



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108431019 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201680071665.9

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

(22)申请日 2016.10.07

11517

代理人 赵昊 顾云峰

(30)优先权数据

62/238,529 2015.10.07 US

62/372,259 2016.08.08 US

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C07K 7/50(2006.01)

C07K 7/64(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/056144 2016.10.07

A61K 38/04(2006.01)

A61K 38/12(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/062879 EN 2017.04.13

(71)申请人 阿佩利斯制药有限公司

地址 美国肯塔基州

(72)发明人 F·格罗西 P·德沙特莱

C·弗朗索瓦

权利要求书13页 说明书130页 附图15页

(54)发明名称

给药方案

(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,本发明进一步提供了使用细胞反应性坎普他汀类似物的方法,例如,治疗补体介导的病症;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,用于治疗补体介导的病症;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,用于治疗补体介导的病症;例如,用于抑制对细胞、组织或器官的补体介导的损伤。

1. 一种生理上可接受的或药用级的组合物,所述组合物包含细胞反应性坎普他汀类似物。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物是生理上可接受的。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物是药用级组合物。
4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物是药学上可接受的以用于施用给人。
5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞反应性坎普他汀类似物包含能够共价地结合哺乳动物细胞的细胞反应性官能团。
6. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞反应性坎普他汀类似物包含含有细胞反应性官能团的细胞反应性部分。
7. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物包含与巯基 (SH) 基团反应以形成共价键的细胞反应性官能团。
8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物包含与胺基团反应以形成共价键的细胞反应性官能团。
9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞反应性坎普他汀类似物包含马来酰亚胺基团。
10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞反应性坎普他汀类似物包含细胞反应性部分,其中所述细胞反应性部分包含细胞反应性官能团。
11. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞反应性坎普他汀类似物包含细胞反应性官能团、坎普他汀类似物部分和连接部分,所述连接部分将所述细胞反应性坎普他汀类似物的细胞反应性官能团与坎普他汀类似物部分部分分隔开。
12. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞反应性坎普他汀类似物包含氨基酸,所述氨基酸的侧链含有式 (NH) —R 的基团,其中R代表包含细胞反应性官能团的部分。
13. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述细胞反应性坎普他汀类似物是这样的化合物:所述化合物包含具有X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly (SEQ ID NO:3) 的核心序列的环状肽,其中X' aa和Xaa选自Trp和Trp类似物,且其中所述化合物包含细胞反应性部分。
14. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物是这样的化合物:所述化合物包含具有X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'' aa (SEQ ID NO:4) 的核心序列的环状肽,其中X' aa和Xaa各自独立地选自Trp和Trp类似物,且X'' aa选自His、Ala、无支链的单甲基氨基酸、Phe、Trp和Trp类似物,且其中所述化合物包含细胞反应性部分。
15. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述肽具有X' aa1-X' aa2-X' aa3-X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'' aa-X'' aa2-X'' aa3-X'' aa4-X'' aa5 (SEQ ID NO:5) 的序列,且X' aa1、X' aa2、X' aa3、X'' aa2、X'' aa3-X'' aa4和X'' aa5与坎普他汀中的对应位置处的氨基酸相同,且其中所述化合物包含细胞反应性部分。
16. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物是这样的化合物:所述化合物包含具有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) 的序列的环状肽,其中X' aa4和Xaa选自Trp和Trp类似物,其中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,其中所述肽经由X' aa2和X'' aa4之间的键而环化,且其中所述化合物包含细胞反应性部分。
17. 根据权利要求16所述的组合物,其中X' aa2和X'' aa4是Cys,且其中X'' aa1任选地是

Ala或无支链的单甲基氨基酸,且其中所述化合物包含细胞反应性部分。

18. 根据权利要求16所述的组合物,其中X' aa2和X" aa4是Cys,其中X' aa1、X' aa2、X' aa3、X" aa2、X" aa3、X" aa4和X" aa5中的任意一个或多个与坎普他汀中的对应位置处的氨基酸相同,且X' aa1是Ala或无支链的单甲基氨基酸,且其中所述化合物包含细胞反应性部分。

19. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物是包含具有以下序列的环状肽的化合物:

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

Xaa1是Ile、Val、Leu、B¹-Ile、B¹-Val、B¹-Leu或包含Gly-Ile或B¹-Gly-Ile的二肽,且B¹代表第一封端部分;

Xaa2和Xaa2*独立地选自Trp和Trp类似物;

Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp或Trp类似物;

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中的任一个的羧基末端-OH任选地被第二封端部分B²替代;且

所述2个Cys残基通过二硫键连接,且其中所述化合物包含细胞反应性部分。

20. 根据权利要求19所述的组合物,其中

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

Xaa2和Xaa2*独立地选自Trp和Trp类似物;

Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp或Trp类似物;

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中的任一个的羧基末端-OH任选地被-NH₂替代。

21. 根据权利要求19所述的组合物,其中Xaa2是具有比Trp更高的疏水性的Trp类似物。

22. 根据权利要求19所述的组合物,其中Xaa2是Trp类似物,其包含被取代的或未被取代的二环芳族环组分或2个或更多个被取代的或未被取代的单环芳族环组分。

23. 根据权利要求19所述的组合物,其中Xaa2*是Trp类似物,其具有在吲哚环上的带负电取代基,且不具有与Trp相比增加的疏水性。

24. 根据权利要求19所述的组合物,其中Xaa2*是Trp类似物,其包含在色氨酸的1或5位处的低级烷氧基或低级烷基取代基或在色氨酸的5或6位处的卤素取代基。

25. 根据权利要求19所述的组合物,其中Xaa2*是Trp类似物,其包含在色氨酸的1或5位处的低级烷氧基或低级烷基取代基或在色氨酸的5或6位处的卤素取代基,且Xaa2*是Trp。

26. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物包含具有选自SEQ ID NO:9-36的序列的环状肽,且包含细胞反应性部分。

27. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物包含具有选自SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36的序列的环状肽,且包含细胞反应性部分。

28. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物包含具有SEQ ID NO:28、32或34的序列的环状肽。

29. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述坎普他汀类似物是这样的化合物:所述化

合物包含具有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)的序列的环状肽,其中X' aa4和Xaa选自Trp和Trp类似物,其中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,X' aa2和X'' aa4不是Cys,且所述肽经由X' aa2和X'' aa4之间的键而环化,且其中所述化合物包含细胞反应性部分。

30. 根据权利要求29所述的组合物,其中X' aa1、X' aa3、X'' aa2、X'' aa3和X'' aa5中的任意一个或多个与根据权利要求18-28中的任一项所述的肽中的对应位置处的氨基酸相同,且X'' aa1是Ala或无支链的单甲基氨基酸。

31. 根据权利要求29所述的组合物,其中X' aa2和X'' aa4之一是具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸或氨基酸类似物,X' aa2和X'' aa4中的另一个是具有含羧酸基团的侧链的氨基酸或氨基酸类似物,且所述键是酰胺键。

32. 根据权利要求29所述的组合物,其中X' aa1、X' aa3、X'' aa1、X'' aa2、X'' aa3和X'' aa5与根据权利要求18-28中的任一项所述的环状肽中的对应位置处的氨基酸相同,且其中,任选地,X' aa2和X'' aa4之一是具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸或氨基酸类似物,X' aa2和X'' aa4中的另一个是具有含羧酸基团的侧链的氨基酸或氨基酸类似物,且所述键是酰胺键。

33. 根据权利要求10-32中的任一项所述的组合物,其中所述环状肽在N末端被乙酰化,在C末端被酰胺化,或者既在N末端被乙酰化又在C末端被酰胺化。

34. 一种分离的细胞或器官,其具有与其共价地键合的坎普他汀类似物。

35. 根据权利要求34所述的分离的细胞或器官,其中所述分离的细胞或器官是人类细胞或器官。

36. 根据权利要求34所述的分离的细胞或器官,其中所述分离的细胞是血细胞,或所述分离的器官是心脏、肾、肝、肺或胰腺。

37. 一种降低细胞或器官对补体依赖性的损伤的敏感性的方法,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,其中所述细胞反应性坎普他汀类似物共价地结合所述细胞或器官。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述细胞或器官是人类细胞或器官。

39. 根据权利要求37所述的方法,其中所述细胞是血细胞,或所述器官是心脏、肾、肝、肺或胰腺。

40. 根据权利要求37所述的方法,其中所述细胞或器官是要移植进受试者中的分离的细胞或器官,且所述方法包括:在移植之前,使所述细胞或器官与所述细胞反应性坎普他汀类似物接触。

41. 根据权利要求37所述的方法,其中所述细胞或器官已经被移植进受试者中,且所述方法包括:在移植之后,使所述器官与所述细胞反应性坎普他汀类似物接触。

42. 根据权利要求37所述的方法,其中所述方法包括:用包含所述细胞反应性坎普他汀类似物的流体灌注所述器官。

43. 根据权利要求37所述的方法,其中所述方法包括:在将所述器官移植进受试者中的过程中,使所述细胞或器官与所述细胞反应性坎普他汀类似物接触。

44. 根据权利要求37所述的方法,其中所述方法包括:在将所述细胞或器官移植进受试者中以后,将所述细胞反应性坎普他汀类似物施用给所述受试者。

45. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述方法包括: 在将所述器官移植进受试者中以后, 将所述细胞反应性坎普他汀类似物施用给所述受试者, 其中将所述细胞反应性坎普他汀类似物局部地施用给所移植的器官。

46. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述细胞或器官已经或将要移植进受试者中, 所述受试者处于发展超急性或急性补体介导的输血反应或器官排斥的高危中。

47. 一种治疗受试者的方法, 所述受试者需要治疗补体介导的病症, 所述方法包括: 将细胞反应性坎普他汀类似物施用给所述受试者。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中将所述细胞反应性坎普他汀类似物局部地施用至处于补体介导的损伤的风险中的部位或经历补体介导的损伤的部位。

49. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述病症会导致对红细胞的补体介导的损伤, 并血管内地施用所述细胞反应性坎普他汀类似物。

50. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述受试者具有补体调节缺陷。

51. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述受试者需要治疗移植排斥。

52. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述受试者需要治疗缺血/再灌注损伤。

53. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述受试者需要治疗溶血性贫血。

54. 一种长效坎普他汀类似物, 其包含一个或多个坎普他汀类似物部分以及聚合物, 所述聚合物作为清除率降低部分 (CRM), 具有10千道尔顿 (kD) 至45kD之间的分子量。

55. 根据权利要求54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聚合物, 所述聚合物作为CRM, 具有20千道尔顿 (kD) 至45kD之间的分子量。

56. 根据权利要求54或55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聚合物, 所述聚合物作为清除率降低部分, 具有30千道尔顿 (kD) 的分子量。

57. 根据权利要求54或55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聚合物, 所述聚合物作为清除率降低部分, 具有40千道尔顿 (kD) 的分子量。

58. 根据权利要求54-57中任一项所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述聚合物包含聚乙二醇 (PEG)。

59. 根据权利要求54-58中任一项所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述聚合物包含直链PEG。

60. 根据权利要求54-58中任一项所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述聚合物包含支链PEG。

61. 根据权利要求59所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述聚合物包含直链PEG, 且包含连接在所述直链PEG的每个末端处的坎普他汀类似物部分。

62. 根据权利要求60所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述聚合物包含具有3-10个分支的支链PEG。

63. 根据权利要求62所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述聚合物包含具有3-10个分支的支链PEG, 且所述分支中的至少约50%具有与其连接的坎普他汀类似物部分。

64. 根据权利要求63所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述聚合物包含具有3-10个分支的支链PEG, 且所述分支中的至少约75%具有与其连接的坎普他汀类似物部分。

65. 根据权利要求54-57中任一项所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述聚合物包含人血清白蛋白。

66. 根据权利要求54-65中任一项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。

67. 根据权利要求54-66中任一项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。

68. 根据权利要求54-67中任一项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。

69. 根据权利要求54-68中任一项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。

70. 根据权利要求54-69中任一项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。

71. 根据权利要求54-70中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的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约20%。

72. 根据权利要求54-71中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的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约30%。

73. 根据权利要求54-72中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多个坎普他汀类似物部分,且其摩尔活性至少约等于所述坎普他汀类似物部分的活性的总和。

74. 根据权利要求54-73中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的终末半衰期是可比较剂量的不包含所述CRM的对应坎普他汀类似物的终末半衰期的至少5倍。

75. 根据权利要求54-74中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的C_{max}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C_{max}的至少10倍。

76. 根据权利要求54-75中任一项所述的长效坎普他汀类似物,当皮下地注射进灵长类动物中时,其具有至少2天的血浆半衰期。

77. 根据权利要求76所述的长效坎普他汀类似物,当皮下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。

78. 根据权利要求76所述的长效坎普他汀类似物,当皮下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。

79. 根据权利要求76-78中任一项所述的所述的长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物的摩尔活性为不包含清除率降低部分的对应坎普他汀类似物的活性的至少约20%。

80. 根据权利要求76-79中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的摩尔活性为包含相同氨基酸序列、但是不包含所述清除率降低部分的坎普他汀类似物的活性的至少约30%。

81. 根据权利要求76-79中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约10%。

82. 根据权利要求76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的C_{max}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C_{max}的至少10倍。

83. 根据权利要求54-82中的任一项所述的长效坎普他汀类似物, 其具有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至少约30%的活性和所述对应坎普他汀类似物的至少10倍的C_{max}, 并且具有至少3天的血浆半衰期。

84. 根据权利要求54-83中的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部分包含具有X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly (SEQ ID NO:3) 的核心序列的环状肽, 其中X' aa和Xaa选自Trp和Trp类似物。

85. 根据权利要求54-83中的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部分包含具有X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'' aa (SEQ ID NO:4) 的核心序列的环状肽, 其中X' aa和Xaa各自独立地选自Trp和Trp类似物, 且X'' aa选自His、Ala、无支链的单甲基氨基酸、Phe、Trp和Trp类似物。

86. 根据权利要求54-83中的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部分包含具有X' aa1-X' aa2-X' aa3-X' aa-Gln-Asp-Xaa-Gly-X'' aa-X'' aa2-X'' aa3-X'' aa4-X'' aa5 (SEQ ID NO:5) 的序列的环状肽, 且X' aa1、X' aa2、X' aa3、X'' aa2、X'' aa3-X'' aa4和X'' aa5与坎普他汀中的对应位置处的氨基酸相同。

87. 根据权利要求54-83中的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部分包含具有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) 的序列的环状肽, 其中X' aa4和Xaa选自Trp和Trp类似物, 其中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, 其中所述肽经由X' aa2和X'' aa4之间的键而环化。

88. 根据权利要求54-83中的任一项所述的长效坎普他汀类似物, 其中X' aa2和X'' aa4是Cys, 且其中X'' aa1任选地是Ala或无支链的单甲基氨基酸。

89. 根据权利要求54-83中的任一项所述的长效坎普他汀类似物, 其中X' aa2和X'' aa4是Cys, 其中X' aa1、X' aa2、X' aa3、X'' aa2、X'' aa3、X'' aa4和X'' aa5中的任意一个或多个与坎普他汀中的对应位置处的氨基酸相同, 且X'' aa1是Ala或无支链的单甲基氨基酸。

90. 根据权利要求54-83中的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部分包含具有以下序列的环状肽的:

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

Xaa1是Ile、Val、Leu、B¹-Ile、B¹-Val、B¹-Leu或包含Gly-Ile或B¹-Gly-Ile的二肽, 且B¹代表第一封端部分;

Xaa2和Xaa2*独立地选自Trp和Trp类似物;

Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp或Trp类似物;

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中的任一个的羧基末端-OH任选地被第二封端部分B²替代; 且

所述2个Cys残基通过二硫键连接。

91. 根据权利要求90所述的长效坎普他汀类似物, 其中
Xaa1是Ile、Val、Leu、Ac-Ile、Ac-Val、Ac-Leu或包含Gly-Ile或Ac-Gly-Ile的二肽;
Xaa2和Xaa2*独立地选自Trp和Trp类似物;
Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp或Trp类似物;
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中的任一个的羧基末端-OH任选地被-NH₂替代。
92. 根据权利要求90所述的长效坎普他汀类似物, 其中Xaa2是具有比Trp更高的疏水性的Trp类似物。
93. 根据权利要求90所述的长效坎普他汀类似物, 其中Xaa2是Trp类似物, 其包含被取代的或未被取代的二环芳族环组分或2个或更多个被取代的或未被取代的单环芳族环组分。
94. 根据权利要求90所述的长效坎普他汀类似物, 其中Xaa2*是Trp类似物, 其具有在吲哚环上的带负电取代基, 且不具有与Trp相比增加的疏水性。
95. 根据权利要求90所述的长效坎普他汀类似物, 其中Xaa2*是Trp类似物, 其包含在色氨酸的1或5位处的低级烷氧基或低级烷基取代基或在色氨酸的5或6位处的卤素取代基。
96. 根据权利要求90所述的长效坎普他汀类似物, 其中Xaa2*是Trp类似物, 其包含在色氨酸的1或5位处的低级烷氧基或低级烷基取代基或在色氨酸的5或6位处的卤素取代基, 且Xaa2*是Trp。
97. 根据权利要求90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坎普他汀类似物部分, 所述坎普他汀类似物部分具有选自SEQ ID NO:9-36的序列的环状肽, 任选地, 还包含具有侧链的氨基酸, 所述侧链包含伯胺或仲胺或巯基反应性基团。
98. 根据权利要求90所述的长效坎普他汀类似物部分, 其中所述坎普他汀类似物包含具有选自SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36的序列的环状肽。
99. 根据权利要求90所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述坎普他汀类似物部分包含具有SEQ ID NO:28、32或34的序列的环状肽。
100. 根据权利要求54-83中的任一项所述的长效坎普他汀类似物, 其中所述长效坎普他汀类似物包含坎普他汀类似物部分, 所述坎普他汀类似物部分包含具有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) 的序列的环状肽, 其中X' aa4和Xaa选自Trp和Trp类似物, 其中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, X' aa2和X'' aa4不是Cys, 且所述肽经由X' aa2和X'' aa4之间的键而环化。
101. 根据权利要求100所述的长效坎普他汀类似物, 其中X' aa1、X' aa3、X'' aa2、X'' aa3和X'' aa5中的任意一个或多个与根据权利要求90-99中的任一项所述的肽中的对应位置处的氨基酸相同, 且X'' aa1是Ala或无支链的单甲基氨基酸。
102. 根据权利要求100所述的长效坎普他汀类似物, 其中X' aa2和X'' aa4之一是具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸或氨基酸类似物, X' aa2和X'' aa4中的另一个是具有含羧酸基团的侧链的氨基酸或氨基酸类似物, 且所述键是酰胺键。
103. 根据权利要求100所述的长效坎普他汀类似物, 其中X' aa1、X' aa3、X'' aa1、X'' aa2、

X^{aa3}、和X^{aa5}与根据权利要求90-99中的任一项所述的环状肽中的对应位置处的氨基酸相同,且其中,任选地,X^{aa2}和X^{aa4}之一是具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸或氨基酸类似物,X^{aa2}和X^{aa4}中的另一个是具有含羧酸基团的侧链的氨基酸或氨基酸类似物,且所述键是酰胺键。

104. 根据权利要求84-103中的任一项所述的长效坎普他汀类似物,其中所述环状肽在N末端被乙酰化,在C末端被酰胺化,或者既在N末端被乙酰化又在C末端被酰胺化。

105. 一种长效坎普他汀类似物,其包含这样的化合物:所述化合物包含(i)具有选自SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36的序列的环状肽;和(ii)具有10kD至45kD之间的分子量的聚合物。

106. 根据权利要求84-105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:所述化合物中式I-XVI或式A-H中的任一个的化合物的至少一个NHS酯已经与坎普他汀类似物部分的侧链或末端中的氨基反应,条件是式I-XVI或式A-H中的任一个的化合物具有10kD至45kD之间的分子量。

107. 一种制备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,条件是式I-XVI或式A-H中的任一个的化合物具有10kD至45kD之间的分子量。

108. 一种制备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SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40a或41A中的任一个的氨基酸序列,条件是式I-XVI或式A-H中的任一个的化合物具有10kD至45kD之间的分子量。

109. 一种长效坎普他汀类似物,其根据权利要求107-108所述的方法制备,或者在结构方面与所述长效坎普他汀类似物相同。

110. 根据权利要求84-106或109或145-164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进一步包含靶向部分。

111. 一种组合物,其包含根据权利要求54-105或109或145-164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。

112. 一种药物组合物,其包含根据权利要求54-106或109或145-164中的任一项所述的长效坎普他汀类似物。

113. 一种药物组合物,其包含根据权利要求54-106或109或145-164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。

114. 一种降低细胞或器官对补体依赖性的损伤的敏感性的方法,所述方法包括:使所述细胞与根据权利要求54-106或109-113或144-165中的任一项所述的长效坎普他汀类似物或组合物接触。

115. 根据权利要求114所述的方法,其中所述细胞或器官是人细胞或器官。

116. 根据权利要求114所述的方法,其中所述细胞是血细胞,或所述器官是心脏、肾、肝、肺或胰腺。

117. 根据权利要求114所述的方法,其中所述方法包括:将所述长效坎普他汀类似物或组合物施用给受试者。

118. 一种治疗受试者的方法,所述受试者需要治疗补体介导的病症,所述方法包括:将

根据权利要求54-106、109-113、144-165或167-174中的任一项所述的长效坎普他汀类似物或组合物施用给所述受试者。

119. 根据权利要求118所述的方法, 其中将所述长效坎普他汀类似物局部地施用至处于补体介导的损伤的风险中的部位或经历补体介导的损伤的部位。

120. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述病症会导致对红细胞的补体介导的损伤。

121. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述病症会导致对红细胞的补体介导的损伤, 且血管内地或皮下地施用所述长效坎普他汀类似物。

122. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者具有补体调节缺陷。

123. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗移植排斥。

124. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗缺血/再灌注损伤。

125. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗溶血性贫血。

126. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗自身免疫病。

127. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗神经性疼痛。

128. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗MPGN。

129. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗视神经脊髓炎。

130. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗脊髓损伤。

131. 根据权利要求118所述的方法, 其中所述受试者需要治疗哮喘、COPD或特发性肺纤维化。

132. 根据权利要求118-131中的任一项所述的方法, 其中皮下地施用所述长效坎普他汀类似物。

133. 根据权利要求118-131所述的方法, 其中每天皮下地施用所述长效坎普他汀类似物一次或多次。

134. 根据权利要求118-131中的任一项所述的方法, 其中透皮地施用所述长效坎普他汀类似物。

135. 根据权利要求118-131中的任一项所述的方法, 其中使用笔装置皮下地施用所述长效坎普他汀类似物。

136. 根据权利要求118-131中的任一项所述的方法, 其中肌肉内地施用所述长效坎普他汀类似物。

137. 根据权利要求118-131中的任一项所述的方法, 其中所述长效坎普他汀类似物包含具有约40kD的分子量的聚合物并且每天皮下地施用所述长效坎普他汀类似物1或2次, 其中所述总的日剂量在90mg和360mg之间, 任选地在180mg/天和270mg/天之间。

138. 根据权利要求107或权利要求108所述的方法, 其中所述式I-XVI或式A-H中的任一个的化合物和所述坎普他汀类似物部分各自包含点击功能(click functionality), 且所述方法包括进行点击化学反应。

139. 一种坎普他汀类似物, 其包含点击化学基团。

140. 根据权利要求139所述的坎普他汀类似物, 其中所述坎普他汀类似物包含具有SEQ ID NO: 3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一个的化合物。

141. 根据权利要求139或权利要求140所述的坎普他汀类似物, 其中所述点击化学基团包含叠氮、炔、辛炔、二苯并芳环辛炔。

142. 根据权利要求140所述的坎普他汀类似物,其中所述点击化学基团是DBCO、DIBO、DIFO、BARAC或BCN。

143. 根据权利要求140所述的坎普他汀类似物,其中所述点击化学基团适合用于无铜点击化学反应。

144. 一种组合物,其包含根据权利要求139-143中的任一项所述的坎普他汀类似物和CRM,其中所述CRM包含聚合物,所述聚合物的分子量为10kD至45kD,任选地为35kD至45kD,例如,40kD。

145. 一种缀合物,其通过根据权利要求139-143中的任一项所述的坎普他汀类似物与包含互补的点击化学基团的CRM反应形成,其中所述CRM包含聚合物,所述聚合物的分子量为10kD至45kD,任选地为35kD至45kD,例如,40kD。

146. 一种长效坎普他汀类似物,其包含坎普他汀类似物部分和通过点击化学键缀合的CRM,其中所述CRM包含聚合物,所述聚合物的分子量为10kD至45kD,任选地为35kD至45kD,例如,40kD。

147. 一种长效坎普他汀类似物,其包含坎普他汀类似物部分和CRM,其中所述CRM包含POZ,所述POZ的分子量为10kD至45kD,任选地为35kD至45kD,例如,40kD。

148. 一种长效坎普他汀类似物,其包含至少2个坎普他汀类似物部分和CRM,所述CRM包含聚合物,所述聚合物的分子量为10kD至45kD,任选地为35kD至45kD,例如,40kD,进一步任选地,其中每个坎普他汀类似物部分都包含SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一个。

149. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其中,所述长效坎普他汀类似物具有与所述坎普他汀类似物部分序列相同的坎普他汀类似物的在摩尔基础上的至少90%的活性,或至少100%的活性。

150. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其中所述CRM包含PEG。

151. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其中所述CRM包含POZ。

152. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其中所述CRM包含多肽。

153. 根据权利要求148-152中的任一项所述的长效坎普他汀类似物,其包含2个坎普他汀类似物部分。

154. 根据权利要求148-152中的任一项所述的长效坎普他汀类似物,其包含3个坎普他汀类似物部分。

155. 根据权利要求148-152中的任一项所述的长效坎普他汀类似物,其包含2到8个坎普他汀类似物部分。

156. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含2个坎普他汀类似物部分和直链PEG,其中坎普他汀类似物部分任选地经由氨基甲酸酯或酯键连接至所述直链PEG的每个末端。

157. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含3个坎普他汀类似物部分和PEG。

158. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含2到8个坎普他汀类似物部分和PEG。

159. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含2个坎普他汀类似物部分和

POZ。

160. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含3个坎普他汀类似物部分和POZ。

161. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含2到8个坎普他汀类似物部分和POZ。

162. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含2个坎普他汀类似物部分和多肽。

163. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含3个坎普他汀类似物部分和多肽。

164. 根据权利要求148所述的长效坎普他汀类似物,其包含2到8个坎普他汀类似物部分和多肽。

165. 一种组合物,其包含根据权利要求139-164中的任一项所述的坎普他汀类似物的,其中所述组合物是任选地药物组合物。

166. 根据权利要求118所述的方法,其中施用所述长效坎普他汀类似物治疗Th17相关疾病。

167. 根据根据权利要求54-106、109-113、144-165或167-174中的任一项所述的长效坎普他汀类似物,其中所述长效坎普他汀类似物具有至少约30kD的分子量、在施用给灵长类时至少约3天的终末半衰期、和包含与所述坎普他汀类似物部分序列相同的坎普他汀类似物的、但是不与所述CRM连接的坎普他汀类似物的在摩尔基础上的至少80%的活性。

168. 根据权利要求167所述的长效坎普他汀类似物,其具有至少约40kD的分子量。

169. 根据权利要求167或168所述的长效坎普他汀类似物,其具有至少约4天的终末半衰期。

170. 根据权利要求167或168所述的长效坎普他汀类似物,其具有至少约5天的终末半衰期。

171. 根据权利要求167或167所述的长效坎普他汀类似物,其具有包含与所述坎普他汀类似物部分序列相同的坎普他汀类似物、但是不与所述CRM连接的坎普他汀类似物的在摩尔基础上的至少90%的活性。

172. 根据权利要求167或168所述的长效坎普他汀类似物,其具有包含与所述坎普他汀类似物部分序列相同的坎普他汀类似物的、但是不与所述CRM连接的坎普他汀类似物的在摩尔基础上的至少相等的活性。

173. 根据权利要求167或167所述的长效坎普他汀类似物,其中所述坎普他汀类似物部分包含SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一个。

174. 根据权利要求167-173中的任一项所述的长效坎普他汀类似物,其中所述CRM包含PEG、POZ或多肽。

175. 一种治疗补体介导的眼病的方法,所述方法包括将根据权利要求54-106、109-113、144-165或167-174中的任一项所述的长效坎普他汀类似物施用给需要其的受试者。

176. 根据权利要求175所述的方法,其中所述眼病是AMD。

177. 根据权利要求175所述的方法,其中所述眼病是地图样萎缩。

178. 根据权利要求175所述的方法,其中所述眼病是中间型AMD。

179. 根据权利要求175-178中的任一项所述的方法, 其中通过玻璃体内注射施用所述长效坎普他汀类似物。

180. 根据权利要求179所述的方法, 其中每月或每隔一个月施用所述LACA一次。

181. 根据权利要求179或180所述的方法, 其中施用的剂量为10mg至20mg。

182. 根据权利要求179或180所述的方法, 其中施用的剂量为15mg。

183. 一种LACA单位剂量, 其包含聚合物, 所述聚合物的分子量为10kD至45kD, 任选地为35kD至45kD, 例如, 40kD, 其中所述单位剂量的量为45mg至360mg, 任选地为180mg至270mg, 例如, 180mg或270mg。

184. 一种用于玻璃体内施用的LACA单位剂量, 所述LACA包含聚合物, 所述聚合物的分子量为10kD至45kD, 任选地为35kD至45kD, 例如, 40kD, 其中所述单位剂量的量为10mg至20mg, 任选地为15mg。

185. 根据权利要求183或184所述的单位剂量, 其中所述聚合物的分子量为约30kD。

186. 根据权利要求183或184所述的单位剂量, 其中所述聚合物的分子量为约40kD。

187. 根据权利要求183-186中的任一项所述的单位剂量, 其还包含药学上可接受的运载体。

188. 一种注射器或容器, 其包含权利要求183-187中的任一项所述的单位剂量。

189. 根据权利要求187或188所述的单位剂量、注射器或容器, 其中所述LACA在所述药学上可接受的运载体中的浓度为125mg/ml至200mg/ml。

190. 根据权利要求189所述的单位剂量、注射器或容器, 其中所述LACA在所述药学上可接受的运载体中的浓度为140mg/ml至180mg/ml, 例如, 150mg/ml。

191. 根据权利要求187或188所述的单位剂量、注射器或容器, 其中所述LACA在所述药学上可接受的运载体中的浓度为80mg/ml至125mg/ml, 例如, 100mg/ml。

192. 根据权利要求183-191中的任一项所述的单位剂量、注射器或容器, 其中所述聚合物是PEG。

193. 根据权利要求183-192中的任一项所述的单位剂量、注射器或容器, 其中所述LACA包含两个坎普他汀类似物部分, 其中一个坎普他汀类似物部分经由以下部分附接至所述聚合物的每个末端: 包含不饱和烷基部分的部分、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。

194. 根据权利要求183-193中的任一项所述的单位剂量、注射器或容器, 其中所述LACA包含两个坎普他汀类似物部分, 其中一个坎普他汀类似物部分经由酯键或氨基甲酸酯键附接至所述聚合物的每个末端。

195. 根据权利要求183-194中的任一项所述的单位剂量、注射器或容器, 其中所述坎普他汀类似物部分包含SEQ ID NO: 3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一个。

196. 根据权利要求183-195中的任一项所述的单位剂量、注射器或容器, 其中坎普他汀类似物部分包含肽, 所述肽包含环状部分, 所述肽在N端、C端或两端延伸一个或多个氨基酸, 其中至少一个所述氨基酸具有侧链, 所述侧链包含反应性官能团, 其中所述一个或多个氨基酸的延伸任选地通过间隔子与所述坎普他汀类似物部分的环状部分分离。

197. 根据权利要求196所述的单位剂量、注射器或容器, 其中所述间隔子包含被取代的或未被取代的、饱和的或不饱和的烷基链, 或者低聚(乙二醇)链。

198. 根据权利要求197所述的单位剂量、注射器或容器,其中所述间隔子包含AEEAc部分。

199. 根据权利要求183-198中的任一项所述的单位剂量、注射器或容器,其中所述LACA是CA28-2TS-BF或CA28-2GS-BF。

给药方案

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年10月7日提交的美国临时专利申请号62/238,529以及2016年8月8日提交的美国临时专利申请号62/372,259的优先权和权益,其整体内容特此各自通过引用并入。

背景技术

[0003] 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。

发明内容

[0004] 在某些方面,本发明提供了和/或涉及某些长效坎普他汀(compstatin)类似物。例如,本发明提供了和/或涉及此类长效坎普他汀类似物,包含其的组合物,以及制备、鉴定、表征和/或使用其的方法。在某些方面,本发明提供了和/或涉及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,本发明提供了和/或涉及一种药用级组合物,其包含长效坎普他汀类似物。在一些方面,本公开描述了特别有用的长效坎普他汀类似物,并且还提供了特定的剂量、剂型、给药方案、单位剂量组合物,以及与给人受试者施用长效坎普他汀类似物(例如,如患有和/或易患一种或多种某些疾病、病症或病症的特定的人受试者)有关的其它技术,以及其它内容。

[0005] 在某些方面,本发明提供了治疗需要治疗补体介导的病症的受试者的方法,所述方法可以包括:使用特定的剂量、剂型(例如,单位剂量组合物和/或特定的制剂)和/或给药方案(例如,在某些实施方案中确定为对于治疗某些疾病、病症或状况特别理想的施用途径,给药的时机等)给所述受试者施用长效坎普他汀类似物。

[0006] 在某些实施方案中,根据本公开所述的待治疗的补体介导的病症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病症。在某些实施方案中,所述病症是缺血/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,所述病症是创伤。在某些实施方案中,所述病症是移植排斥。在某些实施方案中,所述病症是慢性呼吸病症,例如,哮喘或COPD。

[0007] 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,在本文中使用本领域接受的术语和缩写的含义。本文中描述的某些方面的实践可以采用本领域普通技术范围内的分子生物学、细胞培养、重组核酸(例如,DNA)技术、免疫学、和/或核酸和多肽的合成、检测、操作和量化等常规的技术。

术。参见,例如,Ausubel,F.等(编),Current Protocols in Molecular Biology,Current Protocols in Immunology,Current Protocols in Protein Science和Current Protocols in Cell Biology,所有均为John Wiley&Sons,N.Y.出版,例如,当前的2010年1月版或其后的版本;Sambrook,Russell和Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,2001或2012年的第4版。

附图说明

[0008] 图1的图显示了随着肽浓度(μM)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)。

[0009] 图2的图显示了随着化合物浓度(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。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。

[0010] 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_{max}的值会高估实际的C_{max}。CA28 (正方形,浅灰色),CA28-2 (三角形,黑色),CA28-3 (圆圈,深灰色)。

[0011] 图4的图显示了随着化合物浓度(μM)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)。

[0012] 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_{max}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_{max}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)。

[0013] 图6是代表性的色谱图,显示了使用反相HPLC对基于PEG的长效坎普他汀类似物的紫外线(UV)检测。具有33.68分钟的保留时间(RT)的峰代表PEG化的坎普他汀类似物并具有96%的相对面积。

[0014] 图7的图显示了随着化合物浓度(μM)而变化的CA28和长效坎普他汀类似物CA28-2CS、CA28-2GS、CA28-2HS和CA28-2TS的补体激活抑制活性百分比。CA28-2CS (菱形,红色);

CA28-2GS (交叉, 蓝色); CA28-2HS (三角形, 绿色); CA28-2TS (正方形, 黑色)。

[0015] 图8的图显示了随着化合物浓度(微摩尔)而变化的CA28和双官能化长效坎普他汀类似物CA28-2GS-BF的补体激活抑制活性百分比。CA28 (空心圆圈, 蓝色); CA28-2G-SBF (实心圆圈, 红色)。

[0016] 图9的图显示了在单次静脉内注射 (CA28 (正方形, 红色) 和CA28-2GS-BF (圆圈, 紫色)) 以后或当每天一次连续7天通过皮下注射 (仅CA28-2GS-BF, 星号, 蓝色) 施用以后, 食蟹猴中CA28和长效坎普他汀类似物CA28-2GS-BF的血浆浓度相对于时间的关系。以25mg/ml施用CA28-2GSBF。用于静脉内施用的给药体积是2ml/kg且用于皮下施用的给药体积是0.28ml/kg/天。CA28的数据来自不同的实验, 在所述实验中所述化合物也是在5%葡萄糖中的并被配制成20mg/ml并且给药体积为10ml/kg。在每种情况下, 媒介物是5%葡萄糖水溶液。

[0017] 图10 (A) 和10 (B) 的图显示了随着化合物浓度(微摩尔)而变化的CA28和双官能化长效坎普他汀类似物CA28-2TS-BF的补体激活抑制活性百分比。(A) CA28 (圆圈, 红色) 和CA28-2TS-BF (交叉, 蓝色) 对经典途径的抑制。(B) 旁路途径的抑制。CA28 (圆圈, 红色) 和CA28-2TS-BF (交叉, 蓝色)。

[0018] 图10 (C) 显示了CA28-2TS-BF的结构 (假定PEG部分是40kD)。

[0019] 图11的图显示了在单次静脉内注射200mg/kg CA28 (正方形, 红色)、单次静脉内注射7mg/kg CA28-2TS-BF (星号, 紫色)、皮下仅注射7mg/kg CA28-2TS-BF一次 (圆圈, 蓝色) 或每天一次连续7天皮下注射7mg/kg CA28-2TS-BF (倒三角形, 绿色) 之后, 食蟹猴中CA28和长效坎普他汀类似物CA28-2TS-BF的血浆浓度相对于时间的关系。在每种情况下, 媒介物是5%葡萄糖水溶液。

[0020] 图12显示了对来自PNH患者的红细胞上C3沉积的流式细胞计数分析, 所述细胞在修改版海姆氏试验 (Ham's test) 中暴露于激活的补体。(A) 显示了证实CA28对C3沉积作用的稀释实验结果。(B) 显示了证实CA28-2GS-BF对C3沉积影响的稀释实验结果。使用的化合物浓度示于每个图的上和上方。

[0021] 图13显示了对来自PNH患者的红细胞上C3沉积的流式细胞计数分析, 所述细胞在修改版海姆氏试验中, 在不存在补体抑制剂 (左图)、存在抗C5单克隆抗体依库珠单抗 (eculizumab) (中间图) 和存在CA28-2GS-BF (右图) 的条件下暴露于激活的补体。

[0022] 图14显示了在健康受试者中用包含40kD PEG的长效坎普他汀类似物在多次递增剂量试验中观察到的离体的血清诱导的溶血图。

具体实施方式

[0023] I. 定义

[0024] 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)。

[0025] “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。

[0026] “补体介导的病症”是其中已知或怀疑补体激活在至少一些罹患该病症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病症, 例如, 其中补体激活导致组织损伤的病症。补体介导的病症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病症, 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)或移植物功能病症; (iii) 涉及缺血/再灌注损伤的病症, 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) 呼吸系统病症, 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) 眼科病症, 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。“病症”在本文中“与”“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病症是为了方便, 且无意限制本发明。应该理解, 某些病症可以适当地列在多个种类中。

[0027] “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。

[0028] 本文中使用的“分离的”是指, 1) 从至少一些在自然状态下通常与其结合的组分中分离; 2) 通过涉及人的过程制备或纯化; 和/或3) 在自然条件下不发生, 例如, 在人工环境中存在。一般的, 除非另有说明或显而易见, 否则任何实体、产物、试剂、组合物等, 如果需要的话, 可被视为“分离的”。

[0029] 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”。

[0030] 本文中使用的“生理条件”是指能至少部分地模拟在活体的受试者(例如,哺乳动物受试者)中常见的那些条件的一组条件,例如温度、盐浓度、pH值。在某些方面,生理条件是指水性介质中的条件,例如,在体积/体积的基础上,包含至少90%、95%、96%、97%、97%、99%或约100%的水的介质。在某些实施方案中,如果存在其它液体,则该液体基本上不影响蛋白质的二级或三级结构。在一些实施方案中,生理条件至少部分地模拟发现于体液(例如,哺乳动物受试者的例如血液或细胞外液,例如,间质液)中的那些条件。本领域已知多种对,例如,体外测试,有益的生理条件。一般的,生理条件下的介质含有生理浓度的盐,例如,氯化钠。在某些实施方案中,生理浓度的盐是指浓度范围从约250mOsm/L至约350mOsm/L,例如,约275mOsm/L至约325mOsm/L,例如,约300mOsm/L。在某些实施方案中,生理条件与体液(例如血液或细胞外液(例如,间质液))近似等渗。在某些实施方案中,生理条件包括范围从约6.5至约7.8,例如,约7.0至约7.5的pH。在某些实施方案中,生理介质包含缓冲物质,所述缓冲物质帮助维持所述介质的pH在生理范围内。在某些实施方案中,生理条件包括使得典型的哺乳动物蛋白质,例如,通常在体液(例如血液或细胞外液)中存在的蛋白质,基本上保留通常在体液中存在的蛋白质所具有的二级结构以及三级结构(如果适用的话)的条件。在某些实施方案中,生理介质的组分以其在所述生理介质中的浓度存在时,对哺乳细胞通常基本上是无毒性的。在多个标准参考文献中列出了多种生理介质(有时称为“缓冲液”),例如以上引用的那些文献(例如,Sambrook等,Protocols series)。在一些实施方案中,生理温度的范围从约25摄氏度至约38摄氏度,例如,从约30摄氏度至约37摄氏度,例如,35摄氏度到37摄氏度。

[0031] 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。

[0032] 本文使用的术语“纯化的”,是指已经从至少某些或大部分组分中分离的物质,该物质在天然状态下或在最初生成时与所述组分结合或在纯化之前与所述组分结合。一般的,这样的纯化涉及人的活动。纯化的试剂可以是部分纯化的、基本上纯化的或是纯的。这样的试剂的纯度可以是,例如,纯度至少为50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%。在某些实施方案中,纯化核酸、多肽或小分子以使其分别构成存在于制剂中的总核酸、多肽或小分子材料的75%、80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%或更多。在某些实施方案中,纯化有机物质,例如核酸、多肽或小分子以使其构成存在于制剂中的总有机材料的75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。纯度可以基于,例如,干重、色谱跟踪(GC,HPLC等)峰的大小、分子丰度、电泳法、凝胶上的条带强度、光谱数据(例如,NMR)、要素分析、高通量测序、质谱法或任何本领域公认的定量方法。在某些实施方案中,水、缓冲物质、离子和/或小分子(例如,合成的前体如核苷酸或氨基酸),可任选地存在于纯化的制剂中。纯化的试剂可以通过将其从其它物质(例如,其他细胞材料)中分离或通过以用于达到所需纯度的方式生产而制得。在某些实施方案中,当“部分纯化的”用于细胞产生的分子时,是指细胞产生的分子不再存在于所述细胞内,例如,所述细胞已被裂解,并且任选地,已去除至少一些细胞材料(例如,细胞壁、细胞膜、细胞器)和/或已将所述分子从存在于该裂解物中的至少一些同类分子(蛋白质、RNA、DNA等)中分离或隔离。

[0033] “重组宿主细胞”、“宿主细胞”和其它此类术语,是指原核的或真核的细胞或细胞系,所述细胞或细胞系含有外源性核酸(通常为DNA),例如包含编码目的多肽的核酸的表达载体。应当理解,此类术语包括已经引入了所述载体或其它核酸的原始细胞的后代。合适的宿主细胞包括本领域内常规用于表达多核苷酸(例如,为了生产由该多核苷酸编码的多肽)的那些细胞的任一种,包括,例如,原核生物,例如大肠杆菌或其它细菌如埃希氏菌种;乳杆菌属、芽孢杆菌属(例如,枯草芽孢杆菌)、沙门氏假单胞菌属、链霉菌属、葡萄球菌属等;和真核生物,包括例如,真菌,如酵母(例如,毕赤酵母属(例如,巴斯德毕赤酵母)、克鲁维酵母,如乳酸克鲁维酵母,汉逊酵母,例如多形汉逊酵母)。其它真菌细胞的例子有丝状真菌细胞,例如细胞曲霉属、脉孢菌属、镰刀菌属或木霉属,例如,米曲霉、构巢曲霉或黑曲霉株;昆虫细胞(例如,Sf9)、植物细胞和动物细胞,例如,哺乳动物细胞如CHO、R1.1、B-W、L-M,非洲绿猴肾细胞(例如,COS-1、COS-7、BSC-1、BSC-40和BMT-10),以及培养的人细胞。也包括遗传修饰(例如,转基因)植物或动物中的遗传修饰细胞,其中至少一些这样的细胞产生重组多肽。多肽可于乳汁中分泌、从植物材料中获得等。可将所述外源核酸可作为附加体如质粒而稳定地维持,或者可以任选地在被复制或逆转录之后,至少部分地整合进宿主细胞的基因组中。术语例如“宿主细胞”等,也用来指在引入核酸之前,可用作外源核酸的接收者的细胞或细胞系。“重组多核苷酸”一般是含有在自然状态下未被发现彼此直接连接的核酸序列的多核苷酸。例如,所述核酸序列可以存在于不同的基因或不同的物种中或者一个或多个所述序列可以是天然发生的序列的变体,或者可以至少部分是不与天然发生的序列同源的人工序列。“重组多肽”一般至少部分由重组宿主细胞或由无细胞的体外表达系统对外源核酸进行转录和翻译产生,和/或包含在自然状态下未被发现彼此直接连接的氨基酸序列。在后一种情况下,所述重组多肽可以指“嵌合多肽”。在嵌合多肽中的氨基酸序列可以,例如,存在于不同的基因或不同的物种中,或者一个或多个所述序列可以是天然存在序列的变体,或者可以至少部分是在大部分长度上与天然存在的序列不相同的或在某些实施方案中不同源的人工序列。应该理解,嵌合多肽可以包含两个或更多的多肽。例如,嵌合多肽的第一和第二多肽A和B可以直接连接(A-B或B-A)或者可以由第三多肽部分C隔开(A-C-B或B-C-A)。在某些实施方案中,C部分代表多肽接头,该接头可以,例如,包含多个甘氨酸和/或丝氨酸残基或任意的多种其它氨基酸。在某些实施方案中,两个或更多个多肽可由非多肽接头连接。在某些实施方案中,本文所使用的“重组”包括由连接(例如,化学缀合、酶缀合)产生

的多肽,可以在重组宿主细胞中产生的较短的重组多肽。在某些实施方案中,重组多肽可以包含涉及分泌所述多肽的信号序列或将表达的多肽引导入特定的隔室或细胞器的序列。合适的序列是本领域已知的。可以针对目的宿主细胞的类型(例如,细菌、真菌、哺乳动物、植物等)选择适当的序列。在某些实施方案中,信号序列可以位于或邻近(例如,在其高达10-50个氨基酸内)N末端或C末端处。在某些实施方案中,多肽包含标记。标记对于方便检测和/或纯化含有该标记的蛋白质是有用的。标记的例子包括多组氨酸标记(例如,6X-His标签)、谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖结合蛋白、NUS标记、SNUT标记、Strep标记、表位标记如V5、HA、Myc蛋白或FLAG。在某些实施方案中,蛋白酶裂解位点位于所述标记与所述多肽之间的区域中,从而允许通过暴露于蛋白酶而将所述多肽从所述标记分离。在某些实施方案中,编码重组多肽的多核苷酸在目的宿主细胞(例如,细菌、真菌、哺乳动物、植物等)中至少部分进行了表达的密码子优化。在多个实施方案中,标记可以位于或邻近(例如,在其高达10-50个氨基酸内)多肽的N末端或C末端处。可以使用多种方法中的任一种来对重组多肽进行分离、纯化等。参见,例如,Sambrook,Protocols series或其他标准参考文献。使用的方法可包括,例如,透析(例如,使用具有确定孔径的膜)、层析、沉淀、凝胶纯化或基于亲和力的方法,在某些实施方案中,所述基于亲和力的方法使用标记或特异性结合试剂例如抗体。

