



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108135881 B

(45) 授权公告日 2020.11.13

(21) 申请号 201680045855.3

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2016.08.11

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108135881 A

(56) 对比文件

CN 103372199 A, 2013.10.30

CN 104667292 A, 2015.06.03

CN 102231951 A, 2011.11.02

CN 104784699 A, 2015.07.22

(43) 申请公布日 2018.06.08

(66) 本国优先权数据

201510489556.6 2015.08.11 CN

201510489560.2 2015.08.11 CN

Myung Joo Kang 等.Folic acid-tethered

Pep-1 peptide-conjugated liposomal

nanocarrier for enhanced intracellular

drug delivery to cancer cells:

conformational characterization and in

vitro cellular uptake evaluation.

《International Journal of Nanomedicine》

.2013,第8卷第1155-1165页.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2016/094704 2016.08.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/025057 EN 2017.02.16

Myung Joo Kang 等.Folic acid-tethered

Pep-1 peptide-conjugated liposomal

nanocarrier for enhanced intracellular

drug delivery to cancer cells:

conformational characterization and in

vitro cellular uptake evaluation.

《International Journal of Nanomedicine》

.2013,第8卷第1155-1165页.

(73) 专利权人 同宜医药(苏州)有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖

街218号C36-2F

(72) 发明人 黄保华 戴建 王中波 谢雪原

刘小栋 胡新礼

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 黄遵玲 顾云峰

审查员 焦士勇

(51) Int.Cl.

A61K 31/40 (2006.01)

权利要求书13页 说明书36页

序列表5页 附图8页

(54) 发明名称

多配体药物偶联体及其用途

(57) 摘要

一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐,

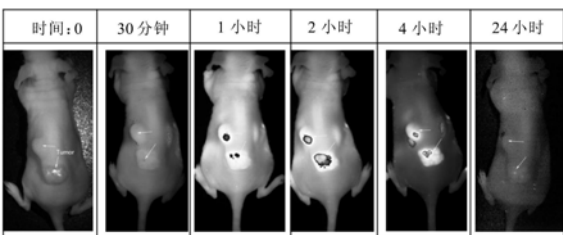
所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含

有效载荷(payload)和两种或多种细胞相互作用

分子。所述细胞相互作用分子是能够与细胞表面

受体特异性结合的配体。一种治疗疾病的方法,

所述方法包括向对象递送有效载荷。



1. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐,所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷、连接子和两种或多种细胞相互作用分子,其中所述有效载荷通过所述连接子与至少一个所述细胞相互作用分子偶联,其中所述两种或多种细胞相互作用分子选自:

(a) 能够与第一细胞表面受体特异性结合的第一配体和能够与第二细胞表面受体特异性结合的第二配体,其中所述第一细胞表面受体与第二细胞表面受体不同;或者

(b) 能够与第一细胞表面受体特异性结合的第一配体和能够介导内吞作用的内吞作用分子,

其中所述第一细胞表面受体和所述第二细胞表面受体选自生长抑素-14受体、促黄体生成素释放激素受体和TRPV6,所述内吞作用分子选自叶酸及其类似物和穿膜肽,其中所述叶酸类似物选自下组:5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、甲氨蝶呤和5,10-亚甲基四氢叶酸,所述穿膜肽选自SEQ ID NO: 19或SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列,所述第一配体和第二配体选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18,

且所述连接子是肽类连接子、二硫化物连接子或pH依赖型连接子,所述有效载荷选自小分子化合物、核苷酸、肽和蛋白。

2. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第一配体与所述第二配体偶联。

3. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第一配体通过间隔区与所述第二配体偶联。

4. 根据权利要求3所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述间隔区选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-14、Arg-Arg、Ala-Ser-Asn、Ala-Ala-Ala、Ser-Ser-Arg、Pro-Arg和Pro-Leu-Gly。

5. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述有效载荷通过所述连接子与所述第一配体偶联,并且所述有效载荷通过所述连接子与所述第二配体偶联。

6. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐还包含能够与第三细胞表面受体特异性结合的第三配体。

7. 根据权利要求6所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述第一细胞表面受体、所述第二细胞表面受体和所述第三细胞表面受体彼此之间是不同的。

8. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含一个、两个、三个、四个或更多个有效载荷。

9. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述有效载荷是小分子化合物。

10. 根据权利要求9所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述小分子化合物选自下组:美登素及其衍生物、紫杉醇及其衍生物、澳瑞他汀及其衍生物、埃博霉素及其衍生物、博来霉素及其衍生物、更生霉素及其衍生物、普卡霉素及其衍生物以及丝裂霉素C。

11. 根据权利要求10所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述小分子化合物是澳瑞他汀或其衍生物。

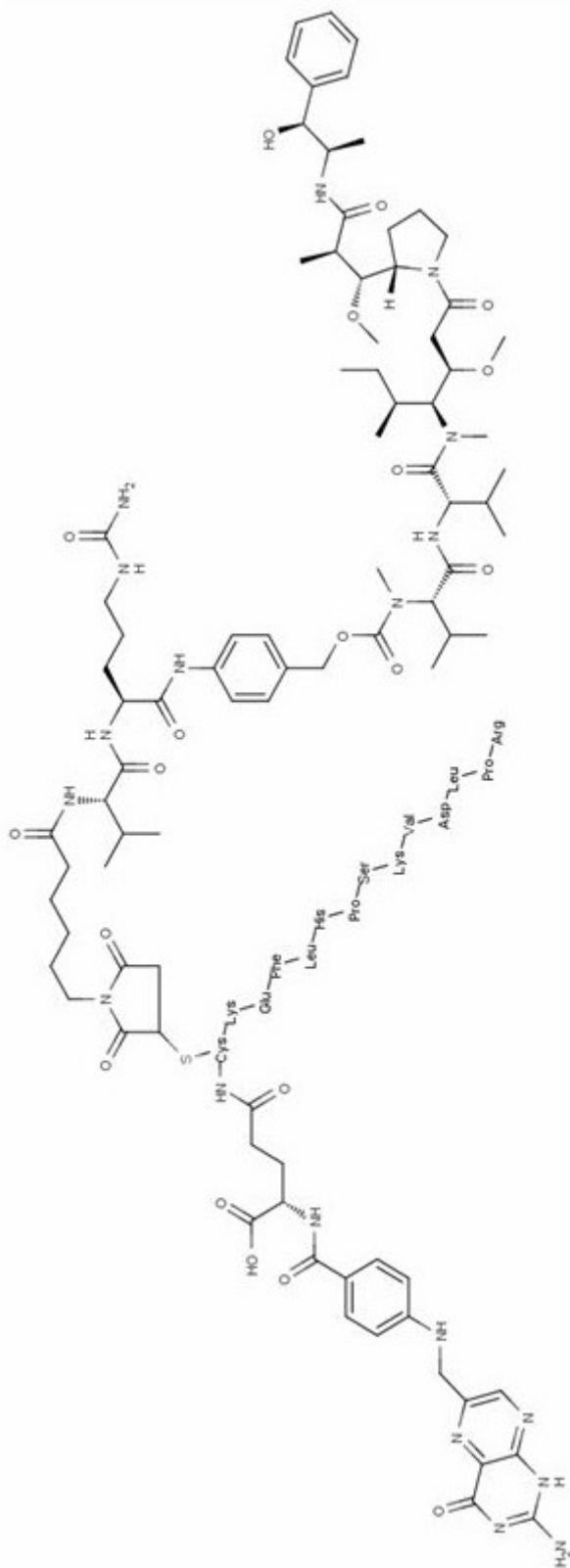
12. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述肽类连接子可在特定的生理环境下通过蛋白酶裂解或还原裂解。

13. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述肽类连接子选自下组:缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸和缬氨酸-赖氨酸。

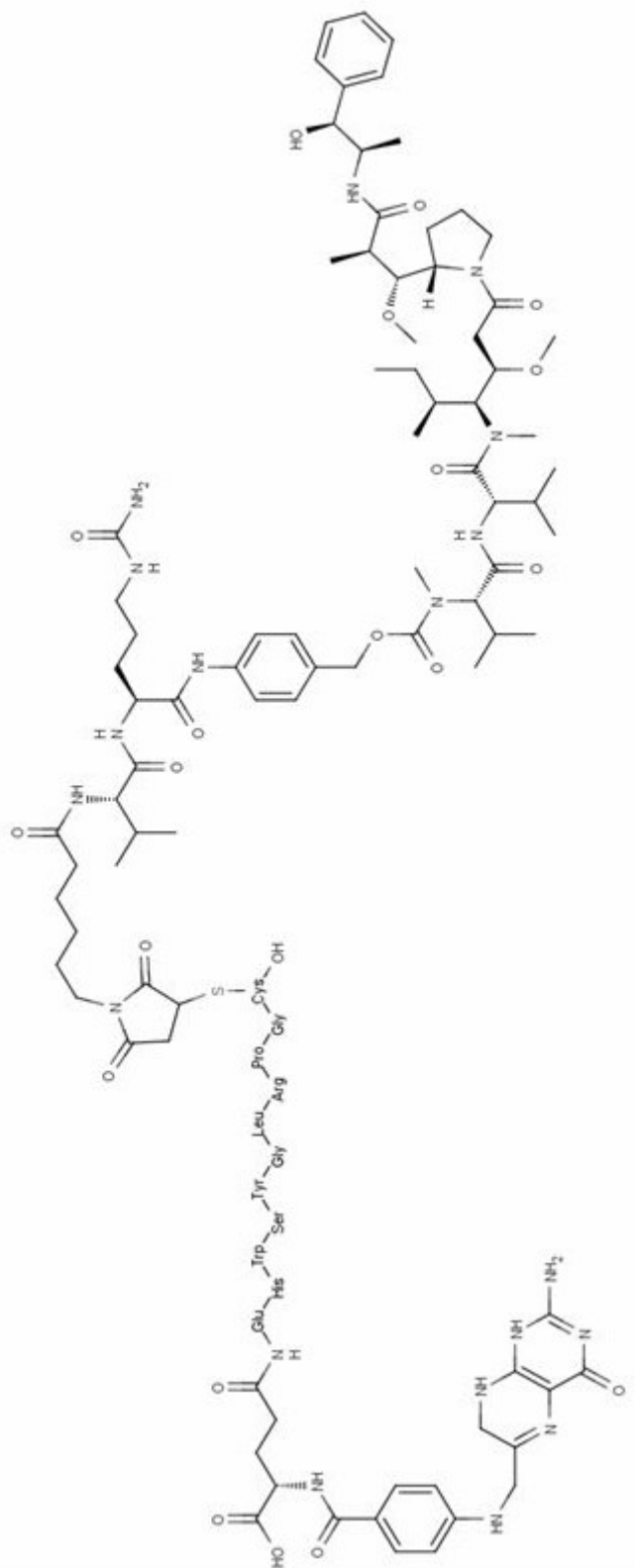
14. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述二硫化物连接子选自下组:DMDS、MDS、DSDM和NDMDS。

15. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述pH依赖型连接子是顺乌头酸酐。

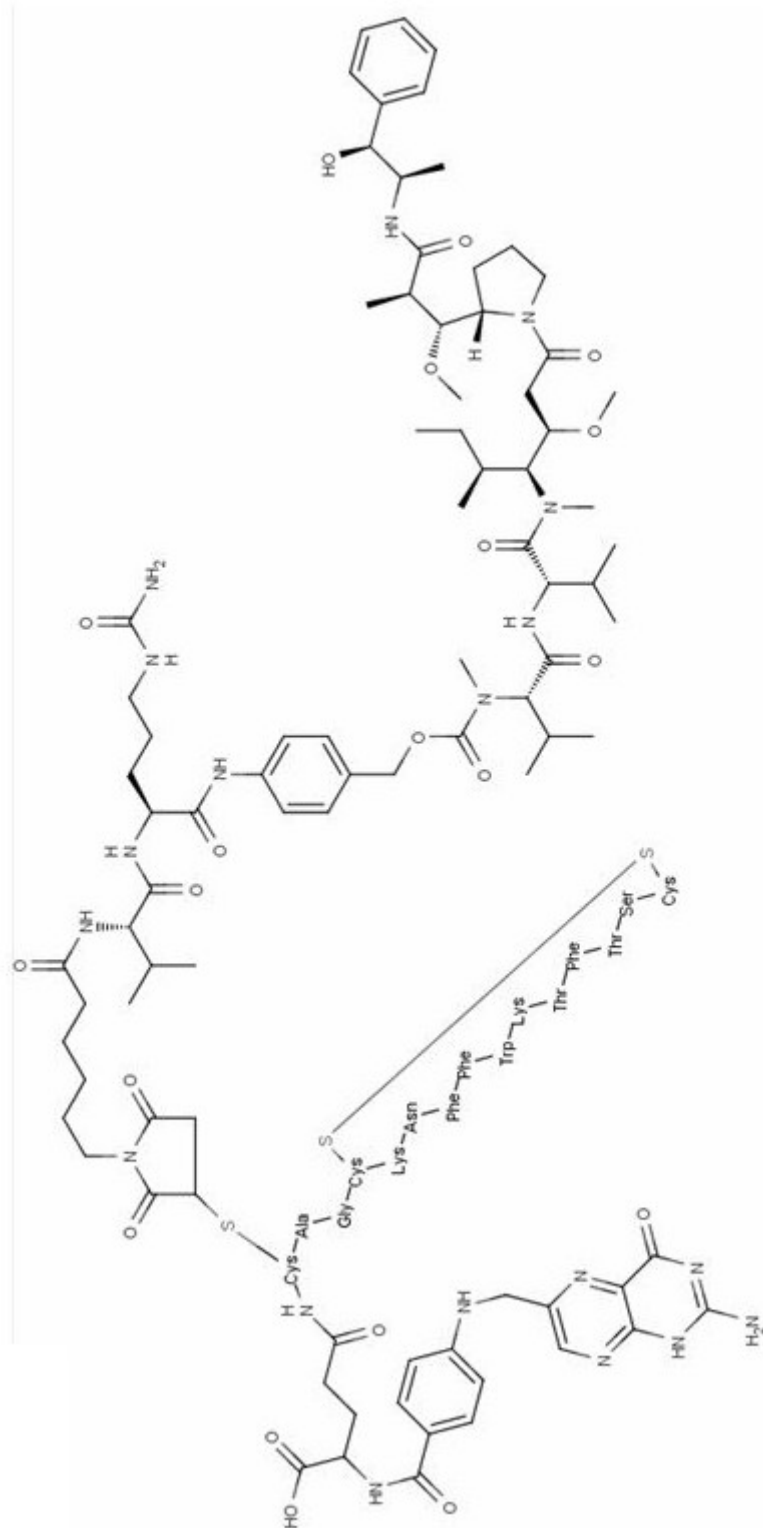
16. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,其中所述偶联体化合物选自由下述化合物组成的组:



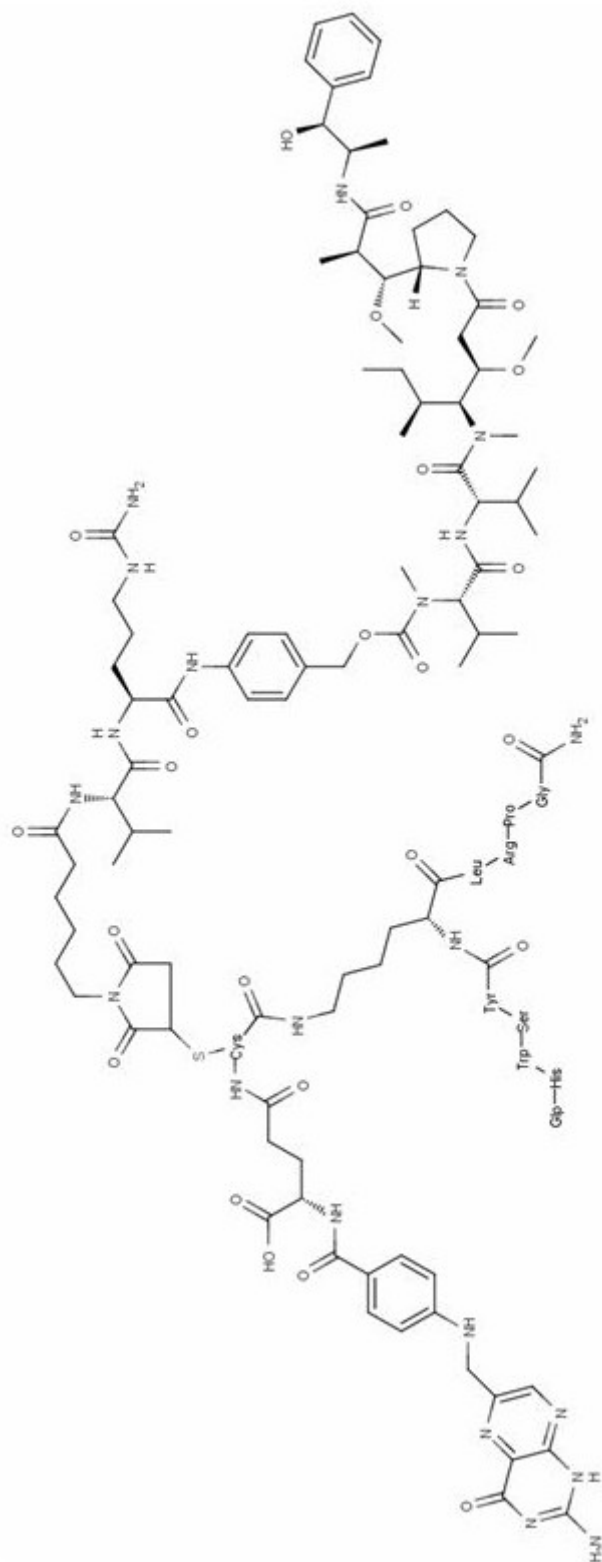
(LDC10B)、



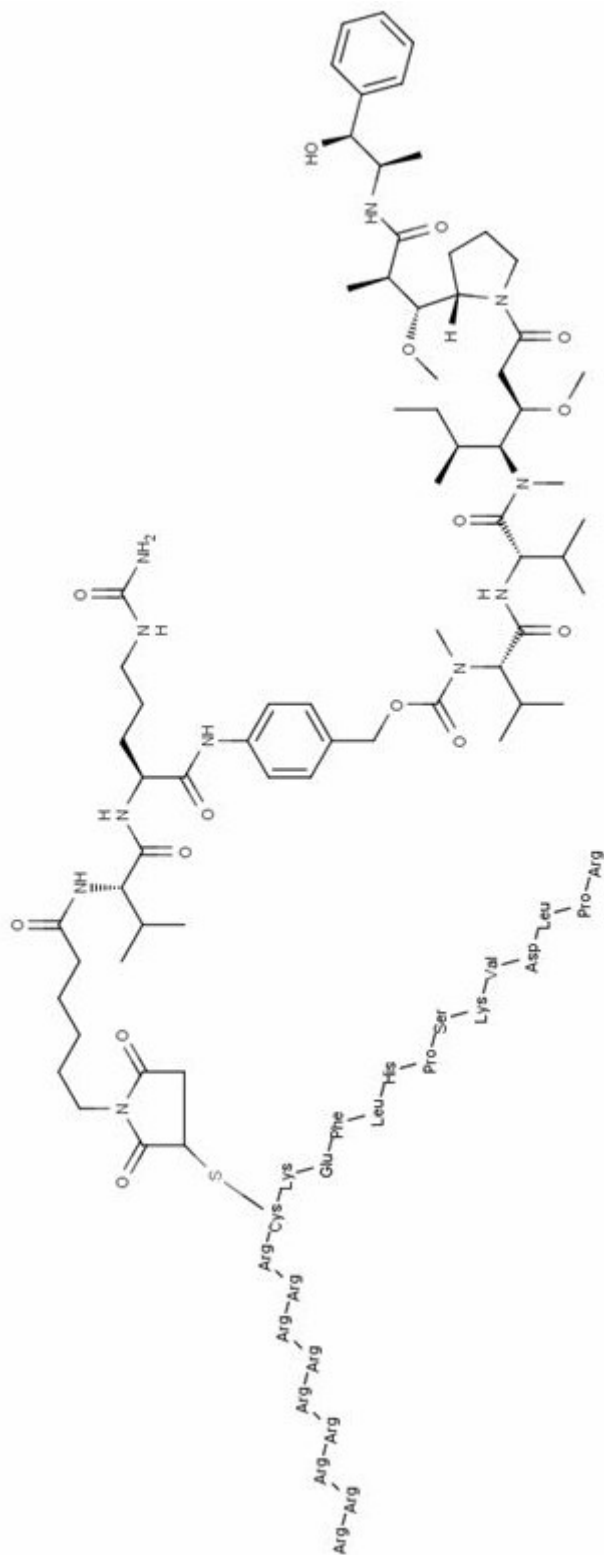
(LDC11B)、



(LDC12B)、



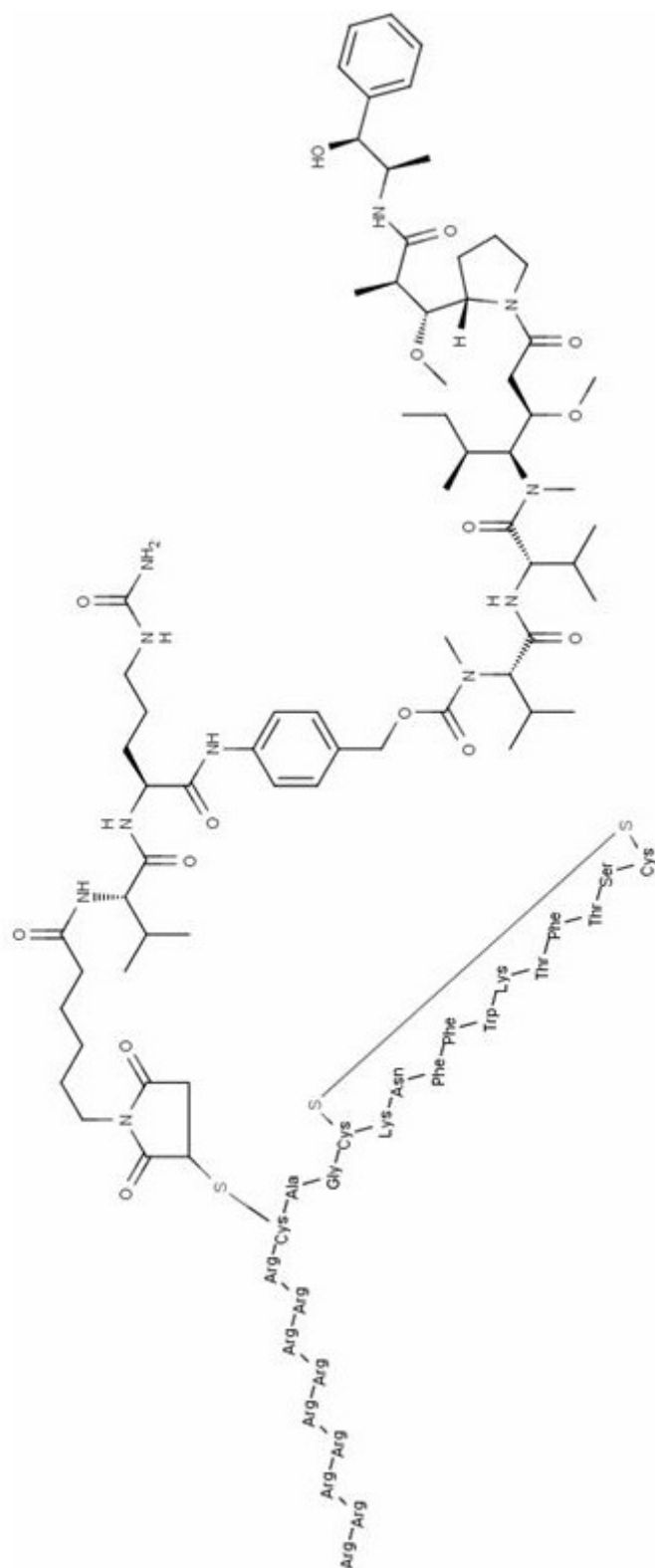
(LDC13B)、



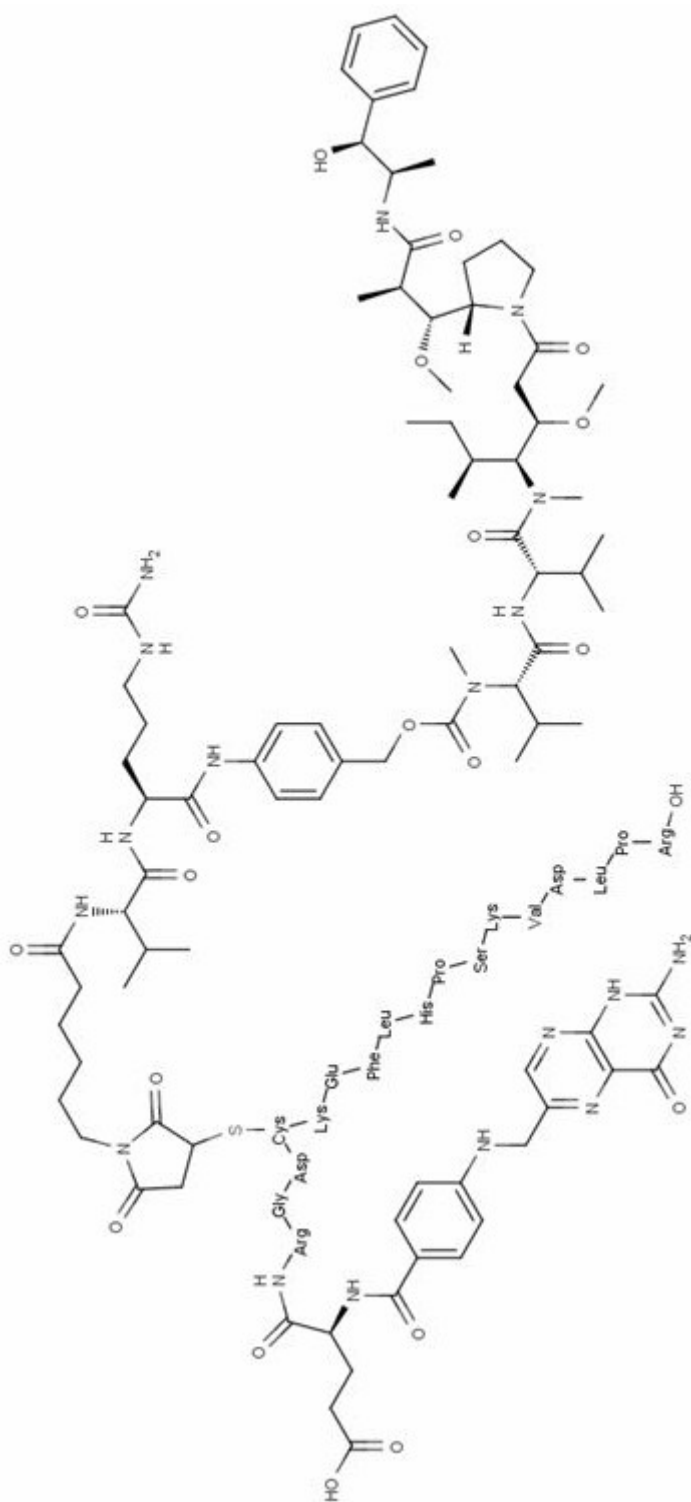
(LDC10H)、





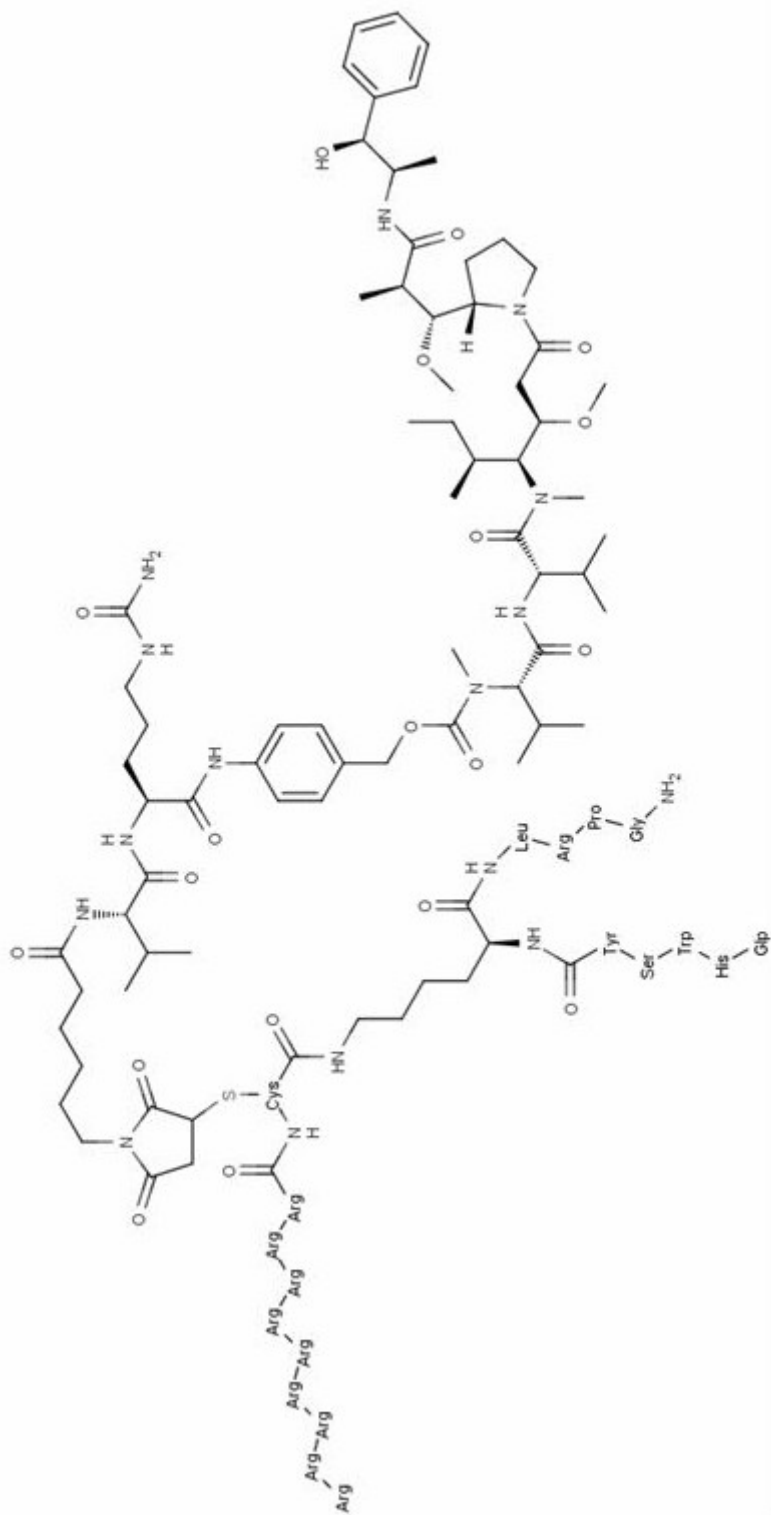


(LDC12H)、



(LDC10BR)、





(LDC1013)。

17. 根据权利要求1所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐还包含第三细胞相互作用分子,其中所述第三细胞相互作用分子是内吞作用分子。

18. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-17中任意一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

19. 根据权利要求18所述的药物组合物,其中静脉内、皮下、口服或肌肉内施用所述组合物。

20. 根据权利要求1-17中任意一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐或者根据权利要求18或19所述的药物组合物在制备用于治疗对象中的癌症的药物中的用途,所述治疗包括向所述对象施用治疗有效量的根据权利要求1-17中任意一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述癌症选自下组:乳腺癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、子宫癌、肝癌、甲状腺癌、胰腺癌、结直肠癌、食道癌、皮肤癌和淋巴瘤。

22. 根据权利要求20所述的用途,其中所述癌症选自下组:多发性骨髓瘤、子宫内膜癌、结肠癌和白血病。

23. 根据权利要求20-22中任意一项所述的用途,其中所述方法还包括将一种或多种治疗剂与所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐,或者所述药物组合物联合施用。

24. 根据权利要求23所述的用途,其中所述治疗剂靶向抗癌治疗靶点,诱导或增强针对癌症的免疫应答,或者是化疗剂。

## 多配体药物偶联体及其用途

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年8月11日提交的中国专利申请号为201510489556.6、发明名称为“一种具有细胞内吞介导功能的靶向配体-药物偶联体”，以及2015年8月11日提交的中国专利申请号为201510489560.2、发明名称为“一种具有细胞内吞介导功能的多靶向配体-药物偶联体”的中国专利申请的优先权，其分别通过引用整体并入本申请。

### 技术领域

[0003] 本申请总体上涉及偶联体化合物、药物组合物和及其使用方法。更具体地，本申请涉及多配体药物偶联体 (mLDC)，特别是能够诱导内吞作用的mLDC及其药物组合物，以及使用所述mLDC向需要其的对象递送有效载荷的方法和使用其治疗疾病的方法。

### 背景技术

[0004] 通常，病变细胞的病理及生理特征都与正常细胞有显著不同，其中之一表现为病变细胞表面具有特异性或过度表达的物质(例如，抗原、化学信号、受体等)，这些物质在正常细胞中无表达或低表达。基于这一原理，研发了抗体-药物偶联体 (ADC) 和多肽-药物偶联体 (PDC) 来治疗疾病。目前，虽然已有一些ADC和PDC药物上市或进入临床研究，但由于这些药物设计原理的原因，ADC和PDC在临床应用中均具有很多局限性。

[0005] 随着2011年Seattle Genetics公司的Adcetris和2013年Genentech公司的Kadcyla获得批准，最近ADC已经极大地站稳了脚跟，并且仍是热门R&D研发领域，有超过30个药物正在进行临床试验。尽管如此，由于ADC的复杂性和具有较大分子量，使其研发面临着许多困难，包括缺乏适宜的靶点、生产困难和药物稳定性较差。目前，ADC主要用于治疗癌症。在一些情况下，靶向抗体对癌细胞表面抗原的亲合性能够高达 $10^{-9} \sim 10^{-12}$  (Kd, 摩尔/升)。因此，在对靶细胞具有较高特异性的同时，ADC对与靶细胞具有相同靶向受体的正常细胞也具有较高的特异性。同时，由于ADC在体内的代谢时间较长(1至3周)，在此期间其会不断地杀伤正常细胞，因而极大地增加了ADC的毒副作用。因此，ADC更理想的适应症应当是其特征为在肿瘤和正常细胞中的细胞表面抗原量相差非常悬殊的疾病。然而，目前所知满足此严格要求的疾病非常少。

[0006] 另一类药物偶联体化合物是配体-药物偶联体 (LDC)，其中配体是肽或小分子。然而，从生物利用度、稳定性、疗效到毒性等方面，LDC的应用存在很多问题。例如，很多配体由于其具有较大分子量、亲脂性或其他属性使其不能进入细胞，这限制了其治疗应用。此外，如果配体与常规化疗药物(例如，多柔比星、紫杉醇等)偶联，则疗效通常较低，而如果其与高效药物分子(例如，MMAE、DM1)偶联，则毒性较大，因此甚至在达到肿瘤治疗的治疗有效量之前就导致动物中毒死亡。

### 发明内容

[0007] 本申请涉及偶联体化合物或其药学上可接受的盐、其药物组合物及其使用方法。

更具体地,本申请涉及多配体药物偶联体(mLDC),特别是能够诱导内吞作用的mLDC及其药物组合物,使用所述mLDC向需要其的对象递送有效载荷的方法,和使用其治疗疾病的方法,所述疾病包括但不限于癌症、免疫性疾病、心血管疾病、代谢疾病和神经疾病。

[0008] 本申请的一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐,所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两种或多种细胞相互作用分子,其中所述有效载荷与至少一个所述细胞相互作用分子偶联。

[0009] 在一些实施方式中,有效载荷与至少一个细胞相互作用分子直接偶联。在一些实施方式中,有效载荷与至少一个细胞相互作用分子间接偶联。在一些实施方式中,有效载荷通过连接子与至少一个细胞相互作用分子偶联。在一些实施方式中,至少一个细胞相互作用分子是能够与细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中,至少两个细胞相互作用分子是能够与细胞表面受体结合的配体。

