

说明书

发明名称: 一种融合多肽AJ007及其应用

技术领域

[0001] 本申请属于眼科药物技术领域，具体涉及一种融合多肽AJ007及其应用，更具体的涉及一种融合多肽AJ007及其在制备预防或治疗眼后段新生血管性疾病的药物中的应用。

背景技术

[0002] 随着年龄的增长、近视的加剧或是相关代谢性疾病的发展，当出现例如病理性近视、年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变等眼底疾病时，眼底会新生一些不必要的血管。这些新生血管会侵犯脉络膜血管、视网膜感光细胞层等原本正常的眼底组织，使视功能受损，严重的还会导致失明。

[0003] 年龄相关性黄斑变性(Age-related macular degeneration, AMD)是导致不可逆视力损伤的最常见原因，包括干性(非渗出性或萎缩性)和湿性(新生血管性或渗出性)，其中湿性年龄相关性黄斑变性(wAMD)是人群低视力和致盲的重要原因，其发病率正逐年增加。脉络膜新生血管(Choroidal neovascularization, CNV)是其危害视力功能的主要病理基础和首要原因，因此，非常有必要开发合适的药物来通过改善CNV从而缓解患者的视力衰退。

[0004] 血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)已被证实在CNV形成中起重要作用，因此目前临床上针对湿性年龄相关性黄斑变性的药物都属于针对VEGF的抗体类药物，如雷珠单抗、阿柏西普和康柏西普等。这些药物具有一定的改善湿性年龄相关性黄斑变性病人视力的作用，但是此类抗体类药物分子量较大，无法透过血眼屏障到达视网膜和脉络膜处，因此临床上都是采用眼球内玻璃体注射的给药方式来进行治疗。然而，眼球内玻璃体注射会导致眼内出血、眼内感染、视网膜脱落、眼内炎症、白内障和眼压升高等多种严重的副作用，患者的依从性和耐受性很差，因此临床上需要更合适的治疗方案来避免这些严重的副作用的发生。除此之外，此类抗体类药物都是直接中和VEGF，然而有文献报道VEGF对于视网膜和脉络膜具有营养作用，若长期VEGF不足容易

导致视网膜和脉络膜的萎缩，反而有加剧视力受损的风险，所以针对VEGF的受体或其它抑制脉络膜处血管新生的信号通路来进行治疗更为合适。

[0005] 在申请人在先的授权公告号为CN104045718B的中国发明专利中，公开了一种多功能融合多肽VI(HM-1)，其氨基酸序列为：Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp(SEQ ID NO:1)，该多功能融合多肽VI具备较强的新生血管抑制能力，其主要是通过抑制VEGFR2和 $\alpha v \beta 3$ 信号通路从而抑制血管的形成，并进一步验证该多功能融合多肽VI能够治疗大鼠脉络膜新生血管。然而该多功能融合多肽VI仍需要采用眼球内玻璃体注射的给药方式，此种给药方式并不是临床上对于患者依从性较好的方式，也会导致其他严重的副作用。

[0006] 因此，需要通过合适的手段来优化该多功能融合多肽VI，减少副作用，提高患者依从性，为湿性年龄相关性黄斑变性患者提供一种更合适的临床治疗方案。

[0007] 发明内容

[0008] 1.要解决的问题

[0009] 本申请针对现有技术中多肽类药物，如多功能融合多肽VI(HM-1)，无法透过血眼屏障而必须通过眼球内玻璃体注射的给药方式，该方式容易引起严重副作用等的问题，提供了一种融合多肽AJ007及其应用，该融合多肽AJ007是通过在具备较强的新生血管抑制能力的多功能融合多肽VI(HM-1)序列前端连接细胞穿膜肽TAT制备而成，增强了其穿透血眼屏障或巩膜从而到达眼后段的能力。同时将该融合多肽AJ007及其在药学上可接受的盐、酯等作为多肽原料药，选择合适的辅料配伍，制备成滴眼液，用于湿性年龄相关性黄斑变性等疾病的预防和/或治疗，既增加融合多肽AJ007的药效，又减少副作用，还方便临床使用。

[0010] 2.技术方案

[0011] 为了解决上述问题，本申请所采用的技术方案如下：

[0012] 本申请提供了一种融合多肽AJ007，该融合多肽AJ007包括如下氨基酸序列：Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp(YGRKKRRQRRRRGADRAGG GGRGD, SEQ ID NO:2)，通过在申请人在先公开的具备较强的新生血管抑制能力的多功能融合多肽VI(HM-1)序列前端连接细胞穿膜肽TAT，增强了其穿透