[0034] 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、肼、胂、酰肼、重氮基、重氮鎗、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、脒、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)。

[0035] “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。

[0036] 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岁之间的人。在某些实施方案中,人受试者至少是12岁。在某些实施方案中,受试者是成人,例如,至少18岁,例如,18-100岁之间的人。在某些实施方案中,受试者至少是40、45、50、55、60、65、70、75或80岁。在某些实施方案中,所述受试者是儿童,例如,0-4岁或5-11岁之间的人。

[0037] 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征状或表现,抑制或防止所述征状或表现的进展,预防或降低止所述征状或表现的可能性。“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征状或表现。治疗可以包括:在发展出指示疾病的一种或多种征状或表现后,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征状或表现的严重程度,和/或抑制或所述疾病的一种或多种征状或表现。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征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征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征状或表现之前。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。

[0038] “载体”可以是能够通过,例如,转移、运输等,介导目的核酸在不同的遗传环境之间穿梭或进入细胞的多种核酸分子、病毒或其部分的任一种。可以使用,例如,限制和连接,将所述目的核酸连接至(例如,插入)所述载体。载体包括,例如,DNA或RNA质粒、粘粒、天然存在的或修饰的病毒基因组或其部分、可被包装入病毒衣壳的核酸、小染色体、人工染色体等。质粒载体通常包括复制起点(例如,用于在原核细胞中复制)。质粒可以包括部分的或全部的病毒基因组(例如,病毒启动子、增强子、加工或包装信号、和/或足以产生可以整合进所述宿主细胞基因组的核酸和/或产生感染性病毒的序列)。可将用于将核酸引入细胞的病毒或其部分称为病毒载体。病毒载体包括,例如,腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒(例如,慢病毒、牛痘病毒和其它痘病毒、疱疹病毒(例如,单纯疱疹病毒)等。杆状病毒用于,例如,昆虫细胞中。已知多种植物病毒载体,包括,例如,那些基于或包括花椰菜花叶病毒、烟草花叶病毒或其一种或多种遗传元件(例如,花椰菜花叶病毒35S启动子)的载体。病毒载体可含有

或可不含有足够的病毒遗传信息用于在被引入宿主细胞时产生感染性病毒,即,病毒载体可以是有复制能力的或是复制缺陷的。在某些实施方案中,例如,在缺乏足够的信息用于产生感染性病毒的实施方案中,如果想要产生病毒,可由宿主细胞或由另一被引入所述细胞的载体提供该信息。在某些实施方案中,如果不想要产生病毒,则不提供这样的信息。待转移的核酸可被掺入天然存在的或修饰的病毒基因组或其片段中,或在病毒衣壳内作为单独的核酸分子存在。载体可含有一个或多个编码标记物的核酸,所述标记物适合用于鉴定和/或选择已摄取了所述载体的细胞。标记物包括,例如,各种增强或减弱对抗生素或其它试剂(例如,赋予针对抗生素如嘌呤霉素、潮霉素或灭瘟素的抗性的蛋白质)的抗性或敏感性的蛋白质、其活性可经本领域已知的测试法检测的酶(例如, β -半乳糖苷酶或碱性磷酸酶)、以及蛋白质或RNA,所述蛋白质或RNA可检测地影响其表达(例如,荧光蛋白)细胞的表型。载体通常包括一个或多个适当的限制性酶位点,该位点可用于促进将核酸,例如,待表达的核酸,插入进所述载体。表达载体是所需核酸已被插入或可被插入的载体,所述核酸与调控元件(也称作“调控序列”、“表达控制元件”或“表达控制序列”)可操作地连接并可表达成RNA转录子(例如,可被翻译成蛋白质的mRNA或非编码RNA)。表达载体包括调控序列,例如,表达控制序列,所述调控序列在至少某些条件下足以引导与其可操作地连接的核酸的转录;其它表达所需的或有助于表达的元件由,例如,所述宿主细胞或由体外表达系统提供。这样的调控序列通常包括启动子并且可以包括增强子序列或上游激活子序列。在某些实施方案中,载体可以包括编码5'非翻译区和/或3'非翻译区的序列,所述序列可以包含裂解和/或聚腺苷酸化信号。一般而言,调控元件可以在插入所需表达的核酸之前就包含在载体中或可以包含在插入的核酸中或可以在插入所需表达的核酸之后插入载体中。如本申请所用,当核酸和调控元件共价地连接以使所述核酸的所述表达或转录受所述调控元件影响或控制时,称其为“可操作地连接”。例如,如果启动子区能够影响核酸的转录,则会将所述启动子区可操作地连接到所述核酸。本领域的普通技术人员将认识到,有助于基因表达的调控序列的确切的性质会因物种或细胞类型不同而变化,但是一般而言,会适当地包括,参与转录起始、RNA加工或翻译起始的序列。本领域普通技术人员有能力和判断力来选择和设计适当的载体和调控元件。例如,本领域普通技术人员将选择适当的启动子(或其它表达控制序列)用于在所需的物种(例如,原核生物(细菌)或真核生物(例如,真菌、植物、哺乳动物类)或细胞类型中表达。载体可以含有能够在哺乳动物细胞中指导表达的启动子,例如合适的病毒启动子,来自,例如,巨细胞病毒(CMV)、逆转录病毒、猿猴病毒(例如,SV40)、乳头状瘤病毒、疱疹病毒或其它感染哺乳动物细胞的病毒,或来自,例如,基因如EF1 α 、泛素(例如,泛素B或C)、球蛋白、肌动蛋白、磷酸甘油酸激酶(PGK)等的哺乳动物启动子,或复合启动子例如CAG启动子(CMV早期增强子元件和鸡 β -肌动蛋白启动子的组合)。在某些实施方案中,可以使用人启动子。在某些实施方案中,可以使用通常引导由真核RNA聚合酶I(“聚合酶I启动子”)介导的转录,例如,(U6、H1、7SK或tRNA的启动子或其功能性变体)。在某些实施方案中,使用通常引导由真核RNA聚合酶II(“聚合酶II启动子”)介导的转录的启动子或其功能性变体。在某些实施方案中,可以使用通常引导由真核RNA聚合酶III(“聚合酶III启动子”)介导的转录的启动子或其功能性变体,例如,用于转录核糖体RNA(除5S rRNA外)的启动子。本领域普通技术人员将选择适当的启动子用于引导目的序列的转录。可在哺乳动物细胞中使用的表达载体的例子包括,例如,pCDNA载体系列、pSV2载体系列、pCMV载体系列、

pRSV载体系列、pEF1载体系列、Gateway®载体等。在某些实施方案中,使用可调节的(例如,可诱导的或可阻遏的)表达控制元件,例如,使用可调节的启动子调控表达,例如,开启或增强或关闭或减弱。在某些实施方案中,载体可包含编码多肽的多核苷酸序列,其中所述多核苷酸序列位于插入所述载体的核酸的框架内,由此发生N-或C-末端融合。在某些实施方案中,所述多核苷酸序列编码的多肽可以包含信号序列(其引导蛋白质的分泌)或将所述表达的蛋白质引导入特定的细胞器或细胞内位点例如细胞核或线粒体的序列。在某些实施方案中,多肽包含标记。标记对于方便检测和/或纯化含有该标记的蛋白质是有用的。标记的例子包括多组氨酸标记(例如,6X-His标记)、谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖结合蛋白、NUS标记、SNUT标记、Strep标记、表位标记如V5、HA、Myc蛋白或FLAG。在某些实施方案中,蛋白酶裂解位点位于由所述插入的核酸编码的所述蛋白质和所述多肽之间的区域中,从而允许通过暴露于所述蛋白酶而去除所述多肽。可以使用本领域已知的方法将载体引入宿主细胞。本领域普通技术人员将基于,例如,所述载体、细胞类型等,选择适当的方法。合适的方法的例子包括,例如,磷酸钙介导的转染、以多种市售试剂的任一种进行的转染,例如,基于脂质的或基于非脂质的试剂(例如FuGENE、Lipofectamine、TurboFect);电穿孔;微粒轰击等。在标准参考文献如Sambrook、Protocols series和其它文献中详细解释了这些方法。

[0039] 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。

[0040] 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。

[0041] 本文中使用的“卤素”表示F、Cl、Br或I。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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。

[0046] 本文中使用的“羧基”表示-C(=O)OH基团。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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)NH₂)、-N-取代的氨基羰基(-C(=O)NHR)、CF₃、CF₂CF₃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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] II. 补体系统

[0055] 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。

[0056] 补体是先天性免疫系统的一个分支，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。

[0057] 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(H₂O)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。

[0058] 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。

[0059] 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。MB1-1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。

[0060] 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病症(例如,如本文中讨论的)的发病机制。

[0061] III.坎普他汀类似物

[0062] 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，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，Biochem Soc Trans. 32 (第1部分):28-32, 2004, Mallik, B.等，J. Med. Chem., 274-286, 2005; Katragadda, M.等，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。

[0063] 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)。

[0064] 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。

[0065] 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, Katragadda 2006, 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路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。

[0066] 坎普他汀类似物的活性可以以其IC₅₀(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IC₅₀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(W02004/026328)，已经将坎普他汀的IC₅₀测量为12μM。应当理解，所测量的给定坎普他汀类似物的准确IC₅₀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IC₅₀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IC₅₀值不超过坎普他汀的IC₅₀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IC₅₀是坎普他汀IC₅₀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IC₅₀是在约0.2μM至约0.5μM之间。在某些实施方案中，所述坎普他汀类似物的IC₅₀是在约0.1μM至约0.2μM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 μM 至约0.1 μM 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 μM 至约0.05 μM 之间。

[0067] 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, 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 μM 与1.0 μM 之间、介于0.05 μM 与0.1 μM 之间、介于0.025 μM 与0.05 μM 之间、介于0.015 μM 与0.025 μM 之间、介于0.01 μM 与0.015 μM 之间或介于0.001 μM 与0.01 μM 之间。

[0068] “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、 β 转角和二硫键。

[0069] 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。

[0070] 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 α , α -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-NaI)、1-萘基丙氨酸(1-NaI)、2-茚满基甘氨酸甲酸(2Ig1)、二氢色氨酸(Dht)、4-苯甲酰基-L-苯丙氨酸(Bpa)、2- α -氨基丁酸(2-Abu)、3- α -氨基丁酸(3-Abu)、4- α -氨基丁酸(4-Abu)、环己基丙氨酸(Cha)、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)、 α -甲基-L-色氨酸(α MeW)、 β -甲基-L-色氨酸(β MeW)、N-甲基-L-色氨酸(NMeW)、鸟氨酸(orn)、瓜氨酸、正亮氨酸、 γ -谷氨酸等。

[0071] 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, *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 α 或 β 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C₁-C₅)取代基)的Trp类似物(例如在4位)。在某些实施方案中,使用N(α)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C₁-C₅))的类似物。例子包括1-乙酰基-L-色氨酸和L- β -色氨酸。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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CH₂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)。

[0075] 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)_n-Gln-Asp-Xaa-Gly-(X'' aa)_m(SEQ ID NO:2)的肽的化合物,其中各X' aa和各X'' aa是独立选择的氨基酸或氨基酸类似物,其中Xaa是Trp或Trp类似物,并且其中n>1和m>1,而且n+m是5-21。所述肽具有Gln-Asp-Xaa-Gly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肽形成β转角的氨基酸或氨基酸类似物。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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)_n,而另一个位于(X''aa)_m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。

[0079] 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NH₂(CH₂)_nCH(NH₂)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δ-胱硫醚或γ-胱硫醚。在某些实施方案中,修饰包括:用CH₂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γ-胱硫醚。在另一个实施方案中,所述胱硫醚是δ-胱硫醚。根据本发明的另一种修饰包括,在不添加CH₂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。

[0080] 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:

[0081] Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa2*-Gly-Xaa3-His-Arg-Cys-Xaa4 (SEQ ID NO:6);其中:

[0082] Xaa1是Ile、Val、Leu、B¹-Ile、B¹-Val、B¹-Leu或包含Gly-Ile或B¹-Gly-Ile的二肽,且B¹代表第一封端部分;

[0083] Xaa2和Xaa2*独立地选自Trp和Trp类似物;

[0084] Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp或Trp类似物;

[0085] 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B²替换;并且

[0086] 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。

[0087] 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B¹。

[0088] 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B²替换。

[0089] 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。

[0090] 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-Nal)、1-萘基丙氨酸(1-Nal)、2-茚满基甘氨酸甲酸(Ig1)、二氢色氨酸(Dht)和4-苯甲酰基-L-苯丙氨酸。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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B¹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B²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B¹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B¹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B¹是乙酰基, 即, Xaa1是Ac-Ile、Ac-Val、Ac-Leu或Ac-Gly-Ile。

[0097] 在本发明的某些实施方案中, 封端部分B²是伯胺或仲胺(-NH₂或-NHR¹, 其中R是有机部分, 例如烷基)。

[0098] 在本发明的某些实施方案中, 封端部分B¹是中和/或降低正电荷(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B²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。

[0099] 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。

[0100] 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:

[0101] Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa2*-Gly-Xaa3-His-Arg-Cys-Xaa4 (SEQ ID NO: 7); 其中:

[0102] Xaa1是Ile、Val、Leu、Ac-Ile、Ac-Val、Ac-Leu或包含Gly-Ile或Ac-Gly-Ile的二肽;

[0103] Xaa2和Xaa2*独立地选自Trp和Trp类似物;

[0104] Xaa3是His、Ala或Ala类似物、Phe、Trp或Trp类似物;

[0105] 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-NH₂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。

[0106] 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。

[0107] 在本发明的某些实施方案中, Xaa1是Ile, 且Xaa4是L-Thr。

[0108] 在本发明的某些实施方案中, Xaa1是Ile, Xaa2*是Trp, 且Xaa4是L-Thr。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 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(W02004/026328, W02007044668, 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。在某些实施方案中,表1中的一种或多种坎普他汀类似物,例如,在与坎普他汀的第13位对应的位置处,含有至少一个N-甲基异亮氨酸。例如,在表1中列出序列的肽或任意其它坎普他汀类似物序列的C末端处或邻近的Thr,可被N-甲基Ile取代。如将理解的,在某些实施方案中,所述N-甲基化的氨基酸包含在第8位的N-甲基Gly和在第13位的N-甲基Ile。在某些实施方案中,所述N-甲基化的氨基酸包括在核心序列如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中的N-甲基Gly。在某些实施方案中,所述N-甲基化的氨基酸包括在核心序列如SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7中的N-甲基Gly。

[0112] 表1

[0113]

肽	序列	SEQ ID NO:	相对于坎普他汀的活性
坎普他汀	<i>H-ICVVQDWGHHRCT-CONH₂</i>	8	*
Ac-坎普他汀	<i>Ac-ICVVQDWGHHRCT-CONH₂</i>	9	3 倍多
Ac-V4Y/H9A	<i>Ac-ICVYQDWGAHRCT-CONH₂</i>	10	14 倍多
Ac-V4W/H9A-OH	<i>Ac-ICVWQDWGAHRCT-COOH</i>	11	27 倍多
Ac-V4W/H9A	<i>Ac-ICVWQDWGAHRCT-CONH₂</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-CONH₂</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-V42IgI/H9A	<i>Ac-ICV(2-IgI)QDWGAHRCT-CONH₂</i>	17	39 倍多
Ac-V42IgI/H9A-OH	<i>Ac-ICV(2-IgI)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-CONH₂</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-CONH₂</i>	23	64 倍多
Ac-V4W/H9(2-Abu)	<i>Ac-ICVWQDWG(2-Abu)HRCT-CONH₂</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-CONH₂</i>	26	31 倍多
Ac-V4(5-MeW)/H9A	<i>Ac-ICV(5-甲基-W)QDWGAHRCT-CONH₂</i>	27	67 倍多
Ac-V4(1-MeW)/H9A	<i>Ac-ICV(1-甲基-W)QDWGAHRCT-CONH₂</i>	28	264 倍多
Ac-V4W/W7(5fW)/H9A	<i>Ac-ICVWQD(5fW)GAHRCT-CONH₂</i>	29	121 倍多
Ac-V4(5fW)/W7(5fW)/H9A	<i>Ac-ICV(5fW)QD(5fW)GAHRCT-CONH₂</i>	30	NA
Ac-V4(5-MeW)/W7(5fW)/H9A	<i>Ac-ICV(5-甲基-W)QD(5fW)GAHRCT-CONH₂</i>	31	NA
Ac-V4(1MeW)/W7(5fW)/H9A	<i>Ac-ICV(1-甲基-W)QD(5fW)GAHRCT-CONH₂</i>	32	264 倍多
+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-CONH₂</i>	34	264 倍多

[0114]

Ac-V4(5-甲氧基-W)/H9A	<i>Ac-ICV(1-甲酰基-W)QDWGAHRCT-CONH₂</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

[0115] NA=不可得到

[0116] 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。

[0117] 在某些实施方案中,封端部分 B¹ 包含氨基酸,所述氨基酸可表示为 Xaa⁰。在某些实施方案中,封端部分 B² 包含氨基酸,所述氨基酸可表示为 Xaa^N。在某些实施方案中,封端部

分B¹和/或B²包含非标准氨基酸,例如D-氨基酸、N-烷基氨基酸(例如,N-甲基氨基酸)。在某些实施方案中,封端部分B¹和/或B²包含非标准氨基酸,所述非标准氨基酸是标准氨基酸的类似物。在某些实施方案中,氨基酸类似物与其所类似的标准氨基酸相比,包含低级烷基、低级烷氧基或卤素取代基。在某些实施方案中,取代基在侧链上。在某些实施方案中,取代基在α碳原子上。在某些实施方案中,封端部分B¹包含氨基酸,例如,非标准氨基酸,进一步包含B^{1a}部分。例如,封端部分B¹可表示为B^{1a}-Xaa0。在某些实施方案中,B¹中和/或降低正电荷,否则所述正电荷在生理pH下可存在于N末端。在某些实施方案中,B^{1a}包含,例如,酰基基团,或由其组成,所述酰基基团例如,包含,1-12个碳,例如,1-6个碳。在某些实施方案中,封端部分B^{1a}选自下组:甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、戊酰基、异戊酰基等。在某些实施方案中,包含氨基酸(例如,非标准氨基酸)的封端部分B²,可以进一步包含B^{2a}部分。例如,封端部分B²可表示为XaaN-B^{2a},其中N代表所述氨基酸的适当的编号(该编号将取决于所述肽的其余部分所使用的编号方式)。在某些实施方案中,B^{2a}中和/或降低可能在生理pH下存在于N末端的负电荷。在某些实施方案中,B^{2a}包含伯胺或仲胺(例如,NH₂)或由其组成。应该理解,在多个实施方案中,B^{1a}-Xaa0和/或XaaN-B^{2a}部分的封闭活性可由任一或两个所述部分的组分提供。在某些实施方案中,封端部分或其一部分,例如,氨基酸残基,可能对所述化合物对C3或C3b的亲力的增强和/或提高所述化合物的活性做出贡献。在某些实施方案中,对氨基酸残基的亲力或活性的贡献可以与对封闭活性的贡献至少同样重要。例如,在某些实施方案中,B^{1a}-Xaa0和/或XaaN-B^{2a}中的Xaa0和/或XaaN可以主要起到增强所述化合物的亲力或活性的作用,而B^{1a}和/或B^{2a}可以抑制对所述肽的消化和/或中和所述肽的电荷。在某些实施方案中,坎普他汀类似物包含SEQ ID NO:5-36中任一个的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:5-36在N末端和/或C末端进一步延伸。在某些实施方案中,所述序列可被表示为B^{1a}-Xaa0-SEQUENCE-XaaN-B^{2a},其中SEQUENCE代表SEQ ID NO:5-36中的任一个,其中B^{1a}和B^{2a}可以独立地存在或缺失。例如,在某些实施方案中,坎普他汀类似物包含B^{1a}-Xaa0-X'aa1-X'aa2-X'aa3-X'aa4-Gln-Asp-Xaa-Gly-X''aa1-X''aa2-X''aa3-X''aa4-X''aa5-XaaN-B^{2a}(SEQ ID NO:37A),其中X'aa1-X'aa2-X'aa3-X'aa4、Xaa、X''aa1、X''aa2、X''aa3、X''aa4和X''aa5如以上对SEQ ID NO:5的描述。

[0118] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物包含B^{1a}-Xaa0-Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa2*-Gly-Xaa3-His-Arg-Cys-Xaa4-XaaN-B^{2a}(SEQ ID NO:38A),其中Xaa1、Xaa2、Xaa2*、Xaa3和Xaa4如以上对SEQ ID NO:6的描述,或者其中Xaa1、Xaa2、Xaa2*、Xaa3和Xaa4如以上对SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的描述。

[0119] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物包含B^{1a}-Xaa0-Xaa1-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-XaaN-B^{2a}(SEQ ID NO:39A),其中Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4、Xaa5、Xaa6、Xaa7、Xaa8、Xaa9、Xaa10、Xaa11、Xaa12和Xaa13与SEQ ID NO:9-36任一个的第1-13位处的氨基酸相同。

[0120] 在某些实施方案中,在任意坎普他汀类似物序列中的Xaa0和/或XaaN包含氨基酸,所述氨基酸包含在一个或多个位点处具有烷基取代基的芳族环。在某些实施方案中,烷基取代基是低级烷基取代基。例如,在某些实施方案中,烷基取代基是甲基或乙基基团。在某些实施方案中,取代基位于不破坏所述化合物的所述芳族特性的任意位点。在某些实施方案中,取代基位于不破坏该取代基所连接的环的所述芳族特性的任意位点。在某些实施方

案中,取代基位于第1、2、3、4或5位处。在某些实施方案中,Xaa0包含酪氨酸、2-羟基苯丙氨酸或3-羟基苯丙氨酸的O-甲基类似物。对于本申请的目的,可用小写的“m”后面跟着三个字母的氨基酸缩写来具体表示所述氨基酸是N-甲基氨基酸。例如,当本文中出现缩写“mGly”时,其指代N-甲基甘氨酸(有时也表示为肌氨酸或Sar)。在某些实施方案中,Xaa0是或包含mGly、Tyr、Phe、Arg、Trp、Thr、Tyr (Me)、Cha、mPhe、mVal、mIle、mAla、DTyr、DPhe、DArg、DTrp、DThr、DTyr (Me)、mPhe、mVal、mIle、DAla或DCha。例如,在某些实施方案中,坎普他汀类似物包含具有序列B¹-Ile-[Cys-Val-Trp (Me)-Gln-Asp-Trp-mGly-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-B² (SEQ ID NO:40A) 或B¹-Ile-[Cys-Val-Trp (Me)-Gln-Asp-Trp-mGly-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-B² (SEQ ID NO:41A) 的肽。在所述活性化合物中,所述两个Cys残基由二硫键连接。在某些实施方案中,所述肽在所述N末端乙酰化和/或在所述C末端酰胺化。在某些实施方案中,如上所述,B¹包含B^{1a}-Xaa0和/或B²包含XaaN-B^{2a}。例如,在某些实施方案中,B¹包含Gly、mGly、Tyr、Phe、Arg、Trp、Thr、Tyr (Me)、mPhe、mVal、mIle、mAla、DTyr、DPhe、DTrp、DCha、DAla或由其组成,以及B²包含NH₂,例如,mIle的羧基末端-OH被NH₂取代。在某些实施方案中,B¹包含mGly、Tyr、Dtyr或Tyr (Me) 或由其组成,以及B²包含NH₂,例如,mIle的羧基末端-OH被NH₂取代。在某些实施方案中,在Xaa1位处的Ile被Gly取代。所选的坎普他汀类似物的补体抑制效力和/或C3b结合参数在WO/2010/127336 (PCT/US2010/033345) 和/或Qu等,Immunobiology (2012),doi:10.1016/j.imbio.2012.06.003中进行描述。

[0121] 在某些实施方案中,封端部分或其一部分,例如,氨基酸残基,可能对所述化合物对C3或C3b的亲力的增强和/或所述化合物的活性的提高做出贡献。在某些实施方案中,对氨基酸或氨基酸类似物的亲和力和活性的贡献可能比对封闭活性的贡献更显著。

[0122] 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-基团被如本申请中所述的替代封端部分B¹替换。在某些实施方案中,所述-NH₂基团被如本申请中所述的替代封端部分B²替换。

[0123] 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(Souluka, A.M. 等, Mol. Immunol., 35:160, 1998; Souluka, A.M. 等, 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、37、37A、38A、39A、40A或41A或本申请公开的另一坎普他汀类似物序列)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、37、37A、38A、39A、40A或41A或本申请公开的另一坎普他汀类似物序列)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。

[0124] 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, 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、37、37A、38A、39A、40A或41A或本申请公开的另一坎普他汀类似物序列)的肽基本上相同的分子间接触。

[0125] 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, Malik, 2005, 和Katragadda, 2006。

[0126] 在一些实施方案中,坎普他汀类似物可以是或者可以包含细胞反应性坎普他汀类似物。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,在生理条件下)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 (H₂O) 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。

[0127] 在某些实施方案中,本发明提供了和/或利用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,或与未附着至细胞或组

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”。通常所述靶分子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,将分离的细胞与靶向坎普他汀类似物进行离体(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,对受试者施用靶向坎普他汀类似物,且在体内与细胞、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。所述靶向部分使所述坎普他汀类似物靶向,例如,特定的细胞类型(通过与这样的细胞上的分子非共价地结合)。然后所述细胞反应性部分共价地结合所述细胞或细胞外物质。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。

[0128] 在某些方面,坎普他汀类似物可以是或者可以包含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。

[0129] 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, 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)。

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 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。

[0133] IV. 坎普他汀模拟物

[0134] 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。

[0135] 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 β 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或其它坎普他汀类似物序列)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其它坎普他汀类似物序列)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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 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Nikiforovich 1991)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。

[0139] 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。

[0140] V.细胞反应性的或长效的坎普他汀类似物

[0141] 如上所述,在一些实施方案中,本发明提供了和/或利用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(NH₂)基团的侧链（所述坎普他汀类似物可以由式R¹-(NH₂)表示））可以具有式R¹-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加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末端处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。

[0142] 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。

[0143] 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(-NH₂)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(ϵ -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。

[0144] 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(CH₂)_n,其中n是1-30。

[0145] 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(-(O-CH₂-CH₂-)_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。

[0146] 在某些实施方案中,L包含:不饱和的部分诸如-CH=CH-或-CH₂-CH=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(-C-O-C-);酰胺部分(-C(=O)-N-);酯部分(-CO-O-);羰基部分(-C(=O)-)亚胺部分(-C=N-);硫醚部分(-C-S-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;-NO₂;-CN;-CF₃;-CH₂CF₃;-CHCl₂;-CH₂OH;-CH₂CH₂OH;-CH₂NH₂;-CH₂SO₂CH₃;-或-GRG1,其中G是-O-、-S-、-NRG2-、-C(=O)-、-S(=O)-、-SO₂-、-C(=O)O-、-C(=O)NRG2-、-OC(=O)-、-NRG2C(=O)-、-OC(=O)O-、-OC(=O)NRG2-、-NRG2C(=O)O-、-NRG2C(=O)NRG2-、-C(=S)-、-C(=S)S-、-SC(=S)-、-SC(=S)S-、-C(=NRG2)-、-C(=NRG2)O-、-C(=NRG2)NRG3-、-OC(=NRG2)-、-NRG2C(=NRG3)-、-NRG2SO₂-、-NRG2SO₂NRG3-或-SO₂NRG2-,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病症和/或用于接触细胞、组织或器官(如本文中所述

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。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A-(L^{Pj})_j-M表示,其中j通常是在1-10之间,且每个L^{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-(CH₂)_n-和/或-(O-CH₂-CH₂-)_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-(CH₂)_m-C(=O)-NH-(CH₂CH₂O)_n(CH₂)_pC(=O)-或-(CH₂)_m-C(=O)-NH-(CH₂)_p(OCH₂CH₂)_nC(=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-CH₂-被CH-R替代,其中R可以是任意取代基。任选地,至少一个-CH₂-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。

[0147] 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L¹,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L²。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L³。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L¹、L²、L³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

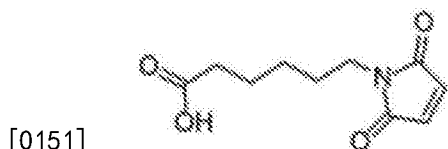
共价连接诸如生物素/抗生物素蛋白(抗生物素链菌素)连接或大约等同强度的其它非共价连接。

[0148] 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、37A、38A、39A、40A或41A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。色氨酸具有包含吡啶环的侧链,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。

[0149] 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直接或经由肽键连接至SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A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连接或经由连接部分连接至SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A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 M_1 代表SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A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 M_1 。 R1 和/或 R2 可以包含连接部分 $\text{L}^{\text{P}3}$ 。例如, R1 可以具有式 $\text{M}_2-\text{L}^{\text{P}3}$,和/或

R2可以具有式 $L^{P3}-M_2$,其中 L^{P3} 是连接部分,且 M_2 包含至少一个具有含伯胺或仲胺的侧链的氨基酸。例如, M_2 可以是Lys或包含Lys的氨基酸链。在某些实施方案中, L^{P3} 包含一个或多个氨基酸,或由其组成。例如, L^{P3} 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^{P3} 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^{P3} 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^{P3} 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^{P3} 经由酰胺键连接至 M_1 的N末端氨基酸。在某些实施方案中, L^{P3} 经由酰胺键连接至 M_1 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。

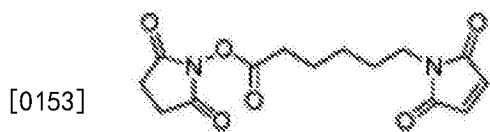
[0150] 在下面更详细地描述了某些细胞反应性坎普他汀类似物。在以下的讨论中,使用具有氨基酸序列Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr (SEQ ID NO:37) (对应于SEQ ID NO:28的坎普他汀类似物,其中在SEQ ID NO:37中的星号代表活性化合物中通过二硫键连接的半胱氨酸,且(1Me) Trp代表1-甲基-色氨酸)的肽作为一个示例性的坎普他汀类似物部分;使用马来酰亚胺(缩写为Ma1)作为细胞反应性官能团的一个例子;使用 $(CH_2)_n$ 和 $(O-CH_2-CH_2)_n$ 作为连接部分的例子;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NH₂。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,下面或在本申请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。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(Ma1-(CH₂)₅-COOH)。



化合物 I

[0152] 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

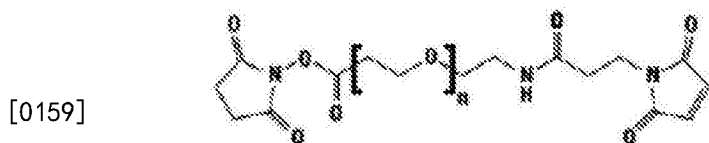
[0154] SEQ ID NO:37的化合物可以在N末端和/或C末端处被修饰,以产生细胞反应性坎普他汀类似物。例如,通过与Ile的N末端氨基反应,可以使用化合物II来制备下述细胞反应性坎普他汀类似物。

[0155] 马来酰亚胺-(CH₂)₅-C(=O)-Ile-Cys*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH₂(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。

[0156] 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:

[0157] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-(C=O)-(CH₂)₅-马来酰亚胺(SEQ ID NO:39)。

[0158] 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(CH₂-CH₂-O)_n和(CH₂)_m(其中m=2)部分:



化合物 III

[0160] 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。

[0161] 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:

[0162] 马来酰亚胺-(CH₂)₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂C(=O)-Ile-Cys*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH₂(SEQ ID NO:40)

[0163] 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(CH₂-CH₂-O)_n部分中的n的示例性值。

[0164] 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):

[0165] 马来酰亚胺-(CH₂)₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂C(=O)-Ile-Cys*-Val-(1Me)Trp-

Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:41)

[0166] 马来酰亚胺-(CH₂)₃-C(=O)-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂C(=O)-Ile-Cys*-Val-(1Me)

Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:42)

[0167] 马来酰亚胺-(CH₂)₅-C(=O)-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂C(=O)-Ile-Cys*-Val-(1Me)

Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:43)

[0168] 马来酰亚胺-(CH₂)₄-C(=O)-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂C(=O)-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:44)

[0169] 马来酰亚胺-(CH₂)₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂C(=O)-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:45)

[0170] 马来酰亚胺-(CH₂)₅-C(=O)-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂C(=O)-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:46)

[0171] 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:

[0172] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-Lys-NH₂ (SEQ ID NO:47)。

[0173] 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:

[0174] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-(Gly)₅-Lys-NH₂ (SEQ ID NO:48)。

[0175] 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NH₂(CH₂CH₂O)_nCH₂C(=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):

[0176] NH₂(CH₂)₅C(=O)-Ile-Cys-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:49)

[0177] NH₂(CH₂CH₂O)₂CH₂C(=O)-Ile-Cys-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:50)

[0178] 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):

[0179] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂-C(=O)-Lys-NH₂ (SEQ ID NO:51)

[0180] 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。

[0181] 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:

[0182] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-Lys-(C(=O)-(CH₂)₅-Mal)-NH₂ (SEQ ID NO:52)。

[0183] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-(Gly)₅-Lys--(C(=O)-(CH₂)₅-Mal)-NH₂ (SEQ ID NO:53)。

[0184] Mal-(CH₂)₅-(C(=O)-NH(CH₂)₅C(=O)-Ile-Cys-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:54)

[0185] Mal-(CH₂)₅-(C(=O)NH(CH₂CH₂O)₂CH₂C(=O)-Ile-Cys-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys-Thr-NH₂ (SEQ ID NO:55)

[0186] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH-CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂-C(=O)-Lys-(C(=O)-(CH₂)₅-Mal)-NH₂ (SEQ ID NO:56)

[0187] 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)-CH₂(OCH₂CH₂)₂NH(C(=O)-(CH₂)₅-Mal)-NH₂ (SEQ ID NO:57)。

[0188] 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-被包含任意其它坎普他汀类似物(例如,SEQ ID NO 3-27或29-36、37、37A、38A、39A、40A或41A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。

[0189] 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]。

[0190] 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)。

[0191] 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。

[0192] 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,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。

[0193] 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。

[0194] 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”(LACA)。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,或以约1-3mg/kg、3-5mg/kg、5-10mg/kg,例如,7mg/kg的剂量施用,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,当以例如,约1-3mg/kg、3-5mg/kg、5-10mg/kg,例如,7mg/kg的剂量皮下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,当以例如,

约1-3mg/kg、3-5mg/kg或5-10mg/kg,例如,7mg/kg的剂量静脉内地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介于约4-10、5-9、5-8、6-9、7-9或8-9天(例如,约4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10天)的平均血浆半衰期(例如,终末半衰期)。在某些实施方案中,当以例如,约1-3mg/kg、3-5mg/kg、5-10mg/kg,例如,7mg/kg的剂量皮下地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介于约4-10、5-9、5-8、6-9、7-9或8-9天(例如,约4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10天)的平均血浆半衰期(例如,终末半衰期)。在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物的特征在于,其在皮下注射之后的期间被广泛地从施用的位点吸收,并且在例如施用约1-2天之时或之后,其在血液中的水平与静脉施用相同量的化合物所达到的水平相当。在某些实施方案中,在皮下施用一定剂量约2、3、4、5、6、7、8或更多天之时或之后,所述血液中的水平是在静脉内施用相同量的化合物所达到的血液水平的约5%、10%、15%、20%或25%之内。参见,例如,图11,所述图显示了本文所述的示例性化合物剂量在经静脉内和皮下施用之后的约1-2天的药代动力学。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倍或100-150倍或150-200倍。应该理解,在不同的实施方案中,可在经由其它途径例如皮下施用和/或使用其它剂量,例如本申请所述的其它剂量(例如,20mg/kg)进行施用之后,观察到半衰期的增强。如上面所指出的,在某些实施方案中,SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A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、37、37A、38A、39A、40A或41A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、37、37A、38A、39A、40A或41A“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_{max}是不包含CRM的对应坎普他汀类似物的C_{max}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_{max}是不包含CRM的对应坎普他汀类似物的C_{max}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或20mg/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倍或100-150倍或150-200倍。应该理解,在不同的实施方案中,可在经由其它途径例如皮下施用和/或使用其它剂量,

例如本申请所述的其它剂量(例如,20mg/kg)进行施用之后,观察到肾清除率的下降。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v 5.2 (Pharsight Corporation, St. Louis, MO)或其它合适的程序,可以执行药代动力学分析。

[0195] 在某些实施方案中,CRM在生理条件下稳定至少24小时或更长时间。在某些实施方案中,CRM在哺乳动物,例如,灵长类动物,例如,人或非人灵长类动物(例如,猴)的血液、血浆或血清中稳定至少24小时。在不同的实施方案中,在生理条件下孵育24小时、48小时、72小时、96小时、120小时、144小时、168小时或更长时间后,所述CRM分子的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多保持完整。在不同的实施方案中,在血液、血浆或血清中于37摄氏度孵育48小时、72小时、96小时、120小时、144小时、168小时或更长时间后,所述CRM分子的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多保持完整。在不同的实施方案中,可以使用浓度为1 μ g/ml至约100mg/ml的CRM进行孵育。可以在不同时间点分析样品。可以使用例如色谱法(例如,HPLC)、质谱法、Western印迹或任意其它合适的方法评估大小或完整性。缀合至所述CRM的部分可以具有这种稳定的特性。在不同的实施方案中,包含CRM的长效坎普他汀类似物可以具有上文提及的任意稳定特性。在某些方面,关于长效坎普他汀类似物的完整性是指所述坎普他汀类似物部分仍与所述CRM缀合并且所述CRM的大小仍与开始孵育或施用时的大小大致相同。

[0196] 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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分。在某些实施方案中,所述PEG的平均分子量是至少20,000道尔顿,高达约100,000、120,000、140,000、160,000、180,000或200,000道尔顿。“平均分子量”表示数量平均分子量。在某些实施方案中, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 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。

[0197] 在某些实施方案中, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分是单分散的,且 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分的多分散性是1.0。这样的单分散的 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 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。

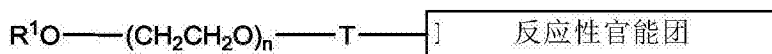
[0198] 在某些实施方案中,化合物包含多个 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分,其中所述 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分的总分子量是约1,000、5,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000至100,000道尔顿。在某些实施方案中,所述化合物或 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分的平均总

分子量是至少20,000道尔顿,高达约100,000、120,000、140,000、160,000、180,000或200,000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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分的总分子量。在某些实施方案中,所述化合物或 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分的平均总分子量是至少20,000道尔顿,高达约100,000、120,000、140,000、160,000、180,000或200,000道尔顿。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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 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。

[0199] 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。

[0200] 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(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。

[0201] 在某些实施方案中,单功能PEG具有式A:



[0202]

式 A

[0203] 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;

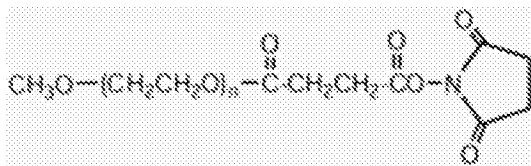
[0204] R^1 是氢、脂族或任意合适的末端基团;且

[0205] T是共价键或 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 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^x)-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-N(R^x)C(O)-$ 、 $-C(O)N(R^x)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-N(R^x)SO_2-$ 或 $-SO_2N(R^x)-$ 替代;且

[0206] 每个 R^x 独立地是氢或 C_{1-6} 脂族。

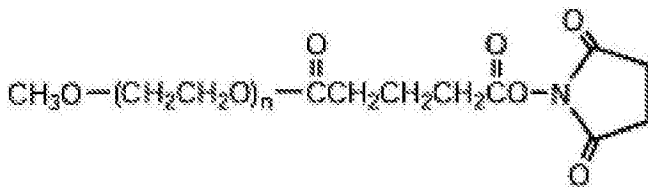
[0207] 示例性的式A的单功能PEG包括:

[0208]



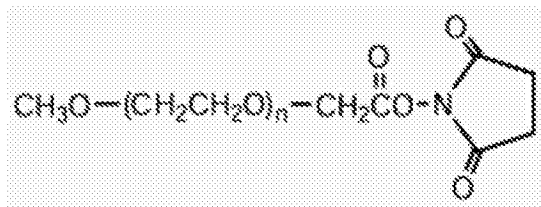
式 I

[0209] 在式I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,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:



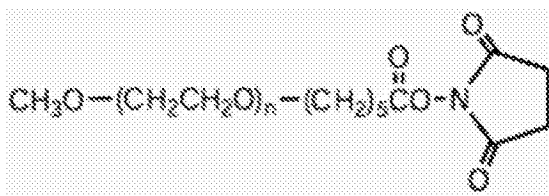
式 Ia

[0210]



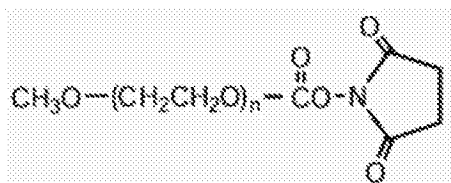
式 II

[0211] 在式II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,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)。



式 III

[0212]



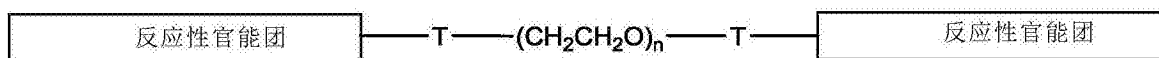
[0213]

式 IIIa

[0214] 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 $-(CH_2CH_2O)_n$ 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。

[0215] 在某些实施方案中,双功能的直链PEG具有式B:

[0216]

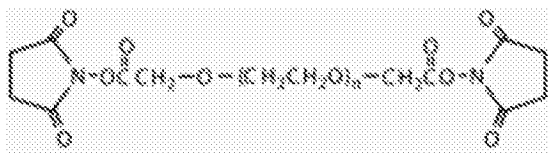


式 B

[0217] 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。

[0218] 示例性的式B的双功能PEG包括:

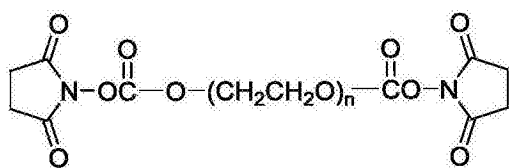
[0219]



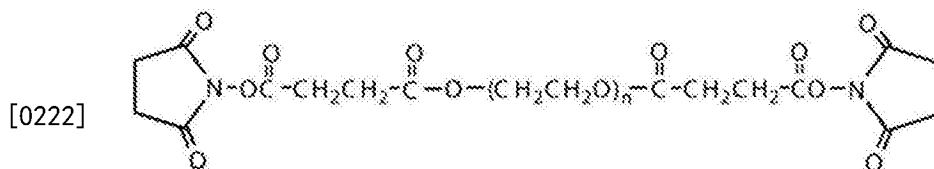
式 IV

[0220] 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。在某些实施方案中,例如,在包含反应性官能团的部分具有通式结构 $-COO-NHS$ 的实施方案中, m 是0。例如,在某些实施方案中,双官能PEG具有式IVa的结构,显示如下:

[0221]

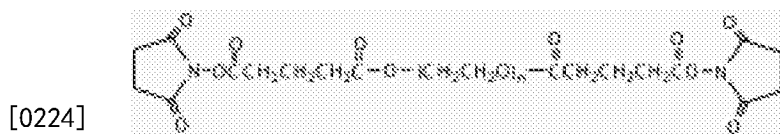


式 IVa



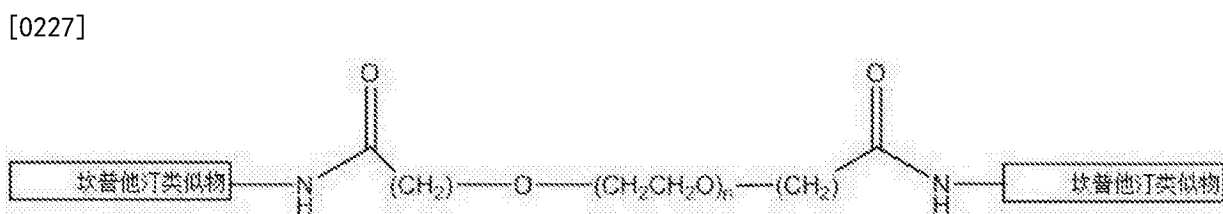
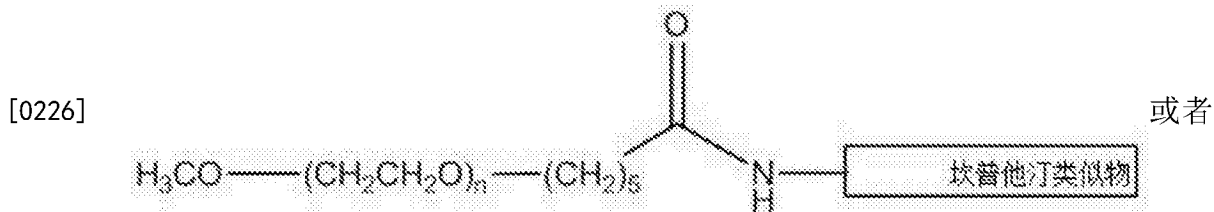
式 V

[0223] 在式V中,包含反应性官能团的部分具有通式结构 $\text{-CO- (CH}_2\text{)}_m\text{-COO-NHS}$,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。在某些实施方案中,例如, m 是2,显示如下:



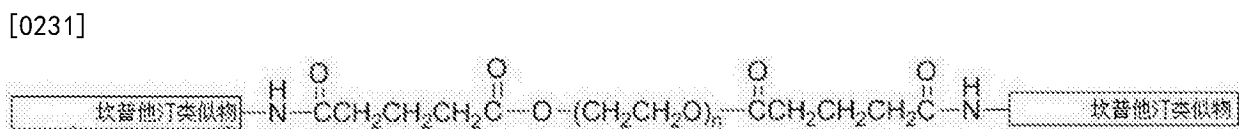
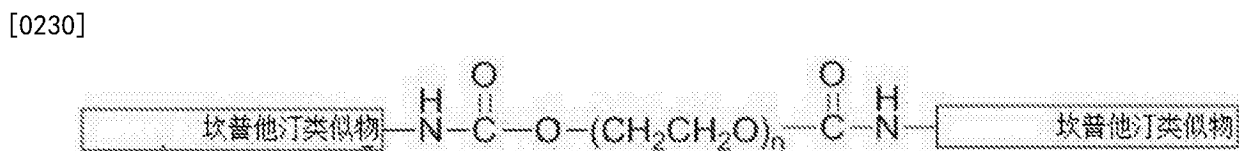
式 Va

[0225] 在某些实施方案中,本发明提供了缀合至聚合物的坎普他汀类似物。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:



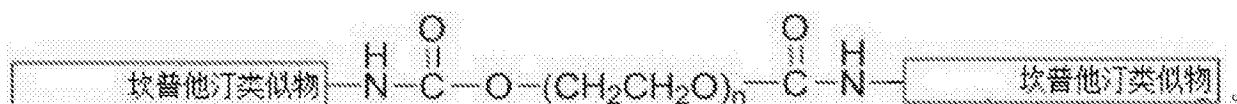
[0228] 其中,  代表胺基团在坎普他汀类似物上的连接点。在某些实施方案中,胺基团是赖氨酸侧链基团。

[0229] 应该理解,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。例如,式IVa和Va可以分别形成具有以下结构的坎普他汀类似物缀合物:

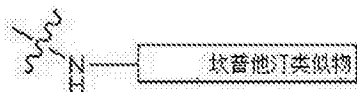


[0232] 在某些实施方案中,此类缀合物的所述PEG成分具有介于约20kD-100kD、约20kD-90kD、约20kD-80kD、约20kD-70kD、约20kD-60kD、约20kD-50kD、约30kD-80kD、约30kD-70kD、约30kD-60kD、约30kD-50kD、约30kD-45kD、约35kD-50kD、约35kD-45kD、约36kD-44kD、约37kD-43kD、约38kD-42kD或约39kD-41kD的平均分子量。在某些实施方案中,此类缀合物的所述PEG成分具有约40kD的平均分子量。本文中有时使用术语“双官能的”或“双官能化的”来表示包含两个与CRM连接的坎普他汀类似物部分的化合物。可用字母“BF”代表该化合物。在某些实施方案中,双官能化的化合物是对称的。在某些实施方案中,所述CRM与双官能化化合物的每个坎普他汀类似物部分之间的连接是相同的。在某些实施方案中,CRM和双官能化化合物的坎普他汀类似物之间的每个连接包含氨基甲酸酯。在某些实施方案中,CRM和双官能化化合物的坎普他汀类似物之间的每个连接包含氨基甲酸酯并且不包含酯。在某些实施方案中,双官能化化合物的每个坎普他汀类似物经由氨基甲酸酯直接与CRM连接。在某些实施方案中,双官能化化合物的每个坎普他汀类似物经由氨基甲酸酯直接与CRM连接,并且所述双官能化化合物具有以下结构:

[0233]

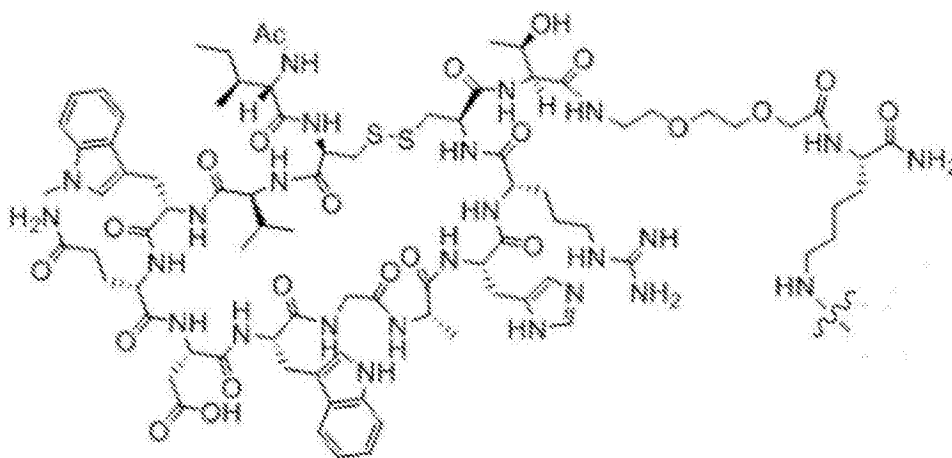


[0234] 在某些关于式的实施方案和本申请所述的实施方案中,



代表坎普他汀类似物中赖氨酸侧链基团的连接点,所述坎普他汀类似物具有以下结构:

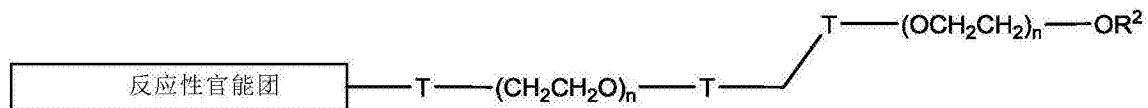
[0235]



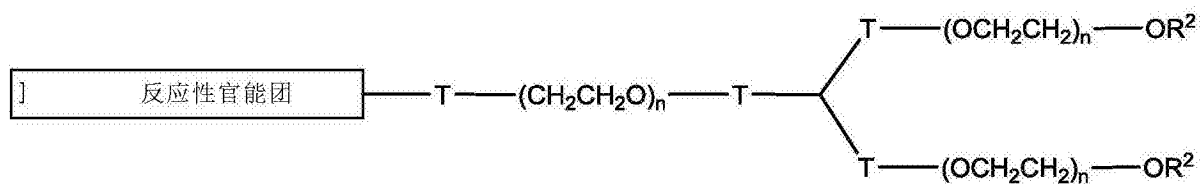
[0236] 其中符号“~~~~~”表示化学部分与分子或化学式剩余部分的连接点。

[0237] 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-(CH₂CH₂O)_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:

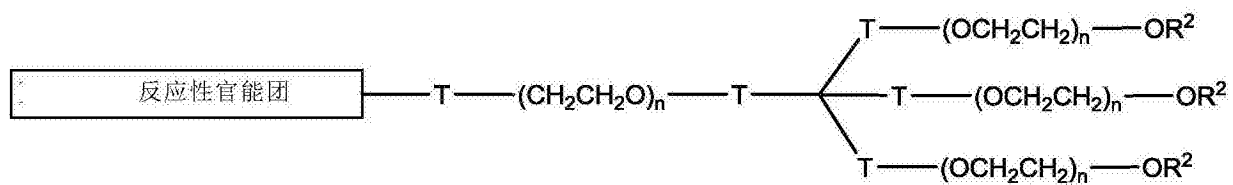
[0238]



式 C

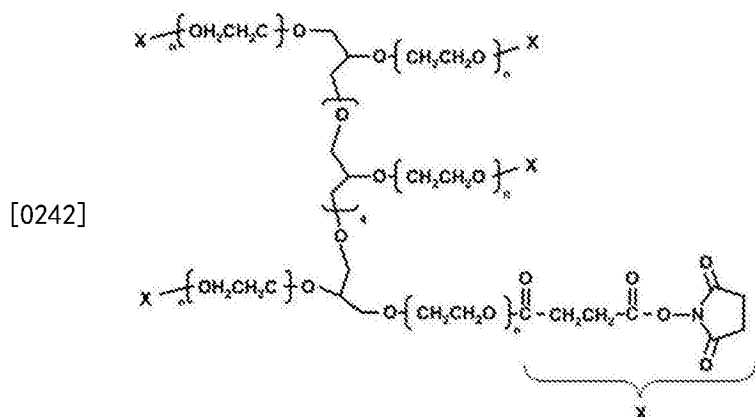


式 D



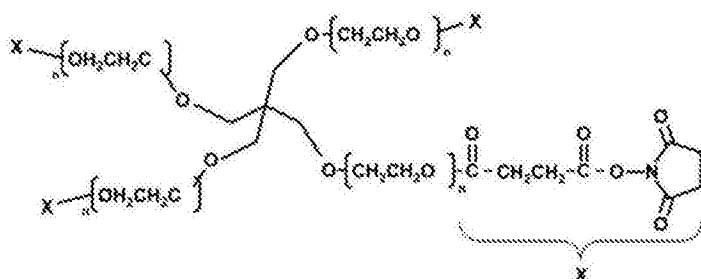
式 E

式 VI

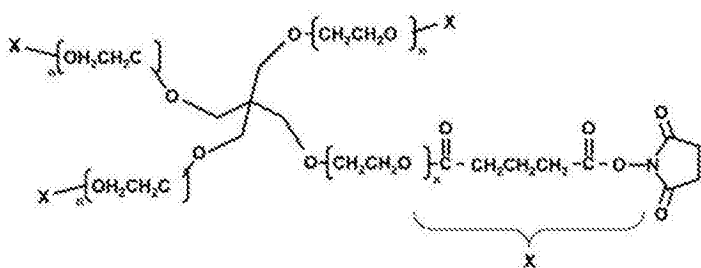


式 VII

[0243] 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:



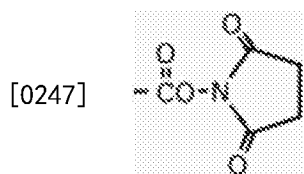
式 VIII



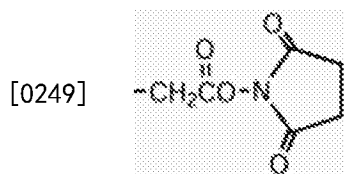
式 IX

[0245] 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 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}$ 基团终止,如上所述。

[0246] 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

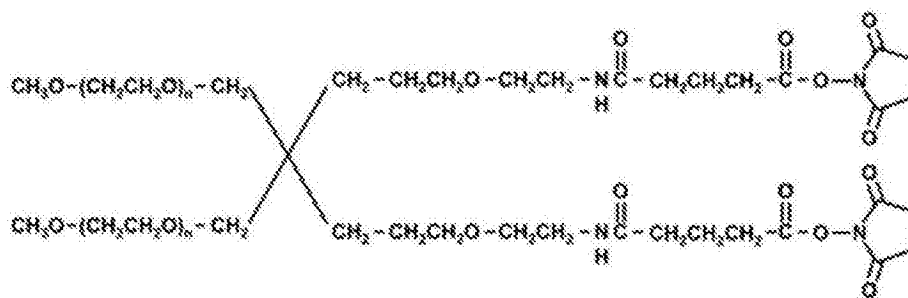


[0248] 在某些实施方案中,支链PEG具有式VII、VIII或IX(或其具有不同数目的分支的变体)的结构,前提条件是,x是



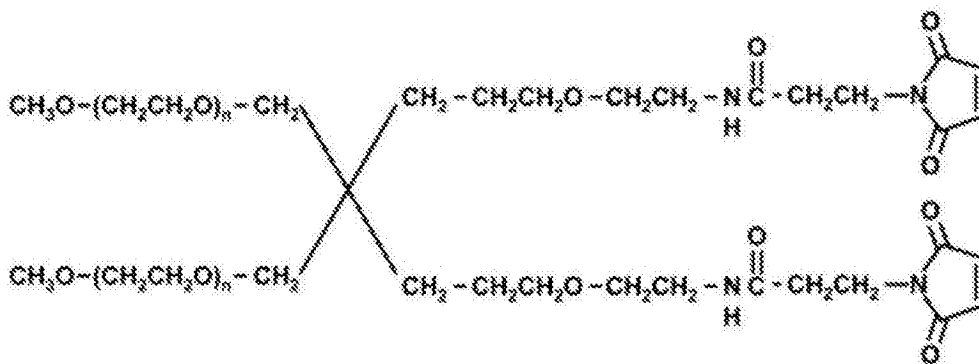
[0250] 当然,在上面的x部分中的亚甲基(CH₂)基团可以替代性地包含较长的烷基链(CH₂)_m,其中m是至多2、3、4、5、6、8、10、20或30,或者可以包含一个或多个本文中描述的其它部分。

[0251] 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:



式 X

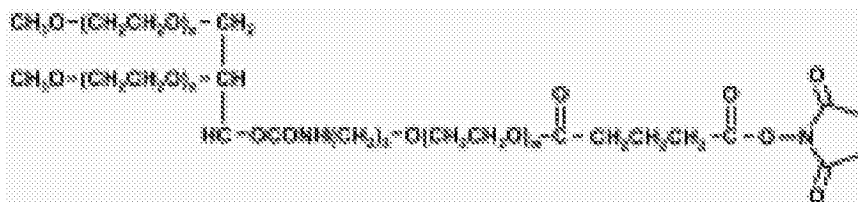
[0252]



式 XI

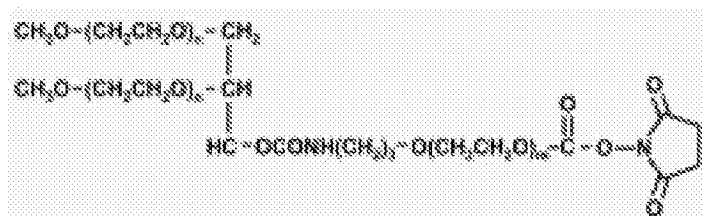
[0254] 在某些实施方案中,使用式X或XI的变体,其中所述4个分支中的3个或每个包含反应性官能团。

[0255] 可以如下表示PEG的其它例子:



式 XII

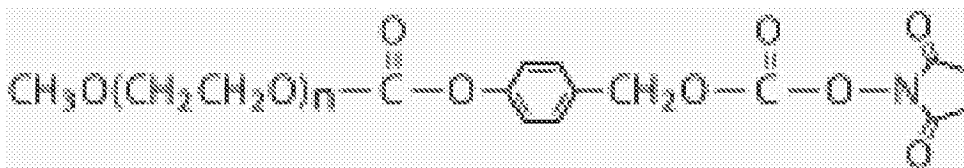
[0256]



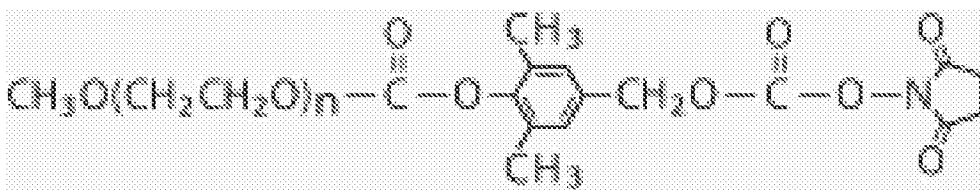
式 XIII

[0257] 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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}$ 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:

[0258]

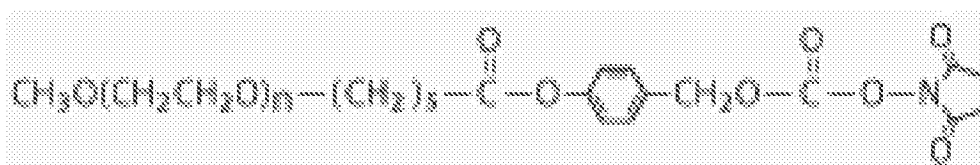


式 XIV



式 XV

[0259]



式 XVI

[0260] 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。

[0261] 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。

[0262] 在某些实施方案中,CRM和坎普他汀类似物之间的连接包含氨基甲酸酯(carbamate)。在某些实施方案中,坎普他汀类似物经由氨基甲酸酯直接与CRM连接。在某些实施方案中,CRM和坎普他汀类似物之间的连接不包含酯。在某些实施方案中,CRM和坎普他汀类似物之间的连接包含氨基甲酸酯并且不包含酯。在某些实施方案中,CRM和坎普他汀类似物之间的连接包含氨基甲酸酯并且不包含在水性介质中比氨基甲酸酯更易于水解的键。在某些实施方案中,所述CRM包含PEG部分或由其组成。

[0263] 在某些实施方案中,CRM和坎普他汀类似物之间的连接包含酰胺。在某些实施方案中,坎普他汀类似物经由酰胺直接与CRM连接。在某些实施方案中,CRM和坎普他汀类似物之间的连接包含酰胺并且不包含酯。在某些实施方案中,CRM和坎普他汀类似物之间的连接包含酰胺并且不包含在水性介质中比酰胺更易于水解的键。在某些实施方案中,所述CRM包含PEG部分或由其组成。

[0264] 在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的一个或多个坎普他汀类似物通过包含氨基甲酸酯的连接与CRM连接。在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的一个或多个坎普他汀类似物通过不包含酯的连接与CRM连接。在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的一个或多个坎普他汀类似物通过包含氨基甲酸酯并且不包含酯的连接与CRM连接。在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的一个或多个坎普他汀类似物通过包含氨基甲酸酯并且不包含在水性介质中比氨基甲酸酯更易于水解的键的连接与CRM连接。在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的每个坎普他汀类似物经由氨基甲酸酯直接与CRM连接。

[0265] 在某些实施方案中,所述CRM包含PEG部分或由其组成。在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的一个或多个坎普他汀类似物通过包含酰胺的连接与CRM连接。在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的一个或多个坎普他汀类似物通过包含酰胺并且不包含酯的连接与CRM连接。在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的一个或多个坎普他汀类似物通过包含酰胺并且不包含在水性介质中比酰胺更易于水解的键的连接与CRM连接。在某些实施方案中,多官能化化合物(例如,双官能化、三官能化或更广泛地官能化的化合物)的每个坎普他汀类似物经由酰胺直接与CRM连接。在某些实施方案中,所述CRM包含PEG部分或由其组成。

[0266] 在某些实施方案中,本发明提供了与聚合物缀合的坎普他汀类似物,其中所述聚合物是除PEG以外的聚合物。在某些实施方案中,聚合物是聚噁唑啉(POZ)。下面描述了用于直接缀合或经由接头缀合的示例性的单官能化和多官能化聚噁唑啉衍生物:

[0267] $Z-T-[N(COR^X)CH_2CH_2]_n-T-R^1$;

[0268] $R^1-[N(CO-T-Z)CH_2CH_2]_m-[N(COR^X)CH_2CH_2]_n^a-T-R^1$;

[0269] $R^1-[N(CO-T-Z^1)CH_2CH_2]_p-[N(COR^X)CH_2CH_2]_n-[N(CO-T-Z^2)CH_2CH_2]_m^a-T-R^1$;

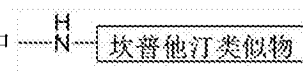
[0270] $R^1-[N(CO-T-Z^1)CH_2CH_2]_p-[N(COR^X)CH_2CH_2]_n-[N(CO-T-Z^2)CH_2CH_2]_m^a-T-Z$;

是1到1000。在某些实施方案中,接头是8-氨基-3,6-二氧杂辛酸(AEEAc)。在某些实施方案中,激活接头用于与聚合物部分或坎普他汀类似物的官能团缀合。例如,在某些实施方案中,在与赖氨酸基团侧链的胺基团缀合之前,激活AEEAc的羧基。

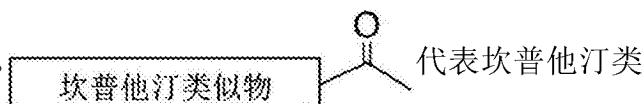
[0284] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物上合适的官能团(例如,胺、羟基、硫醇或羧酸基团)用于与聚合物部分直接地缀合或经由接头缀合。在某些实施方案中,坎普他汀类似物经由接头通过胺基团与PEG部分缀合。在某些实施方案中,胺基团是氨基酸残基的 α -胺基团。在某些实施方案中,胺基团是所述赖氨酸侧链的胺基团。在某些实施方案中,坎普他汀类似物经由具有 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 结构(其中 n 是1到1000)的接头通过赖氨酸侧链的胺基团(ϵ -胺基团)与PEG部分缀合。在某些实施方案中,坎普他汀类似物经由AEEAc接头通过赖氨酸侧链的所述胺基团与所述PEG部分缀合。在某些实施方案中,在缀合之后,所述 $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 接头将 $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ 部分引入坎普他汀赖氨酸侧链上。在某些实施方案中,在缀合之后,所述AEEAc接头将 $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ 部分引入坎普他汀赖氨酸侧链上。

[0285] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物经由接头与聚合物部分缀合,其中所述接头包含AEEAc部分和氨基酸残基。在某些实施方案中,坎普他汀类似物经由接头与聚合物部分缀合,其中所述接头包含AEEAc部分和赖氨酸残基。在某些实施方案中,聚合物是PEG。在某些实施方案中,坎普他汀类似物的C末端与AEEAc的胺基团连接并且AEEAc的C末端与赖氨酸残基连接。在某些实施方案中,坎普他汀类似物的C末端与AEEAc的胺基团连接,并且AEEAc的C末端与赖氨酸残基的 α -胺基团连接。在某些实施方案中,坎普他汀类似物的C末端与AEEAc的胺基团连接,AEEAc的C末端与所述赖氨酸残基的 α -胺基团连接,并且聚合物部分(例如PEG部分)通过所述赖氨酸残基的 ϵ -胺基团进行缀合。在某些实施方案中,修饰了所述赖氨酸残基的C末端。在某些实施方案中,通过酰胺化修饰所述赖氨酸残基的C末端。在某些实施方案中,将坎普他汀类似物的N末端进行乙酰化。

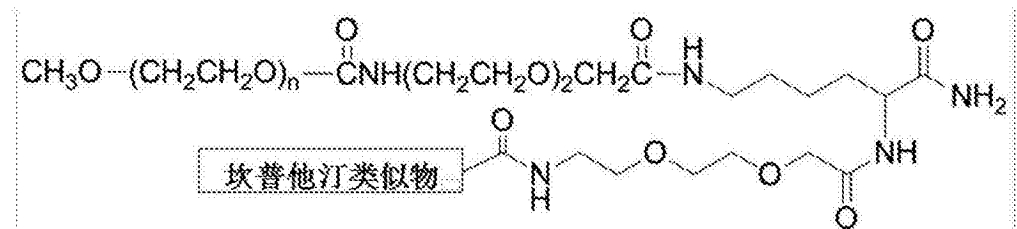
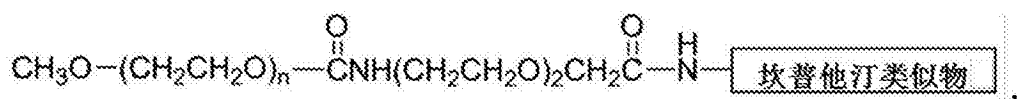
[0286] 下面描述了包含AEEAc接头和聚合物的示例性缀合物,其中



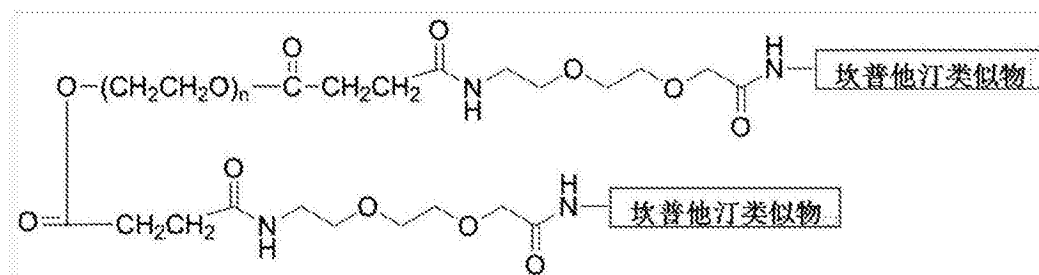
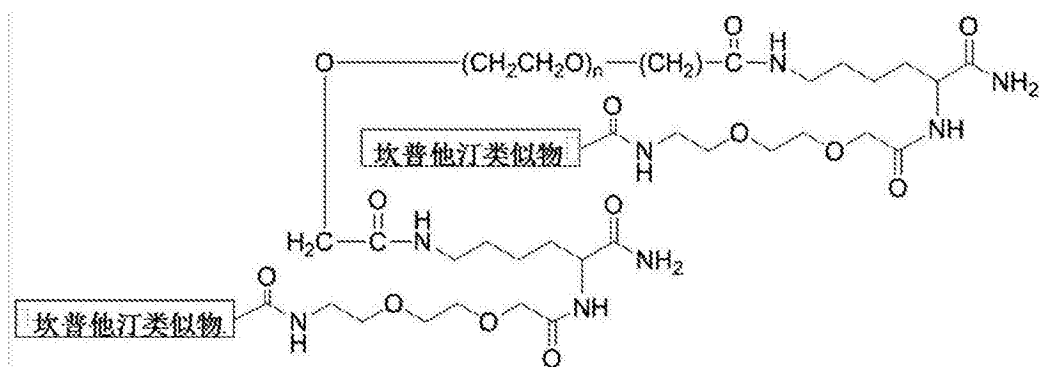
代表在坎普他汀类似物上胺基团的连接点。



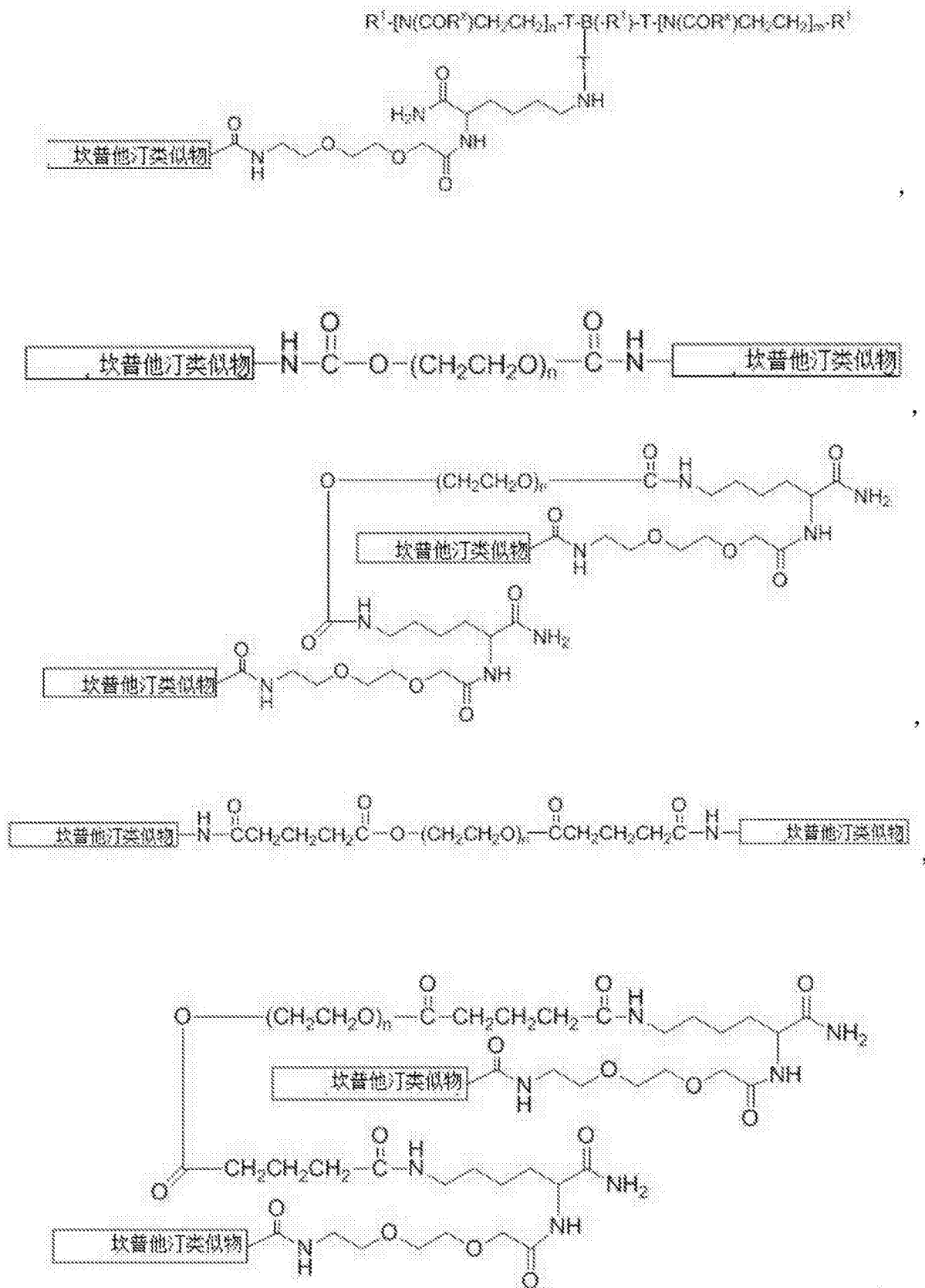
似物通过其C末端进行连接,并且其中每个其它的变量独立地如上文定义并在本文中的类和亚类中进行了描述。在某些实施方案中,胺基团是赖氨酸侧链的胺基团。



[0287]



[0289]



[0290] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物可以表示为M-AEEAc-Lys-B₂,其中B₂是封端部分,例如,NH₂,M代表SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一个,前提条件是

SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一个的C末端经由与AEEAc-Lys-B₂结合的肽进行连接。单官能或多官能(例如,双官能)PEG的NHS部分与所述赖氨酸侧链的游离胺反应以生成单官能化的(一个坎普他汀类似物部分)或多官能化的(多个坎普他汀类似物部分)长效坎普他汀类似物。在不同的实施方案中,任意包含含有反应性官能团的侧链的氨基酸可以用于代替Lys(或除Lys之外还使用)。包含合适的反应性官能团的单官能或多官能PEG可以与此侧链以类似于NHS-酯激活的PEG与Lys反应的方式反应。

[0291] 对于上面的式和结构的任一个,应当理解,明确公开了所述坎普他汀类似物的成分包含本文所述的任意坎普他汀类似物,例如,SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A、41A的任意坎普他汀类似物的实施方案。例如,但不限于,坎普他汀类似物可以包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。图10(C)描绘了示例性的长效坎普他汀类似物,其中所述坎普他汀类似物的成分包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。应当理解,如本文所述,在不同的实施方案中,所述PEG部分可以具有多种不同的分子量或平均分子量。例如,如本文所述,制剂内的单个PEG链可以在分子量上变化和/或不同的制剂可以具有不同的平均分子量和/或多分散性。在某些实施方案中,图10(C)的所述化合物的所述PEG部分具有介于约20kD-100kD、约20kD-90kD、约20kD-80kD、约20kD-70kD、约20kD-60kD、约20kD-50kD、约30kD-80kD、约30kD-70kD、约30kD-60kD、约30kD-50kD、约30kD-45kD、约35kD-50kD、约35kD-45kD、约36kD-44kD、约37kD-43kD、约38kD-42kD或约39kD-41kD的平均分子量。在某些实施方案中,图10(C)的所述化合物的所述PEG部分具有介于约30kD和约50kD之间的平均分子量,例如,介于约35kD和约45kD、介于约37.5kD和约42.5kD。在某些实施方案中,所述PEG部分具有约40kD的平均分子量,例如,37.5kD-42.5kD、38kD、39kD、40kD、41kD、42kD,所述化合物在本文中有时被称为CA28-2TS-BF。在某些实施方案中,包含CRM(例如PEG部分)的化合物具有约40kD的平均分子量,例如,37.5kD-42.5kD、38kD、39kD、40kD、41kD、42kD,当其被以约1-3mg/kg、3-5mg/kg或5-10mg/kg的剂量静脉内地或皮下地施用于非人灵长类动物或人类时,所述化合物具有至少约5天(例如,约5-10天,例如,约5、6、7、8、9天)的终末半衰期。

[0292] 在某些方面,本发明涉及与坎普他汀类似物相关的点击化学的使用。“点击化学”是本领域熟知的并在本发明的一些方面是有用的。在某些实施方案中,点击化学体现为叠氮化物和炔烃间通用的环加成反应,该反应使得众多有用的应用得以进行。开展点击化学的方法在本领域是已知的,并在以下进行了描述:Kolb,H.C.;Sharpless,K.B.,*Drug Disc.Today*,2003,1128-1137;Moses,J.E.;Moorhouse,A.D.;*Chem.Soc.Rev.*,2007,1249-1262,其每个的全部内容通过引用并入本文。点击化学是流行的生物缀合方法,这归因于其即便是在生物介质中也具有的高反应性和选择性。参见Kolb,H.C.;Finn,M.G.;Sharpless,K.B.*Angew.Chem.Int.Ed.*2001,40,2004-2021;和Wang,Q.;Chan,T.R.;Hilgraf,R.;Fokin,V.V.;Sharpless,K.B.;Finn,M.G.*J.Am.Chem.Soc.*2003,125,3192-3193。此外,目前已有的重组技术和合成方法允许将带有叠氮化物和炔烃的非经典氨基酸引入肽、蛋白质、细胞、病毒、细菌和其它生物实体,所述生物实体由蛋白质组成或展示蛋白质。参见Link,A.J.;Vink,M.K.S.;Tirrell,D.A.*J.Am.Chem.Soc.*2004,126,10598-10602;Deiters,A.;Cropp,T.A.;Mukherji,M.;Chin,J.W.;Anderson,C.;Schultz,P.G.*J.Am.Chem.Soc.*2003,125,11782-11783。

[0293] 本文使用的术语“点击化学基团”有时用来表示能够与适当的第二反应官能团一

起参与点击化学反应的反应官能团,所述第二反应官能团也是点击化学基团。所述第一和第二点击化学基团,或包含这样的基团的实体(例如,分子),可以是互补的。包含互补的点击化学基团的第一和第二实体,例如,分子,可被表示为点击化学伴侣。包含点击化学基团的实体或分子可被表示为“点击官能化的”。由互补的点击化学伴侣反应形成的键可被表示为“点击化学键”。

[0294] 在某些实施方案中,本发明提供了点击官能化的坎普他汀类似物,用于,例如,与伴侣分子或生物分子上的互补部分缀合。在某些实施方案中,互补的伴侣分子或生物分子是聚合物、肽、蛋白质或作为清除率降低部分的分子。在某些实施方案中,所述“点击官能化的”部分是能够与互补的带有叠氮化物的分子和生物分子进行[3+2]环加成反应的炔烃或炔烃衍生物。在另一实施方案中,所述“点击官能化的”官能团是能够与互补的带有炔烃分子和生物分子(即,点击化学)进行[3+2]环加成反应的叠氮化物或叠氮化物衍生物。

[0295] 在某些实施方案中,点击官能化的坎普他汀类似物在所述坎普他汀类似物的任意侧链基团上带有叠氮基团。在某些实施方案中,点击官能化的坎普他汀类似物在赖氨酸侧链基团上带有叠氮基团。

[0296] 在某些实施方案中,点击官能化的坎普他汀类似物在所述坎普他汀类似物的任意侧链基团上带有炔基团。在某些实施方案中,点击官能化的坎普他汀类似物在赖氨酸侧链基团上带有炔基团。

[0297] 在某些实施方案中,本发明提供了包含坎普他汀类似物、作为清除率降低部分的分子和三唑接头的坎普他汀缀合物。在某些实施方案中,三唑接头是坎普他汀缀合物和作为清除率降低部分的分子间点击缀合化学的结果。在某些实施方案中,所述CRM可以是本文公开的任意CRM。例如,所述CRM可以是PEG、多肽或POZ。

[0298] 在某些实施方案中,本发明提供了包含坎普他汀类似物、PEG部分和三唑接头的坎普他汀缀合物。在某些实施方案中,三唑接头是坎普他汀缀合物和PEG部分间点击缀合化学的结果。

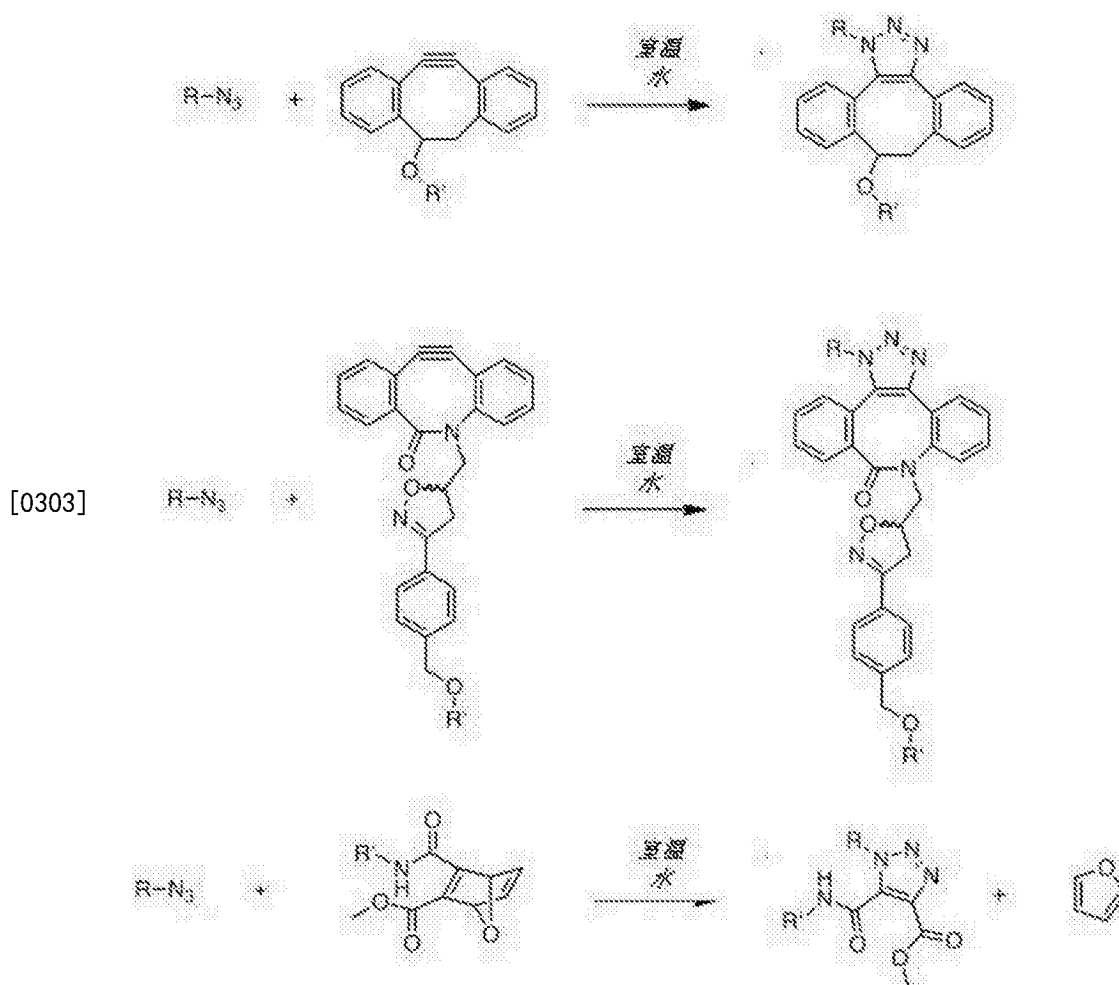
[0299] 在某些实施方案中,本发明提供了包含坎普他汀类似物、聚噁唑啉部分和三唑接头的坎普他汀缀合物。在某些实施方案中,三唑接头是坎普他汀缀合物和聚噁唑啉部分间点击缀合化学的结果。

[0300] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物和另一部分之间的点击化学是由过渡金属催化的。催化“点击”反应的含铜分子包括,但不限于,铜线、溴化铜(CuBr)、氯化铜(CuCl)、硫酸铜(CuSO_4)、五水硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、醋酸铜($\text{Cu}_2(\text{AcO}_4)$)、碘化铜(CuI)、 $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4](\text{OTf})$ 、 $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4](\text{PF}_6)$ 、胶体铜源和固态铜源。在某些实施方案中,还包括其它金属,例如钐。还原剂以及有机的和无机的金属结合配体可以用于结合金属催化剂,包括,但不限于,抗坏血酸钠、三(三唑基)胺配体、三(羧乙基)膦(TCEP)、磺化红菲咯啉配体和基于苯并咪唑的配体。

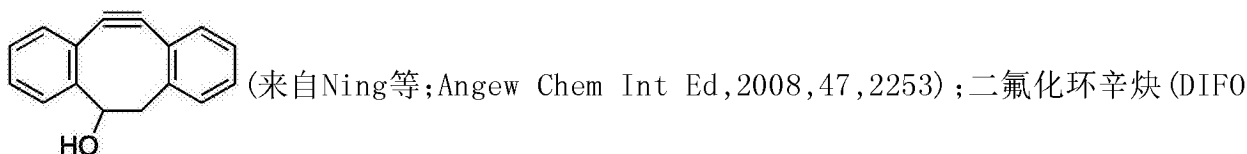
[0301] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物使用无金属点击化学(也被称为无铜点击化学)缀合至其它部分,以获得无金属的组合物或缀合物。与标准的点击化学(也被称为铜辅助点击化学(CuACC))相反,无金属点击化学发生于有张力的环状炔或炔前体(例如氧杂降冰片烯(oxanorbornadiene))和叠氮基团之间。如其名所示,对于所述反应的发生是不需要金属催化剂的。这类化学物质的实施例包括涉及环辛炔衍生物(Codelli等,

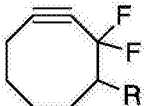
J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 11486-11493; Jewett等, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 3688-3690; Ning等, Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47, 2253-2255)、二氟氧杂降冰片烯(difluoro-oxanorbornene)衍生物(van Berkel等, ChemBioChem, 2007, 8, 1504-1508)或氧化腈衍生物(Lutz等, Macromolecules, 2009, 42, 5411-5413)的反应。在某些实施方案中,无金属点击化学反应是无金属[3+2]环加成反应、狄尔斯-阿尔德(Diels-Alder)反应或硫醇-烯基的自由基加成反应。点击化学反应和点击化学基团的实例在,例如,Joerg Lahann, Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science, 2009, John Wiley & Sons Ltd, ISBN 978-0-470-69970-6; Becer, Hoogenboom和Schubert, Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition, Angewandte Chemie International Edition (2009) 48: 4900-4908中进行描述。在某些实施方案中,点击化学基团包含二芳环辛炔(diarylcyclooctyne)。

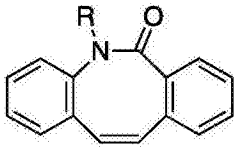
[0302] 下面的方案中显示了某些无金属点击化学的实例。

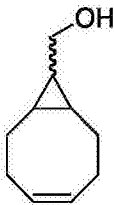


[0304] 某些无金属点击部分是文献中已知的。例子包括4-二苯基环辛炔(DIBO)

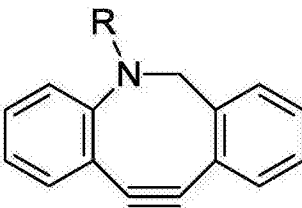


或DFO)  (来自Codeilli等; J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 11486-11493); 二芳基氮杂

环辛酮 (biarylazacyclooctynone) (BARAC)  (来自Jewett等;

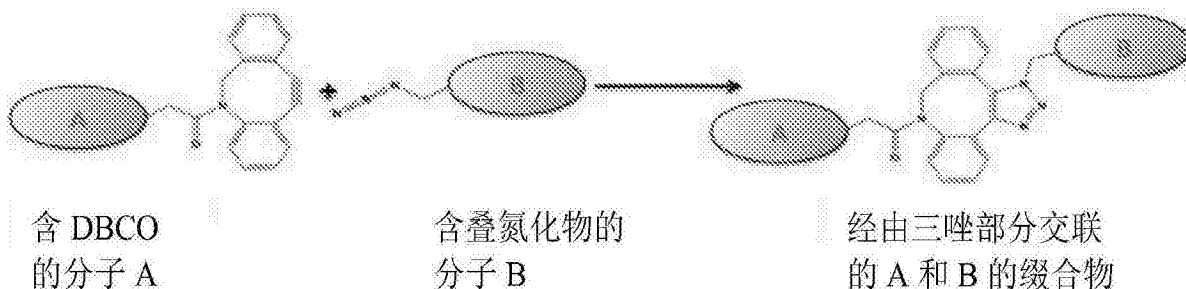
J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 3688); 或双环壬炔 (bicyclononyne) (BCN)  (来自

Dommerholt等; Angew Chem Int Ed, 2010, 49, 9422-9425) 或二苄基环辛炔

(dibenzylcyclooctyne) (DBCO) 

[0305] 下面显示了涉及DBCO和叠氮化物的反应的反应方案:

[0306]



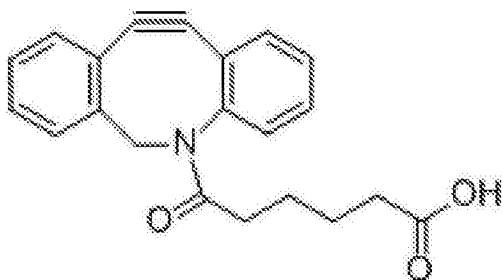
[0307] 在不同的实施方案中, 上图中的A可以包含坎普他汀类似物部分或由其组成以及B可以包含CRM, 例如, 聚合物 (例如PEG或POZ或多肽), 或由其组成; 或者B可以包含坎普他汀类似物部分或由其组成以及A可以包含CRM, 例如, 聚合物 (例如PEG或POZ或多肽), 或由其组成。

[0308] 在某些实施方案中, 所述“无金属点击官能化的”部分是乙炔或乙炔衍生物, 所述乙炔或乙炔衍生物能够在不使用金属催化剂的条件下, 与互补的带有叠氮化物的分子和生物分子进行[3+2]环加成反应。

[0309] 在某些实施方案中, 所述无金属点击化学试剂的所述R和R' 基团是坎普他汀类似物或本文所述的与坎普他汀类似物缀合的任意分子。在某些实施方案中, 这样的坎普他汀类似物在赖氨酸侧链上带有点击官能化的部分。在某些实施方案中, 这样的坎普他汀类似物经由接头与点击官能化的部分连接。在某些实施方案中, 这样的坎普他汀类似物经由AEEAc与点击官能化的部分连接。

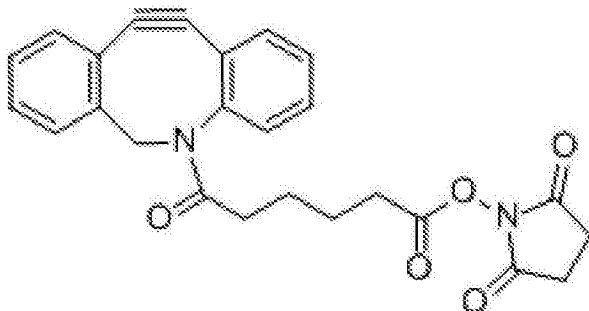
[0310] 在某些实施方案中, 点击化学试剂包含DBCO。以下描绘了示例性试剂及其示例性使用:

[0311]

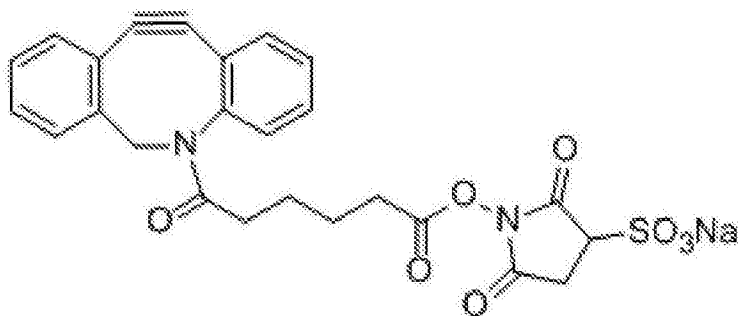


[0312] DBCO酸。在某些实施方案中, DBCO酸可被用来与含胺的部分反应。

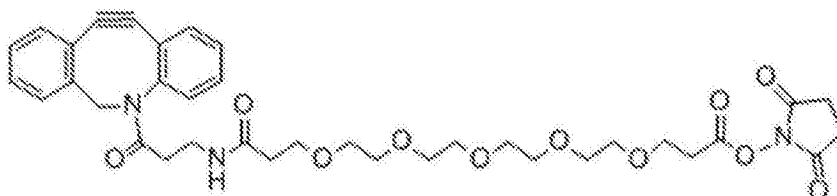
[0313]



[0314] DBCO-NHS酯(上面)或DBCO-磺基-NHS酯(下面)可被用来将DBCO官能团掺入到含有胺的分子中,例如坎普他汀类似物或包含赖氨酸残基的多肽。

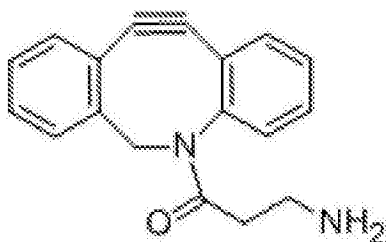


[0315]



[0316] DBCO-PEG4-NHS酯。在某些实施方案中, 这样的试剂对于通过与已有的胺官能团反应来引入DBCO部分是有用的。在某些方面, 作为亲水性间隔物而存在的PEG链对于, 例如, 增强溶解度或提供灵活性, 是有用的。

