

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 1 月 2 日 (02.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/001976 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 7/08 (2006.01) **A61P 27/02** (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)

Jiangsu 210032 (CN)。王晔 (WANG, Ye); 中国江苏省南京市浦口区星火路 10 号 C 座人才大厦 A 栋 303, Jiangsu 210032 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/100500

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 20 日 (20.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310781313.4 2023 年 6 月 29 日 (29.06.2023) CN

(71) 申请人: 刘晓蓉 (LIU, Xiaorong) [CN/CN]; 中国江苏省南京市栖霞区仙林街道正荣润岚府 1 栋 404 室, Jiangsu 210033 (CN)。

(72) 发明人: 戴鹏 (DAI, Peng); 中国江苏省南京市浦口区星火路 10 号 C 座人才大厦 A 栋 303 室,

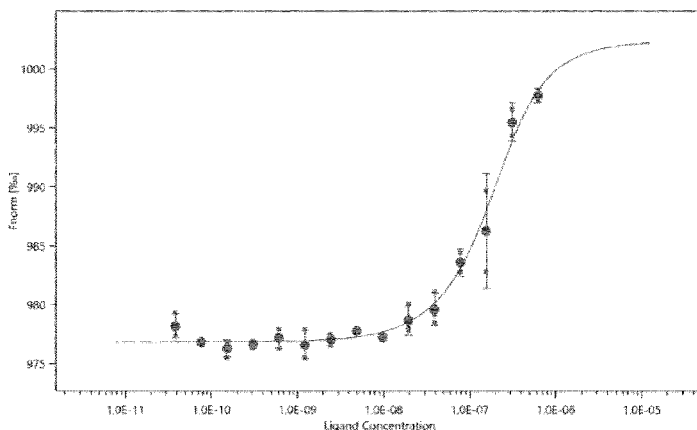
(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: NOVEL COMPLEMENT INHIBITOR, AND PREPARATION, USE AND PRODUCT THEREOF

(54) 发明名称: 新型补体抑制剂及其制备、应用和产品

[图 14]



(57) Abstract: Provided in the present invention are a novel complement inhibitor, and a preparation, the use and a product thereof, which belong to the field of molecular medicine. The portion having complement inhibitory activity comprises a cyclic peptide and a pharmaceutically acceptable salt thereof. The cyclic peptide is shown as general formula I: R1-ICXaa3-Xaa4-QD-Xaa7-G-Xaa9-HRCT-R2, wherein Xaa7 and Xaa9 are selected from uncommon amino acids, and Xaa3 and Xaa4 include at least one uncommon amino acid. When the cyclic peptide provided in the present invention is used as an active ingredient of the complement inhibitor, the cyclic peptide has good affinity to a C3 protein, has good pharmacokinetic properties, and has good application prospects.

(57) 摘要: 本发明提供新型补体抑制剂及其制备、应用和产品, 属于分子药物领域, 所述的补体抑制活性部分包括一种环肽及其药学上可接受盐, 所述的环肽如通式 I: R1-ICXaa3-Xaa4-QD-Xaa7-G-Xaa9-HRCT-R2; 其中 Xaa7 和 Xaa9 选自非常见氨基酸, Xaa3、Xaa4 中包括至少一个非常见氨基酸。本发明提供的环肽作为补体抑制剂的活性成分时, 对 C3 蛋白具有较好的亲和力, 且具备较好的药代动力学性质, 有很好的应用前景。

[见续页]

NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

说明书

发明名称: 新型补体抑制剂及其制备、应用和产品

技术领域

[0001] 本发明属于分子药物领域，具体涉及新型补体抑制剂及其制备、应用和产品。

背景技术

[0002] 补体是存在于人和动物血液、组织液及细胞膜表面的一组激活后具有酶样活性的球蛋白。补体系统是固有免疫的重要组成部分，参与人体免疫调节及免疫损伤性反应。补体系统由30余种可溶性蛋白和膜结合蛋白组成，其激活途径主要有经典途径(classical pathway)、旁路途径(alternative pathway)和凝集途径(lectin activation pathway)，补体以非活性状态存在于血浆之中，被激活后具有生物活性，可通过溶胞、调理、吞噬及介导炎症反应来清除免疫复合物，表现出相应的生物学功能。

[0003] 补体系统的3条激活途径均以形成C3转化酶和C5转化酶为中心，通过裂解C3和C5产生相应的生物活性片段，进一步放大补体反应，这些片段修饰靶表面，可促进吞噬、炎症和免疫调节等过程。其中，从接触激活起始物到生成C3转化酶(并裂解C3)可被当作这些激活途径的前端反应。尽管这些激活途径的前端反应各异，但具有共同的末端通路，即生成C5转化酶，通过裂解C5形成C5b片段，依次与C6、C7、C8、C9反应，最终形成攻膜复合物(membrane attack complex, MAC)，发挥溶细胞效应。

[0004] 补体系统虽然在人体免疫中起到重要作用，但不适当或过度的补体激活却是许多严重疾病的根本原因或促成因素，补体抑制剂的发现为治疗相关疾病提供了很好的研究方向，在阵发性睡眠性血红蛋白尿症及年龄性黄斑变性导致的地图样萎缩等疾病领域均有补体药物获批上市。根据补体系统的3条激活途径可以知晓，抑制C3可以控制激活途径的前端反应，因此开发C3补体抑制剂具有很好的应用前景。C3作为人血清中含量最高的补体蛋白，由 α 、 β 两条链组成，被激活的C3裂解为同样具有重要生物学活性的片段：C3a、C3b、iC3a、C3d等。C3包含41个外显子，并具有提供多重不同配体结合位点的丰富构造，如现

有技术公开的保守结构域： α 2巨球蛋白结构域(A2M)，C3a过敏毒素结构域等(咎琦,刘欣,逢越,等.补体C3结构与功能研究进展[J].中国免疫学杂志,2014(04):549-553.DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2014.04.031.)，在免疫监视和免疫反应途径中很重要。

- [0005] 坎普他汀(Compstatin)是首个发现的C3补体抑制剂，其作为一种十三环肽，可以结合C3a和C3b二者，并且阻止C3转化酶对天然C3的切割。该环肽为一个由极性部分和非极性部分组成的分子，极性部分包括I型 β 转角，非极性部分包括二硫键。现有技术已经验证了 β 转角的四个残基和带环绕的疏水簇的二硫键在C3补体抑制素的抑制活性中起着重要作用。现有技术在最早公开的坎普他汀结构基础上不断进行优化以提高其药学性能，如优化的坎普他汀类似物Ac-ICVW(CH₃)QDWGAHRCT-NH₂(C-C)，其活性是母体的16倍，如“Morikis D,Soulika A M,Mallik B,et al.Improvement of the anti-C3activity of compstatin using rational and combinatorial approaches”中所记载。
- [0006] Empaveli(pegcetacoplan)是第一款上市的C3补体抑制剂药物，是与聚乙二醇聚合物偶联的合成环状肽，可以特异性结合C3a和C3b。Empaveli目前已获批的适应症包括阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)和干性黄斑病变导致的地图样萎缩。
- [0007] 坎普他汀现有技术公开的其他优化方式还包括基于肽主链上的甲基化和侧翼位置上的取代，并研发出具有改善效力的一系列坎普他汀类似物(Qu等人,2011,Molec Immunol48:481-489,WO2010/127336)。这些修饰产生了结合亲和力优于大多数迄今报导的活性类似物的坎普他汀类似物。
- [0008] 申请号为CN201980030725.6的中国专利中公开了一种具有C末端和/或N末端修饰的坎普他汀类似物，改善了肽的溶解度而不导致其药代动力学特性显著降低，并且在一些情况下，赋予增强的血浆和玻璃体稳定性和/或对C3及其片段的结合亲和性，但实际其并未改善环肽自身特性。
- [0009] 也有一些优化方式采用的是对肽段上氨基酸种类的优化，但氨基酸优化的方式多样，且任何优化方式的结果都不具有确定性。鉴于坎普他汀类似物在多种疾病中的治疗潜能，对坎普他汀进行进一步优化以获得更大的效力是相当重要的。

[0010] 发明内容

[0011] 为了解决上述问题，本发明提供了新型补体抑制剂及其制备、应用和产品。

[0012] 术语：

[0013] 本发明中，“补体抑制剂”有时也被称为补体抑制素、补体抑制类似物，补体抑制素是与补体组份C3结合并抑制补体活化的环肽。补体抑制素抑制由转化酶将C3断裂为C3a和C3b。由于C3是所有三种补体活化路径的中心组份，故补体抑制素和其类似物能抑制对汇聚所三种路径的蛋白的活化。补体抑制素和其类似物抑制补体活化的旁路路径的能力可显著促进其在某些本文所述眼部病况中的效能。

[0014] 本发明中，“环肽”一般指环状多肽，指蛋白质或非蛋白质氨基酸之间以环状序列通过化学键形成的多肽链，一般可以通过二硫键成环，也可以通过酰胺键成环，或者其他现有技术中已披露的成环方式。在同一环肽中可能存在多种成环方式。

[0015] 本文所用“多肽”是指氨基酸聚合物，视需要包括一或多种氨基酸类似物。蛋白质是由一或多种多肽组成的分子。肽是相对短的多肽，其长度通常为约2至60个氨基酸。术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”可互换使用。本文所用多肽可含有氨基酸，例如在蛋白质中天然存在的氨基酸、在蛋白质中并非天然存在的氨基酸和/或非氨基酸的氨基酸类似物。本文所用氨基酸“类似物”可为结构上类似氨基酸的不同氨基酸、或除结构上类似氨基酸的氨基酸以外的化合物。蛋白质中普遍存在的20种氨基酸的大量业内认可的类似物是已知的。可对多肽中的一或多个氨基酸加以修饰，例如，通过添加化学实体(例如碳水化合物基团、磷酸基、法呢基、异法呢基、脂肪酸基团、共轭连接体)、官能化或其它修饰等来达成。

[0016] 本发明中，部分简写释义如下：

简写	中文	英文	分子式
Pip	4-氨基哌啶-4-羧酸	4-Aminopiper	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₂
2Nal	2-萘基丙氨酸	2-Naphthyl-alanine	C ₁₃ H ₁₃ NO ₂
5F-Trp	5-氟-DL-色氨酸	5-Fluoro-DL-tryptophan	C ₁₁ H ₁₁ FN ₂ O ₂
Aib	2-氨基异丁酸	2-Aminoisobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂
Abu	2-氨基丁酸	2-Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂
Bpa	苯甲酰基苯丙氨酸	Benzoyl phenylalanine	C ₁₆ H ₁₅ NO ₃
AzaTrp	氮杂色氨酸	azatryptophan	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₂
W(CH ₃)	N-甲基色氨酸	1-Methyl-L-tryptophan	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂

- [0017] 本发明中，未特别注明的简写参照现行通用简写方式，具体地，参照常见氨基酸的简写方式。
- [0018] 本发明中，“非常见氨基酸”涵盖的范围包括除业内公知的20种常见氨基酸之外的所有氨基酸类型。其中包括天然氨基酸和非天然氨基酸。天然氨基酸可以是已经发现或尚未发现的自然界天然存在的氨基酸。非天然氨基酸可以是人工修饰氨基酸。
- [0019] 本发明中，“非天然氨基酸”的人工修饰方法包括但不限于：磷酸化、甲基化、乙酰化、泛素化、糖基化等方式，本领域常规的氨基酸修饰方式所制备的人工修饰氨基酸都属于本发明所涵盖的非天然氨基酸范畴。
- [0020] 本发首先提供了一种新型的补体抑制剂。
- [0021] 所述的补体抑制剂的活性部分包括一种环肽或其药学上可接受盐，所述的环肽如通式I：
- [0022] 通式I：R1-IC-Xaa₃-Xaa₄-QD-Xaa₇-G-Xaa₉-HRCT-R2(C-C)；
- [0023] 其中，Xaa₇和Xaa₉选自非常见氨基酸及衍生物，Xaa₃、Xaa₄中包括至少一个非常见氨基酸及衍生物，R1和R2为修饰基团。

- [0024] 具体地，可以是Xaa₃、Xaa₄中各自独立地包括1个非常见氨基酸，也可以是Xaa₃选自非常见氨基酸，Xaa₄选自常见氨基酸；还可以是Xaa₄选自非常见氨基酸，Xaa₃选自常见氨基酸。
- [0025] 所述的通式中的非常见氨基酸可以是：色氨酸(W)类似物、丙氨酸(A)类似物、氨基丁酸类似物、氨基异丁酸类似物、4-氨基哌啶-4-羧酸类似物、苯甲酰基苯丙氨酸类似物。
- [0026] 所述的类似物的修饰可以是甲基化、乙酰化、羟基化、羧基化、磷酸化、萘基化、氮原子杂化、氟代、酰基化、烷氧基化、卤代。
- [0027] 优选地，所述的色氨酸类似物选自：5-氟-DL-色氨酸、氮杂色氨酸或N-甲基色氨酸。
- [0028] 作为优选，当Xaa₃选自非常见氨基酸时，可以是Abu；
- [0029] 作为优选，当Xaa₃选自常见氨基酸时，可以是V或Y。
- [0030] 作为优选，当Xaa₄选自非常见氨基酸时，可以是2Nal、W(CH₃)、Bpa中的任意一个。
- [0031] 在一些优选的条件中，所述的Xaa₄必选自非常见氨基酸。
- [0032] 作为优选，所述的Xaa₇选自2Nal或5F-Trp任一。
- [0033] 作为优选，所述的Xaa₉选自Aib或Pip任一。
- [0034] 在一些具体的实施例中，Xaa₃、Xaa₄、Xaa₇、Xaa₉各自独立地选自以上优选的条件，包括但不限于：
- [0035] (1)所述的环肽中，Xaa₃选自V或Y，Xaa₄选自2Nal、W(CH₃)、Bpa中的任意一个；
- [0036] 或(2)所述的环肽中，Xaa₄选自2Nal、W(CH₃)、Bpa中的任意一个，Xaa₇选自2Nal或5F-Trp任一；
- [0037] 或(3)所述的环肽中，Xaa₄选自2Nal、W(CH₃)、Bpa中的任意一个，Xaa₉选自Aib或Pip任一；
- [0038] 或(4)所述的环肽中，Xaa₃为Abu，Xaa₇选自2Nal或5F-Trp任一；
- [0039] 或(5)所述的环肽中，Xaa₃为Abu，Xaa₉选自Aib或Pip任一；

