



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104781281 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201380043328. 5

(22) 申请日 2013. 08. 14

(30) 优先权数据

61/682, 991 2012. 08. 14 US

61/865, 071 2013. 08. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 02. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2013/050625 2013. 08. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/026286 EN 2014. 02. 20

(71) 申请人 安吉奥开米公司

地址 加拿大魁北克

(72) 发明人 让-保罗·卡斯泰恩 杨高强

克里斯蒂安·切 米歇尔·德默勒

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 余刚 张英

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

C07K 14/81(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

C07K 16/28(2006. 01)

权利要求书3页 说明书28页 附图8页

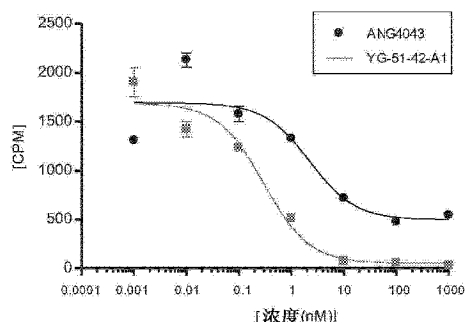
(54) 发明名称

包含抗体部分、穿过血脑屏障的多肽和细胞毒素的结合物

(57) 摘要

本发明涉及抗体-多肽-细胞毒素结合物以及制作、包装和使用该结合物的方法。多肽可以是帮助结合物穿过血脑屏障和/或进入CNS外的癌细胞的转运的库尼茨型蛋白酶抑制剂或其衍生物,并且抗体部分选择性地结合CNS内或外周肿瘤中的靶以将细胞毒素剂指向该靶(例如,肿瘤或癌细胞)。结合物可以由以下进一步定义:在抗体部分和多肽之间包含接头;多肽和与其结合的细胞毒素剂的数量;在结合物内的实体彼此结合所在的位置;以及结合物更大的构型。修饰的多肽(例如,与细胞毒素剂但不与抗体部分结合的多肽)、药物组合物、试剂盒(例如,包含修饰的多肽和尚未结合的抗体)以及制作和使用结合物的方法也是本发明的特征。

BT-474 中细胞毒性分析
5天处理接着是胸苷-³H 掺入



1. 一种包含抗体部分、多肽和细胞毒素剂的蛋白结合物,其中,所述多肽包含氨基酸序列 Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys (SEQ ID NO:123) 或其生物学活性类似物。

2. 根据权利要求 1 所述的结合物,进一步包含在所述抗体部分和所述多肽之间和 / 或在所述多肽和所述细胞毒素剂之间的接头。

3. 根据权利要求 2 所述的结合物,其中,所述接头是同官能接头或异官能接头。

4. 根据权利要求 3 所述的蛋白结合物,其中,所述同官能接头是分别包含两个、三个或四个反应性基团的同双官能、同三官能或同四官能接头,其中,所述反应性基团与伯胺、硫醇基团、羟基或糖类反应,并且所述异官能接头是包含至少一个反应性基团的异双官能、异三官能或异四官能接头,所述反应性基团与伯胺、硫醇基团、羟基或糖类反应。

5. 根据权利要求 4 所述的蛋白结合物,其中,所述接头是包含与伯胺反应的基团和与硫醇基团反应的基团的异双官能、异三官能或异四官能接头。

6. 根据权利要求 2 所述的蛋白结合物,其中,所述接头是一氟环辛炔 (MFCO)、二环 [6.1.0] 壬炔 (BCN)、二苯并环辛炔 (DBCO)、N- 琥珀酰亚胺基 -S- 乙酰基硫代乙酸酯 (SATA)、N- 琥珀酰亚胺基 -S- 乙酰基硫代丙酸酯 (SATP) 或 N- 羟基 - 琥珀酰亚胺 (NHS)。

7. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述多肽包含氨基酸序列 Thr₁-Phe₂-Phe₃-Tyr₄-Gly₅-Gly₆-Cys₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉ (SEQ ID NO:67) 或其类似物或者 Thr₁-Phe₂-Phe₃-Tyr₄-Gly₅-Gly₆-Ser₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉ (SEQ ID NO:97) 或其类似物。

8. 根据权利要求 7 所述的结合物,其中,所述结合物包含 SEQ ID NO:67 的类似物,其中,包括 Cys₇、Lys₁₀和 Lys₁₅的至少 13 个氨基酸残基是不变的,或者所述结合物包含 SEQ ID NO:97 的类似物,其中,包括 Ser₇、Lys₁₀和 Lys₁₅的至少 13 个氨基酸残基是不变的。

9. 根据权利要求 8 所述的结合物,其中,在 SEQ ID NO:67 的类似物或 SEQ ID NO:97 的类似物中,用 Gln 取代 Asn₁₂,用 Gln 取代 Asn₁₃,和 / 或用 Tyr 或 Trp 取代 Phe₁₄。

10. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述类似物包括序列 Phe₃-Tyr₄-Gly₅-Gly₆-Cys₇/Ser₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:118) ;Gly₅-Gly₆-Ser₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:119) ;Ser₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:120) ;Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:121) 或 Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:122)。

11. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述多肽包含至少一个为 D- 型的氨基酸残基。

12. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述结合物包含 1-10 个多肽和一个抗体部分。

13. 根据权利要求 12 所述的结合物,其中,所述结合物包含 1-6 个多肽。

14. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述多肽和所述细胞毒素剂以 1:1 至 1:3 (多肽 : 细胞毒素剂) 的比率存在。

15. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,每个多肽经由至少一个接头连接到抗体部分。

16. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述抗体部分是四聚体抗体或其生物学活性变体。

17. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述抗体部分是单链抗体(scFv)、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段。

18. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述抗体部分包括人类抗体、嵌合抗体或人源化抗体或它们的生物学活性变体。

19. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述抗体部分是单克隆抗体或多克隆抗体。

20. 根据权利要求 16 或权利要求 17 所述的结合物,其中,所述四聚体抗体、其生物学活性变体、所述 scFv、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段特异性结合生长因子受体或白介素受体。

21. 根据权利要求 20 所述的结合物,其中,所述生长因子受体是表皮生长家族受体(EGFR) 家族的成员。

22. 根据权利要求 21 所述的结合物,其中,所述抗体部分是曲妥珠单抗、西妥昔单抗或帕尼单抗或它们的生物学活性变体。

23. 根据权利要求 20 所述的结合物,其中,所述生长因子受体是血管内皮生长因子受体(VEGFR)。

24. 根据权利要求 20 所述的结合物,其中,所述白介素受体是 IL-2 受体。

25. 根据权利要求 24 所述的结合物,其中,所述抗体部分是巴利昔单抗、达利珠单抗或它们的生物学活性变体。

26. 根据权利要求 20 所述的结合物,其中,所述白介素受体是 IL-6 受体。

27. 根据权利要求 26 所述的结合物,其中,所述抗体部分是托珠单抗或其生物学活性变体。

28. 根据权利要求 20 所述的结合物,其中,所述生长因子受体是 TNF- α 受体。

29. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述抗体部分是抗癌剂或抗炎剂。

30. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述细胞毒素剂是紫杉烷、生物碱、蒽环类药物、阿里他汀、抗叶酸剂、卡里奇霉素、倍癌霉素、丝裂霉素、嘧啶类似物或美登素的衍生物。

31. 根据权利要求 30 所述的结合物,其中,所述紫杉烷是多西他赛。

32. 根据权利要求 30 所述的结合物,其中,所述生物碱是长春花生物碱;所述蒽环类药物是多柔比星;所述阿里他汀是一甲基阿里他汀 E(MMAE);所述抗叶酸剂是甲氨蝶呤或氨蝶呤;所述卡里奇霉素是卡里奇霉素 γ 1;所述倍癌霉素是阿多来新、比折来新或卡折来新;所述丝裂霉素是丝裂霉素 C;所述嘧啶类似物是氟尿嘧啶;并且所述美登素的衍生物是类美登醇。

33. 根据权利要求 32 所述的结合物,其中,所述类美登醇是安丝霉素、mertansine 或 emtansine。

34. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述抗体部分、所述多肽和所述细胞毒素剂以线性结合物的形式连接。

35. 根据权利要求 1 所述的结合物,其中,所述抗体部分、所述多肽和所述细胞毒素剂以树枝状结合物的形式连接。

36. 一种药物组合物,包括权利要求 1 所述的结合物和药学上可接受的载体。

37. 根据权利要求 36 所述的药物组合物,其中,所述药物组合物被配制用于静脉内给

予。

38. 一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:

识别需要治疗的患者;并且

给予患者治疗有效量的权利要求 36 所述的药物组合物。

39. 根据权利要求 38 所述的方法,其中,所述患者是人类患者。

40. 根据权利要求 38 所述的方法,其中,所述癌症是原发性或继发性肿瘤。

41. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,所述原发性或继发性肿瘤在患者的脑或脊髓内。

42. 根据权利要求 38 所述的方法,其中,所述癌症与 HER-2 的表达相关联。

43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中,所述癌症是乳癌、卵巢癌、肺癌或胃癌。

44. 根据权利要求 38 所述的方法,其中,所述癌症与表皮生长因子受体的表达相关联。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中,所述癌症是头颈癌或结肠癌。

包含抗体部分、穿过血脑屏障的多肽和细胞毒素的结合物

[0001] 相关申请的参考

[0002] 本申请要求 2012 年 8 月 14 日提交的 U. S. 申请号 US 61/682,991 的提交日期的权益,和在 2013 年 8 月 12 日提交的 U. S. 申请号 US 61/865,071 的提交日期的权益。为了要求这些临时申请中一个或两个的优先权的任何后提交的 U. S. 实用新型申请和 /U. S. 或专利的目的,将临时申请的内容以其整体通过引用结合于此。

技术领域

[0003] 本发明涉及蛋白结合物 (conjugate), 其中一个或多个库尼茨 (Kunitz) 型蛋白酶抑制剂 (例如, 抑肽酶) 或其衍生物 (例如, 抑肽酶衍生的多肽) 以本文所描述的方式结合到抗体部分并且结合到细胞毒素剂; 方法, 结合物通过该方法被合成以供使用; 包含它们的生理学上可接受的组合物; 以及本文所描述的将结合物给予患者用于癌症的治疗方法。

背景技术

[0004] 由以下两个屏障系统保护大脑免于暴露于潜在有毒的、摄入的物质: 血脑屏障 (BBB) 和血脑脊液屏障 (BCSFB)。当这些屏障保护中枢神经系统 (CNS) 免受有害物质 (例如, 意外摄入的毒素) 的同时, 它们也妨碍治疗性蛋白质接近大脑和脊髓, 并且因此展示了在治疗 CNS 疾病中的主要障碍物。作为一般规则, 只有小于约 500 道尔顿的亲脂性分子穿过 BBB。在 CNS 疾病动物的研究中显示出有成功希望成果的很多药物远大于其, 并且通常, 蛋白疗法被排除在 CNS 外, 完全由于大脑毛细管内皮壁对这种大小和复杂性的药物可忽略不计的可渗透性。治疗有脑癌的患者, 无论是神经瘤或神经胶质瘤, 一直具有显著的挑战性。尽管手术切除、放射治疗和 / 或全身化疗, 患有一些恶性肿瘤的大部分患者存活不到一年。

[0005] 目前正追求提高蛋白疗法至 CNS 的递送的策略通常可以被分为三类。第一类包括侵入性操作, 如直接心室内给予药物和颈动脉内输注临时性破坏 BBB 的高渗溶液。第二类包括旨在提高穿过 BBB 的蛋白的脂质溶解度 (类脂可溶性, lipid solubility) 的基于药理学的策略。第三类是递送机制, 在其中治疗剂被附着到作为与 BBB 相关的载体或受体靶向的递送媒介物的蛋白。该第三类方法其优点在于, 其是高度特异且有效的, 引起最小的不良反应, 并且是广泛适用的。

[0006] 在 CNS 外, 将治疗剂仅靶向递送至病变的细胞仍然是普遍的挑战。全身化疗在某些种类的癌症治疗中是有效的, 但是在治疗许多其他种癌症时它却失败了, 因为需要实现肿瘤生长控制的剂量经常是如此得高以致它们引起不可接受的全身毒性。

发明内容

[0007] 在第一方面, 本发明特征在于包含抗体部分、一个或多个库尼茨型蛋白酶抑制剂 (例如, 抑肽酶) 或其衍生物 (例如, 抑肽酶衍生的多肽) 和细胞毒素剂的蛋白结合物。蛋白结合物可以由以下进一步限定: 在抗体部分和多肽间包含接头; 在多肽和细胞毒素剂间

包含的接头；以及在结合物内的抗体部分、多肽和细胞毒素剂的构型。因此，在一个实施方式中，本发明特征在于包含抗体部分、多肽和细胞毒素剂的蛋白结合物，其中，多肽包括氨基酸序列 Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys (SEQ ID NO:123) 或其生物学活性类似物。通常，结合物基本上可以是线性的（在蛋白质组分的三级结构允许的范围内）或分枝的。如下面进一步所描述的，通过将结合物的组成部件彼此直接连接或者与双官能接头连接而获得线性构型，而通过包含至少一个具有三或更多官能取代基的接头（例如，将一个抗体部分与两个多肽连接的三官能接头或，例如，将一个抗体和三个多肽连接的四官能接头）而获得分枝构型。因此，本文所描述的结合物可以包含在抗体部分和多肽之间和 / 或在多肽和细胞毒素剂之间的接头。其中，接头是同官能 (homofunctional) 接头时，其可以是分别包含两个、三个或四个反应性基团的同双官能、同三官能或同四官能接头，并且这些反应性基团（或取代基）可以与伯胺、硫醇基团、羟基或糖类反应。其中，接头是异官能 (heterofunctional) 接头时，其可以是包含至少一个反应性基团（也被称为取代基）的异双官能、异三官能或异四官能接头，其中反应性基团与伯胺、硫醇基团、羟基或糖类 (carbohydrate) 反应。也可以使用具有多于四个反应性基团（例如，5-10 个反应性基团）的接头。更具体地，蛋白结合物可以包含作为接头的一氟环辛炔 (MFCO)、二环 [6.1.0] 壬炔 (BCN)、二苯并环辛炔 (DBCO)、N- 琥珀酰亚胺基-S- 乙酰基硫代乙酸酯 (SATA)、N- 琥珀酰亚胺基-S- 乙酰基硫基丙酸酯 (SATP) 或 N- 羟基-S- 琥珀酰亚胺 (NHS)。

[0008] 当多肽在下面进一步被描述的同时，我们在此注意到本发明的蛋白结合物可以包含多肽，其包含氨基酸序列 Thr₁-Phe₂-Phe₃-Tyr₄-Gly₅-Gly₆-Cys₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉ (SEQ ID NO:67) 或其类似物或 Thr₁-Phe₂-Phe₃-Tyr₄-Gly₅-Gly₆-Ser₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉ (SEQ ID NO:97) 或其类似物。除非上下文另外明确指示，否则本文所描述的包含组成部件（例如，具体的序列）的组合物，如多肽，可以只包含组成部件（例如，在多肽情况下只有具体的序列）或者包含组成部件和更多（例如，在多肽情况下的在任一端或两端处具有另外的残基的具体的序列）。当多肽是本文所描述的特定序列（参考多肽）的类似物时，参考多肽中的半胱氨酸、丝氨酸和赖氨酸残基中的一个或更多个可以保持不变。例如，当结合物包含 SEQ ID NO:67 的类似物时，至少 13 个氨基酸残基（包括 Cys₇、Lys₁₀ 和 Lys₁₅）可以保持不变；当结合物包含 SEQ ID NO:97 的类似物时，至少 13 个氨基酸残基（包括 Ser₇、Lys₁₀ 和 Lys₁₅）可以保持不变。在 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:97 的类似物中，可以用 Gln 取代 Asn₁₂，可以用 Gln 取代 Asn₁₃，和 / 或可以用 Tyr 或 Trp 取代 Phe₁₄。类似物可以包含，例如，序列 Phe₃-Tyr₄-Gly₅-Gly₆-Cys₇/Ser₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:118)；Gly₅-Gly₆-Ser₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:119)；Ser₇-Arg₈-Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:120)；Gly₉-Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Thr₁₆-Glu₁₇-Glu₁₈-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:121)；或 Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅-Tyr₁₉-Cys (SEQ ID NO:122)。在多肽的任何一个中，至少一个氨基酸残基以 D- 型呈现。

[0009] 至于组成部件的数量，结合物可比抗体部分（看下面可能的构型的说明）包含更多的多肽。在一些实施方式中，结合物可以包含 1-10 个多肽和一个抗体部分，并且多肽与

抗体部分的比率可以是 1:1-10:1 (根据下面的说明,其他比率是可能的)。在一些实施方式中,结合物包含 1-6 个多肽。多肽和细胞毒素剂可以以 1:1 至 1:3 (多肽:细胞毒素剂) 的比率存在。

[0010] 每个多肽可以经由至少一个接头连接到抗体部分,并且该抗体部分可以是四聚体抗体或其生物学活性变体 (variant)。例如,抗体部分可以是单链抗体 (scFv)、Fab 片段或 F(ab')₂ 片段;可以是人类抗体、嵌合抗体或人源化抗体或它们的生物学活性变体;和/或可以是(或者可以衍生自)单克隆抗体或多克隆抗体。关于抗体部分特异性结合的靶,该靶可以是生长因子受体或白介素受体。例如,生长因子受体可以是表皮生长家族受体 (EGFR) 家族的成员,并且抗体部分可以是曲妥珠单抗、西妥昔单抗或帕尼单抗,或它们的生物学活性变体。在其他实施方式中,生长因子受体可以是血管内皮生长因子受体 (VEGFR)。在其他实施方式中,白介素受体可以是 IL-2 受体(在这种情况下,抗体部分可以是,例如,巴利昔单抗、达利珠单抗或它们的生物学活性变体)或 IL-6 受体(在这种情况下,抗体部分可以是,例如,托珠单抗或其生物学活性变体)。在其他实施方式中,生长因子受体是 TNF- α 受体。更普遍地,抗体部分可以是抗癌剂或抗炎剂。

[0011] 细胞毒素剂可以是紫杉烷(例如,多西他赛或其活性变体)、生物碱(例如,长春花生物碱)、蒽环类药物(例如,多柔比星)、阿里他汀(例如,一甲基阿里他汀 E (MMAE))、抗叶酸剂(例如,甲氨蝶呤或氨蝶呤)、卡里奇霉素 (calicheamicin)(例如,卡里奇霉素 γ 1)、倍癌霉素 (duocarmycin)(例如,阿多来新 (adozelesin)、比折来新 (bizelesin) 或卡折来新 (carzelesin))、丝裂霉素(例如,丝裂霉素 C);嘧啶类似物(例如,氟尿嘧啶);或美登素 (mytansine) 的衍生物(例如,类美登醇 (mytansinoid),如,安丝菌素 (ansamitocin)、mertansine 或 emtansine)。

