



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104955471 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201380070468. 1

(22) 申请日 2013. 11. 15

(30) 优先权数据

61/726, 998 2012. 11. 15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 07. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/070306 2013. 11. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/078655 EN 2014. 05. 22

(71) 申请人 塔夫斯大学

地址 美国马萨诸塞州

申请人 嘉勒托生物技术公司

(72) 发明人 N·潘吉瓦尼 陈玮笙 H·莱弗勒

U·尼尔森

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

A61K 31/732(2006. 01)

A61K 31/70(2006. 01)

A61P 27/02(2006. 01)

权利要求书18页 说明书73页

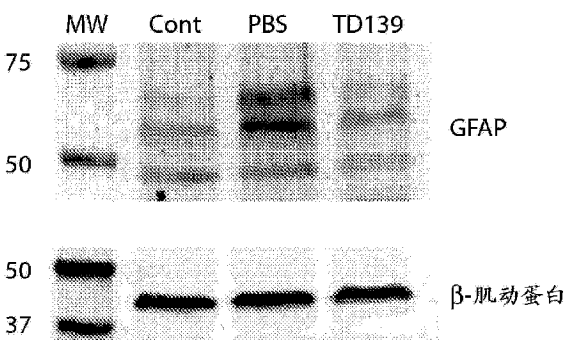
序列表6页 附图16页

(54) 发明名称

使用半乳糖凝集素蛋白抑制剂用于治疗、调节或预防受试者的眼部血管生成或者纤维化的方法、组合物以及试剂盒

(57) 摘要

本发明在此提供了药物组合物用于在抑制眼部血管生成或纤维化中应用的方法和试剂盒,其中组合物包括一种药学上可接受的载体或稀释剂以及通过抑制半乳糖凝集素蛋白或其部分的表达和/或活性来有效用于抑制眼部血管生成或纤维化的抑制剂组合物的剂量。



1. 一种药物组合物,其应用于在用于眼部血管生成的治疗的方法中,其中所述组合物包括一种药学上适用的载体或稀释剂以及一种足以抑制眼部血管生成的有效用于抑制或调节半乳糖凝集素蛋白或其部分所述组合物的剂量。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述半乳糖凝集素蛋白选自由下列蛋白所组成的组中:半乳糖凝集素-1、半乳糖凝集素-3、半乳糖凝集素-7 以及半乳糖凝集素-8。

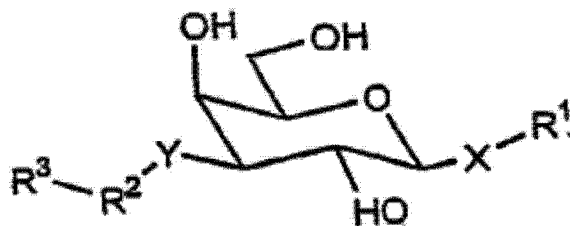
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中所述组合物选自:药物、聚合物、蛋白质、肽、碳水化合物、低分子量化合物、寡核苷酸、多核苷酸、以及遗传物质(比如 DNA 或 RNA)的至少其中之一。

4. 根据权利要求 1 至权利要求 3 的任意一项所述的组合物,其中所述组合物在用于治疗或预防与眼部血管生成有关的疾病或病况的方法中是有效的,例如所述疾病或病况是与过度性新血管形成相关。

5. 根据权利要求 4 所述的组合物,其中所述疾病或病况选自由与与瘢痕形成相关的手术(例如青光眼滤过术);新生血管性青光眼;角膜损伤;结膜炎后瘢痕形成;翼状胬肉、年龄相关黄斑变性(AMD)例如湿 AMD 或干 AMD;从干 AMD 到湿 AMD 的转换;增殖性糖尿病性视网膜病变;糖尿病性黄斑水肿;以及角膜新血管生成(沙眼)所组成的组中。

6. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物是 β -半乳糖苷,它是衍生或官能化的。

7. 根据权利要求 1 所述的组合物,其具备下述通式:



其中吡喃糖环的结构是 D-半乳糖;

X 选自由下述基团所组成的组中:O, S, NH, CH₂, 以及 NR⁴, 或者是键;

Y 选自由 NH, CH₂, 以及 NR⁴所组成的组中,或者是键;

R¹选自由糖、氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基和杂环基所组成的组中的基团;

R²选自由 CO, SO₂, SO, PO 以及 PO₂所组成的组中;

R³选自由下述基团所组成的组中:至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基或烯基、同时被羧基和氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、以及被卤素取代的至少 4 个碳原子的烷基;苯基、被羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被烷氧基取代的苯基、被硝基取代的苯基、被磺基取代的苯基、被氨基取代的苯基、被羟基取代的苯基、被羰基取代的苯基以及被取代的羰基取代的苯基;以及苯基氨基;

R⁴选自由氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基和杂环基所组成的组中。

8. 根据权利要求 1 至权利要求 7 任意一项所述的组合物,进一步包括至少一种试剂,所述试剂选自由抗血管生成、抗肿瘤、抗病毒、抗细菌、抗分枝杆菌、抗真菌、抗增生、抗炎和抗

凋亡所组成的组中。

9. 根据权利要求 8 所述的组合物, 其中所述糖 (R^1) 选自葡萄糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖、果糖、木糖、唾液酸、葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、二糖或包含至少两种上述糖类的寡糖及其衍生物所组成的组中。

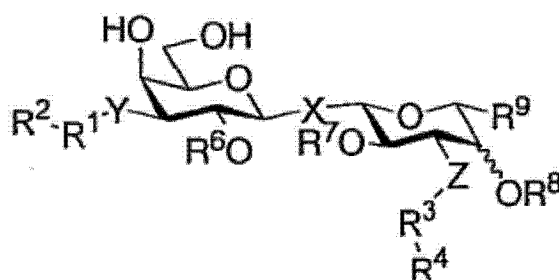
10. 根据权利要求 8 或 9 所述的组合物, 其中 Y 是 NH。

11. 根据权利要求 8 至权利要求 10 任意其中一项所述的组合物, 其中 X 是 O。

12. 根据权利要求 8 至权利要求 11 任意其中一项所述的组合物, 其中所述卤素选自 F、Cl、Br 和 I 所组成的组中。

13. 根据权利要求 8 至权利要求 12 任意其中一项所述的组合物, 其中所述组合物是: 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[3-羧基丙酰胺]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[{z}-3-羧基丙酰胺]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯甲酰氨基-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-苯甲酰氨基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-甲氧基-2,3,5,6-四氟苄基-酰氨基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-3,4,5,6-四氟苯甲酰胺]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-甲磺酰氨基-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-硝基苯磺酰胺]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷, 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯氨基羰基酰胺-苯甲酰氨基-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-氨基乙酰氨基-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[{2S}-2-氨基-3-羧基-丙酰胺]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷。

14. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其具备下述通式:



其中吡喃糖环的其中一种结构是 β -D-半乳糖;

X 选自 O, S, SO, SO₂, NH, CH₂ 和 NR⁵ 所组成的组中,

Y 选自 O, S, NH, CH₂ 和 NR⁵ 所组成的组中, 或者是键;

Z 选自 O, S, NH, CH₂, 和 NR⁵ 所组成的组中, 或者是键;

R¹ 和 R³ 各自独立地选自 CO, SO₂, SO, PO₂, PO 和 CH₂ 所组成的组中, 或者是键;

R² 和 R⁴ 各自独立地选自: 至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被所基取代的至少 4 个碳原子的烯基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烯基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳

原子的烷基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烯基、和被一个或多个卤素取代的烷基；被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个硝基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个氨基取代的苯基、被至少一个烷基氨基取代的苯基、被至少一个芳基氨基取代的苯基、被至少一个二烷基氨基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个被取代的羰基取代的苯基；或者萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个硝基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个氨基取代的萘基、被至少一个烷基氨基取代的萘基、被至少一个芳基氨基取代的萘基、被至少一个二烷基氨基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、以及被至少一个被取代的羰基取代的萘基；杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个硝基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个氨基取代的杂芳基、被至少一个烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个二烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个被取代的羰基取代的杂芳基； R^6 和 R^8 各自独立地选自由氢、酰基、烷基、卞基、和糖所组成的组中； R^7 选自由氢、酰基、烷基、和卞基所组成的组中；和/或 R^9 是选自由氢、甲基、羟基甲基、酰氧基甲基、烷氧基甲基、和苄氧基甲基所组成的组中。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物其中 Y 是 NH。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的组合物其中 Z 是 NH。

17. 根据权利要求 15 至 16 所述的组合物，其中 X 是 S。

18. 根据权利要求 14 至权利要求 17 任意其中一项所述的组合物，其中 R^1 是 CO。

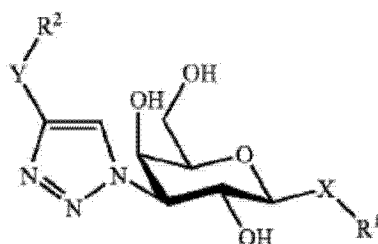
19. 根据权利要求 14 至权利要求 18 任意其中一项所述的组合物，其中 R^3 是 CO。

20. 根据权利要求 14 至权利要求 19 任意其中一项所述的组合物，其中： R^2 或 R^4 是芳香族例如芳香环； R^6 、 R^7 和 R^8 中的任一个为氢；或者 R^9 是羟基甲基。

21. 根据权利要求 14 所述的组合物，其中所述组合物是双-(3-脱氧-3-苯甲酰氨基- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷(17)、双-(3-脱氧-3-(3-甲氧基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3,5-二甲氧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-硝基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(2-萘甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-甲氧基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-硝基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[4-(二甲基氨基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-甲基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-氯代苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-叔-丁基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-乙酰苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[2-(3-羧基)-萘甲酰胺基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3,4-亚甲二氧基)苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷、双-(3-脱氧-3-(4-甲氧基羰基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-羧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-羟基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3,5-二苄氧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷。

喃半乳糖基) 硫烷; 双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷; 双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷; 双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷; 双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷、双-(3-脱氧-3-[3-苄氧基-5-(4-氟-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷; 双-(3-脱氧-3-[3-甲氧基-5-(4-甲基-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷; 或者双-(3-脱氧-3-(3-烯丙氧基-5-苄氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷。

22. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述组合物包括半乳糖苷例如 3-三唑-半乳糖苷, 例如所述组合物具有如下所示的通式:



其中, 吡喃糖环的结构为 D-半乳糖;

X 选自由 O, S, NH, CH₂, 和 NR⁴ 所构成的组中, 或者是键;

Y 选自由 CH₂, CO, SO₂, SO, PO₂ 和 PO 所组成的组中、苯基、或者是键;

R¹ 为选自由下述基团所组成的组中: 糖、被取代的糖、D-半乳糖、被取代的 D-半乳糖、C3-[1,2,3]-三唑-1-基-取代的 D-半乳糖; 氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基以及它们的衍生物; 和氨基、被取代的氨基、亚氨基、或被取代的亚氨基; 以及, R² 选自由下述基团所组成的组中: 氢、氨基、被取代的氨基、烷基、被取代的烷基、烯基、被取代的烯基、炔基、被取代的炔基、烷氧基、被取代的烷氧基、烷基氨基、被取代的烷基氨基、芳基氨基、被取代的芳基氨基、芳基氧基、被取代的芳基氧基、芳基、被取代的芳基、杂芳基、被取代的杂芳基、以及杂环基、被取代的杂环基。

23. 根据权利要求 22 所述的组合物, 其中所述糖选自由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖、果糖、木糖、唾液酸、葡糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖醛酸、二糖或包含至少两种上述糖类的低聚糖、以及它们的衍生物。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的组合物, 其中 Y 为 CO、SO₂、或键。

25. 根据权利要求 22、权利要求 23 或者权利要求 24 所述的组合物, 其中 R² 为胺基或芳基, 或者 R² 是取代的苯基, 其中所述的取代基是一个或多个选自由下述基团所组成的组中的基团: 卤素、烷氧基、烷基、硝基、磺基、氨基、羟基或羰基。

26. 根据权利要求 22 所述的组合物, 其中 R¹ 是半乳糖、葡萄糖或 N-乙酰葡萄糖胺。

27. 根据权利要求 22 所述的组合物, 其中 R¹ 是被取代的半乳糖。

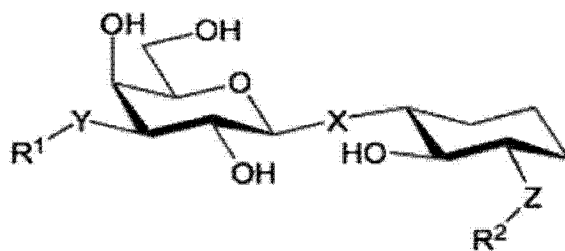
28. 根据权利要求 22 所述的组合物, 其中 R¹ 是一种被取代的葡萄糖、被取代的半乳糖、或被取代的 N-乙酰葡萄糖胺。

29. 根据权利要求 22 所述的组合物, 其中 R¹ 是 C3-[1,2,3]-三唑-1-基-取代的半乳糖。

30. 根据权利要求 22 所述的组合物, 其中 X 是 O 或 S。

31. 根据权利要求 22 所述的组合物, 其中所述组合物是甲基 3-脱氧-3-(1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-(4-丙基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-(4-甲氧基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-(4-(1-羟基-1-环己基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-(4-苯基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-(4-对甲苯磺酰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-(4-丁基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-(4-苄氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 甲基-3-{4-(3-羟基丙-1-基氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 甲基-3-{4-[2-(N-吗啉代)乙氨基羰基]-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧 β -D-吡喃半乳糖苷-(1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧 β -D-吡喃葡萄糖苷, 双-(3-脱氧-3-(4-(甲基氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)- β -D-半乳糖基) 硫烷, 3-脱氧-3-{4-(2-氟苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(2-甲氧基苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(3-甲氧基苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(4-甲氧基苯基)-H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(3,5-二甲氧基苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(1-萘基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(2-萘基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(2-吡啶基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(3-吡啶基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-{4-(4-吡啶基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-3-吡啶碳酸酐}; 3-0-{3-脱氧-3-[4-(甲氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-3-吡啶碳酸酐}; 3-0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-(2-羟基-5-硝基苯基)-碳酸酐}; 3-0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-(2-羟基-5-硝基苯基)-碳酸酐}; 3-0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]- β -D-乳糖吡喃糖基]-(2,5-二羟基苯基)-碳酸酐}; 3-0-{3-脱氧-3-[4-(甲氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-(2,5-二羟基苯基)-碳酸酐}; 3-0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-1-萘基碳酸酐}; 或 3-0-{3-脱氧-3-[4-(甲氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]- β -D-半乳糖基]-1-萘基碳酸酐}。

32. 根据权利要求 1 所述的组合物, 其中所述组合物具有二半乳糖苷或硫代二半乳糖苷, 例如所述组合物包括下述所示的通式



其中吡喃糖环的结构是 D- 半乳糖；

X 选自由 O, S 和 SO 构成的组中；

Y 和 Z 独立地选自由 CONH 或 1H-1, 2, 3- 三唑环所组成的组中；R¹和 R²各自独立地选自由下述基团所组成的组中：至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、至少 4 个碳原子的炔基；氨基甲酰基、被烷基取代的氨基甲酰基、被烯基取代的氨基甲酰基、被炔基取代的氨基甲酰基、被芳基取代的氨基甲酰基、被取代的烷基取代的氨基甲酰基、被取代的芳基取代的氨基甲酰基；被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷基取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个三氟甲基取代的苯基、被至少一个三氟甲氧基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个取代的羰基取代的苯基；萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷基取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、以及被至少一个取代的羰基取代的萘基；杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个芳基氨基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个取代的羰基取代的杂芳基；以及噻吩基、被至少一个羧基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个烷氧基取代的噻吩基、被至少一个磺基取代的噻吩基、被至少一个芳基氨基取代的噻吩基、被至少一个羟基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个羰基取代的噻吩基、以及被至少一个取代的羰基取代的噻吩基。

33. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中 Y 是 CONH。

34. 根据权利要求 33 所述的组合物，其中 CONH 基团通过 N 原子连接到吡喃糖环上。

35. 根据权利要求 32 至权利要求 34 任意其中一项所述的组合物，其中 Z 是 CONH。

36. 根据权利要求 35 所述的组合物，其中 CONH 基团。

37. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中 Y 是 1H-1, 2, 3- 三唑环。

38. 根据权利要求 37 所述的组合物，其中 1H-1, 2, 3- 三唑环通过 N1 原子连接到吡喃糖环上。

39. 根据权利要求 38 所述的组合物，其中 R¹连接到 1H-1, 2, 3- 三唑环的 C4 原子上。

40. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中 Z 是 1H-1, 2, 3- 三唑环。

41. 根据权利要求 40 所述的组合物，其中 Z 是 1H-1, 2, 3- 三唑环。

42. 根据权利要求 41 所述的组合物，其中 R²连接到 1H-1, 2, 3- 三唑环的 C4 原子上。

43. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中 R¹和 R²各自独立地选自由氨基甲氧基、烷基化的氨基甲酰基、烯基化的氨基甲酰基、芳基化的氨基甲酰基、苯基、被取代的苯基、卤代苯

基、氟代苯基、氯代苯基、溴代苯基、烷基化的苯基、烯基化的苯基、三氟甲基化苯基、甲氧基苯基、三氟甲氧基化的苯基；萘基、被取代的萘基、杂芳基、被取代的杂芳基、噻吩基以及被取代的噻吩基。

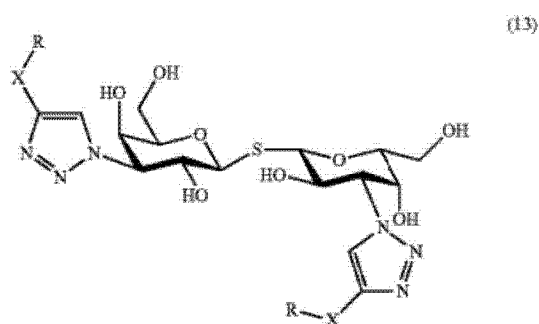
44. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中 R^1 是烷基化的氨基甲酰基、氟化的苯基、或噻吩基。

45. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中 R^2 是烷基化的氨基甲酰基、氟化的苯基、或噻吩基。

46. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中 X 是 O 或 S。

47. 根据权利要求 32 所述的组合物，其中所述组合物选自由下述组合物所组成的组中：((1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-(3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1,2,3-三唑-1-基))-β-D-吡喃半乳糖苷；((1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(2-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(2-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷；((1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(3-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(3-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷；((1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(4-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(4-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷；(1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(3-噻吩基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(3-噻吩基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷；(1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷，和 (1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(氯代苯甲酰基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(氯代苯甲酰基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷所组成的组中。

48. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述组合物包括二半乳糖吡喃糖苷，例如所述组合物具有通式 (13)：



其中至少一个吡喃糖环的结构是 D-半乳糖；X 是键；R 是苯基，其被选自由甲基、乙基、异丙基、叔丁基，氟代、氯代、溴代和三氟甲基所组成的组中的一个或多个取代基在任意位置进行取代，或者 R 是噻吩基。

49. 根据权利要求 48 所述的组合物，其中 R 是苯基，其被选自由氟代、氯代、和溴代所组成的组中的一个或多个取代基在任意位置进行取代。

50. 根据权利要求 48 所述的组合物，其中 R 是被选自氟的一个或多个取代基在任意位置进行取代的苯基。

51. 根据权利要求 48 至 50 所述的组合物,其中两个吡喃酮环的结构是 D- 半乳糖。

52. 一种用于治疗或预防受试者眼部血管生成或眼部纤维化的方法,所述方法包括给药受试者一种治疗有效量的至少一种组合物,其中所述组合物包括一种半乳糖凝集素蛋白或其部分的抑制剂。

53. 根据权利要求 52 所述的方法,其中眼部血管生成或者眼部纤维化是与一种疾病或病况有关,所述疾病和病况选自下述疾病或病况所组成的组中:与瘢痕形成有关的手术例如是青光眼滤过手术;新生血管性青光眼;角膜损伤;结膜炎后的瘢痕形成;翼状胬肉、AMD 例如湿性 AMD 或干性 AMD;从干性 AMD 到湿性 AMD 的转换;增殖性糖尿病性视网膜病;糖尿病性黄斑水肿;或角膜新血管形成(沙眼)。

54. 根据权利要求 52 或 53 所述的方法,其中所述半乳糖凝集素蛋白选自由:半乳糖凝集素-1 蛋白,半乳糖凝集素-3 蛋白,半乳糖凝集素-7 蛋白,以及半乳糖凝集素-8,以及其中所述组合物是选自:药物,聚合物,蛋白质,肽,碳水化合物,低分子量化合物,寡核苷酸,多核苷酸,和遗传物质比方说 DNA 或 RNA 的至少其中之一。

55. 根据权利要求 53 或 54 所述的方法,进一步包括观测疾病或病况的指标或参数中的减少量,例如标记物的参数或指标。

56. 根据权利要求 52 至 55 任意一项所述的方法,进一步包括,在给药之前,对所述组合物进行设计,使得所述组合物结合到半乳糖凝集素蛋白上,并调节 VEGF/VEGF 受体-2 途径, TGF- β 受体途径,或者所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白的表达。

57. 一种用于治疗或预防受试者眼部血管生成的方法,所述方法包括给药受试者一种治疗有效量的至少一种组合物,其中所述组合物包括一种半乳糖凝集素蛋白或其部分的抑制剂,其中所述给药包括时受试者与任意一种权利要求 1-51 所述的药物组合物进行接触。

58. 一种用于治疗或预防受试者眼部纤维化的方法,所述方法包括给药受试者一种治疗有效量的至少一种组合物,其中所述组合物包括一种半乳糖凝集素蛋白或其部分的抑制剂,其中所述给药包括时受试者与任意一种权利要求 1-51 中所述的药物组合物进行接触。

59. 根据权利要求 51 至 58 任意一项所述的方法,其中给药包括使受试者或受试者的组织与下述至少一种剂量进行接触:约 0.01 纳克 (ng) 到约 1ng、约 1ng 至约 10ng、约 10ng 至约 20ng、约 20ng 至约 30ng、约 30ng 至约 40ng、约 40ng 至约 50ng、约 50ng 至约 100ng、100ng 至约 200ng、200ng 至约 300ng、约 300ng 至约 400ng、约 400ng 至约 600ng、约 600ng 至约 800ng、约 1 微克 (μ g) 至约 5 μ g、约 5 μ g 至约 20 μ g、约 20 μ g 至约 40 μ g、约 40 μ g 至约 60 μ g、约 60 μ g 至约 80 μ g、约 80 μ g 至约 100 μ g、约 100 μ g 至约 200 μ g、约 200 至约 300 μ g、以及约 300 μ g 至约 400 μ g。

60. 根据权利要求 51 至 59 任意一项所述的方法,进一步包括在给药之前,对所述组合物进行配制用于眼部递送,所述眼部递送选自由:注射剂、滴眼剂、贴片、油膏、凝胶、或喷雾剂所组成的组中。

61. 根据权利要求 60 所述的方法,其中给药包括注射所述组合物例如眼内、玻璃体内、角膜、眼结膜、眼结膜后、静脉内、或锥内 (tenonly)。

62. 一种用于治疗或预防受试者或来自受试者的细胞的眼部血管生成的试剂盒,所述试剂盒包括:

一种抑制半乳糖凝集素蛋白或其部分的药物组合物,其中所述组合物连接到半乳糖凝

集素蛋白上,并调节 VEGF/VEGF 受体 -2 途径或者调节 TGF- β 途径或者所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白的活性;

使用说明;以及

一种容器,

其中所述药物组合物是权利要求 1-51 所述的任意一种。

63. 根据权利要求 62 所述的试剂盒,进一步包括用于给药该组合物的施药器或装置,例如所述施药器或所述装置是注射器、针、喷雾器、海绵、凝胶、条、带、绷带、盘、绳、或纳米结构。

64. 根据权利要求 62 至 63 所述的试剂盒,其中所述组合物选自:药物、聚合物、蛋白质、多肽、糖类、低分子量化合物、寡核苷酸、多核苷酸、和遗传物质如 DNA 或 RNA 的至少其中之一。

65. 根据权利要求 62 至 64 所述的试剂盒,其中所述组合物与药学上适用的载体或稀释剂进行配制。

66. 根据权利要求 62 至 65 所述的试剂盒,进一步包括一种控制剂,例如 AVASTINTM(BEVACIZUMABTM)、LUCENTISTM(RANIBIZUMABTM)、或者 EYLEATM(AFLIBERCEPTTM),其中所述控制剂抑制眼部血管生成。

67. 根据权利要求 62 至 66 所述的试剂盒,其中所述半乳糖凝集素蛋白选自由半乳糖凝集素 -1 蛋白,半乳糖凝集素 -3 蛋白,半乳糖凝集素 -7 蛋白,以及半乳糖凝集素 -8 所组成的组中。

68. 一种在眼部纤维化的治疗的方法中使用的药物组合物,其中所述组合物包括一种药学上可接受的载体或稀释剂,以及有效用于抑制或调节半乳糖凝集素蛋白或其部分的可满足抑制眼部纤维化的所述组合物的剂量。

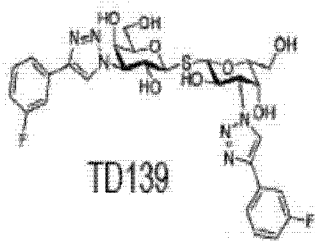
69. 根据权利要求 68 所述的组合物,其中 the 半乳糖凝集素蛋白选自由半乳糖凝集素 -1,半乳糖凝集素 -3,半乳糖凝集素 -7,以及半乳糖凝集素 -8 所组成的组中。

70. 根据权利要求 68 或者 69 所述的组合物,其中所述组合物是选自下述组合物中的至少一种:药物、聚合物、蛋白质、多肽、糖类、低分子量化合物、寡核苷酸、多核苷酸、以及遗传物质比如 DNA 或 RNA。

71. 根据权利要求 68 至权利要求 70 任意一项所述的组合物,其中所述组合物在用于治疗或预防与眼部血管生成或眼部纤维有关的疾病中是有效的,例如所述疾病或病况是与过度性新血管形成相关。

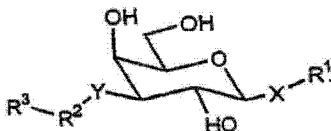
72. 根据权利要求 71 所述的组合物,其中所述疾病或病况选自由与瘢痕形成相关的手术例如青光眼滤过手术;新生血管性青光眼;角膜损伤;角膜营养不良、在结膜炎之后的瘢痕形成;翼状胬肉、AMD 例如湿性 AMD 或干性 AMD;干性 AMD 到湿性 AMD 的转换;增殖性糖尿病性视网膜病;糖尿病性黄斑水肿;以及角膜新血管生成(沙眼)。所组成的组中。

73. 根据权利要求 68 所述的组合物,包括双-{3-O-[(5,6-二氟-2-/-1-苯并吡喃-2-酮-3-基)-甲基]- β -D-吡喃半乳糖基}硫烷、或者具有下述结构的化合物的一种或多种:



其中所述组合物抑制血管生成。

74. 根据权利要求 68 所述的组合物, 其中所述组合物是衍生的或功能化的 β -半乳糖苷, 例如, 所述组合物具有以下通式:



其中吡喃糖环的结构是 D-半乳糖;

X 为选自由 O、S、NH、CH₂、和 NR⁴ 所构成的组中的基团, 或者是键;

Y 为选自由 NH、CH₂、和 NR⁴ 所构成的组中的基团, 或者是键;

R¹ 是选自由下述基团所构成的组中的基团: c) 糖; d) 氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基;

R² 选自由 CO、SO₂、SO、PO、和 PO₂ 所组成的组中的基团;

R³ 选自由下述基团所组成的组中的基团: 至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基或烯基、同时被羧基和氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、以及被卤素取代的至少 4 个碳原子的烷基; 苯基、被羧基取代的苯基、被至少一种卤素取代的苯基、被烷氧基取代的苯基、被至少一个卤素和至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素和至少一个烷氧基取代的苯基、被硝基取代的苯基、被磺基取代的苯基、被氨基取代的苯基、被羟基取代的苯基、被羰基取代的苯基以及被取代的羰基取代的苯基; 以及苯基氨基;

R⁴ 是选自由氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基所组成的组中的基团。

75. 根据权利要求 68 至权利要求 74 任意一项所述的组合物, 其中所述组合物是不可代谢的或者是可代谢的。

76. 根据权利要求 75 所述的组合物, 其中糖 (R¹) 选自葡萄糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖、果糖、木糖、唾液酸、葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、二糖或包含至少两种上述糖类的寡糖及其衍生物。

77. 根据权利要求 75 或者 76 所述的组合物, 其中 Y 是 NH。

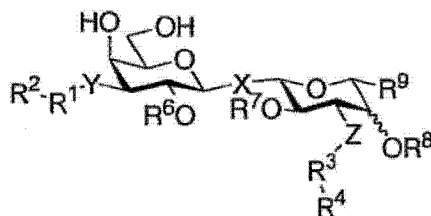
78. 根据权利要求 75 至权利要求 77 任意其中一项所述的组合物, 其中 X 是 O。

79. 根据权利要求 75 至权利要求 78 任意其中一项所述的组合物, 其中所述卤素选自由 F、Cl、Br、以及 I 所组成的组中。

80. 根据权利要求 75 至权利要求 79 任意其中一项所述的组合物, 其中所述组合物是甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[3-羧基丙酰氨基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[{z}-3-羧基丙烯酰

氨基]-3-脱氧-β-d-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯甲酰氨基-3-脱氧-β-d-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-苯甲酰氨基]-3-脱氧-β-d-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-甲氧基-2,3,5,6-四氟苯甲酰胺基]-3-脱氧-β-d-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-硝基苯亚磺酰氨基]-3-脱氧-β-d-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷,甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯氨基羰基氨基-3-脱氧-β-d-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-氨基乙酰氨基-3-脱氧-β-d-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷;以及甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[{2S}-2-氨基-3-羧基-丙酰氨基]-3-脱氧-β-d-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷。

81. 根据权利要求 68 所述的组合物,其中所述组合物具备下述通式:



其中吡喃糖环的其中一种结构是 β-D-半乳糖;

X 选自由 O, S, SO, SO₂, NH, CH₂, 和 NR⁵所组成的组中;

Y 选自由 O, S, NH, CH₂和 NR⁵所组成的组中,或者是键;Z 选自由 O, S, NH, CH₂和 NR⁵所组成的组中,或者是键;

R¹和 R³各自独立地选自由 CO, SO₂, SO, PO₂, PO 和 CH₃所组成的组中,或者是键;

R²和 R⁴各自独立地选自由:至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被所基取代的至少 4 个碳原子的烯基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烯基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烯基、和被一个或多个卤素取代的烷基;被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个硝基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个氨基取代的苯基、被至少一个烷基氨基取代的苯基、被至少一个芳基氨基取代的苯基、被至少一个二烷基氨基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个被取代的羰基取代的苯基;或者萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个硝基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个氨基取代的萘基、被至少一个烷基氨基取代的萘基、被至少一个芳基氨基取代的萘基、被至少一个二烷基氨基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、以及被至少一个被取代的羰基取代的萘基;杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个硝基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个氨基取代的杂芳基、被至

少一个烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个芳基氨基取代的杂芳基、被至少一个二烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个被取代的羰基取代的杂芳基； R^6 和 R^8 各自独立地选自由氢、酰基、烷基、卞基、和糖所组成的组中； R^7 选自由氢、酰基、烷基、和卞基所组成的组中；和/或 R^9 是选自由氢、甲基、羟基甲基、酰氧基甲基、烷氧基甲基、和苄氧基甲基所组成的组中。

82. 根据权利要求 81 所述的组合物，其中 Y is NH。

83. 根据权利要求 81 或 82 所述的组合物，其中 Z is NH。

84. 根据权利要求 82 或 83 所述的组合物，其中 X is S。

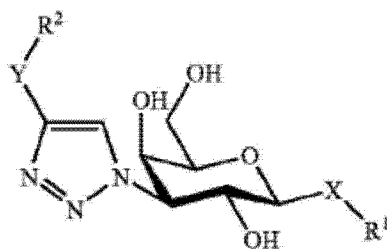
85. 根据权利要求 81 至 84 任意其中一项所述的组合物，其中 R^1 is CO。

86. 根据权利要求 81 至 85 任意一项所述的组合物，其中 R^3 is CO。

87. 根据权利要求 81 至 86 任意其中一项所述的组合物，其中： R^2 或 R^4 是芳香族例如芳香环； R^6 、 R^7 和 R^8 中的任意一个为氢；或者 R^9 是羟基甲基。

88. 根据权利要求 81 所述的组合物，其中所述组合物是双-(3-脱氧-3-苯甲酰氨基- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷(17)、双-(3-脱氧-3-(3-甲氧基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-(3,5-二甲氧基苯甲酰胺)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-硝基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(2-萘甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-甲氧基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-硝基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[4-(二甲基氨基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-甲基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-氯代苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-叔-丁基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-乙酰苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[2-(3-羧基)-萘甲酰胺基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-[3-脱氧-3-(3,4-亚甲二氧基)苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷、双-(3-脱氧-3-(4-甲氧基羰基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-羧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-羟基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3,5-二苄氧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷、双-(3-脱氧-3-[3-苄氧基-5-(4-氟-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[3-甲氧基-5-(4-甲基-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；或者双-(3-脱氧-3-(3-烯丙氧基-5-苄氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷。

89. 根据权利要求 68 所述的组合物，其中所述组合物包括 s a 3-三唑-半乳糖苷，例如所述组合物包括具有如下所示的通式：



其中吡喃糖环的结构为 D- 半乳糖：

X 选自由 O、S、NH、CH₂、和 NR⁴所构成的组中,或者是键;

Y 选自由 CH₃、CO、SO₂、SO、PO₂、和 PO 所组成的组中、苯基、或者是键；

R¹为选自由下述基团所组成的组中：糖、被取代的糖、D-半乳糖、被取代的D-半乳糖、C3-[1,2,3]-三唑-1-基-取代的D-半乳糖；氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基以及它们的衍生物；和氨基、被取代的氨基、亚氨基、或被取代的亚氨基；以及，

R²选自由下述基团所组成的组中：氢、氨基、被取代的氨基、烷基、被取代的烷基、烯基、被取代的烯基、炔基、被取代的炔基、烷氧基、被取代的烷氧基、烷基氨基、被取代的烷基氨基、芳基氨基、被取代的芳基氨基、芳基氧基、被取代的芳基氧基、芳基、被取代的芳基、杂芳基、被取代的杂芳基、以及杂环基、被取代的杂环基。

90. 根据权利要求 89 所述的组合物,其中所述糖选自由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、N- 乙酰葡萄糖胺、N- 乙酰半乳糖胺、岩藻糖、果糖、木糖、唾液酸、葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖醛酸、二糖或包含至少两种上述糖类的低聚糖、以及它们的衍生物。

91. 根据权利要求 88 或者 89 所述的组合物, 其中 Y 为 CO、SO₂、或键。

92. 根据权利要求 68 所述的组合物, 其中 R^2 为胺或芳基, 或者其中 R^2 被取代的苯基, 其中所述取代基是一个或多个选自由下述基团所组成的组中的基团: 卤素、烷氧基、烷基、硝基、磺基、氨基、羟基或羰基。

93. 根据权利要求 68 所述的组合物, 其中 R^1 是半乳糖、葡萄糖或 N-乙酰葡萄糖胺。

94. 根据权利要求 68 所述的组合物, 其中 R^1 是被取代的半乳糖。

95. 根据权利要求 68 所述的组合物, 其中 R^1 是被取代的半乳糖、被取代的半乳糖、或被取代的 N-乙酰葡萄糖胺。

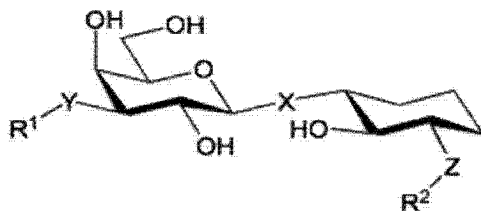
96. 根据权利要求 68 所述的组合物, 其中, R¹ 是 C3-[1,2,3]-三唑-1-基-取代的半乳糖。

97. 根据权利要求 68 所述的组合物, 其中 X 是 O 或 S。

98. 根据权利要求68所述的组合物,其中所述组合物是甲基-3'-脱氧-3-(1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-1-硫代β-D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-(4-丙基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-1-硫代β-D-吡喃半乳糖苷;3-(4-甲氧基羰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代β-D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-(4-(1-羟基-1-环己基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-1-硫代β-D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-(4-苯基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-1-硫代β-D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-(4-对甲苯磺酰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-1-硫代β-D-吡喃半乳糖苷;3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代β-D-吡喃半乳糖苷;3-(4-T基氨基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代β-D-吡喃半乳糖苷;3-(4-苄氨基羰

基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;甲基-3-{4-(3-羟基丙-1-基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;甲基-3-{4-[2-(N-吗啉代)乙氨基羰基]-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧 β -D-吡喃半乳糖苷-(1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧 β -D-吡喃葡萄糖苷,双-(3-脱氧-3-(4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)- β -D-半乳吡喃糖基)硫烷,3-脱氧-3-{4-(2-氟苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(2-甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(3-甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(4-甲氧基苯基)-H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(3,5-二甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(1-萘基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(2-萘基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(2-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(3-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(4-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-O-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-3-吡啶碳酸醛肟;3-O-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-3-吡啶碳酸醛肟;3-O-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-(2-羟基-5-硝基苯基)-碳酸醛肟;3-O-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-(2-羟基-5-硝基苯基)-碳酸醛肟;3-O-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-乳糖吡喃糖基]-(2,5-二羟基苯基)-碳酸醛肟;3-O-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-(2,5-二羟基苯基)-碳酸醛肟;3-O-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖苷]-1-萘基碳酸醛肟;或3-O-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-半乳吡喃糖基]-1-萘基碳酸醛肟。

99. 根据权利要求 68 所述的组合物,其中所述组合物包括硫代二半乳糖苷,例如所述组合物包括下述所示的通式:



其中吡喃糖环的结构是 D-半乳糖;

X 选自由 O, S 和 SO 构成的组中;

Y 和 Z 独立地选自由 CONH 或 1H-1,2,3-三唑环所组成的组中;

R¹以及 R²各自独立地选自由下述基团所组成的组中:至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、至少 4 个碳原子的炔基、氨基甲酰基、被烷基取代的氨基甲酰基、被烯基取代的氨基甲酰基、被炔基取代的氨基甲酰基、被芳基取代的氨基甲酰基、被取代的烷基取

代的氨基甲酰基、以及被取代的芳基取代的氨基甲酰基；被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷基取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个三氟甲基取代的苯基、被至少一个三氟甲氧基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个取代的羰基取代的苯基；萘基，至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷基取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、被至少一个被取代的羰基取代的萘基；杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个芳基氨基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个被取代的羰基取代的杂芳基；以及噻吩基、被至少一个羧基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个烷氧基取代的噻吩基、被至少一个磺基取代的噻吩基、被至少一个芳基氨基取代的噻吩基、被至少一个羟基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个羰基取代的噻吩基、以及被至少一个取代的羰基取代的噻吩基。

100. 根据权利要求 99 所述的组合物，其中 Y 是 CONH。

101. 根据权利要求 100 所述的组合物，其中所述 CONH 基团通过 N 原子连接到吡喃糖环上。

102. 根据权利要求 99 至权利要求 101 任意一项所述的组合物，其中 Z 是 CONH。

103. 根据权利要求 102 所述的组合物，其中所述 CONH 基团通过 N 原子连接到环己烷上。

104. 根据权利要求 99 所述的组合物，其中 Y 是 1H-1,2,3- 三唑环。

105. 根据权利要求 104 所述的组合物，其中 H-1,2,3- 三唑环通过 N1 原子连接到吡喃糖环上。

106. 根据权利要求 105 所述的组合物，其中 R¹ 连接到 1H-1,2,3- 三唑环的 C4 原子上。

107. 根据权利要求 101 所述的组合物，其中 Z 是 1H-1,2,3- 三唑环。

108. 根据权利要求 106 所述的组合物，其中所述 1H-1,2,3- 三唑环通过 N1 原子连接到环己烷上。

109. 根据权利要求 108 所述的组合物，其中 R² 连接到 1H-1,2,3- 三唑环的 C4 原子上。

110. 根据权利要求 99 所述的组合物，R¹ 和 R² 各自独立地选自由氨基甲氧基、烷基化的氨基甲酰基、烯基化的氨基甲酰基、芳基化的氨基甲酰基、苯基、被取代的苯基、卤代苯基、氟代苯基、氯代苯基、溴代苯基、烷基化的苯基、烯基化的苯基、三氟甲基化苯基、甲氧基苯基、三氟甲氧基化的苯基、萘基、被取代的萘基、杂芳基、被取代的杂芳基、噻吩基以及被取代的噻吩基。

111. 根据权利要求 99 所述的组合物，其中 R¹ 是烷基化的氨基甲酰基、氟基化的苯基或者噻吩基。

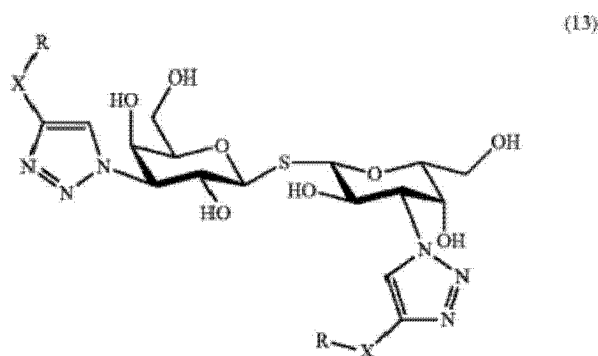
112. 根据权利要求 99 所述的组合物，其中 R² 是烷基化的氨基甲酰基、氟化的苯基、或噻吩基。

113. 根据权利要求 99 所述的组合物，其中 X 是 O 或 S。

114. 根据权利要求 99 所述的组合物，其中所述组合物选自由 ((1R,2R,3S)-2- 羟

基-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-(3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1,2,3-三唑-1-基))-β-D-吡喃半乳糖苷;((1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(2-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(2-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;((1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(3-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(3-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;((1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(4-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(4-氟苯基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;(1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(3-噻吩基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(3-噻吩基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;(1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷,和(1R,2R,3S)-2-羟基-3-(4-氯代苯甲酰基)-环己基)3-脱氧-3-(4-氯代苯甲酰基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷所组成的组中。

115. 根据权利要求 68 所述的组合物,其中所述组合物包括二半乳糖苷,例如所述组合物包括通式 (13):



其中至少一个吡喃糖环的结构是 D-半乳糖;X 是键;R 是苯基,其被选自由甲基、乙基、异丙基、叔丁基,氟代、氯代、溴代和三氟甲基所组成的组中的一个或多个取代基在任意位置进行取代,或者 R 是噻吩基。

116. 根据权利要求 115 所述的组合物,其中 R 是苯基,其被选自由氟代、氯代、和溴代所组成的组中的一个或多个取代基在任意位置进行取代。

117. 根据权利要求 116 所述的组合物,其中 R 是被选自氟的一个或多个取代基在任意位置进行取代的苯基。

118. 根据权利要求 115 至 117 所述的组合物,其中两个吡喃糖环的结构是 D-半乳糖。

119. 一种用于治疗或预防受试者的眼部血管生产或眼部纤维化的方法,所述方法包括给药受试者一种治疗有效量的至少一种组合物,所述组合物包括一种半乳糖凝集素蛋白或其部分的抑制剂。

120. 根据权利要求 119 所述的方法,其中所述眼部血管生成或者眼部纤维化与一种疾病或病况有关,例如所述疾病和病况由一种与瘢痕形成有关的手术例如是青光眼滤过手术;新生血管性青光眼;角膜损伤;结膜炎后的瘢痕形成;翼状胬肉、AMD 例如湿性 AMD 或干性 AMD;从干性 AMD 到湿性 AMD 的转换;增殖性糖尿病性视网膜病;糖尿病性黄斑水肿;或角

膜新血管形成（沙眼）。

121. 根据权利要求 119 或 120 所述的方法，其中所述半乳糖凝集素蛋白是选自自由：半乳糖凝集素 -1 蛋白质，半乳糖凝集素 -3 蛋白质，半乳糖凝集素 -7 蛋白质和半乳糖凝集素 -8 蛋白质所组成的组中，并且其中组合物是选自：药物，聚合物，蛋白质，肽，碳水化合物，低分子量化合物，寡核苷酸，多核苷酸，和遗传物质比方说 DNA 或 RNA 的至少其中之一。

122. 根据权利要求 120 或 121 所述的方法，进一步包括观测疾病或病况的指标或参数中的减少量，例如，标记物的参数或指标。

123. 根据权利要求 119 或 122 所述的方法，进一步包括，在给药之前，对所述组合物进行设计，使得所述组合物结合到半乳糖凝集素蛋白上，并调节血管内皮生长因子（VEGF）/VEGF 受体 -2 途径或者成纤维细胞生长因子（FGF）途径，或者所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白的表达。

124. 一种用于治疗或预防受试者眼部血管生成或眼部纤维化的方法，所述方法包括给药受试者一种治疗有效量的至少一种组合物，其中所述组合物包括一种半乳糖凝集素或其部分的抑制剂，其中所述给药包括使受试者与至少一种权利要求 68 至 118 所述的药物组合物进行接触。

125. 根据权利要求 124 所述的方法，进一步包括观察或检测纤维化减少量。

126. 根据权利要求 124 或 125 所述的方法，其中所述给药包括使受试者或受试者的组织与至少一种下述剂量进行接触：0.01 纳克（ng）到约 1ng、约 1ng 至约 10ng、约 10ng 至约 20ng、约 20ng 至约 30ng、约 30ng 至约 40ng、约 40ng 至约 50ng、约 50ng 至约 100ng、100ng 至约 200ng、200ng 至约 300ng、约 300ng 至约 400ng、约 400ng 至约 600ng、约 600ng 至约 800ng、约 1 微克（ μg ）至约 5 μg 、约 5 μg 至约 20 μg 、约 20 μg 至约 40 μg 、约 40 μg 至约 60 μg 、约 60 μg 至约 80 μg 、约 80 μg 至约 100 μg 、约 100 μg 至约 200 μg 、约 200 至约 300 μg ，以及约 300 μg 至约 400 μg 。

127. 根据权利要求 119 至权利要求 126 任意一项所述的方法，其中，在给药于受试者之前，所述方法进一步包括对编码所述抑制剂的多核苷酸序列进行设计。

128. 根据权利要求 119 至权利要求 126 任意一项所述的方法，进一步包括在给药之前，对所述组合物进行配制用于眼部递送，所述眼部递送选自：注射剂、滴眼剂、贴片、油膏、凝胶、或喷雾剂所组成的组中。

129. 根据权利要求 124 所述的方法，其中所述给药包括所述组合物的眼内、玻璃体内、角膜、眼结膜、眼结膜后、静脉内、或锥内（tenonly）给药。

130. 一种用于治疗或预防受试者或来自受试者的细胞的眼部血管生成或眼部纤维化的试剂盒，所述试剂盒包括：

一种抑制半乳糖凝集素蛋白或其部分的药物组合物，其中所述组合物连接到半乳糖凝集素蛋白上，并调节 VEGF/VEGF 受体 -2 途径，或者所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白的表达，其中所述药物组合物指的是权利要求 68-118 中所述的药物组合物；

使用说明；以及

一种容器。

131. 一种用于治疗或者预防受试者或者来自受试者细胞的眼部血管生成或眼部纤维化的试剂盒，所述试剂盒包括：

一种抑制半乳糖凝集素蛋白或部分的药物组合物,其中所述组合物连接到半乳糖凝集素蛋白上,并且调节 VEGF/VEGF 受体 -2 途径或者所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白的表达;