- [0040] 或(6)所述的环肽中, X_{aa3}为Abu, X_{aa4}选自2Nal、W(CH₃)、Bpa中的任意一个, X_{aa7}选自2Nal或5F-Trp任一, X_{aa9}选自Aib或Pip任一;
- [0041] 或(7)所述的环肽中, X_{aa3}选自V或Y, X_{aa4}选自2Nal、W(CH₃)、Bpa中的任意一个, X_{aa7}选自2Nal或5F-Trp任一, X_{aa9}选自Aib或Pip任一。
- [0042] 所述的R1或R2可以选自反应性官能团,包括但不限于以下的基团: 烯炔、乙炔、醇、苯酚、醚、氧化物、卤化物、醛、酮、羧酸、酯、酰胺、氰酸盐、异氰酸盐、硫氰酸盐、异硫氰酸盐、胺、肼、脞、酰肼、重氮、重氮基、硝基、腈、硫醇、硫化物、二硫化物、硫氧化物、砒、磺酸、硫酸、缩醛、缩酮、酐、硫酸盐、次磺酸、异腈、脍、酰亚胺、酰亚胺酯、硝酮、羟胺、脞、异羟肟酸、硫异羟肟酸、丙二烯、原酸酯、亚硫酸盐、烯胺、炔胺、脲、假脲、氨基脲、碳化二亚胺、氨基甲酸酯、亚胺、叠氮化物、偶氮化合物、氧化偶氮化合物和亚硝基化合物。反应性官能团也包括经常用于制备生物结合物的基团, 例如N-羟基琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺、巯基和类似物。
- [0043] 作为优选, 所述的R1可以包括氢、乙酰基、甲氧基、PEG、羧基中的一种或多种。
- [0044] 作为优选, 所述的R2可以包括氨基。
- [0045] 作为优选, 所述的R1或R2中包括氨基酸或其变体。
- [0046] 在一些实施例中, 所述的R1或R2独立地包括酪氨酸或者异亮氨酸。
- [0047] 在一些实施例中, 所述的R1包括异亮氨酸, 所述的R2包括酪氨酸。
- [0048] 作为优选, 所述的R1和R2形成酰胺键使多肽首尾成环。
- [0049] 在一些实施例中, 所述的补体抑制剂活性部分选自SEQ ID NO.1-6中的任意1个或多个:
- [0050] SEQ ID NO.1: Ac-ICV-W(CH₃)-QD-2Nal-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C);
- [0051] SEQ ID NO.2: Ac-ICV-AzaTrp-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C);
- [0052] SEQ ID NO.3: Ac-ICV-2Nal-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C);
- [0053] SEQ ID NO.4: Ac-IC-Abu-W(CH₃)-QD-5F-Trp-G-Pip-HRCT-NH₂(C-C);
- [0054] SEQ ID NO.5: Ac-IC-Abu-2Nal-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C);

[0055] SEQ ID NO.6: Ac-IC-Y-Bpa-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)。

[0056] 在一些条件下,所述的通式I具有与坎普他汀类似的结构:

[0057] 通过Cys-2和Cys-12形成的二硫化物桥环化。Cys-2表示通式中2号位半胱氨酸(C), Cys-12表示通式中12号位半胱氨酸(C)。

[0058] 所述的补体抑制剂可以直接包括前述的环肽中的任意一个或多个;

[0059] 所述的补体抑制剂可以包括以上所述的环肽进行边链修饰后的产物,所述的边链修饰可以是连接小分子蛋白类修饰、C端修饰。

[0060] 本发明中,所述的“边链修饰”在一些情况下可能被称作“侧链修饰”或“支链修饰”。根据本领域技术人员所知晓的,肽的末端默认为N端游离的氨基,C端游离的羧基。肽末端往往需要封闭,即N端乙酰化,C端酰胺化,这种修饰避免引入多余电荷,也使其更能防止外切酶作用,使肽更加稳定。

[0061] 本发明中,作为修饰用的小分子蛋白类可以是以共价修饰的方式实现。可以是无机小分子或有机小分子,如磷酸化、糖基化、脂酰化等。

[0062] 所述的补体抑制剂也可以是前述通式I通过常规技术手段所获得的优化产品,不改变环肽自身活性,所述的优化可以发生在R1或R2上,也可以发生在主链的氨基酸上。如PEG优化、缀合、同源多聚体、异源多聚体、氨基酸手性优化、亲水/带电残基掺入、增加穿膜肽、链中N甲基化等方式。如作为优选,所述的Xaa₉上可以包括N甲基衍生。所述的通式I或其优化后形式可以视为坎普他汀类似物。

[0063] 本发明中,所述的“甲基化”是指从活性甲基化合物上将甲基催化转移到其他化合物的过程,可形成各种甲基化合物,或是对某些蛋白质等进行化学修饰形成甲基化产物。具体地,对本发明所提供的环肽进行化学修饰形成甲基化产物。

[0064] 本发明中,所述的“链中N甲基化”指发生在链中任意一个或多个氨基酸上的甲基化,具体地,在任意一个或多个链中氨基酸的-NH₂上连接一个甲基形成-NH-CH₃结构。作为优选,所述的链中N甲基化发生在任意一个链中氨基酸上。在一些实施例中,所述的N甲基化发生在本申请所述的环肽的第9位氨基酸上。

- [0065] 本发明中，所述的“氨基酸手性”是指氨基酸中与其镜像不相同不能互相重合的具有一定构型或构象的分子。手性用于表达旋光性分子和其镜影不能相叠的立体形象的关系。所有的手性分子都具有光学活性，同时所有具有光学活性的化合物的分子，都是手性分子。手性分子包括不具有任何对称因素的不对称分子和具有简单对称轴而不具有其他对称因素的非对称分子。
- [0066] 所述的补体抑制剂可以是通式I上增加穿膜肽，所述的穿膜肽可以是现有技术中已经公开的穿膜肽，或现有技术中尚未公开但在公开后仍与现有技术中的穿膜肽起到相同功能的氨基酸序列。
- [0067] 如本领域技术人员所认知，穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPPs)，也称为转移肽(transduction peptides)，是一类具有穿透细胞膜能力的短肽分子，可以通过膜扰动和膜翻转等机制，进入细胞内部，并与靶分子发生作用。穿膜肽对药物运输能够起到作用。穿膜肽通常由3-30个氨基酸组成，具有正电荷或疏水性等特征。这些特性使得它们能够与细胞膜上的负电荷成分(如磷脂酰肌醇等)发生相互作用，并进入细胞内部。穿膜肽还具有较好的生物稳定性、可重复合成和改变等特点。本发明中，作为优化通式I获得补体抑制剂的穿膜肽，并不限制其具体的类型，其可以是3-30个氨基酸组成，也可以是范围外氨基酸数量的组成。一般来说，所述的穿膜肽可以是2-10、2-12、2-18、2-20、2-25、5-10、5-20、5-25、10-15、10-20、10-25、15-20、15-25、15-30、20-30、25-30、13-19或18-24个氨基酸的长度。在另一些实施例中，所述的穿膜肽上可以带有修饰，如细胞穿膜肽TAT：H₂N-YGRKKRRQRRR-OH。
- [0068] 亲水/带电残基的掺入可以作为增加环肽的溶解度的方法，因此，所述的补体抑制剂可以是通式I掺入亲水/带电残基，数量可以是两个或三个，所述的亲水/带电残基的掺入可以发生在C端或N端或者同时发生，具体到通式I中，可以发生在通式I的R1上或R2上或同时发生，所述的同时发生指R1和R2上均包括亲水/带电残基的掺入。在一些情况下，可以认定为肽的溶解度随着赖氨酸残基数量的增加而增加，但不代表所有情况下的该种修饰都具有同种确定的效果。通式I可以掺入的残基如KK、KKK、KRK、RRR。添加两个或三个赖氨酸残基，在一些情况下可以提高环肽的溶解度，而且在保持抑制能力的同时，提高

了结合亲和力，表现出改进的药代动力学特征，扩大给药途径的范围，降低慢性治疗期间的给药频率，提高药物的依从性。这在一些现有技术中已有相关公开，如“Nadja B,Tchilabalo A ,Resuello R,et al.New analogs of the complement C3 inhibitor compstatin with increased solubility and improved pharmacokinetic profile[J].Journal of Medicinal Chemistry,2018:acs.jmedchem.8b00560.”所公开。

- [0069] 作为优选，所述的亲水/带电残基的掺入发生在R₂上，具体地，连接在氨基之前。进一步具体的，以任意一个或多个K或R连接在氨基之前。可选择的，可以连接一个K或R；也可以连接KK、RR、KR或RK；还可以连接三个氨基酸残基，其中各个氨基酸残基各自独立地为K或R，如连接KKK、KKR、KRR、RKK、KRR、RRK、RRR中的任意一种。
- [0070] 所述的补体抑制剂可以是，在前述通式I的环肽的基础上包含具有1kD至100kD的分子量的清除率降低部分，具体地，所述的清除率降低部分包含聚乙二醇(PEG)。该种优化不影响环肽自身抑制活性，为本领域常规优化手段。
- [0071] 优选地，所述的清除率降低部分的分子量可以是20–80kD、20–90kD、30–80kD、30–90kD、40–80kD、40–50kD、50–60kD、70–80kD、70–90kD、80–90kD。
- [0072] 优选地，所述的PEG可以是支链PEG或直链PEG；进一步优选地，其中所述清除率降低部分包含具有3–10个分支的支链PEG，且所述分支中的至少约50%具有与其连接的坎普他汀类似物部分。
- [0073] 更进一步地，所述清除率降低部分包含具有3–4个、3–6个、3–9个、4–5个、4–7个、4–9个、5–6个、5–8个、6–7个、6–9个、7–8个、7–9个或8–9个分支的支链PEG；所述的分支中的至少约55%、58%、60%、64%、65%、70%、75%、76%、80%、85%、90%、98%或95%具有与其连接的坎普他汀类似物部分。
- [0074] 通过添加分子(诸如聚乙二醇或类似分子)，可以修饰任选地连接至细胞反应性部分或靶向部分，以稳定化合物、降低其免疫原性、延长其在体内的寿命、增强或减弱其可溶性和/或增强其对降解的抗性。聚乙二醇化方法是本领域众所周知的。聚乙二醇化(PEGylation)是将活化的PEG通过化学方法以共价键偶联到蛋

白质或多肽分子上。补体抑制剂可以在C端或N端或同时使用聚乙二醇化，具体地，在通式I的R1或R2上添加聚乙二醇分子，也可以在R1和R2上同时添加聚乙二醇分子。也可以如现有技术中所公开的，将低分子量的PEG链附着在坎普他汀的C端或Lys残基上，开发出C3抑制剂坎普他汀的新类似物。与亲本肽相比，连接3kD的PEG可以在生理pH下的溶解度有显著提高，并保持抑制活性，显示更好地药代动力学谱。PEG化为临床上较成熟的半衰期延长技术，其安全性在多年的临床实践中已得到充分的验证，并已被大多数国家/地区药监局批准供人静脉、口服和皮肤使用。

[0075] 在一些实施例中，本领域技术人员公知，通过对环肽的末端区域进行修饰可以增强肽的溶解度，如PEG修饰，但是不局限于PEG修饰。在一些条件下，本领域技术人员可以知晓，在一些情况下PEG链的大小与化合物的溶解度直接相关，但不代表所有情况都是如此，可能存在其他修饰影响化合物溶解度。

[0076] 作为优选，所述的PEG修饰发生在R1和/或R2上，并且还可包括羧基、甲氧基中的任意一种或两种，PEG修饰与羧基或甲氧基自由组合。

[0077] 作为优选，所述的PEG修饰后的通式I的R2可以有以下类似结构： $-\text{COCH}_2-$ PEG-OMe；PEG的分子量参考清除率降低部分所述，可以是1kD至100kD。

[0078] 在另一个实施方案中，将环肽融合至免疫球蛋白或其部分的Fc结构域。在一些其它的实施方案中，将环肽缀合至白蛋白部分或白蛋白结合肽。因而，在某些实施方案中，用一种或多种多肽或非多肽组分修饰环肽，例如，将环肽聚乙二醇化或缀合至另一个部分。在某些实施方案中，所述组分不是免疫球蛋白或其部分的Fc结构域。可以将环肽提供为多聚体或超分子复合物的一部分，所述超分子复合物可以包括单一分子物质或多种不同物质。

[0079] 在某些实施方案中，补体抑制剂是多价化合物，其包含与聚合主链或支架共价地或非共价地连接的多个环肽。所述连接的各个环肽可以是相同的或不同的。在本发明的某些实施方案中，所述环肽包含单一坎普他汀类似物部分的多个实例或拷贝。在本发明的其它实施方案中，所述多价化合物包含两种或更多种不同环肽(例如3、4、5或更多种不同的环肽)中的每一种的一个或多个实例。在本发明的某些实施方案中，所述环肽的数目可以是1-10。在本发明的其它实施方

案中，环肽的数目可以是10-20、20-100、100-1000、1000-10000、10000至50000、50000-100000、100000至1000000。

