



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108369611 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680071297.8

(22)申请日 2016.10.05

(30)优先权数据

62/238,393 2015.10.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/055421 2016.10.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/062407 EN 2017.04.13

(71)申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R·凯利 J·希尔 W·沙茨

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

G06F 19/00(2018.01)

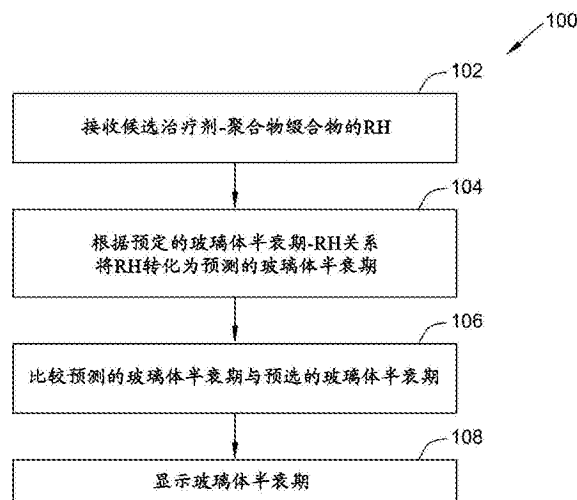
权利要求书5页 说明书25页 附图17页

(54)发明名称

用于预测治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的系统和方法

(57)摘要

本申请公开了用于估计治疗剂的玻璃体半衰期的系统和方法。具体而言,本申请公开了用于使用玻璃体半衰期与候选治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径的经验导出关系预测与聚合物缀合的治疗剂的玻璃体半衰期的系统和方法。本申请还涉及本文公开的系统和方法用于设计具有预选的玻璃体半衰期的候选治疗剂-聚合物缀合物的用途。



1. 一种用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的方法,所述方法包括:

a) 确定治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径 (RH);

b) 根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化成治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;和

c) 评估预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期。

2. 权利要求1的方法,其中所述预定的玻璃体半衰期-RH关系是通过使针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的多个玻璃体半衰期与针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的流体动力学半径 (RH) 相关联而经验性获得的。

3. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述预定玻璃体半衰期-RH关系是使用线性回归方法经验性获得的。

4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述预定的玻璃半衰期-RH关系表示为方程 (1):

$$Y = (1.53 \pm 0.005) + (0.588 \pm 0.005) X \quad \text{方程 (1)}$$

其中:

Y是以天计的预测的玻璃体半衰期;

X是以nm计的RH;且

由方程 (1) 表示的预定的玻璃半衰期-RH关系进一步包括大于或等于约0.9的相关系数 (R^2)。

5. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述预定的玻璃半衰期-RH关系表示为方程 (2):

$$Y = 1.5322 + 0.58834X \quad \text{方程 (2)}$$

其中:

Y是以天计的预测的玻璃体半衰期;

X是以nm计的RH;且

由方程 (2) 表示的预定的玻璃半衰期-RH关系进一步包括大于或等于约0.97434的相关系数 (R^2)。

6. 权利要求1-5中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物包括选自以下的聚合物部分:聚乙二醇 (PEG)、透明质酸、羟乙基淀粉、肝素、磷酸胆碱聚合物和2-聚烷基噁唑啉。

7. 权利要求6的方法,其中所述聚合物部分是聚乙二醇 (PEG)。

8. 权利要求6-7中任一项的方法,其中所述PEG是分支的。

9. 权利要求8的方法,其中所述分支的PEG包括选自以下的多臂PEG:2臂PEG、3臂PEG、4臂PEG、5臂PEG、6臂PEG、7臂PEG、8臂PEG、9臂PEG、10臂PEG、11臂PEG和12臂PEG。

10. 权利要求9的方法,其中所述多臂PEG选自4臂PEG、6臂PEG和8臂PEG。

11. 权利要求1-10中任一项的方法,其中所述治疗剂是抗体或其片段。

12. 权利要求11的方法,其中所述抗体片段是Fab片段。

13. 权利要求6-12中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分的分子量大于或等于约1000道尔顿。

14. 权利要求6-13中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分具有约1000道尔顿至约500000道尔顿的平均分子量。

15. 权利要求1-14中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径

大于或等于约1nm。

16. 权利要求1-15中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径范围是约1nm至约50nm。

17. 权利要求1-16中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径范围是约1nm至约25nm。

18. 权利要求1-17中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径范围是约1nm至约15nm。

19. 权利要求1-18中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径范围是约1nm至约10nm。

20. 权利要求1-19中任一项的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径范围是约2nm至约8nm。

21. 权利要求1-20中任一项的方法,进一步包括:

d) 如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重复a)-c)直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期;和

e) 选择来自d)的治疗剂-聚合物缀合物,其中缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。

22. 权利要求21的方法,进一步包括:

f) 使用动物模型确定来自c)的治疗剂-聚合物缀合物的体内玻璃体半衰期。

23. 一种选择用于眼部治疗的治疗剂-聚合物缀合物的方法,所述治疗剂-聚合物缀合物具有大于或等于预选的玻璃体半衰期的预测的玻璃体半衰期,所述方法包括:

a) 制备多个候选治疗剂-聚合物缀合物,其中多个候选治疗剂-聚合物缀合物中的每个包含治疗剂和聚合物部分,每个聚合物部分包含比所述多个候选治疗剂-聚合物缀合物中的每个其他聚合物部分不同的组成;

b) 确定多个治疗剂-聚合物缀合物中的每个的流体动力学半径(RH);

c) 根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将每个RH转化成多个治疗剂-聚合物缀合物中的每个的预测的玻璃体半衰期;

d) 评估每个预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期;和

e) 从所述多个候选治疗剂-聚合物缀合物中选择一种候选治疗剂-聚合物缀合物用于眼部治疗,其中所选的候选治疗剂-聚合物缀合物的特征在于大于或等于预选的玻璃体半衰期的预测的玻璃体半衰期。

24. 权利要求23的方法,还包括以足以向至少一个患者提供剂量的量制备所选的候选治疗剂-聚合物缀合物。

25. 权利要求23的方法,其进一步包括将至少一个剂量包装在适于向所述患者使用所述剂量的存储装置中。

26. 权利要求25的方法,其中所述包装包括配置为用于注射到患者眼中的预填充注射器。

27. 权利要求25-26中任一项的方法,其中所述包装包括配置为允许经由注射器抽出至少一个所述剂量的安瓿/小瓶。

28. 一种用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的方法,所述方法由包括与存储器通信的至少一个处理器的计算设备来实现,所述方法包括:

a) 通过计算设备接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径 (RH);

b) 通过计算设备根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化为治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;

c) 评估预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期;和

d) 通过计算设备在计算设备的用户界面上显示预测的玻璃体半衰期。

29. 权利要求28的方法,其中所述治疗剂-聚合物缀合物的RH选自:从治疗剂-聚合物缀合物的样品测量的RH;从治疗剂-聚合物缀合物的化学结构估计的RH;和公开的治疗剂-聚合物缀合物的RH值。

30. 权利要求28-29中任一项的方法,其中所述RH使用选自以下的方法测量:准弹性光散射 (QELS)、荧光相关光谱 (FCS)、脉冲场NMR和UV区域成像。

31. 权利要求28-30中任一项的方法,其中所述RH使用准弹性光散射 (QELS) 测量。

32. 权利要求28-31中任一项的方法,其中所述预定的玻璃体半衰期-RH关系是通过使针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的多个玻璃体半衰期与针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的流体动力学半径 (RH) 相关联而经验性获得的。

33. 权利要求28-32中任一项的方法,其中所述预定玻璃体半衰期-RH关系是使用线性回归方法经验性获得的。

34. 权利要求28-33中任一项的方法,其中所述预定的玻璃半衰期-RH关系表示为方程(1):

$$Y = (1.53 \pm 0.005) + (0.588 \pm 0.005) X \quad \text{方程 (1)}$$

其中:

Y是以天计的预测的玻璃体半衰期;

X是以nm计的RH;且

由方程(1)表示的预定的玻璃半衰期-RH关系进一步包括大于或等于约0.9的相关系数(R^2)。

35. 权利要求28-33中任一项的方法,其中所述预定的玻璃半衰期-RH关系表示为方程(2):

$$Y = 1.5322 + 0.58834X \quad \text{方程 (2)}$$

其中:

Y是以天计的预测的玻璃体半衰期;

X是以nm计的RH;且

由方程(2)表示的预定的玻璃半衰期-RH关系进一步包括大于或等于约0.97434的相关系数(R^2)。

36. 权利要求28-35中任一项的方法,进一步包括:

d) 通过计算设备在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物,以及预测的玻璃体半衰期;和

e) 如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重复a)-d)直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预

选的玻璃体半衰期。

37. 一种计算设备,其包括与存储器通信的至少一个处理器,所述至少一个处理器被编程为:

- a) 接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径 (RH);
- b) 根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化成治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;
- c) 评估预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期;和
- d) 在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和经修改的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物,以及预测的玻璃体半衰期。

38. 权利要求37的计算设备,其中所述至少一个处理器进一步被编程为:

- e) 如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重复a) -d) 直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。

39. 权利要求38的计算设备,其中聚合物部分通过计算设备进行修改。

40. 一种计算机可读存储介质,其上包括有计算机可执行指令,其中,当由包括与存储器通信的至少一个处理器的计算设备执行时,计算机可执行指令使计算设备:

- a) 接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径 (RH);
- b) 根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化成治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;
- c) 评估预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期;和
- d) 在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和经修改的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物,以及预测的玻璃体半衰期。

41. 权利要求40的计算机可读存储介质,其中所述计算机可执行指令进一步使计算设备:

- e) 如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重复a) -d) 直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。

42. 权利要求40-41中任一项的计算机可读存储介质,其中所述计算机可执行指令还使所述计算设备修改所述聚合物部分。

43. 一种用于使用计算设备鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的系统,所述计算设备包括与存储器通信的至少一个处理器,所述存储器包括多个模块,每个模块包括被配置为使用所述至少一个处理器执行的指令,所述多个模块包括:

- a) 第一模块,用于接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径 (RH);
- b) 第二模块,用于根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化为治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期
- c) 第三模块,用于评估预测的玻璃体半衰期是否至少是预选的玻璃体半衰期;和
- d) 第四模块,用于在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和修改的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物,以及预测的玻璃体半衰期。

44. 权利要求43的系统,其中所述多个模块进一步包括第五模块,用于如果预测的玻璃

体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重新执行第一、第二、第三和第四模块的指令,直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。

用于预测治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的系统和 方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求发明名称为“用于预测治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的系统和方法”且于2015年10月7日提交的第62/238,393号美国临时申请的权益,在此通过引用将其全部内容并入本文。

技术领域

[0003] 本申请一般涉及用于预测治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的系统和方法。具体而言,本申请涉及用于通过玻璃体半衰期与治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径之间的经验导出关系来预测与聚合物缀合的治疗剂的玻璃体半衰期的系统和方法。本申请还涉及本文公开的系统和方法用于设计具有预定的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的用途。

背景技术

[0004] 由于这些结构的相对隔离的位置以及通常用于这些眼内眼部治疗的治疗剂的相对较短的停留时间,用于治疗许多眼内疾病(诸如视网膜病)的治疗剂的施用是具有挑战性的。结果是,通常通过玻璃体内注射治疗剂的频繁剂量获得对患者的最大益处。然而,使用需要较不频繁剂量给药的治疗可更容易地获得增加的患者便利性和依从性以及降低的炎症风险。

[0005] 为了以较不频繁的剂量给药获得积极的临床结果,已经考虑多种技术来实现治疗剂的长效递送(LAD)。用于长效递送(LAD)的现有技术包括治疗剂的缓慢释放制剂、治疗剂延长治疗剂半衰期的分子修改以及使用可植入装置给予治疗剂。通常,这些方法需要在动物模型(诸如兔)中进行体内临床前测试以评估持续递送的可行性。用于评估眼内治疗剂的玻璃体半衰期的现有范例包括初始测试兔的玻璃体内剂量以评估候选治疗剂的玻璃体半衰期。然而,这种现有范例可能不适合评价某些类型的候选治疗剂,诸如人或人源化抗体。使用动物模型体内测试玻璃体半衰期是耗时且昂贵的。此外,动物模型的结果可能是不可靠的,因为对治疗剂的免疫应答历经长时间的暴露时间。通常,大多数人或人源化抗体在兔中具有免疫原性,这是长时间暴露后加剧的问题。所考虑的动物模型对候选治疗剂的免疫反应证明对初始测试期间获得的药代动力学(PK)数据的解释有误,并且如果在兔中使用人或人源化抗体作为兔中这些可行性研究的治疗剂可能会导致关于治疗剂-聚合物缀合物的潜力的有缺陷的结论。

[0006] 因此,需要预测各种制剂中候选治疗剂的玻璃体半衰期的系统和方法,所述制剂包含利用简单的体外测量以使得能够相对快速和廉价地筛选治疗剂的候选制剂的治疗剂-聚合物缀合物。此外,需要预测各种制剂中候选治疗剂玻璃体半衰期的系统和方法,所述制剂与各种治疗剂(包括人或人源化抗体)相容。还需要用于设计治疗剂-聚合物缀合物的制剂的系统和方法,其在通过玻璃体内注射施用后达到预选的玻璃体半衰期。

发明内容

[0007] 在一个方面,本申请涉及一种用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的方法。在该方面,该方法包括:a) 确定治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH); b) 根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化成治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;和c) 评估预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期。该方法可进一步包括:d) 如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重复a)-c) 直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。该方法可另外包括:e) 选择来自c) 的治疗剂-聚合物缀合物,其中缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。该方法可另外包括:f) 使用动物模型确定来自c) 的治疗剂-聚合物缀合物的体内玻璃体半衰期。

[0008] 另一方面,本申请涉及一种选择用于眼部治疗的治疗剂-聚合物缀合物的方法,该治疗剂-聚合物缀合物具有大于或等于预选的玻璃体半衰期的预测的玻璃体半衰期。在该方面,该方法包括:a) 制备多个候选治疗剂-聚合物缀合物,其中多个候选治疗剂-聚合物缀合物中的每个包含治疗剂和聚合物部分,并且进一步其中每个聚合物部分具有比所述多个候选治疗剂-聚合物缀合物中的每个其他聚合物部分不同的组成。该方法还包括:b) 确定多个治疗剂-聚合物缀合物中的每个的流体动力学半径(RH); c) 根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将每个RH转化成多个治疗剂-聚合物缀合物中的每个的预测的玻璃体半衰期;d) 评估每个预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期;和e) 选择一种候选治疗剂-聚合物缀合物用于眼部治疗,其具有大于或等于预选的玻璃体半衰期的预测的玻璃体半衰期。

[0009] 在又一方面,本申请涉及一种用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的方法。在该方面,该方法由包括与存储器通信的至少一个处理器的计算设备来实现。该方法包括:a) 通过计算设备接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH); b) 通过计算设备根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化为治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;c) 评估预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期;和d) 通过计算设备在计算设备的用户界面上显示预测的玻璃体半衰期。该方法可进一步包括:d) 通过计算设备在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和经修改的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物,以及预测的玻璃体半衰期;和e) 如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重复a)-d) 直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。

[0010] 在又一方面,本申请涉及一种计算设备,其包括与存储器通信的至少一个处理器,其中,该至少一个处理器被编程为:a) 接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH); b) 根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化成治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;c) 评估预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期;和d) 在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和经修改的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物,以及预测的玻璃体半衰期。该至少一个处理器可进一步编程为:e) 如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重复a)-d) 直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。在该方面,聚合物部

分可通过计算设备进行修改。

[0011] 在又一方面,本申请涉及一种计算机可读存储介质,其上包括有计算机可执行指令,其中,当由包含与存储器通信的至少一个处理器的计算设备执行时,计算机可执行指令使计算设备:a)接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH);b)根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化成治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;c)评估预测的玻璃体半衰期是否大于或等于预选的玻璃体半衰期;和d)在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和经修改的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物,以及预测的玻璃体半衰期。计算机可执行指令进一步可使计算设备:e)如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重复a)-d)直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。计算机可执行指令还可使计算设备通过从待评价的聚合物数据库提供一种或多种建议的聚合物来修改聚合物部分,以用作治疗剂-聚合物缀合物中的聚合物部分。

[0012] 在又一方面,本申请涉及选择具有期望的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物,并将其剂量包装在适用于将其施用于患者的存储装置中。在一个具体方面,存储装置是预填充的注射器或替代地安瓿或小瓶,其被配置为允许经由注射器抽取至少一个剂量。

[0013] 在又一方面,本申请涉及一种用于使用计算设备来识别具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的系统,所述计算设备包括与存储器通信的至少一个处理器,所述存储器包括多个模块,每个模块包括被配置为使用所述至少一个处理器执行的指令。多个模块包括:第一模块,用于接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH);第二模块,用于根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化为治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;第三模块,用于评估预测的玻璃体半衰期是否至少是预选的玻璃体半衰期;和第四模块,用于在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和修改的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物,以及预测的玻璃体半衰期。该多个模块进一步包括第五模块,用于如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重新执行第一、第二、第三和第四模块的指令,直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期。

附图说明

[0014] 图1是描绘在兔眼内玻璃体内注射后作为流体动力学半径的函数的几种治疗剂、治疗剂-聚合物缀合物和替代物-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的图。

[0015] 图2是描绘在兔眼内玻璃体内注射后作为分子量的函数的几种治疗剂、治疗剂-聚合物缀合物和替代物-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的图。

[0016] 图3是描绘在兔眼内玻璃体内注射后作为流体动力学半径的函数的几种治疗剂、治疗剂-聚合物缀合物和替代物-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的图。

[0017] 图4是说明在一个实施方案中鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物组合物的方法的流程图。

[0018] 图5是描绘在兔眼内和猴眼内玻璃体内注射后作为流体动力学半径的函数的几种治疗剂和/或治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的图。

[0019] 图6是说明设计具有大于或等于预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的

方法的流程图。

[0020] 图7A描绘与单个聚合物部分缀合的示例性治疗剂化学结构。图7B描绘与单个聚合物部分缀合的两种治疗剂的示例性治疗剂化学结构。图7C描绘与分支聚合物部分的多个臂缀合的多个治疗剂的示例性治疗剂化学结构。

[0021] 图8是说明服务器系统的框图。

[0022] 图9是说明计算设备的框图。

[0023] 图10是描绘在玻璃体内注射后替代物从兔模型的眼中消除的图。

[0024] 图11是描绘在重复玻璃体内注射后替代物从兔模型的眼中多次消除的图。

[0025] 图12A是描绘用于使用准弹性光散射 (QELS) 测量RH的相关函数的图。图12B是描绘代表性QELS信号的图。

[0026] 图13是描绘在玻璃体内注射后作为流体动力学半径的函数的来自兔模型的几种替代物-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的图。

[0027] 图14是描绘在玻璃体内注射后几种替代物-聚合物缀合物从兔模型的眼中消除的图。

[0028] 图15A是描绘FcRn结合对治疗剂的玻璃体半衰期的影响的图。图15B是描绘FcRn结合对治疗剂的全身半衰期的影响的图。

[0029] 图16是描绘治疗剂的净电荷对相应玻璃体半衰期的影响的图。

[0030] 本申请的实施方案的以下详细描述参考附图。不同附图中的相同附图标记可标识相同或相似的元素。而且,以下详细描述不限制权利要求。

具体实施方式

[0031] 如本文进一步详述的,本申请涉及源自以下发现的系统和方法,即如下所述包含治疗剂和聚合物的治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期可基于治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH)准确地预测。

