

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、または配列番号：7によって表されるアミノ酸配列を有するコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログを含む化合物；および

(b) 同等の条件下で非修飾コンプスタチンペプチドと比較して、(1)ペプチドのC3、iC3b、C3bまたはC3c結合親和性、(2)生理学的pHでのペプチドの溶解度、(3)ペプチドの血漿安定性および/または血漿滞留時間、および/または(4)ペプチドの硝子体安定性および/または硝子体滞留時間、を改善する付加された末端成分を含む末端修飾；を含む化合物。

10

【請求項 2】

付加された末端成分が、付加されたC末端成分である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

付加された末端成分が、付加されたN末端成分である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

付加された末端成分が、1つ以上の親水性 / 荷電アミノ酸残基を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 5】

付加された末端成分が、2つまたは3つ以上の親水性 / 荷電アミノ酸残基を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか1つに記載の化合物。

20

【請求項 6】

付加された末端成分が、3つ以上の親水性 / 荷電アミノ酸残基を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 7】

1つ以上の親水性 / 荷電アミノ酸残基が、リシン、アルギニン、オルニチン、またはそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項 4 ~ 6 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 8】

1つ以上の親水性 / 荷電アミノ酸残基が、リシンである、請求項 4 ~ 7 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 9】

配列番号：7によって表されるアミノ酸配列を有するコンプスタチンアナログを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか1つに記載の化合物。

30

【請求項 10】

配列番号：8、配列番号：9、または配列番号：10によって表されるアミノ酸配列を有するコンプスタチンアナログを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 11】

アミノ酸配列が、配列番号：9によって表される、請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 12】

アミノ酸配列が、配列番号：10によって表される、請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 13】

さらに約3kDa以下の平均分子量を有するポリマーを含む、前記請求項のいずれか1つに記載の化合物。

40

【請求項 14】

ポリマーが、ポリエチレングリコール(PEG)である、請求項 13 に記載の化合物。

【請求項 15】

PEGが、コンプスタチンまたはコンプスタチンアナログのNまたはC末端に結合する、請求項 14 に記載の化合物。

【請求項 16】

PEGが、約0.5kDa ~ 約3kDaの分子量を有する単分散PEGである、請求項 14 または請求項 15 に記載の化合物。

50

【請求項 17】

PEGが、約0.5kDa～約3kDaの分子量を有する多分散PEGである、請求項14または請求項15に記載の化合物。

【請求項 18】

N末端に結合したPEGを有する配列番号：8、配列番号：9または配列番号：10を含む、請求項14～17のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 19】

(a)アミノ酸配列：Xaa1-Xaa2-Cys-Val-Xaa3-Gln-Xaa4-Xaa5-Gly-Xaa6-His-Xaa7-Cys-Xaa8を有するコンスタチンペプチドであって、ここで、Xaa5とXaa6の間のGlyは、主鎖コンホメーションを制限するように修飾される；

10

ここで、

Xaa1は、不在であるか、またはTyr、D-TyrまたはSarである；

Xaa2は、Ile、GlyまたはAc-Trpである；

Xaa3は、Trpであるか、またはTrpのアナログであり、ここで、Trpのアナログは、Trpと比較して、増加した疎水性特性を有する；

Xaa4は、AspまたはAsnである；

Xaa5は、Trpであるか、またはそのインドール環への化学修飾を含むTrpのアナログであり、ここで、化学修飾は、インドール環の水素結合ポテンシャルを増加させる；

Xaa6は、His、Ala、PheまたはTrpである；

Xaa7は、ArgまたはOrnである；

20

Xaa8は、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleであり、ここで、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleのいずれかのカルボキシ末端-OHは、-NH₂によって任意に置換される；および

該ペプチドは、Cys-Cysまたはチオエーテル結合を介して環状である；ならびに

(b)同等の条件下で非修飾コンスタチンペプチドと比較して、(1)ペプチドのC3、iC3b、C3bまたはC3c結合親和性、(2)生理学的pHでのペプチドの溶解度、および/または(3)ペプチドの血漿安定性および/または血漿滞留時間、および/または(4)ペプチドの硝子体安定性および/または硝子体滞留時間；を改善する付加された末端成分を含む末端修飾；を含む化合物。

30

【請求項 20】

Xaa5とXaa6の間のGlyが、N-メチル化される；

Xaa1が、D-TyrまたはSarである；

Xaa2が、Ileである；

Xaa3が、Trp、1-メチル-Trpまたは1-ホルミル-Trpである；

Xaa5が、Trpである；

Xaa6が、Alaである；および

Xaa8が、カルボキシ末端-OHが-NH₂で任意に置換された、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleである；

請求項19に記載の化合物。

40

【請求項 21】

Xaa1が、D-Tyrである；

Xaa2が、Ileである；

Xaa3が、1-メチル-Trpである；

Xaa4が、Aspである；

Xaa5が、Trpである；

Xaa6が、Alaである；および

Xaa8が、カルボキシ末端-OHが-NH₂で置換された、N-メチルIleである；

請求項20に記載の化合物。

【請求項 22】

付加された末端成分が、付加されたC末端成分である、請求項19～21のいずれか1つ

50

に記載の化合物。

【請求項 23】

付加された末端成分が、付加されたN末端成分である、請求項 19 ~ 21 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 24】

付加された末端成分が、1つ以上の親水性 / 荷電アミノ酸残基を含む、請求項 19 ~ 23 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 25】

付加された末端成分が、2つまたは3つの親水性 / 荷電アミノ酸残基を含む、請求項 19 ~ 23 のいずれか1つに記載の化合物。

10

【請求項 26】

付加された末端成分が、3つ以上の親水性 / 荷電アミノ酸残基を含む、請求項 19 ~ 23 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 27】

親水性 / 荷電アミノ酸残基が、リシン、アルギニン、オルニチン、またはそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項 24 ~ 26 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 28】

1つ以上の親水性 / 荷電アミノ酸残基が、リシンである、請求項 24 ~ 27 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 29】

さらに約3kDa以下の平均分子量を有するポリマーを含む付加された成分をさらに含む、請求項 19 ~ 28 のいずれか1つに記載の化合物。

20

【請求項 30】

付加された成分が、ポリエチレングリコール(PEG)である、請求項 29 に記載の化合物。

【請求項 31】

PEGが、コンプスタチンアナログのNまたはC末端に結合する、請求項 30 に記載の化合物。

【請求項 32】

PEGが、約0.5kDa ~ 約3kDaの分子量を有する単分散PEGである、請求項 30 または請求項 31 に記載の化合物。

30

【請求項 33】

PEGが、約0.5kDa ~ 約3kDaの分子量を有する多分散PEGである、請求項 30 または請求項 31 に記載の化合物。

【請求項 34】

N末端に共有結合したPEGを有する配列番号：8、配列番号：9または配列番号：10を含む、請求項 30 ~ 33 のいずれか1つに記載の化合物。

【請求項 35】

前記請求項のいずれかに記載の化合物および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

40

【請求項 36】

化合物の経口投与用に製剤された、請求項 35 に記載の医薬組成物。

【請求項 37】

化合物の局所投与用に製剤された、請求項 35 に記載の医薬組成物。

【請求項 38】

化合物の眼内投与用に製剤された、請求項 35 に記載の医薬組成物。

【請求項 39】

化合物の硝子体内投与用に製剤された、請求項 35 または請求項 38 に記載の医薬組成物。

【請求項 40】

50

化合物の歯周投与用に製剤された、請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 1】

化合物の歯肉投与または乳頭内浸潤注射用に製剤された、請求項 3 5 または請求項 4 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 2】

化合物の肺投与用に製剤された、請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 3】

化合物の皮下または筋肉内投与用に製剤された、請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 4】

化合物の静脈内投与用に製剤された、請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 4 5】

請求項 3 5 ~ 4 4 のいずれか1つに記載の医薬組成物の投与を含む補体活性化を阻害する方法。

【請求項 4 6】

(a) 配列番号：1 ~ 配列番号：10のいずれか1つによって表されるアミノ酸配列を有するコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログ；および

(b) 約3kDa以下の平均分子量を有するポリマー；

を含む化合物。

【請求項 4 7】

ポリマーが、約3kDa以下の平均分子量を有するポリエチレングリコール(PEG)である、請求項 4 6 に記載の化合物。

20

【請求項 4 8】

PEGが、NまたはC末端に結合する、請求項 4 7 に記載の化合物。

【請求項 4 9】

PEGが、約0.5kDa ~ 約3kDaの分子量を有する単分散PEGである、請求項 4 7 または請求項 4 8 に記載の化合物。

【請求項 5 0】

PEGが、約0.5kDa ~ 約3kDaの分子量を有する多分散PEGである、請求項 4 7 または請求項 4 8 に記載の化合物。

【請求項 5 1】

請求項 4 7 ~ 5 0 のいずれか1つに記載の化合物および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

30

【請求項 5 2】

配列番号：9の配列を有するペプチド。

【請求項 5 3】

配列番号：10の配列を有するペプチド。

【請求項 5 4】

本質的に、配列番号：9からなるペプチド。

【請求項 5 5】

本質的に、配列番号：10からなるペプチド。

40

【請求項 5 6】

配列番号：9からなるペプチド。

【請求項 5 7】

配列番号：10からなるペプチド。

【請求項 5 8】

ペプチドのための薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に配置された、請求項 5 2 ~ 5 7 のいずれか1つに記載のペプチド。

【請求項 5 9】

(1) 補体活性化に関連する病的状態を有する個体を提供するステップ；

(2) 薬学的に許容される担体および請求項 1 ~ 3 4 のいずれか1つに記載の化合物を含む

50

医薬組成物の治療有効量を個体に投与するステップ；および

(3)病的状態の1つ以上のパラメーターを測定するステップ；

を含む、補体活性化に関連する病的状態を有する個体を治療する方法であって、

医薬組成物の投与が補体の阻害をもたらすことによって、補体活性化に関連する病的状態が治療される方法。

【請求項 6 0】

補体活性化に関連する病的状態が、非定型溶血性尿毒症症候群(aHUS)；高密度沈着症(DD)；C3系球体腎炎(C3GN)；C3系球体障害；その他の補体介在性腎症および系球体炎症性疾患；加齢性黄斑変性症(AMD)；黄斑変性症を特徴とする眼障害、脈絡膜血管新生(CNV)；網膜血管新生(RNV)、増殖性硝子体網膜症、緑内障、ブドウ膜炎、眼の炎症、またはこれらの任意の組み合わせ；発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)；寒冷凝集素症(CAD)；温式抗体自己免疫性溶血性貧血(wAIHA)；鎌状赤血球症；移植関連血栓性微小血管症；関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)；自己免疫および自己炎症性腎疾患；自己免疫性心筋炎；多発性硬化症；外傷性脳および脊髄損傷；脳、腸および腎臓の虚血再灌流(IR)傷害；自発的および再発性妊娠損失；抗リン脂質抗体症候群(APS)；パーキンソン病；アルツハイマー病；異常なシナプスリモデリング、過剰なミクログリア活動および認知機能低下に裏打ちされた神経変性炎症状態；喘息；抗核細胞質抗原関連の微量免疫型血管炎(ウェゲナー症候群)；天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および表皮水疱症などの非ループス自己免疫性皮膚疾患；外傷後ショック、癌；歯周炎；歯肉炎；およびアテローム性動脈硬化症；からなる群から選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

10

20

【請求項 6 1】

化合物が、配列番号：9または配列番号：10を含む、請求項 5 9 または請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

化合物が、配列番号：10を含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

化合物が、約1kDa～約3kDaの分子量を有する単分散PEGをさらに含み、単分散PEGが、コンプスタチンアナログのN末端に共有結合する、請求項 5 9 または請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 4】

化合物が、約1kDa～約3kDaの分子量を有する多分散PEGをさらに含み、多分散PEGが、コンプスタチンアナログのN末端に共有結合する、請求項 5 9 または請求項 6 0 に記載の方法。

30

【請求項 6 5】

医薬組成物が、約0.125mg/kg～約10mg/kgの治療有効用量で静脈内または皮下投与される、請求項 5 9 ～ 6 4 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 6 6】

治療有効用量が、約0.25mg/kg～約5mg/kgである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

治療有効用量が、約0.5mg/kg～約5mg/kgである、請求項 6 5 または請求項 6 6 に記載の方法。

40

【請求項 6 8】

治療有効用量が、約0.5mg/kg～約4mg/kgである、請求項 6 5 ～ 6 7 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 6 9】

治療有効用量が、約3mg/kgである、請求項 6 5 ～ 6 8 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7 0】

医薬組成物が、約0.25mg/kg～約50mg/kgの治療有効用量で筋肉内投与される、請求項 5 9 ～ 6 4 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7 1】

50

治療有効用量が、約0.25mg/kg～約35mg/kgである、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

治療有効用量が、約0.25mg/kg～約10mg/kgである、請求項70または請求項71に記載の方法。

【請求項73】

治療有効用量が、約0.25mg/kg～約5mg/kgである、請求項70～72のいずれか1つに記載の方法。

【請求項74】

治療有効用量が、約2.5mg/kgである、請求項70～73のいずれか1つに記載の方法。

【請求項75】

医薬組成物が、約1μg～約10mgの治療有効用量で硝子体内投与される、請求項59～64のいずれか1つに記載の方法。

10

【請求項76】

治療有効用量が、約1μg～約2,000μgである、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

治療有効用量が、約1mgである、請求項75または請求項76に記載の方法。

【請求項78】

医薬組成物が、約1μg～約1,000μgの治療有効用量で歯周投与される、請求項59～64のいずれか1つに記載の方法。

20

【請求項79】

治療有効用量が、約10μg～約200μgである、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

治療有効用量が、約20μg～約100μgである、請求項78または請求項79に記載の方法。

【請求項81】

治療有効用量が、約25μgまたは約50μgである、請求項78～80のいずれか1つに記載の方法。

【請求項82】

医薬組成物が、乳頭内浸潤注射によって投与される、請求項78～81のいずれか1つに記載の方法。

30

【請求項83】

医薬組成物が、約1mg～約20mgの治療有効用量で経口投与される、請求項59～64のいずれか1つに記載の方法。

【請求項84】

治療有効用量が、約1mg～約10mgである、請求項83に記載の方法。

【請求項85】

治療有効用量が、約1mg～約5mgである、請求項83または請求項84に記載の方法。

【請求項86】

医薬組成物が、単回投与として投与される、請求項59～85のいずれか1つに記載の方法。

40

【請求項87】

医薬組成物が、12時間に1回～3ヶ月に1回の範囲の定期的な間隔で投与される、請求項59～85のいずれか1つに記載の方法。

【請求項88】

医薬組成物が、2～3日に1回投与される、請求項87に記載の方法。

【請求項89】

医薬組成物が、2週間に1回投与される、請求項87に記載の方法。

【請求項90】

医薬組成物が、3ヶ月に1回投与される、請求項87に記載の方法。

【請求項91】

50

医薬組成物が、約0.125mg/kg～約10mg/kgの第1の治療有効用量で個体に静脈内または皮下投与され、および医薬組成物が、(i)約0.25mg/kg～約50mg/kgの第2の治療有効維持用量で個体に筋肉内に；または(ii)約1mg/kg～約20mg/kgの第2の治療有効維持用量で個体に経口で；さらに投与される、請求項59～64のいずれか1つに記載の方法。

【請求項92】

第2の治療有効維持用量が、2～3日に1回投与される、請求項91に記載の方法。

【請求項93】

第2の治療有効維持用量が、2週間に1回投与される、請求項91に記載の方法。

【請求項94】

第1の治療有効用量が、約0.5mg/kg～約3mg/kgである、請求項91～93のいずれか1つに記載の方法。 10

【請求項95】

第2の治療有効維持用量が、約0.25mg/kg～約10mg/kgであり、筋肉内投与される、請求項91～93のいずれか1つに記載の方法。

【請求項96】

第2の治療有効維持用量が、約0.25mg/kg～約5mg/kgである、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

第2の治療有効維持用量が、約1mg/kg～約20mg/kgであり、経口投与される、請求項91～93のいずれか1つに記載の方法。

【請求項98】

第2の治療有効維持用量が、約1mg/kg～約5mg/kgである、請求項97に記載の方法。 20

【請求項99】

個体が、非ヒト霊長類またはヒトである、請求項59～98のいずれか1つに記載の方法。

【請求項100】

個体が、ヒトである、請求項98に記載の方法。

【請求項101】

(1)個体を提供するステップ；
 (2)薬学的に許容される担体および請求項1～34のいずれか1つに記載の化合物を含む医薬組成物の治療有効量を個体に投与するステップ；および
 (3)補体活性化の1つ以上のパラメーターを測定するステップ；
 を含む、個体における補体活性化を阻害する方法であって、
 医薬組成物の投与が補体の活性化の阻害をもたらす方法。 30

【請求項102】

化合物が、配列番号：9または配列番号：10を含む、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

化合物が、配列番号：10を含む、請求項101に記載の方法。

【請求項104】

化合物が、約1kDa～約3kDaの分子量を有する単分散PEGをさらに含み、単分散PEGが、コンプスタチンアナログのN末端に共有結合する、請求項101に記載の方法。 40

【請求項105】

化合物が、約1kDa～約3kDaの分子量を有する多分散PEGをさらに含み、多分散PEGが、コンプスタチンアナログのN末端に共有結合する、請求項101に記載の方法。

【請求項106】

医薬組成物が、約0.125mg/kg～約10mg/kgの治療有効用量で静脈内または皮下投与される、請求項101～105のいずれか1つに記載の方法。

【請求項107】

治療有効用量が、約0.25mg/kg～約5mg/kgである、請求項106に記載の方法。

【請求項108】

治療有効用量が、約0.5mg/kg～約4mg/kgである、請求項106または請求項107に記載の方法。

【請求項109】

治療有効用量が、約3mg/kgである、請求項106～108のいずれか1つに記載の方法。

【請求項110】

医薬組成物が、約0.25mg/kg～約50mg/kgの治療有効用量で筋肉内投与される、請求項101～105のいずれか1つに記載の方法。

【請求項111】

治療有効用量が、約0.25mg/kg～約35mg/kgである、請求項110に記載の方法。

10

【請求項112】

治療有効用量が、約0.25mg/kg～約10mg/kgである、請求項110または請求項111に記載の方法。

【請求項113】

治療有効用量が、約0.25mg/kg～約5mg/kgである、請求項110～112のいずれか1つに記載の方法。

【請求項114】

治療有効用量が、約2.5mg/kgである、請求項110～113のいずれか1つに記載の方法。

【請求項115】

医薬組成物が、約1μg～約10mgの治療有効用量で硝子体内投与される、請求項101～105のいずれか1つに記載の方法。

20

【請求項116】

治療有効用量が、約1μg～約2,000μgである、請求項115に記載の方法。

【請求項117】

治療有効用量が、約100μg～約1,500μgである、請求項115または請求項116に記載の方法。

【請求項118】

治療有効用量が、約1mgである、請求項115～117に記載の方法。

【請求項119】

医薬組成物が、約1mg～約20mgの治療有効用量で経口投与される、請求項101～105のいずれか1つに記載の方法。

30

【請求項120】

治療有効用量が、約1mg～約10mgである、請求項119に記載の方法。

【請求項121】

治療有効用量が、約1mg～約5mgである、請求項119または請求項120に記載の方法。

【請求項122】

医薬組成物が、約1μg～約1,000μgの治療有効用量で乳頭内浸潤注射を介して投与される、請求項101～105のいずれか1つに記載の方法。

40

【請求項123】

治療有効用量が、約10μg～約200μgである、請求項122に記載の方法。

【請求項124】

治療有効用量が、約20μg～約100μgである、請求項122または請求項123に記載の方法。

【請求項125】

医薬組成物が、単回投与として投与される、請求項101～124のいずれか1つに記載の方法。

【請求項126】

医薬組成物が、12時間に1回～3ヶ月に1回の範囲の定期的な間隔で投与される、請求項

50

101 ~ 124 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項127】

医薬組成物が、2~3日に1回投与される、請求項126に記載の方法。

【請求項128】

医薬組成物が、2週間に1回投与される、請求項126に記載の方法。

【請求項129】

医薬組成物が、3ヶ月に1回投与される、請求項126に記載の方法。

【請求項130】

医薬組成物が、約0.125mg/kg ~ 約10mg/kgの第1の治療有効用量で個体に静脈内または皮下投与され、および医薬組成物が、(i) 約0.25mg/kg ~ 約50mg/kgの第2の治療有効維持用量で個体に筋肉内に；または(ii) 約1mg/kg ~ 約20mg/kgの第2の治療有効維持用量で個体に経口で；さらに投与される、請求項101 ~ 105 のいずれか1つに記載の方法。

10

【請求項131】

第2の治療有効維持用量が、2~3日に1回投与される、請求項130に記載の方法。

【請求項132】

第2の治療有効維持用量が、2週間に1回投与される、請求項130に記載の方法。

【請求項133】

第1の治療有効用量が、約0.5mg/kg ~ 約3mg/kgである、請求項130 ~ 132 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項134】

第2の治療有効維持用量が、約0.25mg/kg ~ 約10mg/kgであり、個体に筋肉内投与される、請求項130 ~ 133 のいずれか1つに記載の方法。

20

【請求項135】

第2の治療有効維持用量が、約0.5mg/kg ~ 約5mg/kgである、請求項134に記載の方法。

【請求項136】

第2の治療有効用量が、約1mg/kg ~ 約20mg/kgであり、個体に経口投与される、請求項91 ~ 93 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項137】

第2の治療有効用量が、約1mg/kg ~ 約10mg/kgである、請求項136に記載の方法。

30

【請求項138】

第2の治療有効用量が、約1mg/kg ~ 約5mg/kgである、請求項136または請求項137に記載の方法。

【請求項139】

医薬組成物が、約100 µg ~ 約50mgの治療有効用量で眼のインプラントを介して投与される、請求項59 ~ 64 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項140】

治療有効用量が、約100 µg ~ 約10mgである、請求項139に記載の方法。

【請求項141】

治療有効用量が、約100 µg ~ 約5mgである、請求項139に記載の方法。

40

【請求項142】

治療有効用量が、約100 µg ~ 約500 µgである、請求項139 ~ 141 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項143】

眼のインプラントが、眼上または眼内に少なくとも約2日間維持される、請求項139 ~ 142 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項144】

眼のインプラントが、眼上または眼内に少なくとも約1週間維持される、請求項139 ~ 142 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項145】

50

眼のインプラントが、眼上または眼内に少なくとも約1ヶ月維持される、請求項139～142のいずれか1つに記載の方法。

【請求項146】

個体が、非ヒト霊長類またはヒトである、請求項101～145のいずれか1つに記載の方法。

【請求項147】

個体が、ヒトである、請求項146に記載の方法。

【請求項148】

生体サンプル中のコンスタチンアナログの検出方法であって、

(1)コンスタチンアナログ分子の少なくとも一部がC3および/またはその画分であるC3b、iC3b、およびC3cに結合して、複数のC3-結合コンスタチンアナログ分子を生成する、第1の複数のコンスタチンアナログ分子を含む生体サンプルを提供するステップ；

(2)コンスタチン分子が、それらの標的であるC3分子から解離する、生体サンプルを熱不活性化して、熱不活性化サンプルを生成するステップ；

(3)第2の複数のコンスタチンアナログ分子が共有結合する、CM5センサーチップを提供するステップ；

(4)熱不活性化サンプルを所定量のC3/C3b/iC3b/C3cまたはヒト血漿(C3の供給源として)と混合し、混合物をCM5センサーチップに接触させることによって、生体サンプル中に存在する熱放出コンスタチンアナログ分子が、固定化されたコンスタチンアナログ分子とC3への結合を競合するステップ；および

(5)CM5チップ上のコンスタチンアナログ分子への遊離C3/C3b/iC3b/C3cの結合を検出することによって、結合したC3/C3b/iC3b/C3cの減少が、熱不活性化生体サンプル中のコンスタチンアナログ分子の存在に比例するステップ；を含む方法。

【請求項149】

検出が、表面プラズモン共鳴を含む、請求項149に記載の方法。

【請求項150】

生体サンプルが、ヒトまたは非ヒト霊長類から抽出された硝子体液サンプルまたは血漿サンプルである、請求項148または請求項149に記載の方法。

【請求項151】

生体サンプルが、ヒトまたは非ヒト霊長類から抽出された硝子体液サンプルである、請求項148～150のいずれか1つに記載の方法。

【請求項152】

第1の複数のコンスタチンアナログ分子、第2の複数のコンスタチンアナログ分子、または第1の複数のコンスタチンアナログ分子および第2の複数のコンスタチンアナログ分子の両方が、配列番号：7、配列番号：9、および配列番号：10からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、アミノ酸配列が配列番号：7である場合、コンスタチンアナログ分子が、コンスタチンアナログのN末端に共有結合した約1kDa～約3kDaの分子量を有するPEGをさらに含む、請求項148～150のいずれか1つに記載の方法。

【請求項153】

ポリペプチドが、配列番号：10のアミノ酸配列を有する、請求項152に記載の方法。

【請求項154】

リシン修飾、または非修飾コンスタチンアナログを検出するための非常に特異的な抗体を生成する方法であって、

(a)第1のコンスタチンまたはコンスタチンアナログで第1の哺乳動物に免疫を付与するステップ；

(b)第2のコンスタチンまたはコンスタチンアナログが、C末端に結合した1つ以上のリシン残基を有する以外は、(a)の第1のコンスタチンまたはコンスタチンアナログと同じアミノ酸配列を有する、第2のコンスタチンまたはコンスタチンアナログで第2の

10

20

30

40

50

哺乳動物に免疫を付与するステップ；

(c)注射が、少なくとも2週間の期間中に少なくとも2日に1回行われ、第1の複数の抗体が生成される、第1の哺乳動物に、第1のコンスタチンまたはコンスタチンアナログを注射するステップ；

(d)注射が、少なくとも2週間の期間中に少なくとも2日に1回行われ、第2の複数の抗体が生成される、第2の哺乳動物に、第2のコンスタチンまたはコンスタチンアナログを注射するステップ；および

(e)第1の複数の抗体および第2の複数の抗体を精製するステップ；を含む方法であって

、
第1の複数の抗体および第2の複数の抗体が、組み合わせて使用される場合、第2のコンスタチンまたはコンスタチンアナログの抗原から第1のコンスタチンまたはコンスタチンアナログの抗原を区別することができる方法。

【請求項 1 5 5】

第1の哺乳動物、第2の哺乳動物、または第1の哺乳動物および第2の哺乳動物の両方が、ラット、マウス、サル、ウサギ、ヤギ、ブタおよびヒツジからなる群あから選択される、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

第1の哺乳動物、第2の哺乳動物、または第1の哺乳動物および第2の哺乳動物の両方が、ウサギである、請求項 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

ステップ(c)における注射、ステップ(d)における注射、またはステップ(c)における注射およびステップ(d)における注射の両方が、少なくとも5週間の期間、毎週行われる、請求項 1 5 4 ~ 1 5 6 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 5 8】

ステップ(c)における注射、ステップ(d)における注射、またはステップ(c)における注射およびステップ(d)における注射の両方が、少なくとも3週間の期間、毎週行われる、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

免疫を付与するステップ(a)が、約50 μ g ~ 約500 μ gの範囲での第1のコンスタチンまたはコンスタチンアナログの第1の用量を含む、請求項 1 5 4 ~ 1 5 8 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 6 0】

免疫を付与するステップ(b)が、約50 μ g ~ 約500 μ gの範囲での第2のコンスタチンまたはコンスタチンアナログの第2の用量を含む、請求項 1 5 4 ~ 1 5 8 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 6 1】

第1の用量、第2の用量、または第1の用量および第2の用量の両方が、約100 μ gである、請求項 1 5 9 または 1 6 0 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

注射するステップ(c)が、約10 μ g ~ 約100 μ gの範囲での第1のコンスタチンまたはコンスタチンアナログの第3の用量を含む、請求項 1 5 4 ~ 1 6 1 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 6 3】

注射するステップ(d)が、約10 μ g ~ 約100 μ gの範囲での第2のコンスタチンまたはコンスタチンアナログの第4の用量を含む、請求項 1 5 4 ~ 1 6 1 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 1 6 4】

第3の用量、第4の用量、または第3の用量および第4の用量の両方が、約50 μ gである、請求項 1 6 2 または 1 6 3 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

10

20

30

40

50

第1の複数の抗体、第2の複数の抗体、または第1の複数の抗体および第2の複数の抗体の両方が、モノクローナル抗体である、請求項154～164のいずれか1つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府の支援

本発明は、国立衛生研究所によって授与された認可番号A1030040およびA1068730の下で政府の支援を受けて行われた。政府は本発明において一定の権利を有する。

技術分野

本発明は、体内の補体カスケードの活性化に関する。特に、本発明は、ナノモルの親和性でC3タンパク質に結合し、強力な補体阻害活性、生理学的pHでの増加した溶解度、血漿安定性およびインビボ保持を示すコンスタチンアナログを提供する。

【背景技術】

【0002】

特許、公開された出願、技術論文および学術論文などのさまざまな刊行物が明細書全体に引用される。これらの引用された刊行物のそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

人間の補体系は、病原性生物に対する防御と免疫反応の媒介において強力な役割を果たす。補体は、古典的経路、レクチン経路、および副経路の3つの異なる経路を介して活性化することができる。3つの経路すべてで共有される主要な活性化イベントは、C3転換酵素による、補体系C3の中心タンパク質の活性化産物C3aおよびC3bへのタンパク質分解による切断である。これらの画分の生成は、C3bおよびiC3bによる病原性細胞のオプソニン化、それらを食作用またはクリアランスの影響を受けやすくするプロセス、および補体受容体との相互作用による免疫細胞の活性化を引き起こす。標的細胞へのC3bの沈着はまた、新しい転換酵素複合体の形成を誘導し、それによって自己増幅ループを開始する。

【0004】

血漿および細胞表面結合タンパク質のアンサンプルは、補体の活性化を注意深く調節して、宿主細胞が補体カスケードによって自己攻撃するのを防ぐ。しかしながら、補体の過剰な活性化または不適切な調節は、自己免疫疾患から炎症性疾患に至るまで、多くの病的状態を引き起こす可能性がある。したがって、治療的補体阻害剤の開発が非常に望ましい。これに関連して、C3およびC3bは、カスケードにおけるそれらの中心的な役割が、補体の開始、増幅、および下流の活性化の同時阻害を可能にするため、有望な標的として浮上している。

【0005】

補体系の異常な活性化に関連する臨床症状の数が増え続けるにつれて、効果的で疾患に合わせた治療に対する需要の高まりに応えるために、補体治療の分野も成長しなければならない。この分野での研究と医薬品開発における多大な継続的な努力にもかかわらず、最初の補体標的薬であるエクリズマブ(Soliris(登録商標)、Alexion)は、発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)の治療に関するFDAの承認後、10年以上市場で唯一の治療薬であり続けている。エクリズマブは、C5に対するヒトモノクローナル抗体であり、C5aおよびC5bへの切断を防ぎ、補体の末端経路の活性化をブロックする。したがって、潜在的な治療薬として追加の補体標的化合物を同定する必要性があり続ける。

【0006】

補体カスケードの中心的成分であるC3のレベルでの上流介入が、さまざまな病原性経路へのC3の関与を考慮して、介入アプローチとして検討されている。約13個のアミノ酸からなる環状ペプチドのグループであるコンスタチンファミリーは、20年前に最初に導入され、ヒトおよび非ヒト霊長類(NHP)からのC3に対して強い結合親和性を示す(Sahuら、1996、The Journal of Immunology 157 : 884-891)。コンスタチンの継続的な研究とさらな

10

20

30

40

50

る開発により、最も強力な誘導体であるCp40を含む、補体阻害活性と標的親和性が改善された多くの次世代アナログがもたらされた(Quら、2011、Mol Immunol 48 : 481-489 ; Quら、2013、Immunobiology 218 : 496-505を参照)。Quら(2013、上記)によって記載されているように、Cp40はC3に対してナノモル以下の結合親和性を持ち、それは、親ペプチドのものよりも約6,000倍高く、血漿半減期が延長されている。しかしながら、水への溶解度が高いにもかかわらず、Cp40は生理的pHでの溶解度が低いため、有効量のCp40を送達するために使用できる投与経路が制限されるだけでなく、注射部位における沈殿が増加し、患者に局所的な刺激や痛みを引き起こす可能性がある。さらに、生理的pHで高い溶解性を有するコンスタチンアナログは、静脈内投与と皮下投与の両方へのその適合性を改善し、後者は、医療システムのコストの削減、投与頻度の削減、利便性とコンプライアンスの向上など、静脈内注射に比べてさまざまな利点を提供する 患者のために、そして自己投与のためのより多くのオプションを提供する。

