



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103687867 B

(45)授权公告日 2017.02.08

(21)申请号 201280033181.7

(22)申请日 2012.05.11

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103687867 A

(43)申请公布日 2014.03.26

(30)优先权数据  
61/484,836 2011.05.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.01.03

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/037648 2012.05.11

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/155107 EN 2012.11.15

(73)专利权人 阿佩利斯制药公司

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

(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

(51)Int.Cl.  
C07K 7/00(2006.01)  
A61K 38/04(2006.01)  
C12N 5/00(2006.01)  
A61P 37/00(2006.01)

审查员 皇甫洁琼

权利要求书48页 说明书62页  
序列表41页 附图3页

(54)发明名称

细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类  
似物及其用途

(57)摘要

在某些方面,本发明提供了细胞反应性坎普他汀类似物和包含细胞反应性坎普他汀类似物的组合物。在某些方面,本发明提供了使用细胞反应性坎普他汀类似物的方法,例如,用于抑制对细胞、组织或器官的补体介导的损伤。在某些方面,本发明提供了长效坎普他汀类似物和包含长效坎普他汀类似物的组合物。在某些方面,本发明另外提供了使用长效坎普他汀类似物的方法,例如,用于抑制对细胞、组织或器官的补体介导的损伤。在某些方面,本发明提供了靶向坎普他汀类似物和包含靶向坎普他汀类似物的组合物。在某些方面,本发明另外提供了使用靶向坎普他汀类似物的方法,例如,用于抑制对细胞、组织或器官的补体介导的损伤。

1. 一种长效坎普他汀类似物,其包含与一个或多个坎普他汀类似物部分连接的一个或多个清除率降低部分,其中:

(a)每个坎普他汀类似物部分包含环状肽,所述环状肽在N末端、C末端或二者处延长一个或多个氨基酸,其中所述环状肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:28、32或34,其中所述一个或多个氨基酸具有包含伯胺或仲胺的侧链且其与所述肽的环化部分被包含寡乙二醇部分的刚性或柔性隔离物分开,和

(b)每个清除率降低部分包含PEG或白蛋白部分。

2. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述一个或多个氨基酸包含Lys残基。

3. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述寡乙二醇部分是 $-(O-CH_2-CH_2-)_n$ ,其中n是1-10之间。

4. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述隔离物包含共价连接的 $-(CH_2)_m-$ 和 $-(O-CH_2-CH_2-)_n$ ,其中m是1-10之间,n是1-10之间。

5. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述隔离物包含8-氨基-3,6-二氧杂辛酸(AEEAc)或11-氨基-3,6,9-三氧杂十一烷酸。

6. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其包含具有至少5千道尔顿(kD)的分子量的清除率降低部分。

7. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其包含具有至少10千道尔顿(kD)的分子量的清除率降低部分。

8. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述一个或多个清除率降低部分与所述一个或多个坎普他汀类似物部分直接连接或通过连接部分连接。

9. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述一个或多个清除率降低部分与所述一个或多个坎普他汀类似物部分通过连接部分连接,并且其中所述连接部分包含不饱和烷基部分、包含非芳族环系的部分、芳族部分、醚部分、酰胺部分、酯部分、羰基部分、亚胺部分、硫醚部分和/或氨基酸残基。

10. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含具有20千道尔顿(kD)至100kD的分子量的清除率降低部分。

11. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含具有至少30千道尔顿(kD)的分子量的清除率降低部分。

12. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含具有至少40千道尔顿(kD)的分子量的清除率降低部分。

13. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述清除率降低部分包含聚乙二醇(PEG)。

14. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述清除率降低部分包含直链PEG。

15. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述清除率降低部分包含支链PEG。

16. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述清除率降低部分包含直链PEG,且所述坎普他汀类似物部分连接在所述直链PEG的每个末端处。

17. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述清除率降低部分包含具有3-10个分支的支链PEG。

18. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,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50%具有与其连接的坎普他汀类似物部分。

19. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,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75%具有与其连接的坎普他汀类似物部分。

20. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其中所述清除率降低部分包含人血清白蛋白。

21. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其包含2-10个坎普他汀类似物部分。

22. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,其包含2-100个坎普他汀类似物部分。

23. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,当静脉内地注射进灵长类动物中时,所述长效坎普他汀类似物具有至少2天的血浆半衰期。

24. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,当静脉内地注射进灵长类动物中时,所述长效坎普他汀类似物具有至少3天的血浆半衰期。

25. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,当静脉内地注射进灵长类动物中时,所述长效坎普他汀类似物具有至少4天的血浆半衰期。

26. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含清除率降低部分,且其摩尔活性为具有相同氨基酸序列、但是不包含所述清除率降低部分的对应坎普他汀类似物的活性的至少20%。

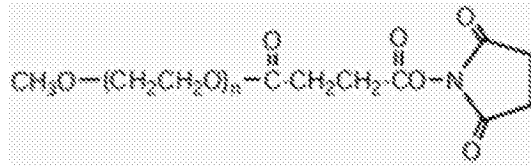
27. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含清除率降低部分,且其摩尔活性为不包含所述清除率降低部分的对应坎普他汀类似物的活性的至少30%。

28. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含多个坎普他汀类似物部分,且其摩尔活性为所述坎普他汀类似物部分的活性总和的至少10%。

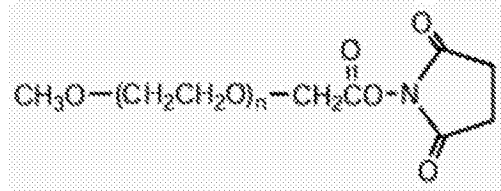
29. 根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含清除率降低部分,且其终末半衰期是可比较剂量的不包含所述清除率降低部分的对应坎普他汀类似物的终末半衰期的至少5倍。

30. 根据权利要求1-29中任一项所述的长效坎普他汀类似物,其中所述坎普他汀类似物包含环状肽,所述环状肽的序列为SEQ ID NO:28。

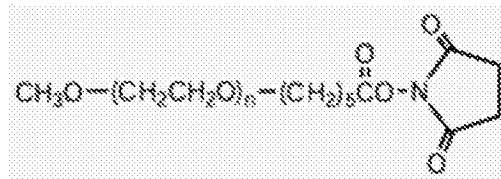
31. 一种制备根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物的方法,所述方法包括:使式I-XVI或式A-H中的任一个的化合物与坎普他汀类似物部分反应,所述坎普他汀类似物部分包含环状肽,其中所述环状肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:28、32或34:



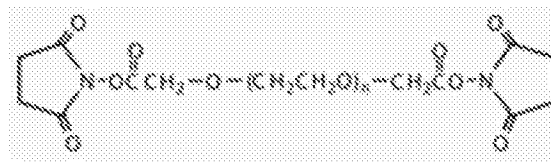
式 I,



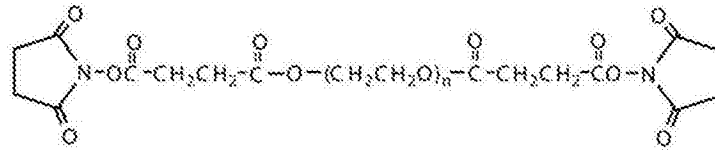
式 II,



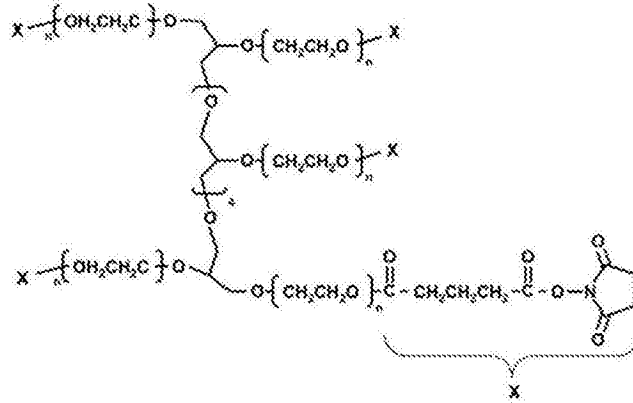
式 III,



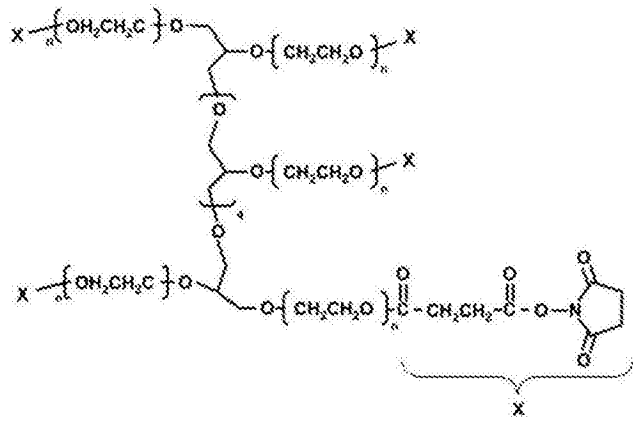
式 IV,



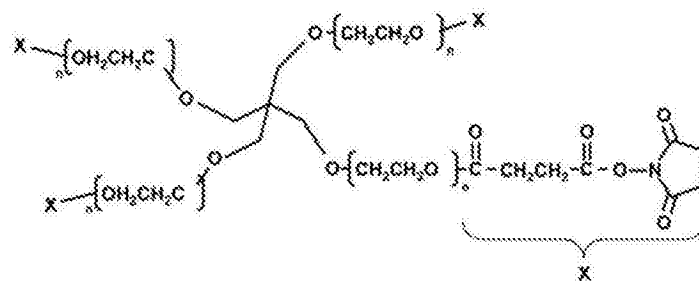
式 V,



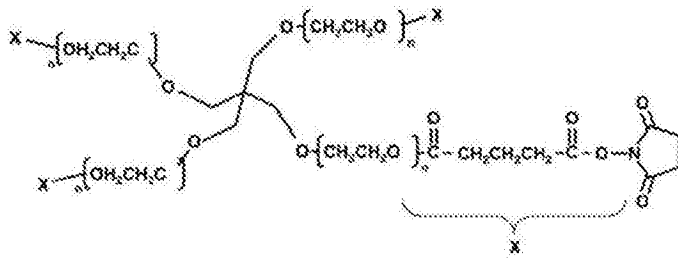
式 VI,



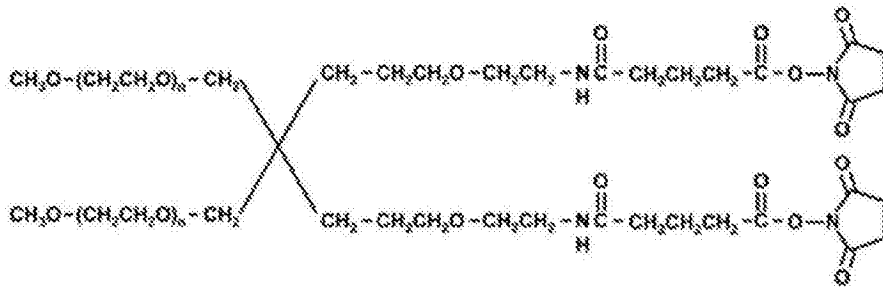
式 VII,



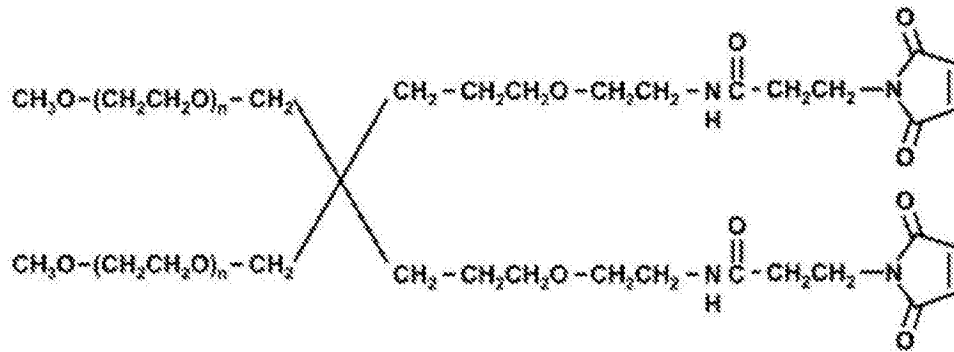
式 VIII,



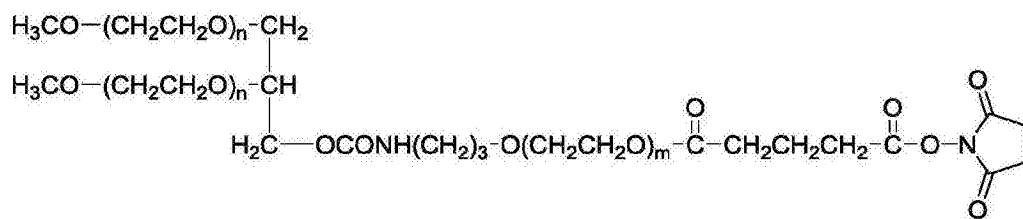
式 IX,



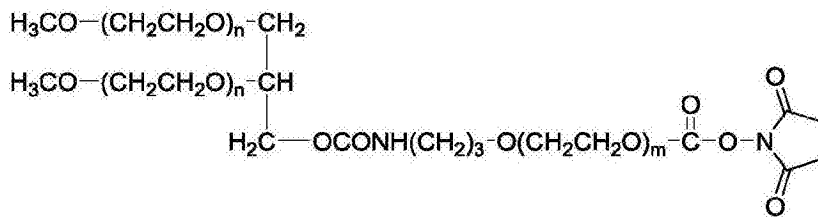
式 X,



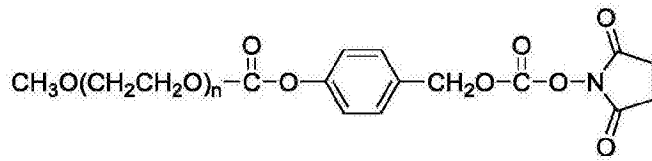
式 XI,



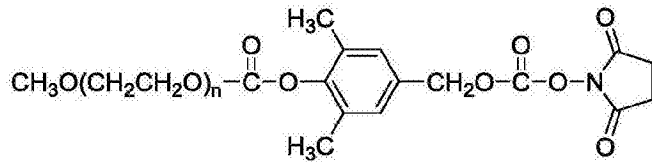
式 XII,



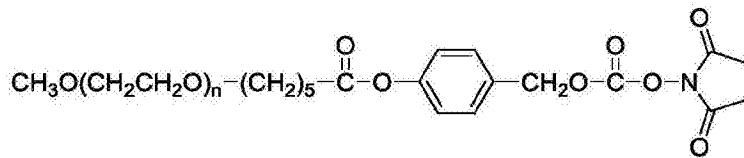
式 XIII,



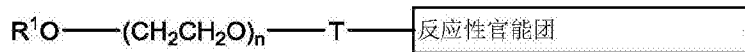
式 XIV,



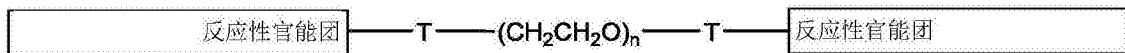
式 XV,



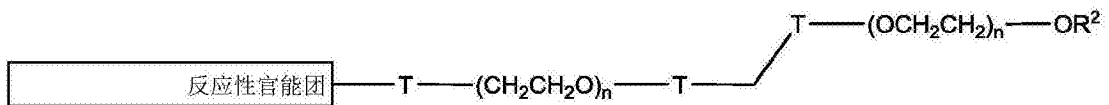
式 XVI,



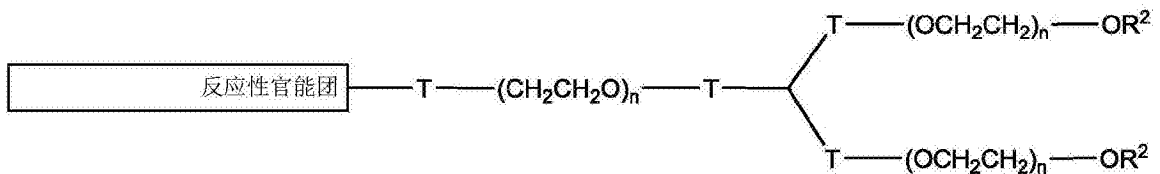
式 A,



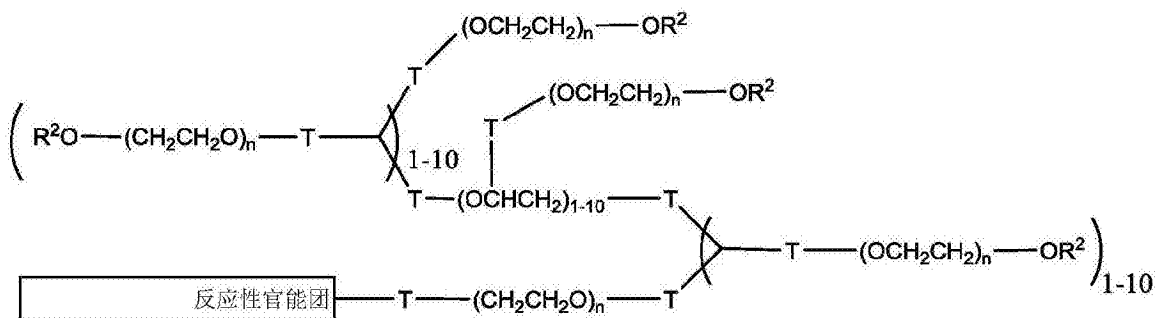
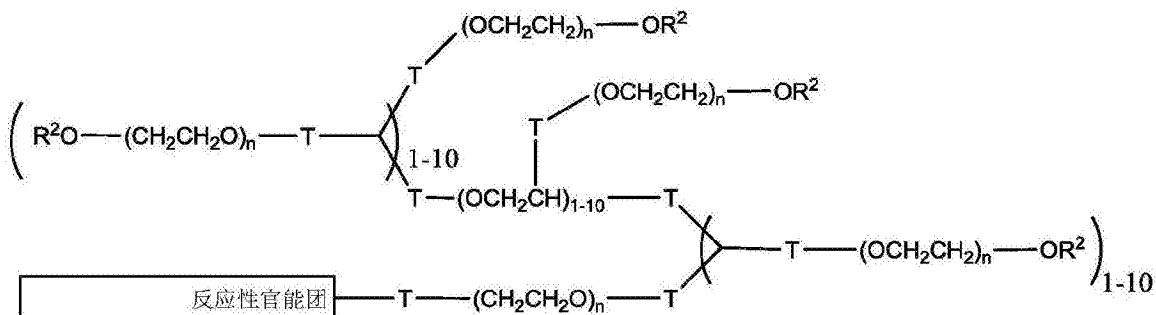
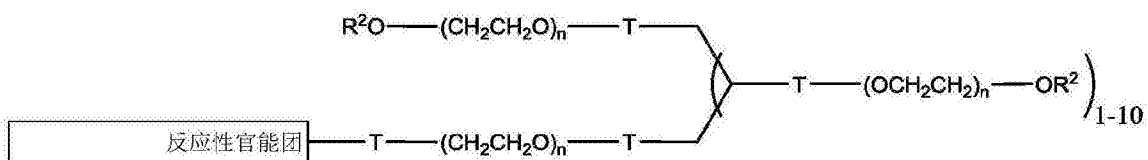
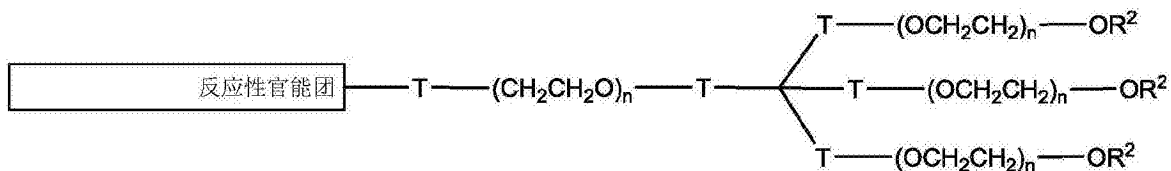
式 B,



式 C,



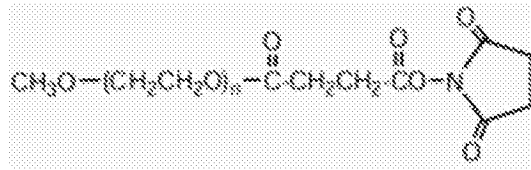
式 D,



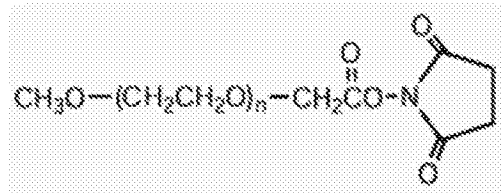
其中所述反应性官能团选自以下基团组成的组：烯烃、炔烃、醇、酚、醚、氧化物、卤化物、醛、酮、羧酸、酯、酰胺、氰酸酯、异氰酸酯、硫氰酸酯、异硫氰酸酯、胺、肼、酰肼、重氮基、重氮鎓、硝基、腈、硫化物、亚砷、砷、磺酸、亚磺酸、缩醛、缩酮、酸酐、次磺酸、异腈、羟胺、硫代异羟肟酸、脲、碳化二亚胺、亚胺、叠氮化物、偶氮化合物、氧化偶氮基化合物和亚硝基化合物。

32. 一种制备根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物的方法，所述方法包括：使式

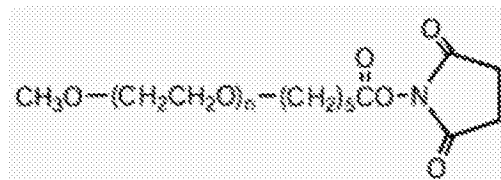
I-XVI或式A-H中的任一个的化合物与坎普他汀类似物部分反应,所述坎普他汀类似物部分包含环状肽,其中所述环状肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:28、32或34:



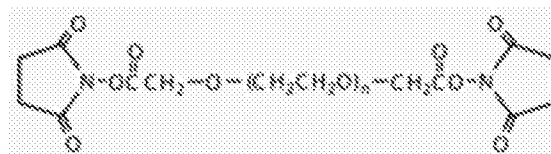
式 I,



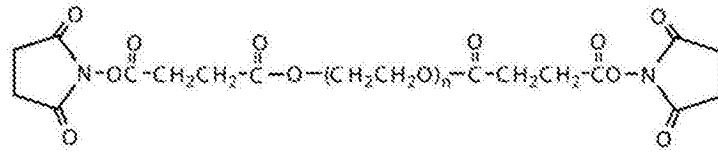
式 II,



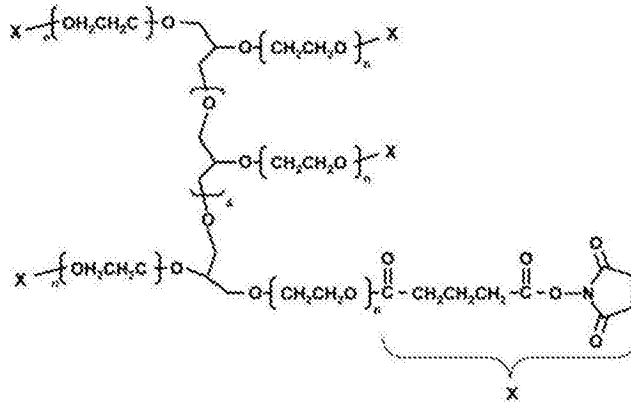
式 III,



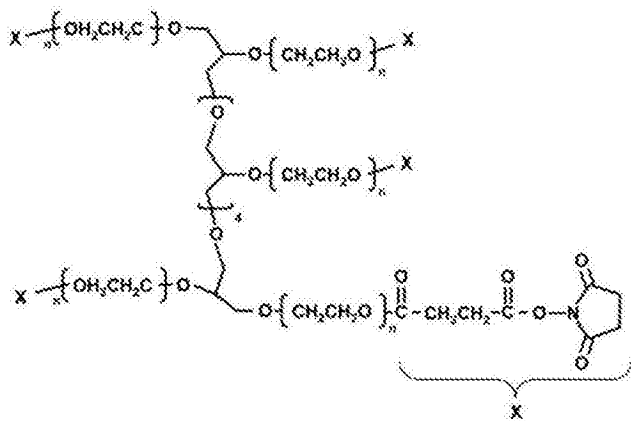
式 IV,



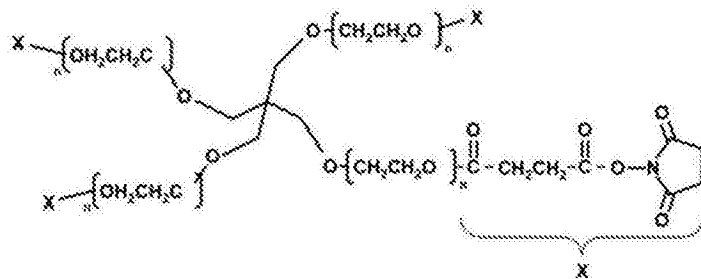
式 V,



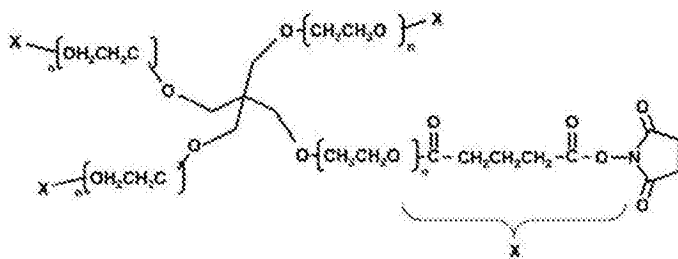
式 VI,



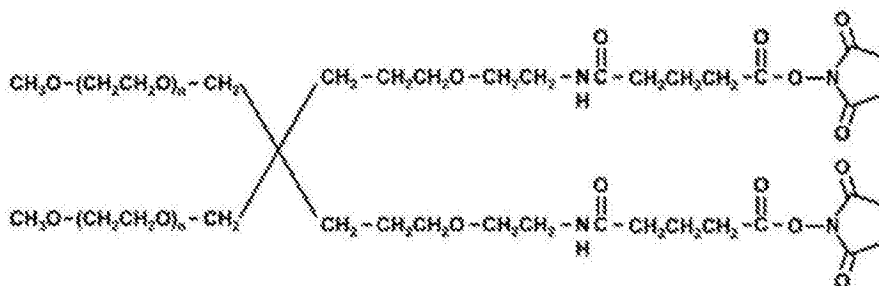
式 VII,



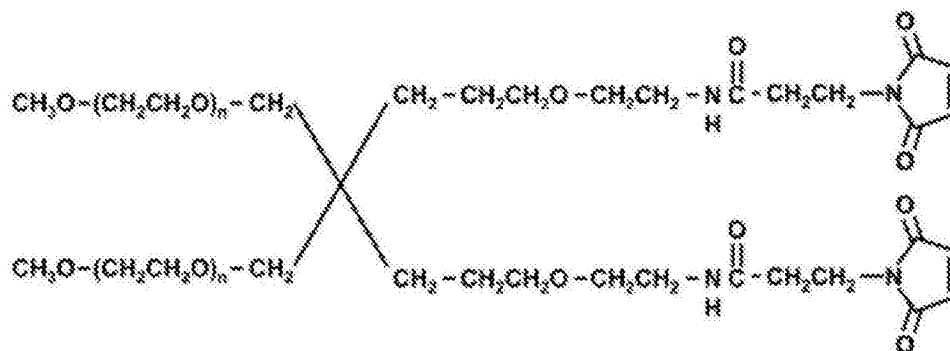
式 VIII,



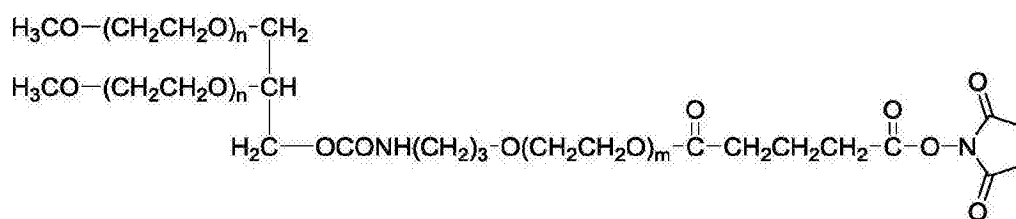
式 IX,



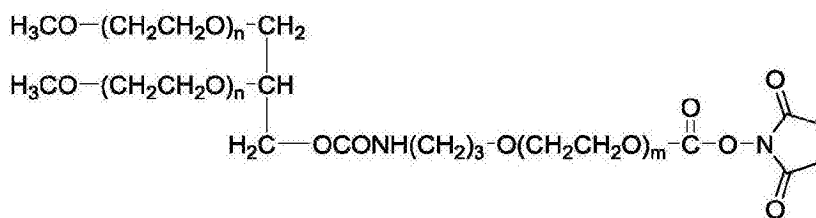
式 X,



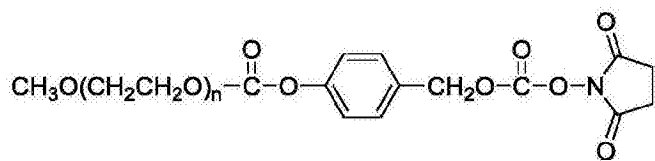
式 XI,



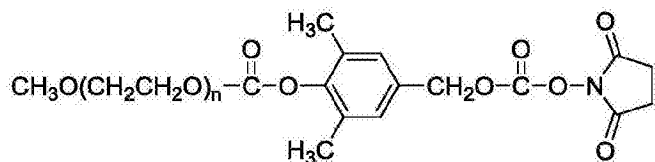
式 XII,



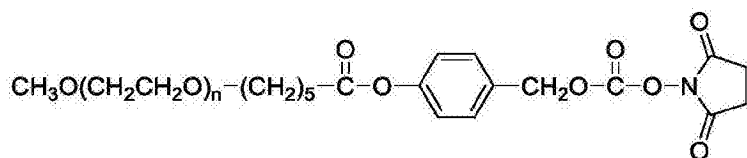
式 XIII,



式 XIV,



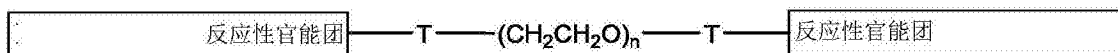
式 XV,



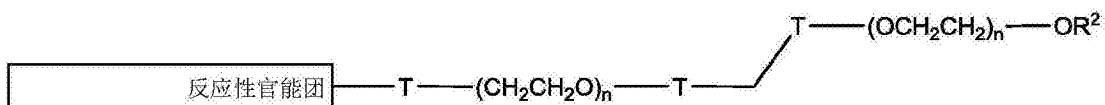
式 XVI,



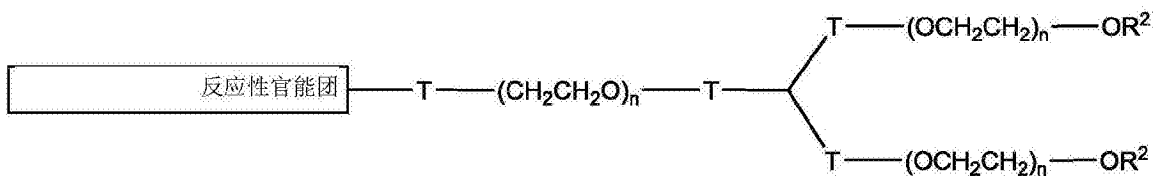
式 A,



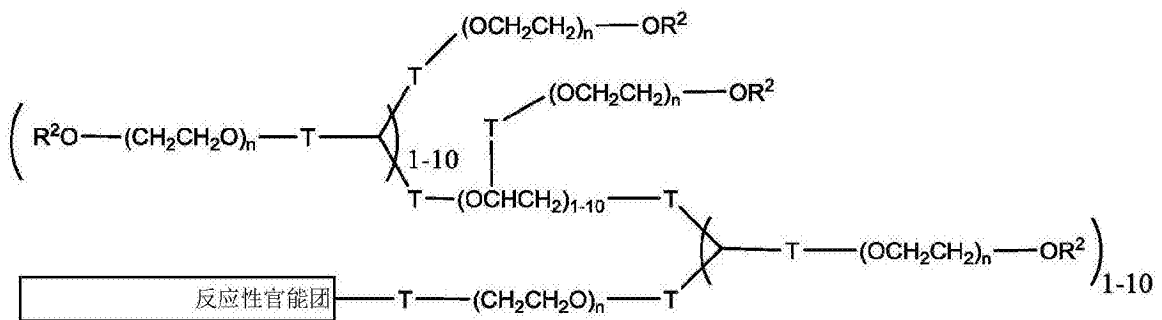
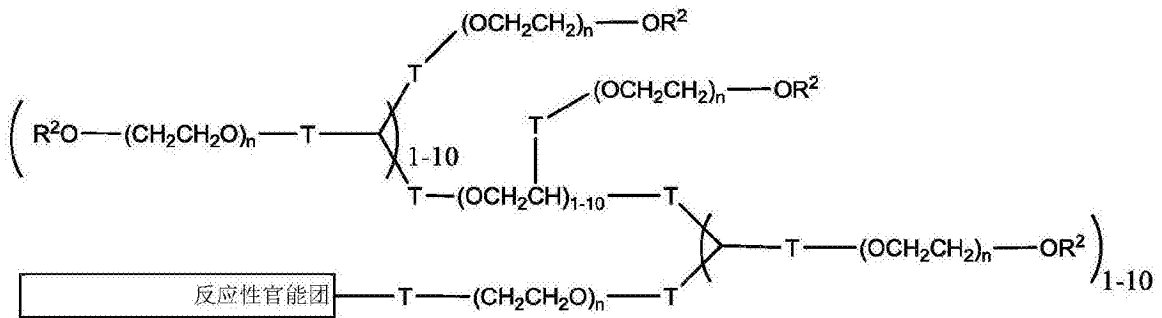
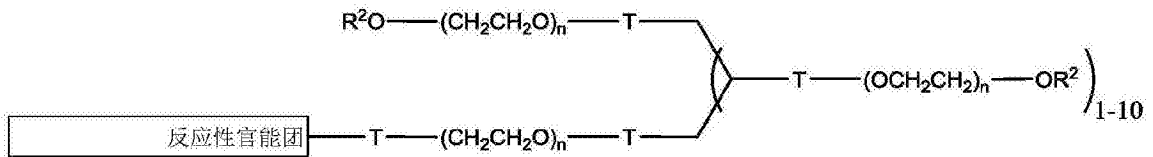
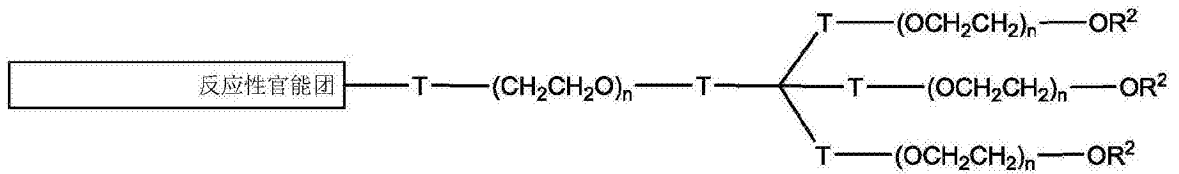
式 B,



式 C,

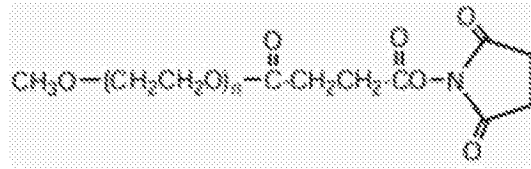


式 D,

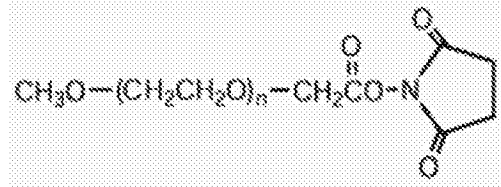


其中所述反应性官能团选自硫酸酯、亚氨酯、原酸酯、亚硫酸酯、氨基甲酸酯和N-羟基琥珀酰亚胺酯。

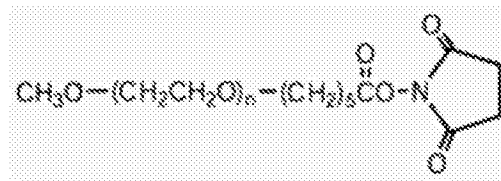
33. 一种制备根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物的方法,所述方法包括:使式 I-XVI或式 A-H 中的任一个的化合物与坎普他汀类似物部分反应,所述坎普他汀类似物部分包含环状肽,其中所述环状肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO:28、32或34:



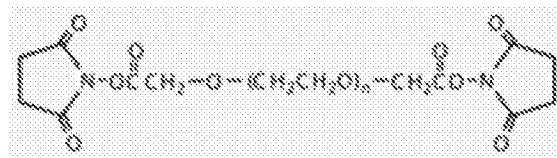
式 I,



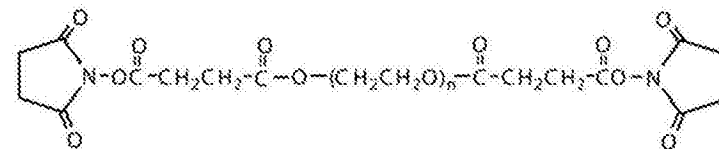
式 II,



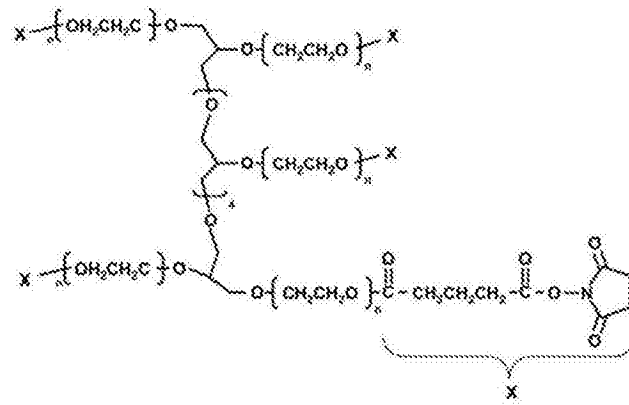
式 III,



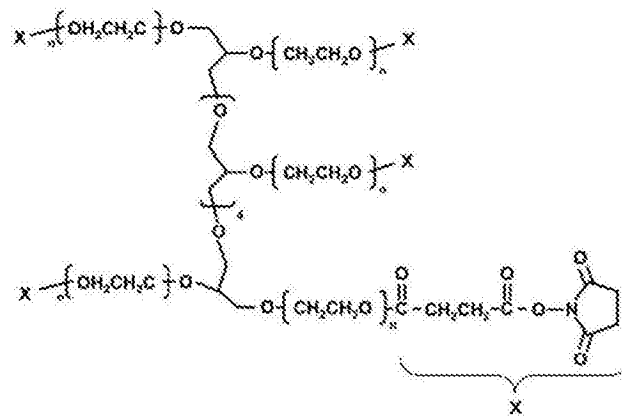
式 IV,



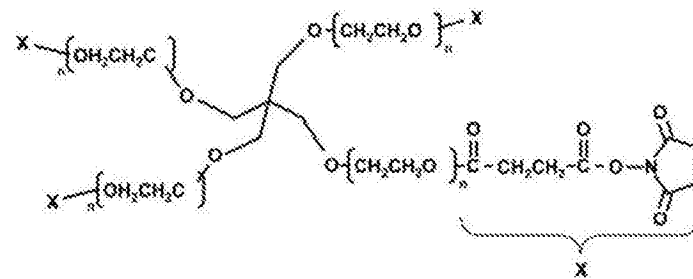
式 V,



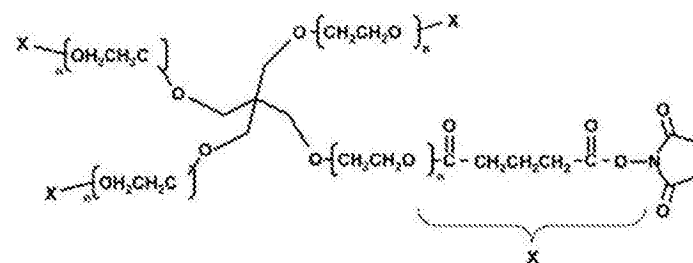
式 VI,



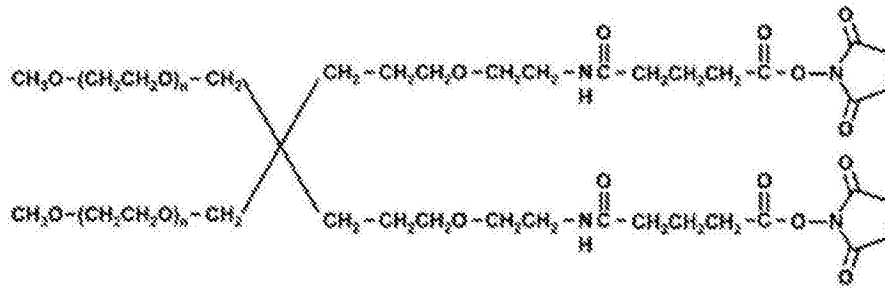
式 VII,



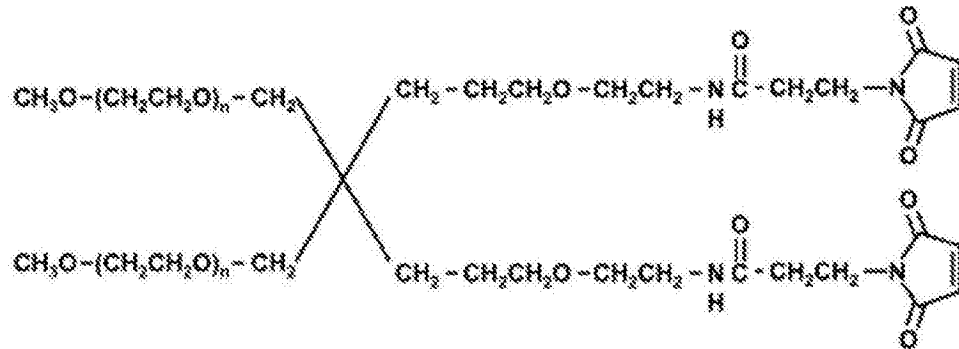
式 VIII,



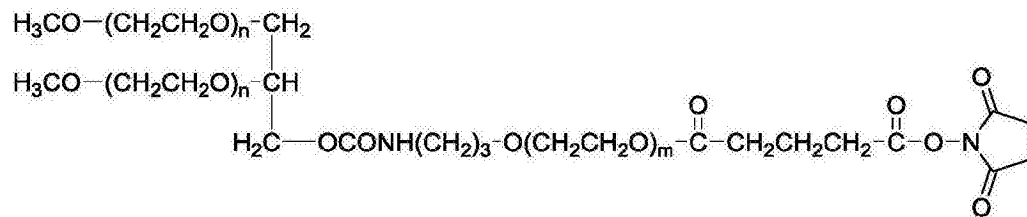
式 IX,



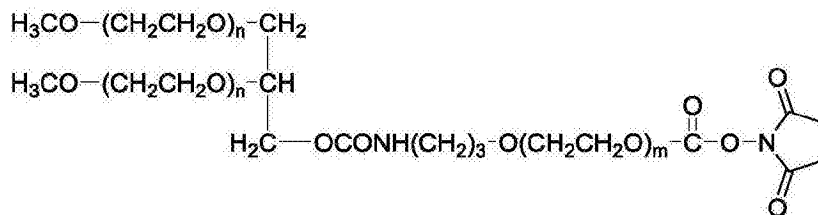
式 X,



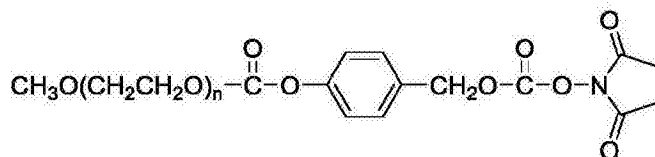
式 XI,



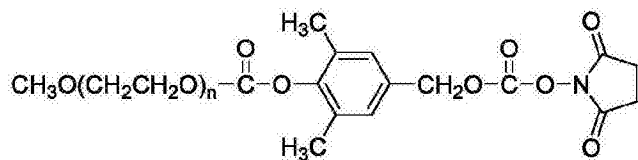
式 XII,



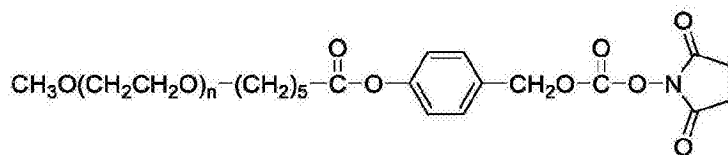
式 XIII,



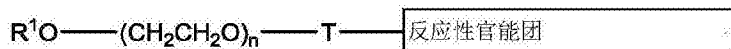
式 XIV,



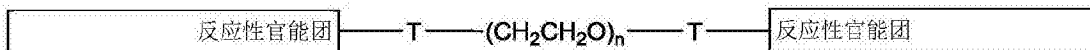
式 XV,



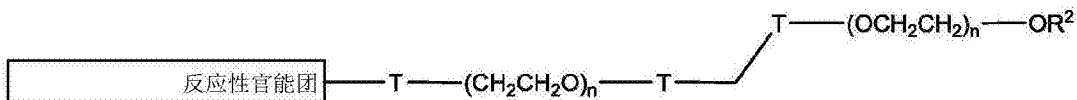
式 XVI,



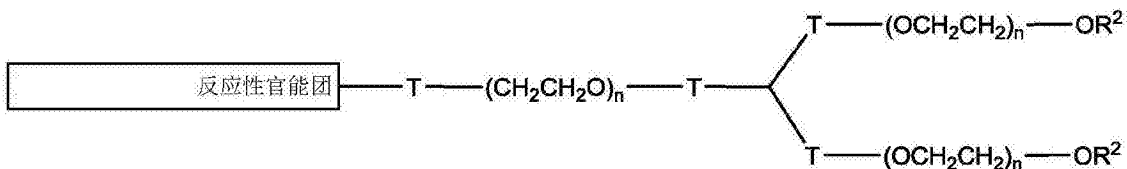
式 A,



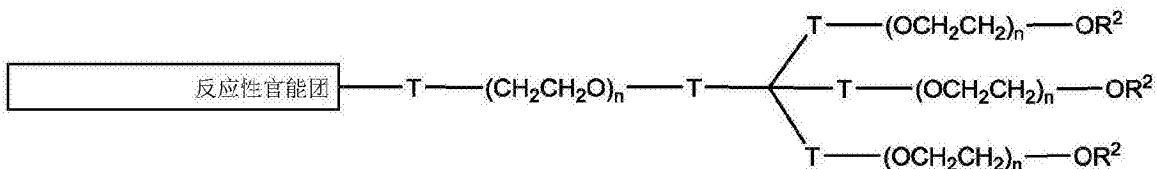
式 B,



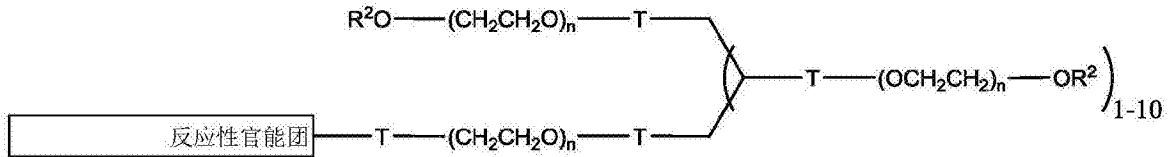
式 C,



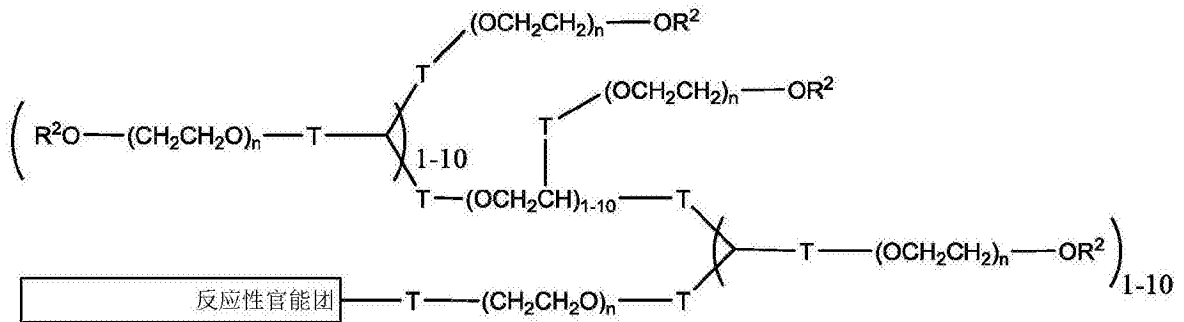
式 D,



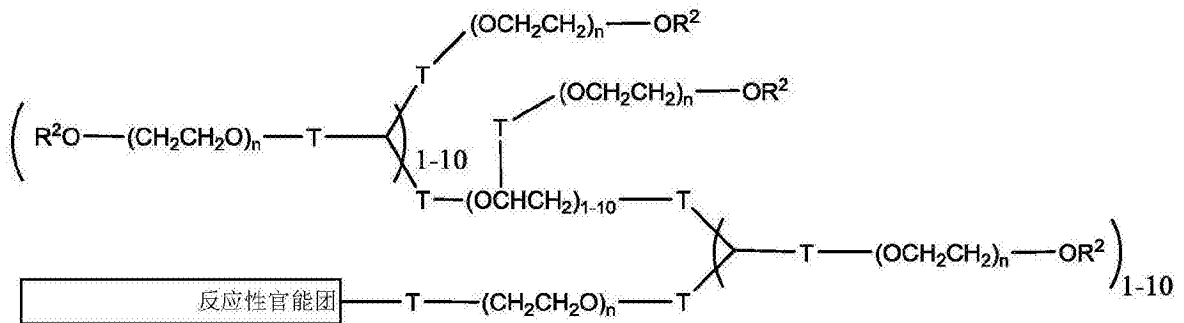
式 E,



式 F,



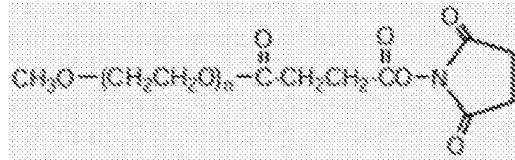
式 G,



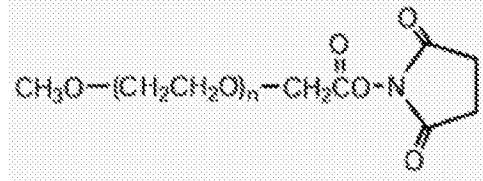
式 H,

其中所述反应性官能团选自异羟肟酸、酰亚胺和马来酰亚胺。

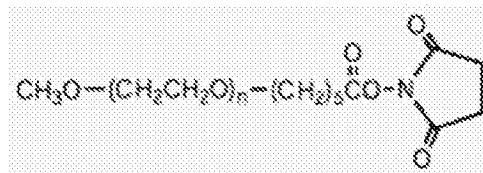
34. 一种制备根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物的方法,所述方法包括:使式 I-XVI 或式 A-H 中的任一个的化合物与坎普他汀类似物部分反应,所述坎普他汀类似物部分包含环状肽,其中所述环状肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 28、32 或 34:



