(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102985443 B
(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201180019382.7

(22)申请日 2011.04.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102985443 A

(43)申请公布日 2013.03.20

(30)优先权数据
61/325146 2010.04.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.10.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/032771 2011.04.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2011/130697 EN 2011.10.20

(73)专利权人 动量制药公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 H.周 E.科克兰 T.K.基希莫托

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 杜艳玲 梁谋

(51)Int.Cl.
C08B 37/10(2006.01)

(56)对比文件
US 2009149424 A1,2009.06.11,
WO 2009059283 A1,2009.05.07,
US 2009149424 A1,2009.06.11,

审查员 范燕迪

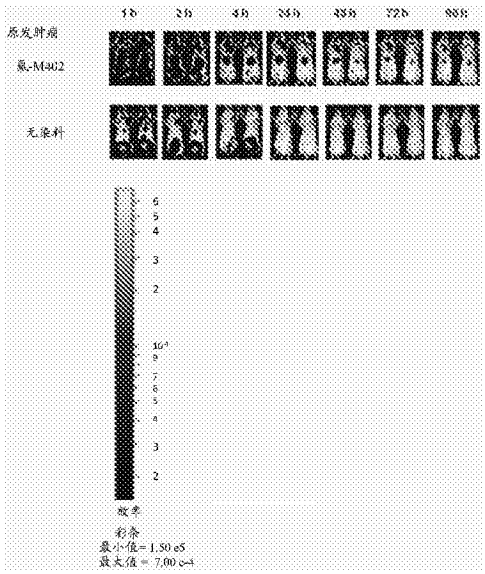
权利要求书6页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

组织靶向

(57)摘要

在此说明了涉及将药剂靶向至肿瘤组织的方法和组合物。



CN 102985443 B

1.治疗剂或成像剂和多糖制剂的偶联物在制备药物中的用途，该药物用于将治疗剂或成像剂靶向至患者肿瘤组织的方法中使用，其中该治疗剂或成像剂选自：放射剂、荧光剂、细胞毒性剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、蛋白酶抑制剂、抗血管新生剂、抗转移剂、类固醇、生物免疫调节剂、单克隆抗体、抗体片段、适配子、siRNA、反义分子、融合蛋白、细胞因子、细胞因子受体、支气管扩张剂、他汀、抗炎剂、微管抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢剂、蛋白合成和分解抑制剂、有丝分裂抑制剂、烷化剂、铂化剂、核酸合成抑制剂、组蛋白去乙酰化酶以及DNA甲基转移酶抑制剂、氮芥、亚硝基脲、乙烯亚胺、烷基磺酸盐、三氮烯、叶酸盐类似物、核苷类似物、核糖核苷酸还原酶抑制剂、长春花碱、紫杉烷、埃博霉素、嵌入剂、信号转导抑制剂、凋亡诱导剂、细胞因子、趋化因子、以及疫苗；并且其中该多糖制剂具有以下特征：

重均链分子量在3,500 Da与8,000 Da之间；

抗Xa活性以及抗IIa活性，各自小于50 IU/mg；以及

大于5%并且小于50%的乙二醇裂解的糖醛酸残基；并且

其中该多糖制剂缺少实质性抗凝血剂活性，

其中该多糖制剂包含式I的多糖：

$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]_m\sim[U_G\text{-}H_{x,y,z}]_n$

其中U的每次出现表示糖醛酸残基，并且H的每次出现表示己糖胺残基；

其中m和n是整数，以使

m = 4至16，并且

n = 1至4；

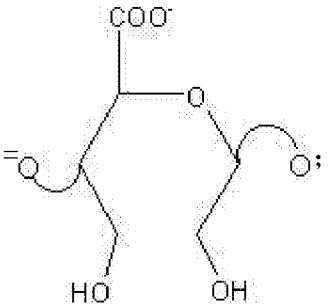
w、x、y、以及z中的每个对于$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]$的每次出现可以独立地是相同或不同的，并且x、y、以及z中的每个对于$[U_G\text{-}H_{x,y,z}]$的每次出现可以独立地是相同或不同的，其中

w = -20S或-20H；

x = -NS或-NAc；

y = -30S或-30H；

z = -60S或-60H；

并且U_G = 

；

其中符号 ~ 表示m和n标记的单元是沿着该多糖链分布的，并且并非必须按照顺序，

该方法包括 (a)识别带有肿瘤组织的患者，其中该患者需要给予该治疗剂或成像剂以治疗该肿瘤或使其成像；并且

(b)将该偶联物给予该患者，由此将该治疗剂或成像剂靶向至该肿瘤组织。

2.如权利要求1所述的用途，其中该治疗剂或成像剂选自下组，其构成为：顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、羟基脲、托泊替康、伊立替康、氮杂

胞苷、伏立诺他、伊沙匹隆、硼替佐米、紫杉烷类、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、长春瑞宾、秋水仙碱(colchicin)、蒽环类、柔红霉素、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、阿霉素、1-双氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、蓖麻毒素、以及美登木素类、吉非替尼、埃罗替尼、拉帕替尼、索拉菲尼、舒尼替尼、伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼、西罗莫司、依维莫司、雷帕霉素、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、利妥昔单抗、以及托西莫单抗。

3.如权利要求1或2所述的用途,其中该肿瘤是实体瘤。

4.如权利要求1或2所述的用途,其中该肿瘤是肉瘤或癌。

5.如权利要求1或2所述的用途,其中该肿瘤是以下部位的癌或肉瘤:头部、颈部、咽、甲状腺、肺、乳房、淋巴、血液、胃肠系统、肝、胰、生殖器以及生殖泌尿道、膀胱,中枢神经系统(CNS),神经细胞或神经胶质细胞、或皮肤,或者该肿瘤是口、食管、肾、尿路上皮、卵巢、子宫、子宫颈、子宫内膜、前列腺或睾丸肿瘤。

6.如权利要求1或2所述的用途,其中该肿瘤是原发癌症位点或转移位点。

7.如权利要求1或2所述的用途,进一步包括下列步骤中的一个或多个:对该肿瘤组织进行活组织检查、对该肿瘤组织进行成像、并且评价给药对该肿瘤组织的作用。

8.如权利要求1或2所述的用途,其中该偶联物是通过静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内、或口服给药的。

9.抗肿瘤剂和多糖制剂的偶联物在制备药物中的用途,该药物用于治疗受试者的方法中使用,其中该抗肿瘤剂选自:放射剂、细胞毒性剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、蛋白酶抑制剂、抗血管新生剂、抗转移剂、类固醇、生物免疫调节剂、单克隆抗体、抗体片段、适配子、siRNA、反义分子、融合蛋白、细胞因子、细胞因子受体、支气管扩张剂、他汀、抗炎剂、微管抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢剂、蛋白合成和分解抑制剂、有丝分裂抑制剂、烷化剂、铂化剂、核酸合成抑制剂、组蛋白去乙酰化酶以及DNA甲基转移酶抑制剂、氮芥、亚硝基脲、乙烯亚胺、烷基磺酸盐、三氮烯、叶酸盐类似物、核苷类似物、核糖核苷酸还原酶抑制剂、长春花碱、紫杉烷、埃博霉素、嵌入剂、信号转导抑制剂、凋亡诱导剂、细胞因子、趋化因子、以及疫苗;并且其中该多糖制剂具有以下特征:

重均链分子量在3,500 Da与8,000 Da之间;

抗Xa活性以及抗IIa活性,各自小于50 IU/mg;以及

大于5%并且小于50%的乙二醇裂解的糖醛酸残基;并且

其中该多糖制剂缺少实质性抗凝血剂活性,

其中该多糖制剂包含式I的多糖:

$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]_m\sim[U_G\text{-}H_{x,y,z}]_n$

其中U的每次出现表示糖醛酸残基,并且H的每次出现表示己糖胺残基;

其中m和n是整数,以使

m = 4至16,并且

n = 1至4;