10

20

30

40

50

【0007】

ペプチド修飾は、溶解度を向上させ、インビボでの化合物の半減期を延長するために使用されてきた。しかしながら、そのような修飾は、化合物の活性および/または結合を低下させることが可能であり、化合物の有益な特性を低下させるか可能性がある。ペグ化は、望ましくない特性を持つ薬物を強化するために使用されており、これらのペグ化化合物は、溶解度が向上する傾向がある。しかしながら、これらの修飾化合物の薬理的活性を維持することは場合によっては課題のままであり、それによって特定の化合物の治療上の利益を制限するため、ペグ化によって与えられる改善された溶解度は、かなりの犠牲を払う可能性がある(たとえば、Zhangら、2014、Expert Opin Drug Metabol Toxicol 10 : 1691-1702を参照)。実際、PEG化はCp40の血漿半減期と溶解度を延長するためにうまく適用されたが、mPEG(40k)に結合したCp40は、C3画分に対する結合親和性の100分の1以上の減少および阻害活性の低下を示したことが報告されている(Risitanoら、2014、Blood 123 : 2019-2101)。さらに、インビボでの薬物クリアランスに関して、身体からのPEGのクリアランスは、PEGのサイズに比例して減少することが報告されている(たとえば、Websterら、2007、Drug Metab & Dispos 35 : 9-16を参照)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上記を考慮して、より大きな活性、インビボ安定性、血漿滞留時間、溶解度および/またはバイオアベイラビリティを有する修飾コンスタチンペプチドの開発が当技術分野における重要な進歩を構成することは明らかである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概略

本発明は、補体阻害ペプチド、コンスタチンのアナログを提供する。特に、コンスタチンアナログは、薬物動態特性を著しく低下させることなくペプチドの溶解度を改善し、場合によっては、予期せぬことに、血漿および硝子体安定性および/またはC3およびその画分に対する結合親和性の向上を付与する、C末端および/またはN末端修飾を備えている。

【0010】

本発明の1つの態様は、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、または配列番号：7によって表されるアミノ酸配列；および同等の条件下で非修飾コンスタチンペプチドと比較して、(1)ペプチドのC3、iC3b、C3bまたはC3c結合親和性、(2)生理学的pHでのペプチドの溶解度、(3)ペプチドの血漿安定性および/または血漿滞留時間、および/または(4)ペプチドの硝子体安定性および/または硝子体滞留時間、を改善する付加された末端成分を含む末端修飾；を有するコンスタチンまたはコンスタチンアナログを含む化合物を特徴とする。

【0011】

末端修飾は、C末端成分またはN末端成分でありうる。いくつかの実施態様では、付加された末端成分は、リシン、アルギニン、オルニチン、またはそれらの任意の組み合わせなどの1つ以上、2つ以上、または3つ以上の親水性/荷電アミノ酸残基を含む。特定の実施態様では、1つ以上の親水性/荷電アミノ酸残基は、リシンである。

【0012】

いくつかの実施態様では、化合物は、配列番号：7(Cp40)で表されるアミノ酸配列を有するコンプスタチンアナログを含む。他の実施態様では、化合物は、配列番号：8、配列番号：9、または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する；好ましくは、アミノ酸配列は、配列番号：9(Cp40-KK)または配列番号：10(Cp40-KKK)によって表される。

【0013】

化合物は、付加的または代替的に、ポリマー成分を含むことができる。そのような成分は、バイオアベイラビリティを増加させるか、または化合物のインビボ保持を延長するのに有用である。特に、付加成分は、短いポリマー、典型的には、約3kDa以下の平均分子量を有するポリエチレングリコール(PEG)である。PEGは、コンプスタチンアナログのNまたはC末端のいずれかに結合する。1つの実施態様では、PEGは、アミド結合を介してN末端に共有結合する。前述の実施態様では、PEGは、約0.5kDa～約3kDaの分子量を有する単分散PEG、約0.5kDa～約3kDaの平均分子量を有する多分散PEGのいずれかでありうる。

【0014】

もう1つの態様では、コンプスタチンペプチドは、アミノ酸配列：Xaa1-Xaa2-Cys-Val-Xaa3-Gln-Xaa4-Xaa5-Gly-Xaa6-His-Xaa7-Cys-Xaa8(配列番号：7)を有し、ここで、Xaa5とXaa6の間のGlyは、主鎖コンホメーションを制限するように任意に修飾される；

ここで、

Xaa1は、不在であるか、またはTyr、D-TyrまたはSarである；

Xaa2は、Ile、GlyまたはAc-Trpである；

Xaa3は、Trpであるか、またはTrpのアナログであり、ここで、Trpのアナログは、Trpと比較して、増加した疎水性特性を有する；

Xaa4は、AspまたはAsnである；

Xaa5は、Trpであるか、またはそのインドール環への化学修飾を含むTrpのアナログであり、ここで、化学修飾は、インドール環の水素結合ポテンシャルを増加させる；

Xaa6は、His、Ala、PheまたはTrpである；

Xaa7は、ArgまたはOrnである；および

Xaa8は、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleであり、ここで、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleのいずれかのカルボキシ末端-OHは、-NH₂によって任意に置換される；および

該ペプチドは、Cys-Cysまたはチオエーテル結合を介して環状である。

【0015】

このような態様では、コンプスタチンペプチドは、同等の条件下で非修飾コンプスタチンペプチドと比較して、(1)ペプチドのC3、iC3b、C3bまたはC3c結合親和性、(2)生理学的pHでのペプチドの溶解度、および/または(3)ペプチドの血漿安定性および/または血漿滞留時間、および/または(4)ペプチドの硝子体安定性および/または硝子体滞留時間；を改善する付加された末端成分を含む末端修飾を包含する。

【0016】

本発明のもう1つの態様では、前述の化合物のいずれか1つを薬学的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物が記載される。医薬組成物は、経口、局所、眼内(硝子体内または眼のインプラントを介してなど)、歯周(歯肉または乳頭内浸潤を介してなど)、肺、皮下、筋肉内、または静脈内を含むさまざまな投与経路用に製剤されうる。いくつかの実施態様では、前述の医薬組成物のいずれか1つの投与を含む補体活性化を阻害する方法が記載される。

【0017】

いくつかの実施態様では、化合物は、平均分子量が約3kDa以下のポリマーに連結された

10

20

30

40

50

コンブスタチンまたはコンブスタチンアナログである。特定の例では、ポリマーは、平均分子量が約3kDa以下のポリエチレングリコール(PEG)である。いくつかの態様では、PEGは、NまたはC末端に連結される。PEGは、単分散または多分散であってもよく、約0.5kDa~3kDaの間の平均分子量を有する。

【0018】

もう1つの態様では、配列番号：9または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含む、からなる、または本質的にからなる新規Cp40アナログが記載される。いくつかの態様において、新規Cp40アナログは、Cp40-KK、Cp40-KKK、mPEG(1K)-Cp40、およびmPEG(3K)-Cp40を包含する。

【0019】

補体活性化に関連する病的状態を有する個体を提供するステップ；本明細書に記載される医薬組成物のいずれか1つの治療有効量を個体に投与するステップ；および病的状態の1つ以上のパラメーターを測定するステップ；を包含する、補体活性化に関連する病的状態を有する個体を治療する方法もまた本明細書に記載される。これらの方法では、医薬組成物の投与は、補体の阻害をもたらす。これらの方法によって治療される病的状態として、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)；デンスデポジット病(DDD)；C3系球体腎炎(C3GN)；C3系球体症；その他の補体媒介性腎症および系球体炎症性疾患；加齢性黄斑変性症(AMD)；黄斑変性症、脈絡膜血管新生(CNV)、網膜血管新生(RNV)、増殖性硝子体網膜症、緑内障、ブドウ膜炎、眼炎、またはこれらの任意の組み合わせを特徴とする任意の眼障害；発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)；寒冷凝集素症(CAD)；温式抗体自己免疫性溶血性貧血(wAIHA)；鎌状赤血球症；移植関連血栓性微小血管症；関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)；いくつかの自己免疫および自己炎症性腎疾患；自己免疫性心筋炎；多発性硬化症；外傷性脳および脊髄損傷；脳、腸および腎の虚血再灌流(IR)損傷；自発的および再発性の妊娠損失；抗リン脂質抗体症候群(APS)；パーキンソン病；アルツハイマー病；異常なシナプスリモデリング、過剰なミクログリア活動および認知機能低下に支えられた他の神経変性炎症状態；喘息；抗核細胞質抗原関連微量免疫性血管炎(ウェゲナー症候群)；天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および表皮水疱症などの非ループス自己免疫性皮膚疾患；心的外傷後ショック、癌；歯周炎；歯肉炎；およびアテローム性動脈硬化症；が挙げられるが、これらに限定されない。

【0020】

いくつかの実施態様では、方法は、約0.125mg/kg~約10mg/kg、または約0.25mg/kg~約5mg/kg、または約0.5mg/kg~約5mg/kg、または約0.5mg/kg~約4mg/kg、または約3mg/kgの治療有効量で静脈内または皮下投与される医薬組成物を使用する。他の実施態様では、医薬組成物は、約0.25mg/kg~約50mg/kg、または約0.25mg/kg~約35mg/kg、または約0.25mg/kg~約10mg/kg、または約0.25mg/kg~約5mg/kg、または約2.5mg/kgの治療有効量で筋肉内投与される。他の実施態様では、医薬組成物は、約1mg/kg~約20mg/kg、または約1mg/kg~約10mg/kg、または約1mg/kg~約5mg/kgの治療有効量で経口投与される。さらに他の実施態様では、医薬組成物は、約1μg~約10mg、または約1μg~約2,000μg、または約1mgの治療有効量で硝子体内投与される。さらにまた他では、医薬組成物は、約1μg~約1,000μg、または約10μg~約200μg、または約20μg~約100μg、または約25μgまたは50μgの治療有効量で歯周投与される。

いくつかの態様では、歯周投与は、歯肉内注射または乳頭内浸潤によって行われる。これらの医薬組成物は、単回投与として、または12時間に1回~3ヶ月に1回(たとえば、2~3日に1回、2週間に1回、または3ヶ月に1回)の範囲の定期的な間隔で投与することができる。

【0021】

方法の他の態様は、約0.125mg/kg~約10mg/kg(または約0.5mg/kg~約3mg/kg)の第1の治療有効用量として個体に静脈内または皮下投与される医薬組成物、および続いて、筋肉内投与の場合、約0.25mg/kg~約50mg/kg、または経口投与の場合、約1mg/kg~約20mg/kgの第2の治療有効維持用量での医薬組成物のさらなる投与を想定している。さらに、筋肉内

10

20

30

40

50

投与の場合、第2の治療有効維持用量は、約0.25mg/kg～約10mg/kgまたは約0.25mg/kg～約5mg/kgでありうる。あるいは、第2の治療有効量は、約1mg/kg～約10mg/kgまたは約1mg/kg～約5mg/kgの範囲で経口投与されうる。

【0022】

本発明のもう1つの態様では、個体を提供するステップ、薬学的に許容される担体および前述の化合物のいずれか1つを含む治療有効量の医薬組成物を個体に投与するステップ；および1つ以上の個体における補体活性化のパラメーターを測定するステップ；を含む、個体における補体活性化を阻害する方法が提供される。この方法で使用される医薬組成物は、上記の製剤および投与量のいずれかを含むことができ、単回投与として、または12時間に1回～3ヶ月に1回(たとえば、2～3日に1回、2週間に1回、または3ヶ月に1回)の範囲の定期的な間隔で投与することができる。医薬組成物は、第1の治療有効用量として(たとえば、静脈内または皮下で)投与され、続いて、第2の治療有効維持用量として(たとえば、筋肉内または経口で)投与されうる。本発明方法で使用されうる治療有効量として、静脈内または皮下で、約0.125～約10mg/kg、約0.25mg/kg～約5mg/kg、約0.5mg/kg～約5mg/kg、約0.5mg/kg～約4mg/kg、または約0.5mg/kg～約3mg/kgの範囲；筋肉内で、約0.25mg/kg～約50mg/kg、約0.25mg/kg～約35mg/kg、約0.25mg/kg～約30mg/kg、約0.25mg/kg～約10mg/kg、約0.25mg/kg～約5mg/kgの範囲；または経口で、約1mg/kg～約20mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、または約1mg/kg～約5mg/kgの範囲が挙げられるが、これらに限定されない。そのような実施態様では、第2の治療有効維持用量は、2～3日に1回または2週間に1回、個体に投与される。いくつかの実施態様では、医薬組成物は、眼のインプラントを介して、約100μg～約50mg(たとえば、約100μg～約10mg、または約100μg～約5mg、または約100μg～約500μg)の治療有効量で投与される。眼のインプラントは、個体(たとえば、ヒト)の眼上または眼内に少なくとも約2日間維持されうる。他の実施態様では、眼のインプラントは、眼上または眼内に少なくとも約1週間維持されうる。さらに他の場合では、眼のインプラントは、眼上または眼内に少なくとも約1ヶ月間維持されうる。

【0023】

本明細書において、もう1つの態様は、生体サンプル中のコンプスタチンアナログの検出方法であって、(1)コンプスタチンアナログ分子の少なくとも一部がC3および/またはその画分であるC3b、iC3b、およびC3cに結合して、複数のC3-結合コンプスタチンアナログ分子を生成する、第1の複数のコンプスタチンアナログ分子を含む生体サンプルを提供するステップ；(2)コンプスタチン分子が、それらの標的であるC3分子から解離する、生体サンプルを熱不活性化して、熱不活性化サンプルを生成するステップ；(3)第2の複数のコンプスタチンアナログ分子が共有結合する、CM5センサーチップを提供するステップ；(4)熱不活性化サンプルを所定量のC3/C3b/iC3b/C3cまたはヒト血漿(C3の供給源として)と混合し、混合物をCM5センサーチップに接触させることによって、生体サンプル中に存在する熱放出コンプスタチンアナログ分子が、固定化されたコンプスタチンアナログ分子とC3への結合を競合するステップ；および(5)CM5チップ上のコンプスタチンアナログ分子への遊離C3/C3b/iC3b/C3cの結合を検出することによって、結合したC3/C3b/iC3b/C3cの減少が、熱不活性化生体サンプル中のコンプスタチンアナログ分子の存在に比例するステップ；を含む方法を提供する。

【0024】

いくつかの実施態様では、検出方法は、表面プラズモン共鳴を利用する。他の実施態様では、生体サンプルは、ヒトまたは非ヒト霊長類から抽出された硝子体液サンプルまたは血漿サンプルである。この方法は、Cp40-KK、Cp40-KKK、mPEG(1K)-Cp40、またはmPEG(3K)-Cp40などの上記の任意のアナログを使用して実施することができる。

【0025】

また、本明細書は、リシン修飾、または非修飾コンプスタチンアナログを検出するための非常に特異的な抗体を生成する方法であって、(a)第1のコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログで第1の哺乳動物に免疫を付与するステップ；(b)第2のコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログが、C末端に結合した1つ以上のリシン残基を有する以外は、

(a)の第1のコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログと同じアミノ酸配列を有する、第2のコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログで第2の哺乳動物に免疫を付与するステップ；(c)注射が、少なくとも2週間の期間中に少なくとも2日に1回行われ、第1の複数の抗体が生成される、第1の哺乳動物に、第1のコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログを注射するステップ；(d)注射が、少なくとも2週間の期間中に少なくとも2日に1回行われ、第2の複数の抗体が生成される、第2の哺乳動物に、第2のコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログを注射するステップ；および(e)第1の複数の抗体および第2の複数の抗体を精製するステップ；を含む方法を提供する。この方法によって産生される第1および第2の抗体は、第2のコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログの抗原から、第1のコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログの抗原を、それぞれ区別することができる。好ましい実施形態では、この方法によって産生される第1および第2の抗体は、モノクローナル抗体である。

10

【0026】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、図面、および実施例を参照することによって理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1のパネルa)は、Cp40およびの一般的な構造とCp40のN末端およびC末端の修飾を描く。図1のパネルb)は、本明細書に記載のCp4系アナログのさまざまな実施態様の概要である。図1のパネルc)は、13.9~18.7分で溶出するCp40およびそのアナログのUV-HPLCクロマトグラムの抜粋である。

20

【図2】図2は、Cp40系アナログのMALDIスペクトルの概要である。図2Aは、以下を示す：パネルa)mPEG(3k)-Cp40、パネルb)mPEG(2k)-Cp40、パネルc)mPEG(1k)-Cp40、パネルd)mPEG(1056)-Cp40、およびパネルe)mPEG(528)-Cp40；図2Bは、以下を示す：パネルa)Cp40、パネルb)Cp40-K、パネルc)Cp40-KK、およびパネルd)Cp40-KKK。

【図3】図3は、ELISAによって測定された例示的なコンプスタチンアナログによる古典的経路補体阻害を示し、各グラフにおけるCp40は、比較のために示されている。y軸は、補体活性の阻害率を表し、x軸は、ペプチドの濃度である。

【図4】図4は、N末端またはC末端で修飾されたCp40と比較した、Cp40の速度論的分析である。各SPRセンサーグラムは、5つの濃度にわたる個々のペプチドの単サイクル動的滴定の少なくとも3つのSPR実験からの代表的な例の分析の結果である(黒：処理されたSPRデータ、灰色：1:1ラングミュアモデルへの動的適合)。

30

【図5】1:1ラングミュア結合モデルへの適合後のSPR実験によって評価された、例示的なCp40系アナログのC3bへの結合のPup5プロファイル。

【図6】図6は、NHPにおけるCp40および例示的な修飾Cp40ペプチドの薬物動態評価である。パネルa)は、ゼロ時点(垂直矢印)での2匹のカニクイザルへの皮下注射を介した単回投与ペプチド投与のスキームを描く。Cp40または修飾Cp40を各動物に注射し(2mg/kg；正味8mg)、さまざまな時点(水滴印)で血液サンプルを採取した。パネルb)は、Cp40の薬物動態プロファイルである。パネルc)は、mPEG(3k)-Cp40の薬物動態プロファイルである。パネルd)は、Cp40-KKの薬物動態プロファイルである。パネルe)は、NHP血漿サンプルのUPLC-ESI-MS分析によって評価された、Cp40-KKKの薬物動態プロファイルである。各動物のC3レベルを、対応する色で点線として示す。

40

【図7】図7のパネルa)およびb)は、UPLC-ESI-MSによって測定された2匹のカニクイザルの血漿サンプル中のCp40-KKの定量を示す。図7のパネルc)およびd)は、UPLC-ESI-MSによって測定された2匹のカニクイザルの血漿サンプル中のCp40-KKKの定量を示す。個々のサンプルで検出された画分、および各サンプル中のペプチドの総量に対応する検出された画分の合計も含まれる。

【図8】図8は、8μMの濃度(実線)で非ヒト霊長類(NHP)血漿にスパイクされたCp40-KKK、および2mg/kg Cp40-KKKをNHPに単回皮下注射を行った後、5分(長い破線)、30分(点線)、1時間(一点鎖線)、2時間(一点鎖線)にて採取された4つの血漿サンプルの重ね合わせたペー

50

スピーク強度(BPI)クロマトグラムの抜粋である。

【図9】図9は、48時間に1回の2mg/kgの静脈内注射を3回行った後のカニクイザルのCp40-KKKの血漿濃度のグラフである。x軸は、質量分析によって測定されたNHP血漿中のペプチド濃度(μM)を表し、y軸は、注射後の時間(時間)を表す。点線は血漿C3の平均レベルを表す。

【図10】図10は、0、8、16、および24時間の時点で行われた2mg/kgのCp40(パネルa)、または0、12、24、および36時間の時点で行われた4mg/kgのCp40(パネルb)の4回の皮下注射後のカニクイザルにおけるCp40のNHP血漿濃度のグラフである。x軸はNHP血漿中のペプチド濃度(μM)を表し、y軸は注射後の時間(時間)を表す。点線は、血漿C3の平均レベルを表す。

10

【図11】図11は、2mg/kgのCp40-KK(パネルa)、Cp40-KKK(パネルb)、mPEG(1k)-Cp40(パネルc)、およびmPEG(3k)-Cp40(パネルd)の単回静脈内注射を行われたカニクイザルにおける経時ペプチド濃度のグラフを表す。x軸は、NHP血漿中のペプチド濃度(nM)を表し、y軸は、注射後の時間(時間)を表す。

【図12】図12は、2mg/kgのCp40-KK(パネルaおよびb)またはCp40-KKK(パネルcおよびd)の単回静脈内注射後のカニクイザルにおけるペプチド切断画分の定量である。x軸は、NHP血漿中のペプチド濃度(nM)を表し、y軸は、注射後の時間(時間)を表す。

【図13】図13は、100mg/kgのCp40(パネルa)、Cp40-KK(パネルb)、およびCp40-KKK(パネルc)の単回静脈内注射後のカニクイザルからのNHP血漿中の経時ペプチド濃度を表す。x軸は、MSによって定量された、NHP血漿中のペプチド濃度(nM)を表し、y軸は、注射後の時間(日数)を表す。

20

【図14】図14は、ELISAプレートに固定されたCp40およびCp40-KKK抗体の特異性を示す例示的な直接ELISAアッセイである。Cp40抗体(AB-101)は、Cp40ペプチドを含む生体サンプル(黒丸)と反応するが、Cp40-KKKペプチド(黒四角)への力価は10分の1になる。同様に、Cp40-KKK抗体(AB-102)は、Cp40-KKKペプチドを含む生体サンプル(網掛けのない四角)と反応が、Cp40ペプチドへの力価は10分の1(網掛けのない丸)になる。y軸は、405nmにおけるOD読み取り値を表し、x軸は、抗血清希釈を表す。

【図15】図15は、ウサギ硝子体サンプルにスパイクされた所定量のCp40-KKKペプチドを実行して得られた代表的な5点標準曲線(パネルa)および単純なウエスタンブロットゲル(パネルb)である。パネルa)では、x軸は、ペプチド濃度(nM)を表し、y軸は、ピーク面積を表す。

30

【図16】図16は、体液中のCp40アナログを定量するためのSPR法の模式図を表す。血漿サンプルを希釈し、95℃にて5分間加熱(#3)した後、遠心分離し、C3またはC3の血漿源(#4)を添加した。次に、サンプルを対応するCp40アナログ固定化チップ上に流した(#5)。

【図17】図17は、所定量のCp40-KKKペプチドをスパイクしたウサギ硝子体サンプルの表面プラズモン共鳴分析によって得られた代表的な標準曲線である。x軸は、ペプチド濃度(nM)を表し、y軸は、相対光単位を表す。

【図18】図18は、単回硝子体内注射後のカニクイザルからの硝子体サンプルにおいて検出された、mPEG(3k)-Cp40(点々のあるバー)、mPEG(1k)-Cp40(チェックのバー)、Cp40-KK(黒いバー)、およびCp40-KKK(白いバー)化合物の濃度を描く。x軸は、500 μg の化合物を注射した後の日数を表し、y軸は、化合物の濃度(nM)を表す。

40

【図19】図19は、精製されたC3bに結合するCp40-KKKのSPRプロファイルである。パネルa)は、陽性対照であり、2、4、8、および16nMの濃度でウサギ硝子体に添加されたCp40-KKによるC3b結合を示す標準曲線である。x軸はペプチド濃度(nM)を表し、y軸は、相対光単位を表す。パネルb)は、Cp40-KKKを注入したNHP硝子体から得られたC3b結合シグナルを表す。y軸は、相対光単位を表す。硝子体チップを固定化する前に、サンプルは、熱不活性化に付される(白いバー)か、または熱不活性化に付されない(黒いバー)かのいずれかであった。

【図20】図20は、ウサギ硝子体の存在(四角)または不在(丸)下で、Cp40(パネルa)、Cp4

50

0-K(パネルb)、Cp40-KK(パネルc)、およびCp40-KKK(パネルd)とともにインキュベートされたヒト眼血漿における古典的補体経路阻害を描く。x軸は、アナログ濃度(nM)を表し、y軸は、C3b沈着の阻害率を表す。

【図21】図21は、Cp40-KK(パネルa)およびCp40-KKK(パネルb)におけるインビボおよびインビトロLys切断の概略である。

【発明を実施するための形態】

【0028】

例示的な実施態様の詳細な説明

定義：

本発明の方法および他の態様に関連するさまざまな用語が、明細書および特許請求の範囲全体で使用される。そのような用語は、特に明記しない限り、当技術分野においてそれらの通常の意味を与えられるべきである。他の具体的に定義された用語は、本明細書で提供される定義と一致する意味で解釈されるべきである。

【0029】

下記の略語が本明細書で使用される：Ac、アセチル基；BSA、ウシ血清アルブミン；DCM、ジクロロメタン；DMF、ジメチルホルムアミド；ELISA、酵素結合免疫吸着アッセイ；ESI、エレクトロスプレーイオン化；Fmoc、9-フルオレニルメトキシカルボニル；MALDI-TOF-MS、マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析；NHP、非ヒト霊長類；PBS、リン酸緩衝生理食塩水；RP-HPCL、逆相高速液体クロマトグラフィー；Sar、N-メチルグリシン；s.c.、皮下；SPR、表面プラズモン共鳴法；TFA、トリフルオロ酢酸；UP LC-ESI-MS、超高速液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化-タンデム質量分析；VBS、ベロナール緩衝生理食塩水；WFI、注射用水。

【0030】

単語の単数形には、複数形が包含され、文脈が明確に指示しない限り、その逆も同様である。「a」、「an」、および「the」への言及は、一般に、それぞれの用語の複数形を含む。たとえば、「化合物」または「方法」への言及は、複数のそのような「化合物」「方法」を包含する。同様に、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、および「含む(comprising)」という単語は、排他的ではなく包含的に解釈されるべきである。同様に、「含む(include)」、「含む(including)」、および「または(or)」という用語は、そのような構成が文脈から明らかに禁止されていない限り、すべて包含的であると解釈されるべきである。

【0031】

「含む(comprising)」または「包含する(including)」という用語は、「本質的にからなる(consisting essentially of)」および「からなる(consisting of)」という用語に含まれる実施態様を包含することを意図している。同様に、「本質的にからなる」という用語は、「からなる」という用語に含まれる実施態様を包含することを意図している。さらに、「本質的にからなる」という用語は、実施態様の範囲を、実施態様の基本的かつ新規な特性に実質的に影響を及ぼさない特定の成分またはステップおよびそれらの成分ステップに限定する。

【0032】

本明細書で使用される用語「約」は、量、時間的な期間などの測定可能な値に関する場合、変動が開示化合物および組成物を調製し、使用するのに適合するように、特定された値からの±20%または±10%、ある実施態様では、±5%、ある実施態様では、±1%、ある実施態様では、±0.1%の変動を包含することを意味する。

【0033】

本明細書で使用される用語「コンプスタチン」は、配列番号：1であるI[CVVQDWGHHRC]T(括弧で示されたジスルフィド結合を介する環式C2-C12)を意味する。用語「コンプスタチンアナログ」は、天然および/または非天然アミノ酸またはアミノ酸アナログの置換、ならびに本明細書でより詳細に記載され、当技術分野で公知であるさまざまなアミノ酸内または間の修飾を含む、修飾されたコンプスタチンを意味する。コンプスタチンまたはコン

10

20

30

40

50

プスタチンアナログ内の特定のアミノ酸またはアナログの位置に関する場合、これらの位置は、1(コンプスタチンのIle)から13(コンプスタチンのThr)まで番号付けられた位置である前記ペプチド内の「位置」として意味することもある。たとえば、Gly残基は「8位」を占める。

【0034】

用語「医薬的に活性な」および「生物学的に活性な」は、C3またはその画分に結合し、補体活性を阻害する本発明化合物の能力を意味する。この生物学的活性は、本明細書でより詳細に記載されるように、1つ以上の数種類の当技術分野で理解されるアッセイによって測定されうる。

【0035】

本明細書で使用される「アルキル」は、約1～約10個の炭素原子、好ましくは、約1～約7個の炭素原子を有する任意に置換される飽和の直鎖、分岐鎖または環式炭化水素(およびその中の炭素原子の範囲および具体的な数のすべての組み合わせおよび部分的な組み合わせ)を意味する。アルキル基として、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、n-ペンチル、シクロペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシル、シクロヘキシル、シクロオクチル、アダマンチル、3-メチルペンチル、2,2-ジメチルブチル、および2,3-ジメチルブチルが挙げられるが、これらに限定されない。用語「低級アルキル」は、約1～約5個の炭素原子を有する任意に置換される飽和の直鎖、分岐鎖または環式炭化水素(およびその中の炭素原子の範囲および具体的な数のすべての組み合わせおよび部分的な組み合わせ)を意味する。低級アルキル基として、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、t-ブチル、n-ペンチル、シクロペンチル、イソペンチルおよびネオペンチルが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0036】

本明細書で使用される「ハロ」は、F、Cl、Br、またはIを意味する。

【0037】

本明細書で使用される「アルカノイル」は、「アシル」と相互に交換可能に用いられてもよく、約1～約10個の炭素原子、好ましくは、約1～約7個の炭素原子を有する任意に置換される直鎖または分岐鎖の脂肪族アシル基(およびその中の炭素原子の範囲および具体的な数のすべての組み合わせおよび部分的な組み合わせ)を意味する。アルカノイル基として、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ペンタノイル、イソペンタノイル、2-メチル-ブチリル、2,2-ジメチルプロピオニル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイルなどが挙げられるが、これらに限定されない。用語「低級アルカノイル」は、約1～約5個の炭素原子を有する任意に置換される直鎖または分岐鎖の脂肪族アシル基(およびその中の炭素原子の範囲および具体的な数のすべての組み合わせおよび部分的な組み合わせ)を意味する。低級アルカノイルとして、ホルミル、アセチル、n-プロピオニル、イソプロピオニル、ブチリル、イソブチリル、ペンタノイル、イソペンタノイルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0038】

本明細書で使用される「アリール」は、約5～約14個の炭素原子、好ましくは、約6～約10個の炭素を有する、任意に置換される単環または二環式芳香族環(およびその中の炭素原子の範囲および具体的な数のすべての組み合わせおよび部分的な組み合わせ)を意味する。非限定的例として、たとえば、フェニルおよびナフチルが挙げられる。

40

【0039】

本明細書で使用される「アラルキル」は、アリール置換基を保有し、約6～約20個、好ましくは、約6～約12個の炭素原子を有する、上記に定義されるアルキル(およびその中の炭素原子の範囲および具体的な数のすべての組み合わせおよび部分的な組み合わせ)を意味する。アラルキル基は、任意に置換されうる。非限定的例として、たとえば、ベンジル、ナフチルメチル、ジフェニルメチル、トリフェニルメチル、フェニルエチルおよびジフェニルエチルが挙げられる。

50

【0040】

本明細書で使用される用語「アルコキシ」および「アルコキシル」は、任意に置換されるアルキル-O-基(アルキルは上記に定義される)を意味する。例示的なアルコキシおよびアルコキシル基として、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、i-プロポキシ、n-ブトキシおよびヘプトキシなどが挙げられる。

【0041】

本明細書で使用される「カルボキシ」は、 $-C(=O)OH$ 基を意味する。

【0042】

本明細書で使用される「アルコキシカルボニル」は、 $-C(=O)O$ -アルキル基(アルキルは、上記に定義される)を意味する。

10

【0043】

本明細書で使用される「アロイル」は、 $-C(=O)$ -アリール基(アリールは、上記に定義される)を意味する。例示的なアロイル基として、ベンゾイルおよびナフトイルが挙げられる。

【0044】

典型的に、置換された化学部分は、分子上の選択された位置で水素を置換する1つ以上の置換基を包含する。例示的な置換基として、たとえば、ハロ、アルキル、シクロアルキル、アラルキル、アリール、スルフヒドリル、ヒドロキシル($-OH$)、アルコキシル、シアノ($-CN$)、カルボキシル($-COOH$)、アシル(アルカノイル： $-C(=O)R$)； $-C(=O)O$ -アルキル、アミノカルボニル($-C(=O)NH_2$)、 $-N$ 置換アミノカルボニル($-C(=O)NHR$)、 CF_3 、 CF_2CF_3 などが挙げられる。前記置換基に関して、各部分 HR は、独立して、たとえば、 H 、アルキル、シクロアルキル、アリールまたはアラルキルのいずれかでありうる。

20

【0045】

本明細書で使用される「L-アミノ酸」は、タンパク質中に通常存在する天然の左旋性アルファ-アミノ酸またはこれらのアルファ-アミノ酸のアルキルエステルのいずれかを意味する。用語「D-アミノ酸」は、右旋性アルファ-アミノ酸を意味する。特に断りがなければ、本明細書に関するすべてのアミノ酸は、L-アミノ酸である。

【0046】

「疎水性」または「非極性」は、本明細書で同意語として用いられ、双極子によって特徴付けされない分子間または分子内相互作用のいずれかを意味する。

30

【0047】

「PEG化」は、少なくとも1つのポリエチレングリコール(PEG)部分が、サイズに関わらず、タンパク質またはペプチドに化学的に結合して、PEG-ペプチド複合体を形成する反応を意味する。「PEG化された」は、少なくとも1つのPEG部分が、サイズに関わらず、ペプチドまたはタンパク質に化学的に結合することを意味する。用語PEGは、一般に、PEGポリマーのおおよその平均分子量を示す語尾の数値を伴い；例えば、PEG-8,000は、約8,000ダルトン(または g/mol)の平均分子量を有するポリエチレングリコールを意味する。

【0048】

「単分散」は、ほぼ同じ質量の鎖長を有する分子から構成されるポリマーを意味する。

【0049】

「多分散」は、ある範囲の分子量にわたる鎖長を有する分子から構成されるポリマーを意味し、ここで、質量は、通常は、平均分子量によって示される。

40

【0050】

本明細書で使用される「医薬的に許容される塩」は、親化合物がその酸性または塩基性塩を作り出すことによって改変される開示化合物の誘導体であって、医薬組成物のいずれの他の成分とも適合性があり、組成物が投与される対象に有害ではないものを意味する。医薬的に許容される塩の例として、塩基性残基の鉱酸または有機酸塩(たとえば、アミン)；酸性残基のアルカリまたは有機塩(例えば、カルボン酸)などが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、用語「酸付加塩」は、酸を付加することによって調製される親化合物の対応する塩誘導体を意味する。医薬的に許容される塩として、たとえば、無機