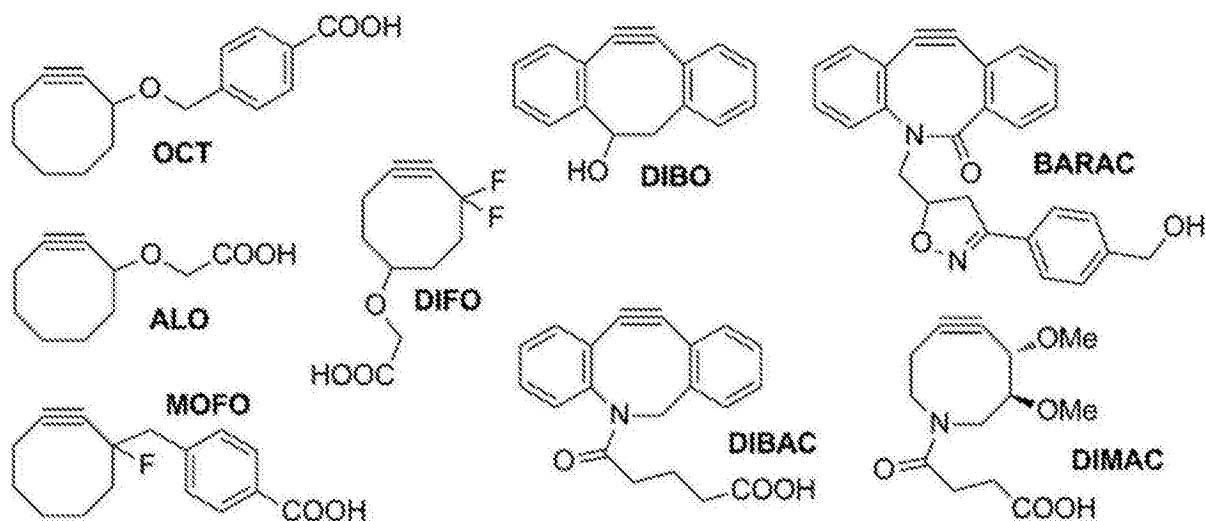
[0317]



[0318] DBCO胺。在某些实施方案中,点击化学试剂包括羰基/羧基反应性二苄基环辛炔(dibenzylcyclooctyne),其可以与酸、活性酯和/或醛反应。

[0319] 在某些实施方案中,点击化学反应涉及以下描述中环辛炔:

[0320]



[0321] 在某些实施方案中,点击化学反应包括硝和环辛炔之间的反应(参见,例如,Ning, Xinghai; Temming, Rinske P.; Dommerholt, Jan; Guo, Jun; Ania, Daniel B.; Debets, Marjoke F.; Wolfert, Margreet A.; Boons, Geert-Jan等(2010). "Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition". *Angewandte Chemie International Edition* 49(17):3065)、从醛和酮形成肟/肟、四嗪连接(参见,例如, Blackman, Melissa L.; Royzen, Maksim; Fox, Joseph M. (2008). "The Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation based on Inverse-electron-demand Diels-Alder Reactivity". *Journal of the American Chemical Society* 130(41):13518-9)、四唑连接、基于异腈的点击反应(参见,例如, Stackmann, Henning; Neves, André A.; Stairs, Shaun; Brindle, Kevin M.; Leeper, Finian J. (2011). "Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules". *Organic & Biomolecular Chemistry* 9(21):7303)和四环庚烷连接(参见,例如, Sletten, Ellen M.; Bertozzi, Carolyn R. (2011). "A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation". *Journal of the American Chemical Society* 133(44):17570-3)。在某些实施方案中,点击化学反应是施陶丁格连接(膦-叠氮化物)。

[0322] 在不同的实施方案中,可以修饰任意坎普他汀类似物以掺入点击化学基团。例如,可以如此修饰包含SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一序列的坎普他汀类似物。在某些实施方案中,任意这样的序列(例如,在C末端)进一步包含赖氨酸残基或 AEEAc-Lys部分。在某些实施方案中,在肽合成之后掺入点击化学基团。例如,赖氨酸侧链可与叠氮基乙酸反应以引入叠氮部分作为点击化学基团。在某些实施方案中,在环化之后掺入点击化学基团,并且在某些实施方案中,在N末端和/或C末端加入封闭部分之后掺入点击化学基团。在某些实施方案中,在肽合成的过程中掺入点击化学基团。例如,可以在坎普他汀类似物的合成中使用包含有点击化学基团的侧链的氨基酸。多种这样的氨基酸具有若干市售来源,例如, AAPPTec (路易斯维尔,肯塔基州)、Jena Bioscience GmbH (Jena, 德国)。

在某些方面,本文提供了制备点击化学官能化的坎普他汀类似物的方法。

[0323] 在某些实施方案中,提供了包含坎普他汀类似物和点击化学试剂的组合物。所述点击化学试剂可以是能与氨基酸侧链或包含坎普他汀类似物的化合物的末端反应以安装点击化学基团的任意分子,例如,本领域已知的任意点击化学基团。在某些方面,可将所述组合物在合适的条件下温育(其可以包括提供合适的催化剂、光(例如,UV))以用点击化学官能来官能化所述坎普他汀类似物。在某些实施方案中,本发明提供了包含任意点击化学基团的坎普他汀类似物,所述点击化学基团包括,但不限于,本文所述的那些。在某些实施方案中,提供了制备长效坎普他汀类似物的方法。在某些实施方案中,所述方法包括在适合发生点击化学反应的条件下,将包含第一点击化学基团的坎普他汀类似物和包含互补的点击化学基团的CRM混合。附加的步骤可以包括纯化得到的缀合物。在某些实施方案中,纯化包括(例如,使用适当的清除剂)去除至少一些未反应的成分。

[0324] 在某些实施方案中,使用点击化学反应连接两个或更多个CRM,且所述CRM中的至少两个与坎普他汀类似物部分连接。在不同的实施方案中,所述坎普他汀类似物部分可以是相同的或不同的。所述坎普他汀类似物部分可以经由点击化学反应与所述CRM连接或可以不与其连接。例如,在某些实施方案中,在第一末端包含第一点击化学基团以及在第二末端包含NHS酯的第一异源双官能PEG,经由所述NHS酯与坎普他汀类似物部分偶联。在单独的反应中,在第一末端包含第二点击化学基团以及在第二末端包含NHS酯的第二异源双官能PEG,经由所述NHS酯与坎普他汀类似物部分偶联。所得到的两种化合物随后经由点击化学反应进行反应,以形成较大的包含两个坎普他汀类似物部分的分子。将PEG作为CRM的例子而提及,但应当理解,本方案可以与任意CRM一起使用。例如,在某些实施方案中,它可以与包含多肽(例如,HAS或其一部分)或白蛋白或白蛋白结合肽,或抗体或其一部分的CRM一起使用。在某些实施方案中,本方案可以与POZ一起使用。

[0325] 包含点击化学基团的坎普他汀类似物具有多种用途。在某些实施方案中,包含第一点击化学基团的坎普他汀类似物与包含互补的点击化学基团的任意实体反应。包含所述互补的点击化学基团的所述实体可以包括,例如,标记(例如,荧光团、荧光蛋白、放射性同位素等)、亲和试剂、抗体、靶向部分、金属、颗粒等。在某些实施方案中,点击化学基团被用于将坎普他汀类似物部分与表面结合,其中所述表面包含或被官能化以包含互补的点击化学基团。在某些实施方案中,表面是传感器,例如,用于捕捉/检测C3的表面或传感器。在某些实施方案中,所述表面作为可能与血液接触(例如,体外)或临时地或无限期地植入受试者体内(例如,假体装置或药物递送装置)的医疗设备、管材、膜、储库、植入物或其它材料中的一部分。在某些实施方案中,表面经坎普他汀类似物官能化以降低在其上发生的补体激活。在某些实施方案中,装置或管材用于在手术等过程中循环血液,例如,用于血液透析。在某些实施方案中,装置是血液透析器或体外循环支持部件。本文中提供了这样的坎普他汀类似物官能化的装置及其制作方法。

[0326] 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(例如,本文描述的任意PEG)或其他聚合物(例如,POZ、多肽)替代,所述 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分或其他聚合物具有至少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)。在某些实施方案中,所述化合物或 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 部分(或其他聚合物,例如,POZ或多肽)的平均分子量为至少20,000道尔顿,高达约100,000、120,000、140,000、160,000、180,000或200,000道尔顿。因而可以理解,本文关于细胞反应性坎普他汀类似物(例如,所使用的坎普他汀类似物部分以及使坎普他汀类似物部分连接至细胞反应性部分的连接)的教导可适用于长效坎普他汀类似物,并且长效坎普他汀类似物可以具有如上所述的任何由A-L-M表示的结构,其中A包含清除率降低部分(例如,本文所述的任何清除率降低部分),并且此外其中可以存在一个、两个或更多个(例如,3个、4个、5个、6个、7个、8个)坎普他汀类似物部分M,所述坎普他汀类似物部分M经由本文中用L(或 L^{P1} 、 L^{P2} 或 L^{P3})表示的连接部分连接至A。坎普他汀类似物部分可以包含肽,所述肽的序列包含SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一个,或其变体(例如,本文所述的任何变体),任选地在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(诸如伯胺或仲胺(例如赖氨酸)、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,所述侧链会促进包含CRM的部分与所述坎普他汀类似物缀合(应该理解,在缀合后,这样的反应性官能团将会反应以形成键)。还应当理解,当包含SEQ ID NO:3-36、37、37A、38A、39A、40A或41A中的任一个或其变体的坎普他汀类似物部分在N末端、C末端或二端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时,这样的—个或多个氨基酸延伸可以通过刚性或柔性隔离物部分,与所述坎普他汀类似物部分的环状部分分隔开,所述刚性或柔性隔离物部分包含,例如,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/或本文中用L(或 L^{P1} 、 L^{P2} 或 L^{P3})表示的任何其他部分。

[0327] 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。在某些实施方案中,n足以提供介于约20,000道尔顿,高达约100,000、120,000、140,000、160,000、180,000或200,000道尔顿的平均分子量。

[0328] $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}(=\text{O})-\text{Ile}-\text{Cys}-\text{Val}-(1\text{Me})\text{Trp}-\text{Gln}-\text{Asp}-\text{Trp}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{His}-\text{Arg}-\text{Cys}-\text{Thr}-\text{NH}_2$ (SEQ ID NO:58)

[0329] $\text{Ac}-\text{Ile}-\text{Cys}^*-\text{Val}-(1\text{Me})\text{Trp}-\text{Gln}-\text{Asp}-\text{Trp}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{His}-\text{Arg}-\text{Cys}^*-\text{Thr}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{NH}_2$ (SEQ ID NO:59)

[0330] $\text{Ac}-\text{Ile}-\text{Cys}^*-\text{Val}-(1\text{Me})\text{Trp}-\text{Gln}-\text{Asp}-\text{Trp}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{His}-\text{Arg}-\text{Cys}^*-\text{Thr}-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{NH}_2$ (SEQ ID NO:60)。

[0331] $\text{Ac}-\text{Ile}-\text{Cys}^*-\text{Val}-(1\text{Me})\text{Trp}-\text{Gln}-\text{Asp}-\text{Trp}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{His}-\text{Arg}-\text{Cys}^*-\text{Thr}-(\text{Gly})_5-\text{Lys}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{NH}_2$ (SEQ ID NO:61)

[0332] $\text{Ac}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}(=\text{O})\text{Lys}-(\text{Gly})_5-\text{Ile}-\text{Cys}^*-\text{Val}-(1\text{Me})\text{Trp}-\text{Gln}-\text{Asp}-\text{Trp}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{His}-\text{Arg}-\text{Cys}^*-\text{Thr}-\text{NH}_2$ (SEQ ID NO:62)

[0333] $\text{Ac}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}(=\text{O})\text{Lys}-\text{Ile}-\text{Cys}^*-\text{Val}-(1\text{Me})\text{Trp}-\text{Gln}-\text{Asp}-\text{Trp}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{His}-\text{Arg}-\text{Cys}^*-\text{Thr}-\text{NH}_2$ (SEQ ID NO:63)

[0334] 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 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Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C(=O)-Lys-(C(=O)-}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R)-NH}_2$ (SEQ ID NO:64),其中R是例如H或 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:

[0335] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C(=O)-Lys-(C(=O)-}(\text{CH}_2)_m\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R)-NH}_2$ (SEQ ID NO:65);

[0336] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C(=O)-Lys-(C(=O)-}(\text{CH}_2)_m\text{-C(=O)-}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R)-NH}_2$ (SEQ ID NO:66)

[0337] Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me) Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-NH- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-C(=O)-Lys-(C(=O)-}(\text{CH}_2)_m\text{-C(=O)-}(\text{CH}_2)_j\text{(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R)-NH}_2$ (SEQ ID NO:67)

[0338] 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。

[0339] 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 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-R}$ 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。

[0340] 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-被包含任意其它坎普他汀类似物的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO 3-27或29-36、37、37A、38A、39A、40A或41A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。

[0341] 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、37A、38A、39A、40A或41A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。

[0342] 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。

[0343] 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)-(CH₂)₅-Mal)-NH₂（SEQ ID NO:68）反应，以产生长效坎普他汀类似物。

[0344] 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，所述多肽是纯化的。例如，在某些实施方案中，从宿主细胞裂解液或从培养液中纯化所述多肽，其中所述多肽已由宿主细胞分泌进入培养液。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（HAS）。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。

[0345] 在某些实施方案中，多肽或接头或组合物中的一个或多个氨基酸可选择是疏水的或亲水的或选择以对含有其的化合物赋予增强的亲水性，或者在某些实施方案中，增强的疏水性。如本领域已知的，使用术语“亲水的”和“疏水的”来表示物质具有的对水的亲和力。在某些方面，亲水性物质对水具有很强的亲和力，倾向于在水中溶解、与水混合或者被水润湿，然而疏水性物质基本上缺乏对水的亲和力，趋向于排斥和不吸收水并倾向于不溶于水或不与水混合或不被水润湿。如本领域所熟知的，可基于其疏水性对氨基酸进行分类。“亲水性氨基酸”的例子是精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸。“疏水性氨基酸”的例子是色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。在某些实施方案中，使用标准氨基酸的类似物，其中所述类似物

相较于其所类似的氨基酸,具有增强的或降低的亲水性或疏水性特性。

[0346] 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,得到的分子(或其CRM成分)的平均分子量是至少20,000道尔顿,高达约100,000、120,000、140,000、160,000、180,000或200,000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。本发明的方面涉及用于制备长效坎普他汀类似物的组合物和方法,以及合成过程中的中间体。

[0347] 在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物(包括坎普他汀类似物部分)的总分子量不大于50kD。例如,对于包含40kD PEG的LACA来说,在某些实施方案中,由所述化合物(包括坎普他汀类似物部分)的其它部分贡献的分子量可以不大于10kD,例如,1.5kD-5.0kD或5.0kD-10kD。在某些实施方案中,LACA(包括坎普他汀类似物部分)的总分子量在45kD至50kD之间。在某些实施方案中,LACA(包括坎普他汀类似物部分)的总分子量在40kD至45kD之间,15kD至40kD之间,例如15kD至25kD之间,25kD至35kD之间,35kD至40kD之间。因此,当本公开提及的坎普他汀类似物包含具有特定分子量的或具有特定范围内分子量的聚合物或CRM时,在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物的总分子量可以比所述聚合物或CRM的分子量大例如,1.5kD至5kD,或者在某些实施方案中,比所述聚合物的分子量大5kD至10kD。应该理解,化合物(例如,包含聚合物的化合物)的分子量可以是指组合物中该化合物分子的平均分子量。

[0348] 多种有益于检测聚合物,例如,PEG、POZ和/或多肽,和/或有益于测量聚合物例如,PEG、POZ和/或多肽的物理和/或结构特性的方法和测定法是本领域已知的,并且如果需要的话,可用于检测坎普他汀类似物,例如,细胞反应性的、长效的、靶向的坎普他汀类似物或坎普他汀类似物部分。例如,有益于确定例如聚合、溶解度、大小、结构、熔融性、纯度、降解产物或污染物的存在、水含量、流体动力半径等属性的方法和测定法是已有的。这样的方法包括,例如,分析离心法、各种类型的色谱法例如液相色谱法(例如,离子交换HPLC法、尺寸排阻HPLC法、反相HPLC法)、光散射法、毛细管电泳法、圆二色性法、等温量热法、差示扫描量热法、荧光法、红外(IR)法、核磁共振法(NMR)、拉曼光谱法、折射法、UV/可见光谱法、质谱法、免疫学方法等。应该理解,所述方法可以组合。在某些方面,如由上述方法中的任一种评估的,细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物(或包含细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物的组合物)具有本文所述的一种或多种特性。在某些方面,本文描述了有益于检测和/或定量长效坎普他汀类似物的方法。

[0349] VI. 靶向坎普他汀类似物

[0350] 本发明提供了和/或利用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_d 来测量)为 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。

[0351] 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')₂、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')₂或F(ab')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。

[0352] 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*. 2000 March; 74(1):5-13。在某些实施方案中,使用肽核酸或锁定核酸。

[0353] 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。

[0354] 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)。

[0355] 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。

[0356] 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。

[0357] 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)。

[0358] 在某些实施方案中,所述靶分子是至少部分地暴露于红细胞表面的蛋白,诸如血型糖蛋白(例如,血型糖蛋白A、B、C或D)或带3。

[0359] 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, α -gal表位 (Gal α 1-3Gal β 1-(3) 4GlcNAc-R) (参见,例如, Macher BA and Galili U. The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 1780 (2):75-88 (2008))。

[0360] 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。

[0361] 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。

[0362] 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。

[0363] 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。本发明的方面涉及用于制备靶向的坎普他汀类似物的组合物和方法,以及在合成过程中的中间体。

[0364] VII. 用途

[0365] 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。

[0366] 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。

[0367] 某些感兴趣的用途包括:(1)在具有病症的个体中保护红细胞(RBC)免于补体介导的损伤,所述病症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裂解为特征的其它病症;(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病症中的任一种中,保护可能暴露于补体组分的各种身体结构(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。

[0368] A. 血细胞保护

[0369] 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。多种病症与对血细胞的补体介导的损伤有关。这样的病症可以源自,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损伤的病症的风险中。已经发生病症特有的一种或多种发作的个体处于增加的复发风险中。

[0370] 阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)是一种相对罕见的病症,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、勃起功能病症和肺性高血压,并且处于增加的肾衰竭和血栓栓塞性事件的风险中。

[0371] 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,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。

[0372] 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病症,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,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。

[0373] 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,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,112:4542-4545(2008))。

[0374] 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(CH₂CH₂O)部分的长效坎普他汀类似物来治疗PNH或aHUS。

[0375] B. 移植

[0376] 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”。

[0377] 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病症,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。

[0378] 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。

[0379] 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。

[0380] 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[®], Baxter Healthcare)、威斯康辛州大学 (University of Wisconsin, UW) 溶液 (ViaSpan[™], Bristol Myers Squibb)、组氨酸色氨酸酮戊二酸盐 (HTK) 溶液 (Custodial[®], Kohler Medical Limited)、EuroCollins (Fresenius) 和 Celsior[®] (Sangstat Medical)、Polysol、IGL-1 或 AQIX[®] 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。

[0381] 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。

[0382] 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。

[0383] 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。

[0384] 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。

[0385] 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。

[0386] 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病症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。

[0387] 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病症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。

[0388] 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。

[0389] C. 缺血/再灌注损伤

[0390] 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。

[0391] 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病症。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。

[0392] 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。

[0393] 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。

[0394] 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。

[0395] D. 其它补体介导的病症

[0396] 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病症,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,可以将细胞反应性的、长效的或靶向的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,所述AMD是新生血管性(湿性)AMD。在某些实施方案中,所述AMD是干性AMD。本领域普通技术人员将理解,干性AMD包括地图样萎缩(GA)、中晚期AMD和早期AMD。在某些实施方案中,治疗患有GA的受试者以减缓或停止疾病的进展。例如,在某些实施方案中,治疗对患有GA的受试者能降低视网膜细胞死亡率。与对照组(例如,被给予假注射的患者)相比,用LACA治疗的患者中GA病灶生长速率的降低能证明视网膜细胞死亡率的降低。在某些实施方案中,受试者患有中晚期AMD。在某些实施方案中,受试者患有早期AMD。在某些实施方案中,治疗患有中晚期或早期AMD的受试者以减缓或停止疾病的进展。例如,在某些实施方案中,治疗患有中晚期AMD的受试者可以减缓或阻止发展成晚期形式的AMD(新生血管性AMD或GA)。在某些实施方案中,治疗患有早期AMD的受试者可以减缓或阻止发展成中晚期AMD。在某些实施方案中,眼睛同时患有GA和新生血管性AMD。在某些实施方案中,眼睛患有GA但不患有湿性AMD。在某些实施方案中,通过玻璃体内注射施用细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物,以治疗青光眼、葡萄膜炎(例如,后葡萄膜炎)或糖尿病视网膜病变。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。

[0397] 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。

[0398] 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。

[0399] 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。

[0400] 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。

[0401] 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。

[0402] 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。

[0403] 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。

[0404] 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。

[0405] 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。

[0406] 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)或特发性肺纤维化。在不同的实施方案中,可以,例如,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、肌肉或皮下)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。

[0407] 在某些方面,提供了治疗补体介导的病症(例如,补体介导的慢性病症)的方法,所述方法包括将长效补体抑制剂施用给需要治疗所述病症的受试者。在多种实施方案中,所述长效坎普他汀类似物可以是本文所述的任意长效坎普他汀类似物。在某些方面,提供了治疗Th17相关病症的方法,所述方法包括将长效补体抑制剂施用给需要治疗所述病症的受试者。

[0408] 在某些方面,“慢性病症”是持续至少3个月和/或在本领域视为慢性病症的病症。在许多实施方案中,慢性病症持续至少6个月,例如,至少1年,或更长,例如,无限期。本领域普通技术人员将认识到,多种慢性病症的至少某些表现可以是间歇性的和/或严重性可能随时间逐渐减弱。慢性病症可以是渐进的,例如,随时间推移具有变得更为严重或影响更大面积的趋势。本文中讨论了许多补体介导的慢性病症。补体介导的慢性病症可以是涉及补体激活(例如,过度的或不适当的补体激活)的任意慢性病症,例如,作为促成的因素和/或至少部分诱导的因素。为方便起见,有时参考患有所述病症的受试者中经常特别受影响的器官或系统对病症进行分组。应当理解,许多病症能影响多个器官或系统,并且这样的分类不以任何方式限制。此外,许多表现(例如,症状)会发生于患有许多不同的病症中的任一个的受试者中。关于本文的目的病症的非限制性信息可以在,例如,标准的内科医学教科书(例如,Cecil Textbook of Medicine(例如,第23版)、Harrison's Principles of Internal Medicine(例如,第17版),和/或侧重于特定的医学领域、特定的身体系统或器官和/或特定的病症的标准教科书中找到。

[0409] 在某些实施方案中,补体介导的慢性病症是Th2相关病症。本文中所使用的Th2相关病症,其特征在于在体内或其一部分(例如,在至少一种组织、器官或结构中)中,Th2亚型的CD4+辅助性T细胞(“Th2细胞”)过量和/或过度的或不适当的活性。例如,在例如,受病症

影响的至少一种组织、器官或结构中, Th2细胞相对于Th1亚型的CD4+辅助性T细胞(“Th1细胞”)可能更具有优势。如本领域已知的, Th2细胞通常分泌特征性的细胞因子例如白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-5 (IL-5) 和白细胞介素-13 (IL-13), 而Th1细胞通常分泌干扰素- γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子(TNF β)。在某些实施方案中, Th2相关病症的特征在于, 在至少一种组织、器官或结构中, 例如, 相对于IFN- γ 和/或TNF β , IL-4、IL-5和/或IL-13的过度的生产和/或量。

[0410] 在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症是Th17相关病症。在某些方面, 如在2012年6月22日提交的命名为“Methods of Treating Chronic Disorders with Complement Inhibitors”的PCT/US2012/043845中的进一步详细描述, 补体激活和Th17细胞参与涉及树突状细胞和抗体和促成对引起一系列病症的病理免疫微环境的维持的周期。不希望受任何理论约束, 所述病理免疫微环境一旦确立, 便是自我维持的并且促成细胞和组织损伤。在某些方面, 长效坎普他汀类似物用于治疗Th17相关病症。

[0411] 本文中所使用的Th17相关病症的特征在于在体内或其一部分(例如, 在至少一种组织、器官或结构中)中, Th17亚型的CD4⁺辅助性T细胞(“Th17细胞”)过量和/或有过度的或不适当的活性。例如, 在例如, 受病症影响的至少一种组织、器官或结构中, Th17细胞相对于Th1和/或Th2细胞可能更具有优势。在某些实施方案中, Th17细胞的优势是相对的优势, 例如, Th17细胞对Th1细胞的比和/或Th17细胞对Th2细胞的比, 相对于正常值是升高的。在某些实施方案中, Th17对调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺调节性T细胞, 也称作“Treg细胞”)的比, 相对于正常值是升高的。多种细胞因子, 例如, 白细胞介素6 (IL-6)、白细胞介素21 (IL-21)、白细胞介素23 (IL-23) 和/或白细胞介素1 β (IL-1 β), 促进了Th17细胞的形成和/或Th17细胞的激活。Th17细胞的形成包括前体T细胞, 例如, 初始CD4⁺T细胞, 向Th17表型的分化及其成熟为功能性Th17细胞。在某些实施方案中, Th17细胞的形成包括Th17细胞的发育、增殖(扩张)、存活和/或成熟的任意方面。在某些实施方案中, Th17相关病症的特征在于IL-6、IL-21、IL-23和/或IL-1 β 的过度的产生和/或量。Th17细胞通常分泌特征性的细胞因子例如白细胞介素-17A (IL-17A)、白细胞介素-17F (IL-17F)、白细胞介素-21 (IL-21) 和白细胞介素-22 (IL-22)。在某些实施方案中, Th17相关病症的特征在于Th17效应细胞因子, 例如, IL-17A、IL-17F、IL-21和/或IL-22的过度的产生和/或量。在某些实施方案中, 在血液中可检测到细胞因子的过度的产生或量。在某些实施方案中, 例如, 在至少一种组织、器官或结构中, 局部地检测到细胞因子的过度的产生或量。在某些实施方案中, Th17相关病症与Treg降低的数量和/或Treg相关细胞因子的降低的量有关。在某些实施方案中, Th17病症是任意慢性炎症疾病, 该术语包括, 该一系列病症的特征在于对多种组织的自我持续的免疫损伤, 并且其似乎与引起所述病症的初始损伤相分离(其可以是未知的)。在某些实施方案中, Th17相关病症是任意自身免疫疾病。就算不是大多数, 也有很多“慢性炎症疾病”实际上可能是自身免疫疾病。Th17相关病症的例子包括炎性皮肤病(例如银屑病和特应性皮炎)、系统性硬皮病和硬化症、炎性肠病(IBM)(例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)、白塞氏病、皮肌炎、多发性肌炎、多发性硬化症(MS)、皮炎、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、骨关节炎、狼疮性肾炎、类风湿关节炎(RA)、Sjogren综合征、多发性硬化症、血管炎、中枢神经系统(CNS)炎症病症、慢性肝炎、慢性胰腺炎、肾小球肾炎、结节病、甲状腺炎、对组织/器官移植的病理性免疫应答(例如, 移植排斥)、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘、支气管炎、过敏性肺炎、特发性肺纤维化(IPF)、牙周

炎和齿龈炎。在某些实施方案中, Th17疾病是已知的经典的自身免疫疾病例如I型糖尿病或牛皮癣。在某些实施方案中, Th17相关病症是年龄相关的黄斑变性病。

[0412] 在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症是IgE相关病症。本文中使用的“IgE相关病症”是这样的病症的特征在于过量的IgE和/或不适当的IgE的产生和/或量、过量的IgE生成细胞和/或其不适当的活性(例如, 生成IgE的B细胞或浆细胞)和/或过量的IgE应答细胞如嗜酸性粒细胞或肥大细胞和/或其不适当的活性。在某些实施方案中, IgE相关病症的特征在于总IgE的升高和/或在某些实施方案中, 变应原特异性IgE, 在受试者血浆中和/或在局部的水平的上升。

[0413] 在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症的特征在于在体内存在自身抗体和/或免疫复合物, 所述自身抗体和免疫复合物可以经由, 例如, 经典途径, 激活补体。自身抗体可以, 例如, 结合自身抗原(例如, 在体内的细胞或组织上的自身抗原)。在某些实施方案中, 自身抗体在血管内、皮肤内、神经内、肌肉内、结缔组织内、心脏内、肾内、甲状腺内等结合抗原。在某些实施方案中, 受试者患有视神经脊髓炎并产生针对水通道蛋白4的自身抗体(例如, IgG自身抗体)。在某些实施方案中, 受试者患有类天疱疮并产生针对半桥粒的结构组分(例如, 跨膜胶原蛋白XVII (BP180或BPAG2) 和/或珀金氏家族蛋白质BP230 (BPAG1) 的自身抗体(例如, IgG或IgE自身抗体)。在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症不具有自身抗体和/或免疫复合物特征。

[0414] 在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症是呼吸病症。在某些实施方案中, 慢性呼吸病症是哮喘或慢性阻塞性肺疾病(COPD)。在某些实施方案中, 慢性呼吸病症是肺纤维化(例如, 特发性肺纤维化)、辐射诱发的肺损伤、过敏性支气管肺曲霉病、过敏性肺炎(也称为过敏性肺炎)、嗜酸细胞性肺炎、间质性肺炎、结节病、韦格纳肉芽肿病或闭塞性细支气管炎。在某些实施方案中, 本发明提供了一种治疗需要治疗慢性呼吸病症(例如, 哮喘、COPD、肺纤维化、辐射诱发的肺损伤、过敏性支气管肺曲霉病、过敏性肺炎(也称为过敏性肺炎)、嗜酸细胞性肺炎、间质性肺炎、结节病、韦格纳肉芽肿病或闭塞性细支气管炎)的受试者的方法, 所述方法包括施用长效补体抑制剂给需要治疗所述病症的受试者。

[0415] 在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症是过敏性鼻炎、鼻窦炎或鼻息肉。在某些实施方案中, 本发明提供了一种治疗需要治疗过敏性鼻炎、鼻窦炎或鼻息肉的受试者的方法, 所述方法包括施用长效补体抑制剂给需要治疗所述病症的受试者。

[0416] 在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症是影响肌肉骨骼系统的病症。这样的病症的例子包括炎性关节疾病(例如, 关节炎如类风湿性关节炎或银屑病关节炎、幼年型慢性关节炎、脊椎关节病赖特综合征、痛风)。在某些实施方案中, 肌肉骨骼系统病症导致例如疼痛、僵硬和/或所受影响的身体部位运动受限的症状: 炎性肌病包括皮肌炎、多发性肌炎以及其它各种病因不明的、能导致肌无力的慢性肌炎症性病症。在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症是重症肌无力。在某些实施方案中, 本发明提供了治疗影响肌肉骨骼系统的任意前述病症的方法, 所述方法包括施用长效补体抑制剂给需要治疗所述病症的受试者。

[0417] 在某些实施方案中, 补体介导的慢性病症是影响皮肤系统的病症。这样的病症的例子包括, 例如, 特应性皮炎、银屑病、类天疱疮、天疱疮、系统性红斑狼疮、皮肌炎、硬皮病、硬化性皮肌炎、干燥综合征和慢性荨麻疹。在某些方面, 本发明提供了治疗影响皮肤系统的任意前述病症的方法, 所述方法包括施用长效补体抑制剂给需要治疗所述病症的受试者。

[0418] 在某些实施方案中,补体介导的慢性病症影响神经系统,例如,中枢神经系统(CNS)和/或外周神经系统(PNS)。这样的病症的例子包括,例如,多发性硬化症、其它慢性脱髓鞘疾病(例如,视神经脊髓炎)、肌萎缩性侧索硬化、慢性痛、中风、过敏性神经炎、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病和帕金森氏病。在某些实施方案中,本发明提供了治疗影响神经系统的任意前述病症的方法,所述方法包括施用补体抑制剂(例如,长效的、靶向的或细胞反应性的坎普他汀类似物)给需要治疗所述病症的受试者。

[0419] 在某些实施方案中,补体介导的慢性病症影响循环系统。例如,在某些实施方案中,所述病症是血管炎或与其它与血管炎症(例如,血管炎和/或淋巴管炎)相关的病症。在某些实施方案中,血管炎是结节性多动脉炎、韦格内肉芽肿、巨细胞动脉炎、Churg-Strauss综合征、显微镜下多血管炎、过敏性紫癜、大动脉炎、川崎病或白塞氏病。在某些实施方案中,受试者,例如,需要治疗血管炎的受试者,针对抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)是阳性的。

[0420] 在某些实施方案中,补体介导的慢性病症影响肠胃系统。例如,所述病症可以是炎性肠病,例如,克罗恩病或溃疡性结肠炎。在某些实施方案中,本发明提供了治疗影响肠胃系统的补体介导的慢性病症的方法,所述方法包括施用长效补体抑制剂给需要治疗所述病症的受试者。

[0421] 在某些实施方案中,补体介导的慢性病症是甲状腺炎(例如,桥本甲状腺炎、格雷夫斯病、产后甲状腺炎)、心肌炎、肝炎(例如,丙肝)、胰腺炎、肾炎(例如,膜增生性肾炎或膜性肾小球肾炎)或脂膜炎。

[0422] 在某些实施方案中,本发明提供了治疗患有慢性疼痛的受试者的方法,所述方法包括施用长效补体抑制剂给需要其的受试者。在某些实施方案中,受试者患有神经性疼痛。神经性疼痛已被定义为由神经系统中的原发性损伤或机能病症引发或引起的疼痛,特别是作为影响体感系统的损伤或疾病的直接后果而发生的疼痛。例如,神经性疼痛可能起因于涉及在外周神经中破坏小纤维和/或在CNS中破坏脊髓-丘脑皮层系统的体感通路的损伤。在某些实施方案中,神经性疼痛起因于自身免疫性疾病(例如,多发性硬化症)、代谢疾病(例如,糖尿病)、感染(例如,病毒性疾病如带状疱疹或HIV)、血管疾病(例如,中风)、创伤(例如,损伤、外科手术)或癌症。例如,神经性疼痛可以是在损伤愈合之后或是停止刺激周围神经末梢的之后持续存在的疼痛,或是由于神经损害而发生的疼痛。神经性疼痛病症或相关的病症的示例包括疼痛性糖尿病神经病变、疱疹后神经痛(例如,在急性发作后的3个月或更多个月在急性带状疱疹部位持续的或反复发作的疼痛)、三叉神经痛、癌症相关的神经性疼痛、化疗相关的神经性疼痛、HIV相关的神经性疼痛(例如,源自HIV神经病)、中风中/中风后的神经性疼痛、背部疼痛相关的神经病变(例如,腰痛(例如,源自神经根病如脊神经根压迫,例如,腰椎根压迫,该压迫可能是由于椎间盘突出))、椎管狭窄、外周神经损伤疼痛、幻肢痛、多发性神经病、脊髓损伤相关的疼痛、脊髓病和多发性硬化症。在本发明的某些实施方案中,根据发明性的给药方案,在患有一种或多种前述病症的受试者中施用补体抑制剂以治疗神经性疼痛。

[0423] 在某些实施方案中,补体介导的慢性病症是慢性眼病症。在某些实施方案中,所述慢性眼病症的特征为黄斑变性、脉络膜新生血管(CNV)、视网膜新生血管(RNV)、眼部炎症或上述的任意组合。黄斑变性、CNV、RNV和/或眼部炎症可能是所述病症的定义性和/或诊断性特征。以这些特征的一个或多个为特征的示例性病症包括,但不限于,黄斑变性相关的病

症、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、增殖性玻璃体变、葡萄膜炎、角膜炎、结膜炎和巩膜炎。黄斑变性相关的病症包括,例如,年龄相关性黄斑变性(AMD)。在某些实施方案中,受试者需要治疗湿性AMD。在某些实施方案中,受试者需要治疗干性AMD。在某些实施方案中,受试者需要治疗地图状萎缩(GA)。在某些实施方案中,受试者需要治疗眼部炎症。眼部炎症可以影响大部分眼结构例如结膜(结膜炎)、角膜(角膜炎)、巩膜外层、巩膜(巩膜炎)、葡萄膜、视网膜、血管系统和/或视神经。眼部炎症的证据可以包括在眼内存在炎症相关的细胞如白血细胞(例如,嗜中性粒细胞、巨噬细胞)、存在内源性炎症介质、一种或多种以下症状:例如眼痛、发红、光敏感、视力模糊和飞蚊症等。葡萄膜炎是通用术语,表示在眼葡萄膜中,例如,在葡萄膜的任意结构(包括虹膜、睫状体和脉络膜)中,存在炎症。葡萄膜炎的具体类型包括虹膜炎、虹膜睫状体炎、睫状体炎、睫状体平坦部炎和脉络膜炎。在某些实施方案中,受试者需要治疗地图状萎缩(GA)。在某些实施方案中,所述慢性眼病症是以视神经损伤(例如,视神经病变)为特征的眼病症,例如青光眼。

[0424] 如上面所指出的,在某些实施方案中,所述慢性呼吸疾病是哮喘。关于风险因素、流行病学、发病机制、诊断、目前对哮喘的管理等的信息可在,例如,“Expert Panel Report 3:Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma”.National Heart Lung and Blood Institute.2007.<http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.pdf>. (“NHLBI Guidelines”;www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.htm),Global Initiative for Asthma,Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2010“GINA Report”)和/或内科医学的标准教材例如Cecil Textbook of Medicine(第20版),Harrison’s Principles of Internal Medicine 17版)和/或侧重于肺医学的标准教材中找到。哮喘是慢性的气道炎性病症,在所述哮喘中许多细胞和细胞元件发挥作用,例如,肥大细胞、嗜酸性粒细胞、T淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和上皮细胞。哮喘的个体经历与症状相关的反复发作,例如气喘、气绝(也称为呼吸困难或呼吸急促)、胸闷和咳嗽。这些发作通常与分布广泛但可变的气流阻塞相关,所述气流阻塞往往是自发可逆的或经治疗可逆的。所述炎症还导致现有的针对多种刺激的支气管高反应性的相关增强。气道高反应性(针对刺激的过大的支气管收缩反应)是哮喘的典型特征。一般而言,气流受限源于支气管收缩和气道水肿。在某些患有哮喘的患者中,气流受限的可逆性可以是不完全的。例如,气道重塑会导致固定化的气道变窄。结构变化可以包括亚基底膜增稠、皮下纤维化、气道平滑肌肥大增生、血管增生和扩张以及粘膜腺体增生和分泌过多。

[0425] 患有哮喘的个体可能经历恶化,所述恶化以特征为与所述个体先前的状态发生改变的事件而被鉴定出。严重的哮喘恶化可以被定义成需要在所述个体的所述部位上采取紧急措施并需要他/她的医生以预防严重的结果,例如住院或因哮喘死亡的事件。例如,严重的哮喘恶化可能需要在受试者上使用系统性皮质类固醇(例如,口服皮质类固醇),所述受试者的哮喘通常在没有OCS的情况下得到很好地控制;或者可能需要增加稳定的维持剂量。中度哮喘恶化可被定义为对于所述受试者是棘手的,并且需要改变治疗,但其并不严重的事件。这些事件在临床上被鉴定为在所述受试者通常的日常哮喘变化范围之外。

[0426] 目前用于哮喘的药物通常分为两大类:用于达到和维持对持久哮喘的控制的长期控制药物(“控制药”)例如吸入性糖皮质激素(ICS)、口服皮质类固醇(OCS)、长效支气管扩张剂(LABA)、白三烯改性剂(例如,白三烯受体拮抗剂或白三烯合成抑制剂、抗IgE抗体(奥

马珠单抗(Xolair®)、色甘酸钠和奈多罗米,和用于治疗急性症状和恶化的快速缓解药物如短效支气管扩张剂(SABA)。对于本发明的目的,这些治疗可被示为“常规疗法”。对恶化的治疗也可以包括增加控制药物治疗的剂量和/或强度。例如,可以使用OCS疗程重获对哮喘的控制。对于患有持久哮喘的受试者,目前的指南强制每天施用控制药物,或者在许多情况下,每天施用多次剂量的控制药物(除Xolair之外,其为每2周或每4周施用)。

[0427] 如果受试者每周平均遭受多于两次的症状和/或通常每周使用多于两次的快速缓解药物(例如,SABA)用于控制症状,则一般考虑所述受试者患有持久哮喘。一旦已治疗相关的合并症并且已优化吸入器技术和粘附,可基于控制所述受试者的哮喘所需要的治疗强度分类“哮喘严重程度”(参见,例如,GINA Report;Taylor,DR,Eur Respir J 2008;32:545-554)。治疗强度的描述可基于分步治疗算法中建议的药物和剂量,所述分步治疗算法可在例如NHLBI Guidelines 2007、GINA Report和其前身等指南中和/或在标准医学教科书中找到。例如,如表X中所示,可将哮喘分为间歇性哮喘、轻度哮喘、中度哮喘或重度哮喘,其中“治疗”表示足以在受试者上达到最好的哮喘控制水平的治疗。(应当理解,一般而言,哮喘的轻度、中度和重度的类别暗示持久的、而非间歇性的哮喘)。本领域普通技术人员将认识到,表X是示例性的,并且并非在所有的医疗保健系统中都能获得所有的这些药物,这在某些环境中可能会影响对哮喘严重程度的评估。还将认识到,其它新兴的或新的方案可能会影响对轻度/中度哮喘的分类。然而,仍然可以应用相同的原理,将轻度哮喘定义为能使用非常低强度的治疗达到较好的控制以及将重度哮喘定义为需要高强度的治疗。也可以或者可替代地,在基于所述疾病在没有治疗的情况下的固有强度对哮喘严重程度进行分类(参见,例如,NHLBI Guidelines 2007)。可在当前的肺功能检查和在前2-4周内该患者对症状的回忆的基础上进行评估。可评估当前损害和未来风险的参数,并包括进对哮喘严重程度的确定过程。在某些实施方案中,对于0-4岁、5-11岁或>12岁年龄的个体,分别如NHLBI Guidelines中的图3.4(a)、3.4(b)、3.4(c)中所示,定义哮喘的严重程度。

[0428] 表X:基于治疗的哮喘分类

[0429]

哮喘的分类	治疗
间歇性	根据需要使用SABA(通常一周不超过两次)

[0430]

轻度	低剂量ICS或其它低强度的治疗(例如,LTRA、色甘酸钠、奈多罗米、茶碱)
中度	低到中等剂量的ICS和LABA或其它额外治疗
重度	高强度治疗(高剂量的ICS和LABA±口服皮质类固醇激素和/或其它额外治疗)

[0431] “哮喘控制”表示通过治疗(不论是药物的或非药物的)已经减少或去除了哮喘的表现的程度。可以基于以下因素评估哮喘控制:例如症状频率、夜间症状、肺功能的客观量度如肺量计参数(例如,预测的FEV₁%、FEV₁变化性、用于症状控制而需要使用SABA。可评

估当前损害和未来风险的参数,并包括进对哮喘控制水平的确定过程。在某些实施方案中,对于0-4岁、5-11岁或>12岁年龄的个体,分别如NHBLI Guidelines中的图4.3(a)、4.3(b)、4.3(c)中所示,定义哮喘控制。

[0432] 一般而言,本领域普通技术人员可以选择适当的方式确定哮喘的严重程度和/或控制水平,并且可使用本领域的那些普通技术人员认为合理的任意分类方案。

[0433] 在本发明的某些实施方案中,使用本发明的给药方案,用补体抑制剂治疗患有持久性哮喘的受试者。在某些实施方案中,所述受试者患有轻度或中度哮喘。在某些实施方案中,所述受试者患有重度哮喘。在某些实施方案中,受试者患有的哮喘不能用常规治疗很好的控制。在某些实施方案中,当用常规治疗进行治疗时,需要使用ICS以较好的控制受试者患有的哮喘。在某些实施方案中,尽管使用了ICS,还是不能较好地控制受试者患有的哮喘。在某些实施方案中,若使用常规疗法进行治疗,将需要使用OCS以较好地控制受试者患有的哮喘。在某些实施方案中,尽管使用了高强度的包括OCS的常规治疗,还是不能较好地控制受试者患有的哮喘。在本发明的某些实施方案中,将长效补体抑制剂作为控制药物进行施用或允许所述受试者避免使用常规控制药物或减少常规控制药物的剂量。

[0434] 在某些实施方案中,所述受试者患有过敏性哮喘,其是大多数哮喘个体的情况。在某些实施方案中,如果针对哮喘的非过敏触发源(例如,冷、锻炼)是未知的和/或没有在标准诊断评估中鉴别,则考虑哮喘的受试者患有过敏性哮喘。在某些实施方案中,如果受试者(i)在暴露于过敏原或该受试者所敏感的过敏原之后,重复地发展出哮喘症状(或哮喘症状恶化);(ii)表现出特异性针对过敏原或该受试者所敏感的过敏原的IgE;(iii)针对过敏原或所述受试者所敏感的过敏原,表现出阳性的皮肤点刺试验;和/或(iv)表现出其它与特应性疾病一致的特征性症状,例如过敏性鼻炎、湿疹或血清总IgE的升高,则考虑所述哮喘的受试者患有过敏性哮喘。应该认识到,如果,例如,所述受试者在特定的环境中经历症状恶化,可能鉴别不出特异性的过敏触发源,但可以对其进行怀疑或推断。

[0435] 吸入性的过敏原刺激是广泛用于评估过敏性气道疾病的技术。过敏原的吸入导致与IgE受体结合的过敏原特异性的IgE在例如,肥大细胞和嗜碱性粒细胞上交联。分泌途径的激活随之而来,导致释放支气管收缩和血管通透性介质的释放。患有过敏性哮喘的个体可能在过敏原刺激之后发展出多种表现,例如,早期哮喘反应(EAR)、迟发型哮喘反应(LAR)、气道高反应性(AHR)和气道嗜酸性粒细胞增多,其每个可如本领域已知的那样被检测和定量。例如,气道嗜酸性粒细胞增多可能通过痰和/或BAL液中嗜酸性粒细胞增多而检测出。EAR,有时也被称为速发型哮喘反应(IAR),是对吸入性过敏原的应答,其在吸入后不久(通常在吸入的10分钟之内)可通过例如,FEV₁的减弱而检测出。所述EAR通常在30min内达到最大值,并在刺激后2-3小时内消失。例如,在这个时间窗口期内,如果他/她的FEV₁相对于基线FEV₁(其中此处的“基线”表示在所述刺激之前的情况,例如,与所述受试者未经历哮喘恶化和未暴露于所述受试者所敏感的过敏性刺激时的惯常情况相当的情况)减少了至少15%,例如,至少20%,可考虑所述受试者表现出“阳性的”EAR。晚期哮喘反应(LAR)通常始于刺激之后的3h至8h,并且其特征在于气道的细胞炎症、支气管血管渗透性的增强和粘液分泌。其通常通过FEV₁的减弱而检测出,该减弱可能在幅度上大于与所述EAR相关的减弱并且潜在地,可能在临床上更重要。例如,在所述相关时间窗口期内,如果他/她的FEV₁相对于基线FEV₁减少了至少15%,例如,至少20%,可考虑所述受试者表现出“阳性的”LAR。迟发

气道反应 (DAR) 可能始发于刺激之后的约26至32h,在约32至48h间达到最大值,并在约56h内消失 (Pelikan, Z. Ann Allergy Asthma Immunol. 2010, 104 (5) : 394-404)。

[0436] 在某些实施方案中,所述慢性呼吸病症是慢性阻塞性肺疾病 (COPD)。COPD包括众多具有特征为气流受限即使在治疗下也是不完全可逆的并且通常是渐进性的病症。COPD的症状包括呼吸困难(气绝)、运动耐受力降低、咳嗽、咳痰、喘息和胸闷。患有COPD的人会经历症状的急性阶段(例如,在不到一周的期间内以及经常在24小时或更短的期间内发展),恶化(称作COPD恶化),所述恶化可在频率和持续时间上变化并与显著发病率相关。它们可由例如呼吸道感染、暴露于有害颗粒等事件触发,或者可能具有未知的病因。吸烟是COPD最常遇到的风险因素,并且其它吸入性接触也会促成该疾病的发展和进展。遗传因素在COPD中的作用是一个活跃的研究领域。小部分的COPD患者具有 α -1抗胰蛋白酶(丝氨酸蛋白酶主要的循环性抑制剂)的遗传性缺陷,并且这种缺陷可导致产生该疾病的快速进展的形式。