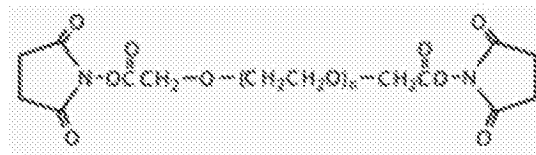
式 I,



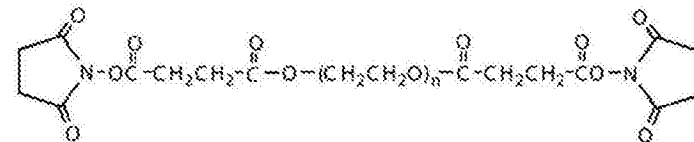
式 II,



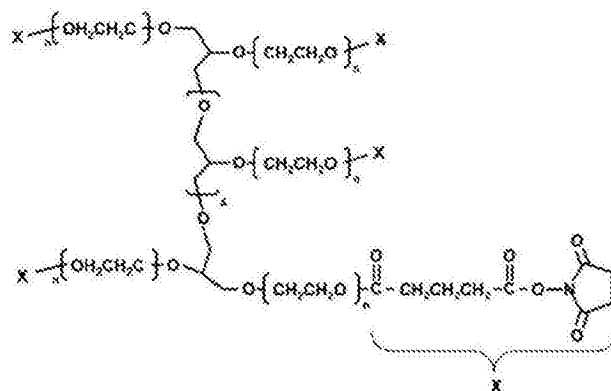
式 III,



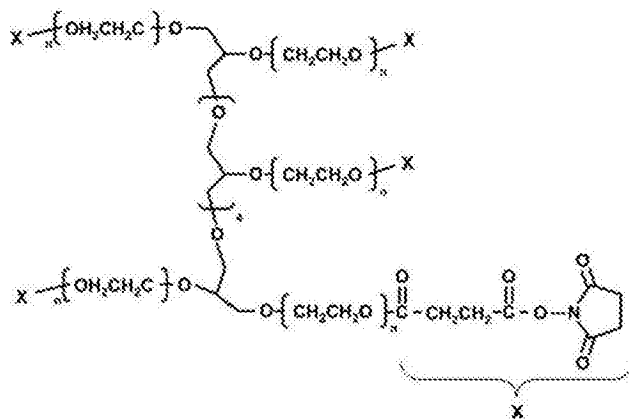
式 IV,



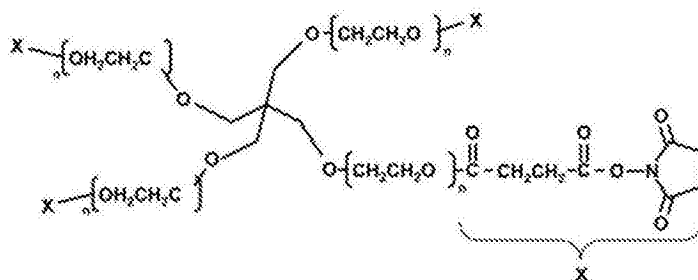
式 V,



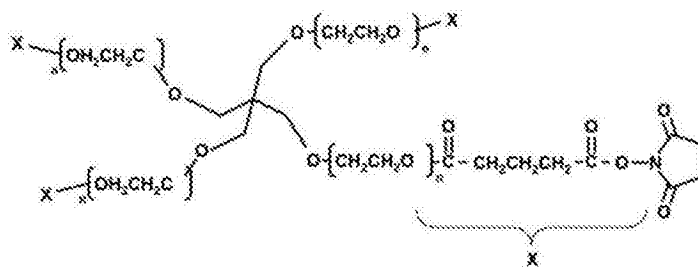
式 VI,



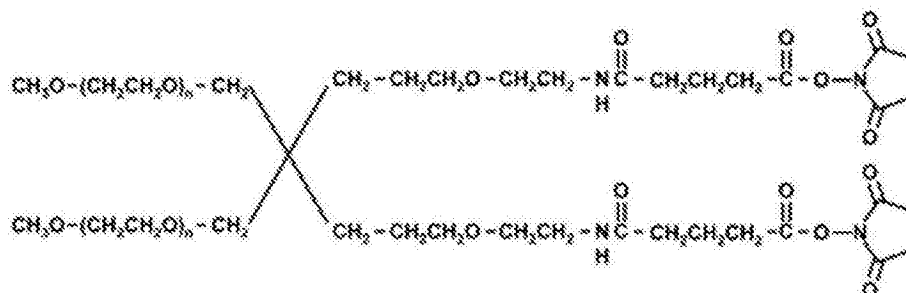
式 VII,



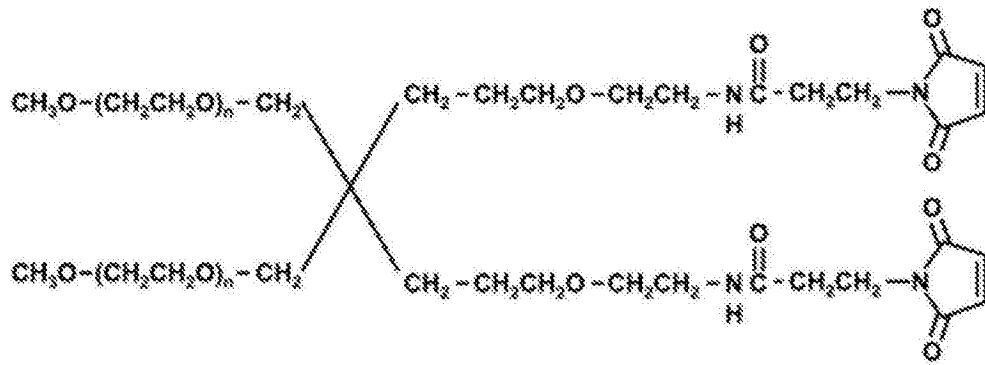
式 VIII,



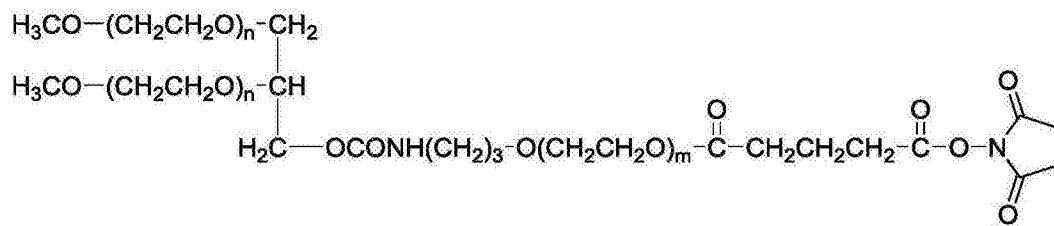
式 IX,



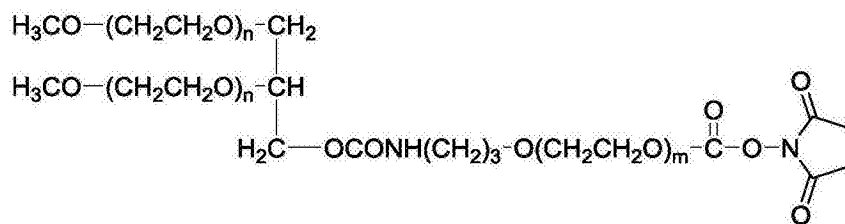
式 X,



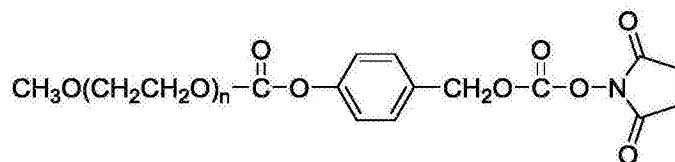
式 XI,



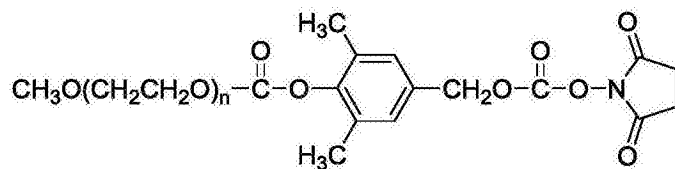
式 XII,



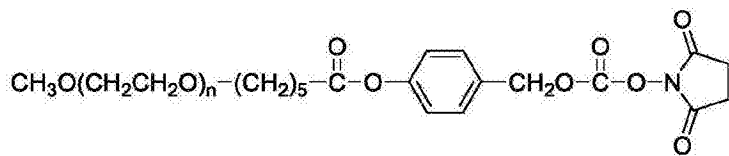
式 XIII,



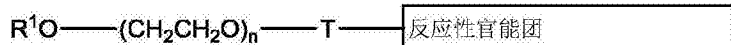
式 XIV,



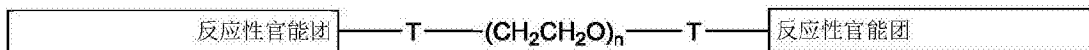
式 XV,



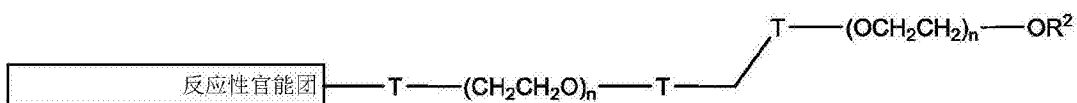
式 XVI,



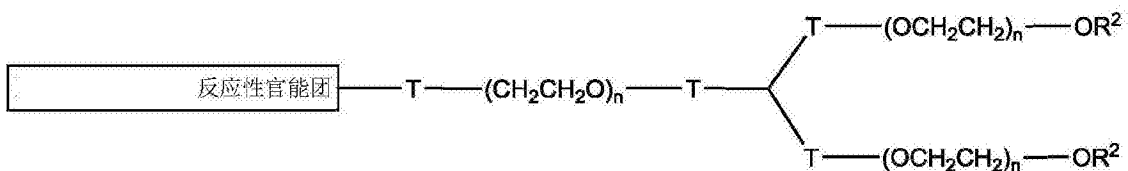
式 A,



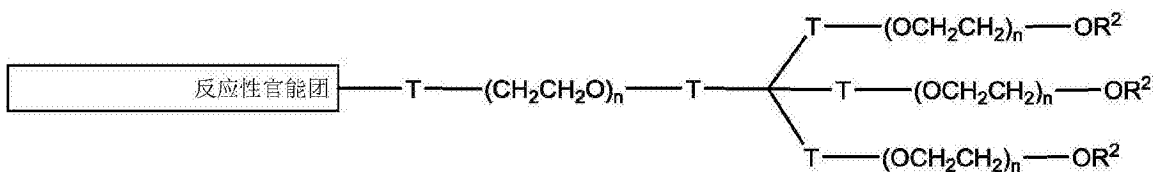
式 B,



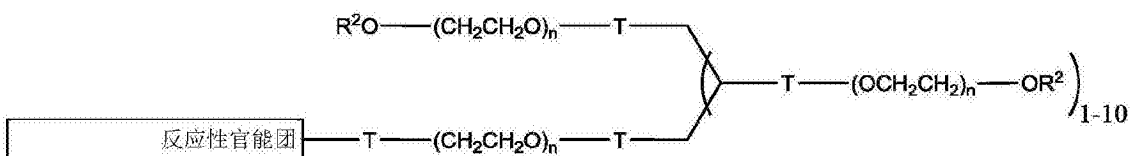
式 C,



式 D,

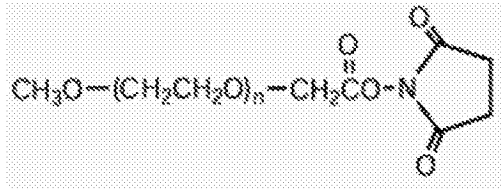


式 E,

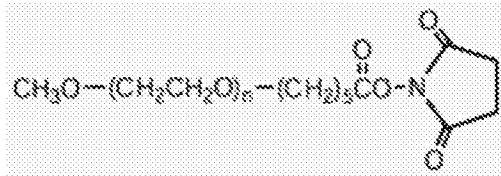


式 F,

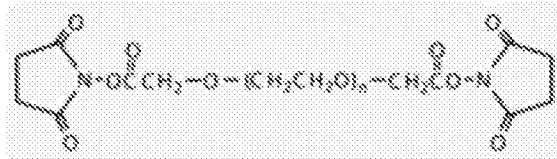




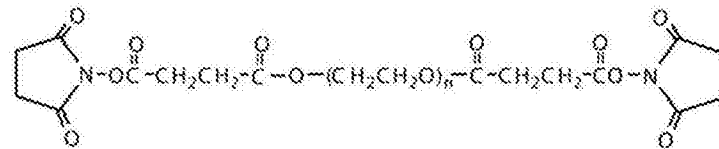
式 II,



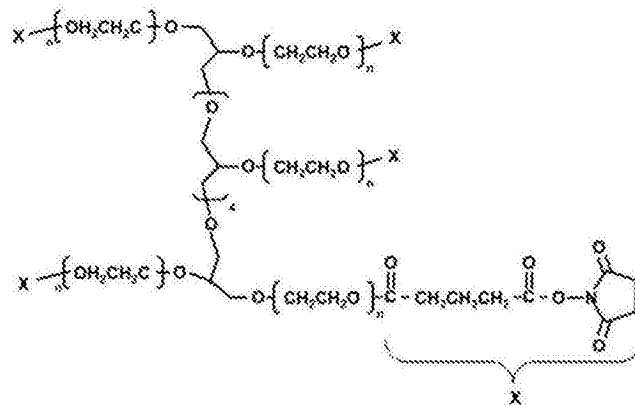
式 III,



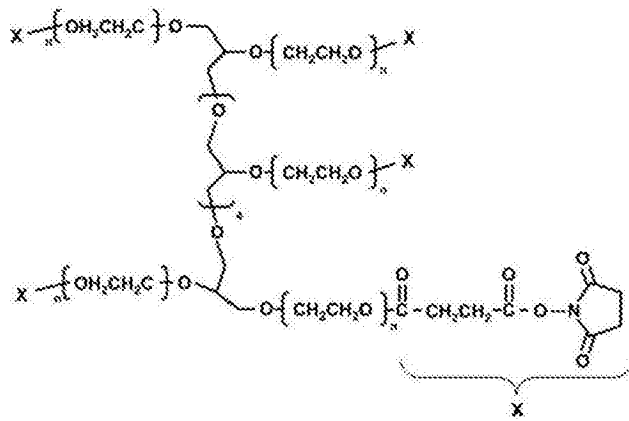
式 IV,



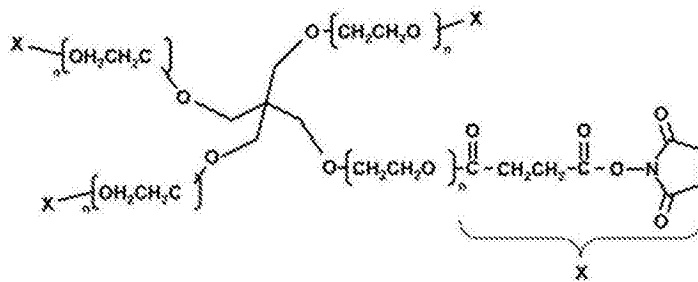
式 V,



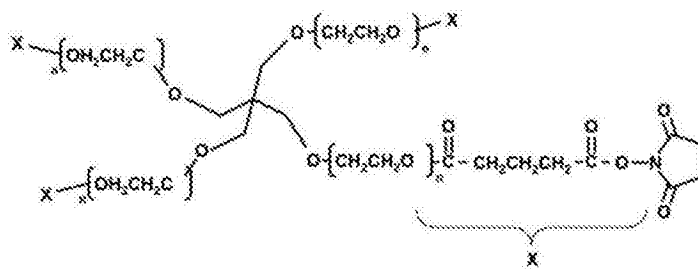
式 VI,



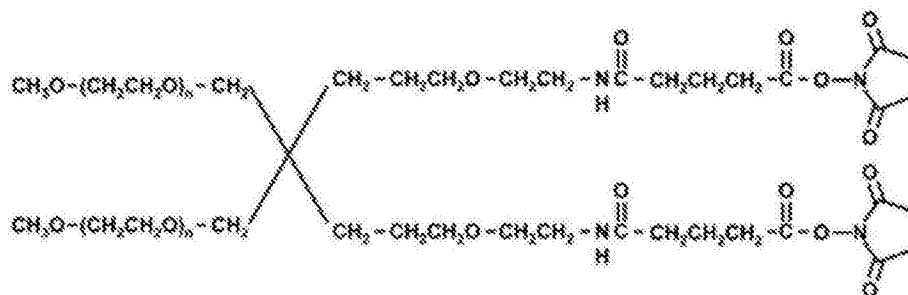
式 VII,



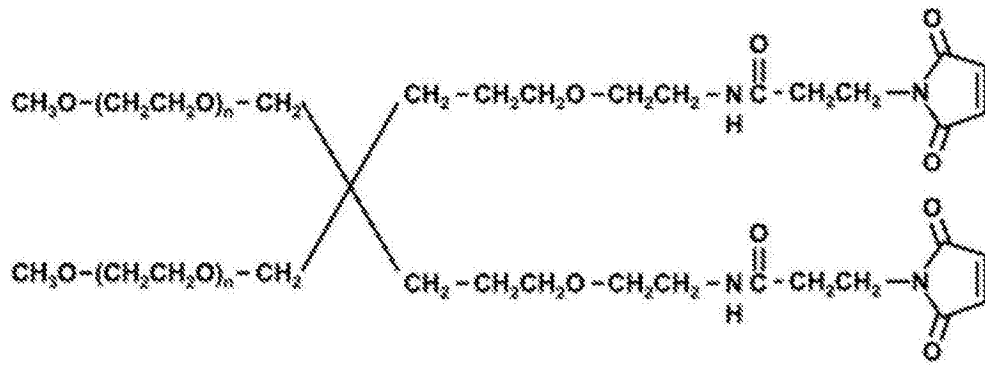
式 VIII,



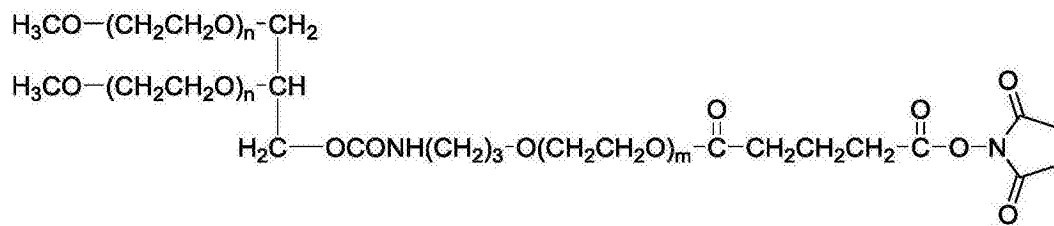
式 IX,



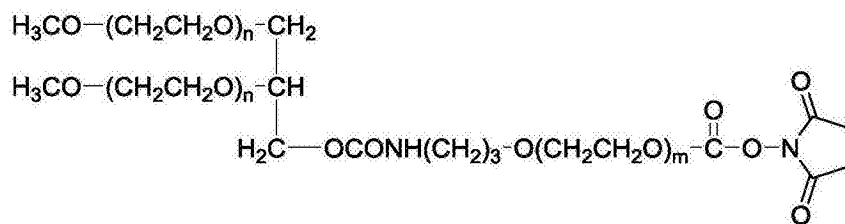
式 X,



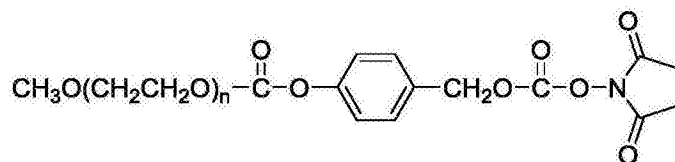
式 XI,



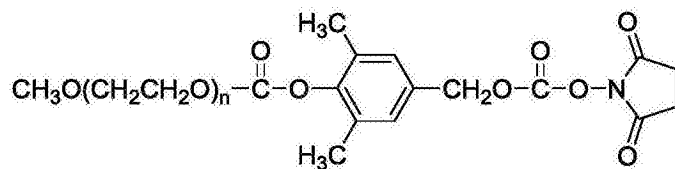
式 XII,



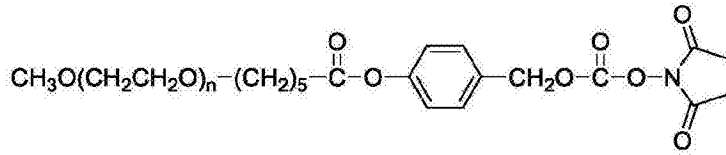
式 XIII,



式 XIV,



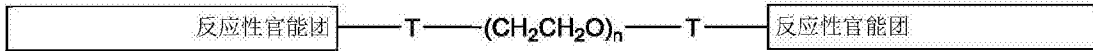
式 XV,



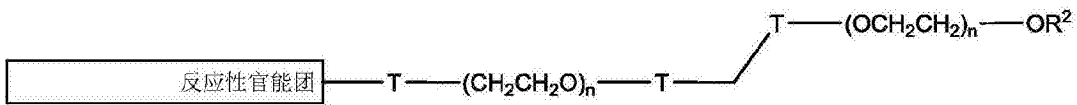
式 XVI,



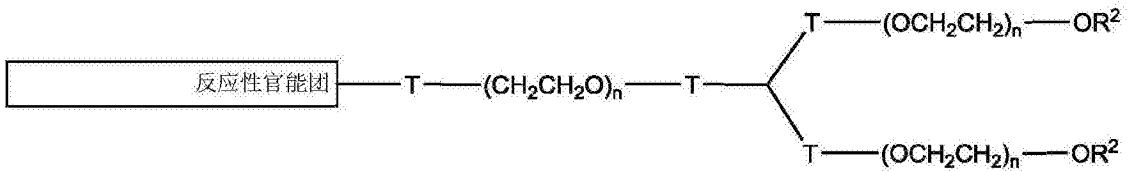
式 A,



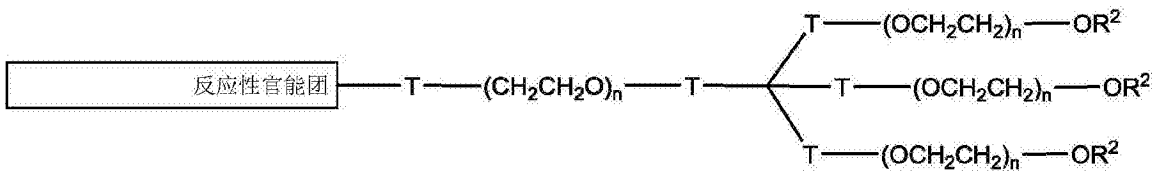
式 B,



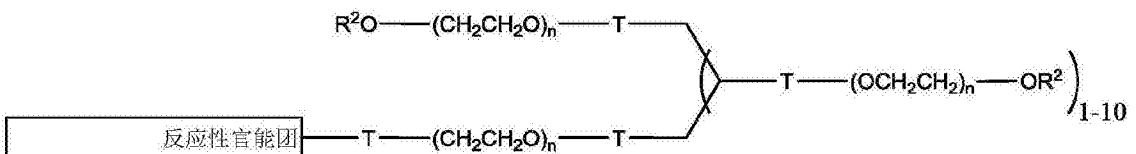
式 C,



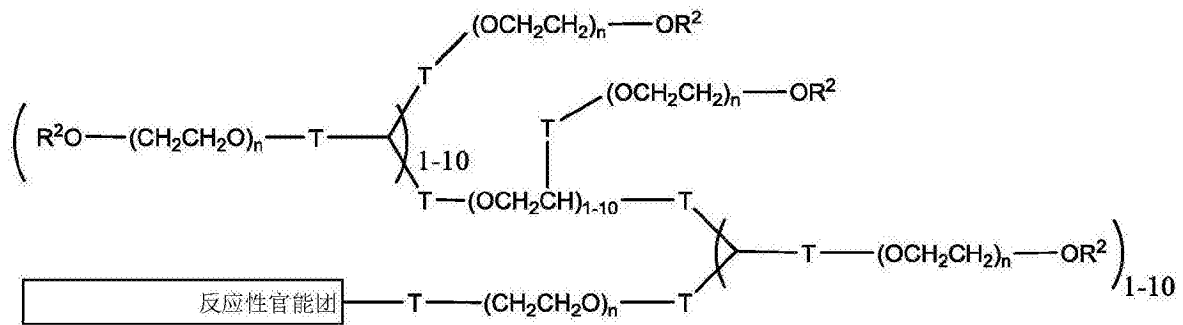
式 D,



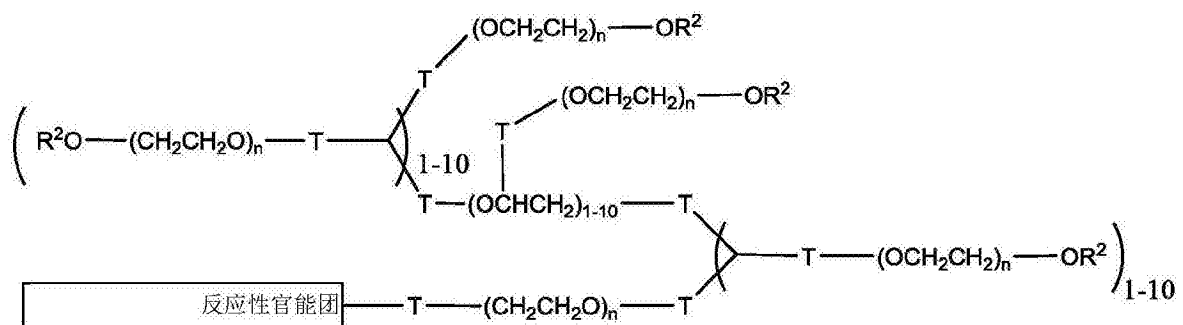
式 E,



式 F,



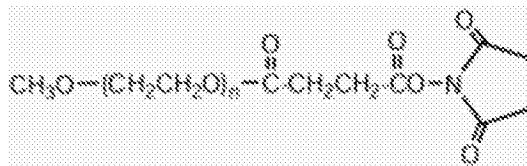
式 G,



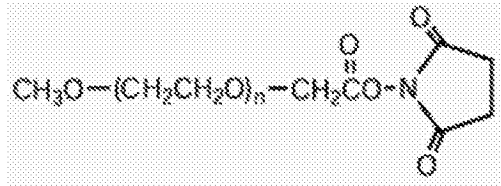
式 H,

其中所述反应性官能团选自硫醇和二硫化物。

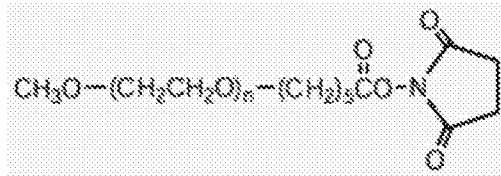
36. 一种制备根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物的方法,所述方法包括:使式 I-XVI或式A-H中的任一个的化合物与坎普他汀类似物部分反应,所述坎普他汀类似物部分包含环状肽,其中所述环状肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:28、32或34:



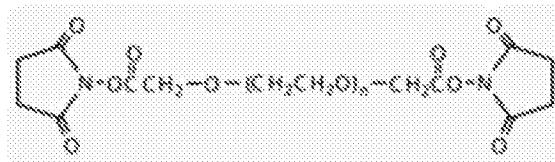
式 I,



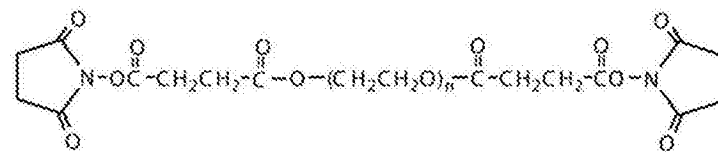
式 II,



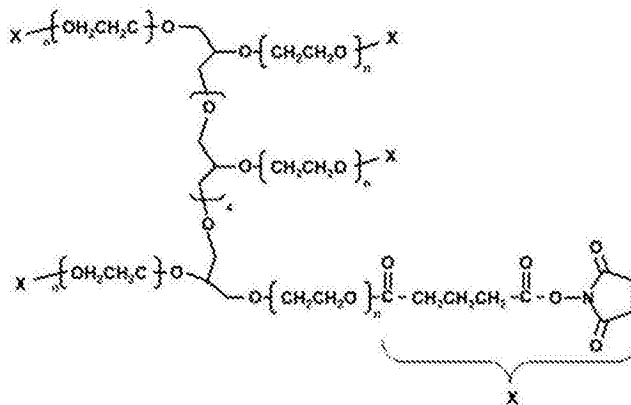
式 III,



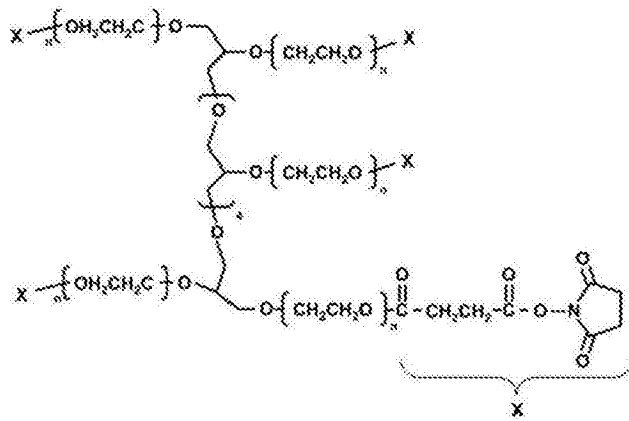
式 IV,



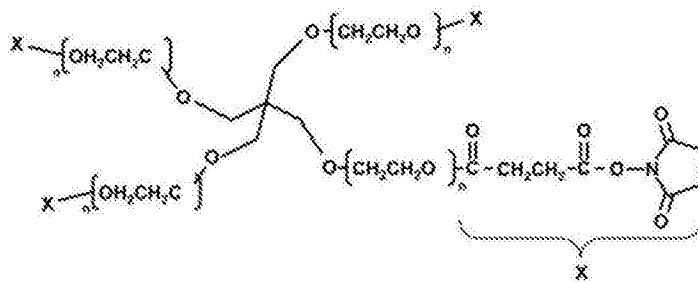
式 V,



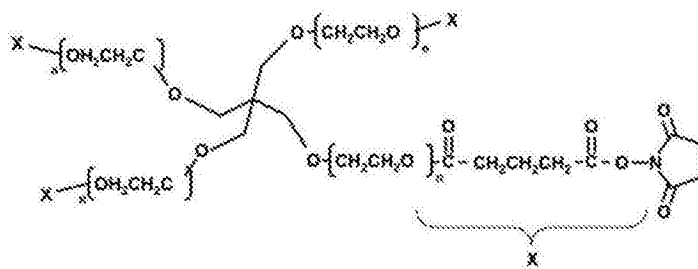
式 VI,



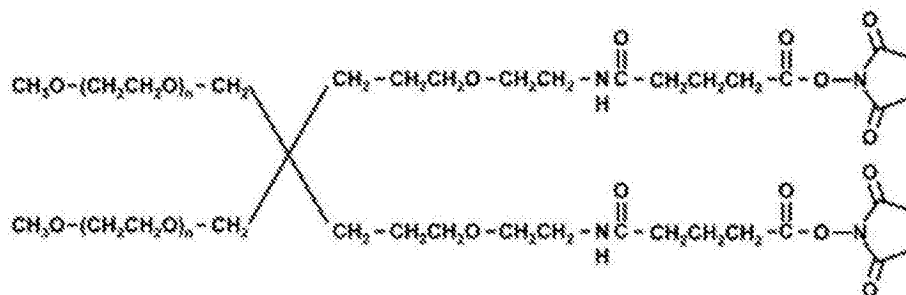
式 VII,



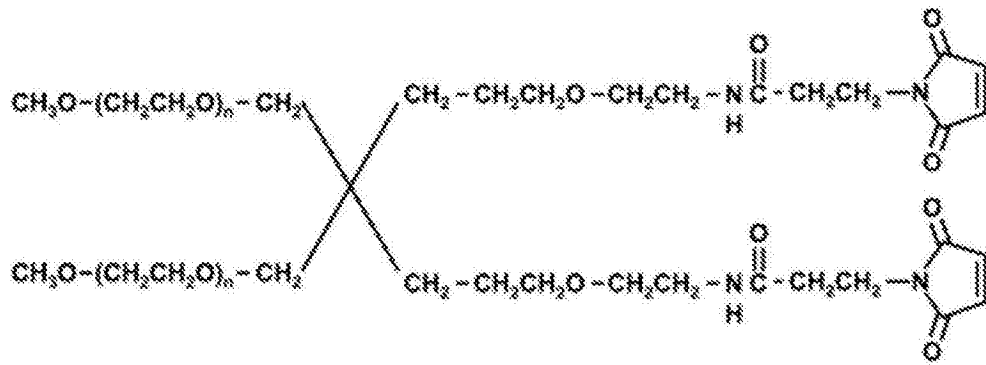
式 VIII,



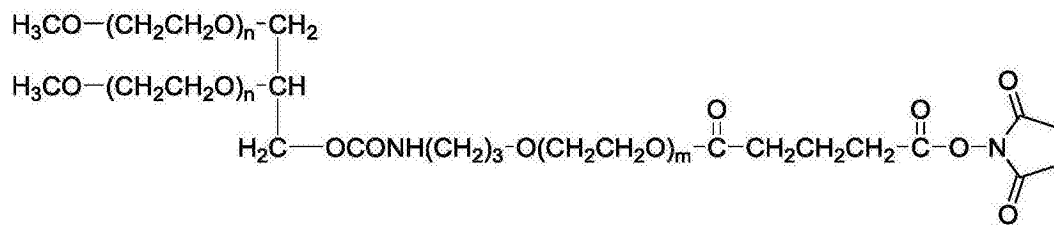
式 IX,



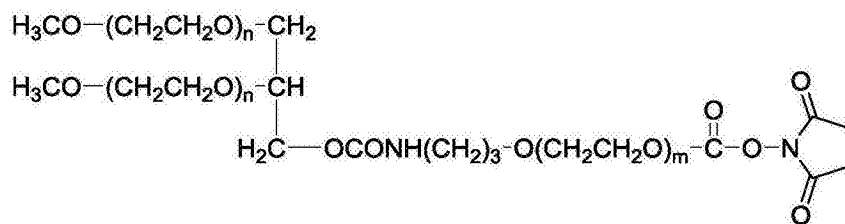
式 X,



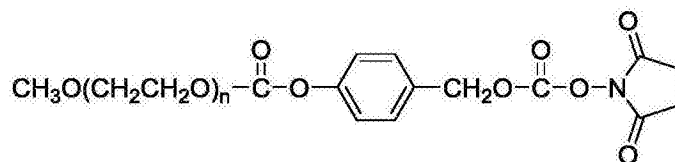
式 XI,



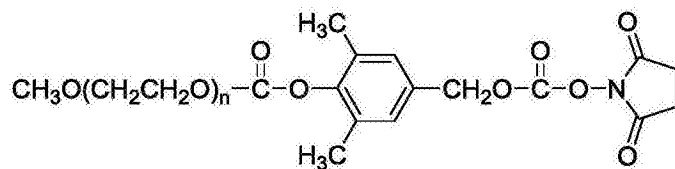
式 XII,



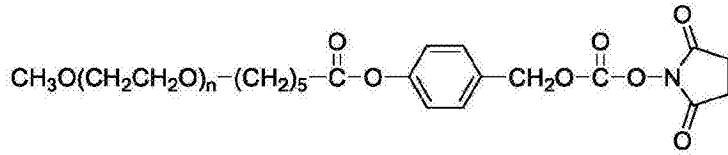
式 XIII,



式 XIV,



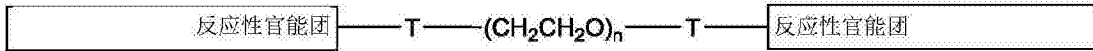
式 XV,



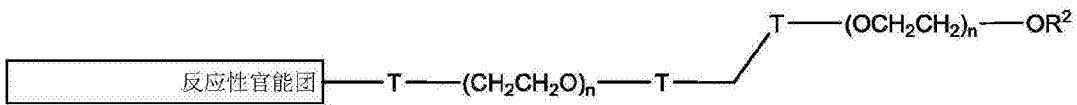
式 XVI,



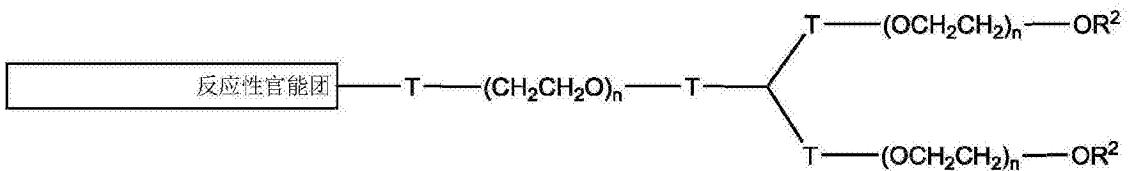
式 A,



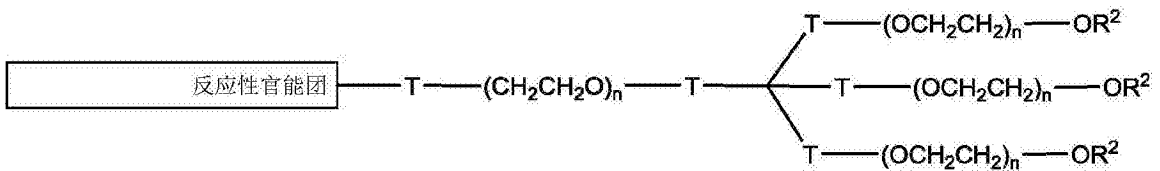
式 B,



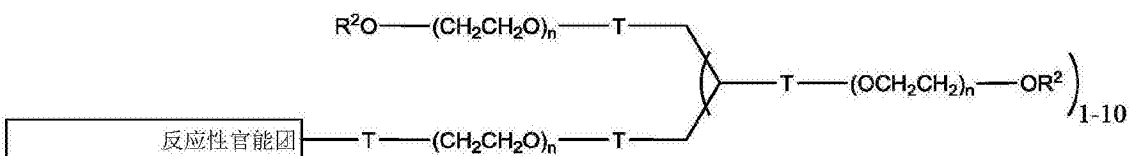
式 C,



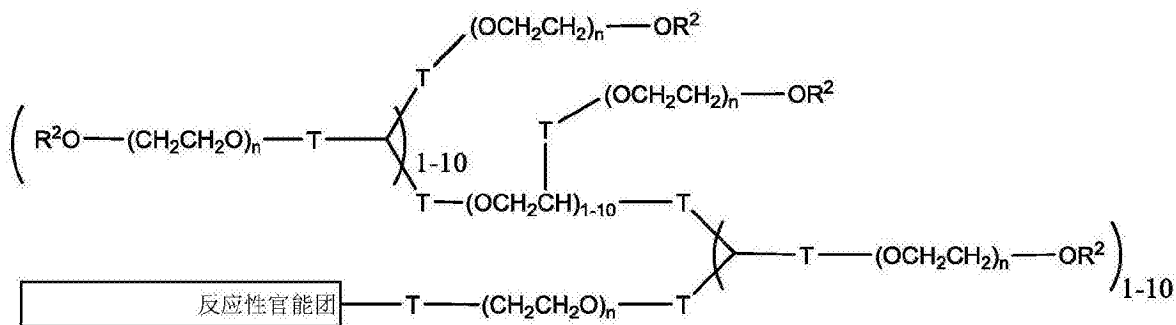
式 D,



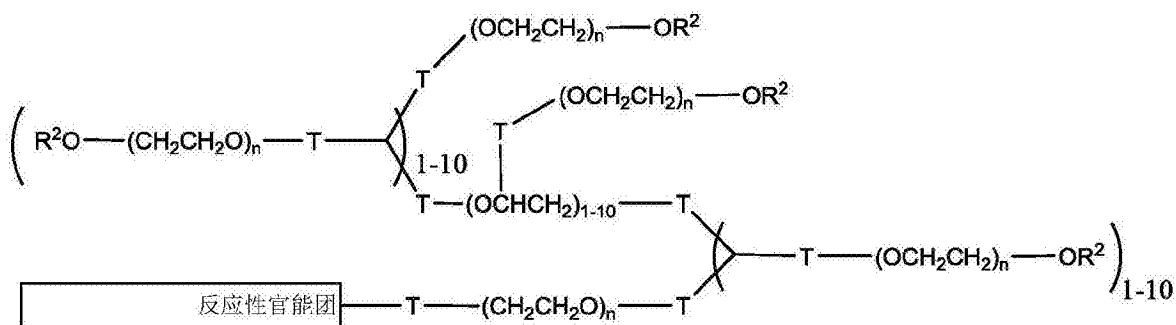
式 E,



式 F,



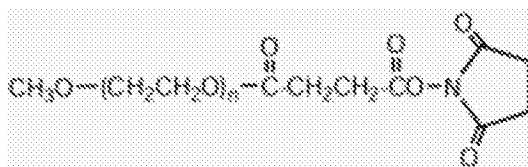
式 G,



式 H,

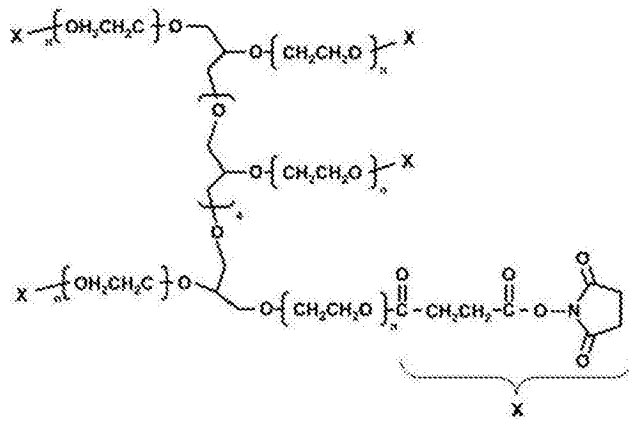
其中所述反应性官能团为巯基。

37. 一种制备根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物的方法,所述方法包括:使式 I-XVI或式A-H中的任一个的化合物与坎普他汀类似物部分反应,所述坎普他汀类似物部分包含环状肽,其中所述环状肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:28、32或34:

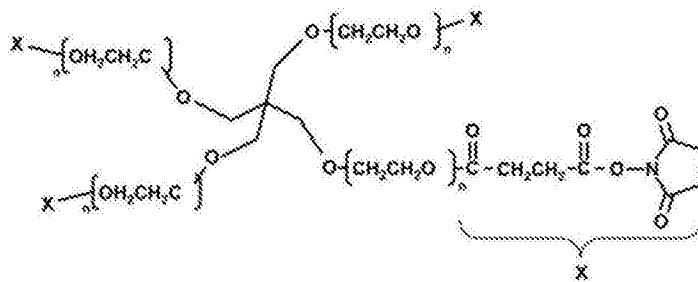


式 I,

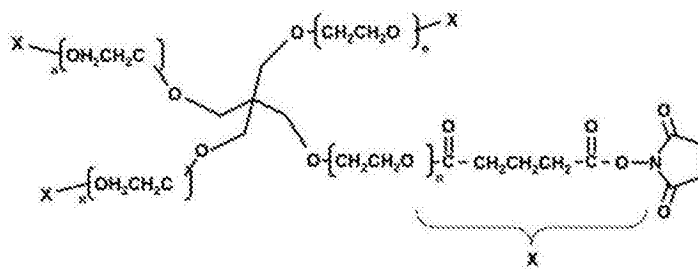




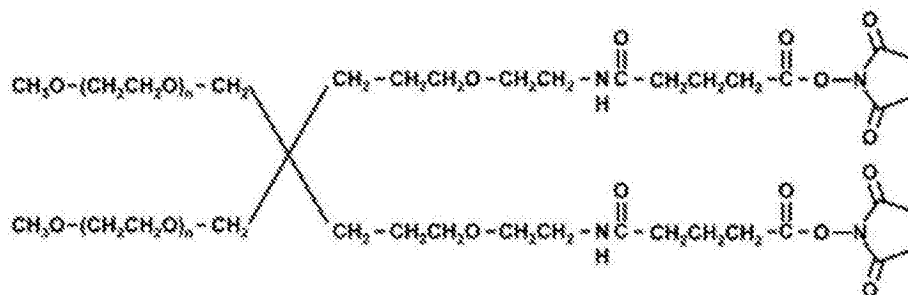
式 VII,



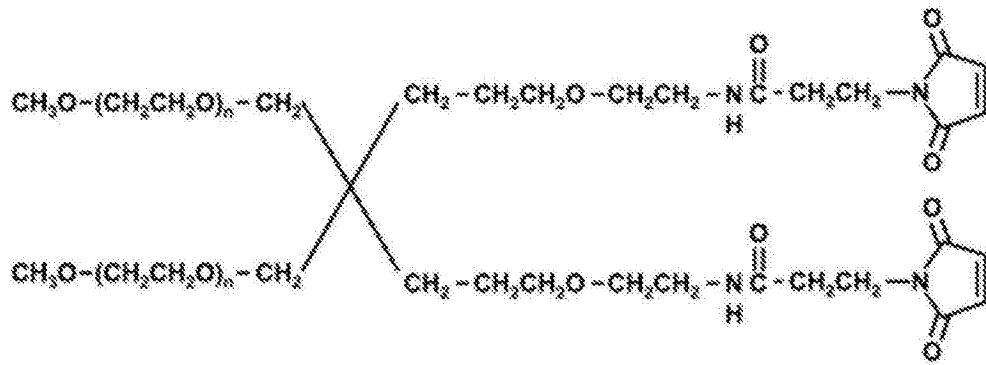
式 VIII,



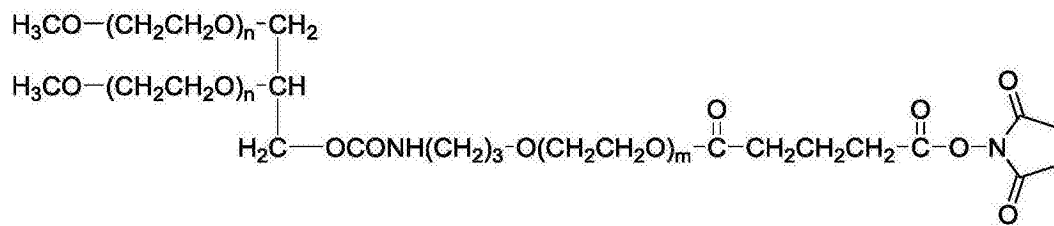
式 IX,



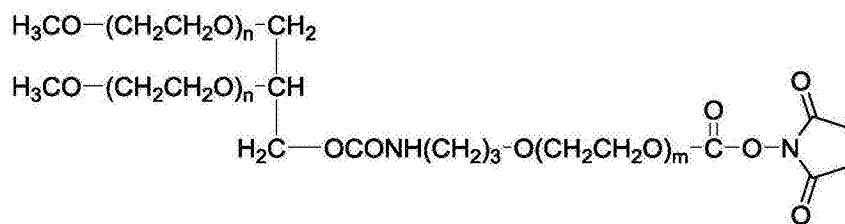
式 X,



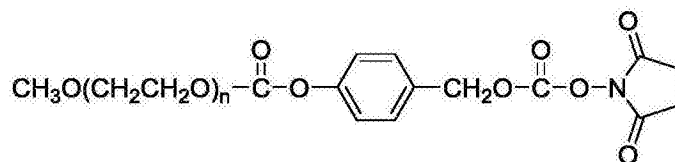
式 XI,



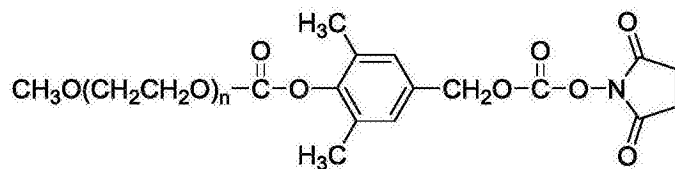
式 XII,



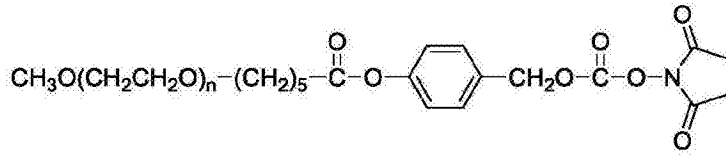
式 XIII,



式 XIV,



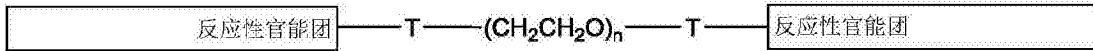
式 XV,



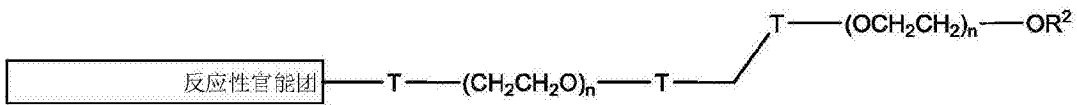
式 XVI,



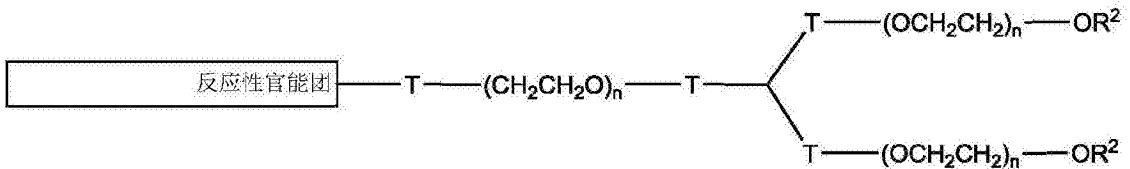
式 A,



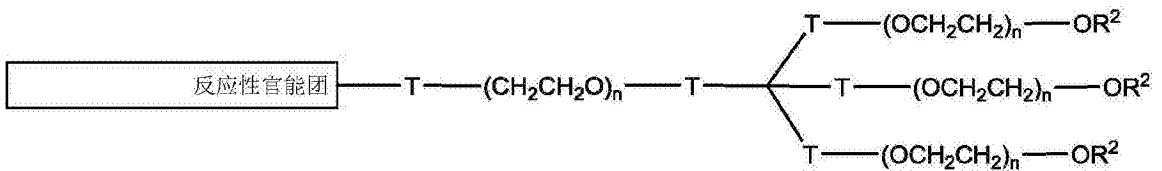
式 B,



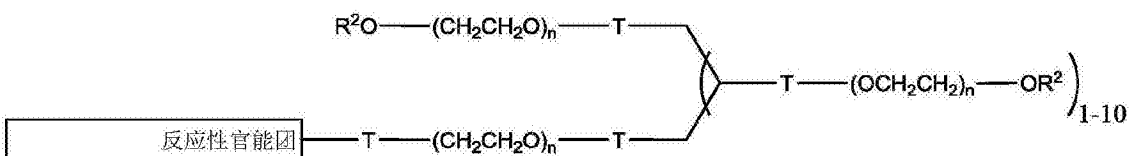
式 C,



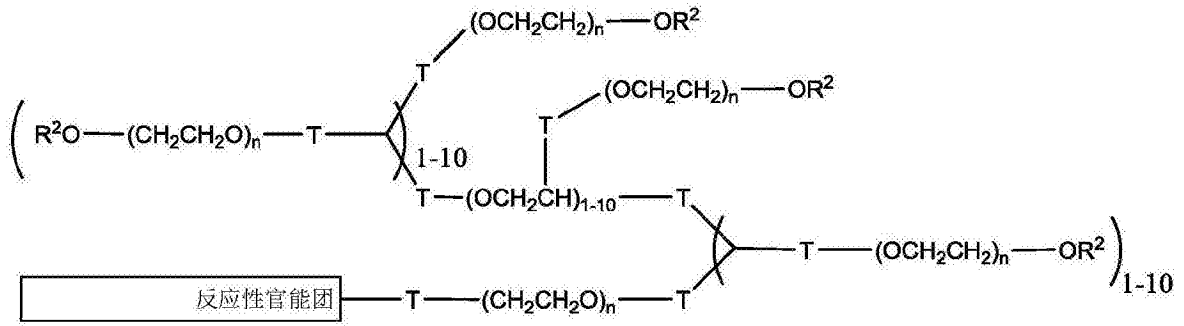
式 D,



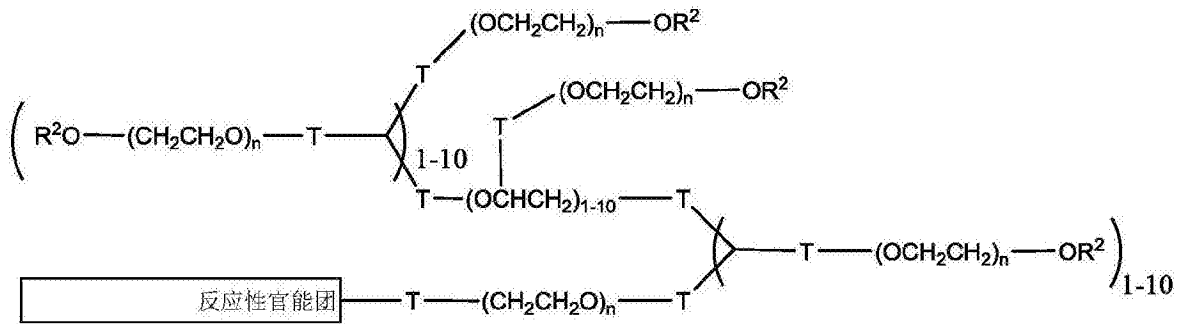
式 E,



式 F,



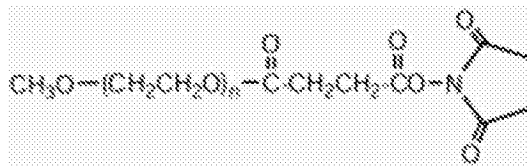
式 G,



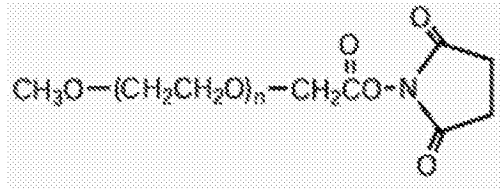
式 H,

其中所述反应性官能团选自胺、脒、硝酮和脒。

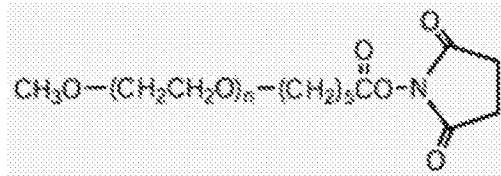
38. 一种制备根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物的方法,所述方法包括:使式 I-XVI或式A-H中的任一个的化合物与坎普他汀类似物部分反应,所述坎普他汀类似物部分包含环状肽,其中所述环状肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:28、32或34:



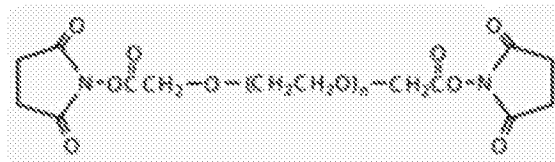
式 I,



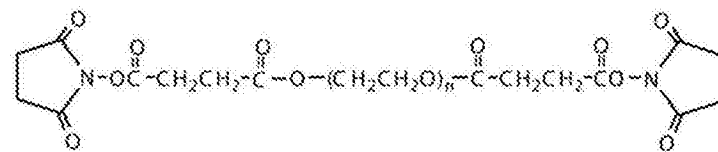
式 II,



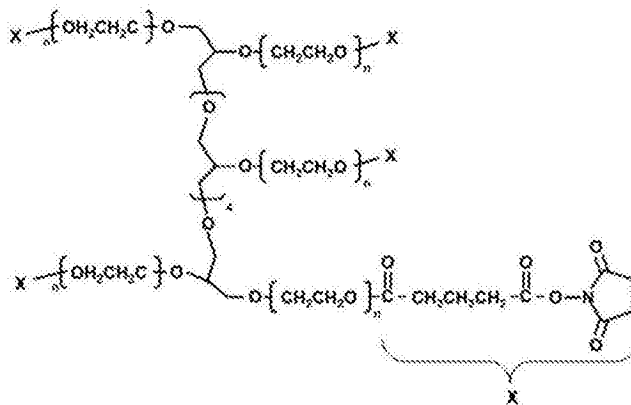
式 III,



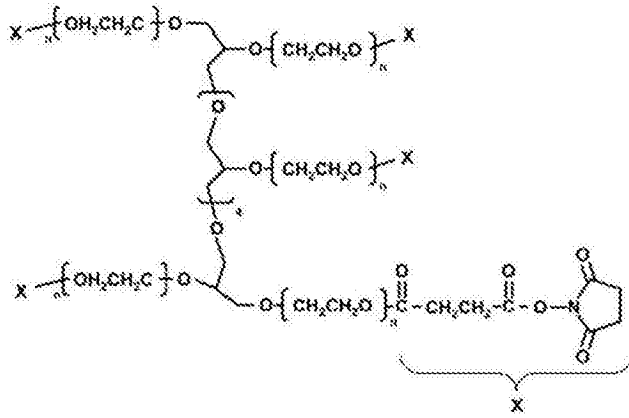
式 IV,



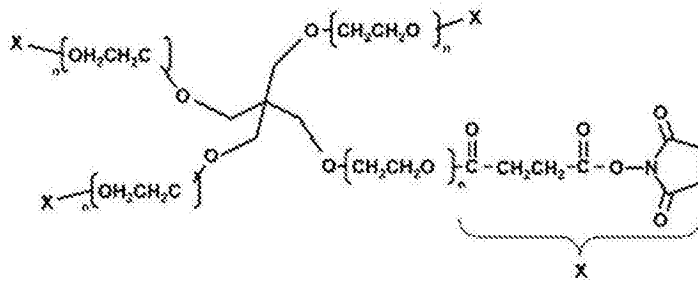
式 V,



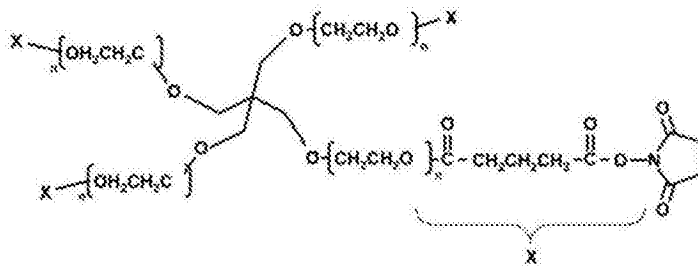
式 VI,



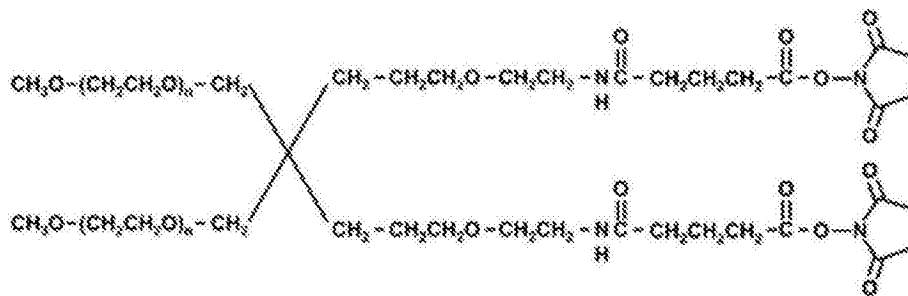
式 VII,



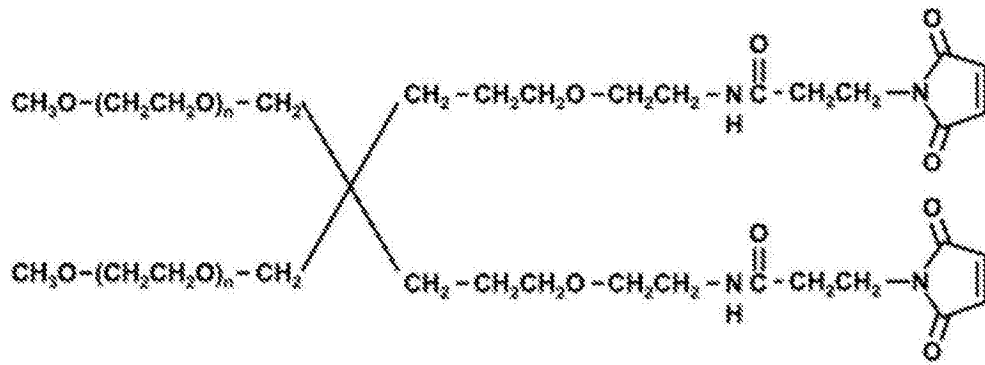
式 VIII,



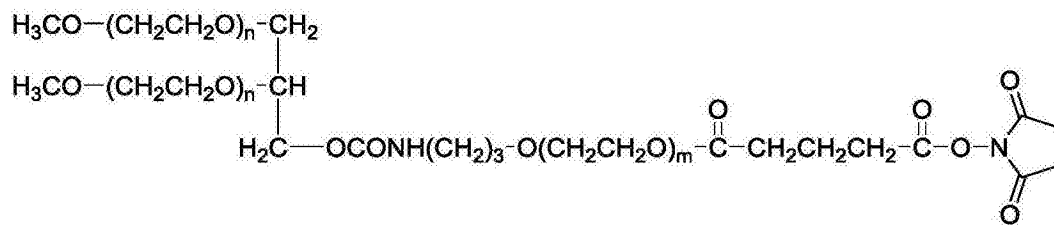
式 IX,



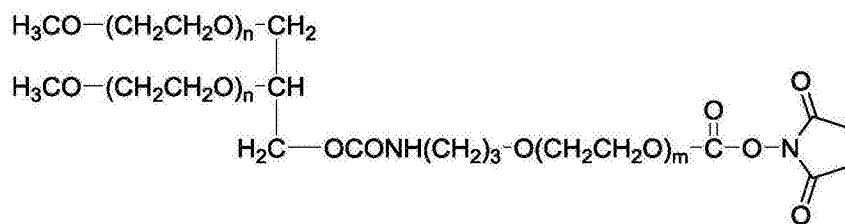
式 X,



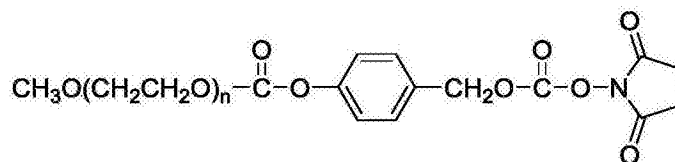
式 XI,



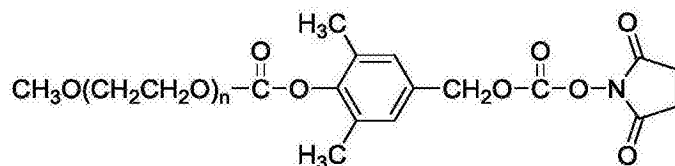
式 XII,



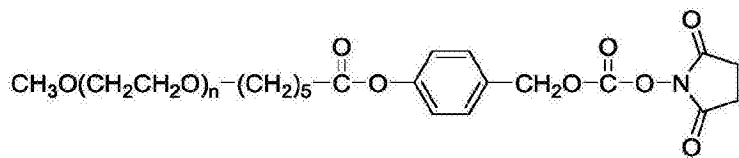
式 XIII,



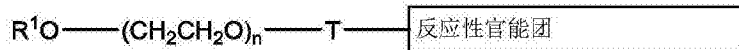
式 XIV,



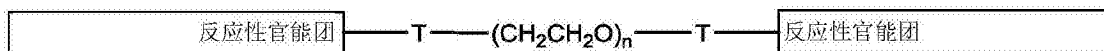
式 XV,



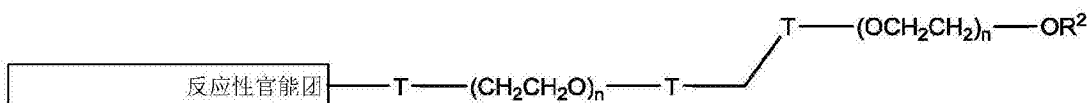
式 XVI,



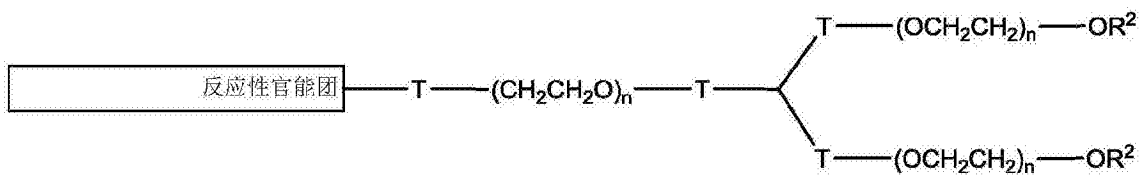
式 A,



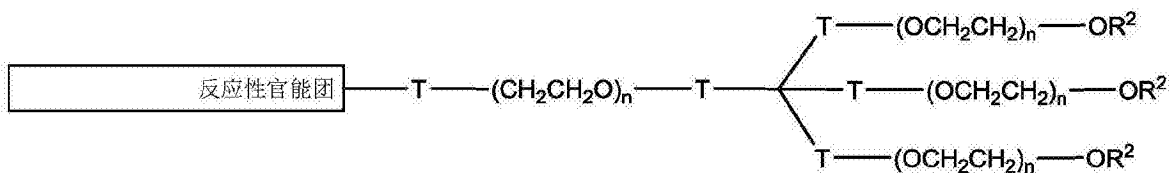
式 B,



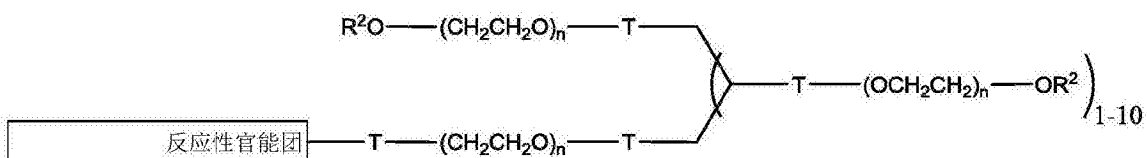
式 C,



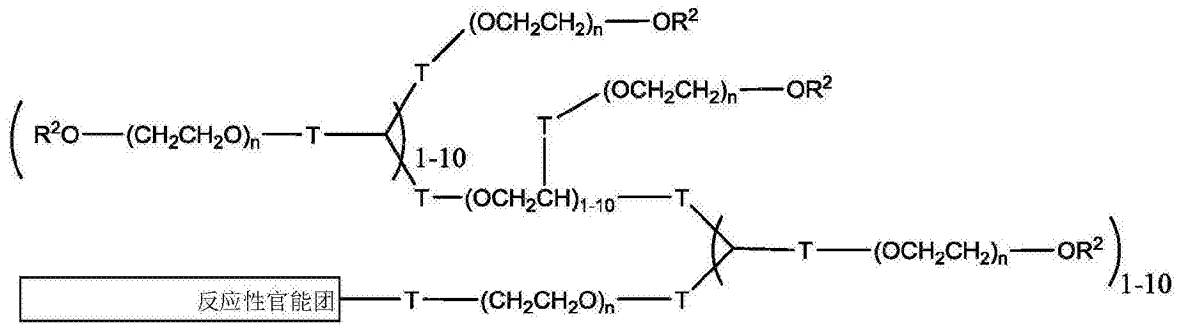
式 D,



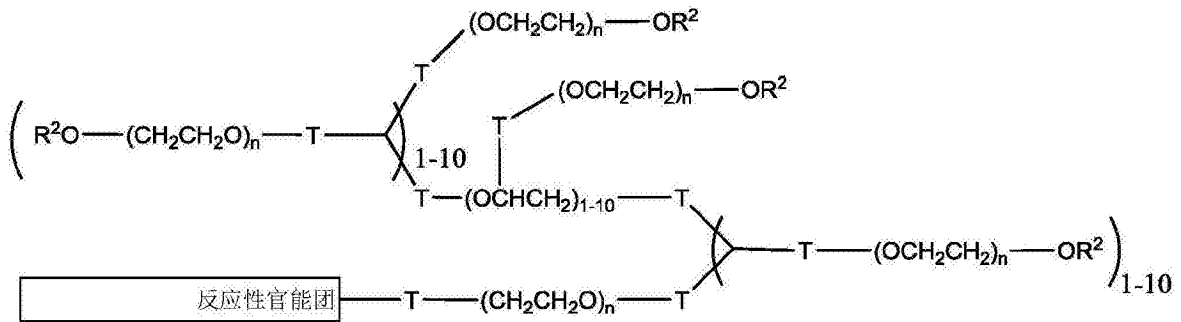
式 E,



式 F,



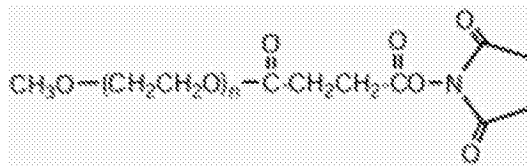
式 G,



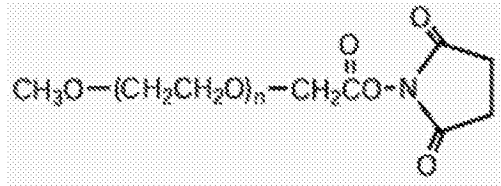
式 H,

其中所述反应性官能团为联烯。

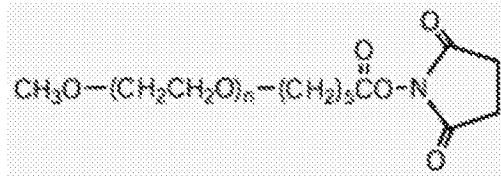
39. 一种制备根据权利要求1所述的长效坎普他汀类似物的方法,所述方法包括:使式 I-XVI或式A-H中的任一个的化合物与坎普他汀类似物部分反应,所述坎普他汀类似物部分包含环状肽,其中所述环状肽的氨基酸序列为SEQ ID NO:28、32或34:



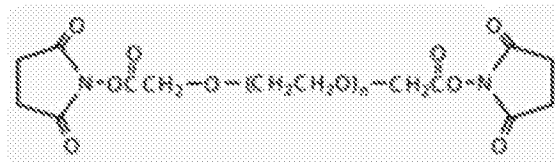
式 I,



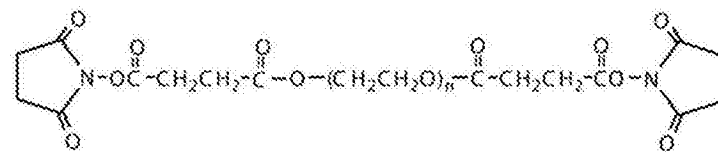
式 II,



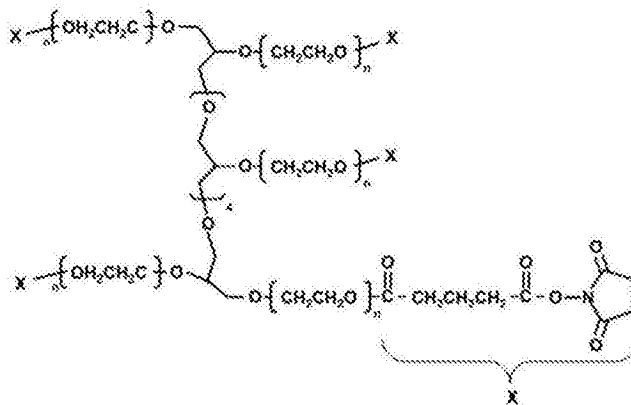
式 III,



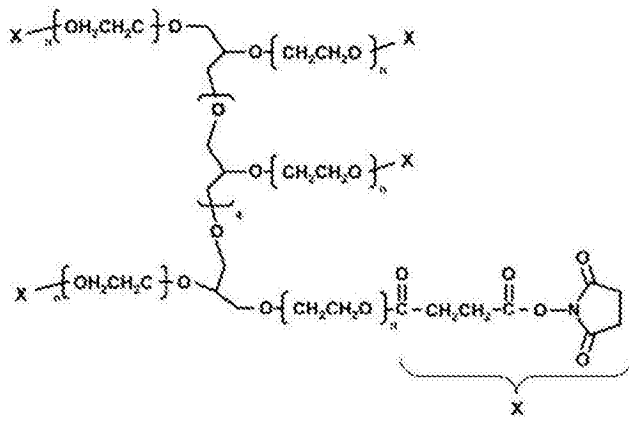
式 IV,



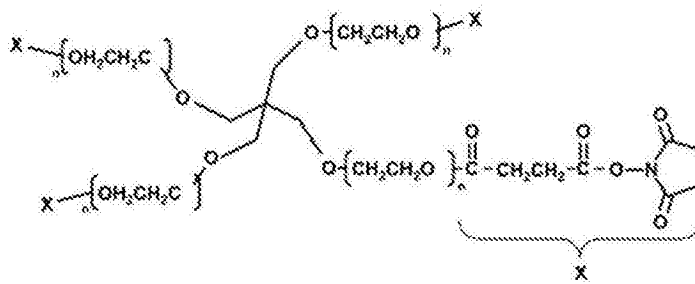
式 V,



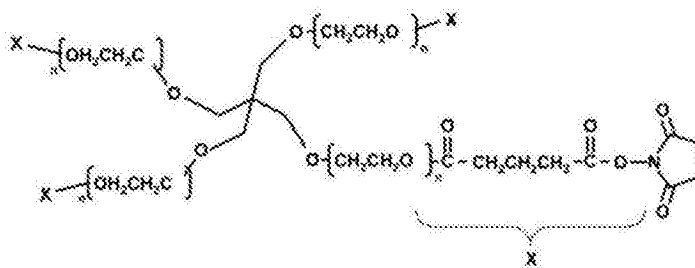
式 VI,



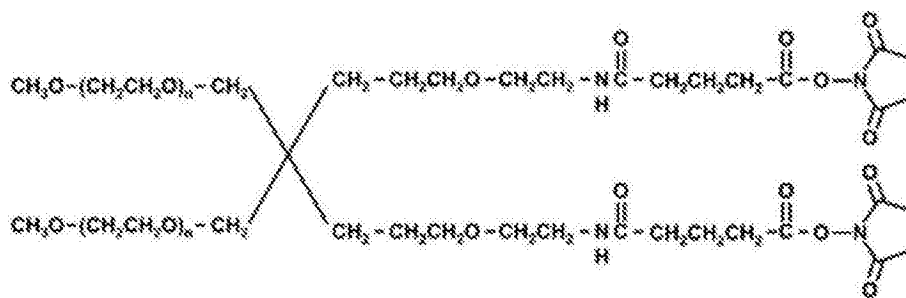
式 VII,



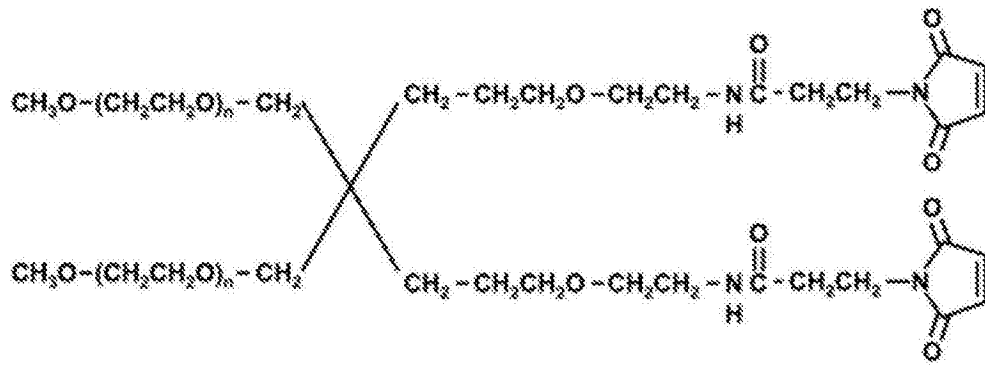
式 VIII,



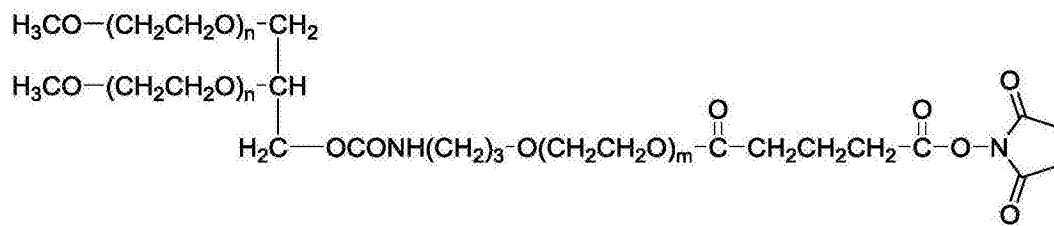
式 IX,



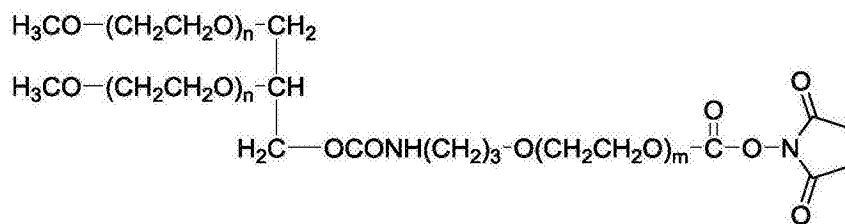
式 X,



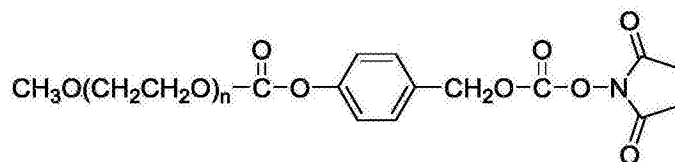
式 XI,



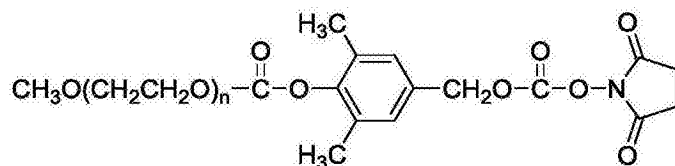
式 XII,



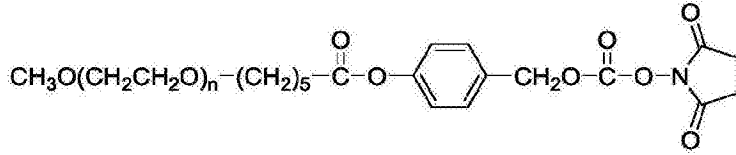
式 XIII,



式 XIV,



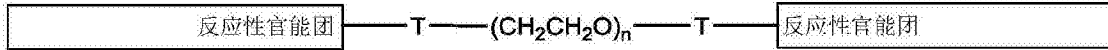
式 XV,



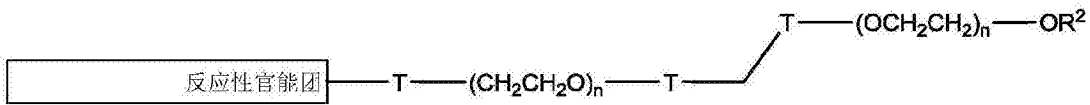
式 XVI,



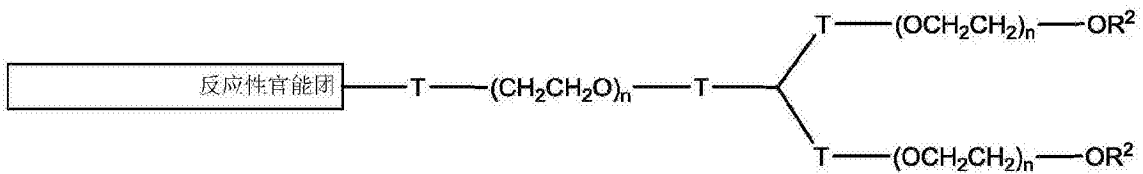
式 A,



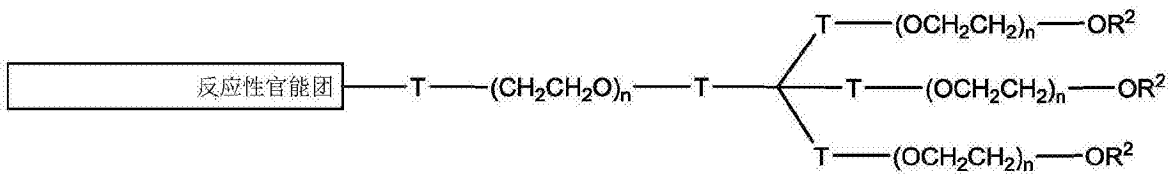
式 B,



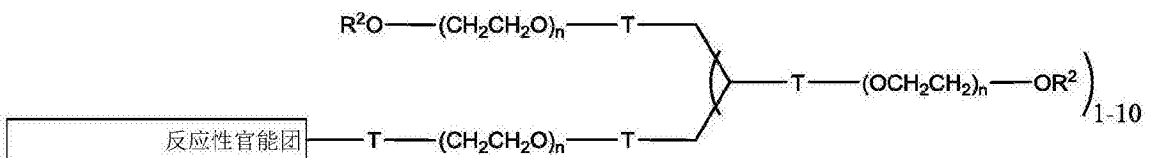
式 C,



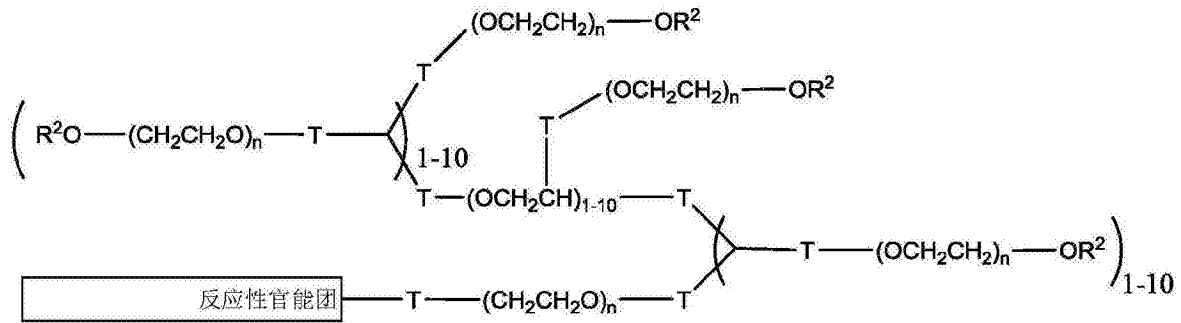
式 D,



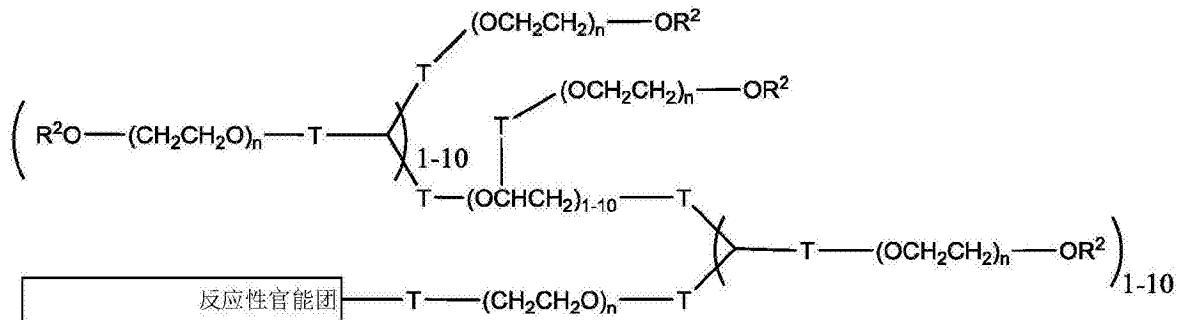
式 E,



式 F,



式 G,



式 H,

其中所述反应性官能团选自假脲和氨基脲。

40. 一种组合物,其包含根据权利要求1-30中的任一项所述的长效坎普他汀类似物和药学上可接受的载体。

41. 一种药用级组合物,其包含根据权利要求1-30中的任一项所述的长效坎普他汀类似物。

42. 一种药用级组合物,其包含根据权利要求1-30中的任一项所述的长效坎普他汀类似物和药学上可接受的载体。

43. 根据权利要求1-30或权利要求40-42所述的长效坎普他汀类似物或组合物在制备用于治疗受试者的药物中的用途,所述受试者需要治疗会导致对红血细胞损伤的补体介导的障碍。

44. 根据权利要求43所述的用途,其中血管内地或皮下地施用所述长效坎普他汀类似物。

45. 根据权利要求43所述的用途,其中所述受试者具有补体调节缺陷。

46. 根据权利要求43所述的用途,其中所述受试者需要治疗溶血性贫血。

47. 根据权利要求43所述的用途,其中所述受试者患有阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)。

48. 根据权利要求43所述的用途,其中所述受试者患有非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)。

49. 根据权利要求43所述的用途,其中静脉内地施用所述长效坎普他汀类似物。

50. 根据权利要求43所述的用途,其中皮下地施用所述长效坎普他汀类似物。

51. 根据权利要求1-30中的任一项所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含这样的化合物:所述化合物中包含巯基基团的多肽已经与包含巯基反应性基团的

坎普他汀类似物部分反应。

52. 一种制备根据权利要求1-30、40-42和51所述的长效坎普他汀类似物或组合物的方法,所述方法包括:使包含巯基基团的多肽与包含巯基反应性基团的坎普他汀类似物部分反应。

## 细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明要求2011年5月11日提交的美国临时专利申请号61/484,836的优先权,其整个内容特此通过引用并入。

[0003] 序列表

[0004] 本发明包括已经以ASCII格式电子提交的序列表,其整个内容特此通过引用并入。所述ASCII副件于2014年1月15日生成,并命名为2008575-0035\_SL.txt,其具有35,444个字节。

### 背景技术

[0005] 补体是由超过30种血浆蛋白和细胞结合的蛋白组成的系统,该系统在先天性免疫和适应性免疫中起重要作用。补体系统的蛋白通过多种蛋白相互作用和裂解事件在一系列酶促级联中起作用。补体激活通过3个主要途径而发生:抗体依赖性的经典途径,旁路途径,和结合甘露糖的凝集素(MBL)途径。不适当的或过度的补体激活是许多严重疾病和病症的根本原因或促成因素,在过去的数十年中已经做出了大量努力来探究不同的补体抑制剂作为治疗剂。但是,仍然需要用于多种治疗目的的用于抑制补体激活的创新方案。

### 发明内容

[0006] 在某些方面,本发明提供了细胞反应性坎普他汀(compstatin)类似物。例如,本发明提供了细胞反应性坎普他汀类似物,包含细胞反应性坎普他汀类似物的组合物,和制备、鉴别、表征和/或使用细胞反应性坎普他汀类似物的方法。在某些方面,本发明提供了一种生理上可接受的组合物,其包含细胞反应性坎普他汀类似物。在某些方面,本发明提供了一种药用级组合物,其包含细胞反应性坎普他汀类似物。

[0007] 在某些方面,本发明提供了长效坎普他汀类似物。例如,本发明提供了长效坎普他汀类似物,包含长效坎普他汀类似物的组合物,和制备、鉴别、表征和/或使用长效坎普他汀类似物的方法。在某些方面,本发明提供了一种生理上可接受的组合物,其包含长效坎普他汀类似物。在某些方面,本发明提供了一种药用级组合物,其包含长效坎普他汀类似物。

[0008] 在某些方面,本发明提供了靶向坎普他汀类似物。例如,本发明提供了靶向坎普他汀类似物,包含靶向坎普他汀类似物的组合物,和制备、鉴别、表征和/或使用靶向坎普他汀类似物的方法。在某些方面,本发明提供了一种生理上可接受的组合物,其包含靶向坎普他汀类似物。在某些方面,本发明提供了一种药用级组合物,其包含靶向坎普他汀类似物。

[0009] 本发明另外提供了保护细胞免于补体介导的损伤的方法。在某些实施方案中,所述方法包括:使所述细胞与细胞反应性坎普他汀类似物接触。在不同的实施方案中,所述细胞可以是任意类型的细胞。例如,在某些实施方案中,所述细胞是血细胞。在某些实施方案中,所述血细胞是红血细胞(RBC),也被称作红细胞。在某些实施方案中,所述细胞具有异常低的一种或多种补体调节蛋白的表达、表面密度和/或活性。例如,所述细胞可以具有编码这样的蛋白的基因的突变,其中所述突变会导致编码的蛋白的表达减少或缺失和/或活性

降低。在不同的实施方案中,所述细胞可以是任意动物类型或物种。例如,所述细胞可以是哺乳动物,例如,灵长类动物(人或非人灵长类动物)、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、兔)、有蹄动物(例如,猪、绵羊、奶牛)、犬科动物或猫科动物。在许多实施方案中,所述保护是针对灵长类动物补体,例如,人补体。在某些实施方案中,使所述细胞离体(在受试者体外)接触。在某些实施方案中,使所述细胞在体内(在受试者例如人体内)接触。在某些实施方案中,所述细胞将要移植进受试者中或已经移植进受试者中。在某些方面,本发明提供了一种分离的细胞,其具有与其共价连接的坎普他汀类似物。在某些方面,本发明提供了一种分离的组织或器官,其具有与至少一些它的细胞连接的坎普他汀类似物。

[0010] 本发明提供了治疗需要治疗补体介导的障碍的受试者的方法。在某些实施方案中,所述方法包括:给所述受试者施用细胞反应性坎普他汀类似物。在某些实施方案中,所述方法包括:给所述受试者施用长效坎普他汀类似物。在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物是细胞反应性坎普他汀类似物。在某些实施方案中,所述补体介导的障碍是阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)或与补体介导的溶血有关的其它障碍。在某些实施方案中,所述障碍是缺血/再灌注(I/R)损伤(例如,由于心肌梗塞、血栓栓塞性中风或外科手术。在某些实施方案中,所述障碍是创伤。在某些实施方案中,所述障碍是移植排斥。

