



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113490681 A

(43) 申请公布日 2021.10.08

(21) 申请号 202080012557.0

(22) 申请日 2020.02.03

(30) 优先权数据

62/800,879 2019.02.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2020/050847 2020.02.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/161602 EN 2020.08.13

(71) 申请人 塔图大学

地址 爱沙尼亚塔图

(72) 发明人 坦贝特·蒂萨鲁

普拉卡什·林加萨米

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 张福誉 刘振佳

(51) Int.Cl.

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

权利要求书4页 说明书118页

序列表22页 附图6页

(54) 发明名称

双特异性胞外基质结合肽及其使用方法

(57) 摘要

公开了与可靶向并归巢至癌症、肿瘤和胞外基质的肽相关的组合物、化合物和方法。这基于发现可与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB)、生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 或这二者特异性结合的肽。

1. 分离的肽,其包含含有以下的氨基酸序列:序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸并且第11位保留苏氨酸。

2. 权利要求1所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少50%、58%、66%、75%、83%或91%序列同一性。

3. 权利要求1或2所述的肽,其中所述氨基酸序列包含式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$,其中 X_6 是亮氨酸,其中 X_7 是异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸,其中 X_9 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,其中 X_{11} 是苏氨酸,并且其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{10} 和 X_{12} 各自独立地是任何氨基酸,

任选地,其中 X_1 是脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或天冬酰胺,其中 X_2 是脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或天冬酰胺,并且其中 X_5 是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,

任选地,其中 X_7 是异亮氨酸并且其中 X_9 是亮氨酸,

任选地,其中 X_2 是脯氨酸,

任选地,其中 X_3 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_4 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_8 是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸或色氨酸,其中 X_{10} 是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸或色氨酸,并且其中 X_{12} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、或脯氨酸,并且

优选地,其中 X_1 是脯氨酸、甘氨酸或丙氨酸,其中 X_3 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_4 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_5 是甘氨酸、丙氨酸或缬氨酸,其中 X_8 是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸或精氨酸,其中 X_{10} 是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸或精氨酸,并且其中 X_{12} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸。

4. 权利要求1至3中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或PPRRGLIKLKTSNTKENSIVASLRP (SEQ ID NO:2)。

5. 分离的肽,其包含含有以下的氨基酸序列:序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸。

6. 权利要求5所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少14%、28%、42%、57%、71%或85%序列同一性。

7. 权利要求5或6所述的肽,其中所述氨基酸序列包含式 $X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}$,其中 X_{19} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_{18} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸,并且其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 和 X_{17} 各自独立地是任何氨基酸,

任选地,其中 X_{16} 是谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、丙氨酸或甘氨酸,其中 X_{14} 是丝氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸或组氨酸,并且其中 X_{15} 是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,

任选地,其中 X_{17} 是天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、缬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、色氨酸或赖氨酸,并且其中 X_{13} 是苏氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或天冬氨酸,

任选地,其中 X_{19} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{18} 是丝氨酸或天冬酰胺,

优选地,其中 X_{16} 是谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸或精氨酸,其中 X_{14} 是丝氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸或天冬氨酸,并且其中 X_{15} 是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,

优选地,其中 X_{19} 是精氨酸并且其中 X_{18} 是丝氨酸,并且

更优选地,其中 X_{16} 是谷氨酰胺或天冬酰胺,其中 X_{14} 是丝氨酸或天冬酰胺,并且其中 X_{15} 是赖氨酸、精氨酸或组氨酸。

8. 权利要求5至7中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)。

9. 分离的肽,其包含含有以下的氨基酸序列:序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换,其中第3位保留精氨酸,任选地 (i) 其中第6位保留亮氨酸和/或第8位保留精氨酸,或 (ii) 其中第6位保留亮氨酸、第8位保留精氨酸并且第5位保留精氨酸。

10. 权利要求9所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少25%、37%、50%、62%、75%或87%序列同一性。

11. 权利要求9或10所述的肽,其中所述氨基酸序列包含式 $X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}$,其中 X_{22} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸,其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,并且其中 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{23} 、 X_{24} 和 X_{26} 各自独立地是任何氨基酸,

任选地,其中 X_{24} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,

任选地,其中 X_{21} 是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,其中 X_{23} 是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,并且其中 X_{26} 是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸或丙氨酸,

任选地,其中 X_{20} 是丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,

任选地,其中 X_{22} 是精氨酸或赖氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,并且其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,

优选地,其中 X_{24} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,更优选地,其中 X_{24} 是精氨酸或赖氨酸,最优选地,其中 X_{24} 是精氨酸,并且

优选地,其中 X_{22} 是精氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸,并且其中 X_{27} 是精氨酸。

12. 权利要求1至11中任一项所述的肽,其中任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。

13. 权利要求9至11中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或AGRGRLLVR AKLAAALE (SEQ ID NO:14)。

14. 分离的肽,其包含第一氨基酸序列和第二氨基酸序列,所述第一氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两

个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸,所述第二氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换,其中第3位保留精氨酸。

15. 权利要求1至14中任一项所述的肽,其中所述肽可通过所述氨基酸序列与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB)、生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 或纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB) 和生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 二者选择性地结合。

16. 权利要求1至15中任一项所述的肽,其中所述肽的长度小于20个氨基酸,优选地,其中所述肽的长度小于15个氨基酸,并且更优选地,其中所述肽的长度为12个氨基酸,

任选地,其中所述肽是线性的或环状的,并且

任选地,其中所述肽是经修饰肽。

17. 权利要求1至16中任一项所述的肽,其中所述肽是甲基化肽,任选地,其中所述甲基化肽包含甲基化氨基酸区段,并且任选地,其中所述肽在至少一个位置处被N-或C-甲基化。

18. 组合物,其包含权利要求1至17中任一项所述的肽。

19. 权利要求18所述的组合物,其还包含载荷组合物,其中所述肽和所述载荷组合物彼此共价偶联或非共价缔合,

任选地,其中所述载荷组合物包含治疗剂、可检测剂、载体、载剂、表面分子或其组合,

优选地,其中所述治疗剂是抗血管生成剂、抗菌剂、抗癌剂、抗炎剂、化学治疗剂(例如癌症化学治疗剂)、细胞毒性剂、免疫刺激剂、免疫抑制剂、核酸分子、多肽、促血管生成剂、促凋亡剂、促炎剂、小分子或毒素,更优选地,其中所述治疗剂是D (KLAKLAK)₂ (SEQ ID NO: 6),

优选地,其中所述可检测剂是标记、标记剂、造影剂、显像剂、微泡(例如碳氟化合物微泡)、荧光团(例如FAM、荧光素或罗丹明)或放射性核素(例如碳-11、碳-13、镓-111或镓-99),优选地,其中所述可检测剂是FAM,

优选地,其中所述载体、载剂和/或表面分子独立地包含珠、脂质体、胶束、微粒、纳米粒(例如白蛋白纳米粒、铁氧化物纳米粒或银纳米粒)、纳米虫(例如铁氧化物纳米虫)、磷脂、聚合物、噬菌体、噬菌体衣壳、噬菌体颗粒、病毒衣壳、病毒颗粒、病毒、病毒样颗粒或微泡(例如碳氟化合物微泡);

任选地,其中所述肽与所述表面分子缀合,优选地,其中所述缀合肽中的一种或更多种通过接头与所述表面分子间接缀合,

任选地,其中所述组合物还包含多种接头,优选地,其中所述接头中的至少一种包含聚乙二醇,

优选地,其中所述表面分子包含脂质体。

20. 权利要求18或19所述的组合物,其中所述组合物选择性地归巢至表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤,其中所述组合物选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质,其中所述组合物结合表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤,和/或其中所述组合物结合具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质,

任选地,其中所述组合物内化入细胞,并且

任选地,其中所述组合物减慢肿瘤生长。

21. 权利要求18至20中任一项所述的组合物,其还包含所述肽的一个或更多个拷贝,优选地,其中所述组合物包含所述肽的至少100个或至少1000个拷贝。

22. 包括以下的方法:将肿瘤暴露于权利要求18至21中任一项所述的组合物,任选地,其中所述组合物与所述肿瘤选择性地结合,任选地,其中所述肿瘤在对象中,任选地,其中通过将所述组合物施用于所述对象来使所述肿瘤暴露于所述组合物,任选地,其中所述肿瘤表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者,并且任选地,其中所述组合物与表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的所述肿瘤选择性地结合。

23. 包括以下的方法:将胞外基质暴露于权利要求18至21中任一项所述的组合物,任选地,其中所述组合物与所述胞外基质选择性地结合,任选地,其中所述胞外基质在对象中,任选地,其中通过将所述组合物施用于所述对象来使所述胞外基质暴露于所述组合物,任选地,其中所述胞外基质具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者,并且任选地,其中所述组合物与具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的所述胞外基质选择性地结合。

24. 权利要求22或23所述的方法,其中所述组合物具有治疗性作用,优选地,其中所述治疗性作用包括提高凋亡,任选地,其中所述对象患有疾病或病症,优选地,其中所述疾病是癌症。

25. 权利要求18至21中任一项所述的组合物,其用作药物,用于在对象中对癌症进行治疗、检测、可视化和/或定位,用于制备用于癌症治疗的药物,或用于制备用于癌症检测的药物。

26. 癌症诊断方法,其包括向有此需要的对象施用有效量的权利要求18至21中任一项所述的组合物。

双特异性胞外基质结合肽及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年2月4日提交的美国临时申请No.62/800,879的权益和优先权，其在此通过引用整体并入。

[0003] 序列表的引用

[0004] 根据37 C.F.R. §1.52(e) (5)，在此通过引用并入2020年2月4日提交的序列表，所述序列表是命名为“TARTU_100_PCT_ST25.txt”的文本文件，其创建于2020年1月6日，并且大小为19,915字节。

技术领域

[0005] 本发明一般性地涉及分子医学、癌症治疗领域，并且更具体地，涉及细胞和组织靶向肽。

背景技术

[0006] 靶向具有亲和配体的抗癌药物(例如抗体和归巢肽(homing peptide))被广泛用于在提高肿瘤部位处的药物浓度和降低全身性暴露之间实现平衡(Kennedy et al., Pharmacol. Ther. (2017), doi:10.1016/j.pharmthera.2017.03.004; Ruoslahti, Adv. Drug Deliv. Rev. (2016), doi:10.1016/j.addr.2016.03.008)。特别地，抗体药物缀合物(antibody drug conjugate, ADC)已取得临床成功，其中临床上批准4种ADC，并且>100种处于临床测试的不同阶段(Lambert and Morris, Adv. Ther., 1-21 (2017))。然而，抗体的制备昂贵并且由于大尺寸和高亲和力的组合而表现出差的组织渗透(Carter and Lazar, Nat. Rev. Drug Discov. 17:197-223 (2018))。体内肽噬菌体展示(不可知论的探索性技术)已被用于探测活体动物的血管异质性和鉴定肿瘤归巢肽(Teesalu et al., Methods Enzymol. 503:35-56 (2012))。由于用于体内展示的噬菌体本身是纳米粒，因此该肽特别良好地适合于递送纳米粒载荷(Ruoslahti, Adv. Drug Deliv. Rev. (2016), doi:10.1016/j.addr.2016.03.008)。归巢肽靶分子(受体)包含不同的细胞表面分子：例如 α v-整联蛋白、NRP-1、叶酸受体 α 、EphA2，以及在肿瘤和基质细胞表面上异常表达的分子，例如p32、核仁蛋白(nucleolin)和钙网蛋白(calreticulin)；血凝块和肿瘤胞外基质的组分(Willmore et al., Nanoscale. 8:9096-9101 (2016); Sugahara et al., Cancer Cell. 16:510-520 (2009); Paasonen et al., ChemBioChem. 17, 570-575 (2016); Christian et al., J. Cell Biol. 163:871-878 (2003); Xing et al., Sci. Rep. 8:8426 (2018); Simberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104:932-6 (2007); Mitra et al., Biochemistry. 49:6687-6695 (2010))。

[0007] 在肿瘤微环境中过表达的一些ECM蛋白(例如，骨膜蛋白(periostin)、透明质酸、某些胶原蛋白、层黏连蛋白、串珠蛋白聚糖(perlecan)、纤连蛋白和生腱蛋白)可提供比在细胞表面上表达的抗原更稳健的靶标用于亲和递送(Järveläinen, Pharmacol. Rev. 61: 198-223 (2009))。选择性剪接的纤连蛋白额外结构域-B(fibronectin Extra Domain-B,

FN-EDB) 和腱生蛋白-C (Tenascin-C, TNC) 在许多实体瘤中过表达 (Silacci et al., Protein Eng.Des.Sel.19:471-478 (2006); Camemolla et al., Am.J.Pathol.154:1345-52 (1999); Park et al., J.Control.Release.163:111-118 (2012))。TNC同种型C (TNC-C) 在非恶性组织中表现出特别低的基线表达, 并且在实体瘤例如恶性脑肿瘤和肺癌中表现出稳健的上调 (Silacci et al., Protein Eng.Des.Sel.19:471-478 (2006); Camemolla et al., Am.J.Pathol.154:1345-52 (1999))。FN-EDB和TNC抗体 (例如, FN-EDB ScFV L19、TNC-C ScFV G11、F16和81C6) 可用作细胞因子 (例如, IL2、TNF) 和放射性核素的导向模块 (Kumra and Reinhardt, Adv.Drug Deliv.Rev.97:101-110 (2016); Spenlé et al., Cell Adh.Migr.9:141-53 (2015))。另外, 这些抗体已被评价为在恶性原发性和转移性脑肿瘤以及头颈部鳞状细胞癌中用于免疫-PET、SPECT/CT和放射免疫治疗 (radioimmunotherapy, RIT) 的诊断性显像剂 (Kumra and Reinhardt, Adv.Drug Deliv.Rev.97:101-110 (2016); Spenlé et al., Cell Adh.Migr.9:141-53 (2015); Akabani et al., J.Nucl.Med.46:1042-1051 (2005))。重要的是, 最近的研究表明, ECM导向的非内化抗体可用于增强胞内作用细胞毒性药物的细胞毒活性 (Dal Corso et al., J.Control.Release.264:211-218 (2017))。

[0008] 然而, 已证明靶向FN-EDB和TNC-C是困难的。因此, 需要用于靶向FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的组合物和治疗剂。

[0009] 本发明的目的是提供用于靶向FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的组合物和方法。

[0010] 发明概述

[0011] 公开了与可靶向并归巢至癌症、肿瘤和胞外基质的肽相关的组合物、化合物和方法。这基于对肽的发现, 所述肽可与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB)、生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 或这二者特异性结合。特别地, 公开了包含含有以下的氨基酸序列的肽: (a) 序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体, 所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸替换, 其中第6位保留亮氨酸并且第11位保留苏氨酸, (b) 序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体, 所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换, 其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸, (c) 序列AGRGR LVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGR LVR (SEQ ID NO:4) 的变体, 所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换, 其中第3位保留精氨酸, 或 (d) 其组合。

[0012] 在一些形式中, 氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体, 所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸替换。在一些形式中, 氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体, 所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换。在一些形式中, 氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体, 所述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。在一些形式中, 氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体, 所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少50%序列同一性。在一些形式中, 氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体, 所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具

有至少58%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO: 1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO: 1) 具有至少66%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少75%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少83%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少91%序列同一性。

[0013] 在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个或三个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个或两个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ IDNO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少14%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少28%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 变体,所述变体具有至少42%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少57%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少71%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少85%序列同一性。

[0014] 在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸和/或第8位保留精氨酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸、第8位保留精氨酸并且第5位保留精氨酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个或三个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个或两个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 或序列

AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少25%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少37%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少50%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少62%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少75%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少87%序列同一性。

[0015] 在一些形式中, (a) 氨基酸序列可包含式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$, (b) 氨基酸序列可包含式 $X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}$, (c) 氨基酸序列包含式 $X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}$, 或 (d) 其组合, 其中 X_6 是亮氨酸, 其中 X_7 是异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸, 其中 X_9 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸, 其中 X_{11} 是苏氨酸, 其中 X_{19} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸, 其中 X_{18} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸, 其中 X_{22} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸, 其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸, 其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸, 并且其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{23} 、 X_{24} 和 X_{26} 各自独立地是任何氨基酸。

[0016] 在一些形式中, 氨基酸序列可包含式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$, 其中 X_6 是亮氨酸, 其中 X_7 是异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸, 其中 X_9 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸, 其中 X_{11} 是苏氨酸, 并且其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{10} 和 X_{12} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中, X_1 可以是脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或天冬酰胺, 其中 X_2 可以是脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或天冬酰胺, 并且其中 X_5 可以是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。在一些形式中, X_7 可以是异亮氨酸并且其中 X_9 可以是亮氨酸。在一些形式中, X_2 可以是脯氨酸。在一些形式中, X_3 可以是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸, 其中 X_4 可以是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸, 其中 X_8 可以是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸或色氨酸, 其中 X_{10} 可以是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸或色氨酸, 并且其中 X_{12} 可以是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸或脯氨酸。在一些形式中, X_1 可以是脯氨酸、甘氨酸或丙氨酸, 其中 X_3 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸, 其中 X_4 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸, 其中 X_5 可以是甘氨酸、丙氨酸或缬氨酸, 其中 X_8 可以是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸或精氨酸, 其中 X_{10} 可以是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸或精氨酸, 并且其中 X_{12} 可以是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸。在一些形式中, X_7 和 X_9 处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中, 任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中, 氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)。

[0017] 在一些形式中, 氨基酸序列可包含式 $X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}$, 其中 X_{19} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸, 其中 X_{18} 是丝氨酸、丙

氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸,并且其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 和 X_{17} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中, X_{16} 可以是谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、丙氨酸或甘氨酸,其中 X_{14} 可以是丝氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸或组氨酸,并且其中 X_{15} 可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。在一些形式中, X_{17} 可以是天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、缬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、色氨酸或赖氨酸,并且其中 X_{13} 可以是苏氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或天冬氨酸。在一些形式中, X_{19} 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{18} 可以是丝氨酸或天冬酰胺。在一些形式中, X_{16} 可以是谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸或精氨酸,其中 X_{14} 可以是丝氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸或天冬氨酸,并且其中 X_{15} 可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。在一些形式中, X_{19} 可以是精氨酸,其中 X_{18} 可以是丝氨酸。在一些形式中, X_{16} 可以是谷氨酰胺或天冬酰胺,其中 X_{14} 可以是丝氨酸或天冬酰胺,并且其中 X_{15} 可以是赖氨酸、精氨酸或组氨酸。在一些形式中, X_{19} 和 X_{18} 处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)。

[0018] 在一些形式中,氨基酸序列包含式 X_{20} - X_{21} - X_{22} - X_{23} - X_{24} - X_{25} - X_{26} - X_{27} ,其中 X_{22} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸,其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,并且其中 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{23} 、 X_{24} 和 X_{26} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中, X_{24} 可以是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。在一些形式中, X_{21} 可以是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸, X_{23} 可以是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸并且其中 X_{26} 可以是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸或丙氨酸。在一些形式中, X_{20} 可以是丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。在一些形式中, X_{22} 可以是精氨酸或赖氨酸,其中 X_{25} 可以是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,其中 X_{27} 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸。在一些形式中, X_{24} 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸。在一些形式中, X_{24} 可以是精氨酸或赖氨酸。在一些形式中, X_{22} 可以是精氨酸,其中 X_{25} 可以是亮氨酸,其中 X_{27} 可以是精氨酸。在一些形式中, X_{24} 可以是精氨酸。在一些形式中, X_{22} 、 X_{25} 和 X_{27} 处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGR LVR (SEQ ID NO:4)。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGR LVR AKLAAALE (SEQ ID NO:14)。

[0019] 还公开了包含第一氨基酸序列和第二氨基酸序列的肽,所述第一氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸,所述第二氨基酸序列包含序列AGRGR LVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGR LVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换,其中第3位保留精氨酸。在一些形式中,肽可通过所述氨基酸序列与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB) 选择性地结合。在一些形式中,肽可包含具有序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列。在一些形式中,肽可通过所述氨基酸序列与生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 选择性地结合。在一些形式中,肽可包含具有序列AGRGR LVR (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列。在一些形式中,肽可通过

所述氨基酸序列与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB) 和生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 二者选择性地结合。

[0020] 在一些形式中,肽的长度可小于20个氨基酸。在一些形式中,肽的长度可小于15个氨基酸。在一些形式中,肽的长度可以是12个氨基酸。在一些形式中,肽可包含序列 PPRGLIKLKTSSNTKENS VVASLRP (SEQ ID NO:2)。在一些形式中,肽是线性的。在一些形式中,肽是环状的。在一些形式中,肽是经修饰肽。在一些形式中,肽是甲基化肽。在一些形式中,甲基化肽可包含甲基化氨基酸区段。在一些形式中,肽在至少一个位置处被N-或C-甲基化。

[0021] 还公开了包含所公开的肽的任一种或更多种的组合物。在一些形式中,所述组合物还包含载荷 (cargo) 组合物,其中所述肽和所述载荷组合物彼此共价偶联或非共价缔合。在一些形式中,所述肽可选择性地归巢至表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤。在一些形式中,所述组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质。在一些形式中,所述肽可选择性地归巢至表达NRP-1 (例如,NRP-1b1b2结构域) 的肿瘤。在一些形式中,所述组合物可选择性地归巢至具有NRP-1 (例如,NRP-1b1b2结构域) 的胞外基质。

[0022] 在一些形式中,载荷组合物可包含治疗剂、可检测剂、载体、载剂、表面分子或其组合。

[0023] 在一些形式中,载荷组合物可包含治疗剂。在一些形式中,治疗剂是抗血管生成剂、抗菌剂、抗癌剂、抗炎剂、化学治疗剂 (例如癌症化学治疗剂)、细胞毒性剂、免疫刺激剂、免疫抑制剂、核酸分子、多肽、促血管生成剂、促凋亡剂、促炎剂、小分子或毒素。在一些形式中,治疗剂是_D (KLAKLAK)₂ (SEQ ID NO:6)。

[0024] 在一些形式中,载荷组合物可包含可检测剂。在一些形式中,可检测剂是标记、标记剂、造影剂、显像剂、微泡 (例如碳氟化合物微泡)、荧光团 (例如FAM、荧光素或罗丹明) 或放射性核素 (例如碳-11、碳-13、铟-111或镅-99)。在一些形式中,可检测剂是FAM。

[0025] 在一些形式中,载荷组合物可包含载体、载剂、表面分子或其组合。在一些形式中,载体、载剂和/或表面分子独立地包含珠、脂质体、胶束、微粒、纳米粒 (例如白蛋白纳米粒、铁氧化物纳米粒或银纳米粒)、纳米虫 (nanoworm) (例如铁氧化物纳米虫)、磷脂、聚合物、噬菌体、噬菌体衣壳、噬菌体颗粒、病毒衣壳、病毒颗粒、病毒、病毒样颗粒或微泡 (例如碳氟化合物微泡)。

[0026] 在一些形式中,组合物可包含多种载荷组合物。在一些形式中,载荷组合物可包含表面分子。在一些形式中,肽与表面分子缀合。在一些形式中,缀合肽中的一种或更多种通过接头与表面分子间接缀合。在一些形式中,组合物还可包含多种接头。在一些形式中,所述接头中的至少一种可包含聚乙二醇。

[0027] 在一些形式中,表面分子可包含纳米粒、纳米虫、铁氧化物纳米虫、铁氧化物纳米粒、白蛋白纳米粒、银纳米粒、脂质体、胶束、磷脂、聚合物、微粒或碳氟化合物微泡。在一些形式中,表面分子可包含脂质体。在一些形式中,表面分子可包含铁氧化物纳米虫。

[0028] 在一些形式中,组合物结合表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤。在一些形式中,组合物结合具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质。在一些形式中,组合物结合表达NRP-1 (例如,NRP-1b1b2结构域) 的肿瘤。在一些形式中,组合物结合具有NRP-1 (例如,NRP-1b1b2结构域) 的胞外基质。在一些形式中,组合物可内化入细胞。在

一些形式中,组合物可减慢肿瘤生长。在一些形式中,组合物还包含肽的一个或更多个拷贝。在一些形式中,组合物可包含肽的至少100个拷贝。在一些形式中,组合物可包含肽的至少1000个拷贝。

[0029] 还公开了这样的方法,其包括将肿瘤暴露于任一种或更多种所公开的组合物。在一些形式中,组合物与肿瘤选择性地结合。在一些形式中,肿瘤在对象中。在一些形式中,通过将组合物施用于对象来使肿瘤暴露于组合物。在一些形式中,肿瘤表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者。在一些形式中,组合物与表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤选择性地结合。在一些形式中,肿瘤表达NRP-1(例如,NRP-1b1b2结构域)。在一些形式中,组合物与表达NRP-1(例如,NRP-1b1b2结构域)的肿瘤选择性地结合。

[0030] 还公开了这样的方法,其包括将胞外基质暴露于任一种或更多种所公开的组合物。在一些形式中,组合物与胞外基质选择性地结合。在一些形式中,胞外基质在对象中。在一些形式中,通过将组合物施用于对象来使胞外基质暴露于组合物。在一些形式中,胞外基质具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者。在一些形式中,组合物与具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质选择性地结合。在一些形式中,胞外基质具有NRP-1(例如,NRP-1b1b2结构域)。在一些形式中,组合物与具有NRP-1(例如,NRP-1b1b2结构域)的胞外基质选择性地结合。

[0031] 在一些形式中,组合物具有治疗性作用。在一些形式中,治疗性作用可包括提高凋亡。在一些形式中,对象患有疾病或病症。在一些形式中,该疾病是癌症。在一些形式中,组合物选择性地归巢至表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤。在一些形式中,组合物选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质。在一些形式中,组合物选择性地归巢至表达NRP-1(例如,NRP-1b1b2结构域)的肿瘤。在一些形式中,组合物选择性地归巢至具有NRP-1(例如,NRP-1b1b2结构域)的胞外基质。

[0032] 还公开了用作药物的所公开组合物的任一种。还公开了用于在对象中治疗癌症的所公开组合物的任一种。还公开了用于在对象中检测癌症的所公开组合物的任一种。还公开了用于在对象中使癌症可视化的所公开组合物的任一种。还公开了用于在对象中定位癌症的所公开组合物的任一种。

[0033] 还公开了所公开组合物的任一种用于制备用于癌症治疗的药物的用途。还公开了所公开组合物的任一种用于制备用于癌症检测的药物的用途。

[0034] 还公开了癌症诊断方法,其包括向有此需要的对象施用有效量的所公开组合物的任一种或更多种。

[0035] 在所公开的方法、所公开的组合物或所公开的用途的一些形式中,癌症可以是表10中列出的癌症。

[0036] 在所公开的方法、所公开的组合物或所公开的用途的一些形式中,癌症可以是实体瘤癌症,例如表11中列出的癌症。

[0037] 所公开的方法和组合物的另外的优点将部分地在以下描述中阐述,并且部分地将从描述中理解,或者可通过实践所公开的方法和组合物而获悉。所公开的方法和组合物的优点将通过在所附权利要求书中特别指出的要素和组合来实现和达到。应理解,上述一般性描述和以下详细描述二者仅是示例性和说明性的,并且不对所要求保护的本发明具有限制性。

附图说明

[0038] 并入本说明书中并构成本说明书一部分的附图举例说明了所公开的方法和组合物的数个实施方案,并且与说明书一起用于解释所公开的方法和组合物的原理。

[0039] 图1A和1B是描绘FN-EDB、TNC-C、FN-EDB和TNC-C的单链抗体的表达和纯化的图。图1A是克隆在pET28a+质粒中的TNC-C和FN-EDB表达盒的示意性表示。图1B是FN-EDB、TNC-C、ScFV-L19-FN-EDB和ScFV-G11-TNC-C的表达和纯化工作流程的图。

[0040] 图2是示出在T7噬菌体上展示的PL1肽的丙氨酸扫描诱变的图。PL1序列中的氨基酸(y轴底部框中的最后一个序列)被丙氨酸残基逐个替换,并研究了与固定化FN-EDB和TNC-C的噬菌体结合。噬菌体结合以相对于亲本PL1肽的结合百分比表示。氨基酸序列从上到下为SEQ ID NO:54至65和SEQ ID NO:1。

[0041] 图3是示出多种命中肽(hit peptide)展示噬菌体与Fn-EDB的结合(以相对于对照噬菌体的倍数显示)的图。氨基酸序列从上到下为SEQ ID NO:20、66、67、68、3、27、26、25、24、23、22和21。

[0042] 图4A至4C是示出多种肽的结合的图。图4C示出了通过PL2肽的丙氨酸扫描产生的肽的结合。图4A中的氨基酸序列从左到右为SEQ ID NO:3、21、22、69、23和43。图4B中的氨基酸序列从左到右为SEQ ID NO:3和43。图4C中的氨基酸序列从上到下的第二个序列为SEQ ID NO:70至76和SEQ ID NO:3。

[0043] 图5是示出多种肽(包含PL2)与Fn-EDB的结合的图。图5中的氨基酸序列从上到下为SEQ ID NO:20、66、67、68、77、3、27、26、25、24、23、22和21。

[0044] 图6是示出通过PL3肽的丙氨酸扫描产生的肽的结合的图。图6中的氨基酸序列从上到下为SEQ ID NO:78至84和SEQ ID NO:4。

[0045] 图7是示出通过共聚焦显微术测定的TNC-C和NRP-1抗体对PL3-AgNP的肿瘤积累的作用的定量的图。将PL3-AgNP单独或者与抗TNC-C和/或抗NRP1抗体组合i.v注射到荷有U87-MG异种移植肿瘤的小鼠中。小鼠在注射之后5小时用PBS/DMEM灌注通过心脏,并且收集器官用于冷冻切片和共聚焦显微术。

[0046] 图8是PL3的肽变体与TNC-C的结合的图。图8中的氨基酸序列从上到下为SEQ ID NO:46、4、85、38、47和14。

[0047] 图9是示出与对照NW或PBS相比,PL2NW与肿瘤组织的结合和对肿瘤组织的渗透的图。

[0048] 图10是示出氨基酸泰勒分类(Taylor classification)的维恩图。

[0049] 发明详述

[0050] 通过参照具体实施方案和其中包含的实施例的以下详细描述以及附图及其之前和之后的描述,可更容易地理解所公开的方法和组合物。

[0051] 在公开和描述本发明化合物、组合物、制品、装置和/或方法之前,应理解,除非另有说明,否则它们不限于特定的合成方法或特定的重组生物技术方法,或除非另有说明,否则不限于特定的试剂,因此当然可变化。还应理解,本文中使用的术语仅是出于描述具体实施方案的目的,并不旨在进行限制。

[0052] A. 定义

[0053] 除非上下文另外明确指出,否则说明书和所附权利要求书中使用的没有数量词修

饰的名词包括一个/种或更多个/种。因此,例如,提及“药物载体”包括两种或更多种这样的载体的混合物等。

[0054] 在本文中范围可表示为从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。当表达这样的范围时,另一个实施方案包括从一个特定值和/或至另一特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,将理解的是,该特定值形成另一个实施方案。还应理解,每个范围的端点在与另一个端点相关和独立于另一个端点二者方面均是重要的。还应理解,本文公开了许多值,并且每个值在本文中也公开为除了该值本身之外的“约”该特定值。例如,如果公开了值“10”,则也公开了“约10”。还应理解,当公开一个值时,也公开了“小于或等于”该值、“大于或等于该值”和值之间的可能的范围,如技术人员适当地理解的。例如,如果公开了值“10”,则还公开了“小于或等于10”以及“大于或等于10”。还应理解,在本申请通篇,数据以多种不同的形式提供,并且该数据表示端点和起点以及数据点的任何组合的范围。例如,如果公开了特定数据点“10”和特定数据点15,则应理解大于、大于或等于、小于、小于或等于和等于10和15以及在10至15之间被视为是公开的。还应理解,还公开了两个特定单元之间的每个单元。例如,如果公开了10和15,则也公开了11、12、13和14。

[0055] 在本说明书和所附权利要求中,将涉及许多术语,这些术语应被定义为具有以下含义:

[0056] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,并且该描述包括所述事件或情况发生的情况和所述事件或情况不发生的情况。

[0057] 术语“高”、“更高”、“提高”、“升高”是指例如与对照相比,高于基准水平的提高。术语“低”、“更低”、“降低”是指例如与对照相比,低于基准水平的降低。

[0058] 本文中使用的术语“包括/包含”、“具有”、“带有”或其变化形式旨在类似于术语“包含”为包含性的。

[0059] 术语“抑制”意指降低或减少活性或表达。这可以是活性或表达的完全抑制,或部分抑制。抑制可与对照或标准水平进行比较。抑制可以是1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0060] 本文中使用的“氨基酸区段”是指较大氨基酸序列或参考氨基酸序列(包括多至整个参考氨基酸序列)的特定一部分。因此,术语“氨基酸区段”通常用于方便地提及较大氨基酸序列或参考氨基酸序列的特定一部分。例如,对氨基酸区段的提及可用于指代定义的氨基酸序列或参考氨基酸序列的具有特定特性、功能、作用等的一部分。例如,甲基化氨基酸区段可用于指代参考氨基酸序列中该区段被甲基化的一部分。

[0061] 在本申请通篇引用了多种出版物。这些出版物的公开内容在此通过引用整体并入本申请中,以便更全面地描述本发明所属的技术水平。所公开的参考文献也针对其中所包含的材料单独且具体地通过引用并入本文,所述材料在参考所依赖的句子中进行了讨论。

[0062] 应理解,除非另有说明,否则所公开的方法和组合物不限于特定的合成方法、特定的分析技术或特定的试剂,并且因此可变化。还应理解,本文中使用的术语仅是出于描述具体实施方案的目的,并不旨在进行限制。

[0063] B. 概述

[0064] 包含额外结构域B (FN-EDB) 和生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 的癌胎纤连蛋白在正常成人组织的胞外基质中几乎不存在,但在胚胎发育期间表达并在肿瘤中上调。在肿瘤相关ECM中,同时亲和靶向多种分子可能优于同时靶向一种受体。首先,肿瘤ECM的表达是异质的,并且多靶向可导致恶性组织中载荷的更均匀的生物分布。其次,双重靶向可减轻与有限数量的亲和配体可用受体相关的问题-这是亲和靶向的主要瓶颈 (Hussain et al., Sci.Rep.4:5232 (2014))。

[0065] 已发现一种新的双特异性肽 (PL1;氨基酸序列:PPRRGLIKLKTS;SEQ ID NO:1) 识别 FN-EDB和TNC-C二者。还发现这种双重靶向肽可用于将显像剂和治疗性载荷稳健且特异性地递送至实体瘤。PL1肽来源于使用噬菌体生物淘选发现的26个氨基酸肽。非常值得注意的是,该结果比对于噬菌体展示筛选而言为典型的更难以实现。进行十次尝试 (其中每次尝试进行约两至三周的工作) 来鉴定双特异性发现肽。通常来说,获得特定的肽仅需要三个周期的选择。在此,需要五个周期。事实上,在三个周期之后,噬菌体结合仅比背景大10倍多一点,这仍然是相当平的。在五个周期之后 (约三周的工作,相对于三个周期的两周),实现了噬菌体结合的1000倍提高。在获得该结果之前,通过噬菌体展示筛选可能无法鉴定双特异性肽。在此的结果是第一次证明这是可能的。最后,该发现还基于一种噬菌体的出乎意料和计划外的突变。使用了7个氨基酸的随机肽的文库。在具有这样的文库的情况下,预期命中肽将具有7个氨基酸 (与文库肽的长度相同) 并且这几乎是普遍的。出乎意料的是,发现肽具有26个氨基酸,这是由于噬菌体序列中的随机移码突变而发生的。

[0066] 系统性PL1功能化铁氧化物纳米虫 (nanoworm,NW) 和金属银纳米粒归巢至胶质母细胞瘤 (glioblastoma,GBM) 和前列腺癌异种移植物,以及归巢至由VEGF驱动腺病毒诱导的皮内血管生成新生血管,表明了PL1功能化造影剂的诊断性效用。用包被有PL1肽和促凋亡肽的NW处理的荷GBM小鼠显示出肿瘤体积降低和存活提高,而用非靶向颗粒处理没有效果。这些发现表明,PL1肽作为亲和配体应用,用于将诊断性和治疗性化合物靶向递送至癌症和肿瘤,特别是实体瘤。

[0067] 公开了与可靶向并归巢至癌症、肿瘤和胞外基质的肽相关的组合物、化合物和方法。这基于对肽的发现,所述肽可与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB)、生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 或这二者特异性结合。特别地,公开了包含含有以下的氨基酸序列的肽: (a) 序列 PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸并且第11位保留苏氨酸, (b) 序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸, (c) 序列AGRGRVLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRVLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换,其中第3位保留精氨酸,或 (d) 其组合。因此,在一些形式中,肽可靶向具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞和组织。所公开的肽还可介导与肽偶联、缔合、缀合或者甚至共施用的化合物和组

合物的靶向和递送。

[0068] C.肽

[0069] 已发现具有有用结合特性的肽。如本文中所述,这些肽和这些肽的变体可与其他有用的材料和组合物组合并且可用于多种方法。

[0070] 一种类型的公开肽基于发现序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1),其来源于原始命中序列PPRRGLIKLKTSNTKENS VVASLRP (SEQ ID NO:2)。与PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)相关的肽可被称为LI肽。分析表明,许多氨基酸可被保留有用结合能力的肽替换。氨基酸第6位和第9位显示更重要,且第7位对FN-EDB结合是重要的,但对TNC-C结合不太重要(图2)。因此,一些形式的LI肽可包含含有以下的氨基酸序列:序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸并且第11位保留苏氨酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)具有至少50%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)具有至少58%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)具有至少66%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)具有至少75%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)具有至少83%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)具有至少91%序列同一性。与PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)相关的肽可被称为LI肽。

[0071] 另一种类型的公开肽基于发现序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)。与TSKQNSR (SEQ ID NO:3)相关的肽可被称为SR肽。分析表明,许多氨基酸可被保留有用结合能力的肽替换。氨基酸第6位和第7位显示更重要(图4C)。因此,一些形式的SR肽可包含含有以下的氨基酸序列:序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体具有一个、二个、三个、四个或五个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所

述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个或三个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个或两个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少14%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少28%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少42%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少57%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少71%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 具有至少85%序列同一性。与TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 相关的肽可被称为SR肽。

[0072] 另一种类型的公开肽基于发现序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4)。与AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 相关的肽可被称为RLR肽。分析表明,许多氨基酸可被保留有用结合能力的肽替换。氨基酸第3位、第5位、第6位和第8位显示对TNC-C结合更重要(图6)。因此,一些形式的RLR肽可包含含有以下的氨基酸序列:序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、二个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换,其中第3位保留精氨酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、二个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸和/或第8位保留精氨酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸、第8位保留精氨酸并且第5位保留精氨酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个或三个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个或两个氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少25%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少37%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少50%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少62%序列同一性。在一些形式

中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少75%序列同一性。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少87%序列同一性。与AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 相关的肽可被称为RLR肽。

[0073] 在一些形式中,(a) 氨基酸序列可包含式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$, (b) 氨基酸序列可包含式 $X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}$, (c) 氨基酸序列包含式 $X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}$,或(d) 其组合,其中 X_6 是亮氨酸,其中 X_7 是异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸,其中 X_9 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,其中 X_{11} 是苏氨酸,其中 X_{19} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_{18} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸,其中 X_{22} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸,其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸或丙氨酸,并且其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{23} 、 X_{24} 和 X_{26} 各自独立地是任何氨基酸。式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$ 的肽是LI肽。式 $X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}$ 的肽是SR肽。式 $X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}$ 的肽是RLR肽。

[0074] LI肽还可根据包含式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$ 的氨基酸序列来描述,其中 X_6 是亮氨酸,其中 X_7 是异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸,其中 X_9 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,其中 X_{11} 是苏氨酸,并且其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{10} 和 X_{12} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$,其中 X_6 是亮氨酸,其中 X_7 是异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸,其中 X_9 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,其中 X_{11} 是苏氨酸,并且其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{10} 和 X_{12} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中, X_1 可以是脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或天冬酰胺,其中 X_2 可以是脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或天冬酰胺,并且其中 X_5 可以是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。在一些形式中, X_7 可以是异亮氨酸并且其中 X_9 可以是亮氨酸。在一些形式中, X_2 可以是脯氨酸。在一些形式中, X_3 可以是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_4 可以是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_8 可以是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸或色氨酸,其中 X_{10} 可以是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸或色氨酸,并且其中 X_{12} 可以是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸或脯氨酸。在一些形式中, X_1 可以是脯氨酸、甘氨酸或丙氨酸,其中 X_3 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_4 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_5 可以是甘氨酸、丙氨酸或缬氨酸,其中 X_8 可以是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸或精氨酸,其中 X_{10} 可以是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸或精氨酸,并且其中 X_{12} 可以是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸。在一些形式中, X_7 和 X_9 处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列^{PPRRGLIKLKTS} (SEQ ID NO:1)。

[0075] SR肽还可根据包含式 $X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}$ 的氨基酸序列来描述,其中 X_{19} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_{18} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸,并且其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 和 X_{17} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中,氨基酸序列可包含式 $X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}$,其中 X_{19} 是精氨酸、赖

氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_{18} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸,并且其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 和 X_{17} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中, X_{16} 可以是谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、丙氨酸或甘氨酸,其中 X_{14} 可以是丝氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸或组氨酸,并且其中 X_{15} 可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。在一些形式中, X_{17} 可以是天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、缬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、色氨酸或赖氨酸,并且其中 X_{13} 可以是苏氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或天冬氨酸。在一些形式中, X_{19} 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{18} 可以是丝氨酸或天冬酰胺。在一些形式中, X_{16} 可以是谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸或精氨酸,其中 X_{14} 可以是丝氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸或天冬氨酸,并且其中 X_{15} 可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。在一些形式中, X_{19} 可以是精氨酸,其中 X_{18} 可以是丝氨酸。在一些形式中, X_{16} 可以是谷氨酰胺或天冬酰胺,其中 X_{14} 可以是丝氨酸或天冬酰胺,并且其中 X_{15} 可以是赖氨酸、精氨酸或组氨酸。在一些形式中, X_{19} 和 X_{18} 处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)。

[0076] RLR肽还可根据包含式 $X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}$ 的氨基酸序列来描述,其中 X_{22} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸,其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,并且其中 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{23} 、 X_{24} 和 X_{26} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中,氨基酸序列包含式 $X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}$,其中 X_{22} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸,其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,并且其中 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{23} 、 X_{24} 和 X_{26} 各自独立地是任何氨基酸。在一些形式中, X_{24} 可以是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。在一些形式中, X_{21} 可以是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸, X_{23} 可以是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,并且其中 X_{26} 可以是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸或丙氨酸。在一些形式中, X_{20} 可以是丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。在一些形式中, X_{22} 可以是精氨酸或赖氨酸,其中 X_{25} 可以是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,其中 X_{27} 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸。在一些形式中, X_{24} 可以是精氨酸、赖氨酸或组氨酸。在一些形式中, X_{24} 可以是精氨酸或赖氨酸。在一些形式中, X_{22} 可以是精氨酸,其中 X_{25} 可以是亮氨酸,其中 X_{27} 可以是精氨酸。在一些形式中, X_{24} 可以是精氨酸。在一些形式中, X_{22} 、 X_{25} 和 X_{27} 处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4)。在一些形式中,氨基酸序列可包含序列AGRGRLLVRRAKLAAALE (SEQ ID NO:14)。

[0077] 还公开了包含第一氨基酸序列和第二氨基酸序列的肽,所述第一氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸,所述第二氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4)

的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换,其中第3位保留精氨酸。在一些形式中,肽可通过所述氨基酸序列与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB) 选择性地结合。在一些形式中,肽可包含具有序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列。在一些形式中,肽可通过所述氨基酸序列与生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 选择性地结合。在一些形式中,肽可包含具有序列AGRRLVR (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列。在一些形式中,肽可通过所述氨基酸序列与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB) 和生腱蛋白-C C结构域 (TNC-C) 二者选择性地结合。

[0078] 在一些形式中,肽的长度可小于20个氨基酸。在一些形式中,肽的长度可小于15个氨基酸。在一些形式中,肽的长度可以是12个氨基酸。在一些形式中,肽可包含序列PPRRGLIKLKTSSNTKENSIVASLRP (SEQ ID NO:2)。在一些形式中,肽是线性的。在一些形式中,肽是环状的。在一些形式中,肽是经修饰的肽。在一些形式中,肽是甲基化肽。在一些形式中,甲基化肽可包含甲基化氨基酸区段。在一些形式中,肽在至少一个位置处被N-或C-甲基化。

[0079] 所公开的肽优选地包含以下的序列:(1) 一种或更多种LI肽,(2) 一种或更多种SR肽,(3) 一种或更多种RLR肽,(4) 一种或更多种LI肽和一种或更多种SR肽,(5) 一种或更多种LI肽和一种或更多种RLR肽,(6) 一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽,或者(7) 一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽。这样的肽(即具有这些组合中的任一种的肽)可被称为LSR肽。所公开的组合物优选地包含(1) 一种或更多种LI肽,(2) 一种或更多种SR肽,(3) 一种或更多种RLR肽,(4) 一种或更多种LI肽和一种或更多种SR肽,(5) 一种或更多种LI肽和一种或更多种RLR肽,(6) 一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽,或(7) 一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽。这样的组合物可被称为LSR组合物。

[0080] 包含一种或更多种LI肽和一种或更多种SR肽的序列的肽可被称为LS肽。包含一种或更多种LI肽和一种或更多种RLR肽的序列的肽可被称为LR肽。包含一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽的序列的肽可被称为RS肽。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽的序列的肽可被称为LSR肽。

[0081] 包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽或这二者的序列的肽可被称为L/S肽。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种RLR肽或这二者的序列的肽可被称为L/R肽。包含一种或更多种SR肽、一种或更多种RLR肽或这二者的序列的肽可被称为S/R肽。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽、一种或更多种RLR肽或者其组合的序列的肽可被称为L/S/R肽。

[0082] 可结合FN-EDB的肽可被称为FN-EDB肽。可结合TNC-C的肽可被称为TNC-C肽。可结合FN-EDB和TNC-C二者的肽可被称为FN-EDB/TNC-C肽。值得注意的是,FN-EDB/TNC-C肽也构成FN-EDB肽和TNC-C肽。结合FN-EDB或TNC-C或FN-EDB和TNC-C二者的肽可被称为F/T/F&T肽。值得注意的是,F/T/F&T肽包含FN-EDB肽、TNC-C肽和FN-EDB/TNC-C肽。

[0083] 在所公开的F/T/F&T肽的情况下,肽可提供归巢至具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的细胞和组织二者。例如,一些癌症和胞外基质具有FN-EDB。在一些形式中,肽可选择性地归巢至或结合表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的细胞。在一些形式中,肽可选择性地归巢至或结合表达NRP-1 (例如,b1b2结构域)、TNC-C或NRP-1 (例如,b1b2结构

域)和TNC-C二者的细胞。

[0084] 所公开的肽(例如F/T/F&T肽)的任一种可由例如氨基酸、氨基酸类似物、肽类似物、氨基酸模拟物、肽模拟物等构成。尽管为了方便起见,根据氨基酸和由氨基酸构成的肽,在本文中描述了所公开的肽的结构、设计等,但是应理解,氨基酸和肽的类似类似物、模拟物、经修饰形式等也可作为所公开的肽使用并且使用类似的原则设计。

[0085] 任何组分,例如本文中公开的组分,可与肽例如F/T/F&T肽重叠、相邻和/或在其上游、下游或者上游和下游。这样的组分的一些实例包括辅助分子、归巢分子、蛋白酶切割位点等。将一些组分与肽例如在该肽下游(C-端)的F/T/F&T肽偶联或缔合是有用的。例如,当肽被活化时,具有肽下游(并且因此在用于活化的切割位点的下游)的辅助蛋白或归巢肽的可活化肽将与肽分离。作为另一个实例,当肽被活化时,具有肽下游(并且因此在用于活化的切割位点的下游)的辅助分子或归巢分子的可活化肽将与肽分离。这可能具有一些优势,例如使肽功能更有效或降低消除的组分的外来影响的机会。

[0086] 本文中使用的术语“变体”是指与参考肽、多肽、寡核苷酸或多核苷酸不同但保留基本特性的肽、多肽、寡核苷酸或多核苷酸。肽的典型变体在氨基酸序列上不同于另一参考肽。一般而言,差异是有限的,使得参考肽和变体的序列总体上紧密类似,并且在许多区域中相同。变体和参考肽的氨基酸序列可能因一个或更多个修饰(例如,替换、添加和/或缺失)而不同。替换或插入的氨基酸残基可能是或者可能不是由遗传密码编码的氨基酸残基。肽、多肽、寡核苷酸或多核苷酸的变体可以是天然存在的,例如等位基因变体,或者它可以是未知是否天然存在的变体。

[0087] 可在肽和多肽的结构中进行修饰和改变,并且仍获得具有与所述肽或多肽类似特征分子(例如,保守氨基酸替换)。例如,某些氨基酸可替换序列中的其他氨基酸而没有明显的活性损失。因为是肽或多肽的相互作用能力和性质限定了该肽或多肽的生物或化学功能活性,所以可在肽或多肽序列中进行某些氨基酸序列替换并且仍获得具有相似特性的肽或多肽。

[0088] 在进行一些这样的改变时,可考虑多种因素和模式。例如,在一些形式中,可考虑氨基酸的亲水指数。氨基酸亲水指数在赋予肽或多肽相互作用的生物学功能方面的重要性是本领域通常了解的。已知某些氨基酸可替换具有类似亲水指数或分数的其他氨基酸,并且仍产生具有类似生物活性的多肽。每种氨基酸基于其的疏水性和电荷特性指定了亲水指数。这些指数是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0089] 认为氨基酸的相对亲水特性决定了所得多肽的二级结构,其继而限定了多肽与其他分子,例如酶、底物、受体、抗体、抗原和辅因子的相互作用。本领域已知的是,氨基酸可被具有类似亲水指数的另一氨基酸替换,并且仍获得功能上等同的多肽。在这样的变化中,优选亲水指数在 ± 2 内的氨基酸的替换,特别优选在 ± 1 内的那些,并且甚至更特别优选在 ± 0.5 内的那些。基于亲水指数相似性的替换可被称为亲水指数替换。

[0090] 相似氨基酸的替换也可基于亲水性进行,特别是当由此产生的生物功能等同的多肽或肽旨在用于免疫学实施方案时。已将以下亲水性值分配给氨基酸残基:精氨酸(+3.0);

赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0±1);谷氨酸(+3.0±1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);脯氨酸(-0.5±1);苏氨酸(-0.4);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。应理解的是,氨基酸可替换具有类似亲水性值的另一种氨基酸,并且仍获得生物学上等同的,并且特别是免疫学上等同的多肽。在这样的变化中,优选亲水性值在±2内的氨基酸的替换,特别优选在±1内的那些,并且甚至更特别优选在±0.5内的那些。基于亲水性值相似性的替换可被称为亲水性值替换。

[0091] 如上所概述的,氨基酸替换通常可基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到多种前述特征的一些示例性替换是本领域技术人员公知的并且包括(原始残基:示例性替换):(Ala:Gly,Ser)、(Arg:Lys)、(Asn:Gln,His)、(Asp:Glu,Cys,Ser)、(Gln:Asn)、(Glu:Asp)、(Gly:Ala)、(His:Asn,Gln)、(Ile:Leu,Val)、(Leu:Ile,Val)、(Lys:Arg)、(Met:Leu,Tyr)、(Ser:Thr)、(Thr:Ser)、(Tyr:Trp,Phe)和(Val:Ile,Leu)。本文中使用的保守氨基酸替换是这样的替换。

[0092] 氨基酸替换也可基于氨基酸氨基酸替换的其他分类。例如,氨基酸替换可基于泰勒分类(Taylor,J.Theor.Biol.119:205-218(1986))。泰勒分类基于多种氨基酸特征,主要是侧链的大小和疏水性。泰勒分类通常展示为维恩图(图11)。泰勒分类可通过根据追踪从原始或目前氨基酸到替换氨基酸的路径跨越多少边界来指定氨基酸替换来使用。这在图11中通过示出在从亮氨酸(L)到精氨酸(R)的移动中跨越了五个边界来举例说明。因此,泰勒氨基酸替换可被指定为多至一个边界交叉、两个边界交叉、三个边界交叉、四个边界交叉、五个边界交叉、六个边界交叉或七个边界交叉。优选的氨基酸替换是具有多至三个边界交叉的那些。更优选的是具有多至两个边界交叉的氨基酸替换。最优选的是具有多至一个边界交叉的那些氨基酸替换。