[0080] 环肽可以与聚合支架直接连接，或可以通过连接部分连接，所述连接部分将环肽连接至聚合支架。所述连接部分可以连接至单一环肽和连接至聚合支架。可替代地，连接部分可以具有多个与其连接的环肽，以使所述连接部分将多个环肽连接至聚合支架。

[0081] 在某些实施方案中，所述环肽包含具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸，例如Lys残基。例如，使Lys残基或包含Lys残基的序列附加至环肽的N末端和/或C末端。在某些实施方案中，所述Lys环肽环状部分被刚性或柔性隔离物分开。所述隔离物可以例如包含被取代的或未被取代的、饱和的或不饱和的烷基链、寡(乙二醇)链和/或其它部分。所述链的长度可以是例如2-20个碳原子。在其它实施方案中，所述隔离物是肽。所述肽隔离物的长度可以是例如1-20个氨基酸，例如长度为4-20个氨基酸。例如，合适的隔离物可以包含多个Gly残基、Ser残基或二者，或由其组成。任选地，具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸和/或隔离物中的至少一个氨基酸是D-氨基酸。可以使用多种聚合主链或支架中的任一种。例如，聚合主链或支架可以为聚酰胺、多糖、聚酸酐、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、多肽、聚氧化乙烯或树枝状聚合物。在一个实施方案中，所述聚合主链或支架包含多种反应性官能团，诸如羧酸、酸酐或琥珀酰亚胺基团。所述聚合主链或支架与环肽反应。在一个实施方案中，所述环肽包含多种不同反应性官能团(诸如羧酸、酸酐或琥珀酰亚胺基团)中的任一种，其与聚合主链上的适当基团反应。可替代地，可以彼此结合形成聚合主链或支架的单体单元首先与环肽反应，并且得到的单体发生聚合。在另一个实施方案中，将短链预聚合、官能化，然后使不同组成的短链的混合物装配成较长聚合物。

[0082] 在一些具体的实施方案中，所述的补体抑制剂包含与巯基(SH)基团反应以形成共价键的细胞反应性官能团。

[0083] 在一些具体的实施方案中，所述的补体抑制剂包含与胺基团反应以形成共价键的细胞反应性官能团。

[0084] 本发明中的环肽作为补体抑制剂的活性成分主要用于抑制C3补体的激活作用。

- [0085] 本发明同时提供了根据氨基酸序列制备本发明所述的补体抑制剂的方法。
- [0086] 本发明的环肽可以通过各种肽合成法，根据常规肽合成方法经由一个或多个氨基酸残基的缩合来制备。通过固相法或液相法合成肽或模拟肽的其他方法是本领域技术人员熟知的。在肽合成过程中，支链氨基和羧基可以根据需要被保护/去保护，使用通常已知的保护基。利用选择性肽和肽衍生物的保护基进行修饰对本领域技术人员来说是显而易见的。
- [0087] 作为选择，本发明的某些肽可以通过在适当的原核或真核系统表达来生产。例如，DNA构建体可以插入适宜于在细菌细胞(例如大肠杆菌)或酵母细胞(例如酿酒酵母)中表达的质粒载体，或插入用于在昆虫细胞中表达的杆状病毒载体或用于在哺乳动物细胞中表达的病毒载体。这种载体包含DNA在宿主细胞中表达所需的调控元件，其以使得允许DNA在宿主细胞中表达的方式安置。表达所需的这种调控元件包括启动子序列、转录起始序列和任选增强子序列。
- [0088] SEQ ID NO.1-6和设计相似的其他肽适于通过体外或体内表达核酸分子来生产。编码肽多连体的DNA构建体可以被引入体内表达系统，多连体的上限取决于所用的表达系统。多连体产生后，通过多肽暴露于胬来实现C末端Asn和下列N末端G之间的切割。
- [0089] 在重组原核或真核系统中表达基因而生产的肽可以根据本领域已知方法来纯化。
- [0090] 在一个实施方案中，可使用市场上可买到的表达/分泌系统，由此重组肽被表达并此后从宿主细胞分泌出来，易于从周围培养基中纯化。
- [0091] 也可以使用基因表达和合成法组合生产上述环肽。例如，可以通过基因表达来生产和此后经受一个或多个翻译后合成过程，例如修饰N-或C-末端或使分子环化。
- [0092] 其次，本发明提供前述补体抑制剂在制备药物中的应用。
- [0093] 所述的补体抑制剂用于治疗补体介导障碍，具体为C3补体介导障碍。具体地，抑制C3被C3转变酶切割为C3a和C3b。
- [0094] 所述的药物所针对的疾病包括但不限于：眼部疾病、肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、肺炎链球菌感染、皮疹、炎症、阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、非典型溶

血性尿毒症综合征(aHUS)、补体介导溶血、成人呼吸综合征、心脏病、补体介导损伤中的任一或组合。

- [0095] 所述的药物还可以在血液透析(Mastellos,D.C.等, Compstatin:a C3-targeted complement inhibitor reaching its prime for bedside intervention.)、肾移植(Mastellos,D.C.等, Complement C3-targeted therapy:replacing long-held assertions with evidence-based discovery.)和失血性休克(van Griensven,M等.Protective effects of the complement inhibitor compstatin Cp40 in hemorrhagic shock.)中起到保护或治疗作用,如现有技术所公开。
- [0096] 所述的炎症包括但不限于急性炎症或慢性炎症,在一些实施例中,所述的炎症表现为牙周炎。牙周炎是一种流行的慢性口腔疾病,由龈下牙齿部位形成的不良生物微生物群落引起的过度炎症导致,并可能导致牙齿脱落,咀嚼和营养状况受损。牙周炎发病率较高,人类牙周炎的早期临床和组织学观察表明牙周炎症和组织破坏与补体活性增加相关。因此本发明的药物通过发挥补体抑制剂作用能够用于治疗牙周炎。
- [0097] 所述补体介导损伤包括但不限于:传染病早期组织损伤、肿瘤排斥反应、缺血/再灌注(I/R)损伤、异种移植后排斥中的任一或组合。
- [0098] 所述的眼部疾病包括但不限于:黄斑变性、脉络膜新生血管、视网膜新生血管、眼部炎症、地图样病变中的任一或组合。
- [0099] 在一些情况下,所述的药物针对的疾病还可以是:非典型溶血尿毒症综合征(aHUS);致密沉积病(DDD);C3肾小球肾炎(C3GN);C3肾小球病变;补体介导的肾病和肾小球炎性疾病;年龄相关性黄斑变性(AMD);以黄斑变性、脉络膜新生血管形成(CNV)、视网膜新血管形成(RNV)、增生性玻璃体视网膜病变、青光眼、葡萄膜炎、眼部炎症或以上任意组合为特征的眼病;阵发性夜间血红蛋白尿(PNH);冷凝集素病(CAD);温抗体自身免疫性溶血性贫血(wAIHAs);镰状细胞病;移植相关的血栓性微血管病;类风湿关节炎(RA);系统性红斑狼疮(SLE);自身免疫和自身炎症肾脏疾病;自身免疫性心肌炎;多发性硬化症;外伤性脑和脊髓损伤;脑、肠和肾缺血再灌注(IR)损伤;自发性和反复性流产;抗磷脂综合征(APS);帕金森氏病;阿尔茨海默氏病;由异常突触重塑、小胶质细胞活

性和认知能力下降支撑的神经退行性炎性疾病；哮喘；抗核细胞质抗原相关的弱免疫性血管炎(韦格纳综合征)；非狼疮性自身免疫性皮肤病，例如天疱疮、大疱性类天疱疮和大疱性表皮松解；创伤后休克；癌症；牙龈炎；和动脉粥样硬化。

[0100] 本发明同时提供了前述的补体抑制剂在治疗以上疾病中的应用。

[0101] 所述的补体抑制剂应用与治疗时，其用量可以从毫克级别至克级，针对不同的适应症，用量可以进行调节。如当应用于局部用于适应症时，其用量可以考虑设置为毫克级；当应用于全身用药适应症时，其用量可以考虑设置为克级。所述的局部适应症比如前述的眼部疾病或牙周炎等；所述的全身用药适应症比如阵发性夜间血红蛋白尿、非典型溶血性尿毒症综合征等。以上仅为根据一般治疗方式可选择的应用方法，不代表本发明的补体抑制剂仅能采用以上方式进行施用。

[0102] 对于递送本发明组合物或药剂来说，“局部投与”或“局部递送”是指不依赖于组合物或药剂通过血管系统向其既定靶组织或部位运输的递送。可将组合物或药剂直接递送至其既定靶组织或位点，或递送至其附近，例如紧邻既定靶组织或位点递送。例如，可通过注射或植入组合物或药剂，或通过注射或植入含有组合物或药剂的装置来递送组合物。在靶组织或位点附近局部投与后，组合物或药剂或其一或多种组份可扩散至既定靶组织或位点。应了解在完成局部递送后，治疗药剂的部分(通常仅为小部分所投与剂量)可进入血管系统并被运输至另一位置，包括回到其既定靶组织或位点。

[0103] 再有，本发明提供了包括前述补体抑制剂的药物。

[0104] 所述的药物中包括前述补体抑制剂或其药学上可接受的盐中的任意一种或多种。

[0105] 补体抑制剂或其盐的串联体或多聚体也可用于本发明中。

[0106] 在一些情况下，所述的药物中包括SEQ ID NO.1-6或其修饰体中的任意一种或多种。

[0107] 所述的药物中还可能包括其他药学上可接受的载体或赋形剂。

- [0108] 所述的药学上可接受的载体或赋形剂包括但不限于：缓冲液、赋形剂、稳定剂、防腐剂、调香剂、调味剂、透膜增强剂、酶抑制剂、PH调节剂或者其他不影响抑制剂活性但可能影响成药性的辅料。
- [0109] 所述的药物的剂型包括但不限于注射剂、输液剂。本领域技术人员可以根据具体的适应症选择药物剂型，不局限于本发明已公开的内容，也可以是现有技术中已公开或未公开的药物剂型。
- [0110] 所述的药物的应用方法可以是皮下注射或静脉注射。
- [0111] 所述的药物的给药方式可以选择局部注射，包括但不限于：经血、经皮、经眼、经腹腔的注射方式。
- [0112] 所述的药物的给药方式也可以选择透皮或口服等其他能够达到治疗效果的方式。
- [0113] 优选地，所述的药物可以是眼用制剂，优选为玻璃体注射剂或滴眼给药制剂。
- [0114] 本文使用的“药学上可接受的盐”是指所公开化合物的衍生物，其中母体化合物通过制备其酸或碱盐而被修饰。药物可接受盐的实例包括但不限于碱性残基例如胺类的无机或有机酸盐；酸性残基例如羧酸类的碱性或有机盐等等。药物可接受盐包括由无机或有机酸形成的母体化合物的常规盐或季铵盐。这种常规盐包括但不限于源自无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等的盐；和由无机酸如醋酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰基苯甲酸、反丁烯二酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟乙磺酸等制备的盐。本发明的某些酸性或碱性化合物可以以两性离子形式存在。所有形式的化合物，包括游离酸、游离碱和两性离子都包括在本发明范围内。
- [0115] 本文所用“治疗”是指提供治疗，即向受试者提供任一类型的内科或外科治疗。提供治疗的目的可为逆转、减轻或抑制疾病、病症或病况的发展、预防或降低其发生的可能性，或逆转、减轻、抑制或预防疾病、病症或病况的一或多种症状或现象、预防或降低其发生的可能性。“预防”是指在至少某些个体中于至少一段时间内使疾病、病症、病况或其症状或现象不发生。治疗可包括在指

示病况(例如黄斑变性或糖尿病性视网膜病)的一或多种症状或现象发生后向受试者投与药剂,其目的为(例如)逆转、减轻、降低病况的严重度和/或抑制或预防病况的发展,和/或逆转、减轻、降低病况的一或多种症状或表现的严重度和/或抑制病况的一或多种症状或现象。可将本发明组合物投与受试者,其已发生眼部疾病(例如渗出性或非渗出性ARMD或糖尿病性视网膜病),或相对于一般人群的成员其发生此一病症的风险增加。可预防性投与本发明组合物,即在病况的任何症状或现象发生前投与。通常在这种情况下,受试者具有发生病况的风险。

[0116] 本发明的有益效果:

[0117] 本发明提供的环肽作为补体抑制剂的活性成分时,对C3蛋白具有较好的亲和力和抑制活性。作为药物应用时,本发明的补体抑制剂具有更好的体内稳定性、溶解性等药代动力学性能,并改善了依从性,临床应用的范围广。

[0118] 本发明中,所述的“体内稳定性”(in vivo stability)指药物在体内耐受酶降解等生物活动而保持自身结构及性质不变的特性。一般用动物或人血清中放射性药物维持基本性状的时间表示。

[0119] 本发明中,所述的“依从性”(Patient compliance/Treatment compliance)也称顺从性、顺应性,指病人按医生规定进行治疗、与医嘱一致的行为,习惯称病人“合作”;反之则称为非依从性。依从性可分为完全依从、部分依从(超过或不足剂量用药、增加或减少用药次数等)和完全不依从3类,在实际治疗中这三类依从性各占1/3。病人对于具体用药的依从性,即为该具体药物的依从性。

[0120] 本发明中,所述的“药代动力学”(pharmacokinetics)简称药动学,主要研究机体对药物的处置(Disposition)的动态变化。包括药物在机体内的吸收、分布、生化转换(或称代谢)及排泄的过程,特别是血药浓度随时间变化的规律。药物的代谢与人的年龄、性别、个体差异和遗传因素等有关。