[0012] 正如所记载的,抗体部分、多肽和细胞毒素剂可以线性结合物的形式连接或者被构造为树枝状结合物。

[0013] 在另一个方面,本发明特征在于治疗患有癌症的患者的方法。该方法可以包括识别需要治疗的患者(例如,有原发性或继发性肿瘤的(例如,在患者大脑或脊髓内的肿瘤)人类患者)的步骤,并且包括给予患者治疗有效量的包含本文所描述的蛋白结合物的药物组合物的步骤。患者的癌症可以与 HER-2 的表达相关联(例如,乳癌、卵巢癌、肺癌或胃癌)。患者的癌症可以与表皮生长因子受体的表达相关联(例如,头颈癌或结肠癌)。

[0014] 本发明也特征在于以下内容:制备本文所描述的结合物的方法;制备包含它们的药物组合物的方法;以及这些结合物和组分在疾病(包括癌症、炎症和本文所描述的特定的癌症)的治疗中的应用。任何治疗的方法可以被构造为“应用”的方法。因此,本发明特征在于以下:如本文所描述的蛋白结合物在制备药物中的应用,以及如本文所描述的蛋白结合物在制备用于治疗疾病或病症(包括癌症、炎症和本文所描述的特定的癌症)的药物中的应用。

[0015] 我们使用术语“蛋白结合物”指由分子结合(例如,共价键合)部件形成的基于氨基酸的化合物。在本发明中,部件包括与选定的靶特异性结合的抗体部分、帮助结合物穿过血脑屏障和/或进入靶细胞的转运的库尼茨型蛋白酶抑制剂(例如,抑肽酶)或其衍生物(例如,抑肽酶衍生的多肽)、以及细胞毒素剂。为了易于阅读,我们将库尼茨型蛋白酶抑制剂或其衍生物称作“多肽”。“基于氨基酸的化合物”是主要但不一定排他地包含氨基酸残

基的一种化合物。如上所述,蛋白结合物可以包含接头,其可以是化合物(或以其他方式认定的相对于氨基酸或蛋白的化学实体)。细胞毒素剂也可以是化合物。这样的结合物可主要但不一定排他地包含氨基酸残基,因为当接头和细胞毒素剂可以是化学实体的同时,抗体部分和多肽可以由氨基酸制成。如下面进一步所描述的,在一些实施方式中,细胞毒素也可以是蛋白,增加由氨基酸形成的结合物的比例。蛋白结合物也可以包含可以是或不是蛋白质的检测剂。例如,检测剂可以是荧光体、荧光蛋白、放射性同位素、染料等。本发明包括在其中检测检测剂以,例如,分析结合物到在 CNS 或另一组织内的肿瘤或癌细胞或在 CNS 外的细胞类型的递送的方法。

[0016] 为了增加明晰度,我们注意到,抗体部分和多肽彼此不同。进一步地,任何蛋白结合物可以包含多于一个的多肽,并且两个、三个、四个或更多的多肽可以是相同的(即可以具有完全相同的氨基酸序列)或者可以彼此不同(即与抗体部分结合的多肽可以具有不同的氨基酸序列)。关于本发明的组合物和方法,我们使用术语“包括”意味着“包含”。在任何情况下,除非上下文另有特别指示,否则本发明的组合物、它们的组成部件(例如,抗体部分和多肽)和本发明的方法可以包括所记载的要素或步骤或由所记载的要素或步骤组成。例如,在任一实施方式中,给定的多肽可以包含所记载的序列(例如,SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:117 或 SEQ ID NO:123)或由所记载的序列组成。

[0017] 如上所指出的,本发明的蛋白结合物可以包含如本文所描述的多肽或其生物学活性类似物或片段。我们使用关于给定多肽的术语“生物学活性的”意味着在有益的生理学设置中保持足够的活性(例如,受体结合活性)的多肽的类似物或片段。例如,当给定的多肽促进蛋白结合物(该多肽作为其的一部分)穿过 BBB 的转运时,在相同或可比的条件下,当多肽的类似物或片段还具有使结合物穿过 BBB 转运的能力时,该多肽的类似物或片段是有生物学活性的。可以在体内或离体(ex vivo)模型中检测任何这样的性质(例如,受体结合、细胞内化或穿过 BBB),并且参考多肽的生物学活性类似物和片段可比参考多肽更有效或效果较差。具体地,片段或类似物的效力可以低于参考多肽的效力,只要其保持足够高以达到期望的结果(例如,只要多肽包含在其中的结合物达到临床上有益的结果)。

[0018] 参考多肽的“片段”是参考多肽的连续的或邻近的部分(例如,10 个氨基酸长度的多肽的片段可以是在该多肽内的任何 2-9 个连续的残基)。参考多肽的“类似物”是任何具有相似于但不同于参考多肽或其部分的序列的序列的多肽。因此,包含氨基酸残基的一个或多个氨基酸置换、增加或缺失(或其任何组合)的多肽是参考序列的类似物,并且片段是一种类型的类似物。在下面进一步描述适用于包含在本蛋白结合物中的多肽的片段和类似物。

[0019] 除 BBB 渗透性之外,本发明的蛋白结合物可以具有以下优点中的一个或多个:在剂量浓度时几乎没有沉淀;冻融稳定性;高溶解度(在溶液中产生很少的(如果有的话)聚集)。抗体部分也可以保持对其靶标的高亲和力(相对于在非结合形式中的亲和力)。例如,抗体部分可以具有对其靶标的这样的亲和力:其中亲和力为在当非结合时部分的亲和力的约 3 倍内。在用蛋白结合物 H43(包含血管肽素-2)的研究中,我们观察到 2.2nM 的亲和力,其中非结合的抗体部分的亲和力是 1.3nM。包含细胞毒素在癌细胞对抗体治疗变得难治的情况下是特别有利的。在下面的说明、附图和权利要求中示出本组合物和方法的其他特征和优点。

附图说明

[0020] 图 1 是示出可并入到本蛋白结合物中的代表性的多肽的表格。

[0021] 图 2a-图 2d 是在其中抗体部分（在左边由灰色的椭圆形代表）可以结合到已经依次结合到细胞毒素剂的多肽的四种方式的图解。在图 2(a)（最上面的）中，通过点击化学实现结合；与抗体部分连接的环辛炔与在多肽的 N-端处的叠氮基团反应。（这两个活性取代基可以是颠倒的，其中，环辛炔与多肽连接而抗体被修饰以包含叠氮化物。）在图 2(b)-图 2(d) 中，抗体通过活性巯基基团与多肽连接。在图 2(b) 中，多肽在 N-端处带有巯基基团（C-SH），其可以与包含马来酰亚胺的接头如 Ma1-AMCHC-OSu（反式-4-（马来酰亚胺基甲基）环己烷-1-羧酸 N-琥珀酰亚氨基酯（trans-N-Succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)；与胺和巯基反应的异双官能交联试剂）或 SPDP（3-[2-吡啶基二硫代]-丙酸 N-琥珀酰亚氨基酯（N-succinimidyl 3-[2-pyridyldithio]-propionate））。当蛋白结合物的多肽部分可以被修饰以包含巯基基团的同时，如图 2(b) 所示，替代地结合物可以通过使带有巯基的抗体部分与结合到多肽的巯基反应性接头反应形成。在图 2(c) 中，从多肽延伸出的吡啶基二硫化物基团与带有巯基的抗体部分反应。在图 2(d) 中，从多肽延伸出的包含马来酰亚胺的接头与带有巯基的抗体部分发生反应。细胞毒素剂通过脂肪族接头（具有与多肽的胺键和与细胞毒素剂的酯键）结合到在多肽内的赖氨酸残基。

[0022] 图 3 示出结合方案，其中单细胞毒素剂通过巯基反应性接头结合到代表性的多肽的巯基修饰的 C-端。当抗体被连接到环辛炔预期与多肽的含有叠氮化物的 N-端反应时，可以以本文所描述的任何方式（包括图 2(b)-图 2(d) 示出的那些方式）连接抗体和多肽。

[0023] 图 4(a)-图 4(b) 示出三种方式，其中本结合物可以被构造成树枝状的形式。如图 2(a)，抗体和多肽被构造成通过点击反应结合。包含烷基（C₁-C₆烷基）的单个分枝从抗体部分延伸到第一分枝部分，其作为从其中延伸的分枝的核（在公式 I 中的 X_核）。在图 4(a)-图 4(c) 中，结合物的分枝部分具有 4 个分枝，并且所有四个分枝可终止在连接到细胞毒素剂的两个拷贝的多肽处（如 4(b)，其中，多肽通过吡啶基二硫键（pyridinyl disulfide bond）被连接到结合物，并且如 4(c)，其中，多肽通过马来酰亚胺己酸连接到结合物）。可替代地，四个分枝中的两个分枝可终止在多肽处，并且剩下的两个可用细胞毒素剂终止（如 4(a)）。

[0024] 图 5(a)-图 5(c) 示出本结合物可以构造为树枝状形式的三个另外的方式。在图 5(a) 和图 5(b) 中，抗体部分被连接到树枝状核部分，由其延伸两个分枝。在每个分枝的末端是连接多肽的细胞毒素。在图 5(c) 中，四个分枝从中央核伸出，其中一个分枝的末端被连接到抗体部分，并且剩下的三个分枝的末端被连接到连接多肽的细胞毒素。

[0025] 图 6 是用于将药物结合到修饰的多肽（N₃An2-(SuDoce)₂）的方案。

[0026] 图 7 是示出在 BT-474 细胞中实施的细胞毒性试验的结果的线图。用 ANG 4043 和 YG-51-42-A1 处理细胞 5 天。前者是包含结合 HER2 的抗体和由 SEQ ID NO:97 代表的多肽（血管肽素-2（An2））的结合物。后者是包含相同的抗体和抑肽酶衍生的多肽以及细胞毒素剂多西他赛的结合物。当对于 ANG4043 的 IC₅₀是 2.228nM 的同时，对于 YG-51-42-A1 的 IC₅₀仅为 0.297nM。

[0027] 图 8a-图 8h 示出含有可以包含在本结合物中的分枝结构的结合物的部分。该结

合物可以包含如该图示出的多肽或如本文所描述的另一个多肽连同本文所描述的抗体部分和细胞毒素中的一个或多个。

具体实施方式

[0028] 大部分在治疗 CNS 中可能有用的药物不能穿过 BBB, 并且令人惊奇的是, 在这个长期存在的问题上付出了如此小的努力。据估算在全世界范围内超过 99% 的 CNS 药物开发致力于药物发现本身, 少于 1% 的努力针对提高递送。对于许多严重的、昂贵的和使人衰弱的 CNS 疾病, 包括脑癌, 没有可靠有效的治疗。因此, 存在不仅对于发现有效的药剂而且还对于成功地将那些药剂递送至大脑和脊髓的大量的和未满足的需要。治疗性抗体在用于许多类癌症的最有前途的新的治疗中。然而, 由于其大小, 治疗性的抗体在递送至 CNS 的最困难的药剂中。我们的研究已经证明了结合到抑肽酶衍生的多肽的抗体可以被更有效地递送到 CNS, 并且, 进一步地, 对于受癌症影响的患者, 这种结合物的治疗益处可以通过包含的细胞毒素而增加。在本发明的上下文中, 包含抗体部分、多肽和细胞毒素剂的结合物比抗体部分单独穿过血脑屏障 (即不结合到多肽) 更大程度地穿过 BBB。也可以在 BBB 的离体模型中观察在转运方面的差异。因此, 在本结合物中的多肽有益于将抗体部分和细胞毒素剂转运穿过个体的血脑屏障, 并且, 结果是, 对 CNS 的改善的接近允许以之前不可能的方式在 CNS 癌症的治疗中使用抗体部分和细胞毒素剂。如本文还描述的, 本结合物也有益于治疗癌症, 其中无论其是在 CNS 外生长的原发性或继发性肿瘤。

[0029] 本发明以用于药物递送的基于生理学的策略扩展发明人的先期工作。在此, 结合物进一步包含提供另外的治疗益处的细胞毒素剂。尽管已经证明许多抗体对肿瘤或癌细胞的选择性, 但是由于在人类患者中治疗效果差, 它们的临床应用受限。同样地, 由于其毒性分布 (profile), 已知细胞毒素对于癌症治疗在临床上具有受限的应用。本结合物改善治疗性药物递送和在 CNS 中癌症的治疗, 并且在别处其在可接受的安全参数内。因此, 本结合物的优点是其穿过 BBB、优先地靶向在 CNS 和其他组织中的肿瘤和 / 或癌细胞以及最终将治疗有效浓度的细胞毒素剂递送至那些细胞的组合能力。本文所描述的蛋白结合物不仅能够穿过血脑屏障 (BBB), 还能够以提高的效率将它们带有的细胞毒素递送至特定的外周细胞类型, 包括在乳房、结肠、肝脏、肺、脾脏、肾脏、卵巢和肌肉中的细胞。更普遍地, 本结合物能够靶向表达低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP1) 的任何细胞或组织。该受体是还包括 LRP2 (也被称为 megalin) 的 LDL 受体家族的成员, 并且其介导配体穿过 BBB 的内皮细胞的转运 (Shibata 等人, 2000 ; Ito 等人, 2006 ; Bell 等人, 2007)。更具体地, LRP2 作为在内皮细胞的质膜处的多配体结合受体并且介导引起转胞吞作用的配体的内吞作用。在以下段落中, 我们首先描述本蛋白结合物的组成部件、随后描述它们可以被构造的方式以及在这样的构型中有用的接头。

[0030] 多肽 : 抑肽酶是库尼茨型 (即, 其包含 KPI 结构域) 的蛋白酶抑制剂。它是 LRP1 和 LRP2 的配体, 并且体外研究已经证明抑肽酶穿过模拟哺乳动物 BBB 的细胞层。尽管转胞吞作用的确切的分子机制尚不清楚, 并且尽管本发明并不限于通过任何特定的分子机制起作用的蛋白结合物的同时, 但是本文所描述的多肽, 包括抑肽酶和抑肽酶衍生的多肽, 被认为与 LDL 受体家族中的受体相互作用。发明人已经识别了不同于抑肽酶多肽、但是保持与抑肽酶多肽一定程度的结构和官能相似性的多肽。例如, 发明人已经识别了在本结合物内

是有用的 19-氨基酸多肽和在那些多肽内的 6-氨基酸多肽。19-氨基酸多肽相当于抑肽酶 (SEQ ID NO:126) 的残基 32-50, 并且符合序列 Xaa₁-Phe-Xaa₃-Tyr-Gly-Gly-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Lys-Xaa₁₁-Asn-Asn-Xaa₁₄-Lys-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Xaa₁₉ (SEQ ID NO:128), 其中 Xaa₁ 是 Thr、Pro 或 Ser; Xaa₃ 是 Val、Gln、Phe 或 Tyr; Xaa₇ 是 Cys 或 Ser; Xaa₈ 是 Arg、Met、Gly 或 Leu; Xaa₉ 是 Gly 或 Ala; Xaa₁₁ 是 Gly、Arg 或 Lys; Xaa₁₄ 是 Phe 或 Tyr; Xaa₁₆ 是 Thr、Arg 或 Ser; Xaa₁₇ 是 Gly 或 Ala; Xaa₁₈ 是 Lys 或 Glu; 并且 Xaa₁₉ 是 Gly、Tyr 或 Asp。图 1 的 SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:61 符合 (SEQ ID NO:) SEQ ID NO:126。6-氨基酸多肽相当于抑肽酶 (SEQ ID NO:126) 的残基 41-46, 并且符合序列 Lys-Arg-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Lys (SEQ ID NO:106), 其中 Xaa₃ 是 Asn、Ser、Thr 或 Gln; Xaa₄ 是 Asn、Ser、Thr 或 Gln; 并且 Xaa₅ 是 Phe 或 Tyr。例如, 本文所描述的结合物可以包括含有序列 Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys (SEQ ID NO:123) 的多肽。

[0031] 并入本结合物的多肽可以包含约 6-60 个氨基酸残基或由约 6-60 个氨基酸残基组成, 并且有用的多肽可以包含符合 SEQ ID NO:106 或 SEQ ID NO:128 的序列或由符合 SEQ ID NO:106 或 SEQ ID NO:128 的序列组成。任何给定的多肽可表现出与抑肽酶序列一定程度的同源性或同一性 (例如, 70-100% 的同源性或同一性); 包含约 10 个赖氨酸和 / 或精氨酸残基; 包含不超过约四个带负电荷的残基 (例如, 不超过约 4 个天冬氨酸或谷氨酸残基); 包含约 3 (例如, 包括 2-4) 个分子内 (例如, 二硫) 键; 和 / 或包含扭曲的 β -发卡和 / 或 C-端 α 螺旋。其中, 长久有用的多肽是 SEQ ID NO 98 和 SEQ ID NO 126。

[0032] 在结合物内的多肽可以具有 (由...组成) 或包括 (含有) 如本文具体列出的序列 (例如, 由 SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:97 表示的序列或在图 1 的表格中示出的抑肽酶衍生的多肽的任何其他序列), 或者它们可以是这些参考序列中任何一个的生物学活性片段或类似物。片段由于具有较少的邻接的氨基酸残基 (例如, 来自 N-端或 C-端的一个或多个氨基酸被删除) 不同于参考序列, 而类似物由于其包含至少一个另外的氨基酸残基或至少一个氨基酸置换不同于参考序列。另外的一个或多个氨基酸残基可以被添加到 N-端、C-端, 添加到在参考多肽的末端间的位置 (例如, SEQ ID NO:117), 或这些位置的任何组合。类似物可以比参考序列更短 (即, 它可以包含一个或多个氨基酸残基的缺失), 然而, 我们使用术语“类似物”表示变体, 其以某种方式不同于参考序列, 而不只是 N-和 / 或 C-端氨基酸残基或多个残基的简单缺失。其中, 类似物包含氨基酸残基的置换, 该置换可以被认为是保守的或非保守的。保守的置换是在以下组内的那些: Ser、Thr 和 Cys; Leu、Ile 和 Val; Glu 和 Asp; Lys 和 Arg; Phe、Tyr 和 Trp; 以及 Gln、Asn、Glu、Asp 和 His。保守的置换也可以由 BLAST (基础局部比对搜索工具, Basic Local Alignment Search Tool) 算法、BLOSUM 置换矩阵 (例如, BLOSUM 62 矩阵) 或 PAM 置换: p 矩阵 (例如, PAM 250 矩阵) 限定。