[0032] 本文所述的系统和方法有助于鉴定用于眼部治疗的合适治疗剂-聚合物缀合物。本文公开的系统和方法实现了通过选择合适的例如相对高的玻璃体半衰期而增强的眼部治疗方法。在各种实施方案中,该方法利用预定的玻璃体半衰期-RH关系,该关系通过使玻璃体半衰期与先前针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的流体动力学半径和/或流体动力学体积相关联而经验性地导出。图1是描绘一个实施方案中的预定的玻璃体半衰期-RH关系的图,其中预定的玻璃体半衰期-RH关系使用如本文所述的兔或其他动物模型中RH的测量和玻璃体半衰期的测量而经验性地导出。

[0033] 不受限于任何特定理论,玻璃体半衰期相对于流体动力学半径和/或流体动力学体积的相对高度的相关性来源于以下发现:治疗剂从玻璃体液中的清除可由扩散过程支配,而不是通过全身清除过程典型的对流和/或过滤过程。通过非限制性实例的方式,已经证明,治疗剂-聚合物缀合物的全身半衰期相对于流体动力学半径不表现出线性关系(参见 Koumenis et al. 2000 Int. J. Pharm. 198:83-95)。如下文详细描述,治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期表现出相对于流体动力学半径(RH)的线性相关性。如本文所用,化合物的“流体动力学半径(RH)”是指以与化合物在溶液中相同的速率扩散的硬球的半径。因此,高度依赖于扩散过程的玻璃体半衰期与量化治疗剂、聚合物和/或治疗剂-聚合物缀合物的

扩散行为的RH良好地相关。相反,如图2所示,图1中所示的相同治疗剂和/或治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期(特别是PEG-Fab缀合物)与其相应的分子量关联不良(也参见Missell 2012Pharm.Res.29:3251-3272)。

[0034] 从多个治疗剂和/或治疗剂-聚合物缀合物的测量的玻璃体半衰期和相应的流体动力学半径与一系列流体动力学半径的相关性导出的预定的玻璃体半衰期-RH关系能够使流体动力学半径(可使用现有方法容易地测量的量)准确地转换为玻璃体半衰期,其以前需要使用动物模型进行繁琐且耗时的体内测量。该预定的玻璃体半衰期-RH关系被包括在用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的系统和方法中,与现有的体内筛选方法相比,以更迅速且成本更低地准确预测各种治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期。

[0035] A. 定义

[0036] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语、符号和其他科学术语旨在具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的普通含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义了具有通常理解的含义的术语,并且在本文中包括这样的定义不应该被解释为表示与本领域中通常理解的实质差异。本领域技术人员使用常规方法通常熟知并且通常采用本文中描述或参考的技术和程序,例如在Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd edition(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.适当时,除非另有说明,否则涉及使用市售试剂盒和试剂的程序通常根据制造商定义的方案和/或参数进行。

[0037] 如本文所用,“治疗剂”是指用于成品药物产品(FPP)中的任何物质或物质的组合,旨在提供药理学活性或另外对疾病的诊断、治愈、缓解、治疗或预防具有直接作用,或者当对患者施用恢复、矫正或改变生理学功能具有直接作用。治疗剂的非限制性实例包括抗体及其片段、蛋白质及其片段和小分子。

[0038] 本文使用的“替代物(surrogate)”或“替代化合物”是指用于评价具有类似结构的治疗剂制剂方面的化合物。替代物的一个非限制性实例是rabFab,一种用于评价眼部PK特征的兔抗体,如以下实施例1-3中所述。

[0039] 本文使用的术语“预选的玻璃体半衰期”是指由本申请的系统和方法的用户选择的玻璃体半衰期,其表示治疗剂-聚合物缀合物的期望或目标水平的玻璃体半衰期。可将预测的玻璃体半衰期与预选的玻璃体半衰期进行比较,以确定治疗剂-聚合物缀合物是否可被鉴定为适合用作眼部治疗。

[0040] 本文使用的术语“预测的玻璃体半衰期”是指通过本申请的系统和方法预测的治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期。典型地,预测的玻璃体半衰期是通过根据预定的玻璃体半衰期-RH关系转换用户提供的流体动力学半径(RH)而产生的。

[0041] 本文使用的术语“预定的玻璃体半衰期-RH关系”是指指定治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期与流体动力学半径(RH)之间相关性的方程,其用于根据本申请的系统和方法将治疗剂-聚合物缀合物的用户所提供的RH转换成预测的玻璃体半衰期。作为非限制性实例,预定的玻璃体半衰期-RH关系可以是使用包含多个治疗剂-聚合物缀合物的测量的玻璃体半衰期的数据集的线性回归分析获得的线性回归方程以及相应的测量的RH值,如图3所示。

[0042] 本文使用的化合物的“流体动力学半径(RH)”是指以与化合物在溶液中相同的速率扩散的硬球的半径。治疗剂-聚合物缀合物的“流体动力学半径”可根据聚合物的分子量、聚合物的化学结构(线性、分支、多臂等)以及聚合物与溶剂的相互作用程度而变化。

[0043] 本文使用的“流体动力学体积”是指聚合物卷或治疗剂-聚合物缀合物在溶液中时占据的体积。聚合物或治疗剂-聚合物缀合物的“流体动力学体积”可根据其分子量以及其与溶剂相互作用的程度而变化。例如,已知PEG的每个氧化乙烯重复单元结合2-3个水分子。流体动力学体积可以分子半径为单位进行测量。

[0044] 本文使用的术语“带电荷的分子”或“带电荷的部分”是指具有形式电荷的任何部分或分子。带电荷的分子可凭借其固有的结构或由于其与另一个原子共价键合而永久带电。凭借周围环境存在的pH条件,诸如药物递送过程中存在的环境,带电荷的分子也可能具有形式电荷。分子上的电荷可以是正电荷(阳离子)或负电荷(阴离子)。带电荷的分子只能包含正电荷或负电荷。带电荷的分子还可包含正电荷和负电荷两者的组合。在一个具体实施方案中,带电荷的分子具有净阴离子电荷。赋予带电荷的分子正电荷的化学基团包括但不限于可电离的氮原子,诸如在含氨基的化合物中。赋予带电荷的分子负电荷的化学基团包括但不限于羧酸根、硫酸根、磺酸根、膦酸根或磷酸根基团。

[0045] 带电荷的分子或生物活性分子-带电荷的分子缀合物任选伴随有一个或多个“抗衡离子”。伴随带电荷的分子或生物活性分子-带电荷的分子缀合物的抗衡离子可被认为是带电荷的分子的一部分。带电荷的分子和所得生物活性分子-带电荷的分子缀合物的抗衡离子可导致药学上可接受的盐。合适的阴离子抗衡离子包括但不限于氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、甲磺酸盐、琥珀酸盐等。合适的阳离子抗衡离子包括但不限于 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 NH_4^+ 和有机胺阳离子。有机胺阳离子包括但不限于四烷基铵阳离子和有机胺,其与质子一起形成季铵阳离子。能够形成季铵阳离子的有机胺的实例包括但不限于单有机胺和二有机胺、单氨基酸和二氨基酸以及单氨基酸酯和二氨基酸酯、二乙醇胺、乙二胺、甲胺、乙胺、二乙胺、三乙胺、葡糖胺、N-甲基葡糖胺、2-(4-咪唑基)乙胺、葡萄糖胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸、哌嗪、哌啶、氨基丁三醇、6'-甲氧基-辛可宁-9-醇、辛可宁-9-醇、吡唑、吡啶、四环素、咪唑、腺苷、维拉帕米和吗啉。

[0046] 术语“聚合物”是指由许多重复的亚基或单体组成的任何大分子(large molecule)或高分子(macromolecule)。聚合物的分子量通常至少约20,000Da。

[0047] 术语“单体”是指在聚合物内是重复单元的小分子。多个单体共价键合形成聚合物。

[0048] 术语“线性聚合物”是指以单体的单个线性链为特征的聚合物,其中每个单体首尾相连地与相邻单体连接。

[0049] “分支聚合物”是指以主单体链和至少一个取代基侧链为特征的聚合物。

[0050] 术语“多臂聚合物”是指以至少两个相对长的取代基侧链(在本文中称为“臂”)为特征的分支聚合物。

[0051] 术语“治疗剂-聚合物缀合物”是指包含共价连接至聚合物的至少一种治疗剂分子的组合物。在“治疗剂-聚合物缀合物”的背景下,聚合物在本文中被称为“聚合物部分”。通常,治疗剂以最小化对治疗剂活性的影响的方式共价连接到聚合物部分。

[0052] 术语“共聚物”是指由多于一种单体制成的聚合物。共聚物可包含几种构型之一,

包括嵌段构型(例如AAAAAABBBBBB),无规构型(例如AABAABBABBBAA)或重复构型(例如ABABABABAB)。

[0053] 术语“共价键”是指当它们共享一对电子时发生的两个原子的连接。

[0054] 本文使用的术语“非肽聚合物”是指基本上不含氨基酸残基的寡聚物。

[0055] 本文使用的术语“非核酸聚合物”是指基本上不含核苷酸残基的寡聚物。

[0056] “眼部递送”和“经眼递送”是指将化合物(诸如生物活性分子)递送至眼组织或流体。“眼电离子透入疗法”是指离子电渗递送至眼组织或液体。任何眼组织或流体都可使用离子电渗疗法进行治疗。眼组织和流体包括例如眼内、眼上或眼周的那些,诸如玻璃体、结膜、角膜、巩膜、虹膜、晶状体、睫状体、脉络膜、视网膜和视神经。

[0057] 术语“非蛋白质聚合物”通常是指亲水性合成聚合物,即未在自然界中发现的聚合物。合适的非蛋白质聚合物的非限制性实例包括聚乙烯醇;聚乙烯吡咯烷酮;聚亚烷基醚诸如聚乙二醇(PEG);聚氧化烯诸如聚氧化乙烯、聚氧化丙烯,以及聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的嵌段共聚物(Pluronic);聚甲基丙烯酸酯;卡波姆;分支或非分支多糖,其包含糖单体D-甘露糖、D-和L-半乳糖、岩藻糖、果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、唾液酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸(例如聚甘露糖醛酸或藻酸)、D-葡萄糖胺、D-半乳糖胺、D-葡萄糖和神经氨酸,包括同多糖和杂多糖诸如乳糖、分支淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、直链淀粉、葡聚糖硫酸盐、葡聚糖、糊精、糖原、或酸性粘多糖的多糖亚基,例如透明质酸;糖醇聚合物诸如聚山梨糖醇和聚甘露糖醇;和肝素(heparin)或肝素(heparosan)。

[0058] 术语“聚乙二醇”或“PEG”是指通式 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 的任何聚合物,其中n大于3。在一个实施方案中,n是约4至约4000。在另一个实施方案中,n是约20至约2000。在一个实施方案中,n是约450。在一个实施方案中,PEG具有约800道尔顿(Da)至约100,000Da的分子量。在进一步的实施方案中,聚乙二醇是20kDa PEG、40kDa PEG或80kDa PEG。聚乙二醇的平均相对分子量有时用后缀数字表示。例如,可将分子量为4000道尔顿(Da)的PEG称为“聚乙二醇4000”。PEG-缀合产物可被称为PEG化产物。

[0059] 本文使用的以单数形式叙述并且前面带有词语“一”或“一个”的元素或步骤应当理解为不排除多个元素或步骤,除非明确列举了这种排除。此外,对本申请的“示范性实施方案”或“一个实施方案”的引用不意图被解释为排除也包含所述特征的附加实施方案的存在。

[0060] B. 鉴定具有预选半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的方法

[0061] 图4是说明用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的本发明方法100的一个实施方案的步骤的流程图。在各种实施方案中,方法100由包括与存储器通信的至少一个处理器的计算设备来实现,如下文中进一步详细描述。

[0062] 接收流体动力半径

[0063] 再参照图4,方法100包括在步骤102接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH)。在各个方面,治疗剂-聚合物缀合物的RH可通过任何已知方法获得,包括但不限于,根据经验测量来自治疗剂-聚合物缀合物样品的RH;使用任何已知方法(包括例如使用具有基本上相似的化学结构的缀合物的已知RH值估计治疗剂-聚合物缀合物的RH)来估算来自治疗剂-聚合物缀合物的化学结构的RH;并检索先前公布的治疗剂-聚合物缀合物的RH值。用于根据经验测量治疗剂-聚合物缀合物的RH的合适方法的非限制性实例包括:准弹性光散

射(QELS)、荧光相关光谱(FCS)、脉冲场NMR和UV区域成像。在一个实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物的RH值使用准弹性光散射(QELS)测量。在下文实施例中提供了使用QELS方法测量RH的实例(还参见Roche et al. (1993) Biochemistry 32:5629)。

[0064] 在一些实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物的RH可由计算设备经由提供用于接收来自用户的输入的输入设备来接收,该输入设备包括但不限于键盘、触敏面板等。在其他实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物的RH可由计算设备经由通信接口接收,该通信接口将计算设备可操作地耦合到用于测量RH的设备,包括但不限于QELS模块。

[0065] 将RH转化为预测的玻璃体半衰期

[0066] 再参照图4,方法100可以进一步包括在步骤104根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将所接收的RH转换成预测的玻璃体半衰期。如本文前面所讨论的,预定的玻璃体半衰期-RH关系可通过将针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的多个玻璃体半衰期与针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的相应流体动力学半径(RH)相关联而经验性地获得。不受任何特定理论的限制,预定的玻璃体半衰期-RH关系的特征在于包含结构上不同的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期和流体动力学半径之间的相对高度的相关性。

[0067] 作为非限制性实例,图1中引用的治疗剂-聚合物缀合物包括各种聚合物部分,其包括线性聚合物(PEG和透明质酸(HA))以及缺乏任何聚合物部分的治疗剂,但预定的玻璃体半衰期-RH关系特征在于包括在图1中的所有治疗剂-聚合物缀合物的相关性良好的线性回归。

[0068] 在各种实施方案中,可使用任何已知的合适的相关方法来获得预定的玻璃体半衰期-RH关系,而没有限制。适用于获得预定的玻璃体半衰期-RH关系的相关方法的非限制性示例包括:线性回归法、非线性回归法、多项式曲线拟合、对诸如三角函数或对数函数等其他函数的曲线拟合、以及任何其它合适的相关方法。在一个具体实施方案中,预定的玻璃体半衰期-RH关系可以包含作为独立变量RH的函数的因变量玻璃体半衰期的方程形式表达。在该实施方案中,预定的玻璃体半衰期-RH关系可以任何可用形式存储在计算设备的存储器内,而没有限制。作为非限制性示例,如果预定的玻璃体半衰期-RH关系以线性回归的形式提供,如图3所示,则预定的玻璃体半衰期-RH关系可存储在计算设备的存储器中作为指定线性回归方程的斜率和截距。作为另一个非限制性示例,如果以多项式曲线拟合的形式提供预定的玻璃体半衰期-RH关系,则预定的玻璃体半衰期-RH关系可作为数据集存储在存储器中,该数据集包括曲线拟合的多项式的阶数以及与多项式曲线拟合的每个项对应的系数。

[0069] 在另一具体实施方案中,预定的玻璃体半衰期-RH关系可以如图5所示的线性回归的形式提供。在又一具体实施方案中,可以一系列至少两个线性回归的形式提供预定的玻璃体半衰期-RH关系,其中每个线性回归在RH值的预定范围内有效。作为非限制性示例,预定的玻璃体半衰期-RH关系可针对在约1nm至约25nm范围内的RH来限定。在该非限制性示例中,预定的玻璃体半衰期-RH关系可被提供作为将在约1nm至约10nm范围内的RH上使用的第一线性回归,以及在约10nm至约25nm范围内的RH上使用的第二线性回归。在又一方面中,预定的玻璃体半衰期-RH关系可以一系列至少两个方程的形式提供,该至少两个方程式指定在RH回归的期望范围的至少一部分上的预定的玻璃体半衰期-RH关系,其中每个方程可以是包括但不限于线性回归、多项式曲线拟合或上文所述的任何其它方程的任何方程。

[0070] 在各种实施方案中,预定的玻璃体半衰期-RH关系可以一个或多个相关方程的形式提供,其中每个相关方程被定义为对于以下范围的RH值是有效的:约1nm至约200nm、约1nm至约100nm、和约1nm至约50nm。在各种其他实施方案中,每个相关方程被定义为对于以下范围的RH值是有效的:约1nm至约45nm、约1nm至约40nm、约1nm至约35nm、约1nm至约30nm、约1nm至约25nm、约1nm至约20nm、约1nm至约15nm、约1nm至约10nm、和约1nm至约5nm。或者,RH值范围可以是约2至约8、约2至约6、和约2.5至约5.5。在各种其他实施方案中,每个相关方程被定义为对于以下范围的RH值的子基是有效的:约1nm至约3nm、约2nm至约4nm、约3nm至约5nm、约4nm至约6nm、约5nm至约7nm、约6nm至约8nm、约7nm至约9nm、约8nm至约10nm、约9nm至约11nm、约10nm至约12nm、约11nm至约13nm、约12nm至约14nm、约13nm至约15nm、约14nm至约16nm、约15nm至约17nm、约16nm至约18nm、约17nm至约19nm、约18nm至约20nm、约19nm至约21nm、约20nm至约28nm、约24nm至约32nm、约28nm至约36nm、约32nm至约40nm、约36nm至约44nm、约40nm至约48nm、和约44nm至约50nm。

[0071] 就此而言,应注意的是,在不脱离本申请的预期范围的情况下,可出于本发明方法和系统的目的选择在那些范围内的任何组合或范围或值(例如,约2至约10,约2.5至约5.5,约3至约6等)。

[0072] 在各种实施方案中,预定的玻璃体半衰期-RH关系可能对一种或多种因素敏感,所述因素包括但不限于:患者或动物模型的物种,受试者的性别,受试者的年龄,受试者眼睛的形态(诸如眼球半径)以及任何其他相关因素。作为非限制性实例,认为玻璃体液的组成在动物的不同物种之间以及眼睛形态之间变化,这两者都可能影响预定的玻璃体半衰期-RH关系。如图5所示,兔眼的预定的玻璃体半衰期-RH关系不同于猴眼的预定的玻璃体半衰期-RH关系。

[0073] 在各种实施方案中,使用公知的方法和动物模型收集用于确定玻璃体半衰期的药代动力学(PK)数据。合适的已知动物模型的非限制性实例包括兔眼和猴眼。从兔眼收集和分析数据的方法在下文中在实施例1中描述。从猴眼收集和分析PK数据在本领域中类似公知的,如例如在各种公开文章中所述(参见例如Gaudreault et al. (2005) IOVS 46:726, and Le et al. (2015) J Pharmacol Exp Ther jpet.115.227223;在2015年9月10日印刷之前出版)。

[0074] 在各种实施方案中,可将多个预定的玻璃体半衰期-RH关系存储在计算设备的存储器中。在这些不同的方面中,多个预定的玻璃体半衰期-RH关系可与对应于一个或多个因素的一个或多个指数相关联地存储,所述一个或多个因素包括但不限于适用的RH范围,患者或动物模型物种,患者的性别,患者的年龄,形态学参数(诸如眼球半径),或如上文讨论的与玻璃体半衰期有关的任何其他因素。在这些各种实施方案中,指定一个或多个指标的一个或多个附加值可由图4的步骤102处的计算设备接收。

[0075] 在一个实施方案中,对于兔模型,预定的玻璃体半衰期-RH关系是线性回归,表示为方程(0):

$$Y = (1.5) + (0.6) X; \quad \text{方程 (0)}$$

[0077] 其中Y是以天计的预测的玻璃体半衰期,X是以nm计的RH,并且线性回归的 R^2 大于或等于约0.9。

[0078] 在一个实施方案中,对于兔模型,预定的玻璃体半衰期-RH关系是线性

[0079] 回归,表示为方程(1):

$$[0080] \quad Y = (1.53 \pm 0.005) + (0.588 \pm 0.005) X; \quad \text{方程(1)}$$

[0081] 其中Y是以天计的预测的玻璃体半衰期,X是以nm计的RH,线性回归方程的斜率和截距作为平均值±标准偏差提供,并且线性回归的 R^2 大于或等于约0.90,诸如大于或等于约0.95。

