



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113286820 B

(45) 授权公告日 2025. 04. 08

(21) 申请号 201980069301.0

(22) 申请日 2019.08.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113286820 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(30) 优先权数据
62/722,726 2018.08.24 US
62/804,063 2019.02.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.20

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2019/051170 2019.08.26

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/037434 EN 2020.02.27

(73) 专利权人 特拉斯福特普拉斯公司
地址 加拿大魁北克

(72) 发明人 R·贝利沃 B·阿纳比
M·德梅勒 A·拉罗克
J-C·柯里 A·兹格海布

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 胡晨曦 黄革生

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/64 (2006.01)
A61K 47/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C40B 30/04 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 107921047 A, 2018.04.17
WO 2017088058 A1, 2017.06.01

审查员 陈盛峰

权利要求书2页 说明书77页
序列表10页 附图51页

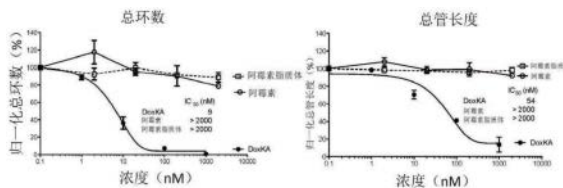
(54) 发明名称

用于靶向分拣蛋白受体和抑制血管生成拟态的方法和化合物

(57) 摘要

本公开涉及肽化合物和共轭化合物、其用于治疗癌症或侵袭性癌症的过程、方法和用途。例如,所述化合物可以包含以下式的化合物:
 $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (SEQ ID NO:1)、 $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (SEQ ID NO:2)、 $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (SEQ ID NO:3)、 $YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4)、 $IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (V) (SEQ ID NO:5)、 $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (VI) (SEQ ID NO:6)、 $IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (VII) (SEQ ID NO:7)、 $GVQAKAGVINMFKSESY$ (VIII) (SEQ ID NO:8)、

GVRKAGVRNMFKSESY (IX) (SEQ ID NO:9)、GVRKAGVRN(N1e)FKSESY (X) (SEQ ID NO:10)、YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL (XI) (SEQ ID NO:11)、YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL (XII) (SEQ ID NO:12)、YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL (XIII) (SEQ ID NO:13), 其中 X_1 至 X_{21} 和n可以具有各种不同的值,并且其中至少一个保护基团和/或至少一种标记剂任选地在N和/或C末端与所述肽化合物连接,用于抑制血管生成拟态和/或治疗癌症。



CN 113286820 B

1. 具有式A-(B)_n的共轭化合物在制造用于治疗表达分拣蛋白并表现出血管生成拟态的侵袭性癌症的药物中的用途:

其中,

n是1、2、3或4;

A是式(X)的肽化合物:

GVRAKAGVRN(N1e)FKSESY(X) (SEQ ID NO:10)

其中至少一个保护基团任选地在N和/或C末端与所述肽化合物连接和/或至少一个半胱氨酸残基任选地在C末端与所述肽化合物连接,

B是至少一种抗癌剂,其中B与所述肽化合物连接,任选地在所述肽化合物的游离胺处、在所述肽化合物的N末端位置处、在所述肽化合物的游离-SH处或在所述肽化合物的游离羧基处与所述肽化合物连接,

其中所述癌症是卵巢癌或乳腺癌。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述肽化合物包含至少一个保护基团,所述保护基团是乙酰基或琥珀酰基。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述肽化合物包含至少一个半胱氨酸残基,其中所述半胱氨酸残基与C末端连接,且B在游离-SH处与所述肽化合物连接。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述肽化合物由式(XXXIX)表示:

乙酰基-GVRAKAGVRN(N1e)FKSESY(XXXIX) (SEQ ID NO:15)。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中B通过接头、任选地可切割接头与所述肽化合物连接。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述抗癌剂是多西他赛、紫杉醇、阿霉素、卡巴他赛、美登木素生物碱、阿里他汀、卡奇霉素、鹅膏毒素、鹅膏蕈碱或aldoxorubicin。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述抗癌剂是多西他赛。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述共轭化合物由式(XIX)表示:GVRAK(多西他赛)AGVRN(N1e)FK(多西他赛)SESY-式(XIX)

其包含SEQ ID NO:10的肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的多西他赛分子。

9. 根据权利要求7所述的用途,其中所述共轭化合物由式(XXIII)表示:

乙酰基-GVRAK(多西他赛)AGVRN(N1e)FK(多西他赛)SESY-式(XXIII)

其包含SEQ ID NO:15的肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的多西他赛分子。

10. 根据权利要求6所述的用途,其中所述抗癌剂是阿霉素。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述共轭化合物由式(XXVI)表示:GVRAK(阿霉素)AGVRN(N1e)FK(阿霉素)SESY-式(XXVI)

其包含SEQ ID NO:10的肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的阿霉素分子。

12. 根据权利要求10所述的用途,其中所述共轭化合物由式(XXVIII)表示:乙酰基-GVRAK(阿霉素)AGVRN(N1e)FK(阿霉素)SESY-式(XXVIII)

其包含SEQ ID NO:15的肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的阿霉素分子。

13. 根据权利要求6所述的用途,其中所述抗癌剂是卡巴他赛。

14. 根据权利要求6所述的用途,其中所述抗癌剂是aldoxorubicin。

15. 根据权利要求1所述的用途,其中所述B在所述肽化合物的所述游离胺处通过接头与所述肽化合物连接,其中所述游离胺是所述肽化合物的赖氨酸残基的游离胺。

16. 根据权利要求1所述的用途,其中所述B在所述肽化合物的所述N末端处通过接头与所述肽化合物连接。

17. 根据权利要求15所述的用途,其中所述接头选自琥珀酸和二甲基戊二酸。

18. 根据权利要求16所述的用途,其中所述接头选自琥珀酸和二甲基戊二酸。

19. 根据权利要求14所述的用途,其中所述共轭化合物由式(LI)表示:

GVRAKAGVRN(N1e)FKSESYC(aldoxorubicin)-式(LI)

其包含SEQ ID NO:23的肽化合物,其中半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子,或者

其包含SEQ ID NO:10的肽化合物,其中半胱氨酸残基被添加到所述肽化合物的C末端,并且其中所述半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子。

20. 根据权利要求14所述的用途,其中所述共轭化合物由式(LII)表示:

乙酰基-GVRAKAGVRN(N1e)FKSESYC(aldoxorubicin)-式(LII)

其包含SEQ ID NO:24的所述肽化合物,其中半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子,或者

其包含SEQ ID NO:15的肽化合物,其中半胱氨酸残基被添加到所述肽化合物的C末端,并且其中所述半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的用途,其中所述癌症是卵巢癌。

22. 根据权利要求1至20中任一项所述的用途,其中所述癌症是乳腺癌。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌(TNBC)。

24. 根据权利要求1至20中任一项所述的用途,其中所述药物与选自细胞毒素、抗癌肽、免疫调节剂和抗血管生成剂的治疗剂组合使用。

25. 根据权利要求1至20中任一项所述的用途,其中所述药物与选自毒素的治疗剂组合使用。

26. 根据权利要求1至20中任一项所述的用途,其中所述药物与抗PD1或抗PDL1组合使用。

27. 根据权利要求1至20中任一项所述的用途,其中所述药物与放射疗法组合使用。

28. 根据权利要求1至20中任一项所述的用途,其中所述癌症包含CD133阳性细胞。

用于靶向分拣蛋白受体和抑制血管生成拟态的方法和化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请主张2018年8月24日提交的美国临时申请第62/722,726号和2019年2月11日提交的美国临时申请第62/804,063号的优先权,上述两个申请以引用方式全文并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于靶向分拣蛋白受体和抑制血管生成拟态的方法和组合物。

背景技术

[0004] 根据世界卫生组织最近的一份报告,2012年有820万患者死于癌症(1)。因此,癌症在发展中国家和发达国家都是持续增长的健康问题。据估计,在未来二十年内,每年的癌症病例数将会增加(1)。癌症常用的一般治疗是手术、内分泌疗法、化疗和放疗(2)。然而,最近的一个希望被放在产生“靶向疗法”上,该靶向疗法着眼于癌细胞中的特定分子缺陷,有望成为比不精确的化疗剂更有效和毒性更低的疗法(3)。

[0005] 目前,当抗癌药物通过经典配方施用,据估计约95%的治疗剂被健康组织内的细胞吸收,而仅约2%-5%有效地到达肿瘤(4)。因此,任何未来成功的个性化治疗途径的挑战是部分通过抗癌药物向癌细胞隔室的主动运输来增加靶向疗法的选择性(5-6)。

[0006] 鉴于分拣蛋白在配体内化和细胞转运中的作用,可将其视为细胞自身的穿梭系统之一(11)。最近的研究表明,分拣蛋白在内吞和受体转运两者中具有双重作用,从而允许将配体从细胞表面分选至特定的亚细胞隔室,并转运神经营养因子前体(pro-neurotrophin),诸如神经肽神经降压素(NT)、proNGF和proBDNF(8,11-16)。分拣蛋白表达在包括乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、胰腺癌、皮肤癌和脑垂体癌在内的多种人类癌症中升高(17-20)。与健康卵巢组织相比,也有报告称分拣蛋白在卵巢癌中被过表达(21,22)。

[0007] 血管生成拟态与肿瘤恶性有关,包括侵袭和转移。血管生成拟态与更具侵袭性的肿瘤表型和癌症患者5年总生存率差有关(24)。血管生成拟态被描述为癌细胞可通过无内皮细胞机制建立替代血液灌注途径的过程(25,29)。此外,血管生成拟态也为癌细胞提供潜在的播散路线(42)。1999年,观察到在检测到红细胞的高侵袭性和转移性人类黑色素瘤中的图案化血管样通道结构(28)。通过光显微镜、透射电子显微镜或CD34和CD31内皮细胞标志物的免疫组织化学检测,均未在这些通道中检测到内皮细胞。

[0008] 血管生成拟态在肿瘤生长中起重要作用(42),并且其在卵巢癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、肉瘤和神经胶质瘤中也被类似表征(43,29,44)。生存分析表明,与未表现出血管生成拟态的肿瘤患者相比,肿瘤中具有血管生成拟态的患者的临床结局差。评价血管生成拟态对15种恶性肿瘤患者生存率影响的荟萃分析研究表明,血管生成拟态与更具侵袭性的肿瘤表型和差的5年总生存率相关(24,43)。近年来,据报道,癌症干细胞(CSC)和上皮向内皮转化(上皮细胞向间充质细胞转化亚型)可通过刺激癌细胞可塑性、细胞外基质重塑以及将血管生成拟态通道与宿主血管连接等方式来加速血管

生成拟态(45)。

[0009] 卵巢癌是最早描述血管生成拟态并与患者总生存率下降相关的癌症之一(43)。在120个卵巢癌样本中进行的回顾性研究表明,所有受试组织中有43%涉及血管生成拟态(46)。在同一研究中,在47%的卵巢癌组织中发现了CD133表达,这是癌症干细胞最可靠的细胞表面标记物之一。血管生成拟态和CD133阳性表达两者的存在与晚期肿瘤、高度恶性卵巢癌和化疗无反应性相关,导致卵巢癌患者预后不良。在乳腺癌中,据报道血管生成拟态在三阴性乳腺癌(TNBC)样本中最高(30)。在后一项研究中,在TNBC中,具有CSC特征的CD133+细胞与血管生成拟态相关。此外,在TNBC中,CD133表达和血管生成拟态有密切关系,因为据建议,TNBC来源的MDA-MB-231细胞内具有高度可塑性的CSC亚群在体外触发了血管生成拟态和3D管状结构的形成。

发明内容

[0010] 因此,第一方面是一种肽化合物,其与选自式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)和式(XII)的化合物的化合物具有至少60%的序列同一性:

[0011] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (SEQ ID NO:1)

[0012] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (SEQ ID NO:2)

[0013] $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (SEQ ID NO:3)

[0014] $YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4)

[0015] IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM (V) (SEQ ID NO:5)

[0016] IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY (VI) (SEQ ID NO:6)

[0017] IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK (VII) (SEQ ID NO:7)

[0018] GVQAKAGVINMFKSESY (VIII) (SEQ ID NO:8)

[0019] GVRAKAGVRNMFKSESY (IX) (SEQ ID NO:9)

[0020] GVRAKAGVRN(N1e)FKSESY (X) (SEQ ID NO:10)

[0021] YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL (XI) (SEQ ID NO:11)

[0022] YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL (XII) (SEQ ID NO:12)

[0023] YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL (XIII) (SEQ ID NO:13)

[0024] 其中

[0025] X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 和 X_{19} 独立地选自任何氨基酸;

[0026] X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 和 X_{21} 独立地选自Q、P、Y、I和L;

[0027] n是0、1、2、3、4或5;

[0028] 当 X_9 存在多于一次时,每个所述 X_9 独立地选自任何氨基酸;

[0029] 当 X_{19} 存在多于一次时,每个所述 X_{19} 独立地选自任何氨基酸;

[0030] 并且其中至少一个保护基团和/或至少一种标记剂任选地在N和/或C末端与所述肽连接,

[0031] 任选地,所述肽化合物是环状的,

[0032] 用于抑制血管生成拟态和/或治疗癌症。

[0033] 另一方面是一种肽化合物,其与选自式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)和式(XII)的化合物的化合物具有至少80%的序列同一性:

[0034] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (SEQ ID NO:1)

[0035] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (SEQ ID NO:2)

[0036] $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (SEQ ID NO:3)

[0037] $YKX_{18}LRR(X_{19})_NPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4)

[0038] $IKLSSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (V) (SEQ ID NO:5)

[0039] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (VI) (SEQ ID NO:6)

[0040] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (VII) (SEQ ID NO:7)

[0041] $GVQAKAGVINMFKSESY$ (VIII) (SEQ ID NO:8)

[0042] $GVRKAGVRNMFKSESY$ (IX) (SEQ ID NO:9)

[0043] $GVRKAGVRN(N1e)FKSESY$ (X) (SEQ ID NO:10)

[0044] $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL$ (XI) (SEQ ID NO:11)

[0045] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL$ (XII) (SEQ ID NO:12)

[0046] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL$ (XIII) (SEQ ID NO:13)

[0047] 其中

[0048] X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 和 X_{19} 独立地选自任何氨基酸;

[0049] X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 和 X_{21} 独立地选自Q、P、Y、I和L;

[0050] n是0、1、2、3、4或5;

[0051] 当 X_9 存在多于一次时,每个所述 x_9 独立地选自任何氨基酸;

[0052] 当 X_{19} 存在多于一次时,每个所述 X_{19} 独立地选自任何氨基酸;

[0053] 并且其中至少一个保护基团和/或至少一种标记剂任选地在N和/或C末端与所述肽连接,

[0054] 任选地,所述肽化合物是环状的,

[0055] 用于抑制血管生成拟态和/或治疗癌症。

[0056] 在一方面,提供一种化合物、肽化合物或其衍生物,其特异性结合具有SEQ ID NO: 25-50中任一项所示氨基酸序列、其类似物或其片段的多肽,用于抑制血管生成拟态。

[0057] 在一方面,提供一种靶向分选蛋白受体的化合物、肽化合物或其衍生物。

[0058] 在一方面,提供一种用于靶向分选蛋白受体的化合物、肽化合物或其衍生物。

[0059] 在一方面,提供一种化合物、肽化合物或其衍生物,其结合至少2个、任选地至少4个如SEQ ID NO:25-50中任一项所示的连续氨基酸残基、其类似物或其片段。

[0060] 在本文公开的另一方面,是一种具有式A-(B)_n的共轭化合物,

[0061] 其中

[0062] n是1、2、3或4;

[0063] A是在本公开中所定义的肽化合物,其中所述肽任选地被保护基团保护;并且

[0064] B是至少一种治疗剂,其中B与A连接,

[0065] 用于抑制血管生成拟态和/或治疗癌症。

- [0066] 在本文公开的另一方面,是一种具有式A-(B)_n的共轭化合物,
- [0067] 其中
- [0068] n是1、2、3或4;
- [0069] A是在本公开中所定义的肽化合物,其中所述肽化合物任选地被保护基团保护;并且
- [0070] B是至少一种治疗剂,其中B任选地在所述肽化合物的游离胺处、在所述肽化合物的N末端位置处、在所述肽化合物的游离-SH处或在所述肽化合物的游离羧基处与A连接,
- [0071] 用于抑制血管生成拟态和/或治疗癌症。
- [0072] 本文公开的另一方面是一种具有式A-(B)_n的共轭化合物,
- [0073] 其中
- [0074] n是1、2、3或4;
- [0075] A是在本公开中所定义的肽化合物,其中所述肽任选地被保护基团保护;并且
- [0076] B是至少一种治疗剂,其中B在所述肽化合物的赖氨酸残基的游离胺处任选地通过接头,或者在所述肽化合物的N末端位置处任选地通过接头与A连接,
- [0077] 用于抑制血管生成拟态和/或治疗癌症。
- [0078] 本文公开的另一方面是一种由式 (XXIII) 表示的共轭化合物:
- [0079] 乙酰基-GVRAK(多西他赛)AGVRN(N1e)FK(多西他赛)SESY-式 (XXIII)
- [0080] 其包含具有SEQ ID NO:15的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的多西他赛分子。
- [0081] 本文公开的另一方面是一种由式 (XXVIII) 表示的共轭化合物:
- [0082] 乙酰基-GVRAK(阿霉素)AGVRN(N1e)FK(阿霉素)SESY-式 (XXVIII)
- [0083] 其包含具有SEQ ID NO:15的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的阿霉素分子。
- [0084] 本文公开的另一方面是一种由式 (LII) 表示的共轭化合物:
- [0085] 乙酰基-GVRAKAGVRN(N1e)FKSESYC(aldoxorubicin)-式 (LII)
- [0086] 其包含具有SEQ ID NO:24的所述肽化合物,其中半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子,或者
- [0087] 其包含具有SEQ ID NO:15的所述肽化合物,其中半胱氨酸残基被添加到所述肽化合物的C末端,并且其中所述半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子。
- [0088] 本文公开的另一方面是选自式 (XVI) 和式 (XVII) 的化合物的共轭化合物:
- [0089] 乙酰基-GVRAK(姜黄素)AGVRN(N1e)FK(姜黄素)SESY-式 (XVI)
- [0090] 其包含具有SEQ ID NO:15的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的姜黄素分子;和
- [0091] 乙酰基-YK(姜黄素)SLRRK(姜黄素)APRWDAPLRDPALRQLL-式 (XVII)
- [0092] 其包含具有SEQ ID NO:16的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的姜黄素分子。
- [0093] 本文公开的另一方面是一种分离的抗体,其特异性结合具有SEQ ID NO:25-50中任一项所示氨基酸序列、其类似物或其片段的多肽,用于抑制血管生成拟态。
- [0094] 本文公开的另一方面是一种靶向分选蛋白受体的分离的抗体。

[0095] 本文公开的另一方便是一种用于靶向分选蛋白受体的分离的抗体。本文公开的另一方便是一种分离的抗体,其结合至少2个、任选地至少4个如SEQ ID NO:25-50中任一项所示的连续氨基酸残基、其类似物或其片段。

[0096] 本文公开的再一方面是一种具有式A' - (B)_n的共轭抗体,

[0097] 其中

[0098] n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12;

[0099] A' 是在本公开中所定义的分离的抗体,其中所述分离的抗体任选地被保护基团保护;并且

[0100] B是至少一种治疗剂,其中B任选地在所述分离的抗体的游离胺处、在所述分离的抗体的N末端位置处、在所述分离的抗体的游离-SH处或在所述分离的抗体的游离羧基处与A' 连接,

[0101] 用于抑制血管生成拟态。

[0102] 本文公开的再一方面,一种具有式A' - (B)_n的共轭抗体,

[0103] 其中

[0104] n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12;

[0105] A' 是在本公开中所定义的分离的抗体,其中所述分离的抗体任选地被保护基团保护;并且

[0106] B是至少一种治疗剂,其中B在所述分离的抗体的赖氨酸残基的游离胺处任选地通过接头,或者在所述分离的抗体的N末端位置处任选地通过接头与A' 连接,

[0107] 用于抑制血管生成拟态。

[0108] 在一方面,提供一种靶向分选蛋白受体的共轭抗体。

[0109] 在一方面,提供一种用于制备本公开中公开的共轭化合物或共轭抗体的过程,所述过程包含:

[0110] 使接头与所述至少一种治疗剂一起反应以获得中间体;

[0111] 任选地纯化所述中间体;

[0112] 使所述中间体与所述肽化合物一起反应以获得所述共轭化合物或共轭抗体,其中所述至少一种治疗剂通过所述接头与所述肽化合物或分离的抗体连接;以及

[0113] 任选地纯化所述共轭化合物或共轭抗体;

[0114] 其中所述至少一种治疗剂在赖氨酸残基的游离胺处或在N末端处与所述肽化合物或分离的抗体连接;并且其中所述肽化合物包含与其连接的1、2、3或4个治疗剂分子,或者分离的抗体包含与其连接的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个治疗剂分子。

[0115] 在一方面,提供一种抑制血管生成拟态的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

[0116] 在另一方面,提供一种抑制表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态的方法,所述方法包含使所述细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物接触。

[0117] 在另一方面,提供一种治疗癌症或侵袭性癌症的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

[0118] 还提供一种通过以下步骤制作分离的抗体的方法,其中所述分离的抗体特异性结合包含如SEQ ID NO:25-50中任一项所示的序列、其类似物或其片段的分离的多肽:i) 用免

疫原性形式的所述分离的多肽使动物免疫; ii) 筛选表达文库; 或 iii) 使用噬菌体展示。

[0119] 在一方面, 提供一种抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态的方法, 所述方法包含使所述癌组织细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物接触, 其中所述抑制血管生成拟态包含: 使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比未治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、约5%至约50%、约10%至约50%、约15%至约45%、约20%至约45%或约30%至约40%。

[0120] 在一方面, 提供一种抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态的方法, 所述方法包含使所述癌组织细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物接触, 其中所述抑制血管生成拟态包含: 使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、约5%至约50%、约10%至约50%、约15%至约45%、约20%至约45%或约30%至约40%。

[0121] 在一方面, 提供一种抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态的方法, 所述方法包含使所述癌组织细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物接触, 其中所述抑制血管生成拟态包含: 使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2、至少2.4倍、约1.2至约2.4倍或约1.2至约2.0倍。大至少2倍的减少意味着, 例如, 如果在用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态管长度减少10%, 则在用本文所述的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态管长度减少至少20%。

[0122] 在一方面, 提供一种抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态的方法, 所述方法包含使所述癌组织细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物接触, 其中所述抑制血管生成拟态包含: 使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2、至少2.4倍、约1.2至约2.4倍或约1.2至约2.0倍。大至少2倍的减少意味着, 例如, 如果在用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态环减少10%, 则在用本文所述的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态环减少至少20%。

[0123] 在一方面, 提供一种抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态的方法, 所述方法包含使所述癌组织细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物接触, 其中表达分选蛋白的细胞是免疫细胞, 任选地是巨噬细胞、CD4+、CD8+、B220+、骨髓来源的细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和细胞毒性T淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、T辅助1型(Th1)细胞。

[0124] 在一方面, 提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于抑制血管生成拟态的用途。

[0125] 在一方面, 提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于

靶向分选蛋白受体的用途。

[0126] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态的用途。

[0127] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于治疗癌症或侵袭性癌症的用途。

[0128] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于治疗癌组织或表达分选蛋白的细胞中的癌症或侵袭性癌症的用途。

[0129] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物在制造用于抑制血管生成拟态的医药中的用途。

[0130] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物在制造用于靶向分选蛋白受体的医药中的用途。

[0131] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物在制造用于抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态的医药中的用途。

[0132] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物在制造用于治疗癌症或侵袭性癌症的医药中的用途。

[0133] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物在制造用于治疗癌组织或表达分选蛋白的细胞中的癌症或侵袭性癌症的医药中的用途。

[0134] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比未治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、约5%至约50%、约10%至约50%、约15%至约45%、约20%至约45%或约30%至约40%。

[0135] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、约5%至约50%、约10%至约50%、约15%至约45%、约20%至约45%或约30%至约40%。

[0136] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2、至少2.4倍、约1.2至约2.4倍或约1.2至约2.0倍。

[0137] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2、至少2.4倍、约1.2至约2.4倍或约1.2至约2.0倍。

[0138] 在一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于抑制表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态,其中所述表达分选蛋白的细胞是免疫细胞,任选地是巨噬细胞、CD4+、CD8+、B220+、骨髓来源的细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和细胞毒性T淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、T辅助1型(Th1)细胞。

[0139] 在一方面,提供一种用于制备本公开中公开的共轭化合物或抗体共轭物的过程,所述过程包含:

[0140] 使接头与所述至少一种治疗剂一起反应以获得中间体;

[0141] 任选地纯化所述中间体;

[0142] 使所述中间体与所述肽化合物或分离的抗体一起反应以获得所述共轭化合物或抗体共轭物,其中所述至少一种治疗剂通过所述接头与所述肽化合物或分离的抗体连接;以及

[0143] 任选地纯化所述共轭化合物;

[0144] 其中所述至少一种治疗剂在赖氨酸残基的游离胺处或在N末端处与所述肽化合物或分离的抗体连接;并且其中所述肽化合物包含与其连接的1、2、3或4个治疗剂分子,或者分离的抗体包含与其连接的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个治疗剂分子。

[0145] 在另一方面,提供一种增加治疗剂的稳定性和/或生物利用度的方法,所述方法包含:

[0146] 获得本文公开的共轭化合物,其中所述共轭化合物包含所述治疗剂,以及

[0147] 将治疗有效量的所述共轭化合物施用于有需要的受试者。

[0148] 在另一方面,提供一种增加治疗剂的稳定性和/或生物利用度的方法,所述方法包含:

[0149] 使所述治疗剂与本文定义的肽化合物共轭以获得共轭化合物,以及

[0150] 将治疗有效量的所述共轭化合物施用于有需要的受试者。

[0151] 在另一方面,提供一种本文定义的共轭化合物用于增加所述至少一种治疗剂的稳定性和/或生物利用度的用途。

[0152] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物在制造用于抑制血管生成拟态的医药中的用途。

[0153] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物在制造用于靶向分选蛋白受体的医药中的用途。

[0154] 在另一方面,本文提供一种增加治疗剂的耐受性的方法,所述方法包含:

[0155] 使所述治疗剂与本文公开的肽化合物共轭以获得共轭化合物,以及

[0156] 将治疗有效量的所述共轭化合物施用于有需要的受试者。

[0157] 在另一方面,本文提供一种增加治疗剂的耐受性的方法,所述方法包含:

[0158] 获得本文公开的共轭化合物或抗体共轭物,其中所述共轭化合物或抗体共轭物包含治疗剂、接头,其中所述抗体共轭物靶向分选蛋白。

[0159] 将治疗有效量的所述共轭化合物或所述抗体共轭物施用于有需要的受试者。

[0160] 例如,提供一种本文公开的共轭化合物或抗体共轭物用于增加治疗剂的耐受性的用途。

[0161] 在另一方面,提供一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其包含本文定义的用于抑制血管生成拟态的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

[0162] 在另一方面,提供一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其包含本文定义的用于靶向分选蛋白受体的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

[0163] 在再一方面,提供一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其涂覆有本文定义的

用于抑制血管生成拟态的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

[0164] 在再一方面,提供一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其涂覆有本文定义的用于靶向分选蛋白受体的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

附图说明

[0165] 本公开的进一步的特征和优点将从下面对特定实施例的描述中变得更加显而易见,所述实施例通过所附方案和附图中的实例来说明,其中:

[0166] 图1是现有技术的表示,其描绘显示来自ref 24(n=3062个临床病例)的呈现血管生成拟态(VM)的人类癌症的百分比的图。血管生成拟态形成表达与晚期肿瘤、高度恶性癌和化疗无反应相关。在各种癌症中,血管生成拟态也与较短的总生存时间相关。缩写:BDMT:双向分化恶性肿瘤;HCC:肝细胞癌;NSCLC:非小细胞肺癌;OLSCC:口腔/喉鳞状细胞癌。

[0167] 图2是现有技术的表示,其描绘显示具有血管生成拟态(VM)的乳腺癌的百分比的图。在乳腺癌中,与管腔或HER2+阳性乳腺癌相比,在三阴性(TN)乳腺癌患者中血管生成拟态的存在最高。血管生成拟态可代表导致当前抗血管生成疗法未能完全根除肿瘤的重要生存机制(30)。

[0168] 图3是现有技术的表示,其显示使用SKOV3卵巢癌细胞(来自ref.31)的血管生成拟态的X射线显微断层摄影的体外3D重建。人工基底膜上卵巢癌细胞4天3D培养景观的重建图清晰可见,显示有管状外观的升高结构(板图a)。白色矩形内的结构在板图b和c中以更高的放大率显示,其中箭头表示在扁平细胞聚集体上方突出的看似管状的结构。显示此结构的横截面,以展示估计直径为50 μ m的充气空间(板图c)。

[0169] 图4显示使用表达绿色荧光蛋白(GFP)的SKOV3(来自ref.31)的血管生成拟态管状结构的现有技术共聚焦显微镜检查。板图a:共聚焦显微镜检查Z-叠层重建,展示存在含管状结构的细胞。Z-叠层显示连续的上层单层[1],以及具有中空中心的中心壁结构[2]和连续的下层单层[3]。板图b:计算机生成的横截面,清晰显示含管腔的管状结构。

[0170] 图5显示ES-2卵巢癌细胞形成3D管状结构。在种接在人工基底膜后4小时内,ES-2卵巢癌细胞中的管样结构迅速形成并被观察到。

[0171] 图6A、图6B、图6C和图6D显示,在ES-2卵巢癌细胞的3D管状结构中检测到分选蛋白。更具体地说,图6A显示种接在人工基底膜上的ES-2卵巢癌细胞。12小时后,使用兔抗分选蛋白抗体通过共聚焦显微镜检查在3D管状结构中检测到分选蛋白。图6B显示仅具有二次抗兔抗体的对照。总体结果表明,(图6A)中的分选蛋白检测是特异性的。图6C和图6D显示,在用于抗SORT1和二次抗体检测的条件下,3D管状结构中的ES2癌细胞核出现DAPI染色。

[0172] 图7A和图7B显示分选蛋白基因沉默对血管生成拟态形成的影响。ES-2卵巢癌细胞用加扰siRNA(siScrambled)或特异性SORT1 siRNA(siSORT1)转染,并种接在人工基底膜上。12小时后,在用加扰siRNA转染的ES-2癌细胞中观察到3D管状结构。用特异性SORT1 siRNA转染的ES-2不形成3D管状结构。通过Wimasis图像分析软件对总管长度和总环数进行量化,结果表明,当分选蛋白表达由于siSORT1减少时(n=4),这些结构受到的抑制超过90%。

[0173] 图8A和图8B显示阿霉素共轭化合物(DoxKA)对血管生成拟态的影响。更具体地说,图8A显示在增加DoxKA、阿霉素或阿霉素脂质体(包封在脂质体中的阿霉素)的浓度的情况

下,将ES2卵巢癌细胞种接在人工基底膜上。12小时后,3D管状结构被DoxKA抑制,而不是被阿霉素或阿霉素脂质体单独抑制。图8B显示通过Wimasis图像分析软件软件对总环数和总管长度的量化,并且这些结构在DoxKA的低nM浓度下受到抑制。

[0174] 图9显示Aldoxorubicin共轭化合物(AldoxKA)对血管生成拟态的影响。阿霉素衍生物Aldoxorubicin通过对酸性pH敏感的接头共轭在Katana肽上。在AldoxKA浓度增加的情况下,将ES-2卵巢癌细胞种接在人工基底膜上。12小时后,3D管状结构被AldoxKA抑制,而不是被阿霉素单独抑制(参见图8)。

[0175] 图10A和图10B显示多西他赛共轭化合物(DoceKA)对血管生成拟态的影响。在多西他赛或DoceKA存在的情况下,将ES-2卵巢癌细胞种接在人工基底膜上。12小时后,在多西他赛当量浓度下,DoceKA显示出对3D管状结构的抑制作用比多西他赛单独使用时更强(600pM;图10A)。对总环数和总管长度的量化显示出这些结构在DoceKA的低nM浓度下受到抑制(图10B)。

[0176] 图11显示姜黄素共轭化合物(CurKA)对血管生成拟态的影响。在姜黄素或CurKA存在的情况下,将ES-2卵巢癌细胞种接在人工基底膜上。12小时后,在姜黄素当量浓度下,CurKA显示出对3D管状结构的抑制作用比姜黄素单独使用时更强。总环数和总管长度显示出这些结构在CurKA的nM浓度下受到抑制。

[0177] 图12显示抗分拣蛋白(抗SORT1)mAb对血管生成拟态的抑制作用。在载体(对照)、小鼠IgG(12nM)或抗SORT1 mAb(12nM)存在的情况下,将ES-2卵巢癌细胞种接在人工基底膜上。在4小时和12小时后拍摄图像。抗SORT1 mAb抑制3D管状结构的形成,并且对总管长度和环数产生强烈影响(n=2)。

[0178] 图13A、图13B、图13C和图13D表示一系列图表,其显示抗SORT1 mAb与ES-2卵巢癌细胞的结合和内化。图13A显示使用英杰公司(Invitrogen)的Alexa Fluor488蛋白标记试剂盒进行抗分拣蛋白抗体标记。将人ES-2卵巢癌细胞与抗分拣蛋白-Alexa488(1 μ g/ml)在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后进行胰蛋白酶化或不进行胰蛋白酶化,以评估细胞表面的结合。结果清楚地表明,荧光信号的主要部分是由与细胞表面的分拣蛋白受体结合引起的,因为胰蛋白酶化使荧光水平降低了超过90%。图13B显示在分拣蛋白配体(神经降压素(NT)和颗粒蛋白前体(PGRN))存在以及Katana肽(KBP106和KBP201)存在的情况下,进行抗分拣蛋白-Alexa488(1 μ g/ml,30分钟)在人ES-2卵巢癌细胞的细胞表面的结合。图13C显示抗分拣蛋白抗体内化至ES-2癌细胞中。在本实验中,首先在4 $^{\circ}$ C下进行抗分拣蛋白-Alexa488抗体(1 μ g/ml,30分钟)在人ES-2卵巢癌细胞上的结合,然后洗涤细胞以除去未结合的荧光抗体,并且将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育1或2小时,然后胰蛋白酶化。然后通过流式细胞术对与内化的荧光抗-分拣蛋白-Alexa488相关的荧光进行量化。结果表明,约50%最初结合在细胞表面上的抗分拣蛋白-Alexa488在2小时内被内化。图13D显示如在图13C中所述在浓度增加的情况下测量抗-分拣蛋白-Alexa488的内化。结果表明,抗分拣蛋白-Alexa488荧光共轭物的内化随着荧光共轭物浓度的增加而增加,并且是可饱和的。

[0179] 图14显示分拣蛋白的不同区域和产生本公开中使用的抗分拣蛋白抗体的区域的示意图。

[0180] 图15显示抗分拣蛋白抗体对卵巢癌细胞血管生成拟态的抑制作用。抗分拣蛋白(抗SORT1)mAb对血管生成拟态的抑制作用。在载体(对照)、小鼠IgG(12nM)或抗SORT1 mAb#

1 (12nM) 或抗SORT1 mAb#2 (12nM) 存在的情况下,将ES-2卵巢癌细胞种接在人工基底膜上。在抗体治疗0小时和12小时后拍摄图像。结果表明抗SORT1 mAb抑制3D管状结构的形成,并且对总管长度和环数产生强烈影响(n=2)。

[0181] 图16A和图16B显示抗分拣蛋白抗体对ES-2卵巢癌细胞血管生成拟态的影响。更具体地说,图16A显示抗分拣蛋白mAb#1和#2减少血管生成拟态环的总数。图16B显示抗分拣蛋白mAb#1和#2降低总血管生成拟态管长度。针对分拣蛋白胞外氨基酸序列(300-422)产生的抗分拣蛋白mAb#2强烈抑制血管生成拟态。

[0182] 图17A、图17B、图17C和图17D显示正常细胞和乳腺癌细胞中分拣蛋白表达的组织学特征以及MDA-MB-231细胞中Alexa488标记的KA-肽摄取评估。更具体地说,图17A是免疫组织化学技术,其显示正常相邻组织中缺乏分拣蛋白表达,和其在阶段IIIC浸润性导管癌(IDC)和淋巴结转移癌(LNMC)中过度表达。使用IS法评价分拣蛋白染色强度。图17B显示分拣蛋白在正常组织与IDC和LNMC乳腺肿瘤中的分布。图17C说明分拣蛋白的基因沉默是如方法部分所述进行的,并通过使用抗SORT1抗体的免疫印迹法进行验证。然后在对照组(siScrambled)或分拣蛋白缺陷型(siSORT1)MDA-MB-231癌细胞中进行200nM Alexa488标记的KA-肽的摄取。图17D描绘在MDA-MB-231细胞中,在过量的未标记的KA-肽(50 μ M)、神经降压素(10 μ M)或颗粒蛋白前体(1nM)不存在(白条)或存在(黑条)的情况下,也对200nmAlexa488标记的KA-肽的摄取进行了评价。

[0183] 图18A说明多西他赛-Katana肽共轭物的合成。在搅拌下将二异丙基乙胺(DIEA; 0.21 ml, 1.2mmol)滴加至多西他赛(0.81g, 1.0mmol)和琥珀酸酐(105mg, 1.05mmol)在DMSO(5ml)中的悬浮液中。将混合物在室温下搅拌,并通过UPLC-MS来监测。2小时后,反应完成。除去溶剂,并且将所得残留物溶于二氯甲烷中,并装填在拜泰齐(Biotage)硅胶柱上进行纯化。冻干后得到白色粉末形式的DoceSuOH, UPLC-MS纯度>95%。向DoceSuOH(213mg, 0.234mmol)和TBTU(75mg, 0.234mmol)在DMSO(3-4ml)中的溶液中滴加DIEA(0.234mmol),以预激活DoceSuOH。通过UPLC-MS监测预激活的完成情况,然后加入KA-肽(120mg, 0.062mmol)在二甲基亚砜(0.2ml)中的溶液。将混合物在室温下搅拌。通过UPLC-MS监测反应,直至完成。使用3ORPC树脂柱和AKTA纯化器系统(10%至80%ACN)来纯化反应混合物,以在冻干后得到白色粉末形式的KA(SuDoce)₂或DoceKA。图18B说明通过UPLC-MS纯度评价的共轭物纯度大于95%。

[0184] 图19描绘使用[³H]-胸苷并入测定确定的DoceKA对MDA-MB-231乳腺癌细胞的体外抗癌性质。针对每种药物浓度,绘制了并入的[³H]-胸苷图。使用GraphPad Prism软件计算IC₅₀值(nM)。DoceKA的IC₅₀值为0.38nM,并且多西他赛的IC₅₀值为0.68nM。图19是一组图表,其描绘在用2 μ M多西他赛或1 μ M DoceKA治疗24小时后,使用流式细胞术基于细胞DNA含量确定的MDA-MB231细胞的细胞周期分布。

[0185] 图20A和图20B说明分拣蛋白基因沉默对DoceKA的抗迁移潜力的影响。更具体地说,图20A描绘多西他赛对MDA-MB-231细胞迁移的影响,并且图20B描绘在分拣蛋白的SiRNA介导的基因沉默后,DoceKA对MDA-MB-231细胞迁移的影响。将转染的细胞与DoceKA(1 μ M)或非共轭多西他赛(2 μ M)预孵育2小时。然后收获细胞,并且使用Xcelligence仪器实时评估其迁移潜力。

[0186] 图21A、图21B和图21C说明多西他赛和DoceKA共轭物在MDA-MB-231细胞中的细胞

死亡诱导作用。用对照(载体)或增加浓度的多西他赛或DoceKA治疗MDA-MB-231细胞5小时。然后收获细胞,并在用膜联蛋白V-FITC和碘化丙啶(PI)染色后确定凋亡率。通过流式细胞术对细胞进行分析。更具体地说,图21A描绘用对照(载体)、10 μ M多西他赛或5 μ M DoceKA治疗MDA-MB-231细胞24小时,并且在光显微镜下检查细胞形态。图21B是显示基于不同浓度的DoceKA和多西他赛的凋亡细胞死亡百分比的线图。图21C描绘在MDA-MB-231细胞中,过量的游离KA-肽(50 μ M)或分拣蛋白配体、神经降压素(10 μ M)或颗粒蛋白前体(1nM)会竞争DoceKA的摄取。孵育5小时后,对细胞进行膜联蛋白V-FITC/PI染色,如图21A所示。

[0187] 图22A和图22B说明DoceKA在MDA-MB-231细胞中诱导细胞死亡的分子机制。图22A说明免疫印迹实验,该免疫印迹实验显示经多西他赛和DoceKA治疗后MDA-MB-231细胞中IL-6、生存素、Bcl-xi和突变p53的表达水平。使用GAPDH作为对照。图22B数据代表三个独立实验,并且条形图显示与GAPDH相比,IL-6、生存素、Bcl-xL和p53表达的光密度量化。将对照组的平均值设定为1.0。

[0188] 图23A和图23B描绘DoceKA对微管蛋白聚合的影响。更具体地说,图23A说明用载体(DMSO)、2 μ M多西他赛或1 μ M DoceKA治疗24小时、用抗 α -微管蛋白抗体固定和免疫染色并使用共聚焦显微镜成像的细胞。用DAPI对DNA进行染色,并且使用共聚焦显微镜将细胞可视化展示每种条件下的代表性细胞。图23B说明,在基于荧光的聚合测定中,在体外检查多西他赛(2 μ M)和DoceKA(1 μ M)对纯化微管蛋白聚合的影响。分别添加紫杉醇(2 μ M)和长春花碱(2 μ M)作为微管蛋白聚合剂和微管蛋白解聚剂的对照。微管蛋白组装成微管是由荧光发射(Ex. 340-360nm \pm 20nm; Em. 410-460nm \pm 20nm)的增加决定的。

[0189] 图24A描绘未经治疗(载体)、经多西他赛治疗(多西他赛)或经多西他赛共轭物治疗(DoceKA)后的残留肿瘤负荷。图24B说明未经治疗、经多西他赛治疗或经DoceKA治疗14天后和治疗74天后的肿瘤大小。图24C说明经多西他赛或DoceKA治疗74天后的残留肿瘤负荷。

[0190] 图25A和图25B描绘DoceKA对MDA-MB231 TNBC异种移植模型的影响。更具体地说,图25A描绘经多西他赛或DoceKA治疗后小鼠的肿瘤体积。接受多西他赛治疗的小鼠按15mg/kg/周(MTD)接受3次治疗。接受DoceKA治疗的小鼠按照多西他赛的当量剂量接受5次治疗。图25B描绘经多西他赛或DoceKA治疗后不同时间点的小鼠体重。接受多西他赛治疗的小鼠按15mg/kg/周(MTD)接受3次治疗。接受DoceKA治疗的小鼠按照多西他赛的当量剂量接受5次治疗。由于毒性(体重:-25%),在第15天处死了一只小鼠。