[0093] 如上所述,考虑了肽的功能或生物学等同物。特别地,肽或多肽的一些实施方案可包括与目标肽具有约50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的变体。

[0094] 所公开的肽可以是分离的形式。本文中在提及所公开的肽时使用的术语“分离的”意指处于相对不含例如以下物质的形式的肽:污染性多肽、脂质、核酸和通常与细胞中的肽相关的、或者与文库或粗制品中的肽相关的其他细胞物质。

[0095] 所公开的肽的长度可以是多至10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、400、500、1000或2000个残基。在一些具体实施方案中,所公开的肽的长度可以是至少7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或200个残基。在另一些实施方案中,所公开的肽的长度可以是7至200个残基、7至100个残基、7至90个残基、7至80个残基、7至70个残基、7至60个残基、7至50个残基、7至40个残基、7至30个残基、7至20个残基、7至15个残基、7至10个残基、8至200个残基、8至100个残基、8至90个残基、8至80个残基、8至70个残基、8至60个残基、8至50个残基、8至40个残基、8至30个残基、8至20个残基、8至15个残基、8至10个残基、9至200个残基、9至100个残基、9至90个残基、9至80个残基、9至70个残基、9至60个残基、9至50个残基、9至40个残基、9至30个残基、9至20个残基、9至15个残基、9至10个残基、10至200个残基、10至100个残基、10至90个残基、10至80个残基、10至70个残基、10至60个残基、10至50个残基、10至40个残基、10至30个残基、10至20个残基、10至15个残基、15至200个残基、15至100

个残基、15至90个残基、15至80个残基、15至70个残基、15至60个残基、15至50个残基、15至40个残基、15至30个残基、15至20个残基、20至200个残基、20至100个残基、20至90个残基、20至80个残基、20至70个残基、20至60个残基、20至50个残基、20至40个残基或20至30个残基。本文中使用的术语“残基”是指氨基酸或氨基酸类似物。

[0096] 包含L/S/R或F/T/F&T肽的蛋白质或肽的长度可以是多至50、100、150、200、250、300、400、500、1000或2000个残基。在一些具体实施方案中，L/S/R或F/T/F&T组合物的蛋白质或肽部分的长度可以是至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或200个残基。在另一些实施方案中，包含L/S/R或F/T/F&T肽的蛋白质或肽的长度可以是7至200个残基、7至100个残基、7至90个残基、7至80个残基、7至70个残基、7至60个残基、7至50个残基、7至40个残基、7至30个残基、7至20个残基、7至15个残基、7至10个残基、8至200个残基、8至100个残基、8至90个残基、8至80个残基、8至70个残基、8至60个残基、8至50个残基、8至40个残基、8至30个残基、8至20个残基、8至15个残基、8至10个残基、9至200个残基、9至100个残基、9至90个残基、9至80个残基、9至70个残基、9至60个残基、9至50个残基、9至40个残基、9至30个残基、9至20个残基、9至15个残基、9至10个残基、10至200个残基、10至100个残基、10至90个残基、10至80个残基、10至70个残基、10至60个残基、10至50个残基、10至40个残基、10至30个残基、10至20个残基、10至15个残基、15至200个残基、15至100个残基、15至90个残基、15至80个残基、15至70个残基、15至60个残基、15至50个残基、15至40个残基、15至30个残基、15至20个残基、20至200个残基、20至100个残基、20至90个残基、20至80个残基、20至70个残基、20至60个残基、20至50个残基、20至40个残基或20至30个残基。

[0097] 所公开的缀合物的长度可以是多至50、100、150、200、250、300、400、500、1000或2000个残基。在一些具体实施方案中，所公开的缀合物的长度可以是至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或200个残基。在另一些实施方案中，所公开的缀合物的长度可以是10至200个残基、10至100个残基、10至90个残基、10至80个残基、10至70个残基、10至60个残基、10至50个残基、10至40个残基、10至30个残基、10至20个残基、10至15个残基、15至200个残基、15至100个残基、15至90个残基、15至80个残基、15至70个残基、15至60个残基、15至50个残基、15至40个残基、15至30个残基、15至20个残基、20至200个残基、20至100个残基、20至90个残基、20至80个残基、20至70个残基、20至60个残基、20至50个残基、20至40个残基或20至30个残基。

[0098] L/S/R或F/T/F&T组合物的蛋白质或肽部分的长度可以是多至50、100、150、200、250、300、400、500、1000或2000个残基。在一些具体实施方案中，L/S/R或F/T/F&T组合物的蛋白质或肽部分的长度可以是至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或200个残基。在另一些实施方案中，L/S/R或F/T/F&T组合物的蛋白质或肽部分的长度可以是7至200个残基、7至100个残基、7至90个残基、7至80个残基、7至70个残基、7至60个残基、7至50个残基、7至40个残基、7至30个残基、7至20个残基、7至15个残基、7至10个残基、8至200个残基、8至100个残基、8至90个残基、8至80个残基、8至70个残基、8至60个残基、8至50个残基、8至40个残基、8至30个残基、8至20个残基、8至15个残基、8至10个残基、9至200个残基、9至100个残基、9至90个残基、9至80个残基、9至70个残基、9至60个残基、9至50个残基、9至40个残基、9至30个残基、9至20个残基、9至15个残基、9至10个残基、10至200个残基、10至100个残基、10至90个残基、10至80个残基、10至70个残基、10至60个残基、10至50个残基、10至40个残基、10至30

个残基、10至20个残基、10至15个残基、15至200个残基、15至100个残基、15至90个残基、15至80个残基、15至70个残基、15至60个残基、15至50个残基、15至40个残基、15至30个残基、15至20个残基、20至200个残基、20至100个残基、20至90个残基、20至80个残基、20至70个残基、20至60个残基、20至50个残基、20至40个残基或20至30个残基。

[0099] 所公开的组合物长度可以是多至50、100、150、200、250、300、400、500、1000或2000个残基。在一些具体实施方案中，所公开的组合物长度可以是至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或200个残基。在另一些实施方案中，所公开的组合物长度可以是10至200个残基、10至100个残基、10至90个残基、10至80个残基、10至70个残基、10至60个残基、10至50个残基、10至40个残基、10至30个残基、10至20个残基、10至15个残基、15至200个残基、15至100个残基、15至90个残基、15至80个残基、15至70个残基、15至60个残基、15至50个残基、15至40个残基、15至30个残基、15至20个残基、20至200个残基、20至100个残基、20至90个残基、20至80个残基、20至70个残基、20至60个残基、20至50个残基、20至40个残基或20至30个残基。

[0100] F/T/F&T和其他公开的肽可被稳定化以对抗蛋白水解。例如，可通过用N-甲基化或C-甲基化保护一些肽键来提高肽的稳定性和活性。辅助肽和归巢肽可同样或类似地被稳定化以对抗蛋白水解。

[0101] 所公开的肽可被制成稳定肽的形式和/或配制成循环形式。例如，可使用聚乙二醇缀合物。所公开的肽和/或载荷也可在一段时间内施用。例如，所公开的肽和/或载荷可用渗透泵递送。这可扩展靶细胞和组织的渗透性。可使用所公开的肽的经修饰形式。例如，所公开的肽可被甲基化（这可使肽稳定以对抗蛋白水解）。除了待切割以活化肽的键之外，还期望对抗切割的稳定性。对所公开的肽的修饰通常应使其具有功能性。与天然存在的肽形式具有结构差异的肽可被视为经修饰肽。

[0102] 应理解，存在可并入所公开的组合物、缀合物、分子、蛋白质、肽和要素中的许多氨基酸和肽类似物。例如，存在许多可被使用的D氨基酸或其他非天然氨基酸。公开了天然存在的肽的相反立体异构体，以及肽类似物的立体异构体。这些氨基酸可通过化学合成或通过使tRNA负载有选择的氨基酸并将利用例如琥珀密码子的遗传构建体工程化以以位点特异性方式将类似氨基酸插入到肽链中，而容易地并入多肽链中(Thorson et al., Methods in Molec. Biol. 77:43-73 (1991), Zoller, Current Opinion in Biotechnology, 3:348-354 (1992); Ibba, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 13:197-216 (1995), Cahill et al., TIBS, 14 (10):400-403 (1989); Benner, TIB Tech, 12:158-163 (1994); Ibba and Hennecke, Bio/technology, 12:678-682 (1994), 至少对于与氨基酸类似物相关的物质，所有这些均通过引用并入本文)。

[0103] 可产生类似肽的分子，但它们不通过天然肽键连接。例如，氨基酸或氨基酸类似物的键联可包括 $\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $- \text{CH}_2\text{S}-$ 、 $- \text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $- \text{CH}=\text{CH}-$ （顺式和反式）、 $- \text{COCH}_2-$ 、 $- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $- \text{CHH}_2\text{SO}-$ （这些和其他的可见于以下：Spatola, A.F. in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, 编辑, Marcel Dekker, New York, 第267页 (1983); Spatola, A.F., Vega Data (March 1983), 第1卷, 第3期, Peptide Backbone Modifications (一般性综述); Morley, Trends Pharm Sci (1980) 第463至468页; Hudson, D. et al., Int J Pept Prot Res 14:177-185 (1979) ($- \text{CH}_2\text{NH}-$ 、

CH₂CH₂--);Spatola et al.Life Sci 38:1243-1249(1986) (--CHH₂--S);Hann J.Chem.Soc Perkin Trans.I 307-314(1982) (--CH----,顺式和反式);Almquist et al.J.Med.Chem.23:1392-1398(1980) (--COCH₂--);Jennings-White et al.Tetrahedron Lett 23:2533(1982) (--COCH₂--);Szelke et al.European Appln,EP 45665CA(1982): 97:39405(1982) (--CH(OH)CH₂--);Holladay et al.Tetrahedron.Lett 24:4401-4404(1983) (--C(OH)CH₂--);和Hruby Life Sci 31:189-199(1982) (--CH₂--S--);其各自通过引用并入本文。特别优选的非肽键联是--CH₂NH--。应理解,肽类似物在键原子之间可具有多于一个原子,例如b-丙氨酸、g-氨基丁酸等。

[0104] 氨基酸类似物和肽类似物通常具有增强的或期望的特性,例如更经济的产生、更高的化学稳定性、增强的药理学特性(半衰期、吸收、效能、效力等)、改变的特异性(例如,广泛的生物活性谱)、降低的抗原性等。

[0105] D-氨基酸可用于产生更稳定的肽,因为D氨基酸不被肽酶等识别。只要保留活性,则用同一类型的D-氨基酸系统性地替换共有序列的一个或更多个氨基酸(例如,D-赖氨酸代替L-赖氨酸)可用于产生更稳定的肽。半胱氨酸残基可用于环化两个或更多个肽或者将两个或更多个肽连接在一起。这可有益于将肽限制在特定的构象中。(Rizo and Gierasch Ann.Rev.Biochem.61:387(1992),其通过引用并入本文)。

[0106] 本文中使用的术语“肽”广泛用于意指肽、蛋白质、蛋白质片段等。本文中使用的术语“肽模拟物”意指具有肽的活性的肽样分子,其结构性的基于肽。这样的肽模拟物包括经化学修饰的肽、包含非天然存在的氨基酸的肽样分子以及类肽类,并且具有例如肽模拟物所来源的活性(参见例如Goodman and Ro,Peptidomimetics for Drug Design,in" Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery"第1卷(编辑M.E.Wolff;John Wiley&Sons 1995),第803至861页)。

[0107] 所公开的肽可通过例如以下来验证:测试与FN-EDB、TNC-C或这二者的体外结合和对于具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞和组织的体内归巢。可通过例如以下针对所公开的肽的结合和归巢能力来筛选或测试肽:测试与FN-EDB、TNC-C或这二者的体外结合和对于具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞和组织的体内归巢。例如,与具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞和组织的特异性结合可通过评估肽与具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞和组织或者合适的测试细胞或细胞系的结合来测试。例如,与具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞和组织的特异性结合可使用细胞系J774A.1和RAW264.7的细胞来测试或评估。与具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞或组织或者合适的测试细胞的结合特异性可通过比较在对照细胞中观察到的结合来测试或评估,所述对照细胞例如这样的细胞,其不是具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞或组织,或者不是合适的测试细胞。优选地,这样的对照细胞是不具有FN-EDB、TNC-C或这二者之一的细胞或组织。在非人动物中缺乏归巢至具有FN-EDB、TNC-C或这二者的细胞和组织的测试肽也可用作对照。

[0108] 可通过在非人动物中评估归巢至靶标和有效递送载荷分子来筛选或测试肽。一般而言,肽可作为L/S/R或F/T/F&T组合物或者L/S/R或F/T/F&T缀合物的一部分来测试,但用所使用的测试肽代替L/S/R或F/T/F&T肽。可鉴定可用作L/S/R或F/T/F&T肽的肽,例如,当在这样的筛选或测试中,测试组合物归巢至靶标并有效递送载荷分子。

[0109] 合成的肽可用于表明与所选噬菌体相关的活性被噬菌体展示的肽重现

(reproduce)。这方面的技术是公知的(例如Zhang et al.,2005;Simberg et al.,2007;Karmali et al.,2008)。肽通常可用荧光团进行标记以允许在组织中检测,并且可测试纳米粒上的游离肽和多聚体缀合物(其更紧密地类似于噬菌体上的多价呈递)二者。

[0110] 本文中在提及肽时使用的术语“环状的”意指在两个非相邻氨基酸或氨基酸类似物之间包含分子内键的结构。环化可通过共价键或非共价键实现。分子内键包括但不限于骨架至骨架、侧链至骨架和侧链至侧链的键。一种优选的环化方法是通过在非相邻氨基酸或氨基酸类似物的侧链之间形成二硫键。能够形成二硫键的残基包括例如半胱氨酸(Cys)、青霉胺(Pen)、 β,β -五亚甲基半胱氨酸(Pmc)、 β,β -五亚甲基- β -巯基丙酸(Pmp),及其功能等同物。

[0111] 肽也可例如通过内酰胺键环化,该内酰胺键可利用一个氨基酸或其类似物的侧链基团来与氨基端残基的N-端胺形成共价连接。能够形成内酰胺键的残基包括天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、赖氨酸(Lys)、鸟氨酸(orn)、 α,β -二氨基-丙酸、 γ -氨基-己二酸(Adp)和M-(氨基甲基)苯甲酸(Mamb)。环化另外地可例如通过在赖氨酸(Lys)和亮氨酸(Leu)残基之间形成赖氨酸正亮氨酸键或者在两个酪氨酸(Tyr)残基之间形成二酪氨酸键来实现。技术人员理解这些和其他键可包含在环肽中。

[0112] 多种肽可用于所公开的组合物、缀合物和方法。这样的肽包括但不限于如本文中公开的F/T/F&T和L/S/R肽。所公开的化合物、组合物、缀合物和方法可包括或使用多种形式的所公开的肽,包括所公开的L/S/R和F/T/F&T肽和肽模拟物。为了便于表达,在本文的许多地方将叙述肽的使用或包含。应理解,在这样的情况下,认为还可以以与在L/S/R和F/T/F&T肽的方面描述的相同或类似的方式使用或包含多种形式的肽,并且从而这样的使用和包含是特别考虑和公开的。

[0113] D.组合物

[0114] 所公开的肽可用于多种其他组分中和与多种其他组分一起使用并且以多种模式和配置使用。这样的组合物和其他形式可用于实现如本文中所述的多种目的和作用。因此,公开了包含任一种或更多种所公开的肽的组合物。在一些形式中,所述组合物还包含载荷组合物,其中所述肽和所述载荷组合物彼此共价偶联或非共价缔合。在一些形式中,所述组合物可选择性地归巢至表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤。在一些形式中,所述组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质。在一些形式中,所述组合物可选择性地归巢至表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的细胞。在一些形式中,所述组合物可选择性地归巢至表达NRP-1(例如,b1b2结构域)、TNC-C或NRP-1(例如,b1b2结构域)和TNC-C二者的肿瘤。在一些形式中,所述组合物可选择性地归巢至表达NRP-1(例如,b1b2结构域)、TNC-C或NRP-1(例如,b1b2结构域)和TNC-C二者的胞外基质。在一些形式中,所述组合物可选择性地归巢至表达NRP-1(例如,b1b2结构域)、TNC-C或NRP-1(例如,b1b2结构域)和TNC-C二者的细胞。

[0115] 在一些形式中,载荷组合物可包含治疗剂、可检测剂、载体、载剂、表面分子,或其组合。

[0116] 在一些形式中,载荷组合物可包含治疗剂。在一些形式中,治疗剂是抗血管生成剂、抗菌剂、抗癌剂、抗炎剂、化学治疗剂(例如癌症化学治疗剂)、细胞毒性剂、免疫刺激剂、免疫抑制剂、核酸分子、多肽、促血管生成剂、促凋亡剂、促炎剂、小分子或毒素。在一些形式

中,治疗剂是 D_2 (KLAKLAK) $_2$ (SEQ ID NO:6)。

[0117] 在一些形式中,载荷组合物可包含可检测剂。在一些形式中,可检测剂是标记、标记剂、造影剂、显像剂、微泡(例如碳氟化合物微泡)、荧光团(例如FAM、荧光素或罗丹明)或放射性核素(例如碳-11、碳-13、镓-111或锝-99)。在一些形式中,可检测剂是FAM。

[0118] 在一些形式中,载荷组合物可包含载体、载剂、表面分子,或其组合。在一些形式中,载体、载剂和/或表面分子独立地包含珠、脂质体、胶束、微粒、纳米粒(例如白蛋白纳米粒、铁氧化物纳米粒或银纳米粒)、纳米虫(例如铁氧化物纳米虫)、磷脂、聚合物、噬菌体、噬菌体衣壳、噬菌体颗粒、病毒衣壳、病毒颗粒、病毒、病毒样颗粒或微泡(例如碳氟化合物微泡)。

[0119] 在一些形式中,组合物可包含多种载荷组合物。在一些形式中,载荷组合物可包含表面分子。在一些形式中,肽与表面分子缀合。在一些形式中,缀合肽中的一种或更多种通过接头与表面分子间接缀合。在一些形式中,组合物还可包含多种接头。在一些形式中,所述接头中的至少一种可包含聚乙二醇。

[0120] 在一些形式中,表面分子可包含纳米粒、纳米虫、铁氧化物纳米虫、铁氧化物纳米粒、白蛋白纳米粒、银纳米粒、脂质体、胶束、磷脂、聚合物、微粒或碳氟化合物微泡。在一些形式中,表面分子可包含脂质体。在一些形式中,表面分子可包含铁氧化物纳米虫。

[0121] 在一些形式中,组合物结合表达FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤。在一些形式中,组合物结合具有FN-EDB、TNC-C、或FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质。在一些形式中,组合物可内化入细胞。在一些形式中,组合物可减慢肿瘤生长。在一些形式中,组合物还包含肽的一个或更多个拷贝。在一些形式中,组合物可包含肽的至少100个拷贝。在一些形式中,组合物可包含肽的至少1000个拷贝。

[0122] 包含一种或更多种LI肽和一种或更多种SR肽的组合物可被称为LS组合物。包含一种或更多种LI肽和一种或更多种RLR肽的组合物可被称为LR组合物。包含一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽的组合物可被称为RS组合物。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽的组合物可被称为LSR组合物。

[0123] 包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽或这二者的组合物可被称为L/S组合物。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种RLR肽或这二者的组合物可被称为L/R组合物。包含一种或更多种SR肽、一种或更多种RLR肽或这二者的组合物可被称为S/R组合物。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽、一种或更多种RLR肽或其组合的组合物可被称为L/S/R组合物。

[0124] 公开了LI组合物、LI缀合物、LI分子、LI蛋白和LI肽。LI肽是LI组合物、LI缀合物、LI分子、LI蛋白等的基本特征。LI组合物是包含LI肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。LI缀合物是LI肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,LI缀合物可包含LI肽、LI蛋白、LI化合物、LI分子等。LI分子是包含LI肽的分子。例如,LI分子可包含LI蛋白、LI肽等。一般而言,LI肽、LI蛋白、LI分子和LI缀合物均是LI组合物的形式。LI化合物、LI肽和LI蛋白可以是LI分子的形式。除非上下文另有说明,否则对LI组合物的提及旨在指代LI组合物、LI分子、LI蛋白、LI肽等。LI组分是包含LI肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。LI组分的一些实例包括例如LI组合物、LI分子、LI蛋白和LI肽。LI组分可包含一种或更多种LI

肽。

[0125] 公开了SR组合物、SR缀合物、SR分子、SR蛋白和SR肽。SR肽是SR组合物、SR缀合物、SR分子、SR蛋白等的基本特征。SR组合物是包含SR肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。SR缀合物是SR肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,SR缀合物可包含SR肽、SR蛋白、SR化合物、SR分子等。SR分子是包含SR肽的分子。例如,SR分子可包含SR蛋白、SR肽等。一般而言,SR肽、SR蛋白、SR分子和SR缀合物均是SR组合物的形式。SR化合物、SR肽和SR蛋白可以是SR分子的形式。除非上下文另有说明,否则对SR组合物的提及旨在指代SR组合物、SR分子、SR蛋白、SR肽等。SR组分是包含SR肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。SR组分的一些实例包括例如SR组合物、SR分子、SR蛋白和SR肽。SR组分可包含一种或更多种SR肽。

[0126] 给定名称(例如LI、SR、RLR、LS、LR、RS、LSR、L/S、L/R、S/R或L/S/R)的组合物、缀合物、分子、蛋白质和肽是指这样的组合物、缀合物、分子、蛋白质和肽,其包含具有给定名称特征的肽或肽的序列。

[0127] 举例来说,包含一种或更多种LI肽和一种或更多种SR肽的序列的蛋白质可被称为LS蛋白。包含一种或更多种LI肽和一种或更多种RLR肽的序列的蛋白质可被称为LR蛋白。包含一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽的序列的蛋白质可被称为RS蛋白。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽和一种或更多种RLR肽的序列的蛋白质可被称为LSR蛋白。

[0128] 包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽或这二者的序列的蛋白质可被称为L/S蛋白。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种RLR肽或这二者的序列的蛋白质可被称为L/R蛋白。包含一种或更多种SR肽、一种或更多种RLR肽或这二者的序列的蛋白质可被称为S/R蛋白。包含一种或更多种LI肽、一种或更多种SR肽、一种或更多种RLR肽或其组合的序列的蛋白质可被称为L/S/R蛋白。

[0129] 公开了RLR组合物、RLR缀合物、RLR分子、RLR蛋白和RLR肽。RLR肽是RLR组合物、RLR缀合物、RLR分子、RLR蛋白等的基本特征。RLR组合物是包含RLR肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。RLR缀合物是RLR肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,RLR缀合物可包含RLR肽、RLR蛋白、RLR化合物、RLR分子等。RLR分子是包含RLR肽的分子。例如,RLR分子可包含RLR蛋白、RLR肽等。一般而言,RLR肽、RLR蛋白、RLR分子和RLR缀合物均是RLR组合物的形式。RLR化合物、RLR肽和RLR蛋白可以是RLR分子的形式。除非上下文另有说明,否则对RLR组合物的提及旨在指代RLR组合物、RLR分子、RLR蛋白、RLR肽等。RLR组分是包含RLR肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。RLR组分的一些实例包括例如RLR组合物、RLR分子、RLR蛋白和RLR肽。RLR组分可包含一种或更多种RLR肽。

[0130] 公开了LS组合物、LS缀合物、LS分子、LS蛋白和LS肽。LS肽是LS组合物、LS缀合物、LS分子、LS蛋白等的基本特征。LS组合物是包含LS肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。LS缀合物是LS肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,LS缀合物可包含LS肽、LS蛋白、LS化合物、LS分子等。LS分子是包含LS肽的分子。例如,LS分子可包含LS蛋白、LS肽等。一般而言,LS肽、LS蛋白、LS分子和LS缀合物均是LS组合物的形式。LS化合物、LS肽和LS蛋白可以是LS

分子的形式。除非上下文另有说明,否则对LS组合物的提及旨在指代LS组合物、LS分子、LS蛋白、LS肽等。LS组分是包含LS肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。LS组分的一些实例包括例如LS组合物、LS分子、LS蛋白和LS肽。LS组分可包含一种或更多种LS肽。

[0131] 公开了LR组合物、LR缀合物、LR分子、LR蛋白和LR肽。LR肽是LR组合物、LR缀合物、LR分子、LR蛋白等的基本特征。LR组合物是包含LR肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。LR缀合物是LR肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,LR缀合物可包含LR肽、LR蛋白、LR化合物、LR分子等。LR分子是包含LR肽的分子。例如,LR分子可包含LR蛋白、LR肽等。一般而言,LR肽、LR蛋白、LR分子和LR缀合物均是LR组合物的形式。LR化合物、LR肽和LR蛋白可以是LR分子的形式。除非上下文另有说明,否则对LR组合物的提及旨在指代LR组合物、LR分子、LR蛋白、LR肽等。LR组分是包含LR肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。LR组分的一些实例包括例如LR组合物、LR分子、LR蛋白和LR肽。LR组分可包含一种或更多种LR肽。

[0132] 公开了RS组合物、RS缀合物、RS分子、RS蛋白和RS肽。RS肽是RS组合物、RS缀合物、RS分子、RS蛋白等的基本特征。RS组合物是包含RS肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。RS缀合物是RS肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,RS缀合物可包含RS肽、RS蛋白、RS化合物、RS分子等。RS分子是包含RS肽的分子。例如,RS分子可包含RS蛋白、RS肽等。一般而言,RS肽、RS蛋白、RS分子和RS缀合物均是RS组合物的形式。RS化合物、RS肽和RS蛋白可以是RS分子的形式。除非上下文另有说明,否则对RS组合物的提及旨在指代RS组合物、RS分子、RS蛋白、RS肽等。RS组分是包含RS肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。RS组分的一些实例包括例如RS组合物、RS分子、RS蛋白和RS肽。RS组分可包含一种或更多种RS肽。

[0133] 公开了LSR组合物、LSR缀合物、LSR分子、LSR蛋白和LSR肽。LSR肽是LSR组合物、LSR缀合物、LSR分子、LSR蛋白等的基本特征。LSR组合物是包含LSR肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。LSR缀合物是LSR肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,LSR缀合物可包含LSR肽、LSR蛋白、LSR化合物、LSR分子等。LSR分子是包含LSR肽的分子。例如,LSR分子可包含LSR蛋白、LSR肽等。一般而言,LSR肽、LSR蛋白、LSR分子和LSR缀合物均是LSR组合物的形式。LSR化合物、LSR肽和LSR蛋白可以是LSR分子的形式。除非上下文另有说明,否则对LSR组合物的提及旨在指代LSR组合物、LSR分子、LSR蛋白、LSR肽等。LSR组分是包含LSR肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。LSR组分的一些实例包括例如LSR组合物、LSR分子、LSR蛋白和LSR肽。LSR组分可包含一种或更多种LSR肽。

[0134] 公开了L/S组合物、L/S缀合物、L/S分子、L/S蛋白和L/S肽。L/S肽是L/S组合物、L/S缀合物、L/S分子、L/S蛋白等的基本特征。L/S组合物是包含L/S肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。L/S缀合物是L/S肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,L/S缀合物可包含L/S肽、L/S蛋白、L/S化合物、L/S分子等。L/S分子是包含L/S肽的分子。例如,L/S分子可包含L/S

蛋白、L/S肽等。一般而言，L/S肽、L/S蛋白、L/S分子和L/S缀合物均是L/S组合物的形式。L/S化合物、L/S肽和L/S蛋白可以是L/S分子的形式。除非上下文另有说明，否则对L/S组合物的提及旨在指代L/S组合物、L/S分子、L/S蛋白、L/S肽等。L/S组分是包含L/S肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。L/S组分的一些实例包括例如L/S组合物、L/S分子、L/S蛋白和L/S肽。L/S组分可包含一种或更多种L/S肽。

[0135] 公开了L/R组合物、L/R缀合物、L/R分子、L/R蛋白和L/R肽。L/R肽是L/R组合物、L/R缀合物、L/R分子、L/R蛋白等的基本特征。L/R组合物是包含L/R肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。L/R缀合物是L/R肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合（无论是共价的还是非共价的）。例如，L/R缀合物可包含L/R肽、L/R蛋白、L/R化合物、L/R分子等。L/R分子是包含L/R肽的分子。例如，L/R分子可包含L/R蛋白、L/R肽等。一般而言，L/R肽、L/R蛋白、L/R分子和L/R缀合物均是L/R组合物的形式。L/R化合物、L/R肽和L/R蛋白可以是L/R分子的形式。除非上下文另有说明，否则对L/R组合物的提及旨在指代L/R组合物、L/R分子、L/R蛋白、L/R肽等。L/R组分是包含L/R肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。L/R组分的一些实例包括例如L/R组合物、L/R分子、L/R蛋白和L/R肽。L/R组分可包含一种或更多种L/R肽。

[0136] 公开了S/R组合物、S/R缀合物、S/R分子、S/R蛋白和S/R肽。S/R肽是S/R组合物、S/R缀合物、S/R分子、S/R蛋白等的基本特征。S/R组合物是包含S/R肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。S/R缀合物是S/R肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合（无论是共价的还是非共价的）。例如，S/R缀合物可包含S/R肽、S/R蛋白、S/R化合物、S/R分子等。S/R分子是包含S/R肽的分子。例如，S/R分子可包含S/R蛋白、S/R肽等。一般而言，S/R肽、S/R蛋白、S/R分子和S/R缀合物均是S/R组合物的形式。S/R化合物、S/R肽和S/R蛋白可以是S/R分子的形式。除非上下文另有说明，否则对S/R组合物的提及旨在指代S/R组合物、S/R分子、S/R蛋白、S/R肽等。S/R组分是包含S/R肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。S/R组分的一些实例包括例如S/R组合物、S/R分子、S/R蛋白和S/R肽。S/R组分可包含一种或更多种S/R肽。

[0137] 公开了L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白和L/S/R肽。L/S/R肽是L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白等的基本特征。L/S/R组合物是包含L/S/R肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。L/S/R缀合物是L/S/R肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合（无论是共价的还是非共价的）。例如，L/S/R缀合物可包含L/S/R肽、L/S/R蛋白、L/S/R化合物、L/S/R分子等。L/S/R分子是包含L/S/R肽的分子。例如，L/S/R分子可包含L/S/R蛋白、L/S/R肽等。一般而言，L/S/R肽、L/S/R蛋白、L/S/R分子和L/S/R缀合物均是L/S/R组合物的形式。L/S/R化合物、L/S/R肽和L/S/R蛋白可以是L/S/R分子的形式。除非上下文另有说明，否则对L/S/R组合物的提及旨在指代L/S/R组合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白、L/S/R肽等。L/S/R组分是包含L/S/R肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。L/S/R组分的一些实例包括例如L/S/R组合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白和L/S/R肽。L/S/R组分可包含一种或更多种L/S/R肽。

[0138] 公开了F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白和F/T/F&T肽。F/T/F&T肽是F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白等的基本特征。F/T/F&T组合物是包含F/T/F&T肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。F/T/F&T

缀合物是F/T/F&T肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,F/T/F&T缀合物可包含F/T/F&T肽、F/T/F&T蛋白、F/T/F&T化合物、F/T/F&T分子等。F/T/F&T分子是包含F/T/F&T肽的分子。例如,F/T/F&T分子可包含F/T/F&T蛋白、F/T/F&T肽等。一般而言,F/T/F&T肽、F/T/F&T蛋白、F/T/F&T分子和F/T/F&T缀合物均是F/T/F&T组合物的形式。F/T/F&T化合物、F/T/F&T肽和F/T/F&T蛋白可以是F/T/F&T分子的形式。除非上下文另有说明,否则对F/T/F&T组合物的提及旨在指代F/T/F&T组合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白、F/T/F&T肽等。F/T/F&T组分是包含F/T/F&T肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。F/T/F&T组分的一些实例包括例如F/T/F&T组合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白和F/T/F&T肽。F/T/F&T组分可包含一种或更多种F/T/F&T肽。

[0139] 在所公开的FN-EDB肽的情况下,肽可提供归巢至具有FN-EDB的细胞和组织二者。例如,一些癌症和胞外基质具有FN-EDB。

[0140] 公开了FN-EDB组合物、FN-EDB缀合物、FN-EDB分子、FN-EDB蛋白和FN-EDB肽。FN-EDB肽是FN-EDB组合物、FN-EDB缀合物、FN-EDB分子、FN-EDB蛋白等的基本特征。FN-EDB组合物是包含FN-EDB肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。FN-EDB缀合物是FN-EDB肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,FN-EDB缀合物可包含FN-EDB肽、FN-EDB蛋白、FN-EDB化合物、FN-EDB分子等。FN-EDB分子是包含FN-EDB肽的分子。例如,FN-EDB分子可包含FN-EDB蛋白、FN-EDB肽等。一般而言,FN-EDB肽、FN-EDB蛋白、FN-EDB分子和FN-EDB缀合物均是FN-EDB组合物的形式。FN-EDB化合物、FN-EDB肽和FN-EDB蛋白可以是FN-EDB分子的形式。除非上下文另有说明,否则对FN-EDB组合物的提及旨在指代FN-EDB组合物、FN-EDB分子、FN-EDB蛋白、FN-EDB肽等。FN-EDB组分是包含FN-EDB肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。FN-EDB组分的一些实例包括例如FN-EDB组合物、FN-EDB分子、FN-EDB蛋白和FN-EDB肽。FN-EDB组分可包含一种或更多种FN-EDB肽。

[0141] 在所公开的TNC-C肽的情况下,肽可提供归巢至具有TNC-C的细胞和组织二者。例如,一些癌症和胞外基质具有TNC-C。

[0142] 公开了TNC-C组合物、TNC-C缀合物、TNC-C分子、TNC-C蛋白和TNC-C肽。TNC-C肽是TNC-C组合物、TNC-C缀合物、TNC-C分子、TNC-C蛋白等的基本特征。TNC-C组合物是包含TNC-C肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。TNC-C缀合物是TNC-C肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如,TNC-C缀合物可包含TNC-C肽、TNC-C蛋白、TNC-C化合物、TNC-C分子等。TNC-C分子是包含TNC-C肽的分子。例如,TNC-C分子可包含TNC-C蛋白、TNC-C肽等。一般而言,TNC-C肽、TNC-C蛋白、TNC-C分子和TNC-C缀合物均是TNC-C组合物的形式。TNC-C化合物、TNC-C肽和TNC-C蛋白可以是TNC-C分子的形式。除非上下文另有说明,否则对TNC-C组合物的提及旨在指代TNC-C组合物、TNC-C分子、TNC-C蛋白、TNC-C肽等。TNC-C组分是包含TNC-C肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。TNC-C组分的一些实例包括例如TNC-C组合物、TNC-C分子、TNC-C蛋白和TNC-C肽。TNC-C组分可包含一种或更多种TNC-C肽。

[0143] 公开了FN-EDB/TNC-C组合物、FN-EDB/TNC-C缀合物、FN-EDB/TNC-C分子、FN-EDB/TNC-C蛋白和FN-EDB/TNC-C肽。FN-EDB/TNC-C肽是FN-EDB/TNC-C组合物、FN-EDB/TNC-C缀合物、FN-EDB/TNC-C分子、FN-EDB/TNC-C蛋白等的基本特征。FN-EDB/TNC-C组合物是包含FN-

EDB/TNC-C肽的任何组合物、聚集物、缀合物、分子、蛋白质、肽等。FN-EDB/TNC-C缀合物是FN-EDB/TNC-C肽与一种或更多种其他要素、肽、蛋白质、化合物、分子、药剂、化合物等的缔合(无论是共价的还是非共价的)。例如, FN-EDB/TNC-C缀合物可包含FN-EDB/TNC-C肽、FN-EDB/TNC-C蛋白、FN-EDB/TNC-C化合物、FN-EDB/TNC-C分子等。FN-EDB/TNC-C分子是包含FN-EDB/TNC-C肽的分子。例如, FN-EDB/TNC-C分子可包含FN-EDB/TNC-C蛋白、FN-EDB/TNC-C肽等。一般而言, FN-EDB/TNC-C肽、FN-EDB/TNC-C蛋白、FN-EDB/TNC-C分子和FN-EDB/TNC-C缀合物均是FN-EDB/TNC-C组合物的形式。FN-EDB/TNC-C化合物、FN-EDB/TNC-C肽和FN-EDB/TNC-C蛋白可以是FN-EDB/TNC-C分子的形式。除非上下文另有说明, 否则对FN-EDB/TNC-C组合物的提及旨在指代FN-EDB/TNC-C组合物、FN-EDB/TNC-C分子、FN-EDB/TNC-C蛋白、FN-EDB/TNC-C肽等。FN-EDB/TNC-C组分是包含FN-EDB/TNC-C肽的任何分子、肽、蛋白质、化合物、缀合物、组合物等。FN-EDB/TNC-C组分的一些实例包括例如FN-EDB/TNC-C组合物、FN-EDB/TNC-C分子、FN-EDB/TNC-C蛋白和FN-EDB/TNC-C肽。FN-EDB/TNC-C组分可包含一种或更多种FN-EDB/TNC-C肽。

[0144] 在一些形式中, F/T/F&T组合物和载荷彼此不结合。在一些形式中, F/T/F&T组合物、载荷和/或载荷组合物可包含治疗剂。在一些形式中, F/T/F&T组合物、载荷和/或载荷组合物可包含可检测剂。在一些形式中, F/T/F&T组合物、载荷和/或载荷组合物可包含载体、载剂或二者。在一些形式中, F/T/F&T组合物、载荷和/或载荷组合物可包含治疗性蛋白质、治疗性化合物、治疗性组合物、促凋亡剂、促炎剂、免疫刺激剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗血管生成剂、促血管生成剂、癌症化学治疗剂、毒素、抗菌剂、细胞毒性剂、抗关节炎剂、生长因子、细胞因子、趋化因子、调节一种或更多种信号传导途径的化合物、抗体、核酸、核酸类似物、细胞、病毒、噬菌体、病毒颗粒、噬菌体颗粒、病毒衣壳、噬菌体衣壳、病毒样颗粒、脂质体、胶束、珠、纳米粒、微粒、化学治疗剂、造影剂、成像剂、标记、标记剂、或组合。

[0145] 在一些形式中, L/S/R组合物和载荷彼此不结合。在一些形式中, L/S/R组合物、载荷和/或载荷组合物可包含治疗剂。在一些形式中, L/S/R组合物、载荷和/或载荷组合物可包含可检测剂。在一些形式中, L/S/R组合物、载荷和/或载荷组合物可包含载体、载剂或二者。在一些形式中, L/S/R组合物、载荷和/或载荷组合物可包含治疗性蛋白质、治疗性化合物、治疗性组合物、促凋亡剂、促炎剂、免疫刺激剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗血管生成剂、促血管生成剂、癌症化学治疗剂、毒素、抗菌剂、细胞毒性剂、抗关节炎剂、生长因子、细胞因子、趋化因子、调节一种或更多种信号传导途径的化合物、抗体、核酸、核酸类似物、细胞、病毒、噬菌体、病毒颗粒、噬菌体颗粒、病毒衣壳、噬菌体衣壳、病毒样颗粒、脂质体、胶束、珠、纳米粒、微粒、化学治疗剂、造影剂、成像剂、标记、标记剂、或组合。

[0146] 在一些形式中, F/T/F&T组合物可包含一种或更多种辅助分子。在一些形式中, L/S/R组合物可包含一种或更多种辅助分子。

[0147] 多种不同的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、或组合可一起使用。类似地, 多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物、或组合可一起使用。当这样的多种不同的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、或组合一起使用时, 它们可与单一类型的载荷、单一类型的载荷组合物、多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物、或组合一起使用。类似地, 当多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物、或组合可一起使用时, 它们可与单一类型的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组

合物,或与多种不同的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、或组合一起使用。

[0148] 例如,PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 可与一种或多种不同的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、或组合,一种或多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物、或组合,或者这些的任意组合一起使用。在这样的组合中,PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 本身可与一种或更多种载荷组合物、一种或更多种辅助分子等在相同的缀合物或组合物中组合。

[0149] 多种不同的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、或组合可一起使用。类似地,多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物、或组合可一起使用。当这样的多种不同的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、或组合一起使用时,它们可与单一类型的载荷、单一类型的载荷组合物、多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物、或组合一起使用。类似地,当多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物、或组合可一起使用时,它们可与单一类型的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物,或与多种不同的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、或组合一起使用。

[0150] 例如,PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 可与一种或多种不同的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、或组合,一种或多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物、或组合,或者这些的任意组合一起使用。在这样的组合中,PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 本身可与一种或更多种载荷组合物、一种或更多种辅助分子等在相同的缀合物或组合物中组合。

[0151] F/T/F&T肽或L/S/R肽可包含在蛋白质或肽的氨基酸序列中。在一些形式中,当蛋白质或肽中存在氨基酸序列时,而不是当蛋白质或肽中不存在氨基酸序列时,蛋白质或肽可被靶向、递送或二者至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,当蛋白质或肽中存在氨基酸序列时,而不是当蛋白质或肽中不存在氨基酸序列时,蛋白质或肽可被靶向、递送或二者至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,氨基酸序列是蛋白质或肽中唯一的功能归巢分子。

[0152] F/T/F&T肽可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含F/T/F&T肽的氨基酸序列、蛋白质或肽的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与F/T/F&T肽或者包含F/T/F&T肽的氨基酸序列、蛋白质或肽共价偶联或非共价缔合。辅助分子可与F/T/F&T肽分开或重叠。例如,一些辅助分子是氨基酸序列。这可允许由F/T/F&T肽组成的氨基酸序列与由辅助氨基酸序列组成的氨基酸序列重叠。或者,辅助肽可以是不与F/T/F&T肽重叠的单独实体。在一些形式中,辅助分子可包含序列,例如在与不同于F/T/F&T肽的受体的特定受体结合的F/T/F&T肽中的序列。

[0153] L/S/R肽可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含L/S/R肽的氨基酸序列、蛋白质或肽的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与L/S/R肽或者包含L/S/R肽的氨基酸序列、蛋白质或肽共价偶联或非共价缔合。辅助分子可与L/S/R肽分开或重叠。例如,一些辅助分子是氨基酸序列。这可允许由L/S/R肽组成的氨基酸序列与由辅助氨基酸序列组成的氨基酸序列重叠。或者,辅助肽可以是不与L/S/R肽重叠的单独实体。在一些形式中,辅助分子可包含序列,例如在与不同于L/S/R肽的受体的特定受体结合的L/S/R肽中的序列。

[0154] 氨基酸序列可包含一种或更多种辅助肽。蛋白质或肽可包含一种或更多种辅助肽。在一些形式中,载荷不包含辅助分子。载荷可包含一种或更多种辅助分子。在一些形式中,载荷不包含辅助肽。载荷可包含一种或更多种辅助肽。载荷可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,载荷不会选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,载荷组合物不包含辅助分子。载荷组合物可包含一种或更多种辅助分子。在一些形式中,载荷组合物不包含辅助肽。载荷组合物可包含一种或更多种辅助肽。载荷组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,载荷组合物不会选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。

[0155] 肽可与一种或更多种治疗剂缔合。例如,治疗剂可以是包含肽的氨基酸序列、蛋白质或肽的一部分。作为另一个实例,治疗剂可与肽或者包含该肽的氨基酸序列、蛋白质或肽共价偶联或非共价缔合。治疗剂可与肽分开或重叠。例如,一些治疗剂是氨基酸序列。这可允许由肽组成的氨基酸序列与由治疗性氨基酸序列组成的氨基酸序列重叠。或者,治疗剂可以是不与肽重叠的单独实体。在一些形式中,治疗剂可包含序列,例如在与不同于肽的靶标的特定受体结合的肽中的序列。

[0156] 公开的肽归巢至特定细胞(具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织),并且许多归巢分子归巢至靶组织的脉管系统。然而,为了方便起见,归巢在本文中的一些地方是指归巢至与FN-EDB、TNC-C或二者,或者与肽或归巢肽实际上可归巢的脉管系统缔合的组织。因此,例如,归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的归巢肽在本文中可以是指归巢至肿瘤组织或肿瘤细胞。通过包含肽或归巢肽或者使肽或归巢肽与例如蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷或载荷组合物缔合,该蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷或载荷组合物可被靶向至或可归巢至肽或归巢肽的靶标。以这种方式,蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷或载荷组合物,或者可以说是归巢至肽或归巢肽的靶标。为了方便起见且除非另有说明,否则对蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷、载荷组合物等的归巢的提及旨在表明该蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷、载荷组合物等包含合适的肽或归巢肽或者与合适的肽或归巢肽缔合。

[0157] 在一些形式中,肽和载荷彼此不是共价偶联或直接非共价缔合。在一些形式中,载荷不包含肽。载荷可包含一种或更多种肽。在一些形式中,载荷不包含LI肽、SR肽、RLR肽或归巢肽。载荷可包含一种或更多种LI肽、SR肽、RLR肽或归巢肽。载荷可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,载荷不会选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。

[0158] 在一些形式中,肽和载荷组合物彼此不是共价偶联或直接非共价缔合。在一些形式中,载荷组合物不包含肽。载荷组合物可包含一种或更多种肽。在一些形式中,载荷组合物不包含LI肽、SR肽、RLR肽或归巢肽。载荷组合物可包含一种或更多种LI肽、SR肽、RLR肽或归巢肽。载荷组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,载荷组合物不会选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。

[0159] 如本文中所用,提及组分(例如F/T/F&T肽和载荷)为“不是共价偶联”意指组分不是通过共价键连接的(例如,F/T/F&T肽和载荷不是通过共价键连接的)。即,在例如F/T/F&T肽和载荷之间没有连续的共价键链。相反,提及组分(例如F/T/F&T肽和载荷组合物)为“共

价偶联”意指组分通过共价键连接(例如,F/T/F&T肽和载荷组合物通过共价键连接)。即,在例如F/T/F&T肽和载荷组合物之间存在连续的共价键链。组分可以直接或间接地共价偶联。直接共价偶联是指每个组分的原子之间存在共价键。间接共价偶联是指每个组分的原子之间不存在共价键。即,一些其他原子或不属于任一偶联组分的原子介于组分的原子之间。直接和间接共价偶联二者都涉及连续的共价键链。

[0160] 非共价缔合是指组分通过非共价键和相互作用的缔合。非共价缔合可以是直接的或间接的。直接非共价缔合是指涉及各自通过共价键链分别与组分连接的原子非共价键。因此,在直接非共价缔合中,没有其他分子介入缔合的组分之间。间接非共价缔合是指连接组分的任何分子链和键,其中组分不是共价偶联的(即,除了通过非共价键介于组分之间的组分外,至少有一个单独分子)。

[0161] 提及组分(例如F/T/F&T肽和载荷)为不是“非共价缔合”意指组分之间没有直接或间接的非共价缔合。即,例如,与F/T/F&T肽共价偶联的原子不参与具有与载荷共价偶联的原子非共价键。在这个意义上,F/T/F&T肽和载荷可一起在组合物中,其中它们通过多个居间的非共价键间接缔合,而不是非共价缔合,如该术语在本文中限定的那样。例如,F/T/F&T肽和载荷可在载体中混合在一起,其中它们不是直接非共价缔合。被称为非间接非共价缔合的F/T/F&T肽和载荷不可在连续组合物中混合在一起。提及组分(例如F/T/F&T肽和载荷)为不是“直接非共价缔合”意指组分之间没有直接非共价缔合(可存在间接非共价缔合)。提及组分(例如F/T/F&T肽和载荷)为不是“间接非共价缔合”意指组分之间没有直接或间接的非共价缔合。

[0162] 应理解,组分可通过包括直接和间接非共价缔合二者在内的多个链和路径非共价缔合。出于这些定义的目的,存在单个直接非共价缔合使缔合成为直接非共价缔合,即使还存在间接非共价缔合。类似地,组分之间存在共价连接意指组分是共价偶联的,即使还存在非共价缔合。还应理解,认为碰巧彼此之间缺乏任何非共价缔合的共价偶联组分不落入非共价缔合的组分的定义之内。

[0163] 在一些形式中,载荷不包含肽。载荷可包含肽。在一些形式中,载荷不包含归巢肽。载荷可包含归巢肽。载荷可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,载荷不会选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,载荷不包含辅助分子。载荷可包含辅助分子。在一些形式中,载荷不包含辅助肽。载荷可包含辅助肽。载荷可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。

[0164] F/T/F&T肽可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含F/T/F&T肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与F/T/F&T肽或者包含F/T/F&T肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。辅助分子可以是具有有用功能并且可与F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质和/或F/T/F&T肽组合使用的任何分子、化合物、组分等。有用的辅助分子的一些实例包括肽、靶向分子、亲和配体、细胞穿透分子、内体逃逸分子、亚细胞靶向分子、核靶向分子。不同的辅助分子彼此可具有相似或不同的功能。具有相似功能、不同功能或二者的辅助分子可与F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质和/或F/T/F&T肽缔合。

[0165] L/S/R肽可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含L/S/R肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与L/S/R肽或者包含L/S/R肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。辅助分子可以是具有有用功能并且可与L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白质和/或L/S/R肽组合使用的任何分子、化合物、组分等。有用的辅助分子的一些实例包括肽、靶向分子、亲和配体、细胞穿透分子、内体逃逸分子、亚细胞靶向分子、核靶向分子。不同的辅助分子彼此可具有相似或不同的功能。具有相似功能、不同功能或二者的辅助分子可与L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白质和/或L/S/R肽缔合。

[0166] 辅助分子可与F/T/F&T肽分开或重叠。例如,一些辅助分子是氨基酸序列。这可允许由F/T/F&T肽组成的氨基酸序列与由辅助氨基酸序列组成的氨基酸序列重叠。或者,辅助分子可以是不与F/T/F&T肽重叠的单独实体。在一些形式中,辅助分子可包含序列,例如在与不同于F/T/F&T肽的受体的特定受体结合的肽中的序列。

[0167] 辅助分子可与L/S/R肽分开或重叠。例如,一些辅助分子是氨基酸序列。这可允许由L/S/R肽组成的氨基酸序列与由辅助氨基酸序列组成的氨基酸序列重叠。或者,辅助分子可以是不与L/S/R肽重叠的单独实体。在一些形式中,辅助分子可包含序列,例如在与不同于L/S/R肽的受体的特定受体结合的肽中的序列。

[0168] F/T/F&T肽可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含F/T/F&T肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与F/T/F&T肽或者包含F/T/F&T肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。F/T/F&T缀合物可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含F/T/F&T缀合物的缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与F/T/F&T缀合物或者包含F/T/F&T缀合物的缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。F/T/F&T组合物可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含F/T/F&T组合物的组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与F/T/F&T组合物或包含F/T/F&T组合物的组合物共价偶联或非共价缔合。

[0169] L/S/R肽可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含L/S/R肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与L/S/R肽或者包含L/S/R肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。L/S/R缀合物可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含L/S/R缀合物的缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与L/S/R缀合物或者包含L/S/R缀合物的缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。L/S/R组合物可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含L/S/R组合物的组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与L/S/R组合物或包含L/S/R组合物的组合物共价偶联或非共价缔合。

[0170] 氨基酸序列可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含氨基酸序列的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与氨基酸序列或者包含该氨基酸序列的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。蛋白质或肽可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含肽的蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与肽或者包含该肽的蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。例如,辅助分子可以是包含蛋白质的

蛋白质、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与蛋白质或者包含该蛋白质的蛋白质、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。缀合物可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是缀合物或包含该缀合物的组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与缀合物或者包含该缀合物的缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。组合物可与一种或更多种辅助分子缔合。例如,辅助分子可以是包含组合物的组合物的一部分。作为另一个实例,辅助分子可与组合物或包含该组合物的组合物共价偶联或非共价缔合。