[0437] COPD特征性的病理生理特征包括小气道变窄和结构变化以及肺实质的破坏(特别是肺泡周围),其最常见的原因是慢性炎症。在COPD中观察到的慢性气流受限通常涉及这些因素的混合,并其在促成气流受限和症状中的相对重要性因人而异。术语“肺气肿”表示终末细支气管远端的空气空间(肺泡)的扩大,并伴有对其壁的损坏。应当指出,所述术语“肺气肿”临床上经常用于表示与这样的病理变化相关的医学病症。某些患有COPD的个体具有慢性支气管炎,其在临床上被定义为连续2年、每年的3个月中大多数日子里有咳痰。关于COPD的风险因素、流行病学、发病机制、诊断和目前的管理的进一步信息可在例如,慢性阻塞性肺疾病全球倡议公司(GOLD)网站(www.goldcopd.org)上的“Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease”(2009年更新)(本文中也被称为“GOLD报告”)、ATS网站www.thoracic.org/clinical/copd-guidelines/resources/copddoc.pdf上的美国胸科学会/欧洲呼吸学会指南(2004年)(本文中也被称为“ATC/ERS COPD”指南)和内科医学的标准教材例如Cecil Textbook of Medicine(第20版)、Harrison's Principles of Internal Medicine(第17版),和/或侧重于肺医学的标准教材中找到。

[0438] 在某些实施方案中,本文公开的方法抑制(干扰、破坏)上面所讨论的DC-Th17-B-Ab-C-DC循环。例如,施用补体抑制剂可以打破该循环,通过该循环,补体刺激DC细胞以促进Th17细胞表型的循环。其结果是,Th17细胞的数目和/或活性减弱,从而减少Th17介导的对B细胞的刺激和多克隆抗体的产生。在某些实施方案中,这些效应导致将免疫微环境“复位”到更正常的、病理性更低的状态。如PCT/US2012/043845 (W0/2012/178083)的实施例1和USSN 20140371133中的描述(简要概述于下面的实施例27中)中所述,已经在动物哮喘模型中得到了证据,所述证据支持补体抑制能够对Th17相关的细胞因子的产生发挥延长的抑制效应。

[0439] 在某些实施方案中,抑制所述DC-Th17-B-Ab-C-DC循环具有疾病修饰效应。不希望受任何理论约束,抑制所述DC-Th17-B-Ab-C-DC循环会干扰这样的基本病理机制而不是仅仅治疗病症的症状,所述机制即使在症状得到较好的控制时,也可能会促成持续的组织损伤,和/或其可能会促成所述疾病的恶化。在某些实施方案中,抑制所述DC-Th17-B-Ab-C-DC循环引起了慢性病症进入缓解阶段。在某些实施方案中,缓解表示在患有慢性病症的受试者中,不存在或基本上不存在疾病活性,但疾病有复发的可能。在某些实施方案中,在不存

在继续治疗或在减少剂量或提升给药间隔的条件下,可在延长的时间段内(例如,至少6个月,例如,6-12个月、12-24个月或更长)持续缓解。在某些方面,抑制补体可能会改变富含Th17细胞的组织的免疫微环境,并将其修饰成富含调节性T细胞(Treg)的微环境。这样做会允许免疫系统对自身进行“重设”并进入缓解状态。在某些实施方案中,例如,缓解可以持续至触发事件的发生。触发事件可以是,例如,感染(其可能导致产生与传染剂和自身蛋白质都发生反应的多克隆抗体)、暴露于特定的环境条件(例如,高水平的空气污染物如臭氧或烟雾的特定的物质或组分如香烟烟雾、过敏原)等。遗传因素可能起一定作用。例如,具有编码补体成分的特定等位基因的个体可能具有更高的补体活性的基线水平,更有反应性的补体系统和/或更低内源性补体调节蛋白活性的基线水平。在某些实施方案中,个体具有与AMD的增强的风险相关的基因型。例如,所述受试者可以具有编码补体蛋白或补体调节蛋白(例如,CFH、C3、B因子)的基因的多态性,其中所述多态性与AMD增强的风险相关。

[0440] 在某些实施方案中,例如,在尚未发展出慢性病症的症状的受试者中或在已经发展出所述病症并已经过本文所述的治疗的受试者中,免疫微环境可能随时间的推移,朝着病理状态逐步变得更为极化。这样的转化可能随机发生(例如,至少部分是由于抗体水平和/或亲和性的明显的随机波动)和/或由累积的、强度不足以触发病症症状爆发的“亚阈值”触发事件而导致。

[0441] 在某些实施方案中,可以预期,相对短程的长效坎普他汀类似物,例如,介于1周至6周,例如,约2-4周,会提供长效的益处。在某些实施方案中,在延长的时间段内达到缓解,例如,1-3个月、3-6个月、6-12个月、12-24个月或更长时间。在某些实施方案中,可在症状复发之前,检测和/或预防性治疗受试者。例如,可在暴露于触发性事件之前或之时治疗受试者。在某些实施方案中,可在受试者上监测,例如,生物标记物(例如,包含Th17细胞或Th17细胞活性的指示分子的生物标记物)的升高,或补体活化,并在这样的生物标记物水平升高时进行治疗。进一步的讨论参见,例如,PCT/US2012/043845。

[0442] VIII. 组合物和施用

[0443] 本发明提供了和/或利用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。

[0444] 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。

[0445] 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。

[0446] 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用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。

[0447] 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用于期望的制剂(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病症的受试者的化合物)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病症的受试者。

[0448] 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,其与被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。在某些实施方案中,所述固体形式是冻干形式。在某些实施方案中,所述固体形式是粉末形式,例如,冻干的粉末。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。在某些实施方案中,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,试剂盒或包装件包含(i)第一容器,所述第一容器含有足够一次或多次给药的细胞反应性的、长效的或靶向的坎普他汀类似物;(ii)第二容器,所述第二容器包含药学上可接受的运载体,所述药学上可接受的运载体将与所述第一容器的内容物组合以产生适合通过例如,皮下(缩写

为SQ或SC)或玻璃体内(IVT)注射施用给受试者的组合物。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(例如,1-200个或子范围的任何插入的数字)。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,提供了一个或多个笔或笔筒(pen cartridge)。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,例如,经由皮下注射的说明书。

[0449] 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。

[0450] 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者单次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。

[0451] 另外,本公开内容提供了以下的特别见解:在某些情况下,对于施用如本文所述的坎普他汀类似物(例如,LACA),皮下和/或肌肉内注射可能是特别理想的。例如,在某些实施方案中,特别对于治疗慢性病症来说,皮下和/或肌肉内注射可以是优选的(相对于例如静脉内递送来说)。另选地或另外地,当例如期望和/或预期患者自己施用坎普他汀类似物的组合物时(例如,不需要或不依赖于由医护人员进行施用,特别是当这种由护理提供者进行的施用可能需要前往输液中心时),皮下和/或肌肉内注射可能会特别有用。

[0452] 在一些具体的方面,本公开涵盖以下认识:在每天施用药物的实施方案中,每天施用可能比以更长的给药间隔(如每周一次或每2周一次)施用更能维持更恒定的血液水平。更恒定的血液水平可能是合乎需要的,特别是在一些实施方案中(例如,如本文所述的对慢

性疾病的治疗)。本公开认识到,长期的每日静脉内输注可能会很不方便,特别是对于非住院患者。

[0453] 本公开特别认识到,在一些实施方案中,皮下施用可能甚至比肌肉内注射更有效和/或更理想,特别是在预期或期望自己施用的情况下。

[0454] 在某些实施方案中,可以使用装置施用本文所述的组合物,特别是包含LACA的组合物,所述装置在某些实施方案中在激活时以至至少部分自动化的形式,通过注射来递送一定剂量的药物组合物。这种装置在本领域中被称为“笔”或“自动注射器”,并且这些术语在本文中可互换使用。通常,笔或自动注射器允许通过自动或手动插入的皮下注射针,或通过高速射流,注射容纳于筒、贮存器或注射器中的一定剂量的药物组合物。它可以被设计成用于施用单剂量或多剂量。

[0455] 在某些特定的实施方案中,这种笔或自动注射器被用于肌肉内和/或皮下注射。根据本公开,笔或其他自动注射器对于利用皮下注射的实施方案可能特别有用。笔通常是这样的装置:其在自带的筒或贮存器中含有(或可以装载有)药物,并且所述自带的筒或贮存器可以连接至针。

[0456] 在某些实施方案中,本公开提供了如本文所述的以下认识:对于本文所述的一种或多种LACA,皮下和/或肌肉内注射可能是特别理想的递送模式。例如,本公开记载了某些特别理想的和/或有效的给药方案,其涉及通过注射(例如,通过皮下注射)施用LACA;在某些实施方案中,通过使用笔(例如,可能已经预先装载有适当剂量或体积的笔)来实现这样的注射。笔可以是耐久的(以及可重复使用的)或一次性使用的。耐久的笔通常使用可更换的筒,将空了的筒丢弃,并且将新筒插入笔中。一次性使用的笔通常在筒或贮存器中预先装有药物。当所述筒或贮存器空了的时候,将笔丢弃。筒或贮存器可以含有单剂量或多剂量。在使用笔的时候,将针与笔连接并插入皮肤。通常,推动按钮以施用剂量,但是在某些实施方案中也可以使用其他激活方法。在某些实施方案中,自动注射器可以包括加载有弹簧的注射器,但是本领域普通技术人员将理解,可以使用多种技术来提供自动化施用。在某些实施方案中,通过按下按钮或以其他方式激活装置,自动插入针并且递送药物。在某些实施方案中,自动注射器可被设计成自动地和/或准确地将针插至皮下组织中的期望深度。笔或自动注射器可以包括诸如允许使用者选择或调整剂量或注射深度的标度盘等装置。

[0457] 在某些实施方案中,使用包含双腔室注射器的装置施用本文所述的组合物,特别是包含LACA的组合物。一个腔室中含有干燥的药物(例如,冻干的药物)。第二腔室含有合适的药学上可接受的运载体。在使用该装置时,首先通过将腔室中的内容物混合来重构药物。这可以通过多种方式来完成。在某些实施方案中,推动柱塞会例如,通过将运载体转移到含有冻干药物的腔室中,使腔室的内容物混合。

[0458] 因此,可以提供包含本文所述组合物(例如,包含LACA)的多种药物递送装置,例如,预填充注射器、双腔室注射器、耐久的和/或一次性使用的笔、以及适用于笔的筒。这样的装置可以含有一个或多个剂量(例如,本文所述的任何剂量中的一个或多个)。

[0459] 在某些实施方案中,本公开涵盖向受试者提供(例如,通过邮寄或预约取件或其他常规递送方式)本文所述的一组装置,其共同提供足以持续预定的一段时间(例如,一周,两周,三周,四周等)的活性剂(例如,LACA)供应。在某些实施方案中,将上述的装置组定期地(例如,每周、每两周、三周、四周等)送到患者的住所,选择好时机以使得患者不会断供。在

某些实施方案中,组合物(例如,LACA)可以容纳于容器(例如,小瓶)中或任意一种上文面提到的药物递送装置或包装件中。

[0460] 在某些实施方案中,所述组合物一直到施用前不久都是冻干的或保持冷藏的或冷冻的,在施用时将其复原(如果是冻干的)或解冻(如果是冷冻的)。在施用前可让组合物达到室温。

[0461] 在一些实施方案中,可以使用贴剂系统(例如,用于皮下或透皮施用)施用组合物。在某些实施方案中,所述贴剂可以包含或连接至贮存器,所述贮存器可含有,例如,高达约10ml的溶液,从而允许在单次施用中向患者施用10ml的溶液。

[0462] 在某些实施方案中,包含本文所述坎普他汀类似物(例如,细胞反应性坎普他汀类似物,LACA或靶向坎普他汀类似物)和药学上可接受的运载体的组合物的pH在6.5至7.5之间,例如在6.8至7.2之间(例如7.0)。在执行稳定性测试的过程中,观察到相对于中性的pH,较低的pH导致了某些LACA的稳定性升高。因此,在某些实施方案中,包含LACA和药学上可接受的运载体的组合物的pH在6.0至6.5之间,5.5至6.0之间,或5.0至5.5之间。在一些实施方案中,可以使用更低的pH值,例如4.5-5.0。在某些实施方案中,所述组合物还包含一种或多种药学上可接受的缓冲物质,其适于将pH维持在选定范围(例如,任何上述范围)内。本文描述了合适的缓冲物质(例如,乙酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐或磷酸盐)。在某些实施方案中,所述组合物另外地或另选地包含盐,例如,本文所述的任何药学上可接受的盐。在一些特定的实施方案中,所述组合物包含磷酸盐。

[0463] 应当注意,为简明起见,本公开中描述的某些方面和实施方案(例如,涉及给药方案,剂量,施用方法,用于施用的装置和/或治疗方法)是就长效坎普他汀类似物而言的。然而,应该理解,提供了类似的实施方案,其中坎普他汀类似物不是LACA。所述坎普他汀类似物可以是,例如,不包含清除率降低部分的细胞反应性的或靶向的坎普他汀类似物。

[0464] 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。

[0465] 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。

[0466] 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)。在某些实施方案中,用于多个实施方案的合适的水性媒介物包括水或盐水,任选地包括醇。在一些实施方案中,所述组合物包含甘油水溶液,例如约2%的甘油水溶液。在某些实施方案中,所述组合物

包含适合用于引入肺中的表面活性剂。除此之外或可选地,可以使用适合用于肺部施用的其它赋形剂。

[0467] 多种不同装置可用于通过吸入施用(其可互换地称为“吸入施用”,“呼吸施用”或“肺部施用”)。喷雾器是将药物溶液或悬液转化成适合用于在下呼吸道沉积的气雾剂的装置。喷雾器的类型包括喷射式喷雾器、超声波喷雾器和振动筛网喷雾器。已有的振动筛网喷雾器的部分列表包括eFlow (Pari), i-Neb (Respironics), MicroAir (欧姆龙), IHS0喷雾器 (Beurer) 和 Aeroneb® (Aerogen)。可以使用 Respimat.® Soft Mist.™ 吸入器 (Boeringer Ingelheim)。定量吸入器 (MDI) 是使用推进剂递送治疗剂的手持式气雾剂装置。MDI 包括加压金属罐,所述加压金属罐含有药剂悬液或溶液、推进剂、表面活性剂(通常含有)和计量阀。氯氟烃 (CFC) 已被广泛用作推进剂,但大部分已被氢氟烃 (HFC, 也被称为氢氟烷烃 (HFA)) 取代,例如 HFC-134a 和 HFC-227ea。其他的选择是二氧化碳和氮气。干粉吸入器 (DPI) 是呼吸致动装置,其递送容纳在胶囊或泡罩中的颗粒形式的药物并且通常不使用推进剂,所述胶囊或泡罩在使用前被刺穿。目前用于递送治疗哮喘和/或 COPD 的药物的 DPI 的例子包括,例如, Diskus、Aerolizer、HandiHaler、Twisthaler、Flexhaler。这样的装置可用于递送多种实施方案中的坎普他汀类似物。可在多种实施方案中使用的其它示例性 DPI 装置包括 3M Conix™、TAIFUN® (AKELA Pharma)、Acu-Breathe™ (Respirics) 以及合并了锥形干粉吸入技术的装置,例如 API-5000 (其中活性药物成分 (API) 存于微结构运载带上)。

[0468] 吸入辅助装置 (IAD) 通常分为两类:腔体储雾罐和握持储雾罐。腔体储雾罐和握持储雾罐延长吸入器的吸口并将药雾引向口腔,减少药物在空气中的流失。将腔体储雾罐与 MDI 一起使用,有助于减少药物粘在喉咙背面的量,改善通过 MDI 递送的药物的方向和沉积。单向阀握持储雾罐 (VHC) 使细密的药物云状物留在腔体储雾罐中,直到患者通过单向阀将其吸入,将药物剂量吸入肺中。实例包括 Aerochamber 和 Optichamber。

[0469] 可基于多种参数,例如细颗粒部分 (FPF)、排放剂量、平均颗粒密度和质量中值空气动力学直径 (MMAD) 对颗粒组合物进行表征。合适的方法在本领域中已知,其中一些记述于美国专利号 6,942,868 和 7,048,908,以及美国公开号 20020146373、20030012742 和 20040092470 中。在某些实施方案中,对于呼吸递送,气雾剂颗粒在约 0.5 μm –10 μm (MMAD) 之间,例如约 5 μm ,然而也可以使用更小或更大的颗粒。在某些实施方案中,使用质量平均空气动力学直径在 1 μm 和 25 μm 之间 (例如,在 1 μm 和 10 μm 之间) 的颗粒。

[0470] 在本文中,含有直径小于约 1mm 的颗粒的干颗粒组合物也被称为干粉。“干”组合物具有相对较低的液体含量,使得颗粒易于分散,例如在干粉吸入装置中分散形成气雾剂或喷雾剂。“粉”主要由或基本上全部由细小分散的固体颗粒组成,所述固体颗粒相对地自由流动并且能够易于在吸入装置中分散并随后被受试者吸入,优选地使得大部分颗粒可以到达所期望的呼吸道部分。在某些实施方案中,使用平均几何直径在 3 至 15 μm 范围内并且振实密度在 0.04 和 0.6g/cm³ 之间的大多孔颗粒。参见,例如,美国专利号 7,048,908; Edwards, D. 等, Science 276:1868–1871, 1997; 和 Vanbever, R. 等, Pharmaceutical Res. 16:1735–1742, 1999。

[0471] 在某些方面,本文描述了用于通过坎普他汀类似物的吸入施用治疗患者的多种剂量,给药方案,组合物和方法。所述坎普他汀类似物可以是本文所述坎普他汀类似物中的任一种。所述坎普他汀类似物可以包含本文第 III 部分中描述的任何肽。例如,所述坎普他汀

类似物可以包含本文所述的SEQ ID No:3-36的任一种或由其组成,和/或可以包含与本文所述的坎普他汀有关的任何修饰。在特定的实施方案中,所述坎普他汀类似物包含肽或由肽组成,所述肽的序列列于表1中,例如SEQ ID NO:14、21、28、29、32、33、34或36。在特定的实施方案中,所述坎普他汀类似物不包含清除率降低部分、细胞反应性部分或靶向部分。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物的分子量在1.5kD至2.0kD之间,或2.0kD至2.5kD之间。在某些实施方案中,所述坎普他汀类似物具有11至25个氨基酸,例如,确切地,13、14、15、16、17或18个氨基酸。

[0472] 在某些实施方案中,通过吸入施用(在本文中可互换地称为“肺施用”或“呼吸施用”)坎普他汀类似物的总每日剂量为至少5mg/天,例如,至少10mg/天,至少15mg/天,至少20mg/天,至少25mg/天,或至少30mg/天。在某些实施方案中,所述每日剂量在5mg/天-20mg/天之间,例如,10mg/天或15mg/天。在某些实施方案中,所述每日剂量在20mg/天-60mg/天之间。在一些特别的实施方案中,所述剂量为10mg/天、15mg/天、20mg/天、25mg/天、30mg/天、35mg/天、40mg/天、45mg/天、50mg/天、55mg/天或60mg/天。如实施例所述,在健康受试者中进行的吸入施用的坎普他汀类似物的1期临床试验中,在30mg/天或60mg/天的剂量下观察到了药理学活性的可能证据。

[0473] 在一些实施方案中,所述每日剂量在60mg/天-150mg/天之间,例如,60、70、80、90、100、110、120、130、140或150mg/天。在一些实施方案中,所述每日剂量在150mg/天-350mg/天之间,例如,150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340或350mg/天。在一些实施方案中,所述每日剂量可以在单次施用期间施用。在某些实施方案中,所述每日剂量可以在一天之内以两剂或更多剂施用(例如在早上和晚上施用)。

[0474] 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。

[0475] 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。

[0476] 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。

[0477] 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裹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。在某些方面,CRM赋予坎普他汀类似物贮库的属性。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。

[0478] 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。

[0479] 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。

[0480] 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:(i)减少补体介导的病症的至少一项症状或体征;(ii)提高生活质量;(iii)减少住院;(iv)降低死亡率。本领域的普通技术人员将理解,特定的有益效果将至少部分取决于多种因素,例如,所治疗的特定的病症。本领域的普通技术人员将意识到在患有补体介导的病症的受试者中可能发生的症状和体征。本文中提供了多种补体介导的病症的症状和体征。例如,在某些实施方案中,例如,其中受试者患有PNH或aHUS,有益效果是补体介导的红细胞溶解的减少。在某些方面,在本领域普通技术人员的判断范围内,有益效果是统计学显著的和/或有治疗意义的。

[0481] 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。在某些实施方案中,施用约0.5mg/kg/天至约10mg/kg/天的坎普他汀类似物。在某些实施方案中,施用约1mg/kg/天至约5mg/kg/天的坎普他汀

类似物。在某些实施方案中,施用约1mg/kg/天至约3mg/kg/天的坎普他汀类似物。在某些实施方案中,施用约3mg/kg/天至约5mg/kg/天的坎普他汀类似物。在某些实施方案中,施用约5mg/kg/天至约7.5mg/kg/天的坎普他汀类似物。在某些实施方案中,施用约7.5mg/kg/天至约10mg/kg/天的坎普他汀类似物。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,每天进行1次或2次施用。如在所述实施例中的进一步描述,每天皮下地施用示例性的长效坎普他汀类似物容易达到远高于5微摩尔的血液水平。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。在某些实施方案中,使用治疗有效量将长效坎普他汀类似物施用给受试者,其中这样的施用导致所述化合物的血液浓度达到这样的水平:其高于至少1 μ M、至少2 μ M、至少2.5 μ M、至少3 μ M、至少4 μ M、至少5 μ M、至少6 μ M、至少7 μ M、至少8 μ M、至少9 μ M、至少10 μ M、至少11 μ M、至少12 μ M或至少13 μ M、至少14 μ M、至少15 μ M、至少16 μ M、至少18 μ M或至少约20 μ M,或至少约25 μ M或介于4 μ M和约15 μ M或约20 μ M或约25 μ M的任意范围内。在某些实施方案中,在单次静脉内注射之后或在每天皮下注射约5-7天之后,这样的水平能维持至少约24小时,或至少约48小时,或至少约72小时,或至少约96小时,或至少约120小时,或至少约144小时。可实现更长的持续水平,例如,长达约10天、12天、14天或更长。

[0482] 在某些实施方案中,治疗受试者以保持以下的稳态水平:约1.0 μ M、约2.0 μ M、约2.5 μ M、约3.0 μ M、约3.5 μ M、约4.0 μ M、约4.5 μ M、约5.0 μ M、约5.5 μ M、约6.0 μ M、约6.5 μ M、约7.0 μ M、约7.5 μ M、约8.0 μ M、约8.5 μ M、约9.0 μ M、约9.5 μ M或约10 μ M。在某些实施方案中,稳态水平具有以下值:介于约1.0 μ M和约10.0 μ M之间,例如,介于约2.0 μ M和约5.0 μ M之间,介于约2.5 μ M和约5.0 μ M之间,介于约5.0 μ M和约7.5 μ M之间,或介于约7.5 μ M和约10 μ M之间,或任意前述范围内的任何中间值。在某些实施方案中,例如,使用利用人血清的修改版海姆氏试验,浓度足以基本上抑制体外暴露于人血清的PNH患者的红细胞的裂解(参见,例如,实施例8)。在某些实施方案中,例如,使用利用人血清的修改版海姆氏试验,浓度足以使体外暴露于人血清的PNH患者的红细胞的裂解减少至少50%、60%、70%、80%、90%或更多(参见,例如,实施例8)。在某些实施方案中,可以使用被调节至镁水平为约0.005mol/L和pH低至约6.2以激活补体的人血清进行海姆氏试验。实施例18和19显示的数据确认本文所述的坎普他汀类似物对来自PNH患者的RBC裂解的抑制能力。

[0483] 在某些实施方案中,坎普他汀类似物,例如,长效坎普他汀类似物,可以保护PNH患

者的红细胞免于表面累积显著量的C3和/或C3激活的产物。例如,由坎普他汀类似物,例如,长效坎普他汀类似物,保护PNH红细胞不受补体介导的裂解,也可保护其不在表面累积显著量的C3和/或C3激活的产物。如本领域已知的,依库珠单抗(Soliris®, Alexion制药公司)是在许多国家被批准用于治疗PNH和aHUS的人源化抗C5单克隆抗体(参见,例如, Dmytrijuk A, FDA report: eculizumab (Soliris) for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Oncologist*. 2008 Sep; 13 (9) : 993-1000. doi: 10.1634/theoncologist.2008-0086. Epub 2008 Sep 10; Westra D., A new era in the diagnosis and treatment of atypical haemolytic uraemic syndrome. *Neth J Med*. 2012 Apr; 70 (3) : 121-9)。据报道,当PNH RBC暴露于依库珠单抗时,其可能在其表面表现出显著量的C3和/或C3激活产物的累积,所述累积可能促成对这些细胞的清除和/或血管外溶血(例如,在脾中)以及可能由此至少部分地导致在某些PNH患者中观察到持久的血液异常,例如,持久性贫血,尽管所述患者已接受了依库珠单抗的治疗。不希望受任何理论束缚,这可能是由依库珠单抗对所述MAC形成的抑制而导致发生的,所述依库珠单抗保护细胞免于MAC介导的裂解,但不抑制C3的激活或C3和/或C3激活产物的沉积,并且由于所述细胞缺乏GPI-锚定补体抑制蛋白,使得PNH细胞容易发生表面上的C3的激活以及C3和/或C3激活产物的沉积。不希望受任何理论约束,本文中所述的坎普他汀类似物抑制C3的激活并从而抑制C3激活产物的产生的能力可能提供显著优势。在某些实施方案中,用本文所述的坎普他汀类似物治疗已经或正在接受依库珠单抗治疗并继续表现出溶血的证据的受试者,例如,临床显著溶血,如引起贫血和/或需要输血处理。在某些实施方案中,以足以导致以下的浓度使用坎普他汀类似物:暴露于所述坎普他汀类似物的PNH RBC上的C3和/或C3激活产物的水平在来自健康受试者的正常RBC表现出的范围内。在某些实施方案中,暴露于坎普他汀类似物的PNH RBC上的C3和/或C3激活产物的水平(体外(例如,在海姆氏试验中)或体内)在平均水平或正常上限的约1.2、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0之内。在某些实施方案中,暴露于坎普他汀类似物的PNH RBC上的C3和/或C3激活产物的水平(体外(例如,在海姆氏试验中)或体内)低于暴露于Soliris的PNH RBC上的C3和/或C3激活产物的水平,所述Soliris的浓度能提供相当的保护不受补体介导的裂解。在某些实施方案中,暴露于坎普他汀类似物(体外或体内)的PNH RBC上的C3和/或C3激活产物的水平不超过暴露于依库珠单抗的PNH RBC上的C3和/或C3激活产物水平的约5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%或50%,所述依库珠单抗的浓度能提供相当的保护不受补体介导的裂解。在某些实施方案中,暴露于坎普他汀类似物的PNH RBC上的C3和/或C3激活产物的水平(体外或体内)在正常范围的平均水平或上限的约1.2、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0之内。在某些实施方案中,所述PNH细胞包含II型PNH细胞、III型PNH细胞,或其混合物,或由其组成。在某些实施方案中,所述RBC是至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的III型和/或II型RBC。在某些实施方案中,所述细胞可包含一些I型细胞。在某些实施方案中,可基于RBC表面上的GPI锚定蛋白如CD59的水平,将RBC分为I、II或III型,所述水平可用流式细胞术、免疫荧光或ELISA,例如,使用抗体(例如,单克隆抗体)或其它与所述GPI锚定蛋白结合的结合剂测量得到。在某些方面,对C3和/或C3激活产物在细胞或表面上的沉积的抑制作用可被用作坎普他汀类似物在其它补体介导的疾病如aHUS、其它补体介导的溶血性疾病或其它补体介导的疾病中的功效的指标。例如,在某些实施方案中,坎普他汀类似物在患有aHUS的受试者上抑制内皮细

胞上的这种沉积。在某些实施方案中,可使用流式细胞术、免疫荧光或ELISA,例如,使用抗体(例如,单克隆抗体)或其它与C3和/或一种或多种C3激活产物结合的结合剂测量C3和/或C3激活产物的水平。在某些实施方案中,C3激活产物是C3b、C3c或C3d。在某些实施方案中,结合剂结合C3d。在某些实施方案中,结合剂结合C3d和至少一种其它的C3激活产物。在某些实施方案中,与坎普他汀类似物体外接触(例如,在海姆氏试验中)的PNH患者的RBC被保护免受激活的补体的作用,使得I型、II型和III型细胞的相对比例(百分比)或III型和I型、II型和I型或III型和II型的相对比例或百分比,与使用失活的补体(例如,热灭活的补体)的对照测定法中的相对比例或百分比大致相同。在某些实施方案中,与坎普他汀类似物体外接触(例如,在海姆氏试验中)的PNH患者的RBC被保护免受激活的补体的作用,使得I型、II型和III型细胞的相对比例或百分比或III型和I型、II型和I型或III型和II型的比例或百分比,是在使用失活的补体(例如,热灭活的补体)的对照测定法中的相对比例或百分比的5%之内。在某些实施方案中,补体可以通过热灭活而被灭活,所述热灭活可通过将补体成分或含有补体成分的血清或血浆加热至56摄氏度或更高而得以进行。

[0484] 在某些实施方案中,在确定裂解量的过程中,可以额外地或替代地使用LDH(一种在红细胞中大量存在的并且充当溶血功能标记物的酶)的测量、一种或多种血液学参数如血细胞比容、血红蛋白,和/或网织红细胞的测量。在某些实施方案中,可以使用一种或多种方法来确定RBC的裂解量,例如,易受补体介导的裂解的RBC,例如PNH患者细胞、aHUS患者细胞、来自患有其它补体介导的血液疾病的受试者的细胞、暴露于异常高水平的补体激活的细胞。在某些方面,本公开提供了一种方法,所述方法包括将一种或多种细胞体外或体内接触本文所述的坎普他汀类似物以及测量所述坎普他汀类似物对一个或多个补体介导的细胞损伤的指示物和/或细胞表面的补体激活或沉积的效应。在某些实施方案中,以足够的浓度与所述一种或多种细胞接触足够长的时间,导致以异常高的值减少或异常低的值升高至正常范围内或至正常范的下限或上限的5%、10%、15%、20%、25%以内。

[0485] 在某些方面,本公开提供了一种选择或改进用于患有补体介导的溶血病如PNH的患者的给药方案或给药方案的一个或多个成分的方法。所述给药方案的一个或多个成分可以包括剂量、施用间隔、施用途径(例如,静脉内的或皮下的),或其组合。剂量可以是负荷剂量、维持剂量,或两者兼而有之。在某些实施方案中,可从患者得到一份或多份血液样品,并且可以选择或改进针对坎普他汀类似物(例如,长效坎普他汀类似物)的剂量方案或其成分,以达到体外所需的使所述患者的RBC免于裂解和/或免于累积C3和/或C3激活产物的保护水平。在某些实施方案中,可将一种或多种剂量的坎普他汀类似物,例如,长效坎普他汀类似物,施用给患者,并且随后可从患者获得一份或多份血液样品并评估其表面上的C3和/或C3激活产物的水平。在某些实施方案中,可选择或改进给药方案或其成分,例如,剂量、施用间隔或施用途径,以达到体外或体内所需的使所述患者的RBC免于裂解和/或免于累积C3和/或C3激活的产物的保护水平。在某些实施方案中,可选择或改进给药方案或其成分,例如,剂量、施用间隔或施用途径,以达到体内所需的使所述患者的RBC免于血管外清除和/或血管外裂解的保护水平。所需的水平可以是,例如,本领域接受的能提供具有临床意义的益处的水平,给特定病人提供具有临床意义的益处的水平,在正常范围内的水平,由医生选择的水平,或任意其它选择的水平。参数的正常范围可以是本领域中已知的和/或可以由实验室(例如,临床实验室)建立的参考范围,其中,在至少95%、96%、97%、98%或99%的一

般人群中或至少95%、96%、97%、98%或99%的健康个体(其可以任选地匹配一个或多个人口统计变量,如性别、年龄等)或获自其的生物样品(如血液样品)中测量的所述相关参数的值将落入参考范围内。可使用代表一般人群或代表健康个体的样本人群建立参考范围。

[0486] 在某些实施方案中,包含CRM的长效坎普他汀类似物被设计成在皮下或肌肉内施用给患者之后,相对于不包含CRM的长效坎普他汀类似物,具有较慢的全身性吸收速率。在某些实施方案中,选择特定的CRM属性,例如,长度,以在皮下或肌肉内施用之后,相对于至少一些其它的CRM,具有所需的全身性吸收速率。在某些实施方案中,相对于剂量相当的不与CRM连接的坎普他汀类似物,降低了所述C_{max},其可能因此将所述化合物的血浆浓度保持在所需的窗口之内,例如,治疗窗口。在某些实施方案中,长效坎普他汀类似物的组合物的特征在于,当皮下施用,基于在所述注射位点的目测,在施用后的约1、2、3、4、6、8、12、15、30、45、60、90或120小时内,剂量呈现为完全吸收。

[0487] 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,然后转换至替代的途径,例如,皮下、肌肉内、透皮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/或细胞保护的程度。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。

[0488] 在某些方面,本文描述了这样的方法,其中将患者从用不包含坎普他汀类似物的补体抑制剂治疗,转换到用坎普他汀类似物(例如,长效坎普他汀类似物(LACA),细胞反应性的或靶向的坎普他汀类似物)治疗。为简明起见,针对LACA描述这样的方法,但该方法也可以应用于将患者转换到用细胞反应性的或靶向的坎普他汀类似物治疗。在某些实施方案中,被施用坎普他汀类似物(例如,LACA)的患者在开始用坎普他汀类似物(例如LACA)治疗时,正在用另外一种不包含坎普他汀类似物的补体抑制剂治疗。在一些实施方案中,被施用坎普他汀类似物的患者在开始用坎普他汀类似物治疗时正在进行用另外的不包含坎普他汀类似物的补体抑制剂治疗,在这样的实施方案中所述患者的补体系统可能在开始用LACA治疗时已经被抑制(例如,通过合适的测定法(例如使用患者血清进行的离体血清诱导溶血测定法)测得)。在某些实施方案中,另外的补体抑制剂是C5的抑制剂(即,通常通过结合C5来抑制C5的活化和/或活性的试剂)。在某些实施方案中,所述C5的抑制剂是抗-C5抗体,例如依库珠单抗、抗-C5siRNA(如ALN-CC5 (Alnylam Pharmaceuticals))、抗-C5多肽(如Coversin (Volution Immuno Pharmaceuticals, Ltd.))或者抗-C5小分子。在某些实施方案中,另外的补体抑制剂可以是C3的抑制剂。在某些实施方案中,停止用另外的补体抑制剂(例如C5的抑制剂)治疗并且将所述患者转换到用LACA治疗。应当理解,理想地以这样的方式转换到用LACA治疗:使患者在向用LACA作为唯一补体抑制剂疗法过渡的过程中不会经历

临床上显著的补体系统抑制降低。

[0489] 例如,对于患有补体介导的溶血性贫血(例如PNH)的患者,所述患者在停止用另外的补体抑制剂治疗时,不会经历临床上显著的溶血升高(例如,通过LDH水平和/或离体血清溶血活性所测得)。在某些实施方案中,监测所述患者并且妥善处理所述过渡,使得所述患者不会经历测得的LDH水平上升超过10%或者测得的溶血活性上升超过10%。在某些实施方案中,用使得在过渡期间维持对离体血清溶血活性至少80%的抑制的方式,过渡到用LACA作为唯一补体抑制剂疗法的治疗。“过渡期”是指从首剂LACA当天开始,并且到另外的补体抑制剂末剂过后的4乘以X天为止的时间段,其中“X”表示在首剂LACA施用给患者之前,另外的补体抑制剂施用给患者的给药间隔,例如以推荐剂量使用时,另外的补体抑制剂的推荐给药间隔。药物的“推荐剂量”是指在美国FDA批准的标签上的处方信息中针对所述药物指定的剂量,或者如果所述药物未经FDA批准,则为在所述药物使用的管辖地负责药物审批的政府机构所批准的标签上的处方信息中针对所述药物指定的剂量。药物的“推荐给药间隔”是指在处方信息中和/或在美国FDA批准的标签上针对所述药物所指定的给药间隔,或者如果所述药物未经FDA批准,则为处方信息中和/或在所述药物使用的管辖地负责药物审批的政府机构所批准的标签上指定的给药间隔。应该理解,药物可以具有两个或更多个不同的推荐给药方案。这样的给药方案可能适合用于不同的适应症,适合用于具有不同特征的患者,或者只是替代性的剂量、给药间隔和施用途径的治疗有效的组合。在药物具有两个或更多个推荐给药方案的情况下,应当理解,术语“推荐给药间隔”是指通过特定施用途径施用的特定剂量所使用的推荐给药间隔。

[0490] 在某些实施方案中,首先将LACA施用给已经在一段时间内接受了至少一剂另外的补体抑制剂的患者,所述一段时间不超过另外的补体抑制剂的推荐给药间隔的1.5倍,例如,在不超过另外的补体抑制剂的推荐给药间隔的一段时间内,例如,在不超过另外的补体抑制剂的推荐给药间隔的一半的一段时间内。在某些实施方案中,在所述患者的首剂LACA之前的2周内,所述患者接受了至少一剂另外的补体抑制剂。在某些实施方案中,在所述患者的首剂LACA之前的1周内,所述患者接受了至少一剂另外的补体抑制剂。在某些实施方案中,在所述患者的首剂LACA之前不到一周的时间内,所述患者已经接受了一剂另外的补体抑制剂。在某些实施方案中,在所述患者的首剂LACA当天,所述患者接受了一剂另外的补体抑制剂。在某些实施方案中,用有效量的另外的补体抑制剂和有效量的LACA治疗患者,从而使得另外的补体抑制剂和LACA的治疗有效的血液水平都维持一段时间。这样的联合治疗的时间段可以持续例如,1周至2周、2周至4周、4周至6周、6周至8周、8周至12周、12周至26周。在某些实施方案中,联合治疗的时间段可以是1、2、3、4、5或6个月。在某些实施方案中,联合治疗的时间段是从首剂LACA至末剂另外的补体抑制剂之间的一段时间。可以以患者在开始用LACA治疗之前就已经接受的常规维持剂量来施用另外的补体抑制剂。在某些实施方案中,可以以随时间(逐渐)减少的剂量施用另外的补体抑制剂,直到最终停止用另外的补体抑制剂治疗。例如,在某些实施方案中,可以将另外的补体抑制剂的剂量减少至维持剂量的约67%,然后末剂为维持剂量的约33%。在某些实施方案中,可以将不同补体抑制剂的剂量减少至维持剂量的约75%,然后为维持剂量的约50%,然后末剂为维持剂量的约25%。在某些实施方案中,其中用LACA和另外的补体抑制剂治疗所述患者的总时间段(即,从首剂LACA至末剂第一补体抑制剂之间的时间)为2周至26周。在某些实施方案中,另外的补体抑制剂

不是逐渐减少的。相反,在某些实施方案中,例如,在LACA达到了治疗有效的血液水平之后,允许另外的补体抑制剂的血液水平随着其被代谢或以其他方式从身体移除而降低。在某些实施方案中,在过渡期间和/或在其之后监测患者血清的离体血清诱导的溶血。在某些实施方案中,在从用另外的补体抑制剂治疗向用LACA作为唯一补体抑制剂的治疗转变的过渡期中,如果检测发现患者血清的离体血清诱导的溶血未减少至少80%,例如至少90%,那么可以提升LACA的剂量。在某些实施方案中,C3片段(例如C3d)对PNH患者的红细胞的调理作用的降低,可以指示患者正在接受治疗有效量的LACA。在某些实施方案中,继续用另外的补体抑制剂(例如C5的抑制剂)和LACA治疗至少6个月,例如6至12个月,12至24个月或更长时间(例如,无限期地)。在某些实施方案中,以低于其作为患者的唯一补体抑制剂疗法使用时所用的剂量,施用另外的补体抑制剂和/或LACA。应该注意到,如果有需要,可以使用类似的方法将患者从用LACA治疗转换到用另外的补体抑制剂治疗,或者将患者从用第一LACA治疗转换到用另外一种LACA治疗。

[0491] 在某些方面,本文描述了用于向受试者施用长效坎普他汀类似物(LACA)的某些剂量、给药方案、组合物和方法。在某些方面,本文描述的某些剂量、给药方案、组合物和方法已经用于临床试验中,所述临床试验涉及向健康的人受试者或PNH患者通过皮下或玻璃体内施用LACA,所述LACA包含分子量为40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分(所述直链PEG的每个末端各连接一个),或者涉及向AMD患者玻璃体内施用所述LACA(参见实施例)。因此,在某些方面,本文描述的剂量、给药方案、组合物和/或方法可用于向受试者(例如,患有补体介导的病症的患者)施用LACA,所述LACA包含分子量为40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分。在某些实施方案中,所述两个坎普他汀类似物部分与直链PEG的末端连接(即,所述PEG的每个末端各连接一个坎普他汀类似物部分)。在某些实施方案中,各坎普他汀类似物部分经其C-末端与直链PEG连接。在某些实施方案中,所述LACA可以是CA28-2GS-BF或CA28-2TS-BF。

[0492] 如本文所述,坎普他汀类似物部分可以包含隔离物,所述隔离物将具有侧链(所述侧链包含反应性官能团,例如,伯胺或仲胺、巯基或巯基反应性基团)的氨基酸(或者包含此类氨基酸的氨基酸序列)与包含环状部分的坎普他汀类似物部分的分隔开,或者这样的连接部分可以不存在。存在时,这样的隔离物部分可以包含被取代的或未被取代的、饱和的或不饱和的烷基链,低聚(乙二醇)链,和/或本文中用L(或 L^{P1} 、 L^{P2} 或 L^{P3})表示的任何其它部分。当化合物中存在两个或更多个包含隔离物部分的坎普他汀类似物部分时,所述隔离物部分在各种实施方案中可以相同或不同。剂量、给药方案、组合物和/或方法可被用于施用包含坎普他汀类似物部分的长效坎普他汀类似物,所述坎普他汀类似物部分包含任何上述隔离物部分。

[0493] 本文还描述到,在各种实施方案中,坎普他汀类似物部分可以经由很多种不同连接中的任一种与PEG(或其他聚合物)连接。在一些实施方案中,(一个或多个)坎普他汀类似物部分可以经由以下部分与CRM连接:包含不饱和烷基部分的部分、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、氨基酸残基、和/或上文中任何用L(或 L^{P1} 、 L^{P2} 或 L^{P3})表示的部分。例如,如本文所述,在特定的实施方案中,(一种或多种)坎普他汀类似物可以经由氨基甲酸酯连接,酯连接,酰胺连接或两种或更多种这样的连接的组合,与CRM连接。当化合物中存在两个或更多个坎普他汀类似物部分时,

各种实施方案中的与所述聚合物的连接可以相同或不同。剂量、给药方案、组合物和/或方法可被用于施用长效坎普他汀类似物,所述长效坎普他汀类似物包含经由任何上述部分与CRM连接的坎普他汀类似物部分。

[0494] 在某些实施方案中,本申请所描述的剂量、给药方案、组合物和/或方法可被用于施用LACA,所述LACA在一个或多个方面区别于本文所述的临床试验中所使用的LACA。例如,这样的LACA可以包含:(i)作为CRM的另外的聚合物(例如,POZ、多肽、支链PEG),(ii)作为CRM的分子量低于或高于40kD的聚合物;(iii)不同数目的坎普他汀类似物部分(例如,1个、3个、4个或更多个坎普他汀类似物部分,而不是2个坎普他汀类似物部分),(iv)一个或多个坎普他汀类似物部分,其包含替代了SEQ ID NO:28的不同于SEQ ID NO:28的序列(例如,本文所述的任何其他坎普他汀类似物部分);(v)(一种或多种)延伸了一个不同的氨基酸残基(或包含该氨基酸残基的氨基酸序列)的坎普他汀类似物,其具有侧链,所述侧链包含伯胺或仲胺但不包含赖氨酸,或者包含不同的反应性官能团(如巯基或巯基反应性基团);(vi)经由坎普他汀类似物部分的N末端而不是经由C末端与CRM连接的(一种或多种)坎普他汀类似物部分;(vii)一个或多个坎普他汀类似物部分的游离末端处的不同阻断部分;(viii)(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)和(viii)中的两个或更多个的任意组合。

[0495] 如上所述,在某些方面,本文描述的剂量、给药方案、组合物和/或方法可被用于施用LACA,其包含作为CRM的分子量约为40kD的聚合物(例如,PEG),例如,分子量为36kD-44kD、37kD-43kD、38kD-42kD或39kD-41kD的聚合物。然而,在某些实施方案中,剂量、给药方案、组合物和/或方法可被用于施用包含分子量在更宽范围内的聚合物的LACA。在值得特别关注的某些实施方案中,所述聚合物的分子量不大于45kD。在某些实施方案中,所述聚合物具有10kD-45kD的分子量。在某些实施方案中,所述聚合物具有20kD-45kD的分子量。在某些实施方案中,所述聚合物具有30kD-40kD的分子量。在某些实施方案中,所述聚合物具有30kD至45kD的分子量。在某些实施方案中,所述聚合物具有35kD-45kD的分子量。在某些实施方案中,所述聚合物的分子量大于45kD,例如高达50kD。应当理解,聚合物的分子量可以是指本文讨论的组合中聚合物分子的平均分子量。

[0496] 在某些实施方案中,所述组合物包含5%的右旋糖作为药学上可接受的运载体。然而,可以使用任何药学上可接受的运载体。

[0497] 在各种实施方案中,本文描述的剂量、给药方案、组合物和/或方法可被用于治疗本文提到的任何补体介导的病症。不受限制地,这样的病症包括,例如,PNH、NMO、重症肌无力、aHUS、COPD、特发性肺纤维化、移植后的器官排斥(例如、急性或慢性排斥)、类天疱疮和AMD。在某些实施方案中,所述补体介导的病症是补体介导的慢性病症,例如,本文提及的任何补体介导的慢性病症。在某些实施方案中,所述补体介导的病症是Th17相关病症,例如本文提及的任何Th17相关病症。

[0498] 在某些方面,本文描述了用于通过皮下施用LACA来治疗患者的多种剂量、给药方案、组合物和方法。在用包含40kD的PEG部分的LACA进行的实验中,发现粘度而非溶解度是限制包含LACA的组合物的浓度的主要因素,在通过给定内径或规格号的针递送给定体积的组合物所需的时间和压力方面,所述组合物可以以医师和患者可接受的方式,通过皮下或IVT注射施用。规格号描述空心针的外径,较大的规格号表示较小的外径。通常,患者和医师优选具有较大规格号的针,因为与具有较小规格号的针相比,其可能与较少的疼痛和/或组

织损伤相关(或可以被认为相关)。内径取决于外径和壁厚。对于标准的针,规格号越大,则内径越小(例如,27号针的内径大于29号针的内径,后者的内径又大于30号针的内径)。

[0499] 在某些实施方案中,包含LACA的组合物(例如药物组合物)的浓度为150mg/ml。发现使用27号针可以容易地递送包含40kD PEG的150mg/ml LACA溶液。因此,在某些实施方案中,使用27号针来施用浓度高达150mg/ml(例如,100mg/ml-150mg/ml,如100mg/ml、125mg/ml或150mg/ml)的一定剂量的LACA,所述LACA包含分子量为约40kD的PEG。在某些实施方案中,包含LACA的组组合物的浓度为150mg/ml-180mg/ml,所述LACA包含40kD的PEG。在某些实施方案中,包含LACA的组组合物的浓度为180mg/ml-200mg/ml,所述LACA包含分子量为40kD的PEG。在某些实施方案中,使用27号针施用浓度为150mg/ml-160mg/ml、160mg/ml-170mg/ml、170mg/ml-180mg/ml、180mg/ml-190mg/ml或190mg/ml-200mg/ml的包含LACA的组合物,所述LACA包含分子量为约40kD的PEG。当然,也可以替代地使用具有较小规格号(例如25、26号规格)的针来代替27号(或更大的)规格的针。

