



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116322671 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202180068881.9

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

(22) 申请日 2021.10.08

专利代理师 于巧玲

(30) 优先权数据

20201040.1 2020.10.09 EP

(51) Int.Cl.

A61K 31/4172 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/077931 2021.10.08

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/074228 EN 2022.04.14

(71) 申请人 MC2疗法有限公司

地址 英国吉尔福德

(72) 发明人 T·曼尼 J·塞尔迈 J·兰格

J·邦德伯格 M·乔治欧

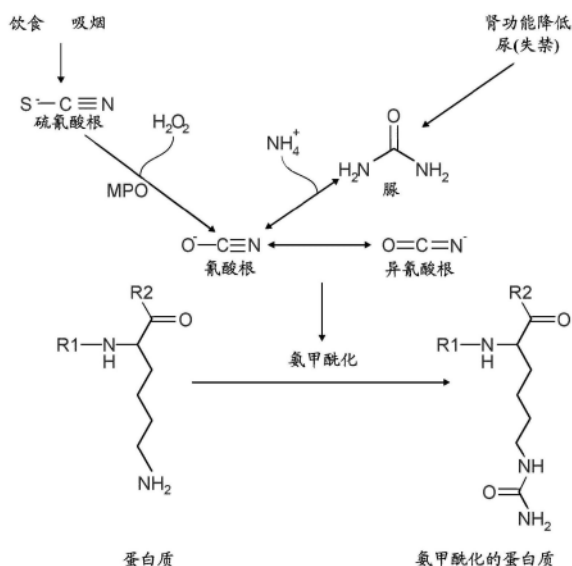
权利要求书2页 说明书14页 附图3页

## (54) 发明名称

皮肤病学病症的治疗

## (57) 摘要

提供了一种用于治疗涉及皮肤或结缔组织损伤的病症的药物组合物,其包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物。还提供了用于治疗患者的涉及皮肤或结缔组织损伤的病症的方法,所述方法包括向所述患者施用所述药物组合物。



1. 一种用于治疗涉及皮肤或结缔组织损伤的病症的药物组合物,其包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物。

2. 一种用于治疗患者的涉及皮肤或结缔组织损伤的病症的方法,所述方法包括向需要这种治疗的患者施用包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物的药物组合物。

3. 根据权利要求1所述的用途的药物组合物或根据权利要求2所述的方法,其中所述组合物是局部用组合物。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述病症是皮肤病学病症。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述皮肤病学病症选自皮肤红斑狼疮、局限性硬皮病、扁平苔藓、Dupuytren挛缩病、腕管综合征、硬斑病、获得性穿通性皮肤病、外阴阴道萎缩、生殖器牛皮癣、生殖器特应性皮炎和硬化性苔藓。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物导致通过本文提供的体外蛋白质氨甲酰化测定测量的BSA氨甲酰化程度小于80%、优选小于70%、更优选小于60%、甚至更优选小于50%。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是包含至少一个亲核部分的有机分子。

8. 根据权利要求7所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述至少一个亲核部分选自伯胺(-NH<sub>2</sub>)、仲胺(-NHR<sub>1</sub>-)、胍基(-NR<sub>1</sub>C(NR<sub>2</sub>)NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、脒基(-C(NR<sub>2</sub>)NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、胍基(R<sub>1</sub>-NR<sub>2</sub>-NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)或硫醇(-SH)。

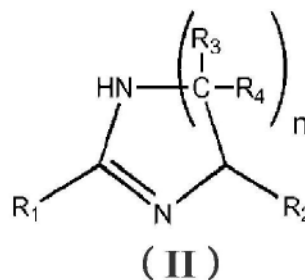
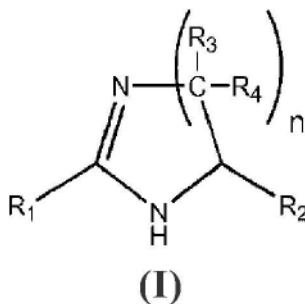
9. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述药物组合物包含两种或更多种不同的氨基酸,例如三种或更多种不同的氨基酸。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是二肽、三肽或四肽,优选二肽。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是选自以下的二肽或四肽:Gly-Gly、Lys-Pro、Val-Pro、Ile-Pro、Tyr-Pro、Ser-Pro、Pro-Ser、Ala-Gln、Ala-Glu、Tyr-Ala、Val-Tyr、Gly-Sar、Gly-His、Gly-Gly-Gly-Gly、D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-4-氨基-哌啶-4-羧酸TFA盐。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物选自乙酰半胱氨酸、苯乙胍和西格列汀。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物不是式(I)或(II)的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体或溶剂合物



其中R1是H或C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基,

R2是H、-COOH、-COO(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基)或-CONHR<sub>5</sub>,其中R<sub>5</sub>是H、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、氨基酸基团、二肽基团或三肽基团,R3和R4在每种情况下彼此独立地是H或OH,n是1、2、或3。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是亲核小分子。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述硬化性苔藓为生殖器硬化性苔藓,优选外阴硬化性苔藓。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述组合物还包含抗炎剂,例如皮质类固醇、钙调磷酸酶抑制剂、PDE4抑制剂或Janus激酶抑制剂,优选皮质类固醇。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述治疗包括与抗炎剂诸如皮质类固醇同时或连续施用所述亲核化合物。

## 皮肤病学病症的治疗

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物组合物,其包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物,用于治疗涉及皮肤或结缔组织损伤的病症,特别是皮肤病学病症。还提供了治疗患者的涉及皮肤或结缔组织损伤的病症的方法,所述方法包括向所述患者施用包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物的药物组合物。

### 背景技术

[0002] 硬化性苔藓(LS)(也称为硬化性萎缩性苔藓(LSA))是主要影响肛门区域的慢性炎症性萎缩性皮肤病。LS也可以出现在大腿内侧、臀部、乳房下方、颈部、肩部和腋窝上。男性和女性都有病例,虽然女性更常见。病因学未知,但是自身免疫和激素水平(特别是雌激素水平)的变化被认为有助于该病症。

[0003] LS的体征和症状包括瘙痒、刺激、性交疼痛、排尿困难、尿道和阴道分泌物、性交困难、大小便失禁(Bunker CB等人,2013;Christmann-Schmid等人,2018)。还有可能在受影响的区域中发生疼痛性皮肤开裂、粘连形成、阴蒂包茎和皮肤增厚。

[0004] LS患者的皮肤的特征在于真皮上部具有无定形层(透明质化带),具有玻璃态透明质层的外观。透明质化带由厚的、扭曲的和片段化的胶原纤维组成且不存在弹性蛋白纤维(Godoy等人,2015)。包括角质层在内的表皮是萎缩的。LS可导致某些癌症(例如外阴癌)的风险增加。

[0005] 可用的LS治疗方法很少,包括激素和皮质类固醇治疗,在许多情况下,这些治疗方法并不能缓解症状。大多数患者还会使用局部保湿剂来控制症状,但这些保湿剂并不能治疗潜在的病症。EP3498276描述了依克多因(ectoine)和依克多因衍生物用于治疗 and/或预防外阴皮肤病的用途。