[0191] 图26A和图26B描绘MDA-MB231 TNBC模型的DoceKA剂量反应。更具体地说,图26A说明经不同剂量的DoceKA治疗后对肿瘤体积的影响。图26B描绘治疗后第15天不同剂量的DoceKA对肿瘤体积进展的影响。

[0192] 图27A、图27B和图27C展示DoceKA对裸鼠血细胞没有影响。图27A说明用不同浓度的多西他赛或DoceKA进行3次治疗后对淋巴细胞的影响。图27B说明用不同浓度的多西他赛或DoceKA进行3次治疗后对血小板的影响。图27C说明用不同浓度的多西他赛或DoceKA进行3次治疗后对中性粒细胞的影响。IP表示腹膜内施用,而IV表示静脉内递送。

[0193] 图28描绘DoceKA的初步毒性数据,具体来说在不同剂量的多西他赛或DoceKA进行DoceKA治疗后的中性粒细胞计数(g/L)。以最大耐受剂量单次注射四天后,多西他赛诱导中性粒细胞计数急剧减少;而即使在六次DoceKA注射后,中性粒细胞计数仍保持在正常范围内。

[0194] 图29A说明按进行性时间间隔计算的DoceKA和释放的多西他赛(BDL)的血浆浓度。图29B说明CD-1小鼠中的PK。向小鼠静脉施用DoceKA(20mg/kg)。在不同时间点采集血浆。用乙腈提取DoceKA和释放的多西他赛。DoceKA和释放的多西他赛使用紫杉醇作为内标物,通过UPLC/MS进行量化:直接注射2 μ l和10 μ l的上清液用于DoceKA和多西他赛,无需冻干。在0.083、0.25和4小时的时间,释放的多西他赛浓度低于多西他赛的量化限值(LOQ)。多西他赛剂量为20mg/kg时,报告的C最大为约20 μ g/ml或25 μ M。

[0195] 图30说明通过免疫组织化学分析的分拣蛋白在人卵巢癌和正常组织中的表达。分拣蛋白表达从正常细胞、向良性细胞、向交界线细胞、向恶性细胞、向转移细胞逐渐增加。

[0196] 图31A说明使用免疫组织化学测量的分拣蛋白在人卵巢癌和正常组织中的表达。图31B描绘正常、良性、低度恶性浆液性癌、高度恶性浆液性癌、透明细胞癌、粘液性癌、子宫内膜样癌、移行细胞癌、交界性、转移性细胞以及生殖细胞和其他非上皮细胞的分拣蛋白表达。

[0197] 图32说明人卵巢癌分拣蛋白基因在cDNA组织微阵列(傲锐基因(Origen))中的表达。具体来说,它使用qPCR量化说明分拣蛋白基因在健康组织和I至IV级卵巢肿瘤中的表达。

[0198] 图33A是暴露于抗SORT1 mAB的正常乳腺组织和乳腺癌组织的一系列免疫组织化学图像。图33B描绘分拣蛋白在正常组织、浸润性导管癌和淋巴结转移癌组织中的表达。

[0199] 图34描绘浸润性导管癌(阶段IIIC)、相关淋巴结转移和相邻正常组织的三种不同患者的免疫组织化学图像。用抗SORT1 mAB染色IHC样本。

[0200] 图35A描绘黑色素瘤中分拣蛋白的免疫组织化学图像。具体来说,图像显示在正常组织和黑色素瘤II、II和IV阶段肿瘤中的分拣蛋白。图35B以条形图形式描绘分拣蛋白在正常组织和I至IV阶段黑色素瘤组织中的表达。

[0201] 图36是显示分拣蛋白在正常组织和黑色素瘤II、II和IV阶段肿瘤中的一系列图像。

[0202] 图37A和图37B描绘分拣蛋白在子宫癌中的免疫组织化学。更具体地说,图37A由分拣蛋白在正常组织、子宫内膜癌组织和宫颈癌组织中的图像组成。图37B是分拣蛋白在正常组织、子宫内膜癌组织和宫颈癌组织中表达的图示。

[0203] 图38A和图38B描绘分拣蛋白在肺癌中的免疫组织化学。更具体地说,图38A由分拣蛋白在正常肺组织和癌性肺组织中的图像组成。图38B是分拣蛋白在正常肺组织和癌性肺组织中表达的图示。

[0204] 图39是说明分拣蛋白在几种不同癌细胞系(卵巢癌、乳腺癌、脑癌和其他癌症)中的表达的一系列免疫印迹图像。

[0205] 图40A和图40B描绘OVCAR-3卵巢癌细胞中3D管状结构的共聚焦显微镜成像。使用兔抗分拣蛋白抗体检测分拣蛋白。更具体地说,图40A是三面嵌板,第一幅图像描绘细胞中存在的分拣蛋白的染色,第二幅图像描绘细胞核的赫斯特(Hoechst)染色,并且最后一幅图像描绘合并的前两幅图像。图40B是三面嵌板,第一幅图像描绘细胞中存在的对照抗体的染色,第二幅图像描绘细胞核的赫斯特染色,并且最后一幅图像描绘合并的前两幅图像。这些结果表明,分拣蛋白阳性细胞有助于体外血管生成拟态。

[0206] 图41A、图41B和图41C说明多西他赛共轭化合物(DoceKA)对ES-2卵巢癌细胞中血

管生成拟态的抑制作用。更具体地说,图41A说明当存在不同浓度的多西他赛或DoceKa时存在的总环。图41B说明当存在不同浓度的多西他赛或DoceKa时存在的总管长度。图41C说明当存在不同浓度的多西他赛或DoceKa时存在的分支点的百分比。这些图说明,低pM浓度的DoceKA抑制ES-2卵巢癌细胞的血管生成拟态。

[0207] 图42A、图42B、图42C、图42D、图42E和图42F描绘分拣蛋白基因沉默对TNBC来源的MDA-MB231细胞中体外血管生成拟态的影响。更具体地说,图42A说明在0小时用加扰siRNA (siScrambled) 瞬时转染的MDA-MB231细胞。图42B说明在0小时用特异性分拣蛋白siRNA (siSortilin) 瞬时转染的MDA-MB231细胞。图42C说明在24小时用加扰siRNA (siScrambled) 瞬时转染的MDA-MB231细胞。图42D说明在24小时用特异性分拣蛋白siRNA (siSortilin) 瞬时转染MDA-MB231细胞。图42E是描绘在24小时内siScrambled和siSortilin细胞的总环百分比的条形图。图42F是描绘在24小时内siScrambled细胞和siSortilin细胞的平均环面积百分比的条形图。

[0208] 图43A和图43B描绘DoceKA对MDA-MB231血管生成拟态的抑制。更具体地说,图43A说明向细胞施用的不同浓度的多西他赛(上板图)和DoceKa(下板图)的效果。图43B是说明当暴露于不同浓度的多西他赛和DoceKA时细胞中存在的总环数的图。

[0209] 图44A说明ES-2卵巢癌细胞在0、2、6、12和24小时的血管生成拟态。图44B描绘0、2、6、12和24小时分拣蛋白(SORT1)、CD133和MMP9的基因表达。CD133是从肿瘤中分离癌症干细胞(CSC)群体最常用的标志物之一。CD133+癌细胞(CSC)与血管生成拟态形成、局部区域复发和远转移呈正相关。

[0210] 图45A说明MDA-MB-231 TNBC细胞在0、2、6、12和24小时的血管生成拟态。图45B描绘0、2、6、12和24小时分拣蛋白(SORT1)、CD133和MMP9的基因表达。

[0211] 图46A和图46B描绘抗分拣蛋白抗体对ES-2卵巢癌细胞中血管生成拟态的抑制。更具体地说,图46A描绘在兔IgG、抗SORT1兔pAb、小鼠IgG和抗SORT1小鼠mAb存在的情况下,ES-2卵巢癌细胞在12小时后拍摄的图像。图46B说明暴露于兔IgG、抗分拣蛋白兔pAb、小鼠IgG和抗分拣蛋白mAb的细胞在第12小时出现的总环数。抗SORT1 mAb抑制3D管状结构的形成,并且对总管长度和环数产生强烈影响。

[0212] 图47描绘在不同浓度的对照或抗SORT1抗体存在的情况下在0和12小时ES-2细胞卵巢癌细胞的嵌板图像。

[0213] 图48A和图48B说明抗分拣蛋白对ES-2卵巢癌细胞中血管生成拟态的影响。图48A描绘在不同浓度的抗SORT1抗体下细胞中存在的总环数。图48B说明与未暴露于抗分拣蛋白的对照组相比,暴露于不同浓度的抗SORT1抗体的细胞的增殖百分比。

[0214] 图49是说明ES-2卵巢癌细胞在暴露0和24小时的时间单独暴露于不同浓度的Katana肽(KBP106)的嵌板图像。在与用于Katana共轭物相同的实验条件下,肽(KBP106)在50 μ M下对血管生成拟态没有显著影响。

[0215] 图50是说明暴露于KBP106肽和阿霉素共轭物(KBB106)的ES-2卵巢癌细胞的嵌板图像。图50描绘ES-2卵巢癌细胞在暴露0和24小时的时间暴露于不同浓度的KBP106肽和KBB106的图像。添加过量的KBP106被示出会逆转由KBB106引起的血管生成拟态抑制。尽管KBP106对血管生成拟态没有影响,但向KBB106中添加KBP106会防止KBB106对血管生成拟态的抑制,这表明KBP106通过与分拣蛋白结合会防止KBB106与受体相互作用。

[0216] 图51描绘暴露于分拣蛋白配体、神经降压素和颗粒蛋白前体的ES-2卵巢癌细胞在暴露于每种配体0和12小时的图像。此图表明,分拣蛋白配体、神经降压素和颗粒蛋白前体不影响血管生成拟态。

[0217] 图52是说明暴露于KBB106共轭物以及神经降压素配体或颗粒蛋白前体配体的ES-2卵巢癌细胞在暴露0和12小时的嵌板图像。这些图像表明,分拣蛋白配体、神经降压素和颗粒蛋白前体的加入逆转KBB106共轭物的血管生成拟态抑制。

[0218] 图53A、图53B、图53C、图53D和图53E由裸鼠中的ES-2异种移植肿瘤的组织切片图像组成。它们是在40X下的单个标记的实例。图53A说明CASPASE-3的标记;图53B说明PAS的标记;图53C说明Ki-67的标记;图53D说明小鼠CD31的标记;并且图53E说明CD133的标记。

[0219] 图54显示通过免疫组织化学分析的血管生成拟态识别的实例。PAS阳性和CD31阳性表明在图像中标识为“血管”的小鼠脉管系统正常。PAS阳性和CD31阴性表明在图像中标识为“VM”的血管生成拟态。

[0220] 图55A、图55B和图55C由描绘小鼠CD31-PAS (图55A)、分拣蛋白-PAS (图55B)和CD133-PAS (图55C)染色的ES-2肿瘤组织的图像板图组成。所有图均描绘染色组织的四个逐渐放大的图像。在图55A中,血管被标识为“血管”,并且血管生成拟态由“VM”来标识。

[0221] 图56A、图56B和图56C由描绘分别针对小鼠CD31-PAS (图56A)、分拣蛋白-PAS (图56B)和CD133-PAS (图56C)染色的ES-2肿瘤组织的图像板图组成。所有图均描绘染色组织的四个逐渐放大的图像。在图56A中,血管用词“血管”来标识,而血管生成拟态由用词“VM”来标识。

[0222] 图57A、图57B和图57C由描绘小鼠CD31-PAS (图57A)、分拣蛋白-PAS (图57B)和CD133-PAS (图57C)染色的ES-2肿瘤组织的图像组成。这些图展示血管生成拟态中的分拣蛋白和CD133免疫组织化学检测。

[0223] 图58是在非变性条件下的免疫印迹分析图像,其说明分拣蛋白存在于各种三阴性乳腺癌(TNBC)细胞系(MDA-MB 231、MDA-MB 468、MDA-MB 157、DU4475、HCC70、BT-20)以及ES-2卵巢癌细胞系中。

[0224] 图59A和图59B说明可以形成3D管状结构的BT-20TNBC癌细胞的另一实例。更具体地说,图59A描绘在形成血管生成拟态结构之前的20,000个BT-20TNBC癌细胞,而图59B描绘形成血管生成拟态结构后的相同细胞。

具体实施方式

[0225] 本文所用的术语“肽化合物”或“Katana肽”、“Katana生物制药肽”或“KBP”指例如源自细菌蛋白或源自靶向癌细胞(包括多药耐药癌细胞)上表达的受体的配体的肽。例如,肽化合物可以源自参与细胞渗透的细菌蛋白或源自分拣蛋白配体,例如颗粒蛋白前体和神经降压素。例如,肽化合物可以是环状的。在某些实施例中,肽化合物与至少一种治疗剂(诸如抗癌剂或植物化学物质)连接(例如通过共价键、原子或接头),从而形成可用于例如治疗癌症或侵袭性癌症的共轭化合物。在某些其他实施例中,肽化合物可用于脂质体的表面。例如,肽化合物可用于包覆脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,该脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒可装载有至少一种治疗剂(诸如抗癌剂或植物化学物质,或基因或siRNA)。

[0226] 术语“Katana生物制药肽家族1肽化合物”或“KBP家族1肽化合物”是指源自细菌细胞渗透蛋白的肽化合物。例如，KBP家族1肽化合物可源自氨基酸序列为IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM (SEQ ID NO:5)的蛋白。KBP家族1肽化合物的非限制性实例如下所示：

[0227] 氨基酸序列

KBP-101 IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM - 式 (V) (由 SEQ ID NO: 5 表示)

KBP-102 琥珀酰基-IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY - 式 (XXXVI) (包括 SEQ ID NO: 6, 其中琥珀酰基附着在 N 末端处)

[0228] KBP-103 IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK(生物素) - 式 (XXXVII) (包括 SEQ ID NO: 7, 其中生物素分子在 C 末端处与其连接)

KBP-104 GVQAKAGVINMFKSESY - 式 (VIII) (由 SEQ ID NO: 8 表示)

KBP-105 乙酰基-GVRAKAGVRNMFKSESY - 式 (XXXVIII) (由 SEQ ID NO: 14 表示)

KBP-106 乙酰基-GVRAKAGVRN(N1e)FKSESY - 式 (XXXIX) (由 SEQ ID NO: 15 表示)

[0229] 如本文所用的肽化合物KBP-101由IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列表示。

[0230] 如本文所用的肽化合物KBP-102由琥珀酰基-IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY的氨基酸序列表示,其包含SEQ ID NO:6的肽序列,其中琥珀酰基基团在N末端处与其附接。

[0231] 如本文所用的肽化合物KBP-103由IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK(生物素)的氨基酸序列表示,其包含SEQ ID NO:7的肽序列,其中生物素分子在C末端处与其连接。

[0232] 如本文所用的肽化合物KBP-104由GVQAKAGVINMFKSESY (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列表示。

[0233] 如本文所用的肽化合物KBP-105由乙酰基-GVRAKAGVRNMFKSESY (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列表示。

[0234] 如本文所用的肽化合物KBP-106由乙酰基-GVRAKAGVRN(N1e)FKSESY (SEQ ID NO:15)的氨基酸序列表示。

[0235] 术语“Katana生物制药肽家族2肽化合物”或“KBP家族2肽化合物”是指源自分拣蛋白配体、颗粒蛋白前体和神经降压素的肽。例如,肽可以源自人、大鼠或小鼠的颗粒蛋白前体。例如,KBP家族2肽化合物可以源自人颗粒蛋白前体,例如具有氨基酸序列KCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL (SEQ ID NO:19),源自大鼠颗粒蛋白前体,例如具有氨基酸序列KCLRKKTPrWDILLRDPAPRPLL (SEQ ID NO:20),源自小鼠颗粒蛋白前体,例如具有氨基酸序列KCLRKKIPRWDMLRDPVPRPLL (SEQ ID NO:21),或源自神经降压素,例如具有氨基酸序列XLYENKPRRPYIL (SEQ ID NO:22)。KBP家族2肽化合物的非限制性实例如下所示：

[0236] 氨基酸序列

KBP-201 乙酰基-YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL - 式 (XXXX) (由 SEQ ID NO: 16 表示)

[0237] KBP-202 乙酰基-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL - 式 (XXXXI) (由 SEQ ID NO: 17 表示)

KBP-203 乙酰基-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL - 式 (XXXXII) (由 SEQ ID NO: 18 表示)

[0238] 如本文所用的肽化合物KBP-201由乙酰基-YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL (SEQ ID NO:16)的氨基酸序列表示。

[0239] 如本文所用的肽化合物KBP-202由乙酰基-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL (SEQ ID

NO:17)的氨基酸序列表示。

[0240] 如本文所用的肽化合物KBP-203由乙酰基-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL (SEQ ID NO:18)的氨基酸序列表示。

[0241] 如本文所用的术语“分拣蛋白”或“分拣蛋白受体”是指由SORT1基因编码的神经元1型膜糖蛋白,属于空泡蛋白分选10蛋白(Vps10)受体家族。分拣蛋白(又称神经降压素受体3;登录号NP_002950,通过引入并入本文)在中枢神经系统和外周神经系统中大量表达,并且在其他类型的组织中也表达。例如,分拣蛋白的表达在许多癌症中上调,包括例如卵巢癌、乳腺癌、结肠癌和前列腺癌。编码的前体蛋白被弗林蛋白酶蛋白水解加工,从而生成分子量为100-110kDa的成熟受体。还描述分拣蛋白(95kDa)的截短形式和可溶形式,与其大的管腔结构域(即,胞外结构域或胞外域)相对应,其先前已在来自分拣蛋白过表达细胞的上清液培养基中被检测到(48)。本文引用的分拣蛋白的氨基酸残基对应于全长形式的位置(即,登录号NP_002950)。分拣蛋白的胞外结构域位于全长形式的氨基酸残基78-755处。本文所述的肽化合物、共轭化合物、抗体和共轭抗体可对分拣蛋白具有高结合亲和力,并且因此可特异性靶向表达或过表达分拣蛋白的癌细胞。

[0242] 本文件中使用的术语“化合物”是指式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)、(XI)、(XII)、(XIII)、(XIV)、(XV)、(XVI)、(XVII)、(XIX)、(XXIII)、(XXVI)、(XXVIII)、(LI)、(LII)的化合物或这些化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物和/或前药、这些后一种化合物的异构体或这些后一种化合物的外消旋混合物,和/或用本公开中先前指出的此类化合物制成的组合物。表达“化合物”也指本文公开的各种化合物的混合物。

[0243] 本公开的化合物包括前药。一般来说,此类前药将是这些化合物的功能性衍生物,其在体内容易转化为其理论上来源的化合物。本公开化合物的前药可以是与可用的羟基或氨基形成的常规酯。例如,本公开化合物中的可用OH或氮可以在碱存在下和任选地在惰性溶剂(例如,吡啶中的酰氯)中使用激活酸来酰化。已经用作前药的一些常见酯是苯基酯、脂族(C₈-C₂₄)酯、酰氧基甲酯、氨基甲酸酯和氨基酸酯。在某些情况下,本公开化合物的前药是其中化合物中的一个或多个羟基被掩蔽为可在体内转化为羟基的基团的那些。选择和制备合适前药的常规程序在例如“前药设计(Design of Prodrugs)”H. Bundgaard编辑,爱思唯尔(Elsevier),1985中描述。

[0244] 本公开的化合物包括放射性标记形式,例如,通过并入在结构²H、³H、¹⁴C、¹⁵N或放射性卤素(诸如¹²⁵I)中而标记的化合物。本公开化合物的放射性标记化合物可使用本领域已知的标准方法制备。

[0245] 如本文使用的术语“类似物”包括本公开氨基酸的部分、延伸、取代、变体、修饰或化学等价物及其衍生物,其以基本相同的方式执行与本公开的肽或抗原基本相同的功能。例如,本公开的肽和抗原的类似物包括但不限于保守氨基酸取代。本公开的肽和抗原的类似物还包括对本公开的肽和抗原的添加和缺失。

[0246] 如本文所用的“保守氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基被另一个氨基酸残基取代而不消除肽或抗原的所需性质的取代。

[0247] 当提及化合物时,如本文所用的表达“其衍生物”是指具有类似反应性且可用作化合物的替代物以获得相同所需结果的该化合物的衍生物。

[0248] 如本文所用的术语“癌症”是指原发性癌症或继发性癌症,并且包括非转移性癌症和/或转移性癌症。提及癌症包括提及癌症组织或细胞。例如,癌症是卵巢癌、脑癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、黑色素瘤、结肠直肠癌、成胶质细胞瘤、肝癌、肺癌、前列腺癌、宫颈癌、头癌、胃癌、肾癌、子宫内膜癌、睾丸癌、尿路上皮癌、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、霍奇金淋巴瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、软组织癌、骨肉瘤、甲状腺癌、移行细胞膀胱癌、维尔姆瘤、神经胶质瘤、胰腺癌或脾癌。如本文所用的术语“癌症”还包含任何涉及分选蛋白表达的癌症。

[0249] 如本文所用的术语“侵袭性癌症”是指具有快速分裂和生长的癌细胞的癌症。侵袭性癌症可以是侵入的或转移性的,或者更可能是侵入的或转移性的并扩散至淋巴结和/或其他身体器官。提及侵袭性癌症包括提及侵袭性癌症组织或细胞。侵袭性癌症可以是本文所述的任何癌症类型。侵袭性癌症也可能表现出诸如血管生成拟态等特征。

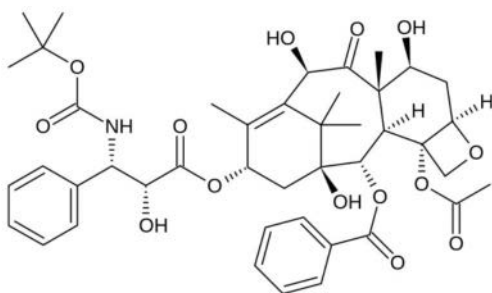
[0250] 如本文所用的术语“血管生成拟态”(或VM)是指癌细胞形成微血管通道。参与血管生成拟态的癌细胞通常具有侵袭性、转移性和遗传去调节性。血管生成拟态与血管生成的不同之处在于,它是在内皮细胞不存在的情况下重新发生的,因为癌细胞排列在肿瘤血管上,模仿真实的血管内皮。血管生成拟态主要有两种类型:管状和图案化。管状血管生成拟态在形态上与正常血管相似,而图案化血管生成拟态则明显不同,但能够与血管发生吻合。血管生成拟态见于各种癌症类型中,例如黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、前列腺癌、骨肉瘤、膀胱癌、结肠直肠癌、肝细胞癌、胃癌、肺癌和本文所述其他癌症类型。

[0251] 如本文所用的表达“治疗剂”是指与对照相比,通过抑制或减少受试者、癌组织或细胞中的血管生成或血管生成拟态而能够产生治疗效果的试剂。例如,治疗剂是本公开中描述的抗血管生成拟态剂抗分选蛋白抗体。抗分选蛋白抗体可与抗癌药物共轭,例如多西他赛、阿霉素、卡巴他赛、美登木素生物碱、阿里他汀、卡奇霉素、鹅膏毒素、鹅膏蕈碱和aldoxorubicin,或植物化学物质(姜黄素)。抗血管生成拟态剂也可以是本文所述的肽,例如,KBP-101、KBP-102、KBP-103、KBP-104、KBP-105、KBP-106、KBP-201、KBP-202或KBP-203。该肽还可以与抗癌药物共轭,例如多西他赛、阿霉素、卡巴他赛、美登木素生物碱、阿里他汀、卡奇霉素、鹅膏毒素、鹅膏蕈碱和aldoxorubicin,或植物化学物质(姜黄素)。例如,KBC-106、KBC-201、KBP-106-Cys-Aldoxorubicin、多西他赛-Katana肽共轭物(DoceKA)或阿霉素-Katana肽共轭物(DoxKA)。

[0252] 如本文所用的术语“抗癌剂”是指能够在癌细胞中引起毒性的试剂。例如,源自太平洋紫杉——短叶红豆杉——树皮的紫杉烷可用作抗癌剂。紫杉烷包括例如多西他赛和卡巴他赛。其他抗癌剂包括例如通过插入DNA发挥作用的蒽环霉素化合物。例如,蒽环霉素包括阿霉素和aldoxorubicin。

[0253] 如本文所用的术语“多西他赛”或“doce”是指具有以下结构的抗癌剂:

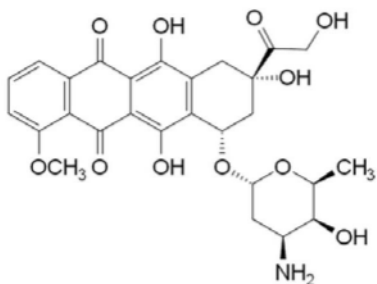
[0254]



[0255] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药及其混合物。例如,多西他赛可以通过附着至其侧链2位处碳原子的氧原子与本公开的肽化合物或分离的抗体共轭。多西他赛可以直接或通过接头与肽化合物或分离的抗体连接。

[0256] 如本文所用的术语“阿霉素”、“dox”或“doxo”是指具有以下结构的抗癌剂:

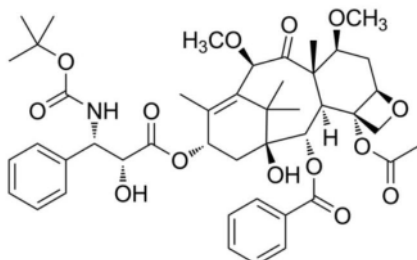
[0257]



[0258] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药及其混合物。例如,阿霉素可以通过附着至14位处碳原子的氧原子与本公开的肽化合物或分离的抗体共轭。阿霉素可以直接或通过接头与肽化合物或分离的抗体连接。

[0259] 如本文所用的术语“卡巴他赛”或“cab”是指具有以下结构的抗癌剂:

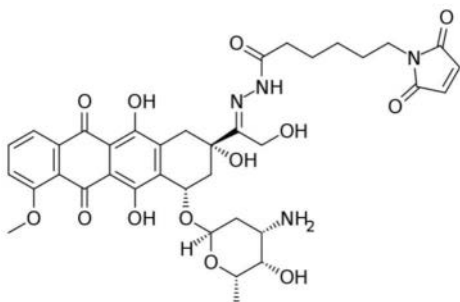
[0260]



[0261] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药及其混合物。例如,卡巴他赛可以通过附着至其侧链2位处碳原子的氧原子与本公开的肽化合物或分离的抗体共轭。卡巴他赛可以直接或通过接头与肽化合物或分离的抗体连接。

[0262] 如本文所用的术语“aldoxorubicin”或“aldo”是指具有以下结构的抗癌剂:

[0263]

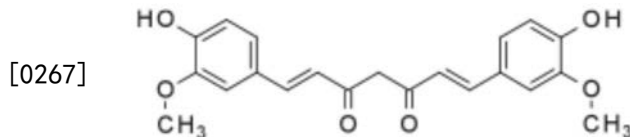


[0264] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药及其混合物。例如,aldoxorubicin可以

通过附着至其侧链13位处碳的(6-马来酰亚胺基己酰基)胺与本公开的肽化合物或分离的抗体共轭。Aldoxorubicin可以直接或通过其接头与肽化合物或分离的抗体连接。

[0265] 如本文所用的术语“植物化学物质”是指天然存在于植物中并可用于抑制血管生成拟态的化学化合物。植物化学物质的实例包括,例如姜黄素。姜黄素(二阿魏酰基甲烷)是存在于与抗炎相关的香料姜黄根(姜黄)中的黄色颜料。具有抗炎性质的其他植物化学物质包括,例如, ω -3、白柳皮、绿茶、儿茶素、碧萝芷、齿叶乳香树脂、白藜芦醇、绒毛钩藤、辣椒素、花青素/花色苷、黄酮、橄榄油化合物、绿原酸和sulfopharaphane。

[0266] 本文所用的术语“姜黄素”或“cur”是指具有以下结构的植物化学物质:



[0268] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药及其混合物。例如,姜黄素可以通过其酚基的氧原子与本公开的肽化合物或分离的抗体共轭。姜黄素可以直接或通过接头与肽化合物或分离的抗体连接。

[0269] 如本文所用的表达“共轭化合物”、“肽-药物共轭物”或“肽共轭物”是指包含本文公开的肽化合物的化合物,该肽化合物任选地通过接头与至少一种治疗剂连接。共轭化合物可以包含例如与其连接的1、2、3或4个治疗剂分子。治疗剂的这些1-4个分子可以相同或不同,即,至多四种不同的治疗剂可以与肽化合物连接。治疗剂通过至少一个共价键、至少一个原子或至少一个接头与肽化合物连接。共轭化合物可用于抑制血管生成拟态。共轭化合物的实例包括但不限于如下所示的共轭化合物:

<p>[0270]</p> <p>KBC-106 (2:1)</p>	<p>乙酰基-GVRAK(姜黄素)AGVRN(Nle)FK(姜黄素)SESY - 式 (XVI)</p> <p>其包含具有 SEQ ID NO: 15 的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的姜黄素分子</p>
<p>KBC-201 (2:1)</p>	<p>乙酰基-YK(姜黄素)SLRRK(姜黄素)APRWDAPLRDPALRQLL - 式 (XVII)</p> <p>其包含具有 SEQ ID NO: 16 的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的姜黄素分子</p>

[0271] 如本文所用的术语“抗体”是指单克隆抗体,包括嵌合和人源化单克隆抗体、多克隆抗体、人源化抗体、人抗体和嵌合抗体。抗体可以来自重组源和/或在转基因动物中产生。如本文使用的术语“抗体片段”旨在包括Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、迷你体、双体以及其多聚体和双特异性抗体片段。可以使用常规技术对抗体进行片段化。例如,可以通过用胃蛋白酶处理抗体来产生F(ab')₂片段。所得F(ab')₂片段可被处理以减少二硫醚桥,从而产生Fab'片段。木瓜蛋白酶消化可导致Fab片段的形成。Fab、Fab'和F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、迷你体、双体、双特异性抗体片段和其他片段也可以通过重组技术合成。抗体任选地为任何有用的同种型,包括在一个实施例中用于诊断应用的IgM和在一个实施例中用于治疗应用的IgG,诸如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0272] 术语“分离的抗体”是指已经从产生抗体的来源,例如动物、杂交瘤或其他细胞系,包括产生抗体的重组细胞中除去的体外或体内产生的抗体。分离的抗体任选地是“纯化

的”,这意味着至少:80%、85%、90%、95%、98%或99%的纯度和任选地药物级纯度。

[0273] 术语“抗分拣蛋白mAb#1”或“抗SORT1 mAb#1”是指从EMB密理博公司(Millipore)获得的单克隆抗体(克隆F11;Cat#MABN1792)。此抗体的免疫原位于分拣蛋白的胞外结构域,即分拣蛋白的氨基酸残基78-755。

[0274] 术语“抗分拣蛋白mAb#2”或“抗SORT2 mAb#2”是指从BD生物科学公司(BD Biosciences)获得的单克隆抗体(克隆48;Cat#612100)。此抗体的免疫原是分拣蛋白的氨基酸残基300-422,对应于此蛋白的部分胞外结构域。

[0275] 还可以通过筛选编码在具有细胞表面组分的细菌中表达的免疫球蛋白基因或其部分的表达文库来产生对分拣蛋白中可及的特定抗原或分子具有反应性的特定抗体或抗体片段,包括分拣蛋白的氨基酸残基300-422(SEQ ID NO:25)。例如,使用噬菌体表达文库可以在细菌中表达完整的Fab片段、VH区域和FV区域(参见例如ref.33)。抗原性分拣蛋白残基的实例包括但不限于如下所示的氨基酸序列:

SEQ ID NO: 25 (分拣蛋白的氨基酸残基300-422)	GVKIYSFGLGGRFLFASVMADKDTTRRIHVSTDQGDTWSMAQLPSV GQEQFYSILAANDDMVFMHVDEPGDTGFGTIFTSDDRGIVYSKSLDR HLYTTTGGGETDFTNVTSLRGVYITSVLSED
SEQ ID NO: 26 (分拣蛋白的氨基酸残基300-330)	GVKIYSFGLGGRFLFASVMADKDTTRRIHVS
SEQ ID NO: 27 (分拣蛋白的氨基酸残基315-345)	ASVMADKDTTRRIHVSTDQGDTWSMAQLPSV
SEQ ID NO: 28 (分拣蛋白的氨基酸残基330-360)	STDQGDTWSMAQLPSVGQEQFYSILAANDDM
SEQ ID NO: 29 (分拣蛋白的氨基酸残基345-375)	VGQEQFYSILAANDDMVFMHVDEPGDTGFGT
SEQ ID NO: 30 (分拣蛋白的氨基酸残基360-390)	MVFMHVDEPGDTGFGTIFTSDDRGIVYSKSL
SEQ ID NO: 31 (分拣蛋白的氨基酸残基375-405)	TIFTSDDRGIVYSKSLDRHLYTTTGGGETDFT
[0276] SEQ ID NO: 32 (分拣蛋白的氨基酸残基390-422)	LDRHLYTTTGGGETDFTNVTSLRGVYITSVLSED
SEQ ID NO: 33 (分拣蛋白的氨基酸残基300-320)	GVKIYSFGLGGRFLFASVMAD
SEQ ID NO: 34 (分拣蛋白的氨基酸残基310-330)	GRFLFASVMADKDTTRRIHVS
SEQ ID NO: 35 (分拣蛋白的氨基酸残基320-340)	DKDTTRRIHVSTDQGDTWSMA
SEQ ID NO: 36 (分拣蛋白的氨基酸残基330-350)	STDQGDTWSMAQLPSVGQEQF
SEQ ID NO: 37 (分拣蛋白的氨基酸残基340-360)	AQLPSVGQEQFYSILAANDDM
SEQ ID NO: 38 (分拣蛋白的氨基酸残基350-370)	FYSILAANDDMVFMHVDEPGD
SEQ ID NO: 39 (分拣蛋白的氨基酸残基360-380)	MVFMHVDEPGDTGFGTIFTSD
SEQ ID NO: 40 (分拣蛋白的氨基酸残基380-400)	DTGFGTIFTSDDRGIVYSKSL

	蛋白的氨基酸残基 370-390)	
	SEQ ID NO: 41 (分拣 蛋白的氨基酸残基 380-400)	DDRGIVYSKSLDRHLYTTTGG
	SEQ ID NO: 42 (分拣 蛋白的氨基酸残基 390-410)	LDRHLYTTTGGETDFTNVTSL
	SEQ ID NO: 43 (分拣 蛋白的氨基酸残基 400-422)	GETDFTNVTSLRGVYITSVLSED
	SEQ ID NO: 44 (分拣 蛋白的氨基酸残基 319-324)	ADKDTT
[0277]	SEQ ID NO: 45 (分拣 蛋白的氨基酸残基 330-338)	STDQGDTWS
	SEQ ID NO: 46 (分拣 蛋白的氨基酸残基 342-348)	LPSVGQE
	SEQ ID NO: 47 (分拣 蛋白的氨基酸残基 366-373)	DEPGDTGF
	SEQ ID NO: 48 (分拣 蛋白的氨基酸残基 378-379)	TS
	SEQ ID NO: 49 (分拣 蛋白的氨基酸残基 382-384)	RGI
	SEQ ID NO: 50 (分拣 蛋白的氨基酸残基 396-405)	TTTGGETDFT

[0278] 在一些实施例中,特异性结合具有或包含SEQ ID NO:25-50中任一项所示氨基酸序列、其类似物或其片段的多肽的分离的抗体用于抑制血管生成拟态。在一些实施例中,分离的抗体靶向分拣蛋白受体。在其他实施例中,分离的抗体结合至少2个、任选地至少4个如SEQ ID NO:25-50中任一项所示的连续氨基酸残基、其类似物或其片段。

[0279] 如本文所用的术语“人源化抗体”是指所述抗体或片段包含人保守框架区域(另外被称为恒定区域),并且高变区域(另外被称为抗原结合域)是非人类来源的。例如,高变区域可以来自小鼠、大鼠或其他物种。来自非人物种的抗体的人源化已在文献中有很好的描述。参见例如Carter&Merchant 1997 (34)。人源化抗体也很容易购得。

[0280] 通过CDR移植很容易地产生人源化形式的啮齿动物抗体(35)。在这种途径中,包含啮齿动物单克隆抗体的抗原结合位点的六个CDR环与相应的人框架区域相连。CDR移植通常产生亲和力降低的抗体,因为框架区域的氨基酸可能影响抗原识别(36)。为了保持抗体的亲和力,经常需要通过定向诱变或其他重组技术来替换某些框架残基,并且可以通过抗原

结合位点的计算机建模来辅助(37)。抗体的人源化形式任选地通过表面重修来获得(38)。在这种途径中,只有啮齿动物抗体的表面残基是人源化的。

[0281] 人源化抗体选自任一类免疫球蛋白,包括:IgM、IgG、IgD、IgA或IgE和任何同种型,包括:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化抗体或人抗体可以包括来自一个或多个同种型或类的序列。此外,这些抗体通常产生为抗原结合片段,诸如Fab、Fab'F(ab')₂、Fd、Fv和单结构域抗体片段,或产生为重链和轻链通过间隔基连接的单链抗体。此外,人源化抗体可以单体或聚合形式存在。人源化抗体任选地包含一条非人链和一条人源化链(即一条人源化的重链或轻链)。

[0282] 此外,对具有或包含SEQ ID NO:25-50中任一项所示氨基酸序列的多肽特异的抗体,例如分拣蛋白的氨基酸残基300-422(登录号NP 002950)很容易通过筛选抗体噬菌体展示文库来分离。例如,任选地通过使用本公开的抗原的部分来筛选抗体噬菌体文库,以确定对分拣蛋白特异的抗体片段。任选地使用所确定的抗体片段来产生可用于本公开的不同实施例的多种重组抗体。抗体噬菌体展示文库可通过例如Xoma(加利福尼亚伯克利)购得筛选抗体噬菌体文库的方法是本领域众所周知的。

[0283] 产生抗体的其他方法是本领域已知的。例如,具有或包含SEQ ID NO:25-50中任一项所示氨基酸序列、其类似物或其片段的抗原性多肽可与KLH共轭,用于例如BALB/c小鼠的免疫以产生对多肽上的表位具有反应性的B细胞。作为另一选择,将多肽的具有或包含SEQ ID NO:25-50肽(包含一个或多个抗原决定因素)中任一项的氨基酸序列的部分与KLH共轭,最低限度地包含单独或与KLH偶联时具有免疫原性的任何肽序列的3或5个连续氨基酸。

[0284] 用分拣蛋白多肽的抗原性制剂(例如,如SEQ ID NO:25-50所示的氨基酸序列、或其类似物、或其片段)对动物进行免疫后,可以获得抗血清,并且可以从血清中分离多克隆抗体。为了产生单克隆抗体,抗体产生细胞(即B-淋巴细胞)可从经免疫的动物收获并通过本领域众所周知的体细胞融合程序与永生化细胞诸如骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞。此类技术包括例如杂交瘤技术(39)、人B细胞杂交瘤技术(40)和产生人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术(41)。可以通过免疫化学方法筛选杂交瘤细胞,以产生与分拣蛋白多肽特异性结合的抗体和从包含此类杂交瘤细胞的培养物中分离的单克隆抗体。

[0285] 本文在提及抗体使所用的术语“特异性结合”或其衍生物旨在意指如本领域通常所理解的,该抗体在感兴趣的抗原(例如,分拣蛋白多肽)和与不感兴趣的其他抗原之间具有充分的选择性,该抗体用于检测特定类型的生物样品中是否存在感兴趣的抗原。不希望受理论的束缚,在采用该抗体的某些方法中,例如,治疗应用中,可能需要结合的更高程度的特异性。单克隆抗体通常比多克隆抗体更容易有效区分所需抗原和交叉反应多肽。抗体对抗原的亲合力(其通常用解离常数表示)是影响抗体:抗原相互作用的特异性的特征。可以用一系列不同的亲合力达到所需的特异性,并且通常优选的抗体将具有约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更小的解离常数。在另一个实例中,与另一个分子相比,抗体可以更高效地与其感兴趣的抗原进行3-5、5-7、7-10、10-15、5-15或5-30倍结合。

[0286] 此外,所获得的抗体的性质受用于筛选抗体的技术的影响。例如,如果抗体用于结合溶液中的抗原,则可以进行溶液结合。不同的技术可用于测试抗体和抗原之间的相互作用,以确定特别理想的抗体。此类技术包括免疫印迹、免疫沉淀测定、免疫组织化学、ELISA、表面等离子体共振结合测定(诸如Biacore结合测定(Bia-core AB,瑞典乌普萨拉))和夹心

测定(诸如顺磁珠系统)。

[0287] 在一方面,本公开提供结合可溶性分拣蛋白多肽的抗体。此类抗体可如本文所述,使用SEQ ID NO:25-50中任一项所示的可溶性分拣蛋白多肽序列、其类似物或片段作为抗原产生。可以使用这种类型的抗体,例如,以检测生物样品中的分拣蛋白多肽和/或监测受试者中的可溶性分拣蛋白多肽水平。在另一方面,特异性结合可溶性分拣蛋白多肽的抗体可用于调节分拣蛋白多肽和相关途径的活性,从而抑制血管生成拟态。

[0288] 如本文所用的表达“抗体-药物共轭物”、“抗体共轭物”或“共轭抗体”是指本文所公开的任选地通过接头与至少一种治疗剂连接的抗体。抗体-药物共轭物可以包含例如与其连接的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个治疗剂分子。这些1-12个治疗剂分子可以相同或不同,即,至多四种不同的治疗剂可以与抗体连接。治疗剂通过至少一个共价键、至少一个原子或至少一个接头与抗体连接。抗体-药物共轭物可用于抑制血管生成拟态。抗体-药物共轭物的实例包括但不限于与抗癌药物共轭的抗分拣蛋白抗体,该抗癌药物诸如多西他赛、阿霉素、卡巴他赛、美登木素生物碱、阿里他汀、卡奇霉素、鹅膏毒素、鹅膏蕈碱和aldoxorubicin,和/或植物化学物质,诸如姜黄素。下表总结了可与抗分拣蛋白抗体共轭的抗癌药物:

[0289]