使用说明;以及

一种容器。

132. 根据权利要求 130 或 131 所述的试剂盒,进一步包括一种给药所述组合物的施药器或装置,例如所述施药器或所述装置是注射器、针、喷雾器、海绵、凝胶、条、带、绷带、盘、绳、或纳米结构递送材料。

133. 根据权利要求 130 至权利要求 132 任意一项所述的试剂盒,其中所述组合物选自药物、聚合物、蛋白质、多肽、糖类、低分子量化合物、寡核苷酸、多核苷酸、和遗传物质如 DNA 或 RNA 的至少其中之一。

134. 根据权利要求 130 至权利要求 133 任意一项所述的试剂盒,其中所述组合物与药学上适用的载体或稀释剂进行配制。

135. 根据权利要求 130 至权利要求 134 任意一项所述的试剂盒,进一步包括一种控制剂,例如 AVASTIN™(BEVACIZUMAB™)、LUCENTIS™(RANIBIZUMAB™)、或者 EYLEA™(AFLIBERCEPT™),其中所述控制剂抑制眼部血管生成。

136. 根据权利要求 130 至权利要求 135 任意一项所述的试剂盒,其中所述半乳糖凝集素蛋白选自由下述蛋白质所组成的组中:半乳糖凝集素 -1 蛋白、半乳糖凝集素 -3 蛋白、半乳糖凝集素 -7 蛋白、以及半乳糖凝集素 -8 蛋白。

使用半乳糖凝集素蛋白抑制剂用于治疗、调节或预防受试者的眼部血管生成或者纤维化的方法、组合物以及试剂盒

[0001] 相关申请

[0002] 本发明要求保护 2012 年 11 月 15 日提交的美国临时申请序列号为 61/726, 998, 名称为“使用半乳糖凝集素蛋白抑制剂用于治疗、调节或预防受试者的眼部血管生成或纤维化的方法、组合物和试剂盒”申请的权益, 上述临时申请的发明人为 N·潘吉瓦尼、陈玮笙、H·莱弗勒和 U·尼尔森。该申请已经通过引证全部并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及使用药物组合物在抑制受试者眼部血管生成或者眼部纤维化的应用中的方法和试剂盒。

[0004] 政府支持

[0005] 本发明式在政府的支持下, 拥有国立卫生院 (National Institute of Health) 给予的授权号为 EY007088 的保障。该政府部门在本发明中享有一定的权利。

背景技术

[0006] 眼部血管生成相关的病症 (例如脉络膜生成血管性疾病) 会导致眼部出血和眼部纤维化, 并且会引起视力损失。血管生成相关病症包括年龄相关性黄斑变性、眼组织胞浆菌病综合征、新生血管性青光眼、晶状体后纤维组织增生症、病理性近视、血管样条纹症、特发性疾病、脉络膜炎、脉络膜破裂、上覆脉络膜痣、移植排斥、单纯疱疹性角膜炎、利什曼病、盘尾丝虫病、某些炎症性疾病如干眼症、以及眼部 (例如, 角膜) 创伤。

[0007] 脉络膜新血管生成疾病是一种血管生成相关的疾病, 其会导致出血、纤维化和视力损失 (2009 年 8 月 20 日公开的库马尔 -Singh 等人提交的国际申请号为 W02009/102488 的申请)。正常的角膜是缺少血管的, 但是在某些病理 (如脉络膜新生血管) 条件下, 毛细血管从角膜周围的角膜缘的血管丛伸入到角膜中。当其变得越来越被血管化时, 角膜就会变得有阴影, 从而导致患者的视力被损失。

[0008] 在 65 岁以上的人群中, 年龄相关性黄斑变性 (AMD) 是严重视力损失的主要原因 (Bressler 等人 1988 年 Surv. Ophthalmol. 32:375413; Guyer 等人 1986 年 Arch. Ophthalmol. 104:702-705, Hyman 等人 1983 年 Am. J. Epidemiol. 118:816-824, Klein&Klein 的 1982 年 Arch. Ophthalmol. 100:571-573; 以及 Leibowitz 等人 1980 年 Surv. Ophthalmol. 24:335-610)。虽然临床病理描述已经对 AMD 进行说明, 但是对所述疾病的病因和发病机制却知之甚少。

[0009] 干性 AMD 是黄斑变性的较为常见的类型, 并且其特征在于通过在黄斑里玻璃膜疣、色素和萎缩性变化的产生, 从而伴随着中央视力的缓慢渐进性丧失。湿性或新生血管性的 AMD 的特征在于视网膜下出血, 其仅次于脉络膜新血管 (CNV) 的形成的纤维化和流体, 以及视力的更迅速和明显的下降。虽然相对于干性 AMD 而言新生血管性 AMD 并不常见, 但是新生血管性 AMD 却占了由于 AMD 导致的严重的视力损失中的 80%。而且, 每年仅在美国就

可诊断出大约 200,000 例新生血管性 AMD (参见 Miller 等人, 2006 年 10 月 24 日授权的美国专利号为 7,125,542 的专利, 其已通过引用全部并入本文)。

[0010] 目前, 很少有用于眼睛的血管生成相关病症的有效治疗方案, 比方说针对湿性 AMD 以及干性 AMD。直到近年来, 发现了激光光凝疗法是唯一可用于对新生血管性 AMD 选择病例的治疗。但是, 不幸的是, 大多数患有新生血管性 AMD 的患者并不符合激光光凝治疗所规定的条件。大约 85% 的患有新生血管性 AMD 的患者具有难以定义的、隐形的、或相对广泛的中心凹下脉络膜新生血管, 但是上述病因中却并没有一种适合接受激光治疗。此外, 激光光凝疗法依赖于针对 CNV 组织的热损伤, 但是其会损伤上覆感觉神经视网膜并且伴随有视功能的损失。此外, 激光光凝疗法还有大约 50% 的病例会产生复发的困扰。

[0011] 光动力学疗法 (PDT) 在对于移除不希望的 CMV 以及治疗新生血管性 AMD 方面已经显示出所期望的结果 (Miller 等人, 1999 年《眼科学档案》(Archives of Dermatology) 117: 1161-1173; Schmidt-Erfurth 等人, 1999 年《眼科学档案》(Archives of Dermatology) 117: 1177-1187; TAP 研究小组, 1999 年《眼科学档案》(Archives of Dermatology) 117: 1329-1345; 以及, Husain 等人, 1999 年 Philadelphia: Mosby 297-307)。PDT 疗法包括全身给药一种光敏剂或 PDT 染料 (光敏剂或染料积聚在增生组织例如肿瘤和新生成的血管中), 然后在对应于该染料的吸收峰值波长下用低强度、非热能光对靶体组织进行照射 (Oleinick 等人, 1998 年 Radiation Research 150: S146-S156)。染料的激发会导致形成单线态氧和自由基 (更为人们所知的是活性氧类), 从而对靶体组织造成光化学损伤 (Weishaupt 等人, 1976 年 Cancer Res. 36: 2326-2329)。

[0012] 使用 PDT 对 CNV 的治疗研究表明, 经过适当治疗参数的光敏剂剂量、激光光剂量和照射时间, 可以实现对于实验性 CNV 相对可选择性的损伤, 从而不伤害视网膜血管、大的脉络膜血管, 并且由此导致在感觉神经视网膜内最低限度的变化 (Husain 等人, 1996 年, Arch. Ophthalmology 121: 978-985; Husain 等人, 1997 年 Seminars in Ophthalmology 12: 14-25; Miller 等人, 1995 年 Arch. Ophthalmology 113: 810-818; 以及, Kramer 等人, 1996 年 Ophthalmology 103(3): 427-438)。近期, 使用一种绿卟啉染料的以 PDT 为基的方法已在多个国家被批准用于在新生血管性 AMD 的治疗中使用。

[0013] 然而, 在临床研究中, 研究者已经报道了至少在部分 CNV 的中, 在 1~3 个月治疗后会出现渗漏物复发情况。而增加光敏剂或光的剂量却并不会阻止这种复发, 并且甚至可能导致不希望的对视网膜血管的一种非选择性损伤 (Miller 等人, 1999 年 Arch. Ophthalmology 117: 1161-1173)。某些研究中心的 3 期试验正在研究每 3 个月使用一次的重复的 PDT 治疗。研究者通过给药 PDT 治疗从而期望降低中度视力损失的复发率 (TAP 研究组, 1999 年 Arch. Ophthalmology 117: 1329-1345)。但是, 重复的 PDT 治疗可能导致视网膜色素上皮 (RPE) 和脉络膜毛细血管的累积损害, 从而引起进行性治疗相关的视力降低。

[0014] 现在已研究出应用于受试者中的 AMD 进行治疗的蛋白质, 其包括血管内皮生长因子 (VEGF) 如 AVASTIN™ (BEVACIZUMAB™) 和 LUCENTIS™ (RANIBIZUMAB™), 以及 VEGF 诱导受体例如 EYLEA™ (AFLIBERCEPT™) 的特异性抗体。但是, 尽管某些患者的所述病况得到改善, 但是医疗服务提供者已经发现出由于每个患者所特有的生物学特性, 这些治疗的效果却是高度个体化的。因此, 并不是每一个用这些蛋白质进行治疗的患者都将经历疾病得到改善的过程。

[0015] 某些类型的眼部疾病,特别是视网膜和角膜的疾病,会伴随有疤痕组织的形成,从而进一步加重了视力损失,因此疤痕组织形成的预防的特异性抑制很可能导致改善的视觉结果的程度。

[0016] 在眼部形成的疤痕组织可能是与在老年性黄斑变性中的脉络膜新生血管的形成有关,在积极渗出型和出血型血管增长阶段退化之后,疤痕组织就是最为显著的,由于所述疤痕组织可占据视网膜中央凹区光感受器之后的整个视网膜下隙,从而剥夺了接触功能视网膜色素上皮的感觉神经视网膜的光感受器。目前,并没有可适用于眼部纤维化治疗的方法,例如应用于视网膜纤维化、角膜纤维化、或视网膜下纤维化以及伴随的视力损失。视网膜下纤维化的预防和抑制可通过激光光凝疗法、Verteporfin- 光动力学疗法或者玻璃体内的血管内皮生长因子的药理学抑制得到实现。但是,这些治疗方法却并没有显示出完全有能力对视网膜下新生血管中的视网膜下纤维化进行预防的能力。视网膜下纤维化的其他形成原因包括退化性近视、脉络膜破裂、随着脉络膜炎形成的外层视网膜疤痕和布鲁赫氏膜疤痕、血管样条纹、或者其他原因的外层视网膜损伤。

[0017] 在眼部形成的疤痕组织可能是与导致视网膜前和 / 或视觉神经头新生血管形成的疾病有关,包括例如增殖性糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、镰状细胞病、和葡萄膜炎。疤痕组织的形成一般会晚于心血管形成就会达到高峰,通常与新血管的形成同时发生并且在相同的位置。近期,临床观察显示在增殖性糖尿病视网膜病变中,血管内皮生长因子抑制剂(兰尼单抗或贝伐单抗)在玻璃体内进行给药是可以在视网膜前新血管迅速退化之后进行。不幸的是,已经发现了侵蚀性视网膜前纤维化可能在随着在这些治疗之后的几周内,因而需要进行早期玻璃体切除术。

[0018] 在眼部形成的疤痕组织还可在孔源性视网膜脱离、一种称为增殖性玻璃体视网膜病变之后被发现。在这种情况下,纤维化的出现不需要事先有新血管的形成,纤维细胞被认为是被形成作为在玻璃体内以及在视网膜内表面,或者在视网膜下隙中的异位视网膜色素上皮细胞转化的结果。目前,伴随视网膜前膜切除术的玻璃体切除术对于牵引视网膜脱离而言是唯一可普遍接受的治疗方案。

[0019] 在眼部形成的疤痕组织可能作为早产儿视网膜病变的结果发生,很显然,其是作为来源于不成熟细胞外围视网膜中血管化组织和非血管化组织之间的分界线的新血管形成的结果。在目前的治疗方法中,包括无血管视网膜的冷冻剥脱术和光切除术,但是却并不能满足于完全预防由收缩视网膜前膜纤维化引起的牵位性视网膜脱离继发性的视力损失。目前,视网膜前膜切除的玻璃体切除术是用于牵位性视网膜脱离的唯一可被接受的治疗。通过脉络膜新血管在视网膜下隙的侵入是年龄相关性黄斑变性 (AMD) 视力损失的一个主要原因。新生血管性 AMD 会受益于特别是对血管内皮生长因子 (VEGF) 进行抑制的治疗,但是在这种治疗中仅会在极少数的患者内引起视敏度正常化,并且尽管经过治疗但是大约 30% 会经历相当大的视力损失(参见 Rosenfeld 等人, NEJM 2006 ;355:1419- ;Brown 等人, NEJM 2006 ;355:1432-)。视网膜下纤维化通过感觉神经视网膜下的疤痕组织引起视网膜色素上皮细胞的替换,并将伴随视觉功能的局部丧失。已经报道了,在增生性的、即主要是使用兰尼单抗或贝伐单抗的血管增殖性的视网膜病变 VEGF- 抑制剂治疗中能够闭合,即消除病理学新血管的灌注。但是遗憾的是,由于随着 VEGF- 抑制剂治疗开始后的几周内的一种侵略性的纤维化反应,因此这种潜在有利的反应在一定程度上会被抵消。

[0020] 眼睛前段中的新血管形成和炎症可能会导致前段疾病以及视网膜疾病、脉络膜疾病或者视神经疾病复杂化。重症的患者还会伴随有在虹膜上、在睫状体上以及在前房角中的纤维性膜的形成。

[0021] 由于纤维化是导致在所述疾病中视力丧失,由于纤维化难于移除或者不可能被移除,并且由于纤维化所引起的损害可能难于或不可能被修复,从而对于使用能够消除或减少所述疾病纤维化的成分的治疗救济方法就会具备强力的理由。

[0022] 前包裹下白内障 (ASC),作为一种白内障主要类型,其特征存在于在前囊下密集光散射的纤维化区域。这种类型的白内障是与眼部外伤、炎症和刺激(例如特应性皮炎)有关。

[0023] 结膜瘢痕形成和纤维化似乎是一种眼部手术后的特殊问题,例如用于治疗青光眼的过滤手术,其中纤维化可扰乱水状液引流至白内障小泡。

[0024] 包括感染(例如,病毒感染比方说角膜疱疹)、深部角膜手术、外伤、化学/热灼伤以及遗传的营养不良的一些角膜损伤,可能刺激炎性修复反应,其中纤维化会引起浑浊化、常规曲率的变化以及视力下降。

[0025] 晶状体纤维化可在晶状体创伤愈合部位被观察到,例如在白内障手术后或晶体囊膜损伤后。在白内障手术后,后发性白内障(PCO)通常可以导致光透明度降低以及所植入晶状体的偏差,上述二者都将导致视力下降

[0026] 翼状胬肉是与慢性UV照射有关的非恶性生长的结膜,其特征存在于纤维血管组织。翼状胬肉可引起局部刺激,并通过诱导散光或者直接影响视觉轴线而造成视力障碍。存在手术复发的风险。

[0027] 纤维化与某些继发性闭角型青光眼(例如从新生血管青光眼中虹膜生长的纤维血管膜引起前房角关闭)的病理生理学有关。此外,大量证据显示了在原发性开角型青光眼的发展中小梁网ECM的沉积、以及水引流的合成障碍。

[0028] 已经通过实验的方法证明某些生长因子会刺激纤维化。特别是,在促使眼内纤维化中和在视网膜色素上皮细胞转变为纤维细胞中的作用已经被证明是转化生长因子 β (TGF- β)。因此,仍然需要用于治疗或预防血管生成相关疾病以及纤维化相关病症的改良的组合物和方法。

发明内容

[0029] 本发明的一个方面在于提供一种药物组合物,其被用于抑制眼部血管生成或眼部纤维化,从而所述组合物包括一种药学上适用的载体或一种稀释剂以及一种可有效抑制或调节半乳糖凝集素蛋白或其部分的组合物的剂量,从而足以抑制眼部血管生成或眼部纤维化。在某些实施方式中,抑制剂连接到含有碳水化合物识别结构域的至少一个氨基酸的部分半乳糖凝集素蛋白上。

[0030] 在组合物的多个实施方案中,半乳糖凝集素蛋白选自半乳糖凝集素-1、半乳糖凝集素-3、半乳糖凝集素-7和半乳糖凝集素-8的选择。在各种实施方案中的组合物选自:药物、聚合物、蛋白质、肽、碳水化合物、低分子量化合物、寡核苷酸、多核苷酸、以及遗传物质(比如DNA或RNA)的至少其中之一。例如,遗传物质是对半乳糖凝集素表达进行负性调节的siRNA。在各种实施方案中的药物是一种治疗上、预防上和/或药理学上或生理学上有益的活性剂、物质或它们的混合物,其被递送到细胞或受试者中,用以产生期望的有利效

果。药物包括例如蛋白质、肽、或核酸。

[0031] 在多个实施方案中,组合物有效用于治疗 and 预防与眼部血管生产相关的疾病或病况。正如在这里所使用的,所述短语“眼部疾病或病况”指的是:与过量的新血管生成、眼睛外伤或创伤、与瘢痕形成相关的手术(例如青光眼滤过术);新生血管性青光眼;角膜损伤;结膜炎后瘢痕形成;翼状胬肉、年龄相关黄斑变性(AMD)例如湿 AMD 或干 AMD;从干 AMD 到湿 AMD 的转换;增殖性糖尿病性视网膜病变;糖尿病性黄斑水肿;以及角膜新血管生成(沙眼)的至少其中之一为特征的任意的病症。可选择的,短语“疾病或病况”指的是由眼部血管生成导致或者引起的任意的病况。在多个实施方案中,疾病或病况与眼部新血管形成、视网膜水肿、糖尿病性视网膜病变、与视网膜缺血相关的后遗症、后段新血管形成、以及新生血管性青光眼相关。

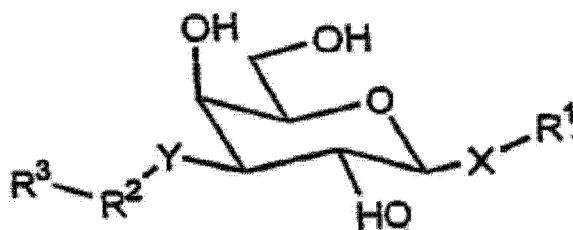
[0032] 在多个实施方案中,组合物有效用于治疗或预防与眼部纤维化有关的疾病或病症。正如在这里所使用的,短语“眼部疾病和病况”指的是特征在于:眼睛的一个或多个解剖位置的过量的纤维化或胶原沉积、纤维化特别是由于眼睛的创伤或其它损伤、手术诱导的瘢痕形成例如青光眼滤过手术;新生血管性青光眼;角膜损伤;结膜炎后的瘢痕形成;翼状胬肉、年龄相关黄斑变性(AMD)例如湿 AMD 或干 AMD;从干 AMD 到湿 AMD 的转换;增殖性糖尿病性视网膜病;糖尿病性黄斑水肿;病理性近视、早产儿视网膜疾病、视网膜色素上皮脱离、斯-约综合征、眼色素层炎、前囊下白内障、干眼病和角膜新血管生成(沙眼)其中之一的任何病症。可选择的,短语“疾病或病况”为由眼部纤维化导致或者引起的任意的病况。在多个实施方案中,疾病或病况与眼部纤维化、视网膜瘢痕形成、糖尿病性视网膜病变、与视网膜缺血相关的后遗症、以及青光眼相关。

[0033] 在多个实施方案中,组合物为 β -半乳糖吡喃糖苷。在多个实施方案中,所述组合物是被衍生或功能化的。在多个实施方案中,所述组合物是不可代谢的,或者在可选的实施方案中是可代谢的。

[0034] 在相关的实施方案中,组合物进一步包括至少一种试剂,所述试剂选自由抗血管生成、抗肿瘤、抗病毒、抗细菌、抗分枝杆菌、抗真菌、抗增生、抗炎和抗凋亡所组成的组中的试剂。例如,试剂是一种预防眼睛感染的抗菌分子。

[0035] 在多个实施方案中,用于抑制眼部血管生成或眼部纤维化的组合物包括下述通式:

[0036]



[0037] 其中吡喃糖环的结构是 D-半乳糖;X 选自由 O、S、NH、CH₂、和 NR⁴所组成的组中的基团,或者是键;Y 选自由 NH、CH₂、和 NR⁴所组成的组中的基团,或者是键;R¹选自由糖、氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基和杂环基所组成的组中的基团;R²选自由 CO、SO₂、SO、PO 和 PO₂所组成的组中;R³选自由:至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基或烯基、同时被羧基和氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、以及被卤素取

代的至少 4 个碳原子的烷基；苯基、被羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被烷氧基取代的苯基、被硝基取代的苯基、被磺基取代的苯基、被氨基取代的苯基、被羟基取代的苯基、被羰基取代的苯基以及被取代的羰基取代的苯基；以及苯基氨基；或者 R^4 选自自由氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基和杂环基所组成的组中。

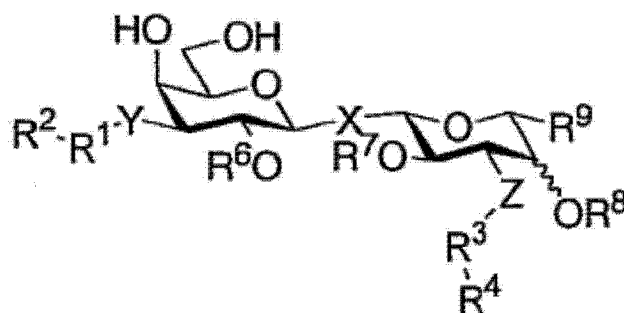
[0038] 在组合物的相关实施方案中，糖 (R^1) 选自自由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖、果糖、木糖、唾液酸、葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、二糖或包含至少两种上述糖类的寡糖及其衍生物所组成的组中。

[0039] 在组合物的多个实施方案中，Y 是 NH；X 是 O；或者卤素选自自由 F、Cl、Br 和 I 所组成的组中。

[0040] 在多个实施方案中，组合物选自自由下述组合物所组成的组中：甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[3-羧基丙酰胺]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[z]-3-羧基丙酰胺)-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯甲酰氨基-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-苯甲酰氨基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-甲氧基-2,3,5,6-四氟苄基-酰氨基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-3,4,5,6-四氟苄基-酰胺]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-甲磺酰氨基-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-硝基苯磺酰胺]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯氨基羰基酰胺-苯甲酰基氨基-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-氨基乙酰氨基-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷；以及甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2S]-2-氨基-3-羧基-丙酰胺)-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷。

[0041] 在多个实施方案中，组合物包括通式：

[0042]



[0043] 其中，吡喃糖环的其中一种结构是 β-D-半乳糖；X 选自自由 O, S, SO, SO₂, NH, CH₂, 和 NR⁵所组成的组中；Y 选自自由 O, S, NH, CH₂和 NR⁵所组成的组中，或者是键；Z 选自自由 O, S, NH, CH₂, 和 NR⁵所组成的组中，或者是键；R¹和 R³各自独立地选自自由 CO, SO₂, SO, PO₂, PO 和 CH₂所组成的组中，或者是键；R²和 R⁴各自独立地选自自由：至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被所基取代的至少 4 个碳原子的烯

基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烯基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烯基、和被一个或多个卤素取代的烷基；被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个硝基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个氨基取代的苯基、被至少一个烷基氨基取代的苯基、被至少一个芳基氨基取代的苯基、被至少一个二烷基氨基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个被取代的羰基取代的苯基；或者萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个硝基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个氨基取代的萘基、被至少一个烷基氨基取代的萘基、被至少一个芳基氨基取代的萘基、被至少一个二烷基氨基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、以及被至少一个被取代的羰基取代的萘基；杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个硝基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个氨基取代的杂芳基、被至少一个烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个芳基氨基取代的杂芳基、被至少一个二烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个被取代的羰基取代的杂芳基； R^6 和 R^8 各自独立地选自自由氢、酰基、烷基、卞基、和糖所组成的组中； R^7 选自自由氢、酰基、烷基、和卞基所组成的组中；和 / 或 R^9 是选自自由氢、甲基、羟基甲基、酰氧基甲基、烷氧基甲基、和苄氧基甲基所组成的组中。

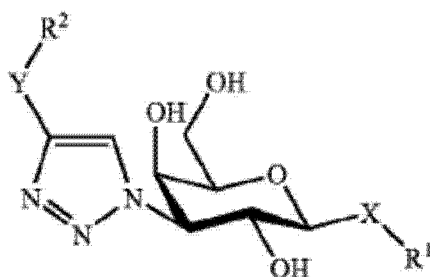
[0044] 在组合物的多个实施方案中，Y 为 NH。在组合物的多个实施方式中，Z 为 NH。在组合物的多个实施方式中，X 是 S。在组合物的在多个实施方案中， R^1 是 CO。在组合物的多个实施方式中， R^3 是 CO。在组合物的多个实施方式中， R^2 或 R^4 是芳香族例如芳香环； R^6 、 R^7 和 R^8 中的任一个为氢；或者 R^9 是羟基甲基。

[0045] 在多个实施方案中，所述组合物是：双-(3-脱氧-3-苯甲酰氨基-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷(17)、双-(3-脱氧-3-(3-甲氧基苯甲酰氨基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-(3,5-二甲氧基苯甲酰胺)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-硝基苯甲酰胺基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双(3-脱氧-3-(2-萘甲酰胺基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-甲氧基苯甲酰氨基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-硝基苯甲酰胺基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[4-(二甲基氨基)-苯甲酰氨基]-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-甲基苯甲酰氨基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-氯代苯甲酰氨基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-叔-丁基苯甲酰胺基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-乙酰苯甲酰胺基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[2-(3-羧基)-萘甲酰胺基]-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-[3-脱氧-3-(3,4-亚甲二氧基)苯甲酰氨基]-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷、双-(3-脱氧-3-(4-甲氧基羰基苯甲酰胺基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-羧基苯甲酰胺基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-羟基-苯甲酰氨基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3,5-二苄氧基苯甲酰胺基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷；

乳糖基) 硫烷; 双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷; 双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)-硫烷; 双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷、双-(3-脱氧-3-[3-苄氧基-5-(4-氟-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷; 双-(3-脱氧-3-[3-甲氧基-5-(4-甲基-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷; 或者双-(3-脱氧-3-(3-烯丙氧基-5-苄氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷。

[0046] 在多个实施方案中, 组合物包括半乳糖吡喃糖苷例如 3-三唑-半乳糖苷。在多个实施方案中, 组合物具有如下所示的通式:

[0047]



[0048] 其中, 吡喃糖环的结构为 D-半乳糖; X 选自由 O、S、NH、CH₂、和 NR⁴ 所构成的组中, 或者是键; Y 选自由 CH₂、CO、SO₂、SO、PO₂、和 PO 所组成的组中、苯基、或者是键; R¹ 为选自由下述基团所组成的组中: 糖、被取代的糖、D-半乳糖、被取代的 D-半乳糖、C3-[1, 2, 3]-三唑-1-基-取代的 D-半乳糖; 氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基以及它们的衍生物; 和氨基、被取代的氨基、亚氨基、或被取代的亚氨基; 和 / 或 R² 选自由下述基团所组成的组中: 氢、氨基、被取代的氨基、烷基、被取代的烷基、烯基、被取代的烯基、炔基、被取代的炔基、烷氧基、被取代的烷氧基、烷基氨基、被取代的烷基氨基、芳基氨基、被取代的芳基氨基、芳基氧基、被取代的芳基氧基、芳基、被取代的芳基、杂芳基、被取代的杂芳基、以及杂环基、被取代的杂环基。

[0049] 在组合物的相关实施方案中, 糖选自由葡萄糖、甘露糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖、果糖、木糖、唾液酸、葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、半乳糖醛酸、二糖或包含至少两种上述糖类的低聚糖、以及它们的衍生物。

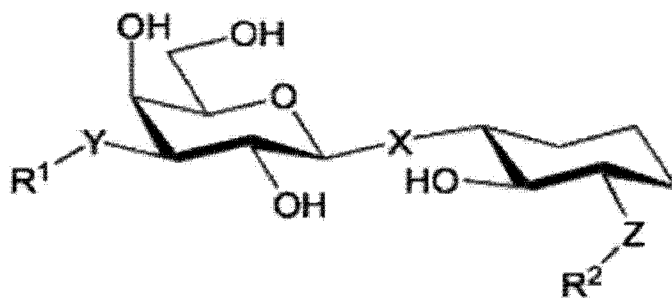
[0050] 在组合物的在多个实施方案中, Y 为 CO、SO₂、或键。在组合物的在多个实施方案中, R² 为胺或芳基。在组合物的各种实施方式中, R² 是被取代的苯基, 其中所述取代基是一个或多个选自由下述基团所组成的组中的基团: 卤素、烷氧基、烷基、硝基、磺基、氨基、羟基或羰基。在组合物的多个实施方案中, R¹ 是半乳糖、葡萄糖或 N-乙酰葡萄糖胺。在组合物的多个实施方案中, R¹ 是被取代的半乳糖。在组合物的多个实施方式中, R¹ 是一种被取代的葡萄糖、被取代的半乳糖、或被取代的 N-乙酰葡萄糖胺。在组合物的在多个实施方案中, R¹ 是 C3-[1, 2, 3]-三唑-1-基-取代的半乳糖。在组合物的各种实施方式中, X 是 O 或 S。

[0051] 在多个实施方案中, 组合物包括从下述基团选择的至少一个基团: 甲基 3-脱氧-3-(1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-(4-丙基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-(4-甲氧基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷; 3-脱氧-3-(4-(1-羟

基-1-环己基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-(4-苯基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-(4-对甲苯磺酰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-(4-丁基氨基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-(4-苄氨基羰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;甲基-3-{4-(3-羟基丙-1-基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;甲基-3-{4-[2-(N-吗啉代)乙氨基羰基]-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧 β -D-吡喃半乳糖苷-(1 $\rightarrow$ 4)-2-乙酰氨基-2-脱氧 β -D-吡喃葡萄糖苷,双-(3-脱氧-3-(4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)- β -D-半乳吡喃糖基)硫烷,3-脱氧-3-{4-(2-氟苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(2-甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(3-甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(4-甲氧基苯基)-H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(3,5-二甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(1-萘基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(2-萘基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(2-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(3-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-脱氧-3-{4-(4-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷;3-0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-3-吡啶碳酸醛酐};3-0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]-3-吡啶碳酸醛酐};3-0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]}-(2-羟基-5-硝基苯基)-碳酸醛酐;3-0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]}-(2-羟基-5-硝基苯基)-碳酸醛酐;3-0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-乳糖吡喃糖基]}-(2,5-二羟基苯基)-碳酸醛酐;3-0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]}-(2,5-二羟基苯基)-碳酸醛酐;3-0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-吡喃半乳糖基]}-1-萘基碳酸醛酐;或3-0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]- β -D-半乳吡喃糖基}-1-萘基碳酸醛酐。

[0052] 在多个实施方案中,组合物具有二半乳糖苷或硫代二半乳糖苷,例如所述化合物具备下述所示的通式:

[0053]



[0054] 其中,吡喃糖环的结构是D-半乳糖;X选自由O,S和SO构成的组中;Y和Z独立地选自由CONH或1H-1,2,3-三唑环所组成的组中; R^1 和 R^2 各自独立地选自由下述基团所组成的组中:至少4个碳原子的烷基、至少4个碳原子的烯基、至少4个碳原子的炔基;氨基甲酰基、被烷基取代的氨基甲酰基、被烯基取代的氨基甲酰基、被炔基取代的氨基甲酰基、被芳基取代的氨基甲酰基、被取代的烷基取代的氨基甲酰基、被取代的芳基取代的氨基甲酰基;被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷基取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个三氟甲基取代的苯基、被至少一个三氟甲氧基取代苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个取代的羰基取代的苯基;萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷基取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、以及被至少一个取代的羰基取代的萘基;杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个取代的羰基取代的杂芳基;以及噻吩基、被至少一个羧基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个烷氧基取代的噻吩基、被至少一个磺基取代的噻吩基、被至少一个芳基氨基取代的噻吩基、被至少一个羟基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个羰基取代的噻吩基、以及被至少一个取代的羰基取代的噻吩基。

[0055] 在组合物的多个实施方案中,Y是CONH例如通过N原子连接到吡喃糖环上的CONH基团。在组合物的多个实施方案中,ZCONH。在组合物的多个实施方案中,CONH基团通过N原子连接到环己烷上。在组合物的多个实施方案中,Y是1H-1,2,3-三唑环,例如在组合物的相关实施方案中,1H-1,2,3-三唑环通过N1原子连接到吡喃糖环上。在组合物的多个实施方案中, R^1 连接到1H-1,2,3-三唑环的C4原子上。

[0056] 在组合物的多个实施方案中,Z是1H-1,2,3-三唑环。举例说明,1H-1,2,3-三唑环通过N1原子连接到环己烷上。在组合物的多个实施方案中, R^2 连接到1H-1,2,3-三唑环的C4原子上。

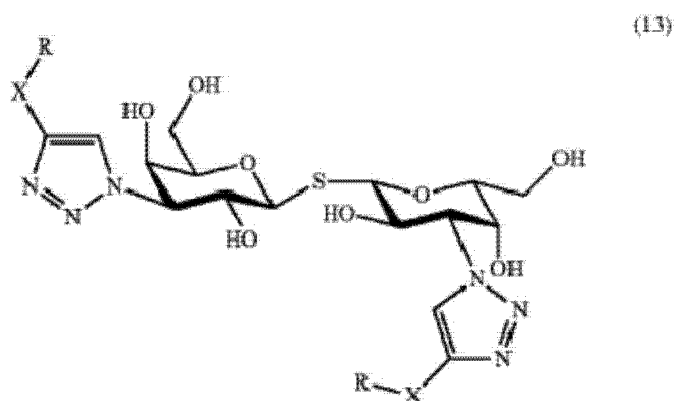
[0057] 在组合物的多个实施方案中, R^1 和 R^2 各自独立地选自由氨基甲氧基、烷基化的氨基甲酰基、烯基化的氨基甲酰基、芳基化的氨基甲酰基、苯基、被取代的苯基、卤代苯基、氟代苯基、氯代苯基、溴代苯基、烷基化的苯基、烯基化的苯基、三氟甲基化苯基、甲氧基苯基、三氟甲氧基化的苯基、萘基、被取代的萘基、杂芳基、被取代的杂芳基、噻吩基以及被取代的噻吩基。

[0058] 在组合物的多个实施方案中, R^1 是烷基化的氨基甲酰基、氟化的苯基、或噻吩基。在组合物的多个实施方案中, R^2 是烷基化的氨基甲酰基、氟化的苯基、或噻吩基。在组合物的多个实施方案中, X 是 O 或 S。

[0059] 在多个实施方案中, 组合物是选自: ((1R, 2R, 3S)-2-羟基-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基))-β-D-吡喃半乳糖苷; ((1R, 2R, 3S)-2-羟基-3-(4-(2-氟苯基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(2-氟苯基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷; ((1R, 2R, 3S)-2-羟基-3-(4-(3-氟苯基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(3-氟苯基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷; ((1R, 2R, 3S)-2-羟基-3-(4-(4-氟苯基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(4-氟苯基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷; (1R, 2R, 3S)-2-羟基-3-(4-(3-噻吩基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(3-噻吩基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷; (1R, 2R, 3S)-2-羟基-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-环己基)3-脱氧-3-(4-(N-(1-丙基)-氨基甲酰基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷, 和 (1R, 2R, 3S)-2-羟基-3-(4-氯代苯甲酰基)-环己基)3-脱氧-3-(4-氯代苯甲酰基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷所组成的组中。在组合物的多个实施方案中, 抑制剂包括 TD139、化合物 32、或其部分或同系物。

[0060] 在多个实施方案中, 组合物具有二半乳糖苷, 举例来说, 组合物具有通式 (13):

[0061]



[0062] 其中, 至少一个吡喃糖环的结构是 D-半乳糖; X 是键; R 是苯基, 其被选自由甲基、乙基、异丙基、叔丁基, 氟代、氯代、溴代和三氟甲基所组成的组中的一个或多个取代基在任意位置进行取代, 或者 R 是噻吩基。

[0063] 在组合物的多个实施方案中, R 是苯基, 其被选自由氟代、氯代、和溴代所组成的组中的一个或多个取代基在任意位置进行取代。例如, R 是被选自氟的一个或多个取代基在任意位置进行取代的苯基。通常而言, 两个吡喃酮环的结构是 D-半乳糖。

[0064] 本发明的一个方面提供了一种用于治疗或预防受试者眼部血管生成或眼部纤维化的方法, 所述方法包括为受试者给药治疗有效量的至少一种组合物, 其中所述组合物包括一种半乳糖凝集素蛋白质或其部分的抑制剂。受试者例如是哺乳动物比方说人类、狗、猫、马、猪、啮齿类动物、以及牛。

[0065] 在所述方法的多个实施方案中,眼部血管生成或眼部纤维化与一种疾病或病况有关,所述疾病和病况指的是被通过与瘢痕形成有关的手术进行常规治疗疾病和病况,所述瘢痕形成例如是青光眼滤过手术;新生血管性青光眼;角膜损伤;结膜炎后的瘢痕形成;翼状胬肉、AMD 例如湿性 AMD 或干性 AMD;从干性 AMD 到湿性 AMD 的转换;增殖性糖尿病性视网膜病;糖尿病性黄斑水肿;或角膜新血管形成(沙眼)。

[0066] 在所述方法的多个实施方案中,半乳糖凝集素蛋白是选自:半乳糖凝集素-1 蛋白质,半乳糖凝集素-3 蛋白质,半乳糖凝集素-7 蛋白质和半乳糖凝集素-8 蛋白质所组成的组中,并且其中组合物是选自:药物,聚合物,蛋白质,肽,碳水化合物,低分子量化合物,寡核苷酸,多核苷酸,和遗传物质比方说 DNA 或 RNA 的至少其中之一。

[0067] 在多个实施方案中,所述方法进一步包括:观测疾病或病况的指标或参数中的减少量,例如,标记物的参数或指标。举例来说,所述标记是一种分子(例如,一种生长因子),该分子可显示眼部血管生成或眼部纤维化的存在或不存在。

[0068] 在多个实施方案中,所述方法进一步包括,在给药之前,对所述组合物进行设计,使得所述组合物结合到半乳糖凝集素蛋白上,并调节 VEGF/VEGF 受体-2 途径,或者所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白的表达。在多个实施方案中,所述方法进一步包括,在给药之前,对所述组合物进行设计,使得所述组合物结合到半乳糖凝集素蛋白上,并调节成纤维细胞发育能力因子途径,或所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白的表达。

[0069] 本发明的一个方面提供了一种用于治疗或预防受试者的眼部血管生成或眼部纤维化的方法,所述方法包括向受试者给药一种治疗有效量的至少一种组合物,其中所述组合物包括半乳糖凝集素蛋白或其部分的抑制剂,使得所述给药包括使所述受试者与本发明所述的任何药物组合物进行接触。在所述方法的多个实施方案中,受试者是哺乳动物。

[0070] 在多个实施方案中,所述方法进一步包括对纤维化的减少进行观察或检测。在所述方法的多个实施方案中,所述给药包括使所述受试者或受试者的组织与一种组合物进行接触,所述组合物含有至少下述的剂量:约 0.01 纳克 (ng) 到约 1ng、约 1ng 至约 10ng、约 10ng 至约 20ng、约 20ng 至约 30ng、约 30ng 至约 40ng、约 40ng 至约 50ng、约 50ng 至约 100ng、100ng 至约 200ng、200ng 至约 300ng、约 300ng 至约 400ng、约 400ng 至约 600ng、约 600ng 至约 800ng、约 1 微克 (μ g) 至约 5 μ g,约 5 μ g 至约 20 μ g,约 20 μ g 至约 40 μ g,约 40 μ g 至约 60 μ g,约 60 μ g 至约 80 μ g,约 80 μ g 至约 100 μ g、约 100 μ g 至约 200 μ g,约 200 至约 300 μ g,以及约 300 μ g 至约 400 μ g。举例来说,所述剂量为约 0.01ng 至约 10ng、或约 10ng 至 100ng,或约 100ng 至约 500ng,或约 500ng 至约 2 μ g,或约 2 至约 250 μ g,或约 250 μ g 至约 750 μ g。

[0071] 在多个实施方案中,在向受试者给药之前,所述方法进一步包括对编码所述抑制剂的多核苷酸序列进行设计,例如所述抑制剂使一种连接蛋白,其可模仿半乳糖凝集素-1、半乳糖凝集素-3、半乳糖凝集素-7 或者半乳糖凝集素-8 的碳水化合物结构域。例如,所述抑制剂是一种融合蛋白。

[0072] 在多个实施方案中,所述方法进一步包括,在给药之前,对所述组合物进行配制用于眼部递送,所述眼部递送选自:注射剂、滴眼剂、贴片、油膏、凝胶、或喷雾剂所组成的组中。举例来说,抑制剂被配制于一种组合物中,该组合物是 pH 中性、缓冲和等渗。

[0073] 在所述方法的多个实施方案中,将组合物给药于受试者包括一种途径注射所述组

合物,所述途径例如是眼内、玻璃体内、角膜、眼结膜、眼结膜后、静脉内、或锥内 (tenonly) 给药。在多个实施方案中,眼部血管生成或眼部纤维化是与眼部新血管形成、视网膜水肿、糖尿病性视网膜病、与视网膜缺血相关的后遗症、后段新血管形成、新生血管性青光眼有关。在所述方法的各种实施方案中,抑制剂包括 TD139、化合物 32、或它们的一部分或同系物。

[0074] 本发明的一个方面提供了一种用于治疗或预防受试者或来自受试者的细胞中的眼部血管生成或眼部纤维化的试剂盒,该试剂盒包括:一种抑制半乳糖凝集素蛋白或其部分的药物组合物,其中使所述组合物与半乳糖凝集素蛋白结合并且调节 VEGF/VEGF 受体 -2 途径或成纤维细胞发育能力因子 (FGF) 途径,或者所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白的表达;使用说明书;以及,容器。该药物组物包含本发明在此所述的任意组合物。

[0075] 本发明的一个方面提供了一种用于治疗或预防受试者或来自受试者的细胞中的眼部血管生成或眼部纤维化试剂盒,该试剂盒包括:一种抑制一种半乳糖凝集素蛋白或其部分的药物组合物,其中活性化合物结合到半乳糖凝集素蛋白上并且对 VEGF/VEGF 受体 -2 途径进行调节或者组合物对半乳糖凝集素蛋白的表达进行调节;使用说明书;以及,容器。该药物组物包含本发明在此所述的任意组合物例如 TD139 化合物、或一种化合物 32 的化合物。

[0076] 在多个实施方案中,试剂盒还包括用于给药该组合物的施药器或装置,例如所述施药器或所述装置是注射器、针、喷雾器、海绵、凝胶、条、带、绷带、盘、绳、或纳米结构。

[0077] 在试剂盒的多个实施方案中,组合物选自:药物、聚合物、蛋白质、多肽、糖类、低分子量化合物、寡核苷酸、多核苷酸、和遗传物质如 DNA 或 RNA 的至少其中之一。在一个相关实施方案中,组合物与药学上适用的载体或稀释剂进行配制。

[0078] 在多个实施方案中,试剂盒进一步包括一种控制剂,例如 AVASTIN™ (BEVACIZUMAB™)、LUCENTIS™ (RANIBIZUMAB™)、或者 EYLEA™ (AFLIBERCEPT™),从而控制剂特异性结合 VEGF 并且对 VEGF 诱导的血管生成进行抑制。在多个实施方案中,控制剂结合或抑制 FGF 或 FGF 途径。在试剂盒的多个实施方案中,药物组合物结合到选自半乳糖凝集素 -1 蛋白、半乳糖凝集素 -3 蛋白、半乳糖凝集素 -7 蛋白和半乳糖凝集素 -8 的蛋白的半乳糖凝集素蛋白上。

[0079] 本发明的一个方面提供了一种用于抑制眼部血管生成或者眼部纤维化的病况的药物组合物。其中,所述组合物包括一种药物可接受载体或者稀释剂,并且该组合物的剂量能有效抑制或调节半乳糖凝集素蛋白或其部分的活性,满足抑制眼部血管生成或者眼部纤维化。通常,所特定选择的所述载体和稀释剂是对于受试者的眼睛是相容的、无毒的、并且无刺激性的。

[0080] 在药物组合物的多个实施方案中,半乳糖凝集素蛋白是选自由半乳糖凝集素 -1、半乳糖凝集素 -3、半乳糖凝集素 -7 和半乳糖凝集素 -8 所组成的组中。半乳糖凝集素 - 蛋白例如来源于人、小鼠、大鼠或家兔。

[0081] 在多个实施方案中,药物组合物是选自下述组合物中的至少一种:药物、聚合物、蛋白质、多肽、糖类、低分子量化合物、寡核苷酸、多核苷酸、以及遗传物质比如 DNA 或 RNA。例如,所述蛋白质是一种特异性地结合于一种半乳糖凝集素蛋白质的表位的抗体,使得所述抗体抑制半乳糖凝集素蛋白的活性。在某些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体、单克隆抗

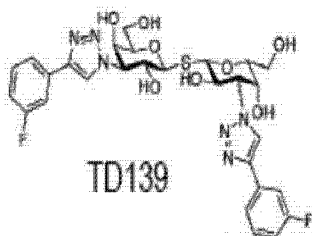
体、多克隆抗体、或它们的一部分。例如,所述抗体特异性结合于半乳糖凝集素的碳水化合物结合域或其部分。

[0082] 在多个实施方案中,药物组合物在用于治疗或预防与眼部血管生成或眼部纤维有关的疾病中是有效的,例如所述疾病或病况是与过度性新血管形成相关。在多个实施方案中,药物组合物能有效地治疗或预防选自下列所述的病况:眼睛或其部分的创伤或损伤(例如,视网膜、晶状体以及角膜);与瘢痕形成相关的手术例如青光眼滤过手术;新生血管性青光眼;角膜损伤;角膜营养不良、在结膜炎之后的瘢痕形成;翼状胬肉、AMD 例如湿性 AMD 或干性 AMD;干性 AMD 到湿性 AMD 的转换;增殖性糖尿病性视网膜病;糖尿病性黄斑水肿;以及角膜新血管生成(沙眼)。

[0083] 在多个实施方案中,药物组合物有效用于治疗或预防眼部纤维化、或与病况相关的其它类型的纤维化。

[0084] 在多个实施方式中,药物组合物包括具有下述结构的化合物:

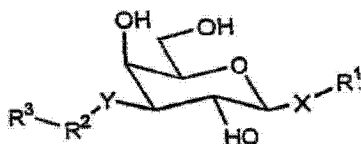
[0085]



[0086] 以至于所述化合物抑制受试者的眼部血管生成的病况。

[0087] 在相关的实施方案中,药物组合物是衍生的或功能化的 β -半乳糖苷,例如,所述组合物具有以下通式:

[0088]



[0089] 其中,吡喃糖环的结构是 D-半乳糖;X 为选自由 O、S、NH、CH₂、和 NR⁴所构成的组中的基团,或者是键;Y 为选自由 NH、CH₂、和 NR⁴所构成的组中的基团,或者是键;R¹是选自由下述基团所构成的组中的基团:c) 糖;d) 氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基;R²选自由 CO、SO₂、SO、PO、和 PO₂所组成的组中的基团;R³选自由下述基团所组成的组中的基团:至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基或烯基、同时被羧基和氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、以及被卤素取代的至少 4 个碳原子的烷基;苯基、被羧基取代的苯基、被至少一种卤素取代的苯基、被烷氧基取代的苯基、被至少一个卤素和至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素和至少一个烷氧基取代的苯基、被硝基取代的苯基、被磺基取代的苯基、被氨基取代的苯基、被羟基取代的苯基、被羰基取代的苯基以及被取代的羰基取代的苯基;以及苯基氨基;R⁴是选自由氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基所组成的组中的基团。在多个实施方案中,组合物是不可代谢的或者是可代谢的。