血眼屏障或巩膜从而到达眼后段的能力，能够穿透血眼屏障或巩膜从而到达脉络膜处。

- [0013] 本申请还提供了上述一种融合多肽AJ007在制备预防或治疗眼后段新生血管性疾病的药物中的应用，该药物可以抑制新生血管形成。
- [0014] 进一步地，上述预防或治疗眼后段新生血管性疾病的药物中至少含有融合多肽AJ007和/或其药学上可接受的载体。
- [0015] 进一步地，上述预防或治疗眼后段新生血管性疾病的药物包括：含有融合多肽AJ007及其药学上可接受的载体的滴眼液。
- [0016] 进一步地，上述眼后段新生血管性疾病包括：湿性年龄相关性黄斑变性(wAMD)、视网膜静脉阻塞(RVO)、糖尿病性视网膜病变(DR)、早产儿视网膜病变(ROP)等疾病中的一种或多种，糖尿病性视网膜病变、视网膜静脉阻、早产儿视网膜病变都是与血管异常新生高度相关的疾病，其中：
- [0017] 糖尿病性视网膜病变(DR)是一种慢性进行性疾病，会随着糖尿病的病程进展而加重，可表现为视网膜渗出、出血、黄斑水肿、视网膜新生血管形成，当病变发展到一定程度后开始出现不同程度的视力减退，严重者可致盲；DR的主要发病机制是持续的高血糖环境损伤了血-视网膜屏障，通透性增加，微血管渗透，导致视网膜异常的新生血管形成、纤维增殖，最终使视网膜微血管细胞结构改变甚至完全丧失；VEGF水平与DR严重程度密切相关，而通过抗VEGF药物治疗法控制或延缓病变进展，减少视力丧失；
- [0018] 视网膜静脉阻塞(RVO)是种常见的视网膜血管性疾病，由视网膜静脉血流阻所导致，主要表现为静脉无法引流视网膜血液，视网膜血管发生渗出，导致黄斑水肿及视网膜内出血，导致视力下降；RVO的发病机制较多，主要有血管壁改变、血液流变学改变、血流动力学改变；RVO没有特异性治疗方法，目前的治疗手段都无法有效逆转视网膜静脉阻的病理改变，而给予抗VEGF药物治疗可以抑制RVO导致的黄斑水肿和新生血管形成，从而可以维持患者的视力；
- [0019] 早产儿视网膜病变(ROP)是一种病理性新生血管增殖并伴纤维化改变的早产儿眼底疾病，是全球儿童致盲的主要原因；主要的病理机制为出生后视网膜血管闭塞和缺氧导致的视网膜血管异常增生；抗VEGF疗法是治疗ROP的较好手段；

- [0020] DR、RVO、ROP的病理表现和发病机制有较多与wAMD相似之处，并且抗VEGF治疗已证明对于DR、RVO、ROP皆有较好的控制病情能力，因此AJ007也有较大潜力可以通过抑制视网膜的异常血管形成来改善DR、RVO、ROP的病程。
- [0021] 进一步地，上述眼后段新生血管性疾病包括：湿性年龄相关性黄斑变性。
- [0022] 本申请还提供了一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，该多肽滴眼液包括上述融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式，和辅料配伍。
- [0023] 进一步地，上述一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，每100mL包括如下组分：
- [0024] 融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式，0~50%w/v；
- [0025] 2-羟丙基- β -环糊精，5~10%w/v；
- [0026] 聚山梨醇酯80，0.1~5%w/v；
- [0027] 泰洛沙泊，0.05~5%w/v；
- [0028] 泊洛沙姆407，0.05~10%w/v；
- [0029] 磷酸二氢钠，0~1%w/v；
- [0030] 防腐剂，0~0.005%w/v；
- [0031] 渗透压调节剂，0~1%w/v，调节渗透压摩尔浓度为250~350mOsm/kg；
- [0032] pH值调节剂，0~1%w/v，调节pH值为6.0~8.0；
- [0033] 在该多肽滴眼液中，以融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式为多肽原料药，辅料配伍作为融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式的载体，能够有效增加对于多肽原料药的包合，促进融合多肽AJ007的溶解，增强融合多肽AJ007的稳定性，并使其具备更好的穿透血眼屏障或巩膜到达眼后段的效果，通过在具备较强的新生血管抑制能力的多功能融合多肽VI(HM-1)序列前端连接细胞穿膜肽TAT和本申请所选择的辅料配伍这两方面的优化，将具有抗新生血管形成功能的融合多肽AJ007传递到眼后段视网膜至脉络膜处，可以实现通过滴眼给药方式来改善CNV的效果。
- [0034] 进一步地，上述一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，每100mL包括如下组分：