[0010] 在一些实施方式中,偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含能够与第一细胞表面受体特异性结合的第一配体,和能够与第二细胞表面受体特异性结合的第二配体。在一些实施方式中,偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含能够与第一细胞表面受体特异性结合的第一配体,和能够与第二细胞表面受体特异性结合的第二配体,其中第一细胞表面受体和第二细胞表面受体彼此之间是不同的。

[0011] 在一些实施方式中,有效载荷与第一配体偶联,并且第一配体与第二配体偶联。在一些实施方式中,第一配体与第二配体直接偶联。在一些实施方式中,第一配体与第二配体间接偶联。在一些实施方式中,第一配体通过间隔区(spacer)与第二配体偶联。

[0012] 在一些实施方式中,有效载荷与第一配体和第二配体均是直接偶联,而无任何连接子。在一些实施方式中,有效载荷通过第一连接子与第一配体偶联,并且有效载荷通过第二连接子与第二配体偶联。在一些实施方式中,第一连接子和第二连接子是相同的。在一些其他实施方式中,第一连接子和第二连接子是不同的。在一些实施方式中,有效载荷与第一配体直接偶联,而无任何连接子,并且有效载荷通过连接子与第二配体偶联。

[0013] 在一些实施方式中,偶联体化合物或其药学上可接受的盐还包含能够与第三细胞表面受体特异性结合的第三配体。在一些实施方式中,第一细胞表面受体、第二细胞表面受体和第三细胞表面受体彼此之间是不同的。在一些实施方式中,第一细胞表面受体、第二细胞表面受体和第三细胞表面受体中的至少两个彼此之间是不同的。在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体是相同的。

[0014] 在一些实施方式中,本申请提供的第一细胞表面受体、第二细胞表面受体和第三细胞表面受体独立地选自下组:转铁蛋白受体(TFR)、低密度脂蛋白受体(LDLR)、叶酸受体(FR)、尿酸激酶受体、肿瘤坏死因子受体(TNFR)、整合素受体LFA-1、生长抑素SST-14受体、促黄体生成素释放激素(LHRH)受体、TRPV6受体和蛋白酶表面抗原受体。

[0015] 在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体独立地选自下组:肽、叶酸及其类似物。

[0016] 在一些实施方式中,配体包含具有选自下组的氨基酸序列的肽:

[0017] Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg (SEQ ID NO:15,称为P10)、Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys (SEQ ID NO:16,称为P11)、Ala-Gly-[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys] (SEQ ID NO:17,称为



P12)、Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys (SEQ ID NO:18,称为P13)、Arg-Gly-Asp (称为RGD)、与SEQ ID NO:15-18的任意一个具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的氨基酸序列同源性的同源肽,其中所述同源肽分别是SEQ IDNO:15-18所示的肽的功能性等效物。

[0018] 在一些实施方式中,如本申请所述的至少一个细胞相互作用分子是能够介导内吞作用的内吞作用分子。在一些实施方式中,内吞作用分子还能够与细胞表面受体特异性结合。

[0019] 在一些实施方式中,内吞作用分子选自下组:叶酸及其类似物、能够介导内吞作用的肽和穿膜肽。

[0020] 在一些实施方式中,本申请中提供的连接子是肽类连接子、二硫化物连接子或pH依赖型连接子。

[0021] 在一些实施方式中,肽类连接子可在特定的生理环境下通过蛋白酶裂解或还原裂解。在一些实施方式中,肽类连接子选自下组:缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸和缬氨酸-赖氨酸。

[0022] 在一些实施方式中,二硫化物连接子选自下组:DMDS、MDS、DSDM和NDMDS。

[0023] 在一些实施方式中,pH依赖型连接子是顺乌头酸酐。

[0024] 在一些实施方式中,偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含至少一个有效载荷。在一些实施方式中,偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含一个、两个、三个、四个或更多个有效载荷。

[0025] 在一些实施方式中,有效载荷选自下组:小分子化合物、核苷酸、肽、蛋白和纳米颗粒。在一些实施方式中,有效载荷是小分子化合物。在一些实施方式中,有效载荷是治疗剂。

[0026] 在一些实施方式中,偶联体化合物是多配体偶联体化合物,其包含有效载荷,两种、三种或更多种配体以及任选地连接子或间隔区。在一些实施方式中,偶联体化合物是双配体偶联体化合物,其包含有效载荷、两种配体以及任选地连接子和/或间隔区。在一些实施方式中,偶联体化合物是三配体偶联体化合物,其包含有效载荷、三种配体以及任选地连接子和/或间隔区。在一些实施方式中,偶联体化合物选自由本申请图1中所示的下述化合物组成的组:LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC10I3、LDC10H、LDC11H、LDC12H。

[0027] 本申请的另一个方面公开了一种药物组合物,所述药物组合物包含本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。在一些实施方式中,静脉内、皮下、口服、肌内、胃肠外或心室内施用所述药物组合物。

[0028] 本申请的另一个方面公开了一种用于向需要其的对象递送有效载荷的方法,所述方法包括向对象施用治疗有效量的本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,或者本申请提供的药物组合物。

[0029] 本申请的另一个方面公开了一种用于治疗对象中的疾病的方法,所述方法包括向对象施用治疗有效量的本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,或者本申请提供的药物组合物。在一些实施方式中,疾病选自下组:癌症、免疫性疾病、心血管疾病、代谢疾病和神经疾病。

[0030] 在一些实施方式中,癌症选自下组:乳腺癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、子宫癌、子宫内膜癌、肝癌、甲状腺癌、胰腺癌、结肠癌、结直肠癌、食道癌、皮肤癌、淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤。

[0031] 在一些实施方式中,免疫性疾病是自身免疫性疾病。在一些实施方式中,自身免疫性疾病选自下组:结缔组织病、系统性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。

[0032] 在一些实施方式中,心血管疾病选自下组:心绞痛、心肌梗死、中风、心脏病发作、高血压性心脏病、风湿性心脏病、心肌病、心脏心律失常和先天性心脏病。

[0033] 在一些实施方式中,代谢疾病选自下组:糖尿病、痛风、肥胖症、低血糖症、高血糖症和血脂异常。

[0034] 在一些实施方式中,神经疾病选自下组:阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、头部损伤、多发性硬化症、眩晕、昏迷和癫痫。

[0035] 在一些实施方式中,本申请提供的方法还包括将一种或多种治疗剂与本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,或者本申请提供的药物组合物联合施用。在一些实施方式中,所述治疗剂靶向抗癌治疗靶点,诱导或增强针对癌症的免疫应答,或者是化疗剂。

## 附图说明

[0036] 图1显示了LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H和LDC12H的结构。

[0037] 图2显示了LDC10B的内吞作用实验结果。图A和图B显示了叶酸-FITC进入KB细胞(叶酸受体阳性细胞),但不进入A375细胞(叶酸受体阴性细胞);图C和图D显示了10A-FITC不能进入KB细胞和A375细胞;图E和图F显示了双配体偶联体10B-FITC进入KB细胞,但不进入A375细胞。

[0038] 图3显示了叶酸-FITC、10A-FITC和10B-FITC的结构。

[0039] 图4显示了显示集中在肿瘤部位的荧光标记的LDC10B-Cy5的活体小鼠成像结果。

## 具体实施方式

[0040] 尽管本申请将公开各种方面和实施方式,但是显而易见的是,在不偏离本申请的主旨和范围的前提下,本领域技术人员可以对这些方面和实施方式进行各种等同改变和修改。本申请公开的各个方面和实施方式仅用于说明目的,并非旨在限制,真正的范围由所附权利要求表示。本申请引用的所有出版物、专利或专利申请通过引用整体并入本申请。除非另外说明,否则本申请中使用的所有科技术语具有的含义与本申请所属领域技术人员通常理解的含义相同。

[0041] 如本申请和所附权利要求中所使用的,单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数对象,除非上下文清楚地表示不是这样。术语“一(a)”(或“一个(an)”)、“一个或多个”和“至少一个”在本申请中可以互换使用。还应当注意的是,术语“包含(comprising)”、“包括(including)”和“具有(having)”可以互换使用。

[0042] 本申请的一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐,所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两种或多种细胞相互作用分子,其中有效载

荷与至少一个细胞相互作用分子偶联。

[0043] 在本申请中使用的术语“有效载荷(payload)”指的是拟递送至靶细胞或组织的分子或物质。非限制性地,有效载荷可以是旨在用于诊断、治疗或预防对象中的疾病的任意药物化合物。

[0044] 在一些实施方式中,有效载荷是小分子化合物、核苷酸(例如,DNA、质粒DNA、RNA、siRNA、反义寡核苷酸、适体等)、肽、蛋白(例如,酶)或纳米颗粒。在一些实施方式中,有效载荷是小分子化合物。在一些实施方式中,小分子化合物选自下组:美登素及其任何衍生物、紫杉醇及其任何衍生物、澳瑞他汀(auristatins)及其任何衍生物、埃博霉素及其任何衍生物、博来霉素及其任何衍生物、更生霉素及其任何衍生物、普卡霉素及其任何衍生物,以及丝裂霉素C。在一些实施方式中,有效载荷是澳瑞他汀或其任何衍生物。在一些实施方式中,药物化合物是用于缓解或治疗癌症的化疗剂。

[0045] 在一些实施方式中,本申请公开的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含一个有效载荷。在一些实施方式中,本申请公开的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含至少一个有效载荷。例如,偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个有效载荷。在含有多个有效载荷的偶联体分子中,每个有效载荷彼此之间可以是相同的或不同的。在一些实施方式中,至少两个有效载荷彼此之间是不同的。

[0046] 在本申请中使用的术语“细胞相互作用分子”指的是能够与靶分子或靶细胞的细胞表面受体相互作用以触发或促进含有此类细胞相互作用分子的偶联体分子与靶分子的特异性结合、触发或促进靶细胞对偶联体分子的内吞作用和/或以其他形式引起偶联体分子与靶细胞特异性结合和保留的任意分子或部分。

[0047] 细胞相互作用分子可以是小的化学分子或大的生物分子。在一些实施方式中,细胞相互作用分子是抗体、配体或内吞作用分子。在一些实施方式中,至少一个细胞相互作用分子是能够与细胞表面受体结合的配体。在一些实施方式中,至少一个细胞相互作用分子是能够介导内吞作用的内吞作用分子。

[0048] 本申请公开的配体可以包括各种各样的化学或生物实体,其可以对所选定的靶点具有特异性的结合亲和性,例如细胞表面受体、细胞、组织、器官等。在一些实施方式中,配体可以与靶细胞表面上表达的蛋白或标记物特异性结合。在一些实施方式中,本申请的配体以 $10^{-6}$ ~ $10^{-9}$ (Kd值)的亲和性与细胞表面受体结合。在一些实施方式中,配体以至少 $10^{-7}$ 、至少 $10^{-8}$ 、至少 $10^{-9}$ M(Kd值)的亲和性与细胞表面受体结合。在一些实施方式中,本申请的配体以一定的亲和性与细胞表面受体结合,所述亲和性为对靶细胞表面受体的亲和性比对非靶细胞表面蛋白或标记物的亲和性高至少两倍、三倍、四倍或更多倍。

[0049] 在一些实施方式中,本申请的两种或多种细胞相互作用分子是能够与不同细胞表面受体特异性结合的两种或多种配体。在一些实施方式中,本申请的偶联体化合物或其药学上可接受的盐含有两个配体,其中第一配体能够与第一细胞表面受体特异性结合,并且第二配体能够与第二细胞表面受体特异性结合。在一些实施方式中,偶联体分子含有两个配体,其中第一配体能够与叶酸受体特异性结合,第二配体能够与促黄体生成素释放激素

[0050] (LHRH)受体特异性结合。在一些实施方式中,偶联体分子含有三个配体,其中第一配体能够与叶酸受体特异性结合,第二配体能够与LHRH受体特异性结合,并且第三配体能

够与SST-14受体特异性结合。

[0051] 在一些实施方式中,本申请公开的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个细胞相互作用分子。在偶联体分子中,每一个细胞相互作用分子彼此之间可以是相同的或不同的。在一些实施方式中,至少两个细胞相互作用分子彼此之间是不同的。在一些实施方式中,每一个细胞相互作用分子彼此之间是不同的。

[0052] 在一些实施方式中,本申请提供的偶联体分子仅包含与多个细胞相互作用分子偶联的单一有效载荷。在一些实施方式中,本申请提供的偶联体分子包含与多个细胞相互作用分子偶联的多个有效载荷。

[0053] 在本申请中使用的术语“偶联的”指的是通过两个化学基团共价键的连接,其可以是在两个化学基团之间直接形成共价键,也可以是通过连接子将两个化学基团间接连接。

[0054] 在一些实施方式中,偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两种或多种细胞相互作用分子,其中有效载荷与至少一个细胞相互作用分子直接共价连接。在一些实施方式中,有效载荷与每一个细胞相互作用分子直接共价连接。

[0055] 在一些实施方式中,偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两种或多种细胞相互作用分子,其中有效载荷与至少一个细胞相互作用分子通过连接子共价连接。在一些实施方式中,有效载荷与每一个细胞相互作用分子通过连接子共价连接。

[0056] 在本申请中使用的术语“连接子”指的是将有效载荷与细胞相互作用分子共价连接的分子或部分。连接子包括用于将有效载荷与至少一个细胞相互作用分子连接的官能团。在一些实施方式中,官能团可以含有两个反应性部分,一个用于与有效载荷连接,另一个用于与细胞相互作用分子连接。在一些实施方式中,官能团彼此之间是不同的。在一些实施方式中,官能团包含含有巯基反应性部分和胺反应性部分的基团。在一些实施方式中,官能团彼此之间是相同的。在一些实施方式中,官能团是马来酰亚胺基团。

[0057] 在一些实施方式中,本申请的连接子是能够结合至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)有效载荷和至少两个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)细胞相互作用分子的多价连接子。与多价连接子结合的有效载荷可以是相同的或不同的,并且与多价连接子结合的细胞相互作用分子可以是相同的或不同的。

[0058] 在一个方面中,连接子应足够稳定以避免在血液循环过程中意外释放有效载荷,以增加有效载荷到靶细胞或组织的有效量并避免毒性。在另一个方面,连接子应能够在靶细胞周围或内部释放有效载荷以有效杀死靶细胞或阻断靶细胞的功能。在一些实施方式中,连接子包含至少一个可裂解官能团。优选地,可裂解官能团在靶细胞外足够稳定,但是其在进入靶细胞后裂解以释放有效载荷。在一些实施方式中,可裂解官能团在靶细胞中的裂解效率比在对象血液或血清中的裂解效率高至少10、20、30、50、100倍或更多倍。

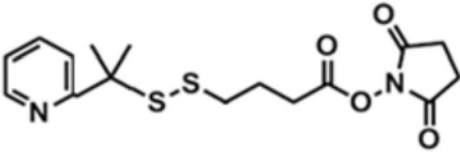
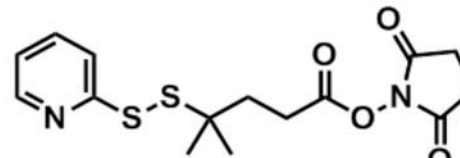
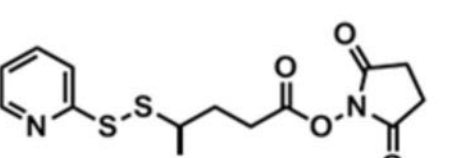
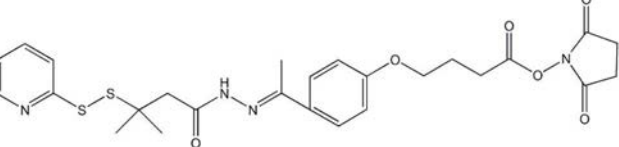
[0059] 可裂解连接子可以被水解、酶促反应、或还原反应、或通过pH改变所裂解。在一些实施方式中,连接子在特定生理环境下(例如,在适宜pH环境下)是可裂解的。在一些实施方式中,连接子可在pH约6.5或更低的酸性环境中裂解,或通过诸如可作为普通酸的酶等试剂裂解。在一些实施方式中,连接子对裂解剂敏感。例如,pH、氧化还原电位或存在降解分子。

[0060] 在一些实施方式中,连接子是不可裂解的。在本申请中使用的不可裂解连接子指的是在细胞内代谢期间保持完整的连接子。

[0061] 在一些实施方式中,连接子是肽类连接子,其由通过肽键连接的直链或支链氨基酸组成。在一些实施方式中,肽类连接子可被在靶细胞周围或靶细胞中高度或特异性表达的蛋白酶裂解,例如在溶酶体或胞内体中的组织蛋白酶B。本申请所用的肽类连接子的长度可以有多种。通常地,本申请的肽类连接子的长度为1至50个氨基酸。在一些实施方式中,肽类连接子的长度为2至45、2至40、2至35、2至30、2至25、2至20、2至15、2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4、2至3个氨基酸。本申请所述的肽类连接子的氨基酸数量可以等于上述数值范围内的任意整数值,包括该范围的端点。在一些实施方式中,肽类连接子的长度优选为2、3、4或5个氨基酸。在一些实施方式中,肽类连接子是缬氨酸-瓜氨酸 (Val-Cit)、苯丙氨酸-赖氨酸或缬氨酸-赖氨酸。

[0062] 在一些实施方式中,连接子是含有二硫键的二硫化物连接子。二硫键可以在细胞内的还原环境下裂解,而在循环系统中保持稳定。本申请的二硫化物连接子可以是DSDM、DMDS、MDS或NDMDS。这些二硫化物连接子的结构如下表1中所示。

[0063] 表1:DSDM、DMDS、MDS和NDMDS的结构

名称	结构
[0064] DSDM	
DMDS	
[0065] MDS	
NDMDS	

[0066] 在一些实施方式中,连接子是pH依赖型连接子。本申请所述的pH依赖型连接子可以在特定pH环境下裂解。在一些实施方式中,pH依赖型连接子可以在碱性条件下稳定,但在酸性条件下(例如,在6.5或更低的pH值下)裂解。在一些实施方式中,pH依赖型连接子是顺乌头酸酐。

