



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111050778 B

(45) 授权公告日 2024.09.10

(21) 申请号 201880043683.5

(22) 申请日 2018.07.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111050778 A

(43) 申请公布日 2020.04.21

(30) 优先权数据
62/530,066 2017.07.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/041280 2018.07.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/010490 EN 2019.01.10

(73) 专利权人 斯米克IP有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 约翰·埃里克·帕代里

格伦·普雷斯特维奇

凯瑟琳·艾利森·斯图尔特

哈沙·卡布拉 埃尔维斯·伊克瓦

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理
事务所(普通合伙) 44348
专利代理师 何锦标 杨娅莉

(51) Int. Cl.
A61K 31/737 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61L 33/08 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2016331841 A1, 2016.11.17

审查员 张茜

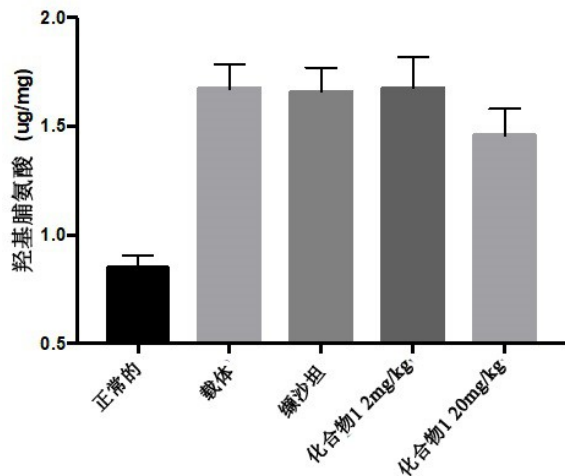
权利要求书2页 说明书47页 附图11页

(54) 发明名称

具有化学修饰的骨架的生物缀合物

(57) 摘要

本文提供了包含共价地结合至化学修饰的聚糖骨架的胶原结合肽的合成生物缀合物、包含其的组合物及其用途。



1. 一种生物缀合物,其包括至少一个肽,其中所述肽包括共价地键合至化学硫酸化的透明质酸的胶原结合单元,

其中所述化学硫酸化的透明质酸的分子量大于150kDa,

其中所述化学硫酸化的透明质酸包含15%至30%的肽官能化,

其中所述化学硫酸化的透明质酸已经被化学硫酸化至2.0至3.0的硫酸化度,并且其中所述肽由氨基酸序列GQLYKSILYSGSGSRR组成。

2. 根据权利要求1所述的生物缀合物,其中所述化学硫酸化的透明质酸的分子量为150至1000kDa。

3. 根据权利要求1所述的生物缀合物,其中所述化学硫酸化的透明质酸的分子量为150至750kDa。

4. 根据权利要求1所述的生物缀合物,其中所述化学硫酸化的透明质酸的分子量为150至350kDa。

5. 根据权利要求1所述的生物缀合物,其中所述化学硫酸化的透明质酸的分子量为200至400kDa。

6. 根据权利要求1所述的生物缀合物,其中所述化学硫酸化的透明质酸是羧甲基衍生物。

7. 根据权利要求1所述的生物缀合物,其中所述化学硫酸化的透明质酸是化学硫酸化的羧甲基透明质酸、或其衍生物。

8. 根据权利要求1-7的任一项所述的生物缀合物,其中所述肽官能化百分比(%)由所述化学硫酸化的透明质酸上被肽官能化的二糖单元的百分比确定。

9. 根据权利要求1-7的任一项所述的生物缀合物,其中所述化学硫酸化的透明质酸包含15%的肽官能化、或20%的肽官能化、或25%的肽官能化、或30%的肽官能化。

10. 根据权利要求1-7的任一项所述的生物缀合物,其中所述肽的胶原结合单元以小于1mM的解离常数(K_d)结合至胶原。

11. 根据权利要求1-7的任一项所述的生物缀合物,其包括1至25个肽、或5至150个肽、或75至125个肽、或100个肽。

12. 根据权利要求1-7的任一项所述的生物缀合物,其中所述化学硫酸化的透明质酸不包含氧化裂解的糖单元。

13. 根据权利要求1-7的任一项所述的生物缀合物,其中酰肼基团任选地经由间隔物键合至所述肽的C末端。

14. 根据权利要求1-7的任一项所述的生物缀合物,其中酰肼基团任选地经由间隔物键合至所述肽的N末端。

15. 根据权利要求1-7的任一项所述的生物缀合物,其中酰肼基团经由间隔物键合至C末端,所述间隔物包含一个或多个选自甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、赖氨酸和丝氨酸的氨基酸。

16. 根据权利要求14所述的生物缀合物,其中所述间隔物包含序列甘氨酸-甘氨酸、丝氨酸-甘氨酸、赖氨酸-精氨酸、精氨酸-精氨酸、以及甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸。

17. 一种组合物,其包括前述任一项权利要求所述的生物缀合物,其中每个透明质酸的平均肽数目大于50个。

18. 一种组合物,其包括权利要求1-16的任一项所述的生物缀合物,其中每个透明质酸

的平均肽数目为50个至150个。

19. 一种组合物,其包括权利要求1-16的任一项所述的生物缀合物,其中每个透明质酸的平均肽数目为100个。

20. 一种组合物,其包括权利要求1-16的任一项所述的生物缀合物或权利要求17-19的任一项所述的组合物,以及含有胶原结合单元的额外的肽,其中所述额外的肽非共价地结合至所述生物缀合物,并且其中所述组合物包含基于透明质酸中的二糖单元的数目的1%至200%的肽。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述额外的肽与所述生物缀合物离子结合。

22. 有效量的权利要求1-16的任一项所述的生物缀合物或权利要求17-21的任一项所述的组合物在制备用于治疗有需要的患者中的肝纤维化的药物中的用途。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述肝纤维化是慢性酒精暴露、乙型肝炎病毒(HBV)感染、非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、丙型肝炎病毒(HCV)感染、威尔逊氏病、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症、血色素沉着症、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、或自身免疫性肝炎的结果。

具有化学修饰的骨架的生物缀合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 USC 119 (e) 要求2017年7月7日提交的美国临时专利申请号62/530,066的利益,其公开内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供了包含共价地结合至化学修饰的聚糖骨架的胶原结合肽的合成生物缀合物、包含其的组合物、及其用途。

背景技术

[0004] 在组织中,细胞被包含各种大分子的细胞外基质 (ECM) 包围,所述大分子例如是生物缀合物、胶原、透明质酸、层粘连蛋白、纤连蛋白等。在哺乳动物中,生物缀合物是细胞外基质的主要成分,在此它们与其他生物缀合物、透明质酸、以及纤维基质蛋白质(例如胶原)形成大的复合物。随着哺乳动物年龄增长、伤口持续,以及在某些疾病状态中,身体的某些部位(例如滑膜关节、玻璃体液、脊椎盘、皮肤等)中的细胞外基质可能会丢失或降解,引起不良的症状。另外,诸如血管损伤、角膜损伤和伤口的一些组织损伤会导致细胞外基质和/或其组分(包括胶原)的暴露。

[0005] 概述

[0006] 令人惊讶地,本文所述的生物缀合物代谢不良,因为它们未发现是GAG降解酶的底物,并且发现与非硫酸化衍生物相比,它们靶向肝并同时具有延长的半衰期和降低的肾清除率。本公开提供了包含至少一个肽的生物缀合物,其中所述肽包含共价地键合至化学硫酸化(chemically sulfated)的聚糖的胶原结合单元。

[0007] 本文还提供了包含本文所述的生物缀合物的组合物、及其使用方法。在一个方面,提供了包含如本文所述的生物缀合物的组合物,其中结合至聚糖的肽的数目变化。例如,该组合物可以包含生物缀合物,其中结合至其上的肽的数量被计算为平均值,例如每个聚糖约50至约150个肽。

[0008] 本文还提供了药物组合物,其包含本文所述的生物缀合物或包含其的组合物以及一种或多种稀释剂或载体(例如盐水)。

[0009] 本文所述的生物缀合物和包含其的组合物可以被用于治疗有需要的患者的纤维化,包括但不限于肺纤维化、囊性纤维化、特发性肺纤维化、肾纤维化、肝纤维化(例如慢性酒精暴露、乙型肝炎病毒(HBV)感染、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、丙型肝炎病毒(HCV)感染、威尔逊氏(Wilson's)病、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症、血色素沉着症、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、或自身免疫性肝炎导致的肝纤维化)、肝硬化、心脏纤维化、心房纤维化、心肌内膜纤维化、心肌梗塞、神经胶质瘢痕、关节纤维化、克罗恩(Crohn's)病、杜普伊特伦(Dupuytren's)挛缩、瘢痕疙瘩、纵隔纤维化、骨髓纤维化、佩罗尼氏(Peyronie's)病、肾源性全身纤维化、进行性大块纤维化、腹膜后纤维化、硬皮病、全身性硬化症和粘连性囊炎。

[0010] 本文还提供了制备本文所述的生物缀合物的方法,其包括在偶联反应条件下,任选地在活化剂的存在下,使化学硫酸化的聚糖与至少一个肽接触以提供所述生物缀合物,其中所述肽包含胶原结合单元。在某些实施方案中,该方法首先包括:在足以提供化学硫酸化的聚糖的反应条件下,通过使聚糖与硫酸化剂接触来提供所述化学硫酸化的聚糖。

附图说明

[0011] 可以通过附图查看本发明的一些方面。本文包括以下附图:

[0012] 图1示出了化合物1的两个剂量的肝脏中的羟基脯氨酸含量。

[0013] 图2示出了CCl₄模型中肝脏的天狼星红染色。

[0014] 图3示出了与缬沙坦相比,通过天狼星红染色在组织学上测量的化合物1的两个剂量的肝脏中胶原蛋白含量。

[0015] 图4示出了与替米沙坦相比,通过天狼星红在组织学上测量的化合物1的两个剂量的肝脏中的胶原蛋白含量。

[0016] 图5示出了NASH模型中9周龄的动物中肝脏甘油三酯水平。

[0017] 图6和7示出了化合物1和2的血小板抑制和肝脏星状细胞抑制数据。

[0018] 图8示出了IVIS成像,显示荧光标记分子(化合物1、化合物2和化合物3)在肾脏、膀胱或肝脏中的分布。静脉注射后五分钟拍摄顶部图像,注射后一小时拍摄底部图像。左图是小鼠的腹侧,右图是小鼠的背侧。

[0019] 图9示出了非官能化的HA、硫酸化的HA和化合物1与VEGF189的结合。

[0020] 图10示出了化合物1B、单独的肽、sHA-OPM和HA与PDGF-AA的结合曲线。虚线表示在高分子浓度(非特异性的)下与未包被的孔的结合。

[0021] 图11示出了化合物1B、单独的肽、sHA-OPM和HA与PDGF-BB的结合曲线。虚线表示在高分子浓度(非特异性的)下与未包被的孔的结合。

[0022] 图12示出了化合物1B、单独的肽、sHA-OPM和HA与PDGF-CC的结合曲线。虚线表示在高分子浓度(非特异性的)下与未包被的孔的结合。

[0023] 图13示出了化合物1B、单独的肽、sHA-OPM和HA与PDGF-DD的结合曲线。虚线表示在高分子浓度(非特异性的)下与未包被的孔的结合。

[0024] 图14示出了在越来越多的化合物1、单独的肽、非官能化的sHA或官能化的sHA(OPM)的存在下,PDGF-BB在体外与其受体PDGF-R β 的结合。

[0025] 图15示出了在越来越多的具有不同肽负载的化合物1的存在下,PDGF-BB在体外与其受体PDGF-R β 的结合。

[0026] 图16示出了与用载体处理的动物相比,高纤维化评分降低了。

[0027] 图17示出了在给药两周后,用30 mg/kg化合物1处理的碱性磷酸酶(ALP)的血清水平显著降低。

[0028] 图18示出了剂量范围研究,证明了化合物1和具有不同的硫酸化程度和肽负载的生物缀合物对肝脏星状细胞(HSC)增殖的影响。

[0029] 图19示出了剂量范围研究,证明了化合物1、骨架(无化学衍生化,即硫酸化)和骨架(0肽修饰,“sHA-OPM”)对肝脏星状细胞(HSC)增殖的影响。

[0030] 详细说明

[0031] 应该理解的是,本发明不被限制至所述特定的实施方案,因为这些实施方案当然可能发生改变。还应该理解的是,本文所用的术语仅仅是为了描述特定的实施方案,并且并非旨在进行限制,因为本发明的范围将仅仅被附加的权利要求限制。

[0032] 1. 定义

[0033] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术的和科学的术语都具有如属于本发明的技术领域的普通技术人员通常理解一样的含义。应当注意的是,如在本文和在权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”、以及“所述”包括复数指代,除非文中另外明确规定。因此,例如,对“一个肽”的引用,包括多个肽。

[0034] 如本文使用的,术语“包括”旨在表示组合物和方法包括所述的元素但不排除其他元素。“基本上由……组成”当被用来定义组合物和方法时,应该表示排除对于预期用途的组合来说具有任何实质性作用的其他元素。因此,如本文定义的基本上由该元素组成的组合物,将不会排除不实质性地影响本发明的基础性和新颖性特征的其他材料或步骤。“由……组成”应该表示排除多于微量元素的其他成分和实质性方法步骤。通过这些过渡性术语的每一个进行定义的方面都在本发明的范围之内。

[0035] 术语“约”当被用在数字指定(例如温度、时间、数量和浓度,包括范围)前面时,表示可以(+或-) 10%、5%或1%变化的近似值。

[0036] 如本文使用的,术语“生物缀合物”、“肽聚糖”和“蛋白聚糖”、以及“合成的生物缀合物”被可互换地使用,并且是指包含具有一个或多个与之共价地键合的肽的化学硫酸化的聚糖的合成的缀合物。

[0037] 如本文所用,术语“化学硫酸化的聚糖”是指具有大量以糖苷键连接的单糖的化合物,其已被化学修饰以包括硫酸根部分。在一些实施方案中,所述聚糖是糖胺聚糖(GAG),其包含以交替方式与糖醛酸连接的2-氨基糖,并且包括聚合物,例如肝素、硫酸乙酰肝素、软骨素、角蛋白和皮肤素。相应地,可以在本文描述的实施方案中使用的聚糖的非限制性的实例包括藻酸盐、琼脂糖、葡聚糖、硫酸葡聚糖、软骨素、硫酸软骨素(CS)、皮肤素、硫酸皮肤素(DS)、硫酸乙酰肝素、肝素(Hep)、角蛋白、硫酸角质素和透明质酸(HA),包括其衍生物。在另一个实施方案中,改变所述聚糖的分子量,以适应生物缀合物的效果(参见例如Radek, K. A., et al., *Wound Repair Regen.*, 2009, 17: 118-126; 以及Taylor, K. R., et al., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280:5300-5306)。在一个实施方案中,通过氧化和碱性消除将聚糖降解(参见例如Fransson, L. A., et al., *Eur. J. Biochem.*, 1980, 106 :59-69)以提供具有较低分子量(例如约10 kDa至约50 kDa)的降解聚糖。在另一个实施方案中,通过加热、通过超声、通过臭氧分解、通过剪切、或通过其他已知的解聚和降低聚糖分子量的方法,通过酶将聚糖降解。在某些实施方案中,聚糖不包含被氧化裂解的糖环,因此不包含并且不会含有醛官能团。

[0038] 如本文使用的,术语“键合”和“共价地键合”可以被可互换地使用,是指一个或多个电子对由两个原子共享。

[0039] 在一个实施方案中,本发明的生物缀合物直接或间接地结合至胶原。本文使用的术语“结合”旨在包括分子之间的相互作用,其可以使用例如杂交测定、表面等离子共振、ELISA、竞争性结合测定、等温滴定量热法、噬菌体展示、亲和层析、流变学或免疫组织化学来探测。该术语还旨在包括分子之间的“结合”相互作用。结合可以是“直接的”或“间接的”。

“直接的”结合包括分子之间的直接物理接触。分子之间的“间接的”结合包括分子同时与一个或多个分子直接物理接触。该结合可以导致含有相互作用的分子的“复合物”的形成。“复合物”是指通过共价或非共价的键、相互作用或力维持在一起的两个或更多个分子的结合。

[0040] 如本文使用的,术语“细胞外基质”是指为周围细胞提供结构和生物化学支持的组织的细胞外部分。

[0041] 如本文使用的,术语“组合物”是指适于施用至预期患者用于治疗目的的含有至少一种药学活性成分的制剂,包括其任何固体形式。所述组合物可以包含至少一种药学上可接受的组分,以提供该化合物的改进制剂,例如合适的载体。在一些实施方案中,所述组合物配制成膜、凝胶、贴剂、或液体溶液。如本文使用的,术语“局部”是指将组合物非全身地施用至待治疗的组织和/或器官(内部的或在一些情况下外部的)的表面,以获得局部效果。

[0042] 如本文使用的,术语“药学上可接受的”表示所指出的材料不具有会引起合理谨慎的医师避免给予患者的性质,考虑到使用的量和/或待治疗的疾病或病症以及相应的给药途径。典型的药学上可接受的基本上是无菌的。

[0043] 如本文使用的,术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或载体,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料,其涉及将任何补充物或组合物、或其组分从一个器官或身体的一部分携带或运输至另一个器官或身体的一部分,或将药剂递送到静脉的内表面。

[0044] 如本文使用的,术语“配制的”或“制剂”是指将不同的化学物质(包括一种或多种药物活性成分)组合以产生剂型的方法。在一些实施方案中,两种或更多种药物活性成分可以共制成单一剂型或组合剂量单位,或分别配制并随后组合成组合剂量单位。持续释放制剂是被设计来在延长的时间内在体内缓慢释放治疗剂的制剂,而立即释放制剂是被设计来在缩短的时间内在体内快速释放治疗剂的制剂。

[0045] 如本文使用的,术语“递送”是指根据需要在体内运输药物组合物的途径、方法、制剂、技术和系统,以安全地实现其期望的治疗效果。递送途径可以是任何合适的途径,包括但不限于血管内、静脉内、动脉内、肌内、皮肤、皮下、经皮、皮内和表皮内途径。

[0046] 如本文使用的,术语“溶液”是指本领域公知的溶液剂、混悬剂、乳剂、滴剂、软膏剂、液体洗剂、喷雾剂和脂质体。在一些实施方案中,液体溶液含有水性pH缓冲剂,当加入少量的酸或碱时,其能够抵抗pH的变化。在一些实施方案中,液体溶液含有润滑性增强剂。

[0047] 如本文使用的,术语“治疗”是指在血管损伤或干预之前、期间和/或之后预防、治愈、逆转、减轻、缓解、最小化、抑制、压制和/或停止疾病或病症的一种或多种临床症状。

[0048] 2. 生物缀合物

[0049] 本公开提供了包含至少一个肽的生物缀合物,其中所述肽包含共价地键合至化学硫酸化的聚糖的胶原结合单元。令人惊讶地,本文所述的生物缀合物代谢不良,因为它们未发现是GAG降解酶的底物,并且发现与非硫酸化衍生物相比,它们靶向肝,同时具有延长的半衰期和降低的肾清除率。

[0050] 可用于本文所述实施方案中的化学硫酸化的聚糖可以是任何的化学硫酸化聚糖(例如,糖胺聚糖(GAG))。非限制性实例包括化学硫酸化的藻酸盐、化学硫酸化的软骨素、化学硫酸化的硫酸软骨素、化学硫酸化的皮肤素、化学硫酸化的乙酰肝素、化学硫酸化的肝素前体(heparosan)、化学硫酸化的硫酸乙酰肝素、化学硫酸化的肝素、化学硫酸化的葡聚糖、

化学硫酸化的硫酸葡聚糖、化学硫酸化的透明质酸、或其衍生物。在一个实施方案中,化学硫酸化的聚糖是化学硫酸化的肝素前体或其衍生物。在一个实施方案中,化学硫酸化的聚糖是化学硫酸化的葡聚糖或其衍生物。在一个实施方案中,化学硫酸化的聚糖是化学硫酸化的透明质酸或其衍生物。

[0051] 在某些实施方案中,化学硫酸化的聚糖已经被进一步衍生化,该衍生化可以在硫酸化之前或之后发生。在某些实施方案中,在硫酸化步骤之前,聚糖已被衍生化以包含羧甲基取代基。因此,在某些实施方案中,化学硫酸化的聚糖是化学硫酸化的羧甲基藻酸盐、化学硫酸化的羧甲基软骨素、化学硫酸化的羧甲基硫酸软骨素、化学硫酸化的羧甲基皮肤素、化学硫酸化的羧甲基乙酰肝素、化学硫酸化的羧甲基肝素前体、化学硫酸化的羧甲基硫酸乙酰肝素、化学硫酸化的羧甲基肝素、化学硫酸化的羧甲基葡聚糖、化学硫酸化的羧甲基硫酸葡聚糖、化学硫酸化的羧甲基透明质酸、或其衍生物。

[0052] 在某些实施方案中,化学硫酸化的聚糖是化学硫酸化的肝素前体、化学硫酸化的羧甲基肝素前体、化学硫酸化的葡聚糖、化学硫酸化的羧甲基葡聚糖、化学硫酸化的透明质酸、化学硫酸化的羧甲基透明质酸、或其衍生物。

[0053] 聚糖上的硫酸化度可以根据起始聚糖和最终生物缀合物的所需性质而变化。在某些实施方案中,聚糖的硫酸化度为约0.5至约4、或约0.5至约3.9、或大于约0.5、或约0.6、或约0.7、或约0.8、或约0.9、或约1.0、或约1.1、或约1.2、或约1.3、或约1.4、或约1.5、或约1.6、或约1.7、或约1.8、或约1.9、或约2.0、或约2.1、或约2.2、或约2.3、或约2.4、或约2.5、或约2.6、或约2.7、或约2.8、或约2.9、或约3.0、或约3.1、或约3.2、或约3.3、或约3.4、或约3.4、或约3.5、或约3.6、或约3.7、或约3.8、或约3.9、或约4。硫酸化度可以通过本领域已知的方法计算(参见例如实施例1和Biomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297)。

[0054] 在某些实施方案中,化学硫酸化的聚糖包含每个二糖约0.25至约4、约0.5至约3、约2至约3、约0.5至约2.5、或约0.5至约2个硫酸根部分、或每个二糖约0.5、或约0.6、或约0.7、或约0.8、或约0.9、或约1.0、或约1.1、或约1.2、或约1.3、或约1.4、或约1.5、或约1.6、或约1.7、或约1.8、或约1.9、或约2.0、或约2.1、或约2.2、或约2.3、或约2.4、或约2.5、或约2.6、或约2.7、或约2.8、或约2.9、或约3.0、或约3.1、或约3.2、或约3.3、或约3.4、或约3.5、或约3.6、或约3.7、或约3.7、或约3.8、或约3.9、或约4个硫酸根部分。在聚糖不包含常规的“二糖单元”的实施方案(例如藻酸)中,化学硫酸化的聚糖通常包含每个单糖约0.25至约0.75、或约0.3、或约0.4、或约0.5、或约0.6、或约0.7、或约0.75、或约0.8、或约0.85、或约0.9、或约0.95、或约1、或约1.25、或约1.5、或约1.75、或约2个硫酸根部分。

[0055] 聚糖的各种分子量可用于本文所述的生物缀合物中,但是,可以预期更高的分子量将提供某些益处,例如增加的半衰期。在一些实施方案中,化学硫酸化聚糖的分子量为约5至约1000 kDa。在一些实施方案中,化学硫酸化的聚糖为至少约20、或约25、或约30、或约35、或约40、或约45、或约50、或约100、或约150、或约200、或约250、或约300、或约350、或约400、或约450、或约500、或约550、或约600、或约650、或约700、或约750、或约800、或约850、或约900、或约950、或约1000 kDa。在一些实施方案中,化学硫酸化的聚糖具有大于约150 kDa的分子量。在一些实施方案中,化学硫酸化的聚糖具有约150至约750 kDa的分子量。在一些实施方案中,化学硫酸化的聚糖具有约150至约350 kDa的分子量。在一些实施方案中,化学硫酸化的聚糖具有约200至约400 kDa的分子量。在某些实施方案中,聚糖不包含被氧

化裂解的糖环,因此不包含并且不会包含醛官能团。

[0056] 在一个实施方案中,所述生物缀合物包括具有胶原结合单元的肽,该单元结合至I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、或XIV型胶原中的一个或多个。在一个实施方案中,胶原结合单元在结合至胶原时促进或抑制原纤维生成。在一个实施方案中,胶原结合单元在结合至胶原时不促进或抑制原纤维生成。在一些实施方案中,所述肽结合至I型胶原。在其他实施方案中,所述肽结合至IV型胶原。在一些实施方案中,在本文所述的生物缀合物中可以使用对胶原具有特定结合亲和力的一种或多种肽。例如,合成的生物缀合物可以包含至少一个对I型胶原具有结合亲和力的肽和至少一个对IV型胶原具有结合亲和力的肽。在另一个实施方案中,所述肽具有对I型胶原的结合亲和力。在另一个实施方案中,所述肽具有对IV型胶原的结合亲和力。在一些实施方案中,所述肽具有对II型胶原的结合亲和力。在一些实施方案中,所述肽具有对III型胶原的结合亲和力。在一些实施方案中,所述肽结合至多于一种类型的胶原,其中对每种胶原类型的相对亲和力可以变化。在一个实施方案中,所述胶原结合单元以解离常数(K_d)结合至胶原,所述解离常数(K_d)为少于约1 mM、或少于约900 μ M、或少于约800 μ M、或少于约700 μ M、或少于约600 μ M、或少于约500 μ M、或少于约400 μ M、或少于约300 μ M、或少于约200 μ M、或少于约100 μ M。

[0057] 进一步地,本文所述的生物缀合物可以包含具有多于一个结合单元的肽,其中所述结合单元可以是相同的或不同的。例如,在一些实施方案中,所述肽包含两个或更多个胶原结合单元,其中所述胶原结合单元是相同的。在另一个实施方案中,所述肽包含两个或更多个胶原结合单元,其中所述胶原结合单元是不同的。

[0058] 根据生物缀合物的期望性质,键合至聚糖的肽的总数可以变化。在一些实施方案中,存在于生物缀合物中的肽的总数为每个聚糖约50至约250、或约50至约150、或约75至约125、或约50、或约60、或约70、或约80、或约90、或约100、或约110、或约120、或约130、或约140、或约150、或约160、或约170、或约180、或约190、或约200、或约210、或约220、或约230、或约240、或约250个肽。