[0011] 在本申请中提及的所有文章、书籍、专利申请、专利、其它出版物、网站和数据库通过引用并入本文。在说明书和任意并入的参考文献之间冲突的情况下,以说明书(包括对其做出的任何修改)为准。除非另有说明,在本文中使用的本领域接受的术语和缩写的含义。

## 附图说明

[0012] 图1的图显示了随着肽浓度( $\mu\text{M}$ )而变化的坎普他汀类似物CA28(SEQ ID NO:28)和3种长效坎普他汀类似物(CA28-1、CA28-2、CA28-3)的补体激活抑制活性百分比。使用经典的补体抑制测定,在体外试验了补体激活的抑制。该图显示了通过平均2组测量的结果所得到的值。CA28(圆圈;红色),CA28-1(交叉(x);蓝色);CA28-2(三角形;绿色),CA28-3(正方形;紫色)。

[0013] 图2的图显示了随着化合物浓度( $\mu\text{M}$ )而变化的CA28和长效坎普他汀类似物CA28-2和CA28-3的补体激活抑制活性百分比。CA28(正方形,浅灰色),CA28-2(菱形,黑色),CA28-3(圆圈,深灰色)。CA28-3是含有多个肽部分的化合物。尽管每个肽部分的活性小于单个CA28分子的活性,在摩尔基础上,CA28-3的总活性超过CA28的活性。

[0014] 图3的图显示了在单次静脉内注射以后,食蟹猴中CA28和长效坎普他汀类似物CA28-2和CA28-3的血浆浓度相对于时间的关系。以200mg/kg施用CA28。分别以50mg/kg施用CA28-2和CA28-3。在为这些实验计算剂量时,假定施用的CA28-2和CA28-3物质由80%(w/w,基于干重)的活性化合物组成。但是,在样品分析过程中,标准曲线假定100%(w/w,基于干重)的活性化合物,超出30%的估测值。因而,C<sub>max</sub>的值会高估实际的C<sub>max</sub>。CA28(正方形,浅灰色),CA28-2(三角形,黑色),CA28-3(圆圈,深灰色)。

[0015] 图4的图显示了随着化合物浓度( $\mu\text{M}$ )而变化的CA28和长效坎普他汀类似物CA28-4的补体激活抑制活性百分比。使用经典的补体抑制测定,在体外试验了补体激活的抑制。该图显示了通过平均CA28-4的4组测量的结果所得到的值。CA28(正方形,浅灰色),CA28-4(交

叉,黑色)。

[0016] 图5的图显示了在单次静脉内注射以后,食蟹猴中CA28和长效坎普他汀类似物CA28-2、CA28-3和CA28-4的浓度相对于时间的关系。以200mg/kg施用CA28。分别以50mg/kg施用CA28-2、CA28-3和CA28-4。在为这些实验计算剂量时,假定施用的CA28-2和CA28-3物质由80%(w/w,基于干重)的活性化合物组成。但是,在样品分析过程中,标准曲线假定100%(w/w,基于干重)的活性化合物。因而,C<sub>max</sub>的值会将在指定的剂量(基于干质量)施用这些化合物时所达到的C<sub>max</sub>高估30%的估测值。CA28(正方形,浅灰色),CA28-2(三角形,黑色),CA28-3(圆圈,深灰色),CA28-4(倒三角形,黑色)。

## 具体实施方式

### [0017] I. 定义

[0018] 除非另有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±10%内、在某些实施方案中±5%内、在某些实施方案中±1%内、在某些实施方案中±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)。

[0019] “补体组分”或“补体蛋白”是补体系统激活所涉及的蛋白或参与一种或多种补体介导的活性的蛋白。经典补体途径的组分包括例C1q、C1r、C1s、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9和C5b-9复合物(也被称作膜攻击复合物(MAC)),和任何上述的活性片段或酶切割产物(例如,C3a、C3b、C4a、C4b、C5a等)。旁路途径的组分包括例如因子B、因子D和备解素。凝集素途径的组分包括例如MBL2、MASP-1和MASP-2。补体组分还包括可溶性补体组分的细胞结合受体,其中这样的受体在可溶性补体组分结合以后介导这样的可溶性补体组分的一种或多种生物活性。这样的受体包括例如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、也被称作CD45)等。应当理解,术语“补体组分”无意包括充当补体激活的“触发剂”的那些分子和分子结构,例如抗原-抗体复合物、存在于微生物或人工表面上的外来结构等。

[0020] “补体介导的障碍”是其中已知或怀疑补体激活在至少一些罹患该障碍的受试者中是促成因素和/或至少部分地是诱发因素的任意障碍,例如,其中补体激活导致组织损伤的障碍。补体介导的障碍的非限制性例子包括、但不限于:(i)以溶血或溶血性贫血为特征的各种障碍,诸如非典型溶血性尿毒症综合征、冷凝集素疾病、阵发性夜间血红蛋白尿、输血反应;(ii)移植排斥(例如,超急性或急性移植排斥)或移植物功能障碍;(iii)涉及缺血/再灌注损伤的障碍,诸如创伤、外科手术(例如,动脉瘤修复)、心肌梗塞、缺血性中风;(iv)呼吸系统障碍,诸如哮喘和慢性阻塞性肺疾病(COPD);(v)关节炎,例如,类风湿性关节炎;(vi)眼科障碍,诸如年龄相关的黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变、青光眼和葡萄膜炎。“障碍”在本文中“疾病”、“病症”和类似词语互换使用,表示生物体的健康的任何病损或异常功能状态,例如,其中指示医学和/或外科手术处置或受试者适当地寻求针对它的医学和/或外科手术注意的任何状态。还应当理解,在特定种类内列出的特定障碍是为了方便,且无意限制本发明。应该理解,某些障碍可以适当地列在多个种类中。

[0021] “补体调节蛋白”是参与调节补体活性的蛋白。补体调节蛋白可以减量调节补体活性,例如,通过抑制补体激活或通过灭活一种或多种被激活的补体蛋白或加速一种或多种被激活的补体蛋白的衰变。补体调节蛋白的例子包括C1抑制剂、C4结合蛋白、簇连蛋白、玻

璃体结合蛋白、CFH、因子I、以及细胞结合蛋白CD46、CD55、CD59、CR1、CR2和CR3。

[0022] 本文中关于两个或更多个部分使用的“连接的”是指,所述部分彼此以物理方式结合或连接以形成足够稳定的分子结构,以致所述部分在形成连接的条件(并且优选在使用新分子结构的条件下,例如在生理条件下)保持结合。在本发明的某些优选实施方案中,所述连接是共价连接。在其它实施方案中,所述连接是非共价的。各部分可直接或间接连接。当两个部分直接连接时,它们彼此共价键合,或者足够紧邻以致两个部分之间的分子间力保持其结合。当两个部分间接连接时,它们各自共价地或非共价地连接至第三部分,所述第三部分保持所述两个部分之间的结合。一般而言,当将两个部分说成通过“连接基团”或“连接部分”连接时,所述两个被连接的部分之间的连接是间接的,并且通常所述被连接的部分各自共价地键合至连接部分。使用“接头”可以连接2个部分。接头可以是与要连接的实体在合理时间段内在符合所述实体(其部分可以根据条件经过适当保护)的稳定性的条件下足量反应以产生合理产率的任何合适部分。通常,所述接头含有至少2个官能团,其中之一与第一实体反应,另一个官能团与第二实体反应。应当理解,在接头已经与要连接的实体反应以后,术语“接头”可以表示得到的结构的源自所述接头的部分,或者至少表示不包括反应过的官能团的部分。连接部分可以包含这样的部分:其不参与与要连接的实体的键,且其主要目的可以是使所述实体在空间上彼此分离。这样的部分可以被称作“隔离物”。

[0023] 本文中使用的“多肽”表示氨基酸的聚合物,任选包括一个或多个氨基酸类似物。蛋白是由一个或多个多肽组成的分子。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”、“多肽”和“肽”可互换使用。本文中使用的多肽可以含有氨基酸,例如蛋白质中天然存在的氨基酸、蛋白质中非天然存在的氨基酸和/或不为氨基酸的氨基酸类似物。本文中使用的氨基酸的“类似物”可以是在结构上类似于氨基酸的不同氨基酸,或在结构上类似于氨基酸的除氨基酸外的化合物。已知大量本领域公知的在蛋白质中常见的20种氨基酸(“标准”氨基酸)的类似物。可以修饰多肽中的一个或多个氨基酸,例如,通过添加化学实体,如糖基、磷酸酯基、法呢基、异法呢基、脂肪酸基团、用于连接、官能化或其它修饰的接头等。某些非限制性的合适的类似物和修饰描述于W02004026328和/或下面。多肽可以例如在N末端被乙酰化和/或例如在C末端被酰胺化。

[0024] 本文中使用的“反应性官能团”表示包括、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、胍、脲、酰胍、重氨基、重氮鎓、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、N-羟基琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺、巯基等。制备这些官能团中的每一种的方法是本领域众所周知的,并且它们对于特定目的的应用或修饰都在本领域技术人员的能力范围内(参见,例如,Sandler和Karo,编.ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS,Academic Press,San Diego,1989,和Hermanson,G.,Bioconjugate Techniques,第2版,Academic Press,San Diego,2008)。

[0025] “特异性结合”通常表示靶多肽(或更一般而言,靶分子)与结合分子(例如抗体或

配体)之间的物理结合。所述结合通常依赖于可被结合分子识别的靶标的特定结构特征(例如抗原决定簇、表位、结合槽或裂隙)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,或游离的未标记的A在含有游离的经标记的A和与其结合的结合分子的反应物中的存在,将降低与结合分子结合的经标记的A的量。应当理解,特异性不需要是绝对的,而通常表示在其中发生结合的情形。例如,本领域众所周知,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。本领域普通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(例如用于检测靶分子、用于治疗目的等)中进行的抗体或配体。还应当理解,可以在额外因素的情形中评价特异性,例如结合分子对靶标的亲和力相对于结合分子对其它靶标(例如竞争剂)的亲和力。如果结合分子对需要检测的靶分子表现出高亲和力并且对非靶分子表现出低亲和力,则所述抗体可能成为可接受的试剂。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,而无需再评价其特异性。在某些实施方案中,在所测试的条件下,例如在生理条件下,表现出特异性结合的2个分子的亲和力(如通过平衡解离常数 $K_d$ 所测得)是 $10^{-3}M$ 或更小,例如, $10^{-4}M$ 或更小,例如, $10^{-5}M$ 或更小,例如, $10^{-6}M$ 或更小, $10^{-7}M$ 或更小, $10^{-8}M$ 或更小,或 $10^{-9}M$ 或更小。

[0026] 根据本发明治疗的“受试者”通常是人、非人灵长类动物或低等动物(例如,小鼠或大鼠),其表达或含有至少一些灵长类动物(例如,人)补体组分C3和任选的一种或多种其它灵长类动物补体组分。在某些实施方案中,所述受试者是雄性。在某些实施方案中,所述受试者是雌性。在某些实施方案中,所述受试者是成年人,例如,至少18岁(例如,18-100岁)的人。

[0027] 本文中关于治疗受试者使用的“治疗”表示,提供治疗,即,提供受试者的任何类型的医学或外科手术处置。可以提供治疗以便逆转、缓解疾病,抑制所述疾病的进展,预防或降低所述疾病的可能性,或者以便逆转、缓解疾病的一种或多种症状或表现,抑制或防止所述症状或表现的进展,预防或降低止所述症状或表现的可能性。“预防”表示,使至少一些个体在至少一段时间内不会出现疾病或者疾病的症状或表现。治疗可以包括:在发展出指示疾病的一种或多种症状或表现后,给受试者施用化合物或组合物,例如以便逆转、缓解、降低所述疾病的严重程度,和/或抑制或防止所述疾病的进展,和/或逆转、缓解、降低所述疾病的一种或多种症状或表现的严重程度,和/或抑制或所述疾病的一种或多种症状或表现。可以将化合物或组合物施用给已经发展疾病的受试者或相对于一般群体的成员而言具有增加的发展所述疾病的风险的受试者。可以将化合物或组合物施用给这样的受试者:其已经发展疾病,且与确诊该疾病的其它个体相比,或者与所述受试者的典型的平均的这种症状或表现或恶化风险相比,具有增加的发展所述疾病的一种或多种特定症状或表现或者所述疾病的恶化的风险。例如,所述受试者可能已经暴露于“触发剂”,所述“触发剂”使所述受试者处于增加的经历恶化的风险(例如,暂时增加的风险)。可以预防性地施用化合物或组合物,即,在发展出所述疾病的任何症状或表现之前。通常,在该情况下,所述受试者将处于发展疾病的风险中,例如,相对于一般群体的成员,所述成员任选地以年龄、性别和/或其它人口统计变量的方式相匹配。

[0028] 本文中使用的术语“脂族”表示这样的烃部分:其可以是直链(即,无分支)、支链或环状(包括稠合的、桥连和螺稠合的多环),且可以是完全饱和的,或者可以含有一个或多个

不饱和单元,但是其是非芳族的。除非另外指出,脂族基团含有1-30个碳原子。在某些实施方案中,脂族基团含有1-10个碳原子。在其它实施方案中,脂族基团含有1-8个碳原子。在其它实施方案中,脂族基团含有1-6个碳原子,且在其它实施方案中,脂族基团含有1-4个碳原子。合适的脂族基团包括、但不限于:直链或支链的烷基、烯基和炔基,以及它们的杂合物,诸如(环烷基)烷基、(环烯基)烷基或(环烷基)烯基。

[0029] 本文中使用的“烷基”表示,具有约1至约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,其中在本发明的某些实施方案中,约1至约12个碳原子、或约1至约7个碳原子是优选的。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。

[0030] 本文中使用的“卤素”表示F、Cl、Br或I。

[0031] 本文中使用的“烷酰基”表示其中具有约1-10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)、例如约1-7个碳原子的任选地被取代的直链或支链脂族无环残基,如将理解的,所述残基用单键连接至末端C=O基团(且也可以被称作“酰基”)。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,并且就本发明的目的而言,甲酰基被视作烷酰基。“低级烷酰基”表示具有约1至约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)的任选地被取代的直链或支链脂族无环残基。这样的基团包括、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。

[0032] 本文中使用的“芳基”表示具有约5至约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)的任选地被取代的、单环或二环芳族环系,其中约6至约10个碳是优选的。非限制性例子包括,例如,苯基和萘基。

[0033] 本文中使用的“芳烷基”表示这样的烷基残基:其带有芳基取代基,并且具有约6至约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),其中在某些实施方案中,约6至约12个碳原子是优选的。芳烷基可以任选地被取代。非限制性例子包括,例如,苄基、萘基甲基、二苯基甲基、三苯基甲基、苯基乙基和二苯基乙基。

[0034] 本文中使用的术语“烷氧基”表示任选地被取代的烷基-O-基团,其中烷基如先前所定义。示例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。

[0035] 本文中使用的“羧基”表示-C(=O)OH基团。

[0036] 本文中使用的“烷氧基羰基”表示-C(=O)O-烷基,其中烷基如先前所定义。

[0037] 本文中使用的“芳酰基”表示-C(=O)-芳基,其中芳基如先前所定义。示例性芳酰基包括苯甲酰基和萘甲酰基。

[0038] 术语“环系”表示芳族或非芳族、部分不饱和的或完全饱和的、3-10元环系,其包括3-8个原子大小的单环和可包括与非芳族环稠合的芳族5或6元芳基或芳族杂环基团的二环系和三环系。这些杂环包括具有1-3个杂原子的那些杂环,所述杂原子独立地选自氧、硫和氮。在某些实施方案中,术语杂环表示非芳族5-、6-、或7-元环或多环基团,其中至少一个环原子是选自O、S和N的杂原子,包括、但不限于,二环或三环基团,其包含具有1-3个独立地选自氧、硫和氮的杂原子的稠合6元环。在某些实施方案中,“环系”表示环烷基,其在本文中用于表示具有3-10个(例如,4-7个)碳原子的基团。环烷基包括、但不限于任选地被取代的环

丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基等。在某些实施方案中，“环系”表示任选地被取代的环烯基或环炔基部分。

[0039] 通常，被取代的化学部分包括一个或多个替代氢的取代基。示例性取代基包括例如卤代、烷基、环烷基、芳烷基、芳基、巯基、羟基(-OH)、烷氧基、氰基(-CN)、羧基(-COOH)、-C(=O)O-烷基、氨基羰基(-C(=O)NH<sub>2</sub>)、-N-取代的氨基羰基(-C(=O)NHR’)、CF<sub>3</sub>、CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>等。关于上文所述的取代基，每个部分R’可独立地为例如H、烷基、环烷基、芳基或芳烷基中任一个。

[0040] 本文中使用的“L-氨基酸”表示通常存在于蛋白质中的任何天然存在的左旋α-氨基酸，或那些α-氨基酸的烷基酯。术语“D-氨基酸”表示右旋α-氨基酸。除非另有说明，否则本文中提及的所有氨基酸都是L-氨基酸。

[0041] 本文中使用的“芳族氨基酸”是包含至少一个芳族环的氨基酸，例如其包含一个芳基。

[0042] 本文中使用的“芳族氨基酸类似物”是包含至少一个芳族环的氨基酸类似物，例如其包含一个芳基。

[0043] II. 概述

[0044] 本发明提供了细胞反应性坎普他汀类似物和与其有关的方法，例如，其使用方法。细胞反应性坎普他汀类似物是这样的化合物：其包含坎普他汀类似物部分和细胞反应性官能团，所述官能团能够与在细胞表面上暴露的官能团反应(例如，在生理条件向)以形成共价键。所述细胞反应性坎普他汀类似物因而变得与细胞共价连接。不希望受任何特定理论约束，细胞连接的坎普他汀类似物会保护细胞免于补体介导的损伤，例如，通过结合在细胞表面处和/或在细胞附近的C3(其可以是C3(H<sub>2</sub>O)的形式)和抑制C3裂解和激活，和/或通过结合C3b和抑制它在细胞上的沉积或在补体激活级联中的参与。在本发明的某些方面，使分离的细胞与细胞反应性坎普他汀类似物离体(在体外)接触。在本发明的某些方面，所述细胞存在于分离的组织或器官(例如，要移植进受试者中的组织或器官)中。在本发明的某些方面，通过将细胞反应性坎普他汀类似物施用给受试者，使细胞与细胞反应性坎普他汀类似物在体内接触。所述细胞反应性坎普他汀类似物变得在体内与细胞共价连接。在某些方面，本发明的方案会保护细胞、组织和/或器官免于补体激活的有害作用至少2周，在这期间无需再治疗。

[0045] 在某些方面，本发明提供了包含靶向部分的坎普他汀类似物，所述靶向部分与存在于细胞或组织表面上的靶分子非共价地结合，或与未连接至细胞或组织的细胞外物质非共价地结合。这样的坎普他汀类似物在本文中被称作“靶向坎普他汀类似物”)。所述靶分子经常是连接至细胞膜和暴露于细胞表面上的蛋白或碳水化合物。所述靶向部分将坎普他汀类似物靶向细胞、组织或易于补体激活的位置。在本发明的某些方面，使分离的细胞与靶向坎普他汀类似物离体(在体外)接触。在本发明的某些方面，所述细胞存在于分离的组织或器官(例如，要移植进受试者中的组织或器官)中。在本发明的某些方面，将靶向坎普他汀类似物施用给受试者，且其变得与在体内与细胞、组织或细胞外物质非共价结合。在某些方面，本发明的方案会保护细胞、组织和/或器官免于补体激活的有害作用至少2周，在这期间无需再治疗。在某些实施方案中，靶向坎普他汀类似物包含靶向部分和细胞反应性部分。所述靶向部分将坎普他汀类似物靶向特定细胞类型，例如通过与这样的细胞上的分子非共价

地结合。所述细胞反应性部分然后共价地结合细胞或细胞外物质。在其它实施方案中,靶向坎普他汀类似物不包含细胞反应性部分。

[0046] 在某些方面,本发明提供了长效坎普他汀类似物,其中所述长效坎普他汀类似物包含延长所述化合物在体内的半衰期的部分诸如聚乙二醇(PEG)(例如,通过降低它从血液的清除率)。在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物不包含靶向部分或细胞反应性部分。在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物包含靶向部分和/或细胞反应性部分。

### [0047] III. 补体系统

[0048] 为了促进本发明的理解,且无意以任何方式限制本发明,本部分提供了补体和它的激活途径的概述。其它细节参见,例如,Kuby Immunology,2006年第6版;Paul,W.E.,Fundamental Immunology,Lippincott Williams&Wilkins;2008年第6版;和Walport M.J.,Complement.2个部分的第一部分.N Engl J Med.,344(14):1058-66,2001。

[0049] 补体是先天性免疫系统的分支,其在对抗传染性病原体的身体防御中起重要作用。补体系统包含30多种血清蛋白和细胞蛋白,所述蛋白涉入三个主要途径:称为经典途径、旁路途径和凝集素途径。经典途径通常通过抗原与IgM或IgG抗体的复合物与C1的结合而触发(但某些其它激活剂也可以启动此途径)。激活的C1裂解C4和C2,除了产生C2a和C2b之外,还产生C4a和C4b。C4b与C2a组合以形成C3转化酶,其裂解C3以形成C3a和C3b。C3b与C3转化酶的结合会产生C5转化酶,其将C5裂解成C5a和C5b。C3a、C4a和C5a是过敏毒素,并且介导急性炎症应答中的多种反应。C3a和C5a还是趋化因子,其吸引免疫系统细胞诸如嗜中性粒细胞。

[0050] 旁路途径是由例如微生物表面和各种复合多糖启动和放大。在此途径中,C3向C3(H<sub>2</sub>O)的水解(其以低水平自发发生)会导致因子B(其被因子D裂解)的结合,从而产生流体相C3转化酶,所述C3转化酶通过将C3裂解成C3a和C3b而激活补体。C3b结合靶标诸如细胞表面,并与因子B(其以后被因子D裂解)形成复合物,从而产生C3转化酶。表面结合的C3转化酶会裂解和激活其它C3分子,导致在激活部位紧密靠近处的快速C3b沉积,并导致其它C3转化酶的形成,这又会产生其它C3b。该过程会导致C3裂解和C3转化酶形成的循环,这会显著扩大应答。C3的裂解以及另一分子C3b与C3转化酶的结合会产生C5转化酶。此途径的C3和C5转化酶受宿主细胞分子CR1、DAF、MCP、CD59和fH调节。这些蛋白质的作用模式涉及衰变加速活性(即,解离转化酶的能力)、在因子I对C3b或C4b的降解中充当辅因子的能力,或二者。通常,补体调节蛋白在宿主细胞表面上的存在会阻止在其上面发生显著的补体激活。

[0051] 两种途径中产生的C5转化酶裂解C5以产生C5a和C5b。C5b然后结合至C6、C7和C8以形成C5b-8,其催化C9的聚合以形成C5b-9膜攻击复合物(MAC)。MAC本身插入靶细胞膜中,并引起细胞裂解。细胞膜上的少量MAC可能具有除细胞死亡以外的多种后果。

[0052] 凝集素补体途径是由甘露糖结合凝集素(MBL)和MBL相关丝氨酸蛋白酶(MASP)与碳水化合物的结合而启动。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)之间的中间区域中的I型嵌膜蛋白。MBL-2基因编码存在于血清中的可溶性甘露糖结合蛋白。在人凝集素途径中,MASP-1和MASP-2涉入C4和C2的蛋白酶解,产生上文所述的C3转化酶。

[0053] 补体活性受称作补体调节蛋白(CCP)或补体激活(RCA)蛋白调节剂(RCA)的各种哺乳动物蛋白调节(美国专利号6,897,290)。这些蛋白质在配体特异性和补体抑制机制方面

存在差异。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酶促裂解成更小的片段。CCP的特征是存在多个(通常4-56个)同源基序,所述同源基序被称为短共有重复序列(SCR)、补体调节蛋白(CCP)模块或SUSHI结构域,其长度为约50-70个氨基酸,含有包括四个二硫键键合的半胱氨酸(两个二硫键)、脯氨酸、色氨酸和许多疏水残基的保守基序。CCP家族包括补体受体1型(CR1;C3b:C4b受体)、补体受体2型(CR2)、膜辅因子蛋白(MCP;CD46)、衰变加速因子(DAF)、补体因子H(fH)和C4b结合蛋白(C4bp)。CD59是一种在结构上与CCP无关的膜结合的补体调节蛋白。补体调节蛋白通常用于限制否则可能在哺乳动物(例如,人宿主)的细胞和组织上发生的补体激活。因而,“自我”细胞通常会被保护免于有害作用,所述有害作用否则会在这些细胞上发生补体激活以后而产生。补体调节蛋白的缺点或缺陷涉入多种补体介导的障碍(例如,如本文中讨论的)的发病机制。

[0054] IV. 坎普他汀类似物

[0055] 坎普他汀是一种环状肽,其结合至C3并抑制补体激活。美国专利号6,319,897描述了一种具有序列Ile-[Cys-Val-Val-Gln-Asp-Trp-Gly-His-His-Arg-Cys]-Thr(SEQ ID NO:1)的肽,其中两个半胱氨酸之间的二硫键由括号表示。应当理解,在美国专利号6,319,897中未使用名称“坎普他汀”,但随后在科技文献和专利文献(参见,例如,Morikis,等人,Protein Sci.,7(3):619-27,1998))中用它来表示具有与美国专利号6,319,897中所公开的SEQ ID NO:2相同的序列、但是如表1中所示在C末端处被酰胺化的肽(SEQ ID NO:8)。术语“坎普他汀”在本文中与所述用法一致地使用(即,表示SEQ ID NO:8)。已经开发出具有比坎普他汀更高的补体抑制活性的坎普他汀类似物。参见,例如,W02004/026328(PCT/US2003/029653),Morikis,D.,等人,Biochem Soc Trans.32(第1部分):28-32,2004,Mallik,B.,等人,J.Med.Chem.,274-286,2005;Katragadda,M.,等人.J.Med.Chem.,49:4616-4622,2006;W02007062249(PCT/US2006/045539);W02007044668(PCT/US2006/039397),W0/2009/046198(PCT/US2008/078593);W0/2010/127336(PCT/US2010/033345)和下面的讨论。

[0056] 坎普他汀类似物可以在例如N末端和/或C末端被乙酰化或酰胺化。例如,坎普他汀类似物可以在N末端被乙酰化和在C末端被酰胺化。与本领域的用法一致,本文中使用的“坎普他汀”以及本文中相对于坎普他汀的活性描述的坎普他汀类似物的活性表示在C末端被酰胺化的坎普他汀(Mallik,2005,出处同上)。

[0057] 坎普他汀或其补体抑制类似物的多联体或多聚体也可用于本发明中。

[0058] 本文中使用的术语“坎普他汀类似物”包括坎普他汀及其任何补体抑制类似物。术语“坎普他汀类似物”包括坎普他汀以及这样的其它化合物:所述化合物基于坎普他汀设计或鉴别,并且当使用例如本领域认可的任何补体激活测定或基本上类似或相当的测定测量时,其补体抑制活性是坎普他汀的补体抑制活性的至少50%。某些合适的测定描述于:美国专利号6,319,897,W02004/026328,Morikis,出处同上,Mallik,出处同上,Katragadda2006,出处同上,W02007062249(PCT/US2006/045539);W02007044668(PCT/US2006/039397),W0/2009/046198(PCT/US2008/078593);和/或W0/2010/127336(PCT/US2010/033345)。所述测定可例如测量旁途径或经典途径介导的红细胞裂解,或者是ELISA测定。在某些实施方案中,使用在W0/2010/135717(PCT/US2010/035871)中描述的测定。

[0059] 坎普他汀类似物的活性可以以其 $IC_{50}$ (使补体激活抑制50%的化合物浓度)的方式来表示,如本领域所公认的,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的活性相同。应当指出,已知某些修饰会降低或消除补体抑制活性,并且其可以明确地排除在本发明任何实施方案之外。使用旁路途径介导的红细胞裂解测定(WO2004/026328),已经将坎普他汀的 $IC_{50}$ 测量为 $12\mu M$ 。应当理解,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(例如,在测定中使用的血清浓度)而变化。例如从在基本上相同的条件下确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。在一个实施方案中,坎普他汀类似物的 $IC_{50}$ 值不超过坎普他汀的 $IC_{50}$ 值。在本发明的某些实施方案中,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 $IC_{50}$ 是坎普他汀 $IC_{50}$ 的 $1/2$ 至 $1/99$ )。例如,所述活性可以是坎普他汀10-50倍,或是坎普他汀的50-99倍。在本发明的某些实施方案中,坎普他汀类似物的活性是坎普他汀的活性的99-264倍。例如,所述活性可以是坎普他汀的活性的100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260或264倍。在某些实施方案中,所述活性是坎普他汀的活性的250-300、300和350、350和400、或400和500倍。本发明另外涵盖这样的坎普他汀类似物:其活性是坎普他汀的活性的500-1000倍或更多。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物的 $IC_{50}$ 是在约 $0.2\mu M$ 至约 $0.5\mu M$ 之间。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物的 $IC_{50}$ 是在约 $0.1\mu M$ 至约 $0.2\mu M$ 之间。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物的 $IC_{50}$ 是在约 $0.05\mu M$ 至约 $0.1\mu M$ 之间。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物的 $IC_{50}$ 是在约 $0.001\mu M$ 至约 $0.05\mu M$ 之间。

[0060] 使用等温滴定量热法,可以测量坎普他汀结合C3的 $K_d$ 值(Katragadda, 等人, J. Biol. Chem., 279(53), 54987-54995, 2004)。已经将多种坎普他汀类似物与C3的结合亲和力与它们的活性相关联,如本领域所公认的,较低的 $K_d$ 指示较高的结合亲和力。证实了某些试验的类似物的结合亲和力与活性之间的线性关系(Katragadda, 2004, 出处同上; Katragadda 2006, 出处同上)。在本发明的某些实施方案中,坎普他汀类似物结合C3的 $K_d$ 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。

[0061] “基于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其序列的氨基酸链的化合物:(i)修饰坎普他汀的序列(例如,用不同的氨基酸或氨基酸类似物替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,或从坎普他汀序列删除一个或多个氨基酸);(ii)从其中将坎普他汀的一个或多个氨基酸随机化的噬菌体展示肽文库选择,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、 $\beta$ 转角和二硫键。

[0062] 在本发明的某些实施方案中,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个置换(即,由不同标准氨基酸或非标准氨基酸替代坎普他汀序列中的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。在本发明的某些实施方案中,4位的氨基酸被改变。在本发明的某些实施方案中,9位的氨基酸被改变。在本发明的某些实施方案中,4位和9位的氨基酸被改变。在本发明的某些实施方案中,仅4位和9位的氨基酸被改变。在本发明的某些实施方案中,4位或9位的氨基酸被改变,或在某些实施方案中,4位和9位的氨基酸都被改变,而且另外位于选自1、7、10、11和13位的多达两个氨基酸也被改变。在

本发明的某些实施方案中,4位、7位和9位的氨基酸被改变。在本发明的某些实施方案中,2位、12位或两个位置的氨基酸都被改变,前提条件是,所述改变保留欲环化的化合物的能力。在2位和/或12位的这种改变可以是除1、4、7、9、10、11和/或13位改变之外还有的改变。其序列是通过替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地在C末端进一步包括多达1、2或3个额外氨基酸。在一个实施方案中,所述额外氨基酸是Gly。其序列是通过替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地在C末端进一步包括多达5个或多达10个额外氨基酸。应当理解,除非另有说明或从上下文显而易见,否则坎普他汀类似物可以具有本文所述各种实施方案的任何一个或多个特性或特征,并且任意实施方案的特性或特征可另外表征本文所述的任何其它实施方案。在本发明的某些实施方案中,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位的位置以外都与坎普他汀一致的序列,或基本上由所述序列组成。

[0063] 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、蛋氨酸、精氨酸、赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸和组氨酸)。具有提高的活性的某些坎普他汀类似物包含一个或多个非标准氨基酸。有用的非标准氨基酸包括单卤代和多卤代(例如氟代)氨基酸、D-氨基酸、高氨基酸、N-烷基氨基酸、脱氢氨基酸、芳族氨基酸(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 $\alpha, \alpha$ -二取代的氨基酸。在本发明的某些实施方案中,通过用相应的D-氨基酸替换本文别处所述的坎普他汀类似物中的一个或多个L-氨基酸,设计坎普他汀类似物。这样的化合物及其使用方法是本发明的一个方面。适用的示例性非标准氨基酸包括:2-萘基丙氨酸(2-Nal)、1-萘基丙氨酸(1-Nal)、2-茛满基甘氨酸甲酸(2Igl)、二氢色氨酸(Dht)、4-苯甲酰基-L-苯丙氨酸(Bpa)、2- $\alpha$ -氨基丁酸(2-Abu)、3- $\alpha$ -氨基丁酸(3-Abu)、4- $\alpha$ -氨基丁酸(4-Abu)、环己基丙氨酸(Cha)、同素环己基丙氨酸(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)、 $\alpha$ -甲基-L-色氨酸( $\alpha$ MeW)、 $\beta$ -甲基-L-色氨酸( $\beta$ MeW)、N-甲基-L-色氨酸(NMeW)、鸟氨酸(orn)、瓜氨酸、正亮氨酸、 $\gamma$ -谷氨酸等。

[0064] 在本发明的某些实施方案中,所述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)。示例性的Trp类似物如上所述。也参见Beene, 等人. *Biochemistry* 41:10262-10269, 2002(特别描述单卤代的和多卤代的Trp类似物); Babitzke和Yanofsky, *J. Biol. Chem.* 270:12452-12456, 1995(特别描述甲基化的和卤代的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类似物包括在 $\alpha$ 或 $\beta$ 碳处以及任选在吲哚环的一个或多个位置被取代(例如被甲基取代)的变体。包含两个或更多个芳族环(包括其被取代、未被取代或可替换地被取代的变体)的氨基酸作为Trp类似物是值得关注的。在本发明的某些实施方案中,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。在本发明的某些实施方案中,使用包含1-烷基取代基(例如低级烷基(例如C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>)取代基)的Trp类似物(例如在4位)。在某些实施方案中,使用N( $\alpha$ )甲基色氨酸或5-甲基色氨酸。在某些实

施方案中,使用包含1-烷酰基取代基(例如低级烷酰基(例如C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>))的类似物。例子包括1-乙酰基-L-色氨酸和L-β-色氨酸。

[0065] 在某些实施方案中,Trp类似物的疏水性相对于Trp有所增加。例如,吲哚环可以被一个或多个烷基(例如甲基)取代。在某些实施方案中,Trp类似物参与与C3的疏水相互作用。这样的Trp类似物可以位于例如相对于坎普他汀序列的4位。在某些实施方案中,Trp类似物包含被取代的或未被取代的二环芳族环组分,或者包含两个或更多个被取代的或未被取代的单环芳族环组分。

[0066] 在某些实施方案中,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/或参与与C3上氢键供体的静电相互作用的能力有所增加。具有增加的氢键形成性质的某些示例性Trp类似物在吲哚环上包含带负电荷的取代基。这样的Trp类似物可以位于例如相对于坎普他汀序列的7位。

[0067] 在本发明的某些实施方案中,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CH<sub>2</sub>基团外都与Ala一致的Ala类似物。在某些实施方案中,Ala类似物是无支链的单甲基氨基酸,例如2-Abu。在本发明的某些实施方案中,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)。

[0068] 在本发明的某些实施方案中,坎普他汀类似物是包含序列为(X'aa)<sub>n</sub>-Gln-Asp-Xaa-Gly-(X''aa)<sub>m</sub>(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是5-21。所述肽具有Gln-Asp-Xaa-Gly(序列ID号:70)的核心序列,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、但在某些实施方案中疏水性相对于Trp没有增加的Trp类似物。例如,所述类似物可以是其中Trp的吲哚环被带负电部分(例如卤素诸如氟)取代的类似物。在一个实施方案中,Xaa是5-氟色氨酸。在没有相反证据的情况下,本领域技术人员会认识到,其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能基于坎普他汀序列而设计。在一个替代实施方案中,Xaa是除Trp类似物外允许Gln-Asp-Xaa-Gly(序列ID号:70)肽形成β转角的氨基酸或氨基酸类似物。

[0069] 在本发明的某些实施方案中,所述肽具有X'aa-Gln-Asp-Xaa-Gly(SEQ ID NO:3)的核心序列,其中X'aa和Xaa选自Trp和Trp类似物。在本发明的某些实施方案中,所述肽具有X'aa-Gln-Asp-Xaa-Gly(SEQ ID NO:3)的核心序列,其中X'aa和Xaa选自Trp、Trp类似物以及包含至少一个芳族环的其它氨基酸或氨基酸类似物。在本发明的某些实施方案中,在肽的情况下,所述核心序列形成β转角。β转角可以是柔性的,以致当例如使用核磁共振(NMR)评估时,所述肽可呈现两种或更多种构象。在某些实施方案中,X'aa是包含被取代的或未被取代的二环芳族环组分、或者包含两个或更多个被取代的或未被取代的单环芳族环组分的Trp类似物。在本发明的某些实施方案中,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。在本发明的某些实施方案中,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。在本发明的某些实施方案中,Xaa是形成氢键的倾向相对于Trp有所增加、但是在某些实施方案中疏水性相对于Trp没有增加的Trp类似物。在本发明的某些实施方案中,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,例如卤素原子对5位的氢原子的替代。

例如, Xaa可以是5-氟色氨酸。

[0070] 在本发明的某些实施方案中, 所述肽具有X'aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X''aa(SEQ ID NO:4)的核心序列, 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。在本发明的某些实施方案中, 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)具有烷基取代基的其它Trp类似物。在某些实施方案中, X'aa是包含被取代的或未被取代的二环芳族环组分、或者包含两个或更多个被取代的或未被取代的单环芳族环组分的Trp类似物。在本发明的某些实施方案中, X'aa选自: 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。在本发明的某些实施方案中, Xaa是与C3形成氢键的倾向相对于Trp有所增加、但是在某些实施方案中疏水性相对于Trp没有增加的Trp类似物。在本发明的某些实施方案中, 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, 例如卤素原子对5位的氢原子的替代。例如, Xaa可以是5-氟色氨酸。在某些实施方案中, X''aa是Ala或Ala类似物(例如Abu)或另一无支链单甲基氨基酸。在本发明的某些实施方案中, 所述肽具有X'aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X''aa(SEQ ID NO:4)的核心序列, 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。在某些实施方案中, X''aa选自Trp类似物、芳族氨基酸和芳族氨基酸类似物。

[0071] 在本发明的某些优选实施方案中, 所述肽是环状的。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)<sub>n</sub>, 而另一个位于(X''aa)<sub>m</sub>内。在某些实施方案中, 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。在某些实施方案中, 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。

[0072] 在某些实施方案中, 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。在某些实施方案中, 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。在某些实施方案中, X'aa4和Xaa选自芳族氨基酸和芳族氨基酸类似物。X'aa1、X'aa2、X'aa3、X''aa1、X''aa2、X''aa3、X''aa4和X''aa5中的任意一个或多个可以与坎普他汀中的相应位置的氨基酸相同。在一个实施方案中, X''aa1是Ala或无支链单甲基氨基酸。肽可以通过(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。在一个实施方案中, 肽通过X'aa2与X''aa4之间的共价键环化。在一个实施方案中, 共价结合的氨基酸各自是Cys, 而且共价键是二硫(S-S)键。在其它实施方案中, 共价键是C-C、C-O、C-S或C-N键。在某些实施方案中, 共价结合的残基之一是其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其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。其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, 和通式结构NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH的二氨基甲酸, 诸如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)。其侧链包含羧酸基团的氨基酸的例子包括二羧基氨基酸, 例如谷氨酸和天冬氨酸。还可以使用类似物, 例如β-羟基-L-谷氨酸。在某些实施方案中, 肽用硫醚键环化, 例如, 如在PCT/US2011/052442(WO/2012/040259)中所述。例如, 在某些实施方案中, 任意肽中的二硫键被

硫醚键替代。在某些实施方案中,形成胱硫醚。在某些实施方案中,所述胱硫醚是 $\delta$ -胱硫醚或 $\gamma$ -胱硫醚。在某些实施方案中,修饰包括:用CH<sub>2</sub>的添加来替代SEQ ID NO:5中的X'aa2和X''aa4处的半胱氨酸之间的Cys-Cys二硫键(或其它序列中的对应位置)以形成在X'aa2或X''aa4处的高半胱氨酸,和引入硫醚键以形成胱硫醚。在一个实施方案中,所述胱硫醚是 $\gamma$ -胱硫醚。在另一个实施方案中,所述胱硫醚是 $\delta$ -胱硫醚。根据本发明的另一种修饰包括,在不添加CH<sub>2</sub>的情况下用硫醚键替代二硫键,由此形成羊毛硫氨酸。在某些实施方案中,至少在某些条件下,与含有二硫键的坎普他汀类似物相比,含有替代硫醚的二硫键的坎普他汀类似物具有增加的稳定性。

[0073] 在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物是包含具有以下序列的肽的化合物:

[0074] Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa2\*-Gly-Xaa3-His-Arg-Cys-Xaa4(SEQ ID NO:6);其中:

[0075] Xaa1是Ile、Val、Leu、B<sup>1</sup>-Ile、B<sup>1</sup>-Val、B<sup>1</sup>-Leu或包含Gly-Ile或B<sup>1</sup>-Gly-Ile的二肽,且B<sup>1</sup>代表第一封端部分;

[0076] Xaa2和Xaa2\*独立地选自Trp和Trp类似物;

[0077] Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp或Trp类似物;

[0078] 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任选地被第二封端部分B<sup>2</sup>替换;并且

[0079] 两个Cys残基通过二硫键连接。在某些实施方案中,Xaa4是Leu、Nle、His或Phe、或选自Xaa5-Ala和Xaa5-Asn的二肽、或三肽Xaa5-Ala-Asn,其中Xaa5选自Leu、Nle、His或Phe,且其中L-Thr、D-Thr、Ile、Val、Gly、Leu、Nle、His、Phe、Ala或Asn中的任一个的羧基末端-OH任选地被第二封端部分B<sup>2</sup>替换;并且两个Cys残基通过二硫键连接。

[0080] 在其它实施方案中,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如上面所定义。如果Xaa1不存在,则N末端Cys残基可以具有与其连接的封端部分B<sup>1</sup>。

[0081] 在另一个实施方案中,Xaa4为任何氨基酸或氨基酸类似物,并且Xaa1、Xaa2、Xaa2\*和Xaa3如上面所定义。在另一个实施方案中,Xaa4是选自Thr-Ala和Thr-Asn的二肽,其中羧基末端-OH或者Ala或Asn任选地被第二封端部分B<sup>2</sup>替换。

[0082] 在SEQ ID NO:6的坎普他汀类似物的任意实施方案中,Xaa2可以是Trp。

[0083] 在SEQ ID NO:6的坎普他汀类似物的任意实施方案中,Xaa2可以是包含被取代的或未被取代的二环芳族环组分、或者包含两个或更多个被取代的或未被取代的单环芳族环组分的Trp类似物。例如,Trp类似物可以选自2-萘基丙氨酸(2-NaI)、1-萘基丙氨酸(1-NaI)、2-茛满基甘氨酸甲酸(Ig1)、二氢色氨酸(Dht)和4-苯甲酰基-L-苯丙氨酸。

[0084] 在SEQ ID NO:6的坎普他汀类似物的任意实施方案中,Xaa2可以是疏水性比Trp强的Trp类似物。例如,所述Trp类似物可以选自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。在一个实施方案中,Trp类似物是1-甲基色氨酸。在一个实施方案中,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的那些相同。

[0085] 在SEQ ID NO:6的坎普他汀类似物的任意实施方案中,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方案中疏水性相对于Trp没有

增加的Trp类似物。在某些实施方案中,Trp类似物在吲哚环上包含带负电取代基。例如,Trp类似物可以选自5-氟色氨酸和6-氟色氨酸。

[0086] 在本发明的某些实施方案中,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方案中疏水性相对于Trp没有增加的Trp类似物。在SEQ ID NO:6的坎普他汀类似物的某些实施方案中,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方案中疏水性相对于Trp没有增加的Trp类似物。例如,在一个实施方案中,Xaa2是甲基色氨酸,并且Xaa2\*是5-氟色氨酸。

[0087] 在某些上述实施方案中,Xaa3是Ala。在某些上述实施方案中,Xaa3是无支链的单甲基氨基酸,例如Abu。

[0088] 本发明另外提供了如上文所述的SEQ ID NO:6的坎普他汀类似物,其中Xaa2和Xaa2\*独立地选自Trp、Trp类似物,以及包含至少一个芳族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、或另一芳族氨基酸或芳族氨基酸类似物。

[0089] 在本发明的某些实施方案中,存在于本文所述的任意坎普他汀类似物的N末端或C末端处的封端部分是使肽稳定以防降解(否则其将在哺乳动物(例如人类或非人灵长类动物)血液或间隙液中发生)的任何部分。例如,封端部分B<sup>1</sup>可以是改变肽的N末端结构从而抑制肽的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B<sup>2</sup>可以是改变肽的C末端结构从而抑制肽的C末端氨基酸与相邻氨基酸之间的肽键裂解的任何部分。可以使用本领域已知的任何合适的封端部分。在本发明的某些实施方案中,封端部分B<sup>1</sup>包含酰基(即,羧酸在去除-OH基团后剩余的部分)。酰基通常包含1-12个碳,例如1-6个碳。例如,在本发明的某些实施方案中,封端部分B<sup>1</sup>选自:甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、异戊酰基等。在一个实施方案中,封端部分B<sup>1</sup>是乙酰基,即,Xaa1是Ac-Ile、Ac-Val、Ac-Leu或Ac-Gly-Ile。

[0090] 在本发明的某些实施方案中,封端部分B<sup>2</sup>是伯胺或仲胺(-NH<sub>2</sub>或-NHR<sup>1</sup>,其中R是有机部分,例如烷基)。

[0091] 在本发明的某些实施方案中,封端部分B<sup>1</sup>是中和/或降低负电荷(否则其可以在生理pH存在于N末端)的任何部分。在本发明的某些实施方案中,封端部分B<sup>2</sup>是中和/或降低负电荷(否则其可以在生理pH存在于C末端)的任何部分。

[0092] 在本发明的某些实施方案中,坎普他汀类似物分别在N末端和/或C末端被乙酰化或酰胺化。坎普他汀类似物可以在N末端被乙酰化、在C末端被酰胺化,和/或在N末端被乙酰化和在C末端被酰胺化。在本发明的某些实施方案中,坎普他汀类似物在N末端包含烷基或芳基,而非乙酰基。

[0093] 在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物是包含具有以下序列的肽的化合物:

[0094] Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa2\*-Gly-Xaa3-His-Arg-Cys-Xaa4(SEQ ID NO:7);其中:

[0095] Xaa1是Ile、Val、Leu、Ac-Ile、Ac-Val、Ac-Leu或包含Gly-Ile或Ac-Gly-Ile的二肽;

[0096] Xaa2和Xaa2\*独立地选自Trp和Trp类似物;