附图说明

[0121] 图1为SEQ ID NO.1的质谱图。

[0122] 图2为SEQ ID NO.2的质谱图。

[0123] 图3为SEQ ID NO.3的质谱图。

- [0124] 图4为SEQ ID NO.4的质谱图。
- [0125] 图5为SEQ ID NO.5的质谱图。
- [0126] 图6为SEQ ID NO.6的质谱图。
- [0127] 图7为SEQ ID NO.1的HPLC谱图。
- [0128] 图8为SEQ ID NO.2的HPLC谱图。
- [0129] 图9为SEQ ID NO.3的HPLC谱图。
- [0130] 图10为SEQ ID NO.4的HPLC谱图。
- [0131] 图11为SEQ ID NO.5的HPLC谱图。
- [0132] 图12为SEQ ID NO.6的HPLC谱图。
- [0133] 图13为BLI亲和力实验中样品实时结合曲线。
- [0134] 图14为MST亲和力实验中样品2的拟合曲线。
- [0135] 图15为MST亲和力实验中阳性样品对照的拟合曲线。

具体实施方式

- [0136] 下面结合具体实施例，对本发明作进一步详细的阐述，下述实施例不用于限制本发明，仅用于说明本发明。以下实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，下述实施例中所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0137] 实施例1

- [0138] 本实施例制备了以下环肽作为补体抑制剂的活性成分：

[0139] SEQ ID NO.1：Ac-ICV-W(CH₃)-QD-2Nal-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)；z

[0140] SEQ ID NO.2：Ac-ICV-AzaTrp-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)；

[0141] SEQ ID NO.3：Ac-ICV-2Nal-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)；

[0142] SEQ ID NO.4：Ac-IC-Abu-W(CH₃)-QD-5F-Trp-G-Pip-HRCT-NH₂(C-C)；

[0143] SEQ ID NO.5：Ac-IC-Abu-2Nal-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)；

[0144] SEQ ID NO.6：Ac-IC-Tyr-Bpa-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)。

[0145] 通过Cys-2和Cys-12形成的二硫化物桥环化。Cys-2表示通式中2号位半胱氨酸(C)，Cys-12表示通式中12号位半胱氨酸(C)。

[0146] 本实施例的SEQ ID NO.1-6通过F-moc固相肽合成法合成，并根据本领域已知技术使用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)进行纯化。但本发明并不限制其具体的制备方法，凡通过现有技术已公开或未公开的制备方法得到以上序列或对以上序列进行修饰，其所涉产品均在本发明的范围内。本领域技术人员有能力对以上活性成分进行常规技术优化并验证优化后环肽的多种活性，部分情况下如实验例所示的活性，但不仅限于实验例所呈现的数据形式。

[0147] 本实施例中SEQ ID NO.1-6的质谱图见图1-6，HPLC谱图见图7-12。

[0148] 实验例1 BLI亲和力实验

[0149] 采用BLI亲和力实验对本发明的环肽和对照品进行效果验证。

[0150] BLI指生物膜干涉技术(Bio-Layer Interferometry)，原理为：可见光从光谱仪射出后，在传感器末端的光学膜层的两个界面会形成两束反射光谱，并形成一束干涉光谱。任何由于分子结合而形成的膜层厚度变化，能够通过干涉光谱的位移值而体现。

[0151] 用His-tag重组人C3蛋白负载Ni-NTA生物传感器(Sino Biological Inc.)，然后与7种环肽(SRQ ID NO.1-6编号1-6，阳性对照组为现有技术中公开的Ac-ICVW(CH₃)QDWGAHRCT-NH₂环肽，编号为7)生成关联曲线(ForteBio Octet)。随后在60s缔合阶段之后进行90s离解步骤，以通过拟合曲线获得K_d值。

[0152] 储存液溶解条件为15%乙腈，工作液采用pH 8.0的PBS进行倍比稀释。

[0153] 实验结果如下表1：

[0154] 表1

No.	K _d (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
1	3.19E-06	1.54E+04	4.92E-02
2	4.54E-08	3.93E+05	1.79E-02
3	4.54E-08	3.87E+05	1.76E-02

4	3.51E-07	1.12E+05	3.93E-02
5	2.26E-06	1.31E+04	2.96E-02
6	3.99E-05	9.25E+02	3.69E-02
7	9.29E-08	2.02E+05	1.88E-02

[0155] 结果表明：本发明的SEQ ID NO.1-6所示的环肽在BLI亲和力实验中的Kd值均小于1000nM，结合速率常数kon均大于1000l/Ms，解离速率常数kdis均小于0.05l/s。

[0156] 各样品实时结合曲线见图13。

[0157] 结果表明，受试化合物均具有C3蛋白亲和力，活性最优的<100nM。

[0158] 实验例2 MST亲和力实验

[0159] 本实验例采用MST亲和力实验测定环肽与C3蛋白结合的Kd值。委托南京钟鼎生物技术有限公司完成。

[0160] 1.试剂与耗材：

[0161] 1)荧光标记试剂盒：Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS2nd Generation Kit；

[0162] 2)C3蛋白缓冲液：PBS；

[0163] 3)环肽缓冲液：0.5×PBS，15% ACN；

[0164] 4)20% Tween-20；

[0165] 5)MST NT115标准毛细管。

[0166] 2.实验器材

仪器名称	厂家	货号
超净工作台	苏州净化设备有限公司	SW-CJ-2F
MST 微量热泳动仪	德国 NanoTemper	Monolith NT.115
恒温培养箱	上海新苗医疗器械制造有限公司	MJ-300B5H-III
离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司	H1750R

[0167] 3.实验方法及结果

[0168] 在标准的标记型MST实验中，最多可以一次测量16个稀释梯度。荧光标记的分子(Target，标记分子，环肽)的浓度保持在一个不变，而另外一个分子(ligand，非标记分子，C3蛋白)做2倍梯度稀释。

[0169] 3.1配体分子稀释装载

- [0170] 10 μ L梯度稀释的非标记分子(Ligand)和10 μ L固定浓度的标记分子(Target)混合后静置反应5min，混合的样品装载到玻璃毛细管中，然后通过MST-NT.115设备进行分析。
- [0171] 3.2 Pretest及Binding Check
- [0172] 实验开始前，进行Pretest步骤，检测Target荧光标记强度，检测蛋白的吸附及聚集现象，确定实验参数。
- [0173] 3.3 Binding Affrinity
- [0174] 完成Binding Chcek后，如果蛋白无吸附聚集现象，且信噪比达标，则开始进行Binding Affinity。
- [0175] Binding Affinity实验参数：三种多肽上机浓度约为200nM，Buffer(0.5 × PBS，15 % ACN)，蛋白浓度为最大0.25 μ M 2倍梯度稀释。
- [0176] 若小分子融于水溶液中，则直接将小分子母液进行2倍浓度梯度稀释16次，稀释后每管溶液为10 μ L，然后加入10 μ L稀释后的蛋白溶液混匀，用毛细管吸取后置于仪器检测。本次实验案例小分子(蛋白)融于PBS中，梯度稀释完成后，每管溶液中加入10 μ L稀释后的Target溶液，用移液枪轻轻吹打数次混匀，然后用毛细管吸取后置于仪器分析。
- [0177] 3.4实验结果
- [0178] 结果见图14-15和表2。图14为SEQ ID NO.2的拟合曲线，图15为阳性对照的拟合曲线。
- [0179] 表2

No.	2	3	7
Kd (M)	1.1412E-07	3.5394E-08	1.2012E-07
Kd (复测)	2.4602E-08	——	2.7311E-08

- [0180] 结果表明，本发明的SEQ ID NO.1-6所示的环肽在BLI亲和力实验中均显示出亲和力，其中最优的Kd值小于100nM。Kd值越大，说明亲和力越低，反之Kd值越小，亲和力越高。

[0181] 实验例3 溶解度实验

[0182] 取合成的SEQ ID NO.1-6成品以及阳性对照，使用PBS进行溶解，测定溶解度。

[0183] 溶解度实验参照以下步骤进行：

[0184] 在LoBind-Eppendorf管中称重肽(5-10mg)；加入20 μ L PBS(pH 7.4)，将混合物涡旋并在16873g下离心2分钟。除非另有说明，否则如果相应的肽未溶解，则额外以10 μ L加入PBS，然后涡旋和离心，直到所有沉淀物消失。肽溶液的pH在pH指示剂条上或使用SevenExcellence pH计(Mettler Toledo, Columbus, OH)测定。基于如上所述在NanoDrop 2000c分光光度计上测量的吸光度来确定最终溶液的浓度。

[0185] 实验例4 半抑制浓度值测定

[0186] 通过经典途径补体抑制试验评估的SEQ ID NO.1-6半抑制浓度值。通过表面等离子体共振(SPR)实验测定了缔合常数(K_a)、解离常数(K_d)和平衡解离常数(K_D)。

[0187] 补体抑制实验可以参照以下步骤：

[0188] 通过建立的酶联免疫吸附测定法(ELISA)进行评估。常规环境温度下，用50 μ L 1% 卵清蛋白在PBS中包被96孔板2小时。用200 μ L 1% BSA在PBS中将孔封闭1小时，然后用50 μ L 1:1000稀释的 α -卵清蛋白多克隆抗体在PBS中包被1小时。在每个步骤之间，用200 μ L 0.05% 吐温20在PBS(PBS-T)中洗涤板三次。将在veronal缓冲液(VBS；5mM veronal, pH 7.4，含有150mM NaCl、0.5mM CaCl_2 和0.5mM MgCl_2)中制备的环肽的系列稀释液加入96孔板中，随后加入人血浆(在VBS中为1:40)，并将混合物在室温下孵育15分钟。洗涤后，使用HRP缀合的山羊 α -人C3抗体(1:1000；MP Biomedicals)检测补体激活(结合到免疫复合物的C3b/iC3b/C3d)。使用HRP底物(0.05% ABTS和0.1% H_2O_2 溶于0.1M柠檬酸钠，pH 4.2)进行反应，并使用VICTOR多标签板读取器(PerkinElmer, Waltham, MA)在405nm处读取。不存在C3肽抑制剂的情况下获得100%的补体活化，在405nm处获得的吸光度数据转换为补体抑制的百分比。根据浓度的对数绘制抑制百分比，并使用GraphPad Prism 5将所得数据集拟合到方程“log(抑制剂)vs归一化响

应”。IC50值由三个独立实验获得的平均值的拟合参数获得。表面等离子体共振(SPR)实验使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare, Piscataway Town, NJ), 通过SPR评估环肽的结合亲和力和动力学特征。

[0189] 实验结果如下表3:

[0190] 表3

No.	2	3	4	7
IC50 (uM)	0. 920	1. 457	2. 256	1. 007

[0191] 实验例5 体内药代动力学评价

[0192] SEQ ID NO.1-6及阳性对照品全身给药或局部给药到实验动物, 并在不同的时间点采集样本。以此测定药代动力学参数, 可以通过对样本的UPLC-ESI-MS分析进行评估。测定每个动物的C3或其他标志物水平。定量测定原始化合物和裂解产物的总浓度。

[0193] 本发明中, 对于药代动力学的评价不限于实验例中所呈现的形式, 本领域技术人员所熟知的评价方法或指标都可以用于评价本发明所提供的抑制剂的药代动力学性质。

[0194] 以上实施例仅作为本发明一些优选的实施方式所呈现, 并不用于限制本发明, 本领域技术人员在本申请公开的技术方案的基础上, 进行的常规替代或等同替代方案, 均在本发明保护的范围内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种补体抑制剂，其特征在于，活性部分包括一种环肽或其药学上可接受盐，所述的环肽如通式I：通式I：R1-IC-Xaa₃-Xaa₄-QD-Xaa₇-G-Xaa₉-HRCT-R2；
其中，Xaa₇和Xaa₉选自非常见氨基酸，Xaa₃、Xaa₄中包括至少一个非常见氨基酸；
R1和R2为修饰基团；
通式I通过Cys-2和Cys-12形成的二硫化物桥环化。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的补体抑制剂，其特征在于，Xaa₃选自常见氨基酸或非常见氨基酸；Xaa₄选自非常见氨基酸；Xaa₇选自2NaI或5F-Trp任一；Xaa₉选自Aib或Pip任一。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的补体抑制剂，其特征在于，Xaa₃选自V、Y或Abu中的任一；Xaa₄选自2NaI、W(CH₃)、Bpa、AzaTrp中的任一；Xaa₇选自2NaI或5F-Trp任一；Xaa₉选自Aib或Pip任一。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述的补体抑制剂，其特征在于，R1选自氢、乙酰基、甲氧基、PEG、羧基中的一种，R2选自氨基。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的补体抑制剂，其特征在于，R1选自乙酰基，R2选自氨基。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的补体抑制剂，其特征在于，R1和R2选自氨基酸或其变体。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的补体抑制剂，其特征在于，R1和R2各自独立地选自酪氨酸或者异亮氨酸。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的补体抑制剂，其特征在于，R1选自异亮氨酸，R2选自酪氨酸。
- [权利要求 9] 根据权利要求6-8任一项所述的补体抑制剂，其特征在于，R1和R2形成酰胺键使多肽首尾成环。

