



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101854916 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 06

(21) 申请号 200880115155. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 10. 02

A61K 9/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/52 (2006. 01)

60/976, 919 2007. 10. 02 US

A61K 38/08 (2006. 01)

61/026, 460 2008. 02. 05 US

A61K 38/10 (2006. 01)

A61P 27/02 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/078593 2008. 10. 02

(87) PCT申请的公布数据

W02009/046198 EN 2009. 04. 09

(71) 申请人 博泰迪亚制药公司

地址 美国肯塔基州

(72) 发明人 塞德里克·弗朗索瓦

帕斯卡尔·德沙特莱 保罗·奥尔森

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 王允方

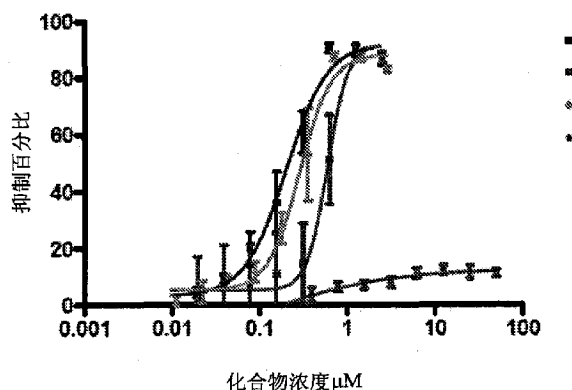
权利要求书 5 页 说明书 51 页 附图 2 页

(54) 发明名称

由凝胶持续递送坎普他汀类似物

(57) 摘要

本发明提供坎普他汀 (compstatin) 类似物以及任选地另一活性剂的持续递送, 其是通过从将含有所述坎普他汀类似物的液体溶液投予哺乳动物个体体内的血管外位置 (例如玻璃体腔) 所形成的宏观凝胶状沉积物释放来进行。



1. 一种治疗补体介导的病症的方法,其包含以下步骤:将包含有效量的坎普他汀(compstatin)类似物的液体组合物投予个体的血管外位置,其中所述有效量足以在所述血管外位置内形成含有所述坎普他汀类似物的离散的宏观凝胶状结构。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间而减小,但在至少2周内仍易于检测到。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间而减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,持续至少2周。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间而减小,但在至少3个月内仍易于检测到。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间而减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,持续至少3个月。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间而减小,并释放出活性形式的所述坎普他汀类似物,以在所述血管外位置或邻近组织内达到所述坎普他汀类似物的治疗浓度,持续至少2周。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间而减小,并释放出活性形式的所述坎普他汀类似物,以在所述血管外位置或邻近组织内达到所述坎普他汀类似物的治疗浓度,持续至少3个月。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述坎普他汀类似物包含肽,所述肽的序列包含选自 SEQ ID NO:3、4、5、6 和 7 组成的群组的序列。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO:8 的至少100倍。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO:8 的至少200倍。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO:14、21、28、29、30、31、32、33、34 和 36。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO:28、32 和 34。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述液体组合物中所述坎普他汀类似物的量介于1mg/ml与50mg/ml之间。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述液体组合物中所述坎普他汀类似物的量介于2mg/ml与25mg/ml之间。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中将介于50 μ g与5000 μ g之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中将介于150 μ g与2000 μ g之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中将介于400 μ g与1500 μ g之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中以介于25 μ l与125 μ l之间的体积将所述坎普他汀类似物投予玻璃体腔。

19. 根据权利要求 1 所述的方法,其中以约 50 μ l 的体积将所述坎普他汀类似物授予玻璃体腔。

20. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述个体患有年龄相关性黄斑变性,并且所述液体组合物是授予玻璃体腔。

21. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述液体组合物进一步包含有效量的第二治疗剂。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述第二治疗剂是补体抑制剂、血管生成抑制剂、类固醇、消炎剂、抗感染剂或镇痛剂。

23. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述组合物是经玻璃体内注射授予。

24. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述组合物包含多个微米粒子或纳米粒子。

25. 一种凝胶状结构,其包含坎普他汀类似物和至少一种通常存在于个体的血管外位置的内源性多肽。

26. 根据权利要求 25 所述的凝胶状结构,其中所述血管外位置选自自由以下组成的群组:玻璃体腔、结膜下腔、筋膜下腔(sub-Tenon' s space)、视网膜下腔、滑膜腔和脑脊髓腔。

27. 一种包含坎普他汀类似物的液体组合物,其中所述组合物的特征在于,其当授予哺乳动物个体的玻璃体腔内时,形成宏观凝胶状结构。

28. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足量存在,以当通过玻璃体内注射授予所述个体的玻璃体腔时,形成离散的宏观凝胶状结构。

29. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间而减小,但在至少 2 周内仍易于检测到。

30. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间而减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,持续至少 2 周。

31. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间而减小,但在至少 3 个月内仍易于检测到。

32. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间而减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,持续至少 3 个月。

33. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间而减小,但在至少 6 个月内仍易于检测到。

34. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间而减小,并释放出活性坎普他汀类似物,持续至少 6 个月。

35. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间而减小,并释放出活性形式的所述坎普他汀类似物,以便在所述玻璃体腔或邻近组织内达到所述坎普他汀类似物的治疗浓度,持续至少 2 周。

36. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足以形成宏观

凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间而减小,并释放出活性形式的所述坎普他汀类似物,以便在所述玻璃体腔或邻近组织内达到所述坎普他汀类似物的治疗浓度,持续至少 3 个月。

37. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物包含肽,所述肽的序列包含选自 SEQ ID NO :3、4、5、6 和 7 组成的群组的序列。

38. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的活性是 SEQ IDNO :8 的至少 100 倍。

39. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的活性是 SEQ IDNO :8 的至少 200 倍。

40. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的序列包含选自 SEQ ID NO :14、21、28、29、30、31、32、33、34 和 36 的序列。

41. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的序列包含选自 SEQ ID NO :28、32 和 34 的序列。

42. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的序列包含 SEQ IDNO :28。

43. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的序列包含 SEQ IDNO :32。

44. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的序列包含 SEQ IDNO :34。

45. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述液体组合物中所述坎普他汀类似物的量介于 1mg/ml 与 50mg/ml 之间。

46. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述液体组合物中所述坎普他汀类似物的量介于 3mg/ml 与 25mg/ml 之间。

47. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物含有介于 150 μ g 与 5000 μ g 之间的坎普他汀类似物。

48. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物含有介于 250 μ g 与 2000 μ g 之间的坎普他汀类似物。

49. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物含有介于 400 μ g 与 1500 μ g 之间的坎普他汀类似物。

50. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物的体积介于 25 μ l 与 125 μ l 之间。

51. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物在介于 50 μ l 与 100 μ l 之间的体积中含有介于 150 μ g 与 2000 μ g 之间的坎普他汀类似物。

52. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物基本上由存于水中的坎普他汀类似物组成。

53. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物实质上无赋形剂。

54. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物包含选自以下组成的群组的组分:多元醇和氨基酸。

55. 根据权利要求 54 所述的液体组合物,其中所述组分的存在调节所述沉积物在体内

消失的速率。

56. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物包含组氨酸。

57. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物包含缓冲剂。

58. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物包含乙酸钠。

59. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述组合物包含甘露醇。

60. 根据权利要求 27 所述的液体组合物,其中所述液体组合物进一步包含有效量的第二治疗剂。

61. 根据权利要求 60 所述的液体组合物,其中所述第二治疗剂是补体抑制剂、血管生成抑制剂、类固醇、消炎剂、抗感染剂或镇痛剂。

62. 根据权利要求 60 所述的液体组合物,其中所述第二治疗剂是抗体或抗体片段。

63. 一种制备用于在一段较长时间内递送治疗剂的组合物的方法,其包含:制备包含所述治疗剂和坎普他汀类似物的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物是以足量存在,以当将所述组合物授予哺乳动物个体的血管外位置时,形成宏观凝胶状结构。

64. 根据权利要求 63 所述的方法,其进一步包含将所述液体组合物授予哺乳动物个体体内的血管外位置。

65. 根据权利要求 63 所述的方法,其中所述血管外位置是玻璃体腔。

66. 根据权利要求 63 所述的方法,其中所述血管外位置是玻璃体腔,并且所述个体患有年龄相关性黄斑变性 (AMD)。

67. 一种治疗患有 AMD 或有患 AMD 风险的个体的方法,其包含将包含坎普他汀类似物的液体组合物直接授予所述个体的玻璃体腔,其中所述液体组合物含有足量的所述坎普他汀类似物,以在投药后形成宏观凝胶状结构。

68. 根据权利要求 67 所述的方法,其中所述坎普他汀类似物包含肽,所述肽的序列包含选自 SEQ ID NO :3、4、5、6 和 7 组成的群组的序列。

69. 根据权利要求 67 所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 100 倍。

70. 根据权利要求 67 所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 200 倍。

71. 根据权利要求 67 所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO :14、21、28、29、30、31、32、33、34 和 36。

72. 根据权利要求 67 所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO :28、32 和 34。

73. 根据权利要求 67 所述的方法,其中所述坎普他汀类似物的量介于 2mg/ml 与 20mg/ml 之间。

74. 根据权利要求 67 所述的方法,其中将介于 100 μ g 与 2,000 μ g 之间的坎普他汀类似物授予眼睛。

75. 根据权利要求 67 所述的方法,其中将介于 250 μ g 与 1,500 μ g 之间的坎普他汀类似物授予眼睛。

76. 根据权利要求 67 所述的方法,其中将介于 400 μ g 与 1,200 μ g 之间的坎普他汀类似物授予眼睛。

77. 根据权利要求 67 所述的方法,其中所述液体组合物进一步包含血管生成抑制剂。

78. 一种包含坎普他汀类似物 and 水的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的浓度介于 3mg/ml 与 50mg/ml 之间。

79. 根据权利要求 78 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的浓度介于 5mg/ml 与 30mg/ml 之间。

80. 根据权利要求 78 所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的浓度介于 8mg/ml 与 25mg/ml 之间。

81. 根据权利要求 78 至 80 中任一权利要求所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物包含选自 SEQ ID NO :3、4、5、6 和 7 组成的群组的肽。

82. 根据权利要求 78 至 80 中任一权利要求所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 100 倍。

83. 根据权利要求 78 至 80 中任一权利要求所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 200 倍。

84. 根据权利要求 78 至 80 中任一权利要求所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO :14、21、28、29、30、31、32、33、34 和 36。

85. 根据权利要求 78 至 80 中任一权利要求所述的液体组合物,其中所述坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO :28、32 和 34。

86. 根据权利要求 78 至 80 中任一权利要求所述的液体组合物,其中所述组合物基本上由所述坎普他汀类似物和水组成。

87. 根据权利要求 78 至 80 中任一权利要求所述的液体组合物,其中所述组合物进一步包含选自氨基酸和糖醇的赋形剂。

由凝胶持续递送坎普他汀类似物

[0001] 相关申请案的交叉参考

[0002] 本申请案主张 2007 年 10 月 2 日申请的美国临时专利申请案第 USSN 60/976,919 号和 2008 年 2 月 5 日申请的第 USSN 61/026,460 号的优先权和权益。这些申请案的内容都是以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 补体系统包含 30 多种血清蛋白和细胞蛋白,这些血清蛋白和细胞蛋白涉及三种主要路径,称为经典路径、旁路路径和凝集素路径。经典路径通常是由抗原与 IgM 或 IgG 抗体的复合物结合至 C1 而触发(但某些其它激活因子也可以启动此路径)。激活的 C1 裂解 C4 和 C2,除 C2a 和 C2b 之外,还产生 C4a 和 C4b。C4b 与 C2a 组合形成 C3 转化酶,其裂解 C3,形成 C3a 和 C3b。C3b 结合至 C3 转化酶,产生 C5 转化酶,其将 C5 裂解成 C5a 和 C5b。C3a、C4a 和 C5a 是过敏毒素,并且介导急性炎症反应中的多种反应。C3a 和 C5a 还是趋化因子,其吸引免疫系统细胞,例如嗜中性粒细胞。

[0004] 旁路路径是由微生物表面和各种复合多糖启动。在此路径中,C3 裂解(以低水平自发发生)所产生的 C3b 与例如细胞表面上的靶结合,并与因子 B 形成复合物,所述复合物随后经因子 D 裂解,产生 C3 转化酶。C3 裂解以及另一分子 C3b 与 C3 转化酶结合,产生 C5 转化酶。此路径中的 C3 和 C5 转化酶受 CR1、DAF、MCP 和 fH 调控。这些蛋白质的作用模式涉及衰变加速活性(即,离解转化酶的能力)、充当因子 I 降解 C3b 或 C4b 的辅因子的能力,或二者。

[0005] 两种路径中产生的 C5 转化酶裂解 C5,产生 C5a 和 C5b。接着 C5b 结合至 C6、C7 和 C8,形成 C5b-8,其催化 C9 聚合,形成 C5b-9 膜攻击复合物(membrane attack complex, MAC)。MAC 本身插入靶细胞膜中,并引起细胞溶解(cell lysis)。细胞膜上少量的 MAC 可能造成除细胞死亡外的多种后果。

[0006] 凝集素补体路径是由甘露糖结合凝集素(mannose-binding lectin, MBL)和 MBL 相关丝氨酸蛋白酶(MBL-associated serine protease, MASP)结合至碳水化合物而启动。MBL-1 基因(在人类中,称为 LMAN-1)编码位于内质网与高尔基体(Golgi)之间的中间区中的 I 型内在膜蛋白。MBL-2 基因编码血清中所见的可溶性甘露糖结合蛋白。在人凝集素路径中, MASP-1 和 MASP-2 涉及于 C4 和 C2 的蛋白水解,产生上文所述的 C3 转化酶。

[0007] 补体活性受称作补体调节蛋白(complement control protein, CCP)或补体激活调控蛋白(regulators of complement activation, RCA)的各种哺乳动物蛋白调控(美国专利第 6,897,290 号)。这些蛋白质的配体特异性和补体抑制机制不同。它们可加速转化酶的正常衰变,和/或充当因子 I 的辅因子,以将 C3b 和/或 C4b 酶促裂解成较小的片段。CCP 的特征是存在多个(通常 4 到 56 个)同源基元,称为短一致重复序列(short consensus repeat, SCR)、补体调节蛋白(CCP)模组或 SUSHI 结构域。这些结构域是由约 50 到 70 个氨基酸、通常约 60 个氨基酸组成,以包括四个以二硫键键结的半胱氨酸(两个二硫键)、脯氨酸、色氨酸和许多疏水残基的保守基元为特征。CCP 家族包括补体受体 1

型 (complement receptor type 1, CR1 ;C3b :C4b 受体)、补体受体 2 型 (CR2)、膜辅蛋白 (membrane cofactor protein, MCP ;CD46)、衰变加速因子 (decay-accelerating factor, DAF)、补体因子 H (complement factor H, fH) 和 C4b 结合蛋白 (C4bp)。CD59 是一种结构与 CCP 无关的膜结合补体调控蛋白。

[0008] 关于补体系统和其激活路径的进一步详情见于以下参考文献中 :SC 马克德斯 (Makrides, SC), 药学评述 (Pharm Rev.), 50(1) :59-87, 1998 ;MK 利斯瓦斯基 (Lisczewski, MK) 和 JP 安特金森 (Atkinson, JP), 健康与疾病相关性人补体系统 (The Human Complement System in Health and Disease), JE 瓦兰纳奇斯 (Volanakis, JE) 和 MM 弗兰克 (Frank, MM) 编, 莱克公司 (Dekker), 纽约 (New York), 第 149-66 页, 1998 ;库比免疫学 (Kuby Immunology), 2000 ;W.E. 保罗 (Paul, W.E.), 免疫学基础 (Fundamental Immunology), 利平科特·威廉姆斯 & 威尔金斯工作室 (Lippincott Williams & Wilkins) ;第 5 版, 2003 ;和 MJ. 瓦普特 (Walport MJ.), 补体 - 两部分中的第一部分 (Complement. First of two parts.) 新英格兰医学杂志 (N Engl J Med.), 344(14) :1058-66, 2001。

[0009] 尽管补体激活在先天性和适应性免疫系统中起重要作用, 但人们越来越认识到补体系统涉及于多种局部缺血性、炎症性和自身免疫性疾病期间的组织损伤 (SC 马克德斯 (Makrides, SC), 药学评述 (Pharm Rev.), 50(1) :59-87, 1998 ;MK 利斯瓦斯基 (Lisczewski, MK) 和 JP 安特金森 (Atkinson, JP), 健康与疾病相关性人补体系统 (The Human Complement System in Health and Disease), JE 瓦兰纳奇斯 (Volanakis, JE) 和 MM 弗兰克 (Frank, MM) 编, 莱克公司 (Dekker), 纽约 (New York), 第 149-66 页, 1998)。已提出补体抑制作为许多此类疾病的治疗策略。坎普他汀 (compstatin) 和其类似物是环状肽, 其结合至 C3 并抑制其激活。此项技术中需要授予坎普他汀类似物的新组合物和方法。此项技术中还需要改进的药物递送系统。

发明内容

[0010] 本发明提供对哺乳动物个体持续释放授予坎普他汀类似物的新颖调配物和方法。一方面, 本发明提供一种液体组合物, 其包含足量的坎普他汀类似物, 以当引入到哺乳动物个体体内的血管外位置中时, 形成宏观凝胶状结构。在本发明某些实施例中, 血管外位置是玻璃体腔。在其它实施例中, 血管外位置是结膜下腔。在一些实施例中, 血管外位置是球后、结膜下、筋膜下 (sub-Tenon' s) 或视网膜下腔。在本发明某些实施例中, 坎普他汀类似物的活性是坎普他汀活性的至少 100 倍。在本发明某些实施例中, 坎普他汀类似物的活性是坎普他汀活性的至少 150 倍。在本发明某些实施例中, 坎普他汀类似物的活性是坎普他汀活性的至少 200 倍。在本发明某些实施例中, 坎普他汀类似物的活性是坎普他汀活性的至少 250 倍。在涉及对个体投药的本发明任何方法的某些实施例中, 本发明个体是非人类灵长类动物。在涉及对个体投药的本发明任何方法的某些实施例中, 个体是人类。

[0011] 在一些实施例中, 液体组合物包含坎普他汀类似物以及除所述坎普他汀类似物外的第二活性剂。第二活性剂可以是多肽、肽、非肽小分子、核酸等。在一些实施例中, 第二活性剂是补体抑制剂。在一些实施例中, 第二活性剂是血管生成抑制剂。

[0012] 本发明进一步提供一种治疗哺乳动物个体的补体介导的病症的方法, 其包含对个体授予任何上述液体组合物。一方面, 本发明提供一种治疗补体介导的病症的方法, 其包含

以下步骤:将包含有效量坎普他汀类似物的液体组合物授予个体体内的血管外位置,其中所述有效量足以在所述血管外位置内形成含有坎普他汀类似物的宏观凝胶状结构。在某些实施例中,所述有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间减小,但在至少 2 周内仍易于检测到。在某些实施例中,宏观凝胶状结构的尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,以便在血管外位置中达到治疗浓度,持续至少 2 周、至少 4 周、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月或至少 12 个月。在某些实施例中,宏观凝胶状结构在至少 2 周、至少 4 周、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月或至少 12 个月,例如长达约 18 个月或约 24 个月内仍易于检测到。“活性形式”的坎普他汀类似物保留结合至 C3 并抑制其裂解的能力。

[0013] 在一些实施例中,将组合物授予患有年龄相关性黄斑变性 (AMD) 或有患 AMD 风险的个体的玻璃体腔。在一些实施例中,个体患有干性 AMD 或有患干性 AMD 的风险。在一些实施例中,个体患有糖尿病性视网膜病变、葡萄膜炎、青光眼或视网膜色素变性,或有患所述疾病的风险。

[0014] 在一些实施例中,将组合物授予个体的鞘内腔。个体可能患有脊髓损伤或慢性疼痛。

[0015] 在一些实施例中,将组合物授予个体的颅腔,例如脑室内。个体可能患有多发性硬化、帕金森氏病 (Parkinson' s disease)、阿尔茨海默氏病 (Alzheimer' s disease) 或中风。

[0016] 在一些实施例中,将组合物授予个体的滑膜腔或滑膜囊。个体可能患有关节炎,例如类风湿性关节炎、银屑病关节炎、赖特综合症 (Reiter' s syndrome)、幼年型关节炎或痛风。

[0017] 另一方面,还提供制备本发明组合物的方法。

[0018] 在一些方面中,本发明提供一种治疗补体介导的病症的方法,其包含以下步骤:将包含有效量坎普他汀类似物的液体组合物授予个体的血管外位置,其中所述有效量足以在所述血管外位置内形成含有坎普他汀类似物的离散、宏观凝胶状结构。在一些实施例中,有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间减小,但在至少 2 周内仍易于检测到。在一些实施例中,有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,持续至少 2 周。在一些实施例中,有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间减小,但在至少 3 个月内仍易于检测到。在一些实施例中,有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,持续至少 3 个月。在一些实施例中,有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,以使所述坎普他汀类似物在血管外位置或邻近组织内达到治疗浓度,持续至少 2 周。在一些实施例中,有效量足以形成宏观凝胶状结构,其尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,以使所述坎普他汀类似物在血管外位置或邻近组织内达到治疗浓度,持续至少 3 个月。在一些实施例中,坎普他汀类似物包含序列包含选自 SEQ ID NO :3、4、5、6 和 7 组成的群组的序列的肽。在一些实施例中,坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 100 倍。在一些实施例中,坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 200 倍。在一些实施例中,坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO :14、21、28、29、30、31、32、33、34 和 36。在一些实施例中,坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO :28、32 和 34。

在一些实施例中,坎普他汀类似物是 SEQ ID NO:14 的肽。在一些实施例中,坎普他汀类似物是 SEQ ID NO:28 的肽。在一些实施例中,坎普他汀类似物是 SEQ ID NO:30 的肽。在一些实施例中,坎普他汀类似物是 SEQ ID NO:32 的肽。在一些实施例中,坎普他汀类似物是 SEQ ID NO:33 的肽。在一些实施例中,坎普他汀类似物是 SEQ ID NO:34 的肽。在一些实施例中,液体组合物中所述坎普他汀类似物的量介于 1mg/ml 与 50mg/ml 之间。在一些实施例中,液体组合物中所述坎普他汀类似物的量介于 2mg/ml 与 25mg/ml 之间。在一些实施例中,将介于 50 μ g 与 5000 μ g 之间量的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于 150 μ g 与 2000 μ g 之间量的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于 400 μ g 与 1500 μ g 之间量的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将约 450 μ g 坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将约 1050 μ g 坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,以介于 25 μ l 与 125 μ l 之间的体积将坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,以约 50 μ l 的体积将坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,以约 75 μ l 的体积将坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,个体患有年龄相关性黄斑变性,并且液体组合物是投予玻璃体腔。在一些实施例中,液体组合物进一步包含有效量的第二治疗剂。在一些实施例中,第二治疗剂是补体抑制剂、血管生成抑制剂、类固醇、消炎剂、抗感染剂或镇痛剂。在一些实施例中,组合物经玻璃体内注射投予。在一些实施例中,组合物包含多个微米粒子或纳米粒子。微米粒子或纳米粒子可包含治疗剂,其可(但未必)为坎普他汀类似物,并且当其坎普他汀类似物时,其可(但未必)与形成凝胶的坎普他汀类似物相同。在一些实施例中,至少一些微米粒子或纳米粒子在投药后被截留在凝胶中。

[0019] 本发明提供一种凝胶状结构,其包含坎普他汀类似物和至少一种通常存在于个体的血管外位置中的内源性多肽。在一些实施例中,所述多肽是存在于选自以下组成的群组的血管外位置中的多肽:玻璃体腔、结膜下腔、筋膜下腔、视网膜下腔、滑膜腔和脑脊髓腔。

[0020] 本发明提供一种包含坎普他汀类似物的液体组合物,其中所述组合物的特征在于,其当投予哺乳动物个体的玻璃体腔内时形成宏观凝胶状结构。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足量存在,以在经玻璃体内注射(例如,体积为约 50 μ l 到约 100 μ l)投予个体的玻璃体腔时,形成离散的宏观凝胶状结构。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间减小,但在至少 2 周内仍易于检测到。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,持续至少 2 周。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间减小,但在至少 3 个月内仍易于检测到。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,持续至少 3 个月。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间减小,但在至少 6 个月内仍易于检测到。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间减小,并释放出活性坎普他汀类似物,持续至少 6 个月。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,以

便使所述坎普他汀类似物在玻璃体腔或邻近组织内达到治疗浓度,持续至少 2 周。在一些实施例中,坎普他汀类似物是以足以形成宏观凝胶状结构的量存在,所述结构的尺寸随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,以便使所述坎普他汀类似物在玻璃体腔或邻近组织内达到治疗浓度,持续至少 3 个月。在一些实施例中,坎普他汀类似物包含序列包含选自 SEQ ID NO :3、4、5、6 和 7 组成的群组的序列的肽。在一些实施例中,坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 100 倍。在一些实施例中,坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 200 倍。在一些实施例中,坎普他汀类似物的序列包含选自 SEQ ID NO :14、21、28、29、30、31、32、33、34 和 36 的序列。在一些实施例中,坎普他汀类似物的序列包含选自 SEQ ID NO :28、32 和 34 的序列。在一些实施例中,坎普他汀类似物的序列包含 SEQ ID NO :28。在一些实施例中,坎普他汀类似物的序列包含 SEQ ID NO :32。在一些实施例中,坎普他汀类似物的序列包含 SEQ ID NO :34。在一些实施例中,液体组合物中所述坎普他汀类似物的量介于 1mg/ml 与 50mg/ml 之间。在一些实施例中,液体组合物中所述坎普他汀类似物的量介于 3mg/ml 与 25mg/ml 之间。在一些实施例中,组合物含有介于 150 μ g 与 5000 μ g 之间量的坎普他汀类似物。在一些实施例中,组合物含有介于 250 μ g 与 2000 μ g 之间量的坎普他汀类似物。在一些实施例中,组合物含有介于 400 μ g 与 1500 μ g 之间量的坎普他汀类似物。在一些实施例中,组合物的体积介于 25 μ l 与 125 μ l 之间。在一些实施例中,组合物在介于 50 μ l 与 100 μ l 之间的体积中含有介于 150 μ g 与 2000 μ g 量的坎普他汀类似物。在一些实施例中,组合物基本上由存于水中的坎普他汀类似物组成。在一些实施例中,组合物实质上无赋形剂。在一些实施例中,组合物包含选自糖醇和氨基酸组成的群组的组分。在一些实施例中,所述组分的存在调节沉积物在体内消失的速率。在一些实施例中,组合物包含组氨酸。在一些实施例中,组合物包含缓冲剂。在一些实施例中,组合物包含乙酸钠。在一些实施例中,组合物包含甘露醇。在一些实施例中,液体组合物进一步包含有效量的第二治疗剂。在一些实施例中,所述第二治疗剂是补体抑制剂、血管生成抑制剂、类固醇、消炎剂、抗感染剂或镇痛剂。