[0097] Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp或Trp类似物；

[0098] 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任选地被-NH<sub>2</sub>替换；并且两个Cys残基通过二硫键连接。在某些实施方案中，Xaa4是Leu、Nle、His、或Phe、或选自Xaa5-Ala和Xaa5-Asn的二肽、或三肽Xaa5-Ala-Asn，其中Xaa5选自Leu、Nle、His或Phe，且其中L-Thr、D-Thr、Ile、Val、Gly、Leu、Nle、His、Phe、Ala或Asn中任一个的羧基末端-OH任选地被第二封端部分B2替换；并且两个Cys残基通过二硫键连接。

[0099] 在某些实施方案中，Xaa1、Xaa2、Xaa2\*、Xaa3和Xaa4如上文关于SEQ ID NO:6的各个实施方案所述。例如，在某些实施方案中，Xaa2\*是Trp。在某些实施方案中，Xaa2是疏水性比Trp强的Trp类似物，例如1-甲基色氨酸。在某些实施方案中，Xaa3是Ala。在某些实施方案中，Xaa3是无支链的单甲基氨基酸。

[0100] 在本发明的某些实施方案中，Xaa1是Ile，且Xaa4是L-Thr。

[0101] 在本发明的某些实施方案中，Xaa1是Ile，Xaa2\*是Trp，且Xaa4是L-Thr。

[0102] 本发明另外提供了如上文所述的SEQ ID NO:7的坎普他汀类似物，其中Xaa2和Xaa2\*独立地选自Trp、Trp类似物、其它氨基酸或芳族氨基酸类似物，并且Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp、Trp类似物、或另一芳族氨基酸或芳族氨基酸类似物。

[0103] 在本文所述任意坎普他汀类似物的某些实施方案中，使用Phe类似物而不是Phe。

[0104] 表1提供了可用于本发明中的坎普他汀类似物的非限制性列表。所述类似物在左边一栏中以缩写形式提及，其中指示了在指定位置(1-13)与亲本肽坎普他汀相比较的特定修饰。与本领域的用法一致，本文中使用的“坎普他汀”和本文中相对于坎普他汀的活性描述的坎普他汀类似物的活性，表示在C末端被酰胺化的坎普他汀肽。除非另有说明，否则表1中的肽在C末端被酰胺化。粗体字用于指示某些修饰。与坎普他汀有关的活性是基于公开的数据和其中所述的测定(WO2004/026328, WO2007044668, Mallik, 2005; Katragadda, 2006)。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，在各测定之间存在差异的情况下，可以对值进行调整。还应当理解，在本发明的某些实施方案中，在表1中列出的肽当用于本发明的治疗组合物和方法中时，通过两个Cys残基之间的二硫键环化。用于环化肽的替代方式也在本发明范围内。如上面所指出的，在本发明的不同实施方案中，坎普他汀类似物(例如，本文中公开的任意坎普他汀类似物)的一个或多个氨基酸可以是N-烷基氨基酸(例如，N-甲基氨基酸)。例如，但不限于，在所述肽的环状部分内的至少一个氨基酸、在环状部分的N末端的至少一个氨基酸和/或在环状部分的C末端的至少一个氨基酸可以是N-烷基氨基酸，例如，N-甲基氨基酸。在本发明的某些实施方案中，例如，坎普他汀类似物包含N-甲基甘氨酸，例如，在与坎普他汀的8位对应的位置处和/或在与坎普他汀的13位对应的位置处。在某些实施方案中，表1中的一种或多种坎普他汀类似物含有至少一个N-甲基甘氨酸，例如，在与坎普他汀的8位对应的位置处和/或在与坎普他汀的13位对应的位置处。

[0105] 表1

[0106]

肽	序列	SEQ ID NO:	相对于坎普他汀的活性
坎普他汀	<i>H-ICVVQDWGHHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	8	*
Ac-坎普他汀	<i>Ac-ICVVQDWGHHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	9	3 倍多
Ac-V4Y/H9A	<i>Ac-ICVYQDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	10	14 倍多
Ac-V4W/H9A -OH	<i>Ac-ICVWQDWGAHRCT-COOH</i>	11	27 倍多
Ac-V4W/H9A	<i>Ac-ICVWQDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	12	45 倍多
Ac-V4W/H9A/T13dT -OH	<i>Ac-ICVWQDWGAHRCT-T-COOH</i>	13	55 倍多
Ac-V4(2-Nal)/H9A	<i>Ac-ICV(2-Nal)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	14	99 倍多
Ac V4(2-Nal)/H9A -OH	<i>Ac-ICV(2-Nal)QDWGAHRCT-COOH</i>	15	38 倍多
Ac V4(1-Nal)/H9A -OH	<i>Ac-ICV(1-Nal)QDWGAHRCT-COOH</i>	16	30 倍多
Ac-V42Igl/H9A	<i>Ac-ICV(2-Igl)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	17	39 倍多
Ac-V42Igl/H9A -OH	<i>Ac-ICV(2-Igl)QDWGAHRCT-COOH</i>	18	37 倍多
Ac-V4Dht/H9A -OH	<i>Ac-ICVDhtQDWGAHRCT-COOH</i>	19	5 倍多
Ac-V4(Bpa)/H9A -OH	<i>Ac-ICV(Bpa)QDWGAHRCT-COOH</i>	20	49 倍多
Ac-V4(Bpa)/H9A	<i>Ac-ICV(Bpa)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	21	86 倍多
Ac-V4(Bta)/H9A -OH	<i>Ac-ICV(Bta)QDWGAHRCT-COOH</i>	22	65 倍多
Ac-V4(Bta)/H9A	<i>Ac-ICV(Bta)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	23	64 倍多
Ac-V4W/H9(2-Abu)	<i>Ac-ICVWQDWG(2-Abu)HRCT-CONH<sub>2</sub></i>	24	64 倍多
+G/V4W/H9A +AN -OH	<i>H-GICVWQDWGAHRCTAN-COOH</i>	25	38 倍多
Ac-V4(5fW)/H9A	<i>Ac-ICV(5fW)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	26	31 倍多
Ac-V4(5-MeW)/H9A	<i>Ac-ICV(5-甲基-W)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	27	67 倍多
Ac-V4(1-MeW)/H9A	<i>Ac-ICV(1-甲基-W)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	28	264 倍多
Ac-V4W/W7(5fW)/H9A	<i>Ac-ICVWQD(5fW)GAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	29	121 倍多
Ac-V4(5fW)/W7(5fW)/H9A	<i>Ac-ICV(5fW)QD(5fW)GAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	30	NA
Ac-V4(5-MeW)/W7(5fW)/H9A	<i>Ac-ICV(5-甲基-W)QD(5fW)GAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	31	NA
Ac-V4(1MeW)/W7(5fW)/H9A	<i>Ac-ICV(1-甲基-W)QD(5fW)GAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	32	264 倍多

[0107]

+G/V4(6fW)/W7(6fW)/H9A+N-OH	<i>H-GICV(6fW)QD(6fW)GAHRCTN-COOH</i>	33	126 倍多
Ac-V4(1-甲酰基-W)/H9A	<i>Ac-ICV(1-甲酰基-W)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	34	264 倍多
Ac-V4(5-甲氧基-W)/H9A	<i>Ac-ICV(1-甲酰基-W)QDWGAHRCT-CONH<sub>2</sub></i>	35	76 倍多
G/V4(5f-W)/W7(5fW)/H9A+N-OH	<i>H-GICV(5fW)QD(5fW)GAHRCTN-COOH</i>	36	112 倍多

[0108] NA=不可得到

[0109] 在本发明的组合物和方法的某些实施方案中,所述坎普他汀类似物具有选自序列 9-36 的序列。在本发明的组合物和方法的某些实施方案中,所述坎普他汀类似物具有选自 SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34 和 36 的序列。在本发明的组合物和/或方法的某些实施方案中,所述坎普他汀类似物具有选自 SEQ ID NO:30 和 31 的序列。在本发明的组合物和方

法的一个实施方案中,所述坎普他汀类似物具有SEQ ID NO:28的序列。在本发明的组合物和方法的一个实施方案中,所述坎普他汀类似物具有SEQ ID NO:32的序列。在本发明的组合物和方法的一个实施方案中,所述坎普他汀类似物具有SEQ ID NO:34的序列。在本发明的组合物和方法的一个实施方案中,所述坎普他汀类似物具有SEQ ID NO:36的序列。

[0110] 在本发明的组合物和方法的某些实施方案中,所述坎普他汀类似物具有表1中描绘的序列,但是其中Ac-基团被如上文所述的替代封端部分B<sup>1</sup>替换。在某些实施方案中,所述-NH<sub>2</sub>基团被如上文所述的替代封端部分B<sup>2</sup>替换。

[0111] 在一个实施方案中,所述坎普他汀类似物结合与坎普他汀基本上相同的人类C3的β链的区域。在一个实施方案中,坎普他汀类似物是这样的化合物:其结合至坎普他汀所结合的人类C3的β链的C末端部分的分子量为约40kDa的片段(Soulika, A.M., 等人, Mol. Immunol., 35:160, 1998; Soulika, A.M., 等人, Mol. Immunol. 43(12):2023-9, 2006)。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物是这样的化合物:其结合至如在坎普他汀-C3结构(例如,晶体结构或NMR衍生的3D结构)中确定的坎普他汀结合位点。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物是这样的化合物:其可以置换坎普他汀-C3结构中的坎普他汀,并与C3形成与坎普他汀基本上相同的分子间接触。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物是这样的化合物:其结合至肽-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、32、33、34或36)的肽的结合位点。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物是这样的化合物:其结合至肽-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。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物是这样的化合物:其可以置换肽-C3结构中具有SEQ ID NO:9-36(例如SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36)的肽,并且能与C3形成与所述肽基本上相同的分子间接触。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物是这样的化合物:其可以置换肽-C3结构中SEQ ID NO:30或31的肽,并且能与C3形成与所述肽基本上相同的分子间接触。

[0112] 本领域普通技术人员使用常规实验方法能够容易地确定坎普他汀类似物是否结合C3的β链的C末端部分的片段。例如,本领域技术人员可以如下合成可光交联形式的坎普他汀类似物:在所述化合物中,例如在序列的C末端,包括光交联氨基酸,例如对苯甲酰基-L-苯丙氨酸(Bpa)(Soulika, A.M., 等人, 出处同上)。可以任选地包括额外氨基酸,例如表位标签,如FLAG标签或HA标签,以便利化合物的检测,例如,通过蛋白质印迹法。将坎普他汀类似物与所述片段一起温育,并开始交联。坎普他汀类似物与C3片段的共定位指示结合。也可以使用表面等离子体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。本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中任意肽的序列(例如,SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36,或在某些实施方案中,SEQ ID NO:30或31)的肽基本上相同的分子间接触。

[0113] 坎普他汀类似物可以通过本领域已知的多种肽合成方法经由氨基酸残基的缩合来制备,例如,根据常规肽合成方法,可以使用本领域已知的方法,通过在体外或在活细胞中从编码它们的合适核酸序列表达来制备。例如,可以使用如下述文献中所述的标准固相方法来合成肽:Malik, 出处同上, Katragadda, 出处同上, W02004026328, 和/或 W02007062249。使用本领域已知的各种保护基和方法,可以对潜在反应性部分诸如氨基和羧基、反应性官能团等进行保护和随后去保护。参见,例如,“Protective Groups in

Organic Synthesis”,第3版Greene,T.W.和Wuts,P.G.,编,John Wiley&Sons,New York:1999.使用标准方案诸如反相HPLC,可以纯化肽。如果需要的话,使用已知方法诸如反相HPLC,可以进行非对映异构肽的分离。如果需要的话,可以将制剂低压冻干,随后溶解于合适溶剂(例如,水)中。使用碱(例如NaOH),可以调整所得溶液的pH,例如调到生理pH。如果需要的话,可以通过质谱法来表征肽制剂,例如以确认质量和/或二硫键形成。参见,例如,Mallik,2005,和Katragadda,2006。

[0114] 通过添加分子(诸如聚乙二醇(PEG)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的坎普他汀类似物,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(Veronese,F.M.和Harris,Adv. Drug Deliv. Rev. 54,453-456,2002;Davis,F.F.,Adv. Drug Deliv. Rev. 54,457-458,2002);Hinds,K.D.和Kim,S.W. Adv. Drug Deliv. Rev. 54,505-530(2002;Roberts,M.J.,Bentley,M.D.和Harris,J.M. Adv. Drug Deliv. Rev. 54,459-476;2002);Wang,Y.S.等人. Adv. Drug Deliv. Rev. 54,547-570,2002)。多种聚合物诸如PEG和经修饰的PEG(包括可与多肽方便地连接的衍生化的PEG)描述于Nektar Advanced Pegylation 2005-2006 Product Catalog, Nektar Therapeutics, San Carlos, CA中,其也提供了适当的缀合操作的细节。在另一个实施方案中,将坎普他汀类似物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,将坎普他汀类似物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坎普他汀类似物,例如,将坎普他汀类似物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。可以将坎普他汀类似物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(例如,多种不同的类似物)。

[0115] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物是多价化合物,其包含与聚合主链或支架共价地或非共价地连接的多个坎普他汀类似物部分。所述坎普他汀类似物部分可以是相同的或不同的。在本发明的某些实施方案中,所述多价化合物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坎普他汀类似物部分(例如3、4、5或更多种不同的坎普他汀类似物部分)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,所述坎普他汀类似物部分的数目(“n”)是2-6。在本发明的其它实施方案中,n是7-20。在本发明的其它实施方案中,n是20-100。在其它实施方案中,n是100-1,000。在本发明的其它实施方案中,n是1,000至10,000。在其它实施方案中,n是10,000至50,000。在其它实施方案中,n是50,000至100,000。在其它实施方案中,n是100,000至1,000,000。

[0116] 坎普他汀类似物部分可以与聚合支架直接连接,或可以通过连接部分连接,所述连接部分将坎普他汀类似物部分连接至聚合支架。所述连接部分可以连接至单一坎普他汀类似物部分和连接至聚合支架。可替代地,连接部分可以具有多个与其连接的坎普他汀类似物部分,以使所述连接部分将多个坎普他汀类似物部分连接至聚合支架。

[0117] 在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物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残基的序列附加至坎普他汀类似物的N末端和/或C末端。在某些实施方案中,所述Lys残基与坎普他汀类似物的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,例如,如在第VI部分中关于接头所述。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。合适的方法和聚合主链描述于例如W098/46270(PCT/US98/07171)或W098/47002(PCT/US98/06963)中。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坎普他汀类似物反应。在一个实施方案中,所述坎普他汀类似物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坎普他汀类似物反应,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。

#### [0118] V. 坎普他汀模拟物

[0119] 坎普他汀的结构是本领域已知的,并且许多具有比坎普他汀更高活性的坎普他汀类似物的NMR结构也是已知的(Malik, 出处同上)。结构信息可以用于设计坎普他汀模拟物。

[0120] 在一个实施方案中,所述坎普他汀模拟物是这样的任意化合物:其与坎普他汀或任意坎普他汀类似物(例如其序列列于表1中的坎普他汀类似物)竞争结合C3或其片段(例如坎普他汀所结合的 $\beta$ 链的40kD片段)。在某些实施方案中,所述坎普他汀模拟物具有等于或大于坎普他汀活性的活性。在某些实施方案中,所述坎普他汀模拟物与坎普他汀相比更稳定、更易于口服得到或具有更好的生物利用度。所述坎普他汀模拟物可以为肽、核酸、或小分子。在某些实施方案中,所述坎普他汀模拟物是与在坎普他汀-C3结构(例如晶体结构或得自NMR实验的3-D结构)中所确定的坎普他汀的结合位点结合的化合物。在某些实施方案中,所述坎普他汀模拟物是这样的化合物:其在坎普他汀-C3结构中可以置换坎普他汀,并且可以与C3形成与坎普他汀基本上相同的分子间接触。在某些实施方案中,所述坎普他汀模拟物是这样的化合物:其与肽-C3结构中具有表1所列序列(例如,SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36,或在某些实施方案中,SEQ ID NO:30或31)的肽的结合位点结合。在某些实施方案中,所述坎普他汀模拟物是这样的化合物:其可以置换肽-C3结构中具有表1所列序列(例如,SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36,或在某些实施方案中,SEQ ID NO:30或31)的肽,并且可以与C3形成与所述肽基本上相同的分子间接触。在某些实施方案中,所述坎普他汀模拟物具有非肽主链,但具有以基于坎普他汀序列而设计的序列排列的侧链。

[0121] 本领域技术人员会明白,在确定短肽的特定所需构象后,设计肽或肽模拟物以配合所述构象的方法是众所周知的。参见,例如,G.R.Marshall(1993),Tetrahedron,49:3547-3558;Hruby和Nikiforovich(1991),Molecular Conformation and Biological Interactions,P.Balaram和S.Ramasehan,编,Indian Acad.of Sci.,Bangalore,PP.429-455),Eguchi M,Kahn M.,Mini Rev Med Chem.,2(5):447-62,2002。与本发明特别相关的是,通过考虑氨基酸残基的各种侧链的贡献(例如对于官能团的作用或空间考虑),可以进

一步精化肽类似物的设计,如本领域关于坎普他汀及其类似物以及其它所述。

[0122] 本领域普通技术人员应当理解,就提供结合C3和抑制补体激活所需的特定主链构象和侧链官能团的目的而言,肽模拟物可以起与肽相同的作用。因此,本发明的范围涵盖,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来制备结合C3的、抑制补体的化合物,并利用所述化合物。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/或其它官能团的肽的置换或衍生化,以致其与示例性说明的肽足够类似以抑制补体激活。更一般来说,坎普他汀模拟物是其中药效团的位置类似于它们在坎普他汀中的定位(即使主链不同)的任何化合物。

[0123] 肽模拟物用于开发高亲和力肽类似物的用途是本领域众所周知的。假定旋转约束与肽内的氨基酸残基的旋转约束类似,借助于拉马钱德兰图(Hruby和Nikiforovich1991)和其它已知技术,可以分析包含非氨基酸部分的类似物,并验证它们的构象基序。

[0124] 本领域普通技术人员将能够容易地确立合适的筛选测定,以鉴别额外坎普他汀模拟物并选择具有所需抑制活性的那些模拟物。例如,可以标记(例如,用放射性标记或荧光标记)坎普他汀或其类似物,并在不同浓度试验化合物存在下与C3接触。评价试验化合物的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的结合明显减少的试验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%的试验化合物是候选坎普他汀模拟物。本领域普通技术人员将认识到,可以使用所述筛选测定的多种变化形式。欲筛选的化合物包括天然产物、适体文库、噬菌体展示文库、使用组合化学合成的化合物文库等。本发明包括:基于上述核心序列来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。还可以使用这些方法中的任一种来鉴别新坎普他汀类似物,其具有比迄今所试验的坎普他汀类似物更高的抑制活性。应当理解,坎普他汀模拟物可以用于本发明的细胞反应性的化合物中,并且本发明提供了这样的细胞反应性坎普他汀模拟物。

[0125] VI. 细胞反应性的或长效的坎普他汀类似物

[0126] 本发明提供了多种细胞反应性坎普他汀类似物。在某些方面,细胞反应性坎普他汀类似物包含式A-L-M的化合物,其中A是包含细胞反应性官能团J的部分,L是任选地存在的连接部分,且M包含坎普他汀类似物部分。在不同的实施方案中,所述坎普他汀类似物部分可以包含任意坎普他汀类似物,例如,上述的任意坎普他汀类似物。式A-L-M包括:其中A-L存在于坎普他汀类似物部分的N末端的实施方案,其中A-L存在于坎普他汀类似物部分的C末端的实施方案,其中A-L连接至坎普他汀类似物部分的氨基酸的侧链的实施方案,和其中相同的或不同的A-L存在于M的两端的实施方案。应当理解,当某些坎普他汀类似物作为坎普他汀类似物部分存在于式A-L-M的化合物中时,坎普他汀类似物的官能团将与L的官能团反应以形成与A或L的共价键。例如,细胞反应性坎普他汀类似物(其中坎普他汀类似物部分包含含有氨基酸的坎普他汀类似物,所述氨基酸具有含伯胺(NH<sub>2</sub>)基团的侧链(所述坎普他汀类似物可以由式R<sup>1</sup>—(NH<sub>2</sub>)表示))可以具有式R<sup>1</sup>—NH—L—A,其中已经形成与L的新共价键(例如,N—C),且丢失氢。因而,术语“坎普他汀类似物部分”包括这样的分子结构:其中坎普他汀类似物的至少一个原子参与与第二部分的共价键,所述第二部分可以是例如侧链的修饰。类似的考虑适用于在上述多价化合物中存在的坎普他汀类似物部分。在某些实施方案

中,在坎普他汀类似物(例如,在上面第IV部分中描述的坎普他汀类似物)的N末端或C末端的封端部分被细胞反应性坎普他汀类似物的结构中的A-L替代。在某些实施方案中,A或L包含封端部分。在某些实施方案中,细胞反应性坎普他汀类似物的摩尔活性为具有相同氨基酸序列(和,如果适用的话,一个或多个封端部分)、但是不包含细胞反应性部分的对应坎普他汀类似物的活性的至少约10%、20%或30%,例如,30%至40%、30%至50%、30%至60%、30%至70%、30%至80%、30%至90%或更多。在某些其中细胞反应性坎普他汀类似物包含多个坎普他汀类似物部分的实施方案中,细胞反应性坎普他汀类似物的摩尔活性是所述坎普他汀类似物部分的活性总和的至少约10%、20%或30%,例如,30%至40%、30%至50%、30%至60%、30%至70%、30%至80%、30%至90%或更多。

[0127] 在不同的实施方案中,细胞反应性部分A可以包含多种不同的细胞反应性官能团J中的任一种。一般而言,细胞反应性官能团可以至少部分地基于例如下述因素来选择:(a)要靶向的特定官能团;(b)在生理上可接受的离体条件(例如,生理上可接受的pH和渗量)下和/或在体内条件下(例如,在血液中),反应性官能团与靶官能团反应的能力;(c)在生理上可接受的离体条件下和/或在体内,反应性官能团和靶官能团之间的反应的特异性;(d)由反应性官能团与它的靶官能团的反应产生的共价键的稳定性(例如,在体内条件下);(e)合成包含反应性官能团的细胞反应性坎普他汀类似物的容易性,等。在某些实施方案中,选择这样的反应性官能团:其在不释放离去基团的情况下与它的靶化学基团反应。在某些实施方案中,选择这样的反应性官能团:其在与靶标反应以后导致离去基团的释放。含有这样的基团的化合物可以用于,例如,监测反应的进展和/或程度。在某些实施方案中,离去基团在产生的量(例如,基于浓度和/或产生的绝对量)方面是细胞、组织或器官在生理上可接受的,和/或在体内产生的量(例如,基于在有关体液诸如血液中的浓度,和/或基于产生的绝对量)方面是受试者在医学上可接受的。在某些实施方案中,至少部分地除去离体产生的离去基团,例如,通过洗涤细胞,或通过洗涤或灌注组织或器官,例如用盐水。

[0128] 在许多实施方案中,在本发明中使用的细胞反应性官能团与氨基酸残基的侧链和/或与蛋白的N末端氨基或C末端羧基反应。在某些实施方案中,所述细胞反应性官能团可与存在于半胱氨酸残基侧链中的巯基(-SH)基团反应。在某些实施方案中,使用马来酰亚胺基团。马来酰亚胺基团会在生理pH与蛋白的半胱氨酸残基的巯基反应,并形成稳定的硫醚键。在某些实施方案中,使用卤代乙酰基,诸如碘代乙酰基或溴代乙酰基。卤代乙酰基会在生理pH与巯基反应。碘代乙酰基的反应通过来自巯基的硫原子对碘的亲核取代而进行,从而产生稳定的硫醚键。在其它实施方案中,使用碘乙酰胺基团。在某些实施方案中,所述细胞反应性官能团会与氨基(-NH<sub>2</sub>)基团反应,所述氨基存在于蛋白的N末端处和赖氨酸残基的侧链中( $\epsilon$ -氨基)。在某些实施方案中,使用活化的酯,例如,琥珀酰亚胺基酯(即,NHS酯)。例如,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)或它的水溶性的类似物(磺基-NHS)可以用于合成中,由此得到的细胞反应性坎普他汀类似物包含NHS酯。在某些实施方案中,所述细胞反应性官能团会与羧基(-COOH)基团反应,所述羧基存在于蛋白的C末端处和氨基酸残基的侧链中。在某些实施方案中,所述细胞反应性坎普他汀类似物可与羟基(-OH)基团反应,所述羟基存在于不同氨基酸的侧链中和糖基化蛋白的碳水化合物部分中。

[0129] 一般而言,连接部分L可以包含任意一种或多种脂族和/或芳族部分,所述部分适合形成结合所述连接的部分的稳定化合物。本文中使用的术语“稳定”优选地表示这样的化

合物:其具有足以实现制备的稳定性,且其维持化合物的完整性足够的时间段,例如,以用于本文中描述的一个或多个目的。在某些实施方案中,L包含饱和的或不饱和的、被取代的或未被取代的、支链或无支链的、脂族链,其具有1-30个、1-20个、1-10个、1-6个或5个碳原子或更少碳原子的长度,其中长度表示主(最长)链中的C原子的数目。在某些实施方案中,所述脂族链包含一个或多个可以独立地选择的杂原子(O、N、S)。在某些实施方案中,L的主链中的原子的至少50%是碳原子。在某些实施方案中,L包含饱和的烷基部分 $(\text{CH}_2)_n$ ,其中n是1-30。

[0130] 在某些实施方案中,L包含一个或多个杂原子,且具有1-1000个、1-800个、1-600个、1-400个、1-300个、1-200个、1-100个、1-50个、1-30个或1-10个碳原子的链长度。在某些实施方案中,L包含寡(乙二醇)部分 $(-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n)$ 其中n是1-500、1-400、1-300、1-200、1-100、10-200、200-300、100-200、40-500、30-500、20-500、10-500、1-40、1-30、1-20或1-10。

[0131] 在某些实施方案中,L包含:不饱和的部分诸如 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ;包含非芳族环系的部分(例如,环己基部分)、芳族部分(例如,芳族环系诸如苯基部分);醚部分 $(-\text{C}-\text{O}-\text{C}-)$ ;酰胺部分 $(-\text{C}(=\text{O})-\text{N}-)$ ;酯部分 $(-\text{C}-\text{O}-\text{O}-)$ ;羰基部分 $(-\text{C}(=\text{O})-)$ ;亚胺部分 $(-\text{C}=\text{N}-)$ ;硫醚部分 $(-\text{C}-\text{S}-\text{C}-)$ ;氨基酸残基;和/或通过2个相容的反应性官能团的反应可以形成的任意部分。在某些实施方案中,连接部分或细胞反应性部分的一个或多个部分被包括、但不限于以下的一个或多个部分对其上的一个或多个氢(或其它)原子的独立替换所取代:脂族;芳族、芳基;烷基、芳烷基、烷酰基、芳酰基、烷氧基;硫代;F;Cl;Br;I; $-\text{NO}_2$ ;  $-\text{CN}$ ;  $-\text{CF}_3$ ;  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ;  $-\text{CHCl}_2$ ;  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ;  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ;  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ;  $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ ; 或 $-\text{GRG}_1$ ,其中G是 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NRG}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NRG}_2-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NRG}_2\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NRG}_2-$ 、 $-\text{NRG}_2\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{NRG}_2\text{C}(=\text{O})\text{NRG}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{S}-$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})-$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{S}-$ 、 $-\text{C}(=\text{NRG}_2)-$ 、 $-\text{C}(=\text{NRG}_2)\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{NRG}_2)\text{NRG}_3-$ 、 $-\text{OC}(=\text{NRG}_2)-$ 、 $-\text{NRG}_2\text{C}(=\text{NRG}_3)-$ 、 $-\text{NRG}_2\text{SO}_2-$ 、 $-\text{NRG}_2\text{SO}_2\text{NRG}_3-$ 或 $-\text{SO}_2\text{NRG}_2-$ ,其中RG1、RG2和RG3的每次出现独立地包括、但不限于:氢、卤素或任选地被取代的脂族、芳族或芳基部分。应当理解,环系应当作为取代基存在时,可以任选地经由直链部分连接。本发明预见到的取代基和变量的组合优选地是导致稳定化合物形成的那些,所述化合物可用于本文所述的方法的任意一种或多种中,例如,可用于治疗一种或多种障碍和/或用于接触细胞、组织或器官(如本文中所述),和/或可在一种或多种这样的化合物的制备中用作中间体。

[0132] 在不同的实施方案中,L可以包含一个或多个在上述段落中描述的任意部分。在某些实施方案中,L包含2个或更多个不同的部分,所述部分彼此连接以形成通常具有1至约60个原子、1至约50个原子(例如,1-40个、1-30个、1-20个、1-10个或1-6个原子)的长度的结构,其中长度表示主(最长)链中的原子的数目。在某些实施方案中,L包含2个或更多个不同的部分,所述部分彼此连接以形成在主(最长)链中通常具有1至约40个(例如,1-30个,例如,1-20个、1-10个或1-6个)碳原子的结构。一般而言,这样的细胞反应性坎普他汀类似物的结构可以由式 $\text{A}-(\text{L}^{\text{Pj}})_j-\text{M}$ 表示,其中j通常是在1-10之间,且每个 $\text{L}^{\text{Pj}}$ 独立地选自在上述段落中描述的部分。在许多实施方案中,L包含一个或多个含碳链诸如 $-(\text{CH}_2)_n-$ 和/或 $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$ ,其彼此共价连接和/或与细胞反应性官能团或坎普他汀类似物连接,例如,通过由2个相容的反应性官能团的反应产生的部分(例如,酰胺、酯或醚部分)。在某些实施方案中,L

包含寡(乙二醇)部分和/或饱和的烷基链。在某些实施方案中,L包含 $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_p\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_p(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})-$ 。在某些实施方案中,选择m、n和p,使得链中的碳的数目是1-500,例如,2-400、2-300、2-200、2-100、2-50、4-40、6-30或8-20。在某些实施方案中,m是2-10,n是1-500,和/或p是2-10。在某些实施方案中,m是2-10,n是1-400,和/或p是2-10。在某些实施方案中,m是2-10,n是1-300,和/或p是2-10。在某些实施方案中,m是2-10,n是1-200,和/或p是2-10。在某些实施方案中,m是2-10,n是1-100,和/或p是2-10。在某些实施方案中,m是2-10,n是1-50,和/或p是2-10。在某些实施方案中,m是2-10,n是1-25,和/或p是2-10。在某些实施方案中,m是2-10,n是1-8,和/或p是2-10。任选地,至少一个 $-\text{CH}_2-$ 被 $\text{CH}-\text{R}$ 替代,其中R可以是任意取代基。任选地,至少一个 $-\text{CH}_2-$ 被杂原子、环系、酰胺、酯或醚部分替代。在某些实施方案中,L不包含在最长链中具有超过3个碳原子的烷基。在某些实施方案中,L不包含在最长链中具有超过4、5、6、7、8、9、10或11个碳原子的烷基。

[0133] 在本发明的某些实施方案中,A包含细胞反应性官能团J和包含连接部分 $L^{P1}$ 和反应性官能团的接头 $L^1$ ,所述反应性官能团与坎普他汀类似物反应以产生A-M。在某些实施方案中,使用包含2个反应性官能团和连接部分 $L^{P2}$ 的双功能接头 $L^2$ 。L的反应性官能团与A和M的适当的反应性官能团反应,以产生细胞反应性坎普他汀类似物A-L-M。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物包含含有连接部分 $L^{P3}$ 的接头 $L^3$ 。例如,如下面讨论的,包含反应性官能团的接头可以存在于N或C末端处,或者包含反应性官能团的部分可以经由接头连接至N或C末端。因而,L可以含有多个连接部分 $L^P$ ,所述连接部分 $L^P$ 例如由A贡献,由用于连接A和M的接头贡献,和/或由坎普他汀类似物贡献。应该理解,当存在于结构A-L-M中时,在反应之前存在于 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 等中的某些反应性官能团将经历反应,使得所述反应性官能团的仅一部分将存在于最终的结构A-L-M中,且所述化合物将含有由所述官能团的反应形成的部分。一般而言,如果化合物含有2个或更多个连接部分,所述连接部分可以相同或不同,且可以在不同的实施方案中独立地选择。多个连接部分 $L^P$ 可以彼此连接以形成更大的连接部分L,且至少一些这样的连接部分可以具有与其连接的一个或多个坎普他汀类似物和/或细胞反应性官能团。在包含多个坎普他汀类似物的分子中,所述坎普他汀类似物可以相同或不同,且如果不同的话,可以独立地进行选择。这同样适用于连接部分和反应性官能团。本发明包括包含一个或多个细胞反应性官能团的多价坎普他汀类似物的用途,包含一个或多个细胞反应性官能团的坎普他汀类似物的多联体的用途。在某些实施方案中,至少一个连接是稳定的非共价连接诸如生物素/抗生物素蛋白(抗生物素链菌素)连接或大约等同强度的其它非共价连接。

[0134] 在某些实施方案中,细胞反应性坎普他汀类似物包含这样的坎普他汀类似物:其中SEQ ID NO:3-36中的任一个在N末端、C末端或二者处延长一个或多个氨基酸,其中至少一个氨基酸具有包含反应性官能团的侧链,所述反应性官能团是例如:伯胺或仲胺、巯基、羧基(其可以作为羧酸盐基团存在)、胍基、酚基团、吡啶环、硫醚或咪唑环。在某些实施方案中,所述氨基酸是L-氨基酸。在某些实施方案中,任意一个或多个氨基酸是D-氨基酸。如果添加多个氨基酸,所述氨基酸可以独立地进行选择。在某些实施方案中,使用所述反应性官能团(例如,伯胺或仲胺)作为用于添加包含细胞反应性官能团的部分的靶标。具有包含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸包括赖氨酸(Lys)和通式结构 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 的二氨基甲

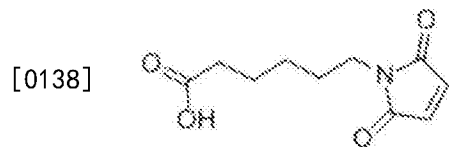
酸,诸如2,3-二氨基丙酸(dapa)、2,4-二氨基丁酸(daba)和鸟氨酸(orn),其中n分别为1(dapa)、2(daba)和3(orn)。在某些实施方案中,至少一个氨基酸是半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、酪氨酸、色氨酸、蛋氨酸或组氨酸。半胱氨酸具有包含巯基的侧链。天冬氨酸和谷氨酸具有包含羧基(可离子化为羧酸盐基团)的侧链。精氨酸具有包含胍基的侧链。酪氨酸具有包含酚基团(可离子化为酚盐基团)的侧链。色氨酸具有包含吲哚环的侧链,包括例如色氨酸。蛋氨酸具有包含硫醚基的侧链,包括例如蛋氨酸。组氨酸具有包含咪唑环的侧链。可以得到多种包含侧链(其包含一个或多个这样的反应性官能团)的非标准氨基酸,包括天然存在的氨基酸和在自然界中不存在的氨基酸。参见,例如,Hughes,B.(编),Amino Acids,Peptides and Proteins in Organic Chemistry,第1-4卷,Wiley-VCH(2009-2011);Blaskovich,M.,Handbook on Syntheses of Amino Acids General Routes to Amino Acids,Oxford University Press,2010。本发明包括这样的实施方案,其中使用一个或多个非标准氨基酸来提供用于添加包含细胞反应性官能团的部分的靶标。在化合物合成过程中,可以适当地保护任意一个或多个氨基酸。例如,在涉及靶氨基酸侧链的反应过程中,可以保护一个或多个氨基酸。在某些其中使用含巯基的氨基酸作为用于添加包含细胞反应性官能团的部分的靶标的实施方案中,当通过在其它氨基酸(诸如半胱氨酸)之间形成分子内二硫键而环化化合物时,保护巯基。

[0135] 在该段落的讨论中,使用具有含胺基团的侧链的氨基酸作为一个例子。本发明包括类似的实施方案,其中使用具有含不同反应性官能团的侧链的氨基酸。在某些实施方案中,具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸经由肽键直接连接至SEQ ID NO:3-36中的任一个的N末端或C末端。在某些实施方案中,具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸经由连接部分连接至SEQ ID NO:3-36中的任一个的N末端或C末端,所述连接部分可以含有任意一种或多种上述的连接部分。在某些实施方案中,至少2个氨基酸连接至任一端或两端。所述2个或更多个连接的氨基酸可以通过肽键彼此连接,或者至少一些连接的氨基酸可以通过连接部分彼此连接,所述连接部分可以含有任意一种或多种本文中描述的连接部分。因而,在某些实施方案中,细胞反应性坎普他汀类似物包含式B1-R1-M1-R2-B2的坎普他汀类似物部分M,其中M1代表SEQID NO:3-36中的任一个,R1或R2可以缺少,R1和R2中的至少一个包含具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸,且B1和B2是任选地存在的封端部分。R1和/或R2可以通过肽键或非肽键连接至M1。R1和/或R2可以包含连接部分L<sup>P3</sup>。例如,R1可以具有式M2-L<sup>P3</sup>,和/或R2可以具有式L<sup>P3</sup>-M2,其中L<sup>P3</sup>是连接部分,且M2包含至少一个具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸。例如,M2可以是Lys或包含Lys的氨基酸链。在某些实施方案中,L<sup>P3</sup>包含一个或多个氨基酸,或由其组成。例如,L<sup>P3</sup>的长度可以是1至约20个氨基酸,例如,4-20个氨基酸的长度。在某些实施方案中,L<sup>P3</sup>包含多个Gly、Ser和/或Ala残基,或由其组成。在某些实施方案中,L<sup>P3</sup>不包含含反应性SH基团的氨基酸,诸如Cys。在某些实施方案中,L<sup>P3</sup>包含寡(乙二醇)部分和/或饱和的烷基链。在某些实施方案中,L<sup>P3</sup>经由酰胺键连接至M1的N末端氨基酸。在某些实施方案中,L<sup>P3</sup>经由酰胺键连接至M1的C末端氨基酸。所述化合物可以通过添加其它连接部分和/或氨基酸而在任一端或两端进一步延伸。所述氨基酸可以相同或不同,且如果不同的话,可以独立地进行选择。在某些实施方案中,使用2个或更多个具有含反应性官能团的侧链的氨基酸,其中所述反应性官能团可以相同或不同。可以使用2个或更多个反应性官能团作为用于添加2个或更多个部分的靶标。在某些实施方案中,添加2个或更多个细胞反应性部分。在某些实施

方案中,添加细胞反应性部分和靶向部分。在某些实施方案中,在缉拿该氨基酸掺入肽链中以后,将接头和/或细胞反应性部分连接至氨基酸侧链。在某些实施方案中,在将氨基酸用于合成细胞反应性坎普他汀类似物之前,接头和/或细胞反应性部分已经连接至氨基酸侧链。例如,可以使用具有与其侧链连接的接头的Lys衍生物。所述接头可以包含细胞反应性官能团,或者可以随后进行修饰以包含细胞反应性官能团。

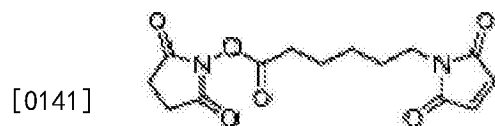
[0136] 在下面更详细地描述了某些细胞反应性坎普他汀类似物。在以下的讨论中,使用具有氨基酸序列Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr(SEQ ID NO:37)(对应于SEQ ID NO:28的坎普他汀类似物,其中在SEQ ID NO:37中的星号代表活性化合物中通过二硫键连接的半胱氨酸,且(1Me)Trp代表1-甲基-色氨酸))的肽作为一个示例性的坎普他汀类似物部分;使用马来酰亚胺(缩写为Mal)作为细胞反应性官能团的一个例子;使用(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>和(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>作为连接部分的例子;使用赖氨酸作为包含反应性官能团的氨基酸的一个例子(在某些化合物中),和分别使用N和C末端的乙酰化和酰胺化作为在某些化合物中任选地存在的示例性封端部分,且分别用斜体字表示,即,作为Ac和NH<sub>2</sub>。应当理解,使用多种合成方案和使用多种前体,可以制备化合物。下面的不同合成方案和前体的讨论无意限制本发明。一般而言,下面描述的任意化合物的任意特征可以与下面或在本文别处描述的其它化合物的特征自由组合,且本发明包括这样的实施方案。

[0137] 在某些实施方案中,所述细胞反应性部分由包含马来酰亚胺基团(作为细胞反应性官能团)和链烷酸(RCOOH)(其中R是烷基)的细胞反应性的化合物提供。例如,可以使用下面描述的6-马来酰亚胺基己酸(Mal-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-COOH)。



[0139] 化合物I

[0140] 在某些实施方案中,所述细胞反应性部分由链烷酸衍生物提供,在所述链烷酸衍生物中,羧酸部分已经被激活,例如,OH部分已经被转化成更好的离去基团。例如,化合物I的羧基可以与EDC反应,随后与NHS(其可以任选地提供为水溶性的磺基-NHS)反应,从而产生6-马来酰亚胺基己酸的N-羟基琥珀酰亚胺酯衍生物,即,6-马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯(下面描述)。



## 化合物 II

[0142] SEQ ID NO:37的化合物可以在N末端和/或C末端处被修饰,以产生细胞反应性坎普他汀类似物。例如,通过与Ile的N末端氨基反应,可以使用化合物II来制备下述细胞反应性坎普他汀类似物。

[0143] 马来酰亚胺-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(=O)-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:38)。应当理解,在SEQ ID NO:38中,-C(=O)部分经由C-N键连接至邻近的C末端氨基酸(Ile),其中所述N是氨基酸的一部分,且未显示。

[0144] 在其它实施方案中,马来酰亚胺基团连接至Thr的C末端,从而产生下述细胞反应性坎普他汀类似物:

[0145] Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-(C=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-马来酰亚胺(SEQ ID NO:39)。

[0146] 在某些实施方案中,细胞反应性坎普他汀类似物可以使用双功能接头(例如,异双功能接头)来合成。下面显示了一种示例性的异双功能接头,其包含(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>和(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(其中m=2)部分:



[0148] 化合物III

[0149] 化合物III包含作为细胞反应性官能团的马来酰亚胺基团和可与氨基(例如,N末端氨基或氨基酸侧链的氨基)容易地反应的NHS酯部分。

[0150] 使用SEQ ID NO:37的坎普他汀类似物,可以使用化合物III的一个实施方案(其中n=2)来制备下述细胞反应性坎普他汀类似物:

[0151] 马来酰亚胺-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:40)

[0152] 应当理解,在SEQ ID NO:40的化合物中,-C(=O)部分经由C-N键连接至N末端氨基酸(Ile残基),其中所述N是氨基酸的一部分,且未显示。在某些实施方案中,接头具有化合物III的式,其中n≥1。本文提供了(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>部分中的n的示例性值。

[0153] 在某些实施方案中,与SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40的化合物相比,将马来酰亚胺部分连接至分子的其余部分的烷基链含有更多或更少的亚甲基单元,寡(乙二醇)部分含有更多或更少的乙二醇单元,和/或存在更多或更少的侧接寡(乙二醇)部分的任一侧或两侧的亚甲基单元。下面显示了解释几个这样的变体的示例性细胞反应性坎普他汀类似物(SEQ ID NO:41-46):

[0154] 马来酰亚胺-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:41)

[0155] 马来酰亚胺-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:42)

[0156] 马来酰亚胺-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:43)

[0157] 马来酰亚胺-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:44)

[0158] 马来酰亚胺-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:45)

[0159] 马来酰亚胺-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:46)

[0160] 在某些实施方案中,将SEQ ID NO:37延长以包含在肽的N或C末端处的Lys残基,例

如,如下面关于C末端连接所解释的:

[0161] Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-Lys-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:47)。

[0162] 在某些实施方案中,将Lys残基经由肽接头连接至SEQ ID NO:37的N或C末端,例如,如下面关于C末端连接所解释的:

[0163] Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-(Gly)<sub>5</sub>-Lys-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:48)。

[0164] 在某些实施方案中,将包含伯胺或仲胺的接头添加至坎普他汀类似物的N或C末端。在某些实施方案中,所述接头包含烷基链和/或寡(乙二醇)部分。例如,可以使用NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)OH(例如,8-氨基-3,6-二氧杂辛酸(AEEAc)或11-氨基-3,6,9-三氧杂十一烷酸)或其NHS酯(例如,8-氨基-3,6-二氧杂辛酸或11-氨基-3,6,9-三氧杂十一烷酸的NHS酯)。在某些实施方案中,得到的化合物如下(其中由接头贡献的部分以粗体显示):

[0165] NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>C(=O)-Ile-Cys-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:49)

[0166] NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:50)

[0167] 在某些实施方案中,将Lys残基经由包含非肽部分的肽接头连接至SEQ ID NO:37的N或C末端。例如,所述接头可以包含烷基链、寡(乙二醇)链和/或环系。在某些实施方案中,使用8-AEEAc或其NHS酯,从而产生(在C末端处连接Lys的情况下)下述化合物(其中由8-AEEAc贡献的部分以粗体显示):

[0168] Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-C(=O)-Lys-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:51)

[0169] 应当理解,在SEQ ID NO:49和50中,将-C(=O)部分经由C-N键连接至邻近的Ile残基,其中所述N是氨基酸的一部分,且未显示。类似地,在SEQ ID NO:51中,将-C(=O)部分经由C-N键连接至邻近的Lys残基,其中所述N是氨基酸的一部分,且未显示。还应当理解,在SEQ ID NO:51中,将NH部分经由C-N键连接至邻近的N末端氨基酸(Thr),其中所述C是氨基酸的羰基碳,且未显示。

[0170] 可以在伯胺基团处容易地修饰SEQ ID NO:47-51的化合物,以产生细胞反应性坎普他汀类似物。例如,SEQ ID NO:47-51的化合物(或包含伯胺或仲胺和坎普他汀类似物部分的其它化合物)可以与6-马来酰亚胺基己酸N-琥珀酰亚胺基酯反应,以产生下述细胞反应性坎普他汀类似物:

[0171] Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-Lys-(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Mal)-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:52)。

[0172] Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-(Gly)<sub>5</sub>-Lys--(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Mal)-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:53)。

[0173] Mal-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-(C(=O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>C(=O)-Ile-Cys-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:54)

[0174] Mal-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-(C(=O)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)-Ile-Cys-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:55)

[0175] Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr

[0176] -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-C(=O)-Lys-(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Mal)-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:56)

[0177] 在另一个实施方案中,将细胞反应性坎普他汀类似物表示为:Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-Lys-C(=O)-CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Mal)-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:57)。

[0178] 本发明提供了SEQ ID NO:38-57的变体,其中-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-(序列ID号:71)被包含任意其它坎普他汀类似物(例如,SEQ ID NO3-27或29-36中的任一个)的氨基酸序列的氨基酸序列替代,前提条件是,存在于坎普他汀类似物的N末端和/或C末端处的封端部分可以缺失,被接头(其可以包含封端部分)替代,或连接至存在于对应变体中的不同N或C末端氨基酸。