A) 细胞毒素 (细胞毒素剂)	
1	烷基化剂
2	铂配位: 顺铂、卡铂、奥沙利铂
3	抗代谢产物
4	微管破坏剂: 长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、紫杉醇、多西他赛
5	拓扑异构酶-2 抑制剂: 依托泊苷
6	拓扑异构酶-1 抑制剂: 拓扑替康、伊立替康
7	抗生素: 放线菌素 D、阿霉素、道诺霉素、表柔比星、博来霉素、丝裂霉素 C
8	杂项: 羟基脲、L-天冬酰胺酶、维甲酸
B) 毒素	
1	美登木素生物碱
2	阿里他汀
3	卡奇霉素
4	鹅膏毒素
5	鹅膏蕈碱
C) 抗癌肽	
1	D-肽 A、B、C 和 D、D-K6L9、NRC-03、NRC-07、Gomesin、肝杀菌肽 TH2-3、皮抑菌肽 B2、PTP7、MGA2、HNP-1、速普肽、滕波林-1 CEa、NK-2、天杀菌肽 CB1
D) 靶向药物	
1	酪氨酸蛋白激酶抑制剂: 伊马替尼、达沙替尼
2	EFG 受体抑制剂: 吉非替尼、埃罗替尼
3	血管生成抑制剂: 贝伐单抗、沙利度胺、内皮抑素、血管抑素、血管生成素 (Angiopoitein)、类大麻酚 (Cannabionoid)
4	蛋白酶体抑制剂: 硼替佐米、卡非佐米 (Carfizomib)、伊萨佐米 (伊萨佐米)、马里佐米 (Marizomib)、环氧霉素
5	单克隆抗体 (mAb): 利妥昔单抗、曲妥珠单抗
E) 免疫疗法	
1	检查点抑制剂
2	CAR-T 细胞疗法
3	抗体
4	抗体药物共轭物
5	双特异性 T 细胞接合物和双特异性抗体
6	基因工程 T 细胞介导的细胞杀伤
7	溶瘤病毒

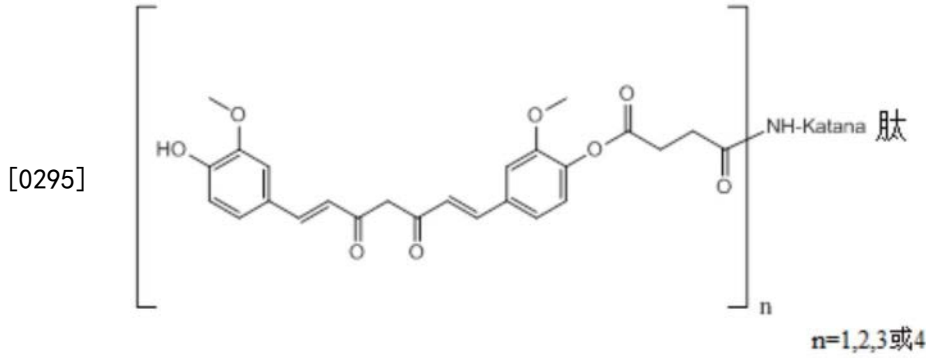
	8	T 细胞介导的细胞溶解
	F) 植物化学物质	
	1	生物碱: 绿原酸、可可碱、茶碱
	2	花青素: 花青色素、二甲花翠素
	3	类胡萝卜素: β -胡萝卜素、叶黄素、番茄红素
	4	香豆烷 (Coumestan)
	5	黄烷-3-醇
	6	类黄酮: 表儿茶素、橙皮苷、异鼠李素、山柰酚、杨梅素、柚皮苷、川皮苷、原花青素、槲皮素、芦丁、桔皮素
	7	羟基肉桂酸: 菊苣酸、香豆素、阿魏酸、东莨菪素
	8	异黄酮: 大豆苷元、染料木素
	9	木酚素: 水飞蓟素
[0290]	10	单萜: 香叶醇、柠檬烯
	11	有机硫化物: 蒜素、谷胱甘肽、吲哚-3-甲醇、异硫氰酸酯、萝卜硫素
	12	其他植物化学物质: 丹宁卡、地高辛、植酸
	13	酚酸: 辣椒素、鞣花酸、没食子酸、迷迭香酸、鞣酸
	14	植物甾醇: β -谷甾醇
	15	皂苷
	16	芪 (Stylbene): 紫檀芪、白藜芦醇
	17	三萜系化合物: 乌索酸
	18	叶黄素: 虾青素、 β -隐黄质
	19	单酚: 羟基酪醇
	G) 寡肽模拟物	
	1	妥布赖森 (Tubulysin)

[0291] 如本文所用的术语“共轭”是指例如如上定义的共轭物的制备。此类作用包含任选地通过接头将肽化合物或抗体与至少一种治疗剂连接在一起。

[0292] 如本文使用的术语“CD133阳性细胞 (CD133 positive cell或CD133 positive cells)”是指表达CD133细胞表面标记物的一种或多种细胞。

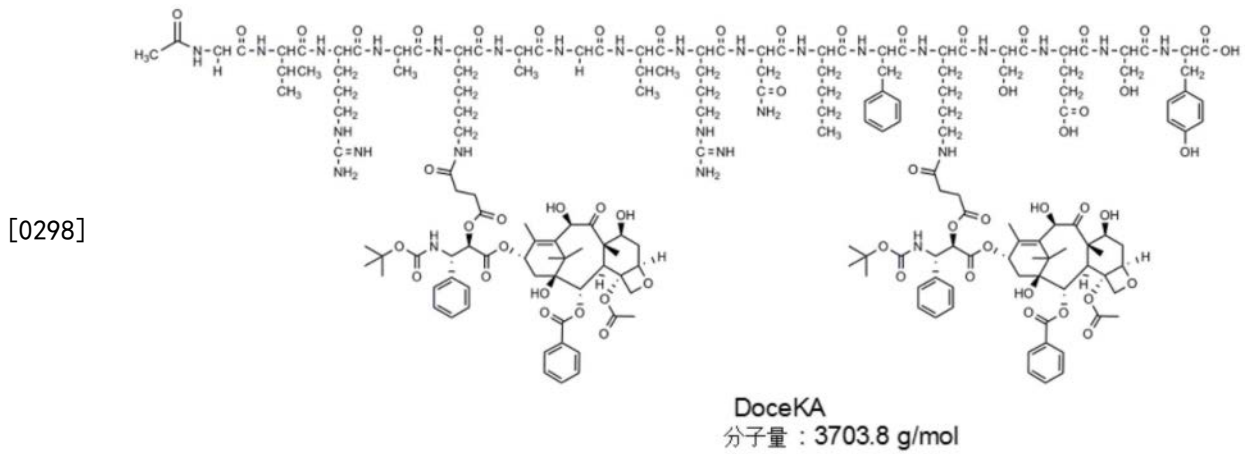
[0293] 例如,以下是本文公开的一些肽-共轭化合物的一般化学式。

[0294] 姜黄素-Katana共轭化合物:

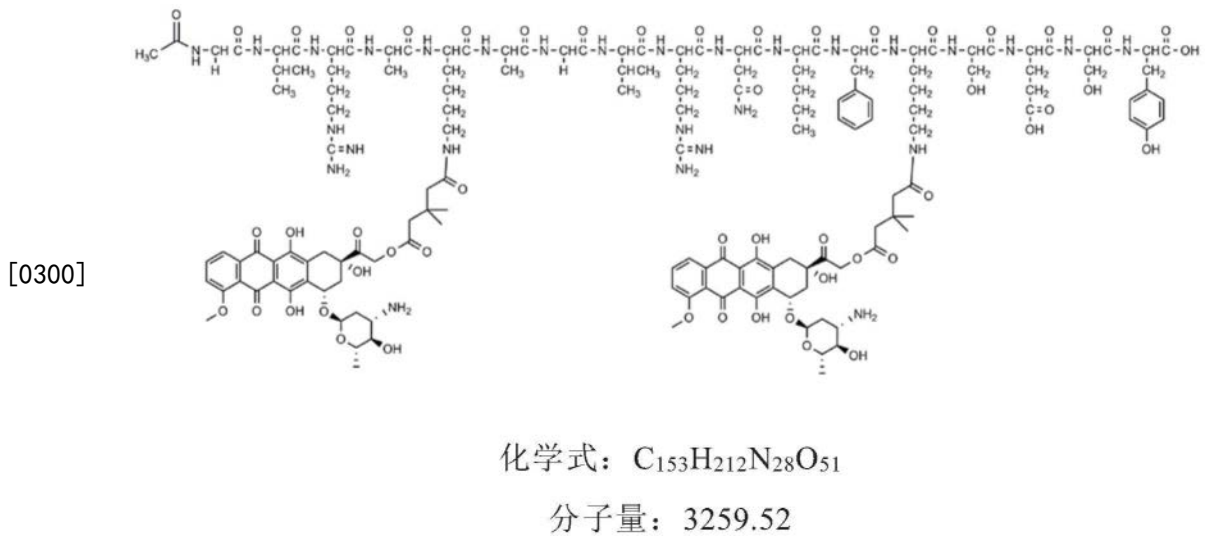


[0296] 例如,以下是本文公开的一些共轭化合物的化学结构。

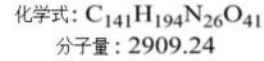
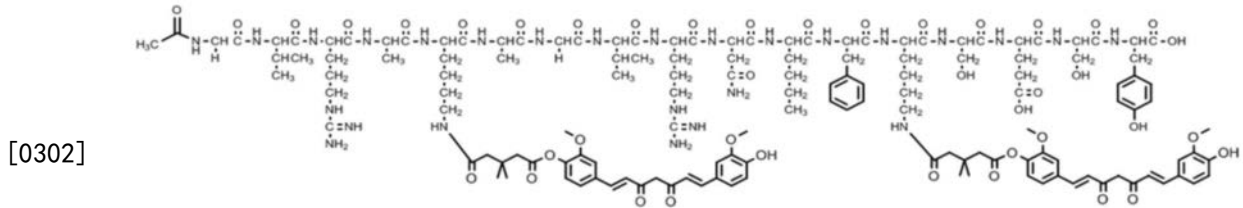
[0297] 多西他赛-Katana肽共轭物 (DoceKA) :



[0299] 阿霉素-Katana肽共轭物 (DoxKA) :

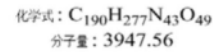
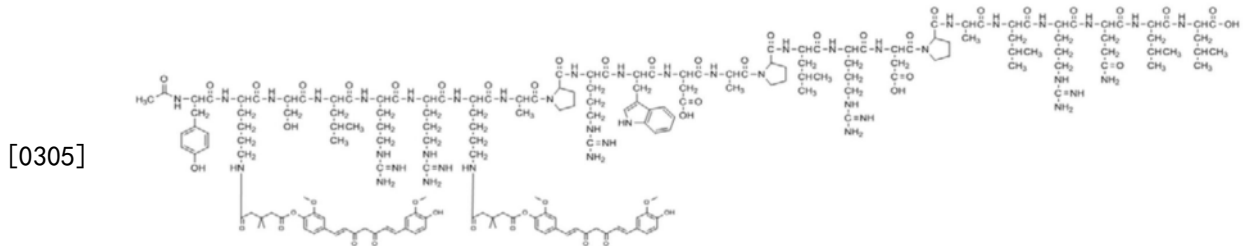


[0301] KBC-106:

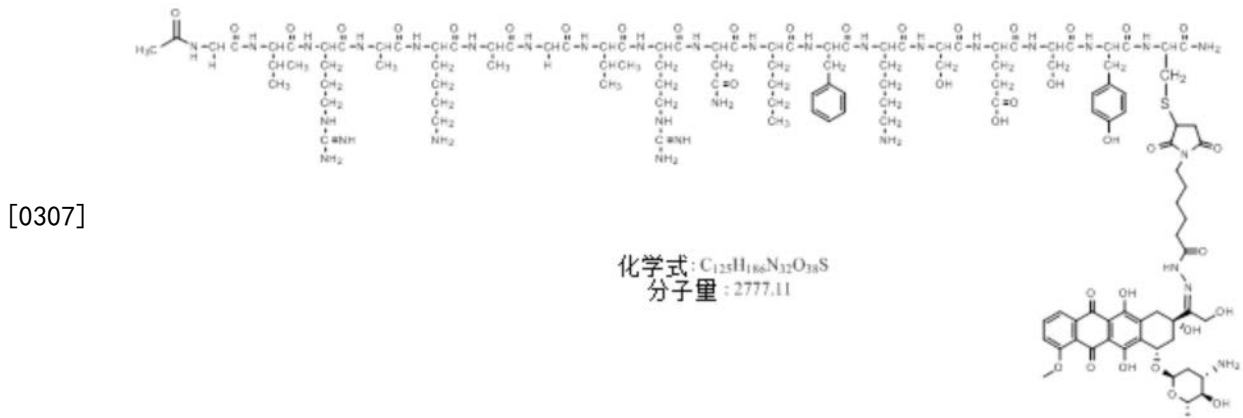


[0303] 姜黄素-Katana肽共轭物:

[0304] KBC-201:



[0306] KBP-1 06-Cys-Aldoxorubicin:



[0308] 如本文所用的术语“接头”是指将本文公开的肽化合物或抗体与至少一种治疗剂连接的化学结构。接头可以在肽化合物或抗体上的不同官能团处与肽化合物或分离的抗体连接。例如,接头可以在伯胺(胺(-NH₂))处与肽化合物或分离的抗体连接:此基团存在于每个多肽链的N末端处(称为 α -胺)和赖氨酸(Lys,K)残基的侧链中(称为 ϵ -胺)。例如,接头可以在羧基(-COOH)处与肽化合物或分离的抗体连接:此基团存在于每个多肽链的C末端处以及天冬氨酸(Asp,D)和谷氨酸(Glu,E)的侧链中。例如,接头可以在巯基(-SH)处与肽化合物或分离的抗体连接:此基团存在于半胱氨酸(Cys,C)的侧链中。通常,作为蛋白质二级或三级结构的一部分,半胱氨酸在其侧链之间通过二硫键(-S-S-)连接在一起。必须将其还原为巯基,使其可用于通过大多数类型的反应性基团进行交联。例如,接头可在羰基(-CHO)处与肽化合物或分离的抗体连接:通过用偏高碘酸钠氧化多糖翻译后修饰(糖基化),可在糖蛋白中产生酮或醛基。例如,接头可以是可切割接头。例如,接头可以是不可切割接头。

[0309] 下表总结了标准化学共轭的一些主要接头的反应性类别和化学基团:

反应性类别	化学基团
羧基至胺反应性基团	碳化二亚胺 (例如, EDC)
胺反应性基团	NHS 酯 亚氨酸酯 五氟苯基酯 羟甲基磷
[0310] 巯基反应性基团	马来酰亚胺 卤乙酰基 (溴代-或碘代-) 吡啶基二硫化物 硫代磷酸盐 乙烯基砷
醛反应性基团 即氧化糖 (羰基)	酰肼 烷氧基胺
光反应性基团	双吡丙啶 芳基叠氮化物

[0311] 例如,可以使用同双官能交联剂和异双官能交联剂。例如,二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)是在短间隔臂的任一端具有相同的胺反应性NHS酯基团的同双官能交联剂。例如,磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)是在环己烷间隔臂的一端具有胺反应性磺基-NHS-酯基团,且在相对的一端具有巯基反应性马来酰亚胺基团的异双官能交联剂。这允许连续的两步共轭程序。市售的同双官能交联剂是:BSOCOES(双(2-[琥珀酰亚胺氧羰基氧基]乙基)砷);DPDPB(1,4-二-(3'-[2吡啶基二硫代]-丙酰胺基)丁烷);DSS(二琥珀酰亚胺基辛二酸酯);DST(二琥珀酰亚胺基酒石酸酯);磺基DST(磺基二琥珀酰亚胺基酒石酸酯);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));EGS(乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯));和BASED(可碘化的双(β -[4-叠氮基水杨氨基]-乙基)二硫化物)。

[0312] 肽化合物或抗体可以通过各种接头,例如巯基、氨基(胺)或任何合适的反应性基团共轭。接头可以是共价键。接头基团可以包含柔性臂,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个碳原子。

[0313] 示例性的接头包括但不限于吡啶二硫化物、硫代磷酸酯、乙烯基磷酸酯、异氰酸酯、酰亚胺酯、二嗪、肼、硫醇、羧酸、多肽接头和乙炔。作为另一选择,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](其是靶向可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)碳化二亚胺(NHS/EDC允许伯胺基团与羧基基团共轭)、磺基-EMCS([N- ϵ -马来酰亚胺基丙酸]酰肼(磺基-EMCS是对巯基和氨基基团具有反应性的异双官能反应性基团)、酰肼(大多数蛋白含有暴露的碳水化合物,并且酰肼是连接羧基和伯胺的有用试剂)。

[0314] 为了形成共价键,可以使用各种活性羧基(例如,酯)作为化学反应性基团,其中羟基部分在修饰肽化合物或抗体所需的水平下是生理上可接受的。具体的试剂包括例如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-苯甲酰基-琥珀酰亚胺(MBS)、 γ -马来酰亚胺基-丁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)和马来酰亚胺基十一烷酸(MUA)。

[0315] 伯胺是NHS酯的主要目标;NHS酯与伯胺反应形成共价酰胺键。存在于蛋白质N末端

的可及 α -胺基团和赖氨酸的 ϵ -胺与NHS酯反应。因此,本文公开的共轭化合物可包括具有与肽化合物或抗体的N末端氨基或赖氨酸的 ϵ -胺共轭的NHS酯的接头。当NHS酯与伯胺反应释放N-羟基琥珀酰亚胺时,会形成酰胺键。含有反应性基团的琥珀酰亚胺可以更简单地称为琥珀酰亚胺基。在一些实施例中,肽化合物或抗体上的官能团将是硫醇基,并且化学反应性基团将是含马来酰亚胺基的基团,诸如 γ -马来酰亚胺-丁基酰胺(GMBA或MPA)。此类含马来酰亚胺的基团在本文中可称为马来酰基。

[0316] 胺至胺接头包括NHS酯、酰亚胺酯等,其实例在下面列出。

	示例性的 NHS 酯:
	DSG (二琥珀酰亚胺基谷氨酸酯)
	DSS (二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)
	BS ³ (双[磺基琥珀酰亚胺基]辛二酸酯)
	TSAT (三-琥珀酰亚胺基氨基三乙酸酯)
[0317]	双琥珀酰亚胺酯激活化合物的变体,包括聚乙二醇间隔基,诸如 BS(PEG) _n , 其中 n 是 1-20 (例如, BS(PEG) ₅ 和 BS(PEG) ₉)
	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 (二琥珀酰亚胺基酒石酸酯)

	BSOCOES (双[2-(琥珀酰亚胺氧羰基氧基)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:
[0318]	DMA (己二酸二甲酯·2 HCl)
	DMP (庚二亚氨酸二甲酯·2 HCl)
	DMS (辛二亚酰胺二甲酯·2 HCl)
	DTBP (二甲基 3,3'-二硫代双丙酰亚氨酸酯·2 HCl)
	其他示例性的胺至胺接头:
	DFDNB (1,5-二氟-2,4-二硝基苯)
	THPP (β -[三(羟甲基)膦基]丙酸(甜菜碱))

[0319] 接头也可以是巯基至巯基接头,诸如下面列出的马来酰亚胺和吡啶基二硫醇。

示例性的马来酰亚胺:	另一个巯基接头:
BMOE (双马来酰亚胺基乙烷)	HBVS (1,6-己烷-双乙烯基砜)
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)	
[0320] BM(PEG) ₂ 1,8-双马来酰亚胺基二乙二醇	
BM(PEG) _n , 其中 n 是 1 至 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)	
示例性的吡啶基二硫醇:	
DPDPB (1,4-二-[3'-(2'-吡啶基二硫代)-丙酰氨基]丁烷)	

[0321] 接头可以是胺至巯基接头,其包括NHS酯/马来酰亚胺化合物。下面提供这些化合物的实例。

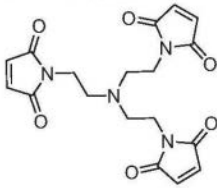
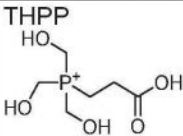
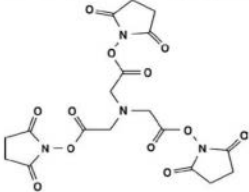
胺至巯基接头:
AMAS (N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯)
BMPS (N-[β -马来酰亚胺基丙基氧基]琥珀酰亚胺酯)
GMBS (N-[γ -马来酰亚胺基丁酰基氧基]琥珀酰亚胺酯)
磺基-GMBS (N-[γ -马来酰亚胺基丁酰基氧基]磺基琥珀酰亚胺酯)
MBS (间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)
磺基-MBS (间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯)
[0322] SMCC (琥珀酰亚胺基 4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯)
磺基-SMCC (磺基琥珀酰亚胺基 4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯)
EMCS (N- ϵ -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 (琥珀酰亚胺基 4-[对马来酰亚胺基苯基]丁酸酯)
磺基-SMPB (磺基琥珀酰亚胺基 4-[对马来酰亚胺基苯基]丁酸酯)
SMPH (琥珀酰亚胺基-6-[β -马来酰亚胺基丙酰氨基]己酸酯)
LC-SMCC (琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧基-[6-氨基己酸酯])
磺基-KMUS (N-[κ -马来酰亚胺基十一酰基氧基]磺基琥珀酰亚胺酯)
SM(PEG) _n (琥珀酰亚胺基-([N-马来酰亚胺基丙酰氨基-聚乙二醇]酯), 其中 n 是 1 至 30 (例如, 2、4、6、8、12 或 24))
SPDP (N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫代)-丙酸酯)
LC-SPDP (琥珀酰亚胺基 6-(3-[2-吡啶基二硫代]-丙酰氨基)己酸酯)
磺基-LC-SPDP (磺基琥珀酰亚胺基 6-(3-[2-吡啶基二硫代]-丙酰氨基)己酸酯)
[0323] SMPT (4-琥珀酰亚胺基氧羰基- 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)甲苯氨基]己酸酯)
SIA (N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯)
SBAP (琥珀酰亚胺基 3-[溴乙酰氨基]丙酸酯)
SIAB (N-琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯)
磺基-SIAB (N-磺基琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯)

[0324] 接头可以与氨基和非选择性实体反应。此类接头包括NHS酯/芳基叠氮化物和NHS酯/双吡啶丙啶接头,其实例在下面列出。

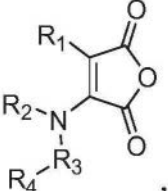
	NHS 酯/芳基叠氮化物接头:
	NHS-ASA (N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮水杨酸)
	ANB-NOS (N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺)
	磺基-HSAB (N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯)
	磺基-NHS-LC-ASA (磺基琥珀酰亚胺基[4-叠氮基水杨氨基]己酸酯)
	SANPAH (N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯氨基)己酸酯)
	磺基-SANPAH (N-磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯氨基)己酸酯)
	磺基-SFAD (磺基琥珀酰亚胺基-(全氟叠氮基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯)
[0325]	磺基-SAND (磺基琥珀酰亚胺基-2-(间叠氮基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-丙酸酯)
	磺基-SAED (磺基琥珀酰亚胺基 2-[7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺基]乙基-1,3'-二硫代丙酸酯)
	NHS 酯/双吡啶丙啶接头:
	SDA (琥珀酰亚胺基 4,4'-吡戊酸酯) (succinimidyl 4,4'-azipentanoate)
	LC-SDA (琥珀酰亚胺基 6-(4,4'-吡戊氨基)己酸酯) (succinimidyl 6-(4,4'-azipentanamido)hexanoate)
	SDAD (琥珀酰亚胺基 2-([4,4'-吡戊氨基]乙基)-1,3'-二硫代丙酸酯)
	磺基-SDA (磺基琥珀酰亚胺基 4,4'-吡戊酸酯)
	磺基-LC-SDA (磺基琥珀酰亚胺基 6-(4,4'-吡戊氨基)己酸酯)
	磺基-SDAD (磺基琥珀酰亚胺基 2-([4,4'-吡戊氨基]乙基)-1,3'-二硫代丙酸酯)


[0326] 示例性的胺至羧基接头包括碳化二亚胺化合物(例如,DCC(N,N-二环己基碳化二亚胺)和EDC(1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺)。示例性的巯基至非选择性接头包括吡啶基二硫醇/芳基叠氮化物化合物(例如,APDP((N-[4-(对叠氮基水杨氨基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺))。示例性的巯基至碳水化合物接头包括马来酰亚胺/酰肼化合物(例如,BMPH(N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼)、EMCH([N-ε-马来酰亚胺基己酸]酰肼)、MPBH 4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼)和KMUH(N-[κ-马来酰亚胺基十一烷酸]酰肼)和吡啶基二硫醇/酰肼化合物(例如,PDPH(3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼))。示例性的碳水化合物至非选择性接头包括酰肼/芳基叠氮化物化合物(例如,ABH(对叠氮基苯甲酰基酰肼))。示例性的羟基至巯基接头包括异氰酸酯/马来酰亚胺化合物(例如,(N-[对马来酰亚胺基苯基]异氰酸酯))。示例性的胺至DNA接头包括NHS酯/补骨脂素化合物(例如,SPB(琥珀酰亚胺基-[4-(补骨脂素-8-基氧基)]-丁酸酯))。

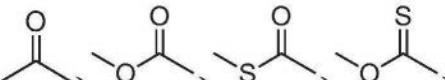
[0327] 为了在共轭肽化合物或抗体中产生不同复杂性的分支点,接头能够连接3-7个实体。

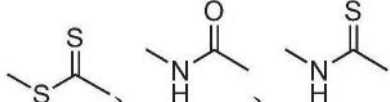
示例性的三官能接头:			
[0328]	TMEA; (三-(2-马来酰亚胺基乙基)胺) 	THPP 	LC-TSAT (三-琥珀酰亚胺基(6-氨基己酰基)氨基三乙酸酯)、 三-琥珀酰亚胺基-1,3,5-苯三羧酸酯
	TSAT; 三-琥珀酰亚胺基氨基三乙酸酯 	SDMB (琥珀酰亚胺基-3,5-二马来酰亚胺基苯基苯甲酸酯) Mal-4 (四-(3-马来酰亚胺基丙基)季戊四醇, NHS-4 (四-(N-琥珀酰亚胺基羧丙基)季戊四醇))	

[0329] TMEA和TSAT通过他们的马来酰亚胺基团与巯基接触。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是同芳族或杂芳族环系统; A是单键或未取代或取代的二价 C_{1-30} 桥接基, 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、OAr (其中Ar是缺电子的激活芳基) 或OC(O)R (其中R是-A-Q-N=C=Y或 C_4-20 叔烷基) (参见美国专利第4,680,338号)。

[0330] 其他有用的接头具有式  其中 R_1 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-O-、-S-或  偶联的这些, 其中 R' 是 C_{1-6} 烷基, 连接部分; R_2 是H、 C_{1-12} 烷

基、 C_{6-12} 芳基或 C_{6-12} 芳烷基, R_3 是 

 或能够使相邻氮的孤对电子离域的另一种化学结构, 并且 R_4 是

能够将 R_3 连接至肽化合物、抗体或试剂的侧挂反应性基团 (参见例如美国专利第5,306,809号)。

[0331] 接头可以包括至少一个氨基酸残基, 并且可以是具有至少或约2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、30、40或50个氨基酸残基的肽。当接头是单个氨基酸残基时, 它可以是任何天然或非天然存在的氨基酸 (例如, Gly或Cys)。当接头是短肽时, 它可以是富含甘氨酸的肽 (其倾向于是柔性的), 诸如具有序列[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser] $_n$ 的肽, 其中 n 是1至6 (包括端值) 的整数 (参见美国专利第7,271,149号) 或富含丝氨酸的肽接头 (参见美国专利第5,525,491

号)。富含丝氨酸的肽接头包括式 $[X-X-X-X-Gly]_y$ 的那些,其中至多两个X是Thr,其余X是Ser,并且y是1至5(包括端值)的整数(例如,Ser-Ser-Ser-Ser-Gly,其中y大于1)。其他接头包括刚性接头(例如,PAPAP和 $(PT)_n P$,其中n是2、3、4、5、6或7)和 α -螺旋接头(例如, $A(EAAAK)_n A$,其中n是1、2、3、4或5)。

[0332] 接头可以是脂族接头(例如,具有与多肽的酰胺键和与治疗剂的酯键)。在使用脂族接头的情况下,它可以在长度(例如, C_1-C_{20})及其包含的化学部分(例如,氨基或氨基甲酸酯)方面变化。

[0333] 合适的氨基酸接头的实例是琥珀酸、Lys、Glu和Asp,或二肽诸如Gly-Lys。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,而其另一个羧基可以例如与肽或取代基的氨基形成酰胺键。当接头为Lys、Glu或Asp时,其羧基可与氨基酸残基的氨基形成酰胺键,而其氨基可例如与取代基的羧基形成酰胺键。当使用Lys作为接头时,可在Lys的 ϵ -氨基和取代基之间插入另一个接头。另一个接头可以是琥珀酸,其可以与Lys的 ϵ -氨基和取代基中存在的氨基形成酰胺键。在一个实施例中,另外的接头是Glu或Asp(例如,其与Lys的 ϵ -氨基形成酰胺键,而与取代基中存在的羧基形成另一个酰胺键),即取代基是N $^{\epsilon}$ -酰化赖氨酸残基。

[0334] 接头也可以是分支多肽。示例性的分支肽接头描述于美国专利第6,759,509号中,该专利通过引用并入本文。

[0335] 接头可以提供可切割链键(例如,硫酯链键)或不可切割链键(例如,马来酰亚胺链键)。例如,细胞毒性蛋白可与接头结合,该接头与修饰的游离胺反应,游离胺存在于多肽内的赖氨酸残基和多肽的氨基末端处。因此,可用于本共轭化合物的接头可包含与治疗剂部分共轭的多肽或修饰的多肽上的伯胺反应的基团。更具体地,该接头可选自由单氟环辛炔(MFCO)、双环[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)、马来酰亚胺基和二苯并环辛炔酯(DBCO酯)组成的群组。在给定的接头中,有用的环辛炔包括OCT、ALO、MOFO、DIFO、DIBO、BARAC、DIBAC和DIMAC。

[0336] 接头可以包括柔性臂,例如短臂(<2个碳链)、中等大小的臂(2-5个碳链)或长臂(3-6个碳链)。

[0337] 点击化学也可用于肽(DBCO、TCO、四嗪、叠氮化物和炔烃接头)的共轭。这些接头家族可对胺、羧基和巯基具有反应性。此外,这些接头也可以是生物素化的、聚乙二醇化的、用荧光成像染料修饰的,或被磷酸化以并入寡核苷酸序列。

[0338] 本文使用的术语“中间体”是指已经与接头反应从而形成中间体或治疗剂的激活形式的治疗剂。该中间体可与本文公开的肽化合物或抗体反应,从而形成本文公开的可用于治疗癌症或侵袭性癌症的共轭化合物。

[0339] 表达“氨基酸”是指本领域技术人员已知的常见天然(遗传编码的)或合成氨基酸及其常见衍生物。当应用于氨基酸时,“标准”或“蛋白原性”是指以其天然构型遗传编码的20个氨基酸。类似地,当应用于氨基酸时,“非标准的”、“非天然的”或“不寻常的”是指非天然的、稀有的或合成的氨基酸的广泛选择,诸如Hunt, S.在“氨基酸的化学和生物化学(Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids)”,Barrett, G.C.编辑,查普曼和霍尔公司(Chapman and Hall: New York),1985中描述的那些。非标准氨基酸的一些实例包括非 α 氨基酸、D-氨基酸。

[0340] 用于氨基酸和肽命名的缩写遵循以下规则：“生物化学杂志 (J.Biol.Chem)” 中的 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会 (Commission of Biochemical Nomenclature) 1972, 247, 977-983。本文档已更新：“生物化学杂志 (Biochem.J.)”, 1984, 219, 345-373; “欧洲生物化学杂志 (Eur.J.Biochem.)”, 1984, 138, 9-37; 1985, 152, 1; “国际肽和蛋白质研究杂志 (Int.J.Pept.Prot.Res.)”, 1984, 24, 接着 p 84; “生物化学杂志”, 1985, 260, 14-42; “理论化学与应用化学 (PureAppl.Chem.)” 1984, 56, 595-624; “氨基酸和肽 (Amino Acids and Peptides)”, 1985, 16, 387-410; 和“生物化学命名及相关文档 (Biochemical Nomenclature and Related Documents)”, 第2版, 波特兰出版社 (Portland Press), 1992, pp 39-67。这些规则的延伸出版在 JCBN/NC-IUB 时事通讯 (Newsletter) 1985, 1986, 1989 中; 参见“生物化学命名及相关文档”, 第2版, 波特兰出版社, 1992, pp 68-69。

[0341] 术语“拮抗剂”是指减少蛋白的内源性配体、受体、酶、相互作用等的至少一些作用的化合物。

[0342] 术语“抑制剂”是指降低蛋白、受体、酶、相互作用等的正常活性的化合物。

[0343] 表达“反向激动剂”是指将组成型活性受体的活性降低至低于其基础水平的化合物。

[0344] 术语“文库”是指可用于例如药物发现目的的化合物的集合。例如, 文库化合物可以是本文公开的肽化合物、抗体、肽-共轭物和/或抗体-共轭物。

[0345] 如本文所用的术语“混合物”是指包含两种或更多种肽-化合物或抗体的组合物。在实施例中, 混合物是两种或更多种不同的肽-化合物或抗体的混合物。在另一个实施例中, 当肽-化合物或抗体被称为“混合物”时, 这意味着它可以任何比率包含两种或更多种“形式”的肽-化合物或抗体, 诸如肽-化合物的盐、溶剂化物、前药或 (在适用时) 立体异构体。本领域技术人员将理解, 混合物中的肽-化合物或抗体也可以多种形式的混合物存在。例如, 肽-化合物或抗体可以肽-化合物或抗体的盐的水合物或前药的盐的水合物的形式存在。本文公开的肽化合物和抗体的所有形式都在本申请的范围之内。

[0346] 术语“调节剂”是指对生物或化学过程或机制产生作用的肽-化合物或抗体。例如, 调节剂可以增加、促进、上调、激活、抑制、降低、阻断、防止、延迟、脱敏、去激活、下调等生物或化学过程或机制。因此, 调节剂可以是“激动剂”或“拮抗剂”。受调节剂影响的示例性生物过程或机制包括但不限于酶结合、受体结合和激素释放或分泌。受调节剂影响的示例性化学过程或机制包括但不限于催化和水解。

[0347] 术语“肽”是指包含使用酰胺键共价键合在一起的至少两个氨基酸的化学化合物。

[0348] 本文所用的术语“前药”是指已知化合物或组合物的活性形式的衍生物, 当向受试者施用该衍生物时, 该衍生物逐渐转化为活性形式以产生更好的治疗反应和/或降低的毒性水平。一般来说, 前药将是本文公开的化合物的功能性衍生物, 其在体内容易转化为其理论上来源的化合物。前药包括但不限于酰基酯、碳酸酯、磷酸酯和氨基甲酸酯。这些基团是示例性的而非穷尽性的, 并且本领域技术人员可以制备其他已知品种的前药。前药可以例如用可用的羟基、硫醇基、氨基或羧基来形成。例如, 本公开化合物中的可用 OH 和/或 NH₂ 可以在碱存在下和任选地在惰性溶剂 (例如, 吡啶中的酰氯) 中使用活化酸来酰化。已经用作前药的一些常见酯是苯基酯、脂族 (C₁-C₂₄) 酯、酰氧基甲酯、氨基甲酸酯和氨基酸酯。在某些情况下, 本公开化合物的前药是其中化合物中的羟基和/或氨基被掩蔽为可在体内转化为羟基和/


或氨基的基团的那些。选择和制备合适前药的常规程序在例如“前药设计”H. Bundgaard编辑, 爱思唯尔, 1985。

[0349] 表达“保护基团”是指可用于防止分子上的潜在反应性官能团诸如胺、羟基或羧基发生化学反应而分子中其他地方发生化学变化的任何化学化合物。许多此类保护基团是本领域技术人员已知的, 并且实例可以见于“有机合成中的保护基团 (Protective Groups in Organic Synthesis)”, T.W. Greene and P.G. Wuts编辑, 约翰威立 (John Wiley & Sons), 纽约, 第4版, 2006, 1082pp, ISBN 9780471697541中。氨基保护基团的实例包括但不限于苯二甲酰亚氨基、三氯乙酰基、苄氧羰基、叔丁氧羰基和金刚烷基-氧羰基。在一些实施例中, 氨基保护基是氨基甲酸酯氨基保护基团, 其被定义为当与氨基结合时形成氨基甲酸酯的氨基保护基。在其他实施例中, 氨基甲酸酯保护基团是烯丙氧基羰基 (Alloc)、苄氧羰基 (Cbz)、9 芴甲氧羰基 (Fmoc)、叔丁氧羰基 (Boc) 和 α, α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧羰基 (Ddz)。关于较新的氮保护基团的最新讨论参见四面体 (Tetrahedron) 2000, 56, 2339-2358。羟基保护基团的实例包括但不限于乙酰基、叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBDMS)、三苯甲基 (Trt)、叔丁基和四氢吡喃基 (THP)。羧基保护基团的实例包括但不限于甲酯、叔丁酯、苄酯、三甲基甲硅烷基乙酯和2,2,2-三氯乙酯。

[0350] 本文所用的表达“序列同一性”是指两个多肽序列或两个核酸序列之间的序列同一性百分比。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比, 比对序列以用于最佳的比较目的 (例如, 可以在第一个氨基酸或核酸序列的序列中引入间隙, 以便与第二个氨基酸或核酸序列最佳比对)。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时, 则在该位置的分子是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列所共有的相同位置的数目的函数 (即, %同一性 = 相同重叠位置的数目 / 位置总数乘以100%)。在一个实施例中, 两个序列的长度相同。也可以使用数学算法来确定两个序列之间的同一性百分比。用于比较两个序列的数学算法的一个优选的非限制性实例是如在ref. 53中修改的ref. 52的算法。此类算法被并入ref. 49的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以使用NBLAST核苷酸程序参数集例如对于得分 = 100, 字长 = 12, 进行以获得与本申请的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白搜索可以使用XBLAST程序参数集例如对于得分 = 50, 字长 = 3进行以获得与本公开的蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的间隙比对, 可如在ref. 47所述利用间隙BLAST。作为另一选择, 可使用PSI-BLAST来执行迭代搜索, 以检测分子之间的距离关系 (Id.)。当利用BLAST、间隙BLAST和PSI-Blast程序时, 可使用相应程序 (例如, XBLAST和NBLAST) 的默认参数 (参见例如NCBI网站)。用于比较序列的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17的算法。此类算法并入作为GCG序列比对软件包一部分的比对程序 (2.0版) 中。当利用比对程序比较氨基酸序列时, 可以使用PAM120重量残基表、12的间隙长度罚分和4的间隙罚分。两个序列之间的同一性百分比可以在允许或不允许有间隙的情况下使用与上述类似的技术确定。在计算同一性百分比时, 通常只计算精确匹配项。

[0351] 如本文所用的表达“基本上由……组成”旨在指定所述特征、元件、组件、群组、整数和/或步骤的存在, 以及实质上不影响特征、元件、组件、群组、整数和/或步骤的基本和新颖特征的那些。

[0352] 表达“固相化学”是指其中反应的一种组分共价键合至聚合物材料(如下定义的固体支持物)的化学反应的进行。在肽和寡核苷酸化学的传统领域之外,在固相上进行化学反应的反应方法已经变得更加广为人知和确立(固相化学:实用手册(Solid-Phase Synthesis:A Practical Guide),F.Albericio编辑,CRC出版社(CRC Press),2000,848pp,ISBN:978-0824703592;固相有机合成(Organic Synthesis on Solid Phase),第2版,Florencio Zaragoza Dörwald,威立-VCH(Wiley-VCH),2002,530pp,ISBN:3-527-30603-X;固相有机合成:概念、策略与应用(Solid-Phase Organic Synthesis:Concepts, Strategies, and Applications),P.H.Toy,Y.Lam编辑,威立(Wiley),2012,568pp,ISBN:978-0470599143)。

[0353] 术语“固体支持物”、“固相”或“树脂”是指用于进行固相化学的机械和化学稳定的聚合物基质。这用“树脂”、“P-”或以下符号:  来表示。

[0354] 合适的聚合物材料的实例包括但不限于聚苯乙烯、聚乙烯、聚乙二醇(PEG,包括但不限于ChemMatrix®(Matrix Innovation,加拿大魁北克省魁北克;组合化学杂志(J.Comb.Chem.)2006,8,213-220)、接枝或共价键合至聚苯乙烯的聚乙二醇(也称为PEG-聚苯乙烯,TentaGel™,Rapp,W.;Zhang,L;Bayer,E.在固相合成的创新与展望(Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis)中,肽、多肽和寡核苷酸(Peptides, Polypeptides and Oligonucleotides);Epton,R.编辑;SPCC Ltd.:英国伯明翰;p 205)、聚丙烯酸酯(CLEAR™)、聚丙烯酰胺、聚氨基甲酸酯、PEGA[聚乙二醇聚(N,N二甲基-丙烯酰胺)共聚物,四面体快报(Tetrahedron Lett.)1992,33,3077-3080]、纤维素等。这些材料可以任选地含有另外的化学试剂以形成交联键从而机械地稳定结构,例如与二乙烯基苯交联的聚苯乙烯(DVB,通常为0.1%-5%,优选0.5%-2%)。作为非限制性实例,此固体支持物可包括氨基甲基聚苯乙烯、羟甲基聚苯乙烯、二苯甲基胺聚苯乙烯(BHA)、甲基二苯甲基胺(MBHA)聚苯乙烯,以及其他含有游离化学官能团的聚合物主链,最典型的是NH₂或-OH,用于进一步衍生或反应。该术语还意指包括具有高比例(“负载”)的这些官能团的“Ultrasins”,诸如由聚乙烯亚胺和交联分子制备的那些(组合化学杂志2004,6,340-349)。在合成结束时,树脂通常被丢弃,尽管它们已被证明能够被回收(四面体快报1975,16,3055)。

[0355] 通常,用作树脂的材料是不溶性聚合物,但某些聚合物根据溶剂具有不同的溶解度,并且也可用于固相化学。例如,聚乙二醇可以这种方式使用,因为它可溶于可进行化学反应的许多有机溶剂中,但它不溶于其他溶剂,诸如二乙醚中。因此,反应可以在溶液中均匀进行,然后通过加入二乙醚使聚合物上的产物沉淀,并加工成固体。这被称为“液相”化学。

[0356] 表达“药学上可接受的”是指与受试者诸如动物或人的治疗相容。

[0357] 表达“药学上可接受的盐”是指适用于或与受试者诸如动物或人的治疗相容的酸加成盐或碱加成盐。

[0358] 如本文所用的表达“药学上可接受的酸加成盐”是指本公开的任何化合物或抗体的任何无毒有机或无机盐或其任何中间体。形成合适盐的示例性无机酸包括盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸,以及金属盐,诸如正磷酸一氢钠和硫酸氢钾。形成合适盐的示例性有机酸包括