50

酸または有機酸から形成される親化合物の従来塩または第四級アンモニウム塩が挙げられる。たとえば、このような従来塩として、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸などの無機酸に由来するもの；ならびに酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、2-アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸などの有機酸から調製される塩が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のある酸性もしくは塩基性化合物は、双性イオンとして存在しうる。本化合物のすべての形態(遊離酸、遊離塩基および双性イオンを含む)は、本発明の範囲内であることが企図される。

10

【0051】

特に本発明の化合物の溶解度に関して、本明細書で使用される語句「薬学的に適切な液体」または「薬学的に適切な液体」は、限定的ではないが、生理学的pHを有する緩衝液および他の水溶液、ならびに本明細書で論じられるようなさまざまな経路による薬物の調製および身体への送達に一般的に使用される非水性溶媒および液体媒体を含むがこれらに限定されない流体を集合的に意味する。そのような非水性溶媒および液体媒体として、特に、低級アルコールなどの極性プロトン性および/または非プロトン性非水性有機溶媒、ポリビニルピロリドンなどのメチルおよびビニルピロリドン、メチルスルホニルメタン、ジメチルスルホキシドおよび関連化合物、ポリ乳酸などのヒドロキシおよびポリヒドロキシ酸が挙げられる。この語句は、「臨床的に関連する溶媒」という用語と同じ意味で使用される場合がある。

20

【0052】

本明細書で使用される用語「薬学的に許容される担体」は、コンプスタチンアナログと組み合わせることができ、その組み合わせの後に、コンプスタチンアナログを個体に投与するために使用することができる化学組成物を意味する。

【0053】

本明細書で使用される、医薬組成物の「眼内投与」または「眼投与」は、「硝子体内投与」などの眼への導入を特徴とする任意の投与経路を包含する。医薬組成物の「硝子体内投与」という用語は、眼の硝子体腔への導入を特徴とする任意の投与経路を包含する。「硝子体」は、硝子体腔内のゲル状の物質であり、水晶体と網膜の間の空間を満たし、眼がその形状を維持するのを助ける。

30

【0054】

本明細書で使用される、医薬組成物の「筋肉内投与」は、筋肉への導入を特徴とする任意の投与経路を包含する。

【0055】

本明細書で使用される、医薬組成物の「歯周投与」は、歯(単数または複数)の周囲および/または付近の組織内への投与(たとえば、注射、局所適用、または生分解性インプラントによる)を意味し、「歯肉投与」および「乳頭内浸潤」を包含する。本明細書で使用される、医薬組成物の「歯肉投与」は、歯肉または歯茎への導入を特徴とする任意の投与経路を包含する。「乳頭内浸潤」または「乳頭内浸潤注射」は、歯の頬側および舌側の表面の歯肉の遊離縁に冠状に存在する歯肉(歯茎)組織である、歯間乳頭への医薬組成物の投与を意味する歯肉投与の一種である。

40

【0056】

本明細書で使用される、医薬組成物の「経口投与」または「経腸投与」は、消化管への導入を特徴とする任意の投与経路を包含する。「経口投与」は、経口栄養法および経口胃または胃内強制経口投与を包含する。「経口投与」または「経腸投与」はまた、当技術分野で知られている他の経路の中でもとりわけ、舌下、頬側、鼻腔内、肺または直腸投与を包含しうる。

【0057】

当業者によって理解されるように、「生理学的pH」は、典型的には、7.35~7.45の間に

50

維持されるヒト血液のpHを意味する。本用語書で使用される用語「生理学的pH」は、7.3～7.5のpH範囲を包含する。

【0058】

「治療する」という用語は、疾患または状態の治療または改善の成功のなんらかの兆候を意味する。治療は、たとえば、疾患または状態の症状の1つ以上の重症度を軽減または改善することを包含しうるか、ヒト患者などの個体が経験する疾患、欠陥、障害、または有害な状態などの症状の頻度を減らすことを包含しうる。

【0059】

「予防する」という用語は、ヒト患者などの個体の疾患または状態の予防を意味する。たとえば、炎症性疾患を発症するリスクのある個体が、本発明化合物で、および / または本発明方法を使用して、治療され、その後には疾患または状態を発症しない場合、その個体において疾患は、予防されている。

10

【0060】

用語「治療または予防」は、本明細書では、疾患または状態のあるレベルの治療または改善をもたらす方法を示すために使用されることがあり、状態の完全な予防を含むがこれに限定されない、その目的に向けられた一連の結果を企図する。

【0061】

本明細書で使用される「パラメーター」という用語は、当技術分野で利用可能な適切な測定技術を使用して観察可能または測定可能である任意の身体機能を測定することを意味する。当業者であれば理解するように、身体機能の1つ以上の「パラメーター」を測定することは、平均的な正常パラメーターと比較して特定の機能障害を検出するために使用することができ、また、その身体機能が治療後または治療中に改善されたかどうかを決定するために使用することができる。このようなパラメーターは、たとえば、体温、血圧、脈拍(心拍数)、および呼吸数(呼吸速度)など一般的なものでありうるか、またはたとえば、血液またはその他の臓器/組織からの機能試験結果などの特定の臓器、組織あるいは疾患または状態に固有のものでありうる。

20

【0062】

「治療有効量」または「治療有効用量」という用語は、医薬組成物を投与された個体に有益な効果をもたらすのに十分な医薬組成物の量である。

【0063】

30

説明：

本発明は、部分的には、溶解度の増加および薬物動態パラメーターの改善を示すコンプスタチンアナログを発明者が開発したことから生じる。コンプスタチンまたはコンプスタチンアナログのN末端を小さなポリマー(たとえば、約3,000 Da以下)で修飾すると、臨床的に関連する溶媒への溶解度が改善され、一方で、同時に、同等の条件下で非修飾親化合物と同様の補体阻害活性を有するコンプスタチンアナログが得られる。平均分子量：～500-3,000 Daを有する、多分散、および特に単分散ポリエチレングリコール(PEG)が、特に適切である。

【0064】

さらに、リシンなどの1つ以上の荷電親水性アミノ酸残基の付加によるN末端またはC末端でのコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログの修飾は、コンプスタチンまたはコンプスタチンアナログに改善された薬物動態特性(たとえば、溶解度の増加)を付与することができる。たとえば、本明細書に記載されているのは、ペプチドの溶解度を増加させるだけでなく、C3またはその画分に対するコンプスタチンアナログの滞留時間および結合親和性を予想外に増強する、1つ以上の荷電親水性残基(たとえば、リシン)の付加によるC末端でのコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログの修飾である。非ヒト霊長類における修飾コンプスタチンアナログCp40の薬物動態学的評価により、非修飾Cp40系アナログと同様であるか、またはそれを超える修飾Cp40ペプチドの血漿半減値が明らかになった。したがって、本発明のコンプスタチンアナログは、改善された薬物動態プロファイルならびに生理学的pHでの改善された溶解度を示す。

40

50

【0065】

したがって、本発明による1つの修飾は、以下に詳述するように、コンプスタチン(Ile-Cys-Val-Val-Gln-Asp-Trp-Gly-His-His-Arg-Cys-Thr(環状C2-C12)(配列番号:1)またはそのアナログのC末端に成分を付加することを含み、同等の条件下で非修飾親ペプチドと比較して、同様のC3結合親和性、血漿半減期、および/または補体阻害活性を維持しながら、生理学的pHでのペプチドの溶解度を改善する。たとえば、いくつかの実施態様では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の親水性および/または荷電アミノ酸(たとえば、ArgまたはLys)が、C末端に付加される。いくつかの実施態様では、2つ以上の親水性および/または荷電アミノ酸残基が、コンプスタチンアナログのC末端に付加される。他の実施態様では、3つ以上の親水性/荷電アミノ酸残基が、コンプスタチンアナログのC末端に付加される。特定の実施態様では、親水性/荷電アミノ酸残基は、Lys、Argまたはそれらの組み合わせである。より好ましい実施態様では、1つ以上のリシンアミノ酸残基が、コンプスタチンまたはコンプスタチンアナログに付加される。たとえば、以下により詳述される例示的な実施態様では、1つ以上のリシンアミノ酸残基が、コンプスタチンアナログCp40のC末端に付加される。

10

【0066】

本発明の例示的な実施態様は、2つ以上のリシンアミノ酸残基がC末端に付加されるコンプスタチンアナログCp40を特徴とする。以下および実施例においてより詳述されるように、本発明者らは、Cp40-KKおよびCp40-KKKが、非修飾Cp40と比較して、増加した溶解度を示すだけでなく、驚くべきことに、Cp40および他のCp40系アナログと比較して、増加した血漿および硝子体保持および増強されたC3結合を示すことを発見した。実際、Cp40-KKKは、硝子体内投与後3ヶ月に等しいか、またはそれを超えるインビボ滞留時間を示す。特に、Cp40-KKとCp40-KKKアナログの両方が、Cp40と比較して、著しく改善された薬物動態特性を示す。

20

【0067】

本発明によるもう1つの修飾は、同等の条件下で非修飾親ペプチドと比較して、生理学的pHでのペプチドの溶解度を改善する一方で、同様のC3結合親和性血漿半減期および/または補体阻害活性を維持する成分を、そのコンプスタチンアナログのN末端またはC末端のいずれかもしくは両方に付加することを含む。特定の実施態様では、付加される成分は、以前に使用されたPEGよりも短い鎖長を有する短いポリマー、たとえば、ポリエチレングリコール(PEG)の付加である。本発明によって使用されるPEGは、約500~約5,000、たとえば、500、600、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300、1,400、1,500、1,600、1,700、1,800、1,900、2,000、2,100、2,200、2,300、2,400、2,500、2,600、2,700、2,800、2,900、3,000、3,100、3,200、3,300、3,400、3,500、3,600、3,700、3,800、3,900、4,000、4,100、4,200、4,300、4,400、4,500、4,600、4,700、4,800、4,900、または5,000の平均分子量を有する。好ましい実施態様では、PEGは、5,000未満の平均分子量を有する。1つの実施態様では、コンプスタチンアナログは、一方または両方の末端で、約500~約5,000 Daの平均分子量を有するPEGを含むように修飾される。もう1つの実施態様では、PEGは、約1,000~約3,000 Daの平均分子量を有する。例示的な実施態様では、Cp40系アナログは、約1,000~約3,000 Daの平均分子量を有するN末端PEGを含むように修飾される。

30

40

【0068】

ポリマー修飾は、コンプスタチンまたはコンプスタチンアナログに共有結合する単分散PEGまたは単分散PEGでありうる。たとえば、1つの実施態様では、末端修飾は、約500~約1000の分子量を有する単分散PEGである。他の実施態様では、修飾は、約1,000~約3,000の平均分子量を有する多分散PEGである。単分散PEGは、実質的に単一のピークからPEG化合物の収集を可能にすることにより、化合物の均一な精製を容易にするため、本発明での使用に特に適している(たとえば、図2Aのパネルdおよびeと比較して、パネルa-cを参照)。

【0069】

本発明のコンプスタチンおよびコンプスタチンアナログは、連結基を介してPEGに共有

50

結合させることができる。そのような方法は当技術分野でよく知られている。(Reviewed in Kozlowski A.ら、2001、BioDrugs NMにおいて概説されている：419-29；また、Harris JM and Zalipsky S, eds. Poly(ethylene glycol)、Chemistry and Biological Applications、ACS Symposium Series 680(1997)を参照)。許容しうる連結基の非限定的例として、エステル基、アミド基、イミド基、カルバメート基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、炭水化物、スクシンイミド基(コハク酸スクシンイミジル(SS)、プロピオン酸スクシンイミジル(SPA)、スクシンイミジルカルボキシメチレート(SCM)、スクシンイミジルスクシンアミド(SSA)およびN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)を含むがこれらに限定されない)、エポキシド基、オキシカルボニルイミダゾール基(カルボニルジイミダゾール(CDI)を含むがこれに限定されない)、ニトロフェニル基(ニトロフェニルカーボネート(NPC)またはトリクロロフェニルカーボネート(TPC)を含むがこれに限定されない)、トリシレート基、アルデヒド基、イソシアネート基、ビニルスルホン基、チロシン基、システイン基、ヒスチジン基、一級アミンが挙げられる。特定の実施態様では、連結基は、スクシンイミド基である。1つの実施態様では、連結基は、NHSである。

10

20

30

40

50

【0070】

あるいは、本発明のコンプスタチン薬コンプスタチンは、アミノ基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基またはカルボキシル基を介して、PEGに直接(すなわち、連結基なしで)結合することができる。1つの実施態様では、PEGは、コンプスタチンのC末端に付加されたリシン残基に結合する。特定の実施態様では、PEGは、アミド結合を介してコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログN末端に結合する。

【0071】

いくつかの実施態様では、コンプスタチンまたはコンプスタチンアナログへの修飾は、ペグ化およびC末端への1つ以上の親水性または荷電アミノ酸残基の付加の両方を含む。これらの実施態様の特定のものでは、PEGは、アミド結合を介してコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログN末端に向けて結合され、PEGは、約500～約3,000の平均分子量、または単分散の場合はその範囲の実際の分子量でを有する。これらの実施態様の特定のものでは、1つ以上のリシン残基が、C末端に共有結合する。

【0072】

ポリマーとしてPEG(mw 500～3,000 DA)および荷電残基としてリシンを利用する例示的な実施態様では、成分のさまざまな配置は、次のように選択されうる(ここで、「Comp A」は、「コンプスタチンアナログ」を表す)：

PEG-Comp A

Comp A-Lys₍₁₋₃₎

PEG-Comp A-Lys₍₁₋₃₎

Comp A-Lys₍₁₋₃₎-PEG

PEG-Comp A-Lys₍₁₋₃₎-PEG

【0073】

これらの修飾されたコンプスタチンアナログの分子量は、PEGのサイズを変更することによって増加または減少させることができる。多分散PEG、単分散PEG、ヘテロ二官能性および分岐PEGを含む、さまざまな市販のPEGも当業者に理解されるであろう(たとえば、Creative PEGWorks、Chapel Hill、NC；XL-Protein GMBH、フライジング、ドイツ；BroadPharm、サンディエゴ、カリフォルニア州を参照)

【0074】

コンプスタチンアナログのN末端がポリマーで修飾されていない場合(すなわち、上記の例示的なシリーズの配置が、Comp A-Lys₍₁₋₃₎またはComp A-Lys₍₁₋₃₎-PEGである場合)、次に、N末端を別の方法で修飾することができる。たとえば、アルブミン結合小分子(例えば、ABM2)が、N末端に連結することができる。このタイプの特定の実施態様は、C末端に連結された1～3個の荷電残基(たとえば、Lys)およびアミド結合を介してN末端に連結されたABM2を含むコンプスタチンアナログCp40を特徴とする。

【0075】

本明細書に記載のN末端および/またはC末端修飾は、同等の条件下で非修飾ペプチドと比較して、約7.3~約7.5のpHの流体におけるコンスタチンまたはコンスタチンアナログの溶解度を増加させる。特定の実施態様では、溶解度の増加は、少なくとも約5倍である。特定の実施態様では、溶解度の増加は、少なくとも約5倍である。特定の実施態様では、溶解度の増加は、同等の条件下で非修飾ペプチドと比較して、少なくとも約10倍、または少なくとも約20倍、または少なくとも約30倍、または少なくとも約40倍、または少なくとも約50倍、または少なくとも100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、または500倍またはそれ以上である。さらに、特定の態様では、本明細書に記載のN末端および/またはC末端修飾を含むコンスタチンまたはコンスタチンアナログは、同等の条件下で非修飾ペプチドと比較して、補体阻害活性において約2分の1未満の減少を示す。さらに、好ましい実施態様では、本明細書に記載のN末端および/またはC末端修飾を含むコンスタチンまたはコンスタチンアナログは、同等の条件下で非修飾ペプチドと比較して、C3結合親和性において約5分の1未満の減少を示す。いくつかの態様では、本明細書に記載のN末端および/またはC末端修飾を含むコンスタチンまたはコンスタチンアナログは、同等の条件下で非修飾ペプチドと比較して、C3結合親和性において約10分の1未満の減少を示す。他の態様では、本明細書に記載のN末端および/またはC末端修飾を含むコンスタチンまたはコンスタチンアナログは、同等の条件下で非修飾ペプチドと比較して、C3結合親和性において増加を示す。

10

20

30

40

50

【0076】

例示的な例として、mPEGの結合によるCp40のN末端修飾は、親化合物であるCp40と比較した場合、そのリガンドであるC3との会合定数(k_a)の約3~6分の1への減少をもたらしたが、解離定数(k_d)に有意な変化は見られなかった。Cp40(K_D , 0.5 nM)と比較した場合、特に、より大きなPEG鎖(mPEG(3k)-Cp40, 7.9 nM ; mPEG(2k)-Cp40, 4.4 nM)を有するアナログでは、より低い k_a 値が、より低い親和性値に反映された。しかしながら、明らかにより低い親和性は、アナログの補体阻害活性に有意な影響を与えなかった(実施例の表2を参照)。同様に、Cp40へのLys残基の付加は、上記の生化学的パラメーターのいずれにも有意な影響を与えず、このことは、選択した修飾が、アナログおよびそのリガンドであるC3との間の相互作用に大きな変化を引き起こさなかったことを示す(表2)。解離 K_D が化合物の滞留時間にとって最も重要であることが強調される。

【0077】

本明細書に記載のC末端および/またはN末端修飾は、コンスタチン自体またはその任意のアナログに適用することができる。本明細書に開示されるN末端および/またはC末端修飾と共に使用するのに適したコンスタチンアナログの非限定的な例を、以下に詳述する。

【0078】

コンスタチンアナログ

上記のN末端およびC末端修飾は、活性を改善することが以前に示されたコンスタチンの他の修飾と組み合わせることができ、それにより、著しく改善された補体阻害活性を有するペプチドが生成される。たとえば、N末端がペグ化されていない実施態様では、N末端はアセチル化される。さらに、9位のHisをAlaに置換すると、コンスタチンの活性が改善されることが知られており、本発明のペプチドの好ましい修飾でもある。

【0079】

4位のTrpおよび特定のTrpアナログ、ならびに7位の特定のTrpアナログは、特に9位のAlaと組み合わせると、コンスタチンよりもはるかに大きな活性が得られることが、WO2004/026328およびWO2007/0622249に開示された。これらの修飾は、本発明においても有利に使用される。

【0080】

特に、4位に5-フルオロ-トリプトファン、または5-メトキシ-、5-メチル-または1-メチル-トリプトファンのいずれか、または1-ホルミル-トリプトファンを含むペプチドは、非修飾コンスタチンよりもはるかに高い活性を有することが示されている。特に好ましい

のは、1-メチルおよび1-ホルミルトリプトファンである。インドールの「N」を介した水素結合は、コンスタチンの結合および活性にとって、4位では必要ではないと考えられている。この水素結合、または4位の水素を低級アルキル、アルカノイルまたはインドール窒素で置き換えることによる極性特性の低下がないことは、コンスタチンの結合および活性を増強する。特定の実施態様では、コンスタチンの4位のTrpは、1-アルキル置換基、より具体的には上記で定義された低級アルキル(たとえば、C₁-C₅)置換基を含むアナログで置き換えられる。これらとして、N()メチルトリプトファンおよび5-メチルトリプトファンが挙げられるが、これらに限定されない。他の実施態様では、他の選択された、コンスタチンの4位のTrpは、1-アルカノイル置換基、より具体的には上記で定義された低級アルカノイル(たとえば、C₁-C₅)置換基、たとえば、N()ホルミルトリプトファン、1-アセチル-L-トリプトファンおよびL- -ホモトリプトファンを含むアナログで置き換えられる。

10

【0081】

コンスタチンの7位に5-フルオロ-トリプトファンを組み込むと、コンスタチンと比較して、得られるコンスタチンアナログとC3の間の相互作用のエンタルピーが増加することが、4位で5-フルオロ-トリプトファンを組み込むと、この相互作用のエンタルピーが減少することが、WO2007/0622249に開示された。したがって、WO2007/062249に記載されているような7位でのTrpの修飾は、上記のN末端修飾と組み合わせた有用な修飾として企図される。

20

【0082】

WO2007/062249に記載の例示的コンスタチンアナログは：

Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa3-Gly-Xaa4-His-Arg-Cys-Xaa5(cyclic C2-C12)(配列番号：2)である；ここで：

Xaa1は、Ile、Val、Leu、Ac-Ile、Ac-Val、Ac-LeuまたはGly-Ileを含むジペプチドである；

Xaa2は、TrpまたはTrpのアナログであり、ここで、Trpのアナログは、Trpと比較して増加した疎水性を有し、ただし、Xaa3がTrpである場合、Xaa2は、Trpのアナログである；

Xaa3は、Trpまたはそのインドール環への化学修飾を含むTrpのアナログであり、ここで、化学修飾は、インドール環の水素結合ポテンシャルを増加させる；

30

Xaa4は、His、Ala、PheまたはTrpである；

Xaa5は、L-Thr、D-Thr、Ile、Val、Gly、Thr-Asnを含むジペプチド、またはThr-Alaを含むジペプチド、またはThr-Ala-Asnを含むトリペプチドであり、ここで、L-Thr、D-Thr、Ile、Val、GlyまたはAsnのいずれかのカルボキシ末端-OHは、-NH₂によって任意に置換される；および

2つのCys残基は、ジスルフィド結合によって結合される。

【0083】

さまざまな実施態様では、Xaa2のTrpのアナログは、5-フルオロ-1-トリプトファンまたは6-フルオロ-1-トリプトファンなどのハロゲン化Trpである。他の実施態様では、Xaa2におけるTrpアナログは、5位に低級アルコキシまたは低級アルキル置換基を含み、たとえば、5-メトキシトリプトファンまたは5-メチルトリプトファンである。他の実施態様では、Xaa2におけるTrpアナログは、1位に低級アルキルまたは低級アルカノイル置換基を含み、たとえば、1-メチルトリプトファンまたは1-ホルミルトリプトファンである。他の実施態様では、Xaa3のTrpのアナログは、5-フルオロ-1-トリプトファンまたは6-フルオロ-1-トリプトファンなどのハロゲン化Trpである。

40

【0084】

特定の実施態様では、Xaa2は、トリプトファンの1位に低級アルカノイルまたは低級アルキル置換基を含み、Xaa3は、ハロゲン化トリプトファンを任意に含み、Xaa4は、Alaを含む。

【0085】

配列番号：1および2にさまざまな修飾を加えた他のクラスのコンスタチンアナログは

50

、WO2010/127336に記載されている。その文献に開示されている1つの修飾は、ペプチドの8位におけるペプチド骨格の制限を含む。特定の実施態様では、骨格は、8位のグリシン(Gly⁸)をN-メチルグリシンに置き換えることによって制限される。その文献に開示されている別の修飾は、13位のThrをIle、Leu、Nle(ノルロイシン)、N-メチルThrまたはN-メチルIleに置き換えることを含む。このクラスのアナログは、以下の配列：

Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa3-Gly-Xaa4-His-Arg-Cys-Xaa5(環状C2-C12)(配列番号：3)によって表される；ここで：

8位のGlyは、その位置でのペプチドの主鎖コンホメーションを制限するように修飾され、ここで：

Xaa1は、Ile、Val、Leu、Ac-Ile、Ac-Val、Ac-LeuまたはGly-Ileを含むジペプチドである；

Xaa2は、TrpまたはTrpのアナログであり、ここで、Trpのアナログは、Trpと比較して増加した疎水性を有する；

Xaa3は、Trpまたはそのインドール環への化学修飾を含むTrpのアナログであり、ここで、化学修飾は、インドール環の水素結合ポテンシャルを増加させる；

Xaa4は、His、Ala、PheまたはTrpである；および

Xaa5は、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleであり、ここで、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleのいずれかのカルボキシ末端-OHは、-NH₂によって任意に置換される。

【0086】

このクラスのアナログの実施態様では、Xaa2のTrpアナログは、5位に低級アルコキシまたは低級アルキル置換基を含み、たとえば、5-メトキシトリプトファンまたは5-メチルトリプトファンである；または1位に低級アルキルまたは低級アルカノイル置換基を含み、たとえば、1-メチルトリプトファンまたは1-ホルミルトリプトファンである。他の実施態様では、Xaa3のTrpのアナログは、5-フルオロ-1-トリプトファンまたは6-フルオロ-1-トリプトファンなどのハロゲン化トリプトファンである。

【0087】

このクラスのアナログの特定の実施態様では、8位のGlyは、N-メチル化され、Xaa1は、Ac-Ileであり、Xaa2は、1-メチル-Trpまたは1-ホルミル-Trpであり、Xaa3は、Trpであり、Xaa4は、Alaであり、およびXaa5は、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleである。特に、Xaa5は、Ile、N-メチルThrまたはN-メチルIleであってもよい。特に、コンプスタチンアナログは、アナログCp20：

Ac-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH₂(配列番号：4)を含む。

【0088】

コンプスタチンアナログへのもう1つのタイプの修飾は、WO2012/040259に記載されている。1つのこのような修飾は、CH₂の付加によりC2-C12ジスルフィド結合を置き換えることにより、C2またはC12にホモシステインを形成すること、およびチオエーテル結合の導入により、ガンマシスタチオニンまたはデルタシスタチオニンなどのシスタチオニンを形成することを含む。もう1つの修飾は、CH₂を付加することなくチオエーテル結合でC2-C12ジスルフィド結合を置き換えることにより、ランチチオニン(lantithionine)を形成することを含む。チオエーテル結合を含むアナログは、特定のジスルフィド結合アナログと実質的に同じである活性を実証し、等価または改善された安定性を有する。

【0089】

新しい薬物動態特性を有する新規化合物を生成するための、本発明のC末端またはN末端修飾のためのペプチド足場として特に適した別のクラスのコンプスタチンアナログが、WO 2013/036778に記載されている。このクラスのアナログは、アミノ酸配列：Xaa1-Xaa2-Cys-Val-Xaa3-Gln-Xaa4-Xaa5-Gly-Xaa6-His-Xaa7-Cys-Xaa8(配列番号：5)によって表される；ここで、Xaa5とXaa6の間のGlyは、主鎖コンホメーションを制限するように任意に修飾される；ここで：

10

20

30

40

50

Xaa1は、不在であるか、またはTyr、D-TyrまたはSarである；
 Xaa2は、Ile、GlyまたはAc-Trpである；
 Xaa3は、TrpまたはTrpのアナログであり、ここで、Trpのアナログは、Trpと比較して増加した疎水性を有する；
 Xaa4は、AspまたはAsnである；
 Xaa5は、Trpまたはそのインドール環への化学修飾を含むTrpのアナログであり、ここで、化学修飾は、インドール環の水素結合ポテンシャルを増加させる；
 Xaa6は、His、Ala、PheまたはTrpである；
 Xaa7は、ArgまたはOrnである；および
 Xaa8は、Thr、Ile、Leu、Nle、N-メチルThrまたはN-メチルIleであり、ここで、Thr、Ile、Leu、Nle、またはN-メチルThrもしくはN-メチルIleのいずれかのカルボキシ末端-OHは、-NH₂によって任意に置換され、ペプチドは、Cys-Cysまたはチオエーテル結合を介して環状である。

10

20

30

40

40

10

50

【0090】

Xaa3のTrpのアナログは、5-フルオロ-1-トリプトファンまたは6-フルオロ-1-トリプトファンなどのハロゲン化トリプトファンであってもよい。Xaa3におけるTrpアナログは、5位に低級アルコキシまたは低級アルキル置換基を含んでもよく、たとえば、5-メトキシトリプトファンまたは5-メチルトリプトファンであってもよい。他の実施態様では、Xaa3におけるTrpアナログは、1位に低級アルキルまたは低級アルカノイル置換基を含み、例示的実施態様は、1-メチルトリプトファンまたは1-ホルミルトリプトファンを含む。他の実施態様では、Xaa5のTrpのアナログは、5-フルオロ-1-トリプトファンまたは6-フルオロ-1-トリプトファンなどのハロゲン化トリプトファンである。いくつかの実施態様では、Xaa5とXaa6の間のGlyは、N-メチルGly(Sar)で置き換えられる。

【0091】

このクラスの例示的コンプスタチンアナログは、以下のとおりである：

Cp30：

Sar-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH₂

(配列番号：6)

Cp40：

DTyr-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH₂

(配列番号：7)

【0092】

本明細書の実施例に記載されるように、本発明による例示的なN末端およびC末端修飾されたアナログは、アナログCp40を修飾することによって作製された。

【表1】

表1. C末端修飾Cp40系アナログ

アナログ	配列*	配列番号
Cp40**	DTyr-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asn-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH ₂	7
Cp40-K	DTyr-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asn-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-Lys-NH ₂	8
Cp40-KK	DTyr-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asn-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-Lys-Lys-NH ₂	9
Cp40-KKK	DTyr-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asn-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-Lys-Lys-Lys-NH ₂	10

*角括弧は、Cys-Cys結合を示す。

**Cp40は、比較のために示される。

【0093】

PEG化またはLys残基の添加により、生理学的pHにおけるCp40の溶解度が増加した。同時に、Cp40の好ましいC3阻害活性は修飾の影響を受けず、驚くべきことに、C3に対するLys

誘導体の結合親和性は、親化合物Cp40の結合親和性よりもさらに強かった。さらに、Cp40変異体は、非ヒト霊長類への皮下、静脈内、硝子体内、および/または筋肉内投与後に、同様または延長された半減期を示したが、Cp40変異体が使用された場合、C3濃度は長期間飽和した。

【 0 0 9 4 】

mPEG(3k)-Cp40、Cp40-KK、およびCp40-KKKと命名された、実施例に記載されているように評価されたものの中で最も有望な化合物は、親ペプチドであるCp40と比較した場合、それらの溶解度の劇的な改善(>200倍)を示した。最も重要なことに、新規アナログは、Cp40と比較した場合、阻害活性を維持し、改善された薬物動態プロファイルを示した。非ヒト霊長類に2mg/kgの個々のアナログを皮下投与したインビボ研究は、mPEG(3k)-Cp40が、Cp40化合物よりも、より高い c_{max} (~2倍)、より長いC3飽和時間(~34時間)、わずかに長い $t_{1/2}$ (~15時間)、増加した AUC_{0-t} (~2.7倍)および減少したCL/F(~3倍)を有することを示した。Lysの残基が付加されたアナログのうち、Cp40-KKKが最も特徴が強化された候補であるように見えた。この効果は、Cp40-KKKが複数回の皮下注射によって投与されたときに、さらに顕著であった。インビボ薬物動態研究は、Cp40-KKKの皮下投与が、mPEG(3k)-Cp40が、Cp40よりも、より高い c_{max} (~2倍)、より長いC3飽和時間(~42時間)、増加した AUC_{0-t} (~2.6倍)および減少したCL/F(~3倍)に関連することを示した。個々のアナログのさらなる薬物動態研究は、単回の静脈内注射後に、Cp40-KKKが、Cp40-KKより3.5倍以上大きく、mPEG(1k)-Cp40およびmPEG(3k)-Cp40に匹敵する AUC_{0-120} 時間の値を示すことを明らかにした。これらの静脈内PK研究では、mPEG(3k)-Cp40は、他のアナログと比較した場合、少なくとも、~30時間延長された $t_{1/2}$ を示し、最も強化された特性を有するよう見えた。さらに、非ヒト霊長類に0.5mgのCp40-KK、Cp40-KKK、mPEG(1k)-Cp40、またはmPEG(3k)-Cp40を硝子体内(ivt)投与したインビボ研究は、PEG化Cp40アナログについては少なくとも14日、Cp40-KKおよびCp40-KKKについては73日を超える硝子体内滞留時間を明らかにした。さらに、Cp40-KKKは、90日後でさえもC3飽和レベルにおいて硝子体滞留時間を示した。

【 0 0 9 5 】

これらの新規アナログに関連する溶解度および薬物動態プロファイルの全体的な改善は、薬物投与の頻度を減らし、注射部位での局所刺激を最小限に抑える可能性によって強化される。さらに、本明細書に記載の薬物動態研究は、これらの化合物の長期全身投与に有利な薬物動態が、Cp40と比較して著しく改善されていることを示す。

【 0 0 9 6 】

したがって、特定の実施態様では、配列番号：7に基づく化合物が提供され、この化合物は、少なくとも1つのリシンアミノ酸がC末端に共有結合する。いくつかの実施態様では、少なくとも2つのリシンアミノ酸がC末端に共有結合し、他の実施態様では、3つ以上のリシンアミノ酸がC末端に共有結合する。好ましい実施態様では、2または3個のリシンアミノ酸がC末端に共有結合する、配列番号：7に基づく化合物が提供される。他の実施態様では、配列番号：9または配列番号：10からなる化合物が提供される。さらに他の実施態様では、化合物は、本質的に配列番号：9または配列番号：10からなる。たとえば、1つの実施態様では、配列番号：10(Cp40-KKK)で表されるアミノ酸配列を有する化合物が提供され、ここで、化合物は、配列番号：7(Cp40)で表されるアミノ酸配列を有する化合物と比較して、溶解度、血漿滞留時間、硝子体滞留時間、および/またはC3結合の増加を示す。

【 0 0 9 7 】

小さいポリマー、小さいPEGの付加、および/または親水性または荷電残基のC末端付加は、当技術分野で知られている他のクラスのコンプスタチンアナログに適用することができる。これらは、WO2012/155107、WO2013/036778、WO2014/078731、WO2014/078734、WO2014/152931およびWO2017/062879に記載のアナログを包含するが、これらに限定されない。