[0171] F/T/F&T肽可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含F/T/F&T肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与F/T/F&T肽或者包含F/T/F&T肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。肽可与F/T/F&T肽分开或重叠。例如,一些肽是氨基酸序列。这可允许由F/T/F&T肽组成的氨基酸序列与由归巢氨基酸序列组成的氨基酸序列重叠。或者,肽可以是不与F/T/F&T肽重叠的单独实体。在一些形式中,肽可包含序列,例如在与不同于F/T/F&T肽的受体的特定受体结合的F/T/F&T肽中的序列。

[0172] F/T/F&T缀合物可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含F/T/F&T缀合物的缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与F/T/F&T缀合物或者包含F/T/F&T缀合物的缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。F/T/F&T组合物可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含F/T/F&T组合物的组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与F/T/F&T组合物或包含F/T/F&T组合物的组合物共价偶联或非共价缔合。

[0173] L/S/R肽可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含L/S/R肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与L/S/R肽或者包含L/S/R肽的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。肽可与L/S/R肽分开或重叠。例如,一些肽是氨基酸序列。这可允许由L/S/R肽组成的氨基酸序列与由归巢氨基酸序列组成的氨基酸序列重叠。或者,肽可以是不与L/S/R肽重叠的单独实体。在一些形式中,肽可包含序列,例如在与不同于L/S/R肽的受体的特定受体结合的L/S/R肽中的序列。

[0174] L/S/R缀合物可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含L/S/R缀合物的缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与L/S/R缀合物或者包含L/S/R缀合物的缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。L/S/R组合物可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含L/S/R组合物的组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与L/S/R组合物或包含L/S/R组合物的组合物共价偶联或非共价缔合。

[0175] 氨基酸序列可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含氨基酸序列的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与氨基酸序列或者包含该氨基酸序列的氨基酸序列、蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。蛋白质或肽可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含肽的蛋白质、肽、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与肽或者包含该肽的蛋白质、肽、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。例如,肽可以是包含蛋白质的蛋白质、缀合物或组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与蛋白质或者包含该蛋白质的蛋白质、缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。缀合物可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是缀合物或包含该缀合物的组合物的一部分。作为另一个实例,肽可与缀合物或者包含该缀合物的缀合物或组合物共价偶联或非共价缔合。组合物可与一种或更多种肽缔合。例如,肽可以是包含组合物的组合物的一部分。

作为另一个实例,肽可与组合物或包含该组合物的组合物共价偶联或非共价缔合。

[0176] 可选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列。可选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的蛋白质或肽。可选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的缀合物。可选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的组合物。

[0177] F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型肿瘤的脉管系统。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至肿瘤或癌症的一个或更多个特定阶段。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至肿瘤或癌症的一个或更多个特定阶段的脉管系统。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型肿瘤的一个或更多个特定阶段。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型肿瘤的一个或更多个不同阶段的脉管系统。

[0178] L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型肿瘤的脉管系统。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至肿瘤或癌症的一个或更多个特定阶段。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至肿瘤或癌症的一个或更多个特定阶段的脉管系统。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型肿瘤的一个或更多个特定阶段。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物,或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型肿瘤的一个或更多个不同阶段的脉管系统。

[0179] F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质和F/T/F&T肽可以以任何合适的方式设计和生产。例如,在公开的F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分

子和F/T/F&T蛋白质中的F/T/F&T肽可通过选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列来设计或生产。

[0180] L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白质和L/S/R肽可以以任何合适的方式设计和生产。例如，在公开的L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子和L/S/R蛋白质中的L/S/R肽可通过选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列来设计或生产。

[0181] F/T/F&T肽可包含在氨基酸序列中。氨基酸序列可包含在蛋白质或肽中。F/T/F&T肽可包含在蛋白质或肽中。在一些形式中，当蛋白质或肽中存在氨基酸序列时，而不是当蛋白质或肽中不存在氨基酸序列时，蛋白质或肽可归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中，当蛋白质或肽中存在氨基酸序列时，而不是当蛋白质或肽中不存在氨基酸序列时，蛋白质或肽可归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中，当蛋白质或肽中存在F/T/F&T氨基酸序列时，而不是当蛋白质或肽中不存在F/T/F&T氨基酸序列时，蛋白质或肽可被内化到细胞中并穿透组织。

[0182] L/S/R肽可包含在氨基酸序列中。氨基酸序列可包含在蛋白质或肽中。L/S/R肽可包含在蛋白质或肽中。在一些形式中，当蛋白质或肽中存在氨基酸序列时，而不是当蛋白质或肽中不存在氨基酸序列时，蛋白质或肽可归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中，当蛋白质或肽中存在氨基酸序列时，而不是当蛋白质或肽中不存在氨基酸序列时，蛋白质或肽可归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中，当蛋白质或肽中存在L/S/R氨基酸序列时，而不是当蛋白质或肽中不存在L/S/R氨基酸序列时，蛋白质或肽可被内化到细胞中并穿透组织。

[0183] 氨基酸序列可与一种或更多种辅助分子缔合。蛋白质或肽可与一种或更多种辅助分子缔合。一种或更多种辅助分子可独立地是肽、靶向分子、亲和配体、细胞穿透肽、内体逃逸分子、亚细胞靶向分子、核靶向分子、或组合。一种或更多种辅助分子可以是肽。

[0184] 可选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列。

[0185] F/T/F&T肽可包含在F/T/F&T组合物中。F/T/F&T组合物可包含一种或更多种辅助分子。F/T/F&T组合物可包含一种或更多种载荷组合物。F/T/F&T组合物可包含一种或更多种肽。F/T/F&T肽可包含在F/T/F&T缀合物中。F/T/F&T缀合物可包含一种或更多种辅助分子。F/T/F&T缀合物可包含一种或更多种载荷组合物。F/T/F&T缀合物可包含一种或更多种肽。

[0186] L/S/R肽可包含在L/S/R组合物中。L/S/R组合物可包含一种或更多种辅助分子。L/S/R组合物可包含一种或更多种载荷组合物。L/S/R组合物可包含一种或更多种肽。L/S/R肽可包含在L/S/R缀合物中。L/S/R缀合物可包含一种或更多种辅助分子。L/S/R缀合物可包含一种或更多种载荷组合物。L/S/R缀合物可包含一种或更多种肽。

[0187] 本文中使用的“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列”是指选择、鉴定设计以靶向具有由氨基酸序列构成的蛋白质或肽的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织为特定意图的氨基酸序列，或者在其他情况下对该氨基酸序列进行分类。因此，例如，选择用于一些目的或能力而不是归巢至具有由氨基酸序列构成的蛋白质或肽的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织以及在没有归巢至具有由氨基酸序列构成的蛋白质或肽的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的意图的氨基酸序列不构成“选择用于归巢至

具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列”。选择用于一些目的或能力以及用于归巢至具有由氨基酸序列构成的蛋白质或肽的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列确实构成“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列”。因此,存在另外的目标或目的不改变:选择至少以归巢至具有由氨基酸序列构成的蛋白质或肽的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织为特定意图的氨基酸序列构成“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的氨基酸序列”。

[0188] 除非上下文另外说明,否则本文中使用的“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷”是指选择、鉴定设计以归巢至具有载荷和F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质或F/T/F&T肽二者的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织为特定意图的载荷和F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质或F/T/F&T肽,或者在其他情况下对其进行分类。因此,例如,选择用于一些目的或能力而不是归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织与进入选择的F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质或F/T/F&T肽组合以及没有归巢至具有载荷和F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质或F/T/F&T肽二者的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的意图的载荷不构成“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷”。选择用于一些目的或能力以及用于归巢至具有载荷的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷确实构成“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷”。因此,存在另外的目标或目的不改变:选择至少以归巢至具有载荷的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织为特定意图的载荷构成“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷”。

[0189] 除非上下文另外说明,否则本文中使用的“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷组合物”是指选择、鉴定设计以归巢至具有载荷组合物和F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质或F/T/F&T肽二者的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织为特定意图的载荷组合物和F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质或F/T/F&T肽,或者在其他情况下对其进行分类。因此,例如,选择用于一些目的或能力而不是归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织与进入选择的F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质或F/T/F&T肽组合以及没有归巢至具有载荷组合物和F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质或F/T/F&T肽二者的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的意图的载荷组合物不构成“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷组合物”。选择用于一些目的或能力以及用于归巢至具有载荷组合物的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷组合物确实构成“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷组合物”。因此,存在另外的目标或目的不改变:选择至少以归巢至具有载荷组合物的FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织为特定意图的载荷组合物构成“选择用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的载荷组合物”。

[0190] 本文中使用的“使化合物或组合物与其他事物共价偶联或直接非共价缔合”是指导致与其他事物不是共价偶联或直接非共价缔合的化合物或组合物变成或进入与其他事物共价偶联或直接非共价缔合的状态的任何作用。作为一个实例,使辅助分子与F/T/F&T肽共价偶联构成“使辅助分子与F/T/F&T肽共价偶联或直接非共价缔合”。作为另一个实例,将

作为不存在的概念开始并然后作为包含F/T/F&T肽与之偶联或缔合的事物的组合物的一部分合成的F/T/F&T肽构成“使F/T/F&T肽与事物共价偶联或直接非共价缔合”。例如,合成包含目的氨基酸序列和包含C-端元件的氨基酸序列二者的肽构成使目的氨基酸序列与包含C-端元件的氨基酸序列共价偶联或直接非共价缔合。然而,并且通常来说,作为“使目的氨基酸序列与包含C-端元件的氨基酸序列共价偶联或直接非共价缔合”的过程,合成天然包含目的氨基酸序列和包含C-端元件的氨基酸序列二者的蛋白质或肽可被排除。

[0191] 本文中使用的“使载荷与其他事物共价偶联或直接非共价缔合”是指导致与其他事物不是共价偶联或直接非共价缔合的载荷变成或进入与其他事物共价偶联或直接非共价缔合的状态的任何作用。更清楚地,“使载荷与其他事物共价偶联或直接非共价缔合”是指导致载荷和其他事物变成或进入共价偶联或直接非共价缔合的状态的任何作用。作为一个实例,使载荷与另一载荷共价偶联构成“使载荷与另一载荷共价偶联或直接非共价缔合”。作为另一个实例,将作为不存在的概念开始并然后作为包含载荷与之偶联或直接缔合的事物的组合物的一部分合成的载荷构成“使载荷与事物共价偶联或直接非共价缔合”。

[0192] 本文中使用的“使载荷组合物与其他事物共价偶联或直接非共价缔合”是指导致与其他事物不是共价偶联或直接非共价缔合的载荷组合物变成或进入与其他事物共价偶联或非共价缔合的状态的任何作用。更清楚地,“使载荷组合物与其他事物共价偶联或直接非共价缔合”是指导致载荷组合物和其他事物变成或进入共价偶联或直接非共价缔合的状态的任何作用。作为一个实例,使载荷组合物与另一载荷组合物共价偶联构成“使载荷组合物与另一载荷组合物共价偶联或直接非共价缔合”。作为另一个实例,将作为不存在的概念开始并然后作为包含载荷组合物与之偶联或直接缔合的事物的组合物的一部分合成的载荷组合物构成“使载荷组合物与事物共价偶联或直接非共价缔合”。

[0193] 载荷可以是,例如,具有治疗或诊断应用的纳米粒或分子或分子复合物。可用公开的肽靶向的治疗性载荷包括但不限于纳米粒、分子、分子复合物、促凋亡剂、免疫调节剂、促炎剂、免疫刺激剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗血管生成剂、促血管生成剂、癌症化学治疗剂、抗菌剂、细胞毒性剂、促细胞存活剂、细胞分化剂、神经保护剂、抗关节炎剂、抗病毒剂、或这些的组合。可用公开的肽靶向的治疗性载荷包括但不限于治疗性蛋白质、治疗性化合物、治疗性组合物、促凋亡剂、免疫调节剂、促炎剂、免疫刺激剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗血管生成剂、促血管生成剂、癌症化学治疗剂、毒素、抗菌剂、细胞毒性剂、抗关节炎剂、生长因子、细胞因子、趋化因子、调节一种或更多种信号传导途径的化合物、抗体、核酸、核酸类似物、细胞、病毒、噬菌体、病毒颗粒、噬菌体颗粒、病毒衣壳、噬菌体衣壳、病毒样颗粒、脂质体、胶束、珠、纳米粒、微粒、化学治疗剂、造影剂、成像剂、标记、标记剂、或组合。可用公开的肽靶向的诊断性载荷包括但不限于纳米粒、分子、分子复合物、MRI成像剂、放射成像剂、光学成像剂、分子标签(例如生物素)、荧光团、表位标签(可例如使用特定的分子测定检测的)、或这些的组合。

[0194] 载荷组合物可以是,例如,具有治疗或诊断应用的纳米粒或分子或分子复合物。可用公开的肽靶向的治疗性载荷组合物包括但不限于纳米粒、分子、分子复合物、促凋亡剂、免疫调节剂、促炎剂、免疫刺激剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗血管生成剂、促血管生成剂、癌症化学治疗剂、抗菌剂、细胞毒性剂、促细胞存活剂、细胞分化剂、神经保护剂、抗关节炎剂、抗病毒剂、或这些的组合。可用公开的肽靶向的治疗性载荷组合物包括但不限于治疗性蛋白

质、治疗性化合物、治疗性组合物、促凋亡剂、免疫调节剂、促炎剂、免疫刺激剂、抗炎剂、免疫抑制剂、抗血管生成剂、促血管生成剂、癌症化学治疗剂、毒素、抗菌剂、细胞毒性剂、抗关节炎剂、生长因子、细胞因子、趋化因子、调节一种或更多种信号传导途径的化合物、抗体、核酸、核酸类似物、细胞、病毒、噬菌体、病毒颗粒、噬菌体颗粒、病毒衣壳、噬菌体衣壳、病毒样颗粒、脂质体、胶束、珠、纳米粒、微粒、化学治疗剂、造影剂、成像剂、标记、标记剂、或组合。可用公开的肽靶向的诊断性载荷组合物包括但不限于纳米粒、分子、分子复合物、MRI成像剂、放射成像剂、光学成像剂、分子标签(例如生物素)、荧光团、表位标签(可例如使用特定的分子测定检测的)、或这些的组合。

[0195] 公开了多功能组合物,其除了L/S/R或F/T/F&T肽之外还包含例如辅助肽、与L/S/R或F/T/F&T肽融合的辅助肽、与L/S/R或F/T/F&T肽共价偶联或非共价缔合的辅助分子、与L/S/R或F/T/F&T肽融合的载荷组合物、和/或与L/S/R或F/T/F&T肽共价偶联或非共价缔合的载荷组合物。可将具有单独功能的另外的化合物添加至组合物。这样的多功能缀合物具有由组合物的不同部分赋予的至少两种功能,并且除了选择性归巢活性之外还可例如显示出抗炎活性或促凋亡活性。

[0196] 在与靶分子或组分结合的分子的情况下,“选择性结合”意指与非靶标相比,该分子优先与靶标结合。例如,与其他受体和蛋白质相比,该分子可优先与靶标受体结合。与例如具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织选择性结合的特征通常在于与非具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织以及其他细胞和组织的数种组织类型相比,与具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的结合至少是两倍高。分子的特征可在于,例如,与一种或更多种非靶标相比,以5倍、10倍、20倍或更多优先与靶标结合。例如,分子的特征可在于,例如,与数种或许多其他非具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织相比,或者与所有非肿瘤组织相比,以5倍、10倍、20倍或更多优先与具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织结合。作为另一个实例,分子的特征可在于,例如,与非具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织相比,或者与大多数或全部其他细胞和组织相比,以5倍、10倍、20倍或更多优先与具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织结合。因此,应理解,在一些情况下,分子除了与靶标结合之外还部分地与一种或更多种非靶标结合。

[0197] 分子通过组分与靶标结合通常意指该组分与靶标结合或是靶标的一部分,分子与组分结合,以及从而分子与靶标间接地结合或缔合。

[0198] 本文中使用的术语“归巢分子”意指在体内优先于正常组织选择性归巢至特定细胞或特定组织的任何分子。类似地,术语“归巢肽”或“归巢肽模拟物”意指在体内优先于正常组织选择性归巢至特定细胞或特定组织的肽。应理解,在体内选择性归巢至特定细胞或特定组织的归巢分子或可表现出优先归巢至特定细胞或特定组织。公开的F/T/F&T和L/S/R肽是归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的归巢分子的实例。

[0199] “选择性归巢”意指在体内,与非靶标相比,归巢分子优先与靶标结合。例如,与非具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织相比,归巢分子可优先与具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织结合。选择性归巢至,例如,具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的特征通常在于与非具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织以及其他细胞和组织的数种组织类型相比,在具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织周围的定位至少是两倍大。归巢分子的特征可在于,例如,与一种或更多种非靶标相比,以5倍、10倍、20倍或更多优先定位于靶标。例

如,归巢分子的特征可在于,例如,与数种或许多其他非具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织相比,或者与所有非肿瘤组织相比,以5倍、10倍、20倍或更多优先定位于具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。作为另一个实例,归巢分子的特征可在于,例如,与非具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织相比,或者与大多数或全部其他细胞和组织相比,以5倍、10倍、20倍或更多优先定位于具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。因此,应理解,在一些情况下,归巢分子除了归巢至靶组织之外还部分地归巢至与一个或更多个正常器官。选择性归巢也可被称为靶向。归巢分子所靶向的分子、蛋白质、细胞、组织等可被称为靶分子、靶蛋白质、靶细胞、靶组织等。

[0200] 在归巢分子识别其靶标和/或与其靶标结合的情况下的结合可以是指共价结合和非共价结合二者,例如其中归巢分子可通过共价和/或非共价结合与其靶标结合、连接或在其他情况下偶联。结合可以是高亲和力或低亲和力,优选高亲和力。可以有用的结合力的一些实例包括但不限于共价键、偶极相互作用、静电力、氢键、疏水相互作用、离子键和/或范德华力。

[0201] 表面分子可以以多种构型与组合物缔合并布置在组合物中。在一些形式中,表面分子可与多个肽、多个载荷分子或二者缔合、缀合和/或共价偶联。在一些形式中,表面分子可与多个肽缔合、缀合和/或共价偶联,其中肽可与多个载荷分子缔合、缀合和/或共价偶联。在一些形式中,表面分子可与多个载荷分子缔合、缀合和/或共价偶联,其中载荷分子可与多个肽缔合、缀合和/或共价偶联。也可使用这些组合的组合。

[0202] 本文中公开的表面分子,或者被称为表面颗粒,可以以将组合物递送至靶标的方式与肽和载荷分子缀合。表面分子可以是可与肽和载荷分子一起使用的任何物质,并且不受尺寸或物质的限制。一些实例包括但不限于纳米粒(例如铁氧化物纳米粒或白蛋白纳米粒)、脂质体、小有机分子、微粒或微泡,例如氟碳微泡。术语表面分子用于鉴定所公开组合物的组分,但不旨在进行限制。特别地,公开的表面分子不限于由单个分子构成的物质、化合物、组合物、颗粒或其他材料。相反,公开的表面分子是可与多个肽和载荷分子缀合的任何物质、化合物、组合物、颗粒和/或其他材料,使得至少一些肽和/或载荷分子在表面分子的表面上呈递和/或可接近表面分子的表面。本文中描述和公开了合适的表面分子的多个实例。

[0203] 表面分子可以是可检测的,或者可以是治疗剂,例如影响或调节巨噬细胞的药剂。在一些形式中,治疗剂抑制磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K) γ 基因的表达。在一些形式中,治疗剂抑制PI3K γ 。在一些形式中,治疗剂可以是PI3K γ 抑制剂(例如TG100-115)和TNF- α 。讨论可以是可检测的或治疗性的载荷分子和部分的本文中章节也应用于表面分子。

[0204] 术语“纳米粒”是指具有以纳米测量的尺寸的纳米级颗粒,例如,至少一个维度小于约100nm的纳米级颗粒。纳米粒的一些实例包括顺磁性纳米粒、超顺磁性纳米粒、金属纳米粒、纳米虫、类富勒烯材料、无机纳米管、树状聚合物(例如具有共价连接的金属螯合物)、纳米纤维、纳米角、纳米洋葱、纳米棒、纳米绳和量子点。纳米粒可产生可检测的信号,例如,通过光子(包括射频和可见光子)的吸收和/或发射以及等离子体共振。

[0205] 微球(或微泡)也可用于本文中公开的方法。包含发色团的微球已被用于广泛的多种应用,包括光子晶体、生物标记和微流体通道中的流动可视化。参见,例如,Y.Lin, et al., Appl. Phys. Lett. 2002, 81, 3134; D.Wang, et al., Chem. Mater. 2003, 15, 2724; X.Gao,

460-463 (1977)) 和 Houser et al., Surgery, Gynecology and Obstetrics, 150:811-816 (1980)) 并与交换输血联合治疗新生儿高胆红素血症 (参见, 例如, Finlayson, Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 6:85-120 (1980))。考虑了其他白蛋白, 例如牛血清白蛋白。使用这样的非人白蛋白可以是合适的, 例如, 在非人哺乳动物中使用这些组合物, 例如兽用 (包括家养宠物和农业环境) 的情况下。

[0212] 组合物中的载体蛋白 (例如白蛋白) 通常用作疏水性载荷分子的载体, 即, 与不包含载体蛋白的组合物相比, 组合物中的载体蛋白使载荷分子更容易悬浮于水性介质中或有助于维持悬浮。这可避免使用毒性溶剂 (或表面活性剂) 溶解载荷分子, 并且从而可降低向个体 (例如人) 施用载荷分子的一种或更多种副作用。因此, 在一些实施方案中, 本文中所述的组合物可基本上不含 (例如不含) 表面活性剂, 例如克列莫佛 (Cremophor) (包括 Cremophor EL[®] (BASF))。在一些实施方案中, 组合物可基本上不含 (例如不含) 表面活性剂。如果当向个体施用组合物时, 组合物中克列莫佛或表面活性剂的量不足以在个体中引起一种或更多种副作用, 则组合物“基本上不含克列莫佛”或“基本上不含表面活性剂”。

[0213] 本文中所述组合物中载体蛋白的量将根据组合物中的其他组分而变化。在一些实施方案中, 组合物、载荷、载荷组合物和/或 L/S/R 或 F/T/F&T 组合物可包含在水性悬浮液 (例如, 为稳定的胶体悬浮液形式 (例如稳定的纳米粒悬浮液)) 中足以使载荷分子稳定的量的载体蛋白。在一些实施方案中, 载体蛋白的量降低了载荷分子在水性介质中的沉降速率。对于含颗粒组合物, 载体蛋白的量还取决于载荷分子纳米粒的尺寸和密度。

[0214] 制备纳米粒组合物的方法是本领域已知的。例如, 包含载荷分子和载体蛋白 (例如白蛋白) 的纳米粒可在高剪切力 (例如, 声处理、高压均化等) 的条件下制备。这些方法公开于例如美国专利 No. 5,916,596; 6,506,405; 和 6,537,579 以及还公开于美国专利公布 No. 2005/0004002A1。

[0215] 简言之, 可将疏水性载体分子溶解于有机溶剂中, 并将该溶液添加至人血清白蛋白溶液。对混合物进行高压均化。然后可通过蒸发去除有机溶剂。获得的分散体可进一步冻干。合适的有机溶剂包括例如酮、酯、醚、氯化溶剂和本领域已知的其他溶剂。例如, 有机溶剂可以是二氯甲烷和氯仿/乙醇 (例如比例为 1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1 或 9:1)。

[0216] 纳米粒也可以是例如热生成纳米壳。本文中使用的“纳米壳”是具有被一个或更多个导电壳层包围的离散介电体或半导体核芯部分的纳米粒。美国专利 No. 6,530,944 在此通过引用整体并入本文, 因为其教导了制造和使用金属纳米壳的方法。靶向分子可与所公开组合物和/或载体连接。例如, 靶向分子可以是抗体或其片段、特定受体的配体、或与待靶向细胞的表面特异性结合的其他蛋白质。

[0217] 本文中使用的术语“脂质体”是指包含包围内部水性空间的外部脂质双层或多层膜的结构。脂质体可用于包装任何生物活性剂以递送至细胞。

[0218] 用于形成脂质体的材料和操作是本领域技术人员公知的。在适当的介质中分散之后, 广泛多种的磷脂溶胀、水合并形成具有将脂质双层隔开的水性介质层的多层同心双层囊泡。这些系统被称为多层脂质体或多层脂质囊泡 (“multilamellar lipid vesicle, MLV”), 并且直径为 10nm 至 100 μ m。这些 MLV 首次描述于 Bangham, et al., J Mol. Biol. 13: 238-252 (1965)。通常来说, 脂质或亲脂性物质溶解于有机溶剂中。当溶剂被去除时, 例如在

真空下通过旋转蒸发,脂质残余物在容器壁上形成膜。然后向膜添加通常包含电解质或亲水性生物活性材料的水性溶液。搅拌时产生大的MLV。当期望较小的MLV时,对较大的囊泡进行声处理,通过具有降低孔径的过滤器顺序过滤,或通过其他形式的机械剪切减小。还有一些技术,通过其可降低MLV的尺寸和层数量二者,例如通过加压挤出(Barenholz, et al., FEBS Lett. 99:210-214 (1979))。

[0219] 脂质体也可采用单层囊泡的形式,其通过对MLV进行更广泛的声处理来制备,并且由包围水性溶液的单个球状脂质双层组成。单层囊泡(“unilamellar vesicle, ULV”)可以是小的,直径为20至200nm,而较大的ULV的直径可以为200nm至2 μ m。有数种用于制备单层囊泡的公知技术。在Papahadjopoulos, et al., Biochim et Biophys Acta 135:624-238 (1968)中,磷脂水性分散体的声处理产生具有包围水性溶液的脂质双层的小ULV。Schneider, 美国专利No. 4,089,801描述了通过超声处理形成脂质体前体,随后添加含有两亲化合物的水性介质并离心以形成生物分子脂质层系统。

[0220] 也可通过Batzri, et al., Biochim et Biophys Acta 298:1015-1019 (1973)描述的乙醇注射技术和Deamer, et al., Biochim et Biophys Acta 443:629-634 (1976)的乙醚注射技术来制备小的ULV。这些方法涉及将脂质的有机溶液迅速注射到缓冲溶液中,这导致单层脂质体的迅速形成。在“Liposome Technology”, ed. G. Gregoriadis, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla., Vol. I, Chapter 7, pg. 79-107 (1984)中Weder, et al.教导了另一种用于制备ULV的技术。这种洗涤剂去除方法涉及通过搅拌或声处理用洗涤剂溶解脂质和添加剂以产生期望的囊泡。

[0221] Papahadjopoulos, et al., 美国专利No. 4,235,871描述了通过反相蒸发技术来制备大的ULV,该技术涉及在有机溶剂中形成脂质的油包水乳液并将药物包封在水性缓冲溶液中。在压力下去除有机溶剂以产生混合物,其在在水性介质中搅拌或分散之后转化为大的ULV。Suzuki et al., 美国专利No. 4,016,100描述了另一种通过冷冻/解冻试剂和脂质的水性磷脂分散体而将试剂包封在单层囊泡中的方法。

[0222] 除了MLV和ULV之外,脂质体也可以是多囊泡的。在Kim, et al., Biochim et Biophys Acta 728:339-348 (1983)中描述了这些多囊泡脂质体是球状的并且包含内部颗粒结构。外膜是脂质双层,而内部区域包含由双层隔膜分开的小区室。还有另一种类型的脂质体是寡层囊泡(“oligolamellar vesicle, OLV”),其具有由数个周围脂质层包围的大的中心区室。这些直径为2至15 μ m的囊泡描述于Callo, et al., Cryobiology 22(3):251-267 (1985)。

[0223] Mezei, et al., 美国专利No. 4,485,054和4,761,288也描述了制备脂质囊泡的方法。最近,Hsu, 美国专利No. 5,653,996描述了利用雾化制备脂质体的方法,并且Yiournas, et al., 美国专利No. 5,013,497描述了用于利用高速剪切混合室制备脂质体的方法。还描述了使用特定起始材料产生ULV (Wallach, et al., 美国专利No. 4,853,228) 或OLV (Wallach, 美国专利No. 5,474,848和5,628,936)的方法。

[0224] 对所有上述脂质囊泡及其制备方法的全面综述描述于“Liposome Technology”, ed. G. Gregoriadis, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla., Vol. I, II&III (1984)。描述了适用于本发明的多种脂质囊泡的该参考文献和前述参考文献通过引用并入本文。

[0225] 本文中使用的“胶束”是指包含外脂质单层的结构。当超过临界胶束浓度

(Critical Micelle Concentration, CMC) 时, 可在水性介质中形成胶束。通常认为在约为临界胶束浓度 (CMC) 的稀溶液中的小胶束是球状的。然而, 在其他条件下, 其可呈扭曲的球、盘、棒、层等形状。由相对低分子量的两亲分子形成的胶束可具有高的 CMC, 因此形成的胶束在稀释之后相当迅速地解离。如果这是不期望的, 可使用具有大疏水区的两亲分子。例如, 可使用具有长脂肪酸链或两条脂肪酸链的脂质, 例如磷脂和鞘脂, 或聚合物, 特别是嵌段共聚物。

[0226] 已制备出表现出低至 10^{-6} M (摩尔) 的 CMC 的聚合物胶束。因此, 其趋于非常稳定, 同时显示出与两亲胶束相同的有益特征。本领域目前已知的任何胶束形成聚合物或在未来可变得已知的任何胶束形成聚合物均可用于所公开组合物和方法中。胶束形成聚合物的一些实例包括但不限于甲氧基聚(乙二醇)-b-聚(ϵ -己内酯)、聚(乙二醇)与磷脂酰乙醇胺的缀合物、聚(乙二醇)-b-聚酯、聚(乙二醇)-b-聚(L-氨基酸)、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)-b1-聚(原酸酯)、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)-b-聚酐和聚(N-乙烯基吡咯烷酮)-b-聚(丙烯酸烷基酯)。

[0227] 胶束可通过本领域的常规方法产生。这样的一些实例描述于例如, Liggins (Liggins, R.T. and Burt, H.M., "Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations." Adv. Drug Del. Rev. 54:191-202, (2002)); Zhang, et al. (Zhang, X. et al., "Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol." Int. J. Pharm. 132:195-206, (1996)) 和 Churchill (Churchill, J.R., and Hutchinson, F.G., "Biodegradable amphipathic copolymers." 美国专利 No. 4,745,160, (1988))。在一种这样的方法中, 聚醚-聚酯嵌段共聚物 (其是具有亲水 (聚醚) 和疏水 (聚酯) 段的两亲聚合物) 用作胶束形成载体。

[0228] 可使用例如描述于例如以下中的具有亲水段和疏水段二者的 AB 型嵌段共聚物来形成另一种类型的胶束: Tuzar (Tuzar, Z. and Kratochvil, P., "Block and graft copolymer micelles in solution." Adv. Colloid Interface Sci. 6:201-232, (1976)) 和 Wilhelm, et al. (Wilhelm, M. et al., "Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study." Macromolecules 24:1033-1040 (1991))。这些聚合物胶束能够保持令人满意的水性稳定性。这些尺寸在约 <200 nm 范围内的胶束可有效降低非选择性 RES 清除并显示出增强的渗透性和保留。

[0229] 此外, Kataoka, et al. 的美国专利 No. 5,929,177 描述了聚合物分子, 其尤其可用作药物递送载体。胶束由在其两端均具有官能团并且包含亲水/疏水段的嵌段共聚物形成。嵌段共聚物末端的聚合物官能团包括 α -末端上的氨基、羧基和巯基以及 ω -末端上的羟基、羧基、醛基和乙烯基。亲水段包含聚环氧乙烷, 而疏水段来源于丙交酯、内酯或(甲基)丙烯酸酯。

[0230] 此外, 例如, 可使用 MePEG 1900 和 5000 制备聚(D,L-丙交酯)-b-甲氧基聚乙二醇 (MePEG:PDLLA) 二嵌段共聚物。使用辛酸亚锡 (0.25%) 作为催化剂可使反应在 160°C 下进行 3 小时。然而, 如果允许反应进行约 6 小时, 则可使用低至 130°C 的温度, 或者如果反应进行仅约 2 小时, 则可使用高至 190°C 的温度。

[0231] 作为另一个实例,N-异丙基丙烯酰胺(“IPAAm”) (Kohjin,Tokyo,Japan) 和二甲基丙烯酰胺(“DMAAm”) (Wako Pure Chemicals,Tokyo,Japan) 可用于在使用Kohori,F.et al. (1998) 的方法的自由基聚合过程中制备羟基封端的聚(IPAAm-共-DMAAm) (Kohori,F.et al.,“Preparation and characterization of thermally Responsive block copolymer micelles comprising poly(N-isopropylacrylamide-b-D,L-lactide).” J.Control.Rel.55:87-98, (1998))。获得的共聚物可溶解于冷水中,并通过截留分子量为10,000和20,000的两种超滤膜过滤。首先将聚合物溶液通过20,000截留分子量的膜过滤。然后将滤液再次通过10,000截留分子量的膜过滤。可获得三种分子量级分作为结果,低分子量级分、中分子量级分和高分子量级分。然后可通过来自中分子量级分的聚(IPAAm-共-DMAAm) 的末端羟基的D,L-丙交酯的开环聚合来合成嵌段共聚物。所得聚(IPAAm-共-DMAAm)-b-聚(D,L-丙交酯) 共聚物可如Kohori,F.et al. (1999) 中所述进行纯化(Kohori,F.et al.,“Control of adriamycin cytotoxic activity using thermally responsive polymeric micelles composed of poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide).-”,Colloids Surfaces B:Biointerfaces 16:195-205, (1999))。

[0232] 可从其制备胶束并用于涂覆支持物表面的嵌段共聚物的一些实例见于Kataoka, et al.的美国专利No.5,925,720、Sakarai,et al.的美国专利No.5,412,072、Kataoka,et al.的美国专利No.5,410,016、Kataoka,et al.的美国专利No.5,929,177、Sakurai,et al.的美国专利No.5,693,751、Yokoyama,et al.的美国专利No.5,449,513、WO 96/32434、WO 96/33233和WO 97/0623,其全部内容通过引用并入。其修饰,通过在其上引入合适的官能团(包括烯键式不饱和可聚合基团) 制备,也是从其优选地制备本发明胶束的嵌段共聚物的一些实例。优选的嵌段共聚物是上述专利和或国际专利公布中公开的那些。如果嵌段共聚物在亲水性聚合物段的一端具有糖残基,如在WO 96/32434的嵌段共聚物中那样,则糖残基应优选进行马拉普拉德(Malaprade) 氧化以使得可形成相应的醛基。

[0233] 脂质是合成或天然存在的分子,其包括脂肪、蜡、固醇、孕烯醇酮脂质(prenol lipid)、脂溶性维生素(例如维生素A、D、E和K)、甘油脂质、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、甘油磷脂、鞘脂、磷脂、脂肪酸甘油单酯、糖脂等。脂质可以是疏水性或两亲性小分子;一些脂质的两亲性质允许其在适当的环境,即水性环境中形成结构,例如单层、囊泡、胶束、脂质体、双层或膜。许多脂质中的任一种都可用作两亲分子,包括两亲、中性、阳离子和阴离子脂质。这样的脂质可单独或组合使用,并且还可包括双层稳定组分,例如聚酰胺寡聚物(参见,例如,Ansell的美国专利No.6,320,017,“Polyamide Oligomers”)、肽、蛋白质、洗涤剂、脂质-衍生物,例如与磷脂酰乙醇胺偶联的PEG和与神经酰胺缀合的PEG(参见美国专利No.5,885,613)。在一个优选实施方案中,也可包括降低宿主免疫系统对脂质体的消除的隐身剂(cloaking agent),例如聚酰胺-寡聚物缀合物,例如ATTA-脂质(参见,1998年2月2日提交的美国专利申请序列号08/996,783) 和PEG-脂质缀合物(参见美国专利No.5,820,873、5,534,499和5,885,613)。

[0234] 可包括许多中性脂质中的任一种,其是指在生理pH下以不带电或中性两性离子形式存在的许多脂质种类中的任一种,包括二酰磷脂酰胆碱、二酰磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰甘油。

[0235] 阳离子脂质在生理pH下带有净正电荷,可容易地用作两亲分子。这样的脂质包括但不限于N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(“DODAC”);N-(2,3-二油氧基)丙基-N,N,N-三乙基氯化铵(“DOTMA”);N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(“DDAB”);N-(2,3-二油酰基)丙基-N,N,N-三甲基氯化铵(“DOTAP”);3.β-(N-(N',N'-二甲氨基乙烷)-氨甲酰基)胆固醇(“DC-Chol”);N-(1-(2,3-二油氧基)丙基)-N-2-(精胺甲酰胺基)乙基-N,N-二甲基-三氟乙酸铵(“DOSPA”);二十八烷基氨基甘氨酸羧基精胺(“DOGS”);1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(“DOPE”);1,2-二油酰基-3-二甲基丙烷铵(“DODAP”)和N-(1,2-二肉豆蔻基氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(“DMRIE”)。另外,可使用许多阳离子脂质的商业制剂,例如LIPOFECTIN(包含DOTMA和DOPE,可从GIBCO/BRL获得)、LIPOFECTAMINE(包含DOSPA和DOPE,可从GIBCO/BRL获得)和TRANSFECTAM(包含DOGS,在乙醇中,来自Promega Corp.)。

[0236] 阴离子脂质可用作两亲分子,并且包括但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰磷脂酰丝氨酸、二酰磷脂酸、N-十二酰磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酸磷脂酰甘油和与中性脂质连接的其他阴离子改性基团。

[0237] 两亲脂质也可以是合适的两亲分子。“两亲脂质”是指任何合适的材料,其中脂质材料的疏水部分朝向疏水相,而亲水部分朝向水相。这样的化合物包括但不限于脂肪酸、磷脂、氨基脂和鞘脂。代表性的磷脂包括鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱或二亚油酰磷脂酰胆碱。还可使用其他缺磷化合物,例如鞘脂、鞘糖脂家族、二酰甘油和β-酰氧基酸。另外,这样的两亲脂质可容易地与其他脂质,例如甘油三酯和固醇混合。两性离子脂质是两亲性脂质的一种形式。

[0238] 鞘脂是与脂肪族氨基醇鞘氨醇缀合的脂肪酸。脂肪酸可通过酰胺键与鞘氨醇共价结合。如上所述的任何氨基酸都可与鞘氨醇共价结合以形成鞘脂。鞘脂可通过α-羟基通过共价键进一步修饰。修饰可包括烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、环基、杂环基、膦基团。鞘脂的一些非限制性实例是N-酰基鞘氨醇、N-酰基鞘磷脂、福斯曼抗原(Forssman antigen)。

[0239] 糖脂是包含脂肪酸和糖二者的化合物。脂肪酸与糖骨架共价结合。糖主链可包含一种或更多种糖。脂肪酸可通过酰胺键或酯键与糖结合。糖可以是任何糖基。脂肪酸可以是如本文中其他地方所述的任何脂肪酸。所提供的组合物可包含天然或合成糖脂。非限制性糖脂是UDP-3-O-(β-羟基肉豆蔻酰基)-GlcNAc、脂质IVA、Kdo2-脂质A。

[0240] 所公开组合物、载荷、载荷组合物和L/S/R或F/T/F&T组合物可包含一种或更多种载荷分子。通常来说,所公开组合物可包含多个载荷分子。所公开组合物可包含单一类型的载荷分子或多个不同类型的载荷分子。因此,例如,所公开组合物可包含多个不同类型的载荷分子,其中可存在多个一种或更多种不同类型的载荷分子。

[0241] 载荷分子可以是期望使用所公开组合物递送的任何化合物、分子、缀合物、组合物等。例如,载荷分子可以是治疗剂、可检测剂、或组合。例如,载荷分子可以是促凋亡分子、免疫调节分子、促炎分子、免疫刺激分子、抗炎分子、免疫抑制分子、促凋亡分子、孔生成分子、抗微生物分子、影响线粒体的分子、线粒体靶向分子、或组合。一些有用的载荷分子的一些实例在下文和本文中其他地方描述。在一些形式中,治疗剂抑制磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)γ基因的表达。在一些形式中,治疗剂抑制PI3Kγ。在一些形式中,治疗剂可以是PI3Kγ抑制剂(例如TG100-115)和TNF-α。

[0242] 载荷分子可以以多种构型与组合物缔合并布置在组合物中。在一些形式中,载荷分子可与多个表面分子缔合、缀合和/或共价偶联。在一些形式中,载荷分子可与多个肽缔合、缀合和/或共价偶联。在一些形式中,载荷分子可与多个肽缔合、缀合和/或共价偶联,其中肽可与多个表面分子缔合、缀合和/或共价偶联。也可使用这些组合的组合。

[0243] 膜扰动分子包括可破坏膜、可在膜上形成孔、可使膜渗漏、可被靶向或影响胞内膜或细胞器(例如线粒体或溶酶体)的分子。一些形式的膜扰动分子可以是促凋亡的,而其他形式的可以是非凋亡的。一些形式的膜扰动分子仅对一些类型的细胞可以是促凋亡的。

[0244] 在一些形式中,组合物还可包含表面分子和多种膜扰动分子。在一些形式中,一种或更多种膜扰动分子可包含氨基酸序列_D(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6)或其保守变体、(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6)或其保守变体、(KLAKKLA)₂(SEQ ID NO:17)或其保守变体、(KAACKAA)₂(SEQ ID NO:18)或其保守变体、(KLGKKLG)₃(SEQ ID NO:19)或其保守变体、或组合。在一些形式中,一种或更多种膜扰动分子可包含氨基酸序列_D(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6)、(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6)、(KLAKKLA)₂(SEQ ID NO:17)、(KAACKAA)₂(SEQ ID NO:18)或(KLGKKLG)₃(SEQ ID NO:19)、或组合。在一些形式中,一种或更多种膜扰动分子可包含氨基酸序列_D(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6)或其保守变体。在一些形式中,一种或更多种膜扰动分子可包含氨基酸序列_D(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6)。

[0245] 多种经修饰和/或未经修饰的膜扰动分子可各自独立地选自,例如,包含经修饰或未经修饰形式的归巢肽的氨基酸序列的氨基酸段,包含经修饰或未经修饰形式的氨基酸序列_D(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6)、(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6)、(KLAKKLA)₂(SEQ ID NO:17)、(KAACKAA)₂(SEQ ID NO:18)、(KLGKKLG)₃(SEQ ID NO:19)的氨基酸段、或组合。多种膜扰动分子可各自独立地包含含有经修饰或未经修饰形式的归巢肽的氨基酸序列的氨基酸段。

[0246] 组合物、载荷、载荷组合物和/或L/S/R或F/T/F&T组合物可包含足够数量和组成的膜扰动分子(经修饰或未经修饰),使得组合物对靶标具有膜扰动作用。在一个实例中,可通过评估膜破坏、细胞凋亡和/或对靶标的治疗作用来确定经修饰和/或未经修饰的膜扰动分子的数量和组成的充足性。

[0247] 组合物、载荷、载荷组合物和/或L/S/R或F/T/F&T组合物可包含任何数量的经修饰和/或未经修饰的膜扰动分子。举例来说,组合物、载荷、载荷组合物和/或L/S/R或F/T/F&T组合物可包含至少1、5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、625、750、775、800、825、850、875、900、925、950、975、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2250、2500、2750、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、15,000、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、75,000或100,000或更多经修饰和/或未经修饰的膜扰动分子。组合物还可包含在上面列出的那些数量之间的任何数量。

[0248] 膜扰动分子可以以多种构型与组合物缔合并布置在组合物中。在一些形式中,膜扰动分子可与多个表面分子缔合、缀合和/或共价偶联。在一些形式中,膜扰动分子可与多个归巢分子缔合、缀合和/或共价偶联。在一些形式中,膜扰动分子可与多个归巢分子缔合、缀合和/或共价偶联,其中归巢分子可与多个表面分子缔合、缀合和/或共价偶联。也可使用这些组合的组合。

[0249] 公开的膜扰动分子可包括经修饰形式的膜扰动分子。膜扰动分子可具有任何有用的修饰。例如，一些修饰可稳定膜扰动分子。例如，公开的膜扰动分子包括甲基化的膜扰动分子。当膜扰动分子包含蛋白质、肽或氨基酸段时，甲基化的膜扰动分子特别有用。例如，膜扰动分子可以是经修饰的膜扰动分子，其中，例如，经修饰的膜扰动分子包含经修饰的氨基酸段或氨基酸序列。例如，经修饰的膜扰动分子可以是甲基化的膜扰动分子，其中，例如，甲基化的膜扰动分子包括甲基化的氨基酸段或氨基酸序列。可单独或组合使用其他修饰。当膜扰动分子是，或包含蛋白质、肽、氨基酸段和/或氨基酸序列时，修饰可对蛋白质、肽、氨基酸段、氨基酸序列和/或蛋白质、肽、氨基酸段和/或氨基酸序列中的任何氨基酸进行。氨基酸和肽修饰是本领域技术人员已知的，其中一些在下文和本文中其他地方描述。甲基化是对公开的膜扰动分子特别有用的修饰。使用经修饰形式的膜扰动分子可提高其有效性。

[0250] 所公开组合物、表面分子、载荷分子、肽、蛋白质、氨基酸序列等可包含一种或更多种内化元件、组织穿透元件或二者。内化元件和组织穿透元件可并入到组合物的其他肽组分中或与组合物的其他肽组分融合，所述组合物的其他肽组分例如肽归巢分子和肽载荷分子。内化元件是分子，通常是肽或氨基酸序列，其允许内化元件和与其缔合的组分穿过生物膜。组织穿透元件是分子，通常是肽或氨基酸序列，其允许组织穿透元件和与其缔合的组分进入和通过组织。

[0251] 内化元件包括，例如细胞穿透肽 (cell-penetrating peptide, CPP) 和 CendR 元件。内化到细胞中的肽通常被称为细胞穿透肽。这样的肽有两种主要类别：疏水性和阳离子性 (Zorko and Langel, 2005)。通常用于将核酸、蛋白质引入细胞中的阳离子肽包括原型细胞穿透肽 (CPP)、Tat 和穿透素 (penetratin) (Derossi et al., 1998; Meade and Dowdy, 2007)。疱疹病毒蛋白 VP22 能够进入和离开细胞二者并携带载荷 (Elliott and O'Hare, 1997; Brewis et al., 2003)。

[0252] 多种组合物可通过 CendR 机制内化 (美国申请公布 No. 2010/0322862)。CendR 途径也可用于目的组合物从脉管系统中离开并扩散到组织中。C-端元件可导致组合物从脉管系统扩散 (例如，并且因此可通过静脉内注射扩散到肿瘤组织中)。CendR 元件还可用于介导目的组合物通过其他具有 CendR 能力的膜，例如黏膜和血脑屏障。本文中使用的“组织穿透”和“组织的穿透”是指穿过组织之外或通过第一层细胞的外部或通过组织膜。这样的穿过或穿透组织 (其也可被称为外渗和组织穿透) 可以是例如细胞内化和穿过组织中细胞之间的功能。在本申请通篇，当使用术语“组织穿透”时，应理解，这样的穿透还可扩展到其他屏障和见于遍布身体的具有 CendR 能力的膜，例如血脑屏障。肽可以是可激活肽。可激活肽可以是蛋白酶-可激活肽。

[0253] 可通过分子、缀合物和/或组合物帮助或完成所公开组合物的组分的缔合。当这样的分子、缀合物和/或组合物不是 L/S/R 或 F/T/F&T 肽、表面分子、归巢分子、辅助分子、载荷、载荷组合物或载荷分子 (如膜扰动分子、内化元件、组织穿透元件和/或部分)，它们在本文中可被称为接头。这样的接头可以是可用于缔合所公开组合物的组分的任何分子、缀合物、组合物等。通常来说，接头可用于将除表面分子之外的组分与表面分子缔合。有用的接头包括生物相容的、具有低生物活性、具有低抗原性等的材料。即，这样的有用的接头材料可起到连接/缔合功能而不会向所公开组合物添加不期望的生物反应性。许多这样的材料是已知的并且用于类似的连接和缔合功能。聚合物材料是接头材料的特别有用的形式。例如，可使用

聚乙二醇。

[0254] 接头可用于实现表面分子上组分(例如肽和辅助分子)的有用数量和密度。例如,纤维形式的接头可用于提高每个表面分子或每给定表面分子面积的组分数目。类似地,具有分支形式的接头可用于提高每个表面分子或每给定表面分子面积的组分数目。接头也可具有分支纤维形式。

[0255] 组合物中肽的数量和组成的充足性可通过评估在非人动物中归巢至靶标和有效递送载荷分子来确定。组合物、载荷、载荷组合物和/或L/S/R或F/T/F&T组合物可包含足够数量和组成的肽(经修饰或未经修饰的)以使得组合物归巢至靶标并有效地递送载荷分子。在一个实例中,经修饰和/或未经修饰肽的数量和组成的充足性可通过评估载荷递送和/或对靶标的治疗作用来确定。

[0256] 组合物、载荷、载荷组合物和/或L/S/R或F/T/F&T组合物可包含足够密度和组成的肽以使得组合物归巢至靶标并有效地递送载荷分子。肽的密度和组成的充足性可通过评估在非人动物中载荷递送和/或对靶标的治疗作用来确定。

[0257] 可以以任何合适的方式描述表面分子上肽的密度。例如,密度可表示为每例如表面分子的给定面积、表面积、体积、单位、亚单位、臂等的肽的数量。密度还可相对于例如整个表面分子的面积、表面积、体积、单位、亚单位、臂等或相对于表面分子的一部分的面积、表面积、体积、单位、亚单位、臂等。例如,足够密度的肽可存在于表面分子的一部分中。因此,具有足够密度的肽的组合物对于整个表面分子或对于表面分子的仅一个或更多部分可具有阈值密度(或以上)。除非另有说明,否则密度是指表面分子指定部分的平均密度。例如,每平方nm表面分子的1个肽的密度是指在表面分子上肽的平均密度。作为另一个实例,每平方nm表面分子一部分的1个肽的密度是指在表面分子的仅该部分上的肽的平均密度。

[0258] 可以以任何合适的方式测量或计算密度。例如,存在于表面分子或表面分子组上的肽的数量或量可通过例如检测由标记肽产生的信号的水平或强度并基于表面的结构特征计算密度来测量。

[0259] 肽的密度或阈值密度可以是例如至少0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个肽/平方nm的整个或部分表面分子。组合物还可包含在上面列出的那些密度之间的任何密度。

[0260] 肽的密度或阈值密度可以是例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、4200、4400、4600、4800、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000个肽/平方 μm^2 的整个或部分表面分子。组合物还可包含在上面列出的那些密度之间的任何密度。

[0261] 肽的密度或阈值密度可以是例如至少0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个肽/每立方nM的整个或部分表面分子。组合物还可包含在上面列出的那些密度之间的任何密度。

[0262] 肽的密度或阈值密度可以是例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、4200、4400、4600、4800、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、900、9500、10,000个肽/立方 μ M的整个或部分表面分子。组合物还可包含在上面列出的那些密度之间的任何密度。

[0263] 这样的密度测量和考虑也可应用于所公开组合物除肽之外的任何组分。

[0264] 可以以任何合适的方式描述表面分子上肽的数量。例如，数量可表示为每例如表面分子的给定面积、表面积、体积、单位、亚单位、臂等的肽的数量。数量还可相对于例如整个表面分子的面积、表面积、体积、单位、亚单位、臂等或相对于表面分子的一部分的面积、表面积、体积、单位、亚单位、臂等。例如，足够数量的肽可存在于表面分子的一部分中。因此，具有足够数量的肽的组合物对于整个表面分子或对于表面分子的仅一个或更多个部分可具有阈值数量(或以上)。

[0265] 可以以任何合适的方式测量或计算数量。例如，存在于表面分子或表面分子组上的肽的数量或量可通过例如检测由标记肽产生的信号的水平或强度并基于表面的结构特征计算数量来测量。

[0266] 肽的数量或阈值数量可以是例如在表面分子上至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、4200、4400、4600、4800、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、900、9500、10,000个肽。组合物还可包含在上面列出的那些数量之间的任何数量。

[0267] 肽的数量或阈值数量可以是例如至少0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个肽/平方nM的整个或部分表面分子。组合物还可包含在上面列出的那些数量之间的任何数量。

[0268] 肽的数量或阈值数量可以是例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、

25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、4200、4400、4600、4800、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、900、9500、10,000个肽/平方 μM 的整个或部分表面分子。组合物还可包含在上面列出的那些数量之间的任何数量。