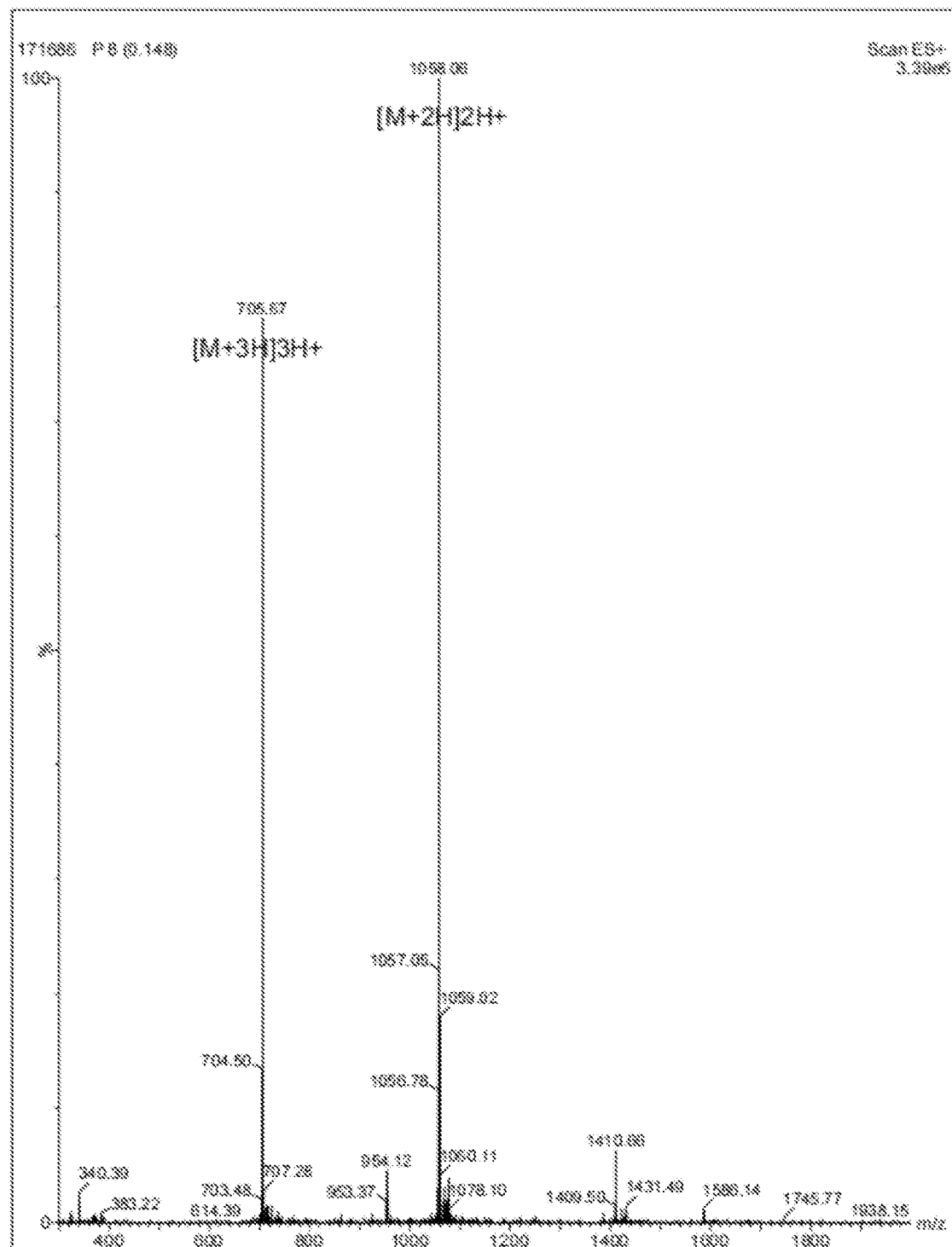
- [权利要求 10] 根据权利要求1所述的补体抑制剂，其特征在于，所述的活性部分选自SEQ ID NO.1-6中的任意1个或多个：SEQ ID NO.1：Ac-ICV-W(CH₃)-QD-2Nal-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)；SEQ ID NO.2：Ac-ICV-AzaTrp-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)；SEQ ID NO.3：Ac-ICV-2Nal-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)；SEQ ID NO.4：Ac-IC-Abu-W(CH₃)-QD-5F-Trp-G-Pip-HRCT-NH₂(C-C)；SEQ ID NO.5：Ac-IC-Abu-2Nal-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)；SEQ ID NO.6：Ac-IC-Y-Bpa-QD-5F-Trp-G-Aib-HRCT-NH₂(C-C)。
- [权利要求 11] 根据权利要求1所述的补体抑制剂，其特征在于，所述的活性部分为通式I优化后产物；所述的优化包括PEG化、缀合、同源多聚体、异源多聚体、氨基酸手性优化、亲水/带电残基掺入、增加穿膜肽、链中N甲基化的一种或多种。
- [权利要求 12] 根据权利要求11所述的补体抑制剂，其特征在于，所述的优化发生在R1或R2或主链氨基酸上；优选地，所述的优化为发生在R2上亲水/带电残基的掺入，优选为掺入任意一个或多个K或R。
- [权利要求 13] 根据权利要求11所述的补体抑制剂，其特征在于，所述的PEG化发生在R1上；所述的链中N甲基化发生在Xaa₉上。
- [权利要求 14] 根据氨基酸序列制备权利要求1-13任一项所述的补体抑制剂的方法。
- [权利要求 15] 权利要求1-13任一项所述的补体抑制剂在制备治疗补体介导障碍的药物中的应用。
- [权利要求 16] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，所述的补体介导障碍包括：眼部疾病、肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、肺炎链球菌感染、皮疹、炎症、阵发性夜间血红蛋白尿、非典型溶血性尿毒症综合征、补体介导溶血、成人呼吸综合征、心脏病、补体介导损伤中的任一或组合；所述的炎症包括牙周炎；所述的眼部疾病包括：黄斑

变性、脉络膜新生血管、视网膜新生血管、地图样病变中的任一或组合；所述药物优选为注射剂，优选为局部注射，优选为皮下注射或静脉注射；所述的药物优选为眼用制剂；优选为玻璃体注射或滴眼给药。

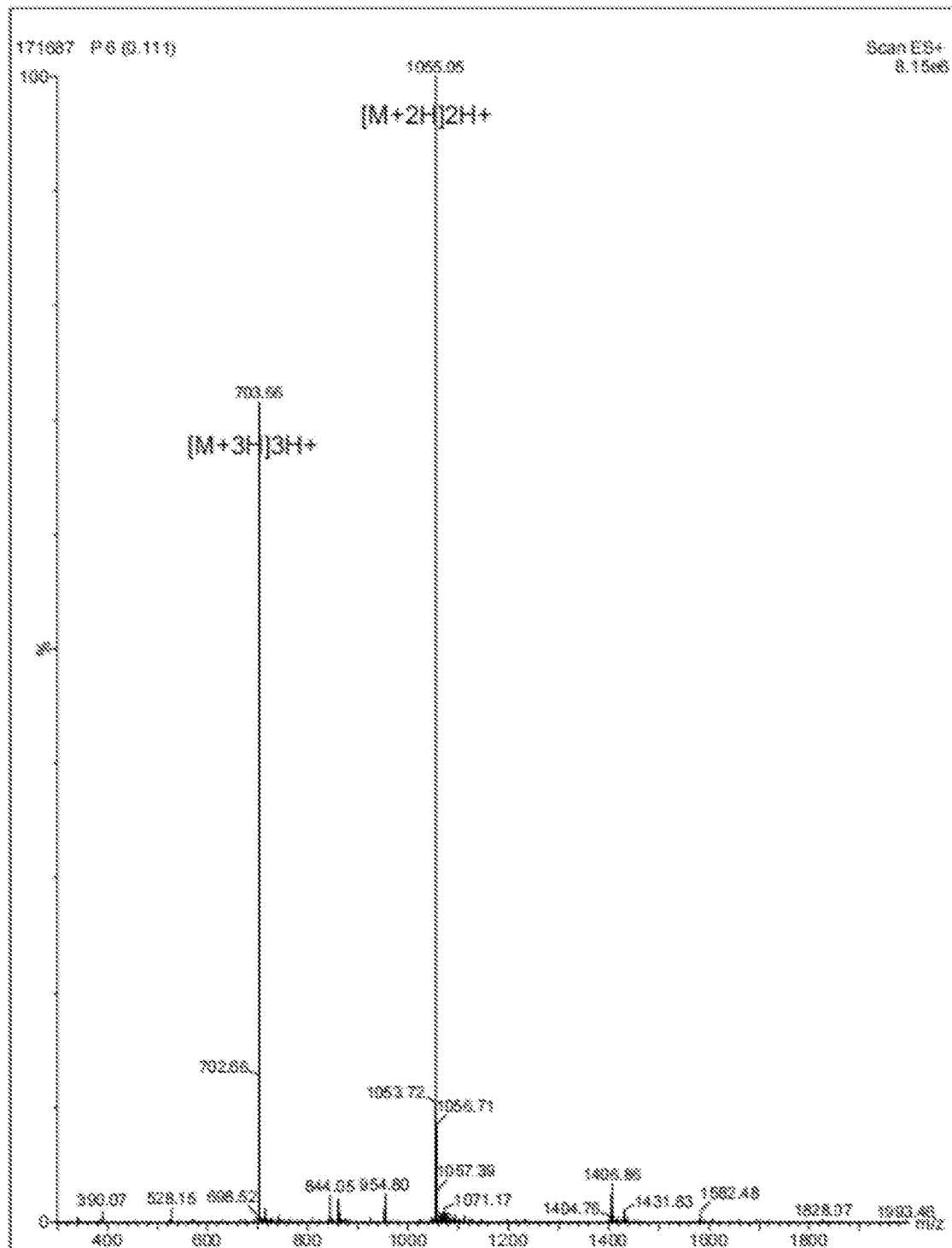
[权利要求 17] 包括权利要求1-13任一项所述的补体抑制剂或其盐或其串联体、多聚体的药物。

[权利要求 18] 根据权利要求17所述的药物，其特征在于，包括SEQ ID NO.1-6中的任意一种或多种。

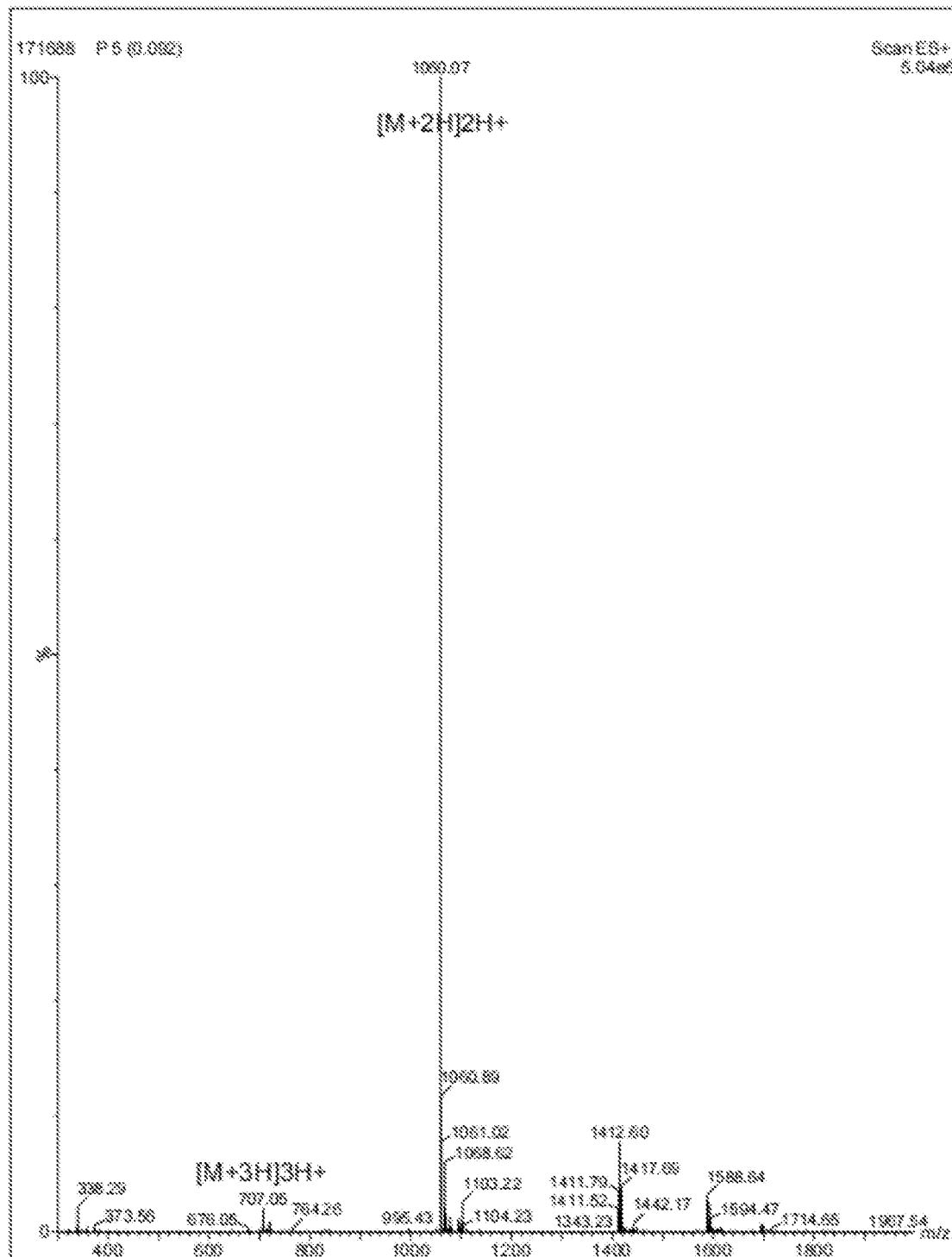
[图 1]