【 0 0 9 8 】

本発明の修飾されたコンプスタチンペプチドは、従来のペプチド合成方法に従って、1つ以上のアミノ酸残基の縮合を介したペプチド合成のさまざまな合成方法によって調製す

10

20

30

40

50

ることができる。たとえば、ペプチドは、標準的な固相方法論に従って合成される。固相方法論または液相で、のいずれかによって、ペプチドまたはペプチド模倣物を合成する他の方法は、当業者によく知られている。ペプチド合成の過程で、一般に知られている保護基を使用して、必要に応じて分枝鎖アミノ基およびカルボキシル基を保護/脱保護することができる。ペプチドおよびペプチド誘導体のための代替の保護基を利用する修飾は、当業者には明らかであろう。

【0099】

あるいは、本発明の特定のペプチドは、適切な原核生物または真核生物系での発現によって産生されうる。たとえば、DNA構築物は、細菌細胞(*E. coli*など)または酵母細胞(*Saccharomyces cerevisiae*など)での発現に適合したプラスミドベクターに、または昆虫細胞での発現のためのバキュロウイルスベクター、または哺乳動物細胞で発現するためのウイルスベクターに挿入することがされうる。このようなベクターは、宿主細胞におけるDNAの発現を可能にするように配置された、宿主細胞におけるDNAの発現に必要な調節エレメントを含む。発現に必要なそのような調節エレメントには、プロモーター配列、転写開始配列、および任意に、エンハンサー配列が含まれる。

10

【0100】

ペプチドはまた、インビトロまたはインビボで核酸分子を発現させることによって産生することができる。ペプチドのコンカテマー(コンカテマーの上限は、利用される発現系に依存する)をコードするDNA構築物は、インビボ発現系に導入されうる。コンカテマーが生成された後、C末端Asnおよびそれに続くN末端Glyとの間の切断は、ポリペプチドをヒドラジンに曝露することによって達成される。

20

【0101】

組換え原核生物または真核生物系における遺伝子発現によって産生されたペプチドは、当技術分野で知られている方法に従って精製することができる。遺伝子発現と合成方法の組み合わせもまた、コンプスタチンアナログを生成するために利用されうる。たとえば、アナログは、遺伝子発現によって生成され、その後、例えば、NまたはC末端を修飾して分子を環化するために、1回以上の翻訳後合成プロセスに供されうる。

【0102】

非天然アミノ酸、たとえば、メチル化アミノ酸を組み込んだペプチドは、適切な原核生物または真核生物系でのインビボ発現によって産生されうるのが有利である。たとえば、Katragadda & Lambris(2006、Protein Expression and Purification 47:289-295)によって記載された、*E. coli*栄養要求株での発現を介してコンプスタチンに非天然Trpアナログを導入する方法などを利用して、N-メチル化または他の非天然アミノ酸を、コンプスタチンの選択した位置に導入することができる。

30

【0103】

コンプスタチンの構造は、当技術分野で知られており、前述のアナログの構造は同様の方法で決定される。短いペプチドの特定の所望のコンホメーションが確認されると、そのコンホメーションに適合するようにペプチドペプチド模倣物を設計するための方法は、当技術分野で周知である。本発明に特に関連して、ペプチドアナログの設計は、上記のように、アミノ酸残基のさまざまな側鎖の寄与(すなわち、官能基の効果のため、またに立体的考察のための)を考慮することによってさらに洗練されうる。

40

【0104】

当業者は、ペプチド模倣物が、C3への結合および補体活性化の阻害に必要な特定の主鎖コンホメーションおよび側鎖官能性を提供するためのペプチドと同等に役立つ可能性があることを理解するであろう。したがって、結合して適切な主鎖コンホメーションを形成することが可能な天然に存在するアミノ酸、アミノ酸誘導体、アナログまたは非アミノ酸分子のいずれかを使用することにより、C3結合、補体阻害化合物を生成することが本発明の範囲内であると考えられる。非ペプチドアナログ、またはペプチドおよび非ペプチド成分を含むアナログは、本発明のペプチドの置換または誘導を指定するために、本明細書において「ペプチド模倣物」または「等価模倣物」と称されることがあり、補体活性化を阻害

50

するように例示されたペプチドに十分に類似するように、同じ主鎖コンホメーションの特徴および/または他の官能性を有する。

【0105】

高親和性ペプチドアナログの開発のためのペプチド模倣物の使用は、当技術分野でよく知られている(たとえば、Vagnerら、2008、Curr. Opin. Chem. Biol. 12:292-296; Robinsonら、2008、Drug Disc. Today 13:944-951を参照)。ペプチド内のアミノ酸残基と同様の回転制限を仮定して、非アミノ酸部分を含むアナログを分析することができ、それらのコンフォメーションモチーフを、当技術分野で周知の様々な計算技術によって検証することができる。

【0106】

コンスタチンアナログの使用および治療的投与

コンスタチンアナログ、ペプチド模倣物および複合体の補体阻害活性は、当技術分野で知られているさまざまなアッセイによって試験することができる。特定の実施態様では、実施例に記載のアッセイが利用される。その他のアッセイの非包括的リストは、米国特許6,319,897、WO99/13899、WO2004/026328、WO2007/062249およびWO2010/127336に記載され、限定的ではないが、(1)C3およびC3画分へのペプチド結合；(2)さまざまな溶血アッセイ；(3)C3の転換酵素媒介性切断の測定；および(4)D因子によるB因子の切断の測定；を包含する。

【0107】

本明細書に記載のペプチドおよびペプチド模倣物は、当技術分野で知られているように、コンスタチン自体が利用される任意の目的のために実用的である。このような使用として、(1)限定的ではないが、加齢性黄斑変性症、地図状萎縮、脈絡膜血管新生、網膜血管新生、眼の炎症、血液透析誘発性炎症、緑内障、ブドウ膜炎、糖尿病性網膜症、関節リウマチ、脊髄損傷、外傷性脳損傷、脳虚血/再灌流障害(たとえば、脳卒中)、急性多発外傷(出血性ショック)、パーキンソン病、アルツハイマー病、癌、敗血症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、自己免疫病因の溶血性障害(寒冷凝集素症およびwAIHA)、乾癬、および喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アレルギー性炎症、肺気腫、気管支炎、気管支拡張症、嚢胞性線維症、結核、肺炎、呼吸窮迫症候群(RDS-新生児および成人)、鼻炎および副鼻腔炎などの呼吸器疾患、移植関連血栓性微小血管症、皮膚炎症性疾患、歯周炎、歯肉炎、補体関連腎疾患などの、特定の疾患または状態の治療を促進することができる、患者(ヒトまたは動物)の血清中、および細胞、組織、臓器内の補体活性化を阻害すること；(2)細胞または臓器移植中、または人工臓器またはインプラントの使用において起こる補体活性化を阻害すること(たとえば、医療手当前、医療手当中および/または医療手当後の時間制限された全身投与によるか、またはコーティングすることによる、あるいは細胞、臓器、人工臓器またはインプラントを本発明のペプチドでコーティングするか、もしくは別の方法で処理することによって)；(3)生理液(血液、尿)の体外シャント中に発生する補体活性化を阻害すること(たとえば、医療手当前、医療手当中および/または医療手当後の時間制限された全身投与によるか、またはそれを通して液体がシャントされる管を本発明のペプチドでコーティングすることによって)；(4)コンスタチン活性化の他の阻害剤を同定するための小分子ライブラリーのスクリーニング(たとえば、C3またはC3画分との結合につ

【0108】

上述の用途の1つ以上を実施するために、本発明の別の態様は、本明細書に記載および例示されるコンスタチンアナログまたは複合体を含む医薬組成物を特徴とする。そのような医薬組成物は、対象への投与に適した形態の有効成分のみからなりうるか、または医薬組成物は、有効成分および1つ以上の薬学的に許容される担体、1つ以上の追加の成分、あるいはこれらの何らかの組み合わせを含みうる。有効成分は、当技術分野で周知のように、生理学的に許容されるカチオンまたはアニオンと組み合わせるなど、生理学的に許容

10

20

30

40

50

されるエステルまたは塩の形態で医薬組成物中に存在しうる。

【0109】

本発明の特定のコンプスタチンアナログは、その溶解特性に基づいて、特定の製剤のために選択されうる。上述したように、水または緩衝生理食塩水に非常に溶解しやすいアナログは、注射量を最小限に抑えることができるため、全身注射に特に適している可能性がある。比較すると、水溶性が高く、緩衝生理食塩水への溶解度が低いアナログは、眼内注射(硝子体内注射を含む)などの局所適用または局所注射用のより長持ちするゲル、懸濁液または沈殿物を生成する可能性がある。

【0110】

このように、特定の実施態様では、Cp40系のコンプスタチンアナログは、皮下、静脈内、眼内(硝子体内を含む)、筋肉内注射、歯周投与(歯肉投与または乳頭内浸潤注射を含む)、または局所投与を介して投与される。さらに他の実施態様では、Cp40アナログは、経口送達される。いくつかの実施態様では、Cp40系アナログは、単回の経口、皮下、静脈内、眼内(硝子体内を含む)、筋肉内注射、歯周投与、または局所投与として投与される。他の実施態様では、複数回の経口、皮下、静脈内、眼内(硝子体内を含む)、筋肉内注射、歯周投与、または局所投与を介して投与される。さらに他の実施態様では、Cp40系アナログは、既知のコンプスタチンアナログについて以前に記載された方法と比較して、より少ないアナログの投与量およびより少ない頻度の投与間隔を可能にするために、初回の皮下、静脈内、または筋肉内負荷用量と、長期間にわたる経口、筋肉内、皮下、静脈内の反復投与を組み合わせる。さらに他の実施態様では、維持投与は、皮下注入ポンプまたは眼のインプラントによるCp40アナログ送達を介して行われる(たとえば、US2016/0060297、およびUS 6,692,759を参照)。

【0111】

医薬組成物の製剤は、製薬技術の分野で既知の方法または今後開発される任意の方法によって調製されてもよい。一般に、そのような調製方法は、有効成分を担体または1つ以上の他の付属成分と結合させるステップを含み、次に、必要に応るか、または望ましい場合、製品を所望の単回または複数回投与単位に成形または包装する。

【0112】

本発明を実施するのに有用な医薬組成物は、単回ボラスとして、または硝子体内用量として1 μ g~約10mgの間で、または繰り返し投与計画で、または当業者によって容易に決定されるそれらの組み合わせで、0.125mg/kg~50mg/kg体重の間の用量を送達するように投与されうる。特定の実施態様では、投与量は、毎日、または別の適切な定期投与計画で、少なくとも0.05mg/kg、0.1mg/kg、または少なくとも0.2mg/kg、または少なくとも0.3mg/kg、または少なくとも0.4mg/kg、または少なくとも0.5mg/kg、または少なくとも0.6mg/kg、または少なくとも0.7mg/kg、または少なくとも0.8mg/kg、または少なくとも0.9mg/kg、または少なくとも1mg/kg、または少なくとも2mg/kg、または少なくとも3mg/kg、または少なくとも4mg/kg、または少なくとも5mg/kg、または少なくとも6mg/kg、または少なくとも7mg/kg、または少なくとも8mg/kg、または少なくとも9mg/kg、または少なくとも10mg/kg、または少なくとも15mg/kg、または少なくとも20mg/kg、または少なくとも25mg/kg、または少なくとも30mg/kg、または少なくとも35mg/kg、または少なくとも40mg/kg、または少なくとも45mg/kg、または少なくとも50mg/kgである。

【0113】

本明細書に開示されるCp40系アナログ(たとえば、PEG(1K)-Cp40、PEG(3K)-Cp40、Cp40-KK、またはCp40-KKK)の投与は、以前に知られているコンプスタチンアナログと比較して、血漿滞留時間および硝子体内滞留時間を延長することが発見されており、したがって、より少ない治療有効用量およびより少ない投与間隔の頻度で、静脈内、硝子体内、筋肉内、および/または皮下に投与されうる。当業者が理解するように、特定の投与経路は、治療効果に必要な用量に影響を及ぼしうる。

【0114】

1つの実施態様では、本発明は、本明細書に記載されるように、約0.125mg/kg~約10mg/

kg、たとえば、0.125mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、1.25mg/kg、1.5mg/kg、1.75mg/kg、2mg/kg、2.25mg/kg、2.5mg/kg、2.75mg/kg、3mg/kg、3.25mg/kg、3.5mg/kg、3.75mg/kg、4mg/kg、4.25mg/kg、4.5mg/kg、4.75mg/kg、5mg/kg、5.25mg/kg、5.5mg/kg、5.75mg/kg、6mg/kg、6.25mg/kg、6.5mg/kg、6.75mg/kg、7mg/kg、7.25mg/kg、7.5mg/kg、7.75mg/kg、8mg/kg、8.25mg/kg、8.5mg/kg、8.75mg/kg、9mg/kg、9.25mg/kg、9.5mg/kg、9.75mg/kg、または10mg/kgである治療有効用量での、Cp40系アナログの静脈内または皮下投与を想定している。好ましい実施態様では、Cp40系アナログは、約0.25mg/kg ~ 約5mg/kgである治療有効用量で、静脈内または皮下送達(たとえば、注射または注入)を介して投与される。もう1つの実施態様では、治療有効用量は、約0.5mg/kg ~ 約5mg/kgである。さらにもう1つの実施態様では、治療有効用量は、約0.5mg/kg ~ 4mg/kgまたは約0.5mg/kg ~ 約3mg/kgである。たとえば、1つの特定の実施態様では、Cp40系アナログ(たとえば、PEG(1K)-Cp40、PEG(3K)-Cp40、Cp40-KK、またはCp40-KKK)は、約3mg/kg/24時間の用量でヒトに静脈内または皮下注射される。

【0115】

もう1つの実施態様では、本発明は、本明細書に記載されるように、約0.25mg/kg ~ 約50mg/kg、たとえば、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、3.5mg/kg、4mg/kg、4.5mg/kg、5mg/kg、5.5mg/kg、6mg/kg、6.5mg/kg、7mg/kg、7.5mg/kg、8mg/kg、8.5mg/kg、9mg/kg、9.5mg/kg、10mg/kg、10.5mg/kg、11mg/kg、11.5mg/kg、12mg/kg、12.5mg/kg、13mg/kg、13.5mg/kg、14mg/kg、14.5mg/kg、15mg/kg、15.5mg/kg、16mg/kg、16.5mg/kg、17mg/kg、17.5mg/kg、18mg/kg、18.5mg/kg、19mg/kg、19.5mg/kg、20mg/kg、20.5mg/kg、21mg/kg、21.5mg/kg、22mg/kg、22.5mg/kg、23mg/kg、23.5mg/kg、24mg/kg、24.5mg/kg、25mg/kg、26mg/kg、27mg/kg、28mg/kg、29mg/kg、30mg/kg、31mg/kg、32mg/kg、33mg/kg、34mg/kg、35mg/kg、36mg/kg、37mg/kg、38mg/kg、39mg/kg、40mg/kg、41mg/kg、42mg/kg、43mg/kg、44mg/kg、45mg/kg、46mg/kg、47mg/kg、48mg/kg、49mg/kg、または50mg/kgである治療有効用量での、Cp40系アナログの筋肉内投与を想定している。好ましい実施態様では、Cp40系アナログは、約0.25mg/kg ~ 約35mg/kgである治療有効用量で、筋肉内送達(たとえば、注射)を介して投与される。もう1つの実施態様では、治療有効用量は、約0.25mg/kg ~ 30mg/kgである。さらにもう1つの実施態様では、治療有効用量は、約0.25mg/kg ~ 10mg/kgである。さらに他の実施態様では、治療有効用量は、約0.25mg/kg ~ 5mg/kgである。たとえば、1つの特定の実施態様では、Cp40系アナログ(たとえば、PEG(1K)-Cp40、PEG(3K)-Cp40、Cp40-KK、またはCp40-KKK)は、約2.5mg/kgの用量で筋肉内注射される。

【0116】

さらにもう1つの実施態様では、本発明は、本明細書に記載されるように、さらにもう1つの実施態様では、約1 μ g ~ 約10mg、たとえば、1 μ g、1.25 μ g、1.5 μ g、1.75 μ g、2 μ g、2.25 μ g、2.5 μ g、2.75 μ g、3 μ g、3.25 μ g、3.5 μ g、3.75 μ g、4 μ g、4.25 μ g、4.5 μ g、4.75 μ g、5 μ g、5.25 μ g、5.5 μ g、5.75 μ g、6 μ g、6.25 μ g、6.5 μ g、6.75 μ g、7 μ g、7.25 μ g、7.5 μ g、7.75 μ g、8 μ g、8.25 μ g、8.5 μ g、8.75 μ g、9 μ g、9.25 μ g、9.5 μ g、9.75 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g、50 μ g、60 μ g、70 μ g、80 μ g、90 μ g、100 μ g、150 μ g、200 μ g、250 μ g、300 μ g、350 μ g、400 μ g、450 μ g、500 μ g、550 μ g、600 μ g、650 μ g、700 μ g、750 μ g、800 μ g、850 μ g、900 μ g、950 μ g、1mg、1.1mg、1.2mg、1.3mg、1.4mg、1.5mg、1.6mg、1.7mg、1.8mg、1.9mg、2mg、2.1mg、2.2mg、2.3mg、2.4mg、2.5mg、2.6mg、2.7mg、2.8mg、2.9mg、3mg、3.5mg、4mg、4.5mg、5mg、5.5mg、6mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg、または10mgである治療有効用量での、Cp40系アナログの硝子体内投与を想定している；好ましくは、用量は、約1 μ g ~ 約2,000 μ g、たとえば、約1 μ g ~ 約2,000 μ gまたは約100 μ g ~ 約1,500 μ g、または約500 μ g ~ 約1,200 μ g、または約500 μ g ~ 約1,000 μ gである。いくつかの実施態様では、硝子体内投与を介して送達されるCp40系アナログの治療有効用量は、少なくとも約0.02mg、たとえば、少なくとも約0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.15mg、0.2mg、0.25mg、0.3mg、0.35mg、0.4mg、0.45mg、0.5mg、0.55mg、0.6mg、0.65mg、0.7

mg、0.75mg、0.8mg、0.85、mg、0.9mg、0.95mg、または1mgである。たとえば、1つの特定の
の実施態様では、Cp40系アナログ(たとえば、PEG(1K)-Cp40、PEG(3K)-Cp40、Cp40-KK、ま
たはCp40-KKK)は、約1mgの用量で硝子体内注射される。

【0117】

もう1つの実施態様では、本発明は、本明細書に記載されるように、約1mg/kg ~ 約20mg/
kg、たとえば、1mg/kg、1.5mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、3.5mg/kg、4mg/kg、4.5
mg/kg、5mg/kg、5.5mg/kg、6mg/kg、6.5mg/kg、7mg/kg、7.5mg/kg、8mg/kg、8.5mg/kg、9
mg/kg、9.5mg/kg、10mg/kg、10.5mg/kg、11mg/kg、11.5mg/kg、12mg/kg、12.5mg/kg、13m
g/kg、13.5mg/kg、14mg/kg、14.5mg/kg、15mg/kg、15.5mg/kg、16mg/kg、16.5mg/kg、17m
g/kg、17.5mg/kg、18mg/kg、18.5mg/kg、19mg/kg、19.5mg/kg、または20mg/kgである治療
有効用量での、Cp40系アナログの経口投与を想定している。好ましい実施態様では、Cp40
系アナログは、約1mg/kg ~ 約10mg/kgである治療有効用量で経口送達を介して投与される
。たとえば、1つの特定の実施態様では、Cp40系アナログ(たとえば、PEG(1K)-Cp40、PEG(
3K)-Cp40、Cp40-KK、またはCp40-KKK)は、約1 ~ 5mg/kgの用量でヒトに経口送達される。
いくつかの実施態様では、本明細書に記載の経口用量は、一回で投与される。他の実施態
様では、それは、毎日投与される。

10

【0118】

もう1つの実施態様では、本発明は、本明細書に記載されるように、約1 μ g ~ 約1,000 μ
g、たとえば、1 μ g、5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g、25 μ g、30 μ g、35 μ g、40 μ g、45 μ g
、50 μ g、55 μ g、60 μ g、65 μ g、70 μ g、75 μ g、80 μ g、85 μ g、90 μ g、95 μ g、100 μ g、
110 μ g、120 μ g、130 μ g、140 μ g、150 μ g、160 μ g、170 μ g、180 μ g、190 μ g、200 μ g、
210 μ g、220 μ g、230 μ g、240 μ g、250 μ g、260 μ g、270 μ g、280 μ g、290 μ g、300 μ g、
310 μ g、320 μ g、330 μ g、340 μ g、350 μ g、360 μ g、370 μ g、380 μ g、390 μ g、400 μ g、
410 μ g、420 μ g、430 μ g、440 μ g、450 μ g、460 μ g、470 μ g、480 μ g、490 μ g、500 μ g、
550 μ g、600 μ g、650 μ g、700 μ g、750 μ g、800 μ g、850 μ g、900 μ g、950 μ g、または1,
000 μ gである治療有効用量での、Cp40系アナログの乳頭内浸潤などの歯周投与を想定して
いる。たとえば、Cp40系アナログは、約5 μ g ~ 約500 μ gの用量でヒトに歯周投与されうる
(たとえば、注射によって歯間乳頭に送達される)。好ましい実施態様では、Cp40系アナロ
グは、約10 μ g/歯間乳頭 ~ 約200 μ g/歯間乳頭の用量または 約20 μ g/歯間乳頭 ~ 約100 μ g
/歯間乳頭の用量でヒトに歯周投与される。たとえば、1つの特定の実施態様では、Cp40系
アナログ(たとえば、PEG(1K)-Cp40、PEG(3K)-Cp40、Cp40-KK、またはCp40-KKK)は、約25
 μ g/歯間乳頭または約50 μ g/歯間乳頭の用量でヒトに歯周送達される。

20

30

【0119】

1つの実施態様では、本発明は、個体において約0.01 μ M ~ 約30 μ MであるCp40系アナ
ログの血清濃度をもたらす用量の投与を想定している。特定の実施態様では、組み合わせ
用量および投与計画は、少なくとも約0.01 μ M、または少なくとも約0.02 μ M、または少
なくとも約0.03 μ M、または少なくとも約0.04 μ M、または少なくとも約0.05 μ M、また
は少なくとも約0.06 μ M、または少なくとも約0.07 μ M、または少なくとも約0.08 μ M、
または少なくとも約0.09 μ M、または少なくとも約0.1 μ M、0.11 μ M、または少なくと
も約0.12 μ M、または少なくとも約0.13 μ M、または少なくとも約0.14 μ M、または少な
くとも約0.15 μ M、または少なくとも約0.16 μ M、または少なくとも約0.17 μ M、または
少なくとも約0.18 μ M、または少なくとも約0.19 μ M、または少なくとも約0.2 μ M、ま
たは少なくとも約0.3 μ M、または少なくとも約0.4 μ M、または少なくとも約0.5 μ M、
または少なくとも約0.6 μ M、または少なくとも約0.7 μ M、または少なくとも約0.8 μ M
、または少なくとも約0.9 μ M、または少なくとも約1 μ Mまたは少なくとも約1.5 μ M、
または少なくとも約2 μ M、または少なくとも約2.5 μ M、または少なくとも約3 μ M、ま
たは少なくとも約3.5 μ M、または少なくとも約4 μ M、または少なくとも約4.5 μ M、ま
たは少なくとも約5 μ M、または少なくとも約5.5 μ M、または少なくとも約6 μ M、また
は少なくとも約6.5 μ M、または少なくとも約7 μ M、または少なくとも約7.5 μ M、また
は少なくとも約8 μ M、または少なくとも約8.5 μ M、または少なくとも約9 μ M、または

40

50

少なくとも約9.5 μM 、または少なくとも約10 μM 、または少なくとも約10.5 μM 、または少なくとも約11 μM または少なくとも約11.5 μM 、または少なくとも約12 μM 、または少なくとも約12.5 μM 、または少なくとも約13 μM 、または少なくとも約13.5 μM 、または少なくとも約14 μM 、または少なくとも約14.5 μM 、または少なくとも約15 μM 、または少なくとも約15.5 μM 、または少なくとも約16 μM 、または少なくとも約16.5 μM 、または少なくとも約17 μM 、または少なくとも約17.5 μM 、または少なくとも約18 μM 、または少なくとも約18.5 μM 、または少なくとも約19 μM 、または少なくとも約19.5 μM 、または少なくとも約20 μM 、または少なくとも約20.5 μM 、または少なくとも約21 μM または少なくとも約21.5 μM 、または少なくとも約22 μM 、または少なくとも約22.5 μM 、または少なくとも約23 μM 、または少なくとも約23.5 μM 、または少なくとも約24 μM 、または少なくとも約24.5 μM 、または少なくとも約25 μM 、または少なくとも約25.5 μM 、または少なくとも約26 μM 、または少なくとも約26.5 μM 、または少なくとも約27 μM 、または少なくとも約27.5 μM 、または少なくとも約28 μM 、または少なくとも約28.5 μM 、または少なくとも約29 μM 、または少なくとも約29.5 μM 、または少なくとも約30 μM であるCp40系アナログの血清濃度、または経時平均血清濃度をもたらす。特定の実施態様では、組み合わせ用量および投与計画は、最大で約0.1 μM 、または最大で約0.11 μM 、または最大で約0.12 μM 、または最大で約0.13 μM 、または最大で約0.14 μM 、または最大で約0.15 μM 、または最大で約0.16 μM 、または最大で約0.17 μM 、または最大で約0.18 μM 、または最大で約0.19 μM 、または最大で約0.2 μM 、または最大で約0.3 μM 、または最大で約0.4 μM 、または最大で約0.5 μM 、または最大で約0.6 μM 、または最大で約0.7 μM 、または最大で約0.8 μM 、または最大で約0.9 μM 、または最大で約1 μM または最大で約1.5 μM 、または最大で約2 μM 、または最大で約2.5 μM 、または最大で約3 μM 、または最大で約3.5 μM 、または最大で約4 μM 、または最大で約4.5 μM 、または最大で約5 μM 、または最大で約5.5 μM 、または最大で約6 μM 、または最大で約6.5 μM 、または最大で約7 μM 、または最大で約7.5 μM 、または最大で約8 μM 、または最大で約8.5 μM 、または最大で約9 μM 、または最大で約9.5 μM 、または最大で約10 μM 、または最大で約10.5 μM または最大で約11 μM または最大で約11.5 μM 、または最大で約12 μM 、または最大で約12.5 μM 、または最大で約13 μM 、または最大で約13.5 μM 、または最大で約14 μM 、または最大で約14.5 μM 、または最大で約15 μM 、または最大で約15.5 μM 、または最大で約16 μM 、または最大で約16.5 μM 、または最大で約17 μM 、または最大で約17.5 μM 、または最大で約18 μM 、または最大で約18.5 μM 、または最大で約19 μM 、または最大で約19.5 μM 、または最大で約20 μM 、または最大で約20.5 μM または最大で約21 μM または最大で約21.5 μM 、または最大で約22 μM 、または最大で約22.5 μM 、または最大で約23 μM 、または最大で約23.5 μM 、または最大で約24 μM 、または最大で約24.5 μM 、または最大で約25 μM 、または最大で約25.5 μM 、または最大で約26 μM 、または最大で約26.5 μM 、または最大で約27 μM 、または最大で約27.5 μM 、または最大で約28 μM 、または最大で約28.5 μM 、または最大で約29 μM 、または最大で約29.5 μM 、または最大で約20 μM であるCp40系アナログの血清濃度、または経時平均血清濃度をもたらす。

10

20

30

40

【0120】

適切な範囲として、約0.1～約30 μM 、または約1～約29 μM 、または約2～約28 μM 、または約3～約27 μM 、または約4～約26 μM 、または約5～約25 μM 、または約6～約24 μM 、または約7～約23 μM 、または約8～約22 μM 、または約9～約21 μM 、または約10～約20 μM 、または約11～約19 μM 、または約12～約18 μM 、または約13～約17 μM 、または約1～約5 μM 、または約5～約10 μM 、または約10～約15 μM 、または約15～約20 μM 、または約20～約25 μM 、または約25～約30 μM が挙げられる。投与される正確な投与量は、患者の種類および治療される病状の種類、患者の年齢および投与経路を含むがこれらに限定されない任意の数の要因に応じて変化するが、そのような投与量は、当業者によって容易に決定可能である。

【0121】

50

Cp40系アナログを含有する医薬組成物は、患者に1日数回の頻度で投与することができ、またはより少ない頻度で、たとえば、1日1回、1週間に1回、2週間に1回、1カ月に1回、あるいは、数ヶ月に1回または1年に1回あるいはそれ以下などの、それ以下の頻度で投与することができる。投与の頻度は、当業者には容易に明らかであり、上記のように、治療される疾患の種類および重症度、患者の種類および年齢などの任意の数の要因に依存するであろう。しかしながら、上記のように、本開示のCp40系アナログは、以前から知られているコンブスタチンアナログと比較して、より少ない頻度で投与することができる。

【0122】

たとえば、いくつかの実施態様では、Cp40系アナログを含む医薬組成物の静脈内、筋肉内、眼内(硝子体内を含む)、皮下、歯周(歯肉投与または乳頭内浸潤を含む)、または局所投与は、単回注射による。他の実施態様では、Cp40系アナログは、経口送達される。さらに、そして現在記載されているCp40系アナログ(すなわち、mPEG化および/またはLys含有Cp40系アナログ)の延長された滞留時間を考えると、本発明は、これらのCp40系アナログの長期全身投与を想定しており、ここで、Cp40系アナログは、患者の種類および年齢、および治療される疾患の種類および重症度に応じて、治療上有効なCp40システムアナログの維持用量を提供するため。長い時間をかけて、複数回送達(たとえば、口腔または注射)を介して、上記治療用量で、経口、静脈内、眼内(硝子体内を含む)、皮下、筋肉内、歯周(歯肉投与または乳頭内浸潤を含む)または局所投与経路によって送達される。したがって、いくつかの実施態様では、Cp40系アナログ(たとえば、PEG(1K)-Cp40、PEG(3K)-Cp40、Cp40-KK、またはCp40-KKK)は、約12時間に1回～約3ヶ月に1回、たとえば、12時間に1回、24時間に1回、2日に1回、3日に1回、4日に1回、5日に1回、6日に1回、7日に1回、8日に1回、9日に1回、10日に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回投与される、該アナログを含む医薬組成物の複数回注射によって、静脈内、眼内(硝子体内を含む)、皮下、筋肉内、歯周(たとえば、乳頭内浸潤を介して)、または局所送達される。他の実施態様では、Cp40系アナログは、約12時間に1回～約3ヶ月に1回、たとえば、12時間に1回、24時間に1回、2日に1回、3日に1回、4日に1回、5日に1回、6日に1回、7日に1回、8日に1回、9日に1回、10日に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回投与される、該アナログを含む医薬組成物の経口摂取によって、経口送達される。

【0123】

投与経路および用量の組み合わせを含む送達方法も本明細書で提供される。たとえば、本明細書は、初回の飽和用量と、それに続くより低い治療有効用量およびより少ない頻度の投与間隔での複数回投与を含む、本開示のCp40系アナログ(たとえば、PEG(1K)-Cp40、PEG(3K)-Cp40、Cp40-KK、またはCp40-KKK)を含む医薬組成物の全身治療の方法を提供する。全身治療のこの新規方法は、補体障害の長期のインビボ維持/制御を提供するであろう。この目的に向かって、いくつかの実施態様では、Cp40系アナログの初回の負荷用量は、上記の範囲から選択されるより高い治療有効用量で皮下、静脈内、または筋肉内投与され、その後、定期的な投与間隔で筋肉内または経口投与される。1つの実施態様では、本明細書に記載のCp40系アナログの1つ(たとえば、Cp40-KKK)を含む医薬組成物は、少なくとも約0.5～約3mg/kgの初回治療有効用量で皮下または静脈内注射され、その後、約0.25mg/kg～約50mg/kgの治療有効維持用量で経口または筋肉内投与され、ここで、維持用量は、2日～3ヶ月に1回、たとえば、2日、3日、3日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、28日、29日、30日、31日、32日、33日、34日、35日、36日、37日、38日、39日、42日、45日、50日、56日、60日、65日、70日、77日、80日、84日、または90日に1回送達される。たとえば、1つの特定の実施態様では、Cp40-KKKを含む医薬組成物は、約0.5mg/kg～約3mg/kgの飽和用量で静脈内投与され、続いて、約0.5～約10mg/kgの維持用量で1週間または2週間に1回筋肉内投与される。

【0124】

上記のように、本発明の方法に有用なCp40系アナログを含む医薬組成物は、経口、非経

口、眼内、眼内(硝子体内を含む)、静脈内、皮下、筋肉内(i.m.)、歯周(たとえば、乳頭内浸潤注射)、坐剤、エアロゾル、局所、皮下またはその他の同様の製剤にて全身投与することができる。このような医薬組成物は、薬物投与を増強および促進することが知られている薬学的に許容される担体および他の成分を含みうる。ナノ粒子、リポソーム、再封された赤血球などの他の製剤、および免疫学的に基づくシステムもまた、本発明の方法に従って、コンプスタチンアナログを投与するために使用されうる。

【0125】

注射可能な用途に適した医薬組成物として、典型的には、無菌の水溶液(水溶性の場合)または分散液および無菌の注射可能な溶液の即時調製のための無菌粉末が挙げられる。静脈内投与の場合、適切な担体として、生理食塩水、静菌水、クレモフォアELTM(BASF、Par