[0090] 在药物组合物的多个实施方案中,所述糖(R¹)选自葡萄糖、甘露糖、半乳糖、N-乙

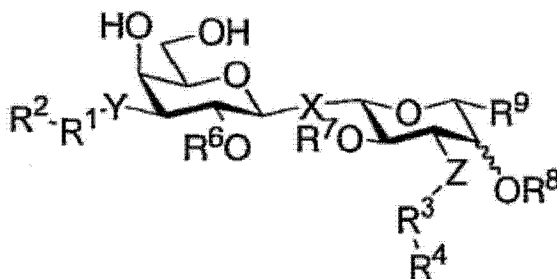
酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖、果糖、木糖、唾液酸、葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸、二糖或包含至少两种上述糖类的寡糖及其衍生物。

[0091] 在药物组合物的多个实施方案中, Y 是 NH; X 是 O; 或卤素选自 F、Cl、Br 和 I 所组成的组中。

[0092] 在多个实施方案中, 所述药物组合物是选自下述组合物的一种: 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[3-羧基丙酰氨基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[{z}-3-羧基丙烯酰氨基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯甲酰氨基-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-苯甲酰氨基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-甲氧基-2,3,5,6-四氟苯甲酰胺基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-3,4,5,6-四氟苯甲酰胺基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-甲磺酰氨基-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-硝基苯亚磺酰氨基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯氨基羰基氨基-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-氨基乙酰氨基-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷; 以及甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[{2S}-2-氨基-3-羧基-丙酰氨基]-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基)-β-D-吡喃葡萄糖苷。

[0093] 在各种实施方案中, 所述药物组合物具有以下通式:

[0094]



[0095] 其中, 吡喃糖环的其中一个结构是 β-D-半乳糖; X 选自由 O, S, SO, SO₂, NH, CH₂, 和 NR⁵所组成的组中; Y 选自由 O, S, NH, CH₂, 和 NR⁵所组成的组中, 或者是键; Z 选自由 O, S, NH, CH₂, 和 NR⁵所组成的组中, 或者是键; R¹和 R³各自独立地选自由 CO, SO₂, SO, PO₂, PO, 和 CH₂所组成的组中, 或者是键; R²和 R⁴各自独立地选自由下述基团所组成的组中: 至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烯基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烯基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烯基、被一个或多个卤素取代的至少 4 个碳原子的烷基; 被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个硝基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个氨基取代的苯基、被至少一个烷基氨基取代的苯基、被至少一个芳基氨基取代的苯基、被至少一个二烷基氨基取代的苯基、被

至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个取代的羰基取代的苯基；萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个硝基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个氨基取代的萘基、被至少一个烷基氨基取代的萘基、被至少一个芳基氨基取代的萘基、被至少一个二烷基氨基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、以及被至少一个取代的羰基取代的萘基；杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个硝基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个氨基取代的杂芳基、被至少一个烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个芳基氨基取代的杂芳基、被至少一个二烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个取代的羰基取代的杂芳基； R^6 和 R^8 各自独立地选自自由下述基团所组成的组中：氢、酰基、烷基、卞基、和糖； R^7 选自自由氢、酰基、烷基、和卞基所组成的组中；或者 R^9 选自自由氢、甲基、羟甲基、酰氧甲基、烷氧甲基、和卞氧甲基所组成的组中。

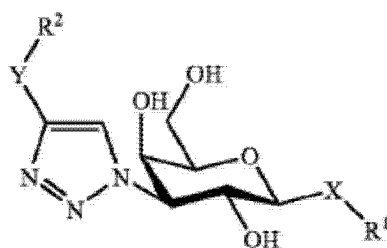
[0096] 在药物组合物的多个实施方案中，Y 是 NH；Z 是 NH；X 是 S； R^1 是 CO； R^3 是 CO； R^2 或 R^4 是芳香族例如芳香环； R^6 、 R^7 、和 R^8 的每个是氢；或者， R^9 是羟基甲基。

[0097] 在多个实施方案中，所述药物组合物包括选自下述结构的至少其中之一：双-(3-脱氧-3-苯甲酰氨基- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷(17)、双-(3-脱氧-3-(3-甲氧基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-(3,5-二甲氧基苯甲酰胺)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-硝基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双(3-脱氧-3-(2-萘甲酰胺)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-甲氧基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-硝基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[4-(二甲氨基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-甲基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-氯代苯甲酰胺)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-叔丁基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(4-乙酰苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[2-(3-羧基)-萘甲酰胺基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-[3-脱氧-3-(3,4-亚甲二氧基)苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷、双-(3-脱氧-3-(4-甲氧羰基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-羧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-羟基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3,5-二苄基氧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)-硫烷；双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷、双-(3-脱氧-3-[3-苄氧基-5-(4-氟-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；双-(3-脱氧-3-[3-甲氧基-5-(4-甲基-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷；或者双-(3-脱氧-3-(3-烯丙氧基-5-苄氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)硫烷。

[0098] 在多个实施方案中，药物组合物包含 3-三唑基一半乳糖吡喃糖苷，例如所述组合

物包括具备如下所示的通式：

[0099]



[0100] 其中,吡喃糖环的结构是D半乳糖;X为选自由O, S, NH, CH₂, 和NR⁴所组成的组中,或者是键;Y为选自由CH₂, CO, SO₂, SO, PO₂和PO所组成的组中,苯基、或者是键;R¹是选自由下述基团所组成的组中:糖、被取代的糖、D-半乳糖、被取代的D-半乳糖、C 3[1, 2, 3]-三唑-1-基-取代的D-半乳糖;氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基及其衍生物;和氨基、被取代的氨基、亚氨基、胡哦被取代的亚氨基;并且,R²是选自由下述基团所组成的组中:氢、氨基、被取代的氨基、烷基、被取代的烷基、烯基、被取代的烯基、炔基、被取代的炔基、烷氧基、被取代的烷氧基、烷基氨基、被取代的烷基氨基、芳基氨基、被取代的芳基氨基、芳基氧基、被取代的芳基氧基、芳基、被取代的芳基、杂芳基、被取代的杂芳基、以及杂环基、被取代的杂环基。

[0101] 在药物组合物的多个实施方案中,糖选自由下述糖类所组成的组中:葡萄糖,甘露糖,半乳糖,N-乙酰葡萄糖胺,N-乙酰半乳糖胺,岩藻糖,果糖,木糖,唾液酸,葡糖醛酸,艾杜糖醛酸,半乳糖醛酸,二糖或包括至少两个以上的糖类的寡糖,以及它们的衍生物。

[0102] 在药物组合物多个实施方案中,Y是CO, SO₂, 或一个键;R²是胺基或芳基;R¹是半乳糖,葡萄糖或N-乙酰氨基葡萄糖;R¹是取代的半乳糖,葡萄糖或者N-乙酰氨基葡萄糖;R¹是一个C 3[1, 2, 3]-三唑-1-基-取代的半乳糖;或者X为O或S。

[0103] 在组合物的多个实施方案中,R²是取代的苯基,其中所述的取代基团是一个或多个选自由卤素,烷氧基,烷基,硝基,磺基,氨基,羟基或羰基所组成的组中的基团。

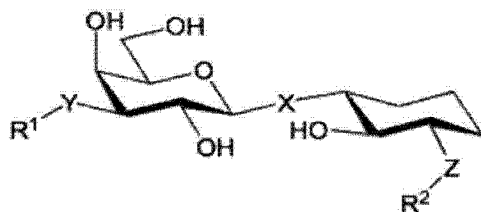
[0104] 在多个实施方案中,药物组合物被配制用于眼部递送。在多个的实施方案中,组合物被配制作作为注射剂,滴眼剂,或软膏用于眼部递送。举例来说,注射是选自由玻璃体内注射,眼内注射,结膜下注射和眼球下注射所组成的组中的至少其中一种。

[0105] 在多个实施方案中,所述药物组合物具有或者包括选自:甲基3-脱氧-3-(1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-(4-丙基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-(4-甲氧基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-(4-(1-羟基-1-环己基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-(4-苯基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-(4-对-甲苯磺酰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基-(4-基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-(4-苄基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-{[4-(3-羟基丙-1-基氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]}-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-{4-[2-(N-吗啉代)-乙

氨基羰基]-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖苷、双-(3-脱氧-3-(4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基)-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷、甲基3-脱氧-3-{4-(2-氟苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖基;甲基3-脱氧-3-{4-(2-甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{4-(3-甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{4-(4-甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{4-(3,5-二甲氧基苯基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{4-(1-萘基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{4-(2-萘基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{4-(2-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{4-(3-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{4-(4-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖-1]}-3-吡啶-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基}-3-吡啶-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖-1]}-(2-羟基-5-硝基-苯基)-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基}-(2-羟基-5-硝基-苯基)-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基}-(2,5-二羟基苯基)-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基}-(2,5-二羟基苯基)-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基}-1-萘基-碳酸乙醛肟;或0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基}-1-萘基-碳酸乙醛肟

[0106] 在多个实施方案中,药物组合物包括一种硫代二半乳糖苷,例如所述组合物具备下述所示的通式:

[0107]



[0108] 其中吡喃糖环的结构是D-半乳糖;X选自由O,S,和SO所组成的组中;Y和Z各自独立地选自CONH或1H-1,2,3-三唑环;R¹和R²各自独立地选自由下述基团所组成的组中:至少4个碳原子的烷基、至少4个碳原子的烯基、至少4个碳原子的炔基、氨基甲酰基、被烷基取代的氨基甲酰基、被酰基取代的氨基甲酰基、被炔基取代的氨基甲酰基、被芳基取代的氨基甲酰基、被取代的烷基取代的氨基甲酰基、被取代的芳基取代的氨基甲酰基;被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷基取代的苯基、被至少一个

烷氧基取代的苯基、被至少一个三氟代甲基取代的苯基、被至少一个三氟代甲氧基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个被取代的羰基取代的苯基；萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷基取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、被至少一个取代的羰基取代的萘基；杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个芳基氨基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个取代的羰基取代的杂芳基；以及噻吩基、被至少一个羧基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个烷氧基取代的噻吩基、被至少一个磺基取代的噻吩基、被至少一个芳基氨基取代的噻吩基、被至少一个羟基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个羰基取代的噻吩基、以及被至少一个取代的羰基取代的噻吩基。

[0109] 在药物组合物的多个实施方案中，Y 为 CONH，例如 CONH 基团经由 N 原子连接到吡喃糖环上；Z 是 CONH，例如 CONH 基团经由 N 原子连接到环己烷上；Y 是 1H-1, 2, 3- 三唑环，例如经由 N1 原子连接到吡喃糖环上；R¹被连接到该 1H-1, 2, 3- 三唑环的 C4 原子上；Z 为 1H-1, 2, 3- 三唑环，例如 1H-1, 2, 3- 三唑环经由 N1 原子连接到环己烷上；或者 R²被链接到 1H-1, 2, 3- 三唑环的 C4 原子上。

[0110] 在多个实施方案中，药物组合物的 R¹和 R²各自独立地选自由氨基甲酰基，烷基化的氨基甲酰基，链烯基化氨基甲酰基，芳基化氨基甲酰基，苯基，取代的苯基，卤代苯基，氟代苯基，氯代苯基，溴代苯基，烷基化的苯基，链烯基化的苯基，三氟甲基化苯基，甲氧基苯基，三氟甲氧基化的苯基，萘基，取代的萘基，杂芳基，取代的杂芳基，噻吩基和取代的噻吩基所组成的组中。

[0111] 在各种药物组合物的实施方案中，R¹是烷基化的氨基甲酰基，氟化的苯基，或者噻吩基。

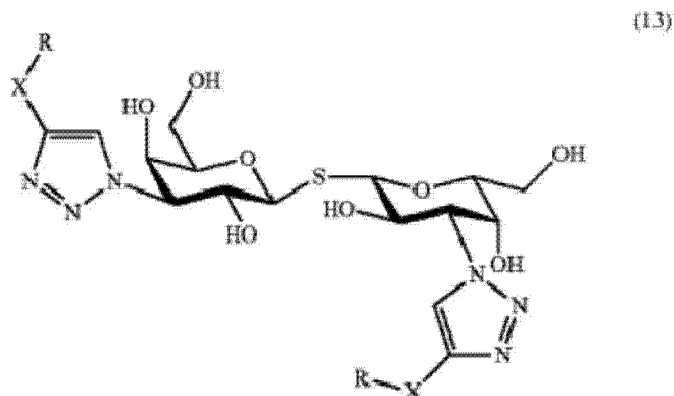
[0112] 在药物组合物的多个实施方案中，R²是烷基化的氨基甲酰基，氟化的苯基，或噻吩基，或者 X 是 O 或 S。

[0113] 在多个实施方案中，所述药物组合物选自由下述组合物所组成的组中：((1r, 2r, s)-2- 羟基 -3-(4-(n-(1- 丙基)- 氨基甲酰基)-1h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基) 环己基)3- 脱氧 -3-(4-(n-(1- 丙基)- 氨基甲酰基)-1h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基))-β-d- 吡喃半乳糖苷；((1r, 2r, s)-2- 羟基 -3-(4-(2- 氟苯基)-h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)- 环己基)3- 脱氧 -3-(4-(2- 氟苯基)-h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)-1- 硫代 -β-d- 吡喃半乳糖苷；((1r, 2r, s)-2- 羟基 -3-(4-(3- 氟苯基)-h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)- 环己基)3- 脱氧 -3-(4-(3- 氟苯基)-h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)-1- 硫代 -β-d- 吡喃半乳糖苷；((1r, 2r, s)-2- 羟基 -3-(4-(4- 氟苯基)-h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)- 环己基)3- 脱氧 -3-(4-(4- 氟苯基)-h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)-1- 硫代 -β-d- 吡喃半乳糖苷；(1r, 2r, s)-2- 羟基 -3-(4-(3- 噻吩基)-1h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)- 环己基)3- 脱氧 -3-(4-(3- 噻吩基)-1h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)-1- 硫代 -β-d- 吡喃半乳糖苷；(1r, 2r, s)-2- 羟基 -3-(4-(n-(1- 丙基)- 氨基甲酰基)-1h-1, 2, 3- 三唑 -1- 基)- 环己基)3- 脱氧 -3-(4-(n-(1- 丙基)- 氨基甲酰基)-1h-1,

2,3-三唑-1-基)-1-硫代-β-d-吡喃半乳糖苷,和(π,2r,s)-2-羟基-3-(4-氯代苯甲酰氨基)-环己基)-3-脱氧-3-(4-氯代苯甲酰氨基)-1-硫代-β-d-吡喃半乳糖苷。

[0114] 在多个实施方案中,药物组合物包括二半乳糖苷,举例来说,所述组合物包括通式(13)

[0115]



[0116] 其中至少一个吡喃糖环的结构的是 D-半乳糖;X 是键;R 为苯基基团,其在任意位置上被选自由甲基,乙基,异丙基,叔丁基,氟,氯,溴和三氟甲基所组成的组中的一个或多个取代基进步取代,或者,R 是噻吩基。

[0117] 在组合物的多个实施方案中,R 是苯基,其在任意位置被选自由氟,氯和溴所组成的组中的一个或多个取代基进行取代。举例来说,R 是苯基,该苯基在任意位置被一个或多个选自氟的取代基进行取代。一般来说,两种吡喃糖环的结构是 D-半乳糖。

[0118] 本发明的一个方面提供了一种用于治疗或预防受试者的眼部血管生成或眼部纤维化病症的方法,所述方法包括将治疗有效量的至少一种组合物给药于受试者,其中所述组合物包含半乳糖凝集素蛋白或其部分的抑制剂。在多个实施方案中,受试者是哺乳动物。

[0119] 在所述方法的多个实施方案中,所述病症选自由下列所述的病症所组成的组中的病症:与瘢痕形成相关的手术,例如青光眼滤过手术;新生血管性青光眼;角膜损伤;结膜炎后的瘢痕形成;翼状胬肉,年龄相关的黄斑变性 (AMD),例如湿性 AMD 或干性 AMD;从干性 AMD 至湿性 AMD 的转化;增殖性糖尿病视网膜病变;糖尿病性黄斑水肿;以及角膜新生血管(沙眼)。

[0120] 在所述方法的多个实施方案中,半乳糖凝集素蛋白选自下述所组成的组中的蛋白:半乳糖凝集素-1 蛋白,半乳糖凝集素-3 蛋白,半乳糖凝集素-7 蛋白和半乳糖凝集素-8 蛋白,并且其中组合物是选自由:药物,聚合物,蛋白质,肽,碳水化合物,低分子量化合物,寡核苷酸,多核苷酸,以及遗传物质如 DNA 或 RNA 所组成的组中的至少一种。

[0121] 在多个实施方案中,所述方法还包括观对疾病或病况的参数或指标中的降低进行观测,例如所述参数或所述指标是一种标记物。

[0122] 在多个实施方案中,所述方法进一步包括,在给药之前,对组合物进行设计,使得所述组合物结合到半乳糖凝集素蛋白上,并且对 VEGF/VEGF 受体-2 途径进行调节,或者所述组合物对半乳糖凝集素蛋白质的表达进行调节。在一个相关的实施方案中,所述抑制剂对 FGF 进行调节并且抑制 FGF 诱导的血管生成。

[0123] 本发明的一个方面提供了一种用于治疗或预防受试者的眼部血管生成或眼部纤

维化的病况的方法,所述方法包括将治疗有效量的至少一种组合物给药于受试者的,其中所述组合物包含半乳糖凝集素蛋白或其部分的抑制剂,并且其中所述的给药包括是受试者于本发明所描述的任意药物组合物进行接触。在多个实施方案中,受试者是哺乳动物。

[0124] 在各种实施方案中,所述方法进一步包括对纤维化的减少量进行观测或测量。

[0125] 给药所述方法的组合物包括使受试者或受试者的组织与下述至少一个剂量进行接触:约 0.01 纳克 (ng) 至约 1ng, 约 1ng 至约 10ng, 约 10ng 至约 20 纳克, 约 20ng 至约 30ng, 约 30ng 至约 40ng, 约 40ng 至约 50ng, 约 50ng 至约 100ng, 100ng 至约 200ng, 200ng 至约 300ng, 约 300ng 至约 400ng, 约 400ng 至约 600ng, 约 600ng 至约 800ng, 约 1 微克 (μ g) 至约 5 μ g, 约 5 μ g 至约 20 μ g, 约 20 μ g 到约 40 μ g, 约 40 μ g 至约 60 μ g, 约 60 μ g 至约 80 μ g, 约 80 μ g 至约 100 μ g, 约 100 μ g 至约 200 μ g, 约 200 μ g 到约 300 μ g, 以及约 300 μ g 至约 400 μ g。

[0126] 在多个实施方案中,所述方法进一步包括,在给药之前,配制所述组合物用于眼部递送,所述眼部递送选自注射剂,滴眼剂,贴剂,软膏,凝胶或喷雾剂所组成的组中。

[0127] 给药所述方法的组合物包括包括例如眼内,玻璃体内,角膜,眼结膜,或 tenon's 注射所述组合物。举例来说,所述注射被给药于受试者的粘膜层,或者给药于受试者的眼睛的外层。

[0128] 本发明的一个方面提供了一种用于治疗或预防受试者或者来自受试者的细胞的眼部血管生成或者眼部纤维化病况的试剂盒,所述试剂盒包括:一种抑制半乳糖凝集素蛋白质或其部分的药物组合物,其中所述组合物结合到半乳糖凝集素蛋白上,并且调节 VEGF/VEGF 受体-2 途径或者所述组合物调节半乳糖凝集素蛋白质的表达;使用说明书;并且,容器。举例说明,所述药物组合物包括 TD139,化合物 32,或类似物或其衍生物。

[0129] 本发明的一个方面提供了一种用于治疗或预防受试者或来自受试者的细胞的眼部血管生成或眼部纤维化病况的试剂盒,所述受试者包括:一种抑制半乳糖凝集素蛋白质或其部分的药物组合物,其中所述组合物结合半乳糖凝集素蛋白上,并且调节 VEGF/VEGF 受体-2 途径或者所述组合物对半乳糖凝集素蛋白进行调节,使得所述药物组合物是本发明所描述的任意组合物;使用说明书;以及容器。举例说明,所述药物组合物包括至少一种半乳糖凝集素抑制剂,例如 TD139,化合物 32,或类似物或其衍生物。

[0130] 在多个实施方案中,试剂盒进一步包括一个用于给药组合物的给药器或装置,比方说,所述的给药器或装置是注射器、针、喷雾器、海绵、凝胶、条带、带子、绷带、盘子,绳子,或纳米结构。

[0131] 该组合物在多个实施方案中,试剂盒的组合物选自下述所列的至少其中之一:药物,聚合物,蛋白质,肽,碳水化合物,低分子量化合物,寡核苷酸,多核苷酸,以及遗传物质如 DNA 或 RNA。在试剂盒的多个实施方案中,所述组合物与药学上合适的载体或稀释剂进行配制。在相关实施方案中,试剂盒还包括一种对照例如 AVASTIN™ (BEVACIZUMAB™), LUCENTIS™ (RANIBIZUMAB™), 或者 EYLEA™ (AFLIBERCEPT™)。在多个实施方案中,所述对照与对照的受试者或样品进行应用,从而结合于 VEGF 上并且抑制眼部血管生成,或者可选的,是与药物组合物结合应用,从而抑制眼部血管生成。在试剂盒的相关实施方案中, the AVASTIN™ 特异性地结合 VEGF, 并且抑制 VEGF 诱导的血管生成。在多个实施方案中,所述对照连接或抑制 FGF 或者 FGF 途径。在试剂盒的多个实施方案中,所述组合物特异性地结合

并抑制半乳糖凝集素蛋白,其中所述半乳糖凝集素蛋白选自由半乳糖凝集素-1蛋白,半乳糖凝集素-3蛋白,半乳糖凝集素-7蛋白和半乳糖凝集素-8蛋白所组成的组中。

[0132] 本发明的一个方面提供了一种产品,其包括:本发明在此所述的药物组合物,所述药物组合物用于抑制半乳糖凝集素蛋白质或其部分并且是有效地抑制或调节眼部血管生成或眼部纤维化;以及一种抗血管生成剂或抗纤维化剂,其中所述产品是有效用于抗血管生成或抗纤维化治疗。在多个实施方案中,所述产品是一种用于同时、单独或顺序给药的组合制剂。举例来说,抗血管生成剂是 AVASTIN™(BEVACIZUMAB™)、LUCENTIS™(RANIBIZUMAB™),以及 EYLEA™(AFLIBERCEPT™) 的至少其中一种。

[0133] 本发明的一个方面提供了一种通过使用本发明在上文中所描述的产品用于抑制或者调节眼部血管生成或眼部纤维化的方法,所述方法包括给药本发明在此所述的至少一种药物组合物,以及另一种抗血管生成剂。举例来说,所述组合物和/或其它抗血管生成剂用于调节在血管发生信号转导途径中的分子的表达或活性。在多个实施方案中,所述组合物和/或其它抗血管生成剂指的是药物,蛋白质,肽,碳水化合物,或者小分子。在多个实施方案中,所述组合物和/或其他血管生成剂包括激酶受体的抑制剂或酪氨酸激酶受体的抑制剂。在多个实施方案中,所述受体是选自血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血小板衍生的生长因子受体(PDGFR)、血管生成素受体(例如,Tie-1以及Tie-2)、成纤维细胞发育能力因子受体(FGFR)、或者血管内皮生长因子受体(EGFR)。在多个实施方案中,其他的血管生成剂指的是 AVASTIN™(BEVACIZUMAB™)、LUCENTIS™(RANIBIZUMAB™)、或者 EYLEA™(AFLIBERCEPT™)。

附图说明

[0134] 附图1显示了人半乳糖凝集素-3蛋白(GenBank登记号为:BAA22164,SEQ ID NO:1)的氨基酸序列和组合物。

[0135] 附图2显示了人半乳糖凝集素-7蛋白(GenBank登记号为:I55469,SEQ ID NO:2)的氨基酸序列和组合物。

[0136] 附图3显示了人半乳糖凝集素-3蛋白(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列与家兔半乳糖凝集素-3蛋白(GenBank登记号为:JC4300)、鸡半乳糖凝集素-3蛋白(GenBank登记号为:AAB02856)、以及半乳糖凝集素-3蛋白(GenBank登记号为:CAA55479)的比对。在附图中的第一个(位于上方的)序列是人半乳糖凝集素-3蛋白(SEQ ID NO:1)的氨基酸1至250,在附图中的第二个序列是仓鼠半乳糖凝集素-3蛋白的氨基酸1至245,在附图中的第三个序列是家兔半乳糖凝集素-3蛋白的氨基酸1至242,以及在附图中的第四个(位于下方的)序列是鸡半乳糖凝集素-3蛋白的氨基酸1至262。

[0137] 附图4显示的是人半乳糖凝集素-7蛋白(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列与鼠(rat)半乳糖凝集素-7蛋白(GenBank登记号为:P97590)以及小鼠(mouse)半乳糖凝集素-7蛋白(GenBank登记号为:054974)的比对。在附图中的第一个(位于上方的)序列是鼠半乳糖凝集素-7蛋白的氨基酸1至136,在附图中的第二个序列是小鼠半乳糖凝集素-7蛋白的氨基酸1至136,以及在附图中的第四个(位于下方的)序列是人半乳糖凝集素-7蛋白(SEQ ID NO:2)的氨基酸1至136。

[0138] 附图5是人半乳糖凝集素-3蛋白(SEQ ID NO:1)的PROSITE扫描结果的总结。

[0139] 附图 6 是人半乳糖凝集素 -7 蛋白 (SEQ ID NO:2) 的 PROSITE 扫描结果的总结。

[0140] 附图 7 显示的是人半乳糖凝集素 -3 蛋白的半乳糖吡喃糖苷结合区域与来源于 PFAM 的隐马尔可夫模型 (HMM) 的共有氨基酸序列 (PF00337) 的比对。位于上方的的序列是共有氨基酸序列 (PF00337, SEQ ID NO:3), 并且位于下方的氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:1 的氨基酸 117-237。

[0141] 附图 8 显示的是人半乳糖凝集素 -7 蛋白的半乳糖吡喃糖苷结合区域与来源于 PFAM 的隐马尔可夫模型 (HMM) 的共有氨基酸序列 (PF00337) 的比对。位于上方的的序列是共有氨基酸序列 (PF00337, SEQ ID NO:3), 并且位于下方的氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 5-135。

[0142] 附图 9A 和 9B 是显示 TD139 半乳糖凝集素 -3 抑制剂显著降低了血管内皮生长因子 (VEGF) 诱导的毛细管形成在人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的柱状图和显微照片。

[0143] 附图 9A 是一种柱状图, 其显示了作为具有 25ng/mL 的 VEGF ;25ng/mL 的 VEGF 以及 10 微摩尔的 TD139, 或者 25ng/mL 的 VEGF 以及 50 微摩尔的 TD139 任意其中之一的治疗 (横坐标) 的函数的在 HUVEC 中的毛细血管生成相对于控制的 HUVEC (纵坐标) 的倍数变化。控制的 HUVEC 指的是既没有被 VEGF 也没有被 TD139 进行治疗。相比与仅用 25ng/mL 的 VEGF 进行治疗的 HUVEC 而言, 用 25ng/mL 的 VEGF 以及 10 微摩尔的 TD139 进行治疗的 HUVEC 以及对于用 25ng/mL 的 VEGF 以及 50 微摩尔的 TD139 进行治疗的 HUVEC, 会观测到减少的毛细血管生成。

[0144] 附图 9B 是一系列被治疗的 HUVEC 的显微照片, 其中 HUVEC 是用 25ng/mL 的 VEGF (左边) ;25ng/mL 的 VEGF 以及 10 微摩尔的 TD139 (中间) ;或者 25ng/mL 的 VEGF 以及 50 微摩尔的 TD139 (右边) 其中之一进行治疗。显微照片显示出与 VEGF 和 TD139 半乳糖凝集素 -3 蛋白抑制剂接触的 HUVEC 相比与 VEGF 接触的 HUVEC 大量的毛细血管生成。与用 25ng/mL 的 VEGF 以及 10 微摩尔的 TD139 的混合物进行治疗的 HUVEC 相比, 用 25ng/mL 的 VEGF 以及 50 微摩尔的 TD139 的混合物 (右边) 进行治疗的 HUVEC, 会观测到降低的毛细血管生成。

[0145] 附图 10A-B 是一种条形图和显微照片, 其显示的是在体外血管生成 / 发芽试验中半乳糖凝集素 -3 抑制剂 TD139 基本上降低在 HUVEC 中生长的 VEGF 诱导的毛细管。

[0146] 附图 10A 是柱状图, 表示源于 HUVEC 的单个球体 (纵坐标) 的中央部分的所有的毛细管状生长作为治疗 (横坐标) 的函数累计长度, 通过任意 :25ng/mL 的 VEGF ;25ng/mL 的 VEGF 和十微摩尔 TD139 半乳糖凝集素 3 蛋白抑制剂 ;或者 25ng/mL 的 VEGF 和 50 微摩尔的 TD139 半乳糖凝集素 -3 蛋白抑制剂。对照 HUVEC 既不使用 VEGF 也不用 TD139 处理。数据显示, 相比与对照细胞, 用 VEGF 处理的 HUVEC 仅导致大量的生长长度。对于用 25ng/mL 的 VEGF 和 10 微摩尔 TD139 或者用 25ng/mL 的 VEGF 和 50 微摩尔的 TD139 处理的 HUVEC, 观察到生长长度降低。针对用 50 微摩尔的 TD139 处理的 HUVEC, 观测到在生长长度中上 VEGF 诱导的增大的最大降低量。

[0147] 附图 10B 的数据是一组用的显微照片显示出下述任一种处理的 HUVEC :显示 HUVEC 的球体与治疗之一 :25ng/mL 的 VEGF (上排右一) ;25ng/mL 的 VEGF 和 10 微摩尔 TD139 的 galectin-3 蛋白抑制剂 (最后一行左图) ;或者 25ng/mL 的 VEGF 和 50 微摩尔 TD139 半乳糖凝集素 3 蛋白抑制剂 (下排右一)。对照 HUVEC 既不使用 VEGF 也不用 TD139 处理 (图

10B 第一行左图)。该显微照片显示了对于与 VEGF 接触的 HUVEC 相比对照细胞的生长和生长长度。在 VEGF 诱导生长在与 VEGF 和 TD139 的混合物接触的 HUVEC 中被减少。减少的毛细管小管形成在用 25ng/mL 的 VEGF 和 50 微摩尔的 TD139 的混合物(右)处理的人内皮细胞中,相比于用 25ng/mL 的 VEGF 和 10 微摩尔的 TD139 的混合物处理的人内皮细胞,相比于仅用 25ng/mL 的 VEGF 处理的细胞。

[0148] 附图 11A,附图 11B 和附图 11C 是图、一组显微照片以及曲线,显示出 TD139 具备体内抗新血管生成的效果。新生血管生成通过用硝酸银烧灼眼睛在小鼠眼角膜中被诱导。

[0149] 附图 11A 是一种在小鼠受试者菌株 C57B/6L 中药物给药的实验方案的图。受试者给药在含有 0.5% 的 DMSO PBS 中的(微升)10 微升 TD139(325 纳克),或 10 微升载体(含有 0.5% DMSO 的 PBS),在第零天,第二天,以及第四天经由结膜后注射。另外,单独加入 10 μ l 载体或 50 μ M 的 TD139 经由滴眼剂,每天给药一次。在第零天,将硝酸银涂布用于灼伤受试者的眼睛。在第五天处死小鼠,并且用抗 CD31 对眼角膜的平片进行染色,从而使血管形象化。附图 11B-C 中显示的数据是如附图 11A 所示的处理的受试者。

[0150] 附图 11B 是一种显微照片,其是代表性的眼睛(上排)以及通过如附图 11A 在灼烧 5 天后的处理 C57B/6L 受试者的眼角膜的平片(底行)的显微照片。显微照片的显示出如附图 11A 所描述的用 TD139(右栏)处理的受试者或者用含有 0.5% 的 DMSO 的 PBS 处理的对照受试者的眼部组织。放大倍数为 X100 倍。

[0151] 附图 11 是一种曲线图,其显示出在图附图 11A 所示的给药 TD139 的受试者的眼睛最后哦功能的血管(纵坐标)面积百分数。对照受试者给药含有 0.5% 的 PBS。对覆盖整个眼角膜的血管密度通过 ImageJ 进行定量。数据通过 Student's t 检验进行分析。血管覆盖对照受试者的眼角膜的大约 40%,并且,在 TD139 处理的受试者最后哦功能眼角膜覆盖 28%。针对给药 TD139 半乳糖凝集素抑制剂的受试者相比与对照受试者而言,烧灼后的眼睛的新生血管应答被显著地抑制。

[0152] 附图 12 图是蛋白质印迹的显微照片,显示半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3 与 VEGFR-2 相互反应。将 HUVEC 溶解物与半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3-琼脂糖珠一起培养,其中存在或者不存在 0.1M 的蔗糖或乳糖。对样品仅含有 HUVEC 溶解物或糖珠。结合材料用 Laemmli 样品缓冲液进行洗脱,加入到 4-20% 的 SDS-PAGE 凝胶,并使其经电泳。凝胶转移至膜印迹上,然后用抗 VEGFR-2 抗体进行探测。VEGFR-2 抗体被观察到结合到 HUVEC 溶解物对照,而不是仅到糖珠对照。该 VEGF-2 抗体表明 HUVEC 连接到两个半乳糖凝集素 1 显示糖珠和半乳糖凝集素-3 显示糖珠。所述 VEGF-2 抗体到半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素 3 显示糖珠的结合是被由外源凝集素的竞争糖类、乳糖被抑制,并且没有被的所存在的非竞争性糖类糖蔗糖抑制。因此,在这里所观察到的 VEGFR-2 和半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3 之间的相互作用是碳水化合物依赖性。

[0153] 附图 13 和附图 13B 是一组柱状图,显示 TD139 干扰 VEGF-A 诱导的内皮细胞生长及迁移。TD139 是以剂量为基础的方式显著抑制 VEGF-A 诱导生长和迁移。HPF 表示高倍视野。数据被绘制为均值 $\pm$ SEM 并且进行单向方差分析。 $*p < 0.05$ VS 对照; $***p < 0.001$ VS 控制; $####p < 0.001$ 对 VEGF-A。

[0154] 附图 13 图是柱状图,显示用(横坐标)VEGF-A(100ng/mL)具有或不具有 TD139(在 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 或 10 μ M 的任一种)处理的 HUVEC 细胞以什么都没有或者仅

用 TD139 处理的对照的生长长度（纵坐标）。对 HUVEC 球状体进行制备并接种到 I 型胶原凝胶。聚合的胶原覆盖的补充了 20 μ M 的 TD139 或 50 μ M 的 TD139 的 100 μ l 的 EBM-2 和 25ng/mL 的 VEGF。对照胶原蛋白样品用 100 μ l 的 EBM-2 和在 EBM-2 中的 25ng/mL 的 VEGF 进行 2 处理。在六小时预处理之后，凝胶剂被处理：仅 VEGF-A (100ng/mL)，VEGF-A (100ng/mL) 和 TD139 (0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 或 10 μ M)，或者仅 TD139 (10 μ M)。在 24 小时培养后，球状体用钙黄绿素 AM 染料染色和用荧光显微镜拍照。在凝胶中 HUVEC 的累积生长用 ImageJ 进行量化。可观测到，是 HUVEC 与 TD139DE 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M 或 10 μ M 的任一种进行接触显著抑制 VEGF-A 诱导的生长。

[0155] 附图 13B 是一种条形图，其中显示了用（横坐标）VEGF-A 或不用 VEGF-A 处理的 HUVEC 细胞的迁移距离（迁移指数，纵坐标）。HUVEC 被血清饥饿培养过夜，用蛋白水解的和溶胶原的酶产品 Accutase™ 进行分离（Millipore 公司），再悬浮于 1% 的 FBS/M199 中，然后加入到迁移测试系统的上腔室。该系统的底腔填充填充有 VEGF-A (100ng/mL)，其存在或不存与在 1% 的 FBS/M199 的在 TD130 的变化浓度 (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 或 1000 μ M) 范围中。经过 3 小时培养后，对迁移到膜较低一侧的 HUVEC 进行计数。观测到，存在处于低水平的 1nM 浓度的 TD139 显著废止 VEGF-A 诱导的趋化性，更不用说在更大的浓度下。TD139 以剂量依赖的方式显著进一步抑制 VEGF-A 诱导迁移。

[0156] 附图 14A 和 14B 是一组柱状图，显示了 TD139 针对 HUVEC 是无毒的。HUVEC 在 1% 的 FBS/M199 中培养过夜，然后用任一 0.1% 的 DMSO，或用 0.1% 的 Triton™X-100 进行处理，或用 5 μ M 的 TD139 处理三小时。HUVEC 被然后与钙黄绿素 AM 染料或 WST-1，四唑鎓盐的任一种进行培养。钙黄绿素 AM 和 WST-1 是一种细胞增殖和细胞活性的指标。用分光光度计检测荧光信号。用 TD139 处理后，HUVEC 活性没有改变，表示通 TD139 的半乳糖凝集素抑制剂 VEGF-A- 诱导的功能的抑制并不是由于细胞活性的改变。阳性对照的 Triton X-100 消除活性，数据以平均值 $\pm$ SEM 绘制并进行单向方差分析。***P<0.001VS 对照。

[0157] 附图 14 图是柱状图，显示的 HUVEC 的钙黄绿素 AM 荧光（纵坐标）在 1% 的 FBS/M199 中培养过夜，然后用任一 0.1% 的 DMSO, 0.1% 的 Triton™X-100, 或 5 μ M 的 TD139 处理三小时（横坐标）。对照细胞不用 DMSO、Triton™X-100、或者 TD139 进行处理。将处理过的细胞与钙黄绿素 AM 培养 30 分钟。数据显示，相对于用 DMSO 处理的细胞和对照细胞对于细胞 TD139 细胞而言的可比较的钙黄绿素 AM 荧光。相比用 TD139 处理的细胞，用 Triton™X-100 处理的细胞显示出降低的荧光。

[0158] 附图 14B 是柱状图，显示了 HUVEC 的 WST-1 荧光（纵坐标）在 1% FBS/M199 中培养过夜，然后用任一 0.1% DMSO、0.1% 的 Triton™X-100, 或 5 μ M 的 TD139（横坐标）进行处理 3 个小时。对照细胞不用 DMSO、Triton™X-100、或者 TD139 进行处理。WST-1 加入到该处理过的细胞中，并培养 2 小时。数据显示，相比于用 DMSO 处理的细胞和对照细胞而言，细胞 TD139 细胞可比较的细胞活性。相比 TD139 处理的细胞，用 Triton™X-100 处理的细胞显示出降低的 WST-1 荧光。

[0159] 附图 15 是 Western 印迹图，显示了在细胞中 VEGFR2 表达不会收到 TD139 处理的影响。HUVEC 1% 的 FBS/M199 中培养过夜，然后用 0.1% 的 DMSO 和 10 μ M 的 TD139 处理 6 个小时。细胞溶解物通过在 4-20% 的 SDS-PAGE 凝胶上的电泳法进行分析。将凝胶转移至印迹膜，并用抗 VEGFR-2 抗体（图 15 上排）或 β 肌动蛋白抗体（图 15 底行）探测。VEGFR2

表达水平被观察到与对照和 TD139 处理的细胞相似。用 TD139 半乳糖凝集素抑制剂进行的内皮细胞的处理不会降低总的 VEGFR2 表达。

[0160] 附图 16 是条形图和显微照片,显示在体内半乳糖凝集素-3 抑制剂化合物 32 抑制角膜血管。8 周龄的 C57BL/6 小鼠的角膜用硝酸银烧灼五秒钟以诱导新血管形成。将 10 μ L 的化合物 32 的半乳糖凝集素-3 抑制剂 (在 0.5% 的二甲亚砷中的 100 μ M, DMSO) 在第零天和第二天,第四天和第六天结膜下注射入角膜中。对照受试者仅结膜下注射 10 μ L 的 DMSO 载体 (在 PBS 中 0.5% 的 DMSO)。

[0161] 注射化合物 32 的受试者每天给药化合物 32 滴眼剂 (5 微升),而对照组每天给药 DMSO 的载体 (5 微升)。在七日后,角膜切除并且在角膜中的血管和淋巴管被可视化和量化。从两个独立的结果组合的数据显示于附图 6 的左部条形图。代表性的图像示于附图 15 右部分。

[0162] 附图 16 的条形图显示了在结膜下给药 10 μ L 的化合物 32 半乳糖凝集素-3 抑制剂 (在 0.5% DMSO 中, 100 μ M; 横坐标) 的受试者的角膜的血管面积的百分比 (BV%; 纵坐标)。对照受试者仅结膜下注射 10 微升 DMSO 载体 (PBS 中 0.5% 的 DMSO; 横坐标)。化合物 32 或 DMSO 载体的滴眼液 (5 微升) 每日给药到每个眼睛。在第 7 天,切除小鼠角膜,并对角膜中的血管面积进行定量。数据显示,相比于仅注射 DMSO 载体的对照受试者而言,注射化合物 32 的受试者的角膜中显著减少血管面积。在属蛇化合物 32 的收拾者的角膜的血管的百分比面积是 29%,和对照收拾者的角膜中的血管的百分比面积是 42%。附图 16 中的数据绘制为均值 $\pm$ SEM,并且使用 Student 't 检验进行分析。

[0163] 附图 16 的显微照片是在受试者典型的角膜的照片,并且结膜下注射 10 μ L 的化合物 32 半乳糖凝集素-3 抑制剂 (0.5% 的 DMSO 中的 100 μ M; 附图 16 右边底部)。对照受试者仅结膜下注射 DMSO 载体 (PBS 中 0.5% DMSO; 附图 16 右边上部)。分别眼睛每天给药化合物 32 或 DMSO 载体的眼药水 (5 微升)。角膜切除并使其可视化。与仅注射 DMSO 载体额对照受试者相比,在注射化合物 32 的受试者的角膜中被观测到血管减少量是。

[0164] 附图 17A-C 是一组照片、图形和 western 印迹的照片,显示 TD139 抑制的角膜纤维化。C57BJ/6 小鼠通过腹腔膜内注射氯胺酮和甲苯噻嗪的混合物进行麻醉。受试者的角膜通过使用丙美卡因 (proparacain) 的滴眼剂被局部麻醉。0.15M 的氢氧化钠的 1.5 μ L 滴剂被用于每个受试者的中央角膜一分钟。每只眼睛立刻在 PBS 中广泛洗涤,及角膜上皮和角膜缘上皮与 ALGEBRUSH™ 光学装置 (Storz Ophthalmic Instruments, St. Louis, MO) 轻轻除去。各角膜上覆盖抗生素软膏。50mM 的 TD139 的 10 μ L 的体积被每天进行结膜下注射共注射 14 天。对照受试者结膜下注射对照载体 PBS。角膜进行可视化的并进行不透明度分析,比功能且纤维化的蛋白标记如下所述进行定量。

[0165] 在手术第 7 天和第 14 天之后,对眼睛的角膜混浊进行评分 (任意单位),使用下述规则: 0 表示角膜是清楚的; 1 表示不透明度小于瞳孔的面积; 2 表示不透明的面积大于瞳孔面积; 3 表示不透明的区域是小于 2/3 的角膜面积大小的; 和 4 表明整个角膜是不透明的。在手术 14 天后地 14 天用氯胺酮和甲苯噻嗪的混合物处死小鼠。小鼠角膜进行解剖并溶解在冰冷的溶解缓冲液,所述缓冲液含有 5mM 的氟化钠, 1mM 的 PMSF, 1mM 的 DTT, 20mM 的 HEPES, 1mM 的 EDTA, 400mM 的 NaCl, 1mM 的 EGTA, 0.1% 的 NP-40, 以及蛋白酶抑制剂混合产物 (Roche)。角膜蛋白 (20 微克) 的等分试样装载到凝胶的每一个泳道,并转移到

硝酸纤维素膜上。在 4℃ 下,用特异于 α 平滑肌肌动蛋白的家兔抗体 (10,000dilution; Abcam Inc., Cambridge, England), 或者特异于 β -肌动蛋白的对照抗体对印迹进行探测过夜。对印迹广泛洗涤,并且与山羊抗兔的 IRDye 800CW 抗体 (1:10,000dilution; LI-Cor Biosciences; Lincoln Nebraska) 进行培养。对膜进行扫描,并使用 Odessey 成像系统 (LI-Cor Biosciences) 进行定量。

[0166] 附图 17 图是一组结膜下注射 10 μ l 的 TD139 (附图 17A 底行) 的受试者和结膜下仅注射载体 (附图 17B 首行) 的对照受试者的有代表性的角膜的照片。据观察,相比与仅注射 PBS 的对照受试者,来自给药 TD139 的受试者的角膜具有角膜混浊降低的量/程度。

[0167] 附图 17B 是柱状图,表示结膜下注射 10 μ l 的 TD139 (在 PBS 中 50mM;横坐标) 的受试者的角膜混浊的量 (任意混浊评分;纵坐标)。对照受试者结膜下注射 10 μ l 对照载体。角膜用氢氧化钠处理,各只眼睛每天给药 TD139 或对照 PBS 共 14 天。在地 14 天,切除小鼠角膜,并对角膜的不透明度进行定量。数据显示,相对于仅注射 PBS 载体的对照受试者,注射 TD139 的受试者的角膜的混浊具有显著降低的程度。注射 TD139 的受试者不透明度小于约瞳孔的部位面积。

[0168] 附图 17C 是一个印迹照片,显示 TD139 处理减少具有创伤的眼睛的纤维化。受试者角膜接触氢氧化钠,并每天结膜下注射一种量 (10 μ l) 的 50mM 的 TD139,连续 14 天。对照受试者仅结膜下注射载体 (PBS)。角膜细胞裂解液 (20ug) 或对照 β -激动蛋白的材料,通过凝胶电泳法和 Western blot 法进行分析。对所述膜使用小鼠抗 SMA (平滑肌肌动蛋白) 抗体 (图 17C 最上一排) 进行探测,或用对照抗体特异的 β 肌动蛋白 (图 17C 最后一行) 进行探测。相对于注射了 PBS 的对照眼睛,在注射了 TD139 的眼睛中的 SMA (平滑肌肌动蛋白) 的表达水平被观测到已经减少了 30%。

[0169] 图 18 是一组蛋白印迹照片,显示 TD139 处理降低视网膜神经胶质增生在眼睛。鼠受试者的角膜接触氢氧化钠。的 50mM 的溶液 10 μ l 的 TD139 的提及被每天结膜下注射到,连续 14 天。对照受试者仅结膜下注射 PBS 对照载体。在手术后地 14 天,受试者通过氯胺酮和甲苯噻嗪被处死。小鼠角膜解剖并溶解在一种冰冷的溶解缓冲液中,所述缓冲液含 5mM 的氟化钠,1mM 的 PMSF,1mM 的 DTT,20mM 的 HEPES,1mM 的 EDTA,400mM 的 NaCl,1mM 的 EGTA,0.1% 的 NP-40 和蛋白酶抑制剂混合产物 (Roche)。从溶解物中去除视网膜蛋白 (30 μ g),或对照 β -肌动蛋白材料的等分试样装载到凝胶上,并转移到硝酸纤维素膜。在 4℃ 下,用特异于神经胶质纤维酸性蛋白的家兔抗小鼠抗体 (GFAP;50,000 缓冲液;Abcam Inc.;附图 18 最上一行) 对印迹探测过夜。GFAP 是一个指示视网膜胶质细胞增生的中间丝的标志。用特异于 β -肌动蛋白的家兔抗体探测对照印迹 (图 18 最后一行)。对探针进行洗涤并且与山羊抗兔的 IRDye 800CW 抗体 (1:10,000 稀释;LI-COR Biosciences) 进行培养。对膜进行扫描,并使用 Odessey 成像系统 (LI-COR Biosciences 公司) 进行定量。据观察,相比与注射 PBS 的对照受试者,注射了 TD139 的受试者的视网膜具有减少的 GFAP 的表达。

