(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112236440 A
(43)申请公布日 2021.01.15

(21)申请号 201980036092.X

(22)申请日 2019.05.27

(66)本国优先权数据
PCT/CN2018/088701 2018.05.28 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2019/088593 2019.05.27

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/228307 EN 2019.12.05

(71)申请人 江阴贝瑞森制药有限公司
地址 214437 江苏省无锡市江阴市东盛西路2号B13

(72)发明人 顾铭 B·I·塞缪森 J-C·詹森

(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.
C07K 7/06(2006.01)
A61K 38/08(2019.01)
A61K 8/64(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 17/06(2006.01)
A61P 17/10(2006.01)
A61P 17/02(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 11/02(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 1/04(2006.01)
A61P 33/12(2006.01)
A61Q 19/00(2006.01)

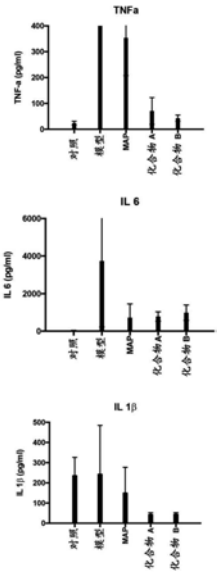
权利要求书2页 说明书26页 附图3页

(54)发明名称

新的药物用途

(57)摘要

本发明提供具有如下序列的肽:Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-Tyr-Lys,或其盐,其用作药物。该肽特别用于治疗特征在于炎症的病状,包括伤口、烧伤、痔疮、牛皮癣、痤疮、特应性皮炎、COPD、溃疡性结肠炎和IPF。



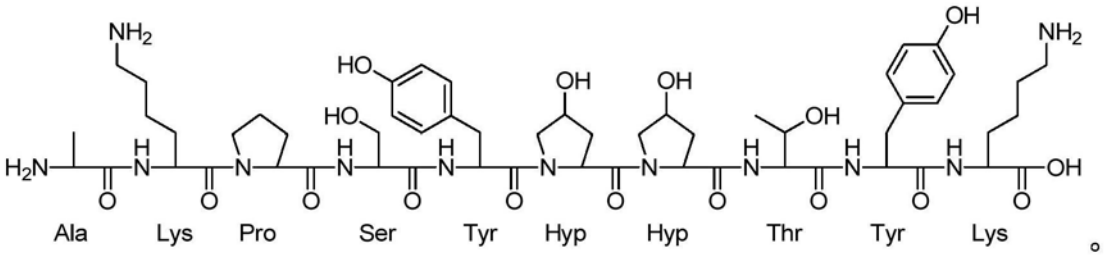
CN 112236440 A

1.化合物

Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-Tyr-Lys，

其区域异构体、立体异构体或药学上或化妆品上可接受的盐，其用作药物。

2.权利要求1的用于所述用途的化合物，其中所述化合物为：



。

3.权利要求1或权利要求2的用于所述用途的化合物，其不是盐的形式。

4.药物制剂，其包含权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐，和药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体。

5.药物制剂，其包括权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐；另一种抗炎剂；和药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体。

6.套装药盒，其包含以下组分：

(A)药物制剂，所述药物制剂包括权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐与药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体的混合物；和

(B)药物制剂，所述药物制剂包括另一种抗炎剂与药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体的混合物，

所述组分(A)和(B)各自以适用于与另一种组分一起联合给药的形式提供。

7.权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐、权利要求4或5所述的制剂或权利要求6所述的套装药盒，其用于治疗炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症的病症。

8.权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐、权利要求4或5所述的制剂或权利要求6所述的套装药盒在用于制备用于治疗炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症的病症的药物的用途。

9.治疗炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症的病症的方法，所述方法包括向有此治疗需要的患者给药权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐、权利要求4或5所述的制剂或权利要求6所述的套装药盒。

10.权利要求7所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、权利要求8所述的用途或权利要求9所述的方法，其中所述炎症性病症选自牛皮癣、痤疮、湿疹、皮炎、鼻炎、慢性阻塞性肺病和溃疡性结肠炎。

11.权利要求10所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述皮炎是特应性皮炎或类固醇依赖性皮炎。

12.权利要求7所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、权利要求8所述的用途或权利要求9所述的方法，其中所述特征在于炎症的病症是伤口或烧伤。

13.权利要求12所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述伤口是擦伤、抓痕、切口、撕裂、皮肤刺伤、撕脱伤、瘀伤、疤痕或水泡，或与前述任一种相

关的发痒。

14.权利要求7所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、权利要求8所述的用途或权利要求9所述的方法，其中所述特征在于炎症的病状或病症是痔疮。

15.权利要求7所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、权利要求8所述的用途或权利要求9所述的方法，其中所述特征在于炎症的病症是病毒感染。

16.权利要求15所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述病毒感染是普通感冒。

17.权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐、权利要求4或权利要求5所述的制剂或权利要求6所述的套装药盒，其用于治疗特发性肺纤维化。

18.权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐、权利要求4或权利要求5所述的制剂或权利要求6所述的套装药盒用于制备用于治疗特发性肺纤维化的药物的用途。

19.治疗特发性肺纤维化的方法，所述方法包括向有此治疗需要的患者给药权利要求1至3中任一项定义的化合物或其药学上或化妆品上可接受的盐、权利要求4或权利要求5所述的制剂或权利要求6所述的套装药盒。

20.前述权利要求中任一项所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、用途或方法，其中制剂中或套装药盒中提供的化合物或其盐以局部制剂的形式局部给药。

21.权利要求20所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述给药是直接局部给药于粘膜表面。

22.权利要求21(当从属于权利要求1至10或17至19中任一项时)所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述给药是直接局部给药于肺。

23.权利要求20(当从属于权利要求1至16中任一项时)所述的用于所述用途的化合物、制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述给药是直接局部给药于皮肤。

24.权利要求20、21或23(当从属于权利要求5至14中任一项时)中任一项所述的制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述另一种抗炎剂是孟鲁司特或其药学上可接受的盐，并且所述病状是伤口、烧伤或痔疮。

25.权利要求20至22(当从属于权利要求5至10、13或17至19中任一项时)中任一项所述的制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述另一种抗炎剂是孟鲁司特或其药学上可接受的盐，并且所述病状是慢性阻塞性肺病或特发性肺纤维化。

26.权利要求20至22(当从属于权利要求5至10中任一项时)中任一项所述的制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述另一种抗炎剂是mefp-1，并且所述病状是溃疡性结肠炎。

27.权利要求20或权利要求21(从属于权利要求5至9、15或16中任一项)所述的制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述另一种抗炎剂是胰蛋白酶，并且所述特征在于炎症的病状是病毒感染。

28.权利要求27所述的制剂或套装药盒、用途或方法，其中所述病毒感染是普通感冒。

29.用于制备权利要求4至28中任一项定义的药物制剂的方法，所述方法包括将权利要求1至3中任一项定义的化合物与一种或多种佐剂、稀释剂或载体组合。

30.用于制备权利要求5至28中任一项定义的套装药盒的方法，所述方法包括将所述套装药盒的组分(A)与所述套装药盒的组分(B)组合。

新的药物用途

技术领域

[0001] 本发明涉及已知化合物在人类医学中的新用途，并且涉及包含已知化合物的药物组合物。特别地，本发明涉及所述化合物和那些组合物在治疗炎症中的用途。

[0002] 背景技术和现有技术

[0003] 炎症的特征通常在于对例如微生物、某些抗原、受损细胞或物理和/或化学因子的入侵的局部组织应答。炎症性反应一般来说是一种保护性机制，其用于消灭、稀释或隔离伤害因子和损伤组织两者、以及用于引发组织愈合。

[0004] 炎症可能源自物理性创伤、感染、某些慢性病(例如牛皮癣和自身免疫性疾病诸如类风湿性关节炎)和/或对外部刺激的化学和/或生理反应(例如作为变态反应的部分)。可能牵涉一系列复杂事件，其中炎症介质增加血流量和使局部血管扩张，这导致发红和发热，使得分泌液体，这通常导致局部肿胀，使得白细胞迁移进发炎区，和引起疼痛。

[0005] 很多病状/病症的特征在于非正常的组织损伤性炎症、和/或由非正常的组织损伤性炎症引起。这样的病状的特征通常在于激活免疫防御机制，对宿主所产生的有害影响大于对宿主的益处，且通常与以下有关：各种程度的组织发红或充血、肿胀、高热、疼痛、发痒、细胞死亡、组织破坏、细胞增殖和/或丧失功能。实例包括炎症性肠病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、牛皮癣、血管球性肾炎和移植排斥。

[0006] 通常，一系列复杂事件产生炎症性变化，诸如通过局部血管扩张增加血流量，这导致发红和发热，白细胞和血浆外渗，这通常导致局部肿胀，激活感觉神经(导致一些组织中存在疼痛)，和丧失功能。这些炎症性变化由一连串的细胞和生物化学事件触发，涉及细胞如嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞连同炎症介质诸如血管活性胺、细胞因子、补体因子和活性氧簇。

[0007] 炎症尤其在伤口愈合过程中起关键作用。伤口和烧伤因此可分类为与炎症相关的病状。本领域中的传统想法是不应该将抗炎药直接施用于开放性伤口，因为这将有害于伤口愈合的进行。

[0008] 贻贝粘附蛋白(MAP)也称为贻贝足丝蛋白(Mytilus edulis foot protein)(mefp)，其为由海洋贝类物种分泌的蛋白质，所述物种诸如为紫贻贝(Mytilus edulis)、厚壳贻贝(Mytilus coruscus)和翡翠贻贝(Perna viridis)。粘附蛋白由贻贝从足丝腺分泌，其中所述粘附蛋白在足丝腺中产生和储存。当在固体(诸如岩石)以及其它固体对象(诸如金属、木材、玻璃等)的表面上分泌时，形成防水粘结(water-proof bond)，其将贻贝固定于固体对象。贻贝通常以群的形式贴附于海岸礁或贴附于船的底部。该粘结极为强力，具有抵抗沿海水域中的波浪冲击的能力。

[0009] 对紫贻贝(Mytilus edulis)、地中海贻贝(Mytilus galloprovincialis)、加州贻贝(Mytilus californias)和翡翠贻贝(Perna viridis)的研究迄今已经识别出11种源自贻贝的单独的粘附蛋白亚型：mfp-1(有时称为“mefp-1”，下文可互换使用)，mfp-2/mefp-2，mfp-3/mefp-3，mfp-4/mefp-4，mfp-5/mefp-5，mfp-6/mefp-6；胶原蛋白pre-COL-P，pre-COL-D和pre-COL-NG；以及贻贝足丝基质蛋白PTMP(近端丝基质蛋白)和DTMP(远侧近端丝基

质蛋白)。参见,例如,Zhu等人,Advances in Marine Science,32,560(2014)和Gao等人,Journal of Anhui Agr..Sci.,39,19860(2011))。

[0010] 所有贻贝粘附蛋白(包括其亚型)具有两种结构特征,在于它们包括:(1)赖氨酸,使得所述蛋白质携载高正电荷荷电(由于NH_2末端);(2)3,4-二羟基苯基丙氨酸(DOPA,多巴胺),其邻苯二酚部分负责形成强的共价键,由此赋予使贻贝粘附蛋白结合于固体表面的能力。

[0011] 基于贻贝粘附蛋白产物的产品目前用于数量有限的领域(包括作为组织粘合剂用于微孔粘结,和治疗伤口和烧伤)。商业产品或直接作为贻贝粘附蛋白的溶液使用或作为冻干粉储存以在使用前溶解。

[0012] mefp-1的重要部分由70至90个如下十肽的串联重复构成:Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys(参见Waite,Int.J.Adhesion and Adhesives,7,9(1987))。该十肽序列可以作为天然存在的MAP的低分子量衍生物分离,或者可以例如按照Yamamoto在J.Chem.Soc.,Perkin Trans.1,613(1987)中的描述合成。也参见Dalsin等人,J.Am.Chem.Soc.,125,4253(2003)。

[0013] DOPA残基被认为对MAP、例如mefp-1的活性是必需的。本领域中没有暗示MAP用不同的氨基酸(诸如酪氨酸)完全替换可能导致MAP的物理化学或生物学意义上的性质保留。

[0014] 本领域当然没有暗示分离的不含DOPA残基的十肽将会或甚至可能具有与MAP相同或甚至类似的性质,该不含DOPA残基的十肽仅作为模型化合物被例如如下文献所公开:Kanyalkar等人,Biomaterials,389(2002)和Belli等人,Dental Materials,26,e125(2010)。令人惊奇的是,我们发现在mefp-1中具有与重复十肽单元不同结构的分离的十肽可用于治疗炎症。也参见US 5,616,311和WO 96/39128。

发明内容

[0015] 根据本发明,提供(分离的)肽化合物,其包含如下序列或优选由如下序列构成:

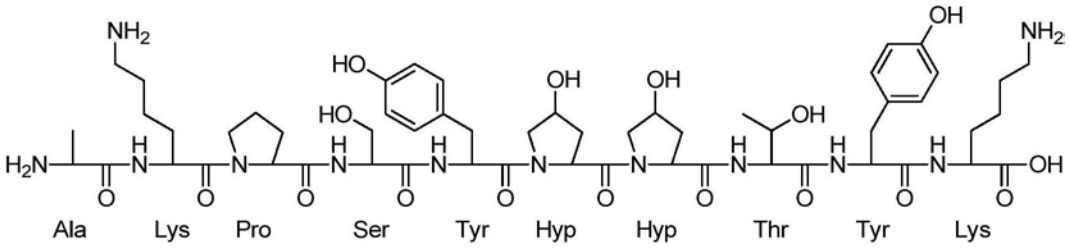
[0016] Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-Tyr-Lys,

[0017] 其区域异构体、立体异构体或盐,其用于医药和/或用作药物,例如用于治疗炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症的病症。

[0018] 本发明进一步提供用于兽医科学和/或作为化妆品的上述序列的(分离的)肽化合物。本申请公开的用于本申请提及的用途的化合物(包括区域异构体和立体异构体)及其盐在下文中一起称为“本发明化合物”。

[0019] 本发明化合物,无论是盐形式还是其它形式,包括上述结构中某些氨基酸(例如Hyp和Tyr)内的区域异构体以及这些区域异构体的混合物。例如,包括在Tyr的定义中的不仅是酪氨酸(4-羟基苯丙氨酸),还有2-羟基苯丙氨酸和3-羟基苯丙氨酸,并且包括在Hyp的定义中的是4-羟基脯氨酸、3-羟基脯氨酸和5-羟基脯氨酸。与本发明化合物中的Tyr残基相邻的Hyp残基可以是3-羟基脯氨酸,并且与本发明化合物中的Thr残基相邻的Hyp残基可以是4-羟基脯氨酸。更优选Hyp残基两者都是4-羟基脯氨酸。

[0020] 因此,不是盐形式的本发明化合物可具有以下特定化学结构:

[0021] 

[0022] 此外，除了上述序列中氨基酸的标准中心碳原子(L-构型中没有例外)，序列中的某些氨基酸进一步包含其它手性碳原子。所有这些立体异构体及其混合物(包括外消旋混合物)都包括在本发明的范围内。就Hyp的定义而言，包括反式-4-羟基-L-脯氨酸、顺式-4-羟基-L-脯氨酸、反式-3-羟基-L-脯氨酸、顺式-3-羟基-L-脯氨酸、反式-5-羟基-L-脯氨酸和顺式-5-羟基-L-脯氨酸，但我们优选用于本发明化合物的Hyp是4-羟基-L-脯氨酸。

[0023] 本发明化合物可以是盐的形式。可以提及的盐包括药学上可接受的盐和/或化妆品上可接受的盐，诸如药学上可接受的或化妆品上可接受的酸加成盐和碱加成盐。这样的盐可以通过常规手段形成，例如通过游离肽与一当量或更多当量的合适酸或碱任选在溶剂中或在盐不溶于其中的介质中的反应，然后使用标准技术(例如在真空中，通过冻干或过滤)除去所述溶剂或所述介质进行。也可以如下制备盐：例如使用适宜的离子交换树脂使盐形式的活性成分的抗衡离子与另一种抗衡离子交换。

[0024] 优选的盐包括，例如，盐酸盐、硫酸氢盐、马来酸盐、甲磺酸盐、甲苯磺酸盐、碱土金属盐诸如钙盐和镁盐、或碱金属盐诸如钠盐和钾盐。

[0025] 本发明化合物是有用的，因为它们具有药理学活性。因此，本发明化合物可以用于人和动物医学。因此它们适用作药物(和/或用于兽医科学)，尽管它们也可以用作化妆品和/或用作医疗器械的一部分。

[0026] 尽管本发明化合物本身可以具有药理学活性，但本发明化合物的某些药学上可接受的(例如“经保护的”)衍生物可以存在或可以被制备，其可不具有这种活性，但可以将其给药然后代谢或化学转化以形成本发明化合物。这种化合物(可以具有一定的药理学活性，条件是这种活性明显低于所述化合物代谢/转化为的活性化合物的活性)因此可以描述为本发明化合物的“前药”。

[0027] 如本申请所用，提及的前药将包括下述化合物，其在给药之后在预定的时间内以实验可检测量形成本发明化合物。本发明化合物的所有前药都包括在本发明的范围内。

[0028] 本发明化合物可特别用于治疗炎症。

[0029] “治疗炎症”包括不考虑原因在身体的任何器官(包括软组织、关节、神经、血管系统、内部器官，尤其是粘膜表面，特别是皮肤)中治疗炎症，并且也包括所有这样的炎症性病症或病状、和/或特征在于炎症(例如作为症状)的病症或病状。

[0030] 炎症性病状的特征可以(且通常)在于激活免疫防御机制，对宿主所产生的有害影响大于对宿主的益处。这样的病状通常与以下有关：各种程度的组织发红或充血、肿胀、水肿、高热、疼痛(包括酸痛)、体液渗出、发痒(瘙痒)、细胞死亡和组织破坏、细胞增殖和/或丧失功能。

[0031] 可以提及的炎症性病状包括动脉炎、糖尿病、代谢综合征、酒糟鼻、哮喘和过敏性反应、强直性脊柱炎、慢性阻塞性肺病、痛风性关节炎、炎症性肠病(诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎)、多发性硬化症、骨关节炎、胰腺炎、前列腺炎、牛皮癣性关节炎、类风湿性关节炎、

腱炎、滑液囊炎、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、系统性红斑狼疮、葡萄膜炎、荨麻疹、血管炎、肥大细胞增多症、糖尿病血管并发症、偏头痛、动脉粥样硬化和相关的心血管疾病。可以提及的特征在于炎症的疾病状态是慢性阻塞性肺病(COPD)。可以提及的另一种特征在于炎症的疾病状态是炎症性肠病,包括克罗恩病,尤其是溃疡性结肠炎。

[0032] 可以更特别提及的炎症性病状包括皮肤或粘膜(包括口腔粘膜、鼻粘膜、眼粘膜、阴道粘膜、子宫颈粘膜和/或肛肠粘膜,更特别是口腔粘膜或鼻粘膜)的炎症,诸如由于感染(诸如病毒和/或细菌感染)带来的炎症,或过敏性/特应性病状(诸如鼻炎、咽炎、牙周炎、齿龈炎、干眼症、结膜炎、皮炎、荨麻疹(urticaria,hives)和食物过敏);和其它炎症性病状,诸如疱疹、药疹、多形性目光疹、晒伤、皮肤癌的早期表现(红斑样皮肤损伤)、病理性脱发(包括在皮肤移植之后)、化疗疹(chemo rash)、牛皮癣、多形红斑、毛囊炎、湿疹和外耳道炎。

[0033] 更特别地,化合物可以用于治疗特征在于炎症、和/或与炎症相关的某些病状。这样的病状可以包括伤口(包括擦伤(抓痕)、切口(包括手术切口)、撕裂、刺伤、撕脱伤、瘀伤和疤痕形成)和烧伤(包括由于烧伤之后的外科手术诸如皮肤移植引起的炎症)及其它病状诸如痔疮。

[0034] 皮肤或粘膜的伤口可以产生于对膜表面的内部或外部物理性损伤,或者可以由其引起(即,是潜在生理失调的症状)。

[0035] 物理性(例如"开放性")伤口可以由以下引起:利器(割伤、切口、刺伤)或钝器/机械力(撕裂、擦伤、撕脱伤)、物理打击(瘀伤)、热或化学品(烧伤和水泡)、UV光(晒伤)、寒冷(冻疮或冻伤)。伤口可以是表面伤口(仅损伤表皮和/或真皮)或者可以是全层皮肤缺损的伤口(full thickness wound)(表皮和/或真皮以下的损伤)。在严重的情况中,皮下和/或粘膜下组织诸如肌肉、骨骼、关节、和甚至内部器官可能被损伤。

[0036] 本发明化合物可以用于缓解与炎症和/或伤口有关的疼痛(包括酸痛)。特别地,本发明化合物可用于缓解手术疼痛和/或非手术疼痛。本领域技术人员将理解,术语"手术疼痛"(即操作疼痛)是指与为医疗保健目的而进行的医学研究和治疗相关的急性疼痛。术语"非手术(疼痛)"是指与炎症和/或伤口相关的一般疼痛(例如与口腔溃疡、烧伤和/或疤痕相关的疼痛),并且不是特定医学干预的结果。

[0037] 本发明化合物不仅可以用于治疗炎症、疼痛(包括酸痛)和/或与伤口本身以及愈合过程相关的瘙痒(发痒),而且它们也可以用于防止体液从伤口渗出、感染的风险,以及防止源自炎症和/或伤口愈合过程的生理性反应诸如疤痕形成和黑色素沉着。

[0038] 疤痕形成是炎症和/或伤口愈合的结果,且是作为这样的炎症/愈合的结果的纤维化组织形成的通用术语。

[0039] 本发明化合物也可以用于抑制可能产生自炎症/伤口愈合的黑色素沉着的产生。本发明化合物也可以用于抑制与黑色素沉着相关的病症,诸如黄褐斑、雀斑、黑变病、面颊疹和其它色素沉着、具有黑素瘤的皮肤癌(skin cancer with melanoma),和由暴露于阳光引起的色素沉着或皮肤病如痤疮。

[0040] 伤口也可以作为疾病或病症的结果产生。这种伤口可以包括皮肤和粘膜的水泡形成和/或溃疡。这些是通常长期和难以治疗的普通病状。皮肤组织通常可以是损伤的、除去的、液化的、感染的和/或坏死的。溃疡可以导致对健康的继发性后果,特别是如果它们变得

感染的话，其难以痊愈且造成重大损失。它们也可以对患者造成明显的心理压力和经济损失，影响总体幸福感和生活质量两者。

[0041] 在可替换的实施方式中，本发明化合物可特别用于其的炎症性皮肤病状或疾病包括牛皮癣、痤疮、湿疹和皮炎，尤其是过敏性/特应性皮炎，以及用于治疗鼻炎(尤其是过敏性鼻炎)、痔疮和慢性阻塞性肺病。

[0042] 牛皮癣是慢性炎症性皮肤病，其往往会复发(一些患者在其整个生命过程中从未痊愈)。牛皮癣的临床表现主要包括红斑和鳞屑(scales)。其可以发生在整个身体上，但是更常在头皮和肢体上观察到。

[0043] 痤疮是毛囊(毛囊皮脂腺单位)的慢性炎症性皮肤病，其发生于下述主要因素紧密相关，例如皮脂分泌过多，闭塞性皮脂腺管(包括闭合性和开放性粉刺)，细菌感染和炎症性反应，其往往在青年时期发生，特征在于面部上的多形性皮肤损伤。术语痤疮因此包括寻常痤疮和酒糟鼻痤疮(即，褐鼻病)。

[0044] 湿疹是具有由多种内部和外部因素引起的强烈发痒的皮肤炎症性反应。其具有三个阶段，即急性期、亚急性期和慢性期。在急性期，往往产生渗出物，而慢性期则包括浸润和肥大。皮肤损伤通常发痒且容易复发。

[0045] 皮炎是常见皮肤病，其特征在于粗糙、发红、发痒、湿疹和干燥。由皮炎引起的小肿块、难治性溃疡和色素斑，如果未立即治疗，则可能发展成基底细胞瘤、鳞状细胞癌和恶性黑素瘤。皮炎可能由各种内部和外部感染性或非感染性因素引起，包括物质(接触性皮炎)或过敏性反应(过敏性/特应性皮炎)。也包括脂溢性皮炎(脂溢性湿疹)和所有形式的类固醇依赖性皮炎(包括光敏性皮脂溢疹、口周皮炎、酒糟鼻样皮炎、类固醇酒糟鼻、类固醇诱导的酒糟鼻、医源性酒糟鼻、类似于类固醇皮炎的酒糟鼻、局部皮质类固醇诱导的酒糟鼻样皮炎，和更特别是面部皮质类固醇成瘾性皮炎(facial corticosteroid addictive dermatitis)(FCAD)或面部皮质类固醇依赖性皮炎(facial corticosteroid-dependent dermatitis)(FCDD)，特征在于在用(包括不受控使用、滥用或错用)局部皮质类固醇长期治疗之后在面部区域出现的脸红、红斑、毛细管扩张、萎缩、丘疹和/或脓泡；参见，例如，Xiao等人，J.Dermatol.，42，697(2015)和Lu等人，Clin.Exp.Dermatol.，35，618(2009))。