- [0035] 融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式，2%w/v；
- [0036] 2-羟丙基-β-环糊精，8.41%w/v；
- [0037] 聚山梨醇酯80，1%w/v；
- [0038] 泰洛沙泊，0.1%w/v；
- [0039] 泊洛沙姆407，2%w/v；
- [0040] 磷酸二氢钠，0.142%w/v；
- [0041] 防腐剂，0.005%w/v；
- [0042] 渗透压调节剂，调节渗透压摩尔浓度至276mOsm/kg；
- [0043] pH值调节剂，调节pH值为6.47。
- [0044] 进一步地，上述融合多肽AJ007药学上可接受的盐形式包括：醋酸盐、三氟乙酸盐、盐酸盐、铵盐、钠盐、双羟萘酸盐、柠檬酸盐、水杨酸盐形式中的一种或多种。更进一步地，上述融合多肽AJ007药学上可接受的盐形式包括：醋酸盐形式。
- [0045] 进一步地，上述防腐剂包括：苯扎氯铵、苯扎溴铵阳离子表面活性剂、苯甲醇、三氯叔丁醇、山梨酸中的一种或多种。更进一步地，上述防腐剂包括：苯扎氯铵，占比为0.005%w/v。
- [0046] 进一步地，上述渗透压调节剂包括：氯化钠、硼酸、葡萄糖中的一种或多种。更进一步地，上述渗透压调节剂包括：氯化钠，占比为0.2%w/v。
- [0047] 进一步地，上述pH值调节剂包括：磷酸缓冲液、硼酸缓冲液、盐酸、氢氧化钠中的一种或多种。更进一步地，上述pH值调节剂包括：氢氧化钠，占比为0.8%w/v。
- [0048] 进一步地，上述眼后段新生血管性疾病包括：湿性年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变等疾病中的一种或多种。
- [0049] 进一步地，上述眼后段新生血管性疾病包括：湿性年龄相关性黄斑变性。
- [0050] 本申请还提供了上述一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液的制备方法，具体包括如下步骤：

- [0051] (1)辅料溶液配制：取超纯水，依次加入处方量磷酸二氢钠、苯扎氯铵、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆407、泰洛沙泊，持续搅拌至溶解完全；用0.22 μ m滤膜过滤，作为A液备用；
- [0052] (2)2-羟丙基 β -环糊精溶液制备：取A液置水浴搅拌锅中加热至60℃，开启搅拌，分多次将2-羟丙基 β -环糊精加入，待分散溶解完全后取出冷却，作为B液备用；
- [0053] (3)调节pH、渗透压：检测B液pH值和渗透压，利用pH调节剂和渗透压调节剂调节pH、渗透压，用0.22 μ m滤膜过滤，作为C液备用；
- [0054] (4)多肽滴眼液制备：称取融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式加入C液中，持续震摇使融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式分散溶解完全，即为多肽滴眼液。
- [0055] 3.有益效果
- [0056] 本申请与现有技术相比，其有益效果在于：
- [0057] (1)本申请提供一种融合多肽AJ007，通过在申请人在先公开的具备较强的新生血管抑制能力的多功能融合多肽VI(HM-1)序列前端连接细胞穿膜肽TAT，增强了其穿透血眼屏障或巩膜从而到达眼后段的能力，能够穿透血眼屏障或巩膜从而到达脉络膜处。而且，从实施例3可以看出，原始的多功能融合多肽VI(HM-1)滴眼后只有低于10ng/mL的活性分子能够到达wAMD的病变靶标位置—RPE/脉络膜复合物，而融合多肽AJ007有6291.38ng/mL的活性分子可以到达RPE/脉络膜复合物，极大地提高了原有活性分子的眼穿透能力。而在现有的技术方案中，一种靶向于VEGFR2的多肽AT7在连接上穿膜肽TAT之后，它穿透进入内皮细胞的能力提高了119倍；贝伐珠单抗连接上穿膜肽CPP后，它滴眼后穿透进入到眼后段的能力提高了约10倍；在CN107129521A专利中，穿膜肽CC12连上KV12后，它滴眼后穿透进入眼内的能力提高了约8倍；在CN114073774A专利中，穿膜肽289WP连上雷珠单抗后，它滴眼后到达视网膜的浓度提高了约100倍；在CN114668717A专利中，穿膜肽PENE连接阿西替尼后，它滴眼后到达视网膜的浓度提高了约5~10倍。但是上述这些现有技术方案相比于AJ007较HM-1

的眼后段穿透能力提高了约600倍，AJ007的优效性还是显而易见的，并且这个优效性是超出正常预期的，说明该肽的特殊性和创造性。

- [0058] (2)本申请提供一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，是以融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式为多肽原料药，选择合适的辅料配伍制备而成。通过在具备较强的新生血管抑制能力的多功能融合多肽VI(HM-1)序列前端连接细胞穿膜肽TAT和本申请所选择的辅料配伍这两方面的优化，最终得到一个全新的组合物产品，使得该产品区别与其它的肽类滴眼液，具备独一无二的新颖性。它能够将具有抗新生血管形成功能的融合多肽AJ007传递到眼后段视网膜至脉络膜处，可以实现通过滴眼给药方式来改善CNV的效果。通过眼部组织药物分布以及小鼠激光诱导的CNV药效实验和原来的多功能融合多肽VI(HM-1)进行比较，眼部组织药物分布的实验结果表明本申请的多肽滴眼液比起多功能融合多肽VI(HM-1)，有至少100倍以上的活性分子可以到达wAMD的病变靶标位置—RPE/脉络膜复合物。而药效实验结果表明本申请的多肽滴眼液相比原来的多功能融合多肽VI(HM-1)分子具备非常优效的CNV渗漏改善效果，即使是和目前临床上效果最好的wAMD治疗药物阿柏西普相比也具备非劣效性，这是其它所有肽类滴眼液都难以达到的，在技术上更为进步，克服了之前的滴眼液治疗眼底疾病疗效有限的缺点，因此具备较强的治疗wAMD的临床潜力，有望改变wAMD患者必须接受眼内玻璃体注射这种治疗方式的现状，能够显著增加患者的依从性，为wAMD患者提供依从性显著提升的治疗选择。