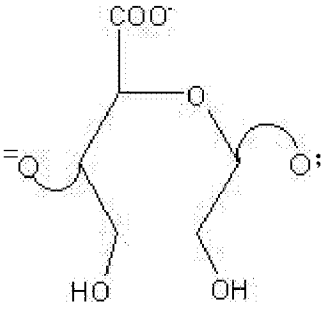
w、x、y、以及z中的每个对于$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]$的每次出现可以独立地是相同或不同的,并且x、y、以及z中的每个对于$[U_G\text{-}H_{x,y,z}]$的每次出现可以独立地是相同或不同的,其中

w = -2OS或-2OH；

x = -NS或-NAc；

y = -3OS或-3OH；

z = -6OS或-6OH；

并且U_G = ；

其中符号 ~ 表示m和n标记的单元是沿着该多糖链分布的，并且并非必须按照顺序；

该方法包括：

(a) 识别带有肿瘤的患者，并且

(b) 向该受试者给予治疗有效量的药物组合物，该药物组合物包括该偶联物。

10.如权利要求9所述的用途，其中该抗肿瘤剂选自下组，其构成为：顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、羟基脲、托泊替康、伊立替康、氮杂胞苷、伏立诺他、伊沙匹隆、硼替佐米、紫杉烷类、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、长春瑞宾、秋水仙碱(colchicin)、蒽环类、柔红霉素、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、阿霉素、1-双氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、蓖麻毒素、以及美登木素类、吉非替尼、埃罗替尼、拉帕替尼、索拉菲尼、舒尼替尼、伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼、西罗莫司、依维莫司、雷帕霉素、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、利妥昔单抗、以及托西莫单抗。

11.如权利要求9或10所述的用途，其中该肿瘤是实体瘤。

12.如权利要求9或10所述的用途，其中该肿瘤是肉瘤或癌。

13.如权利要求9或10所述的用途，其中该肿瘤是以下部位的肉瘤或癌：头部、颈部、咽、甲状腺、肺、乳房、淋巴、血液、胃肠系统、肝、胰、生殖器以及生殖泌尿道、膀胱，中枢神经系统(CNS)，神经细胞或神经胶质细胞、或皮肤，或者该肿瘤是口、食管、肾、尿路上皮、卵巢、子宫、子宫颈、子宫内膜、前列腺或睾丸肿瘤。

14.如权利要求9或10所述的用途，进一步包括以下步骤中的一个或多个：对该肿瘤组织进行活组织检查、对该肿瘤组织进行成像、并且评价给药对该肿瘤组织的作用。

15.如权利要求9或10所述的用途，其中该偶联物是静脉内给药的。

16.一种药物组合物，包括治疗剂或成像剂与多糖制剂的偶联物，其中该治疗剂或成像剂选自：放射剂、荧光剂、细胞毒性剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、蛋白酶抑制剂、抗血管新生剂、抗转移剂、类固醇、生物免疫调节剂、单克隆抗体、抗体片段、适配子、siRNA、反义分子、融合蛋白、细胞因子、细胞因子受体、支气管扩张剂、他汀、抗炎剂、微管抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢剂、蛋白合成和分解抑制剂、有丝分裂抑制剂、烷化剂、铂化剂、核酸合成抑制剂、组蛋白去乙酰化酶以及DNA甲基转移酶抑制剂、氮芥、亚硝基脲、乙烯亚

胺、烷基磺酸盐、三氮烯、叶酸盐类似物、核苷类似物、核糖核苷酸还原酶抑制剂、长春花碱、紫杉烷、埃博霉素、嵌入剂、信号转导抑制剂、凋亡诱导剂、细胞因子、趋化因子、以及疫苗；并且其中该多糖制剂具有以下特征：

重均链分子量在3,500 Da与8,000 Da之间；

抗Xa活性以及抗IIa活性，各自小于50 IU/mg；以及

大于5%并且小于50%的乙二醇裂解的糖醛酸残基；并且

其中该多糖制剂缺少实质性抗凝血剂活性，

其中该多糖制剂包含式I的多糖：

$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]_m\sim[U_G\text{-}H_{x,y,z}]_n$

其中U的每次出现表示糖醛酸残基，并且H的每次出现表示己糖胺残基；

其中m和n是整数，以使

m = 4至16，并且

n = 1至4；

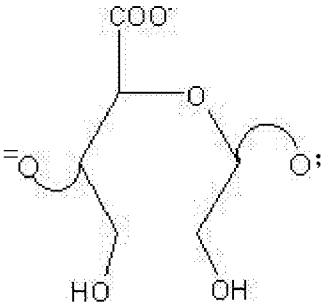
w、x、y、以及z中的每个对于$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]$的每次出现可以独立地是相同或不同的，并且x、y、以及z中的每个对于$[U_G\text{-}H_{x,y,z}]$的每次出现可以独立地是相同或不同的，其中

w = -2OS或-2OH；

x = -NS或-NAc；

y = -3OS或-3OH；

z = -6OS或-6OH；

并且U_G = 

；

其中符号 ~ 表示m和n标记的单元是沿着该多糖链分布的，并且并非必须按照顺序。

17.如权利要求16所述的组合物，其中该治疗剂或成像剂选自：顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、羟基脲、托泊替康、伊立替康、氮杂胞苷、伏立诺他、伊沙匹隆、硼替佐米、紫杉烷类、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、长春瑞宾、秋水仙碱(colchicin)、蒽环类、柔红霉素、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、阿霉素、1-双氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、蓖麻毒素、以及美登木素类、吉非替尼、埃罗替尼、拉帕替尼、索拉菲尼、舒尼替尼、伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼、西罗莫司、依维莫司、雷帕霉素、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、利妥昔单抗、以及托西莫单抗。

18.治疗剂或成像剂和多糖制剂的偶联物在制备药物中的用途，该药物用于将治疗剂或成像剂靶向患者的纤维化组织或炎性损伤的方法中使用，其中该多糖制剂具有以下特征：

重均链分子量在3,500 Da与8,000 Da之间；

抗Xa活性以及抗IIa活性，各自小于50 IU/mg；以及

大于5%并且小于50%的乙二醇裂解的糖醛酸残基；并且

其中该多糖制剂缺少实质性抗凝血剂活性，

其中该多糖制剂包含式I的多糖：

$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]_m\sim[U_G\text{-}H_{x,y,z}]_n$

其中U的每次出现表示糖醛酸残基，并且H的每次出现表示己糖胺残基；

其中m和n是整数，以使

m = 4至16，并且

n = 1至4；

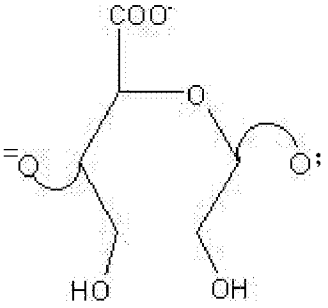
w、x、y、以及z中的每个对于$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]$的每次出现可以独立地是相同或不同的，并且x、y、以及z中的每个对于$[U_G\text{-}H_{x,y,z}]$的每次出现可以独立地是相同或不同的，其中

w = -2OS或-2OH；

x = -NS或-NAc；

y = -3OS或-3OH；

z = -6OS或-6OH；

并且U_G = 

；

其中符号 ~ 表示m和n标记的单元是沿着该多糖链分布的，并且并非必须按照顺序；

该方法包括 (a)识别患有纤维化组织或炎性损伤的患者，其中该患者需要给予该治疗剂或成像剂以治疗该纤维化组织或炎性损伤或对其进行成像；并且

(b) 将该偶联物给予该患者，由此将该治疗剂或成像剂靶向该纤维化组织或炎性损伤。

19.如权利要求18所述的用途，其中该治疗剂或成像剂选自以下各项：放射剂、荧光剂、抗炎剂，以及抗纤维化剂。

20.如权利要求18或19所述的用途，其中该患者患有关节炎、红斑狼疮、桥本甲状腺炎、多发性硬化、糖尿病、葡萄膜炎、皮炎、银屑病、荨麻疹、肾病综合征、肾小球性肾炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、干燥综合征、过敏、哮喘、鼻炎、湿疹、GVH、COPD、胰岛炎、支气管炎或纤维病。

21.如权利要求18或19所述的用途，进一步包括以下各步骤中的一个或多个：对该纤维化组织或炎性损伤进行活组织检查、对该纤维化组织或炎性损伤进行成像、并且评价给药对该纤维化组织或炎性损伤的作用。

22.如权利要求18或19所述的用途，其中该偶联物是经静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内、或口服给药的。