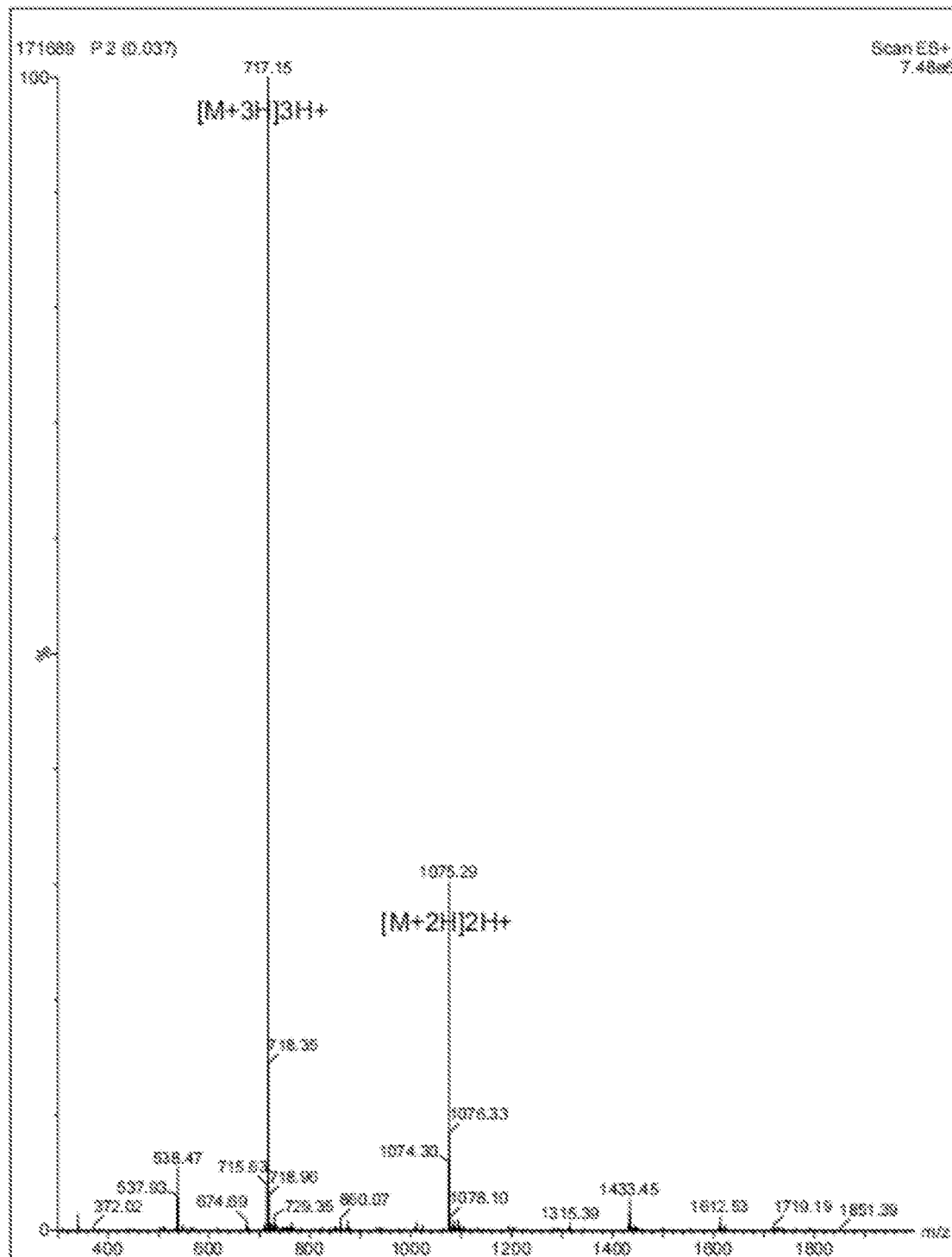
[图 2]



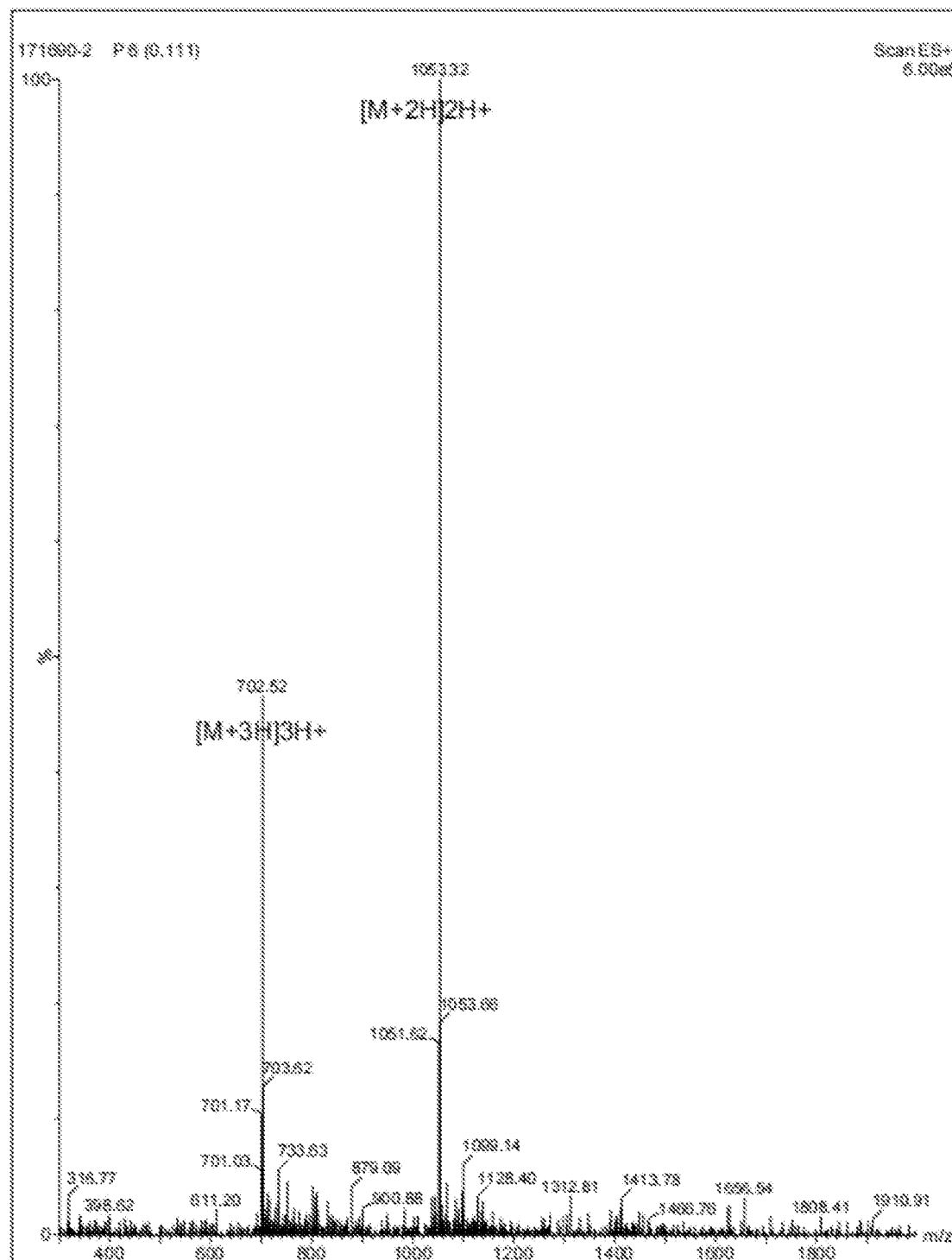
[图 3]



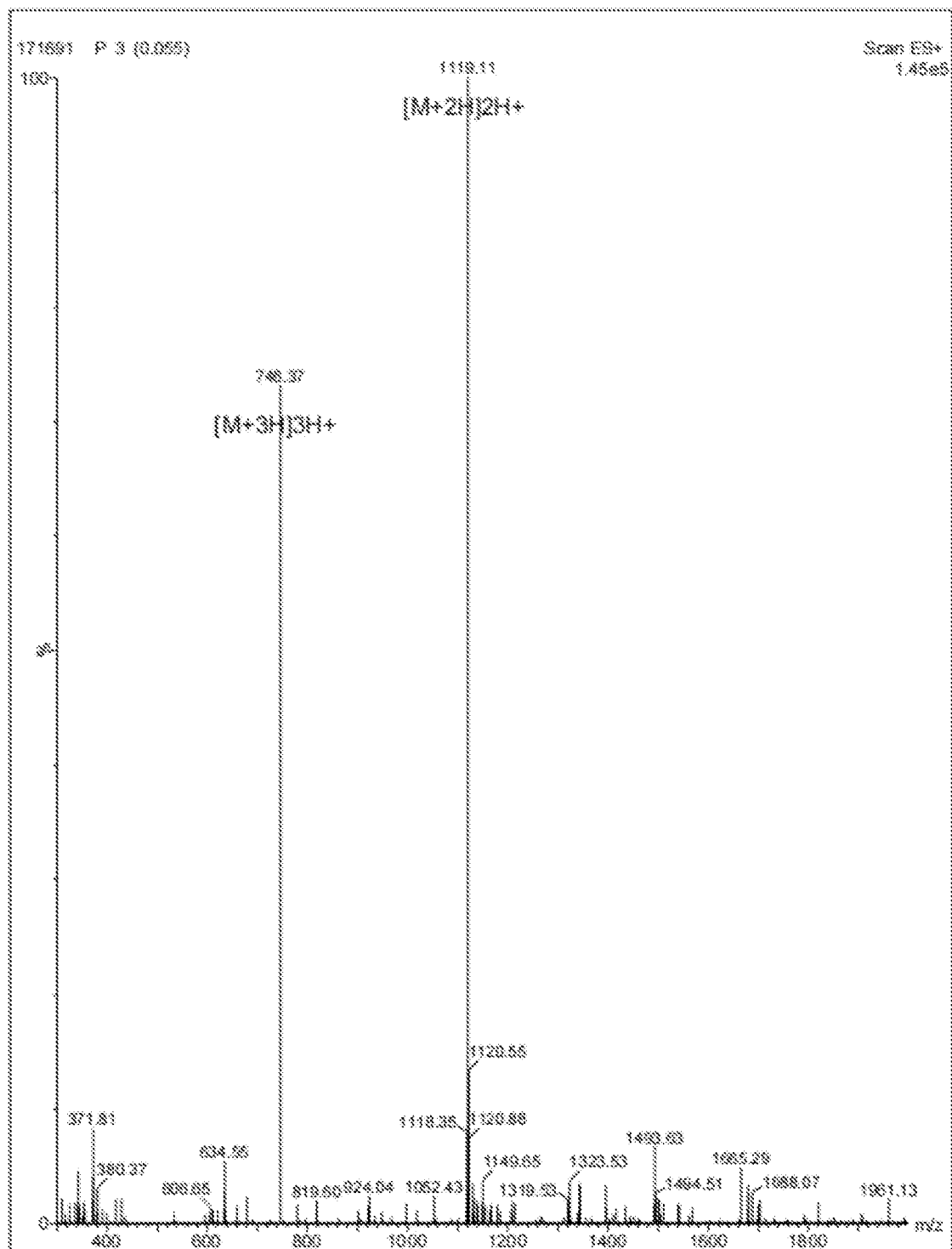
[图 4]



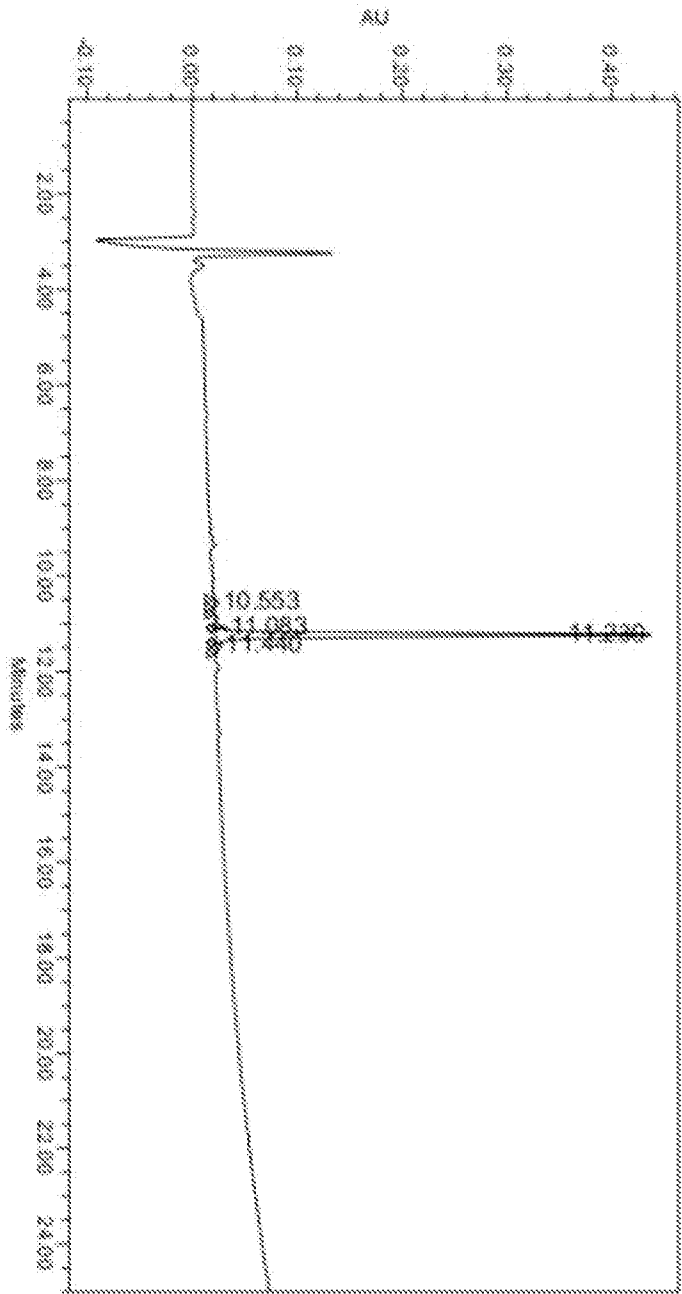
[图 5]



[图 6]