[0021] 本发明还提供一种制备经较长时间段递送治疗剂的组合物的方法,其包含:制备包含治疗剂和坎普他汀类似物的液体组合物,其中坎普他汀类似物是以足量存在,以在将组合物授予哺乳动物个体的血管外位置时,形成宏观凝胶状结构。在一些实施例中,所述方法进一步包含将液体组合物授予哺乳动物个体体内的血管外位置。在一些实施例中,血管外位置是玻璃体腔。在一些实施例中,血管外位置是玻璃体腔,并且个体患有 AMD。

[0022] 在一些方面中,本发明提供一种治疗患有 AMD 或有患 AMD 风险的个体的方法,其包含将包含坎普他汀类似物的液体组合物直接授予个体的玻璃体腔,其中液体组合物含有足量的坎普他汀类似物,以在投药后形成宏观凝胶状结构。在某些实施例中,坎普他汀类似物包含序列包含选自 SEQ ID NO :3、4、5、6 和 7 组成的群组的序列的肽。在某些实施例中,坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 100 倍。在某些实施例中,坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO :8 的至少 200 倍。在某些实施例中,坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO :14、21、28、29、30、31、32、33、34 和 36。在某些实施例中,坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO :28、32 和 34。在某些实施例中,坎普他汀类似物的量介于 2mg/ml 与 20mg/ml 之间。在某些实施例中,将介于 100 μ g 与 2,000 μ g 之间量的坎普他汀类似物授予眼睛。在某些实施例中,将介于 250 μ g 与 1,500 μ g 之间量的坎普他汀类似物授予眼睛。在某些实

施例中,将介于 400 μ g 与 1,200 μ g 之间量的坎普他汀类似物投予眼睛。在某些实施例中,液体组合物进一步包含血管生成抑制剂。

[0023] 本发明提供包含坎普他汀类似物和水的液体组合物,其中坎普他汀类似物的浓度介于 3mg/ml 与 50mg/ml 之间。在某些实施例中,坎普他汀类似物的浓度介于 5mg/ml 与 30mg/ml 之间。在某些实施例中,坎普他汀类似物的浓度介于 8mg/ml 与 25mg/ml 之间。在关于任何所述组合物的某些实施例中,坎普他汀类似物包含选自由 SEQ ID NO:3、4、5、6 和 7 组成的群组的肽。在关于任何所述组合物的某些实施例中,坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO:8 的至少 100 倍。在关于任何所述组合物的某些实施例中,坎普他汀类似物的活性是 SEQ ID NO:8 的至少 200 倍。在关于任何所述组合物的某些实施例中,坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO:14、21、28、29、30、31、32、33、34 和 36。在关于任何所述组合物的某些实施例中,坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO:28、32 和 34。在关于任何所述组合物的某些实施例中,组合物基本上由坎普他汀类似物和水组成。在关于任何所述组合物的某些实施例中,组合物进一步包含选自氨基酸和糖醇的赋形剂。本发明提供包含坎普他汀类似物和水的液体组合物,其中坎普他汀类似物的浓度介于 100mg/ml 与 2000mg/ml 之间,例如介于 100mg/ml 与 1000mg/ml 之间,或介于 100mg/ml 与 500mg/ml 之间,其中组合物包含改变组合物特性的组分,以致在投予血管外位置(例如玻璃体腔)后形成的凝胶降解或崩解比不存在所述组分时快。在一些实施例中,所述组分是选自糖醇和氨基酸的赋形剂。在一些实施例中,氨基酸是标准氨基酸,例如组氨酸。在一些实施例中,糖醇是甘露醇。在一些实施例中,所述组分是缓冲剂,例如乙酸钠。

[0024] 除非另作说明,否则本发明利用分子生物学、化学、细胞培养、动物养护、医学和兽医检查等标准方法,并使用技术公认的术语含义。本申请案参考多种专利和出版物。本申请案中提及的所有科技论文、书籍、专利、专利申请案和其它出版物的内容都以引用的方式并入本文中。此外,以下出版物都以引用的方式并入本文中:当前分子生物学方案(Current Protocols in Molecular Biology),当前免疫学方案(Current Protocols in Immunology),当前蛋白质科学方案(Current Protocols in Protein Science)和当前细胞生物学方案(Current Protocols in Cell Biology),均是纽约约翰威立出版公司(John Wiley & Sons, N. Y.),2002 年 7 月出版;萨姆布鲁克(Sambrook),鲁塞尔(Russell)和萨姆布鲁克,分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual),第 3 版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港(Cold Spring Harbor),2001;库比免疫学(Kuby Immunology),第 4 版,R. A. 古斯比(Goldsby, R. A.),T. J. 金迪特(Kindt, T. J.)和 B. 奥斯波尼(Osborne, B.)(编),W. H. 弗雷曼公司(W. H. Freeman),2000,古德曼和吉尔曼治疗学的药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics),第 10 版,麦格劳-希尔出版公司(McGraw Hill),2001,B. 卡祖格(Katzung, B.)(编)基础和临床药理学(Basic and Clinical Pharmacology),麦格劳-希尔/艾普顿 & 朗格公司(McGraw-Hill/Appleton & Lange);第 9 版(2003 年 12 月);古德曼和奥斯罗(Goldman & Ausiello),希氏内科学(Cecil Textbook of Medicine),第 22 版,W. B. 索恩德(W. B. Saunders),2003。在并入的任何文献与本说明书之间出现冲突或矛盾的情况下,应以本说明书(包括其任何修正)为准。除非另作说明,否则本文中使用的技术认可的氨基酸缩写。

附图说明

[0025] 图 1 显示从通过玻璃体内注射而投予强效坎普他汀类似物的兔的玻璃体取出的宏观凝胶状结构。

[0026] 图 2 显示注射强效坎普他汀类似物后 12 天（左图）和 8 周（右图）时动物的 B 超扫描图像。沉积物在注射后 12 天明显，而在 8 周后小得多，但仍能检测到。

[0027] 图 3 是经染色以显示沉积物中存在的蛋白质连同强效坎普他汀类似物的 SDS-PAGE 凝胶。也显示在注射或不注射坎普他汀类似物情况下于玻璃体内所发现的蛋白质。

[0028] 图 4 是绘示沉积物中存在的坎普他汀类似物随时间保持稳定并且保留补体抑制活性的图。蓝色方形：坎普他汀类似物（标准物质）；绿色方形：由从注射后 6 周的兔玻璃体取出的凝胶获得的坎普他汀类似物；褐色菱形：由从注射后 8 个月的兔玻璃体取出的凝胶获得的坎普他汀类似物；红色椭圆形：无活性对照肽 G8A。

[0029] 图 5 是绘示玻璃体内注射 0、450 μg 、1050 μg 或 2100 μg 化合物后 14 天所测量的食蟹猴血清和玻璃体中坎普他汀类似物的浓度的图。所有值都表示为平均值 $\pm$ 标准误差；对于每一玻璃体， $n = 4$ ，并且对于血清， $n = 8$ 。应注意，血清的实际值是所示值的 1/100，即，在同一投药剂量下，是玻璃体浓度的约 1/100。

具体实施方式

[0030] 定义

[0031] 在详细描述本发明之前，应了解，本发明不局限于特别举例说明的系统或参数，其当然可以变化。还应了解，本文所使用的术语只是出于描述本发明特定实施例的目的，而不打算以任何方式限制本发明的范围。为方便读者，提供以下定义，并且除非具体说明，否则预期所述定义与此项技术中此类术语的用法不冲突。

[0032] 术语“血管生成抑制剂”与“抗血管生成剂”在本文中可互换使用，以指能够抑制或减少一个或多个与新血管形成、生长和 / 或发育有关的过程（包括但不限于，内皮细胞增殖、内皮细胞迁移和毛细管形成）的药剂。此外，所述药剂可抑制血管中流体渗出。

[0033] 术语“拮抗剂”是指抑制（例如拮抗、减少、降低、阻断或逆转）给定分子的作用的化合物。拮抗剂能够针对特定分子的活性以一定方式起作用，使得以与所述分子的一种或多种天然作用相拮抗（例如对抗、对立、相反）的方式降低或阻断所述分子的生物活性。拮抗剂可包括（但不限于）抗体或其抗原结合片段、蛋白质、肽、核酸（例如 RNAi 剂、核糖酶和反义核酸）或小分子。

[0034] 术语“抗体”是指免疫球蛋白，或其含有能结合抗原的免疫球蛋白结构域的衍生物。抗体可以来源于任何物种，例如人类、啮齿动物、兔、山羊、鸡等。抗体可以是任一类免疫球蛋白的成员，包括以下任一人类类别：IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE，或其亚类，例如 IgG1、IgG2 等。在本发明各个实施例中，抗体是片段，例如 Fab'、F(ab')₂、scFv（单链可变）或保留抗原结合位点的其它片段，或重组产生的 scFv 片段，包括多种重组产生的片段。例如参看 T. 艾伦 (Allen, T.)，自然 - 癌症评述 (Nature Reviews Cancer)，第 2 卷，750-765，2002，和其中的参考文献。抗体可以是单价、二价或多价的。抗体可以是嵌合抗体或“人化”

抗体,其中例如啮齿动物来源的可变结构域与人类来源的恒定结构域融合,由此保留了啮齿动物抗体的特异性。就所述人类来源的结构域最初是人类合成的意义上看,其无需直接源自于人类。而是,“人类”结构域可在基因组中并入有人类免疫球蛋白基因的啮齿动物中产生。例如参看瓦格罕 (Vaughan) 等人 (1998),自然-生物技术 (Nature Biotechnology), 16 :535-539。抗体可以是部分或完全人化的。抗体可以是多克隆或单克隆抗体,但出于本发明的目的,一般优选单克隆抗体。此项技术中已知产生特异性结合几乎任何所关注分子的抗体的方法。例如,单克隆或多克隆抗体可从产生所述抗体(例如自然暴露于所述分子或其抗原片段后,或经所述分子或其抗原片段免疫后)的动物的血液或腹水纯化得到;可使用重组技术在细胞培养物或转基因生物体中产生;或可至少部分利用化学合成制备。

[0035] 除非另作说明或另外从上下文中显而易见,否则有关数字时的术语“大约”或“约”一般包括在所述数字的 $\pm 10\%$ 内;在一些实施例中 $\pm 5\%$ 内;在一些实施例中 $\pm 1\%$ 内;在一些实施例中 $\pm 0.5\%$ 内的数字(所述数字不允许超过可能值的 100%的情形除外)。

[0036] “生物相容性”的用法与其在此项技术中的用法一致,并且指在体外对细胞实质上无毒的物质,例如在某些实施例中,如果其添加到培养中的细胞的量接近所预期的体内使用的量,则引起小于或等于 20% 的细胞死亡。如果一种物质以所用的量在所用的位置对接受者的细胞和组织实质上无毒,并且也不会对接受者的身体造成或引起显著有害或不利影响,例如免疫或炎症反应、形成不可接受的瘢痕组织等,则认为此物质对于所述接受者是生物相容的。

[0037] “生物可降解”意思指一种物质能够例如通过在生理条件下水解,通过天然生物过程(例如细胞内或体内存在的酶的作用)等,在细胞内或个体体内的细胞外区室内物理和/或化学分解,而形成可被代谢并且任选再使用和/或排泄或以其它方式处置的较小化学物质。“生物可降解”物质的范围内包括在生理条件下消蚀、崩解或退化成较小片段的物质,例如可溶性分子或超分子复合物。生物可降解物质优选为生物相容性的。

[0038] “生物大分子”是一种由生物系统中所见的一种类型的较小亚基构成的大分子。生物大分子的实例包括多肽、核酸和多糖。通常,生物大分子含有至少 3 个亚基(例如氨基酸、核苷、单糖等)。生物大分子可以(但未必)是天然存在的多肽、核酸或多糖。生物大分子可经修饰,例如其可与例如合成聚合物等非生物分子连结(conjugated)。

[0039] “补体组分”或“补体蛋白”是补体系统激活所涉及或参与一种或多种补体介导的活性的分子。经典补体路径的组分包括例如 C1q、C1r、C1s、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9 和 C5b-9 复合物(也称为膜攻击复合物(MAC)),和任何上述的活性片段或酶促裂解产物(例如 C3a、C3b、C4a、C4b、C5a 等)。旁路路径的组分包括例如因子 B、因子 D、因子 I 和备解素(properdin)。凝集素路径的组分包括例如 MBL2、MASP-1 和 MASP-2。补体组分还包括细胞结合受体作为可溶性补体组分。此类受体包括例如 C5a 受体(C5aR)、C3a 受体(C3aR)、补体受体 1(CR1)、补体受体 2(CR2)、补体受体 3(CR3) 等。应理解,术语“补体组分”不打算包括充当补体激活“触发剂”的那些分子和分子结构,例如抗原-抗体复合物、微生物或人工表面上所见的外来结构等。

[0040] “补体调控蛋白”是调控补体活性所涉及的蛋白质,例如哺乳动物蛋白补体因子 H(CFH)。

[0041] “补体调节蛋白”是包含多个 SCR 模组的补体调控蛋白。

[0042] “补体样蛋白”是序列长度的至少 20% 与补体蛋白或补体调节蛋白具有显著序列一致性,和 / 或与补体蛋白或补体调节蛋白特异性竞争与其靶结合(例如,亲和力高达至少 10%) 的蛋白质。编码所述蛋白质的基因可在紧邻编码具有类似序列的补体蛋白或补体调节蛋白的基因处发现。例如,CFH 基因簇含有众多 CFH 样基因(例如 CFHR1、CFHR1、CFHR3、CFHR4 和 CFHR5)。

[0043] “补体相关蛋白”总体上指补体组分、补体调控蛋白和补体样蛋白;然而,在本发明大体上提及补体相关蛋白时,应了解,本发明涵盖明确提及补体组分、补体调控蛋白、补体样蛋白和其组合的实施例。

[0044] 活性剂(例如补体抑制剂)的“有效量”是指足以引起所需生物反应(或等同地,抑制不合需要的生物反应)的活性剂的量。所属领域技术人员将理解,特定药剂的绝对有效量可视例如所需生物终点、欲递送的药剂、靶组织等因素而变化。所属领域技术人员将进一步了解,“有效量”可以单一剂量投予,或可通过投予多个剂量实现。例如,有效量可以是足以减轻病症的至少一种症状的量。有效量可以是足以减缓慢性和进行性病症的进展,例如延迟所述病症表现其一种或多种症状或病征的时间,或延迟患有所述病症的个体达到某种程度的损伤的时间的量。有效量可以是足以使损伤比不存在所述药剂时恢复更快或更多的量。

[0045] “一致性”是指两个或两个以上核酸或多肽相同的程度。在评估窗口内,例如在所关注序列的长度内,所关注序列与第二序列之间的一致性百分比可通过以下步骤计算:比对所述序列,测定评估窗口内为相对一致残基的残基(核苷酸或氨基酸)的数量,从而允许引入空位(gap)以使一致性最大化,除以所关注序列或第二序列中落在窗口内的残基总数(取较大者),并乘以 100。空位意思指序列中未被残基占据的一部分。当计算达到特定一致性百分比所需的一致残基的数量时,分数应四舍五入为最接近的整数。一致性百分比可利用此项技术中已知的多种计算机程序计算。例如,如 BLAST2、BLASTN、BLASTP、Gapped BLAST 等计算机程序产生比对并提供所关注序列与多个公共数据库中任一个中的序列之间的一致性百分比。根据卡林(Karlin)和奥斯舒尔(Altschul),美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 90:5873-5877,1993 中修改的卡林和奥斯舒尔算法(卡林(Karlin)和奥斯舒尔(Altschul),美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 87:22264-2268,1990) 被并入到奥斯舒尔等人的 NBLAST 和 XBLAST 程序中(奥斯舒尔等人,分子生物学杂志(J. Mol. Biol.) 215:403-410,1990)。为获得带空位的比对以供比较,利用奥斯舒尔等人中所述的 GappedBLAST(奥斯舒尔等人,核酸研究(Nucleic Acids Res.) 25:3389-3402,1997)。当利用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时,可使用各自程序的默认参数。可使用 PAM250 或 BLOSUM62 矩阵。有关这些程序,参看网页 URL www.ncbi.nlm.nih.gov。在具体实施例中,使用利用默认参数的 BLAST2 计算所关注序列与第二序列的一致性百分比。

[0046] 术语“分离的”意思指 1) 与至少一些通常在自然界与其缔合的组分分开;2) 通过涉及人工的方法制备或纯化;和 / 或 3) 自然界中不存在。例如,从产生分子的细胞中取出所述分子,即为“分离的”。化学合成的分子是“分离的”。

[0047] 术语“联接的”用于两个或两个以上部分时,意思指所述部分彼此以物理方式缔合或连接,形成足够稳定的分子结构,以致所述部分在形成联接的条件下,并且优选在使用新分子结构的条件下,例如在生理条件下,保持缔合。在本发明某些优选实施例中,联接是共

价联接。在其它实施例中,联接是非共价的。各部分可直接或间接联接。当两个部分直接联接时,其彼此共价键结或足够紧邻以致两个部分之间的分子间力保持其缔合。当两个部分间接联接时,其各自共价或非共价联接至第三部分,所述第三部分保持两个部分之间的缔合。一般当提及两个部分是通过“联接基团”或“联接部分”联接时,这两个被联接的部分之间的联接是间接的,并且通常被联接的部分各自共价键结至联接基团。联接基团可以是与欲联接的两个部分在合理时间段内在符合所述部分(必要时,其取决于条件可经保护)的稳定性的条件下足量反应,产生合理产率的任何合适部分。

[0048] “液体组合物”是指包含至少一种在室温下为液体的化学物质的组合物。液体组合物可含有治疗剂。治疗剂可例如溶解、混悬或分散于其中。治疗剂的存在形式可以是点缀着液体分子的个别分子,或是微观或宏观聚集体或粒子等,只要所述聚集体或粒子不妨碍组合物作为液体的易流动性即可。

[0049] 关于组合物或药剂递送的“局部投药”或“局部递送”是指不通过血管系统将所述组合物或药剂运送到其预定靶组织或位点的递送。组合物或药剂可直接递送到其预定靶组织或位点,或其附近,例如紧邻预定靶组织或位点。例如,组合物可经组合物的注射或输注递送。在紧邻靶组织或位点局部投药后,组合物或者其一种或多种组分可扩散到预定靶组织或位点。应了解,在局部递送后,一部分治疗剂(通常仅极小部分投药剂量)可能进入血管系统,并被运送到另一位置,包括运送回其预定靶组织或位点。

[0050] “局部激活”是指在血管系统外发生的补体激活。

[0051] “多个(种)”意思指多于一个(种)。

[0052] 如本文所使用,“多肽”是指氨基酸聚合物,任选包括一个或多个氨基酸类似物。蛋白质是由一个或多个多肽构成的分子。肽是相对较短的多肽,长度通常介于约2个与60个氨基酸之间,例如长度介于8个与40个氨基酸之间。术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”可互换使用。本文使用的多肽可含有例如蛋白质中天然可见的氨基酸、蛋白质中非天然可见的氨基酸,和/或不为氨基酸的氨基酸类似物。如本文所使用,一种氨基酸的“类似物”可以是结构与所述氨基酸类似的不同氨基酸,或结构与所述氨基酸类似的除氨基酸外的化合物。已知大量技术认可的在蛋白质中常见的20种氨基酸(“标准”氨基酸)的类似物。可例如通过添加化学实体,如碳水化合物基团、磷酸酯基、法呢基、异法呢基、脂肪酸基团、用于连结、官能化或其它修饰的联接基团等,来修饰多肽中的一个或多个氨基酸。某些合适的非限制性类似物和修饰描述于PCT公开案W02004026328和W02007062249中。多肽可例如在N末端乙酰化,和/或例如在C末端酰胺化。修饰可以在多肽中任何地方进行,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。给定多肽可含有许多类修饰。多肽可为分支的,和/或环状,其中可存在或不存在分支。多肽可例如从天然来源纯化得到;在合适表达系统中(例如通过重组宿主细胞或在转基因动物或植物中)使用重组DNA技术,在体外或体内于合适表达系统中产生;通过例如常规固相肽合成和/或涉及所合成肽化学连接(chemical ligation)的方法等化学方式合成(例如参看S. 肯特(Kent, S.),肽科学杂志(JPept Sci.),9(9):574-93,2003),或上述任何组合。众所周知这些方法,并且所属领域技术人员将能够选择并实施合成本文所述肽和多肽的合适方法。多肽可包含一个或多个化学连接位点,如例如美国公开案第20040115774号中所述。在某些实施例中,使用一种或多种这一公开案中所述或参考的方法,用聚合物修饰本发明多肽。如本文所使用,术语“多肽序列”或“氨基酸序

列”可以指多肽物质本身,并且不限于以生物化学方式表征多肽的序列信息(即,选自用作氨基酸名称缩写的字母和代码的连续字母或三字母代码)。除非另作说明,否则本文提供的多肽序列是沿 N 末端到 C 末端方向呈现。

[0053] 如本文所使用,“纯化的”意思指实体或物质与先前在未纯化之前与其一起发现的一个或多个其它实体或物质分开。实体或物质可以是部分纯化、实质上纯化或纯的。当将物质或实体(例如核酸或多肽)从除溶剂和溶剂中所含的任何离子外实质上所有其它化合物或实体移出时,认为其是纯的,即,其占组合物干重至少约 90%、更优选至少约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或高于 99%。部分或实质上纯化的化合物或实体(例如核酸或多肽)可从至少 50 重量%、至少 60 重量%、至少 70 重量%或至少 80 重量%天然与其一起发现的物质(例如细胞物质如细胞蛋白和/或核酸)移出。在某些实施例中,分别以组合物中总核酸或多肽的干重计,纯化的核酸或多肽占至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或甚至更多。此项技术中已知评定纯度的方法,并且包括色谱分析法、免疫法、电泳法等。本文所述任何多核苷酸或多肽都可为纯化的。

[0054] 如本文所使用,“反应性官能团”是指包括(但不限于)以下的基团:烯烃、炔烃、醇、酚、醚、氧化物、卤化物、醛、酮、羧酸、酯、酰胺、氰酸酯、异氰酸酯、硫氰酸酯、异硫氰酸酯、胺、肼、脒、酰肼、重氨基、重氮盐、硝基、腈、硫醇、硫化物、二硫化物、亚砷、砷、磺酸、亚磺酸、缩醛、缩酮、酸酐、硫酸酯、次磺酸异腈、脘、酰亚胺、亚氨酯(imidate)、硝酮(nitrone)、羟胺、肟、异羟肟酸硫代异羟肟酸、联烯(allene)、原酸酯、亚硫酸酯、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、氧化偶氮基化合物和亚硝基化合物。反应性官能团还包括常用于制备生物连结物(bioconjugate)的官能团,例如 N-羟基琥珀酰亚胺酯、顺丁烯二酰亚胺、硫氢基等(例如参看 G. 赫曼森(Hermanson, G.), 生物连结物技术(Bioconjugate Techniques), 圣地亚哥学术出版社(Academic press, San Diego), 1996)。此项技术中众所周知制备每一所述官能团的方法,并且其对于特定目的的应用或修饰都在所属领域技术人员的技能范围内(例如参看萨德勒(Sandler)和卡洛(Karo)编,有机官能团制备(ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS), 圣地亚哥学术出版社(Academic press, San Diego), 1989)。

[0055] 术语“RNA 干扰”或“RNAi”于本文中如此项技术中所理解一般使用,例如,其是指通过在靶细胞或生物体中引入或表达序列符合所关注基因的双链 RNA(dsRNA,称为“RNAi 剂”),尤其含有与所关注基因的信使 RNA 互补的链的短双链 RNA(siRNA),来降低基因或基因产物的表达的任何方法。

[0056] “特异性结合”一般是指靶多肽(或更一般地说,靶分子)与结合分子(例如抗体或配体)之间的物理缔合。所述缔合通常依赖于可由结合分子识别的靶的特定结构特征(例如抗原决定簇、表位、结合口袋或裂隙)的存在。例如,如果抗体对表位 A 具特异性,则含有表位 A 的多肽的存在,或在含有游离的标记 A 和与其结合的结合分子的反应中游离的未标记 A 的存在,将降低与结合分子结合的标记 A 的量。应了解,特异性不需要是绝对的,而一般是指发生结合的情形。例如,此项技术中众所周知,众多抗体除与靶分子中存在的表位反应外,还与其它表位交叉反应。取决于欲使用抗体的应用,所述交叉反应性可以是可接受的。所属领域技术人员将能够选择特异性程度足以适合在任何给定应用(例如检测靶分子、治疗目的等)中进行的抗体或配体。还应了解,可在额外因素的情形中,例如结合分子

对靶的亲合力相对于结合分子对其它靶（例如竞争剂）的亲合力，评估特异性。如果结合分子对需要检测的靶分子展现高亲合力并且对非靶分子展现低亲合力，则所述抗体将很可能为可接受的试剂。在从一个或多个情形中确立结合分子的特异性后，即可将其用于其它、优选类似的情形，而无需再评估其特异性。如果在所测试的条件下，例如在生理条件下，平衡离解常数 (K_d) 为 $10^{-3}M$ 或更小，优选为 $10^{-4}M$ 或更小，更优选为 $10^{-5}M$ 或更小，例如为 $10^{-6}M$ 或更小、 $10^{-7}M$ 或更小、 $10^{-8}M$ 或更小，或 $10^{-9}M$ 或更小，则可认为两个或两个以上分子的结合是特异性的。