10

【0126】

従来、溶媒または懸濁媒体として、滅菌固定油が採用されている。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドなどの任意の無菌固定油を使用することができる。オレイン酸およびそのグリセリド誘導体などの脂肪酸は、オリーブ油またはひまし油などの天然の薬学的に許容される油、特にそれらのポリオキシエチル化バージョンと同様に、注射剤の調製に有用である。これらの油性溶液または懸濁液はまた、エマルジョンおよび懸濁液などの薬学的に許容される剤形の製剤に一般的に使用されるカルボキシメチルセルロースまたは類似の分散剤などの長鎖アルコール希釈剤または分散剤を含みうる。薬学的に許容される固体、液体、または他の剤形の製造に一般的に使用される、Tween、スパンおよび他

20

【0127】

一般に、本発明組成物は無菌でなければならず、容器は、容易な注射可能性が存在するように流動性でなければならない。好ましい医薬製剤は、製造および貯蔵の条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されうる。一般に、関連する担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール(たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒体でありうる。適切な流動性は、たとえば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合に必要な粒子サイズの維持によって、および界面

30

【0128】

滅菌注射液は、必要に応じて、必要に応じて、上記に列挙した成分の1つまたは組み合わせを用いて適切な溶媒に必要な量の活性化化合物を組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。好ましくは、注射用の溶液はエンドトキシンを含まない。一般に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散媒体および上に列挙したものから必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、有効成分の粉末に加えて、予め滅菌濾過された溶液から、その任意の追加の所望の成分が得られる。

40

【0129】

経口投与に適した医薬組成物の製剤は、数例を挙げると、丸剤、錠剤、顆粒、粉末、カプセル、分散液、懸濁液、溶液、エマルジョン、マイクロエマルジョン、ゲルおよびフィルムを含むがこれらに限定されないさまざまな剤形で、薬学的に許容される担体と組み合

50

わされた有効成分を含む。そのような剤形は、典型的には、有効成分の製剤および送達を容易にするための担体、賦形剤、および透過促進剤を含む。

【0130】

薬学的に許容される担体は、タンパク質、炭水化物、脂質、有機および無機分子、それらの組み合わせから選択される。有効成分は、適切な希釈剤中で担体と組み合わせて、溶液または懸濁液を形成することができる。そのような液体製剤は、使用される量および担体に応じて、粘性または非粘性でありうる。液体製剤は、直接使用することができるか、または当業者に知られている方法によって、適切なカプセル、ゲルカプセルまたは固体にさらに製剤化することができる。あるいは、固形成分を組み合わせることにより、固形製剤を作製することができる。このような固形製剤は、顆粒、カプセル、錠剤またはフィルムに製剤化された粉末として使用することができ、これらのいずれか1つを徐放性製剤に製剤することができる。

10

【0131】

経口剤形における担体として使用するのに適したタンパク質として、カゼイン、カゼイン酸ナトリウム、乳清、還元乳糖乳清、乳清タンパク質濃縮物などの乳タンパク質、ゼラチン、大豆タンパク質(単離)、褐色藻類タンパク質、紅藻タンパク質、パン酵母エキスおよびアルブミンが挙げられる。適切な炭水化物として、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、酢酸セルロースおよびエチルセルロースなどのセルロース；コーンスターチ、ジャガイモデンプン、タピオカデンプン、小麦デンプン、酸加工デンプン、アルファ化デンプンおよび非修飾デンプンなどのデンプン；アルギン酸アンモニウム、アルギン酸ナトリウム、およびアルギン酸カルシウムなどのアルギン酸塩；コーングルテンおよび小麦グルテンなどのグルテン；アカシア(アラビアガム)、ガットィガム、グアーガム、カラヤゴム(ステルキュリアガム)、ガム(トラガカント)などのガム；不溶性グルコースイソメラーゼ酵素製剤；コーンシュガー、転化糖、コーンシロップ、高果糖コーンシロップ、グルコン酸ナトリウムなどの糖質が挙げられる。適切な脂質として、酢酸-トコフェロールなどのトコフェロール；短鎖、中鎖および長鎖脂肪酸およびそれらのエステル、それらの脂肪酸およびエーテル；ココナッツ油(精製)、大豆油(水素化)および菜種油などの油；パルミチン酸アルミニウム、チオジプロピオン酸ジラウリル、酵素修飾レシチン、ステアリン酸カルシウム、酵素修飾脂肪、パルミトステリン酸グリセリン、レシチン、モノグリセリドおよびジグリセリド、グリセリンおよび蜂ワックス(黄色および白)、カンデリラワックスおよびカルナウバワックスなどのワックスおよび植物油が挙げられる。適切な有機および無機物質として、他の多くのなかで、ポリビニルピロリドンなどのメチルおよびビニルピロリドン、メチルスルホニルメタン、ジメチルスルホキシドおよび関連化合物、ポリ乳酸などのヒドロキシおよびポリヒドロキシ酸が挙げられる。

20

30

【0132】

いくつかの実施態様では、本明細書で提供される医薬組成物の経口剤形は、Maherら(2016、Adv. Drug Deliv. Rev. 106:277-319)に記載されているものなどの経口投与後の組成物のバイオアベイラビリティを高めるための1つ以上の浸透促進剤および/または脂質賦形剤を含む。本明細書での使用に適した例示的な透過促進剤として、 $C_{12}E_9$ 、カプリロカプロイルPEG 8グリセリド、クエン酸、ドデシル-D-マルトピラノシド(DDM)、モノカプリン酸グリセリド、ラウリルカルニチン、n-テトラデシル-D-マルトピラノシド(TDM)、N-トリメチル化キトサン、パルミトイルカルニチン、ペネトラチン(D-ペネトラチン)、SNAC、カプリン酸ナトリウム(C_{10})、カプリル酸ナトリウム(C_8)、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、およびモノラウリン酸スクロースが挙げられる。本明細書での使用に適した例示的な脂質賦形剤として、ポリオキシシルグリセリド(たとえば、ステアリン酸ポリオキシシル、モノステアリン酸ポリエチレングリコール、カプリロカプロイルポリオキシシル-8グリセリド、カプリロカプロイルマクロゴール-8グリセリド、ラウラオイルポリオキシグリセリド、ステアロ

40

50

イルポリオキシグリセリド、オレオイルポリオキシシル-6グリセリド、リノレオイルポリオキシシル-6グリセリド、およびラウロイルポリオキシシル-6グリセリド)、プロピレングリコールエステル(たとえば、プロピレングリコールモノカプリレートタイプI、プロピレングリコールモノカプリレートタイプII、プロピレングリコールモノラウレートタイプI、プロピレングリコールモノラウレートタイプII)、ポリグリセロールエステル(たとえば、ポリグリセリル-3ジオレエート)、グリセリド(たとえば、モノグリセリド、ジグリセリド、モノステアリン酸グリセロール40-55タイプI、中鎖トリグリセリド、プロピレングリコールジカプリレート/ジカプレート、プロピレングリコールジカプリロカプレート、モノリノール酸グリセリル、およびモノオレイン酸グリセリルタイプ40)、および遊離水性アルコール溶媒(たとえば、ジエチレングリコールモノエチルエーテル)が挙げられる。

10

【0133】

いくつかの実施態様では、経口送達用に製剤された医薬組成物は、薬物送達システムとしてナノ粒子を含みうる。本明細書で提供されるCp40アナログをカプセル封入するナノキャリアのコーティングでの使用に適したポリマーには、カルボポール、キトサン、コレステリルポリマー、シクロデキストリン、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ポリ(エチルシアノアクリレート)、ポリエチレングリコール、ポリアクリル酸、ポリラクチド-co-グリコリド、およびポリアリルラミンが含まれるが、これに限定されない(たとえば、Guptaら、2013、Drug Deliv. 20(6) : 237-246を参照)。

【0134】

局所適用の場合、本明細書で提供される医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体に懸濁または溶解された薬学的に活性な成分を含む適切な軟膏に製剤されうる。本明細書に開示されるコンスタチンまたはコンスタチンアナログの局所投与のための薬学的に許容される担体として、鉱油、液体ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックスおよび水が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、医薬組成物は、1つ以上の医薬的に許容される担体に懸濁された有効成分を含む適切なローションまたはクリームに製剤することができる。適切な担体として、鉱油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0135】

眼への局所送達のために、本明細書で提供される医薬組成物は、たとえば(限定的ではないが)、等張性の、pH調整された滅菌生理食塩水中で、塩化ベンジルアルコニウムなどの防腐剤なしで、適切に製剤されうる。あるいは、眼科用のために、医薬組成物は、点眼薬としてワセリンなどの軟膏に製剤することができる。

30

【0136】

眼への局所投与の方法として、たとえば、脈絡膜注射、経強膜注射または強膜パッチの配置、選択的動脈カテーテル法、点眼剤または眼用軟膏；浸透圧ポンプ等による経網膜、結膜下眼球、硝子体内注射、脈絡膜上注射、テノン嚢下注射、強膜ポケットおよび強膜カットダウン注射を含む眼内投与が挙げられる。Cp40アナログはまた、代替的に、静脈内(IV)または動脈内などの血管内に投与することができる。脈絡膜注射および強膜パッチングでは、臨床医は、鎮痛剤および眼科薬を含む適切な麻酔の開始後、眼への局所的アプローチを行う。医薬組成物を含む注射針は、被験者の脈絡膜または強膜へ向けられ、滅菌条件下で挿入される。注射針が適切な部位に配置されたら、脈絡膜または強膜のいずれかまたは両方へCp40アナログが注射される。これらの方法のいずれかを使用する場合、臨床医は、徐放性または長時間作用型製剤を選択することができる。したがって、この手順は、治療および反応に対する対象の耐性に応じて、数ヶ月または数年ごとにのみ繰り返すことができる。

40

【0137】

薬物の眼内投与は当技術分野でよく知られている。たとえば、米国特許第5,632,984号および5,770,589号ならびに米国公開番号2016/0060297 A1を参照。米国特許第6,378,526

50

号は、治療または診断用材料を、網膜を覆う場所に強膜内注射するための方法を提供し、これは、薬剤を眼の後部に送達するための最小限の侵襲技術を提供する。

【0138】

特定の実施態様では、本発明のCp40アナログを含む医薬組成物は、たとえば、眼の後部に近接して、眼の近くに送達される。「眼の近く」は、眼およびその付属器官が位置する頭蓋骨内の空洞である軌道内の位置を示す。典型的には、組成物は、眼内のそれらの意図された標的の近く、たとえば、眼の後部を覆う強膜の部分の近く(数ミリメートル以内)、または強膜の外表面に直接隣接して送達されるであろう。好ましい実施態様では、本発明の医薬組成物は、眼の硝子体腔に(すなわち、硝子体内に)送達される。

【0139】

制御放出を提供するための多くのポリマー送達ビヒクルが眼の状況で使用されており、本発明の医薬組成物を投与するために使用することができる。さまざまなポリマー、たとえば、生分解性でありうる生体適合性ポリマーを使用することができる。たとえば、米国特許第6,692,759号は、眼における治療薬の制御放出を提供するための埋め込み型デバイスを作製するための方法を記載している。治療薬の眼内投与のための他の有用なポリマーおよび送達システムが記載されている。ポリマーが分解するにつれて、活性剤が放出される。薬物送達に使用されてきたポリマーとして、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)、ポリ無水物、エチレン酢酸ビニル、ポリグリコール酸、キトサン、ポリオルトエステル、ポリエーテル、ポリ乳酸、およびポリ(ベータアミノエステル)が挙げられるが、これらに限定されない。ペプチド、コラーゲンやアルブミンなどのタンパク質、およびデンドリマー(たとえば、PAMAMデンドリマー)も使用されている。これらのいずれも、本発明のさまざまな実施態様において使用することができる。

【0140】

ポリ(オルトエステル)が眼に導入され、徐放性の眼の薬物送達にとって好ましい特性が実証されている(Einmahl, S., 2002, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43(5)を参照)。ポリラクチド粒子は、そのような粒子の懸濁液の硝子体内注射に続いて、網膜およびRPEに薬剤を標的化するために使用されている(Bourgesら、2003, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44(8))。眼の後部または前部への導入に適した巨視的移植可能なデバイスは、本明細書では眼のインプラントと呼ばれる(Jaffe, G., 2000, Invest. Ophthalmol. Hs. Sci., 41(11)を参照)。したがって、本明細書で提供されるのは、補体障害によって治療可能な疾患または状態を有する個体にCp40アナログを送達するための、たとえば、治療有効量でCp40アナログを含む眼のインプラントである。そのようなデバイスは、Cp40アナログを含む巨視的インプラントでありうるか、または薬剤を含浸またはカプセル封入した複数のナノ粒子または微粒子から構成される。1つの実施態様では、眼のインプラントは、当技術分野で知られている任意の眼のインプラントである。例示的インプラントおよびその製造方法は、たとえば、米国公開公報2009/0220572 A1に記載されている。当技術分野で知られている他のインプラントも使用することができる。

【0141】

他の実施態様は、眼の後部へのコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログの送達にとって有用な可溶性コラーゲンを含むゲル形成組成物を含む。コラーゲンは、最初は可溶性であり、低粘度であるが、適切な条件下、たとえば、哺乳動物対象への投与時に遭遇する条件下でゲルを迅速に形成することができる溶液を形成する。したがって、本発明は、眼の後部への薬学的に活性な薬剤の送達のためのシステムを提供する。このシステムは、そのような分子を十分な濃度で局在化させて持続的な送達を提供すると同時に、高分子を十分な量で放出することを可能にするように設計されている。さらに、コラーゲンゲルは、たとえば、内因性プロテアーゼによる分解からコンプスタチンまたはコンプスタチンアナログを保護する可能性がある。

【0142】

組成物は、体内に導入された後、たとえば、生理液と接触するとゲルを形成する。組成物はまた、リン酸緩衝生理食塩水などの流体、または適切なイオンを含む他の流体と接触

10

20

30

40

50

するとゲルを形成することができる。したがって、組成物は、たとえば、それがゲルを形成する、眼の後部に近接した適切な位置に注射することができる。あるいは、たとえば、溶液を所望の形状の型またはくぼみに導入し、適切な濃度の塩の存在下でゲル形成を起こさせることにより、予め成形されたゲルインプラントを作製することができる。塩は、型またはくぼみへの溶液の導入の前または後に添加することができる。型またはくぼみは、たとえば、空洞、凹面のくぼみを含み、そこに溶液を導入することができる任意の構造でありうる。もう1つの実施態様では、フィルムまたは膜は、治療薬を含むコラーゲン溶液から形成される。

【0143】

ゲルからの薬剤の放出は、任意のメカニズムによって、たとえば、ゲルの破壊の結果としてのゲルからの薬剤の拡散、またはその両方によって起こりうる。本発明の1つの態様は、所望の期間持続性放出を提供しながら、眼の後部の作用部位で有効であるのに十分な濃度でゲルからの薬剤の放出も可能にする、ゲル内に薬剤を保持するゲルが得られる適切な濃度の可溶性コラーゲンおよびコラーゲン固形物の選択である。

10

【0144】

本発明の特定の実施態様によれば、可溶性コラーゲンおよびコンスタチンまたはコンスタチンアナログを含む溶液は、可溶性コラーゲンおよびコンスタチンまたはコンスタチンアナログを任意の適切な方法を使用して溶液中で組み合わせることによって、たとえば、可溶性コラーゲンを含む溶液へのコンスタチンまたはコンスタチンアナログの添加によって、調製される。組成物は、哺乳動物対象の眼の中または近くの適切な場所に局所的に送達され、典型的には、眼の後部の外側および近接する領域に送達される。溶液は、投与部位またはその近くで急速にゲルを形成する。コンスタチンまたはコンスタチンアナログは、ゲル内に閉じ込められ、次いで、ゲルから拡散するか、または時間の経過とともにゲルが分解するにつれて放出され、それによって、コンスタチンまたはコンスタチンアナログがゲルと直接物理的に接触するか、または近くにある組織および構造に継続的に供給されるか、または血流に送達されて入る。特定の実施態様では、溶液は、以下でさらに論じられるように、眼の強膜の後ろに投与される。送達は、以下にさらに記載されるように、注射(たとえば、30ゲージの針を使用するなど)によって、カテーテルなどによって、達成されうる。

20

【0145】

コラーゲンが最初に可溶性であり、適切な条件下で迅速にゲルを形成することができるという条件で、さまざまな異なるコラーゲン調製物を本発明で使用することができる。適切なコラーゲン調製物、それらの製造方法は、たとえば、米国特許第5,492,135号；第5,861,486号；第6,197,934号；第6,204,365号；およびWO 00/47130に記載されているが、本発明はそのような調製方法に限定されない。これらのコラーゲンは、可溶性の形態で調製され、生理学的流体または適切な濃度のイオンを有する他の流体にさらされると急速にゲルを形成する。本発明によれば、注射、またはその他の方法でコラーゲン溶液を眼または眼の近くに導入することは、おそらく生理液との接触によって誘発されるゲル形成をもたらす。しかしながら、本発明は、ゲル形成が起こるメカニズムによって決して制限されないことに留意されたい。さらに、上記のように、ゲルは、インビトロで形成されうるものであり、それらは、適切な場所、たとえば、眼の後部に近接して移植され得る。

30

40

【0146】

可溶性コラーゲン溶液を調製する1つの適切な方法は、天然源からコラーゲンを抽出すること、コラーゲンを酸可溶化すること、キレート剤、たとえば、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩二水和物(EDTA)などの金属キレート剤を含む溶液に対してpHを上げながら可溶化コラーゲンを透析することを含む。キレート剤なしで脱イオン水などの溶液に対する1回以上の透析工程も実施することができる。中性pHおよび室温で自発的な原線維形成を受ける標準的なコラーゲン溶液とは異なって、本発明で使用するコラーゲン溶液は、長期間の貯蔵中に溶液中に留まり、生理液に曝されると急速にゲル形成を受ける。いかなる理論にも拘束されることを望まないが、キレート剤は、1つ以上のカチオンの濃度を変

50

化させ、それによって、そうでなければpHが上昇するときに起こるであろう原線維形成を防止しうる。キレート剤は、コラーゲン溶液に対して他の望ましい効果を有する可能性があり、本発明の特定の実施態様において、コラーゲン溶液は、キレート剤、たとえば、EDTAを含む。キレート剤は、透析後にコラーゲン溶液中に残っている可能性があるか、またはコラーゲン溶液に添加されうる。キレート剤の濃度は、たとえば、約0.02M~約0.05M、たとえば、約0.025M~約0.035Mの範囲でありうる。米国特許第5,861,486号に記載されているものを含むがこれらに限定されない他のキレート剤も使用することができる。

【0147】

特定の実施態様では、コラーゲン溶液は、1mg/ml~100mg/ml、たとえば、10mg/ml~70mg/ml、20mg/ml~50mg/ml、たとえば、30mg/mlなどの範囲の可溶性コラーゲンの濃度を有する。本発明の特定の実施態様では、コラーゲン溶液のpHは、6.0~8.0、たとえば、6.5~7.5、たとえば、7.0である。

10

【0148】

本発明の特定の実施態様では、コラーゲン組成物は、繊維状コラーゲン固形物を含む繊維状成分をさらに含む。たとえば、特定のコラーゲン組成物は、0.5mg/ml~30mg/mlの繊維状コラーゲン固形物、または1mg/ml~20mg/ml、たとえば、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、8mg/ml、10mg/mlなどの繊維状コラーゲン固形物を含む。重量/体積ベースの繊維状コラーゲン固形物の割合に関して、特定のコラーゲン組成物は、0.05~3%の繊維状コラーゲン固形物またはbetween 0.1~2%、たとえば、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1%、1.2%など繊維状コラーゲン固形物を含む。任意の適切な繊維成分を本発明のコラーゲン組成物に使用することができる。繊維状コラーゲン固形物は、さまざまな方法を使用して調製することができる。たとえば、線維状コラーゲンは、ウシの皮などの動物源から調製された再構成コラーゲンであってもよい(Frontiers in Matrix Biology, Vol. 10, pp. 1-58, in Methods of Connective Tissue Research, Eds. Robert Moczar, およびMoczar, S. Karger, Basel, 1985)。繊維状コラーゲンは、米国特許第4,969,912号および第5,322,802号に記載されているように、ヒトまたは動物源から調製することができる。繊維状コラーゲン固形物は、典型的には、約10~100mg/mlの範囲の濃度で溶液中に懸濁される。繊維状コラーゲン固形物を含むコラーゲン懸濁液は、可溶性コラーゲンを含む溶液への治療薬の添加の前または後に、可溶性コラーゲン組成物に、たとえば、添加されるなどにより、組み合わされる

20

30

【0149】

本発明のいくつかの実施態様では、可溶性コラーゲン調製物は、化学的架橋剤を含む。該架橋剤は、コラーゲン分子および/または原線維を互いに架橋することができ、および/またはコンプスタチンまたはそのアナログなどの治療薬をコラーゲン分子または原線維に架橋することができる。典型的な架橋剤は、コラーゲンアミン基を互いに、または治療薬のアミン、カルボキシル、フェノール、スルホニル、または炭水化物基に架橋する。適切な架橋剤として、WO 00/47130に記載されているもの挙げられるが、これらに限定されない。いかなる理論にも束縛されることを望まないが、架橋は、コラーゲンゲルを安定化(たとえば、その分解速度を低下させる)および/またはゲルからの治療薬の放出速度を低下させる可能性がある。

40

【0150】

いかなる理論にも束縛されることを望まないが、繊維状コラーゲン固形物の存在は、さまざまな有利な効果のいずれかを有する可能性がある。非限定的な例として、繊維状コラーゲン固形物は、コラーゲンゲルのインビボ安定性を増加させることができ、たとえば、それらは、ゲルの分解速度を減少させることができる。繊維状コラーゲン固形物は、ゲルに含まれる治療薬の安定性を高め、および/またはゲルの拡散および/または分解によって薬剤がゲルから放出される速度を低下または調節することができる。

【0151】

コラーゲン調製物が、生理液との接触後5分(300秒)以内にゲルを形成するのが好ましい。コラーゲン調製物が、生理液との接触後、90秒、2分(120秒)、または3分(180秒)以内に

50

ゲルを形成するのがより好ましい。より短い時間、たとえば、5~90秒以内、またはより長い時間、たとえば、3~5分以内にゲルを形成する調製物も使用することができる。

【0152】

コラーゲンタイプI~XXVIII、またはそれらの混合物のいずれかを本発明で使用することができる。コラーゲンは、上記の特許および刊行物に記載されているように、天然の供給源(たとえば、ヒト組織またはウシ、ウサギなどの動物組織)から精製することができる。あるいは、コラーゲンは、組換えDNA技術を使用して製造することができ、その場合、配列は、ヒトまたは動物起源のものでありうる。たとえば、米国特許第5,593,854号および第5,667,839号を参照。組換えDNA技術を使用する、タンパク質、たとえば、コラーゲン鎖などの目的のポリペプチドを生成するための方法は、当技術分野で周知である。適切な方法には、上記のものが含まれる。「コラーゲン」という用語は、コラーゲン画分を含む。したがって、特定の実施態様では、可溶性コラーゲンは、コラーゲン画分またはコラーゲン画分との組み合わせを含むか、またはそれらからなる。特定の実施態様では、完全なコラーゲンポリペプチド鎖が使用される。

10

【0153】

本発明の特定の実施態様では、上記のようなコラーゲン調製物が、特に好ましいが、さまざまな他のゲル形成材料もまた、本発明のゲル形成組成物において使用されうる。特定の実施態様では、ゲルはヒドロゲルであり、ヒドロゲルは、相当量の水を含むゲルを意味する。材料およびそれが形成するゲルが、生体適合性であるのが好ましい。特定の実施態様では、材料およびそれが形成するゲルは、生分解性である。さまざまな修飾または誘導体化コラーゲンもまた、本発明のさまざまな実施態様において使用される。たとえば、米国特許第5,201,764号を参照。たとえば、コラーゲンは、無水グルタル酸、無水コハク酸、および無水マレイン酸などの1つ以上のアシル化剤、ならびに無水メタクリル酸、ベータ-スチレンスルホニルクロリド、エチレン-無水マレイン酸コポリマー、スチレン-無水マレイン酸コポリマーまたはポリ(ビニル)スルホン酸からなる群から選択される少なくとも1つの他のアシル化剤でアシル化することができる。

20

【0154】

他のゲル形成材料として、ヒアルロン酸およびその修飾形態、アルギン酸塩およびその修飾形態などの多糖類、自己組織化ペプチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。アルギン酸塩およびその修飾形態、ヒアルロン酸およびその修飾形態のさらなる説明および本発明の様々な実施態様で使用される可溶性ゲル形成材料の追加の例については、たとえば、米国特許第6,129,761号を参照。本明細書に記載されるように、他の高分子ヒドロゲル前駆体には、Steinleitnerら、Obstetrics & Gynecology、77:48-52(1991);およびSteinleitnerら、Fertility and Sterility、57:305-308(1992)に記載されるように水素結合および/または温度変化によって架橋されるPluronic(商標)またはTetronics(商標)などのポリエチレンオキシド-ポリプロピレングリコールブロックコポリマーが含まれる。利用することができる他の材料として、フィブリンまたはゼラチンなどのタンパク質が挙げられる。ポリマー混合物も利用することができる。たとえば、混合時に水素結合によりゲル化するポリエチレンオキシドとポリアクリル酸の混合物を利用することができる。

30

40

【0155】

共有結合的に架橋可能なヒドロゲル前駆体もまた有用である。たとえば、キトサンなどの水溶性ポリアミンは、ポリエチレングリコールジイソチオシアネートなどの水溶性ジイソチオシアネートと架橋することができる。イソチオシアネートはアミンと反応して、化学的に架橋されたゲルを形成する。アミンとのアルデヒド反応、たとえば、ポリエチレングリコールジアルデヒドとのアルデヒド反応もまた利用されうる。ヒドロキシル化水溶性ポリマーも利用することができる。

【0156】

あるいは、ラジカル開始剤との接触時にラジカル反応によって架橋される置換基を含むポリマーを利用することができる。たとえば、光化学的に架橋することができるエチレン

50

性不飽和基を含むポリマーは、WO 93/17669に開示されているように利用することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。この実態様では、少なくとも1つの水溶性領域、生分解性領域、および少なくとも2つのフリーラジカル-重合領域を含む水溶性マクロマーが提供される。マクロマーは、たとえば、感光性化学物質および光によって生成されたフリーラジカルへの重合性領域の曝露によって重合される。これらのマクロマーの例は、PEG-オリゴラクチル-アクリレートであり、ここで、アクリレート基は、エオシン染料などのラジカル開始システムを使用して、または紫外線可視光への短時間の曝露によって重合される。さらに、Matsudaら、ASAID Trans.、38 : 154-157(1992)に開示されているように、光化学的に架橋されうるシンナモイル基を含む水溶性ポリマーを利用することができる。

10

【0157】

一般に、ポリマーは、水、緩衝塩溶液、またはアルコール水溶液などの水溶液に少なくとも部分的に可溶性である。上記の他のポリマーを合成するための方法は、当業者に知られている。たとえば、Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts、E. Goethals、editor(Pergamen Press、Elmsford、N. Y. 1980)を参照。ポリ(アクリル酸)などの多くのポリマーが市販されている。天然および合成ポリマーは、当技術分野で利用可能であり、たとえば、March、“Advanced Organic Chemistry、” 4th Edition、1992、Wiley-Interscience Publication、New Yorkに記載されている化学反応を使用して修飾することができる。

20

【0158】

荷電側基を有する水溶性ポリマーは、ポリマーが酸性側基を有する場合はカチオン、ポリマーが塩基性側基を有する場合はアニオンのいずれかの、反対の電荷のイオンを含む水溶液とポリマーを反応させることによって架橋することができる。ポリマーを酸性側基で架橋してヒドロゲルを形成するためのカチオンの例は、ナトリウムなどの一価カチオン；銅、カルシウム、アルミニウム、マグネシウム、ストロンチウム、バリウム、およびスズ、ならびにアルキルアンモニウム塩などのジ、トリまたはテトラ官能性有機カチオンである。これらのカチオンの塩の水溶液をポリマーに添加すると、柔らかい、高度に膨潤したヒドロゲルおよび膜が形成される。カチオンの濃度が高いほど、または結合価が高いほど、ポリマーの架橋度が高くなる。さらに、ポリマーは、酵素的に、たとえば、フィブリンとトロンピンとを架橋することができる。いくつかの実施態様では、米国特許第6,800,481号に記載のものなどの自己組織化ペプチドが使用される。これらのペプチドは、たとえば、細胞外液に存在するものなどの一価カチオンと接触すると、自己集合してヒドロゲル構造を形成する。

30

【0159】

ポリマー鎖を互いに架橋することによってゲルが形成される本発明の実施態様では、組成物は、特定のポリマーに従って選択される適切な架橋剤を含むことができる。あるいは、架橋剤は、ゲル形成材料を含む組成物の投与後に、実質的に同じ場所に投与することができる。これらのゲルのいずれも、たとえば、可溶性コラーゲンを含むゲルについて上記したように、インビトロで形成することができ、眼の近くの適切な位置に埋め込むことができる。

40

【0160】

特定の実施態様では、本明細書に記載のインプラントは、約100 μ g ~ 約50mgのCp40アナログ、たとえば、約100 μ g ~ 約40mg 約100 μ g ~ 約30mg 約100 μ g ~ 約20mg 約100 μ g ~ 約10mg 約100 μ g ~ 約9mg たとえば、約100 μ g ~ 約8mg、たとえば、約100 μ g ~ 約7mg、たとえば、約100 μ g ~ 約6mg、たとえば、約100 μ g ~ 約5mg、たとえば、約100 μ g ~ 約4mg、たとえば、約100 μ g ~ 約3mg、たとえば、約100 μ g ~ 約2mg、たとえば、約100 μ g ~ 約1mg、たとえば、約100 μ g ~ 約500 μ gを含む。

【0161】

微粒子およびナノ粒子の作製方法は、当技術分野で知られている。一般に、微粒子は、500ミクロン以下、たとえば、50 ~ 500ミクロン、20 ~ 50ミクロン、1 ~ 20ミクロン、1 ~ 10

50

ミクロンの直径を有し、ナノ粒子は、1ミクロン未満の直径を有する。好ましくは、デバイスは、硝子体液が占める空間に埋め込まれる。眼のインプラントは、ポリマーマトリックスを含み得る。本発明はまた、眼の近く、たとえば、眼のすぐ近くに導入するのに適した肉眼で見える埋め込み型デバイスである眼周囲インプラントを提供する。特定の実施態様では、眼周囲インプラントは、上記のものと同様の材料で作られている。

【0162】

他の実施態様では、Cp40アナログを発現する細胞を眼に移植することができる。米国特許第6,436,427号は、生物学的に活性な分子の細胞源を含む生体適合性カプセルを埋め込むことによって、生物学的に活性な分子を眼に送達するための方法を提供する。

【0163】

いくつかの実施態様では、制御放出形態は、吸収を改善し、特定の形態の代謝を防ぐために、消化管におけるコンスタチンアナログの持続的または場所特異的な遊離を達成するために調製されうる。たとえば、錠剤または耐酸性カプセル材料の耐酸性コーティングを使用して、コ胃でのコンスタチンアナログの放出を防止し、胃酵素による代謝から化合物を保護することができる。胃通過後の制御放出を達成するための適切な材料およびコーティングは、主に脂肪酸、ワックス、シェラック、プラスチックおよび植物繊維から構成され、これらに限定されないが、メチルアクリレート-メタクリル酸コポリマー、酢酸コハク酸セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタル酸塩、ヒドロキシプロピルメチルセルロース酢酸コハク酸塩(ヒプロメロース酢酸コハク酸塩)、酢酸フタル酸ポリビニル、アルギン酸ナトリウムまたはステアリン酸を含む。胃腸管での持続放出は、たとえば、さまざまなアクリル、キチンなどの不溶性物質のマトリックスにコンスタチンアナログを埋め込むことによって達成することができる。そのような製剤を調製する方法は、当業者に知られている。

【0164】

コンスタチンは、直腸、膣、尿道投与用の坐剤または浣腸剤に製剤することができる。この目的のために、コンスタチンアナログは、室温では固体半固体であるが、体温で溶融するカカオバターなどの脂肪性ベース担体に、またはポリエチレングリコールまたはグリセリンなどの水溶性固体ベース(グリセロールとゼラチンから作られる)に、溶解または懸濁することができる。製剤を改善するために他の賦形剤を添加することができ、坐剤は、投与を容易にする形態に成形される。他の実施態様では、小さな注射器で適用される、直腸送達に適した液体担体に溶解または懸濁されたコンスタチンアナログからなる液体坐剤を使用することができる。

【0165】

補体活性化が関係する慢性または急性肺状態の治療のためには、医薬組成物の好ましい投与経路は肺投与である。したがって、本発明の医薬組成物は、頬腔を介した肺投与に適した製剤で、調製、包装、または販売することができる。そのような製剤は、有効成分を含み、直径が約0.5~約7ナノメートル、好ましくは、約1~約6ナノメートルの範囲である乾燥粒子を含みうる。そのような組成物は、粉末を分散させるように推進剤の流れを向けることができる乾燥粉末リザーバを含むデバイスを使用して、あるいは、密閉容器内の低沸点推進剤に溶解または懸濁した有効成分を含むデバイスなどの自己推進式溶媒/粉末分配容器を使用して、投与するための乾燥粉末の形態であるのが好都合である。そのような粉末は、粒子の98重量%が0.5ナノメートルを超える直径を有し、粒子の数による95%が7ナノメートル未満の直径を有する粒子を含むのが好ましい。粒子の95重量%が、1ナノメートルを超える直径を有し、粒子の数による90%が6ナノメートル未満の直径を有するのがより好ましい。乾燥粉末組成物は、好ましくは、糖などの固体微粉末希釈剤を含み、単位剤形で都合よく提供される。