[0082] 在另一个实施方案中,并参照图3,对于兔模型,预定的玻璃体半衰期-RH关系是线性回归,表示为方程(2):

$$[0083] \quad Y = 1.5322 + 0.58834X; \quad \text{方程(2)}$$

[0084] 其中Y是以天计的预测的玻璃体半衰期,X是以nm计的RH,并且线性回归的 R^2 是约0.97434。

[0085] 在另一个实施方案中,对于猴模型,预定的玻璃体半衰期-RH关系是线性回归,表示为方程(3):

$$[0086] \quad Y = (1.54 \pm 0.006) + (0.299 \pm 0.005) X; \quad \text{方程(3)}$$

[0087] 其中Y是以天计的预测的玻璃体半衰期,X是以nm计的RH,并且线性回归的 R^2 大于或等于约0.90,诸如大于或等于约0.95。

[0088] 在另一个实施方案中,对于猴模型,预定的玻璃体半衰期-RH关系是线性回归,表示为方程(4):

$$[0089] \quad Y = 1.5441 + 0.29933X; \quad \text{方程(4)}$$

[0090] 其中Y是以天计的预测的玻璃体半衰期,X是以nm计的RH,并且线性回归的 R^2 是约0.98089。

[0091] 在各种实施方案中,预定的玻璃体半衰期-RH关系是线性回归,表示为上述线性方程,其中 R^2 值大于或等于约0.8、大于或等于约0.82、大于或等于约0.84、大于或等于约0.85、大于或等于约0.86、大于或等于约0.88、大于或等于约0.90、大于或等于约0.91、大于或等于约0.92、大于或等于约0.93、大于或等于约0.94、大于或等于约0.95、大于或等于约0.96、大于或等于约0.97、大于或等于约0.98、和大于或等于约0.99。在另一个实施方案中,预定的玻璃体半衰期-RH关系是线性回归,表示为上述线性方程,其中 R^2 值大于或等于约0.9。

[0092] 在其他实施方案中(未示出),该方法可以类似于使用上文所述的预定的玻璃体半衰期-RH关系的方式使用预定的玻璃体半衰期VH关系。在这些其他实施方案中,可接收流体动力学体积(VH)并使用预定的玻璃体半衰期VH关系将其转化为玻璃体半衰期。可以与之前讨论的玻璃体半衰期和流体动力学半径(RH)的相关性类似的方式,通过将针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的多个玻璃体半衰期与针对多个治疗剂-聚合物缀合物测量的相应流体动力学体积(VH)相关联而凭经验获得预定的玻璃体半衰期VH关系。

[0093] 在各种实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物的VH可通过任何已知的方法获得,包括但不限于根据经验测量来自治疗剂-聚合物缀合物样品的VH;使用任何已知方法(包括例如使用对于具有基本相似的化学结构的缀合物的已知VH值来估计治疗剂-聚合物缀合物的VH),从治疗剂-聚合物缀合物的化学结构估计VH;并检索先前公布的治疗剂-聚合物缀合物的VH值。在另一个实施方案中,VH可通过假设水合治疗剂-聚合物缀合物近似球形并且根据方程(5)进行估计:

[0094] $VH = (4/3)\pi(RH)^3$ 方程(5)。

[0095] 在各种实施方案中,预定的玻璃体半衰期VH关系可以一个或多个相关方程的形式提供,其中每个相关方程被定义为对于以下范围的VH值是有效的:约 1nm^3 至约 $3.5 \times 10^7\text{nm}^3$ 、约 1nm^3 至约 $4 \times 10^6\text{nm}^3$ 、和约 1nm^3 至约 $5 \times 10^5\text{nm}^3$ 。在各种其他实施方案中,每个相关性方程被定义为对于以下范围的VH值是有效的:约 1nm^3 至约 $3.8 \times 10^5\text{nm}^3$ 、约 1nm^3 至约 $2.7 \times 10^5\text{nm}^3$ 、约 1nm^3 至约 $1.8 \times 10^5\text{nm}^3$ 、约 1nm^3 至约 $1.1 \times 10^5\text{nm}^3$ 、约 1nm^3 至约 $6.5 \times 10^4\text{nm}^3$ 、约 1nm^3 至约 $3.4 \times 10^4\text{nm}^3$ 、约 1nm^3 至约 $1.4 \times 10^4\text{nm}^3$ 、约 1nm^3 至约 $4.2 \times 10^3\text{nm}^3$ 、和约 1nm^3 至约 $5.2 \times 10^2\text{nm}^3$ 。或者,VH值的范围可为约 35nm^3 至约 2150nm^3 、约 35nm^3 至约 900nm^3 、和约 65nm^3 至约 700nm^3 。

[0096] 评估预测的玻璃体半衰期

[0097] 再参照图4,一旦在步骤104获得预测的玻璃体半衰期,方法100可进一步包括评估在步骤106获得的预测的玻璃体半衰期。在各种实施方案中,在步骤106将预测的玻璃体半衰期与预选的玻璃体半衰期比较。在这些不同的实施方案中,如果在步骤106预测的玻璃体半衰期被确定为大于或等于预选的玻璃体半衰期,则可选择治疗剂-聚合物缀合物用于眼部治疗。在各种其他实施方案中,如果在步骤106预测的玻璃体半衰期被确定为小于预选的玻璃体半衰期,则用户可选择拒绝治疗剂-聚合物缀合物用于眼部治疗,或者,用户可选择修改治疗剂-聚合物缀合物,并使用经修改的治疗剂-聚合物缀合物的RH重复方法100的步骤102、104和106。在一个实施方案中,用户可通过修改聚合物部分或通过取代不同的聚合物部分来修改治疗剂-聚合物缀合物。作为非限制性实例,用户可通过用具有较高MW和RH的PEG聚合物或具有较高RH的分支PEG聚合物取代修改的聚合物部分来修改PEG聚合物部分。作为另一非限制性实例,用户可用不同的聚合物(诸如透明质酸(HA))代替PEG聚合物部分。

[0098] 在各种实施方案中,可由用户选择预选的玻璃体半衰期并将其存储在计算设备的存储器中以供在步骤106中使用。治疗剂-聚合物缀合物的值可基于任何一种或多种因素选择,包括但不限于:待治疗的眼部病症和与该病症相关的治疗时间的量;治疗剂的组成和/或制剂以及相关的药代动力学、药效学和粘度性质;包括聚合物类型(PEG、HA等)、聚合物分支和臂数的治疗剂-聚合物缀合物的组成和/或配制;剂量给药治疗剂以进行眼部治疗的期望剂量和频率;和其他相关因素。

[0099] 在一个实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物的预选的玻璃体半衰期可以是单独而不与聚合物部分缀合的治疗剂的玻璃体半衰期的至少两倍。在各种其他实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物的预选的玻璃体半衰期可以为至少1.2倍、至少1.4倍、至少1.5倍、至少1.75倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍或更多(例如,至少约20倍、30倍、40倍、50倍或更多)未缀合治疗剂单独的玻璃体半衰期。在各种其他方面,治疗剂-聚合物缀合物的预选的玻璃体半衰期可以为至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、和至少15天或更多。就此而言,应注意的是,治疗剂-聚合物缀合物被配制成延长玻璃体半衰期,并且还需要考虑与通过玻璃体内注射实际施用制剂的能力相关的挑战。

[0100] 在一个实施方案中,可选择治疗剂-聚合物缀合物的粘度,以便能够通过玻璃体内注射递送治疗剂-聚合物缀合物。不受任何特定理论的限制,合适的粘度可取决于注射器和针的选定构造以及期望的注射力。在一个实施方案中,如果常规注射器和30号针头用于注

射治疗剂-聚合物缀合物,则合适的粘度小于或等于约200cP,并且在一些实施方案中范围可以为约2cP至约200cP、约5cP至约175cP、或约10cP至约150cP。在各种其他实施方案中,粘度小于约1000cP、小于约800cP、小于约600cP、小于约500cP、小于约400cP、小于约300cP、小于约200cP、小于约100cP、小于约75cP、或小于约50cP。

[0101] 图6是说明在另一个实施方案中用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的方法100A的步骤的流程图。如图6所示,步骤106中预测的玻璃体半衰期与预选的玻璃体半衰期的比较可与附加方法步骤相关联。如图6所示,步骤106中预测的玻璃体半衰期与预选的玻璃体半衰期的比较可在步骤110进行逻辑分析。如果步骤100的逻辑分析确定预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期,则可在步骤112选择治疗剂-聚合物缀合物用于眼部治疗。如果步骤100的逻辑分析确定预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则可在步骤114修改治疗剂-聚合物缀合物以增强治疗剂-聚合物缀合物的RH,并且可重复方法100A的步骤102、104、106和108。如本文其他地方进一步详述的,这样的修改可通过选择不同的治疗剂或不同的聚合物,或通过化学修改治疗剂或聚合物来实现。

[0102] 在各种实施方案中,计算机设备和相关联的存储器可包括有助于修改治疗剂-聚合物缀合物的附加数据、指令和/或特征。作为非限制性实例,计算设备的存储器可包括储存的数据,其包括由于增加聚合物部分的分子量而引起的RH增加的预定估计,这是由于将聚合物部分的结构改变为具有相当分子量的更多分支结构,由于将聚合物部分的组成从一种聚合物化合物改变为另一种聚合物化合物,以及它们的任何组合。在该非限制性实例中,计算设备可提供附加的能力,以提示用户具有对治疗剂-聚合物缀合物的建议修改列表,其导致修改的治疗剂-聚合物缀合物可能在步骤114匹配或超过预选的玻璃体半衰期。

[0103] 在各种其它实施方案中(未示出),方法可包括组装候选治疗剂-聚合物缀合物的集合,并使用图4所示的方法100和/或图6所示的方法100A鉴定潜在用于眼部治疗的那些候选物,其具有大于或等于预选的玻璃体半衰期的预测的玻璃体半衰期。另外或可选地,候选治疗剂-聚合物缀合物的集合可在动物模型中进行测试以确定或测量实际体内玻璃体半衰期。值得注意的是,并且如下面的实施例5进一步说明的,迄今的经验表明,与体内测量的玻璃体半衰期相比,基于本申请的方法和系统的预测的玻璃体半衰期的准确性可以在有些情况下为约75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0104] 显示结果

[0105] 再参照图4和图6,在步骤108,计算设备的用户界面可显示预测的玻璃体半衰期。在其他实施方案中,步骤108还可包括向用户显示附加信息,包括但不限于:识别和/或与治疗剂-聚合物缀合物相关联的结构信息,建议修改如上文所述的治疗剂-聚合物缀合物,以方程形式或以与图1中所示的图类似的图的形式的预定的玻璃体半衰期-RH关系,治疗剂-聚合物缀合物的分子量,以及与所公开的方法的结果相关的任何其他信息。

[0106] C. 治疗剂-聚合物缀合物

[0107] 在各种实施方案中,本文描述的系统和方法鉴定和/或设计具有大于或等于预定的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物。如上文所讨论的,所述系统和方法利用预定的玻璃体半衰期-RH关系,该关系提供了使用从多个测量的玻璃体半衰期相关的流体动力学半径获得的相关性将流体动力学半径(RH)转换为玻璃体半衰期的手段。如上文进一步讨论的,如果不是唯一的,该预定的半衰期-RH关系主要由流体动力学半径决定;换言之,与流体

动力学半径相比,该预定的半衰期-RH关系显示出对分子量或电荷变化(如果有的话)小得多的敏感性(电荷对玻璃体半衰期净效应的更多细节和讨论参见例如实施例4)。

[0108] 在各种实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物包含至少一种共价键合至聚合物部分的至少一部分的治疗剂。图7A、7B和7C是治疗剂-聚合物缀合物800A、800B和800C的几个非限制性实例的说明。参考图7A,治疗剂-聚合物缀合物800A可包含与聚合物部分804共价键合的单一治疗剂802。参考图7B,治疗剂-聚合物缀合物800B可包含共价键合至聚合物部分804的至少两种治疗剂802/802A。在各个方面中,聚合物部分804可以是线性聚合物,如图7A和7B所示,或者聚合物部分可以是分支的,如图7C所示。参考图7C,治疗剂-聚合物缀合物800C可包含共价键合到分支或多臂聚合物部分804的至少两种治疗剂802/802A。

[0109] 可使用本领域已知的任何方法将聚合物共价键合至治疗剂802以形成聚合物部分804。作为一个非限制性实例,可使用下文实施例1中所述的方法将PEG聚合物共价键合至rabFab,rabFab是用于评价兔模型中眼部PK的非免疫原性替代化合物。在另一个非限制性实例中,透明质酸可使用第2011/006417号美国专利申请公开中所述的方法共价键合至抗-VEGF抗体,其通过引用整体并入本文。在又一个非限制性实例中,可使用第2014/0186350号美国专利申请公开中所述的方法将玻璃体中体内结合透明质酸的蛋白质或蛋白质片段连接至抗-VEGF抗体,其通过引用整体并入。

[0110] 在各种实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH)范围是约1nm至约200nm、约1nm至约100nm、或约1nm至约50nm。在各种其他实施方案中,治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH)范围是约1nm至约45nm、约1nm至约40nm、约1nm至约35nm、约1nm至约30nm、约1nm至约25nm、约1nm至约20nm、约1nm至约15nm、约1nm至约10nm、或约1nm至约5nm。

[0111] 治疗剂

[0112] 在各种实施方案中,治疗剂可以是适合用于眼部治疗而没有限制的任何化合物。合适的治疗剂的非限制性实例包括蛋白质、蛋白质片段、融合蛋白质、抗体、抗体片段和小分子。抗体的非限制性实例包括抑制肿瘤坏死因子(TNF)、上皮生长因子受体、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子受体、CD11a、B淋巴细胞抗原CD20、CD25、CD52和血小板源性生长因子受体的单克隆抗体。抗-VEGF抗体的非限制性实例包括雷珠单抗(ranibizumab)和贝伐珠单抗(bevacizumab)。抑制VEGF的示例性融合蛋白的非限制性实例是阿柏西普(aflibercept)。抗-TNF抗体的非限制性实例包括英夫利昔单抗(infliximab)、依那西普(etanercept)和阿达木单抗(adalimumab)。抗-CD11a抗体的非限制性例子包括依法珠单抗(efalizumab)。抗-CD20抗体的非限制性实例包括利妥昔单抗(rituximab)。抗-CD25抗体的非限制性实例包括达克珠单抗(daclizumab)。抗-CD52抗体的非限制性实例包括阿仑珠单抗(alemtuzumab)。示例性小分子包括甾族抗炎化合物诸如曲安西龙(triamcinolone),PI3K抑制剂诸如LY294002和m-TOR抑制剂诸如Palomid529。

[0113] 聚合物部分

[0114] 在各种实施方案中,用于包含在治疗剂-聚合物缀合物中的合适聚合物部分可包括具有足以可接受地增加治疗剂-聚合物缀合物的玻璃体半衰期的流体动力学半径的任何水溶性高分子量化合物。在一个实施方案中,可使用任何已知的测量方法,包括但不限于动态光散射来测量聚合物部分和含有聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半

径。

[0115] 特别有用的聚合物部分的非限制性实例包括：多糖诸如糖胺聚糖、透明质酸和藻酸盐、聚酯、高分子量聚氧化烯醚（诸如PLURONIC™）、聚酰胺、聚氨酯、聚硅氧烷、聚丙烯酸酯、多元醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚酞、羧甲基纤维素、其他纤维素衍生物、壳聚糖、聚醛或聚醚。

[0116] 在一个实施方案中，聚合物部分充分溶于水或生理溶液中。此外，聚合物部分的分子量可高达约500,000D，优选至少约20,000D，或至少约30,000D，或至少约40,000D。选择的分子量可取决于欲获得的缀合物的有效尺寸、聚合物的性质（例如，结构诸如线性或分支）和衍生化程度（即每个抗体片段的聚合物部分的数目）以及抗体片段上的一个或多个聚合物附着位点。聚合物部分可具有足够大小的流体动力学半径以在分离中适当地增强治疗剂-聚合物缀合物相对于治疗剂的玻璃体半衰期。

[0117] 在一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径的范围是约0.5纳米（nm）至约100nm、或约2nm至约8nm。在另一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径的范围是约1nm至约500nm。在另一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径的范围是约1nm至约200nm。在另一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径的范围是约1nm至约100nm。在另一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径的范围是约1nm至约50nm。在另一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径的范围是约1nm至约10nm。在另一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径是约4nm。在另一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径是约8nm。在另一个实施方案中，聚合物部分的流体动力学半径是约12nm。

[0118] 在一个实施方案中，聚合物部分是聚醚多元醇。在一个实施方案中，聚合物部分是聚乙二醇（PEG），聚丙二醇（PPG）或包含聚乙二醇和聚丙烯重复单元的共聚物。在一个实施方案中，聚合物包含聚乙二醇（PEG）。PEG可具有游离羟基或可被烷基化。在另一个实施方案中，未结合治疗剂的PEG的末端具有甲氧基（mPEG）。聚乙二醇可以是线性的、分支的或多臂的。在一些实施方案中，PEG可以是多臂的。在一些实施方案中，PEG包含选自2臂PEG、3臂PEG、4臂PEG、5臂PEG、6臂PEG、7臂PEG、8臂PEG、9臂PEG、10臂PEG、11臂PEG和12臂PEG。在一些实施方案中，多臂PEG选自4臂PEG、6臂PEG和8臂PEG。在一些实施方案中，聚乙二醇可包含约3个重复单元至约4000个重复单元，诸如约20个重复单元至约2000个重复单元，诸如约100个重复单元至约1000个重复单元，诸如约450个重复单元。在一个实施方案中，PEG具有约800道尔顿（Da）至约100,000Da的分子量。在进一步的实施方案中，聚乙二醇是20kDa PEG、40kDa PEG或80kDa PEG。

[0119] 在另一个实施方案中，聚合物部分是多糖。在一个实施方案中，可溶性高分子量立体基团是葡聚糖。葡聚糖可以是线性的或分支的。在一个实施方案中，葡聚糖是羧甲基葡聚糖（CMDex）。

[0120] 在另一个实施方案中，聚合物部分是纤维素衍生物。在另一个实施方案中，聚合物部分是羧甲基纤维素（CMC）。CMC（一种葡聚糖的类似物）及其还原末端可用于在缀合中通过Schiff碱化学与生物活性化合物的氨基偶联。在另一个实施方案中，聚合物部分是聚葡萄糖胺。在另一个实施方案中，聚合物部分是壳聚糖。

[0121] 多糖可通过还原胺化与治疗剂末端的胺连接。含有还原末端诸如醛或半缩醛官能团的多糖可通过还原胺化缀合至含伯胺的治疗剂以提供仲胺键。或者，可修改治疗剂，使得

治疗剂与胍或酰胍官能团之间存在共价键。用这些胺等价物中的任一个形成亚胺提供了相对于常规亚胺对水解稳定的缀合物。当还原胺化受接头长度限制时,胍或酰胍偶联是有用的。例如,当需要接头来分离大体积聚合物部分和高电子密度大分子治疗剂,同时允许各部分的反应性基团聚集在一起时,胍或酰胍偶联是特别有用的。寡核苷酸胺与胍或酰胍之间的接头可提供额外的空间自由度量度。由胍或酰胍产生的亚胺可不经进一步还原而使用或还原得到胺样键。