[0057] “显著序列一致性”用于氨基酸序列时，意思指所述序列与参考序列至少约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 一致。在具体实施例中，用于氨基酸序列时，意思指所述序列与参考序列至少约 70%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 一致。在具体实施例中，相对于参考序列，保守性置换至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的非一致氨基酸。可根据 L. 夏尔 (Shyer, L.), 生物化学 (Biochemistry), 第 3 版, 1988, 确定保守置换, 根据所述文献, 以下群组中的氨基酸在例如电荷、疏水性、芳香性等侧链特性方面具有类似特征: (1) 脂肪族侧链: G、A、V、L、I; (2) 芳香族侧链: F、Y、W; (3) 含硫侧链: C、M; (4) 脂肪族羟基侧链: S、T; (5) 碱性侧链: K、R、H; (6) 酸性氨基酸: D、E、N、Q; (7) 环状脂肪族侧链: P, 其可视为属于群组 (1)。在另一公认的分类中, 保守取代发生于以下群组内: (1) 非极性: A、L、I、V、G、P、F、W、M; (2) 极性: S、T、C、Y、N、Q; (3) 碱性: K、R、H; (4) 酸性: D、E。具有较小侧链的氨基酸 (G、A、S、T、M) 也形成可进行保守取代的群组。此项技术中已知的其它分类方法也可使用。此外, 可根据这些方案, 对氨基酸类似物和非天然氨基酸进行分类。

[0058] 如本文所使用, “个体”是指欲递送药剂例如以达到实验、诊断和 / 或治疗目的的个体。除非另作说明, 否则个体为哺乳动物, 例如家养哺乳动物, 如狗、猫、兔等; 非人类灵长类动物, 或人类。

[0059] 如本文提及补体组分时所使用, “全身的 (systemic)”是指由肝细胞合成并进入血流中, 或由循环巨噬细胞或单核细胞合成并分泌到血流中的补体蛋白。

[0060] “治疗剂”在本文中用于指适用于治疗病症的任何药理学活性剂。所述术语包括任何医药学上可接受的盐、前药、前药的盐, 以及此项技术中已知的或使用此项技术中已知的标准方法容易制备的所述药剂的衍生物。“前药”是指药剂的前体, 其中前药本身不具有药理学活性 (或活性比药物的所需活性低或与其不同), 但在投药后转化 (例如通过代谢) 成医药学上活性药物。治疗剂可以是 (不限于) 小分子或生物大分子, 例如多肽、抗体, 或核酸, 如适配子、RNAi 剂 (例如小干扰 RNA (siRNA)) 等。在本文中, 治疗剂有时被称为 “活性剂”或 “药物”。小分子通常是分子量为 1,500 道尔顿 (Dalton, Da) 或更小, 例如 1,000Da 或更小, 例如 500Da 或更小, 并且具有多个碳-碳键的有机化合物。

[0061] 如本文所使用, “治疗”是指提供治疗, 即, 对个体提供任何类型的医学或手术处理。可提供治疗以便逆转、缓解疾病、病症或病况; 抑制其进展; 预防或降低其可能性, 或以便逆转、缓解疾病、病症或病况的一种或多种症状或表现; 抑制或防止其进展; 预防或降低其可能性。“预防”是指使至少一些个体在至少一段时间内不会出现疾病、病症、病况或者其症状或表现。治疗可包括在发展出指示补体介导的病况的一种或多种症状或表现后, 对个体投予药剂, 例如以便逆转、缓解、降低所述病况的严重程度, 和 / 或抑制或防止其进展, 和

/ 或逆转、缓解、降低所述病况的一种或多种症状或表现的严重程度, 和 / 或抑制或所述病况的一种或多种症状或表现。本发明组合物可授予已发展补体介导的病征或相对于一般群体的成员发展此类病征的风险较高的个体。本发明组合物可出于预防目的授予, 即, 在发展出所述病况的任何症状或表现前授予 (例如, 授予具有至少一个发展所述病况的风险因子的个体)。

[0062] 如本文所使用, “烷基”是指具有约 1 到约 22 个碳原子 (以及其中碳原子范围和具体个数的所有组合和子组合) 的饱和直链、支链或环状烃, 其中在本发明某些实施例中, 优选为约 1 到约 12 个, 或约 1 到约 7 个碳原子。烷基包括 (但不限于) 甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、环戊基、异戊基、新戊基、正己基、异己基、环己基、环辛基、金刚烷基、3- 甲基戊基、2, 2- 二甲基丁基和 2, 3- 二甲基丁基。

[0063] 如本文所使用, “卤基”是指 F、Cl、Br 或 I。

[0064] 如本文所使用, “烷酰基”是指具有约 1 到 10 个碳原子 (以及其中碳原子范围和具体个数的所有组合和子组合), 例如约 1 到 7 个碳原子的任选取代的直链或支链脂肪族无环残基。烷酰基包括 (但不限于) 甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、异戊酰基、2- 甲基 - 丁酰基、2, 2- 二甲氧基丙酰基、己酰基、庚酰基、辛酰基等。“低碳数烷酰基”是指具有约 1 到约 5 个碳原子 (以及碳原子范围和具体个数的所有组合和子组合) 的任选取代的直链或支链脂肪族无环残基。此类基团包括 (但不限于) 甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、异戊酰基等。

[0065] 如本文所使用, “芳基”是指具有约 5 到约 14 个碳原子 (以及其中碳原子范围和具体个数的所有组合和子组合) 的任选取代的单环或双环芳香族环系统, 其中优选具有约 6 到约 10 个碳。非限制性实例包括例如苯基和萘基。

[0066] 如本文所使用, “芳烷基”是指带有芳基取代基的烷基并且具有约 6 到约 22 个碳原子 (以及其中碳原子范围和具体个数的所有组合和子组合), 其中在某些实施例中优选具有约 6 到约 12 个碳原子。芳烷基可任选经取代。非限制性实例包括例如苯甲基、萘甲基、二苯甲基、三苯甲基、苯乙基和二苯乙基。

[0067] 如本文所使用, 术语“烷氧基”是指任选取代的烷基 -O- 基团, 其中烷基如先前所定义。例示性烷氧基包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基和庚氧基。

[0068] 如本文所使用, “羧基”是指 $-C(=O)OH$ 基团。

[0069] 如本文所使用, “烷氧羰基”是指 $-C(=O)O-$ 烷基, 其中烷基如先前所定义。

[0070] 如本文所使用, “芳酰基”是指 $-C(=O)-$ 芳基, 其中芳基如先前所定义。例示性芳酰基包括苯甲酰基和萘甲酰基。

[0071] 通常, 经取代的化学部分包括一个或多个替代氢的取代基。例示性取代基包括例如卤基、烷基、环烷基、芳烷基、芳基、硫氢基、羟基 ($-OH$)、烷氧基、氰基 ($-CN$)、羧基 ($-COOH$)、 $-C(=O)O-$ 烷基、氨基羰基 ($-C(=O)NH_2$)、-N 经取代的氨基羰基 ($-C(=O)NHR''$)、 CF_3 、 CF_2CF_3 等。关于上文所述的取代基, 各部分 R'' 可独立地例如 H、烷基、环烷基、芳基或芳烷基中任一个。

[0072] 如本文所使用, “L- 氨基酸”是指通常存在于蛋白质中的任何天然存在的左旋 α - 氨基酸, 或所述 α - 氨基酸的烷基酯。术语“D- 氨基酸”是指右旋 α - 氨基酸。除非另作说明, 否则本文中所提及的所有氨基酸都是 L- 氨基酸。

[0073] 如本文所使用,“芳香族氨基酸”是包含至少一个芳香环的氨基酸,例如其包含一个芳基。

[0074] 如本文所使用,“芳香族氨基酸类似物”是包含至少一个芳香环的氨基酸类似物,例如其包含一个芳基。

具体实施方式

[0075] 由凝胶状结构持续释放坎普他汀类似物

[0076] 本发明涉及通过由凝胶状结构释放坎普他汀类似物来持续递送所述坎普他汀类似物,所述凝胶状结构是在将包含坎普他汀类似物的液体组合物引入哺乳动物个体体内的血管外位置(例如玻璃体腔)中后形成。本发明还涉及通过由凝胶状结构释放坎普他汀类似物来持续递送所述坎普他汀类似物,所述凝胶状结构是在使包含坎普他汀类似物的液体组合物与身体物质接触后形成。所述身体物质通常是除血液(或源自血液的物质,例如血浆或血清)或尿液外的其它流体或含流体物质。例如,所述物质可以是玻璃体液。

[0077] 所述身体物质通常含有蛋白质、无机或有机离子,和/或糖胺聚糖。这些成分中有一种或多种可起始或促成凝胶状结构的形成。在本发明某些实施例中,凝胶状结构含有一种或多种在身体物质中所见的内源性蛋白质或糖胺聚糖,其中所述内源性蛋白质或糖胺聚糖是在凝胶状结构于体内形成时并入其中。

[0078] 本发明还涉及通过将含有治疗剂和坎普他汀类似物的液体组合物引入哺乳动物个体体内的血管外位置,由此形成凝胶状结构,来持续递送治疗剂。本发明还涉及通过由凝胶状结构释放治疗剂来持续递送所述治疗剂,所述凝胶状结构是在使包含坎普他汀类似物和治疗剂的液体组合物与身体物质(例如含蛋白质的身体物质)接触后形成。所述身体物质通常是除血液(或源自血液的流体,例如血浆或血清)或尿液外的其它流体或含流体物质。例如,所述物质可以是玻璃体液。

[0079] 本发明还涉及一种通过使包含坎普他汀类似物的液体组合物与一种或多种足以驱使凝胶形成的蛋白质、离子或糖胺聚糖或其组合接触,而在身体外部(离体)形成的凝胶状结构。所述蛋白质、离子或糖胺聚糖的结构或序列可与例如玻璃体腔、滑膜腔等体腔中天然所见的那些类似或基本上相同。凝胶状结构可进一步含有额外治疗剂。本发明进一步涉及通过对有需要的个体投予凝胶状结构,例如通过将其注射、植入或施用于需要补体抑制的部位,来持续递送坎普他汀类似物以及任选使用的额外治疗剂。

[0080] 在本发明某些实施例中,液体组合物的特征在于,除坎普他汀类似物外,其缺乏形成凝胶的物质。如果组合物中删除掉坎普他汀类似物,则在存在适量坎普他汀类似物时(例如在玻璃体内注射后)将易于形成凝胶状结构的情况下,将液体组合物投予个体后不会形成凝胶状结构。在本发明某些实施例中,液体组合物的特征在于,其含有形成凝胶的物质,但所述物质并非以足量存在,以致在不存在坎普他汀类似物时,在存在适量坎普他汀类似物时(例如在玻璃体内注射后)将易于形成凝胶状结构的情况下,不会形成凝胶。因此,在本发明某些实施例中,液体组合物不同于含有例如胶原蛋白、合成聚合物等形成凝胶的物质的组合物,所述形成凝胶的物质可以足量包括在其它坎普他汀类似物调配物中,以在不存在坎普他汀类似物的情况下能形成凝胶。

[0081] 在本发明某些实施例中,液体组合物基本上由坎普他汀类似物和一种或多种在室

温下呈液态的化学物质（例如水）组成。在某些实施例中，以干重计，组合物的至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 由坎普他汀类似物组成。在一些实施例中，液体组合物含有水和有机溶剂。在一些实施例中，液体组合物除坎普他汀类似物外，还包含无机离子、缓冲剂、增溶剂或其组合，其中所述组合物在无坎普他汀类似物的情况下，投药后不会形成凝胶状结构。液体组合物任选包含坎普他汀类似物和一种或多种额外治疗剂。

[0082] 本发明还涉及调节利用包含坎普他汀类似物的液体组合物形成凝胶的方法，和/或调节由包含坎普他汀类似物的液体组合物所形成的凝胶的特性的方法，和测试试剂以确定其是否合意地调节一种或多种凝胶特性和/或一种或多种形成特征（例如凝胶形成或消失的速率、密度、稠度、坎普他汀类似物含量、坎普他汀类似物释放速率等）的方法。所述方法包括制备包含坎普他汀类似物、液体物质（例如水）和测试剂的液体组合物；将液体组合物授予哺乳动物个体的血管外位置（例如玻璃体腔）；和评定投药后组合物在体内的一种或多种特性。所述方法可用于鉴别合意地影响凝胶和/或其形成的一种或多种特性的试剂。待测试的试剂包括标准赋形剂、粘度调节剂、无机和有机离子、缓冲剂等。

[0083] 本发明一方面是液体组合物，其包含坎普他汀类似物、液体物质以及凝胶或凝胶形成的一种或多种特性的调节剂。

[0084] 坎普他汀是一种环状肽，其结合至补体组分 C3 并抑制补体激活。美国专利第 6,319,897 号描述一种具有序列 Ile-[Cys-Val-Val-Gln-Asp-Trp-Gly-His-His-Arg-Cys]-Thr (SEQ ID NO:44) 的肽，其中两个半胱氨酸之间的二硫键由括号表示。应了解，美国专利第 6,319,897 号中未使用“坎普他汀”这一名称，但在随后的科技文献和专利文献（例如参看默瑞斯 (Morikis) 等人，蛋白质科学 (Protein Sci.), 7(3):619-27, 1998) 中采用，指序列与美国专利第 6,319,897 号中所揭示的 SEQ ID NO:2 相同，但如表 1 中所示在 C 末端酰胺化的肽 (SEQ ID NO:8)。术语“坎普他汀”在本文中的用法与所述用法相符（即，指 SEQ ID NO:8）。已开发出补体抑制活性高于坎普他汀的坎普他汀类似物。例如参看 WO2004/026328 (PCT/US2003/029653)；D. 默瑞斯 (Morikis, D.) 等人，生物化学学会快报 (Biochem Soc Trans.) 32(Pt 1):28-32, 2004；B. 默里克 (Mallick, B.) 等人，医药化学杂志 (J. Med. Chem.), 274-286, 2005；M. 卡特拉格达 (Katragadda, M.) 等人，医药化学杂志 (J. Med. Chem.), 49:4616-4622, 2006；WO2007062249 (PCT/US2006/045539)；WO2007044668 (PCT/US2006/039397)；USSN 11/544,389 (用于眼病的坎普他汀和其类似物 (Compstatin and Analogs Thereof for Eye Disorders))，和下文的论述。

[0085] 本发明至少部分源自于意外的发现：玻璃体内授予含有存于水中的强效坎普他汀类似物的液体组合物，导致形成玻璃体内宏观凝胶状结构，也称为“沉积物”或简称为“凝胶”（参看图 1）。如本文所使用，“凝胶状”是指凝胶或具有凝胶所特有的物理特性的任何物质组合物（例如明胶）。因此，术语“凝胶状”旨在描述胶状或胶凝结构的物理性质，而不是代表特定物理结构。例示性物理特性是粘度、弹性、硬度和可压缩性。术语“凝胶状”包括（但不限于）可具有与胶体化学领域技术人员一般所认为属于凝胶的相同的均匀结构的组合物，其中凝胶可定义为互连粒子（通常是纳米级）的多孔网络覆盖液体介质整个体积的胶体系统。血管外位置可含有身体物质，其可具有不同粘度。所述物质可以是体液。就稠度来说，所述物质本身可至少略呈凝胶状。在本发明某些实施例中，在授予坎普他汀类似

物后形成的凝胶状结构具有比形成所述凝胶状结构的血管外位置的内含物高的粘度和更高的固体稠度 (solid consistency)。

[0086] 本发明的发明人认识到,所述沉积物可用作坎普他汀类似物的独特持续递送系统。已发现,沉积物含有较大部分所授予的坎普他汀类似物,并且所述化合物保留活性并随时间被释放。沉积物是离散结构,通常可在其形成后立即解剖时并且当使用浓度足够高的坎普他汀类似物时,将其与玻璃体物质分离。随时间推移和 / 或如果使用较低浓度,则凝胶不够“坚固”,而且柔软并在处理后容易裂开,这与其随时间崩解一致。在本发明某些实施例中,凝胶近似呈球形,并且实质上呈半透明。在某些实施例中,宏观凝胶状结构的尺寸和 / 或密度 (如使用超声波扫描术观察到的) 随时间减小,并释放出活性形式的坎普他汀类似物,以便达到治疗浓度,持续至少 2 周、至少 4 周、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月或至少 12 个月 (例如在不同实施例中,达约 3、6、9、12、18 或 24 个月)。血管外位置可以是可含有流体或半流体身体物质的离散小室、区室或腔。所述位置可为玻璃体腔、滑膜腔、鞘内腔等。所述小室、腔或区室内可至少部分排列有,或可含有在补体介导的病症中补体对其施加不合需要的作用的组织。在一些实施例中,所述组织不与所述小室的内部直接接触,但与其足够接近,以致补体抑制剂可扩散到浸浴所述组织的细胞外流体中。例如,所述组织可邻近所述区室的内层,例如与所述区室内层的距离在 10mm 到 20mm 内,在一些实施例中在 5mm 到 10mm 内、在 1mm 到 5mm 内、在 0.5mm 到 1mm 内、在 0.1mm 到 0.5mm 内或在小于 .1mm 内,并且不经会阻碍补体抑制剂扩散到组织的屏障分开。可测量血管外位置内所发现的物质内 (例如玻璃体液) 或其内排列的组织内或邻近组织内治疗剂的浓度。

[0087] 在某些实施例中,宏观凝胶状结构在至少 2 周、至少 4 周、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月或至少 12 个月 (例如在不同实施例中,达约 3、6、9、12、18 或 24 个月) 内仍易于检测到。应了解,个体之间可能存在差异,并且上述值可反映所研究的个体群体中的平均值。“易于检测到”意思指可 (i) 通过标准检眼镜检查; (ii) 不经放大利用解剖; 和 / 或 (iii) 使用超声波成像,看到沉积物。在一些实施例中,沉积物的初始直径 (或者最长轴的尺寸,或表面上两个点之间的最大距离) 为约 5mm,但取决于例如所授予的液体组合物的体积和坎普他汀类似物的浓度,所述直径可更小或更大。在一些实施例中,宏观凝胶状结构的直径 (或者最长轴的尺寸,或表面上两个点之间的最大距离) 保持在至少 1mm,持续至少 2 周、至少 4 周、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 6 个月、至少 9 个月或至少 12 个月 (例如在不同实施例中,达约 3、6、9、12、18 或 24 个月)。

[0088] 通常,仅一部分所授予的坎普他汀类似物被捕获在沉积物内。当所注射的化合物的浓度和总量增加时,随后在沉积物中发现的投药剂量的分率也增加。在本发明某些实施例中,在沉积物中最初保留至少 25% 的投药剂量。例如,在某些实施例中,介于 25% 与 50% 之间,或介于 50% 与 75% 之间量的所授予的坎普他汀类似物保留在沉积物中。在本发明某些实施例中,在沉积物中最初保留介于 75% 与 90% 之间量的所授予的坎普他汀类似物。应了解,个体之间可能存在差异,并且上述值可反映所研究的个体群体中的平均值。

[0089] 沉积物在所测试的剂量下明显无毒,并且看起来似乎不会改变眼睛的正常生理机能或干扰视力。其除含有坎普他汀类似物外,还含有通常存在于玻璃体内的蛋白质。沉积物可存留较长时间段,在此期间,其释放坎普他汀类似物。如本文所使用,“释放”一般是指使沉积物的外部 (例如体内) 能获得活性剂 (例如坎普他汀类似物),但并不隐含发生所述

过程的任何特定机制。例如,随着沉积物降解或崩解,通过将所述药剂扩散到沉积物外等,可发生释放。所释放的坎普他汀类似物保留相当大活性。在一些实施例中,以摩尔浓度计,所释放的坎普他汀类似物保留至少 50% 的所投予化合物的活性(例如原有活性的 50% 到 75%、75% 到 95%、95% 到 100%)。

[0090] 因此,沉积物提供坎普他汀类似物的储库,并提供一种新颖的持续递送方式。预期当将包含坎普他汀类似物的液体组合物引入含有体液(例如滑膜腔、滑膜囊、颅腔、颅腔中的脑室、鞘内腔等中存在的体液)的血管外位置中时,可在体内形成与玻璃体内投药后所形成的沉积物类似的凝胶状沉积物。所述沉积物将含有坎普他汀类似物,和一种或多种存在于所述位置所发现的各自体液中的物质,例如离子、蛋白质或糖胺聚糖。还预期,可由包含坎普他汀类似物和一种或多种蛋白质、离子或糖胺聚糖(与在体内于血管外位置所发现的那些类似或相同)的液体组合物,离体形成凝胶状沉积物。

[0091] 本发明另外提供一种治疗补体介导的病症的方法,其包含以下步骤:将包含有效量坎普他汀类似物的液体组合物投予个体的血管外位置,其中所述有效量足以在所述血管外位置内形成含有所述坎普他汀类似物的离散的宏观凝胶状结构。在本发明某些实施例中,例如通过玻璃体内注射,将组合物投予玻璃体腔中。在某些实施例中,使用 27 号到 30 号针。

[0092] 本发明另外提供一种凝胶状物质,其包含坎普他汀类似物,和一种或多种在哺乳动物个体的血管外位置天然发现的蛋白质、离子和/或糖胺聚糖(GAG)。在一个实施例中,蛋白质、离子和/或糖胺聚糖通常是在玻璃体液中发现。在另一实施例中,蛋白质、离子和/或糖胺聚糖通常是在滑膜液中发现。在另一实施例中,蛋白质、离子和/或糖胺聚糖通常是在脑脊髓液(CSF)中发现。在本发明某些实施例中,凝胶状物质含有至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10 种或更多种不同的蛋白质和/或 GAG。在本发明某些实施例中,蛋白质或 GAG 不是此项技术中常用于制备持续释放组合物的物质。在本发明某些实施例中,蛋白质或 GAG 不是此项技术中已知的治疗剂。

[0093] 在本发明某些实施例中,凝胶状物质存在于个体中或从个体分离。在这些实施例中,凝胶状物质可含有所述特定个体的内源性蛋白质、离子和/或糖胺聚糖(即,其天然存在于所述特定个体中)。在某些实施例中,凝胶状物质是离体形成。在后一情况下,沉积物可含有与欲投予凝胶的个体类似或相同,但不是从所述个体获得的蛋白质、离子或糖胺聚糖。例如,其可从天然来源纯化得到、使用化学或重组合成技术合成等。

[0094] 在本发明某些实施例中,在适于在玻璃体腔中形成凝胶状沉积物的条件下投予坎普他汀类似物,以便治疗有患影响眼睛的病症的风险或患有所述病症的个体。在本发明一些实施例中,病症是在患有所述病症的个体的眼睛中检测到的补体激活水平比未患所述病症的个体的眼睛中的补体激活水平高(例如,通过补体激活产物的含量增加所证实)的一种病症。在本发明一些实施例中,病症是在患有所述病症的个体眼睛中检测到的 MAC 含量比未患有所述病症的个体眼睛中的 MAC 含量高的一种病症。

[0095] 在一些实施例中,所述病症是黄斑变性,例如年龄相关性黄斑变性(AMD)。在一些实施例中,病症是湿性 AMD。在一些实施例中,病症是干性 AMD。在一些实施例中,个体患有地图样萎缩(GA)。在一些实施例中,个体患有年龄相关性黄斑病,这一术语是指尚未发展成 GA 的早期到中期干性 AMD。在一些实施例中,病症是糖尿病性视网膜病变。在一些实施例

中,病症是青光眼。在一些实施例中,眼病是后段葡萄膜炎或角膜炎。在一些实施例中,眼病是视网膜色素变性。有关这些和其它眼病的进一步信息,参见同在申请中的专利申请案 USSN 11/247, 886、USSN 11/544, 389 和 USSN 11/612, 751, 以及 J. 坎斯基 (Kanski, J.), 临床眼科学:系统方法 (Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach) 巴特沃兹-海尼曼公司 (Butterworth-Heinemann); 第 6 版 (2007 年 5 月 4 日)。在一些实施例中,组合物是经玻璃体内授予,例如经玻璃体内注射。在一些实施例中,组合物是授予眼睛的前房。

[0096] 血管外位置按所治疗病症的需要来选择。例如,如果病况是关节炎,则可将补体抑制剂直接授予滑膜腔中。可授予本发明液体组合物的关节内关节的实例包括髋关节、膝关节、肘关节、腕关节 (wrist)、胸锁关节、颞下颌关节、腕关节 (carpal)、跗关节、踝关节和经历关节炎病况的任何其它关节。所述组合物也适于授予滑膜囊。可授予本发明组合物的滑膜囊的实例包括肩峰 (acromial) 囊、肱二头肌桡骨 (bicipitoradial) 囊、肘骨间 (cubitoradial) 囊、三角肌 (deltoid) 囊、髌下 (infrapatellar) 囊、坐骨 (ischial) 囊和所属领域技术人员已知的其它滑膜囊。如果病况是脊髓损伤或慢性疼痛,则可经鞘内授予组合物。如果病况是中风、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或中风,则可将组合物授予脑室系统 (例如第三、第四或侧脑室), 其包含脑中与脊髓中央管相连的结构组。可使用此项技术中已知的将治疗剂授予这些位置的方法 (参看下文)。

[0097] 可至少部分根据所关注血管外位置或邻近组织的内含物内补体蛋白含量和 / 或补体激活水平,来选择坎普他汀类似物的合适量。可根据多个个体中所作的测量来在欲治疗的个别个体中进行测定。在本发明某些实施例中,至少部分根据此信息,并且任选通过使用所述小室近似体积估算补体蛋白的总量,来选择坎普他汀类似物的合适剂量。例如,可选择坎普他汀类似物的合适剂量,以在所述小室内实现至少足以结合 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或更多现存 C3 的平均或稳态浓度。在某些实施例中,对剂量加以选择,以达到等于 C3 浓度的 1、2、5、10、20、50 倍或介于 1 与 50 之间的任何中间子范围倍数的平均或稳态浓度。在本发明某些实施例中,从沉积物释放出坎普他汀类似物,以致在较长时间段内,例如 2 到 4 周、4 到 6 周、1 到 3 个月、3 到 6 个月、6 到 12 个月、12 到 24 个月内,提供有效的平均或稳态浓度。在一些实施例中,选择剂量以使在玻璃体腔中的释放速率介于约 0.01 微克 / 天与约 3 到 5 微克 / 天之间,例如介于约 0.05 微克 / 天与 3 微克 / 天之间、介于 0.1 微克 / 天与约 3 微克 / 天之间、约 0.5 微克 / 天与约 3 微克 / 天之间、约 0.5 微克 / 天与 2 微克 / 天之间等,持续至少 2 周,例如 2 到 4 周、4 到 6 周、1 到 3 个月、3 到 6 个月、6 到 12 个月、12 到 24 个月。在一些实施例中,选择剂量以使在玻璃体腔中的释放速率介于约 0.5 微克 / 天与 1 微克 / 天之间或介于约 1 微克 / 天与约 3 微克 / 天之间,持续至少 2 周,例如 2 到 4 周、4 到 6 周、1 到 3 个月、3 到 6 个月、6 到 12 个月、12 到 24 个月。