23.如权利要求2或10所述的用途或如权利要求16所述的药物组合物，其中所述紫杉烷类是紫杉醇或多西他赛。

24.如权利要求2或10所述的用途或如权利要求16所述的药物组合物，其中所述蒽环类是多柔比星或表柔比星。

25.如权利要求5所述的用途，其中胃肠系统的肿瘤是胃、小肠、结肠和直肠或肛管的肿瘤。

26.如权利要求13所述的用途，其中胃肠系统的肿瘤是胃、小肠、结肠和直肠或肛管的肿瘤。

27.如权利要求20所述的用途，其中所述患者具有过敏性或内源性哮喘或急性哮喘发作。

组织靶向

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求于2010年4月16日提交的美国申请序列号61/325,146的优先权。在先申请的披露被视为本申请披露的部分(并且通过引用结合在此)。

[0003] 发明背景

[0004] 很多抗肿瘤剂攻击癌细胞和相似的正常细胞。因此,选择性地靶向癌组织同时将针对正常组织的毒性效应最小化的治疗方式是一种重要的需求。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明至少部分地基于以下发现,即在此说明的一种低分子量肝素(例如,一种缺少实质性抗凝血剂活性的LMWH(低分子量肝素),例如M402)与一种异源剂相偶联,当给予一只实验动物时在原发肿瘤位点展示出选择性的累积。因此,本发明的特点尤其是将一种药剂(例如一种治疗剂或成像剂)递送并靶向至受试者的一个肿瘤位点的方法。还包括的是将一种药剂(例如一种治疗剂或成像剂)递送并靶向至受试者的一个炎症的、纤维化的或感染的部位的相关方法。

[0007] 如在此所用的“偶联物”是一种组合物,该组合物包括在此说明的与一种异源活性剂连接的LMWH,这样使得该连接在给药后在受试者的体内基本上保持完整,至少直到将该偶联物靶向至一个特定的位点(比如一个肿瘤位点)。该LMWH与异源剂可能直接相连(例如,共价连接)或经由一个连接物或隔离物连接。该连接在靶向至该肿瘤位点后可能是稳定的或可分裂的(例如,就像在药物前体中)。

[0008] 如在此说明的“连接物”或“隔离物”,可能是熟练的技术人员会识别并理解的任何一种分子。这些分子可以包括同型双功能或异型双功能的部分。通常,同型双功能部分包括相同的反应基团,而异型双功能部分包括并不相同的反应基团。这些反应基团可以选自任何普遍接受的功能基团,这些基团与连接或交联的生物相关分子相关联(例如,酰肼、N-羟基琥珀酰亚胺或辛二亚氨酸二甲酯)。用作连接物和/或隔离物的分子可包括很多类别或化合物,这些化合物包括聚合物(例如,一种PEG聚合物、聚丙烯酰胺以及其他生物相容性聚合物)、染料以及已知在连接和交联生物相关分子中有用的的其他化合物(例如,LMWH)。

[0009] 用在此时说明的一种偶联物将一种药剂“靶向”至一个组织位点是指,将该药剂以一定速率、和/或以一定量值、和/或持续一定时间递送至该位点,递送效果超过若该药剂未如在此所说明进行偶联而递送至该位点。

[0010] 如在此所使用,术语“受试者”旨在表示人类或非人类哺乳动物,包括但不限于伴侣动物以及实验动物,比如犬、猫、马、奶牛、猪、绵羊、山羊、兔子、豚鼠、灵长类动物、大鼠和小鼠。

附图说明

[0011] 图1展示了氟-M402(上组)与无染料(下组)在荷瘤小鼠体内的分布。

[0012] 图2是一幅图,展示了在注射了氟-M402或无染料的小鼠的原发肿瘤内荧光信号水平的时间过程。

[0013] 图3是一幅图，展示了荷瘤小鼠在一个单一皮下剂量^{3}H-M402后该肿瘤位点的经滴定的M402的累积。

[0014] 图4展示了荷瘤小鼠与未荷瘤小鼠在连续6天接受每日单一皮下剂量氟-M402后24小时氟-M402的分布。

[0015] 图5表示一系列照片，这些照片展示了多个不同组织(例如，肿瘤、肝、脾脏)在连续7天每日注射氟-M402的最后之后24小时氟-M402的累积。

[0016] 图6表示一系列照片，这些照片展示了连续7日每日单一注射氟-M402处理的小鼠其原发肿瘤、唾液腺和肝中荧光信号水平的时间过程。

[0017] 详细说明

[0018] 生物分布研究表明，M402在肿瘤位点累积并维持，展示M402能用于将一种异源剂靶向至一个肿瘤位点。这类靶向是有用的，例如用于以下各项中的一个或多个：优先地将该药剂递送至一个靶肿瘤位点；用来与非靶向药剂相比，增加该药剂的半衰期；用来与非靶向药剂相比，提供该药剂更加缓慢地释放至血流中；用来与非靶向药剂相比，降低该药剂的有效剂量；用来与非靶向药剂相比，降低受试者对该药剂的抗性。

[0019] 靶向部分

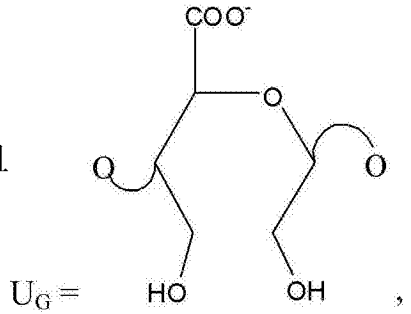
[0020] 在此说明的LMWH可用于将一种异源剂(例如，一种治疗剂或成像剂)靶向至一个肿瘤位点。这种LMWH可以具有以下特点中的一种或多种：抗-Xa活性小于50IU/mg、20IU/mg、10IU/mg、5IU/mg或更小；乙二醇裂解的糖醛酸残基(例如，小于50％、40％、30％、20％的乙二醇裂解的糖醛酸残基)；每条多糖链不大于3个乙二醇裂解的糖醛酸残基(U_G)；大于40％$U_{2S}H_{NS,6S}$二糖残基；脱硫度小于40％；一条或多条多糖链，这些链具有一个4,5-未饱和的非还原端糖醛酸残基；一条或多条多糖链，这些链在还原端具有一个2,5-脱水甘露醇残基；重均分子量在3,500Da与8,000Da之间，例如4,000Da与8,000Da之间；以及在此说明的分子量分布。

[0021] 在此说明的靶向剂的实例包括多糖制剂，这些制剂包括以下链，这些链包括以下：

[0022] $[U_W\text{-}H_{x,y,z}]_m\sim[U_G\text{-}H_{x,y,z}]_n$

[0023] 其中U表示一个糖醛酸残基，而H表示一个已糖胺残基，其中m和n是整数，这样使得m＝6-18，并且n＝1-4；w＝-2OS或-2OH；x＝-NS或-NAc；y＝-3OS或-3OH；z＝-6OS或-6OH，

[0024] 并且



U_G＝ ，

[0025] 其中符号～表示m和n标记的单元是沿着该多糖链分布的，并且并非必须按照顺序。

[0026] 例如，本实施方案涵盖了以下多糖链：

[0027] $[U_G\text{-}H_{x,y,z}]\text{-}[U_W\text{-}H_{x,y,z}]\text{-}[U_G\text{-}H_{x,y,z}]\text{-}[U_W\text{-}H_{x,y,z}]\text{-}[U_W\text{-}H_{x,y,z}]\text{-}[U_W\text{-}H_{x,y,z}]$

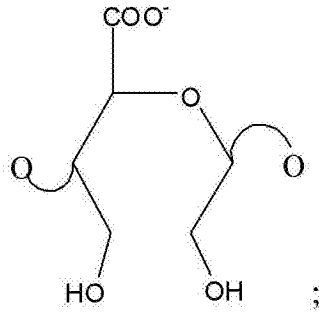
[0028] 此外，当$[U_W\text{-}H_{x,y,z}]$每次出现时，w、x、y、和z中每一个可以相同或不同，并且当$[U_G$-

$H_{x,y,z}$]每次出现时，x、y、和z中每一个可以相同或不同。U每次出现时可以独立地是艾杜糖醛酸(I)或一种葡萄糖醛酸(G)。

[0029] 该多糖制剂可具有抗Xa活性以及抗IIa活性，它们各自小于50IU/mg(例如，抗Xa活性小于约40IU/mg、30IU/mg、20IU/mg、15IU/mg、10IU/mg、5IU/mg、4IU/mg、3IU/mg、2IU/mg或1IU/mg；或从约0至50IU/mg、约0至40IU/mg、约0至30IU/mg、约0至25IU/mg、约0至20IU/mg、约0至10IU/mg、约0至5IU/mg、约5至10IU/mg、约5至15IU/mg、或约5至20IU/mg；并且抗IIa活力小于约40IU/mg、30IU/mg、20IU/mg、15IU/mg、10IU/mg、5IU/mg、4IU/mg、3IU/mg、2IU/mg或1IU/mg；或从约0至50IU/mg、约0至40IU/mg、约0至30IU/mg、约0至25IU/mg、约0至20IU/mg、约0至10IU/mg、约0至5IU/mg、约5至10IU/mg、约5至15IU/mg、或约5至20IU/mg)；以及