[0006] 因此,仍然需要有效治疗皮肤或结缔组织病症,例如,硬化性苔藓,特别是外阴硬化性苔藓。

[0007] 氨甲酰化是由异氰酸根对蛋白质和氨基酸的亲核氨基的翻译后修饰。该反应优先发生在氨基酸、肽或蛋白质的 $\alpha$ -氨基上,而在赖氨酸残基侧链的 $\epsilon$ -氨基上,由于它们较低的pKa,则发生反应的速度降低100倍。该反应也可以发生在硫醇官能团上,并且在一些情况下这可以是可逆的。导致异氰酸根形成的最常见途径是脲在水溶液中自发解离为氨和异氰酸根,这在生理学条件下以约99:1的比例发生,有利于脲。异氰酸根也可由在过氧化氢存在下通过髓过氧化物酶(MPO)转化硫氰酸盐产生(Wang等人,2007)。硫氰酸盐通过饮食引入,尤其是通过水果和蔬菜以及牛奶副产品,以及通过吸烟引入。已知MPO是在炎症性细胞例如多形核中性粒细胞和单核细胞/巨噬细胞中含量丰富的酶。已报道炎症、吸烟和尿毒症或肾功能降低会增加氨甲酰化(Wang等人,2007)。

[0008] 蛋白质氨甲酰化由于在易感个体中形成针对氨甲酰化蛋白质的抗体(抗-CarP抗体)而可以导致耐受性丧失(Shi等人,2014)。已经在患有涉及皮肤或结缔组织表现的自身免疫性炎症性疾病的患者的血清中检测到抗-CarP抗体,所述疾病包括但不限于红斑狼疮

(Ziegelasch等,2016)和系统性硬化、或硬皮病(Favoino等人,2018)。

[0009] 胶原蛋白是体内最丰富的蛋白质,不仅起到结构作用,还调节细胞生长、分化和迁移。胶原由于其周转特别缓慢而成为氨甲酰化的主要靶标(Pietrement等,2013)。先前的研究已经报道,氨甲酰化对胶原的结构和功能具有关键影响,包括热稳定性降低(Jaisson等人,2006)、原纤维形成干扰(Jaisson等人,2006)、对胶原酶的易感性改变(Jaisson等人,2007)和激活炎症性细胞的能力降低(Jaisson等人,2006,2008)。最近的结果表明,羧基赖氨酸氨甲酰化通过竞争性抑制各种组织(包括皮肤)中的胶原交联形成而影响结缔组织的机械性能(Taga等人,2017)。

## 发明内容

[0010] 已经发现,可以通过抑制氨甲酰化来治疗涉及皮肤或结缔组织损伤的病症(特别是皮肤病学病症)。具体地,已经表明,患有外阴硬化性苔藓的患者在用含有亲核试剂的乳膏治疗数周后已经实现了症状完全缓解、疼痛减轻和皮肤变化显著改善。存在以下基本原理:源于相关的尿失禁,由尿衍生的异氰酸根,和/或炎症导致的由MPO介导的硫氰酸盐转化增加,是由于皮肤和结缔组织(如弹性蛋白、胶原蛋白)的破坏性氨甲酰化所致硬化性苔藓的一个原因。不受理论的束缚,本发明人认为,氨甲酰化影响胶原、弹性蛋白和锚定丝的分子内桥和三维结构,这导致不仅在LS患者中,而且在具有皮肤和结缔组织临床表现的一系列其他炎症性疾病中,都观察到萎缩、纤维化、开裂和角化过度,所述其他炎症性疾病包括但不限于皮肤红斑狼疮、局限性硬皮病、扁平苔藓、Dupuytren收缩病、腕管综合征、硬斑病、获得性穿通性皮肤病、和外阴阴道萎缩。

[0011] 此外,其他最近的研究已经在大多数硬化性苔藓患者中鉴定到针对细胞外基质1蛋白(ECM1)的循环自身抗体(Tran等人,2019)。在表皮内,ECM1具有控制角质形成细胞分化的作用。ECM1与作为主要的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的基底膜蛋白多糖(perlecan)结合。以这种方式,ECM1可以在真皮中充当“生物胶水”,有助于调节基底膜和间质胶原纤维的宏观组装和生长因子结合。ECM1还可能在其他获得性皮肤病和生理性皮肤变化中发挥作用。可想而知,氨甲酰化也可能导致ECM1的失调,从而导致肝硬化和其他病症中的皮肤和结缔组织损伤。

[0012] 用于各种组织的功能的另一种重要蛋白质是丝聚蛋白,其对于表皮稳态特别重要(Thyssen和Maibach,2014)。类似地,丝聚蛋白的氨甲酰化可能引起功能丧失,导致皮肤和结缔组织损伤。

[0013] 因此提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物,用于治疗涉及皮肤或结缔组织损伤的病症(特别是皮肤病学病症)。还提供了一种治疗患者的皮肤病学病症的方法,所述皮肤病学病症特别是涉及皮肤或结缔组织损伤的皮肤病学病症,所述方法包括向所述患者施用包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物的药物组合物。

[0014] 本技术的进一步细节在以下说明书文本、实施例和从属的权利要求中提供。

[0015] 附图简述

[0016] 图1说明了由不同途径形成的氰酸根或异氰酸根导致蛋白质侧链的氨甲酰化的机制,这导致蛋白质功能改变或丧失。缩写MPO是指髓过氧化物酶。

[0017] 图2显示了使用重构的人皮肤进行体外蛋白质氨甲酰化测定的结果。

[0018] 图3是用在图2中测试的各种亲核试剂处理的皮肤样品的苏木精和伊红 (H&E) 染色的图片。

[0019] 发明详述

[0020] 药物组合物

[0021] 在第一方面,提供了一种药物组合物,其包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物,用于治疗涉及皮肤或结缔组织损伤的病症,特别是皮肤病学病症。据信亲核化合物通过清除氰酸根/异氰酸根来抑制氨甲酰化(如图1所示)。优选地,所述组合物是局部用组合物。

[0022] 术语“亲核试剂”和“亲核化合物”表示具有亲核部分的有机化合物,所述亲核部分可以向另一分子或化学基团提供电子对以形成化学键。所有亲核试剂都是路易斯碱。在本技术中,理论上,亲核化合物的亲核部分与患者皮肤中存在的异氰酸根反应,从而抑制异氰酸根引起的蛋白质氨甲酰化。

[0023] 亲核化合物的亲核性质可以通过模型蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 在所述亲核试剂存在下的氨甲酰化程度来确定。

[0024] 在一个方面,所述亲核化合物在通过本文提供的体外蛋白质氨甲酰化测定测量时产生的BSA氨甲酰化程度(相对于在Hank平衡盐溶液 (HBSS) 中的对照) 小于80%,优选小于70%,更优选小于60%,甚至更优选小于50%。根据该定义,不提供所需的BSA氨甲酰化程度的化合物不被认为是“亲核化合物”。

[0025] 如上所述,亲核化合物适宜地是包含至少一个亲核部分的有机分子。亲核化合物上可存在多于一个亲核部分,任选不同类型的多于一个亲核部分。

[0026] 在一个方面,至少一个亲核部分选自伯胺(-NH<sub>2</sub>)、仲胺(-NHR<sub>1</sub>-)、胍基(-NR<sub>1</sub>C(NR<sub>2</sub>)NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、脒基(-C(NR<sub>2</sub>)NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、胍基(R<sub>1</sub>-NR<sub>2</sub>-NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)或硫醇(-SH)。

[0027] 为了提供对BSA氨甲酰化的最佳抑制,在所述组合物或所述方法中,至少一个亲核部分优选为其未质子化形式。这允许亲核部分作为游离路易斯碱充分反应。

[0028] 在特定情况下,亲核化合物是氨基酸。可使用任何天然或非天然氨基酸,但优选选自组氨酸、赖氨酸或精氨酸的氨基酸。

[0029] 在一个优选方面,药物组合物包含两种或更多种不同的氨基酸,例如三种或更多种不同的氨基酸。例如,已经显示,组氨酸、赖氨酸和精氨酸这三种氨基酸的组合特别有效(参见实施例2)。