[0046] 鼻炎是鼻内粘膜的刺激和炎症。鼻炎的常见症状包括鼻塞、流鼻涕、打喷嚏和鼻后滴流。最常见的鼻炎种类是过敏性鼻炎，其由过敏原引起，诸如花粉、灰尘、霉菌或某些动物的皮肤屑/鳞片(flake)。即使在鼻腔给药(即，鼻腔粘膜给药)时，本发明化合物也可以缓解眼睛瘙痒。

[0047] 痔疮是由直肠和肛门内部或周围发现的痔血管的大量炎症引起的肿胀。症状包括粪便通过后出血(即，伤口)、痔疮脱垂、粘液排出和瘙痒、肛门区域内的疼痛、发红和肿胀。痔疮据信是腹部压力增加的结果，例如，作为便秘或腹泻的结果。

[0048] 慢性阻塞性肺病(COPD)是引起呼吸困难的一组肺病状的名称，包括肺气肿(肺泡受损)和慢性支气管炎(气道的长期炎症)。当肺部发炎、受损和变窄时发生COPD。对肺的损害通常是不可逆的，并且导致进出肺的空气流受损。COPD的症状包括呼吸困难、排痰性咳嗽、频繁胸部感染和持续性喘息。这种疾病最常见的原因是吸烟，但其它风险因素包括高水平的空气污染以及职业性暴露于灰尘、化学物质和烟雾。

[0049] 本发明化合物可以在减轻由各种病状(包括本申请一般和具体提及的那些)引起

的红斑、发红和肿胀、水肿、水泡和大疱性类天疱疮方面具有正面效果，并且可以抑制皮下组织液的渗出，和抑制由这样的炎症性病状引起的发痒和疼痛。

[0050] 可以提及的其它炎症性病状包括：

[0051] (a)粘膜炎症，诸如口腔粘膜炎、口腔溃疡、中耳炎、喉炎、气管炎、食管炎、胃炎、肠炎和小肠结肠炎(包括细菌性痢疾、慢性阿米巴痢疾、血吸虫病、非特异性溃疡性结肠炎和节段性肠炎)、子宫颈炎和子宫颈内膜炎、子宫内膜炎、由吸入性损伤引起的炎症等，以及与癌症和感染(例如病毒感染，诸如普通感冒或流感)相关的炎症，其影响粘膜表面，诸如口腔、鼻咽、耳朵、咽喉、气管、胃肠道、子宫颈等中的粘膜表面。

[0052] (b)与例如骨折、骨骼和关节的化脓性感染相关的骨科炎症，由以下引起的炎症：风湿性骨病，以及化脓性骨髓炎(急性、慢性、局部的、硬化的、外伤后的)，化脓性关节炎；骨肿瘤(骨瘤、骨样骨瘤、软骨瘤)、骨囊肿、破骨细胞瘤、原发性骨肉瘤(骨肉瘤、软骨肉瘤、骨纤维肉瘤、尤文氏肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、骨髓瘤、脊索瘤)、骨转移瘤、骨的肿瘤样病变(骨囊肿、动脉瘤性骨囊肿、嗜酸细胞肉芽肿、骨纤维异常增殖症)；和类风湿性关节炎。

[0053] (c)神经炎症，诸如多发性末梢神经炎、面神经炎、末梢神经炎、皮下神经炎、尺神经炎、肋间神经炎等。

[0054] (d)皮下和粘膜下软组织炎症，诸如肌炎、韧带炎、腱炎、脂膜炎、囊炎、淋巴腺炎、腹股沟腺炎(bubonadentitis)、扁桃体炎、滑膜炎、筋膜炎，和由肌肉、韧带、筋膜、腱、滑膜、脂肪、关节囊和淋巴组织的损伤、挫伤或撕裂引起的软组织炎症。

[0055] (e)血管炎症，诸如变应性白细胞碎裂性小血管炎、变应性皮肤血管炎、结节性多动脉炎、血栓性血管炎、肉芽肿性血管炎、淋巴细胞性血管炎、血液组成中具有异常的血管炎和风湿性血管炎，以及与由以下引起的血管癌相关的血管炎症：变应性白细胞碎裂性小血管炎、结节性多动脉炎、血栓性血管炎、肉芽肿性血管炎、淋巴细胞性血管炎、血液组成中具有异常的血管炎和风湿性血管炎。

[0056] (f)内部器官(例如心脏、胃、肠、肺、肝、脾、肾、胰腺、膀胱、卵巢和前列腺)的炎症，包括但不限于心包炎、心肌炎、心内膜炎、肺炎、肝炎、脾炎、肾炎、胰腺炎、膀胱炎、卵巢炎、前列腺炎和胃溃疡的治疗。

[0057] (g)眼睛和周围区域的炎症，诸如结膜炎、角膜炎(例如急性上皮角膜炎、钱币状角膜炎、间质性角膜炎、盘状角膜炎、神经营养性角膜炎、粘斑性角膜炎、单纯疱疹性角膜炎、带状疱疹性角膜炎、细菌性角膜炎、真菌性角膜炎、棘阿米巴角膜炎、盘尾丝虫性角膜炎、浅层点状角膜炎、溃疡性角膜炎、暴露性角膜炎、光敏性角膜炎和隐形眼镜急性红眼病)、视神经炎等。

[0058] (h)牙龈和口腔的炎症，诸如牙周炎、牙龈炎、口腔溃疡等。

[0059] (i)与风湿病相关的炎症，诸如风湿性血管炎、类风湿性关节炎、风湿性骨病、强直性脊柱炎、滑液囊炎、克罗恩病、痛风、感染性关节炎、幼年特发性关节炎、骨关节炎、骨质疏松症、风湿性多肌痛、多发性肌炎、牛皮癣性关节炎、硬皮病、干燥综合征、脊柱关节病、系统性红斑狼疮、腱炎等。

[0060] 本发明化合物也可用于治疗呼吸系统的某些特定疾病，诸如肺囊性纤维化、普通型间质性肺炎、过敏性肺炎、石棉沉着病、肺气肿、肺心病、肺栓塞等。可以提及的特定疾病状态是特发性肺纤维化。

[0061] 特发性肺纤维化是弥漫性和致命性肺间质疾病，病理特征包括肺泡上皮损伤、肺成纤维细胞大量增殖、细胞外基质过度沉积，最终导致不可逆的肺组织损伤。在该疾病的后期，患有特发性肺纤维化的受试者经历呼吸衰竭和死亡。已经发现，本发明化合物可用于治疗特发性纤维化和/或缓解与该疾病相关的症状。

[0062] 本发明化合物可以通过增加SOD(超氧化物歧化酶)产生和减少脂质氧化进一步具有抗氧化作用。因此，可以认为这种化合物和包括这种化合物的制剂具有抗氧化性质。

[0063] 本发明化合物也可具有退热性质，可以治疗发烧和/或缓解其症状；例如，通过降低受试者的体温，从而减少发烧。因此，可以认为本发明化合物和包括本发明化合物的制剂是退热药。

[0064] 根据本发明的再一个方面，提供了治疗炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症(例如作为症状)的病症/病状的方法，该方法包括将本发明化合物给予需要这种治疗的患者。

[0065] 为避免疑义，在本发明的上下文中，术语“治疗”、“疗法”和“治疗方法”包括有需要的患者的治疗性或减轻性治疗，以及易患炎症和/或炎症性病症的患者的预防性治疗和/或诊断。

[0066] “患者”包括两栖动物、禽类和哺乳动物(特别是人)患者。

[0067] 根据本发明，本发明化合物优选局部或全身给药，例如口服给药、静脉内或动脉内给药(包括通过血管内和其它血管周装置/剂型(例如支架))、肌内给药、经皮给药、皮下给药、透粘膜给药(例如舌下或口腔给药)、经直肠给药、阴道内给药、透皮给药、经鼻给药、经肺给药(例如经气管给药或经支气管给药)、优选局部给药或通过任何其它非肠道途径给药，形式为药学上可接受的剂型中包含化合物的药物制剂。当待治疗的病状是鼻炎或源自呼吸道的病毒感染(例如普通感冒、流感)的炎症时，通过吸入(例如经鼻)给药特别有用。当待治疗的病状是COPD或IPF时，经肺给药特别有用。可以通过产生包含活性成分的喷雾(spray)增强局部给药形式，例如通过使用粉末气溶胶(aerosol)或借助于使用适当的雾化技术或设备诸如喷雾器的水雾(aqueous mist)。

[0068] 本发明化合物的优选递送模式包括以适于施用于皮肤和/或适宜粘膜表面的适宜(例如药学上和局部上可接受的)媒介物和/或商购制剂局部递送至炎症部位(例如粘膜，包括肺，或更优选皮肤)，但也可包括口服、静脉内、经皮或皮下、经鼻、肌内、腹膜内或经肺递送。

[0069] 本发明化合物将通常以与(例如药学上可接受的)佐剂、稀释剂或载体混合的一种或多种例如药物制剂的形式给药，所述佐剂、稀释剂或载体可以适当考虑预定给药途径(例如局部给药于相关粘膜(包括肺)或优选皮肤)和标准制药或其它(例如化妆品)实践来选择。这样的药学上可接受的载体可以对活性化合物具有化学惰性，并且可以在使用条件下不具有有害副作用或毒性。这样的药学上可接受的载体也可以赋予活性成分的立即释放(immediate release)或改良释放(modified release)。

[0070] 适宜的药物制剂可以商购或以其它方式根据文献中描述的技术制备，例如，Remington The Science and Practice of Pharmacy,22nd edition,Pharmaceutical Press(2012)和Martindale-The Complete Drug Reference,38th Edition,Pharmaceutical Press(2014)以及其中提及的文件，所有文件中的相关公开内容并入本申请以作参考。否则，包含本发明化合物的适宜制剂的制备可以由本领域技术人员使用常规

技术无创造性地实现。

[0071] 本发明化合物可以是含水制剂的形式诸如乳液、悬浮液和/或溶液(例如(任选)缓冲的含水制剂,诸如含生理盐水的制剂、含磷酸盐的制剂(例如溶、含乙酸盐的制剂或含硼酸盐的制剂),或冻干粉。

[0072] 活性成分可以进一步与适当的赋形剂组合以制备:

[0073] • 凝胶制剂(对其适宜的凝胶基质材料包括纤维素衍生物、卡波姆和海藻酸盐、西黄蓍胶、明胶、果胶、卡拉胶、结冷胶、淀粉、黄原胶、阳离子瓜尔胶、琼脂、非纤维素多糖、糖类如葡萄糖、甘油、丙二醇、乙烯基聚合物、丙烯酸树脂、聚乙烯醇、羧基乙烯基聚合物,和特别是透明质酸);

[0074] • 洗剂(对其适宜的基质材料包括纤维素衍生物、甘油、非纤维素多糖、具有不同分子量的聚乙二醇和丙二醇);

[0075] • 糊剂或软膏剂(对其适宜的糊剂基质材料包括甘油、凡士林(vaseline)、石蜡、具有不同分子量的聚乙二醇等);

[0076] • 乳膏剂或泡沫剂(对其适宜的赋形剂(例如发泡剂)包括羟基丙基甲基纤维素、明胶、具有不同分子量的聚乙二醇、十二烷基硫酸钠、脂肪醇钠、聚氧乙烯醚磺酸盐、玉米蛋白粉和丙烯酰胺);

[0077] • 粉末气溶胶(对其适宜的赋形剂包括甘露醇、甘氨酸、糊精、右旋糖、蔗糖、乳糖、山梨醇和聚山梨酯,例如干粉吸入剂);和/或

[0078] • 液体(气溶胶)喷雾,用于口服使用或用于吸入(对其适宜的赋形剂包括粘度调节剂,诸如透明质酸、糖类诸如葡萄糖和乳糖、乳化剂、缓冲剂、醇、水、防腐剂、甜味剂、香料等)。

[0079] 视情况而定,以下物质也可以包括在这样的制剂中:保湿剂,诸如甘油(glycerol)、丙三醇(glycerin)、聚乙二醇、海藻糖、甘油、矿脂(petrolatum)、石蜡油、硅油、透明质酸及其盐(例如钠盐和钾盐)、辛酸/羊脂酸甘油三酯等;和/或抗氧化剂,诸如维生素和谷胱甘肽;和/或pH调节剂,诸如酸、碱和pH缓冲剂。此外,可以包括以下物质:表面活性剂/乳化剂,诸如十六烷醇(鲸蜡醇)、脂肪酸(例如硬脂酸)、十二烷基硫酸钠(月桂基硫酸钠)、山梨聚糖酯(例如山梨聚糖硬脂酸酯、山梨聚糖油酸酯等)、单酰基甘油酯(诸如单硬脂酸甘油酯)、聚乙氧基化醇、聚乙烯醇、多元醇酯、聚氧乙烯烷基醚(例如聚氧乙烯山梨聚糖单油酸酯)、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、乙氧基化脂肪酸酯、聚氧甘油酯、月桂基二甲基胺氧化物、胆汁盐(例如脱氧胆酸钠、胆酸钠)、磷脂、N,N-二甲基十二烷胺-N-氧化物、十六烷基三甲基溴化铵、泊洛沙姆、卵磷脂、固醇(例如胆固醇)、糖酯、聚山梨酯等;防腐剂,诸如苯氧基乙醇、乙基己基甘油等;和增稠剂,诸如牛磺酸丙烯酰基二甲基酯/VP共聚物。特别地,硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、十六醇、山梨聚糖硬脂酸酯、鲸蜡醇、辛酸/羊脂酸甘油酯等可以特别包括在乳膏制剂中。