单羧酸、二羧酸和三羧酸,诸如乙醇酸、乳酸、丙酮酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、马来酸、苯甲酸、苯乙酸、肉桂酸和水杨酸,以及磺酸,诸如对甲苯磺酸和甲磺酸。可以形成单酸盐或二酸盐,并且此类盐可以水合、溶剂化或基本无水的形式存在。一般来说,本公开的化合物或抗体的酸加成盐在水和各种亲水有机溶剂中更易溶解,并且与它们的游离碱形式相比通常表现出更高的熔点。合适的盐的选择将是本领域技术人员已知的。其他非药学上可接受的盐,例如草酸盐可用于例如分离本公开的化合物或抗体,用于实验室用途,或用于随后转化为药学上可接受的酸加成盐。

[0359] 如本文所用的表达“药学上可接受的碱加成盐”是指本公开的任何酸化合物的任何无毒有机或无机碱加成盐或其任何中间体。可形成碱加成盐的本公开的酸性化合物包括,例如,其中 CO_2H 是官能团。形成合适盐的示例性无机碱包括锂、钠、钾、钙、镁或钡氢氧化物。形成合适盐的示例性有机碱包括脂族、脂环族或芳族有机胺,诸如甲胺、三甲胺和甲基吡啶或氨。合适的盐的选择将是本领域技术人员已知的。其他非药学上可接受的碱加成盐可用于,例如,分离本公开的化合物、抗体或共轭化合物,用于实验室用途,或者用于随后转化为药学上可接受的酸加成盐。

[0360] 使用标准技术实现所需化合物盐的形成。例如,用酸或碱在合适的溶剂中处理中性化合物,并且通过过滤、提取或任何其他合适的方法分离形成的盐。

[0361] 如本文所用的术语“溶剂化物”是指化合物或抗体或其药学上可接受的盐,其中合适溶剂的分子并入晶格中。合适的溶剂在施用剂量下是生理学上可耐受的。合适的溶剂的实例是乙醇、水等。当水是溶剂时,分子被称为“水合物”。溶剂化物的形成将根据化合物和溶剂化物变化。一般来说,溶剂化物是通过将化合物或抗体溶解在合适的溶剂中,并通过冷却或使用抗溶剂分离溶剂化物而形成的。溶剂化物通常在环境条件下干燥或共沸。

[0362] 本文使用的术语“受试者”包括动物界的所有成员,包括哺乳动物诸如小鼠、大鼠、狗和人。

[0363] 术语“合适的”和“适当的”是指特定基团或条件的选择将取决于待进行的特定合成操作和分子的特性,但所述选择将完全在本领域训练有素的人员的技能范围内。本文描述的所有过程步骤都要在适合提供所示产物的条件下进行。本领域技术人员将理解,可以改变所有反应条件,包括例如反应溶剂、反应时间、反应温度、反应压力、反应物比率以及反应应该在无水还是惰性气氛下进行,以优化所需产物的产率,并且其在他们的技能范围内。

[0364] 表达本公开的化合物或组合物的“治疗有效量”、“有效量”或“足够量”是当向受试者(包括哺乳动物,例如人)施用足量以产生有益的或期望的结果(包括临床结果)的量,并且因此,“治疗有效量”或“有效量”取决于其应用的上下文。例如,在治疗癌症的情况下,其是与不施用化合物、肽化合物-共轭物、抗体、抗体-共轭物或组合物而获得的反应相比,化合物、肽化合物-共轭物、抗体、抗体-共轭物或组合物足以实现癌症的此类治疗的量。将对应于有效量的本公开的给定化合物、肽化合物-共轭物、抗体、抗体-共轭物或组合物的量将根据各种因素而变化,诸如给定的药物、肽化合物-共轭物、抗体、抗体-共轭物、药物配方、施用途径、疾病或障碍的类型、被治疗的受试者或宿主的身份等,但是仍然可以由本领域技术人员常规地确定。此外,如本文所用的本公开的化合物、肽化合物-共轭物、抗体、抗体-共轭物或组合物的“治疗有效量”或“有效量”是与对照相比禁止、抑制或减少受试者中的癌症(例如,如由临床症状或癌细胞的量所确定的)的量。

[0365] 如本文所用以及本领域所熟知的“治疗(treatment或treating)”是用于获得有益或期望的结果,包括临床结果的途径。有益或期望的临床结果可包括但不限于抑制血管生成拟态。例如,受试者、癌组织和/或细胞中的血管生成拟态管长度的减少比未治疗的对照受试者、癌组织和/或细胞大至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。例如,受试者、癌组织和/或细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的对照受试者、癌组织和/或细胞大至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。“治疗”也指减轻或改善一种或多种症状或病症,减轻疾病程度,稳定(即,不恶化)疾病状态、防止疾病传播、延缓或减缓疾病进展、改善或减轻疾病状态以及缓解(部分或全部),无论是可检测的还是不可检测的。

[0366] 如本文所用的术语“耐受性”或“耐受的”是指用治疗剂治疗的受试者可耐受或接受治疗剂的程度。例如,可通过测量不同参数诸如(i)维持或无体重减轻,(ii)耐受的治疗持续时间和(iii)副作用减少或无副作用来评估耐受性。例如,众所周知,当使用治疗剂治疗期间没有观察到体重减轻时,受试者对此类治疗剂是耐受的。例如,本公开的共轭物(包含至少一种治疗剂)可以增加给定治疗剂的耐受性,因为该共轭物比单独服用的治疗剂对受体更具选择性。非共轭毒素可能毒性太大,无法在受试者中单独施用或使用。因此,高效力毒素可用于抗体-药物共轭物,以增加耐受性。例如,本公开的共轭物是本文所述的抗体共轭物。在一些实施例中,共轭物是包含本文所述的至少一种治疗剂的共轭抗体,用于增加该至少一种治疗剂的耐受性。在一些实施例中,该治疗剂是选自由美登木素生物碱、阿里他汀、卡奇霉素、鹅膏毒素和鹅膏蕈碱组成的群组中的毒素。

[0367] 如本文所用的术语“施用(administered或administering)”是指将治疗有效量的本申请的化合物、肽化合物-共轭物、抗体、抗体-共轭物或组合物在体外(例如,细胞培养物)或体内(例如,在受试者中)对细胞施用。

[0368] 在理解本公开的范围时,如本文所用的术语“包含”及其派生词旨在是开放式术语,其指定所述特征、元件、组件、群组、整数和/或步骤的存在,但是不排除其他未陈述的特征、元件、组件、群组、整数和/或步骤的存在。前述内容也适用于具有类似含义的词语,诸如术语“包括”、“具有”及其派生词。最后,如本文所用的程度术语诸如“基本上”、“约”和“近似”是指所修饰的术语的合理偏差量,使得最终结果不会显著改变。如果这种偏离将不会否定它所修饰的词的意思,则这些程度术语应被解释为包括被修饰术语的至少±5%的偏离。

[0369] 除非内容另有明确说明,否则如在本说明书和所附权利要求书中所使用的单数形式“一(a、an)”和“该”包括复数指称。因此例如,含有“化合物”的组合物包括两种或更多种化合物的混合物。还应该注意的,术语“或”通常以其包括“和/或”的含义使用,除非上下文清楚地另有规定。

[0370] 在包含“另外的”或“第二”组分的组合物中,如本文所用的第二组分在化学上不同于其他组分或第一组分。“第三”组分不同于其他组分、第一组分和第二组份,并且进一步列举的或“附加的”组分类似地不同。

[0371] 在特定部分中描述的定义和实施例旨在适用于本文描述的其他实施例,如本领域技术人员所理解的,它们适用于这些其他实施例。

[0372] 本文中通过端点对数值范围的叙述包括包含在所述范围内的所有数字和分数(例

如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.90、4和5)。应当理解,所有数字及其分数都被认为是由术语“约”修饰的。

[0373] 之前开发了一个平台,该平台允许将治疗剂运输至癌细胞中以用于针对原发性肿瘤和继发性肿瘤的新疗法。此途径利用源自细菌蛋白或癌细胞中表达的受体的配体的肽化合物(例如,分拣蛋白/多配体聚糖)。在本公开中,描述了用于抑制血管生成拟态的治疗剂与这些肽化合物之一的共轭。例如,植物化学物质例如姜黄素可以与肽化合物共轭。

[0374] 本文公开了肽化合物以及包含与肽化合物连接的至少一种治疗剂的共轭化合物,用于抑制血管生成拟态。

[0375] 因此,第一方面是一种肽化合物,其与选自式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)和式(XIII)的化合物的化合物具有至少60%的序列同一性:

[0376] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (SEQ ID NO:1)

[0377] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (SEQ ID NO:2)

[0378] $YKX_{13}LRRX_{14}APRDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (SEQ ID NO:3)

[0379] $YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4)

[0380] $IKLSSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (V) (SEQ ID NO:5)

[0381] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (VI) (SEQ ID NO:6)

[0382] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (VII) (SEQ ID NO:7)

[0383] $GVQAKAGVINMFKSESY$ (VIII) (SEQ ID NO:8)

[0384] $GVRKAGVRNMFKSESY$ (IX) (SEQ ID NO:9)

[0385] $GVRKAGVRN(N1e)FKSESY$ (X) (SEQ ID NO:10)

[0386] $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL$ (XI) (SEQ ID NO:11)

[0387] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL$ (XII) (SEQ ID NO:12)

[0388] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL$ (XIII) (SEQ ID NO:13)

[0389] 其中

[0390] X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 和 X_{19} 独立地选自任何氨基酸;

[0391] X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 和 X_{21} 独立地选自Q、P、Y、I和L;

[0392] n是0、1、2、3、4或5;

[0393] 当 X_9 存在多于一次时,每个所述 X_9 独立地选自任何氨基酸;

[0394] 当 X_{19} 存在多于一次时,每个所述 X_{19} 独立地选自任何氨基酸

[0395] 并且其中至少一个保护基团和/或至少一种标记剂任选地在N和/或C末端与所述肽连接,

[0396] 用于抑制血管生成拟态。

[0397] 另一方面是一种肽化合物,与选自式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)和式(XIII)的化合物的化合物至少具有至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%或至少80%的序列同一性:

- [0398] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY(I)$ (SEQ ID NO:1)
- [0399] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY(II)$ (SEQ ID NO:2)
- [0400] $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L(III)$ (SEQ ID NO:3)
- [0401] $YKX_{18}LRR(X_{19})_NPLRDPALRX_{20}X_{21}L(IV)$ (SEQ ID NO:4)
- [0402] $IKLSSGGVQAKAGVINMDKSESM(V)$ (SEQ ID NO:5)
- [0403] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESY(VI)$ (SEQ ID NO:6)
- [0404] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESYK(VII)$ (SEQ ID NO:7)
- [0405] $GVQAKAGVINMFKSESY(VIII)$ (SEQ ID NO:8)
- [0406] $GVRKAGVRNMFKSESY(IX)$ (SEQ ID NO:9)
- [0407] $GVRKAGVRN(N1e)FKSESY(X)$ (SEQ ID NO:10)
- [0408] $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL(XI)$ (SEQ ID NO:11)
- [0409] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL(XII)$ (SEQ ID NO:12)
- [0410] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL(XIII)$ (SEQ ID NO:13)
- [0411] 其中
- [0412] $X_1、X_2、X_3、X_4、X_5、X_6、X_7、X_8、X_9、X_{10}、X_{11}、X_{12}、X_{13}、X_{14}、X_{15}、X_{18}$ 和 X_{19} 独立地选自任何氨基酸；
- [0413] $X_{16}、X_{17}、X_{20}$ 和 X_{21} 独立地选自Q、P、Y、I和L；
- [0414] n是0、1、2、3、4或5；
- [0415] 当 X_9 存在多于一次时，每个所述 X_9 独立地选自任何氨基酸；
- [0416] 当 X_{19} 存在多于一次时，每个所述 X_{19} 独立地选自任何氨基酸
- [0417] 并且其中至少一个保护基团和/或至少一种标记剂任选地在N和/或C末端与所述肽连接，
- [0418] 用于抑制血管生成拟态。
- [0419] 再一方面是一种肽化合物，其与选自式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)和式(XIII)的化合物的化合物具有至少80%的序列同一性：
- [0420] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY(I)$ (SEQ ID NO:1)
- [0421] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY(II)$ (SEQ ID NO:2)
- [0422] $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L(III)$ (SEQ ID NO:3)
- [0423] $YKX_{18}LRR(X_{19})_NPLRDPALRX_{20}X_{21}L(IV)$ (SEQ ID NO:4)
- [0424] $IKLSSGGVQAKAGVINMDKSESM(V)$ (SEQ ID NO:5)
- [0425] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESY(VI)$ (SEQ ID NO:6)
- [0426] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESYK(VII)$ (SEQ ID NO:7)
- [0427] $GVQAKAGVINMFKSESY(VIII)$ (SEQ ID NO:8)
- [0428] $GVRKAGVRNMFKSESY(IX)$ (SEQ ID NO:9)
- [0429] $GVRKAGVRN(N1e)FKSESY(X)$ (SEQ ID NO:10)
- [0430] $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL(XI)$ (SEQ ID NO:11)
- [0431] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL(XII)$ (SEQ ID NO:12)
- [0432] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL(XIII)$ (SEQ ID NO:13)

- [0433] 其中
- [0434] X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{18} 和 X_{19} 独立地选自任何氨基酸；
- [0435] X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 和 X_{21} 独立地选自Q、P、Y、I和L；
- [0436] n是0、1、2、3、4或5；
- [0437] 当 X_9 存在多于一次时，每个所述 x_9 独立地选自任何氨基酸；
- [0438] 当 X_{19} 存在多于一次时，每个所述 X_9 独立地选自任何氨基酸
- [0439] 并且其中至少一个保护基团和/或至少一种标记剂任选地在N和/或C末端与所述肽连接，
- [0440] 用于抑制血管生成拟态。
- [0441] 在一些实施例中，所述肽化合物靶向分拣蛋白受体。在一些实施例中，所述肽化合物用于靶向分拣蛋白受体。
- [0442] 例如，所述肽化合物是包含以下的肽化合物：
- [0443] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (SEQ ID NO:1)
- [0444] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (SEQ ID NO:2)
- [0445] $YKX_{13}LRRX_{14}APRDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (SEQ ID NO:3)
- [0446] $YKX_{18}LRR(X_{19})_NPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4)
- [0447] $IKLSSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (V) (SEQ ID NO:5)
- [0448] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (VI) (SEQ ID NO:6)
- [0449] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (VII) (SEQ ID NO:7)
- [0450] $GVQAKAGVINMFKSESY$ (VIII) (SEQ ID NO:8)
- [0451] $GVRKAGVRNMFKSESY$ (IX) (SEQ ID NO:9)
- [0452] $GVRKAGVRN(N1e)FKSESY$ (X) (SEQ ID NO:10)
- [0453] $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL$ (XI) (SEQ ID NO:11) $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL$ (XII) (SEQ ID NO:12) 或 $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL$ (XIII) (SEQ ID NO:13)。
- [0454] 例如，所述肽化合物是基本上由以下组成的肽化合物：
- [0455] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (SEQ ID NO:1)
- [0456] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (SEQ ID NO:2)
- [0457] $YKX_{13}LRRX_{14}APRDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (SEQ ID NO:3)
- [0458] $YKX_{18}LRR(X_{19})_NPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4)
- [0459] $IKLSSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (V) (SEQ ID NO:5)
- [0460] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (VI) (SEQ ID NO:6)
- [0461] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (VII) (SEQ ID NO:7)
- [0462] $GVQAKAGVINMFKSESY$ (VIII) (SEQ ID NO:8)
- [0463] $GVRKAGVRNMFKSESY$ (IX) (SEQ ID NO:9)
- [0464] $GVRKAGVRN(N1e)FKSESY$ (X) (SEQ ID NO:10)
- [0465] $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL$ (XI) (SEQ ID NO:11) $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL$ (XII) (SEQ ID NO:12) 或 $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL$ (XIII) (SEQ ID NO:13)。
- [0466] 例如，所述肽化合物是由以下组成的肽化合物：

- [0467] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (SEQ ID NO:1)
- [0468] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (SEQ ID NO:2)
- [0469] $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (SEQ ID NO:3)
- [0470] $YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4)
- [0471] $IKLSSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (V) (SEQ ID NO:5)
- [0472] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (VI) (SEQ ID NO:6)
- [0473] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (VII) (SEQ ID NO:7)
- [0474] $GVQAKAGVINMFKSESY$ (VIII) (SEQ ID NO:8)
- [0475] $GVRKAGVRNMFKSESY$ (IX) (SEQ ID NO:9)
- [0476] $GVRKAGVRN(N1e)FKSESY$ (X) (SEQ ID NO:10)
- [0477] $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL$ (XI) (SEQ ID NO:11)
- [0478] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL$ (XII) (SEQ ID NO:12) 或
- [0479] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL$ (XIII) (SEQ ID NO:13)。
- [0480] 根据另一方面,提供一种肽化合物,其包含选自式(I)、式(II)、式(III)、式(IV)、式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)、式(X)、式(XI)、式(XII)和式(XIII)的化合物的化合物:
- [0481] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (I) (SEQ ID NO:1)
- [0482] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (II) (SEQ ID NO:2)
- [0483] $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (III) (SEQ ID NO:3)
- [0484] $YKX_{18}LRR(X_{19})_nPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4)
- [0485] $IKLSSGGVQAKAGVINMDKSESM$ (V) (SEQ ID NO:5)
- [0486] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESY$ (VI) (SEQ ID NO:6)
- [0487] $IKLSSGGVQAKAGVINMFKSESYK$ (VII) (SEQ ID NO:7)
- [0488] $GVQAKAGVINMFKSESY$ (VIII) (SEQ ID NO:8)
- [0489] $GVRKAGVRNMFKSESY$ (IX) (SEQ ID NO:9)
- [0490] $GVRKAGVRN(N1e)FKSESY$ (X) (SEQ ID NO:10)
- [0491] $YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL$ (XI) (SEQ ID NO:11)
- [0492] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL$ (XII) (SEQ ID NO:12)
- [0493] $YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL$ (XIII) (SEQ ID NO:13)
- [0494] 其中
- [0495] X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 和 X_{19} 独立地选自任何氨基酸;
- [0496] X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 和 X_{21} 独立地选自Q、P、Y、I和L;
- [0497] n是0、1、2、3、4或5;
- [0498] 当 X_9 存在多于一次时,每个所述 X_9 独立地选自任何氨基酸;
- [0499] 当 X_{19} 存在多于一次时,每个所述 X_{19} 独立地选自任何氨基酸
- [0500] 并且其中至少一个保护基团和/或至少一种标记剂任选地在N和/或C末端与所述肽连接,
- [0501] 用于抑制血管生成拟态。

至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0515] 例如,所述肽化合物与由式(XIII)或SEQ ID NO:13表示的肽化合物具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0516] 例如,所述肽化合物与由式(LI)或SEQ ID NO:23表示的肽化合物具有至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0517] 在一个实施例中,n是0。在一个实施例中,n是1。在一个实施例中,n是2。在一个实施例中,n是3。在一个实施例中,n是4。在一个实施例中,n是5。

[0518] 在实施例中,肽化合物由式(I)或式(II)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(I)或SEQ ID NO:1表示。在一个实施例中,肽化合物由式(II)或SEQ ID NO:2表示。在一个实施例中,肽化合物由式(III)或式(IV)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(III)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(IV)表示。在实施例中,肽化合物由式(V)、式(VI)、式(VII)、式(VIII)、式(IX)或式(X)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(V)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(VI)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(VII)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(VIII)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(IX)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(X)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(XI)、式(XII)或式(XIII)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(XI)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(XII)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(XIII)表示。在一个实施例中,肽化合物由式(LI)表示。

[0519] 在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:1的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:2的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:3的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:4的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:5的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:6的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:7的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:8的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:9的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:10的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:11的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:12的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:13的氨基酸序列表示。在一个实施例中,肽化合物由SEQ ID NO:23的氨基酸序列表示。

[0520] 在一个实施例中,至少一个保护基团在N和/或C末端与所述肽连接。

[0521] 在一个实施例中,琥珀酰基与肽化合物连接。例如,肽化合物具有琥珀酰基-IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY序列,其对应于SEQ ID NO:6,并且在N末端具有附着至其的琥珀酰基。

[0522] 在一个实施例中,乙酰基与肽化合物连接。例如,所述肽化合物具有乙酰基-GVRAKAGVRNMFKSESY (SEQ ID NO:14) 的序列。例如,所述肽化合物具有乙酰基-GVRAKAGVRN (N1e) FKSESY (SEQ ID NO:15) 的序列。例如,所述肽化合物具有乙酰基-YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL (SEQ ID NO:16) 的序列。例如,所述肽化合物具有乙酰基-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL (SEQ ID NO:17) 的序列。例如,所述肽化合物具有乙酰基-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL (SEQ ID NO:18) 的序列。

[0523] 在一个实施例中,至少一种标记剂在N和/或C末端与所述肽连接。

[0524] 本领域技术人员将理解,可以使用常用的标记剂。例如,标记剂是维生素。例如,标记剂是生物素。例如,标记剂用作荧光探针和/或成像剂。

[0525] 在一个实施例中,肽化合物是生物素化的。例如,肽化合物具有 IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK (生物素) 序列,其对应于SEQ ID NO:7,并且在C末端具有附着至其的生物素分子。

[0526] 例如,肽化合物由式 (XXXVI) 表示:

[0527] 琥珀酰基-IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY (XXXVI)

[0528] 其包含具有SEQ ID NO:6的所述肽化合物,其中琥珀酰基附着在所述N末端处。

[0529] 在一个实施例中, X_{16} 独立地选自Q、P、Y、I和L。

[0530] 例如, X_{16} 是Q。例如, X_{16} 是P。例如, X_{16} 是Y。例如, X_{16} 是I。

[0531] 在一个实施例中, X_{17} 独立地选自Q、P、Y、I和L。

[0532] 例如, X_{17} 是Q。例如, X_{17} 是P。例如, X_{17} 是Y。例如, X_{17} 是I。

[0533] 在一个实施例中, X_{20} 独立地选自Q、P、Y、I和L。

[0534] 例如, X_{20} 是Q。例如, X_{20} 是P。例如, X_{20} 是Y。例如, X_{20} 是I。

[0535] 在一个实施例中, X_{21} 独立地选自Q、P、Y、I和L。

[0536] 例如, X_{21} 是Q。例如, X_{21} 是P。例如, X_{21} 是Y。例如, X_{21} 是I。

[0537] 在一个实施例中,肽化合物选自:

[0538] $X_1X_2X_3X_4X_5GVX_6AKAGVX_7NX_8FKSESY$ (SEQ ID NO:1);

[0539] $(X_9)_nGVX_{10}AKAGVX_{11}NX_{12}FKSESY$ (SEQ ID NO:2);

[0540] $YKX_{13}LRRX_{14}APRWDX_{15}PLRDPALRX_{16}X_{17}L$ (SEQ ID NO:3);

[0541] $YKX_{18}LRR(X_{19})_NPLRDPALRX_{20}X_{21}L$ (IV) (SEQ ID NO:4);

[0542] IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM (SEQ ID NO:5);

[0543] 琥珀酰基-IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY (其包含SEQ ID NO:6,其中琥珀酰基在N末端处与其附接);

[0544] IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK (生物素) (其包含SEQ ID NO:7,其中生物素分子在C末端处与其附接);

[0545] GVQAKAGVINMFKSESY (SEQ ID NO:8);

[0546] 乙酰基-GVRAKAGVRNMFKSESY (SEQ ID NO:14);

[0547] 乙酰基-GVRAKAGVRN (N1e) FKSESY (SEQ ID NO:15);

[0548] 乙酰基-YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL (SEQ ID NO:16);

[0549] 乙酰基-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL (SEQ ID NO:17);

[0550] 乙酰基-YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL (SEQ ID NO:18);

[0551] GVRAKAGVRN(N1e)FKSESYC(SEQ ID NO:23);和

[0552] 乙酰基-GVRAKAGVRN(N1e)FKSESYC(SEQ ID NO:24)。

[0553] 在一个实施例中,可以通过添加一个或多个氨基酸残基在C和/或N末端修饰肽化合物,以获得或增加肽末端的优先结合位点。例如,氨基酸可以是半胱氨酸。例如,氨基酸可以是赖氨酸。例如,氨基酸可以是添加在肽C末端的半胱氨酸。在一个实施例中,通过在C末端添加半胱氨酸来修饰肽化合物。在具体实施例中,肽化合物具有对应于SEQ ID NO:15的乙酰基-GVRAKAGVRN(N1e)FKSESY序列,所述序列通过在C末端添加半胱氨酸而被修饰。

[0554] 在一方面,本文所述的肽化合物或其衍生物特异性结合具有SEQ ID NO:25-50中任一项所示氨基酸序列、其类似物或其片段的多肽,用于抑制血管生成拟态。在另一方面,本文所述的肽化合物或其衍生物靶向分拣蛋白受体。在另一方面,本文所述的肽化合物或其衍生物用于靶向分拣蛋白受体。在另一方面,本文所述的肽化合物或其衍生物结合如SEQ ID NO:25-50中任一项所示的至少2、3、4或5个连续氨基酸残基、其类似物或其片段。例如,肽化合物或其衍生物结合至少2个连续氨基酸残基,如SEQ ID NO:25所示。例如,肽化合物或其衍生物结合至少3个连续氨基酸残基,如SEQ ID NO:25所示。例如,肽化合物或其衍生物结合至少4个连续氨基酸残基,如SEQ ID NO:25所示。例如,肽化合物或其衍生物结合至少5个连续氨基酸残基,如SEQ ID NO:25所示。

[0555] 本文所述的肽化合物可与小分子、肽、蛋白、寡核苷酸、诊断剂、成像剂或放射性核素剂、大分子诸如单克隆抗体、治疗剂诸如植物化学物质或药物递送系统连接(connect)、连接(link)、混合或共轭,该药物递送系统包括纳米颗粒、脂质体、纳米管、负载有治疗剂的石墨烯颗粒、成像剂、基因、siRNA。所得共轭化合物可用作单一或联合疗法,例如用于抑制血管生成拟态。

[0556] 因此,本文公开的另一方面是一种具有式A-(B)_n的共轭化合物,

[0557] 其中

[0558] n是1、2、3或4;

[0559] A是本文定义的肽化合物,其中所述肽任选地被保护基团保护;并且

[0560] B是至少一种治疗剂,其中B与A连接,

[0561] 任选地,所述肽化合物是环状的,

[0562] 用于抑制血管生成拟态。

[0563] 本文公开的再一方面是一种具有式A-(B)_n的共轭化合物,

[0564] 其中

[0565] n是1、2、3或4;

[0566] A是在本公开中所定义的肽化合物,其中所述肽化合物任选地被保护基团保护;并且

[0567] B是至少一种治疗剂,其中B任选地在所述肽化合物的游离胺处、在所述肽化合物的N末端位置处、在所述肽化合物的游离-SH处或在所述肽化合物的游离羧基处与A连接,

[0568] 任选地,所述肽化合物是环状的,

[0569] 用于抑制血管生成拟态。

[0570] 在一些实施例中,本文所述的共轭肽靶向分拣蛋白受体。在一些实施例中,本文所述的共轭肽用于靶向分拣蛋白受体。

- [0571] 本文公开的再一方面是一种具有式A-(B)_n的共轭化合物,
- [0572] 其中
- [0573] n是1、2、3或4;
- [0574] A是本文定义的肽化合物;并且
- [0575] B是至少一种治疗剂,其中B在所述肽化合物的赖氨酸残基的游离胺处任选地通过接头,或者在所述肽化合物的N末端位置处任选地通过接头与A连接,
- [0576] 任选地,所述肽化合物是环状的,
- [0577] 用于治疗癌症或侵袭性癌症。
- [0578] 在实施例中,B通过接头、任选地可切割接头与A连接。
- [0579] 例如,所述至少一种治疗剂是选自姜黄素、 ω -3、白柳皮、绿茶、儿茶素、碧萝芷、齿叶乳香树脂、白藜芦醇、绒毛钩藤、辣椒素、花青素/花色苷、黄酮、橄榄油化合物、绿原酸和sulfopharaphane的植物化学物质。
- [0580] 在实施例中,治疗剂是植物化学物质或抗癌剂。
- [0581] 在实施例中,植物化学物质是姜黄素。
- [0582] 在实施例中,共轭化合物选自:
- [0583] GVRAK(姜黄素)AGVRN(N1e)FK(姜黄素)SESY-式(XIV)
- [0584] 其包含具有SEQ ID NO:10的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的姜黄素分子;和
- [0585] YK(姜黄素)SLRRK(姜黄素)APRWDAPLRDPALRQLL-式(XV)
- [0586] 其包含具有SEQ ID NO:11的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的姜黄素分子。
- [0587] 例如,共轭化合物由式(XIV)表示。
- [0588] 例如,共轭化合物由式(XV)表示。
- [0589] 在实施例中,共轭化合物选自:
- [0590] 乙酰基-GVRAK(姜黄素)AGVRN(N1e)FK(姜黄素)SESY-式(XVI)
- [0591] 其包含具有SEQ ID NO:15的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的姜黄素分子,和
- [0592] 乙酰基-YK(姜黄素)SLRRK(姜黄素)APRWDAPLRDPALRQLL-式(XVII)
- [0593] 其包含具有SEQ ID NO:16的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的姜黄素分子。
- [0594] 例如,共轭化合物由式(XVI)表示。
- [0595] 例如,共轭化合物由式(XVII)表示。
- [0596] 在实施例中,治疗剂是抗癌剂。
- [0597] 在实施例中,抗癌剂是多西他赛。
- [0598] 在实施例中,共轭化合物由式(XIX)表示:
- [0599] GVRAK(多西他赛)AGVRN(N1e)FK(多西他赛)SESY-式(XIX)
- [0600] 其包含具有SEQ ID NO:10的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的多西他赛分子。
- [0601] 在另一实施例中,共轭化合物由式(XXIII)表示:

- [0602] 乙酰基-GVRAK(多西他赛)AGVRN(N1e)FK(多西他赛)SESY-式(XXIII)
- [0603] 其包含具有SEQ ID NO:15的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的多西他赛分子。
- [0604] 在实施例中,抗癌剂是阿霉素。
- [0605] 在实施例中,共轭化合物由式(XXVI)表示:
- [0606] GVRAK(阿霉素)AGVRN(N1e)FK(阿霉素)SESY-式(XXVI)
- [0607] 其包含具有SEQ ID NO:10的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的阿霉素分子。
- [0608] 在另一实施例中,共轭化合物由式(XXVIII)表示:
- [0609] 乙酰基-GVRAK(阿霉素)AGVRN(N1e)FK(阿霉素)SESY-式(XXVIII)
- [0610] 其包含具有SEQ ID NO:15的所述肽化合物,其中每个赖氨酸残基具有与其连接的阿霉素分子。
- [0611] 在实施例中,抗癌剂是卡巴他赛。
- [0612] 在实施例中,抗癌剂是aldoxorubicin。
- [0613] 在实施例中,共轭化合物由式(LI)表示:
- [0614] GVRAKAGVRN(N1e)FKSESYC(aldoxorubicin)-式(LI)
- [0615] 其包含具有SEQ ID NO:23的所述肽化合物,其中半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子,或者
- [0616] 其包含具有SEQ ID NO:10的所述肽化合物,其中半胱氨酸残基被添加到所述肽化合物的C末端,并且其中所述半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子。
- [0617] 在实施例中,共轭化合物由式(LII)表示:
- [0618] 乙酰基-GVRAKAGVRN(N1e)FKSESYC(aldoxorubicin)-式(LII)
- [0619] 其包含具有SEQ ID NO:24的所述肽化合物,其中半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子,或者
- [0620] 其包含具有SEQ ID NO:15的所述肽化合物,其中半胱氨酸残基被添加到所述肽化合物的C末端,并且其中所述半胱氨酸残基具有与其连接的aldoxorubicin分子。
- [0621] 在实施例中,所述至少一种治疗剂B在所述肽化合物的所述赖氨酸残基的所述游离胺处,通过接头与所述肽化合物A连接。
- [0622] 在实施例中,所述至少一种治疗剂B在所述肽化合物的所述N末端位置通过接头与所述肽化合物A连接。
- [0623] 在实施例中,接头选自琥珀酸和二甲基戊二酸接头。
- [0624] 例如,接头是可切割接头。例如,接头是不可切割接头。
- [0625] 例如,共轭化合物可以包含将所述至少一种治疗剂连接至肽化合物或抗体的可切割接头。例如,所述至少一种治疗剂可以通过酯酶对酯键的作用从肽化合物或抗体中释放。
- [0626] 例如,可以通过形成键诸如肽键,在赖氨酸或氨基末端,在肽或抗体上可用的游离胺上将治疗剂与肽化合物或抗体共轭。
- [0627] 在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少2个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:

25-50中任一个的至少3个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少4个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少5个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少6个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少7个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少8个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少9个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少10个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少11个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少12个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少13个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少14个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少15个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少16个连续。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少17个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少18个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少19个连续残基。在实施例中,分离的抗体结合SEQ ID NO:25-50中任一个的至少20个连续。

[0628] 在实施例中,分离的抗体是单克隆的、多克隆的、嵌合的或人源化的。在实施例中,分离的抗体是抗体片段。在实施例中,抗体片段是Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、迷你体、双体或其多聚体或双特异性抗体片段。在实施例中,分离的抗体是单克隆抗体。在实施例中,mAb是抗分选蛋白mAb#1或抗分选蛋白mAb#2。在实施例中,mAb是抗分选蛋白mAb#1。在实施例中,mAb是抗分选蛋白mAb#2。

[0629] 本领域技术人员将理解,可以使用特异性结合分选蛋白的其他已知抗体或其结合片段。例如,可使用将氨基酸残基800与分选蛋白C末端结合的抗分选蛋白抗体ab6640(艾博抗公司(abcam)制造)。

[0630] 可使用的结合分选蛋白的抗体或其片段的非限制性实例包括:Cat#PA5-77535、Cat#OSS00052W、Cat#MA5-31438、Cat#OSS00011W、Cat#PA1-18312、Cat#PA5-29195、Cat#PA5-96865、Cat#703207、Cat#PA5-47462、Cat#PA5-19481、Cat#OSS00010W、Cat#MA5-31437、Cat#OSS00041G(由英杰公司制造);Cat#ab16640,Cat#ab188586(由艾博抗公司制造);Cat#AF3154、Cat#AF2934、Cat#MAB3154、Cat#BAF3154、Cat#BAF2934、Cat#FAB3154(由R&D系统公司(R&D Systems)制造);克隆W16078A(由白乐津公司公司(BioLegend)制造);Cat#A56294、Cat#A56295、Cat#A56296(由E_pigentek制造);克隆CL6526、克隆CL6528、HPA006889(由Atlas Antibodies制造);Cat#12369-1-AP(由Proteintech制造);sc-376561、sc-376576、sc-376561 HRP、sc-376561 AC(由圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)制造);Cat#N2177-52A、Cat#N2177-51A、Cat#N2177-52、Cat#133710、Cat#133710-HRP、Cat#133710-生物素、Cat#133710-FITC(由United States Biological制造);Cat#A01666(由博士德生物工程公司(Boster Biological Technology)制造);Cat#LS-C198140、Cat#LS-C672508、Cat#LS-C672507、Cat#LS-C672506、Cat#LS-C672509、Cat#LS-C37627、Cat#LS-C37628、Cat#LS-C73437、Cat#LS-C94842、Cat#LS-C94818、Cat#LS-C94912、Cat#LS-C94806、Cat#LS-C668404(由Lifespan biosciences制造);Cat#A7926、Cat#A4101(由ABclonal

Technology制造);Cat#NBP2-76498、Cat#NBP2-76501、Cat#NBP2-89745、Cat#H00006172-M01 (由NovusBiologicals制造);Cat#orb525096、Cat#orb525097、Cat#orb331290、Cat#orb243645、Cat#orb243644、Cat#orb243646、Cat#orb243643、Cat#orb255650、Cat#orb412666、Cat#orb416271、Cat#orb416270、Cat#orb416272、Cat#orb416269、Cat#orb446447、Cat#orb468236、Cat#orb101927、Cat#orb373861、Cat#orb103522、Cat#orb484107 (由Biorbyt制造);Cat#H00006272-M01、Cat#H00006272-A01 (由亚诺法公司(Abnova)制造);Cat#DPAB-DC2767、Cat#CABT-B1343 (由Creative Diagnostics Incorporation制造);Cat#0AGA03665、Cat#0AAN03744、Cat#ARP64630_P050、Cat#ARP87664_P050、Cat#ARP81139_P050、Cat#OACD07428、Cat#OACA03712 (由奥维亚生物技术有限公司(Aviva Systems Biology)制造);Cat#TA351744、Cat#TA 813064、Cat#CF 813064、Cat#TA328904 (由傲锐基因公司制造);Cat#R-150-100 (由Biosensis制造);Cat#AB9712 (由密理博公司制造);Cat#67531 (由诺泰公司(NovaTeinBio)制造)和Cat#612100、Cat#612101 (由BD生物科学公司制造),以上所有者当前全文并入本文。

[0631] 在一方面,还提供一种通过以下步骤制作本文所述分离的抗体的方法,其中所述分离的抗体特异性结合包含如SEQ ID NO:25-50中任一项所示的序列、其类似物或其片段的分离的多肽:i)用免疫原性形式的所述分离的多肽使动物免疫;ii)筛选表达文库;或iii)使用噬菌体展示。

[0632] 在一方面,还提供一种具有式A' - (B)_n的共轭抗体,

[0633] 其中

[0634] n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12;

[0635] A' 是本文定义的分离的抗体,其中所述分离的抗体任选地被保护基团保护;并且

[0636] B是至少一种治疗剂,其中B任选地在所述分离的抗体的游离胺处、在所述分离的抗体的N末端位置处、在所述分离的抗体的游离-SH处或在所述分离的抗体的游离羧基处与A' 连接,

[0637] 用于抑制血管生成拟态和/或治疗癌症。

[0638] 在另一方面,还提供一种具有式A' - (B)_n的共轭抗体,

[0639] 其中

[0640] n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12;

[0641] A' 是本文定义的分离的抗体,其中所述分离的抗体任选地被保护基团保护;并且

[0642] B是至少一种治疗剂,其中B在所述分离的抗体的赖氨酸残基的游离胺处任选地通过接头,或者在所述分离的抗体的N末端位置处任选地通过接头与A' 连接,

[0643] 用于抑制血管生成拟态和/或治疗癌症。

[0644] 在实施例中,所述共轭抗体靶向分拣蛋白受体。在实施例中,所述共轭抗体用于靶向分拣蛋白受体。

[0645] 在实施例中,其中B通过接头、任选地可切割接头或不可切割接头与A' 连接。在实施例中,所述至少一种治疗剂是抗癌剂。在实施例中,抗癌剂多西他赛、阿霉素、卡巴他赛、aldoxorubicin、美登木素生物碱、阿里他汀类、卡奇霉素、鹅膏毒素、鹅膏蕈碱和寡肽模拟物(例如,妥布赖森)。在实施例中,所述至少一种治疗剂是植物化学物质,任选地姜黄素。在实施例中,抗癌剂是多西他赛。在实施例中,抗癌剂是阿霉素。在实施例中,抗癌剂是卡巴他

赛。在实施例中,抗癌剂是aldoxorubicin。

[0646] 抗体共轭物中治疗剂的数目可以是异质的。例如,对于曲妥珠单抗emtansine,其在每分子抗体0至8个美登素分子之间变化,平均每抗体3.5至4个美登素分子。

[0647] 在实施例中,共轭化合物或抗体共轭物包含与肽化合物或分离的抗体连接的1个治疗剂分子。在实施例中,共轭化合物或抗体共轭物包含与肽化合物或分离的抗体连接的至少1个治疗剂分子。在实施例中,共轭化合物或抗体共轭物包含与肽化合物或分离的抗体连接的至多8个治疗剂分子。在实施例中,抗体共轭物包含与分离的抗体连接的至多10个治疗剂分子。在实施例中,抗体共轭物包含与分离的抗体连接的至多12个治疗剂分子。

[0648] 在实施例中,共轭化合物或抗体共轭物包含与肽化合物或分离的抗体连接的2个治疗剂分子。在实施例中,共轭化合物或抗体共轭物包含与肽化合物或分离的抗体连接的3个治疗剂分子。在实施例中,共轭化合物或抗体共轭物包含与肽化合物或分离的抗体连接的4个治疗剂分子。在实施例中,共轭化合物或抗体共轭物包含与肽化合物或分离的抗体连接的1至8个治疗剂分子。在实施例中,抗体共轭物包含与分离的抗体连接的0至12、任选地0至10、任选地0至8个治疗剂分子。在另一个实施例中,抗体共轭物包含与分离的抗体连接的多于零个且至多12个、任选地10个、任选地8个治疗剂分子。在另一实施例中,抗体共轭物包含与分离的抗体连接的1至12、任选地1至10、任选地1至8个治疗剂分子。

[0649] 在实施例中,共轭抗体包含治疗剂,所述治疗剂选自自由细胞毒素剂、毒素、抗癌肽、靶向药物、免疫疗法、植物化学物质和/或寡肽模拟物组成的群组。在另一实施例中,所述治疗剂是烷基化剂;铂配位剂,选自自由顺铂、卡铂和奥沙利铂组成的群组;抗代谢产物;微管损伤剂,选自自由长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、紫杉醇和多西他赛组成的群组;拓扑异构酶-2抑制剂,诸如依托泊苷;拓扑异构酶-1抑制剂,选自自由拓扑替康和伊立替康组成的群组;抗生素,选自自由放线菌素D、阿霉素、道诺霉素、表柔比星、博来霉素和丝裂霉素C组成的群组;羟基脲;L-天冬酰胺酶;维甲酸;美登木素生物碱;阿里他汀;卡奇霉素;鹅膏毒素;鹅膏蕈碱;D-肽A;D-肽B;D-肽C;D-肽D;D-K619;NRC-03;NRC-07;Gomesin;肝杀菌肽Th2-3;皮抑菌肽B2;PTP7;MGA2;HNP-1;速普肽;滕波林-1 Cea;NK-2;杀菌肽Cb1;酪氨酸蛋白激酶抑制剂,选自自由伊马替尼和达沙替尼组成的群组;EFG受体抑制剂,选自自由吉非替尼和埃罗替尼组成的群组;血管生成抑制剂,选自自由贝伐单抗、沙利度胺、内皮抑素、血管抑素、血管生成素和类大麻酚组成的群组;蛋白酶体抑制剂,选自自由硼替佐米、卡非佐米、伊萨佐米、马里佐米和环氧霉素组成的群组;mAb,选自自由利妥昔单抗和曲妥珠单抗组成的群组;检查点抑制剂;CAR-T细胞疗法;抗体;抗体药物共轭物;双特异性T细胞接合物和双特异性抗体;基因工程T细胞介导的细胞杀伤;溶瘤病毒;T细胞介导的细胞溶解;生物碱,选自自由绿原酸、可可碱和茶碱组成的群组;花青素,选自自由花青色素和二甲花翠素组成的群组;类胡萝卜素,选自自由 β -胡萝卜素、叶黄素和番茄红素组成的群组;香豆烷;黄烷-3-醇;类黄酮,选自自由表儿茶素、橙皮苷、异鼠李素、山柰酚、杨梅素、柚皮苷、川皮苷、原花青素、槲皮素、芦丁和桔皮素组成的群组;羟基肉桂酸,选自自由菊苣酸、香豆素、阿魏酸和东莨菪素组成的群组;异黄酮,选自自由大豆苷元和染料木素组成的群组;木酚素,诸如水飞蓟素;单萜,选自自由香叶醇和柠檬烯组成的群组;有机硫化物,选自自由蒜素、谷胱甘肽、吲哚-3-甲醇、异硫氰酸酯和萝卜硫素组成的群组;虎刺素;地高辛;植酸;酚酸,选自自由辣椒素、鞣花酸、没食子酸、迷迭香酸和鞣酸组成的群组;植物甾醇,诸如 β -谷甾醇;皂苷;芪,选自紫檀芪和白藜芦醇组成的群组;三萜