[0122] 在另一个实施方案中,聚合物部分是聚醛。在进一步的实施方案中,聚醛基团可通过氧化寡糖合成衍生或获得。

[0123] 在另一个实施方案中,聚合物部分是藻酸盐。在一个优选的实施方案中,藻酸盐基团是阴离子藻酸盐基团,其作为与阳离子抗衡离子诸如钠或钙的盐提供。

[0124] 在另一个实施方案中,聚合物部分是聚酯。在具体的实施方案中,聚酯基团可以是共嵌段聚合物型聚酯基团。

[0125] 在另一个实施方案中,聚合物部分是聚乳酸 (PLA) 或聚丙交酯-共-乙交酯 (PLGA)。合适的 PLGA 基团和缀合 PLGA 基团的方法见于 J.H. Jeong et al., *Bioconjugate Chemistry* 2001, 12, 917-923; J.E. Oh et al., *Journal of Controlled Release* 1999, 57, 269-280 and J.E. Oh et al., 第 6,589,548 号美国专利;各自的内容通过引用整体并入本文。

[0126] 在另一个实施方案中,聚合物部分是树枝块 (dendron)。树枝块可由单体和表面修改的任意组合组成。有用的单体的实例包括但不限于聚酰胺胺 (PAMAM)。有用的表面修改基团的实例包括但不限于阳离子胺、N-酰基和 N-羧甲基。树枝块可以是聚阴离子、聚阳离子、疏水或亲水的。在一个具体实施方案中,树枝块具有约 1 至约 256 个表面修改基团。在另一具体实施方案中,树枝块具有约 4、8、16、32、64 或 128 个表面修改基团。树枝块和树枝状聚合物缀合技术的实例见于第 5,714,166 号美国专利;在此通过引用将其全部内容并入。

[0127] 在另一个实施方案中,聚合物部分是牛血清白蛋白 (BSA)。游离硫醇在 BSA 上的存在允许通过使用在一个末端含有硫醇反应性基团而在另一末端含有胺反应性基团的双官能接头使含胺治疗剂与 BSA 缀合。

[0128] 在其他实施方案中,聚合物部分可以是糖胺聚糖、透明质酸 (hyaluronan)、透明质酸 (hyaluronic acid) (HA)、藻酸盐、高分子量聚氧化亚烷基醚 (诸如 Pluronic™)、聚酰胺、聚氨酯、聚硅氧烷、聚丙烯酸酯、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚醚、聚醚或聚己内酯。在其他实施方案中,聚合物部分可以是羟乙基淀粉 (HES) 或 2-聚烷基噁唑啉 (POZ)。在其他实施方案中,聚合物部分可以是肝素聚糖 (heparosan)。在其他实施方案中,聚合物部分可以是磷酸胆碱聚合物。

[0129] D. 用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的系统和装置

[0130] 本文描述的是计算机系统,诸如计算设备和用户计算机系统。如本文所述,所有此类计算机系统包括处理器和存储器。然而,本文涉及的计算机设备中的任何处理器也可以指一个或多个处理器,其中每个处理器可在一个计算设备中或并行工作的多个计算设备中。此外,本文涉及的计算机设备中的任何存储器也可以指一个或多个存储器,其中存储器可在一个计算设备或多个并行工作的计算设备中。

[0131] 本文使用的处理器可包括任何可编程系统,包括使用微控制器,精简指令集电路 (RISC), 专用集成电路 (ASIC), 逻辑电路以及能够执行本文所述功能的任何其他电路或处

理器的系统。以上仅是实例,因此不旨在以任何方式限制术语“处理器”的定义和/或含义。

[0132] 本文使用的术语“数据库”可以指数据体,关系数据库管理系统(RDBMS)或两者。本文使用的数据库可包括任何数据集合,包括分层数据库、关系数据库、平面文件数据库、对象-关系数据库、面向对象的数据库以及存储在计算机系统上的任何其他结构化的记录或数据集合。以上实例仅是实例,因此不旨在以任何方式限制术语数据库的定义和/或含义。RDBMS的实例包括但不限于包括Oracle®数据库、MySQL、IBM®DB2、Microsoft®SQL Server、Sybase®和PostgreSQL。然而,可使用任何数据库来启用本文所述的系统和方法。(Oracle是Oracle Corporation,Redwood Shores,California的注册商标;IBM是International Business Machines Corporation,Armonk,New York的注册商标;Microsoft是Microsoft Corporation,Redmond,Washington的注册商标;Sybase是Sybase, Dublin,California的注册商标)。

[0133] 在一个实施方案中,提供了一种计算机程序,并且该程序体现在计算机可读介质上。在示例实施方案中,系统在单个计算机系统上执行,而不需要连接到服务器计算机。在另一个实施方案中,系统在Windows®环境中执行(Windows是Microsoft Corporation, Redmond, Washington的注册商标)。在又一个实施方案中,系统在大型机环境和UNIX®服务器环境(UNIX是位于Reading, Berkshire, United Kingdom的X/Open Company Limited的注册商标)中执行。该应用程序非常灵活,并且设计用于在各种不同的环境中运行,而不会影响任何主要功能。在一些实施方案中,系统包括分布在多个计算设备中的多个组件。一个或多个组件可以是体现在计算机可读介质中的计算机可执行指令的形式。

[0134] 该系统 and 进程不限于本文所述的具体实施方案。此外,每个系统和每个过程的组件可独立实施并与本文所述的其他组件和进程分开。每个组件和进程也可与其他组装包和进程结合使用。

[0135] 在一个实施方案中,系统可被配置为服务器系统。图8示出服务器系统301的示例配置,诸如用于接收RH、将RH转换成预测的玻璃体半衰期、评估预测的玻璃体半衰期以及将预测的玻璃体半衰期显示在交互式用户界面的计算设备,如上文所述并且在一个实施方案中在图8中示出。服务器系统301还可包括但不限于数据库服务器。在示例实施方案中,服务器系统301执行上文所述的方法的所有步骤。

[0136] 服务器系统301包括用于执行指令的处理器305。例如,指令可被存储在存储区域310中。处理器305可包括用于执行指令的一个或多个处理单元(例如,以多核配置)。这些指令可在服务器系统301上的各种不同的操作系统内执行,诸如UNIX、LINUX、Microsoft Windows®等。还应理解,在启动基于计算机的方法时,可在初始化期间执行各种指令。为了执行本文所述的一个或多个进程可能需要一些操作,而其他操作可能对于特定编程语言(例如,C、C#、C++、Java或其他合适的编程语言等等)更通用和/或特定。

[0137] 处理器305可操作地耦合到通信接口315,使得服务器系统301能够与远程设备诸如用户系统或另一服务器系统301进行通信。例如,通信接口315可通过互联网从客户端系统接收请求(例如,提供交互式用户界面来接收RH输入并显示预测的玻璃体半衰期)。

[0138] 处理器305还可以可操作地耦合到存储设备134。存储设备134是适合于存储和/或检索数据的任何计算机操作的硬件。在一些实施方案中,存储设备134被集成在服务器系统301中。例如,服务器系统301可包括一个或多个硬盘驱动器作为存储设备134。在其他实施

方案中,存储设备134在服务器系统301外部并且可被多个服务器系统301访问。例如,存储设备134可包括多个存储单元,诸如在廉价磁盘冗余阵列(RAID)配置中的硬盘或固态硬盘。存储设备134可包括存储区域网络(SAN)和/或网络附加存储(NAS)系统。

[0139] 在一些实施方案中,处理器305经由存储接口320可操作地耦合到存储设备134。存储接口320是能够向处理器305提供访问存储设备134的任何组件。存储接口320可包括例如高级技术附件(ATA)适配器,串行ATA(SATA)适配器,小型计算机系统接口(SCSI)适配器,RAID控制器,SAN适配器,网络适配器和/或向处理器305提供访问存储设备134的任何组件。

[0140] 存储区域310可包括但不限于随机存取存储器(RAM)诸如动态RAM(DRAM)或静态RAM(SRAM)、只读存储器(ROM)、可擦除可编程只读存储器(EPROM)、电可擦除可编程只读存储器(EEPROM)和非易失性RAM(NVRAM)。上述存储器类型仅是示例性的,并且因此不限制可用于存储计算机程序的存储器的类型。

[0141] 在另一个实施方案中,系统可以计算设备的形式提供。图9示出了计算设备402的示例配置。客户端计算设备402包括用于执行指令的处理器404。在一些实施方案中,可执行指令被存储在存储区域406中。处理器404可包括一个或多个处理单元(例如,在多核配置中)。存储区域406是允许存储和检索诸如可执行指令和/或其他数据之类的信息的任何设备。存储区域406可包括一个或多个计算机可读介质。

[0142] 在另一个实施方案中,包括在用于鉴定具有预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的系统的计算设备402中的存储区域406可包括多个模块(未示出)。每个模块可包括被配置为使用至少一个处理器404执行的指令。当由计算设备的一个或多个处理器404执行时,包含在多个模块中的指令可实现至少部分用于鉴定具有上述预选的玻璃体半衰期的治疗剂-聚合物缀合物的方法。存储在计算设备的存储区域406中的模块的非限制性示例包括:第一模块,用于接收治疗剂-聚合物缀合物的流体动力学半径(RH);第二模块,用于根据预定的玻璃体半衰期-RH关系将RH转化为治疗剂-聚合物缀合物的预测的玻璃体半衰期;第三模块,用于评估预测的玻璃体半衰期是否至少是预选的玻璃体半衰期;第四模块,用于在计算设备的用户界面上显示包含治疗剂和经修改的聚合物部分的治疗剂-聚合物缀合物以及预测的玻璃体半衰期;第五模块,用于如果预测的玻璃体半衰期小于预选的玻璃体半衰期,则修改治疗剂-聚合物缀合物的聚合物部分以增加RH,并且重新执行第一、第二、第三和第四模块的指令,直到缀合物的预测的玻璃体半衰期大于或等于预选的玻璃体半衰期;及其任何组合。

[0143] 计算设备402还包括一个用于向用户400呈现信息的媒体输出组件408。媒体输出组件408是能够向用户400传递信息的任何组件。在一些实施方案中,媒体输出组件408包括输出适配器,诸如视频适配器和/或音频适配器。输出适配器可操作地耦合到处理器404并且进一步被配置为可操作地耦合到输出装置,诸如显示装置(例如,液晶显示器(LCD),有机发光二极管(OLED)显示器,阴极射线管(CRT)或“电子墨水”显示器)或音频输出设备(例如扬声器或耳机)。

[0144] 在一些实施方案中,客户端计算设备402包括用于接收来自用户400的输入的设备410。输入设备410可包括例如键盘、指点设备、鼠标、触控笔、触敏板(例如,触摸板或触摸屏)、相机、陀螺仪、加速度计、位置检测器和/或音频输入设备。单个组件诸如触摸屏可用作媒体输出组件408的输出设备和输入设备410两者。

[0145] 计算设备402还可包括通信接口412,其被配置为通信地耦合到远程设备诸如服务器系统301(参见图8)或网络服务器。通信接口412可包括例如与移动电话网络(例如全球移动通信系统(GSM)、3G、4G或蓝牙)或其他移动数据网络(例如,全球微波接入互操作性(WIMAX))一起使用的有线或无线网络适配器或无线数据收发器。

[0146] 存储在存储区域406中的是例如用于经由媒体输出组件408向用户400提供用户界面并且任选地从输入设备410接收和处理输入的计算机可读指令。用户界面除了其它可能性之外还可包括网络浏览器和应用程序。网络浏览器使得用户400能够显示并且与来自网络服务器的通常嵌入在网页或网站上的媒体和其他信息交互。应用程序允许用户400与服务器应用程序交互。用户界面经由网络浏览器和应用程序中的一个或两者促进显示信息诸如由计算设备402生成的预测的玻璃体半衰期。

[0147] 本申请使用实施例来公开本发明,包括最佳模式,并且还使本领域技术人员能够实践本发明,包括制造和使用任何装置或系统以及执行任何并入的方法。本发明的可专利范围由权利要求限定,并且可包括本领域技术人员想到的其他实施例。如果这些其他实施例具有不与权利要求的字面语言不同的结构要素,或者如果它们包括与权利要求的字面语言无实质差异的等同结构要素,则这些其他实施例意图在权利要求的范围内。

[0148] 实施例

[0149] 实施例1:rabFab替代化合物的玻璃体药代动力学

[0150] 开发蛋白质治疗剂的递送技术需要在相关动物模型中进行测试以证明体内效用。在眼部药代动力学的早期研究中通常使用兔模型。不幸的是,大多数人和人源化抗体在兔中是免疫原性的,排除了使用长效递送技术估计关键药代动力学参数。为了解决该问题,兔Fab(“rabFab”)是一种物种匹配的替代化合物,用于评价兔模型中的递送技术。本文所述的rabFab源自结合人磷酸c-Met的兔单克隆抗体。

[0151] 制备兔抗体(包括兔单克隆抗体)的方法是本领域公知的。参见例如第5,675,063和/或7,429,487号美国专利。与人磷酸c-Met结合的示例性兔单克隆抗体可从Abcam(Cambridge,MA,USA)商购获得,商品编号ab68141。

[0152] 在兔(新西兰白兔)中经玻璃体内注射(0.3mg剂量)后进行rabFab的眼部药代动力学研究。

[0153] 使用三柱步骤方法:亲和柱、阳离子交换柱和凝胶过滤柱,从经过条件化的CHO培养基中纯化由生物工程化CHO细胞培养物产生的rabFab(兔抗-cMet Fab)。

[0154] 将未受攻击的(Naïve)新西兰白(NZW)兔(3.1kg至4.1kg并且在剂量给药时约4个月龄)分配给剂量组并且给予抗磷酸cMet Fab。抗磷酸cMet Fab通过单次双侧玻璃体内注射施用至家兔,随后进行长达27天的观察。除了在第1天和第2天送到尸体剖检的动物以外,在治疗前当天在注射后立即施用两次,并在注射后当天施用两次局部用抗生素(妥布霉素(tobramycin)眼用软膏)。将散瞳药滴剂(1%托吡卡胺(tropicamide))施用于每只眼睛以充分瞳孔扩张。在手术前和手术过程中,用异氟烷/氧气使动物镇静。注射前,每只眼睛还施用阿尔卡因(Alcaine)(0.5%)。结膜用在无菌水,U.S.P.中稀释至1:10,000(v/v)的苯扎氯铵(Zephiran™)冲洗。

[0155] 在剂量给药之前即时在层流罩下填充注射器。通过单一30μL玻璃体内注射(0.3mg剂量)向所有动物的双眼施用抗磷酸cMet Fab。由委员会认证的兽医眼科医生使用具有30

号x 1/2”针的经灭菌的100 μ L汉密尔顿鲁尔锁定(Hamilton Luer Lock)注射器施用剂量。为了模拟临床剂量给药,眼睛在颞下象限内剂量给药,即分别在左眼和右眼的5点和7点钟位置(当面对动物时)。处理后立即用裂隙灯生物显微镜和/或间接检眼镜检查眼睛。

[0156] 所有动物在静脉内注射戊巴比妥钠麻醉后通过切开腋动脉或股动脉进行放血。收集房水、玻璃体液和视网膜组织,在液氮中速冻并储存在-80 $^{\circ}$ C。测试物品的玻璃体浓度通过抗原结合ELISA确定。低于LLOQ的值未用于药代动力学分析或用于图形或总结目的。

[0157] 使用目标b法(target-coat method)进行ELISA分析。在该测定中,目标涂层是与KLH缀合的磷酸化cMet肽(来自Yenzym, South San Francisco, CA的P-cMet肽)。为了制备测定板,将冻干的P-cMet肽用300 μ l缓冲液重构并在0.05M碳酸氢钠缓冲液中进一步稀释至1:200。将稀释的P-cMet肽(100 μ L/孔)添加至96孔微量滴定板(Nunc, Thermo Scientific, Rockford, IL)中并在2-8 $^{\circ}$ C温育过夜。温育后,将平板用400 μ l洗涤缓冲液(BA029)洗涤三次,然后用测定稀释剂(含有0.5%牛血清白蛋白和0.05%Proclin的洗涤缓冲液)封闭。通过将兔Fab(Genentech, South San Francisco, CA)稀释至200ng/ml,然后在测定稀释剂中1:2连续稀释制备标准曲线。对照在测定稀释液中以1:100稀释。使用测定稀释剂将每个样品稀释至测定的定量范围。将所有样品、对照和标准品以100 μ l添加至平板并伴随轻轻搅动在室温温育2小时。温育和洗涤后,在测定稀释液中1/4,000稀释后,每孔添加100 μ l检测抗体(小鼠抗-兔轻链-HRP, SouthernBiotech, Birmingham, AL)。然后在室温伴随轻轻搅动将平板温育1小时。再次洗涤后,将100 μ l HRP底物(来自Kirkegard&PerryLaboratory, Gaithersburg, MD的3,3',5,5'-四甲基联苯胺,TMB)添加至每个孔中,然后在室温伴随轻轻搅动培养15分钟。每个反应用100 μ l 1M磷酸终止。在用于检测的450nm波长和作为参比测量的630nm波长读取平板(SpectraMax 384-plus;Molecular Devices, Sunnyvale, CA)。使用四参数逻辑曲线拟合软件(Softmax, Molecular Devices)绘制标准物的光密度值,通过外推法得出对照和测试样品的浓度值。

[0158] 如上所述通过抗原结合ELISA测定玻璃体液中的浓度,并将其绘制为时间的函数。图10是总结作为注射后时间的函数的玻璃体浓度的图。对这些数据进行非室分析以获得药代动力学(PK)参数。

[0159] 通过标称时间和剂量的单室分析(Phoenix WinNonlin version 6.4, Pharsight Corp, Sunnyvale, CA)确定药代动力学参数。为了估计单剂量玻璃体PK参数,以1/Y²加权及标称时间和剂量使用单室IV推注剂量给药模型。使用非室分析计算的PK参数总结于下表1中,括号内表示95%置信区间。一阶消除动力学很好地描述了玻璃体浓度相对于时间的分布。尽管这些样品未针对抗治疗性抗体(ATA)应答进行特异性测试,但浓度相对于时间曲线和小的动物间变异性表明在兔中没有针对rabFab的免疫应答。计算的C_{max}和VSS值分别与施用的剂量和兔眼的尺寸一致。经玻璃体内注射后玻璃体半衰期和清除率(CL)与兔中其他抗体Fab片段的相应值相似。

[0160] 表1.