[0080] 本发明化合物和(例如包含它们的如上所述的溶液、凝胶、乳膏剂、软膏剂、洗剂、泡沫剂、糊剂和/或干粉)可以进一步与适当的基质材料组合以制备用于给药在生物表面诸如皮肤或粘膜表面上的敷料(dressing)或治疗贴片(therapeutic patch)。这样的制剂因此可以用于浸渍基质材料,诸如纱布、无纺布或丝纸。治疗贴片或者可以是,例如,创可贴、面膜、眼膜、手膜、足膜等。

[0081] 凡士林可以用于将这样的敷料给予伤口，但是我们也已经发现基于PEG(例如PEG 400)的软膏剂可以与基质材料组合以在无需使用凡士林的情况下制备敷料。

[0082] 本发明化合物也可以与一种或多种选自以下的生长因子组合进行治疗：血小板型生长因子(包括血小板源性生长因子，PDGF)；骨肉瘤源性生长因子(ODGF)、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGFα和TGFβ)、成纤维细胞生长因子(αFGF、βFGF)、胰岛素样生长因子(IGF-I、IGF-II)、神经生长因子(NGF)、白细胞介素型生长因子(IL-1、IL-1、IL-3)、促红细胞生成素(EPO)和集落刺激因子(CSF)。

[0083] 根据本发明的另一方面，提供了(例如药物)组合物，其包含本发明化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂，诸如佐剂、稀释剂或载体。优选的制剂适于局部施用于例如粘膜(包括肺)，或更优选皮肤，并且因此包含局部可接受的佐剂、稀释剂或载体。

[0084] 因此，包含本发明化合物的制剂可适于通过直接局部给药该制剂(例如给药于肺、粘膜或优选给药于皮肤)而适用于、适合于和/或包装并且用于局部给药(例如，给药于肺、粘膜或给药于皮肤)，例如用于治疗病症，包括炎症、炎症性病症和/或特征在于炎症的病状(例如作为症状)。

[0085] 关于本发明的这个方面，为避免疑义，本发明的局部制剂(topical formulation)可用于本申请所述的任何和所有病状，包括治疗炎症，治疗任何和所有炎症性病症，和/或治疗任何和所有特征在于炎症的病状，如前所述提及、定义或描述的。

[0086] 本发明的局部(例如基于液体或基于(例如含水)溶液)制剂可特别用于伤口恢复，并且可减轻疼痛(包括酸痛)，特别是与伤口本身和伤口愈合过程相关的瘙痒/发痒。本发明的这种局部制剂可特别用于预防和/或抑制体液从伤口渗出，特别是在急性炎症阶段期间，例如在烧伤或伤口发作后的最初48小时期间。这防止感染和其它生理反应的风险。本发明的这种局部制剂也可特别用于预防和/或抑制疤痕和黑色素沉着(见上文)，无论是否与伤口有关。

[0087] 活性成分的给药可以是连续的或间歇的。给药模式也可以由给药的时机和频率确定，但是在治疗性处理炎症的情况下也取决于病状的严重程度。

[0088] 取决于待治疗的病症和患者以及给药途径，本发明化合物可以按不同的治疗有效剂量给予有其需要的患者。

[0089] 类似地，活性成分在制剂中的量将取决于病状的严重程度，和取决于待治疗的患者，但是可以由本领域技术人员确定。

[0090] 在任何事件中，取决于病状的严重程度和给药途径，医学从业者或其它技术人员将能够按常规确定最适宜于个体患者的实际剂量。本申请提及的剂量是平均情况的示例；当然可以存在个别情况，在这些情况中较高或较低的剂量范围是有利的，这些也在本发明的范围内。

[0091] 剂量可以每天给药一次至每天给药四次。

[0092] 本发明化合物在含水溶液产物中的适当浓度可以是约0.01(例如约0.1)至约15.0mg/mL，在所有情况中都作为游离(非盐)肽计算。

[0093] 本发明化合物的适当的局部剂量为约0.05至约50μg/cm^{2}的治疗面积，诸如约0.1(例如约0.5)至约20μg/cm^{2}的治疗面积，包括约1至约10μg/cm^{2}的治疗面积，诸如约5μg/cm^{2}的治疗面积，在所有情况中都作为游离(非盐)肽计算。

[0094] 我们优选包含本发明化合物的制剂的pH值在约1.0至约9.0(例如约3.0至约8.0)的范围内。然而,我们已发现,本发明化合物在所有pH值(包括中性和碱性pH)比例如MAP和由mefp-1十肽序列构成的分离的化合物明显更稳定。

[0095] 在任何事件中,在本发明的内容中给予哺乳动物特别是人的剂量应该足以在合理的时间表(如上文描述)内在哺乳动物中产生治疗响应。本领域技术人员将会认识到,对精确剂量和组合物以及最适当的递送方案的选择也将尤其由以下影响:制剂的药理学性质,待治疗的病状的性质和严重程度,和接受者的身体状况和精神敏度,以及待治疗患者的年龄、病状、体重、性别和响应,和疾病的分期/严重程度,以及患者之间的遗传差异。

[0096] 在本申请所述的用途和方法中,本发明化合物也可以与用于治疗炎症和/或炎症性病症的一种或多种活性成分(另一种抗炎剂)组合。这样的患者因此也可以(和/或已经)接受基于给药一种或多种这样的另一种活性成分的疗法,这表示在用本发明化合物治疗之前、除用本发明化合物治疗之外、和/或在用本发明化合物治疗之后接受处方剂量的一种或多种本申请提及的那些活性成分。

[0097] 可以在炎症的治疗中与本发明化合物组合使用的这样的抗炎剂包括用于治疗炎症和/或特征在于炎症作为其症状之一的疾病的治疗剂。取决于待治疗的病状,这样的抗炎剂也可以包括NSAID、白三烯受体拮抗剂(例如孟鲁斯特(montelukast),例如如下文所述)、皮质类固醇、镇痛剂和某些酶,诸如胰蛋白酶,例如如下文所述。本发明化合物也可以与白三烯B4(LTB4)组合。

[0098] 在本文中,本发明化合物也可以与一种或多种贻贝粘附蛋白(MAP)组合用于治疗炎症,其包括可以源自贻贝物种的任何粘附蛋白,诸如紫贻贝(Mytilus edulis)(蓝贻贝(blue mussel)),包括全长蛋白,包括所有亚型,其源自或可以源自贻贝,诸如胶原蛋白pre-COL-P、pre-COL-D和pre-COL-NG,贻贝足丝基质蛋白PTMP和DTMP,和更优选为mfps或mefps,诸如mefp-2、mefp-3、mefp-4、mefp-5、mefp-6,和尤其是mefp-1,并且包括任何这些蛋白质的混合物或组合,诸如mefps。虽然上述MAP亚型的混合物/组合可以根据本发明提供,但是我们优选的是主要的MAP亚型(例如mefp-1)的纯度为任何这样的混合物的总量的至少25重量%。

[0099] 天然存在的MAP可以例如通过混合吸附色谱(参见中国专利号ZL200710179491.0)、通过羧基甲基离子交换色谱(参见中国专利号ZL200710179492.5)和/或通过盐析和透析(中国专利号ZL200910087567.6)制备。MAP的商业来源包括USUN Bio Co.(中国;作为MAP Medical Device®出售)、BD Biosciences(美国)、Kollodis(韩国)和Biopolymer(瑞典)。MAP或者可以使用已知的重组DNA方法制备。

[0100] MAP的(例如药学上可接受的)衍生物也可以与本发明化合物组合,并且包括具有下述分子量的化合物:例如分子量范围为约500Da至约2000(例如约1500,诸如约1200,包括约800)Da,所述化合物可以允许较容易穿透生物膜,诸如皮肤屏障或粘膜表面。这样的衍生物也可以包括含有氨基酸序列的其它化合物,所述序列与已经在天然存在的MAP中确定的序列相同或者是其(例如次要)变体,并且所述化合物可以通过化学和/或生物方法(例如天然存在的MAP的化学修饰,或直接合成)合成。我们用"天然存在的MAP中确定的氨基酸序列的(例如次要)变体"表示那些序列中的变化,所述变化不会负面地影响有关天然存在的MAP的必要性质达可测量的程度。

[0101] 例如,如上所述,具有如下序列的分离的十肽化合物:Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys(mefp-1十肽)是药学上可接受的低分子量的MAP衍生物,其可以与本发明化合物组合。

[0102] 这种MAP衍生物可以单独用于根据本发明的组合产品,或者与一种或多种其它这种衍生物和/或一种或多种前述全长MAP组合使用。

[0103] MAP及其衍生物在水溶液局部制剂产品中的适宜浓度可以是约0.01(例如约0.1)至约15.0(例如约1.5)mg/mL,并且适宜的pH值在约1.0至约7.0(例如约3.0至约6.5)的范围内,不论所用的制剂是组合制剂还是如上所述的套装药盒(kit ofparts)。这种水溶液的适宜商业来源包括中国江苏省江阴贝瑞森生化技术有限公司(USUN Bio Co.Jiangyin,Jiangsu Province,China)。

[0104] MAP和其衍生物的适宜的局部剂量在如下范围内:约0.1至约50μg/cm^2的治疗区域,诸如约1至约20μg/cm^2的治疗区域,包括约2至约10μg/cm^2的治疗域,诸如约5μg/cm^2的治疗区域。

[0105] 已经发现本发明化合物和mefp-1的组合在治疗炎症性肠病诸如溃疡性结肠炎方面是特别有用的,特别是在患有这种疾病的患者中阻止出血方面。

[0106] 可以与本发明化合物组合的其它优选药剂包括LTB4(用于治疗伤口和烧伤)、孟鲁司特(一般用于治疗炎症)和胰蛋白酶(用于治疗与例如病毒感染相关的粘膜炎症)。

[0107] 本发明化合物也可以与其它治疗剂组合,已知所述其它治疗剂当给药时会引起作为副作用的炎症。

[0108] 当本发明化合物可以与其它治疗剂以该方式“组合”时,活性成分可以在同一制剂中共同给药,或者在不同制剂中分别给药(同时或依序)。

[0109] 提供这样的组合产品以给药本发明化合物与其它治疗剂,因此这样的组合产品可以体现为单独的制剂,其中那些制剂的至少一种包含本发明化合物,并且至少一种包含其它治疗剂,或者可以体现(即配制)为组合制剂(即体现为包含本发明化合物和其它治疗剂的单一制剂)。

[0110] 因此,进一步提供了:

[0111] (1)药物制剂,其包含:本发明化合物;另一种抗炎剂,或已知造成作为副作用的炎症的药剂;和药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体(所述制剂在下文称为“组合制剂”);和

[0112] (2)套装药盒,其包含以下组分:

[0113] (A)药物制剂,其包含:本发明化合物与药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体的混合物;和

[0114] (B)药物制剂,其包含:另一种抗炎剂、或已知造成作为副作用的炎症的药剂,与药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体的混合物,

[0115] 其中组分(A)和(B)各自以适于与另一种联合来给药的形式提供。

[0116] 根据本发明的另一方面,提供了制备如上定义的套装药盒的方法,所述方法包括使如上定义的组分(A)与如上定义的组分(B)组合,因此使两种组分适于彼此联合给药。

[0117] 通过使两种组分彼此“组合”,我们包括套装药盒的组分(A)和(B)可以是:

[0118] (i)作为单独的制剂(即彼此独立地)提供,随后将单独的制剂组合在一起以在组合疗法中彼此联合使用;或

[0119] (ii)包装并且作为“组合包装”的单独组分一起呈现,以在组合疗法中彼此联合使用。

[0120] 因此,进一步提供了套装药盒,其包括:

[0121] (I)本申请定义的组分(A)和(B)之一;连同

[0122] (II)将所述组分与两种组分中的另一种组分联合使用的说明书。

[0123] 本申请所述的套装药盒可以包含多于一种的包括适当量/剂量的本发明化合物的制剂,和/或多于一种的包括适当量/剂量的另一种抗炎剂的制剂,以提供重复剂量。如果提供多于一种的制剂(包含任一种活性化合物),则就任一种化合物的剂量、化学组成和/或物理形式而言,这种制剂可以是相同的,或可以是不同的。