[0059] 本文所用的肽可以是直链或支链的,并且通常包含1至约120个氨基酸,并具有至少一个胶原结合单元(或序列)。在一个实施方案中,该肽包含约3至约120个氨基酸、或约3至约110个氨基酸、或约3至约100个氨基酸、或约3至约90个氨基酸、或约3至约80个氨基酸、或约3至约70个氨基酸、或约3至约60个氨基酸、或约3至约50个氨基酸、或约3至约40个氨基酸、或约5至约120个氨基酸、或约5至约100个氨基酸、或约5至约90个氨基酸、或约5至约80个氨基酸、或约5至约70个氨基酸、或约5个氨基酸至约60个氨基酸、或约5至约50个氨基酸、或约5至约40个氨基酸、或约5至约30个氨基酸、或约5至约20个氨基酸、或约5至约10个氨基酸。这些肽也可以称为“胶原结合肽”。如本文使用的,术语“胶原结合单元”意在指结合至胶原的肽内的氨基酸序列。“胶原结合”表示与胶原的相互作用,其可以包括疏水的、离子的(电荷)、和/或范德华相互作用,使得化合物与胶原有利地结合或相互作用。这种结合(或相互作用)旨在区别于共价键和与普通官能团的非特异性相互作用,使得所述肽与包含所述肽在胶原上结合的官能团的任何物质相互作用。可以使用本领域已知的任何方法来测试和评估肽与胶原的结合。参见例如Li, Y., et al., *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, 17: 968-975、Helmès, B.A., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 11683-11685、以及Petsalaki, E., et al., *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(3):

e1000335。在一个实施方案中,所述肽或所述肽的胶原结合单元以解离常数(K_d)结合至胶原,所述解离常数(K_d)为少于约1 mM、或少于约900 μ M、或少于约800 μ M、或少于约700 μ M、或少于约600 μ M、或少于约500 μ M、或少于约400 μ M、或少于约300 μ M、或少于约200 μ M、或少于约100 μ M。

[0060] 胶原蛋白结合肽可以结合至I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII或XIV型胶原中的一个或多个。在一些实施方案中,胶原蛋白结合肽结合至IV型胶原,其可以是完整的、切割的或降解的。在一些实施方案中,胶原蛋白结合肽结合至I型或III型胶原,其可以是完整的、切割的或降解的。

[0061] 在各种实施方案中,结合至I型或III型胶原的肽包括选自以下的氨基酸序列: RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、GELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKCILY (SEQ ID NO:)、GELYKCILY (SEQ ID NO:)、RLDGNEIKR (SEQ ID NO:)、AHEEISTTNEGVM (SEQ ID NO:)、NGVFKYRPRYFLYKHAYFYPPPKRFPVQ (SEQ ID NO:)、CQDSETRTFY (SEQ ID NO:)、TKKTLRT (SEQ ID NO:)、GLRSKSKKFRPPDIQYDPATDEDITSHM (SEQ ID NO:)、SQNPVQP (SEQ ID NO:)、SYIRIADTNIT (SEQ ID NO:)、KELNLVYT (SEQ ID NO:)、GSIT (SEQ ID NO:)、GSITTIDVPWNV (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、GQLYKSILYGS GSGSRR (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或具有至少约80%序列同一性、或至少约83%序列同一性、或至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性、或至少约98%序列同一性的序列,条件是该序列能够结合至胶原。

[0062] 在一个实施方案中,结合至I型或III型胶原的肽包括氨基酸序列RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、或具有至少约80%序列同一性、或至少约83%序列同一性、或至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性、或至少约98%序列同一性的序列,条件是该序列能够结合至胶原。

[0063] 在一个实施方案中,结合至I型或III型胶原的肽包括氨基酸序列GELYKSILY (SEQ ID NO:)、或具有至少约80%序列同一性、或至少约83%序列同一性、或至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性、或至少约98%序列同一性的序列,条件是该序列能够结合至胶原。

[0064] 在一个实施方案中,结合至I型或III型胶原的肽包括氨基酸序列GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或具有至少约80%序列同一性、或至少约83%序列同一性、或至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性、或至少约98%序列同一性的序列,条件是该序列能够结合至胶原。

[0065] 在一个实施方案中,结合至I型或III型胶原的肽包括氨基酸序列GQLYKSILYGS GSGSRR (SEQ ID NO:)、或具有至少约80%序列同一性、或至少约83%序列同一性、或至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性、或至少约98%序列同一性的序列,条件是该序列能够结合至胶原。

[0066] 在一个实施方案中,结合至I型或III型胶原的肽包括氨基酸序列RRANAALKAGQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或具有至少约80%序列同一性、或至少约83%序列同一性、或至少约85%序列同一性、或至少约90%序列同一性、或至少约95%序列同一性、或至少约98%序列同一性的序列,条件是该序列能够结合至胶原。

[0067] 结合IV型胶原的胶原结合单元的非限制性实例是TLTYTWS (SEQ ID NO:),其与MMP 2和9降解的基底膜IV型胶原特异性结合。同样,还包括GSG接头的TLTYTWSGSG (SEQ ID NO:)也可以特异性结合裂解或降解的IV型胶原。另一个例子是KLWVLPK (SEQ ID NO:),其选择性结合完整的IV型胶原。

[0068] 在一些实施方案中,所述肽包括与在Chiang, T.M., et al. J. Biol. Chem., 2002, 277: 34896-34901、Huizinga, E.G. et al., Structure, 1997, 5: 1147-1156、Romijn, R.A., et al., J. Biol. Chem., 2003, 278: 15035-15039、以及Chiang, et al., Cardio. & Haemato. Disorders-Drug Targets, 2007, 7: 71-75(其每个都通过引用并入本文中)中描述的血管性血友病因子(vWF)或血小板胶原受体的胶原结合结构域具有至少约80%、或至少约83%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约100%序列同一性的氨基酸序列。一个非限制性的实例是WREPSFCALS (SEQ ID NO:),其来源于vWF。

[0069] 用于筛选肽序列的胶原结合亲和力(或胶原结合结构域/单元)的各种方法在本领域中是常规的。显示具有可用于本文公开的生物缀合物和方法中的胶原结合亲和力(或胶原结合单元)的其他肽序列包括但不限于: β AWHCTTKFPHHYCLYBip (SEQ ID NO:)、 β AHKCPWHLYTTHYCFTBip (SEQ ID NO:)、 β AHKCPWHLYTHYCFT (SEQ ID NO:)等,其中Bip是联苯丙氨酸而 β A是 β -丙氨酸(参见Abd-Elgaliel, W.R., et al., Biopolymers, 2013, 100 (2), 167-173)、GROGER (SEQ ID NO:)、GMOGER (SEQ ID NO:)、GLOGEN (SEQ ID NO:)、GLOGER (SEQ ID NO:)、GLKGEN (SEQ ID NO:)、GFOGERGVEGPOGPA (SEQ ID NO:)等,其中O是4-羟基脯氨酸(参见Raynal, N., et al., J. Biol. Chem., 2006, 281(7), 3821-3831)、HVWMQAPGGGK (SEQ ID NO:) (参见Helms, B.A., et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 11683-11685)、WREPSFCALS (SEQ ID NO:) (参见Takagi, J., et al., Biochemistry, 1992, 31, 8530-8534)、WYRGRL (SEQ ID NO:)等(参见Rothenfluh D.A., et al., Nat Mater. 2008, 7(3), 248-54)、WTCSGDEYTWHC (SEQ ID NO:)、WTCVGDHKTWKC (SEQ ID NO:)、QWHCTTRFPHHYCLYG (SEQ ID NO:)等(参见U.S. 2007/0293656)、STWTWNGSAWTWNEGGK (SEQ ID NO:)、STWTWNGTNWTRNDGGK (SEQ ID NO:)等(参见WO/2014/059530)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、环状CVWLWENC (SEQ ID NO:)、环状CVWLWEQC (SEQ ID NO:) (参见Depraetere H., et al., Blood. 1998, 92, 4207-4211、和Duncan R., Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(5), 347-360)、CMTSPWRC (SEQ ID NO:)等(参见Vanhoorelbeke, K., et al., J. Biol. Chem., 2003, 278, 37815-37821)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO:) (参见Muzzard, J., et al., PLoS one. 4 (e 5585) I- 10)、KLWLLPK (SEQ ID NO:) (参见Chan, J. M., et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2010, 107, 2213- 2218)、以及CQDSETRTFY (SEQ ID NO:)等(参见U.S. 2013/0243700)、H-V-F/W-Q/ M-Q-P/A-P/K (Helms, B.A., et al., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131(33), 11683-11685),其每个的全文都通过引用合并入本文中。

[0070] 显示具有可用于本文公开的生物缀合物和方法中的胶原结合亲和力(或胶原结合单元)的其他肽序列包括但不限于:LSELRLHEN (SEQ ID NO:)、LTELHLDNN (SEQ ID NO:)、LSELRLHNN (SEQ ID NO:)、LSELRLHAN (SEQ ID NO:)、以及LRELHLNHN (SEQ ID NO:) (参见Fredrico, S., Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 37, 10980-10984)。

[0071] 显示具有可用于本文公开的生物缀合物和方法中的胶原结合亲和力(或胶原结合单元)的其他肽序列包括但不限于:RRANAALKAGELYKSILYGC (SEQ ID NO:)、MIVIELGTNPLKSSGIENGAFQGMKK (SEQ ID NO:)、KELNLVY (SEQ ID NO:)、DARKSEVQK (SEQ ID NO:)、HVWMQAP (SEQ ID NO:)、HWGSLRA (SEQ ID NO:) (参见Hendra Wahyudi *et al.*, *J Control Release*. 2016, 240, 323-331)、以及GKWH[CTTKFPHHYC]LYBip-CONH₂, 其中Bip是联苯丙氨酸(参见Wei Chen *et al.*, *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013, 6(3): 373-384)。

[0072] 在一些实施方案中,所述肽包括选自以下的一个或多个序列:RVMHGLHLGDDE (SEQ ID NO:)、D-氨基酸EDDGLHLGHMVR (SEQ ID NO:)、RVMHGLHLGNNQ (SEQ ID NO:)、D-氨基酸QNNGLHLGHMVR (SEQ ID NO:)、RVMHGLHLGNNQ (SEQ ID NO:)、(GQLYKSILYSGS)₄K₂K (SEQ ID NO:) (一种4分支肽)、GSGQLYKSILY (SEQ ID NO:)、GSGGQLYKSILY (SEQ ID NO:)、KQLNLVYT (SEQ ID NO:)、CVWLWQQC (SEQ ID NO:)、WREPSFSALS (SEQ ID NO:)、GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR (SEQ ID NO:)、以及 GHRPLNKKRQQAPSLRPAPPPISGGGYR (SEQ ID NO:)。

[0073] 类似地,对于胶原结合肽,可以产生源自为胶原选择的噬菌体展示文库的肽。可以通过任何技术(例如SPR、ELISA、ITC、亲和层析、或本领域已知的其它技术)合成肽并评估其与胶原的结合。一个实例可以是生物素修饰的肽序列(例如SILY生物素),其在含有固定化的胶原的微孔板上孵育。可以使用链霉亲和素发色团产生剂量反应结合曲线,以确定肽结合至胶原的能力。

[0074] 在一个实施方案中,所述肽包括一个或多个胶原结合单元,其结合I、III 或IV型胶原中的任意一个或多个。在一个实施方案中,所述肽以解离常数(K_d)结合至I型胶原,所述解离常数(K_d)为少于约1 mM、或少于约900 μ M、或少于约800 μ M、或少于约700 μ M、或少于约600 μ M、或少于约500 μ M、或少于约400 μ M、或少于约300 μ M、或少于约200 μ M、或少于约100 μ M。在一个实施方案中,所述肽以解离常数(K_d)结合至III型胶原,所述解离常数(K_d)为少于约1 mM、或少于约900 μ M、或少于约800 μ M、或少于约700 μ M、或少于约600 μ M、或少于约500 μ M、或少于约400 μ M、或少于约300 μ M、或少于约200 μ M、或少于约100 μ M。在一个实施方案中,所述肽以解离常数(K_d)结合至IV型胶原,所述解离常数(K_d)为少于约1 mM、或少于约900 μ M、或少于约800 μ M、或少于约700 μ M、或少于约600 μ M、或少于约500 μ M、或少于约400 μ M、或少于约300 μ M、或少于约200 μ M、或少于约100 μ M。在一个实施方案中,所述肽以解离常数(K_d)结合至IV型胶原,所述解离常数(K_d)为少于约1 mM、或少于约900 μ M、或少于约800 μ M、或少于约700 μ M、或少于约600 μ M、或少于约500 μ M、或少于约400 μ M、或少于约300 μ M、或少于约200 μ M、或少于约100 μ M。

[0075] 在本文所述的任何实施方案中,肽胶原结合单元包含前述段落中描述的任何氨基酸序列、或与这些氨基酸序列中的任何一个具有至少约80%、或至少约83%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%、或至少约100%同源性的氨基酸序列。在各种实施方案中,本文所述生物缀合物的肽组分可以通过包含一个或多个保守氨基酸取代来修饰。如本领域技术人员所熟知的,通过保守取代来改变肽的任何非关键氨基酸不应显著改变该肽的活性,因为替代氨基酸的侧链应该能够与已经被替换的氨基酸的侧链形成相似的键并接触。

[0076] 如本文使用的,术语“序列同一性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的氨基酸残基或核苷酸同一性的水平。当比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,那么分子在该位置是相同的。一个肽(或多肽或肽区域)与另一个序列具有一定百分比(例如至少约60%、或至少约65%、或至少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约83%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%或至少约99%)的“序列同一性”是指,当被对齐时,该百分比的碱基(或氨基酸)在两个序列的比较中是相同的。应该注意,对于在本申请中公开的任何序列(“参考序列”),与该参考序列具有至少约60%、或至少约65%、或至少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约83%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约98%或至少约99%序列同一性的序列也在本发明的范围之内。同样,本发明还包括与参考序列相比具有氨基酸残基或核苷酸的一个、两个、三个、四个、或五个取代、缺失或添加的序列。在一些实施方案中,在本文具体公开的序列中的任何一个或多个中,可以通过具有来自其每一个的一个、两个、或三个氨基添加、缺失和/或取代来修饰所述序列。

[0077] 如本领域所熟知的,氨基酸的“保守性取代”或肽的“保守性取代变体”是指这样的氨基酸取代,其维持了:1)肽的二级结构;2)氨基酸的电荷或疏水性;和3)侧链的庞大性或这些特征中的任何一个或多个。说明性地,众所周知的术语“亲水性残基”涉及丝氨酸或苏氨酸。“疏水性残基”是指亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸等。“带正电的残基”涉及赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、或组氨酸。“带负电的残基”是指天冬氨酸或谷氨酸。具有“庞大的侧链”的残基是指苯丙氨酸、色氨酸、或酪氨酸等。表1中给出了说明性的保守的氨基酸取代的列表。

[0078] 表1

[0079]

对于氨基酸	取代为
丙氨酸	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
精氨酸	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
天冬酰胺	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
天冬氨酸	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
半胱氨酸	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
谷氨酰胺	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
谷氨酸	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
甘氨酸	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
异亮氨酸	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
亮氨酸	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
赖氨酸	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
蛋氨酸	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
苯丙氨酸	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
脯氨酸	D-Pro
丝氨酸	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
苏氨酸	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
酪氨酸	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
缬氨酸	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0080] 所述肽可以直接或通过接头与聚糖结合。在一些实施方案中,接头可以是任何合适的双功能接头,例如N-[β -马来酰亚胺丙酸]酰肼(BMPH)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰肼(PDPH)等。在本文所述的各种实施方案的任一个中,可以修饰肽的序列以包括连接至肽的C末端的甘氨酸-半胱氨酸(GC)和/或连接至肽的N末端的甘氨酸-半胱氨酸-甘氨酸(GCG),从而为聚糖或聚糖-接头缀合物提供附着点。在某些实施方案中,接头是N-[β -马来酰亚胺丙酸]酰肼(BMPH)。在某些实施方案中,接头是3-(2-吡啶基二硫代)丙酰肼(PDPH)。

[0081] 根据生物缀合物的所需性质,可以改变与聚糖结合的肽的总数。在某些实施方案中,存在于生物缀合物中的肽的总数为约50至约200、或约50至约160、或约50至约160、或约50至约160、或约50至160、或约50至约150、或约50至约140、或约60至约120、或约70至约110、或约80至约110、或约90至约110、或约50、或约60、或约70、或约80、或约90、或约100、或约110、或约120、或约130、或约140、或约150、或约160、或约170、或约180、或约190、或约200个。在其他实施方案中,生物缀合物包含约5至约200个肽。在各种实施方案中,生物缀合物包含约4至约180个肽。在某些实施方案中,生物缀合物包含少于约200个肽。在某些实施方案中,生物缀合物包含少于约180个肽。在某些实施方案中,生物缀合物包含少于约150个肽。在某些实施方案中,生物缀合物包含少于约100个肽。

[0082] 在本文描述的任何实施方案中,每个聚糖的肽的数目是平均值,其中组合物中的某些生物缀合物可以具有每个聚糖更多的肽,并且某些生物缀合物具有每个聚糖更少的肽。因此,在某些实施方案中,本文所述的肽的数目是生物缀合物的组合物中的平均值。例如,在某些实施方案中,生物缀合物是其中每个聚糖的肽的平均数目为约50个或大于约50个的组合物。在其他实施方案中,每个聚糖的肽的平均数目为约60、或约70、或约80、或约90、或约100、或约110、或约120、或约130、或约140、或约150、或约160、或约170、或约180、或约190、或约200、或约250、或约300个。

[0083] 在一些实施方案中,根据用聚糖骨架上的被肽官能化的二糖单元的百分比,可以将每个聚糖的肽的数目描述为“官能化百分比(%)”。例如,可以通过将聚糖的分子量(或平均分子量)(例如约25 kDa高至约70 kDa、或甚至约100 kDa)除以单个二糖单元的分子量(例如约550-800 Da、或约650-750 Da),计算存在于聚糖上的可用的二糖单元的总数。在聚糖不含有常规的“二糖单元”(例如海藻酸)的实施方案中,可以通过将聚糖的分子量(或平均分子量)除以单个糖单元的分子量,并乘以2,计算用于本文所示的计算中的聚糖上存在的可用的二糖单元的总数。

[0084] 因此,在某些实施方案中,聚糖包含约1至约50%、或约5至约30%的肽官能化,或约10至约30%的肽官能化,或约20%的肽官能化,其中肽官能化的百分比(%)由聚糖上被肽官能化的二糖单元的百分比确定。在一些实施方案中,聚糖的肽官能化百分比(%)为约1%至约50%、或约3%至约40%、或约5%至约30%、或约10%至约30%、或约5%、或约10%、或约15%、或约20%、或约25%、或约30%、或约35%、或约40%、或约45%、或大约50%。

[0085] 在一些实施方案中,本文提供了一种组合物,其包含如本文所述的生物缀合物和肽,其中所述肽与生物缀合物紧密相关(例如通过离子键)。在一些实施方案中,由此可以形成生物缀合物聚集体。预期的是,生物缀合物聚集体(包含生物缀合物和非共价地结合的肽)可以包含1%至200%肽官能化(由聚糖上被肽官能化的二糖单元的百分比确定)。在一些实施方案中,生物缀合物聚集体中的肽官能化百分比(%)是约1%至约50%、或约3%至约40%、或约5%至约30%、或约10%至约20%、或约1%、或约2%、或约5%、或约10%、或约15%、或约20%、或约25%、或约30%、或约35%、或约40%、或约45%、或约50%、或约55%、或约60%、或约65%、或约70%、或约75%、或约80%、或约85%、或约90%、或约95%、或约100%。

[0086] 在一个实施方案中,在上述方法中使用的生物缀合物包含肝素和约50至约150或约100个肽,其中所述肽包含RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSGSRR (SEQ ID NO:)中的至少一个序列,并通过酰肼-羰基键键合至肝素。在某些实施方案中,肝素是普通肝素(UFH)或低分子量肝素(LMWH)。

[0087] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含肝素和约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:) RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSGSRR (SEQ ID NO:)中的至少一个序列,并通过酰肼-羰基键键合至肝素。

[0088] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含肝素和约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列:GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、

GQLYKSILYGS GSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHGLGDDEGPC (SEQ ID NO:)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。在某些实施方案中,生物缀合物包含至少两个不同的胶原结合单元。

[0089] 可以通过任何技术(例如SPR、ELISA、ITC、亲和层析、或本领域已知的其它技术)合成肽并评估其与胶原的结合。一个实例可以是生物素修饰的肽序列(例如SILY生物素),其在含有固定化的胶原的微孔板上孵育。可以使用链霉亲和素发色团产生剂量反应结合曲线,以确定肽结合至胶原的能力。在本文所述的各种实施方案中,本文所述的肽可以通过包含一个或多个保守氨基酸取代来修饰。如本领域技术人员众所周知的,通过保守取代来改变肽的任何非关键氨基酸不应显著改变该肽的活性,因为替代氨基酸的侧链应能够与已被取代的氨基酸的侧链形成相似的键并接触。非保守取代也是可能的,条件是它们基本上不影响肽的结合活性(即胶原结合亲和力)。

[0090] 因此,在一些实施方案中,通过利用氧化化学来裂解聚糖骨架内糖环中的一个或多个,使肽与聚糖(例如硫酸皮肤素)结合,从而在聚糖上提供醛结合位点。然后将醛结合位点用于缀合肽(例如,通过-C(O)-NH-N=C键)。

[0091] 在一些实施方案中,肽可以经由-C(O)-NH-NH-C(O)-(即酰肼-羰基)键共价地结合至聚糖。在此,肽通过酰肼-羰基键而结合至聚糖,其中酰肼-羰基的羰基基团是存在于聚糖上的环外羰基基团。环外羰基基团可以存在于天然的聚糖上,或者可以修饰聚糖以包含这样的官能团。下文详细描述了这样的方法。预期的是,本文公开的生物缀合物所显示的有益效果(例如提高的结合亲和力)至少部分是由于聚糖不含有氧化切割的糖环。

[0092] 因此,在某些实施方案中,本文所述的肽还包含用于与肽缀合的酰肼部分。酰肼基团可以在任何合适的连接点与肽结合,例如C末端、N末端或通过氨基酸上的侧链。例如,当肽通过该肽的氨基酸的侧链与聚糖结合时,该侧链是谷氨酸或天冬氨酸。酰肼可以在与肽序列中氨基酸上存在的羰基(例如C-末端羰基)或与间隔物(spacer)(如果存在的话)结合的肼(-NHNH₂)之间形成。

[0093] 在某些实施方案中,一种或多种肽通过间隔物与聚糖(或连接子,如果存在的话)结合。如本文所用,术语“间隔物”是指生物缀合物的任选部分,其将肽(或结合单元)连接至接头(存在时)或聚糖(可直接结合)。在本文所述的任何实施方案中,任何一个或多个肽可以具有包含1至约15个氨基酸的线性或分支间隔物序列。在一个实施例中,间隔物包括一个或多个、或1至20、或10至20、或5至15、或5至10、或1至10、或1至5、或1至3个氨基酸。可以预期,在间隔物序列中可以使用任何天然或非天然氨基酸,条件是间隔物序列不显著干扰肽的预期结合。在某些情况下,氨基酸是非极性氨基酸,例如丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。在某些实施方案中,氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、精氨酸和丝氨酸。

[0094] 示例性间隔物包括但不限于包含一至五个甘氨酸单元的短序列(例如G、GG、GGG、GGGG (SEQ ID NO:)、或GGGGG (SEQ ID NO:)),任选地包含半胱氨酸(例如GC、GCG、GSGC (SEQ ID NO:)、或GGC)和/或丝氨酸(例如GSG、SGG、GSGSG (SEQ ID NO:)或GSGSGS (SEQ ID NO:))、一到五个精氨酸单元(例如R、RR、RRR等)、或其组合(例如GSGRR (SEQ ID NO:)、GSGSRR (SEQ ID NO:)、GSGSGRR (SEQ ID NO:)或GSGSGSRR (SEQ ID NO:))。间隔物还

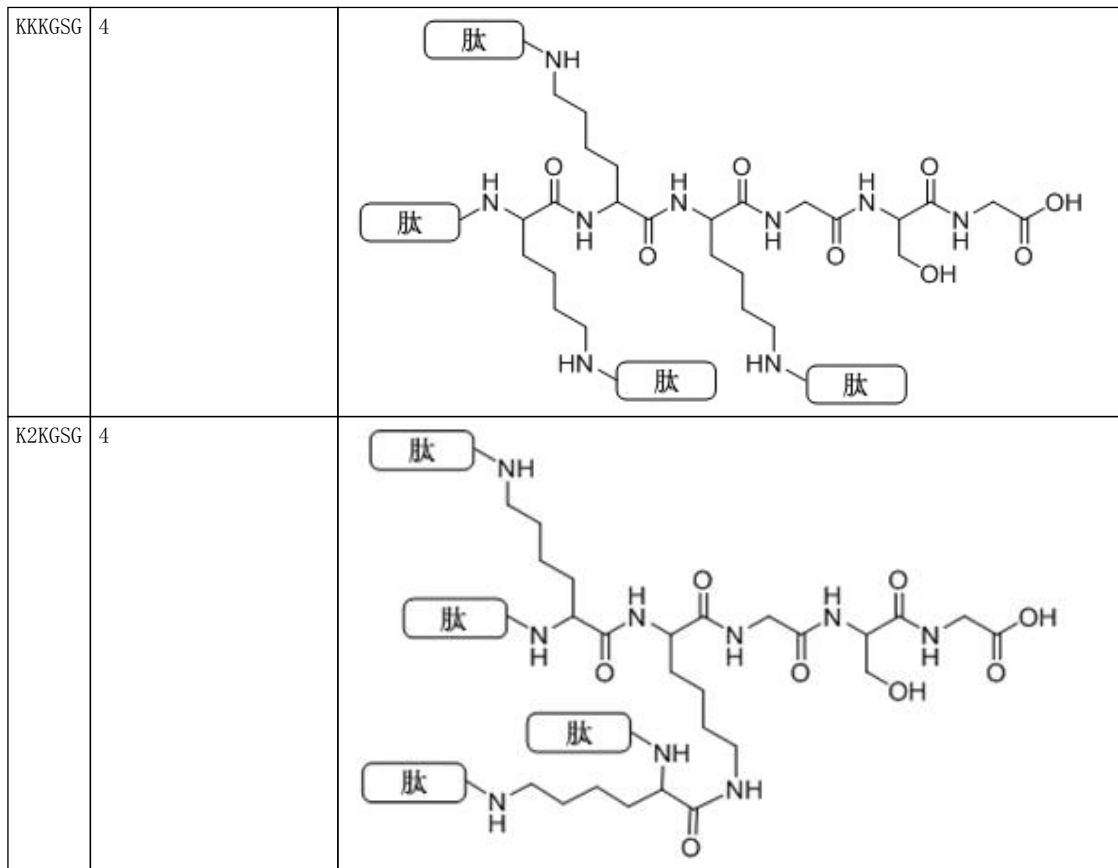
可以包含非氨基酸部分,例如聚乙二醇(PEG)、6-氨基己酸、琥珀酸、或其组合,具有或不具有额外的氨基酸间隔物。在某些实施方案中,本文所述的肽序列进一步包含GSG-NH₂部分。通常,GSG-NH₂部分与C或N末端结合。