[0030] $[U_w\text{-}H_{x,y,z}]_m\text{-}[U_G\text{-}H_{x,y,z}]_n\text{-}[U_w\text{-}H_{x,y,z}]_o\text{-}[U_G\text{-}H_{x,y,z}]_p\text{-}[U_w\text{-}H_{x,y,z}]_q$

[0031] 其中U表示一个糖醛酸残基，并且H表示一个己糖胺残基，其中m至r是整数，以使：m＝0-10、n＝0-3、o＝0-10、p＝0-3、q＝0-10、w＝-2OS或-2OH、x＝-NS或-NAc、y＝-3OS或-3OH、z＝-6OS或-6OH，

[0032] 并且 $U_G=$  ；

[0033] 其中w、x、y、以及z在每个m、n、o、p、或q标记的单元上各自是相同的或不同的。在一些实施方案中，n+p之和小于或等于4(例如，小于或等于3、2、1、或0)。在一些实施方案中，n与p之和是4、3、2或1。在一些实施方案中，m、o和q之和在4与18之间，例如4-8、4-9、4-10、4-11、4-12、4-13、4-14、4-15、4-16或4-17。在一些实施方案中，该制剂的具有在3,500Da与7,000Da之间，例如4,300Da与7000Da之间、4,500Da与7,000Da之间、4,700Da与7,000Da之间以及5,000Da与7,000Da之间的重均分子量。

[0034] 此外，当$[U_w\text{-}H_{x,y,z}]$每次出现时，w、x、y、和z中每一个可以相同或不同，并且当$[U_G\text{-}H_{x,y,z}]$每次出现时，x、y、和z中每一个可以相同或不同。U每次出现时可以独立地是艾杜糖醛酸(I)或一种葡萄糖醛酸(G)。

[0035] 该多糖制剂可具有抗Xa活性以及抗IIa活性，它们各自小于50IU/mg(例如，抗Xa活性小于约40IU/mg、30IU/mg、20IU/mg、15IU/mg、10IU/mg、5IU/mg、4IU/mg、3IU/mg、2IU/mg或1IU/mg；或从约0至50IU/mg、约0至40IU/mg、约0至30IU/mg、约0至25IU/mg、约0至20IU/mg、约0至10IU/mg、约0至5IU/mg、约5至10IU/mg、约5至15IU/mg、或约5至20IU/mg；并且抗IIa活力小于约40IU/mg、30IU/mg、20IU/mg、15IU/mg、10IU/mg、5IU/mg、4IU/mg、3IU/mg、2IU/mg或1IU/mg；或从约0至50IU/mg、约0至40IU/mg、约0至30IU/mg、约0至25IU/mg、约0至20IU/mg、约0至10IU/mg、约0至5IU/mg、约5至10IU/mg、约5至15IU/mg、或约5至20IU/mg)。

[0036] 抗IIa活性使用针对平行线测定的统计方法以每毫克的抗IIa活性的国际单位来计算抗IIa活性。使用以下原理来测量在此说明的抗IIa活性水平。

[0037] 多糖(PS)+ATIII→[PS·ATIII]

[0038] IIa

[0039] PS·ATIII→[PS·ATIII·IIa]+IIa(过量)

[0040] IIa(过量)+底物→肽+pNA(通过分光光度计测量)

[0041] 抗因子IIa的活性通过样品在抑制凝血酶时对抗凝血酶(ATIII)的增强效果来测定。凝血酶过量可以间接地通过分光光度计进行测量。可以例如在Diagnostica Stago分析仪上或在ACL Futura3Coagulation系统上使用来自Chromogenix的试剂(S-2238底物,凝血酶(53nkat/瓶),以及抗凝血酶),或在任何等效的系统上测量抗因子IIa活性。使用针对低分子量肝素的第二国际标准来校正分析仪的应答。

[0042] 抗Xa活性使用针对平行线测定的统计方法以每毫克抗因子Xa活性的国际单位来计算一种制剂的抗Xa活性。使用以下原理来测量在此所说明的制剂的抗因子Xa活性。

[0043] PS+ATIII→[PS·ATIII]

[0044] FXa

[0045] PS·ATIII→[PS·ATIII·FXa]+FXa(过量)

[0046] FXa(过量)+底物→肽+pNA(通过分光光度计测量)

[0047] 抗因子Xa的活性通过样品在抑制已活化的因子Xa(FXa)时对抗凝血酶(ATIII)的增强效果来测定。因子Xa过量可以间接地通过分光光度计进行测量。可以例如在Diagnostica Stago分析仪上用Stachrom®肝素检测试剂盒、在ACL Futura3Coagulation系统上用来自Chromogenix的Coatest®肝素试剂盒、或在任何等效的系统上测量抗因子Xa活性。可以使用针对低分子量肝素的NIBSC国际标准来校正分析仪的应答。

[0048] 分子量和链长度当确定一种制剂的重均分子量时,大约3500至8000Da、大约3500至6300Da、优选地大约4000至6000Da、大约4200至5900、或大约4300至5800Da的重均分子量,表明在该多糖制剂中显著数目的链是具有足够的链长度的。如在此所使用的,“重均分子量”是指糖醛酸/己糖胺二糖重复体的链的以道尔顿计的重量平均值。非糖醛酸和/或非己糖胺结构单元的存在不包括在测定该重均分子量之中。因此,在该制剂中的一条链或多条链中非糖醛酸以及非己糖胺结构单元的分子量不应该包括在测定该重均分子量之中。从以下等式来计算重均分子量:$(M_w):M_w=\Sigma(c_i m_i)/\Sigma c_i$。变量$c_i$是在片层i中聚合物的浓度,并且$m_i$是在片层i中聚合物的分子量。对一个色谱峰求和,该总和包含多个片层的数据。一个片层的数据可以在色谱峰对比时间的图上被绘成一条垂直的线。因此,该洗脱峰可以被分成多个片层。重均分子量的计算是依赖于所有片层的浓度和分子量的总和的平均值。例如使用Wyatt Astra软件或任何合适的软件可以测量重均分子量。通过具有两个串联的柱(例如,一个TSK G3000SWXL以及一个G2000SWXL)的高效液相色谱法,与串联的一个多角度光散射(MALS)检测器以及一个折射率检测器相偶联来测定在此所说明的重均分子量。所使用的洗脱液是0.2M硫酸钠,pH 5.0,并且流速是0.5mL/min。

[0049] 可以例如通过确定在该制剂中这些链的平均链长度和/或通过测定在该制剂内多条链的重均分子量来确定一种多糖制剂是否包括多条足够链长度的链。当确定平均链长度时,大约5至22个(例如,大约7至18个,典型地大约7至14个、或8至13个)二糖重复体的平均链长度表明在该制剂中显著数目的链是具有足够的链长度的。

[0050] 如在此所使用的,“平均链长度”是指在一条链中发生的糖醛酸/己糖胺二糖重复物的平均链长度。非糖醛酸和/或非己糖胺结构单元(例如,附连的PEG部分)的存在不包括

在测定该平均链长度之中。通过将数均分子量(Mn)除以对于一种二糖(500Da)而言的数均分子量测定了平均链长度。

[0051] 乙二醇裂解的糖醛酸在此说明的一种多糖制剂可以包括一个开口的糖苷环，常规地被称为还原-氧化作用(RO)衍生物。在这些制剂中，具有邻二醇(vicinyl diol)的一个或多个糖苷环例如在C2-C3之间的键通过一个氧化作用、随后通过一个还原作用而被打开。这些化合物在此也被称为“乙二醇裂解”的衍生物。在此所说明的本发明的另一个实施方案中，这些乙二醇裂解的残基使它们自己进行随后的官能化作用。因此，这些化合物还可以带有相等或不同的基团，以代替衍生自乙二醇裂解的伯羟基基团，例如醛基团、甲氧基基团、或寡聚糖或肽基团，其范围是从一个单一的糖或氨基酸到大于一个单元的长度，例如2个或3个单元。