[0033] 当参考序列具有 19 个氨基酸残基 (例如, 符合 SEQ ID NO:126 的多肽) 时, 其生物学活性片段可以具有 6-18 个邻接的 (contiguous) 残基 (包含的), 并且其生物学活性类似物可以具有 1-13 个氨基酸置换; 一个或多个氨基酸添加 (例如, 在 N-和 / 或 C-端处残基的添加, 其将参考多肽的长度增加到最高达约 50-60 个氨基酸残基); 或这样的置换和添加的组合。正如所记载的, 在类似物 (相对于片段) 的情况下, 其中存在至少一个置换和 / 或至少一个添加, 也可以存在至少一个缺失。

[0034] 在第一多肽 (例如, 参考多肽, 如, 在图 1 中列出的抑肽酶或另一种多肽) 和第二

多肽之间的相似性的程度可以被表示为在同等的位置处完全相同的残基的百分比。在本结合物中有用的多肽可以与参考多肽至少有 35%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 98% 的同一性。例如,在蛋白结合物内的多肽可以具有这样的氨基酸序列:其与选自 SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:105 和 SEQ ID NO:107-SEQ ID NO:123 组成的组中的序列至少与 80% (例如,至少 85%、90%、95% 或 98%) 的同一性。我们的研究迄今提出,优选的多肽将具有或包含血管肽素-1 (SEQ ID NO:67)、血管肽素-2 (An2) (SEQ ID NO:97)、Cys-血管肽素-2 (CysAn2) (SEQ ID NO:113)、血管肽素-2-Cys (SEQ ID NO:114) 或反向的血管肽素-2 (SEQ ID NO:127) 的氨基酸序列。

[0035] 在多肽内的氨基酸残基可以是标准的 α -氨基酸形式并且可以是 D-型、L-型或这两个对映体形式的混合物。如本领域中所知的,除了甘氨酸之外的所有的 α -氨基酸可以两种对映体形式的任一种存在,并且任一种或两种形式可以被并入本多肽中以及并入蛋白结合物的抗体部分中。在 L-型氨基酸残基的位置置换 D-型氨基酸残基可以产生更稳定的多肽。例如,使用 D-赖氨酸代替在位置 10 和 / 或位置 15 (或在抑肽酶衍生的多肽的类似物中的同等位置) 处的 L-赖氨酸可以增加抑肽酶衍生的多肽的稳定性,并且所有这样的含有 D-赖氨酸的多肽的应用在本发明的范围内。同样地,在这样的多肽的 N-端和 / 或 C-端处使用 D-型氨基酸可增加体内稳定性,因为肽酶不能利用 D-氨基酸作为底物 (Powell 等人, Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993)。多肽也可以被构造成反向-D 多肽,其包含排列在相对于含有 L 氨基酸的多肽的反向序列中的 D-型氨基酸残基;L-氨基酸多肽的 C-端残基成为 D-氨基酸多肽的 N-端,并且反之亦然。反向 D-多肽保持与相应的 L 氨基酸多肽相同的三级构象并因此保持相同的活性,但是其增加的稳定性可以产生更大的疗效 (Brady 和 Dodson, Nature 368:692-693, 1994 及 Jameson 等人, Nature 368:744-746, 1994)。多肽还可以是通过例如添加形成二硫键的半胱氨酸而“受约束的”(参见, Rizo 等人, Ann. Rev. Biochem. 61:387-418, 1992)。在任何一个实施方式中,多肽可以是环状多肽。

[0036] 关于它们的制备,可以通过本领域所知的任何方法产生在蛋白结合物中有用的多肽,方法包括合成方法和常规用于从核酸制备蛋白质的重组技术。所产生的多肽可以未纯化的或分离的或基本上纯化的形式存储直到进一步使用。例如,多肽可以被存储直到其被用于产生本发明的蛋白结合物的下述方法。例如,通过固相合成可实现化学合成,并且重组技术可以包括在生物细胞(例如,原核或真核细胞)中来自于载体构建体的表达。编码具体的氨基酸残基的密码子在本领域中(参见,例如,“Biochemistry”, 第三版, 1988, Lubert Stryer, 斯坦福大学, W.H. Freeman and Company, New-York) 被公认为是用于密码子优化的方法。编码抑肽酶类似物的示例性核苷酸序列在 SEQ ID NO:106 中示出,并且其可以在 GenBank 中以登录号 X04666 中找到。该序列编码在位置 16 处具有赖氨酸(参照由 SEQ ID NO:106 编码的氨基酸序列)而不是如在 SEQ ID NO:98 中发现的缬氨酸的抑肽酶类似物。可以通过本领域所知的方法引入 SEQ ID NO:106 的核苷酸序列中的突变以制备在位置 16 处具有缬氨酸的 SEQ ID NO:98 的肽。

[0037] 用于包含在蛋白结合物中的本文所描述的多肽可以是翻译后修饰的,无论是在多肽在其中表达的细胞内还是在通过化学修饰的离体。例如,如本文所描述的多肽可以是聚乙二醇化、乙酰化、酰化、酰胺化、氧化、环化和 / 或磺化的。

[0038] 正因为并入的氨基酸残基的对映体形式可以改变多肽的稳定性,可以修饰抑肽酶

衍生的多肽的长度和含量以优化特征如电荷或极性、亲水性或疏水性、生物利用度和结合性。例如,可以通过删除一个或多个(例如,从1个到约3个氨基酸残基)氨基酸(其是非碱性的/不带正电荷(not basic/positively charged),或者其是带较少的正电荷(例如,如由 pKa 所确定的))增加正电荷。可替代地,或另外地,可以通过添加一个或多个(例如,从1个到约3个氨基酸残基)氨基酸(其是碱性的/带正电荷的,或者比它们替代的残基带更多的正电荷(例如,如由 pKa 所确定的))增加正电荷。本领域技术人员应该认识到,天然存在的残基具有认可的并共享的属性,主要是归因于其侧链的属性。以下信息可根据需要被用来修饰抑肽酶衍生的多肽的属性。为了增加疏水性,可以并入正亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸;为了提高酸性或负电荷,可以并入天冬氨酸或谷氨酸;为了增加碱性,可以并入天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸和精氨酸。影响链取向的残基包括甘氨酸和脯氨酸。具有芳香族侧链的残基包括色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸和组氨酸。因此,多肽可如本文所描述的随着长度范围改变,其中长度范围具有或至少具有6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、25、35、50、75、100、200或500个氨基酸,或在这些数之间的长度中的任何长度或长度范围。

[0039] 在图1中示出的参考序列中,氨基酸残基是天然存在的。然而,这些序列的生物学活性类似物可以包含一个或多个非天然存在的残基。例如,它们可以在任何位置处,包括在位置7处的半胱氨酸的位置处包含硒代半胱氨酸(例如,硒-L-半胱氨酸)。许多其他“非天然的”氨基酸替代物在本领域中是已知的,并且其可从商业来源获得,如, Sigma Aldrich 化学公司。非天然存在的氨基酸的实例在大多数情况下包括 D-氨基酸、具有附连至半胱氨酸的硫原子的乙酰胺基甲基基团的氨基酸残基、聚乙二醇化的氨基酸和式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 的 Ω (omega) 氨基酸,其中 n 是 2-6 个中性的、非极性的氨基酸,如肌氨酸、t-丁基丙氨酸、t-丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸和正亮氨酸。苯基甘氨酸可替换 Trp、Tyr 或 Phe; 瓜氨酸和甲硫氨酸亚砷是中性的非极性的,半胱氨酸是酸性的,并且鸟氨酸是碱性的。可用羟脯氨酸替换脯氨酸,并且保持赋予脯氨酸的属性的构象。本发明的蛋白结合物包含含有这样的残基的多肽和抗体部分。应当理解,在我们涉及修饰或特征如包含各种对映体、翻译后修饰、包含“非天然”残基等时,该修饰或特征可以存在于本文所描述的结合物的部分中作为抑肽酶衍生的多肽、在抗体部分中或在结合物的任何其他包含氨基酸的部分中(例如,在可检测的标签中)。

[0040] 与参考多肽的生物学活性片段或类似物的精确序列或特征无关,变体可以具有相对于参考序列的能力可比的、降低的或增强的将抗体部分转运穿过 BBB 的能力。例如,当多肽是参考序列(例如, SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:97 或 SEQ ID NO:117)的生物学活性变体时,相对于参考多肽,变体转运结合的抗体部分的能力可降低至少或者约 5%(例如,降低至少或者约 5%、10%、20%、25%、35%、50%、60%、70%、75%、80%、90% 或 95%)。如上所记载的,当活性可以变化的同时,参考多肽的生物学活性片段或类似物是足够活性的那些以获得有益的结果(例如,在给予片段或类似物的患者中或,平均地,一组患者中的临床上有有益的结果)。该有益的结果可以是有益的治疗或诊断程序。

[0041] 如上所记载的,多肽可以是 SEQ ID NO:117 的片段或类似物,其中, SEQ ID NO:117 的 19 个氨基酸残基中的至少 13 个保持不变。具体地, SEQ ID NO:117 的类似物可以包含其中 K_{10} 和 / 或 K_{15} 保持不变的序列。在一些实施方式中, Asn_{12} 被另一个氨基酸残基(例

如, Gln) 替换; Asn₁₃ 被另一个氨基酸残基 (例如, Gln) 替换; 和 / 或 Phe₁₄ 被另一个氨基酸残基 (例如, Tyr 或 Trp) 替换。在具体的实施方式中, 多肽可以包含以下的序列: SEQ ID NO:118; SEQ ID NO:119; SEQ ID NO:120; SEQ ID NO:121; 或 SEQ ID NO:122。

[0042] 当多肽是 SEQ ID NO:117 的片段时, 或者当多肽是包含 SEQ ID NO:117 的片段的 SEQ ID NO:117 的类似物时, 片段可以具有至少 6 个氨基酸残基 (例如, 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18 个氨基酸残基) 的长度, 其与 SEQ ID NO:117 的 6-18 个邻接的氨基酸残基相同。根据本发明, 片段可以是 Lys₁₀-Arg₁₁-Asn₁₂-Asn₁₃-Phe₁₄-Lys₁₅ (SEQ ID NO:123)。SEQ ID NO:17 的生物学活性类似物可以具有 (由...组成) 或者可以包括 (含有) 其中在位置 10 和 15 处的赖氨酸残基不变的序列, 或其中在位置 10 和 15 处的赖氨酸残基以及位置 16 处的精氨酸残基不变的序列。在后一种情况下, 生物学活性类似物可以具有或可以包含符合式 Lys-Arg-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Lys (SEQ ID NO:106) 的序列。Xaa₃ 可以是 Asn 或 Gln; Xaa₄ 可以是 Asn 或 Gln; 并且 Xaa₅ 可以是 Phe、Tyr 或 Trp。如上所记载的序列 SEQ ID NO:123 符合 SEQ ID NO:106 的通式。如连同本文所描述的其他多肽, 其中 Xaa₃、Xaa₄ 和 Xaa₅ 被选择, 它们可以是保守置换 (即, 邻接的 Asn 残基可独立地被 Gln、Glu、Asp 或 His 置换, 并且 Phe 可以被 Tyr 或 Trp 置换)。Xaa₃、Xaa₄ 和 Xaa₅ 也可以对映体的形式变化, 可以是非天然存在的氨基酸残基, 或者可以在本文所描述的另一个特征或特性的基础上选择。

[0043] 抗体部分: 除了多肽 (例如, 抑肽酶衍生的多肽) 外, 本发明的蛋白结合物包含抗体部分或其生物学活性变体。如上所记载的, 抗体部分可以是天然表达的抗体 (例如, 四聚体抗体) 或其生物学活性变体。抗体部分也可以是非天然存在的抗体 (例如, 单链抗体或双特异性抗体 (双价抗体, diabody)) 或其生物学活性变体。变体包括但不限于: 天然存在抗体的片段 (例如, 诸如四聚体抗体的 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段)、scFv 或双特异性抗体的片段, 或四聚体抗体、scFv、双特异性抗体或由于一个或多个氨基酸残基的增加和 / 或置换而不同的其片段的变体。抗体部分可进一步被设计成, 例如, 二-双特异性抗体。

[0044] 如本领域所知的, 可以通过“全长”抗体的酶处理产生抗体片段的某些类型。用木瓜蛋白酶消化产生两个相同的 Fab 片段, 每个具有有单抗原结合位点和残余的 Fc 片段。Fab 片段还包含轻链的恒定结构域和重链的 C_{H1} 域。相反地, 用胃蛋白酶消化产生具有两个抗原结合位点并且仍能交联抗原的 F(ab')₂ 片段。可以通过用这些酶消化产生或者通过其他方法制备并入本结合物的抗体部分。

[0045] Fab' 片段 (其也可以被并入) 不同于 Fab 片段在于: 它们包含在 C_{H1} 域的 C-端处另外的残基, 包括来自于抗体较链区的一个或多个半胱氨酸残基。恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离的巯基, 其可以参与本文所描述的结合反应。F(ab')₂ 抗体片段是由在较链区中的半胱氨酸残基连接的一对 Fab' 片段。抗体片段的其他化学连接 (偶联, coupling) 在本领域中也是熟知的并且其在本文中是有用的。

[0046] Fv 区是由一个重链和一个轻链可变结构域组成的包含完整抗原识别和结合位点的最小的片段。每个可变结构域的三个 CDR 相互作用从而将抗原结合位点限定在 V_H-V_L 二聚体的表面上。共同地, 六个 CDR 为抗体赋予抗原结合特异性。如在本领域中已知的, “单链”抗体或“scFv”片段是当抗体的 V_H 和 V_L 域包含在识别和结合抗原的单多肽链中时而形成的单链 Fv 变体。典型地, 单链抗体包含在能够使 scFv 形成用于抗原结合的所期望的三维结构的 V_H 和 V_L 域间的多肽接头 (参见, 例如, Pluckthun, 在 The Pharmacology

of Monoclonal Antibodies 中, Rosenberg 和 Moore Eds., Springer-Verlag, New York, 113:269-315, 1994)。

[0047] 在其他的实施方式中, 抗体部分可以是双特异性抗体。双特异性抗体是具有两个抗原结合位点的小的抗体片段。每个片段包含与 V_L 域串联的 V_H 域。然而, 由于在域间的接头太短以不允许在相同的链上在它们间的配对, 所以迫使连接的 V_H - V_L 域与另一条链的互补域配对, 产生两个抗原结合位点。双特异性抗体在以下文献中更全面地被描述: 例如, EP 404, 097; EP 404, 097; 以及 Hollinger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993。

[0048] 在其他实施方式中, 抗体部分可以是线性的抗体。在这种情况下, 由形成一对抗原结合区的一对串联的 Fd 区段 (segment) ($VH-CH1-VH-CH1$) 形成抗体部分。线性的抗体可以是双特异的或单特异的, 如在, 例如, Zapata 等人, 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062, 1995 中所描述的。

[0049] 关于靶, 抗体部分 (例如, 四聚体抗体、其生物学活性变体、scFv、Fab 片段、Fab' 片段或 F(ab')₂ 片段或它们的生物学活性变体, 与种类 (即, 是否为 IgG 类或另一个种类) 和是否为人类、人源化的、嵌合的、多克隆的、单克隆的、或者具有本文所描述的任何其他属性或特征无关) 可以特异性结合在发育异常的细胞、肿瘤细胞或恶性肿瘤细胞的细胞表面表达的抗原 (例如, 肿瘤抗原) 以及生长因子受体或细胞因子受体 (例如, 白介素受体)。生长因子受体可以是表皮生长因子 (EGF) 家族的成员结合的受体。对于 EGF 家族中的蛋白的受体的实例包括 EGF 受体 (EGFR)、肝素结合 EGF 样生长因子受体 (HB-EGFR)、双调蛋白受体 (AR)、上皮调节蛋白受体 (EPR)、epigen 受体、 β 细胞素受体和神经调节蛋白的受体 (例如, 神经调节蛋白 -1、神经调节蛋白 -2、神经调节蛋白 -3 或神经调节蛋白 -4 的受体)。尽管本发明并不限于此, 但当靶向 EGFR 时, 抗体部分可以是曲妥珠单抗、西妥昔单抗或帕尼单抗、包含曲妥珠单抗、西妥昔单抗或帕尼单抗的重链和轻链的可变区的 scFv、或这些四聚体或单链抗体的生物学活性变体。例如, 曲妥珠单抗、西妥昔单抗或帕尼单抗的 Fab 或 F(ab')₂ 片段。在其他的实施方式中, 生长因子受体可以是被血管内皮生长因子 (VEGF) 家族的成员结合的受体。在 VEGF 家族中的蛋白的受体靶标的实例包括 VEGF 受体 (VEGFR; 例如, VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C 或 VEGF-D 的受体) 或胎盘生长因子的受体 (PGFR)。正如所记载的, 对于本结合物中的抗体部分的其他合适的靶标是细胞因子受体, 其包括对于肿瘤坏死因子 (TNF) 家族成员的那些受体。这些受体包括由 TNF (也被称作 TNF- α 或恶液质素 (cachectin))、淋巴毒素 - α (LT- α)、T 细胞抗原 gp39 (CD40L)、FASL、4-1BBL、OX40L 和 TNF 相关的细胞凋亡诱导配体 (TRAIL) 结合的那些。当靶向的受体是白介素受体时, 抗体部分可以特异性结合白介素 -2 (IL-2) 或白介素 -6 (IL-6) 受体。尽管本发明并不限于此, 但当抗体部分靶向 IL-2 的受体时, 抗体部分可以是巴利昔单抗或达利珠单抗、包含巴利昔单抗或达利珠单抗的重链和轻链的可变区的 scFv、或四聚体或单链抗体的生物学活性变体。例如, 抗体部分可以是巴利昔单抗或达利珠单抗的 Fab 或 F(ab')₂ 片段。同样地, 当抗体部分靶向 IL-6 的受体时, 抗体部分可以是托珠单抗、包含托珠单抗的重链和轻链的可变区的 scFv、或该四聚体或单链抗体的生物学活性变体 (例如, 托珠单抗的 Fab 或 F(ab')₂ 片段)。关于功能, 抗体部分可以是抗癌剂或抗炎剂。

[0050] 至今已经用曲妥珠单抗 (HERCEPTIN®) 进行了我们几个研究, 包括在下面

实施例中的那些中的一些,该曲妥珠单抗是从来自鼠的经人源化后的单克隆抗体,其以高亲和力结合人表皮生长因子 2(HER2)/neu 受体。曲妥珠单抗被 FDA 批准用于乳癌治疗。(HER2)/neu 受体被认为是没有已知的配体的孤儿受体。然而,它在肿瘤细胞的表面上表达并且调控关键的细胞过程,如,细胞周期进程、细胞存活、细胞增殖和细胞运动。曲妥珠单抗或选择性地结合 HER2 的任何抗体部分可以是对于某些肿瘤类型的临床相关的生物标志物。在治疗上,当曲妥珠单抗结合到 HER 受体时,它不仅抑制细胞生长和分裂的能力,还标志着由宿主的免疫系统要破坏的细胞。