[0030] 亲核化合物在一些情况下可以是二肽、三肽或四肽,并且优选是二肽。二肽、三肽和四肽具有以下优点:由于末端氨基的较低pK<sub>a</sub>值,它们是比单一氨基酸更强的亲核试剂(Stark,1965)。

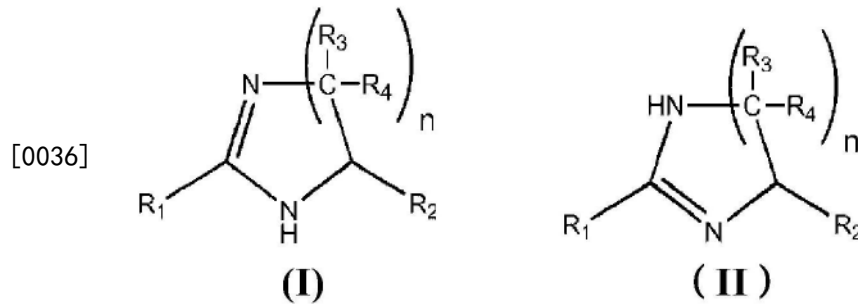
[0031] 感兴趣的特定二肽选自:Gly-Gly、Lys-Pro、Val-Pro、Ile-Pro、Tyr-Pro、Ser-Pro、Pro-Ser、Ala-Gln、Ala-Glu、Tyr-Ala、Val-Tyr、Gly-Sar和Gly-His。

[0032] 感兴趣的特定四肽选自Gly-Gly-Gly-Gly和D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-4-氨基-哌啶-4-羧酸TFA盐(Difelikefalin)。

[0033] 在某些情况下,亲核化合物不是氨基酸。

[0034] 在一个特定方面,亲核化合物可以选自乙酰半胱氨酸(硫醇亲核试剂)、苯乙胍(胍亲核试剂)、西格列汀(小分子氨基亲核试剂)。

[0035] 一方面,亲核化合物不是式(I)或(II)的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体或溶剂合物



[0037] 其中 $R_1$ 是H或 $C_1-C_4$ 烷基, $R_2$ 是H、 $-COOH$ 、 $-COO$  ( $C_1-C_4$ 烷基)或 $-CONHR_5$ ,其中 $R_5$ 是H、 $C_1-C_4$ 烷基、氨基酸基团、二肽基团或三肽基团, $R_3$ 和 $R_4$ 在每种情况下彼此独立地是H或OH, $n$ 是1、2、或3。如实施例3中所示,相对于HBSS对照,依克多因导致高度的氨甲酰化(%),并且不认为是在本发明的含义内的“亲核化合物”。

[0038] 一方面,亲核化合物是亲核小分子。术语“小分子”定义为MW小于500g/mol的有机分子。

[0039] 亲核小分子可包含伯胺亲核部分(即 $-NH_2$ )。在这种情况下,亲核小分子可以选自阿斯巴甜、邻氨基苯甲酸、 $N$ - $\beta$ -氨基乙基-Gly、西格列汀、沙格列汀、利格列汀、吉格列汀、阿格列汀、金刚乙胺(rimantadine)、曲格列汀、奥格列汀、依格列汀、氨氯地平、甲基多巴、乌苯美司(bestatin)、庆大霉素、环丝氨酸或氨苄青霉素。

[0040] 亲核小分子可以可选地或另外地包含仲胺( $>NH$ )亲核部分,优选吡咯烷基、哌啶基或哌嗪基部分。在这种情况下,亲核小分子可以选自替格列汀、戈索列汀(gosogliptin)、麻黄碱、呋塞米、沙丁胺醇、氯胺酮或环丙沙星。

[0041] 亲核小分子可以可选地或另外地包含胍基( $-NH-C(=NH)-NH_2$ )亲核部分。在这种情况下,亲核小分子可以选自二甲双胍、丁双胍、苯乙双胍、氯胍(proguanil)、二氯胍(chlorproguanil)或氯己定。

[0042] 亲核小分子可以可选地或另外地包含脒基( $-CH_2-C(=NH)-NH_2$ )亲核部分,并且可以优选地选自喷他脒、二脒那嗪、双脒苯脒或托西米定(xylamidine)。

[0043] 亲核小分子可以可选地或另外地包含硫醇( $-SH$ )亲核部分,并且可以优选地选自乙酰半胱氨酸或卡托普利。

[0044] 亲核小分子可以可选地或另外地包含胼基( $-NH-NH_2$ )亲核部分。在这种情况下,亲核小分子可以选自苯乙胼、胼屈嗪、双胼屈嗪或恩屈嗪。

[0045] 本文所述的化合物可含有若干不对称中心,并且可以光学纯的对映异构体、对映异构体的混合物(例如,外消旋体)、非对映异构体的混合物、非对映异构外消旋体、或非对映异构外消旋体的混合物的形式存在。

[0046] 通常,亲核化合物以0.1-10%w/w,优选0.5-4%w/w,更优选1-3%w/w的浓度存在于药物组合物中。

[0047] 根据本发明的药物组合物优选用于局部施用。它们可以是任何形式,例如溶液、悬浮液、乳液、糊剂、软膏、凝胶、乳膏、洗剂、粉末、肥皂、含表面活性剂的清洁制剂、局部贴剂、油、泡沫和喷雾剂。优选地,药物组合物为局部用乳膏或洗剂的形式,特别是水包油乳膏。根

据本发明的药物组合物还可以通过其他施用途给予,包括但不限于皮下注射。

[0048] 药物组合物可以以 $0.001\text{mg}/\text{cm}^2$ 至 $5\text{mg}/\text{cm}^2$ 皮肤表面,优选 $0.003\text{mg}/\text{cm}^2$ 至 $1\text{mg}/\text{cm}^2$ 皮肤表面,更优选 $0.005\text{mg}/\text{cm}^2$ 至 $0.5\text{mg}/\text{cm}^2$ 皮肤表面的亲核试剂浓度施用至皮肤。

[0049] 本发明的药物组合物可包含不同于本文所述的亲核化合物的组分,即一种或多种赋形剂。赋形剂可以是载体、佐剂和/或媒介物。合适的赋形剂可以是无菌液体,例如水和油(包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)、崩解剂、润湿剂或稀释剂。这些赋形剂的选择和使用量将取决于药物组合物的施用形式。

[0050] 在一个优选的方面,药物组合物还包含一种或多种抗炎剂,例如皮质类固醇、钙调磷酸酶抑制剂、PDE4抑制剂或Janus激酶抑制剂,优选选自氯倍他索、莫米松、倍他米松或氢化可的松的皮质类固醇。

[0051] 根据本发明的特定药物组合物是局部用乳膏,其包含(以%w/w计):

[0052] -组氨酸0.1-1%

[0053] -精氨酸0.5-1.5%

[0054] -赖氨酸0.50-1.5%

[0055] -任选地,皮质类固醇0.01-1.0%

[0056] 以整个药物组合物的重量计。

[0057] 治疗方法

[0058] 提供了一种用于治疗患者的涉及皮肤或结缔组织损伤的病症(特别是皮肤病学病症)的方法。所述方法包括向需要这种治疗的患者施用包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物的药物组合物。该方法中使用的“亲核化合物”如上所述。