[0052] 在一些实施方案中，小于50％的糖醛酸残基是乙二醇裂解的糖醛酸残基(例如，小于40％、30％、25％、或20％的糖醛酸残基是乙二醇裂解的糖醛酸残基)。

[0053] 还原端结构在一些例子中，在此所说明的一种多糖试剂中至少有大约50％的链具有一个经修饰的还原端结构，例如一个2,5-脱水甘露糖残基或已被还原生成一种醇的一个2,5-脱水甘露糖。在一些实施方案中，在该制剂中至少约55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、或95％的链具有一个经修饰的还原端结构，这样使得该还原端包括一个2,5-脱水甘露糖残基或已被还原生成醇的一个2,5-脱水甘露糖。

[0054] 多分散性在此提供的多糖制剂的多分散性是约2或更小，例如17或更小，例如约1.7或1.6至1.2、约1.4至1.5、以及这之间的数值。

[0055] 术语“多分散的”或“多分散性”是指一种组合物的重均分子量(Mw)除以数均分子量(Mn)。从以下等式来计算数均分子量：(Mn)：$Mn=\Sigma ci/(\Sigma ci/mi)$。变量ci是在片层i中多糖的浓度，而Mi是在片层i中多糖的分子量。对一个色谱峰求和，该总和包含多个片层的数据。一个片层的数据可以在色谱峰对比时间的图上被绘成一条垂直的线。因此，该洗脱峰可以被分成多个片层。数均分子量是依赖于在每个片层数据的分子量和浓度的计算。以上说明了测定重均分子量的方法，并且还将这些方法用于测定多分散性。

[0056] 制作用作在此说明的靶向剂的多糖制剂的方法

[0057] 一种方法包括提供一种前体肝素制剂，该制剂具有大于7000Da的平均分子量或大于7至18个二糖的链长，并且处理该前体肝素制剂(例如，通过酶促或化学解聚作用，例如通过亚硝酸解聚作用)来获得一种多糖制剂，该制剂具有大约3000Da至7000Da的重均分子量或大约7至18个二糖的平均链长度。例如，该前体肝素制剂可以是未分级肝素。

[0058] 可以通过一种方法来处理该前体肝素制剂，该方法包括解聚作用(例如，通过亚硝酸处理、水解、或酶促解聚作用)，之后跟随一个乙二醇裂解的反应。亚硝酸解聚作用可以通过以下方式实现，例如通过用亚硝酸(例如，约0.02至0.04M亚硝酸)在约2至4的pH下、在约10℃至30℃的温度下处理该前体肝素制剂(例如，UFH)一个特定的时间段。该乙二醇裂解反应涉及使用高碘酸盐(例如，约0.05M至0.2M的高碘酸钠)，在约0℃至10℃的温度下，将高碘酸盐氧化反应进行10至20小时。在一些实施方案中，残留的杂质例如盐类或二甘醇(DEG)可以依次通过一种色谱方法，例如凝胶过滤色谱法来去除。可任选地，该氧化的制剂接着通过用一种还原剂(例如，大约0.5至2.0％(重量/体积)硼氢化钠)在大约6.0至7.0的pH下、并且在大约0℃至10℃的温度下处理大约0.5至3小时而被还原。

[0059] 可以使用酶促消化、化学消化或它们的组合来处理一种前体肝素制剂。化学消化的实例包括氧化解聚作用(例如,使用H_2O_2或Cu^+以及H_2O_2)、脱氨基切割(例如使用硝酸异戊酯或亚硝酸)、β-消除性切割(例如用苄基酯)、和/或通过碱性处理。酶促消化可以包括使用一种或多种降解肝素的酶类。例如,这种或这些降解肝素的酶可以是例如一种或多种肝素酶,肝素裂解酶,硫酸肝素甘油氨基聚糖(HSGAG)裂解酶(一种裂解酶,被描述为甘油氨基聚糖(GAG)裂解酶,它也可以降解肝素)。优选地,该酶在未硫酸化的糖醛酸的一个或多个糖苷键上进行切割。

[0060] 抗肿瘤剂

[0061] 在此说明的偶联物和方法包括使用一种药剂,例如一种抗肿瘤剂,该药剂可被靶向至受试者的肿瘤位点。关于可以使用的这些试剂,这些方法和组合物并受限制。

[0062] 在一个实施方案中,该药剂是一种成像剂,例如一种磁化剂(例如,用于MRI)、一种荧光剂、一种生物学活性酶标记、一种放射性同位素(例如,一种放射性离子)、一种发光标记、或一种发色团。放射性同位素可以是一种α-、β-、或γ-发射器,或一种β-和γ-发射器。作为治疗剂有用的放射性同位素包括钇(^{90}y)、镥(^{177}Lu)、锕(^{225}Ac)、镨、砹(^{211}At)、铼(^{186}Re)、铋(^{212}Bi或^{213}Bi)、以及铑(^{188}Rh)。作为标记有用的放射性同位素,例如用于诊断,包括碘(^{131}I或^{125}I)、铟(^{111}In)、锝(^{99}mTc)、磷(^{32}p)、碳(.sup.14C)、以及氚(^{3}H)。

[0063] 在一些实施方案中,该药剂是一种治疗剂,例如一种放射性同位素(例如,一种以上说明的放射性同位素)、一种细胞毒性剂、一种酪氨酸激酶抑制剂、一种蛋白酶体抑制剂、一种蛋白酶抑制剂、一种抗血管新生剂、一种抗转移剂、一种类固醇、一种生物免疫调节剂、一种单克隆抗体、一种抗体片段、一种适配子、一种siRNA、一种反义分子、一种融合蛋白、一种细胞因子或趋化因子、一种细胞因子或趋化因子的受体、一种支气管扩张剂(bronchodialator)、一种他汀、一种抗炎剂、一种微管抑制剂、一种拓扑异构酶抑制剂、一种抗代谢剂、一种蛋白合成和分解抑制剂、一种有丝分裂抑制剂、一种烷化剂、一种铂化剂、一种核酸合成抑制剂、一种组蛋白去乙酰化酶和DNA甲基转移酶抑制剂、一种氮芥、一种亚硝基脲、一种乙烯亚胺、一种烷基磺酸盐、一种三氮烯、一种叶酸盐类似物、一种核苷酸类似物、一种核糖核苷酸还原酶抑制剂、一种长春花碱、一种紫杉烷、一种埃博霉素、一种嵌入剂、一种信号转导抑制剂、一种凋亡诱导剂、一种细胞因子、一种趋化因子、以及一种疫苗。

[0064] 在一个实施方案中,该药剂可能选自:小有机分子、蛋白质、肽、核酸(例如,基因治疗)、抗体、氨基酸、脂类、多糖、细胞生长因子、以及酶类。

[0065] 在一个实施方案中,该药剂是顺铂、环磷酰胺、达卡巴嗪、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、吉西他滨、卡培他滨、羟基脲、托泊替康、伊立替康、氮杂胞苷、伏立诺他、伊沙匹隆、硼替佐米、一种紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、长春瑞宾、秋水仙碱(colchicin)、蒽环类(多柔比星以及表柔比星)柔红霉素、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、阿霉素、1-双氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、蓖麻毒素、以及美登木素类、吉非替尼、埃罗替尼、拉帕替尼、索拉菲尼、舒尼替尼、伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼、西罗莫司、依维莫司、雷帕霉素、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、利妥昔单抗、以及托西莫单抗。

[0066] 化学偶联

[0067] 策略已知用于制备小分子-碳水化合物偶联物以及多肽-碳水化合物偶联物(例如,其中该碳水化合物是一种肝素衍生的碳水化合物),直接或通过一个连接物连接,例如正如以下所说明:

[0068] Wang(王)等人,2009.Pharmaceutical Research(药学研究)785-793,描述了肝素与一种化学治疗剂(例如,一种紫杉烷)的偶联物,包括一种紫杉醇-肝素偶联物;

[0069] Lee(李)等人,2001),Circulation(循环)104:3116-3120,描述了通过将活化的DOCA与肝素在二甲基甲酰胺与水的共溶剂中反应而产生LMWH-脱氧胆酸(DOCA);

[0070] Cho(曹)等人,2008.Bioconjugate Chem.(生物结合物化学)19(7):1346-1351,描述了肝素的羧基基团与经胺化分子的胺基相结合;