[0067] 在一些实施方式中,本申请的连接子可以包含如上文所述的任意一个连接子或其组合。在一些实施方式中,本申请的连接子可以含有间隔区作为连接子的一部分。

[0068] 在一些实施方式中,有效载荷与第一细胞相互作用分子直接或间接偶联,并且第

一细胞相互作用分子与第二细胞相互作用分子直接或间接偶联。在一些实施方式中,有效载荷与第一细胞相互作用分子和第二细胞相互作用分子均是直接偶联。在一些实施方式中,有效载荷与第一细胞相互作用分子和第二细胞相互作用分子均是间接偶联。在一些实施方式中,有效载荷与第一细胞相互作用分子间接(例如,通过连接子)偶联,并且第一细胞相互作用分子与第二细胞相互作用分子直接或间接偶联。在一些实施方式中,有效载荷与第一细胞相互作用分子通过第一连接子偶联,并且有效载荷与第二细胞相互作用分子通过第二连接子偶联。在一些实施方式中,连接子是与至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)有效载荷和至少两个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)配体结合的多价连接子。还可以将多价连接子用于制备包含多个有效载荷和多个细胞相互作用分子的偶联体分子。

[0069] 在一些实施方式中,两个细胞相互作用分子彼此之间通过间隔区连接。在一些实施方式中,用一个或多个间隔区连接2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个细胞相互作用分子。在一些实施方式中,间隔区可以被由靶细胞特异性表达或将由靶细胞触发表达的蛋白酶裂解。此类蛋白酶包括例如在下表2中列出的蛋白酶。在一些实施方式中,间隔区包含选自在下表2中列出的氨基酸序列的任意一个的氨基酸序列。

[0070] 表2:酶促可裂解序列列表

[0071]

蛋白酶	识别位点的氨基酸序列	SEQ ID NO.
组织蛋白酶 B	RR	-
豆荚蛋白	ASN	-
Matripase	KSRAEDE	SEQ ID NO: 1
MMP-2	PLGLAG	SEQ ID NO: 2
前列腺特异性抗原	SSLY	SEQ ID NO: 3
基质溶解素-3	AAA	-
TMPRSS2	LLRSLIG	SEQ ID NO: 4
尿激酶型纤溶酶原激活物	SSR	-
活化的蛋白 C	LVKR	SEQ ID NO: 5
因子 Ixa	LVVR	SEQ ID NO: 6
因子 VIIa	QLTR	SEQ ID NO: 7
因子 Xa	LEGR	SEQ ID NO: 8
凝血酶	PR	-
钙蛋白酶-a	PLFAEP	SEQ ID NO: 9
钙蛋白酶-2	GLGSEP	SEQ ID NO: 10
肠肽酶	DDDDK	SEQ ID NO: 11
MMP-8	GPSG	SEQ ID NO: 12
组织蛋白酶 L	PLG	-
原蛋白转化酶 5	RSKR	SEQ ID NO: 13

[0072]

钙蛋白酶-3	VGVF	SEQ ID NO: 14
--------	------	---------------

[0073] 在本申请中使用的术语“可裂解”或“裂解的”指的是在本申请提供的偶联体化合物上进行的代谢过程或反应过程,从而将有效载荷与细胞相互作用分子之间的连接子,或细胞相互作用分子之间的间隔区破坏以释放游离的有效载荷或细胞相互作用分子。连接子

或间隔区被蛋白酶裂解或在特定生理环境(例如,pH环境)下裂解。

[0074] 在一些实施方式中,如本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐含有与三个配体偶联的有效载荷,其中第一配体能够与第一细胞受体特异性结合,第二配体能够与第二细胞受体特异性结合,并且第三配体能够与第三细胞表面受体特异性结合。

[0075] 在一些实施方式中,第三配体与第一配体直接或间接(例如,通过间隔区)偶联。在一些实施方式中,第三配体与有效载荷直接或间接(例如,通过连接子)偶联。在一些实施方式中,第一配体与第二配体直接或间接(例如,通过间隔区)偶联,并且第二配体与第三配体直接或间接(例如,通过间隔区)偶联。

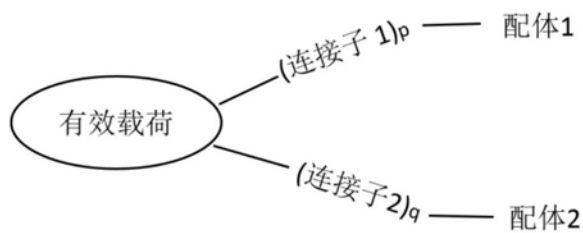
[0076] 在一些实施方式中,第一细胞表面受体、第二细胞表面受体和第三细胞表面受体在结构或功能上彼此之间不同。在一些实施方式中,第一细胞表面受体、第二细胞表面受体和第三细胞表面受体中的至少两个在结构或功能上彼此之间不同。在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体是相同的。

[0077] 在一些实施方式中,偶联体分子具有下述式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX或X所示的结构,其中n、m、p、q、r和s独立地为0或1,其代表独立地存在或不存在连接子或间隔区。

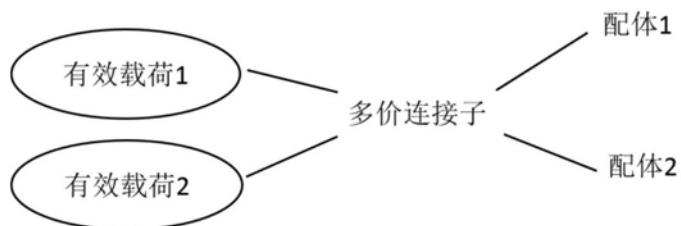


(式 I)





(式 II)

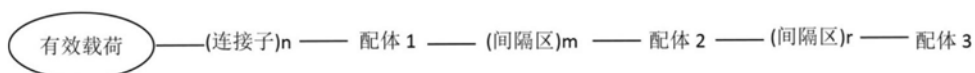


(式 III)

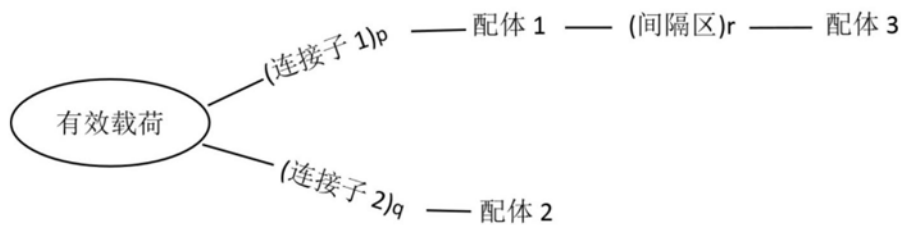
[0079]



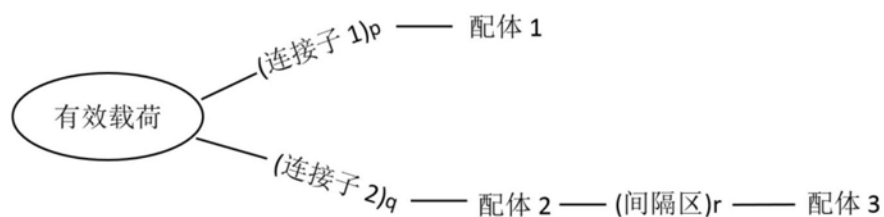
(式 IV)



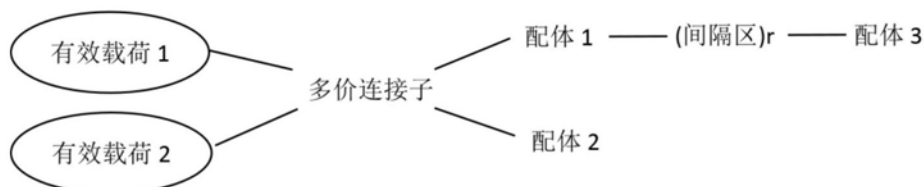
(式 V)



(式 VI)

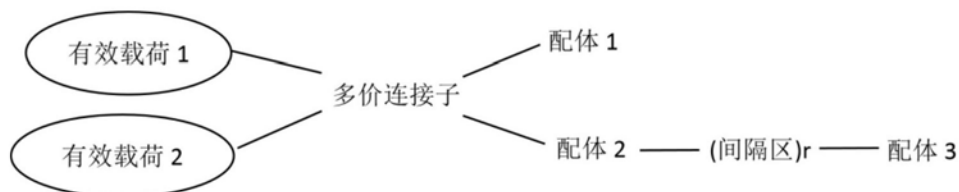


(式 VII)

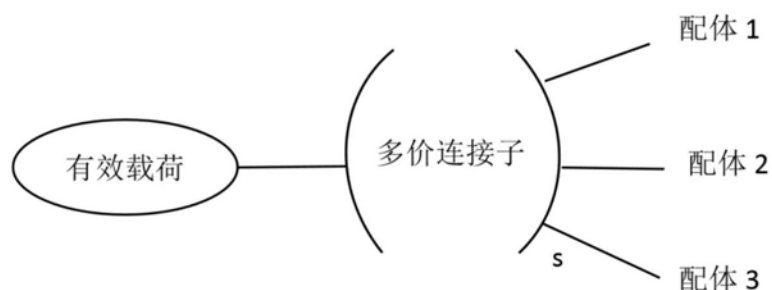


(式 VIII)

[0080]



(式 IX)



(式 X)

[0081] 在优选的实施方式中,靶细胞(例如,癌细胞)中细胞表面受体的表达显著高于正常细胞中的表达。在本申请中使用的术语“显著”指的是统计学上的显著差异,或者可以由本领域技术人员认识到的显著性差异。

[0082] 在一些实施方式中,细胞表面受体在靶细胞(例如,癌细胞)中的表达水平是在正常细胞中的表达水平的2-1,000,000倍,例如在靶细胞(例如,癌细胞)中的表达水平比在正常细胞中的表达水平高2-10倍、2-100倍、2-1,000倍、2-10,000倍、2-100,000倍、2-1,000,000倍(可以等于上述数值范围内的任意值,包括该范围的端点)。在一些实施方式中,细胞表面受体在靶细胞(例如,癌细胞)中的表达水平比在正常细胞中的表达水平高至少10倍、

或者至少100倍、或者至少1,000倍、或者至少10,000倍、或者至少100,000倍。在一些实施方式中,当与靶细胞(例如,癌细胞)上的细胞表面受体的水平比较时,正常细胞上的细胞表面受体的水平降低至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些实施方式中,本申请所述的细胞表面受体在正常细胞中是不可检测的。

[0083] 在一些实施方式中,第一细胞表面受体、第二细胞表面受体和第三细胞表面受体独立地选自下组:转铁蛋白受体(TFR)、低密度脂蛋白受体(LDLR)、叶酸受体(FR)、尿酸激酶受体、肿瘤坏死因子受体(TNFR)、整合素受体LFA-1、SST-14受体、LHRH受体、TRPV6受体和蛋白酶表面抗原受体。

[0084] 在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体是相同的。在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体中的至少两个彼此之间是不同的。在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体能够与相同的细胞表面受体特异性结合。在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体能够与不同的细胞表面受体特异性结合。在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体均能够与两个或多个不同的细胞表面受体结合。

[0085] 在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体独立地选自下组:叶酸及其类似物和肽。在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体独立地是叶酸或其类似物,并且至少两个配体彼此之间不同。在一些实施方式中,叶酸的类似物选自下组:5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、磺胺、甲氨蝶呤和5,10-亚甲基四氢叶酸。

[0086] 在一些实施方式中,第一配体、第二配体和第三配体独立地是肽。在一些实施方式中,肽包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、RGD、与SEQ ID NO:15-18的任意一个具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的氨基酸序列同源性的同源肽,其中所述同源肽分别是SEQ ID NO:15-18所示的肽的功能性等价物。

[0087] 在本申请中使用的术语“与……的同源性百分率(%)”对于氨基酸序列而言指的是将候选序列和参照序列进行比对后两条氨基酸序列之间的同一性百分率,并且如有必要的话引入空位,以获得最大数量的相同氨基酸;对于核苷酸序列而言指的是将候选序列与参照序列进行比对后两条核苷酸序列之间的同一性百分率,并且如有必要的话引入空位以获得最大数量的相同核苷酸。

[0088] 可以采用本领域熟知的多种方法确定同源性百分率。例如,可以通过下述可公开获得的工具对序列进行比较:BLASTp软件(可从国家生物技术信息中心(NCBI)的网站获得:<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>,亦参见Altschul S.F.等,J.Mol.Biol., 215:403-410(1990);Stephen F.等,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402(1997)), ClustalW2(可从欧洲生物信息研究所的网站获得:<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>,亦参见Higgins D.G.等,Methods in Enzymology,266:383-402(1996);Larkin M.A.等,Bioinformatics(Oxford,England),23(21):2947-8(2007))以及Tcoffee(可从瑞典生物信息研究所的网站获得,亦参见Poirot O.等,Nucleic Acids Res.,31(13):3503-6(2003);Notredame C.等,J.Mol.Biol.,302(1):205-17(2000))。如果使用软件进行序列比对,则可以使用软件中提供的默认参数,或者可以以其他方式对参数进行定制以适应比对目的。所有的这些均在本领域技术人员知识范围内。

[0089] 在本申请中使用的术语“功能性等价物”指的是保留了与衍生肽来源的原始肽序列的生物活性基本上类似的生物活性的衍生肽。功能性等价物可以是天然衍生物或合成制备的。示例性的功能性等价物包括具有一个或多个氨基酸取代、缺失或加入的氨基酸序列，条件是肽的生物活性是保守的。取代的氨基酸理想地具有与被取代的氨基酸类似的化学-物理性质。理想的类似的化学-物理性质包括电荷、蓬松性、疏水性、亲水性等的相似性。

[0090] 在一些实施方式中，功能性等价物包括氨基酸残基的保守性取代。氨基酸残基的保守性取代指的是具有相似性质的氨基酸之间的取代，例如极性氨基酸之间的取代（例如，谷氨酰胺和天冬酰胺之间的取代）、疏水性氨基酸之间的取代（例如，亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸之间的取代）、以及具有相同电荷的氨基酸之间的取代（例如，精氨酸、赖氨酸和组氨酸之间的取代，或谷氨酸和天冬氨酸之间的取代）等等。

[0091] 在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐中的至少一个细胞相互作用分子是能够介导内吞作用的内吞作用分子。

[0092] 在本申请中使用的术语“内吞作用分子”指的是这样的分子，即，其与靶细胞相互作用后，能够介导本申请公开的偶联体化合物或其药学上可接受的盐内吞、内化或摄取进入靶细胞。

[0093] 在一些实施方式中，内吞作用分子选自下组：叶酸及其类似物、能够介导内吞作用的肽和穿膜肽。

[0094] 在一些实施方式中，内吞作用分子还能够与细胞表面受体特异性结合。在一些实施方式中，本申请提供的内吞作用分子是叶酸或其类似物。在一些实施方式中，叶酸的类似物选自下组：5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、磺胺、甲氨蝶呤和5,10-亚甲基四氢叶酸。

[0095] 叶酸由于其分子量小、无免疫原性和稳定性好，有利于与其他基团形成化学键。叶酸能够以高亲和性与细胞表面上表达的叶酸受体结合以介导细胞摄取叶酸。虽然叶酸受体在大部分正常细胞中的表达水平非常低，但是在大量癌细胞中以高水平表达以满足在低叶酸条件下快速分裂细胞对叶酸的较高需求（参见Kelemen LE, Int J Cancer, 2006; 119: 243-50; Kane MA等, J Clin Invest. 1988; 81: 1398-406; Matsue H等, Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 6006-9; Zhao R等, Annu Rev Nutr. 2011; 31: 177-201）。叶酸能够与细胞表面上的叶酸受体特异性结合，并且其还是介导偶联体化合物或其药学上可接受的盐进入靶细胞的内吞作用的内吞作用分子。

[0096] 在一些实施方式中，内吞作用分子是能够介导内吞作用的肽。在一些实施方式中，内吞作用分子还能够与细胞表面受体特异性结合。在一些实施方式中，能够介导内吞作用的肽包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、RGD、与SEQ ID NO: 16-18中的任意一个具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的氨基酸序列同源性的同源肽，其中所述同源肽分别为SEQ ID NO: 16-18所示的肽的功能性等价物。

[0097] 在一些实施方式中，内吞作用分子是穿膜肽。穿膜肽 (Cell-Penetrating Peptides, CPP) 也称为蛋白转导结构域 (PTD)，是短肽（通常少于40个氨基酸），能够以不依赖于受体的方式进入细胞内部。穿膜肽与有效载荷偶联时能够介导有效载荷的跨膜转运并且具有蛋白转导活性。在一些实施方式中，本申请所述的穿膜肽选自下组：肿瘤归巢肽、线

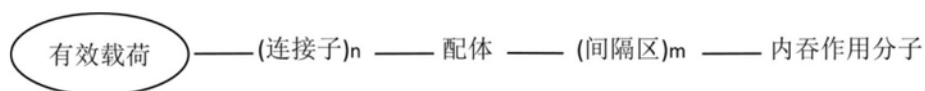
粒体穿透肽、可活化细胞穿膜肽和抗菌肽。在一些实施方式中,穿膜肽包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:19 (RRRRRRRRR,称为R9)和SEQ ID NO:20 (GRKKRRQRRRPPQ,其是Tat肽,即HIV转录蛋白反式激活因子的穿膜肽)。

[0098] 在一些实施方式中,如本申请所述的能够介导内吞作用的肽与SEQ ID NO:16-20、RGD的序列相比,仅在一个氨基酸位点具有氨基酸的保守性取代。在一些实施方式中,如本申请所述的能够介导内吞作用的肽与SEQ ID NO:16-20的序列相比,在2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸位点具有氨基酸的保守性取代。

[0099] 在不影响其生物活性的前提下,如本申请所述的能够介导内吞作用的肽还可以含有非天然存在的氨基酸,包括例如 $\beta$ -氟丙氨酸、1-甲基-组氨酸、 $\gamma$ -亚甲基-谷氨酸、 $\alpha$ -甲基-亮氨酸、4,5-脱氢-赖氨酸、羟脯氨酸、3-氟-苯丙氨酸、3-氨基-酪氨酸、4-甲基-色氨酸等。