[0059] 如本文所用,术语“治疗”通常包括病症发作后的根除、去除、逆转、缓解、改变或控制。术语“治疗”包括预防性治疗(即,在病症发作之前)。术语“治疗”可以具体地指治疗或减少对皮肤或结缔组织的损伤。此外,术语“治疗”可以指治疗或减轻症状,特别是与皮肤或结缔组织损伤相关的症状。

[0060] 在一个具体的实施方案中,“治疗”包括减少弹性蛋白、胶原蛋白、丝聚蛋白和细胞外基质蛋白1(所有这些都是对组织完整性重要的蛋白质)的变化/损伤。

[0061] 本文所用的术语“药物组合物”包括为除食品以外的任何用途制造的任何组合物,其中本发明的亲核试剂在身体上或身体中使用以对人类或动物的疾病进行预防、诊断、缓解、治疗、减轻其症状、或治愈。

[0062] 上述关于药物组合物的所有细节也与本文所述的治疗方法相关。特别地,本发明方法中施用的药物组合物是局部用组合物。

[0063] 本发明的药物组合物和方法可用于选自皮肤红斑狼疮、局限性硬皮病、扁平苔藓、Dupuytren挛缩病、腕管综合征、硬斑病、获得性穿通性皮肤病、外阴阴道萎缩、生殖器银屑病、生殖器特应性皮炎和硬化性苔藓的皮肤病学病症。适宜地,所述硬化性苔藓为生殖器硬化性苔藓,优选外阴硬化性苔藓。

[0064] 已知硬化性苔藓在某些情况下导致癌症(Paulis等人,2019)。氧化应激与硬化性苔藓和潜在恶性肿瘤的发病机制有关(Sander等人,2004;Paulis等人,2019)。本领域技术人员已知,与异氰酸根处于平衡状态的氰酸根增加细胞中的氧应激并且已经显示是致癌的。因此,在一个实施方案中,用于本文公开的用途或方法中的药物组合物通过清除氰酸根



治疗癌症,特别是由硬化性苔藓引起的癌症,例如鳞状细胞癌。

[0065] 在另一个实施方案中,本文公开用途或方法中的药物组合物用于治疗生殖器区域中的银屑病和特应性皮炎,其存在皮肤和结缔组织损伤,并且在失禁患者中特别难以治疗。在这两种疾病中,已知在表皮颗粒层中丝聚蛋白的形成显著降低(Thyssen和Maibach, 2014)。源于氨甲酰化的丝聚蛋白降解可能是致病性因素,因此用本发明的异氰酸根清除剂治疗可以治疗与这些疾病相关的皮肤和结缔组织损伤。

[0066] 应该用药物组合物进行治疗,以便向患者提供“有效”量或“治疗有效量”的亲核化合物(即,无毒性但足够提供所需效果的药物或活性剂的量)。在本发明的治疗中,亲核化合物或其衍生物的“有效量”是有效提供所需效果的化合物的量。所述“有效”的量将根据受试者而异,取决于个体的年龄和一般状况、特定的一种或多种活性剂等。因此,并不是总可以指定确切的“有效量”。然而,本领域普通技术人员可以使用常规实验来确定在任何单独情况下的适当“有效”量。例如,施用可以定期进行(例如每天一次、每天两次等)或结合特定事件进行(例如排尿后),或此类施用的组合。

[0067] 在特别感兴趣的方法中,所述治疗包括将所述亲核化合物与抗炎剂(例如选自氯倍他索、莫米松、倍他米松或氢化可的松的皮质类固醇)同时或连续施用,适当地(但不必定)在同一药物组合物中。

[0068] 用本发明的药物组合物治疗的皮肤或结缔组织可以是纤维性结缔组织,优选包含胶原蛋白和/或弹性蛋白。适当地,所述治疗防止锚定丝降解。所要治疗的组织还包括本领域技术人员已知的各种其他部分,包括但不限于血管和神经纤维,其也可以是治疗的靶标。

## 实施例

[0069] 实施例1:局部用乳膏

[0070] 本领域技术人员熟知的水包油乳膏基质,含有L-组氨酸(0.50%w/w)、L-精氨酸(0.75%w/w)和L-赖氨酸盐酸盐(0.70%)。

[0071] 实施例2:硬化性苔藓的临床病例

[0072] 病例表现

[0073] 患者为74岁女性,诊断患有硬化性苔藓6年。活检已证实诊断。患者有压力性失禁倾向。

[0074] 所述疾病具有稳定的进展过程,并且在6年期间从未完全缓解。症状主要是疼痛和较小程度的瘙痒。最初的客观症状是外阴区域的白色和红色斑块,随后是侵蚀、开裂和溃疡。渐增的严重主观症状包括在例如排尿、步行或骑自行车期间的疼痛。皮肤变化严重影响生活质量和性功能。观察到解剖学变化,包括小阴唇的硬化、阴蒂包埋和阴道周围发炎区域中的黏连。

[0075] 临床史

[0076] 患者自从疾病开始以来一直接受医疗监督。她认真地保存了日记,包括常规照片和基于视觉模拟量表(VAS)的以0-10评分的疼痛登记。最初,在用本发明的氨基酸乳膏治疗开始之前,VAS评分为7。

[0077] 药物治疗:

[0078] 在开始用本发明的氨基酸乳膏治疗前六个月,她重新开始每天两次用丙酸氯倍他

索软膏的维持治疗,持续12周,没有获得令人满意的效果。在用氨基酸乳膏进行治疗干预的过程中,每天一次继续治疗,每周三次。

[0079] 治疗干预

[0080] 患者开始用含有总共1.95%亲核氨基酸(0.5%组氨酸、0.7%赖氨酸、0.75%精氨酸)的乳膏治疗。每天两次向外阴区域局部施用乳膏,每次排尿后补充施用。每月总共使用约60g的氨基酸乳膏。

[0081] 结果

[0082] 用氨基酸乳膏治疗显示对排尿期间疼痛的快速起效。治疗1周后,疼痛显著降低。治疗3周后,患者症状完全缓解,VAS评分为0-1,允许正常的日常生活没有疼痛。治疗6周后的客观观察显示出显著的改善。皮肤总体上色浅且光滑,所有的开裂和溃疡都被愈合而没有疤痕,并且黏连最小化。阴道口处的发炎红色区域持续存在。在治疗总共3个月之后,患者在6年中第一次完全缓解并且没有疼痛症状。不存在炎症或发红。所述硬化区域没有变化。身体机能恢复正常并且治疗区域中的感觉已经恢复。

[0083] 实施例3:体外蛋白氨甲酰化测定

[0084] 将200 $\mu$ L 0.5%BSA溶液、200 $\mu$ L测试溶液和100 $\mu$ L 5 $\mu$ Ci/mL<sup>14</sup>C-氰酸钾溶液在Eppendorf管中混合(对应于终浓度为75 $\mu$ M BSA、25 $\mu$ M <sup>14</sup>C-氰酸钾和10mM亲核试剂)。样品一式三份操作(n=3)。将Eppendorf管在37 $^{\circ}$ C下保温72小时(如果没有另外说明)。