[0095] 在某些实施方案中,间隔物包含一个以上的结合位点(其中间隔物可以是线性或分支的),使得可以将一个以上的肽序列结合到其上,从而产生分支的构建体。另外,由于肽可以通过末端或非末端氨基酸部分与聚糖结合,因此当通过非末端氨基酸部分与聚糖结合时,肽将被分支。间隔物上的结合位点可以相同或不同,并且可以是任何合适的结合位点,例如胺或羧酸部分,从而可以将所需的肽序列结合到其上(例如通过酰胺键)。因此,在某些实施方案中,间隔物包含一个或多个赖氨酸、谷氨酸或天冬氨酸残基。在某些实施方案中,间隔物包含2至6个氨基酸、或3或4个氨基酸。在某些实施方案中,间隔物包含一个或多个式KXX的氨基酸序列,其中每个X独立地是天然或非天然氨基酸。可以单独使用或组合使用以制造分支构建体的间隔物的具体实例包括但不限于KRR、KKK、(K)_nGSG和(KRR)_n-KGSG,其中n为0至5、或1、2、3、4或5。在一个实施方案中,间隔物为GSGKRRGSG (SEQ ID NO:)。

[0096] 这样的构建体可以提供具有一个以上式P_nL单元的肽,其中至少一个P是胶原结合单元,L是间隔物并且n是2至约10、或2至8、或2至6、或2至5、或2至4、或2、或3、或4、或5、或6、或7、或8、或9、或10的整数。例如,间隔物L可以是这样的氨基酸序列,例如KGSG (SEQ ID NO:)、KKGSG (SEQ ID NO:)、K₂KGSG (SEQ ID NO:)、或KKKGSG (SEQ ID NO:)等,其中肽可以与N末端和侧链氮结合,分别提供2、3和4个结合位点。下表显示了这些间隔物与肽结合的示意图。

[0097]

间隔物	肽(即结合位点)的数目	间隔物的结构
KGSG	2	
KKGSG	3	



[0098] 在一些实施方案中,修饰肽序列以用谷氨酰胺替代一个或多个谷氨酸残基和/或用天冬酰胺替代一个或多个天冬氨酸残基。

[0099] 示例性的分支的胶原结合构建体包括但不限于 $(\text{GELYKSILYGS})_2\text{K}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GELYKSILYGS})_2\text{KGS}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GELYKSILYGS})_3\text{KK}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GELYKSILYGS})_3\text{KKGSG}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GELYKSILYGS})_4\text{KKK}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GELYKSILYGS})_4\text{KKKGSG}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_2\text{K}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_2\text{KGS}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_3\text{KK}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_3\text{KKGSG}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_4\text{K}_2\text{K}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_4\text{K}_2\text{KGS}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_4\text{KKK}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_4\text{KKKGSG}$ (SEQ ID NO:)、 $(\text{GQLYKSILYGS})_4-(\text{KRR})_2-\text{K}$ (SEQ ID NO:)、以及 $(\text{GQLYKSILYGS})_4-(\text{KRR})_2-\text{KGS}$ (SEQ ID NO:)。

[0100] 在一个实施方案中,酰肼基团经由包含选自甘氨酸、丙氨酸、精氨酸和丝氨酸的一种或多种氨基酸的间隔物而键合至C-末端。在一个实施方案中,间隔物选自甘氨酸、甘氨酸-甘氨酸、以及甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸。在各种实施方案中,所述肽包含氨基酸间隔物,例如甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸(GSG)、GSGSGSRR (SEQ ID NO:)、KRRGSG (SEQ ID NO:)、或GSGKRRGSG (SEQ ID NO:)。

[0101] 3. 生物缀合物的合成

[0102] 本文使用的肽可以从商业来源购买或者使用本领域公知的方法(例如化学和/或生物技术方法)部分或完全合成。在一些实施方案中,根据本领域公知的固相肽合成方案合成肽。在另一个实施方案中,根据熟知的Fmoc方案在固体支持物上合成肽,按照本领域技术人员已知的方法,用三氟乙酸从支持物上切下并通过色谱法纯化。在其他实施方案中,利用

本领域技术人员熟知的生物技术方法合成肽。在一个实施方案中,通过本领域技术人员已知的重组DNA技术,将编码所需肽的氨基酸序列信息的DNA序列连接进表达质粒(例如结合用于肽的亲纯化的亲和标签的质粒),将质粒转染进宿主生物体中进行表达,然后从宿主生物体或生长培养基中分离肽,例如通过亲和纯化。重组DNA技术方法被描述于Sambrook et al., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001) (其通过引用合并入本文中),并且对于本领域技术人员来说是熟知的。

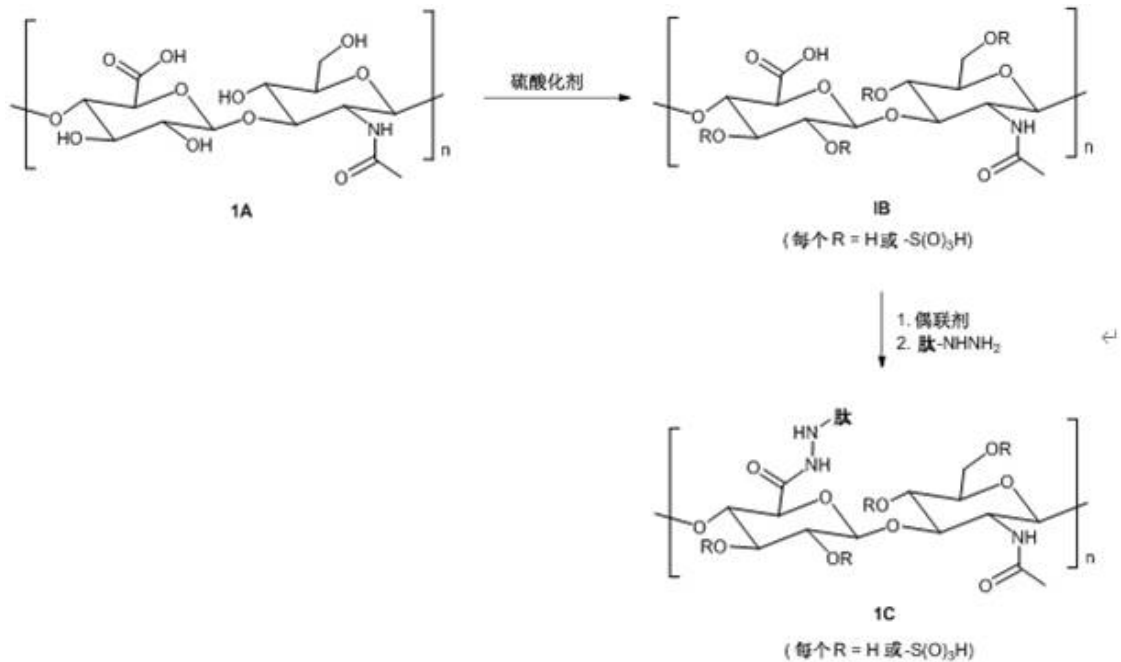
[0103] 如以下方案1中所示,本文所述的生物缀合物由化学硫酸化的聚糖衍生物(例如硫酸化的透明质酸)合成。可以使用本领域已知的方法来制备适用于本文所述的生物缀合物的各种聚糖衍生物,例如通过沿聚糖骨架的羟基的亲核取代(参见例如Biomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297)。如方案1中所示,可以使聚糖(例如透明质酸)1A与合适的硫酸化剂(例如 SO_3/DMF 复合物)反应,以提供一种或多种化学硫酸化的聚糖衍生物1B。对本领域技术人员显而易见的是,可以根据所使用的试剂和反应条件来定制化学硫酸化的聚糖衍生物1B,从而可获得硫酸化的聚糖衍生物1B的一部分、全部或混合物。然后可以在典型的肽偶联反应条件下,任选地在偶联剂的存在下,将化学硫酸化的聚糖衍生物1B与肽反应,以提供生物缀合物1C。

[0104] 如在肽偶联反应中通常那样,可以使用活化剂来促进反应。合适的偶联剂(或活化剂)是本领域已知的,包括例如碳化二亚胺(例如 N,N' -二环己基碳化二亚胺(DCC)、 N,N' -二环戊基碳化二亚胺、 N,N' -二异丙基碳化二亚胺(DIC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)、 N -叔丁基- N -甲基碳化二亚胺(BMC)、 N -叔丁基- N -乙基碳化二亚胺(BEC)、1,3-双(2,2-二甲基-1,3-二氧戊环-4-基甲基)碳化二亚胺(BDDC)等)、四甲基氟代甲脒六氟磷酸盐(TFFH)、酸酐(例如对称的、混合的、或环状的酸酐)、活性酯(例如苯基活化的酯衍生物、对异羟肟酸活化酯、六氟丙酮(HFA)等)、酰基唑(使用CDI的酰基咪唑、酰基苯并三唑等)、酰基叠氮化物、酰基卤化物、磷盐(BOP、AOP、PyAOP、BOP-Cl、Brop、PyBrop、PyOxim、HOBt、PyBOP、HOAt等)、EEDQ、IIDQ、CIP、DPPA、铵盐/脲盐(例如HATU、HBTU、COMU、四甲基铵盐、双吡咯烷基铵盐、双哌啶铵盐、咪唑脲盐、嘧啶脲盐、衍生自 N,N,N' -三甲基- N' -苯基脲的脲盐、基于吗啉代的铵/脲偶联剂、铈酸盐脲盐等)、有机磷试剂(例如膦酸和磷酸衍生物)、有机硫试剂(例如磺酸衍生物)、三嗪偶联剂(例如2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓氯化物、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓四氟硼酸盐等)、吡啶鎓偶联剂(例如Mukaiyama试剂、四氟硼酸吡啶鎓偶联剂等)、聚合物支撑的试剂(例如聚合物结合的碳化二亚胺、聚合物结合的TBTU、聚合物结合的2,4,6-三氯-1,3,5-三嗪、聚合物结合的HOBt、聚合物结合的HOSu、聚合物结合的IIDQ、聚合物结合的EEDQ等),等等(参见例如El-Faham, et al. Chem. Rev., 2011, 111(11): 6557-6602; Han, et al. Tetrahedron, 2004, 60:2447-2467)。

[0105] 在一个实施方案中,通过使聚糖的羧酸部分与偶联剂(例如碳化二亚胺试剂,例如但不限于 N,N' -二环己基碳化二亚胺(DCC)、 N,N' -二异丙基碳化二亚胺(DIC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)等)反应,经由活化的聚糖中间体来进行肽偶联反应,以形成 O -酰基异脲中间体。这种碳化二亚胺化学方法是本领域众所周知的,并且合适的偶联剂可以从商业来源购买。 O -酰基异脲中间体与所需肽接触产生生物缀合物。可以在

肽之前或在肽的存在下使聚糖与活化剂接触。

[0106] 方案1. 生物缀合物的合成



[0107]

[0108] 在某些实施方案中,肽序列可以包含反应性部分(例如酰肼官能团),以帮助与聚糖或其O-酰基尿素中间体的偶联反应。在一些实施方案中,肽序列包含一个或多个氨基酸残基,其充当结合单元与末端氨基酸(例如末端甘氨酸)或反应性部分(即酰肼官能团)之间的间隔物。另外,在肽中的一个或多个氨基酸含有反应性官能团(例如羧酸侧链)的某些情况下,可以使用标准的保护基化学来保护一个或多个侧链,以促进偶联反应。另外,非氨基酸间隔物也可单独使用,或与氨基酸间隔物(例如氨基己酸)结合使用。在某些实施方案中,化学硫酸化的聚糖衍生物1B由O-羧甲基化的聚糖衍生物(即,其中至少一个R为-CH₂C(O)OH)制备,然后可以使其与肽进一步反应,任选地在偶联剂的存在下,以提供替代的生物缀合物。在某些实施方案中,可以将具有至少一个游离羟基的化学硫酸化的聚糖衍生物1B衍生物转化为O-羧甲基化的聚糖衍生物,然后可以将其进一步与肽反应,任选地在偶联剂的存在下,提供替代的生物缀合物。

[0109] 在一些实施方案中,反应是在反应性亲核试剂的存在下进行的,所述亲核试剂例如是N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、和/或羟基苯并三唑(HOBT) N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、羟基苯并三唑(HOBT)、1-羟基-1,2,3-苯并三唑、HOBT/CuCl₂、7-氮杂-1-羟基-1,2,3-苯并三唑(HOAt)、3,4-二氢-3-羟基-4-氧-1,2,3-苯并三唑(HOObt)、和/或3-磺基-1-羟基琥珀酰亚胺(S-NHS)、或其衍生物。

[0110] 4. 使用方法

[0111] a. 纤维化的治疗

[0112] 在一个实施方案中,本文提供了用于预防和/或治疗纤维化的生物缀合物和方法。纤维化是一种炎症性疾病,其中炎症细胞迁移到组织和器官中,导致会导致瘢痕形成的细胞反应。纤维化通常可以由于发炎或损伤而发生在体内的许多组织中。通过防止炎症细胞外渗,可以减轻或预防纤维化。

[0113] 在一个实施方案中,本文提供的生物缀合物和方法可以用来预防和/或治疗肺纤

维化。在肺中,纤维化的类型包括肺纤维化,例如囊性纤维化和特发性肺纤维化。肺纤维化是一种呼吸系统疾病,其中在肺组织中形成疤痕,导致严重的呼吸问题。疤痕的形成导致壁的增厚,并导致血液中氧气供应的减少。结果,患者患有永久性的呼吸急促。

[0114] 在一个实施方案中,本文提供的生物缀合物和方法可以用来治疗肝纤维化。肝纤维化可能由多种情况引起,包括慢性酒精暴露、乙型肝炎病毒 (HBV) 感染、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、丙型肝炎病毒 (HCV) 感染、威尔逊氏病、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症、血色素沉着症、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、以及自身免疫性肝炎。慢性HCV是导致慢性肝病的主要因素,肝脏引起持续的炎症和纤维化,其特征是肝上纤维组织和疤痕的形成。NAFLD和NASH也可以引起肝脏炎症和纤维化。

[0115] 肝硬化是肝脏中的纤维化,其中肝由于长期损害而无法正常运行。通常,这种疾病会在数月或数年内缓慢发作。早期,通常没有任何症状。随着疾病的恶化,人可能会变得疲倦、虚弱、发痒、小腿肿胀、皮肤发黄、容易瘀伤、腹部积水、或在皮肤上形成蜘蛛状血管。腹部积聚的液体可能会自发感染。其他并发症包括肝性脑病、食道扩张静脉或胃静脉扩张出血、以及肝癌。肝性脑病会导致混乱,甚至可能导致意识丧失。肝硬化可以导致肝功能障碍。以下症状或特征是肝功能障碍的直接后果,因此也可以通过本公开的组合物和方法治疗或改善。

[0116] 已经表明,肝星状细胞 (HSC) 和肿瘤细胞之间的直接相互作用通过多种机制促进了肿瘤的生长。因此,靶向HSC以减轻或消除其肿瘤支持作用提出了预防、抑制或治疗肝细胞癌 (HCC) 的潜在治疗策略。在某些实施方案中,提供了在有需要的患者中预防或抑制肝细胞癌 (HCC) 的发展的方法,其包括向患者施用有效量的本文所述的生物缀合物。在某些实施方案中,肝细胞癌 (HCC) 的发展是肝硬化的结果。在某些实施方案中,该方法包括抑制肝星状细胞增殖和/或纤维化表型转变。在某些实施方案中,例如在经导管动脉化学栓塞 (TACE) 过程中,将生物缀合物局部施用至肝脏。

[0117] 蜘蛛状血管瘤或蜘蛛痣是由被许多较小血管围绕的中央小动脉组成的血管病变,由于雌二醇的增加而发生。掌部红斑是在大鱼际和小鱼际隆起处的手掌发红,也是由于雌激素增加。男性乳房发育不全症或男性无癌的乳房腺体增大是由雌二醇增加引起的,可以在多达三分之二的患者中发生。性腺功能减退 (表现为阳痿的性激素减少)、不孕、性欲减退和睾丸萎缩,可能是原发性腺损伤或下丘脑/垂体功能受压所致。性腺功能减退症与酒精中毒和血色素沉着症引起的肝硬化有关。肝硬化患者的肝脏大小可能会增大、正常或缩小。

[0118] 在一个实施方案中,本文提供的生物缀合物和方法可以用来预防和/或治疗肾纤维化。肾纤维化可以由对肾脏的急性或持续伤害引起。损伤可能导致细胞外基质过度沉积。随着时间的流逝,这可能导致肾脏衰竭,需要患者进行透析或肾脏移植。

[0119] 腹水是腹膜腔内积液,会引起腹侧钝感。这随着腹围的增加而可见。肝病性口臭是由于二甲基硫醚含量增加而产生的霉味。黄疸是由于胆红素增加而引起的皮肤和粘膜的黄变。此外,肝硬化会增加对血流的抵抗力和门静脉系统的高压,从而导致门脉高压。

[0120] 在一个实施方案中,本文提供的生物缀合物和方法可以用来预防和/或治疗心脏中的纤维化。心脏中的纤维化以心房纤维化、心肌内膜纤维化、或心肌梗塞的形式存在。胶质疤痕是脑中的纤维化。其他类型的纤维化包括但不限于关节纤维化(膝盖、肩膀、其他关节)、克罗恩氏病(肠)、杜普伊特伦挛缩(手、手指)、疤痕疙瘩(皮肤)、纵隔纤维化(纵隔的软

组织)、骨髓纤维化(骨髓)、佩罗尼氏病(阴茎)、肾源性全身纤维化(皮肤)、进行性大块纤维化(肺)、腹膜后纤维化(腹膜后的软组织)、硬皮/全身性硬化症(皮肤、肺)、以及某些形式的粘连性囊炎(肩)。

[0121] 预期本发明的组合物和方法适用于预防和/或治疗任何这些疾病或与这些疾病有关的症状或特征。纤维化的发展涉及受刺激的细胞铺设结缔组织,包括胶原蛋白和糖胺聚糖。本公开的生物缀合物可以与胶原蛋白或糖胺聚糖相互作用,并因此破坏这种过量的结缔组织的形成。生物缀合物还可以保护内皮屏障。这可以是与由于微血管损伤而暴露的细胞外基质相互作用。保护内皮屏障会防止炎症细胞渗入组织从而引起过多的ECM沉积,其导致纤维化组织。因此,生物缀合物可以预防、抑制、延迟和/或逆转纤维化。

[0122] 在某些实施方案中,纤维化是缺血后、感染后或特发性的(例如肾、肝、心脏、肺)。参见,例如Guerrot, D., et al. *Fibrogenesis & tissue repair* 5.Suppl 1 (2012): S15和Yamaguchi, I., et al. *Nephron Experimental Nephrology* 120.1 (2012): e20-e31。在某些实施方案中,纤维化是腹膜后的。在某些实施方案中,纤维化是皮肤的(例如硬皮病)。参见,例如Maurer, B., et al. *Annals of the rheumatic diseases* (2013): annrheumdis-2013。

[0123] 在一个实施方案中,所述疾病不是急性肾小管坏死、糖尿病慢性肾衰竭、狼疮性肾炎、肾纤维化、或急性肾小球肾炎。在一个实施方案中,所述疾病不是特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、或肺气肿。

[0124] 在某些实施方案中,纤维化是由溶酶体贮积病引起的、或与溶酶体贮积病有关,其包括但不限于法布里(Fabry)病、高雪氏(Gaucher)病、尼曼-皮克(Niemann-Pick)病和亨特(Hunter)综合症(粘多糖病)。因此,在某些实施方案中,本文提供了在有需要的患者中预防由溶酶体贮积病引起或与之相关的纤维化的方法。

[0125] 在一个实施方案中,本文提供了本文公开的生物缀合物用于预防或治疗纤维化的用途。在一个实施方案中,本文提供了本文公开的生物缀合物用于制备用于预防或治疗纤维化的药物的用途。在一个实施方案中,本文提供了本文公开的生物缀合物用于预防或治疗肝纤维化的用途。在一个实施方案中,本文提供了本文公开的生物缀合物用于预防或治疗肺纤维化的用途。在一个实施方案中,生物缀合物包含硫酸化的透明质酸和约50至约150或约100个肽,其中所述肽包括以下在的至少一个序列:RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO:)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述一种或多种肽通过酰肼-羰基键与肝素或其他聚糖键合。在一个实施方案中,生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并具有约15至约30%的肽官能化,其中所述肽包括RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSRR (SEQ ID NO:)中的至少一个序列。在一个实施方案中,一种或多种肽通过酰肼-羰基键与肝素键合。

[0126] 在一个实施方案中,本文提供了一种用于在有需要的患者中预防或治疗肝纤维化或肺纤维化的方法,其包括向所述患者施用有效量的生物缀合物,所述生物缀合物包括硫

酸化的透明质酸,所述硫酸化的透明质酸结合至约50至约150或约100个包含GQLYKSILYSGSGSRR (SEQ ID NO:)或GQLYKSILY (SEQ ID NO:)的肽。在一个实施方案中,本文提供了本文公开的生物缀合物在有需要的患者中预防或治疗肝纤维化或肺纤维化的用途。在一个实施方案中,施用有效量的包含结合至约50至约150或约100个包含GQLYKSILYSGSGSRR (SEQ ID NO:)的肽的硫酸化透明质酸的生物缀合物。

[0127] 本文还提供了预防和/或治疗血管炎的方法。血管炎是由血管壁的炎症所定义,并形成了各种疾病实体的不同群体的病理基础。血管炎是在自身免疫性疾病中通常观察到的难治的病理状况之一,并且其许多起因对于诸如类固醇和免疫抑制剂的常规使用的治疗方法是难治的。在血管炎综合征中,炎症发生在各种大小的动脉中,并且发烧、肌肉和关节疼痛、血管阻塞、皮肤溃疡和多发性单神经炎可能发展。该方法可用于治疗大血管血管炎(LVV)、中血管血管炎(MVV)、小血管血管炎(SVV)、可变血管血管炎(VVV)、单器官血管炎(SOV)、与全身性疾病相关的血管炎、和/或与可能的病因相关的血管炎。大血管血管炎(LVV)的非限制性实例包括高隆动脉炎(TAK)和巨细胞动脉炎(GCA)。中血管血管炎(MVV)的非限制性实例包括结节性多动脉炎(PAN)和川崎(kawasaki)病(KD)。小血管血管炎(SVV)的非限制性实例包括抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)、显微镜下多血管炎(MPA)、肉芽肿伴多血管炎(Wegener's) (GPA)、嗜酸性肉芽肿伴多血管炎(Churg-Strauss) (EGPA)、免疫复合物SVV、抗肾小球基底膜(抗GBM)疾病、灰球性脉管炎(CV)、IgA血管炎(Henoch-Schönlein) (IgAV)、以及低互补性荨麻疹性血管炎(HUV) (抗C1q血管炎)。可变血管血管炎(VVV)的非限制性实例包括白塞(Behcet's)病(BD)和科干(Cogan's)综合征(CS)。单器官血管炎(SOV)的非限制性实例包括皮肤白细胞碎裂性血管炎、皮肤动脉炎、原发性中枢神经系统血管炎、以及孤立的主动脉炎。与全身性疾病相关的血管炎的非限制性实例包括狼疮血管炎、类风湿性血管炎和结节性血管炎。与可能的病因相关的血管炎的非限制性实例包括丙型肝炎病毒相关的冰球蛋白性血管炎、乙型肝炎病毒相关的血管炎、梅毒相关的主动脉炎、药物相关的免疫复合血管炎、药物相关的ANCA相关的血管炎、以及癌症相关血管炎。血管炎的其他例子包括抗磷脂综合症、伯格氏(Buerger's)病(闭塞性血管炎)、冷冻球蛋白血症、冷冻蛋白相关的自体炎症综合征(CAPS) (青少年)、肺出血肾炎(goodpastures)、局部硬皮病(青少年)、风湿性肌痛、雷诺氏病(Raynaud's phenomenon)、硬皮病、干燥综合征(Sjogren's syndrome)、以及系统性红斑狼疮。预期本文公开的生物缀合物和方法可用于抑制和/或治疗血管炎。

[0128] 在一个实施方案中,本文提供了预防和/或治疗血管血管炎的方法。在一个实施方案中,本文提供了预防和/或治疗小血管血管炎的方法,包括抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关血管炎(AAV)、显微镜下多血管炎(MPA)、肉芽肿伴多血管炎(Wegener's) (GPA)、嗜酸性肉芽肿伴多血管炎(Churg-Strauss) (EGPA)、免疫复合物SVV、抗肾小球基底膜(抗GBM)疾病、灰球性脉管炎(CV)、IgA血管炎(Henoch-Schönlein) (IgAV)、和/或低互补性荨麻疹性血管炎(HUV) (抗C1q血管炎)。此类疾病会影响小血管(例如非常小的动脉、小动脉、毛细血管和小静脉)。

[0129] 联合疗法

[0130] 在一些实施方案中,本公开的组合物可以与可用于预防或治疗纤维化的第二药剂组合使用。因此,在一个实施方案中,提供了一种组合、组合物、套装或试剂盒,其包括本公

开内容的任何组合物和一种或多种这种第二药剂。在一个实施方案中,本公开的任何治疗方法进一步包括施用一种或多种这种第二药剂。

[0131] 第二药剂可以是可用于预防、治疗或以其他方式改善纤维化的症状的任何药物或生物药剂。非限制性实例包括:类固醇,例如predonine;还原剂,例如N-乙酰半胱氨酸;抗纤维化药物,例如吡非尼酮和尼达尼布;免疫抑制药物,例如皮质类固醇、环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、青霉素、环孢霉素A和FK506;以及其他药剂,例如秋水仙碱、IFN- γ 和霉酚酸酯。