[0161] 施用单室分析估计的药代动力学参数

[0162]

测试品	玻璃体组织				
	C _{max} ($\mu\text{g/mL}$)	半衰期 (天)	AUC _{all} (天 * $\mu\text{g/mL}$)	CL (mL/ 天)	V _{ss} (mL)
抗 - 磷酸 cMetFab	202 (184, 220)	3.2 (2.9, 3.4)	925 (851, 1000)	0.32 (0.30, 0.35)	1.5 (1.4, 1.6)
20K-抗-磷酸	166	4.7	1116	0.27	1.8

[0163]

cMetFab	(156, 176)	(4.4, 4.9)	(1059, 1173)	(0.26, 0.28)	(1.7, 1.9)
40K-抗-磷酸 cMetFab	169 (153, 184)	6.1 (5.5, 6.7)	1478 (1361, 1596)	0.20 (0.19, 0.22)	1.8 (1.6, 1.9)

[0164] 为了评估延长暴露于兔Fab后PK的一致性,进行重复剂量给药研究。如上所述对动物给药并收获玻璃体组织,不同之处在于在第0、12和24天通过ITV注射30 μL 玻璃体内注射(0.3mg剂量)的兔Fab溶液施用至每只动物的双眼。在第3小时、6天、12天(剂量给药前)、12天(第二剂量给药后3小时)、18天、24天(剂量给药前)、24天(第三剂量给药后3小时)、31天和38天收集样品。如上所述确定兔Fab浓度,并将其与使用Phoenix WinNonlin计算的预测浓度与从单剂量研究获得的PK参数估计值进行比较。

[0165] 使用如上所述的ELISA测定法测量的玻璃体浓度分布概括在图11的图表中。基于单剂量研究预期的浓度分布与重复剂量给药测量的分布一致,表明延长和重复接触0.3mg剂量不会导致药代动力学改变。从这些数据可以得出结论,rabFab是用于评价兔中Fab片段的眼部药代动力学的合适测试品。

[0166] 实施例2:替代物-聚合物缀合物的玻璃体药代动力学

[0167] 为了进一步评价rabFab作为测试技术以改善玻璃体药代动力学的替代物的功效,如下所述产生PEG化形式的rabFab分子并使用实施例1所述的方法进行PK测试。为了保持rabFab分子的结合活性,使用PEG-马来酰亚胺进行位点特异性偶联以修改Fab'形式的兔抗体中的游离Cys(Cys-227)。将20,000Da和40,000Da分子量的线性PEG链缀合至rabFab以产生PEG化(20kD)抗-磷酸cMet Fab缀合物和PEG化(40kD)抗-磷酸cMet Fab缀合物。

[0168] Rabbit Fab'用pH 7.4的PBS透析,然后添加EDTA至5mM的终浓度。为除去游离巯基加合物,以1:1.2(Fab':DTT)的摩尔比添加新鲜DTT,并将样品在室温放置过夜。加合物的去除通过LC-MS确认。在还原之后,将来自NOF America Corporation的分子量为20kD(Sunbright ME-200MA0B)或40kD(Sunbright ME-400MA)的聚乙二醇马来酰亚胺(PEG-mal)稀释于水中并以1:3的摩尔比(Fab':PEG)添加至Fab'池中。轻轻旋转反应过夜,并通过LC-MS监测进展。通过5mL GE Healthcare SP HP柱去除杂质。柱用5CV的25mM乙酸钠pH 5.0洗涤,然后用1M NaCl历经30CV洗脱。收集级分(0.5mL)并通过4-20%Tris-甘氨酸SDS-PAGE分离峰级分以分析纯度并相应地合并。

[0169] 对于含有20kD和40kD PEG化rabFab'缀合物(Genentech, South San Francisco,

CA) 的样品,基本上如上文实施例1中所述使用ELISA测定,进行以下修改:i) 样品和对照在测试前以1:20稀释;和ii) 以1/10,000稀释度使用底物;和iii) 标准曲线从200ng/mL开始。

[0170] 此外,测量与20kD和40kD PEG缀合的rabFab' 的流体动力学半径(RH)。采用准弹性光散射(QELS),以在99.0°检测的单光子计数模块(WyattTechnology, Inc.),使用光子相关光谱法确定流体动力学半径(RH)。使用Wyatt专有的Astra软件获得原始数据,摩尔质量和 R_H 常数使用利妥昔单抗标准在Astra软件中设置。图12A是描绘用于使用准弹性光散射(QELS) 测量RH的相关函数的图表,并且图12B是代表性QELS信号的图表。假设缀合的rabFab' 分子为球形,计算构建体的流体动力学体积。如表2所概述,20kDPEG化使RH增加约2倍,产生略高于兔抗体的IgG格式测量值的值。相对于未修改的rabFab', 40kD PEG化的RH增加约2.7倍。

[0171] 表2.

[0172] 兔构建体的流体动力学性质

[0173]

构建体	R_H (nm)	计算的体积 (nm ³)
Fab	2.5 ± 0.2	65.5
IgG	4.9 ± 0.2	492.8
20KPEG-Fab'	5.2 ± 0.3	589.0
40KPEG-Fab'	6.9 ± 0.3	1376.1

[0174] 在兔中0.3mg IVT剂量后,20kD和40kD PEG化的rabFab' 缀合物观察到的时间依赖性玻璃体浓度分布示于图16。如在上述实施例1中针对rabFab' 所观察,没有观察到针对PEG化rabFab' 抗体缀合物的免疫应答的证据。如上述表1中所总结,20kD PEG化rabFab' 的玻璃体半衰期增加1.5倍并且40kD PEG化rabFab' 的玻璃体半衰期增加约2倍。

[0175] 图13是总结作为测量的流体动力学半径的函数的玻璃体半衰期的图。如图13所示,确定测量的半衰期与相应的流体动力学半径(RH)成正比。虽然实验数据集范围有限(RH值仅在2.7倍范围变化),但玻璃体半衰期在该RH范围内显示出强烈线性相关性,其中斜率0.62 ($R^2=0.9995$)。与此相反,当测量的玻璃体半衰期分别对相应的分子量作图,得到相对差的相关性 ($R^2=0.53425$),如图2所示。

[0176] 作为这些实验的延伸,使用与上述那些类似的方法评价与高MW线性透明质酸(HA) 缀合的rabFab的玻璃体半衰期。如图1所示,高MW HA缀合形式的rabFab的玻璃体半衰期与先述低MW PEG缀合物的直线相关性一致。

[0177] 再次参考上文表2,在NZW兔中玻璃体内注射rabFab' 后观察到的半衰期与针对人源化Fab片段观察到的半衰期一致。在停止延长剂量给药后清除rabFab' 或任一种PEG化缀合物期间观察到玻璃体浓度水平相对较小的变异性(参见图14),表明没有针对任何测试化合物的免疫应答。

[0178] 实施例3:FcRn结合对玻璃体半衰期的影响

[0179] 为了测试FcRn结合对玻璃体清除动力学的影响,使用实施例1所述的兔模型和方法评估两种突变形式的IgG的玻璃体半衰期。

[0180] 用已知消除FcRn结合的抗体突变测试与回收的FcRn受体结合对IgG的玻璃体半衰期的影响。对于循环中的IgG抗体,FcRn通过经非特异性胞饮保护IgG免受分解代谢促进半

衰期 (Roopenian&Akilesh (2007) Nat. Rev. Imm. 7:715)。取代H310A和H435Q在抗体的Fc区与大大降低的FcRn结合和快速全身清除相关联 (Kenanova et al. (2005) Cancer Res. 65: 622)。使用如下文实施例4所述的寡核苷酸定向诱变将这些取代导入人源化5B6 (抗-gD) 抗体的Fc部分。野生型和H310A:H435Q变体抗-gD由瞬时表达在CHO细胞中表达,并且分泌的IgG抗体先后通过A蛋白-琼脂糖凝胶色谱和S-琼脂糖阳离子交换色谱纯化。SPR测量表明野生型抗体以1.5 μ M的 K_D 与人FcRn结合,而对于人和兔FcRn两者在10 μ M的浓度都没有观察到H310A:H435Q (FcRn空) 变体的可检测结合。如实施例1所述,在具有玻璃体内剂量给药的兔药代动力学实验中测试野生型和突变抗体的玻璃体清除动力学。还确定了静脉内 (IV) 注射施用的抗体的药代动力学。

[0181] 图15A是总结野生型IgG、FcRn空IgG和人Fab的玻璃体浓度作为玻璃体内注射后时间的函数的图。图15B是总结野生型IgG、FcRn空IgG和人Fab的血清浓度的作为IV后注射后时间的函数的图。如图15A所示,野生型IgG和FcRn IgG的浓度分布基本相同,表明FcRn结合不影响FcRn空IgG相对于野生型IgG的玻璃体半衰期。Fab玻璃体浓度下降速度快于相应IgG的玻璃体浓度,这与尺寸对玻璃体清除率的依赖性一致。参考图15B, FcRn空IgG相对于血清中的野生型IgG, FcRn空IgG浓度下降得更快,这与先前观察到的FcRn与血清中IgG结合的效应一致。

[0182] 该实验的结果表明与FcRn受体的结合对IgG分子的玻璃体半衰期没有显著贡献。

[0183] 实施例4:活性药物成分的净电荷对玻璃体半衰期的影响

[0184] 通过产生雷珠单抗的经设计分子电荷变体来检查分子电荷变化对眼部药代动力学的影响。由于意欲使用VEGF结合ELISA测定法来检测兔眼组织中的这些变体,设计了引入氨基酸变化而对抗原结合影响最小的策略。检测先前针对与VEGF复合的雷珠单抗确定的3D结构 (Chen. J. Mol. Biol. 1999; 293: 865) 以确定不与靶抗原接触的CDR。基于该检查, CDR L1和L2被鉴定为雷珠单抗分子的区域,其中氨基酸取代可能对抗原结合具有最小影响。已知耐受带电残基取代的CDR L1和L2中的位置选自人抗体序列的数据库 (例如, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第1-3卷)。

[0185] 遵循随试剂盒提供的方案,使用QuikChangeII® (Agilent) 诱变试剂盒通过定点诱变引入突变。合成指定所需密码子变化的寡核苷酸引物,并鉴定具有经设计变化的质粒,并通过DNA测序确认。为了小规模表达和纯化,将DNA转化到大肠杆菌菌株64B4中,并将转化的细胞在含有低磷酸盐的培养基中培养过夜。使用PopCulture® (EMD Millipore) 提取缓冲液通过在ProteinG GraviTrap (GE Healthcare) 上的色谱从制备的细胞裂解物纯化Fab。为了更大规模的纯化,将来自10L发酵的转化细胞的细胞糊 (cell paste) 悬浮于提取缓冲液中,使用微流化器匀化,并通过蛋白G-琼脂糖凝胶上的免疫亲和色谱捕获来自匀浆悬浮液的Fab,并用低pH缓冲液洗脱。将低pH洗脱液调节至pH 5,并通过在S-琼脂糖凝胶柱上的阳离子交换色谱进一步纯化。通过质谱确认纯化的蛋白质的同一性,并将汇集的级分浓缩至约10mg/mL,并经由渗滤将其交换至PBS缓冲液中。在Biacore® T200仪器上的表面等离子体共振 (SPR) 测量表明,雷珠单抗的+7和-3分子电荷变体两者都保持对VEGF的高结合亲和力。

[0186] 使用实施例1的方法将未修改的雷珠单抗以及雷珠单抗的+7和-3分子电荷变体施用于兔。将未修改的雷珠单抗和分子电荷变体经由单次双侧玻璃体内注射施用于兔,并且在注射后观察兔长达27天。使用与实施例1中所述相似的方法获得了玻璃体和视网膜样品。

[0187] 通过在50mM Tris-HCl pH 8.0,1M NaCl中均化来提取视网膜组织中的抗体Fab。使用与实施例1中所述的ELISA测定类似的VEGF结合ELISA测定来确定测试品的玻璃体和视网膜浓度。低于定量下限 (LLOQ) 的值未用于药代动力学分析或用于图解或总结目的。通过具有标称时间和剂量的非室分析 (Phoenix WinNonlin, Pharsight Corp, Mountain View, CA) 确定药代动力学参数。

[0188] 未修改的雷珠单抗和分子电荷变体的浓度时间分布显示在图16中,并且由非室分析计算的药代动力学参数总结在表3中。这些结果表明,雷珠单抗的电荷变化对眼部药代动力学没有显著影响。

[0189] 表3.

[0190] 带电的雷珠单抗变体的玻璃体动力学

[0191]

分子	AUC _{全部} (天* $\mu\text{g}/\text{mL}$)	半衰期 (天)	CL (mL/ 天)	V _d (mL)	C _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
雷珠单抗	822	3.3	0.36	1.4	184
雷珠单抗 v+7	1090	3.0	0.27	1.0	246
雷珠单抗 v-3	865	3.0	0.34	1.2	219

[0192] 该实验的结果表明,测试分子之间分子电荷的变化对玻璃体半衰期没有显著贡献。

[0193] 实施例5:估计和测量的半衰期的比较

[0194] 为了评价前述预定的玻璃体半衰期-RH关系的准确性,进行了以下实验。

[0195] 先前公开的玻璃体半衰期值是使用以上述方程 (2) 表示的预定玻璃体半衰期-RH关系中公开的流体动力学半径公式的值预测的。将公开的玻璃体半衰期与相应的预测玻璃体半衰期进行比较,以评估预定的玻璃体半衰期-RH关系的准确性。

[0196] 该比较的结果总结在下表4中。一般而言,尽管18kD HA分子的预测玻璃体半衰期和文献玻璃体半衰期之间似乎有轻微的差异,但预测的玻璃体半衰期与相应的文献值相比并不逊色。

[0197] 表4.

[0198] 化合物的公开和预测的玻璃体动力学的比较

[0199]

分子	Rh (nm)	预测的玻璃体半	兔中玻璃体半衰期的
----	---------	---------	-----------

[0200]

		衰期(天)	文献值(天)
18 kD HA	9	6.8	4
500 kD HA	45	28	30
白蛋白	3.5	3.6	4
阿柏西普	6	5	4.6

[0201] 实施例6:透明质酸-抗-VEGF缀合物制备

[0202] 透明质酸(HA)-抗-VEGF缀合物可如WO 2011/066417所述制备。简言之,可将透明质酸(10mg,6.25nmol;Sigma-Aldrich,St.Louis,Mo.)溶于1mL过磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)中。将EDC(N-(3-二甲基-氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐,120mg,625nmol;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)、磺基-NHS(N-羟基磺基琥珀酰亚胺钠盐,217mg,1mmole;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)和4-DMAP(4-(二甲基氨基)吡啶,10mg;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)作为固体添加至HA溶液中并使其溶解且反应过夜。可将抗-人VEGF单克隆抗体(0.5mg;R&D Systems Inc.,Minneapolis,MN)添加至活化的透明质酸溶液中并在4℃搅拌过夜。使用针对PBS的旋转透析将溶液透析(MW截断值300kDa)16小时,其中4次更换PBS溶液。

[0203] 实施例7:透明质酸抗-F1t1缀合物制备

[0204] 透明质酸抗-F1t1缀合物可按照Oh et al.,Biomaterials(2009)Vol.30,pp.6029-6034所述制备。

[0205] 四正丁基透明质酸铵可按照Oh et al.,Bioconjugate Chem.,(2008)Vol.19,pp 2401-2408所述制备。可用水洗涤Dowex® 50WX8-400离子交换树脂(12.5g;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO),然后可向Dowex树脂中添加过量的1.5M四正丁基氢氧化铵并混合30分钟。可过滤所得树脂以除去上清液。将透明质酸钠(MW=100kDa,1g;Shiseido Co.,Tokyo,Japan)溶于100mL水中,并倒入制备的Dowex树脂(10g)中。混合3小时后,可通过0.45 μm过滤器过滤上清液以去除树脂并提供四正丁基透明质酸铵,其为透明溶液,可被冻干。

[0206] 将抗-F1t1肽(氨基酸序列GNQWFI、KGNQWFI或GGNQWFI;PeptronCo.,Daejeon,Korea)和四正丁基透明质酸铵各自分别溶于DMSO中,然后将BOP(苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)添加至四正丁基透明质酸铵中并混合30分钟。然后可将四正丁基透明质酸铵溶液与溶于DMSO中的抗-F1t1肽和DIPEA(N,N-二异丙基乙胺;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)混合。在37℃反应一天后,可以1/1的体积比添加1M NaCl水溶液。通过添加1M HCl将该溶液的pH降至3.0,然后通过添加1m NaOH将其升高至7.0。所得产物可用0.3M NaCl溶液、25%乙醇和水的过量混合物透析,并冻干。

[0207] 实施例8:PEG化FAB缀合物的制备

[0208] Fab,诸如雷珠单抗或贝伐珠单抗的Fab部分,可如"Antibody Protocols and Methods,"Springer 2012,Proetzal,Ed.("PEGylation of Antibody Fragments for Half-life Extension,"Jesevar et al.,Chapter 15,pp.233-246)所述制备。简言之,可将所需的Fab(10mg)溶解在磷酸钠缓冲液中至约2.5mg/mL。可添加三(2-羧乙基)磷盐酸盐(TCEP)的磷酸钠缓冲溶液直到TCEP浓度为约0.1μL,并且可将混合物在室温振荡温育90分

钟,然后可经由对磷酸钠缓冲液的旋转透析除去过量的TCEP。Fab溶液可温育24小时以重构链间二硫键,可添加400 μ L PEG马来酰亚胺溶液(SUNBRIGHT ME-200MA,300mg在600 μ L磷酸钠缓冲液中,NOF Corporation),并将所得混合物温育过夜。然后可用乙酸缓冲液稀释混合物,过滤,并且可使滤液通过TSK-GEL SP-5PW树脂柱(Tosoh, Inc.)以提供PEG化的Fab。

[0209] 当介绍本发明的要素或其优选实施方案时,冠词“一”、“一个”、“该”和“所述”旨在表示存在一个或多个要素。术语“包括”、“包含”和“具有”旨在是包含性的并且意味着除了列出的要素之外还可以有其他要素。