[0124] 关于本申请所述的套装药盒,对于“与.....组合给药”,我们包括在治疗相关病状的整个过程中依序、分别和/或同时给药包含本发明化合物和另一种抗炎剂的各个制剂。

[0125] 因此,就根据本发明的组合产品而言,术语“与.....组合给药”包括将组合产品的两种组分(本发明化合物和另一种抗炎剂)一起给药或在时间上足够接近地给药(任选重复地),以使得在相关病症的治疗过程中对于患者的有益效果能够大于在相同的治疗过程中在不存在其它组分下将包含本发明化合物的制剂或包含另一种药剂的制剂相比单独给药(任选重复地)得到的所述效果。确定组合是否在特定病状的治疗过程中提供关于特定病状的较大有益效果将取决于待治疗或预防的病状,但可以通过本领域技术人员常规地实现。

[0126] 此外,在根据本发明的套装药盒的情况下,术语“与.....联合”包括两个制剂中的一种或另一种可以在给药另一种组分之前、在给药另一种组分之后和/或在给药另一种组分的同时给药(任选重复地)。当在本申请中使用时,术语“同时给药”和“与.....同时给药”包括单独剂量的本发明的相关化合物和另一种抗炎剂在彼此间隔的48小时(例如24小时)内给药。

[0127] 在本发明的另一方面,提供了制备如上定义的组合制剂的方法,所述方法包括使本发明化合物、另一种抗炎剂或已知造成作为副作用的炎症的药剂和至少一种(例如药学上可接受的)赋形剂组合。

[0128] 当措辞“约”用于本申请时,例如在量的上下文中,诸如活性成分的浓度和/或剂量、分子量或pH,应了解的是,这样的变量是近似值,就其本身而言可以在下述范围内变化:本申请指定的数字±10%,例如本申请指定的数字±5%,优选为本申请指定的数字±2%(例如±1%)。在这方面,术语“约10%”表示例如数字10周围的±10%,即,在9%和11%之间。

[0129] 本发明化合物具有的优势是,它们用于多种特征在于炎症的病状,无论该病状本身是器质性炎症性疾病还是与炎症相关或特征在于炎症(例如伤口、烧伤或病毒感染)。

[0130] 本发明化合物还具有下述优势:与现有技术中已知的类似化合物诸如MAP和分离的mefp-1十肽相比,本发明化合物对各种pH(包括中性和碱性pH)下的诸如氧化等过程具有物理化学稳定性。

[0131] 本申请所述的用途和方法还可以具有下述优势,即,在上文提及的病状的治疗中,与现有技术中已知用于治疗炎症性病症的类似方法(治疗),对于医生和/或患者而言本申请所述的用途和方法较方便,较有效,毒性较小,具有较宽范围的活性,效力较强,产生较少

的副作用,或者可以具有其它有用的药理学性质,无论用于治疗炎症、炎症性病症、或特征在于炎症的病症作为症状(包括伤口)还是用于治疗其它方面。

[0132] 本发明通过以下实施例进行说明,其中,在小鼠伤口模型中,图1显示了用各种试验化合物测试的根据实施例1从来自在小鼠中诱导的气囊(air pouch)的渗出液获得的各种炎症性标志物的ELISA试验结果;图2显示了用各种试验化合物治疗时对小鼠造成的伤口急性愈合的作用;和图3至5显示了从取自那些小鼠各自伤口的样品中获得的炎症性标志物(分别为Hyp、VEGF和TNF-β1)的ELISA试验结果。

实施例

[0133] 实施例1

[0134] 合成Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-Tyr-Lys

[0135] 将Fmoc-Lys-Boc-Wang树脂(0.3mmol/g;GLS180322-41301,GL Biochem,Shanghai,China)加载到反应柱中。

[0136] 将2升二氯甲烷(DCM;Shandong Jinling Chemical Industry Inc.Co.,Shandong,China)添加至柱中并且使树脂浸泡约半小时。然后将DCM抽出,将2升N,N-二甲基甲酰胺(DMF;Shandong Shitaifeng Fertilizer Industry Inc.Co.,Shandong,China)用于洗涤柱3次。

[0137] 将200mL哌啶(Shanghai Li Ming Industry and Trade Co.,Ltd.,China)与1升DMF混合并且用作脱保护溶液。将液体在15分钟之后排出,将柱用DMF洗涤6次。

[0138] 将69g Fmoc-Tyr(tBu)-OH(GLS170916-36901,GL Biochem)和48g2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基四氟硼酸铵(TBTU;GL Biochem)溶解于300mL DMF中并且添加至反应柱中。然后添加53mL N,N-二异丙基乙胺(DIPEA;Suzhou Highfine Biotech Co.Ltd,Jiangsu,China)。反应时间是1小时。

[0139] 取样,将茚三酮(Shanghai Shanpu Chemical Co.Ltd,China)用于检测反应何时完成。此时,将液体排出并且将残留物用DMF洗涤3次。

[0140] 重复上述偶联步骤以将相同量的剩余氨基酸偶联:Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-4-Hyp(tBu)-OH、Fmoc-4-Hyp(tBu)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH和Fmoc-Ala-OH。

[0141] 在反应序列结束时,以上述方式添加20%在DMF中的哌啶作为脱保护溶液。然后将液体在15分钟后排出,并且将柱分别用DMF、DCM和甲醇各自洗涤3次。

[0142] 将液体排出以得到树脂结合的多肽。

[0143] 添加适量的裂解液,所述裂解液由95%三氟乙酸(TFA),2.5%水和2.5%三异丙基硅烷(Tis)构成,以浸没树脂结合的多肽。将混合物置于振荡器上并且在30℃至35℃温育2小时。然后将树脂通过过滤除去。

[0144] 向滤液中添加无水冰乙醚,离心,弃去上清液。将所得物用无水冰乙醚洗涤3次。将分离的肽通过干燥剂(desiccation)而干燥,得到128g粗制多肽。将粗制化合物使用阴离子交换树脂脱盐、分析且并冷冻干燥。纯化后得到约70.7g纯化的肽,重新测试进行确认。

[0145] 将1mg粗制产物溶解于1mL乙腈和水的混合物(1:3)中并且使用P3000A HPLC泵和LC3000半制备装置(制备柱型号:GS-120-10-C18-AP 30mm;Beijing Chuangxintongheng

Science&Technology Co.,Ltd.,Beijing,China)检测。计算适当的洗脱梯度,在14.351min用LCMS(分析柱型号:GS-120-5-C18-BIO,4.6*250mm;检测:在220nm的紫外线;溶剂A:0.1%在MeCN中的TFA,溶剂A:0.1%在水中的TFA;流速:1.0mL/min;体积:10μL)检测到目标峰。

[0146] m/z 592.65$[M+2H]^{2+}$(97.89%)。

[0147] 实施例2

[0148] 气囊模型

[0149] 重量在20和30g之间的健康成年雄性C57BL/6小鼠由南京大学南京生物医药研究院(Nanjing Biomedical Research Institute)(NBRI)提供。在进行任何实验之前,将小鼠安置在标准化的条件下(在22±2℃的恒定温度,其中亮暗各自交替12小时的时间段),小鼠以标准小鼠饮食与水喂食达约一周。

[0150] 使用腹膜内注射3%水合氯醛(Sinopharm Chemical Reagent Co.,Ltd.,Shanghai,China);1mL/10g体重)来进行全身麻醉。在无菌空气注射之前1天,剃掉整个背部的毛发并脱毛。

[0151] 气囊如下产生:将无菌空气(5mL)皮下注射进小鼠的肩胛区。3天之后,另进行一次注射空气(3mL)以维持气囊。为了诱发急性炎症,在该最终注射之后3天,使动物接受注射无菌卡拉胶溶液(CP Kelco,Taixing,Jiangsu Province,China;1%,0.5mL;通过将0.1g卡拉胶粉末添加到包含10mL的0.9%盐水溶液的烧杯中并搅拌进行制备)。在将卡拉胶注射进皮下气囊之前的1小时和之后的23小时,将小鼠用测试样品或媒介物预处理。在注射卡拉胶之后24小时,将动物处死。

[0152] 皮肤活组织检查从气囊获取。将活组织检查的一部分固定于福尔马林(通过将超纯水添加到50mL的40%甲醛溶液(Nanchang Rain Dew Experimental Equipment Co.,Ltd.,Nanchang,Hubei Province,China)以达500mL的总体积进行制备)中并通过组织埋进石蜡、切片并染色进行分析。

[0153] 将空腔用4mL无菌磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4;通过将4g的NaCl、0.1g的KCl、1.749g的$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$和0.1g的KH_2PO_4溶解于超纯水中,用HCl将pH调节至7.4和用水稀释至500mL的总体积进行制备)洗涤。

[0154] 溶解于收集渗出物并且量化其体积。将渗出物以3000rpm在4℃离心10分钟,收集上清液并且在-20℃储存,以便使用标准ELISA测试试剂盒(来自Beijing 4A Biotech Co.,Ltd.(Beijing))和ELISA读取器(SH-1000Hitachi,Japan)对以下进行ELISA分析:组织坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素1-β(IL-1β)、白细胞介素6(IL-6)。

[0155] 在进行一些初步实验以验证模型之后,进行下述实验,即其中根据以下表1给药测试样品或媒介物来处理小鼠。

[0156] 在表1中,MAP溶液如下制备。在中国山东省沿海区域采集蓝贻贝。收集贻贝足丝,将其切成小片,并将其在包含5%乙酸在4mol/L含水脲中的提取缓冲液中进行均化。在离心之后收集粗制提取物,然后通过液相色谱纯化。将纯化蛋白质(半成品;浓度8mg/mL;通过HPLC测得的纯度为91.72%;pH 4.2)在0℃储存。以下使用的溶液如下制备:将盐水溶液添加到半成品中以获得表1中所述的浓度。

[0157] 由mefp-1十肽序列Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lys构成的分离的化合物(下文中“化合物A”)购自Innovagen(Innovagen AB,Lund,Sweden)。将其作为粉末储

存在-20℃并且溶解于盐水中，浓度为0.6mg/ml，pH为5.5。注射0.5mL溶液。

[0158] 本发明化合物(化合物B)由GL Biochem(Shanghai)Ltd.根据上述实施例1合成，并且也作为粉末储存在-20℃并溶解于盐水中，浓度为0.6mg/ml，pH为5.5。注射0.5mL溶液。

[0159] 表1中列出的所有物质通过直接注射入气囊进行局部给药。

[0160] 表1

[0161]

组别	小鼠数目	药物浓度(mg/mL)	剂量/小鼠	治疗时机(卡拉胶注射之前)
对照(仅空气注射)	5	生理盐水	4.5 mg (NaCl)	n/a
模型(卡拉胶注射)	5	生理盐水	4.5 mg (NaCl)	1 小时
MAP	5	0.6	300 μg	1 小时
化合物 A	5	0.6	300 μg	1 小时
化合物 B	5	0.6	300 μg	1 小时

[0162] 分析组织学标本，并如下评估炎症评分、活性评分(即，病理性载玻片中显示的中性粒细胞的数量和密度，表明炎症程度，并且在开放性伤口和感染性疾病的情况下的感染程度)、水肿评分和成纤维细胞增殖评分。

[0163] 在光学显微镜下观察HE染色的切片，并且根据感知的炎症水平评分(1、2或3分)(在仅显示该区域中散布的少量炎症性细胞的情况下-1分(轻度)；在其中观察到许多炎症性细胞的情况下-2分(中度)；和在具有弥漫性浸润的情况下-3分(重度)。在整体观察后，采用类似的评分系统用于水肿水平(最严重的为3分和轻度的为1分)。中性粒细胞的评分采用与炎症性细胞的方法相同的方法。

[0164] 表2

[0165]

组别	炎症评分	水肿评分	纤维组织增生评分	合计
对照	1	1.2	0.8	2.2
模型	2.2	1.8	0.6	4
MAP	2	1.2	0.4	3.2
化合物 A	1.6	1.8	0.2	3.4
化合物 B	1.6	1.2	1.00	2.8

[0166] 渗出物的TNF-α、IL-6和IL-1β的ELISA试验结果如图1图示。结果显示，化合物B具有非常强的抗炎作用。

[0167] 实施例3

[0168] 急性伤口模型

[0169] 6-8周龄雄性C57BL/6小鼠由Changzhou Cvens Experimental Animal Co.Ltd(Changzhou,Jiangsu Province,China)提供。在进行任何实验之前,将小鼠安置在标准化的条件下(在22±2℃的恒定温度,其中亮暗各自交替12小时的时间段),小鼠以标准小鼠饮食与水喂食达约一周。