[0051] 细胞毒素:各种各样的细胞毒素剂可以并入本结合物。这些细胞毒素剂包括靶向微管的细胞毒素,包括紫杉烷(由红豆杉属(genus *Taxus*)植物产生的二萜)并且,具体地,紫杉烷目前被开处方为抗癌剂(包括 Taxol®(紫杉醇)和 Taxotere®(泰素帝®)(多西他赛)以及 Jevtana®(卡巴他赛))。紫杉醇和多西他赛目前被开处方为用于治疗用本结合物可治疗的患者的抗肿瘤剂(例如,肺癌、乳癌、头颈部的鳞状细胞癌以及食管癌、胃癌和结肠癌)。非紫杉烷微管靶向剂如埃博霉素(例如,埃博霉素 A、B、C、D、E 或 F)和艾瑞布林也可以被并入。

[0052] 其他有用的细胞毒素剂包括生物碱(例如,长春花生物碱,如长春新碱、长春花碱、长春地辛和长春瑞滨)、烷化剂(例如,环磷酰胺、二氯甲基二乙胺(氮芥)、苯丁酸氮芥或美法仑(melphan))、蒽环霉素(例如,道诺霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌和戊柔比星)、阿里他汀(例如,一甲基阿里他汀 E(MMAE))、抗叶酸剂(例如,甲氨蝶呤或氨蝶呤)、卡里奇霉素(calicheamicin)(例如,卡里奇霉素 γ 1)、倍癌霉素(duocarmycin)(例如,阿多来新、比折来新或卡折来新);丝裂霉素(例如,丝裂霉素 C)、嘧啶类似物(例如,氟尿嘧啶)或美登素的衍生物(例如,类美登醇,如安丝霉素、mertansine 或 emtansine)。

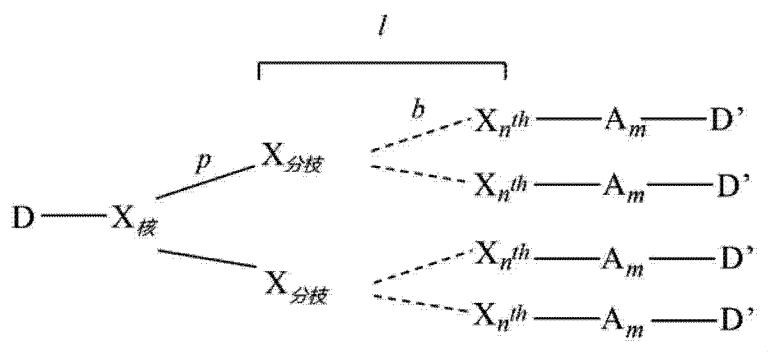
[0053] 细胞毒素可以是通常被认为不太有效的一种细胞毒素,如多柔比星、甲氨蝶呤、丝裂霉素、氟尿嘧啶和长春花生物碱(Senter, Curr. Opin. Chem. Biol. 13:235-244, 2009)。也可以采用更有效的细胞毒素,如阿里他汀(例如,一甲基阿里他汀(MMAE))、类美登醇(maytansinoid)(美登素的衍生物,如安丝霉素、mertansine 或 emtansine)或卡里奇霉素(烯二炔类抗生素,如卡里奇霉素 γ 1)。

[0054] 构型:可以独立选择给定结合物的每个部分,包括抗体部分、细胞毒素剂、接头和多肽。也就是说,本文所描述的任何接头可以用于将本文所描述的多肽和细胞毒素剂中的任何一个结合到本文所描述的抗体部分中的任何一个(条件是,如本领域技术人员所理解的,将要连接的组成部件包含相容的反应性取代基)。随后,结合物可以被用于将抗体部分和细胞毒素剂递送至患者用于 CNS 癌症或其他癌症的治疗。我们可将抗体部分称作“第一试剂”并且将细胞毒素称作“第二试剂”。其中,第一试剂是抗体而第二试剂是小分子药物(例如,细胞毒素),抗体部分和小分子药物(例如,细胞毒素)的组合是对疾病的联合治疗。由于包含可检测的标志物,本结合物也可以被用作显像剂,提供绘制靶(抗体部分与其结合)和/或受体(多肽对其具有亲和力)的分布的图(绘制...的图, map)的方法。

[0055] 尽管在下面被进一步讨论特定的构型,我们注意到给定的蛋白结合物可以包含相对于每个抗体部分的一个或多个多肽部分(例如,相对于在结合物中的每个抗体的 1-512

个多肽)和相对于多肽的一个或多个细胞毒素剂(例如,每个多肽的1-3个细胞毒素剂)。正如所记载的,给定的蛋白结合物可能包含单个抗体部分,但是它可以包含彼此相同或彼此不同的两个或更多(例如,2、3或4)个抗体部分。当不同时,抗体部分可以特异性结合相同的靶或不同的靶。本结合物的组成部件可以各种方式构型。总的来说,结合物可以呈现具有连接到至少一个多肽上的抗体部分的基本上线性形式,其中多肽被依次连接到至少一个细胞毒素剂。可替代地,该结合物可以具有如在树枝状高分子中可见的分枝构型,其中从抗体部分的一些点延伸一个或多个分枝。当本结合物包含分枝部分时,我们可称该结合物为“树枝状结合物”,连同这样的理解:包含抗体部分不允许完全对称的树枝状形式。可以如在式 I 中构造树枝状结合物:

[0056]

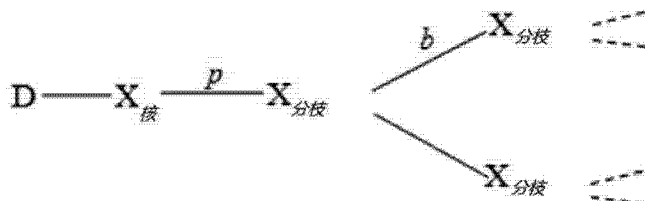


[0057] 其中, D 是直接(例如,通过在抗体部分上的修饰残基和 $X_{核}$ 间的键的方式)或间接地(例如,通过将抗体部分连接到 $X_{核}$ 上的双官能接头的方式)被连接到树枝状结合物的核部分($X_{核}$)的抗体部分。因为 $X_{核}$ 和 $X_{分枝}$ 两者将结合物的一部分连接到另一部分,所以我們也可将任一部分更简单称为“接头”。核部分的复杂度可以变化,其中,包含可用的延伸点 p 的数量从 2 至 6 变化。每个延伸点 p 可以终止于(并且被连接到)分枝部分 $X_{分枝}$, 其如同 $X_{核}$, 在具有 2 到 4 个分枝 b 的每个 $X_{分枝}$ 的复杂度中变化。 X_n^{th} 是 n 个表面分枝中的一个, 并且包含从 1 到 5 的整数的 l 是 $X_{分枝}$ 部分的连续层数。当 l 是 1 时, 每个 $X_{分枝}$ 被附着到 $X_{核}$ 。当 l 大于 1, 在第一 $X_{分枝}$ 远端的每个 $X_{分枝}$ 被附着到另一个 $X_{分枝}$ 。关于表面分枝, X_n^{th} 是树枝状的 n 个表面分枝中的一个。 $n = p(b)^l$, 并且 n 通常 ≤ 512 (例如, ≤ 500 、 ≤ 400 、 ≤ 300 、 ≤ 200 、 ≤ 50 、 ≤ 10 、或 ≤ 8 个分枝)。为了说明: 当存在两个延伸点 p, 其中 l 是 1, 并且其中有来自于每个 $X_{分枝}$ 的两个分枝 b 时, X_n^{th} 是 4; 当存在三个延伸点 p, 其中 l 是 1, 并且其中有来自于每个 $X_{分枝}$ 的三个分枝 b 时, X_n^{th} 是 9; 等等。 A_m 是本文所描述的多肽, 其附着到表面分枝 X_n^{th} 。在一些实施方式中, 多肽 A_m 的数量少于或等于表面分枝的数量, 因为每个表面分枝可以连接到多肽, 并且一些表面分枝可以不含任何另外的组分或者被直接连接到细胞毒素剂 D' (即, 在一些表面分枝处, 由 A_m 所表示的多肽不存在)。在一些实施方式中, 多肽 A_m 的数量多于表面分枝的数量, 因为每个表面分枝可以被连接到第一多肽, 其以尾对头 (tail-to-head) 或头对尾 (head-to-tail) 的构型被融合到相同的或不同类型的第二多肽。细胞毒素剂 D' 被附着到一个或多个 A_m , 或正如所记载的, 其可以替换一个或多个 (但不是所有的) A_m , 直接附着到一个或多个 X_n^{th} 上。在树枝状结合物中的 D' 的数量可以最高达多肽数量的 3 倍, 因为最高达 3 个细胞毒素剂可以被连接到每个多肽。除 D、 D' 和 A_m 外, 树状聚合物的分子量为 ≤ 500 千道尔顿 (例如, ≤ 500 、 ≤ 400 、 ≤ 300 、 ≤ 200 、 ≤ 100 、 ≤ 50

或 ≤ 20 千道尔顿)。

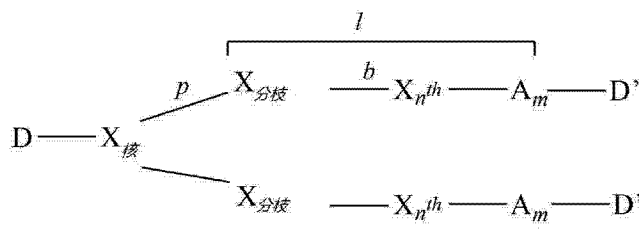
[0058] 被用作 $X_{核}$ 和 $X_{分枝}$ 的接头可以相同或不同,并且一个可以通过采用双官能接头作为 $X_{核}$ 或 $X_{分枝}$ 形成不太复杂的树枝状结合物。当 $X_{核}$ 是双官能接头、 p 是 1 时,并且通过来自于 $X_{核}$ 的多个延伸应当已经产生的复杂度丢失。在下式中示出这种排列,其中结合物的其余部分如上所描述。

[0059]



[0060] 在该构型的变体中, $X_{核}$ 不存在,在这种情况下,抗体部分直接连接到 $X_{分枝}$ 。其中 $X_{分枝}$ 而不是 $X_{核}$ 是双官能接头, b 是 1,并且通过来自于 $X_{分枝}$ 的多个延伸应当已经产生的复杂度丢失。在下式中示出这种排列,其中结合物的其余部分如上所描述。

[0061]



[0062] 树枝状结合物的一个优势是包含多个表面官能度,多个多肽和 / 或细胞毒素可以被结合到其上。改变树枝状结合物的复杂度的能力允许调节 (accommodate) 蛋白结合物的各种组成部件。当 $X_{核}$ 和 $X_{分枝}$ 都是双官能接头时,结合物是线性的,不是树枝状的。

[0063] 用于合成树枝聚合物的方法在本领域中是公知的,并且树枝状大分子的分枝部分 ($X_{核}$ 和 $X_{分枝}$ 部分) 也可以购自商业供应商,具有不同数量的分枝层。可以通过发散性合成 (Divergent Synthesis) 或会聚式合成 (convergent synthesis) 的已知方法构造树枝状大分子。在前者中,树枝状大分子从其核组装,通过一系列反应向外延伸。在后者中,树枝状大分子从小分子组装,其随着反应向内进行在该结构的外周结束。每一种方法的优势在本领域中是熟知的。可替代地,可以通过利用狄尔斯-阿尔德反应、巯基-炔反应和叠氮化物-炔烃反应的点击化学合成树枝状大分子。

[0064] 可以合成任何给定的树枝状大分子以具有在核和分枝中不同的官能度以控制属性,如溶解度、热稳定性和用于特定应用的化合物的附着。合成方法也可精确地控制分枝的尺寸、数量,来自于核的分枝层的数量以及用于各种反应性基团的附着的末端分枝的官能度。

[0065] 结合物的树枝状部分可以包含以下作为核部分:炔丙胺、乙二胺、三乙醇胺、季戊四醇、四苯基甲烷、叠氮基-丙基(烷基)胺、羟乙基(烷基)胺、均苯三甲酰氯、二氨基己烷、二氨基丁烷、胍氨、丙二胺、以及前述中的任一个的衍生物。这些核心部分可被用来合成聚(酰胺基胺)(PAMAM)树枝状大分子。赖氨酸也可被用作核心部分以合成聚赖氨酸树枝状大分子。可替代地,该化合物可包含丙烯亚胺以合成 POPAW 树枝状大分子。

[0066] 本发明的结合物可以具有以下作为分枝部分：炔丙胺、乙二胺、三乙醇胺、季戊四醇、丙胺、丙烯亚胺、叠氮基-丙基（烷基）胺、羟乙基（烷基）胺、四苯基甲烷、均苯三甲酰氯、二氨基己烷、二氨基丁烷、胱氨、丙二胺、以及赖氨酸或前述任一项的衍生物。

[0067] 树枝状大分子的表面分枝可以被官能化以与用合适的反应性基团衍生的多肽结合。例如，表面分枝可用接头如 N-琥珀酰亚胺基 3-2-吡啶二硫代 (N-succinimidyl 3-2-pyridyldithio, SPDP) 被官能化从而产生树枝状大分子-吡啶基-二硫化物中间产物，该中间产物随后可以与包含半胱氨酸残基（或其他带 -SH 的基团）的多肽反应。可替代地，树枝状大分子的表面分枝可用接头 S-乙酰硫基乙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (N-succinimidyl S-acetylthioacetate, SATA) 或 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫基丙酸酯 (N-succinimidyl S-acetylthiopropionate, SATP) 官能化从而形成树枝状大分子-巯基中间产物，该中间产物可以与马来酰亚胺衍生的多肽反应。SATA 和 SATP 是对胺反应的并且添加受保护的巯基基团，使得胺与硫结合（如下进一步所描述的）。

[0068] 接头：在本结合物中的给定的接头可以提供可裂解的键（连接，linkage）（例如，硫酯键）或不可裂解的键（例如，马来酰亚胺键）。例如，细胞毒素蛋白可以结合到与修饰的游离胺反应的接头，其存在于多肽内的赖氨酸残基处和/或在多肽的氨基端。因此，在本结合物中有用的接头可以包含与多肽或修饰的多肽上的伯胺反应的基团，其中抗体部分结合到多肽上。更具体地，接头可以选自由以下组成的组：一氟环辛炔 (MFCO)、二环 [6.1.0] 壬炔 (BCN)、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯 (SATA)、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代丙酸酯 (SATP)、马来酰亚胺和二苯并环辛炔酯 (DBCO 酯)。在给定的接头内的有用的环辛炔包括 OCT、ALO、MOFO、DIFO、DIBO、BARAC、DIBAC 和 DIMAC。

[0069] 结合物的组分可以通过各种连接基团（接头）例如巯基、氨基（胺类）或任何合适的反应性基团结合。接头可以是共价键。在本结合物中有用的同双官能和异双官能的交联剂（结合剂）可获自许多商业来源。尽管在本领域中已知，但是我们简要地注释，在同双官能的交联剂中的反应性基团是完全相同的，并且其位于接头的两端（例如，交联剂的间隔臂）处。它们便于使用，因为可用一步化学交联而完成反应，并且它们可以在期望形成二聚体和聚合物的地方组装。异双官能交联剂具有两个不同的基团，其允许结合按两步反应进行。具有不同类型间隔臂的不同长度的这些接头也可商购。可以在伯胺基团（例如，在赖氨酸残基上）和巯基（例如，在半胱氨酸残基上）间进行结合。具有更大数量的反应性基团的接头，不论相同或不同，可以用于连接多于两个的实体。例如，同或异三官能接头可以将一个抗体部分与两个多肽连接。

[0070] 其中，市售的同双官能交联剂是：BSOCOES（双（2-[琥珀酰亚胺基氧基羰基氧]乙基）砒（Bis(2-[Succinimidooxycarbonyloxy]ethyl sulfone)）；DPDPB（1,4-二-(3'-[2-吡啶基二硫代]-丙酸酰氨基)丁烷）(1,4-Di-(3'-[2pyridyldithio]propionamido)butane)；DSS（辛二酸二琥珀酰亚胺基酯）(disuccinimidyl suberate)；DST（酒石酸二琥珀酰亚胺基酯）(disuccinimidyl tartrate)；磺基 DST（磺基酒石酸二琥珀酰亚胺基酯）；DSP（二硫代双（丙酸琥珀酰亚胺基酯））(dithiobis(succinimidyl propionate)；DTSSP（3,3'-二硫代双（丙酸磺基琥珀酰亚胺基酯））((3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate))；EGS（乙二醇双（琥珀酸琥珀酰亚胺基酯））(ethylene glycol bis(succinimidyl succinate))；和 BASED（可磺

化双(β-[4-叠氮基水杨酰胺基]-乙基)二硫化物)(Bis(β-[4-azidosalicylamido]-ethyl)disulfide iodinatable)。

[0071] 可以在多肽上发现用于交联的位点。接头基团可以是或者可以包含例如在脂肪链中具有例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 20 个碳原子的柔性臂。脂肪族接头在图 2 中示出(例如,具有结合到多肽的酰胺和结合到细胞毒素剂的酯)。正如所记载的,当使用脂肪族接头时,它可关于长度(例如, C₁-C₂₀)和它包含的化学部分(例如,氨基或氨基甲酸酯)变化。通常,认为具有短臂的接头具有 <2- 碳的碳链。中型臂具有 2-5 个碳原子的碳链,并且长臂接头在链中具有 6 个或更多碳。示例性接头包括吡啶二硫化物、硫代磺酸酯(盐)、乙烯基磺酸酯(盐)、异氰酸酯、酰亚胺酯(imidoester)、二噁、肼、硫醇、羧酸、多肽接头和乙炔。可替代地,可以使用的其他接头包括 BS³[双(磺基琥珀酰亚胺基)-辛二酸酯](其为靶向易接近的伯胺的同双官能 N-羟基-琥珀酰亚胺酯)、NHS/EDC(N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide))(NHS/EDC 允许伯胺基团与羧基基团的结合)、磺基-EMCS([N-ε-马来酰亚胺基己酸]酰肼(sulfo-EMCS([N-ε-maleimidocaproic acid]hydrazide))(磺基-EMCS 是具有针对巯基和氨基基团的反应性的异双官能反应性基团)、酰肼(大多数蛋白质包含暴露的糖类,并且酰肼是用于将羧基连接到伯胺的有用的药剂)。可以在本发明的多肽上发现可以用于与同或异双官能交联剂交联的区域。另一种有用的接头是 SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯),其具有针对胺类的反应性并且添加受保护的巯基。关于使用的方法,优选地,将抗体部分结合到多肽的方法不改变或变化抗体部分的关键特征,如其免疫特异性或免疫反应性。同双官能胺特异的交联剂可依靠 NHS-酯和酰亚胺酯反应性基团用于伯胺的选择性结合并且是可切割的。