[0085] 保温后,将100 $\mu$ L体积的每种样品转移到含有100 $\mu$ L 10%三氯乙酸(TCA)的新Eppendorf管中,并在4 $^{\circ}$ C下保持过夜(用于BSA的沉淀)。随后,通过离心(10000rpm,30秒)将沉淀的BSA与缓冲液分离。除去上清液并将BSA沉淀重悬于200 $\mu$ L的10%冷TCA溶液(4 $^{\circ}$ C)中。通过离心(10000rpm,30秒)回收沉淀并丢弃上清液。将BSA沉淀重悬于100 $\mu$ L纯化水(Milli Q)中并转移至闪烁瓶。用另外的100 $\mu$ L纯化水冲洗(先前包含BSA小球的)Eppendorf管,将其转移到相关闪烁小瓶中。对于闪烁计数,将2mL闪烁流体(UltimaGold,PerkinElmer)添加到每个闪烁小瓶中,并且在TRI-Carb 2910闪烁计数器(Perkin Elmer)上进行闪烁计数。不同亲核试剂的结果示于表1中。

[0086] 表1. 不同亲核试剂的体外蛋白质氨甲酰化测定结果

亲核试剂	氨甲酰化程度(相对于 HBSS 对照的%)	SD
HBSS 对照	100	5.45
N- $\beta$ -氨基乙基-Gly	29.7	0.34
Gly-Gly	26.6	0.11
Lys-Pro	28.6	0.75

[0087]

	<b>Val-Pro</b>	<b>22.1</b>	<b>0.62</b>
	<b>Ile-Pro</b>	<b>41.4</b>	<b>1.15</b>
	<b>Tyr-Pro</b>	<b>32.8</b>	<b>0.88</b>
	<b>Ser-Pro</b>	<b>26.4</b>	<b>0.57</b>
	<b>Pro-Ser</b>	<b>41.9</b>	<b>1.15</b>
	<b>Ala-Gln</b>	<b>34.8</b>	<b>0.54</b>
	<b>Ala-Glu</b>	<b>20.4</b>	<b>0.20</b>
	<b>Tyr-Ala</b>	<b>26.1</b>	<b>0.25</b>
	<b>Val-Tyr</b>	<b>28.9</b>	<b>0.30</b>
	<b>Gly-Ser</b>	<b>33.1</b>	<b>0.20</b>
	<b>Gly-His</b>	<b>22.6</b>	<b>0.20</b>
	乌苯美司	53.4	1.93
	依克多因	97.9	0.50
	二甲双胍*HCl <sup>a,b</sup>	71.4	0.87
[0088]	组氨酸	61.1	0.54
	<b>Arg</b>	<b>52.4</b>	<b>1.45</b>
	<b>Arg*HCl</b>	<b>66.1</b>	<b>3.89</b>
	苯乙胍硫酸盐 <sup>b</sup>	9.8	0.28
	乙酰半胱氨酸	14.3	0.11
	金刚乙胺*HCl <sup>a,b</sup>	78.5	0.84
	阿斯巴甜	30.4	0.91
	喷他咪二羟乙磺酸盐 <sup>b</sup>	43.1	2.67
	西格列汀磷酸盐 <sup>b</sup>	48.6	0.45
	<b>Difelikefalin (D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-4-氨基-哌啶-4-羧酸TFA 盐)<sup>b</sup></b>	<b>23.2</b>	<b>1.1</b>
	四甘氨酸	24.9	0.45

[0089] <sup>a</sup>溶解在HBSS:DMSO 90:10中; <sup>b</sup>在使用前通过添加等摩尔量的NaOH进行中和。

[0090] 从表1可以明显看出,具有各种官能团的多种不同化合物都可用作本发明的亲核

试剂。

[0091] 实施例4:使用重构的人皮肤的体外蛋白质氨甲酰化测定

[0092] 重构的人皮肤培养物的制备和处理程序

[0093] 在收货后立即将表皮全厚度 (Epiderm FT, MatTek Corp., USA) 组织转移到含有 EpiDerm™ 全厚度维持培养基 (MatTek Corp., USA) 的B6托盘中,并在37°C和5%CO<sub>2</sub>下孵育24小时。在最初的24小时孵育之后,通过在基底侧用5mL新鲜培养基替换维持培养基并向顶侧添加400μL的不同处理溶液(参见下文处理溶液的列表)并在37°C和5%CO<sub>2</sub>下孵育来开始氨甲酰化实验。氨甲酰化实验持续六天,每隔一天(第0天、第二天和第四天)更换基底侧的维持培养基和顶侧的处理溶液。在第六天,从组织去除处理溶液和维持培养基,并加入预热的磷酸盐缓冲盐水(DPBS, Sigma-Aldrich)并去除,进行两次,然后送检组织用于ELISA和组织学分析。在四种不同的组织上测试7种不同的条件,其中将每次处理的一个组织送检用于ELISA,其余三个组织送用于组织学分析。

[0094] 添加到顶端隔室的处理溶液的概述

[0095] 1. 对照(无治疗)

[0096] 2. 400μL 0.5M脲:异氰酸盐99:1

[0097] 3. 400μL 0.5M脲:异氰酸盐99:1+200μL 2%Ala-Gln溶液

[0098] 4. 400μL 0.5M脲:异氰酸盐99:1+200μL 2%乙酰半胱氨酸溶液

[0099] 5. 400μL 0.5M脲:异氰酸盐99:1+200μL 2%苯乙肼硫酸盐溶液(使用前用1当量NaOH中和)

[0100] 6. 400μL 0.5M脲:异氰酸盐99:1+200μL 2%His溶液

[0101] 7. 400μL 0.5M脲:异氰酸盐99:1+200μL 2%西格列汀溶液

[0102] 将脲和异氰酸盐的99:1混合物用于实验,以模拟生物条件下两种物质之间的平衡。选择所用浓度以类似于尿液中脲的近似浓度(Liu等人,2012)。

[0103] 用于蛋白质氨甲酰化ELISA的蛋白质提取程序

[0104] 用于蛋白质提取的实验程序来自对Ross-Hansen等人,2014和Palosuo等人,1998所述程序的修改。从塑料填料圈切下细胞覆盖的EpidermFT过滤器(Mattek),并用手术刀轻轻地从膜剥离细胞层。将细胞层置于研钵中,加入250μl萃取缓冲液(1M磷酸钾,2mM Na<sub>2</sub>EDTA,0.1%叠氮化钠,1片完全Mini蛋白酶抑制剂片(每片50ml),pH 6.9)加上0.07g石英砂(Merck,目录号1.075360250),研磨至得到光滑的糊状物。将糊状物转移到1.5ml管中,用额外的250μl缓冲液洗涤研钵。将样品冷却并在最大设置下超声处理5分钟。将样品孵育1小时,室温,旋转。随后将样品再冷却并再次超声处理。将混合物以5000xg离心15分钟,并将上清液倾析到新鲜管中。为了脱脂,加入400μl的2-溴-氯-1,1,1-三氟乙烷(Merck,目录号B4388-125),并将管在混合器上旋转1小时。以5000xg离心15min后,收集上清液,弃去中间相和脂质溶剂相。将蛋白质提取物在PBS中在Slide-A-Lyzer 7K透析盒(Thermo Fisher,目录号66370)中透析过夜,并在-20°C下储存。将未经稀释的样品于蛋白质氨甲酰化夹心ELISA(Protein Carbamylation Sandwich ELISA)(Cell Biolabs Inc,目录号STA-877)中进行分析。结果示于图2中。

[0105] 从图2中可以明显看出,根据本发明,一系列具有各种官能团的化学上不同的亲核试剂都可以在重构的人皮肤模型中起到异氰酸根清除剂的作用。对于对照样品,与没有脲:

异氰酸盐处理的对照样品相比,用脲和异氰酸盐的99:1混合物处理确实导致如预期的显著的氨甲酰化。

[0106] 用于皮肤样品的组织学分析的程序

[0107] 将直径约1cm的EpiDermFT膜在福尔马林中固定5天。使用剪刀将膜切成两半,并放置到组织凝胶基质中,以使切割表面作为组织切片表面。样品在酒精和二甲苯中脱水并使用标准石蜡包埋程序包埋在石蜡中。以4 $\mu$ m切割切片,用于苏木精和伊红(H&E)染色和免疫组织化学(IHC)。使用具有Zeiss AxioScan的20x物镜获取图像。选择代表性区域用于呈现。

[0108] 通常,EpiDermFT皮肤样品包含三个特征隔室:具有角化层的表皮、厚真皮层和具有增加的细胞密度的下真皮层。

[0109] 从图3中可以明显看出,用上述亲核试剂处理还导致减少了由脲:异氰酸盐所致的皮肤变化和损伤。没有任何处理的对照样品显示完整的皮肤,其中表皮附着于真皮。用脲:异氰酸盐处理的对照样品没有显示任何附着的表皮,表明用脲:异氰酸盐处理引起严重的皮肤和结缔组织损伤,可想而知是由将真皮和表皮结合在一起的锚定纤维的氨甲酰化所致。与仅用脲:异氰酸盐处理的对照样品相比,在还用不同亲核试剂处理的所有组中,表皮的附着有不同程度的改善。这些结果表明,用不同的亲核试剂处理可以对抗由氨甲酰化引起的皮肤和结缔组织损伤。用西格列汀的处理显示出最小的效果,这与来自ELISA的结果(图2)相符,其中西格列汀未显示像其他亲核试剂那样完全抑制蛋白质氨甲酰化。

[0110] 提供以下编号的方面:

[0111] 方面1.一种用于治疗涉及皮肤或结缔组织损伤的病症的药物组合物,其包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物。

[0112] 方面2.一种在患者中治疗涉及皮肤或结缔组织损伤的皮肤病学病症的方法,所述方法包括向需要这种治疗的患者施用包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物的药物组合物。

[0113] 方面3.根据方面1所述用途的药物组合物或根据方面2所述的方法,其中所述组合物是局部用组合物。

[0114] 方面4.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述病症是皮肤病学病症。

[0115] 方面5.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中将所述组合物以0.001mg/cm<sup>2</sup>至5mg/cm<sup>2</sup>皮肤表面、优选地0.003mg/cm<sup>2</sup>至1mg/cm<sup>2</sup>皮肤表面、并且更优选地0.005mg/cm<sup>2</sup>至0.5mg/cm<sup>2</sup>皮肤表面的范围内的亲核试剂浓度施用到皮肤。

[0116] 方面6.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述皮肤病学病症选自:皮肤红斑狼疮、局限性硬皮病、扁平苔藓、Dupuytren挛缩病、腕管综合征、硬斑病、获得性穿通性皮肤病、外阴阴道萎缩、生殖器银屑病、生殖器特异性皮炎和硬化性苔藓。

[0117] 方面7.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物导致通过本文提供的体外蛋白质氨甲酰化测定测量的BSA氨甲酰化程度小于80%、优选小于70%、更优选小于60%、甚至更优选小于50%。

[0118] 方面8.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是包含至少一个亲核部分的有机分子。

[0119] 方面9.根据方面6所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述至少一个亲

核部分选自伯胺(-NH<sub>2</sub>)、仲胺(-NHR<sub>1</sub>-)、胍基(-NR<sub>1</sub>C(NR<sub>2</sub>)NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、脒基(-C(NR<sub>2</sub>)NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、胥基(R<sub>1</sub>-NR<sub>2</sub>-NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)或硫醇(-SH)。

[0120] 方面10.根据方面6-7中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中在所述组合物或所述方法中,所述至少一个亲核部分呈其未质子化形式。

[0121] 方面11.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是氨基酸,例如选自组氨酸、赖氨酸或精氨酸的氨基酸。

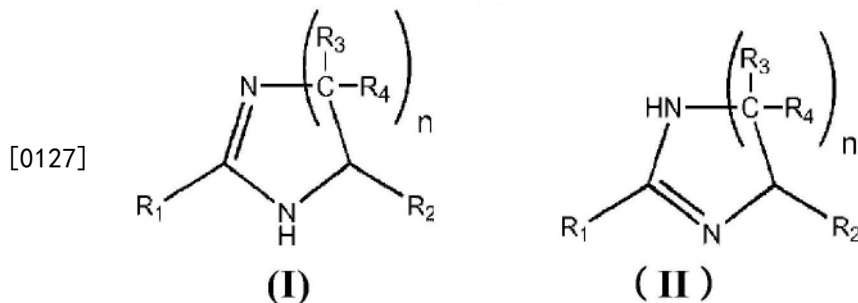
[0122] 方面12.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述药物组合物包含两种或更多种不同的氨基酸,例如三种或更多种不同的氨基酸。

[0123] 方面13.根据方面10所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述药物组合物包含组氨酸、赖氨酸和精氨酸,或组氨酸、赖氨酸和精氨酸中的一种或多种的组合。

[0124] 方面14.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是二肽、三肽或四肽,优选二肽。

[0125] 方面15.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是选自以下的二肽或四肽:Gly-Gly、Lys-Pro、Val-Pro、Ile-Pro、Tyr-Pro、Ser-Pro、Pro-Ser、Ala-Gln、Ala-Glu、Tyr-Ala、Val-Tyr、Gly-Sar、Gly-His、Gly-Gly-Gly-Gly、D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Lys-4-氨基-哌啶-4-羧酸TFA盐。

[0126] 方面16.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物不是式(I)或(II)的化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体或溶剂合物



[0128] 其中R1是H或C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基,

[0129] R2是H、-COOH、-COO(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基)或-CONHR<sub>5</sub>,其中R<sub>5</sub>是H、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、氨基酸基团、二肽基团或三肽基团,R3和R4在每种情况下彼此独立地是H或OH,n是1、2、或3。

[0130] 方面17.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物是亲核小分子。

[0131] 方面18.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子包含伯胺亲核部分。

[0132] 方面19.根据方面18所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子选自阿斯巴甜、邻氨基苯甲酸、N-β-氨乙基-Gly、西格列汀、沙格列汀、利格列汀、吉格列汀、阿格列汀、金刚乙胺(rimantandine)、曲格列汀、奥格列汀、依格列汀、氨氯地平、甲基多巴、乌苯美司、庆大霉素、环丝氨酸、加巴喷丁、普瑞巴林或氨苄青霉素。

[0133] 方面20.根据方面1-17中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子包含仲胺亲核部分,优选吡咯烷基、哌啶基或哌嗪基部分。