具体实施方式

[0170] 来自已经存在的血管系统中的血管生成或者新血管的生成,涉及一系列常规的过程,例如胚胎发育、伤口愈合、以及生殖功能及在许多病理过程中比方说肿瘤生长和转移;眼部疾病和病况比如诸如 Eales 疾病、新生血管性青光眼以及年龄相关性黄斑变性;

局部缺血,糖尿病性微血管病变,以及类风湿性关节炎 (Markowska 等人,2011 年 J of Bio Chem Vol. 286(34):29913 - 29921;以及眼部血管生成:Diseases, Mechanisms, and Therapeutics(Ophthalmology Research)1st edition, Joyce Tombran-Tink and Colin J. Barnstable(editors)Human press, 2006 年 4 月 1 日出版,第 1-428 页,以上参考文献的全部内容引入本文作为参考)。血管生成是通过使来自基底膜和周围血管内皮细胞的内皮细胞的松动被推动,促进新的毛细血管腔的迁移、增殖,以及最终的形成 (Olsson 等人, 2006 Rev. Mol. Cell Biol. 7: :第 359-371 页)。在众多的细胞因子受体及信号因素、VEGF-A 及其与血管内皮生长因子受体 2 (VEGF-R2) 的相互作用之间,已被确定为用于生理和病理性血管生成的主要的阳性信号传导途径的组成部分。VEGF-A 连接到 VEGF-R2 上会促进受体二聚化作用、激酶活化、以及二聚体复合体中多个酪氨酸残基的自身磷酸化。自身磷酸化激活细胞内信号传导途径,例如 p42/44MAP 激酶途径,其涉及内皮细胞增殖、迁移以及存活。

[0171] 半乳糖凝集素 -3,半乳糖吡喃糖苷结合蛋白的半乳糖凝集素家族中的一员,能促进体外内皮细胞迁移和毛细管小管形成,并且提高体内血管生成 (Markowska 等人,2011 年 J of Bio Chem Vol. 286(34):29913 - 29921,将以上参考文献的全部内容引入本文作为参考)。VEGF-A- 介导的血管生成通过加入负显性的半乳糖凝集素 -3,通过泛一半乳糖凝集素抑制剂 (例如,乳糖),以及通过半乳糖凝集素 -3 拆卸在体外被降低。此外,VEGF-A 诱导的血管生成在 Gal3^{-/-} 小鼠体内被显著降低。

[0172] 原发性开角型青光眼 (POAG) 是一种主要的由失明引起的疾病,其特征由于由于房水的不充分流出导致眼内压升高。小梁网 (TM) 使得与水性流出途径对齐会调节该水性流出通畅性 (Diskin 等人,2009 年 Glycobiology 19(1):29 - 37,以上参考文献的全部内容引入本文作为参考)。TM 细胞粘附性,细胞 - 基质相互作用,以及影响 TM 细胞中得 Rho 信号传送得影响因子在水性流出的调节中发挥关键作用。半乳糖凝集素 -8 蛋白通过结合至 $\beta 1$ 整合素以及诱导 Rho 信号传送来调节 TM 细胞粘附性以及细胞骨架结构。

[0173] 半乳糖凝集素 -8 蛋白已经显示出能够调节 TM 细胞得粘附性,并且从而如 TM 细胞粘附至并扩散到半乳糖凝集素 -8 蛋白涂附孔上的扩散,而不是在半乳糖凝集素 -1 涂附的孔上或者是半乳糖凝集素 -3 涂附的孔上。同上所述。TM 细胞粘附至半乳糖凝集素 -8 涂附的孔上可被抑制或者被预防,其是通过给药一种竞争性的糖、 β - 乳糖得到的,并且不会通过给药一种非竞争性的糖例如蔗糖而被抑制。一种三糖,NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc,其特异性地结合于半乳糖凝集素 -8 蛋白的氨基末端糖识别结构域 (CRD),抑制 TM 细胞扩散至半乳糖凝集素 8 蛋白涂附的孔上。与此相反的,NeuAc α 2-6Gal β 1-4GlcNAc,其缺乏对于半乳糖凝集素 -8 的亲合性,对 TM 细胞的扩展没有影响。

[0174] 细胞提取物与半乳糖凝集素 -8 亲和柱的亲合性色谱,以及与结合植物凝集素、山槐 (Maackia amurensis) 和黑接骨木 (Sambucus nigra) 的结合实验,表明 $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 1$ 整合蛋白是 TM 细胞中半乳糖凝集素 -8 的主要受体,并且还表明 TM 细胞 $\beta 1$ 整合蛋白主要地携带了 $\alpha 2-3$ 唾液酸化的聚糖,其对于 Gal8 是高度亲和性的配体而针对 GAL1 或 GAL3 却不是。半乳糖凝集素 -8 蛋白调节 TM 细胞粘附性,并通过与在 $\beta 1$ 整合蛋白上的 $\alpha 2-3$ 唾液酸化的聚糖的相互作用进行扩展。

[0175] 半乳糖凝集素具有碳水化合物识别结构域,CRD(Nilsson 等人,2011 年 6 月 2 日公布的美国专利公开号为 2011/0130553 的专利,将以上参考文献的全部内容引入本文作为

参考)。CRD 是一种大约 130 个氨基酸 (大约 15kDa) 的紧密折叠 β - 夹层, 其具备 β 半乳糖结合位点以及在大约七个氨基酸的序列基序的足够的相似性这两个典型特征, 其中大部分 (大约六个残基) 用于弥补 β - 半乳糖结合位点。进一步, 相邻的位点则需要天然糖类和不同偏好的这些给予半乳糖凝集素与天然糖类不同的精密特异性的紧密结合。

[0176] 人类、鼠 (mouse) 和小鼠 (rat) 的基因组序列的完成揭示了在一个哺乳动物基因组种大约 15 种半乳糖凝集素以及半乳糖凝集素样蛋白质在物种之间具有轻微的变化 (Leffler 等人, 2004 年 Glycoconj. J. 19:433-440 ;Houzelstein 等人, 2004 年 Mol Biol Evol. 21(7):1177-1187)。

[0177] 半乳糖凝集素子单元在单一肽链中含有一个或两个 CRD。第一类中, 单 -CRD 半乳糖凝集素, 在脊椎动物中作为单体或二聚体 (两种类型的) 出现。在溶液和聚合物中, 半乳糖凝集素 -1 是二聚体, 并且半乳糖凝集素 -3 是单体, 而且在与配体相遇的情况下会变为多聚体 (Leffler 等人, 2004 年, Glycoconj. J. 19:433-440 ;Ahmad 等人, 2004 年, J. Biol. Chem. 279:10841-10847)。

[0178] 半乳糖凝集素合成作为在游离核糖体上细胞质蛋白, 并且没有信号肽。半乳糖凝集素蛋白质的 N 末端被乙酰化, 一种细胞内蛋白质的典型的改性, 并且半乳糖凝集素很长一段时间存在与细胞质中 (不典型分泌的蛋白质)。从胞浆半乳糖凝集素靶向至细胞核, 具体细胞液位点, 或者通过一种非典型性 (非 -ER-Golgi) 的途径被分泌 (诱导地或结构性地), 目前尚未知晓, 但是很可能与类似于白介素 -1、IL-1 的输出有关 (Leffler 等人, 2004 年, Glycoconj J. 19:433-440)。

[0179] 半乳糖凝集素在所有这些分区中的作用, 例如半乳糖凝集素 -3 与 RNA 在细胞核的拼接、细胞溶质中的细胞死亡的抑制有关, 并有多种对细胞外基质影响细胞信号和粘附性。半乳糖凝集素 -7 和半乳糖凝集素 -12 通过增强细胞死亡以及调节细胞循环和在某些细胞内的方法从而对细胞溶质产生作用 (Leffler, H., editor, (2004b) Special Issue on Galectins. Glycoconj. J. 19:433-638)。大多数半乳糖凝集素通过交联糖蛋白 (如层粘连蛋白、整合素以及 IgE 受体) 胞外通过交联的糖蛋白, 可能是通过形成超分子有序排列进行胞外作用 (Brewer et al. 2002 Curr. Opin. Struct. Biol. 12:616-623), 并且因此调节细胞粘附性并且诱导细胞内信号。半乳糖凝集素蛋白的氨基酸序列和同源性数据如下述专利所示: 2010 年 1 月 7 日公开的 Panjwani 的美国专利申请号为 2010/0004163A1 的申请, 该专利申请已通过引用全部并入本文中。

[0180] 不受任何特定理论或作用机理的限制, 依据在这里的设想, 半乳糖凝集素蛋白是血管生成的重要调节剂, 以及一种半乳糖凝集素蛋白的表达和 / 或活性的抑制剂, 其通过经由连接至 VEGF 受体上从而调节 VEGF 信号抑制血管生成。

[0181] 半乳糖凝集素抑制剂

[0182] 本发明提供了通过给药一种半乳糖凝集素蛋白的表达和 / 或活性的半乳糖苷抑制剂用于治疗或预防眼部血管生成或眼部纤维化的组合物、方法和试剂盒。在某些实施例中, 一种半乳糖苷抑制剂 TD139 被用于调节半乳糖凝集素 -3 蛋白的活性, 并且从而用于抑制眼部血管生成或眼球纤维化。在本发明中的用于抑制血管生成或纤维化的多种组合物、方法和试剂盒的发现例如可参见 Nilsson 等人, 2004 年 7 月 29 日公开的美国公开号为 2004/0147730A1 (序列编号 10/466,933) 的申请; Nilsson 等人, 2007 年 8 月 7 日公开的美

国公开号为 2007/0185039 (序列编号 11/561,124) 的申请;Leffler 等人,2007 年 8 月 9 日公开的美国公开号为 2007/0185041 (序列编号 11/561,465) 的申请;Nilsson 等人,2004 年 7 月 29 日公开的美国公开号为 2011/0130553 (序列号 12/992,328) 的申请;以及 Leffler 等人,2012 年 6 月 28 日公开的美国专利公布号 2012/0165277 (序列编号 13/266,960) 的申请,上述申请中的每一个已经通过引用的方式全部并入本文中。

[0183] 本发明中所描述的组合物、方法和试剂盒使用一种半乳糖凝集素蛋白的抑制剂用于有选择地抑制和调节血管生成或者纤维化,而没有消极影响体内其它所期望的过程。在实施例中所示的半乳糖凝集素抑制剂用于调节血管生成的途径,包括在用于眼部血管生成的模型系统中通过 VEGF 受体-2 的 VEGF 信号。

[0184] 半乳糖凝集素-3 已经显示可用于延长细胞表面停留,从而提高 TGF- β 受体响应性 (Partridge 等人,2004 年, *Science*, 306:120-124),其调节可替代巨噬细胞分化为 M2 巨噬细胞 (MacKinnon 等,2008 年, *J. Immun.* 147:2657-180:2650-2658)。半乳糖凝集素-3 也已证明起到在纤维化的募集和活化中的中心作用,并且因此在多个器官中形成瘢痕组织,包括肾、肝和肺 (MacKinnon 等人, *AmJRespirCritCareMed* 2012;185(5):537-46, Henderson 等人, *AmJPathol* 2008:172:288, Henderson 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006:103(13):5060)。不受任何特定的理论或作用机制的限制,但这里能预测到的是,半乳糖凝集素-3 是一种 TGF- β 信号和替代巨噬细胞分化的内源增强子、并且半乳糖凝集素-3 抑制剂可用于治疗眼部纤维化和不良的组织重建。

[0185] 免疫组织化学研究显示对于癌症中的半乳糖凝集素的异常表达模式和水平 (Van Den Brule 等人以及 Bidon 等人, in Leffler, H., editor, (2004b) Special Issue on Galectins. *Glycoconj. J.* 19:433-638)。半乳糖凝集素-3 是一种甲状腺癌症的组织化学标记,并且半乳糖凝集素-4 的新表达是一种有前途的早期乳腺癌的标记 (Huflejt, M. E. 和 Leffler, H. 2004 *Glycoconj. J.* 20:247-255; 以及 Leffler 等人, 2004 *Glycoconj. J.* 19:433-440)。半乳糖凝集素-3 在癌症的作用的证据已经在例如小鼠模型的模型系统中获得 (Takenaka et al. in Leffler, H., editor, (2004b) Special Issue on Galectins. *Glycoconj. J.* 19:433-638)。使用配对的肿瘤细胞系 (具有减少的或增加的半乳糖凝集素-3 的表达),诱导在受试者的产生肿瘤和迁移增加的半乳糖凝集素-3,并且半乳糖凝集素-3 的抑制导致较少的肿瘤和转移。

[0186] 不受任何特定的理论或作用机制的限制,在这里预测到的是,半乳糖凝集素蛋白 (例如,半乳糖凝集素-3) 的抑制剂对于眼睛中抑制血管生成或纤维化疾病是有效的。

[0187] 半乳糖凝集素-1 诱导在活化的 T 细胞中的细胞凋亡,并且在自身免疫疾病方面具有显著的免疫抑制效应。半乳糖凝集素在癌症中的过表达可能有助于由宿主提神的肿瘤针对 T-细胞的应答 (Rubinstein 等人,2004 年, *Cancer Cell* 5:241-251)。

[0188] 已经培养了半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3 缺陷型小鼠 (Poirier 2002 *Biochem. Soc. Symp.* 69:95-103),并且这些受试者被观察到是健康的,并且通常是在畜舍情况下繁殖。随后的半乳糖凝集素-3 缺陷型小鼠的研究揭示了在嗜中性粒细胞和巨噬细胞的功能和在骨形成中,以及在神经和肌肉细胞再生/分化为半乳糖凝集素-1 缺陷型小鼠中的细微的表现型 (Leffler 等人,2004 *Glycoconj. J.* 19:433-440;Poirier 2002 *Biochem. Soc. Symp.* 69:95-103;以及 Watt in in Leffler, H., editor, (2004b) Special Issue on

Galectins. Glycoconj. J. 19:433-638)。半乳糖凝集素-7和半乳糖凝集素-9缺陷型小鼠,并且在畜舍情况下是健康的。在表达位点上的差异,特异性和其它性能使得不同的半乳糖凝集素能够功能性地相互替代是不可能。在无效突变小鼠中观察将会表明半乳糖凝集素并不是基本的必要生命支持功能,因为能够在正常畜舍条件中观察到。相反,在畜舍条件下,半乳糖凝集素蛋白可以是一种应力条件下的正常功能和/或要素的优化程序。还未发现在无效突变小鼠中缺乏强有力的效应可以使半乳糖凝集素抑制剂更有利的作为一种潜在的药物。所述凝集素蛋白的抑制很可能具有较少的不期望的副作用。

[0189] 固相结合试验和抑制试验已经确定了具有结合半乳糖凝集素能力的糖类和糖复合物(参见 Leffer 等人,2001 Galectins structure and function-a synopsis(In Mammalian Carbohydrate Recognition Systems Crocker, P., ed., 第 57-83 页;以及 Leffler 等人,2004 Glycoconj. J. 19:433-440)。半乳糖凝集素结合乳糖具有 0.5-1mM 的离解常数 (K_D)。 K_D 是结合常数的倒数,并且较低的 K_D 表示分子之间增加的结合亲和力。D-半乳糖与半乳糖凝集素的结合亲和力通常为比乳糖与半乳糖凝集素低大约 50-倍至 100-倍。N-乙酰基乳糖胺和相关的二糖的结合亲和力是变量,因为这些分子结合半乳糖凝集素的子集以及乳糖(大约 0.5-1mM 的 K_D),以及其他半乳糖凝集素大约 10 倍少于或多于乳糖。小糖类糖配体是有效的结合到半乳糖凝集素-3 蛋白携带血型 A- 确定因素上,其结合到乳糖或 lacNAc 残基上,比功能且观测到结合大约 50 倍大于乳糖的结合亲和性。半乳糖凝集素-1 显示没有对这些糖类优先选择。

[0190] 较大糖类的聚乳糖类型已被提议作为优选的配体用于半乳糖凝集素如半乳糖凝集素-3 蛋白质,但不用于半乳糖凝集素-1(Leffler 等人,1986 J. Biol. Chem. 261:10119-10126)。修饰的植物多糖果胶已被确定为半乳糖凝集素结合-3(Pienta 等人,1995 J Natl Cancer Inst. 1995 Mar 1;87(5):348-53)。

[0191] 已被鉴定为半乳糖凝集素-3 配体的上述天然糖类不适合用作在药用组合物的活性成分,因为它们易于在胃和酶降解酸性水解。此外,天然糖类是亲水性的,并且不容易从胃肠道口服给药后吸收。

[0192] 抑制剂的合成

[0193] 糖类耦合的氨基酸与抗癌活性是在血清天然化合物,并且合成类似物已经完成(Glinsky 等人,1996Cancer Res 56:5319-5324)。糖类与乳糖或半乳糖偶联的氨基酸抑制半乳糖凝集素,具有大约相同的效力与相应的未衍生化的糖。柑桔果胶的化学修饰的形式(Platt 等人,1992 J. Natl. Cancer. Inst. 84:438-442)被描述为半乳糖凝集素-3 的抑制剂,并在体内作为一种抗肿瘤剂(Pienta 等人,1995 J. Natl. Cancer Inst. 94:1854-1862)。

[0194] 天然寡糖、糖簇、糖树状大分子(Glycodendrimers)、以及含糖聚合物是非常极性的且足够大从而可有效地被身体吸收并且在某些情况下在患者内产生免疫应答。进一步的,它们易于在胃中酸性水解,并且易于酶水解。

[0195] 硫代二半乳糖苷酶分子是合成的比功能且水解稳定的,并且是大致一样高效 N-乙酰乳糖胺(Leffler 等人 1986 J. Biol. Chem. 261:10119-10126)。五肽的文库用来得到具有与半乳糖相似 K_D 值的半乳糖凝集素-1 和半乳糖凝集素-3 低亲和力抑制剂和-3 蛋白(Arnusch 等人,2004 Bioorg. Med. Chem. Lett. 14:1437-1440)。此外,肽是不太理想剂用于体内靶向半乳糖凝集素,因为肽是水解敏感,并且通常是极性。N-乙酰基乳糖胺衍

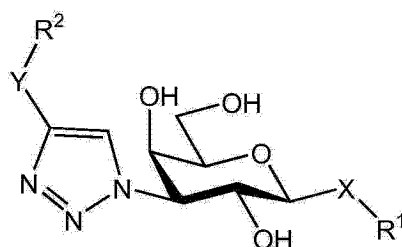
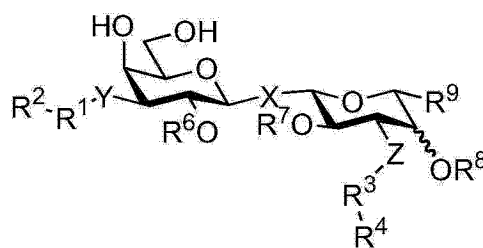
生物携带芳族酰胺或取代的苄醚在 C-3' 是高效的抑制剂半乳糖凝集素 -3, IC_{50} 值低至 $4.8 \mu M$, 其为与天然 N-乙酰基乳糖胺二糖比较的抑制 20 倍的改进 (SörmeP 等人, 2002 *Chembiochem.* 3(2-3):183-189; 和 SörmeP 等人, 2003 *Methods Enzymol.* 363:157-169)。N-乙酰基衍生物是极性较小的整体, 由于芳族酰氨基部分的存在, 因而更适合作为半乳糖凝集素在体内的抑制剂。此外, C-3-C-三唑半乳糖苷已被证明为有效抑制剂, 为相应的 C-3-C-酰胺某些半乳糖凝集素的。因此, 任何适当的结构半乳糖 C3 位取代基可赋予增强半乳糖凝集素的亲和力。

[0196] C3-酰氨基-和 C3-三唑基-衍生的化合物在体内易于水解降解, 因为在半乳糖和 N-乙酰基乳糖胺糖部分存在糖苷键的, 并且虽然它们是有用的半乳糖凝集素 -3 的小分子抑制剂, 甚至需要进一步改善的亲和力和稳定性。因此, 抑制剂基于 3, 3'-二酰氨基或 3, 3'-二三唑-硫代二半乳糖苷得到了发展, (Cumpstey 等人, 2005 *Angew. Chem. Int. Ed.* 44:5110-5112; 5110-5112; Cumpstey 等人, 2008 *Chem. Eur. J.* 14:4233-4245; 和 Dam 等人, 2008 *Biochemistry* 47:8470-8476; 国际申请号为 W02005113569 和国际申请号为 W02005113568、美国专利公开号为 2007/185041、和美国专利号为 7,638,623B2, 其各自是以全文引用的方式并入本文中), 其缺乏 O-糖苷水解和酶稳定的连接物。

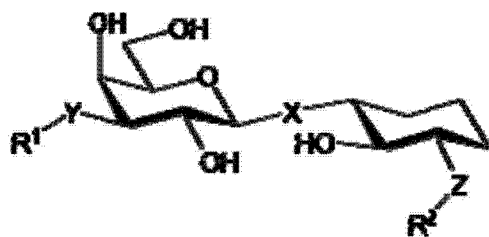
[0197] 然而, 3, 3'-衍生的硫代二半乳糖苷有缺点, 包括一种涉及双反转反应多步合成, 得到 3-N-衍生半乳糖构建模块。此外, 在硫代二半乳糖苷分子中一个半乳糖环的环己烷替代模拟的半乳糖环, 并且提供具有功效的这些半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -3 抑制剂接近那些二氨基-和二三唑基-硫代二半乳糖苷的衍生物 (国际公开 W0 2010/126435, 其已通过引用全部并入本文)。用一个取代的环己烷取代的 D-吡喃半乳糖单元降低极性代谢敏感性, 从而改善药物样性质。

[0198] 已知的化合物具备下述所示的通式:

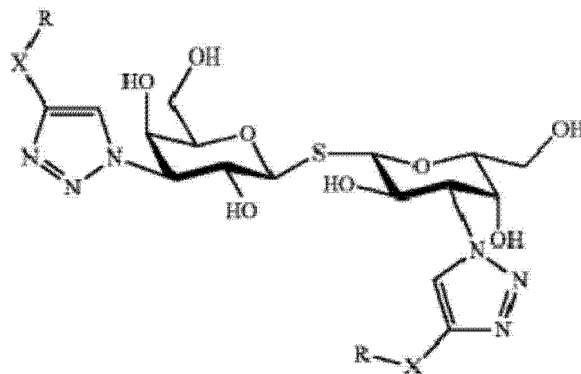
[0199]



[0200]



(13)

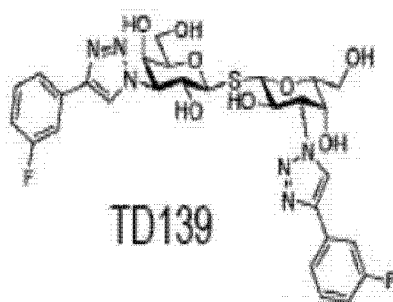


[0201] 其中在第二个结构中的 R¹可以是 d-半乳糖。

[0202] 用于合成制备针对例如半乳糖吡喃糖苷和中间物的半乳糖凝集素抑制剂如下列申请中所示:Nilsson 等人于 2004 年 7 月 29 日公开的美国公开号为 2004/0147730 A1(序列号 10/466,933)的申请;Nilsson 等人于 2007 年 8 月 7 日公开的美国公开号为 2007/0185039(序列号 11/561,124)的申请;Leffler 等人于 2007 年 8 月 9 日公开的美国公开号为 2007/0185041(序列号 11/561,465)的申请;Nilsson 等人于 2004 年 7 月 29 日公开的美国公开号为 2011/0130553(序列号 12/992,328)的申请;以及,Leffler 等人于 2012 年 6 月 28 日公开的美国公开号为 2012/0165277(序列号 13/266,960)的申请,将以上参考文献的全部内容引入本文作为参考。用于合成半乳糖吡喃糖苷的方法包括使 3-叠氮基-半乳糖基硫脲盐衍生物与 3-叠氮基-半乳糖基溴化物进行反应从而产生 3,3'-二-叠氮基-硫代-二-半乳糖吡喃糖苷,其中所述 3-叠氮基-半乳糖基硫脲盐衍生物被激活为在原位的相应的硫醇。

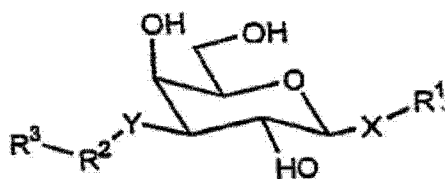
[0203] 在某些实施方案中,用于抑制眼部的血管生成或纤维化的药物组合物包括双-(3-脱氧-3-{3-氟苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基}-β-D-吡喃半乳糖基)硫烷,其具有如下所示的结构:

[0204]



[0205] 其中所述化合物抑制受试者的眼睛内的血管生成。参见 Mackinnon 等人, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2012 年 3 月 1 日, vol. 185 no. 5 537-546, 其以引用方式将其全部内容合并于本文中。在多个实施方案中,所述组合物是 β -半乳糖吡喃糖苷,其是衍生的或者是官能化的,例如,所述组合物具有下述所示的通式:

[0206]



[0207] 并且,该吡喃糖环的结构是 D-半乳糖;X 选自由 O, S, NH, CH₂, 和 NR₄ 所组成的组中,或者是键;Y 选自由 NH, CH₂, 和 NR₄ 所组成的组中,或者是键;R¹ 选自由以下基团所组成的组中的基团:糖;氢,烷基,烯基,芳基,杂芳基以及杂环基;R₂ 选自由 CO, SO₂, SO, PO 和 PO₂ 所组成的组中;R³ 选自由下述基团所组成的组中:至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基或烯基、被羧基和氨基同时取代的至少 4 个碳原子的烷基、以及被卤素取代的至少 4 个碳原子的烷基;苯基、被羧基取代的苯基、被卤素取代的苯基、被烷氧基取代的苯基、被至少一个卤素以及至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素和至少一个烷氧基取代的苯基、被硝基取代的苯基、被磺基取代的苯基、被氨基取代的苯基、被羟基取代的苯基、被羰基取代的苯基、以及被取代的羰基取代的苯基;或者苯基氨基;并且 R⁴ 选自由氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基和杂环基所组成的组中的基团。在多个实施方案中,组合物是不可代谢的,可替代的在多个实施方案中所述组合物是可代谢的。

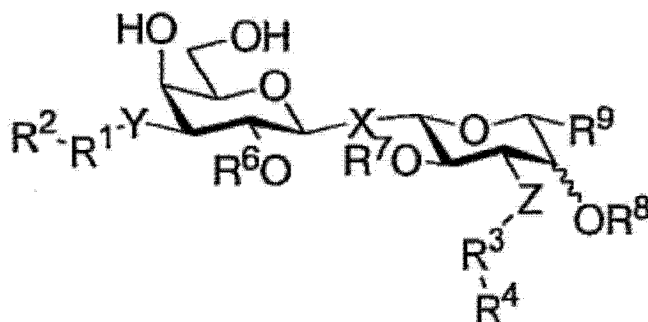
[0208] 在某些实施方案中,糖 (R¹) 选自由葡萄糖,甘露糖,半乳糖, N-乙酰葡萄糖胺, N-乙酰半乳糖胺,岩藻糖,果糖,木糖,唾液酸,葡萄糖醛酸,艾杜糖醛酸,二糖或包括至少两种以上糖类的寡糖,以及它们的衍生物所组成的组中。在某些实施方案中, Y 是 NH, X 是 O, 并且所述卤素选自由 F, Cl, Br 以及 I 所组成的组中。

[0209] 在某些实施方案中,组合物选自由下列组合物所组成的组中:甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[3-羧基丙酰氨基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[3-羧基丙烯酰氨基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯甲酰氨基-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-苯甲酰氨基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-甲氧基-2,3,5,6-四氟苯甲酰胺基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷。

糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2-羧基-3,4,5,6-四氟苯甲酰胺基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-甲磺酰氨基-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[4-硝基苯磺酰胺基]-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷,甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-苯氨基羰基氨基-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-氨基乙酰氨基-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷;和甲基 2-乙酰氨基-2-脱氧-4-O-(3-[2S]-2-氨基-3-羧基-丙酰氨基)-3-脱氧- β -D-吡喃半乳糖基)- β -D-吡喃葡萄糖苷。

[0210] 在多个实施方案中,组合物具备下列通式:

[0211]



[0212] 其中,吡喃糖环其中之一的结构是 β -D-半乳糖;X 选自由 O, S, SO, SO₂, NH, CH₂, 以及 NR⁵所组成的组中;Y 选自由 O, S, NH, CH₂, 以及 NR⁵所组成的组中,或者是键;Z 选自由 O, S, NH, CH₂, 以及 NR⁵所组成的组中,或者是键;R¹以及 R³各自独立地选自由 CO, SO₂, SO, PO₂, PO, 以及 CH₂所组成的组中,或者是键;以及 R²和 R⁴各自独立地选自由下述基团所组成的组中:至少 4 个碳原子的烷基、至少 4 个碳原子的烯基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被羧基取代的至少 4 个碳原子的烯基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烷基、被氨基取代的至少 4 个碳原子的烯基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烷基、同时被氨基和羧基取代的至少 4 个碳原子的烯基、以及被一个或多个卤素取代的烷基;或者,被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个硝基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个氨基取代的苯基、被至少一个烷基氨基取代的苯基、被至少一个烷基氨基取代的苯基、被至少一个二烷基氨基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个取代的羰基取代的苯基;或者,萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个硝基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个氨基取代的萘基、被至少一个烷基氨基取代的萘基、被至少一个芳基氨基取代的萘基、被至少一个二烷基氨基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、以及被至少一个被取代的羰基取代的萘基;或者,杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个硝基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个氨基取代的杂芳基、被至少一个烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个二烷基氨基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及

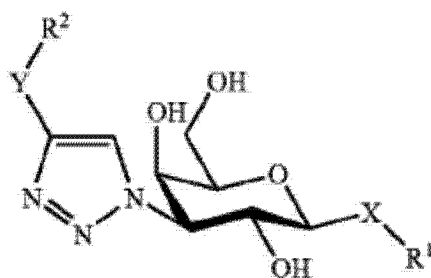
被至少一个取代的羰基取代的杂芳基。 R^6 和 R^8 各自独立地选自由氢,酰基,烷基,苄基,和糖所组成的组中。 R^7 选自由氢,酰基,烷基,和苄基所组成的组中。 R^9 选自由氢,甲基,羟甲基,酰氧甲基基,烷氧基甲基基,和苄氧基甲基基所组成的组中。

[0213] 在某些实施方案中,Y 是 NH,Z 是 NH,X 是 S, R^1 是 CO, R^3 shi CO, R^2 或者 R^4 是芳香族例如芳香环; R^6 , R^7 , 和 R^8 的每一个是氢;或者 R^9 羟甲基。

[0214] 在某些实施方案中,所述是组合物是:双-(3-脱氧-3-苯甲酰氨基- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3-甲氧基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3,5-二甲氧基苯甲酰胺)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(4-硝基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双(3-脱氧-3-(2-萘基酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(4-甲氧基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3-硝基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-[4-(二甲基氨基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(4-甲基苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(4-氯代苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(4-叔-丁基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(4-乙酰苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-[2-(3-羧基)-萘基酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-[3-脱氧-3-(3,4-亚甲二氧基)苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(4-甲氧羰基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3-羧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-羟基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3,5-二苄氧基苯甲酰胺基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3-苄氧基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-甲氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖基)-硫烷;双-(3-脱氧-3-(3-羟基-5-壬氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-[3-苄氧基-5-(4-氟-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;双-(3-脱氧-3-[3-甲氧基-5-(4-甲基-苄氧基)-苯甲酰氨基]- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷;或者双-(3-脱氧-3-(3-烯丙氧基-5-苄氧基-苯甲酰氨基)- β -D-吡喃半乳糖苷)硫烷。

[0215] 在多个实施方案中,组合物包括 3-三唑基-半乳糖吡喃糖苷,举例来说,该组合物具有以下所示的通式:

[0216]



[0217] 其中,吡喃糖环的结构是D-半乳糖;X选自由O, S, NH, CH_2 , 和 NR^4 所组成的组中,或者是键;Y选自由 CH_2 , CO, SO_2 , SO, PO_2 以及PO所组成的组中,苄基,或者是键; R^1 选自由由

下述基团所组成的组中:糖、被取代的糖、D-半乳糖、被取代的D-半乳糖;C 3[1, 2, 3]-三唑-1-基-取代的D-半乳糖;氢、烷基、烯基、芳基、杂芳基、和杂环基及其衍生物;氨基、被取代的氨基、亚氨基,或者被取代的亚氨基;并且, R²选自由下述基团所组成的组中:氢、氨基,被取代的氨基,烷基,被取代烷基,烯基,被取代烯基,炔基,被取代的炔基,烷氧基,被取代的烷氧基,烷基氨基,被取代的烷基氨基,芳基氨基,被取代的芳基氨基,芳基氧基,被取代的芳基氧基,芳基,被取代的芳基,杂芳基,被取代的杂芳基、杂环基,以及被取代的杂环基。

[0218] 在多个实施方案中,糖是选自由葡萄糖,甘露糖,半乳糖组成的组中,N-乙酰葡萄糖胺,N-乙酰基,岩藻糖,果糖,木糖,唾液酸,葡糖醛酸,艾杜糖醛酸,半乳糖醛酸,二糖或包括至少两种上述糖类的寡糖,以及它们的衍生物所组成的组中。

[0219] 在组合物的多个实施方案中,Y是CO,SO₂,或者键;R²是胺基或芳基;R¹是半乳糖,葡萄糖、或N-乙酰氨基葡萄糖;R¹是被取代的半乳糖、葡萄糖或者N-乙酰氨基葡萄糖;R¹是被C 3[1, 2, 3]-三唑-1-基-取代的半乳糖;或者X是O或者S。

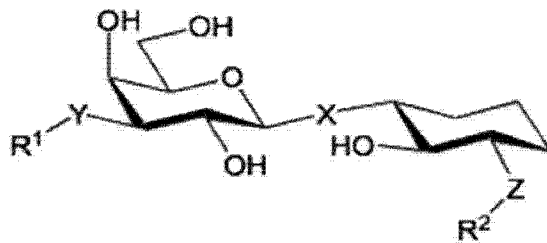
[0220] 在组合物的多个实施方案中,R²是被取代的苯基,其中所述取代基是一个或多个选自由卤素,烷氧基,烷基,硝基,磺基,氨基,羟基或羰基所组成的组中的基团。

[0221] 在多个实施方案中,所述组合物是:甲基3-脱氧-3-(1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-(4-丙基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-(4-甲氧基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-(4-(1-羟基-1-环己基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-(4-苯基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-(4-对-甲苯磺酰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基-(4-基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-(4-苄基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-{{4-[(3-羟基丙-1-基氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]}-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-{{4-[2-(N-吗啉代)-乙氨基羰基]-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基]}-3-脱氧-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-(4-甲基氨基羰基-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-3-脱氧-β-D-吡喃半乳糖基-(1→4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-吡喃葡萄糖苷、双-(3-脱氧-3-(4-(甲基氨基羰基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基)-β-D-半乳糖基)硫烷、甲基3-脱氧-3-{{4-(2-氟苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{{4-(2-甲氧基苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{{4-(3-甲氧基苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{{4-(4-甲氧基苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{{4-(3,5-二甲氧基苯基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{{4-(1-萘基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{{4-(2-萘基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{{4-(2-吡啶基)-1H-[1, 2, 3]-三唑-1-基}}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-{{4-(3-吡啶基)-1H-[1, 2, 3]-三

唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;甲基3-脱氧-3-[4-(4-吡啶基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基}-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷;0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基]-3-吡啶-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基]-3-吡啶-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基]-(2-羟基-5-硝基-苯基)-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基]-(2-羟基-5-硝基-苯基)-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基]-(2,5-二羟基苯基)-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基]-(2,5-二羟基苯基)-碳酸乙醛肟;0-{3-脱氧-3-[4-苯基-[1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基]-1-萘基-碳酸乙醛肟;或0-{3-脱氧-3-[4-(甲基氨基羰基)-1H-[1,2,3]-三唑-1-基]-β-D-吡喃半乳糖基]-1-萘基-碳酸乙醛肟。

[0222] 在多个实施方案中,该组合物具有硫代二半乳糖苷,举例来说,所述组合物具有以下所示的通式:

[0223]



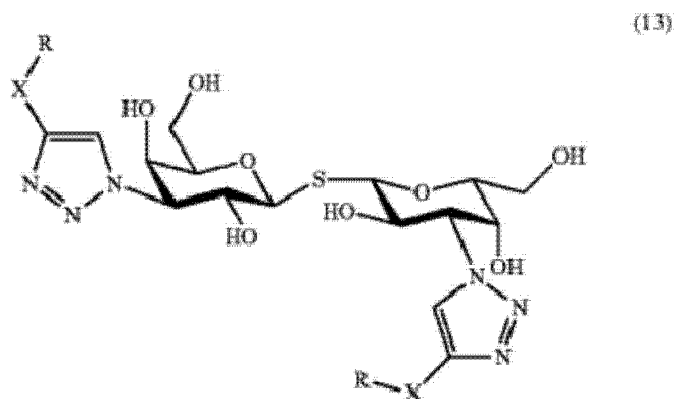
[0224] 其中,吡喃糖环的结构是D-半乳糖;X选自由O、S、以及SO所组成的组中;Y和Z各自独立地选自CONH或者1H-1,2,3-三唑环;R¹和R²选自由下述基团所组成的组中:至少4个碳原子的烷基、至少4个碳原子的烯基、至少4个碳原子的炔基、氨基甲酰基、被烷基取代的氨基甲酰基、被烯基取代的氨基甲酰基、被炔基取代的氨基甲酰基、被芳基取代的氨基甲酰基、被取代的烷基取代的氨基甲酰基、被取代的芳基取代的氨基甲酰基;被至少一个羧基取代的苯基、被至少一个卤素取代的苯基、被至少一个烷基取代的苯基、被至少一个烷氧基取代的苯基、被至少一个三氟甲基取代的苯基、被至少一个三氟甲氧基取代的苯基、被至少一个磺基取代的苯基、被至少一个羟基取代的苯基、被至少一个羰基取代的苯基、以及被至少一个被取代的羰基取代的苯基;萘基、被至少一个羧基取代的萘基、被至少一个卤素取代的萘基、被至少一个烷基取代的萘基、被至少一个烷氧基取代的萘基、被至少一个磺基取代的萘基、被至少一个羟基取代的萘基、被至少一个羰基取代的萘基、以及被至少一个被取代的羰基取代的萘基;杂芳基、被至少一个羧基取代的杂芳基、被至少一个卤素取代的杂芳基、被至少一个烷基取代的杂芳基、被至少一个烷氧基取代的杂芳基、被至少一个磺基取代的杂芳基、被至少一个羟基取代的杂芳基、被至少一个羰基取代的杂芳基、以及被至少一个被取代的羰基取代的杂芳基;以及噻吩基、被至少一个羧基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个烷氧基取代的噻吩基、被至少一个磺基取代的噻吩基、被至少一个芳基氨基取代的噻吩基、被至少一个羟基取代的噻吩基、被至少一个卤素取代的噻吩基、被至少一个羰基取代的噻吩基、以及被至少一个被取代的羰基取代的噻吩基。

[0225] 在多个实施方案中,组合物具有一种通式,其中 Y 为 CONH;所述 CONH 基团经由 N 原子与吡喃糖环相连接;Z 是 CONH 基团,例如所述 CONH 经由 N 原子与环己烷相连接;或者 Y 是 1H-1,2,3-三唑环,举例来说,所述 1H-1,2,3-三唑环经由 N1 原子与吡喃糖环相连接。

[0226] 在组合物的多个实施方案中, R^1 连接到 1H-1,2,3-三唑环的 C4 原子上;Z 是 1H-1,2,3-三唑环,举例来说,所述 1H-1,2,3-三唑环通过 N1 原子连接到缓聚剂晚上;或者 R^2 连接到 1H-1,2,3-三唑环的 C4 原子上。

[0227] 在多个实施方案中,组合物包括一种二半乳糖苷,举例来说,所述组合物具备通式 (13):

[0228]



[0229] 其中,至少一个吡喃糖环的结构是 D-半乳糖;X 是键;R 是苯基,其在任意位置用选自由甲基、乙基、异丙基、叔丁基、氟代、氯代、溴代以及三氟代甲基所组成的组中的一个或多个取代基进行取代,或者 R 是噻吩基。

[0230] 在组合物的多个实施方案中,R 是苯基,其在任意位置用选自由氟代、氯代、以及溴代所组成的组中的取代基进行取代。例如,R 是苯基,其在任意位置被选自氟代的一个或多个取代基进行取代。作为代表地,两个吡喃糖环的结构为 D-半乳糖。

[0231] 正如在这里所使用的术语“烷基”所具备的化学成分是仅由氢和碳原子组成,并且它们是通过单键进行键合。举例来说,烷基具备大约 1 个碳原子至大约 7 个碳原子,并且在多个实施反感中具备大约 1 个碳原子至大约 4 个碳原子。烷基可以是直链或支链,并且还可形成具备 3 个至 7 个碳原子的环,例如 3 个、4 个、5 个、6 个、或 7 个碳原子。因此,烷基涉及任何甲基、乙基、n-丙基、异丙基、n-丁基、sec-丁基、tert-丁基、戊基、异戊基、3-甲基丁基、2,2-二甲基丙基、n-己基、2-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、n-庚基、2-甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和 1-甲基环丙基。

[0232] 正如在这里所使用的术语“烯基”指的是任何含有至少一个双键的官能团或者且取代基。所述烯基具备大约 2 个碳原子至大月 7 个碳原子。所述烯基包括任何乙烯基、烯丙基、丁-1-烯基、丁-2-烯基、2,2-二甲基丙、2,2-二甲基丙-1-烯基、戊-1-烯基、戊-2-烯基、2,3-二甲基丁-1-烯基、己-1-烯基、己-2-烯基、己-3-烯基、丙-1,2-二烯基、4-甲基己-1-烯基、环丙-1-烯基等。

[0233] 正如在这里所使用的术语“烷基化的”指的是使用烷基进行取代的。正如在这里所使用的术语“烯基化的”指的是用被烯基取代。

[0234] 正如在这里所使用的术语“芳基”指的是任何来源于芳香族环的官能团或取代基，具备大约 4 个碳原子至大约 12 个碳原子。所述芳基可以是例如苯基或萘基。所述基团可被有机化学的领域内的任何其它已知的取代基取代。所述基团也可以是被两个或以上的取代基取代。取代基例如是卤素、烷基、链烯基、烷氧基、硝基、磺基、氨基、羟基以及羰基。卤素取代基是溴、氟、碘、以及氯。烷基基团例如包括大约 1 个碳原子到大约 7 个碳原子。烯基包括例如 2 个碳原子至 7 个碳原子，比方说 2 个碳原子或 4 个碳原子。烷氧基包括 1 个碳原子到 7 个碳原子，其可含有不饱和碳原子。可以存在的取代基的组合例如三氟甲基。

[0235] 正如在这里所使用的术语“烷氧基”指的是一种与氧结合的碳原子的官能团或取代基，例如大约 1 个碳原子至大约 7 个碳原子。烷氧基可以是甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、异戊基，3- 甲基丁氧基、2, 2- 二甲基丙氧基、正己氧基、2- 甲基戊基、2, 2- 二甲基 -2, 3- 二甲基丁基、正庚基、2- 丁氧基、2, 2- 二丁氧基、2, 3- 二甲基四戊氧基、环丙氧基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、以及 1- 甲基环丙基氧基。

[0236] 正如在这里所使用的术语“烷基氨基”指的是一种通过共用电子对与氮原子连接的烷基（大约 1 个碳原子至大约 7 个碳原子）官能团或取代基包括烷基（约一个碳原子至约 7 个碳原子）键与孤对氮原子。例如烷基是任何甲基，乙基，正丙基，异丙基，正丁基，仲丁基，叔丁基，戊基，异戊基，3- 甲基丁基，2, 2- 二甲基丙基，正己基，2- 甲基戊基，2, 2- 二甲基丁基，2, 3- 二甲基丁基，正庚基，2- 甲基己基，2, 2- 二甲基戊基，2, 3- 二甲基戊基，环丙基，环丁基，环戊基，环己基，环庚基，和 1- 甲基环丙基。

[0237] 正如在这里所使用的术语“芳基氨基”指的是连接到氮的衍生物上的芳基，从而氮的衍生物包含具有孤对电子的一个碱性氮原子。所述芳基氨基具有例如具有大约 4 个碳原子至大约 7 个碳原子的芳基。所述芳基氨基例如是苯胺，羧苯胺或卤代苯胺，卤素是如上文所定义。

[0238] 正如在这里所使用的术语“芳基氧基”指的是与氧连接的芳基官能团。举例来说，芳基氧基包括大约 4 个碳原子至大约 12 个碳原子，芳基氧基可以是酚，羧苯酚或卤代苯酚，其中卤素如以上文所定义。

[0239] 正如在这里所使用的在芳基基团中的术语“杂芳基”包括大约 4 个碳原子至大约 18 个碳原子，其中所述环中至少一个原子是杂原子，即，不是碳原子。在多个实施方案中，所述杂原子指的是 N, O 或者 S。在某些实施方案中，所述杂芳基指的是吡啶，或吡咯基。

[0240] 上述基团可以被任何其它有机化学领域范围内已知的取代基所取代。所述基团还可被两个或两个以上的取代基取代。取代基的实例包括卤素，烷氧基，硝基，磺基，氨基，羟基以及羰基。卤素取代基指的是溴，氟，碘，以及氯。在多个实施方案中，烷基含有大约 1 个碳原子至大约 7 个碳原子。在多个实施方案中，烯基包括大约 2 个碳原子至大约 7 个碳原子。在多个实施方案中，所述烷氧基包括大约 1 个碳原子至大约 7 个碳原子，优选 1 至 4 个碳原子，并且可含有不饱和碳原子。

[0241] 正如在这里所使用的术语“受试者”在多个实施方案中指的是哺乳动物，包括人类，灵长类，家畜动物（例如，绵羊，猪，牛，马，驴），实验室的试验动物（例如，小鼠，家兔，大鼠和豚鼠），伴侣动物（例如狗和猫）以及高价值的动物园和圈养的野生动物（如狐狸，袋鼠，大象和鹿）。

[0242] 核苷酸酶抑制剂

[0243] 本发明在此所记载的实施方案提供了一种用于抑制或预防眼部血管生成或眼部纤维化,或眼部血管生成相关的病症或眼部纤维化相关的病症的方法,所述方法包括将细胞或组织与一种药物组合物进行接触,所述药物组合物具有一种一种半乳糖凝集素蛋白或一种调节表达源的抑制剂或调节剂。举例来说,所述抑制剂是在原位或者在活体外重组产生的蛋白质。所述术语“重组”涉及通过操纵转基因生物生产的蛋白质,例如在培养中的微生物或真核细胞。