[0179] 在本发明的不同实施方案中使用的其它双功能交联剂(其包含作为细胞反应性部分的马来酰亚胺和作为胺反应性部分的NHS酯)包括,例如,4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸琥珀酰亚胺基酯(SMPB);4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺基酯(SMCC);N-γ-马来酰亚胺基丁酰基-氧基琥珀酰亚胺酯(GMBS)。磺酸酯向NHS环的添加会产生水溶性的类似物,诸如(4-碘乙酰基)-氨基苯甲酸磺基-琥珀酰亚胺基酯(磺基-SIAB)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸磺基-琥珀酰亚胺基酯(磺基-SMCC)、4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸磺基-琥珀酰亚胺基酯(磺基-SMPB)、磺基-N-γ-马来酰亚胺基丁酰基-氧基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)等,这可以避免对有机溶剂的需要。在某些实施方案中,使用长链形式的前述任一种,其包含在NHS酯部分和分子的其它部分之间的间隔臂。所述隔离物可以包含,例如,烷基链。一个例子是琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧基-[6-酰氨基己酸酯]。

[0180] 在某些实施方案中,使用包含NHS酯(作为胺反应性部分)和碘代乙酰基(可与巯基反应)的双功能接头。这样的接头包括,例如,(4-碘乙酰基)-氨基苯甲酸N-琥珀酰亚胺基酯(SIAB);6-[(碘代乙酰基)-氨基]己酸琥珀酰亚胺基酯(SIAX);6-[6-(((碘代乙酰基)氨基)-己酰基)氨基]己酸琥珀酰亚胺基酯(SIAXX);4-((碘代乙酰基)氨基)甲基)-环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺基酯(SIAC);6-(((4-(碘代乙酰基)氨基)甲基)-环己烷-1-羧基)氨基]己酸琥珀酰亚胺基酯(SIACX)。

[0181] 在某些实施方案中,使用包含NHS酯(作为胺反应性部分)和吡啶基二硫化物基团(作为可与巯基反应的细胞反应性部分)的双功能接头。例子包括:3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀酰亚胺基酯(SPDP);琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯(SMPT)和包含在NHS环上的磺酸酯和/或含有烷基链的隔离物的形式,所述隔离物在NHS酯部分和分子的其余部分之间(例如,6-(3-[2-吡啶基二硫基]-丙酰氨基)己酸琥珀酰亚胺基酯)(LC-SPDP)。可以使用包括额外的或不同的部分的这类接头的变体。例如,可以在隔离物中使用更长或更短的烷基链,或者使用寡(乙二醇)部分替代烷基链。

[0182] 一般而言,可以使用多种方案来合成细胞反应性坎普他汀类似物。包含细胞反应性官能团和接头的细胞反应性的化合物经常可以作为预形成的结构单元来购买。例如,6-马来酰亚胺基己酸和6-马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯可以从不同的供应商购买。可替代地,这样的化合物可以使用本领域已知的方法来合成。关于用于合成缀合物的方法和试剂的讨论,参见,例如,Keller O,Rudinger J.Helv Chim Acta.58(2):531-41,1975和

Hashida S,等人,J Appl Biochem.,6(1-2):56-63,1984。也参见,Hermanson,G.出处同上,和其中的参考文献。一般而言,本发明包括生产包含坎普他汀类似物部分和细胞反应性官能团的化合物的任意方法,和得到的化合物。

[0183] 在某些实施方案中,在直链肽的合成中使用具有与侧链连接的接头的氨基酸。所述直链肽可以使用本领域已知的标准肽合成方法(例如,标准的固相肽合成)来合成。然后将直链肽环化(例如,通过Cys残基的氧化以形成分子内二硫键)。然后可以使环状化合物与包含细胞反应性官能团的接头反应。在其它实施方案中,使包含细胞反应性官能团的部分在其环化之前与直链化合物反应。一般而言,可以适当地保护反应性官能团,以避免在合成细胞反应性坎普他汀类似物的过程中不希望的彼此反应。可以在反应过程中保护细胞反应性官能团、任意氨基酸侧链和/或肽的任一端或两端,并随后去保护。例如,可以保护Cys残基的SH基团和/或SH反应性部分诸如马来酰亚胺,直到环化以后,以避免它们之间的反应。至少部分地基于特定反应性官能团在合理时间段内达到合理收率的要求,选择反应条件。可以调节温度、pH和试剂的浓度,以实现期望的反应程度或速率。参见,例如,Hermanson,出处同上。可以纯化期望的产物,例如,以除去未反应的包含细胞反应性官能团的化合物、未反应的坎普他汀类似物、接头、在反应中已经产生的除了期望的细胞反应性坎普他汀类似物以外的产物、存在于反应混合物中的其它物质等。用于制备细胞反应性坎普他汀类似物的组合物和方法,以及在合成中使用的中间体,是本发明的方面。

[0184] 在本发明的某些方面,将上述的接头用于生产包含诸如聚乙二醇(PEG)链或其它聚合物等部分的坎普他汀类似物,所述部分会例如稳定化合物、延长其在体内的寿命、增强其可溶性、降低其免疫原性和/或增强其对降解的抗性。不以任何方式限制本发明,这样的部分在本文中可以被称作“清除率降低部分”(CRM),且包含这样的部分的坎普他汀类似物可以被称作“长效坎普他汀类似物”。在某些实施方案中,当以10mg/kg的剂量静脉内施用给人类或非人灵长类动物时,长效坎普他汀类似物具有至少1天(例如,1-3天、3-7天、7-14天或14-28天)的平均血浆半衰期。在某些实施方案中,在以10mg/kg的剂量静脉内施用给人类或非人灵长类动物以后,与具有相同氨基酸序列(和,如果适用的话,一个或多个封端部分)、但是不包含CRM的对应坎普他汀类似物的平均血浆半衰期相比,长效坎普他汀类似物的平均血浆半衰期增加了至少2倍,例如,增加了2-5、5-10、10-50或50-100倍。如上面所指出的,在某些实施方案中,SEQ ID NO:3-36中的任一个的坎普他汀类似物在N末端、C末端或二者延长了一个或多个氨基酸,其中至少一个氨基酸具有包含反应性官能团(诸如伯胺或仲胺)、巯基、羧基(其可以作为羧酸盐基团存在)、胍基、酚基团、吡啶环、硫醚或咪唑环的侧链,所述侧链会促进与反应性官能团的缀合,以将CRM连接至坎普他汀类似物。应该理解,不包含CRM的对应坎普他汀类似物也可以缺少一个或多个这样的氨基酸,所述氨基酸存在于它所对应的长效坎普他汀类似物中。因而,包含SEQ ID NO:3-36中的任一个且缺少CRM的对应坎普他汀类似物将被理解为分别具有与SEQ ID NO:3-36“相同的氨基酸序列”。例如,包含SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36的氨基酸序列且缺少CRM的对应坎普他汀类似物将被理解为分别具有与SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36“相同的氨基酸序列”。在某些实施方案中,血浆半衰期是单次静脉内施用以后的终末半衰期。在某些实施方案中,血浆半衰期是在多次静脉内施用以后已经达到稳态后的终末半衰期。在某些实施方案中,在单次静脉内施用给灵长类动物以后,或者在多次静脉内施用以后,长效坎普他汀类似物在血

浆中达到的C<sub>max</sub>是不包含CRM的对应坎普他汀类似物的C<sub>max</sub>的至少5倍,例如,5-50倍。在某些实施方案中,在单次静脉内施用给灵长类动物以后,或者在多次静脉内施用以后,长效坎普他汀类似物在血浆中达到的C<sub>max</sub>是不包含CRM的对应坎普他汀类似物的C<sub>max</sub>的10-20倍。在某些实施方案中,灵长类动物是人。在某些实施方案中,灵长类动物是非人灵长类动物,例如,猴,诸如食蟹猴或恒河猴。在某些实施方案中,在以10mg/kg剂量静脉内施用给人类或非人灵长类动物以后的前24小时中,与对应坎普他汀类似物的肾清除率相比,长效坎普他汀类似物的肾清除率下降了至少2倍,例如,2-5、5-10、10-50或50-100倍。使用例如UV、HPLC、质谱法(MS)、或针对CRM的抗体、或这样的方法的组合(诸如LC/MS或LC/MS/MS),可以测量血液和/或尿样品中的坎普他汀类似物的浓度。使用本领域普通技术人员已知的方法,可以确定药代动力学参数诸如半衰期和清除率。用例如WinNonlin软件v5.2(Pharsight Corporation, St. Louis, MO),可以执行药代动力学分析。

[0185] 在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物的摩尔活性为具有相同氨基酸序列(和,如果适用的话,一个或多个封端部分)、但是不包含CRM的对应坎普他汀类似物的活性的至少约10%、20%、30%,例如,30%至40%、30%至50%、30%至60%、30%至70%、30%至80%、30%至90%或更多。在某些其中长效坎普他汀类似物包含多个坎普他汀类似物部分的实施方案中,长效坎普他汀类似物的摩尔活性是所述坎普他汀类似物部分的活性总和的至少约10%、20%或30%,例如,30%至40%、30%至50%、30%至60%、30%至70%、30%至80%、30%至90%或更多。在某些实施方案中,聚乙二醇(PEG)包含具有至少500道尔顿的分子量的(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分。在某些实施方案中,上述的接头包含具有约500、1,000、1,500、2,000、5,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000至100,000道尔顿的平均分子量的(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分。“平均分子量”表示数量平均分子量。在某些实施方案中,(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分的多分散性D是1.0005至1.50,例如,1.005至1.10、1.15、1.20、1.25、1.30、1.40或1.50,或1.0005和1.50之间的任意值。

[0186] 在某些实施方案中,(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分是单分散的,且(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分的多分散性是1.0。这样的单分散的(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分是本领域已知的,且可商购得自Quanta BioDesign (Powell, OH),并且包括(通过非限制性例子)其中n为2、4、6、8、12、16、20或24的单分散部分。

[0187] 在某些实施方案中,化合物包含多个(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分,其中所述(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分的总分子量是约1,000、5,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000至100,000道尔顿。在某些实施方案中,所述化合物包含多个具有确定长度的(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分,例如,n=4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28或30或更大。在某些实施方案中,所述化合物包含足够数目的具有确定长度的(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分,以产生在约1,000、5,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000至100,000道尔顿之间的所述(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分的总分子量。在某些实施方案中,n是约30至约3000。在某些实施方案中,将坎普他汀类似物部分连接在直链PEG的每个末端。可以使用在链的每个末端处具有反应性官能团的双功能PEG,例如,如上所述。在某些实施方案中,所述反应性官能团是相同的,而在某些实施方案中,不同反应性官能团存在于每个末端处。在某些实施方案中,提供多个(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>部分作为支链结构。所述支链可以连接至线性聚合物主链(例如,作为梳状结构),或者可以从一个或多个中心基团发散,例如,作为星形结构。在某些实施方案

中,支链分子具有3-10个 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 链。在某些实施方案中,支链分子具有4-8个 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 链。在某些实施方案中,支链分子具有10、9、8、7、6、5、4或3个 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 链。在某些实施方案中,星形分子具有10-100个、10-50个、10-30个或10-20个从中心基团发散的 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 链。在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物因而可以包含,例如,3-10个坎普他汀类似物部分,例如,4-8个坎普他汀类似物部分,每个部分经由在链末端处的官能团连接至 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 链。在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物可以包含,例如,10-100个坎普他汀类似物部分,每个部分经由在链末端处的官能团连接至 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 链。在某些实施方案中,支链或星形PEG的分支(有时被称作“臂”)含有大约相同数目的 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ 部分。在某些实施方案中,至少一些分支长度可以不同。应该理解,在某些实施方案中,一个或多个 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 链不具有与其连接的坎普他汀类似物部分。在某些实施方案中,所述链的至少约30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%具有与其连接的坎普他汀类似物部分。

[0188] 在本文描述的类和化合物中,如下描绘聚乙二醇部分:将氧原子置于重复单元的右侧或重复单元的左侧。在仅描绘一种取向的情况下,本发明包括给定化合物或类的聚乙二醇部分的两种取向(即, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 和 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ),或者在化合物或类含有多个聚乙二醇部分的情况下,本公开内容包括所有取向组合。

[0189] 下面解释了一些示例性的包含反应性官能团的单功能PEG的通式。为了解释目的,描绘了其中反应性官能团包含NHS酯的通式,但是可以使用其它反应性官能团,例如,如上所述。在某些实施方案中,将 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 描述为在左末端处以甲氧基 $(\text{OCH}_3)$ 终止,但是应该理解,在下面和在本文别处描绘的链可以以不同的OR部分(例如,脂族基团、烷基、低级烷基或任意其它合适的PEG末端基团)或OH基团终止。还应当理解,在不同的实施方案中,除了描述的那些以外的部分可以连接 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分和NHS基团。

[0190] 在某些实施方案中,单功能PEG具有式A:



[0192] 式A

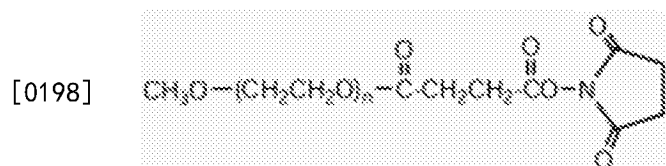
[0193] 其中“反应性官能团”和 $n$ 如上面所定义,并描述在本文中的类和亚类中;

[0194]  $\text{R}^1$ 是氢、脂族或任意合适的末端基团;且

[0195] T是共价键或 $\text{C}_{1-12}$ 直链或支链烃链,其中T的一个或多个碳单元任选地和独立地被 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^x)-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^x)\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^x)-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^x)\text{SO}_2-$ 或 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^x)-$ 替代;且

[0196] 每个 $\text{R}^x$ 独立地是氢或 $\text{C}_{1-6}$ 脂族。

[0197] 示例性的式A的单功能PEG包括:



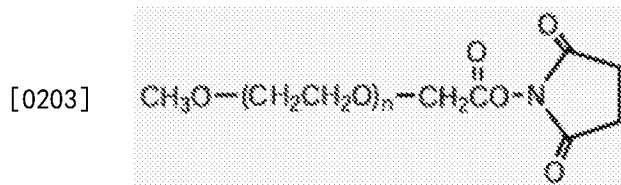
[0199] 式I

[0200] 在式I中,包含反应性官能团的部分具有通式结构 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_m-\text{COO}-\text{NHS}$ ,其中 $m=2$ 。在某些实施方案中,单功能PEG具有式I的结构,其中 $m$ 是1-10,例如,1-5。例如,在某些实施

方案中,  $m$  是 3, 如下所示:

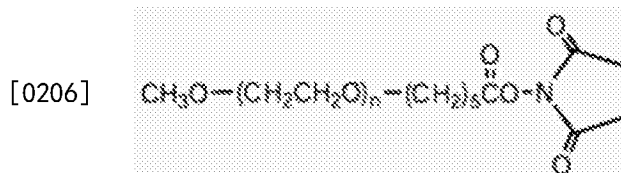


[0202] 式 Ia

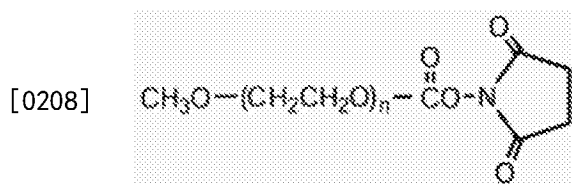


[0204] 式 II

[0205] 在式 II 中, 包含反应性官能团的部分具有通式结构  $-(\text{CH}_2)_m-\text{COO}-\text{NHS}$ , 其中  $m=1$ 。在某些实施方案中, 单功能 PEG 具有式 II 的结构, 其中  $m$  是 1-10 (例如, 其中  $m$  是 5, 如下面式 III 所示), 或其中  $m$  是 0 (如下面式 IIIa 所示)。



[0207] 式 III

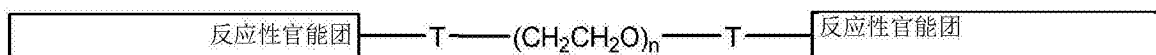


[0209] 式 IIIa

[0210] 在某些实施方案中, 双功能的直链 PEG 包含在它的每个末端处具有反应性官能团的部分。所述反应性官能团可以是相同的 (同双功能的) 或不同的 (异双功能的)。在某些实施方案中, 双功能 PEG 的结构可以是对称的, 其中使用相同部分将反应性官能团连接至在  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$  链的每个末端处的氧原子。在某些实施方案中, 使用不同部分将 2 个反应性官能团连接至分子的 PEG 部分。下面描绘了示例性的双功能 PEG 的结构。为了解释目的, 描绘了其中反应性官能团包含 NHS 酯的通式, 但是可以使用其它反应性官能团。

[0211] 在某些实施方案中, 双功能的直链 PEG 具有式 B:

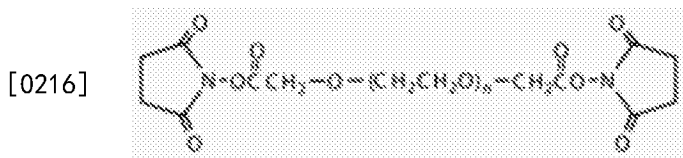
[0212]



[0213] 式 B

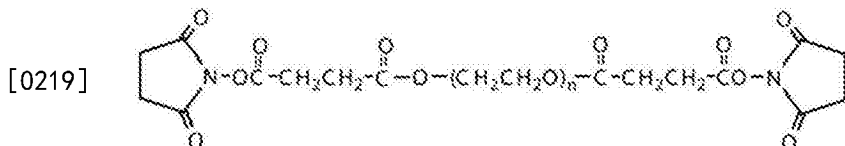
[0214] 其中每个 T 和“反应性官能团”独立地如上定义, 并描述在本文中的类和亚类中, 且  $n$  如上面所定义, 并描述在本文中的类和亚类中。

[0215] 示例性的式 B 的双功能 PEG 包括:



[0217] 式IV

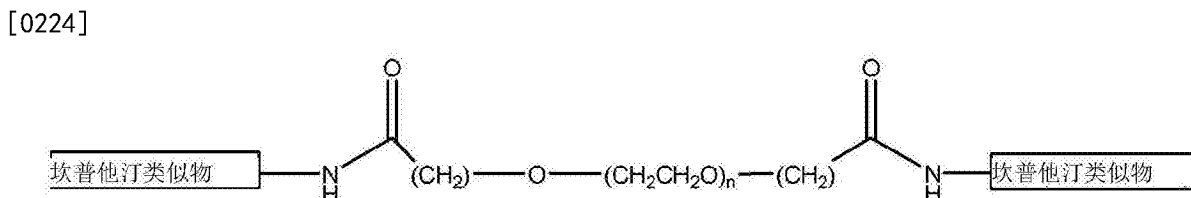
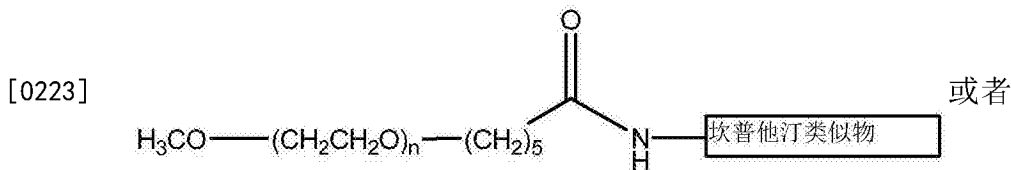
[0218] 在式IV中,包含反应性官能团的部分具有通式结构 $-(CH_2)_m-COO-NHS$ ,其中 $m=1$ 。在某些实施方案中,双功能PEG具有式IV的结构,其中 $m$ 是1-10,例如,1-5。



[0220] 式V

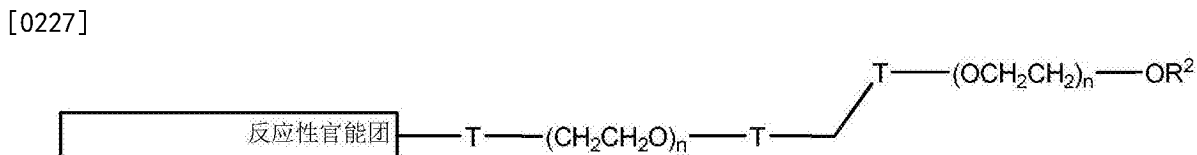
[0221] 在式V中,包含反应性官能团的部分具有通式结构 $-CO-(CH_2)_m-COO-NHS$ ,其中 $m=2$ 。在某些实施方案中,双功能PEG具有式V的结构,其中 $m$ 是1-10,例如,1-5。

[0222] 在某些实施方案中,本发明提供了含有PEG的化合物的坎普他汀类似物缀合物和本文中描述的类。在某些实施方案中,使在坎普他汀类似物上的官能团(例如,胺、羟基或硫醇基团)与具有如本文中所述的“反应性官能团”的含有PEG的化合物反应,以产生这样的缀合物。作为例子,式III和IV分别可以形成具有以下结构的坎普他汀类似物缀合物:



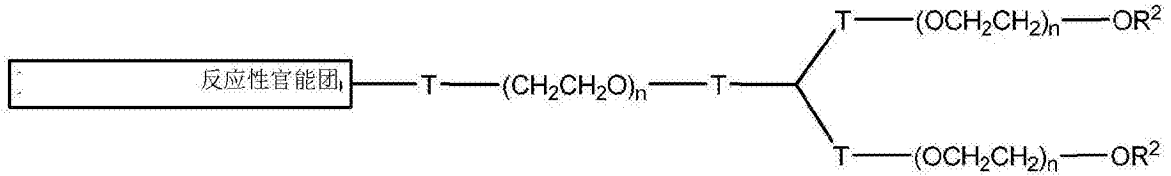
[0225] 其中, 代表胺基团在坎普他汀类似物上的连接点。在某些实施方案中,胺基团是赖氨酸侧链基团。应当理解,对应的缀合物可以用任意含有PEG的化合物和本文所述类形成,取决于反应性官能团和/或坎普他汀官能团的选择。

[0226] 在某些实施方案中,有分支的梳形或星形PEG包含这样的部分:其含有在多个 $-(CH_2CH_2O)_n$ 链的每一个的末端处的反应性官能团。所述反应性官能团可以是相同的,或者可以存在至少2种不同的基团。在某些实施方案中,有分支的梳形或星形PEG具有下式:



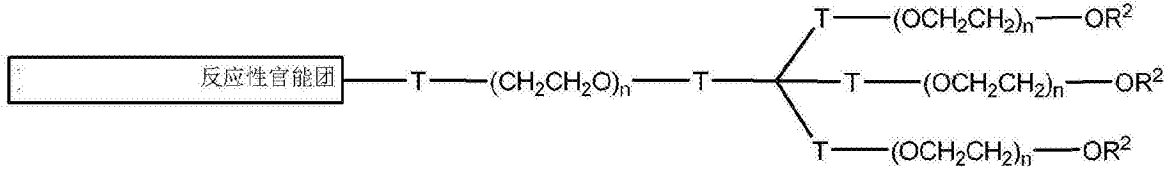
[0228] 式C

[0229]



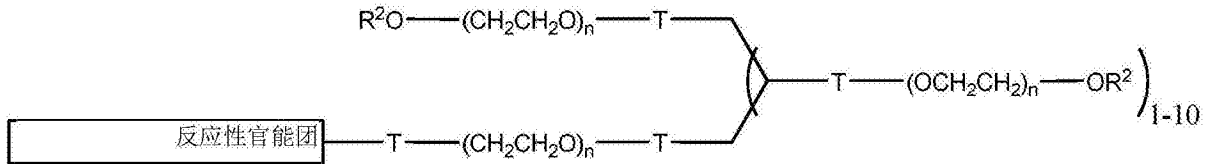
[0230] 式D

[0231]



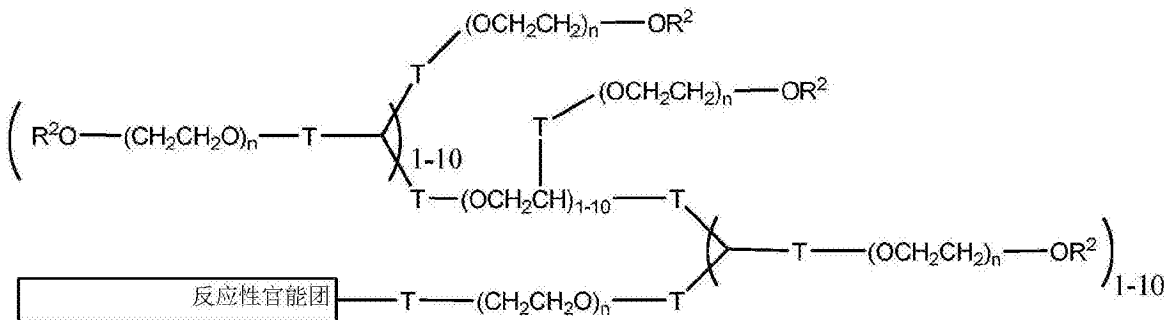
[0232] 式E

[0233]



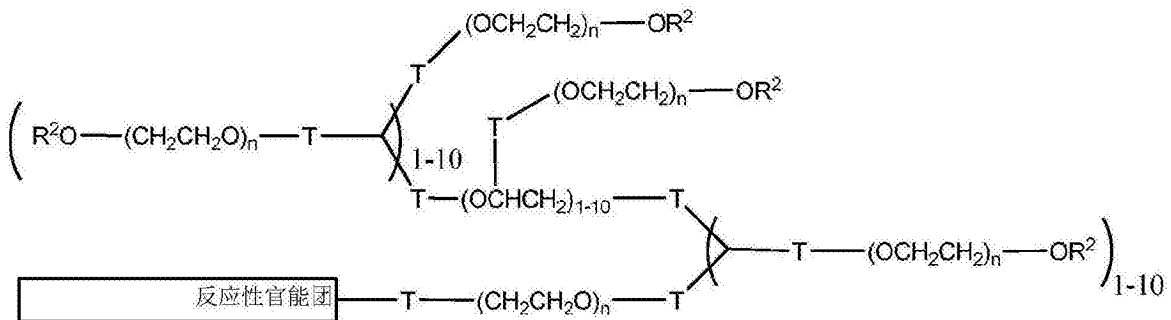
[0234] 式F

[0235]



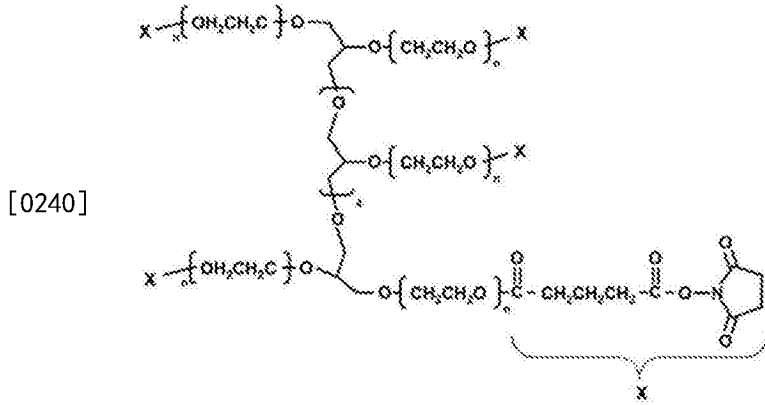
[0236] 式G

[0237]

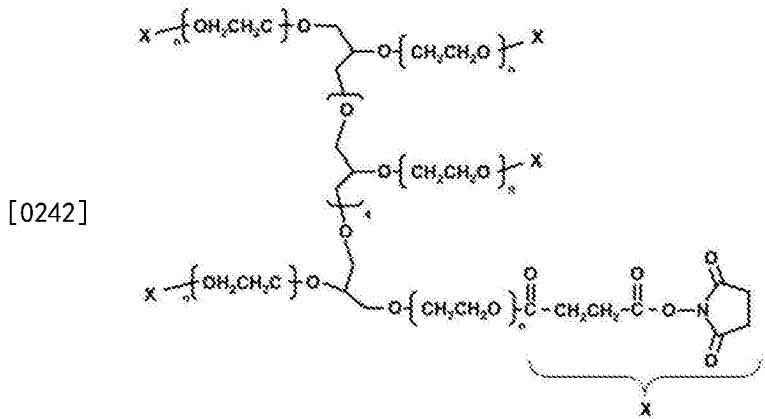


[0238] 式H

[0239] 其中每个R<sup>2</sup>独立地是“反应性官能团”或R<sup>1</sup>,且每个T、n和“反应性官能团”独立地如上定义,并描述在本文中的类和亚类中。下面描述了包含NHS部分作为反应性官能团的示例性支链PEG(具有8个臂或分支)的结构:

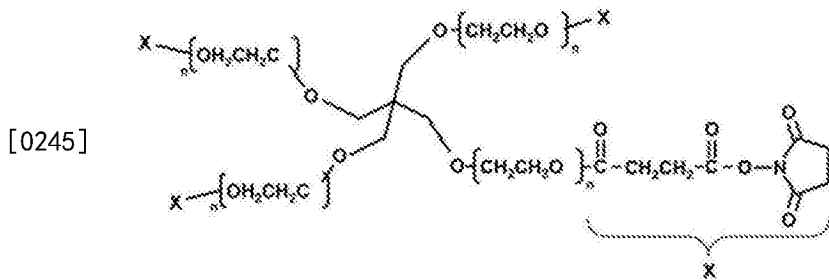


[0241] 式VI

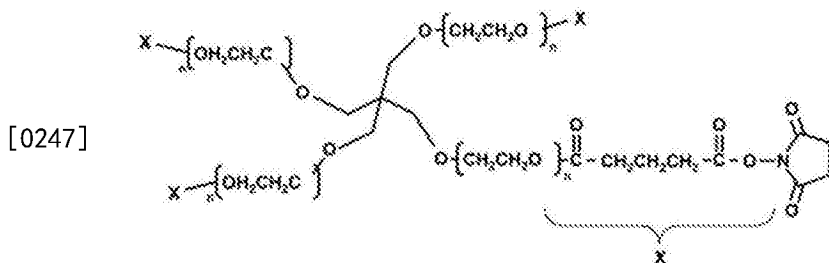


[0243] 式VII

[0244] 下面描述了包含NHS部分作为反应性官能团的示例性支链PEG(具有4个臂或分支)的结构:



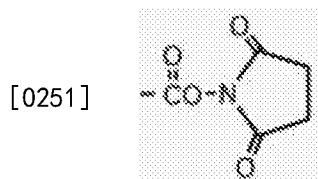
[0246] 式VIII



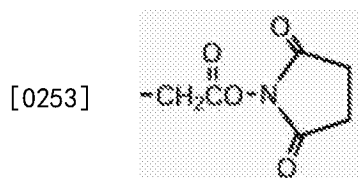
[0248] 式IX

[0249] 从主链发散的分支的数目可以变化。例如,在不同的实施方案中,在上面式VI和VII中的数目4可以变为0-10之间的任意其它整数。在某些实施方案中,一个或多个分支不含有反应性官能团,且所述分支以-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH或-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR基团终止,如上所述。

[0250] 在某些实施方案中,支链PEG具有式VII、VIII或IX(或其具有不同数目的分支的变体)的结构,前提条件是,x是

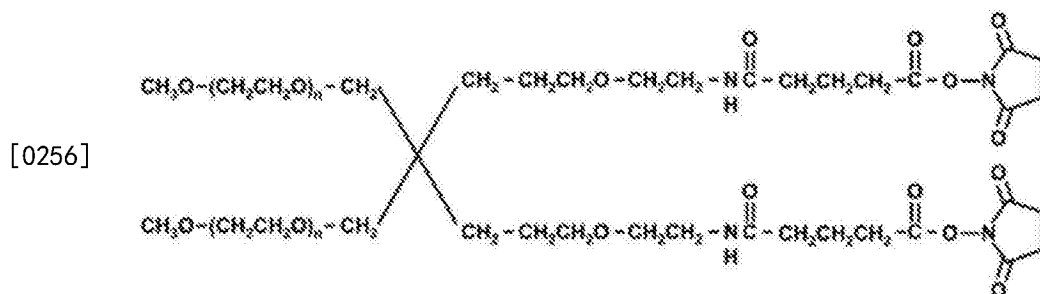


[0252] 在某些实施方案中,支链PEG具有式VII、VIII或IX(或其具有不同数目的分支的变体)的结构,前提条件是,x是

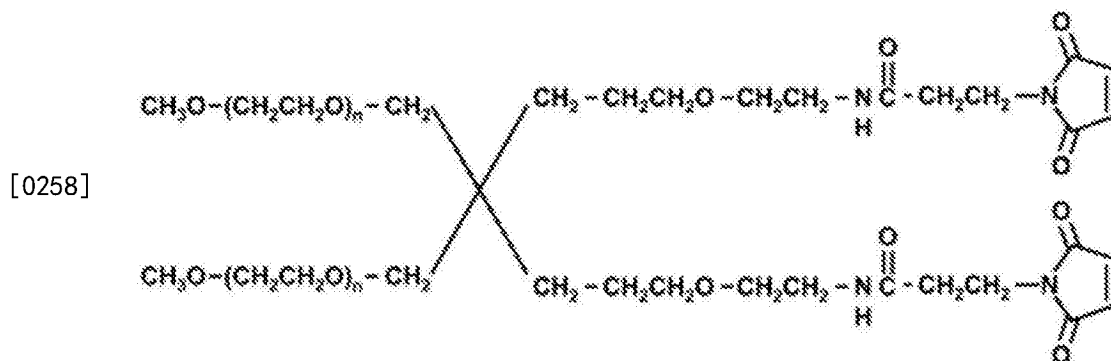


[0254] 当然,在上面的x部分中的亚甲基(CH<sub>2</sub>)基团可以替代性地包含较长的烷基链(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>,其中m是至多2、3、4、5、6、8、10、20或30,或者可以包含一个或多个本文中描述的其它部分。

[0255] 在某些实施方案中,下面描述了具有NHS或马来酰亚胺反应基团的示例性支链PEG:



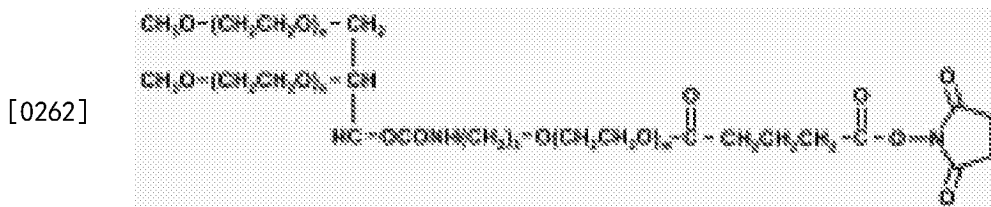
[0257] 式X



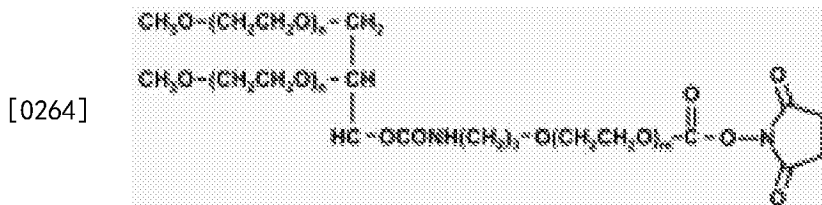
[0259] 式XI

[0260] 在某些实施方案中,使用式X或XI的变体,其中所述4个分支中的3个或每个包含反应性官能团。

[0261] 可以如下表示PEG的其它例子:

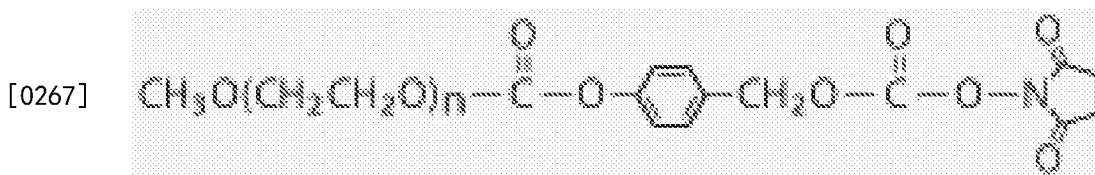


[0263] 式XII

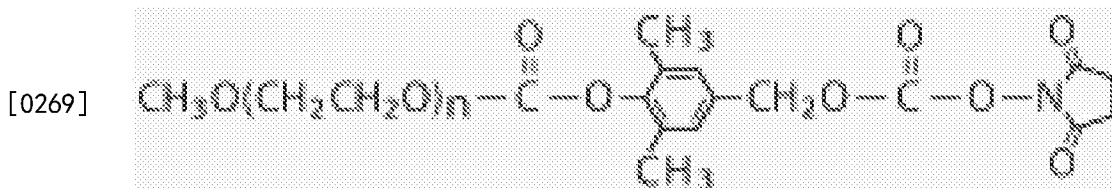


[0265] 式XIII

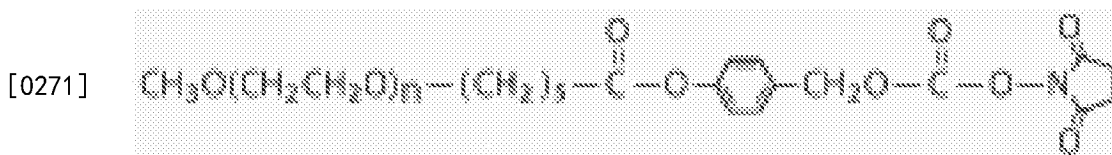
[0266] 如上面所指出的,应当理解,如本文中所述的,在不同的实施方案中,可以将多种部分中的任一种掺入长效坎普他汀类似物的肽组分和(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R部分之间,诸如直链烷基、酯、酰胺、芳族环(例如,被取代的或未被取代的苯基)、被取代的或未被取代的环烷基结构、或它们的组合。在某些实施方案中,这样的部分可以使得化合物对水解更敏感,所述水解可以从CRM释放出化合物的肽部分。在某些实施方案中,这样的释放可以增强化合物的体内组织穿透和/或活性。在某些实施方案中,水解是一般(例如,酸-碱)水解。在某些实施方案中,水解是酶催化的,例如,酯酶催化的。当然,可能发生两类水解。包含一个或多个这样的部分和作为反应性官能团的NHS酯的PEG的例子如下:



[0268] 式XIV



[0270] 式XV



[0272] 式XVI

[0273] 在某些实施方案中,支链(多臂)PEG或星形PEG包含季戊四醇核心、六甘油核心或三季戊四醇核心。应该理解,在某些实施方案中,所述分支可以不都从单个点发散。

[0274] 在某些实施方案中,包含一个或多个反应性官能团的单功能的、双功能的、支链和其它PEG可以得自,例如,NOF America Corp.White Plains,NY或BOC Sciences 45-16 Ramsey Road Shirley,NY 11967,USA,以及其它,或者可以使用本领域已知的方法制备。

[0275] 在本发明的某些实施方案中,坎普他汀类似物包含细胞反应性官能团和CRM。在某些方面,本发明提供了任意前述细胞反应性坎普他汀类似物的分子的变体,其中细胞反应性官能团或部分被 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分替代,所述 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分具有至少500道尔顿的分子量,例如,至少1,500道尔顿至约100,000道尔顿(例如,约20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000或100,000道尔顿的平均分子量)。

[0276] 示例性的长效坎普他汀类似物如下所述,其中n足以提供约500、1,000、1,500、2,000、5,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000至100,000道尔顿的平均分子量。

[0277]  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}(=\text{O})\text{-Ile-Cys-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH}_2$ (SEQ ID NO:58)

[0278]  $\text{Ac-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr}$

[0279]  $\text{-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-Lys-C}(=\text{O})\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-NH}_2$ (SEQ ID NO:59)

[0280]  $\text{Ac-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr-Lys-C}(=\text{O})\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-NH}_2$ (SEQ ID NO:60)。

[0281]  $\text{Ac-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr-(Gly)}_5\text{-Lys-C}(=\text{O})\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-NH}_2$ (SEQ ID NO:61)

[0282]  $\text{Ac-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}(=\text{O})\text{Lys-(Gly)}_5\text{-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr-NH}_2$ (SEQ ID NO:62)

[0283]  $\text{Ac-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}(=\text{O})\text{Lys-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr-NH}_2$ (SEQ ID NO:63)

[0284] 在SEQ ID NO:58中, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 经由酰胺键偶联至N末端氨基酸。在SEQ ID NO:59-63中, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分经由酰胺键偶联至Lys侧链;因而,应该理解,在SEQ ID NO:59、60和61的C末端处的 $\text{NH}_2$ 代表肽的C末端的酰胺化,且应该理解,在SEQ ID NO:62和63中,在N末端处的Ac代表肽的N末端的乙酰化,如上所述。本领域普通技术人员还理解, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分的游离末端通常用(OR)终止,其中带有下划线的O代表末端 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ 基团中的O原子。(OR)经常是诸如羟基(OH)或甲氧基( $-\text{OCH}_3$ )基团等部分,尽管可以使用其它基团(例如,其它烷氧基)。因而,例如,在直链PEG的情况下,SEQ ID NO:59可以表示为 $\text{Ac-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-Lys-(C}(=\text{O})\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R)-NH}_2$ (SEQ ID NO:64),其中R是例如H或 $\text{CH}_3$ 。在双功能的、支链或星形PEG的情况下,R代表分子的其它部分。此外,应该理解,包含反应性官能团的部分可以变化,如本文中所述(例如,根据本文中所述的任意通式)。例如,可以如下表示包含与SEQ ID NO:64相同的肽序列的长效坎普他汀类似物,其中包含反应性官能团的部分含有酯和/或烷基链:

[0285]  $\text{Ac-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-Lys-(C}(=\text{O})\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R)-NH}_2$ (SEQ ID NO:65);

[0286]  $\text{Ac-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-Lys-(C}(=\text{O})\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R)-NH}_2$ (SEQ ID NO:66)

[0287]  $\text{Ac-Ile-Cys*Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*Thr-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-Lys-(C}(=\text{O})\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R)-NH}_2$ (SEQ ID

NO:67)

[0288] 在不同的实施方案中,在SEQ ID NO:65-67中,m的范围可以是1至约2、3、4、5、6、7、8、10、15、20或30。在不同的实施方案中,在SEQ ID NO:67中,j的范围可以是1至约2、3、4、5、6、7、8、10、15、20或30。

[0289] 还应当理解,如本文中所述的,在不同的实施方案中,可以将其它部分掺入Lys-(C(=O)-和(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R之间,诸如酰胺、芳族环(例如,被取代的或未被取代的苯基)、或被取代的或未被取代的环烷基结构。

[0290] 本发明提供了SEQ ID NO:58-67的变体,其中-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-(序列ID号:71)被包含任意其它坎普他汀类似物的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO3-27或29-36中的任一个)的氨基酸序列替代,前提条件是,存在于坎普他汀类似物的N末端和/或C末端处的封端部分可以缺失,被接头(其可以包含封端部分)替代,或连接至存在于对应变体中的不同的N或C末端氨基酸。

[0291] 在不同的实施方案中,任意坎普他汀类似物,例如,包含SEQ ID NO:3-37中的任一个的任意化合物,可以经由它的N末端或C末端或在它的N末端或C末端附近(例如,经由在它的N末端或C末端氨基酸处或附近的氨基酸的侧链)直接地或间接地连接至包含反应性官能团的任意部分,例如,式I-XVI或式A-H的任意化合物。

[0292] 在某些实施方案中,所述CRM包含存在于人血清中的多肽或其片段、或所述多肽或其片段的基本上类似的变体。在某些实施方案中,所述多肽、片段或变体具有5kD至150kD的分子量,例如,至少5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100kD或更多,例如,100-120kD、或120kD和150kD。在某些实施方案中,生产长效坎普他汀类似物包括:使包含反应性官能团的坎普他汀类似物与多肽的一个或多个氨基酸侧链反应,其中所述侧链包含相容的官能团。在某些实施方案中,生产长效坎普他汀类似物包括:使包含反应性官能团的坎普他汀类似物与多肽的N末端胺和/或C末端羧基反应。在某些实施方案中,生产长效坎普他汀类似物包括:使包含胺-反应性官能团的坎普他汀类似物与具有含伯胺的侧链的氨基酸(例如,赖氨酸)和/或与多肽的N末端胺反应。在某些实施方案中,生产长效坎普他汀类似物包括:使包含羧基-反应性官能团的坎普他汀类似物与多肽的C末端羧基反应。在某些实施方案中,将坎普他汀类似物部分连接在多肽的每个末端处,且任选地,连接至一个或多个内部氨基酸的侧链。在某些实施方案中,生产长效坎普他汀类似物包括:使包含巯基-反应性官能团的坎普他汀类似物与多肽的一个或多个巯基反应。

[0293] 在某些实施方案中,将至少一个反应性官能团引入多肽中。例如,在某些实施方案中,在与坎普他汀类似物反应之前,修饰多肽的至少一个侧链,以将第一种反应性官能团转化成不同的反应性官能团。在某些实施方案中,引入硫醇。几种方法可用于将硫醇引入生物分子中,包括还原固有的二硫键、以及将胺、醛或羧酸基团转化成硫醇基团。蛋白中的胱氨酸的二硫键交联可以被二硫苏糖醇(DTT)、三-(2-羧基乙基)膦(TCEP)或三-(2-氰基乙基)膦还原为半胱氨酸残基。通过与3-(2-吡啶基二巯基)丙酸琥珀酰亚胺基酯(SPDP)反应,随后用DTT或TCEP还原3-(2-吡啶基二巯基)丙酰基缀合物,可以间接地使胺硫醇盐化。通过与乙酰基硫代乙酸琥珀酰亚胺基酯反应,随后用50mM羟胺或肼在接近中性pH除去乙酰基,可以间接地使胺硫醇盐化。通过与2-亚氨基四氢噻吩(硫杂环戊烷)反应,可以直接地使胺硫醇盐化,所述反应会保留分子的总电荷并引入游离的硫醇。可以将不含硫醇的蛋白中的色

氨酸残基氧化成巯基色氨酸残基,后者然后可以用碘乙酰胺或马来酰亚胺进行修饰。包含一个或多个硫醇的多肽可以与包含马来酰亚胺基团的坎普他汀类似物诸如Ac-Ile-Cys\*-Val-Trp(1-Me)-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-AEEAc-Lys-(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Mal)-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:68)反应,以产生长效坎普他汀类似物。

[0294] 在某些实施方案中,重组地生产多肽。在某些实施方案中,至少部分地重组生产多肽(例如,在细菌中,或在真核宿主细胞诸如真菌、昆虫、植物或脊椎动物中),和/或至少部分地使用化学合成来生产多肽。在某些实施方案中,所述多肽是puf。在某些实施方案中,所述多肽是糖基化的。在某些实施方案中,所述多肽是未糖基化的。在某些实施方案中,所述多肽是人血清白蛋白(HSA)。在某些实施方案中,多肽的基本上类似的变体与所述变体的母本多肽充分类似,从而不会被受试者(例如,人受试者)的正常免疫系统识别为外来物。在某些实施方案中,选择基本上类似的变体的序列中相对于所述变体的母本多肽的改变,从而避免产生MHC I类表位。多种本领域已知的方法可以用于预测序列是否包含MHC I类表位。