附图说明

- [0059] 图1是原始多功能融合多肽VI(HM-1)滴眼的药-时曲线结果。
- [0060] 图2是本申请多肽滴眼液滴眼的药-时曲线结果。
- [0061] 图3是给予小鼠wAMD模型本申请多肽滴眼液后的FFA造影示意图。
- [0062] 图4是给予小鼠wAMD模型本申请多肽滴眼液后的FFA造影的CNV渗漏面积统计图。
- [0063] 图5是给予小鼠wAMD模型本申请多肽滴眼液后的FITC-葡聚糖铺片染色示意图。

- [0064] 图6是给予小鼠wAMD模型本申请多肽滴眼液后的FITC-葡聚糖铺片染色的CNV面积统计图。
- [0065] 图7是等摩尔浓度的原始多功能融合多肽VI(HM-1)滴眼的药-时曲线结果。
- [0066] 图8是等摩尔浓度的原始多功能融合多肽VI(HM-1)制剂滴眼的药-时曲线结果。
- [0067] 图9是等摩尔浓度的融合多肽AJ007滴眼的药-时曲线结果。
- [0068] 图10是等摩尔浓度的本申请多肽滴眼液滴眼的药-时曲线结果。
- [0069] 图11是等摩尔浓度的原始多功能融合多肽VI(HM-1)玻璃体注射的药-时曲线结果。
- [0070] 图12是给予小鼠wAMD模型等摩尔浓度各药液的FFA造影示意图。
- [0071] 图13是给予小鼠wAMD模型等摩尔浓度各药液的FFA造影的CNV渗漏面积统计图。
- [0072] 图14是给予小鼠wAMD模型等摩尔浓度各药液的FITC-葡聚糖铺片染色示意图。
- [0073] 图15是给予小鼠wAMD模型等摩尔浓度各药液的FITC-葡聚糖铺片染色的CNV面积统计图。

具体实施方式

- [0074] 下面结合具体实施例对本申请进一步进行描述。
- [0075] 需要说明的是，本说明书中所引用的如“上”、“下”、“左”、“右”、“中间”等用语，亦仅为便于叙述的明了，而非用以限定可实施的范围，其相对关系的改变或调整，在无实质变更技术内容下，当亦视为本申请可实施的范畴。
- [0076] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请的技术领域的技术人员通常理解的含义相同；本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。
- [0077] 实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

- [0078] 如本文所使用，术语“约”用于提供与给定术语、度量或值相关联的灵活性和不精确性。本领域技术人员可以容易地确定具体变量的灵活性程度。
- [0079] 如本文所使用，术语“.....中的至少一个”旨在与“.....中的一个或多个”同义。例如，“A、B和C中的至少一个”明确包括仅A、仅B、仅C以及它们各自的组合。
- [0080] 浓度、量和其他数值数据可以在本文中以范围格式呈现。应当理解，这样的范围格式仅是为了方便和简洁而使用，并且应当灵活地解释为不仅包括明确叙述为范围极限的数值，而且还包括涵盖在所述范围内的所有单独的数值或子范围，就如同每个数值和子范围都被明确叙述一样。例如，约1至约4.5的数值范围应当被解释为不仅包括明确叙述的1至约4.5的极限值，而且还包括单独的数字(诸如2、3、4)和子范围(诸如1至3、2至4等)。相同的原理适用于仅叙述一个数值的范围，诸如“小于约4.5”，应当将其解释为包括所有上述的值和范围。此外，无论所描述的范围或特征的广度如何，都应当适用这种解释。
- [0081] 实施例1
- [0082] 本实施例提供一种融合多肽AJ007。
- [0083] 融合多肽AJ007的氨基酸序列为：Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp，(YGRKKRRQRRRRGADRAGGGGRGD，SEQ ID NO:2)。其中，Arg-Gly-Ala-Asp-Arg-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp(SEQ ID NO:1)为申请人在先的授权公告号为CN104045718B的中国发明专利所公开了一种多功能融合多肽VI(HM-1)，该多功能融合多肽VI具备较强的新生血管抑制能力，其主要是通过抑制VEGFR2和 $\alpha_v\beta_3$ 信号通路从而抑制新生血管的形成，因此能够改善小鼠激光诱导导致的脉络膜新生血管生成和渗漏。
- [0084] 实施例2
- [0085] 本实施例提供实施例1所述的融合多肽AJ007在制备预防或治疗眼后段新生血管性疾病的药物中的应用，该药物为用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的肽滴眼液。本实施例还提供了用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的肽滴眼液及其制备方法。