[0269] 肽的数量或阈值数量可以是例如至少0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000个肽/立方 nM 的整个或部分表面分子。组合物还可包含在上面列出的那些数量之间的任何数量。

[0270] 肽的数量或阈值数量可以是例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2200、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、4200、4400、4600、4800、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、900、9500、10,000个肽/立方 μM 的整个或部分表面分子。组合物还可包含在上面列出的那些数量之间的任何数量。

[0271] 这样的数量也可应用于所公开组合物除肽之外的任何组分。

[0272] 公开了用于缔合所公开组合物的组分的接头。这样的接头可以是可用于缔合所公开组合物的组分的任何分子、缀合物、组合物等。通常来说,接头可用于将除表面分子之外的组分与表面分子缔合。有用的接头包括生物相容的、具有低生物活性、具有低抗原性等的材料。即,这样的有用的接头材料可起到连接/缔合功能而不会向所公开组合物添加不期望的生物反应性。许多这样的材料是已知的并且用于类似的连接和缔合功能。聚合物材料是接头材料的特别有用的形式。例如,可使用聚乙二醇。

[0273] 接头可用于实现表面分子上组分(例如肽和辅助分子)的有用数量和密度。例如,纤维形式的接头可用于提高每个表面分子或每给定表面分子面积的组分数量。类似地,具有分支形式的接头可用于提高每个表面分子或每给定表面分子面积的组分数量。接头也可具有分支纤维形式。

[0274] 不同长度的接头可用于将公开的组分与表面分子以及彼此结合。柔性接头即使相对较短也能良好地发挥作用,而较刚性的接头可更长以允许有效暴露和密度。接头的长度可以是指被连接的组分上的连接点之间的连续共价链中的原子数,或者是指被连接的组分上的连接点之间的连续共价链的长度(例如,以纳米计)。除非上下文另有明确说明,否则长度是指被连接的组分上的连接点之间最短的连续共价链,不考虑侧链、分支或环。由于接头的柔性,所有接头与表面分子可具有不同的距离。因此,具有不同链长度的接头可使所得组合物更有效(例如通过提高密度)。带有多个组分的分支化接头还允许在表面分子的给定位点处连接超过一种组分。接头的有用长度包括至少、多至、约、恰好或介于10、15、20、25、30、

35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、150、160、180、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000和10,000个原子。接头的有用长度包括至少、多至、约、恰好或介于10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、150、160、180、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000和10,000纳米。特别考虑了这些长度的任何范围和所列长度之间的所有长度。

[0275] 亲水性或水溶性连接剂可提高连接组分的流动性。可用作接头的水溶性、生物相容性聚合物的一些实例包括但不限于聚合物,例如聚乙二醇(PEG)、聚环氧乙烷(PEO)、聚乙烯醇、聚甲基丙烯酸羟乙酯、聚丙烯酰胺以及天然聚合物,例如透明质酸、硫酸软骨素、羧甲基纤维素和淀粉。分支系链的有用形式包括星形PEO和梳形PEO。星形PEO可由从一个共有核发出的许多PEO“臂”形成。

[0276] 聚乙二醇(PEG)是简单的中性聚醚,其已在生物技术和生物医学应用中备受关注(Milton Harris, J. (ed) "Poly(ethylene glycol) chemistry, biotechnical and biomedical applications" Plenum Press, New York, 1992)。PEG可溶于大多数溶剂,包括水,并且在水性环境中高度水合,其中每个乙二醇段上结合有两个或三个水分子;这种水合现象具有防止其他聚合物或蛋白质吸附到经PEG修饰的表面上的作用。此外,PEG可容易地被修饰并与其他分子结合,对其化学性质具有很小的作用。其有利的溶解性和生物学特性从PEG及其共聚物(包括嵌段共聚物,例如PEG-聚氨酯和PEG-聚丙烯)的许多可能用途来看是明显的。用于所公开组合物的PEG接头的合适分子量可以是约120道尔顿至约20千道尔顿。例如,PEG可以是至少、多至、约、恰好或介于100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1500、1600、1800、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、20,000、30,000、40,000和50,000道尔顿。特别考虑了这些质量的范围和所列质量之间的所有质量。PEG通常作为具有规定平均质量(例如PEG-5000)的稍微异质质量的混合物获得。

[0277] 可使用任何合适的技术产生所公开的组合物。用于连接本文中公开的组分类型的许多技术、反应基团、化学性质等是已知的并且可与所公开的组分和组合物一起使用。

[0278] 可用于将其他分子、元件、部分等与所公开的组合物、表面分子、肽、内化元件、组织穿透元件、载荷组合物、L/S/R肽、F/T/F&T肽、组合物、肽、氨基酸序列等交联的蛋白质交联剂是本领域已知的并且基于效用和结构限定并且包括DSS(二琥珀酰亚胺辛二酸酯)、DSP(二硫代双(琥珀酰亚胺丙酸酯))、DTSSP(3,3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺丙酸酯))、SULFO BSOCOES(双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧羰基氧基)乙基]砒)、BSOCOES(双[2-(琥珀酰亚胺基氧羰基氧基)乙基]砒)、SULFO DST(二磺基琥珀酰亚胺酒石酸酯)、DST(二琥珀酰亚胺酒石酸酯)、SULFO EGS(乙二醇双(琥珀酰亚胺琥珀酸酯))、EGS(乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺琥珀酸酯))、DPPDPB(1,2-二[3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基]丁烷)、BSSS(双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯)、SMPB(琥珀酰亚胺基-4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸酯)、SULFO SMPB(磺基琥珀酰亚胺基-4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸酯)、MBS(3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、SULFO MBS(3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯)、SIAB(N-琥珀酰亚胺(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)、SULFO SIAB(N-磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯

甲酸酯)、SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)、SULFO SMCC(磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)、NHS LC SPDP(琥珀酰亚胺基-6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯)、SULFO NHS LC SPDP(磺基琥珀酰亚胺基-6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、NHS BROMOACETATE(N-羟基琥珀酰亚胺溴乙酸酯)、NHS IODOACETATE(N-羟基琥珀酰亚胺碘乙酸酯)、MPBH(4-(N-马来酰亚胺苯基)丁酸酰肼盐酸盐)、MCCH(4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酰肼盐酸盐)、MBH(m-马来酰亚胺苯甲酸酰肼盐酸盐)、SULFO EMCS(N-(ε-马来酰亚胺己酰氧基)磺基琥珀酰亚胺)、EMCS(N-(ε-马来酰亚胺己酰氧基)琥珀酰亚胺)、PMPI(N-(p-对马来酰亚胺苯基)异氰酸酯)、KMUH(N-(K-马来酰亚胺十一烷酸)酰肼)、LC SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基(6-氨基己酸酯))、SULFO GMBS(N-(γ-马来酰亚胺丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯)、SMPH(琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺丙酰胺基己酸酯))、SULFO KMUS(N-(κ-马来酰亚胺十一酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯)、GMBS(N-(γ-马来酰亚胺丁酰氧基)琥珀酰亚胺)、DMP(二甲基庚二酰亚胺盐酸盐)、DMS(二甲基辛二酰亚胺盐酸盐)、MHBH(Wood's试剂;甲基-p-羟基苯乙酰亚胺盐酸盐,98%)、DMA(二甲基己二酰亚胺盐酸盐)。

[0279] 也可使用例如马来酰亚胺偶联来偶联所公开组合物的组分,例如表面分子、肽、内化元件、组织穿透元件等。举例来说,组分可通过与例如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[马来酰亚胺(聚乙二醇)₂₀₀₀;DSPE-PEG₂₀₀₀-马来酰亚胺](Avanti Polar Lipids)偶联通过利用组分上的游离半胱氨酸巯基来与脂质偶联。可进行该反应,例如在室温下在水性溶液中进行4小时。这种偶联化学性质可用于偶联载荷组合物和载荷的组分。

[0280] 也可使用例如氨基官能化的右旋糖酐化学性质来偶联所公开组合物的组分,例如表面分子、肽、内化元件、组织穿透元件等。可用氨基官能化的右旋糖酐对颗粒,例如如纳米粒、纳米虫和胶束进行包衣。PEG与胺化颗粒的连接提高了循环时间,推测是通过降低参与调理作用的血浆蛋白质的结合(Moghimi et al.,Pharm.Rev.53,283-318(2001))。颗粒可具有表面修饰,例如以用于网状内皮系统回避(PEG),和归巢肽、内体逃逸(pH敏感肽;例如,Pirollo et al.,Cancer Res.67,2938-43(2007))、可检测剂、治疗性化合物、或组合。为了在一个颗粒上容纳所有这些功能,可进行优化研究以确定这些元件中的任何一个应该占据颗粒表面可用连接位点的比例,以提供靶向和载荷递送的最佳组合。

[0281] 所提供的肽和多肽可具有另外的N-端、C-端或中间氨基酸序列,例如氨基酸接头或标签。术语“氨基酸接头”是指可用于连接或分隔两种不同肽、多肽或多肽片段的氨基酸序列或插入物,其中接头不以其他方式对组合物的基本功能作出贡献。术语“氨基酸标签”是指可用于检测或纯化所提供多肽的不同氨基酸序列,其中该标签不以其他方式对组合物的基本功能作出贡献。所提供的肽和多肽还可具有对肽和多肽的基本活性没有贡献的缺失的N-端、C-端或中间氨基酸。

[0282] 组分可通过任何官能团(例如,胺、羰基、羧基、醛、醇)直接或间接地与表面分子或彼此共价结合。例如,组分上的一个或多个胺、醇或硫醇基团可直接与异硫氰酸酯、酰基叠氮化物、N-羟基琥珀酰亚胺酯、醛、环氧化物、酸酐、内酯或者并入表面分子或其他组分上的其他官能团反应。在组分上的胺基与表面分子或其他组分上的醛基之间形成的席夫碱可用试剂例如氰基硼氢化钠还原以形成水解稳定的胺连接(Ferreira et al.,J.Molecular

Catalysis B:Enzymatic2003,21,189-199)。组分可通过例如使用异双官能硅烷接头试剂或通过激活表面分子或组分上的官能团的其他反应与表面分子和其他组分偶联。

[0283] 用于将组分与表面分子和其他组分连接的有用模式包括异双官能接头或间隔区。这样的接头可具有末端胺和硫醇反应性官能团二者以用于使组分上的胺与巯基反应,从而以定向方式偶联组分。这些接头可包含可变数量的原子。这样的接头的一些实例包括但不限于N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP,3-和7-原子间隔区)、长链-SPDP(12-原子间隔区)、(琥珀酰亚胺氧羰基- α -甲基-2-(2-吡啶基二硫代)甲苯)(SMPT,8-原子间隔区)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC,11-原子间隔区)和磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯,磺基-SMCC,11-原子间隔区)、*m*-马来酰亚胺苯甲酰基-N羟基琥珀酰亚胺酯(MBS,9-原子间隔区)、N-(*g*-马来酰亚胺基丁酰氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBS,8-原子间隔区)、N-(*g*-马来酰亚胺丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS,8-原子间隔区)、琥珀酰亚胺6-((4-碘乙酰基)氨基)己酸酯(SIAX,9-原子间隔区)、琥珀酰亚胺6-(6-(((4-碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基)己酸酯(SIAXX,16原子间隔区)和

-硝基苯基碘乙酸酯(NPIA,2原子间隔区)。本领域普通技术人员还将认识到,可使用具有不同原子数的多种其它偶联剂或连接。

[0284] 亲水性间隔区原子可并入接头以提高反应性官能团之间的距离。例如,可将聚乙二醇(PEG)并入到磺基-GMBS中。当共价偶联时,亲水性分子例如PEG也已显示出降低非特异性结合(non-specific binding,NSB)并提高表面的亲水性。PEG也可用作主要接头材料。

[0285] 组分的游离胺基也可通过同双官能接头与含有反应性胺基团的表面分子或其他组分连接。所有需要高pH的接头,例如二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DSP,8-原子间隔区)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS,8-原子间隔区)、戊二醛(4-原子间隔区)、双[2-(琥珀酰亚胺基氧基羰基氧基)乙基]砒(BSOCOES,9-原子间隔区),可用于此目的。同双官能巯基反应性接头的一些实例包括但不限于1,4-二-[3'-2'-吡啶基二硫代)丙-酰胺基]丁烷(DPDPB,16-原子间隔区)和双马来酰亚胺己烷(BMH,14-原子间隔区)。例如,这些同双官能接头首先与水性溶液(例如PBS,pH 7.4)中的硫醇化表面反应,并随后在第二步中,硫醇化抗体或蛋白质通过接头来连接。也可使用同多官能接头和异多官能接头。

[0286] 组分与表面分子和其他组分上的硫醇、胺或羧酸官能团的直接结合可用于产生表现出病毒结合(例如由于组分密度提高)从而导致敏感性增强的组合物。

[0287] 作为一个实例,当需要实现高的肽偶联密度时,可如下将另外的氨基添加至表面分子(例如商购获得的SPI0):首先,在胺化步骤之前交联颗粒,将3ml胶体(双蒸水中约10mg Fe/ml)添加至5ml 5M NaOH和2ml环氧氯丙烷(Sigma,St.Louis,MO)。将混合物在室温下搅拌24小时以促进有机相(环氧氯丙烷)和水相(右旋糖酐包衣的颗粒胶体)之间的相互作用。为了去除过量的环氧氯丙烷,使用透析盒(10,000Da截止,Pierce,Rockford IL)将反应混合物针对双蒸水透析24小时。如下将氨基添加至颗粒表面:将0.02ml浓氢氧化铵(30%)添加至1ml胶体(约10mg Fe/ml)。将混合物在室温下搅拌24小时。将反应混合物针对双蒸水透析24小时。为了进一步清洗颗粒,将胶体截留在MACS®Midi磁分离柱(Miltenyi Biotec,Auburn CA)上,用PBS清洗3次,并用1mlPBS从柱上洗脱。

[0288] 为了使肽与SPI0缀合,将颗粒以1mg Fe/ml的浓度重悬,并在涡旋下添加异双官能接头N-[α -马来酰亚胺乙酰氧基]琥珀酰亚胺酯(AMAS;Pierce)(2.5mg接头/2mgFe)。在室温

下孵育40分钟之后,将颗粒在MACS柱上用10ml PBS洗涤3次。然后添加具有游离末端半胱氨酸的肽(100 μ g肽/2mg Fe)。在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜之后,再次洗涤颗粒并以0.35mg/ml Fe的浓度重悬于PBS中。为了量化与颗粒缀合的肽分子的数量,将已知量的储液或AMAS激活的颗粒与不同量的肽一起孵育。孵育完成之后,使用Beckman TLA 100.3超速离心转子以100.000G使颗粒沉淀(30分钟),并通过荧光来量化未结合肽的量。为了从颗粒裂解缀合肽,将颗粒在37 $^{\circ}$ C下在pH 10下孵育过夜。通过读取荧光并通过使用针对相同肽获得的校准曲线来确定上清液中游离肽的浓度。将已知量的颗粒的荧光强度绘制为肽缀合密度的函数,并使用斜率方程来确定不同批次的缀合密度。

[0289] 辅助分子可以是具有有用功能并且可与以下组合使用的任何分子、化合物、组分等:F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质、F/T/F&T肽、L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白质、L/S/R肽、组合物、载荷和/或载荷组合物。有用的辅助分子的一些实例包括归巢分子、靶向分子、亲和配体、细胞穿透分子、内体逃逸分子、亚细胞靶向分子、核靶向分子。不同的辅助分子彼此可具有相似或不同的功能。

[0290] 靶向、归巢某些分子、结构、细胞、组织等或者对某些分子、结构、细胞、组织等具有亲和力的分子作为辅助分子特别有用。除本文中别处所述的归巢分子之外,还有许多已知的分子和化合物对特定靶分子、结构、细胞、组织等具有亲和力并且可帮助积累和/或指导公开的组分和组合物至期望的靶标。为方便起见,这样的亲和作用可被称为归巢。本文中别处对归巢和归巢作用的描述可应用于这些分子。

[0291] 亲和配体是与特定分子、部分、细胞组织等特异性相互作用的分子。与亲和配体特异性相互作用的分子、部分、细胞组织等在本文中被称为靶标或靶分子、部分、细胞组织等。应理解,术语靶分子是指单独的分子和这样的分子的部分二者,例如与亲和配体特异性相互作用的蛋白质的表位。抗体、受体/配体对的任一成员、合成聚酰胺(Dervan and Burli, Sequence-specific DNA recognition by polyamides.Curr Opin Chem Biol,3(6):688-93(1999);Wemmer and Dervan,Targeting the minor groove of DNA.Curr Opin Struct Biol,7(3):355-61(1997))和具有特异性结合亲和力的其他分子是亲和配体的一些实例。

[0292] 与特定靶分子特异性相互作用的亲和配体被称为对该靶分子具有特异性。例如,当亲和配体是与特定抗原结合的抗体时,该亲和配体被称为对该抗原具有特异性。抗原是靶分子。亲和配体也可被称为对特定靶分子具有特异性。有用的亲和配体的一些实例是抗体、配体、结合蛋白、受体蛋白、半抗原、适配体、碳水化合物、凝集素、叶酸、合成聚酰胺和寡核苷酸。有用的结合蛋白包括DNA结合蛋白。有用的DNA结合蛋白包括锌指基序、亮氨酸拉链基序和螺旋-转角-螺旋基序。这些基序可组合在同一亲和配体中。

[0293] 抗体可用作亲和配体。抗体可商业地获得或使用充分确立的方法产生。例如,在Johnstone and Thorpe,Immunochemistry In Practice(Blackwell Scientific Publications,Oxford,England,1987)的第30至85页描述了可用于生产多克隆抗体和单克隆抗体二者的通用方法。整本书描述了在测定系统中使用抗体的许多通用技术和原则。已知许多抗体和其他亲和配体与特定的蛋白质、碳水化合物、糖蛋白、分子、细胞、组织等结合。这样的抗体可用于公开的组分和组合物中。

[0294] 细胞穿透肽的一些实例描述于,例如,美国专利申请公开No.20100061942、20100061932、20100048487、20100022466、20100016215、20090280058、20090186802、

20080234183、20060014712、20050260756和20030077289中,其在此通过引用整体并入,并且特别是其对细胞穿透肽和基序的描述。内体逃逸分子的一些实例描述于,例如,美国专利申请公开No. 20090325866、20090317802、20080305119、20070292920、20060147997、20050038239、20040219169、20030148263、20030082143、20020132990和20020068272中,其在此通过引用整体并入,并且特别是其对内体逃逸分子和基序的描述。亚细胞靶向分子的一些实例描述于,例如,美国专利申请公开No. 2009031733、20090258926、20090176660、20080311136、20070287680、20070157328、20070111270、20070111251、20060257942、20060154340、20060014712、20050281805、20050233356、20040005309、20030082176和20010021500中,其在此通过引用整体并入,并且特别是其对亚细胞靶向分子和基序的描述。核靶向分子的一些实例描述于,例如,美国专利申请公开No. 10100143454、20100099627、20090305329、20090176710、20090087899、20070231862、20070212332、20060242725、20060233807、20060147922、20060070133、20060051315、20050147993、20050071088、20030166601、20030125283、20030083261、20030003100、20020068272和20020055174中,其在此通过引用整体并入,并且特别是其对核靶向分子和基序的描述。

[0295] 本文中公开的术语“载荷”是指可与公开的肽一起使用的物质的任何组合物。类似地,术语“载荷组合物”是指可与公开的肽一起使用的物质的任何组合物。通常来说,例如,载荷或载荷组合物可以是靶向具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的任何组合物。例如,载荷或载荷组合物可以是分子、缀合物、分子缔合物、组合物和混合物。载荷和载荷组合物的一些实例包括但不限于:癌症化学治疗剂、细胞毒性剂、促凋亡剂、免疫调节剂、促炎剂、免疫刺激剂、抗炎剂、抗关节炎剂、多肽、核酸分子、小分子、纳米粒、微粒、荧光团、荧光素、罗丹明、放射性核素、镭-177 (^{177}Lu)、铼-188 (^{188}Re)、镓-68 (^{68}Ga)、钇-90 (^{90}Y)、锝-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、钬-166 (^{166}Ho)、碘-131 (^{131}I)、铟-111 (^{111}In)、氟-18 (^{18}F)、碳-11 (^{11}C)、氮-13 (^{13}N)、氧-15 (^{15}O)、溴-75 (^{75}Br)、溴-76 (^{76}Br)、碘-124 (^{124}I)、铊-201 (^{201}Tl)、锝-99 (^{99}Tc)、碘-123 (^{123}I)、或其组合。

[0296] 公开的组分可与任何治疗剂一起使用,因为其代表了用于帮助将治疗剂递送至细胞和组织的通用模式和平台。因此,任何治疗剂都可用于公开的组合物中或与公开的组合物一起使用。可在许多地方找到治疗剂和药物的综合清单,例如橙皮书(Orange Book)和美国食品和药品管理局(U.S. Food and Drug Administration)维护的其他清单(信息可在网站 fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ucml29662.htm 和 fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/default.htm 获得) 和其他国家维护的类似列表,以及 clinicaltrials.gov/ (关于正在进行临床试验的药物和治疗剂)。

[0297] 在一些形式中,治疗剂可以是一种或更多种小分子激酶抑制剂或植物化学物或核酸药物,例如脱氧核酶、核酶、siRNA、shRNA、DNA、PNA、RNA和DNA适配体,或miRNA、小分子、抗体、肽、氨基酸、脂质、多糖、生长因子、细胞因子、生物活性肽、酶和细胞毒性药物。

[0298] 载荷和载荷组合物可以是部分。本文中使用的术语“部分”广泛用于意指通常赋予连接的载荷或连接的载荷组合物生物学有用功能的物理、化学或生物材料。部分可以是任何天然或非天然材料,包括但不限于:生物材料,例如细胞、噬菌体或其他病毒;有机化学物质,例如小分子;纳米粒、放射性核素;核酸分子或寡核苷酸;多肽;或肽。例如,影响靶标的部分,例如具有治疗性作用或促进靶标的检测、可视化或成像的部分,例如荧光分子或放射

性核素。

[0299] 公开的载荷和载荷组合物的组分可以以任何合适的方式组合、连接和/或偶联。例如,部分和其他分子可直接或间接地、在有或没有接头部分的情况下,共价或非共价缔合。

[0300] 在一些实施方案中,载荷或载荷组合物可包含癌症化学治疗剂。本文中使用的“癌症化学治疗剂”是抑制癌细胞增殖、生长、寿命或转移活性的化学剂。这样的癌症化学治疗剂可以是但不限于:紫杉烷类,例如多西他赛;蒽环类,例如多柔比星;烷化剂;长春花生物碱;抗代谢物;铂剂,例如顺铂或卡铂;类固醇,例如甲氨蝶呤(Methotrexate);抗生素,例如阿霉素;异环磷酰胺(Ifosfamide);或选择性雌激素受体调节剂;抗体,例如曲妥珠单抗;紫杉醇,例如Abraxane;Doxil。

[0301] 载荷或载荷组合物可包含治疗剂。有用的治疗剂可以是例如本文中使用的细胞毒性剂,可以是直接或间接促进细胞死亡的任何分子。有用的细胞毒性剂包括但不限于:小分子、多肽、肽、肽模拟物、核酸分子、细胞和病毒。作为一些非限制性实例,有用的细胞毒性剂包括细胞毒性小分子,例如多柔比星、多西他赛或曲妥珠单抗;抗微生物肽,例如以下另外描述的那些;促凋亡多肽,例如胱天蛋白酶和毒素,例如胱天蛋白酶-8;白喉毒素A链、假单胞菌外毒素A、霍乱毒素、配体融合毒素例如DAB389EGF、蓖麻毒素(蓖麻毒蛋白);和细胞毒性细胞,例如细胞毒性T细胞。参见,例如,Martin et al.,Cancer Res.60:3218-3224(2000);Kreitman and Pastan,Blood 90:252-259(1997);Allam et al.,Cancer Res.57:2615-2618(1997)和Osborne and Coronado-Heinsohn,Cancer J.Sci.Am.2:175(1996)。本领域技术人员理解本文中所述的或本领域已知的这些和另外的细胞毒性剂可用于公开的组合物和方法中。

[0302] 在一些形式中,治疗剂可以是治疗性多肽。本文中使用的治疗性多肽可以是具有生物学有用功能的任何多肽。可用的治疗性多肽涵盖但不限于:细胞因子、抗体、细胞毒性多肽;促凋亡肽;免疫调节肽、促炎肽、免疫刺激肽;抗炎肽;免疫抑制肽;和抗血管生成多肽。作为一些非限制性实例,可用的治疗性多肽可以是:细胞因子,例如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、肿瘤坏死因子- β (TNF- β)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、干扰素- α (干扰素- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)、白介素-3(IL-3)、白介素-4(IL-4)、白介素-6(IL-6)、白介素-7(IL-7)、白介素-10(IL-10)、白介素-12(IL-12)、淋巴细胞趋化因子(lymphotactin)(LTN)或树突细胞趋化因子1(DC-CK1);抗HER2抗体或其片段;细胞毒性多肽,包括毒素或胱天蛋白酶,例如白喉毒素A链、假单胞菌外毒素A、霍乱毒素、配体融合毒素例如DAB389EGF或蓖麻毒蛋白;促凋亡多肽,例如_D(KLAKLAK)₂(SEQ ID NO:6);免疫调节肽;促炎肽,免疫刺激肽;抗炎肽;免疫抑制肽;或抗血管生成多肽,例如血管抑制素、内皮细胞抑制素、血小板应答蛋白、血小板因子4;anastellin;或者本文中另外描述的或本领域已知的那些之一。应理解,这些和其他具有生物活性的多肽可以是“治疗性多肽”。

[0303] 在公开的载荷和载荷组合物中可用的治疗剂可以是抗血管生成剂。本文中使用的术语“抗血管生成剂”意指降低或阻止血管生成的分子,血管生成是血管的生长和发育。载荷和载荷组合物可用于治疗或诊断与血管生成相关的任何疾病、病症或障碍。例如,可诊断和/或治疗黄斑变性和糖尿病血管并发症。可通过常规方法制备多种抗血管生成剂。这样的抗血管生成剂包括但不限于:小分子;蛋白质,例如显性负形式的血管生成因子、转录因子

和抗体;肽;和核酸分子,包括核酶、反义寡核苷酸和编码例如以下的核酸分子:显性负形式的血管生成因子和受体、转录因子以及抗体及其抗原结合片段。参见,例如,Hagedorn and Bikfalvi, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 34:89-110 (2000) 和 Kirsch et al., J. Neurooncol. 50:149-163 (2000)。

[0304] 可用的治疗剂的一些其他实例包括氮芥类(nitrogen mustard)、亚硝基脲类(nitrosourea)、乙烯亚胺类(ethyleneimine)、烷烃磺酸酯(alkane sulfonate)、四嗪类(tetrazine)、铂化合物(platinum compound)、嘧啶类似物(pyrimidine analog)、嘌呤类似物(purine analog)、抗代谢物(antimetabolite)、叶酸类似物(folate analog)、蒽环类(anthracycline)、紫杉烷类、长春花生物碱、拓扑异构酶抑制剂和激素剂。示例性的化学治疗药物是放线菌素-D (Actinomycin-D)、马法兰 (Alkeran)、Ara-C、阿那曲唑 (Anastrozole)、天冬酰胺酶 (Asparaginase)、BiCNU、比卡鲁胺 (Bicalutamide)、博来霉素 (Bleomycin)、白消安 (Busulfan)、卡培他滨 (Capecitabine)、卡铂 (Carboplatin)、卡铂 (Carboplatinum)、卡莫司汀 (Carmustine)、CCNU、苯丁酸氮芥 (Chlorambucil)、萘氮芥 (Chlomaphazine)、胆磷酰胺 (Cholophosphamide)、顺铂 (Cisplatin)、克拉屈滨 (Cladribine)、CPT-11、环磷酰胺 (Cyclophosphamide)、阿糖胞苷 (Cytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷 (Cytosine arabinoside)、环磷酰胺 (Cytosan)、达卡巴嗪 (Dacarbazine)、放线菌素D (Dactinomycin)、柔红霉素 (Daunorubicin)、右雷佐生 (Dexrazoxane)、多西他塞 (Docetaxel)、多柔比星 (Doxorubicin)、DTIC、表柔比星 (Epirubicin)、雌氮芥 (Estramustine)、乙烯亚胺类 (Ethyleneimine)、依托泊苷 (Etoposide)、氟尿苷 (Flouxuridine)、氟达拉滨 (Fludarabine)、氟尿嘧啶 (Fluorouracil)、氟他胺 (Flutamide)、福莫司汀 (Fotemustine)、吉西他滨 (Gemcitabine)、赫赛汀 (Herceptin)、六甲胺 (Hexamethylamine)、羟基脲 (Hydroxyurea)、伊达比星 (Idarubicin)、异环磷酰胺、伊立替康 (Irinotecan)、洛莫司汀 (Lomustine)、氮芥 (Mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (Melfalan)、巯基嘌呤 (Mercaptopurine)、甲氨蝶呤、丝裂霉素 (Mitomycin)、米托坦 (Mitotane)、米托蒽醌 (Mitoxantrone)、诺文比辛 (Novembiehin)、奥沙利铂 (Oxaliplatin)、紫杉醇 (Paclitaxel)、帕米磷酸二钠 (Pamidronate)、喷司他丁 (Pentostatin)、苯芥胆甾醇 (Phenesterine)、普卡霉素 (Plicamycin)、泼尼莫司汀 (Prednimustine)、丙卡巴肼 (Procarbazine)、雷帕霉素 (Rapamycin)、利妥昔单抗 (Rituximab)、类固醇 (Steroid)、链脲霉素 (Streptozocin)、STI-571、链脲霉素、他莫昔芬 (Tamoxifen)、替莫唑胺 (Temozolomide)、替尼泊苷 (Teniposide)、四嗪、硫鸟嘌呤 (Thioguanine)、噻替哌 (Thiotepa)、雷替曲塞 (Tomudex)、拓扑替康 (Topotecan)、曲奥舒凡 (Tresulphan)、三甲曲沙 (Trimetrexate)、曲磷胺 (Trofosfamide)、长春碱 (Vinblastine)、长春新碱 (Vincristine)、长春地辛 (Vindesine)、长春瑞滨 (Vinorelbine)、VP-16和希罗达 (Xeloda)。烷化剂,例如噻替哌;以及烷基磺酸酯(alkyl sulfonate),例如白消安、英丙舒凡 (Improsulfan) 和哌泊舒凡 (Piposulfan);氮丙啶类 (aziridine),例如苯佐替哌 (Benzodopa)、卡波醌 (Carboquone)、美妥替哌 (Meturedopa) 和乌瑞替哌 (Uredopa);乙烯亚胺类和甲基蜜胺类 (methylamelamine),包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺

(triethylenethiophosphaoramide) 和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine); 硝基脲类, 例如卡莫司汀(Cannustine)、氯脲霉素(Chlorozotocin)、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀(Nimustine) 和雷莫司汀(Ranimustine); 抗生素, 例如阿克拉霉素(Aclacinomycin)、放线菌素(Actinomycin)、氨茴霉素(Authramycin)、氮丝氨酸(Azaserine)、博来霉素、放线菌素C(Cactinomycin)、卡奇霉素(Calicheamicin)、卡柔比星(Carabycin)、洋红霉素(Caminomycin)、嗜癌霉素(Carzinophilin)、色霉素(Chromomycin)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星(Detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星(Esorubicin)、依达比星(Idamycin)、麻西罗霉素(Marcellomycin)、丝裂霉素、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(Nogalamycin)、橄榄霉素(Olivomycins)、培洛霉素(Peplomycin)、泊非霉素(Potfiromycin)、嘌呤霉素(Puromycin)、三铁阿霉素(Quelamycin)、罗多比星(Rodorubicin)、链黑菌素(Streptonigrin)、链脲霉素、杀结核菌素(Tubercidin)、乌苯美司(Ubenimex)、净司他丁(Zinostatin) 和佐柔比星(Zorubicin); 抗代谢物, 例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物, 例如二甲叶酸(Denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(Pteropterin) 和三甲曲沙; 嘌呤类似物, 例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(Thiamiprine) 和硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 例如安西他滨(Ancitabine)、阿扎胞苷(Azacitidine)、6-氮杂尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(Carmofur)、阿糖胞苷、二脱氧尿苷(Dideoxyuridine)、多西氟尿啶(Doxifluridine)、依诺他滨(Enocitabine)、氟尿苷和5-FU; 雄激素类, 例如卡鲁睾酮(Calusterone)、丙酸屈他雄酮(Dromostanolone Propionate)、表硫雄醇(Epitiostanol)、美雄烷(Rnepitiothane) 和睾内酯(Testolactone); 抗肾上腺类(anti-adrenal), 例如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦和曲洛司坦(Trilostane); 叶酸补充剂, 例如亚叶酸(frolineic acid); 醋葡萄糖内酯(aceglatone); 醛磷酸胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基酮戊酸(aminolevulinic acid); 氨苯吡啶(Amsacrine); 贝斯布西(Bestrabucil); 比生群(Bisantrene); 依达曲沙(Edatraxate); 地磷酰胺(Defofamine); 地美可辛(Demecolcine); 地吡酮(Diaziquone); 依氟鸟氨酸(Elfornithine); 醋酸羟吡唑啉(elliptinium acetate); 依托格鲁(Etoglucid); 硝酸镓(gallium nitrate); 羟基脲; 香菇多糖(Lentinan); 氯尼达明(Lonidamine); 米托胍脲(Mitoguazone); 米托蒽醌; 莫哌达醇(Mopidamol); 二胺硝吡啶(Nitracrine); 喷司他丁; 苯来美特(Phenamet); 吡柔比星(Pirarubicin); 鬼臼酸(podophyllinic acid); 2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide); 丙卡巴肼;**PSK®**; 雷佐生(Razoxane); 西索菲兰(Sizofrran); 锗螺胺(Spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三亚胺酮(triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺(2,2',2''-trichlorotriethylamine); 乌拉坦(Urethan); 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露莫司汀(Mannomustine); 二溴甘露醇(Mitobronitol); 二溴卫矛醇(Mitolactol); 哌泊溴烷(Pipobroman); 加西托星(Gacytosine); 阿拉伯糖苷("Ara-C"); 环磷酰胺; 噻替哌(thiotEPa); 紫杉烷类, 例如紫杉醇(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 和多西他赛(**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 吉西他滨; 6-巯鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物, 例如顺铂和卡铂; 长春碱; 铂类; 依托泊苷(VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞滨; 诺维本(Navelbine); 诺安托(Novantrone); 替尼泊苷; 柔红霉素(Daunomycin); 氨基蝶呤

(Aminopterin); 希罗达; 伊拜膦酸盐 (Ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine, DMFO); 视黄酸 (retinoic acid); 埃斯波霉素 (Esperamicin); 卡培他滨; 以及任何上述物质的可药用盐、酸或衍生物。还包括发挥调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂, 例如, 抗雌激素, 包括, 例如他莫昔芬、雷洛昔芬 (Raloxifene)、芳香化酶抑制性 4(5)-咪唑 (aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles)、4 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (Troxifene)、克昔芬 (Keoxifene)、奥那斯酮 (Onapristone) 和托瑞米芬 (Toremifene) (Fareston); 以及抗雄激素, 例如氟他胺、尼鲁米特 (Nilutamide)、比卡鲁胺、亮丙瑞林 (Leuprolide) 和戈舍瑞林 (Goserelin); 以及任何上述物质的可药用盐、酸或衍生物。可用的载荷和载荷组合物包括例如多柔比星、赫赛汀和脂质体多柔比星。

[0305] 载荷或载荷组合物还可包含含硼化合物。在过去的几年里, 含硼化合物作为治疗剂受到越来越多的关注, 因为有机合成技术发展至包括该原子 (Boron Therapeutics on the horizon, Groziak, M.P.; American Journal of Therapeutics (2001) 8, 321-328)。最著名的含硼治疗剂是最近被推出用于治疗多发性骨髓瘤的硼酸硼替佐米 (boronic acid bortezomib)。这一突破证明了使用含硼化合物作为药剂的可行性。含硼化合物已显示出具有多种生物活性, 其包括除草剂 (Organic boron compounds as herbicides. Barnsley, G.E.; Eaton, J.K.; Airs, R.S.; (1957), DE 1016978 19571003)、硼中子俘获治疗 (Molecular Design and Synthesis of B-10 Carriers for Neutron Capture Therapy. Yamamoto, Y.; Pure Appl. Chem., (1991) 63, 423-426)、丝氨酸蛋白酶抑制 (Boronic acid inhibitors as probes of the factors involved in binding at the active sites of subtilisin Carlsberg and alpha-chymotrypsin. Simpelkamp, J.; Jones, J.B.; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, (1992), 2(11), 1391-4; Design, Synthesis and Biological Evaluation of Selective Boron-containing Thrombin Inhibitors. Weinand, A.; Ehrhardt, C.; Metternich, R.; Tapparelli, C.; Bioorganic and Medicinal Chemistry, (1999), 7, 1295-1307)、乙酰胆碱酯酶抑制 (New, specific and reversible bifunctional alkylboronic acid inhibitor of acetylcholinesterase. Koehler, K.A.; Hess, G.P.; Biochemistry (1974), 13, 5345-50) 和作为抗菌剂 (Boron-Containing Antibacterial Agents: Effects on Growth and Morphology of Bacteria Under Various Culture Conditions. Bailey, P.J.; Cousins, G.; Snow, G.A.; and White, A.J.; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (1980), 17, 549-553)。具有抗菌活性的含硼化合物可细分为两大类: 自 20 世纪 60 年代以来已知的重氮杂硼杂环 (diazaborinine); 和二噻吩基硼酸复合物 (dithienylboronic acid complexes)。该后一类别已发展至包括许多不同的具有强效抗菌活性的二芳基硼酸复合物 (Preparation of diarylboronic acid esters as DNA methyl transferase inhibitors. Benkovic, S.J.; Shapiro, L.; Baker, S.J.; Wahnon, D.C.; Wall, M.; Shier, V.K.; Scott, C.P.; Baboval, J.; PCT Int. Appl. (2002), WO 2002044184、。

[0306] 载荷或载荷组合物还可具有一种或更多种同位素。这样的同位素可用作例如治疗剂、可检测剂或二者。可用的同位素的一些实例包括镥-177 (^{177}Lu)、铼-188 (^{188}Re)、镓-68 (^{68}Ga)、钇-90 (^{90}Y)、锝-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、钬-166 (^{166}Ho)、碘-131 (^{131}I)、铟-111 (^{111}In)、氟-18 (^{18}F)、碳-11 (^{11}C)、氮-13 (^{13}N)、氧-15 (^{15}O)、溴-75 (^{75}Br)、溴-76 (^{76}Br)、碘-124 (^{124}I)、铊-201

(^{201}Tl)、锝-99 (^{99}Tc) 和碘-123 (^{123}I)。

[0307] 载荷或载荷组合物还可包含可检测剂。多种可检测剂可用于公开的方法中。本文中使用的术语“可检测剂”是指可被检测到的任何分子。可用的可检测剂包含可在体内施用并随后被检测到的部分。可用于公开的组合物和成像方法中的可检测剂包括但不限于放射性标记和荧光分子。可检测剂可以是,例如,直接或间接,优选地通过非侵入性和/或体内可视化技术促进检测的任何部分。例如,可检测剂可通过任何已知的成像技术,包括例如放射学技术进行检测。可检测剂可包含例如造影剂。造影剂可以是,例如,菲立磁 (Feridex)。在一些实施方案中,例如,可检测剂包含钽化合物。在一些实施方案中,可检测剂包含碘,例如放射性碘。在一些实施方案中,例如,可检测剂包含有机碘酸 (organic iodo acid),例如碘羧酸 (iodo carboxylic acid)、三碘苯酚 (triiodophenol)、碘仿 (iodoform) 和/或四碘乙烯 (tetraiodoethylene)。在一些实施方案中,可检测剂包含非放射性可检测剂,例如非放射性同位素。例如,在某些实施方案中,铁氧化物和Gd可用作非放射性可检测剂。可检测剂还可包含放射性同位素、酶、荧光团和量子点 (Qdot®)。例如,检测部分可以是酶、生物素、金属或表位标签。其他已知的或新发现的可检测标志物预期与所提供的组合物一起使用。在一些实施方案中,例如,可检测剂包含钡化合物,例如硫酸钡。

[0308] 可检测剂可以是 (或者载荷或载荷组合物可包含) 一种或更多种显像剂。显像剂的一些实例包括:放射性造影剂,例如泛影酸钠盐二水合物、碘和硫酸钡;荧光显像剂,例如丽丝胺罗丹明PE;荧光或非荧光染色剂或染料,例如,可赋予可见的颜色的那些或反射在可见或其他波长 (例如红外线或紫外线) 下的电磁辐射特征谱的那些,例如罗丹明;放射性同位素;正电子发射同位素,例如 ^{18}F 或 ^{124}I (尽管正电子发射同位素的短半衰期可具有一些限制);金属;铁磁性化合物;顺磁性化合物 (例如钆);超顺磁性化合物 (例如铁氧化物) 和反磁性化合物 (例如硫酸钡)。可选择显像剂以优化由所选成像技术产生的图像的有用性。例如,可选择显像剂以增强目标特征例如胃肠息肉和正常胃肠组织之间的对比。成像可使用任何合适的成像技术,例如X射线、计算机断层扫描 (computed tomography, CT)、MRI、正电子发射断层扫描 (Positron Emission Tomography, PET) 或SPECT来完成。在一些形式中,载荷或载荷组合物可与核医学显像剂 (例如钆-III或锝99)、PET显像剂或MRI显像剂 (例如纳米粒) 偶联。

[0309] 成像技术的一些实例包括磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)、计算机断层扫描 (CT)、单光子发射计算机断层扫描 (single photon emission computerized tomography, SPECT) 和正电子发射断层扫描 (PET)。显像剂在其应用中通常可分为诊断性的或治疗性的。由于辐射对组织的损伤作用,尽可能准确地靶向放射性药物的生物分布是有用的。PET可使用例如正电子发射体 (例如 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 和 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 和 ^{124}I) 标记的显像剂。SPECT可使用例如单光子发射体 (例如 ^{201}Tl 、 ^{99}Tc 、 ^{123}I 和 ^{131}I) 标记的显像剂。

[0310] 基于葡萄糖和基于氨基酸的化合物可用作显像剂。基于氨基酸的化合物在分析肿瘤细胞时更有用,因为其更快地被摄取并并入到蛋白质合成中。在基于氨基酸的化合物中,含 ^{11}C 和含 ^{18}F 的化合物已被成功使用。适合用于成像的含 ^{11}C 的经放射性标记的氨基酸包括,例如,L-[1- ^{11}C]亮氨酸 (Keen et al. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1989 (9): 429-45)、L-[1- ^{11}C]酪氨酸 (Wiesel et al. J. Nucl. Med. 1991 (32): 2041-49)、L-[甲基- ^{11}C]甲硫氨酸 (Comar et al. Eur. J. Nucl. Med. 1976 (1): 11-14) 和L-[1- ^{11}C]甲硫氨酸 (Bolster et

al. Appl. Radiat. Isot. 1986 (37): 1069-70)。

[0311] PET涉及使用符合法检测来自短寿命正电子发射放射性同位素的湮没光子形式的 γ 射线,所述同位素包括但不限于:半衰期为约110分钟的 ^{18}F ,半衰期为约20分钟的 ^{11}C ,半衰期为约10分钟的 ^{13}N ,和半衰期为约2分钟的 ^{15}O 。对于PET成像研究,可使用化合物例如 ^{11}C 间-羟基麻黄碱(HED)和2- ^{18}F 氟-2-脱氧-D-葡萄糖(FDG)。SPECT可使用寿命更长的同位素,其包括但不限于半衰期为约6小时的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和半衰期为约74小时的 ^{201}Tl 。放射性碘化的间碘苄胍(MIBG)是可用于核医学成像研究的放射示踪剂。

[0312] 载荷或载荷组合物可以是微粒或纳米粒,例如纳米球、纳米壳、纳米虫、产热纳米壳等。本文中使用的“纳米壳”是具有被一个或多个导电壳层包围的离散电介质或半导体核部分的纳米粒。美国专利No. 6,530,944的全部内容在此通过引用并入本文,因为它教导了制备和使用金属纳米壳的方法。纳米壳可由例如电介质或惰性材料(例如硅)的核形成,包被有可使用辐射例如近红外光(约800至1300nm)来激发的材料,例如高导电性金属。在激发时,纳米壳发热。所产生的高热可杀伤周围的一个或多个细胞或组织。纳米壳的壳和核的组合直径范围从几十纳米到几百纳米。近红外光因其穿透组织的能力而有优势。根据纳米粒包衣和被靶向细胞的选择,也可使用其他类型的辐射。一些实例包括X射线、磁场、电场和超声。这些颗粒还可用于增强成像,尤其是使用红外漫射光子成像方法。靶分子可以是抗体或其片段、针对特定受体的配体、或与待靶向细胞的表面特异性结合的其他蛋白质。

[0313] 可与公开的组合物以及载荷和载荷组合物缀合的脂肪酸(即,脂质)包括允许将肽有效并入脂质体中的那些。通常,脂肪酸是极性脂质。因此,脂肪酸可以是磷脂。所提供的组合物可包含天然或合成的磷脂。磷脂可选自包含饱和或不饱和、单取代或双取代的脂肪酸及其组合的磷脂。这些磷脂可以是,例如,二油酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰丝氨酸、二油酰基磷脂酰乙醇胺、二油酰基磷脂酰丙三醇、二油酰基磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、棕榈酰基油酰基磷脂酰丝氨酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰乙醇胺、棕榈酰基油酰基磷脂酰丙三醇、棕榈酰基油酰基磷脂酸、十六碳烯酰基油酰基磷脂酰胆碱、十六碳烯酰基油酰基磷脂酰丝氨酸、十六碳烯酰基油酰基磷脂酰乙醇胺、十六碳烯酰基油酰基磷脂酰丙三醇、十六碳烯酰基油酰基磷脂酸、肉豆蔻油酰基油酰基磷脂酰胆碱、肉豆蔻油酰基油酰基磷脂酰丝氨酸、肉豆蔻油酰基油酰基磷脂酰乙醇胺、肉豆蔻油酰基油酰基磷脂酰丙三醇、肉豆蔻油酰基油酰基磷脂酸、二亚油酰基磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰丝氨酸、二亚油酰基磷脂酰乙醇胺、二亚油酰基磷脂酰丙三醇、二亚油酰基磷脂酸、棕榈亚油酰基磷脂酰胆碱、棕榈亚油酰基磷脂酰丝氨酸、棕榈亚油酰基磷脂酰乙醇胺、棕榈亚油酰基磷脂酰丙三醇、棕榈亚油酰基磷脂酸。这些磷脂还可以是磷脂酰胆碱(溶血磷脂酰胆碱)、磷脂酰丝氨酸(溶血磷脂酰丝氨酸)、磷脂酰乙醇胺(溶血磷脂酰乙醇胺)、磷脂酰丙三醇(溶血磷脂酰丙三醇)和磷脂酸(溶血磷脂酸)的单酰化衍生物。这些溶血磷脂酰衍生物中的单酰基链可以是棕榈酰基、油酰基、棕榈油酰基、亚油酰基肉豆蔻酰基或肉豆蔻酰基。磷脂也可以是合成的。合成磷脂很容易地从多种来源,例如AVANTI Polar Lipids (Albaster, Ala.)、Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.) 商购获得。这些合成的化合物可变化,并且可在其脂肪酸侧链中具有天然存在的磷脂中未发现的变化。脂肪酸可在PS或PC中的任一种或二者中具有含有C14、C16、C18或C20链长的不饱和脂肪酸侧链。合成的磷脂可具有二油酰基(18:1)-PS;棕榈酰基(16:0)-油酰基(18:1)-PS、二肉豆蔻酰基(14:0)-PS、二棕榈油酰基(16:1)-PC、二棕榈酰基(16:0)-PC、二

油酰基(18:1)-PC、棕榈酰基(16:0)-油酰基(18:1)-PC和肉豆蔻酰基(14:0)-油酰基(18:1)-PC作为成分。因此,例如,所提供的组合物可包含棕榈酰基16:0。

[0314] 另一些分子、要素、部分等可以与例如以下共价连接或非共价缔合:公开的载荷、载荷组合物、F/T/F&T组合物、L/S/R组合物、蛋白质、肽或氨基酸序列。这样的分子、要素、部分等可以与例如以下连接:公开的蛋白质、肽、氨基酸序列、L/S/R肽或F/T/F&T肽的氨基末端;公开的蛋白质、肽、氨基酸序列、L/S/R肽或F/T/F&T肽的内部氨基酸;公开的蛋白质、肽或氨基酸序列的羧基末端;公开的肽的N端侧的蛋白质、肽、氨基酸序列;通过接头与公开的蛋白质、肽、氨基酸序列、L/S/R肽或F/T/F&T肽;或组合。公开的组合物还可包含接头,其连接这样的分子、要素、部分等与公开的组合物、蛋白质、肽、氨基酸序列、L/S/R肽或F/T/F&T肽。公开的组合物、蛋白质、肽、氨基酸序列、L/S/R肽或F/T/F&T肽也可与包衣分子例如牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)缀合(参见Tkachenko et al.,(2003) J Am Chem Soc,125,4700-4701),所述包衣分子可用于用蛋白质、肽、氨基酸序列、L/S/R肽或F/T/F&T肽包被纳米粒、纳米虫、纳米壳等。

[0315] 可用于使另一些分子、要素、部分等与公开的载荷、载荷组合物、F/T/F&T组合物、L/S/R组合物、蛋白质、肽、氨基酸序列等交联的蛋白质交联剂是本领域已知的并且基于效用和结构被限定,并且包括:DSS(二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、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))、SULFO BSOCOES(双[2-(磺基琥珀酰亚胺氧基羰基氧基)乙基]砒)、BSOCOES(双[2-(琥珀酰亚胺基氧基羰基氧基)乙基]砒)、SULFO DST(二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯)、DST(二琥珀酰亚胺基酒石酸酯)、SULFO EGS(乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯))、EGS(乙二醇双(磺基琥珀酰亚胺基琥珀酸酯))、DPDPB(1,2-二[3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基]丁烷)、BSSS(双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯)、SMPB(琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯)、SULFO SMPB(磺基琥珀酰亚胺基-4-(对马来酰亚胺苯基)丁酸酯)、MBS(3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、SULFO MBS(3-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯)、SIAB(N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)、SULFO SIAB(N-磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯)、SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)、SULFO SMCC(磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)、NHS LC SPDP(琥珀酰亚胺基-6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯)、SULFO NHS LC SPDP(磺基琥珀酰亚胺基-6-[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、NHS BROMOACETATE(N-羟基琥珀酰亚胺基溴乙酸酯)、NHS IODOACETATE(N-羟基琥珀酰亚胺基碘乙酸酯)、MPBH(4-(N-马来酰亚胺苯基)丁酸酐肼盐酸盐)、MCCH(4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酐肼盐酸盐)、MBH(间马来酰亚胺苯甲酸酐肼盐酸盐)、SULFO EMCS(N-(ε-马来酰亚胺己酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺)、EMCS(N-(ε-马来酰亚胺己酰基氧基)琥珀酰亚胺)、PMPI(N-(对马来酰亚胺苯基)异氰酸酯)、KMUH(N-(κ-马来酰亚胺十一烷酸)酐肼)、LC SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基(6-氨基己酸酯))、SULFO GMBS(N-(γ-马来酰亚胺基丁基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯)、SMPH(琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺丙酰胺基己酸酯))、SULFO KMUS(N-(κ-马来酰亚胺十一酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯)、GMBS(N-(γ-马来酰亚胺基丁基氧基)琥珀酰亚胺)、DMP(二甲基庚二酸酯盐酸盐)、DMS(二甲基辛二酰亚胺酸盐盐酸盐)、MHBH(伍德试剂(Wood's Reagent));甲基-对