[0071] Lee(李)等人,2008.Int J Cancer(国际癌症杂志)124:2755-2765描述了肝素经由形成酰胺而偶联至异源剂。

[0072] 美国专利号6,245,753和美国专利号6,656,922说明了肝素与胆汁酸、甾醇、链烷酸相偶联。

[0073] Chan(陈)等人,1997.J Biol Chem(生物化学期刊),272:22111-22117描述了肝素通过醛糖端共价连接至抗凝血酶。

[0074] Thorpe(索普)等人,1993.Cancer Res(癌症研究),53.3000-3007描述了肝素-类固醇偶联物的制备。

[0075] Wang(王)等人,2009.Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters(生物有机化学与医药化学通讯)19:149-152描述了肝素通过指定的醚键的肝素偶联物。

[0076] US 2009/0149424说明了一种组合物,其中一种胆汁酸通过该胆汁酸的3-碳用一个任选的隔离物键合至肝素上,并且肝素共价键合至一个硫化部分,例如一个萘三磺酸盐残基;

[0077] Barzu(巴鲁)等人,1986.Biochem J(生物化学杂志)238:847-854描述了肝素偶联至化学计量的量值的$Na^{125}I$;

[0078] Hatton(哈顿)等人,1980.Analytical Biochemistry(分析生物化学)106:417-426描述了滴定肝素样品的方法;

[0079] 美国专利5,308,617说明了蛋白质剂经由赖氨酸残基或氨基末端氨基共价偶联一种肝素片段,该片段具有一个末端2,5-酐-D-甘露糖残基,通过此类残基的醛基团而偶联;

[0080] 美国专利7,517,856说明了一种硫化的聚糖与一种生物活性多肽的生物偶联物,其中该生物活性多肽非共价地与该硫化聚糖的硫酸盐基团相关联;

[0081] 美国专利7,417,021说明了生物聚合物例如肝素与一种治疗剂的偶联物,这些物质通过一个二硫化物键结合,具有和不具有隔离物;

[0082] 美国专利7,166,708说明了一种氧化反应敏感的物质的多糖偶联物。

[0083] 配制与给药

[0084] 在此说明的这些偶联物可以被配制为药物组合物用于医学成像、诊断或治疗。此类组合物典型地包括合适的药学可接受的载体(例如缓冲剂以及辅助剂),以及可任选地其他治疗剂或诊断剂,使用熟知的配制方案完成。给予这些药物组合物可通过使用一种适宜的运载体,例如可注射的溶液来实现。给药可以是例如经静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内、或口服。在该药物组合物中所使用的偶联物的精确量值可基于有待治疗的病况的性质、以及

所使用的治疗剂的效能来确定。

[0085] 在此引用的所有参考文献以其全文通过引用结合在此。

[0086] 实例

[0087] 实例1:M402与荧光染料以及放射性同位素的偶联

[0088] 通过用HiLyte Fluor™ 750Hydrazide(AnaSpec,Fremont,CA)在一种催化剂(例如EDC)的存在下、在室温下处理M402来制备与荧光染料偶联的M402。最终产物通过盐-甲醇沉淀而分离。

[0089] M402通过以下方法偶联至^{3}H,这些方法基本上如Hatton(哈顿)等人,1980.Analytical Biochemistry(分析生物化学)106:417-426所说明。

[0090] 实例2:将M402-氟偶联物与M402-3H偶联物靶向至肿瘤位点

[0091] 该实例展示了M402可用于将一种异源剂(例如,一种成像剂或治疗剂)靶向至一个肿瘤位点。

[0092] M402用HiLyte Fluor™ 750染料标记,以便使M402的生物分布可视化。正常或荷瘤小鼠用一个单一剂量的荧光标记的M402处理,或用无HiLyte Fluor™ 750染料处理,并且在不同时间点通过荧光成像使用IVISLumina仪器进行监测。注射后1小时内,在肝和膀胱内观察荧光M402在非荷瘤小鼠体内的分布,以及LMWH通过肾脏和肝的快速清除。然而,在荷瘤动物中,除了膀胱和肝,与M402有关的荧光信号在第一乳腺脂肪垫的区域内(4T1细胞植入其中)很容易能检测到(图1,上组)。重要的并且令人惊讶的是,原发肿瘤区域内的荧光信号在一次单一注射后持续达192小时(8天)(图2)。通过将分离的肿瘤体外成像并且用^{3}H-标记的M402进行生物分布研究来确认分布。如图3所示,经滴定的M402在1小时内在肿瘤位点累积,并且持续超过72小时(圆圈)。相比之下,在注射无染料的小鼠体内,该荧光信号在最初4小时内大部分累积在膀胱内,并且在注射后24小时后不能检测到(图1,下组)。原发肿瘤的组织学检查显示,M402与肿瘤组织附近的纤维化条带以及单独的肿瘤细胞共定位。

[0093] 肿瘤区域内(包括纤维化条带内),荧光信号的累积是有趣并且意料之外的。尽管没有理论束缚,M402可以被靶向至肿瘤组织中纤维化条带内的细胞外基质(ECM),例如经由在此类ECM发现的M402-连接生长因子和/或靶向至富含生长因子、细胞因子或趋化因子(它们包含肝素结合基序)的区域。因此,本发明也考虑了靶向至纤维化的以及炎性的损伤,以及靶向至感染位点。

[0094] 实例3:多次注射氟-M402

[0095] 该实例展示了一个25天实验,其中小鼠在7天内每日注射氟-M402团,以及该实验的结果。

[0096] 如在实例1中所说明的,M402用HiLyte Fluor™ 750染料标记,以便使M402的生物分布可视化。在第5至11天,用一个单一每日剂量的氟-标记的M402处理正常小鼠或荷瘤小鼠。在第6至12天,在每日注射后24小时观察荷瘤小鼠以及非荷瘤小鼠体内荧光M402的分布。M402有关的荧光信号很容易在膀胱、肝以及第一乳腺脂肪垫的区域可检测到(图4)。还发现,多个氟-M402剂量导致不同组织中的特异性累积,这些组织例如原发肿瘤、腋窝(axial)和臂丛的LN(淋巴结),肝、脾脏、胰和肾(图5)。在腋窝(axial)和臂丛的LN,肝、脾脏、胰、肾以及原发肿瘤组织内的荧光信号当与一个单一注射相比、并且当与单独注射该染料相比时,展示出在多次注射时的更加显著的累积。最后发现,唾液腺、肝以及原发肿瘤内