【0166】

低沸点推進剤は、一般に、大気圧で65°F未満の沸点を有する液体推進剤を含む。一般に、推進剤は、組成物の50~99.9%(w/w)を構成してもよく、有効成分は、組成物の0.1~20%(w/w)を構成してもよい。推進剤は、液体非イオン性または固体陰イオン界面活性剤

10

20

30

40

50

または固体希釈剤(好ましくは、活性成分を含む粒子と同じオーダーの粒子サイズを有する)などの追加の成分をさらに含みうる。

【0167】

肺送達用に製剤された本発明の医薬組成物はまた、溶液または懸濁液の液滴の形態で有効成分を提供しうる。そのような製剤は、有効成分を含む、必要に応じて滅菌された水性希釈アルコール溶液または懸濁液として、調製、包装、または販売されてもよく、任意の噴霧化(nebulizatio)または噴霧化(atomization)デバイスを使用して便利に投与することができる。そのような製剤は、サッカリンナトリウムなどの香味剤、揮発性油、緩衝剤、置換肺サーファクタント(replacement pulmonary surfactant)などの界面活性剤、またはヒドロキシ安息香酸メチルなどの保存剤を含むがこれらに限定されない1つ以上の追加の成分をさらに含みうる。この投与経路によって提供される液滴は、好ましくは、約0.1~約200ナノメートルの範囲の平均直径を有する。

10

【0168】

肺送達に有用であるとして本明細書に記載されている製剤は、本発明の医薬組成物の鼻腔内送達にも有用である。

【0169】

鼻腔内投与に適した別の製剤は、有効成分を含み、約0.2~500マイクロメートルの平均粒子を有する粗い粉末である。そのような製剤は、嗅ぎタバコを嗅ぐ方法で、すなわち、鼻孔の近くに保持された粉末の容器から鼻腔を通して急速に吸入することによって投与される。

20

【0170】

経鼻投与に適した製剤は、たとえば、有効成分のわずか約0.1%(w/w)から最大100%(w/w)を含むことができ、さらに、本明細書に記載される1つ以上の追加成分を含むことができる。

【0171】

本明細書で使用される医薬組成物の「非経口投与」には、対象の組織の物理的破壊を特徴とする投与および組織の破裂を介した医薬組成物の投与を含む任意の投与経路が含まれる。したがって、非経口投与には、組成物の注射による医薬組成物の投与、外科的切開による医薬組成物の適用、組織貫通性の非外科的創傷を介した組成物の適用などが含まれるが、これらに限定されない。特に、非経口投与は、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、関節内、硝子体内、内部注射、および腎臓透析注入技術を含むがこれらに限定されないことが企図される。

30

【0172】

非経口投与に適した医薬組成物の製剤は、滅菌水または滅菌等張食塩水などの薬学的に許容される担体と組み合わせられた有効成分を含む。このような製剤は、ポラス投与または連続投与に適した形態で調製、包装、または販売することができる。注射可能な製剤は、アンプルまたは防腐剤を含む複数回投与容器などの単位剤形で調製、包装、または販売することができる。非経口投与用の製剤には、懸濁液、溶液、油性または水性ビヒクル中のエマルジョン、ペースト、および埋め込み可能な徐放性または生分解性の製剤が含まれるが、これらに限定されない。そのような製剤は、懸濁剤、安定剤、または分散剤を含むがこれらに限定されない1つ以上の追加の成分をさらに含みうる。経口投与用の製剤の1つの実施態様では、有効成分は、再構成された組成物の非経口投与の前に、適切なビヒクル(たとえば、滅菌パイロジェンフリー水)で再構成するための乾燥(すなわち、粉末または顆粒)形態で提供される。

40

【0173】

医薬組成物は、無菌の注射可能な水性または油性の懸濁液または溶液の形態で調製、包装、または販売することができる。この懸濁液または溶液は、既知の技術に従って製剤することができる。有効成分に加えて、本明細書に記載の分散剤、湿潤剤、または懸濁剤などの追加の成分を含むことができる。そのような無菌の注射可能な製剤は、たとえば、水または1,3-ブタンジオールなどの非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒を使用し

50

て調製することができる。他の許容される希釈剤および溶媒として、リンゲル液、等張塩化ナトリウム溶液、および合成モノグリセリドまたはジグリセリドなどの固定油挙げられるが、これらに限定されない。有用な他の非経口投与可能な製剤として、微結晶形態で、リポソーム調製物で、超音波放出送達用のマイクロバブルで、または生分解性ポリマーシステムの成分として有効成分を含むものが挙げられる。徐放または埋め込みのための組成物には、薬学的に許容されるポリマーまたは疎水性材料、たとえば、乳濁液、イオン交換樹脂、難溶性ポリマーまたは難溶性塩が含まれる。

【0174】

本明細書で使用される「追加の成分」として、賦形剤；置換肺サーファクタントなどの界面活性剤；分散剤；不活希釈剤；造粒剤および崩壊剤；結合剤；滑沢剤；甘味剤；香料；着色剤；保存剤；ゼラチンなどの生理学的に分解される組成物；水性ビヒクルおよび溶媒；油性ビヒクルおよび溶媒；懸濁剤；分散剤または湿潤剤；乳化剤、粘滑剤；緩衝剤；塩；増粘剤；充填剤；乳化剤；抗酸化剤；抗生物質；抗真菌薬；安定化剤；および医薬的に許容されるポリマーもしくは疎水性材料のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物に含まれる他の「追加の成分」は、当技術分野で知られており、たとえば、Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PAに記載される。

10

【0175】

方法：

本発明の別の態様は、補体活性を調節する方法を特徴とする。一般に、該方法は、本発明のコンプスタチンアナログと、補体活性の調節が望ましい媒体を接触させることを特徴とし、接触は、媒体における補体活性の調節を生じるものである。該媒体は、補体活性の調節が望ましい媒体のいずれかでありうる。特定の実施態様において、該媒体には、(1) 培養された細胞または組織、(2) 対象または患者の体内の細胞または組織、および(3) ある対象の体から取り出され、その同じ患者の体に戻される(たとえば、血液の体外循環または自己移植)か、または別の患者に移される細胞または組織を含む、生物の細胞または組織が含まれる。後者の実施態様に関して、該培地には、体外シャント中に細胞または組織と接触させるチューブ、フィルターまたは膜などの生体材料がさらに含まれる。あるいは、前記媒体には、対象に埋め込まれる生体材料が含まれる。

20

【0176】

特定の実施態様では、補体活性の調節方法は、生きている患者または対象に適用し、補体活性化の誘発メカニズムに関係なく、補体エフェクター応答を増幅し、組織および細胞の炎症性損傷を悪化させる可能性がある、補体活性化、特に、AP介在補体活性化に関連する病的状態の患者の治療方法の一部または全てを含む。多くのこのような病的状態は、当技術分野で知られており(たとえば、上記のHolers, 2008を参照)、限定的ではないが、非定型溶血性尿毒症症候群(aHUS)；高密度沈着症(DDD)；C3系球体腎炎(C3GN)；C3系球体障害；その他の補体介在性腎症および系球体炎症性疾患；加齢性黄斑変性症(AMD)；黄斑変性症を特徴とする眼障害、脈絡膜血管新生(CNV)；網膜血管新生(RNV)、増殖性硝子体網膜症、緑内障、ブドウ膜炎、眼の炎症、またはこれらの任意の組み合わせ；発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)；寒冷凝集素症(CAD)；温式抗体自己免疫性溶血性貧血(wAIHA)；鎌状赤血球症；移植関連血栓性微小血管症；関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)；いくつかの自己免疫および自己炎症性腎疾患；自己免疫性心筋炎；多発性硬化症；外傷性脳および脊髄損傷；脳、腸および腎臓の虚血再灌流(IR)傷害；自発的および再発性妊娠損失；抗リン脂質抗体症候群(APS)；パーキンソン病；アルツハイマー病；異常なシナプスリモデリング、過剰なミクログリア活動および認知機能低下に裏打ちされた他の神経変性炎症状態；喘息；抗核細胞質抗原関連の微量免疫型血管炎(ウェゲナー症候群)；天疱瘡、水疱性類天疱瘡、および表皮水疱症などの非ループス自己免疫性皮膚疾患；外傷後ショック、癌；歯周炎；歯肉炎；およびアテローム性動脈硬化症を含む。特定の実施態様では、病的状態は、FHおよび/またはCD46をコードする遺伝子の突然変異および多型に関連しており、AMD、aHUSおよび膜性増殖性系球体腎炎II型(MPGN-II、高密度沈着症(DDD)とも

30

40

50

呼ばれる))を含むがこれらに限定されない。他の実施態様では、本発明のコンプスタチンアナログは、これらの薬剤が現在処方されているか、または前臨床および臨床試験で開発されている疾患の治療におけるエクリズマブの代替としての使用に適している。このような疾患として、aHUS、PNH、C3G(DDD/C3GN)、CADおよびAMDが挙げられるが、これらに限定されない。

【0177】

治療方法は、典型的に、(1)上記に記載の補体活性化の調節によって治療可能な疾患または病気に罹患している対象を同定し、(2)十分に熟練した技術者の範囲内である技術分野における標準技術を使用する、補体活性化の調節によって治療可能な疾患または状態のパラメーターを測定すること(たとえば、生検、組織学、MRI、骨スキャン、X線、疼痛耐性、姿勢など)、(3)該対象に、治療される状態に適切な治療投薬計画および期間を用いて、有効量の本発明のコンプスタチンアナログを投与すること、および(4)疾患または状態が改善されたか、または治療されたことの指標として、疾患または状態のパラメーターを測定すること；を含む。コンプスタチンまたはコンプスタチンアナログの送達は、経口、鼻(たとえば、鼻腔用スプレーを介して)、眼内(硝子体内を含む)、直腸、静脈内注射/注入、皮下注射/注入、筋肉内、歯周(たとえば、歯肉投与または乳頭内浸潤)、局所などを含む、当技術分野で知られている任意の適切な投与経路によって実施することができる。適当な投与量および治療投薬計画の作成は、限定的ではないが、治療される患者のタイプおよび疾患状態のタイプ、患者の年齢ならびに投与経路などの、多くの因子に依存して変動する。当業者は、このような変動を考慮して、投薬計画を設計することに精通している。たとえば、本発明のコンプスタチンアナログの経口投与が、たとえば、静脈内注射と比較される経路よりバイオアベイラビリティが低いため、より高い初期投薬量が必要とされることは、当業者にとって明らかである。同様に、本発明のコンプスタチンアナログの筋肉内投与は、静脈内または硝子体内注射による同じアナログの送達よりも高い用量を必要とするであろう。適切な治療有効用量は、本明細書の他の部分で、より詳細に記載される。

10

20

【0178】

1つの実施態様では、補体活性化の調節によって治療可能な疾患または状態に罹患しているヒト患者または非ヒト霊長類などの個体を治療するための方法であって、最初に、補体活性化の調節によって治療可能な疾患または病気に罹患している個体を同定し、次に、治療有効量の本発明のCp40系アナログを個体に投与するステップを含む方法が提供され、ここで、投与経路は、静脈内または皮下であり、Cp40系アナログの治療有効量は、約0.125mg/kg～約10mg/kg；preferably、the amount is 約0.25mg/kg～約5mg/kg、または約0.5mg/kg～約5mg/kgまたは約0.5mg/kg～約4mg/kg、または約0.5mg/kg～約3mg/kg、または約3mg/kgである。もう1つの実施態様では、投与経路は、筋肉内であり、Cp40系アナログの治療有効量は、約0.25mg/kg～約50mg/kgであり；好ましくは、治療有効量は、約0.25mg/kg～約35mg/kg、または約0.25mg/kg～約30mg/kg、または約0.25mg/kg～約10mg/kg、または約0.25mg/kg～約5mg/kg、または約2.5mg/kgである。いくつかの態様では、投与経路は、経口であり、Cp40系アナログの治療有効量は、約1mg/kg～約20mg/kgであり；好ましくは、治療有効量は、約1mg/kg～約10mg/kgまたは約1mg/kg～約5mg/kgである。もう1つの実施態様では、投与経路は、硝子体内であり、Cp40系アナログの治療有効量は、約1μg～約10mgであり；好ましくは、治療有効量は、約1μg～約2,000μgまたは約1mgである。他の適切な治療有効用量および投与経路は、本明細書の他の部分でより詳細に記載される。これらの実施態様では、方法は、十分に熟練した技術者の範囲内である、技術分野における標準技術を使用する、補体活性化の調節によって治療可能な疾患または状態の少なくとも1つのパラメーターを測定すること(たとえば、生検、組織学、MRI、骨スキャン、X線、疼痛耐性、姿勢など)を含む、1つ以上の測定ステップも含み、それによって、疾患または状態のパラメーターを測定することが、疾患または状態が治療されている指標として使用することができ、Cp40系アナログの投与前、投与中、および/または投与後に、測定ステップが実行されることが理解される。

30

40

50

【0179】

もう1つの実施態様では、補体活性化の調節によって治療可能な疾患または病気に罹患している個体を治療する方法であって、本発明のCp40系アナログの初回治療有効量を個体に投与することを含む方法が提供され、ここで、投与経路は、静脈内または皮下であり、Cp40系アナログの初回治療有効量は、少なくとも約0.125mg/kg～約10mg/kgであり；好ましくは、約0.5mg/kg～約3mg/kgである。次に、この治療は、本発明のCp40系アナログの維持用量を個体に投与し、ここで、投与経路は、筋肉内であり、Cp40系アナログの維持用量は、約0.25mg/kg～約50mg/kgであり；好ましくは、約0.25mg/kg～約10mg/kgである。あるいは、維持用量は、経口投与され、Cp40系アナログの維持用量は、約1mg/kg～約20mg/kgであり；好ましくは、約1mg/kg～約10mg/kgである。維持用量を投与する他の経路は、本明細書の他の部分でも記載される。次に、維持用量は、2-3日に1回～1ヶ月に約1回；好ましくは、2週間に1回を前提として、複数回送達を介して投与される。あるいは、初回治療有効量は、筋肉内経路を介して投与される、少なくとも約2mg/kgである。これらの実施態様では、方法は、十分に熟練した技術者の範囲内である、技術分野における標準技術を使用する、補体活性化の調節によって治療可能な疾患または状態の少なくとも1つのパラメーターを測定すること(たとえば、生検、組織学、MRI、骨スキャン、X線、疼痛耐性、姿勢など)を含む、1つ以上の測定ステップも含み、それによって、疾患または状態のパラメーターを測定することが、疾患または状態が治療されている指標として使用することができ、Cp40系アナログの投与前、投与中、および/または投与後に、測定ステップが実行されることが理解される。

10

20

【0180】

コンプスタチンアナログに対する抗体を生成する新規な方法も本明細書で提供される。この方法は、典型的には、抗体を生成するのに適した動物、たとえば、ラット、マウス、サル、ウサギ、ヤギ、ブタ、またはヒツジの免疫化を含む。好ましい実施態様では、ウサギは、コンプスタチンアナログで免疫され；好ましくは、コンプスタチンアナログは、Cp40またはCp40系アナログ(たとえば、Cp40-KKまたはCp40-KKK)である。このような態様では、コンプスタチンアナログは、免疫化の前に、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)などの適切な担体タンパク質に結合される。他の実施態様では、コンプスタチンアナログは、さらにアジュバントを含む混合物中で、担体タンパク質に結合され；強力なアジュバントが好ましい。典型的なアジュバントとして、無機化合物(たとえば、ミョウバン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム水酸化物)、鉱物油、洗浄剤、植物サポニン、サイトカイン(たとえば、IL-1、IL-2、IL-12)、ブロックコポリマー、およびそれらの組み合わせが挙げられる。たとえば、1つの特定の態様では、ウサギは、強力なアジュバントの存在下で、KLHに結合されたCp40またはCp40系アナログで免疫される。免疫化用量は、約50 μ g～約500 μ gの範囲であり；好ましくは、免疫化用量は、約100 μ gである。次に、免疫された動物に、2日毎から4週間毎に、注射によってアナログ-KLH-アジュバント組成物を投与し；動物が、毎週注射されるのが好ましい。注射は、少なくとも2週間、たとえば、2週間、3週間、4週間、5週間、またはそれ以上継続される。好ましい実施態様では、免疫された動物は、免疫された動物は、アナログ-KLH-アジュバント組成物の4週間の注射を5週間与えられる。注射は、10 μ g～約100 μ gの用量範囲を含み；好ましくは、用量は、約50 μ gである。次に、Cp40特異的抗体は、当技術分野で知られている任意の適切なタンパク質精製技術、たとえば、アフィニティークロマトグラフィーによって動物血清から精製される。本明細書に記載の方法によって産生されるCp40およびCp40-リシン抗体は、以下の実施例7にさらに詳細に記載されるように、Cp40またはCp40-リシンペプチドに非常に特異的である。したがって、これらの新規抗体は、異なるコンプスタチンアナログを特異的に検出することができるだけでなく、その非修飾バージョンとリシン修飾バージョンをさらに区別することができる。好ましい実施態様では、新規抗体は、モノクローナル抗体である。

30

40

【0181】

また、硝子体など、最小量のわずかなサンプルしか取り出せないものを含む体液中の、

50

本明細書に記載のCp40系アナログを検出するための新規かつ高感度な方法も本明細書に提供される。そのような方法は、非常に少量の生体液しか必要としない。これらの方法は、対象のCp40系アナログを含む硝子体サンプルまたは血漿サンプルに対して実行されるSPR分析を採用する。1つの実施態様では、生体サンプル中のCp40系アナログを検出する方法であって、(1)Cp40系アナログ分子を含む生体サンプルを提供するステップ(ここで、これらのアナログの少なくとも一部分は、C3/C3b/C3cに結合される)；(2)複数のCp40またはCp40アナログ分子が共有結合しているCM5センサーチップを提供するステップ；(3)生体サンプルを熱不活性化して、標的分子(すなわち、C3/C3b/C3c)からコンプスタチンアナログを放出するステップ；(4)熱不活性化サンプルを、C3の供給源として所定量のヒト血漿のC3と混合するステップ；(5)熱不活性化サンプルと固定量のC3またはヒト血漿の混合物をCM5センサーチップに接触させるステップ(それによって、標的-結合Cp40複合体から放出されたCp40アナログ分子は、C3または血漿由来C3への結合に対して、CM5センサーチップ上に固定化されたCp40分子/アナログと競合する)；および(6)CM5センサーチップ上に固定化されたCp40またはそのアナログへの結合によって遊離C3を検出するステップ；を含む方法が提供される。SPR信号は、固定化されたCp40分子またはそのアナログに結合したC3の量に正比例する。したがって、SPR信号の減少は、固定化されたCp40への遊離C3の結合の減少に対応し、熱不活性化された生体サンプル中に存在する遊離Cp40またはCp40アナログの量の尺度として役立つ。サンプル中の未知のCp40アナログ量の定量は、既知のペプチド濃度の標準曲線に従って実行される。好ましい実施態様では、CM5センサーチップに共有結合しているCp40分子は、生体サンプル中で対象となる同じCp40系アナログ分子である。たとえば、特定の実施態様では、Cp40-KKKは、CM5センサーチップに共有結合され、生体サンプル(たとえば硝子体液サンプル)は、最初に上記のように熱不活性化され、続いて、C3の較正源と混合され、チップ上を流されて、サンプル中のC3/C3b/C3c-結合Cp40-KKK複合体から放出されたペプチドの競合的検出を可能にする。

【0182】

以下の実施例は、本発明をより詳細に説明するために提供される。それらは、本発明を限定するものではなく、説明することを意図している。

【実施例1】

【0183】

Cp40に基づくアナログの設計

Cp40(DTyr-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asn-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH₂)(配列番号：7)、Cp40-Lys-NH₂(Cp40-K；配列番号：8)、Cp40-Lys-Lys-NH₂(Cp40-KK；配列番号：9)、およびCp40-Lys-Lys-Lys-NH₂(Cp40-KKK；配列番号：10)は、Fmoc-固相ペプチド合成を使用して、社内またはGL Biochem(上海、中国)によって合成され、当技術分野で知られている技術に基づく逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を使用して精製された(たとえば、Qu、H.ら、2011、Mol Immunol 48：481-489；Qu、H.ら、2013、Immunobiology 218：496-505を参照)。図2に示すように、化合物の純度は、RP-HPLCおよびマイクロマス(登録商標)MALDIマイクロMX(登録商標)で、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)(Waters Corporation、Milford、MA)によって検証された。化合物の量に応じて、直径4.6、10、または19mmのXBridgeBEH C₁₈カラム(5- μ m粒径、150-mm長さ、Waters Corporation、Milford、MA)をRP-HPLCに使用し、それぞれ、2、4.5、または16ml/分の流速にて30分以内で、0.1%TFA水溶液中の5~70%アセトニトリルの勾配で溶出を行った。

【0184】

当技術分野で知られているPEG化手順に基づいて、mPEG(3k)-、mPEG(2k)-、mPEG(1k)-、およびmPEG(1056)-Cp40の合成を行った(米国8,962,553；Risitanoら、2014、Blood 123：2094-2101)。手短に言えば、1当量のCp40(5mg/ml)をアセトニトリル/水(1：1)に溶解し、2当量のそれぞれの活性化したmPEGエステルを加えた。N-メチルモルホリンを用いて反応混合物のpHを8に調節した。

室温で0.5~1時間攪拌した後、0.1%TFA水溶液(pH2)を加えて反応混合物の反応を停止さ

せた。すべてのペプチドを、上記のようにRP-HPLCによって精製し、MALDI-TOF MSによって特徴付けた(図2参照)。

【0185】

mPEG(528)-Cp40の調製のために、前述のように樹脂上で直鎖Cp40を合成した(たとえば、Qu、H.ら、2011、Mol Immunol 48:481-489; Qu、H.ら、2013、Immunobiology 218:496-505を参照)。DMF中の20%ピペリジンを使用して、最終N末端アミノ酸Fmoc-DTyr(tBu)-OHのFmocを脱保護した後、DMF中の3当量のmPEG(528)-NHSエステルを乾燥ビーズに加えた。N-メチルモルホリンを使用してpHを8.0に調節し、回転器上で2時間攪拌を進行させた。カイザー試験により反応完了を確認した。続いて、ビーズをDMFおよびDCMで洗浄し、真空下で乾燥させた。Quら(上記)によって記載されているように、ペプチドを樹脂から切断した。凍結乾燥した粗直鎖脱保護ペプチド(1当量)を80%水性メタノールに溶解し、激しく攪拌しながら、メタノール中の20mMヨウ素(13当量)をゆっくりと加えた。室温で30分間攪拌した後、20mMのアスコルビン酸水溶液を加えることにより環化反応を停止させた。メタノールを減圧下で除去し、粗ペプチドを上記のようにRP-HPLCによって精製した。次に、ペプチドを、MALDI-TOF MSによって特徴付けた(図2参照)。

10

【0186】

すべてのペプチドを最初にTFA塩として得、EP 2163558 A3に記載されているように、25mM酢酸アンモニウム水溶液を使用してHPLCカラムでさらに酢酸塩に変換した。最終化合物の質量を、MALDI-TOF MSによって確認した。インビボ実験に使用したペプチドを、エンドトキシン(<0.03 EU/ml)の存在について試験した。Cp40、Cp40-K、Cp40-KK、およびLohCp40-KKKは、GL Biochem(上海、中国)によるFmoc固相ペプチド合成を使用して合成され、Quらによって以前に記載された手順に基づいて、逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を使用して精製された。化合物の純度は、マイクロマス(登録商標)MALDIマイクロMX(商標)(Waters Corporation、Milford、MA)でのRP-HPLCおよびMALDI-TOFMS(図2)によって検証された。化合物の量に応じて、直径4.6、10、または19mmのXBridgeBEH C18カラム(5- μ m 粒径、150-mm長さ、Waters Corporation、Milford、MA)をRP-HPLCに使用し、それぞれ、2、4.5、または16ml/分の流速にて30分以内で、0.1%TFA水溶液中の5~70%アセトニトリルの勾配で溶出を行った。

20

【実施例2】

【0187】

Cp40系アナログの溶解度

実施例1で設計されたCp40系アナログの溶解度を試験するために、各アナログについて、5~10mgのペプチドをLoBindエッペンドルフチューブで秤量し、20 μ lのPBS(pH7.4)と混合した。混合物をボルテックスし、16,873 x gで2分間遠心分離した。特に断りのない限り、それぞれのペプチドが溶解しなかった場合、PBSを10 μ lずつ加え、その後、すべての沈殿物が消えるまでボルテックスおよび遠心分離を行った。ペプチド溶液のpHは、指示紙(ワットマン(商標)2614-991、タイプCF、比色チャート付きの広範囲のpH試験ストリップ、pH範囲4.510、サイズ6x80mm)で決定された。最終溶液の濃度は、NanoDropTM 2000c分光光度計(Thermo Scientific、Wilmington、DE)で280nmにて測定された吸光度に基づいて、式 $c = A / \epsilon \cdot b$ (c = 濃度、 A = 吸光度、 ϵ = 吸光係数、 b = 光路長)を用いて決定された。

40

【0188】

Cp40は水への溶解度が高いが、生理的pH(pH7.4のPBSで0.8mg/ml)では溶解性が低い(Quら、2013、Immunobiology 218:496-505)。したがって、C3に対する阻害活性または結合親和性を著しく低下させることなく溶解度が改善されたCp40を作製するために、Cp40を、実施例1に記載されるように、そのN末端領域またはそのC末端領域のいずれかで修飾した。

【0189】

以前の報告では、NHPでは、C末端が40kDaのPEG鎖で修飾されたCp40は、阻害活性の低下に関連しているのに対し、N末端が40kDaのPEG鎖で修飾されたCp40は、インビボ投与後に血漿中での滞留時間が延長されたことが示されたが、非修飾Cp40と比較して結合親和性が

50

100分の1を超えて低かった(Risitanoら、2014、Blood 123 : 2094-2101 ; 図2および3を参照)。本研究では、Cp40のN末端は、アミドカップリングを介して1、2、または3kDaの多分散PEG鎖にカップリングされた。得られたアナログは、mPEG(3k)-Cp40、mPEG(2k)-Cp40、およびmPEG(1k)-Cp40と名付けられた(図1)。PEG化により、得られたCp40系アナログの溶解度は大幅に増加し、mPEG(3k)-Cp40はPBS中で、>270mg/mlの最も高い溶解度を示した(pH = 7.0、表2)。

【 0 1 9 0 】

多分散ポリマーでPEG化された化合物は、構造が明確でなく、それによって特性評価がより困難になる(Veronese、2001、Biomaterials 22 : 405-417)。よりよく特徴付けることができるより明確な構造を作り出すために、単分散ポリマーを使用したCp40のPEG化を、mPEG(1056)およびmPEG(528)の活性化NHSエステルを使用して実施した。多分散PEGおよびmPEG(1056)を使用したPEG化は、予め合成されたCp40で行われたが、単分散化合物mPEG(528)-Cp40のPEG化は、樹脂上で行われ、HPLC精製という追加ステップが1つ不要になった。得られた単分散アナログmPEG(1056)-Cp40の溶解特性は、その多分散対応物の溶解特性と非常に類似していることがわかった。対照的に、より小さなPEG鎖(528 Da)の付着は、PBS中の溶解度を約140mg/mlから2.3mg/mlに大幅に低下させた(表2)。

10

【 0 1 9 1 】

PEG化に加えて、親水性 / 荷電残基の組み込みが、Cp40の溶解度を増加させるための代替アプローチとして使用された。この目的のために、ペプチド合成中に、1、2、または3個のリシン残基がCp40のC末端に結合された。特に、化合物の溶解度は、Lys残基の数の増加とともに増加し、すなわち、Cp40-Kの溶解度(37mg/ml)は、Cp40-KKおよびCp40-KKKの溶解度(>245mg/ml)よりもはるかに低かった(表2)。特に、PBS中の277mg/mlのCp40-KKの溶液で7~7.5のpHが測定されたのに対し、3番目のLys残基の存在は、それぞれのCp40-KKK溶液において、より高いpHをもたらした。7の値域のpHは、7mg/mlのCp40-KKK濃度でのみ観察された(表2)。

20

【 0 1 9 2 】

【表 2】

表2. PBS中のCp40系アナログの溶解度およびpH

アナログ	濃度 (mg/ml)	pH
Cp40	1.08	7.5
mPEG (3k)-Cp40	>270	7
mPEG (2k)-Cp40	172	7.5
mPEG (1k)-Cp40	157	7-7.5
mPEG (1056)-Cp40	137	7-7.5
mPEG (528)-Cp40	2.3	7-7.5
Cp40-K	7.1	7.5
Cp40-KK	>272	7-7.5
Cp40-KKK	>245	8.5
Cp40-KKK	7.0	7.5*
Cp40-KKK	>100**	9.5

*PBSの添加により調節されたpH。

**H₂Oからの追加の凍結乾燥後。

【実施例 3】

【0193】

Cp40系アナログの補体阻害能力および標的親和性

修飾ペプチドが、Cp40の阻害活性および標的親和性を保持しているかどうかを判断するために、補体活性の古典的経路の阻害をインビトロ酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)で評価した(たとえば、Malik、2005、Journal of Medicinal Chemistry 48:274-286を参照)。簡単に言えば、Cp40およびそのアナログの存在下または不在下での正常なヒト血漿における抗原-抗体複合体媒介補体活性化は、C3b沈着に基づいて検出された。この目的のために、マイクロタイターウェル(NUNC)をPBS(pH7.4)中の1%オボアルブミン50 μ lで、周囲温度で2時間コーティングした。ウェルを200 μ lの1%BSAを含むPBSで1時間ブロックし、次に、50 μ lの1:1000 -オボアルブミンポリクローナル抗体を含むPBSで1時間コーティングした。各ステップの間に、プレートを200 μ lの0.05%Tween 20を含むPBS(PBS-T)で3回洗浄した; 30 μ lのVBS(ペロナル緩衝液 1X; 5 mMペロナル、pH 7.4、150 mM NaCl、0.5 mM CaCl₂および0.5 mM MgCl₂を含む)を、96ウェルプレートの各列の最初のウェルを除くすべてに配置し、VBS中の5 μ Mペプチド溶液を調製した。ペプチド濃度は、Thermo ScientificのNanodrop™2000c分光光度計で、すべてのペプチドについて、吸光係数12,615 \cdot M⁻¹cm⁻¹を使用して280nmで測定した。VBS中で1:40に希釈されたヒト血漿を、0.005~2.5 μ Mのペプチドと共に15分間インキュベートした。PBS-Tで洗浄した後、PBS中の1%BSA中の1:1000ヤギ -ヒトC3 HRP結合抗体を50 μ l/ウェルでウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。活性化を示す補体結合を、HRP基質(0.05%のABTSおよび0.1%の0.1Mクエン酸ナトリウム中の30%H₂O₂水溶液、pH 4.2)の添加によって検出し、405nmで読み取った。100%をペプチドの不在下での補体活性化に等しいものと考慮して、405nmで得られた吸光度データを阻害%に変換した。阻害パーセントを濃度の対数に対してプロットし、Gr

10

20

30

40

50

aphPad Prism 5(La Jolla, CA)を使用して、結果のデータセットを方程式「log(インヒビター)対正規化された応答」に合わせた。IC₅₀値は、少なくとも3回の独立した実験の平均の適合パラメーターから得られた。Cp40を、常に内部対照として使用した。

【0194】

Cp40系アナログとC3bとの結合親和性および速度論的プロファイルを、以前に記載されたプロトコルに基づいて、Biacore 3000機器(GE Healthcare、Piscataway Township、NJ)を使用するSPRによって評価した(たとえば、Quら、2011、Mol Immunol 48 : 481-489 ; Quら、2013、Immunobiology 218 : 496-505 ; Magottiら、2009、J Mol Recognit 22 : 495-505 ; Huangら、2014、ChemMedChem 9 : 2223-2226を参照)。すべての実験は、0.01M HEPES、pH7.4、0.15M NaCl、3 mM EDTA、および0.005%界面活性剤P20(HBS-EP)をランニングバッファとして使用して、25℃にて行った。精製されたヒトC3b(Complement Technology、Inc.、Tyler、TX)は、GE Healthcareのアミンカップリングキットが付属する固定化手順から適合したように、アミドカップリングを介して11,000~20,000共鳴単位(RU)の密度でCM5センサーチップ(GE Healthcare、Uppsala、Sweden)にコーティングされた。コーティングされていないフローセルを参照面として使用した。各Cp40(2.5、5、10、20、40nM)アナログの濃度を増加させた一連の5つのサンプルを、30 μl/分の流速でそれぞれ2分間連続して注入し、最終解離ステップを80分にした。Cp40は、内部対照としてすべてのSPR実験に含まれた。各ペプチドは、少なくとも3つの独立した実験でスクリーニングされた。すべてのセンサーグラムは、Scrubberソフトウェアを使用して処理された(BioLogic Software、Campbell、Australia)。得られたデータをBIAevaluationソフトウェア(GE Healthcare)の1:1ラングミュア結合モデルにグローバルフィッティングし、方程式 $K_D = k_d/k_a$ から平衡解離定数(KD)を得た。