[0098] 本发明提供一种单位剂量的本文所述的组合物,其通常在容器中包含足量的液体组合物 (或可与液体医药载剂组合得到液体组合物的干粉) 以对患者产生所需的治疗作用,即,足以单次授予有需要的患者的量。在一个实施例中,单位剂量是无菌的且冻干的。在另一实施例中,单位剂量是无菌的,并且是以例如经注射或浸润来授予患者可接受的液体形式提供。在另一实施例中,单位剂量是于液体中的混悬液或分散液,其适于例如经注射、浸润等授予患者。在一些实施例中,液体组合物含有每毫升液体至少 1mg 坎普他汀类似物,例如每毫升液体约 1mg 与约 300mg 之间坎普他汀类似物。坎普他汀类似物无需完全溶解于

液体中,例如至少一部分坎普他汀类似物可以颗粒形式存在。在一些实施例中,组合物中坎普他汀类似物的浓度介于 2mg/ml 与 20mg/ml 之间。在一些实施例中,组合物中坎普他汀类似物的浓度介于 2mg/ml 与 10mg/ml 之间,例如介于 2mg/ml 与 5mg/ml 之间。在一些实施例中,组合物中坎普他汀类似物的浓度介于 8mg/ml 与 25mg/ml 之间。在一些实施例中,溶解的坎普他汀类似物的浓度介于 2mg/ml 与 20mg/ml 之间。在一些实施例中,溶解的坎普他汀类似物的浓度介于 2mg/ml 与 10mg/ml 之间,例如介于 2mg/ml 与 5mg/ml 之间。在一些实施例中,溶解的坎普他汀类似物的浓度介于 8mg/ml 与 25mg/ml 之间。

[0099] 在一些实施例中,将至少 25 μ l 体积中浓度为至少 1mg/ml,例如介于 1mg/ml 与 10mg/ml 之间,例如介于 2mg/ml 与 5mg/ml 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔(例如通过玻璃体内注射)。在一些实施例中,体积介于 25 μ l 与 150 μ l 之间,例如介于 40 μ l 与 125 μ l 之间,例如介于 50 μ l 与 100 μ l 之间。在一些实施例中,体积为约 50 μ l,例如介于 45 μ l 与 55 μ l 之间。在一些实施例中,体积为约 100 μ l,例如介于 90 μ l 与 110 μ l 之间。在一些实施例中,投予介于 50 μ g 与 2mg 之间,例如介于 100 μ g 与 500 μ g 之间的坎普他汀类似物。在一些实施例中,投予介于 500 μ g 与 1mg 之间的坎普他汀类似物。在一些实施例中,投予介于 1mg 与 1.5mg 之间的坎普他汀类似物。在一些实施例中,投予介于 1.5mg 与 2.0mg 之间的坎普他汀类似物。

[0100] 在一些实施例中,将介于约 150 μ g 与约 250 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 250 μ g 与约 350 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 350 μ g 与约 450 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 450 μ g 与约 550 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 550 μ g 与约 650 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 650 μ g 与约 750 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 750 μ g 与约 850 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 850 μ g 与约 950 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 950 μ g 与约 1050 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1050 μ g 与约 1150 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1150 μ g 与约 1250 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1250 μ g 与约 1350 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1350 μ g 与约 1450 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1450 μ g 与约 1550 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1550 μ g 与约 1650 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1650 μ g 与约 1750 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1750 μ g 与约 1850 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1850 μ g 与约 1950 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。在一些实施例中,将介于约 1950 μ g 与约 2050 μ g 之间的坎普他汀类似物投予玻璃体腔。

[0101] 如实例 3 中所述和图 5 中所示,实验显示,在玻璃体内投药后,可在血清中测量到坎普他汀类似物。已发现,血清浓度与玻璃体浓度密切相关。本发明提供一种评定局部投药至血管外位置后坎普他汀类似物的局部浓度的方法,所述方法包含:测量将坎普他汀类似物投予血管外位置后血液中坎普他汀类似物的浓度,和根据已知的血液中浓度与所述位置中浓度之间的相关性,确定所述位置的局部浓度。本发明提供一种评定玻璃体中坎普他

汀类似物浓度的方法,其包含:测量眼内(例如玻璃体内)授予坎普他汀类似物后血液中坎普他汀类似物的浓度,和根据已知的血液中浓度与玻璃体浓度之间的相关性,确定玻璃体浓度。这些方法提供一种便利的方式来监测坎普他汀类似物的局部浓度(例如玻璃体浓度),并提供一种确定何时应对患者进行再治疗的方式。例如,当血清浓度(并且由此局部(例如玻璃体)浓度)降低低于所需值时,需对患者进行再治疗。因此,本方法允许从业人员定制用于所治疗的特定患者的剂量之间的时间间隔。

[0102] 由此,本发明提供一种在局部授予(例如眼内授予)坎普他汀类似物后,监测个体的方法。应了解,可使用多种方法,例如使用利用紫外或荧光检测的高效液相色谱(HPLC)分析连同或联合质谱(LC-MS),对血浆或血清进行分析。

[0103] 另外,已发现,可使用超声波检测凝胶状结构(图2)。可随时间监测沉积物的尺寸和密度,由此提供另一种监测个体并确定何时再治疗的方式。例如,当沉积物的直径或密度降低低于预先选定的限度值时,可提供再治疗。在使用血清分析的同时,可使用或不使用超声波,来监测沉积物的尺寸,并提供与决定是否再治疗和何时再治疗相关的信息。

[0104] 应了解,给定剂量的坎普他汀类似物可在一些个体中形成凝胶状沉积物,但未必在所有个体中都形成凝胶状沉积物。还应了解,坎普他汀类似物当引入某些血管外位置中时可形成凝胶状沉积物,但在其它位置中时并不形成凝胶状沉积物。剂量和具体坎普他汀类似物按需要来选择。例如,可选择当授予特定血管外位置时,在至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%个体(例如非人类灵长类动物或人类)中形成沉积物的剂量和坎普他汀类似物。

[0105] 坎普他汀和其类似物

[0106] 如上文所述,本发明至少部分源自于偶然而意外的发现:含有足够量和/或足够浓度的强效坎普他汀类似物的液体组合物当授予哺乳动物个体的玻璃体腔时,形成宏观凝胶状结构。尽管不希望受任何理论束缚,但本发明的发明人提出,此特性可能由多种坎普他汀类似物展现。根据本文的揭示,所属领域技术人员可容易地测试坎普他汀类似物,以确定其当引入玻璃体腔中或不同血管外位置中时是否展现类似特性。包含所述坎普他汀类似物的液体组合物和使用所述组合物授予坎普他汀类似物和任选使用的额外活性剂的方法都是本发明的方面。在某些实施例中,液体组合物包含第一和第二坎普他汀类似物,其中至少一种坎普他汀类似物在授予血管外位置后形成凝胶状沉积物。在某些实施例中,液体组合物包含坎普他汀类似物,和不是坎普他汀类似物的第二活性剂。

[0107] 如本文所使用,术语“坎普他汀类似物”涵盖坎普他汀和其任何补体抑制类似物。应了解,在术语“坎普他汀类似物”在本申请案中用于描述或指本发明一个方面的情况下,除非另作说明,否则本发明包括坎普他汀类似物是如实例中所述所研究的化合物(SEQ ID NO:32)的实施例。术语“坎普他汀类似物”涵盖坎普他汀,以及根据坎普他汀设计或鉴别并且当使用例如此项技术中认可的任何补体激活分析或实质上类似或相当的分析测量时,补体抑制活性是坎普他汀的至少50%的其它化合物。所述分析可例如测量经典或旁路途径介导的红细胞溶解。在某些实施例中,所述分析是ELISA分析。W02004/026328;默瑞斯(Morikis),同上文;默里克(Mallik),同上文;卡特拉格达(Katragadda)2006,同上文,以及其它参考文献中描述了测定化合物抑制补体激活的能力的方法。坎普他汀或其补体抑制类似物(在N末端和/或C末端适当修饰)的连环体或多聚体也可用于本发明中。

[0108] 坎普他汀类似物的活性可用其例如在特定血浆浓度下的 IC_{50} 值（抑制 50% 补体激活的化合物的浓度）来表示，其中如此项技术中所公认，较低 IC_{50} 值指示较高活性。用于本发明中的优选坎普他汀类似物的活性至少与坎普他汀相同。已知某些修饰可降低或消除补体抑制活性，并且其可明确地排除在本发明任何实施例之外。应了解，所测量的给定坎普他汀类似物的准确 IC_{50} 值将随实验条件而变化。例如从在实质上相同的条件下，测定多种不同化合物的 IC_{50} 值的实验所获得的比较值是有用的。在一个实施例中，坎普他汀类似物的 IC_{50} 值不超过坎普他汀的 IC_{50} 值。在本发明某些实施例中，坎普他汀类似物的活性是坎普他汀的 2 到 99 倍（即，所述类似物的 IC_{50} 值是坎普他汀 IC_{50} 值的 $1/2$ 到 $1/99$ ）。例如，所述活性可以是坎普他汀的 10 倍到 50 倍，或是坎普他汀的 50 倍到 99 倍。在本发明某些实施例中，坎普他汀类似物的活性是坎普他汀的 99 倍到 264 倍。例如，所述活性可以是坎普他汀的 100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260 或 264 倍。在本发明某些实施例中，坎普他汀类似物是强效的坎普他汀类似物，例如活性是坎普他汀的至少 100 倍的类似物。在本发明某些实施例中，坎普他汀类似物的活性是坎普他汀的至少 150 倍、至少 200 倍或至少 250 倍。表 1 提供多种此类类似物的序列。在某些实施例中，本发明涵盖活性是坎普他汀的 264 到 300 倍、300 到 350 倍、350 到 400 倍或 400 到 500 倍的类似物的用途。本发明进一步涵盖活性是坎普他汀的 500 到 1000 倍的坎普他汀类似物的用途。

[0109] 已使用等温滴定量热法，测量各种坎普他汀类似物结合 C3 的 K_d 值（卡特拉格达 (Katragadda) 等人，生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)，279(53)，54987-54995，2004）。已将多种坎普他汀类似物与 C3 的结合亲和力与其活性相关，其中如此项技术中所公认，较低 K_d 值指示较高结合亲和力。某些测试的类似物显示出结合亲和力与活性之间的线性关系（卡特拉格达，2004，同上文；卡特拉格达，2006，同上文）。在本发明某些实施例中，坎普他汀类似物结合 C3 的 K_d 值介于 $0.1 \mu M$ 与 $1.0 \mu M$ 之间、介于 $0.05 \mu M$ 与 $0.1 \mu M$ 之间、介于 $0.025 \mu M$ 与 $0.05 \mu M$ 之间、介于 $0.015 \mu M$ 与 $0.025 \mu M$ 之间、介于 $0.01 \mu M$ 与 $0.015 \mu M$ 之间或介于 $0.001 \mu M$ 与 $0.01 \mu M$ 之间。在某些实施例中，坎普他汀类似物的 IC_{50} 值介于约 $0.2 \mu M$ 与约 $0.5 \mu M$ 之间。在某些实施例中，坎普他汀类似物的 IC_{50} 值介于约 $0.1 \mu M$ 与约 $0.2 \mu M$ 之间。在某些实施例中，坎普他汀类似物的 IC_{50} 值介于约 $0.05 \mu M$ 与约 $0.1 \mu M$ 之间。在某些实施例中，坎普他汀类似物的 IC_{50} 值介于约 $0.001 \mu M$ 与约 $0.05 \mu M$ 之间。

[0110] “根据坎普他汀设计或鉴别的”化合物包括（但不限于）包含通过以下方式获得序列的氨基酸链的化合物：(i) 修饰坎普他汀的序列（例如，用不同氨基酸或氨基酸类似物置换坎普他汀序列的一个或多个氨基酸；将一个或多个氨基酸或氨基酸类似物插入坎普他汀的序列中；或使坎普他汀序列缺失一个或多个氨基酸）；(ii) 从坎普他汀的一个或多个氨基酸经随机化的噬菌体呈现肽文库选择，并任选进一步根据方法 (i) 进行修饰；或 (iii) 通过筛选与坎普他汀或利用方法 (i) 或 (ii) 获得的其任何类似物竞争结合 C3 或其片段的化合物来鉴别。许多有用的坎普他汀类似物包含疏水簇、 β 转角和二硫桥键。

[0111] 在本发明某些实施例中，坎普他汀类似物的序列包含通过在坎普他汀序列中进行 1、2、3 或 4 次取代（即，由不同标准氨基酸或非标准氨基酸置换坎普他汀序列中的 1、2、3 或 4 个氨基酸）而获得的序列，或基本上由所述序列组成。在本发明某些实施例中，4 位的氨基酸改变。在本发明某些实施例中，9 位的氨基酸改变。在本发明某些实施例中，4 位和 9

位的氨基酸改变。在本发明某些实施例中,仅 4 位和 9 位的氨基酸改变。在本发明某些实施例中,4 位或 9 位的氨基酸改变,或在某些实施例中,4 位和 9 位的氨基酸都改变,而且位于选自 1、7、10、11 和 13 位的另外多达两个氨基酸也改变。在本发明某些实施例中,4 位、7 位和 9 位的氨基酸改变。在本发明某些实施例中,2 位、12 位或两个位置的氨基酸都改变,只要所述改变保留欲环化的化合物的能力即可。所述在 2 位和 / 或 12 位的改变可以是除 1、4、7、9、10、11 和 / 或 13 位改变之外还有的改变。序列是通过置换坎普他汀序列的一个或多个氨基酸而获得的任何坎普他汀类似物的序列任选在 C 末端进一步包括多达 1、2 或 3 个额外氨基酸。在一个实施例中,所述额外氨基酸是 Gly。序列是通过置换坎普他汀序列的一个或多个氨基酸而获得的任何坎普他汀类似物的序列任选在 C 末端进一步包括多达 5 或多达 10 个额外氨基酸。应了解,除非另作说明或从上下文显而易见,否则坎普他汀类似物可具有本文所述各种实施例的任何一个或多个特性或特征,并且任一实施例的特性或特征可另外表征本文所述的任何其它实施例。在本发明某些实施例中,坎普他汀类似物的序列包含除对应于坎普他汀序列 4 位和 9 位的位置外都与坎普他汀一致的序列,或基本上由所述序列组成。

[0112] 坎普他汀和活性略高于坎普他汀的某些坎普他汀类似物仅含有标准氨基酸(“标准氨基酸”为甘氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸和组氨酸)。活性改进的某些坎普他汀类似物中并有一个或多个非标准氨基酸。有用的非标准氨基酸包括单卤化和多卤化(例如氟化)氨基酸、D-氨基酸、高氨基酸、N-烷基氨基酸、脱氢氨基酸、芳香族氨基酸(除苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸外)、邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸或对氨基苯甲酸、磷酸-氨基酸、甲氧基化氨基酸和 α , α -双取代氨基酸。在本发明某些实施例中,通过用相应的 D-氨基酸置换本文在别处所述坎普他汀类似物中的一个或多个 L-氨基酸,来设计坎普他汀类似物。所述化合物和其使用方法是本发明的一个方面。适用的例示性非标准氨基酸包括 2-萘基丙氨酸(2-NaI)、1-萘基丙氨酸(1-NaI)、2-茚满基甘氨酸甲酸(2Igl)、二氢色氨酸(Dht)、4-苯甲酰基-L-苯丙氨酸(Bpa)、2- α -氨基丁酸(2-Abu)、3- α -氨基丁酸(3-Abu)、4- α -氨基丁酸(4-Abu)、环己基丙氨酸(Cha)、高环己基丙氨酸(hCha)、4-氟-L-色氨酸(4fW)、5-氟-L-色氨酸(5fW)、6-氟-L-色氨酸(6fW)、4-羟基-L-色氨酸(4OH-W)、5-羟基-L-色氨酸(5OH-W)、6-羟基-L-色氨酸(6OH-W)、1-甲基-L-色氨酸(1MeW)、4-甲基-L-色氨酸(4MeW)、5-甲基-L-色氨酸(5MeW)、7-氮杂-L-色氨酸(7aW)、 α -甲基-L-色氨酸(α MeW)、 β -甲基-L-色氨酸(β MeW)、N-甲基-L-色氨酸(NMeW)、5-甲氧基-色氨酸、鸟氨酸(orn)、瓜氨酸、正亮氨酸、 γ -谷氨酸等。

[0113] 在本发明某些实施例中,坎普他汀类似物包含一种或多种 Trp 类似物(例如相对于坎普他汀序列,在 4 位和 / 或 7 位)。例示性 Trp 类似物于上文提及。也参看比尼(Beene)等人,生物化学(Biochemistry)41:10262-10269,2002(特别描述单卤化和多卤化 Trp 类似物);贝比兹克(Babitzke)和雅诺斯奇(Yanofsky),生物化学杂志(J. Biol. Chem.)270:12452-12456,1995(特别描述甲基化和卤化 Trp 以及其它 Trp 和吲哚类似物);以及美国专利 6,214,790、6,169,057、5,776,970、4,870,097、4,576,750 和 4,299,838。其它 Trp 类似物包括 α 或 β 碳以及任选在吲哚环的一个或多个位置经取代(例如经甲基取代)的变体。包含两个或两个以上芳香环(包括其经取代、未经取代或在其它位置(alternatively))

经取代的变体)的氨基酸作为 Trp 类似物是值得关注的。在本发明某些实施例中,在例如 4 位的 Trp 类似物是 5- 甲氧基、5- 甲基 -、1- 甲基 - 或 1- 甲酰基 - 色氨酸。在本发明某些实施例中,使用包含 1- 烷基取代基(例如低碳数烷基(例如 C₁-C₅)取代基)的 Trp 类似物(例如在 4 位)。在某些实施例中,使用 N(α) 甲基色氨酸或 5- 甲基色氨酸。在一些实施例中,使用包含 1- 烷酰基取代基(例如低碳数烷酰基(例如 C₁-C₅))的类似物。实例包括 1- 乙酰基 -L- 色氨酸和 L-β - 色氨酸。

[0114] 在某些实施例中,Trp 类似物的疏水性相对于 Trp 有所增加。例如,吲哚环可经一个或多个烷基(例如甲基)取代。在某些实施例中,Trp 类似物参与 C3 的疏水相互作用。此类 Trp 类似物可位于例如相对于坎普他汀序列的 4 位。在某些实施例中,Trp 类似物包含经取代或未经取代的双环芳香环组分,或者包含两个或两个以上经取代或未经取代的单环芳香环组分。

[0115] 在某些实施例中,Trp 类似物与 C3 形成氢键的倾向相对于 Trp 增加,但疏水性相对于 Trp 没有增加。Trp 类似物的极性比 Trp 强,和 / 或参与 C3 上氢键供体静电相互作用的能力有所增加。氢键形成性质增加的某些例示性 Trp 类似物在吲哚环上包含带负电荷的取代基。此类 Trp 类似物可位于例如相对于坎普他汀序列的 7 位。

[0116] 在本发明某些实施例中,坎普他汀类似物包含一种或多种 Ala 类似物(例如在相对于坎普他汀序列的 9 位),例如除在侧链包含一个或多个 CH₂ 基团外都与 Ala 一致的 Ala 类似物。在某些实施例中,Ala 类似物是无支链的单甲基氨基酸,例如 2-Abu。在本发明某些实施例中,坎普他汀类似物包含一种或多种 Trp 类似物(例如,在相对于坎普他汀序列的 4 位和 / 或 7 位)和一种 Ala 类似物(例如,在相对于坎普他汀序列的 9 位)。

[0117] 在本发明某些实施例中,坎普他汀类似物是包含序列为 (X' aa)_n-Gln-Asp-Xaa-Gly-(X'' aa)_m(SEQ ID NO:2) 的肽的化合物,其中各 X' aa 和各 X'' aa 是独立选择的氨基酸或氨基酸类似物,其中 Xaa 是 Trp 或 Trp 类似物,并且其中 n > 1 和 m > 1,而且 n+m 介于 5 与 21 之间。所述肽的核心序列为 Gln-Asp-Xaa-Gly,其中 Xaa 是 Trp 或 Trp 类似物,例如,与氢键供体形成氢键的倾向相对于 Trp 有所增加,但在某些实施例中疏水性相对于 Trp 没有增加的 Trp 类似物。例如,所述类似物可以是 Trp 的吲哚环经带负电部分(例如卤素,例如氟)取代的类似物。在一个实施例中,Xaa 是 5- 氟色氨酸。在没有相反证据的情况下,所属领域技术人员将认识到,序列包含此核心序列并且抑制补体激活和 / 或结合 C3 的任何非天然存在的肽都将能根据坎普他汀序列设计出来。在另一实施例中,Xaa 是除 Trp 类似物外允许 Gln-Asp-Xaa-Gly 肽形成 β 转角的氨基酸或氨基酸类似物。

[0118] 在本发明某些实施例中,所述肽的核心序列为 X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly(SEQ ID NO:3),其中 X' aa 和 Xaa 选自 Trp 和 Trp 类似物。在本发明某些实施例中,所述肽的核心序列为 X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly(SEQ ID NO:3),其中 X' aa 和 Xaa 选自 Trp、Trp 类似物,以及包含至少一个芳香环的其它氨基酸或氨基酸类似物。在本发明某些实施例中,在肽的情况下,核心序列形成 β 转角。β 转角可以是可弯曲的,以致当例如使用核磁共振(NMR)评定时,所述肽可呈现两种或两种以上构象。在某些实施例中,X' aa 是包含经取代或未经取代的双环芳香环组分,或者包含两个或两个以上经取代或未经取代的单环芳香环组分的 Trp 类似物。在本发明某些实施例中,X' aa 选自由 2- 萘基丙氨酸、1- 萘基丙氨酸、2- 茚满基甘氨酸甲酸、二氢色氨酸和苯甲酰基苯丙氨酸组成的群组。在本发明某些实施例中,

X' aa 是疏水性比 Trp 强的 Trp 类似物。例如, X' aa 可以是 1- 甲基色氨酸。在本发明某些实施例中, Xaa 是形成氢键的倾向相对于 Trp 有所增加, 但在某些实施例中疏水性相对于 Trp 没有增加的 Trp 类似物。在本发明某些实施例中, 形成氢键的倾向相对于 Trp 有所增加的 Trp 类似物在 Trp 的吲哚环上, 例如在 5 位, 包含修饰, 例如卤素原子取代 5 位的氢原子。例如, Xaa 可以是 5- 氟色氨酸。

[0119] 在本发明某些实施例中, 所述肽的核心序列为 X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'' aa (SEQ ID NO:4), 其中 X' aa 和 Xaa 各独立地选自 Trp 和 Trp 类似物, 并且 X'' aa 选自 His、Ala、Ala 类似物、Phe 和 Trp。在本发明某些实施例中, X' aa 是疏水性比 Trp 强的 Trp 类似物, 例如 1- 甲基色氨酸, 或在吲哚环上 (例如 1、4、5 或 6 位) 具有烷基取代基的另一 Trp 类似物。在某些实施例中, X' aa 是包含经取代或未经取代的双环芳香环组分, 或者包含两个或两个以上经取代或未经取代的单环芳香环组分的 Trp 类似物。在本发明某些实施例中, X' aa 选自 2- 萘基丙氨酸、1- 萘基丙氨酸、2- 茚满基甘氨酸甲酸、二氢色氨酸和苯甲酰基苯丙氨酸组成的群组。在本发明某些实施例中, Xaa 是与 C3 形成氢键的倾向相对于 Trp 有所增加, 但在某些实施例中疏水性相对于 Trp 没有增加的 Trp 类似物。在本发明某些实施例中, 形成氢键的倾向相对于 Trp 有所增加的 Trp 类似物在 Trp 的吲哚环上, 例如在 5 位, 包含修饰, 例如卤素原子取代 5 位的氢原子。例如, Xaa 可以是 5- 氟色氨酸。在某些实施例中, X'' aa 是 Ala 或 Ala 类似物, 例如 Abu, 或另一无支链单甲基氨基酸。在本发明某些实施例中, 所述肽的核心序列为 X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'' aa (SEQ ID NO:4), 其中 X' aa 和 Xaa 各独立地选自 Trp、Trp 类似物以及包含至少一个芳香族侧链的氨基酸或氨基酸类似物, 并且 X'' aa 选自 His、Ala、Ala 类似物、Phe 和 Trp。在某些实施例中, X'' aa 选自 Trp 类似物、芳香族氨基酸和芳香族氨基酸类似物。

[0120] 在本发明某些优选实施例中, 坎普他汀类似物是环状的。所述肽可通过任何两个氨基酸之间的键环化, 其中一个氨基酸是 (X' aa)_n, 而另一个位于 (X'' aa)_m 内。在某些实施例中, 肽的环状部分是 9 到 15 个氨基酸长, 例如 10 到 12 个氨基酸长。在某些实施例中, 肽的环状部分是 11 个氨基酸长, 并且在 2 位与 12 位氨基酸之间具有键 (例如二硫键)。例如, 肽可以是 13 个氨基酸长, 并且在 2 位与 12 位氨基酸之间具有键, 由此产生 11 个氨基酸长的环状部分。