[0500] 本公开包括以下发现:使用25号针可以容易地递送包含40kD的PEG的200mg/ml LACA溶液。在某些实施方案中,使用25号针或26号针施用浓度为200mg/ml或更高浓度的包含LACA的组合物,所述LACA包含40kD PEG。在某些实施方案中,使用25号针或26号针施用浓度为200mg/ml-225mg/ml或225mg/ml-250mg/ml的包含LACA的组合物。

[0501] 在某些方面,本公开教导某些薄壁针用于施用根据本发明所述的LACA的特定用途。例如,在某些实施方案中,薄壁针用于皮下、肌肉内或眼内(例如玻璃体内)注射LACA。对于给定的规格,薄壁针具有与标准针相等的外径,但具有更大的内径。例如,薄壁针的内径尺寸可以与规格小1至2个号的标准针相同(例如,29号薄壁针的内径可以与27号或28号标准针的内径相同,但其外径与29号标准针的外径相同)。内径的增加会导致给定压力下的流体流量显著增加和/或维持给定流量所需的压力显著减小。较低的压力意味着需要较少的注射力来施用具有给定粘度的组合物。通常,低注射力有助于施用,因此通常是理想的特征。在某些实施方案中,薄壁针具有沿针长均匀分布的给定内径。在某些实施方案中,薄壁针具有沿针长变化的内径。例如,所述针在一端的内径可以与29号标准针的内径相同,而在另一端增大到27号标准针的内径。在某些实施方案中,可以使用微型针。在某些实施方案中,可以使用具有类似手术刀的尖端的针。针的长度可以是不同的。在某些实施方案中,可以使用短针,例如5mm或6mm的针。在某些实施方案中,可以使用长度介于6mm和8mm之间,或者介于8mm和12mm之间的针。合适的针和注射器可商购得自,例如,Becton Dickinson and Company (BD)、Terumo Corp.等。

[0502] 在某些实施方案中,可以使用薄壁针来施用具有给定粘度和/或浓度的组合物,所述薄壁针的规格比用来在选定的流速和/或用选定的注射力条件下施用具有同样的粘度和/或浓度的组合物时所优选使用的标准针的规格尺寸大1或2号。例如,在某些实施方案中,对于优选使用25号标准针施用以获得所需的流速和/或注射力的组合物,可以使用26或27号薄壁针以同样的流速和/或注射力施用。在某些实施方案中,对于优选使用27号标准针施用以获得所需的流速和/或注射力的组合物,可以使用28或29号薄壁针以同样的流速和/或注射力施用。在某些实施方案中,对于优选使用29号标准针施用以获得所需的流速和/或注射力的组合物,可以使用30或31号薄壁针以同样的流速和/或注射力施用。在某些实施方案中,使用29号薄壁针来施用浓度为150mg/ml-160mg/ml、160mg/ml-170mg/ml、170mg/ml-

180mg/ml、180mg/ml-190mg/ml或190mg/ml-200mg/ml的包含LACA的组合物,所述LACA包含分子量为约40kD的聚合物(例如PEG)。当然也可以替代地使用具有较小规格号(例如27、28号)的薄壁针来代替规格号为29号(或更大)的薄壁针头。

[0503] 在某些方面,适合用于单次皮下注射的体积可以是高达2毫升(ml)-3ml。因此,例如,在某些实施方案中,可以通过皮下注射施用大于1.0ml的体积,例如,1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0ml。在某些实施方案中,可以通过皮下注射施用大于2.0ml的体积,例如2.1、2.2、2.3、2.4或2.5ml。在某些实施方案中,可以通过皮下注射施用大于2.5ml的体积,例如2.6、2.7、2.8、2.9或3.0ml。在某些实施方案中,使用每次注射1ml或更少的体积,例如0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或1.0ml。在某些实施方案中,施用给患者的总日体积在1.0至2.5ml之间,例如1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4或2.5ml。在施用两次皮下注射的某些实施方案中,可以施用高达5ml的体积。在某些实施方案中,以每日单次注射施用1.0-2.5ml的体积。在某些实施方案中,1.0-2.5ml体积作为两次独立的注射施用。所述两次独立的注射中施用的体积可以相同或不同,只要其能一起提供足以施用所需LACA量的总体积即可。在某些实施方案中,所述两次独立的注射可以间隔多达12小时施用。然而,在某些实施方案中,所述两次独立的注射在彼此相隔5、10、15、20、30或60分钟内施用。

[0504] 在某些方面,一种或多种固定剂量可用于不同患者,所述不同患者的重量和/或体表面积可能有较大范围的差异。在某些实施方案中,可以提供2、3或更多种不同的固定剂量,其中不同的剂量可以例如更适合用于体重和/或体表面积处于不同范围内的个体。

[0505] 在某些实施方案中,固定剂量可以用于施用一定量的坎普他汀类似物(例如LACA),其将在至少25%、至少50%、至少75%、至少90%或至少95%或更多的健康受试者和/或至少25%、至少50%、至少75%、至少90%或至少95%或更多的需要治疗本文提及的特定病症的患者中,达到期望的补体抑制水平(例如,在血浆样品中所测得)。在某些实施方案中,固定剂量可以用于施用这样的量:其将在至少25%、至少50%、至少75%或至少90%的需要治疗本文提及的特定病症的患者中,达到期望的效力水平(例如,通过使用合适的终点所测得)。在某些方面,本文所述的剂量可能对皮下(SC)施用特别有用。然而,在一些实施方案中,作为皮下途径的替代,或者除了皮下途径以外,可以使用其他肠胃外施途径(例如静脉内、透皮或肌肉内),将本文所述的剂量施用给受试者。因此,当描述涉及特定剂量的皮下施用时,本公开内容提供了通过不同的施途径(例如静脉内,透皮或肌肉内)施用该剂量的实施方案。

[0506] 在某些实施方案中,包含两个坎普他汀类似物部分和分子量为约40kD的PEG的LACA的肠胃外施用(例如皮下施用)总日剂量为至少30mg/天,例如至少45mg/天,例如至少90mg/天,例如至少150mg/天,例如至少180mg/天。在一些实施方案中,所述日剂量在90mg/天-180mg/天之间。在一些实施方案中,所述日剂量在180mg/天-270mg/天之间。在某些实施方案中,所述剂量为,例如,180mg/天-230mg/天。在某些实施方案中,所述剂量为至少190mg/天,例如,190mg/天-240mg/天。在某些实施方案中,所述剂量为至少200mg/天,例如,200mg/天-250mg/天。在某些实施方案中,所述剂量为至少210mg/天,例如,210mg/天-260mg/天。在某些实施方案中,所述剂量为至少220mg/天,例如,220mg/天-270mg/天。在某些实施方案中,所述剂量为至少230mg/天,例如,230mg/天-280mg/天。在某些特定的实施方

案中,所述剂量为180mg/天、190mg/天、200mg/天、205mg/天、210mg/天、215mg/天、220mg/天、225mg/天、230mg/天、235mg/天、240mg/天、245mg/天、250mg/天、255mg/天、260mg/天、265mg/天或者270mg/天。在某些实施方案中,以每日单次注射1.5ml-2.0ml的体积施用180mg/天-270mg/天的剂量。在某些实施方案中,以每日单次注射多达2.0-2.5ml的体积施用180mg/天-270mg/天的剂量。在某些实施方案中,以每日两次注射施用180mg/天-270mg/天的剂量,每次体积小于2.0ml(例如,1.0ml至1.9ml)。例如,在特定的实施方案中,以单次注射1.5ml的体积施用270mg/天的日剂量。在另一特定的实施方案中,以单次注射1.8ml的体积施用270mg/天的日剂量。在另一特定的实施方案中,以每日两次注射施用270mg/天的日剂量,每次体积为0.9ml。在某些特定的实施方案中,以每日两次注射施用270mg/天的日剂量,每次体积为0.9ml-1.2ml(例如,1.0ml、1.05ml、1.1ml、1.15ml或1.2ml)。在某些特定的实施方案中,以每日两次注射施用270mg/天的日剂量,每次体积为1.2ml-1.5ml(例如,1.2ml、1.25ml、1.35ml、1.40ml、1.45ml或1.5ml)。在某些具体的实施方案中,以每日两次注射施用270mg/天的日剂量,每次体积为1.5ml-1.9ml(例如,1.55ml、1.6ml、1.65ml、1.7ml、1.75ml、1.8ml、1.85ml或1.90ml)。

[0507] 在某些实施方案中,包含两个坎普他汀类似物部分和分子量为约40kD的PEG的LACA的肠胃外施用(例如皮下施用)总日剂量为270mg/天-360mg/天。在某些实施方案中,所述剂量为270mg/天-300mg/天。在某些实施方案中,所述剂量为300mg/天-330mg/天。在某些实施方案中,所述剂量为330mg/天-360mg/天。在某些特定的实施方案中,所述剂量为295mg/天、300mg/天、305mg/天、310mg/天、315mg/天、320mg/天、325mg/天、330mg/天、335mg/天、340mg/天、345mg/天、350mg/天、355mg/天或360mg/天。在某些实施方案中,以每日单次注射1.5ml-2.0ml的体积,或以每日单次注射多达2.0-2.5ml的体积施用270mg/天-360mg/天的剂量。在某些实施方案中,以每日两次注射施用270mg/天-360mg/天的剂量(例如,任何前述剂量),每次体积小于2.0ml(例如,在1.0ml至1.9ml之间,如1.0ml、1.05ml、1.10ml、1.15ml、1.20ml、1.25ml、1.30ml、1.35ml、1.40ml、1.45ml、1.50ml、1.55ml、1.60ml、1.65ml、1.70ml、1.75ml、1.80ml、1.85ml、1.90ml)。

[0508] 在某些实施方案中,包含两个坎普他汀类似物部分和分子量为约40kD的PEG的LACA的皮下施用总日剂量为至少360mg/天,例如,360mg/天-540mg/天。在某些实施方案中,所述总日剂量大于360mg/天,例如,高达约540mg/天。例如,所述总日剂量可以是370mg/天、380mg/天、390mg/天、400mg/天、410mg/天、420mg/天、430mg/天、440mg/天、450mg/天、460mg/天、470mg/天、480mg/天、490mg/天、500mg/天、510mg/天、520mg/天、530mg/天或540mg/天。在某些实施方案中,以每日单次注射例如约2.0-2.5ml或2.5ml-3.0ml的体积,施用360mg/天-540mg/天的剂量。在某些实施方案中,以每日两次注射,施用360mg/天至高达约540mg/天的剂量,每次体积小于2.0ml(例如,在1.0ml至1.9ml之间)。

[0509] 应当理解,本文所述用于皮下施用(或其他肠胃外施用途径)的剂量和体积可以通过使用独立式(free-standing)针和注射器,笔装置,自动注射器或本领域技术人员已知的其他手段来施用。

[0510] 在某些实施方案中,可以继续通过皮下施用或其他胃肠外施用途径(例如,根据本文所述的任何给药方案和/或使用本文所述的任何剂量或施用装置)用坎普他汀类似物(例如LACA)治疗任意一段时间,例如无限期地。在某些实施方案中,可以用短疗程治疗患者(例

如,治疗长达1周、2周或长达1、2、3、4、5、6个月)。在某些实施方案中,这样的短疗程可足以改变病症(例如,PNH、NMO、重症肌无力、COPD)的病程,使得持续的缓解(例如,通过不再出现突然爆发或恶化所证实)可以用间歇性治疗维持,即,在疗程之间允许将LACA冲洗出体外。在某些实施方案中,受试者可以每年用短疗程治疗一次或两次、每两年用短疗程治疗一次等。在某些实施方案中,短疗程可以改变病症(例如,PNH、NMO、重症肌无力、COPD、哮喘、特发性肺纤维化、血管炎、类天疱疮)的病程,从而实现持续的缓解或治愈而无需进一步治疗。不希望受任何理论约束,用坎普他汀类似物(例如,LACA)进行的短疗程可足以打破使得针对细胞或组织(例如,其组分,如蛋白质或脂质)的免疫应答持续存在的循环,所述细胞或组织是补体介导的病症中免疫系统攻击的靶点。在某些实施方案中,例如,用LACA进行的短疗程可足以打破使得针对以下细胞或组织的免疫应答持续存在的循环:骨髓(例如,造血干细胞)(例如,在PNH患者中)、神经系统(例如,神经细胞,胶质细胞)(例如,在NMO或重症肌无力患者中)、循环系统(例如,内皮细胞)(例如,在血管炎患者中)、呼吸系统(例如,在COPD、哮喘或特发性肺纤维化患者中)、外皮系统(例如,在类天疱疮患者中)中的细胞或组织。

[0511] 在某些方面,本文描述了用于通过玻璃体内(IVT)施用LACA,治疗需要治疗补体介导的眼病的患者的多种剂量、给药方案、组合物和使用方法,所述眼病影响眼后段,例如视网膜。在某些实施方案中,所述眼病是AMD,例如晚期AMD(地图样萎缩(GA)或新生血管性AMD)、糖尿病性视网膜病、青光眼或葡萄膜炎。

[0512] 在某些实施方案中,用于玻璃体内注射包含两个坎普他汀类似物部分和分子量为约40kD的PEG的LACA的剂量为5mg-20mg。在某些实施方案中,所述剂量为10mg。在某些实施方案中,所述剂量为10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg、16mg、17mg、18mg、19mg或20mg。在某些特定的实施方案中,所述剂量为15mg。在某些实施方案中,通过玻璃体内注射介于90至110微升之间的体积(例如100微升体积)施用任意上述剂量。在某些实施方案中,使用27、28、29或30号针通过玻璃体内注射施用任意上述剂量。在1b期临床试验中,发现AMD患者对使用29号针通过玻璃体内注射施用体积为100微升的多达20mg(即,5mg、10mg和20mg)的剂量耐受良好。在一些实施方案中,选择剂量和针规格的组合,所述组合允许在10秒或更短的时间内通过IVT注射的施用。在一些实施方案中,使用剂量和针规格的组合,所述组合允许在5-6秒或更短的时间内通过IVT注射施用所述剂量。发现体积为100微升的15mg的剂量(150mg/ml)导致产生了这样的组合物:其粘度有利于经由薄壁27号针在5-6秒或更短的时间内通过玻璃体内注射进行施用。

[0513] 在一些实施方案中,通过IVT注射以大于100微升的体积来施用一定剂量的包含LACA的组合物。例如,可以使用100-110微升,110-125微升或125-150微升的体积。与100微升注射体积相比,这种更大的体积可以允许施用更高的剂量,而不会增加递送所述剂量所需的时间和/或不需要使用规格更小(直径更宽)的针。这样的总剂量的增加可能与增加的体积成正比。例如,剂量体积增加50%将允许所施用的LACA的量增加50%,而不会增加递送所述剂量所需的时间和/或不需要使用规格更小的针。

[0514] 在某些实施方案中,通过眼部施用(例如玻璃体内注射),每月一次,每6周一次或每2个月(即,每隔一个月)施用一定剂量的包含LACA的组合物。在某些实施方案中,通过玻璃体内注射,每3个月一次,每4个月一次,每5个月一次,或每6个月一次,或以更低的频率(例如,每9个月一次,每年一次)施用一定剂量的包含LACA的组合物。因此,在某些实施方案

中,患者每年可以接受1至6次注射,注射的间隔大致相等。在某些实施方案中,首先用每月一次的注射治疗患者(例如,对于前3-6个月或前6-12个月),随后施用的频率降低(例如每2、3、4、5或6个月一次,或更不频繁地,例如每9个月一次、每年一次)。

[0515] 在某些实施方案中,根据任意前述给药方案通过玻璃体内注射用LACA进行的治疗可以无限期地继续。在某些实施方案中,可以用短疗程(例如,1、2、3、4、5或6次玻璃体内注射)治疗患者。在某些实施方案中,短疗程可足以停止或基本停止病症(例如,AMD,如GA或早期或中晚期AMD)的进展,从而不需要进一步的治疗。例如,用LACA进行的短疗程可足以破坏使针对视网膜或视网膜色素上皮细胞的免疫应答持续存在的循环。

[0516] 在某些实施方案中,使用具有一个或多个减少摩擦和/或所需注射力的设计特征(例如,相对短的筒和/或相对大的柱塞尺寸)的注射器来施用LACA。

[0517] 在使用包含不同分子量PEG的LACA所执行的实验中,确定了与相同浓度(以mg/ml为单位)的包含40kD的PEG的LACA相比,包含较低分子量(例如,10kD-30kD)的PEG的LACA溶液粘度降低。较低的粘度能有利于使用较高规格号的针(例如,29号而非27号)。在某些实施方案中,相较于包含分子量为40kD或更高的聚合物(例如,PEG)的LACA,包含分子量低于40kD的聚合物(例如,PEG)的LACA可以使用具有更小的内径和/或更高的规格号的针来施用。在某些实施方案中,包含分子量低于40kD的聚合物(例如,PEG)的LACA可以以80mg/ml至150mg/ml,例如约100mg/ml或约125mg/ml的浓度施用。在某些实施方案中,包含分子量低于40kD的聚合物(例如,PEG)的LACA可以以150mg/ml至250mg/ml之间的浓度施用。在某些实施方案中,包含分子量低于40kD(例如,10kD-35kD)的聚合物(例如,PEG)的LACA可以以高于250mg/ml的浓度(例如,高达300mg/ml、300mg/ml-400mg/ml、400mg/ml-500mg/ml或更高)施用。

[0518] 在某些实施方案中,包含分子量低于约40kD(例如,10kD-35kD)的CRM(例如,PEG、POZ、多肽或其他聚合物)和特定数量的坎普他汀类似物部分(例如1个、2个、3个、4个)的LACA可以以与上文关于包含分子量为约40kD的CRM的LACA所述的任何量相同的剂量(就摩尔数而言)施用,使得剂量的重量更低,但仍含有大致相同数量的坎普他汀类似物部分。每剂施用总量较低的化合物(按重量计)可以允许给药体积减少。减少给药体积可以允许减少注射次数(例如,在某些实施方案中,每日单次注射代替每日两次注射)和/或可以减少注射时间(施用单个剂量的时间长度)。较低的总剂量(以重量计)能允许在给定体积中使用较低浓度(按重量计)的化合物,使得粘度降低,从而允许使用具有较小内径的针和/或较短的注射时间。在某些实施方案中,包含分子量低于约40kD(例如,10kD-30kD)的CRM(例如,PEG、POZ、多肽或其他聚合物)和特定数量的坎普他汀类似物部分(例如1个、2个、3个、4个)的LACA可以以相较于包含分子量为约40kD的CRM的LACA更高的摩尔剂量施用,使得每剂施用更大数量的坎普他汀类似物部分。在某些实施方案中,所述摩尔剂量可以高达1.2倍、1.5倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍或5倍,取决于例如CRM的分子量。

[0519] 在某些实施方案中,包含分子量低于约40kD(例如,10kD-35kD)的CRM(例如,PEG、POZ、多肽或其他聚合物)和特定数量的坎普他汀类似物部分(例如1个、2个、3个、4个)的LACA可以以相较于上文关于包含分子量为约40kD的CRM的LACA所述的剂量更低的每单位时间剂量(按重量计)(例如,更低的日剂量,更低的周剂量,更低的月剂量等)、大约相同的每单位时间剂量或更高的每单位时间剂量施用。在某些实施方案中,涵盖这样的认识:包含分

子量低于约40kD (例如, 10kD-30kD) 的CRM的LACA的剂量 (按重量计) 可以低于或高于包含40kD的CRM的LACA的每日剂量最多达约3倍 (例如, 约1.1、1.2、1.5、2.0、2.5、3.0)。

[0520] 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, 或潜在可用于治疗患有疾病的受试者的任何试剂的施用。例如, 在某些实施方案中, 将LACA, 细胞反应性的或靶向的坎普他汀类似物与C5的抑制剂 (例如, 依库珠单抗或本文提及的或本领域已知的任何其它C5的抑制剂) 联合施用给患者, 例如患有PNH或本申请提及的任何其他补体介导的病症的患者。在某些实施方案中, 将LACA, 细胞反应性的或靶向的坎普他汀类似物与抗血管内皮生长因子 (VEGF) 剂联合施用给患有湿性AMD的受试者。抗VEGF剂包括结合VEGF的抗体, 如雷珠单抗 (Lucentis) 和贝伐单抗 (阿瓦斯汀), 包含VEGF受体的可溶部分的多肽, 如阿柏西普 (Eylea, 也称为VEGF-Trap)。

[0521] 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, 或者更多, 例如, 在时间上隔开至多约4周、6周、8周或12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)。

[0522] 在某些实施方案中, 施用包括细胞反应性坎普他汀类似物, 或长效的或靶向的坎普他汀类似物和其它化合物二者的组合物。

[0523] 在某些实施方案中, 通过使用例如吸入施用或肠胃外施用的 (经由例如, 皮下、肌肉或静脉内注射) 坎普他汀类似物治疗或将用坎普他汀类似物治疗的受试者, 被针对一种或多种病原体的疫苗接种。例如, 所述受试者可以接受针对脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌和/或肺炎链球菌的疫苗。在某些实施方案中, 受试者被针对所有这三种微生物的疫苗接种。在某些实施方案中, 受试者可在首剂坎普他汀类似物前至少1周、2周、3周、4周、5周或6周接受疫苗。如果合适的话, 所述受试者可以接受一次或多次额外的疫苗剂量。

[0524] 在某些实施方案中, 通过使用例如吸入施用或肠胃外施用的 (经由例如, 皮下、肌肉或静脉内注射) 坎普他汀类似物治疗或将用坎普他汀类似物治疗的受试者可接受抗生素, 所述抗生素预期能有效预防或限制一种或多种病原体 (例如, 脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌和/或肺炎链球菌) 的感染。在某些实施方案中, 所述受试者可以预防性地接受抗生素。预防性施用可以在所述受试者接受首剂坎普他汀类似物之前, 或者之后的任何时间开始。本领域普通技术人员知晓合适的抗生素。例如, 一个

[0525] 实施例

[0526] 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

[0527] 合成了坎普他汀类似物, 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 α -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-NH₂ (SEQ ID NO:51), 缩写为CA28-AEEAc-Lys。应当指出, 为了简明起见, 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SUNBRIGHT®ME-300GS和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。

[0528] 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:

[0529] 经典补体抑制测定的方案

[0530] 材料:

[0531] ●96孔板 (聚苯乙烯板, Thermo Scientific, 9205)

[0532] ●鸡OVA (Sigma A5503-5G)

[0533] ●兔抗-鸡OVA (Abcam ab1221)

[0534] ●封闭缓冲液 (开始封闭缓冲液, Thermo Scientific 37538)

[0535] ●维罗那缓冲液 (5X浓度, Lonza 12-624E)

[0536] ●人血浆 (以50ug/ml终浓度, 与来匹卢定一起收集)

[0537] ●山羊抗-人类C3HRP-缀合的Ab (MP Biomedicals, 55237)

[0538] ●吐温-20洗涤缓冲液 (0.05%吐温20-PBS缓冲液)

[0539] ●TMB (过氧化物酶底物, BD 555214) -BD 51-2607KC和51-2606KC的1:1混合物。

[0540] ●1M H₂SO₄

[0541] 方案:

[0542] 1. 添加100ul/孔的1%鸡OVA (在PBS中)

[0543] 2. 在4℃或室温温育1-2小时

[0544] 3. 通过振荡和轻叩板移出

[0545] 4. 通过添加200μl封闭缓冲液来封闭

[0546] 5. 在室温温育1h

[0547] 6. 通过振荡和轻叩板移出

[0548] 7. 添加100ul多克隆抗-鸡OVA在封闭缓冲液中的1:1000稀释液

[0549] 8. 在室温温育1h

[0550] 9. 用洗涤缓冲液洗涤两次

- [0551] 10.向第2至12号孔中添加50u1 VB⁺⁺
- [0552] 11.向第1号孔中添加100μl起始化合物稀释液 (2x存在于VB⁺⁺中)。
- [0553] 12.如下所述自第1至10号孔连续稀释 (1:2) 药物
- [0554] a.自起始孔取50μl溶液
- [0555] b.将此溶液加入下一孔中
- [0556] c.通过抽吸若干次进行混合
- [0557] d.重复至第10号孔
- [0558] 注:自第10号孔移出50μl并抛弃。
- [0559] 13.向第1至11号孔添加50μl 2x血浆稀释液 (原始血浆的1:37.5稀释液)
- [0560] 14.温育1h
- [0561] 15.用洗涤缓冲液洗涤
- [0562] 16.添加100μl抗-C3-HRP Ab在封闭缓冲液中的1/1000稀释液
- [0563] 17.温育1h
- [0564] 18.用洗涤缓冲液洗涤
- [0565] 19.向所有孔添加100μl TMB
- [0566] 20.在黑暗中温育5-10min
- [0567] 21.添加50u1 1M H₂SO₄
- [0568] 22.在450nm读出板

[0569] VB⁺⁺

[0570] 配方:

巴比妥 5 mM

NaCl 72.5 mM

[0571] MgCl₂ 0.5 mM

CaCl₂ 0.15 mM

PH 7.4

[0572] 储备溶液:

[0573] 维罗那缓冲液 (5X)

[0574]

	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

[0575] Mg-Cl₂ (200X)

[0576]

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

[0577] CaCl₂ (500x)

[0578]

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

[0579] 为了制备50ml工作缓冲液:

[0580] ●称量210mg NaCl

[0581] ●添加10ml 5X VB

[0582] ●添加100μl CaCl₂ (500X)

[0583] ●添加250μl MgCl (200X)

[0584] ●用H₂O调节体积至50ml

[0585] ●调节pH至7.4

[0586] 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(Pa)(Y值)转换成抑制百分比(Pi)。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 $[Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\log EC - X)})]$ 。从拟合参数得到IC₅₀值。

[0587] 结果呈现在图1中,且IC₅₀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%。

[0588] 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

[0589] 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)₈-PEG40k,也被称作CA28-3。

[0590] 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IC₅₀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⁻¹·cm⁻¹),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IC₅₀值是CA28-3的实际IC₅₀的7.5倍。在摩尔基础上,将CA28-3的IC₅₀计算为约0.26(低于母体化合物CA28的IC₅₀)。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。

[0591] 表2

[0592]

	CA28	CA28-1	CA28-2	CA28-3
IC ₅₀	0.3909	1.264	1.288	1.927

[0593] 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。

[0594] 实施例3:表现出急剧增加的血浆半衰期和C_{max}的长效坎普他汀类似物

[0595] 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。

[0596] 定量施用和样品收集

[0597] 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,并放入不含有抗凝血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3000x g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。

[0598] 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1M NH₄OAc(pH 3.5),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 NH₄OAc,流动相B是含有0.1%FA的90:10(ACN:50mM NH₄OAc)。LC柱是Intrada WP-RP 2x150mm,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/z 144离子质量,片段化,并在Q3中选择m/z 77离子质量,并检测。使用Analyst 1.4.2软件处理数据。

[0599] 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。

[0600] 表3

[0601] 血清浓度,以ug/mL计

[0602]

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
2	384	355	360		612	733	760
4	280	252	262		461	458	424
8	151	136	136		268	282	293

[0603] 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_{max}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。

[0604] 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

[0605] 使用2-亚氨基四氢噻吩(硫杂环戊烷),将人血清白蛋白(HAS)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)-(CH₂)₅-Mal)-NH₂(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。

[0606] 表4

[0607] 血清浓度,以ug/mL计

时间 (小时)			
	0.0035	0.0100	0.0200
[0608]	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	16.25	20.00

[0609] 实施例5:在使用不同的NHS激活的PEG的条件下,基于PEG的坎普他汀类似物的合成和活性

[0610] 如实施例1中所述,合成了这样的坎普他汀类似物:其具有SEQ ID NO:28的坎普他汀类似物的氨基酸序列,但掺入了位于SEQ ID NO:28的Thr残基C末端的AEEAc-Lys部分,其目的在于随后将NHS酯活化的PEG与所述Lys侧链的所述氨基缀合。得到的坎普他汀类似物表示为以下:Ac-Ile-Cys*-Val-(1Me)Trp-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys*-Thr-AEEAc-Lys-NH₂(SEQ ID NO:51),缩写成CA28-AEEAc-Lys。将具有40kD的分子量并且在NHS羧酸连接化学方面不同的、经单甲氧基-NHS激活的单官能线性酯/碳酸盐PEG(NOF美国公司,怀特普莱恩斯,纽约州,目录号SUNBRIGHT®ME-400CS、SUNBRIGHT®ME-400GS、SUNBRIGHT®ME-400HS、SUNBRIGHT®ME-400TS),经由酰胺键与所述CA28-AEEAc-Lys的赖氨酸侧链偶联。(由于所述AEEAc接头含有氨基酸残基,所述Lys残基是Lys15。)所有化合物在N末端乙酰化,C-末端酰胺化,并且经由Cys2和Cys12之间的二硫键环化。(所述乙酰化、酰胺化和环化在与所述PEG偶联之前进行。)将所述化合物制备成三氟乙酸盐并纯化。所述化合物如下表(表5)所示。如表5中进一步的详细说明,字母CS、GS、HS和TS代表所述PEG部分和所述NHS部分之间不同的接头部分。应该理解,对于每个化合物,所述多种名称和缩写可以互换使用。注意,CA28-2(参见实施例1)是与CA28-2GS一样的。

[0611] 表5:含有一个坎普他汀类似物部分的基于PEG的坎普他汀类似物

[0612]

化合物缩写和 ID	化合物名称 ^{*†}	激活的 PEG
--------------	---------------------	---------

[0613]

CA28-2CS	CA28-AEEAc-LysCS = CA28-AEEAc-Lys(mPEG4 0K-琥珀酰)	PEG40K: 甲氧基-PEG-CO(CH ₂) ₂ COO-NHS (NOF 品嘉 400CS) 化学名: α-琥珀酰亚胺琥珀酰氧基 (Succinimidylsuccinyl)-ω-甲氧基、聚氧乙烯 CAS#: 78274-32-5
CA28-2GS (也 被称为 CA28-2)	CA28-AEEAc-LysGS CA28-AEEAc-Lys(mPEG4 0K-戊二酰 (pentanedioyl))	PEG40K: 甲氧基-PEG-CO(CH ₂) ₃ COO-NHS (NOF 品 嘉 400GS) 化学名: α-琥珀酰亚胺戊二酰氧基 (Succinimidylglutaryl)-ω-甲氧基、聚氧乙烯 CAS#: 111575-54-3
CA28-2HS	CA28-AEEAc-LysHS CA28-AEEAc-Lys(mPEG4 0K-己酰基)	PEG40K: 甲氧基-PEG-(CH ₂) ₅ COO-NHS (NOF 品嘉 400HS) 化学名: 聚氧-1,2-乙二基、α-甲基 ω-{2-[(2,5-二氧代-1- 吡咯烷基)氧基]-6-氧代己氧基}-
CA28-2TS	CA28-AEEAc-LysTS CA28-AEEAc-Lys(mPEG4 0K-羧基)	PEG40K: 甲氧基-PEG-COO-NHS (NOF 品嘉 400TS) 化学名: α-琥珀酰亚胺羧基-ω-甲氧基、聚氧乙烯 CAS# 135649-01-3

[0614] *AEEAc=8-氨基-3,6-二氧杂辛酸

[0615] †化合物被制备成三氟乙酸盐,但可以使用其它抗衡离子

[0616] 通过反相HPLC分析化合物。图6显示了所述化合物中的一种的代表性色谱图。使用了VariTide RPC柱。洗脱液A是含有0.1%TFA的水溶液;洗脱剂B是含有0.1%TFA的50%CAN/40%水溶液。流速是1.000ml/min,在40分钟内具有0%B至100%B的梯度。具有33.68分钟的保留时间的峰值代表所述PEG化的化合物并具有96.50%的相对面积。

[0617] 如实施例1中所述,使用标准的补体抑制测定法,通过测量所述化合物对经由经典途径的补体激活的效应,评估所述化合物的抑制活性。结果绘于图7中。这些结果表示两次独立实验的组合。所述化合物显示出显著相似的补体抑制活性。

[0618] 实施例6:双官能化的基于PEG的坎普他汀类似物的合成和活性

[0619] 具有40kD的分子量并且在NHS羧酸连接化学方面不同的、经单甲氧基-NHS激活的单官能线性酯/碳酸盐PEG获自NOF美国公司(怀特普莱恩斯,纽约州)。所述被激活的PEG经由酰胺键与CA28-AEEAc-Lys的赖氨酸侧链偶联,使得两个CA28-AEEAc-Lys部分与每个PEG链偶联。所有化合物在N末端乙酰化和在所述CA28-AEEAc-Lys部分的C末端酰胺化,并且经

由Cys2和Cys12之间的二硫键环化。(所述乙酰化、酰胺化和环化在与所述PEG偶联之前进行。)将所述化合物制备成乙酸盐并纯化。所述化合物如下表(表6)所示。

[0620] 表6: 基于PEG的双官能化坎普他汀类似物

[0621]

化合物缩写和 ID	化合物名称 ^{*†}	激活的 PEG
CA28-2CS-BF	CA28-AEEAc-LysCS = CA28-AEEAc-Lys(mPEG4 0K-琥珀酰)	PEG40K: NHS-OCO(CH ₂) ₂ COO-PEG-CO(CH ₂) ₂ COO-NHS 化学名: α -琥珀酰亚胺琥珀酰氧基 (Succinimidyloxysuccinyl)- ω -琥珀酰亚胺琥珀酰氧基氧 (succinimidyloxysuccinyloxy)、聚氧乙烯 CAS#: 85419-94-9
CA28-2GS-BF	CA28-AEEAc-LysGS CA28-AEEAc-Lys(mPEG4 0K-戊二酰)	PEG40K: NHS-OCO(CH ₂) ₃ COO-PEG-CO(CH ₂) ₃ COO-NHS 化学名: α -琥珀酰亚胺戊二酰氧基 (Succinimidyloxyglutaryl)- ω -琥珀酰亚胺戊二酰氧基氧 (succinimidyloxyglutaryloxy)-、聚氧乙烯 CAS#: 154467-38-6
CA28-2HS-BF	CA28-AEEAc-LysHS CA28-AEEAc-Lys(mPEG4 0K-己酰基)	PEG40K: NHS-OCO(CH ₂) ₅ O-PEG-(CH ₂) ₅ COO-NHS 化学名: α -[6-[(2,5-二氧代-1-吡咯烷基)氧基]-6-氧代己 基]- ω -[6-[(2,5-二氧代-1-吡咯烷基)氧基]-6-氧代己氧 基]-、聚氧乙烯
CA28-2TS-BF	CA28-AEEAc-LysTS CA28-AEEAc-Lys(mPEG4 0K-羰基)	PEG40K: NHS-OCO-PEG-COO-NHS 化学名: α -琥珀酰亚胺羰基- ω -琥珀酰亚胺羰基、聚氧 乙烯

[0622] *AEEAc=8=氨基-3,6-二氧杂辛酸

[0623] †化合物被制备成乙酸盐,但可以使用其它抗衡离子

[0624] 如实施例1中所述,使用标准的补体抑制测定法,通过测量所述化合物对经由经典途径的补体激活的效应,评估CA28-2GS-BF的抑制活性,并如实施例1中所述进行了分析。结果绘于图8中。如上所述,CA28-2GS-BF每分子含有两个坎普他汀类似物部分。虽然CA28-2GS-BF的每个坎普他汀类似物部分的活性小于单个CA28分子的活性,但所述两种化合物在摩尔基础上的活性在较宽浓度范围内几乎是相同的。

[0625] 实施例7: 基于PEG的双官能化坎普他汀类似物的皮下施用

[0626] 本实施例描述了长效坎普他汀类似物CA28-2GS-BF在施用给食蟹猴之后的药代动力学参数的确定,所述施用是经由单次静脉内(IV)注射的或是通过反复的(每日一次)皮下施用七天给予的。

[0627] 定量施用和样品收集在时间0经由静脉内注射或经由反复的皮下注射(每天一次,共七天)将CA28-2GS施用进雄性食蟹猴。本研究使用了六只非幼龄雄性食蟹猴,年龄1-5岁,重量范围从4.6至5.3千克(每组3只)。所述动物在所述7天试验开始时是健康的。所述研究是非盲性的。在所述研究开始之前,供应动物自由采食的水和每日两餐的购买的食物。在所述研究之前,以设施SOP向所述动物供应食物。动物没有被禁食。在适当的某天,在时间0经由静脉内和皮下施用向动物定量施用。使用22gauge大小的针用于皮下施用。所述化合物以25mg/ml的浓度溶于5%的葡萄糖水溶液中,并以50mg/kg进行施用。在以下时间点,从股静脉收集血液样本(各约1mL):第1天:给药前、5分钟、15分钟、30分钟、1小时(h)、4h、8h。第2-9天:0分钟。第16天:基于第1天剂量的最终取样。经由直接静脉穿刺,从所述猴的股骨或隐静脉收集每份血液样品(约1.0mL)并置于不含抗凝剂的红盖血清管中,并在室温下保持至少30分钟。将血液样品在4℃以3000x g离心5分钟。在处理过程中,维持样品低温。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℃。将血清样品和剩下的剂量溶液在干冰中冷冻运输用于分析。

[0628] 观察每个皮下施用的部位,检查所述注射量的吸收有多快及所述制剂是否留下肿块或完全消失。在每个收集的时间点和在第2-7天的下午观察所述给药位点。在所述研究的持续期间,所有剂量都被吸收。基于所述观察,估计剂量在施用之后的15分钟内被吸收。在整个研究中,所有动物表现出正常的活动。在整个研究中,没有在动物中观察到的化合物相关的异常。

[0629] 样品分析。通过利用CID(碰撞诱导的解离)的LC/MS/MS分析如上所述得到的血浆样品,所述利用CID的LC/MS/MS类似于实施例3中所述的方法。

[0630] 结果。当如上所述静脉内地或皮下地施用CA28-2GS-BF时,其血清浓度随时间变化的关系绘于图9中。数据点代表所有检测到的PEG化的CA28化合物。图9中的CA28的数据是在以前研究中得到的历史数据,在所述以前的研究中,CA28被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。图9中显示的CA28数据是在以前研究中获得的历史数据,在所述以前的研究中,将CA28静脉内地施用给食蟹猴。在该以前的研究中,使用HPLC检测样品中的CA28。

[0631] 通过皮下施用CA28-2GS-BF达到了500μg/ml (11μM)的血清峰浓度。当被静脉内地或皮下地施用时,CA28-2GS-BF的终端半衰期约为5天。结果总结在下面的表中:

[0632] 表7

[0633] CA28-2GS-BF在猴血清中的研究样品浓度的汇总(在第0天以50mg/kg静脉内施用的)

[0634]

时间点	CA28-2GS-BF 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)		
	动物 1	动物 2	动物 3
5 分钟	1850	1550	2030
15 分钟	1760	1440	2000
30 分钟	1560	1380	1810
1 小时	1650	1330	1710
4 小时	1270	1000	1510
8 小时	1050	913	1360
第 2 天	684	661	711
第 3 天	541	471	538
第 4 天	463	417	492
第 5 天	366	384	389
第 6 天	346	331	358
第 7 天	303	306	311
第 8 天	257	252	259
第 9 天	217	252	233
第 15 天	92.8	107	95.6

[0635] 表8

[0636] 猴血清中CA28-2GS-BF的研究样品浓度的总结 (SQ@7mg/kg/天x 7天)

时间点	CA28-2GS-BF 浓度 (μg/mL)		
	动物 1	动物 2	动物 3
5 分钟	0	5.18	3.55
15 分钟	0	5.57	3.47
30 分钟	0	4.66	3.93
1 小时	0	5.41	3.56
4 小时	4.41	12.6	11.1
8 小时	32.0	15.3	21.5
第 2 天	54.2	56.6	53.5
第 3 天	135	117	122
第 4 天	248	260	234
第 5 天	398	316	311
第 6 天	447	391	419
第 7 天	564	412	448
第 8 天	591	432	468
第 9 天	596	423	455
第 15 天	152	241	199

[0637] 实施例8:对来自具有PNH患者的红细胞的补体介导的裂解的抑制

[0639] 进行修改版海姆氏试验以测量坎普他汀类似物体外抑制补体介导的红细胞裂解的能力,所述红细胞来自具有PNH的患者。通过加入镁的酸化血清激活补体,以裂解所述PNH红细胞。进行90分钟的所述温育。使用标准标记物对流式细胞仪测量的PNH红细胞的进行读数。使用热灭活的血清用作对照(不溶血)。在不存在添加的补体抑制剂的条件下,酸化血清产生最大化的裂解。用两倍系列稀释的坎普他汀类似物CA28、CA28-2、CA28-2CS、CA28-2CS-BD、CA28-2GS、CA28-2GS-BF、CA28-2HS、CA28-2HS-BF、CA28-2TS、CA28-2GS-BF和CA28-3进行所述实验。确定了体外完全阻止溶血所需要的每个化合物的浓度。还使用了不含有任何导致凝集的桥连的抗C3多克隆抗体(例如,Ab4214或Ab14396,二者都是可购得的且FITC缀合的,Abcam,剑桥,英国)测定红细胞的C3片段的沉积,以测量所述化合物抑制C3片段在PNH红细胞上的沉积的能力。将结果与使用相同的测定法用依库珠单抗得到的结果对比。

[0640] 实施例9:具有PNH的患者中的长效坎普他汀类似物

[0641] 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。组4用作对照(无补体抑制剂治疗)。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、红细胞的调理素作用(C3激活的产物(诸如C3b)在红细胞上的沉积,其可以使

用流式细胞计量术来检测)、PNH征状、输血要求、血栓栓塞性事件、溶血相关的一氧化氮耗竭、肺动脉高压的量度、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征状、降低的输血要求、减少的血栓栓塞性事件、减少的溶血相关的一氧化氮耗竭、减少的肺动脉高压的量度、增加的生活质量和/或增加的存活会指示效力。

[0642] 实施例10:在具有PNH的患者中的长效坎普他汀类似物

[0643] 经过下述改进,重复实施例9: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。

[0644] 实施例11:在具有aHUS的患者中的长效坎普他汀类似物

[0645] 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)、红细胞的调理素作用(C3激活的产物(诸如C3b)在红细胞上的沉积)、aHUS征状、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征状、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。

[0646] 实施例12:使用CA28-2GS-BF、CA28-2HS、CA28-2HS-BF、CA28-2TS和CA28-2GS-TS-BF,重复实施例8-11。

[0647] 实施例14:通过皮下注射,每天施用CA28-2GS-BF、CA28-2HS、CA28-2HS-BF、CA28-2TS和CA28-2GS-TS-BF,重复实施例9-12。

[0648] 实施例14:使用额外的长效坎普他汀类似物,重复实施例8-11。

[0649] 实施例15:使用细胞反应性的长效坎普他汀类似物,重复实施例8-11。

[0650] 实施例16:长效坎普他汀类似物的补体激活抑制活性

[0651] 如上所述,合成了CA28和CA28-AEEAc-Lys。使用在NHS羧酸连接化学方面是TS类型的反应性双官能PEG合成了CA28-2TS-BF,其经由所述赖氨酸侧链的所述伯胺,与两个CA28-AEEAc-Lys分子连接。使用标准的补体抑制测试法,通过测量所述化合物对经由经典途径和经由旁路途径的补体激活的效应,评估CA28和CA28-2TS-BF的补体激活抑制活性。用于所述经典途径激活的测试法的方案描述于实施例1中。用于旁路途径激活的方案也以ELISA的形式测量C3b的沉积,并描述于下文。使用此方法检测的C3b的沉积是通过由旁路途径被脂多糖(LPS)激活的补体产生的。简单来说,用LPS包被96孔平板。加入测试化合物(称为“药物”),随后加入血浆或血清作为补体来源,并温育。在这之后加入抗-人类C3HRP-缀合的抗体。再次温育后,加入底物并检测信号。所述方案的详情如下:

[0652] 基于ELISA的旁路补体途径激活的测定

[0653] 材料:

- [0654] ●96孔ELISA板 (Corning 3590)
- [0655] ●来自伤寒沙门氏菌的LPS-Sigma L7136 (40ug/ml的PBS溶液)
- [0656] ●1%BSA的PBS溶液-Calbiochem#1266261/30稀释
- [0657] ●佛罗那缓冲液+10mM MgCl₂+10mM EGTA (VB-Mg EGTA)
- [0658] ●人血浆 (用5ug/ml终浓度的来匹卢定收集)
- [0659] ●抗人C3HRP-缀合的Ab (oli to C3-HRP Ab, Cappel 55237)
- [0660] ●吐温-20洗涤缓冲液 (PBS中0.05%)
- [0661] ●TMB (过氧化物酶底物) -BD 51-2607KC和51-2606KC的1:1混合物
- [0662] ●3M H₂SO₄
- [0663] ●酶标仪
- [0664] 方案:
- [0665] 1. 添加50ul/孔的40ug/ml LPS (在PBS中)
- [0666] 2. 在室温温育2小时
- [0667] 3. 通过振荡和轻叩板移出
- [0668] 4. 通过添加200μl的1%BSA/PBS来封闭
- [0669] 5. 在室温温育1h
- [0670] 6. 通过振荡和轻叩板移出
- [0671] 7. 向第2至12号孔中添加50ul的VB-Mg EGTA
- [0672] 8. 向第1号孔中添加100μl起始药物稀释液 (2x存在于VB-Mg EGTA中)。
- [0673] 9. 如下所述自第1至10号孔连续稀释 (1:2) 所述药物
- [0674] a. 自起始孔取50ul溶液
- [0675] b. 将此溶液加入下一孔中
- [0676] c. 通过抽吸若干次进行混合
- [0677] d. 重复至第10号孔
- [0678] 注: 自第10号孔移出50ul并抛弃。
- [0679] 10. 向第1至11号孔添加50ul 2x血浆稀释液
- [0680] 11. 温育1h
- [0681] 12. 用洗涤缓冲液洗涤两次
- [0682] 13. 添加50ul C3-HRP Ab在1%BSA/PBS中的1/1000稀释液
- [0683] 14. 温育1h
- [0684] 15. 向所有孔添加100ul TMB
- [0685] 16. 温育30min
- [0686] 17. 添加50ul 3M H₂SO₄
- [0687] 18. 在450nm读出板
- [0688] VB Mg EGTA配方:
- [0689] 巴比妥 5 mM

NaCl 72.5 mM

[0690] MgCl₂ 10 mM

EGTA 10 mM

pH 7.3-7.4

[0691] 储备溶液:

[0692] 维罗那缓冲液 (5X)

[0693]

	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

[0694] Mg-Cl₂ (200X)

[0695]

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

[0696] EGTA (10x)

[0697]

	产品编号	分子量	每50ml
100mM EGTA	Sigma E8145	468.3	1.17克

[0698] 为了制备20ml工作缓冲液:

[0699] ●称量84mg NaCl

[0700] ●添加4ml 5X VB

[0701] ●添加2ml EDTA 10X

[0702] ●添加2ml MgCl 10X

[0703] ●用H₂O调节体积至20ml

[0704] ●调节pH至7.4

[0705] 结果

[0706] 图10 (A) 显示了随着所述化合物摩尔浓度而变化的CA28和CA28-2TS-BF的经典补体激活抑制活性百分比。图10 (B) 显示了随着所述化合物摩尔浓度而变化的CA28和CA28-2TS-BF的旁路补体激活抑制活性百分比。原始数据列于以下的表9 (每种条件重复4次) 中。根据所述图中显示的抑制曲线和背后数据, 在所述测定法的实验误差范围内, 所述CA28-2TS-BF的摩尔基础上的补体抑制活性至少与CA28的一样大。这些结果进一步证实本文所述的长效坎普他汀类似物在, 例如, 治疗目的上的适用性。

[0707] 表9

[0708] AP抑制

[0709]