[0072] 为了形成共价键,可以使用作为化学反应性基团的各种活性羧基(例如,酯类),其中羟基部分在修饰肽所要求的水平上是生理学可接受的。特定的药剂包括 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N-羟基-磺基琥珀酰亚胺(磺基-NHS)、马来酰亚胺基-苯甲酰基-琥珀酰亚胺(MBS)、γ-马来酰亚胺基-丙酰氧基琥珀酰亚胺酯(GMBS)、马来酰亚胺基丙酸(MPA)、马来酰亚胺基己酸(MHA)、马来酰亚胺基十一烷酸(MUA)。

[0073] 伯胺是 NHS 酯的主要目标。可用的 α-氨基基团存在于蛋白质的 N-端上,并且赖氨酸的 ε-氨基与 NHS 酯反应。因此,本发明的化合物可以包含具有结合到肽的 N-端氨基或者赖氨酸的 ε-氨基的 NHS 酯的接头。当 NHS 酯与释放伯胺的 N-羟基琥珀酰亚胺反应时形成酰胺键。我们可将这些包含琥珀酰亚胺的反应性基团更简单地称为琥珀酰亚胺基基团。在一些实施方式中,蛋白质上的官能基团将为硫醇基团并且化学反应性基团将为包含马来酰亚胺的基团,如 γ-马来酰亚胺基-丁基胺(GMBA 或 MPA)。这样的包含马来酰亚胺的基团在本文中可以被称为马来酰亚胺基(maleido)基团。

[0074] 当该反应混合物的 pH 值是 6.5 到 7.4 时,该马来酰亚胺基基团对于在肽上的巯基是最有选择性的。在 pH 值 7.0 处,马来酰亚胺基与巯基(例如,在蛋白如血清蛋白或 IgG 上的硫醇基团)的反应速率比与氨类的反应速率快 1000 倍。因此,可以形成马来酰亚胺基和巯基间稳定的硫醚键。因此,本发明的化合物可以包括具有结合到多肽的巯基的马来酰亚胺基的接头。胺对胺接头包括 NHS 酯、酰亚胺酯,在下面表格中列出其实例。

[0075]

示例性 NHS 酯:
DSG (戊二酸二琥珀酰亚胺基酯)
DSS (辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)
BS ³ (辛二酸双[磺基琥珀酰亚胺基]酯)
TSAT (氨基酸三乙酸三琥珀酰亚胺基酯)
包括聚乙二醇间隔子如 BS(PEG) _n 其中 n 是 1-20 (例如, BS(PEG) ₅ 和 BS(PEG) ₉) 的双琥珀酰亚胺酯活化的化合物的变体
DSP (二硫代双[琥珀酰亚胺基丙酸酯])
DTSSP (3,3'-二硫代双[磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯])
DST (酒石酸二琥珀酰亚胺基酯)
BSOCOES (双[2-(琥珀酰亚胺基氧基羰氧基)乙基]砒)
EGS (乙二醇双[琥珀酰亚胺基琥珀酸酯])
磺基-EGS (乙二醇双[磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯])
示例性酰亚胺酯:
DMA (乙二酰亚胺二甲基酯•2 HCl) (dimethyl adipimidate)
DMP (庚二酰亚胺二甲基酯•2 HCl)
DMS (辛二酰亚胺二甲基酯•2 HCl)

[0076]

DTBP (3,3'-二硫代双丙酰亚胺二甲基酯•2 HCl)
其他示例性胺对胺接头:
DFDNB (1,5-二氟-2,4-二硝基苯)
THPP (β-[三(羟甲基)膦]丙酸 (甜菜碱))

[0077] 接头也可以是巯基对巯基的接头,如下面表格中列出的马来酰亚胺和吡啶基二硫醇。

[0078]

示例性马来酰亚胺:	另一种巯基接头:
BMOE (双-马来酰亚胺基乙烷)	HBVS (1,6-己烷-双-乙炔基砒)
BMB (1,4-双马来酰亚胺基丁烷)	
BMH (双马来酰亚胺基己烷)	
TMEA (三[2-马来酰亚胺基乙基]胺)	
BM(PEG) ₂ (1,8-双-马来酰亚胺基二甘醇)	
BM(PEG) _n , 其中 n 是 1 到 20 (例如 2 或 3)	
BMDB (1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷)	
DTME (二硫代-双马来酰亚胺基乙烷)	
示例性吡啶基二硫醇:	
DPDPB (1,4-双-[3'-(2'-吡啶基二硫代)-丙酰胺基]丁烷)	

[0079] 接头可以是胺对巯基的接头,其包括 NHS 酯 / 马来酰亚胺化合物。这些化合物的实例在下面的表格中提供。

[0080]

胺对巯基接头:
AMAS (N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯)
BMPS (N-[β -马来酰亚胺基丙氧基]琥珀酰亚胺酯)
GMBS (N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯)
磺基-GMBS (N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯)
MBS (<i>m</i> -马来酰亚胺基苯甲酰基- <i>N</i> -羟基琥珀酰亚胺酯)
磺基-MBS (<i>m</i> -马来酰亚胺基苯甲酰基- <i>N</i> -羟基磺基琥珀酰亚胺酯)
SMCC (4-[<i>N</i> -马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺基酯)
磺基-SMCC (4-[<i>N</i> -马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺基酯)
EMCS ([N- ϵ -马来酰亚胺基己酰氧基]琥珀酰亚胺酯)
磺基-EMCS ([N- ϵ -马来酰亚胺基己酰氧基]磺基琥珀酰亚胺酯)
SMPB (4-[<i>p</i> -马来酰亚胺基苯基]丁酸琥珀酰亚胺基酯)
磺基-SMPB (4-[<i>p</i> -马来酰亚胺基苯基]丁酸磺基琥珀酰亚胺基酯)
SMPH (琥珀酰亚胺基-6-[β -马来酰亚胺基丙酰胺基]己酸酯)

[0081]

LC-SMCC (琥珀酰亚胺基-4-[<i>N</i> -马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧基-[6-氨基己酸酯])
磺基-KMUS (<i>N</i> -[κ -马来酰亚胺基十一烷基氧基]磺基琥珀酰亚胺酯)
SM(PEG) _n (琥珀酰亚胺基-([<i>N</i> -马来酰亚胺基丙酰胺-聚乙二醇)酯), 其中 n 是 1 到 30 (例如, 2、4、6、8、12 或 24))
SPDP (3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸 <i>N</i> -琥珀酰亚胺基酯)
LC-SPDP (6-(3-[2-吡啶基二硫代]-丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺基酯)
磺基-LC-SPDP (6-(3'-[2-吡啶二硫代]-丙酰胺基)己酸磺基琥珀酰亚胺基酯)
SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -[2-吡啶基二硫代]甲苯)
磺基-LC-SMPT (4-磺基琥珀酰亚胺基-6-[α -甲基- α -(2-吡啶基二硫代)甲苯酰胺基]己酸酯) (4-sulfosuccinimidyl-6-[α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluamido]hexanoate)
SIA (碘乙酸 <i>N</i> -琥珀酰亚胺基酯)
SBAP (3-[溴乙酰胺基]丙酸琥珀酰亚胺基酯)
SIAB ([4-碘乙酰基]氨基苯甲酸 <i>N</i> -琥珀酰亚胺基酯)
磺基-SIAB ([4-碘乙酰基]氨基苯甲酸 <i>N</i> -磺基琥珀酰亚胺基酯)

[0082] 接头可以与氨基和非选择性的实体反应。这样的接头包括 NHS 酯 / 芳香叠氮化物和 NHS 酯 / 双吡丙啶接头,其实例在下面的表格中列出。

[0083]

NHS 酯/芳香叠氮化物接头:
NHS-ASA (N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸)
ANB-NOS (N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺)
磺基-HSAB (N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酸)
磺基-NHS-LC-ASA ([4-叠氮基水杨酰胺基]己酸磺基琥珀酰亚胺基酯)
SANPAH (N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯)
磺基-SANPAH (N-磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯)
磺基-SFAD (磺基琥珀酰亚胺基-(全氟碘苯甲酰胺)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯)
磺基-SAND (2-(<i>m</i> -叠氮基- <i>o</i> -硝基苯甲氨基)-乙基-1,3'-丙酸磺基琥珀酰亚胺基酯)
磺基-SAED (2-[7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酰氨基]乙基-1,3'-二硫代丙酸磺基琥珀酰亚胺基酯)
NHS 酯/双吡丙啶接头:
SDA (4,4'-叠氮戊酸琥珀酰亚胺基酯) (succinimidy1 4,4'-azipentanoate)
LC-SDA (6-(4,4'-叠氮戊酸基)己酸琥珀酰亚胺基酯)

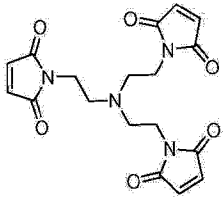
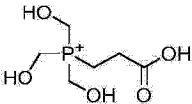
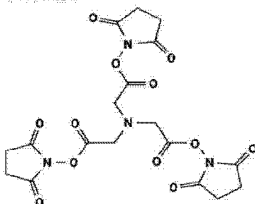
[0084]

SDAD (2-([4,4'-叠氮戊酸基]乙基)-1,3'-二硫代丙酸琥珀酰亚胺基酯)
磺基-SDA (4,4'-叠氮戊酸磺基琥珀酰亚胺基酯)
磺基-LC-SDA (6-(4,4'-叠氮戊酰胺基)己酸磺基琥珀酰亚胺基酯)
磺基-SDAD (2-([4,4'-叠氮戊酰胺基]乙基)-1,3'-二硫代丙酸磺基琥珀酰亚胺基酯)

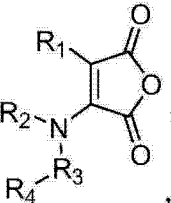
[0085] 示例性胺对羧基接头包括碳二亚胺化合物 (例如, DCC (N, N- 二环己基碳二亚胺) 和 EDC (1- 乙基 -3-[3- 二甲氨基丙基] 碳二亚胺))。示例性巯基对非选择性的接头包括吡啶基二硫醇 / 芳基叠氮化合物 (例如, APDP (N-[4-(*p*- 叠氮基水杨酰胺基) 丁基)-3'-(2'-吡啶基二硫代) 丙酰胺)))。示例性巯基对糖类接头包括马来酰亚胺 / 酰肼化合物 (例如, BMPH (N-[β - 马来酰亚胺丙酸] 酰肼)、EMCH ([N- ϵ - 马来酰亚胺己酸] 酰肼)、MPBH (4-(4-N- 苯基马来酰亚胺苯基) 丁酸酰肼) 和 KMH (N-[κ - 马来酰亚胺十一烷酸] 酰肼) 以及吡啶基二硫醇 / 酰肼化合物 (例如, PDPH (3-(2- 吡啶基二硫) 丙酰基酰肼))。示例性糖类对非选择性的接头包括酰肼 / 芳基叠氮化合物 (例如, ABH (*p*- 叠氮基苯甲酰基酰肼))。示例性羟基对巯基接头包括异氰酸酯 / 马来酰亚胺化合物 (例如, (N-[*p*- 苯基马来酰亚胺基苯基] 异氰酸酯))。示例性胺对 DNA 接头包括 NHS 酯 / 补骨脂化合物 (例如, SPB (琥珀酰亚胺基-[4-(补骨脂-8-基氧基)]-丁酸酯))。

[0086] 为了在蛋白结合物中产生不同复杂度的分枝点, 接头可以能够连接 3 到 7 个实体。

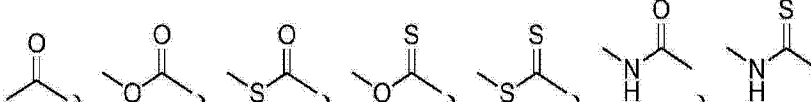
[0087]

示例性三官能接头:		
TMEA; 三-(2-马来酰亚胺基乙基)胺) 	THPP 	LC-TSAT ((6-氨基己酰基)氨基三乙酸三-琥珀酰亚胺基酯)、三-琥珀酰亚胺基-1,3,5-苯三羧酸酯
		MDSI (间苯二甲酸马来酰亚胺基-3,5-二琥珀酰亚胺基酯)
TSAT; 氨基三乙酸三-琥珀酰亚胺基酯 	SDMB (苯甲酸琥珀酰亚胺基-3,5-双马来酰亚胺基苯基酯)	
	Mal-4 (四-(3-马来酰亚胺基丙基)季戊四醇)、NHS-4 (四-(N-琥珀酰亚胺基)季戊四醇)	

[0088] TMEA 和 TSAT 通过它们的马来酰亚胺基团与巯基反应而得到。THPP 的羟基和羧基可以与伯胺或仲胺反应。其他有用的接头符合式 $Y = C = N - Q - A - C(O) - Z$, 其中, Q 是同芳香 (homoaromatic) 或杂芳香 (heteroaromatic) 环系统; A 是单键或未取代的或取代的二价 C_{1-30} 桥基, Y 是 O 或 S; 并且 Z 是 Cl、Br、I、 N_3 、N-琥珀酰亚胺基氧基、咪唑基、1-苯并三唑基氧基 (1-benzotriazolyloxy)、OAr (其中 Ar 是缺电子活化的芳基) 或 OC(O)R (其中 R 是 $-A-Q-N=C=Y$ 或 C_{4-20} 叔烷基 (tertiary-alkyl) (参见 U. S. 专利号 US 4, 680, 338))。

[0089] 其他有用的接头具有式  其中 R1 是 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{6-12} 芳基或芳烷基

或与二价有机的 $-O-$ 、 $-S-$ 或  结合的这些基团, 其中 R' 是 C_{1-6} 烷基、连接部分; R2 是 H、 C_{1-12}

烷基、 C_{6-12} 芳基或 C_{6-12} 芳烷基, R3 是 

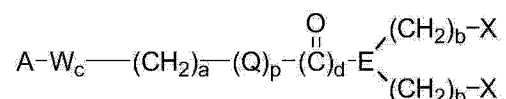
或能够使相邻的氮的孤对电子离域的另一化学结构, 并且 R4 是能够将 R3 连接到肽载体或药剂上的悬垂反应性基团 (看 U. S. 专利号 US 5, 306, 809)。

[0090] 在本结合物中有用的给定接头也可以包括至少一个氨基酸残基, 并且其可以是至少或约 2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、30、40 或 50 个氨基酸残基的肽。当接头是单氨基酸残基时, 它可以是任何天然或非天然存在的氨基酸 (例如, Gly、Cys、Lys、Glu 或 Asp) 或包含两个这样的残基的二肽 (例如, Gly-Lys)。当接头是短肽时, 它可以是富含甘氨酸的肽 (其往往是柔韧性的) 如, 具有序列 $[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n$ (SEQ ID NO: 129) 的肽, 其中 n 是

从 1 到 6 (包含) 的整数 (参见 U. S. 专利号 US7, 271, 149) 或富含丝氨酸的肽接头 (参见 U. S. 专利号 US 5, 525, 491)。富含丝氨酸的肽接头包括式 $[X-X-X-Gly]_y$ (SEQ ID NO:130) 的那些, 其中, 最高达两个 X 是 Thr, 剩下的 X 是 Ser, 并且 y 是从 1 到 5 (包含) 的整数 (例如, Ser-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO:131), 其中 y 大于 1)。其他接头包括刚性接头 (例如, PAPAP (SEQ ID NO:132) 和 $(PT)_n P$ (SEQ ID NO:133), 其中 n 是 2、3、4、5、6 或 7) 和 α -螺旋接头 (例如, A(EAAAK) $_n$ A (SEQ ID NO:134), 其中 n 是 1、2、3、4 或 5)。当接头是琥珀酸时, 其一个羧基可以与氨基酸残基的氨基形成酰胺键, 并且其其他的羧基可以例如与肽或取代基的氨基形成酰胺键。当接头是 Lys、Glu 或 Asp 时, 其羧基基团可以与氨基酸残基的氨基形成酰胺键, 并且其氨基可以例如与取代基的羧基形成酰胺键。当 Lys 被用作接头时, 可以在 Lys 的 ϵ -氨基和取代基之间插入另外的接头。另外的接头可以是琥珀酸, 其可以与 Lys 的 ϵ -氨基和与存在于取代基中的氨基形成酰胺键。在一个实施方式中, 另外的接头是 Glu 或 Asp (例如, 其与 Lys 的 ϵ -氨基形成酰胺键和与存在于取代基中的羧基形成另一个酰胺键), 也就是说, 取代基是 N^ϵ -酰基化的赖氨酸残基。

[0091] 肽接头也可以是分枝的多肽。示例性分枝的肽接头在 U. S. 专利号 US6, 759, 509 中描述。这样的接头包含下式的那些:

[0092]

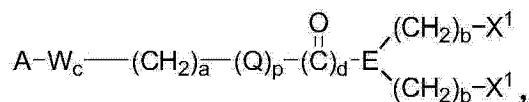


[0093] 其中 A 是硫醇受体; W 是桥接部分; c 是 0 到 1 的整数; a 是 2 到 12 的整数; Q 是 O、NH 或低氮烷基 (N-lower alkyl); p 是 0 或 1 的整数; d 是 0 或 1 的整数; E 是多价原子; 每个 b 是 1 到 10 的整数; 每个 X 是下式:

[0094] $-CO-Y-Z_m-G_n$,

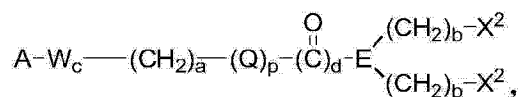
[0095] 其中 Y 是以 L 型的两个氨基酸残基; Z 是一个或两个氨基酸残基; m 是 0 或 1 的整数; G 是自切除间隔子 (self-immolative spacer); 并且 n 是 0 或 1 的整数; 条件是当 n 是 0 时, 则 $-Y-Z_m$ 是 Ala-Leu-Ala-Leu 或 Gly-Phe-Leu-Gly; 或者每个 X 是下式:

[0096]



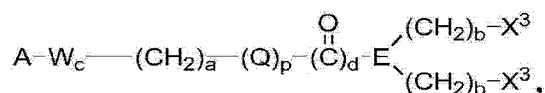
[0097] 其中每个 X^1 是式 $-CO-Y-Z_m-G_n$; 并且其中 Y、Z、Q、E、G、m、d、p、a、b 和 n 是如上所定义的; 或者每个 X^1 是下式:

[0098]