[0121] 在某些实施例中, 所述肽包含序列 X' aa1-X' aa2-X' aa3-X' aa4-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'' aa1-X'' aa2-X'' aa3-X'' aa4-X'' aa5 (SEQ ID NO:5) 或由所述序列组成。在某些实施例中, X' aa4 和 Xaa 选自 Trp 和 Trp 类似物, 并且 X' aa1、X' aa2、X' aa3、X'' aa1、X'' aa2、X'' aa3、X'' aa4 和 X'' aa5 独立地选自氨基酸和氨基酸类似物。在某些实施例中, X' aa4 和 Xaa 选自芳香族氨基酸和芳香族氨基酸类似物。X' aa1、X' aa2、X' aa3、X'' aa1、X'' aa2、X'' aa3、X'' aa4 和 X'' aa5 中任何一个或多个可与坎普他汀中相应位置的氨基酸一致。在一个实施例中, X'' aa1 是 Ala 或无支链单甲基氨基酸。肽可通过 (i) X' aa1、X' aa2 或 X' aa3; 与 (ii) X'' aa2、X'' aa3、X'' aa4 或 X'' aa5 之间的共价键环化。在一个实施例中, 肽通过 X' aa2 与 X'' aa4 之间的共价键环化。在一个实施例中, 共价结合的氨基酸是各 Cys, 而且共价键是二硫 (S-S) 键。在其它实施例中, 共价键是 C-C、C-O、C-S 或 C-N 键。在某些实施例中, 一个共价结合的残基是侧链包含伯胺或仲胺的氨基

酸或氨基酸类似物,另一共价结合的残基是侧链包含羧酸基团的氨基酸或氨基酸类似物,并且共价键是酰胺键。侧链包含伯胺或仲胺的氨基酸或氨基酸类似物包括赖氨酸,和通用结构为 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 的二氨基羧酸,例如 2,3-二氨基丙酸(dapa)、2,4-二氨基丁酸(daba)和鸟氨酸(orn),其中n分别为1(dapa)、2(daba)和3(orn)。侧链包含羧酸基团的氨基酸的实例包括二羧基氨基酸,例如谷氨酸和天冬氨酸。还可使用类似物,例如 β -羟基-L-谷氨酸。

[0122] 在某些实施例中,坎普他汀类似物是包含具有以下序列的肽的化合物:

[0123] Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa2*-Gly-Xaa3-His-Arg-Cys-Xaa4 (SEQ ID NO: 6), 其中:

[0124] Xaa1 是 Ile、Val、Leu、B¹-Ile、B¹-Val、B¹-Leu,或包含 Gly-Ile 或 B¹-Gly-Ile 的二肽,并且

[0125] B¹ 表示第一封端部分;

[0126] Xaa2 和 Xaa2* 独立地选自 Trp 和 Trp 类似物;

[0127] Xaa3 是 His、Ala 或 Ala 类似物、Phe 或 Phe 类似物、Trp 或 Trp 类似物;

[0128] Xaa4 是 L-Thr、D-Thr、Ile、Val、Gly、选自 Thr-Ala 和 Thr-Asn 的二肽,或包含 Thr-Ala-Asn 的三肽,其中 L-Thr、D-Thr、Ile、Val、Gly、Ala 或 Asn 中任一个的羧基末端 -OH 任选经第二封端部分 B² 置换;并且

[0129] 两个 Cys 残基由二硫键连接。

[0130] 在其它实施例中,Xaa1 不存在,或为任何氨基酸或氨基酸类似物,并且 Xaa2、Xaa2*、Xaa3 和 Xaa4 如上文所定义。如果 Xaa1 不存在,则 N 末端 Cys 残基可连接有封端部分 B¹。

[0131] 在另一实施例中,Xaa4 为任何氨基酸或氨基酸类似物,并且 Xaa1、Xaa2、Xaa2* 和 Xaa3 如上文所定义。在另一实施例中,Xaa4 是选自自由 Thr-Ala 和 Thr-Asn 组成的群组的二肽,其中羧基末端 -OH 或者 Ala 或 Asn 任选经第二封端部分 B² 置换。

[0132] 在 SEQ ID NO:6 坎普他汀类似物的任一实施例中,Xaa2 可以是 Trp。

[0133] 在 SEQ ID NO:6 坎普他汀类似物的任一实施例中,Xaa2 可以是包含经取代或未经取代的双环芳香环组分,或者包含两个或两个以上经取代或未经取代的单环芳香环组分的 Trp 类似物。例如,Trp 类似物可选自 2-萘基丙氨酸(2-Nal)、1-萘基丙氨酸(1-Nal)、2-茚满基甘氨酸甲酸(Igl)、二氢色氨酸(Dht)和 4-苯甲酰基-L-苯丙氨酸。

[0134] 在 SEQ ID NO:6 坎普他汀类似物的任一实施例中,Xaa2 可以是疏水性比 Trp 强的 Trp 类似物。例如,所述 Trp 类似物可选自 1-甲基色氨酸、4-甲基色氨酸、5-甲基色氨酸和 6-甲基色氨酸。在一个实施例中,Trp 类似物是 1-甲基色氨酸。在一个实施例中,Xaa2 是 1-甲基色氨酸,Xaa2* 是 Trp,Xaa3 是 Ala,并且其它氨基酸与坎普他汀中的一致。

[0135] 在 SEQ ID NO:6 坎普他汀类似物的任一实施例中,Xaa2* 可以是 Trp 类似物,例如与 C3 形成氢键的倾向相对于 Trp 有所增加并且在某些实施例中疏水性相对于 Trp 没有增加的 Trp 类似物。在某些实施例中,Trp 类似物在吲哚环上包含带负电取代基。例如,Trp 类似物可选自 5-氟色氨酸和 6-氟色氨酸。

[0136] 在本发明某些实施例中,Xaa2 是 Trp,并且 Xaa2* 是与 C3 形成氢键的倾向相对于 Trp 有所增加并且在某些实施例中疏水性相对于 Trp 没有增加的 Trp 类似物。在 SEQ ID NO:

6 坎普他汀类似物的某些实施例中, Xaa2 是疏水性比 Trp 强的 Trp 类似物, 例如选自 1- 甲基色氨酸、4- 甲基色氨酸、5- 甲基色氨酸和 6- 甲基色氨酸的 Trp 类似物, 并且 Xaa2* 是与 C3 形成氢键的倾向相对于 Trp 有所增加并且在某些实施例中疏水性相对于 Trp 没有增加的 Trp 类似物。例如, 在一个实施例中, Xaa2 是甲基色氨酸, 并且 Xaa2* 是 5- 氟色氨酸。

[0137] 在上述某些实施例中, Xaa3 是 Ala。在上述某些实施例中, Xaa3 是无支链的单甲基氨基酸, 例如 Abu。

[0138] 在本发明某些实施例中, Xaa3 是 Phe。

[0139] 在某些实施例中, 本发明使用如上文所述的 SEQ ID NO :6 坎普他汀类似物, 其中 Xaa2 和 Xaa2* 独立地选自 Trp、Trp 类似物, 以及包含至少一个芳香环的其它氨基酸或氨基酸类似物, 并且 Xaa3 是 His、Ala 或 Ala 类似物、Phe、Trp、Trp 类似物, 或另一芳香族氨基酸或芳香族氨基酸类似物。

[0140] 在本发明某些实施例中, 任一本文所述的坎普他汀类似物的 N 末端或 C 末端存在的封端部分是使肽稳定以防降解 (否则其将在哺乳动物 (例如人类或非人类灵长类动物) 血液或玻璃体中发生) 的任何部分。例如, 封端部分 B¹ 可以是改变肽的 N 末端结构以抑制肽的 N 末端氨基酸与相邻氨基酸之间的肽键裂解的任何部分。封端部分 B² 可以是改变肽的 C 末端结构以抑制肽的 C 末端氨基酸与相邻氨基酸之间的肽键裂解的任何部分。可使用此项技术中已知的任何合适的封端部分。在本发明某些实施例中, 封端部分 B¹ 包含酰基 (即, 羧酸在去除 -OH 基团后剩余的部分), 在本文中也称为“烷酰基”。酰基通常包含 1 到 12 个碳, 例如 1 到 6 个碳。例如, 在本发明某些实施例中, 封端部分 B¹ 选自由以下组成的群组: 甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、异戊酰基等。在一个实施例中, 封端部分 B¹ 是乙酰基, 即, Xaa1 是 Ac-Ile、Ac-Val、Ac-Leu 或 Ac-Gly-Ile。

[0141] 在本发明某些实施例中, 封端部分 B² 是伯胺或仲胺 (-NH₂ 或 -NHR¹, 其中 R 是有机部分, 例如烷基)。

[0142] 在本发明某些实施例中, 封端部分 B¹ 是中和或降低负电荷 (否则其可在生理 pH 值下存在于 N 末端) 的任何部分。在本发明某些实施例中, 封端部分 B² 是中和或降低负电荷 (否则其可在生理 pH 值下存在于 C 末端) 的任何部分。

[0143] 在本发明某些实施例中, 坎普他汀类似物分别在 N 末端和 / 或 C 末端乙酰化或酰胺化。坎普他汀类似物可在 N 末端乙酰化、在 C 末端酰胺化, 和或在 N 末端乙酰化和在 C 末端酰胺化。在本发明某些实施例中, 坎普他汀类似物在 N 末端包含烷基或芳基, 而非乙酰基。

[0144] 在某些实施例中, 坎普他汀类似物是包含具有以下序列的肽的化合物:

[0145] Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa2*-Gly-Xaa3-His-Arg-Cys-Xaa4 (SEQ ID NO : 7), 其中:

[0146] Xaa1 是 Ile、Val、Leu、Ac-Ile、Ac-Val、Ac-Leu, 或包含 Gly-Ile 或 Ac-Gly-Ile 的二肽;

[0147] Xaa2 和 Xaa2* 独立地选自 Trp 和 Trp 类似物;

[0148] Xaa3 是 His、Ala 或 Ala 类似物、Phe 或 Phe 类似物、Trp 或 Trp 类似物;

[0149] Xaa4 是 L-Thr、D-Thr、Ile、Val、Gly、选自 Thr-Ala 和 Thr-Asn 的二肽, 或包含 Thr-Ala-Asn 的三肽, 其中 L-Thr、D-Thr、Ile、Val、Gly、Ala 或 Asn 中任一个的羧基末端 -OH

任选经 $-NH_2$ 置换 ; 并且

[0150] 两个 Cys 残基由二硫键连接。

[0151] Xaa1、Xaa2、Xaa2*、Xaa3 和 Xaa4 如上文关于 SEQ ID NO :6 的各个实施例所述。例如,在某些实施例中,Xaa2* 是 Trp。在某些实施例中,Xaa2 是疏水性比 Trp 强的 Trp 类似物,例如 1- 甲基色氨酸。在某些实施例中,Xaa3 是 Ala。在某些实施例中,Xaa3 是无支链的单甲基氨基酸。

[0152] 在本发明某些实施例中,Xaa1 是 Ile 并且 Xaa4 是 L-Thr。

[0153] 在本发明某些实施例中,Xaa1 是 Ile,Xaa2* 是 Trp 并且 Xaa4 是 L-Thr。

[0154] 在某些实施例中,本发明利用如上文所述的 SEQ ID NO :7 坎普他汀类似物,其中 Xaa2 和 Xaa2* 独立地选自 Trp、Trp 类似物、其它氨基酸或芳香族氨基酸类似物,并且 Xaa3 是 His、Ala 或 Ala 类似物、Phe 或 Phe 类似物、Trp、Trp 类似物,或另一芳香族氨基酸或芳香族氨基酸类似物。

[0155] 在本文所述任一坎普他汀类似物的某些实施例中,Xaa3 是 His 类似物。在本文所述任一坎普他汀类似物的某些实施例中,Xaa3 是 Phe。

[0156] 表 1 提供适用于本发明各实施例中的非限制性坎普他汀类似物清单。所述类似物在左边一栏中以缩写形式提及,指示在指定位置 (1-13) 与母肽坎普他汀相比较的特定修饰。与此项技术中的用法一致,如本文所使用的“坎普他汀”和本文所述坎普他汀类似物相对于坎普他汀的活性,是指在 C 末端酰胺化的坎普他汀肽。除非另作说明,否则肽的 C 末端经酰胺化。粗体字用于指示某些修饰。相对于坎普他汀的活性是根据公开的数据和其中所述的分析 (例如 W02004/026326 ;默里克 (Mallik), 2005 ;卡特拉格达 (Katragadda), 2006 ; W02007/062249)。当参考多个报导活性的出版物时,使用最新公开的值,并且应认识到,在各分析之间存在差异的情况下,可对值进行调整。还应了解,表 1 中所列的肽当用于本发明组合物和方法中时,通常通过两个 Cys 残基之间的二硫键环化。然而,也可使用使肽环化的其它方式。

[0157] 表 1

[0158]

肽	序列	SEQ ID NO:	相比坎普他汀的活性
坎普他汀	<i>H</i> -ICVVQDWGHHRCT-CONH ₂	8	*
Ac-坎普他汀	<i>Ac</i> -ICVVQDWGHHRCT-CONH ₂	9	3 倍
Ac-V4Y/H9A	<i>Ac</i> -ICVYQDWGAHRCT-CONH ₂	10	14 倍
Ac-V4W/H9A -OH	<i>Ac</i> -ICVWQDWGAHRCT-COOH	11	27 倍
Ac-V4W/H9A	<i>Ac</i> -ICVWQDWGAHRCT-CONH ₂	12	45 倍
Ac-V4W/H9A/T13dT -OH	<i>Ac</i> -ICVWQDWGAHRCTdT-COOH	13	55 倍
Ac-V4(2-NaI)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(2-NaI)QDWGAHRCT-CONH ₂	14	99 倍
AcV4(2-NaI)/H9A-OH	<i>Ac</i> -ICV(2-NaI)QDWGAHRCT-COOH	15	38 倍
AcV4(1-NaI)/H9A-OH	<i>Ac</i> -ICV(1-NaI)QDWGAHRCT-COOH	16	30 倍
Ac-V42IgI/H9A	<i>Ac</i> -ICV(2-IgI)QDWGAHRCT-CONH ₂	17	39 倍
Ac-V42IgI/H9A-OH	<i>Ac</i> -ICV(2-IgI)QDWGAHRCT-COOH	18	37 倍
Ac-V4Dht/H9A-OH	<i>Ac</i> -ICVDhtQDWGAHRCT-COOH	19	5 倍
Ac-V4(Bpa)/H9A -OH	<i>Ac</i> -ICV(Bpa)QDWGAHRCT-COOH	20	49 倍
Ac-V4(Bpa)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(Bpa)QDWGAHRCT-CONH ₂	21	86 倍
Ac-V4(Bta)/H9A -OH	<i>Ac</i> -ICV(Bta)QDWGAHRCT-COOH	22	65 倍
Ac-V4(Bta)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(Bta)QDWGAHRCT-CONH ₂	23	64 倍
Ac-V4W/H9(2-Abu)	<i>Ac</i> -ICVWQDWG(2-Abu)HRCT-CONH ₂	24	64 倍
+G/V4W/H9A +AN -OH	<i>H</i> -GICVWQDWGAHRCTAN-COOH	25	38 倍
Ac-V4(5fW)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(5fW)QDWGAHRCT-CONH ₂	26	31 倍
Ac-V4(5-MeW)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(5-甲基-W)QDWGAHRCT-CONH ₂	27	67 倍
Ac-V4(1MeW)/W7(5fW)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(1-甲基-W)QD(5fW)GAHRCT-CONH ₂	28	264 倍
Ac-V4W/W7(5fW)/H9A	<i>Ac</i> -ICVWQD(5fW)GAHRCT-CONH ₂	29	121 倍
Ac-V4(5fW)/W7(5fW)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(5fW)QD(5fW)GAHRCT-CONH ₂	30	161 倍
Ac-V4(5-MeW)/W7(5fW)H9A	<i>Ac</i> -ICV(5-甲基-W)QD(5fW)GAHRCT-CONH ₂	31	NA
Ac-V4(1-MeW)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(1-甲基-W)QDWGAHRCT-CONH ₂	32	264 倍
+G/V4(6fW)/W7(6fW)H9A+N-OH	<i>H</i> -GICV(6fW)QD(6fW)GAHRCTN-COOH	33	126 倍
Ac-V4(1-甲酰基-W)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(1-甲酰基-W)QDWGAHRCT-CONH ₂	34	264 倍
Ac-V4(5-甲氧基-W)/H9A	<i>Ac</i> -ICV(1-甲氧基-W)QDWGAHRCT-CONH ₂	35	76 倍
G/V4(5f-W)/W7(5fW)/H9A+N-OH	<i>H</i> -GICV(5fW)QD(5fW)GAHRCTN-COOH	36	112 倍

[0159] NA = 不适用

[0160] 在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物的序列选自序列 9 到 36。在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34 和 36。在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物具有 SEQ ID NO:28。在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物具有 SEQ ID NO:29。在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物的序列选自 SEQ ID NO:30 和 31。在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物具有 SEQ ID NO:32。在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物具有 SEQ ID NO:33。在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物具有 SEQ ID NO:34。在本发明组合物和方法的某些实施例中，坎普他汀类似物具有 SEQ ID NO:36。

[0161] 在其它实施例中，使用具有表 1 中所述序列但 Ac- 基团经如上文所述的替代封端部分 B¹ 置换的坎普他汀类似物。在其它实施例中，使用具有表 1 中所述序列但 -NH₂ 基团经

如上文所述的替代封端部分 B² 置换的坎普他汀类似物。

[0162] 在一个实施例中,坎普他汀类似物与坎普他汀结合至人类 C3 的 β 链的实质上相同的区域。在一个实施例中,坎普他汀类似物是结合至坎普他汀所结合的人类 C3 β 链 C 末端部分的分子量为约 40kDa 的片段的化合物 (A. M. 索利卡 (Soulika, A. M.) 等人,分子免疫学 (Mol. Immunol), 35 :160, 1998 ;A. M. 索利卡 (Soulika, A. M.) 等人,分子免疫学 (Mol. Immunol). 43(12) :2023-9, 2006)。在某些实施例中,坎普他汀类似物是结合至如在坎普他汀 -C3 结构 (例如晶体结构或由 NMR 得到的 3D 结构) 中确定的坎普他汀结合位点的化合物。在某些实施例中,坎普他汀类似物是可取代坎普他汀 -C3 结构中的坎普他汀并且能与 C3 形成与坎普他汀所形成实质上相同的分子间接触的化合物。在某些实施例中,坎普他汀类似物是结合至肽 -C3 结构 (例如晶体结构) 中具有表 1 所述序列 (例如 SEQ ID NO :14、21、28、29 或 32) 的肽的结合位点的化合物。在某些实施例中,坎普他汀类似物是结合至肽 -C3 结构 (例如晶体结构) 中具有 SEQ ID NO :30 或 31 的肽的结合位点的化合物。在某些实施例中,坎普他汀类似物是可取代肽 -C3 结构中具有 SEQ ID NO :9 到 36 (例如 SEQ ID NO :14、21、28、29、30、32、34 或 36) 的肽并且能与 C3 形成与所述肽所形成实质上相同的分子间接触的化合物。

[0163] 所属领域技术人员能够使用常规实验方法,容易地确定坎普他汀类似物是否结合 C3 β 链 C 末端部分的片段。例如,所属领域技术人员可通过在坎普他汀类似物中,例如序列的 C 末端,包括光交联氨基酸,例如对苯甲酰基 -L- 苯丙氨酸 (Bpa),来合成可光交联形式的化合物 (A. M. 索利卡 (Soulika, A. M.) 等人,同上文)。可包括任选使用的额外氨基酸,例如表位标签,如 FLAG 标签或 HA 标签,来便利检测 (例如通过免疫印迹法 (Western blotting)) 化合物。将坎普他汀类似物与所述片段一起培育,并起始交联。坎普他汀类似物与 C3 片段的共定位 (colocalization) 指示结合。也可使用表面等离子共振来确定坎普他汀类似物是否结合 C3 或其片段上的坎普他汀结合位点。所属领域技术人员能够使用分子建模软件程序来预测一种化合物是否能与 C3 形成与坎普他汀或具有表 1 中一个或多个肽的序列 (例如 SEQ ID NO :14、21、28、29 或 32,或在其它实施例中,SEQ ID NO :30 或 31) 的肽所形成实质上相同的分子间接触。

[0164] 坎普他汀类似物可利用此项技术中已知的多种肽合成方法,例如根据常规肽合成方法,经由氨基酸残基的缩合来制备;可使用此项技术中已知的方法,通过在体外或在活细胞中由编码其的合适核酸序列表达来制备。例如,可使用如马立克 (Malik),同上文;卡特拉格达 (Katragadda),同上文;和 / 或 W02004026328 中所述的标准固相方法,来合成肽。可使用此项技术中已知的各种保护基和方法对潜在反应性部分,例如氨基和羧基、反应性官能团等,进行保护和随后脱保护。例如参看 "有机合成中的保护基 (Protective Groups in Organic Synthesis)", 第 3 版 T. W. 格林尼 (Greene, T. W.) 和 P. G. 伍兹 (Wuts, P. G.) 编,约翰威立公司 (John Wiley & Sons), 纽约 (New York) :1999。可使用标准方法,例如反相 HPLC,纯化肽。必要时,可使用已知方法,例如反相 HPLC,进行非对映异构肽的分离。必要时可将制剂冻干,随后溶解于例如水等合适溶剂中。可使用碱 (例如 NaOH), 调整所得溶液的 pH 值,例如调到生理 pH 值。必要时,可利用质谱来表征肽制剂,例如以确认质量和 / 或二硫键形成。例如参看默里克 (Mallik), 2005 和卡特拉格达 (Katragadda), 2006。

[0165] 此项技术中已知坎普他汀的结构,而且活性比坎普他汀高的多种坎普他汀类似物

的 NMR 结构也是已知的 (马立克 (Malik), 同上文)。可使用结构信息来设计坎普他汀模拟物。在一个实施例中, 坎普他汀模拟物是与坎普他汀或任何坎普他汀类似物 (例如序列如表 1 中所述的坎普他汀类似物) 竞争与 C3 或其片段 (例如坎普他汀所结合的 β 链的 40kDa 片段) 结合并且活性等于或高于坎普他汀的任何化合物。坎普他汀模拟物可以是肽、核酸或小分子。在某些实施例中, 坎普他汀模拟物是结合至如在坎普他汀-C3 结构 (例如晶体结构或由 NMR 实验得到的 3D 结构) 中确定的坎普他汀结合位点的化合物。在某些实施例中, 坎普他汀模拟物是可取代坎普他汀-C3 结构中的坎普他汀并且能与 C3 形成与坎普他汀所形成实质上相同的分子间接触的化合物。在多个实施例中, 坎普他汀模拟物是结合至在肽-C3 结构中具有表 1 中所述序列的肽的结合位点的化合物。在某些实施例中, 坎普他汀模拟物具有非肽主链, 而侧链排列成根据坎普他汀序列设计的序列。

[0166] 所属领域技术人员将理解, 在确定短肽的特定所需构象后, 众所周知设计肽或肽模拟物以配合所述构象的方法。例如参看 G. R. 马西尔 (G. R. Marshall) (1993), 四面体通讯 (Tetrahedron), 49:3547-3558; 胡比 (Hruby) 和尼克弗维奇 (Nikiforovich) (1991), 分子构象和生物相互作用 (Molecular Conformation and Biological Interactions), P. 贝拉姆 (P. Balaram) 和 S. 瑞玛西汉 (S. Ramasehan) 编, 印度科学院 (Indian Acad, of Sci.), 班加罗尔 (Bangalore), 第 429-455 页; M 优奇 (Eguchi M), M. 卡恩 (Kahn M.), 药物化学短评 (Mini Rev Med Chem.), 2(5):447-62, 2002。可如此项技术中关于坎普他汀和其类似物所述, 通过考虑各种氨基酸残基侧链的贡献, 例如对于官能团的作用或空间考虑等, 进一步改进肽类似物的设计。

[0167] 所属领域技术人员应理解, 肽模拟物与肽的作用能充分等同, 以便提供结合 C3 和抑制补体激活所需的特定主链构象和侧链官能性。因此, 本发明的范围内涵盖通过使用能连接形成合适主链构象的天然存在的氨基酸、氨基酸衍生物、类似物或非氨基酸分子, 制备结合 C3、抑制补体的化合物, 并利用结合 C3、抑制补体的化合物。非肽类似物或包含肽和非肽组分的类似物在本文中有时称为“肽模拟物”或“电子等排模拟物”, 用于指具有大致相同的主链构象特征和 / 或其它官能性的肽的取代或衍生化, 以致其与例示性说明的肽足够类似以抑制补体激活。更一般来说, 坎普他汀模拟物是药效团的位置类似于其在坎普他汀中的定位 (即使主链不同) 的任何化合物。

[0168] 此项技术中众所周知肽模拟物用于开发高亲和力肽类似物的用途。假定旋转约束 (rotational constraint) 与一种肽内的氨基酸残基类似, 可借助拉马钱德兰图 (Ramachandran plot; 胡比 (Hruby) 和尼克弗维奇 (Nikiforovich) 1991) 和其它已知技术, 来分析包含非氨基酸部分的类似物, 并验证其构象基元。可使用虚拟筛选方法鉴别结合 C3 的坎普他汀模拟物。所述方法可包含使用合适的算法, 用计算机对多种候选结构进行对接、评分和任选分级。可使用多种可用软件程序中任一种来进行虚拟筛选方法。适用于灵活分子对接的例示性程序包括 DOCK 4.0、FlexX 1.8、AutoDock 3.0、GOLD1.2、ICM 2.8 和其较新的版本。

[0169] 所属领域技术人员将能够容易地确立合适的筛选分析, 以鉴别额外坎普他汀模拟物并选择具有所需抑制活性的模拟物。例如, 坎普他汀或其类似物可经标记 (例如, 用放射性或荧光标记), 并在不同浓度测试化合物存在下与 C3 接触。评估测试化合物减少坎普他汀类似物与 C3 结合的能力。使坎普他汀类似物与 C3 的结合明显减少的测试化合物是候选

坎普他汀模拟物。例如,使坎普他汀类似物-C3 复合物的稳态浓度减少,或使坎普他汀类似物-C3 复合物的形成速率降低至少 25%或至少 50%的测试化合物是候选坎普他汀模拟物。所属领域技术人员将认识到,可使用所述筛选分析的多种变化形式。欲筛选的化合物包括天然产物、适配子文库、噬菌体呈现文库、使用组合化学合成的化合物文库等。本发明涵盖根据上述核心序列合成化合物的组合文库,和筛选所述文库以鉴别坎普他汀模拟物。还可使用任何所述方法,鉴别抑制活性高于迄今所测试的坎普他汀类似物的新坎普他汀类似物。