[0132] 在一些实施方案中,本公开的组合物可以与可用于预防或治疗血管炎的第二药剂组合使用。因此,在一个实施方案中,提供了一种组合、组合物、套装或试剂盒,其包括本公开内容的任何组合物和一种或多种这种第二药剂。在一个实施方案中,本公开的任何治疗方法进一步包括施用一种或多种这种第二药剂。

[0133] 第二药剂可以是可用于预防、治疗或以其他方式改善血管炎的症状的任何药物或生物药剂。非限制性实例包括泼尼松、环磷酰胺(Cytoxan)、甲基泼尼松龙、甲氨蝶呤钠、Medrol (Pak)、Medrol、地塞米松、泼尼松龙、DexPak、Deltasone、可的松、泼尼松增强剂(Prednisone Intensol)、地塞米松磷酸钠、Orapred ODT、Trexall、Rheumatrex、甲氨蝶呤钠(PF)、Veripred 20、地塞米松增强剂、泼尼松龙磷酸钠、Pediapred、Milliped、Rayos、Milliped和DoubleDex。

[0134] *b. 冠状动脉疾病(CAD)和外周动脉疾病(PAD)*

[0135] 本公开的一个实例提供了用于改善手术性搭桥手术的成功率和/或减少失败的方法和相关的组合物。搭桥移植物被用作冠状动脉疾病(CAD)和外周动脉疾病(PAD)中的动脉阻塞的一种治疗形式。在美国每年大约进行500,000例冠状动脉搭桥移植术(CABG)和超过70,000例外周搭桥移植术。最常见的是,通常从隐静脉收获自体血管移植物。

[0136] 尽管盛行使用自体静脉移植物进行手术性搭桥来恢复血流,但在CAD和PAD中都有大量的静脉移植失败(VGF)。仅在外周,5年内静脉移植失败率就达到50%的失败率。由于技术因素和急性血栓形成,5%至10%的静脉移植物在植入后不久即失败,另外20%至30%的病例可能出现中期失败(3至24个月),并可能导致昂贵的监测、再次介入程序和截肢。在布里格姆妇女医院的二十年经验中,CLI患者(n = 1219)的12个月的静脉移植失败发生率为29%。静脉移植失败的后果通常对患者来说是严重的,包括复发性缺血症状、使手术衰弱和肢体丧失。迄今为止,药物治疗和技术创新对减少静脉移植失败的影响甚微。

[0137] 预期的是,无论是由静脉移植物采集、保存介质、制备搭桥的过度操作还是由局部缺血和再灌注损伤引起的静脉移植导管的脆性内皮层的损伤,都导致植入之后在血管壁之内的血小板介导的炎症反应。这种内皮损伤和ECM-血小板活化级联可以通过急性炎症和血栓形成早期的VGF,或通过新生内膜增生形成延迟的VGF。因此,限制静脉移植物内皮下基质在植入后暴露至循环的血小板,可以帮助减少急性血管壁炎症,改善再上皮化并限制可能导致血管闭塞和VGF的过度新生内膜增生。如本文所述的生物缀合物可以被用作具有自体静脉移植物的手术搭桥的患有心血管疾病的患者的静脉移植物保存液。如本文所述的生物缀合物和包含其的组合物可以被用来在有需要的患者中治疗和/或预防冠状动脉疾病和/或外周动脉疾病。

[0138] 因此,根据本公开的一个实例,提供了一种制备血管移植物(例如静脉移植物)的

方法,该方法将血管的区段的内壁与含有本发明的合成的生物缀合物的溶液相接触。实现所述接触的一种方法是将该区段浸泡在所述溶液中。这种接触的条件可以变化,但是可以根据合成的生物缀合物的浓度和血管的特性,容易地确定所述条件,使得合适的量的合成生物缀合物结合到内壁。用这种方法制备的血管移植物也在本公开的范围之内。

[0139] 一旦制备了移植物,就可以将其植入至有需要的患者。可以容易地由医疗专业人员进行外科搭桥手术。一旦植入,则结合至移植物内壁的合成的生物缀合物可以帮助减少急性血管壁炎症,改善移植物的再上皮化并限制移植物的过度新生内膜增生,从而减少移植失败。

[0140] 在一个实施方案中,当已经如上所述使用合成的生物缀合物处理移植物时,在搭桥手术过程期间或之后,可以将合成生物缀合物的溶液注射进移植物的内腔中,使得合成的生物缀合物将结合移植物的内壁。在一个方面,在血流恢复或开始通过移植物之前完成注射。在另一个方面,在血流恢复或开始之后不久(例如在10分钟内、在5分钟内、或在1分钟内)完成注射。

[0141] 在一些实施方案中,所述方法有效地抑制血管的负向重塑。冠状动脉疾病,也被称为缺血性或冠状性心脏病,发生在冠状动脉(向心肌提供血液的动脉)之内的一部分光滑的弹性衬里发生动脉粥样硬化时,有效地限制血液流向心脏。外周动脉疾病,也被称为动脉粥样硬化或动脉硬化,是在循环系统的动脉中发生的一种疾病。负性重塑包括血管对刺激的生理或病理反应,导致血管直径和管腔直径的减小。这种刺激可以通过例如血流改变或血管成形术过程来提供。在一些实施方案中,本文所述的生物缀合物和包含其的组合物的注射,与没有注射的血管的直径相比,导致血管直径增加约10%、20%、30%、40%、60%、70%、80%、95%、或以上的任一种。可以例如通过血管造影将负性重塑量化为在病变部位(或疾病部位)的直径狭窄百分比。确定重塑程度的另一种方法涉及使用血管内超声(IVUS)测量病变内外部弹性薄层区域。IVUS是一种可以对外部弹性薄层以及血管腔进行成像的技术。在一些实施方案中,负向重塑与血管介入手术相关,例如血管成形术、支架术或经皮腔内斑块旋切术。因此,可以在血管介入手术之前、期间和/或之后,注射如本文所述的生物缀合物和包含其的组合物。在一些实施方案中,提供了一种在有需要的患者中治疗股腘动脉之内的狭窄、或闭塞的方法,所述方法包括在球囊血管成形术之前、期间和/或之后将溶液施加至腔的内壁,其中所述溶液包含有效量的如本文所述的生物缀合物或包含其的组合物。

[0142] 因此,本发明提供了一种在有需要的个体中抑制血管(例如动脉)中的负性重塑的方法,所述方法包括将有效量的本文所述的生物缀合物或包含其的组合物注射进血管壁或血管壁周围的组织中。在一些实施方案中,所述生物缀合物或组合物被注射在潜在的或实际的负性重塑部位处或其附近(例如离该部位不超过约2.1或0.5cm)。在一些实施方案中,将纳米颗粒组合物远离潜在的或实际的负性重塑部位注射(例如离该部位至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10 cm中的任何一个)。在一些实施方案中,所述注射是通过带有针头的导管。在一些实施方案中,所述部位是冠状动脉或外周动脉。在一些实施方案中,所述动脉选自肾动脉、脑动脉、肺动脉和腿部动脉。在一些实施方案中,所述动脉是球囊受伤的动脉。进一步的实例包括但不限于腹主动脉、胫前动脉、主动脉弓、弓形动脉、腋动脉、肱动脉、颈动脉、腹腔动脉、旋腓动脉、肝总动脉、髂总动脉、深股动脉(deep femoral artery)、掌深动脉弓、指背动脉、跖背动脉、颈外动脉、髂外动脉、面动脉、股动脉、肠系膜下动脉、髂内动脉、肠动脉、

膝下外侧动脉、膝上外侧动脉、掌指动脉、腓动脉、腓动脉、胫后动脉、股深动脉 (profunda femoris artery)、肺动脉、桡动脉、肾动脉、脾动脉、锁骨下动脉、掌浅动脉弓、肠系膜上动脉、尺侧上副动脉、和/或尺动脉。在一些实施方案中,所述动脉是冠脉血管的一部分。

[0143] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并且具有约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列: RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHGLDDEGPC (SEQ ID NO:)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0144] c. 血管治疗

[0145] 本文所述的生物缀合物和组合物可以被用来在血管损伤或介入之前、期间和/或之后治疗患者中的血管。所述血管介入可以包括但不限于有和没有支架的血管成形术、移植血管、经腔内斑块旋切术和血管通路功能障碍、或其他外科手术。

[0146] 在本文所述的各种实施方案中,可以将生物缀合物或其组合物施用至需要治疗的患者,以抑制血小板活化,该活化例如参与血栓形成、血小板结合至裸露内皮的暴露的胶原、剥脱内皮产生的炎症、内膜增生或血管痉挛。

[0147] 在各种实施方案中,所述生物缀合物可以例如静脉内施用或施用进肌肉。其它合适的胃肠外施用途径包括血管内、静脉内、动脉内、肌内、皮肤、皮下、经皮、皮内、和表皮内递送。用于肠胃外施用的合适的手段包括针(包括微针)注射器、输注技术、以及基于导管的递送。基于导管的递送可以包括将生物缀合物作为球囊上的涂层、通过多孔球囊、或作为支架上的涂层而递送。在另一个实施方案中,所述生物缀合物可以全身递送(即不直接递送至目标血管,而是通过肠胃外施用递送)。

[0148] 这些生物缀合物通过物理的肽-胶原相互作用局部地结合至暴露的胶原。当结合至胶原时,所述生物缀合物具有许多功能,包括1)作为血小板附着/活化的屏障,2)通过抑制MMP通路保护胶原免于降解,和3)隔离生长因子FGF-2、FGF-7、和FGF-10,从而促进内皮和上皮细胞的增殖和迁移。

[0149] 所述生物缀合物可以竞争胶原上的血小板结合位点并防止血小板结合和活化。所述生物缀合物的聚糖骨架可以带负电荷并结合水分子,在胶原表面形成亲水屏障,防止血小板和蛋白质的粘附。通过掩盖暴露的胶原,而不是抑制正常的血小板功能,所述生物缀合物可以提供局部治疗,解决级联中炎症和内膜增生的初始步骤。

[0150] 在一个实施方案中,本发明提供了一种新的方法来解决接受血液透析的患者中的血管通路功能障碍的未满足需求。在一个实施方案中,所述方法需要产生设计自如本文所述的生物缀合物的官腔血管涂层。例如,在动静脉瘘(AVF)中,新内膜增生大多发生在AVF的静脉部分。虽然内膜增生的初始机制在动脉和静脉中是相似的,但是产生的病变存在差异。在外周血管疾病的情况下,静脉内膜增生倾向于成为比动脉内膜增生更具侵袭性的病变,并且对血管成形术的反应较差。公开的生物缀合物预防动脉损伤中的血小板结合和内膜增生的能力被认为有助于其降低或预防新内膜增生的能力。

[0151] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种用于改善需要血液透析的患者中的动静脉瘘(AVF)的成熟的方法、或者用于改善开放性、扩大静脉的内径、减少狭窄、减少新生

内膜增生、减少血液动力学应激、减少内皮或平滑肌细胞损伤、减少血管通路功能障碍、或减少AVF处的凝血或炎症的方法。在一些实施方案中,所述方法需要将溶液施加至AVF的腔的内壁;以及恢复或启动AVF中的血流,其中所述溶液是本发明的生物缀合物、或者所述溶液包含有效量的本发明的生物缀合物。

[0152] 本发明公开了一种局部治疗,其使用合成的聚合物腔涂层,其特异性地结合至暴露的胶原,其中所述涂层可以阻止血小板粘附到血管壁,从而抑制血栓形成和内膜增生中的引发事件。另外,所述涂层可以促进血管壁的快速内皮再生,导致更快的愈合。可以预期,在生成过程中将所公开的生物缀合物施用至天然AV瘘管将导致瘘管的狭窄显著减少和直径更大。

[0153] 在一些实施方案中,对于在血液流动开始之前新产生的AVF,在血流开始之前少于约10分钟施用溶液。在一些实施方案中,在血液流动开始之前少于约20、15、10、9、8、7、6、5、4、3或2分钟、或60、45、30、20、10或5秒钟施用溶液。在一些实施方案中,在血液流动开始之前至少1分钟或至少2、3、4、5分钟施用溶液。在一些实施方案中,在血液流动恢复之后至少1分钟或至少2、3、4、5分钟施用溶液。在一些实施方案中,开始血液流动,然后停止以允许输送溶液。在一些实施方案中,在创建吻合术之前、在创建吻合术期间、或之后将溶液施用至血管。在一些实施方案中,在创建吻合术之前、在创建吻合术期间、以及之后将溶液施用至血管。

[0154] 在一些实施方案中,将溶液冲洗通过AVF,例如使用针、导管或其他药物递送装置。在一个实施方案中,所述方法还需要在使用溶液冲洗AVF之后关闭AVF。在一些实施方案中,除了如上所述的溶液的施用之外,或者可替代地,将溶液注入通过夹紧已建立的AVF的近侧和静脉和动脉而产生的封闭的管腔中。

[0155] 在一个实施方案中,在静脉扩张或摩擦AVF的静脉部分之后约5分钟之内(或者10、9、8、7、6、4、3或2分钟之内)施加溶液,其用于扩大静脉的内径。将溶液施用至静脉内部的机械扩张或摩擦的表面,可以减少摩擦过程中表面上生物缀合物的损失。

[0156] 进一步设想,所公开的组合物和方法可以用于在患者中建立血管通路,该方法可能需要将本发明的溶液施用至血管通路中的血管的壁;并恢复或启动血管通路中的血液流动。在一些实施方案中,所述壁是血管的内壁,但也可以是任何血管的外壁。

[0157] 在一些实施方案中,所述血管通路是动静脉瘘(AVF)、动静脉移植(AVG)、或用于肠外营养、化疗或血浆置换的持久的血管通路。预期的是,所述溶液减少暴露至血小板的壁。在一些实施方案中,所述壁包括由于损伤或外科手术而暴露至血流的细胞或组织。结果表明,所述溶液的应用在血管通路(例如AVF和AVG)中改善了开放性、改善了存活率、改善了血流、扩大了血管内径、或者减少了狭窄。

[0158] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于改善需要血液透析的患者中的动静脉瘘(AVF)的成熟的方法、或者用于改善开放性、扩大静脉的内径、减少狭窄、减少新生内膜增生、减少血液动力学应激、减少内皮或平滑肌细胞损伤、减少血管通路功能障碍、或减少AVF处的凝血或炎症的方法。在一些实施方案中,所述方法需要将溶液施加至AVF的腔的内壁;以及恢复或启动AVF中的血流,其中所述溶液包含有效量的本发明的生物缀合物。

[0159] 预期的是,所述生物缀合物可以经皮或静脉内施用至患者的血管的内部。经皮或静脉内递送允许治疗患者手术后瘘生成。所述生物缀合物可以被递送用于治疗血管、维持

血管、或防止瘘管失败。

[0160] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括进行一个或多个维护应用,例如球囊辅助的成熟、球囊血管成形术、经皮腔内斑块旋切术、或脱色程序。但是,在一些实施方案中,在血液透析时的预防性输送,特别是在特别高的流速损伤内皮的过程之后,以及移植或瘘中的注射被认为有利于维持和预防狭窄。

[0161] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并且具有约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列: RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0162] *d. 血管介入*

[0163] 可以在施用胶原结合的合成生物缀合物之前、期间或之后,通过任何常规的程序,进行血管介入(例如经皮冠状动脉介入)。考虑与本发明的方法结合使用的血管介入手术的实例包括支架术、经皮腔内斑块旋切术、和血管成形术,例如球囊血管成形术。血管介入手术可以涉及暂时闭塞血管(例如球囊血管成形术),或者可以不涉及暂时闭塞血管(例如非球囊血管成形术手术、不涉及球囊血管成形术的支架手术等)。示例性的递送模式可以包括导管、肠胃外施用、球囊上的涂层、通过多孔球囊、涂覆的支架、及其任何组合或在血管介入手术期间的递送药物的任何其他已知的方法。

[0164] 在另一个说明性的实施方案中,在血管介入手术期间,具有保守的氨基酸取代的这些生物缀合物中的任一种可以抑制血小板结合至裸露的内皮的暴露的胶原、血小板活化、血栓形成、剥脱内皮导致的炎症、内膜增生、和/或血管痉挛,或者可以刺激内皮细胞增殖或者可以在裸露的血管中结合至胶原。在另一个说明性的实施方案中,在血管介入手术期间,本段中描述的具有保守的氨基酸取代的任何生物缀合物可以抑制血小板结合至裸露的内皮的暴露的胶原、血小板活化、内膜增生、和/或血管痉挛,或者可以在裸露的血管中结合至胶原。

[0165] 在本文所述的各种实施方案中,可以将胶原结合的合成生物缀合物施用至患者(例如需要治疗以抑制血小板活化的患者,该活化例如参与血栓形成、血小板结合至裸露内皮的暴露胶原、血栓形成、剥脱内皮产生的炎症、内膜增生、或血管痉挛)。在各种实施方案中,胶原结合的合成生物缀合物可以例如静脉内施用或施用进肌肉。用于肠胃外施用的合适的途径包括血管内、静脉内、动脉内、肌内、皮肤、皮下、经皮、真皮内、以及表皮内递送。用于肠胃外施用的合适手段包括针(包括微针)注射器、输注技术和基于导管的递送。在说明性实施方案中,提供了用于与胶原结合的合成生物缀合物一起用于肠胃外施用或基于导管的递送的药物制剂,其包含:a) 药物活性量的胶原结合的合成生物缀合物;b) 药学上可接受的pH缓冲剂,以提供在约pH 4.5至约pH 9范围内的pH;c) 浓度范围为约0至约300毫摩尔的离子强度调节剂;和d) 浓度范围为总配方重量的约0.25%至约10%的水溶性粘度调节剂、或任何单独的组分a)、b)、c)或d)或a)、b)、c)、和d)的任何组合。

[0166] 在本文所述的任何实施方案中,可以以任何合适的方式将胶原结合的合成生物缀合物血管内施用进患者(例如进入动脉或静脉)。在本文所述的各种实施方案中,可以在血

管介入之前、期间、或之后,将胶原结合的合成生物缀合物施用进患者的血管中。在各种实施方案中,例如经皮冠状动脉介入(PCI)的血管介入可以包括例如支架术、经皮腔内斑块旋切术、移植术、和血管成形术,例如球囊血管成形术。说明性地,血管介入可以涉及暂时闭塞动脉(例如冠状动脉)或静脉(例如球囊血管成形术),或者可以不涉及暂时闭塞动脉或静脉(例如非球囊血管成形术手术、不涉及球囊血管成形术的支架手术等)。示例性的递送模式可以包括导管、肠胃外施用、球囊上的涂层、通过多孔球囊、涂覆的支架、及其任何组合或在血管介入手术期间的递送药物的任何其他已知的方法。在一个说明性的实施方案中,目标血管可以包括冠状动脉,例如向患者的心脏组织提供血液的任何血管,包括天然的冠状动脉以及已经移植进患者的血管,例如在早期的冠状动脉搭桥手术中移植的。在本文所述的任何实施方案中,待施用胶原结合的合成生物缀合物的目标血管和要在其上进行血管介入手术的目标血管可以包含阻塞,例如狭窄或导致通过血管的血流减少的一些其它形式的完整或部分阻塞。因此,可以通过导管(例如扩张导管、线上血管成形术球囊导管、输注导管、快速交换或单轨导管、或本领域已知的任何其他导管装置)递送胶原结合的合成生物缀合物,所述导管被经皮插入患者体内,并穿过患者的血管到目标血管。本领域已知各种基于导管的装置,包括在美国专利第7,300,454号中描述的那些装置,该专利在此引入作为参考。在使用导管的本文所述的各种实施方案中,用于递送胶原结合的合成生物缀合物的导管,可以是与通过其来进行血管介入的导管相同的导管,或者可以是不同的导管(例如通过相同或不同的皮肤切口径皮插入患者体内的不同导管、和/或通过相同或不同的途径穿过患者的血管至目标血管的不同导管)。在另一个实施方案中,胶原结合的合成生物缀合物可以直接注射进目标血管。在另一个实施方案中,胶原结合的合成生物缀合物可以全身递送(即不直接递送至目标血管,而是通过肠胃外施用递送而不需要基于导管的递送)。

[0167] 在血管含有阻塞物(例如狭窄)的情况下,可以通过将胶原结合的合成生物缀合物直接递送至阻塞部位处或远离阻塞处或两者的目标血管来进行施用。在另一个实施方案中,可以将胶原结合的合成生物缀合物递送至阻塞附近的一个或多个位点。说明性地,当递送胶原结合的合成生物缀合物时,导管尖端可以保持静止,或者可以在递送胶原结合的合成生物缀合物的同时移动导管尖端(例如以从最初远离阻塞的位置、至或者穿过阻塞、或至靠近阻塞的位置的方向)。

[0168] 如上所述,在一个实施方案中,可以在血管介入(例如经皮冠状动脉介入)之前的一个时间,将胶原结合的合成生物缀合物直接施用至患者的血管。例如,可以就在血管介入之前(例如在血管介入之前约1小时内,例如约30分钟内、约15分钟内、和/或约5分钟内),进行胶原结合的合成生物缀合物的递送。任选地,可以在全部或部分血管介入手术期间和/或在该手术完成之后,继续将胶原结合的合成生物缀合物直接递送至目标血管,或者可以在开始血管介入手术之前,停止将胶原结合的合成生物缀合物直接递送至目标血管,并且随后不重新开始。在本文所述的任何实施方案中,胶原结合的合成生物缀合物的递送可以是连续的,或者可以通过单次或多次施用来进行。在将胶原结合的合成生物缀合物施用至目标血管之前、期间和/或之后,可以施用相同的胶原结合的合成生物缀合物或一种或多种不同的胶原结合的合成生物缀合物。

[0169] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并且具有约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列:

RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0170] e. 内皮功能障碍

[0171] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗患有与内皮功能障碍相关的疾病的患者的组合物和方法。在一些实施方案中,所述组合物包括本发明的合成的胶原结合的生物缀合物。

[0172] 本文发现,胶原结合的生物缀合物可以减少急性和慢性疾病中内皮功能障碍或损伤的炎症影响。预期这样的生物缀合物抑制或减少血小板结合至功能失调的内皮,从而减少血小板介导的炎症。炎症可以通过血小板过程来激活,例如血小板-血小板结合、血小板-白细胞结合、促进白细胞渗出、或者简单地从血小板释放局部和区域性细胞因子。

[0173] 进一步地,本文发现,胶原结合的生物缀合物减少了暴露的内皮细胞中的促炎细胞因子分泌和E-选择素和P-选择素的表达。再者,即使在血小板衍生的生长因子(PDGF)的存在下,这些生物缀合物也可以增加内皮细胞增殖和迁移、减弱IL-6分泌和血管损伤标志物的产生。预期的是,由胶原结合的生物缀合物的施用引起的这些作用中的一些或全部有助于减少功能失调的内皮处的炎症。

[0174] 在一些实施方案中,还提供了一种用于预防或减轻患有内皮功能障碍的血管部位的炎症的方法。所述方法需要向所述部位施用包含本发明的合成的胶原结合的生物缀合物的药物组合物。

[0175] 术语“内皮功能障碍”也被称为“内皮细胞(EC)功能障碍”、“功能失调的内皮”或“功能失调的内皮细胞”。可以通过在内皮细胞的细胞表面上揭露或暴露ICAM和VCAM受体或选择素受体,确定内皮功能障碍。P-选择素和E-选择素是暴露的选择素受体实例,其由于损伤和炎症而在细胞表面瞬时表达,并在功能失调的内皮中长期表达。

[0176] 在一些实施方案中,内皮功能障碍的特征是渗透的内皮衬里或损伤的内皮细胞。在一些实施方案中,内皮功能障碍的特征在于糖萼的损失。在一些实施方案中,内皮功能障碍的特征在于在内皮细胞的表面上表达并暴露于循环的选择素蛋白。在一些实施方案中,该部位发炎。

[0177] 在一个方面,血管部位不被物理手段裸露并且不从血管介入手术中恢复。血管介入手术的非限制性实例包括经皮冠状动脉介入(PCI)。

[0178] “功能失调的内皮细胞”或“内皮细胞(EC)功能障碍”意指在内皮细胞的细胞表面上揭露或暴露ICAM和VCAM受体以及选择素受体。P-选择素和E-选择素是暴露的选择素受体实例,其由于损伤和炎症而在细胞表面瞬时表达,并在功能失调的内皮中长期表达。具有慢性功能失调的内皮细胞的疾病状态的一个实例是糖尿病。

[0179] 内皮细胞的功能障碍在广泛的疾病的发病机制中起重要作用,因为内皮细胞参与维持功能性毛细血管。

[0180] 例如,内皮直接涉及外周血管疾病、中风、心脏病、糖尿病、胰岛素抵抗、慢性肾衰竭、肿瘤生长、转移、静脉血栓形成、以及严重的病毒感染性疾病(Rajendran *et al.*, *Int. J. Biol. Sci.*, 9:1057-1069, 2013)。

[0181] 如本文使用的,“与内皮功能障碍相关的疾病”是指至少部分由内皮功能障碍引起或诱导内皮功能障碍的人类疾病或病症。相应地,治疗与内皮功能障碍相关的疾病是指治疗疾病、恢复功能失调的内皮、或者预防或改善由功能失调的内皮引起的病症或症状,例如炎症、内膜增生和血栓形成。

[0182] 本发明人已经证明,胶原结合的生物缀合物可以有效地递送至人类患者的任何器官。因此,胶原结合的生物缀合物可以被用来治疗在任何器官中发生并与以下任何疾病或病症相关的内皮功能障碍。

[0183] **血管疾病。**可以用胶原结合的生物缀合物适当治疗的血管疾病包括但不限于动脉粥样硬化疾病(外周动脉疾病、冠状动脉疾病、中风、颈动脉疾病、肾动脉狭窄)、静脉血栓形成疾病(深静脉或浅静脉血栓形成)、以及医源性大血管损伤(血管成形术、设置支架的血管成形术、经皮腔内斑块旋切术、血栓切除术、创建透析通路、用于搭桥的静脉采集、脑或主动脉瘤的治疗)。

[0184] **肾脏疾病。**可以用胶原结合的生物缀合物适当治疗的肾脏疾病包括但不限于急性肾小管坏死、糖尿病慢性肾衰竭、狼疮肾炎、肾纤维化、以及急性肾小球肾炎。

[0185] **肺部疾病。**可以用胶原结合的生物缀合物适当治疗的肺部疾病包括但不限于特发性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺病、哮喘、以及肺气肿。