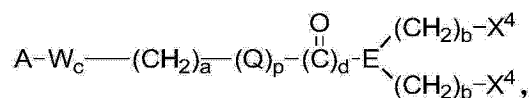
[0099] 其中每个 X^2 是式 $-CO-Y-Z_m-G_n$; 并且其中 Y、Z、G、Q、E、m、d、p、a、b 和 n 是如上所定义的; 或者每个 X^2 是下式:

[0100]



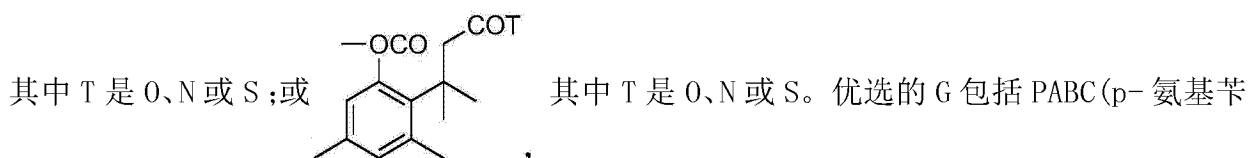
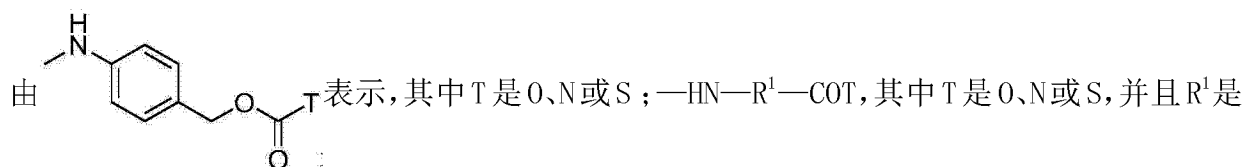
[0101] 其中每个 X^3 是式 $\text{—CO—Y—Z}_m\text{—G}_n$; 并且其中 Y、Z、G、Q、E、m、d、p、a、b 和 n 是如上所定义的; 或者每个 X^3 是下式:

[0102]

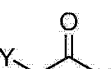


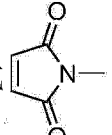
[0103] 其中每个 X^4 是式 $\text{—CO—Y—Z}_m\text{—G}_n$; 并且其中 Y、Z、G、Q、E、m、d、p、a、b 和 n 是如上所定义的。

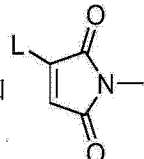
[0104] 分枝的接头可以利用中间产物自切除间隔子部分 (G), 其与药剂或肽载体和分枝的肽接头共价连接。自切除间隔子可以是双官能化学部分, 其能够与两个化学部分共价连接在一起并且能够通过酶切割的方式从三节 (tripartate) 分子中释放所述间隔的化学部分中的一个 (例如, 本文所描述的任何适合的接头)。在某些实施方式中, G 是自切除间隔子部分, 其间隔并且共价连接药剂或肽载体和肽接头, 其中间隔子经由 T 部分 (如在下式中使用的 “T” 表示已经包含在药剂和肽载体中的亲核原子) 连接到肽载体或药剂, 并且其可以由



基-氨基甲酰基)、GABA (γ -氨基丁酸)、 α , α -二甲基 GABA 和 β , β -二甲基 GABA。

[0105] 在分枝的接头中, 硫醇受体 “A” 通过来源于肽载体或药剂中的硫原子被连接到肽载体或药剂。该硫醇受体可以是, 例如 α -取代的乙酰基。该基团具有式:  , 其中 Y 是离去基团如 Cl、Br、I、甲磺酸根 (mesylate)、甲苯磺酸根 (tosylate) 等。如果该硫醇受体是 α -取代的乙酰基, 那么连接到配体后的硫醇加合物形成键 $\text{—S—CH}_2\text{—}$ 。优选地, 硫醇

受体是迈克尔加成受体。本发明的代表性的迈克尔加成受体具有式  在连接配体的

硫醇基团后, 迈克尔加成受体变成了迈克尔加成加合物, 例如  , 其中 L 是药剂或肽

载体。

[0106] 桥连基团 “W” 是能够将两个间隔的化学部分共价连接到稳定的三节分子上的双

官能化学部分。桥连基团的实例在 S. S. Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*. CRC Press, Florida, (1991); 及 G. E. Means and R. E. Feeney, *Bioconjugate Chemistry*, vol. 1, pp. 2-12, (1990) 中描述, 其公开内容通过引用结合于此。W 可将硫醇受体共价连接到酮基部分。示例性的桥连基团具有式 $-(CH_2)_f-(Z)_g-(CH_2)_h-$, 其中 f 是 0 到 10; h 是 0 到 10; g 是 0 或 1, 条件是当 g 是 0 时, f+h 是 1 到 10; Z 是 S、O、NH、SO₂、苯基、萘基、聚乙二醇、包含 3 到 10 个碳原子的环脂族烃环或者包含 3 到 6 个碳原子以及选自 O、N 或 S 的 1 或 2 个杂原子的杂芳烃环。优选的环脂族部分包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。优选的杂芳族部分包括吡啶基、聚乙二醇 (1-20 个重复单元)、呋喃基、吡喃基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、噁嗪基、吡咯基、噻唑基、吗啉基等。在桥连基团中, 优选当 g 是 0 时, f+h 是 2 到 6 的整数 (例如, 2 到 4 如 2)。当 g 是 1 时, 优选 f 是 0、1 或 2; 并且 h 是 0、1 或 2。结合到硫醇受体的优选的桥连基团在 Pierce Catalog, pp. E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, and E-17 (1992) 中示出。

[0107] 修饰的多肽: 并入本发明的蛋白结合物中的任何多肽可以被修饰以与本文所描述的接头方式化学反应, 或者以包含接头。这些修饰的多肽和肽接头构建体在本发明的范围内并且可以被包装为具有用于完成结合到抗体 (例如, 接头结合的抗体部分) 或细胞毒素的方法的说明的试剂盒的组分。例如, 多肽可以被修饰以包含 N₃ 叠氮基, 其将与结合到抗体部分的接头中的炔烃反应 (并且, 反之亦然; 多肽可以结合到包含炔烃的接头中, 其将与从抗体部分延伸出的叠氮基反应)。在其他实施方式中, 仅通过实例说明的方式, 多肽可以被修饰以包含在 N-端、C-段或两端处的用于与例如包含马来酰亚胺的接头如 Mal-AMCHC-OSu 或 SPDP 反应的半胱氨酸残基或其他带有硫醇基团的部分 (例如, C-SH)。正如所记载的, 并入蛋白结合物中的多肽可以被结合到细胞毒素剂, 并且结合到细胞毒素剂的多肽在本发明的范围内。

[0108] 抗体-多肽-细胞毒素结合物和其制备方法: 优选的结合技术包括交联剂 SATA 和应用点击化学。SATA 是帮助形成共价键以连接两个分子 (例如, 将抗体部分连接到多肽部分) 的异双官能交联剂。琥珀酰亚胺基酯与伯胺反应以将硫醇基团引入分子随后除去乙酰基, 因此产生巯基。硫醇基团通过二硫键提供将两个部分连接在一起的靶。利用 SATA 的优点之一是修饰的分子可以被存储很长一段时间用于以后的结合反应, 因为巯基基团可以受保护的形式 (该形式在本方面的范围内) 添加。

[0109] 正如所记载的, 无铜点击化学技术可以被用来产生本文所描述的结合物。点击化学通常被理解为广泛适用的、立体特异性的并且能够在温和的条件 (例如, 生理条件) 下产生的高产量的产品的模块化反应。点击化学已经被描述为包含四类化学转化。第一类是非羟醛型碳基化学反应, 如形成尿素酶、硫脲、胍、脲、酰胺和芳香杂环化合物的那些反应。第二类转化是亲和取代反应, 其中紧张的杂环亲电体 (例如, 环氧化合物、氮丙啶 (aziridine) 和氮丙啶盐离子 (aziridinium ions)) 内的环被打开。在第三类中, 对 C-C 重键的加成反应, 如迈克尔加成、环氧化作用、氮丙啶化反应 (aziridation) 和双羟基化反应发生, 并且在第四类中是环加成反应, 如 1, 3-偶极环加成反应和狄尔斯-阿尔德反应。形成 5 元三唑的炔烃和叠氮化合物的 1, 3-偶极环加成反应 (1, 3-惠斯更 (Huisgen) 反应) 是点击反应的具体实例。参见, Guddehalli Parameswarappa, Sharavathi, "Bifunctional cyclooctynes in copper-free click chemistry for applications in radionuclide

chemistry and 4-Alkylpyridine derivatives in intramolecular dearomatization and heterocycle synthesis” (《在用于分子内脱芳构化作用和杂环合成中的放射性核素化学 and 4-烷基吡啶衍生物的无铜点击化学中的双官能的环辛炔》), 论文, 爱荷华大学, 2011. <http://ir.uiowa.edu/etd/2710>. 点击化学方法可以在生产高产量的生产方法中利用高毒性的催化剂铜。然而, 初步结合反应示出在本发明的结合物中多肽的整体并入是非常低的 (6%)。该结合物也是不稳定的, 并且观察到产物的沉淀。因此, 使用点击化学的结合步骤被优化以消除铜的使用。简要地, 第一步包括活化用于结合的基团, 以及纯化和透析中间产物。对于该步骤, 第一组分 (例如, 抗体或抗体片段) 与产生第一组分-接头中间产物 (例如, 抗体-或抗体片段-接头中间产物) 的接头反应。接下来, 具有用于结合的活化基团的接头 (即炔烃) 和第二组分 (例如, 具有叠氮化合物的多肽) 反应形成可进一步纯化的所需的结合物。该第二步是有效的, 因为在相关基团 (炔烃和叠氮化合物部分) 间的反应在室温下 24 小时内发生并且不使蛋白变性。在此过程中的两步都不干扰产生的分子的生物学活性。

[0110] 可替代地, 多肽部分可以通过氧化过程被附着或结合到抗体分子的糖类部分。糖类氧化的方法可以是化学的或酶学的。糖类部分可以位于抗体的 Fc 区、Fab 或 Fab' 片段上。可以使用已知的方法进行抗体部分的 Fc 区的氧化以制备醛。氧化剂可以选自高碘酸、过碘酸、偏高碘酸钠和偏高碘酸钾组成的组中。紧跟着该步的是与选自由氨衍生物如伯胺、仲胺、羟胺、肼、酰肼、苯基肼、氨基脲或氨基硫脲组成的组中的氨基的反应。酶学方法包括使抗体分子的糖类部分与酶反应, 如在氧的存在下的半乳糖氧化以形成醛。

[0111] 制造本发明的化合物: 本发明特征在于合成本文所描述的蛋白结合物的方法。树枝状大分子可以通过在表面分枝上的反应性基团结合到多个多肽。例如, 可以使树枝状大分子与 3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸 N-琥珀酰亚胺基酯反应以形成树枝状大分子-吡啶基-二硫化物中间产物, 并且随后使该中间产物与包含半胱氨酸残基的多肽反应以使多肽附着到每个表面分枝。可替代地, 可以使树枝状大分子与 S-乙酰硫基乙酸 N-琥珀酰亚胺基酯反应以产生树枝状大分子-巯基中间产物, 紧接着是与多肽的马来酰亚胺衍生物反应以形成树枝状大分子-多肽复合体。

[0112] 树枝状大分子-多肽复合体随后与如上文所描述的第一试剂反应, 并且产生的树枝状大分子-多肽-第一试剂复合体可以以药学上可接受的形式 (例如, 如药学上可接受的盐) 制备。

[0113] 可替代地, 首先, 可以使树枝状大分子经由官能基团 (例如, 叠氮化合物) 与抗体部分反应, 并且产生的树枝状大分子-抗体部分复合体的表面分枝可以被官能化以使细胞毒素或多肽连接的细胞毒素附着到表面分枝的末端。

[0114] 制造本发明的结合物的方法可以另外地包括在附着多肽或抗体部分之前将上述的任何一个接头附着到树枝状大分子。

[0115] 评估: 可用任何数量的方法评估本发明的蛋白结合物。例如, 可以针对下列性质评估蛋白结合物: BBB 渗透性 (通过原位脑灌注或在 BBB 的离体模型 (如在 U.S. 专利号 US 7, 557, 182 中描述的模型中) 测试); 抗体部分对其靶的亲和力; 细胞毒性 (例如, 通过 BT-474^[3H]-胸苷引入 (incorporation)); 溶解度和 / 或体外稳定性; 纯度 (例如, 可以通过凝胶分离和蛋白免疫印迹确认低水平的非结合的抗体部分和低水平的蛋白聚集物); 以

及稳定性和体内组织分布（例如，通过成像试验测量随时间推移的血浆水平和组织分布）。

[0116] 涉及如本文所描述的结合物的合成的本方法可以被稳定地修饰以制备结合物的药学上可接受的盐。因此，包含该盐的药物组合物和给予它们的方法在本发明的范围内。

[0117] 药物组合物：本发明也特征在于包含本发明的蛋白结合物的治疗有效量的药物组合物。可以配制组合物用于通过各种给予途径中的任一种给予，并且可以包含一种或多种生理学可接受的赋形剂，其可以根据给予途径而变化。我们使用术语“赋形剂”广义指任何化合物或物质，包括也可以被称为“载体 (carrier)”或“稀释剂”的那些。制备药学上和生理上可接受的组合物通常被认为在本领域中是常规的，并且本领域的技术人员可以咨询众多的权威以得到指导。例如，可以咨询 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed., 1985。对于用于药物递送的方法的简要综述，参见，例如 Langer (Science 249:1527-1533, 1990)。

[0118] 可以制备本发明的药物组合物用于口服或肠胃外给予，尽管我们预计肠胃外给予而是有利的（不是为了方便而是优化活性的药物成分（这里，抗体部分和 / 或细胞毒素）的递送）。为肠胃外给予而制备的药物组合物包括为静脉内（或动脉内）、肌肉内、皮下、腹膜内、经粘膜（例如，鼻内、阴道内或直肠）或经皮（例如，局部）给予而制备的那些药物组合物。也设想雾化吸入并且其可以被用于递送本结合物。因此，本发明提供用于肠胃外给予的组合物，其包括溶解或悬浮在可接受的载体优选地水性载体如水、缓冲水、盐水、缓冲盐水（例如，PBS）等中的蛋白结合物。包含的一种或多种赋形剂可帮助接近生理条件如 pH 调节和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、洗涤剂。其中组合物包括固体成分（因为它们可以用于口服给予）、一种或多种赋形剂可以作为粘合剂或填充剂（例如，用于片剂、胶囊剂等剂型）。当组合物被配制用于应用到皮肤或黏膜表面时，一种或多种赋形剂可以是用于乳霜剂、软膏剂等的溶剂或乳化剂。

[0119] 药物组合物可以是无菌的；它们可以通过传统的杀菌技术消毒，或者可以被无菌过滤。水溶液可以被包装以如此使用，或被冻干作为冻干制剂使用，其由本发明所包括，在给予前与无菌的水性载体组合。药物组合物的 pH 值通常在 3 和 11 之间（例如，在约 5 和 9 之间）或在 6 和 8 之间（例如，在约 7 和 8 之间）。在一些实施方式中，药物组合物的 pH 值在约 7.0 和 7.5 之间。由此产生的以固体形式存在的组合物以多个单剂量单位被包装，每个都包含如在片剂或胶囊剂的密封包装中的固定量的上述一种或多种药剂。以固体形式存在的组分也可以被包装在灵活量的容器中，如在为局部适用的乳霜剂或软膏剂而设计的挤压管中。

[0120] 治疗方法：以上所描述的药物组合物可以被配制成包含治疗有效量的蛋白结合物。治疗性给予包括预防性应用。基于基因检测和其他预测方法，在与他们的患者咨询中，当患者具有对 CNS 癌症临床上确定的倾向或增加的易感性（在某些情况下，大大增加的易感性）时，医师可以选择预防给予。可以将本发明的药物组合物以足以延迟、减少或优选阻止临床疾病的发作的量给予至受试者（例如，人类患者）。在治疗性的应用中，将组合物以足以至少部分地改善征兆或症状或者抑制（并优选阻止）病症症状的进展、其并发症和影响的量给予至已经患有 CNS 癌症的受试者（例如，人类患者）。足以实现该目标的量被定义为“治疗有效量”。治疗有效量的药物组合物可以是达到治愈的量，但是该结果只是可实现几个量中的一个。正如所记载的，治疗有效量包括提供治疗的量，其中在该治疗中癌症的发

作或进展被延迟、阻碍或阻止,或者癌症的恶性肿瘤或症状被改善。症状中的一个或多个可能不太严重。在已经治愈的个体中复原可以被加快。

[0121] 对于该用途有效的量可以取决于 CNS 癌症的严重性和受试者的体重和一般状况,但是其通常范围为约 0.05 μg 到约 1000 μg (例如,0.5-100 μg) 的每受试者的每剂量的抗体-多肽-细胞毒素结合物的等效剂量。用于最初给予和加强给予的适用方案由最初给予、随后是每一个或多个小时、每天、每周或每月的间隔的随后给予重复剂量为代表。例如,受试者可接受范围为每剂量约 0.05 μg 到 1,000 μg (相比于未结合的抗体部分的等效剂量) 的蛋白结合物,每周一次或多次 (例如,每周 2、3、4、5、6 或 7 或更多次) 的。例如,受试者可接受每周 0.1 μg 到 2,500 μg 的剂量 (例如,2,000、1,500、1,000、500、100、10、1、0.5 或 0.1 μg)。受试者也可以接受范围为每剂量 0.1 到 3,000 μg 的本发明的结合物,每两或三周一次。受试者也可接受 2mg/kg 每周 (该重量基于结合物或抗体部分的重量而估算)。

[0122] 在本发明的药物组合物中的抗体-多肽-细胞毒素结合物的总的有效量可作为单次剂量 (作为大药丸或通过相对短的时间内灌注) 给予至哺乳动物,或者可使用分级治疗方案给予,其中在分级治疗方案中多个剂量在更长的一段时间 (例如,每 4-6、8-12、14-16 或 18-24 小时或每 2-4 天、1-2 周一剂,或一月一次) 内给予。可替代地,设想足以维持在血液中的治疗有效浓度的连续静脉灌注。

[0123] 可以由本领域技术人员连同考虑在年龄、体重和其他一般状况 (如上所述的) 方面的个体差异确定本发明的组合物内并且在被应用到哺乳动物 (例如,人类) 的本发明的方法中使用的一种或多种药剂的治疗有效量。因为本发明的抗体-多肽-细胞毒素结合物表现出增强的穿过 BBB 的能力,抗体部分的剂量可以低于当未结合时的抗体部分的有效剂量。例如,抗体部分的剂量可以小于或为用相同的或可比的未结合的药剂对于治疗效果所要求的剂量的约 90%、75%、50%、40%、30%、20%、15%、12%、10%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5% 或 0.1%。