[0170] 使用腹膜内注射3%水合氯醛(1mL/10g体重)来进行全身麻醉。用婴儿剃发器将背部上的毛发剃掉,并用乳膏剂脱毛。用75%酒精将皮肤区域擦拭和消毒两次。

[0171] 使用具有18mm直径的EMS皮肤取样器(Electron Microscopy Sciences,P.O.Box 550,1560Industry Road,Hatfield,PA,USA)在背部上产生圆形伤口。移除全层皮肤,伤口的深度达到筋膜。伤口保持开放,不进行缝合。

[0172] 将不同药物以50μL/伤口局部给药,从第0天至第12天每天给药一次,如以下表3所示。对照组不具有被施加的伤口。给予模型组相同量的生理盐水。每组有8只小鼠。

[0173] 重组人表皮生长因子(rhEGF,Shanghai Haohai Biological Technology Co.Ltd,23/F,Shanghai,China)根据制造商的说明购买和制备。将冻干的rhEGF粉末(100000IU/小瓶)溶解于20mL生理盐水中,制成浓度为5000IU/mL的溶液。该实验的rhEGF的工作剂量为1285IU/伤口。

[0174] 对于该实验,化合物A得自GL Biochem(Shanghai)Ltd。将肽粉末储存在-20℃并且以61.8μg/mL(化合物A)和61μg/mL(化合物B)的浓度溶于盐水中。将50μL溶液施用于伤口表面上。

[0175] 表3

[0176]

组别	样品	剂量
对照	盐水	/
模型	模型 + 盐水	/

[0177]

rhEGF	模型 +rhEGF	1285 IU/小鼠
化合物 A	模型 + 化合物 A	3.09 μg /小鼠
化合物 B	模型 + 化合物 B	3.05 μg/小鼠

[0178] 在药物给药后,用纱布和透明敷料敷裹伤口。从第0天每隔一天为每个伤口拍摄照片。将照片扫描进计算机中,使用ImageJ图像分析软件(National Institutes of Health,China)计算伤口面积。

[0179] 未愈合的伤口面积以原始伤口面积的百分比表示:

[0180] $A_t/A_0\times100\%$,

[0181] 其中A_0和A_t分别指第0天的初始面积和测量日期(时间t)的伤口面积。

[0182] 在伤口伤害后第4天和第7天采集样品。处死小鼠并且通过用于产生伤口的同一皮肤取样器取出伤口组织。然后,从样品中心切下5mm组织,将其在10%中性缓冲福尔马林(Nanchang Rain Dew Experimental Equipment Co.,Ltd.,Nanchang,Hubei Province,

China)中保存,并通过组包织埋(HE)进石蜡、切片并染色进行分析。

[0183] 在光学显微镜下分析HE和Masson染色的石蜡切片。评估皮肤再生、成纤维细胞增殖、胶原蛋白再生评分和炎症评分。

[0184] 将剩余的样品储存在-80℃进行进一步分析。将组织切割成小片,添加液氮以增加脆度。将9mL生理盐水添加到1g组织中,然后将其使用组织破碎仪(ShanghaiJingxin Industrial Development Co.,Ltd.,Shanghai,China)以55Hz研磨60秒,然后以8000rpm在4℃离心10分钟。

[0185] 收集上清液,提取的蛋白质用于通过使用标准ELISA测试试剂盒和ELISA读取器(SH-1000Hitachi,Japan)。对血管内皮生长因子(VEGF)、转化生长因子β1(TGF-β1)和羟基脯氨酸(Hyp)进行测定。ELISA试剂盒购自Beijing 4A Biotech Co.,Ltd.(Beijing,China)。

[0186] 化合物B对伤口愈合的影响示于表4和图2中,其显示了不同组中初始伤口的剩余伤口面积的比率(±SD,在表4的情况下)。

[0187] 表4

[0188]

组别	模型	rhEGF	化合物 A	化合物 B
第 0 天	86.4 ± 5.4	82.0 ± 2.2	77.2 ± 4.1	79.4 ± 3.4

[0189]

第 1 天	100 ± 7.2	100 ± 9.9	100 ± 17.1	100 ± 4.5
第 2 天	96.7 ± 3.6	94.1 ± 4.3	81.2 ± 11.2	96.7 ± 5.6
第 3 天	89.6 ± 3.1	78.6 ± 7.3	74.2 ± 0.9	76.7 ± 4.8
第 4 天	73.9 ± 3.8	61.5 ± 3.3	60.9 ± 7.3	66.5 ± 1.4
第 5 天	66.2 ± 5.9	53.0 ± 1.0	50.5 ± 11.3	55.8 ± 1.3
第 6 天	56.2 ± 5.3	47.2 ± 5.8	45.8 ± 4.7	51.9 ± 1.7

[0190] 上述数据显示,低剂量的化合物B改善了伤口愈合。改善率定义为(治疗组中的剩余伤口比/模型组中的剩余伤口比)×100%。在第4天,化合物B组的改善率约为10%。

[0191] 伤口Hyp(μg/mg)含量作为胶原蛋白再生的指标,示于下表5和图3中。

[0192] 表5

[0193]

		对照	模型	rhEGF	化合物 A	化合物 B
平均值	第 4 天	4.070	1.551	1.808	3.676	2.039
	第 7 天	4.070	2.355	2.679	2.694	2.810
SD	第 4 天	0.980	1.100	0.790	0.951	0.965
	第 7 天	0.980	1.021	0.594	0.215	1.067

[0194] VEGF含量(pg/g)的结果列于下表6中,并且在图4中图示。

[0195] 表6

[0196]

		对照	模型	rhEGF	化合物 A	化合物 B
平均值	第 4 天	9091.3	6598.0	7614.2	5709.7	10076.3
	第 7 天	9091.3	6500.1	5710.2	7949.5	8117.9

[0197]

SD	第 4 天	1575.9	897.4	3362.9	3229.8	976.1
	第 7 天	1575.9	2375.4	2306.1	1734.8	1163.6

[0198] 结果显示,与模型组相比,化合物B使受伤组织中VEGF的产生增加约56.7%。

[0199] TGF-β1含量(pg/g)的结果列于下表7中,并且在图5中图示。

[0200] 表7

[0201]

		对照	模型	rhEGF	化合物A	化合物B
平均值	第4天	29832.2	15764.4	18190.6	11866.2	20571.8
	第7天	29832.2	15639.4	15443.1	18074.8	18659.6
SD	第4天	6554.9	1946.1	8564.5	7216.3	2310.6
	第7天	6554.9	5141.7	5482.1	3477.0	1123.0

[0202] 实施例4

[0203] 治疗过敏性皮炎的液体喷雾剂。

[0204] 将化合物B(参见上述实施例1)溶解于注射用水(WFI;由TC-RO-0.25/h-2水处理系统,Yangzhou Tiancheng Water Treatment Devices&Engineering Co.,Ltd.,Yangzhou,China制备)。浓度是0.3mg/mL。

[0205] 该研究中登记的受试者具有过敏性皮肤。在治疗之前,患者出现包括皮肤发红、发痒和肿胀在内的症状。受试者需要在面部清洁后的早晨和晚上使用液体喷雾剂。

[0206] 受试者都感觉在第一次使用后8分钟内发痒得到缓解。在使用1天之后,毛细血管充血的症状消失,患者的面部不再发红和肿胀。

[0207] 该实验表明,包含本发明化合物的液体喷雾剂迅速缓解了发痒并且减少了由过敏引起的发红、肿胀和其它症状。

[0208] 实施例5

[0209] 治疗闭合性粉刺的乳膏剂

[0210] 化合物B(10mg;参见上述实施例1)首先溶解于WFI(10g)中。

[0211] 然后制备包含脱水山梨糖醇硬脂酸酯(2g)、鲸蜡醇(4g)、辛酸/癸酸甘油酯(6g)和单硬脂酸甘油酯(3g)(均来自Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd.)的混合物,将其搅拌并且加热至85℃以使混合物完全熔化。

[0212] 将甘油(5g;Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd.)和丙烯酰基二甲基牛磺酸铵/VP共聚物(0.13g;Clariant Chemical(Guangzhou)Co.,Ltd.,China)与68.86g WFI混合。将该混合物搅拌并且加热至85℃,以得到均匀的胶体悬浮液。

[0213] 将共聚物/水的混合物添加至含有山梨糖醇硬脂酸酯的混合物中,然后使用乳化装置快速搅拌5分钟。将所得乳液冷却至室温。

[0214] 然后伴随搅拌将化合物B溶液添加至所得混合物中,得到最终乳膏剂。最终乳膏剂中化合物B的浓度为0.1mg/g。

[0215] 具有闭合性粉刺(堵塞的毛孔)和处于痤疮急性发作期的受试者参加该研究。症状包括由角质形成细胞阻塞的皮脂腺,形成稍硬的肿块和突出的白头。

[0216] 面部清洁之后,早晨和晚上都均匀涂抹该乳膏剂。肿块在使用1天之后消失,表明

含有本发明化合物的乳膏剂可用于治疗闭合性粉刺。

[0217] 实施例6

[0218] 测定本发明化合物的抗氧化能力

[0219] 化合物B的抗氧化能力使用2,2-二苯基-1-(2,4,6-三硝基苯基)肼(2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl,DPPH)测定法测定。

[0220] 化合物A和B如上述实施例3中所述得到。将肽粉末储存在-20℃并且以如下所示的浓度溶解于盐水中。DPPH购自Sigma-Aldrich China,Shanghai。以下使用和鉴定的其它试剂购自Shanghai Aladdin Bio-Chem Technology Co.Ltd.,China。

[0221] DPPH方法是测定抗氧化能力最常用的方法之一。DPPH是稳定的以氮为中心的自由基,其溶液为深紫色和在517nm处具有最大吸收峰。当反应体系中存在自由基清除剂时,自由基清除剂可与DPPH·的单个电子配对,并且517nm处的吸收峰逐渐消失。

[0222] 颜色变化程度与配对电子的数目具有化学计量关系。因此,抗氧化活性可以根据吸光度的变化测量。抑制率越大,抗氧化能力越强。

[0223] 称取6mg DPPH并且置于100mL容量瓶中。将其用80％乙醇定容以制备浓度为0.06mg/mL的溶液。将其在4℃于暗处储存。

[0224] 肽溶液通过将0.6g肽粉末溶解于1mL蒸馏水中来制备。

[0225] 将200μL肽溶液添加至3.8mL DPPH溶液中。将溶液在室温于暗处保持1.5小时。测量517nm处的吸光度并且以A1表示。空白对照样品的吸光度以A0表示。因此,剩余DPPH的百分比计算如下:清除率(％)＝[A0-A1]/A0×100

[0226] 化合物A的DPPH清除率是52.11％。化合物B的DPPH清除率低得多,为8.9％,表明抗氧化能力得到显著改善。

[0227] 实施例7

[0228] 本发明化合物的稳定性

[0229] 化合物A和B(如上述实施例1和3中所述得到)的稳定性如下测试。

[0230] 将10mg化合物各自溶解于1mL蒸馏水中,制成浓度为10mg/mL的储备溶液。然后,将200μL储备溶液用20mM具有如下表8所示不同pH的磷酸盐缓冲液(PB;Sigma-Aldrich China)稀释。

[0231] 表8

[0232]

化合物 A			
编号	pH 值	缓冲液体积	测试的最终 pH
1	5.3	1800 μL	5.3
2	7.2	1800 μL	7.2
3	8.1	1800 μL	8.1
化合物 B			
编号	pH 值	缓冲液体积	测试的最终 pH
4	5.3	1800 μL	5.3
5	7.2	1800 μL	7.2
6	8.2	1800 μL	8.1

[0233] 将上述所有样品在制备后在超净工作台上通过0.22μm膜(SLGV033RS;Sigma-Aldrich China)过滤以除去溶液中的潜在细菌。

[0234] 上述所有样品都在室温储存,3天之后,经HPLC初步样品分析后转移至45℃烘箱中(柱:Angilent ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6×250mm;5μm)(SN:USNH008244);缓冲液:A:0.1%在水中的TFA;B:0.1%在ACN中的TFA;梯度:0-25分钟:5%-30%B;25-30min:100%B;流速:1mL/min;检测波长:220nm;样品体积:20μL)。

[0235] 上述样品的稳定性通过观察颜色(表9)、HPLC峰面积(表10)和纯度(表11)的变化来研究。所有样品的pH值在测试期间测量为稳定的。

[0236] 表9

[0237]

	化合物 A			化合物 B		
天	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
0	NO	NO	NO	NO	NO	NO
1	NO	+	++	NO	NO	NO
3 (转至45°C)	NO	+	++	NO	NO	NO
6 (45°C)	NO	++	++	NO	NO	NO

[0238] NO表示没有观察到颜色变化。+是指观察到轻微的颜色变化。++是指观察到显著的颜色变化。

[0239] 如表9所示,化合物A溶液随时间变得较暗,特别是在较高的pH。其余样品的颜色保持不变。

[0240] 表10

[0241]