[0210] 鉴于以上所述,将会看到,实现了本发明的几个目的并且获得了其他有利的结果。

[0211] 由于可在不脱离本发明的范围的情况下对上述组合物和方法进行各种改变,所以包含在上述说明书中和附图中示出的所有内容应该被解释为说明性的而不是限制性的。

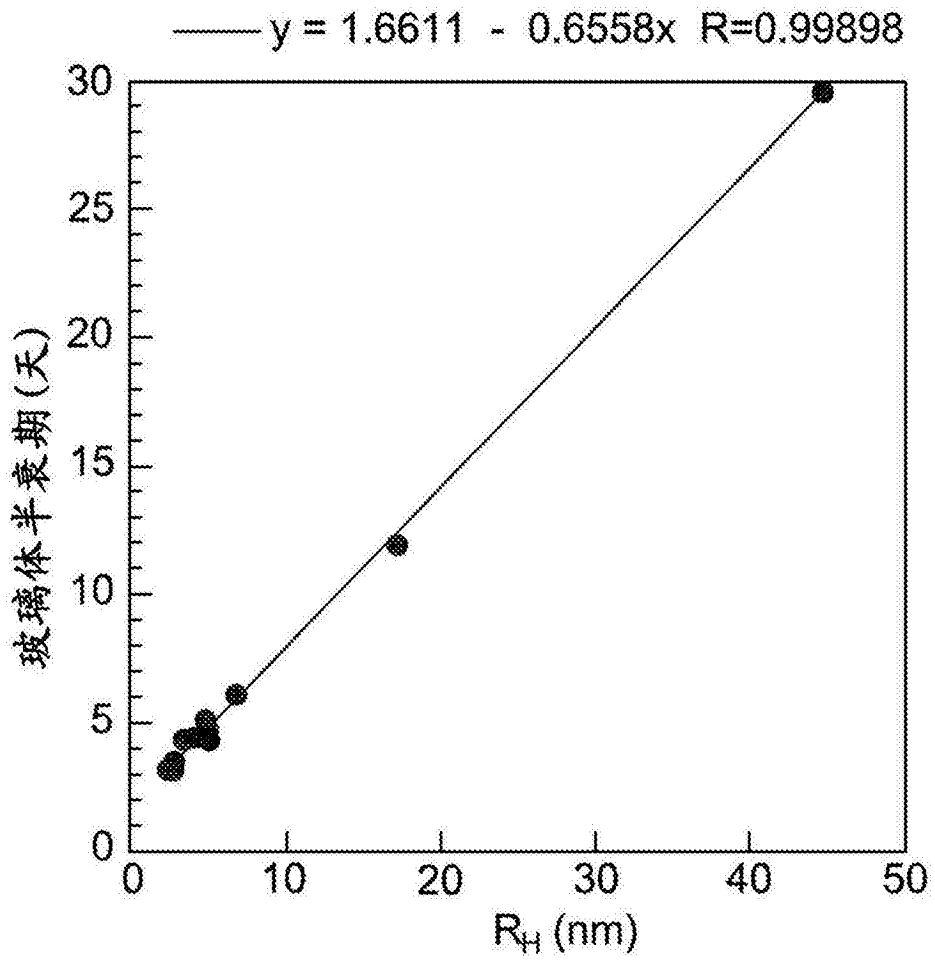


图1

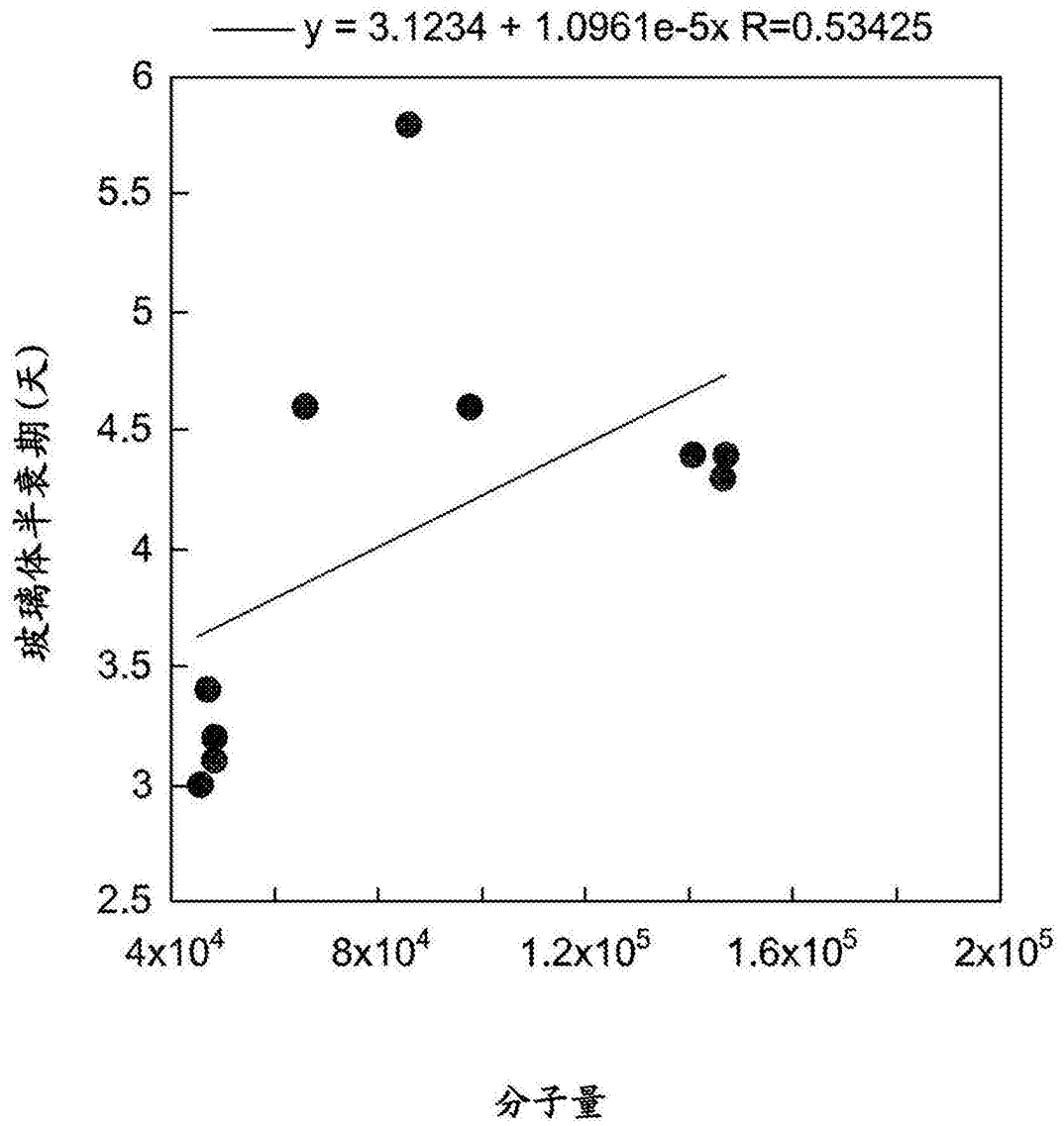


图2

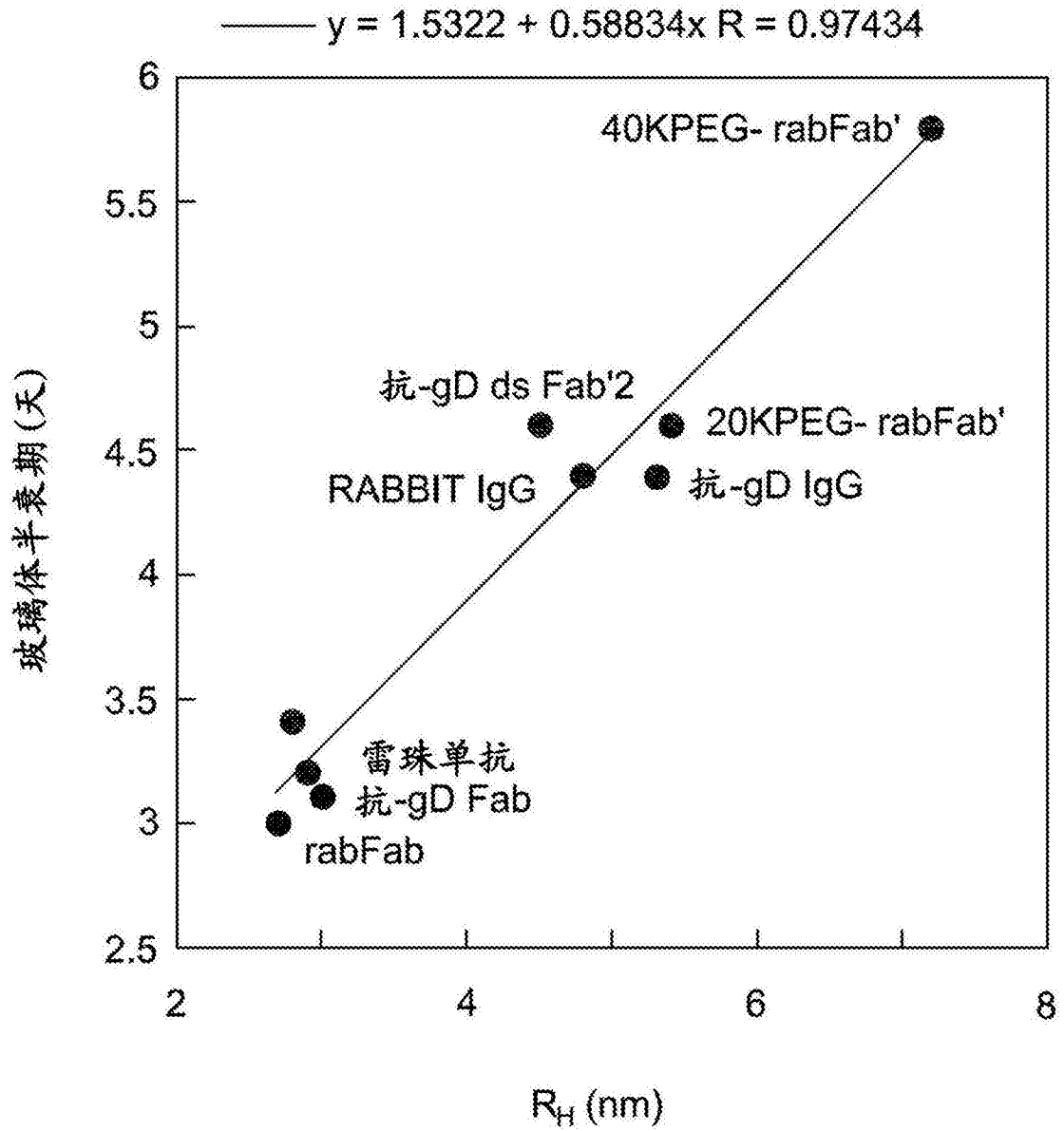


图3

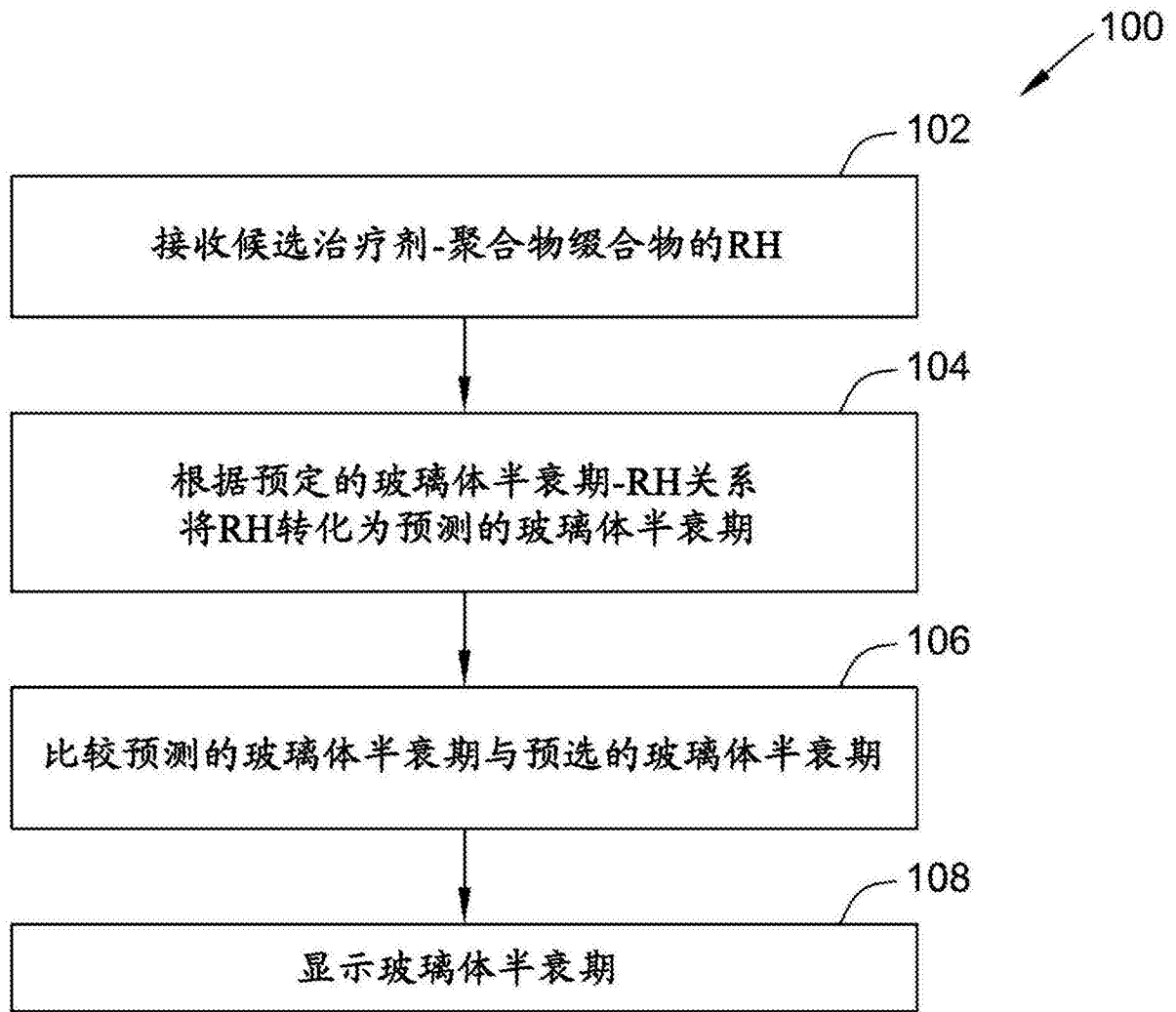


图4

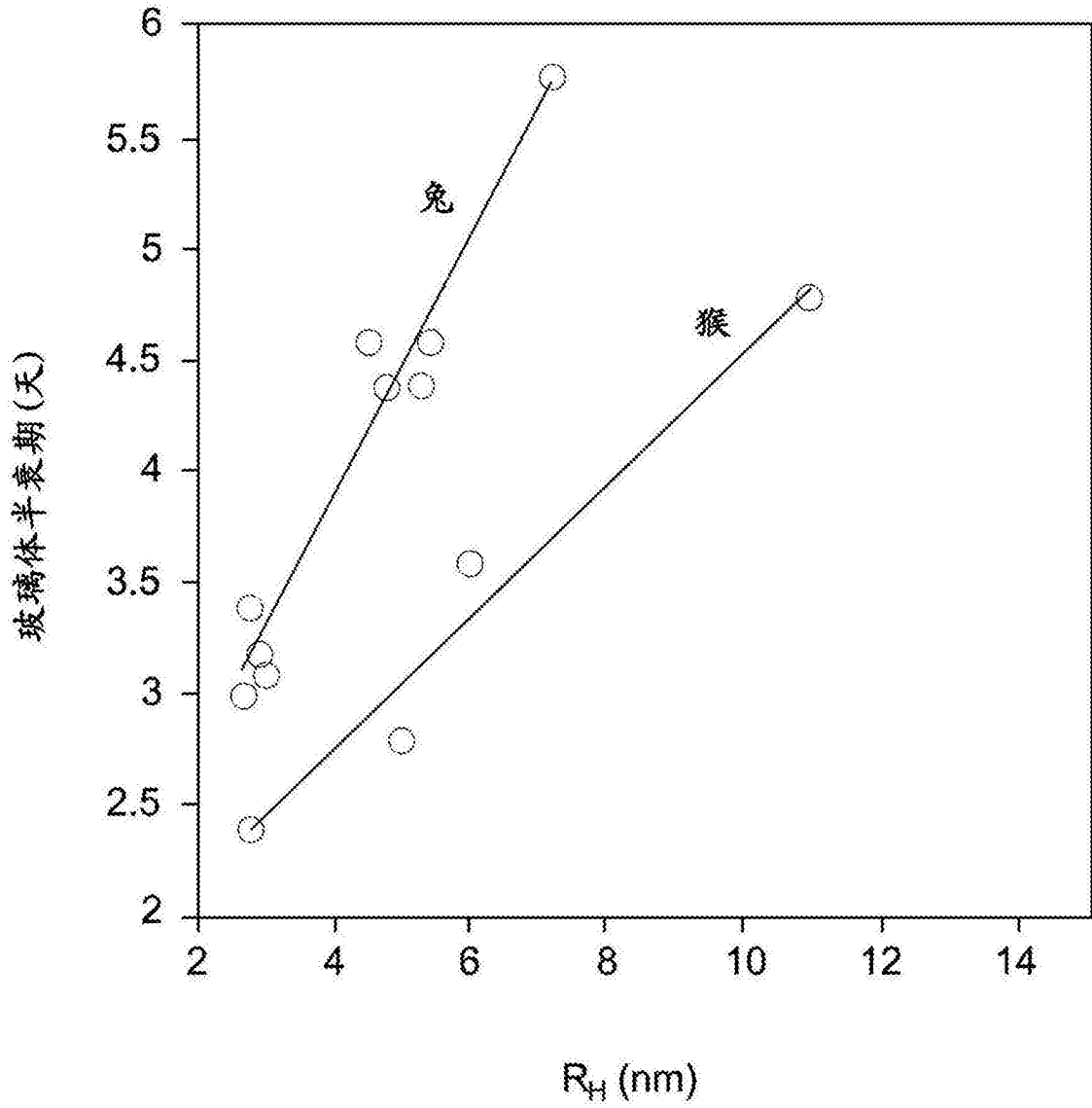


图5