羟基苯甲亚胺酯盐酸盐,98%)、DMA(二甲基己二酰亚胺盐酸盐)。

[0316] 载荷或载荷组合物的组分也可使用例如马来酰亚胺偶联进行偶联。举例来说,组分可通过利用组分上的游离半胱氨酸巯基通过与例如1,2-二硬脂酰基-sn-丙三基-3-磷酸乙醇胺-N-[马来酰亚胺(聚乙二醇)₂₀₀₀;DSPE-PEG₂₀₀₀-马来酰亚胺](Avanti Polar Lipids)偶联来与脂质偶联。该反应可例如在室温下在水溶液中进行4小时。这种偶联化学可用于偶联载荷和载荷组合物的组分。

[0317] 公开的化合物、组分和组合物也可使用例如氨基官能化右旋糖酐化学进行偶联。颗粒,例如如纳米粒、纳米虫和胶束,可用氨基官能化右旋糖酐包被。PEG与胺化颗粒的连接增加了循环时间,推测是通过降低涉及调理作用的血浆蛋白的结合(Moghimi et al., 2001)。颗粒可具有表面修饰,例如,用于网状内皮系统回避(PEG)和归巢肽、内体逃逸(pH敏感肽;例如,Pirello et al., 2007)、可检测试剂、治疗化合物、或组合。为了在一个颗粒上容纳所有这些功能,可进行优化研究以确定这些要素中的任何一个应该占据在颗粒表面上的可用连接位点的多少比例,以给出靶向和有效载荷递送的最佳组合。

[0318] 公开的肽、氨基酸序列、蛋白质、分子、缀合物和组合物本身可与本文中公开的其他组分使用任何已知技术或本文中描述的技术偶联(如本文中别处描述的,但是通常不与公开的载荷偶联)。马来酰亚胺官能团也可用作偶联基团。这些化学物质可用于使公开的肽、氨基酸序列、蛋白质、分子、缀合物和组合物彼此偶联和与其他组分偶联。

[0319] 公开的肽、氨基酸序列和蛋白质也可使用例如马来酰亚胺偶联与其他组分进行偶联。举例来说,公开的肽、氨基酸序列和蛋白质可通过利用肽、氨基酸序列或蛋白质上的游离半胱氨酸巯基通过与例如1,2-二硬脂酰基-sn-丙三基-3-磷酸乙醇胺-N-[马来酰亚胺(聚乙二醇)₂₀₀₀;DSPE-PEG₂₀₀₀-马来酰亚胺](Avanti Polar Lipids)偶联来与脂质偶联。该反应可例如在室温下在水溶液中进行4小时。这种偶联化学可用于使公开的肽、氨基酸序列和蛋白质与许多其他组分、分子和组合物偶联。

[0320] E. 方法和用途

[0321] 公开的肽、组合物和其他物质可在多种方法中使用以实现多种目的并且可用于多种用途。最重要的是,公开的肽和组合物可用于涉及肽与靶分子的结合的方法和用途中。这样的结合可在体外、离体和体内发生,这取决于方法或用途的需要和目的。

[0322] 因此,公开了包括将肿瘤暴露于任何一种或更多种公开的组合物的方法。在一些形式中,组合物选择性地与肿瘤结合。在一些形式中,肿瘤在对象中。在一些形式中,通过向对象施用组合物来使肿瘤暴露于组合物。在一些形式中,肿瘤表达FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者。在一些形式中,组合物选择性地与表达FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤结合。

[0323] 还公开了包括将胞外基质暴露于任何一种或更多种公开的组合物的方法。在一些形式中,组合物选择性地与胞外基质结合。在一些形式中,胞外基质在对象中。在一些形式中,通过向对象施用组合物使胞外基质暴露于组合物。在一些形式中,胞外基质具有FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者。在一些形式中,组合物选择性地与具有FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质结合。

[0324] 在一些形式中,组合物具有治疗性作用。在一些形式中,治疗性作用可包含提高凋亡。在一些形式中,对象患有疾病或病症。在一些形式中,疾病是癌症。在一些形式中,组合

物选择性地归巢至表达FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤。在一些形式中,组合物选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质。

[0325] 还公开了用作药物的任何公开的组合物。还公开了用于在对象中治疗癌症的任何公开的组合物。还公开了用于在对象中检测癌症的任何公开的组合物。还公开了用于在对象中使癌症可视化的任何公开的组合物。还公开了用于在对象中定位癌症的任何公开的组合物。

[0326] 还公开了任何公开的组合物用于制造用于癌症治疗的药物的用途。还公开了任何公开的组合物用于制造用于癌症检测的药物的用途。

[0327] 还公开了癌症诊断方法,其包括向有此需要的对象施用有效量的任何一种或更多种公开的组合物。

[0328] 在公开的方法、公开的组合物或公开的用途的一些形式中,癌症可以是表10中的癌症。

[0329] 表10. 一些癌症实例。

[0330]

急性淋巴细胞白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL)、急性髓性白血病 (Acute Myeloid Leukemia, AML)、肾上腺皮质癌、AIDS 相关癌症、卡波西肉瘤、AIDS 相关淋巴瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肛门癌、阑尾癌 (胃肠道类癌瘤)、星形细胞瘤、非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、脑癌、皮肤基底细胞癌、胆管癌 (Bile Duct Cancer)、膀胱癌、骨癌 (包括尤因肉瘤 (Ewing Sarcoma) 和骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、脑肿瘤、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤 (Burkitt Lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤 (Non-Hodgkin Lymphoma)、类癌瘤、不明原发癌、心脏肿瘤、胚胎肿瘤、生殖细胞肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、宫颈癌、胆管癌 (Cholangio-carcinoma)、脊索瘤、慢性淋巴细胞白血病 (Chronic Lymphocytic Leukemia, CLL)、慢性髓性白血病 (Chronic Myelogenous Leukemia, CML)、慢性骨髓增生性肿瘤、结直肠癌、颅咽管瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (蕁样肉芽肿病和塞扎里综合征 (Sézary Syndrome))、导管原位癌 (Ductal Carcinoma In Situ, DCIS)、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、鼻腔神经胶质瘤 (Esthesioneuro-blastoma)、尤因肉瘤、颅外生殖细胞肿瘤、眼癌、眼内黑色素瘤、输卵管癌、骨纤维组织细胞瘤、骨肉瘤、胆囊癌、胃癌 (Gastric Cancer)、胃癌 (Stomach Cancer)、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤 (Gastrointestinal Carcinoid Tumor, GIST)、中枢神经系统生殖细胞肿瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、卵巢生

[0331]

殖细胞肿瘤、睾丸癌、滋养细胞疾病、毛细胞白血病、头颈癌、心脏肿瘤（Heart Tumor）、肝细胞（肝）癌、组织细胞增生症（朗格汉斯细胞）、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞肿瘤、胰腺神经内分泌肿瘤、肾癌、肾细胞癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、白血病、唇和口腔癌、肝癌、肺癌（非小细胞和小细胞）、淋巴瘤、男性乳腺癌、骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、黑色素瘤、眼内（眼）黑色素瘤、梅克尔细胞癌（Merkel Cell Carcinoma）（皮肤癌）、恶性间皮瘤、转移性癌症、未知原发恶性转移性鳞状颈癌、中线神经束癌伴 NUT 基因改变（Midline Tract Carcinoma With NUT Gene Change）、口癌、多发性内分泌瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样肉芽肿病（淋巴瘤）、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性肿瘤、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、口腔癌和口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、乳头状瘤病、副神经节瘤、鼻旁窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统（Central Nervous System, CNS）淋巴瘤、原发性腹膜癌、前列腺癌、直肠癌、复发性癌症、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、血管肿瘤、子宫肉瘤、塞扎里综合征（淋巴瘤）、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、不明原发癌、输尿管和肾盂移行细胞癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌、肾母细胞瘤（Wilms Tumor）

[0332] 在公开的方法、公开的组合物或公开的用途的一些形式中，癌症可以是实体瘤癌症，例如表11中列出的那些。

[0333] 表11. 实体瘤的一些实例。

[0334]

肾上腺皮质癌、AIDS 相关癌症、卡波西肉瘤、肛门癌、阑尾癌（胃肠道类癌）、星形细胞瘤、非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、脑癌、皮肤基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌（包括尤因肉瘤和骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤）、脑肿瘤、乳腺癌、支气管肿瘤、类癌瘤、不明原发癌、心脏肿瘤、胚胎肿瘤、生殖细胞肿瘤、宫颈癌、胆管癌、脊索瘤、结直肠癌、颅咽管瘤、导管原位癌（DCIS）、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、鼻腔神经胶质瘤、尤因肉瘤、颅外生殖细胞肿瘤、眼癌、眼内黑色素瘤、输卵管癌、骨纤维组织细胞瘤、骨肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤（GIST）、中枢神经系统生殖细胞肿瘤、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、睾丸癌、滋养细胞疾病、头颈癌、心脏肿瘤、肝细胞（肝）癌、组织细胞增生症（朗格汉斯细胞）、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞肿瘤、胰腺神经内分泌肿瘤、肾癌、肾细胞癌、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、唇和口腔癌、肝癌、肺癌（非小细胞和小细胞）、男性乳腺癌、骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、黑色素瘤、眼内（眼）黑色素瘤、梅克尔细胞癌（皮肤癌）、恶性间皮瘤、转移性癌症、未知原发恶性转移性鳞状颈癌、中线神经束癌伴 NUT 基因改变、口癌、

[0335]

多发性内分泌瘤综合征、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、口腔癌和口咽癌、卵巢癌、胰腺癌、乳头状瘤病、副神经节瘤、鼻旁窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性腹膜癌、前列腺癌、直肠癌、复发性癌症、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、血管肿瘤、子宫肉瘤、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、不明原发癌、输尿管和肾盂移行细胞癌、尿道癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌、肾母细胞瘤

[0336] 还公开了增强载荷对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者的方法。在一些形式中,该方法可包括将细胞、组织或二者暴露于载荷和F/T/F&T组合物,从而增强载荷对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者。F/T/F&T组合物可包含任何公开的F/T/F&T肽或包含F/T/F&T肽的任何公开的组合物。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷在暴露于细胞、组织或二者之前彼此不共价偶联或直接非共价缔合。

[0337] 还公开了增强载荷对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者的方法。在一些形式中,该方法可包括将细胞、组织或二者暴露于载荷和L/S/R组合物,从而增强载荷对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者。L/S/R组合物可包含任何公开的L/S/R肽或包含L/S/R肽的任何公开的组合物。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷在暴露于细胞、组织或二者之前彼此不共价偶联或直接非共价缔合。

[0338] 还公开了增强载荷组合物对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者的方法。在一些形式中,该方法可包括将细胞、组织或二者暴露于载荷组合物和F/T/F&T组合物,从而增强载荷组合物对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者。F/T/F&T组合物可包含任何公开的F/T/F&T肽或包含F/T/F&T肽的任何公开的组合物。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷组合物可彼此共价偶联或非共价缔合。

[0339] 还公开了增强载荷组合物对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者的方法。在一些形式中,该方法可包括将细胞、组织或二者暴露于载荷组合物和L/S/R组合物,从而增强载荷组合物对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者。L/S/R组合物可包含任何公开的L/S/R肽或包含L/S/R肽的任何公开的组合物。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷组合物可彼此共价偶联或非共价缔合。

[0340] 还公开了增强对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者的方法。在一些形式中,该方法可包括将细胞、组织或二者暴露于F/T/F&T组合物,从而增强对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者。F/T/F&T组合物可包含任何公开的F/T/F&T肽或包含F/T/F&T肽的任何公开的组合物。

[0341] 还公开了增强对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者的方法。在一些形式中,该方法可包括将细胞、组织或二者暴露于L/S/R组合物,从而增强对细胞、组织或二者的靶向、递送或二者。L/S/R组合物可包含任何公开的L/S/R肽或包含L/S/R肽的任何公开的组合物。

[0342] 在一些形式中,细胞、组织或二者可在对象中。在一些形式中,可通过向对象施用F/T/F&T组合物和载荷而将细胞、组织或二者暴露于F/T/F&T组合物和载荷。在一些形式中,可通过向对象施用F/T/F&T组合物和载荷组合物而将细胞、组织或二者暴露于F/T/F&T组合物和载荷组合物。在一些形式中,可通过向对象施用F/T/F&T组合物而将细胞、组织或二者

暴露于F/T/F&T组合物。在一些形式中,可通过向对象施用L/S/R组合物和载荷而将细胞、组织或二者暴露于L/S/R组合物和载荷。在一些形式中,可通过向对象施用L/S/R组合物和载荷组合物而将细胞、组织或二者暴露于L/S/R组合物和载荷组合物。在一些形式中,可通过向对象施用L/S/R组合物而将细胞、组织或二者暴露于L/S/R组合物。

[0343] 在一些形式中,F/T/F&T组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,F/T/F&T组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷可同时施用于对象。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷可以以包含F/T/F&T组合物和载荷的单一组合物施用于对象。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷可以以独立的组合物施用于对象。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷可在不同时间施用于对象。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷可以以独立的组合物施用于对象。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷可通过独立的途径施用于对象。

[0344] 在一些形式中,L/S/R组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,L/S/R组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷可同时施用于对象。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷可以以包含L/S/R组合物和载荷的单一组合物施用于对象。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷可以以独立的组合物施用于对象。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷可在不同时间施用于对象。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷可以以独立的组合物施用于对象。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷可通过独立的途径施用于对象。

[0345] 在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种肽。在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种载荷组合物。在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种L/S/R组合物。在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种载荷。

[0346] 在一些形式中,F/T/F&T组合物、载荷和/或载荷组合物可具有治疗性作用。在一些形式中,治疗性作用可以是减缓肿瘤负荷的提高或减少肿瘤负荷。在一些形式中,治疗性作用可以是减缓肿瘤大小的提高或减小肿瘤大小。在一些形式中,对象可具有一个或多个待靶向位点,其中F/T/F&T组合物、载荷和/或载荷组合物归巢至所述一个或多个待靶向位点。在一些形式中,对象可具有含有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织,其中F/T/F&T组合物、载荷和/或载荷组合物对肿瘤具有治疗性作用。

[0347] 在一些形式中,L/S/R组合物、载荷和/或载荷组合物可具有治疗性作用。在一些形式中,治疗性作用可以是减缓肿瘤负荷的提高或减少肿瘤负荷。在一些形式中,治疗性作用可以是减缓肿瘤大小的提高或减小肿瘤大小。在一些形式中,对象可具有一个或多个待靶向位点,其中L/S/R组合物、载荷和/或载荷组合物归巢至所述一个或多个待靶向位点。在一些形式中,对象可具有含有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织,其中L/S/R组合物、载荷和/或载荷组合物对肿瘤具有治疗性作用。

[0348] 在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种肽。在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种载荷组合物。在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种F/T/F&T组合物。在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种L/S/R组合物。在一些形式中,细胞、组织或二者可暴露于多种载荷。

[0349] 多种不同的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物或组合可一起使用。类似地,多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物或组合可一起使用。当这样的

多种不同的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物或组合一起使用时,其可与单一类型的载荷、单一类型的载荷组合物、多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物或组合一起使用。类似地,当多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物或组合可一起使用时,其可与单一类型的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、或与多种不同的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物或组合一起使用。

[0350] 例如,PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 可与一种或多种不同的F/T/F&T肽、F/T/F&T化合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物或组合、一种或多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物或组合、或这些的任何组合一起使用。在这样的组合中,PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 本身可与一种或更多种载荷组合物、一种或更多种辅助分子等在同一缀合物或组合物中进行组合。

[0351] 多种不同的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物或组合可一起使用。类似地,多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物或组合可一起使用。当这样的多种不同的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物或组合一起使用时,其可与单一类型的载荷、单一类型的载荷组合物、多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物或组合一起使用。类似地,当多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物或组合可一起使用时,其可与单一类型的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、或与多种不同的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物或组合一起使用。

[0352] 例如,PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 可与一种或多种不同的L/S/R肽、L/S/R化合物、L/S/R缀合物、L/S/R组合物或组合、一种或多种不同的载荷、多种不同的载荷组合物或组合、或这些的任何组合一起使用。在这样的组合中,PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 本身可与一种或更多种载荷组合物、一种或更多种辅助分子等在同一缀合物或组合物中进行组合。

[0353] 通过向对象施用F/T/F&T组分和载荷,可将细胞、组织或二者暴露于不同F/T/F&T组分的组合和不同载荷的组合。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷可同时施用于对象。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷可以以包含一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷的一种或更多种单一组合物施用于对象。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷可以以一种或更多种独立的组合物施用于对象。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷可在不同时间施用于对象。F/T/F&T组合物和载荷可以以一种或更多种独立的组合物施用于对象。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷可通过一种或更多种独立的途径施用于对象。在一些形式中,F/T/F&T组合物和载荷彼此不结合。

[0354] 通过向对象施用L/S/R组分和载荷,可将细胞、组织或二者暴露于不同L/S/R组分的组合和不同载荷的组合。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷可同时施用于对象。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷可以以包含一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷的一种或更多种单一组合物施用于对象。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷可以以一种或更多种独立的组合物施用于对象。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷可在不同时间施用于对象。L/S/R组合物和载荷可以以一种或更多种独立的组合物施用于对象。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷可通过一种或更多种独立的途径施用于对象。在一些形式中,L/S/R组合物和载荷彼此不结合。

[0355] 通过向对象施用F/T/F&T组分和载荷组合物,可将细胞、组织或二者暴露于不同F/T/F&T组分的组合和不同载荷组合物的组合。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷组合物可同时施用于对象。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷组合物可以以包含一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷组合物的一种或更多种单一组合物施用于对象。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷组合物可以以一种或更多种独立的组合物施用于对象。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷组合物可在不同时间施用于对象。F/T/F&T组合物和载荷组合物可以以一种或更多种独立的组合物施用于对象。一种或更多种F/T/F&T组分和一种或更多种载荷组合物可通过一种或更多种独立的途径施用于对象。

[0356] 通过向对象施用L/S/R组分和载荷组合物,可将细胞、组织或二者暴露于不同L/S/R组分的组合和不同载荷组合物的组合。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷组合物可同时施用于对象。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷组合物可以以包含一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷组合物的一种或更多种单一组合物施用于对象。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷组合物可以以一种或更多种独立的组合物施用于对象。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷组合物可在不同时间施用于对象。L/S/R组合物和载荷组合物可以以一种或更多种独立的组合物施用于对象。一种或更多种L/S/R组分和一种或更多种载荷组合物可通过一种或更多种独立的途径施用于对象。

[0357] F/T/F&T肽或L/S/R肽可包含在蛋白质或肽的氨基酸序列中。在一些形式中,当在蛋白质或肽中存在氨基酸序列时而不是当在蛋白质或肽中不存在氨基酸序列时,蛋白质或肽可被靶向、递送或者靶向且递送至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,当在蛋白质或肽中存在氨基酸序列时而不是当在蛋白质或肽中不存在氨基酸序列时,蛋白质或肽可被靶向、递送或者靶向且递送至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。在一些形式中,氨基酸序列是蛋白质或肽中唯一的功能性归巢分子。

[0358] 公开的肽归巢至特定细胞(具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织)并且许多归巢分子归巢至靶组织的脉管系统。然而,为了方便起见,归巢在本文中的一些地方被称为归巢至与FN-EDB、TNC-C或二者相关的组织,或与肽或归巢肽实际上可归巢至的脉管系统相关的组织。因此,例如,归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织的归巢肽在本文中可被称为归巢至肿瘤组织或肿瘤细胞。通过包含肽或归巢肽或将肽或归巢肽与例如蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷或载荷组合物缔合,所述蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷或载荷组合物可被靶向或可归巢至肽或归巢肽的靶标。这样,所述蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷或载荷组合物,可被认为是归巢至肽或归巢肽的靶标。为方便起见并且除非另有说明,否则提及蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷、载荷组合物等的归巢旨在表明所述蛋白质、肽、氨基酸序列、载荷、载荷组合物等包含合适的肽或归巢肽或者与合适的肽或归巢肽缔合。

[0359] 可选择氨基酸序列用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。可选择蛋白质或肽用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。可选择缀合物用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。可选择组合物用于归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。

[0360] F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。

F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。F/T/F&T肽、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0361] L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。L/S/R肽、L/S/R缀合物、L/S/R组合物、氨基酸序列、蛋白质或肽、缀合物、组合物、载荷、载荷组合物或组合可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0362] 细胞、组织或二者可暴露于多种辅助分子。细胞、组织或二者可暴露于多种肽。细胞、组织或二者可暴露于多种载荷组合物。细胞、组织或二者可暴露于多种F/T/F&T肽。细胞、组织或二者可暴露于多种L/S/R肽。细胞、组织或二者可暴露于多种载荷。

[0363] “内化”是指通过质膜或其他生物屏障。“穿透”是指进入并且穿过细胞、组织或其他生物屏障。穿透通常涉及并且包括内化。公开的F/T/F&T肽通常促进并且允许内化(例如内化至细胞中)。

[0364] “内化至细胞中”意指组分能够穿透或穿过质膜,从而被内化至细胞中。针对给定的组分和给定的细胞,这种内化可以以例如10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%的效率发生。“可穿透的”意指细胞和/或组织的允许接近该细胞和/或组织的组合物、缀合物、分子

等进入和或穿过该细胞和/或组织的能力和/或条件。

[0365] 本文中使用的“组织穿透”和“组织的穿透”是指越过或穿过细胞的外层或第一层或者穿过组织膜到达组织。这样的穿过或穿透组织(其也可称为外渗和组织穿透)可以是例如细胞内化和组织中细胞之间的通道的功能。

[0366] 携带具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织对象可通过例如以下被鉴定为用于公开的治疗的候选者:(a) 将来自对象的组织暴露于F/T/F&T肽;以及(b) 确定F/T/F&T肽是否与组织结合,其中与组织的结合将对象鉴定为用于公开的治疗的候选者。F/T/F&T肽、F/T/F&T蛋白、F/T/F&T缀合物或F/T/F&T组合物的任何形式或类型均可用于这些方法中。

[0367] 携带具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织对象可通过例如以下被鉴定为用于公开的治疗的候选者:(a) 将来自对象的组织暴露于L/S/R肽;以及(b) 确定L/S/R肽是否与组织结合,其中与组织的结合将对象鉴定为用于公开的治疗的候选者。L/S/R肽、L/S/R蛋白、L/S/R缀合物或L/S/R组合物的任何形式或类型均可用于这些方法中。

[0368] 公开的肽(和其他公开的形式)和载荷可一起或单独、以相同的形式和方式或者以不同的形式和/或方式、在相同时间或在不同时间、与第一次或第二次施用的公开的肽(或其他公开的形式)一起施用。施用可以是例如,共同施用(在相同时间并且通过相同或不同的途径/方式/形式)、单独施用(通过相同或不同的途径/方式/形式平行施用)、顺序施用(在不同时间通过相同或不同的途径/方式/形式)等。当载荷和肽(或其他形式)在不同时间施用时,在施用之间可使用多种不同的延迟。例如,肽(或其他形式)可在施用载荷之前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、20、30、40、45、50、60、70、80、90、100、110或120分钟或更长时间时施用。肽(或其他形式)可在施用载荷之前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、54、60、66或72小时或更长时间时施用。肽(或其他形式)可在施用载荷之前1、2、3、4、5、6或7天或更长时间时施用。肽(或其他形式)可在施用载荷之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、20、30、40、45、50、60、70、80、90、100、110或120分钟或更长时间时施用。肽(或其他形式)可在施用载荷之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、54、60、66或72小时或更长时间时施用。肽(或其他形式)可在施用载荷之后1、2、3、4、5、6或7天或更长时间时施用。

[0369] 公开的肽(或其他公开的形式)可在施用载荷之前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、20、30、40、45、50、60、70、80、90、100、110或120分钟之内施用。公开的肽(或其他公开的形式)可在施用载荷之前1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、54、60、66或72小时之内施用。公开的肽(或其他公开的形式)可在施用载荷之前1、2、3、4、5、6或7天之内施用。公开的肽(或其他公开的形式)可在施用载荷之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、20、30、40、45、50、60、70、80、90、100、110或120分钟之内施用。公开的肽(或其他公开的形式)可在施用载荷之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、54、60、66或72小时之内施用。公开的肽(或其他公开的形式)可在

施用载荷之后1、2、3、4、5、6或7天之内施用。在同一天或同一小时之内施用是特别有用的。

[0370] F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白或F/T/F&T肽和载荷可同时施用于对象。同时意指在重叠或连续的时间段内。F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白或F/T/F&T肽和载荷可以以包含该F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白或F/T/F&T肽和载荷的单一组合物施用于对象。F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白或F/T/F&T肽和载荷可以以独立的组合物施用于对象。F/T/F&T肽和载荷可在不同时间施用于对象。F/T/F&T肽和载荷可以以独立的组合物施用于对象。独立的组合物意指彼此不混合或不接触(可在施用之后发生除外)的组合物。F/T/F&T肽和载荷可通过独立的途径施用于对象。独立的途径意指在独立的地点,通过不同的方法或方式,或二者。

[0371] L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白或L/S/R肽和载荷可同时施用于对象。同时意指在重叠或连续的时间段内。L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白或L/S/R肽和载荷可以以包含该L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白或L/S/R肽和载荷的单一组合物施用于对象。L/S/R组合物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白或L/S/R肽和载荷可以以独立的组合物施用于对象。L/S/R肽和载荷可在不同时间施用于对象。L/S/R肽和载荷可以以独立的组合物施用于对象。独立的组合物意指彼此不混合或不接触(可在施用之后发生除外)的组合物。L/S/R肽和载荷可通过独立的途径施用于对象。独立的途径意指在独立的地点,通过不同的方法或方式,或二者。

[0372] 肽可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。肽可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。肽可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。肽可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤的脉管系统。肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0373] 组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。组合物可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。组合物可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤的脉管系统。组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0374] 载荷可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。载荷可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。载荷可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。载荷可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤的脉管系统。载荷可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。载荷可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0375] F/T/F&T组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。F/T/F&T组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。F/T/F&T组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。F/T/F&T组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。F/T/F&T组合物可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。F/T/F&T组合物可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。F/T/F&T组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。F/T/F&T组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0376] L/S/R组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。L/S/R组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。L/S/R组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。L/S/R组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。L/S/R组合物可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。L/S/R组合物可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。L/S/R组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。L/S/R组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0377] F/T/F&T肽可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。F/T/F&T肽可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。F/T/F&T肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。F/T/F&T肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。F/T/F&T肽可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。F/T/F&T肽可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。F/T/F&T肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。F/T/F&T肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0378] L/S/R肽可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。L/S/R肽可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。L/S/R肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。L/S/R肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。L/S/R肽可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。L/S/R肽可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。L/S/R肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。L/S/R肽可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0379] 载荷组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷组合物可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。载荷组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。载荷组合物可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。载荷组合物可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。载荷组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。载荷组合物可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0380] 载荷分子可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷分子可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。载荷分子可选择性地归巢至一种

或更多种特定类型的肿瘤。载荷分子可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。载荷分子可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。载荷分子可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。载荷分子可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。载荷分子可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0381] 表面分子可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。表面分子可选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或二者的细胞和组织。表面分子可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤。表面分子可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的肿瘤的脉管系统。表面分子可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症。表面分子可选择性地归巢至一个或更多个特定阶段的肿瘤或癌症的脉管系统。表面分子可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个特定阶段的肿瘤。表面分子可选择性地归巢至一种或更多种特定类型的一个或更多个不同阶段的肿瘤的脉管系统。

[0382] 本文中使用的“与……一起施用”和类似术语意指一种组分与另一种组分在同一组合物中施用。本文中使用的“与……同时施用”和类似术语意指一种组分与另一种组分同时施用。同时意指在时间上同时和/或重叠。本文中使用的“在相同的治疗期间施用”、“在重叠的治疗期间施用”或类似术语意指一种组分在另一种组分保持治疗有效性的时期期间施用。组分保持治疗有效性的时期是指该组分被倾复、清除、分解、改变等至亚治疗量或浓度之前的时期。

[0383] 公开的组合物以及载荷和载荷组合物可在可药用载体中在体内施用。“可药用”意指在生物学上或其他方面不是不期望的物质,即,该物质可与核酸或载体一起施用于对象,而不会引起任何不期望的生物效应或以有害的方式与包含该物质的药物组合物的任何其他组分相互影响。如本领域技术人员公知的,天然地选择载体以使活性成分的任何降解最小化并且使对象中的任何不良反应最小化。该物质可以是溶液、混悬液(例如,并入到微粒、脂质体或细胞中)。

[0384] 公开的组合物以及载荷和载荷组合物可与可药用载体组合来在治疗中使用。合适的载体及其制剂在Remington:The Science and Practice of Pharmacy(第19版)编辑.A.R.Gennaro,Mack Publishing Company,Easton,PA 1995中描述。通常,在制剂中使用适量的可药用盐来使制剂等张。可药用载体的一些实例包括但不限于盐水、林格溶液(Ringer's solution)和右旋糖溶液。溶液的pH优选为约5至约8,并且更优选为约7至约7.5。另外的载体包括缓释制剂,例如包含抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质是成型制品的形式,例如膜、脂质体或微粒。对于本领域技术人员来说显而易见的是,某些载体可以是更优选的,这取决于例如施用途径和所施用组合物的浓度。

[0385] 制剂可本身施用于对象或生物体,或以其与合适的载体或赋形剂混合的药物组合物施用。

[0386] 本文中使用的“药物组合物”是指本文中描述的一种或更多种活性成分与其他化学组分例如生理学合适的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的目的是促进向对象或生物体施用化合物。

[0387] 本文中的术语“活性成分”是指负责生物效应的制剂。例如,具有生物效应的F/T/F&T肽、F/T/F&T组合物、F/T/F&T缀合物、F/T/F&T分子、F/T/F&T蛋白质、L/S/R肽、L/S/R组合

物、L/S/R缀合物、L/S/R分子、L/S/R蛋白、组合物、载荷和载荷组合物可被认为是活性成分。

[0388] 本文中使用的可互换使用的短语“生理学上可接受的载体”和“可药用载体”是指不对对象或生物体造成显著刺激并且不会消除所施用化合物的生物活性和特性的载体或稀释剂。这些短语包括辅料。

[0389] 本文中的术语“赋形剂”是指添加至药物组合物以进一步促进活性成分的施用的惰性物质。赋形剂的一些实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、多种糖和多种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0390] 用于配制和施用药物的技术可见于Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 的最新版, 其通过引用并入本文。

[0391] 任何合适的施用途均可用于公开的组合物。例如, 施用途可包括: 表面、肠内、局部、全身或肠胃外。例如, 施用可以是瘤内、瘤周、经表皮、吸入、灌肠、结膜、滴眼剂、滴耳剂、齿槽的、经鼻(nasal)、鼻内、经阴道(vaginal)、阴道内、经阴道(transvaginal)、肠内、经口(oral)、口内、经口(transoral)、经肠、经直肠(rectal)、直肠内、经直肠(transrectal)、注射、输注、静脉内、动脉内、肌内、脑内、心室内、脑室内、心内、皮下、骨内、皮内、鞘内、腹膜内、膀胱内、海绵体内、髓内、眼内、颅内、经皮、经黏膜、经鼻(transnasal)、吸入、脑池内、硬膜上(epidural)、硬膜外(peridural)、玻璃体内等。

[0392] 对于归巢至细胞和组织, 特别合适的施用途包括肠胃外、局部或全身。例如, 对于归巢至细胞和组织的特别合适的施用途包括静脉内、注射、输注、动脉内、肌内、瘤内、瘤周、脑内、心室内、脑室内、心内、皮下、骨内、皮内、鞘内、腹膜内、膀胱内、髓内、眼内、颅内、脑池内、硬膜上、硬膜外和玻璃体内。公开的组合物可用于任何其他操作中并且可与任何其他操作一起使用。例如, 公开的组合物可作为HIPEC治疗的一部分施用。在HIPEC中, 含有目标组合物的加热灭菌溶液在整个腹膜腔中连续循环。

[0393] 药物组合物可通过本领域公知的方法来制造, 例如通过常规混合、溶解、造粒、糖衣制备(dragee-making)、研磨、乳化、包封、包埋或冻干方法来制造。

[0394] 用于公开的方法中的药物组合物因此可使用一种或更多种生理学上可接受的载体以常规方式进行配制, 所述载体包括促进将活性成分加工成可药用制剂的赋形剂和助剂。适当的制剂取决于所选择的施用途。

[0395] 对于注射剂, 活性成分可配制在水溶液中, 优选地在生理相容性缓冲液, 例如汉克溶液(Hank's solution)、林格溶液或生理盐缓冲液中。对于经黏膜施用, 在制剂中使用与待穿透的屏障相适应的穿透剂。这样的穿透剂是本领域公知的。

[0396] 本文中所述的制剂可被配制用于肠胃外施用, 例如, 通过团注或连续输注。用于注射的制剂可以以单位剂型存在, 例如在安瓶或在多剂量容器中, 任选地具有添加的防腐剂。组合物可以是在油性或水性载剂中的混悬剂、溶液剂或乳剂, 并且可包含配制剂例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0397] 用于肠胃外施用的药物组合物包含水溶性形式的活性制剂的水溶液。此外, 活性成分的混悬剂可制备为合适的油性或基于水的注射混悬剂。合适的亲脂性溶剂或载剂包含脂肪油例如芝麻油, 或合成的脂肪酸酯例如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射混悬剂可包含提高混悬剂黏度的物质, 例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或右旋糖酐。任选地, 混悬剂还可包含合适的稳定剂或提高活性成分溶解度以允许用于制备高度浓缩的溶液的试剂。

[0398] 或者,活性成分可以是用于在使用之前用合适的载剂,例如无菌、基于无热原水的溶液进行配制的散剂形式。

[0399] 可以以任何合适的制剂提供公开的组合物。例如固体、液体、溶液剂、凝胶剂、缓释剂、延时释放剂等。

[0400] 用于公开的方法的药物组合物包括其中含有有效实现预期目的的量的活性成分的组合物。更特别地,治疗有效量意指有效预防、减轻或改善疾病症状或延长被治疗对象存活的活性成分的量。

[0401] 确定治疗有效量完全在本领域技术人员的能力内,尤其是根据本文中提供的详细公开内容。

[0402] 对于在公开的方法中使用的任何制剂,治疗有效量或剂量可最初从体外和细胞培养测定中估计。例如,可在动物模型中配制剂量以实现期望的循环抗体浓度或效价。这样的信息可用于更准确地确定在人体中的有用剂量。

[0403] 本文中描述的活性成分的毒性和治疗效力可通过体外、在细胞培养物中或实验动物中的标准制药学操作来确定。从这些体外和细胞培养测定以及动物研究中获得的数据可用于配制用于人中的一系列剂量。剂量可根据采用的剂型和利用的施用途径而变化。确切的制剂、施用途径和剂量可由个体医师根据患者的病症来选择。(参见例如Fingl et al in The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch.1p.1. (1975))。

[0404] 剂量和间隔可单独调整,以提供足以预防或降低病毒进入的抗体血浆(最小有效浓度,MEC)。每种制剂的MEC不同,但可从体外数据中进行估计。达到MEC所需的剂量将取决于个体特征和施用途径。结合测定可用于确定血浆浓度。

[0405] 剂量间隔也可使用MEC值确定。制剂应使用这样的方案进行施用:该方案在10至90%,优选30至90%并且最优选50至90%的时间内维持血浆水平、靶位点测量或其他合适的测量高于MEC。

[0406] 根据待治疗病症的严重程度和响应性,剂量可以是单次或多次施用,同时治疗过程持续数天至数周或直至有效治愈,实现疾病状态减轻或实现其他治疗性作用。

[0407] 当然,待施用的组合物的量将取决于待治疗的对象、痛苦的严重程度、施用方式、处方医师的判断等。

[0408] “治疗”意指具有以治愈、改善、稳定或预防疾病、病理病症或障碍为目的的患者的医学管理。该术语包括积极治疗,即特别是旨在朝向改善疾病、病理病症或障碍的治疗,并且还包括病因治疗,即旨在朝向消除相关疾病、病理病症或障碍的原因的治疗。此外,该术语包括姑息治疗,即设计用于缓解症状而不是治愈疾病、病理病症或障碍的治疗;预防性治疗,即旨在使相关疾病、病理病症或障碍的发生最小化或者部分或完全抑制相关疾病、病理病症或障碍的發生的治疗;以及支持治疗,即用于补充旨在朝向相关疾病、病理病症或障碍的改善的另一特定治疗的治疗。

[0409] 本文中使用的“对象”包括但不限于动物、植物、细菌、病毒、寄生生物和任何其他具有核酸的生物体或实体。对象可以是脊椎动物,更具体地是哺乳动物(例如,人、马、猪、兔、狗、绵羊、山羊、非人灵长类、牛、猫、豚鼠或啮齿动物)、鱼、鸟或爬行动物或两栖动物。特别地,对象可以是宠物和家畜。对象可以是无脊椎动物,例如蠕虫或节肢动物(例如昆虫和甲壳动物)。该术语不表示特定的年龄或性别。因此,成年和新生儿对象以及胎儿,无论是雄

性还是雌性,都旨在被涵盖在内。患者是指患有疾病或病症的对象。术语“患者”包括人和兽医对象。在子宫内膜异位症和子宫内膜异位症细胞的情况下,应理解对象是具有或可具有子宫内膜异位症和/或子宫内膜异位症细胞的对象。

[0410] 公开的肽可用于增强肿瘤成像和用抗癌药进行的肿瘤治疗。可测试公开的肽对成像的影响。例如,可使用例如使用Kodak IN VIVO Fx成像仪和Li-Cor Odyssey成像仪的近红外荧光团的光学成像(例如Simberg et al.,2007;Sugahara et al.,2009),以及MRI成像。对于MRI成像,载荷或载荷组合物可以是MRI造影剂,例如菲立磁铁氧化物纳米粒和钆化合物。这些化合物可注射到例如有和无L/S/R或F/T/F&T肽或者肽的组合物的小鼠中,然后进行成像。结果可用于确定治疗的有效性并且评估使用L/S/R和F/T/F&T肽与治疗剂作为载荷或载荷组合物的不同治疗方案。

[0411] 不同的L/S/R或F/T/F&T肽以及不同的载荷和/或载荷组合物的组合可通过例如改变药物剂量并使用产生最大作用的肽的剂量来用于测试载荷或载荷组合物在靶细胞和组织中的最佳积累和分布。公开的结果显示,RVL-药物组合可降低所需药物的量,并因此降低副作用,同时产生相同的抗肿瘤作用。公开的肽还可产生通过使用单独的载荷或载荷组合物无法实现的效果。例如,公开的肽的使用可允许在细胞和组织中有更高浓度的载荷或载荷组合物,这在别处是可能的。在这样的情况下,载荷或载荷组合物的有效性可超出在常规治疗情况下可获得的。

[0412] 公开的组合物和方法还可通过以下编号的段落来理解。

[0413] 1.分离的肽,其包含含有以下的氨基酸序列:序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或者序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸并且第11位保留苏氨酸。

[0414] 2.段落1所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个氨基酸替换。

[0415] 3.段落1所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换。

[0416] 4.段落1所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。

[0417] 5.段落1至4中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少50%序列同一性。

[0418] 6.段落1至4中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少58%序列同一性。

[0419] 7.段落1至4中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少66%序列同一性。

[0420] 8.段落1至4中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少75%序列同一性。

[0421] 9.段落1至4中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少83%序列同一性。

[0422] 10.段落1至4中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 或序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 的变体,所述变体与序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1) 具有至少91%序列同一性。

[0423] 11.段落1至10中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}$,其中 X_6 是亮氨酸,其中 X_7 是异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸,其中 X_9 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,其中 X_{11} 是苏氨酸,并且其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_8 、 X_{10} 和 X_{12} 各自独立地是任何氨基酸。

[0424] 12.段落11所述的肽,其中 X_1 是脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或天冬酰胺,其中 X_2 是脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或天冬酰胺,并且其中 X_5 是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。

[0425] 13.段落11或12所述的肽,其中 X_7 是异亮氨酸并且其中 X_9 是亮氨酸。

[0426] 14.段落11至13中任一项所述的肽,其中 X_2 是脯氨酸。

[0427] 15.段落11至14中任一项所述的肽,其中 X_3 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_4 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_8 是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸或色氨酸,其中 X_{10} 是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、酪氨酸或色氨酸,并且其中 X_{12} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、或脯氨酸。

[0428] 16.段落11至15中任一项所述的肽,其中 X_1 是脯氨酸、甘氨酸或丙氨酸,其中 X_3 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_4 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_5 是甘氨酸、丙氨酸或缬氨酸,其中 X_8 是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸或精氨酸,其中 X_{10} 是丙氨酸、赖氨酸、组氨酸或精氨酸,并且其中 X_{12} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸。

[0429] 17.段落11至16中任一项所述的肽,其中在 X_7 和 X_9 处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。

[0430] 18.段落1至17中任一项所述的肽,其中任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。

[0431] 19.段落1至16中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列PPRRGLIKLKTS (SEQ ID NO:1)。

[0432] 20.分离的肽,其包含含有以下的氨基酸序列:序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸。

[0433] 21.段落20所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换。

[0434] 22.段落20所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或序

列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。

[0435] 23.段落20所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体具有一个、两个或三个氨基酸替换。

[0436] 24.段落20所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体具有一个或两个氨基酸替换。

[0437] 25.段落20至24中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)具有至少14%序列同一性。

[0438] 26.段落20至24中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)具有至少28%序列同一性。

[0439] 27.段落20至24中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)具有至少42%序列同一性。

[0440] 28.段落20至24中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)具有至少57%序列同一性。

[0441] 29.段落20至24中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)具有至少71%序列同一性。

[0442] 30.段落20至24中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)或序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)的变体,所述变体与序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)具有至少85%序列同一性。

[0443] 31.段落20至30中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含式 $X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}$,其中 X_{19} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,其中 X_{18} 是丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天冬酰胺或苏氨酸,并且其中 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 和 X_{17} 各自独立地是任何氨基酸。

[0444] 32.段落31所述的肽,其中 X_{16} 是谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、丙氨酸或甘氨酸,其中 X_{14} 是丝氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸或组氨酸,并且其中 X_{15} 是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。

[0445] 33.段落31或32所述的肽,其中 X_{17} 是天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、缬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、色氨酸或赖氨酸,并且其中 X_{13} 是苏氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸或天冬氨酸。

[0446] 34.段落31至33中任一项所述的肽,其中 X_{19} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{18} 是丝氨酸或天冬酰胺。

[0447] 35.段落31至34中任一项所述的肽,其中 X_{16} 是谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸或精氨酸,其中 X_{14} 是丝氨酸、天冬酰胺、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、苏

氨酸或天冬氨酸,并且其中X₁₅是赖氨酸、精氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。

[0448] 36.段落31至35中任一项所述的肽,其中X₁₉是精氨酸,其中X₁₈是丝氨酸。

[0449] 37.段落31至36中任一项所述的肽,其中X₁₆是谷氨酰胺或天冬酰胺,其中X₁₄是丝氨酸或天冬酰胺,并且其中X₁₅是赖氨酸、精氨酸或组氨酸。

[0450] 38.段落31至37中任一项所述的肽,其中在X₁₉和X₁₈处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。

[0451] 39.段落20至38中任一项所述的肽,其中任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。

[0452] 40.段落20至37中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3)。

[0453] 41.分离的肽,其包含含有以下的氨基酸序列:序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换,其中第3位保留精氨酸。

[0454] 42.段落41所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸和/或第8位保留精氨酸。

[0455] 43.段落41所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换,其中第6位保留亮氨酸、第8位保留精氨酸并且第5位保留精氨酸。

[0456] 44.段落41所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个或四个氨基酸替换。

[0457] 45.段落41所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个或三个氨基酸替换。

[0458] 46.段落41所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个或两个氨基酸替换。

[0459] 47.段落41至46中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少25%序列同一性。

[0460] 48.段落41至46中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少37%序列同一性。

[0461] 49.段落41至46中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少50%序列同一性。

[0462] 50.段落41至46中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少62%序列同一性。

[0463] 51.段落41至46中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4)

具有至少75%序列同一性。

[0464] 52.段落41至46中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体与序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 具有至少87%序列同一性。

[0465] 53.段落41至52中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含式 $X_{20}-X_{21}-X_{22}-X_{23}-X_{24}-X_{25}-X_{26}-X_{27}$,其中 X_{22} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或丙氨酸,其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸,并且其中 X_{20} 、 X_{21} 、 X_{23} 、 X_{24} 和 X_{26} 各自独立地是任何氨基酸。

[0466] 54.段落53所述的肽,其中 X_{24} 是精氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺或丙氨酸。

[0467] 55.段落53或54所述的肽,其中 X_{21} 是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸, X_{23} 是甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸,并且其中 X_{26} 是缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸或丙氨酸。

[0468] 56.段落53至55中任一项所述的肽,其中 X_{20} 是丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。

[0469] 57.段落53至56中任一项所述的肽,其中 X_{22} 是精氨酸或赖氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸、异亮氨酸或缬氨酸,其中 X_{27} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸。

[0470] 58.段落53至57中任一项所述的肽,其中 X_{24} 是精氨酸、赖氨酸或组氨酸。

[0471] 59.段落53至58中任一项所述的肽,其中 X_{24} 是精氨酸或赖氨酸。

[0472] 60.段落53至59中任一项所述的肽,其中 X_{22} 是精氨酸,其中 X_{25} 是亮氨酸,其中 X_{27} 是精氨酸。

[0473] 61.段落53至60中任一项所述的肽,其中 X_{24} 是精氨酸。

[0474] 62.段落53至61中任一项所述的肽,其中在 X_{22} 、 X_{25} 和 X_{27} 处的任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。

[0475] 63.段落41至62中任一项所述的肽,其中任何氨基酸替换均是保守氨基酸替换。

[0476] 64.段落41至61中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4)。

[0477] 65.段落41至61中任一项所述的肽,其中所述氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR AKLAAALE (SEQ ID NO:14)。

[0478] 66.分离的肽,其包含第一氨基酸序列和第二氨基酸序列,所述第一氨基酸序列包含序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 或者序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸替换,其中第7位保留精氨酸和/或第6位保留丝氨酸,所述第二氨基酸序列包含序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 或者序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4) 的变体,所述变体具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个氨基酸替换,其中第3位保留精氨酸。

[0479] 67.段落1至66中任一项所述的肽,其中所述肽可通过所述氨基酸序列与纤连蛋白额外结构域B (FN-EDB) 选择性地结合。

[0480] 68.段落67所述的肽,其中所述肽包含具有序列TSKQNSR (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列。

- [0481] 69.段落1至66中任一项所述的肽,其中所述肽可通过所述氨基酸序列与生腱蛋白-C C结构域(TNC-C)选择性地结合。
- [0482] 70.段落69所述的肽,其中所述肽包含具有序列AGRGRLLVR (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。
- [0483] 71.段落1至70中任一项所述的肽,其中所述肽可通过所述氨基酸序列与纤连蛋白额外结构域B(FN-EDB)和生腱蛋白-C C结构域(TNC-C)二者选择性地结合。
- [0484] 72.段落1至71中任一项所述的肽,其中所述肽的长度小于20个氨基酸。
- [0485] 73.段落1至72中任一项所述的肽,其中所述肽的长度小于15个氨基酸。
- [0486] 74.段落1至73中任一项所述的肽,其中所述肽的长度为12个氨基酸。
- [0487] 75.段落1至19中任一项所述的肽,其中所述肽包含序列PPRRGLIKLKTSSNTKENS VVASLRP (SEQ ID NO:2)。
- [0488] 76.段落1至75中任一项所述的肽,其中所述肽是线性的。
- [0489] 77.段落1至75中任一项所述的肽,其中所述肽是环状的。
- [0490] 78.段落1至77中任一项所述的肽,其中所述肽是经修饰肽。
- [0491] 79.段落1至78中的一项所述的肽,其中所述肽是甲基化肽。
- [0492] 80.段落79所述的肽,其中所述甲基化肽包含甲基化氨基酸区段。
- [0493] 81.段落1至80中任一项所述的肽,其中所述肽在至少一个位置处被N-或C-甲基化。
- [0494] 82.组合物,其包含段落1至81中任一项所述的肽。
- [0495] 83.段落82所述的组合物,其还包含载荷组合物,其中所述肽和所述载荷组合物彼此共价偶联或非共价缔合。
- [0496] 84.段落82或83所述的组合物,其中所述肽选择性地归巢至表达FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤。
- [0497] 85.段落82或83所述的组合物,其中所述组合物选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质。
- [0498] 86.段落83至85中任一项所述的组合物,其中所述载荷组合物包含治疗剂、可检测剂、载体、载剂、表面分子或其组合。
- [0499] 87.段落83至86中任一项所述的组合物,其中所述载荷组合物包含治疗剂。
- [0500] 88.段落86或87所述的组合物,其中所述治疗剂是抗血管生成剂、抗菌剂、抗癌剂、抗炎剂、化学治疗剂(例如癌症化学治疗剂)、细胞毒性剂、免疫刺激剂、免疫抑制剂、核酸分子、多肽、促血管生成剂、促凋亡剂、促炎剂、小分子或毒素。
- [0501] 89.段落86至88中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂是 p_0 (KLAKLAK)₂ (SEQ ID NO:6)。
- [0502] 90.段落83至89中任一项所述的组合物,其中所述载荷组合物包含可检测剂。
- [0503] 91.段落86至90中任一项所述的组合物,其中所述可检测剂是标记、标记剂、造影剂、显像剂、微泡(例如碳氟化合物微泡)、荧光团(例如FAM、荧光素或罗丹明)或放射性核素(例如碳-11、碳-13、铟-111或镓-99)。
- [0504] 92.段落86至91中任一项所述的组合物,其中所述可检测剂是FAM。
- [0505] 93.段落83至92中任一项所述的组合物,其中所述载荷组合物包含载体、载剂、表

面分子或其组合。

[0506] 94.段落86至93中任一项所述的组合物,其中所述载体、载剂和/或表面分子独立地包含珠、脂质体、胶束、微粒、纳米粒(例如白蛋白纳米粒、铁氧化物纳米粒或银纳米粒)、纳米虫(例如铁氧化物纳米虫)、磷脂、聚合物、噬菌体、噬菌体衣壳、噬菌体颗粒、病毒衣壳、病毒颗粒、病毒、病毒样颗粒或微泡(例如碳氟化合物微泡)。

[0507] 95.段落83至94中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含多种载荷组合物。

[0508] 96.段落83至95中任一项所述的组合物,其中所述载荷组合物包含表面分子。

[0509] 97.段落96所述的组合物,其中所述肽与所述表面分子缀合。

[0510] 98.段落96或97所述的组合物,其中缀合肽中的一种或更多种通过接头与所述表面分子间接缀合。

[0511] 99.段落96至98中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含多种接头。

[0512] 100.段落98或99所述的组合物,其中所述接头中的至少一种包含聚乙二醇。

[0513] 101.段落96至100中任一项所述的组合物,其中所述表面分子包含纳米粒、纳米虫、铁氧化物纳米虫、铁氧化物纳米粒、白蛋白纳米粒、银纳米粒、脂质体、胶束、磷脂、聚合物、微粒或碳氟化合物微泡。

[0514] 102.段落96至101中任一项所述的组合物,其中所述表面分子包含脂质体。

[0515] 103.段落82至102中任一项所述的组合物,其中所述组合物与表达FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤结合。

[0516] 104.段落82至102中任一项所述的组合物,其中所述组合物与具有FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质结合。

[0517] 105.段落82至104中任一项所述的组合物,其中所述组合物内化入细胞。

[0518] 106.段落82至105中任一项所述的组合物,其中所述组合物减慢肿瘤生长。

[0519] 107.段落82至106中任一项所述的组合物,其还包含所述肽的一个或更多个拷贝。

[0520] 108.段落107所述的组合物,其中所述组合物包含所述肽的至少100个拷贝。

[0521] 109.段落108所述的组合物,其中所述组合物包含所述肽的至少1000个拷贝。

[0522] 110.包括以下的方法:将肿瘤暴露于段落82至109中任一项所述的组合物。

[0523] 111.段落110所述的方法,其中所述组合物与所述肿瘤选择性地结合。

[0524] 112.段落110或111所述的方法,其中所述肿瘤在对象中。

[0525] 113.段落112所述的方法,其中通过向所述对象施用所述组合物来使所述肿瘤暴露于所述组合物。

[0526] 114.段落110至113中任一项所述的方法,其中所述肿瘤表达FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者。

[0527] 115.段落114所述的方法,其中所述组合物与表达FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的所述肿瘤选择性地结合。