[0186] **血液疾病。**可以用胶原结合的生物缀合物适当治疗的血液疾病包括但不限于血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、弥散性血管内凝血(DIC)、以及溶血性尿毒症综合征(HUS)。

[0187] 此外,还可以使用本发明的胶原结合的生物缀合物治疗皮肤疾病(例如系统性硬化)、风湿病(包括血管炎病症(狼疮)、类风湿性关节炎和其他炎性关节炎(痛风))、胃肠疾病(包括炎性肠病、肝炎、和肝纤维化)、肿瘤生长、肿瘤转移、感染性疾病(包括病毒性和细菌性败血症)、神经系统疾病(包括多发性硬化症、痴呆、和肌萎缩侧索硬化)、眼科疾病(包括黄斑变性、青光眼、和葡萄膜炎)、内分泌疾病(例如糖尿病)、以及复合区域疼痛综合征(CRPS)。

[0188] 考虑的是,可以根据待治疗的疾病和受影响的功能失调内皮的位置,针对肽同一性、连接至聚糖的肽的数量、以及GAG骨架特性,对生物缀合物进行调整以优化治疗。因此,可以设计许多分子设计参数来优化目标效果。

[0189] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并且具有约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列: RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0190] *f. 组织粘连*

[0191] 本发明的方法可用于与组织粘连有关的各种应用,例如心脏、腹部或骨盆粘连。考虑的是,本发明的方法可用于治疗和/或预防这些持续的缺陷或复发性损伤。

[0192] 在一些实施方案中,本发明提供了一种在有需要的患者中治疗和/或预防腹部或盆腔粘连的方法,其包括将药物组合物施用于器官的非自然暴露的组织上。在一个实施方案中,所述组合物包含生物缀合物,所述生物缀合物包含聚糖,所述聚糖具有约1至约80个

胶原结合肽键合至该聚糖。“暴露的组织”可以指暴露于在正常健康条件下看到的新环境的组织或表面、或者在正常健康的条件下不暴露于不同器官的细胞或组织但是由于疾病、或损伤、或在医疗程序期间而暴露的组织(即“非自然暴露的组织”)。

[0193] 粘连是纤维疤痕组织的异常地结合通常不连接的组织 and/或器官的带。在对各种类型的损伤或组织紊乱的响应中会发生粘连,例如手术、创伤、感染、化学疗法、放射、异物、或癌症。

[0194] 腹部和盆腔粘连是腹部外科手术常见的并发症。腹部粘连会导致严重的临床问题和/或疼痛。例如,腹部粘连相关的临床问题可以包括小肠梗阻、继发性女性不孕症、异位妊娠、慢性腹部和盆腔疼痛、以及困难和危险的再次手术(Diamond, M. P., Freeman, M. L. Eur. Soc. Human. Repro. Embryo. 2001; 7(6): 567-576)。腹部粘连可能通过束缚不正常连接的组织 and/或器官并引起神经牵引而引起疼痛。如果肠发生梗阻然后膨胀,则会导致疼痛。相应地,腹部粘连可能导致肠道紊乱和肠梗阻或阻塞。在极端的情况下,腹部粘连可能在肠段周围形成纤维条带,其收缩血流并导致组织死亡。

[0195] 导致上述临床问题和/或疼痛的腹部和盆腔粘连的标准治疗是手术干预。然而,手术干预带有额外的腹部粘连和进一步的并发症的风险。因此,腹部粘连的替代治疗和/或预防选择将有益于治疗和/或预防有需要的患者的腹部粘连。

[0196] 在一个方面,腹部组织或器官的创伤导致腹部组织 and/或器官之间的纤维组织带形成。考虑的是,本文所述的方法可用于治疗和/或预防所述腹部粘连。

[0197] 考虑的是,本文提供的合成的生物缀合物将提供保护性水合层以使疼痛最小化、保护腹部组织 and/或器官胶原免于降解、并促进上皮迁移和上皮增殖。

[0198] 在一些实施方案中,本发明提供了一种在有需要的患者中治疗和/或预防腹部粘连的方法,其包括在腹部器官的暴露的组织上施用药物组合物。在一个实施方案中,所述组合物包含生物缀合物,所述生物缀合物包含聚糖,所述聚糖具有约1至约80个胶原结合肽键合至该聚糖。

[0199] 在一些实施方案中,本发明提供了一种在有需要的患者中治疗和/或预防腱-腱鞘粘连的方法,其包括将本文所述的生物缀合物或组合物施用至非自然暴露的腱 and/或腱鞘。

[0200] 在一些实施方案中,本发明提供了一种在有需要的患者中治疗和/或预防心脏粘连的方法,其包括将本文所述的生物缀合物或组合物施用至非自然暴露的心脏组织。

[0201] 在一些方面,所述组织由于手术、创伤、感染、化疗、放射、异物、或癌症而被暴露。在一个方面,所述组织被手术地暴露。

[0202] 在一些方面,所述组合物作为喷雾剂而被施用。在一些方面,所述组织是腹膜组织。

[0203] 还预期本发明的组合物和方法可用于减少或防止畸形粘连,例如在手或手指手术期间。

[0204] 在一些实施方案中,所述方法可以进一步包括本领域已知的减少或防止粘连的其它方法,例如使用围绕组织的网。

[0205] 本文提供的生物缀合物可以被用来通过向患者施用靶向腹部组织 and/或器官的细胞外基质组分的合成生物缀合物来治疗和/或预防有需要的患者的腹部粘连。预期的是,可以针对肽同一性、连接至糖胺聚糖(GAG)骨架的肽的数目、以及GAG骨架特性,来定制本文提

供的合成生物缀合物,以促进腹部组织血管形成。因此,可以设计许多分子设计参数来优化目标效果。

[0206] 本文提供的生物缀合物可以用作手术中的辅助物以防止或减少组织粘附。在手术过程中,合成的生物缀合物可以被递送至可能是粘附性的组织或器官。预期这样的施用将有助于预防和/或减少术后粘连。在一个实施方案中,本发明提供了一种减少或防止手术后粘连的方法,其中所述方法包括将本文提供的合成生物缀合物递送至手术部位。在另一个实施方案中,本文提供的生物缀合物可用于腹腔手术(例如腹腔镜腹部手术)中。在另一个实施方案中,本文提供的生物缀合物可以通过腹腔镜而被递送至可能是粘附性的组织或器官。考虑的是,使用生物缀合物的处理,将通过结合至损伤区域、提供保护性的保湿层以使疼痛最小化、保护腹部组织和/或器官胶原免于降解、以及促进上皮迁移和上皮细胞增殖,从而治疗和/或防止腹部粘连。进一步考虑的是,生物缀合物将持续存在于受伤部位,因此不需要每天多次治疗。

[0207] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并且具有约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列: RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0208] 可以在开放式手术期间或者通过腹腔镜或者通过允许进入手术部位的任何器械而施用本发明的组合物。

[0209] *g. 胃食管损伤*

[0210] 在一个实施方案中,本发明提供了一种新的方法来解决治疗或预防患者中的胃食管损伤的未满足的需求。一般而言,所述新方法需要将包含本发明的合成胶原结合的生物缀合物的药物组合物应用于受损的胃食管组织或细胞上。

[0211] 组合物的这种应用可以产生合成的胶原结合的生物缀合物的涂层。合成的胶原结合生物缀合物可以通过物理的肽-胶原相互作用结合至暴露于食管组织的胶原。当结合至胶原时,所述生物缀合物具有许多功能,包括1)作为血小板附着/活化的屏障、2)通过抑制MMP通路保护胶原免于降解、和3)隔离生长因子FGF-2、FGF-7、和FGF-10,从而促进内皮细胞和上皮细胞的增殖和迁移,导致组织修复和恢复。

[0212] 在一个实施方案中,胶原结合的生物缀合物包括共价连接有胶原结合的肽的多糖骨架。所述合成的生物缀合物可以竞争胶原上的血小板结合位点并防止血小板结合和活化。所述生物缀合物的聚糖骨架可以带负电荷并结合水分子,在胶原表面形成亲水屏障,防止血小板和蛋白质的粘附。通过掩盖暴露的胶原,而不是抑制正常的血小板功能,所述生物缀合物可以提供局部治疗,解决级联中炎症和内膜增生的初始步骤。

[0213] 考虑的是,这种新方法对于治疗胃食管损伤是有用的,其包括但不限于由GERD或医源性干预引起的。进一步考虑的是,以下类别的患者可以从这种方法中受益:A)需要食管胃十二指肠镜(EGD)消融的GERD相关的食管损伤;B)需要EGD扩张的食道狭窄;C)需要EGD治疗的消化性溃疡病(PUD)。

[0214] 可以将药物组合物局部应用至受损的胃食管组织的一个或多个病变。考虑到组织

的有限的可进入性,预期使用输送装置是有益的。例如,可以在食管胃十二指肠镜(EGD)手术期间或使用食管胃镜十二指肠镜,递送所述组合物。

[0215] 帕利夫明(Palifermin)是一种可用于口腔粘膜炎治疗的角质形成细胞生长因子。本发明的生物缀合物结合至胶原,并且也结合至内源或外源生长因子(例如帕利夫明)。因此,这样的制剂提供了帕利夫明的靶向递送。在一些实施方案中,本发明提供了一种递送帕利夫明的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将包含生物缀合物和帕利夫明的组合物施用至有需要的患者。在其他实施方案中,本发明提供了一种用于治疗患者的口腔粘膜炎的方法,其中所述方法包括将包含生物缀合物和帕利夫明的组合物施用至有需要的患者。

[0216] 考虑的是,可以针对肽特性、连接至聚糖的肽的数目、以及GAG骨架特性来定制溶液中提供的生物缀合物,以促进损伤的胃食管组织的恢复。因此,可以设计许多分子设计参数来优化目标效果。

[0217] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并且具有约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列: RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0218] *h. 伤口愈合*

[0219] 本文所述的方法和组合物可以被用来治疗组织完整性受损的任何状况,包括慢性伤口和急性伤口、结缔组织中的伤口、以及肌肉、骨骼和神经组织中的伤口。如本文使用的,“伤口”包括手术切口、烧伤、酸碱烧伤、冷灼伤(冻伤)、晒伤、溃疡、压疮、割伤、擦伤、撕裂伤、由躯体创伤造成的伤口、由先天性疾病造成的伤口、由牙周病或接着的牙科手术造成的伤口、以及与癌组织或肿瘤有关的伤口。如本文所述,伤口可以包括急性伤口或慢性伤口。

[0220] 急性伤口是由完整皮肤的外部损伤引起的,包括手术伤口、咬伤、烧伤、割伤、撕裂、擦伤等。慢性伤口包括例如由损害真皮或上皮组织完整性的内源性机制造成的伤口,例如腿部溃疡、足部溃疡、以及压疮。在本文所述的任何实施方案中,用于促进伤口愈合或减少疤痕形成的组合物可以在任何时间被使用来治疗慢性或急性伤口。例如,可以在手术之前、手术期间、或手术之后治疗与手术切口相关的急性伤口,以促进伤口愈合和/或减少患者中的疤痕形成。在多个示例性方面,可以以一个剂量或多个剂量将如本文所述的组合物施用至患者,以促进伤口愈合和/或减少疤痕形成。

[0221] 如本文使用的,“减少疤痕形成”包括疤痕的极限拉伸强度的增加和/或可见的疤痕长度的减少。如本文使用的,疤痕形成的减少还包括完全抑制疤痕形成或完全消除患者中可见的疤痕。

[0222] 如本文使用的,“促进伤口愈合”是指引起慢性或急性伤口的部分或完全愈合,或减轻由急性或慢性伤口引起的任何症状。这样的症状包括疼痛、出血、组织坏死、组织溃疡、疤痕形成、以及已知由急性或慢性伤口引起的任何其他症状。

[0223] 在本文描述的任何实施方案中,提供了一种促进伤口愈合的方法。所述方法包括向患者施用胶原结合的合成生物缀合物的步骤,其中所述胶原结合的合成生物缀合物促进患者中的伤口愈合。在本文所述的任何各种实施方案中,所述胶原结合的合成生物缀合物

可以是异常的胶原结合的合成生物缀合物或纤维源性胶原结合的合成生物缀合物,其与通常调节胶原原纤维生成的生物缀合物的氨基酸序列的一部分具有氨基酸同源性。

[0224] 在本文描述的任何实施方案中,提供了一种减少疤痕形成的方法。所述方法包括向患者施用胶原结合的合成生物缀合物的步骤,其中所述胶原结合的合成生物缀合物减少患者中的疤痕形成。在本文所述的任何各种实施方案中,所述胶原结合的合成生物缀合物可以是异常的胶原结合的合成生物缀合物或纤维源性胶原结合的合成生物缀合物,其与通常调节胶原原纤维生成的生物缀合物的氨基酸序列的一部分具有氨基酸同源性。

[0225] 在本文所述的任何实施方案中,用于促进伤口愈合和/或减少疤痕形成的组合物可以被浸渍进适于将组合物递送至伤口的任何材料中,所述材料包括棉花、纸、无纺布、机织物和针织物、单丝、薄膜、凝胶、海绵等。例如,可以使用棉花、纸、无纺布、机织物、针织物、薄膜和海绵形式的手术缝合线(单丝、加捻纱或针织纱)、吸收垫、透皮贴剂、绷带、烧伤敷料和包装。

[0226] 在一个实施方案中,上述方法中使用的生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并且具有约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列: RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0227] *i. 角膜伤口*

[0228] 本发明的方法可用于与角膜伤口愈合有关的各种应用。在一个实施方案中,需要治疗的角膜伤口状况是对角膜的创伤性损伤的结果(Chiapella, A. P., Rosenthal, A. R. British Journal of Ophthalmology, 1985; 69: 865-870)。在另一个实施方案中,需要治疗的伤口状况是由眼科手术引起,例如Epi-Lasik诱导角膜损伤(Tuft, S.J., et al. Br J Ophthalmol. 1993; 77: 243-247)。在某些情况下,由于缺乏或不完全愈合,可能会出现持续缺陷或复发性损伤(Kenyon, K. R. Cornea and Refractive Atlas of Clinical Wisdom. Eds. S.A. Melki and M. A. Fava. SLACK, Inc.: New Jersey, US, 2011; pp. 39)。预期本发明的方法可用于治疗这些持久性缺陷或复发性损伤。

[0229] 在一个方面,对角膜上皮的损伤导致角膜屏障功能的破坏,并且预期本文所述的方法可用于治疗所述损伤。

[0230] 本文提供的生物缀合物可以被用来促进有需要的患者的角膜伤口愈合,其向患者施用靶向涉及角膜伤口愈合的特异性细胞外基质组分的生物缀合物。预期可以针对肽特性、连接至聚糖的肽的数目、以及聚糖特性来定制本文提供的生物缀合物,以促进角膜伤口愈合。因此,可以设计许多分子设计参数来优化目标效果。

[0231] 预期使用生物缀合物进行的治疗增强角膜伤口愈合,所述生物缀合物包含硫酸化的透明质酸,并且具有约15%至约30%的肽官能化,其中所述肽包含以下中的至少一个序列: RRANAALKAGELYKSILY (SEQ ID NO:)、RRANAALKAGELYKSILYGSG (SEQ ID NO:)、GQLYKSILY (SEQ ID NO:)、或GQLYKSILYGSGSGSRR (SEQ ID NO:)、CPGRVMHGLHLGDDEGPC (SEQ ID NO)、CVWLWEQC (SEQ ID NO:)、或WREPSFCALS (SEQ ID NO:)、或具有来自其每一个的一个、两个或三个氨基添加、缺失和/或取代的氨基酸序列,其结合至损伤区域、提供

保护性水合层以使疼痛最小化、保护角膜胶原免于降解、和/或促进上皮迁移和/或上皮增殖。进一步考虑,生物缀合物将持续存在于受伤部位,因此不需要每天多次治疗。

[0232] 5. 组合物

[0233] 在一个实施方案中,该生物缀合物以组合物形式施用。本公开提供了包含生物缀合物和药学上可接受的载体的组合物。药学上可接受的载体是本领域普通技术人员已知的,包括水或盐水。如本领域已知的,组分以及它们的相对量由预期用途和递送方法确定。可以选择组合物中使用的稀释剂或载体,使得它们不降低生物缀合物的期望效果。合适的组合物的实例包括水溶液,例如在等渗盐水、5%葡萄糖中的溶液。也可以使用其他熟知的药学上可接受的液体载体,例如醇、乙二醇、酯和酰胺。在某些实施方案中,组合物还包含一种或多种赋形剂,例如但不限于离子强度调节剂、溶解度增强剂、糖(如甘露糖醇或山梨醇)、pH缓冲剂、表面活性剂、稳定聚合物、防腐剂和/或共溶剂。

[0234] 在某些实施方案中,该组合物是水溶液。因为配制的容易性,以及能够通过滴注溶液来容易地施用这些组合物,所以水性溶液适合用于组合物制剂。在某些实施方案中,该组合物是混悬液、粘稠或半粘稠凝胶、或其他类型的固体或半固体组合物。在一些实施方案中,该组合物为本领域中众所周知的泡沫、软膏、液体洗涤剂、凝胶剂、喷雾剂和脂质体的形式。或者,局部施用是通过选自泵-导管系统、连续或选择性释放装置或粘附屏障(adhesion barrier)的装置将所提供的生物缀合物输注至治疗部位。在某些实施方案中,该组合物是直接施用于或接触静脉或动脉的内壁的溶液。在一些实施方案中,该组合物包含聚合物基质。在其他实施方案中,该组合物是可吸收的。在某些实施方案中,该组合物包含pH缓冲剂。在一些实施方案中,该组合物含有润滑性增强剂。

[0235] 在某些实施方案中,聚合物基质或聚合物材料被用作该组合物的药学上可接受的载体。本文所述的聚合物材料可包含天然或非天然聚合物,例如糖、肽、蛋白质、层粘连蛋白、胶原蛋白、透明质酸、离子和非离子水溶性聚合物;丙烯酸聚合物;亲水性聚合物,如聚环氧乙烷、聚氧乙烯-氧丙烯共聚物和聚乙烯醇;纤维素聚合物和纤维素聚合物衍生物,如羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素和醚化纤维素;聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、乳酸和乙醇酸的共聚物,或天然和合成的其它聚合试剂。在某些实施方案中,本文提供的组合物被配制成膜、凝胶、泡沫或其它剂型。

[0236] 合适的离子强度调节剂包括,例如,甘油、丙二醇、甘露醇、葡萄糖、右旋糖、山梨糖醇、氯化钠、氯化钾和其它电解质。

[0237] 在某些实施方案中,该生物缀合物的溶解度可能需要增强。在这种情况下,通过使用合适的制剂技术可以提高溶解度,例如掺入增溶剂成分,如甘露醇、乙醇、甘油、聚乙二醇、丙二醇、泊洛沙姆和本领域已知的其它物质。

[0238] 在某些实施方案中,该组合物含有润滑性增强剂。如本文所用的,润滑性增强剂是指能够改变药学上可接受的载体的粘度的一种或多种药学上可接受的聚合物材料。合适的聚合物材料包括但不限于:离子型和非离子型水溶性聚合物;透明质酸及其盐、硫酸软骨素及其盐、葡聚糖、明胶、壳聚糖、胶凝糖(gellans)、其他生物缀合物或多糖或其任何组合;纤维素聚合物和纤维素聚合物衍生物,如羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素和醚化纤维素;胶原蛋白和改

性胶原蛋白;半乳甘露聚糖,例如瓜尔豆胶、刺槐豆胶和他拉胶,以及衍生自上述天然树胶的多糖以及含有甘露糖和/或半乳糖部分作为主要结构组分的类似天然或合成树胶(例如羟丙基瓜尔胶);胶,如黄蓍胶和黄原胶;结冷胶;海藻酸和海藻酸钠;壳聚糖;乙烯聚合物;亲水性聚合物,如聚环氧乙烷、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物和聚乙烯醇;羧基乙烯基聚合物或交联的丙烯酸聚合物,例如“卡波姆”家族聚合物(如能够以Carbopol™商标商购获得的羧基聚亚烷基);以及各种其他粘性或粘弹性物质。在一个实施方案中,润滑性增强剂选自透明质酸、皮肤素、软骨素、肝素、乙酰肝素、角蛋白、葡聚糖、壳聚糖、藻酸盐、琼脂糖、明胶、羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素和醚化纤维素、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、卡波姆941、卡波姆940、卡波姆971P、卡波姆974P或其药学上可接受的盐。在一个实施方案中,润滑性增强剂与生物缀合物同时施用。或者,在一个实施方案中,将润滑性增强剂与生物缀合物按顺序施用。在一个实施方案中,润滑性增强剂是硫酸软骨素。在一个实施方案中,润滑增强剂是透明质酸。该润滑性增强剂可以改变组合物的粘度。

[0239] 在一些实施方案中,生物缀合物可与以下物质组合:矿物质、氨基酸、糖、肽、蛋白质、维生素(诸如抗坏血酸)、或层粘连蛋白、胶原蛋白、纤连蛋白、透明质酸、纤维蛋白、弹性蛋白、或聚集蛋白聚糖、或生长因子(如表皮生长因子、血小板衍生的生长因子、转化生长因子 β 或成纤维细胞生长因子)、以及糖皮质激素(如地塞米松)或粘弹性改变剂(如离子型和非离子型水溶性聚合物;丙烯酸聚合物;亲水性聚合物(如聚环氧乙烷、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物和聚乙烯醇);纤维素聚合物和纤维素聚合物衍生物(如羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素和醚化纤维素);聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、乳酸和乙醇酸的共聚物、或天然和合成的其它聚合物)。

[0240] 合用于本发明组合物的pH缓冲剂包括例如乙酸盐、硼酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐缓冲剂,以及盐酸、氢氧化钠、氧化镁、磷酸二氢钾、碳酸氢盐、氨、碳酸、盐酸、柠檬酸钠、柠檬酸、乙酸、磷酸氢二钠、硼砂、硼酸、氢氧化钠、二乙基巴比妥酸和蛋白质以及各种生物缓冲液,例如TAPS、Bicine、Tris、Tricine、HEPES、TES、MOPS、PIPES、二甲胍酸盐或MES。在某些实施方案中,将合适的缓冲体系(例如磷酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或硼酸)加入组合物中以防止储存条件下的pH漂移。在一些实施方案中,缓冲液是磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液(即,含有磷酸钠、氯化钠,以及在一些制剂中含有氯化钾和磷酸钾)。具体浓度将根据使用的试剂而变化。在某些实施方案中,加入pH缓冲体系(例如磷酸钠、乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或硼酸)以将pH保持在约pH 4至约pH 8、或约pH 5至约pH 8、或约pH 6至约pH 8、或约pH 7至约pH 8。在一些实施方案中,选择缓冲剂以将pH保持在约pH 4至约pH 8的范围内。在一些实施方案中,pH从约pH 5到约pH 8。在一些实施方案中,缓冲液是盐水缓冲液。在某些实施方案中,所述pH为约pH 4至约pH 8、或约pH 3至约pH 8、或约pH 4至约pH 7。在一些实施方案中,所述组合物为膜、凝胶、贴剂或液体溶液形式,其包含聚合物基质、pH缓冲剂、润滑性增强剂和生物缀合物,其中所述组合物任选地含有防腐剂;并且其中所述组合物的pH在约pH 4至约pH 8的范围内。

[0241] 在组合物中使用表面活性剂来递送更高浓度的生物缀合物。表面活性剂起到增溶抑制剂和稳定胶体分散体的作用,所述胶体分散体例如是胶束溶液、微乳液、乳液和混悬液。合适的表面活性剂包含聚山梨酸酯、泊洛沙姆、聚氧乙烯40硬脂酸酯、聚氧乙烯蓖麻油、

泰洛沙泊、曲通和失水山梨糖醇单月桂酸酯。在一个实施方案中,表面活性剂的亲水/亲油/平衡值(HLB)在12.4至13.2范围内,并且可用于眼用(例如TritonX114和泰洛沙泊)。

[0242] 在某些实施方案中,将稳定聚合物(即缓和剂)加入到组合物中。稳定聚合物应该是离子/带电的聚合物,更具体地说是在其表面上携带负电荷的聚合物,其可以表现出(-)10-50 mV的 ζ -电位以获得物理稳定性并且能够在水中形成分散体(即水溶性)。在一个实施方案中,稳定聚合物包含来自交联聚丙烯酸酯家族的聚电解质或多种聚电解质(如果多于一种的话),例如卡波姆和Pemulen[®],特别是卡波姆974p(聚丙烯酸),其范围为约0.1%至约0.5% w/w。

[0243] 在一个实施方案中,该组合物包含增加生物缀合物对血管的细胞外基质的渗透性的试剂。优选地,该增加渗透性的试剂选自苯扎氯铵、皂苷、脂肪酸、聚氧乙烯脂肪醚、脂肪酸烷基酯、吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、丙酮酸、焦谷氨酸或其混合物。

[0244] 该生物缀合物可以被消毒以去除不需要的污染物,包括但不限于内毒素和传染物。可以使用不会不利地影响生物缀合物的结构和生物趋向性质(biotropic property)的灭菌技术。在某些实施方案中,可以使用常规灭菌技术来消毒和/或灭菌生物缀合物,包括环氧丙烷或环氧乙烷处理、无菌过滤、气体等离子体灭菌、 γ 辐射、电子束和/或过酸(如过乙酸)灭菌。在一个实施方案中,该生物缀合物可以经受一个或多个灭菌过程。或者,可以将生物缀合物包裹在包括塑料包装或箔包装的任何类型的容器中,并且可以进一步灭菌。

[0245] 在一些实施方案中,将防腐剂加入到组合物中以防止使用期间的微生物污染。加入到组合物中的合适的防腐剂包括苯扎氯铵、苯甲酸、对羟基苯甲酸烷基酯、苯甲酸烷基酯、氯丁醇、氯甲酚、十六烷醇、脂肪醇(如十六烷醇)、汞的有机金属化合物(如乙酸盐、硝酸苯汞或硼酸苯汞)、双咪唑烷基脲、己二酸二异丙酯、二甲基聚硅氧烷、EDTA盐、维生素E及其混合物。在某些实施方案中,防腐剂选自苯扎氯铵、氯丁醇、二甲基十二烷基苄基溴化铵、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯乙醇、依地酸二钠、山梨酸或聚季铵盐-1。在某些实施方案中,该组合物包含防腐剂。在一些实施方案中,防腐剂的用量为约0.001%至约1.0% w/v。在某些实施方案中,该组合物不含防腐剂并被称为“无防腐剂的”。在一些实施方案中,单位剂量组合物是无菌的、但无防腐剂的。