- [0086] 本实施例提供的一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，每100mL包括如下组分：
- [0087] 融合多肽AJ007的醋酸盐形式，2%w/v；
- [0088] 2-羟丙基- β -环糊精，8.41%w/v；
- [0089] 聚山梨醇酯80，1%w/v；
- [0090] 泰洛沙泊，0.1%w/v；
- [0091] 泊洛沙姆407，2%w/v；
- [0092] 磷酸二氢钠，0.142%w/v；
- [0093] 防腐剂(苯扎氯铵)，0.005%w/v；
- [0094] 渗透压调节剂(氯化钠)，0.2%w/v，调节渗透压摩尔浓度至276mOsm/kg；
- [0095] pH值调节剂，氢氧化钠，8%w/v，调节pH值为6.47。
- [0096] 本实施例提供的一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液制备方法，具体包括如下步骤：
- [0097] (1)辅料溶液配制：取超纯水100mL，依次加入处方量磷酸二氢钠、苯扎氯铵、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆407、泰洛沙泊，持续搅拌至溶解完全；用0.22 μ m滤膜过滤，作为A液备用；
- [0098] (2)2-羟丙基 β -环糊精溶液制备：取A液100mL置水浴搅拌锅中加热至60℃，开启搅拌，分多次将2-羟丙基 β -环糊精加入，待分散溶解完全后取出冷却，作为B液备用；
- [0099] (3)调节pH、渗透压：检测B液pH值和渗透压，利用pH调节剂和渗透压调节剂调节pH至7.5、渗透压至250，用0.22 μ m滤膜过滤，作为C液备用；
- [0100] (4)多肽滴眼液制备：称取融合多肽AJ007的醋酸盐形式2000mg加入100mL C液中，持续震摇使融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式分散溶解完全，即为20mg/mL浓度的AJ007多肽滴眼液，测得其渗透压摩尔浓度为276mOsm/kg；pH值为6.47。
- [0101] 实施例3
- [0102] 本实施例提供实施例2中的多肽滴眼液(AJ007滴眼液)与多功能融合多肽VI(HM-1)的眼部组织分布对比实验，具体如下：

- [0103] 药液：多肽滴眼液(AJ007滴眼液)，其中融合多肽AJ007为20mg/mL；多功能融合多肽VI(HM-1)溶液，其中多功能融合多肽VI(HM-1)为20mg/mL。
- [0104] 动物分组：C57BL/6J小鼠24只，雌性，随机分为0h、1h、3h、7h、12h、24h共6个时间点组别，每组2只小鼠。
- [0105] 实验过程：所有滴眼液组小鼠给予1次双侧滴眼，每只眼滴5 μ L对应的药液。在给药完成后的0h、1h、3h、7h、12h、24h这6个时间点分别将对应组别的小鼠进行摘眼球取血，全血取出后立刻在6000rpm下离心5min，然后吸取上清液保存作为待检测样品。另外，同时在体视显微镜下从眼球中分离出玻璃体、视网膜、RPE/脉络膜复合物这3个组织部位，按照1:10加入PBS稀释后研磨，12000rpm，离心5min后吸取上清液作为待检测样品，后续用ELISA方法检测各组织的融合多肽AJ007或多功能融合多肽VI(HM-1)浓度。ELISA方法如下：
- [0106] (1)包被：将HM-1用包被液(CBS)以一定浓度稀释至1 μ g/mL，加入酶标板中，每孔100 μ L，4℃过夜；
- [0107] (2)洗板：将包被液弃去，每孔加入265 μ L PBST洗液，洗涤3次，每次3min，拍干；
- [0108] (3)封闭：每孔加入200 μ L 1% BSA封闭液，37℃水浴放置1.5h，重复洗板过程，拍干；
- [0109] (4)加待测样品和抗体：酶标板中先加入100 μ L待测样品，再加入100 μ L一定的浓度HM-1单抗稀释液，设2~3个复孔，于37℃摇床震荡混匀2min，再移至37℃水浴锅放置2h，充分反应后取出，重复洗板过程；
- [0110] (5)与酶标二抗反应：加入一定浓度的HRP酶标山羊抗小鼠IgG，每孔100 μ L，37℃温育1.5h。重复洗板过程，拍干；
- [0111] (6)加入底物：每孔加入100 μ L TMB底物显色液，室温避光显色一定时间；
- [0112] (7)终止：每孔加入50 μ L终止液，终止反应。
- [0113] (8)检测：用酶标仪读取各孔OD450nm值。
- [0114] 实验结果和结论：
- [0115] 通过对比HM-1滴眼和AJ007滴眼液滴眼的药-时曲线结果(图1和图2)，可以发现HM-1滴眼后只有极少量活性分子能够到达wAMD的病变靶标位置—RPE/脉