[0295] 本发明另外提供了包含2个或更多个(例如,2-10个)含有CRM的坎普他汀类似物的多聚体(例如,多联体),其中得到的分子(或其CRM组分)的平均分子量是20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000至100,000道尔顿。在某些实施方案中,使用上述的连接部分中的任一种,可以连接包含CRM的坎普他汀类似物。

[0296] VII. 靶向坎普他汀类似物

[0297] 本发明提供了包含靶向部分和坎普他汀类似物部分的靶向坎普他汀类似物,其中所述靶向部分非共价地结合至靶分子。在某些方面,本发明提供了与在第VI部分中描述的细胞反应性坎普他汀类似物类似的靶向坎普他汀类似物,其中所述化合物除了包含细胞反应性部分以外,或者作为细胞反应性部分的替代,包含靶向部分。所述靶向部分可以包含,例如,特异性地结合靶分子的抗体、多肽、肽、核酸(例如,适体)、碳水化合物、小分子或超分子复合物。在某些实施方案中,在试验的条件下,例如,在生理条件下,靶向部分对靶分子的亲和力(通过平衡解离常数K<sub>d</sub>来测量)为10<sup>-3</sup>M或更小,例如,10<sup>-4</sup>M或更小,例如,10<sup>-5</sup>M或更小,例如,10<sup>-6</sup>M或更小、10<sup>-7</sup>M或更小、10<sup>-8</sup>M或更小或10<sup>-9</sup>M或更小。

[0298] 在本发明的其中靶向部分为抗体的那些实施方案中,所述抗体可以为维持结合能力的任意免疫球蛋白或其衍生物、或具有结合结构域的任意蛋白质,所述结合结构域与免疫球蛋白结合结构域同源或在很大程度上同源。这样的蛋白质可以衍生自天然来源,或部分或全部以合成方式产生(例如使用重组DNA技术、化学合成等)。所述抗体可以属于任意物种,例如,人类、啮齿动物、兔、山羊、鸡等。所述抗体可以为任意免疫球蛋白类别的成员,包括任意人类类别:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在本发明的不同实施方案中,所述抗体可以为抗体片段,诸如Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv(单链可变)或保留抗原结合位点的其它片段;或以重组方式产生的scFv片段,包括以重组方式产生的片段。参见,例如,Allen, T., Nature Reviews Cancer, 第2卷, 750-765, 2002, 和其中的参考文献。可以使用单价、二价或多价抗体。所述抗体可以为嵌合抗体,其中,例如,将啮齿动物起源的可变结构域与人起源的恒定结构域融合,从而保留啮齿动物抗体的特异性。在某些实施方案中,使用展示技术诸如噬菌体展示等,例如在啮齿类动物中制备人抗体或其部分,所述啮齿类动物的基因组掺入人免疫球蛋白基因。在某些实施方案中,通过将一个或多个得自非人物种(例如,小鼠)的互补性决定区移植进入抗体序列中,制备人源化抗体。所述抗体可以是部分地或完全地人源化的。关于得

到人源化抗体的不同方法(其可以用于得到在本发明中使用的靶向部分)的综述,参见,例如,Almagro JC,Fransson J.Humanization of antibodies.Front Biosci.13:1619-33(2008)。抗体可以是多克隆的或单克隆的,尽管就本发明的目的而言,单克隆抗体通常是优选的。在本发明的某些实施方案中,使用F(ab')<sub>2</sub>或F(ab')<sub>1</sub>片段,而在其它实施方案中,使用包含Fc结构域的抗体。生产与基本上任意目标分子特异性结合的抗体的方法是本领域已知的。例如,单克隆或多克隆抗体可以从天然来源纯化,例如从生产抗体的动物(例如,在用分子或其抗原片段免疫接种以后)的血液或腹水液纯化,或者可以在细胞培养物中以重组方式产生。制备抗体片段的方法(例如,通过消化、二硫键还原或合成)是本领域已知的。

[0299] 在本发明的不同实施方案中,靶向部分可以通过除抗原-抗体相互作用以外的机制与靶分子特异性结合的任意分子。这样的靶向部分被称作“配体”。例如,在本发明的不同实施方案中,配体可以为多肽、肽、核酸(例如,DNA或RNA)、碳水化合物、脂质或磷脂或小分子。在某些实施方案中,小分子是天然存在或人工制造的有机化合物,其具有相对较低的分子量,并且不是蛋白质、多肽、核酸或脂质,其通常具有小于约1500g/mol的分子量,并且通常具有多个碳-碳键。一般而言,适体是结合特定蛋白的寡核苷酸(例如,RNA或DNA,其任选地包含一个或多个经修饰的核苷(例如,除了在RNA和DNA中最常见的5种标准碱基(A、G、C、T、U)或糖(核糖和脱氧核糖)以外的碱基或糖)或经修饰的核苷间键(例如,非磷酸二酯键),所述核苷间键例如稳定化分子,例如,通过使它更耐受核酸酶的降解)。在某些实施方案中,寡核苷酸的长度是至多约100个核苷,例如,12-100个核苷的长度。使用被称作SELEX的体外进化方法,可以衍生出适体,并且用于得到对目标蛋白特异性的适体的方法是本领域已知的。参见,例如,Brody E N,Gold L.J Biotechnol.2000March;74(1):5-13。在某些实施方案中,使用肽核酸或锁定核酸。

[0300] 在本发明的某些实施方案中,靶向部分包含肽。在某些实施方案中,使用展示技术诸如噬菌体展示、核糖体展示、酵母展示等,鉴别与目标靶分子结合的肽。

[0301] 可以使用小分子作为配体。鉴定这样的配体的方法是本领域已知的。例如,小分子文库(包括组合文库)的体外筛选和以计算机为基础的筛选,例如以鉴定与蛋白质的凹表面(袋)结合的小有机化合物,可以鉴定多种目标蛋白的小分子配体(Huang,Z.,Pharm.和Ther.86:201-215,2000)。

[0302] 在本发明的某些实施方案中,靶向部分不是蛋白质或通常用作载体的分子,并且与用于实现产生抗体的目的的抗原缀合。实例为载体蛋白或分子,诸如牛血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、牛血清丙种球蛋白和白喉毒素。在本发明的某些实施方案中,所述靶向部分不是免疫球蛋白分子的Fc部分。在某些实施方案中,靶向部分是包含它所共价地或非共价地连接的一个或多个额外部分的复合物的一部分。

[0303] 在本发明的不同实施方案中,靶分子可以由细胞产生的任意分子(包括在细胞表面上表达的任意形式,或至少部分地从细胞外修饰产生的其修饰形式)。在某些实施方案中,靶分子是存在于组织内部或表面上的细胞外物质。在某些实施方案中,靶分子是特定患病或生理状态的特征,或一个或多个细胞类型或组织类型的特征。靶分子经常是这样的分子:其至少部分地存在于细胞表面处(例如,跨膜或以其它方式膜连接的蛋白),使得所述分子的至少一部分可供细胞外结合剂(诸如抗体)结合。靶分子可以、但不一定是细胞类型特异性的。例如,细胞类型特异性的靶分子经常是在特定一个或多个细胞类型表面上或内部

的存在水平高于在许多其它细胞类型表面上或内部的水平的蛋白、肽、mRNA、脂质或碳水化合物。在某些情况下,细胞类型特异性的靶分子仅以可检测的水平存在于特定目标细胞类型表面上或内部。但是,应当理解,为了被视作细胞类型特异性的,有用的细胞类型特异性的靶分子不需要是对目标细胞类型绝对特异性的。在某些实施方案中,针对特定细胞类型的细胞类型特异性的靶分子在所述细胞类型中的表达水平是在参照细胞群体中的至少3倍,所述参照细胞群体可以由例如来自多种(例如5-10种或更多种)不同组织或器官的大致等量的细胞的混合物组成。在某些实施方案中,所述细胞类型特异性的靶分子的存在水平是它在参照群体中的平均表达的至少4-5倍、5-10倍或超过10倍。在某些实施方案中,细胞类型特异性的靶分子的检测或测量允许本领域普通技术人员将一个或多个目标细胞类型与许多、大多数或全部其它类型的细胞区分开。一般而言,使用一种或多种标准技术,诸如RNA印迹法,原位杂交,RT-PCR,测序,免疫学方法诸如免疫印迹法、免疫检测(例如,通过免疫组织化学)或在用荧光标记抗体染色后实施免疫检测(例如,使用FACS)、寡核苷酸或cDNA微阵列或膜阵列、蛋白微阵列分析、质谱法等,可以确定大多数靶分子的存在和/或丰度。

[0304] 在某些实施方案中,靶分子是通道、转运蛋白、受体或至少部分地暴露于细胞表面的其它分子。在某些实施方案中,靶分子是阴离子转运蛋白或水通道(例如,水通道蛋白)。

[0305] 在某些实施方案中,所述靶分子是至少部分地暴露于红血细胞表面的蛋白,诸如血型糖蛋白(例如,血型糖蛋白A、B、C或D)或带3。

[0306] 在某些实施方案中,所述靶分子是至少部分地暴露于内皮细胞表面的蛋白。在某些实施方案中,所述靶分子存在于正常的健康血管系统的表面。在某些实施方案中,所述靶分子存在于激活的内皮细胞的表面。在某些实施方案中,所述靶分子存在于激活的内皮细胞的表面,但是不存在于未激活的内皮细胞的表面。在某些实施方案中,靶分子是这样的分子:其表达或暴露被诸如损伤或炎症等刺激诱导。在某些实施方案中,靶分子被受体识别为“非自身的”,所述受体接受含有表达靶分子的细胞的移植物。在某些实施方案中,所述靶分子是碳水化合物异种抗原,针对所述异种抗原的抗体常见于人类中。在某些实施方案中,所述碳水化合物包含血型抗原。在某些实施方案中,所述碳水化合物包含异种抗原,例如, alpha-gal表位(Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-(3)4GlcNAc-R)(参见,例如, Macher BA and Galili U. The Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R(alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*.1780(2):75-88 (2008)。

[0307] 在本发明的某些实施方案中,坎普他汀类似物包含靶向部分和CRM。

[0308] 在某些实施方案中,靶向坎普他汀类似物包含多个靶向部分,所述靶向部分可以相同或不同。不同的靶向部分可以结合相同的靶分子或不同的靶分子。本发明提供了一种靶向坎普他汀类似物,其就靶向部分、坎普他汀类似物或二者而言是多价的。

[0309] 一般而言,本发明包括生产包含坎普他汀类似物部分和靶向部分的化合物的任意方法,和得到的化合物。在某些实施方案中,使用与在第VI部分中描述的那些基本上类似的方法,可以生产靶向坎普他汀类似物,其中作为细胞反应性部分的替代,或者除了细胞反应性部分以外,使用靶向部分。在某些实施方案中,合成包含肽作为靶向部分的靶向坎普他汀类似物,作为包含坎普他汀类似物部分和肽靶向部分的多肽链。任选地,所述多肽链包含在坎普他汀类似物部分和靶向部分之间的一个或多个隔离肽。

[0310] 在某些实施方案中,靶向坎普他汀类似物的摩尔活性是具有相同氨基酸序列(和,如果适用的话,一个或多个封端部分)、但是不包含靶向部分的对应坎普他汀类似物的活性的至少约10%、20%或30%,例如,30%至40%、30%至50%、30%至60%、30%至70%、30%至80%、30%至90%或更多。在某些其中靶向坎普他汀类似物包含多个坎普他汀类似物部分的实施方案中,靶向坎普他汀类似物的摩尔活性是所述坎普他汀类似物部分的活性总和的至少约10%、20%或30%,例如,30%至40%、30%至50%、30%至60%、30%至70%、30%至80%、30%至90%或更多。

[0311] VIII. 用途

[0312] 细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物具有多种用途。不以任何方式限制本发明,本文中描述了细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物的某些用途和本发明的有关方面。在某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给遭受补体介导的器官、组织或细胞损伤或处于该损伤风险中的受试者。在某些实施方案中,使细胞反应性坎普他汀类似物与离体器官、组织或细胞接触,并变得与其共价结合。将所述器官、组织或细胞引入受试者中并保护免于否则会由受体的补体系统造成的损伤。

[0313] 不共价地结合细胞的坎普他汀类似物可以用于本文中描述的目的。例如,可以使用被增加化合物在体内的寿命的部分修饰的坎普他汀类似物和/或包含特定部分的坎普他汀类似物,所述特定部分将坎普他汀类似物靶向易于补体激活的细胞类型或位置,并且本发明包括这样的用途。在某些实施方案中,使用长效坎普他汀类似物。在某些实施方案中,使用包含靶向部分的坎普他汀类似物。在某些实施方案中,使用这样的坎普他汀类似物:其包含延长化合物在体内的寿命的部分和靶向部分。在下面的讨论提及细胞反应性坎普他汀类似物的情况下,本发明提供了与靶向坎普他汀类似物有关的类似组合物和方法以及(至少在关于坎普他汀类似物向受试者施用的那些方面)实施方案,其中作为细胞反应性坎普他汀类似物的替代,或者除了细胞反应性坎普他汀类似物以外,使用不包含靶向部分或细胞反应性部分的坎普他汀类似物,任选地长效坎普他汀类似物。

[0314] 某些感兴趣的用途包括:(1)在具有障碍的个体中保护红血细胞(RBC)免于补体介导的损伤,所述障碍诸如阵发性夜间血红蛋白尿或非典型溶血性尿毒症综合征或以补体介导的RBC裂解为特征的其它障碍;(2)保护移植器官、组织和细胞免于补体介导的损伤;(3)减轻缺血/再灌注(I/R)损伤(例如,在遭受创伤、血管阻塞、心肌梗塞或其中可能发生I/R损伤的其它情形的个体中);和(4)在多种不同的补体介导的障碍中的任一种中,保护可能暴露于补体组分和各种身体结构(例如,视网膜)或膜(例如,滑膜)免于补体介导的损伤。在细胞或其它身体结构的表面处抑制补体激活的有益效果不限于由保护细胞或结构本身免于直接补体介导的损伤(例如,防止细胞裂解)直接产生的那些。例如,使用细胞反应性坎普他汀类似物抑制补体激活可以减少过敏毒素的产生和引起的嗜中性粒细胞和其它促炎症事件的流入/激活,和/或减少细胞内的内容物的潜在损伤性释放,由此可能对远距离器官系统或遍布体内具有有益效果。

[0315] A. 血细胞保护

[0316] 在本发明的某些实施方案中,使用细胞反应性坎普他汀类似物、细胞靶向的坎普他汀类似物、和/或非靶向的坎普他汀类似物(例如,长效非靶向的坎普他汀类似物)来保护血细胞免于补体介导的损伤。所述血细胞可以是血液的任意细胞组分,例如,红血细胞

(RBC)、白血细胞(WBC)和/或血小板。在某些实施方案中,细胞靶向的坎普他汀类似物被靶向暴露于RBC的细胞表面处的靶分子,诸如血型糖蛋白或带3。多种障碍与对血细胞的补体介导的损伤有关。这样的障碍可以源自,例如,个体的细胞的或可溶性的CRP中的一种或多种的缺乏或缺陷,例如,由于:(a)编码这样的蛋白的基因中的突变;(b)一种或多种CRP的生产或适当功能所需要的基因的突变,和/或(c)针对一种或多种CRP的自身抗体的存在。补体介导的RBC裂解可以源自针对RBC抗原的自身抗体的存在,所述RBC抗原可以由于众多原因(经常是特发性的)而产生。具有在编码CRP的基因中这样的突变和/或具有针对CRP或针对它们自身的RBC的抗体的个体处于增加的涉及补体介导的RBC损伤的障碍的风险中。已经发生障碍特有的一种或多种发作的个体处于增加的复发风险中。

[0317] 阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)是一种相对罕见的障碍,其包含以补体介导的血管内溶血、血红蛋白尿、骨髓衰竭和血栓形成倾向(形成血块的倾向)为特征的后天性溶血性贫血。据估计,它影响世界上每百万人中的16人,发生在两种性别中,并且可以发生在任何年龄,常见于年轻的成年人(Bessler, M. 和Hiken, J., *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 104-110(2008); Hillmen, P. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 116-123(2008))PNH是一种以急性溶血性发作为特征的慢性的且使人虚弱的疾病,并且导致显著的病态和降低的预期寿命。除了贫血以外,许多患者会经历腹部疼痛、吞咽困难、勃起功能障碍和肺性高血压,并且处于增加的肾衰竭和血栓栓塞性事件的风险中。

[0318] PNH在十九世纪初最早被描述为独特的实体,但是仅在二十世纪五十年代,随着补体激活的旁路途径的发现,牢固地确立了PNH中的溶血的原因(Parker C.J. *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 93-103(2008))。CD55和CD59通常经由糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚(将某些蛋白锚定至质膜的糖脂结构)而连接至细胞膜。PNH作为造血干细胞的非恶性克隆繁殖的后果而产生,所述造血干细胞已经获得PIGA基因中的体细胞突变,所述PIGA基因编码在GPI锚的合成中涉及的蛋白(Takeda J, 等人. *Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cell*. 73: 703-711(1993))。这样的干细胞的后代具有有缺陷的GPI锚定蛋白(包括CD55和CD59)。该缺陷使得这些细胞易感补体介导的RBC裂解。使用针对GPI锚定蛋白的抗体的流式细胞计数分析经常被用于诊断。它检测GPI锚定蛋白在细胞表面处的缺乏,并允许确定缺乏的程度和受影响的细胞的比例(Brodsky RA. *Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood Rev.* 22(2):65-74(2008))。PNH III型RBC完全缺乏GPI连接蛋白,且对补体非常敏感,而PNH II型RBC具有部分缺乏且具有更低的敏感性。FLAER是气单胞菌溶素原(一种结合GPI锚的细菌毒素)的荧光地标记的无活性变体,且越来越多地与流式细胞计量术一起用于诊断PNH。FLAER与粒细胞的结合的缺乏足以诊断PNH。在某些实施方案中,细胞反应性坎普他汀类似物会保护PNH RBC免于C3b的沉积。

[0319] 在某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给遭受非典型溶血综合征(aHUS)的受试者。aHUS是一种以微血管病性溶血性贫血、血小板减少症和急性肾衰竭为特征的慢性障碍,且由不适当的补体激活造成,经常归因于编码补体调节蛋白的基因中的突变(Warwicker, P., 等人. *Kidney Int* 53, 836-844(1998); Kavanagh, D. 和Goodship, T. *Pediatr Nephrol* 25, 2431-2442(2010))。补体因子H(CFH)基因中的突变是

具有aHUS的患者中最常见的遗传异常,并且这些患者中的60-70%死亡或在疾病发作以后一年内达到晚期肾衰竭(Kavanagh和Goodship,出处同上)。还已经描述了因子I、因子B、C3、因子H相关蛋白1-5和血栓调节蛋白中的突变。aHUS的其它原因包括针对补体调节蛋白(诸如CFH)的自身抗体。在某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给这样的受试者:其已经被鉴别为具有因子I、因子B、C3、因子H相关蛋白1-5或血栓调节蛋白中的突变,或已经被鉴别为具有针对补体调节蛋白(诸如CFH)的自身抗体。

[0320] 补体介导的溶血发生在包括自身免疫性溶血性贫血在内的其它病症的不同组中,所述自身免疫性溶血性贫血涉及结合RBC并导致补体介导的溶血的抗体。例如,这样的溶血可以发生在原发性慢性冷凝集素疾病和某些针对药物和其它外来物质的反应中(Berentsen, S., 等人, Hematology 12, 361-370 (2007); Rosse, W.F., Hillmen, P. 和 Schreiber, A.D. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 48-62 (2004))。在本发明的某些实施方案中,将细胞反应性坎普他汀类似物施用给遭受慢性冷凝集素疾病或处于慢性冷凝集素疾病的风险中的受试者。在另一个实施方案中,使用细胞反应性坎普他汀类似物来治疗遭受HELLP综合征或处于HELLP综合征的风险中的受试者,所述HELLP综合征通过溶血的存在、升高的肝酶和低血小板计数来定义,且与至少一些受试者中的补体调节蛋白的突变有关(Fakhouri, F., 等人, 112: 4542-4545 (2008))。

[0321] 在其它实施方案中,使用细胞反应性坎普他汀类似物来保护RBC或要输入受试者中的血液的其它细胞组分。在下面进一步讨论了这样的用途的某些实施例。如上面所指出的,靶向的和/或长效的坎普他汀类似物可以用于上述的抑制补体介导的溶血和/或RBC损伤的方法中。在某些实施方案中,使用包含(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)部分的长效坎普他汀类似物来治疗PNH或aHUS。

#### [0322] B. 移植

[0323] 移植是一种具有日益增加的重要性的治疗方案,其提供替代由于创伤、疾病或其它状况而受损的器官和组织的方式。肾、肝、肺、胰腺和心脏是可以成功地移植的器官。经常移植的组织包括骨、软骨、肌腱、角膜、皮肤、心脏瓣膜和血管。胰岛或胰岛细胞移植是一种有前途的治疗糖尿病(例如, I型糖尿病)的方案。就本发明的目的而言,要移植的、正在移植的或已经移植的器官、组织或细胞(或细胞群体)可以被称作“移植物”。就本发明的目的而言,血液输注被视作“移植物”。

[0324] 移植会使移植物遭受多种损伤性事件和刺激,所述事件和刺激可以促成移植物功能障碍,并可能促成失效。例如,就许多移植物(特别是实体器官)而言,缺血-再灌注(I/R)损伤是发病率和死亡率的一种常见且主要的原因,且可以是移植物存活的可能性的一个重要决定因素。移植排斥是与遗传上不同的个体之间的移植有关的重大风险之一,且可以导致移植物失效和需要从受体取出移植物。

[0325] 在本发明的某些实施方案中,使用细胞反应性坎普他汀类似物、细胞靶向的坎普他汀类似物和/或长效坎普他汀类似物来保护移植物免于补体介导的损伤。细胞反应性坎普他汀类似物会与移植物的细胞反应,变成与其共价地连接,并抑制补体激活。细胞靶向的坎普他汀类似物会结合移植物中的靶分子(例如,由移植物中的内皮细胞或其它细胞表达)和抑制补体激活。靶分子可以是例如,其表达由刺激因素(诸如损伤或炎症)诱导或刺激的分子,被受体识别为“非自身”的分子,碳水化合物异种抗原(针对所述异种抗原的抗体常见

于人类中)诸如血型抗原或异种抗原,例如,包含alpha-gal表位的分子。在某些实施方案中,与尚未接触坎普他汀类似物的移植物(例如,就移植物和他们接收的其它治疗而言匹配的受试者)中的C4d沉积的平均水平相比,已经与坎普他汀类似物(例如,细胞反应性坎普他汀类似物)接触的移植物的血管中的平均C4d沉积的减少,可以证实补体激活的减少。

[0326] 在本发明的不同实施方案中,可以在移植之前、过程中和/或之后使移植物与细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物接触。例如,在移植之前,可以使取自供体的移植物与包含细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物的液体接触。例如,可以用所述溶液浸泡和/或灌注移植物。在另一个实施方案中,在取出移植物之前,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给供体。在某些实施方案中,在引入移植物过程中和/或之后,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给受体。在某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物局部地递送至移植的移植物。在某些实施方案中,全身性地(例如,静脉内地)施用细胞反应性坎普他汀类似物。

[0327] 本发明提供了一种组合物,其包含:(a)分离的移植物;和(b)细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物。在某些实施方案中,所述组合物进一步包含液体溶液,所述液体溶液适合用于接触(例如,适合用于冲洗、洗涤、浸泡、灌注、维持或储存)移植物(例如,器官),诸如已经从供体取出并且正在等待移植给受体的分离的移植物。在某些实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含:(a)适合用于接触移植物(例如,器官)的液体溶液;和(b)细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物。所述液体溶液可以是移植物生理上可接受的(例如,非细胞毒性的适当渗透组合物)、且考虑到随后向受体中引入移植物而在医学上可接受的(例如,优选无菌的,或至少适当地不含有微生物或其它污染物)、且与细胞反应性坎普他汀类似物相容(即,不会破坏坎普他汀类似物的反应性)或与长效或靶向坎普他汀类似物相容的任意液体溶液。在某些实施方案中,溶液是本领域认可的用于任意这样的目的的任意溶液。在某些实施方案中,液体溶液是Marshall氏溶液或高渗性柠檬酸盐溶液(**Soltran**<sup>®</sup>, Baxter Healthcare)、威斯康辛州大学(University of Wisconsin, UW)溶液(ViaSpan<sup>™</sup>, Bristol Myers Squibb)、组氨酸色氨酸酮戊二酸盐(HTK)溶液(**Custodial**<sup>®</sup>, Kohler Medical Limited)、EuroCollins(Fresenius)和**Celsior**<sup>®</sup>(Sangstat Medical)、Polysol、IGL-1或**AQIX**<sup>®</sup>RS-1。当然,可以在生理上可接受的组合物的范围内使用其它溶液,例如,含有相同或不同浓度的等效或类似成分。在某些实施方案中,溶液不含有预期细胞反应性坎普他汀类似物会与其显著反应的成分,且可以将任何溶液改进或设计成缺少这样的成分。在某些实施方案中,细胞反应性坎普他汀类似物以例如0.01mg/ml至100mg/ml的浓度存在于移植物相容的溶液中,或者可以加入溶液中以达到这样的浓度。

[0328] 在某些实施方案中,本发明提供了一种试剂盒,其包含:(a)细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物;和(b)移植物相容的溶液或其固体(例如,粉末)组分。所述细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物可以以固体形式(例如,粉末)提供或至少部分地溶解在溶液中。在某些实施方案中,所述细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物和/或移植物相容的溶液以预定量提供,以致于当混合时产生用于与使移植物与细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物接触的适当的浓度的溶液。在许多实施方案中,细胞

反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物和移植物相容的溶液或其固体(例如,粉末)组分是在试剂盒内的单独容器中。在某些实施方案中,所述细胞反应性坎普他汀类似物和移植物相容的溶液的组分都以固体(例如,粉末)形式提供,在单独的容器中或相混合。在某些实施方案中,所述试剂盒包含使用说明书,例如,关于将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物加入移植物相容的溶液中的说明书和/或关于使移植物与细胞反应性坎普他汀类似物接触的说明书。任选地,所述试剂盒含有负责管理在移植、细胞治疗和/或血液输注中使用的产品的政府机构批准的标签。

[0329] 本发明另外提供了一种使坎普他汀类似物与分离的移植物共价连接的方法,所述方法包括:使分离的移植物与细胞反应性坎普他汀类似物接触。本发明另外提供了一种分离的移植物,其具有与其共价连接的坎普他汀类似物。通常,分离的移植物具有许多与其连接的坎普他汀类似物分子。在某些实施方案中,移植物是或包含实体器官,诸如肾、肝、肺、胰腺或心脏。在某些实施方案中,移植物是或包含骨、软骨、筋膜、肌腱、韧带、角膜、巩膜、心包、皮肤、心脏瓣膜、血管、羊膜或硬膜。在某些实施方案中,移植物包含多器官,诸如心-肺或胰腺-肾移植物。在某些实施方案中,移植物包含不完整的器官或组织。例如,移植物可以含有器官或组织的一部分,例如,肝叶、血管段、皮瓣或心脏瓣膜。在某些实施方案中,移植物包含含有分离的细胞或组织片段的制品,所述细胞或组织片段已经从它们的起源组织分离出,但是保留至少一些组织体系结构,例如,胰岛。在某些实施方案中,制品包含没有经由结缔组织彼此连接的分离的细胞,例如,源自周围血和/或脐带血的造血干细胞或祖细胞,或全血或任何含有细胞的血液制品诸如红血细胞(RBC)或血小板。在某些实施方案中,移植物得自死亡的供体(例如,“脑死亡以后的捐赠”(DBD)供体或“心脏死亡以后的捐赠”供体)。在某些实施方案中,取决于移植物的特定类型,移植物得自活供体。例如,肾、肝部分、血细胞是经常可以从活供体得到的移植物类型,对供体没有不适当的风险,且与可靠的医学实践相一致。

[0330] 在某些实施方案中,移植物是异种移植物(即,供体和受体属于不同的物种)。在某些实施方案中,移植物是自体移植物(即,移植物从身体的一个部分移植至相同个体的身体的另一个部分)。在某些实施方案中,移植物是同基因移植物(即,供体和受体是遗传上相同的)。在大多数实施方案中,移植物是同种异体移植物(即,供体和受体是相同物种的遗传上不同的成员)。在同种异体移植物的情况下,供体和受体可以是或不是遗传上有关的(例如,家族成员)。通常,供体和受体具有相容的血型(至少ABO相容性和任选地Rh、Kell和/或其它血细胞抗原相容性)。可以已经针对移植物和/或受体和供体的同种抗体筛选受体的血液,因为这样的抗体的存在可以导致超急性排斥反应(即,在移植物与受体的血液接触以后几乎立即(例如,在几分钟内)开始排斥)。可以使用补体依赖性的细胞毒性(CDC)测定来筛选受试者的血清中的抗-HLA抗体。将血清与一组已知HLA表型的淋巴细胞一起温育。如果所述血清含有针对靶细胞上的HLA分子的抗体,会发生由补体介导的裂解引起的细胞死亡。使用选择的靶细胞集合,允许人们将特异性分配给检测出的抗体。可用于确定抗-HLA抗体的存在与否和任选地确定它们的HLA特异性的其它技术包括:ELISA测定、流式细胞计量术测定、微米珠阵列技术(例如,Luminex技术)。用于执行这些测定的方法是众所周知的,且多种用于执行它们的试剂盒是商购可得的。

[0331] 在某些实施方案中,细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物会抑制补体

介导的排斥。例如,在某些实施方案中,细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物会抑制超急性排斥反应。超急性排斥反应至少部分地由抗体介导的受体的补体系统的激活(经由经典途径)和形成的移植物上的MAC沉积造成。它通常源自预先存在的与移植物反应的抗体的受体的存在。尽管需要尝试通过在移植之前的适当匹配来避免超急性排斥反应,但是由于例如时间和/或资源限制,并非总是可能这样做。此外,一些受体(例如,多次输血的个体、以前已经接受移植物的个体、已经多次妊娠的女性)可能已经具有许多预形成的抗体(可能包括针对通常没有试验的抗原的抗体),以致于难以或也许几乎不可能以及时方式可靠地获得相容的移植物。这样的个体是处于增加的超急性排斥反应的风险中。

[0332] 在某些实施方案中,细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物会抑制急性排斥反应或移植物失效。本文中使用的“急性排斥反应”表示在移植后至少24小时(通常至少几天至1周)直到移植后6个月之间发生的排斥。急性抗体介导的排斥(AMR)经常涉及供体特异性的同种抗体(DSA)在移植后的前几周中剧烈升高。不希望受任何理论约束,预先存在的浆细胞和/或记忆B细胞向新浆细胞的转变可能在增加的DSA生产中起作用。这样的抗体可以导致对移植物的补体介导的损伤,所述损伤可以通过使移植物与细胞反应性坎普他汀类似物接触来抑制。不希望受任何理论约束,抑制在移植物处的补体激活可以减少白细胞(例如,嗜中性粒细胞)浸润,即急性移植物失效的另一个促成因素。

[0333] 在某些实施方案中,细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物会抑制对移植物的补体介导的I/R损伤。如在下面进一步讨论的,I/R损伤可以发生在组织的再灌注以后,所述组织的血液供给已经受到暂时破坏,如在移植器官中所发生的。减少I/R损伤会降低急性移植物功能障碍的可能性或降低它的严重程度,并降低急性移植物失效的可能性。

[0334] 在某些实施方案中,细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物会抑制慢性排斥和/或慢性移植物失效。本文中使用的“慢性排斥或移植物失效”表示在移植后至少6个月(例如,在移植后6个月至1、2、3、4、5年之间或更久,经常在数个月至数年的良好移植物功能以后)发生的排斥或失效。它由针对移植物的慢性炎症性应答和免疫应答造成。就本文中的目的而言,慢性排斥可以包括慢性同种异体移植物血管病变,该术语用于表示移植的组织内部血管的纤维化。由于免疫抑制方案已经降低了急性排斥反应的发生率,慢性排斥正在变为移植物功能障碍和失效的更突出的原因。越来越多的证据表明,同种抗体的B-细胞生产在慢性排斥和移植物失效的发生中是一个重要因素(Kwun J.和Knechtle SJ, Transplantation, 88(8):955-61(2009)。移植物的早期损伤可能是导致慢性进展(诸如纤维化)的促成因素,所述慢性进展最终可以导致慢性排斥。因而,使用细胞反应性坎普他汀类似物抑制这样的早期损伤可能延迟和/或降低慢性移植物排斥的可能性或严重程度。

[0335] 在某些实施方案中,将长效坎普他汀类似物施用给移植物受体以抑制移植物排斥和/或移植物失效。

#### [0336] C. 缺血/再灌注损伤

[0337] 缺血-再灌注(I/R)损伤是创伤以后和在与血流量的暂时破坏有关的其它病症(诸如心肌梗塞、中风、严重感染、血管疾病、动脉瘤修复、心肺转流术和移植)中的组织损伤的一个重要原因。

[0338] 在创伤的情况下,全身性低氧血、低血压以及由挫伤、筋膜间隔综合征和血管损伤引起的血液供给的局部中断会造成缺血,所述缺血会损伤有代谢活性的组织。血液供给的

恢复会触发强烈的全身性炎症反应,所述全身性炎症反应经常比缺血本身更有害。缺血区域被再灌注以后,局部地产生和释放的因子进入循环系统并到达远距离位置,有时造成没有受原始缺血性损伤影响的器官(诸如肺和肠)的显著损伤,从而导致单器官和多器官功能障碍。补体激活发生在再灌注以后不久,且是缺血后损伤的关键介质(直接地和通过它对嗜中性粒细胞的化学吸引效应和刺激效应)。所有3个主要补体途径被激活,并且通过协同地或独立地起作用而参与影响众多器官系统的I/R相关的不利事件。在本发明的某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给最近(例如,在上述的2、4、8、12、24或48小时内)经历创伤(例如,使受试者处于I/R损伤风险中的创伤,例如,由于全身性低氧血、低血压和/或血液供给的局部中断)的受试者。在某些实施方案中,可以任选地将细胞反应性坎普他汀类似物血管内地施用进供给受损伤的身体部分的血管中,或直接施用至所述身体部分。在某些实施方案中,所述受试者遭受脊髓损伤、外伤性脑损伤、烧伤和/或失血性休克。

[0339] 在某些实施方案中,在外科手术(例如,预期会暂时破坏供给组织、器官或身体部分的血流的外科手术)之前、过程中或之后,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给受试者。这样的手术的例子包括心肺转流术、血管成形术、心脏瓣膜修复/置换、动脉瘤修复或其它血管手术。可以在与外科手术重叠的时间段之前、之后和/或过程中施用细胞反应性坎普他汀类似物。

[0340] 在某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给已经遭受MI、血栓栓塞性中风、深静脉血栓形成或肺栓塞的受试者。可以与血栓溶解剂联合施用细胞反应性坎普他汀类似物,所述血栓溶解剂例如组织纤溶酶原激活剂(tPA)(例如,阿替普酶(Activase)、瑞替普酶(Retavase)、替奈普酶(TNKase))、阿尼普酶(Eminase)、链激酶(Kabikinase,Streptase)或尿激酶(雅激酶)。可以在与血栓溶解剂重叠的时间段之前、之后和/或过程中施用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物。

[0341] 在某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用给受试者以治疗I/R损伤。

#### [0342] D. 其它补体介导的障碍

[0343] 在某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物引入眼睛中用于治疗眼障碍,诸如年龄相关的黄斑变性(AMD)、糖尿病视网膜病变、青光眼或葡萄膜炎。例如,可以将细胞反应性坎普他汀类似物引入玻璃体腔中(例如,通过玻璃体内注射),用于治疗遭受AMD或处于AMD风险中的受试者。在某些实施方案中,将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物引入前房中,例如,治疗前葡萄膜炎。

[0344] 在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受自身免疫病(例如,至少部分地由针对一种或多种自身抗原的抗体介导的自身免疫病)或处于所述自身免疫病风险中的受试者。

[0345] 可以将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物引入例如遭受关节炎(例如,类风湿性关节炎)的受试者的滑液腔中。当然,可以另外全身性地施用它们。

[0346] 在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受脑内出血或处于脑内出血风险中的受试者。

[0347] 在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗

遭受重症肌无力或处于重症肌无力风险中的受试者。

[0348] 在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受视神经脊髓炎(NMO)或处于视神经脊髓炎风险中的受试者。

[0349] 在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受膜性增生性肾小球炎(MPGN)(例如,I型MPGN、II型MPGN或III型MPGN)或处于膜性增生性肾小球炎风险中的受试者。

[0350] 在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受神经变性疾病或处于神经变性疾病风险中的受试者。在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受神经性疼痛或处于神经性疼痛风险中的受试者。在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受鼻及鼻窦炎或鼻息肉病或处于鼻及鼻窦炎或鼻息肉病风险中的受试者。在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受癌症或处于癌症风险中的受试者。在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受脓毒症或处于脓毒症风险中的受试者。在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受成人呼吸窘迫综合征或处于成人呼吸窘迫综合征风险中的受试者。

[0351] 在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗遭受过敏反应或输液反应或处于过敏反应或输液反应风险中的受试者。例如,在某些实施方案中,可以在受试者接受可能造成过敏反应或输液反应的药物或媒介物之前、过程中或之后,预处理所述受试者。在某些实施方案中,用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物处理处于来自食品(例如,花生、贝类或其它食品变应原)、昆虫螫伤(例如,蜜蜂、黄蜂)的过敏反应的风险中或者遭受所述过敏反应的受试者。

[0352] 在本发明的不同实施方案中,可以局部地或全身性地施用细胞反应性的长效或靶向坎普他汀类似物。

[0353] 在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗呼吸性疾病,例如,哮喘或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。在不同的实施方案中,可以通过吸入(例如,作为干粉或经由喷雾)将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物施用至呼吸道,或者可以通过注射(例如,静脉内注射)来施用。在某些实施方案中,使用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物来治疗严重哮喘,例如,用支气管扩张剂和/或吸入的皮质类固醇不足以控制的哮喘。

[0354] IX. 组合物和施用

[0355] 本发明提供了多种包含细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物的组合物。在不同的实施方案中,组合物可以具有本文中讨论的任意特征或特征组合,只要它们不是相互排斥。本发明提供了这样的组合物及其使用方法的实施方案,其中所述坎普他汀类似物是任意坎普他汀类似物。

[0356] 在某些实施方案中,组合物包含纯化的细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物。可以使用多种方案来实现纯化,所述方案可以由本领域普通技术人员基于实现纯化之前存在于组合物中的不同组分的期望纯度而进行选择。例如,可以使用过滤、高效液相色谱法、亲和色谱法和/或其它方案和它们的组合。在某些实施方案中,所述组合物包含至

少80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多的细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物,作为总坎普他汀类似物的重量百分比。在某些实施方案中,所述组合物包含至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多的细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物,作为总坎普他汀类似物的摩尔百分比。在某些实施方案中,组合物由细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物组成或基本上由其组成。

[0357] 在某些实施方案中,包含细胞反应性坎普他汀类似物和含有细胞反应性官能团的化合物的组合物的特征在于,细胞反应性坎普他汀类似物与含有细胞反应性官能团的化合物的摩尔比为至少10:1、20:1、50:1、100:1、500:1、1,000:1或更多。在某些实施方案中,所述组合物包含至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多的细胞反应性坎普他汀类似物,作为总坎普他汀类似物的重量百分比。在某些实施方案中,所述组合物包含至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多的细胞反应性坎普他汀类似物,作为总坎普他汀类似物的摩尔百分比。在某些实施方案中,按重量计,组合物包含至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多的细胞反应性坎普他汀类似物。在某些实施方案中,按重量计,组合物包含至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多的长效坎普他汀类似物。在某些实施方案中,按重量计,组合物包含至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多的靶向坎普他汀类似物。在某些实施方案中,按重量计,组合物包含至少80%、85%、90%、95%、98%、99%或更多的靶向坎普他汀类似物。在某些实施方案中,重量是干重。

[0358] 在某些方面,本发明提供了一种药用级组合物,其包含细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物。在不同的实施方案中,所述药用级组合物可以在纯度方面具有上述特征中的任一种。所述药用级组合物基本上不含有内毒素、重金属和未识别的和/或未表征的物质,所以不经进一步纯化即可接受为药物组合物,所述药物组合物适合于施用给人受试者或用于制备要施用给人受试者的药物组合物。在某些实施方案中,所述药用级组合物是无菌的。

[0359] 可以将合适的制品(例如,细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物或其它活性剂的基本上纯的制品)与药学上可接受的载体或媒介物等相组合,以生产适当的药物组合物。术语“药学上可接受的载体或媒介物”表示不会破坏与其一起配制的化合物的药理学活性的无毒载体或媒介物。本领域技术人员会理解,如果载体或媒介物与以适合递送化合物的量施用给受试者相容,而不造成不适当的毒性,那么它是“无毒的”。在本发明的组合物中可以使用的药学上可接受的载体或媒介物包括、但不限于:水、生理盐水、林格氏溶液、醋酸钠或乙酸钾溶液、5%葡萄糖等。所述组合物可以包括适合于期望的制剂(例如,本文中讨论的)的其它组分。还可以将补充活性化合物(例如,可独立地用于治疗遭受补体介导的障碍的受试者的化合物)掺入组合物中。本发明提供了这样的药物组合物,其包含细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物和任选的第二活性剂,所述第二活性剂可用于治疗遭受补体介导的障碍的受试者。

[0360] 在某些实施方案中,本发明提供了一种适合施用给人类的药学上可接受的组合物,其与负责管理药学试剂的政府机构(例如,美国食品和药品管理局)批准的标签一起包装。在某些实施方案中,本发明提供了一种药物试剂盒或包装件,其包含:(a)固体形式的药学上可接受的细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物;(b)药学上可接受的载体或媒介物。任选地,所述试剂盒或包装件含有关于将细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他

汀类似物溶解在载体中的说明书。在某些实施方案中,提供了药物试剂盒或包装件。所述包装件或试剂盒包含足够至少1次给药(例如,1-200次给药,或任何插入的数字或子范围)的量的药物组合物。在某些实施方案中,药物包装件或试剂盒包含一个或多个针和任选的一个或多个注射器。在某些实施方案中,提供了至少一个预装注射器。在某些实施方案中,提供了一个或多个单位剂型或预测量的等分试样。在某些实施方案中,提供了施用说明书,在某些实施方案中,所述施用说明书包含自身施用说明书。

[0361] 通过任意合适的给药途径,包括、但不限于,静脉内、肌肉内、皮下、通过吸入、通过鼻递送、鞘内、颅内、动脉内、口服、直肠、透皮、真皮内、真皮下等,可以将药物组合物施用给受试者。在某些实施方案中,静脉内地施用包含细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物的组合物。在某些实施方案中,动脉内地施用包含细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物的组合物。可以将所述组合物局部地施用进供给器官或组织的血管系统中,或者血管外地施用到器官或组织的附近。应该理解,“施用”包括:给受试者直接施用化合物或组合物,指示第三方给受试者施用化合物或组合物,给受试者开处方或建议化合物或组合物(例如,用于自身施用),自身施用,和适当的使受试者可得到化合物或组合物的其它方式。

[0362] 适合用于注射使用(例如,静脉内施用)或通过泵或导管使用的药物组合物通常包括无菌水溶液(其中水溶性的)或分散体以及用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉剂。可以如下制备无菌溶液:任选地与一种成分或成分组合一起,将需要量的化合物掺入适当的溶剂中,所述成分是例如,缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐或磷酸盐;用于调节张度的试剂诸如氯化钠或葡萄糖;抗菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸、谷胱甘肽或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;和其它合适的成分等,在需要时,随后进行基于过滤的灭菌。本领域技术人员知晓众多可以被包括在药物组合物中的生理上可接受的化合物。其它有用的化合物包括,例如,碳水化合物,诸如葡萄糖、蔗糖、乳糖;葡聚糖;氨基酸诸如甘氨酸;多元醇诸如甘露醇。这些化合物可以例如充当填充剂和/或稳定剂,例如,以粉末形式,和/或当制备或贮存过程的一部分包含低压冻干法时。可以在组合物中包括表面活性剂诸如吐温-80、普流尼克-F108/F68、脱氧胆酸、磷脂酰胆碱等,例如,为了增加可溶性或为了提供微乳剂以递送疏水药物。如果需要的话,可以用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)调节pH。可以将胃肠外制剂包封在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次用弃的注射器或输注袋或多次剂量管形瓶中。优选地,注射用溶液是无菌的,且可接受地不含内毒素。

[0363] 通常,通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述媒介物含有基本分散介质和来自上文所述的那些的适当其它成分。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,制备方法可以包括真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分和任何额外所需成分的粉末,例如,得自其先前无菌过滤的溶液。

[0364] 在某些实施方案中,可以使用口服施用。口服组合物一般包括惰性稀释剂或可食用的载体。为了口服治疗性施用的目的,可以将活性化合物与赋形剂一起掺入并以片剂、糖锭或胶囊剂(例如,明胶胶囊剂)的形式使用。可以包括药学上适合的结合剂和/或辅料,作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以含有任意下述成分或相似性质的化合物:结合剂诸如微晶纤维素、黄蓍树胶或明胶;赋形剂诸如淀粉或乳糖;崩解剂诸如海藻酸、

Primogel或玉米淀粉;润滑剂诸如硬脂酸镁或或Sterotes;助流剂诸如胶体二氧化硅;甜味剂诸如蔗糖或糖精;或矫味剂诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙味矫味剂。也可以口服施用液体组合物。用于口服递送的制剂可以掺入改善在胃肠道内的稳定性和/或增强吸收的试剂。

[0365] 对于吸入给药,可以从含有适当推进剂(例如,气体诸如二氧化碳)的加压容器或分配器以气溶胶喷雾形式递送坎普他汀类似物。可以使用计量剂量吸入器或喷雾器。所述气雾剂可以包含液体颗粒或干燥的气雾剂(例如,干粉、大多孔颗粒等)。

[0366] 对于局部施用,可以将坎普他汀类似物配制在含有悬浮或溶解于一种或多种载体中的活性组分的适当软膏中。用于局部施用的载体包括、但不限于:矿物油、液体矿脂、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替换地,可以将药学上可接受的组合物配制为合适的洗剂或乳膏剂,其含有悬浮或溶解于一种或多种药学上可接受的载体中的坎普他汀类似物。合适的载体包括、但不限于:矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚山梨酯60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

[0367] 也可以通过透粘膜或透皮方式全身施用。对于透粘膜或透皮施用,在制剂中可以使用适于要透过的屏障的穿透剂。该穿透剂是本领域中普遍已知的,并且对于透粘膜给药而言,包括例如去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。可以例如通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂来完成透粘膜施用。对于透皮施用,通常将活性化合物配制成本领域通常已知的软膏剂、油膏剂、凝胶或乳膏剂。

[0368] 也可以以用于直肠递送的栓剂(例如具有常规栓剂基质,如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂的形式,配制所述化合物。