系化合物,例如乌索酸;叶黄素,选自自由虾青素和 β -隐黄质组成的群组;单酚,诸如羟基酪醇;或妥布赖森。

[0650] 例如,治疗癌症或侵袭性癌症包含抑制表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态。

[0651] 在一方面,本文所述的化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于抑制血管生成拟态。在一方面,本文所述的化合物、分离的抗体或抗体共轭物靶向分拣蛋白受体。在一方面,本文所述的化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于靶向分拣蛋白受体。

[0652] 在另一方面,本文所述的化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于抑制CD133阳性细胞中的血管生成拟态和/或治疗癌症。

[0653] 在实施例中,所述化合物、分离的抗体或抗体共轭物使癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比未治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、约5%至约50%、约10%至约50%、约15%至约45%、约20%至约45%或约30%至约40%。

[0654] 在实施例中,所述化合物、分离的抗体或抗体共轭物使癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、约5%至约50%、约10%至约50%、约15%至约45%、约20%至约45%或约30%至约40%。

[0655] 在实施例中,所述化合物、分离的抗体或抗体共轭物使癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2、至少2.4倍、约1.2至约2.4倍或约1.2至约2.0倍。

[0656] 在实施例中,所述化合物、分离的抗体或抗体共轭物使癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2、至少2.4倍、约1.2至约2.4倍或约1.2至约2.0倍。

[0657] 在一方面,本文所述的化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于治疗癌症或侵袭性癌症。

[0658] 例如,治疗癌症或侵袭性癌症包含使受试者、癌组织和/或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比未治疗的对照受试者、癌组织和/或表达分拣蛋白的细胞大至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。

[0659] 例如,治疗癌症或侵袭性癌症包含使受试者、癌组织和/或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的对照受试者、癌组织和/或表达分拣蛋白的细胞大至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。

[0660] 例如,治疗癌症或侵袭性癌症包含使受试者、癌组织和/或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的表达分拣蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2或至少2.4倍。

[0661] 例如,治疗癌症或侵袭性癌症包含使受试者、癌组织和/或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态管环的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2或至少2.4倍。

[0662] 例如,表达分选蛋白的细胞是免疫细胞,任选地是巨噬细胞、CD4+、CD8+、B220+、骨髓来源的细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和细胞毒性T淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、T辅助1型(Th1)细胞。

[0663] 例如,表达分选蛋白的细胞是癌细胞,任选地是卵巢癌细胞、子宫内膜癌细胞、乳腺癌细胞(例如,三阴性乳腺癌细胞)、前列腺癌细胞、结肠直肠癌细胞、肺癌细胞、胰腺癌细胞、皮肤癌细胞、脑(胶质瘤)癌细胞、尿路上皮癌细胞、良性肿瘤癌细胞、肾癌细胞、睾丸癌细胞、脑垂体癌细胞和血液癌细胞,诸如骨髓癌细胞、扩散性大B细胞淋巴瘤癌细胞、骨髓瘤癌细胞或慢性B细胞白血病癌细胞。

[0664] 例如,呈现血管生成拟态的细胞是癌细胞,任选地是乳腺癌细胞(例如,三阴性乳腺癌细胞)、胶质瘤细胞、肝细胞癌细胞、结肠直肠癌细胞、髓母细胞瘤细胞、双向分化的恶性肿瘤细胞、胃癌细胞、前列腺癌细胞、肉瘤细胞、胆囊癌细胞、口腔/喉鳞状细胞癌细胞、黑色素瘤细胞、非小细胞肺癌细胞或卵巢癌细胞。

[0665] 例如,三阴性乳腺癌细胞为HCC1599、HCC1937、HCC1143、MDA-MB468、HCC38、HCC70、HCC1806、HCC1187、DU4475、BT-549、Hs578T、MDA-MB231、MDA-MB436、MDA-MB157、MDA-MB453、BT-20或HCC1395细胞。

[0666] 例如,所述细胞为CD133阳性细胞。

[0667] 本文公开的共轭化合物或抗体共轭物也可用于将治疗剂运输至细胞中,因为它们不是外排泵的底物,所述外排泵是诸如从多耐药药物细胞泵出其他治疗剂的P-糖蛋白膜转运体系。

[0668] 在一方面,提供一种获得肽化合物的方法,所述方法包含i)提供结合肽的文库;以及ii)通过使用靶的亲合性选择从所述文库中选择分选蛋白结合肽;

[0669] 其中所述靶固定在固体支持物上;

[0670] 其中所述靶包含SEQ ID NO:25-50中任一者所示的氨基酸序列、其类似物或其片段;并且

[0671] 其中所述靶与所述分选蛋白结合肽相互作用。

[0672] 在另一方面,提供一种用于制备本文公开的共轭化合物或抗体共轭物的过程,所述过程包含:

[0673] 使接头与所述治疗剂一起反应以获得中间体;

[0674] 任选地纯化所述中间体;

[0675] 使所述中间体与肽化合物一起反应以获得所述共轭化合物,或使所述中间体与分离的抗体一起反应以获得所述抗体共轭物;以及

[0676] 任选地纯化所述共轭化合物或抗体共轭物;

[0677] 其中所述治疗剂在赖氨酸残基的游离胺或N末端处与所述肽化合物或分离的抗体连接;并且其中所述肽化合物包含与其连接的1、2、3或4个治疗剂分子,其中分离的抗体包含与其连接的1-12、任选地1-10、任选地1-8个治疗剂分子。

[0678] 例如,肽化合物或分离的抗体包含与其连接的1个治疗剂分子。例如,肽化合物或

分离的抗体包含与其连接的2个治疗剂分子。例如,肽化合物或分离的抗体包含与其连接的3个治疗剂分子。例如,肽化合物或分离的抗体包含与其连接的4个治疗剂分子。

[0679] 例如,接头是琥珀酸。例如,接头是二甲基戊二酸接头。

[0680] 在实施例中,肽化合物或分离的抗体在与所述中间体反应之前在所述N末端处被保护。

[0681] 例如,在与接头合并之前,可以将保护基团诸如Fmoc作为保护基团加入到治疗剂上的游离胺中。在其合成之后,共轭化合物或抗体共轭物可以经历从保护基团的去保护。例如,包含保护剂Fmoc的共轭化合物或抗体共轭物可以使用哌啶去保护。本领域技术人员将容易理解,其他已知的化学试剂可用于共轭化合物或抗体共轭物的去保护。

[0682] 例如,治疗剂、肽化合物和/或抗体的N末端可以通过其乙酰化被封端,从而在N末端提供不可逆的保护基团。

[0683] 在实施例中,中间体在与所述肽化合物或所述抗体反应之前被激活。

[0684] 例如,所述中间体在与所述化合物反应之前用偶联剂激活,所述偶联剂任选地选自N,N,N',N'-四甲基-0-(苯并三唑-1-基)四氟硼酸脲(TBTU)、(2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯)(HBTU)和(1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐)(HATU)。

[0685] 例如,在与肽化合物或抗体共轭之前,可以用TBTU肽偶联试剂激活包含与接头连接的治疗剂的中间体。

[0686] 在一个实施例中,共轭化合物或抗体共轭物在其合成后被纯化。

[0687] 本文公开的肽化合物和抗体可用于融合蛋白的上下文中。例如,可通过将本文公开的肽化合物或抗体(例如肽化合物)与一种或多种蛋白或其部分(诸如功能结构域)融合来工程化融合蛋白。融合蛋白可以例如通过重组DNA技术进行工程化,并使用蛋白表达系统诸如细菌或哺乳动物蛋白表达系统进行表达。在一些实施例中,在蛋白之间添加肽接头。在其他实施例中,融合蛋白不包含连接蛋白的接头。

[0688] 常用的蛋白表达系统包括那些源自细菌、酵母、杆状病毒/昆虫、植物和哺乳动物细胞的系统,以及最近的丝状真菌诸如嗜热毁丝菌。

[0689] 本文公开的方面是一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其包含本文公开的用于抑制血管生成拟态的至少一种肽化合物或抗体。

[0690] 本文公开的方面是一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其包含本文公开的靶向分选蛋白受体的至少一种肽化合物或抗体。

[0691] 本文公开的方面是一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其包含本文公开的用于靶向分选蛋白受体的至少一种肽化合物或抗体。

[0692] 另一方面是一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其涂覆有本文公开的用于抑制血管生成拟态的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

[0693] 另一方面是一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其涂覆有本文公开的靶向分选蛋白受体的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

[0694] 另一方面是一种脂质体、石墨烯、纳米管或纳米颗粒,其涂覆有本文公开的用于靶向分选蛋白受体的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。

[0695] 另一方面是装载有至少一种治疗剂、基因或siRNA的脂质体、石墨烯、纳米管或纳

米颗粒；并且脂质体或纳米颗粒涂覆有本文定义的用于抑制血管生成拟态的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。例如，所述至少一种化合物、共轭化合物、分离的抗体或抗体共轭物可以连接至脂质体或纳米颗粒的表面。

[0696] 本领域技术人员可以设想脂质体、纳米管、石墨烯或纳米颗粒的不同实施例。例如，脂质体或纳米颗粒可以包含本文公开的涂覆在脂质体或纳米颗粒表面上的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物以及脂质体或纳米颗粒内的治疗剂，例如抗癌剂。例如，脂质体或纳米颗粒可以包含本文公开的涂覆在脂质体或纳米颗粒表面上的至少一种化合物以及脂质体或纳米颗粒内的治疗剂，例如抗癌剂。例如，脂质体或纳米颗粒可以包含本文公开的涂覆在脂质体或纳米颗粒表面上的至少一种肽化合物以及脂质体或纳米颗粒内的治疗剂，例如抗癌剂。例如，脂质体或纳米颗粒可以包含本文公开的涂覆在脂质体或纳米颗粒表面上的至少一种共轭化合物以及脂质体或纳米颗粒内的治疗剂，例如抗癌剂。例如，脂质体或纳米颗粒可以包含本文公开的涂覆在脂质体或纳米颗粒表面上的至少一种分离的抗体以及脂质体或纳米颗粒内的治疗剂，例如抗癌剂。例如，脂质体或纳米颗粒可以包含本文公开的涂覆在脂质体或纳米颗粒表面上的至少一种抗体共轭物以及脂质体或纳米颗粒内的治疗剂，例如抗癌剂。此外，在一些实施例中，本文所述的化合物、肽化合物、共轭化合物、分离的抗体或抗体共轭物可与一种或多种其他化合物相连、连接(link或connect)，以形成多聚体诸如二聚体、三聚体或四聚体，以及支链肽，任选地，肽化合物是环状的。此类化合物、分离的抗体或抗体共轭物可以例如通过共价键、原子或接头连接在一起。例如，多聚体包含多于一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物。用于制作多聚体(例如，二聚体、三聚体)形式的肽化合物或抗体的方法描述于美国专利第9,161,988号中，该专利的全部内容通过引用并入本文。

[0697] 本公开的其他方面通常包括抑制血管生成拟态的方法，所述方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文公开的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物和/或使表达分拣蛋白的细胞与本文公开的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物接触。其他方面包括本文所述的肽化合物、共轭化合物、抗体和/或抗体共轭物用于抑制血管生成拟态以及在制造用于抑制血管生成拟态的医药中的用途。

[0698] 在一方面，提供一种抑制血管生成拟态的方法，所述方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物。

[0699] 在另一方面，提供一种抑制癌组织或表达分拣蛋白的细胞中血管生成拟态的方法，所述方法包含使所述癌组织或细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物接触。

[0700] 在另一方面，提供一种抑制癌组织或表达分拣蛋白的细胞中血管生成拟态的方法，所述方法包含使所述癌组织或细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物接触，其中血管生成拟态管长度或血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。

[0701] 在另一方面，提供一种抑制癌组织或表达分拣蛋白的细胞中血管生成拟态的方法，所述方法包含使所述癌组织或细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物接触，其中血管生成拟态管长度或血管生成拟态环的减少比用所述至少一种治疗

剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2或至少2.4倍。

[0702] 在另一方面,提供一种抑制癌组织或CD133阳性细胞中血管生成拟态的方法,所述方法包含使所述癌组织或CD133阳性细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物接触。

[0703] 在一方面,提供一种治疗癌症或侵袭性癌症的方法,所述方法包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物。

[0704] 在另一方面,提供一种治疗具有癌组织或表达分选蛋白的细胞的受试者中的癌症或侵袭性癌症的方法,所述方法包含使所述癌组织或细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物接触。

[0705] 在另一方面,提供一种治疗具有癌组织或表达分选蛋白的细胞的受试者中的癌症或侵袭性癌症的方法,所述方法包含使所述癌组织或细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物接触,其中血管生成拟态管长度或血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。

[0706] 在另一方面,提供一种治疗具有癌组织或表达分选蛋白的细胞的受试者中的癌症或侵袭性癌症的方法,所述方法包含使所述癌组织或细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物接触,其中血管生成拟态管长度或血管生成拟态环的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2或至少2.4倍。

[0707] 在另一方面,提供一种增加治疗剂的稳定性和/或生物利用度的方法,所述方法包含:

[0708] 获得本文公开的共轭化合物或抗体共轭物,其中所述共轭化合物或抗体共轭物包含所述治疗剂,以及

[0709] 将治疗有效量的所述共轭化合物或抗体共轭物施用于有需要的受试者。

[0710] 在另一方面,提供一种增加治疗剂的稳定性和/或生物利用度的方法,所述方法包含:

[0711] 使所述治疗剂与本文定义的肽化合物或抗体共轭以获得共轭化合物或抗体共轭物,以及

[0712] 将治疗有效量的所述共轭化合物或抗体共轭物施用于有需要的受试者。

[0713] 与非共轭治疗剂相比,本文公开的共轭化合物或抗体共轭物也可提供更大的耐受性。例如,在2016年11月24日提交的公开为WO 2017/088058且标题为“用于通过受体介导的化疗治疗癌症的肽化合物和共轭化合物 (PEPTIDE COMPOUNDS AND CONJUGATE COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF CANCER THROUGH RECEPTOR-MEDIATED CHEMOTHERAPY)”的国际申请(通过引用全文并入本文)中,已经表明与当量剂量的非共轭治疗剂相比,由于特异性受体靶向,Katana-药物共轭物具有更好的耐受性。特别是,体内研究表明,用共轭化合物治疗对受试小鼠的体重几乎没有影响,从而证明共轭化合物的耐受性。

[0714] 例如,本文提供一种增加治疗剂的耐受性的方法,所述方法包含:

[0715] 使所述治疗剂与本文公开的肽化合物或分离的抗体共轭以获得共轭化合物或抗

体共轭物,以及

[0716] 将治疗有效量的所述共轭化合物或所述抗体共轭物施用于有需要的受试者。

[0717] 例如,本文提供一种增加治疗剂的耐受性的方法,所述方法包含:

[0718] 获得本文公开的共轭化合物或抗体共轭物,其中所述共轭化合物或抗体共轭物包含治疗剂,以及

[0719] 将治疗有效量的所述共轭化合物或所述抗体共轭物施用于有需要的受试者。

[0720] 例如,提供一种本文公开的肽化合物、共轭化合物、抗体和/或抗体共轭物用于增加治疗剂的耐受性的用途。

[0721] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物用于抑制血管生成拟态的用途。

[0722] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物用于靶向分拣蛋白受体的用途。

[0723] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物用于抑制涉及分拣蛋白表达的血管生成拟态的用途。

[0724] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物用于抑制癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态的用途。

[0725] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物用于治疗癌症或侵袭性癌症的用途。

[0726] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物用于治疗涉及分拣蛋白表达的癌症或侵袭性癌症的用途。

[0727] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物用于治疗癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的癌症或侵袭性癌症的用途。

[0728] 在另一方面,提供一种至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比未治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、约5%至约50%、约10%至约50%、约15%至约45%、约20%至约45%或约30%至约40%。

[0729] 在另一方面,提供一种至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、约5%至约50%、约10%至约50%、约15%至约45%、约20%至约45%或约30%至约40%。

[0730] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2、至少2.4倍、约1.2至约2.4倍或约1.2至约2.0倍。

[0731] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的血管生成拟态环的数目的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分拣蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少

1.8、至少2.0、至少2.2、至少2.4倍、约1.2至约2.4倍或约1.2至约2.0倍。

[0732] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态的用途,包含使所述癌组织或细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物接触,其中血管生成拟态管长度或血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。

[0733] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物用于抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中血管生成拟态的用途,包含使所述癌组织或细胞与本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物接触,其中血管生成拟态管长度或血管生成拟态环的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2、或至少2.4倍。

[0734] 在另一方面,提供一种本文所定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度或血管生成拟态环的数目的减少比未治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。

[0735] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体或抗体共轭物的用途,用于使癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态管长度或血管生成拟态环的数目的减少比用所述至少一种治疗剂治疗的癌组织或表达分选蛋白的细胞大至少1.2、至少1.4、至少1.6、至少1.8、至少2.0、至少2.2或至少2.4倍。

[0736] 在另一方面,提供一种本文定义的至少一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物用于治疗CD133阳性细胞中的癌症或侵袭性癌症的用途。

[0737] 在另一方面,提供一种本文定义的共轭化合物或抗体共轭物用于增加至少一种治疗剂的稳定性和/或生物利用度的用途。

[0738] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制造用于抑制血管生成拟态的医药中的用途。

[0739] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制造用于靶向血管生成拟态的医药中的用途。

[0740] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制造用于抑制涉及分选蛋白表达的血管生成拟态的医药中的用途。

[0741] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制造用于抑制癌组织或表达分选蛋白的细胞中的血管生成拟态的医药中的用途。

[0742] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制造用于抑制CD133阳性细胞中的血管生成拟态的医药中的用途。

[0743] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制造用于治疗癌症或侵袭性癌症的医药中的用途。

[0744] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制造用于治疗涉及分选蛋白表达的癌症或侵袭性癌症的医药中的用途。

[0745] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制

造用于治疗癌组织或表达分拣蛋白的细胞中的癌症或侵袭性癌症的医药中的用途。

[0746] 在另一方面,提供一种本文定义的一种化合物、分离的抗体和/或抗体共轭物在制造用于治疗CD133阳性细胞中的癌症或侵袭性癌症的医药中的用途。

[0747] 例如,包含在共轭化合物或抗体共轭物中和/或用于制造抑制血管生成拟态的医药的所述至少一种治疗化合物是抗癌剂。例如,抗癌剂选自多西他赛、卡巴他赛、aldoxorubicin、美登木素生物碱、阿里他汀、卡奇霉素、鹅膏毒素、鹅膏蕈碱和阿霉素。

[0748] 例如,包含在共轭化合物或抗体共轭物中和/或用于制造抑制血管生成拟态的医药的所述至少一种治疗化合物是植物化学物质。例如,植物化学物质是姜黄素。

[0749] 例如,植物化学物质选自姜黄素、 ω -3、白柳皮、绿茶、儿茶素、碧萝芷、齿叶乳香树脂、白藜芦醇、绒毛钩藤、辣椒素、花青素/花色苷、黄酮、橄榄油化合物、绿原酸和 sulfopharaphane。

[0750] 在另一方面,提供一种本文公开的至少一种化合物、本文公开的至少一种分离的抗体或本文公开的至少一种共轭抗体与治疗剂(诸如细胞毒素剂、毒素和抗癌肽)、免疫调节剂(诸如抗-PD1和抗-PDL1)、抗癌递送系统、抗血管生成剂和/或放射疗法组合用于抑制血管生成拟态的用途。

[0751] 在另一方面,提供一种本文公开的至少一种化合物、本文公开的至少一种分离的抗体或本文公开的至少一种共轭抗体与治疗剂(诸如细胞毒素剂、毒素和抗癌肽)、免疫调节剂(诸如抗-PD1和抗-PDL1)、抗癌递送系统、抗血管生成剂和/或放射疗法组合用于靶向分拣蛋白受体的用途。

[0752] 现在将参考以下实例描述本公开的其他实施例。应当理解,这些实例是为了说明本公开的实施例,并且不限制本公开的范围。

[0753] 实例

[0754] 实例1:组合物

[0755] 靶向分拣蛋白的肽

[0756] 靶向分拣蛋白的第一Katana肽家族源自细菌细胞渗透剂蛋白,而第二家族则基于源自分拣蛋白配体、颗粒蛋白前体和神经降压素的优化一级序列(表1)。这些肽已在以下文献中描述:PCT/CA2016/051379:通过受体介导的化学疗法治疗癌症的肽化合物和共轭化合物(PEPTIDE COMPOUNDS AND CONJUGATE COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF CANCER THROUGH RECEPTOR-MEDIATED CHEMOTHERAPY)和美国专利申请序列第62/510,381号:共轭物及其在治疗炎症性疾病中的用途(CONJUGATES AND USES THEREOF FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES),这些文献通过引用并入本文。

[0757] 表1Katana肽家族的氨基酸序列。

	氨基酸序列	氨基酸长度
[0758]	<u>Katana 生物制药肽 (KBP) 家族 1:</u>	
	<u>KBP-101: IKLSGGVQAKAGVINMDKSESM</u>	<u>22</u>
	<u>KBP-102: 琥珀酰基-IKLSGGVQAKAGVINMFKSESY</u>	<u>22</u>

	<u>KBP-103: IKLSGGVQAKAGVINMFKSESYK (生物素)</u>	<u>23</u>
	<u>KBP-104: GVQAKAGVINMDKSESMY</u>	<u>17</u>
	<u>KBP-105: 乙酰基-GVRAKAGVRNMFKSESY</u>	<u>17</u>
	<u>KBP-106: 乙酰基-GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY</u>	<u>17</u>
[0759]	<u>KBP-106-Cys: 乙酰基-GVRAKAGVRN(Nle)FKSESY</u>	<u>18</u>
	<u>Katana 生物制药肽 (KBP) 家族 2:</u>	
	<u>KBP-201: YKSLRRKAPRWDAPLRDPALRQLL</u>	<u>24</u>
	<u>KBP-202: YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRQLL</u>	<u>24</u>
	<u>KBP-203: YKSLRRKAPRWDAYLRDPALRPLL</u>	<u>24</u>

[0760] 方法

[0761] 生成Katana-肽药物共轭物

[0762] 首先选择多西他赛和阿霉素作为细胞毒性药物的原则证明,而在植物化学物质中选择姜黄素。多西他赛是紫杉醇的半合成类似物,紫杉醇是从稀有的太平洋紫杉——短叶红豆杉——树皮中提取的。此药物已获FDA(国家癌症研究所)批准用于治疗局部晚期或转移性癌症,包括乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、胃癌、激素难治性前列腺癌和非小细胞肺癌。多西他赛可作为单一试剂使用,或者根据具体的癌症类型和阶段与其他化疗药物联合使用。阿霉素是蒽环霉素抗肿瘤抗生素(注意:在本上下文中,这并不意味着它用于治疗细菌感染),与天然产物道诺霉素密切相关,并且与所有蒽环霉素一样,通过嵌入DNA发挥作用,最严重的不良作用是危及生命的心脏损伤(国家癌症研究所)。其经批准单独或与其他药物联用治疗:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、乳腺癌、胃(gastric)(胃(stomach))癌、霍奇金淋巴瘤、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、小细胞肺癌、软组织及骨肉瘤、甲状腺癌、移行细胞膀胱癌和威尔姆氏瘤。姜黄素(二阿魏酰基甲烷)是存在于与抗氧化剂、抗炎、抗癌、抗病毒和抗菌活性相关的香料姜黄根(姜黄)中的黄色颜料(23)。

[0763] 细胞毒性药物(多西他赛、卡巴他赛、阿霉素)或植物化学物质(姜黄素)可以使用胺共轭策略与肽共轭。简而言之,多西他赛可以通过与激活的多西他赛形成肽键(酰胺键)而与Katana肽在肽上可用的游离胺(赖氨酸或氨基末端)上共轭。这些肽的各种共轭策略已在PCT/CA2016/051379和US62/510,381中描述,这些文献通过引入并入本文。

[0764] 抗体标记

[0765] 使用英杰公司的Alexa Fluor 488蛋白标记试剂盒根据制造商的说明进行抗分选蛋白抗体标记。

[0766] 细胞表面结合测定

[0767] 将人ES-2卵巢癌细胞与抗分选蛋白-Alexa488抗体(1 μ g/ml)在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,然后进行胰蛋白酶化或不进行胰蛋白酶化,以评估细胞表面的结合抗体。

[0768] 血管生成拟态

[0769] 恶性实体肿瘤需要血液供应来促进生长和转移。在过去,血管生成(胚胎发育中的一种新血管形成)被认为是支持肿瘤血液供应的唯一形式(24)。靶向内皮细胞的抗血管生成疗法作为一种潜在的、有前途的治疗靶,受到广泛的关注和研究。许多抗血管生成药物已

被用于预防肿瘤的生长和转移。然而,这些药物对癌症进展的作用受限且不令人满意,这表明除血管生成外,肿瘤组织中可能存在其他血液供应形式。1999年,观察到在检测到红细胞的高侵袭性和转移性人类黑色素瘤中的高度图案化血管样通道结构(28)。通过光显微镜、透射电子显微镜或内皮细胞标志物(诸如CD34、CD31)的免疫组织化学检测,均未在这些通道中检测到内皮细胞。随后,他们报告,不同于血管生成,这种结构由基底膜构成,并且主要由肿瘤细胞内衬。其他研究也证实,血管生成拟态通过充足的血液和营养供应为恶性肿瘤提供重要的灌注途径(24-27)。目前公认的是,血管生成拟态在肿瘤生长中起着重要作用。

[0770] 血管生成拟态与肿瘤恶性有关,包括侵袭和转移(24-27)。在肿瘤组织中,肿瘤内衬血管通道和内皮内衬血管之间存在接合。通过这种结构,对内部网络通道表面进行内衬的肿瘤细胞直接暴露于血液,这显著增加转移机会。血管生成拟态描述癌细胞以无内皮细胞的方式建立替代灌注途径的过程。血管生成肿瘤细胞采用胚胎血管生成的方式,并且直接形成由各种毛细血管样结构、管和网络组成的原始、不成熟的血管。已有报告,血管生成拟态存在于各种恶性肿瘤中,并且已知在癌症进展和转移中发挥作用。血管生成拟态可能存在于各种恶性肿瘤中(24,28,29),包括黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、骨肉瘤、膀胱癌、结肠直肠癌、肝细胞癌、胃癌和肺癌。在乳腺癌中,据报道血管生成拟态在三阴性乳腺癌(TNBC)样本中最高(30)。在后一项研究中,在TNBC中,具有癌症干细胞特征的CD133+细胞与血管生成拟态相关。评价血管生成拟态对15种恶性肿瘤中涉及的3062个癌症病例5年生存率的影响的荟萃分析显示,血管生成拟态与更具侵袭性的肿瘤表型和癌症患者较差的5年总体生存率有关(24)。不希望受理论的束缚,血管生成拟态为生长中的肿瘤提供新的血液灌注机制和潜在的扩散途径。此外,分拣蛋白受体可能涉及癌细胞增殖、癌症生长以及癌细胞的迁移和侵袭。

[0771] 在本公开中,研究了分拣蛋白在血管生成拟态中的潜在作用。本文所公开的分拣蛋白在血管生成拟态管状结构的形成中是必需的。更重要的是,抗癌药物(阿霉素、卡巴他赛、Aldoxorubicin、多西他赛)或植物化学物质(姜黄素)与靶向分拣蛋白的肽之间的共轭物会强烈抑制血管生成拟态的形成。此外,本文描述的结果显示,与血管生成拟态相关的3D-管状结构的形成受针对分拣蛋白的mAb的抑制。

[0772] 结果

[0773] 图1和图2分别显示不同人类癌症和乳腺癌中血管生成拟态的程度(24,30)。卵巢癌和三阴性(TN)乳腺癌存在最高水平的血管生成拟态。

[0774] 图3和图4描述在体外观察到的卵巢癌细胞血管生成拟态的形成(31)。人工基底膜上卵巢癌细胞4天3D培养物景观的X射线显微断层摄影术的3D重建(图3A)显示具有管状外观的高架结构的重建视图。此外,白色矩形内的结构在图3B和图3C中以更高的放大率显示,其中箭头表示在扁平细胞聚集体上方突出的看似管状的结构。此结构的横截面展示估计直径为50 μm 的充气空间(图3C)。图4显示使用表达绿色荧光蛋白(GFP)的SKOV3的血管生成拟态管状结构的共聚焦显微镜检查。总体而言,图4A中的Z叠层重建图像证明含有管状结构的细胞的存在,该管状结构具有连续的上部单层[1]、中心壁结构、中空中心[2]和连续的下部单层[3]。图4B中计算机生成的横截面清晰显示含管腔的管状结构。

[0775] 图5显示显微镜图像,证明ES-2卵巢癌细胞正在形成血管生成拟态。在种接在人工基底膜后4h内,ES-2细胞中的3D管状结构迅速形成并被观察到。

[0776] 图6显示,在ES2卵巢癌细胞的3D管状结构中检测分拣蛋白。将ES-2卵巢癌细胞种接在人工基底膜上。图6A显示12小时后,使用兔抗分拣蛋白抗体通过共聚焦显微镜检查在3D管状结构中检测到分拣蛋白(SORT1)。图6B显示仅利用二次抗兔抗体实施的对照实验。总体结果表明,分拣蛋白检测是特异性的。图6C和图6D显示ES-2癌细胞核的DAPI染色,其用作对照,以证明在用于抗分拣蛋白(图6A)和二次抗体(图6B)检测的条件下3D管状结构的存在。

[0777] 图7显示分拣蛋白基因沉默对ES-2卵巢癌细胞形成血管生成拟态的影响。当分拣蛋白表达受特异性抑制时,与加扰siRNA相比,在血管生成拟态形成期间观察到的3D-管状结构受到强烈抑制(图7A)。将图像发送至Onimagin Technologies,使用Wimasis图像分析软件对总环数和总管长度进行定量分析(图7B)。结果表明,使用siRNA进行分拣蛋白基因沉默后,环数和总管长度均被抑制多于90%。这些结果清楚地表明,分拣蛋白在血管生成拟态中的3D管状结构形成中起关键作用。

[0778] 图8、图9、图10和图11显示通过抗癌药物(阿霉素、卡巴他赛、Aldoxorubicin、多西他赛)或植物化学物质(姜黄素)与靶向分拣蛋白的肽之间的新型共轭物抑制血管生成拟态的实例。在图8中,在人工基底膜上ES-2卵巢癌的血管生成拟态是在未共轭阿霉素或阿霉素共轭化合物(DoxKA)存在的情况下进行。图8A显示24小时后,增加DoxKA浓度会强烈抑制血管生成拟态的形成。图8B显示使用Wimasis图像分析软件分析的3D管状结构。结果绘制为药物浓度的函数。针对总管长度和环数获得的DoxKA IC₅₀值在低nM范围内(5-10nM),如图8B所示。阿霉素衍生物(Aldoxorubicin)-药物共轭化合物的第二个实例呈现在图9中。Aldoxorubicin与肽的共轭不同于与阿霉素的共轭。在Aldoxorubicin的情况下,药物在添加至肽C端的半胱氨酸氨基酸残基上共轭。所用的接头对酸性pH敏感,而不像在阿霉素的情况中那样对酯酶敏感。AldoxKA的并入比率也不同,因为与DoxKA共轭物中的2个阿霉素分子相比,肽上仅共轭了一个Aldoxorubicin分子。这证明从两种不同的阿霉素分子开始的平台的灵活性。抗癌-药物共轭化合物的第三个实例呈现在图10A和图10B中。与多西他赛相比,多西他赛-共轭化合物(DoceKA)对血管生成拟态形成的抑制作用更强。对于此共轭物,针对环数的IC₅₀值为约30pM。另一个实例用植物化学物质共轭化合物示于图11中。对于这类分子,姜黄素与分拣蛋白靶向肽(CurKA)共轭。姜黄素已被建议用于抑制SK-Hep-1肝细胞癌细胞的管形成(32)。在3-30 μ M范围内,姜黄素以剂量依赖性方式抑制细胞的管形成,观察到18%-92%的抑制。图11清楚地显示,在nM浓度下,CurKA共轭物影响ES-2卵巢血管生成拟态的形成。与非共轭姜黄素相比,CurKA对ES-2卵巢癌细胞的3D管形成具有更强的作用。

[0779] 图12表明抗分拣蛋白mAb抑制血管生成拟态。在非特异性小鼠IgG或浓度为12nM的抗分拣蛋白mAb存在的情况下,将ES-2卵巢癌细胞种接至人工基底膜上。12小时后拍摄的图像显示,与对照相比,抗分拣蛋白mAb防止ES-2卵巢癌细胞形成3D管状结构,而小鼠IgG无影响。抗分拣蛋白mAb的这种血管生成拟态抑制与使用siRNA进行分拣蛋白基因沉默时观察到的非常相似(图6)。

[0780] 图13A显示抗SORT1 mAb的结合和内化。图13A表明,用荧光染料Alexa488标记的抗分拣蛋白抗体在卵巢癌细胞的细胞表面与受体分拣蛋白结合。用Alexa Fluor 488标记抗分拣蛋白抗体,以生成抗分拣蛋白-Alexa488抗体。将人ES-2卵巢癌细胞与抗分拣蛋白-Alexa488抗体(1 μ g/ml)孵育30分钟,然后进行胰蛋白酶化或不进行胰蛋白酶化,以评估细

胞表面的结合。结果清楚地表明,荧光信号的主要部分是由与细胞表面的分拣蛋白受体结合引起的,因为胰蛋白酶化使荧光水平降低了超过90%。在图13B中,抗分拣蛋白-Alexa488抗体(1 μ g/ml,30分钟)在人ES-卵巢癌细胞的细胞表面的结合受到分拣蛋白配体(神经降压素(NT)和颗粒蛋白前体(PGRN))抑制。此外,在也被分拣蛋白识别的Katana肽(KBP106和KBP201)存在的情况下孵育,大大降低了荧光抗体的结合。总体上,这些结果表明,分拣蛋白配体和Katana肽的相互作用会防止荧光抗分拣蛋白抗体对受体的标记和识别。

[0781] 图13C中的结果显示抗分拣蛋白抗体可将荧光染料共轭物内化至癌细胞中。在本实验中,首先在4 $^{\circ}$ C下进行抗分拣蛋白-Alexa488抗体(1 μ g/ml,30分钟)在人ES-2卵巢癌细胞上的结合,然后洗涤细胞以除去未结合的荧光抗体,并且将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育1或2小时,然后胰蛋白酶化。这使得抗分拣蛋白-Alexa488共轭物随时间内化至细胞中。然后通过流式细胞术对与内化荧光抗体相关的荧光进行量化,并且结果表明,约50%的首次结合在细胞表面上的抗分拣蛋白-Alexa488抗体在2小时内被内化。抗分拣蛋白-Alexa488抗体的内化随浓度增加而测量(图13D)。结果表明,抗分拣蛋白-Alexa488荧光共轭物的内化随着荧光共轭物浓度的增加而增加,并且是可饱和的。

[0782] 图14显示分拣蛋白的不同区域和产生本公开中使用的抗分拣蛋白抗体的区域的示意图。抗分拣蛋白mAb#1(抗SORT1 mAb#1)得自EMD密理博公司(Cat#MABN1792)。此抗体的免疫原位于分拣蛋白的胞外结构域,即氨基酸残基78-755。抗分拣蛋白mAb#2(抗SORT1 mAb#2)得自BD生物科学公司(Cat#612100)。此抗体的免疫原是分拣蛋白的氨基酸残基300-422,对应于此蛋白的部分胞外结构域。

[0783] 图15显示抗分拣蛋白抗体对卵巢癌细胞血管生成拟态的抑制作用。在载体(对照)、小鼠IgG(4 μ g/mL(约25nM))或抗SORT1 mAb#1(4 μ g/mL(约25nM))或抗SORT1 mAb#2(4 μ g/mL(约25nM))存在的情况下,将ES-2卵巢癌细胞种接在人工基底膜上。ES-2细胞暴露于抗体12小时后,抗分拣蛋白mAb#1和抗分拣蛋白mAb#2强烈抑制了3D-管状结构的形成,这通过这些mAb对总环(图16A)和总管长度(图16B)的影响看出。

[0784] 讨论

[0785] 不受理论束缚,据信血管生成拟态是与各种癌症患者中更具侵袭性的肿瘤表型和不良预后相关的现象。由于分拣蛋白在许多类型的癌症中的过表达与其存活、侵袭和进展有关,因此用共轭化合物、抗体或共轭抗体靶向此受体可能提供增加癌症药物在这些肿瘤内结合/内化的高效途径。本文公开的结果清楚地表明,靶向分拣蛋白/与分拣蛋白相互作用的共轭化合物、mAb及其衍生物导致对血管生成拟态的强烈抑制。

[0786] 实例2:分拣蛋白受体介导的癌症疗法:卵巢癌和乳腺癌中血管生成拟态抑制的靶向途径

[0787] 背景

[0788] 血管生成拟态被定义成通过侵袭性、转移性和遗传性去调节的肿瘤细胞形成微血管通道。此微循环系统独立于内皮细胞,为肿瘤细胞提供氧和营养。卵巢癌和三阴性乳腺癌(TNBC)中已出现血管生成拟态,并显示与癌症患者总生存率下降相关。这种过程部分导致当前的化学抗性,并促进肿瘤进展以及癌症转移的散布。因此,在卵巢和TNBC肿瘤中靶向血管生成拟态可能有助于癌症治疗。分拣蛋白(一种清除受体)已知在癌细胞中发挥主要功能;然而,本文中报告,它在血管生成拟态中进一步发挥新的作用。在卵巢和TNBC探索了通

过分拣蛋白用肽-药物共轭物靶向血管生成拟态。

[0789] 方法

[0790] 使用人工基底膜管形成测定来评估癌细胞的体外血管生成拟态。简言之,用人工基底膜来预先涂覆96孔板的每一个孔。将ES-2卵巢癌或MDA-MB-231 TNBC细胞悬浮液种接在人工基底膜的顶部上。使用Wimasis分析软件对3D管状结构进行分析和量化。使用xCELLigence系统评价了实时细胞迁移。用特异性siRNA来进行分拣蛋白基因沉默。确定靶向分拣蛋白的由式乙酰基-GVRAK(阿霉素)AGVRN(N1e)FK(阿霉素)SESY(式(XXVIII))表示的阿霉素-KA-肽共轭物(DoxKA)KBA-106和由式乙酰基-GVRAK(多西他赛)AGVRN(N1e)FK(多西他赛)SESY(式(XXIII))表示的多西他赛-KA-肽共轭物(DoceKA)对血管生成拟态和细胞迁移的影响。

[0791] 结果

[0792] 发现分拣蛋白在人工基底膜上的3D管状结构中表达,并且是卵巢癌和TNBC中血管生成拟态所必需的。当分拣蛋白表达受特异性抑制时,在血管生成拟态期间观察到的3D管状结构受到强烈抑制。此外,抗分拣蛋白mAb防止血管生成拟态的发生,而非特异性IgG无作用。有趣的是,靶向分拣蛋白的肽-药物共轭物DoxKA或DoceKA对血管生成拟态的抑制作用比未共轭的游离药物更强。针对血管生成拟态抑制的DoxKA和DoceKAIC₅₀值在低nM至pM浓度范围内。DoxKA和DoceKA共轭物两者也在分拣蛋白依赖性过程中抑制ES-2和MDA-MB231癌细胞迁移。

[0793] 结论

[0794] 我们的结果确定分拣蛋白受体是血管生成拟态中的关键角色。更重要的是,靶向分拣蛋白的肽-药物共轭物的设计被证明能强烈抑制血管生成拟态,该血管生成拟态是与TNBC和卵巢癌患者更具侵袭性的肿瘤表型和不良预后有关的现象。我们的肽-药物共轭平台为受体介导的化疗和更高效的分拣蛋白阳性癌症治疗管理提供临床前分子视角。

[0795] 实例3:通过分拣蛋白受体介导的癌症疗法增加抗癌药物的效力和安全性:治疗卵巢癌的靶向途径

[0796] 背景

[0797] 在当前的现代肿瘤学中,针对卵巢癌个性化疗法的发展仍然极具挑战性。实现更高选择性和更好的抗癌药物递送至癌细胞中的一种策略是将细胞毒性剂与特异性肽配体共轭,该特异性肽配体选择性地靶向在这些细胞上大量和/或专门表达的受体。在临床上观察到在侵袭性卵巢癌活检组织中分拣蛋白(一种清除受体)表达增加,并且与肿瘤分级相关。有鉴于此,我们开发了肽共轭平台和分拣蛋白受体介导的矢量化策略,以增加抗癌试剂的细胞靶向选择性和细胞递送效力。

[0798] 方法

[0799] 作为概念验证,阿霉素与分拣蛋白结合肽(KA-肽)共轭。使用流式细胞术和荧光显微镜在ES-2和SKOV-3卵巢癌细胞系模型中评估了由式乙酰基-GVRAK(阿霉素)AGVRN(N1e)FK(阿霉素)SESY(式(XXVIII))表示的阿霉素-KA-肽共轭物(DoxKA)KBB-106的体外细胞内递送。用特异性siRNA来进行分拣蛋白基因沉默。使用ES-2(CD1裸鼠)和SKOV-3(无胸腺小鼠)皮下异种移植模型在体内评价DoxKA的效力和安全性。

[0800] 结果

[0801] 在所测试的两种分拣蛋白阳性卵巢癌细胞系中均观察到DoxKA的摄取,并且当分拣蛋白表达被特异性沉默或与分拣蛋白配体神经降压素和颗粒蛋白前体竞争时,DoxKA的摄取减少。结果表明,与阿霉素的简单扩散相反,DoxKA的摄取通过分拣蛋白介导的内吞作用进行。在过量表达P-gp的MDCK-MDR1细胞中,发现DoxKA绕过P-糖蛋白(P-gp)外排泵,因为P-gp抑制剂环孢菌素A不影响DoxKA的摄取。在体内,与阿霉素单独施用相比,DoxKA的潜在副作用更低,在诸如心脏和卵巢等健康组织中的积聚减少。在小鼠中,DoxKA对人卵巢肿瘤异种移植生长的抑制作用更强,并且与当量剂量的非共轭阿霉素相比,耐受性更好(无白细胞减少和中性粒细胞减少)。