络膜复合物，而且维持时间也较短。然而同浓度的AJ007滴眼液滴眼后却有至少100倍以上的活性分子可以到达RPE/脉络膜复合物处，并且在24h时仍有不少活性分子存在于这个部位，极大地提高了生物利用度。多功能融合多肽VI(HM-1)滴眼，无法通过血眼屏障到达RPE/脉络膜复合物，因此不能起到改善CNV渗漏的治疗效果，而通过添加TAT肽，能促进更多活性分子到达RPE/脉络膜复合物，与一般的穿膜肽连接小分子或大分子的到达眼后段提升效果仅在数倍之内(CN107129521A、CN114073774A、CN114668717A)相比，有着极大的提升。

[0116] 实施例4

[0117] 本实施例提供实施例2中的多肽滴眼液(AJ007滴眼液)与多功能融合多肽VI(HM-1)的药效对比实验，具体如下：

[0118] 动物分组：C57BL/6J小鼠56只，雌性，随机分为完全空白组、模型+溶媒(包含所有等量的辅料配伍但不含融合多肽AJ007的对照溶液)对照组、模型+阳性药阿柏西普玻璃体注射(10mg/mL)组、模型+低剂量HM-1(20mg/mL)组、模型+高剂量HM-1(80mg/mL)组、模型+低剂量AJ007滴眼液(20mg/mL)组、模型+中剂量AJ007滴眼液(40mg/mL)组、模型+高剂量AJ007滴眼液(80mg/mL)组，每组7只。

[0119] 实验过程：小鼠先以复方托吡卡胺滴眼液进行散瞳，腹腔注射4%水合氯醛溶液按0.2mL/20g小鼠体重进行麻醉，麻醉后涂抹玻璃酸钠凝胶进行眼睛保护，贴上盖玻片，用532nm的氩离子激光器对左眼进行激光造模，功率为120mW，爆破时间为0.01s，光斑大小为100 μ m。造模后当天开始给药，各组分别按照不同的给药方式进行给药，只给左眼，其中滴眼液组小鼠每天给予5次滴眼，每次间隔1h，每次滴5 μ L对应的药液，滴眼7天；玻璃体注射组小鼠在造模后当天麻醉然后行玻璃体注射给药，每只小鼠用微量进样针注射1 μ L对应的药液。造模后利用眼底荧光造影系统，在造模后第3天进行一次FFA检查来评价CNV渗漏水平；造模后的第7天处死小鼠，心室注射FITC-葡聚糖后进行RPE-脉络膜/巩膜复合体铺片荧光染色来检测CNV面积的变化。

[0120] 实验结果和结论：FFA检查的结果表明无论是给予低剂量还是高剂量的HM-1都无法显著改善激光诱导的CNV渗漏，而给予低剂量的AJ007滴眼液就能有显著的改善CNV渗漏的效果，明显优于低剂量和高剂量的HM-1，并且效果要好于

中剂量和高剂量的AJ007滴眼液，能够达到持平于眼球玻璃体内注射阳性药阿柏西普的药效(图3和图4)；FITC-葡聚糖注射后铺片染色结果表明低剂量的HM-1无法减少激光诱导的CNV面积，而高剂量的HM-1能部分减少CNV面积，然而给予低剂量的AJ007滴眼液可以大幅度地减少CNV面积，显著优于高剂量的HM-1，效果也是要优于中剂量和高剂量的AJ007滴眼液，药效甚至要略优于眼球玻璃体内注射阳性药阿柏西普(图5和图6)。综合FFA检查和FITC-葡聚糖注射后铺片染色的结果可以看出20mg/mL的AJ007滴眼液具有非常显著的改善小鼠wAMD模型的新生血管异常的效果，明显地优于低剂量和高剂量的HM-1的药效，在该经典wAMD模型上的药效和目前临床上wAMD效果最好的治疗方式眼球玻璃体内注射阿柏西普持平甚至要略好一些。

[0121] 实施例5

[0122] 本实施例提供实施例2中的多肽滴眼液(AJ007滴眼液)与等摩尔浓度的多功能融合多肽VI(HM-1)、多功能融合多肽VI制剂(HM-1制剂，多肽为HM-1，其余辅料配方同AJ007滴眼液)、融合多肽AJ007制剂(TAT-HM-1，多肽为AJ007，纯水为溶媒)滴眼后以及多功能融合多肽VI(HM-1)玻璃体注射后的眼部组织分布对比实验，具体如下：

[0123] 动物分组：C57BL/6J小鼠70只，雌性，随机分为0h、10min、1h、3h、7h、12h、24h共7个时间点组别，每组2只小鼠。

[0124] 实验过程：所有滴眼给药组别小鼠给予1次双侧滴眼，每只眼滴5 μ L对应的药液，而HM-1玻璃体注射组双眼各注射5 μ L对应的药液。在给药完成后的0h、10min、1h、3h、7h、12h、24h这7个时间点分别将对应组别的小鼠进行摘眼球取血，全血取出后赶紧在6000rpm下离心5min，然后吸取上清液保存作为待检测样品；另外，同时在体视显微镜下从眼球中分离出玻璃体、视网膜、RPE/脉络膜复合物这3个组织部位，按照1:10加入PBS稀释后研磨，12000rpm，离心5min后吸取上清液作为待检测样品，后续用ELISA方法检测各组织的HM-1或融合多肽AJ007浓度。