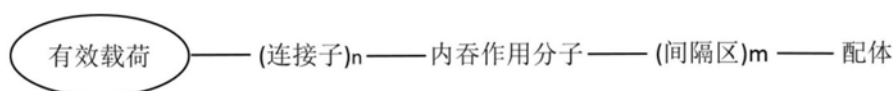
[0100] 在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含如本申请所提供的至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)有效载荷、如本申请所提供的至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)配体、如本申请所提供的至少一个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)内吞作用分子、以及任选地如本申请所提供的连接子或间隔区。在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含如本申请所提供的一个有效载荷、如本申请所提供的一个配体、如本申请所提供的一个内吞作用分子、以及任选地如本申请所提供的连接子或间隔区。

[0101] 在一些实施方式中,偶联体化合物具有如下所示的式XI、XII、XIII、XIIII或XV的结构,其中n、m、p、q和s独立地为0或1,其独立地表示存在或不存在连接子、多价连接子和间隔区。

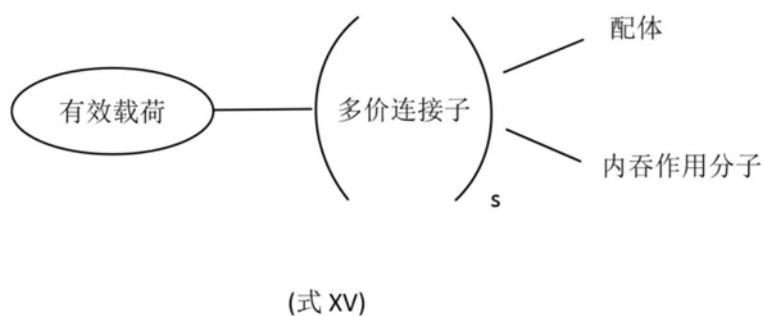
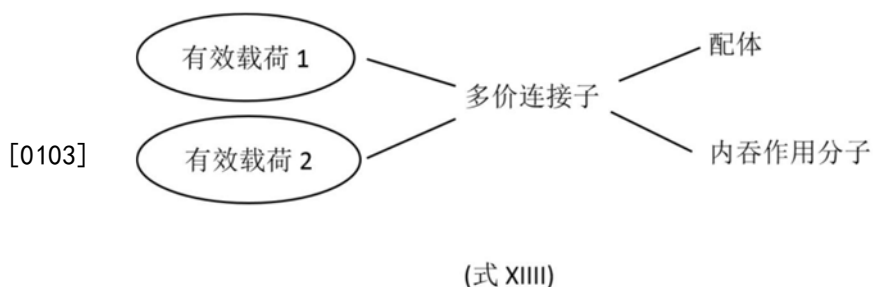
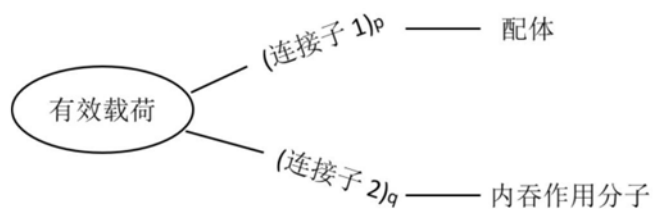


(式 XI)

[0102]



(式 XII)



[0104] 在一些实施方式中,本申请的偶联体化合物选自由下述化合物组成的组:LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H、LDC12H、LDC13H。LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H和LDC12H的组成如下表3中所示。

[0105] 表3:偶联体化合物的组成

[0106]

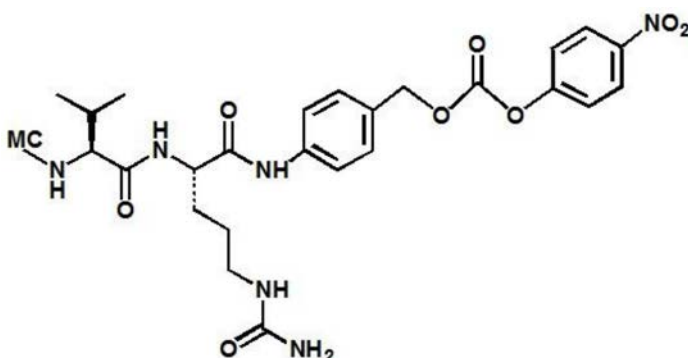
偶联体化合物的名称	细胞相互作用分子	连接子	有效载荷
LDC10B	叶酸; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BR	叶酸; P10; RGD	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BX	叶酸; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11B	叶酸; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE

[0107]

LDC12B	叶酸; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13B	叶酸; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC1013	P10; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10H	R9; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11H	R9; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12H	R9; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13H	R9; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE

[0108] MC-Val-Cit-PAB的结构如下:

[0109]



[0110] LDC10B、LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H和LDC12H的具体结构如图1所示。

[0111] 在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两个细胞相互作用分子,其中一个是与细胞表面受体特异性结合的配体,另一个是内吞作用分子,例如LDC10H、LDC10B、LDC1013。在一些实施方式中,内吞作用分子还能够与细胞表面受体结合,例如LDC10B、LDC1013。在一些实施方式中,内吞作用分子是细胞穿透分子,例如LDC10H。

[0112] 在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两个细胞相互作用分子,其中两个细胞相互作用分子均是内吞作用分子,例如LDC11B、LDC12B、LDC13B。在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含第一内吞作用分子和第二内吞作用分子,其中第一内吞作用分子与第二内吞作用分子是相同的。在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含第一内吞作用分子和第二内吞作用分子,其中第一内吞作用分子与第二内吞作用分子是不同的,例如LDC11B、LDC12B、LDC13B。在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两个细胞相互作用分子,其中两个细胞相互作用分子均是还能够与细胞表面受体特异性结合的内吞作用分子,例如LDC11B、LDC12B、LDC13B。在一些实施方式中,第一内吞作用分子还能够与细胞表面受体特异性结合,并且第二内吞作用分子是细胞穿透分子,例如LDC11H、LDC12H、LDC13H。

[0113] 在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效

载荷和两个细胞相互作用分子,其均是能够与细胞表面受体特异性结合的配体。在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含能够与第一细胞表面受体结合的第一细胞相互作用分子和能够与第二细胞表面受体结合的第二细胞相互作用分子,其中第一细胞相互作用分子与第二细胞相互作用分子是相同的。在一些实施方式中,本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含能够与第一细胞表面受体结合的第一细胞相互作用分子和能够与第二细胞表面受体结合的第二细胞相互作用分子,其中第一细胞相互作用分子与第二细胞相互作用分子是不同的,例如LDC10B、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013。

[0114] 本申请的mLDC可用于将任何有效载荷特异性地递送至在靶组织环境中的靶细胞。在通常情况下,mLDC中的多配体有三个优点。首先,多配体能够以多种方式起作用(通常是协同作用),从而提高治疗效果,同时降低副作用。其次,多配体结合增加了mLDC对靶受体或靶细胞的亲和性或亲和力,从而增强其特异性,并且避免了脱靶毒性。最后,当设计合理时,多配体的组合可以满足药物偶联体通常所需的多功能要求。

[0115] 本申请的mLDC取得了预料不到的技术效果,包括但不限于:(1)能够与细胞表面受体结合的配体和内吞作用分子的组合使得偶联体化合物能够特异性地进入靶细胞;(2)mLDC增强了药物化合物的亲和性和靶向特异性,从而向患者递送高效的化疗剂(如MMAE),拓宽了此类药剂的治疗窗并避免了副作用;(3)连接子能够阻止有效载荷在靶细胞外(例如,血液循环系统、细胞间质等)释放,确保了偶联体化合物在血液循环中的稳定性并降低了药物的毒性。进入靶细胞后,连接子被裂解,释放有效载荷,从而发挥药物的作用。同时,可以避免多重耐药性(MDR);(4)多种多样的药物可以以本申请的偶联体化合物的形式递送,因此扩大了相关药物的应用范围。因此,本申请的mLDC不仅拓宽了LDC药物的目标范围和治疗窗,而且还降低了一些药物的毒性和副作用。

[0116] 例如,可以在偶联体中使用双配体,其中一个配体与癌细胞表面受体特异性结合,而另一个配体仅通过癌症特异性蛋白酶在实体瘤内暴露,引发胞吞作用,从而使得偶联体将药物有效载荷仅特异性地递送至癌细胞,避免了其对表达一种或两种受体的正常细胞的毒性。

[0117] 例如,含有两种配体(即,P10肽和叶酸)的LDC10B能够以双重方式、甚至三重方式发挥作用。P10肽本身已在I期临床试验中显示出是一种有效的抗癌药物,其可能作为TRPV6拮抗剂发挥作用,并且已发现叶酸通过胞吞作用有效地辅助递送细胞毒素有效载荷杀死癌细胞。作为双配体药物偶联体,LDC10B能够潜在地以下述三种方式协同作用杀死表达TRPV6和叶酸受体的癌细胞。首先,P10肽部分本身作为TRPV6拮抗剂发挥作用。其次,P10肽能够通过内化潜在地递送偶联的细胞毒素,尽管不是非常有效;以及叶酸能够与叶酸受体结合通过内吞作用有效递送细胞毒素。最后,双配体P10肽和叶酸能够协同地与其各自的受体结合,并且向表达这两种受体的靶细胞内递送细胞毒素有效载荷。

[0118] 在本申请中使用的术语“多肽”、“蛋白”和“肽”可以互换使用并且指的是氨基酸的聚合物。如本申请所述的多肽、蛋白或肽可以含有天然存在的氨基酸,以及非天然存在的氨基酸,或者氨基酸的类似物和模拟物。可以通过本领域熟知的任何方法获得多肽、蛋白或肽,例如但不限于从天然物质中分离和纯化、重组表达、化学合成等。

[0119] 本申请的另一个方面公开了药物组合物,所述药物组合物含有本申请提供的偶联



体化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

[0120] 在本申请中使用的术语“药学上可接受的”指的是在合理的医学判断范围内,其适用于与人和其他动物的细胞接触而没有不适当的毒性、刺激性、过敏反应等,并且与合理的效益/风险比是相称的。

[0121] 在本申请中使用的术语“药学上可接受的盐”指的是本申请的偶联体化合物的相对无毒性的、无机和有机酸加成盐和碱加成盐。代表性的酸加成盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、茶酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐、氨基磺酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、亚甲基-双-b-羟基萘甲酸盐、龙胆酸盐、羟乙基磺酸盐、二对甲苯甲酰基酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、环己基氨基磺酸盐和奎尼酸月桂基磺酸盐等。碱加成盐包括药学上可接受的金属和胺盐。适宜的金属盐包括钠、钾、钙、钡、锌、镁和铝盐。在一些实施方式中,钠盐和钾盐是优选的。适宜的无机碱加成盐由金属碱制备,所述金属碱包括例如氢化钠、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁和氢氧化锌。适宜的胺碱加成盐由具有足够碱性的胺制备,以形成稳定的盐,并且优选包括以下常用于药物化学的胺,因为其毒性较低并且是医疗用途可接受的:氨、乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄基苯乙胺、二乙胺、哌嗪、三羟甲基氨基甲烷、四甲基氢氧化铵、三乙胺、二苄胺、二苄羟甲胺、脱氢枞胺、N-乙基哌啶、苄胺、四甲基铵、四乙基铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、碱性氨基酸(例如,赖氨酸和精氨酸)以及二环己胺等。

[0122] 在本申请中使用的术语“药学上可接受的载体”指的是用于向对象递送本申请提供的偶联体化合物的药学上可接受的溶剂、混悬剂或任意其他药学上惰性的载剂,其不干扰偶联体化合物的结构和性质。某些这样的载体能够将偶联体化合物配制成例如片剂、丸剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖浆剂、浆剂、混悬剂和软锭剂,供对象口服摄入。某些这样的载体能够将偶联体化合物制成注射、输注或局部施用的制剂。

[0123] 用于本申请提供的药物组合物中的药学上可接受的载体包括但不限于,例如药学上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性载剂(例如,氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液或者右旋糖和乳酸林格氏注射液)、非水性载剂(例如,植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油)、抗微生物剂、等渗剂(例如,氯化钠或右旋糖)、缓冲剂(例如,磷酸或柠檬酸缓冲剂)、抗氧化剂(例如,硫酸氢钠)、麻醉剂(例如,盐酸普鲁卡因)、混悬剂/分散剂(例如,羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮)、螯合剂(例如,EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸))、乳化剂(例如,聚山梨醇酯80(吐温-80))、稀释剂、佐剂、赋形剂、或无毒性辅助物质、本领域公知的其他成分或其各种组合。适宜的成分可以包括例如填充剂、粘合剂、缓冲剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、增稠剂、着色剂或乳化剂。

[0124] 在一些实施方式中,药物组合物是注射制剂。注射制剂包括无菌水溶液或分散剂、混悬剂或乳剂。在所有情况下,注射制剂应该是无菌的并且应该是流体以便于注射。注射制剂应在生产和储存条件下保持稳定,并且必须防止细菌和真菌等微生物的污染。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适宜的混合物和/

或植物油的溶剂或分散介质。注射制剂应保持适当的流动性。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过使用表面活性剂等保持适当的流动性。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂实现阻止微生物的作用,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。

[0125] 在一些实施方式中,药物组合物是口服制剂。口服制剂包括但不限于胶囊、扁胶囊、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、颗粒剂、或在水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂、或者作为水包油或油包水液体乳剂、或者作为酞剂或糖浆、或者作为软锭剂(使用惰性基质,如明胶和甘油,或者蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等。

[0126] 在用于口服施用的固体剂型(例如,胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等)中,将偶联体化合物与一种或多种药学上可接受的载体混合,如柠檬酸钠或磷酸氢二钙,和/或下述中的任意一种:(1)填充剂或增量剂,例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)保湿剂,例如,甘油;(4)崩解剂,例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,例如,石蜡;(6)吸收促进剂,例如,季铵化合物;(7)润湿剂,例如,乙酰基醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸收剂,例如,高岭土和膨润土;(9)润滑剂,例如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物;以及(10)着色剂。

[0127] 在用于口服施用的液体剂型中,将偶联体化合物与下述中的任意一种混合:药学上可接受的乳剂、微乳、溶液、混悬剂、糖浆剂和酞剂。除了偶联体化合物以外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂,例如,水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂,例如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、异丙醇、1,3-丁二醇、油(特别是,棉籽油、花生油、玉米油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂以外,口服组合物还可以包含佐剂,例如,润湿剂、乳化剂和混悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、增香剂和防腐剂。

[0128] 在一些实施方式中,药物组合物是口腔喷雾制剂或鼻喷雾制剂。喷雾制剂包括但不限于水性气雾剂、非水性混悬剂、脂质体制剂或固体颗粒制剂等。水性气雾剂通过将药剂的水溶液或混悬液与常规药学上可接受的载体和稳定剂混合制备。载体和稳定剂根据具体化合物的要求而改变,但是在通常情况下,其包括非离子表面活性剂(吐温或聚乙二醇)、油酸、卵磷脂、氨基酸,例如,甘氨酸、缓冲溶液、盐、糖或糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备,并且能够通过喷雾递送。

[0129] 在一些实施方式中,药物组合物可以通过与一种或多种其他药物混合使用。在一些实施方式中,药物组合物包含至少一种其他药物。在一些实施方式中,其他药物是抗肿瘤药、心血管药、抗炎药、抗病毒药、消化系统药、神经系统药、呼吸系统药、免疫系统药、皮肤病药、代谢药等。

[0130] 在一些实施方式中,可以通过适宜的途径向需要其的对象施用药物组合物,包括但不限于口服、注射(例如,静脉内、肌内、皮下、皮内、心内、鞘内、胸膜内、腹膜内注射等)、粘膜(例如,鼻内、口内施用等)、舌下、直肠、经皮、眼内和肺部施用。在一些实施方式中,药物组合物可以静脉内、皮下、口服、肌内或心室内施用。

[0131] 由于一些有效载荷的性质,例如高毒性、高亲水性,因而希望将有效载荷更特异性地和更有效地向需要其的对象递送。例如,在癌症治疗中,希望将化疗剂特异性地向癌细胞

递送,而不对正常细胞产生毒性。因而,本申请的另一个方面公开了向需要其的对象递送有效载荷的方法,所述方法包括向对象施用治疗有效量的本申请提供的偶联体化合物,或其药学上可接受的盐,或者本申请提供的药物组合物。本申请所述的有效载荷可以是研究者、兽医、医生或其他医师正在寻找的在组织、系统、动物个体或人中引发生物学或医学应答以预防、抑制、改善或治疗疾病的任何药剂。

[0132] 在本申请中使用的术语“对象”指的是人和非人动物。非人动物包括所有的脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物。对象也可以是家畜,例如,牛、猪、羊、家禽和马,或家养动物,例如,狗和猫。对象可以是男性或女性,可以是老年人,以及可以是成年人、青少年、儿童或婴儿。人对象可以是高加索人、非洲人、亚洲人、闪族人或其他种族背景人士,或者是这些种族背景的混合。

[0133] 在本申请中使用的术语“治疗有效量”指的是偶联体化合物或其药学上可接受的盐或药物组合物在一定程度上减轻对象中疾病或病症的一种或多种症状的量;使与疾病或病症相关或导致疾病或病症的一个或多个生理或生化参数部分或完全恢复正常的量;和/或降低疾病或病症发病的可能性的量。这种量通常根据多种因素而改变,本领域的普通技术人员根据本申请提供的说明书的范围能够对其进行确定和说明。这些包括但不限于:特定对象及其年龄、体重、身高、一般身体状况和病史、所使用的特定化合物,以及其制剂的载体和所选择的施用途径;以及所治疗病况的性质和严重程度。