[0244] 在本发明的一个实施方案中,组合物、方法和试剂盒包括一种调节剂源,其是一种抑制剂例如编码抑制性蛋白的多核苷酸序列,例如多核苷酸序列被设计到重组 DNA 分子中用来引导抑制性蛋白或其部分在合适的宿主细胞中的表达。为了表达一种生物活性的抑制剂,编码所述抑制剂或者功能等同物的核苷酸序列,被插入到适当的表达载体中,即,一种包含调节编码插入的编码序列的转录和转译的因子所必需的核苷酸的载体,其可操作地连接到编码抑制性蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列上。

[0245] 本领域普通技术人员所公知的用于构建含有一个核苷酸序列的表达载体,其中所述的核苷酸序列编码例如一种可操作连接到合适的转录和转译控制因子上的蛋白质或肽。这些方法包括体外重组 DNA 技术,合成技术和体内重组或遗传重组技术。这些技术在 Sambrook 等人,1989 年, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY 中有详细描述。

[0246] 多种市场上可买到的表达载体 / 宿主系统可用于包含并表达编码蛋白质或肽的序列。这些物质包括但不限于微生物,如重组噬菌体转化的细菌、质粒或粘粒 DNA 表达载体;酵母表达载体转化的酵母;与病毒表达载体接触的昆虫细胞系统(例如,杆状病毒);病毒表达载体转染的植物细胞系统(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV 启动;烟草花叶病毒, TMV) 或者细菌表达载体转化的植物细胞系统(例如,钛, pBR322, 或者 pET25b 质粒);或者动物细胞系统。参见 Ausubel 等人,1989 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, New York, NY。

[0247] 病毒载体包括,但不限于,腺病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺相关病毒(AAV) 载体、以及辅助依赖性的腺病毒载体。举例来说,所述载体提供了编码一种结合与本发明在此所述的调节肌肉卫星细胞的反-分化的转录上的转录因子或制剂的核苷酸序列。装载由载体的腺病毒可购自美国典型培养物保藏中心(Manassas, VA)。用于构建腺病毒载体并且使用腺病毒载体的方法记载于 Klein 等人,2007 年的 *Ophthalmology*, 114:253-262 以及 Van Leeuwen 等人,2003 年的 *Eur. J. Epidemiol.*, 18:845-854。

[0248] 腺病毒载体已经被用到真核细胞基因表达(Levrero 等人, *Gene*, 101: 195-202, 1991 年)以及疫苗开发中(Graham 等人,1991 年, *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols* 7, (Murray, Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, 109-128)。进一步,重组腺病毒载体可用于基因疗法(Wu 等人,2007 年 6 月 26 日公告的美国专利号为 US 7, 235, 391 的专利)。

[0249] 由例如穿梭载体于前病毒之间的同源重组产生重组腺病毒载体(Wu 等人, 美国专利号为 US 7, 235, 391 的专利)。在这些重组腺病毒载体中使用的辅助细胞系可来自于人细胞,例如,293 人胚肾细胞、肌肉细胞、造血细胞或其它人胚胎间充质细胞或上皮细胞。可

替代的,所述辅助细胞可来自其它容许人腺病毒的哺乳动物物种的细胞,例如,Vero 细胞或其它猴胚胎间充质干细胞或上皮细胞。这些使用辅助细胞系的复制缺陷型腺病毒载体在 Graham 等人,1997 J. Gen. Virol., 36:59-72, 1977 中被记载。

[0250] 装载由载体的慢病毒载体可购自 Invitrogen 公司 (Carlsbad CA)。一种用于慢病毒载体制备的以 HIV 为基的包装系统的制备应用了 Naldini 等人, Science 272:263-267, 1996 ;Zufferey 等人, Nature Biotechnol., 15:871-875, 1997 ;以及 Dull 等人, J. Virol. 72:8463-8471, 1998。

[0251] 根据第三代慢病毒 SIN 载体骨架 (Dull 等人, J. Virol. 72:8463-8471, 1998), 多个载体构建物可使用一种好哦功能系统被装载。例如该载体构建物 pRRLsinCMVGFPpre, 包含一个 5' LTR, 其中所述的 HIV 启动子序列已被替换, 用 Rous 肉瘤病毒 (RSV), 含有一个缺失的 U3 启动子区的自失活 3' 端 LTR, HIV 包装信号, 连接于由 CMV 启动子驱动的 Aequora 水母绿色荧光蛋白 (GFP) 的标志物基因盒的 RRE 序列, 以及并且土拨鼠肝炎病毒的 PRE 因子, 其似乎加强出核。通过直接观察的紫外荧光显微镜或流式细胞仪 GFP 标记基因允许转染或转导效率的定量 (Kafri 等人, Nature Genet., 17:314-317, 1997 以及 Sakoda 等人, J. Mol. Cell. Cardiol., 31:2037-2047, 1999)。

[0252] 逆转录病毒核酸的操作用于构建含有一种编码蛋白基因的逆转录病毒载体, 并且用于包装到细胞中的方法是使用本领域已知的技术完成。参见 Ausubel 等人., 1992, Volume 1, Section III (units 9.10.1-9.14.3); Sambrook 等人, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. ; Miller 等人, Biotechniques. 7:981-990, 1989 ;Eglitis 等人, Biotechniques. 6:608-614, 1988 ;美国专利号为 4,650,764, 美国专利号为 4,861,719, 美国专利号为 4,980,289, 美国专利号为 5,122,767, 以及美国专利号为 5,124,263 的专利;以及 PCT 专利公开号为 WO 85/05629, PCT 专利公开号为 WO 89/07150, PCT 专利公开号为 WO 90/02797, PCT 专利公开号为 WO 90/02806, PCT 专利公开号为 WO 90/13641, PCT 专利公开号为 WO 92/05266, PCT 专利公开号为 WO 92/07943, PCT 专利公开号为 WO 92/14829, 以及 PCT 专利公开号为 WO 93/14188 的专利。

[0253] 使用兼嗜性包装系统, 将反转录病毒载体被构建并且装入非传染性转导病毒颗粒 (病毒粒体) 中。这种包装系统的实例可见于, 例如, Miller 等人, Miller 等人, Mol. Cell Biol. 6:2895-2902, 1986 ;Markowitz 等人, J. Virol. 62:1120-1124, 1988 ;Cosset 等人, J. Virol. 64:1070-1078, 1990 ;美国专利号为 4,650,764, 美国专利号为 4,861,719, 美国专利号为 4,980,289, 美国专利号为 5,122,767, 以及美国专利号为 5,124,263, 以及 PCT 专利公开号为 WO 85/05629, PCT 专利公开号为 WO 89/07150, PCT 专利公开号为 WO 90/02797, PCT 专利公开号为 WO 90/02806, PCT 专利公开号为 WO 90/13641, PCT 专利公开号为 WO 92/05266, PCT 专利公开号为 WO 92/07943, PCT 专利公开号为 WO 92/14829, 以及 PCT 专利公开号为 WO 93/14188。

[0254] “生产者细胞”的产生是通过将逆转录病毒载体导入包装细胞中。这样的逆转录病毒载体的实例可见于, 例如, Korman 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:2150-2154, 1987 ;Morgenstern, 等人, Nucleic Acids Res. 18:3587-3596, 1990 ;美国专利号为 4,405,712,

美国专利号为 4,980,289, 以及, 美国专利号为 5,112,767 ; 以及 PCT 专利公开号为 WO 85/05629, PCT 专利公开号为 WO 90/02797 以及 PCT 专利公开号为 WO 92/07943。

[0255] 疱疹病毒包装载体购自 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA)。示例性的疱疹病毒为 α -疱疹病毒, 如水痘-带状疱疹病毒或假狂犬病病毒; 单纯疱疹病毒例如 HSV-1 或 HSV-2 ; 或疱疹病毒如 EB 病毒。一种制备空心疱疹病毒颗粒的方法可以用所需的核苷酸片段包装, 其记载于 Fraefel 等人的, 199 年 12 月 7 日公告的美国专利号为 5,998,208 的专利中。

[0256] 该疱疹病毒 DNA 载体可以使用本领域技术人员熟悉的技术构建。例如, 编码疱疹病毒的整个基因组 DNA 片段被划分给多个能够携带大 DNA 片段的载体, 例如粘粒 (Evans 等人, Gene 79, 9-20, 1989)、酵母人工染色体 (YACS) (Sambrook, J. 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989) 或大肠杆菌大肠杆菌 (E. coli) F 因子的质粒 (O'Conner, 等人, Science 244:1307-1313, 1989)。

[0257] 例如, 对已经分离了包含重叠粘粒克隆的, 它表示整个基因组的各种疱疹病毒, 包括埃-巴二氏病毒、水痘-带状疱疹病毒、假狂犬病毒和 HSV-1。参见 M. vanZijl 等人, J. Virol. 62, 2191, 1988 ; Cohen 等人., Proc. Nat'l Acad. Sci. U. S. A. 90, 7376, 1993 ; Tomkinson 等人, J. Virol. 67, 7298, 1993 ; and Cunningham 等人, Virology 197, 116, 1993。

[0258] AAV 是一种依赖性细小病毒, 因为它取决于与另一种病毒 (或是腺病毒或疱疹病毒家族某成员) 的协同感染, 在共培养细胞中经历产毒性感染 (Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97129, 1992)。例如, 重组 AAV (rAAV) 是通过共转染含有感兴趣的基因的质粒进行制备, 其中例如, Nkx3.2 基因。细胞也与腺病毒或携带 AAV 辅助功能所需腺病毒基因的质粒接触或转染。以此种方式制备重组 AAV 病毒存储包括用必须物理上分隔开的腺病毒重组 AAV 颗粒 (例如氯化铯密度离心)。

[0259] 腺伴随病毒 (AAV) 包装载体可通过商业途径得自基因检测 (Auckland, New Zealand)。已经证实 AAV 具有高频率的整合和感染非分裂细胞, 使其可将基因输送到哺乳动物细胞的组织培养中 (Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97129, 1992)。AAV 具有广泛范围的感染性 (Tratschin 等人, Mol. Cell. Biol., 4:20722081, 1984 ; Laughlin 等人, J. Virol., 60(2):515524, 1986 ; Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 8(10):39883996, 1988 ; McLaughlin et al., J. Virol., 62(6):19631973, 1988)。

[0260] 构建和使用 AAV 载体的方法已有描述, 例如在美国专利号为 5,139,941 和在美国专利号为 4,797,368 的专利中。AAV 基因递送中的用途的进一步描述, 参见 LaofFace 等人, Virology, 162(2):483486, 1988 ; Zhou 等人, Exp. Hematol, 21:928933, 1993 ; Flotte 等人, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7(3):349356, 1992 ; 以及 Walsh 等人, J. Clin. Invest, 94:14401448, 1994 的文献。

[0261] 重组 AAV 载体已被用于体外和体内转导标记基因 (Kaplitt 等人, Nat Genet., 8(2):14854, 1994 ; Lebkowski 等人, Mol. Cell. Biol., 8(10):39883996, 1988 ; Samulski 等人, EMBO J., 10:39413950, 1991 ; Shelling 和 Smith, Gene Therapy, 1:165169, 1994 ; Yoder 等人, Blood, 82(Supp.):1:347A, 1994 ; Zhou et al., Exp. Hematol, 21:928933, 1993 ; Tratschin 等人, Mol. Cell. Biol., 5:32583260, 1985 ; McLaughlin 等人, J. Virol., 62(6):19631973, 1988) 以及涉及人类疾病的基因转

导 (Flotte 等 人, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 7(3):349356, 1992 ;Ohi 等 人, Gene, 89(2):279282, 1990 ;Walsh 等人, J. Clin. Invest, 94:14401448, 1994 ;以及 Wei 等人, Gene Therapy, 1:261268, 1994)。

[0262] 抗体抑制剂

[0263] 在多个实施方案中,本发明提供了一种调节血管生成(例如,眼部血管生成)的半乳糖凝集素的抑制剂。半乳糖凝集素抑制剂的实施方案,其是一中蛋白质,包括一种连接到半乳糖凝集素蛋白或或者影响半乳糖凝集素蛋白的表达或活性的分子上的抗体。正如这里所使用的“抗体”包括全部抗体和抗体结合片段(即,“抗原-结合蛋白”)或者它们的单链。一种天然存在的“抗体”指的是一种糖蛋白,包括通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链。

[0264] 在多个实施方案中,一种抗体,其“特异性结合到半乳糖凝集素”涉及一种连接到具有半乳糖凝集素蛋白上的抗体,具备慢煮鱼抑制或调节血管生成的 K_D , 例如所述 K_D 是 $5 \times 10^{-9} M$ 或更小, $2 \times 10^{-9} M$ 或更小, or $1 \times 10^{-10} M$ 或更小。例如,所述抗体是一种单克隆抗体或一种多克隆抗体。正如在这里所使用的,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”涉及一种单个分子组合物的抗体分子的制备。一种单克隆抗体组合物表现对于转录因子或转录因子的特异性表位的一种单一结合的特异性和亲和性。所述抗体包括例如 IgM, IgE, IgG 比方说 IgG1 或者 IgG4。

[0265] 术语“多克隆抗体”或者“单克隆抗体组合物”涉及一大组的抗体,其中的每一个为特异于在免疫原重发现的多个不同表位的其中一个,并且其中的每一个的特点在于对于所述表位的特异性亲和性。表位是最小的抗原决定簇,其对于蛋白质,包括 6 个到 8 个残基长度的肽 (Berzofsky, J. 和 I. Berkower, (1993) in Paul, W., Ed., Fundamental Immunology, Raven Press, N. Y., p. 246)。亲和性范围从低例如 $10^{-6} M$ 到高例如 $10^{-11} M$ 。从哺乳动物血清中收集的多克隆抗体片段铜鼓本领域公知的技术进行分离,例如通过色谱法分离与亲和基质的选择性结合的免疫球蛋白分子如蛋白 A, 从而得到 IgG 片段。为了增加抗体的纯度和特异性,所述特异性抗体可进一步通过用固相固定免疫原进行免疫亲和层析从而进一步纯化。所述抗体于固相固定免疫原接触一段时间,以满足免疫原从而于抗体分子进行免疫反应,从而产生固相免疫复合物。结合的抗体用标准技术从固相上洗脱,例如通过降低 pH 或增加离子强度的缓冲剂的应用,对洗脱的成分进行分析,并且收集含有特异性抗体的那些。

[0266] 还可以在本发明所述的方法中应用的是一种重组抗体。正如在这里所使用的,术语“重组人抗体”包括通过重组凡事制备、表达、产生或分离的抗体。在本发明所述的方法中所使用的用于表达重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢 (CHO 细胞), 在 Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980, 与 DH FR 选择标记一起使用的, 例如在 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621, NS0 骨髓瘤细胞, COS 细胞以及 SP2 细胞。更为具体的,为了与 NS0 骨髓瘤细胞使用,其它的表达系统是 GS 基因表达系统,如 WO 87/04462, WO 89/01036 和 EP 338,841 中所述。为了产生是抗体,编码抗体基因的表达载体被诱导进入到哺乳动物宿主细胞中,并且所述宿主细胞被培养足够长的一段时间,从而允许抗体在宿主细胞中的表达,或者抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中。使用标准蛋白纯化方法从培养基中回收抗体。

[0267] 用于评估抗体对多种种类的靶体的结合能力的标准测定法是本领域所公知的,包括例如 ELISA、蛋白质印迹和放射免疫分析 (RIA)。所述抗体的结合动力学 (例如结合亲和力) 也可以通过本领域已知的标准测定评估,例如通过 Biacore 分析。

[0268] 对于抗体生成的一般方法,包括当选择用于抗血清生产的动物是需要烤炉的标准,在 Harlow et al. (Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 93-117, 1988) 中进行了描述。例如,适合的尺寸的动物,例如动物如山羊、狗、绵羊、小鼠或骆驼,通过给药一种剂量的免疫原进行免疫,其中含有来自人转录因子表位的完整蛋白或其部分,有效用于产生免疫应答。一种示例性的方案包括皮下注射 100 微克至 100 毫微克的抗原,其是依据动物的尺寸,随后在 3 个星期后腹膜内注射 100 微克至 100 毫微克的免疫原与佐剂,其是根据动物的尺寸,例如 Freund's 氏完全佐剂。给药额外的腹膜的每两个星期一次结合佐剂的注射,例如 Freund's 氏非完全佐剂,直至完成抗体在动物血液中的合适的滴度。示例性的滴度包括至少大约 1:5000 的滴度、或者 1:100,000 或者更多的滴度,即,最大稀释度指示具有可检测抗体活性。对抗体进行提纯,例如,通过使用理解到含有人 MAC 的柱进行的亲和性纯化。

[0269] 通过人类淋巴细胞的体外免疫产生的单克隆抗体。用于人淋巴细胞体外免疫的技术根据在 Inai 等人, Histochemistry, 99(5):335-362, May 1993; Mulder 等人, Hum. Immunol., 36(3):186-192, 1993; Harada 等人, J. Oral Pathol. Med., 22(4):145-152, 1993; Stauber 等人, J. Immunol. Methods, 161(2):157-168, 1993; 以及 Venkateswaran 等人, Hybridoma, 11(6):729-739, 1992 的文献中的描述。这些技术能够被用于制备抗原-反应性单克隆抗体,包括抗原-特异性 IgG 以及 IgM 单克隆抗体。具有亲和性以及特异于转录因子的任意的抗体或其片段氏在本发明所提供的分子组合物的范围之内。

[0270] 正如在这里所使用的术语“抗体”包括全部的抗体或任何抗原结合片段 (即,“抗原-结合部分”) 或其单链,例如 Fv 片段。一种天然存在的“抗体”指的是一种糖蛋白,包括通过二硫键相互连接的至少两个重 (H) 链和两个轻 (L) 链。每个重链由一个重链可变区 (本文中缩写为 V_H) 以及一个重链恒定区。所述重链恒定区是有三个区域构成:CH1, CH2 以及 CH3。每个轻链氏由一个轻链可变区 (本文中缩写为 V_L) 和一个轻链恒定区构成。所述轻链恒定区氏由一个区域构成: C_L 。所述 V_H 和 V_L 区能够被进一步细分为高变区,称为互补决定区 (CDR), 其间散布有更为保守的区域,称为框架区 (FR)。每个 V_H 和 V_L 是由三个 CDRs 和四个 FRs 构成,从氨基末端到羧基末端以下述顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。所述重链和轻链的可变区包括一种连接区域,其与抗原相互作用。所述抗体的恒定区可接到免疫球蛋白连接到宿主组织或因子上,包括免疫系统的多个细胞 (例如,效应器细胞) 以及典型不提系统的第一成分 (C1q)。

[0271] 正如在这里所使用的,术语“抗原-结合蛋白” (或者简单称为“抗原部分”) 涉及抗体的全长或一个或多个片段,其保留了特异性结合到靶体 (例如、半乳糖凝集素、或半乳糖凝集素的片段,或连接到半乳糖凝集素抑制剂,或者连接到组织中的半乳糖凝集素配体) 上的能力。已经显示出,抗体的抗原结合功能能够通过全长抗体的片段进行。结合片段的实施例涵盖在术语抗体的“抗原-结合部分”的范围内,包括一种 Fab 片段、由 V_L , V_H , C_L 和 CH1 区构成的的单价片段; $F(ab)_2$ 片段,一种包括在铰链区的二硫键结合的两个 Fab 片段的二价片段;Fv 片段,其由抗体单侧的 V_L 和 V_H 区又称为 dAb 片段 (Ward 等人, 1989 Nature

341:544), 其由 V_H 区域构成; 以及分离的互补决定区。

[0272] 进一步, 虽然 Fv 编码的两个区域, VL 和 VH, 是由两个单独的基因编码。但是它们能够被结合, 使用重组的方法, 通过一种使它们能够被只为单个蛋白链的合成连接体, 其中 VL 和 VH 区域配对用来形成单价分子 (称为单链 Fv(scFv); 参见例如 Bird R.E 等人, 1988 Science 242:423; 以及 Huston, J. S 等人, 1988 Proc Natl Acad Sci USA 85:5879)。所述单链抗体还可意欲涵盖在抗体的术语“抗原-结合部分”的范围内。这些抗体结合片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得, 并且所述片段根据用途进行筛选以与完整抗体相同的方法。

[0273] 正如在这里所使用的, 术语“分离的抗体”指的是一种抗体, 其是基本上不含有具备不同抗原特异性 (例如, 一种分离的抗体, 其特异性地结合一种靶体例如半乳糖凝集素或半乳糖凝集素的片段、或者结合于半乳糖凝集素抑制剂、或者结合于组织半乳糖凝集素的配体, 所述分离的抗体基本上不含有特异性结合到除了这一靶体之外的抗原上) 的其它抗体。一种分离的抗体, 其特异性结合 DEC205 可以, 但是, 具有与其他抗原的交叉反应性, 例如来自其他物种的相应的目的靶体。此外, 分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和 / 或化学物质。

[0274] 正如在这里所使用的术语“单克隆抗体”或者“单克隆抗体组合物”涉及单分子组合物的抗癌分子的制备。单克隆抗体组合物显示出对特定表位的一种单一结合特异性和亲和性。

[0275] 正如在这里所使用的, 术语“人抗体”是指包括具有可变区域的抗体, 其中框架以及 CDR 区域二者均来自于人源序列。进一步的, 如果抗体包含恒定区, 恒定区也来源于所述人的序列, 例如人类种系序列, 或者人类种系序列的突变形式。本发明的人抗体可包括没有通过人类序列编码的氨基酸残基 (例如, 通过体外随机或者位点特异性或者通过体内细胞突变引入的突变)。但是, 正如在这里所使用的, 术语“人抗体”并不是指包括这样的抗体, 其中来源于其它哺乳动物种类 (例如小鼠) 的种系的 CDR 序列已经被一直到人类框架序列上。

[0276] 术语“人单克隆抗体”涉及这样的显示单一结合特异性的抗体, 其具有可变区域, 其中框架区和 CDR 区均来自人序列的可变区域。在一个实施方案中, 人单克隆抗体是通过包含获自转基因非人类动物 (例如, 转基因小鼠) 的 B 细胞的杂交细胞进行生产, 其具有包含人类重链转基因和融合至永生化细胞的轻链转基因的基因组。

[0277] 正如在这里所使用的术语“重组人源抗体”, 包括所有的通过重组方式被制备、表达、构建、分离的人抗体, 例如从动物 (例如小鼠) 分离得到的抗体, 其是转基因或转基因改造的针对人免疫球蛋白基因或者由此制备的杂交瘤, 从宿主细胞分离的抗体转化为表达人类抗体, 例如转染瘤, 通过重组、结合的人类抗体库分离的抗体, 以及包含人类免疫球蛋白基因的所有或部分剪接的通过其他方式制备、表达、构建或分离的抗体按顺序拍到其他的 DNA 序列上。这种重组人源抗体具有其中来源于人类免疫球蛋白基因的框架区和 CDR 区均的可变区域。然而, 在某些实施方案中, 这样的重组人抗体可能会受到体外诱变 (或者, 当是用动物转基因的人 Ig 序列时, 体内体细胞的突变) 并且因此所述的重组抗体的 V_H 和 V_L 区域的氨基酸序列是这样的序列, 其尽管来源于并涉及人种系 V_H 和 V_L 序列, 其可以不是天然存在于体内的人抗体种系库中。

[0278] 正如在这里所使用的,“同种型”涉及的抗体种类(例如,IgM, IgE, IgG 比方说 IgG1 或者 IgG4),其是由重链恒变区基因提供。

[0279] 短语“识别抗原的抗体”以及“对抗原由特异性的抗体”在本文中可与术语“特异性连接抗原的抗体”交换使用。

[0280] 正如在这里所使用的,特异性结合树突细胞受体(例如结合于靶体,其中所述靶体特别指的是人靶体,比方说人体组织中的半乳糖凝集素的配体)的抗体或抗体-融合蛋白,指的是涉及一种连接到人靶体上的抗体,其中人靶体具备的 K_D 为大约 $5 \times 10^{-9}M$ 或更小,大约 $2 \times 10^{-9}M$ 或更小,或者大约 $1 \times 10^{-1}M$ 或更小。“与抗原进行交叉反应而不是人靶体”的抗体意在指的是,涉及一种结合到具有 K_D 为大约 $0.5 \times 10^{-8}M$ 或更小,大约 $5 \times 10^{-9}M$ 或更小,或大约 $2 \times 10^{-9}M$ 或更小的抗原上的抗体。“与特定抗原不交叉反应”的抗体意在指的是涉及一种结合到具备 K_D 为约 $1.5 \times 10^{-8}M$ 或更大,或者 K_D 为大约 $5-10 \times 10^{-8}M$ 或大约 $1 \times 10^{-7}M$ 或更大的抗原上的抗体。在某些实施方案中,所述的与抗原不交叉反应的抗体基本上表现出在标准结合测定法中针对这些蛋白质不能检测到的结合。

[0281] 正如在这里所使用的,抑制靶体连接到半乳糖凝集素的抗体涉及一种抗体,所述抗体抑制靶体连接到具有大约 1nM 或更少、大约 0.75nM 或更少、大约 0.5nM 或更少或者 0.25nM 或更少的 K 的受体上。GL117 是细菌的抗 β 半乳糖吡喃糖苷酶的非特异性同种型匹配的鼠单克隆抗体的阴性对照(Hawiger, D. 等人,2001 年 J Exp Med 194:769-779)。

[0282] 正如在这里所使用的术语“ K_{assoc} ”或者“ K_a ”意在指的是涉及特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而正如在这里所使用的,术语“ K_{dis} ”或“ K_D ”意在指的是涉及特定抗体-抗原相互作用的解离速率。正如在这里所使用的,所述术语“ K_D ”意在指的是涉及解离常数,其通过 K_d 与 K_a (即 K_d/K_a) 的比率获得,并且以摩尔浓度(M)表示。对于抗体的 K_D 至可通过使用现有技术所公知的方法来确定。一种用于确定抗体的 K_D 的方法是通过使用表面等离子共振、或者使用生物传感器系统如 **Biacore®** 系统。

[0283] 正如在这里所使用的,术语“亲和性(affinity)”指的是在单一的抗原位点上抗体和抗原之间的相互作用的强度。在每个抗原位点中,抗体“arm”的可变区通过弱的非共价力与抗原在多个位置进行相互作用;相互作用越多,亲和力越强。

[0284] 正如在这里所使用的,术语“亲和力(avidity)”指的抗体-抗原复合物的整体稳定性或强度。它由三个主要因素控制:抗体表位亲和力;抗原和抗体二者的化合价;以及相互作用部分的结构排列。最终这些因素定义抗体的特异性,也就是说,特定抗体结合到精确的抗原表位上的可能性。

[0285] 正如在这里所使用的,术语“交叉反应”指的是结合到其他抗原上的表位的抗体的一种抗体或者抗体种群。这种情况可以通过抗体的低亲和力或特异性或通过具备同一性或者非常相似的表位的多个明显不同的抗原引起。交叉反应在某些时候适合的,当想要一般连接到抗原的相关基团上时或者当抗原表位序列在发展过程中不是高度保守时企图种间交叉标记情况下

[0286] 正如在这里所使用的,对于 IgG 抗体的术语“高度亲和性”指的是一种具有针对目标抗原的 $10^{-8}M$ 或更小、 $10^{-9}M$ 或更小,或者 $10^{-10}M$ 或更小的 K_D 的抗体。但是,“高度亲和性”的结合对于其它抗体同种型而言时可以改变的。例如,“高度亲和性”结合的 IgM 同种型涉及一种具有 $10^{-7}M$ 或更小,或者 $10^{-8}M$ 或更小的 K_D 的抗体。

[0287] 标准测定,用于评价抗体对任意多种物种的靶体的结合能力的标准分析在本领域中是已知的,举例来说,包括 ELISA、western 印迹和 RIA。合适的测定法在实施例中有详细描述。抗体的结合动力学(例如结合亲和力)也可以通过本领域已知的标准测定评估,例如通过 Biacore 分析。用于评估在抗体功能特性方面的抗体的效果的测定(例如结合、预防或改善自身免疫性疾病的受体)在实施例中进行更详细的描述。

[0288] 综上所述,抗体,根据本领域已知这里所描述的的方法所定义的其“抑制”这些半乳糖凝集素-相关功能性质的一个或多个(例如,生物化学、免疫化学、细胞、生理或其它生物活性等等),将被理解为与相对于没有抗体而言在特定活性中的统计学意义的降低有关(例如,或者在当存在一种不相关特异性的对照抗体情况中)。一种能抑制半乳糖凝集素相关的活性的抗体产生所测量的参数的至少 10%的统计学意义的降低,所测量的参数的至少 50%、80%或者 90%的统计学意义的降低,并且在某些实施方案中本发明的抗体可抑制超出 95%、98%或 99%的半乳糖凝集素的功能活性。

[0289] RNA 干扰

[0290] 抑制制剂包括 RNA 干扰制剂,其连接到编码半乳糖凝集素蛋白或者斑马调节半乳糖凝集素蛋白的活性的分子的核苷酸上,其中所述的核苷酸调节血管生成。用于连接到核苷酸上的方法和组合物包括利用 RNA 干扰(RNAi)。RNAi 经由在细胞中的短(例如,30 个核苷酸)双链的 RNA(dsRNA)分子被诱导。这些短 dsRNA 分子,被称为短干扰的 RNA(siRNA),导致与 siRNA 共享序列同源性的信使 RNA(mRNA)的破坏。Beach 等人,2003 年 7 月 31 日公开的国际公开号为 W0/2003/062394 的申请;McSwiggen 等人,2005 年 2 月 10 日公开的美国专利公开号为 US2005/0032733 的申请;Cicciarelli 等人,2012 年 8 月 7 日公开的美国专利公开号为 US 8,236,771 的申请。在多个实施方案中,靶体核酸序列编码半乳糖凝集素蛋白或其部分。例如,RNA 干扰剂带负向调节任意的半乳糖凝集素 1-11 或其部分的表达(例如,糖结合结构域)。

[0291] 用于构建合成的 siRNA 或反义表达盒并且将其插入到载体的重组操作的核苷酸中的方法是本领域所公知的,并且表述在例如 Reich 等人,2010 年 12 月 7 日公告的美国专利号为 US 7,847,090 的专利;Reich 等人,2010 年 3 月 9 日公告的美国专利号为 US 7,674,895 的专利;Khvorova 等人,2010 年 1 月 5 日公告的美国专利号为 US 7,642,349 的专利中。举例来说,本发明在这里包括合成的 siRNA,其包括有义 RNA 链和反义 RNA 链,其中有义 RNA 链包括与细胞中的靶体的核苷酸序列基本上相同的核酸序列。因此,在细胞与编码 siRNA 的病毒载体进行接的情况下,这些细胞表达 siRNA,然后反向地调节所述靶核酸序列的表达。

[0292] 半乳糖凝集素

[0293] 凝集素蛋白质与碳水化合物特异性结合并且集合到凝集细胞(参见国际公开的专利申请 W099//2006/113311,其是以全文引用的方式全文并入本文中)。凝集素已经被证明参与了广泛种类的细胞功能,包括细胞-细胞相互作用以及细胞-基质相互作用。凝集素广泛分布在植物、无脊椎动物和哺乳动物中。动物凝集素被分组为下述家族:C-型凝集素;P-型凝集素;半乳糖凝集素(之前曾被称为 S-型凝集素);以及正五聚蛋白(例如,参见 Barondes 等人,1994 年 J. Biol. Chem., 269:20807)。

[0294] 哺乳动物半乳糖凝集素识别乳糖和相关的半乳糖吡喃糖苷。尽管所有的哺乳

动物的半乳糖凝集素对于小的 β -半乳糖吡喃糖苷都具有相似的亲和性小,但是它们却在特异性结合与更多的糖缀合物方面显示出显著差异 (Henrick 等人, *Glycobiology* 8:45, 1998 年; Sato 等人, *J. Biol. Chem.* 267:6983, 1992 年; 以及 Seetharaman 等人, *J. Biol. Chem.* 273:13047, 1998 年)。除了结合 β -半乳糖吡喃糖苷糖,半乳糖凝集素具有血细胞凝集活性。层粘连蛋白,一种含有多种聚乳糖胺链的天然存在的糖蛋白,已证明对于某些半乳糖凝集素是天然的配体。层粘连蛋白是一种基础薄层的组成成分,所述细胞外基质原则是所有上皮细胞以及围绕个体肌肉、脂肪和雪旺氏细胞的基础。已知细胞之间的相互作用和基础片层能影响在哺乳动物发育期间的多种细胞类型的迁移和/或分化。半乳糖凝集素不包含传统的序列,其定义了膜转位,但是是细胞内同时分泌以及定位。除了它们对于 β -半乳糖吡喃糖苷糖的亲和性,半乳糖凝集素家族的成员共享在碳水化合物识别结构域 (CRD; 也称为碳水化合物结合结构域) 中的显著的序列相似性,其中相关的氨基酸残基已经通过 X-射线晶体学进行测定 (Lobsanov 等人, *J. Biol. Chem.*, 267: 27034, 1993 年, 以及 Seetharaman 等人, 同上)。半乳糖凝集素已经参与广泛种类的生物学功能,包括细胞粘附 (Cooper 等人, *J. Cell Biol.* 115:1437, 1991 年)、生长调节 (Wells 等人, *Cell* 64:91, 1991 等)、细胞迁移 (Hughes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:687, 1992 年)、肿瘤转化 (Raz 等人, *Int. J. Cancer* 46:871, 1990 年) 以及免疫应答 (Offner 等人, *J. Neuroimmunol.* 28:177, 1990 年)。

[0295] 半乳糖凝集素-1

[0296] 半乳糖凝集素-1 形成了 14 千道尔顿亚基的同二聚体,并且每一个亚基具有一个结合位点。半乳糖凝集素-1 在哺乳动物细胞的胞质溶胶内被合成,其所述凝集素聚集在单体形式中 (Cummings 等人, 1999 年 9 月 7 日公告的美国专利号为 US5,948,628 的专利; Cummings 等人, 2001 年 5 月 1 日公告的美国专利号为 US6225071 的专利; Horie 等人, 2005 年 5 月 10 日公告的美国专利号为 US 6,890,531 的专利; 以及, Camby 等人, 2011 年 6 月 21 日公告的美国专利号为 US 7,964,575 的专利)

[0297] 针对人类半乳糖凝集素-1 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6) 如下所示:

[0298] 1 MACGLVASNL NLKPGECLRV RGEVAPDAKS FVLNLGKDSN NLCLHFNPRF

[0299] 51 NAHGDANTIV CNSKDGGAWG TEQREAVFPF QPGSVAEVC I TFDQANLTVK

[0300] 101 LPDGYEFKFP NRLNLEAINY MAADGDFKIK CVAFD

[0301] 半乳糖凝集素-3

[0302] 半乳糖凝集素-3 蛋白家族的成员 (以前称为 CBP-35, Mac-2, L-34, BP, 以及 RL-29) 通常具有大约 240-270 个氨基酸的序列,并且具有大约 25kDa 到大约 29000kDa 的分子量。半乳糖凝集素-3 蛋白通常是由一种短的 N-末端结构域、包括半乳糖吡喃糖苷结合区域的 C-端结构域、以及介于其间包括 7-10 保守氨基酸的重复序列的富含脯氨酸、甘氨酸和酪氨酸的结构域 (Liu 等人, *Biochemistry* 35:6073, 1996 以及 Cherayil 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:7324, 1990)。所述串联重复序列与胶原蛋白基因超家族中发现的那些相类似。所述重复序列的数目在半乳糖凝集素-3 蛋白之间变化,并且导致来源于不同物种键的半乳糖凝集素-3 蛋白之间的差异。半乳糖凝集素-3 蛋白的 N-末端结构域使得蛋白质到含有糖结合物配体表面上进行多聚化。

[0303] 半乳糖凝集素-3 在多种炎性细胞 (例如,活化的巨噬细胞、嗜碱性粒细胞以

及肥大细胞)以及在多种组织的上皮和成纤维细胞中(参见 Perillo 等人, J. Mol. Med. 76:402, 1998) 进行表达。已经发现的包括在细胞表面上,在细胞外基质 (ECM) 内,在细胞的细胞质、以及在细胞核中。在细胞表面上或在 ECM 中,半乳糖凝集素-3 被认为通过连接到在多个 ECM 和细胞表面分子中含有的聚乳糖胺链互补糖缀合物上从而用于调节细胞-细胞和细胞-基质之间的相互作用。半乳糖凝集素-3 被认为是通过影响已知的细胞粘附分子(例如, $\alpha 6 \beta 1$ 和 $\alpha 4 \beta 7$ 整合素, Warlfield 等人, Invasion Metastasis 17:101, 1997, 以及 Matarrese 等人, Int. J. Cancer 85:545, 2000) 以及细胞因子(例如, IL-1, Jeng 等人, Immunol. Lett. 42:113, 1994) 的表达从而直接地抑制细胞-基质的粘附。半乳糖凝集素-3 表达在所选的器官(例如肾脏)中是发育调控的,并且其在肺泡上皮细胞和肝细胞中的表达水平在损伤后被上调。半乳糖凝集素-3 表达在某些肿瘤中升高,表明半乳糖凝集素-3 起转移的作用。事实上,在弱转移性细胞系中半乳糖凝集素-3 的过表达引起在转移能力方面的显著增加(Razet 等人,同上)。

[0304] 人半乳糖凝集素-3 为 250 个氨基酸的长度,并且具有的大约 26.1kDa 的分子量 (SEQ ID NO:1, 图 1)。如在图 1、图 3、图 5 和图 7 所示,人类半乳糖凝集素-3 含有下述结构域、签名序列、或者其他结构特征(针对 PS 和 PF 前缀标识编号的基本信息,参见 Sonnhammer 等人, Protein 28:405, 1997);大约位于 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 15 至 14 的 N-末端结构域;大约位于 SEQ ID NO:1 氨基酸残基 15 至 116 的脯氨酸,甘氨酸,和酪氨酸富集域;大约位于 SEQ ID NO:1 氨基酸残基 117 至 247 的半乳糖吡喃糖苷结合结构域;大约位于 SEQ ID NO:1 氨基酸残基 181 至 200 的 galactin 签名序列 (PROSITE No. PS00309);大约位于 SEQ ID NO:1 氨基酸残基 4 至 7 的一个潜在 N-糖基化位点 (PROSITE No. PS00001);大约位于 SEQ ID NO:1 氨基酸残基 137 至 139 以及 194 至 196 的两个潜在的蛋白激酶 C 磷酸化位点 (PROSITE No. PS00005);大约位于 SEQ ID NO:1 氨基酸残基 6 至 9 以及 175 至 178 的两个潜在酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (PROSITE No. PS00006);以及,大约位于 SEQ ID NO:1 氨基酸残基 24 至 29, 27 至 32, 34 至 39, 43 至 48, 52 至 57, 61 至 66, 65 至 70, 以及 68 至 73 的八个潜在的肉豆蔻位点 (PROSITE No. PS00008)。

[0305] 如本文所定义,“半乳糖凝集素-3”包括一种半乳糖凝集素-3 的“N-末端结构域”、一种半乳糖凝集素-3“脯氨酸,甘氨酸,和酪氨酸富集域”、和/或一种半乳糖凝集素-3“半乳糖吡喃糖苷结合结构域”。这些结构域被进一步定义如下。

[0306] 正如在这里所使用的所用,半乳糖凝集素-3“N-末端结构域”包括大约 10 至 20 个氨基酸的氨基酸序列,优选地为大约 14 个氨基酸,其具有至少大约 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或 100% SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-14 的同一性。所述 N-末端结构域能够包含 N-糖基化位点 (PROSITE No. PS00001) 和/或一种酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (PROSITE No. PS00006)。所述 PROSITE N-糖基化位点具有共有序列: N-{P}-[ST]-{P}, 并且 PROSITE 酪蛋白激酶 II 磷酸化位点具有共有序列: [ST]-X(2)-[DE]。在上述所述的共有序列,以及本文所述其它基序或签名序列中,使用标准 IUPAC 单字母代码来表示。在图示中的每个元素通过划线(-) 进行分离;方括号([]) 表示与在所述位置上所接受的特定残基;X 表示该位置处的任何残基;以及,在括号(()) 中的数字表示由相应的氨基酸所表示的残基的数目。在某些实施方案中,N-末端结构域包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸 L7 和 L11。根据图 3 所示,这些氨基酸被保存在几种哺乳动物的半乳糖凝集素-3 中,并且因此可以起催化和/或

结构作用。

[0307] 正如在这里所使用的,一种半乳糖凝集素-3的“脯氨酸,甘氨酸,和酪氨酸富集区域”包括的氨基酸序列为大约60个-大约140个氨基酸,更优选为大约80-120个氨基酸,或者大约90-110个氨基酸,其中共有至少与SEQ ID NO:1的氨基酸15至氨基酸116的大约60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的同一性。脯氨酸、甘氨酸和酪氨酸富集区域还可以包括一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或者八个N-肉豆蔻酰化位点(PROSITE号为PS00008),其所具有的共有序列为:G-{EDRKHPFYW}-X(2)-[STAGCN]-{P}。在某些实施方案中,所述富含脯氨酸、甘氨酸和酪氨酸的结构域包括SEQ ID NO:1的下述氨基酸以及区域:G21, P23, G27, N28, P30, G32, G34, P37, Y41-P46, G53, Y55-G57, P61, G62, G66, P72, G73, G77, Y79-G81, P83, G87, Y89, P90, G99, Y101, P102, P106, Y107, A109, L114, 以及V116。这些氨基酸和区域被保存在某些哺乳动物的半乳糖凝集素-3中,并且可能起催化和/或结构作用(参见在附图3中用“*”表示氨基酸)。

[0308] 正如在这里所使用的,一种半乳糖凝集素-3“半乳糖吡喃糖苷结合结构域”包括大约80至约180的氨基酸序列,其具备至少150的序列与来自PFAM(SEQ ID NO:3)的共有序列PF00337的同一性比特得分。优选地,一种半乳糖凝集素-3的半乳糖吡喃糖苷结合区域包含至少大约100至160个氨基酸,更优选为大约110至150个氨基酸,或者大约120至约140个氨基酸,并且具有只扫150、至少175、或者200或更高的序列与来自PFAM(SEQ ID NO:3)的共有序列PF00337的同一性比特得分。

[0309] 为了计算特定序列相对于来自PFAM的共有序列PF00337同一性的比特得分,所关注的序列可以针对HMM的PFAM数据库进行搜索(例如,PFAM数据库,版本2.1),使用在www.sanger.ac.uk/Software/Pfam可得到的缺省参数。PFAM数据库的说明可以参见Sonnhammer等人同上,并且HMM的详细说明可参见例如,Gribskov等人,Meth. Enzymol. 183:146, 1990以及Stultz等人,Protein Sci. 2:305, 1993的描述。

[0310] 所述半乳糖凝集素-3半乳糖苷-结合区域能够进一步包括一个,优选两个,蛋白激酶C磷酸化位点(PROSITE No. PS00005);一种酪蛋白激酶C磷酸化位点(PROSITE No. PS00006);以及/或一种galactin签名序列(PROSITE No. PS00309)。所述蛋白激酶C磷酸化位点具有下述共有序列:[ST]-X-[RK]。所述galactin签名序列具有下述共有序列:W-[GEK]-X-[EQ]-X-[KRE]-X(3,6)-[PCTF]-[LIVMF]-[NQE GSKV]-X-[GH]-X(3)-[DENKHS]-[LIVMFC]。在某些实施方案中,所述半乳糖凝集素-3半乳糖苷-结合区域包括SEQ ID NO:1的下述氨基酸和区域:P117, Y118, L120-L122, G125, P128, R129, L131-I134, G136-V138, N141, N143, R144, L147, F149, R151, G152, D154, A156-F163, E165, R169-N174, N179-G182, E184-R186, F190-E193, G195, P197-K199, Q201-L203, E205, D207-Q220, N222, R224, L228, I231, I236, G238-I240, 以及L242-S244。这些氨基酸和区域被保存在某些哺乳动物种类的半乳糖凝集素-3中,并且可以起到一种催化和/或结构作用(参见,附图3中用“*”表示的氨基酸)。

[0311] 某些半乳糖凝集素-3蛋白包括人类半乳糖凝集素-3的氨基酸序列,如SEQ ID NO:1所示。其它的半乳糖凝集素-3蛋白包括的氨基酸序列基本氨基酸序列的SEQ ID NO:1一致。正如在这里所使用的术语“大致相同的”指的是含有与在第二氨基酸序列中比对的氨基酸残基一致的足够或者最小数目的氨基酸残基,从而第一和第二氨基酸序列具备一种共同

的结构区域和/或共同的功能活性。例如,含有与 SEQ ID NO:1 的共同结构域具有至少大约 60%或 65%的同一性,优选至少 75%的同一性,更优选至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列被称为与 SEQ ID NO:1 基本相同的氨基酸序列。具体地说,含有偶然地或故意地诱导的改变的蛋白质,例如 SEQ ID NO:1 的某些氨基酸残基的缺失、添加、替代或修改,可能术语这里所提到的半乳糖宁技术-3 蛋白的定义范围内。还应当理解的是,正如本文所定义的半乳糖凝集素-3 蛋白可以包括以取自其它哺乳动物种类的半乳糖凝集素-3 的氨基酸序列所表示的区域,其中其他的哺乳动物种类包括但不限于牛、犬、猫、山羊、绵羊、猪、鼠和马。

[0312] 序列之间的序列同一性的计算按如下方式进行。为了确定两个氨基酸序列的同一性百分比,对序列进行比对以实现最佳的对比目的(例如,针对最佳的比对,能够将空位引入第一或第二氨基酸序列的一方或者两方中)。然后比较在相应的氨基酸位置或核苷酸位置上的所述的氨基酸残基。当在第一个序列的位置对应于第二个序列的相应位置是被相同的氨基酸残基或核苷酸所占有时,那么所述的蛋白在该位置上是一致的。在两个序列之间的同一性百分比是所述序列所共享的一致位置的数量的函数,考虑到计算空位的数量,需要引入用于两个序列的最佳比对。

[0313] 在两个序列之间的序列比较以及同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。在一个优选实施方案中,两个氨基酸序列之间的同一性百分比是使用比对软件程序通过使用缺省参数来确定的。适当的程序包括,例如,CLUSTAL W(由 Thompson 等人, *Nuc. Acids Research* 22:4673, 1994(www.ebi.ac.uk/clustalw)), BL2SEQ(Tatusova 和 Madden, *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247, 1999 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)), SAGA(由 Notredame 和 Higgins, *Nuc. Acids Research* 24:1515, 1996(igs-server.cnrs-mrs.fr/~cnotred)), 以及 DIALIGN(由 Morgenstern 等人, *Bioinformatics* 14:290, 1998(bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign))。

[0314] 半乳糖凝集素-7

[0315] 半乳糖凝集素-7 家族的成员的蛋白通常以单体形式存在,其包括在约 130 到 about 140 个氨基酸,其分子量介于约 15 ~ 16 kDa(例如,参见 Magnaldo 等人, *Develop Biol.* C168 :259, 1995 和 Madsen 等人, *J. Biol. Chem.*, 270 :5823, 1995)。半乳糖凝集素-7 的表达已经涉及到上皮分层的发生(Timmons 等, *Int. J. of Dev. Biol.* 17543 :229, 1999)。半乳糖凝集素-7 被认为起重要作用的细胞-基质和细胞-细胞相互作用。半乳糖凝集素-7 区域中发现的细胞-细胞接触(例如,在人类表皮的上层);其表达急剧下调的附着依赖性角质形成细胞中并且它是一种恶性角化细胞系中不存在。所需的半乳糖凝集素-7 可以保持正常的角质细胞(参见, Madsen 等人, 同上)。