[0125] 实验结果和结论：

[0126] 通过对比AJ007滴眼液和等摩尔浓度的HM-1、HM-1制剂、TAT-HM-1滴眼液以及HM-1玻璃体注射后的药-时曲线结果(图7, 图8, 图9, 图10, 图11), 可以发现无论是HM-1还是做成制剂的HM-1滴眼液后只有低于10ng/mL的活性分子能够到达wAMD的病变靶标位置—RPE/脉络膜复合物, 并且维持时间也非常短; 然而给HM-1连上TAT后就有843.28ng/mL的活性分子可以到达RPE/脉络膜复合物, 浓度远高于HM-1和HM-1制剂组, 但是维持时间也较短; 在HM-1玻璃体注射后就有约5729.7ng/mL的活性分子可以到达RPE/脉络膜复合物, 浓度要高于TAT-HM-1组, 但是维持时间较短; 相比之下, AJ007滴眼液滴眼液后却有约6291.38ng/mL的活性分子可以到达RPE/脉络膜复合物, 远高于HM-1、HM-1制剂、TAT-HM-1滴眼液组, 略高于HM-1玻璃体注射组, 另外维持时间也要长于HM-1玻璃体注射组, 这就表明经过优化改造后做成的AJ007滴眼液能够使得大量的活性分子到达RPE/脉络膜复合物, 为有效改善脉络膜处的新生血管异常的药效提供药代部分的数据支撑。

[0127] 实施例6

[0128] 本实施例提供实施例2中的多肽滴眼液(AJ007滴眼液)与等摩尔浓度的多功能融合多肽VI(HM-1)、多功能融合多肽VI制剂(HM-1制剂)、融合多肽AJ007(TAT-HM-1)滴眼液以及多功能融合多肽VI(HM-1)玻璃体注射后的药效对比实验, 具体如下:

[0129] 动物分组: C57BL/6J小鼠42只, 雌性, 随机分为模型+溶媒对照组、模型+阳性药阿柏西普玻璃体注射(10mg/mL)组、模型+HM-1(8.76mg/mL)组、模型+HM-1制剂(8.76mg/mL)组、模型+TAT-HM-1(20mg/mL)组、模型+AJ007滴眼液(20mg/mL)组、模型+HM-1玻璃体注射(8.76mg/mL)组, 每组6只。

[0130] 实验过程: 小鼠先以复方托吡卡胺滴眼液进行散瞳, 腹腔注射4%水合氯醛溶液按0.2mL/20g小鼠体重进行麻醉, 麻醉后涂抹玻璃酸钠凝胶进行眼睛保护, 贴上盖玻片, 用532nm的氩离子激光器对左眼进行激光造模, 功率为120mW, 爆破时间为0.01s, 光斑大小为100 μ m。造模后当天开始给药, 各组分别按照不同的给药方式进行给药, 只给左眼, 其中滴眼液组小鼠每天给予5次滴眼, 每次间隔1h, 每次滴5 μ L对应的药液, 滴眼7天; 玻璃体注射组小鼠在造模后当天麻醉

然后行玻璃体注射给药，每只小鼠用微量进样针注射对应的药液(其中阿柏西普组每眼注射1 μ L，HM-1组每眼注射5 μ L)。造模后利用眼底荧光造影系统，在造模后第3天进行一次FFA检查来评价CNV渗漏水平；造模后的第7天处死小鼠，心室注射FITC-葡聚糖后进行RPE-脉络膜/巩膜复合体铺片荧光染色来检测CNV面积的变化。

[0131] 实验结果和结论：FFA检查的结果表明HM-1、HM-1制剂、TAT-HM-1滴眼给药都无法显著改善激光诱导的CNV渗漏，而HM-1玻璃体内注射和AJ007滴眼液滴眼后都能显著的改善CNV渗漏的效果，能够达到持平于眼球玻璃体内注射阳性药阿柏西普的药效(图12和13)，其中AJ007滴眼液滴眼后的药效要略优于玻璃体内注射阳性药阿柏西普；FITC-葡聚糖注射后铺片染色结果也表明HM-1、HM-1制剂、TAT-HM-1滴眼给药都无法减少激光诱导的CNV面积，而HM-1玻璃体内注射和AJ007滴眼液滴眼后都能大幅度地减少CNV面积，药效甚至都要略优于眼球玻璃体内注射阳性药阿柏西普(图14和15)。综合FFA检查和FITC-葡聚糖注射后铺片染色的结果可以看出无论是HM-1还是HM-1做成制剂亦或是给HM-1连接上TAT都不具备改善小鼠wAMD模型的新生血管异常的效果，但是在给HM-1连接上TAT后再做成制剂即成为AJ007滴眼液滴眼给药后在该经典wAMD模型上的药效就能和眼球玻璃体内注射等摩尔浓度的HM-1相当，甚至会略好一些，即使和目前临床上wAMD效果最好的治疗方式—眼球玻璃体内注射阿柏西普相比药效也能持平甚至要略好一些。考虑到滴眼给药方式的患者依从性要明显好于眼球玻璃体注射的给药方式，因此本发明的多肽滴眼液具有较好的临床潜力，为wAMD病人的临床治疗提供更优的选择，可以产生不错的经济效益。