[0528] 116.包括以下的方法:将胞外基质暴露于段落82至109中任一项所述的组合物。

[0529] 117.段落116所述的方法,其中所述组合物与所述胞外基质选择性地结合。

[0530] 118.段落116所述的方法,其中所述胞外基质在对象中。

[0531] 119.段落118所述的方法,其中通过向所述对象施用所述组合物来使所述胞外基质暴露于所述组合物。

- [0532] 120.段落116至119中任一项所述的方法,其中所述胞外基质具有FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者。
- [0533] 121.段落120所述的方法,其中所述组合物与具有FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的所述胞外基质选择性地结合。
- [0534] 122.段落110至121中任一项所述的方法,其中所述组合物具有治疗性作用。
- [0535] 123.段落122所述的方法,其中所述治疗性作用包括提高凋亡。
- [0536] 124.段落112至115或118至123中任一项所述的方法,其中所述对象患有疾病或病症。
- [0537] 125.段落124所述的方法,其中所述疾病是癌症。
- [0538] 126.段落110至125中任一项所述的方法,其中所述组合物选择性地归巢至表达FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的肿瘤。
- [0539] 127.段落126所述的方法,其中所述组合物选择性地归巢至具有FN-EDB、TNC-C或者FN-EDB和TNC-C二者的胞外基质。
- [0540] 128.段落82至109中任一项所述的组合物,其用作药物。
- [0541] 129.段落82至109中任一项所述的组合物,其用于在对象中治疗癌症。
- [0542] 130.段落82至109中任一项所述的组合物,其用于在对象中检测癌症。
- [0543] 131.段落82至109中任一项所述的组合物,其用于在对象中可视化癌症。
- [0544] 132.段落82至109中任一项所述的组合物,其用于在对象中定位癌症。
- [0545] 133.段落82至109中任一项所述的组合物用于制造用于癌症治疗的药物的用途。
- [0546] 134.段落82至109中任一项所述的组合物用于制造用于癌症检测的药物的用途。
- [0547] 135.癌症诊断方法,其包括向有此需要的对象施用有效量的段落90至109中任一项所述的组合物。
- [0548] 136.段落125至127中任一项所述的方法、段落129至132中任一项所述应用的组合物、段落133或134所述的用途或者段落135所述的方法,其中所述癌症是表10中的癌症。
- [0549] 137.在公开的方法、公开的组合物或公开的用途的一些形式中,所述癌症可以是实体瘤癌症,例如表11中的实体瘤癌症。
- [0550] 138.段落82至102中任一项所述的组合物,其中所述组合物与表达NRP-1、TNC-C或者NRP-1和TNC-C二者的肿瘤结合。
- [0551] 139.段落82至102中任一项所述的组合物,其中所述组合物与具有NRP-1、TNC-C或者NRP-1和TNC-C二者的胞外基质结合。
- [0552] 140.段落82至102中任一项所述的组合物,其中所述组合物与表达NRP-1、TNC-C或者NRP-1和TNC-C二者的细胞结合。
- [0553] 141.段落138至140中任一项所述的组合物,其中所述组合物内化入细胞。
- [0554] 142.段落41至66中任一项所述的肽,其中所述肽可通过所述氨基酸序列与NRP-1选择性地结合。
- [0555] 143.段落142所述的肽,其中所述肽可通过所述氨基酸序列与NRP-1 b1b2结构域选择性地结合。

实施例

[0556] 提出了以下实施例以便向本领域普通技术人员提供对于如何制备和评价本文中要求保护的化合物、组合物、制品、装置和/或方法的完整公开内容和描述,并且其旨在仅仅是示例性的,并且不旨在限制本公开内容。已努力确保对于数字(例如量、温度等)的准确性,但应考虑一些误差和偏差。除非另有指出,否则份数是按重量计份数,温度以℃计或以环境温度计,并且压力处于或接近大气压。

[0557] 实施例1:PL1肽和相关肽的选择和特性

[0558] A. 材料和方法

[0559] 1. 材料

[0560] 磷酸缓冲盐水(phosphate-buffered saline,PBS)购自Lonza(Verviers, Belgium), $K_3[Fe(CN)_6]$ 、HCl、核固红(Nuclear Fast Red)、二甲苯替代物、异丙醇、Triton-X、吐温20、 $CHCl_3$ 、MeOH和二甲基甲酰胺(dimethylformamide,DMF)均购自Sigma-Aldrich(Munich,Germany)。蛋白质(FN-EDB、TNC-C、NRP1、NCL和单链抗体FN-EDB-L19和TNC-C-G11)的克隆、表达、纯化,以及多克隆兔抗体的产生在下文和表1中描述。

[0561] 表1:所使用抗体列表

[0562]

抗体	供应商	目录号	稀释度
抗His标签	Abcam, Icosagen	ab5000, A2-501-100	1:5000
抗荧光素	Thermo Fisher Scientific	A889	1:200
CD31	BD Biosciences	557355, 553370	1:200
巢蛋白	Thermo Fisher Scientific	MA1-110	1:100
CD11b	BD Biosciences	557395	1:100
LYVE-1	eBioscience	14044382	1:200
CD68	Bio-Rad	MCA1957A488	1:100
Ki67	Novusbio	NB500-170	
经切割胱天蛋白酶3	Cell Signaling Technology	966	1:200
FN-EDB	Absoluteantibody	Ab00634	10 μ g

[0563]

ScFV L19 FN-EDB	内部		10 µg
ScFV G11 TNC-C	内部		10 µg
兔多克隆 TNC-C	内部		1:250
兔多克隆 FN-EDB	内部		1:250
驴抗小鼠 IgG (H+L) HRP	Jackson Immuno Research	715-035-1510	1:5000 1:10000
驴抗兔 IgG (H+L) HRP	Jackson Immuno Research	711-035-1520	1:5000 1:10000
Alexa 546 山羊抗小鼠 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A11003	1:400
Alexa 546 山羊抗大鼠 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A11081	1:400
Alexa 546 驴抗山羊 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A11056	1:400
Alexa 546 抗仓鼠 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A21111	1:400
Alexa 546 山羊抗兔 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A11010	1:400
Alexa 488 山羊抗兔 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A11008	1:400
Alexa 488 山羊抗小鼠 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A11001	1:400
Alexa 647 山羊抗兔 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A21245	1:400
Alexa 647 山羊抗大鼠 IgG (H+L)	Invitrogen/Molecular Probes	A21247	1:400
IR染料800CW 山羊抗小鼠 IgG (H + L)	LI-COR Biosciences	926-32210	1:20000
IR染料680RD 山羊抗兔 IgG (H + L)	LI-COR Biosciences	926-68071	1:20000

[0564] 2. 细胞系

[0565] U87MG GBM和PC3前列腺癌细胞获自ATCC,以及NCH421K细胞获自CLS Cell Lines

Service GmbH (Eppelheim, Germany)。WT-GBM和VEGF-KO GBM细胞由Gabriele Bergers (Leuven, Belgium) 赠予。

[0566] 3. 临床样品

[0567] 根据爱沙尼亚塔尔图大学伦理委员会 (Ethics Committee of the University of Tartu, Estonia) 批准的方案 (许可#243/T27), 从爱沙尼亚塔尔图大学诊所 (Tartu University Clinics, Tartu, Estonia) 获得GBM的新鲜手术样品。

[0568] 4. 动物实验

[0569] 动物实验程序由爱沙尼亚农业部动物实验委员会 (Estonian Ministry of Agriculture, Committee of Animal Experimentation) 批准, 项目#42和#48。将无胸腺裸鼠 (HD) 饲养在塔尔图大学 (Tartu, Estonia) 生物医学和转化医学研究所动物设施中的无病原体环境中。对于肿瘤建模, 使用荷有原位GBM (NCH421K、U87MG和WT-GBM) 以及s.c. 前列腺癌 (PC3) 的裸鼠。对于原位GBM诱导, 将小鼠放置到立体定向框架的耳棒 (ear bar) 中, 使用手术刀进行中线切口, 暴露矢状缝和冠状缝, 以及使用注射器在前囟前0.5mm和中线外侧2.5mm处的颅骨上刮通钻孔。将3 μ L PBS中的GBM细胞用汉密尔顿氏注射器 (Hamilton syringe) 在4分钟内注射在3mm深度, 并且在注射之后5分钟将针移除。使用骨蜡封闭钻孔, 用无菌棉签清洁表面, 并且通过缝线缝合皮肤。

[0570] 5. 噬菌体生物淘选

[0571] 将展示在T7 415-1b噬菌体支架上的NNK编码的环状CX7C和线性X7肽文库 (多样性为约 5×10^8) 用于生物淘选 (Novagen, EMD Biosciences, MA, USA)。为了鉴定与TNC-C和FN-EDB二者相互作用的双特异性肽, 对两种靶标进行交叉筛选。在第一轮选择期间, 将包被有20 μ g/ml重组纯化的TNC-C的微量滴定板用包含1%牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的PBS进行封闭, 随后将其与PBS中的 5×10^8 pfu噬菌体在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜, 随后洗涤来去除背景, 并随后进行噬菌体挽救以及在大肠杆菌 (E. coli) BLT5403菌株 (Novagen, EMD Biosciences, MA, USA) 中进行扩增 (Teesalu et al., Methods Enzymol. 503:35-56 (2012))。随后的生物淘选轮在包被有经六组氨酸标记的FN-EDB (3 μ g/ μ l珠) 的Ni-NTA磁性琼脂糖珠 (QIAGEN, Hilden, Germany) 上在室温下进行。在选择5轮之后, 对随机克隆集合进行测序, 并将单独肽-噬菌体克隆和对照 (G7肽展示或无插入物 (insertless)) 噬菌体与经FN-EDB和经TNC-C包被的磁珠一起孵育。将RPARPAR噬菌体 (SEQ ID NO:5) 和经His标记的NRP-1 b1b2结构域用作阳性对照 (Teesalu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 16157-62 (2009))。为了求解肽噬菌体与FN-EDB和TNC-C的结合的特异性, 将经蛋白质包被的珠与20 μ g/ml封闭兔多克隆抗体一起预孵育。

[0572] 6. 肽和纳米粒的合成

[0573] 所述肽为内部合成的或从TAG Copenhagen (Frederiksberg, Denmark) 订购。使用Fmoc/t-Bu化学物质在微波辅助自动肽合成仪 (Liberty, CEM Corporation, NC, USA) 上合成肽, 将其通过HPLC使用乙腈-水中的0.1% TFA纯化至90%至95%纯度, 以及通过Q-TOF质谱分析进行验证。所有肽均以游离羧基末端合成; 将5 (6) -羧基荧光素 (FAM) 或生物素通过6-氨基己酸间隔子与肽N端连接。根据 (Park et al., Adv. Mater. 20:1630-1635 (2008)) 的公布方案 (稍有修改) 制备铁氧化物纳米虫 (nanoworm, NW)。使用马来酰亚胺-5K-PEG-NHS使胺化NW PEG化。通过添加至肽N端的半胱氨酸残基的硫醇基与功能化颗粒上的马来酰亚胺之

间的硫醚键将肽与NW偶联。合成同位素纯银纳米粒 (AgNP) 并使其功能化, 如前所述 (Willmore et al., Nanoscale.8:9096-9101 (2016))。

[0574] 7. 无细胞肽结合测定

[0575] 将经FAM标记的肽包被在ELISA板 (Nunc Maxisorp, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) 上, 用包含1%BSA的PBS进行封闭, 并且将其在PBS中以2 μ g/孔与重组蛋白一起孵育6小时。使用以下检测蛋白质: 抗His标签抗体, 随后辣根过氧化物酶缀合的二级抗体、显色反应、以及使用微板阅读仪 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) 在450nm处测量吸光度。

[0576] 8. 基于激光消融ICP-MS的AgNP生物分布研究

[0577] 如 (Willmore et al., Nanoscale.8:9096-9101 (2016)) 所述制备同位素纯Ag¹⁰⁷NP和Ag¹⁰⁹NP并用生物素化PL1肽 (PL1-Ag¹⁰⁹NP) 或生物素 (生物素-Ag¹⁰⁷Np) 颗粒使其功能化。将经PL1功能化AgNP和对照AgNP以1:1比例混合并i.v.注射在荷有U87MG原位GBM的裸鼠中。在5小时之后, 将小鼠用20mL PBS通过心脏左心室进行灌注。将器官快速冷冻以用于冷冻切片和ICP-MS分析。将快速冷冻器官进行冷冻切片 (30 μ m) 并在-20℃下储存。将样品解冻并在干燥器中进行干燥, 然后进行LA-ICP-MS分析。

[0578] 使用与Agilent 8800QQQ ICP-MS联用的使用HelEx 2体积消融池的Cetac LSX-213 G2+激光消融 (laser ablation, LA) 系统进行¹⁰⁹Ag和¹⁰⁷Ag同位素在组织切片上的映射 (2D映射和线扫描)。LA-ICP-MS设置使用NIST 612玻璃进行优化。用于LA-ICP-MS的主要参数示于表2中。¹³C、¹⁰⁷Ag和¹⁰⁹Ag同位素分别用对应于0.05秒工作循环 (duty cycle) 的9.5和14毫秒的驻留时间进行检测。将¹³C用作内标来解释经消融组织的体积差异。使用Chromium 2.2和Iolite v3.62软件构建数据简化以及元素和同位素比例图。

[0579] 进行多个平行线光栅扫描以生成分布图。光栅线彼此直接邻近 (具有65 μ m偏移) 并且使整个映射区域消融。典型的样品面积为约14 $\times$ 8mm, 并且用于单样品的运行时间为约4小时。

[0580] 表2. 用于LA ICP MS的操作参数。

[0581]

激光功率密度	0.9 J/cm ² (线) 或 3.6 J/cm ² (图)
激光束直径	40 μm 圆形 (线) 或 65 μm 方形 (图)
光栅速率	40 μm/s (线) 或 130 μm 方形 (图)
激光重复率	20 Hz
He 载气	0.80 L/分钟
Ar 载气	0.95 L/分钟
RF 功率	1450 W
采集模式	峰跳跃
积分时间/质量	¹³ C – 9.5 毫秒 ¹⁰⁷ Ag – 14 毫秒

[0582]

	¹⁰⁹ Ag – 14 毫秒
线光栅运行时间	7 分钟
映射运行时间	460 分钟

[0583] 9. NW的体内生物分布研究

[0584] 对于NW生物分布研究,将PBS中的NW (7.5mg/kg) 注射到荷瘤小鼠的尾静脉中,随后用20ml PBS/DMEM进行心脏灌注,然后收集肿瘤和对照器官以进行成像。在对照实验中,在注射NW之前15分钟全身预注射阻断FN-EDB和/或TNC-C抗体 (30μg/小鼠),然后进行NW注射。

[0585] 10. 共焦显微术

[0586] 将快速冷冻10μm肿瘤冷冻切片封固在Superfrost^{TM+}载片上。将切片在RT下平衡,并将其用4%多聚甲醛/甲醇固定,并用PBST (PBS+0.05%吐温20) 透化,用PBST、5%BSA、5%山羊血清 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) 在RT下封闭30分钟,随后在RT下进行一级抗体孵育,持续1小时。一级抗体是兔抗荧光素IgG (目录号A889, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)、大鼠抗小鼠CD31 (BD Biosciences, CA, USA)、小鼠抗人巢蛋白 (#MA1-110, Thermo Fisher Scientific Inc.)、大鼠抗小鼠CD31、大鼠抗小鼠CD11b (目录号553370; 557395, BD Biosciences, CA, USA)、大鼠抗小鼠LYVE-1 (目录号14044382, eBioscience, CA, USA)、大鼠抗小鼠CD68 (#MCA1957A488, Bio-Rad, CA, USA)、兔多克隆抗

Ki67 (目录号NB500-170, Novusbio, UK) 和兔抗经切割胱天蛋白酶3 (目录号966, Cell Signaling Technology, MA, USA) 和内部制备的经CF647 (或经CF546) 标记的单链抗体ScFV L19 (针对FN-EDB) 和ScFV G11 (针对TNC-C)。二级抗体Alexa 488山羊抗兔IgG、Alexa 647山羊抗大鼠IgG和Alexa 546山羊抗小鼠IgG均来自Invitrogen (USA)。用DAPI (分子探针) 以1 μ g/ml对核进行复染。将盖玻片用Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) 封固在载玻片上, 使用共焦显微术 (Olympus FV1200MPE, Tokyo, Japan) 进行成像, 并使用FV10-ASW4.2查看器、Imaris软件和ImageJ免费软件进行分析。

[0587] 11. NW覆盖测定 (overlay assay)

[0588] 将新鲜的手术GBM (在尸检期间获得) 在液氮中快速冷冻, 以8 μ m进行冷冻切片, 用甲醇固定, 并用TBS透化, 随后是包含TBS中的5% BSA、5% 山羊血清和5% FBS的封闭缓冲液。对于覆盖, 将切片与20 μ g/载片的PL1-NW或NW一起在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。将切片洗涤并用封闭缓冲液进行封闭, 随后使用兔抗荧光素一级抗体进行免疫染色, 并使用Alexa-488抗兔二级抗体进行检测。通过经荧光素标记的单链抗体ScFV L19 FN-EDB-CF647和ScFV G11 TNC-C-CF555检测FN-EDB和TNC-C。

[0589] 12. 体内血管生成模型和多光子活体内成像

[0590] 血管生成通过将 2.5×10^8 PFU的驱动小鼠VEGF¹⁶⁴ (Ad-VEGF¹⁶⁴) 表达的腺病毒载体皮内注射到7至8周龄雌性裸鼠的左耳中来诱导 (Nagy et al., Methods Enzymol. 444:43-64 (2008))。将右耳用作对照。在诱导血管生成之后4天和活体内成像之前24小时i.v.注射PL1-NW或NW (以7.5mg/kg)。以30mg/kg i.v.注射德克萨斯红 (Texas Red) /伊文思蓝 (Evans Blue) 以使血管显现。使用兽用级胶带将耳固定在盖玻片上以进行成像, 并通过琼脂糖在耳周制备模具以进行成像。在整个实验中用加热垫维持体温。在920nm激发波长下获取图像和影像, 在相同条件下采集光学切片, 并且将实验以一式三份重复。活体内成像使用配备有MaiTai DeepSee IR激光器 (Spectra-Physics) 和配备有XLPLN25x/1.05NA水浸没物镜 (Olympus) 的多光子激光扫描荧光显微镜 (Olympus FV1200MPE-BX61WI) 进行。

[0591] 13. 磁共振成像

[0592] 对于MRI, 将荷有原位NCH421k GBM的裸鼠i.v.注射5mg/kg的铁氧化物纳米虫。在NW注射之后五小时, 将小鼠用异氟烷麻醉, 并使用配备有Para Vision Acquisition 6.0.1软件 (Bruker, Ettlingen, Germany) 的9.4Tesla BioSpec 94/21 (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany) 进行MRI。在活体内MRI之后, 将动物用PBS进行灌注以去除血液和背景循环NW, 并进行死后MRI。在成像之后, 收获肿瘤和对照组织并将其切片以进行免疫荧光染色。小鼠接受氧混合物中的异氟烷 (1.5%, 流量为200ml/分钟) 以进行麻醉; 在整个实验中监测体温和呼吸率。以矢状和冠状方向获取T2*图MGE (多梯度回波, Multiple Gradient Echo) 序列。在数据采集期间使用以下参数: 层面厚度-0.375mm (3个层面平均离线 (offline) 以提高信/噪比); 层面间间隙-0.375mm; 重复时间-800; 回波时间-3.5至38.5毫秒; 翻转角-50 $^{\circ}$; 轴向层面-128, 像素带宽-292.9; 成像频率-400.3; 矩阵-256 $\times$ 256, 以及磁场强度-9.4。为了计算T2弛豫时间, 通过使用图像序列分析 (image sequence analysis, ISA) 工具包 (Paravision 5, Bruker), 使用T2vtr拟合函数 $y = A + C \cdot \exp(-t/T2)$ (A=绝对偏差, C=信号强度, T2=自旋-自旋弛豫时间) 在图像上人工绘制目的区域 (ROI) 以进行T2评价。为了计算相对于参考区域的肿瘤中的平均信号强度, 在给定回波时间 (echo time, TE)

在图像上人工绘制ROI。将实验以一式三份重复。

[0593] 14. 实验性肿瘤治疗

[0594] 将100 μ l PBS中的U87MG细胞(4×10^6)皮下植入到11至15周龄雄性裸鼠的右侧腹中。每隔一天记录动物体重和肿瘤体积[长 $\times$ (宽 $\times$ 宽)/2],直至肿瘤体积达到约100mm³。将动物随机化为4组(PBS、FAM-D₂[KLAKLAK]₂-NW (SEQ ID NO:6)、FAM-PL1-NW和FAM-PL1-D₂[KLAKLAK]₂-NW (SEQ ID NO:6);8只小鼠/组)。将100 μ l的NW(以5mg/kg体重的铁)或PBS每隔一天静脉注射到尾静脉中,10次注射。在处理期间和治疗之后记录肿瘤尺寸、体重、存活和行为。当肿瘤体积达到2000mm³(或 $>10\%$ 体重)时,将小鼠处死,并切除器官和肿瘤,宏观地观察并将其快速冷冻。使用GraphPad Prism 6软件计算肿瘤体积、Kaplan-Meier存活和体重曲线,其中p值 <0.05 被认为是显著的。对于针对经颅内植入的NCH421k GBM的实验性治疗,在肿瘤植入之后3天将32只肿瘤小鼠随机化为4组。每隔一天i.v.注射100 μ l的PBS或者包含FAM-D₂[KLAKLAK]₂-NW (SEQ ID NO:6)、FAM-PL1-NW和FAM-PL1-D₂[KLAKLAK]₂-NW (5mg/kg体重的铁;SEQ ID NO:6)的PBS,共10次注射。在处理期间和处理之后记录肿瘤尺寸、体重、存活和行为。使用GraphPad Prism 6计算Kaplan-Meier存活和体重曲线,并且P值 <0.05 被认为是显著的。

[0595] 15. 统计学分析

[0596] 使用Prism 6软件进行统计学分析。将结果表示为平均值与指示 $\pm$ SEM的误差棒。对于2组的比较,使用未配对t检验或ANOVA检验(p <0.05 被认为是显著的)。P值被认为如下:*p ≤ 0.05 、**p ≤ 0.01 、***p ≤ 0.001 和p**** ≤ 0.0001 。分析详情示于表3中。

[0597] 表3:统计学分析详情

[0598]

检验	N	P 值	ANOVA		t 检验	
			自由度	F 值	自由度	t 值
双尾Student 未配对t检验	3个独立 实验	< 0.0001	NA	NA	2	1644
		0.0019	NA	NA	1	331.4
		0.0677	NA	NA	1	9.374
双尾Student 未配对t检验	3个独立实验, 以及各自3 一式三份	0.0002	NA	NA	2	80.07
		0.0160	NA	NA	2	7.798
双尾Student 未配对t检验	6	< 0.0001	NA	NA	10	6.348
	3	< 0.0001	NA	NA	9	10.42
	3	0.0079	NA	NA	8	3.519
	4	0.0015	NA	NA	4	7.732
	11	0.0015	NA	NA	16	3.820
	8	0.0128	NA	NA	13	2.884
	8	0.0214	NA	NA	14	2.590
用Dunnett多重比较 检验的单向ANOVA	11	< 0.0001	29	22.64	NA	NA
	11	< 0.0001	29	22.64	NA	NA
双尾Student 未配对t检验	4	0.0005	NA	NA	9	5.245
用Bonferroni多重 比较检验的 单向ANOVA	5	< 0.0001	14	364.8	NA	NA
		0.0010	14	364.8	NA	NA
用Bonferroni多重比 较检验的双向ANOVA	6	0.0001	243	7.317	NA	NA
用对数秩(Mantel-Cox) 检验的Kaplan-Meier 分析	8	0.0125	1	NA	NA	NA
双尾Student 未配对t检验	4	0.0222	NA	NA	5	3.269
双尾Student 未配对t检验	3	0.0043	NA	NA	6	4.454
		0.0291	NA	NA	6	2.851
		0.0364	NA	NA	6	2.681

[0599] 对于动物研究,样品量基于分别产生1.2和2.3效应量的先前实验(Sugahara et al., Cancer Cell.16:510-520 (2009)) 和未发表数据进行估计。因此,对于样品计算,保守地假设效应量为1.5。为了有至少>80%的概率检测到对照和肽缀合的纳米粒组之间的平均值差异为2.2标准偏差,在每个处理组中分配了8只小鼠的样品量。使用两平均值不等式

检验程序在PASS (NCSS 2008) 或G Power (Faul et al., Behavior Research Methods 39: 175-191 (2007)) 功率分析软件中进行样品量计算。将NCH421k动物不知情地分配至实验组或对照组。一旦肿瘤达到100mm³, 将U87动物随机分配至实验组或对照组。动物均未从分析中排除。实验期间未使用盲法。我们的实验设计确保引入最小偏差(或噪声), 其可能会被误认为是治疗作用(通过确保相同性别、实验开始时相似的动物体重、相同的动物年龄、相同类型的舍饲、一起分笼的数只动物)。

[0600] 16. FN-EDB和TNC-C的克隆、表达和纯化

[0601] 载体构建。包含TNC全长cDNA的pF1K (Promega, #FXC00319) 衍生质粒和pASK75-Fn7B8/pASK75-Fn789质粒由Arne Skerra博士友情提供。使用Phusion热启动II高保真DNA聚合酶 (Thermo Fisher Scientific Inc #F-537L; 结构域TNC-C的引物对: 5'-CTCCTCTCATATGGAGGCCCTGCCCTTC-3' (SEQ ID NO:7) 和

5'-CAGACACTCGAGTTATCATGTAACAATCTC-3' (SEQ ID NO:8) 以及FN-EDB的引物对

5'-CTCCCTCICATA/GGAGGIGCCCAACICA-3' (SEQ ID NO:9) 和

5'-CAGACACTCGAGTTATCACGTTTGTGTGT-3' (SEQ ID NO:10); 斜体的为NdeI和XhoI限制性位点) 通过PCR对编码TNC-C和FN-EDB的cDNA区进行扩增。将片段克隆在pET28a+质粒中以作为N端经His标记的蛋白质进行表达。

[0602] TNC-C和FN-EDB的表达和纯化。将pET28a+TNC-C和pET28a+FN-EDB质粒转化到大肠杆菌BL21 Rosetta 2 (DE3) pLysS菌株 (Novagen, #70956) 中。通过添加0.5mM终浓度的异丙基β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) (Sigma, #I6758) 诱导蛋白质表达, 并且将细菌在18℃下培养16小时。通过离心收集细菌细胞, 将其重悬于包含无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物和DNase I的冰冷的IMAC缓冲液 (25mM Tris-HCL、400mM NaCl、25mM咪唑pH 8) 中, 并通过声处理 (Bandelin Sonopuls HD 2070, Germany) 进行裂解。使用HiTrap IMAC HP柱 (GE Healthcare#17-0920-05) 在ÄKTA 纯化系统 (GE Healthcare) 上对澄清的细菌裂解物进行纯化, 并且使用3.5kDa截止值、3mL Slide-A-Lyzer透析盒 (Thermo Scientific#66330) 将洗脱物针对PBS进行透析。通过二辛可宁酸测定 (Thermo Scientific#23227) 确定FN-EDB和TNC-C浓度, 并且通过SDS-PAGE评估蛋白质纯度。使用质谱和从头合成 (de novo) 肽测序来确定纯化蛋白质的尺寸和序列。

[0603] 17. 抗体产生

[0604] 单链抗体: 编码FN-EDB-L19-ScFv和TNC-C-G11-scFv的cDNA序列检索自美国专利申请 (分别为US8455625 B2和EP2157102 A1), 并且将其用于产生基于pET28a+的蛋白质表达构建体。将大肠杆菌BL21 RosettaTM 2 (DE3) pLysS (Novagen, #70956) 细胞用驱动单链抗体表达的重组质粒进行转化。抗体使用蛋白A GraviTrap琼脂糖 (Protein A GraviTrap Sepharose) (GE Healthcare#28-9852-54) 进行纯化, 随后针对固定化FN-EDB和TNC-C进行亲和纯化。纯化的单链抗体通过SDS-PAGE进行分析。使用牵出测定 (pull-down assay) 验证纯化的单链抗体与靶FN-EDB和TNC-C结构域的相互作用。

[0605] 多克隆兔抗体: 在LabAs LLC (Tartu, Estonia) 用重组TNC-C和FN-EDB对兔进行免疫接种。使用蛋白G柱从免疫血清中纯化多克隆抗体 (polyclonal antibodies, PAb), 随后针对固定化FN-EDB和TNC-C进行亲和纯化。通过对FN-EDB、TNC-C和对照蛋白进行ELISA和Western印迹确定PAb特异性。

[0606] 18. 铁氧化物纳米虫 (NW) 的制备和表征

[0607] 根据公布方案 (稍有修改) 制备 NW。将 0.63g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich#44944) 和 0.25g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich#44939) 与 4.5g 右旋糖酐 T20 (Pharmacosmos) 在 30ml 去离子 (deionized, DI) 水中混合。将反应混合物在冰上冷却至 0°C, 并且在稳定的氮流和剧烈搅拌下, 在 45 分钟内添加 1ml 的 28% 水性氢氧化铵 (Sigma-Aldrich#338818)。接下来, 将反应混合物在 80°C 下加热 1 小时并冷却至室温 (RT)。在用 90ml DI 水稀释之后, 将胶体悬浮液在 50ml Falcon 管中以 335G 在 RT 下离心 20 分钟以去除聚集体。将上清液转移至 100,000MWC0 离心过滤器 (Millipore), 在 4°C 下以 760G 离心 30 分钟, 用 DI 水加满, 并重悬。将右旋糖酐与表氯醇交联, 并且使用 28% 水性氢氧化铵使 NW 胺化 (24 小时), 并针对 1X PBS 透析 48 小时。将具有另外半胱氨酸残基的肽通过马来酰亚胺-PEG (5000) -NHS 接头 (Jenkem) 与 NW 偶联。NW 通过 0.22 μm 过滤器过滤并且在 1 周内使用。

[0608] 通过使用铁氧化物构建校准曲线以及使用 NanoDrop 2000c 分光光度计 (Thermo Scientific) 在 400nm 处测量 NW 的吸光度来确定 NW 的浓度。浓度测量通过 ICP-MS 来确定。使用透射电子显微术 (transmission electron microscopy, TEM, Tecnai 10, Philips, Netherlands) 对纳米粒进行成像。使用动态光散射 (Dynamic Light Scattering, DLS; Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) 评估 NW 的 ζ 电位、多分散性和尺寸。

[0609] 19. AgNP 的合成和表征

[0610] 如前所述进行野生型 (wt) 和同位素 (Ag^{107} 和 Ag^{109}) AgNP 的合成。将 CF555-N-羟基琥珀酰亚胺-染料 (NHS-染料) 与 PEG 的末端胺基缀合, 并将生物素化肽包被在 AgNP 表面上的中性抗生物素蛋白 (NeutrAvidin, NA) 上。使用透射电子显微术 (TEM, Tecnai 10, Philips, Netherlands) 进行成像, 并且使用 DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) 评估 AgNP 的 ζ 电位、多分散性和尺寸。

[0611] B. 结果

[0612] 1. 双特异性 TNC-C 和 FN-EDB 结合肽的鉴定

[0613] 对于能够结合 FN-EDB 和 TNC-C 二者的双特异性肽的选择, 使用了在重组 FN-EDB 和 TNC-C 片段上对展示在 T7 噬菌体上的随机七肽文库的交叉筛选 (图 1)。通过 FN-EDB 和 TNC-C 的 Western 印迹使用兔多克隆抗体对蛋白质进行分析 (数据未示出)。沿以下对照蛋白对 FN-EDB 和 TNC-C 进行印迹: 神经纤毛蛋白-1 b1b2 结构域 (NRP1) 和核仁蛋白 (nucleolin, NCL)。用与 FN-EDB 和 TNC-C 反应的一级多克隆抗体以及二级经 IRDye-680RD 标记的山羊抗兔抗体探测印迹。还通过 ScFV-L19-FN-EDB (26.02kDa) 和 ScFV-G11-TNC-C (28.33kDa) 的 SDS-PAGE 对蛋白质进行分析 (数据未示出)。

[0614] 第一轮生物淘选针对固定化在聚苯乙烯板上的 TNC-C 进行, 随后是针对包被到磁性 Ni-NTA 珠上的经六组氨酸标记的 FN-EDB 的数轮选择。通过第 5 轮选择, 看到噬菌体结合 > 1000 倍富集。具体地, 在第 5 轮选择中观察到与 FN-EDB 结合的约 3000 倍富集。虽然来自第 5 轮合并物 (pool) 的单独受试的 48 种肽噬菌体中的大多数赋予与任一单独靶标结合的噬菌体, 但 26 个氨基酸 (aa) 的肽

[0615] PPRRGLIKLKTSSNTKENSVVASLRP (PL5; SEQ ID NO:2)

[0616] 具有期望的双结合能力 (数据未示出)。重组蛋白的氨基酸序列以纯文本示出 (从氨基酸第 22 位开始), 以及 6x His 标签序列和载体来源序列以斜体示出。

[0617] TNC-C (112个氨基酸;分子量12299.19Da)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMEALPLENLTISDINPYGFTVSWMASENA

[0618] FDSFLVTVVDSGKLLDPQEFTLSGTQRKLELRGLITGIGYEVMSVSGFTQGHQTKP
LRAEIVT (SEQ ID NO:15)

[0619] FN-EDB (112个氨基酸;分子量12008.62Da)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMEVPQLTDLSFVDITDSSIGLRWTPLNSSTH

[0620] GYRITVVAAGEGIPIFEDFVDSSVGYYTVTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTLT
QQT (SEQ ID NO:16)

[0621] PL5噬菌体的基因组在肽编码区段中包含单核苷酸缺失,导致展示在噬菌体主要衣壳蛋白的C端的7-aa肽移码并转换为26-aa肽(表4)。T7主要衣壳蛋白10的C端部分(纯文本)和邻近的外源PL5肽(粗斜体)的基因组DNA (SEQ ID NO:11)和氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)。肽编码DNA中的单核苷酸缺失位于核苷酸第32位。PL5及其较短的衍生物PL1肽保持与两种靶蛋白结合的能力。

[0622]

10	20	30	40	50	60
ATGCTCGGGGATCCGAATTCTCCGCCGAGAC-GTGGTCTAATTAAGCTTAAACCTCGTC					
M	L	G	D	P	N
		S	P	P	R
			R	G	L
			I	K	L
			K	T	S
			S		
70	80	90	100		
CAATACAAAAGAGAATTCTGTTGTGGCTTCGCTGAGGCCTTAA					
			N	T	K
			E	N	S
			V	V	A
			S	L	R
			P	*	

[0623] 表4:PL5是SEQ ID NO:2;PL1是SEQ ID NO:1;PL6是SEQ ID NO:13。

[0624]

ID	肽序列	结合特异性
PL5	PPRRGLIKLTSSNTKENSVASLRP	TNC-C+FN-EDB
PL1	PPRRGLIKLKTS	TNC-C+FN-EDB
PL6	IKLKTS	-

[0625] 值得注意的是,该结果比噬菌体展示筛选的典型情况更难实现。进行了十次尝试(其中每次尝试需要约两至三周的工作)来鉴定双特异性PL5肽。通常,仅需三个循环选择来获得特异性肽。在此,需要五个循环。事实上,在三个循环之后,噬菌体结合仅比背景高10倍多一点,这仍然是相当平稳的。在五个循环之后(约三周工作,相对于三个循环两周),实现了噬菌体结合1000倍提高。在获得该结果之前,可能无法通过噬菌体展示筛选鉴定出双特异性肽。在此的结果首次表明这是可以的。最后,该发现也基于噬菌体之一中出乎意料和未计划的突变。使用7个氨基酸的随机肽的文库。采用这样的文库,命中肽将具有7个氨基酸(与文库肽的长度相同)是预期的并且几乎是普遍的。出人意料地,发现肽(PL5)具有26个氨基酸,这是由于噬菌体序列中随机移码突变而发生的。

[0626] 创建了PL5肽的较短衍生物组,并且发现命名为PL1 (PPRRGLIKLKTS;SEQ ID NO:1)的12-aa肽保持与FN-EDB和TNC-C二者结合的能力(二者均在展示在噬菌体颗粒上,以及作为合成的经FAM标记的肽时)。结合具有特异性:PL1噬菌体不与重组对照蛋白NRP-1相互作用,并且针对FN-EDB和TNC-C的功能阻断多克隆抗体抑制噬菌体结合。用以下探测固定化FAM-PL1:重组经His标记的EDB和TNC-C(或对照BSA),随后与兔抗His标签一级抗体、二级山羊抗兔HRP抗体依次孵育,以及进行显色过氧化物酶反应。丙氨酸扫描诱变表明PL1肽使用

重叠的结合位点与FN-EDB和TNC-C相互作用,其中L6和T11在这二者相互作用中发挥关键作用(图2)。

[0627] 2. PL1功能化铁氧化物纳米粒归巢至肿瘤病变

[0628] 为了探究PL1肽作为全身性肿瘤靶向探针的效用,对PL1包被对经右旋糖酐涂覆的PEG化顺磁性铁氧化物纳米虫(NW)生物分布的作用进行研究。NW是设计用于全身性亲和靶向作为药物载体和MRI对比剂的纳米级试剂(Park et al., Adv. Mater. 20:1630-1635 (2008))。PL1纳米虫(PL1-NW)的特性概述于下,包括不同NW的物理化学特性、 ζ 电位和尺寸分布,如通过DLS测量的。

[0629]

<u>ζ电位</u>	
NW:	$-7.8 \pm 0.4 \text{ mV}$
PL1-NW:	$-10.3 \pm 0.7 \text{ mV}$
$\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-NW}$:	$-9.5 \pm 0.4 \text{ mV}$
PL1- $\text{D}(\text{KLAKLAK})_2\text{-NW}$:	$-10.4 \pm 0.2 \text{ mV}$
$(n = 3)$	
<u>通过 DLS 测量的尺寸</u>	
$84 \pm 40 \text{ nm } (n = 3)$	

[0630] 在荷有原位GBM(NCH421K, WT-GBM)、和s.c. GBM(U87MG)和前列腺癌(PC3)异种移植物的鼠中,审查PL1-NW在全身施用之后的归巢。与非靶向对照NW相比,PL1功能化在所有受试模型中均提高了NW的肿瘤积累(数据未示出)。

[0631] 将包被有经FAM标记的PL1肽的NW或对照FAM-NW以7.5mg/kg i.v.注射到荷有s.c.U87MG、原位NCH421K和原位WT GBM胶质母细胞瘤异种移植物的鼠中。在循环5小时之后,将鼠用PBS/DMEM通过心脏进行灌注,并且收集器官。用针对荧光素的抗体对冷冻切片进行免疫染色以使NW、内皮细胞(CD31)和干细胞样细胞(NCH421K中的巢蛋白)显现,并使用共焦显微术进行检查(数据未示出)。沿肿瘤血管可见经染色纳米虫并且其外渗。通过Fiji ImageJ对FAM信号进行定量。显示用抗体阻断剂探测的PL1纳米粒的体内归巢为特异性的。将单独的或者与单独抗EDB或抗TNC-C抗体或两种抗体的混合物组合的PL1-NW(7.5mg铁/kg体重) i.v.注射到荷有U87异种移植肿瘤鼠中。在注射之后五小时,将鼠用PBS/DMEM通过心脏进行灌注,并且收集器官用于冷冻切片并通过共焦显微术进行检查。使用Fiji ImageJ从代表性图像中对FAM信号进行定量。

[0632] 将包被有经FAM标记的PL1肽或FAM的NW以7.5mg/kg体重 i.v.注射到荷有PC3人前列腺癌异种移植物的鼠中。在注射之后五小时,将鼠用PBS/DMEM通过心脏进行灌注,并且收集器官。用针对内皮细胞的抗体(CD31)对冷冻切片进行免疫染色,用DAPI对核进行染色,并且通过共焦显微术对切片进行成像(数据未示出)。沿血管可见PL1-NW并且其外渗。肿瘤和对照器官的代表性组织切片中FAM信号的定量(平均像素强度)。误差棒,平均值 $\pm$ SEM

(N=4只小鼠/组);统计学分析:使用双尾Student未配对t检验确定的P值;ns $P>0.05$;** $P<0.01$ 。将包被有经FAM标记的PL1肽(或非肽NW)的铁氧化物NW以7.5mg/kg i.v.注射到荷有PC3、U87、NCH421k和WT GBM肿瘤的小鼠中。在注射之后五小时,将小鼠用PBS/DMEM通过心脏进行灌注,并且收集肿瘤和对照器官。用针对FAM、CD31的抗体对对照器官的切片进行免疫染色,并且用DAPI对核进行复染(数据未示出)。

[0633] 共焦荧光显微术显示PL1-NW在肿瘤周围、中间和核心区域中的血管周基质中积累。与非靶向NW相比,PL1-NW积累提高在NCH421K中为8.8倍、在U87MG中为5倍、在WT中为3.3倍,以及在PC3肿瘤中为4.7倍,然而在对照器官(肝、肾、脾和肺)中,PL1功能化NW和非靶向NW的信号是相似的。

[0634] 通过对铁进行普鲁士蓝(Prussian blue)组织化学染色以及光学显微术来确定PL1-NW的肿瘤趋向性。将荷有U87MG肿瘤的小鼠i.v.注射PL1-NW或对照NW(以7.5mg/kg)。在注射之后五小时,将小鼠用PBS/DMEM通过心脏进行灌注,并且收集器官。对肿瘤、脾、肺、肝和肾的切片进行Pearls普鲁士蓝组织化学,以使组织切片中的铁沉积物作为深蓝色普鲁士蓝颜料显现。在经PL1-NW注射的小鼠中,蓝色信号在肿瘤、脾和肝中明显,并且肺和肾中也有一定程度。然而来自对照经NW注射的小鼠的肿瘤未显示出普鲁士蓝染色,正常器官中的信号显示与注射有PL1-NW的小鼠中所见的信号相似。

[0635] 接下来,对PL1-IONW的归巢模式与FN-EDB和TNC-C免疫反应性在肿瘤中的分布之间的关系进行研究。用FN-EDB特异性(ScFV L19)和TNC-C特异性(ScFV G11)单链抗体对来自经PL1+NW注射的小鼠的U87MG和NCH421K肿瘤的冷冻切片进行染色。肿瘤组织中PL1-NW信号显示与FN-EDB和TNC-C免疫反应性有广泛的重叠。PL1-NW在皮下U87MG和原位NCH421K GBM肿瘤中与FN-EDB和TNC-C共定位。用抗FAM抗体对肿瘤组织进行染色来检测PL1-NW,并且用ScFvG11识别TNC-C或ScFvL19识别FN-EDB。

[0636] PL1-NW与针对FN-EDB或TNC-C的阻断兔多克隆抗体的共施用导致肿瘤归巢显著降低。此外,FN-EDB和TNC-C抗体二者的混合物几乎完全抑制归巢。这些结果表明,PL1功能化以FN-EDB和TNC-C依赖性方式提高NW的肿瘤积累,并且双靶向增强了NW积累。

[0637] NW的伸长形状有助于其能够附着于靶细胞并且增强MRI的磁弛豫性(Park et al., Adv. Mater. 20:1630-1635 (2008))。接下来,对PL1功能化NW作为精确MRI对比剂的潜在应用进行研究。对原位NCH421K GBM小鼠进行MRI扫描,然后注射NW。在全身NW之后5小时和在终末成像之后进行MRI。将NCH421K胶质母细胞瘤小鼠i.v.注射PL1-NW或对照NW(5mg/kg 铁)。在NW注射之前(扫描前)、在NW循环之后5小时(扫描后)和在用PBS进行灌注以去除血液和循环NW之后终末成像(经灌注;T,肿瘤),获取T2加权图像的轴向层面视图(数据未示出)。在注射有PL1-NW的小鼠肿瘤中看到暗信号提高,但用对照NW未看到。使用来自小鼠的冷冻切片的共焦成像用于MRI研究。用不同颜色标记对NW、抗人巢蛋白和核进行染色。

[0638] 来自注射有PL1-NW的小鼠的NCH421k PL1-NW肿瘤的T2加权图像和T2*图像显示通过铁氧化物纳米粒介导的低信号。相比之下,在注射有非靶向NW的动物中,在相同成像条件下未看到肿瘤内信号强度变化。在经PL1-NW注射的小鼠中,肿瘤内T2*弛豫时间显著降低了27至36% (约 23 ± 2 毫秒至 17 ± 1 毫秒和 14 ± 4 毫秒; $p<0.0001$, 3只小鼠/组,对于每个时间点,10至11个数据点/小鼠)。在注射有非靶向NW的小鼠中,弛豫时间未变化(21 ± 5 毫秒至 22 ± 3 和 20 ± 6 ;)。在MRI之后,收集组织进行MRI后共焦荧光成像,以确定PL1-NW在GBM中的选

择性积累。这些结果强调了PL1-NW作为肿瘤检测和成像剂的潜在应用。

[0639] 在发展和疾病期间, FN-EDB和TNC-C在血管生成血管中上调。为了研究血管生成相关组分对PL1归巢的贡献, 对PL1-NW在具有局部诱导的血管生成响应的小鼠中的生物分布进行研究。将驱动VEGF-A164表达的腺病毒载体皮内注射到裸鼠耳中。在注射腺病毒之后四天, 将动物注射德克萨斯红/伊文思蓝以使血管畅通情况 (patent) 显现, 随后注射PL1-NW。PL1-NW在血管生成血管中积累。非靶向NW显示未归巢至经Ad-VEGF-A164诱导的血管生成位点。PL1-NW和非靶向NW在正常耳血管中均显示无信号。体内多光子分析显示, PL1-NW (相对于非靶向NW) 在经腺病毒注射的耳的血管生成血管中积累显著提高约3倍, 但在对侧正常耳中没有 ($n=3$ 只小鼠/组, $p<0.001$, 使用双尾未配对t检验)。在PL1和对照NW二者的正常耳中的血管中均看到背景标记。这些结果表明PL1用作血管生成新血管的亲配体。

[0640] 3. PL1-银纳米粒归巢至肿瘤

[0641] NP的结构和物理化学特性可对其生物分布和对亲和配体的可靶向性具有显著作用。为了确定PL1亲和靶向是否与除NW之外的纳米载体的精确递送相容, 使用了银纳米粒 (AgNP; 为体外和体内生物分布研究开发的模型纳米级平台)。AgNP等离子体增强了从表面荧光团发射以用于超灵敏检测, 并且胞外AgNP可通过暴露于温和且生物相容的蚀刻溶液来溶解-该特征特别地可用于细胞摄取研究 (Braun et al., Nat. Mater. 13:904-11 (2014))。

[0642] 为了在荷瘤小鼠中体内定量全身PL1-AgNP的生物分布, 使用激光消融电感耦合等离子体质谱 (laser-ablation inductively-coupled plasma mass spectrometry, LA-ICP-MS) 测量Ag。为了克服与在给药、肿瘤特性和生理状态中动物间差异有关的问题, 将荷瘤小鼠注射经同位素条码化的PL1靶向和非靶向AgNP的混合物。将荷有原位U87MG GBM的小鼠 i.v. 注射PL1-Ag¹⁰⁹NP和Ag¹⁰⁷NP的等摩尔混合物。在5小时循环之后, 通过ICP-MS对肿瘤和对照组织的30 μ m冷冻切片进行同位素含量的线性和光栅化激光消融映射。映射了显示对照Ag¹⁰⁷NP和靶向PL1 Ag¹⁰⁹Np在肿瘤脑组织中的强度和分布的所映射肿瘤脑组织区域。在组织切片上进行使用40- μ m光斑进行的对Ag¹⁰⁹/Ag¹⁰⁷谱的激光消融线扫描。对Ag¹⁰⁹/Ag¹⁰⁷比值的分析显示, PL1功能化显著提高了Ag¹⁰⁹NP归巢至GBM: 在输入混合物中Ag¹⁰⁹/Ag¹⁰⁷比值平均为约2.7倍 (数据未示出)。肿瘤内Ag¹⁰⁹/Ag¹⁰⁷比值显示出显著异质性, 其中一些区域显示Ag¹⁰⁹/Ag¹⁰⁷比值为约30及高于30。PL1-Ag¹⁰⁹NP的归巢是肿瘤特异性的, 因为对照器官中的Ag¹⁰⁹/Ag¹⁰⁷比值接近输入比值 (肝) 或更低 (肺和正常脑中)。胶质瘤中PL1-NW浓度比对照组织中的PL1-NW浓度高2.6至30倍。这些数据表明, PL1可用于使用不同的纳米级平台进行肿瘤递送。

[0643] 4. PL1靶向促凋亡纳米粒具有抗GBM活性

[0644] 为了确定PL1肽功能化对抗癌纳米粒治疗效力的作用, 使用包被有_D[KLAKLAK]₂肽 (SEQ ID NO:6) 的NW作为模型纳米药物。促凋亡_D[KLAKLAK]₂肽 (SEQ ID NO:6) 通过使线粒体膜失稳来发挥其细胞杀伤活性 (Agemy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 108:17450-17455 (2011); Ellerby et al., Nat. Med. 5:1032-1038 (1999))。将嵌合_D[KLAKLAK]₂-PL1 (SEQ ID NO:6) 通过5K-聚乙二醇 (PEG) 接头与NW共价连接。在第一治疗研究中, 使用了显示血管生成良好-经灌注的脉管系统的s.c.U87MG肿瘤 (Candolfi et al., J. Neurooncol. 85:133-148 (2007))。这允许监测肿瘤尺寸, 而不是使用存活作为终点。将荷有s.c.U87MG肿瘤的小鼠每隔一天用全身注射进行处理, 持续20天。来自经PBS处理组的所有小鼠均在初始肿瘤注射之后37天内达到2cm³肿瘤体积, 然后将其处死。肿瘤生长在经FAM-PL1-_D[KLAKLAK]₂-NW处理组

(SEQ ID NO:6)中显著抑制,然而在用PL1-NW或FAM- Δ [KLAKLAK] $_2$ -NW (SEQ ID NO:6)处理的动物中均看到肿瘤生长仅轻微降低。

[0645] 接下来,在显示血管生成和浸润特征二者的人NCH421k原位异种移植物中评价PL1- Δ [KLAKLAK] $_2$ -NW (SEQ ID NO:6)的抗GBM效力。在肿瘤植入之后三天开始处理。将单独患者肿瘤的冷冻切片与PL1-NW或非靶向NW一起孵育,进行免疫染色,并通过共焦显微术进行检查。PL1-NW显示与肿瘤切片结合,并且与所有受试胶质母细胞瘤的EDB和TNC-C共定位(数据未示出)。对照非靶向NW表现出不与肿瘤切片结合。将组织针对FAM(抗FITC)、EDB(ScFv L19)、TNC-C(ScFv G11)和核(DAPI)进行染色(未示出)。用PL1- Δ [KLAKLAK] $_2$ -NW (SEQ ID NO:6)处理的NCH421k小鼠的中位存活显著长于用PBS、FAM- Δ [KLAKLAK] $_2$ -NW (SEQ ID NO:6)或PL1-NW处理的对照小鼠的中位存活。此外,接受FAM-PL1- Δ [KLAKLAK] $_2$ -NW (SEQ ID NO:6)的NCH421k组中的一只小鼠存活了150天,无任何复发体征,表明治愈。所述处理显示无显著全身毒性,如由来自经处理动物的正常体重和正常器官组织学的维持所证明的(表5和表6)。对于处理期间U87MG和NCH421K肿瘤小鼠的体重动态,将终点设置在 $\geq$ 起始体重的20%或2000mm³肿瘤体积。每隔一天对肿瘤小鼠进行称重并计算肿瘤体积。对于U87MG(表5)和NCH421K(表6)肿瘤模型,不同处理组的中位存活和不同时间点存活小鼠的百分比的Kaplan-Meier分析。

[0646] 表5

天数	PBS	Δ [KLAKLAK] $_2$ -NW	PL1-NW	PL1- Δ [KLAKLAK] $_2$ -NW
0	100 %	100 %	100 %	100 %
29	88 %	100 %	88 %	100 %
31	73 %	88 %	75 %	100 %
33	44 %	88 %	75 %	100 %
35	29 %	75 %	63 %	75 %
37	0 %	50 %	63 %	75 %
39		50 %	38 %	75 %
41		25 %	25 %	63 %
43		13 %	25 %	63 %
45		13 %	13 %	38 %
49		13 %	13 %	25 %
57		13 %	0 %	13 %
61		0 %		13 %
150				13 %
中位存活	33 天	39 天	39 天	45 天