[0134] 在一些实施方式中,偶联体化合物或其药学上可接受的盐,或者药物组合物的量足以在对象中抑制疾病或病症,或者预防性地抑制或阻止疾病或病症的发病。尽管治疗有效量可以在不同对象中改变,但是其范围通常为从0.01至100mg/kg,例如0.01至90mg/kg、0.01至80mg/kg、0.01至70mg/kg、0.01至60mg/kg、0.01至50mg/kg、0.01至40mg/kg、0.01至30mg/kg、0.01至20mg/kg、0.01至10mg/kg、0.01至5mg/kg、0.01至4mg/kg、0.01至3mg/kg、0.01至2mg/kg、0.01至1mg/kg、0.01至0.1mg/kg。本申请所述的治疗有效量可以等于上述数值范围内的任意值,包括该范围的端点。

[0135] 本申请的另一个方面公开了一种向需要其的对象递送有效载荷的方法,所述方法包括向对象施用治疗有效量的本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,或者本申请提供的药物组合物。

[0136] 本申请的另一个方面公开了用于治疗对象中的疾病的方法,所述方法包括向对象施用治疗有效量的本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐,或者本申请提供的药物组合物。

[0137] 在一些实施方式中,疾病是癌症,包括但不限于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、子宫癌、子宫内膜癌、肝癌、甲状腺癌、胰腺癌、结肠癌、结直肠癌、食道癌、皮肤癌、淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤。

[0138] 在一些实施方式中,疾病是免疫性疾病,例如,自身免疫性疾病,包括但不限于结缔组织病、系统性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。

[0139] 在一些实施方式中,疾病是心血管疾病,包括但不限于心绞痛、心肌梗死、中风、心脏病发作、高血压性心脏病,包括但不限于心绞痛、心肌梗死、中风、心脏病发作、高血压性心脏病、风湿性心脏病、心肌病、心脏心律失常和先天性心脏病。

[0140] 在一些实施方式中,疾病是代谢疾病,包括但不限于糖尿病、痛风、肥胖症、低血糖

症、高血糖症和血脂异常。

[0141] 在一些实施方式中,疾病是神经疾病,包括但不限于阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、头部损伤、多发性硬化症、眩晕、昏迷和癫痫。

[0142] 在一些实施方式中,本申请提供的方法还包括将一种或多种治疗剂与偶联体化合物或其药学上可接受的盐,或者药物组合物联合施用。在一些实施方式中,治疗剂靶向抗癌治疗靶点,诱导或增强针对癌症的免疫应答,或者是化疗剂。

[0143] 以下将通过具体实施例更详细地描述本申请。提供以下实施例仅用于说明目的,并且不旨在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地意识到可以对多种非关键参数进行改变或修改以产生基本上相同的结果。

#### [0144] 实施例

[0145] 以下实施例旨在进一步说明本申请。通过描述,本申请的优点和特征将变得清楚。然而,这些说明仅仅是示例性的,并且不应将其理解为对本申请的范围的限制。

#### [0146] 实施例1:偶联体分子的制备

##### [0147] 步骤I:叶酸-NHS的合成

[0148] 将叶酸(44.1g,100mmol)溶解在DMSO(2L)中,然后用N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)(24.8g,120mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(23g,200mmol)混合。将混合物于常温下避光搅拌18小时。过滤不溶物,真空抽干,得到胶状固体。用冰乙醚将胶状固体洗涤3遍,干燥以获得黄色粉末(53.8g),可以将其用于下一步的反应,而无需进一步纯化。

##### [0149] 步骤II:P10保护肽树脂的合成

[0150] 称取Wang树脂(购自Sigma-Aldrich,100g,取代度:1.1mmol/g)并加入固相反应柱中,然后加入DMF,氮气鼓泡溶胀30min。在一个单独的爱伦美氏烧瓶中,称取Fmoc-Arg(pbf)-OH(142.7g,220mmol)、HOBt(35.6g,264mmol)和DMAP(2.7g,22mmol)并用DMF溶解,并使用冰水浴冷却至0℃。然后加入DIC(40.8ml,264mmol)并反应5min。将该溶液加入反应柱并反应3小时,然后真空干燥并使用DMF洗涤3次。

[0151] 将醋酸酐(104ml)和吡啶(88.5ml)溶于DMF(500ml)中,将混合物加入经洗涤的上述树脂,封闭并在室温下放置5h,使用DMF洗涤3次,甲醇收缩后抽干树脂,得到Fmoc-Arg(pbf)-Wang树脂。经检测取代度为0.53mmol/g。

[0152] 称取37.7g(20mmol)Fmoc-Arg(pbf)-Wang树脂(取代度:0.53mmol/g)并加入反应柱,用DMF洗涤3次,再用DMF溶胀30min。然后用DBLK脱除Fmoc保护基团,再用DMF洗涤6次。称取Fmoc-Pro-OH(20.2g,60mmol)和HOBt(9.7g,72mmol)并用DMF溶解,并使用冰水浴冷却至0℃。然后加入DIC(11.1ml,72mmol)并反应5min。将该溶液加入反应柱,反应2小时,然后用DBLK脱除Fmoc保护基团。

[0153] 重复上述操作,按照在肽序列中从C-末端至N-末端的顺序依次加入每个氨基酸。按照肽顺序依次偶联Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH和Fmoc-Cys(Trt)-OH,然后用DBLK脱除Fmoc保护基团。将该溶液用DMF洗涤6次,用甲醇收缩两次,抽干,获得P10保护肽树脂(85.8g)。

[0154] 步骤III:中间体叶酸-P10(叶酸-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)的合成

[0155] 称取叶酸-NHS (32.3g, 60mmol) 并用DMSO溶解, 加入步骤II中获得的P10保护肽树脂 (85.8g), 反应5分钟, 滴加DIEA (21ml, 120mmol), 室温继续反应4h。使用DMF将反应产物洗涤3次, 甲醇收缩, 真空抽干, 得到全保护肽树脂 (320.3g)。

[0156] 将上一步得到的保护肽树脂 (80g) 加入到1000ml单口烧瓶中, 将预先配制的裂解溶液 (640ml, TFA: 苯甲硫醚: EDT: 苯甲醚=90:5:3:2 (体积比)) 加入到烧瓶中, 室温反应2.5h。滤掉树脂并用TFA (100ml) 洗涤, 合并滤液, 加入到无水乙醚 (4500ml) 中析出黄色固体。将固体离心, 使用无水乙醚洗涤并真空干燥得到黄色固体 (40.6g)。粗肽收率为97.1%, HPLC纯度为76.3%。利用HPLC纯化所得到的黄色固体并冻干得到叶酸-P10 (28.25g, 纯度: 98.6%)。

[0157] 步骤IV: 中间体R9-P10

[0158] (Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH) 的合成

[0159] 称取步骤II获得的P10保护肽树脂的一部分并根据R9的肽序列偶联以获得中间体R9-P10。

[0160] 步骤V: 中间体Mc-Val-Cit-PAB-MMAE的合成

[0161] 称取MMAE (7.18g, 10mmol) 加入到250ml三颈烧瓶中, 用无水DMF溶解并在N<sub>2</sub>保护下室温搅拌至澄清。将Mc-Val-Cit-PAB-PNP (7.37g) 和HOAt (72mg, 2mmol) 加入溶液并反应5分钟, 再滴加DIEA (3.5ml, 20mmol), 继续室温反应30min, 然后升温至40-50℃并反应至20h, 期间通过HPLC监测反应。真空抽干除去DMF, 通过进一步HPLC纯化得到产品Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (10.7g, 纯度: 99.3%)。

[0162] 步骤VI: 偶联体LDC10B和LDC10H的合成

[0163] 称取步骤V获得的Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (6.59g, 5mmol) 并加入5000ml单颈烧瓶中, 加入3300ml磷酸盐缓冲液并搅拌, 保持PH=7.2至澄清。加入中间体叶酸-P10或R9-P10 (10.5g, 5.02mmol) 并在室温下反应2h, 期间使用HPLC监测反应。反应完全后, 将溶液过滤, 通过HPLC和冻干得到LDC10B (14.53g, 纯度: 99.2%, 收率: 85.02%) 和LDC10H (12.37g, 纯度: 98.7%, 收率: 81.34%)。

[0164] 可以通过类似方法获得偶联体LDC10BR、LDC10BX、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC11H和LDC12H。

[0165] 步骤VII: 叶酸-FITC的合成 (FITC-ACP-Lys (叶酸)-OH)

[0166] 称取Wang树脂 (1g, 取代度: 1.1mmol/g) 并加入固相反应柱, 然后加入DMF, 随后氮气鼓泡溶胀30min。在一个单独的爱伦美氏烧瓶中, 称取2当量摩尔 (eq.) Fmoc-Lys (Dde)-OH、2.4eq. HOBt和0.2eq. DMAP并用DMF溶解, 并使用冰水浴冷却至0℃。然后加入2.4eq. DIC并反应5min。将该溶液加入反应柱并反应3小时, 然后真空干燥并使用DMF洗涤3次。

[0167] 分别将10eq. 醋酸酐和吡啶溶于DMF (10ml) 中, 将该混合物加入经洗涤的上述树脂, 封闭并在室温下放置5h, 使用DMF洗涤3次, 甲醇收缩后抽干树脂, 得到Fmoc-LYS (Dde)-Wang树脂。经检测取代度为0.51mmol/g。

[0168] 称取1.3g Fmoc-LYS (Dde)-Wang树脂 (取代度: 0.51mmol/g) 并加入反应柱, 使用DMF洗涤3次, 并用DMF溶胀30min。然后用DBLK脱除Fmoc保护基团, 再用DMF洗涤6次。称取2eq. Fmoc-6-ACP-OH和2.4eq. HOBt并溶于DMF, 使用冰水浴冷却至0℃。然后加入2.4eq. DIC

并反应5min。将该溶液加入反应柱并反应2小时,然后用DBLK脱除Fmoc保护基团。

[0169] 将在DMF中的1.5eq.FITC加入树脂,然后滴加3eq.DIEA。反应进行2h并使用DMF洗涤树脂3次。

[0170] 将在DMF中的2%水合肼加入上述树脂并反应15min。重复两次,然后使用DMF洗涤6次。

[0171] 称取叶酸-NHS (2eq.) 并溶于DMSO,将其加入树脂并反应5min,滴加DIEA (21ml, 120mmol),将反应在室温下持续4h。分别使用DMSO和DMF洗涤反应产物3次,使用甲醇收缩,真空抽干,得到全保护肽树脂。

[0172] 在脱保护和从树脂上裂解后,利用HPLC纯化粗叶酸-FITC以获得黄色固体形式的纯度为95%的产物。叶酸-FITC的结构如图3中所示。

[0173] 步骤VIII:10A-FITC的合成

[0174] 称取步骤II获得的P10保护肽树脂0.1mmol (0.43g) 并加入固相反应柱,然后加入DMF,随后氮气鼓泡溶胀30min。加入2eq.Fmoc-e-ACP-OH以及然后加入2eq.DBLK脱除Fmoc保护基团。使用DMF洗涤溶液6次。

[0175] 将在DMF中的1.5eq.FITC加入树脂,随后滴加3eq.DIEA。反应进行2h并使用DMF洗涤树脂3次。

[0176] 在脱保护和从树脂上裂解后,利用HPLC纯化粗10A-FITC以获得黄色固体形式的纯度为95%的产物。10A-FITC的结构如图3中所示。

[0177] 步骤IX:10B-FITC的合成

[0178] 称取步骤II获得的P10保护肽树脂0.1mmol (0.43g) 并加入固相反应柱,然后加入DMF,随后氮气鼓泡溶胀30min。加入2eq.Fmoc-Lys (Dde) -OH、Fmoc-e-ACP-OH,然后加入2eq.DBLK脱除Fmoc保护基团。使用DMF洗涤溶液6次。

[0179] 将在DMF中的1.5eq.FITC加入树脂,然后滴加3eq.DIEA。反应进行2h并使用DMF洗涤树脂3次。

[0180] 将在DMF中的2%水合肼加入上述树脂并反应15min。重复两次,然后使用DMF洗涤6次。

[0181] 称取叶酸-NHS (2eq.) 并溶于DMSO,将其加入树脂并反应5min,滴加DIEA (21ml, 120mmol),将反应在室温下持续4h。分别使用DMSO和DMF洗涤反应产物3次,使用甲醇收缩,真空抽干,得到全保护肽树脂。

[0182] 在脱保护和从树脂上裂解后,利用HPLC纯化粗10B-FITC以获得黄色固体形式的纯度为95%的产物。10B-FITC的结构如图3中所示。

[0183] 步骤X:LDC10B-CY5的合成

[0184] 称取步骤II获得的P10保护肽树脂0.1mmol (0.43g) 并加入固相反应柱,然后加入DMF,随后氮气鼓泡溶胀30min。加入2eq.Fmoc-Lys (Dde) -OH,然后加入2eq.DBLK脱除Fmoc保护基团。使用DMF洗涤溶液6次。

[0185] 将在DMF中的100mg荧光染料Cy5、1.5eq.HATU和1.5eq.HOBT加入树脂中,然后滴加3eq.DIEA。反应进行2h并使用DMF洗涤树脂3次。

[0186] 将在DMF中的2%水合肼加入上述树脂并反应15min。重复两次,然后使用DMF洗涤6次。

[0187] 称取叶酸-NHS (2eq.) 并溶于DMSO, 将其加入树脂并反应5min, 滴加DIEA (21ml, 120mmol), 将反应在室温下持续4h。分别使用DMSO和DMF洗涤反应产物3次, 使用甲醇收缩, 真空抽干, 得到全保护肽树脂。

[0188] 在脱保护和从树脂上裂解后, 利用HPLC纯化粗LDC10B-CY5以获得黄色固体形式的纯度为95%的产物。LDC10B-CY5是LDC10B的荧光探针CY5标记的版本, 其中双配体部分通过赖氨酸间隔区与CY5染料偶联。

[0189] 实施例II: 偶联体的药效测定

[0190] 涉及的偶联体如下所示: LDC10B、LDC10BX、LDC10BR、LDC11B、LDC12B、LDC13B、LDC1013、LDC10H、LDC11H、LDC13H、LDC1、LDC10A、LDC11A和LDC13A。在一些实验中将LDC1、LDC10A、LDC11A和LDC13A作为对照并且其结构如下所示:

[0191] LDC1: 叶酸-(PEG)<sub>3</sub>-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

[0192] LDC10A: P10-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

[0193] LDC11A: P11-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

[0194] LDC13A: P13-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

[0195] 1. 偶联体LDC10B的内吞作用实验

[0196] 所涉及的偶联体如下所示: 叶酸-FITC (FITC-ACP-Lys (叶酸)-OH)、10B-FITC和10A-FITC。

[0197] 培养基: RPMI 1640培养基, 无叶酸

[0198] 实验方法:

[0199] 1) 将人鼻咽癌细胞系KB、黑色素瘤细胞系A375、人肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3、乳腺癌细胞系HCC1954使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养, 细胞每2-3天传代一次。

[0200] 2) 将人鼻咽癌细胞系KB、黑色素瘤细胞系A375、人肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3、乳腺癌细胞系HCC1954以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔加入板(96孔板)中, 并在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养8-12h。

[0201] 3) 将1μM FITC偶联体或对照加入板内的细胞中, 并在37℃下孵育10-15min。然后吸去孔中的培养基并使用PBS洗涤细胞3次。

[0202] 4) 然后使用共聚焦显微镜(商标)将细胞成像以显示内吞作用。

[0203] 结果与分析:

[0204] 为了显示加入叶酸配体能够使叶酸受体介导对双配体LDC10B的内吞作用, 我们使用10A-FITC、叶酸-FITC和10B-FITC对KB细胞(叶酸受体阳性细胞)和A375细胞(叶酸受体阴性细胞)进行了测试。如图2中所示, 叶酸-FITC通过叶酸受体介导的内吞作用进入了KB细胞(叶酸受体阳性细胞)但未进入A375细胞(叶酸受体阴性细胞)(图A和图B), 而10A-FITC由于缺乏内吞作用而不能进入细胞(图C和图D)。然而, 加入叶酸配体将10A-FITC转化成双配体偶联体(即, 10B-FITC), 使得该偶联体通过叶酸受体介导的内吞作用能够进入KB细胞(图E), 但是不能进入A375细胞(图F)。而且, 使用50mM游离叶酸(偶联体过量50倍)预先孵育KB细胞完全阻断了叶酸-FITC和10B-FITC(数据未显示)两者的内吞作用, 证实了内吞作用实际上是由叶酸受体介导的。

[0205] 2. 偶联体LDC10B的细胞毒性实验

[0206] 测试样品:LDC10B

[0207] 对照样品:MMAE、LDC1、LDC10A

[0208] 培养基:RPMI 1640培养基,无叶酸

[0209] 实验方法:

[0210] 1) 将人鼻咽癌细胞系KB、黑色素瘤细胞系A375、人肺癌细胞H1299、慢性髓性白血病细胞系K562、人肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3、乳腺癌细胞系HCC1954、人胃癌细胞N87和人乳腺癌细胞SK-BR-3使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0211] 2) 将人鼻咽癌细胞系KB、黑色素瘤细胞系A375、人肺癌细胞H1299、慢性髓性白血病细胞系K562、人肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3、乳腺癌细胞系HCC1954、人胃癌细胞N87和人乳腺癌细胞SK-BR-3以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔加入板(96孔板)中并在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养8-12h。

[0212] 3) 在PBS溶液中制备LDC偶联体或对照的储备溶液。以100μL/孔将经系列稀释的LDC偶联体或对照加入板中的测试细胞中,并在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下孵育15-30min。然后吸去孔中的培养基,并使用不含偶联体的新鲜培养基(150μL/孔)在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养测试细胞2-3天。

[0213] 4) 将CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)加入各孔中以检测死细胞的量,并将每个板在培养箱中在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下孵育1h。

[0214] 5) 在酶标仪上在490nm处对各板进行读数,比较经LDC偶联体处理或未经其处理的测试细胞的细胞存活情况。确定50%细胞死亡所需的LDC药物浓度(IC<sub>50</sub>值)。

[0215] 结果与分析:

[0216] LDC10B能够非常有效的杀死下述癌细胞:人鼻咽癌细胞系KB、人肺癌细胞H460、人肺癌细胞H1299、慢性髓性白血病细胞系K562、卵巢癌细胞SKOV3、乳腺癌细胞系HCC1954、人胃癌细胞N87、人乳腺癌细胞SK-BR-3,并且LDC10B的IC<sub>50</sub>值低于(更强于)LDC1和LDC10A对照(见表4)。已知这些细胞系表达叶酸受体和/或TRPV6受体。然而,LDC10B对缺乏叶酸受体表达的黑色素瘤细胞系A375的细胞毒性显著降低(IC<sub>50</sub>读数更高)。