[0316] 人半乳糖凝集素-7 包含 136 个氨基酸并且具有约 15.1 kDa 的分子量(SEQ ID NO:2, 附图 2)。如附图 2、4、6 和 8 中,人类半乳糖凝集素-7 含有下述结构域、签名序列、或者其他结构特征:位于 SEQ ID NO:2 的大约氨基酸位置 5 到 135 上的半乳糖结合区域;位于 SEQ ID NO:2 的大约氨基酸位置 70 到 89 上的 galactin 信号序列(Prosite No. PS00309);位于 SEQ ID NO:2 的大约氨基酸位置上的 29-32 的 N-糖基化位点(Prosite No. PS00001);位于 SEQ ID NO:2 的大约氨基酸位置的 132 到 134 上的蛋白激酶 C 磷酸化位点(Prosite No. PS00005);位于 SEQ ID NO:2 的大约氨基酸位置的 9 到 12 上的酪蛋白激酶 II 磷酸化位

点;以及位于 SEQ ID NO:2 的大约氨基酸位置的 13 到 18 以及 44 到 49 上的两个肉豆蔻酰化位点。

[0317] 如本文所定义的,“半乳糖凝集素-7 蛋白”包括一种半乳糖凝集素-7 的“半乳糖苷结合区”。该区域被进一步定义如下。

[0318] 正如在这里所使用的,半乳糖凝集素-7 的“半乳糖苷结合区”包括大约 80 到大约 180 个氨基酸的氨基酸序列,具有针对序列与至少 80 的 PFAM(SEQ ID NO:3) 的共有序列 PF00337 比对的比特得分。优选的,半乳糖凝集素-7 的半乳糖苷结合区具有至少大约 100 到 160 的氨基酸,或大约 110 到 150 的氨基酸,或大约 120 到 140 的氨基酸,并且具有序列与至少 80 的 PFAM(SEQ ID NO:3) 的共有序列 PF00337 的比特得分,更为优选的是至少 100,最为优选的是 120 或更大。乳糖凝集素-7 的半乳糖苷结合区能够包括一个 N-糖基化位点 (PROSITE No. PS00001);一种蛋白质激酶 C 磷酸化位点 (PROSITE No. PS00005);酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (PROSITE No. PS00006);一个或两个肉豆蔻酰化位点 (PROSITE No. PS00008);和/或一个 galactin 签名序列 (PROSITE No. PS00309)。在某些实施方案中,乳糖凝集素-7 的半乳糖苷结合区具有 SEQ ID NO:2 的下述氨基酸和区域:M1, S2, H6, K7, L10, P11, G13, R15, G17-V19, R21-G24, V26, P27, A30, R32-Q43, D46-N63, K65, Q67, G68, W70-G76, G78, P80-L90, I92, G97-K99, V101, G103, D104, Y107, H109, F110, H112, R113, P115, V119, R120, V122-L130, S132, I135, 和 F136。这些氨基酸和区域被保存在某些哺乳动物种类的半乳糖凝集素-7 中,并且可以起到一种催化和/或结构作用(参见,附图 4 中用“*”表示的氨基酸)。

[0319] 某些半乳糖凝集素-7 蛋白包括用 SEQ ID NO:2 表示的人半乳糖凝集素-7 的氨基酸序列。更为具体的,含有偶然地或故意地诱导的改变的蛋白,例如 SEQ ID NO:2 的某些氨基酸残基的缺失、添加、取代或修饰可以术语本发明所定义的半乳糖凝集素-7 的范围内。还应当理解,根据本发明在这里的定义,半乳糖凝集素-7 蛋白可以包括由其他哺乳动物获得的半乳糖凝集素-7 的氨基酸序列所指出的残基,包括但不限于牛,犬,猫,山羊,绵羊,猪,鼠,和马物种。

[0320] 半乳糖凝集素-8

[0321] 半乳糖凝集素-8 是一种广泛表达的蛋白质,存在于例如,在肝脏,心脏,肌肉,肾,脾,后肢和脑,并且人和鼠的半乳糖凝集素-8 基因和蛋白的序列是可用的(参见例如, Hadari 等人, Trends in Glycosci and Glycotechnol. 9:103-112, 1997)。在黏蛋白的 O-连接的寡糖中发现的用于结合 Gal β 1-4GlcNAc 二糖的高度亲水性和功能使得这种蛋白是用于治疗干眼症的理想药剂。

[0322] 对人类半乳糖凝集素-8 的氨基酸序列替代形式是已知的,;iru 一种 316 个氨基酸的形式 (Accession number 000214, 1997 年 11 月创建) 以及一种 359 个氨基酸的形式 (Accession number Q8TEV1, 2002 年 6 月创建)。这些序列,虽然虽然类似或相同的有效长度,但是却并不是整个长度变化,具有不同的部分。所述 316 形式氨基酸序列,使用单字母氨基酸密码,如下所示 (SEQ ID NO. 4):

[0323] MLSLNNLQNI IYNPVIPIYVG TIPDQLDPGT LIVICGHVPS DADRFQVDLQ NGSSVKPRAD 60

[0324] VAFHFNPRFK RAGCIVCNLT INEKWGREEI TYDTPFKREK SFEIVIMVLK DKFQVAVNGK 120

[0325] HTLLYGHRIG PEKIDTLGIY GKVNIHSIGF SFSSDLQSTQ ASSLELTEIS RENVPKSGTP 180

[0326] QLSLPFAARL NTPMGPGRTV VVKGEVNANA KSFNVDLLAG KSKDIALHLN PRLNIKAFVR 240
[0327] NSFLQESWGE EERNITSFPF SPGMYFEMII YCDVREFKVA VNGVHSLEYK HRFKELSSID 300
[0328] TLEINGDIHL LEVRSW 316

[0329] 更长形式的氨基酸序列如下所示 (SEQ ID NO:5):

[0330] MMLSLNNLQN IIYSPVIPYV GTIPDQLDPG TLIVICGHVP SDADRFQVDL QNGSSVKPRA 60
[0331] DVAHFHNPRF KRAGCIVCNT LINEKWGREE ITYDTPFKRE KSFEIVIMVL KDKFQVAVNG 120
[0332] KHTLLYGHRI GPEKIDTLGI YGKVNIHSIG FSFSSDLQST QASSLELTEI SRENVPKSGT 180
[0333] PQLPSNRGGD ISKIAPRTVY TSKDSTVNH TLTCTKIPPT NYVSKILPFA ARLNTPMGPG 240
[0334] GTVVVKGEVN ANAKSFNVDL LAGSKHIAL HLNPRNIKA FVRNSFLQES WGEEERNITS 300
[0335] FPFSPGMYFE MIIYCDVREF KVAVNGVHSL EYKHRFKELS SIDTLEINGD IHLLEVRSW 359

[0336] 如本文所定义的,“半乳糖凝集素-8 蛋白”包括一种半乳糖凝集素-8 “N- 末端结构区”,一种半乳糖凝集素-8 “脯氨酸,甘氨酸,和酪氨酸富集区”和 / 或一种半乳糖凝集素-8 “半乳糖苷- 结合区”,这些区域的定义如下所示。

[0337] 正如在这里所使用的,半乳糖凝集素-8 “N- 末端结构区”包括大约 10-20 个氨基酸的氨基酸序列,优选大约 14 个氨基酸其具有与 SEQ ID NO:4 或者 5 的氨基酸 1 到 14 的大约 60%,70%,80%,90%,95%,99%,或者 100% 的同一性。N- 末端结构区能包括一种 N- 糖基化位点 (PROSITE No. PS00001) 和 / 或一种酪蛋白激酶 II 磷酸位点具有共有序列:[ST]-X(2)-[DE]。在上述的共有序列中,同事由其他的基序列或签名序列。

[0338] 正如在这里所使用的,半乳糖凝集素-8 “脯氨酸,甘氨酸,和酪氨酸富集区”包括一种好哦功能大约 60 到 140 个氨基酸的氨基酸序列,更为优选的是大约 80-120 个氨基酸,或者大约 90-110 个氨基酸,其具有与每个 SEQ ID NO:4 和 5 的氨基酸 15-116 的至少大约 60%,70%,80%,90%,95%,99%,或者 100% 的同一性。所述脯氨酸,甘氨酸,和酪氨酸富集区还可具有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、或者 8 个 N- 豆蔻酰化位点 (PROSITE No. PS00008),其具备共有序列:G-{EDRKHPFYW}-X(2)-[STAGCN]-{P}。在某些实施方案中,所述脯氨酸,甘氨酸,和酪氨酸富集区还具备 SEQ ID NO:4 的下述氨基酸和区域:G20, P23, P28, G29, G36, P39, 以及其他本领域技术人员显而易见的残基。这些氨基酸和区域在某些哺乳动物种类的半乳糖凝集素-7 中,并且可以起到一种催化和 / 或结构作用。在某些实施方案中,所述脯氨酸,甘氨酸,和酪氨酸富集区包括 SEQ ID NO:5 的下述氨基酸和区域:G21, P24, P29, G30, G37, P40, 以及其他本领域技术人员显而易见的残基。

[0339] 正如在这里所使用的,半乳糖凝集素-8 “半乳糖苷- 结合区”百科大约 80-180 个氨基酸的氨基酸序列,其具有至少 150 的与来自 PFAM (SEQ ID NO:3) 的共有序列 PF00337 的序列比对的比特得分。优选地,半乳糖凝集素-8 的半乳糖苷- 结合区包括至少大约 100 到 160 个氨基酸,更为优选地大约 110 到 150 个氨基酸,或者大约 120-140 个氨基酸,并且具有至少 150 的与来自 PFAM (SEQ ID NO:3) 的共有序列 PF00337 的序列比对的比特得分。更为优选地为至少 175,最为优选地为 200 或更大。

[0340] 为了评估具体序列与获自 PFAM 的共有序列 PF00337 的比对的比特得分,所关注的序列可以从 HMMs 的 FAM 数据库进行检索,使用可获自 www.sanger.ac.uk/Software/Pfam 的缺省参数。PFAM 数据库的说明可参见 Sonnhammer 等人,可以得到 HMM 的 supra 和详细描述,例如,在 Gribskov 等人, Meth..Enzymol. 183:146, 1990 以及 Stultz 等人, Protein

Sci. 2:305, 1993。

[0341] 所述半乳糖凝集素-8的半乳糖苷-结合区可进一步具备一个或多个蛋白激酶C磷酸化位点(Prosite No. PS00005);酪蛋白激酶II磷酸化位点(Prosite No. PS00006);和/或galaptin签名序列(Prosite No. PS00309)。所述蛋白激酶C磷酸化位点具有下述的共有序列:[ST]-X-[RK]。所述galaptin签名序列具有下述共有序列:W-[GEK]-X-[EQ]-X-[KRE]-X(3,6)-[PCTF]-[LIVMF]-[NQEGRSKV]-X-[GH]-X(3)-[DENKHS]-[LIVMFC]。在某些实施方案中,半乳糖凝集素-8的半乳糖苷-结合区包括SEQ ID NO:4的下述氨基酸和区域:L123-L124, G126, P131, R128, L140-I146, 以及其他与上述所示相类似的位点。这些氨基酸和区域在某些哺乳动物种类的半乳糖凝集素-8中,并且可以起到一种催化和/或结构作用(参见,附图3中用“*”表示的氨基酸)

[0342] 某些半乳糖凝集素-8蛋白包括SEQ ID NOs:4和5所示的人半乳糖凝集素-8的氨基酸区域。其他的半乳糖凝集素-8蛋白包括SEQ ID NOs:4或5的氨基酸序列基本一致的氨基酸序列。术语“基本一致”,如在这里所使用的,是涉及一种第一氨基酸,其包含一种氨基酸残基的足够或最低的数量,该氨基酸残基与在第二氨基酸序列中的比对氨基酸残基一致,其中第一和第二氨基酸序列可具有共同的结构区域和/或相同的功能活性。例如,含有具有与SEQ ID NOs:4或者5相同的至少75%的同一性,更为优选地为至少85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 或者99%的同一性的氨基酸序列,被称为基本上与SEQ ID NOs:4或者5的氨基酸序列基本相同。更为具体的,含有偶然或故意地诱导的改变的蛋白,例如SEQ ID NOs:4或者5的某些氨基酸残基的缺失,添加,替代或修饰可以落入到在这里所定义的半乳糖凝集素-8蛋白定义的范围内。还应当理解,如本文所定义,半乳糖凝集素8蛋白可包括由获自其他哺乳动物种类的半乳糖凝集素-8的氨基酸序列所表示残基,包括但不限于牛,犬,猫,山羊,绵羊,猪,鼠,和马物种。

[0343] 半乳糖凝集素蛋白的制备

[0344] 它将被本领域的普通技术人员可以理解的是,本发明的半乳糖凝集素可以从任何可用源中获得。这些包括但不限于从天然来源分离的蛋白质,重组产生或合成产生的,例如,通过固相程序。按照本发明,多核苷酸序列,其编码的半乳糖凝集素-3,半乳糖凝集素-7或的半乳糖凝集素-8,可以在该指示本发明在适当的宿主细胞中的半乳糖凝集素的表达的重组DNA分子被使用。Cherayil等人,同上;Madsen等人,同上;和Hadri等人,同上;详细的半乳糖凝集素-7和半乳糖凝集素-8分别描述人半乳糖凝集素-1,人半乳糖凝集素-3的克隆。为了表达生物活性的半乳糖凝集素-1,半乳糖凝集素-3,半乳糖凝集素7或半乳糖凝集素8的核苷酸序列编码的人半乳糖凝集素-1,半乳糖凝集素-3,半乳糖凝集素-7,半乳糖凝集素8或者其功能性等价物,被插入到适当的表达载体,即,其中包含了用于插入的编码序列的转录和翻译所必需的因子的载体。而被公知的那些本领域技术人员可用方法用于构建含有半乳糖凝集素-1编码序列,半乳糖凝集素-3编码序列,半乳糖凝集素-7编码序列或半乳糖凝集素-8编码序列和适当的转录或翻译控制的表达载体。这些方法包括体外重组DNA技术,合成技术和体内重组或遗传重组。缺失,添加,或取代的引入使用在本领域例如任何已知的技术,使用基于PCR诱变来实现。这些技术在Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY, 1989 以及 Ausubel等人 Current Protocols in Molecular

Biology, John Wiley&Sons, New York, NY, 1989 中被描述。多种表达载体 / 宿主系统可用于包含和表达一个的半乳糖凝集素 -1 编码序列, 半乳糖凝集素 -3 编码序列, 半乳糖凝集素 -7 编码序列或半乳糖凝集素 -8 编码序列。这些包括但不限于微生物, 如细菌转化的重组噬菌体, 质粒或粘粒 DNA 表达载体; 酵母转化的酵母表达载体; 昆虫细胞系统感染病毒的表达载体 (例如, 杆状病毒); 植物细胞系统转染的病毒表达载体 (例如, 花椰菜花叶病毒, CaMV 启动; 烟草花叶病毒, TMV) 或转化的细菌表达载体 (例如, 钛, pBR322 中, 或 pET25b 质粒); 或动物细胞系统。可替代地, 用化学方法合成一个的半乳糖凝集素 -1, 半乳糖凝集素 -3, 半乳糖凝集素 -7 或半乳糖凝集素 -8 的氨基酸序列, 全部或部分地产生。例如, 肽合成可以使用各种固相技术来进行 (Roberge 等人, Science 269:202, 1995) 和自动合成可以实现, 例如, 使用 431A 肽合成仪 (可从福斯特城的应用生物系统公司, CA), 按照制造商提供的说明进行操作。

[0345] 药物组合物

[0346] 在本发明的一个方面, 其汇总这些组合物包括至少一种半乳糖凝集素蛋白 (例如半乳糖凝集素 -1 蛋白、半乳糖凝集素 -3 蛋白、半乳糖凝集素 -7 蛋白以及半乳糖凝集素 -8 蛋白) 的活性的抑制剂, 并且可选择地包括一种药学上可接受的载体。在某些实施方案中, 这些组合物可选择地进一步包括一种好哦功能或多种其他的治疗剂。在某些实施方案中, 所述其他的治疗基或制剂选自有下列所组成的组中: 生长因子、抗 - 炎症制剂、血管加压制剂、胶原酶抑制剂、局部类固醇、基质金属蛋白酶抑制剂、抗坏血酸盐、血管紧张素 II、血管紧张素 III、钙网蛋白、四环素、纤维连接蛋白、胶原、血小板反应蛋白、转化生长因子 (TGF)、角质形成细胞生长因子 (KGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、表皮生长因子 (EGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF), neu 分化因子 (NDF)、肝细胞生长因子 (HGF)、B 族维生素如生物素、和透明质酸。

[0347] 所述短语“药学上可接受的载体”和“药学上适用的载体”在这里可交换使用, 并且包括任何或所有的溶剂, 稀释剂或其他液体媒介物, 分散或悬浮助剂, 表面活性剂, 等渗剂, 增稠剂或乳化剂, 防腐剂, 固体粘合剂, 润滑剂等, 其适合所需的特定剂型。Remington 的 Pharmaceutical Sciences Ed. by Gennaro, Mack Publishing, Easton, PA, 1995 公开了多种载体, 其被用于配制药组合物以及其制备所公知的技术。用于药学上可接受的载体的材料的某些实施例包括, 但不限于, 糖例如葡萄糖和蔗糖; 淀粉例如玉米淀粉和马铃薯淀粉, 纤维素及其衍生物例如羧甲基纤维素钠, 乙基纤维素和醋酸纤维素; 粉状黄耆胶; 麦芽; 明胶; 滑石; 赋形剂, 例如可可脂和栓剂蜡; 油类, 例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油、和大豆油; 二醇类; 这样的丙二醇; 酯例如油酸乙酯和月桂酸乙酯; 琼脂; 缓冲剂, 例如氢氧化镁和氢氧化铝; 藻酸; 无热原的水; 等渗盐水; 林格氏溶液; 乙醇、和磷酸盐缓冲溶液, 以及其它无毒相容的润滑剂如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁, 以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中, 根据配方设计师的判断。

[0348] 治疗有效剂量

[0349] 在另一些方面, 根据本发明所述的治疗方法, 眼部血管生产 (例如血管生成香瓜你的病症或病况) 或者眼部纤维化 (例如纤维化有关的病症或病况) 的治疗通过是眼睛与一种本发明所述的药物组合物进行接触。因此, 本发明提供了一种用于治疗眼部血管生成

有关的病症或纤维化有关的病症的治疗方法,包括给药由此需要的受试者一种治疗有效量的药物组合物,其包可抑制半乳糖凝集素-3、半乳糖凝集素-7和/或半乳糖凝集素-8的活性制剂,以这样的量和时间,以使为达到所需结果。可以预测到的是,其涵盖给药一种发明的药物作为治疗措施用于抑制眼部血管生成或眼部纤维化,或者作为一种预防措施用于使与眼部血管生成相关的病症或与眼部纤维化相关的病症所相关的并发症减少到最小,其中所述病症例如与年龄有关的黄斑变性、眼组织胞浆菌病综合征、新生血管性青光眼、晶状体后纤维组织形成、病理性近视、血管样条纹症、特发性疾病、脉络膜炎、脉络膜破裂、覆盖脉络膜痣、移植物排斥、单纯疱疹性角膜炎、利什曼病、盘尾丝虫病、和某些炎性疾病。在某些实施方案中,一种药物组合物的“治疗有效量”指的是有效用于调节血管生成相关病症或纤维化相关病症的剂量,特别是下调的眼血管发生或眼部纤维化。所述组合物,根据本发明所述的方法所述的,可使用有效用于治疗眼部或其他组织的给药的任何剂量或任何途径进行给药。选择精确的剂量是由医生根据被治疗患者的,调整剂量和给药以提供足够水平的活性药剂或以保持所需的效果。可以考虑的其它因素包括疾病状态的严重性(例如,血管生成的程度或纤维变性的程度,条件的历史;患者的年龄、体重和性别;饮食、给药时间和频率;药物组合;反应敏感性;和对治疗的耐受性/反应。长效药物组合物可以一天给药几次,3-4天,每天,每周,或每两周一次,这取决于特定组合物的半衰期和清除速率。

[0350] 本发明的活性制剂优选被配制成为易于给药和剂量均匀的剂量单元形式。正如在这里所使用的,表述“及来呢个单元形式”涉及一种用于被治疗的患者的适合的活性制剂的物理上独立的单元。然而,应该理解的是,该组合物的总的每日用量将由在合理的医学判断范围内由主治医师来决定。对于任何活性剂,所述治疗有效剂量可最初估计无论是在细胞培养试验或动物模型,通常是小鼠,兔,狗或猪。动物模型也可用于得到一个所希望的浓度范围和给药途径。虽然直接施用于眼设想作为给药途径,这样的信息随后可用于确定有用的剂量和给药在人类中其他的路径。治疗有效剂量是指改善症状或病症的活性剂的量。治疗功效和活性剂的毒性可以通过在细胞培养或实验动物,例如标准药学方法来确定,ED₅₀(剂量为治疗有效的人口的50%)和LD₅₀(剂量为致死群体的50%)。毒性与治疗效果的剂量比是治疗指数,并且它可以表示为比率,LD₅₀/ED₅₀。呈现大的治疗指数的药物组合物是优选的。从细胞培养测定和动物研究获得的数据用于配制一系列剂量用于人体。

[0351] 药物组合物的给药

[0352] 在配制一种期望剂量合适的药学上可接受的载体之后,本发明的药物组合物可以局部给予人和其它哺乳动物诸如眼部给药(如通过凝胶剂、软膏剂、或滴剂),即,如直接应用于外部眼组织内。可选的或另外途径例如注射到眼睛中,包括玻璃体内、子桦子(subtenonally)下和视网膜下、或口服、直肠、非肠道、脑池内、阴道内、腹膜内、口颊或经鼻,这取决于所治疗病症的严重性,也是可以预见的。眼内注射包括眼内注射入房水或玻璃体液、或注射到眼的外层,例如通过结膜下注射或眼球筋膜下注射。口服给药是可预见的,因为对合成的小分子抑制剂有效。

[0353] 液体剂型为眼给药包括缓冲剂和增溶剂,优选的稀释剂,例如水,防腐剂如thymosol,和一种或多种生物聚合物或聚合物用于调节溶液,如聚乙二醇,羟基羟基丙基甲基,透明质酸钠,聚丙烯酸钠或罗望子胶。

[0354] 液体剂型用于口服给药包括,但不限于,药学上可接受的乳剂,微乳剂,溶液,悬浮

液,糖浆和酞剂。除了活性剂(s)时,液体剂型可以含有常用的惰性稀释剂在本领域中,如,例如,水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂如乙醇,异丙醇,碳酸乙酯,乙酸乙酯,苜醇,苯甲酸苜酯,丙二醇,1,3-丁二醇,二甲基甲酰胺,油(特别是棉籽油,花生油,玉米油,胚芽油,橄榄油,蓖麻油和芝麻油),甘油,四氢糠醇,聚乙二醇和山梨糖醇的脂肪酸酯,以及它们的混合物。除惰性稀释剂外,口服组合物还可以包括佐剂,例如润湿剂,乳化剂和悬浮剂,甜味剂,矫味剂和芳香剂。

[0355] 剂型对于本发明的药物组合物的局部或透皮给药包括软膏剂,糊剂,霜剂,洗剂,凝胶,粉剂,溶液,喷雾剂,吸入剂或贴剂。活性剂与药学上可接受的载体和任何需要的防腐剂或缓冲剂可能需要在无菌条件下混合。例如,眼或皮肤感染可以与含水液滴,雾,乳剂,或乳膏治疗。给药可以是治疗性或它可以是预防性的。预防性制剂可以存在或施加到潜在的伤口的部位,或对伤口的来源,例如隐形眼镜,隐形眼镜清洁和漂洗溶液,容器为接触透镜贮存或运输,对于接触透镜的处理设备,滴眼剂,外科冲洗液,滴耳剂,眼罩和化妆品眼睛周围,包括面霜,乳液,睫毛膏,眼线,眼影和。本发明包括眼科设备,外科器械,其包含所公开的组合物(如,纱布绷带或条)听力设备或产品,以及制造或使用这些设备或产品的方法。这些设备可以涂有,浸渍有,结合到或以其它方式与公开的组合物处理。

[0356] 软膏剂,糊剂,霜剂和凝胶剂可以含有,除本发明的活性剂,赋形剂,例如动物和植物脂肪,油,蜡,石蜡,淀粉,黄蓍胶,纤维素衍生物,聚乙二醇,硅酮,膨润土,硅酸,滑石,氧化锌,或它们的混合物。

[0357] 粉剂和喷雾剂可以含有,除本发明的活性剂,赋形剂如滑石,硅酸,氢氧化铝,硅酸钙,聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可以另外含有常规的抛射剂如氯氟烃。

[0358] 透皮贴剂具有提供活性成分至身体的受控递送的额外优点。这种剂型可通过溶解或分散在恰当的介质中的化合物来制备。吸收促进剂也可以用于增加通过皮肤的化合物通量。所述速率可通过提供速率控制膜或通过聚合物基质或凝胶中化合物分散来控制。

[0359] 可注射制剂,例如,无菌可注射水性或油性悬浮液可以根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌注射制剂还可以是无菌可注射溶液,悬浮液或乳液在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中,例如,作为在1,3-丁二醇中的溶液。在可以使用的可接受的媒介物和溶剂中有水,林格氏溶液,USP和等渗氯化钠溶液。此外,无菌,不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,任何温和的固定油,可使用包括合成的单或二甘油酯。此外,脂肪酸如油酸用于制备注射剂。可注射制剂可以这样进行灭菌,例如,通过过滤细菌截留过滤器,或通过并入灭菌剂,其中可以溶解或分散在无菌水或其它无菌可注射介质在使用前无菌固体组合物的形式。为了延长活性剂的效果,通常期望自皮下或肌肉注射延缓剂的吸收。肠胃外给药的活性剂的延迟吸收可通过溶解或悬浮于油性媒介来实现。可注射的储库形式通过形成剂的微胶囊基质中的可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯制成。取决于活性剂的比例与聚合物和所用特定聚合物的性质,活性剂的释放速率可以得到控制。其它可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。贮库注射制剂也通过将药物包埋在脂质体或微乳剂中与身体组织相容的试剂来制备

[0360] 固体剂型用于口服给药包括胶囊剂,片剂,丸剂,粉剂和颗粒剂。在这类固体剂型中,将活性剂与至少一种惰性的,药学上可接受的赋形剂或载体混合,例如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或a)填充剂或增量剂如淀粉,蔗糖,葡萄糖,甘露醇和硅酸,b)粘合剂,诸如,例

如,羧甲基纤维素,藻酸盐,明胶,聚乙烯吡咯烷酮,蔗糖和阿拉伯胶,c) 保湿剂,例如甘油,d) 崩解剂,例如琼脂-琼脂,碳酸钙,马铃薯或木薯淀粉,藻酸,某些硅酸盐和碳酸钠,e) 溶液阻滞剂,例如石蜡,f) 吸收促进剂如季铵化合物,g) 润湿剂,如,例如,鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,h) 吸收剂,例如高岭土和膨润土,和 i) 润滑剂如滑石,硬脂酸钙,硬脂酸镁,固体聚乙二醇,月桂基硫酸钠,以及它们的混合物。

[0361] 相似类型的固体组合物也可用作在使用赋形剂如乳糖以及高分子量聚乙二醇等的软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。片剂,锭剂,胶囊,丸剂和颗粒剂的固体剂型可以用包衣和壳例如肠溶包衣,控释包衣和其它包衣药物配制领域中熟知的方法制备。在这类固体剂型中,活性剂可与至少一种惰性稀释剂混合,例如蔗糖或淀粉。这些剂型也可以包括在正常情况下,除惰性稀释剂,例如,压片润滑剂和其它压片助剂如硬脂酸镁和微晶纤维素外的其它物质。在胶囊,片剂和丸剂的情况下,该剂型也可以包含缓冲剂。它们可以任选含有遮光剂,也可以是释放活性剂仅在或优先在肠道的某一部分释放,任选以延迟的方式的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。

[0362] 药物组合物的应用

[0363] 如上述实施例中所讨论的和更详细的描述,半乳糖凝集素-3,半乳糖凝集素-7和半乳糖凝集素-8的至少一种抑制剂可通过结合到眼部 VEGF 受体,通过结合到眼睛的 TGF- β 受体,通过结合到其他的受体或调节蛋白,或者通过结合到分泌粘蛋白至跨膜粘蛋白(或者其他糖蛋白)的寡糖链,用于治疗或调节血管生成或纤维化病症,不受限于任何特定的理论或作用机制。在一般情况下,可以认为,半乳糖凝集素的这些抑制剂将会临床上用于抑制眼部血管生长和纤维化病症的发展,其中包括例如与过度新血管形成,血管发生,或纤维化相关的病症。

[0364] 在一般情况下,在本文中表明,半乳糖凝集素的这些抑制剂是临床上用于抑制血管生成或纤维化,所述血管生成或纤维化与任何上皮或内皮组织有关,包括但不限于角膜上皮;视网膜上皮,眼部血管和淋巴管的内皮细胞。

[0365] 含的至少其中之一的半乳糖凝集素 1-11(例如,半乳糖凝集素 1,半乳糖凝集素-3,半乳糖凝集素-7和半乳糖凝集素-8)的抑制剂的药物组合物是,例如本文中有用的,用于促进正常的血管发生或纤维化的水平。

[0366] 半乳糖凝集素-1,半乳糖凝集素-3,半乳糖凝集素-7和/或半乳糖凝集素-8的抑制剂能预防给药以减少或预防由过量血管生成或纤维化所引起的各种病理状态的伤害。例如,半乳糖凝集素-1,半乳糖凝集素-3,半乳糖凝集素-7和/或半乳糖凝集素-8的用于促进肺泡和支气管上皮的修复从而预防,减轻或治疗急性或慢性肺损伤,可通过本发明组合物来控制适当量。肺气肿,导致肺泡的逐渐丧失,以及吸入性损伤,即,从吸入烟雾和烧伤的支气管上皮和肺泡中由于该原因坏死,可使用有效治疗的半乳糖凝集素-1,半乳糖凝集素-3,半乳糖凝集素-7和/或半乳糖凝集素-8的抑制剂,如可损害归因于化学疗法,放射治疗,肺癌,哮喘,黑肺和其他肺部损伤的条件下,随着半乳糖凝集素治疗。

[0367] 在这些例子中描述的所有动物的治疗符合研究协会在视觉与眼科分辨率在视觉研究中使用动物和美国国立卫生研究院指南实验动物的护理和使用的建议。

[0368] 本发明的多个实施例是例举下述权利要求和实施例和附图仅是示例性的,并且不应被解释为进一步的限制。附录 A, B, C 的此通过整体引用作为参考。附录 A、B 和 C 在此

全文引入本文以供参考。

[0369] 整个本申请所引用的包括参考文献、授予的专利和公布的专利申请的所有引用参考文献的内容均通过引用结合到本文中。

[0370] 实施例

[0371] 实施例 1. 用于合成双 (3-脱氧-3-(3-氟苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷的材料和仪器

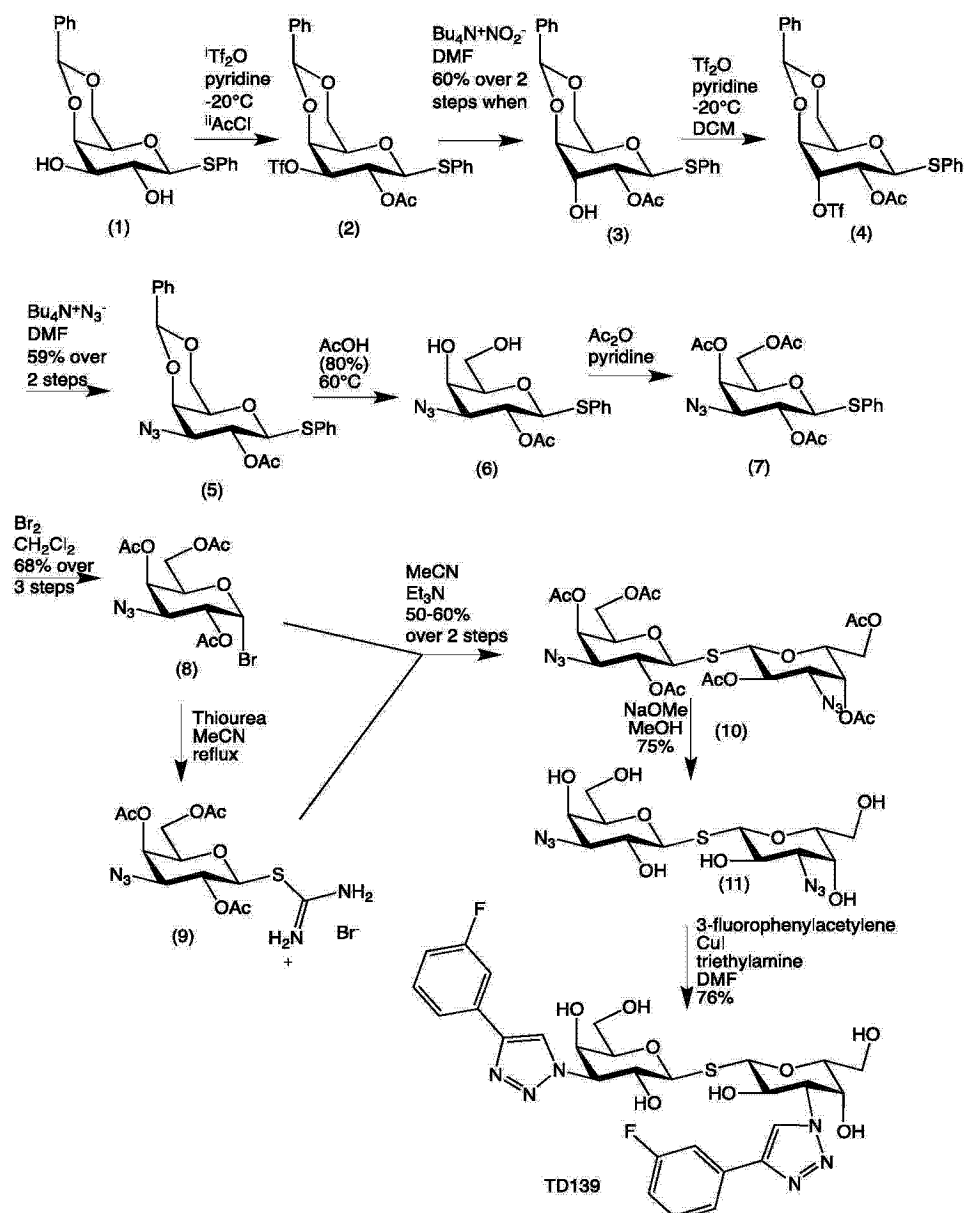
[0372] 双 (3-脱氧-3-(3-氟苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基)- β -D-吡喃半乳糖基) 硫烷 (TD139) 是由专业邮局系统 (Profs) 提供。Hakon Leffler 以及 Ulf Nilsson (瑞典隆德大学 (Lund University)), 并且通过给药本发明在这里所描述的材料和方法进行制备。

[0373] 熔点记录在 Kofler 装置 (赖克特) 上并且未被校正。质子核磁共振 (^1H) 的光谱使用 Bruker DRX400 (400MHz) 或者在 Bruker ARX300 (300 兆赫) 光谱仪进行记录; 多重性以单峰 (s)、峰 (d)、双峰 (dd)、三重峰 (t)、明显的三重峰 (在) 或者双峰明显的三重峰 (ATD) 引述。使用 Bruker DRX400 (100.6 兆赫) 分光计碳核磁共振 (^{13}C) 谱记录。光谱是用 COSY, HMQC 和 DEPT 实验进行分配。所有的化学位移在 δ 尺度上以百万分率 (ppm) 被引述。

[0374] 低-分辨率和高-分辨率 (FAB-HRMS) 快速原子轰击质谱使用 JEOL SX-120 设备进行记录, 并且低-分辨率和高-分辨率 (ES-HRMS) 是使用 Micromass Q-TOF 设备进行记录。旋光度在 Perkin-Elmer 341 偏光计是用 1dm 的途径长度进行测量; 给定浓度为每克 (g) 每 100mL。薄层层析法 (TLC) 是使用预先涂覆了 60F254 二氧化硅的 Merck Kieselgel 板完成。所述板使用 10% 的硫酸来产生。快速柱层析是使用氧化硅完成 (Matrex, $60\text{\AA}$, GraceAmicon, $35-70\text{ }\mu\text{m}$)。乙腈是由氯化钙蒸馏得到的, 并且贮存在 $4\text{\AA}$ 分子筛上。DMF 是从 $4\text{\AA}$ 分子筛进行蒸馏得到的, 并且并贮存在 $4\text{\AA}$ 分子筛上。

[0375] 双 (3-脱氧-3-(3-氟苯基-1H-1,2,3-三唑-1-基)- β -D-半乳吡喃糖基) 硫烷 (TD139) 是按照下面的反应方案 1 进行制备:

[0376]



[0377] 化合物 1 (上述反应 1) 是通过 Carbosynth Limited 8&9 Old Station Business Park-Compton-Berkshire-RG20 6NE - UK 得到, 或者以三个接近定量的步骤经由 D- 半乳糖进行合成, (参见 Li, Z. and Gildersleeve, J. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 11612-11619)。

[0378] 实施例 2. 苯基 2-O-乙酰基-4,6-O-亚苄基-1-硫代-3-O-三氟甲磺酰基-β-D-吡喃半乳糖苷的合成 (方案 1 中的结构式 2)

[0379] 化合物 1 (10.5 克, 29.2 毫摩尔) 溶解于干燥的吡啶 (4.73 毫升, 58.4 毫摩尔) 和干燥的 CH_2Cl_2 (132 毫升)。在搅拌下将反应混合物冷却, 至 -20°C (冰和 NaCl 浴, 比例为 3 : 1)。在 N_2 气氛情况下, 缓慢地将 Ti_2O_3 (5.68 毫升, 33.6 毫摩尔) 添加进去。所述反应混合物通过 TLC (庚烷 : EtOAc 为 1 : 1, 并且甲苯 : 丙酮为 10 : 1) 进行监测。当反应完成后, 加入 AcCl (2.29 毫升, 32.1 毫摩尔) 并且对其维持搅拌, 同时温度升至室温。这一混合物通过 TLC (庚烷 : EtOAc 为 1 : 1; 并且, 甲苯 : 丙酮为 10 : 1) 进行监测。当反应完成后, 用 CH_2Cl_2 进行猝灭, 并且用 5% 的 HCl 、 NaHCO_3 (饱和的) 以及 NaCl (饱和的) 进行洗涤。其中, 有机层使用 MgSO_4 进行干燥, 并对其进行过滤以及减压浓缩。

[0380] 实施例 3. 苯基 2-O-乙酰基-4,6-O-亚苄基-1-硫代 β -D-吡喃葡萄糖苷的合成 (方案 1 中的结构式 3)

[0381] 在 N_2 气氛下, 并且温度为 50°C 的情况下, 及那个四丁基铵亚硝酸盐 (25.3 克, 87.7 毫摩尔) 添加到 DMF (110 毫升) 的化合物 2 的溶液中 (15.6 克, 29.2 毫摩尔), 并且在过程中保持搅拌。所述反应最初观测为具有紫色, 并且稍后被观察到具有深红色。所述反应通过 TLC (庚烷:EtOAc 为 1:1 并且甲苯:丙酮为 10:1) 进行监测, 并且用 CH_2Cl_2 猝灭。将所得的混合物用 5% 的 HCl, NaHCO_3 (饱和的) 以及 NaCl (饱和的) 进行洗涤。其中有机层用 MgSO_4 进行干燥, 并对其进行过滤以及减压浓缩, 然后经过快速色谱纯化 (洗脱液庚烷:EtOAc 为 1:1 并且庚烷:EtOAc 为 1:2), 同时从 EtOAc 和庚烷 (1:3) 的混合物中对其进行重结晶。 ^1H NMR in CDCl_3 δ 7.60–7.57 (m, 2H, Ar), 7.43–7.40 (m, 2H, Ar), 7.37–7.34 (m, 3H, Ar), 7.29–7.25 (m, 3H, Ar), 5.50 (s, 1H, PhCH), 5.15 (d, 1H, $J = 10.29\text{Hz}$, H-1), 5.10 (dd, 1H, $J = 10.27\text{Hz}$, 2.85Hz, H-2), 4.36 (dd, 1H, $J = 12.49\text{Hz}$, 1.4Hz, H-6), 4.18 (br s, 1H, H-3), 4.08 (dd, 1H, $J = 3.59\text{Hz}$, 1.04Hz, H-6), 4.03 (dd, 1H, $J = 12.53\text{Hz}$, 1.75Hz, H-4), 3.88 (s, 2H, H-5+OH), 2.12 (s, 3H, OAc).

[0382] 实施例 4. 苯基 2-O-乙酰基-4,6-O-亚苄基-1-硫代-3-O-三氟甲磺酰基- β -D-吡喃葡萄糖苷的合成 (方案 1 中的结构式 4)

[0383] 将化合物 3 (1.00 克, 2.48 毫摩尔) 溶解于干燥的 CH_2Cl_2 (12.5 μmL) 和干燥的吡啶 (0.40 毫升, 4.96 毫摩尔) 中。在搅拌下将反应混合物冷却, 至 -20°C (冰和 NaCl 浴, 比例为 3:1)。在 N_2 气氛情况下, 缓慢地将 Tf_2O (0.48 毫升, 2.85 毫摩尔) 添加进去。所述反应混合物通过 TLC (庚烷:EtOAc 为 1:1, 并且甲苯:丙酮为 10:1) 进行监测, 并且当反应完成时, 用 CH_2Cl_2 猝灭, 并且用 5% 的 HCl、 NaHCO_3 (饱和的) 和 NaCl (饱和的) 进行洗涤。所得到的有机层在 MgSO_4 上进行干燥、并对其进行过滤以及减压浓缩。

[0384] 实施例 5. 苯基 2-O-乙酰基-3-叠氮基-4,6-O-亚苄基-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷的合成 (方案 1 中的结构式 5)

[0385] 在 N_2 气氛下, 并且温度为 50°C 的情况下, 将叠氮化四丁基铵 (2.12 克, 7.44 毫摩尔) 在搅拌下小心地加入到含化合物 4 (1.3256 克, 2.48 毫摩尔) 的 DMF (10mL) 溶液中。该反应通过 TLC (E:H, 1:1) 进行监测, 和在减压下进行浓缩, 然后经过快速色谱进行纯化 (洗脱液庚烷:EtOAc 为 2:1 并且 heptane:EtOAc 为 1:1)。 ^1H NMR in CDCl_3 δ 7.61–7.58 (m, 2H, Ar), 7.44–7.41 (m, 2H, Ar), 7.39–7.36 (m, 3H, Ar), 7.30–7.24 (m, 3H, Ar), 5.59 (s, 1H, PhCH), 5.35 (t, 1H, $J = 9.95\text{Hz}$, H-2), 4.73 (d, 1H, $J = 9.63\text{Hz}$, H-1), 4.44 (dd, 1H, $J = 6.24\text{Hz}$, 1.60Hz, H-6), 4.35–4.34 (dd, 1H, $J = 3.33\text{Hz}$, 0.88Hz, H-4), 4.11 (dd, 1H, $J = 12.48\text{Hz}$, 1.67Hz, H-6), 3.57 (d, 1H, $J = 1.15\text{Hz}$, H-5), 3.44 (dd, 1H, $J = 10.21\text{Hz}$, 3.29Hz, H-3), 2.17 (s, 3H, OAc).

[0386] 实施例 6. 苯基 2-O-乙酰基-3-叠氮基-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半乳糖苷的合成 (方案 1 中的结构式 6)

[0387] 将化合物 5 (470 毫克, 1.1 毫摩尔) 溶解在 80% 的乙酸 (75 毫升) 中, 并且加热所述混合物并在之后将其保持在 60°C 的温度下。所述反应通过 TLC (庚烷:EtOAc 为 1:1) 进行监测。当反应完成后, 将混合物在加热减压条件下进行浓缩。

[0388] 实施例 7. 苯基 2,4,6-三-O-乙酰基-3-叠氮基-3-脱氧-1-硫代 β -D-吡喃半

乳糖苷的合成（方案 1 中结构式 7）

[0389] 将乙酸酐（30 毫升）添加至在干燥的吡啶（30 毫升）中的化合物 6（373 毫克，1.1 mmol）的溶液中。所述反应通过 TLC（庚烷：EtOAc 为 1：1）进行监测，并且当反应完成时，在减压条件下对其进行浓缩。¹H NMR in CDCl₃ δ 7.54–7.51 (m, 2H, Ar), 7.35–7.30 (m, 3H, Ar), 5.46 (dd, 1H, H-4), 5.23 (t, 1H, H-2), 4.73 (d, 1H, H-1), 4.15 (d, 2H, H-6, H-6'), 3.94 (d, 1H, H-5), 3.68 (dd, 1H, H-3), 2.18 (s, 3H, OAc), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc).

[0390] 实施例 8. 2, 4, 6-三-O-乙酰基-3-叠氮基-3-脱氧-α-D-吡喃半乳糖基溴的合成（方案 1 中的结构式 8）

[0391] 将化合物 7（237.4 毫克，560 微摩尔）溶解在无水二氯甲烷（2 毫升）中，并且添加溴（32 微升，620 微摩尔）。所述反应通过 TLC（庚烷：EtOAc 为 1：1）进行监测。当反应完成时，将少量环戊烯加入到反应混合物中，用来除去剩余的未处理的 Br₂。所述混合物在减压条件下进行浓缩，并且通过快速闪光色谱法进行纯化（洗脱剂：500 毫升庚烷：EtOAc 为 2：1）。

[0392] 实施例 9. 2, 4, 6-三-O-乙酰基-3-叠氮基-3-脱氧-α-D-半乳吡喃糖基-1-异硫脲溴化物的合成（方案 1 中的结构式 9）

[0393] 敏感溴化物化合物 8（70.6 毫克，180 微摩尔）立即溶于无水乙腈（1.7 毫升）中，并且在 N₂ 下用硫脲（13.7 毫克，180 微摩尔）进行回流 4 小时。所述反应通过 TLC（庚烷：EtOAc 为 1：1）进行监测，并且当反应完成时，使混合物冷却。

[0394] 实施例 10. 双-(2, 4, 6-三-O-乙酰基-3-叠氮基-3-脱氧 BD-galactoD-吡喃半乳糖基)-硫烷的合成（方案 1 中的结构式 10）

[0395] 将敏感溴化物化合物 8（77.0 毫克，196 微摩尔）和 Et₃N（60 微升，430 微摩尔）加入到最后的混合物（化合物 9）中。所述反应通过 TLC（庚烷：EtOAc 为 1：1）进行监测。当反应完成后，将混合物在不加热的情况下进行减压浓缩。将残余物通过快速色谱法（洗脱液庚烷：EtOAc 为 1：1）进行提纯。¹H NMR in CDCl₃ δ 5.50 (dd, 2H, H-4,), 5.23 (t, 2H, H-2, H-2'), 4.83 (d, 2H, H-1, H-1'), 4.15 (dd, 4H, H-6, H-6, H-6', H-6'), 3.89 (dt, 2H, H-5, H-5'), 3.70 (dd, 2H, H-3, H-3'), 2.19 (s, 6H, 2OAc), 2.15 (s, 6H, 2OAc), 2.18 (s, 6H, 2OAc).