[0134] 方面21.根据方面20所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分

- 子选自替格列汀、戈索列汀(gosogliptin)、麻黄碱、呋塞米、沙丁胺醇、氯胺酮或环丙沙星。
- [0135] 方面22.根据方面1-17中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子包含胍基亲核部分。
- [0136] 方面23.根据方面22所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子选自二甲双胍、丁双胍、苯乙双胍、氯胍、二氯胍或氯己定。
- [0137] 方面24.根据方面1-17中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子包含脒基亲核部分,优选其中所述亲核小分子选自喷他脒、二脒那嗪、双脒苯脲或托西米定(xylamidine)。
- [0138] 方面25.根据方面1-17中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子包含硫醇亲核部分,优选其中所述亲核小分子选自乙酰半胱氨酸或卡托普利。
- [0139] 方面26.根据方面1-17中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子包含胼基亲核部分。
- [0140] 方面27.根据方面26所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核小分子选自苯乙胼、胼屈嗪、双胼屈嗪或恩屈嗪。
- [0141] 方面28.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述硬化性苔藓是生殖器硬化性苔藓,优选外阴硬化性苔藓。
- [0142] 方面29.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述组合物还包含抗炎剂,诸如皮质类固醇、钙调磷酸酶抑制剂、PDE4抑制剂或Janus激酶抑制剂,优选选自氯倍他索、莫米松、倍他米松或氢化可的松的皮质类固醇。
- [0143] 方面30.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述治疗包括将所述亲核化合物与抗炎剂(例如选自氯倍他索、莫米松、倍他米松或氢化可的松的皮质类固醇)同时或连续施用。
- [0144] 方面31.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,所述药物组合物为局部用乳膏、凝胶或洗剂的形式,特别是水包油乳膏的形式。
- [0145] 方面32.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,其中所述亲核化合物以0.1-10%w/w、优选0.5-4%w/w、更优选1-3%w/w的浓度存在于所述组合物中。
- [0146] 方面33.根据前述方面中任一项所述的用途的药物组合物或所述的方法,所述药物组合物为局部用乳膏,包含(以%w/w计):
- [0147] 组氨酸0.1-1%
- [0148] 精氨酸0.5-1.5%
- [0149] 赖氨酸0.50-1.5%
- [0150] 任选地,皮质类固醇0.01-1.0%。
- [0151] 方面34.一种药物组合物,其包含能够抑制氨甲酰化的亲核化合物和抗炎剂诸如皮质类固醇。
- [0152] 方面35.根据方面33所述的药物组合物,其中所述亲核化合物如方面1-27中任一项所定义。
- [0153] 参考文献

- [0154] Bunker CB,Patel N,Shim TN.Urinary voiding symptomatology (micro-incontinence) in male genital lichen sclerosus. *Acta Derm Venereol.* 2013;93(2) : 246-248.
- [0155] Christmann-Schmid C,Hediger M, **Gröger**S,Krebs J, **Günthert** AR; In cooperation with the Verein Lichen sclerosus.Vulvar lichen sclerosus in women is associated with lower urinary tract symptoms. *Int Urogynecol J.* 2018;29(2) : 217-221.
- [0156] Favoino E,Prete M,Vettori S,et al. Anti-carbamylated protein antibodies and skin involvement in patients with systemic sclerosis: An intriguing association. *PLoS One.* 2018;13(12)
- [0157] Godoy, Charles&Teodoro, Walcy&Velosa, Ana&Garippo, Ana&Eher, Esmeralda&Parra, Edwin&Sotto, Mirian&Capelozzi, Vera. (2015). Unusual remodeling of the hyalinization band in vulval lichen sclerosus by type V collagen and ECM 1 protein. *Clinics (São Paulo, Brazil)*, 70(5), 356-62.
- [0158] Jaisson, S., Lorimier, S., Ricard-Blum, S., Sockalingum, G.D., Delevallee-Forte, C., Kegelaer, G., Manfait, M., Garnotel, R., and Gillery, P. (2006). Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils. *Chem. Biol.* 13, 149-159.
- [0159] Jaisson, S., Larreta-Garde, V., Bellon, G., Hornebeck, W., Garnotel, R., and Gillery, P. (2007). Carbamylation differentially alters type I collagen sensitivity to various collagenases. *Matrix Biol.* 26, 190-196.
- [0160] Jaisson, S., Sartelet, H., Perreau, C., Blanchevove, C., Garnotel, R., and Gillery, P. (2008). Involvement of lysine 1047 in type I collagen-mediated activation of polymorphonuclear neutrophils. *FEBS J.* 275, 3226-3235.
- [0161] Liu L, Mo H, Wei S, Raftery D. Quantitative analysis of urea in human urine and serum by 1H nuclear magnetic resonance. *Analyst.* 2012;137(3) : 595-600.
- [0162] Pietrement, C., Gorisse, L., Jaisson, S., Gillery, P. Chronic increase of urea leads to carbamylated proteins accumulation in tissues in a mouse model of CKD, *PLoS One* 8(2013).
- [0163] Paulis, G., Berardesca, E. Lichen sclerosus: the role of oxidative stress in the pathogenesis of the disease and its possible transformation into carcinoma. *Research and Reports in Urology* 2019;11 223-232.
- [0164] Sander, C.S., Ali, I., Dean, D., Thiele, J.J., Woinarowska, F., Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of lichen sclerosus. *British J. Dermatol.*, Volume 151, Issue 3, September 2004, pages 627-635.
- [0165] Shi J, van Veelen PA, Mahler M, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev.* 2014;13:225-30.



[0166] Stark,G.R.,Reactions of Cyanate with Functional Groups of Proteins.III.Reactions with Amino and Carboxyl Groups,Biochemistry 1965 4(6), 1030-1036.

[0167] Taga,Y.,Hydroxyhomocitrulline Is a Collagen-Specific Carbamylation Mark that Affects Cross-link Formation,Cell Chemical Biology 24,1276-1284, 2017.

[0168] Thyssen,J.P,Maibach H.I.,Filaggrin;Basic Science,Epidemiology, Clinical Aspects and Management,Springer 2014.

[0169] Tran DA,Tan X,Macri CJ,Goldstein AT,Fu SW.Lichen Sclerosus:An autoimmunopathogenic and genomic enigma with emerging genetic and immune targets.Int J Biol Sci 2019;15(7):1429-1439.

[0170] Wang,Z.,Nicholls,S.,Rodriguez,E.et al.Protein carbamylation links inflammation,smoking,uremia and atherogenesis.Nat Med 13,1176-1184(2007).

[0171] Ziegelasch M,van Delft MA,Wallin P,et al.Antibodies against carbamylated proteins and cyclic citrullinated peptides in systemic lupus erythematosus:results from two well-defined European cohorts.Arthritis Res Ther.2016;18(1):289.