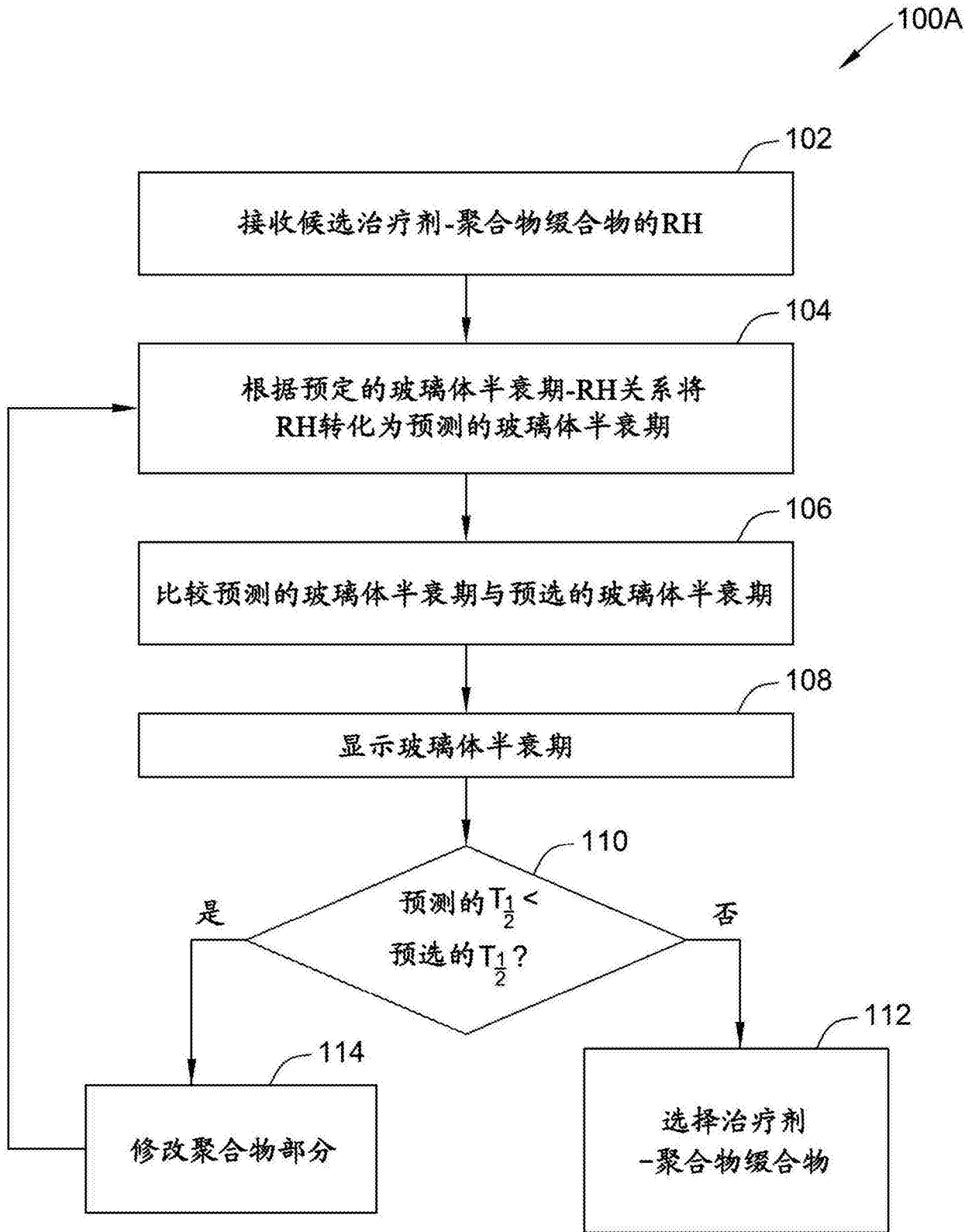


图6

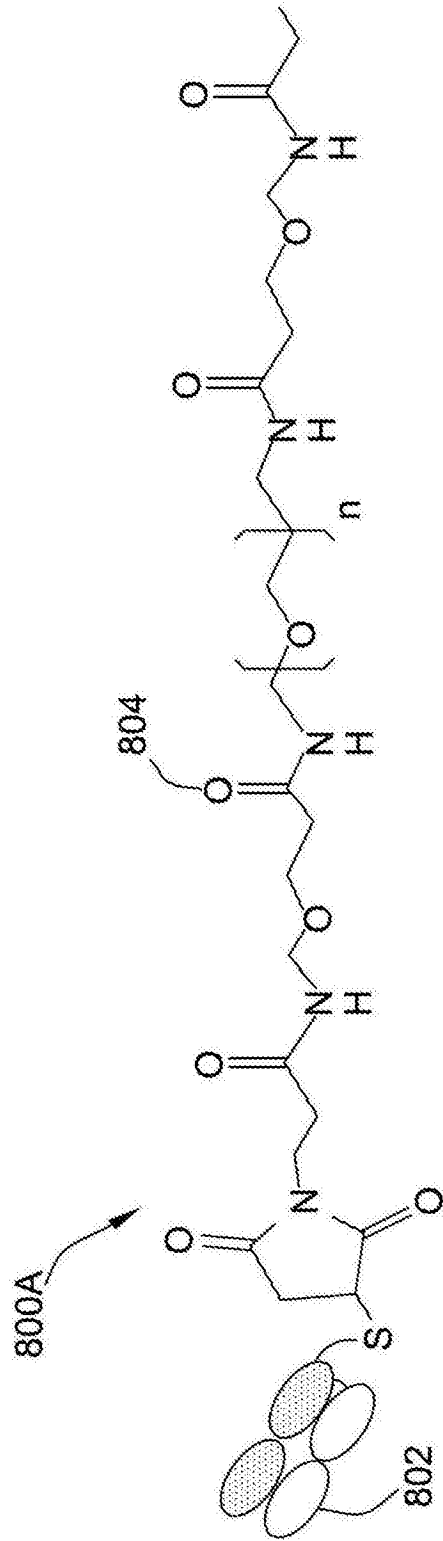


图7A

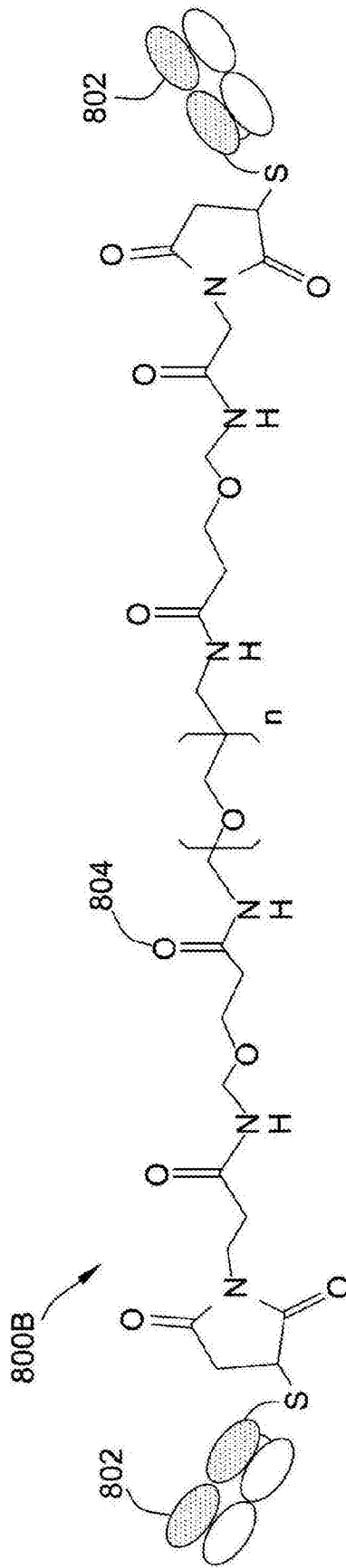


图7B

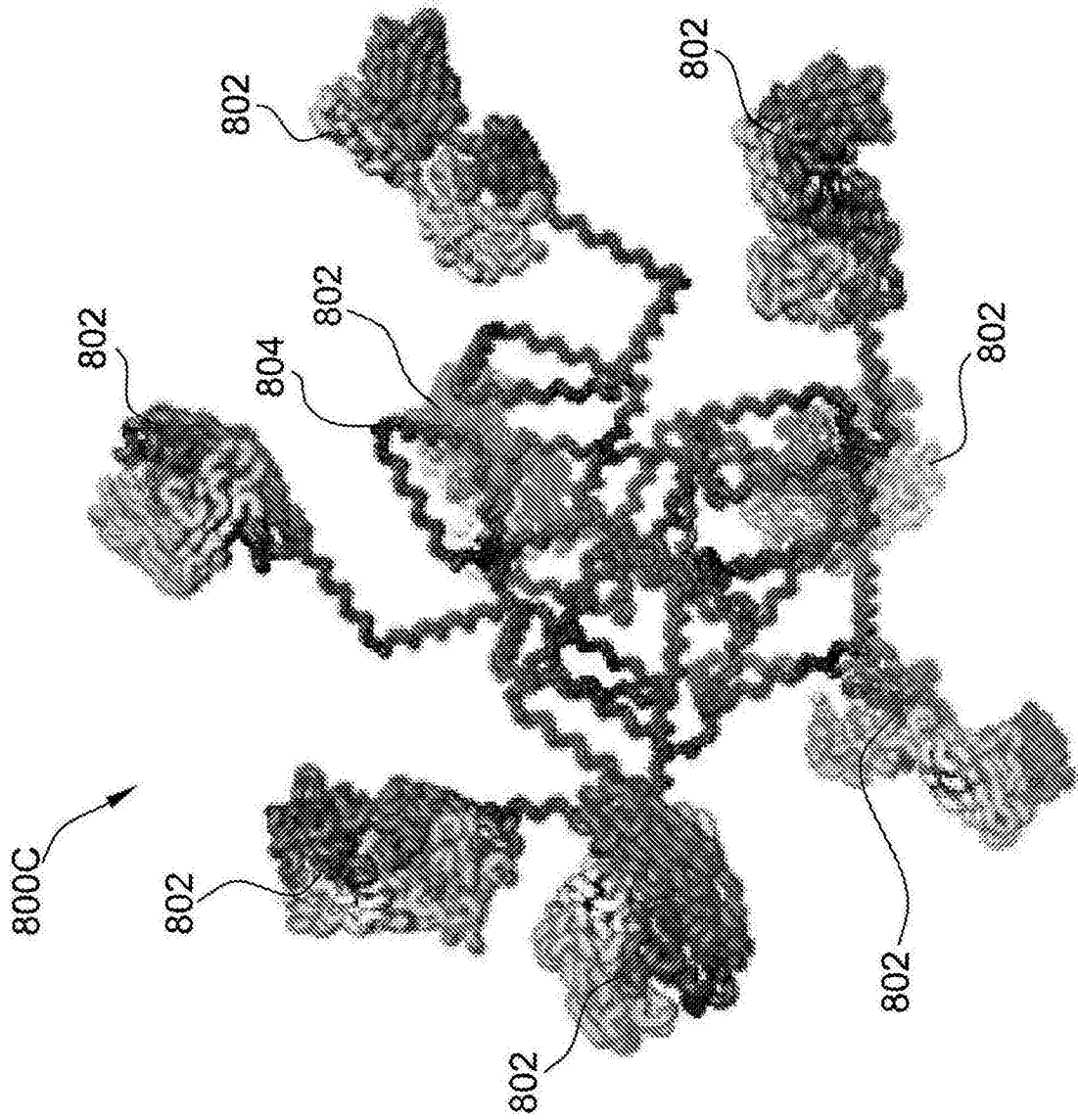


图7C

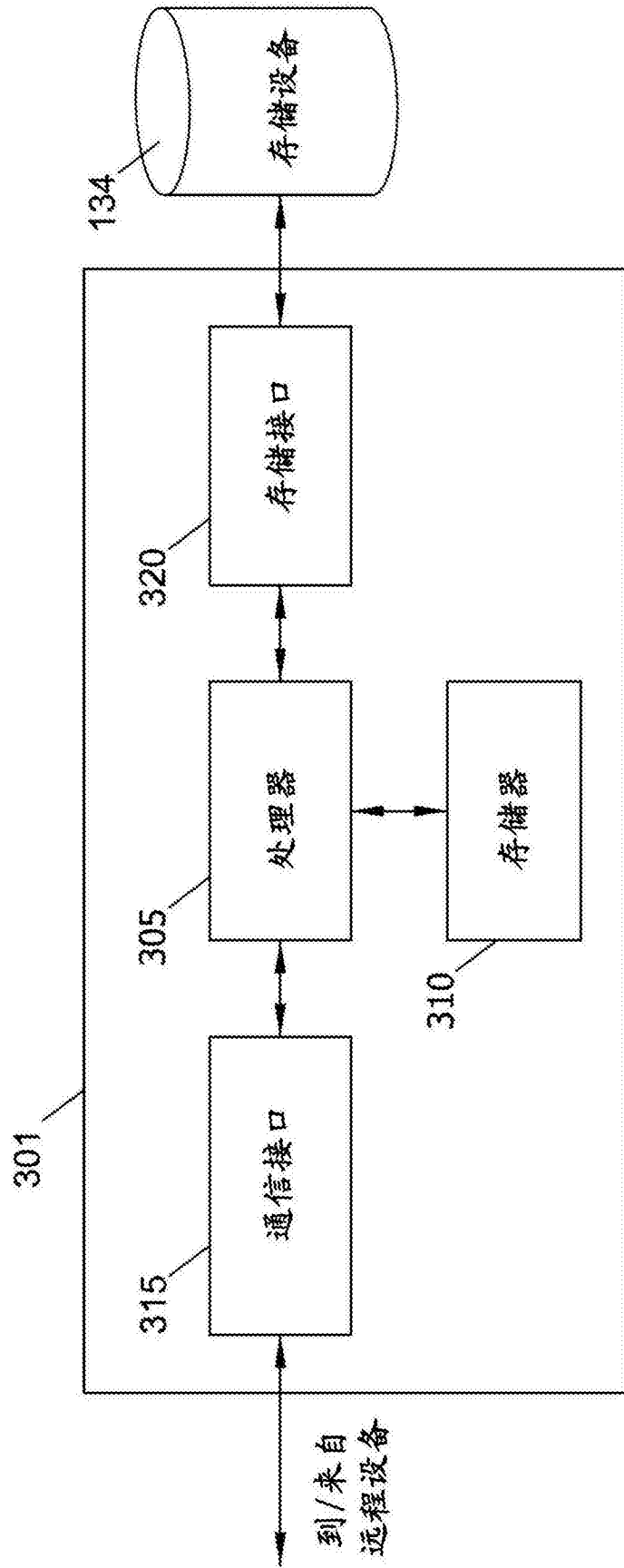


图8

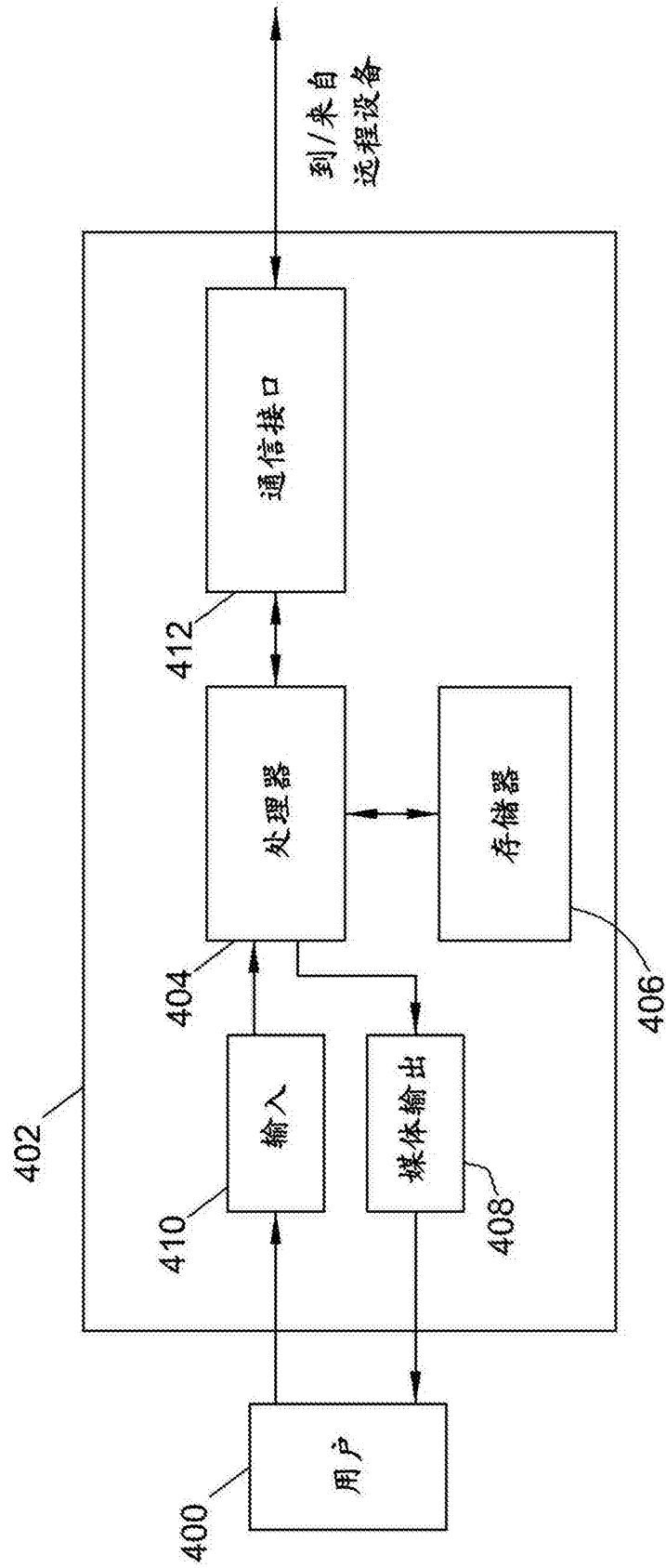


图9

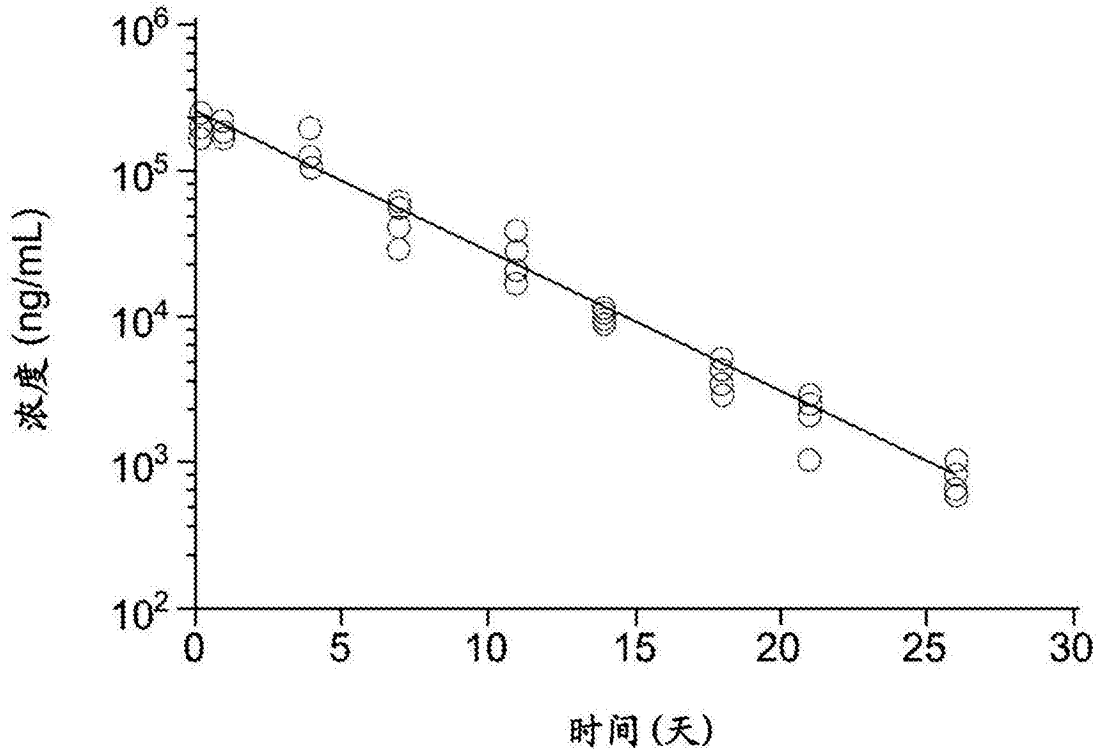


图10

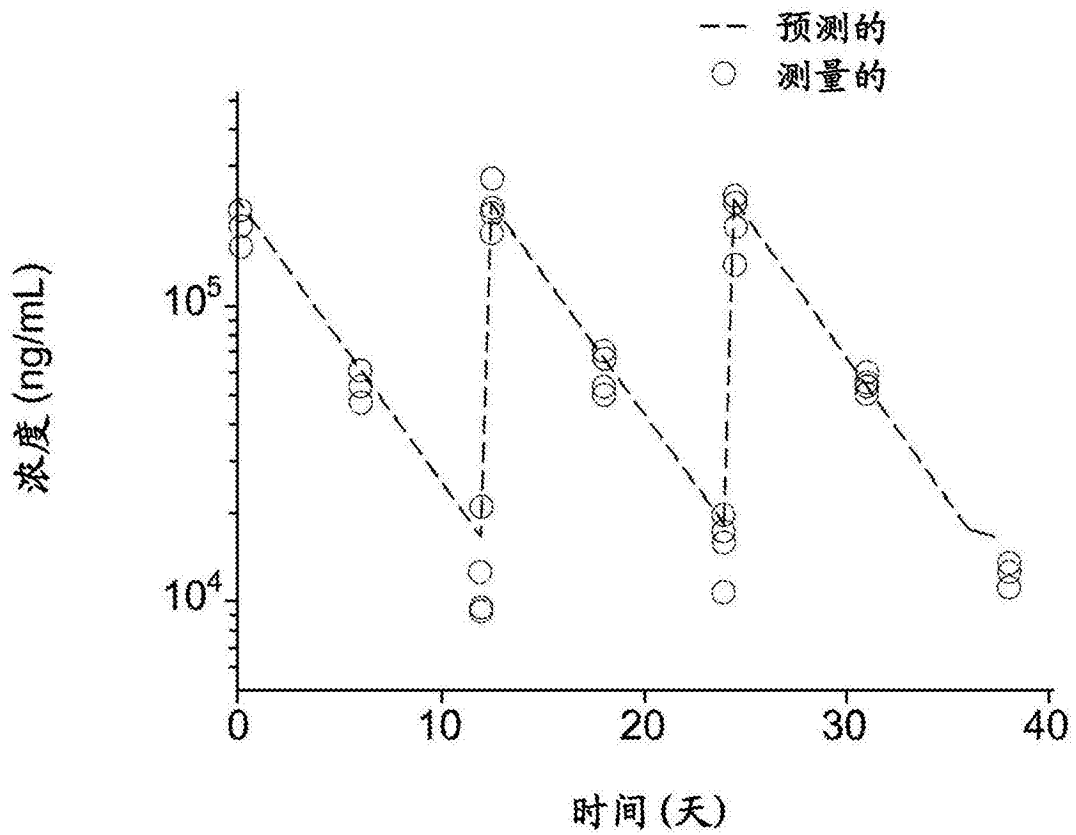