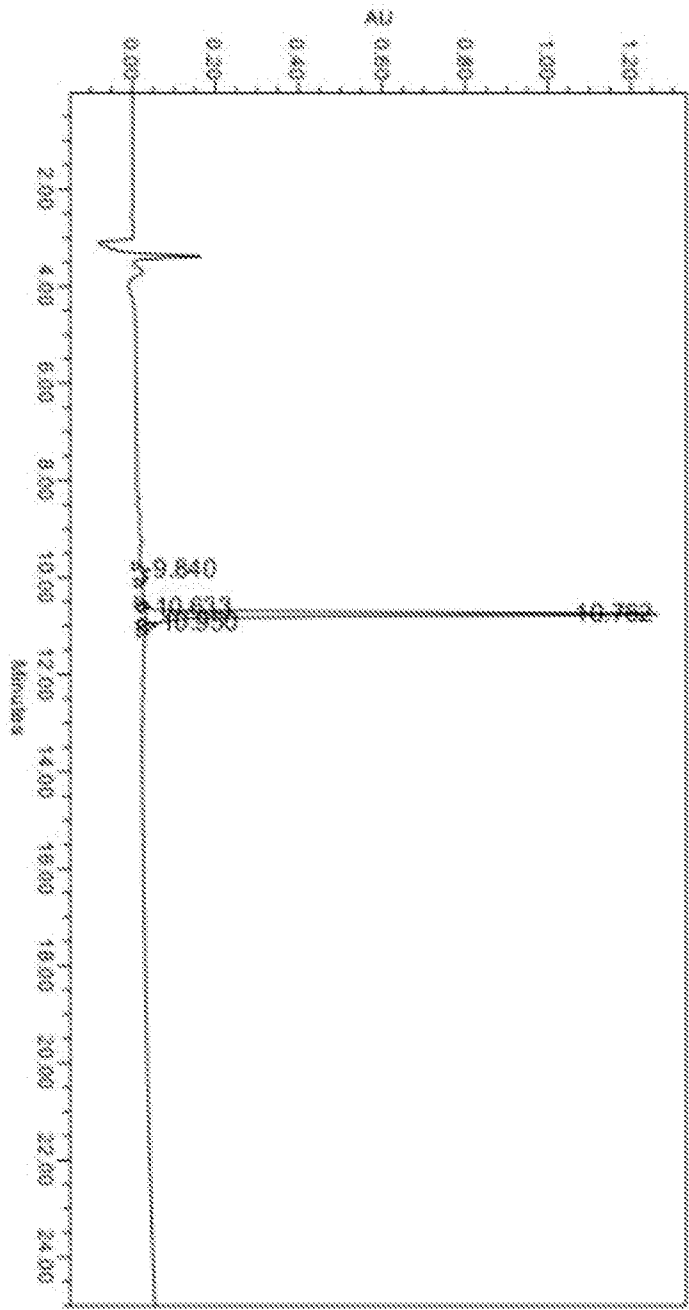


[图 7]



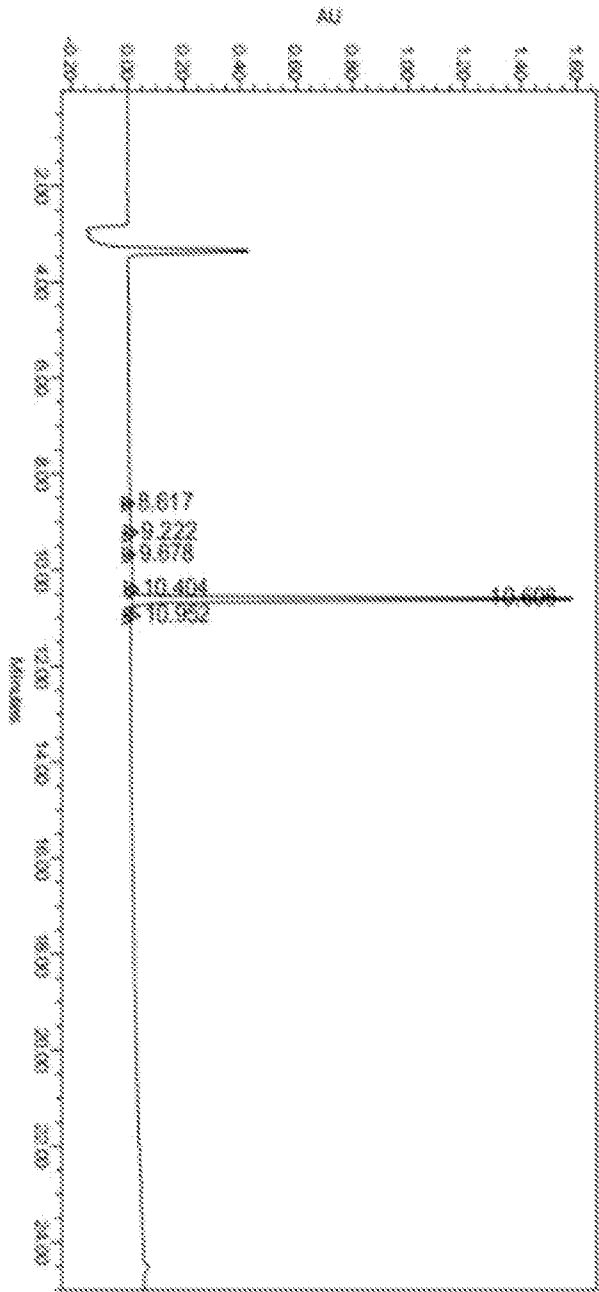
	RT	Area	% Area	Height
1	10.553	23007	0.97	3755
2	11.083	50751	2.14	9999
3	11.230	2260922	95.37	411034
4	11.440	36001	1.52	4774

[图 8]



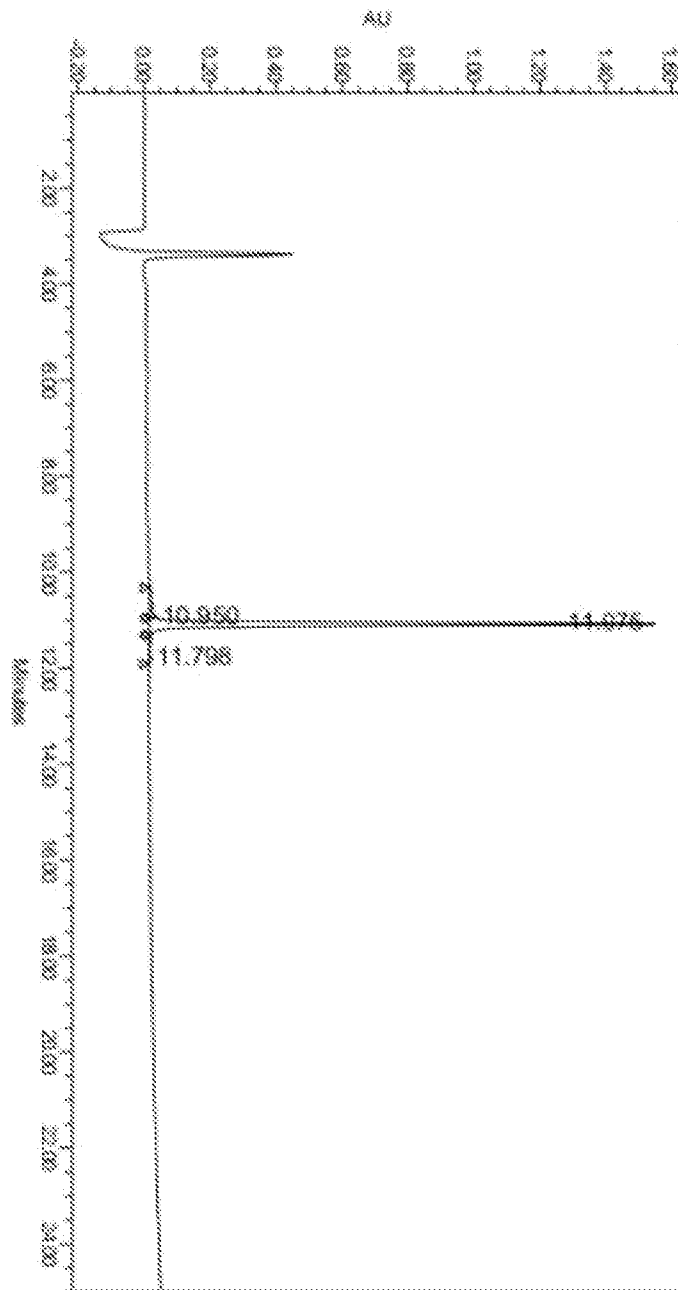
	RT	Area	% Area	Height
1	9.840	122905	1.72	16259
2	10.633	44707	0.63	11767
3	10.762	6832504	95.82	1230051
4	10.950	130742	1.83	23719

[图 9]



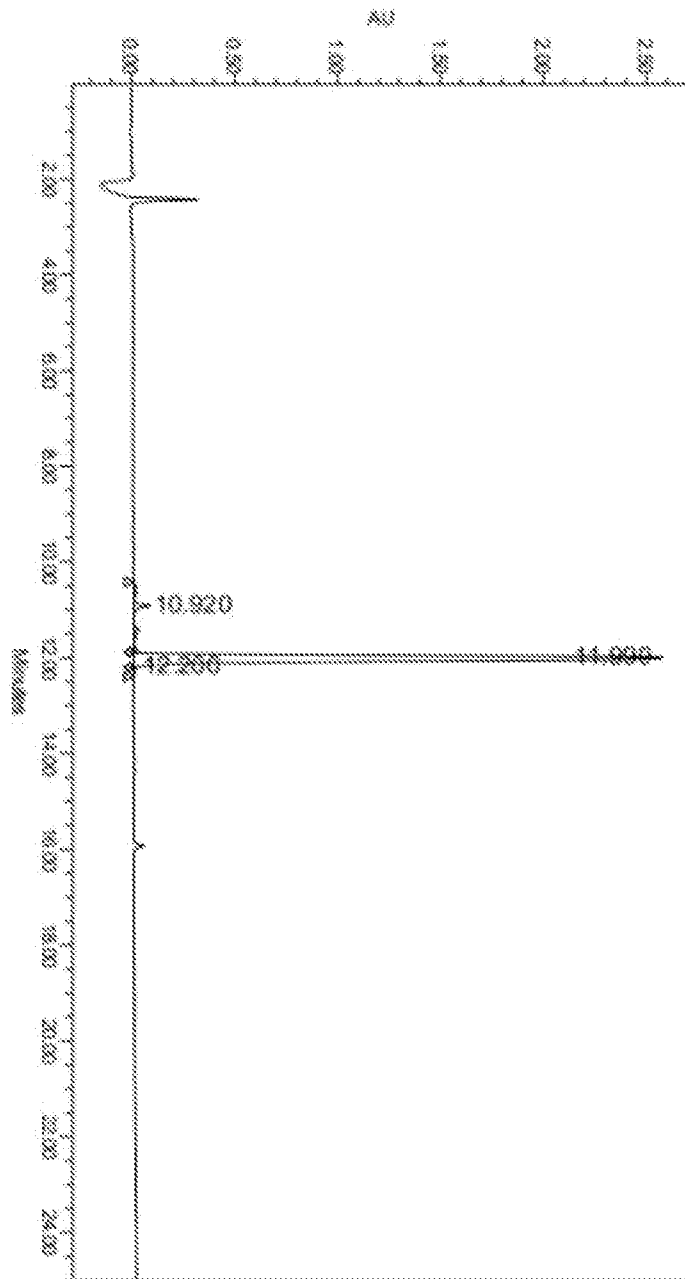
	RT	Area	% Area	Height
1	8.617	44356	0.51	11620
2	9.222	89604	1.03	19759
3	9.676	43203	0.50	9983
4	10.404	115142	1.33	18907
5	10.606	8242285	95.07	1563731
6	10.952	135052	1.56	29171

[图 10]



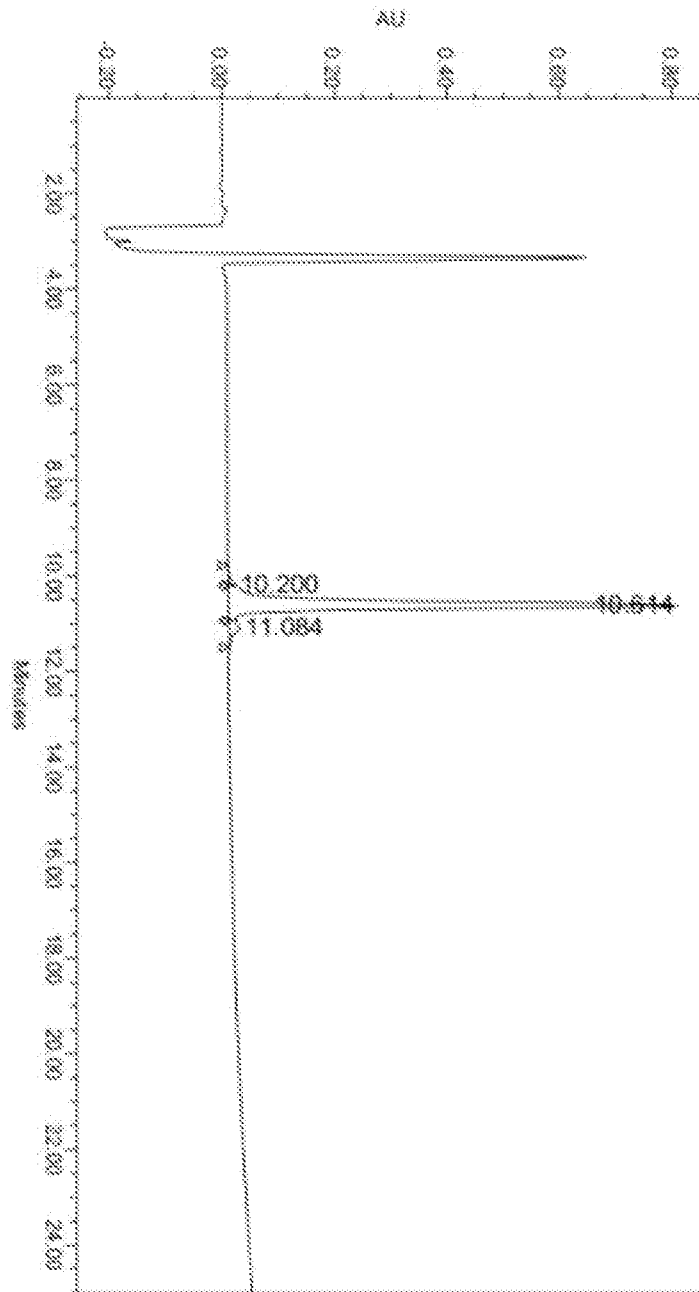
	RT	Area	% Area	Height
1	10.950	289704	3.42	26834
2	11.075	8077607	95.43	1545709
3	11.798	96901	1.14	8123