[0170] 组合疗法和组合物

[0171] 本发明提供液体组合物,其包含:(a) 坎普他汀类似物,其量足以在引入哺乳动物个体的血管外位置中后形成宏观凝胶状结构;和(b) 额外治疗剂,其中所述额外治疗剂不是坎普他汀类似物。本发明涵盖使用坎普他汀类似物连同一种或多种其它有效治疗病症的第二药剂。所述药剂可作用于相同靶或路径或者不同靶或路径。坎普他汀类似物与第二药剂的作用可以是加和的或协同的(其中药剂的组合活性高于其独立投予时活性的总和)。在一些实施例中,投予第二药剂以治疗与补体激活无关的病症,即,凝胶状结构基本上被用作第二药剂的持续释放递送系统。在一些实施例中,使用包含选自 SEQID NO:3、4、5、6 或 7 的序列的肽,形成凝胶状结构,其中肽的补体抑制活性低于坎普他汀。在一些实施例中,肽的活性是坎普他汀的 50%或更低。

[0172] 第二药剂按待治疗病症的需要来选择。合适药剂包括消炎剂,例如皮质类固醇、非类固醇消炎剂、白三烯或白三烯受体拮抗剂、细胞因子或细胞因子受体拮抗剂(例如抗 TNF α 剂,如抗体或可溶性 TNF α 受体,或其结合 TNF α 的片段)、抗 IgE 剂(例如抗体,或结合 IgE 或 IgE 受体的抗体片段)、血管生成抑制剂、镇痛剂和抗感染剂。

[0173] 在一些实施例中,第二药剂是神经保护剂或抗氧化剂,或者抑制或减缓视觉周期的化合物。

[0174] 在本发明某些实施例中,额外活性剂是血管生成抑制剂。可使用多种多样的血管生成抑制剂。在本发明某些实施例中,血管生成抑制剂特异性结合一种或多种血管内皮生长因子(VEGF)同功异型体或受体。血管生成抑制剂可以是抗体、抗体片段、多肽、肽、核酸、适配子或 siRNA。在本发明某些实施例中,血管生成抑制剂特异性结合一种、多于一种或所有血管内皮生长因子(VEGF)同功异型体或受体。在一些实施例中,第二治疗剂是结合血管内皮生长因子(VEGF)的人化单克隆抗体,例如 LG 普雷斯塔(Presta, LG)等人,癌症研究(Cancer Res.),57,4593-4599(1997)中所述的抗体或其抗原结合片段,或者结合相同表位的抗体或抗体片段。在本发明某些实施例中,血管生成抑制剂是或包含哺乳动物肽或多肽,例如色素上皮衍生因子(PEDF)、血管抑素、内皮抑素等,或其保留抗血管生成活性的片段。血管生成抑制剂可以是此项技术中认可的适用于治疗 AMD 和/或 CNV 或 RNV 的血管生成抑制剂,例如 Lucentis®(雷尼株单抗(ranibizumab))、Avastin®(贝伐单抗(bevacizumab))或 Macugen®(哌加他尼钠(pegaptanib sodium))。在一些实施例中,提供的雷尼株单抗、贝伐单抗或哌加他尼的浓度或量是所批准的作为单一药剂在临床上用于湿性 AMD 的约 0.5 倍到约 5 倍。在例示性实施例中,所述量是约 0.3mg、0.5mg、1.0mg 或 1.5mg。在一些实施例中,包含坎普他汀类似物和血管生成抑制剂的液体组合物是投予显现脉络膜新血管形成(choroidal neovascularization, CNV)和/或视网膜新血管形成(retinal

neovascularization, RNV) 的眼睛,例如患有湿性 AMD 的眼睛。所述抑制剂可例如使用重组技术、杂交瘤技术、化学合成而制备得到,或从天然存在的来源中分离。

[0175] 本发明还提供一种方法,其包含:(a) 对哺乳动物个体投予坎普他汀类似物,其量足以在引入个体的血管外位置中后形成宏观凝胶状结构;和(b) 对个体投予血管生成抑制剂。在本发明不同实施例中,血管生成抑制剂可在或不在所述液体组合物中投予。血管生成抑制剂若以不同组合物投药,则可投予相同血管外位置或不同位置。如果分开投予,则液体组合物可在投予血管生成抑制剂之前、基本上同时或之后投予。在一些实施例中,首先投予血管生成抑制剂,并且在一定时间间隔后投予本发明的液体组合物。所述时间间隔可以是例如投予血管生成抑制剂后多达 1、2 或 4 周,或投予血管生成抑制剂后多达 2 或 3 个月。在一些实施例中,在患有 AMD 的个体的视力提高,和 / 或视网膜厚度降低,和 / 或眼睛中血管渗漏减少(例如使用光学相干断层扫描术或荧光素血管造影术)后,将本发明液体组合物投予个体的眼睛。血管生成抑制剂可以投予此类药剂的标准剂量和标准途径(例如玻璃体内投药)使用。

[0176] 本发明提供液体组合物,其包含:(a) 坎普他汀类似物,其量足以在引入哺乳动物个体的血管外位置中后形成宏观凝胶状结构;和(b) 额外补体抑制剂,其中所述额外补体抑制剂不是坎普他汀类似物。在各个实施例中,第二补体抑制剂是肽、多肽、非肽小分子、适配子、抗体或核酸。在本发明某些实施例中,第二药剂是环状肽。在某些实施例中,所述药剂是 C5a 受体 (C5aR) 拮抗剂。例示性 C5a 受体拮抗剂包括多种小环状肽,例如美国专利第 6,821,950 号、USSN 11/375,587 和 / 或 PCT/US06/08960 (W02006/099330) 中所述的那些。在本发明某些实施例中,使用包含序列 [OPdChaWR] (SEQ ID NO:33) 的环状肽。在本发明某些实施例中,使用包含序列 [KPdChaWR] (SEQ ID NO:37) 的环状肽。在某些实施例中,使用包含序列 (Xaa)_n[OPdChaWR] (SEQ ID NO:38) 的肽,其中 Xaa 是氨基酸残基,并且 n 介于 1 与 5 之间。在某些实施例中,使用包含序列 (Xaa)_n[KPdChaWR] (SEQ ID NO:39) 的肽,其中 Xaa 是氨基酸残基,并且 n 介于 1 与 5 之间。在本发明某些实施例中,n 是 1。在本发明某些实施例中,n 是 1,并且 Xaa 是标准或非标准芳香族氨基酸。例如,肽 F-[OPdChaWR] (SEQ ID NO:40)、F-[KPdChaWR] (SEQ ID NO:41)、Cin-[OPdChaWR] (SEQ ID NO:42) 和 HCin-[OPdChaWR] (SEQ ID NO:43) 是值得关注的。游离末端任选包含封端部分,例如末端氨基酸经乙酰化。(缩写:O:鸟氨酸;Cha:环己基丙氨酸;Cin:肉桂酰基;Hcin:氢化肉桂酰基;方括号表示内部肽键)。

[0177] 含粒子组合物

[0178] 在某些实施例中,液体组合物除包含足以形成凝胶状结构的量的坎普他汀类似物外,还包含包括治疗剂的粒子群,其中所述组合物能够释放所述治疗剂。所述组合物以及包含所述组合物的凝胶是本发明的一个方面。所述粒子可以例如是微米粒子或纳米粒子。微米粒子或纳米粒子可以是聚合物基粒子(例如,含有合成有机聚合物、多肽等);脂质基或含脂质粒子,例如脂质体、非离子表面活性剂囊泡(niosome)、胶束等。在本发明某些实施例中,治疗剂是补体抑制剂。粒子被保留在凝胶状结构中,并且随着凝胶状结构崩解或溶解,随时间而释放出来。粒子在截留于凝胶中的同时,可至少部分崩解或溶解。补体抑制剂可以是坎普他汀类似物,其可与形成凝胶状结构的坎普他汀类似物相同,或者是不同的坎普他汀类似物。上文已论述其它有用的治疗剂。

[0179] 纳米粒子或微米粒子可使用此项技术中已知的任何方法制造,包括(但不限于)喷雾干燥、相分离、单乳化和双乳化、溶剂蒸发、溶剂萃取以及单凝聚和复凝聚。也可使用粒化、挤出和/或滚圆来制造颗粒状聚合物组合物。例如参看美国公开案第 20040092470 号。此项技术中已知制备脂质体和其它脂质基粒子的方法。在一些实施例中,粒子基本上由一种或多种坎普他汀类似物组成。在一些实施例中,粒子是由至少 50% (以干重计) 坎普他汀类似物构成。所述粒子任选含有一种或多种赋形剂。

[0180] 一种组合物可含有具有不同组成和/或特性的纳米粒子或微米粒子。可改变用于制备粒子的条件,得到具有所需尺寸或特性(例如,疏水性、亲水性、外部形态、密度、硬度、“粘性”、形状等)的粒子。制备粒子的方法和所用条件(例如溶剂、温度、浓度、气流速率等)也可取决于治疗剂和/或聚合物基质的组成。一般要避免可能导致补体抑制剂明显降解的极端温度或 pH 值。应了解,降解程度可能随特定条件和补体抑制剂暴露于所述条件的时间,以及药剂本身的结构和特性而变化。例如,稳定肽(例如坎普他汀类似物)可具有显著优势。可对组合物进行测试,以确定在保留足够功效方面,所选方法是否适合。在某些实施例中,所选调配方法产生在调配后使化合物保留所输入化合物的至少 10%、优选至少 20%、50% 或更高活性水平的组合物。

[0181] 制备粒子的方法和所用条件(例如溶剂、温度、浓度、气流速率等)也可取决于特定活性剂和组合物中所包括的其它组分。如果利用上述任一方法制备的粒子具有超出所需范围的尺寸范围,那么可例如使用筛网、通过研磨等,来分选粒子。可使用方法的组合。

[0182] 用于本发明中的微米粒子和纳米粒子可具有多种尺寸。一般来说,微米粒子的直径将为 500 微米或更小,例如介于 1 微米与 500 微米之间、介于 50 微米与 500 微米之间、介于 100 微米与 250 微米之间、介于 20 微米与 50 微米之间、介于 1 微米与 20 微米之间、介于 1 微米与 10 微米之间等,而纳米粒子的直径将小于 1 微米,例如介于 10 纳米与 100 纳米之间、介于 100 纳米与 250 纳米之间、介于 100 纳米与 500 纳米之间、介于 250 纳米与 500 纳米之间、介于 250 纳米与 750 纳米之间、介于 500 纳米与 750 微米之间。30. 在一些实施例中,微米粒子的直径在 5 到 750 微米的范围内。在一些实施例中,微米粒子的直径在 10 到 500 微米的范围内。在一些实施例中,微米粒子的直径在 20 到 200 微米的范围内。在一些实施例中,纳米粒子的直径在 5 到 750 纳米的范围内。在一些实施例中,纳米粒子的直径在 10 到 500 纳米的范围内。在一些实施例中,纳米粒子的直径在 20 到 200 纳米的范围内。在一些实施例中,对尺寸进行选择,以最小化或避免跨毛细管壁转运,由此最小程度地进入血管系统中。

[0183] 在一些实施例中,微米粒子或纳米粒子由选自以下组成的群组的聚合物形成:透明质烷、壳聚糖、胶原蛋白、明胶、海藻酸盐、聚(丙交酯)、聚(乙交酯)、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-共-乙醇酸)、聚己内酯、聚碳酸酯、聚酯酰胺、聚酸酐、聚(氨基酸)、聚原酸酯、聚乙酰基、聚氰基丙烯酸酯、聚醚酯、聚(对二氧杂环己酮)、聚(烷酸烷二酯)、聚乙二醇与聚原酸酯的共聚物、生物可降解聚氨基甲酸酯,其掺合物和共聚物。例如,聚合物可以是聚乳酸(PLLA)、聚乙醇酸(PGA)或 PLGA。粒子的尺寸(例如,直径)或形状可实质上均匀,或其尺寸和/或形状可不均匀。其可实质上呈球形,或可具有其它形状,在此情况下,相关尺寸将为粒子表面上两点之间的最长直线尺寸,而非直径。粒子群可由约 20% 到约 100%,例如约 40%、40%、50%、60%、70%、80%、

90%等在上述任一尺寸范围内的粒子组成。

[0184] 液体组合物和其制备方法

[0185] 一般说来,使用此项技术中已知并且适于所述类别化合物的标准方法,来制造补体抑制剂和其它治疗剂。可使用标准固相肽合成技术制造肽,例如坎普他汀类似物和本文论述的其它肽。例如,可通过受保护肽的固相合成,使用 Fmoc 化学、树脂中肽的裂解(leavage)以及侧链保护基的去除、Cys2 与 Cys12 间形成二硫键,随后纯化,和被氧化的肽转化成乙酸酯形式,来制备坎普他汀类似物。必要时,可将块状产物冻干。肽制造商包括例如以下公司:先进化学技术公司(Advanced Chemtech)、安拜法姆公司(Ambiopharm)、美国肽制品公司(American Peptide)、道尔顿制药公司(Dalton PharmaServices)、基因斯普特公司(GenScript)、生物分子综合公司(Integrated Biomolecule)、龙泽公司(Lonza)、新英格兰肽制品公司(New England Peptide)、肽 2.0 公司(Peptide2.0)、辛斯泰克公司(Synthetech)等。可使用如 USSN 11/247,886 和 PCT/US2005/36547(W02006042252)中所述的标准重组核酸技术,制备重组多肽。有关重组多肽的制备和多肽纯化的其它信息,例如参看 C 哈丁(Hardin, C)等人(编),“克隆、基因表达和蛋白质纯化:实验程序和方法原理(Cloning, Gene Expression and Protein Purification:Experimental Procedures and Process Rationale)”,牛津大学出版社(Oxford University Press),牛津(Oxford),2001。抗体(例如单克隆抗体)可从杂交瘤采集,或使用此项技术中已知的重组方法制备。核酸,例如 siRNA、适配子等,使用标准方法合成。可使用标准方法进行化学修饰,例如聚乙二醇化。

[0186] 本发明液体组合物包含坎普他汀类似物和医药学上可接受的载剂。术语“医药学上可接受的载剂”是指不会破坏用其调配的化合物的药理学活性的无毒载剂。可用于本发明组合物中的医药学上可接受的载剂或媒剂包括(但不限于)液体,例如水、生理盐水等。在本发明某些实施例中,医药学上可接受的载剂是水。在一些实施例中,液体组合物的 pH 值在 3.5 与 6.5 之间。在一些实施例中,液体组合物的 pH 值在 4.0 与 4.5 之间。在一些实施例中,液体组合物的 pH 值在 4.5 与 5.0 之间。在一些实施例中,液体组合物的 pH 值在 5.0 与 5.5 之间。在一些实施例中,液体组合物的 pH 值在 5.0 与 6.5 之间。

[0187] 在本发明某些实施例中,液体组合物可含有多种额外成分。例如,可包括缓冲剂、pH 值调节剂、增溶剂、摩尔渗透压浓度调节剂(例如糖)等。可使用此项技术中已知的标准赋形剂。在一些实施例中,将坎普他汀类似物溶解于添加有一种或多种缓冲剂或赋形剂的液体介质(例如水)中。例如,制备出含有例如氨基酸或多元醇(例如糖醇)等赋形剂和/或缓冲剂的溶液。坎普他汀类似物以粉末形式添加,并溶解。必要时,可过滤溶液。

[0188] 可使用医药学上可接受的坎普他汀类似物的盐,例如由医药学上可接受的无机和有机酸和碱得到的盐。此外,应了解,本发明涵盖本文所述活性剂的溶剂化物、水合物、对映异构形式、构象异构体、互变异构体、多晶形式等。在一些实施例中,提供具有乙酸根作为平衡离子的坎普他汀类似物。

[0189] 组合物中坎普他汀类似物的量和浓度可视多种因素而变化,包括(但不限于)坎普他汀类似物的特性、所治疗的病况和其严重程度等,只要当投予组合物时,所述量和浓度足以形成宏观凝胶状结构即可。可通过适当选择所投予的坎普他汀类似物的量和/或浓度,来调控释放的持续时间。还应了解,形成凝胶状沉积物所需的坎普他汀类似物的最小量

和 / 或浓度可视例如个体物种、年龄等因素而变化。所属领域技术人员可容易确定适当值。此外,组合物不必在每一所治疗的个体中都形成凝胶状沉积物。

[0190] 在一些实施例中,本发明提供一种包含坎普他汀类似物的组合物,其中所述组合物的特征在于,当经玻璃体内投予灵长类动物后,组合物即形成凝胶,其在至少 3 个月内仍能利用超声波和 / 或眼科检查,在至少 75% (例如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或更多) 被投予组合物的眼睛中检测到。在一些实施例中,本发明提供一种包含坎普他汀类似物的组合物,其中所述组合物的特征在于,当经玻璃体内投予灵长类动物后,组合物即形成凝胶,其在至少 6 个月内仍能利用超声波和 / 或眼科检查,在至少 75% 被投予组合物的眼睛中检测到。在一些实施例中,本发明提供一种包含坎普他汀类似物的组合物,其中所述组合物的特征在于,当经玻璃体内投予灵长类动物后,组合物即形成凝胶,其在至少 9 个月内仍能利用超声波和 / 或眼科检查,在至少 75% 被投予组合物的眼睛中检测到。在一些实施例中,灵长类动物是非人类灵长类动物,例如食蟹猴。在一些实施例中,灵长类动物为人类。在本发明一些实施例中,在投药的 12、15、18 或 24 个月内,利用超声波在至少 75% (例如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或更多) 眼睛中不能检测到凝胶。在一些实施例中,凝胶每天释放 1 μ g 到 5 μ g 坎普他汀类似物,例如每天约 3 μ g,持续至少 3 个月,例如持续 3 到 6 个月、6 到 9 个月或 9 到 12 个月。

[0191] 本发明提供包含坎普他汀类似物和一种或多种赋形剂或缓冲剂的液体组合物。在一些实施例中,赋形剂为氨基酸。在一些实施例中,氨基酸是精氨酸、组氨酸或丝氨酸。在一些实施例中,赋形剂是“糖醇”(也称为“多元醇”)。在一些实施例中,赋形剂选自自由以下组成的群组:乙二醇、甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露醇、山梨醇、异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇。在一些实施例中,赋形剂的存在浓度在 1mM 到 250mM 范围内,例如介于 10mM 与 100mM 之间,或介于 10mM 与 50mM 之间,例如为约 20 到 45mM。在一些实施例中,组合物包含两种或两种以上赋形剂。在一些实施例中,缓冲剂选自乙酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。在一些实施例中,缓冲剂是乙酸钠。在一些实施例中,缓冲剂浓度介于 10mM 与 1M 之间,例如介于 20mM 与 500mM 之间,例如介于 50mM 与 200mM 之间。

[0192] 如实例 4 中所述,观察到液体组合物中某些赋形剂和 / 或缓冲剂的存在所产生的凝胶与由仅含有相同量坎普他汀类似物和水组成的组合物形成的凝胶相比,具有不同且更易碎的稠度。此外,在经玻璃体内投药后,此类凝胶比由仅含有相同量坎普他汀类似物和水组成的组合物形成的凝胶消失的快。本发明的发明人认识到,此类赋形剂和缓冲剂提供一种调节凝胶的各种物理特性和调节在体内凝胶释放坎普他汀类似物的速率的有用方式。本发明提供一种调节含有坎普他汀类似物的凝胶中所述坎普他汀类似物的释放速率的方法,所述方法包含将所述坎普他汀类似物提供于包含赋形剂或缓冲剂的液体组合物中,其中赋形剂或缓冲剂的存在调节(例如增加或降低)在体内投予组合物后所形成的凝胶溶解或降解的速率。

[0193] 本发明一个方面认识到,增加凝胶在体内的溶解 / 崩解速率的赋形剂可允许投予较大量的坎普他汀类似物,和 / 或投予较高浓度的坎普他汀类似物,同时避免形成过于稳定而无法随时间释放出所需量的坎普他汀类似物的凝胶。

[0194] 测量补体抑制

[0195] 可使用任何合适方法来评定药剂抑制补体激活(或任何其它相关特性)的能力。

可使用多种体外分析。例如,可通过测量在药剂存在或不存在下,人类血清或一组补体组分产生的补体介导的红细胞(例如抗体致敏或未致敏的兔或羊的红细胞)溶血,来评定所述药剂抑制经典或旁路补体路径的能力。如果在本抑制分析中,药剂将溶血作用降低到统计学显著的程度($p < 0.05$),则其抑制补体。药剂结合例如 C3、C5、因子 B、因子 D 等一种或多种补体组分的能力可使用等温滴定量热法或其它适于在液相中进行的方法进行评定。在另一实施例中,使用 ELISA 分析测量药剂结合补体组分的能力。例如,用所述药剂涂覆微量滴定板各孔。可将补体抑制剂官能化,以便利其与板的结合。例如,可将药剂生物素化,并使用涂覆有抗生蛋白链菌素的板。将补体组分添加到各孔中。在培育一段时间后,洗涤各孔,并使用针对所关注补体组分的抗体检测结合的补体组分。其它使用方法包括表面等离子共振、平衡透析等。

[0196] 此项技术中已知测量在体外或体内发生的全身或局部补体激活的方法以及测定补体抑制剂抑制所述激活的能力的方法。例如,补体激活产物(例如 C3a、C5a、C3bBb、C5b-9、经典路径识别分子(C1q)与经激活的 C4 之间的共价复合物等)的测量将指示补体激活的程度。在本发明某些实施例中,所述产物的量的减少指示补体激活的抑制。在一些实施例中,测量活性裂解产物与其无活性 desArg 形式之间的比率(例如 C3a/C3adesArg)。所属领域技术人员可通过适当选择所测量的补体激活产物和/或适合的补体激活剂(例如酵母多糖(zymosan)、脂多糖、免疫复合物等)来辨别经典路径、旁路路径与凝集素路径激活。其它方法涉及测量由最终复合物形成引起的补体介导的红细胞溶血。

[0197] 可利用合适生物样品测量体内补体激活和/或补体抑制剂对其的抑制。例如,可利用血液或血浆样品测量全身补体激活和/或补体抑制剂对其的抑制。可利用玻璃体液样品测量玻璃体液中的局部激活和/或抑制。可利用痰液样品测量呼吸道中的局部激活和/或抑制。可利用滑膜液样品测量关节中的局部激活和/或抑制。可利用 CSF 样品测量 CNS 中的局部激活和/或抑制。在投予补体抑制剂之前开始的连续测量将指示补体抑制剂抑制补体激活的程度以及抑制的时程和持续时间。应了解,只有在投予补体抑制剂之前存在的激活产物降解或清除后,激活产物的减少才变得明显。

[0198] 合适方法描述于本文引用的多篇参考文献中(美国专利第 5,157,110 号、第 6,551,595 号;美国专利第 6,319,897 号;WO2004/026328(PCT/US2003/029653);USSN 10/937,912;默瑞斯(Morikis),2004;默里克(Mallik),2005;M. 卡特拉格达(Katragadda, M.),2006)。

[0199] 监测包含坎普他汀类似物的凝胶状沉积物的降解

[0200] 如上文所述,可在体内通过超声波检测本发明某些凝胶状沉积物。必要时,还可通过在待投予的液体组合物中包括可检测部分,来评定沉积物的降解。如本文所使用,“可检测部分”是当存在于体内时,可利用相关的一种或多种特定方法检测的部分,例如分子或超分子复合物。通常,检测方法是外部的且是非侵入性的,也就是说,方法不涉及穿透皮肤或另外从外部可到达的体表或进入身体中。在某些实施例中,可使用对可检测部分的检测,来评定投药后时间“X”时仍保持完整的持续释放调配物或装置的质量或体积,和/或评定投药后时间“X”时已降解的持续释放调配物或装置的质量或体积。如果确定预定质量或体积的调配物已降解或仍保留,则可在合适时间段内对个体进行再治疗。例如,可安排再治疗在测定或预计调配物至少 70%、80%、90%、95%、99% 或 100% 降解时的 1、2、3 或 4 周内进

行。或者或另外,可使用对可检测部分的检测,来评定持续释放调配物或装置内仍保留的治疗剂的量,即,尚未释放的量。

[0201] 治疗和患者选择方法

[0202] 本发明提供治疗个体的方法,其包含将包含坎普他汀类似物的液体组合物以足以形成宏观凝胶状沉积物的量授予个体的血管外位置。本发明方法可包括提供欲被授予本发明组合物的个体。所述个体通常有患例如补体介导的病症等病症的风险或患有所述病症。在某些实施例中,个体有患黄斑变性(例如年龄相关性黄斑变性)的风险或患有所述疾病。在一些实施例中,个体患有至少一种以眼睛炎症为特征的补体介导的病症。在某些实施例中,个体除以黄斑变性或眼睛炎症为特征的眼病外还有患至少一种补体介导的病症的风险或患有所述病症。

[0203] 通常将所述组合物授予个体以治疗或预防此类病症的发展。因此,所述个体通常已被鉴别为有患此类病况的风险或患有所述病况。可使用任何合适的测试和标准来鉴别有患本文所关注病症的风险或患有所述病症的个体。此项技术中已知诊断本文所关注病症和评定对疗法的反应的方法。

[0204] 在本发明某些实施例中,治疗方法包含测定个体是否呈现与发展或罹患所述病症的风险增加相关的遗传多态性。如本文所使用,“测定”是指通过实施或定制合适测试,或通过接收由其它人实施或定制的测试的结果,来确定个体呈现使患病症风险增加的多态性,其中所述测试探查个体是否呈现所述多态性。应了解,适用的遗传测试未必是 100% 准确的。多态性可能是在编码补体组分的基因中。