10

20

【0195】

表3および図3に示すように、修飾Cp40ペプチドの阻害活性は、N末端でのPEG化またはC末端でのLys残基の付加によって有意に影響されなかった。対照的に、C3bへの個々のペプチドの結合親和性は、Cp40修飾によって影響を受けた(表3)。Cp40(mPEG(528)-Cp40)のN末端に最短のPEG鎖を追加すると、Cp40の親和性(KD 0.5nM)と比較して、C3bに対する結合親和性が5分の1に低下したが、PEG鎖の長さを長くすると、mPEG(3k)-Cp40の親和性がさらに低下した(KD 7.9 nM)(表3ならびに図4および5)。他方、Lys残基の結合は、得られたアナログのC3bへの結合に正の効果をもたらした。単一のLys残基の付加は、結合に有意な影響を与えなかったが、2つまたは3つのLys残基の付加は、C3bへの結合親和性においてそれぞれ1.25倍および2.5倍の増加をもたらした(表3ならびに図4および5)。一般に、さまざまなアナログの会合速度の変動($(0.7-4) \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)は、解離速度の変動($(1.2-2.8) \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$)よりも大きかった。

30

【0196】

【表 3】

表3. Cp40系アナログの阻害活性およびC3b結合親和性*

アナログ	IC ₅₀ (nM)	k _a (10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (10 ⁻³ s ⁻¹)	K _D (nM)
Cp40	56.8 ± 3.0	3.57 ± 0.70	1.84 ± 0.40	0.53 ± 0.14
mPEG(3k)-Cp40	83.0 ± 7.0	0.45 ± 0.27	2.40 ± 0.91	7.91 ± 2.02
mPEG(2k)-Cp40	83.8 ± 4.5	0.54 ± 0.13	2.39 ± 0.46	4.47 ± 0.61
mPEG(1k)-Cp40	52.7 ± 2.9	0.76 ± 0.15	2.18 ± 0.14	2.98 ± 0.54
mPEG(1056)-Cp40	52.0 ± 2.7	0.72 ± 0.25	2.80 ± 0.95	3.93 ± 0.39
mPEG(528)-Cp40	83.5 ± 8.1	1.00 ± 0.27	2.45 ± 0.28	2.58 ± 0.51
Cp40-K	95.6 ± 9.2	1.98 ± 0.20	1.85 ± 0.50	0.92 ± 0.20
Cp40-KK	61.8 ± 4.2	3.94 ± 1.26	1.52 ± 0.25	0.44 ± 0.17
Cp40-KKK	81.7 ± 5.3	3.83 ± 2.58	1.24 ± 0.42	0.21 ± 0.09

k_a、会合定数

k_d、解離定数

K_D、平衡解離定数

*すべての値は、3つの独立した実験の平均から計算された。

【実施例 4】

【0197】

皮下投与後の非ヒト霊長類の血漿中のCp40系アナログの薬物動態分析

方法：

Cp40、mPEG(3k)-Cp40、Cp40-KK、およびCp40-KKKを、NHPにおいてインビボで試験し、薬物動態プロファイルに対するPEG化およびLys結合の影響を評価した。研究は、Simian Conservation Breeding and Research Center(SICONBREC)、Inc. (Makati、フィリピン)で実施された。各ペプチドアナログ(Cp40、Cp40-KK、Cp40-KKK、mPEG(3k)-Cp40)は、体重が約4kgの2匹の個別の6~7歳齢の健康な雄性カニクイザル(*Macaca fascicularis*)で試験した。各ペプチド2mg/kgを1回の皮下注射で投与した：8mgの正味Cp40を2mlの滅菌生理食塩水(Cp40、Cp40-KK)、0.5mlの滅菌生理食塩水(mPEG(3k)-Cp40)、または0.25mlの100 mMリン酸緩衝液(Cp40-KKK)に溶解し、を加え、29GX1/2" 針付きの3/10mLインスリン安全注射器を使用して皮下注射した。血液サンプルは、凝固および補体活性化を防ぐためのEDTA-パキュテイン採血管に、EDTAへのサンプル投与前(0時間)およびサンプル投与後のさまざまな時点(t = 5分、30分、1、2、4、6、12、24、48、72、96、120時間)で採取された。すべての血液サンプルを約800 x gで10分間遠心分離し、得られた血漿サンプルを直ちに凍結し、さらなる分析のためにペンシルベニア大学に送った。すべてのNHP研究は、動物福祉法令に従って実施された。

【0198】

血漿サンプルを分析し、血漿半減期を決定するために、標準溶液と血漿サンプルの調製を最初に行った。検量線は、分析対象の血漿サンプルと一緒に調製した：それぞれのペプチド(Cp40、Cp40-KK、Cp40-KKK、またはmPEG(3k)-Cp40)のストック溶液を、未処置のNHP血漿に最終濃度1、2、4、8、および16 μMでスパイクした。ストック溶液の濃度は、Thermo ScientificのNanodrop™2000c分光光度計を使用して280nmにて測定した。さらなる分析の前に、タンパク質沈殿のために、すべての血漿サンプルを次のようにメタノールで処理した：分析対象のNHP血漿50 μlを、0.5mlのLoBindエッペンドルフチューブ内で、内部標準(IS)として機能する0.5 μg/ml同位体標識Cp40(DTyr-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asn-Trp-Sar-Ala-His-[13C6; 15N4]Arg-Cys]-mIle-NH₂、Bachem、Torrance、CA)を含む150 μl

メタノールと混合した。混合物を～8分間ボルテックスし、室温で10分間静置し、16,873 x gで20分間遠心分離した。注入バイアル(TruView LCMS認定透明ガラス12x32mmスクリー
 ネットータルリカバリーバイアル、Waters Corporation、Milford、MA)で、上清を10
 mMギ酸アンモニウム水溶液中の20%メタノール溶液(pH3)と1:1で混合した。mPEG(3k)-Cp
 40サンプルについては、ギ酸アンモニウム溶液の代わりに3%のMeCN水溶液を使用した。

【0199】

液体クロマトグラフィーおよび質量分析については、血漿サンプルを上記のように処理
 し、当技術分野に記載の手順に基づいて、超高速液体クロマトグラフィー-エレクトロス
 プレーイオン化-タンデム質量分析(UPLC-ESI-MS)によって分析した(Quら、2013、Immunob
 iology 218:496-505; Primikyriら、2017、J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Lif
 e Sci 1041-1042:19-26を参照)。この方法は、mPEG(3k)-Cp40を含む血漿サンプルの分析
 用にわずかに調整された。ここでは、35Vの固定衝突エネルギーが、イオントラップに印
 加された。検量線の作成については、それぞれのMSピーク(3価Cp40および同位体標識Cp40
 、4価Cp40-K(画分)、Cp40-KKおよびCp40-KK、およびmPEG(3k)-Cp40(-Sar-Ala-His-Arg-)
 の436.256 m/zでの一価画分)の曲線下面積(AUC)を積分によって決定し、濃度に対してプ
 ロットした。各時点での血漿濃度を、対応する標準曲線を使用して、各ペプチドの同じ質
 量ピークの抽出されたピーク面積から計算した。

10

【0200】

血漿半減期および追加の薬物動態パラメーターを決定するために、NHP血漿中のペプチ
 ドの半減期を、Quら(上記)およびPrimikyriら(上記)に記載されているように決定した。
 観察された最大濃度(c_{max})および最大濃度時間(t_{max})は、薬物動態プロファイルから手入
 力で決定された。次の式を使用して、0-120時間からのAUC(AUC_{0-t})、0-無限時間からのAU
 C($AUC_{0-\infty}$)、見かけの分布体積Vz/F、(F = バイオアベイラビリティ)、および見かけのク
 リアランスCL/Fを計算した：

20

【数1】

$$AUC_{0-t_n} = \int_0^{t_n} c(t) * dt, \quad AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty}, \quad \frac{Vz}{F} = \frac{CL}{k_{el}}, \quad \frac{CL}{F} = \frac{DOSE}{AUC_{0-\infty}}$$

30

ここで、 $t_n = 120$ 時間、 k_{el} = 消失速度定数である。個々の薬物動態パラメーターを、Ph
 oenix 64 WinNonlin Build8.0.0.3176ソフトウェアを使用した非コンパートメントアプロ
 ーチを使用して計算した。血漿モデル(血管外投与)を、線形台形線形補間で使用した。

【0201】

ヒト補体因子(C3c)に対するN抗血清アッセイキット(Dade Behring、マールブルク、ド
 イツ)を使用して、免疫比濁法を実施して、NHP血漿中の補体成分C3のレベルを決定した。
 NHP血漿中のC3定量化のためのアッセイを検証するために、C3濃度を最初にヒトで測定し
 、次に、NHP血漿で測定して、キット内の抗体の反応性の違いの程度を決定した。この目
 的のために、NHP血漿の段階希釈液を、カニクイザルからの既知濃度の精製C3をスパイク
 した。ヒト血漿とNHP血漿で測定されたC3濃度は相関しており、NHP血漿中のC3濃度に対し
 て1.2の補正係数(CF)が得られた。NHP血漿中のC3濃度である c_{C3} は、比濁法で測定され、
 式： $c_{C3} = c_{C3} * CF$ を使用して最終濃度に補正された。実験の過程中的C3ベースラインレ
 ベルおよびC3レベルを、記載されたアッセイを使用して評価した。

40

【0202】

NHPおよびヒト血漿ならびにNHP総タンパク質皮膚組織におけるCp40-KKおよびCp40-KKK
 のタンパク質分解の評価のために、Cp40-KKまたはCp40-KKKを、最終濃度16 μ MでNHPまた
 はヒト血漿のいずれかにスパイクした。Cp40-KKKを、NHP皮膚総タンパク質(カニクイザル
 由来; Zyagen、サンディエゴ、カリフォルニア)にも最終濃度20 μ Mまでスパイクした。サ
 ンプルを水浴中で、37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートし、インキュベーション前、インキュベ
 ーション中のさまざまな時点、およびインキュベーション終了時に、サンプルを採取した

50

。サンプルを上記のようにタンパク質沈殿に付し、上記のようにUPLC-ESIMSによって分析した。

【 0 2 0 3 】

結果：

各ペプチドを2匹のサルに単回投与(8mg ; 2mg/kg)で皮下(sc)注射し、5日間にわたって血液サンプルを採取した(t = 注射前、注射後5、30分、1、2、4、6、12、24、48、72、96、120時間、図6A)。図3Bおよび表4に示すように、Cp40の半減期は、2匹のサルで41時間および48時間であった。比較すると、2匹のカニクイザルに単回皮下注射として投与されたmPEG(3k)-Cp40の薬物動態プロファイルは、mPEG(3k)-Cp40が、より高い最大濃度に到達し、半減期が、延長されたことが示された($t_{1/2}$ は、それぞれ65時間および53時間)(図6Cおよび表4)。

10

【 0 2 0 4 】

【表 4】

表4. 皮下投与後のNHP血漿中のCp40、Cp40-KK、Cp40-KKK、およびmPEG(3k)-Cp40の薬物動態プロファイルから計算された薬物動態パラメーター

アナログ	動物	C_{max} (mg/ml)	$t_{1/2}$ (時間)	t_{max} (時間)	C_{max} (μ M)	$AUC_{0-\infty}$ (μ M・時間)	AUC_{inf} (μ M・時間)	V_z/F (ml/kg)	CL/F ($(\text{mg/kg})/$ μ M・時間)
Cp40	1		40.9	2	6.20	233	263	448946	7605
	2	4*	48.1	2	5.53	218	255	545665	7856
Cp40-KK (SUM)	1		145	1	12.90	329	597	700664	3348
	2	4*	276	1	9.26	257	755	1055443	2648
Cp40-KKK (SUM)	1		46.7	6	11.90	658	805	167382	2483
	2	32**	41.8	2	15.10	573	685	176010	2921
mPEG(3k)- Cp40	1		64.8	6	11.10	654	922	202917	2169
	2	16*	53.7	2	8.99	529	656	236127	3050

20

【 0 2 0 5 】

略語： $t_{1/2}$ 、半減期； t_{max} 、観察された最大濃度の時間； c_{max} 、最大濃度；AUC、曲線下面積； V_z/F 、見かけの分布体積(F = バイオアベイラビリティ)；およびCL/F、見かけのクリアランス。

30

*生理食塩水に溶解。

**100 mMリン酸緩衝液に溶解。

【 0 2 0 6 】

さらに、mPEG(3k)-Cp40を投与した場合、C3のレベルは、長期間飽和した(Cp40で4-5時間であるのに対して、33-35時間)。カニクイザルにおけるmPEG(3k)-Cp40の単回皮下注射は、注射後2~6時間の t_{max} で、親化合物であるCp40の投与で得られたものに匹敵する薬物動態プロファイルをもたらした(図6B、Cを参照)。同様の薬物動態曲線にもかかわらず、mPEG(3k)-Cp40は、親ペプチドの C_{max} よりもほぼ2倍高い約10 μ Mの C_{max} に達した(図6Cおよび表4)。さらに、 AUC_{0-120} 時間($\sim 592 \mu\text{M}\cdot\text{h}$)は、より高く、 $t_{1/2}$ (~ 59 時間)は、より長く、CL/F($\sim 2610 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$)は、Cp40で得られたそれぞれの値よりも遅かった。(表4参照)。さらに、標的タンパク質C3は、より長期間飽和した(Cp40で ~ 4.5 時間であるのに対し、 ~ 34 時間)(図6B、C、点線)。

40

【 0 2 0 7 】

図6Dは、化合物を皮下注射した2匹のカニクイザルの血漿中のCp40-KKの経時的な薬物動態プロファイルを示す。Cp40-KKは、Cp40($t_{max} = 2$ 時間)よりも早く、両方の動物の血漿中のその最大濃度($t_{max} = 1$ 時間)に達した；しかしながら、Cp40-KKの血漿中濃度も、Cp40よりも速く低下した(図6AとDおよび表4)。Cp40は、4~5時間ではC3の血漿レベルを上回ったままであったが、Cp40-KKの血漿濃度は、2.5~5時間後にC3の血漿濃度よりも低いレベル

50

に減少した。一般的に、ペプチド濃度はC3濃度に依存するようであった。Cp40-KKの全体的なクリアランスは、非常に遅く、半減期は1匹のサルで145時間、もう1匹のサルで276時間であった。Cp40-KKに加えて、Cp40-Kは、NHP血漿サンプルでも検出され、Cp40-KKの皮下注射の30分後に始まり、このことは、ペプチドの末端Lys残基の酵素的切断を示す。しかしながら、Cp40-Kのレベルは、経時的にほとんど変化しなかった(図7AおよびB)。Cp40-Kは、Cp40-KKのLys切断に起因するので、両方の複合体の濃度の合計を図6に示す。

【 0 2 0 8 】

Cp40-KKKは、2匹のカニクイザルに単回皮下注射で投与された。生理食塩水の代わりに、リン酸緩衝液を使用してCp40-KKK溶液のpHを下げ、pHを生理学的範囲にした。Cp40-KKKの単回皮下注射は、Cp40およびmPEG(3k)-Cp40の薬物動態プロファイルに匹敵する薬物動態プロファイルをもたらした。たとえば、Cp40-KKKペプチドは、注射の2~6時間後に約13.5 μM の C_{max} に達し(図6E および表4)、AUC_{0-120時間}は、~616 $\mu\text{M h}$ であり、CL/Fは、~2700 $\text{mL h}^{-1}\text{kg}^{-1}$ であり、 $t_{1/2}$ は、~44.3時間であった。さらに、Cp40-KKKの投与後、C3の血漿レベルは、約40時間飽和したままであり、これは、非修飾Cp40で観察された飽和期間よりも約7倍長かった(図6E)。これらのデータは、親Cp40化合物と比較して、Cp40誘導体mPEG(3k)-Cp40およびCp40-KKKが、皮下注射後に改善された薬物動態プロファイルを有することを示す。

10

【 0 2 0 9 】

NHP血漿中の定量化は、他のペプチドアナログよりもCp40-KKKの方がより面倒であることが証明された。UPLC-ESI-MS分析により、血漿中のCp40-KKK濃度が疑わしいほど低く、両方の動物においてどの時点でも2 μM を超えないことが明らかになった(図7CおよびD)。NHP血漿サンプルのBPIクロマトグラムを重ね合わせると、Cp40-KKKの注射後、Cp40-KK($t_{\text{R}} = 4.35$ 分)とCp40-K($t_{\text{R}} = 4.65$ 分)の保持時間にてピークが増加することがわかった；化合物自体($t_{\text{R}} = 4.10$ 分)のピークは、最初から小さかった。これらのクロマトグラムの例を図8に示す。Cp40($t_{\text{R}} = 4.92$ 分)と同じ保持時間で出現した、内部標準である同位体標識Cp40の強度は変化せず、1つまたは2つのLys残基が、NHP血漿中のCp40-KKKから切断され、3つ目は切断さえないことを示す。したがって、Cp40-KKK、Cp40-KK、Cp40-K、およびCp40の濃度は、両方の動物からのすべての血漿サンプルにおいて決定された。

20

【 0 2 1 0 】

図7CおよびDに示されるように、どの血漿サンプルにおいてもCp40は検出されなかった。最も低い濃度はCp40-KKKで見られ、ほとんどの化合物が血漿中で迅速に切断されてCp40-KKを形成することを示すが、Cp40-KKKは、実験期間全体にわたって検出された。Cp40-KKを投与されたサルの血漿サンプルとは対照的に、より多くの量のCp40-KKが、さらに切断されてCp40-Kを形成した；1匹のサルにおいて、Cp40-KKKの注射の4時間後に5 μM ものCp40-Kが検出された(図7D)。Cp40-K、Cp40-KK、LodCp40-KKKの量を合計して、各時点でのNHP血漿中のペプチドの全体的な濃度を評価した(図6Eおよび図7)。Cp40-KKKの半減期(2匹のサルについて42時間および47時間)は、Cp40の半減期と同等であった(表4)。それにもかかわらず、Cp40-KKKの最大濃度はより高く、少なくとも1匹の動物ではCp40よりも遅い時間に達した。さらに、Cp40-KKKのレベルはCp40のレベルよりも6~9倍長い期間、C3濃度を上回っていた。

30

40

【 0 2 1 1 】

Cp40-KKKの切断は、カニクイザルに複数回皮下注射した後にも観察することができた(図9)。最も興味深いことに、リシン含有誘導体のレベルの蓄積が、経時的に観察された(図9)。このような「蓄積」現象は、以前は親のCp40化合物の複数回の皮下注射後に観察されなかったたので(図10)、Cp40-KKKアナログに固有のものである。注目すべきことに、複数の皮下注射後に観察されたCp40の C_{max} は、化合物がカニクイザルに8~12時間ごとの頻度で投与された場合でも8~10 μM を超えなかった(図10)。逆に、複数回の皮下投与後、同じ用量のCp40-KKKで観察された C_{max} は、著しく高く、20 μM に達するか、それを超えていた。さらに、Cp40-KKKアナログの血漿バイオアベイラビリティは、化合物がCp40よりも頻度の低い間隔(つまり、48時間ごと)で、皮下経路で投与されたにもかかわらず、著しく高

50

く、このことは、Cp40-KKKの独特の構造が、この化合物に、その長期滞留、バイオアベイラビリティの増加、および持続的な阻害活性に寄与する、新しく有益な薬物動態特性を与える可能性があることを示す。

【実施例 5】

【0212】

静脈内投与後のCp40系アナログの薬物動態特性

mPEG(1k)-Cp40、mPEG(3k)-Cp40、Cp40-KK、またはCp40-KKKをカニクイザルに単回静脈内投与するインビボ薬物動態試験を行った。Cp40アナログの薬物動態プロファイルを表5および図11に要約する。

【0213】

【表 5】

表5. 静脈内注射後のCp40アナログの薬物動態プロファイル

PKパラメーター	Cp40アナログ			
	PEG(1k)-Cp40	PEG(3k)-Cp40	Cp40-KK	Cp40-KKK
$t_{1/2}$ (時間)	53.2	84.37	49.23	35.31
AUC 0-120($\mu\text{mol/L}\cdot\text{時間}$)	304.4	313.59	85.39	312

【0214】

静脈内注射実験により、mPEG(1k)-Cp40、mPEG(3k)-Cp40、およびCp40-KKKは、Cp40-KKアナログ(85.23 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$)と比較して、AUC0-120時間が高い(304.4-312 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$)ことが明らかになった(表5および図11を参照)。興味深いことに、Cp40-KKKアナログは、試験されたCp40アナログの最短の $t_{1/2}$ を表示した(表5を参照)。

【0215】

同時に、mPEG(1k)-Cp40、Cp40-KKは同様の $t_{1/2}$ 値を有したが、それと比較して、mPEG(3k)-Cp40は、 $t_{1/2}$ を少なくとも~30時間延長した(表5)。mPEG(3k)-Cp40の延長された $t_{1/2}$ は、静脈内処置用の全身性補体媒介状態の治療薬として、このアナログが発展する可能性を示す。

【0216】

興味深いことに、実施例4に示すように、皮下注射されたカニクイザルの血漿中のCp40-KKまたはCp40-KKKのペプチド切断画分のUPLC/ESI-MS系定量化により、Cp40-KKがインビボで切断され、最小量のCp40が-K生成されることが明らかになり、一方、Cp40-KKKアナログは、Cp40-KKと少量のCp40-Kに、ほぼ完全に代謝される(図7参照)。これらのデータは、皮下注射時にCp40-KKKがCp40-KKに急速に切断されることを示唆し、NHP血漿中の活性化化合物の最大の割合がCp40-KK代謝種によって表されることを示す。

【0217】

同様に、静脈内注射時に、Cp40-KKも最小量のCp40-Kに代謝された(図12を参照)。さらに、注入後12時間で、ほとんどのCp40-KKKアナログもCp40-KKと少量のCp40-Kに代謝された(図12を参照)。したがって、データは、Cp40-KKが、Cp40-KKまたはCp40-KKKのいずれかの注射時に循環中に残る主要な化合物であることを示す。図18は、Cp40-KKおよびCp40-KKにおけるインビボおよびインビトロのLys切断の概要である。

【実施例 6】

【0218】

筋肉内投与後のCp40系アナログの薬物動態特性

Cp40、Cp40-KKおよびCp40-KKKの薬物動態プロファイルは、25mg/kgに相当する100mgの化合物の単回筋肉内注射後にインビボで試験された(図13)。特に、化合物は、静脈内注射

10

20

30

40

50

または皮下注射後に観察されたプロファイルと比較して、筋肉内注射後に異なる薬物動態プロファイルを示し、したがって、筋肉内投与経路は、特定の補体媒介適応症におけるこれらの化合物の調整された送達のための新規な投薬プロトコルにおいて利用されることが示唆される。これらのアナログを単回筋肉内注射した後の $t_{1/2}$ が、約8日であることが最も興味深い(図13)。そのような観察は、化合物の標的レベルを飽和させるための開示されたCp40アナログの最初の皮下注射または静脈内注射の後、それに続く筋肉内注射は、維持用量として使用されうる(たとえば、2週間ごとの筋肉内を介しての投与)。

【実施例7】

【0219】

Cp40およびCp40リシンアナログ抗体の生成および特異性

実施例8および9に記載のWESおよびSPR検出法のためのコンスタチンアナログに対する抗体を生成するために、ウサギ(n=2/アナログ)を、強力なアジュバント(TiterMaxGold-100 μ l)の存在下、100 μ gのCp40またはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と結合した他のリシンアナログで免疫し、続いて、50 μ gのKLH-Cp40 + アジュバントを合計で5週間、毎週注射した。抗体産生を直接ELISAでモニターし、Cp40アナログ(10 μ g/ml)を96ウェルプレートにコーティングした後、PBS/1%BSAでブロッキングし、免疫前および免疫後血漿を段階希釈してインキュベートした。このアッセイは、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と結合した抗ウサギIgGとのインキュベーション、適切な発色基質の添加、およびELISAプレートリーダーを使用した405nmでの吸光度の測定後に開発された。この免疫化手順により、抗Cp40および抗Lysアナログ抗体(それぞれAB101およびAB102)が生成され、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィーによってウサギ血清からさらに精製された。ELISAおよびウエスタンブロットデータは、これらの抗体が免疫原として使用されたのと同じペプチドを含む生体サンプル(血漿、硝子体液)とのみ反応するため、非常に特異的であることを示す(ELISAについては図14を参照)。AB102抗体は、CP40-K、CP40-KK、CP40-KKKに対して同じ特異性を示した。AB101の抗原性エピトープは、Cp40のC末端mIleを必要とし、AB102の抗原性エピトープは、C末端リシン残基を必要とする。したがって、これらの特性は、CP40およびそのアナログを検出するために特有である。

10

20

【実施例8】

【0220】

非ヒト霊長類の硝子体におけるCp40系アナログの滞留時間

カニクイザルの硝子体におけるmPEG(3k)-Cp40、mPEG(1k)-Cp40、Cp40-KK、およびCp40-KKKの滞留時間を決定するために、これらのCp40系アナログを、軽度のケタミン麻酔(10~15mg/kg、筋肉内注射(i.m.)による)およびトロピカミド/フェニレフリン点眼液による瞳孔の拡張の誘導後に、動物に硝子体内(i.v.t.)投与した(研究設計については表6を参照)。

30

【0221】

【表 6】

表6. 硝子体内投与およびCp40系アナログの検出のための研究設計

グループ	動物番号	眼	処置			用量 ($\mu\text{g}/\text{眼}$)	N (眼)	
G1	K-784, K-792,	右	Cp40-KK			500	3	
G2	K-799	左	Cp40-KKK			500	3	
G3	K-780, K-786,	右	PEG(1K)-Cp40			500	3	
G4	K-800	左	PEG(3K)-Cp40			500	3	
G1, G2, G3, G4: サンプル採取および写真撮影の時点								
日	0	0	14	28	42	56	73	90
	投与前	投与				(G1, G2)	(G1, G2)	(G1, G2)
硝子体液	--	--	×	×	×	×	×	×
写真撮影	×	×	×	×	×	×	×	×

10

20

【0222】

硝子体内注射のために、カニクイザルをケタミン(15-25mg/kg、i.m.)およびキシラジン(2mg/kg、i.m.)の組み合わせで麻酔し、ポビドンヨード溶液で眼を洗浄した。オキシブプロカイン塩酸塩溶液(ベノキシル(登録商標)点眼液0.4%)を局所麻酔薬として角膜に塗布した後、各動物の右目(G1、G3)または左目(G2、G4)のいずれかに硝子体内注射により、Cp40系アナログを動物に投与した。各注射の直後に、0.5%レボフロキサシンの単回局所投与を行った。mPEG(3k)-Cp40、mPEG(1k)-Cp40、Cp40-KK、およびCp40-KKKの硝子体内注射後、14、28、42、(G1、G2、G3、G4)、56、73、90(G1、G2)日目に、Cp40系アナログ処置した目から硝子体液サンプル(それぞれ約50 μL)を採取した(これは3回または6回行われた)。サンプルを氷上で採取し、さらに分析するまで冷凍庫(-79.3~-68.5)に保管した。73日目と90日目に、G1およびG2から約100 μL の硝子体液を採取した。Cp40系アナログの存在および濃度は、単純なウエスタン技術(WES、ProteinSimple、San Jose、カリフォルニア)、またはCp40-KKK固定化チップ上の結合反応速度の表面プラズモン共鳴(SPR)系リアルタイム測定の内いずれかを使用して決定した(以下の詳細な方法を参照)。選択した定量方法に関係なく、試験化合物の硝子体内滞留時間および濃度レベルに関して同様の結果が得られた。

30

【0223】

硝子体内注射(図15を参照)後のさまざまな時点で採取された硝子体サンプル中のすべての試験化合物のレベルを定量化するために、使用説明書にしたがって、2~40kDaの分離モジュールおよび抗ウサギ検出モジュールを使用して、WES機器(ProteinSimple、San Jose、カリフォルニア)でWES分析を行った。手短に言えば、希釈されていない眼の硝子体サンプルを蛍光マスターミックスと混合し、95 で5分間加熱した。サンプル、ブロッキング試薬、一次抗体(自社開発抗Cp40;ブロッキング試薬中1:1000)、HRP結合二次抗体(抗ウサギIgG)、化学発光基質を、プレート(分離モジュールの一部)にピペットで移した。使用した機器の設定は、以下のとおりであった:375Vで27分間のスタッピングおよび分離;30分間のブロッキング試薬、30分間の一次抗体と二次抗体の両方;~15分間のルミノール/過酸化水素化学発光検出(5、15、30、60、120、240、および480秒の曝露)。得られたエレクトロフェログラムは、Compassソフトウェア(ProteinSimple、San Jose、カリフォルニア)を使用して評価した。以下の基準を使用して、低ペプチドシグナルをバックグラウンドか

40

50

ら区別した。ソフトウェアによって与えられるピーク信号対雑音(S/N)比は10以上でなければならず、ピーク高さ/ベースライン比(ソフトウェアによって与えられるピーク高さとはベースライン値から手入力計算)は、3以上でなければならない。ウサギ硝子体にスパイクされたペプチドの既知濃度(100~2,000nM)の5点標準曲線を使用して、Compassソフトウェア(Compass Software Inc.、Atlanta、ジョージア)を使用し、硝子体サンプル中のペプチド濃度を計算した。曲線は、0.98より大きい R^2 を示した。図15に示されているのは、WESシステムを使用して生成された代表的な標準曲線および、ウサギ硝子体サンプルにスパイクされた所定量の精製ペプチドを実行して得られたバンドである。

【0224】

すべての試験化合物のWES系測定を裏付けるために、生体サンプル中のCp40およびCp40アナログを検出するためのSPR系競合アッセイが開発された。簡単に言えば、1/1000に希釈された血漿サンプルを、Cp40またはCp40アナログを添加するか、または添加せずに試験に使用した。サンプルを95℃で5分間加熱した。熱処理後、サンプルを回転させ、上清を固定濃度のC3またはC3の供給源としての血漿と混合し、対応するCp40アナログが固定化された(たとえば、共有結合された)CM5センサーチップ上に飛ばした。次に、応答を測定し、定量のための標準曲線と比較した。SPR系法の概略図を図16にまとめる。

【0225】

新規のSPR系競合アッセイは、25℃でBiacore 3000機器(GE Healthcare、Piscataway Township、ニュージャージー)を使用して、同じ硝子体サンプルで行った。Cp40-KKKは、ランニングバッファーとしてHBS-EPを使用した標準的なアミンカップリング反応を使用して、CM5センサーチップに共有結合させた。簡単に説明すると、チップをNHS/EDC(1:1)で7分間活性化し、5mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)中の300 µg/mlのCp40-KKKを使用してCp40-KKKで6分間コーティングし、1Mエタノールアミン-HCl(pH 9.5)で、10分間で不活性化した。空のフローセルは、基準面として機能した。実験中の非特異的結合を排除するために、ランニングバッファーを100 mM NaCl、0.05% Tween 20、10mMEDTAおよび1mg/mlデキストラン硫酸(500kDa)を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.4)に変更した。実験はすべて、10 µl/分の流速にて、2分間のサンプル注入とそれに続くセンサーチップの表面の再生で実施された。続いて、0.5% SDSを1分間、50mMグリシン緩衝液(pH 9.5)を30秒間注入して、表面を再生させた。

【0226】

図17に示されているのは、関連するCp40系アナログの代表的な標準曲線であり、所定の濃度のペプチドをウサギ硝子体液で希釈した後、95℃で5分間熱不活性化し、室温の水浴で10分間平衡化した。標準サンプルを14,000 x gで10分間遠心分離し、上清を正常なヒト血漿と混合した。同様に、硝子体中の未知濃度のmPEG(3k)-Cp40、mPEG(1k)-Cp40、Cp40-KK、およびCp40-KKKを検出するために、サンプルをランニングバッファーで希釈した後、上記のように熱不活性化、平衡化、および遠心分離を行った。サンプル上清を上記のように希釈したヒト血漿と混合し、注射した。データ処理は、Scrubberソフトウェア(BioLogic Software、Campbell、オーストラリア)を使用して行った。

【0227】

図18に示すように、Cp40-KK、Cp40-KKK、PEG(1K)-Cp40、PEG(3K)-Cp40は、Cp40系アナログの0.5mg単回注射の14日後に処置動物から収集された硝子体において検出された。PEG(1K)-Cp40 and PEG(3K)-Cp40化合物は、注射後14日目に検出されたが、それ以降の時点では検出されなかったことに留意すべきであらう(図18を参照)、これは、PEG化合物の硝子体滞留時間が少なくとも14日であるが、リシン含有化合物(すなわち、Cp40-KKおよびCp40-KKK)よりも有意に短いことを示す。

【0228】

Cp40-KKおよびCp40-KKKペプチドは、注射後14、28、42、56、73および90日目に検出された(図18)。NHP硝子体中のCp40-KKの濃度は、42日目から73日目まで、時間の経過とともに減少するが、Cp40-KKKの濃度レベルは、73日間の観察期間を通して安定していた(図18)。注目すべきことに、Cp40-KKKは、処置後90日目でも検出されたので、眼組織において最