[0246] 在一些实施方案中,生物缀合物和其他药剂的单独或顺序施用是有利于递送组合物的。在某些实施方案中,生物缀合物和其它药剂可以以不同的给药频率或间隔给药。例如,生物缀合物可以每天给药,而其他药剂可以给药频率低些。另外,如本领域技术人员所显而易见的,可以使用相同的施用途径或不同的施用途径施用生物缀合物和其它药剂。

[0247] 可以使用任何有效的施用生物缀合物的方案。例如,生物缀合物可以作为单一剂量施用或作为多剂量每日方案施用。此外,例如一至五天每周的交错疗法可以用作每日治疗的替代方案。

[0248] 在各种实施方案中,生物缀合物可以局部施用,例如通过膜、凝胶、贴剂或液体溶液施用。在一些实施方案中,组合物以在缓冲的无菌水溶液形式提供。在某些实施方案中,溶液具有约1至约100厘泊(cps)、或约1至约200 cps、或约1至约300 cps、或约1至约400 cps的粘度。在一些实施方案中,溶液具有约1至约100 cps的粘度。在某些实施方案中,溶液具有约1至约200 cps的粘度。在某些实施方案中,溶液具有约1至约300 cps的粘度。在某些实施方案中,溶液具有约1至约400 cps的粘度。在某些实施方案中,溶液呈可注射液体溶液

的形式。在其它实施方案中,组合物被配制成粘性液体(即几百至几千cps的粘度)、凝胶或软膏。在这些实施方案中,生物缀合物分散或溶解在合适的药学上可接受的载体中。

[0249] 与用于基于导管的递送的生物缀合物一起使用的示例性组合物可以包含:a)如本文所述的合成生物缀合物;b)药学上可接受的载体;c)聚合物基质;d) pH缓冲剂,以提供约pH 4至约pH 8范围内的pH;和e)浓度范围为总配方重量的约0.25%至约10%的水溶性润滑性增强剂,或任何单独的组分a)、b)、c)、d)或e),或a)、b)、c)、d)或e)的任何组合。

[0250] 示例性制剂可以包含:a)如本文所述的生物缀合物;b)药学上可接受的载体;c)聚合物基质;;和d) pH缓冲剂以提供约pH 4至约pH 8范围内的pH,其中所述溶液对于液体溶液具有约3至约30 cps的粘度。

[0251] 本公开所考虑的示例性组合物还可以用于通过注射施用,包括水性或油性混悬液或乳剂(其具有芝麻油、玉米油、棉籽油或花生油),还包括酞剂(其具有甘露醇、右旋糖)或无菌水溶液以及类似的药物载体。盐水中的水溶液也常规用于注射,但是在本文中不太优选。也可以使用乙醇、甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等(及其合适的混合物)、环糊精衍生物和植物油。例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣,通过在分散液的情况下维持所需的粒径和通过使用表面活性剂,来维持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来预防微生物的作用。

[0252] 无菌可注射溶液通过如下方法制备:将所需量的组分加入具有上述各种其他成分(按需要)的适当溶剂中,然后过滤除菌。通常,通过将各种灭菌的活性成分加入含有基础分散介质和所需的上述其它成分的无菌载体中来制备分散液。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其由先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何另外的所需成分的粉末。

[0253] 在制备包含本文所述的生物缀合物的药物组合物时,活性成分通常通过赋形剂或载体稀释和/或包封在可为胶囊、小袋、纸或其他容器形式的载体内。当赋形剂用作稀释剂时,其可以是固体、半固体或液体材料(如上),其充当活性成分的媒介物、载体或介质。因此,所述组合物可以是膜、凝胶、贴剂、散剂、锭剂、小药囊、扁囊剂、酞剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂(固体形式或在液体介质中)、包含例如高达10wt%的活性化合物的软膏剂、软明胶膜和硬明胶膜、凝胶、贴剂、无菌注射溶液和无菌包装粉末的形式。

[0254] 合适赋形剂的一些实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、无菌水、糖浆和甲基纤维素。所述制剂可另外包含:润滑剂,如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化剂和悬浮剂;防腐剂,如羟基苯甲酸甲酯和羟基苯甲酸丙酯;甜味剂;以及调味剂。

[0255] 用于药物递送的膜在本领域中是公知的,并且包括无毒、无刺激性聚合物,不含可浸出的杂质,如多糖(例如纤维素、麦芽糖糊精等)。在一些实施方案中,聚合物是亲水性的。在其他实施方案中,聚合物是疏水性的。该膜粘附在其所施用的组织上,并且在约一周的时间内被缓慢地吸收到体内。本文所述的薄膜剂型中使用的聚合物是可吸收的,并且显示出如本领域中所公知的足够的剥离强度、剪切强度和拉伸强度。在一些实施方案中,膜是可注射的。在某些实施方案中,在手术介入之前、之中或之后将膜施用至患者。

[0256] 这里使用的凝胶是指可以具有从软和弱到硬和韧的性质的固态胶状物质。如本领域所熟知的,凝胶是通过流体在其整个体积内膨胀的非流体胶体网络或聚合物网络。水凝

胶是一种凝胶,其包含亲水性聚合物链网络,有时以胶体凝胶的形式存在,其中水是分散介质。水凝胶是高吸收性的并且可以含有大量的水,例如大于90%的水。在一些实施方案中,本文所述的凝胶包含天然或合成的聚合物网络。在一些实施方案中,凝胶包含亲水性聚合物基质。在其他实施方案中,凝胶包含疏水性聚合物基质。在一些实施方案中,凝胶具有与天然组织非常相似的柔韧程度。在某些实施方案中,凝胶是生物相容的和可吸收的。在某些实施方案中,在外科手术之前、之中或之后将凝胶施用至患者。

[0257] 本文使用的液体溶液是指本领域公知的溶液剂、混悬剂、乳剂、滴剂、软膏剂、液体洗剂、喷雾剂、脂质体。在一些实施方案中,所述液体溶液含有水性pH缓冲剂,当添加少量酸或碱时所述水性pH缓冲剂抵抗pH的变化。在某些实施方案中,在手术介入之前、之中或之后将液体溶液施用至患者。

[0258] 示例性制剂可以包含:a)如本文所述的一种或多种生物缀合物;b)药学上可接受的载体;和c)作为基质网络的亲水性聚合物,其中所述组合物配制成粘性液体(即几百至几千厘泊的粘度)、凝胶或软膏。在这些实施方案中,生物缀合物分散或溶解在合适的药学上可接受的载体中。

[0259] 在某些实施方案中,生物缀合物或包含其的组合物在配制之前、期间或之后被冻干。因此,本文还提供了包含生物缀合物的冻干组合物或包含含有如本文所述生物缀合物的组合物的冻干组合物。

[0260] 6. 剂量

[0261] 生物缀合物的合适剂量可以通过标准方法确定,例如通过在实验室动物模型或临床试验中建立剂量-反应曲线来确定,并且可以根据患者状况、被治疗的疾病状态、施用途径和组织分布以及共同使用其他治疗方法的可能性而显著变化。给予患者的有效量基于体表面积、患者体重或质量、以及医师对患者状况的评估。在各种示例性实施例中,剂量在约0.01 μg 至约10 g的范围内。例如,对于全身性递送,剂量可以是约10 g、或约5 g、或约1 g。在其它示例性实施方案中,有效剂量范围为每剂约100 μg 至约10 g,或每剂约100 μg 至约1 g,或每剂约100 μg 至约500 mg,每剂约0.01 μg 至约100 mg,或每剂约100 μg 至约50 mg,或每剂约500 μg 至约10 mg,或每剂约1 mg至10 mg,或每剂约1至约100 mg,或每剂约1 mg至500 mg,或每剂约1 mg至200 mg,或每剂约10 mg至100 mg,或每剂约10 mg至75 mg,或每剂约10 mg至50 mg,或每剂约10 mg,或每剂约20 mg,或每剂约30 mg,或每剂约40 mg,或每剂约50 mg,或每剂约60 mg,或每剂约70 mg,或每剂约80 mg,或每剂约90 mg,或每剂约100 mg。在本文所述的各种实施方案的任一个中,有效剂量范围为每剂约0.01 μg 至约1000 mg,每剂1 μg 至约100 mg,约100 μg 至约1.0 mg,约50 μg 至约600 μg ,约50 μg 至约700 μg ,约100 μg 至约200 μg ,约100 μg 至约600 μg ,约100 μg 至约500 μg ,约200 μg 至约600 μg ,或约100 μg 至约50 mg,或每剂约500 μg 至约10 mg,或每剂约1 mg至约10 mg。

[0262] 在一些实施方案中,组合物以多剂量形式包装。因此需要防腐剂来防止使用过程中的微生物污染。在某些实施方案中,可以将如上所述的合适的防腐剂加入到组合物中。在一些实施方案中,组合物含有防腐剂。在某些实施方案中,防腐剂的用量为约0.001%至约1.0%w/v。在一些实施方案中,单位剂量组合物是无菌的、但无防腐剂的。

实施例

[0263] 实施例1:硫酸化透明质酸(sHA)的制备和表征

[0264] 由于透明质酸(HA)的钠盐不溶于有机溶剂,因此有必要在硫酸化HA之前制备HA的四丁基铵盐。将3.74 g (9.31 mmol)的HA(钠盐)溶解在400 mL蒸馏水中。用1.4 L蒸馏水洗涤Dowex-50WX8珠粒(75.74 g)3次。然后将酸性Dowex珠粒添加至HA溶液中,并在室温下搅拌30分钟。过滤溶液以除去树脂,并用氢氧化四丁基铵(1M的H₂O溶液)处理直至pH = 6.5。将四丁基铵HA盐(HA-TBA)冻干并获得白色固体(5.76 g,99%产率)。

[0265] 硫酸化HA的制备¹:在氮气下干燥的三颈烧瓶中,将HA-TBA(5.7622 g,9.28 mmol,323 kDa HA)溶解于无水DMF(1050 mL)中,并使其溶解过夜。在氮气下另一个干燥的三颈烧瓶中,将SO₃-吡啶配合物(38.890 g,244.3 mmol,比率为1:26.3的HA-TBA:SO₃)溶解于无水DMF(432 mL)中,然后添加至HA-TBA溶液中。将反应在室温下搅拌20分钟。20分钟后,快速加入冷水(500 mL),并将反应混合物转移至烧杯中。加入乙酸钠饱和的冷乙醇(2 L)后,观察到沉淀。过滤后,将沉淀物溶于水(1 L)中,然后通过TFF先用5 CV的0.5 M NaCl,再用8 CV的水纯化。然后将产物冻干3天,并回收米色固体(3.21 g,58%产率)。

[0266] sHA的表征:通过对氮和硫含量的元素分析获得硫酸化度。一旦获得,就进行以下计算以确定硫酸化度(DS):

$$[0267] \quad DS = \frac{\text{硫 \%} / 32.065}{\text{氮 \%} / 14.0067}$$

[0268] 还通过在D₂O中进行¹H NMR分析来分析样品,以确定来自四丁基铵和/或吡啶配合物的具有其独特的峰值的任何痕量杂质。

[0269] 硫酸化度是根据HA:SO₃-吡啶的摩尔比以及所用的初始HA的分子量计算得出的,表示为每个二糖单元的硫酸基数。下表描述了这些差异。

初始的 MW HA	比率 HA:SO ₃ -吡啶	硫酸化度
20 kDa	1:13.2	1.5
	1:19.8	1.9
136 kDa	1:13.2	1.5
323 kDa	1:13.2	1.5
	1:26.3	2.4
738 kDa	1:13.2	1.3
	1:26.3	1.7

[0271] ¹ Biomacromolecules, 2009, 10, 3290-3297。

[0272] 实施例2:化合物合成

[0273] 反应缓冲液制备:在反应前6小时内制备含有8.0 M尿素、0.6%NaCl、pH为5.5的0.064 M MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)。注意,8 M尿素需要如下计算溶质体积变化。反应缓冲液由以下方程式表示:

[0274] • $V_{0.1 \text{ M MES, } 0.9\% \text{ NaCl}} \text{ (mL)} = V_{\text{最终的}} \text{ (mL)} \times 0.64$

[0275] • 尿素 (g) = $V_{0.1 \text{ M MES, } 0.9\% \text{ NaCl}} \text{ (mL)} \times 0.7443$

[0276] • 其中 $V_{\text{最终的}}$ = 添加尿素后的目标最终体积

[0277] 然后将反应缓冲液通过 $0.2 \mu\text{m}$ 过滤器过滤。确认pH值在pH 4.75以内,如果需要,则用1 M HCl或0.5 M NaOH进行调节。

[0278] *TFF缓冲液制备*:在纯化前的12小时内制备TFF缓冲液:含有8.0 M尿素、0.6% NaCl、pH为7.0-7.8的10 mM磷酸钠。注意,8 M尿素需要如下计算溶质体积变化。反应缓冲液由以下方程式表示:

[0279] • $V_{15.6 \text{ mM 磷酸钠}} \text{ (mL)} = V_{\text{最终的}} \text{ (mL)} \times 0.64$

[0280] • $V_{100 \text{ mM 磷酸氢二钠}} \text{ (mL)} = V_{\text{最终的}} \text{ (mL)} \times 0.06$

[0281] • $V_{100 \text{ mM 磷酸二氢钠}} \text{ (mL)} = V_{\text{final}} \text{ (mL)} \times 0.04$

[0282] • $V_{\text{水}} \text{ (mL)} = V_{15.6 \text{ mM 磷酸钠}} \text{ (mL)} - (V_{100 \text{ mM 磷酸氢二钠}} \text{ (mL)} + V_{100 \text{ mM 磷酸二氢钠}} \text{ (mL)})$

[0283] • 尿素 (g) = $V_{15.6 \text{ mM 磷酸钠}} \text{ (mL)} \times 0.7443$

[0284] 其中 $V_{\text{最终的}}$ = 添加尿素后的目标最终体积。然后将反应缓冲液通过 $0.2 \mu\text{m}$ 过滤器过滤。确认pH值在pH 7-7.8以内,如果需要,则用1 M HCl或0.5 M NaOH进行调节。

[0285] *反应计算*:反应摩尔比如下:每GAG二糖2摩尔EDC,每GAG二糖0.12摩尔肽,每20 kDa GAG 1摩尔生物素和/或荧光标签CF633。反应比表示为GAG:肽:EDC。例如,300 kDa硫酸化度为2.5的sHA的反应将产生1:55:916的反应摩尔比。

[0286] *反应*:缀合物合成包含通过EDC化学反应通过激活骨架上的羧基(GAG激活)使活化的羧基与肽的N末端的酰肼端反应,将酰肼官能化的肽连接到GAG骨架上。

[0287] 将sHA以20 mg/ml、酰肼官能化的肽以3 mg/ml、每个检测标签(生物素和/或CF633)以3 mg/ml、以及EDC以75mg/ml溶于反应缓冲液。GAG可以在反应前4小时溶解。将肽与GAG和标签混合,然后添加溶解的EDC。

[0288] EDC必须立即溶解,然后将其添加到含有溶解的GAG、肽和标签的反应混合物中。在搅拌或摇动反应混合物的同时,使反应在25 °C下进行2小时。然后通过使用0.5 M NaOH将pH升至8来淬灭反应,并摇动/搅拌30分钟。

[0289] *TFF纯化*:使用从Spectrum Labs购买的Spectrum KR2i TFF系统进行TFF纯化。使用购自Spectrum labs的、截留分子量为30 kD的修饰聚醚砜(mPES)滤芯。过滤器表面积将根据批次大小而变化。TFF缓冲液在TFF系统中循环10分钟以平衡系统,然后用新鲜的缓冲液替换TFF线(line)。然后将合成反应容器连接至TFF系统,并使用100 mL/min和将TMP调节至18 psi进行TFF。反应先后用6个纯化体积(CV)的TFF缓冲液和16 CV的水(其中CV等于反应体积加TFF滞留体积)进行渗透。

[0290] 通过以上概述的步骤,使用表中所示的各种分子量的硫酸化的HA骨架和酰肼官能化的肽制备以下生物缀合物(表2)。

[0291] 表2

化合物	骨架	肽
化合物 1 (约 8%的肽官能化)	sHA, MW = 163	GQLYKSILYGS GSGSRRRNHNH ₂
化合物 1B (约 8%的肽官能化)	sHA, MW = 163	生物素 GQLYKSILYGS GSGSRRRNHNH ₂
[0292] 化合物 2 (约 8%的肽官能化)	sHA, MW = 323	GQLYKSILYGS GSGSRRRNHNH ₂
化合物 2B (约 8%的肽官能化)	sHA, MW = 323	生物素 GQLYKSILYGS GSGSRRRNHNH ₂
化合物 3 (约 8%的肽官能化)	sHA, MW = 28	GQLYKSILYGS GSGSRRRNHNH ₂

[0293] 通过使肽以每聚糖约30个肽的比率反应来合成化合物1和化合物1B。使用该比率，预期与聚糖缀合的肽的平均数目为每个聚糖约20-25个肽，对应于约8%、或约8-12%的修饰。对于表2中所示的各种分子量的sHA缀合物，肽缀合的程度呈线性变化，使得肽与骨架长度的比率恒定。具体而言，预计化合物2和化合物2B的与聚糖缀合的肽的平均数目为每聚糖约70-80个肽，化合物3的与聚糖缀合的肽的平均数目为每聚糖约6个肽，全部对应于约8%、或约8-12%的修饰。

[0294] 实施例3:肝脏星状细胞(HSC)体外试验

[0295] 细胞增殖试验。从单个供体人肝脏分离的正常人肝脏原代肝脏星状细胞(HSC)购自ScienCell Research Laboratories (San Diego, CA)。在添加有0.5%胎牛血清(Invitrogen)、1%星状细胞生长补充剂(ScienCell Research Laboratories)、100 U/ml青霉素(Invitrogen, Carlsbad, CA)和100 U/ml链霉素(Invitrogen)的星状细胞培养基(SteCM; ScienCell Research Laboratories)中,使早期传代的HSC(P2)以6000细胞/孔的接种密度在纤维状的胶原蛋白包被的板上生长。在培养物中通过用10 ng/mL的TGF- β 1 (Bio-Techne Corporation, Minneapolis, MN)过夜处理来激活原代HSC。然后将细胞暴露于浓度范围为1000-0.0001 μ g/mL的含有生物素标记的化合物1B或2B的低血清培养基中30小时。根据制造商的说明,使用CyQUANT直接细胞增殖检测试剂盒(Invitrogen)评估每种处理对HSC增殖的影响。

[0296] 对HSC活化和 α 平滑肌肌动蛋白免疫染色的影响。如前所述,早期传代的HSC(P2)以6000个细胞/孔的接种密度在纤维状的胶原蛋白包被的板上生长,并在培养物中通过用10 ng/mL的TGF- β 1过夜处理来激活。然后将细胞暴露于浓度范围为6000-0.0001 μ g/mL的含有化合物1B或化合物2B的低血清培养基中30小时。处理30小时后,将细胞用4%甲醛固定10分钟,用PBS洗涤,然后用0.1% Triton X-100透化7分钟。然后用1% BSA、10%正常山羊血清、含有0.3 M甘氨酸的0.1% PBS-Tween封闭细胞过夜。对于 α 平滑肌肌动蛋白染色,所有样品与稀释200倍的抗 α 平滑肌肌动蛋白抗体(Abcam)在4°C下孵育过夜。然后用PBS洗涤样品4次,每次5分钟。此后,使用Alexa Fluor 633二抗复染样品2小时,然后用PBS洗涤4次,每次5分钟。然后使用EVOS荧光显微镜(ThermoFisher Scientific)对细胞成像。

[0297] **血小板流量试验**。Ibidi μ -Slide VI 0.1 (Ibidi) 通道用纤维状的I型胶原蛋白 (Chrono-Log Corp) 以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被1小时。然后用PBS冲洗通道。根据批准的IRB方案, 从同意的供体的柠檬酸钠真空采血管中收集用于该试验的人血。将新鲜收集的血液用稀释400倍的Calcein AM (Invitrogen) 染色30分钟。将化合物1B或化合物2B以100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加到预染色的血液中, 并且使血液以1000⁻¹s的剪切速率流过每个通道10分钟。流动后, 冲洗通道中所有可见的血液痕迹, 并使用EVOS荧光显微镜 (ThermoFisher Scientific) 成像。

[0298] **结果**

[0299] **细胞增殖试验**。在化合物1B和化合物2B的最高测试浓度 (1 mg/mL) 下, HSC增殖大约被抑制60%。两种缀合物均以剂量依赖性方式抑制增殖。

[0300] **对HSC活化和 α 平滑肌肌动蛋白免疫染色的影响**。在慢性肝病中, TGF- β 1是将HSC激活为成肌纤维细胞表型的主要刺激物。如对照组图像中所示, 激活的HSC能够通过 α 平滑肌肌动蛋白的表达而被识别。在测试的最高浓度 (6 mg/mL) 下, 用化合物1B和化合物2B处理活化的HSC导致 α 平滑肌肌动蛋白染色减少 (图7)。

[0301] **血小板流量试验**。荧光图像显示了在全血流动下, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的化合物1B和化合物2B的血小板结合和抑制作用。未经处理的通道1 (无抑制的对照) 几乎完全被结合的血小板覆盖, 而经缀合物处理的通道的结合的血小板数量显著减少 (图6)。

[0302] 本文所述的生物缀合物出人意料地显示出对肝脏星状细胞的抗纤维化和抗增殖作用, 表明用硫酸基和肽进行的化学修饰不会显著降低其生物学作用。

[0303] **实施例4: 四氯化碳模型**

[0304] 在小鼠模型中使用四氯化碳 (CCl_4) 作为有毒的损害测试了本文所述化合物影响肝脏纤维化的能力。C57BL/6小鼠每周两次腹腔内施用100 μL 含有5% CCl_4 的矿物油, 共4周。在相同的4周期间, 动物每周接受3次静脉内施用生理盐水 (载体) 或试验物品 (化合物1)。一组动物每天口服缬沙坦。最后, 将未接受任何试验物品或 CCl_4 的健康动物作为正常对照组。

[0305] 在4周期末, 处死动物并收集肝脏用于生化和组织学分析。羟基脯氨酸水平如图1所示。与正常健康动物相比, 施用 CCl_4 增加羟基脯氨酸水平。用20 mg/kg 的化合物1处理使羟基脯氨酸水平在统计学水平上显著降低 ($p < 0.05$)。使用天狼星红染色对肝脏的胶原蛋白含量进行组织学分析。图2显示了肝脏切片的代表性图像, 与正常健康动物相比, 载体处理组的胶原蛋白染色增加, 而化合物处理组的胶原蛋白染色减少。定量染色并显示在图3中。根据天狼星红的组织学测量, CCl_4 增加肝脏中胶原蛋白的水平。与载体对照相比, 化合物1处理显著降低胶原蛋白染色。

[0306] **实施例5: 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 模型**

[0307] 在非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的小鼠模型中测试了本文所述的化合物影响肝脏纤维化的能力。C57BL/6小鼠出生后接受单次皮下注射200 μg 链脲酶素。从4周龄开始, 以高脂饮食饲喂动物。从第5周开始, 持续4周直到第9周, 动物接受每周3次盐水或化合物1的静脉内处理。在相同的时期, 另一组动物每天口服替米沙坦。在9周龄时处死动物, 并收集肝脏用于组织学和生化分析。

[0308] 使用天狼星红染色对肝脏的胶原蛋白含量进行组织学分析。定量染色并显示在图4中。与载体处理组相比, 替米沙坦或化合物1的处理降低了肝脏中的胶原蛋白水平。

[0309] 肝脏甘油三酸酯如图5所示。在研究过程中,用替米沙坦和化合物1处理降低了肝脏甘油三酯。

[0310] 体内成像系统研究分布

[0311] 用荧光标记的分子合成。具体地,CF633通过酰肼以1:1的染料与骨架的合成摩尔比连接至骨架。将该分子以10 mg/kg的剂量静脉内给予裸鼠,并使用体内成像系统 (IVIS) 进行成像。在不同的时间点,将动物麻醉并使用IVIS成像,以确定标记的化合物的生物分布。图8示出了注射后5或60分钟的化合物的定位。已经证实,在肾脏、膀胱或肝脏中的定位取决于化合物的分子量。

[0312] 化合物分布的差异与sHA骨架的分子量有关。在肾脏、膀胱以及肝脏中观察到低分子量的sHA (28 kDa) 骨架 (化合物3)。相反,较高分子量的sHA (323 kDa) 骨架 (化合物2) 仅被发现位于肝脏中,在膀胱或肾脏中未显示任何信号。发现163 kDa的sHA骨架 (化合物1) 主要位于肝脏内,但在膀胱内也显示出轻微的信号。这些结果证明了当静脉内给药时,sHA骨架的分子量与分子的分布之间出乎意料的相关性,使得大约150 kDa分子量的sHA主要被排除在肾脏之外,而是主要位于肝脏内。鉴于在亲本HA骨架上进行硫酸化和肽缀合的化学修饰的性质未知,因此sHA-肽缀合物在肝脏中的定位也是一个出乎意料的发现。在其他组织或器官中分布相对较低,但在肝脏内定位提供了以预期的低全身作用靶向肝脏疾病的独特机会。

[0313] 实施例6:VEGF生长因子结合

[0314] 通过向每个孔中加入75 μ l的含有1 μ g/ml溶液的1x PBS,将VEGF189 (R&D Systems, 8147-VE) 包被至96孔板 (Corning, 9018) 上,并在4C下孵育过夜。使用300 μ L PBST (含有0.02% Tween 20的1x PBS) 洗涤板3次。然后在室温下用含有1% BSA的PBS溶液封闭板1小时。然后将生物素化的分子以100 μ g/mL的浓度溶于含有1% BSA的PBST中,并按1:10的顺序稀释,直至达到0.1 ng/mL的最终浓度。然后将50 μ L样品在板上于37 $^{\circ}$ C孵育1小时。然后用含有1% BSA的PBST溶液洗涤板3次,并与100 μ L的含有1:500链霉亲和素-HRP (Thermo N504) 的1% BSA PBST溶液一起在室温孵育20分钟。然后用PBST洗涤板3次,在避光条件下用100 μ l 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (Abcam ab171527) 显色10分钟。加入100 μ L 0.16 M硫酸终止反应。10分钟内在酶标仪上读取450 nm的吸光度。