浓度 uM	CA28		%抑制		CA28-2TS-BF	
25	90.07908	89.9353	90.65421	89.21639	90.25768	91.10484
12.5	88.92883	89.21639	89.21639	90.94177	90.11649	89.12814
6.25	87.05967	89.07261	88.20992	88.64127	88.28098	87.29263
3.125	85.62186	87.49101	87.49101	86.77211	84.04519	84.46877
1.5625	70.81236	81.30841	82.02732	70.38102	77.40911	69.50223
0.78125		58.01582	55.57153	57.15313	61.73668	65.35605
0.390625	18.04458	12.4371	23.65205	24.94608	56.79492	44.9347
0.1953	15.02516		15.31273	15.31273	22.34381	23.89693
0.09766	2.803741	14.30625	6.685644	5.823158	13.87222	6.953766
0.0488	-1.365921	5.679367	0.790802	-2.803734	0.6000748	2.012009
0	-2.803734	-1.509697	1.078362	3.235085	0.6000748	7.094963

[0710] CP抑制

[0711]

浓度 uM	CA28		%抑制		CA28-2TS-BF	
25	83.89539	79.90365		81.00482	82.09677	81.32716
12.5	78.66483	67.24019	81.69305	83.75774	89.48766	80.70988
6.25	84.58362	84.03304	80.45423	81.28011	81.94444	78.38507
3.125	83.62009	81.69305	79.90365	81.8307	79.93827	77.9321
1.5625	78.04955	76.60014	79.76601	78.94012	71.60493	70.52469
0.78125	71.50723	69.85547	73.96486	72.33311	72.97654	68.20988
0.390625	58.84377	72.05782	68.89195	63.11081	79.16666	70.37037
0.1953	42.60152	44.39091			66.51234	
0.09766	24.7075	24.15692	23.05575	35.03089	41.66667	35.03086
0.0488	15.7605	12.59454	15.20992	27.04749	12.50001	26.23457
0	-20.99105	7.088783	12.04405	1.858231	5.09259	-0.1543198

[0712] 实施例17:通过静脉内或皮下途径施用的长效坎普他汀类似物的药代动力学性质

[0713] 本实施例描述了长效坎普他汀类似物CA28-2TS-BF在施用给食蟹猴之后的药代动力学参数的确定,所述施用是经由单次静脉内(IV)注射的、单次皮下注射的或是通过每日皮下施用一次共七天给予的。使用在NHS羧酸连接化学方面是TS类型的反应性双官能PEG合成了CA28-2TS-BF,其经由所述赖氨酸侧链的所述伯胺,与两个CA28-AEEAc-Lys分子连接。

[0714] 定量施用和样品收集

[0715] 在时间0经由静脉内注射进隐静脉或经由单次皮下注射或反复的皮下注射(每天一次,共七天)将CA28-2TS-BF施用进食蟹猴。本研究使用了六只幼龄雌性食蟹猴,年龄2-5岁,重量范围从2.6至3.9千克(每组3只)。所述动物在所述试验开始之时是健康的。所述研究不是盲性的。在所述研究开始之前,供应动物自由采食的水和每日两餐购买的食物。在所述研究之前,以设施SOP向所述动物供应食物。动物没有被禁食。在适当的某天,在时间0经由静脉内和皮下施用向动物定量施用7mg/kg。用于静脉内施用的给药溶液浓度是3.5mg/mL,用于皮下施用的给药溶液浓度是25mg/mL。用于静脉内施用的施用体积是2mL/kg,用于皮下施用的施用体积是0.28mL/kg。用23G3/4大小的注射针皮下施用。所述化合物溶于5%的葡萄糖水溶液中进行施用。

[0716] 在以下时间点,从股静脉收集血液样本(约0.5-1mL):第1天:给药前、5分钟、15分钟、30分钟、1小时(h)、4h、8h。第2-9天:0分钟。第15天:基于第1天剂量的最终取样。经由直

接静脉穿刺,从所述猴的隐静脉收集每份血液样品并置于不含抗凝剂的红盖血清管中,并在室温下保持至少30分钟。将血液样品在4℃以3000x g离心5分钟。在处理过程中,维持样品低温。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℃。将血清样品和剩下的剂量溶液在干冰中冷冻运输用于分析。

[0717] 观察每个皮下施用的部位,检查所述注射量的吸收有多快及所述制剂是否留下肿块或完全消失。对于接受皮下注射的所述动物,在每个施用日的晚上观察所述给药位点。基于目测观察,所述给药部位没有显示具有肿块并到该时间为止被完全吸收。在整个研究中,每天观察所有动物两次且其表现出正常的活动。在整个研究中,没有观察到在动物中的化合物相关的异常。

[0718] 样品分析。通过利用CID(碰撞诱导的解离)的LC/MS/MS分析如上所述得到的血浆样品,所述利用CID的LC/MS/MS类似于实施例3中所述的方法。

[0719] 结果。

[0720] 当如上所述静脉内地或皮下地施用CA28-2GS-BF时,其血清浓度随时间变化的关系绘于图11中。数据点代表所有检测到的PEG化的CA28化合物。图11中显示的CA28的数据是在以前研究中得到的历史数据,在所述以前的研究中,CA28被静脉内地施用给食蟹猴。在该以前的研究中,使用HPLC/MS检测样品中的CA28。

[0721] 通过每天一次地皮下施用CA28-2TS-BF,共7天,达到了约500微克/mL的血清峰浓度。当被静脉内地施用或通过单次皮下注射时,CA28-2TS-BF的终端半衰期约为8天。以下表10(A)(静脉内施用)和10(B)(皮下施用)中提供了原始数据。(在图11和表10(A)和10(B)中,给药当天被认为是第0天)。

[0722] 表10(A)

时间(天数)	CA28 (IV)	CA28-2TS-BF (单次剂量 IV)		
	200 mg/kg	7 mg/kg		
0.0035		232	190	214
0.01		216	190	209
0.02	34	221	177	199
0.042	17	211	175	183
0.167	9	190	152	185
0.333	5	212	191	154
[0723] 1	1.5	180	130	150
2		141	116	126
3		128	98.7	113
4		114	89.1	95.8
5		105	75	87.1
6		95.1	67	74.4
7		83.3	61.4	69.9
8		86	52.8	68.4
14		51	30.8	39.7

[0724] 表10(B)

[0725]

时间 (天数)	CA28-2TS-BF (单次剂量 SC)			CA28-2TS-BF (7×每天 SC)		
	7 mg/kg			7 mg/kg/天		
0.0035	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
0.01	1.42	BQL	1.7	BQL	BQL	BQL
0.02	3.55	1.64	3.8	BQL	BQL	BQL
0.042	6.1	3.46	7.05	2.32	1.14	2.44
0.167	15	12.2	20.6	14.7	5.76	12.1
0.333	25	25.8	32.9	32.9	18	25.8
1	70	76.5	76	80.5	80	66.5
2	107	101	96.6	196	185	169
3	111	103	99.8	391	286	292
4	108	98.9	99.5	455	377	405
5	99.4	97.6	101	427	404	486
6	86.8	87	81.6	490	483	568
7	75.2	83.2	78.6	607	502	564
8	67.5	73.4	72.2	495	481	570
14	38.3	44.5	40.7	322	298	397

[0726] BQL=低于定量限值

[0727] 如上面所指出的,使用TS类型的反应性双官能PEG合成了CA28-2TS-BF,导致在与赖氨酸的伯胺反应之后形成氨基甲酸酯。使用在NHS羧酸连接化学方面是GS型的反应性双官能PEG合成了CA28-2GS-BF,导致在与赖氨酸的伯胺反应之后形成酰胺。所述化合物还含有在CA28-2TS-BF中不存在的酯键。值得注意的是,本实验中CA28-2TS-BF达到的约8天的终末半衰期比CA28-2GS-BF的大得多,所述CA28-2GS-BF在类似的实验中被发现具有约5天的半衰期(参见实施例8)。

[0728] 实施例18:坎普他汀类似物抑制C3在PNH患者的红细胞上的沉积并防止补体介导的裂解

[0729] 进行修改版海姆氏试验以评估坎普他汀类似物保护PNH RBC免于补体介导的裂解的能力。在不存在补体抑制剂或存在不同量的坎普他汀类似物CA28或CA28-2GS-BF的条件下,将来自具有PNH的患者的RBC暴露于酸化的人血清(作为补体成分的来源)和镁(Mg^{2+} ,为旁路途径激活所需)。将暴露于热灭活人血清用作对照,代表没有显著的补体介导的裂解,这是由于热灭活了补体。在不存在补体抑制剂的条件下(标记为 Mg^{2+} 的图),将暴露于酸化的人血清和镁(Mg^{2+})用作对照,代表最大化裂解。

[0730] 温育以后,用抗CD59和C3d的抗体染色细胞。CD59水平允许将PNH RBC分类为I型、II型或III型。对C3d的染色用作C3和C3激活产物沉积(堆积)的标记物,所述C3d是C3激活和裂解的产物。进行流式细胞分析以评估RBC表面的CD59和C3d并定量存在于多种样品中的I型、II型和III型细胞的百分比。

[0731] 证实不同浓度的CA28对C3沉积的效应的和细胞百分比的稀释实验结果示于图12(A)。证实不同浓度的CA28-2GS-BF对C3沉积的效应和细胞百分比的稀释实验结果示于图12(B)。所述结果定量地呈现于以下的表11中。I型细胞(以橘色示于图12中)具有正常的CD59

水平。III型细胞(以蓝色示于图12中)基本上没有可检测到的CD59。这些细胞是很容易受补体介导的裂解的。II型细胞(以紫色示于图12中)具有与正常细胞或I型细胞相比降低的CD59水平并对补体介导的裂解具有中等敏感性。在存在补体激活的条件下,III型细胞迅速裂解。裂解的减少或缺失可由III型细胞的升高来证明,这在图12(A)和12(B)中是明显的,因为与存在 Mg^{2+} (最大化裂解)的图相比,在无裂解的图中具有更高的III型细胞的百分比。换句话说,在所述阳性对照中具有比所述阴性对照中相对更少的III型细胞。II型细胞可能在存在激活的补体的条件下最终裂解,但这之前可以积累大量的C3激活产物例如C3d。裂解的减少或缺失可由II型细胞上升高的C3或C3激活产物的水平来证明,这在图12(A)和12(B)中是明显的,所述图12(A)和12(B)将所述无裂解的图中的II型细胞上的C3d水平与所述最大化裂解的图中的II型细胞上的C3d水平做比较。换句话说,在所述最大化裂解图中具有比所述无裂解图中更多的C3d。I型细胞具有功能性的CD59,因此它们灭活转化酶并因而不积累与II型细胞一样多的C3d。然而,其累积的C3d的量可被用作更脆弱的细胞(II和III型)的裂解量的替代指标。因此,I型细胞上降低的C3d能指示针对裂解的保护作用。I、II和III型细胞的相对百分比从所述最大化裂解对照图(Mg^{2+})中的百分比向所述无裂解对照图(热灭活血清)中的百分比的转移,能指示针对补体介导的裂解的保护作用。这些百分比示于下表中。表11中标记% C₃的栏表示对于C3和C3激活产物(“C3堆积”)的存在被认为是“阳性”的细胞的百分比。从图12(A)和(B)和表11中可以看出,CA28和CA28-2GS-BF在被测试的浓度中,表现出相似对的PNH红细胞裂解的保护作用,在100微克/ml化合物或更高浓度时,PNH细胞上基本上没有C3的堆积。值得注意的是,在存在100ug/ml或更多坎普他汀类似物的条件下,III、II和I型细胞的百分比基本上与所述无裂解对照中的相同,表明本测试法确定了针对补体介导的裂解的完全保护作用。本实验中没有测试低于100ug/ml但高于60ug/ml的浓度,例如,至少70ug/ml、至少80mg/ml,或至少90ug/ml,但低于100ug/ml,但所述浓度仍可能提供显著的保护作用。100微克/ml CA28-2GS-BF代表约2.5微摩尔的浓度,如本文所述,其在体内是很容易达到的。

[0732] 表11:在不存在或存在坎普他汀类似物的条件下的I、II和III型PNH RBC的百分比和C3的堆积(显示了以微克/ml表示的浓度)

[0733]

	III 型 %	% C ₃	II 型 %	% C ₃	I 型 %	% C ₃
热灭活的(无裂解)	37.88	0.28	51.79	1.22	11.12	0.88
添加镁的(最大化的裂解)	15.75	0.68	64.7	13.48	19.55	3.2
CA28 1	19.42	1.2	64.81	10.08	15.77	1.7
CA28 4	18.43	0.83	64.9	10.42	16.68	1.78
CA28 8	17.83	0.7	66	11.12	16.17	1.88
CA28 15	22.11	0.68	62.8	8.83	15	1.88
CA28 25	26.53	0.75	64.51	8.3	14.96	1.84
CA28 100	37.96	0.1	51.5	0.82	10.64	0.88
CA28 500	37.29	0.08	52.06	0.83	10.64	0.14
CA28-2GS-BF 20	19.19	0.88	65.35	12.28	15.46	2.18
CA28-2GS-BF 40	15.15	1.31	68.86	15.12	15.89	2.84
CA28-2GS-BF 50	13.87	1.28	69.46	15.54	16.67	2.28
CA28-2GS-BF 60	17.54	1.44	66.87	13.04	15.89	2.06
CA28-2GS-BF 100	35.32	0.11	53.93	0.88	10.75	0.87
CA28-2GS-BF 200	37.43	0.02	51.99	0.28	10.59	0.82
CA28-2GS-BF 500	37.87	0.05	51.87	0.3	10.26	0.94

[0734] 实施例19:坎普他汀类似物和Soliris对来自PNH患者的红细胞上C3沉积的效应

[0735] 进行了与实施例18中所述的相似的实验,以进一步证实坎普他汀类似物CA28-2GS-BF的保护效应,并将其与抗C5的抗体Soliris作比较。使用PNH RBC进行了如实施例18中所述的修改版海姆氏试验,将所述PNH RBC在不存在补体抑制剂(左图)或存在Soliris(中图)或CA28-2GS-BF (50ug/ml) (右图)的条件下温育。在使用抗CD59和C3d的抗体进行抗体染色之后,进行流式细胞术。结果示于图13中。在该图中,象限1 (Q1) 和象限3 (Q3) 代表III型细胞。象限2 (Q2) 和象限4 (Q4) 代表I型和II型细胞。Q1和Q2代表具有显著的和异常高量的C3激活产物(例如,C3d) 沉积的细胞。Q3和Q4代表没有显著的C3d沉积或稍高的(Q4的右半部分)、但比Q2细胞低的水平的细胞。在所述不同象限里的细胞百分比呈现在图13中的每个图的下面和以下表12中。

[0736] 表12

[0737]

	无抑制剂			依库珠单抗			CA28-2GS-BF	
群	事件编号	母体细		事件编号	母体细胞		事件编号	母体细胞

[0738]

		胞百分 比			百分比			百分比
Q1	233	0.09		90,146	36.79		23	0.01
Q2	7,992	3.22		9,609	3.92		18	0.01
Q3	9,853	3.97		4,591	1.87		153,187	61.54
Q4	230,241	92.72		140,689	57.42		95,713	38.45

[0739] 可以看到,在不存在抑制剂的条件下,绝大多数细胞位于Q4 (具有低水平的C3激活产物沉积的I型或II型)。III型细胞将大部分裂解,因此其百分比 (Q1和Q3) 较低。积累C3沉积产物的Q2细胞最终裂解,所以其数量保持相对较低。在存在依库珠单抗的条件下,III型细胞至少在初期被保护免于裂解,但是仍积累C3激活产物(例如,C3d),表现为与无抑制剂的图相比具有较高的Q1细胞的百分比 (36.79%对0.09%)。由于III型细胞的存活增加,Q2+Q4细胞 (I型和II型) 的相对比例是较低的。然而,显而易见的是,III型细胞上发生了显著的C3激活产物(例如,C3d) 沉积,这可能最终导致裂解或清除(体内)。与依库珠单抗的结果相反,经CA28-2GS-BF处理的PNH RBC (右图) 显示C3d基本上没有沉积,不管其是I、II或III型。在Q1和Q2中的细胞百分比是可以忽略不计的。相对于没有抑制剂或有依库珠单抗条件下的结果,III型细胞的百分比显著升高 (61.55%),表明 (连同C3d沉积的缺失) CA28-2GS-BF对于免于裂解的保护作用的增强。

[0740] 实施例20:长效坎普他汀类似物在健康受试者中的1期临床试验

[0741] 启动了两个关于长效坎普他汀类似物的1期随机双盲安慰剂对照临床试验:单次递增剂量(SAD)试验和多次递增剂量(MAD)试验,来评估安全性、耐受性、药代动力学和药效学,所述长效坎普他汀类似物包含40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分(线性PEG的每个末端各连接一个),每个坎普他汀类似物部分包含具有SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的肽,所述肽在其C末端延伸一个部分,所述部分包含用于衔接至所述PEG部分的AEEAc-Lys。为方便起见,这种化合物在实施例20-26中简称为LACA-40。在单次递增剂量试验中,将健康受试者随机分到六个组之一,剂量范围为45mg至1440mg(45、90、180、360、720或1440mg),溶于5%右旋糖溶液中。在试验的第一天通过皮下注射施用LACA-40,然后根据剂量水平监测29或43天。每组包括4名接受药物的受试者和1或2名接受安慰剂的受试者。在多次递增剂量试验中,连续28天每天通过皮下注射向健康受试者施用LACA-40,然后在末次给药后监测56天。受试者参与到剂量为30mg至270mg/天的(30、90、180或270mg/天)的四个组之一中。每组包括4名接受药物的受试者和1名接受安慰剂的受试者。通过密集的临床监测来评估安全性。为了测定血清中的LACA-40浓度,进行连续血液采样。还获得了血液样品以测定补体活性相关标记物(C3、CH50和AP50)。在后几组中测量了其他相关的PD标记物(完整的C3、iC3b、C3a、C4a和C5a)。在多次给药之前,受试者接受了脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌和B型流感嗜血杆菌(Hib)的疫苗接种。

[0742] 结果

[0743] 当在1期单次递增剂量试验中总共有24名健康受试者以高达1440mg的剂量接受单剂量的LACA-40,以及在多次递增剂量试验中总共有16名健康受试者以高达270mg/天的剂量连续28天接受了多个剂量的LACA-40时,有11名健康受试者在试验中接受了单次或多次安慰剂施用,并且分析显示LACA-40在两次试验中耐受性良好,未报告严重不良事件或导致研究药物停用的治疗紧急不良事件或严重不良事件。此外,在对每次试验的实验室数据、生命体征、身体检查或心电图结果的审阅中,均未观察到临床相关的安全性信号。

[0744] LACA-40的药代动力学符合来源于临床前数据的预期,几乎观察不到受试者间的多变性。

[0745] 在多次递增剂量试验中,观察到LACA-40的血浆浓度随剂量线性升高,在第14天至第28天之间达到最大浓度。在每日给药28天后,血清浓度接近稳定状态。

[0746] 在两个试验中均观察到C3的剂量依赖性的升高,这表明LACA-40与C3结合。

[0747] 在单次递增剂量研究中,在单次剂量的1440mg LACA-40后,观察到了旁路途径介导的溶血活性(AP50)降低。

[0748] 在LACA-40的多次递增剂量试验的第三组中,在180mg/天的剂量水平下,体外血清诱导的溶血的减少早在治疗开始后7天就被观察到,并在治疗期间持续存在,而且在四名受试者中的两名中达到最大超过80%,在其他两名受试者中最大达到超过60%(图14)。在LACA-40的多次递增剂量试验的第四组中,在270mg/天的剂量水平下,体外血清诱导的溶血的减少早在治疗开始后7天就被观察到,并在治疗期间持续存在,而且在四名受试者中的三名中达到最大超过80%。第四名受试者是异常值,相对于基线减少了大约40%。

[0749] 基于兔红细胞在补体被旁路途径(AP)激活时的溶血的标准测定法,测定了抑制离体血清诱导的溶血的百分比。兔红细胞是人AP的自发激活剂。该测定法利用了以下事实:当兔红细胞在加入EGTA以螯合Ca²⁺(以抑制经典和凝集素途径对补体的活化)的血清中孵育

时,AP转化酶形成,导致C3的活化以及随后红细胞的溶解,其可以通过用分光光度法检测游离血红蛋白来检测到。值得注意的是,该测定法可能会低估抑制溶血的实际百分比,因为阴性对照样品缺乏血清,而血清存在于来自受试者的样品中,并且贡献这些样品中的基线吸光度。

[0750] 值得注意的是,在PNH患者的依库珠单抗(一种结合C5的补体抑制剂)临床试验中,显示对离体血清诱导的溶血(使用来自PNH患者的血清)的80%抑制率对于治疗PNH有相当大的益处(Hillmen,P.等,N Engl J Med 2004;350:552-9)。因此,本实施例证实,至少在180mg/天的LACA-40剂量下,达到了药理学相关水平的补体抑制。本实施例进一步证实,LACA-40的药理学剂量安全且耐受性良好,LACA-40的药代动力学/药效学(PK/PD)谱支持每日皮下施用,并且每日180mg和270mg的LACA-40剂量早在给药开始后七天就显著降低了溶血活性,并且这种抑制在给药期间持续。

[0751] 在一个方面,来自这些研究的PK数据已被用于开发PK/PD模型,其可用于辅助PNH患者或其他被施用LACA-40的患者中的剂量选择。

[0752] 本公开涵盖这样的认识:较低剂量的LACA-40也可能对PNH有效。例如,离体血清诱导的溶血测定法仅测量MAC导致的裂解,反映血管内溶血。LACA-40(以及本文所述的某些其它化合物)保护细胞免于MAC,并且还免于C3片段(例如C3b)的调理作用,其导致血管外溶血和依库珠单抗所无法改善的潜在的功能病症。因此,不希望受任何特定理论约束,本公开教导了,在某些实施方案中,即使用的剂量低于抑制80%离体血清诱导的溶血的所需剂量,也能达到治疗PNH的功效,这至少部分地归因于对血管外溶血的抑制。

[0753] 因此,另外本实施例还证实,包含40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分的长效坎普他汀类似物的皮下给药(例如,在相关的一段时间(例如至少一天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周或更多)内每日皮下给药)可以实现有效的作用。本实施例具体证实了180mg/天的日剂量实现的有效作用,并且具体涵盖这样的认识:在适当情况下较高的和较低的剂量都是可取的。本实施例还具体证实了270mg/天的日剂量达到的有效作用,并且具体涵盖这样的认识:在适当情况下较高的和较低的剂量都是可取的。

[0754] 此外,鉴于特别表明所提供的用于LACA-40的给药方案得到的有效结果,本实施例证实了长效坎普他汀类似物,特别是包含至少两个坎普他汀类似物部分的类似物和/或包含分子量为大约40kD(例如,在约10kD至约50kD的范围内,包括具体地,分子量为约20kD,30kD,40kD等)的PEG部分的类似物在此类方案中的特别用途。

[0755] 另选地或另外地,本实施例表明总分子量为不大于约50kD的长效坎普他汀类似物在本文描述的给药方案(参见上文)中的特定用途。

[0756] 实施例21:LACA-40在PNH患者中的Ib期临床试验

[0757] 启动了LACA-40的Ib期单次和多次递增剂量临床试验,以评估LACA-40联合依库珠单抗(Soliris)在成人PNH患者中的安全性、耐受性、PK和PD。在该临床试验中,向PNH患者施用LACA-40的5%右旋糖溶液的皮下剂量,所有患者当前均正在接受依库珠单抗治疗。参加试验的患者必须年满18岁,体重超过55公斤,已用依库珠单抗治疗至少3个月,筛查时血红蛋白<10g/dL或者在筛查前12个月内至少接受过1次输血,血小板计数>30,000/mm³,并且绝对嗜中性粒细胞计数>500个细胞/ μ L。在给药之前,所有受试者开始预防性的抗生素口服并接受针对脑膜炎奈瑟菌的疫苗接种。第3组和第4组的受试者还被接种针对肺炎链球菌和B

型流感嗜血杆菌 (Hib) 的疫苗。

[0758] 前两组各由两名患者组成,所述患者接受单剂量的LACA-40,随后接受至少28天的监测。如果在这一监测期后认为单剂量耐受性良好,那么患者随后接受另外连续28天每天给予皮下剂量的LACA-40的方案。第三组和第四组分别由两名和六名患者组成,他们连续28天每天接受皮下剂量的LACA-40。研究的剂量如下:

[0759] 第1组:25mg LACA-40的单次皮下剂量和5mg/天的重复皮下剂量

[0760] 第2组:50mg LACA-40的单次皮下剂量和30mg/天的重复皮下剂量

[0761] 第3组:180mg/天LACA-40的重复皮下剂量

[0762] 第4组:270mg/天LACA-40的重复皮下剂量

[0763] 通过临床监测来评估安全性,并且所有药物都由合格的护士在受试者家中或在诊所中施用。收集一系列血清血样用于测定LACA-40的浓度。评估药效学 (PD) 活性和效力信号,包括乳酸脱氢酶 (LDH)、血红蛋白水平、RBC的PNH克隆分布、输血要求、补体水平、RBC和网织红细胞上的C3片段沉积。

[0764] 结果

[0765] 前三组已经完成其给药时,分析显示LACA-40的耐受性良好,报告了一起严重不良事件,其被认为不太可能与LACA-40的施用有关。

[0766] 当两名受试者完成了180mg药理学活性剂量的给药时,两者都显示出临床改善和血液生物标志物的相关变化。两名受试者的血红蛋白水平均在治疗前两周的期间升高,并在第28天治疗结束前保持稳定。一名受试者的LDH稳定在正常上限的约1.5倍,而另一名受试者的LDH从正常上限约1.5倍降至正常范围内。两名受试者中III型 (CD59阴性) RBC的比例均大致增至两倍,从第1天到第29天分别从22.3%上升到52.5%以及从32.5%上升到62.5%。与最近的历史数据相比,给药期间的RBC输血要求也有所降低。未报告治疗相关的严重不良事件,并且没有发生导致停药的治疗相关的不良事件。继续对第4组给药(每天270mg)。

[0767] 三名受试者已经完成28天的270mg/天的皮下LACA-40给药时,全部三名受试者都显示出了相似的与血液生物标志物的相关变化相关联的临床改善。Hb水平升高,LDH水平下降,网织红细胞减少,并且PNH III型RBC百分比升高。基于对风险/收益配制的评估,批准了步骤修正,以允许在270mg/天的组中,在正在进行的依库珠单抗治疗之外再进行56天,总共84天的不间断的继续给药。自从开始用LACA-40治疗以来,三名受试者都没有要求RBC输血。

[0768] 这些数据证实,LACA-40的药理学剂量在患有PNH的受试者中是安全且耐受性良好的,并且LACA-40的每日皮下给药将对PNH患者的溶血活性提供持续的抑制作用。这些数据进一步证实,对C3的抑制为对抗C5的治疗(例如,依库珠单抗治疗)具有次优应答的PNH受试者提供临床益处。

[0769] 因此,本公开涵盖这样的认识:皮下给予(例如,在相关时间段(例如至少1天,2天,3天,4天,5天,6天,1周,2周,3周,4周或更长)内每天皮下给药,例如持续数月或数年)包含40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分的长效坎普他汀类似物,无论是作为单独治疗或者与其他疗法(例如,依库珠单抗疗法)联合。

[0770] 实施例22:LACA-40在PNH患者中的1b期临床试验

[0771] 在未接受过治疗的PNH患者中进行LACA-40的1b期开放标签临床试验,以评估重复

剂量的LACA-40的安全性、PK、PD和初步效力。诊断为溶血性PNH的男性和女性患者均符合条件。受试者需要在试验前12个月内输过血,并且乳酸脱氢酶(LDH)水平是正常上限(ULN)的2倍以上。在给药之前,受试者被针对脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌和B型流感嗜血杆菌(Hib)的疫苗接种并开始预防性的抗生素口服。LACA-40的5%右旋糖溶液的剂量通过皮下注射连续施用至少28天,最多连续施用84天。(在这种情况下,未接受过治疗的患者是指先前未用补体抑制剂治疗过的患者)。招募了2个组,每组3名患者。测试了用于第一组的180mg/天和用于第二个组的270mg/天的剂量。每日单次注射施用1.8ml体积的剂量,或者每日两次、每次注射施用0.9ml体积的剂量。该试验的主要效力终点是作为血管内溶血指示物的LDH水平测量值。测量的其他相关效力标记包括血红蛋白、RBC的PNH克隆分布、总溶血补体活性(CH50)、旁路途径介导的溶血活性(AP50)、输血要求、网织红细胞计数和C3片段在血细胞上的沉积(作为潜在的血管外溶血的指示物)。通过流式细胞术(例如,如上所述的)进行对C3片段沉积的测量。使用与C3b、C3c和C3d交叉反应的抗体。

[0772] 结果

[0773] 组1

[0774] 在组1结束后,两名受试者已接受了28天180mg剂量的LACA-40,并且有一名受试者由于首剂后的反应而撤回了同意书。在接受了28天治疗的两名受试者中,均观察到了从第1天至第29天LDH水平的显著下降,分别从2078U/L降至1082U/L以及从1325U/L降至709U/L(正常为100-250U/L)。这两名受试者都没有达到继续进入第2部分的标准。

[0775] 筛选血红蛋白(Hb)水平低于80g/L并且两位受试者均在给予LACA-40之前的3周中接受了输血。两名受试者的血红蛋白水平均维持在80g/L以上,且在给药期间均不需要输血。两名受试者在停止LACA-40治疗的4周内接受了输血。

[0776] 在两位受试者中III型(CD59阴性)RBC的部分均大致增至三倍,分别从第1天的5.1%和13.4%上升到第29天的17.4%和37.6%。

[0777] 在完成了28天给药的两名受试者中,LACA-40显示为安全且耐受性良好的。第三位受试者在接受了第一剂LACA-40后的5-6小时出现恶心、呕吐和皮疹。该事件被报告为可能是与LACA-40相关的严重不良事件。为了支持在本研究中的继续参与,用体外的细胞反应性测试以及LACA-40和40kD的PEG的皮肤点刺测试进一步研究了该反应。测试得出没有T细胞活化的证据,并且皮肤测试呈阴性结论。因此,认为所述受试者重新进入研究在医学上是安全的。但是,该受试者因个人原因撤回了同意书。

[0778] 组2

[0779] 在通过皮下注射施用270mg/天的LACA-40治疗的两名受试者完成了28天的治疗期后,两名受试者均表现出LDH水平显著降低至正常上限的2倍以内,以及PNH的III型红细胞百分比的升高。如果观察到了临床益处并且如果研究人员要求的话,则该组中的受试者能够在检验所有数据之后继续接受每日的LACA-40。两名被治疗的受试者均符合继续给药至84天的预定标准。一位受试者因个人原因而离开研究。另一位受试者继续给药,并且在第57天测试时继续显示LDH的持续降低。第2组中的下一位受试者的给药待定。

[0780] 综上,每天施用LACA-40是安全并且耐受性良好的,并导致在没有正在接受依库珠单抗的PNH患者中溶血的持续抑制。

[0781] 另外,本公开具体提供了某些见解,所述见解特别涉及特别适用于递送某些LACA

组合物的装置的某些期望特征(例如,针的规格、针孔直径和/或壁厚等),所述LACA组合物具体包括本文描述的某些LACA-40组合物(见上文)。

[0782] 实施例23:玻璃体内LACA-40的临床前研究

[0783] 进行了猴子中的临床前研究,以评估玻璃体内注射LACA-40时的安全性和药理学。在食蟹猴中,玻璃体内施用的LACA-40分布进入血流,然后进一步分布于身体和/或缓慢地从身体中被排除。以剂量高达24.8mg/眼的50或100 μ L/眼体积的5%右旋糖溶液,在9个月的过程中的重复玻璃体内注射后,LACA-40的玻璃体和血清浓度的毒代动力学分析结果表明,在多次注射过程中,药物几乎没有眼内或血清积聚。此外,在任何测试的剂量下,全面的毒理学检验均未发现LACA-40介导的变化的证据,所述全面的毒理学检验包括通过间接照射和裂隙灯进行眼科评估,谱域光学相干层析成像,视网膜电图,以及对每只猴子的双眼和大约50个另外的组织进行的眼压测量和组织病理学检查。

[0784] 对猴子中LACA-40的单次玻璃体内剂量(双眼均为10mg/眼)的药代动力学特征的评估显示玻璃体半衰期为大约3.2天。在玻璃体内注射后,LACA-40的血清浓度持续上升,直至给药后第7天,然后以10.4天的表观半衰期下降。

[0785] 另外,本公开涵盖针对包含40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分的长效坎普他汀类似物的给药方案,在所述给药方案中,根据本文所述的LACA-40的半衰期,特别地选择单个剂量的时机以确保得到预期的PK模式。

[0786] 实施例24:LACA-40在患有AMD的受试者中的1b期单次递增剂量临床试验

[0787] 在患有湿性AMD并正在接受抗VEGF疗法(特别是Lucentis®、Eylea®或Avastin®)的患者中,启动了LACA-40的1期开放标签单次递增剂量临床试验,以评估LACA-40的安全性、耐受性和PK。在该试验中,患者通过玻璃体内注射接受单剂量的LACA-40,然后进行113天的监测。最初计划在试验中招募9名患者,以剂量为5mg、10mg和20mg的100微升体积的LACA-40的5%右旋糖溶液,分成三组,每组三名患者。所有三个组招募完成后,第三组从三名患者扩展到总共12名患者。在最初的9名患者中,LACA-40的耐受性良好,未报告严重不良事件。

[0788] 本公开内容提供了给药方案,根据所述给药方案通过玻璃体内注射施用包含40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分的长效坎普他汀类似物。在某些实施方案中,将包含40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分的长效坎普他汀类似物作为单一疗法施用;在某些实施方案中,将其与另一种疗法(例如抗VEGF治疗)联合施用,使得所述患者同时暴露于两者。

[0789] 本实施例具体描述并支持给药方案,在所述给药方案下,通过玻璃体内注射,向正在接受VEGF疗法的受试者施用包含40kD的直链PEG和两个坎普他汀类似物部分的长效坎普他汀类似物。在某些实施方案中,用抗VEGF疗法和LACA-40疗法两者治疗的受试者接受抗-VEGF剂的剂量的间隔长于在其它方面相当但没有接受LACA-40疗法的受试者所用的间隔。已经开发出了多种抗VEGF试剂(例如,在Lanzetta Br J Ophthalmol 97:1497,2013中的综述)。例如,报道的用于某些抗VEGF试剂的给药方案包括玻璃体内注射0.5mg兰尼单抗或1.25mg贝伐单抗,每4周(q4)施用一次,或者必要时施用;在某些实施方案中,将这样的方案用作适当的参照方案,相对于其来评估本文所述的抗VEGF组合治疗方案。

[0790] 根据本文提供的(包括本实施例中的)公开内容,本领域技术人员将理解,提供了

某些组合治疗方案,例如,根据所述方案,LACA-40和抗VEGF试剂各以玻璃体内的方式施用;在某些实施方案中,针对某些(但不一定是全部)剂量,LACA-40和抗-VEGF可以在单次注射中一起施用。在某些实施方案中,相较于在不施用LACA-40的条件下施用的剂量,在选定的一段时间内施用更少的抗VEGF剂量。

[0791] 实施例25:LACA-40在患有地图样萎缩的受试者中2期单次递增剂量临床试验

[0792] 在GA患者中进行了LACA-40的随机单盲假性对照临床试验。试验招募了大约240名患者。试验中的患者被诊断为继发与年龄相关性黄斑变性的黄斑地图样萎缩,在进行随机分配之前的14天内,通过使用眼底自发荧光图像的中央阅读中心以及以下标准进行确认:总GA面积必须 $\geq 2.5\text{mm}^2$ 并且 $\leq 17.5\text{mm}^2$ (分别为1个和7个视盘面积[DA]),通过筛选FAF的图像确定。

[0793] 患者以2:2:1:1的方式随机分配为每月接受一次LACA-40、每隔一个月接受一次LACA-40、每月接受一次假性注射或每隔一个月接受一次假性注射。LACA-40臂(arm)中的患者接受12个月15mg剂量的LACA-40,以0.1cc的体积注射到玻璃体液中,每月一次或每隔一个月一次,然后在治疗结束后进行6个月的监测。在假性注射组中,患者接受模拟注射。评估了多次玻璃体内注射LACA-40在GA患者至少一只眼中的安全性、耐受性、PK和活性证据。主要效力终点为GA病灶大小从基线至第12个月的变化。所述试验被设计用来检测在LACA-40臂和假性对照臂之间从基线至第12个月期间病灶大小生长减少至少30%。主要的安全性终点为局部和全身性治疗的紧急不良事件的次数和严重程度。

[0794] 实施例26:LACA-40在患有中晚期AMD的受试者中的2期单次递增剂量临床试验

[0795] 在患有中晚期AMD患者中进行了LACA-40的随机单盲假性对照临床试验。试验中的患者被诊断为中晚期年龄相关性黄斑变性。试验的目的是评估LACA-40是否能预先阻止中晚期AMD发展成GA或湿性AMD。

[0796] 患者以2:2:1:1的方式随机分配为每月接受一次LACA-40、每隔一个月接受一次LACA-40、每月接受一次假性注射或每隔一个月接受一次假性注射。LACA-40臂中的患者接受至少12个月15mg剂量LACA-40,以0.1cc的体积注射到玻璃体液中,每月一次或每隔一个月一次,然后在治疗结束后进行6个月的监测。在假性注射组中,患者接受模拟注射。评估了多次玻璃体内注射LACA-40在中晚期AMD患者的至少一只眼中的安全性、耐受性和活性证据。效力终点包括从中晚期AMD发展成GA和/或湿性AMD的发生率(与接受假性注射的患者相比,用LACA-40治疗的患者中发生率降低,其代表了效力证据),以及高风险玻璃膜疣的数量和/或体积和总玻璃膜疣的数量和/或体积的变化。与接受假性注射的患者相比,用LACA-40治疗的患者中玻璃膜疣数量、体积和/或生长速率的更大幅度的减少代表了效力证据。主要的安全性终点为局部和全身性治疗的紧急不良事件的次数和严重程度。

[0797] 实施例27:吸入性CA28的临床前研究

[0798] 在狗和食蟹猴中进行了单剂量或重复给药的吸入性研究。在测试的最高吸入剂量下,在任何动物中都没有与药物有关的发现。在狗的7天重复剂量研究中,剂量为25mg/kg/天,在猴子的单剂量研究中,剂量为80mg/kg,以及在猴子的14天重复剂量中,剂量为30mg/kg/天。

[0799] 利用猪蛔虫刺激模型来研究CA28与皮质类固醇相比在食蟹猴中的在体内药理学效应。在14天的治疗期内和治疗停止后的28天内,将药物洗脱后,20mg/天或15mg/kg/天(连

续14天)剂量的雾化CA28在过敏原刺激后控制肺中的炎性细胞因子水平(如在支气管肺泡灌洗液中所测得)方面均具有的药理学效应。

[0800] 实施例28:吸入性CA28在健康受试者中的1期单次和多次递增剂量临床试验

[0801] 进行了坎普他汀类似物(CA28)的每日雾化制剂的1期开放标签的、随机化的、安慰剂对照的单次和多次递增剂量临床试验,以评估所述药物的单次和多次吸入剂量在健康志愿者中的安全性、耐受性和PK。将(2%甘油的)CA28溶液或安慰剂(2%甘油)经由带有灭弧室的PARI LCSprint®喷射式喷雾器施用,所述灭弧室由PARI TurboBOY®S压缩机驱动。在试验的单次递增剂量部分中,16名受试者招募至4个组中,每组4名受试者。向这些受试者施用剂量范围为20mg至350mg(20、60、150或350mg)的单剂量CA28,并在治疗后监测14天。在这部分试验中,CA-28的耐受性良好,并且未报告严重不良事件。

[0802] 试验的多次递增剂量部分的第一组中招募了四名受试者。这些受试者将连续14天接受60mg/天剂量的药物的治疗。然而,在用60mg/天的剂量治疗9天后,有一名受试者发展出与潜在的细菌感染相一致的体征和症状,其被认为可能与所述药物的药理学有关。试验暂停,随后在受试者接受30mg/天恢复。另一名受试者发展出与潜在的细菌感染相一致的体征和症状,其被认为可能与所述药物以30mg/天剂量治疗10天后的药理学有关。于是试验终止。

[0803] 两名受试者均在几小时内对一线抗生素治疗产生应答,其提示了细菌性的发病机理。在这项试验中,受试者被针对脑膜炎奈瑟菌的疫苗接种,并密切监测感染迹象。尽管细菌培养物都呈阴性,但是相信流感嗜血杆菌或肺炎链球菌可能与所观察到的发热的现象有关,因为已知C3缺陷型个体感染脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌和肺炎链球菌的风险更高。针对这三种病原体的疫苗是已有的,并且相信感染的风险可以通过疫苗接种来解决,潜在性地可以添加预防性抗生素(例如,青霉素V)。

[0804] *****

[0805] 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。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。为了简明起见,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、病症和病症的讨论是为了方便,且无意限制本发明。