[0124] 也可以由本领域的技术人员凭经验确定治疗有效量。例如,可以用由治疗医师选择的剂量水平和时机或给予模式来进行本发明的药物组合的单次或多次给予。可以基于受试者中疾病或病症的严重性确定和调节剂量和给予时间表,在整个治疗过程中其可根据临床医生或其他有技能的医疗保健专业人员普遍实行的方法监护。

[0125] 试剂盒:本发明的试剂盒可以包括以上所描述的组合物和适当说明 (无论是书面的和 / 或作为音频、可视或视听材料提供的)。在一个实施方式中,该试剂盒包括与使用说明书一起包装的药物组合物或其前体和可选地,在为给予组合物做准备或 / 和在给予组合物中操作组合物有用的任何设备。例如,本发明的试剂盒可以包括以下中的一个或多个:稀释剂、手套、小瓶或其他容器、移液器、针头、注射器、导管、支架、药匙、无菌布或消毒盖布、阳性和 / 或阴性对照,等等。在另一个实施方式中,本发明的试剂盒包括在制作蛋白结合物中有用的组合物和试剂。例如,试剂盒可以包括下列中的一个或多个:抗体部分、接头、接头连接的抗体部分、多肽、与接头反应的化学实体和 / 或修饰的多肽。例如,在一个实施方式中,试剂盒可以包括抗体部分、接头、与接头反应的化学实体和多肽。在其他实施方式中,试剂盒可以包括接头连接的抗体部分和修饰的多肽。正如试剂盒用于给予组合物,用于制作组合物的试剂盒可以包括下列中的任何一个或多个:稀释剂、手套、小瓶或其他容器、移液器、针头、注射器、导管、支架、药匙、无菌布或消毒盖布、阳性和 / 或

阴性对照,等等。也可以包括在使接头结合到抗体部分或多肽、修饰多肽、使接头结合的抗体部分结合到修饰的多肽(或反之亦然;是抗体部分结合到接头结合的多肽)或纯化和测试蛋白结合物中有用的任何试剂。正如所记载的,接头结合的抗体部分和修饰的多肽是本发明的特征组合物。

[0126] 实施例

[0127] 实施例 1:合成结合物抗-HER2 mAb-[MFCO-An2-(SuDoce)₂]_n

[0128] 在图 6 中示出用于将本发明的多肽结合到细胞毒素剂的方案。该方案例示了在血管肽素 2(An2) 和多西他赛(Doce)间的结合以产生 N₃An2-(SuDoce)₂。为了产生中间产物 DoceSuOH,在搅拌下将 DIEA(0.21ml, 1.2mmol) 逐滴加入多西他赛(0.81g, 1.0mmol) 和琥珀酸酐(105mg, 1.05mmol) 在 DCM(7ml) 中的悬浮液中。在室温下搅拌该混合物并且通过 UPLC 检测。在 2 小时之后,反应完成。除去溶剂,并且将所得残余物溶解在 DMF(2ml) 中。用具有 0.05% 的甲酸的水中的 30% MeCN(6ml) 稀释该溶液并且直接装载到苯基 42ml 柱上纯化。在冷冻干燥后,以白色粉末获得 DoceSuOH(0.68g, 75%), UPLC 纯度 >95%。为了产生 N₃An2-(SuDoce)₂,在搅拌下,在 5℃ 将 DIEA(0.012ml, 0.07mmol) 逐滴加入 DoceSuOH(31mg, 0.034mmol) 和 HATU(14mg, 0.037mmol) 在 DCM 中的溶液(0.8ml) 中。混合物在 5℃ 搅拌 30min 到室温,随后加入叠氮基血管肽素-2(AzidoAngpep-2)(53mg, 0.017mmol) 在 DMSO(0.2ml) 和 DMF(0.5ml) 中的溶液。该混合物在室温搅拌 30 分钟。HPLC 显示反应完成。使用制备型 HPLC(30% 到 60% 的 MeCN 在 H₂O 中和 0.05% 的 FA) 纯化反应混合物以产生在冷冻干燥后为白色粉末的 N₃An2-(SuDoce)₂(32mg, 45%), UPLC 纯度 >95%。

[0129] 如在图 3、图 4 和图 5 中所图示说明的,随后我们将 N₃An2-(SuDoce)₂ 结合到抗-HER2 单克隆抗体。为了产生结合物(抗-HER2mAb-MFCO_n) 的抗体-接头部分, MFCO(2.0mg, 6.9 μmol) 被溶解在 DMSO(1ml) 中,并且 0.07ml(0.48 μmol, 8eq) 的溶液被转移到曲妥珠单抗的 PBS 缓冲溶液(5mg/ml, 1.8ml) 中。使用二碱式磷酸盐(bibasic phosphate) 溶液将该溶液的 pH 值调节到 8.0。摇晃混合物并且允许在室温下反应 3 小时。使用 20mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 洗脱的盐交换柱将修饰的抗体部分与过量的小分子中纯化出来。收集包含蛋白的片段,并且使用 amicon 离心过滤器(MWCO 10,000) 将缓冲液改变为柠檬酸盐/磷酸盐缓冲剂 pH 5.0(分别为 25mM, 50mM)。获得 3ml 的最终溶液,并且 Bradford 分析给出 2.7mg/ml 的浓度、90% 的产量。随后,我们称之为活化的曲妥珠单抗的抗体-接头被结合到结合物的多肽-细胞毒素部分以产生抗-HER2 mAb-[MFCO-An2-(SuDoce)₂]_n 构建体。更具体地,用乙酸缓冲液(pH 5) 将活化的曲妥珠单抗(8.1mg, 3ml, 0.046 μmol) 稀释至 8ml 并且加入吐温 80(0.008ml) 并涡旋(vortexed) 以制成均匀的溶液。在室温下加入 N₃An2(DoceSu)₂(2.2mg, 8eq) 在 DMSO(0.3ml) 中的溶液。摇晃混合物并且在室温下存储 2 天。使用 amicon 离心过滤器(MWCO 10,000) 和柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液 pH 5.0(分别为 25mM, 50mM) 4 次去除过量的小分子。获得 3ml 的最终溶液,浓度 2.8mg/ml, 定量 Malldi-tof 分析显示 162000 的质量,其表明约 3 个分子的 N₃An2-(SuDoce)₂ 被结合到抗-HER2mAb。

[0130] 实施例 2:细胞毒素分析

[0131] 使用胸苷掺入法细胞增殖。在白色 96-孔板(Perkin Elmer, USA) 中以每孔 7500 个细胞的密度孵育 BT-474 肿瘤细胞。首先,细胞在血清剥夺的培养基中同步 24 小时。在用

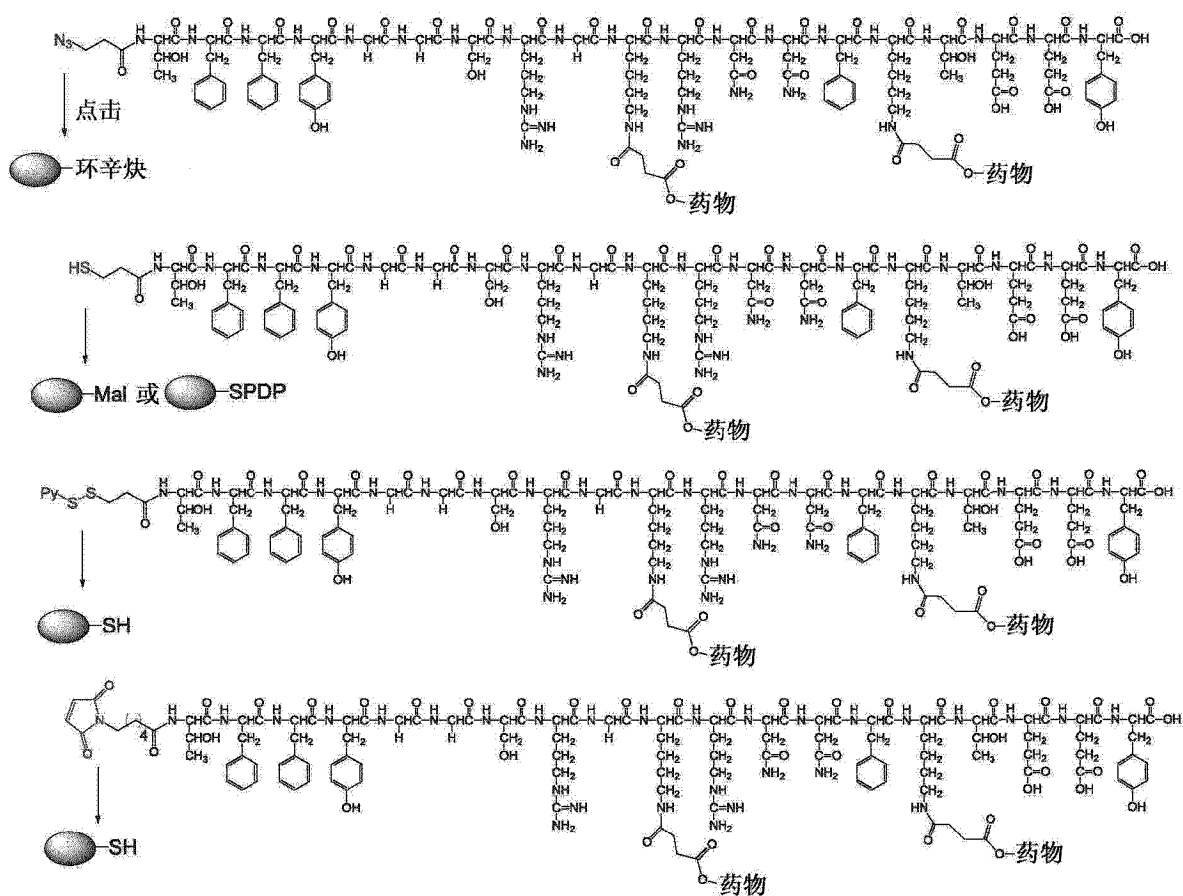
持续增加浓度的抗-HER2-血管肽素-2结合物(ANG4043)或抗-HER2-血管肽素-2-(多西他赛)2孵育细胞5天后,抽吸完全培养基并且用包含 $2.5\mu\text{Ci/mL}$ [甲基- ^3H]-胸苷(Perkin Elmer, USA)的完全培养基在 37°C /5% CO_2 脉冲标记细胞4小时。在加入来自于Perkin Elmer的闪烁液Microscint 0之前,冲洗、固定和干燥细胞。在24h之后,使用用于测定氚摄取的酶标仪TopCount(Perkin Elmer, USA)读数板。为每个药物浓度而绘制掺入的[^3H]-胸苷。该结果在图7中示出。

SEQ ID NO	序列
1	Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser
2	Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Glu-Lys-Glu
3	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Asp-Thr-Glu-Glu-Tyr
4	Ser-Phe-Tyr-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Tyr-Leu-Arg-Glu-Glu-Glu
5	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
6	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
7	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Lys-Asn-Asn-Tyr-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
8	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Lys-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
9	Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Lys-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
10	Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Lys-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
11	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
12	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Leu-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
13	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Lys-Lys-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
14	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Gly-Asn-Asn-Tyr-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
15	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Leu-Arg-Ala-Lys-Tyr
16	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Glu-Lys-Tyr
17	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Lys-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Glu
18	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Asp
19	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Asp-Arg-Ala-Lys-Tyr
20	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Lys-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Glu-Tyr
21	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Ala-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
22	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Lys-Lys-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Ala-Lys-Tyr
23	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Leu-Arg-Ala-Lys-Tyr
24	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Ala-Lys-Tyr
25	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Ala-Lys-Tyr
26	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
27	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Leu-Arg-Ala-Lys-Tyr
28	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Ala-Lys-Tyr
29	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Lys-Tyr
30	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Lys-Asn-Asn-Phe-Asp-Arg-Glu-Lys-Tyr
31	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Leu-Arg-Glu-Lys-Glu
32	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Gly-Asn-Asn-Phe-Asp-Arg-Ala-Lys-Tyr
33	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Gly-Asn-Asn-Phe-Asp-Arg-Ala-Lys-Tyr
34	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Ala-Lys-Tyr
35	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Lys-Gly-Asn-Asn-Tyr-Val-Thr-Ala-Lys-Tyr
36	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Lys-Gly-Asn-Asn-Phe-Leu-Thr-Ala-Lys-Tyr
37	Ser-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Phe-Leu-Thr-Ala-Lys-Tyr
38	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
39	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
40	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Met-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
41	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Tyr-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
42	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
43	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Tyr-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
44	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Leu-Thr-Ala-Lys-Tyr
45	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Leu-Thr-Ala-Glu-Tyr
46	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Tyr
47	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Ala-Glu-Tyr
48	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
49	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Asp
50	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
51	Ser-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
52	Ser-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Met-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
53	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
54	Ser-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Tyr-Leu-Arg-Glu-Lys-Tyr
55	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Leu-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Arg-Glu-Lys-Tyr
56	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Thr-Ala-Glu-Tyr
57	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Lys-Gly-Asn-Asn-Phe-Val-Ser-Ala-Glu-Tyr
58	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Asp-Arg-Ala-Glu-Tyr
59	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Leu-Arg-Glu-Glu-Tyr
60	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Tyr-Leu-Arg-Glu-Glu-Tyr
61	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Tyr-Leu-Arg-Glu-Glu-Tyr
62	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Tyr-Leu-Arg
63	Met-Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Val-Ala-Arg-Ile
64	Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly

65	Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Tyr-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly
66	Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Val-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe-Tyr
67	Thr ₁ -Phe ₂ -Phe ₃ -Tyr ₄ -Gly ₅ -Gly ₆ -Cys ₇ -Arg ₈ -Gly ₉ -Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅ -Thr ₁₆ -Glu ₁₇ - Glu ₁₈ -Tyr ₁₉ 其是血管肽素-1(An1)
68	Lys-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
69	Thr-Phe-Tyr-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
70	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
71	Cys-Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Cys-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
72	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr-Cys
73	Cys-Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Ser-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
74	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr-Cys
75	Pro-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
76	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Lys-Glu-Tyr
77	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Lys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
78	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Lys-Arg-Tyr
79	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Lys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Ala-Glu-Tyr
80	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Lys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Ala-Gly-Tyr
81	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Lys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Glu-Lys-Tyr
82	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Lys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
83	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
84	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Cys-Gly-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
85	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Arg-Cys-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
86	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Gly-Asn-Asn-Phe-Asp-Thr-Glu-Glu-Glu
87	Thr-Phe-Gln-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
88	Tyr-Asn-Lys-Glu-Phe-Gly-Thr-Phe-Asn-Thr-Lys-Gly-Cys-Glu-Arg-Gly-Tyr-Arg-Phe
89	Arg-Phe-Lys-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Met-Asn-Asn-Phe-Glu-Thr-Leu-Glu-Glu
90	Arg-Phe-Lys-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Phe-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr
91	Arg-Phe-Lys-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Tyr-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr
92	Lys-Thr-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Ile-Ala-Tyr-Glu-Glu-Ile-Phe-Lys-Asn-Tyr
93	Lys-Thr-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Ile-Ala-Tyr
94	Arg-Gly-Gly-Arg-Leu-Ser-Tyr-Ser-Arg-Arg-Phe-Ser-Thr-Ser-Thr-Gly-Arg
95	Arg-Arg-Leu-Ser-Tyr-Ser-Arg-Arg-Arg-Phe
96	Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys
97	Thr ₁ -Phe ₂ -Phe ₃ -Tyr ₄ -Gly ₅ -Gly ₆ -Ser ₇ -Arg ₈ -Gly ₉ -Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅ -Thr ₁₆ -Glu ₁₇ - Glu ₁₈ -Tyr ₁₉ 其是血管肽素-2(An2)
98	Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Tyr- Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn- Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Thr-Cys-Gly-Gly-Ala Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe- Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn- Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly-Gly-Ala
99	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Lys-Glu-Tyr
100	Arg-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Gly-Asn-Lys-Asn-Asn-Tyr-Leu-Arg-Leu-Lys-Tyr
101	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Arg-Ala-Lys-Tyr
102	Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Leu-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe- Glu-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly-Gly-Ala
103	Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly- Gly-Ala
104	Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu
105	Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Glu-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala
106	Lys-Arg-Xaa ₃ -Xaa ₄ -Xaa ₅ -Lys
107	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
108	Arg-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
109	Arg-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
110	Arg-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Arg-Thr-Glu-Glu-Tyr
111	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Arg-Thr-Glu-Glu-Tyr
112	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Arg-Arg-Asn-Asn-Phe-Arg-Thr-Glu-Glu-Tyr
113	Cys-Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr
114	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Thr-Glu-Glu-Tyr-Cys
115	Cys-Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Arg-Thr-Glu-Glu-Tyr
116	Thr-Phe-Phe-Tyr-Gly-Gly-Ser-Arg-Gly-Arg-Arg-Asn-Asn-Phe-Arg-Thr-Glu-Glu-Tyr-Cys
117	Thr ₁ -Phe ₂ -Phe ₃ -Tyr ₄ -Gly ₅ -Gly ₆ -Cys ₇ /Ser ₇ -Arg ₈ -Gly ₉ -Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅ -Thr ₁₆ - Glu ₁₇ -Glu ₁₈ -Tyr ₁₉
118	Phe ₃ -Tyr ₄ -Gly ₅ -Gly ₆ -Cys ₇ /Ser ₇ -Arg ₈ -Gly ₉ -Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅ -Thr ₁₆ -Glu ₁₇ -Glu ₁₈ - Tyr ₁₉ -Cys
119	Gly ₅ -Gly ₆ -Ser ₇ -Arg ₈ -Gly ₉ -Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅ -Thr ₁₆ -Glu ₁₇ -Glu ₁₈ -Tyr ₁₉ -Cys
120	Ser ₇ -Arg ₈ -Gly ₉ -Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅ -Thr ₁₆ -Glu ₁₇ -Glu ₁₈ -Tyr ₁₉ -Cys
121	Gly ₅ -Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅ -Thr ₁₆ -Glu ₁₇ -Glu ₁₈ -Tyr ₁₉ -Cys

122	Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅ -Tyr ₁₉ -Cys
123	Lys ₁₀ -Arg ₁₁ -Asn ₁₂ -Asn ₁₃ -Phe ₁₄ -Lys ₁₅
124	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLLYSGVPSRFSGSRSGTDFELTISSLQPEDFATYYC QQHYTTPFTPGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
125	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPNIKDTYIHVVRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNRPSTNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPEAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREPEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
126	Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr- Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg- Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly-Gly-Ala 其是抑肽酶。
127	Tyr-Glu-Glu-Thr-Lys-Phe-Asn-Asn-Arg-Lys-Gly-Arg-Ser-Gly-Gly-Tyr-Phe-Phe-Thr
128	Xaa ₁ -Phe-Xaa ₃ -Tyr-Gly-Gly-Xaa ₇ -Xaa ₈ -Xaa ₉ -Lys-Xaa ₁₁ -Asn-Asp-Xaa ₁₄ -Lys-Xaa ₁₆ -Xaa ₁₇ -Xaa ₁₈ -Xaa ₁₉

图 1



药物：紫杉醇、多西他赛、多柔比星、MMAE...