10

20

30

40

50

も長い滞留時間を示した。逆に、硝子体におけるCp40-KKの滞留時間は、90日目に検出されなくなったので、Cp40-KKKの滞留時間よりも著しく短かった。Cp40-KKKの硝子体内濃度は、90日目までの全観察期間中、硝子体内コンパートメント内の標的C3の濃度に達し、飽和レベルを維持したことに留意すべきである(0-140 nM ; Loyet KMら、2012、Invest Ophthalmol Vis Sci. 53 : 6628-37を参照)(図18、点線を参照)。

【0229】

ミニPEG部分の付加または荷電した親水性残基(リシンなど)を有するペプチドの伸長は両方ともが、ペプチドの溶解度を増加させるそれらの能力について当技術分野で知られている化学修飾であるが、眼組織におけるCp40-KKおよびCp40-KKKの著しく増加した滞留時間は、非常に驚くべき結果であり、以前には報告されていなかった。試験化合物(Cp40-KKおよびCp40-KKK)の長期の眼内滞留は、その構造に特有であり、理論に拘束されることを意図するものではないが、化合物のC末端でのタンデムLysリピートの存在を利用する組織特異的メカニズムに起因する可能性がある。これは、ミニペグ化Cp40がCp40-Lys(n)化合物と同等の溶解度プロファイルを示す一方で(表1を参照)、Cp40-KKまたはCp40-KKKよりも明らかに短い眼内滞留を有するという観察によってさらに裏付けられる。さらに、Cp40-KK誘導体と比較して、Cp40-KKKに3番目のLys残基を付加することによってもたらされる眼の滞留の予想外で有意な増加は、単にそれらの類似の溶解度プロファイルを考慮することによって説明することはできず(表1を参照)、むしろ、Cp40-KKKは、Cp40-KKアナログと比較しても、硝子体液中に長期間保持される新しい経路を示す。

【0230】

注目すべきことに、処置されたカニクイザルの硝子体で14日目に検出された化合物の量は、最初に注射された用量の約0.2%に相当し、これは、標的C3濃度を超える化合物が眼から急速に除去され、その標的にしっかりと結合している化合物のみが組織内に長く残る、二相性の標的駆動型除去プロファイルを示唆する。言い換えれば、これらのCp40系アナログによる硝子体内投与は、はるかに低い用量(たとえば、約10 µg未満または1~2 µgでさえ)で観察された滞留時間を達成することができる。逆に、100 µgのCp40を硝子体内投与した場合、1ヶ月後に化合物の検出は観察されず、本明細書で論じたCp40系アナログと比較して、Cp40の滞留時間が非常に短いことを示唆する。したがって、開示されたCp40系アナログは、Cp40と比較して、溶解度の増強に加えて、滞留時間の有益な増加をもたらす。

【0231】

要約すると、上記のデータは、Cp40-KKの硝子体内滞留時間がCp40-KKK未満であること、Cp40-KKKの硝子体内滞留時間が硝子体内注射後約3ヶ月以上であることを示す。これらの発見は、無秩序な補体活性化の関与を伴う眼疾患および他の臨床病理の治療のための慢性投与プロトコルの設計にとって重要な意味合いを有する。Cp40-KKおよびCp40-KKKの長期の眼内滞留により、前世代の化合物アナログであるCp40およびAPL-2と比較して、投与頻度を有意に減らし、患者の負担を軽減する新薬投与スキームの適用が可能になる。

【実施例9】

【0232】

非ヒト霊長類の硝子体におけるリシン含有Cp40系アナログの活性

NHP硝子体に存在する化合物が、すべての補体経路にわたってその阻害作用を誘発するための前提条件であるC3b結合活性を維持することを確認するために、表面プラズモン共鳴(SPR)結合実験を行った。簡単に説明すると、陽性結合コントロールのために、Cp40-KK(K(16、8、4、および2nM)の段階希釈液をウサギ硝子体サンプルに添加し、精製ヒトC3b(Complement Technology Inc、Tyler、テキサス)を固定化したBiacoreCM5チップ上に流した(図19Aを参照)。次に、注射後14日目にCp40-KKKを注射した眼から硝子体サンプルを採取し、95 °Cで5分間熱不活性化した。熱不活性化サンプルと非熱不活性化サンプルの両方を、上記のように精製されたヒトC3bを固定化したCM5チップに流した(図19B)。

【0233】

図14Aに示すように、ウサギ硝子体サンプルにスパイクされたCp40-KKKは用量依存的にC

10

20

30

40

50

3bに結合する。さらに、Cp40-KKK(図19B)を注射された眼から採取された硝子体サンプルの試験においてC3b結合のシグナルが観察され、これは、硝子体に存在するCp40-KKKがそのC3b結合活性を維持することを示す。

【0234】

特に、熱不活性化された硝子体サンプルで得られたC3b結合シグナル(図19B、左バー)は、非熱不活性化サンプルから得られたシグナル(図19B、右バー)と比較して高かった(それぞれ、10対2相対単位)。熱不活性化ステップにより、化合物が標的から解離することが保証されるため、SPR分析で観察された応答の違いは、化合物の大部分が硝子体の中の補体C3タンパク質に結合していることを示す可能性がある。この観察結果は、Cp40およびその誘導體(Cp40-KKK、Cp40-KK)のC3への高親和性で緊密な結合と一致しており、NHP研究で以前に報告されたように、これらの化合物の二相性の標的駆動型除去プロファイルと一致する(Risitanoら、2014、Blood 123(13) : 2091-2101 ; Bergerら、2018、J Med Chem 61(14) : 6153-6162を参照)。

【0235】

上に示したものの別の説明は、硝子体がCp40-KKKアナログに関連するさらなる未確認の因子を含むということである。未確認の硝子体因子が、リシン含有化合物の補体阻害活性に影響を与えるかどうかを調査するために、硝子体サンプルを使用して補体活性化アッセイを行った。簡単に説明すると、ヒト血漿を、ウサギ硝子体と混合したCp40系アナログの段階希釈の存在下でOVA-抗OVA免疫複合体とともにインキュベートした。古典的経路活性化(C3b沈着)のレベルは、HRPと結合したポリクローナル抗ヒトC3抗体を使用するELISAによって決定された。(MP Biomedicals、Solon、オハイオ)(図20)。

【0236】

図20に示すように、硝子体の不在下で、試験したすべての化合物(Cp40、Cp40-1K、Cp40-KK、Cp40-KKK)は、用量依存的に、補体の古典的経路を介した阻害活性を示す(実線)。特に、硝子体の存在が試験化合物の補体阻害活性を増強するように見えるので、硝子体サンプルはわずかな補体阻害活性を有するように見える(図20、破線を実線と比較する)。したがって、データは、試験された化合物(すなわち、Cp40およびそのリシン含有誘導體)の活性が、これらの化合物にある程度結合する可能性のある硝子体の未確認の因子によって阻害されないことを示す。

【0237】

要約：異なる投与経路を介した個々のアナログのPK特性と治療法の開発の可能性の比較
実施例8に示されるデータは、Cp40-KKKおよびCp40-KK化合物が、それらの結合活性を維持しながら、他の試験化合物と比較した場合、硝子体における滞留時間の改善を示し、したがって、眼症状の治療薬としてのこれらの分子の開発の可能性を支持することを示した。さらに、カニクイザルの皮下(s.c.)および静脈内(i.v.)研究から得られた薬物動態データは、mPEG(1k)-Cp40、mPEG(3k)-Cp40、Cp40-KK、およびCp40-KKKが、それらの親分子であるCp40とは異なる薬物動態特性を有し、これらの薬物動態特性によって、臨床障害における補体活性を調節するための局所的および全身的に投与される治療薬として開発される独特の可能性を有することを示す(図6および11 ; 表4参照)。

【0238】

具体的には、Cp40-KKK化合物の皮下投与は、C3血漿レベルを約40時間飽和させ、これは、非修飾Cp40で観察された飽和期間よりも約7倍長い(実施例4 ; 図6E)。Cp40-KKKの長い標的飽和期間は、その溶解度の増加と相まって、全身および/または慢性的補体媒介状態の治療に適した皮下治療薬として開発される独特の可能性をもたらす。複数回投与計画にその蓄積を促進する可能性のある潜在的なデポ効果、および他の未知の担体様または結合タンパク質との潜在的な相互作用を介した標的組織へのそのより遅い放出による、Cp40-KKKアナログの独特の構造により、半減期が延長され、硝子体などのさまざまなコンパートメントでの生体内分布が強化される可能性がある。さらに、Cp40-KKKを注射したカニクイザル(図12)の血漿中に有意な量のCp40-K代謝物が検出されたのに対し、Cp40-KKを注射した動物の血漿にはこの代謝物はほとんど見られず、このことは、Cp40-KK代謝物は循環

10

20

30

40

50

系でより安定している可能性があり(たとえば、さらなるタンパク質分解が起こりにくい)、親Cp40のC末端に3番目のリシン残基を追加すると新しい生体内変化プロファイル、およびその血漿および硝子体内滞留を集合的に増強する、得られたペプチドに対する新規な薬物動態特性が得られることを示す。したがって、これらの特性は、Cp40-KKKアナログに、より少ない頻度の投与間隔でこのアナログの慢性投与を可能にすることができる、より好ましい薬物動態プロファイルを与える。図21に示されているのは、Cp40-KKおよびCp40-KKKにおけるインビボおよびインビロのLys切断の概要である。

【 0 2 3 9 】

同様に、NHPへの静脈内注射後に観察されたmPEG(3k)-Cp40の延長された $t_{1/2}$ (実施例5; 表5)は、全身性補体媒介状態の静脈内治療としてのこのアナログの進歩の可能性を示す。さらに、実施例6に示すように、筋肉内投与経路は、補体媒介適応症におけるCp40アナログの適合された送達のための新規な投薬プロトコルにおいて利用されうる。

【 0 2 4 0 】

本発明は、本明細書に記載および例示された実施態様に限定されず、添付の特許請求の範囲内で変更および修正することができる。

10

【 図 1 】

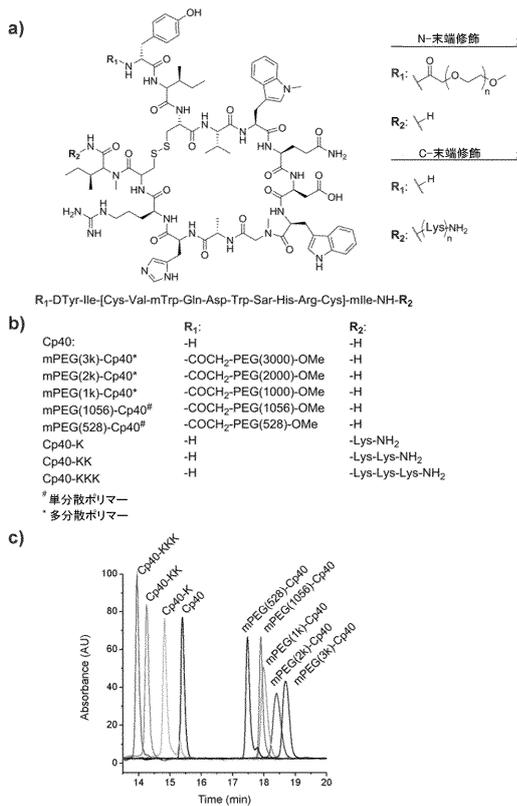


FIG. 1

【 図 2 A - 1 】

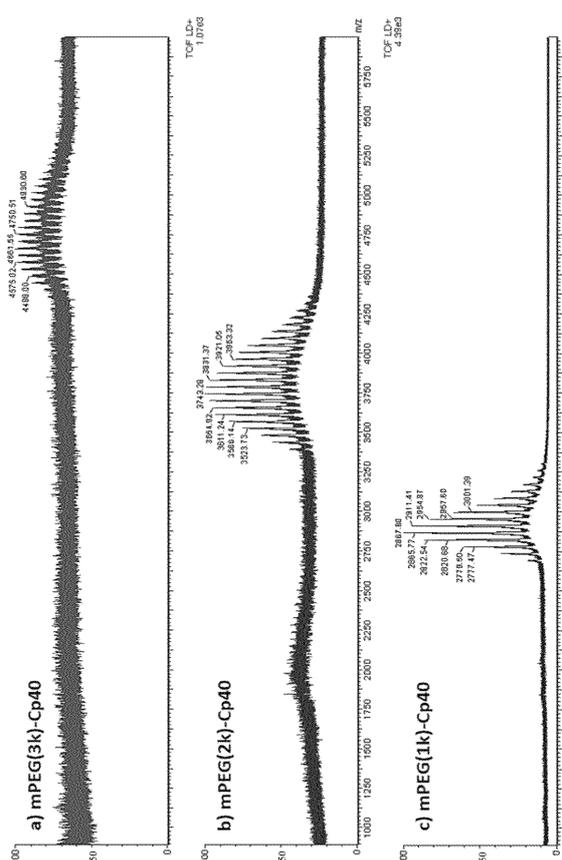


FIG. 2A

【 図 2 A - 2 】

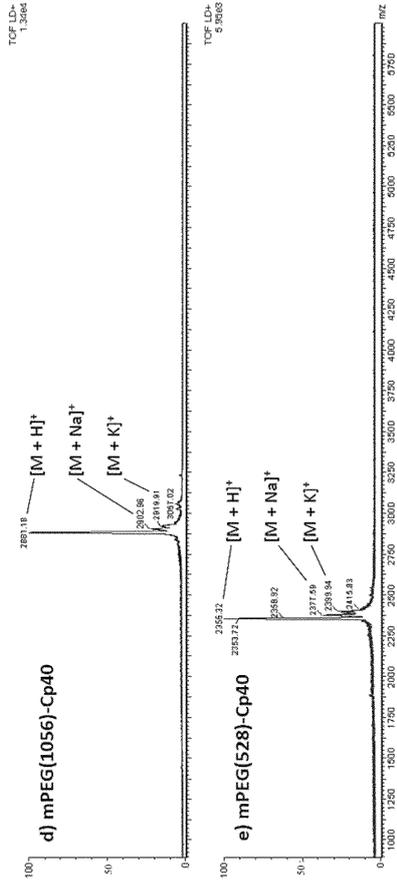
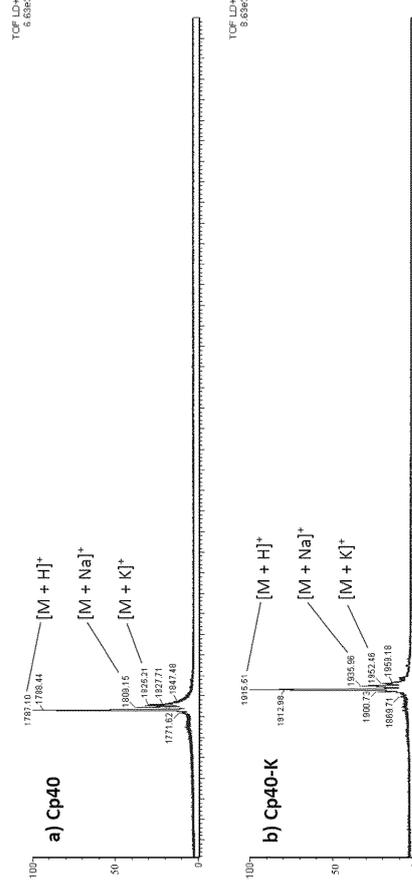


FIG. 2A (続き)

【 図 2 B - 1 】



【 図 4 】

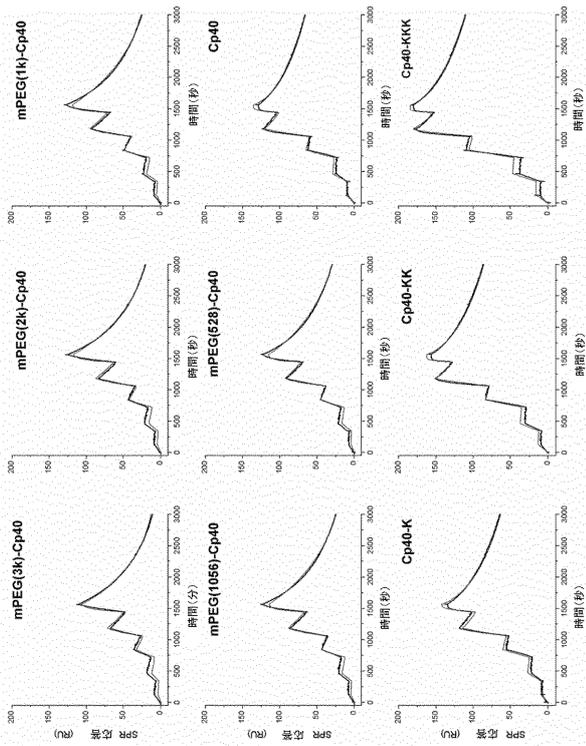


FIG. 4

【 図 5 】

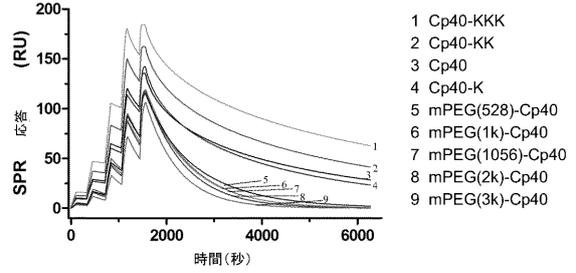


FIG. 5

【 図 6 】

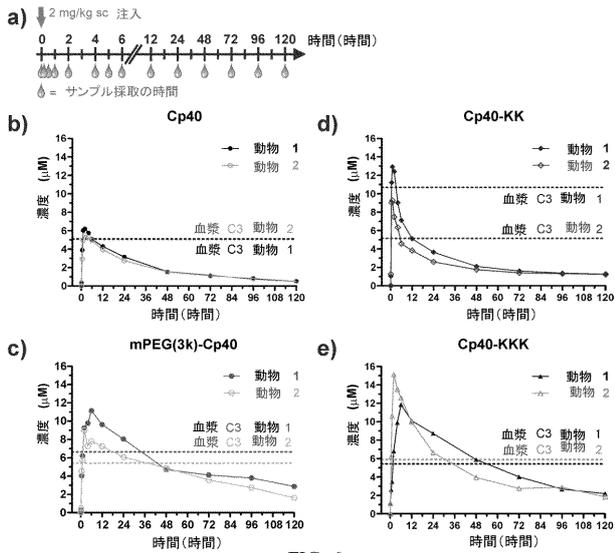


FIG. 6

【 図 7 】

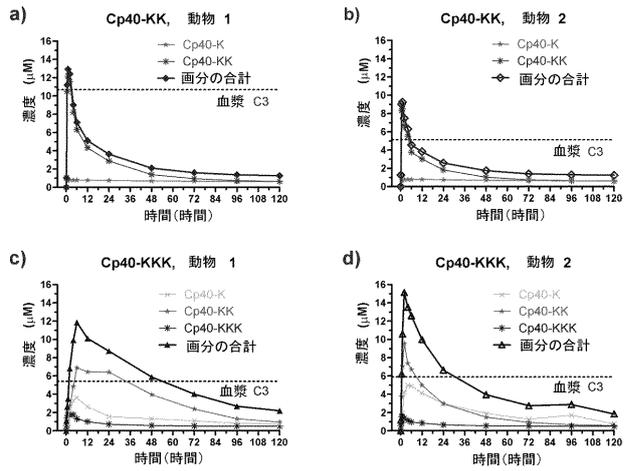


FIG. 7

【 図 8 】

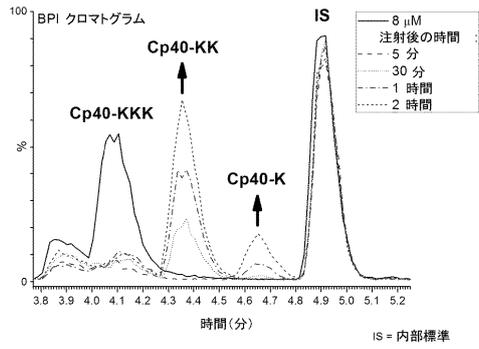


FIG. 8

【 図 9 】

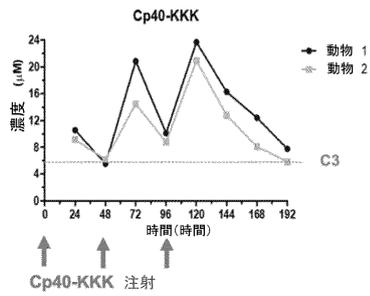


FIG. 9

【 図 10 】

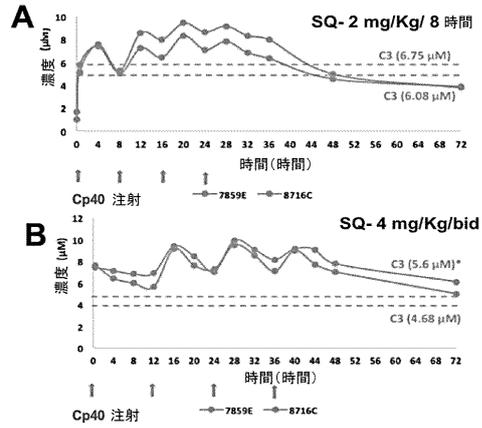


FIG. 10

【 図 11 】

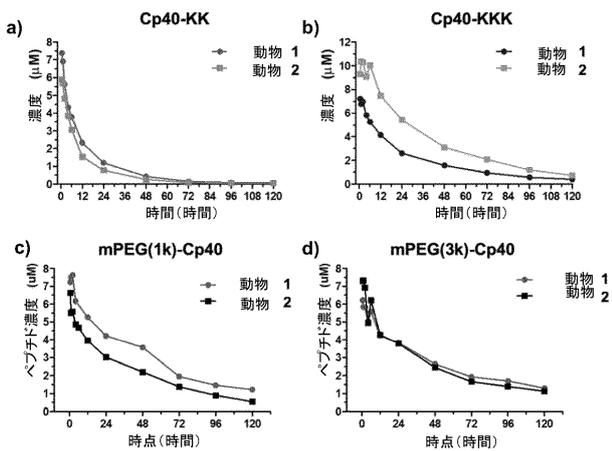


FIG. 11

【 図 12 】

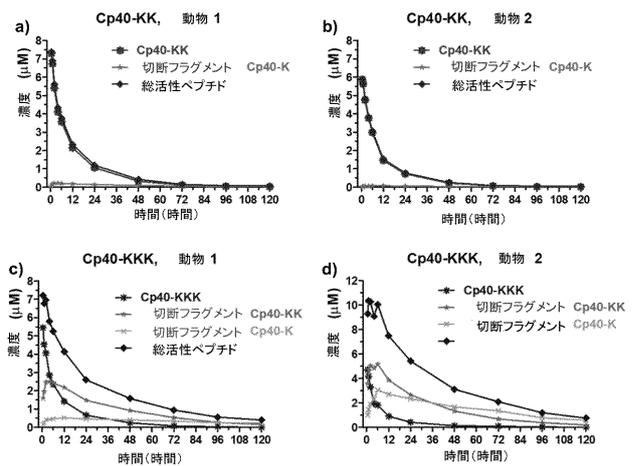


FIG. 12

【 図 1 3 】

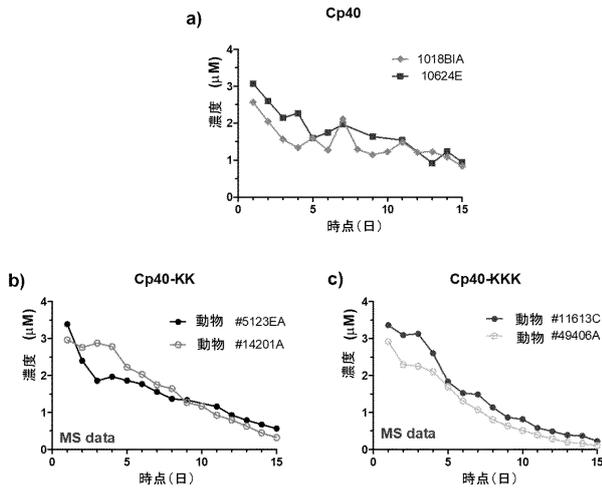


FIG. 13

【 図 1 4 】

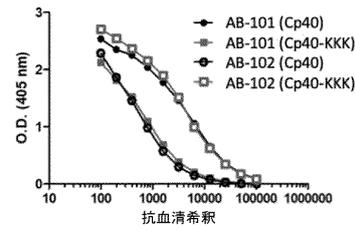


FIG. 14

【 図 1 5 】

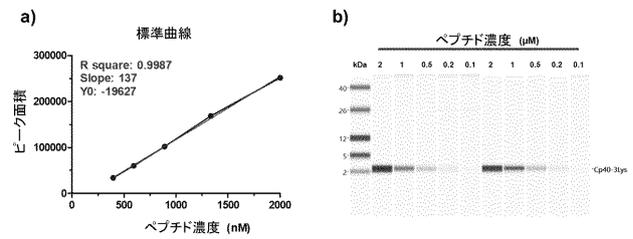


FIG. 15

【 図 1 6 】

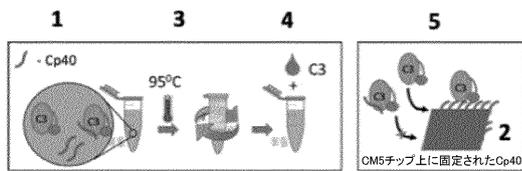


FIG. 16

【 図 1 8 】

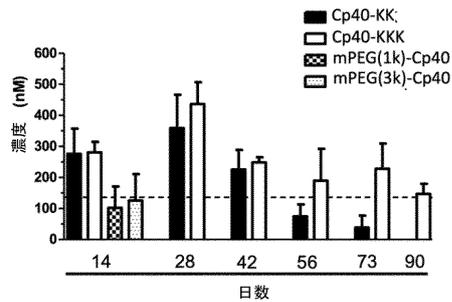


FIG. 18

【 図 1 7 】

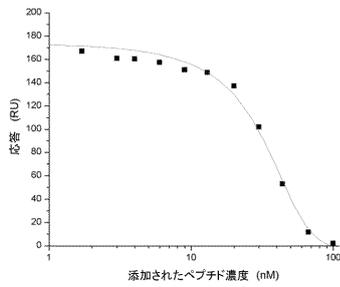


FIG. 17

【 図 1 9 】

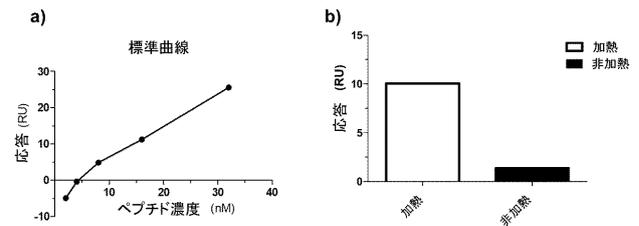


FIG. 19

【 図 2 0 】

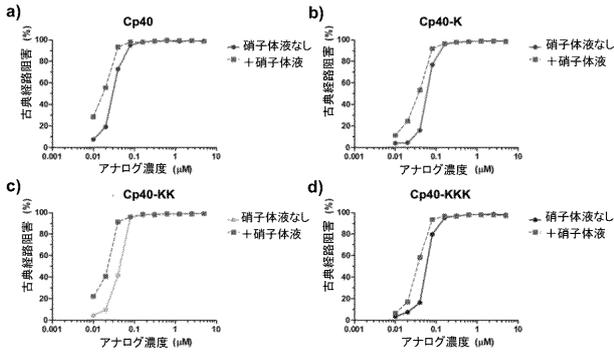


FIG. 20

【 図 2 1 】

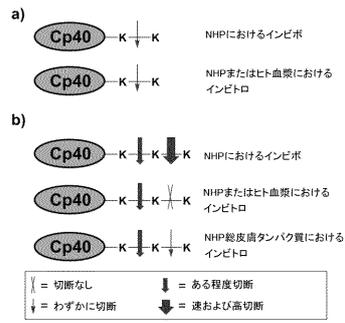


FIG. 21

【 配 列 表 】

2021521108000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/026040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K7/08 C07K14/47 ADD. A61K38/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YIJUN HUANG: "Evolution of compstatin family as therapeutic complement inhibitors", EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY, vol. 13, no. 5, 5 February 2018 (2018-02-05), pages 435-444, XP055620403, London, GB ISSN: 1746-0441, DOI: 10.1080/17460441.2018.1437139 the whole document figure 9 ----- -/--	1-10, 13-33, 35-51, 58-60, 63-101, 104-152, 154-165
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/>
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 September 2019		13/11/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Cervigni, S

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/026040

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANTONIO M. RISITANO ET AL: "Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria", BLOOD, vol. 123, no. 13, 27 March 2014 (2014-03-27), pages 2094-2101, XP055620409, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2013-11-536573 the whole document figure 1	1-10, 13-33, 35-51, 58-60, 63-101, 104-152, 154-165
X	----- WO 2007/062249 A2 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; LAMBRIS JOHN D [US]; KATRAGADDA MADAN [US]) 31 May 2007 (2007-05-31) cited in the application the whole document example 10	1-10, 13-33, 35-51, 58-60, 63-101, 104-152, 154-165
X	----- WO 2012/040259 A2 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; UNIV ILLINOIS [US] ET AL.) 29 March 2012 (2012-03-29) cited in the application the whole document page 15	1-10, 13-33, 35-51, 58-60, 63-101, 104-152, 154-165
X	----- WO 2014/078734 A2 (APELLIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 22 May 2014 (2014-05-22) cited in the application examples 1-2	1-10, 13-33, 35-51, 58-60, 63-101, 104-152, 154-165
X	----- ALIANA LÓPEZ DE VICTORIA ET AL: "A New Generation of Potent Complement Inhibitors of the Compstatin Family : Compstatin Family Complement Inhibitors", CHEMICAL BIOLOGY & DRUG DESIGN, vol. 77, no. 6, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 431-440, XP055620413, ISSN: 1747-0277, DOI: 10.1111/j.1747-0285.2011.01111.x the whole document table 1	1-10, 13-33, 35-51, 58-60, 63-101, 104-152, 154-165
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/026040

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GIANFRANCO PASUT ET AL: "PEGYLATION FOR IMPROVING THE EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC BIOMOLECULES", DRUGS OF TODAY, vol. 45, no. 9, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 687-695, XP055280334, DOI: 10.1358/dot.2009.45.9.1416421 the whole document -----	1-165

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/026040**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-147(completely); 148-165(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2019/ 026040

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-147(completely); 148-165(partially)

Compstatin analogues as characterised in independent claims 1, 19, 46, 52-57, pharmaceutical compositions comprising them, medical uses and methods involving such compound. Methods for their detection and for generating antibodies thereto;

2. claims: 148-153(partially)

A "method of detection of a compstatin analog" different from those of invention 1;

3. claims: 154-165(partially)

A "method for generating highly specific antibodies" against compounds different from those of invention 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/026040

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2007062249 A2	31-05-2007	AU 2006318333 A1	31-05-2007		
		BR P10619023 A2	20-09-2011		
		CA 2631443 A1	31-05-2007		
		CA 2971349 A1	31-05-2007		
		CN 101400692 A	01-04-2009		
		CN 102977191 A	20-03-2013		
		CN 106188239 A	07-12-2016		
		DK 1960422 T3	13-08-2012		
		EP 1960422 A2	27-08-2008		
		EP 2377877 A1	19-10-2011		
		EP 2377878 A1	19-10-2011		
		EP 3363810 A1	22-08-2018		
		ES 2390828 T3	16-11-2012		
		ES 2677619 T3	03-08-2018		
		ES 2677947 T3	07-08-2018		
		HK 1124621 A1	08-02-2013		
		HR P20120621 T1	30-09-2012		
		IL 191674 A	30-04-2015		
		IL 237915 A	29-11-2018		
		JP 5302004 B2	02-10-2013		
		JP 5927139 B2	25-05-2016		
		JP 2009517476 A	30-04-2009		
		JP 2013177403 A	09-09-2013		
		PL 1960422 T3	30-11-2012		
		PT 1960422 E	16-08-2012		
		RS 52429 B	28-02-2013		
		RU 2012147267 A	20-05-2014		
		US 2008227717 A1	18-09-2008		
		US 2012004393 A1	05-01-2012		
		US 2016096866 A1	07-04-2016		
		US 2017305971 A1	26-10-2017		
		US 2019016758 A1	17-01-2019		
		WO 2007062249 A2	31-05-2007		

		WO 2012040259 A2	29-03-2012	CA 2813049 A1	29-03-2012
				US 2014113874 A1	24-04-2014
				WO 2012040259 A2	29-03-2012

		WO 2014078734 A2	22-05-2014	US 2016194359 A1	07-07-2016
				US 2017283461 A1	05-10-2017
WO 2014078734 A2	22-05-2014				

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 27/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/06	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 1
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	R
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 5
G 0 1 N 21/41 (2006.01)	G 0 1 N 21/41	1 0 1
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 ジョン・ディ・ランブリス

アメリカ合衆国 1 9 1 0 6 ペンシルベニア州フィラデルフィア、パイン・ストリート 6 3 0 番

F ターム(参考) 2G059 AA05 BB04 BB13 CC16 CC18 EE07
 4B064 AG26 AG27 CA19 CC24 CE10 DA01
 4C076 AA94 AA95 CC41 EE59 FF31 FF33 FF63
 4C084 AA02 AA03 BA18 BA23 BA26 CA59 DC50 MA52 MA55 MA56
 MA57 MA58 MA66 NA14 ZA02 ZA16 ZA33 ZA36 ZA45 ZA51
 ZA55 ZA62 ZA67 ZA81 ZA89 ZA96 ZB08 ZB15 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA16 BA17 BA57 CA40 DA75 DA76
 EA20 FA33 FA74 GA21