[0802] 结论

[0803] 这些结果支持此平台在未来的临床应用中产生新的个性化疗法,在1期临床试验的下一个开发阶段对分拣蛋白阳性肿瘤进行特异性靶向。

[0804] 实例4:用于治疗分拣蛋白阳性三阴性乳腺癌的多西他赛-肽共轭物

[0805] 背景

[0806] 三阴性乳腺癌(TNBC)是仍缺乏明确的分子生物标志物的异质性疾病。在过去的十年里,靶向肿瘤的特定基因/蛋白分子标志成为最佳的抗癌策略之一。最近,TNBC患者中报告了分拣蛋白(SORT1)受体表达增加。鉴于SORT1在蛋白内化、分选和转运中的作用,我们开发了肽-抗癌药物共轭平台,通过将多西他赛与特异性靶向SORT1的肽(KA-肽)连接,而靶向SORT1阳性乳腺癌。

[0807] 方法

[0808] 使用MDA-MB-231细胞作为体外和体内异种移植(CD1裸鼠)测定的TNBC细胞模型。使用xCELLigence实时系统评估细胞迁移,而使用MTT测定进行细胞增殖分析。通过免疫印迹法评估细胞凋亡生物标志物的表达。

[0809] 结果

[0810] 在MDA-MB-231细胞中,多西他赛-KA-肽共轭物(DoceKA) KBA-106(由式乙酰基-GVRAK(多西他赛)AGVRN(N1e)FK(多西他赛)SESY-式(XXIII)表示)在体外发挥了强效的抗增殖和抗迁移活性。实验结果如图17至图29所示。与单独使用游离多西他赛相比,DoceKA触发的细胞死亡机制更快、更高。通过SORT1配体神经降压素和颗粒蛋白前体以及在SORT1的siRNA介导的沉默时逆转了凋亡和抗迁移作用。DoceKA改变了微管聚合并触发了IL-6、生存素、Bcl-xL和突变型p53促生存生物标志物的下调(特别参见图22)。在体内,与多西他赛相比,DoceKA在鼠科MDA-MB-231异种移植瘤模型中表现出更大的肿瘤消退能力,生存期延长。

[0811] 多西他赛与共轭多西他赛(DoceKA)相比的药代动力学(PK)参数示于下表2中。

[0812] 表2:多西他赛和共轭多西他赛(DoceKA)的药代动力学参数之间的比较

参数	多西他赛	DoceKA
	(10 mg/kg)	(50 mg/kg)
C 最大(μg/ml)	9.76	1617
C 最大(μmol/ml)	12.5	437
AUC(μg/L*h)	4.8-17	2276
AUC(μmol/L*h)	6月21日	614
t _{1/2} 吸附分布(分钟)	7	6-20
t _{1/2} 消除(小时)	1.2	1.5-2.5
CL(mL/h/kg)	2100	18
Vd(L/Kg)	2.2-5	0.04

[0814] 多西他赛的PK数据来自refs.50和51。使用PK溶液软件对DoceKA进行PK分析。多西他赛在小鼠中的PK在13-62mg/kg之间是双相和线性的。与多西他赛(20mg/kg)相比,DoceKA的C最大高约18倍。曲线下面积(AUC)(组织暴露量)为约29倍高,表明DoceKA的组织暴露量高于多西他赛。两者的半衰期相似。DoceKA具有较低的清除率(CL)和分布容积(Vd)。这些初步数据需要用更多的数据(更短和更长的时间点)来证实。

[0815] 结论

[0816] 总之,结果表明,DoceKA是通过受体介导的机制特异性内化。此类性质允许靶向SORT1阳性乳腺癌,并使DoceKA成为治疗TNBC的有前途的新疗法。

[0817] 实例5: SORT1在多种癌症中的过表达

[0818] 在图30至图40中,显示分拣蛋白在多种癌症、病理亚型和癌症亚型——包括例如卵巢癌(例如,上皮性卵巢癌)、乳腺癌(例如,浸润性导管癌、浸润性小叶癌、管腔A、管腔B、HER2+、TNBC)、脑癌、黑色素瘤、子宫癌(例如,子宫内膜癌和子宫颈癌)和肺癌——中过表达。已经显示出在乳腺癌中的SORT1表达与临床病理参数之间的关联。如下表3所示。

[0819] 表3: SORT1在乳腺癌中的表达与临床病理参数之间的关联

乳腺癌	分拣蛋白+
病理类型	
-浸润性导管癌	79%
-浸润性小叶癌	54%
乳腺癌亚型	
-管腔A	66%
-管腔B	73%
-HER2+	79%
-TNBC	59%

[0822] 分拣蛋白在诸如胃肠道、胰腺、骨髓、脑和肾等正常组织中表达。HER2在诸如肝、胃肠道、胰腺、骨髓和乳腺等正常组织中表达。与HER2的7%相比,所有卵巢癌(100%)均过表达分拣蛋白。SORT1在66%的乳腺癌中过表达,而对于HER2表达是10%-15%。分拣蛋白和HER2靶标在物种间均保守,如下表4所示:

[0823] 表4: 与人相比的序列同源性

	小鼠	大鼠
[0824] 分拣蛋白	91%	93%
Her2	89%	95%

[0825] 实例6:分拣蛋白在卵巢癌和乳腺癌的血管生成拟态中的作用以及在体外和体内对血管生成拟态的抑制作用

[0826] 在图40和图44中,表明分拣蛋白受体参与导致卵巢癌和三阴性乳腺癌细胞中形成血管生成拟态的早期事件。分拣蛋白在OVCAR-3和ES-2卵巢癌细胞形成的3D管状结构中表达(图40和图44)。这些结果表明,分拣蛋白阳性细胞有助于体外血管生成拟态。

[0827] 通过siRNA基因沉默抑制血管生成拟态

[0828] 当分拣蛋白表达被特定分拣蛋白siRNA特异性抑制时,在MDA-MB231 TNBC细胞中,与加扰siRNA相比,3D管状结构被强烈抑制(图42A至图42D)。如前实例所述,对总环和总管长度进行定量分析。结果表明,在进行分拣蛋白基因沉默时,环数和总管长度均被抑制多于80%(图42E和图42F)。这些结果证实分拣蛋白对3D毛细血管样结构的形成很重要。

[0829] 通过肽共轭物抑制血管生成拟态

[0830] 非常低pM浓度的DoceKA抑制ES-2卵巢癌细胞的血管生成拟态(图41)。与单用多西他赛相比,DoceKA对血管生成拟态有更强的抑制作用(图43)。

[0831] 在图49至图50中,显示靶向分拣蛋白的KA-肽药物共轭物通过抑制卵巢癌和乳腺癌细胞的侵袭性表型表现出强的抗血管生成拟态作用。在KBP106肽或共轭阿霉素(KBB106)存在的情况下,在人工基底膜上评估了ES-2卵巢癌的血管生成拟态(图49和图50)。在与用于Katana共轭物的实验条件下,肽(KBP106)在至多50 μ M下对血管生成拟态没有显著影响(图49)。尽管单用肽(KBP106)对血管生成拟态没有影响,但向KBB106中添加肽会防止阿霉素共轭物(KBB106)的血管生成拟态抑制(图50)。这些结果表明,KBP106通过与分拣蛋白结合会防止KBB106与受体的相互作用。

[0832] 在图51至图52中,表明在ES-2卵巢癌细胞中,分拣蛋白配体、神经降压素和颗粒蛋白前体不影响血管生成拟态(图51),但确实逆转由细胞暴露于KBB106引起的血管生成拟态抑制。

[0833] 抗分拣蛋白mAb对血管生成拟态的抑制作用

[0834] 在图46至图48中,显示血管生成拟态形成主要被抗分拣蛋白mAb消除。在非特异性小鼠IgG、兔IgG、抗分拣蛋白兔pAb或抗分拣蛋白mAb存在的情况下,将ES-2卵巢癌细胞种接在人工基底膜的顶部上(图46)。结果显示,与抗分拣蛋白mAb一起孵育会防止ES-2卵巢癌中3D管状结构的形成,而所测试的其他抗体无影响(图46)。ES-2卵巢癌细胞被暴露于增加浓度的抗-Sort1,这表明增加浓度的抗-Sort1在防止3D管状结构形成方面比较低浓度更有效(图47)。在抑制血管生成拟态的浓度下(12-24小时),抗分拣蛋白对ES-2癌细胞增殖没有影响,表明血管生成拟态抑制与细胞毒性作用无关(图48)。下表5显示不同浓度的抗-Sort1对ES-2卵巢癌细胞中的管长度、分支和环数的影响。

[0835] 表5:不同浓度的抗-Sort1对血管生成拟态过程中出现的管长度、分支和环数的影响

[0836] 表5(续)

样品名称	SORT 1 µg /mL (n=1)	SORT 1 µg /mL (n=2)	SORT 2 µg /mL (n=1)	SORT 2 µg /mL (n=2)	SORT 4 µg /mL (n=1)	SORT 2 µg /mL (n=2)
[0837] 总管长度 (像素)	29793	30395	28759	27470	11887	4307
总分支点	350	360	324	321	148	65
总环	129	126	104	119	5	0

[0838] 实例7:在形成血管生成拟态期间分拣蛋白和CD133的表达

[0839] 在图53至图57中,显示分拣蛋白和CD133均存在于ES-2肿瘤异种移植物形成的血管生成拟态结构中。首先将肿瘤组织切片与抗分拣蛋白、CD3 1和CD1 33的一次抗体杂交或用高碘酸希夫(PAS)染色(图53)。然后用PAS-抗CD3 1、PAS-抗分拣蛋白或PAS-抗CD1 33对切片进行共染色(图54至图57)。观察到的血管生成拟态结构为PAS阳性和CD31阴性,并且用词“VM”表示,而血管用词“血管”表示,并且对于CD3 1为阳性。分拣蛋白和CD1 33染色均与癌细胞相关,并且也部分地与PAS染色相关。

[0840] 通过免疫组织化学进行的血管生成拟态鉴定如下进行。将福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织切片用适当的一次抗体染色,以检测CD3 1、CD1 33和分拣蛋白。将切片用0.5%高碘酸溶液处理15分钟。用蒸馏水冲洗2分钟后,将组织切片置于希夫溶液中,于暗室中放置15-30分钟,然后用蒸馏水冲洗3次。然后,将切片用苏木精复染。在苏木精-伊红染色载玻片上看到3D管状结构将由CD3 1阴性肿瘤细胞形成。然后,通过CD31/高碘酸-希夫(PAS)双染色验证血管生成拟态,并且通过检测被肿瘤细胞(而非内皮细胞)包围的PAS阳性环来识别血管生成拟态。关于CD133和分拣蛋白的免疫组织化学染色,对来自癌症组织切片的福尔马林固定和石蜡包埋的载玻片进行常规脱蜡和再水合。然后,将载玻片与3%H2O2孵育以阻断内源性过氧化物酶,并且然后与20%山羊血清一起孵育以减少非特异性结合。用磷酸盐缓冲盐水洗涤后,将小鼠抗人CD1 33单克隆抗体(克隆CD133,美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))以1:50的稀释度添加至载玻片中。然后将载玻片在4℃下孵育过夜。第二天,将载玻片在过氧化物酶共轭的兔抗小鼠二次抗体(DakoCytomation公司,美国加利福尼亚州卡平特里亚)中以1:200孵育30分钟。使用二氨基联苯胺对反应进行可视化。最后,用苏木精对载玻片进行复染。

[0841] 在图44和图45中,显示在血管生成拟态3D管状结构形成期间,分拣蛋白和癌症干细胞样CD133基因的表达增加。

[0842] 在ES-2卵巢癌细胞(图44)和MDA-MB-231细胞(图45)形成3D管状结构期间,通过逆转录和定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)评估分拣蛋白、CD133和MMP9的基因表达。在ES-2卵巢癌细胞形成这些毛细血管样结构期间,分拣蛋白基因表达在2小时后迅速增加,并在24小时内保持高水平(图44)。在血管生成拟态形成期间,CD133和MMP9基因表达随时间增加多于4倍。CD133是从肿瘤中分离癌症干细胞(CSC)群体最常用的标志物之一。CD133+癌细胞(CSC)与血管生成拟态形成、局部区域复发和远转移呈正相关。在MDA-MB-231(图45)中出现血管生成拟态的情况下,分拣蛋白和CD133基因表达随时间略有增加,并且MMP9增加约2倍。这表明,在MDA-MB-231中,CD1 33在血管生成拟态中的作用可能适度,而与ES-2癌细胞相反,观察到CD133基因表达更强有力地增加。

[0843] 实例8:筛选额外的分拣蛋白阳性TNBC细胞系模型

[0844] 正在筛选表达分拣蛋白的其他TNBC细胞系。在图58至图59中,显示各种三阴性乳腺癌(TNBC)细胞系是分拣蛋白阳性细胞系(图58和表6),并且特别是已经证实一个细胞系形成3D管状血管生成拟态结构,BT-20TNBC细胞(图59)。

[0845] 表6:TNBC细胞系模型列表

[0846]

类型	亚型	名称	组织学
基底样形态	BL-1	HCC1599	原发性导管癌
		HCC1937	原发性导管癌
		HCC1143	原发性导管癌
		MDA-MB468	腺癌
		HCC38	原发性导管癌
	BL-2	HCC70	原发性导管癌
		HCC1806	原发性棘层松解性鳞状细胞癌
	IM	HCC1187	原发性导管癌
		DU4475	癌
	间质样形态	M	BT-549
MSL		Hs578T	癌
		MDA-MB231	腺癌
		MDA-MB436	腺癌
		MDA-MB157	髓质癌 (Medullary carcinoma)
LAR	LAR	MDA-MB453	癌
未分类形态		BT-20	癌
		HCC1395	原发性导管癌

[0847] 本公开的段落[0062]至[00458]的实施例在本公开中以这样的方式呈现,以便证明当适用时,可以进行实施例的每个组合。因此,这些实施例已经在说明书中以等同于对依赖于任何前述权利要求的所有实施例做出从属权利要求的方式呈现(覆盖先前呈现的实施例),从而证明其可以以所有可能的方式组合在一起。例如,当适用时,段落[0062]至[00458]的实施例之间的所有可能的组合和段落[005]至[0064]中呈现的各个方面由此被本公开覆盖。

[0848] 参考文献

[0849] 1.世界癌症报告(World Cancer Report),2014.

[0850] 2.Urruticoechea A,Aleman R,Balart J,Villanueva A,Viñals F,Capellá G.癌症治疗的最新进展:综述(Recent advances in cancer therapy:an overview).当前药物

设计 (Curr Pharm Des) 2010;16:3-10.

[0851] 3. Fisher R, Puzsai L, Swanton C. 癌症异质性: 靶向治疗的含义 (Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics). 英国癌症杂志 (Brit J Cancer) 2013;108:479-485.

[0852] 4. Zhao P, Astruc D. 抗癌治疗中的多西他赛纳米技术 (Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy). 化学药物化学 (Chem Med Chem) 2012;7:952-72.

[0853] 5. Ophir E, Bobisse S, Coukos G, Harari A, Kandalaft LE. 癌症主动免疫治疗的个性化方法 (Personalized approaches to active immunotherapy in cancer). 生物化学生物物理学报 (Biochim Biophys Acta) 2016;1865:72-82.

[0854] 6. Sapiezynski J, Taratula O, Rodriguez-Rodriguez L, Minko T. 卵巢癌的精确靶向治疗 (Precision targeted therapy of ovarian cancer). 控释杂志 (J Cont Rel) .2016;243:250-268.

[0855] 7. Wilson CM, Naves T, Saada S, Pinet S, Vincent F, Lalloué F, Jauberteau MO. 分选蛋白/vps10p结构域受体在神经和人类疾病中的意义 (The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases.) CNS神经障碍药物靶点 (CNS Neurol Disord Drug Targets) 2014;13:1354-65.

[0856] 8. Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. 神经降压素和神经降压素受体 (Neurotensin and neurotensin receptors). 趋势药理学科学 (Trends Pharmacol Sci) 1999;20:302-309.

[0857] 9. Carlo AS, Nykjaer A, Willnow TE. (分选受体分选蛋白——心血管和神经系统疾病的罪魁祸首) Sorting receptor sortilin—a culprit in cardiovascular and neurological diseases. 分子医学杂志 (J Mol Med) 2014;92:905-11.

[0858] 10. Schmidt V, Willnow TE. 蛋白质分类出错——心血管和代谢疾病中的VPS10P结构域受体 (Protein sorting gone wrong—VPS10P domain receptors in cardiovascular and metabolic diseases). 动脉粥样硬化与抗栓杂志 (Atheroscler) 2016;245:194-9.

[0859] 11. Wilson CM, Naves T, Al Akhrass H, Vincent F, Melloni B, Bonnaud F, Lalloué F, Jauberteau MO. 分选蛋白带在癌症中的新作用 (A new role under sortilin's belt in cancer). 综合与比较生物学 (Com Integr Biol) 2016;9:e1130192.

[0860] 12. Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, Raza S, Crutcher K, Thrasivoulou C, Simons P, Cowen T. ProNGF、分选蛋白和与年龄相关神经变性 (ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration). 纽约科学院年鉴 (Ann N Y Acad Sci) 2007;1119:208-15.

[0861] 13. Lewin GR, Nykjaer A. 前神经营养蛋白、分选蛋白和伤害感受 (Pro-neurotrophins, sortilin, and nociception). 欧洲神经科学杂志 (Eur J Neurosci) 2014;39:363-74.

[0862] 14. Mazella J, Vincent JP. 神经降压素受体的内化和再循环特性 (Internalization and recycling properties of neurotensin receptors). 肽 (Peptides) 2006;27:2488-92.

- [0863] 15.Vaegter CB,Jansen P,Fjorback AW,Glerup S,Skeldal S,Kjolby M, Richner M,Erdmann B,Nyengaard JR,Tessarollo L,等人,分拣蛋白与Trk受体结合以增强顺行转运和神经营养蛋白信号传导(Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling).自然神经科学(Nat Neurosci)2011;14:54-61.
- [0864] 16.Akil H,Perraud A,Melin C,Jauberteau MO,Mathonnet M.内源性脑源性神经营养因子、TrkB和分拣蛋白在结直肠癌细胞存活中的微调作用(Fine-tuning roles of endogenous brain-derived neurotrophic factor.TrkB and sortilin in colorectal cancer cell survival).公共科学图书馆·综合(PloS One)2011;6:e25097.
- [0865] 17.Dal Farra C,Sarret P,Navarro V,Botto JM,Mazella J,Vincent JP.神经降压素受体亚型NTR3参与神经降压素对癌细胞系的生长作用(Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines).国际癌症杂志(IntJ Cancer)2001;92:503-9.
- [0866] 18.Truzzi F,Marconi A,Lotti R,Dallaglio K,French LE,Hempstead BL, Pincelli C.神经营养因子及其受体刺激黑色素瘤细胞增殖和迁移(Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration).皮肤病学研究杂志(J Invest Dermatol)2008;128:2031-40.
- [0867] 19.Giorgi RR,Chile T,Bello AR,Reyes R,Fortes MA,Machado MC,Cescato VA,Musolino NR,Bronstein MD,Giannella-Neto D,等人,神经降压素及其受体在垂体腺瘤中的表达(Expression of neurotensin and its receptors in pituitary adenomas).神经内分泌学杂志(J Neuroendocrinol)2008;20:1052-7.
- [0868] 20.Xiong J,Zhou L,Yang M,Lim Y,Zhu YH,Fu DL,Li ZW,Zhong JH,Xiao ZC, Zhou XF.ProBDNF及其受体在胶质瘤中上调,并在体外抑制胶质瘤细胞的生长(ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells in vitro).神经肿瘤学杂志(Neuro Oncol)2013;15:990-1007.
- [0869] 21.Hemmati S,Zarnani AH,Mahmoudi AR,Sadeghi MR,Soltanghorae H, Akhondi MM,Tarahomi M,Jeddi-Tehrani M,Rabbani H.卵巢癌患者分拣蛋白1(NTR-3)的异位表达(Ectopic Expression of Sortilin 1 (NTR-3) in Patients with Ovarian Carcinoma).阿维森纳医学生物技术杂志(Avicenna J Med Biotechnol)2009;1:125-31.
- [0870] 22.Ghaemimanesh F,Ahmadian G,Talebi S,Zarnani AH,Behmanesh M,Hemmati S,Hadavi R,Jeddi-Tehrani M,Farzi M,Akhondi MM,Rabbani H.分拣蛋白沉默对卵巢癌细胞的影响(The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells).阿维森纳医学生物技术杂志(Avicenna J Med Biotechnol)2014;6:169-77.
- [0871] 23.Hosseini A,Ghorbani A.利用植物化学物质的癌症治疗:来自临床研究的证据(Cancer therapy with phytochemicals:evidence from clinical studies).阿维森纳植物医药杂志(Avicenna J Phytomed).2015;5:84-97.
- [0872] 24.Cao Z,Bao M,Miele L,Sarkar FH,Wang Z,Zhou Q..肿瘤血管生成拟态与人类癌症患者不良预后相关:系统综述和荟萃分析(Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients:a systemic review and

meta-analysis). 欧洲癌症杂志 (Eur J Cancer). 2013;49:3914-23.

[0873] 25. Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. 分子途径: 肿瘤细胞中的血管生成拟态: 诊断和治疗意义 (Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications). 临床癌症研究 (Clin Cancer Res). 2012;18:2726-32.

[0874] 26. Clarijs R, Otte-Höller I, Ruiter DJ, de Waal RM. 异种移植皮肤和原发性人葡萄膜黑色素瘤中存在流体传导网 (Presence of a fluid-conducting meshwork in xenografted cutaneous and primary human uveal melanoma). 眼科研究与视力科学 (Invest Ophthalmol Vis Sci.) 2002;43:912-8.

[0875] 27. Kobayashi H, Shirakawa K, Kawamoto S, Saga T, Sato N, Hiraga A, Watanabe I, Heike Y, Togashi K, Konishi J, Brechbiel MW, Wakasugi H. 通过使用大分子对比剂 G6-(1B4M-Gd) (256) 的对比增强动态 MRI 预测的放射性标记的赫赛汀在具有血管生成拟态的炎性乳腺癌异种移植植物中的快速积聚和内化 (Rapid accumulation and internalization of radiolabeled herceptin in an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd) (256)). 癌症研究 (Cancer Res.) 2002;62:860-6.

[0876] 28. Maniotis AJ, Chen X, Garcia C, DeChristopher PJ, Wu D, Pe'er J, Folberg R. 黑色素瘤形态发生、内皮细胞存活和细胞外基质灌注的控制 (Control of melanoma morphogenesis, endothelial survival, and perfusion by extracellular matrix). 实验室研究 (Lab Invest). 2002;82:1031-43.

[0877] 29. Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X, Tian Y. 癌症中血管生成拟态的研究进展 (Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer). 细胞分子医学杂志 (J Cell Mol Med). 2015;19:315-26.

[0878] 30. Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q, Yao Z, Dong X Y, Zhao N, Liu N. 三阴性乳腺癌中具有癌症干细胞特征的 CD133+ 细胞与血管生成拟态相关 (CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer). 致癌基因 (Oncogene). 2013;32:544-53.

[0879] 31. Racordon D, Valdivia A, Mingo G, Erices R, Aravena R, Santoro F, Bravo ML, Ramirez C, Gonzalez P, Sandoval A, González A, Retamal C, Kogan MJ, Kato S, Cuello MA, Osorio G, Nualart F, Alvares P, Gago-Arias A, Fabri D, Espinoza I, Sanchez B, Corvalán AH, Pinto MP, Owen GI. 体外血管生成拟态的结构和功能鉴定 (Structural and functional identification of vasculogenic mimicry in vitro). 科学报告 (Sci Rep). 2017;7:6985.

[0880] 32. Chiablaem K, Lirdpramongkol K, Keeratichamroen S, Surarit R, Svasti J. 姜黄素通过 STAT3 和 PI3K/AKT 抑制来抑制肝细胞癌细胞的血管生成拟态能力 (Curcumin suppresses vasculogenic mimicry capacity of hepatocellular carcinoma cells through STAT3 and PI3K/AKT inhibition). 抗癌研究 (Anticancer Res). 2014;34:1857-64.

- [0881] 33. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. 噬菌体抗体:展示抗体可变区的丝状噬菌体 (Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains). 自然 (Nature) 1990; 348: 552-554.
- [0882] 34. Carter P, Merchant AM. 成像和治疗用工程抗体 (Engineering antibodies for imaging and therapy). 生物技术当前述评 (Current Opinion in Biotechnology) 1997; 8: 449-454.
- [0883] 35. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. 重塑人类抗体用于治疗 (Reshaping human antibodies for therapy). 自然 (Nature) 1988; 332: 323-327.
- [0884] 36. Foote J, Winter G. 影响高变环的构象的抗体框架残基 (Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops). 分子生物杂志 (Journal of Molecular Biology) 1992; 224: 487-499.
- [0885] 37. Yano S, Hsu RK, Landolfi N F, Vasquez M, Cole M, Tso JT, Bringman T, Laird W, Hudson D. 对血小板整合素 gpIIb/IIIa 有特异性的人源化抗体 (A humanized antibody specific for the platelet integrin gpIIb/IIIa). 免疫学杂志 (The Journal of Immunology) 1994; 152: 2968-2976.
- [0886] 38. Pedersen JT, Henry AH, Searle SJ, Guild BC, Roguska M, Rees AR. 人和鼠免疫球蛋白 Fv 结构域中表面可及残基的比较: 鼠抗体人源化的含义 (Comparison of surface accessible residues in human and murine immunoglobulin Fv domains: implication for humanization of murine antibodies). 分子生物学杂志 (Journal of molecular biology) 1994; 235: 959-973.
- [0887] 39. Köhler G, Milstein C. 分泌预定特异性抗体的融合细胞的连续培养 (Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity). 自然 (Nature) 1975, 256: 495-497.
- [0888] 40. Kozbor D, Roder JC. 从人类淋巴细胞产生单克隆抗体 (The production of monoclonal antibodies from human lymphocytes). 今日免疫学 (Immunology Today) 1983. 4: 72-79.
- [0889] 41. Cole SPC, Kozbor D, Roder JC. EBV 杂交瘤技术及其在人肺癌中的应用 (The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer). In: Reisfeld RA, Sell S, 编辑, 单克隆抗体与癌症治疗 (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy). New York: Alan R. Liss Inc. (加州大学洛杉矶分校分子和细胞生物学研讨会 (UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology)) 1985, 27: 77-96.
- [0890] 42. Ge H, Luo H. 血管生成拟态——肿瘤治疗的潜在靶点的进展概述 (Overview of advances in vasculogenic mimicry—a potential target for tumor therapy). 癌症管理研究 (Cancer Manag Res). 2018; 10: 2429-2437.
- [0891] 43. Zhou Q, Zhifei C, Meimei B, Miele L, Sarkar FH, Wang Z. 肿瘤血管生成拟态与人类癌症患者不良预后相关: 系统综述和荟萃分析 (Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: A systemic review and meta-analysis). 欧洲癌症杂志 (Eur J Cancer) 2013; 49: 3914-3923.
- [0892] 44. Yang, J.P. 等人, 肿瘤血管生成拟态预测癌症患者不良预后: 荟萃分析 (Tumor

vasculogenic mimicry predicts poor prognosis in cancer patients:a meta-analysis).血管生成(Angiogenesis)2016;19:191-200.

[0893] 45.Sun B,Zhang D,Zhao N and Zhao X.上皮-内皮转换和癌症干细胞:恶性肿瘤血管生成拟态的两大基石(Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells:two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors).肿瘤靶标(Oncotarget)2017;8:30502-30510.

[0894] 46.Liang J,Yang B,Cao Q,Wu X.卵巢癌血管生成拟态形成和CD133表达与预后不良的关系(Association of Vasculogenic Mimicry Formation and CD133 Expression with Poor Prognosis in Ovarian Cancer).妇产科研究(Gynecol Obstet Invest).2016;81:529-536.

[0895] 47.Altschul等人,1997,核酸研究(Nucleic Acids Res).25:3389-3402.

[0896] 48.Navarro等人,2002.

[0897] 49.Altschul等人,1990,分子生物学杂志(J.Mol.Biol).215:403.

[0898] 50.Bissery等人,1995.

[0899] 51.Clarke等人,1999.

[0900] 52.Karlin and Altschul,1990,美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)87:2264-2268.

[0901] 53.Karlin and Altschul,1993,美国国家科学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)90:5873-5877.

序列表

- <110> 特拉斯福特普拉斯公司.
- <120> 靶向分拣蛋白受体和抑制血管生成拟态的方法和化合物
- <130> 14863-P53144PC00
- <150> 62/722,726
<151> 2018-08-24
- <150> 62/804,063
<151> 2019-02-11
- <160> 50
- <170> 专利版本3.5
- <210> 1
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成构建体
- <220>
<221> MISC_特征
<222> (1)..(5)
<223> Xaa可以是任何氨基酸
- <220>
<221> MISC_特征
<222> (8)..(8)
<223> Xaa可以是任何氨基酸
- <220>
<221> MISC_特征
<222> (14)..(14)
<223> Xaa可以是任何氨基酸
- <220>
<221> MISC_特征
<222> (16)..(16)
<223> Xaa可以是任何氨基酸
- <400> 1
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Xaa Ala Lys Ala Gly Val Xaa Asn Xaa
1 5 10 15
Phe Lys Ser Glu Ser Tyr
20
- <210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成构建体
- <220>
<221> MISC_特征
<222> (1)..(6)
<223> Xaa可以是任何氨基酸并且可以存在或不存在
- <220>
<221> MISC_特征
<222> (9)..(9)
<223> Xaa可以是任何氨基酸
- <220>
<221> MISC_特征
<222> (15)..(15)
<223> Xaa可以是任何氨基酸
- <220>
<221> MISC_特征
<222> (17)..(17)
<223> Xaa可以是任何氨基酸
- <400> 2
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Xaa Ala Lys Ala Gly Val Xaa Asn
1 5 10 15
Xaa Phe Lys Ser Glu Ser Tyr
20
- <210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成构建体

[0001]

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa可以是任何氨基酸

 <220>
 <221> MISC_特征
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa可以是任何氨基酸

 <220>
 <221> MISC_特征
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa可以是任何氨基酸

 <220>
 <221> MISC_特征
 <222> (22)..(23)
 <223> Xaa可以是Gln、Pro、Tyr、Ile或Leu

 <400> 3
 Tyr Lys Xaa Leu Arg Arg Xaa Ala Pro Arg Trp Asp Xaa Pro Leu Arg
 1 5 10 15

Asp Pro Ala Leu Arg Xaa Xaa Leu
 20

<210> 4
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa可以是任何氨基酸

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (7)..(12)
 <223> Xaa可以是任何氨基酸并且可以存在或不存在

[0002]

<220>
 <221> MISC_特征
 <222> (21)..(22)
 <223> Xaa可以是Gln、Pro、Tyr、Ile或Leu

<400> 4
 Tyr Lys Xaa Leu Arg Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Leu Arg Asp
 1 5 10 15

Pro Ala Leu Arg Xaa Xaa Leu
 20

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 5
 Ile Lys Leu Ser Gly Gly Val Gln Ala Lys Ala Gly Val Ile Asn Met
 1 5 10 15

Asp Lys Ser Glu Ser Met
 20

<210> 6
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 6
 Ile Lys Leu Ser Gly Gly Val Gln Ala Lys Ala Gly Val Ile Asn Met
 1 5 10 15

Phe Lys Ser Glu Ser Tyr
 20

<210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体
 <400> 7
 Ile Lys Leu Ser Gly Gly Val Gln Ala Lys Ala Gly Val Ile Asn Met
 1 5 10 15
 Phe Lys Ser Glu Ser Tyr Lys
 20

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 8
 Gly Val Gln Ala Lys Ala Gly Val Ile Asn Met Phe Lys Ser Glu Ser
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 9
 Gly Val Arg Ala Lys Ala Gly Val Arg Asn Met Phe Lys Ser Glu Ser
 1 5 10 15
 Tyr

[0003]

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MISC 特征
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa是Nle
 <400> 10
 Gly Val Arg Ala Lys Ala Gly Val Arg Asn Xaa Phe Lys Ser Glu Ser
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 11
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 11
 Tyr Lys Ser Leu Arg Arg Lys Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg
 1 5 10 15
 Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu Leu
 20

<210> 12
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 12
 Tyr Lys Ser Leu Arg Arg Lys Ala Pro Arg Trp Asp Ala Tyr Leu Arg
 1 5 10 15

Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu Leu
20

<210> 13
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 13

Tyr Lys Ser Leu Arg Arg Lys Ala Pro Arg Trp Asp Ala Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Asp Pro Ala Leu Arg Pro Leu Leu
20

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 14

Gly Val Arg Ala Lys Ala Gly Val Arg Asn Met Phe Lys Ser Glu Ser
1 5 10 15

Tyr

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MISC_特征
<222> (11)..(11)
<223> Xaa是Nle

<400> 15

Gly Val Arg Ala Lys Ala Gly Val Arg Asn Xaa Phe Lys Ser Glu Ser
1 5 10 15

Tyr

<210> 16
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 16

Tyr Lys Ser Leu Arg Arg Lys Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg
1 5 10 15

Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu Leu
20

<210> 17
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 17

Tyr Lys Ser Leu Arg Arg Lys Ala Pro Arg Trp Asp Ala Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu Leu
20

<210> 18
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 18

Tyr Lys Ser Leu Arg Arg Lys Ala Pro Arg Trp Asp Ala Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Asp Pro Ala Leu Arg Pro Leu Leu
20

<210> 19
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

[0005]

Lys Cys Leu Arg Arg Glu Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp
1 5 10 15

Pro Ala Leu Arg Gln Leu Leu
20

<210> 20
<211> 23
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<400> 20

Lys Cys Leu Arg Lys Lys Thr Pro Arg Trp Asp Ile Leu Leu Arg Asp
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Pro Leu Leu
20

<210> 21
<211> 23
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 21

Lys Cys Leu Arg Lys Lys Ile Pro Arg Trp Asp Met Phe Leu Arg Asp
1 5 10 15

Pro Val Pro Arg Pro Leu Leu
20

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_特征
<222> (1)..(1)
<223> Xaa可以是任何氨基酸

<400> 22

Xaa Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
1 5 10

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MISC_特征
 <222> (1)..(11)
 <223> Xaa是Nle
 <400> 23
 Gly Val Arg Ala Lys Ala Gly Val Arg Asn Xaa Phe Lys Ser Glu Ser
 1 5 10 15

Tyr Cys

<210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 乙酰化
 <220>
 <221> MISC_特征
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa是Nle
 <400> 24
 Gly Val Arg Ala Lys Ala Gly Val Arg Asn Xaa Phe Lys Ser Glu Ser
 1 5 10 15

Tyr Cys

[0006]

<210> 25
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 25
 Gly Val Lys Ile Tyr Ser Phe Gly Leu Gly Gly Arg Phe Leu Phe Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Met Ala Asp Lys Asp Thr Thr Arg Arg Ile His Val Ser Thr
 20 25 30
 Asp Gln Gly Asp Thr Trp Ser Met Ala Gln Leu Pro Ser Val Gly Gln
 35 40 45
 Glu Gln Phe Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Asn Asp Asp Met Val Phe Met
 50 55 60
 His Val Asp Glu Pro Gly Asp Thr Gly Phe Gly Thr Ile Phe Thr Ser
 65 70 75 80
 Asp Asp Arg Gly Ile Val Tyr Ser Lys Ser Leu Asp Arg His Leu Tyr
 85 90 95
 Thr Thr Thr Gly Gly Glu Thr Asp Phe Thr Asn Val Thr Ser Leu Arg
 100 105 110
 Gly Val Tyr Ile Thr Ser Val Leu Ser Glu Asp
 115 120

<210> 26
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 26
 Gly Val Lys Ile Tyr Ser Phe Gly Leu Gly Gly Arg Phe Leu Phe Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Met Ala Asp Lys Asp Thr Thr Arg Arg Ile His Val Ser
 20 25 30

<210> 27
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 27
 Ala Ser Val Met Ala Asp Lys Asp Thr Thr Arg Arg Ile His Val Ser
 1 5 10 15

Thr Asp Gln Gly Asp Thr Trp Ser Met Ala Gln Leu Pro Ser Val
 20 25 30

<210> 28
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28
 Ser Thr Asp Gln Gly Asp Thr Trp Ser Met Ala Gln Leu Pro Ser Val
 1 5 10 15

Gly Gln Glu Gln Phe Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Asn Asp Asp Met
 20 25 30

<210> 29
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 29
 Val Gly Gln Glu Gln Phe Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Asn Asp Asp Met
 1 5 10 15

Val Phe Met His Val Asp Glu Pro Gly Asp Thr Gly Phe Gly Thr
 20 25 30

<210> 30
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人

[0007]

<400> 30
 Met Val Phe Met His Val Asp Glu Pro Gly Asp Thr Gly Phe Gly Thr
 1 5 10 15

Ile Phe Thr Ser Asp Asp Arg Gly Ile Val Tyr Ser Lys Ser Leu
 20 25 30

<210> 31
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31
 Thr Ile Phe Thr Ser Asp Asp Arg Gly Ile Val Tyr Ser Lys Ser Leu
 1 5 10 15

Asp Arg His Leu Tyr Thr Thr Thr Gly Gly Glu Thr Asp Phe Thr
 20 25 30

<210> 32
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32
 Leu Asp Arg His Leu Tyr Thr Thr Thr Gly Gly Glu Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Asn Val Thr Ser Leu Arg Gly Val Tyr Ile Thr Ser Val Leu Ser Glu
 20 25 30

Asp

<210> 33
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 33
 Gly Val Lys Ile Tyr Ser Phe Gly Leu Gly Gly Arg Phe Leu Phe Ala
 1 5 10 15

[0008]

Ser Val Met Ala Asp
20

<210> 34
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Gly Arg Phe Leu Phe Ala Ser Val Met Ala Asp Lys Asp Thr Thr Arg
1 5 10 15

Arg Ile His Val Ser
20

<210> 35
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Asp Lys Asp Thr Thr Arg Arg Ile His Val Ser Thr Asp Gln Gly Asp
1 5 10 15

Thr Trp Ser Met Ala
20

<210> 36
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Ser Thr Asp Gln Gly Asp Thr Trp Ser Met Ala Gln Leu Pro Ser Val
1 5 10 15

Gly Gln Glu Gln Phe
20

<210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Ala Gln Leu Pro Ser Val Gly Gln Glu Gln Phe Tyr Ser Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Asn Asp Asp Met
20

<210> 38
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Phe Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Asn Asp Asp Met Val Phe Met His Val
1 5 10 15

Asp Glu Pro Gly Asp
20

<210> 39
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Met Val Phe Met His Val Asp Glu Pro Gly Asp Thr Gly Phe Gly Thr
1 5 10 15

Ile Phe Thr Ser Asp
20

<210> 40
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Asp Thr Gly Phe Gly Thr Ile Phe Thr Ser Asp Asp Arg Gly Ile Val
1 5 10 15

Tyr Ser Lys Ser Leu
20

<210> 41
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Asp Asp Arg Gly Ile Val Tyr Ser Lys Ser Leu Asp Arg His Leu Tyr
1 5 10 15

Thr Thr Thr Gly Gly
20

<210> 42
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Leu Asp Arg His Leu Tyr Thr Thr Thr Gly Gly Glu Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Asn Val Thr Ser Leu
20

<210> 43
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Gly Glu Thr Asp Phe Thr Asn Val Thr Ser Leu Arg Gly Val Tyr Ile
1 5 10 15

Thr Ser Val Leu Ser Glu Asp
20

[0009]

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Ala Asp Lys Asp Thr Thr
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Ser Thr Asp Gln Gly Asp Thr Trp Ser
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Leu Pro Ser Val Gly Gln Glu
1 5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

Asp Glu Pro Gly Asp Thr Gly Phe
1 5

<210> 48
<211> 2
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Thr Ser
1

<210> 49
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Arg Gly Ile
1

[0010]