[0315] 测试了被每个二糖中2.5个硫酸基基团硫酸化的HA (s2.5HA, 163 kDa) 与VEGF189的结合,观察到 EC_{50} 约为1 nM (图9)。当相同的硫酸化HA骨架与肽 (化合物1) 缀合时,观察到相似的 EC_{50} 值。然而,未被硫酸化的相似MW的HA不结合VEGF189。在测试FGF2结合的试验中也观察到相同的趋势。这些数据证明HA的硫酸化增强了对生长因子的结合,并且令人惊讶的是,如果硫酸化的HA与肽缀合不会降低该结合。

[0316] 实施例7:PDGF生长因子结合

[0317] 以下试验 (生长因子结合和受体结合) 评估了各种硫酸化HA骨架结合重组PDGF-BB并干扰其受体结合的能力。PDGF-BB是纤维化中发现的关键炎症介质,通过与细胞表面的受体PDGF-R β 相互作用触发细胞信号传导。

[0318] PDGF-BB的主要作用是促进HSC的迁移和增殖。同样,已经证明在小鼠和人类中活化的HSC (成肌纤维细胞) 会高度上调PDGF-R β 的表达。活化的HSC也产生PDGF-BB,导致分泌纤维化环。最后,PDGF-BB/PDGF-R β 信号传导协同地调节TGF- β 的纤维化信号传导。PDGF和

TGF- β 都是介导肝脏纤维化的重要生长因子。

[0319] 本文提供的数据证明,化合物1抑制显著的生长因子亚型(PDGF-BB)和受体(PDGF-R β)的结合。另外,化合物1还结合其他亚型PDGF-AA、PDGF-CC和PDGF-DD。基于该数据,预期化合物1将通过结合和整合它们来抑制所有PDGF亚型的受体结合。

[0320] 生长因子结合试验方法

[0321] 为了确定化合物1在体外与PDGF的所有亚型结合的能力,使用了来自R&D系统的重组PDGF(AA、BB、CC和DD)进行ELISA。简而言之,PDGF的所有四种亚型均按照制造商的方案进行了重组,并以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的包被浓度分别吸附在Costar High Bind板上。在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,通过用1X PBS Tween(0.02%)洗涤缓冲液冲洗除去所有未结合的PDGF。然后将板用含有1%BSA的1X PBS在25 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1小时。将化合物1B(具有肽负载和生物素的官能化的sHA)、零肽修饰聚糖骨架(sHA-OPM)或单独的肽(均用生物素标记以进行检测)在1%BSA 1X PBS Tween(0.02%)中从100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 连续稀释至0.0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。然后将分子稀释液加入包被PDGF的孔中,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小时。此后,用1%BSA 1X PBS Tween(0.02%)冲洗板三次去除所有未结合的分子。然后用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的链霉亲和素检测生物素标记的结合分子。洗涤后,使用四甲基联苯胺(TMB)底物显色板,并用酸溶液终止反应。使用Biotek Synergy H4多模式酶标仪在450 nm处测量板孔吸光度。

[0322] 已经观察到,在该体外试验中,化合物1B以不同程度与PDGF的所有亚型结合(参见图10-13)。

[0323] 令人惊讶地发现,测试的化合物显示出对某些亚型的选择性,如表3所列的EC₅₀所示。总之,化合物1B与PDGF-AA的结合比PDGF-BB、PDGF-DD和PDGF-CC中的每一个都更好。还观察到,sHA-OPM与PDGF-AA的结合比PDGF-BB和PDGF-DD更好。在该试验中未检测到PDGF-CC结合。根据这项研究,非硫酸化HA和单独的肽在体外不与任何PDGF亚型结合。此外,与官能化的sHA-OPM相比,肽与sHA的缀合改善与PDGF-CC和PDGF-DD的结合。

[0324] 表3:体外各种PDGF亚型的EC₅₀(μM)值。

分子	PDGF-AA	PDGF-BB	PDGF-CC	PDGF-DD
化合物 1B	0.00068	0.0012	0.069	0.0059
sHA-OPM	0.00029	0.0007	-	0.16
单独的肽	-	-	-	-
HA	-	-	-	-

[0326] 生长因子受体结合

[0327] 在竞争性ELISA试验中测试了具有不同硫酸化度和/或肽负载的化合物1或官能化的聚糖骨架(本文称为缀合物),该竞争性ELISA试验旨在测量对PDGF-BB与PDGF-R β 结合的抑制作用。按照制造商的方案重组了重组人PDGF-R β Fc嵌合蛋白和生物素标记的PDGF-BB(R&D Systems)。PDGF-R β Fc嵌合蛋白在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以1 nM的包被浓度吸附到Costar High Bind板上过夜。通过用1X PBS Tween(0.02%)洗涤缓冲液冲洗去除未结合的PDGF-R β Fc,然后在25 $^{\circ}\text{C}$ 下用含有1%BSA的1X PBS溶液封闭板1小时。在含有1%BSA的1X PBS Tween(0.02%)中以2X浓度(结果1和2的连续稀释范围从000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以下结果3的单一浓度2 mg/mL(测定的有效孔浓度=1 mg/mL))制备化合物1和缀合物。还以20 ng/mL的2X浓度制

备了PDGF-BB储备溶液。通过在室温下将等体积的每种溶液孵育30分钟,将缀合物和PDGF-BB 1:1混合在一起。然后将预孵育的溶液添加到PDGF- β Fc包被的板中,并在37°C下结合1小时。接下来,用含有1%BSA的1X PBS Tween (0.02%) 冲洗板3次。用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的链霉亲和素检测结合的生物素标记的PDGF-BB。洗涤后,将四甲基联苯胺(TMB)底物添加到孔中以显色。用酸溶液终止反应,并使用Biotek Synergy H4多模式酶标仪在450 nm处测量吸光度。抑制作用越大,与平板上受体结合的PDGF-BB越少,因此读出的信号越低。记录结果3中缀合物与参考的吸光度之比。

[0328] 在体外,化合物1(具有30个肽负载的官能化sHA,有大约8%或8-12%的肽官能化)抑制PDGF-BB(配体)与其受体PDGF- β 的结合(图14)。预期缀合至聚糖的肽的平均数目小于“肽负载”下显示的数目。例如,有人认为30 PM缀合物中缀合至聚糖的肽的平均数目可以是每个聚糖约20-25个肽,对应于约8-12%的修饰。出人意料的是,sHA(官能化的或未官能化的)不会抑制这种情况。先前,在图11中,显示了官能化的sHA-OPM在体外结合PDGF-BB。然而,基于图14中的数据,sHA-OPM与PDGF-BB的结合似乎并不干扰其受体相互作用。

[0329] 还显示出增加官能化的sHA上的肽负载增加了其在体外抑制PDGF-BB与其受体结合的能力(图15)。

[0330] 这些结果表明,在体外试验中,官能化的HA的硫酸化度影响其干扰PDGF-BB的受体结合的能力。通常,在相同的肽负载下,硫酸化度的增加会增加PDGF-BB在体外与其受体结合的抑制作用。如下表所示,具有2.3-2.4的硫酸化度的化合物的抑制作用超过具有1.4或0的硫酸化度的化合物的抑制作用。

[0331] 还发现,随着肽负载的增加,PDGF-BB与其受体结合的抑制得到改善,进一步证实了上述发现。

[0332] 表4列出了缀合物吸光度450 /参考吸光度450的比率。与反应中相似量的参考化合物1相比,粗体显示PDGF-BB与受体的相似或更好的结合。阴影单元格表示PDGF-BB与受体的结合受到更高的抑制或降低。

[0333] 表4

肽负载	HA108 骨架				HA163 骨架
	HA	s1.4HA	s2.3HA	s2.4HA	s2.5HA
无 EDU	-	-	-	-	12.49
0PM	17.27	12.66	11.46	11.36	16.40
[0334] 10PM	16.96	15.05	7.18	7.46	4.82
20PM	16.33	12.83	5.17	4.11	-
30PM	14.18	13.33	2.64	5.18	-
50PM	9.31	13.42	1.48	1.52	-
60PM	-	-	-	-	0.53

[0335] 实施例8:硫代乙酰胺(TAA)模型

[0336] 毒素硫代乙酰胺在大鼠中诱导出严重的肝脏纤维化,以100至150 mg/kg之间的浓度每周腹膜内给药3次,共8周。从第5周开始,开始以3种不同剂量的化合物1或sHA-OPM(无肽)给药试验物品,每周一次静脉内给药。在8周结束时,处死动物。收集血浆并测量肝脏生

物标记物。分离肝脏用于通过羟基脯氨酸测量总胶原蛋白的生化分析,或通过天狼星红染色进行组织学评估纤维化。

[0337] 使用0-6的评分在组织学上对纤维化评分,其中0表示无纤维化,6表示严重纤维化。用载体对照治疗的动物中有70%的纤维化水平最高,表明该模型的严重性。与用载体处理的动物相比,用化合物的处理减少了高纤维化评分的发生(图16)。纤维化的这种减少发生在测试化合物1的所有剂量中,并且总体趋势朝向相反的剂量反应。sHA-OPM的给药使纤维化评分降低了一些,但比化合物1少。此外,阿司匹林被用作血小板抑制的阳性对照,并且它的使用导致纤维化评分降低。

[0338] 在研究期间还测量了碱性磷酸酶(ALP)的血清水平。ALP通常用于衡量胆汁阻塞的或代谢性的肝脏损伤。在两周的试验物品给药后,用30 mg/kg的化合物1处理显著降低ALP(图17),但是较低剂量的化合物1对ALP则无显著影响。sHA-OPM确实显著降低了ALP。对ALP的这种影响发生在处理期间的中期,但在整个研究过程中,在这种严重模型中并未保持持续。降低ALP水平不是模型中的预期结果。此外,研究中期中ALP水平的剂量依赖性效应出乎意料地与研究终点的纤维化评分中发现的相反的剂量反应相反。

[0339] 另外的纤维化数据可以包括通过胶原蛋白染色的组织学定量或在肝脏中胶原蛋白的生化分析中量化纤维化的量。预期化合物1将减少胶原蛋白的这些含量。另外,化合物1还可以降低胶原蛋白的mRNA水平以及前胶原蛋白III的血清水平,如在其他轻度纤维化模型(四氯化碳模型)中用化合物1处理所见。此外,化合物1可以减少纤维化的其他生物标记物,例如PDGFRb、 α 平滑肌肌动蛋白、或已知与纤维化有关的任何其他标记物。

[0340] 实施例9:硫酸化研究

[0341] 胶原蛋白I结合试验

[0342] 使用0.2 N冰醋酸将大鼠尾部单体胶原蛋白I(Corning)稀释至50 μ g/mL的工作浓度。将含有稀释的大鼠尾部胶原蛋白I的Costar High Bind平板在4 $^{\circ}$ C下过夜。通过用1X PBS Tween (0.05%) 洗涤缓冲液冲洗去除未结合的胶原蛋白,然后在25 $^{\circ}$ C下用含有1%BSA的1X PBST (0.05%) 溶液封闭平板1小时。在1%BSA 1X PBST (0.05%) 中,以4000 μ g/mL至0.064 μ g/mL的2X浓度范围制备化合物1和具有不同的硫酸化程度和肽负载的(表5)生物缀合物的系列稀释液。还以8 μ g/mL的2X浓度制备了生物素标记的化合物1B储备溶液。将测试生物缀合物和化合物1B以1:1的体积比合并,并在室温下孵育5分钟。然后将预孵育的溶液添加至胶原蛋白包被的板中,并在25 $^{\circ}$ C结合15分钟。将板用1X PBST (0.05%) 冲洗3次,并用含有5%BSA的1X PBST (0.05%) 溶液在25 $^{\circ}$ C封闭1小时。使用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的链霉亲和素检测化合物1B。洗涤后,将四甲基联苯胺(TMB)底物添加到孔中以显色。用酸溶液终止反应,并使用Biotek Synergy H4多模式酶标仪在450 nm处测量吸光度。

[0343] 表5

DOS	肽负载				
	0	10	20	30	50
0	27.78	14.76	2.82	13.41	7.49
1.4	1000	161.28	1000	1.96	1000
2.3	53.88	1000	4.90	0.79	0.80
2.4	42.19	1000	0.50	0.43	0.25

[0344] 上面的表5显示了来自竞争性胶原蛋白I结合试验的 $IC_{50\text{样品}}/IC_{50\text{化合物1}}$ 的比率。比率 ≤ 1 表示与化合物1相似或比化合物1更强的结合。比率 > 1 表明与胶原蛋白的结合比化合物1更弱。数据显示,胶原蛋白的结合随肽负载的增加而增加,并且对于硫酸化度2.3和2.4,每个骨架的肽增加表明与胶原蛋白的结合与化合物1相似。这表明硫酸化程度(DOS)和肽负载在决定与胶原蛋白的结合中均起着协同作用。

[0346] 肝脏星状细胞增殖试验A

[0347] 这项研究证明了化合物1和具有不同的硫酸化程度和肽负载的生物缀合物对肝脏星状细胞(HSC)增殖的影响。人原发性肝脏星状细胞(HSC)从ScienCell Research Labs (San Diego, CA, USA)获得。这些细胞在第1代时被提供,因此表现出活化的表型。将细胞在多聚-L-赖氨酸包被的T-75烧瓶上、由ScienCell Research Labs提供的含有2%胎牛血清的培养基中、含有95%空气、5%CO₂的湿润气氛中扩增。细胞生长至75-80%细胞覆盖,在P2冷冻保存,以用于所有实验。

[0348] 组织培养处理过的96孔 μ -板(Ibidi)在含有95%空气、5%CO₂的湿润气氛中用50 μ g/mL的Chrono-Par纤维状胶原蛋白I包被2小时。孵育2小时后,将板用无菌1X PBS手动冲洗以去除任何多余的纤维状胶原蛋白。然后将平板与每孔30 μ L的培养基进行预孵育,该培养基由ScienCell Research Labs提供,含有0.5%的胎牛血清。将P2冷冻保存的细胞解冻,并在相同的低血清含量培养基中进行重组用于实验。将细胞以每孔30 μ L中6000个细胞的接种密度接种到纤维状胶原蛋白包被的孔中,并附着2-3小时。通过用Leica相差显微镜成像确认细胞附着。TGF- β (R&D Systems)根据制造商的方案进行了重组。然后将每孔30 μ L的30 ng/mL的TGF- β 加入到每个孔中,并将板在含有95%空气、5%CO₂的湿润气氛中孵育过夜。以1000、100、10和1 μ g/mL的浓度制备化合物1和不同的硫酸化程度和肽负载的缀合物的储备溶液。TGF- β 刺激20小时后,培养基用制备的稀释液每孔80 μ L替换。阴性对照孔用低血清培养基每孔80 μ L处理。细胞在含有95%空气、5%CO₂的潮湿气氛中生长48小时。使用CyQuant Direct Assay试剂盒评估48小时时的细胞增殖。使用Molecular Devices M5多模式酶标仪记录荧光强度测量值。

[0349] 合成了硫酸化度范围从零(s0HA)、1.4(s1.4HA)、2.3(s2.3HA)到2.4(s2.4HA)并且与肽负载0、10、20、30或50缀合的HA骨架。化合物1由具有2.5的硫酸化度和30个肽的肽负载的HA骨架组成。如图18所示,硫酸化程度和肽负载均对抑制HSC的增殖具有协同作用。具有低肽负载的低硫酸化程度不会像化合物1一样好地抑制,而具有较低硫酸化程度的缀合物上的肽负载增加,将恢复其抑制增殖的能力。

[0350] 表6显示了在浓度为1000 μ g/mL测试时,化合物1和具有不同的硫酸化程度(DOS)和肽负载的生物缀合物对HSC增殖的抑制百分比。

[0351] 表6

DOS	肽负载				
	0	10	20	30	50
0	9.57	21.25	20.51	29.46	25.53
1.4	36.69	44.11	34.10	27.20	29.52
2.3	33.66	38.89	39.31	48.82	53.70
2.4	38.96	42.12	47.51	51.62	52.85
2.5	x	x	x	64.25	x

[0353] 数据显示,增加HA骨架的硫酸化程度会增加骨架介导的HSC增殖抑制。对于硫酸化度2.3和2.4,增加肽负载会导致对HSC增殖的抑制,与通过化合物1所观察到的相似。这表明硫酸化程度和肽负载在确定生物活性中均具有协同作用。

[0354] 肝脏星状细胞增殖试验B

[0355] 这项研究表明,未经化学修饰的骨架(非硫酸化的HA)与化合物1相似,抑制HSC增殖。人原发性HSC从ScienCell Research Labs (San Diego, CA, USA)获得。这些细胞在第1代时被提供,因此表现出活化的表型。将细胞在多聚-L-赖氨酸包被的T-75烧瓶上、由ScienCell Research Labs提供的含有2%胎牛血清的培养基中、含有95%空气、5%CO₂的湿润气氛中扩增。细胞生长至75-80%细胞覆盖,在P2冷冻保存,以用于所有实验。

[0356] 组织培养处理过的Costar 96孔板在含有95%空气、5%CO₂的湿润气氛中用50 μg/mL的Chrono-Par纤维状胶原蛋白I包被2小时。孵育2小时后,将板用无菌1X PBS手动冲洗以去除任何多余的纤维状胶原蛋白。然后将平板与每孔100 μL的培养基进行预孵育,该培养基由ScienCell Research Labs提供,含有0.5%的胎牛血清。将P2冷冻保存的细胞解冻,并在相同的低血清含量培养基中进行重组用于实验。将细胞以每孔100 μL中6000个细胞的接种密度接种到纤维状胶原蛋白包被的孔中,并附着2-3小时。通过用Leica相差显微镜成像确认细胞附着。TGF-β (R&D Systems)根据制造商的方案进行了重组。然后将每孔100 μL的30 ng/mL的TGF-β加入到每个孔中,并将板在含有95%空气、5%CO₂的湿润气氛中孵育过夜。以1000至0.001 μg/mL的浓度范围制备化合物1和经修饰的和未经修饰的骨架的储备溶液。TGF-β刺激20小时后,培养基用制备的稀释液每孔200 μL替换。阴性对照孔用低血清培养基每孔200 μL处理。细胞在含有95%空气、5%CO₂的潮湿气氛中生长48小时。使用CyQuant Direct Assay试剂盒评估48小时时的细胞增殖。使用Molecular Devices M5多模式酶标仪记录荧光强度测量值。

[0357] 图19显示了剂量范围研究,表明化合物1、骨架(无化学衍生化,即硫酸化)和骨架(0肽修饰,“sHA-0PM”)对肝脏星状细胞(HSC)增殖的影响。与化合物1相似,无化学修饰的骨架抑制HSC增殖。HA骨架的硫酸化减弱了其抑制HSC增殖的能力。将肽添加至硫酸化骨架(例如化合物1)可以恢复生物活性的丧失。因此,HA骨架的肽负载和硫酸化程度在抑制HSC增殖中起着协同作用。