	化合物A			化合物B		
天	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
0	100%	100%	100%	100%		100%
1	100.1%	89.0%	64.8%	100.0%		98.9%
3（转至45°C)	100.3%	41.7%	21.7%	99.9%	100%	99.2%
6 (45°C)	99.6%	11.5%	3.8%	102.4%	100.6%	97.0%

[0242] 上表10中表示为第0天结果的面积％的峰面积表示肽浓度。如表10所示，化合物B的三个样品的峰面积几乎没有变化。对于化合物B，pH为5的峰面积没有变化，但在pH为7.2和pH为8.1时，峰面积显著减少，这表明肽的浓度随时间而降低。

[0243] 表11

[0244]

	化合物A			化合物B		
天	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
0	99.4%	98.9%	96.3%	99.2%	99.6%	99.5%
1	99.2%	92.1%	61.0%	99.2%	99.3%	99.4%
3（转至45°C)	99.4%	94.8%	52.5%	98.4%	98.7%	98.4%
6 (45°C)	98.0%	13.8%	3.9%	99.0%	98.2%	96.4%

[0245] 当肽被氧化时，HPLC峰移位并且肽的纯度降低。如上表11所示，结果表明大多数化合物A在pH为7.2和pH为8.3时被氧化。

[0246] 从上述结果可以看出，本发明化合物在所有pH值都是稳定的，但化合物A仅在pH为5.3是稳定的。

[0247] 实施例8

[0248] 化合物B/孟鲁司特敷料

[0249] 软膏如下制备：首先伴随搅拌将孟鲁司特钠(200mg；Arromax Pharmatech Co.，Ltd，Suzhou，China)溶解于聚乙二醇400(20.0g；Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)中。然后将化合物B(16mg；参见上述实施例1)添加至该溶液中。

[0250] 将聚乙二醇3350(21.3g；Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)伴随搅拌通过加热至60℃溶解于聚乙二醇400(58.5g)中。该溶液冷却至40-50℃之后，伴随搅拌向其中添加包含化合物B和孟鲁司特的溶液，然后混合5至10分钟。冷却至室温得到最终产物。

[0251] 将软膏用平板均匀地涂在纱布上。冷却至室温得到最终敷料。

[0252] 实施例9

[0253] 化合物B/胰蛋白酶喷雾剂

[0254] 将化合物B(30mg；参见上述实施例1)溶解于10mL水中。将胰蛋白酶(30mg；Sichuan Deebio Pharmacutical Co.Ltd.，Guanhan，Sichuan，China)溶解于另外10mL水中。

[0255] 将氯化钙(0.1g)、乙醇(0.5g、水溶性甲醇(0.01g)、乳酸0.01g和甘油(30g)(均来

自Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd)在49.32mL水中混合在一起。

[0256] 伴随搅拌将含有化合物B和胰蛋白酶的溶液添加至混合物中以提供用于喷雾的液体。

[0257] 实施例10

[0258] 用于吸入的化合物B/胰蛋白酶气溶胶

[0259] 基本上如上述实施例9中所述，由20mg化合物B和30mg胰蛋白酶制备气溶胶制剂，此次没有甘油，总共99.32mL水。

[0260] 实施例11

[0261] 普通感冒研究

[0262] 参加研究的受试者患有自我诊断为普通感冒的病毒感染。受试者出现症状，包括咳嗽、咽喉痛和失声持续2天。治疗之前尚未使用其它抗感冒药。

[0263] 受试者需要在早晨和晚上使用上述实施例10的液体喷雾剂。

[0264] 在每次使用时，将3mL喷雾剂倒入雾化器储罐中，该储罐连接到雾化器上。然后打开雾化器并且将面罩放在受试者的口和鼻上。

[0265] 受试者感觉第一次使用后咽喉疼痛得到缓解。在第二次使用之后，受试者不再感到咽喉疼痛并且可以说话，表明包含本发明化合物的液体喷雾可以缓解由普通感冒引起的咳嗽和咽喉痛症状。

[0266] 实施例12

[0267] 特发性肺纤维化(IPF)模型

[0268] 实验动物和分组:40只成年雄性Sprague Dawley大鼠，经过7天的适应性喂养之后，分为4组:假手术组(Sham)，IPF模型组(无治疗;模型)，试验组(化合物B)和阳性对照组(阳性对照)。

[0269] 试验以130μg/大鼠的剂量给药化合物B，化合物B通过雾化吸入引入。以120mg/kg单次大剂量(single-bolus dose)口服给药吡非尼酮(Etuary®,Beijing Continent Pharmaceutical Co.,Ltd.,Beijing,China)用作阳性对照。

[0270] 肺纤维化模型通过气管内灌注博来霉素建立。将大鼠麻醉并且置于手术台上处于仰卧位以暴露气管。将博来霉素(5mg/kg)盐水溶液通过气管软骨环之间的间隙注射入气管。假手术组给予等同体积的生理盐水。给药后不久，将大鼠垂直提起并且旋转，以均匀分散药物。一旦大鼠恢复，大约5天之后，将大鼠按照计划连续给药不同药物持续28天。实验计划如表12所示。

[0271] 表12

[0272]

组别	治疗	给药	剂量
Sham	盐水	雾化吸入	/
模型	盐水	雾化吸入	/
阳性对照	吡非尼酮	管饲法	250mg/kg
化合物B	化合物B	雾化吸入	130μg/大鼠

[0273] 雾化装置的排气量为0.15mL/分钟。每只大鼠的吸入时间为1分钟。

[0274] 在药物给药后的第29天，通过腹膜腔内注射水合氯醛麻醉大鼠。眼眶采血之后，处死大鼠。快速打开胸腔并且收集肺用于进一步分析。测量肺湿重，并且计算肺系数(肺湿重/

大鼠重量×1000)。将组织储存在-80℃的冰箱中以备进一步使用。

[0275] 精确称量一块肺组织,添加9倍重量的盐水。然后,将组织均化并且以3000rpm离心10分钟。匀浆用于检测转化生长因子(TGF-β1)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达。使用标准ELISA方法进行检测。也检测了肺组织中丙二醛(MDA)的含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。

[0276] 化合物B对大鼠的博来霉素诱导的肺纤维化组织中TNF-α、α-SMA、TGF-β1含量的影响如表13所示。

[0277] 表13

[0278]

	TNF-α (pg/mg 蛋白质)	α-SMA (pg/mg 蛋白质)	TGF-β1 (ng/mg 蛋白质)
Sham	181.85 ± 27.34	9.37 ± 0.72	0.41 ± 0.06
模型	301.69 ± 28.97	13.71 ± 1.41	0.55 ± 0.05
化合物 B	187.91 ± 12.20	10.85 ± 1.42	0.40 ± 0.02
阳性对照	208.41 ± 17.73	10.98 ± 0.93	0.41 ± 0.03

[0279]

[0280] 结果表明,化合物B抑制大鼠的博来霉素诱导的肺纤维化肺组织中TNF-α、α-SMA和TGF-β1的产生。抑制作用几乎与已知的IPF药物、吡非尼酮的抑制作用相当。

[0281] 化合物B对肺系数、MDA和SOD含量的影响如表14所示。

[0282] 表14

[0283]

	肺系数 (%)	MDA (U/mg 蛋白质)	SOD (U/mg 蛋白质)
Sham	4.85 ± 0.26	0.12 ± 0.02	51.22 ± 1.07
模型	6.49 ± 0.69	0.66 ± 0.08	41.89 ± 2.82
化合物 B	5.14 ± 0.37	0.17 ± 0.04	48.64 ± 1.85
阳性对照	5.54 ± 0.51	0.24 ± 0.05	48.59 ± 2.36

[0284] 结果显示,化合物B组的肺系数值低于模型组的肺系数值,表明化合物B可以减轻水肿。与模型组相比,化合物B组中较低的MDA值和较高的SOD值表明,化合物B通过增加SOD产生和减少脂质氧化具有抗氧化作用。

[0285] 实施例13

[0286] 小鼠镇咳实验-氨诱导的咳嗽法。

[0287] 将36只ICR小鼠根据其体重随机分成3组,标记为CMC-Na(阴性)对照组,右美沙芬氢溴酸盐(阳性)对照组和化合物B(B)组。每组包含12只小鼠,每组中6只雄性和6只雌性。

[0288] 化合物B通过雾化吸入使用YLS-8A多功能咳嗽和痰诱导装置(Jinan Yiyan Science and Technology Co.,Ltd.)(0.15mL/min)给药1分钟,每天一次,持续5天。并且阳

性对照药物通过以10mg/kg灌胃给药进行给药，每天一次，持续5天。

[0289] 在最后一次药物给药后的1、2和4小时，将小鼠置于倒置烧杯中。将1mL氨水(25.0％至28.0％)置于沸水浴的顶部上并且蒸发至烧杯中。

[0290] 小鼠接受氨暴露的时间通过特征在于在一次试验或一批试验后立即分析数据的方法来确定。先前分析的结果确定如何进行下一次试验或下一批试验。通过这种方式，实验-分析-实验的过程如下依序进行：

[0291] (a)前一次小鼠咳嗽所用的时间确定了下一只小鼠接受氨刺激的预定时间(更短)；或

[0292] (b)如果前一只小鼠没有咳嗽，则随后的小鼠会被刺激更长时间。

[0293] 两个相邻时间段的对数值之差为0.1。

[0294] 1分钟内的咳嗽次数使用听诊器检测。如果一只小鼠在一分钟内咳嗽三次或更多次，则将其标记为“咳嗽”，并且在一分钟内咳嗽少于三次标记为“无咳嗽”。

[0295] EDT_{50}被定义为一半小鼠发生“咳嗽”的氨刺激时间，由下式计算：

[0296] $EDT_{50}=1g^{-1}c/n$

[0297] (c等于r和x的总和，r是每个刺激时间组中动物的数量，x是刺激时间的对数，n是每组中动物的数量)。lg是以10为底的对数值。结果示于下表15。

[0298] 表15

[0299]

给药后的时间		1小时		2小时		4小时	
	剂量	EDT_{50} (s)	R (%)	EDT_{50} (s)	R (%)	EDT_{50} (s)	R (%)
阴性		20.7		21.5		22.4	
阳性	10 mg/kg	50.1	241.7	44.7	207.3	41.4	184.8
B	195 μg/小鼠	28.2	131.7	28.2	131.8	26.9	100 [???]

[0300] 在表15中，R是治疗组中的EDT_{50}除以对照组中的EDT_{50}，以百分数表示。R值＞130％是指化合物具有镇咳作用，R值＞150％表明化合物具有明显的镇咳作用。

[0301] 结果表明，化合物B在1小时和2小时对咳嗽缓解具有正面作用。

[0302] 实施例14

[0303] 治疗普通感冒的液体喷雾剂

[0304] 将化合物B溶解于注射水(WFI；来自TC-RO-0.25T/h-2水处理系统，Yangzhou Tiancheng Water Treatment Devices&Engineering Co.,Ltd.,Yangzhou,China)中。浓度是0.5mg/mL。将5mL装入塑料水喷雾瓶中。

[0305] 研究中登记的受试者在治疗之前患有普通感冒2天。治疗之前未使用其它感冒治疗。出现咳嗽、咽喉痛和失声的患者需要使用液体喷雾剂(早晨和晚上每次各按3至5次)。

[0306] 受试者感觉第一次使用之后咽喉疼痛得到缓解。在第二次使用之后，受试者感到咽喉不再疼痛并且可以说话。

[0307] 该实验表明，包含本发明化合物的液体喷雾剂减轻了由普通感冒引起的咳嗽和咽

喉痛症状。

[0308] 实施例15

[0309] 治疗发热的气溶胶吸入。

[0310] 将上述实施例14中所述的相同制剂给药于参加研究的受试者，该受试者已经发烧(体温超过38.5℃)1天。治疗之前未使用其它退烧药物。

[0311] 要求受试者在早晨和晚上如下使用气溶胶吸入装置：将3mL制剂倒入连接到雾化器和面罩的雾化器储罐中，将所述面罩戴在口和鼻上。

[0312] 受试者感到两小时内体温已降至正常。3次使用后，没有再出现发烧症状。

[0313] 该实验表明，包含本发明化合物的气溶胶吸入减轻了发烧。

[0314] 实施例16

[0315] 缓解激光手术中的手术疼痛的液体喷雾剂。

[0316] 登记的受试者需要在点阵激光手术(lattice laser operation)之前和之后在受试者半张脸上使用水喷雾瓶中的1mL液体喷雾剂，所述液体喷雾剂包含与上述实施例14中所述相同的制剂，以除去面部黑色素。