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

Thr Thr Thr Gly Gly Glu Thr Asp Phe Thr
1 5 10

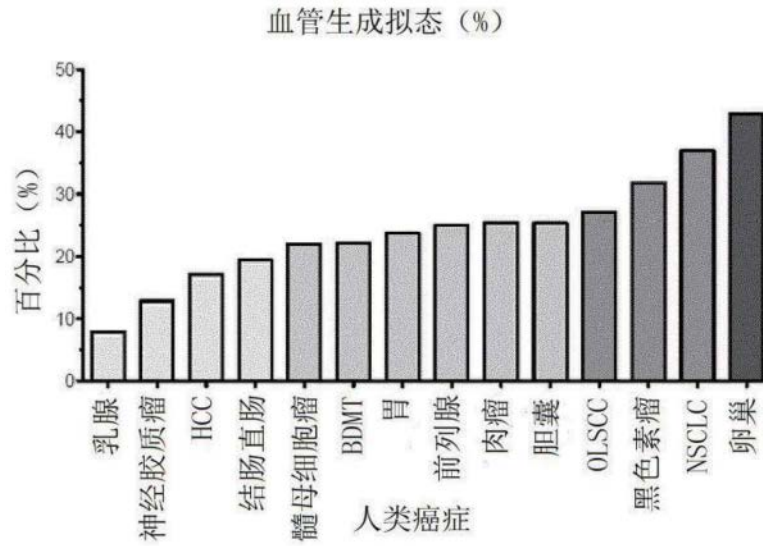


图1现有技术

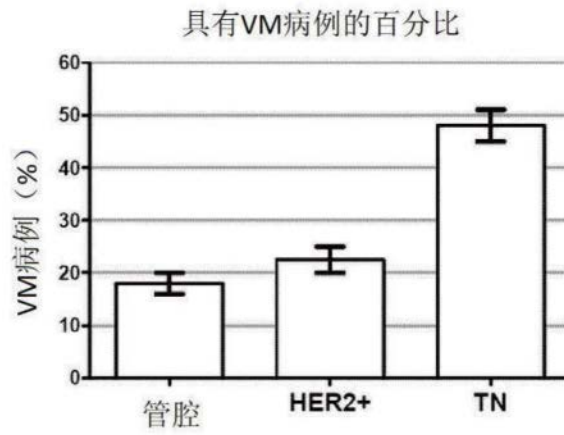


图2现有技术

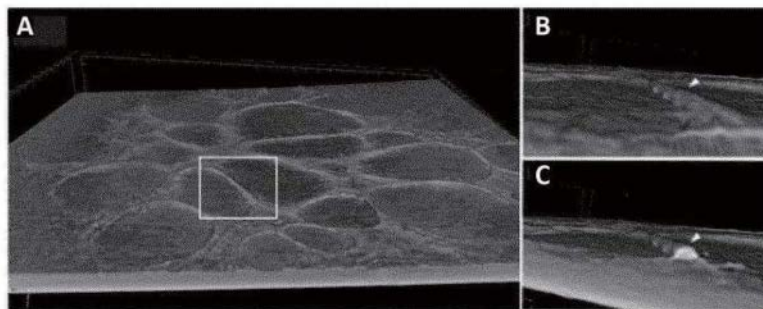


图3现有技术

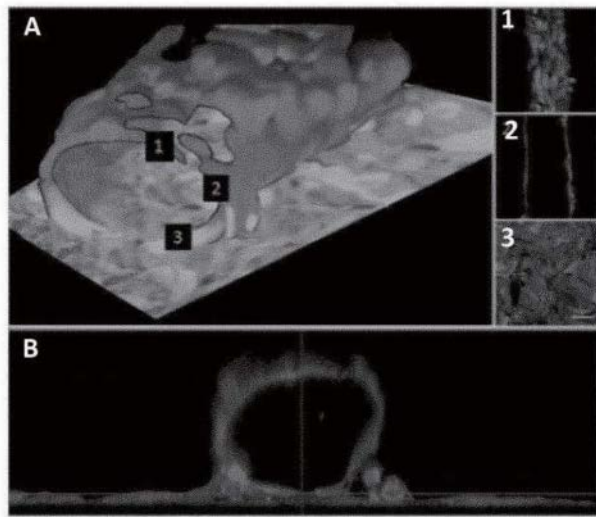


图4现有技术

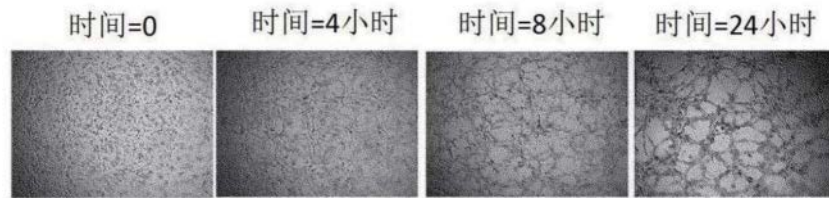


图5

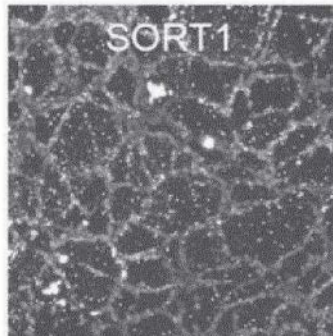


图6A



图6B

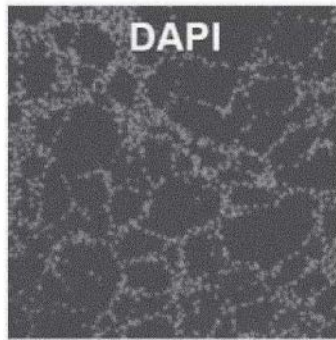


图6C

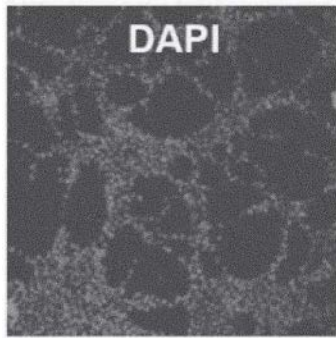


图6D

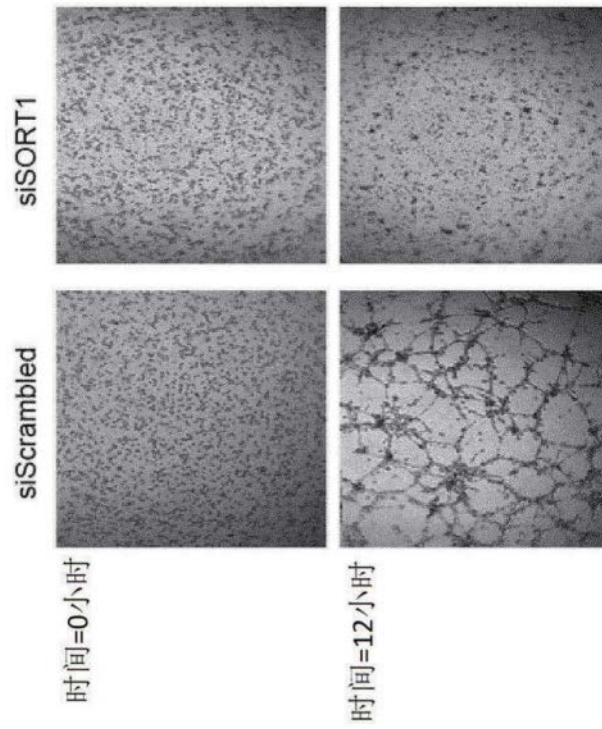


图7A

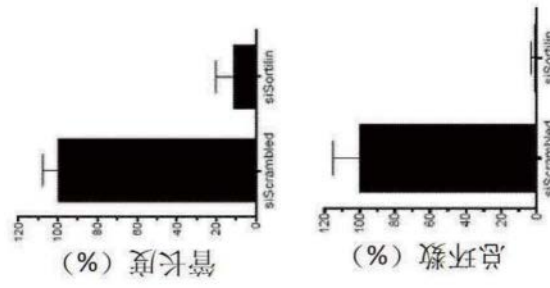


图7B

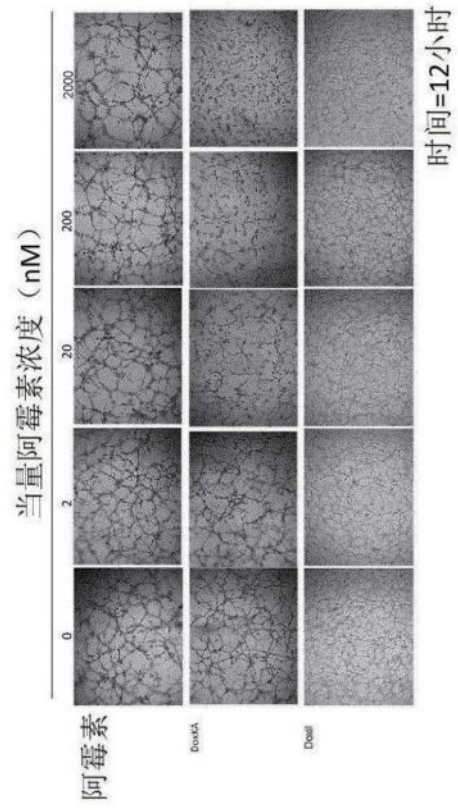


图8A

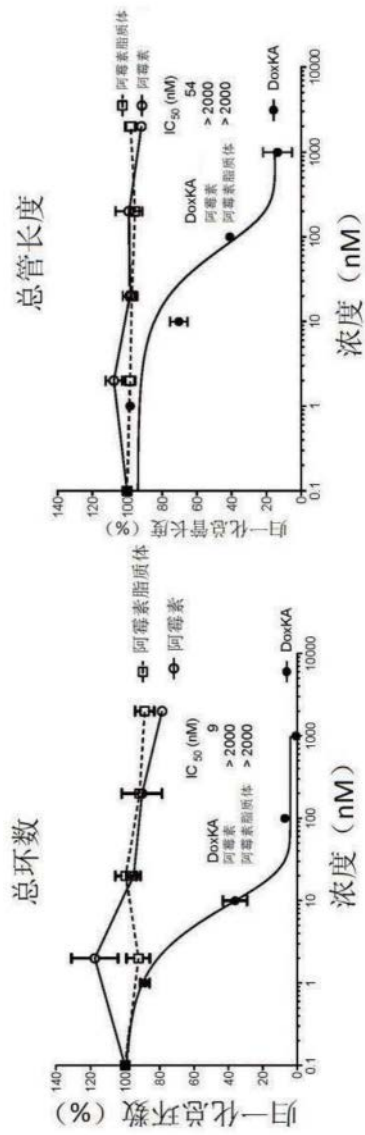


图8B

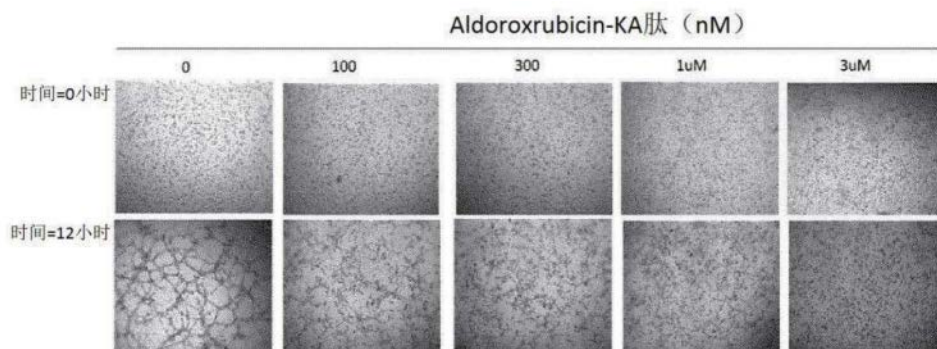


图9

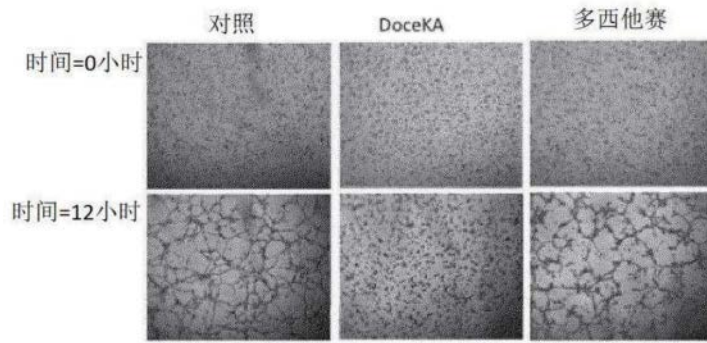


图10A

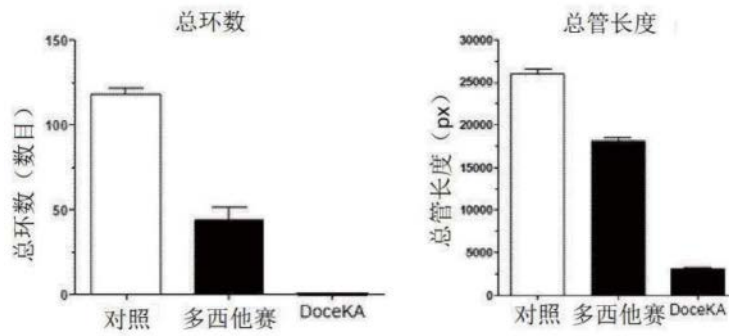


图10B

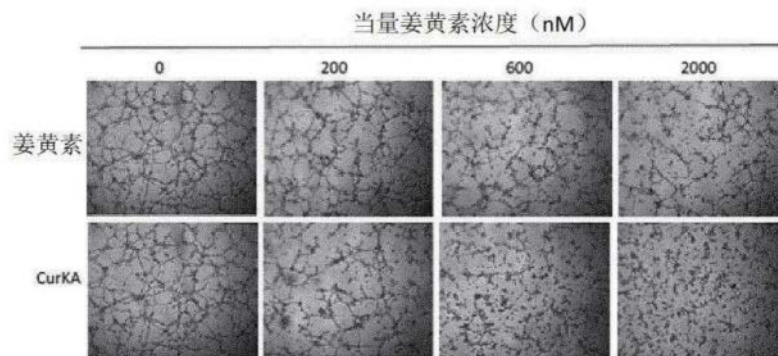


图11

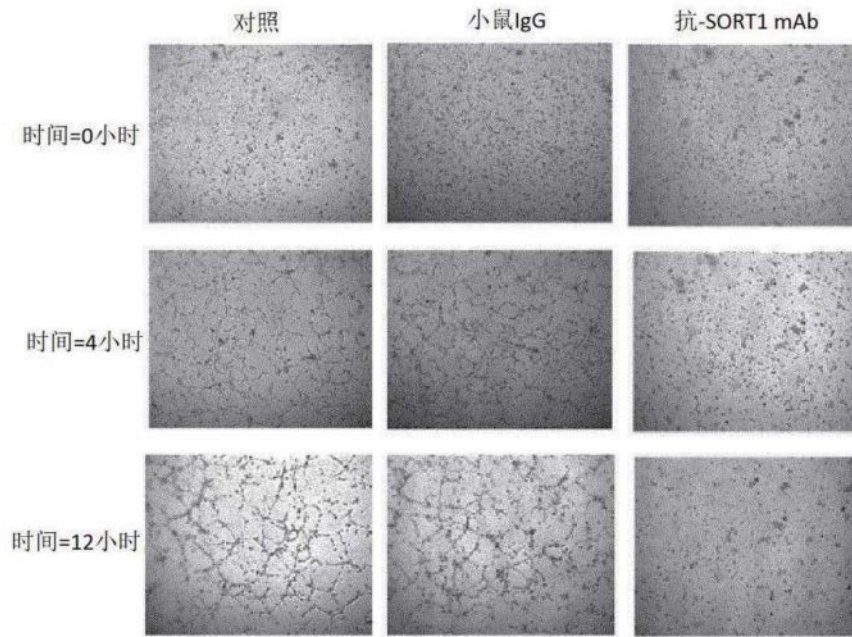


图12

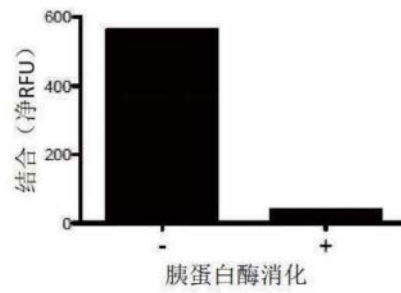


图13A

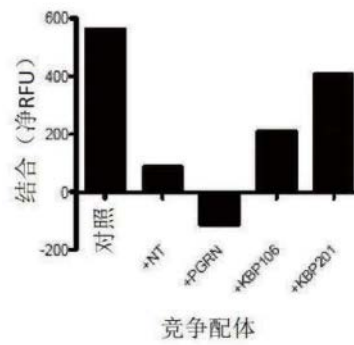


图13B

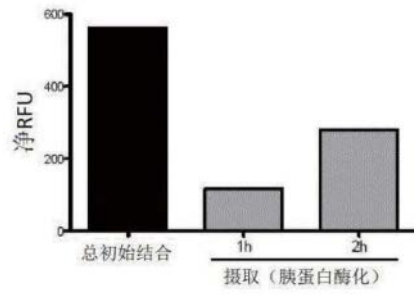


图13C

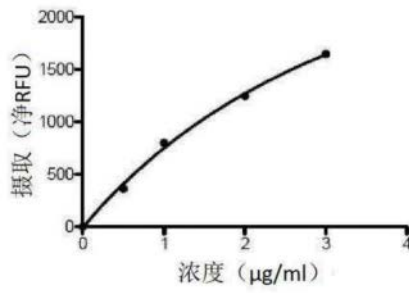


图13D

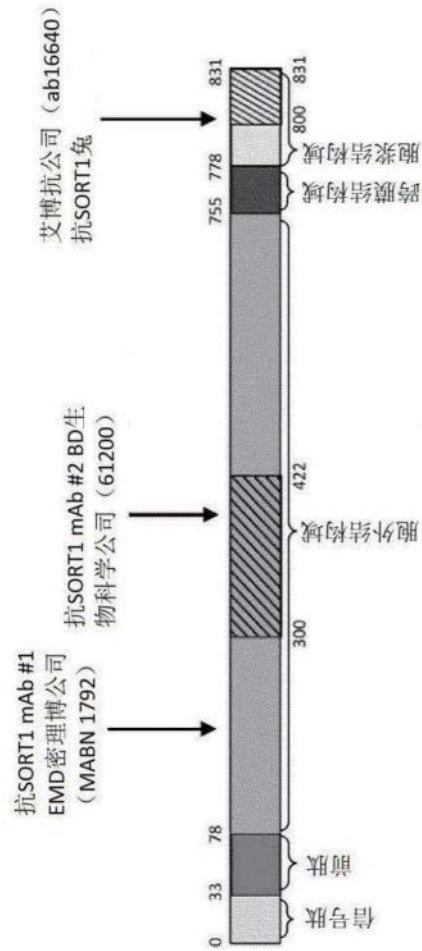


图14

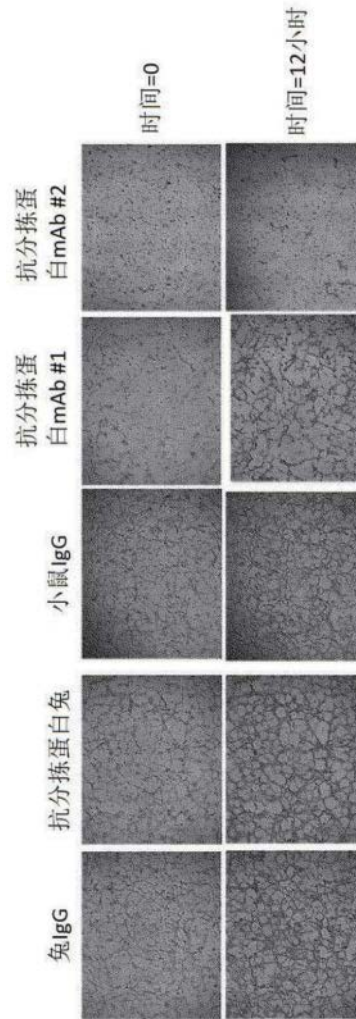


图15

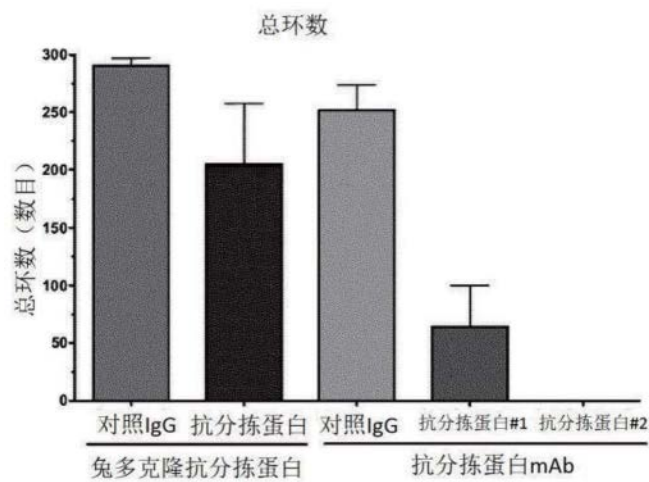


图16A

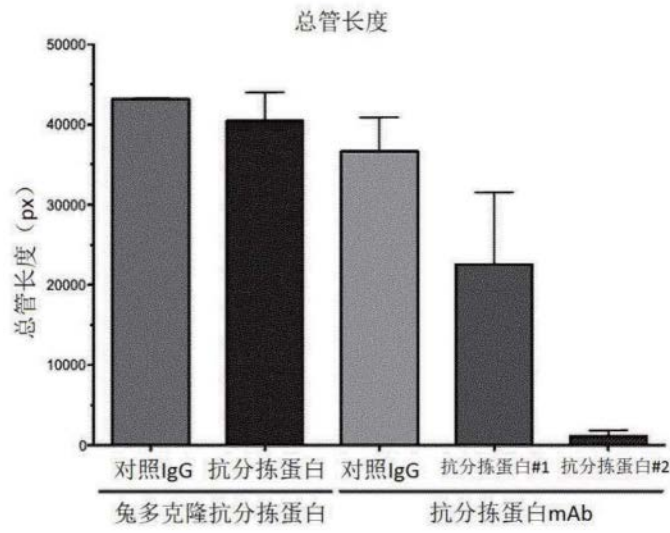


图16B

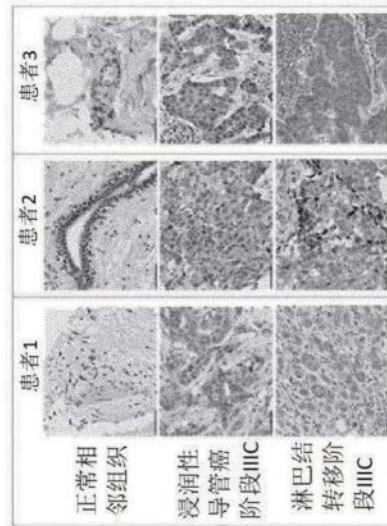


图17A

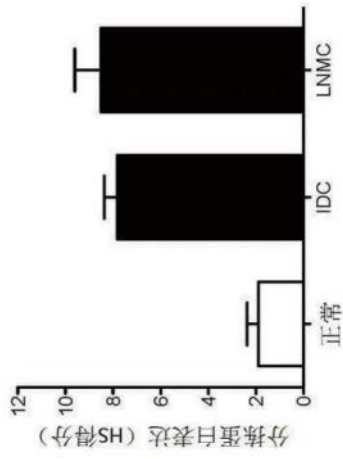


图17B

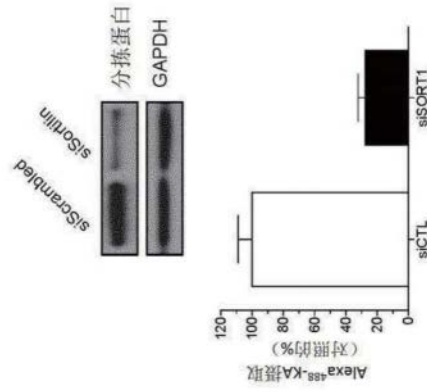


图17C

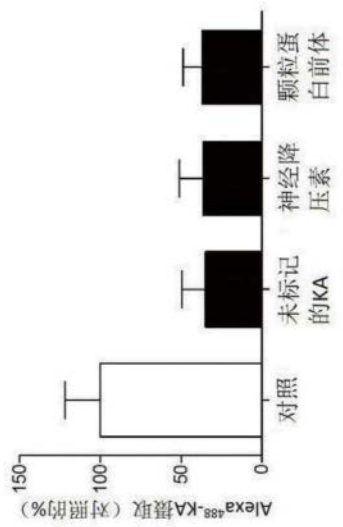


图17D

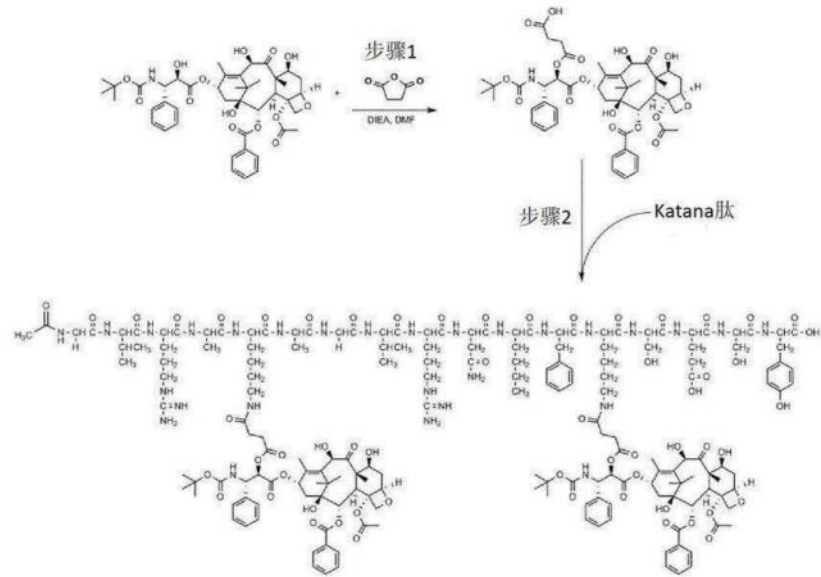


图18A

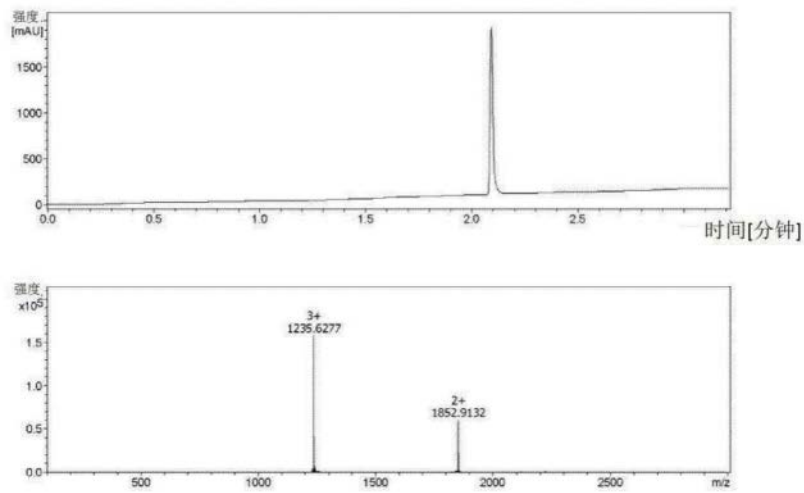


图18B

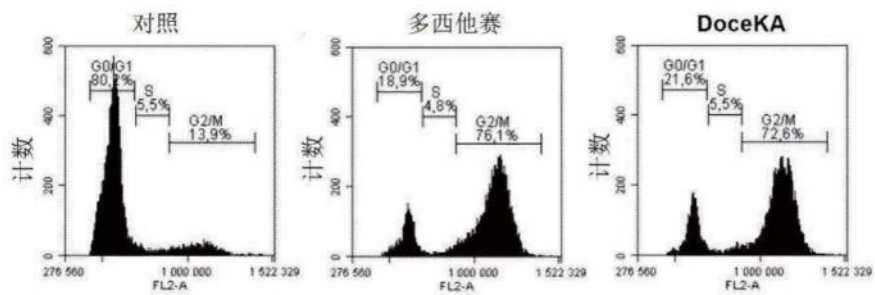


图19

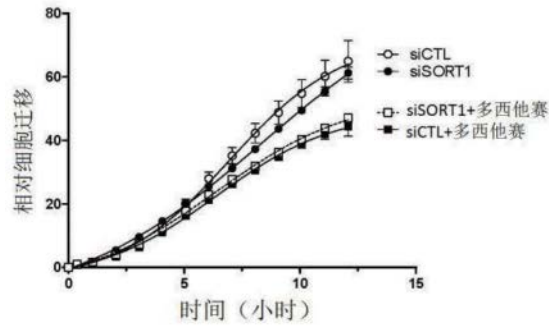


图20A

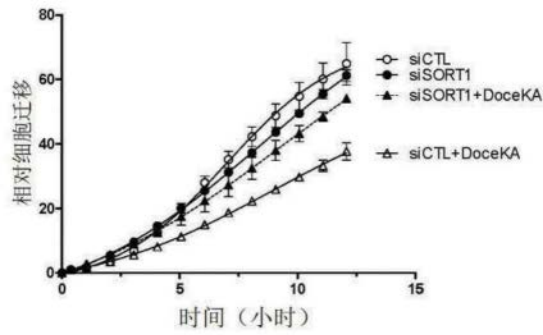


图20B

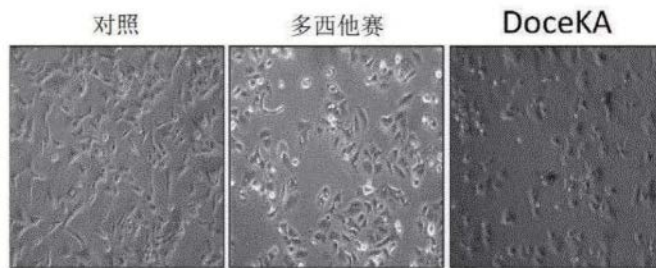


图21A

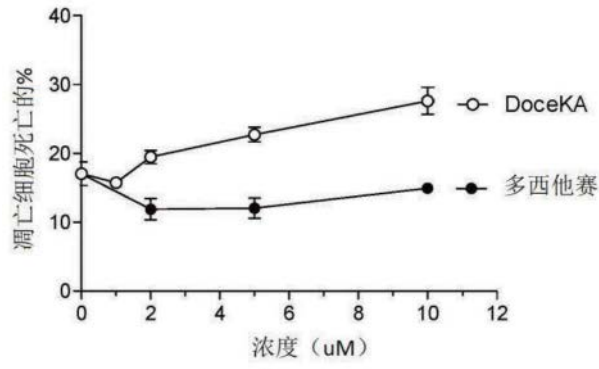


图21B

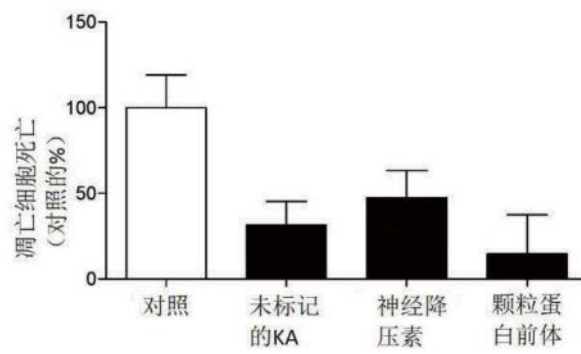


图21C

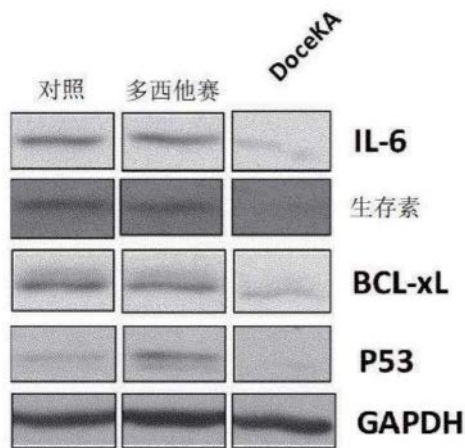


图22A

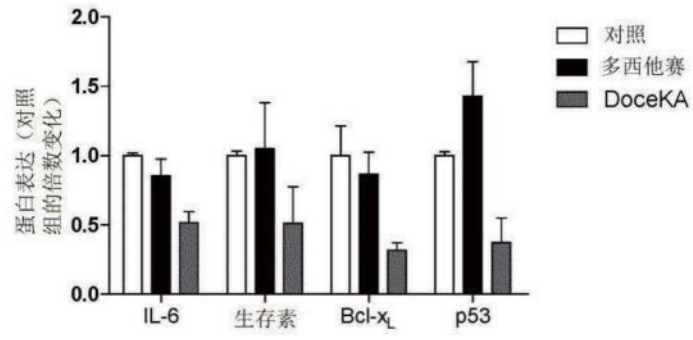


图22B

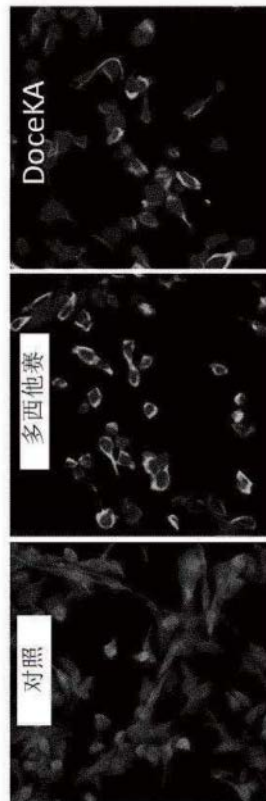


图23A

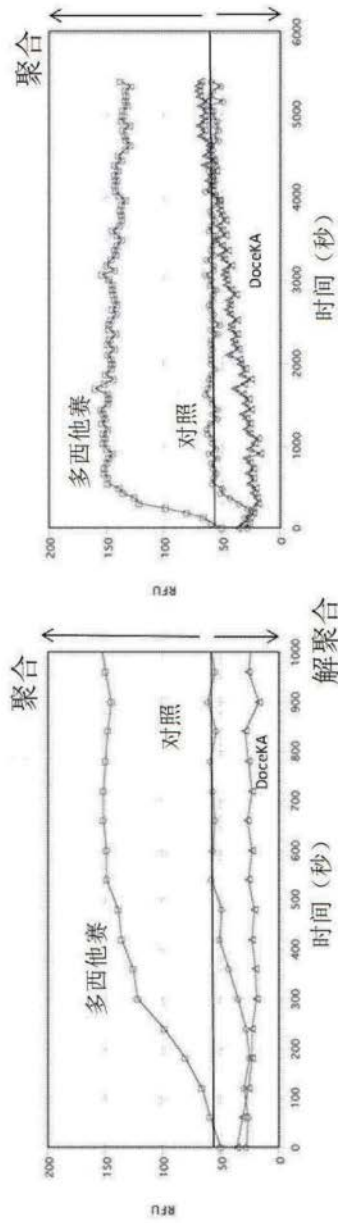


图23B

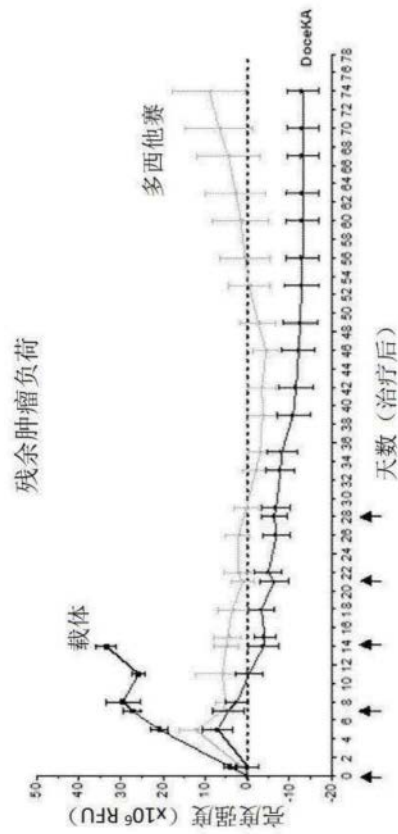


图24A

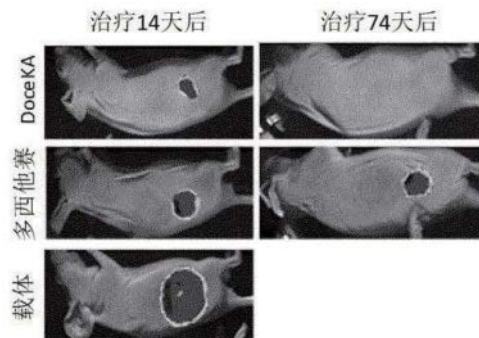


图24B

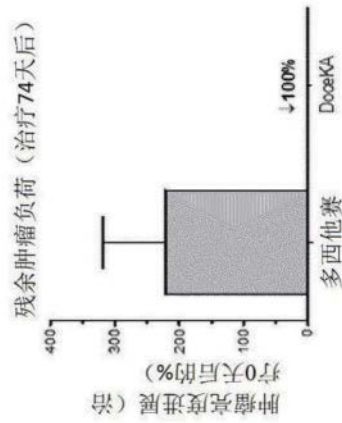


图24C

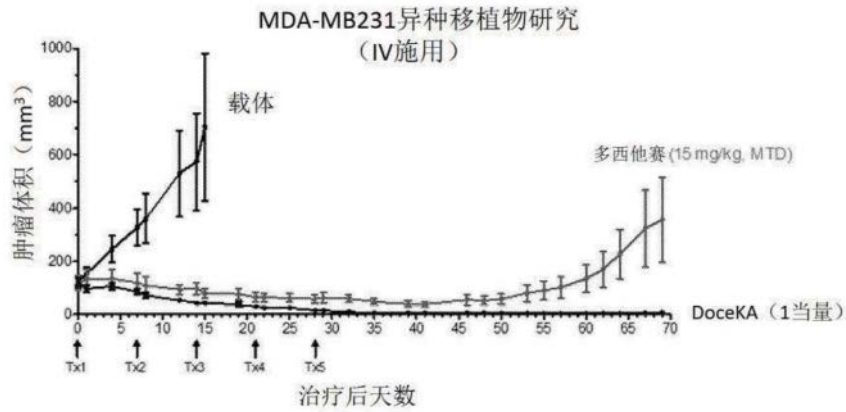


图25A

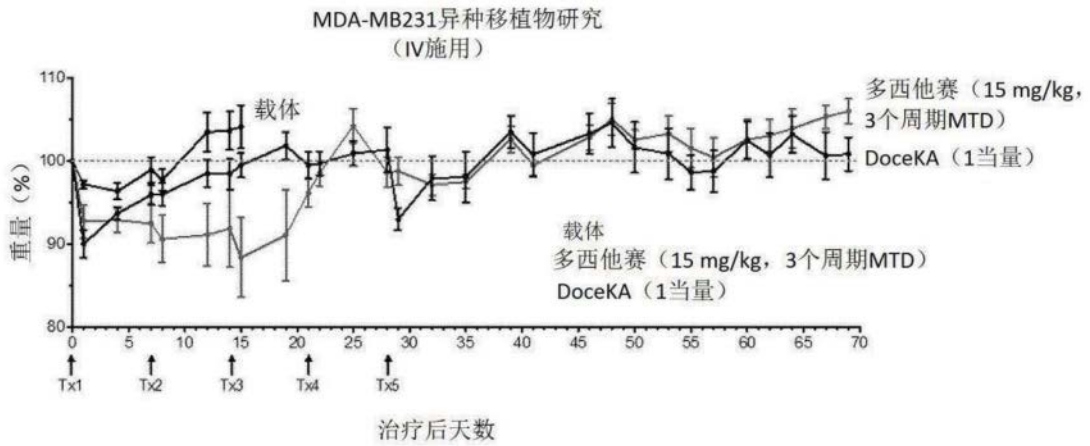


图25B

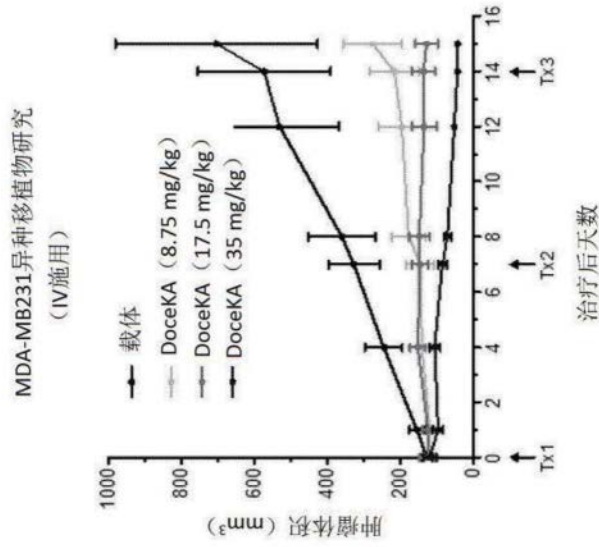


图26A

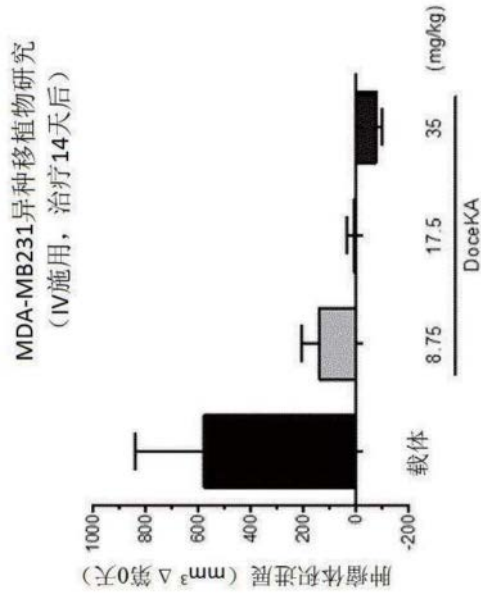


图26B

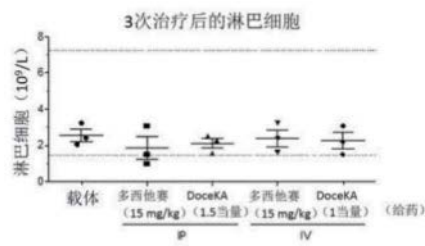


图27A

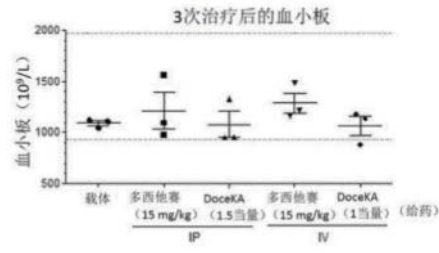


图27B

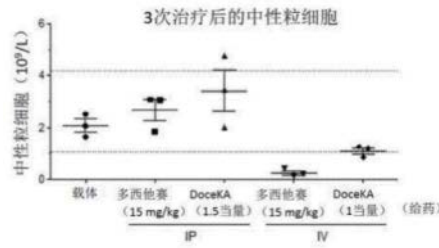


图27C

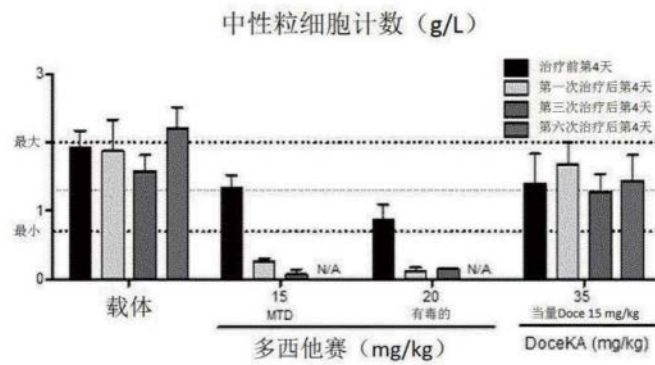


图28

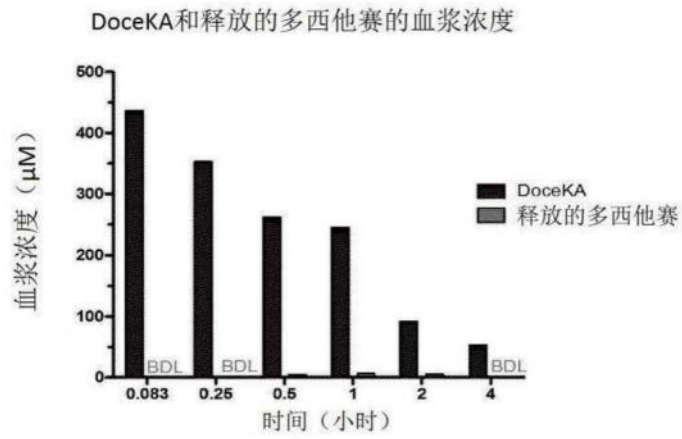