[0205] 遗传研究已显示编码各种补体相关蛋白的基因的某些等位基因与发展 AMD 的易感性增加和 / 或发展严重形式 AMD 的可能性增加之间的关联。与病症或病况发展的可能性增加,和 / 或发展所述病症或病况的严重形式的可能性增加,或具有所述病症或病况引起的不良结果的等位基因,在本文中称为所述病症或病况的“风险等位基因 (risk allele)”,而基因称为病症或病况的“风险修饰基因 (risk modifier)”。某些风险等位基因是编码补体因子 (CFH) 的基因的等位基因,其中等位基因含有产生在 402 位含有 His 而非 Tyr 的 CFH 同功异型体的多态性 (Tyr402His 多态性)。在不希望受任何理论束缚的情况下,CFH 的 Tyr402His 变体在控制补体激活方面可能不太有效,和 / 或可能具有不利影响其补体控制能力的组织定位改变。随后的研究发现,其它 CFH 同功异型体与 AMD 风险密切相关 (R. J. 克雷文 (Klein, R. J.) 等人,年龄相关性黄斑变性中的补体因子 H 多态性 (Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration.) 科学 (Science) (2005); A. O. 爱德华 (Edwards, A. O.) 等人,补体因子 H 多态性和年龄相关性黄斑变性 (Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration.) 科学 (Science) (2005); J. L. 海尼斯 (Haines, J. L.) 等人,补体因子 H 变体增加年龄相关性黄斑变性的风险 (Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration.) 科学 (Science) (2005))。此外,编码补体蛋白 C2、C3、因子 B、C7 和 MBL-2 的基因的变体也已与 AMD 风险关联 (B. 古德 (Gold, B.) 等人,因子 B (BF) 和补体组分 2 (C2) 基因的变异与年龄相关性黄斑变性相关 (Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration.) 自然 - 遗传学 (Nat. Genet.) 38, 458-462 (2006); V. 戴努 (Dinu, V.) 等人,有关多个补体路径

基因与AMD之间的关联的证据 (Evidence for Association between Multiple Complement Pathway Genes and AMD.) 遗传流行病学 (Genet. Epidemiol.) 31, 224-237 (2007); J. R. W. 亚特斯 (Yates, J. R. W.), 补体 C3 变体与年龄相关性黄斑变性的风险 (Complement C3 Variant and the Risk of Age-Related Macular Degeneration,) 新英格兰医学杂志 (N. Engl. J. Med.), 357:19-27, 2007)。此外, 编码 CFHR1、CFHR3 和 CFI 的基因的变体已与 AMD 风险关联, 并且可使用至少部分基于此类变体检测的方法。

[0206] 本发明涵盖评定个体的于上文参考文献中所述任何基因和 / 或多态性的基因型, 或编码补体相关蛋白的任何其它基因 (参看上文) 的基因型; 和至少部分基于所述评定的结果, 将个体选为适于授予包含坎普他汀类似物的液体组合物的个体 (例如, 如果评定指示个体发展或罹患例如 AMD 等补体介导病症的风险增加, 则授予组合物)。应了解, 多态性 (例如 SNP) 可与位于同一染色体上的其它多态性 (例如其它 SNP) 处于连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD)。此类 SNP 可存在于单体型中。例如, 一些 SNP 可在多达 100kB, 或甚至 150kB 或更大的距离上被连锁 (D. E. 瑞琪 (Reich, D. E.) 等人, 自然 (Nature), 411, 199-204, 2001)。因此, 在一些实施例, 本发明方法包含测定个体是否呈现包含至少一个与患补体介导病症的风险增加相关的多态性变体的单体型, 其中所述多态性是在补体相关基因中。在一些实施例, 单体型包含编码 Tyr402His 的 CFH 基因变体。在一些实施例, 单体型是不包含编码 Tyr402His 的变体的 CFH 单体型 (例如参看李 (Li) 等人, 同上文)。

[0207] 个体的基因型可使用多种方法中任一种测定。所用特定方法对于本发明并不重要, 而且由于所述方法在此项技术中众所周知, 故无需在本文中详细描述。所述方法通常利用从个体获得的生物样品, 其中样品包含核酸和 / 或蛋白质。如本文所使用, “生物样品” 是指以下任一种: 一个或多个细胞、一部分组织, 体液, 例如血液、尿液、唾液、脑脊髓液等。术语 “生物样品” 还包括通过处理前文所定义的生物样品 (例如通过从样品中分离或纯化 DNA、RNA 和 / 或蛋白质, 通过使样品或其一部分经历扩增、限制性酶消化等) 而得到的任何物质。通常使用血液或组织样品。方法可涉及测试个体的 DNA, 以确定所述 DNA 是否包含所关注的等位基因或多态性。还可使用 RNA, 如果所关注的多态性位于基因被转录的一部分中。在一些实施例, 所述方法涉及测定特定核苷酸的特性, 其中在所述核苷酸位置的多态性与外伤后出现不良结果的风险增加和 / 或 AMD 或另一补体介导病症的易感性增加有关。

[0208] 此项技术中众所周知进行所述测试的方法, 并且包括例如分离出 DNA 或 RNA, 任选对其进行扩增 (例如, 使用聚合酶链反应 (PCR) 或逆转录酶-PCR), 和实施多种方法, 例如等位基因特异性引物延伸、等位基因特异性杂交、限制性酶消化、测序等。在一些实施例, 使用微阵列或 “芯片 (chip)” 进行基因分型。在一些实施例, 使用珠粒基分析, 例如 Luminex 平台, 来进行基因分型。其它有用方法包括寡核苷酸连接分析 (美国专利第 5, 185, 243 号、第 5, 679, 524 号和第 5, 573, 907 号)、裂解分析、异源双链追踪分析 (heteroduplex tracking analysis, HTA) 等。实例包括 Taqman® 分析 (应用生物系统公司 (Applied Biosystems)) (美国专利第 5, 723, 591 号)。还可使用环状探针技术 (cycling probe technology, CPT), 这是一种基于信号或探针扩增而非靶扩增的核酸检测系统 (美国专利第 5, 011, 769 号、第 5, 403, 711 号、第 5, 660, 988 号和第 4, 876, 187 号)。也可使用侵入性裂解分析, 例如侵入性 RTM 分析 (Invader. RTM. assay) (第三波科技公司 (Third Wave

Technologies)), 如 P. S. 埃斯 (Eis, P. S.) 等人, 自然 - 生物技术 (Nat. Biotechnol.) 19 : 673, 2001 中所述。可使用基于分子信标 (molecular beacon) 的分析 (美国专利第 6, 277, 607 号、第 6, 150, 097 号、第 6, 037, 130 号) 或荧光能量转移 (fluorescence energy transfer, FRET)。美国公开案第 20050069908 号和其中的参考文献描述可用于检测核酸的多种其它方法。美国专利第 5, 854, 033 号、第 6, 143, 495 号和第 6, 239, 150 号描述用于所关注分子的扩增和多重检测的涉及滚环式复制 (rolling circle replication) 的组合物和方法。所述方法适用于同时检测样品中的多种特定核酸。任选对核酸进行测序。美国公开案第 20050026180 号描述进行包括扩增、检测和基因分型在内的多重核酸反应的方法, 其可用于测定所关注特定位置的序列, 以便确定个体是否呈现与外伤后出现不良结果的风险增加相关的基因型。

[0209] 总的说来 (而不限于), 适合方法包括基于杂交的方法, 例如动态等位基因特异性杂交、使用分子信标、SNP 微阵列; 基于酶的方法, 例如基于限制性片段长度多态性的方法、基于 PCR 的方法、使用侧翼核酸内切酶、引物延伸、5' - 核酸酶、寡核苷酸连接酶分析的方法; 其它基于 DNA 物理特性、单链构象多态性、温度梯度凝胶电泳、变性高效液相色谱和测序的扩增后方法。高通量测序正迅速变得更加有效, 而且预见测序可能成为基因分型目的中的常规程序。可使用基于焦磷酸测序、原位测序、珠粒基测序 (US2007087362) 等方法。有关进一步信息和相关定义, 也参看 PCT/US2006/029449 (W02007014338)。

[0210] 在某些实施例中, 将溶液例如经眼内注射直接授予眼睛。可使用眼内投药的标准方法, 例如玻璃体内注射、注射到前房等。在本发明某些实施例中, 通过筋膜下注射、球后注射或以结膜下方式授予组合物。

[0211] 在一些实施例中, 用血管生成抑制剂治疗患有眼新血管形成的个体 (例如患有湿性 AMD 或增生性糖尿病性视网膜病变的个体), 以便在授予本发明组合物之前, 抑制出血和 / 或流体渗出。在一些实施例中, 用血管生成抑制剂治疗个体, 并且在授予血管生成抑制剂后 1 周到 6 周授予本发明组合物。

[0212] 在某些实施例中, 将溶液授予关节中或关节附近。

[0213] 可通过注射 (例如使用 25、27 或 30 号针等)、导管等实现递送。

[0214] 在本发明某些实施例中, 将含有坎普他汀类似物的组合物递送到中枢神经系统中一个或多个含有 CSF 的腔或小室 (例如脑室或颅后窝池) 中。为了使用输注泵将药剂递送到脑室或颅后窝池, 可植入导管, 以使排出部分处于所述脑室或所述池中, 从而在其中形成凝胶状沉积物。坎普他汀类似物药剂扩散到脑室或颅后窝池外。因此, 向这些位置的递送允许将药剂递送到脑中相对较宽的区域, 而不是将其更紧密地局限于局部特定位点。在本发明某些实施例中, 通过手术植入导管穿过颅骨, 使尖端可以到达含 CSF 腔, 来实现向所述腔的递送。随后将导管的另一端连接到储液囊 (例如 Ommaya 储液囊), 所述储液囊放于头皮之下 (皮下)。

[0215] 此项技术中众所周知鞘内投药的方法。如果个体患有脊髓损伤, 则植入导管, 以使排出部分处于鞘内腔中, 而另一端与泵式储液囊连接。所述方法常用于治疗慢性疼痛, 并且是经数月时间递送镇痛剂的常规使用程序。类似方法在本发明中可用于在鞘内腔中有效形成宏观凝胶状沉积物的量, 递送包含坎普他汀类似物的液体组合物。

[0216] 在本发明一个实施例中, 通过在适于形成包含坎普他汀类似物的宏观凝胶状沉积

物的条件下授予坎普他汀类似物,来治疗患有外伤性脑损伤、中风或脊髓损伤的个体。在某些实施例中,在本发明各种实施例中,还全身和/或局部授予神经保护剂或神经营养剂。在某些实施例中,神经保护剂或神经营养剂连同补体抑制剂一起以单一组合物形式授予。

[0217] 每次投药所递送坎普他汀类似物的给药时间间隔(即,本发明组合物各别投药之间的时间)和剂量可改变。在某些实施例中,间隔超过6周时间,例如间隔2、3、4、5或6个月,或其间任何周数,例如8、10、12、14、16周等,递送组合物。在其它实施例中,甚至间隔更长时间,例如间隔7、8、9、10、11或12个月时间,递送组合物。在其它实施例中,时间间隔为6周或更短,例如1、2、3、4、5或6周。例如,可平均每2周、每4周、每30天等,授予一次组合物。当然,时间间隔可改变。例如,每次给药之间的时间间隔可在6周或更短与超过6周之间变换。在某些实施例中,本发明组合物每次投药之间的平均时间间隔为至少6周,例如2、3、4、5或6个月,或其间任何周数,例如8、10、12、14、16周等。在本发明某些实施例中,平均间隔至少6、8、10或12周,或平均间隔3、4、6、8、12、15、18或24个月等间隔时间,多次授予组合物。可授予组合物至少1、2、5、10、15、20或更多次。可以各种时间间隔对患有补体介导的病症(例如AMD)或有患所述病症的风险的个体长期授予组合物。

[0218] 实例

[0219] 实例1:玻璃体内授予非人类灵长类动物以强效坎普他汀类似物后形成凝胶状沉积物

[0220] 坎普他汀类似物的合成

[0221] 遵循马力菲尔德(Merrifield)(美国化学会志(J. Amer. Chem. Soc.)85, 2149(1963))所述的固相方法,合成强效坎普他汀类似物(在实例1到3中也称为“化合物”)。用Fmoc基团保护各氨基酸的 α -氨基。还用各种适合的保护基将侧链官能团封端。通过在RinkAmide AM树脂上c末端氨基酸(即, Thr)的衍生化,随后氨基酸的顺次偶联(sequential coupling),侧链保护基的去除和从树脂的裂解,来形成肽链。当完成全部肽序列时,将肽树脂的N末端乙酰化(使用包含体积比为6:50:3的 $\text{Ac}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DIEA}$ 的封端溶液),随后用相继体积量的MeOH和DMF漂洗树脂。使用标准方法从树脂裂解后,通过 I_2 氧化,在肽的 Cys^2 与 Cys^{12} 残基之间形成二硫桥键。首先,将线性肽溶解于20% ACN水溶液中,制得浓度为1mg/mL的肽溶液。其次,在搅拌下,将 I_2/NaI 溶液逐滴加到所述肽溶液中(NaI 用于增加 I_2 于 H_2O 中的溶解度)。在添加起初, I_2 的黄色在接触后消失。在 I_2 的黄色保留(已添加足够 I_2 的标志)时,再搅拌烧瓶30分钟,以完成氧化。添加抗坏血酸溶液(0.1M)以中和过量的 I_2 并中止反应。用过程控制高压液相色谱(HPLC)法监测反应。

[0222] 氧化完成后,接着使反应混合物滤过 $1\mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜,准备进行制备型HPLC纯化。将过滤后的肽溶液加载到充填 C_{18} 反相树脂的制备型HPLC柱上,其利用制备型HPLC系统(瓦里安HPLC(Varian HPLC))进行操作。用缓冲液“A”[0.1% TFA水溶液-1:1000(v/v)]和使用缓冲液“B”[0.1% TFA的乙腈溶液-1:1000(v/v)]的线性梯度洗脱柱。

[0223] 利用装备有分析型HPLC柱(科罗马斯(Kromasil)C185 μm)的分析型HPLC系统(瓦里安HPLC)分析从制备型柱收集到的洗脱部分。随后汇集满足纯度需求的洗脱部分,以进行下一处理步骤。对不满足纯度需求的洗脱部分进行再纯化,以达到纯度需求,并随后汇集。所述过程是设计达到至少95%纯度。接着,将汇集的纯化洗脱部分再加载到制备型HPLC柱上,用乙酸铵缓冲液洗涤,并用所需缓冲液系统洗脱,以将肽盐形式交换成所需盐,

在此处为乙酸盐。利用分析型 HPLC 再次分析洗脱部分,并汇集满足最终纯度标准的洗脱部分,并准备进行冻干。使用歧管型冻干机,并在冷冻后将不超过 350mL 的纯化肽溶液放入各冻干瓶中。冷冻干燥进行至少 3 天。使用反相 HPLC 评估最终块状肽的纯度。

[0224] 制造液体组合物

[0225] 通过将化合物溶解于注射用水中达到以下不同浓度:(i)0.299mg/mL,称为 LD;和(ii)4.51mg/mL,称为 HD,并通过密理博(Millipore)Durapore 系列 47mm 0.22 μ m 滤膜无菌过滤,而制得两种不同调配物。将液体组合物分装到个别小瓶中(各 250 μ l)。LD 组合物的 pH 值为 5.48,而 HD 组合物的 pH 值是 6.0。

[0226] 玻璃体内投药

[0227] 在进行涉及玻璃体内投予非人类灵长类动物以含坎普他汀类似物(其合成如上文所述,SEQ ID NO:32)的注射用水的研究期间,观察到,所述化合物在玻璃体内注射后,可在灵长类动物(食蟹猴)的眼睛中形成近似球形的凝胶状玻璃体内沉积物。沉积物是在注射部位形成,并且只在所测试的两种浓度中较高的浓度下形成。高剂量由玻璃体内(IVT)注射 50 μ L 体积含有 150 μ g 估计剂量化合物的注射用水组成,而低剂量由 50 μ L 体积含有 3 μ g 估计剂量化合物的注射用水组成。裂隙灯眼前节检查显示,投药后第 2 天和第 15 天时无异常。第 2 天时进行的双眼间接检眼镜检查法显示,在 IVT 给予每只眼 3 微克的一只动物的右眼中和在 IVT 给予每只眼睛 150 μ g 的 4 只动物中出现弥漫性玻璃体混浊。第 15 天时,这些动物中有 4 只仍存在玻璃体混浊,而且注意到另外两只动物首次显现玻璃体混浊。并无证据证实化合物在玻璃体腔内引起任何明显不利反应。ERG 值在正常界限内,而且眼压测量法指示眼内压不存在由投予化合物引起的药物相关改变。

[0228] 尸检时,在剖开眼睛后,大多数(10/12) IVT 给予每只眼 150 μ g 化合物的雄性动物中观察到球形凝胶状玻璃体内沉积物。分离出这些沉积物,并分析所述化合物的存在。结果表明,化合物含量在每一沉积物 7.0 μ g 到 72 μ g 的范围内。在 IVT 注射单次剂量后 2 周被处死的两只动物中有一只未显示球形玻璃体内沉积物,并因此未观察到可检测的化合物。类似地,在治疗后 4 小时被处死的一只 IVT 给予每只眼睛 150 μ g 的动物,也未显现球形玻璃体内沉积物。因此,最初在第一时间点(治疗后 4 小时)时观察到沉积物,并且在 2 周结束时处死的两只动物中有一只仍存在沉积物。在存在或不存在玻璃体内沉积物的情况下,利用组织病理学,在给予化合物的任一动物的眼睛中都未观察到药物相关的异常。

[0229] 分析沉积物中的药物含量,并使用 HPLC 观察和测量药物含量。发现沉积物含有大量的化合物。每只眼睛经玻璃体内给予 150 μ g 剂量水平化合物的所有动物的玻璃体,在检查的所有时间点(投药后 4 小时到 2 周)都显示出化合物的存在。这些结果表明,当形成沉积物时,其会随时间释放化合物。

[0230] 实例 2:表征玻璃体内投予兔以强效坎普他汀类似物后形成的凝胶状沉积物

[0231] 使用新西兰白(New Zealand White, NZW)兔进行研究,以更详细地表征沉积物的形成,由此找到在玻璃体内注射后使沉积物形成的最低化合物浓度,并评定玻璃体内注射后化合物的急性毒理学特性。

[0232] 方法

[0233] 化合物溶液的制备

[0234] 如实例 1 中所述制备 HD 组合物,并在无菌条件下用 WFI 稀释,得到不同剂量的化

合物。将 50 μ l 体积经玻璃体内注射到兔眼中。

[0235] 治疗的动物

[0236] 本研究检查剂量在每只眼 0 到 200 μ g (0、25、50、75、100、125、150、175、200 μ g) 范围内的化合物在玻璃体内注射后于眼睛中形成沉积物的能力 (表 2)。将各种浓度注射到 3 只眼睛中。对于剂量范围, 使用 13 只动物。对于组织学分析, 再使用 5 只动物。

[0237] 动物程序

[0238] 麻醉: 通过肌肉内注射氯胺酮 (Ketamine ;50mg/kg)+ 塞拉嗪 (xylazine, 10mg/kg) 溶液使动物麻醉。

[0239] 表 2. 有关在新西兰白兔中形成玻璃体沉积物的剂量范围研究

[0240]

化合物 IVT (微克/眼)		程序 ^A	动物 ID
左眼	右眼		
25	25	OE, DIS	1312
25	50	OE, DIS	1334
50	50	OE, DIS	1335
75	75	OE, DIS	1344
75	100	OE, DIS	1345
100	100	OE, DIS	1346
125	125	OE, DIS	1313
125	150	OE, DIS	1310A
150	150	OE, DIS	1338
175	175	OE, DIS	1339
175	200	OE, DIS	1340
200	200	OE, DIS	1341
0	0	OE, DIS	1342
0	0	OE, HISTO	1390
0	0	OE, HISTO	1391
25	25	OE, HISTO	1337
50	50	OE, HISTO	1343
100	100	OE, HISTO	1336

[0241] ^A 这些程序是在治疗后 27 小时进行。

[0242] OE = 眼科检查

[0243] DIS = 剖开

[0244] HISTO = 组织病理学分析

[0245] 注射前程序: 将 2 滴局麻剂 (0.5% 普鲁卡因胺 (procainamide)) 和 2 滴 5% 聚维酮碘 (povidone iodine) 滴眼液先后直接滴到眼睛上, 由此准备眼睛。采取特殊护理, 以使聚维酮碘溶液覆盖计划注射的部位。用 4×4 纱布片吸干眼周区域过量的液体。使局麻剂和聚维酮碘溶液作用至少 5 分钟, 随后进行玻璃体内注射。

[0246] 注射程序: 使用 0.5cc 结核菌素注射器 (永久式连接 29G 1/2 英寸针) 授予玻璃体内注射液; 从小瓶中抽取 0.2ml 化合物溶液。排出过量液体, 以使注射器只含有单次注射所需体积的液体 (50 μ l)。使用眼撑 (eye lid speculum) 使眼睛保持打开状态。将针插入颞上象限中, 穿过缘后部 3.5-4.0mm 的区域, 避开水平子午线, 并朝向眼睛中心。只将针总长度 (1/2 英寸) 的一半 (1/4 英寸) 插入眼睛中。缓慢递送注射体积, 以防止眼内压迅速增加。为确保所有溶液都在眼睛中和避免推回经过注射部位, 缓慢取出针。

[0247] 注射后程序:注射后立即用标准生理盐水溶液洗涤眼睛。用4×4纱布片吸干眼周区域上过量的液体。随后添加2滴抗微生物滴眼液(**Vigamox®**,莫西沙星(moxifloxacin), 0.5%滴眼液)。

[0248] 眼科检查:在处死前,由从业的临床眼科医师对所有动物进行眼科检查(间接检眼镜)。检查评分要点显示于表3中。

[0249] 安乐死:使用22号针经由耳静脉注射约2-3cc Beuthanasia-D(先灵葆雅公司(Schering Plough)),对麻醉的兔实施安乐死。

[0250] 表3. 间接检眼镜检查评分要点

[0251]

评分	玻璃体检查
0	澄清,检测不到沉积物、气泡或浑浊
1	轻微浑浊,没有出现不透明沉积物或玻璃体不透明
2	中度不透明或者出现不透明气泡或沉积物
3	玻璃体明显不透明
4	不透明

[0252]

评分	视网膜检查
0	平坦,无伤痕、水疱或斑点
1	不平坦;具有折皱、肿块或波纹
2	轻微炎症或出血

[0253]

3	视网膜脱落,中度出血
4	视网膜组织破坏(GA、CNV、视网膜撕裂)

[0254] 摘出眼睛以准备眼球:用一只手保持眼睑全开,并使用解剖刀沿角膜边缘切开结膜。以顺时针方式切开眼外肌,并切下和取出瞬膜。从鼻侧进入眼眶,用摘出剪切下视神经。通过剖开眼睛眼球后区室的结构,“完整(en-block)”拣出眼球。借助于小弯剪去除连带的眶筋膜、眶脂肪和眼外肌,来修整所摘出的各眼球。

[0255] 从分离出的眼球中收集兔玻璃体液、球形玻璃体内沉积物和视网膜层:将修整过的兔眼球放入无菌皮氏培养皿(Petri dish)中。用1×2的精细拔牙钳抓住眼睛,用11号解剖刀在缘后5mm处轻轻地穿过巩膜做一个切口。随后,切开巩膜并沿眼睛周围切开视网膜,分离出冠部(crown)。用镊子小心地拣出沉积物,随后转移到艾本多夫管(eppendorf tube)中并在冰上保存。如果沉积物太易碎,则用15号解剖刀舀取。通过用拔牙钳拣取玻璃体液来进行收集,随后转移到艾本多夫管中,并在冰上保存。用15号解剖刀从眼睛背面剥下各眼球的视网膜层,并用RNA Later(艾姆拜公司(Ambion),德克萨斯州奥斯汀(Austin, TX))立即转移到艾本多夫管中,并在冰上保存。冷冻所有收集到的物质(玻璃体液、沉积物和视网膜层),并在-20℃下储存。

[0256] 沉积物评分:如果在物质收集期间注意到沉积物,则对其进行评分并加以收集。沉积物的评分标准显示于表4中。

[0257] 表 4. 沉积物评分要点

[0258]

评分	尺寸	不透明度	硬度
0	无沉积物	无沉积物	无沉积物
1	直径 ≤ 1 mm	澄清	触碰后粉碎, 或在眼球剖开后发现多个碎片
2	直径 1-2 mm	略带蓝色/白色, 易于看透	在镊子作用下易于变形; 轻压会使沉积物永久变形
3	直径 2-4 mm	明显的蓝色/白色, 不易于看透	在镊子作用下易于变形但具有弹性; 沉积物可回复其初始形状
4	直径 ≥ 4 mm	不透明	沉积物形式在镊子作用下相当稳固

[0259] 组织病理学分析: 检查后, 对动物实施安乐死, 并摘出眼睛, 用戴维森溶液 (Davidson' s solution) 固定, 切片并进行 H/E 染色。由美国病理学委员会认证的病理学家检查每只眼接收 25、50 或 100 μ g 化合物的动物 (表 2, 最后 3 只动物) 的两只眼睛的切片, 并由委员会认证和认可的专业兽医病理学家进行互评。

[0260] HPLC 分析:

[0261] 沉积物样品制备

[0262] • 分析前冷冻干燥沉积物

[0263] • 将沉积物再悬浮于 50 μ l 80% 乙酸 /20% 水中

[0264] • 从凝胶溶液中取出 8 μ l

[0265] • 添加 20 μ l 内标储备液 (于流动相 A 中的 1/16 稀释液)

[0266] • 添加 52 μ l 流动相 A

[0267] 玻璃体样品制备

[0268] 遵循修改过的 SOP-D0002v1, 制备玻璃体样品。此时, 将 20 μ l 内标品 (序列与所述化合物密切相关) (于水中的 1/8 稀释液) 添加到 50 μ l 玻璃体中, 随后进行样品提取。

[0269] 样品分析

[0270] 通过 HPLC, 使用反相柱 (C_{18} Hypersil Gold AQ, 2.1 $\times$ 150mm, 5 μ m (美国热电公司 (Thermo Electron))) 和在 214nm 波长下进行 UV 检测, 来分析沉积物和玻璃体样品。产生单独校准曲线以进行沉积物和玻璃体分析。

[0271] 兔玻璃体内沉积物样品的 SDS-PAGE 分析:

[0272] 1. 将冷冻干燥的沉积物溶解于 PBS : 乙酸 (1 : 1) 中后, 将兔玻璃体沉积物样品等分于艾本多夫管中。(沉积物样品来自动物 #1341、1310A 和 1339)