[0369] 在本发明的某些实施方案中,用载体制备坎普他汀类似物或其它活性化合物,所述载体会保护化合物免于从身体中快速消除,诸如控释制剂,包括植入剂和微囊化的递送系统。例如,可以将坎普他汀类似物掺入或包囊在微粒或纳米颗粒制剂中。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚醚、聚乳酸、PLGA等。可以使用脂质体或其它基于脂质的颗粒作为药学上可接受的载体。根据本领域技术人员已知的方法,例如,如在美国专利号4,522,811和/或本文中列出的其它参考文献中所述,可以制备这些物质。可以使用含有坎普他汀类似物的贮库制剂。坎普他汀类似物随着时间从贮库释放,例如,从而与静脉内施用所述化合物相比,更久地提供治疗浓度。本领域普通技术人员会明白,为控释制剂、植入物等的制备而选择的材料和方法应当会例如保留化合物的活性。

[0370] 应当理解,可以将坎普他汀类似物和/或其它活性剂提供为药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括源自药学上可接受的无机和有机酸和碱的那些。合适的酸盐的例子包括乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡萄糖庚酸盐、甘油磷酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、草酸盐、棕榈酸盐(palmoate)、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。并且,如果合适的话,根据活性剂的特性,可以将药学上可接受的盐制备为碱金属或碱土金属盐,诸如钠盐、钾盐或钙盐。

[0371] 应该理解,本文中提及的药学上可接受的载体、化合物和制备方法是示例性的和非限制性的。关于药学上可接受的化合物和制备不同类型的药物组合物的方法的其它讨论,参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy.第21版.Philadelphia,PA.Lippincott Williams&Wilkins,2005。

[0372] 可以以有效地实现期望的有益效果的量施用药物组合物。在某些实施方案中,有效量足以提供一项或多项下述益处:

[0373] 在本发明的某些实施方案中,胃肠外地施用包含细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物的药物组合物。在某些实施方案中,静脉内地施用所述组合物。在某些实施方案中,通过静脉内注射施用所述组合物。在某些实施方案中,作为静脉内推注或静脉内输注来施用所述组合物。在某些实施方案中,作为静脉内滴注来施用所述组合物。在某些实施方案中,作为静脉内推注、随后作为静脉内输注或静脉内滴注来施用所述组合物。在某些实施方案中,历时约1、2、3、4、5、15、20、30、60或120分钟,施用静脉内输注。在某些实施方案中,历时超过约60分钟,例如,历时约1、2、3或更多小时,施用静脉内滴注。在某些实施方案中,施用总量为约0.1mg/kg/天至约2,000mg/kg/天的坎普他汀类似物,例如,约1mg/kg/天至约1,000mg/kg/天,例如,约5mg/kg/天至约500mg/kg/天。在某些实施方案中,施用总量为约10mg/kg/天至约100mg/kg/天的坎普他汀类似物,例如,约10mg/kg/天至约50mg/kg/天,例如,约10mg/kg/天至约20mg/kg/天。应当理解,可以使用多种不同的定量施用方案来施用期望的总日量。例如,可以在单次施用或多次施用中(例如,在24小时时段内)施用期望量的坎普他汀类似物。例如,受试者可以在24小时时段内接受2次或更多次给药,所述给药可以经历相同的时间长度或经历不同的时间长度来施用。在某些实施方案中,以大于24小时的时间间隔,施用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物。例如,在不同的实施方案中,可以平均每隔日、每3-4天、每周、每隔周等进行施用。在某些实施方案中,共价连接的、长效的或靶向的坎普他汀类似物会保护细胞、组织、器官持续数周或数月的时段,无需再治疗。例如,可以以间隔1-2周、2-4周、4-6周、6-8周或甚至更长的再治疗维持受试者。在某些实施方案中,使用皮下施用来施用至少一些剂量。例如,在某些实施方案中,涵盖大约0.1-5mg/kg/天(例如,约0.5-2mg/kg/天)的施用,例如,以约0.25ml-2mL的体积,例如,约1ml的体积。在某些实施方案中,所述浓度是约50mg/ml至约300mg/ml,例如,约50mg/ml至约100mg/ml,或约100mg/ml至约200mg/ml。在某些实施方案中,施用是每天施用。在某些实施方案中,使用肌肉内施用来递送类似量的化合物。应该理解,可以存在初次治疗阶段,其中治疗更频繁,和/或其中施用更高的剂量。例如,在具有PNH或aHUS的受试者中,可能需要几次施用才能达到受试者的大部分RBC的保护。此后,可以使用更低的剂量和/或更低的给药频率,例如,以保护新形成的RBC和/或以补充现有RBC的保护。当然,在适当时,可以遵循用于治疗任何疾病的类似方案。在某些实施方案中,使用静脉内施用开始治疗,然后转换至皮下、肌肉内或真皮内进行维持疗法。取决于疾病,治疗可以间隔地(例如隔数月、数年)或不确定地继续。适当的剂量和定量施用方案至少部分地取决于坎普他汀类似物(或其它活性剂)的效能和半衰期,且可以任选地为特定受体定制,例如,通过施用递增的剂量,直到达到预选择的期望应答,诸如期望的补体抑制和/或细胞保护的程。如果需要的话,可以至少部分地基于多种因素来选择任何特定受试者的具体剂量水平,所述因素包括采用的具体化合物的活性、要治疗的特定病症、年龄、体重、一般健康、给药途径、排泄速率、任何药物组合

和/或在得自受试者的一个或多个样品中测得的补体蛋白表达或活性程度。

[0374] 本发明包括与其它治疗联合施用坎普他汀类似物。这样的其它治疗可以包括,在本领域中使用的、或潜在用于治疗遭受疾病的受试者的任何试剂的施用。

[0375] 在本发明的不同实施方案中,当彼此“联合”使用或施用2种或更多种疗法(例如,化合物或组合物)时,它们可以同时地、在重叠的时间段内或顺序地(例如,在时间上隔开至多2周)施用。它们可以经由相同途径或不同途径来施用。在某些实施方案中,在彼此相距48小时内施用所述化合物或组合物。在某些实施方案中,坎普他汀类似物的施用可以在其它化合物的施用之前或之后,例如,在时间上足够接近,使得坎普他汀类似物和其它化合物以有用的水平在体内存在至少一次。在某些实施方案中,在时间上足够接近地一起施用所述化合物或组合物,使得在施用第二种化合物或组合物时,不超过90%的先施用的组合物已经代谢为无活性的代谢物或从身体消除(例如,排泄)。

[0376] 在某些实施方案中,施用包括细胞反应性坎普他汀类似物和其它化合物二者的组合物。

[0377] 实施例1:保留大部分补体抑制活性的聚乙二醇化的坎普他汀类似物的开发

[0378] 坎普他汀类似物,其具有SEQ ID NO:28的坎普他汀类似物的氨基酸序列,但是掺入了位于SEQ ID NO:28的Thr残基的C末端的AEEAc-Lys部分,该部分用于随后将NHS酯激活的PEG缀合至Lys侧链的氨基。使用标准方法合成化合物。简而言之,得到氨基酸(包括AEEAc)作为Fmoc-保护的氨基酸,其中每个氨基酸的 $\alpha$ -氨基用Fmoc保护。侧链官能团也用不同的适当保护基封端。按照Merrifield(J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149(1963))描述的固相方法完成合成。在固相上进行链装配,在其结束时,将N末端乙酰化;然后从固相切离肽,并同时使用TFA经由酸解而去保护,并酰胺化。然后将直链肽氧化和纯化。得到的坎普他汀类似物被表示为Ac-Ile-Cys\*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-AEEAc-Lys-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:51),缩写为CA28-AEEAc-Lys。应当指出,为了简洁目的,在该缩写中省略了N末端乙酰基和C末端氨基。分别将具有30kD和40kD的分子量的单功能的直链NHS-酯激活的PEG(NOF America Corp. White Plains, NY, 目录号 **UNBRIGHT®**ME-400GS)偶联至CA28-AEEAc-Lys的赖氨酸侧链,产生如下表示的长效坎普他汀类似物:CA28-AEEAc-Lys-(PEG30k)和CA28-AEEAc-Lys-(PEG40k),并纯化。应当指出,在术语“PEG”后面且在字母“k”前面的数字代表以千道尔顿计的PEG部分的分子量,且“k”是kD的缩写)。CA28-AEEAc-Lys-(PEG30k)也被称作CA28-1。CA28-AEEAc-Lys-(PEG40k)也被称作CA28-2。

[0379] 如下评估合成的化合物的抑制活性:使用标准的补体抑制测定,测量所述化合物对经由经典途径的补体激活的影响。所述方案以ELISA形式测量C3b沉积。使用该方法监测的C3b沉积通过被经典途径激活的补体产生。简而言之,用BSA包被96-孔平板。加入人血浆、鸡卵白蛋白(OVA)、多克隆抗-OVA抗体和要试验的化合物(被称作“药物”)并温育,随后加入抗-人类C3HRP-缀合抗体。另外温育以后,加入底物,并检测信号。该方案的细节如下:

[0380] 经典补体抑制测定的方案

[0381] 材料:

[0382] ●96孔板(聚苯乙烯板,Thermo Scientific,9205)

[0383] ●鸡OVA(Sigma A5503-5G)

[0384] ●兔抗-鸡OVA(Abcam ab1221)

- [0385] ●封闭缓冲液(开始封闭缓冲液,Thermo Scientific37538)
- [0386] ●维罗那缓冲液(5X浓度,Lonza12-624E)
- [0387] ●人血浆(以50ug/ml终浓度,与来匹卢定一起收集)
- [0388] ●山羊抗-人类C3HRP-缀合的Ab(MP Biomedicals,55237)
- [0389] ●吐温-20洗涤缓冲液(0.05%吐温20-PBS缓冲液)
- [0390] ●TMB(过氧化物酶底物,BD555214)-BD51-2607KC和51-2606KC的1:1混合物。
- [0391] ●1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- [0392] 方案:
- [0393] 1.添加100u1/孔的1%鸡OVA(在PBS中)
- [0394] 2.在4℃或室温温育1-2小时
- [0395] 3.通过振荡和轻叩板移出
- [0396] 4.通过添加200μl封闭缓冲液来封闭
- [0397] 5.在室温温育1h
- [0398] 6.通过振荡和轻叩板移出
- [0399] 7.添加100u1多克隆抗-鸡OVA在封闭缓冲液中的1:1000稀释液
- [0400] 8.在室温温育1h
- [0401] 9.用洗涤缓冲液洗涤两次
- [0402] 10.向第2至12号孔中添加50u1 VB<sup>++</sup>
- [0403] 11.向第1号孔中添加100μl起始化合物稀释液(2x存在于VB<sup>++</sup>中)。
- [0404] 12.如下所述自第1至10号孔连续稀释(1:2)药物
- [0405] a.自起始孔取50μl溶液
- [0406] b.将此溶液加入下一孔中
- [0407] c.通过抽吸若干次进行混合
- [0408] d.重复至第10号孔
- [0409] 注:自第10号孔移出50μl并抛弃。
- [0410] 13.向第1至11号孔添加50μl2x血浆稀释液(原始血浆的1:37.5稀释液)
- [0411] 14.温育1h
- [0412] 15.用洗涤缓冲液洗涤
- [0413] 16.添加100μl抗-C3-HRP Ab在封闭缓冲液中的1/1000稀释液
- [0414] 17.温育1h
- [0415] 18.用洗涤缓冲液洗涤
- [0416] 19.向所有孔添加100μlTMB
- [0417] 20.在黑暗中温育5-10min
- [0418] 21.添加50u11M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- [0419] 22.在450nm读出板

**VB<sup>++</sup>****配方：**

[0420] **巴比妥 5 mM**  
**NaCl 72.5 mM**  
**MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM**  
**CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM**  
**PH 7.4**

[0421] 储备溶液：

[0422] 维罗那缓冲液(5X)

[0423]

	产品编号	分子量	每500ml
9mM巴比妥钠	Sigma B0500	206.17	927mg
15.5mM二乙基巴比妥酸	Sigma B0375	184.19	1.42克

[0424] Mg-Cl<sub>2</sub>(200X)

[0425]

	产品编号	分子量	每50ml
100mM MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	Sigma M0250	203.30	1.00克

[0426] CaCl<sub>2</sub>(500x)

[0427]

	产品编号	分子量	每50ml
75mM CaCl <sub>2</sub>	Sigma C7902	147.01	551.28mg

[0428] 为了制备50ml工作缓冲液：

[0429] ●称量210mg NaCl

[0430] ●添加10ml 5X VB

[0431] ●添加100μl CaCl<sub>2</sub>(500X)

[0432] ●添加250μl MgCl(200X)

[0433] ●用H<sub>2</sub>O调节体积至50ml

[0434] ●调节pH至7.4

[0435] 使用GraphPad Prism5软件分析数据。相对于与没有添加化合物的孔对应的100%激活对照，将得自每个实验的数据集标准化为激活百分比。将药物浓度值(X值)转换成它们的对数，并使用下式 $P_i = 100 - P_a(Y_i = 100 - Y_a)$ ，将激活百分比(P<sub>a</sub>)(Y值)转换成抑制百分比(P<sub>i</sub>)。将抑制百分比相对于药物浓度绘图，并将得到的数据集拟合至S形-剂量响应函数 $[Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{Log EC} - X)))}]$ 。从拟合参数得到IC<sub>50</sub>值。

[0436] 结果呈现在图1中，且IC<sub>50</sub>值显示在表2(在实施例2中)中。如指示的，在摩尔基础上，CA28-1和CA28-2表现出CA28的活性的约30%。

[0437] 实施例2:表现出增加的摩尔活性的长效坎普他汀类似物的开发

[0438] 将分子量为40kD的8臂NHS-酯激活的PEG(NOF America Corp.White Plains,NY,目录号**UNBRIGHT®**HGE0-400GS;化学式:六甘油八(琥珀酰亚胺基氧基戊二酰基)聚氧乙烯)偶连至CA28-AEEAc-Lys的赖氨酸侧链,产生如下表示的长效坎普他汀类似物:(CA28-AEEAc)<sub>8</sub>-PEG40k,也被称作CA28-3。

[0439] 使用在实施例1中描述的测定,试验CA28-3的补体抑制活性。将结果绘图在图1中,将IC<sub>50</sub>值列出在表2中,二者都是CA28浓度的函数。使用CA28在283nm的消光系数(10208.14L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>),计算CA28的浓度。基于其它分析(紫外吸收相对于物质的质量,和元素CHN%分析),得出结论:每个CA28-3分子存在7.5个CA28部分。因而,在摩尔基础上,CA28-3的活性是图1和表2所示的7.5倍。因而,在摩尔基础上,表2中的IC<sub>50</sub>值是CA28-3的实际IC<sub>50</sub>的7.5倍。在摩尔基础上,将CA28-3的IC<sub>50</sub>计算为约0.26(低于母体化合物CA28的IC<sub>50</sub>)。图2显示了随着CA28-3浓度(μM)而变化的CA28和长效坎普他汀类似物CA28-2和CA28-3的补体激活抑制活性百分比,即,已经校正CA28-3的活性,以解释该化合物含有7.5个CA28部分的事实。在摩尔基础上,CA28-3的补体抑制活性超过CA28的补体抑制活性。

[0440] 表2

[0441]

	CA28	CA28-1	CA28-2	CA28-3
IC <sub>50</sub>	0.3909	1.264	1.288	1.927

[0442] 在有或没有多种缓冲物质和/或赋形剂的情况下,观察到CA28-1、CA28-2和CA28-3在水中的溶解度超过母体化合物CA28的溶解度。

[0443] 实施例3:表现出急剧增加的血浆半衰期和C<sub>max</sub>的长效坎普他汀类似物

[0444] 本实施例描述了长效坎普他汀类似物CA28-2和CA28-3在施用给食蟹猴以后的药代动力学参数的确定。

[0445] 定量施用和样品收集

[0446] 在时间0经由静脉内注射将CA28-2和CA28-3施用进雌性食蟹猴(每组3只,2-5岁,2.9-3.5kg)。以25mg/ml的浓度,以50mg/kg在5%葡萄糖水溶液中施用化合物。在以下时间点,从股静脉收集血液样本(各约1mL):施用前,施用后5min、15min、30min、1小时(h)、4h、8h、24h、48h、96h(4天)和192h(8天)。通过直接静脉穿刺来收集样本,并放入不含有抗凝剂的红顶血清试管中,并在室温保持至少30分钟。将血液样品在3000xg在4℃温度离心5分钟。在处理过程中,维持样品冷冻。在离心以后,收集血清样品,并放入样品试管中。将样品储存在冰柜中,所述冰柜设定成维持在-60℃至-80℃。在整个研究中,所有动物表现出正常的活动。在整个研究中,没有观察到动物的化合物相关的异常。

[0447] 样品分析.使用下述方法,通过LC/MS/MS分析如上所述得到的血浆样品,以确定化合物的浓度:将50μL样品与内部标准品(CA28-AEEAc-Arg)混合,然后加入100μL含有HOAc的1MNH<sub>4</sub>OAc(pH3.5),并混合。然后,加入250μL乙腈,并混合。将样品离心,并将上清液倒入另一个试管中,并干燥。将样品重构,并注射到LC/MS/MS系统上。流动相A是含有0.1%FA的5mM NH<sub>4</sub>OAc,流动相B是含有0.1%FA的90:10(ACN:50mMNH<sub>4</sub>OAc)。LC柱是Intrada WP-RP2x150mm,3μ。在以阳离子模式运行的Applied Biosystems API-4000三重四极质谱仪上进行定量。使用源内(In-source)碰撞诱导的解离(CID)将质谱仪源中的化合物片段化,在Q1中选择m/

z144离子质量,片段化,并在Q3中选择m/z77离子质量,并检测。使用Analyst1.4.2软件处理数据。

[0448] 结果. 在下面的表3中显示了在每个时间点的CA28-2和CA28-3的血清浓度(以微克/ml计)。显示了3只接受指定的化合物的猴子各自的数据。容易地计算平均值和标准差。在动物之间存在显著的一致性。CA28是在以前研究中得到的历史数据,在所述以前研究中,将CA28静脉内地施用给食蟹猴。在该研究中,使用HPLC检测样品中的CA28。

[0449] 表3

[0450]

血清浓度, 以 ug/mL 计

时间(天)	CA28-3(8-臂 40k PEG) (50 mg/kg)			CA28 (200 mg/kg)	CA28-2 (直链 40k PEG) (50 mg/kg)		
0.0035	1600	1330	1300		1460	1660	1610
0.01	1600	1220	1480		1360	1430	1530
0.02	1510	1170	1270	34	1310	1510	1500
0.042	1270	1030	1220	17	1290	1340	1540
0.167	926	893	934	9	1200	1210	1390
0.333	797	714	792	5		1190	1180
1	621	479	558	1.5	927	853	881
[0451]							
2	384	355	360		612	733	760
4	280	252	262		461	458	424
8	151	136	136		268	282	293

[0452] 取每种化合物的结果的平均值,并绘制在图3中。观察到与CA28相比,CA28-2和CA28-3的半衰期和C<sub>max</sub>的显著增加。CA28-2和CA28-3的终末半衰期为约4-4.5天。基于这些数据,预期在大约1-2周给药间隔的静脉内施用会提供持久的化合物水平,并有效地抑制人受试者中的补体激活,尽管可以使用更短或更长的给药间隔。

[0453] 实施例4:包含HSA作为清除率降低部分的长效坎普他汀类似物

[0454] 使用2-亚氨基四氢噻吩(硫杂环戊烷),将人血清白蛋白(HSA)的侧链赖氨酸转化成硫醇,并与包含马来酰亚胺作为反应性官能团的坎普他汀类似物Ac-Ile-Cys\*-Val-Trp(1-Me)-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys\*-Thr-AEEAc-Lys-(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Mal)-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:68)反应。对于得到的长效坎普他汀类似物(CA28-4),如实施例1所述在体外试验其补体抑制活性(图4),并如实施例3所述在体内试验其药代动力学性质。如在前述实施例中所述,确定CA28-4在施用给食蟹猴以后的药代动力学参数。结果显示在图5中(与CA28、CA28-1、CA28-2和CA28-3的结果一起)。CA28-4的PK数据显示在表4中。

[0455] 表4

[0456] 血清浓度,以ug/mL计

时间	小时		
	0.0035	0.0100	0.0200
[0457]	1790.0	1445.00	1395.00
	1195.0	915.50	885.00
	900.0	504.50	553.50
	449.0	267.50	295.00
	194.0	164.00	158.50
	150.0	163.00	119.50
	97.2	86.00	78.05
	73.3	51.55	57.40
	43.1	29.20	34.15
	24.1	18.25	20.00

[0458] 实施例5:在具有PNH的患者中的长效坎普他汀类似物

[0459] 将一群被诊断出PNH的受试者分成4组。以1-2周的时间间隔,以5mg/kg至20mg/kg之间的剂量,分别用CA28-2或CA28-3的静脉内施用来治疗组1和2中的受试者。任选地,在更频繁的时间间隔开始治疗,然后降低频率进行维持疗法。根据推荐的定量施用方案,用依库珠单抗治疗组3中的受试者。随时间监测血管内溶血(基于LDH测量和/或RBC的(51)Cr标记)、网状细胞增多(贫血的指征)、血细胞比容、血液中的血红蛋白浓度、红血细胞的调理素作用(C3激活的产物(诸如C3b)在红血细胞上的沉积,其可以使用流式细胞计量术来检测)、PNH症状、输血要求、血栓栓塞性事件、生活质量和存活。在各组之间对比结果,并与得自对照PNH患者的历史数据(在依库珠单抗的临床试验中得到)进行对比。与组4的受试者相比,在接受CA28-2(组1)或CA28-3(组2)的受试者中持久贫血的改善(例如,通过减轻的网状细胞增多、减少的溶血证据、增加的血细胞比容、增加的血红蛋白来证实)、提高的生活质量、减少的PNH症状、降低的输血要求、减少的血栓栓塞性事件、增加的生活质量和/或增加的存活会指示效力。

[0460] 实施例6:在具有PNH的患者中的长效坎普他汀类似物

[0461] 经过下述改进,重复实施例4:受试者是在依库珠单抗治疗下仍然输血依赖性的和/或继续具有低于截止值(诸如9.0g/dL)的血红蛋白的具有PNH的个体。在各组之间对比结果。

[0462] 实施例7:在具有aHUS的患者中的长效坎普他汀类似物

[0463] 将一群被诊断出aHUS的受试者分成4组。以1-2周的时间间隔,以5mg/kg至20mg/kg之间的剂量,分别用CA28-2或CA28-3的静脉内施用来治疗组1和2中的受试者。任选地,在更频繁的时间间隔开始治疗,然后降低频率进行维持疗法。根据推荐的定量施用方案,用依库珠单抗治疗组3中的受试者。随时间监测血管内溶血(基于LDH测量)、红血细胞的调理素作用(C3激活的产物(诸如C3b)在红血细胞上的沉积)、aHUS症状、肾功能、对血浆交换或透析的需要、生活质量和存活。在各组之间对比结果,并与得自对照aHUS患者的历史数据(在依库珠单抗的临床试验中得到)进行对比。与组4的受试者相比,在接受CA28-2或CA28-3的受试者中减少的溶血证据、提高的生活质量、减少的aHUS症状、减少的对血浆交换或透析的需要、增加的生活质量和/或增加的存活会指示效力。

[0464] 实施例8:使用其它长效坎普他汀类似物,重复实施例5-7。

[0465] 实施例9:使用细胞反应性坎普他汀类似物,重复实施例5-7。

[0466] \*\*\*\*\*

[0467] 本领域技术人员会认识到或仅仅使用例行实验就能够确定许多与本文所述的本发明的具体实施方案等效的方案。本发明的范围无意限于上面的描述,而是如所附权利要求所述。应当理解,本发明绝不依赖于任何具体实施例中或利用任何具体实施方案实现的特定结果。除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见,否则诸如“一个”、“一种”和“所述”等词可以指一个/种或超过一个/种。如果群体成员中的一个、超过一个或所有成员存在于指定的产品或过程中、在指定的产品或过程中使用、或以其它方式与指定的产品或过程相关,那么认为满足在一组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述,除非指示相反情形或以其它方式从上下文显而易见。本发明包括这样的实施方案,其中所述组的刚好一个成员存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。例如,但不限于,应当理解,在权利要求或描述指示特定位置的残基可以选自特定氨基酸或氨基酸类似物组的情况下,本发明包括其中所述位置的残基是任何所列氨基酸或氨基酸类似物的个别实施方案。本发明还包括这样的实施方案,其中所述组成员中的超过一个或全部都存在于给定产品或方法中、用于给定产品或方法中或者以其它方式与给定产品或方法相关。此外,应当理解,本发明包括其中将一个或多个限定、要素、条款、说明性术语等从一个或多个所列权利要求或从上述描述引入另一权利要求中的所有变体、组合和排列。例如,可以对从属于另一权利要求的任何权利要求进行修改,以包括从属于相同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、限定、条款或说明性术语等。此外,当权利要求叙述一种组合物时,应当理解,根据本文中公开的任意方法施用所述组合物的方法,和为了本文中公开的任何目的而使用所述组合物的方法,都被包括在本发明的范围内,并且根据本文中公开的任意制备方法来制备所述组合物的方法也被包括在本发明的范围内,除非另外指出或者除非本领域普通技术人员显而易见会引起抵触或矛盾。治疗受试者的方法可以包括:提供需要这种治疗的受试者(例如,已经具有疾病或者处于增加的具有疾病的风险中的受试者)的步骤,将受试者诊断为具有疾病的步骤,和/或选择受试者进行细胞反应性坎普他汀类似物治疗的步骤。

[0468] 在将要素呈现为列表的情况下,应当理解,也公开了所述要素的每个亚组,并且可以从所述组中除去任何要素。为了简洁的目的,本文中仅明确地叙述这些实施方案中的一些,但本发明包括所有这样的实施方案。还应当理解,一般而言,在本发明或本发明的方面被称作包含特定要素、特征等的情况下,本发明的某些实施方案或本发明的方面由这样的要素、特征等组成,或基本上由其组成。在本文中的不同标题下对不同疾病、障碍和病症的讨论是为了方便,且无意限制本发明。

[0469] 在给出范围的情况下,包括端点。此外,应当理解,除非另外指示或以其它方式从上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见,否则以范围表述的数值在本发明的不同实施方案中可呈现处于所述范围内的任何具体数值或子范围,其精确至该范围的下限单位的十分之一,除非上下文另外清楚地指明。可以从权利要求中明确地排除本发明的任何特定实施方案、方面、要素、特征等,即使这样的排除没有在本文中明确地阐述。例如,可以明确地排除任意坎普他汀类似物、官能团、连接部分、疾病或适应症。

044534-8023CN01\_SL.TXT  
SEQUENCE LISTING

<110> APELLIS PHARMACEUTICALS, INC.  
 <120> CELL-REACTIVE, LONG-ACTING, OR TARGETED COMPOSTATIN ANALOGS AND USES THEREOF  
 <130> 2008575-0035  
 <140>  
 <141>  
 <150> PCT/US2012/037648  
 <151> 2012-05-11  
 <150> 61/484,836  
 <151> 2011-05-11  
 <160> 71  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 [0001] <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(12)  
 <223> Disulfide bond  
 <400> 1  
 Ile Cys Val Val Gln Asp Trp Gly His His Arg Cys Thr  
 1                   5                   10  
 <210> 2  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(19)  
 <223> Any independently selected amino acid or amino

044534-8023CN01\_SL.TXT

acid analog

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(19)

&lt;223&gt; This region may encompass 2 to 19 residues, wherein some residues may be absent.

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (22)..(22)

&lt;223&gt; Trp or an analog of Trp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (24)..(42)

&lt;223&gt; Any independently selected amino acid or amino acid analog

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (24)..(42)

&lt;223&gt; This region may encompass 2 to 19 residues, wherein some residues may be absent.

&lt;400&gt; 2

[0002] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Gln Asp Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Trp or an analog of Trp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;223&gt; Trp or an analog of Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

&lt;400&gt; 3

Xaa Gln Asp Xaa Gly

1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (1).. (1)

&lt;223&gt; Trp or an analog of Trp

[0003]

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4).. (4)

&lt;223&gt; Trp or an analog of Trp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (6).. (6)

&lt;223&gt; His, Ala, analogs of Ala, Phe or Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

&lt;400&gt; 4

Xaa Gln Asp Xaa Gly Xaa

1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

044534-8023CN01\_SL.TXT

- <221> MOD\_RES  
 <222> (1).. (3)  
 <223> Any independently selected amino acid or amino acid analog
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> Trp or analog of Trp
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7).. (7)  
 <223> Trp or analog of Trp
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (9).. (13)  
 <223> Any independently selected amino acid or amino acid analog
- <220>  
 <223> see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments
- <400> 5  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Asp Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 [0004] 1 5 10
- <210> 6  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence
- <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
- <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1).. (2)  
 <223> Ile, Val, Leu, BI-Ile, BI-Val, BI-Leu or a dipeptide comprising Gly-Ile or BI-Gly-Ile, wherein BI represents a first blocking moiety
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1).. (2)  
 <223> This region may encompass 1 to 2 residues, wherein some positions may be absent
- <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3).. (13)

044534-8023CN01\_SL.TXT

- <223> Disulfide bond
- <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> Independently selected from Trp or analogs of Trp
- <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)..(8)  
<223> Independently selected from Trp or analogs of Trp
- <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> His, Ala or an analog of Ala, Phe, Trp or an analog of Trp
- <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (14)..(16)  
<223> L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, a dipeptide selected from Thr-Ala or Thr-Asn, or a tripeptide comprising Thr-Ala-Asn, wherein a c-term -OH of any of the L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, Ala or Asn is optionally replaced by a second blocking moiety
- [0005] <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (14)..(16)  
<223> This region may encompass 1 to 3 residues, wherein some positions may be absent
- <220>  
<223> see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments
- <400> 6  
Xaa Xaa Cys Val Xaa Gln Asp Xaa Gly Xaa His Arg Cys Xaa Xaa Xaa  
1                   5                   10                   15
- <210> 7  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence
- <220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide
- <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(2)  
<223> Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu or a dipeptide comprising Gly-Ile or Ac-Gly-Ile

044534-8023CN01\_SL.TXT

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1).. (2)  
 <223> This region may encompass 1 to 2 residues, wherein some positions may be absent

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3).. (13)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5).. (5)  
 <223> Independently selected from Trp or analogs of Trp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8).. (8)  
 <223> Independently selected from Trp or analogs of Trp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10).. (10)  
 <223> His, Ala or an analog of Ala, Phe, Trp or an analog of Trp

[0006]

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14).. (16)  
 <223> L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, a dipeptide selected from Thr-Ala or Thr-Asn, or a tripeptide comprising Thr-Ala-Asn, wherein a c-term -OH of any of L-Thr, D-Thr, Ile, Val, Gly, Ala, or Asn is optionally replaced by -NH<sub>2</sub>

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (14).. (16)  
 <223> This region may encompass 1 to 3 residues, wherein some positions may be absent

<220>  
 <223> see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

<400> 7  
 Xaa Xaa Cys Val Xaa Gln Asp Xaa Gly Xaa His Arg Cys Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

<210> 8  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term H

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 8

Ile Cys Val Val Gln Asp Trp Gly His His Arg Cys Thr  
1 5 10

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

[0007]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 9

Ile Cys Val Val Gln Asp Trp Gly His His Arg Cys Thr  
1 5 10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 10

Ile Cys Val Tyr Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10

044534-8023CN01\_SL.TXT

<210> 11  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide  
  
<220>  
<223> N-term Ac  
  
<220>  
<223> C-term COOH  
  
<400> 11  
Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1                   5                   10

[0008]

<210> 12  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide  
  
<220>  
<223> N-term Ac  
  
<220>  
<223> C-term CONH2  
  
<400> 12  
Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1                   5                   10

<210> 13  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide  
  
<220>  
<223> N-term Ac



044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;223&gt; 2-Nal

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term COOH

&lt;400&gt; 15

Ile	Cys	Val	Ala	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5					10			

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; 1-Nal

[0010]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term COOH

&lt;400&gt; 16

Ile	Cys	Val	Ala	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5					10			

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; 2-Igl

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

044534-8023CN01\_SL.TXT

<400> 17  
Ile Cys Val Gly Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10

<210> 18  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<223> N-term Ac

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> 2-Igl

<220>  
<223> C-term COOH

[0011] <400> 18  
Ile Cys Val Gly Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10

<210> 19  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<223> N-term Ac

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Dht

<220>  
<223> C-term COOH

<400> 19  
Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10



044534-8023CN01\_SI..TXT

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Ac

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Bta

<220>  
 <223> C-term COOH

<400> 22  
 Ile Cys Val Xaa Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

[0013] <210> 23  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Ac

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Bta

<220>  
 <223> C-term CONH2

<400> 23  
 Ile Cys Val Xaa Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

044534-8023CN01\_SL.TXT

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<223> N-term Ac

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> 2-Abu

<220>

<223> C-term CONH2

<400> 24

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Xaa His Arg Cys Thr  
1 5 10

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

[0014] <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<223> N-term H

<220>

<223> C-term COOH

<400> 25

Gly Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Ala Asn  
1 5 10 15

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<223> N-term Ac

<220>

<221> MOD\_RES

044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; 5f-Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 26

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5							10	

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

[0015]

&lt;223&gt; 5-methyl-Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 27

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5							10	

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; 1-methyl-Trp

&lt;220&gt;

044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 28

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (7).. (7)

&lt;223&gt; 5f-Trp

[0016]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 29

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4).. (4)

&lt;223&gt; 5f-Trp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (7).. (7)

&lt;223&gt; 5f-Trp

044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 30

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5						10		

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; 5-methyl-Trp

[0017]

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (7)..(7)

&lt;223&gt; 5f-Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 31

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5						10		

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; 1-methyl-Trp

044534-8023CN01\_SL.TXT

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (7).. (7)  
 <223> 5f-Trp

<220>  
 <223> C-term CONH2

<400> 32  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term H

[0018] <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5).. (5)  
 <223> 6f-Trp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8).. (8)  
 <223> 6f-Trp

<220>  
 <223> C-term COOH

<400> 33  
 Gly Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Asn  
 1 5 10 15

<210> 34  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; 1-formyl-Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 34

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5							10	

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

[0019]

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; 1-methoxy-Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term CONH2

&lt;400&gt; 35

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5							10	

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term II

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

044534-8023CN01\_SL.TXT

<222> (5).. (5)  
 <223> 5f-Trp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8).. (8)  
 <223> 5f-Trp

<220>  
 <223> C-term COOH

<400> 36  
 Gly Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Asn  
 1 5 10 15

<210> 37  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

[0020] <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2).. (12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> (1Me)Trp

<400> 37  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 38  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Maleimide-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(=O)

<220>  
 <221> misc\_feature

044534-8023CN01\_SL.TXT

<222> (2).. (12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH2

<400> 38  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

[0021] <220>  
 <223> N-term Ac

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2).. (12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term (C=O)-(CH2)5-maleimide

<400> 39  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 40  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

044534-8023CN01\_SL.TXT

<220>  
 <223> N-term Maleimide-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2).. (12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

<400> 40  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 41  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

[0022]

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide

<220>  
 <223> N-term Maleimide-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2).. (12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

<400> 41  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 13

044534-8023CN01\_SL.TXT

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Maleimide-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O)

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

<400> 42  
 [0023] Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 43  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Maleimide-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C(=O)

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;400&gt; 43

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

<223> N-term Maleimide-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2)..(12)

&lt;223&gt; Disulfide bond

[0024]

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; (1Me)Trp

&lt;220&gt;

<223> C-term NH<sub>2</sub>

&lt;400&gt; 44

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

<223> N-term Maleimide-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2)..(12)

&lt;223&gt; Disulfide bond

044534-8023CN01\_SL.TXT

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH2

<400> 45  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

[0025] <220>  
 <223> N-term Maleimide-(CH2)5-C(=O)-NH-CH2CH2OCH2CH2  
 OCH2C(=O)

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2).. (12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH2

<400> 46  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 47  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2)..(12)

&lt;223&gt; Disulfide bond

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; (1Me)Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term NH2

&lt;400&gt; 47

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr	Lys
1				5					10				

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

[0026]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2)..(12)

&lt;223&gt; Disulfide bond

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; (1Me)Trp

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term NH2

&lt;400&gt; 48

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gly Gly Lys



044534-8023CN01\_SL.TXT

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Ac

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-C(=O)-Lys

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

[0028] <400> 51  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Lys  
 1 5 10

<210> 52  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Ac

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>

044534-8023CN01\_SL.TXT

<221> MOD\_RES  
 <222> (14).. (14)  
 <223> Lys-(C(=O)-(CH2)5-Mal)  
  
 <220>  
 <223> C-term NH2  
  
 <400> 52  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Lys  
 1 5 10

<210> 53  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Ac

[0029] <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2).. (12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4).. (4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19).. (19)  
 <223> Lys-(C(=O)-(CH2)5-Mal)

<220>  
 <223> C-term NH2

<400> 53  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Lys

<210> 54  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

044534-8023CN01\_SL.TXT

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Mal-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-(C(=O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>C(=O))

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

<400> 54  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 55  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

[0030] <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Mal-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-(C(=O)NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O))

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> (1Me)Trp

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

<400> 55  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
 1 5 10

<210> 56  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide



044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term NH2

&lt;400&gt; 57

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr	Lys
1				5					10				

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term (CH2CH2O)nC(=O)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; (1Me)Trp

[0032]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term NH2

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

&lt;400&gt; 58

Ile	Cys	Val	Trp	Gln	Asp	Trp	Gly	Ala	His	Arg	Cys	Thr
1				5					10			

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2)..(12)

&lt;223&gt; Disulfide bond



044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;400&gt; 60

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2)..(12)

&lt;223&gt; Disulfide bond

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (4)..(4)

[0034]

&lt;223&gt; (1Me)Trp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (19)..(19)

&lt;223&gt; Lys-C(=O)-(CH2CH2O)n

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; C-term NH2

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

&lt;400&gt; 61

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Lys

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

044534-8023CN01\_SL.TXT

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<223> N-term Ac

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1).. (1)

<223> (CH2CH2O)nC(=O)Lys

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8).. (18)

<223> Disulfide bond

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (10).. (10)

<223> (1Me)Trp

<220>

<223> C-term NH2

<220>

[0035] <223> see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

<400> 62

Lys Gly Gly Gly Gly Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His  
1 5 10 15

Arg Cys Thr

<210> 63

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<223> N-term Ac

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1).. (1)

<223> (CH2CH2O)nC(=O)Lys



044534-8023CN01\_SL.TXT

&lt;400&gt; 64

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; N-term Ac

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2)..(12)

&lt;223&gt; Disulfide bond

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

[0037] &lt;222&gt; (4)..(4)

&lt;223&gt; (1Me)Trp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (14)..(14)

<223> NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-C(=O)-Lys-(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-  
(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R)

&lt;220&gt;

<223> C-term NH<sub>2</sub>

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

&lt;400&gt; 65

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Lys  
1 5 10

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide



044534-8023CN01\_SL.TXT

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-C(=O)-Lys-(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)-  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R)

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

<400> 67  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Lys  
 1 5 10

<210> 68  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <223> N-term Ac

[0039] <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(12)  
 <223> Disulfide bond

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> (1Mc)Trp

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)..(14)  
 <223> AEEAc-Lys-(C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Mal)

<220>  
 <223> C-term NH<sub>2</sub>

<220>  
 <223> see specification as filed for detailed description of substitutions and preferred embodiments

<400> 68  
 Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr Lys  
 1 5 10

<210> 69  
 <211> 6  
 <212> PRT



044534-8023CN01\_SL.TXT

[0041] Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr  
1 5 10

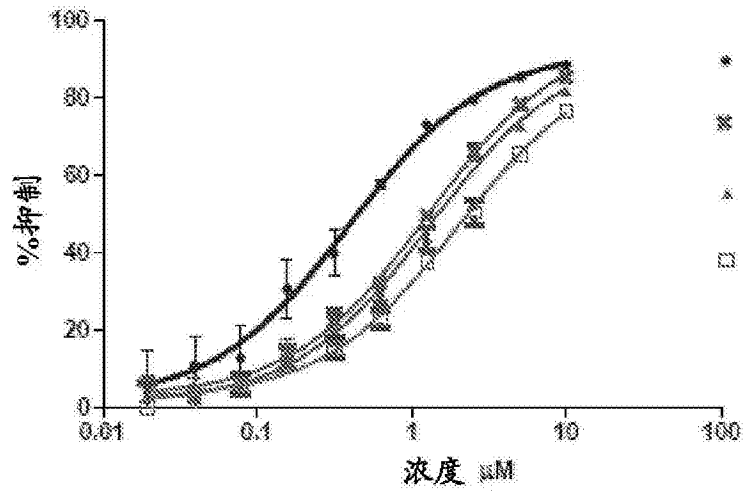


图1

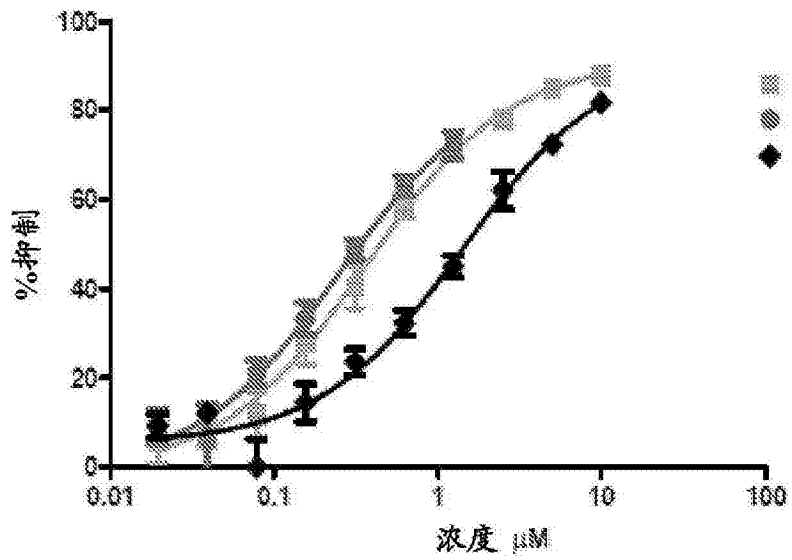


图2

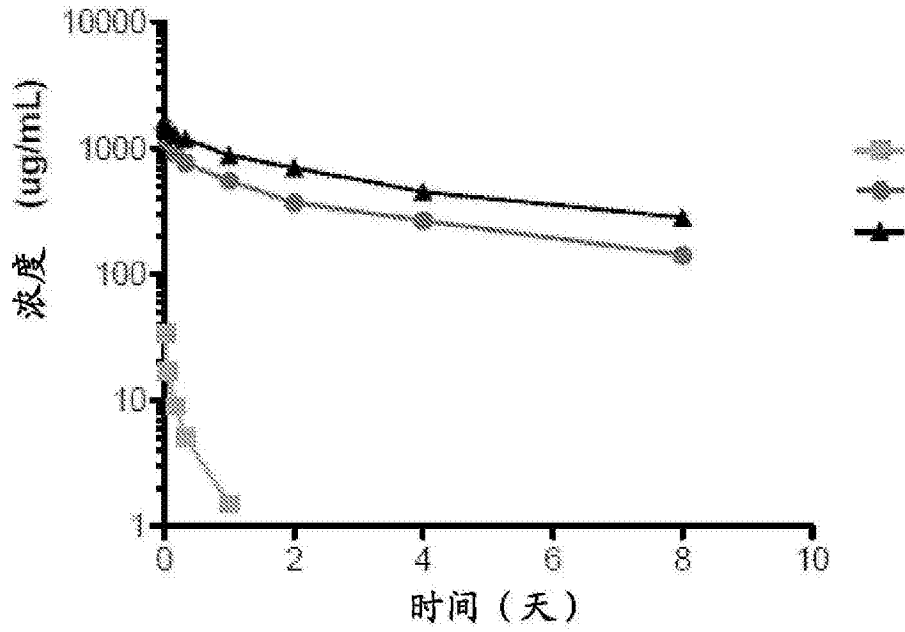


图3

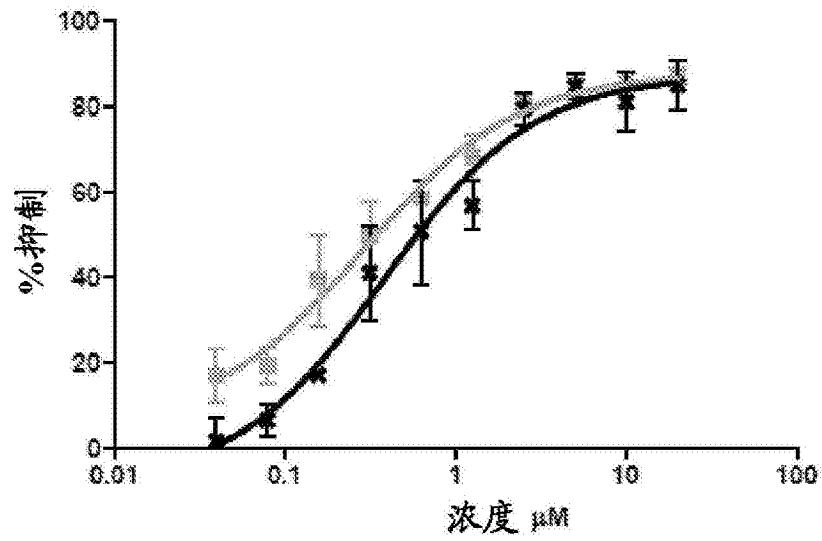


图4

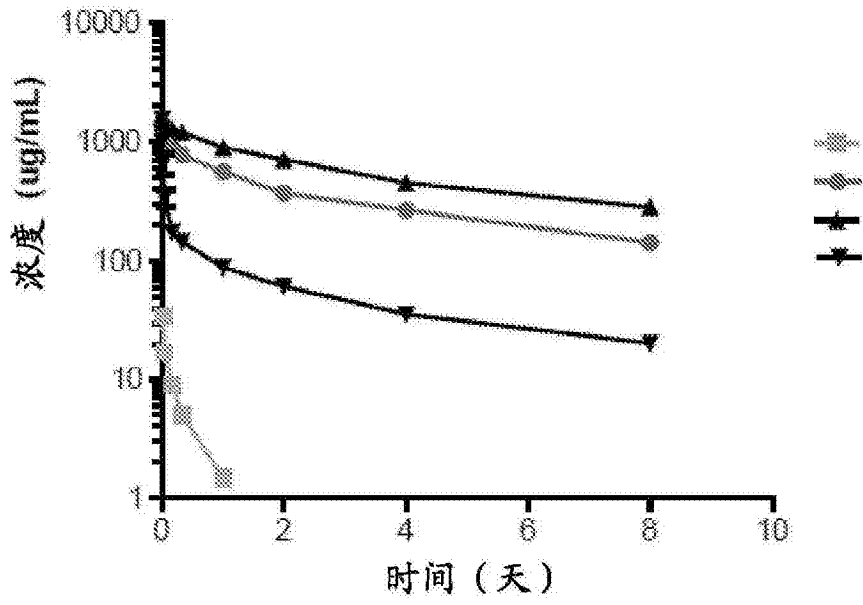


图5