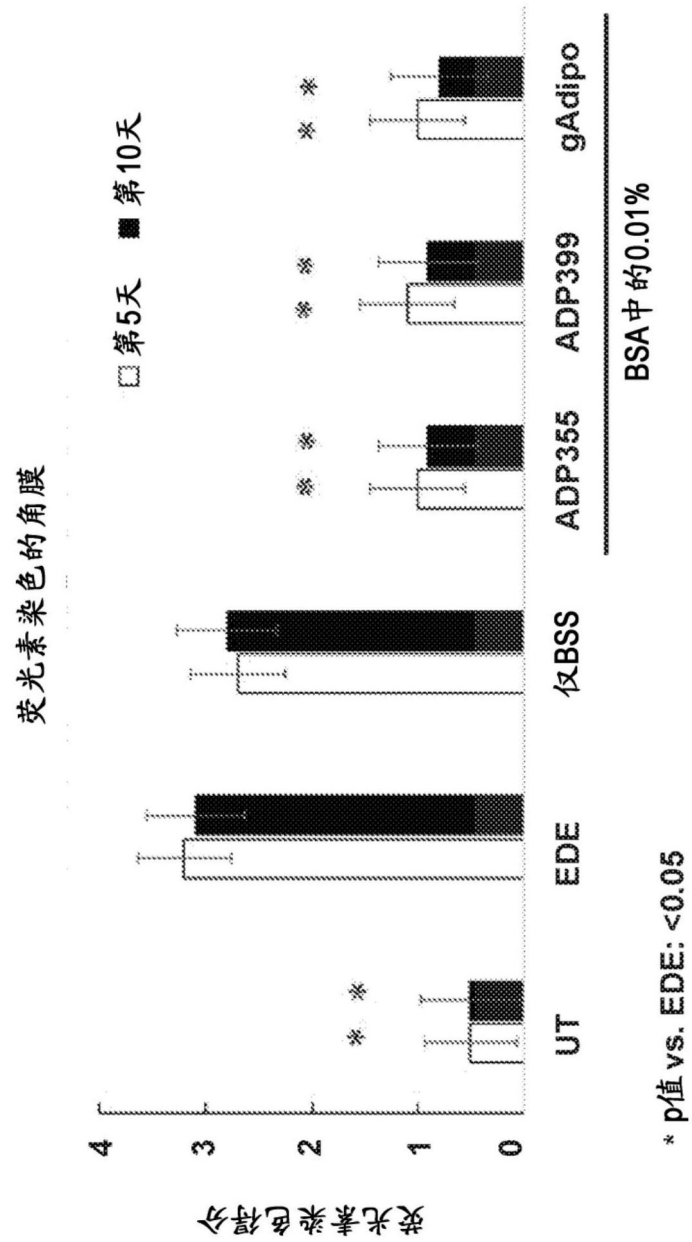


图2