的荧光信号在用氟-M402多次注射处理后，持续至少2至3周(图6)。

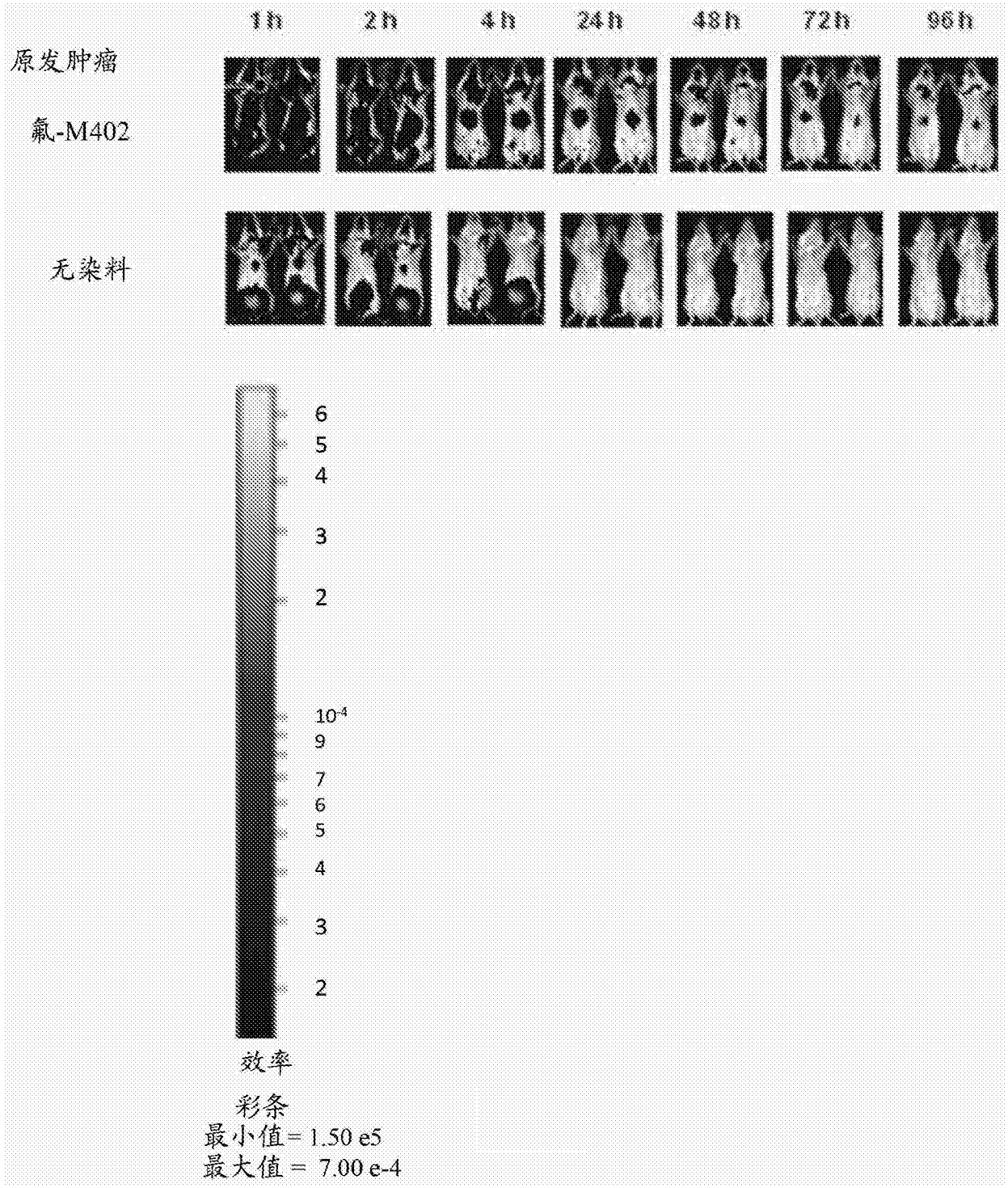

1h
2h
4h
24h
48h
72h
96h
原发肿瘤
氟-M402
无染料
6
5
4
3
2
10-4
9
7
6
5
4
3
2
效率
彩条
最小值= 1.50 e5
最大值 = 7.00 e-4