图 2a-2d

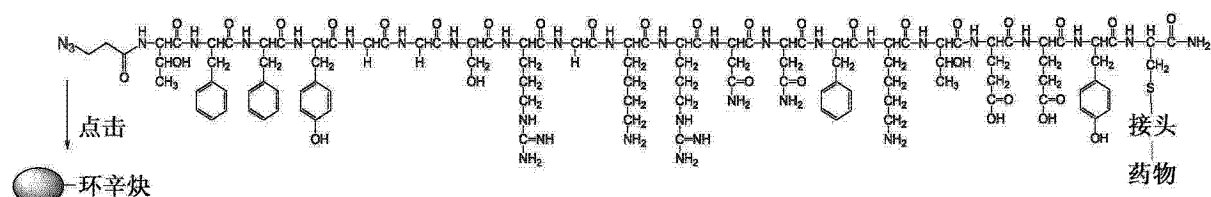


图 3

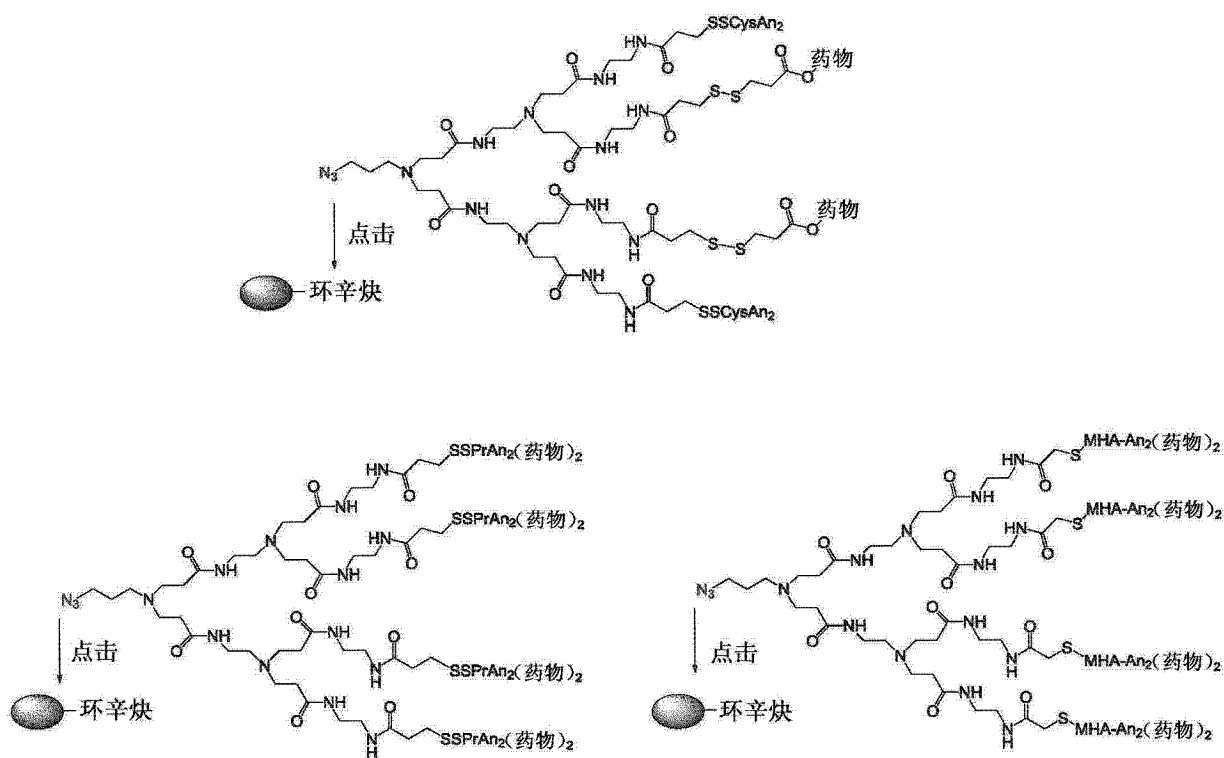


图 4(a)-4(c)

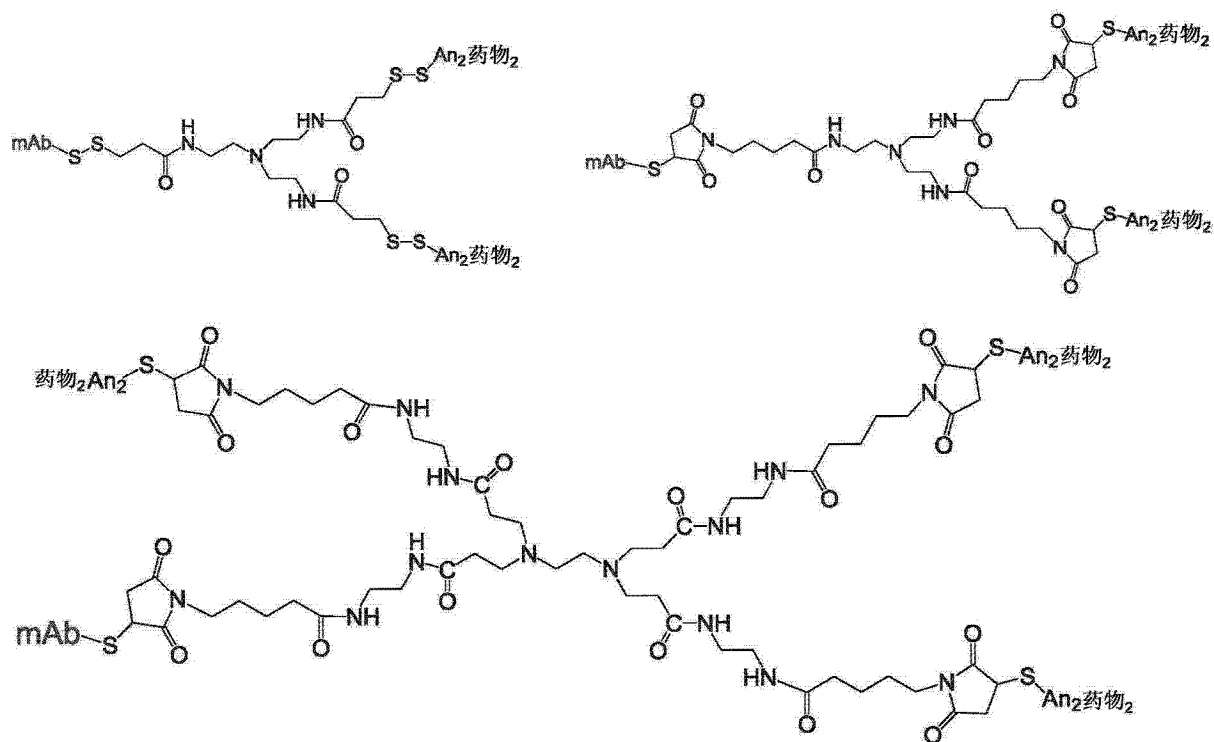


图 5(a) - 5(c)

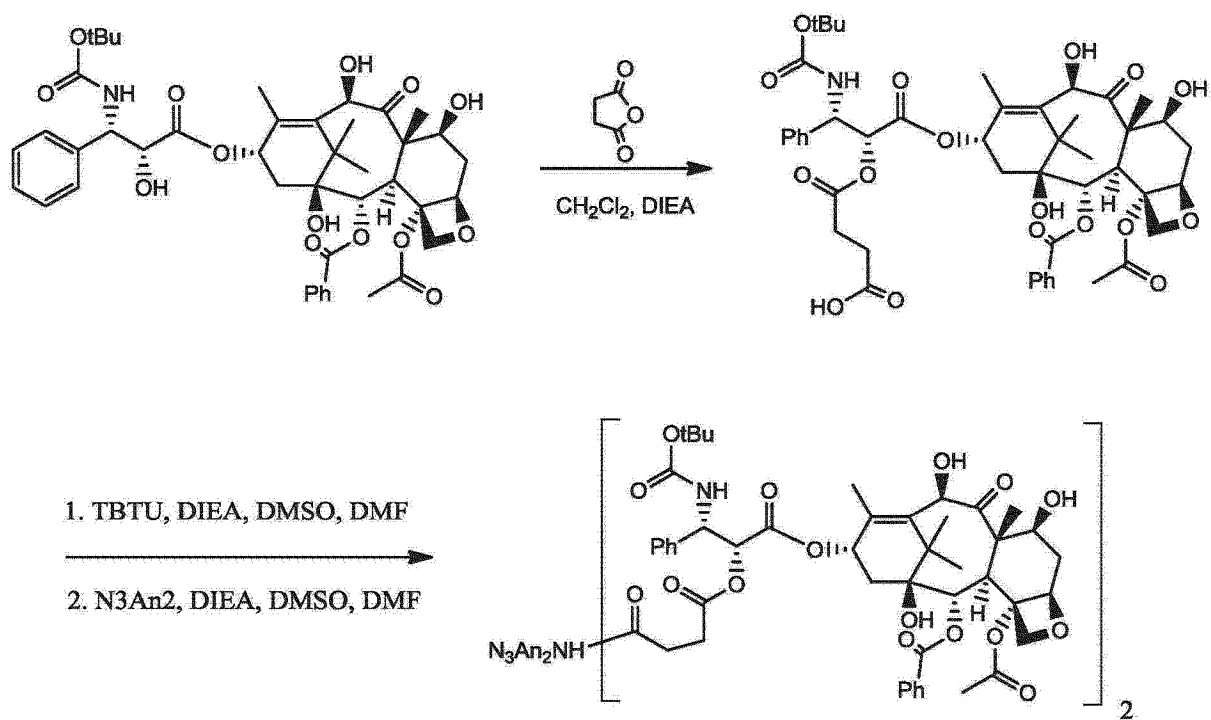


图 6

BT-474 中细胞毒性分析
5 天处理接着是胸苷 ^3H 掺入

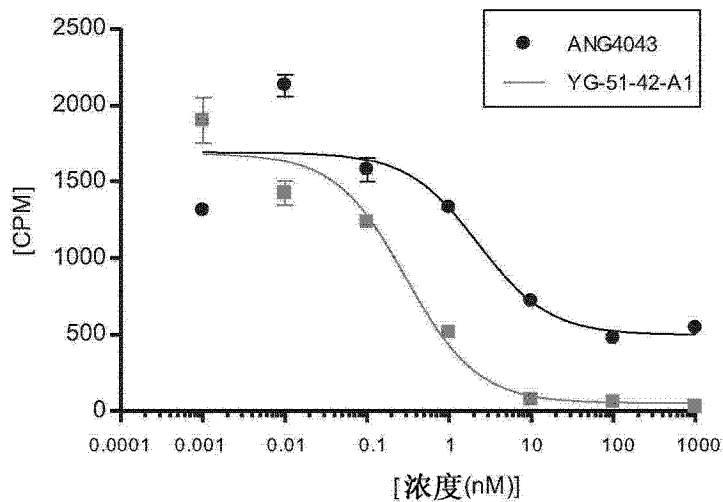


图 7

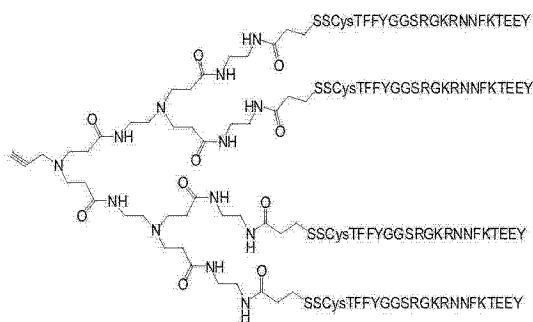


图 8a

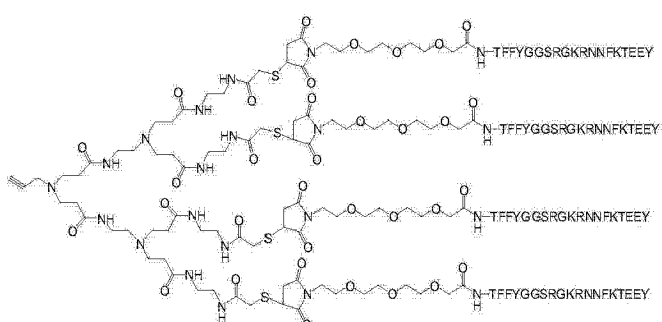


图 8b

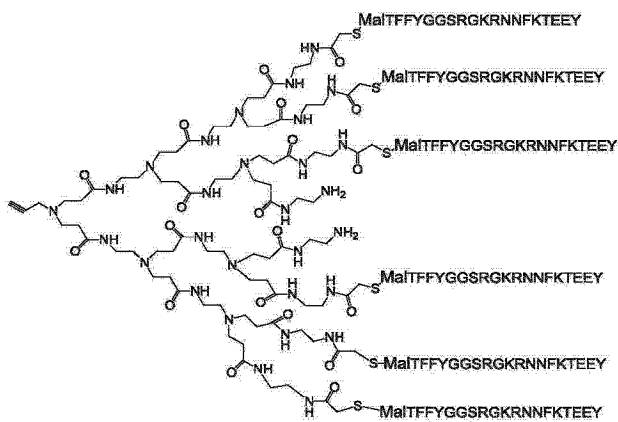


图 8c

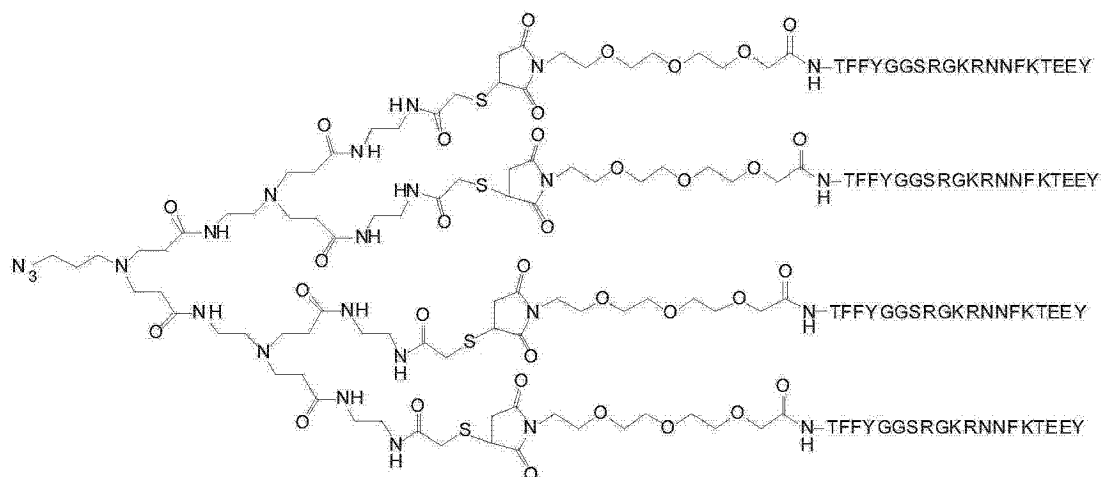


图 8d

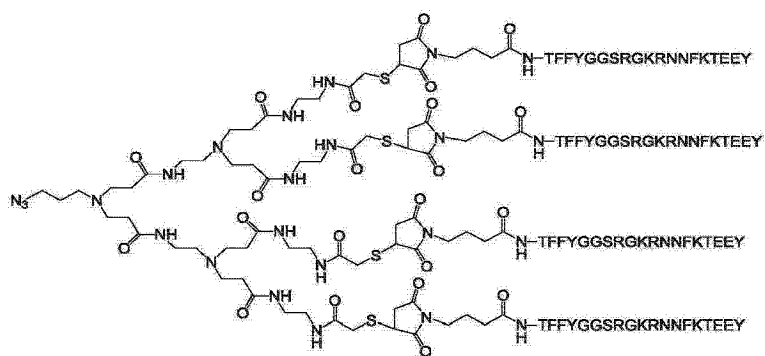


图 8e

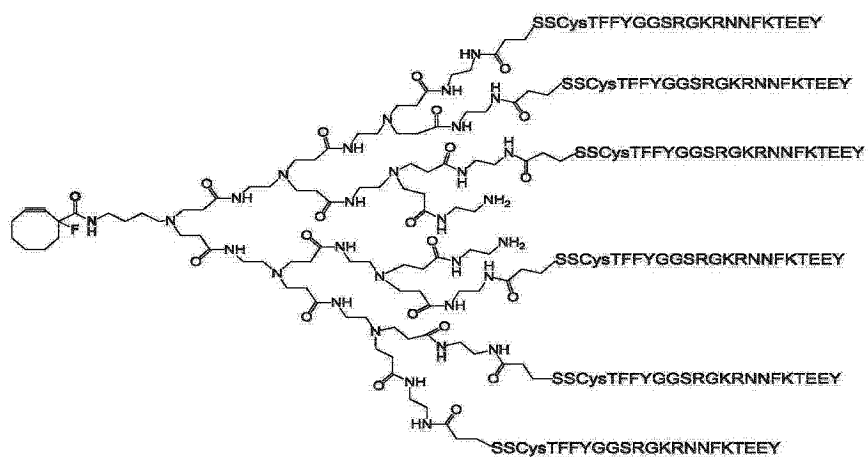


图 8f

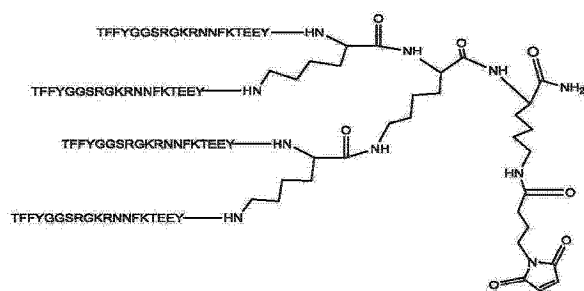


图 8g

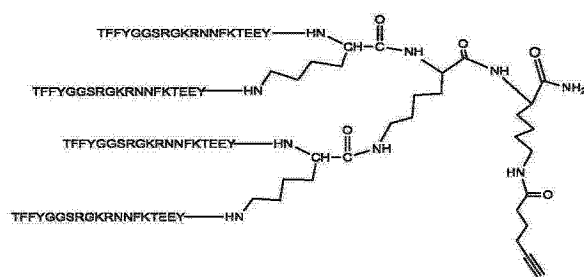


图 8h