图29A

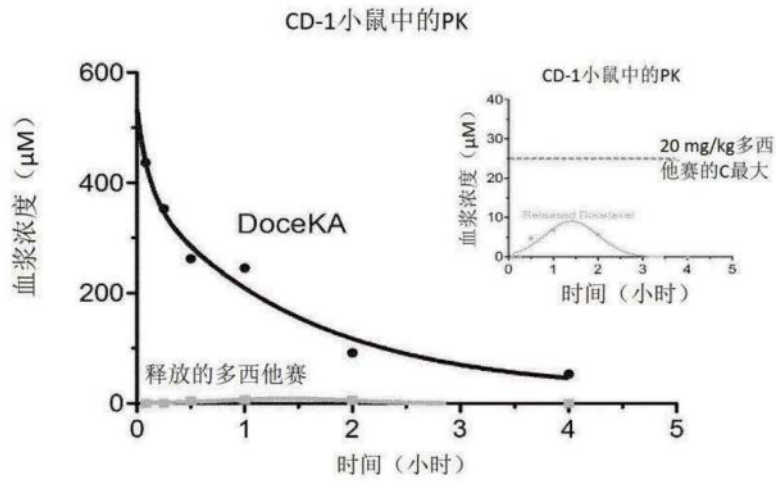


图29B

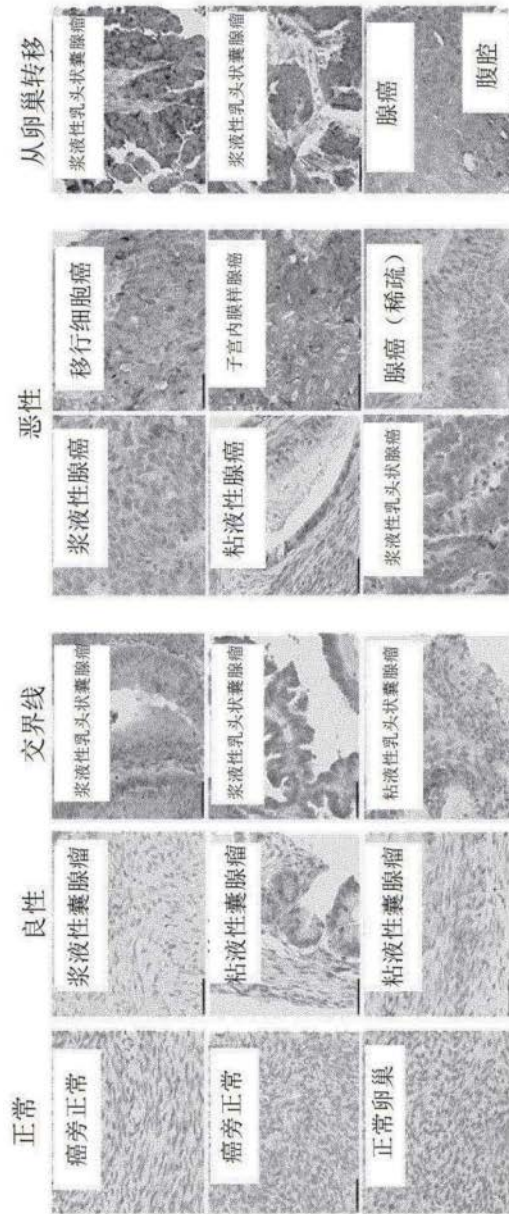


图30

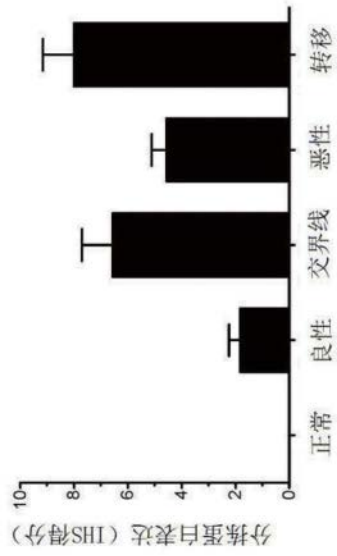


图31A

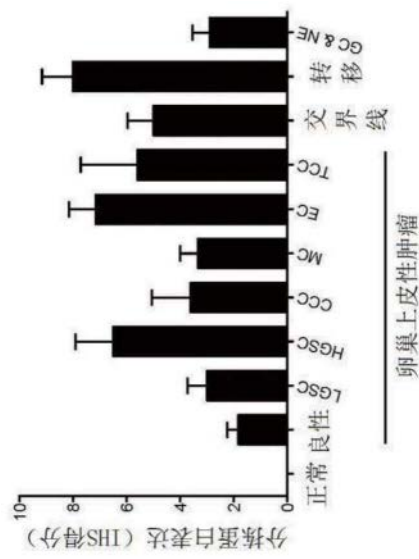


图31B

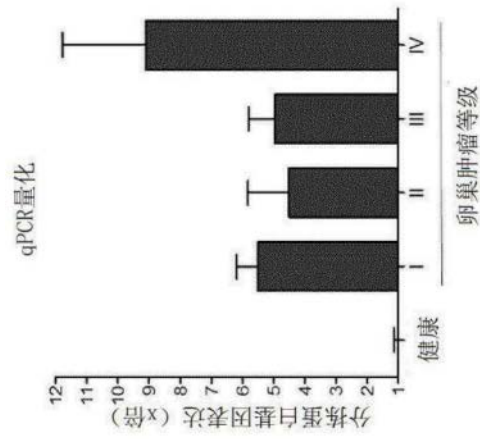


图32

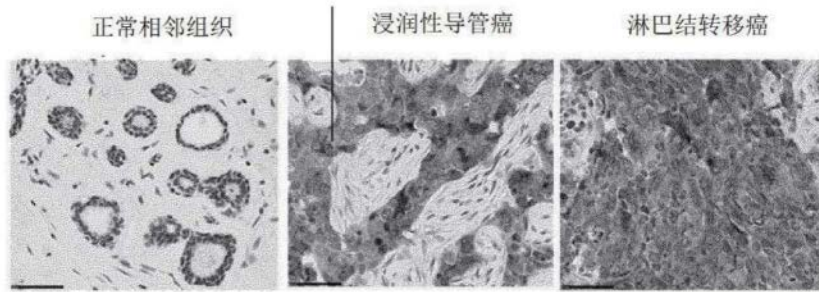


图33A

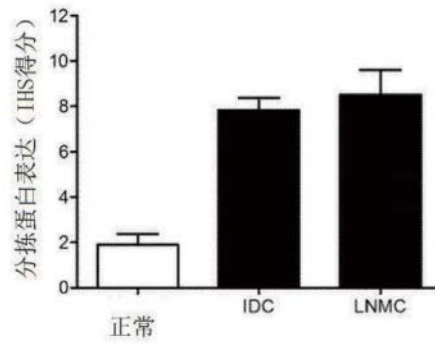


图33B

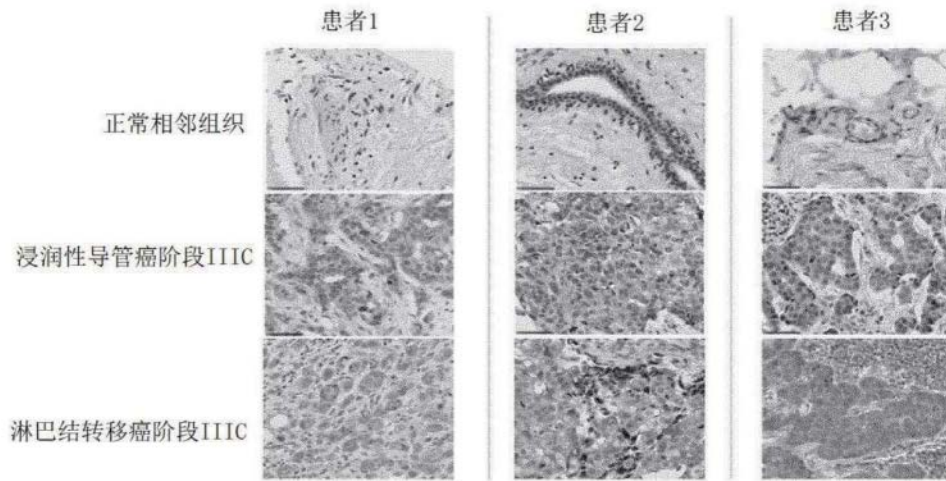


图34

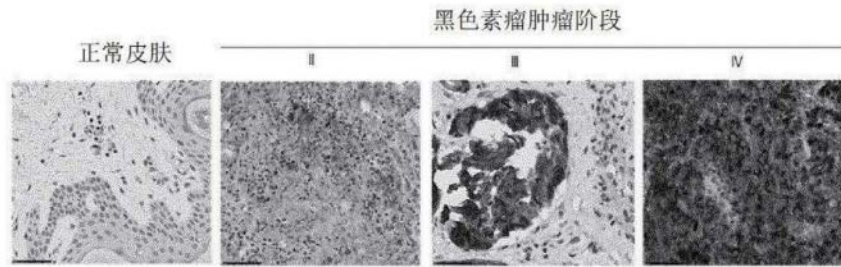


图35A

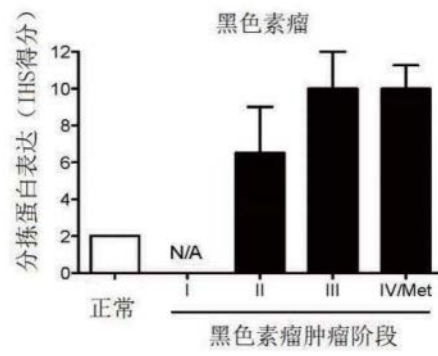


图35B

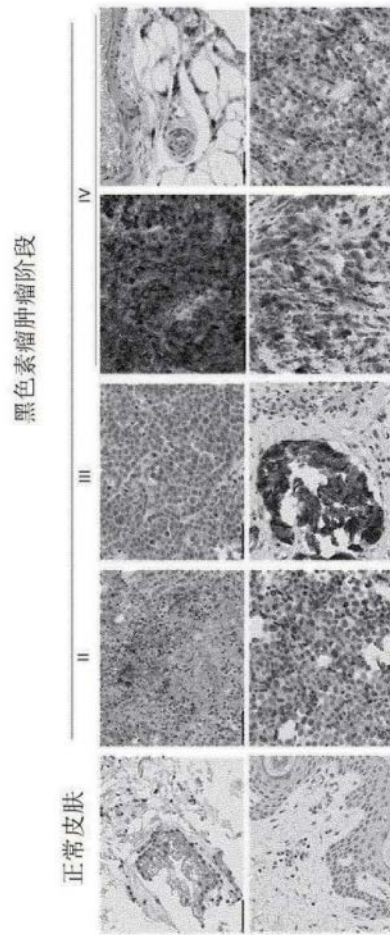


图36

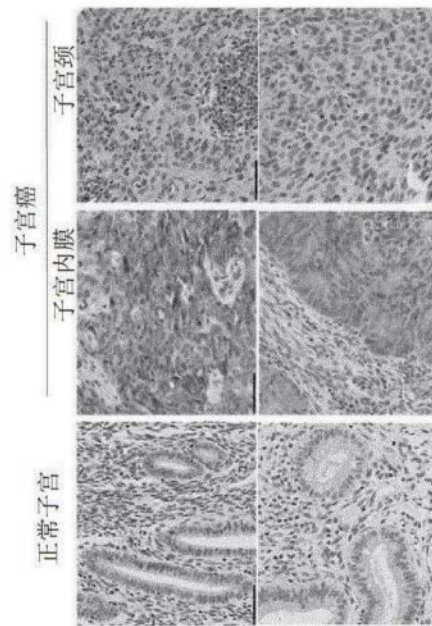


图37A

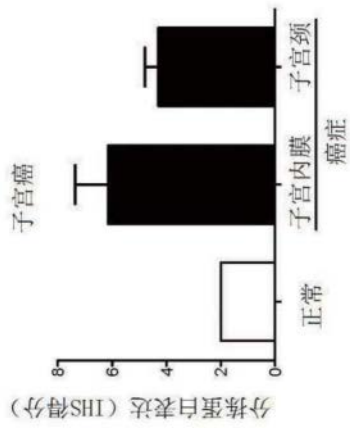


图37B

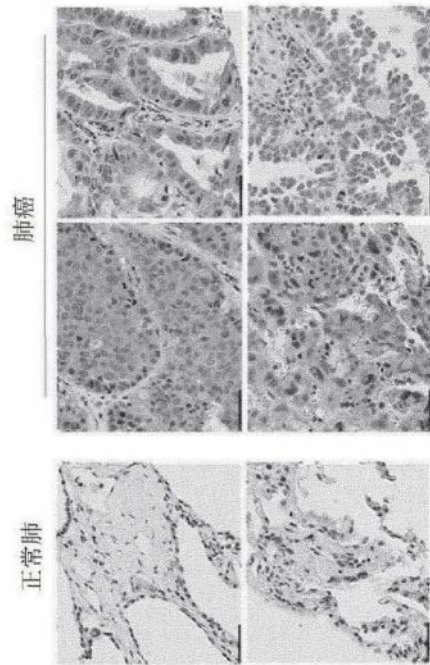


图38A

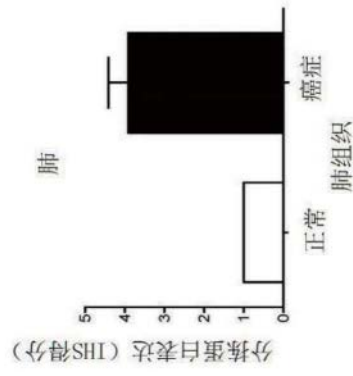


图38B

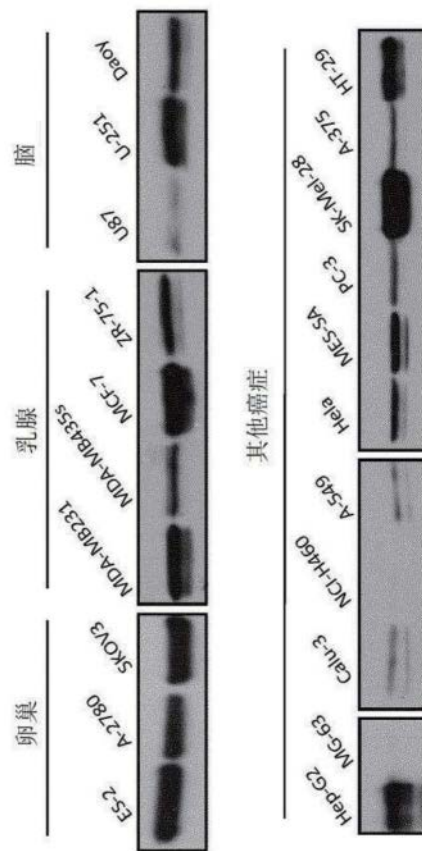


图39

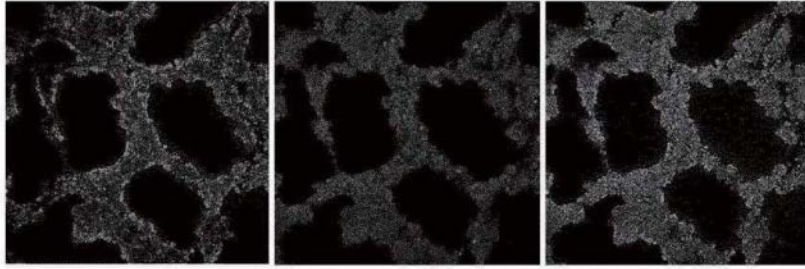


图40A

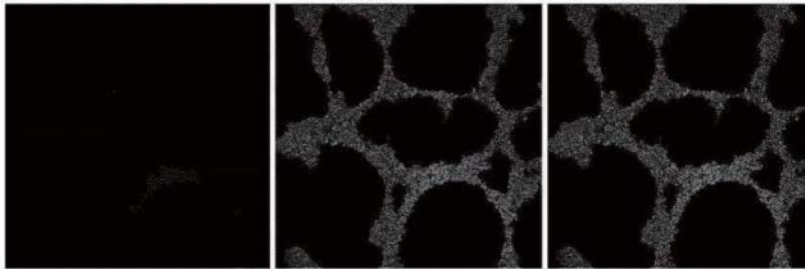


图40B

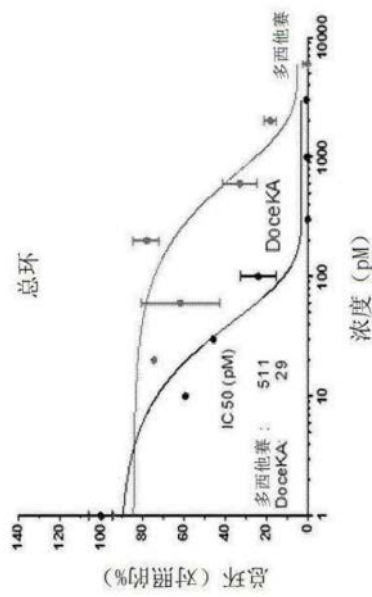


图41A

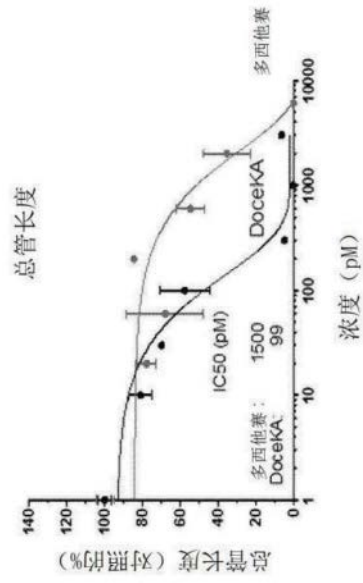


图41B

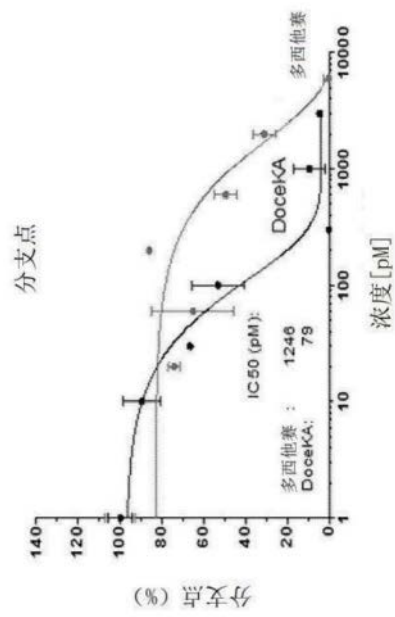


图41C

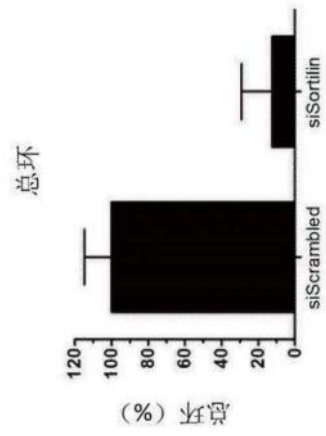
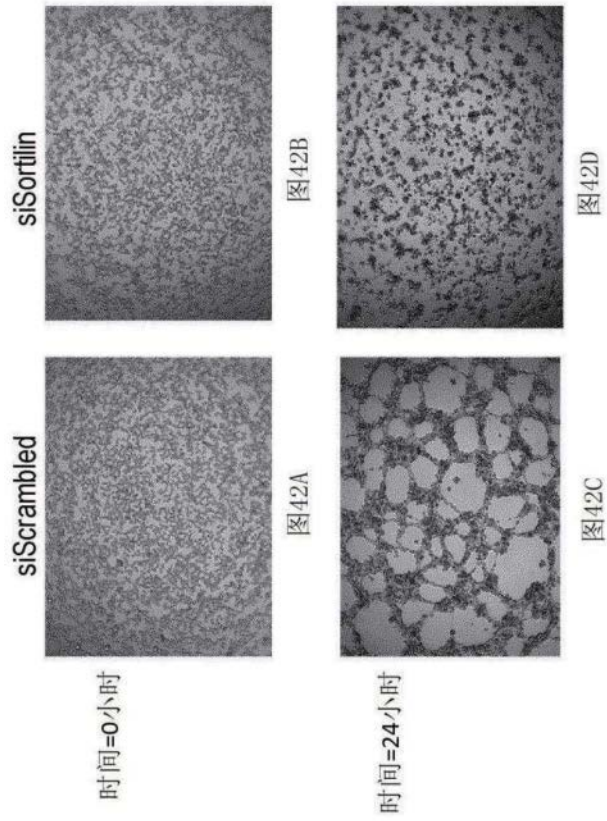


图42E

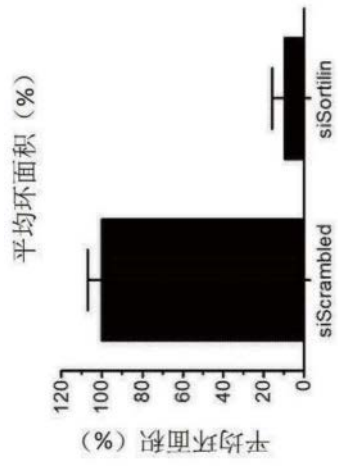


图42F

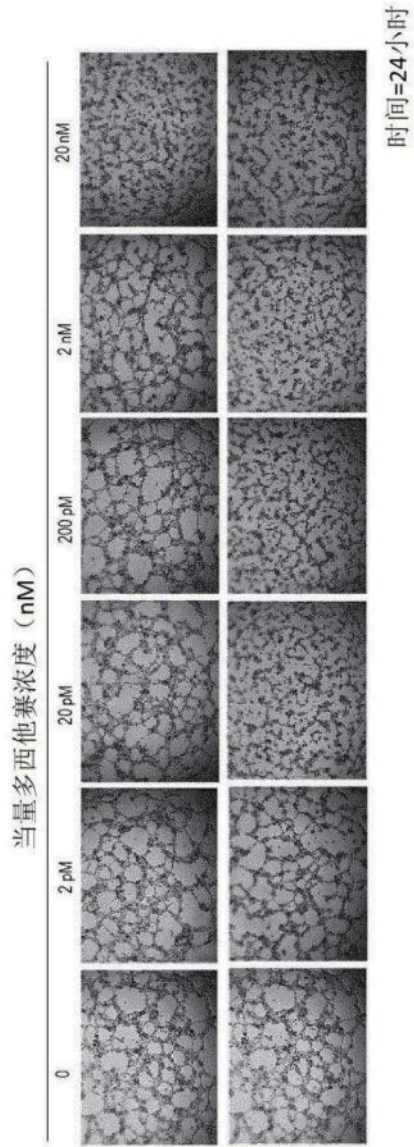


图43A

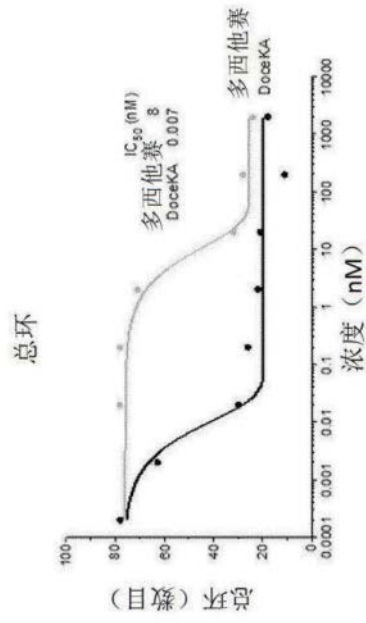


图43B

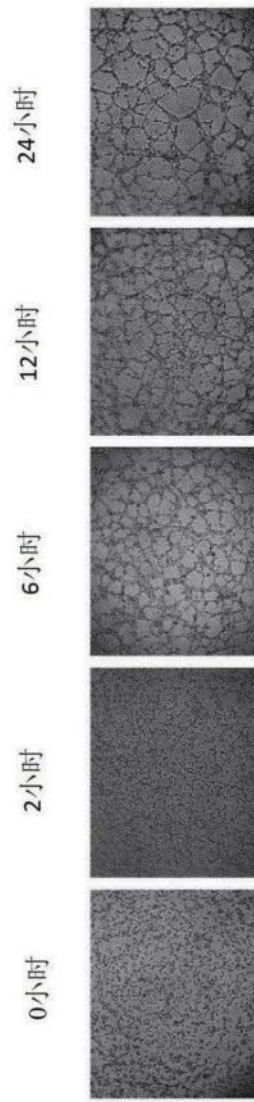


图44A

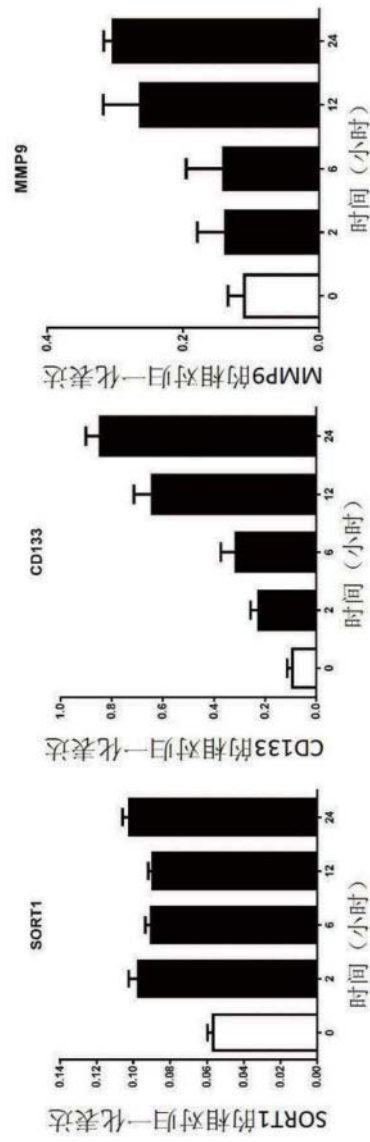


图44B

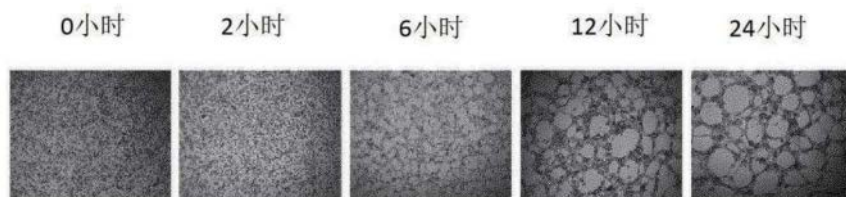


图45A

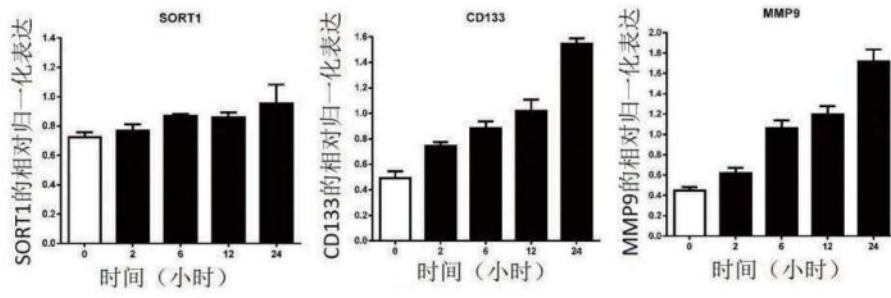


图45B

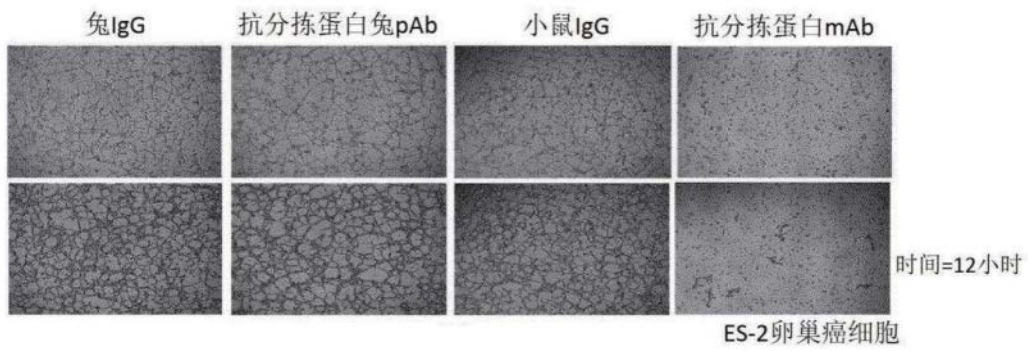


图46A

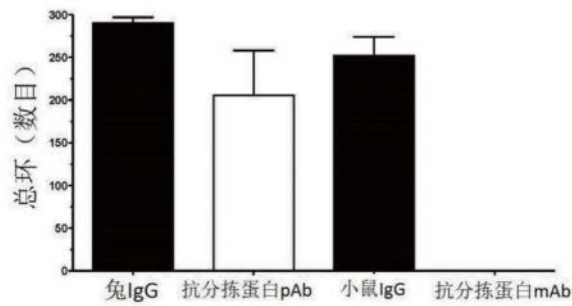


图46B

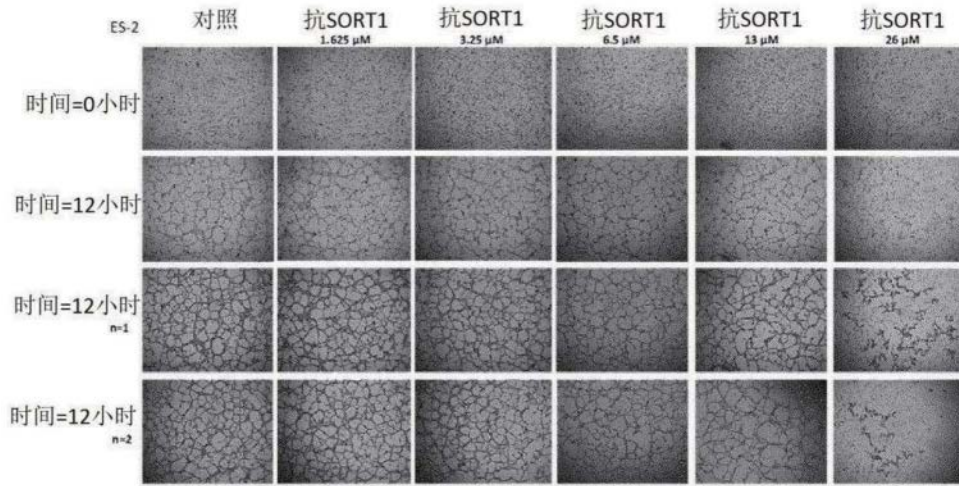


图47

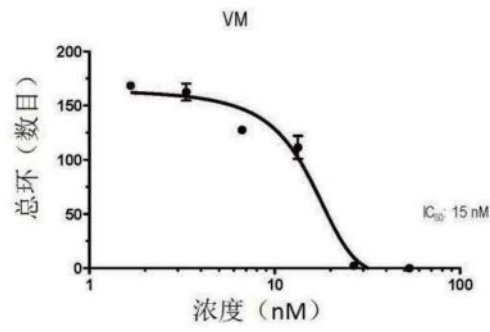


图48A

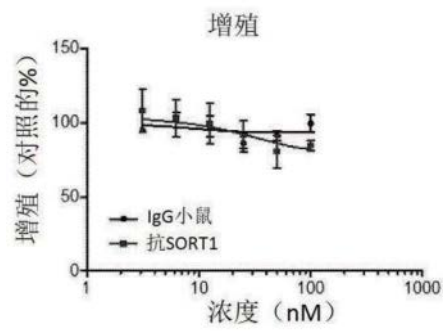


图48B

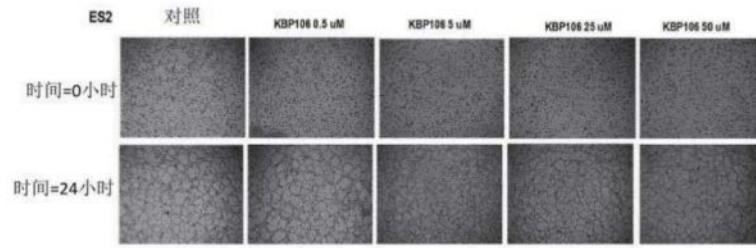


图49

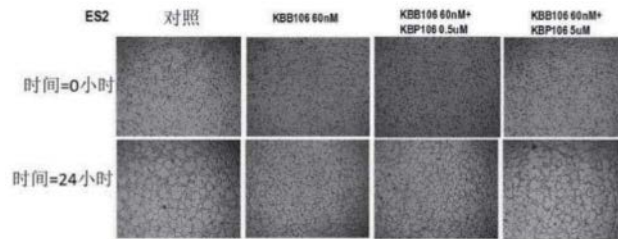


图50

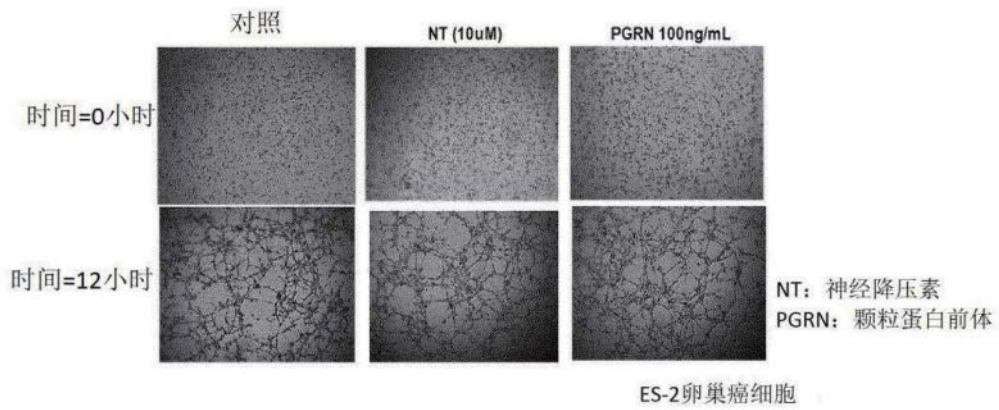


图51

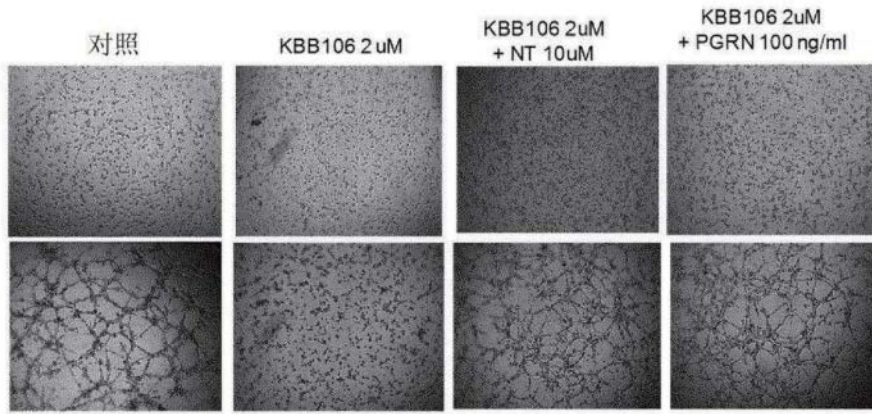


图52

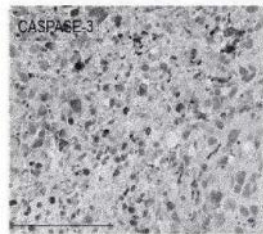


图53A

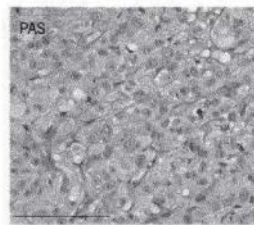


图53B

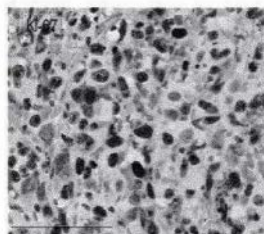


图53C

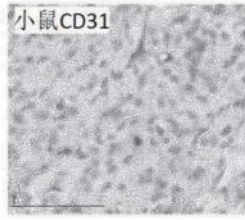


图53D

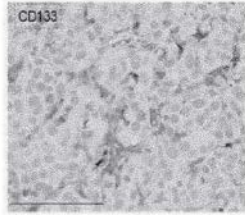


图53E

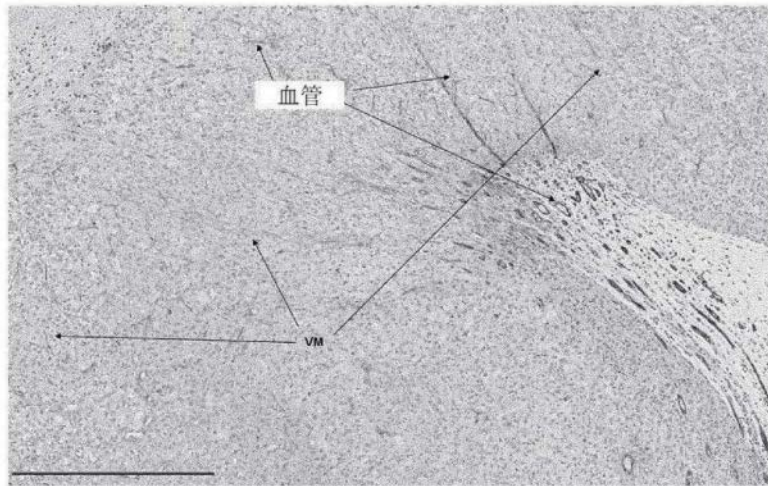


图54

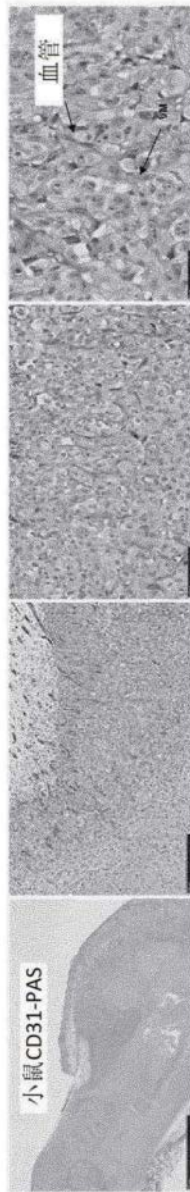


图55A

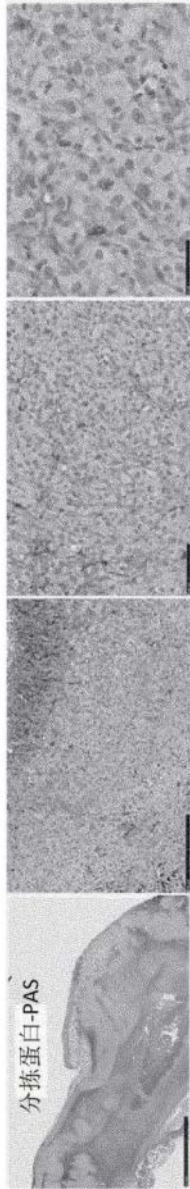


图55B

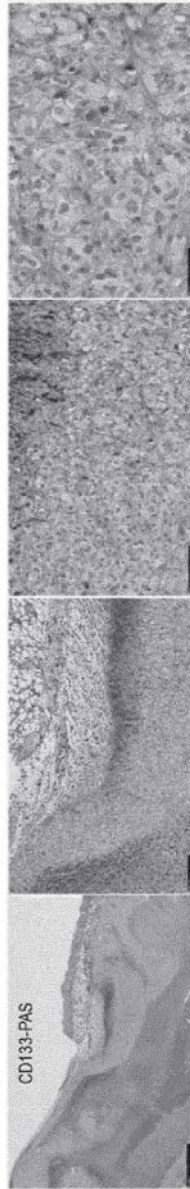


图55C



图56A

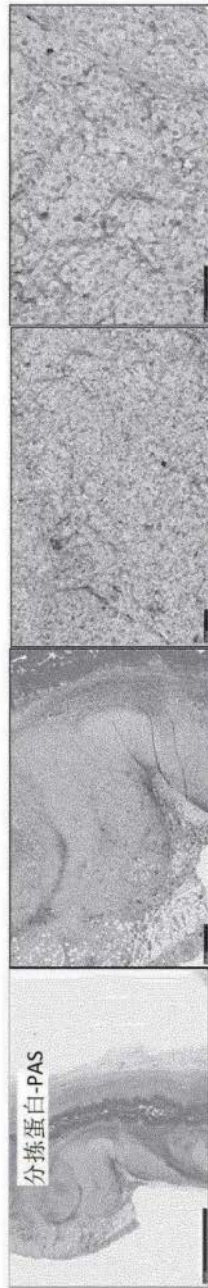


图56B

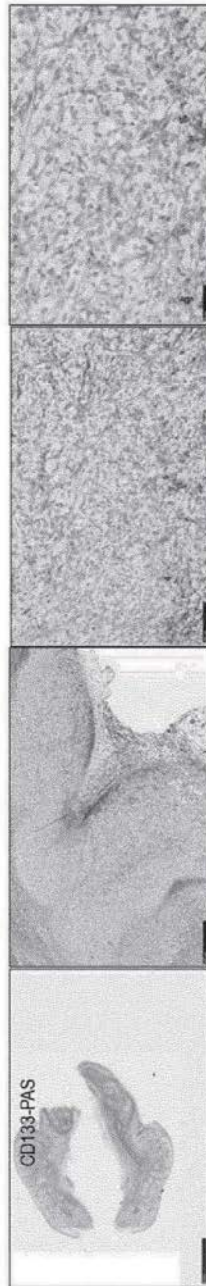


图56C

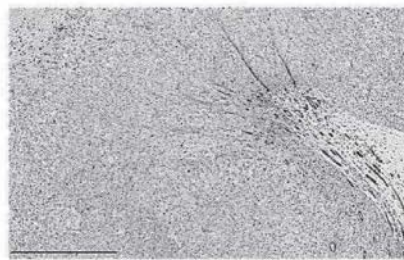


图57A



图57B

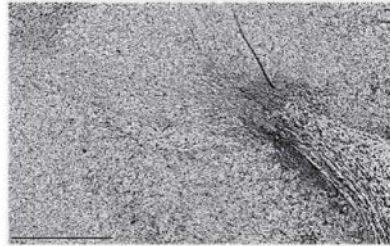


图57C

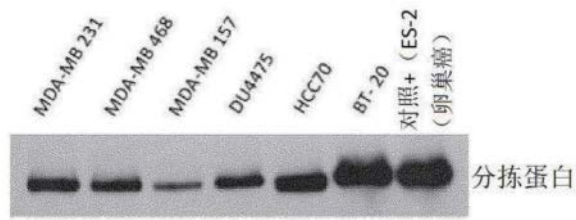


图58

时间=0小时



图59A

时间=24小时

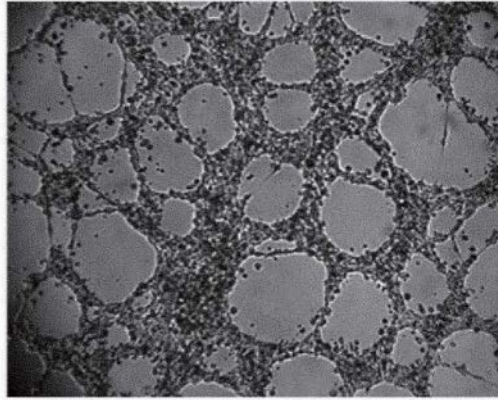


图59B