[0132] 根据上述实施例结果，本申请通过在具备较强的新生血管抑制能力的多功能融合多肽VI(HM-1)序列前端连接细胞穿膜肽TAT和选择的辅料配伍制备成滴眼液，成功优化升级了该分子，眼部药代和小鼠激光诱导的AMD模型药效结果表明AJ007滴眼液相比HM-1原分子大幅度地提高了在视网膜、脉络膜的组织浓度和药效结果，其药效甚至已经是要略优于目前临床上针对wAMD最好的药物阿柏西普，从总体上来看实现了1+1>2的效果，该滴眼液的效果要明显好于其他

对比文件中连接穿膜肽的滴眼液的效果。另外，考虑到阿柏西普的临床给药方式是眼球内玻璃体注射这种有创方式，显然该多肽滴眼液的无创滴眼方式对于患者来说具备更加安全和方便，避免了眼球内玻璃体注射带来的各种严重副作用，具有更好地临床治疗潜力。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种融合多肽AJ007，其特征在于，所述融合多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。
- [权利要求 2] 权利要求1所述的一种融合多肽AJ007在制备预防或治疗眼后段新生血管性疾病的药物中的应用。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的应用，其特征在于，所述眼后段新生血管性疾病包括：湿性年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变疾病中的一种或多种。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的应用，其特征在于，所述眼后段新生血管性疾病，包括：湿性年龄相关性黄斑变性。
- [权利要求 5] 根据权利要求2-4任一所述的应用，其特征在于，所述预防或治疗眼后段新生血管性疾病的药物至少含有融合多肽AJ007和/或其药学上可接受的载体。
- [权利要求 6] 一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，其特征在于，所述多肽滴眼液包括权利要求1所述的融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式，和辅料配伍。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，其特征在于，所述多肽滴眼液，每100mL包括如下组分：
- 融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式，0~50%w/v；
- 2-羟丙基-β-环糊精，5~10%w/v；
- 聚山梨醇酯80，0.1~5%w/v；
- 泰洛沙泊，0.05~5%w/v；
- 泊洛沙姆407，0.05~10%w/v；
- 磷酸二氢钠，0~1%w/v；
- 防腐剂，0~0.005%w/v；
- 渗透压调节剂，0~1%w/v，调节渗透压摩尔浓度为250~350mOsm/kg；

pH值调节剂，0~1% w/v，调节pH值为6.0~8.0。

[权利要求 8]

根据权利要求7所述的一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，其特征在于，所述融合多肽AJ007药学上可接受的盐形式包括：醋酸盐、三氟乙酸盐、盐酸盐、铵盐、钠盐、双羟萘酸盐、柠檬酸盐、水杨酸盐形式中的一种或多种；
和/或所述防腐剂包括苯扎氯铵、苯扎溴铵阳离子表面活性剂、苯甲醇、三氯叔丁醇、山梨酸中的一种或多种；
和/或所述渗透压调节剂包括氯化钠、硼酸、葡萄糖中的一种或多种；
和/或所述pH值调节剂包括磷酸缓冲液、硼酸缓冲液盐酸、氢氧化钠中的一种或多种。

[权利要求 9]

根据权利要求8所述的一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液，其特征在于，所述融合多肽AJ007药学上可接受的盐形式包括醋酸盐形式；所述防腐剂包括苯扎氯铵；所述渗透压调节剂包括氯化钠；所述pH值调节剂包括氢氧化钠。

[权利要求 10]

权利要求6-9任一所述的一种用于预防或治疗眼后段新生血管性疾病的多肽滴眼液的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：
(1)辅料溶液配制：取超纯水，依次加入处方量磷酸二氢钠、苯扎氯铵、聚山梨醇酯80、泊洛沙姆407、泰洛沙泊，持续搅拌至溶解完全；用0.22 μm滤膜过滤，作为A液备用；
(2)2-羟丙基 β-环糊精溶液制备：取A液置水浴搅拌锅中加热至60℃，开启搅拌，分多次将2-羟丙基 β-环糊精加入，待分散溶解完全后取出冷却，作为B液备用；
(3)调节pH、渗透压：检测B液pH值和渗透压，利用pH调节剂和渗透压调节剂调节pH、渗透压，用0.22 μm滤膜过滤，作为C液备用；

(4)多肽滴眼液制备：称取融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式加入C液中，持续震摇使融合多肽AJ007或其药学上可接受的盐形式分散溶解完全，即为多肽滴眼液。