[0806] 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、清除率降低部分、疾病或适应症。

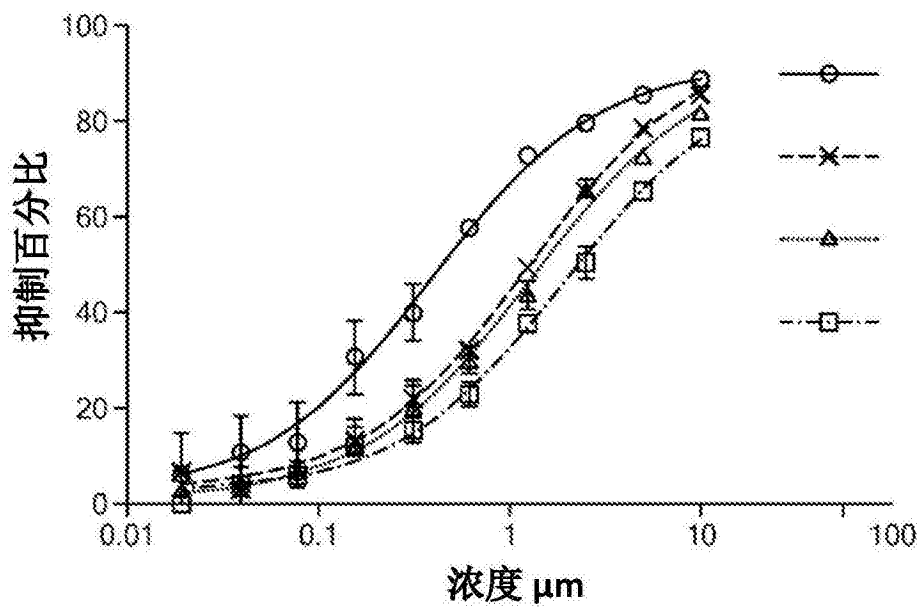


图1

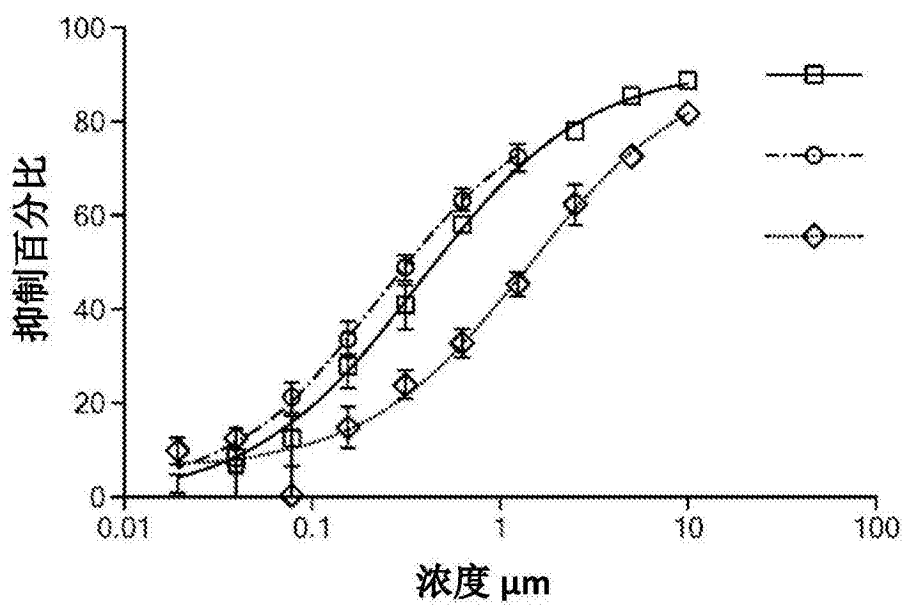


图2

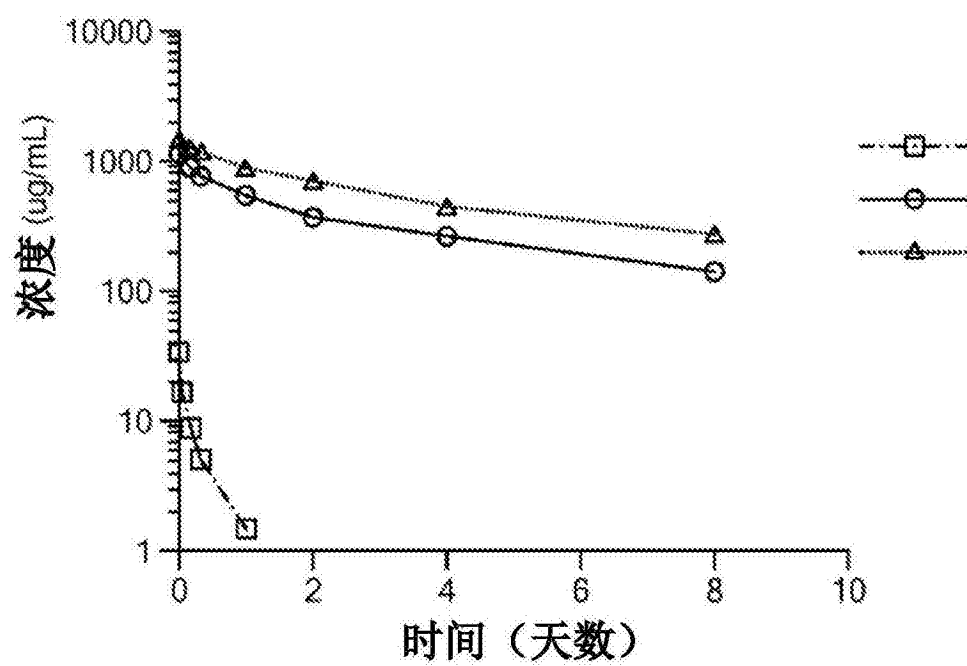


图3

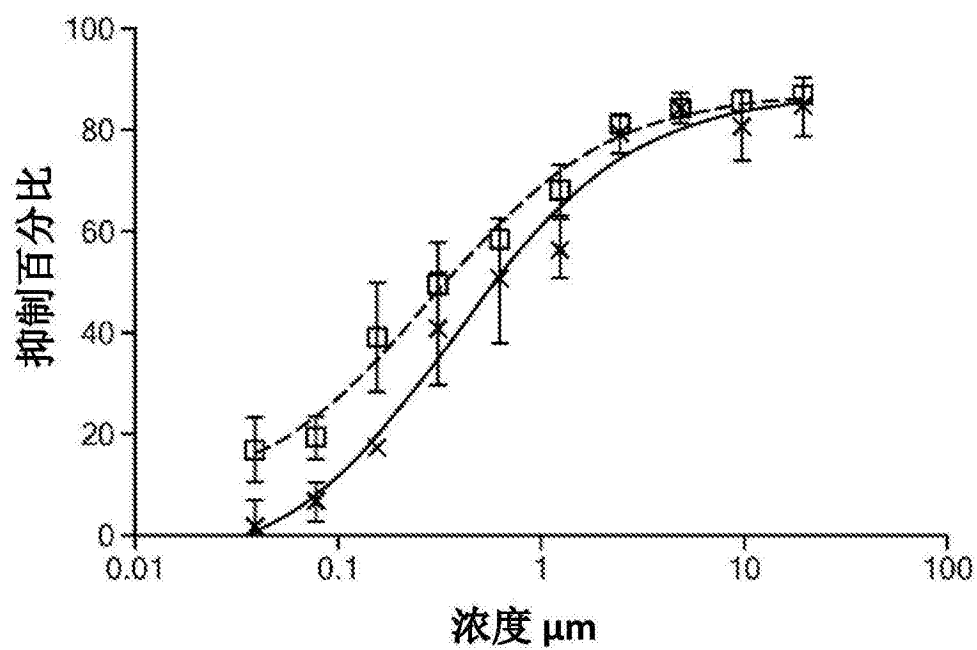


图4

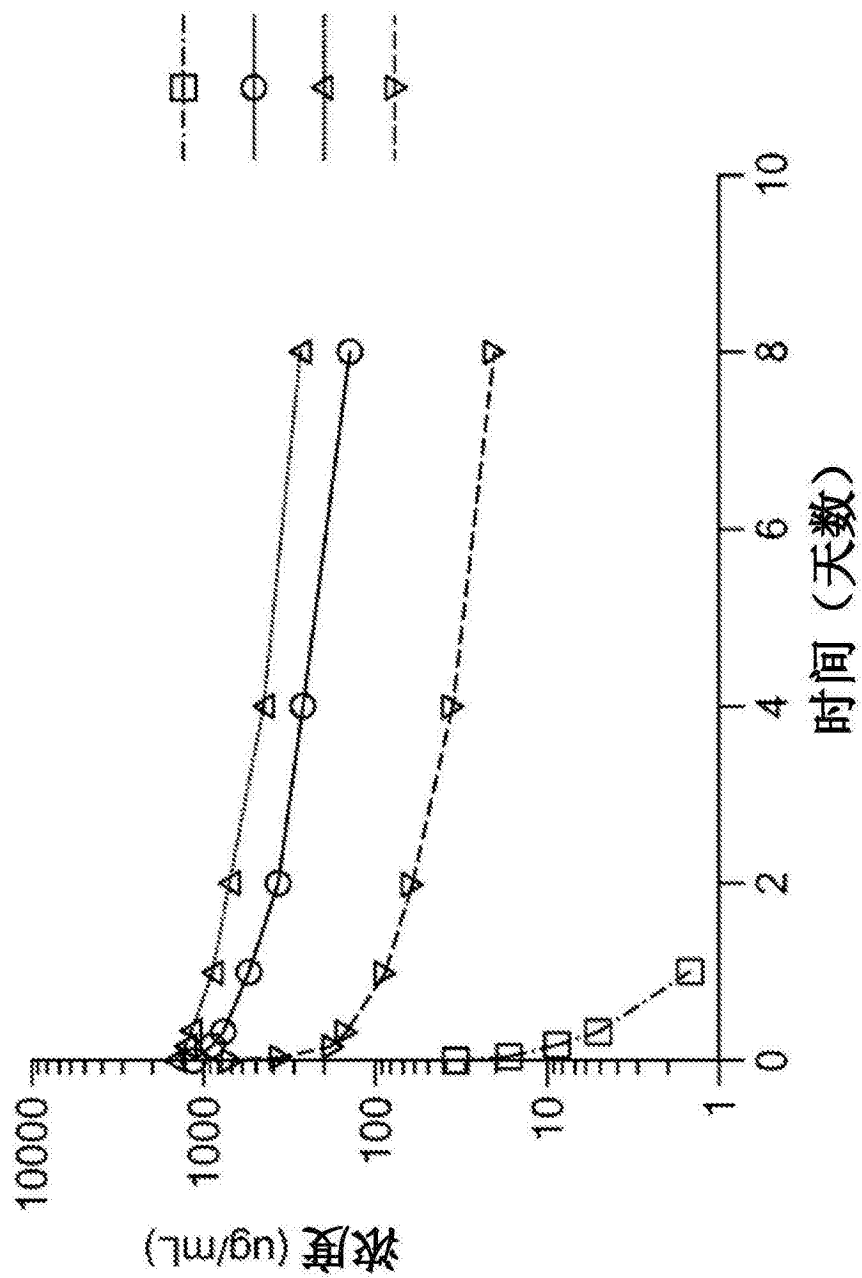


图5

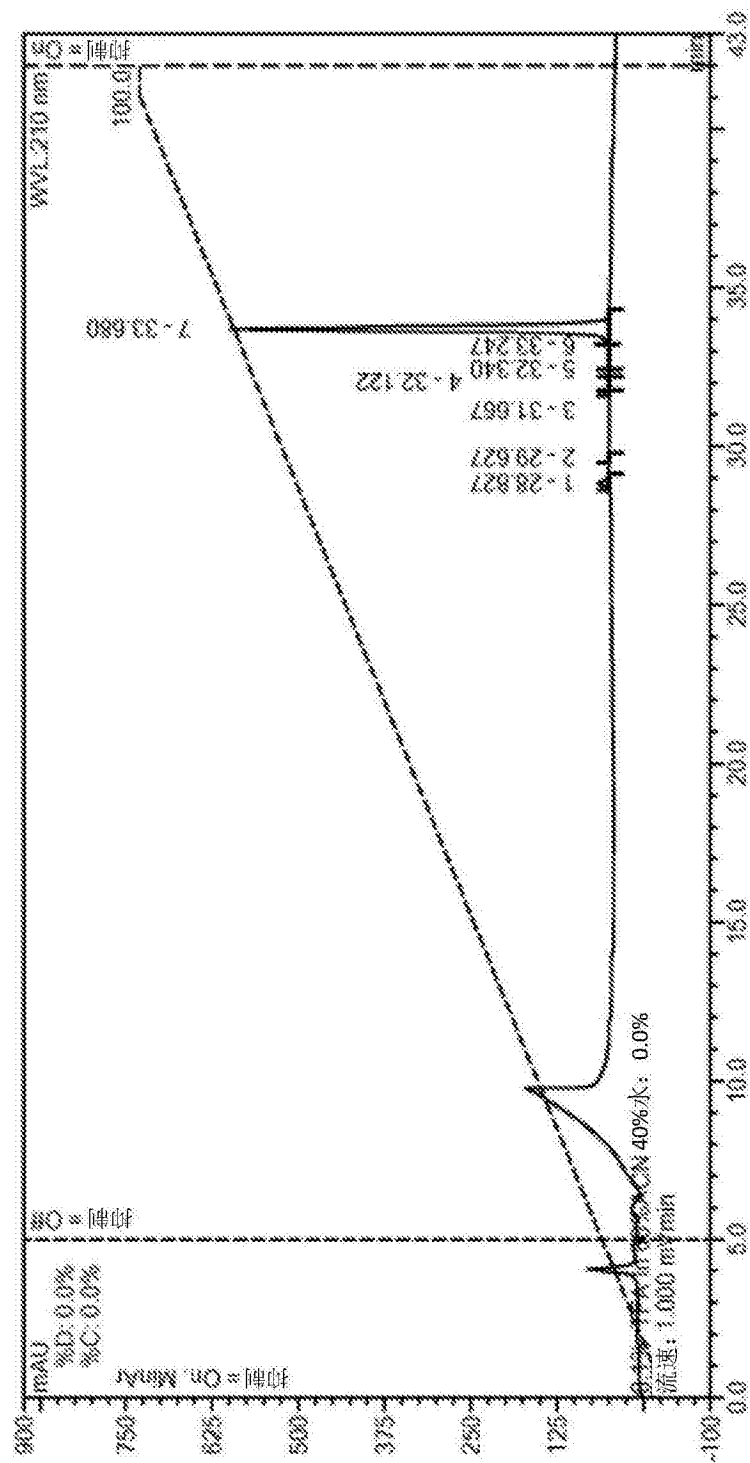


图6

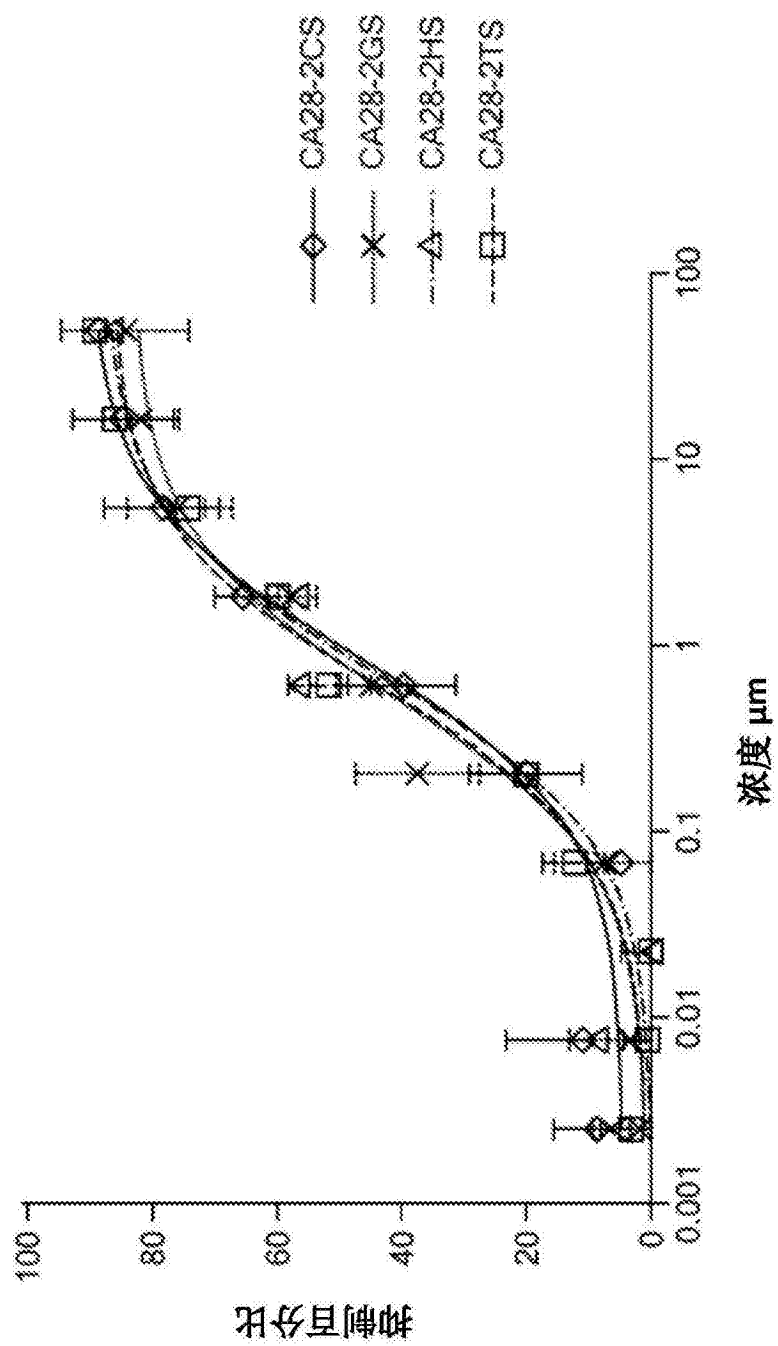


图7

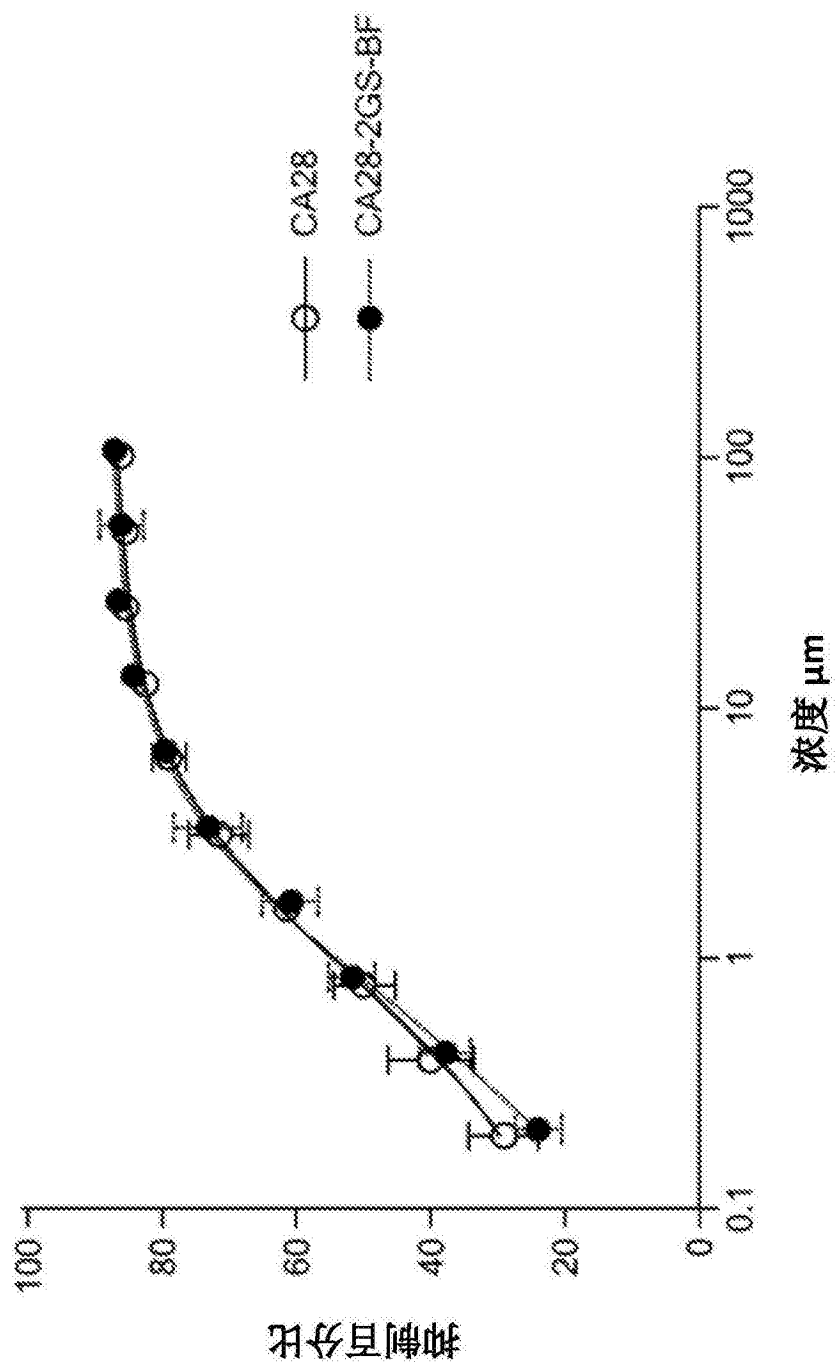


图8

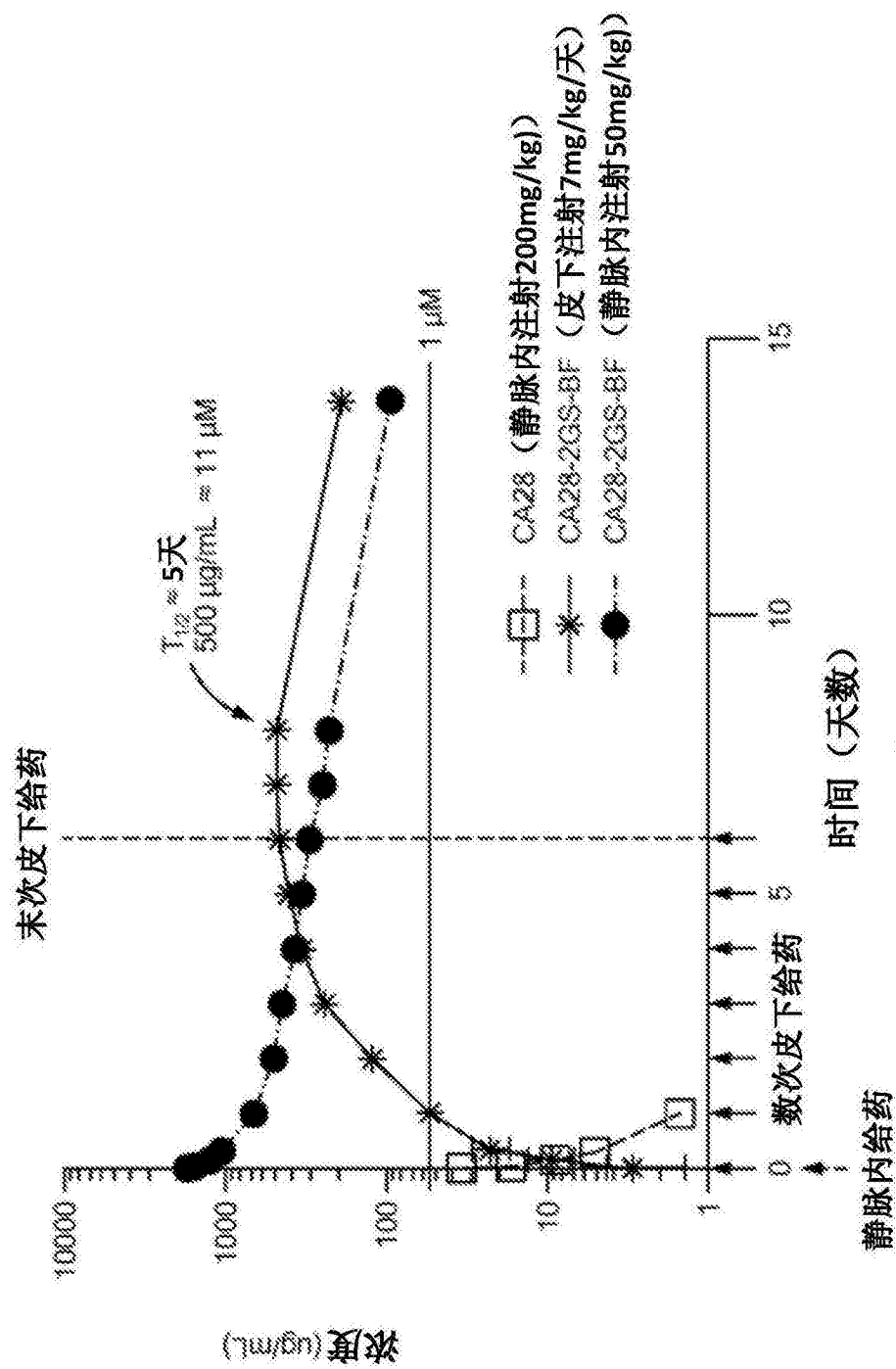


图9

CA28和CA28-2TS-BF的经典途径抑制的比较

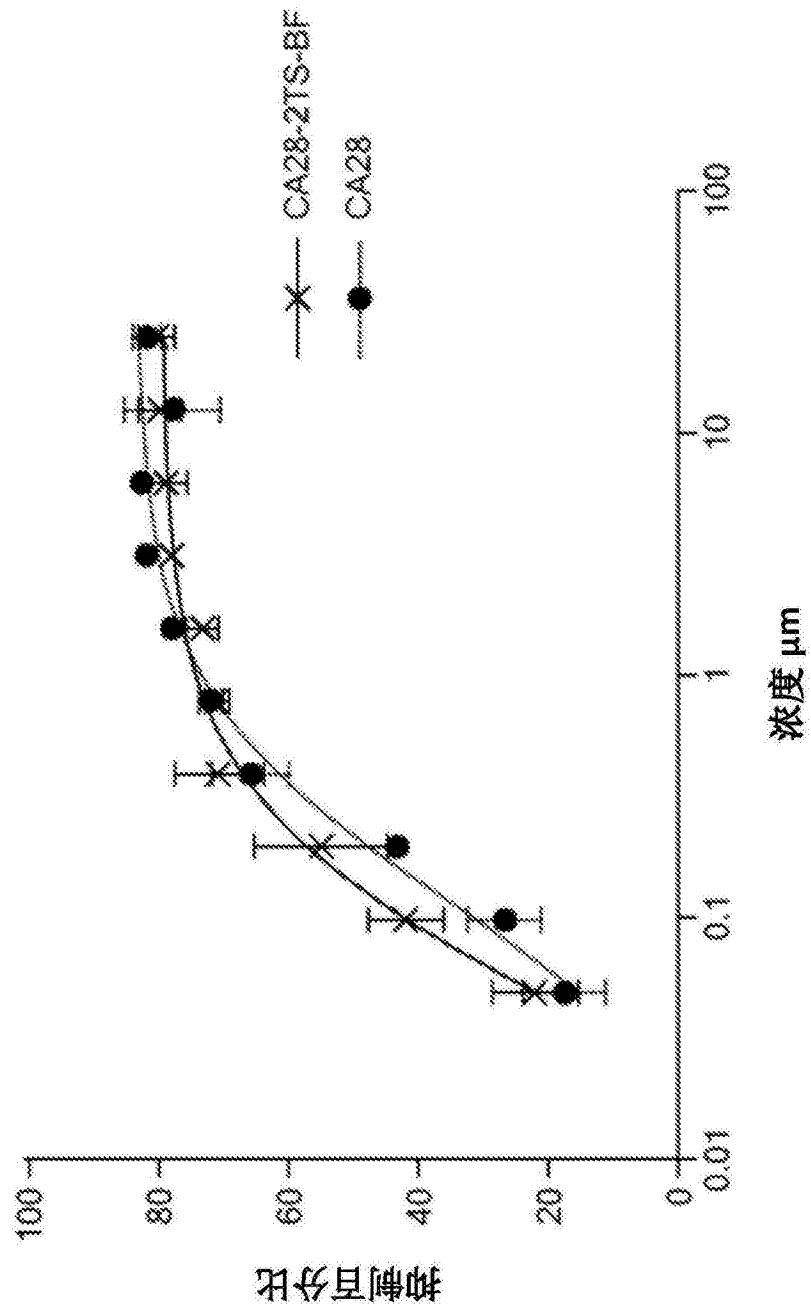


图10 (A)

CA28和CA28-2TS-BF的旁路途径抑制的比较

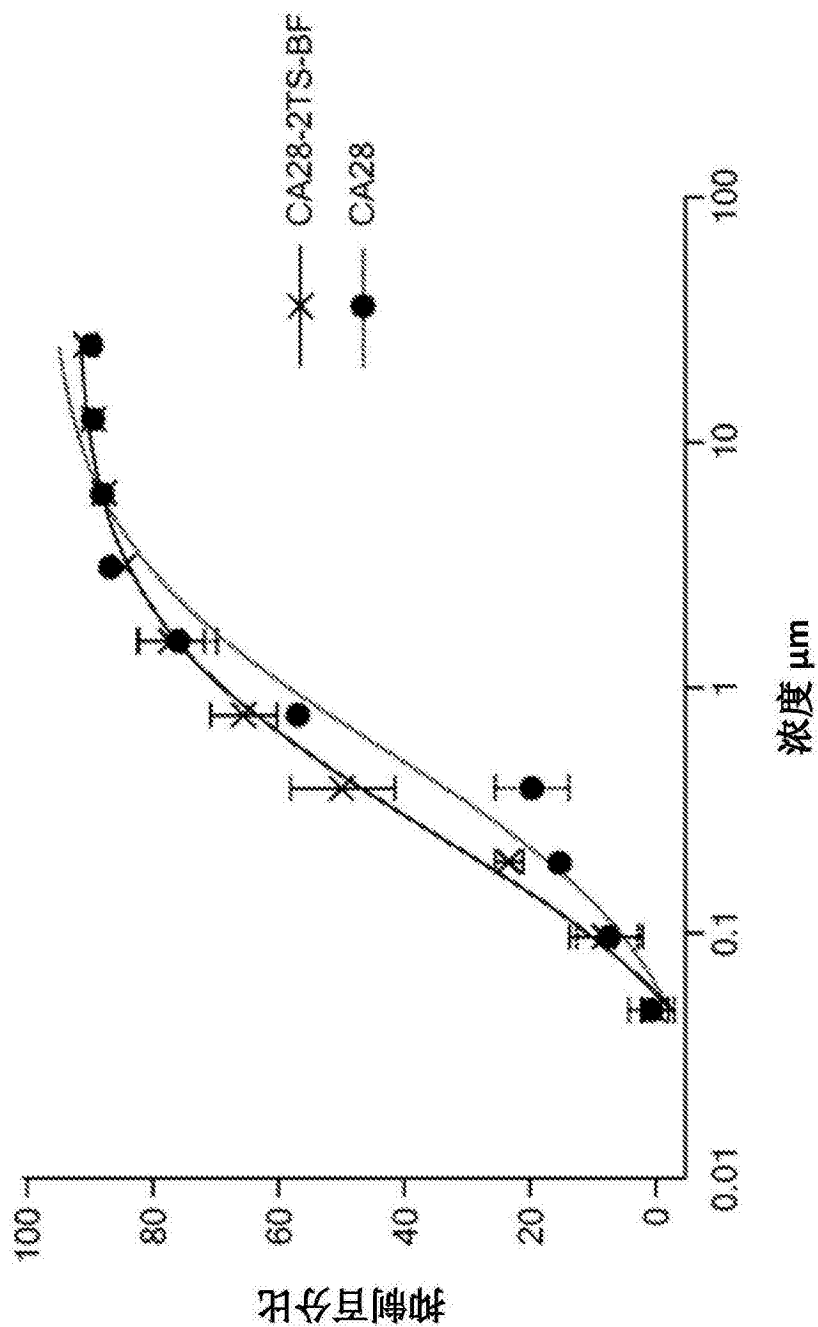


图10 (B)

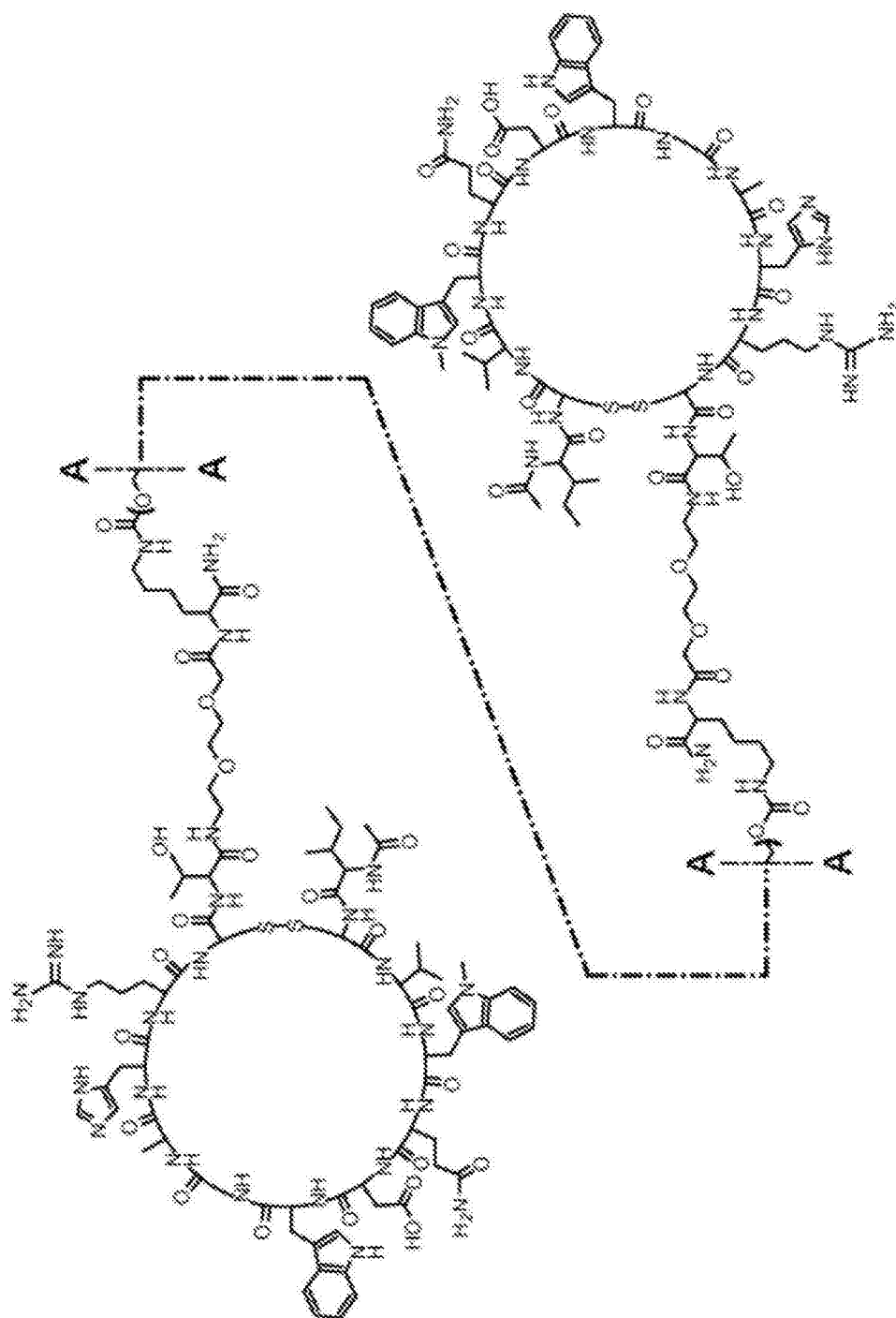


图10 (C)

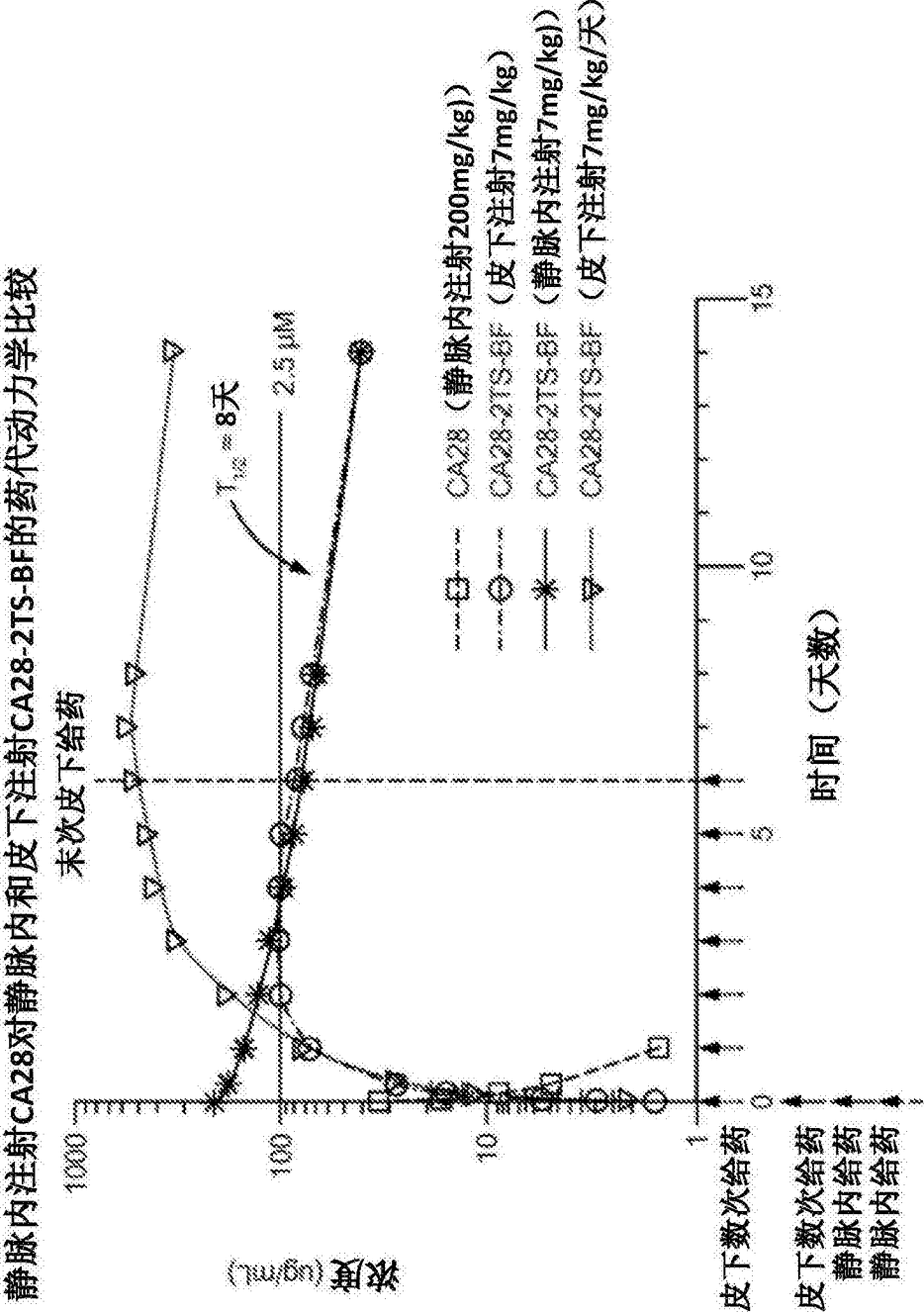


图11

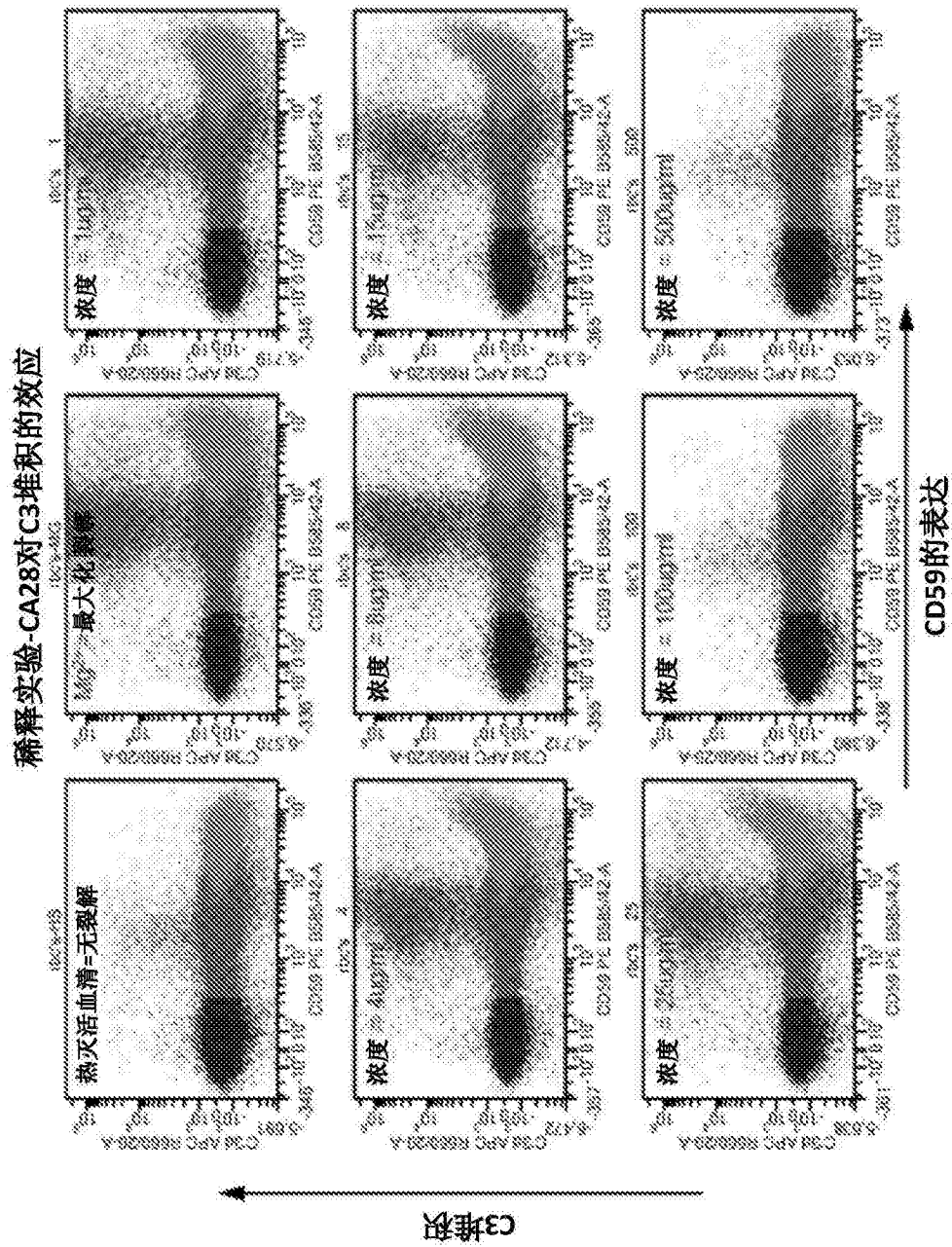


图12(A)

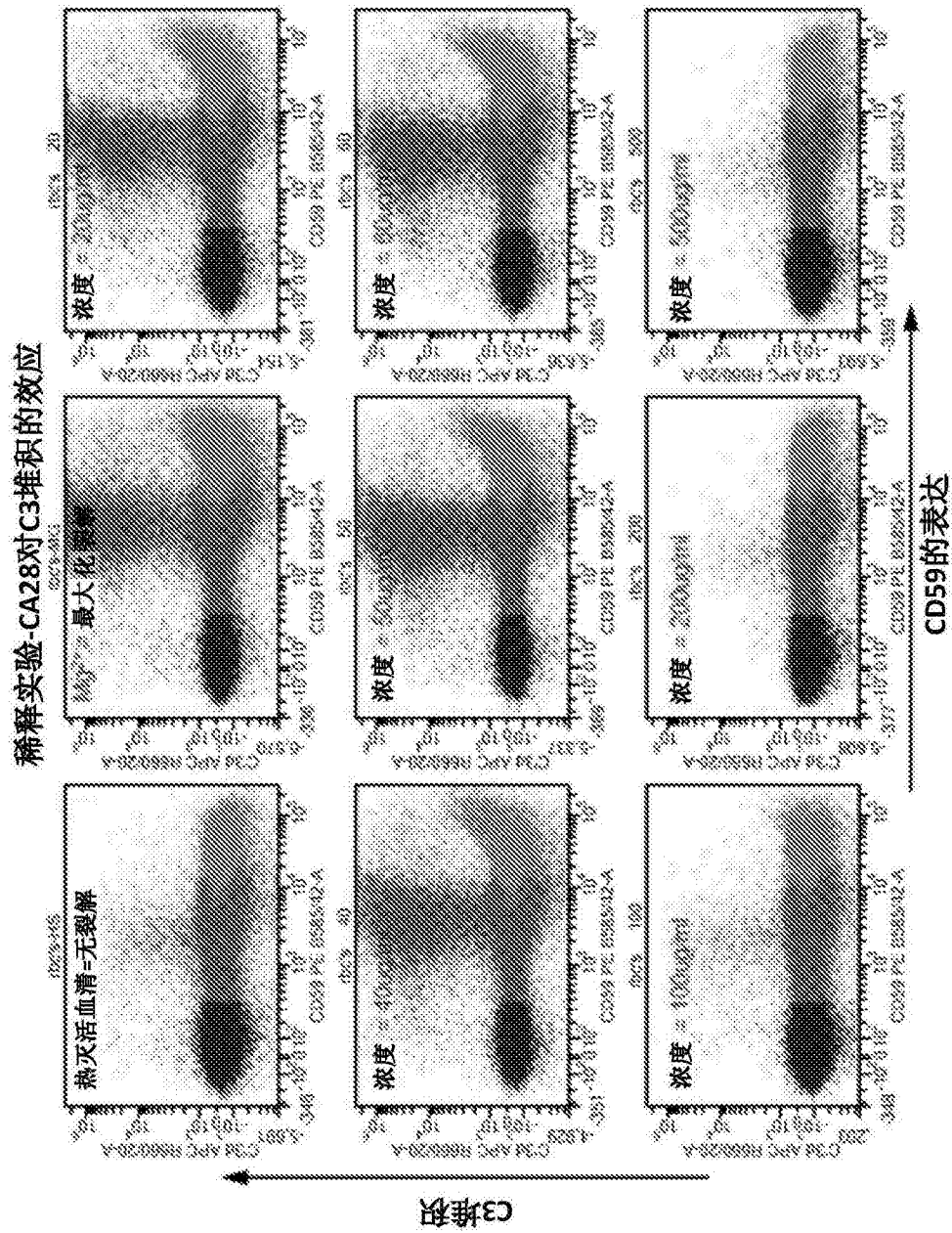


图12 (B)

在修改版海姆氏试验过程中堆积C3的PNH红细胞

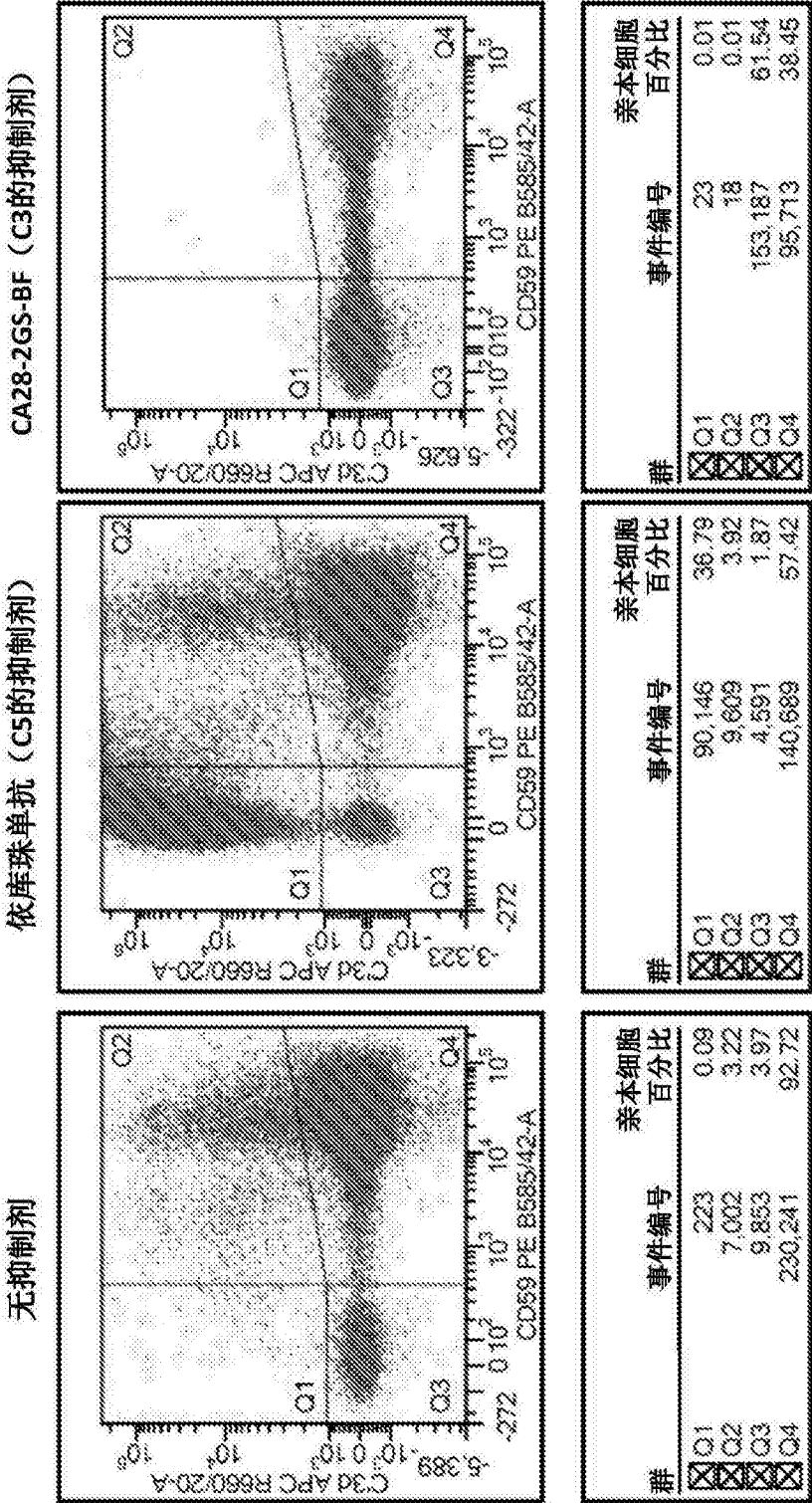


图13

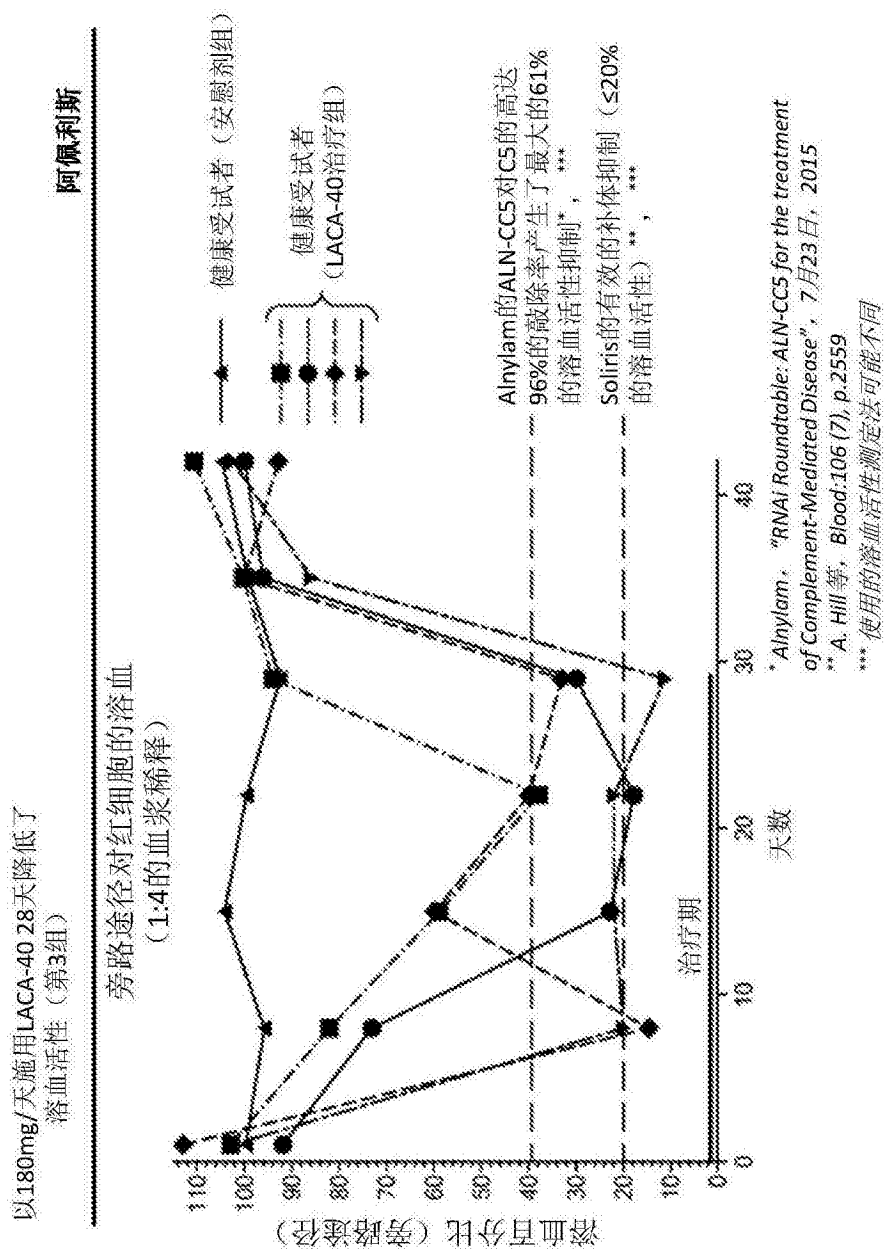


图14