图1

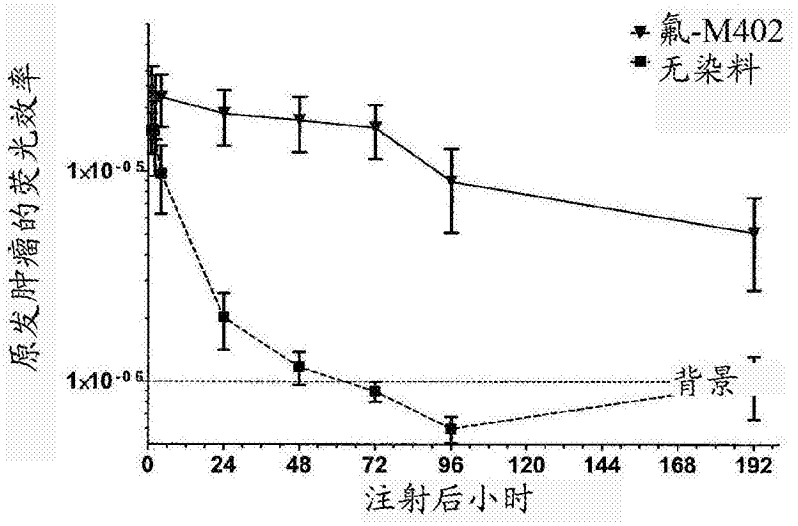


图2

4T1荷瘤雌性Balb/c小鼠在一次单一皮下30 mg/kg剂量的^{3}H-MONC 402之后其肿瘤内的^{3}H-MONC402等效物的浓度

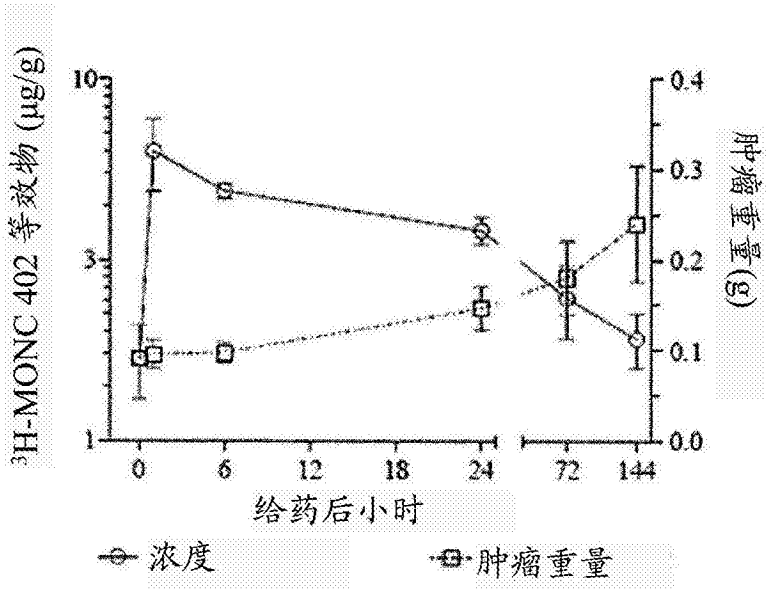


图3

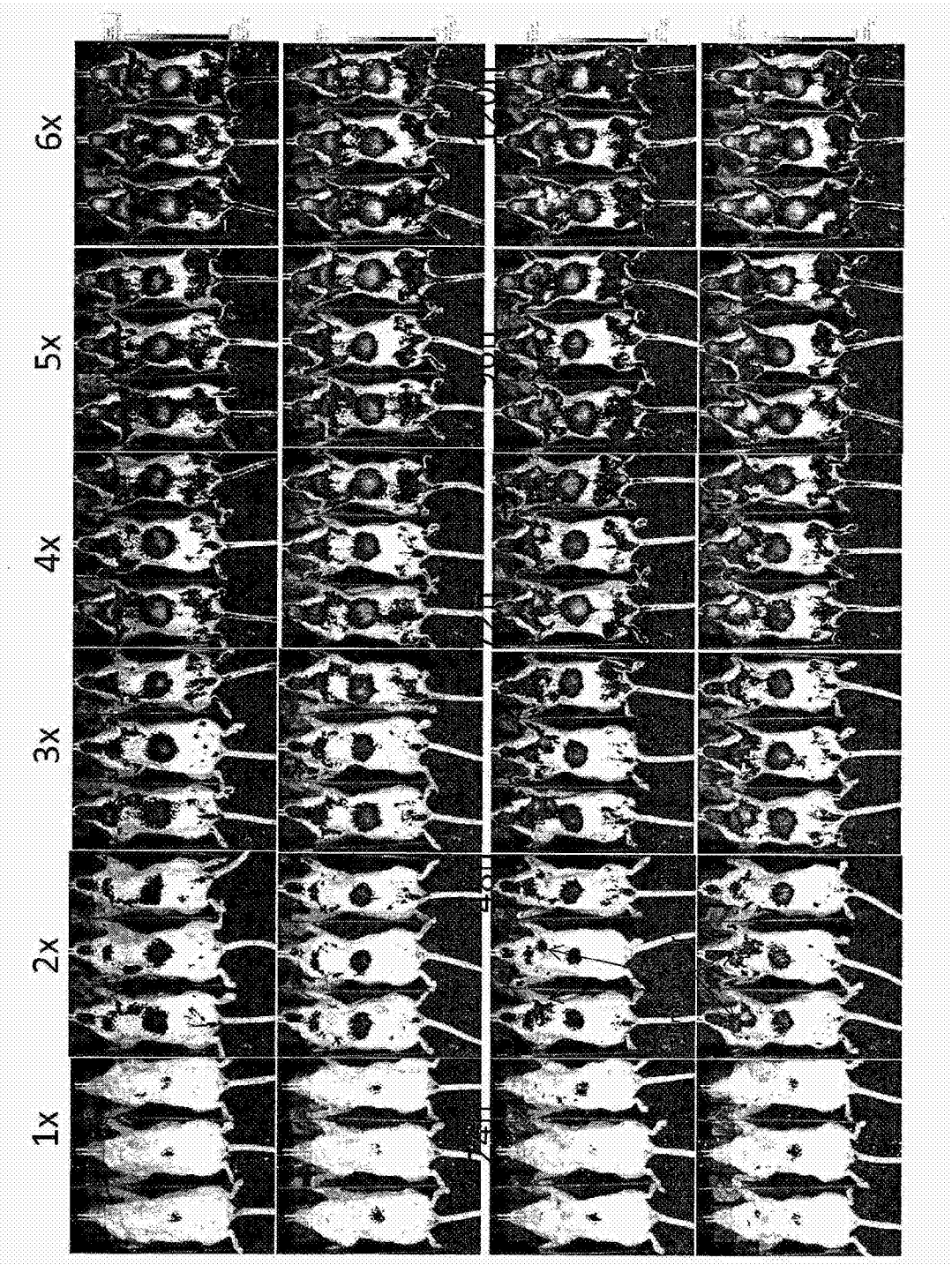


图4

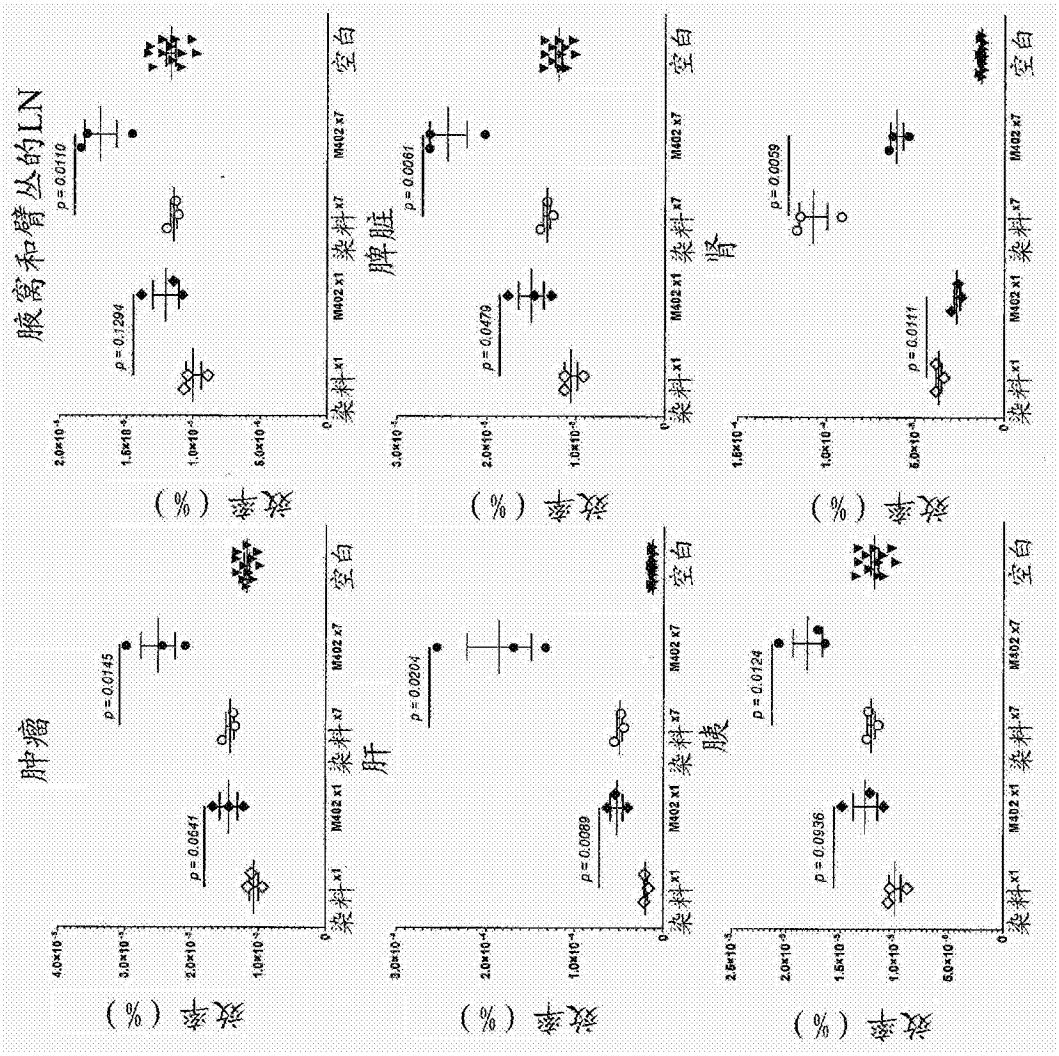

腋窝和臂丛的LN
肿瘤
肝
脾脏
胰
肾
效果（%）
染料x1
M402 x1
染料x7
M402 x7
空白
p = 0.0110
p = 0.1294
p = 0.0145
p = 0.0641
p = 0.0204
p = 0.0089
p = 0.0061
p = 0.0479
p = 0.0059
p = 0.0111
p = 0.0124
p = 0.0936

图5

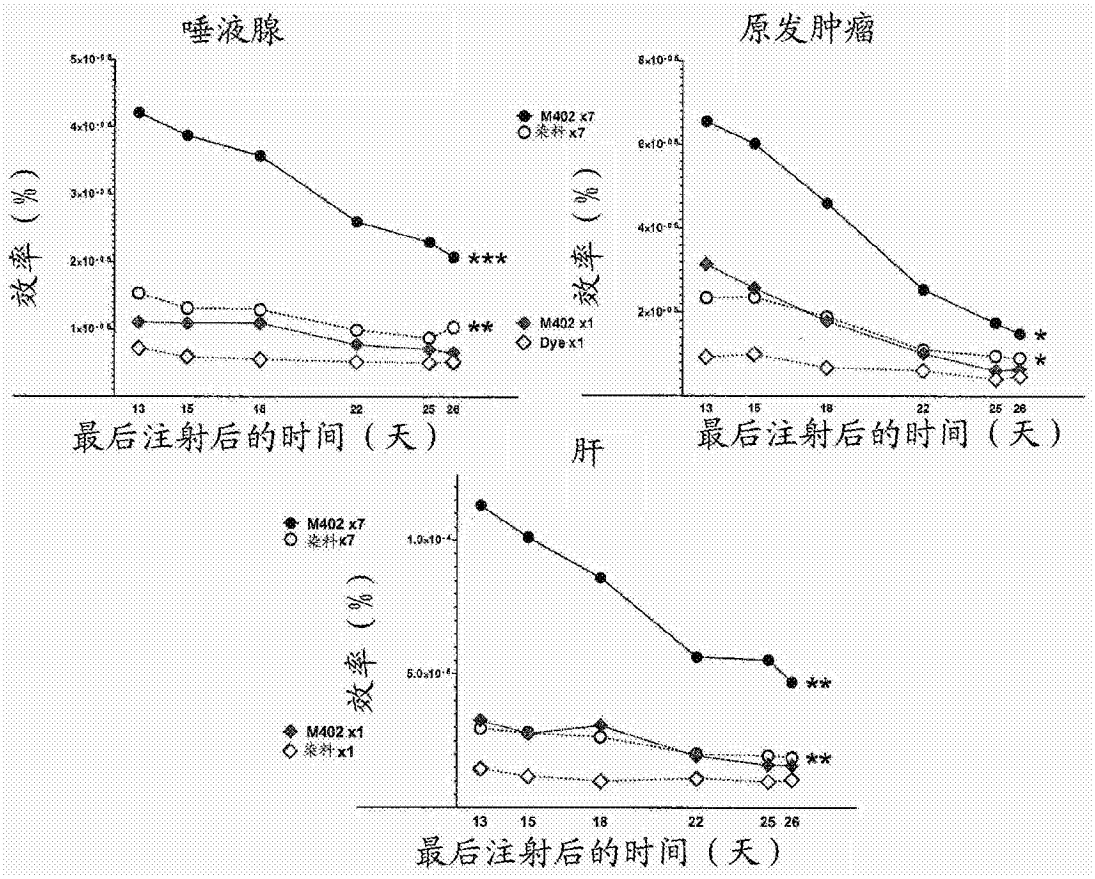

唾液腺
效率（%）
M402 x7
亲和 x7
M402 x1
Dye x1
***
**
最后注射后的时间（天）
原发肿瘤
效率（%）
*
*
最后注射后的时间（天）
肝
M402 x7
亲和x7
M402 x1
亲和 x1
效率（%）
**
**
最后注射后的时间（天）

图6