[图 11]



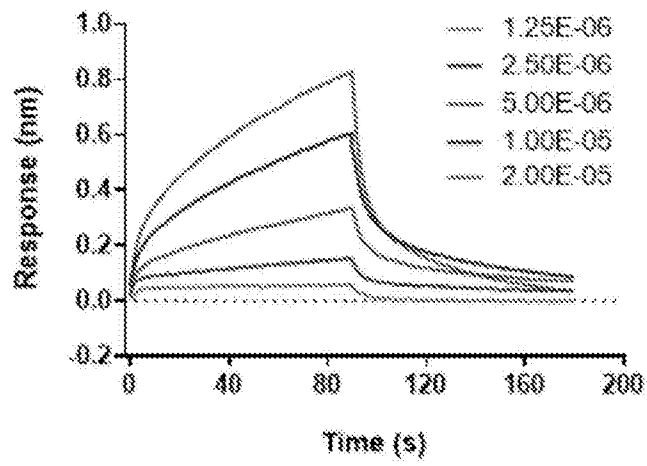
	RT	Area	% Area	Height
1	10.920	791833	3.74	73731
2	11.999	26298017	95.95	2580230
3	12.200	64143	0.30	20011

[图 12]

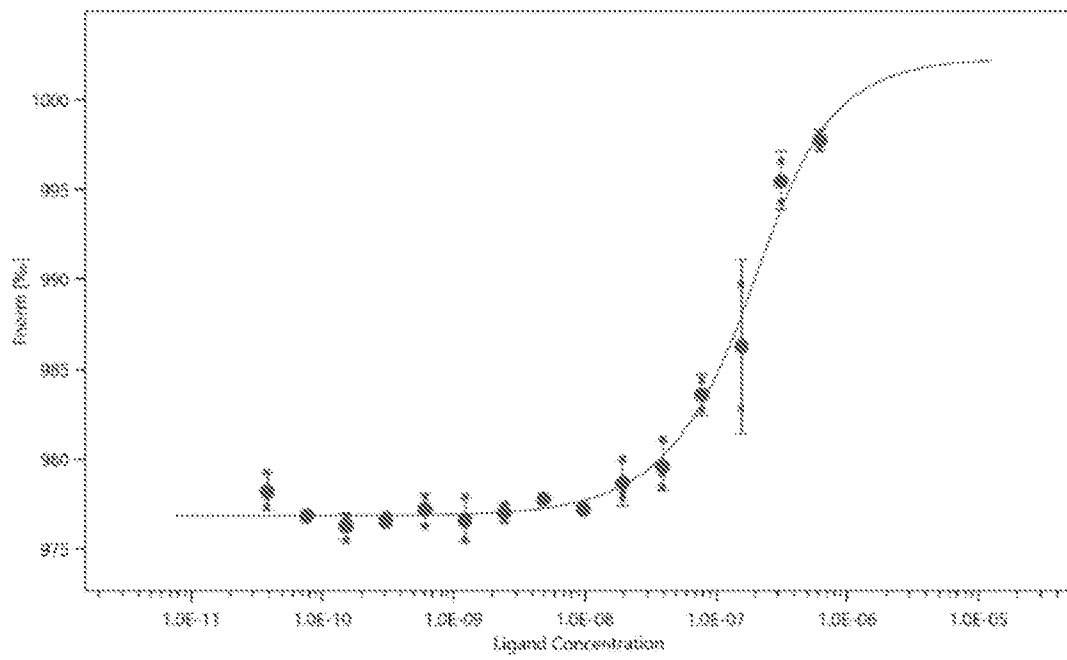


	RT	Area	% Area	Height
1	10.200	76062	0.65	12126
2	10.614	8611326	95.83	796805
3	11.084	298454	3.32	19062

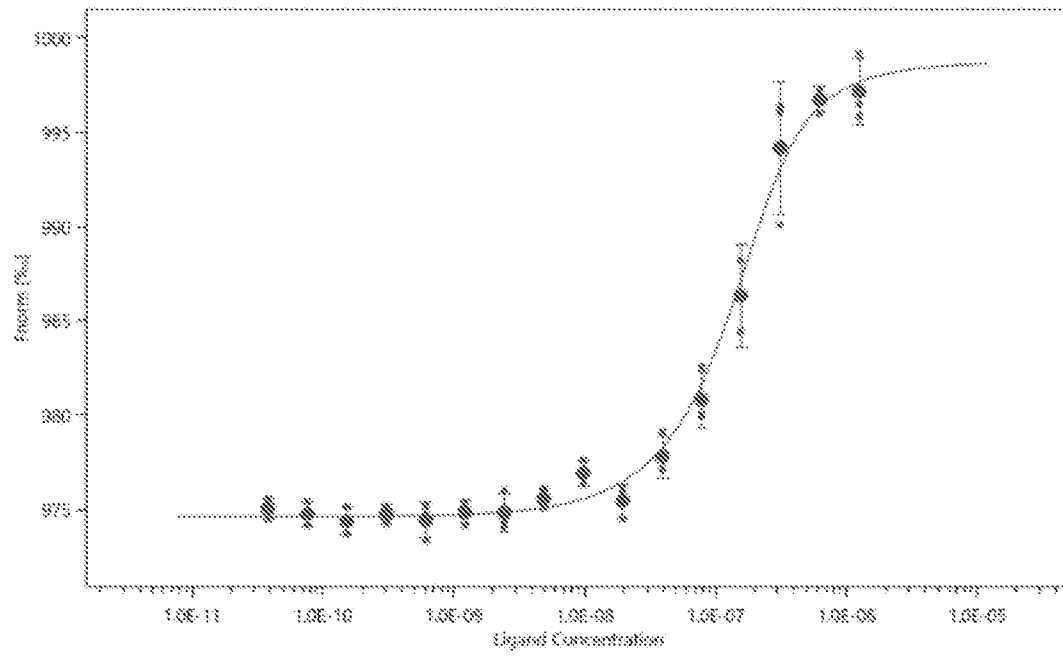
[图 13]



[图 14]



[图 15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K7/08(2006.01)i; A61K38/10(2006.01)i; A61P27/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT; ENTXTC; VCN; CJFD; DWPI; CNKI; WFNPL; NPTXT; NPABS; Web of Science; STNext; 读秀, DUXIU: 补体, 环肽, 环状, 坎普他汀, 氨基哌啶, 氨基异丁酸, 2NaI, 5F-Trp, aminoisobutyric, aminopiperidine, PIP, AIB, Cyclic, disulfide, HRCT, 2-naphthyl-alanine, 5-fluoro-dl-tryptophan, Compstatin, 序列检索, sequence search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007044668 A2 (POTENTIA PHARMACEUTICALS, INC. et al.) 19 April 2007 (2007-04-19) description, table 1	1-18
A	CN 116209671 A (ZEALAND PHARMA III, INC.) 02 June 2023 (2023-06-02) abstract	1-18
A	US 2023192770 A1 (ZP SPV 3 K/S) 22 June 2023 (2023-06-22) abstract	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2024

Date of mailing of the international search report

23 September 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/100500

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/100500

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2007044668	A2	19 April 2007	JP	2016026178	A	12 February 2016
				JP	6305382	B2	04 April 2018
				JP	2013173754	A	05 September 2013
				JP	2017226666	A	28 December 2017
				DK	1951279	T3	31 July 2017
				PL	1951279	T3	29 December 2017
				BRPI	0617186	A2	19 July 2011
				IL	190695	A0	03 November 2008
				IL	190695	A	31 October 2017
				JP	2009511496	A	19 March 2009
				JP	5345849	B2	20 November 2013
				CA	2625206	A1	19 April 2007
				CA	2625206	C	07 December 2021
				MX	351152	B	04 October 2017
				AU	2006302212	A1	19 April 2007
				AU	2006302212	B2	20 December 2012
				EP	1951279	A2	06 August 2008
				EP	1951279	B1	12 April 2017
				WO	2007044668	A3	17 January 2008
				EP	2662089	A2	13 November 2013
				EP	2662089	A3	19 February 2014
CN	116209671	A	02 June 2023	IL	299870	A	01 March 2023
				EP	4182023	A1	24 May 2023
				CA	3185730	A1	20 January 2022
				CO	2023001411	A2	16 February 2023
				WO	2022013374	A1	20 January 2022
				AU	2021309548	A1	23 February 2023
				JP	2023538807	A	12 September 2023
				US	2023287051	A1	14 September 2023
				MX	2023000679	A	18 April 2023
				KR	20230039718	A	21 March 2023
US	2023192770	A1	22 June 2023	CA	3091993	A1	06 September 2019
				RU	2020128624	A	28 March 2022
				CO	2020011027	A2	10 December 2020
				BR	112020017385	A2	15 December 2020
				JP	2021515759	A	24 June 2021
				PE	20201254	A1	16 November 2020
				TW	202000686	A	01 January 2020
				MX	2020008902	A	03 December 2020
				US	11965039	B2	23 April 2024
				SG	11202008177	WA	29 September 2020
				AU	2019228639	A1	17 September 2020
				WO	2019166411	A1	06 September 2019
				KR	20200135797	A	03 December 2020
				EP	3759120	A1	06 January 2021
				IL	276877	A	29 October 2020
				CL	2020002197	A1	05 March 2021

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☐ 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交 (细则13之三.1(a)) ,
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☒ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

A. 主题的分类

C07K7/08(2006.01)i; A61K38/10(2006.01)i; A61P27/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07K A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTEXT; ENTXTC; VCN; CJFD; DWPI; CNKI; WFNPL; NPTXT; NPABS; Web of Science; STNext; 读秀: 补体, 环肽, 环状, 坎普他汀, 氨基哌啶, 氨基异丁酸, 2NaI, 5F-Trp, aminoisobutyric, aminopiperidine, PIP, AIB, Cyclic, disulfide, HRCT, 2-naphthyl-alanine, 5-fluoro-dl-tryptophan, Compstatin, 序列检索

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2007044668 A2 (POTENTIA PHARMACEUTICALS INC等) 2007年4月19日 (2007 - 04 - 19) 说明书表1	1-18
A	CN 116209671 A (西兰制药第三特殊目的公司) 2023年6月2日 (2023 - 06 - 02) 说明书摘要	1-18
A	US 2023192770 A1 (ZP SPV 3 K/S) 2023年6月22日 (2023 - 06 - 22) 说明书摘要	1-18

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“p” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年9月12日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月23日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

齐洁

电话号码 (+86) 0512-88996496

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/100500

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2007044668	A2	2007年4月19日	JP	2016026178	A	2016年2月12日
				JP	6305382	B2	2018年4月4日
				JP	2013173754	A	2013年9月5日
				JP	2017226666	A	2017年12月28日
				DK	1951279	T3	2017年7月31日
				PL	1951279	T3	2017年12月29日
				BR - PI	0617186	A2	2011年7月19日
				IL	190695	A0	2008年11月3日
				IL	190695	A	2017年10月31日
				JP	2009511496	A	2009年3月19日
				JP	5345849	B2	2013年11月20日
				CA	2625206	A1	2007年4月19日
				CA	2625206	C	2021年12月7日
				MX	351152	B	2017年10月4日
				AU	2006302212	A1	2007年4月19日
				AU	2006302212	B2	2012年12月20日
				EP	1951279	A2	2008年8月6日
				EP	1951279	B1	2017年4月12日
				WO	2007044668	A3	2008年1月17日
				EP	2662089	A2	2013年11月13日
				EP	2662089	A3	2014年2月19日
CN	116209671	A	2023年6月2日	IL	299870	A	2023年3月1日
				EP	4182023	A1	2023年5月24日
				CA	3185730	A1	2022年1月20日
				CO	2023001411	A2	2023年2月16日
				WO	2022013374	A1	2022年1月20日
				AU	2021309548	A1	2023年2月23日
				JP	2023538807	A	2023年9月12日
				US	2023287051	A1	2023年9月14日
				MX	2023000679	A	2023年4月18日
				KR	20230039718	A	2023年3月21日
US	2023192770	A1	2023年6月22日	CA	3091993	A1	2019年9月6日
				RU	2020128624	A	2022年3月28日
				CO	2020011027	A2	2020年12月10日
				BR	112020017385	A2	2020年12月15日
				JP	2021515759	A	2021年6月24日
				PE	20201254	A1	2020年11月16日
				TW	202000686	A	2020年1月1日
				MX	2020008902	A	2020年12月3日
				US	11965039	B2	2024年4月23日
				SG	11202008177	WA	2020年9月29日
				AU	2019228639	A1	2020年9月17日
				WO	2019166411	A1	2019年9月6日
				KR	20200135797	A	2020年12月3日
				EP	3759120	A1	2021年1月6日
				IL	276877	A	2020年10月29日
				CL	2020002197	A1	2021年3月5日