[0648] 表6

天数	PBS	$_{\text{d}}[\text{KLAKLAK}]_2\text{-NW}$	PL1-NW	PL1- $_{\text{d}}[\text{KLAKLAK}]_2\text{-NW}$
0	100 %	100%	100 %	100 %
32	75 %	100%	100 %	100 %
35	60 %	100%	875 %	100 %
37	60 %	87%	75 %	100 %
38	60 %	62%	62.5 %	100 %
39	50 %	62%	62.5 %	100 %
40	50 %	62%	62.5 %	75 %
[0649] 41	25 %	62%	62.5 %	62.5 %
42	25 %	37.5%	37.5 %	62.5 %
43	0 %	37.5%	25 %	62.5 %
44		25%	0 %	62.5 %
45		12.5%		50 %
46		0%		37.5 %
52				12.5 %
150				12.5 %
中位存活	40 天	42 天	42 天	45.5 天

[0650] 处理结束时的肿瘤切片染色显示,与对照组相比,FAM-PL1- $_{\text{d}}[\text{KLAKLAK}]_2\text{-NW}$ (SEQ ID NO:6) 组中CD31阳性血管数目显著降低,然而Ki67阳性细胞、半胱天冬酶3阳性细胞、CD11b和CD68巨噬细胞或LYVE-1阳性淋巴管无差异。将肿瘤组织切片并用抗CD31抗体进行染色以使血管突出显示,用抗LYVE-1使淋巴内皮细胞显现,用针对CD11b和CD68的抗体检测巨噬细胞,用抗Ki67检测增殖细胞,以及用抗半胱天冬酶3检测凋亡细胞。

[0651] 为了探究PL-1靶向系统的转化相关性,对PL1-NW与临床GBM样品的结合进行研究。将GBM的冷冻切片用FAM-PL1-NW或经FAM标记的对照NW覆盖,洗涤并对其进行共焦成像。PL1-NW显示与所受试所有人GBM样品均结合,其中在血管周结构处以及在肿瘤实质中结合。将肿瘤冷冻切片与PL1-NW或对照非靶向NW孵育,FAM反应性抗体进行染色以检测NW,并且通过共焦显微术进行检查。使用多个平行切片进行定量。PL1-NW与临床GBM样品中高度过表达的肿瘤FN-EDB和TNC-C共定位 (Pedretti et al., Br. J. Cancer. 103:827-836 (2010); Carnemolla et al., Am. J. Pathol. 154:1345-1352 (1999))。相比之下,对照NW显示仅背景荧光信号。这些数据表明PL1功能化探针与人GBM靶向在转化上相关。

[0652] C. 讨论

[0653] ECM蛋白纤连蛋白和生腱蛋白-C的替代性剪接同种型是在许多实体瘤中过表达的丰富且容易获得的靶标。对靶向纤连蛋白FN-EDB和TNC-C二者用于精确靶向肿瘤ECM的双特异性十二肽PL1进行评价和临床前验证。显示PL1特异性地归巢至实体瘤和血管生成血管,以有效地递送纳米粒有效载荷。PL1功能化NW显示出作为精确MRI对比剂的临床前效用,并且当负载有促凋亡肽时,抑制GBM的进展。这些观察表明PL1肽在对FN-EDB和TNC-C表达呈阳性的实体瘤管理中的应用。

[0654] 用亲和配体进行双靶向是提高可用结合位点数目的越来越流行的策略以便解决

肿瘤相关标志物的表达和可及性在肿瘤间和肿瘤内的异质性(Wang et al., *Neurotherapeutics* (2017), doi:10.1007/s13311-016-0510-y; Ehlerding et al., *J. Nucl. Med.*, doi:10.2967/jnumed.117.199877)。串联使用两种不同的肿瘤归巢肽可改善有效载荷在恶性组织内的生物分布,但可能导致可能具有免疫原性的长肽,并且两种组分也可能干扰彼此与受体的结合。PL1是来自与Fn-EBD和TNC-C二者结合的噬菌体展示肽的不可知筛选(agnostic screen)的短肽。显示通过PL1的双靶向通过两种受体蛋白的参与导致纳米粒的肿瘤递送增强。事实证明这确实如此,就荧光强度和对纳米粒存在呈阳性的区域二者而言,通过中和抗体在体内阻断任一受体导致FAM-PL1-NW积累稳健降低。FN-EBD和TNC在肿瘤血管基质(angiomatrix)和肿瘤实质中的过表达可导致具有两种受体的高密度和可用性的结构域,从而导致PL1-受体相互作用的概率提高和选择性NP吸附的焓增益(Wang and Dormidontova, *Phys. Rev. Lett.* 109:238102 (2012))。

[0655] 肿瘤ECM越来越被认为是药物和成像剂的亲和递送的转化相关靶标。与靶向肿瘤细胞特定(亚)群上的膜结合受体相比,由于对肿瘤组织中不同细胞群的作用更广泛以及由于不存在溶酶体药物截存(sequestration)和失活,因此用ECM靶向化合物进行治疗可导致更高的治疗效力。FN-EBD和TNC已成为恶性疾病亲和靶向的临床相关受体。多年来,研究者已经鉴定了FN-EBD的数种单特异性靶向配体,例如FN-EBD-ScFV L19(Nilsson et al., *Cancer Res.* 61:711-716 (2001)),以及TNC的数种单特异性靶向配体,例如TNC-C-ScFV G11(Silacci et al., *Protein Eng. Des. Sel.* 19:471-478 (2006)),TNC适配体(Daniels et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:15416-15421 (2003)),和TNC结合FHK肽(Kim et al., *Mol. Cells.* 33:71-77 (2012))。为了研究PL1作为纳米粒导向配体,使用了PEG化铁氧化物NW——经优化用于体内靶向的纳米级有效载荷(Simberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:932-6 (2007); Park et al., *Adv. Mater.* 20:1630-1635 (2008))。荧光成像表明,PL1功能化NW特异性地归巢至实体瘤组中的FN-EBD-和TNC-C阳性区域和由通过注射驱动VEGF表达的腺病毒诱导的皮内血管生成位点。GBM通常过表达VEGF-FN-EBD表达的已知直接诱导物(Khan et al., *Angiogenesis* 8, 183-196 (2005); Trachsel et al., *J. Invest. Dermatol.* 127:881-886 (2007))。活小鼠的多光子成像显示,血管生成血管被全身施用的PL1-NW靶向。此外,PL1功能化NW可用作肿瘤特异性对比剂;T2 MRI表明NW在原位NCH421K GBM病变中活体内积累。PL1功能化还在另一纳米系统(金属AgNP)中提高了肿瘤选择性。针对来自用经同位素条码化的PL1和对照AgNP的等摩尔混合物给药的肿瘤小鼠的组织比值LA-ICP-MS表明在肿瘤组织中PL1 AgNP高至30倍高表现,然而对照器官中PL1-AgNP/AgNP比值为约1。

[0656] 作为概念验证实验性治疗,使用了由线粒体膜失稳_D[KLAKLAK]₂肽(SEQ ID NO:6)组成的抗癌有效载荷。该肽最初作为抗菌剂来设计和开发(Ellerby et al., *Nat. Med.* 5: 1032-1038 (1999))。已报道,包被有_D[KLAKLAK]₂肽(SEQ ID NO:6)的纳米粒在被非内化肽带至细胞表面之后内化到细胞中(Agemy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:17450-17455 (2011))。PL1-_D[KLAKLAK]₂-NW(SEQ ID NO:6)系统显著降低了肿瘤体积并提高了小鼠寿命。可对非内化ECM靶向ADC药物进行改造以在胞外环境中有效释放其细胞毒性有效载荷,以介导强效治疗活性(Dal Corso et al., *J. Control. Release.* 264:211-218 (2017); Casi and Neri, *Mol. Pharm.* 12:1880-1884 (2015))。类似的策略将用于在未来研究中开发PL1功能化

化学治疗剂。在此报道的结果是转化相关的:FN-EDB和TNC-C在小鼠与人之间是保守的,并且针对临床样品的研究显示PL1-NW与这些靶分子共定位。

[0657] 综上所述,双靶向PL1肽允许将纳米级有效载荷特异性地递送至表达FN-EDB和TNC-C的实体瘤,导致抗癌和成像剂的高肿瘤选择性和效力。基于PL1的成像剂可开发成伴随诊断测试以将患者分层进行治疗性靶向FN-EDB和TNC-C阳性肿瘤,以及评估抗癌干预的效力。

[0658] 实施例2:PL2肽和相关肽的选择和特性

[0659] 通常使用如实施例1中所述的技术和方案来选择肽并测试其与FN-EDB的结合。数据和结果示于图3至5和22中。

[0660] A. 材料和方法

[0661] 1. 材料

[0662] 磷酸缓冲盐水(PBS)购自Lonza (Verviers,Belgium)。K₃[Fe(CN)₆]、HCl、异丙醇、Triton-X、吐温20、CHCl₃、MeOH、异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)和二甲基甲酰胺(DMF)购自Sigma-Aldrich (Munich,Germany)。

[0663] 2. 肽和蛋白质

[0664] 具有6-氨基己酸间隔子的Cys-5(6)-羧基荧光素(FAM)-PL2和Cys-FAM肽购自TAG Copenhagen (Denmark)。pASK75-Fn7B8和pASK75-Fn789质粒由Ame Skerra博士教授友情提供(Schiefner et al.,2012)。从质粒中扩增Fn-EDB结构域的基因片段,并将其克隆到N端包含His₆标签的pET28a+质粒中,以用于在大肠杆菌BL21 RosettaTM 2 (DE3) pLysS (Novagen,#70956)菌株中表达。重组Fn-EDB作为可溶性蛋白质产生,并使用HiTrap IMAC HP柱(GE Healthcare,#17-0920-05)进行纯化。蛋白质纯度、尺寸和序列用SDS-PAGE、质谱(MS)完整蛋白质和鸟枪分析(shotgun analysis)进行确定。NRP-1 b1b2蛋白在桑福德伯纳姆普利贝斯医学发现研究所(Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute) (La Jolla,CA,US)的蛋白质产生和分析设施中进行纯化。

[0665] 3. 细胞系和实验动物

[0666] 人胶质母细胞瘤(U87MG,HTB-14)细胞和前列腺癌(PC3,CRL1435)细胞购自ATCC (VA,USA)。鼠WT-GBM胶质母细胞瘤细胞是来自Gabriele Bergers (UCSF,USA)的友好赠物,以及P3、P13干细胞样是来自Rolf Bjerkvig (卑尔根大学(University of Bergen),Norway)的友好赠物。细胞和肿瘤如前所述进行制备(Bougnaud et al.,2016;Keunen et al.,2011;Talasila et al.,2013)。无胸腺裸鼠(Hsd/Athymic Fox1 nu Harlan)购自Harlan Sprague Dawley (HSD,Indianapolis,IN,USA),并且将其在塔尔图大学(Tartu,Estonia)生物医学和转化医学研究所动物设施的标准饲养条件下维持。原位GBM肿瘤模型,将3μL PBS中约2至3×10⁵个的NCH421K、P13和P3干细胞样细胞、WT-GBM细胞颅内植入到小鼠脑右侧2mm和前囟缝前1mm处。皮下模型,将以100μl PBS中2至9×10⁶个细胞注射的U87 GBM和前列腺癌(PC3)细胞皮下植入到11至15周龄雄性和雌性裸鼠的右侧腹。动物实验程序由爱沙尼亚农业部动物实验委员会批准,项目#42和#48。

[0667] 4. T7噬菌体肽文库生物淘选

[0668] 将展示在T7415-1b噬菌体展示系统(Novagen,EMD Biosciences,MA,USA)上的多样性为约5×10⁸的NNK编码的X7肽噬菌体文库用于针对重组Fn-EDB的生物淘选。对固定化

在Costar 96孔酶联免疫吸附测定 (ELISA) 板 (#3590, Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) 上的Fn-EDB进行第一淘选轮。将板用100 μ l PBS中的20 μ g/ml重组Fn-EDB在4 $^{\circ}$ C下包被过夜,随后用PBS中1%牛血清白蛋白 (BSA) 在4 $^{\circ}$ C下封闭过夜。将噬菌体文库溶液 (100 μ l PBS-BSA中 5×10^8 pfu) 在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,随后用PBS+BSA+0.1%吐温20进行6次洗涤以去除非特异性结合的背景噬菌体,并随后进行噬菌体挽救 (phage rescue) 和在大肠杆菌菌株 BLT5403 (Novagen, EMD Biosciences, MA, USA) 中扩增 (Teesalu et al., 2012)。随后的选择轮在400 μ l PBS中在包被有经His-6X标记的Fn-EDB (30 μ g/10 μ l珠) 的Ni-NTA磁性琼脂糖珠 (QIAGEN, Hilden, Germany) 上在室温下进行1小时。将Fn-EDB固定化珠用PBS+BSA+0.1% NP40洗涤三次,随后将先前轮噬菌体 (100 μ l PBS+BSA+0.1% NP40中 5×10^8 pfu) 在室温下孵育1小时。通过用PBS+BSA+0.1% NP40冲洗六次去除未结合/弱结合的噬菌体,将结合的噬菌体用1ml的PBS+500mM咪唑+0.1% NP40进行洗脱。对所回收噬菌体进行滴定和扩增,以进行随后轮选择。在选择6轮之后,对来自第5轮的48种克隆的随机挑选集合的肽编码噬菌体DNA进行桑格测序 (Sanger sequencing),以获得展示肽的信息 (Ikemoto et al., 2017; Teesalu et al., 2012)。

[0669] 对于使用单独扩增的噬菌体克隆进行的无细胞结合研究;将噬菌体与经Fn-EDB包被的磁珠一起孵育,如上所述。将经NRP-1包被的珠上的RPARPAR噬菌体用作阳性对照 (Teesalu et al., 2009),将核仁蛋白 (NCL) 和生腱蛋白C-C结构域 (TNC-C) 用作阴性对照。将展示七甘氨酸肽 (GGGGGGG, G7 (SEQ ID NO:20)) 的噬菌体克隆或无插入物的噬菌体克隆用作阴性对照。

[0670] 5. 体内复选噬菌体审查 (play-off phage auditioning)

[0671] 体内复选用于评价肽噬菌体向异种移植肿瘤模型的全身性归巢。对体外选择的候选Fn-EDB结合肽、展示已发表肿瘤归巢肽的噬菌体和对照肽进行扩增,并将其通过用PEG-8000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 沉淀进行纯化,随后进行CsCl₂梯度超速离心和透析。将扩增的噬菌体肽以等摩尔合并,并且静脉内注射 (最终:200 μ l PBS中 1×10^{10} pfu) 在荷瘤小鼠中持续两小时循环,在此之后将小鼠用2.5%阿佛丁麻醉并用DMEM心内灌注。将肿瘤和器官收集在溶源性肉汤 (lysogeny broth, LB) +1% NP40中,对组织进行均质化以进行噬菌体肽挽救。将组织裂解物在大肠杆菌中扩增,通过用PEG-8000沉淀进行纯化,以及使用DNA提取试剂盒 (High Pure PCR Template Preparation试剂盒; Roche, Basel, Switzerland) 提取DNA。噬菌体基因组DNA的下一代测序使用Ion Torrent下一代测序系统 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 评价每个噬菌体在输入混合物中、在肿瘤和对照器官中的表现。噬菌体文库的下一代深度测序使用Ion Torrent根据制造商方案 (稍有修改) 进行。来自Ion Torrent的FASTQ数据由鉴定条码、恒定侧翼残基、提取正确长度读出的定制python脚本处理。

[0672] 6. 肽结合测定

[0673] 将经FAM标记的肽以PBS中20 μ g/100 μ l在ELISA板 (Nunc Maxisorp, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) 上在37 $^{\circ}$ C下包被过夜,用包含1%BSA的PBS在37 $^{\circ}$ C下封闭1小时。将孔用封闭溶液 (包含1%BSA和0.1%吐温20的PBS) 洗涤,用重组蛋白以2 μ g/孔在PBS中孵育6小时,并用封闭溶液洗涤3次。使用以下检测结合的蛋白质:抗His标签抗体 (Abcam/Icosagen, Estonia) 在37 $^{\circ}$ C下1小时,用封闭溶液洗涤三次,随后用辣根过氧化物酶缀合的

二级抗体 (Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK)。将孔用封闭溶液洗涤三次, 并且通过添加100 μ L/孔的来自TMB Peroxidase EIA Substrate试剂盒 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 的新鲜制备的溶液进行过氧化物酶反应, 随后在37 $^{\circ}$ C下孵育5分钟。通过1N H₂SO₄ 停止反应, 并用微板阅读仪 (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria) 在450nm处测量吸光度。

[0674] 7. 纳米粒合成与功能化

[0675] 如 (Park et al., 2008) (稍有修改) 中所述制备铁氧化物纳米虫 (NW)。使用马来酰亚胺-5K-PEG-NH使胺化NW PEG化。将肽通过添加至肽N端的半胱氨酸残基的硫醇基之间的硫醚键与NW偶联。通过用铁氧化物构建校准曲线以及用NanoDrop 2000c分光光度计 (Thermo Scientific) 在400nm处测量NW的吸光度来确定NW浓度。合成同位素纯银纳米粒 (AgNP) 并使其功能化, 如 (Willmore et al., 2016) 所述; 将CF647-N-羟基琥珀酰亚胺-染料 (NHS-染料) 与PEG的末端胺基缀合, 并将生物素化肽包被在AgNP表面上的中性抗生物素蛋白 (NA) 上。使用透射电子显微术 (TEM, Tecnai10, Philips, Netherlands) 进行成像, 并且使用DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) 来评估纳米粒的 ζ 电位、多分散性和尺寸。

[0676] 8. 肿瘤靶向递送和生物分布研究

[0677] 将PBS中的经FAM标记的PL2肽偶联的NW或对照FAM-NW (7.5mg/kg) 注射到皮下U87、PC3和原位WT-GBM肿瘤小鼠的尾静脉中。在循环之后五小时, 通过在深麻醉下用20ml PBS/DMEM对小鼠进行心脏灌注来收集肿瘤和器官。在Illuminatool Bright Light System LT-9900 (Lighttools Research, Encinitas, CA, USA) 下对组织进行成像, 然后将其快速冷冻。将冷冻组织以8至10 μ m进行冷冻切片并将其封固在superfrost+载片上。将切片在RT下平衡, 并用4%多聚甲醛/甲醇固定。用以下一级抗体进行免疫染色: 兔抗荧光素IgG片段 (目录号A889, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 大鼠抗小鼠CD31 (BD Biosciences, CA, USA), 以及内部制备的经CF647或经CF546标记的单链抗体ScFV G11, 对于二级抗体: Alexa 488山羊抗兔IgG、Alexa 647山羊抗大鼠IgG和Alexa 546山羊抗小鼠IgG均来自Invitrogen, CA, USA。用1个1 μ g/ml的4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 分子探针) 对核进行复染。将盖玻片用Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) 封固到载玻片上, 使用共焦显微术 (Olympus FV1200MPE, Hamburg, Germany) 进行成像, 并使用FV10-ASW4.2查看器/Imaris软件/Fiji ImageJ进行分析。

[0678] 9. 针对临床肿瘤样品的离体浸渍测定 (dipping assay)

[0679] 根据爱沙尼亚塔尔图大学伦理委员会批准的方案 (许可#243/T27) 在尸检期间获得新鲜的手术卵巢癌样品。对于浸渍测定, 将新鲜卵巢癌组织立即用DMEM洗涤, 并将约1cm³的外植体与PL2-NW/NW (补充有1%BSA的DMEM中稀释的40 μ g/mL Fe) 在37 $^{\circ}$ C下孵育4小时。接下来, 将外植体用PBS洗涤, 快速冷冻, 以10 μ m进行冷冻切片, 并使用兔抗荧光素一级抗体进行免疫染色, 随后用Alexa-488抗兔二级抗体 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 进行检测。

[0680] 10. 临床样品

[0681] 根据爱沙尼亚塔尔图大学伦理委员会批准的方案 (许可#243/T27), 从爱沙尼亚塔尔图塔尔图大学诊所获得卵巢癌的新鲜手术样品。

[0682] 11. 统计学分析

[0683] 使用Prism 6软件进行统计学分析。将结果表示为平均值与指示 $\pm$ SEM的误差棒。对于两组的比较,使用了使用未配对t检验和多组ANOVA检验的比较。 $p < 0.05$ 被认为是显著的,P值示出如下:*P小于或等于0.05,**P小于或等于0.01,***P小于或等于0.001,以及****P小于或等于0.0001。

[0684] B. 结果

[0685] 1. FN-EDB结合肽的鉴定

[0686] 对于能够与FN-EDB结构域特异性结合的肽的选择,使用X7 T7噬菌体文库进行生物淘选。第一轮生物淘选在FN-EDB固定化的聚苯乙烯孔板上进行,随后是针对包被到磁性Ni-NTA珠上的经六组氨酸标记的FN-EDB的数轮选择。通过第6轮选择,观察到噬菌体结合 > 3000 倍富集。从选择用于测序的48种克隆中,选择了鉴定出具有Fn-EDB结合能力的7种肽序列作为主要候选物以进行进一步评价(表7)。

[0687] 表7

克隆No	肽噬菌体	相对于G7的倍数
2	TKRKGKG (SEQ ID NO:21)	58
3	GLGGRRIKLKTS (SEQ ID NO:22)	2064
4	GRRGRVIKLTSEPPQ (SEQ ID NO:23)	1185
10	GTRRRSRINLAAALE (SEQ ID NO:24)	1563
17	KVKKRG (SEQ ID NO:25)	44
24	VHERTRI (SEQ ID NO:26)	1
33	RESRRGRVKLAAALE (SEQ ID NO:27)	209
46	TSKQNSR (SEQ ID NO:3)	89

[0689] 为了在体内鉴定候选噬菌体肽中最佳的肿瘤靶向和效率,在荷有异种移植肿瘤模型的小鼠中在全身施用之后对归巢进行审查。对噬菌体基因组的肿瘤和对照器官肽编码部分进行高通量测序(high throughput sequencing, HTS),并使用定制生物信息学工具(噬菌体展示解析器(Phage Display Parser) 互联网网站canbio.ut.ee)进行分析。结果表明,与其他肽相比,命名为PL2 (TSKQNSR; SEQ ID NO:3)的Fn-EDB结合肽在不同肿瘤模型中具有更好的靶向和归巢作用。PL2肽具有满足CendR规则并且先前已显示与神经纤毛蛋白1b1b2结构域(NRP1)结合的R末端氨基酸(Teesalu et al., 2009)。用纯化的NRP1蛋白以及Fn-EDB进行测试以确定该结合能力。结果确定了PL2在展示在噬菌体颗粒上时保持与Fn-EDB和NRP1二者特异性结合的能力。为评价结构-功能关系而进行的丙氨酸扫描诱变显示靠近C端的关键氨基酸残基丝氨酸(S)和精氨酸(R)对Fn-EDB结合很重要(图4C)。另外,合成的经FAM标记的PL2肽在ELISA试验中在包被有Fn-EDB的板中显示出与噬菌体PL2肽相似的结合能力。

[0690] 2. PL2功能化铁氧化物纳米粒归巢至肿瘤病变

[0691] 为了评价PL2肽作为全身性肿瘤靶向探针的效用,对PL2包被对经右旋糖酐涂覆的PEG化顺磁性铁氧化物纳米虫(NW)的作用进行研究。NW是设计用于全身性亲和靶向作为药物载体和MRI对比剂的纳米级试剂(Park et al., Adv. Mater. 20:1630-1635 (2008))。PL2纳米虫(PL2-NW)不改变不同NW的物理化学特性、 ζ 电位和尺寸分布,如通过DLS测量的。在荷有

原位GBM WT-GBM和s.c.GBM (U87MG) 以及前列腺癌 (PC3) 异种移植物的老鼠中在全身施用之后,对PL2 NW的归巢进行审查。与非靶向对照NW相比,PL2功能化在受试的所有模型中均提高了NW的肿瘤积累。

[0692] 观察到的PL2归巢模式主要定位于肿瘤血管,包括肿瘤的基质区域、中间区域和核心区域,如通过定位的CD31标志物所看到的。存在其中在远离血管处检测到信号的一些区域。相比之下,对照NW在肿瘤组织中显示仅背景信号。PL2-NW积累在U87MG中为7.5倍,在WT中为2倍,以及在PC3肿瘤中为6.9倍,然而在对照器官(肝、肾、脾和肺)中,PL1功能化和非靶向NW的信号是相似的(数据未示出)。

[0693] 接下来,通过对来自经PL2-NW注射的U87小鼠的器官进行离体Illumatool成像来研究免疫染色分析。肿瘤器官的宏观图像再次表明PL2肽效率的特异性靶向。接下来,对PL2-IONW的归巢模式与FN-EDB免疫反应性在U87肿瘤中的分布之间的关系进行研究。用FN-EDB特异性(ScFv L19)单链抗体对来自经PL2-NW注射的小鼠的U87MG肿瘤的冷冻切片进行染色。U87MG肿瘤组织中PL2-NW信号显示与FN-EDB广泛重叠以及与FN-EDB共定位。用抗FAM抗体对肿瘤组织进行染色来检测PL2-NW,并且用ScFvL19识别FN-EDB。

[0694] 3. PL2-NW与人临床癌症手术外植体的结合

[0695] 对基于PL2-NW的靶向系统对新鲜提取的人卵巢癌癌症组织的转化相关性和组织渗透效应进行探究。在肿瘤浸渍测定中,与对照NW或PBS相比,PL2 NW显示出与肿瘤组织结合,并且对肿瘤组织的渗透高9倍(图9)。在一些区域中在外植体内部数微米处观察到渗透效应,然而结合主要与肿瘤组织表面相关。这些数据表明PL2导向探针与实体瘤靶向在转化上相关。

[0696] C. 讨论

[0697] 胞外基质蛋白糖蛋白纤连蛋白额外结构域-B (Fn-EDB) 在多种癌症基质中和在血管生成血管中特异性地表达。Fn-EDB是血管生成的优异标志物,并且在健康成人个体中基本上检测不到。开发了新Fn-EDB特异性PL2肽(TSKQNSR;SEQ ID NO:3)用于选择性地靶向胶质瘤和前列腺癌脉管系统。使用T7噬菌体展示来鉴定EDB靶向肽。首先通过使用高通量测序(HTS)在体外和在荷有胶质母细胞瘤(GBM)和前列腺肿瘤的多种原位异种移植物的老鼠中评估所选择噬菌体肽的靶向特性。PL2肽在不损害正常器官的同时显示出高度特异性的肿瘤归巢,并且还和神经纤毛蛋白-1结合。用铁氧化物纳米虫(NW)功能化的合成FAM-PL2肽在GBM和前列腺癌异种移植体中显示出主动归巢。离体成像和肿瘤组织显示纳米粒递送和滞留增强,主要分布在肿瘤内部。另外,PL2 NW显示出归巢至人卵巢癌癌症组织的能力,表明其将纳米级有效载荷靶向递送至侵袭性实体瘤的转化相关性。

[0698] 在大多数实体瘤中,血管生成是这样的共同特征,表达独特标志物在肿瘤启动、进展和转移中发挥关键作用(Jain,1999;Matejuk et al.,2011)。肿瘤血管扩张、渗漏并且迂曲。为了使肿瘤细胞存活和增殖,它们必须在血管一定距离内来得到足够的氧和营养(Forster et al.,2017)。肿瘤生长关键依赖于血管生成,并且新血管形成需要血管内皮细胞与胞外基质(ECM)之间的相互作用(Ruiz-Cabello et al.,2002;Schliemann and Neri,2007;Teesalu et al.,2012)。目前许多不同的策略用于血管靶向,包括抗血管生成剂、血管靶向剂、立体定向体部放射治疗(stereotactic body radiation therapy,SBRT)和肿瘤抗血管 α 治疗(tumor antivascular alpha therapy,TAVAT)(Forster et al.,2017)。许多

其他靶向治疗和化学治疗通常依赖于肿瘤脉管系统来将药物递送至肿瘤细胞。

[0699] 高水平的受体表达及其从血流中的可及性是靶向治疗的理想靶标 (Ruoslahti et al., 2010)。ECM组分通常大量存在,并且位于肿瘤血管的血管周空间。其中,纤连蛋白额外结构域B (Fn-EDB) 在肿瘤血管中选择性地表达,其通常在静止健康成人 and 成熟血管中不存在 (Khan et al., 2005; Zardi et al., 1987)。Fn-EDB在胚胎形成和新生血管形成期间特异性地表达,并且在许多侵袭性实体瘤中在肿瘤血管中高度过表达 (Park et al., 2012; Schiefner et al., 2012)。EDB结构域对新生血管形成肿瘤具有特异性,并因此提供了良好分子靶标的优点。

[0700] 迄今为止,已经开发了数种EDB靶向配体,包括抗体和肽,来介导细胞因子、细胞毒性剂、化学治疗药物和放射性同位素的递送以治疗EDB表达肿瘤。已经开发了介导细胞因子、细胞毒性剂、化学治疗药物和放射性同位素的递送的EDB-FN特异性抗体和肽。一些正在临床试验中进行检查,并且在EDB-FN阳性癌症患者中发挥治疗作用。这些中一种, L19抗体,在临床前和临床研究中表现出潜能,表明对EDB具有特异性的高亲和力分子可使得能够有效的、特异性的肿瘤靶向。

[0701] 针对重组FN-EDB结构域使用肽噬菌体展示以鉴定小肽。在七种肽中, PL2与FN-EDB特异性地相互作用,并且在体内复选实验中显示与其他肽相比,在不同肿瘤模型上有更好的积累。为了研究PL2作为纳米粒导向配体,使用了PEG化铁氧化物NW。全身性PL2导向的铁氧化物纳米粒在植入在小鼠中的肿瘤异种移植物组中积累,并特异性地归巢至实体瘤组中的FN-EDB阳性区域。FN-EDB靶向纳米粒可用于实体瘤检测、成像和抗癌有效载荷。该研究表明, PL2导向剂可用于改善实体瘤的检测和治疗。

[0702] 实施例3: PL3肽和相关肽的选择和特性

[0703] 通常使用如实施例1中所述的技术和方案来选择肽并测试其与TNC-C的结合。数据和结果中的一些示于图6至8中。

[0704] A. 材料和方法

[0705] 1. 材料

[0706] 磷酸缓冲盐水 (PBS) 购自Lonza (Verviers, Belgium)。K₃[Fe(CN)₆]、HCl、异丙醇、Triton-X、吐温20、CHCl₃、MeOH、异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和二甲基甲酰胺 (DMF) 购自Sigma-Aldrich (Munich, Germany)。具有6-氨基己酸间隔子的Cys荧光素 (FAM) -PL3和Cys-FAM肽购自TAG Copenhagen (Denmark)。使用Fmoc/t-Bu化学物质在微波辅助自动肽合成仪 (Liberty; CEM Corporation, Matthews, NC, USA) 上合成 [D (KLAKLAK)₂] 和 [D (KLAKLAK)₂] -PL3肽 (SEQ ID NO: 6)。通过高效液相色谱 (HPLC) 使用0.1% 三氟乙酸 (TFA) 在乙腈-水混合物中将肽纯化至90%至95%纯度,并且通过四极飞行时间 (Q-TOF) 质谱分析进行验证。CF647胺染料购自Biotium, Hayward, CA, USA。

[0707] 2. 细胞系和实验动物

[0708] U87 (人胶质母细胞瘤, HTB-14) 细胞和PC3 (前列腺癌, CRL1435) 细胞和PPC1 (原发性前列腺癌1) 细胞购自ATCC。鼠WT-GBM胶质母细胞瘤细胞是来自Gabriele Bergers (UCSF, USA) 的友好赠物, 以及P3、P8、P13干细胞样细胞、P22、NCH421K细胞是来自Rolf Bjerkvig (卑尔根大学, Norway) 的友好赠物。M21黑素瘤细胞为David Cheresch (USA) 的赠物。细胞和肿瘤如前所述 (Bougnaud et al., 2016; Keunen et al., 2011; Talasila et al., 2013) 进行制

备。

[0709] 无胸腺裸鼠 (Hsd/Athymic Fox1 nu Harlan) 购自Envigo (Netherlands), 并且将其在塔尔图大学 (Tartu, Estonia) 生物医学和转化医学研究所动物设施的标准饲养条件下维持。对于原位GBM肿瘤模型, 使用NCH421K、P13和P3干细胞样细胞、WT-GBM细胞。将3 μ L PBS中约2至3 $\times 10^5$ 个相应GBM细胞颅内植入到小鼠脑右侧2mm和前凶缝前1mm处。将U87-MG和前列腺癌 (PC3) 细胞用作皮下模型。将100 μ L PBS中2至9 $\times 10^6$ 个细胞皮下注射到11至15周龄雄性和雌性裸鼠的右侧腹中。动物实验程序由爱沙尼亚农业部动物实验委员会批准, 项目#42和#48。

[0710] 3. 临床样品

[0711] 根据爱沙尼亚塔尔图大学伦理委员会批准的方案 (许可#243/T27), 从爱沙尼亚塔尔图大学诊所获得胶质瘤和卵巢癌的新鲜手术样品。

[0712] 4. 肽噬菌体生物淘选

[0713] 对于针对重组TNC-C的生物淘选, 使用了展示在T7 415-1b噬菌体 (Novagen, EMD Biosciences, MA, USA) 上的多样性为约5 $\times 10^8$ 的NNK编码的CX7C和X7肽噬菌体文库。在我们整个筛选中, 使用板扩增方案来扩增选择轮期间回收的噬菌体 (Teesalu et al., 2012)。第1和第4轮的生物淘选针对固定化在Costar 96孔ELISA板 (#3590, Coming Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) 上的TNC-C进行。简言之, 将多孔板用100 μ L PBS中的20 μ g/ml重组TNC-C在4 $^{\circ}$ C下包被过夜, 随后用PBS中1%牛血清白蛋白 (BSA) 在4 $^{\circ}$ C下封闭过夜。将噬菌体文库溶液 (100 μ L PBS-BSA中5 $\times 10^8$ pfu) 在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜, 随后用PBS+1%BSA+0.1%吐温20进行6次洗涤以去除非特异性结合的背景噬菌体, 并随后进行噬菌体挽救和在大肠杆菌菌株BLT5403 (Novagen, EMD Biosciences, MA, USA) 中扩增 (Lingasamy, P. et al., Biomaterials 119373. 2019)。随后的选择轮在400 μ L PBS中在包被有经His-6X标记的TNC-C (30 μ g/10 μ L珠) 的Ni-NTA磁性琼脂糖珠 (QIAGEN, Hilden, Germany) 上在室温下进行1小时。将TNC-C固定化珠用PBS+1%BSA+0.1%NP40洗涤三次, 随后将先前轮噬菌体 (100 μ L的PBS+1%BSA+0.1%NP40中的5 $\times 10^8$ pfu) 与经TNC-C包被的珠在室温下孵育1小时。通过用PBS+1%BSA+0.1%NP40冲洗六次去除未结合/弱结合的 (背景) 噬菌体, 并且用1ml的PBS+500mM咪唑+0.1%NP40洗脱结合的噬菌体。

[0714] 对回收的噬菌体进行滴定和扩增, 以用于随后选择轮。在选择5轮之后, 对来自48种克隆的随机挑选集合的肽编码噬菌体DNA进行桑格测序, 以获得展示肽的信息 (Ikemoto et al., 2017; Teesalu et al., 2012)。对于使用单独扩增的噬菌体克隆进行的无细胞结合研究; 将噬菌体与经TNC-C包被的磁珠一起孵育, 如上所述。将经NRP-1包被的珠上的RPARPAR噬菌体用作阳性对照 (Teesalu et al., 2009)。将展示七甘氨酸肽 (GGGGGGG, G7 (SEQ ID NO:20)) 的噬菌体克隆或无插入物的噬菌体克隆用作阴性对照。

[0715] 5. 纳米粒合成与功能化

[0716] 根据 (Park et al., 2008) 的发表方案 (稍有修改) 制备铁氧化物纳米虫 (NW)。使用马来酰亚胺-5K-PEG-NH使胺化NW PEG化。将肽通过添加至肽N端的半胱氨酸残基的硫醇基之间的硫醚键与NW偶联。通过用铁氧化物构建校准曲线并用NanoDrop 2000c分光光度计 (Thermo Scientific) 在400nm处测量NW的吸光度来确定NW浓度。合成同位素纯银纳米粒 (AgNP) 并使其功能化, 如 (Willmore et al., 2016) 所述; 将CF647-N-羟基琥珀酰亚胺-染料

(NHS-染料)与PEG的末端胺基缀合,并将生物素化肽包被在AgNP表面上的中性抗生物素蛋白(NA)上。使用透射电子显微术(TEM,Tecnai 10,Philips,Netherlands)以对NP进行成像,以及使用DLS(Zetasizer Nano ZS,Malvern Instruments,UK)以评估纳米粒的 ζ 电位、多分散性和尺寸。

[0717] 6. 体内复选噬菌体审查

[0718] 体内复选用于评价肽噬菌体向异种移植物肿瘤模型的全身性归巢。对体外所选择的候选TNC-C结合肽、展示已发表的肿瘤归巢肽的噬菌体和对照肽进行扩增,并通过用PEG-8000(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,USA)沉淀进行纯化,随后进行CsCl₂梯度超速离心和透析。将扩增的噬菌体肽以等摩尔量合并,并且静脉内注射(最终:200 μ l PBS中 1×10^{10} pfu)在荷瘤小鼠中持续两小时循环,在此之后将小鼠用2.5%阿佛丁麻醉并用DMEM心内进行心内灌注。将肿瘤和器官收集在溶源性肉汤(LB)+1%NP40中,并使用手持式均质器对组织进行均质化以进行噬菌体肽挽救。将组织裂解物中的噬菌体在大肠杆菌中进行扩增,通过用PEG-8000沉淀进行纯化,并使用DNA提取试剂盒(High Pure PCR Template Preparation试剂盒;Roche,Basel,Switzerland)提取DNA。噬菌体基因组DNA的下一代测序使用Ion Torrent系统(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)评价每个噬菌体在输入混合物、在肿瘤和对照器官中的表现。噬菌体文库的下一代深度测序使用Ion Torrent根据制造商方案(稍有修改)进行。来自Ion Torrent的FASTQ数据由鉴定条码、恒定侧翼残基并提取正确长度读出的定制python脚本处理。

[0719] 7. 用IVIS光谱系统进行体内荧光成像

[0720] 通过在U87-MG异种移植物小鼠模型(雄性,18至20周龄)中,用IVIS光谱成像系统(PerkinElmer,Waltham,MA)进行体内荧光成像来评估PL3肽肿瘤归巢的活体成像。将具有经CF647染料标记的中性抗生物素蛋白包被的AgNP用生物素化PL3肽(AgNP-PL3)或对照生物素(AgNP)进行功能化。将AgNP PL3和AgNP颗粒静脉内注射到小鼠中。对于通过IVIS评估肿瘤PL3靶向递送和归巢,将小鼠在异氟烷麻醉下置于暗成像室中,并用以下参数进行成像。特定激发滤光片,650nm;发射滤光片,665nm;自动曝光时间;像素合并,中等;视野,12;f/停止,2;开式滤光片(open filter)。在预注射(0小时)和注射之后5小时捕获图像。信号以总辐射效率[p/s]/[μ W/cm²]表示。在组织背景校正之后,绘制覆盖每只小鼠整个肿瘤的目的区域(ROI),并对辐射效率信号进行定量。使用自动光谱分解算法,通过使用Living Image 4.4软件(Caliper Life Sciences,Hopkinton,MA)对图像进行分析。对每个实验组的三只动物进行分析。对于受体阻断研究,在注射AgNP之前15分钟全身预注射阻断TNC-C和/或NRP1抗体(30 μ g/小鼠),然后进行PL3-AgNP注射。

[0721] 8. 肿瘤靶向递送和生物分布研究

[0722] 将PBS中经FAM标记的PL3肽偶联的NW或对照FAM-NW(7.5mg/kg)注射到荷有皮下U87-MG、PC3和原位WT-GBM肿瘤的小鼠的尾静脉中。在循环之后五小时,通过在深麻醉下用20ml PBS/DMEM对小鼠进行心脏灌注来收集肿瘤和器官。使用Illuminatool Bright Light System LT-9900(Lighttools Research,Encinitas,CA,USA)对组织进行离体成像并将其快速冷冻。将冷冻组织以8至10 μ m进行冷冻切片并将其封固在superfrost+载片上。将切片在RT下平衡,并用4%多聚甲醛在RT下固定20分钟,或用甲醇在-20C下固定1分钟。用以下一级抗体进行免疫染色:兔抗荧光素IgG片段(目录号A889,Thermo Fisher Scientific,MA,

USA),大鼠抗小鼠CD31(BD Biosciences,CA,USA),以及内部制备的经CF647或经CF546标记的单链抗体ScFV G11。二级抗体为Alexa 488山羊抗兔IgG、Alexa 647山羊抗大鼠IgG和Alexa 546山羊抗小鼠IgG(所有均来自Invitrogen,CA,USA)。用1个 $1\mu\text{g/ml}$ 的4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI,分子探针)对核进行复染。将盖玻片用Fluoromount-G(Electron Microscopy Sciences,PA,USA)封固到载玻片上,使用共焦显微术(Olympus FV1200MPE, Hamburg,Germany)进行成像,并使用FV10-ASW4.2查看器/Imaris软件/Fiji ImageJ进行分析。

[0723] 9. 实验性治疗

[0724] 通过将U87-MG细胞(8×10^6 个)皮下注射到18至20周雄性裸鼠($38 \pm 5\text{g}$)的右背侧腹中来建立U87异种移植物GBM模型。当初始肿瘤体积达到 $100 \pm 20\text{mm}^3$ 时,将小鼠随机分为四组($N=6/\text{组}$)。将各组用 $100\mu\text{l}$ 的PBS、FAM- $_{\text{D}}$ [KLAKLAK] $_2$ -NW(SEQ ID NO:6)、FAM-PL3-NW和FAM-PL3- $_{\text{D}}$ [KLAKLAK] $_2$ -NW(SEQ ID NO:6)进行处理,将其每隔一天通过尾静脉静脉内(IV)注射,10次注射。用游标数显卡尺以两天一次监测体重、存活、动物健康状况(行为、外观、理毛(grooming))和肿瘤体积,直至处理结束。肿瘤体积以以下该式计算:体积(V)(mm^3)=[长度 $\times$ (宽度) 2]/2。研究终点固定,当肿瘤体积达到 2000mm^3 (或 $>20\%$ 体重)时,通过灌注将小鼠处死,并且切除器官和肿瘤,并将其快速冷冻用于组织学研究。使用GraphPad Prism 6软件计算每组的肿瘤体积、Kaplan-Meier存活和体重曲线,其中p值 <0.05 被认为是显著的。

[0725] 10. 临床肿瘤样品的覆盖和体外浸渍测定

[0726] 根据爱沙尼亚塔尔图大学伦理委员会批准的方案(许可#243/T27)在尸检期间获得人样品,包括新鲜的手术胶质母细胞瘤脑和卵巢癌样品。在手术期间从爱沙尼亚塔尔图大学医院神经外科部门获得新鲜的切除人样品。从所有患者获得知情同意。将胶质瘤组织在液氮中快速冷冻,以 $10\mu\text{m}$ 进行冷冻切片,用甲醇固定,并用PBST缓冲液(1X磷酸缓冲盐水、0.1%吐温20)透化,随后将其与包含PBST中的5%BSA,5%山羊血清,5%FBS的封闭缓冲液进行孵育。对于覆盖,将切片与 $20\mu\text{g}$ /玻片的PL3-NW和NW在 4°C 下孵育过夜。将切片洗涤,并用封闭缓冲液进行封闭,随后使用兔抗荧光素一级抗体进行免疫染色,并用Alexa-488抗兔和小鼠抗TNC-C抗体进行检测,并用647山羊抗小鼠IgG进行检测。对于浸渍测定,将新鲜卵巢癌组织立即用DMEM洗涤,并将约 1cm^3 的外植体与PL3-NW/NW(补充有1%BSA的DMEM中稀释的 $40\mu\text{g/mL}$ Fe)在 37°C 下孵育4小时。接下来,将外植体用PBS洗涤,快速冷冻,以 $10\mu\text{m}$ 进行冷冻切片,并使用兔抗荧光素一级抗体进行免疫染色,随后使用Alexa-488抗兔二级抗体进行检测(Invitrogen,Thermo Fisher Scientific,MA,USA)。

[0727] 11. 统计学分析

[0728] 使用Prism 6软件进行统计学分析。将结果表示为平均值与指示 $\pm$ SEM的误差棒。对于两组的比较,使用了使用未配对t检验和多组ANOVA检验的比较。p <0.05 被认为是显著的,P值示出如下:*P小于或等于0.05,**P小于或等于0.01,***P小于或等于0.001,以及****P小于或等于0.0001。

[0729] 12. 细胞结合和内化实验

[0730] 将培养在玻璃盖玻片上的U87-MG、PPC1和M21细胞与经CF555标记的AgNP在 37°C 下孵育1小时,随后用培养基进行洗涤以去除背景AgNP。将在PBS中的从 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的0.2M储备溶液新鲜稀释至10mM工作浓度的蚀刻溶液施加至细胞,持续3分钟,随后进行PBS

洗涤。将盖玻片上的细胞用-20℃甲醇固定1分钟。通过用Alexa Fluor 488标记的麦胚凝集素(wheat germ agglutinin,WGA)以1:1000在RT下染色1小时使细胞膜显现。用4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI,分子探针)以1μg/mL对核进行染色。使用Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences)培养基以将盖玻片封固在显微镜载片上以进行共焦成像。

[0731] B.结果

[0732] 1.TNC-C结合肽的鉴定

[0733] 为了鉴定特异性靶向TNC-C结构域的肽,在大肠杆菌中表达前91个氨基酸的TNC-C结构域,并使用亲和色谱在Ni-NTA基质上进行纯化。进行了五轮CX7C T7噬菌体肽生物淘选,第一和第四轮选择在经his标记的TNC-C固定化的聚苯乙烯96孔板上进行,以避免在Ni-NTA基质上选择含组氨酸的肽。随后轮在固定化在磁性Ni-NTA珠上的TNC-C上进行。在第五轮中,看到所选择噬菌体合并物与TNC-C的结合>1000倍富集。来自第4轮文库的38种随机选择的噬菌体克隆的噬菌体基因组的肽编码部分的桑格测序表明,由于肽编码区的移码和包含以下基序的肽的过表达,与原始CX7C文库配置发生了显著变化:RGRLXR (SEQ ID NO: 28;7个重复),RGRLR (SEQ ID NO:86;18个重复)和RLXR (SEQ ID NO:45;12个重复)。见表8。创建了来源于包含最长富集基序RGRLXR的噬菌体克隆5的展示肽的T7噬菌体克隆组,并对其与TNC-C的结合进行了表征(图8)。选择了鉴定具有TNC-C结合能力的15种肽序列作为主要候选物用于进一步评价。其中,AGRGRLVRAKLAAALE肽 (SEQ ID NO:14) 显示出最高结合能力,并且创建了该TNC-C结合肽的数种较短排列并用TNC-C进行验证。多种TNC-C结合肽的结合示于表8中。

[0734] 表8:TNC-C结合肽的特性。

[0735]

克隆 No.	肽序列	Seq ID No.	重复	TNC-C结合 (G7对照噬菌体的倍数)
1	AGV GRLRR AKLAAALE	29	1	3259
2	CRGV LRR AKLAAALE	30	4	5955
3	AVR GRLR VAKLAAALE	31	7	5333
4	CSRRGILRAKPAAALE	33	5	4889
5	AGR GRLV RAKLAAALE	14	1	5785
7	AVR GRLR VAKLAAALE	31	7	7111
35	RRLVR VA	34	2	1223
30	VGRVRF SR KLAAALE	35	1	3702
36	CQRMGVVGAKLAAALE	36	2	3928
44	RGR <u>LR</u> RV E	37	4	886

45	RGR <u>LV</u> RA	38	2	737
46	GRL <u>TR</u> VR	39	2	115

[0736] 该表示出了38种经测序克隆的肽序列,以及单独肽噬菌体与TNC-C的结合的定量(相对于对照七甘氨酸噬菌体的倍数结合)。RGRLXR基序以斜体示出,RGRLR基序加下划线,以及RLXR基序以粗体指示。

[0737] 为了鉴定候选TNC-C靶向肽中最佳的肿瘤靶向和效率,用小鼠中的不同异种移植物肿瘤模型进行了体内噬菌体复选审查。在荷有原位胶质母细胞瘤异种移植物肿瘤模型WT-GBM、P3干细胞样、P1、NCH421K和皮下胶质瘤(U87MG)以及前列腺癌(PC3)异种移植物肿瘤模型的小鼠中在全身施用之后审查归巢(表9)。对噬菌体基因组的肿瘤和对照器官肽编码部分进行高通量测序(HTS),并使用定制生物信息学工具(噬菌体展示解析器互联网网站canbio.ut.ee)对测序数据进行分析。观察到展示AGR**GRLV**R(SEQ ID NO:4)八肽的T7克隆在受试模型中在肿瘤组织中过表达。下一代测序(NGS)结果表明,与其他肽相比,命名为PL3(AGR**GRLV**R;SEQ-ID-NO:4)的TNC-C肽在不同肿瘤模型中具有良好的靶向和归巢作用。

[0738] 2. PL3肽与重组TNC-C和NRP-1相互作用并被培养的肿瘤细胞吸收

[0739] 接下来,对丙氨酸替换的PL3衍生肽-噬菌体的结合进行研究以确定对肽结合重要的氨基酸。PL3肽中精氨酸或亮氨酸残基的替换导致与重组TNC-C的结合降低(图6)。相比之下,丙氨酸替换甘氨酸和缬氨酸的作用最小。与与TNC-C的稳健相互作用相反,PL3噬菌体不与纤连蛋白EDB结构域(与TNC-C具有相似尺寸和负表面电荷的蛋白质)结合。这些结果表明,关键氨基酸残基精氨酸(R)和亮氨酸(L)对TNC-C结合是重要的。在PL3肽其他位置的氨基酸的丙氨酸替换未改变其结合。

[0740] PL3肽包含满足CendR规则并且先前已显示与神经纤毛蛋白1b1b2结构域(NRP1)结

合的C端RXXR基序(Teesalu et al., 2009)。用纯化的NRP1蛋白以及TNC进行测试以确定该结合能力。PL-3噬菌体与NRP-1的重组b1b2结构域的结合比七甘氨酸对照噬菌体高约200倍。与NRP-1的相互作用依赖于C端精氨酸的存在,因为具有有末端R至A替换的PL3衍生肽的噬菌体显示出结合显著降低(图6)。结果确定了PL3在展示在噬菌体颗粒上时保持与TNC-C和NRP1二者特异性结合的能力。

[0741] 许多培养的肿瘤细胞系过表达NRP-1并使具有活性CendR基序的肽内化。对经CF555标记的PL3-AgNP在NRP-1阳性U87-MG胶质瘤和PPC1前列腺癌细胞中以及在NRP-1阴性M21黑素瘤细胞中的摄取进行研究。经染料标记的AgNP核心非常适合于荧光成像,因为AgNP通过等离子体增强将表面结合的染料的亮度提高了约一个数量级。将用CF647染料标记的AgNP用中性抗生物素蛋白(NA)包被并使其PEG化,产生稳定的胶体,以准备用生物素化肽进行包被。透射电子显微术(TEM)和动态光散射(DLS)显示,颗粒的平均尺寸为 66.9 ± 27.6 nm,以及在PBS中 ζ 电位为 -5.09 ± 0.19 mV。在与U87-MG和PPC1细胞孵育1小时之后,PL3-AgNP稳健地内吞以及核周积累,然而对照纳米粒显示仅背景结合。相比之下,NRP-1阴性M21细胞显示出在PL3和对照AgNP二者下的低背景样摄取。可通过用温和的生物相容的基于六氰基铁酸盐/硫代硫酸盐氧化还原的脱色溶液进行处理来去除胞外AgNP,使得仅保留内化的AgNP信号(Braun et al., 2014)。在U87-MG和PPC1细胞中,蚀刻导致细胞PL3-AgNP信号适度降低,表明大多数的细胞相关颗粒被内化并被细胞膜保护免受蚀刻。这些实验表明PL3肽与TNC-C和NRP-1相互作用,并且PL3功能化纳米粒被NRP-1阳性培养的细胞吸收。