[0317] 受试者报告，在手术期间，在施用喷雾剂的半张脸上没有感到疼痛。类似地，受试者在手术之后感觉不疼痛。相反，在手术期间，在未喷雾的半张脸上感觉到疼痛。此外，在手术之后，疼痛持续约2小时。

[0318] 该实验表明，包含本发明化合物的液体喷雾剂减轻了激光手术期间的手术疼痛。

[0319] 实施例17

[0320] 组合治疗溃疡性结肠炎

[0321] 包含浓度均为1mg/g的化合物B(如上所述得到)和mefp-1(USUN Bio Co.,Jiangyin,China)的凝胶如下制备：将活性成分与甲基纤维素(2.5％)、丙二醇(11％)、甘油(11％)和乙酸(pH调节剂；至多0.5g)组合，得到pH为5.5的凝胶前体。所有赋形剂得自Sinopharm Chemical Reagent Co.Ltd。凝胶由注射用水制成。将凝胶装入一次性肛门-肠道药物递送系统中。

[0322] 在治疗之前，受试者每天排便超过20次并且在结肠内表现出严重的出血和溃疡。凝胶制剂通过肛门给予。在第一天给予一剂后，患者在第二天仅仅排便3次。然后受试者在第二天接受另外两剂。到第三天，出血得到控制。

[0323] 在每天两剂进行给药14天之后，患者的溃疡性结肠炎的症状已经缓解并且没有进一步出血。

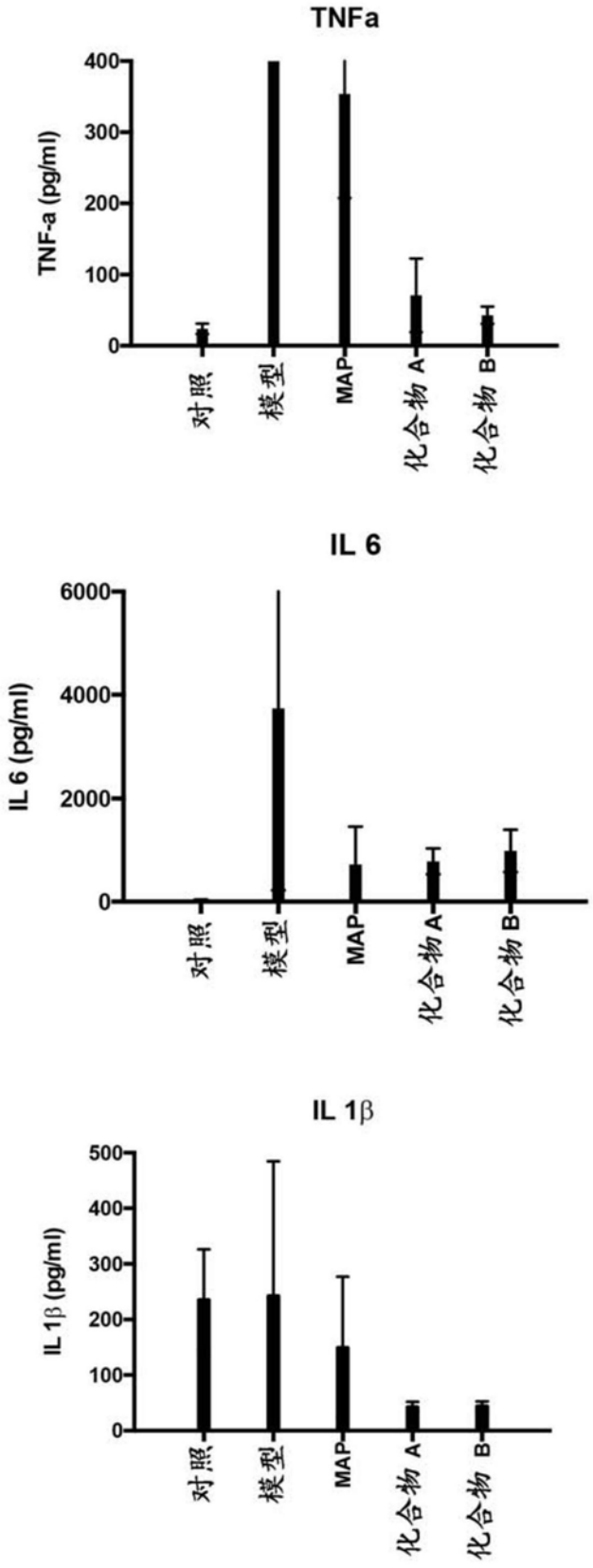

TNFa
TNF-a (pg/ml)
400
300
200
100
0
对照
模型
MAP
化合物 A
化合物 B
IL 6
IL 6 (pg/ml)
6000
4000
2000
0
对照
模型
MAP
化合物 A
化合物 B
IL 1β
IL 1β (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
对照
模型
MAP
化合物 A
化合物 B

图1

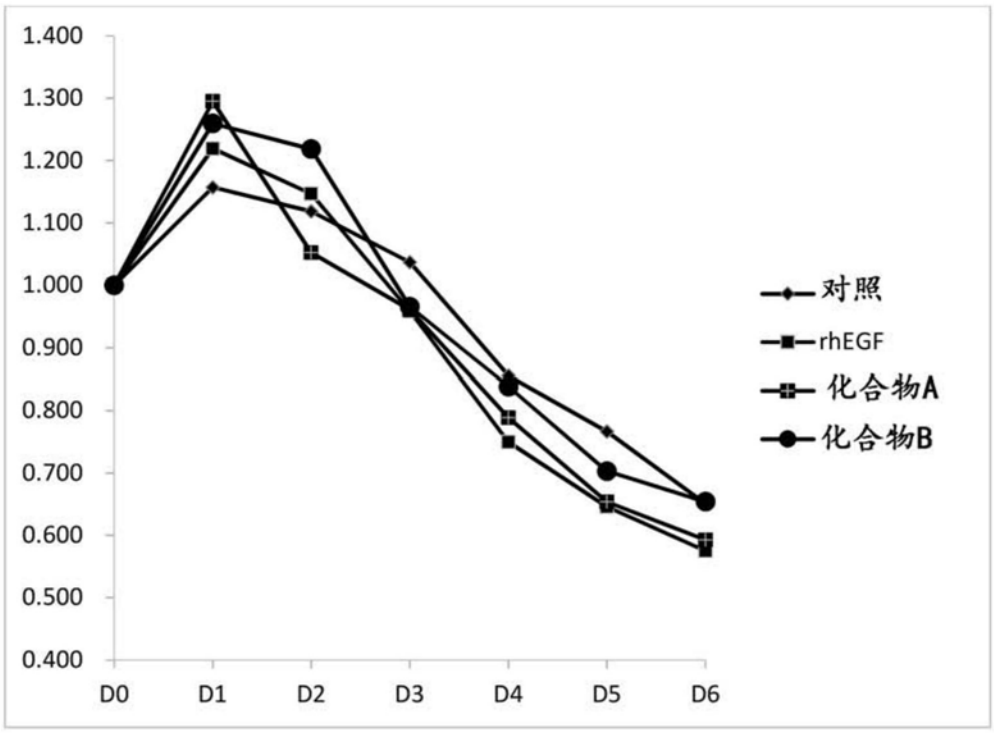

1.400
1.300
1.200
1.100
1.000
0.900
0.800
0.700
0.600
0.500
0.400
D0
D1
D2
D3
D4
D5
D6
对照
rhEGF
化合物A
化合物B

图2

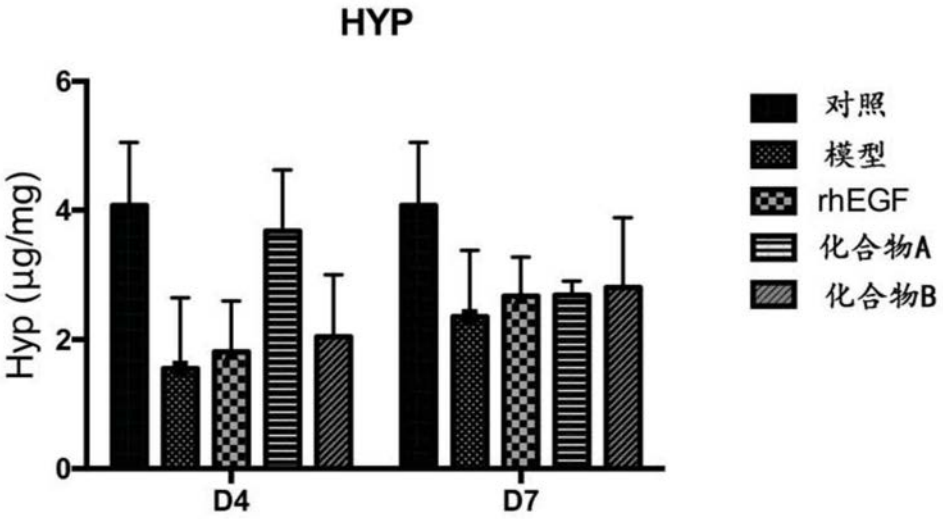

HYP
Hyp (μg/mg)
6
4
2
0
D4
D7
对照
模型
rhEGF
化合物A
化合物B

图3

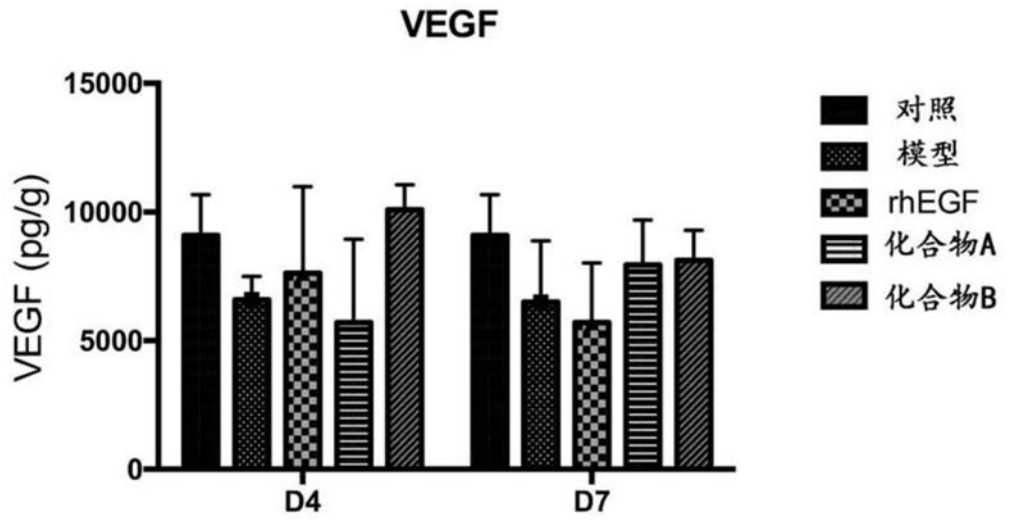

VEGF
15000
10000
5000
0
VEGF (pg/g)
D4
D7
对照
模型
rhEGF
化合物A
化合物B

图4

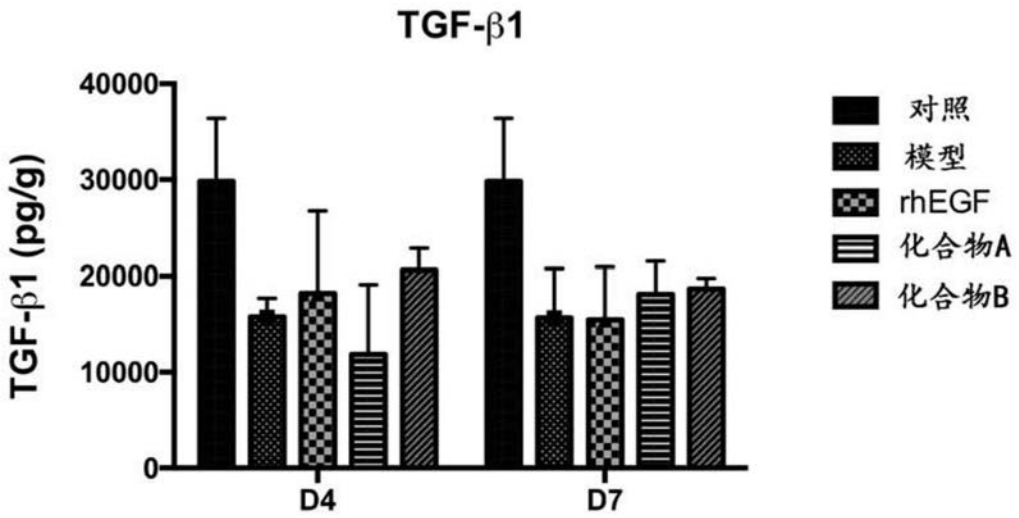

TGF-β1
40000
30000
20000
10000
0
TGF-β1 (pg/g)
D4
D7
对照
模型
rhEGF
化合物A
化合物B

图5