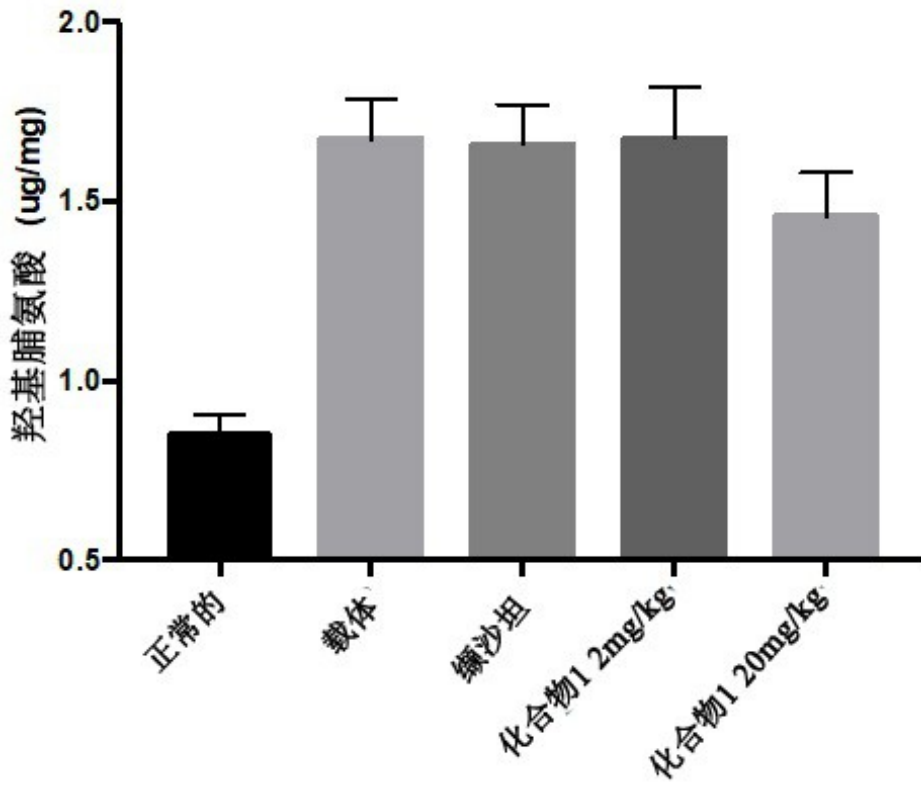


图1

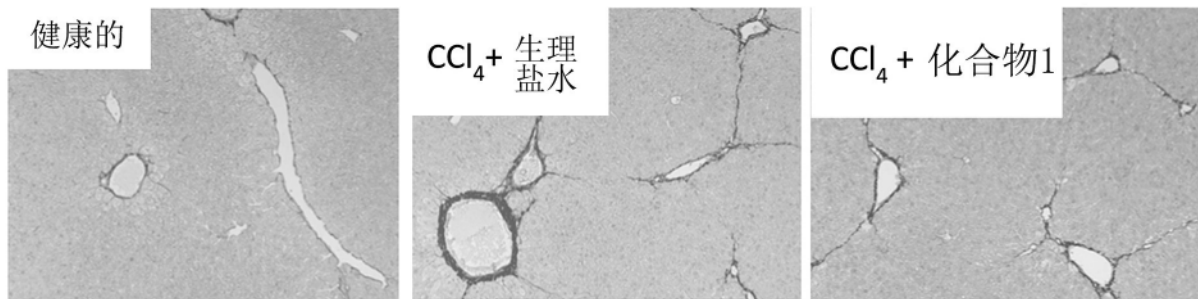


图2

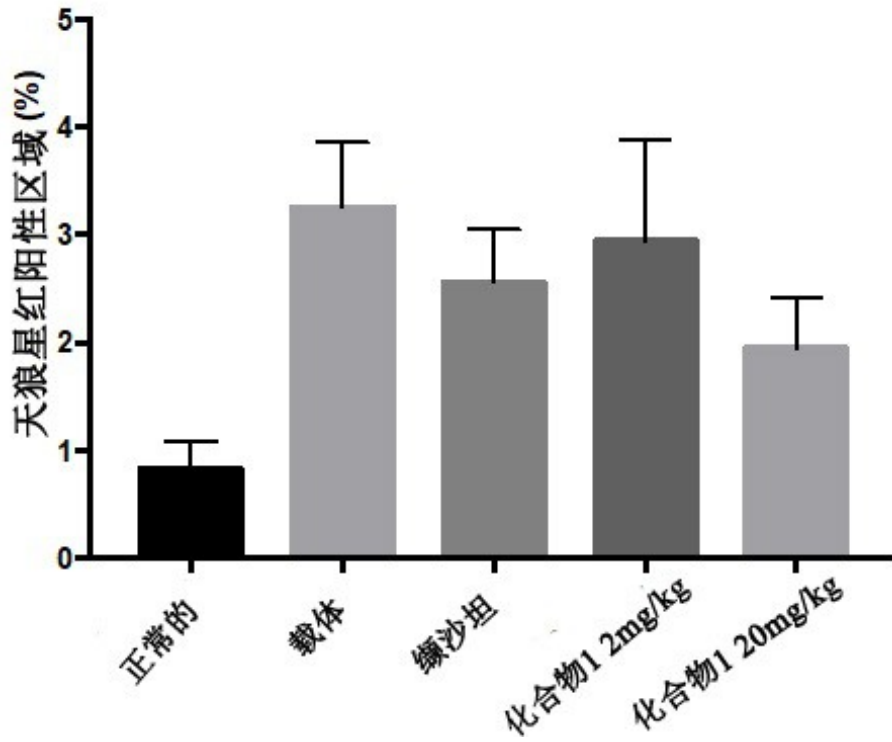


图3

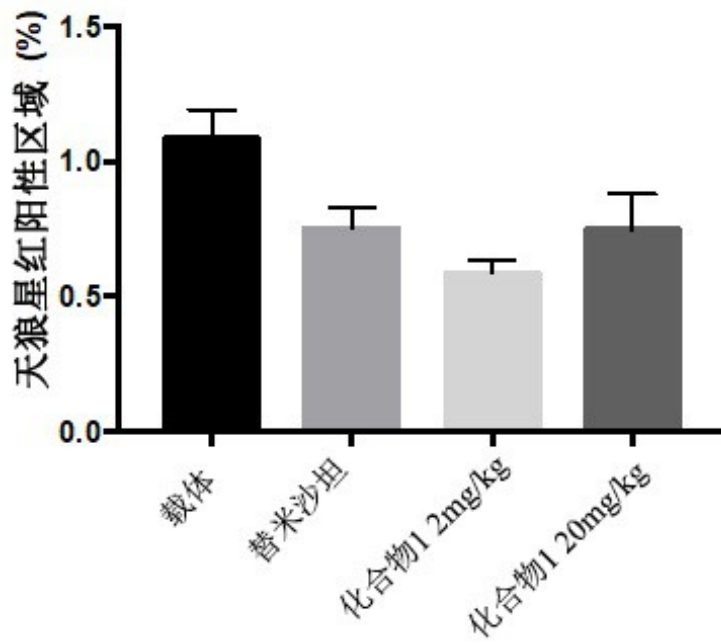


图4

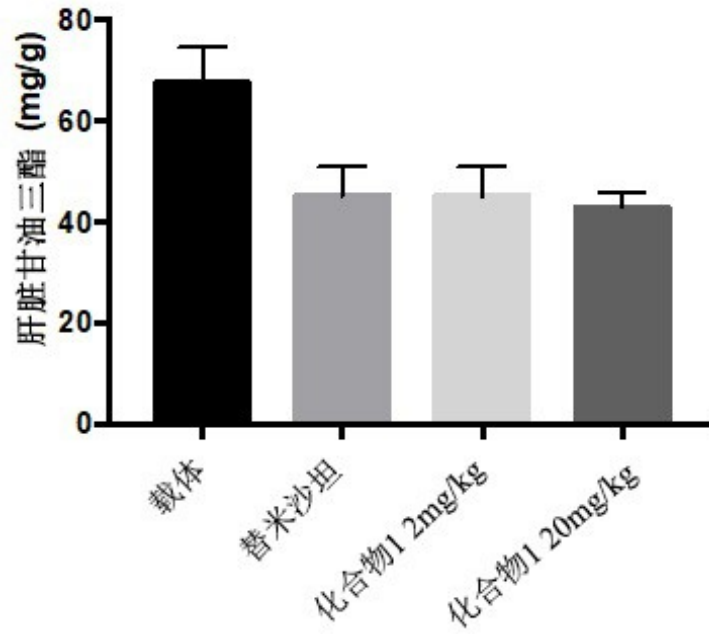


图5

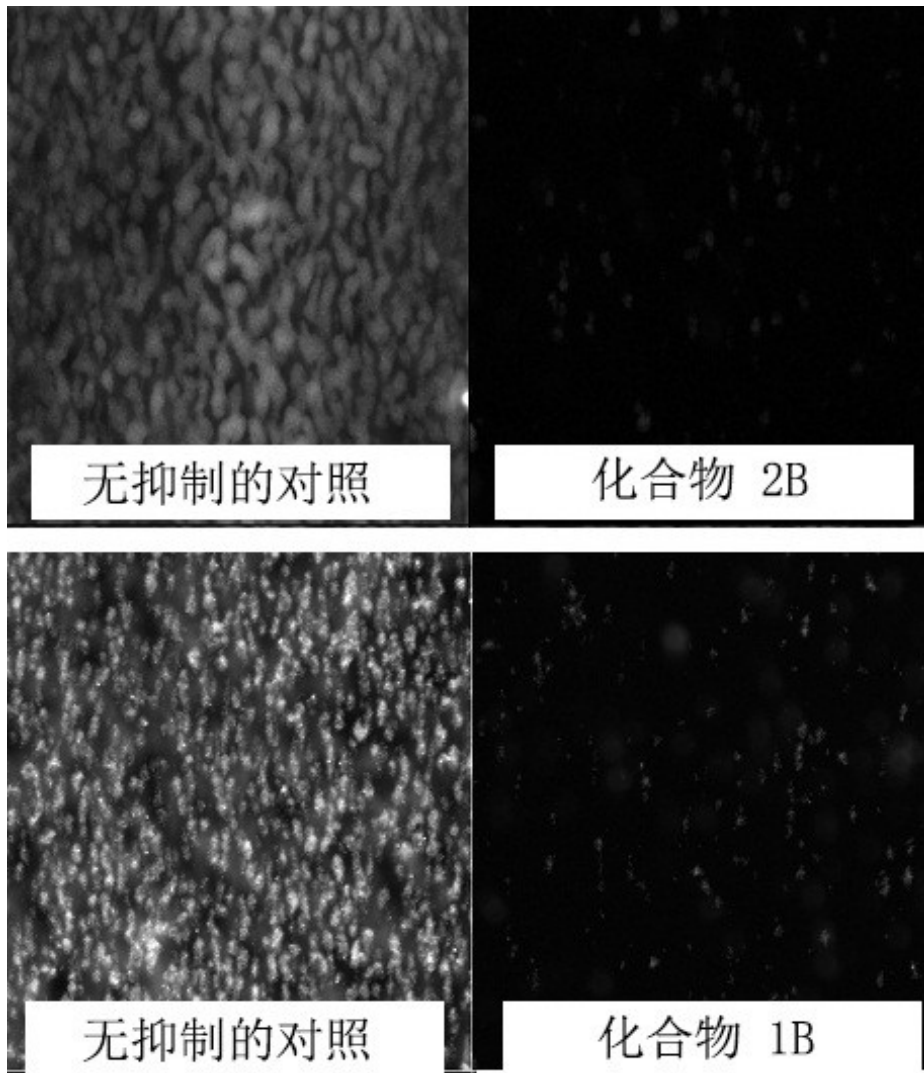


图6

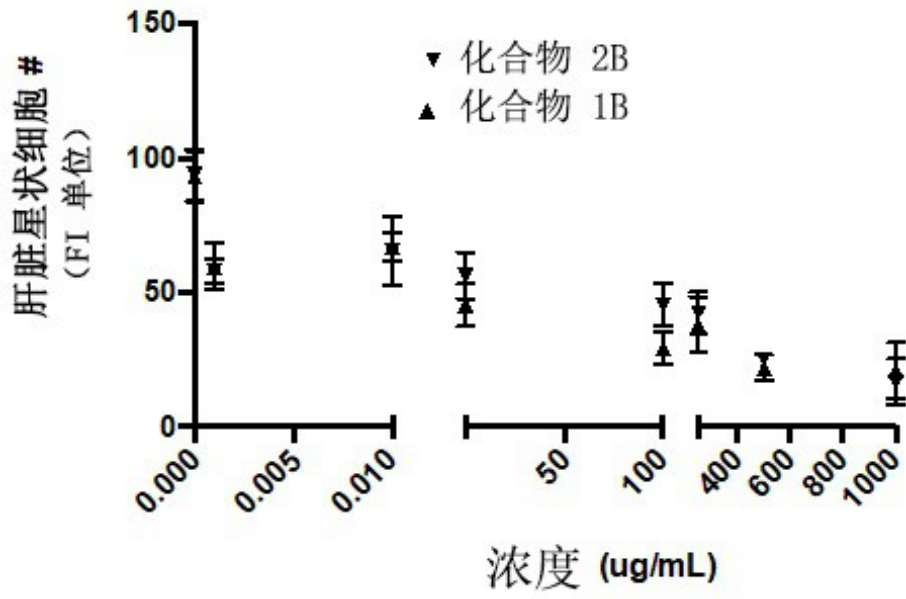


图7

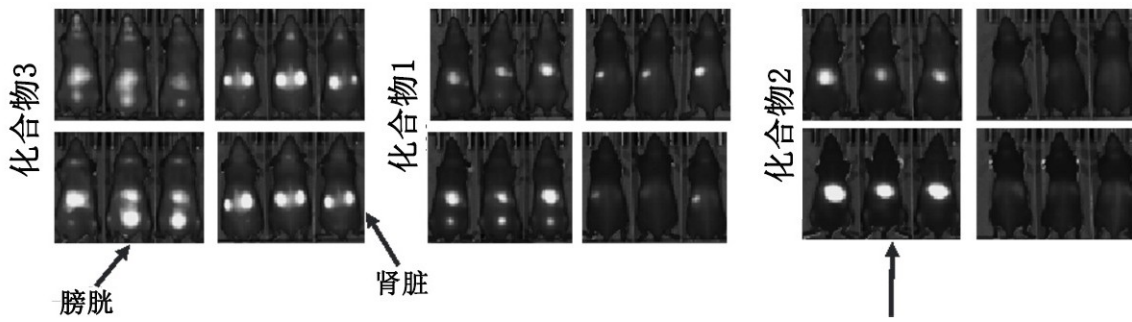


图8

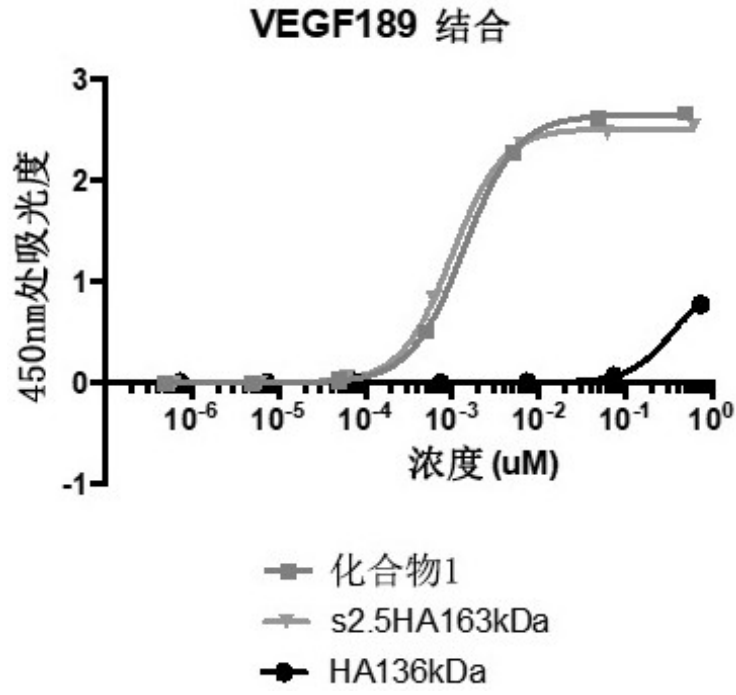


图9

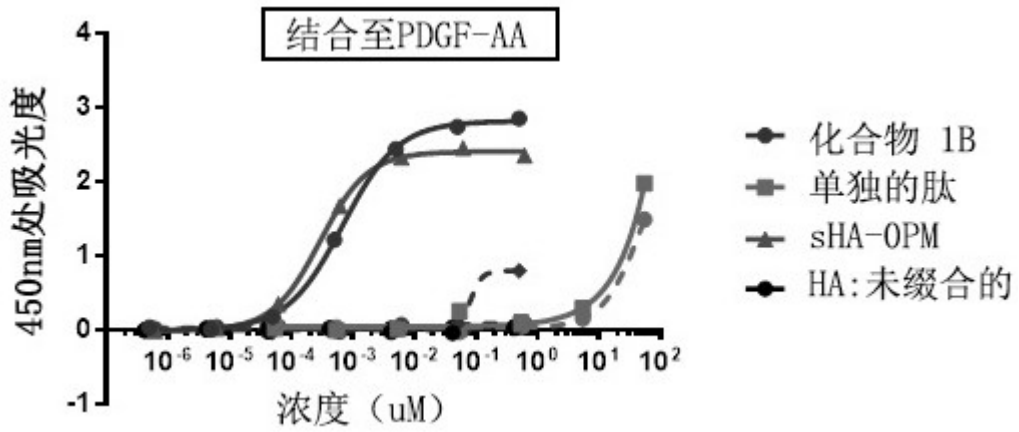


图10

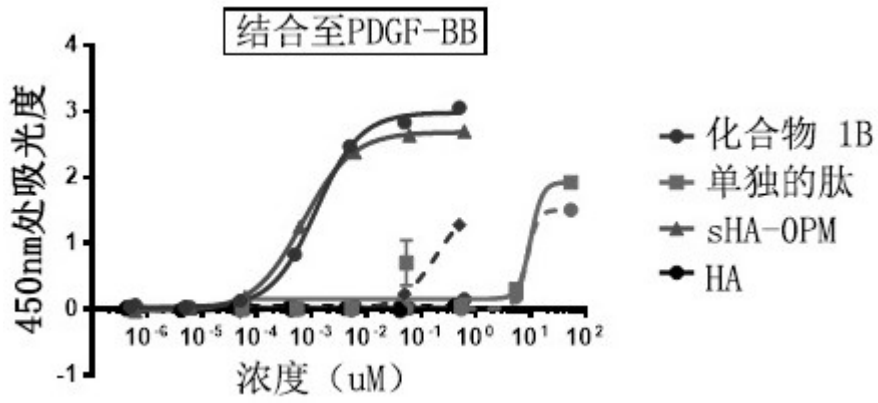


图11

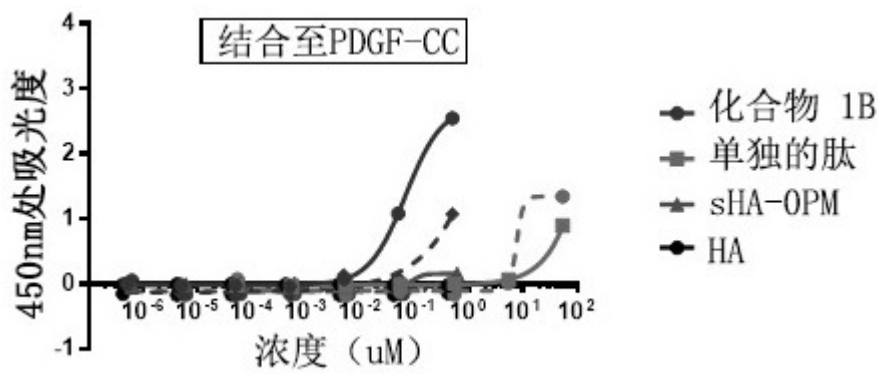


图12

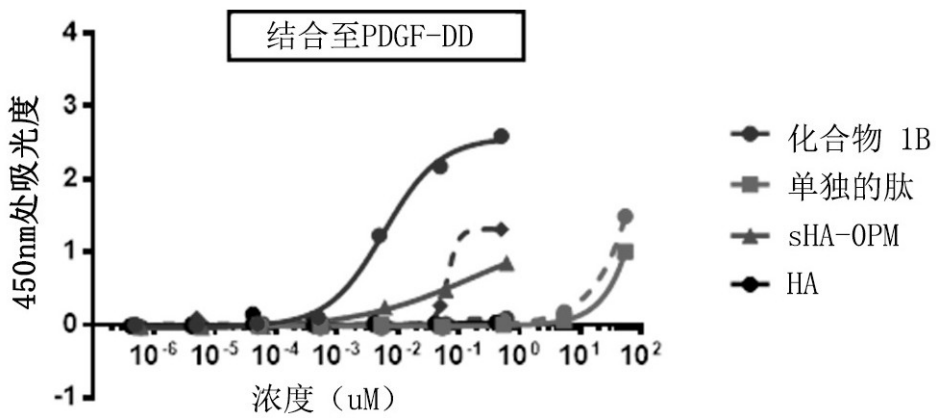


图13

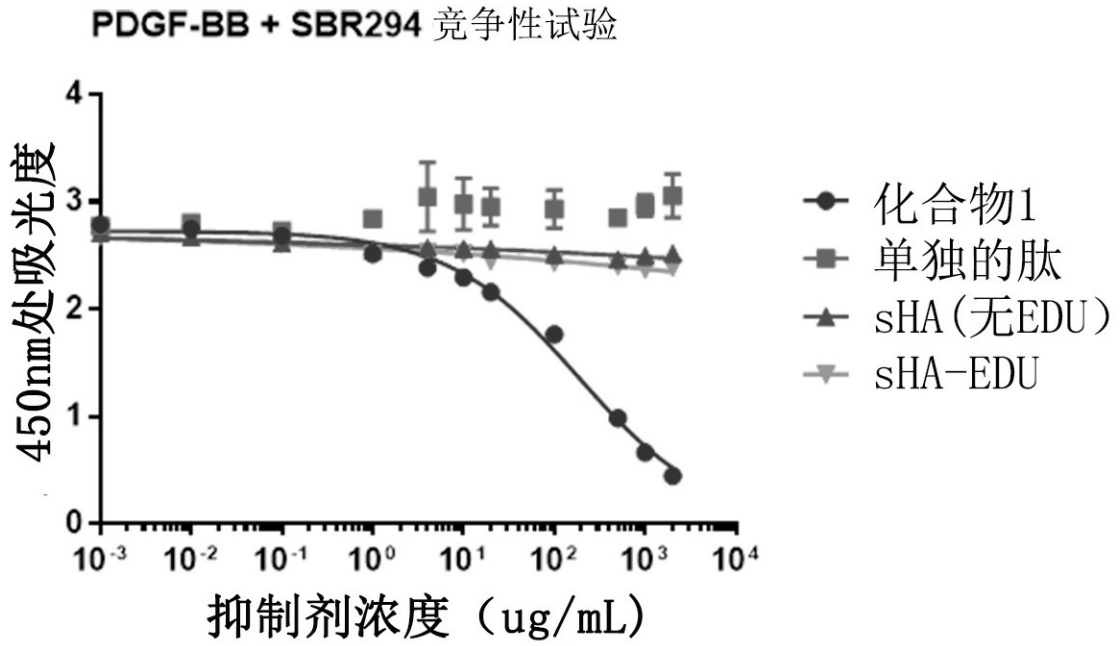


图14

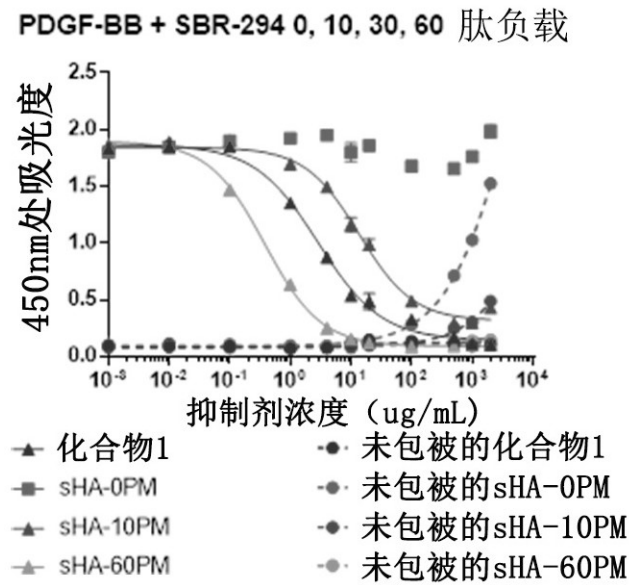


图15

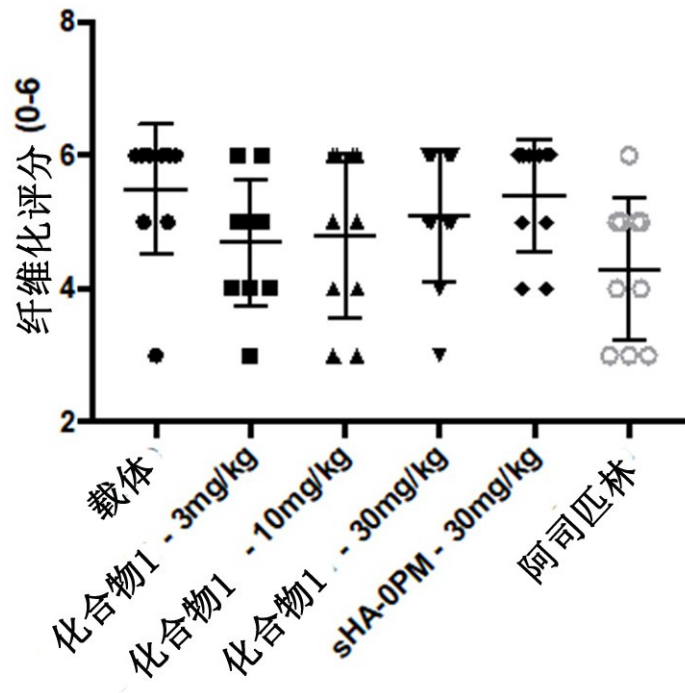


图16

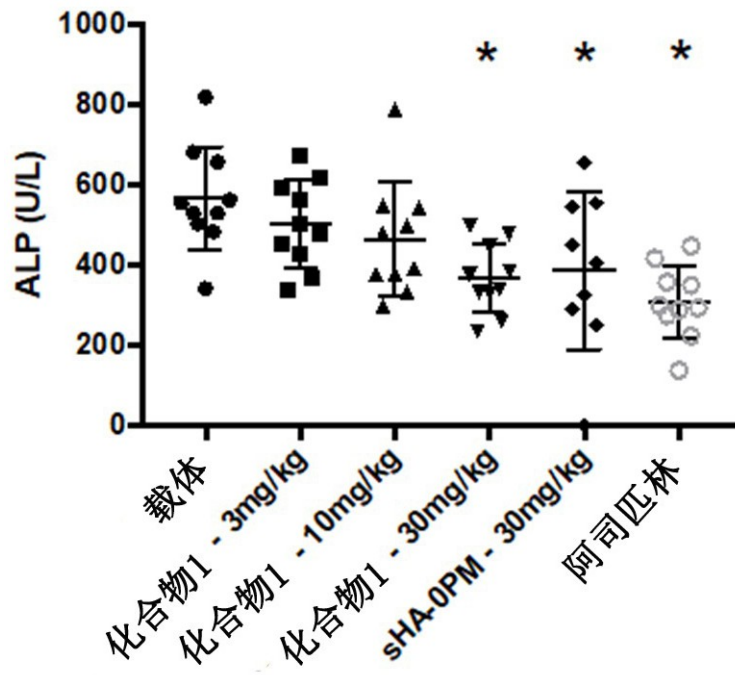


图17

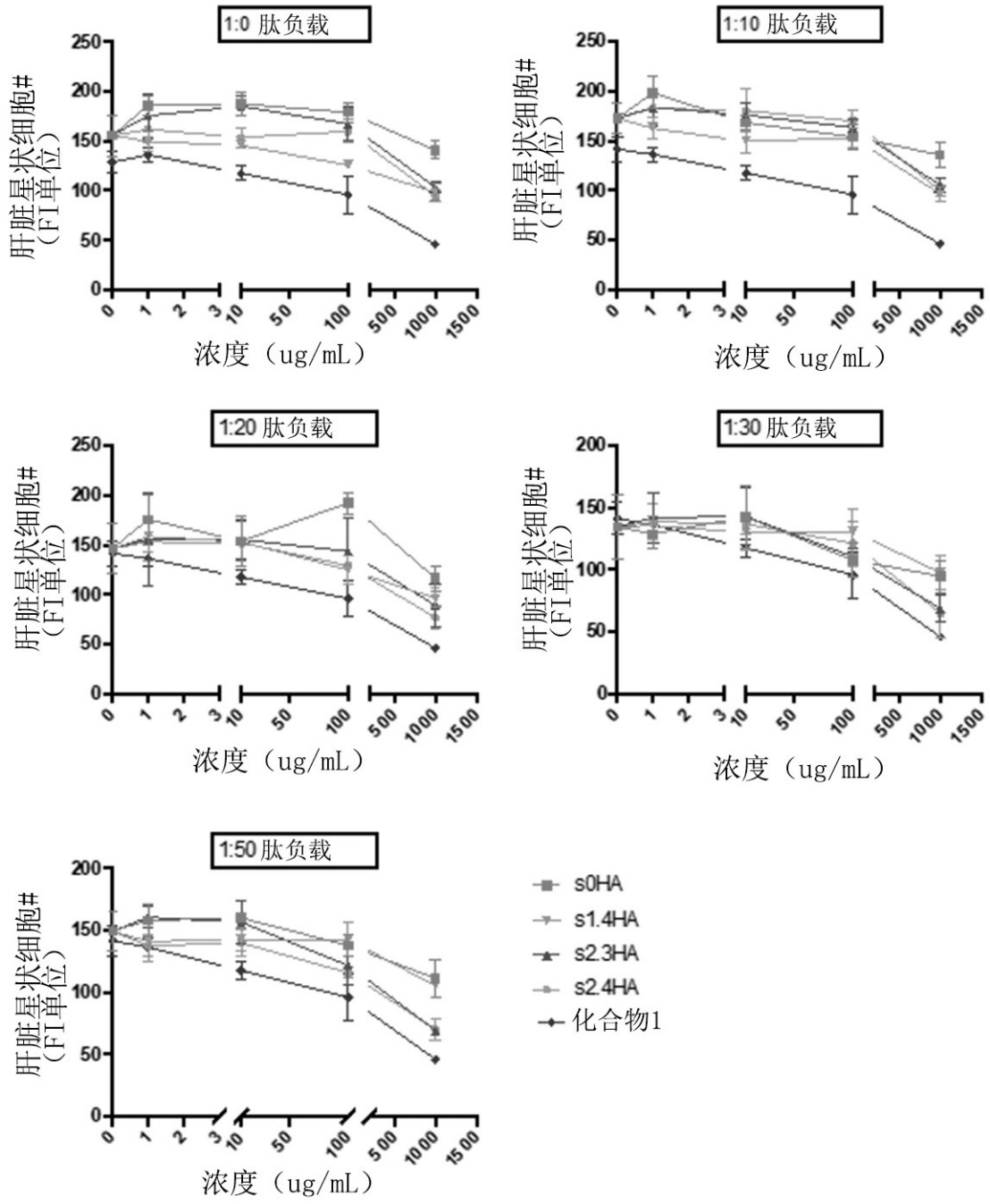


图18

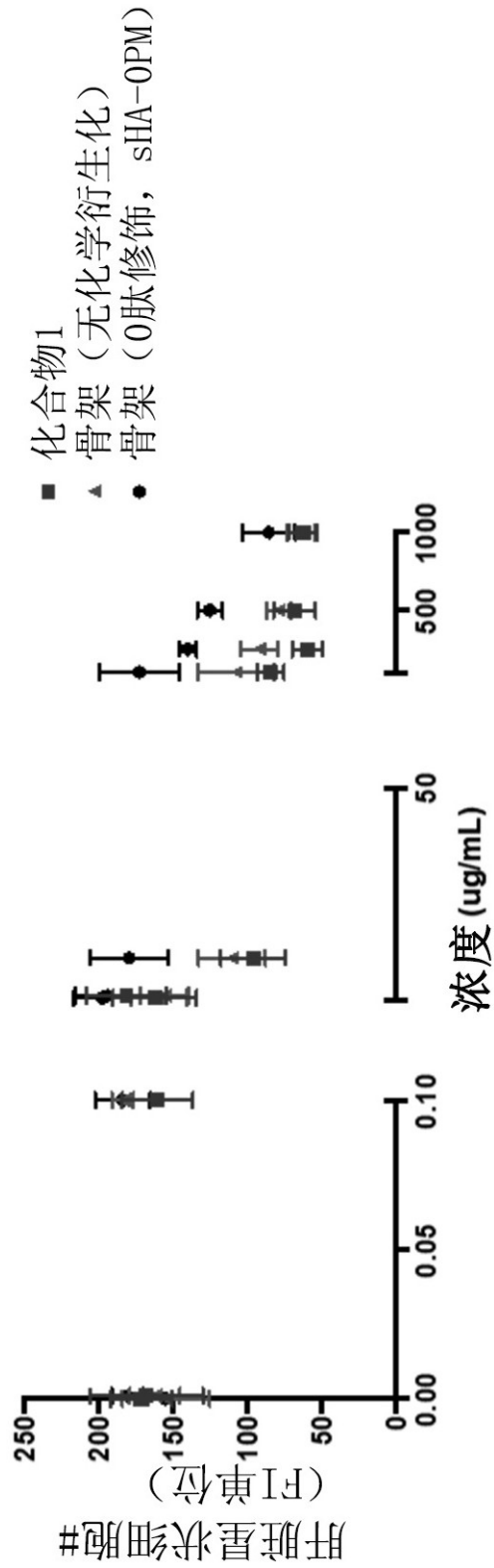


图19