图11

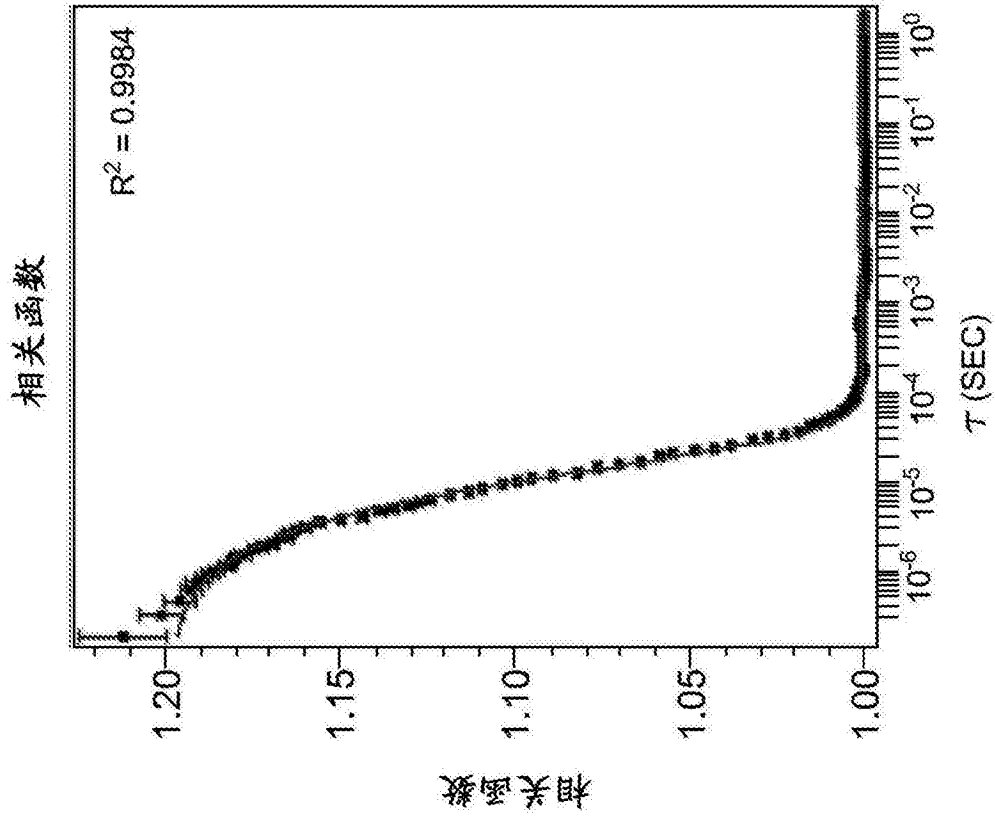


图12A

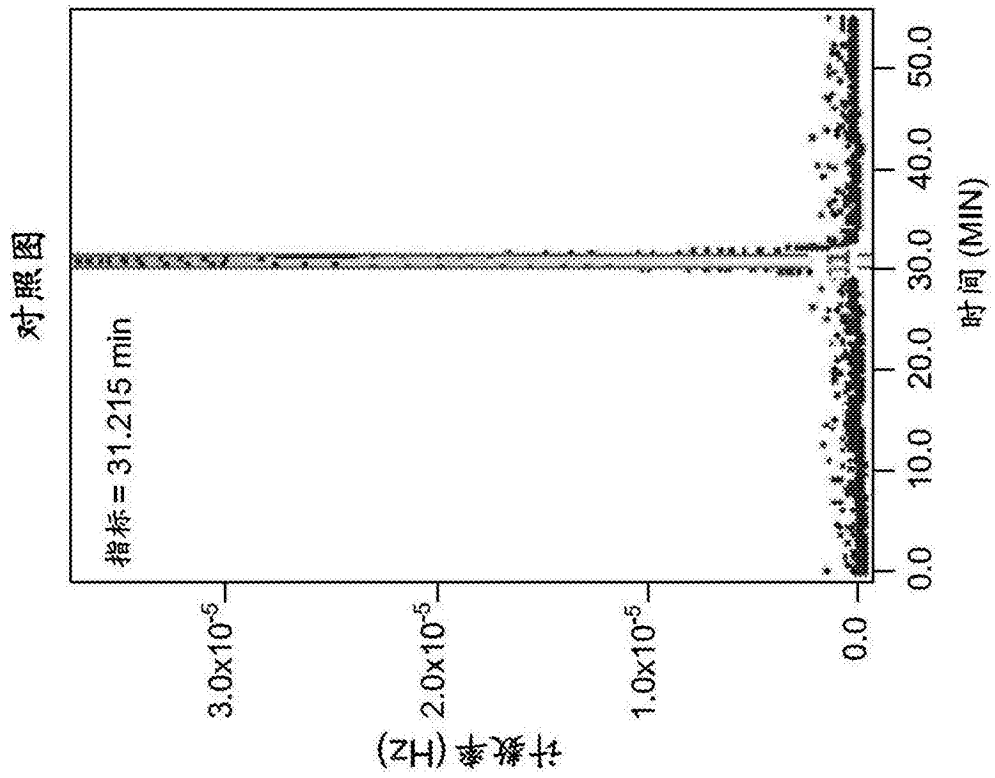


图12B

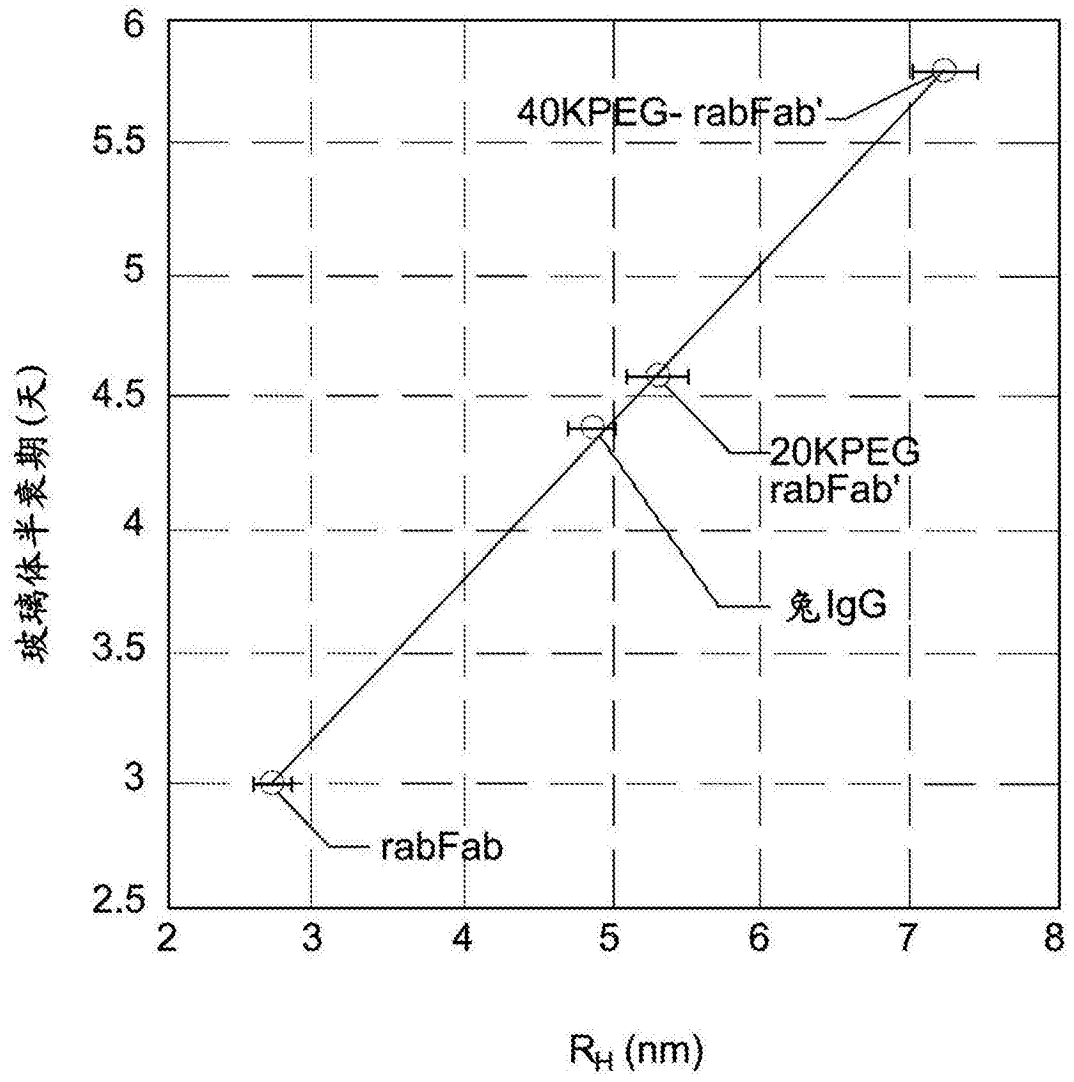


图13

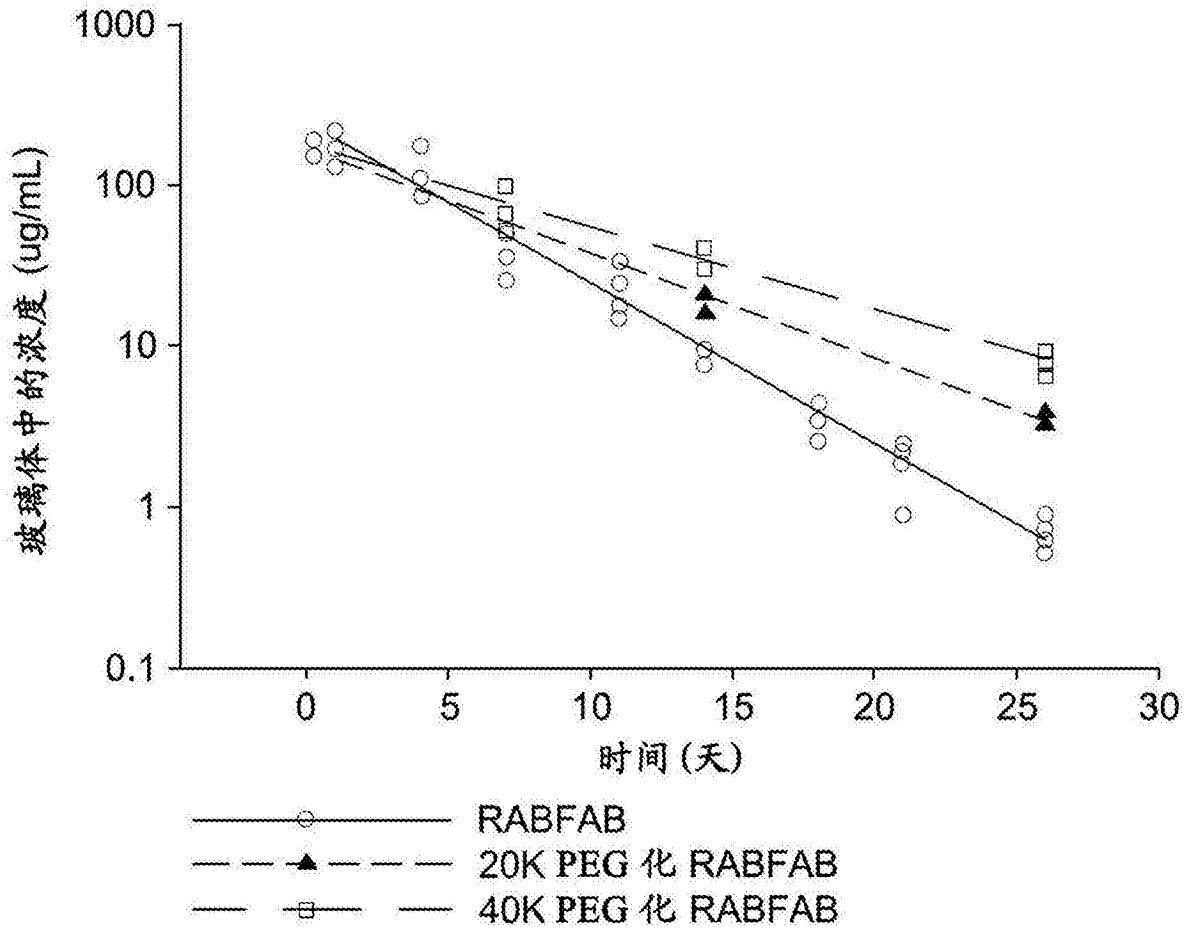


图14

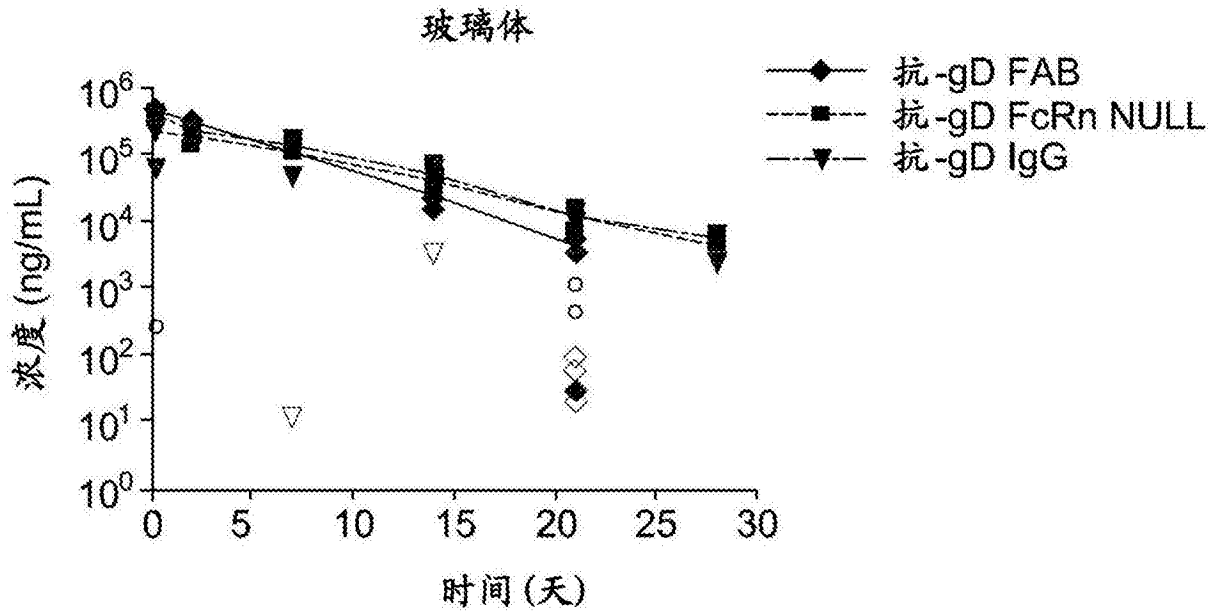


图15A

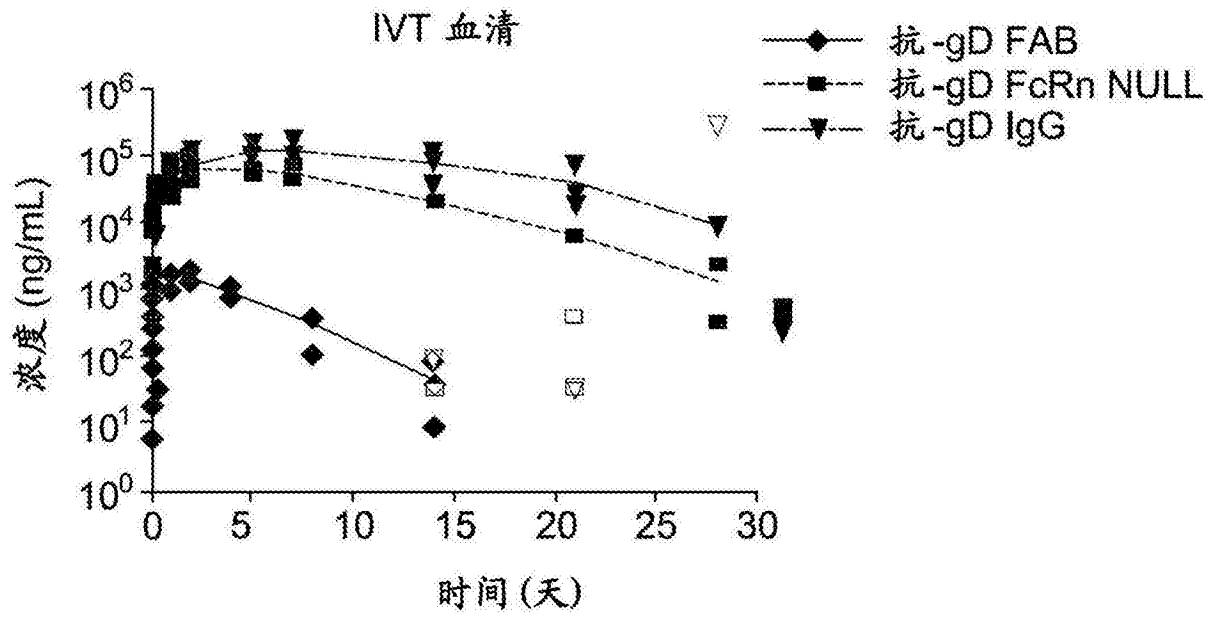


图15B

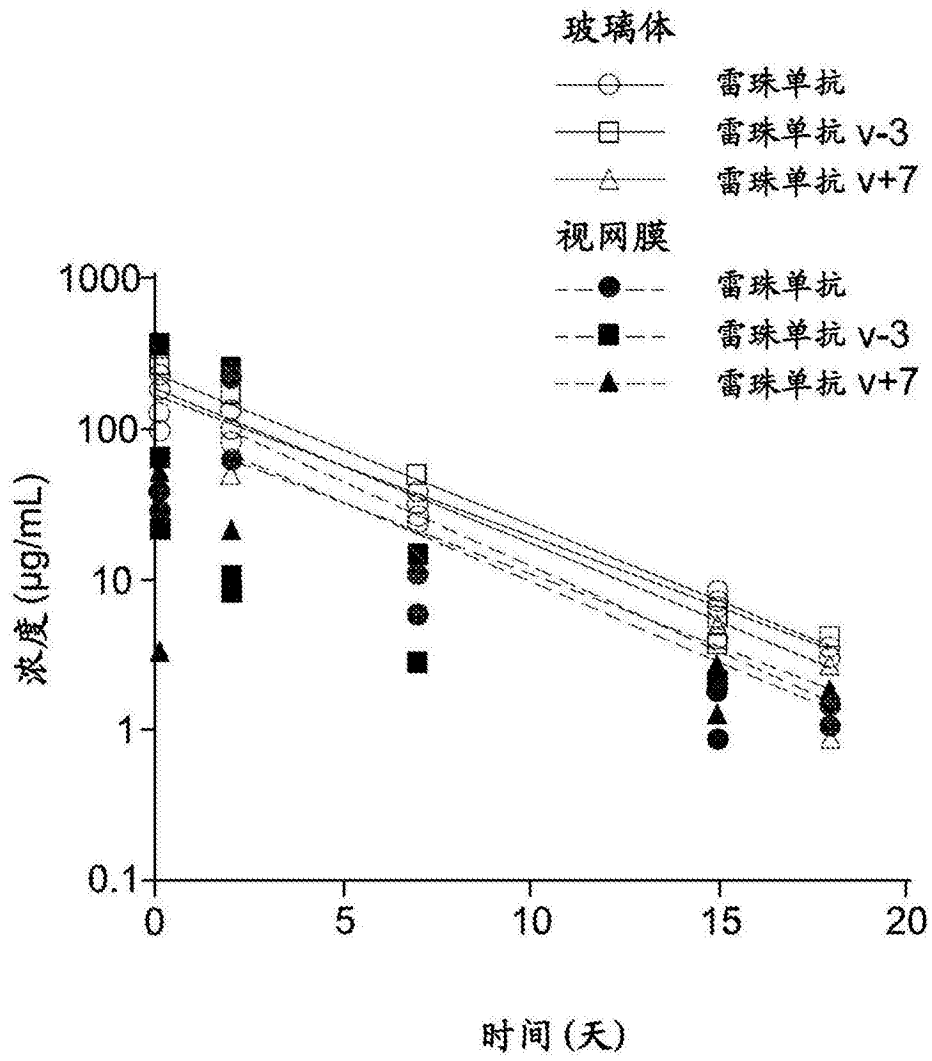


图16