[0742] 表9:体内复选归巢实验之后噬菌体克隆的表现。

[0743]

“复选”混合物中的噬菌体展示肽			噬菌体在肿瘤或对照脑组织中的表现 (G7对照噬菌体的倍数)					
			WT - GB M	P3 SCL	P13	U87- MG	PC3	正常 脑
对照	GGGGGGG	对照	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1
TNC-C 选择的 (第5轮)	AGVGRLRRAKLAA ALE	克隆1	2.3	0.9	0.9	1.0	1.4	0.2
	CRGVLRRAKLAAAL E	克隆2	1.6	0.4	0.4	0.7	0.9	0.1
	AVRGRLRVAKLAA ALE	克隆3	1.3	0.6	0.6	0.8	1.0	0.1
	CSRRGILRAKPAAA LE	克隆4	1.5	0.9	0.8	1.1	1.2	0.1
	AGRGRLVRAKLAA ALE	克隆5	23.9	0.4	0.1	0.2	0.3	0.0
	VGRVRF SRKLAAAL E	克隆30	2.5	0.4	0.5	0.7	1.2	0.1
	RRLVRVA	克隆35	1.4	0.3	0.4	0.6	0.9	0.1
	RGRLVRA	克隆45	3	0.3	0.4	0.8	1.8	0.1
	GRLTRVR	克隆46	1.9	0.5	0.5	0.9	0.9	0.1
克隆5 衍生肽	AGRGRLV	经修饰 克隆5 (PL3)	24.1	2.1	4.7	2.1	3.9	0.4
	CAGRGRLVRC	经修饰 克隆5	0.9	0.2	0.4	0.1	0.4	0.0
	RGRLVRAK	经修饰 克隆5	23.8	0.3	0.1	0.5	3.0	0.2

[0744] 以 1×10^{10} pfu/小鼠在荷有WT-GBM、P3干细胞样、P13、U87-MG胶质母细胞瘤或PC3前列腺癌异种移植物的 mice 中 i.v. 注射经TNC-C选择的噬菌体的等摩尔混合物。在2小时循环之后,通过灌注去除背景噬菌体。通过Ion-Torrent高通量测序评估每个噬菌体在肿瘤组织中或在正常脑中的表现。肽从上至下为SEQ ID NO: 20、29至31、33、14、35、34、38至39、4和46至47。

[0745] 3. 全身性PL3功能化纳米粒在肿瘤病变中积累

[0746] 接下来,评价了用合成PL3肽进行功能化对两类合成纳米粒(铁氧化物NW和AgNP)的体内肿瘤趋向性的作用。

[0747] 评价了PL3功能化对经右旋糖酐涂覆的PEG化顺磁性NW肿瘤归集的作用,所述NW为可用作药物载体和由于固有的T2对比度特性而用于MR成像的两用模型纳米平台(Lingasamy, et al., 2019; Park et al., 2008)。为了评价PL3特异性靶向、将纳米粒递送

到肿瘤中以及渗透到肿瘤组织中的效率,将FAM PL3肽与经右旋糖酐涂覆的PEG化顺磁性铁氧化物纳米虫 (NW) 缀合。与经FAM染料标记的PL3肽和FAM-Cys对照缀合的NW不影响其结构、尺寸和表面电荷。NW的透射电子显微术 (TEM) 和动态光散射 (DLS) 显示,颗粒的平均尺寸为 $88.8 \pm 5\text{nm}$,以及在PBS中 ζ 电位为 $-7.8 \pm 2\text{mV}$ 。

[0748] 初始,在U87和PC3皮下和原位WT GBM肿瘤异种移植模型中研究PL3-NW特异性归巢模式的全身IV施用。在荷有前列腺癌异种移植模型(PC3 s.c.肿瘤)或胶质瘤(s.c.U87-MG和原位WT-GBM)的小鼠中以 7.5mg/kg NW i.v.施用NW,所述两种肿瘤均已表达TNC-C和NRP-1。在IV注射PL3-NW之后五小时,对肿瘤组织的检查显示对于受试的所有肿瘤模型,PL3-NW的显著更高积累和非常特异性的归巢,但对照NW则没有。在所有组织中,PL3归巢模式主要观察到定位于肿瘤血管,包括基质区域中,如通过定位的CD31标志物所看到的。共焦分析表明,虽然PL3-NW归巢主要与CD31阳性血管结构重叠或与其相关,在一些区域中,PL3-NW外渗并在肿瘤实质中积累。在对照器官中,PL3-NW和对照NW显示出相似的背景。存在其中在远离血管处检测到信号的一些区域。相比之下,对照NW在肿瘤组织中显示仅背景信号。PL3-NW和NW的定量生物分布分析显示,在受试的所有三种不同模型中,在肝、肺以及相对于肾的一些延伸部位均有非特异性积累。结果与先前对NW的报道相当。

[0749] 通过对来自经PL3-NW/NW注射的U87小鼠的器官的离体Illumatool成像再次确定了免疫染色分析。肿瘤器官的宏观图像再次表明PL3肽效率的特异性靶向。通过用临床分期单链抗体(scFV)G11和兔NRP1抗体进行免疫染色进一步检查了在U87皮下肿瘤模型中PL3与TNC-C和NRP1的共定位。宏观成像确定了PL3-NW在U87-MG肿瘤小鼠中的优先肿瘤积累。U87肿瘤模型中的TNC-C表达呈弥漫性并且在肿瘤血管中更为显著。在肿瘤组织中,PL3-NW显示与对TNC-C和NRP1免疫反应性呈阳性的区域共定位,然而对照NW显示无信号。

[0750] 还检查了PL3和对照NW与临床胶质瘤的结合。将NW覆盖在GBM的冷冻切片上,洗涤,并进行共焦成像。PL3-NW显示与肿瘤血管周空间和实质中的TNC-C阳性结构共定位。对于TNC-C检测,使用了内部单克隆抗体,并且其作为特异性对照,确定了抗体与重组TNC-C的预孵育导致染色降低。

[0751] 4. 使用PL3功能化纳米粒进行的对荷有胶质瘤的裸鼠的体内成像

[0752] 还检查了近红外染料标记的AgNP的PL3包被对肿瘤归巢的作用。将带有CF647染料标记的AgNP与经中性抗生物素蛋白包被的颗粒与生物素PL3和生物素缀合,不改变颗粒尺寸或表面电荷。AgNP的透射电子显微术 (TEM) 和动态光散射 (DLS) 显示,颗粒的平均尺寸为 $66.9 \pm 27.6\text{nm}$,以及在PBS中 ζ 电位为 $-5.09 \pm 0.19\text{mV}$ 。为了确定体内靶向特异性和纳米粒积累,将AgNP PL3和AgNP对照颗粒静脉内施用在荷有U87皮下GBM肿瘤的裸鼠中。如通过用IVIS光谱系统进行的活体内荧光成像所判断的,PL3-CF647-AgNP在胶质瘤病变中的积累比对照非肽CF647-AgNP (5小时) 多约10倍 (5小时)。共焦成像确定了PL3-AgNP的肿瘤归巢。PL3-AgNP与针对TNC-C或NRP-1的阻断兔多克隆抗体的共施用导致肿瘤归巢降低,并且两种抗体的混合物几乎完全抑制了肿瘤积累 (图7)。还对NW在U87胶质瘤小鼠中的靶向效率进行研究,并且体内光信号也显示相似的结果。一些荷瘤小鼠在预注射时间点显示来自GI道的背景信号。在5小时时间点使用来自经灌注小鼠的切除器官的终末离体Illumatool成像证实了非侵入性活体内成像结果。这些数据表明PL3功能化导致不同类别的纳米粒的特异性肿瘤归巢。

[0753] 5. 靶向PL3的促凋亡NW显示抗胶质瘤活性

[0754] 检查了PL3功能化对抗癌效力的作用。为了确定PL3-NW的靶向治疗效果和递送,使用促凋亡_D(KLAKLAK)₂肽 (SEQ ID NO:6) 作为U87-MG皮下异种移植GBM模型的模型药物。使用U87-MG肿瘤模型以便监测作为终点的肿瘤尺寸,而不是存活。

[0755] 从肿瘤诱导之后第36天(当肿瘤已达到100mm³)开始,对肿瘤小鼠每隔一天注射PL3-_D(KLAKLAK)₂-NW、_D(KLAKLAK)₂-NW、PL3-NW或PBS持续10次,并记录小鼠的肿瘤体积和存活。与_D(KLAKLAK)₂-PL3组相比,用PBS、PL3-NW和_D(KLAKLAK)₂-NW处理的小鼠的肿瘤体积在处理期间迅速提高。用_D(KLAKLAK)₂-PL3 NW处理的小鼠的肿瘤生长得到显著的抑制。PBS、_D(KLAKLAK)₂-NW、PL3-NW和PL3-_D(KLAKLAK)₂-NW组的中位存活分别为55、58、54和70天。与其他组中的小鼠相比,_D(KLAKLAK)₂-PL3组有50%的小鼠示出存活延长。该抗肿瘤作用是由于PL3的特异性靶向和递送作用。用抗CD31抗体对处理后肿瘤组织进行免疫染色,以使肿瘤脉管系统显现,显示出与对照相比,PL3-_D(KLAKLAK)₂-NW处理的肿瘤的CD31阳性面积显著减少。在处理期间测量体重以评价PL3-NW制剂的全身毒性。整个组中在处理期间未观察到体重减轻,表明PL3-NW衍生物未引发显著的全身毒性。进一步的免疫荧光研究表明,组织-巨噬细胞CD68染色、细胞增殖Ki67染色和凋亡细胞(如通过切割的半胱天冬酶3染色测定的)未明显变化。

[0756] 为探究基于PL3的靶向系统的转化相关性和组织穿透效应,对临床胶质瘤脑样品和新鲜提取的人卵巢癌组织进行了重叠测定和肿瘤浸渍测定。检查了PL3和对照NW与临床胶质瘤的结合。将PL3 NW和对照NW颗粒与GBM冷冻切片重叠,洗涤并进行共焦成像。PL3 NW显示在血管周空间和肿瘤实质中的TNC-C阳性结构与人GBM样品的广泛结合。对于TNC-C检测,使用了一种内部单克隆抗体,并且作为特异性对照,确定了抗体与重组TNC-C的预孵育导致染色降低。PL3-NW与临床胶质瘤样品中高度过表达的肿瘤TNC-C共定位 (Giblin and Midwood, 2015)。在不同类型的GBM组织中,TNC-C显示出异质表达模式,在胶质肉瘤、胶质母细胞瘤、间变性少突胶质细胞瘤、少突胶质细胞瘤和弥漫性星形细胞瘤中具有非常高的丰度。相反,对照NW仅示出背景荧光信号。在肿瘤浸渍测定中,PL3 NW显示与肿瘤组织的结合和对其的穿透比对照NW或PBS高一倍。在一些区域中观察到外植体内部几微米的穿透效果,然而结合主要与肿瘤组织表面有关。这些数据表明PL3导向的探针在转化上与实体瘤靶向相关。

[0757] C. 讨论

[0758] 大多数基于亲和力的精确递送策略都是靶向肿瘤细胞表面的受体。该方法虽然有用,但有局限性,因为它依赖于在遗传不稳定的恶性细胞上靶向数目有限的全身可及的受体。与肿瘤细胞上的表面抗原相比,肿瘤相关ECM代表了具有低脱落的丰富和稳定的靶点 (Raavé, R., et al., J. Control. Release 274:1-8. (2018))。ECM导向的亲亲和靶向策略可允许同时靶向恶性肿瘤细胞和肿瘤支持细胞二者(例如,成纤维细胞、免疫细胞和血管细胞),并且可有益于提高治疗效力。

[0759] TNC是一种在侵袭性肿瘤前沿和血管基质中表达的ECM成分,由于其多种结构和功能上不同的同种型的精确控制的表达,它提供了特定的靶向机会 (Spénlé et al., 2015)。TNC-C在大多数实体瘤中丰富表达,特别在GBM中显示出非常高的表达。此外,TNC表达与包括癌症的广泛范围的疾病状态下的血管生成高度相关 (Orend et al., 2012; Rupp et al.,

2016)。

[0760] 本文公开的数据表明了能够靶向实体瘤ECM成分生腱蛋白C FnIII C结构域的新型PL3肽的开发。靶向TNC的C结构域的亲和配体八聚体PL3肽也与NRP-1相互作用,NRP-1是一种多效性中枢受体,在血管生成位点和参与血管通透性调节的恶性组织中上调。在多种临床前肿瘤模型中,其靶向体内和体外二者的能力都得到了证明。纳米粒缀合的PL3肽在多种肿瘤模型和实时体内活体成像中已示出了靶向递送和归巢。全身性PL3噬菌体纳米粒和两种类型的合成的PL3导向的纳米载体归巢于植入小鼠中的实体瘤,并与临床肿瘤样品中的受体阳性区域结合。对于治疗性纳米粒,PL3功能化改善了它们的抗癌活性。促凋亡NW的靶向PL3的递送在小鼠中示出肿瘤抑制和存活提高。这些数据表明,PL3肽为TNC-C特异性靶向提供了有力的工具用于成像和在多种实体瘤中的进一步治疗应用。

[0761] 多种有希望的方法已被开发用于靶向生腱蛋白C,与细胞毒性剂偶联的配体包括双特异性CD95/抗生腱蛋白-C抗体(Herrmann et al.,2008),抗生腱蛋白-C抗体(G11)与IL2(Mårilind et al.,2008),B8C6抗生腱蛋白-C抗体偶联细胞毒性放射性(Reardon et al.,2008),基于DNA的适配体(Hicke et al.,2006),FHK肽(Kim et al.,2012),除了TNC-C还靶向纤连蛋白额外结构域B的双特异性PL1肽,(Lingasamy et al.,2019),TNC-C/D靶向单克隆抗体81C6(Lee et al.,Cancer Res.48:584-588(1988))和与tLyp-1缀合的F3肽(Hu et al.,2013)。这些和其他ECM反应性亲和配体已被证明对胞外发挥作用的抗癌有效载荷(例如细胞因子/生长因子)或具有内在内化能力的有效载荷(例如促凋亡_D(KLKLAK)₂肽纳米粒)或有细胞渗透性的细胞毒化合物的肿瘤递送有用。然而,这些和其他ECM导向的全身性化合物的挑战是,它们只能通过异常肿瘤微脉管系统渗漏的提高,被动地到达血管外肿瘤组织,该现象被称为高通透性和滞留(enhanced permeability and retention,EPR)效应。然而,考虑到TNC-C特异性亲和肽的受限的表达、可及性和其治疗潜力,迄今尚未发现TNC-C特异性亲和肽。所公开的PL3肽短为8个氨基酸并且对具有限制性表达模式的TNC-C结构域以及NRP1高度特异。

[0762] 体外生物淘选实验产生了15倍高的TNC-C结合肽,其可用于药物递送应用。显示了体内噬菌体展示技术与噬菌体基因组HTS测序一起允许用于验证TNC-C结合肽并证明它们在体内模型中的归巢偏好。令人感兴趣的是,体内复赛实验显示,在不同肿瘤模型中测试的肽噬菌体中,PL3在肿瘤中显示出优异的积累。然而,与其他肽相比,体外PL3显示出中等的结合性能。因此,显示出高亲和力可削弱有效的肿瘤穿透,并降低有效的体内靶向(Adams et al.,2001)。PL3的C端RLVR对应于RXXR CendR共有基序,当暴露在C端时,该基序与NRP-1的b1结构域相互作用以触发跨组织通路,该通路介导从血管退出并通过肿瘤组织进行血管外转运(Ruoslahti,2012;Teesalu et al.,2009;Teesalu et al.,Front.Oncol.3,216(2013))。表明PL3肽也与NRP1蛋白体外结合。观察到PL3纳米粒与重组NRP-1b1b2结构域特异性结合,然而不与具有突变的CendR结合口袋的b1b2特异性结合,以及PL3纳米粒在NRP-1阳性PPC1细胞中的结合和内化,并且观察到与NRP-1阴性M21黑素瘤细胞无相互作用。PL3肽与NRP1的结合不仅促进了与肿瘤ECM的结合,而且促进了肿瘤实质和细胞中的穿透。

[0763] 在本研究中,PL3 NW数据清楚地表明GBM和胰腺癌模型的有效靶向性。在生物分布分析中,PL3 NW在所有受试模型中均表现出良好的积累和肿瘤靶向表现,比对照NW高3至7倍。牢记纳米粒的物理和化学参数,在U87肿瘤小鼠中PL3 AgNP积累的实时成像表明纳米

粒之间具有相似的靶向行为。在两种纳米粒制剂中,与对照相比,在用PL3处理的小鼠肿瘤中观察到最强的荧光。此外,PL3与生腱蛋白C共定位,并在新生血管和血管周区域大量穿透。PL3的临床应用潜力用人癌GBM和卵巢癌组织示出。此外,如TNC特异性单克隆抗体的临床试验所证明的那样,TNC-C的局部表达可成为治疗剂的肿瘤特异性递送以及世代交替(digenesis)的一个高度有价值的靶标(Spenle et al.,2015)。

[0764] 在体内,包括生物噬菌体纳米粒的NP,由于其尺寸,它们特别容易被排除在肿瘤的难以接近部位之外,然而PL3功能化可缓解该问题。研究记录了CendR肽在肿瘤中特异性增强多种抗癌治疗剂(例如化学治疗剂、抗体和NP)积累的能力(Sugahara et al.,2009)。对于PL3肽,CendR活性与肿瘤ECM归巢功能的结合可增强TNC-C在肿瘤实质中的可及性,其比在具有简单的基于对接的亲合力靶向的生理EPR条件下所可能的更深。一种由TNC-A-D结构域结合肽和靶向肿瘤细胞上NRP-1的tLyP-1肿瘤穿透肽构成的嵌合19聚体嵌合肽被报道允许抗神经胶质瘤药物通过NRP-1和TNC介导的纳米粒特异性穿透递送到神经胶质瘤实质中(Roth,L.et al.,Oncogene 31:3754-3763 (2012);Kang,T.et al.,Biomaterials 101:60-75 (2016))。与该肽相比,我们鉴定的8氨基酸PL3肽的优点是更小,因此不太可能具有免疫原性,并且更易于产生和开发用于临床应用。在这两种肽中,CendR基序是C端暴露的,并且不需要原位蛋白水解激活,如其他数种肿瘤穿透肽所见。

[0765] 总之,本研究描述了与TNC-C和细胞及组织穿透受体NRP-1相互作用的8氨基酸归巢肽PL3的鉴定。全身性PL3导向的纳米粒在植入小鼠中的肿瘤异种移植物中积累。PL3导向的纳米粒可用于肿瘤检测、成像,并用作促凋亡肽抗癌有效载荷的肿瘤寻找载体。

[0766] 在整个本申请中,引用了多种出版物。为了更全面地描述本发明所属领域的状态,在此将这些出版物的公开内容通过引用整体并入本申请中。

[0767] 必须注意,如本文和所附权利要求书中所使用的,除非上下文另有明确指示,否则未用数量词修饰的名词包括一个/种或更多个/种。因此,例如,对“肽”的提及包括多个这样的肽,对“该肽/所述肽”的提及是对本领域技术人员已知的一种或更多种肽及其等效物的引用,等等。

[0768] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件、情况或材料可能或可能不发生或存在,并且该描述包括事件、情况或材料发生或存在的情况以及事件、情况或材料不发生或不存在的状况。

[0769] 在本文中范围可表示为从“约”一个特定值和/或至“约”另一个特定值。当表达这样的范围时,除非上下文另有明确说明,否则还特别预期和考虑所公开的是从一个特定值和/或到另一个特定值的范围。类似地,当值通过使用先行词“约”被表示为近似值时,将理解,除非上下文另有明确指示,否则特定值形成应被视为公开的另一个具体预期的实施方案。还将理解,除非上下文另有明确指示,否则每个范围的端点在与另一端点有关和独立于另一端点二者的情况下都是重要的。最后,应当理解,在明确公开的范围内包含的所有单独值和值的子范围也被具体地预期并且应当被认为是公开的,除非上下文另有明确指示。无论在特定情况下是否明确公开了这些实施方案中的一些或所有,上述内容都适用。

[0770] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与所公开的方法和组合物所属领域的技术人员通常理解的相同含义。尽管在本方法和组合物的实践或测试中可以使用与本文所述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料,但是特别有用的方法、

装置和材料如所述。本文引用的出版物及它们引用的材料在此通过引用特别并入。本文中的任何内容都不应被解释为承认本发明无权凭借先前的发明解释这样的公开内容。不承认任何引用构成现有技术。对参考文献的讨论陈述了其作者的主张，申请人保留对引用文献的准确性和相关特性质疑的权利。将清楚地理解，尽管本文引用了许多出版物，但是这样的引用并不构成对这些文件中的任何一个构成本领域公知常识的一部分的承认。

[0771] 应当理解，所公开的方法和组合物不限于所描述的特定方法、方案和试剂，因为它们可以变化。还应理解，本文中使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的，并且不旨在限制将仅由所附权利要求书限制的本发明的范围。

[0772] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定与本文所述方法和组合物的具体实施方案的许多等效物。这样的等效物旨在被所附权利要求书所涵盖。

序列表

<110> University of Tartu
 Teesalu, Tambet
 Lingasamy, Prakash
 <120> 双特异性胞外基质结合肽及其使用方法
 <130> TARTU 100 PCT
 <150> 62/800,879
 <151> 2019-02-04
 <160> 86
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽
 <400> 1
 Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ile Lys Leu Lys Thr Ser
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽
 <400> 2
 Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ile Lys Leu Lys Thr Ser Ser Asn Thr Lys
 1 5 10 15
 Glu Asn Ser Val Val Ala Ser Leu Arg Pro
 20 25
 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽
 <400> 3
 Thr Ser Lys Gln Asn Ser Arg

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 4

Ala Gly Arg Gly Arg Leu Val Arg

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 5

Arg Pro Ala Arg Pro Ala Arg

1 5

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 6

Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Leu Ala Lys Leu Ala Lys

1 5 10

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 7

ctcctctcat atggaggccc tgccccttc

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

29

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	8	
cagacactcg agttatcatg taacaatctc		30
<210>	9	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	9	
ctcctctcat atggaggtgc cccaactca		29
<210>	10	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	10	
cagacactcg agttatcacg tttgttgtgt		30
<210>	11	
<211>	102	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的寡核苷酸	
<400>	11	
atgctcgggg atccgaattc tccgccgaga cgtggtctaa ttaagcttaa aacctcgtcc		60
aatacaaaaag agaattctgt tgtggcttcg ctgaggcett aa		102
<210>	12	
<211>	33	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的肽	
<400>	12	
Met Leu Gly Asp Pro Asn Ser Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ile Lys Leu		
1	5	10 15

Lys Thr Ser Ser Asn Thr Lys Glu Asn Ser Val Val Ala Ser Leu Arg
 20 25 30
 Pro
 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽
 <400> 13
 Ile Lys Leu Lys Thr Ser
 1 5
 <210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽
 <400> 14
 Ala Gly Arg Gly Arg Leu Val Arg Ala Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu
 1 5 10 15
 <210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的肽
 <400> 15
 Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1 5 10 15
 Arg Gly Ser His Met Glu Ala Leu Pro Leu Leu Glu Asn Leu Thr Ile
 20 25 30
 Ser Asp Ile Asn Pro Tyr Gly Phe Thr Val Ser Trp Met Ala Ser Glu
 35 40 45
 Asn Ala Phe Asp Ser Phe Leu Val Thr Val Val Asp Ser Gly Lys Leu
 50 55 60
 Leu Asp Pro Gln Glu Phe Thr Leu Ser Gly Thr Gln Arg Lys Leu Glu
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Leu Ile Thr Gly Ile Gly Tyr Glu Val Met Val Ser Gly

				85					90					95					
Phe	Thr	Gln	Gly	His	Gln	Thr	Lys	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Ile	Val	Thr				
				100					105					110					

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 16

Met	Gly	Ser	Ser	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro
1				5					10					15	

Arg	Gly	Ser	His	Met	Glu	Val	Pro	Gln	Leu	Thr	Asp	Leu	Ser	Phe	Val
			20					25					30		

Asp	Ile	Thr	Asp	Ser	Ser	Ile	Gly	Leu	Arg	Trp	Thr	Pro	Leu	Asn	Ser
		35					40						45		

Ser	Thr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Arg	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Gly
	50					55					60				

Ile	Pro	Ile	Phe	Glu	Asp	Phe	Val	Asp	Ser	Ser	Val	Gly	Tyr	Tyr	Thr
65					70				75					80	

Val	Thr	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Ile	Asp	Tyr	Asp	Ile	Ser	Val	Ile	Thr
				85				90					95		

Leu	Ile	Asn	Gly	Gly	Glu	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	Gln	Thr
			100					105					110		

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 17

Lys	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Ala
1				5				10					

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 18

Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Lys Lys Ala Ala

1 5 10

<210> 19

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 19

Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu Gly Lys Lys Leu Gly Lys Leu

1 5 10 15

Gly Lys Lys Leu Gly

20

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 20

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 21

Thr Lys Arg Lys Gly Lys Gly

1 5

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 22

Gly Leu Gly Gly Arg Arg Ile Lys Leu Lys Thr Ser

1 5 10

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 23

Gly Arg Arg Gly Arg Val Ile Lys Leu Lys Thr Ser Glu Pro Pro Gln

1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 24

Gly Thr Arg Arg Arg Ser Arg Ile Asn Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 25

Lys Val Lys Lys Arg Gly Ala

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 26

Val His Glu Arg Thr Arg Ile

1 5

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 27

Arg Glu Ser Arg Arg Gly Arg Val Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 28

Arg Gly Arg Leu Xaa Arg

1 5

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 29

Ala Gly Val Gly Arg Leu Arg Arg Ala Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 30

Cys Arg Gly Val Leu Arg Arg Ala Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 31

Ala Val Arg Gly Arg Leu Arg Val Ala Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 32

Cys Ser Arg Arg Gly Ile Leu Arg Ala Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 33

Cys Ser Arg Arg Gly Ile Leu Arg Ala Lys Pro Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 34

Arg Arg Leu Val Arg Val Ala

1 5

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 35

Val Gly Arg Val Arg Phe Ser Arg Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 36

Cys Gln Arg Met Gly Val Val Gly Ala Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu

1 5 10 15

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 37

Arg Gly Arg Leu Arg Arg Val Glu

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 38

Arg Gly Arg Leu Val Arg Ala

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 39
Gly Arg Leu Thr Arg Val Arg
1 5
<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 40
Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys
1 5
<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 41
Ser Ser Val Asp Lys Leu
1 5
<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 42
Cys Ala Gly Ala Leu Cys Tyr
1 5
<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 43
Gly Arg Pro Ala Arg Pro Ala Arg
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 44
Cys Arg Gly Asp Lys Gly Pro Asp Cys
1 5
<210> 45
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<220>
<221> misc_feature
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 45
Arg Leu Xaa Arg
1
<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 46
Cys Ala Gly Arg Gly Arg Leu Val Arg Cys
1 5 10
<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 47
Arg Gly Arg Leu Val Arg Ala Lys

1 5
<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 48
Ala Gly Val Gly Arg Leu Arg Arg Ala Lys Leu
1 5 10
<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 49
Cys Arg Gly Val Leu Arg Arg Ala Lys Leu
1 5 10
<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 50
Ala Val Arg Gly Arg Leu Arg Val Ala Lys Leu
1 5 10
<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 51
Cys Ser Arg Arg Gly Ile Leu Arg Ala Lys Pro
1 5 10
<210> 52
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 52
Ala Gly Arg Gly Arg Leu Val Arg Ala Lys Leu
1 5 10
<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 53
Val Gly Arg Val Arg Phe Ser Arg Lys Leu
1 5 10
<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 54
Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ile Lys Leu Lys Thr Ala
1 5 10
<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 55
Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ile Lys Leu Lys Ala Ser
1 5 10
<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的肽

<400> 56

Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ile Lys Leu Ala Thr Ser
1 5 10

<210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 57

Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ile Lys Ala Lys Thr Ser
1 5 10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 58

Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ile Ala Leu Lys Thr Ser
1 5 10

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 59

Pro Pro Arg Arg Gly Leu Ala Lys Leu Lys Thr Ser
1 5 10

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 60

Pro Pro Arg Arg Gly Ala Ile Lys Leu Lys Thr Ser

1	5	10
<210>	61	
<211>	12	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的肽	
<400>	61	
Pro	Pro	Arg
Arg	Ala	Leu
Ile	Lys	Leu
Lys	Thr	Ser
1	5	10
<210>	62	
<211>	12	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的肽	
<400>	62	
Pro	Pro	Arg
Ala	Gly	Leu
Ile	Lys	Leu
Lys	Thr	Ser
1	5	10
<210>	63	
<211>	12	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的肽	
<400>	63	
Pro	Pro	Ala
Arg	Gly	Leu
Ile	Lys	Leu
Lys	Thr	Ser
1	5	10
<210>	64	
<211>	12	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的肽	
<400>	64	
Pro	Ala	Arg
Arg	Gly	Leu
Ile	Lys	Leu
Lys	Thr	Ser
1	5	10
<210>	65	
<211>	12	

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 65
Ala Pro Arg Arg Gly Leu Ile Lys Leu Lys Thr Ser
1 5 10
<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 66
Cys Gly Arg Arg Ile Lys Leu Lys Thr Ser Cys
1 5 10
<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 67
Gly Arg Arg Ile Lys Leu Lys Thr Ser
1 5
<210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 68
Gly Gly Arg Arg Ile Lys
1 5
<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的肽
<400> 69
Arg Glu Ser Arg Arg Gly Arg Val Lys Leu
1 5 10

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 70

Thr Ser Lys Gln Asn Ser Ala
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 71

Thr Ser Lys Gln Asn Ala Arg
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 72

Thr Ser Lys Gln Ala Ser Arg
1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的肽

<400> 73

Thr Ser Lys Ala Asn Ser Arg

1 5
<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 74
Thr Ser Ala Gln Asn Ser Arg
1 5
<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 75
Thr Ala Lys Gln Asn Ser Arg
1 5
<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 76
Ala Ser Lys Gln Asn Ser Arg
1 5
<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 77
Cys Thr Val Arg Thr Ser Ala Asp Cys
1 5
<210> 78
<211> 8

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 78
Ala Gly Arg Gly Arg Leu Val Ala
1 5
<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 79
Ala Gly Arg Gly Arg Leu Ala Arg
1 5
<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 80
Ala Gly Arg Gly Arg Ala Val Arg
1 5
<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 81
Ala Gly Arg Gly Ala Leu Val Arg
1 5
<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的肽
<400> 82
Ala Gly Arg Ala Arg Leu Val Arg
1 5
<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 83
Ala Gly Ala Gly Arg Leu Val Arg
1 5
<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 84
Ala Ala Arg Gly Arg Leu Val Arg
1 5
<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 85
Ala Gly Arg Gly Arg Leu Val
1 5
<210> 86
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的肽
<400> 86
Arg Gly Arg Leu Arg

1

5

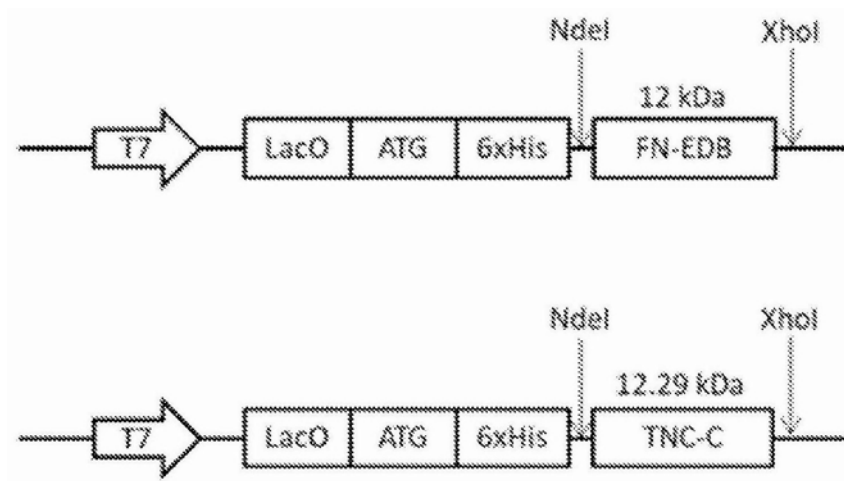


图1A

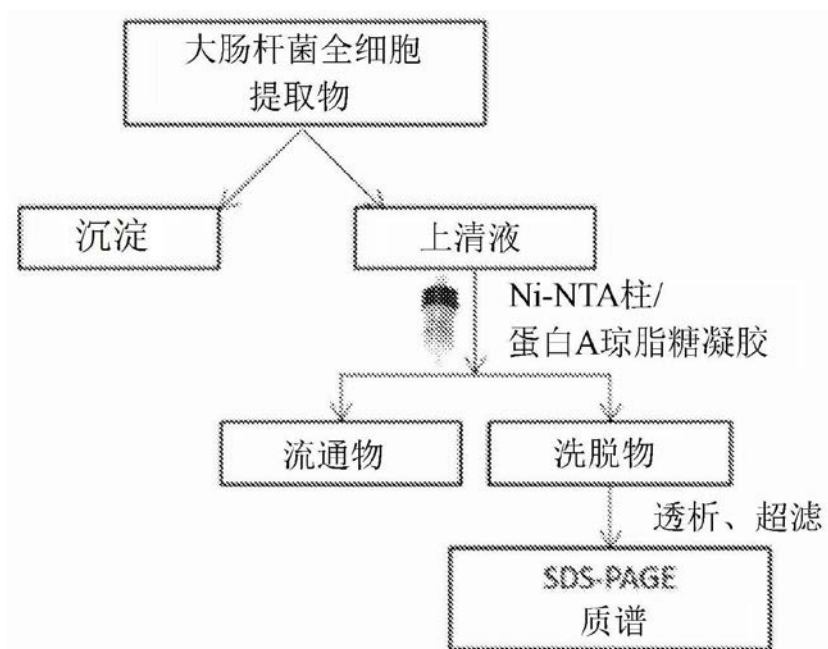


图1B

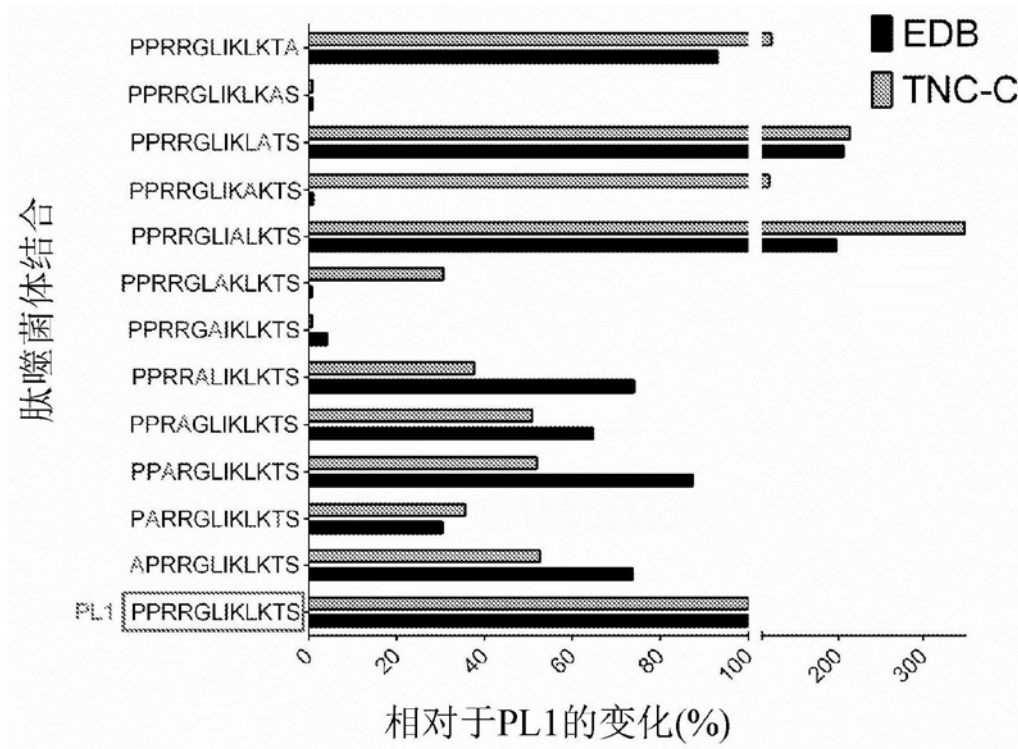


图2

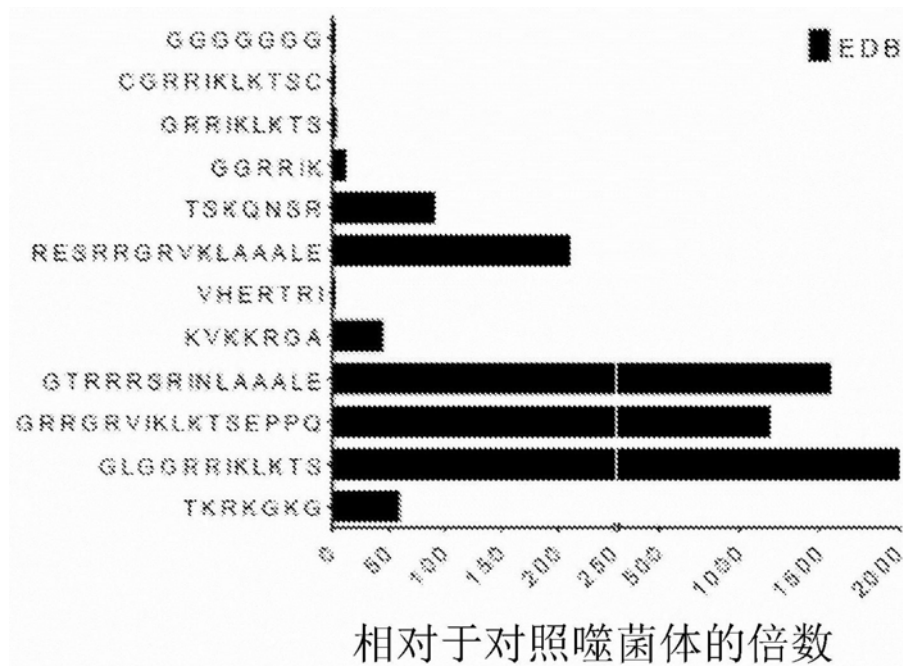


图3

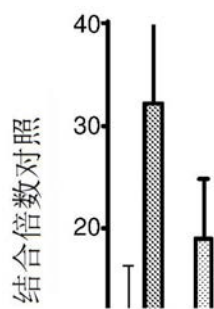


图4A

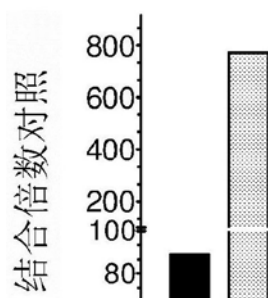


图4B

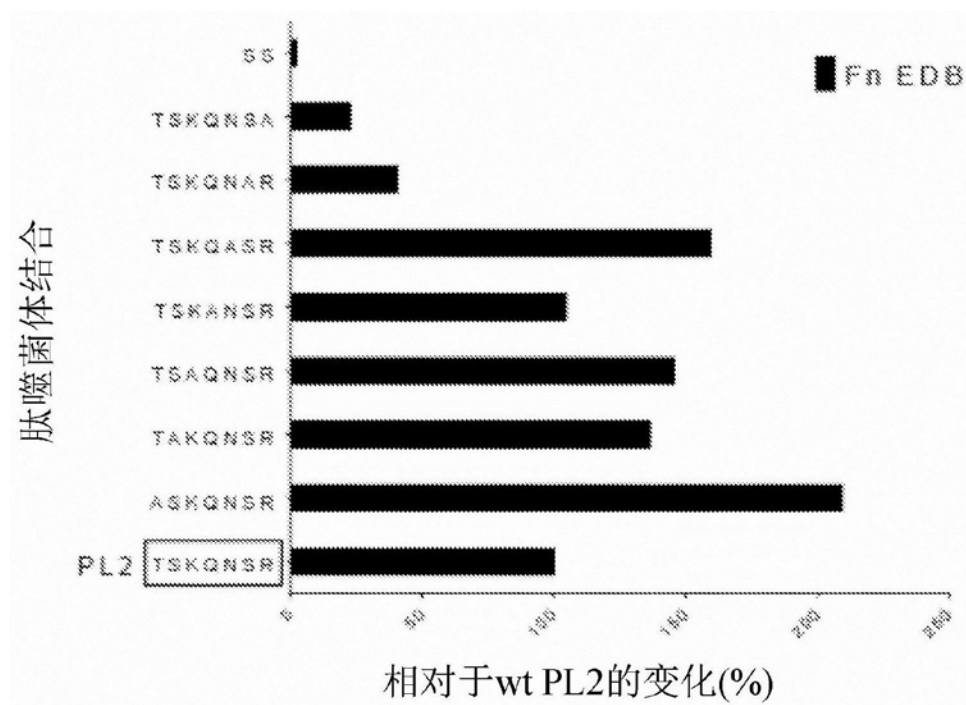


图4C

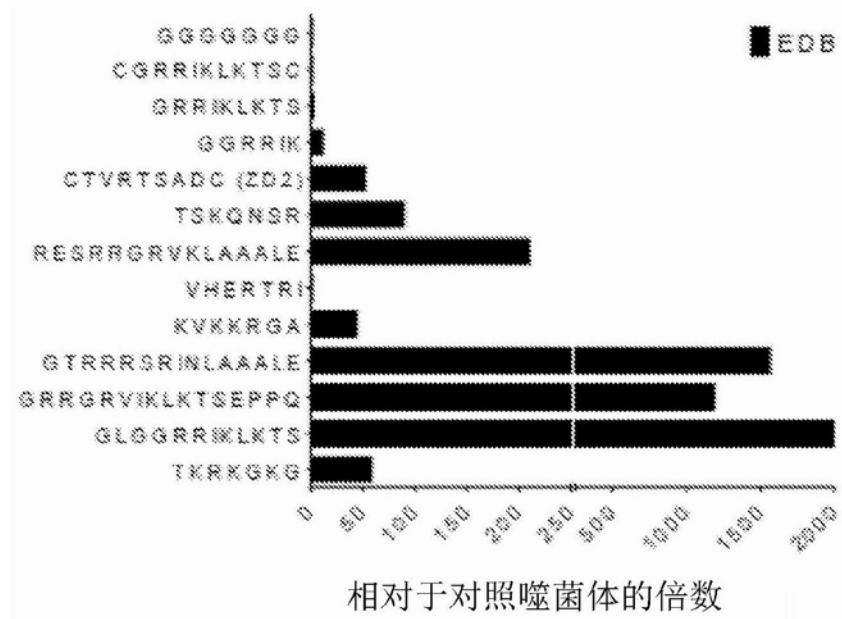


图5

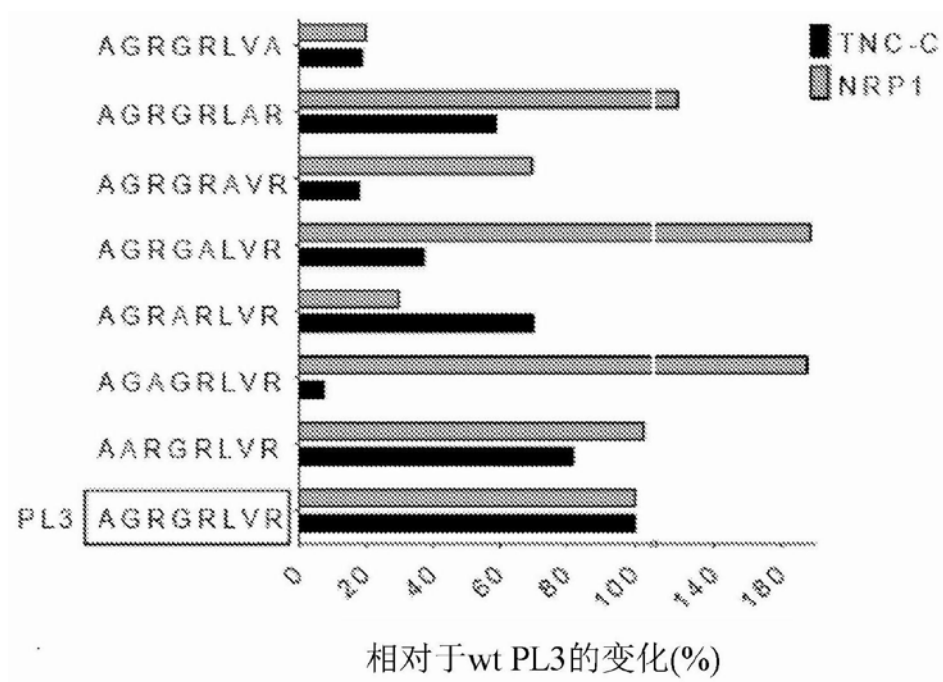


图6

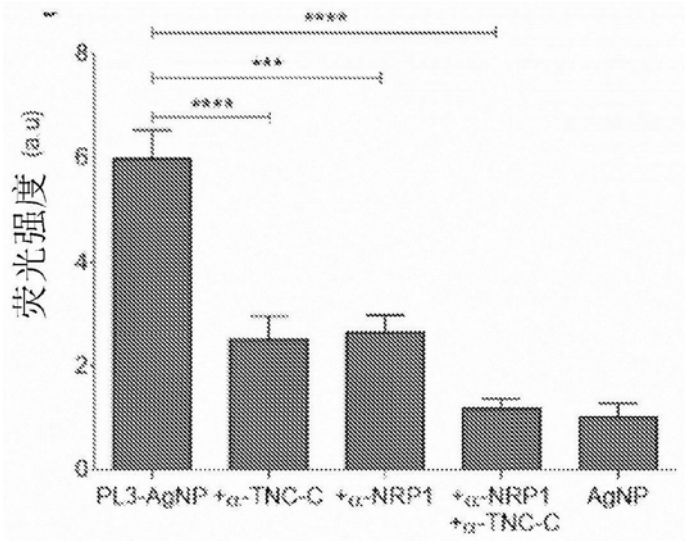


图7

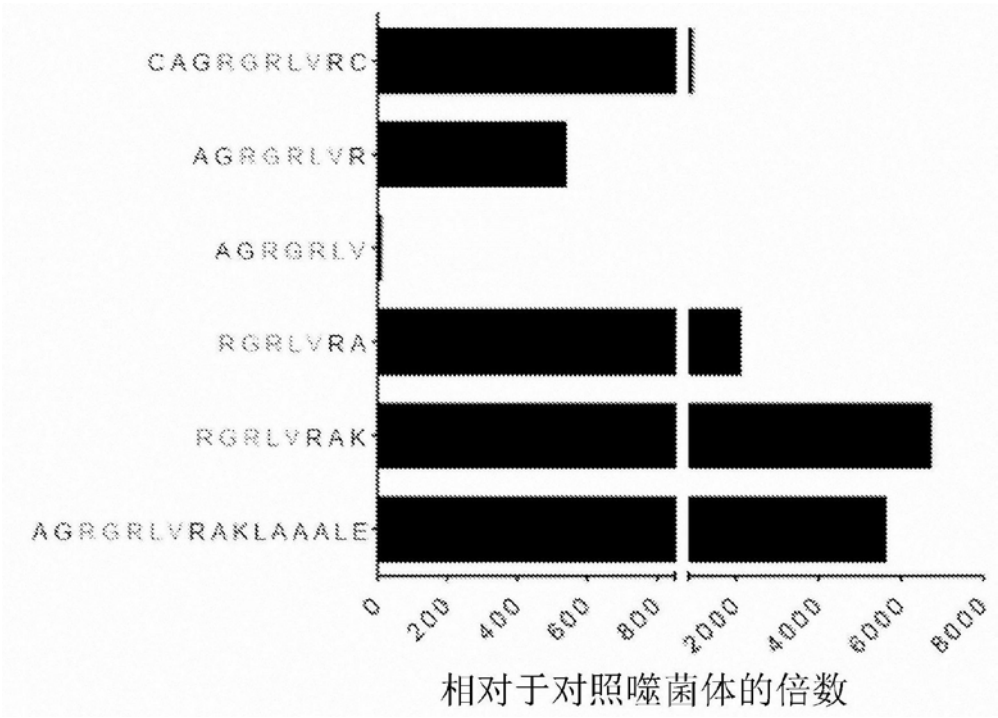


图8

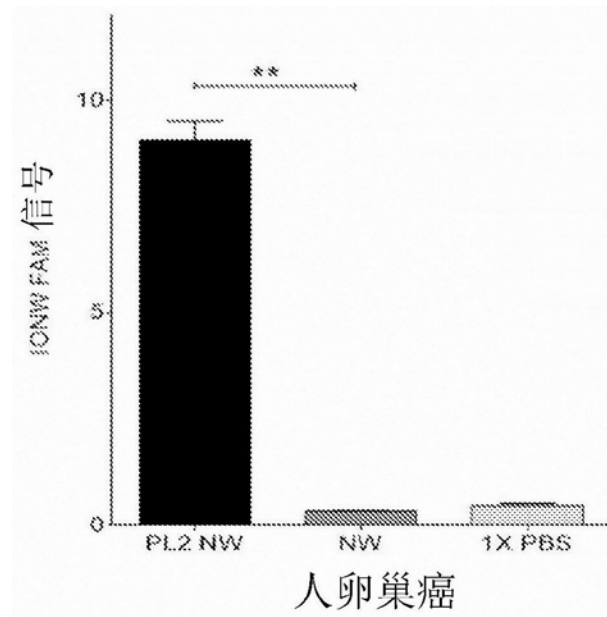


图9

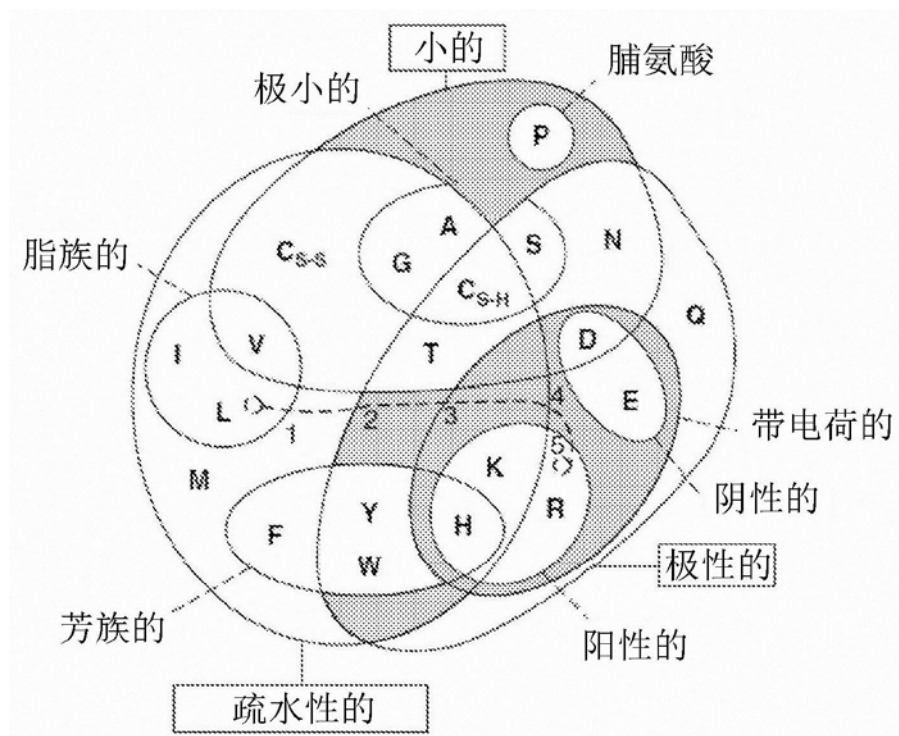


图10