[0396] 实施例 11. 双-(3-叠氮基-3-脱氧 β-D-吡喃半乳糖基)-硫烷的合成（方案 1 中的结构式 11）

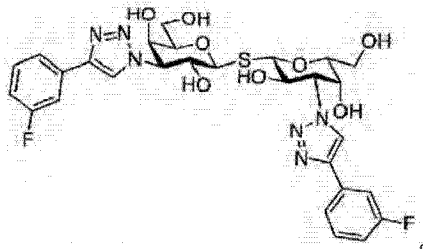
[0397] 将化合物 10（160 毫克，0.00024 摩尔）溶解于无水 MeOH（2.6 毫升）和无水二氯甲烷（1.6 毫升）中，并加入 NaOMe（1M, 24 μL, 24 微摩尔）。所述反应通过 TLC（庚烷：EtOAc 为 1：1 并且 D：M 为 5：1）进行监测。当反应完成后，用 Duolite C436 将混合物中和至 pH 为 7，并且对其进行过滤，然后用 MeOH 进行洗涤。将过滤的溶液在减压条件下进行浓缩。所得残余物通过快速色谱法纯化（洗脱液：CH₂Cl₂：MeOH 为 5：1），得到纯化的化合物 11（74.1 毫克，75%）。¹H NMR in CDCl₃ δ 4.72 (d, 2H, J = 9.7 Hz, H-1, H-1'), 3.95 (br s, 2H, H-4, H-4'), 3.84 (t, 2H, J = 9.8 Hz, H-2, H-2'), 3.74 (dd, 2H, J = 11.47 Hz, 7.23 Hz, H-6, H-6'), 3.64 (dd, 2H, J = 11.48 Hz, 4.72 Hz, H-6, H-6'), 3.60–3.55 (ddd, 2H, 7.15 Hz, 4.67 Hz, 0.93 Hz, H-5, H-5'), 3.36 (dd, 2H, J = 10 Hz, 3.05 Hz, H-3, H-3').

[0398] 实施例 12. 二-{3-脱氧-3-[4-(3-氟苯基)-1H-1, 2, 3-三唑-1-基]-β-D-半乳吡喃糖基} 硫烷的合成 (TD139)

[0399] 在环境温度下使用在 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF, 100 毫升 / 毫摩尔硫烷) 中的铜 (I) (0.23eq.)、三乙胺 (2eq.) 的通过环双-(3-叠氮基-3-脱氧 β -D-吡喃半乳糖基)-硫烷 (化合物 11) 和 3-氟苯乙炔 (33eq.) 与之间进行的铜 (I) 催化合成所述 TD139。反应应用 TLC 进行监测直到反应完成, 并且首先通过快速色谱法进行浓缩和纯化 (洗脱液: 二氯甲烷: 甲醇为 8:1), 然后通过制备型 HPLC 以得到为白色无定形固体的产率为 76% 的 TD139。¹H-NMR (CD₃OD, 400MHz) δ 8.59 (s, 2H, triazole-H), 7.63 (br d, 2H, 7.6Hz, Ar-H), 7.57 (br d, 2H, 8.4Hz, Ar-H), 7.41 (dt, 2H, 6.0 and 8.0Hz, Ar-H), 7.05 (br dt, 2H, 2.4 and 6.4Hz, Ar-H), 4.93 (dd, 2H, 2.4 and 10.4Hz, H3), 4.92 (d, 2H, 10.4Hz, H1), 4.84 (2H, 10.4Hz, H2), 4.18 (d, 2H, 2.4Hz, H4), 3.92 (dd, 2H, 4.2 and 7.6Hz, H5), 3.84 (dd, 2H, 7.6 and 11.4Hz, H6), 3.73 (dd, 2H, 4.2 及 11.4Hz, H6); FAB-HRMS m/z calcd for C₂₈H₃₀F₂N₆NaO₈ (M+Na⁺), 671.1712; found, 671.1705.

[0400] 化合物 TD139 的结构如下图所示:

[0401]



[0402] 实施例 13. 在毛细管小管形成实验中使用的材料

[0403] 生长因子减少的 (GFR) Matrigel (产品目录号: 354230) 的材料得自 Becton Dickinson 公司 (Franklin Lakes, NJ)。从 Corning 公司购得具有八 μ M (μ M, μ m) 的孔径反式井嵌。(Corning, NY; 产品目录号: 3422)。内皮基础培养基获自 Lonza 公司 (Walkersville, MD; 产品目录号: CC-3156)。血管内皮生长因子 (VEGF) 获自为 Cell Signal Inc. 公司。(Canton, MA; 产品目录号: CRV001A)。

[0404] 实施例 14. 抑制剂对毛细管小管形成测定的作用

[0405] 将 matrigel 稀释至 4.5mg/mL 的浓度, 并将其加入到八个腔室的载玻片 (200 μ l/室), 并且在 37°C 条件下对其聚合 20 分钟。将人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 培养在容器中, 并且以使用 0.25% 的胰蛋白酶 - 乙二胺四乙酸将其从容器的表面提起的方式取出。

[0406] 在增补了 1% 的胎牛血清 (FBS) 的内皮基础培养基 2 (EBM-2) 上制备含有 25 纳克 (ng)/毫升 (mL) 的溶液。HUVEC 样品 (20,000 细胞/样品) 或者是给药: 在 EBM-2 中的 25ng/mL 的 VEGF 以及 10 微摩尔 (μ M) TD139 半乳糖凝集素-3 抑制剂 (分子量为 600), 或者是给药在 EBM-2 中的 25ng/mL 的 VEGF 以及 50 μ M 的 TD139。

[0407] 对照 HUVEC 仅使用 25ng/mL 的 VEGF 进行处理, 其在 EBM-2 中。每个不同的 HUVEC 样品在 37°C、5% 的 CO₂ 条件下在基质胶腔室中培养 6 小时。

[0408] 代表性的摄影图像 (每个腔室四个图像)。得出形成毛细管获得数据, 并且通过计算分叉点的数量对其进行量化。所述数据被归一化为使用仅增补了 1% 的胎牛血清 (FBS) 的 EBM-2 培养基处理的对照样品 (并没有添加 VEGF 和 TD139 抑制剂)。

[0409] 使用共焦激光扫描显微镜 (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) 获得共聚

焦显微镜图像,其中共焦激光扫描显微镜配备有 X40/0.75(f/) 的物镜(参见 Markowska 等人,2011 J of Bio Chem Vol. 286(34):29913 - 29921)。荧光图像是使用 Eclipse E400 显微镜(Nikon,Tokyo,Japan)得到,其具备 CFI Plan Fluor X4(f/0.13)或 CFI Plan Fluor X20(f/0.50)的物镜。细胞芽的图像是使用 Nikon Eclipse TE200 相差显微镜拍摄到的,所述显微镜具备 CFI Plan Fluor X4 以及 CFI Plan Fluor X10(f/0.30)的物镜。在室温条件下使用 SPOT RT 彩色数码相机(Diagnostic Instruments(Sterling Heights,MI)以及 SPOT 获取软件版本 4.0.6(Diagnostic Instruments)得到这些图像。所述数据通过 Student's t-检测法进行分析(如表 1 所示)。

[0410] 表 1. 给药 VEGF 和 TD139 抑制剂和没有抑制剂的对照的人类脐静脉内皮细胞的毛细小管形成

[0411]

	相比与没有使用 VEGF (25ng/mL) 以及抑制剂处理的对照细胞而言在已处理的细胞中的小管形成的倍数变化		
复制	VEGF	VEGF + 10 μ M 抑制剂	VEGF + 50 μ M 抑制剂
1	2.42	1.94	1.13
2	2.6	1.85	0.79
3	1.64	1.32	0.27
平均值	2.22	1.70	0.73
标准偏差	0.51	0.34	0.43
标准误差	0.29	0.19	0.25

[0412] 相比与使用 EBM-2 中的 VEGF 和 10 μ M 的 TD139 半乳糖凝集素-3 抑制剂或者使用 EBM-2 中的 VEGF 和 50 μ M 的 TD139 进行处理的 HUVEC 而言,使用 25ng/mL 的 VEGF 处理的 HUVEC(1- 倍至 3- 倍)中观察到增强的毛细管形成(参见表 1,附图 9A 和附图 9B)。与仅使用 VEGF 处理的 HUVEC 相比,使用 10 μ M 的 TD139 抑制剂处理的 HUVEC 降低在 HUVEC 中 VEGF- 调节的毛细小管的形成(参见表 2 以及附图 9B)。

[0413] 更为重要的是,相比于禁用 VEGF 处理的 HUVEC,用 50 μ M 的 TD139 抑制剂处理的 HUVEC 显著降低了 VEGF 介导的毛细管小管形成的程度($n = 3$ 时, $P < 0.05$;图 9B)。这些数据表明,所述半乳糖凝集素抑制剂 TD139 基本上抑制了 VEGF 诱导的毛细管形成。

[0414] 实施例 15. 在三维中的体外血管生成测定 / 发芽试验的材料

[0415] 甲基纤维素(产品目录号:M0512)购自 Sigma 公司(圣路易斯,密苏里州),Dulbecco Modified Eagle 的培养基(DMEM;目录号 11965)购自 Invitrogen 公司(Carlsbad,CA)。I 型胶原蛋白(产品目录号:354-4236)购自 Becton Dickinson 公司。浓缩(10 倍)的 Penicillin-streptomycin 溶液(产品目录号:11825)购自 Invitrogen 公司。浓缩(10 倍)的青霉素-链霉素溶液(产品目录号:15140)购自 Gibco Invitrogen 公司(Carlsbad,CA)。

[0416] 聚苯乙烯悬浮培养微孔板(每板 96 个孔;产品目录号:650185)购自 Greiner

Bio One(Frickenhause,Germany)。VEGF(产品目录号:100-200),购自 PeptoTech G 公司(Rocky Hill,NH)。内皮细胞发育能力培养基-2(EGM-2)(产品目录号:CC4176)和EBM-2(产品目录号:CC3156)中自 Lonza 公司。

[0417] 实施例 16. 甲基纤维素制剂

[0418] 使用在 500 毫升瓶内将甲基纤维素粉末(6 克)使用电磁棒搅拌进行高压灭菌。将所述粉末溶解在 250 毫升的 DMEM 培养基并在 60℃温度下搅拌 30 分钟,然后在室温下添加 250 毫升的 DMEM,并将该混合物在 4℃下搅拌 2 小时。然后将得到的混合物分开至 50 毫升圆柱管中并在室温下对其离心(6170 转每分钟)两小时,以除去与球体形成干扰的杂质。从离心管中收集澄清的上清液。

[0419] 实施例 17. 内皮细胞球体制备

[0420] 内皮细胞(EC)是在容器中被培养,并且用 0.25%的胰蛋白酶从所述容器表面分离。胰蛋白酶化的 EC 细胞的 pH 使用 DMEM 进行中和。球体溶液在管中通过将 3.75 毫升的甲基纤维素、1.75 毫升胎牛血清、17.5 微升青霉素/链霉素、以及 90,000 个内皮细胞结合进行制备,并且添加 DMEM 从而使总体积为 17.5 毫升。所述球体溶液通过使其倒置使其得到混合,并将 150 微升(μ l)等分试样通过使用多通道移液器和广口吸头加入到 96 孔板的每个孔中。球状体被放置其内并且在 37℃,5%的 CO₂条件下培养 24 小时。

[0421] 实施例 18. 胶原蛋白的制备

[0422] 每个 96 孔板产生满足于 24 孔板的 4 个孔的球状体。胶原蛋白溶液用 2.3 毫升(3.9 毫克/毫升)的 I 型胶原蛋白进行制备,其中,400 微升(μ l)的 10×M199 的培养基,200 μ l FBS 以及 1.1 毫升水。胶原蛋白溶液用使用彩色 pH 指示剂的氢氧化钠进行中和。所述甲基纤维素溶液(4.5 毫升)与 1.5 毫升的 DMEM 进行结合,并且在水浴中加热到 37℃。使用一个宽口移液管收集 EC 球状体,并在室温下离心分离(每分钟 700 转)三分钟。

[0423] 除去得到的上清液,并且将 2 毫升的甲基纤维素溶液添加到沉淀物中。将所述中和的胶原蛋白溶液(2 毫升)加入到该混合物中,并用移液管进行小心地进行混合以避免形成气泡。

[0424] 将每份(1mL)所述混合胶原蛋白溶液添加的 24 孔板的 4 个空中,并且所述的板在 37℃,5%的 CO₂ 条件下培养 30 分钟,从而使胶原蛋白聚合。所述聚合的胶原蛋白被在增补了 20 μ M 的 TD139 或者 50 μ M 的 TD139 的 EBM-2 中的 100 μ l 的 EBM-2 和 25ng/mL 的 VEGF 覆盖进行覆盖。对照胶原蛋白样品用在 EBM-2 中的 100 μ l 的 EBM-2 和 25ng/mL 的 VEGF 进行处理。

[0425] 用倒置相差显微镜(Nikon)观测作为时间参数(天)的发芽和小管,并使用 SPOT RT 彩色数码相机(Diagnostic Instruments,Sterling Heights,MI)和所述 SPOT 采集软件版本 4.00.6(诊断仪器)进行拍照。参见 Meyer 等人,2003 J Biol Chem. 278(18):16347-55。得到所述培养的样品的代表性的图像,并且在任意单位的在内皮细胞芽中的累积长度通过 ImageJ 处理和分析程序来确定。该数据是由学生 t 检验(表 2)进行分析的(参见表 2)。

[0426] 统计分析:将样品于相比与仅存在 0.0012VEGF 的相比;仅存在 VEGF 的于存在 50 μ M 抑制剂和 VEGF 为 0.110 相比;并且将仅存在 VEGF 于 50 μ M 的抑制剂和 VEGF 为 0.079 相比。

[0427] 数据显示,与对照的仅用培养基处理的 EC 球状体样本相比,给药 25ng/mL 的 VEGFEC 球状体仅产生四倍多的内皮细胞芽的形成(参见附图 10A)。据观察,给药 10 μ M 的 TD139 抑制剂减少了大约三分之一的发芽影响因子,相比于单独与 VEGF 接触的 EC 球状体的 VEGF 介导的 EC 出芽的量(参见表 2 和附图 10B)。与使用 10 μ M 的 TD139 抑制剂处理的 EC 球状体,给药 50 μ M 的 TD139 抑制剂进一步显著降低的了 VEGF 介导的发芽的程度(大约三分之二)($n = 3$ 时, $P < 0.01$)。因此,半乳糖凝集素抑制剂基本上抑制血管生成过程,也就是说,毛细血管的 VEGF 诱导的萌芽,并且所述抑制相对于抑制剂给药量而言是剂量依赖性的。

[0428] 表 2. 体外血管生成 EC 管理和 VEGF 抑制剂 TD139

[0429]

	EC的毛细血管出芽超过没有接触VEGF和抑制剂的对照细胞的折叠变化			
复制	对照	VEGF	VEGF +10 μ M 抑制剂	VEGF + 50 μ M 抑制剂
1	207	800	779	-
2	N/A	650	294	394
3	169	921	729	294
4	132	604	200	93
平均值	169	743	500	260
标准偏差	38	145	296	153
标准误差	22	72	148	77

[0430] 实施例 19. 半乳糖凝集素蛋白抑制作用体内调节 VEGF 受体途径

[0431] 虽然血管内皮生长因子 (VEGF) 发信号与 VEGF 受体 -2 (VEGFR2) 是主要的血管生产途径,但是其中半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -3 的蛋白质是重要的调节剂。TD139 具有针对半乳糖凝集素 -1 (12nM 的平衡解离常数或 K_D) 和半乳糖凝集素 3 ($K_D = 14$ nM) 的高亲和力和力。参见 Lepur A 等人,2012 Biochim Biophys Acta. 1820 (7):804-18,其已通过引用全部并入本文中。化合物 TD139 特异性地结合与半乳糖凝集素 1 和半乳糖凝集素 3 的每一个上。

[0432] 在此的实施例表明,TD139 同事靶向半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -3 影响 VEGF-A/VEGFR2 信号。TD139 用于抑制病理性血管生成的功效如在本文中的实施例所示。不受任何特定理论或作用机理的限制,这里可以设想的是 TD139 治疗干扰的 VEGF-A/VEGFR2 信号并且消除的 VEGF-A 诱导的血管生成。

[0433] 通过给药硝酸银灼烧在小鼠角膜中诱导眼睛的新血管生成。附图 11A 显示出了用于 C57B/6L 鼠类受试者的治疗方案 / 给药时间表。其中 A 组受试者隔一天子 - 结膜注射含有 0.5% 的 DMSO 的 PBS 的 10 微升 (μ L) 的 TD139 (325ng)。对照的受试者仅子 - 结膜注射

载体（仅含有 0.5% 的 DMSO 的 PBS）。另一组受试者每天给药单独 10 μ l 的载体或者每天一次含有 50 μ M 的 TD139 的载体的眼药水。

[0434] 经过五天的不论是子结膜注射治疗还是滴眼剂治疗五之后，处死受试者，并且将平片的角膜切下、拍照、并用抗 CD31 着色从而显现出血管（图 11B，放大倍率为 $\times 100$ ）。通过 ImageJ 对血管覆盖整个角膜的密度进行定量，并用 Student' t 检验进行分析（附图 11C）。

[0435] 灼烧五天后获自受试者的眼睛的示例性的照片参见附图 11B 最上面一行。用 PBS 处理的对照受试者的眼睛显示出强标记的血管生成和新血管的形成（图 11B 左栏最上面一行）。最为重要的是，与对照受试者相比，TD139 治疗的眼睛的照片分析显示出降低的血管生成（图 11B 右栏最上面一行）。

[0436] 用抗 CD31 染色的角膜平支架的代表段在显示与附图 11B 的最后一行。用 PBS 处理的对照受试者的眼睛单独显示出强烈 CD31 染色（附图 11B 左列最后一行）。最重要的是，与仅使用 PBS 进行处理的对照受试者的眼睛相比，用 TD139 处理的角膜进行治疗的受试者的角膜显示出降低 CD31 染色。

[0437] 进一步，仅用 PBS 处理的对照受试者的角膜所覆盖的血管的密度约为 40%。用 TD139 处理的受试者的角膜所覆盖的血管的密度显著地降低（28%）。参见附图 11C。能够观察到，TD139 眼药水的球结膜下注射和局部应用二者降低了体内的烧伤引起的角膜新生血管生成。由此可知，TD139 被观察到是一种角膜新血管形成的有效的体内抑制剂，其中角膜新血管形成是眼部血管生成的一种重要体系。

[0438] 实施例 20. 半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 3 蛋白结合并与 VEGFR-2 的相互作用

[0439] 在 0.1 摩尔 (M) 蔗糖或 0.1M 乳糖存在下，将从 HUVEC 表达的 VEGFR-2 的溶解产物用共轭了琼脂糖珠的半乳糖凝集素 -1 蛋白或者共轭了琼脂糖珠的半乳糖凝集素 -3 进行培养。对照的 HUVEC 溶解产物仅用半乳糖凝集素 -1 琼脂糖珠粒或半乳糖凝集素 3 琼脂糖珠进行培养。对所述糖珠进行漂洗以除去其上未结合的材料。

[0440] 结合到糖珠上的 HUVEC 溶解产物材料用的 Laemmli 样品缓冲液进行洗脱，并且用凝胶电泳（4-20% SDS-PAGE 凝胶）进行分析。封闭后，膜印迹使用抗 VEGFR-2 抗体探测（附图 12）。所得数据表明，获自表达 VEGFR-2 的 HUVEC 溶解产物特异性连接到共轭了琼脂糖珠的半乳糖凝集素 -1 蛋白的每个上，并且连接到共轭了琼脂糖珠的半乳糖凝集素 -3 上。HUVEC 溶解材料到每个半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -3 蛋白糖珠上的连接，被观测到通过用乳糖（一种相竞争的糖）的治疗而被抑制。进一步的，连接到糖珠上的 VEGFR2HUVEC 溶解产物并没有被观测到通过用蔗糖（一种非竞争的糖）处理的糖珠。

[0441] VEGFR-2 的特异性结合到每个半乳糖凝集素 1 蛋白偶联琼脂糖珠和半乳糖凝集素 3 蛋白偶联琼脂糖珠。的 HUVEC 溶解物材料到每个半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 3 蛋白珠结合，观察到通过用乳糖，竞争糖类治疗来抑制。另外，未观察到与蔗糖，一个非竞争性糖处理过的微珠的 VEGFR2 的 HUVEC 溶解物结合于珠。

[0442] 不受任何特定理论或作用机理的限制，在这里所设想的 VEGFR-2 和半乳糖凝集素 -1 蛋白质之间的相互作用，以及 VEGFR-2 和半乳糖凝集素 3 蛋白之间的相互作用是碳水化合物依赖性的。半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -3 连接的碳水化合物特异性地与

VEGFR2 进行结合并与之相互作用。

[0443] 实施例 21. TD139 抑制 VEGF-A 诱导的内皮细胞出芽

[0444] HUVEC 球状体通过在本文所述的实施例的描述进行制备,并且所述球状体被接种于 I 型胶原凝胶中。经过 6 小时的培养后,所述凝胶用下述之一的方式进行处理:仅 VEGF-A(100ng/ml), VEGF-A(100ng/ml) 和 TD139(0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M、5 μ M、或者 10 μ M),或者仅 TD139(10 μ M)。对照球状体既不使用 VEGF-1 也不使用 TD139 进行处理。经过 24 小时的处理后,用钙黄绿素 AM 对球状体染色,钙黄绿素 AM 是一种细胞浸透染料其表示在真核细胞(Invitrogen 公司)中的细胞发育能力,并且对所述球状体用荧光显微镜进行拍照。累积生长长度由 ImageJ 进行量化。

[0445] 与没有用 VEGF 处理的对照细胞相比,仅用 VEGF-A 处理的 HUVEC 球状体观察到具有提高的 HUVEC 生长(附图 13A)。最为重要的是,相比与仅用 VEGF-A 进行处理的 HUVEC 球状体,用 TD139 处理的 HUVEC 球状体被观测到具有降低的生长长度。用 0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M、5 μ M、以及 10 μ M 任意之一的 TD139 的处理显著地抑制了 HUVEC 的 VEGF-A- 诱导的生长。

[0446] 实施例 22. TD139 抑制 VEGF-A 诱导的内皮细胞迁移

[0447] 不用血清对 HUVEC 培养过夜,用 Accutase 进行分离,再悬浮于 1% 的 FBS/M199 中,并且添加到通过膜从底部腔室分离出的上部腔室。底部腔室充满了 VEGF-A 其中存在 1% 在 FBS/M199 中的不同浓度(1nM、10nM、100nM、1000nM、或 5000nM) TD139 浓度,或者一种不具有 TD129 的对照。对照 HUVEC 既不使用 VEGF-A 也不使用 TD139 处理。

[0448] 经过 3 小时的培养后, HUVEC 被观测到已经迁移到膜的下侧,并且使用高功率场(HPF) 分析(附图 13B) 进行计数。数据被绘制用于均值 $\pm$ SEM,并且用单向方差进行分析。 $*p<0.05$ VS 对照; $**p<0.001$ VS 控制; $***p<0.001$ VS VEGF-A。

[0449] 相对于既不使用 VEGF-A 也不使用 TD139 处理的对照 HUVEC 而言, VEGF-A 被观察到会导致 HUVEC 的趋化性增加。相比与仅用 VEGF 处理的 HUVEC, TD139 抑制在 HUVEC 中的 VEGF-A 诱导的趋化性。已经使用三维生长测定观测到,使用 TD139 显著抑制了在将 - 依赖性方法中的 VEGF-A 诱导的趋化性以及迁移。

[0450] 实施例 23. TD139 对于 HUVEC 是无毒

[0451] HUVEC 在 1% FBS/M199 中培养过夜,然后使用 0.1% DMSO, 0.1% TritonTMX-100(用于杀死的阳性对照) 或者 D139(5 μ M) 处理 3 个小时。对照 HUVEC 使用不含有 DMSO, TritonTMX-100 或者 TD139 的载体进行处理。

[0452] 经处理的 HUVEC 以及对照 HUVEC 的细胞发育能力使用钙黄绿素 AM 和 WST-1 的每一个进行确定,两种系统用于确定细胞发育能力。钙黄绿素 AM 加入到处理过的 HUVEC 的一个组中,其被培养 30 分钟(附图 14A)。处理的 HUVEC 的另一组用 WST-1 培养两个小时,其中所述 WST-1 是一种用于确定细胞增殖的四唑盐并且是一种指示剂或者细胞发育能力。数据以平均值 $\pm$ SEM 被绘制,并且用单向方差进行分析。 $***p<0.001$ VS 对照。

[0453] 对于每个与黄绿素 AM 或 WST-1 进行接触的处理的组,荧光发射通过分光光度计进行检测。钙黄绿素 AM 或 WST-1 系统二者都显示出类似的结果,特别是所述数据表明,相对于未被处理的对照 HUVEC 而言,用 TritonTMX-100 处理的 HUVEC 发育能力被降低。相对于对照 HUVEC 而言,要么使用 TD139 处理要么使用 DMSO 处理之后, HUVEC 发育能力没有被降低

(参见附图 14B)。因此,通过两种不同的试剂 (Calciin AM 和 WST-1) 的评估,TD139 对于 VEGF-A 诱导的生长和迁移的抑制作用并不是细胞发育能力的改变的结果。

[0454] 实施例 24. VEGFR2 表达不受 TD139 处理的影响

[0455] HUVEC 在 1% FBS/M199 中培养过夜,然后用含有 0.1% 的 DMSO 和 10 μ M TD139 的 PBS 处理六个小时。对照 HUVEC 没有用 TD139 处理。使用凝胶电泳 (4-20% SDS-PAGE 凝胶) 对细胞溶解产物进行分析,并用抗 VEGFR-2 抗体或者 β 肌动蛋白抗体对膜印迹进行探测。数据显示,在对照 HUVEC 和 TD139 处理的 HUVEC 每一个中,VEGFR2 表达水平和 β -actin 的表达水平是相似的。观测到,TD139 处理的 HUVEC 在中的 VEGFR2 蛋白表达上是具有很少或者没有影响 (附图 15)。

[0456] 本文实施例表明,TD139 靶向半乳糖凝集素 -1 蛋白和半乳糖凝集素 -3 蛋白,并且 TD139 改善在培养中的细胞的病理性血管发生,以及在组织中和受试者体内。使用本发明在这里所描述的半乳糖吡喃糖苷化合物半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -3 的抑制作用显示出其是一种对于眼部眼部血管生成以及对于多种与眼部血管生成相关的疾病病况有效的治疗和预防方案,包括年龄相关性黄斑变性以及角膜新血管生成。

[0457] 实施例 25: 递送半乳糖凝集素抑制剂用于防止眼部血管生成

[0458] 眼部血管生成: 给药所述化合物的可代替半乳糖凝集素抑制剂和途径已经被研究用于治疗或预防眼部血管生成。

[0459] 特异于半乳糖凝集素蛋白 (半乳糖凝集素 -1,半乳糖凝集素 -3,半乳糖凝集素 -7 和半乳糖凝集素 8) 或者编码半乳糖凝集素蛋白的核苷酸序列的抑制剂被制备。所述抑制剂包括抗体、小半乳糖苷化合物、siRNA、以及编码半乳糖凝集素活性的蛋白调节剂的载体。受试者通过静脉内、肌内、腹膜内、皮内、肺内、阴道内、口服、口腔、局部、舌下、鼻内,局部、以及眼内的方式给药所述抑制剂。对照受试者给药磷酸盐缓冲盐水或者不编码调节剂的空载体。如在这里所述的,动物被使用烧灼诱导从而具有眼部血管生成和 / 或新血管形成。动物被处死并且组织样本被移除,并且去除组织样本,并对包括内皮细胞生长的血管生成的标记进行分析。

[0460] 相比与对照受试者的结果而言,给药半乳糖凝集素抑制剂可以观察到受试者的眼部血管生成的预防的结果。相比与来自对照受试者的组织而言,来自半乳糖凝集素抑制剂处理的受试者的组织显示出眼部血管发生的降低的水平,用任意种类的所使用的抑制剂 (抗体、半乳糖吡喃糖苷、siRNA 和载体),以及给药的途径。

[0461] 实施例 26: 递送半乳糖凝集素抑制剂用于防止眼纤维化

[0462] 作为异常血管发生、伤口愈合、组织缺血、或炎症的结果,眼睛的眼部疾病会引起视力的灾难性损失 (Friedlander, M. 2007 J Clin Invest. 117(3):576 - 586, 其已通过引用的方式全部并入本文)。纤维化通常由物理创伤或代谢故障所引起,包括对炎症、局部缺血、和退行性疾病的响应。眼部纤维化涉及炎性细胞、纤维细胞,或者成纤维细胞样细胞的渗入到眼睛和眼部组织 (例如,视网膜),并且还涉及例如新血管生成和改变的血管通透性的状况。

[0463] 用于眼部纤维化的动物模型和体外模型使用多种不同的系统,包括基本的溶液 (如,氢氧化钠)、蛋白质 (例如,分散酶)、以及细胞如巨噬细胞丰富的腹腔渗出细胞。参见 Okada 等人,2001 年, American Journal of Pathology 178(6):2654-2664; Tan 等人,2012

年, *Molecular Vision* 18:887-900; 以及 Zhang 等人, 2012 年, *International Journal of Ophthalmology* 5(3):307-311, 上述文献的每一个都已通过引用全部并入本文中。

[0464] 本发明使用了应用于受试者眼睛的氢氧化钠溶液的眼部纤维化模型 (Okada 等人, 2001 病理学 178 的美国杂志 (6):2654 年至 2664 年) 用于测试在本发明中所描述的药物组合物的能力, 用来抑制、防止、或调节眼部纤维化。制备对于半乳糖凝集素蛋白 (半乳糖凝集素 -1, 半乳糖凝集素 -3, 半乳糖凝集素 -7 和半乳糖凝集素 8) 或者编码半乳糖凝集素蛋白的核苷酸序列特异性的抑制剂。所述抑制剂包括抗体、小乳糖苷化合物、siRNA、以及编码半乳糖凝集素活性的蛋白调节剂的载体。受试者通过选自静脉内, 肌内, 腹膜内, 皮内, 肺内, 阴道内, 口服, 口腔, 局部, 舌下, 鼻内, 局部, 或者眼内的途径进行给药。对照受试者给药磷酸盐缓冲的盐水或不用于编码调节剂的空载体。动物被诱导具备本发明所述的眼部纤维化。处死所述动物并且, 将所述组织样本去除并针对好友纤维细胞增殖的眼部纤维化的标记进行分析。

[0465] 相对于对照受试者的结果而言, 给药半乳糖凝集素抑制剂会观察到对于受试者眼部纤维化预防的结果。对于所使用的每种类型的抑制剂 (即, 抗体, 半乳糖糖苷, siRNA 和载体) 以及给药途径, 相对于来自对照受试者的组织而言, 来自半乳糖凝集素抑制剂处理的受试者的组织显示降低的眼部纤维化的水平。

[0466] 实施例 27: 半乳糖凝集素 3 特异性抑制剂降低角膜新血管生成

[0467] 角膜的新血管生成可能是由创伤、手术或疾病引起的疼痛、视力模糊、流泪、红肿、由极端感光度所引起。为了确定对于半乳糖凝集素 -3 的高特异性亲和力的抑制剂是否降低试者的眼睛中的新血管生成, 外伤的动物模型应用于正常受试者的角膜中, 含有很少或没有血管, 收到创伤从而诱导影响眼睛功能的角膜中的新血管生成。

[0468] 合成化合物并进行测试所述化合物是否特异性结合到半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -3 上。用于确定分子到半乳糖凝集素分子的连接的方法如下所述。参见 Brevet 等人, 2004 年 7 月 29 日公开的美国专利申请号为 2004/0147730 的申请。微量滴定板孔用重组的半乳糖凝集素 -1 或半乳糖凝集素 3 (10 微克 / 毫升, 50 微升 / 孔) 涂覆, 然后依次含有 PBS 和去垢剂的溶液进行洗涤。所述孔用 BSA 封闭, 并用洗涤溶液 / 缓冲液洗涤。每个化合物 32 (下面进一步描述)、TD139 (上问所述的)、或以非特异性凝集素的剂量被制备并一式两份添加 (100 μ L / 孔) 到孔中。对照孔仅包括 PBS。特异于半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 -3 的半乳糖凝集素受体 -HRP 复合物的量 (100 μ L / 孔, 1 毫克 / 毫升) 被分别加入孔中。将所述孔培养 1 个小时, 然后用缓冲液在室温下进行洗涤。使用 TMB 过氧化物酶底物试剂盒 (BioRad 公司) 进行辣根过氧化物酶酶反应。反应一小时后, 通过加入 1N 硫酸 (100 μ L / 孔) 是反应停止, 并且在 450nm 读取光密度。数据显示, 化合物 32 特异性结合于半乳糖凝集素 -3, 而不会结合于半乳糖凝集素 -1, 而 TD139 特异性结合于半乳糖凝集素 -1 和半乳糖凝集素 3。非特异性凝集素不结合于半乳糖凝集素 -1 或半乳糖凝集素 3 上。

[0469] 在 Nilsson 等人, 2013 年 8 月 1 日公开的国际公开号为 WO 2013/110704A1, PCT 申请号为 PCT/EP2013/051339 的专利中所识别的化合物 32, 并根据其所述的方法中进行制备, 其全部内容已通过引用在此并入本文作为参考。

[0470] 八周大的 C57BL/6 小鼠的角膜用硝酸银烧灼五秒钟。试验的受试者给药 10 μ l 化合物 32 的 (在 0.5% DMSO 中 100 μ M), 在第 0 天, 第 2 天, 第 4 天和第 6 天结膜下注射至眼

部。对照受试者的烧灼的角膜结膜下仅注射 DMSO 载体只（在 PBS 中 0.5% 的 DMSO），以及所述试验的受试者和对照受试者分别每天给药任一化合物 32 或对照 DMSO 媒介物的滴眼剂（5 微升（ μl ））。在第 7 天，切除角膜并对其进行分析。

[0471] 相比仅注射媒介物的对照受试者，结膜下注射化合物 32 半乳糖凝集素-3 抑制剂的受试者显示出显著较低的血管百分面积（29% 针对化合物 32 注射的受试者；42% 针对对照受试者）。获自两种独立结果的合并后的数据显示于附图 16A。附图 16B 显示了对于结膜下注射了对照物质或者化合物 32 的受试者所得到的灼烧眼睛的角膜的代表性荧光成像。相对于来自注射了 DMSO 和 PBS 对照载体的对照受试者的角膜而言，在结膜下注射化合物 32 的受试者的角膜中观测到显著较少的血管以及降低的量的新血管生成。在附图 16A 最后哦功能的数据被绘制为均值 $\pm$ SEM，并且采用 Student's t 检验进行分析。

[0472] 实施例 28: 用于诱导角膜纤维化和神经胶质瘤病的模型系统

[0473] 使用一种小鼠模型系统来确定的半乳糖凝集素-3 抑制剂 TD139 的功效，从而减少角膜纤维化和视网膜神经胶质增生（参见 Paranthan, RR 等人, 2011 年, Molecular Vision 17:1901-1908）。C57BJ/6 小鼠通过腹膜内的注射氯胺酮和甲苯噻嗪的混合物进行麻醉。角膜被通过应用丙美卡因（proparacaine）滴眼液进行局部麻醉。稀释 0.15M 氢氧化钠的滴剂（1.5 μl ）应用于每只小鼠的角膜中央 1 分钟。角膜立即用 PBS 进行大量洗涤，并且角膜和角膜缘上皮用 ALGEBRUSH™ 光学装置（Storz Ophthalmic Instruments, St. Louis, MO）轻轻除去。使用抗生素软膏涂覆每个角膜。在碱处理或手术后，连续 14 天注射一定量（10 μl ）的 TD139（50mM）或 PBS 媒介物。

[0474] 在使用碱处理之后，使用下述标准在第 7 天和第 14 天对角膜不透明度进行打分：0 指示清楚；1 表示不透明区 / 尺寸小于瞳孔；2 表明不透明面积大于瞳孔；3 表明不透明面积大于角膜的 2/3 面积；4 表明整个角膜是不透明的。在碱性手术之后，使用氯胺酮和甲苯噻嗪的混合物在第十四天处死受试者。切割出角膜和视网膜，并溶解于含 5mM 氟化钠，1mM 的 PMSF，1mM 的 DTT，20mM 的 HEPES，1mM EDTA，400mM 的 NaCl，1mM 的 EGTA，0.1% 的 NP-40 和蛋白酶抑制剂混合物（Roche）的冰的溶解缓冲液中。角膜蛋白（20 微克）和视网膜蛋白（30 μg 的）的等分试样装载到凝胶的每一泳道中，并转移到硝酸纤维素膜上。在 40℃ 温度下，用兔抗体特异性的小鼠 α -SMA（1:10,000；Abcam 公司）或者兔抗体特异性的 GFAP（标记视网膜胶质发现中间丝；1:50000；Abcam 公司）进行过夜印迹探测。对细胞膜进行洗涤，并用三羊抗兔的 IRDye 800CW 抗体（1:10,000；LI-COR 公司）进行培养，所述膜被扫描并用 Odyssey 成像系统（LI-COR 公司）进行量化。

[0475] 实施例 29: TD139 抑制角膜纤维化

[0476] SMA（平滑肌肌动蛋白）是角膜纤维化的标志物。使用如本发明的实施例 28 所描述的碱对眼睛进行处理，从而应用于一种模型系统中，用来确定 TD139 是否抑制角膜纤维化。在碱处理之后，受试者的眼睛进行结膜下给药 10 μl 的 50mM 的 TD139 连续 14 天。对照受试者结膜下只注射有对照 PBS 载体。在第 7 天和第 14 天对眼睛的不透明度进行评分。附图 17A 是在碱处理以及结膜下注射 TD 139 之后 7 天内的一系列眼睛的典型照片。使用活组织镜检查以及不透明度比例在碱处理之后进行 7 天的用碱处理的受试者的角膜混浊的量化，其中：0 表示没有混浊清楚的眼睛；1 表示不透明面积比瞳孔区域 / 地区小；2 表示不透明区域比瞳孔区域大；3 表示不透明度面积超过角膜区域三分之二；4 表示在整个角膜

区域不透明。(N = 9 只小鼠 / 组)。P<0.05。附图 17B。

[0477] 据观察可知,相比如注射对照 PBS 载体而言,TD139 的注射减少眼睛中的角膜混浊。角膜细胞的 western 印迹分析表明,相比注射 PBS 的对照受试者而言, α -SMA 的表达由于注射 TD139 而降低 30%。附图 17C。

[0478] 实施例 30:TD139 抑制神经胶质瘤病

[0479] 胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 是针对视网膜胶质细胞增生的标志指示视网膜胶质细胞增生的中间微丝指示的标志物。鼠的眼睛使用如本发明实施例 28 中所示的碱进行处理,用来确定 TD139 是否能够抑制视网膜胶质细胞增生。在碱处理后,将 50mM 的 TD139 的量 (10 μ L) 结膜下注射连续 14 天。对照受试者结膜下仅注射对照 PBS 载体。受试者被处死,并且收集视网膜并在溶解缓冲液中溶解。

[0480] 通过视网膜胶质细胞的溶解产物的 western 印记观测到,相对于给药 PBS 的对照受试者而言,TD139 降低了 GFAP 的表达。附图 18, TD139 给药降低了眼睛中视网膜胶质瘤增生 (附图 18),并且降低了眼部纤维化 (附图 17A-C)。

[0481] 如上所述,含有半乳糖凝集素抑制剂的组合物表现出能被有效地在用于眼睛病症和疾病治疗中应用,所述眼睛病症和疾病包括纤维化和在角膜和视网膜的神经胶质增生,并且能有效地抑制纤维化以及受损或患病组织中新血管生成和血管增生。因为半乳糖凝集素广泛地分布于不同的组织中,所以使用特定的基于吡喃糖的抑制剂用于选择性地靶向和抑制一个或多个半乳糖凝集素提供了最小化的不期望的共生作用并提供一种常规的眼部治疗的前景,而局部眼部环境将会通过在其他身体组织中的肿瘤和疾病中应用的半乳糖凝集素的调节或抑制容许某些疾病治疗的血管生成以及组织生长过程中预测的详细的组织学观察结果。

[0001]

序列表

<110> 塔夫斯大学
嘉勒托生物技术公司
N·潘吉瓦尼
陈玮笙
H·莱弗勒
U·尼尔森

<120> 使用半乳糖凝集素蛋白抑制剂用于治疗、调节或预防受试者的眼部血管生成或者纤维化的方法、组合物以及试剂盒

<130> 34724-124

<150> 61/726,998

<151> 2012-11-15

<160> 6

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 250

<212> PRT

<213> 现代人

<400> 1

```

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

```

[0002]

```

Pro Leu Ile Val Pro Tyr Asn Leu Pro Leu Pro Gly Gly Val Val Pro
    115                      120                      125
Arg Met Leu Ile Thr Ile Leu Gly Thr Val Lys Pro Asn Ala Asn Arg
    130                      135                      140
Ile Ala Leu Asp Phe Gln Arg Gly Asn Asp Val Ala Phe His Phe Asn
    145                      150                      155                      160
Pro Arg Phe Asn Glu Asn Asn Arg Arg Val Ile Val Cys Asn Thr Lys
                      165                      170                      175
Leu Asp Asn Asn Trp Gly Arg Glu Glu Arg Gln Ser Val Phe Pro Phe
    180                      185                      190
Glu Ser Gly Lys Pro Phe Lys Ile Gln Val Leu Val Glu Pro Asp His
    195                      200                      205
Phe Lys Val Ala Val Asn Asp Ala His Leu Leu Gln Tyr Asn His Arg
    210                      215                      220
Val Lys Lys Leu Asn Glu Ile Ser Lys Leu Gly Ile Ser Gly Asp Ile
    225                      230                      235                      240
Asp Leu Thr Ser Ala Ser Tyr Thr Met Ile
                      245                      250

```

<210> 2

<211> 136

<212> PRT

<213> 现代人

<400> 2

```

Met Ser Asn Val Pro His Lys Ser Ser Leu Pro Glu Gly Ile Arg Pro
1                      5                      10                      15
Gly Thr Val Leu Arg Ile Arg Gly Leu Val Pro Pro Asn Ala Ser Arg
    20                      25                      30
Phe His Val Asn Leu Leu Cys Gly Glu Glu Gln Gly Ser Asp Ala Ala
    35                      40                      45
Leu His Phe Asn Pro Arg Leu Asp Thr Ser Glu Val Val Phe Asn Ser
    50                      55                      60
Lys Glu Gln Gly Ser Trp Gly Arg Glu Glu Arg Gly Pro Gly Val Pro
65                      70                      75                      80
Phe Gln Arg Gly Gln Pro Phe Glu Val Leu Ile Ile Ala Ser Asp Asp
    85                      90                      95
Gly Phe Lys Ala Val Val Gly Asp Ala Gln Tyr His His Phe Arg His
    100                      105                      110
Arg Leu Pro Leu Ala Arg Val Arg Leu Val Glu Val Gly Gly Asp Val
    115                      120                      125
Gln Leu Asp Ser Val Arg Ile Phe
    130                      135

```

[0003]

<210> 3
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> 现代人

<400> 3

```

Pro Gly Leu Val Ala Leu Asn Leu Gly Leu Lys Pro Gly Lys Thr Leu
1           5           10          15
Thr Val Lys Gly Thr Val Ala Pro Lys Asn Ala Lys Arg Phe Ala Val
          20          25          30
Asn Leu Gly Lys Gly Ser Lys Glu Glu Asn Asp Leu Val Leu His Phe
        35          40          45
Asn Pro Arg Phe Asn Glu Ala His Gly Asp Gln Asn Thr Val Val Cys
        50          55          60
Asn Ser Lys Glu Asn Gly Asp Asn Glu Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu
65          70          75          80
Ala Ala Phe Pro Phe Gln Ala Gly Gln Pro Phe Glu Ile Ser Ile Ser
          85          90          95
Val Glu Glu Asp Lys Phe Lys Val Lys Val Asn Asp Gly His Glu Phe
        100         105         110
Glu Phe Pro His Arg Leu Lys Leu Glu Ala Val Gln Tyr Leu Gly Ile
        115         120         125
Lys Gly Asp Ile Lys Leu Thr Ser Ile Lys Phe
        130         135

```

<210> 4
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> 现代人

<400> 4

```

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

```

[0004]

Leu Ile Asn Glu Lys Trp Gly Arg Glu Glu Ile Thr Tyr Asp Thr Pro
 85 90 95
 Phe Lys Arg Glu Lys Ser Phe Glu Ile Val Ile Met Val Leu Lys Asp
 100 105 110
 Lys Phe Gln Val Ala Val Asn Gly Lys His Thr Leu Leu Tyr Gly His
 115 120 125
 Arg Ile Gly Pro Glu Lys Ile Asp Thr Leu Gly Ile Tyr Gly Lys Val
 130 135 140
 Asn Ile His Ser Ile Gly Phe Ser Phe Ser Ser Asp Leu Gln Ser Thr
 145 150 155 160
 Gln Ala Ser Ser Leu Glu Leu Thr Glu Ile Ser Arg Glu Asn Val Pro
 165 170 175
 Lys Ser Gly Thr Pro Gln Leu Arg Leu Pro Phe Ala Ala Arg Leu Asn
 180 185 190
 Thr Pro Met Gly Pro Gly Arg Thr Val Val Val Lys Gly Glu Val Asn
 195 200 205
 Ala Asn Ala Lys Ser Phe Asn Val Asp Leu Leu Ala Gly Lys Ser Lys
 210 215 220
 Asp Ile Ala Leu His Leu Asn Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ala Phe Val
 225 230 235 240
 Arg Asn Ser Phe Leu Gln Glu Ser Trp Gly Glu Glu Glu Arg Asn Ile
 245 250 255
 Thr Ser Phe Pro Phe Ser Pro Gly Met Tyr Phe Glu Met Ile Ile Tyr
 260 265 270
 Cys Asp Val Arg Glu Phe Lys Val Ala Val Asn Gly Val His Ser Leu
 275 280 285
 Glu Tyr Lys His Arg Phe Lys Glu Leu Ser Ser Ile Asp Thr Leu Glu
 290 295 300
 Ile Asn Gly Asp Ile His Leu Leu Glu Val Arg Ser Trp
 305 310 315
 <210> 5
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> 现代人

 <400> 5

 Met Met Leu Ser Leu Asn Asn Leu Gln Asn Ile Ile Tyr Asn Pro Val
 1 5 10 15
 Ile Pro Phe Val Gly Thr Ile Pro Asp Gln Leu Asp Pro Gly Thr Leu
 20 25 30
 Ile Val Ile Arg Gly His Val Pro Ser Asp Ala Asp Arg Phe Gln Val
 35 40 45