[0172] 已经参考多个实施例和实施方案描述了本发明。然而,本发明的真实范围在所附的独立权利要求中阐述。

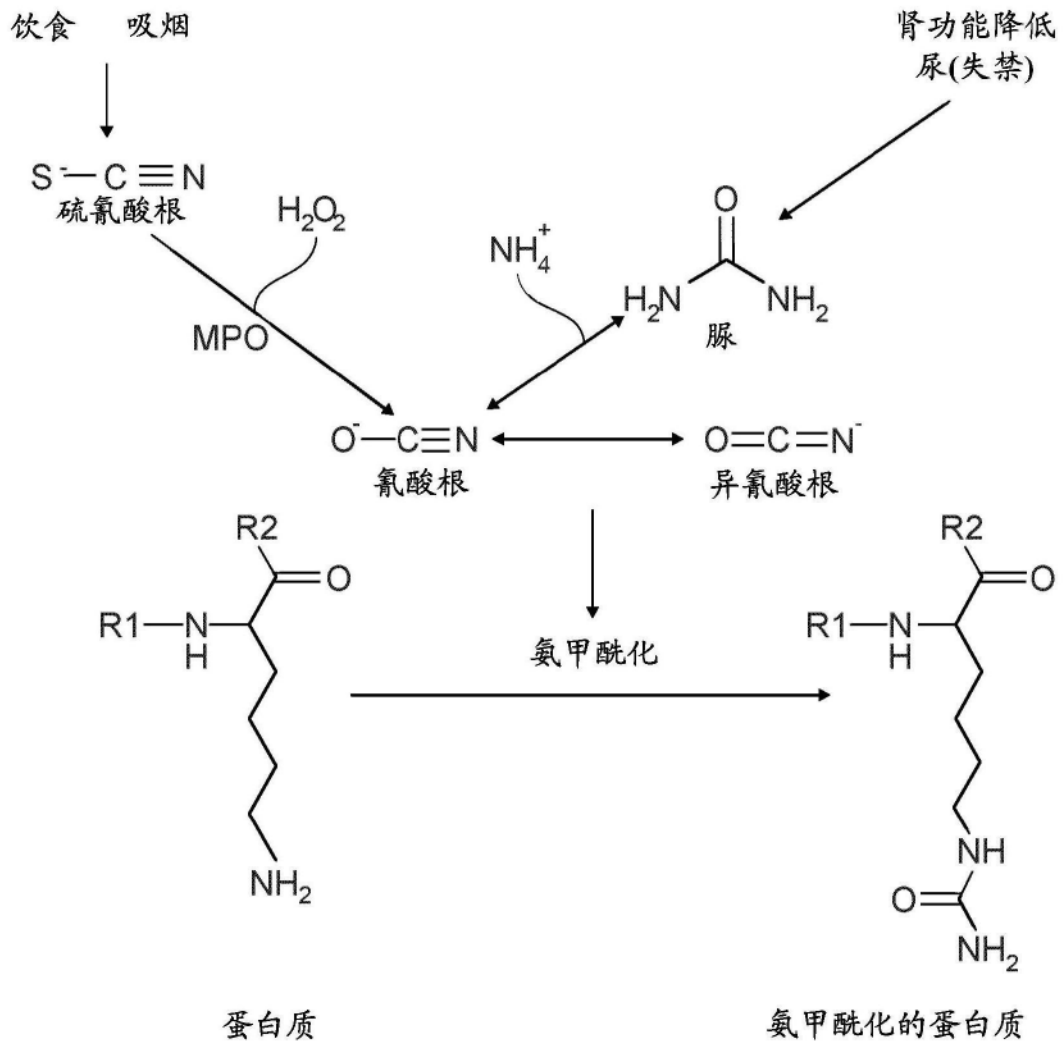


图1

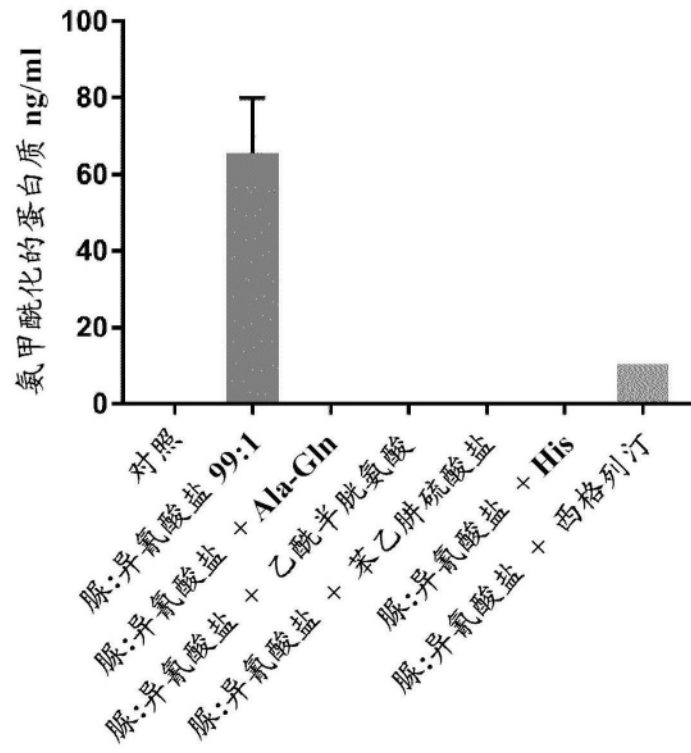


图2

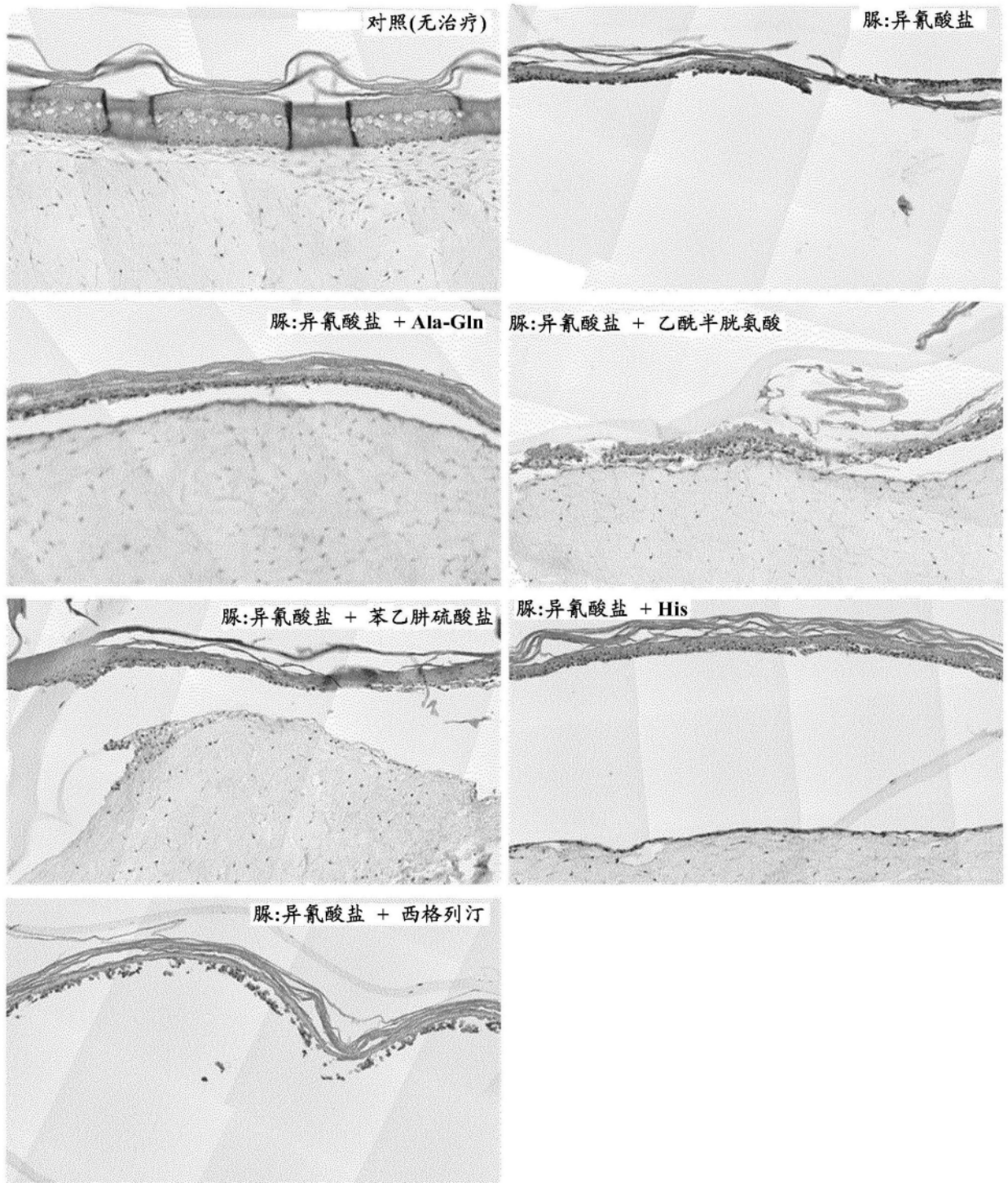


图3