[0217] LDC10B是能够与叶酸受体和TRPV6受体两者结合的双配体药物偶联体。对于受体阳性细胞系而言,从表4中可以看出,LDC10B的细胞毒性是单配体药物偶联体LDC1或LDC10A的2-15倍(IC<sub>50</sub>值降低2-15倍)。对于缺乏叶酸受体的黑色素瘤细胞系A375而言,与LDC1和LDC10A类似,LDC10B的毒性降低约15倍,表明其具有良好的特异性。因而,双配体药物偶联体LDC10B显示出协同作用和对药效的贡献。

[0218] 表4:偶联体LDC10B与对照的对比细胞毒性实验结果(IC<sub>50</sub>值)

[0219] (单位:mol/l,M)

[0220] 表4A:孵育时间30min

[0221]

细胞	H1299	K562	H460	SKOV3	HCC1954	N87	SK-BR-3
MMAE	$0.86 \times 10^{-9}$	$0.54 \times 10^{-9}$	$0.77 \times 10^{-9}$	$0.62 \times 10^{-9}$	$0.45 \times 10^{-9}$	$0.68 \times 10^{-9}$	$0.52 \times 10^{-9}$
LDC1	$2.62 \times 10^{-7}$	$9.31 \times 10^{-8}$	$1.92 \times 10^{-7}$	$1.02 \times 10^{-7}$	$9.44 \times 10^{-8}$	$2.39 \times 10^{-7}$	$9.82 \times 10^{-8}$
LDC10A	$5.09 \times 10^{-7}$	$1.11 \times 10^{-7}$	$4.83 \times 10^{-7}$	$1.25 \times 10^{-7}$	$1.06 \times 10^{-7}$	$5.17 \times 10^{-7}$	$1.09 \times 10^{-7}$
LDC10B	$5.88 \times 10^{-8}$	$1.48 \times 10^{-8}$	$5.04 \times 10^{-8}$	$1.57 \times 10^{-8}$	$1.41 \times 10^{-8}$	$7.51 \times 10^{-8}$	$1.59 \times 10^{-8}$



[0222] 表4B: 孵育时间15min

细胞	A375	KB
MMAE	$1 \times 10^{-7}$	$8.9 \times 10^{-8}$
LDC1	$1 \times 10^{-5}$	$1.5 \times 10^{-5}$
LDC10A	$1 \times 10^{-5}$	$8.5 \times 10^{-6}$
LDC10B	$1 \times 10^{-5}$	$7.6 \times 10^{-7}$

[0224] 3. 偶联体LDC11B的细胞毒性实验

[0225] 测试样品:LDC11B

[0226] 对照样品:MMAE、LDC1、LDC11A

[0227] 培养基:RPMI 1640培养基,无叶酸

[0228] 实验方法:

[0229] 1) 将人肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3、人胚肾细胞293A使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0230] 2) 将人肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3、人胚肾细胞293A以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔加入板(96孔板)中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养8-12h。

[0231] 3) 在PBS溶液中制备LDC偶联体或对照的储备溶液。以100μL/孔将经系列稀释的LDC偶联体或对照加入板中的细胞中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育15-30min。然后吸去孔中的培养基,并使用不含偶联体的新鲜培养基(150μL/孔)在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养细胞2-3天。

[0232] 4) 将CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)加入各孔中以检测死细胞的量,并将每个板在培养箱中在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育1h。

[0233] 5) 在酶标仪上在490nm处对板进行读数,比较经LDC偶联体处理或未经其处理的细胞的细胞存活情况。确定50%细胞死亡所需的LDC药物浓度(IC<sub>50</sub>值)。

[0234] 结果与分析:

[0235] LDC11B能够杀死下述癌细胞或抑制其生长:人肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3、人胚肾细胞293A。已知这些细胞系具有较高水平的叶酸受体和/或LHRH受体表达。LDC11B的IC<sub>50</sub>值低于LDC1和LDC11A对照的IC<sub>50</sub>值(见表5)。

[0236] LDC11B是能够与叶酸受体和LHRH受体两者结合的双配体药物偶联体。从表5中可以看出,LDC11B的细胞毒性几乎比单配体偶联体LDC1或LDC11A的细胞毒性强10倍(IC<sub>50</sub>值几乎降低10倍)。因而,双配体药物偶联体LDC11B显示出协同作用和对药效的贡献。

[0237] 表5: 偶联体LDC11B与对照的对比细胞毒性实验结果(IC<sub>50</sub>值)

[0238] (单位: mol/l, M)

细胞	H460	SKOV3	293A
MMAE	$0.58 \times 10^{-9}$	$0.44 \times 10^{-9}$	$0.86 \times 10^{-9}$
LDC1	$5.26 \times 10^{-7}$	$2.95 \times 10^{-7}$	$7.15 \times 10^{-7}$
LDC11A	$6.67 \times 10^{-7}$	$3.41 \times 10^{-7}$	$1.31 \times 10^{-6}$
LDC11B	$8.13 \times 10^{-8}$	$4.38 \times 10^{-8}$	$5.24 \times 10^{-7}$

[0240] 4. 偶联体LDC12B的细胞毒性实验

[0241] 测试样品:LDC12B

[0242] 对照样品:MMAE

[0243] 培养基:RPMI 1640培养基,无叶酸

[0244] 实验方法:

[0245] 1) 将人子宫内膜癌细胞HEC-1A、人胃癌细胞系GTL-16、人结肠癌HCT-116、人神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0246] 2) 将人子宫内膜癌细胞HEC-1A、人胃癌细胞系GTL-16、人结肠癌HCT-116、人神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔加入板(96孔板)中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养8-12h。

[0247] 3) 在PBS溶液中制备LDC偶联体或对照的储备溶液。以100μL/孔将经系列稀释的LDC偶联体或对照加入板中的细胞中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育15-30min。然后吸去孔中的培养基,并使用不含偶联体的新鲜培养基(150μL/孔)在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养细胞2-3天。

[0248] 4) 将CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)加入各孔中以检测死细胞的量,并将每个板在培养箱中在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育1h。

[0249] 5) 在酶标仪上在490nm处对板进行读数,比较经LDC偶联体处理或未经其处理的细胞的细胞存活情况。确定50%细胞死亡所需的LDC药物浓度(IC<sub>50</sub>值)。

[0250] 结果与分析:

[0251] LDC12B能够杀死下述癌细胞或抑制其生长:人子宫内膜癌细胞HEC-1A、人胃癌细胞系GTL-16、人结肠癌HCT-116、人神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y。IC<sub>50</sub>值如表6中所示。

[0252] 表6:偶联体LDC12B与MMAE的对比细胞毒性实验结果(IC<sub>50</sub>值)

[0253] (单位:mol/l,M)

细胞	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	SH-SY5Y
MMAE	$1.27 \times 10^{-8}$	$6.38 \times 10^{-9}$	$8.74 \times 10^{-9}$	$2.4 \times 10^{-8}$
LDC12B	$8.26 \times 10^{-7}$	$6.12 \times 10^{-7}$	$6.31 \times 10^{-7}$	$3.96 \times 10^{-7}$

[0255] 5. 偶联体LDC13B的细胞毒性实验

[0256] 测试样品:LDC13B

[0257] 对照样品:MMAE、LDC1、LDC13A

[0258] 培养基:RPMI 1640培养基,无叶酸

[0259] 实验方法:

[0260] 1) 将人鼻咽癌细胞系KB、人结肠癌HCT-116、人前列腺癌细胞PC-3、人胃癌细胞系GTL-16、人子宫内膜癌细胞HEC-1A和人胃癌细胞N87使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0261] 2) 将人鼻咽癌细胞系KB、人结肠癌HCT-116、人前列腺癌细胞PC-3、人胃癌细胞系GTL-16、人子宫内膜癌细胞HEC-1A和人胃癌细胞N87以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔加入板(96孔板)中,并在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养8-12h。

[0262] 3) 在PBS溶液中制备LDC偶联体或对照的储备溶液。以100μL/孔将经系列稀释的LDC偶联体或对照加入板中的细胞中并在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下孵育15-30min。然后吸去

孔中的培养基,并使用不含偶联体的新鲜培养基(150 $\mu$ L/孔)在37℃、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养细胞2-3天。

[0263] 4) 将 **CellTiter 96<sup>®</sup>** Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) 加入各孔中以检测死细胞的量,并将板在培养箱中在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育1h。

[0264] 5) 在酶标仪上在490nm处对板进行读数,比较经LDC偶联体处理或未经其处理的细胞的细胞存活情况。确定50%细胞死亡所需的LDC药物浓度(IC<sub>50</sub>值)。

[0265] 结果与分析:

[0266] LDC13B能够杀死下述癌细胞或抑制其生长:人鼻咽癌细胞系KB、人结肠癌HCT-116、人胃癌细胞系GTL-16、人子宫内膜癌细胞HEC-1A、人前列腺癌细胞系PC-3、人胃癌细胞N87。特别地,LDC13B对KB是高度有效的,KB是同时具有叶酸受体和LHRH受体的细胞系。而且,双配体LDC13B比单配体药物偶联体(即,LDC1和LDC13A)的药效高2-10倍,证实了双配体药物偶联体在药效方面的优势。IC<sub>50</sub>值如表7中所示。

[0267] 表7:偶联体LDC13B与对照的对比细胞毒性实验结果(IC<sub>50</sub>值)

[0268] (单位:mol/l,M)

细胞	KB	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	PC-3	N87
MMAE	$2.88 \times 10^{-8}$	$1.27 \times 10^{-8}$	$6.38 \times 10^{-9}$	$8.74 \times 10^{-9}$	$1.28 \times 10^{-8}$	$3.83 \times 10^{-9}$
LDC1	$6.5 \times 10^{-8}$	—	—	—	—	—
LDC13A	$4.5 \times 10^{-6}$	—	—	—	—	—
LDC13B	$2.57 \times 10^{-8}$	$1.07 \times 10^{-6}$	$7.55 \times 10^{-7}$	$9.4 \times 10^{-7}$	$1.18 \times 10^{-6}$	$3.26 \times 10^{-7}$

[0270] 6. 偶联体LDC10H的细胞毒性实验

[0271] 测试样品:LDC10H

[0272] 对照样品:MMAE、LDC1、LDC10A

[0273] 培养基:RPMI 1640培养基,无叶酸

[0274] 实验方法:

[0275] 1) 将人肺癌细胞H1299、卵巢癌细胞SKOV3、人乳腺癌细胞系HCC1954和人肺癌细胞H460使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0276] 2) 将人肺癌细胞H1299、卵巢癌细胞SKOV3、乳腺癌细胞系HCC1954和人肺癌细胞H460以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔加入板(96孔板)中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养8-12h。

[0277] 3) 在PBS溶液中制备LDC偶联体或对照的储备溶液。以100 $\mu$ L/孔将经系列稀释的LDC偶联体或对照加入板中的细胞中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育15-30min。然后吸去孔中的培养基,并使用不含偶联体的新鲜培养基(150 $\mu$ L/孔)在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养细胞2-3天。

[0278] 4) 将 **CellTiter 96<sup>®</sup>** Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) 加入各孔中以检测死细胞的量,并将板在培养箱中在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育1h。

[0279] 5) 在酶标仪上在490nm处对板进行读数,比较经LDC偶联体处理或未经其处理的细胞的细胞存活情况。确定50%细胞死亡所需的LDC药物浓度(IC<sub>50</sub>值)。

[0280] 结果与分析:

[0281] LDC10H能够杀死下述癌细胞或抑制其生长:人肺癌细胞H1299、卵巢癌细胞SKOV3、

乳腺癌细胞系HCC1954和人肺癌细胞H460。双配体LDC10H的药效比单配体偶联体LDC10A的药效高10倍,表明膜穿透肽序列(H)能够通过内吞作用辅助药物递送进入细胞。而且,LDC10H也比单配体偶联体LDC1更有效,证实了双配体药物偶联体在药效方面的优势。LDC10H的 $IC_{50}$ 值低于LDC1和LDC10A对照的 $IC_{50}$ 值(见表8)。

[0282] 表8:偶联体LDC10H与对照的对比细胞毒性实验结果( $IC_{50}$ 值)

[0283] (单位:mol/l,M)

细胞	HCC1954	H1299	SKOV3	H460
MMAE	$0.29 \times 10^{-9}$	$0.71 \times 10^{-9}$	$0.49 \times 10^{-9}$	$0.56 \times 10^{-9}$
LDC1	$7.79 \times 10^{-8}$	$1.86 \times 10^{-7}$	$2.01 \times 10^{-7}$	$1.37 \times 10^{-7}$
LDC10A	$4.18 \times 10^{-7}$	$7.88 \times 10^{-7}$	$6.41 \times 10^{-7}$	$7.24 \times 10^{-7}$
LDC10H	$3.6 \times 10^{-8}$	$9.04 \times 10^{-8}$	$7.38 \times 10^{-8}$	$8.53 \times 10^{-8}$

[0285] 7. 偶联体LDC1013的细胞毒性实验

[0286] 对照样品:MMAE、LDC1、LDC10A

[0287] 培养基:RPMI 1640培养基,无叶酸

[0288] 实验方法:

[0289] 1) 将人鼻咽癌细胞系KB、黑色素瘤细胞系A375和人肺癌细胞H460使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0290] 2) 将人鼻咽癌细胞系KB、黑色素瘤细胞系A375和人肺癌细胞H460以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔加入板(96孔板)中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件培养8-12h。

[0291] 3) 在PBS溶液中制备LDC偶联体或对照的储备溶液。以100μL/孔将经系列稀释的LDC偶联体或对照加入板中的细胞中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育15-30min。然后吸去孔中的培养基,并使用不含偶联体的新鲜培养基(150μL/孔)在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养细胞2-3天。

[0292] 4) 将CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)加入各孔中以检测死细胞的量,并将板在培养箱中在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育1h。

[0293] 5) 在酶标仪上在490nm处对板进行读数,比较经LDC偶联体处理或未经其处理的细胞的细胞存活情况。确定50%细胞死亡所需的LDC药物浓度( $IC_{50}$ 值)。

[0294] 结果与分析:

[0295] LDC1013有效地杀死人鼻咽癌细胞系KB和人肺癌细胞H460,抑制黑色素瘤细胞系A375的生长,而且LDC1013的 $IC_{50}$ 值低于(更强)LDC1和LDC10A对照的 $IC_{50}$ 值(见表9)。然而,LDC1013对于对照细胞系黑色素瘤细胞系A375的细胞毒性显著降低( $IC_{50}$ 读数更高)。

[0296] LDC1013是能够与LHRH受体和TRPV6受体两者结合的双配体药物偶联体。对于受体阳性细胞系而言,从表9中可以看出,LDC1013的细胞毒性比单配体药物偶联体LDC1或LDC10A的细胞毒性高2-15倍( $IC_{50}$ 值降低2-15倍)。对于A375而言,与H460和KB相比,LDC1013的细胞毒性分别降低约10-100倍,表明其具有良好的特异性。因而,双配体药物偶联体LDC1013显示出协同作用和对药效的贡献。

[0297] 表9:偶联体LDC1013与对照的对比细胞毒性实验结果( $IC_{50}$ 值)

[0298] (单位:mol/l,M)

[0299]		MMAE	FA-MMAE	LDC10A	LDC1013
	KB	$2 \times 10^{-8}$	$4 \times 10^{-6}$	$5.8 \times 10^{-6} \text{M}$	$1.3 \times 10^{-7}$
	H460	$3.7 \times 10^{-8}$	$9.4 \times 10^{-6}$	$1.39 \times 10^{-5} \text{M}$	$2.2 \times 10^{-6}$
	A375	$8.5 \times 10^{-8}$	$3.7 \times 10^{-5}$	$3.94 \times 10^{-5} \text{M}$	$1.19 \times 10^{-5}$

[0300] 8. 偶联体LDC10BR的细胞毒性实验

[0301] 对照样品:MMAE和LDC10B

[0302] 培养基:RPMI 1640培养基,无叶酸

[0303] 实验方法:

[0304] 1) 将人鼻咽癌细胞系KB、黑色素瘤细胞系A375和人肺癌细胞H460使用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0305] 2) 将人鼻咽癌细胞系KB、黑色素瘤细胞系A375和人肺癌细胞H460以 $1 \times 10^3$ 个细胞/孔加入板(96孔板)中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养8-12h。

[0306] 3) 在PBS溶液中制备LDC偶联体或对照的储备溶液。以100μL/孔将经系列稀释的LDC偶联体或对照加入板中的细胞中,并在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育15-30min。然后吸去孔中的培养基,并使用不含偶联体的新鲜培养基(150μL/孔)在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养细胞2-3天。

[0307] 4) 将CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)加入各孔中以检测死细胞的量,并将板在培养箱中在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下孵育1h。

[0308] 5) 在酶标仪上在490nm处对板进行读数,比较经LDC偶联体处理或未经其处理的细胞的细胞存活情况。确定50%细胞死亡所需的LDC药物浓度(IC<sub>50</sub>值)。

[0309] 结果与分析:

[0310] LDC10BR有效地杀死人鼻咽癌细胞系KB和人肺癌细胞H460,抑制黑色素瘤细胞系A375的生长,并且LDC10BR的IC<sub>50</sub>值与双配体偶联体LDC10B的IC<sub>50</sub>值相当(见表10)。

[0311] LDC10BR是能够与RGD(整合素α)受体、叶酸受体和TRPV6受体结合的三配体药物偶联体。对于受体阳性细胞系而言,从表10中可以看出,LDC10BR的细胞毒性与双配体偶联体LDC10B的细胞毒性相当。因而,三配体药物偶联体LDC10BR至少与双配体LDC10B一样有效。而且,三配体LDC对表达全部三个受体的癌细胞具有更强的细胞毒性和选择性,三种配体显示出协同作用和对药效的贡献。

[0312] 表10:偶联体LDC10BR与LDC10B的对比细胞毒性实验结果(IC<sub>50</sub>值)

[0313] (单位:mol/l,M)