[0273] 2. 添加上样染料 (4X) 和 β -巯基乙醇。

[0274] 3. 在加热板上将样品煮沸 5 分钟。

[0275] 4. 在冰上冷却样品数分钟。

[0276] 5. 在 10,000rpm 下离心样品 2 分钟。

[0277] 6. 将 2 种体积 (5 μ l 和 20 μ l) 的各样品分别加载到 SDS-PAGE 凝胶的孔中, 其间留下一个孔作为空白。

- [0278] 7. 加载 SeeBlue 蛋白标志物以供比较。
- [0279] 8. 以 200 伏恒定电压跑胶 1 小时。
- [0280] 9. 从所述组装件中取出凝胶, 并利用考马斯蓝染料 (Coomassie blue dye) 染色 30 分钟。
- [0281] 10. 从凝胶上切下可见的蛋白质谱带, 放入单独管中, 并送交质谱设备。
- [0282] 结果
- [0283] 表 5 提供研究结果的概述。
- [0284]

表 5. 研究结果

[0285]

动物 ID 和剂量				间接检查		凝胶评分 (切开后)			
动物	眼睛	剂量	使用	玻璃体	视网膜	尺寸	不透明度	硬度	总得分
1342	左	0	剖开	1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1342	右	0	剖开	1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1312	左	25	剖开	1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1312	右	25	剖开	1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1334	左	25	剖开	1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1334*	右	50	剖开	2	0	1.0	1.0	0.0	2.0
1335*	左	50	剖开	1	0	0.5	0.5	0.0	1.0
1335	右	50	剖开	2	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1344	左	75	剖开	1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1344	右	75	剖开	2	0	0.5	0.5	0.5	1.5
1345	左	75	剖开	1	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1345	右	100	剖开	2	0	0.5	0.0	0.0	0.5
1346	左	100	剖开	3	0	0.5	1.0	0.0	1.5
1346	右	100	剖开	2	0	0.0	0.0	0.0	0.0
1310	左	125	剖开	1	0	0.5	0.0	0.5	1.0
1313	左	125	剖开	1	0	2.0	1.0	1.0	4.0
1313	右	125	剖开	1	0	2.0	2.0	2.0	6.0
1310	右	150	剖开	2	0	2.0	2.0	2.0	6.0
1338	左	150	剖开	1	0	3.0	3.0	3.0	9.0
1338	右	150	剖开	1	0	2.0	3.0	3.0	8.0
1339	左	175	剖开	2	2	1.0	1.0	1.0	3.0
1339	右	175	剖开	1	0	2.0	0.0	2.0	4.0
1340	左	175	剖开	4	0	1.0	1.0	1.0	3.0
1340	右	200	剖开	1	0	2.0	2.0	2.0	6.0
1341	左	200	剖开	1	0	3.0	3.0	2.0	8.0
1341	右	200	剖开	1	0	3.0	3.0	3.0	9.0
* 沉积物过少而无法收集									

[0286] 表 5 中显示间接检查的结果和评分, 以及动物数量和剂量。在每只眼接收等于或高于 125 微克化合物剂量的所有眼睛中都发现沉积物。在每只眼接收 25 微克化合物的眼睛中未检测到沉积物。在其它浓度下, 以各种出现率形成沉积物。在本研究中, 利用间接检

查不能可靠地检测沉积物。应注意,甚至在浓度低于形成沉积物的浓度的情况下,眼科医生也可以检测到轻微的浑浊。

[0287] 间接检眼镜检查未展示出与玻璃体内化合物注射相关的任何病理学改变。除一只动物 #1339 出现眼科医师将其归因于由注射针引起的损伤的视网膜出血外,其余眼底检查都很正常。在 32 只检查的眼睛中,有 9 只观察到玻璃体混浊。浑浊的存在与化合物剂量不存在强相关性。

[0288] 组织病理学评估

[0289] 在本研究中,还处理 5 只动物以进行组织病理学评估。表 6 中显示动物和其所接收的治疗。由两位病理学家对眼睛进行评估。这两位病理学家都同意,所有所评估的眼睛都是正常的。角膜、虹膜、睫状体、晶状体、巩膜、视网膜和玻璃体都是正常的。

[0290] 沉积物分析:利用 HPLC 分析沉积物,以确认化合物的存在并定量。还进行 SDS-PAGE 分析以检测无法通过所用 HPLC 方案(主要检测低 MW 肽)鉴别的其它蛋白质的存在可能。在 UV 检测下,未鉴别到除化合物外的其它组分。数据证实了假说:沉积物中存在的化合物含量与注射到玻璃体中的化合物的量相关。测量每一剂量下玻璃体内注射后兔玻璃体中化合物的浓度。注射 27 小时后,不能观察到存在的化合物与所注射的化合物之间的相关性。

[0291] 图 3 提供兔 1341 右眼(20ug 化合物)、1310 右眼(150ug 化合物)和 1339 右眼(175ug 化合物)中沉积物的 SDS-PAGE 分析。切下第 2 道的蛋白质谱带并送交质谱鉴别。利用 MS/MALDI 方法,成功地鉴别出来自兔玻璃体沉积物的所有可见蛋白质谱带。结果显示于下表中:

[0292]

谱带	最高得分 ¹	蛋白质 ID	蛋白质名称	物种 ²
1	98	Q8MIE4_9LAGO	内部光受体类视黄醇结合蛋白 (片段)。	大草原野兔 (Lepus crawshayi) (野兔)
2, 混合物	208	AAB58347	血清白蛋白前体	穴兔 (Oryctolagus cuniculus) (兔)
	85	AAB94136	血清转铁蛋白前体	穴兔 (兔)
3	293	AAB58347	血清白蛋白前体	穴兔 (兔)
4	未返回结果			
5	180	AAB94136, TFRBP	转铁蛋白前体	穴兔 (兔)
6	518	AAB58347	血清白蛋白前体	穴兔 (兔)
7	277	AAB58347	血清白蛋白前体	穴兔 (兔)
8	152	AAB58347	血清白蛋白前体	穴兔 (兔)
	78 (此可能忽略)	CAA27396	细胞质 β -肌动蛋白	小家鼠 (Mus musculus) (小鼠)
9	209	CRYL1_RABIT	λ -晶体蛋白	穴兔 (兔)
10	99	CRBB1_BOVIN	β 晶体蛋白 B1	欧洲牛 (Bos taurus) (牛)
11	108	CRBB1_BOVIN	β 晶体蛋白 B1	欧洲牛 (牛)
12	203	CRBB2_HUMAN	β 晶体蛋白 B2 (β 晶体蛋白 Bp)	智人 (Homo sapiens) (人)
13	105	Q95KK5_RABIT	β A1-晶体蛋白	穴兔 (兔)
14	167	CYRBAA	α -晶体蛋白 A 链	穴兔 (兔)
15	97	CYRBAA	α -晶体蛋白 A 链	穴兔 (兔)
16 ³ 混合物	105	CYRBAA	α -晶体蛋白 A 链	穴兔 (兔)

[0293] ¹ 马斯科特搜索 (Mascot Search) www.matrixscience.com。这很可能是利用 MALDI-MS 分析的蛋白质的特性。较高得分反映较高的置信水平。

[0294] ² 如果最高得分不是兔, 则可能兔方案不在数据库中。

[0295] ³ 混合物中其它两种组分确定为来自家鼠 (Rattus rattu) 的 CAA42911 (RRHARTABC) (81 分) 和来自穴兔 (兔) 的 HBB_RABIT (血红蛋白亚基 β -1/2)。

[0296] 总之, 沉积物的形成是剂量依赖性的。利用每只眼 25 μ g 剂量, 从未观察到沉积物形成, 并且在接收每只眼 125 μ g 或更高剂量 (体积都为 50 μ l) 的眼睛中确实形成沉积物。对于球形凝胶状玻璃体内沉积物的分析显示, 活性化合物是沉积物中的主要组分, 并且还显示, 沉积物中蛋白质含量局限于兔玻璃体液中存在的蛋白质。注射后 24 小时, 对每只眼玻璃体内注射单次剂量 25、50 和 100 μ g 化合物的兔的眼睛进行组织病理学评估。两位病理学家同意所检查的所有眼睛切片都是正常的。

[0297] 在接下来的研究中, 玻璃体内投予化合物后, 饲养新西兰白兔超过 8 个月。在投药后 6 周到 8 个月时从兔玻璃体中取出的凝胶中所提取的化合物, 在标准分析中仍保持稳定并保留相当大部分的补体抑制活性。

[0298] 在其它研究中, 在初始治疗后 3 个月, 对兔进行再治疗 (在初始治疗后形成的凝胶状沉积物的明显消失以后)。第二次治疗导致形成新的沉积物, 确认了使用此持续释放方式进行重复治疗的可行性。

[0299] 实例 3 :非人类灵长类动物中坎普他汀类似物沉积物的进一步研究

[0300] 为了进一步研究非人类灵长类动物眼睛中沉积物随时间的行为 (behavior), 进行额外研究。与在兔中的情形相同, 发现可在检眼镜检查下目测观察沉积物, 并使用超声波随时间对其跟踪。

[0301] 在一项研究中, 通过玻璃体内注射, 对食蟹猴投予 50 μ l 含 0、150、450、1050 或 2100 μ g 化合物的 WFI。注意到, 在注射后 2 周时, 在所有给予 150 μ g 剂量的眼睛中以及投予更高剂量的眼睛中, 可见到沉积物。

[0302] 在投药后 14 天, 处死一部分投予 0、450、1050 或 2100 μ g 的动物, 并测量血清和玻璃体中化合物的浓度。使用 HPLC 进行化合物测量。如图 5 中所示, 猴玻璃体内的沉积物缓慢释放出化合物, 持续至少 2 周。当投药浓度过低而无法形成沉积物时, 化合物被从食蟹猴玻璃体中清除, 其中 $T_{1/2}$ 为约 22 小时。因此, 很明显, 2 周后在本实验中测量的化合物须反映从沉积物中的释放, 而非从不存在于沉积物中的残余化合物。

[0303] 继续进行本研究, 以评估沉积物随时间的行为。投予 150 μ g 剂量时形成的沉积物在 2 个月后仍能检测到, 但尺寸变小。有一些在 3 个月时完全消失, 而一些持续存在长达 6 个月。投予 450、1050 或 2100 μ g 剂量形成的沉积物在 6 个月后仍能检测到。有证据表明, 在 6 个月时间点时, 其尺寸和 / 或密度减小。在大部分情况下, 投予 450、1050 和 2100 μ g 剂量水平时形成的沉积物在 37 周时间点以及到研究结束时止长达 1 年的时间点仍能观察到。利用检眼镜检查和超声波都能观察到沉积物。看起来, 其尺寸随时间继续减小和 / 或分裂成多个更小的沉积物。此外, 如通过测量从这些动物获得的血清样品中的坎普他汀类似物所确定, 在此期间, 发生坎普他汀类似物的持续释放。

[0304] 在一项独立研究中, 当通过玻璃体内注射投予浓度低到 1mg/ml (50 μ g 于 50 μ l 中) 的含化合物的水时, 通过检眼镜检查和超声波都观察到凝胶状沉积物。到给药后约 1 周时, 使用这些技术无法检测到沉积物。

[0305] 注意到, 总体上, 与在兔中所见的情形相比, 在猴中沉积物的形成和消失速率具有更高可再现性。一般说来, 注意到, 与投予相同剂量的猴相比, 在兔中形成的沉积物更致密并且持续时间更长。在猴或兔研究中, 利用组织病理学检查或在体格检查期间都未观察到由沉积物引起的不利影响。

[0306] 实例 4 :调节沉积物特性

[0307] 测试各种赋形剂、缓冲剂和 pH 值范围, 以评定其改变实例 1 到 3 中所用坎普他汀类似物的凝胶形成特性的潜力, 并且评定其对体外和体内凝胶特性的影响。评定包括精氨酸、丝氨酸和组氨酸在内的氨基酸。发现, 含有组氨酸的调配物在凝胶稳定性方面所展现的特性比含有精氨酸或丝氨酸的调配物有利。

[0308] 在一些实验中, 在体外和 / 或体内测试单独或各种组合形式的各种浓度的乙酸钠 (NaCH_3COO)、组氨酸和甘露醇的影响。组氨酸和甘露醇的浓度在 10mM 到 50mM 的范围内。一般说来, 观察到, 与由只含有存于水中的坎普他汀类似物的调配物形成的凝胶相比, 含有任一所述物质的调配物产生的凝胶更易碎, 并且在体内尺寸减小得更快。总之, 添加这些赋形剂允许调节尺寸减小的速率, 并由此调节沉积物中坎普他汀类似物的释放速率。所述调节可潜在地允许投予总剂量较高的坎普他汀类似物。

[0309] 例示性调配物包括下述:

- [0310] A. 100mM 乙酸钠的注射用水溶液 (pH = 5.10)。
- [0311] B. 100mM 乙酸钠 + 25mM 组氨酸 (pH = 5.2)
- [0312] C. 100mM 乙酸钠 + 45mM 甘露醇 (pH = 5.05)
- [0313] pH 值范围为约 (5 到 5.50)。
- [0314] 材料：
- [0315] 1. 乙酸钠：
- [0316] 储备液 : 3M
- [0317] 制造商 : 艾姆拜公司 (Ambion)
- [0318] pH = 5.5
- [0319] 调配物中最终浓度 : 100mM
- [0320] 调配物的最终 pH 值 : 5.1
- [0321] 2. 组氨酸：
- [0322] DL- 组氨酸盐酸盐, 98% min
- [0323] 分子量 : 209.64
- [0324] 制造商 : 艾科斯科技公司 (Acros Organics)
- [0325] 3. D- 甘露醇
- [0326] USP 级粉末
- [0327] 制造商 : 菲舍尔科技公司 (Fisher Scientific)
- [0328] 调配方案：
- [0329] 对于制备 10ml 溶液：
- [0330] 1. 用去离子水将乙酸钠从 3M 稀释到 100mM。
- [0331] 2. 称取精确量的组氨酸 / 甘露醇, 以达到所需浓度。
- [0332] 3. 测定溶液的最终 pH 值和摩尔渗透压浓度。
- [0333] 对于制备所需的坎普他汀类似物调配物：
- [0334] 1. 对空管称重
- [0335] 2. 将所需量的坎普他汀类似物添加到这些管中。
- [0336] 3. 添加溶液 (水 / 乙酸钠 / 乙酸钠 + 甘露醇 / 乙酸钠 + 组氨酸) 以达到所需的坎普他汀类似物浓度
- [0337] 4. 利用 0.22 微米无菌滤膜过滤溶液
- [0338] 5. 测量最终吸光度以验证坎普他汀类似物的最终浓度
- [0339] 6. 测量最终溶液的 pH 值。
- [0340] 在一些实验中, 将坎普他汀类似物添加到 100mM 乙酸钠的注射用水溶液 (pH = 5.10) 中。通过玻璃体内注射, 将调配物 (1050 μ g 坎普他汀类似物于 50 μ l 液体中) 投予 3 只非人类灵长类动物。在 2 周到 6 周中, 所有 3 只动物都显示出沉积物。到第 9 周, 没有观察到显著沉积物。3 只动物中有一只展现残余物 (remnant)。相比之下, 在第 9 周时, 接收等量由坎普他汀类似物溶解于 WFI 中组成的坎普他汀类似物调配物的动物显现沉积物。由此, 乙酸钠的存在使沉积物的溶解速率明显增加。
- [0341] * * * * *
- [0342] 所属领域技术人员仅使用常规实验就能认识到或能够确定本文所述的本发明具

体实施例的许多等效物。本发明的范围不打算局限于上述实施方式,而是如随附权利要求书所述。应理解,本发明不受任何具体实例中或利用任何具体实施例实现的特定结果所限制。在权利要求书中,除非另作相反说明或另外由上下文显而易见,否则例如“一”和“所述”等词可指一个或多个。除非另作相反说明或另外由上下文显而易见,否则认为在一组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或实施方式满足所述组的一个、多于一个或所有成员存在于、用于给定产物或方法中,或另外与给定产物或方法相关。本发明包括所述组的正好一个成员存在于、用于给定产物或方法中或者另外与给定产物或方法相关的实施例。例如(但不限于),应了解,在权利要求或实施方式指示特定位置的残基可选自特定氨基酸或氨基酸类似物群组的情况下,本发明包括所述位置的残基是所列任何氨基酸或氨基酸类似物的个别实施例。本发明还包括所述组的多于一个或所有成员都存在于、用于给定产物或方法中或者另外与给定产物或方法相关的实施例。此外,应了解,本发明涵盖将所列一个或多个权利要求中的一个或多个限定、要素、条款、说明性术语等引入另一权利要求中的所有变更、组合和改变。具体说来,可对附属于另一权利要求的任何权利要求进行修改,以使其包括附属于同一基本权利要求的任何其它权利要求中所见的一个或多个要素或限定。此外,当权利要求叙述一种组合物时,除非另作指示,或除非所属领域技术人员明显发现会引起抵触或矛盾,否则应了解,包括根据任何本文所述方法授予组合物的方法,和使用组合物实现本文中所揭示的任何目的的方法,并且包括根据本文所揭示的任何制备方法制备组合物的方法。

[0343] 在要素是以例如马库西群组(Markush group)格式以列表提供的情况下,应了解,也揭示出所述要素的各个亚组并且可从所述群组中去除任何要素。出于简明的目的,本文中只个别且具体地叙述这些实施例中的一些实施例,但本发明包括所有此类实施例。还应了解,一般说来,在本发明或本发明各方面提及包含特定要素、特征等的情况下,本发明某些实施例或本发明各方面由或基本上由此类要素、特征等组成。

[0344] 在本发明某些方法中包括“提供”的步骤是打算指示授予所述组合物以治疗本方法中所叙述的病症。因此,个体将患有所述病症或有患所述病症的风险,并且通常在执业医师或手术人员的建议下,授予组合物以治疗病症,所述执业医师或手术人员可以是或可不是授予组合物的同一个体。本发明包括不明确包括提供步骤的实施例,和包括提供步骤的实施例。本发明还包括包含将个体鉴别为有患补体介导的病症的风险或患有所述病症的步骤的实施例。

[0345] 当给定范围时,本发明包括包含终点的实施例、排除两个终点的实施例,以及包括一个终点但排除另一终点的实施例。除非另作说明,否则可假定两个终点都包括在内。此外,应了解,除非另作指示,或者另外从上下文和所属领域技术人员的理解显而易见,否则以范围表示的值在本发明不同实施例中可采用所述范围内的任何具体值或子范围,除非上下文中另作清楚指示,否则精确到所述范围下限单位的十分之一。1个月的时间应理解为指30天。1年的时间应理解为指365天。对于数字值前加“约”或“近似”的本发明任何实施例,本发明包括叙述确切值的实施例。对于数字值前未加“约”或“近似”的本发明任何实施例,本发明包括在所述值前加“约”或“近似”的实施例。

[0346] 应了解,本发明的任何特定实施例、特征或方面可明确地从任一个或多个权利要求中排除。例如,可从任一个或多个权利要求中排除任何特定组合物、化合物或化合物种

类、投药部位、投药途径或方法、剂量、调配物或补体介导的病症。

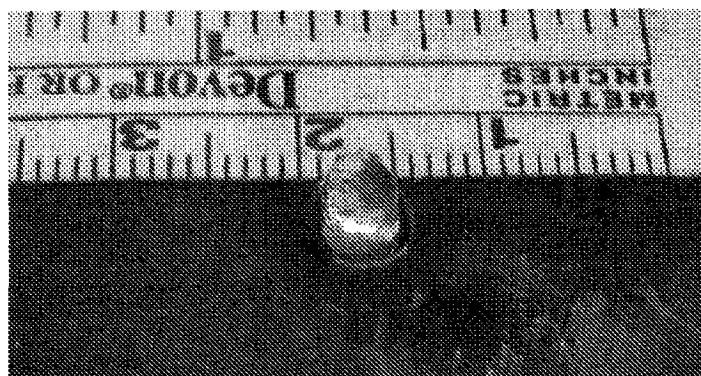


图 1

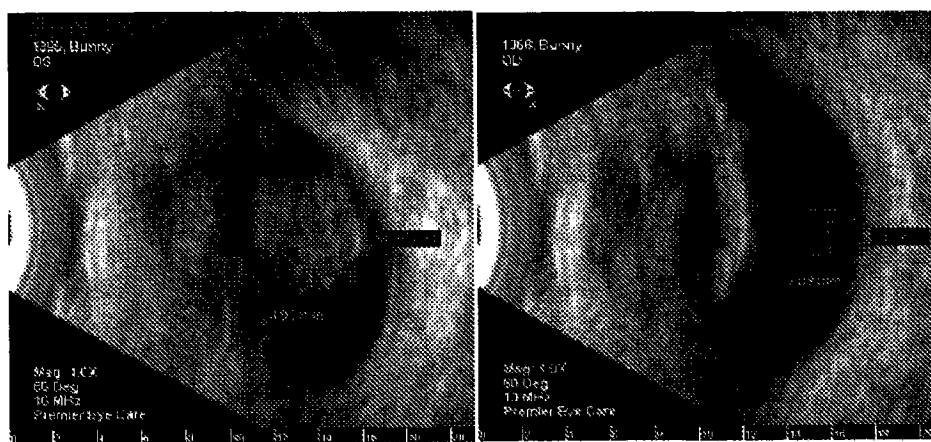


图 2

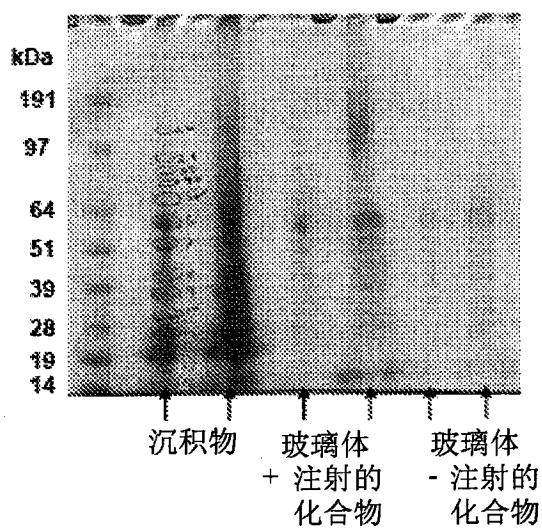


图 3

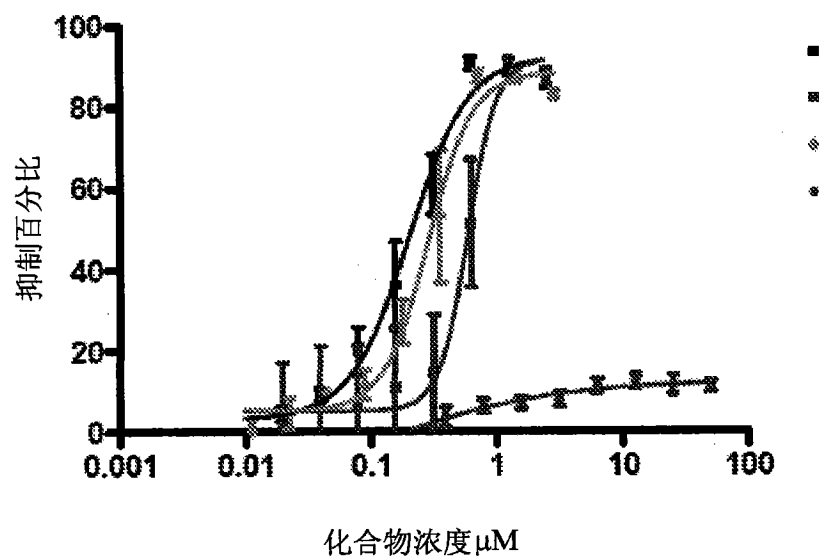


图 4

化合物浓度
(ng/ml)

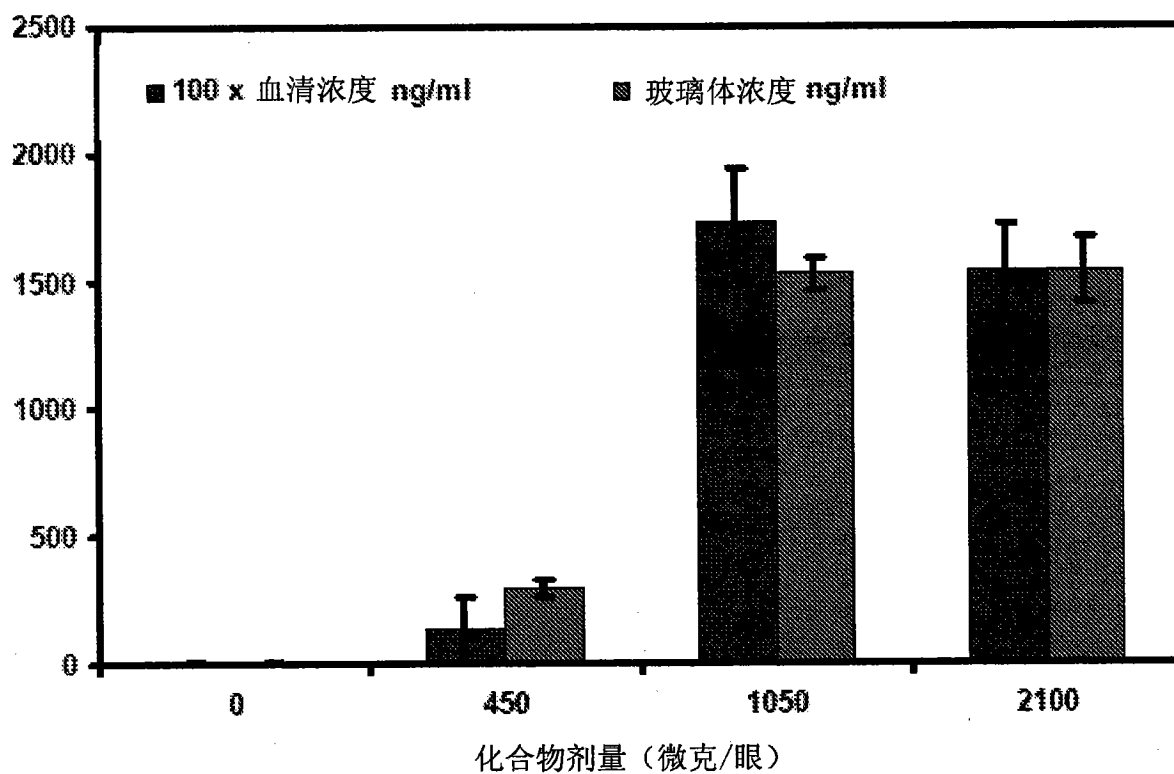


图 5