[0005]

```

Asp Leu Gln Asn Gly Ser Ser Met Lys Pro Arg Ala Asp Val Ala Phe
 50                      55                      60
His Phe Asn Pro Arg Phe Lys Arg Ala Gly Cys Ile Val Cys Asn Thr
65                      70                      75                      80
Leu Ile Asn Glu Lys Trp Gly Arg Glu Glu Ile Thr Tyr Asp Thr Pro
                      85                      90                      95
Phe Lys Arg Glu Lys Ser Phe Glu Ile Val Ile Met Val Leu Lys Asp
100                    105                    110
Lys Phe Gln Val Ala Val Asn Gly Lys His Thr Leu Leu Tyr Gly His
115                    120                    125
Arg Ile Gly Pro Glu Lys Ile Asp Thr Leu Gly Ile Tyr Gly Lys Val
130                    135                    140
Asn Ile His Ser Ile Gly Phe Ser Phe Ser Ser Asp Leu Gln Ser Thr
145                    150                    155                    160
Gln Ala Ser Ser Leu Glu Leu Thr Glu Ile Ser Arg Glu Asn Val Pro
165                    170                    175
Lys Ser Gly Thr Pro Gln Leu Pro Ser Asn Arg Gly Gly Asp Ile Ser
180                    185                    190
Lys Ile Ala Pro Arg Thr Val Tyr Thr Lys Ser Lys Asp Ser Thr Val
195                    200                    205
Asn His Thr Leu Thr Cys Thr Lys Ile Pro Pro Met Asn Tyr Val Ser
210                    215                    220
Lys Arg Leu Pro Phe Ala Ala Arg Leu Asn Thr Pro Met Gly Pro Gly
225                    230                    235                    240
Arg Thr Val Val Val Lys Gly Glu Val Asn Ala Asn Ala Lys Ser Phe
245                    250                    255
Asn Val Asp Leu Leu Ala Gly Lys Ser Lys Asp Ile Ala Leu His Leu
260                    265                    270
Asn Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ala Phe Val Arg Asn Ser Phe Leu Gln
275                    280                    285
Glu Ser Trp Gly Glu Glu Glu Arg Asn Ile Thr Ser Leu Pro Phe Ser
290                    295                    300
Pro Gly Met Tyr Phe Glu Met Ile Ile Tyr Cys Asp Val Arg Glu Phe
305                    310                    315                    320
Lys Val Ala Val Asn Gly Val His Ser Leu Glu Tyr Lys His Arg Phe
325                    330                    335
Lys Glu Leu Ser Ser Ile Asp Thr Leu Glu Ile Asn Gly Asp Ile His
340                    345                    350
Leu Leu Glu Val Arg Ser Trp
355

```

<210> 6

<211> 135

[0006]

<212> PRT

<213> 现代人

<400> 6

Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Cys Leu Arg Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val
20 25 30
Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Cys Leu His Phe Asn Pro
35 40 45
Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Cys Asn Ser Lys
50 55 60
Asp Gly Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu Ala Val Phe Pro Phe
65 70 75 80
Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Cys Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asn
85 90 95
Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg
100 105 110
Leu Asn Leu Glu Ala Ile Asn Tyr Met Ala Ala Asp Gly Asp Phe Lys
115 120 125
Ile Lys Cys Val Ala Phe Asp
130 135

人半乳糖凝集素-3 序列

人半乳糖凝集素-3 (SEQ ID NO.1):

```
1  MADNFSLHDA LSGSGNPNPQ GWPGAWGNQP AGAGGYPGAS YPGAYPGQAP PGAYPGQAPP
61  GAYHGAPGAY PGAPAPGVYP GPPSGPGAYP SSGQPSAPGA YPATGPGYAP AGPLIVPYNL
121 PLPGGVVPRM LITILGTVKP NANRIALDFQ RGNDVAFHFN PRFNENNRV IVCNTKLDNN
181 WGREERQSVF PFESGKPFKI QVLVEPDHFK VAVNDAHLLQ YNHRVKKLNE ISKLGISGDI
241 DLTSASYTMI
```

氨基酸组合物 (250 氨基酸, 分子量: 26174.2 Da)

aa	#	摩尔%	wt%
A Ala	27	10.80	7.33
C Cys	1	0.40	0.39
D Asp	9	3.60	3.96
E Glu	6	2.40	2.96
F Phe	9	3.60	5.06
G Gly	34	13.60	7.41
H His	6	2.40	3.14
I Ile	10	4.00	4.32
K Lys	8	3.20	3.92
L Leu	15	6.00	6.49
M Met	3	1.20	1.51
N Asn	18	7.20	7.85
P Pro	36	14.40	13.36
Q Gln	9	3.60	4.41
R Arg	9	3.60	5.37
S Ser	14	5.60	4.66
T Thr	6	2.40	2.32
V Val	14	5.60	5.30
W Trp	3	1.20	2.13
Y Tyr	13	5.20	8.11

图 1

人半乳糖凝集素-7 序列

人半乳糖凝集素-7 (SEQ ID NO.2):

```
1 MSNVPHKSSL PEGIRPGTVL RIRGLVPPNA SRFHVNLLCG EEQGSDAALH FNPRLDTSEV
61 VFNSKEQGSW GREERGPGVP FQRGQPFEVL IIASDDGFKA VVGDAQYHHF RHRLPLARVR
121 LVEVGGDVQL DSVRIF
```

氨基酸组合物 (136 氨基酸, 分子量: 15059.1 Da)

aa	#	摩尔%	wt%
A Ala	7	5.15	3.30
C Cys	1	0.74	0.68
D Asp	7	5.15	5.35
E Glu	9	6.62	7.72
F Phe	8	5.88	7.82
G Gly	14	10.29	5.31
H His	6	4.41	5.46
I Ile	5	3.68	3.76
K Lys	3	2.21	2.55
L Leu	12	8.82	9.02
M Met	1	0.74	0.87
N Asn	5	3.68	3.79
P Pro	10	7.35	6.45
Q Gln	6	4.41	5.11
R Arg	13	9.56	13.48
S Ser	10	7.35	5.78
T Thr	2	1.47	1.34
V Val	15	11.03	9.88
W Trp	1	0.74	1.24
Y Tyr	1	0.74	1.08

图 2

半乳糖凝集素-3 家族的比对

CLUSTAL W (1.81) 多序列比对

```

序列 1: gi|2385452|dbj|BAA22164.1|      250 aa
序列 2: gi|1363962|pir|JC4300          242 aa
序列 3: gi|1389600|gb|AAB02856.1|      262 aa
序列 4: gi|535083|emb|CAA55479.1|      245 aa

序列 (2:3) 比对的 . 分数 : 58
序列 (1:2) 比对的 . 分数 : 82
序列 (2:4) 比对的 . 分数 : 78
序列 (3:4) 比对的 . 分数 : 52
序列 (1:3) 比对的 . 分数 : 55
序列 (1:4) 比对的 . 分数 : 84

组 1: 序列 : 2      分数 :4935
组 2: 序列 : 3      分数 :4768
组 3: 序列 : 4      分数 :3929
比对分数 6348

人半乳糖凝集素-3      -----MADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPGAWG-NQPAG 32
仓鼠半乳糖凝集素-3    -----MADGFSLNDALAGSGNPNPQGWPGAWG-NQP-G 31
家兔半乳糖凝集素-3    -----MADGFSLNDALSGSGHPPNQGWPWPWG-NQPAG 32
鸡半乳糖凝集素-3      MQAMKARCWQPHWMLPLLPLSSPLHPQLSDALPAHNPGAPPPQGWNRPPG 50
                        :. . .*: *:;. . ** . **:**

人半乳糖凝集素-3      AGGYPG-ASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPG--APGAYPGAPAPGVY 79
仓鼠半乳糖凝集素-3    AGGYPG-ASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGPTAPGAYPG-PAPGAY 79
家兔半乳糖凝集素-3    PGGYPG-AAYPGAYPGHAP-GAYPGQAPPGFYPG-----PG--AHGAY 71
鸡半乳糖凝集素-3      PGAFPAYPGYPGAYP--GAPGPYPG--APGPHHG--PPGPYPG-GPPGPY 93
                        .*:*. .***** ..*.*** .*:; * ** . **

人半乳糖凝集素-3      PGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPA--TCPYG-APAGPLIVPYNLPLPGGV 126
仓鼠半乳糖凝集素-3    PGQPGASGAYP----SAPGAYPA--AGPYG-APTGALTVPYKPLLAGGV 121
家兔半乳糖凝集素-3    PGQPGGPGAYPSPGQPSGAGAYPG--ASPYS-ASAGPLVPYDLPPLGGV 118
鸡半乳糖凝集素-3      PGGP--PGPYPG---GPPGPYPGGPTAPYSEAPAAPLKVPYDLPPLAGL 137
                        ** * .*:** . .*:** .:*** .*:..* ***.***.**:

人半乳糖凝集素-3      VPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENNRRRVIVCNTK 176
仓鼠半乳糖凝集素-3    MPRMLITIMGTVKPNANRIILNFLRGNDIAFHFNPRFNENNRRRVIVCNTK 171
家兔半乳糖凝集素-3    MPRMLITIVGTVKPNANRLALDFKRGNDVAFHFNPRFNENNRRRVIVCNTK 168
鸡半乳糖凝集素-3      MPRLITITITGTVNSNPNRFSLDFKRGQDIAFHFNPRFKEDHKRVIVCNSM 187
                        :*:***** **:*.*:*: *: * **:*:*****:*:*:*****:

人半乳糖凝集素-3      LDNNWGREERQS-VFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRV 225
仓鼠半乳糖凝集素-3    QDNNWGREERQS-AFPFESGRPFKIQVLVEADHFKVAVNDAHLLQYNHRM 220
家兔半乳糖凝集素-3    VDNNWGREERQT-TFPFEIGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRM 217
鸡半乳糖凝集素-3      FQNNWGREERTAPRPFEPGTPEKQLQVLCEGDHFKVAVNDAHLLQFNFRE 237
                        :****:*** : ***** * **:*** * *****:***:

人半乳糖凝集素-3      KKLNEISKLGISGDIDLTSAASYTMI 250
仓鼠半乳糖凝集素-3    KNLREINQMEISGDITLTSAAPTMI 245
家兔半乳糖凝集素-3    RNLKEINKLGISGDIQLTSASHAMI 242
鸡半乳糖凝集素-3      KKLNGITKLCIAGDITLTSLVLTSMI 262
                        :*: .*:*: *:*** **: .**

```

图 3

半乳糖凝集素-7家族的比对

CLUSTAL W (1.81) 多序列比对

```

序列 1: gi|2135152|pir||I55469          136 aa
序列 2: gi|3915736|sp|P97590|LEG7_RAT    136 aa
序列 3: gi|3913978|sp|O54974|LEG7_MOUS   136 aa

```

```

序列 (2:3) 比对的 . 分数 : 88
序列 (1:2) 比对的 . 分数 : 72
序列 (1:3) 比对的 . 分数 : 78

```

```

组 1: 序列: 2      分数 : 2837
组 2: 序列: 3      分数 : 2646
比对分数 2151

```

```

鼠半乳糖凝集素-7      MSATHHK TPLPQGVR LGTVMR IRGVVPDQAGRFHVNLLCGEEQEADAALH 50
小鼠半乳糖凝集素-7    MSATHHK TSLPQGV RVGTVMR IRGLVPDQAGRFHVNLLCGEEQGADAALH 50
人半乳糖凝集素-7      MSNVPHK SSLPEGIR PGTVLRI RGLVPPN ASRFHVNLLCGEEQGS DAALH 50
** . ** : ** : * : * *** : *** : * : * . ***** : *****

鼠半乳糖凝集素-7      FNPRLDTSEVVFNTKQQGKWGREERGTGIPFQRGQPFVLLIITTEEGFKT 100
小鼠半乳糖凝集素-7    FNPRLDTSEVVFNTKQQGKWGREERGTGIPFQRGQPFVLLIATEEGFKA 100
人半乳糖凝集素-7      FNPRLDTSEVVFNSKEQGSWGREERGPGVFPFQRGQPFVLLIASDDGFKA 100
***** : * : * . ***** . * . ***** : * : : : * : * :

鼠半乳糖凝集素-7      VIGDDEYLHFHHRMPSSNVR SVEVG DVQLHSVKIF 136
小鼠半乳糖凝集素-7    VVG DDEYLHFHRLPPARVRLVEVG DVQLHSLNIF 136
人半乳糖凝集素-7      VVGDAQYHHFRHRLPLARVRLVEVG DVQLDSVRIF 136
* : * * : * * : * : * : * . * * ***** . * : * *

```

图 4

人半乳糖凝集素-3的PROSITE分析

人半乳糖凝集素-3的PROSITE扫描 (SEQ ID NO.1)

N-糖基化位点 (PROSITE: PS00001)

4-7 NFSL

蛋白激酶C磷酸化位点 (PROSITE: PS00005)

137-139 TVK

194-196 SGK

蛋白激酶II磷酸化位点 (PROSITE: PS00006)

6-9 SLHD

175-178 TKLD

N-肉豆蔻位点 (PROSITE: PS00008)

24-29 GAWGNQ

27-32 GNQPAG

34-39 GGYPGA

43-48 GAYPGQ

52-57 GAYPGQ

61-66 GAYPGA

65-70 GAPGAY

68-73 GAYPGA

Galaptin 签名序列 (PROSITE: PS00309)

181-200 WGREERQSVFPFESGKPFKI

图 5

人半乳糖凝集素-7 的PROSITE 分析

人半乳糖凝集素-7 的PROSITE 扫描 (SEQ ID NO.2)

N-糖基化位点 (PROSITE: PS00001)

29-32 NASR

蛋白激酶 C 磷酸化位点 (PROSITE: PS00005)

132-134 SVR

蛋白激酶II磷酸化位点 (PROSITE: PS00006)

9-12 SLPE

N-肉豆蔻位点 (PROSITE: PS00008)

13-18 GIRPGT

44-49 GSDAAL

Galaptin 签名序列 (PROSITE: PS00309)

70-89 WGREERGPGVPFQRGQPFEV

图 6

人半乳糖凝集素-3的PFAM 分析

PFAM 7.0 HMM 序列比对

PF00337 (半乳糖结合凝集素域) 分数 217.2, E = 1.3e-62

```

PF00337      *->pglvalnlgkpgkltltVkGtVapknakrFavNlgkgskeEndlvLH
                p+  +l++g+ p++ +t+ GtV p na+r a+++ +g  nd+++H
人半乳糖凝集素-3  117  PYNLPLPGGVVPRMLITILGTVKP-NANRIALDFQRG----NDVAFH 158

PF00337      fNPRFneaHGDqntvVcNSkenGDNeWGtEqReaafPFqaGqpFeisIsv
                fNPRFne +   +++VcN+k+++ +WG E+r+ fPF++G+pF+i++ v
人半乳糖凝集素-3  159  FNPRFNENN--RRVIVCNTKLDN--NWGREERQSVFPFESGKPFKIQVLV 204

PF00337      eedkfkVkvndghefeFphRlk.leavqyLgikGDikltsikf<-*
                e+d+fkV+vnd+h+++++hR k+l ++++Lgi+GDi+ltS+++
人半乳糖凝集素-3  205  EPDHFkVAVNDAHLLQYNHRVKKLNEISKLGISGDIDLTSASY 247

```

图 7

人半乳糖凝集素-7 的 PFAM 分析

PFAM 7.0 HMM 序列比对

PF00337 (半乳糖结合凝集素域) 分数 124.0, E = 1.6e-34

```

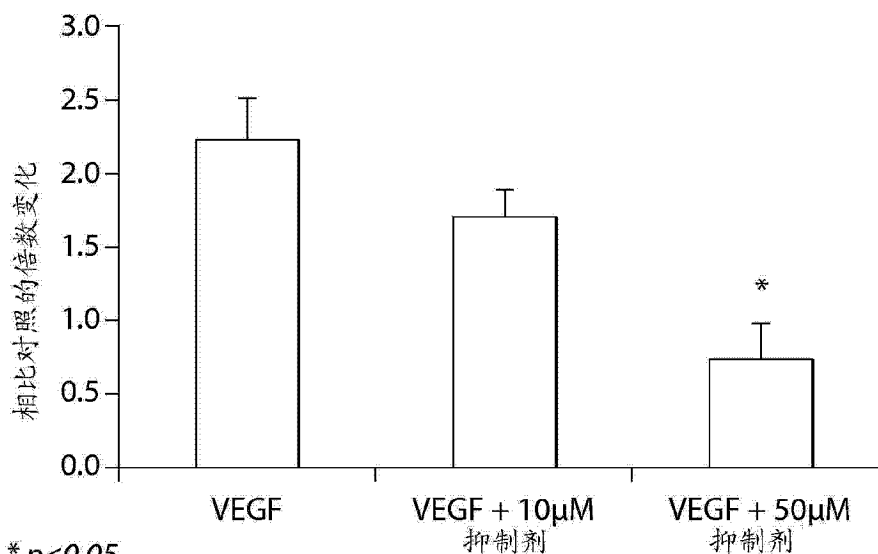
PF00337      *->pglvalnlgkpgkltltVkGtVapknakrFavNlgkgskeEndlvLH
              p  + l++g +pG  l+++G+V p na rF+vNl+ g    +d +LH
人半乳糖凝集素-7 5  PHKSSLPEGIRPGTVLRIRGLVPP-NASRFHVNLGCGEEQGSDAALH 50

PF00337      fNPRFneaHGDqntvVcNSkenGDNeWGtEqReaafPFqaGqpFeisIsv
              fNPR + +      vV NSke G  +WG E+R +  PFq+GqpFe+ I
人半乳糖凝集素-7 51 FNPRLDTSE-----VVFNSKEQG--SWGREERGPGVPFQRGQPFEVLIIA 93

PF00337      eedkfkVkvndghefeFphRlkleavqyLgikGDikltsikf<-*
              d fk  v d+ + +F hRl+l +v  +++ GD+ l+s+ +
人半乳糖凝集素-7 94 SDDGFKAVVGDAQYHHFRHRLPLARVRLVEVGGDVQLDSVRI 135

```

图 8



统计分析

VEGF vs 10μm 抑制剂

0.217 不显著

VEGF vs 50μm 抑制剂

0.019 p<0.05

图 9A

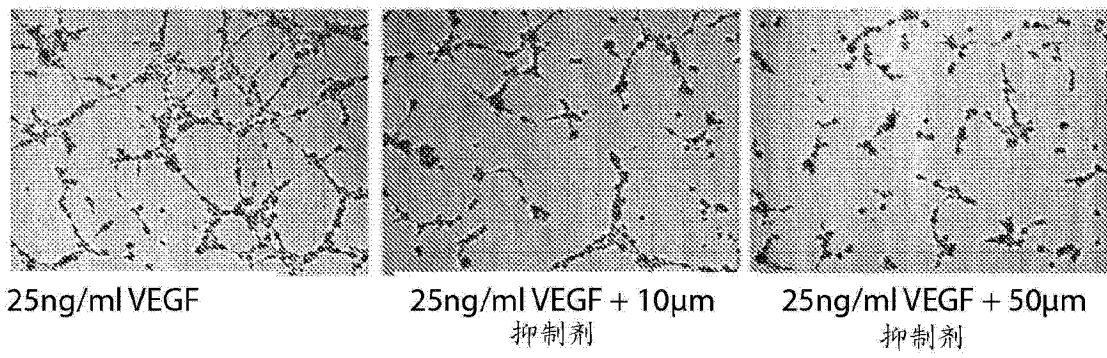


图 9B

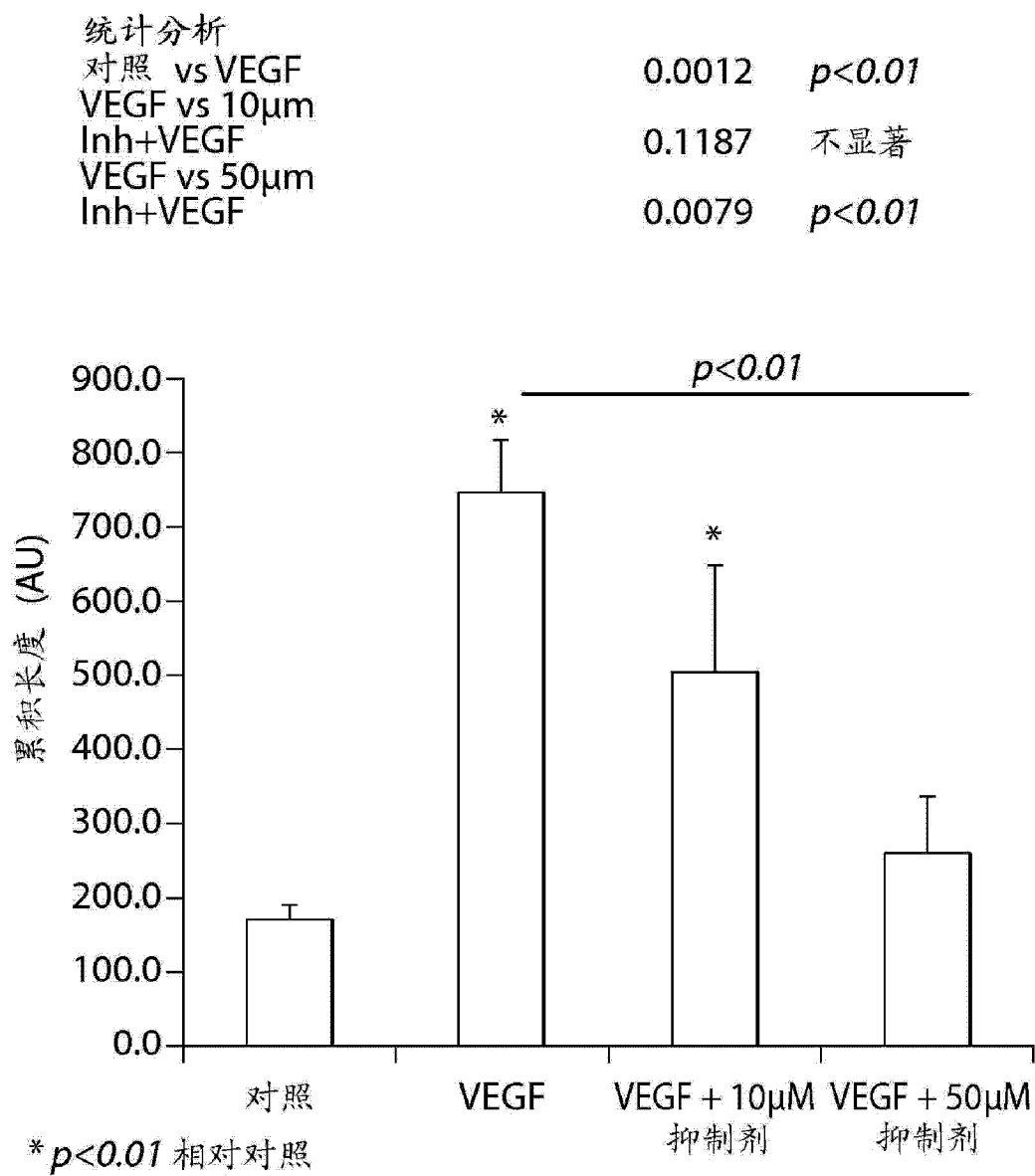


图 10A

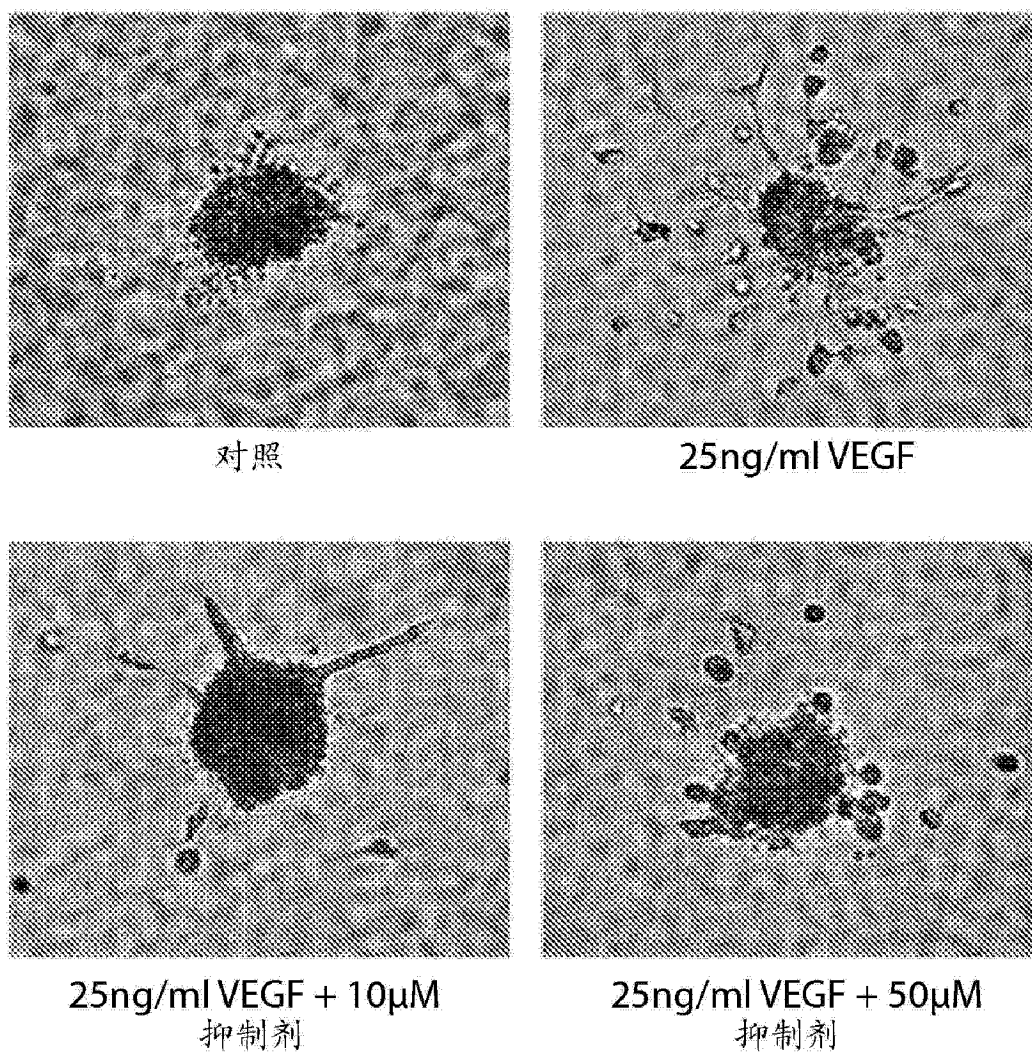


图 10B

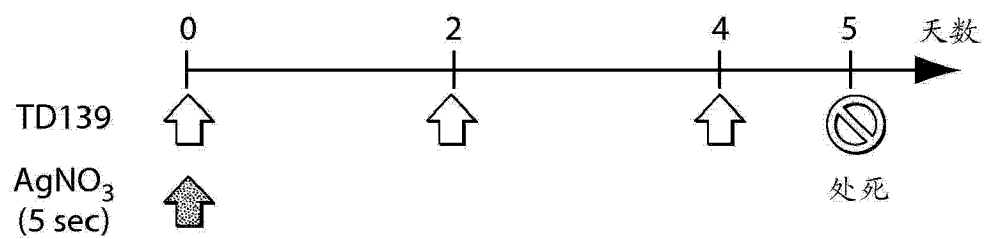


图 11A

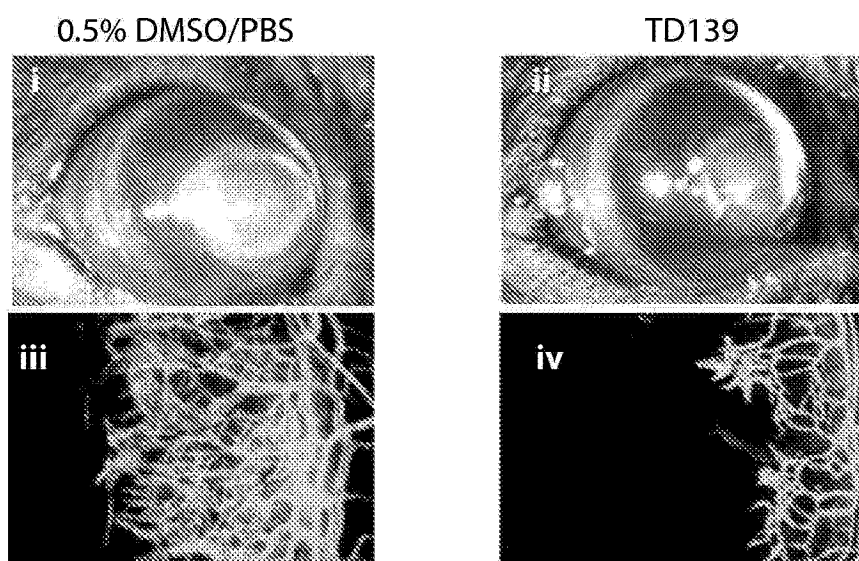


图 11B

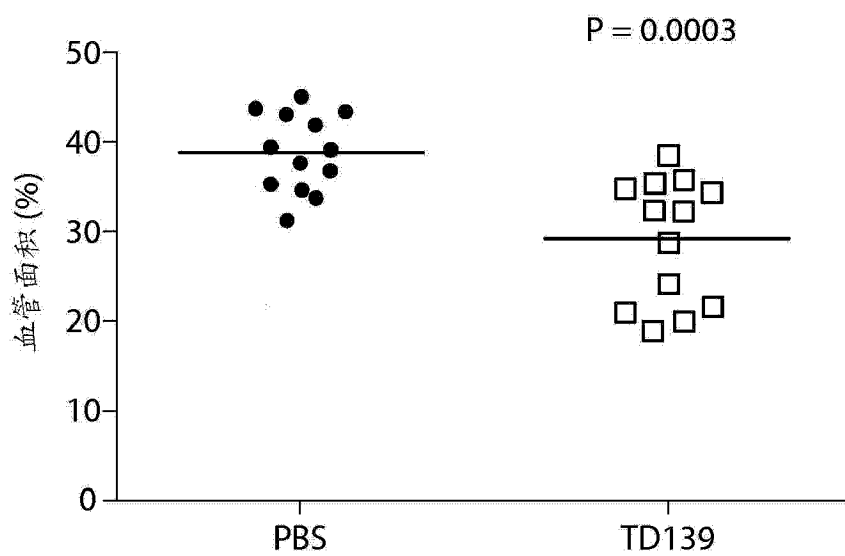


图 11C

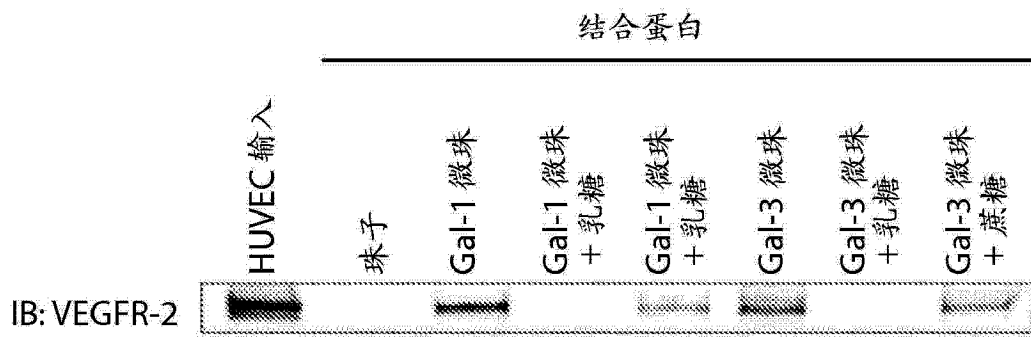


图 12

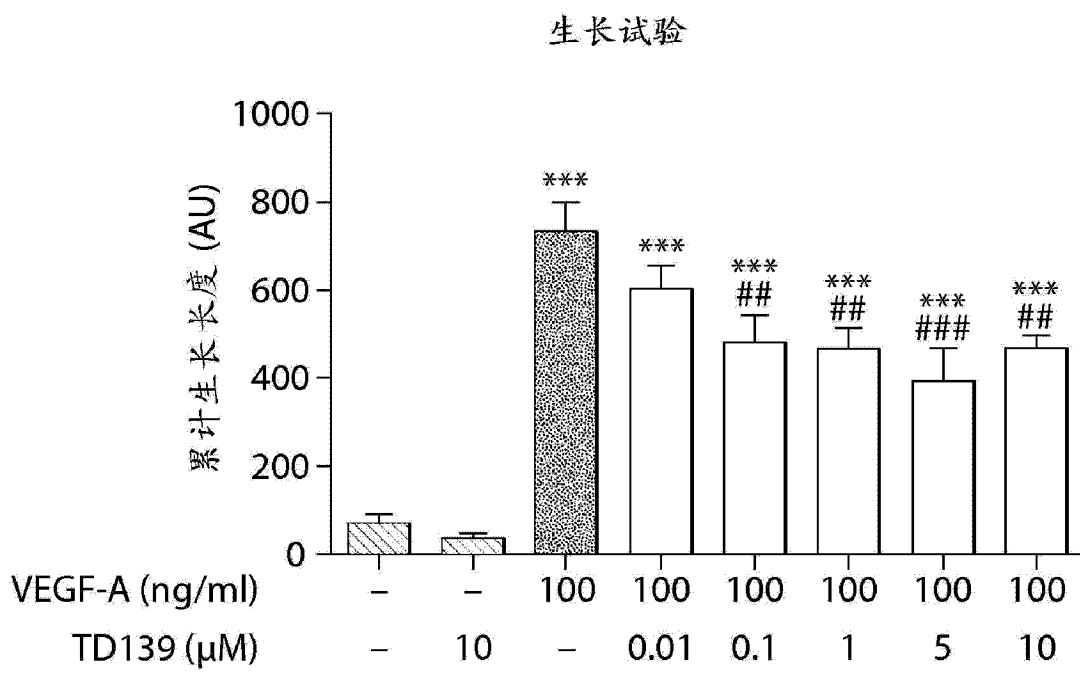


图 13A

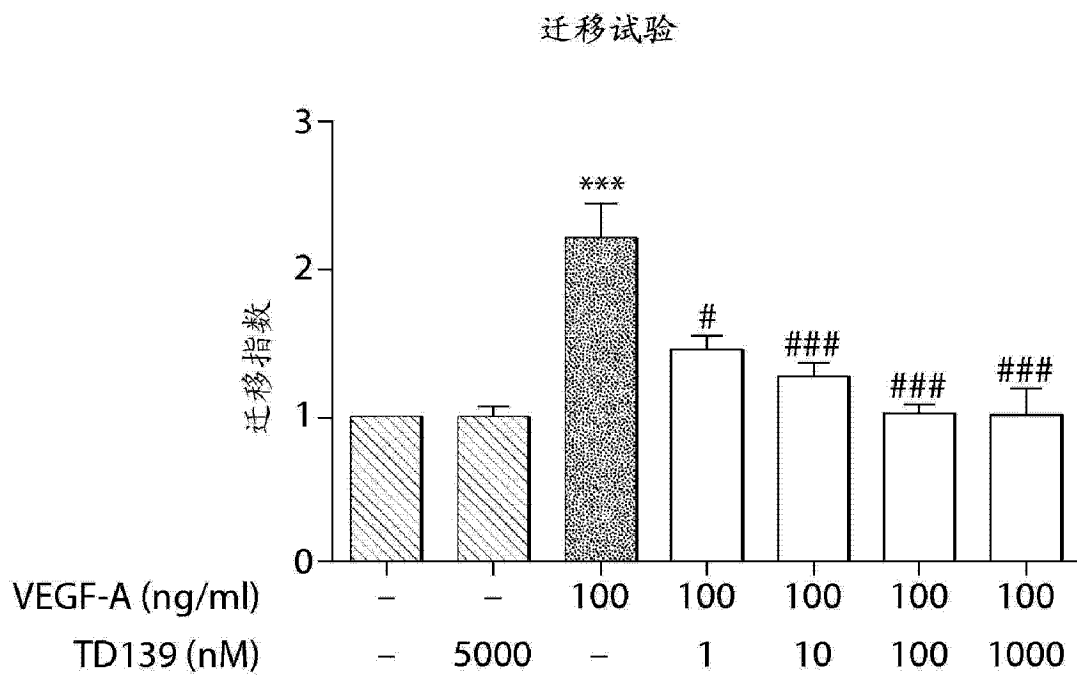


图 13B

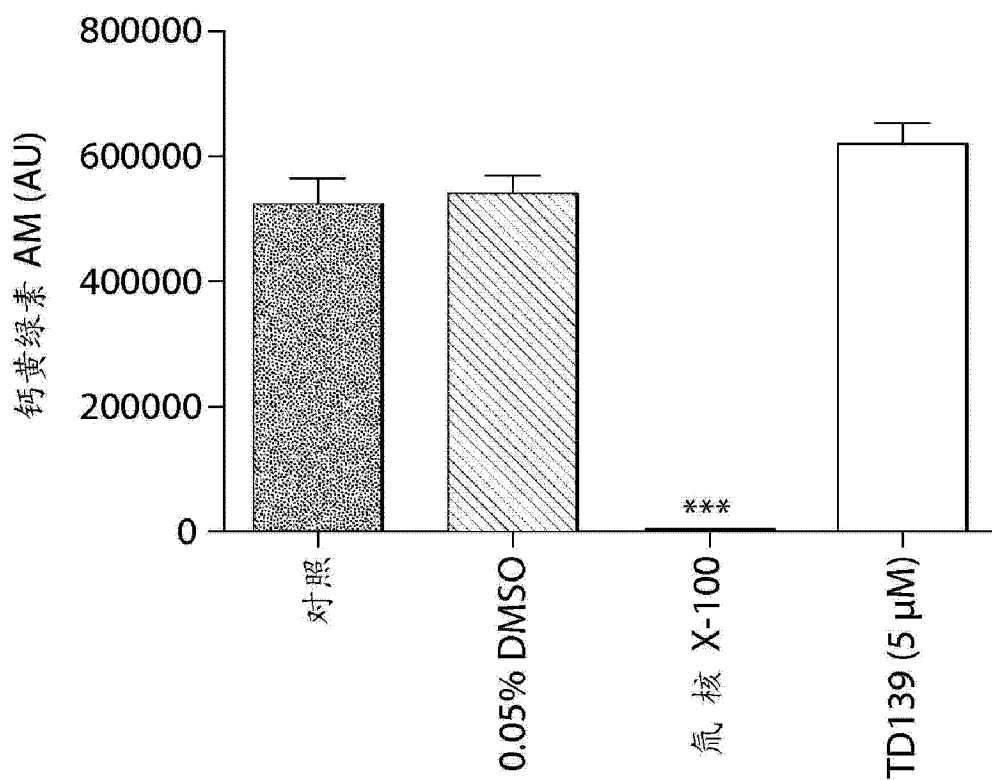


图 14A

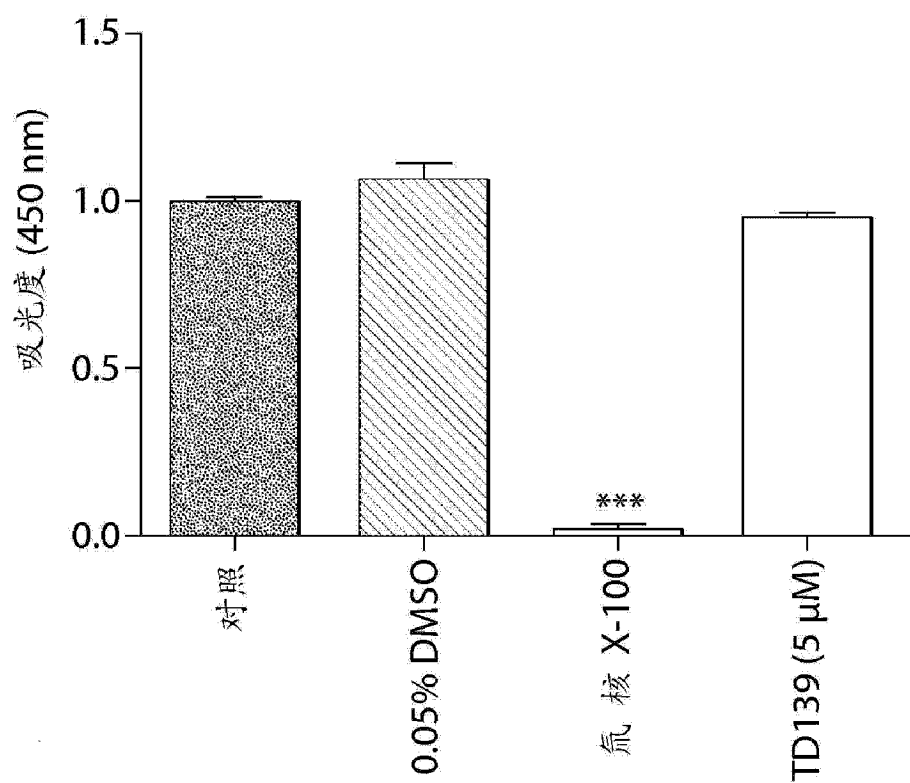


图 14B

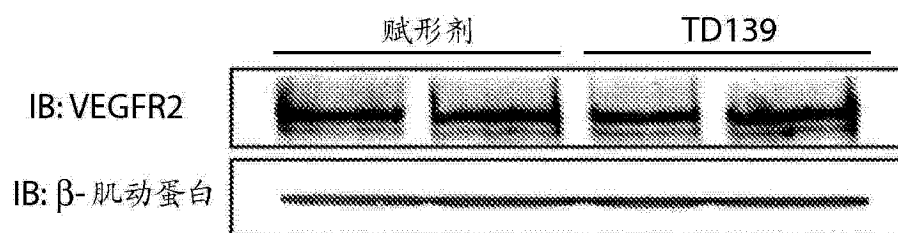


图 15

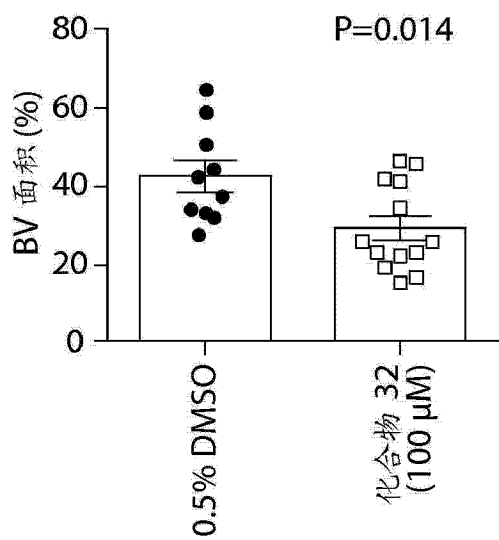


图 16A

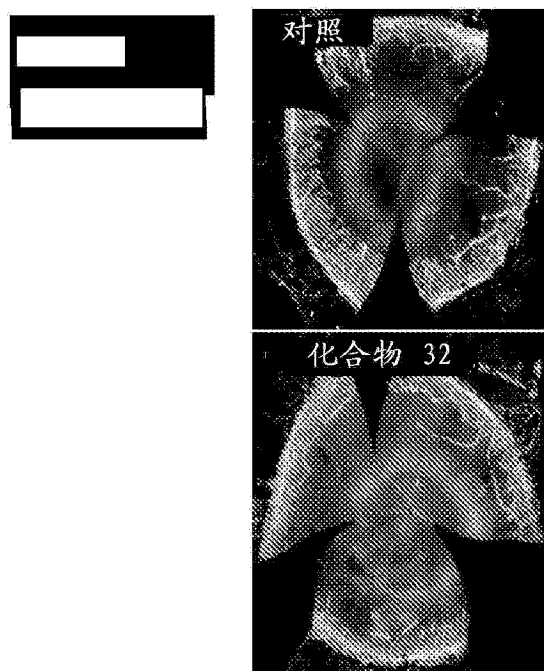


图 16B

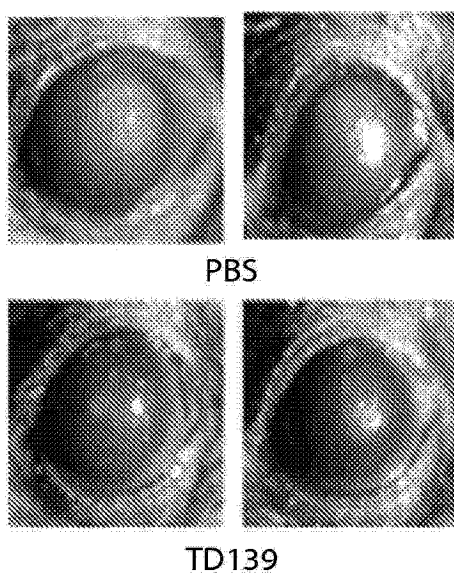


图 17A

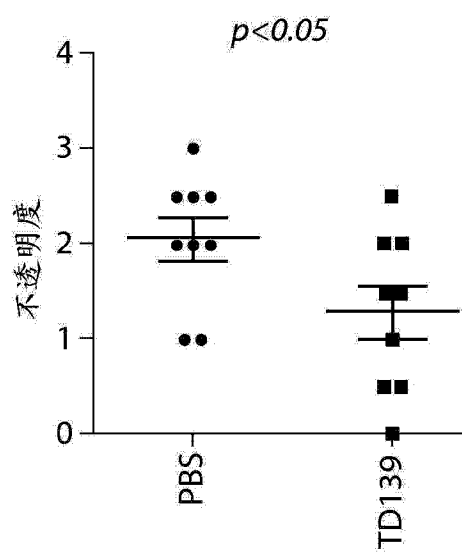


图 17B

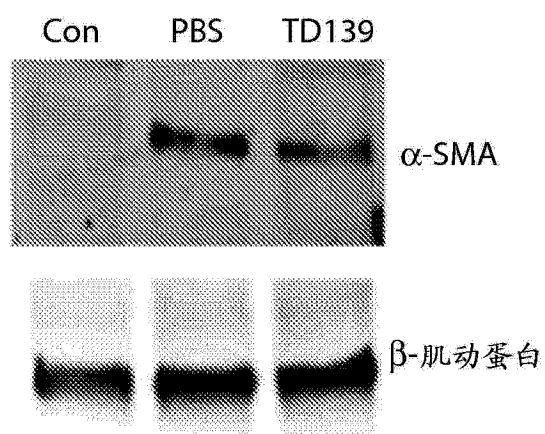


图 17C

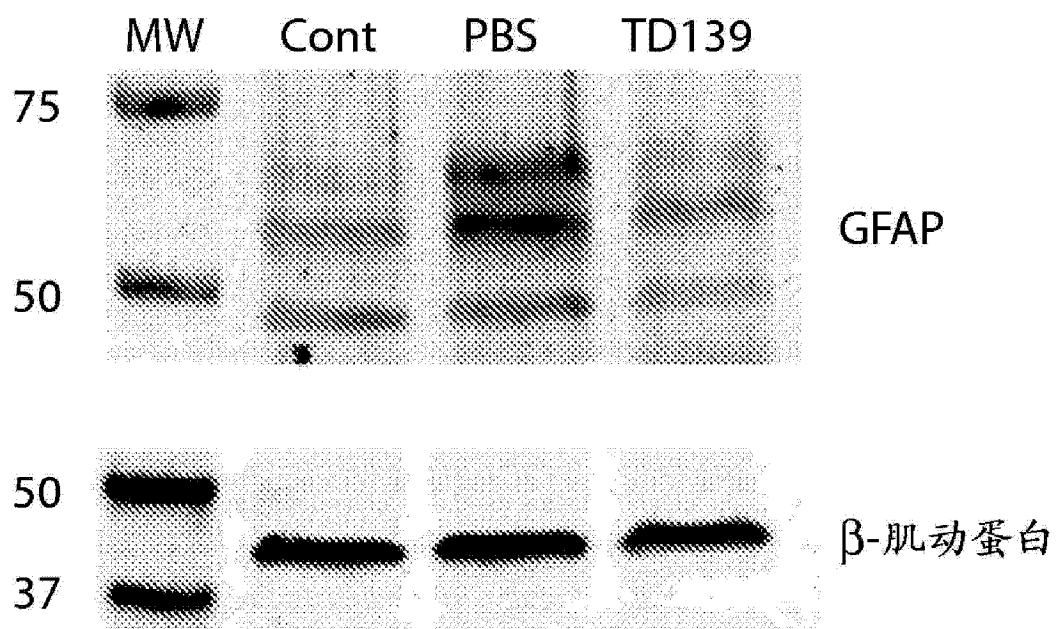


图 18