[0314]		MMAE	LDC10B	LDC10BR
	KB	$2 \times 10^{-8}$	$2.2 \times 10^{-6}$	$6.6 \times 10^{-6}$
	H460	$3.7 \times 10^{-8}$	$6.8 \times 10^{-6}$	$6.4 \times 10^{-6}$
	A375	$8.5 \times 10^{-8}$	$5.13 \times 10^{-5}$	$3.81 \times 10^{-5}$

[0315] 实施例III:偶联体在动物模型中的药效研究

[0316] 目的:在小鼠的癌症治疗模型中考察偶联体的抗肿瘤药效。

[0317] 1. 偶联体LDC10B和LDC10H对移植瘤的抑制测定

[0318] 用于治疗偶联体:LDC10B、LDC10H

[0319] 动物:裸小鼠,6-8周龄,雌性

[0320] 实验方法:

[0321] 1) 将人大细胞肺癌细胞H460、人肺癌细胞A549、卵巢癌细胞SKOV3和乳腺癌细胞系HCC1954使用含10%胎牛血清的IMDM培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0322] 2) 肿瘤的产生:将 $7 \times 10^6$ 个肿瘤细胞皮下注射至裸小鼠背部,待肿瘤尺寸达到约100-200mm<sup>3</sup>后将小鼠分组给药治疗。

[0323] 3) 治疗:3只小鼠/组,使用LDC10B、LDC10H以及对照MMAE和PBS治疗,剂量为5和10mg/kg,每5天给药一次,注射3次。

[0324] 4) 监测动物的身体状况、体重和肿瘤尺寸。记录实验过程中动物死亡的数量。

[0325] 结果与分析:

[0326] LDC10B和LDC10H能够抑制人大细胞肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3和乳腺癌细胞系HCC1954的肿瘤生长,以5和10mg/kg的剂量进行3次注射后大部分肿瘤消失。详细的结果如表11和表12中所示。

[0327] 表11:偶联体LDC10B对移植瘤的抑制作用

时间	移植的 H460 肿瘤				移植的 HCC1954 肿瘤		移植的 SKOV3 肿瘤	
	5mg/kg		10mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	小鼠的 体重(g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的 体重(g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的 体重(g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的 体重(g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )
注射前	23.13	89.25	22.51	97.38	21.85	225.32	22.96	178.68
第1次注射5天后	22.53	78.63	22.53	45.74	22.2	108.73	22.44	163.05
第2次注射5天后	22.26	49.11	23.37	6.32	22.55	0	23.23	120.51
第3次注射5天后	21.65	52.5	23	0	22.38	0	23.53	68.31

[0329] 表12:偶联体LDC10H对移植瘤的抑制作用

LDC10H	移植的 H460 肿瘤				移植的 HCC1954 肿瘤	
	5mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	小鼠的体 重(g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的体 重(g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的 体重(g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )
注射前	23.29	136.49	23.37	126	22.05	88.6
第1次注射5天后	24.26	71.51	24.39	108.15	23.32	16.77
第2次注射5天后	23.14	65.73	22.12	37.5	22.87	0
第3次注射5天后	23.22	11.64	23.61	2.34	22.51	0

[0331] 2. 偶联体LDC11A、LDC11B对移植瘤的抑制测定

[0332] 用于治疗偶联体:LDC11A和LDC11B

[0333] 动物:裸小鼠,6-8周龄,雌性

[0334] 实验方法:

[0335] 1) 将人大细胞肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3、乳腺癌细胞系HCC1954和人乳腺癌细胞SK-BR-3使用含10%胎牛血清的IMDM培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0336] 2) 肿瘤的产生:将 $7 \times 10^6$ 个肿瘤细胞皮下注射至裸小鼠背部,待肿瘤尺寸达到约

100-200mm<sup>3</sup>后将小鼠分组给药治疗。

[0337] 3) 治疗:3只小鼠/组,使用LDC11A、LDC11B以及对照MMAE和PBS治疗,剂量为5和10mg/kg,每5天给药一次,注射3次。

[0338] 4) 监测动物的身体状况、体重和肿瘤尺寸。记录实验过程中动物死亡的数量。

[0339] 结果与分析:

[0340] LDC11B能够抑制人大细胞肺癌细胞H460、卵巢癌细胞SKOV3和乳腺癌细胞系HCC1954的肿瘤生长,以10mg/kg的剂量连续进行3次注射后大部分肿瘤消失。而对于LDC11A而言,由于其具有较强毒性,动物在第一次注射后死亡。详细的结果如表13和表14中所示。

[0341] 表13:偶联体LDC11B对移植瘤的抑制作用

时间	移植的 H460 肿瘤		移植的 SKOV3 肿瘤		移植的 HCC1954 肿瘤	
	10mg/kg		10mg/kg		10mg/kg	
	小鼠的体重 (g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的体重 (g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的体重 (g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )
注射前	21.85	225.32	22.11	169.22	22.76	218.76
第1次注射5天后	22.2	108.73	24.28	137.66	22.56	87.51
第2次注射5天后	22.55	0	23.6	76.13	23.15	0
第3次注射5天后	22.38	0	24.92	27.84	23.48	0

[0343] 表14:偶联体LDC11A对移植瘤的抑制作用

LDC11A	移植的 H460 肿瘤	
	10mg/kg	
	小鼠的体重 (g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )
注射前	24.46	294
第1次注射3天后	18.25	300
第1次注射5天后	死亡	死亡

[0345] 3. 偶联体LDC13B对移植瘤的抑制测定

[0346] 用于治疗偶联体:LDC13B

[0347] 动物:裸小鼠,6-8周龄,雌性

[0348] 实验方法:

[0349] 1) 将人大细胞肺癌细胞H460使用含10%胎牛血清的IMDM培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0350] 2) 肿瘤的产生:将7×10<sup>6</sup>个肿瘤细胞皮下注射至裸小鼠背部,待肿瘤尺寸达到约200mm<sup>3</sup>后将小鼠分组给药治疗。

[0351] 3) 治疗:3只小鼠/组,使用LDC13B以及对照MMAE和PBS治疗,剂量为2.5和5mg/kg,每3天给药一次,注射4次。

[0352] 4) 监测动物的身体状况、体重和肿瘤尺寸。记录实验过程中动物死亡的数量。

[0353] 结果与分析:

[0354] LDC13B能够抑制人大细胞肺癌细胞H460的肿瘤生长,在2.5mg/kg剂量下大部分肿

瘤迅速缩小,并且以5mg/kg的剂量进行4次注射后肿瘤完全消失。详细的结果如表15中所示。

[0355] 表15:偶联体LDC13B对移植瘤的抑制作用

时间	移植的 H460 肿瘤			
	2.5mg/kg		5 mg/kg	
	小鼠的体重 (g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的体重 (g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )
注射前	22.7	294	20.95	196
第 1 次注射后 3 天	22.73	384	18.36	144
第 2 次注射后 3 天	22.65	384	19.65	40
第 3 次注射后 3 天	22.47	144	18.21	18
第 4 次注射后 3 天	21.76	144	18.22	13.5

[0357] 4. 偶联体LDC1013对移植瘤的抑制测定

[0358] 用于治疗偶联体:LDC1013

[0359] 动物:裸小鼠,6-8周龄,雌性

[0360] 实验方法:

[0361] 1) 将人乳腺癌细胞HCC1954使用含10%胎牛血清的IMDM培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0362] 2) 肿瘤的产生:将 $7 \times 10^6$ 个肿瘤细胞皮下注射至裸小鼠背部,待肿瘤尺寸达到约180-320mm<sup>3</sup>后将小鼠分组给药治疗。

[0363] 3) 治疗:3只小鼠/组,使用LDC1013以及对照MMAE和PBS治疗,剂量为2.5和5mg/kg,每3天给药一次,注射4次。

[0364] 4) 监测动物的身体状况、体重和肿瘤尺寸。记录实验过程中动物死亡的数量。

[0365] 结果与分析:

[0366] 在每3天一次,分别以2.5mg/kg和5mg/kg的剂量注射7次后,LDC1013能够完全消除HCC1954移植瘤。详细的结果如表16中所示。

[0367] 表16:偶联体LDC1013对移植瘤的抑制作用

时间	移植的 HCC1954 肿瘤			
	2.5mg/kg		5 mg/kg	
	小鼠的体重 (g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )	小鼠的体重 (g)	肿瘤尺寸 (mm <sup>3</sup> )
注射前	24.14	180	21.92	320
第 1 次注射后 3 天	24.46	198	20.7	405
第 2 次注射后 3 天	24.54	198	20.43	405
第 3 次注射后 3 天	23.94	180	21.31	288
第 4 次注射后 3 天	24.3	113	21.15	88
第 5 次注射后 4 天	24.98	64	21.21	40
第 6 次注射后 5 天	24.73	22	20.49	0
第 7 次注射后 6 天	24.43	0	24.49	-

[0369] 5. 偶联体LDC10BX对移植瘤的抑制测定



[0370] 用于治疗偶联体:LDC10BX

[0371] 动物:裸小鼠,6-8周龄,雌性

[0372] 实验方法:

[0373] 1) 将人肺癌细胞H460使用含10%胎牛血清的IMDM培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0374] 2) 肿瘤的产生:将 $7 \times 10^6$ 个肿瘤细胞皮下注射至裸小鼠背部,待肿瘤尺寸达到约180-320mm<sup>3</sup>后将小鼠分组给药治疗。

[0375] 3) 治疗:3只小鼠/组,使用LDC10BX以及对照LDC13A治疗,剂量为10mg/kg,每3天给药一次,注射3次。

[0376] 4) 监测动物的身体状况、体重和肿瘤尺寸。记录实验过程中动物死亡的数量。

[0377] 结果与分析:

[0378] 在每3天一次,以10mg/kg的剂量注射3次后,LDC10BX消除了H460移植瘤。

[0379] 6. 在移植瘤模型中检测偶联体浓度

[0380] 样品:LDC10B、LDC10H

[0381] 动物:裸小鼠,6-8周龄,雌性

[0382] 实验方法:

[0383] 1) 将人卵巢癌细胞SKOV3和乳腺癌细胞系HCC1954使用含10%胎牛血清的IMDM培养基在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,细胞每2-3天传代一次。

[0384] 2) 肿瘤的产生:将 $7 \times 10^6$ 个肿瘤细胞皮下注射至裸小鼠背部,待肿瘤尺寸达到约100~200mm<sup>3</sup>后将小鼠分组给药治疗。

[0385] 3) 治疗:3只小鼠/组,10mg/kg,腹腔注射。

[0386] 4) 采血:将给药前的采血时间设为0,在给药后20min、2h、4h和24h采血。将血液离心以收集血清,将血清冷冻保存。

[0387] 5) 检测:利用小鼠抗-MMAE ELISA试剂盒检测血清中MMAE、LDC10B、LDC10H的总量以及LDC10B和LDC10H的MMAE代谢产物。

[0388] 结果与分析:

[0389] 给药后24h,在血清中检测到痕量的LDC10B,而未检测到LDC10H及其MMAE代谢产物,表明游离的药物在体内迅速排泄/代谢。详细的结果如表17中所示。

[0390] 表17:在具有移植瘤的动物中偶联体的浓度

浓度 (ug/ml)	LDC10B	LDC10H
给药前	0	0
20min	10.8	0.77
2h	5.035	0.58
4h	0.53	0.196
24h	0.1179	0

[0392] 鉴于上述情况,体外和体内研究表明:

[0393] (a) 多配体药物偶联体 (mLDC) 与靶细胞结合和/或通过内吞作用进入靶细胞,并且通过细胞毒性有效载荷的作用杀死细胞。已测试了超过20种不同的癌细胞系并且结果证实了上述结论。

[0394] (b) 体内活体动物成像显示了荧光标记的LDC10B-Cy5浓缩在瘤块原位并且持续超过24小时(见图4)。

[0395] (c) mLDC在小鼠模型中能够完全消除移植瘤。大多数先导化合物以剂量和受体表达水平依赖性方式在控制或消除移植瘤方面显示出极佳的药效,并且不会导致体重减轻或其他明显的毒性。当肿瘤完全消除时,在其剩余寿命中(>6个月)小鼠保持无肿瘤。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 同宜医药开曼有限公司
- [0003] <120> 多配体药物偶联体及其用途
- [0004] <130> 066138-8001W001
- [0005] <150> CN201510489556.6
- [0006] <151> 2015-08-11
- [0007] <150> CN201510489560.2
- [0008] <151> 2015-08-11
- [0009] <160> 20
- [0010] <170> PatentIn version 3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 7
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> Matripase的识别位点
- [0017] <400> 1
- [0018] Lys Ser Arg Ala Glu Asp Glu
- [0019] 1 5
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 6
- [0022] <212> PRT
- [0023] <213> 人工序列
- [0024] <220>
- [0025] <223> MMP-2的识别位点
- [0026] <400> 2
- [0027] Pro Leu Gly Leu Ala Gly
- [0028] 1 5
- [0029] <210> 3
- [0030] <211> 4
- [0031] <212> PRT
- [0032] <213> 人工序列
- [0033] <220>
- [0034] <223> 前列腺特异性抗原的识别位点
- [0035] <400> 3
- [0036] Ser Ser Leu Tyr
- [0037] 1
- [0038] <210> 4

---

[0039]	<211> 7
[0040]	<212> PRT
[0041]	<213> 人工序列
[0042]	<220>
[0043]	<223> TMPRSS2的识别位点
[0044]	<400> 4
[0045]	Leu Leu Arg Ser Leu Ile Gly
[0046]	1 5
[0047]	<210> 5
[0048]	<211> 4
[0049]	<212> PRT
[0050]	<213> 人工序列
[0051]	<220>
[0052]	<223> 活化的蛋白C的识别位点
[0053]	<400> 5
[0054]	Leu Val Lys Arg
[0055]	1
[0056]	<210> 6
[0057]	<211> 4
[0058]	<212> PRT
[0059]	<213> 人工序列
[0060]	<220>
[0061]	<223> 因子Ixa的识别位点
[0062]	<400> 6
[0063]	Leu Val Val Arg
[0064]	1
[0065]	<210> 7
[0066]	<211> 4
[0067]	<212> PRT
[0068]	<213> 人工序列
[0069]	<220>
[0070]	<223> 因子VIIa的识别位点
[0071]	<400> 7
[0072]	Gln Leu Thr Arg
[0073]	1
[0074]	<210> 8
[0075]	<211> 4
[0076]	<212> PRT
[0077]	<213> 人工序列

---

[0078]	<220>
[0079]	<223> 因子Xa的识别位点
[0080]	<400> 8
[0081]	Leu Glu Gly Arg
[0082]	1
[0083]	<210> 9
[0084]	<211> 6
[0085]	<212> PRT
[0086]	<213> 人工序列
[0087]	<220>
[0088]	<223> 钙蛋白酶-a的识别位点
[0089]	<400> 9
[0090]	Pro Leu Phe Ala Glu Pro
[0091]	1 5
[0092]	<210> 10
[0093]	<211> 6
[0094]	<212> PRT
[0095]	<213> 人工序列
[0096]	<220>
[0097]	<223> 钙蛋白酶-2的识别位点
[0098]	<400> 10
[0099]	Gly Leu Gly Ser Glu Pro
[0100]	1 5
[0101]	<210> 11
[0102]	<211> 5
[0103]	<212> PRT
[0104]	<213> 人工序列
[0105]	<220>
[0106]	<223> 肠肽酶的识别位点
[0107]	<400> 11
[0108]	Asp Asp Asp Asp Lys
[0109]	1 5
[0110]	<210> 12
[0111]	<211> 4
[0112]	<212> PRT
[0113]	<213> 人工序列
[0114]	<220>
[0115]	<223> MMP-8的识别位点
[0116]	<400> 12

[0117]	Gly Pro Ser Gly
[0118]	1
[0119]	<210> 13
[0120]	<211> 4
[0121]	<212> PRT
[0122]	<213> 人工序列
[0123]	<220>
[0124]	<223> 原蛋白转化酶5的识别位点
[0125]	<400> 13
[0126]	Arg Ser Lys Arg
[0127]	1
[0128]	<210> 14
[0129]	<211> 4
[0130]	<212> PRT
[0131]	<213> 人工序列
[0132]	<220>
[0133]	<223> 钙蛋白酶-3的识别位点
[0134]	<400> 14
[0135]	Val Gly Val Phe
[0136]	1
[0137]	<210> 15
[0138]	<211> 14
[0139]	<212> PRT
[0140]	<213> 人工序列
[0141]	<220>
[0142]	<223> P10
[0143]	<400> 15
[0144]	Cys Lys Glu Phe Leu His Pro Ser Lys Val Asp Leu Pro Arg
[0145]	1 5 10
[0146]	<210> 16
[0147]	<211> 11
[0148]	<212> PRT
[0149]	<213> 人工序列
[0150]	<220>
[0151]	<223> P11
[0152]	<400> 16
[0153]	Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Cys
[0154]	1 5 10
[0155]	<210> 17

[0156]	<211>	14
[0157]	<212>	PRT
[0158]	<213>	人工序列
[0159]	<220>	
[0160]	<223>	P12
[0161]	<400>	17
[0162]	Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	
[0163]	1	5 10
[0164]	<210>	18
[0165]	<211>	11
[0166]	<212>	PRT
[0167]	<213>	人工序列
[0168]	<220>	
[0169]	<223>	P13
[0170]	<220>	
[0171]	<221>	MISC_FEATURE
[0172]	<222>	(6) .. (6)
[0173]	<223>	Xaa=D-Lys
[0174]	<400>	18
[0175]	Glu His Trp Ser Tyr Xaa Leu Arg Pro Gly Cys	
[0176]	1	5 10
[0177]	<210>	19
[0178]	<211>	9
[0179]	<212>	PRT
[0180]	<213>	人工序列
[0181]	<220>	
[0182]	<223>	R9
[0183]	<400>	19
[0184]	Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg	
[0185]	1	5
[0186]	<210>	20
[0187]	<211>	13
[0188]	<212>	PRT
[0189]	<213>	人工序列
[0190]	<220>	
[0191]	<223>	Tat肽
[0192]	<400>	20
[0193]	Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln	
[0194]	1	5 10

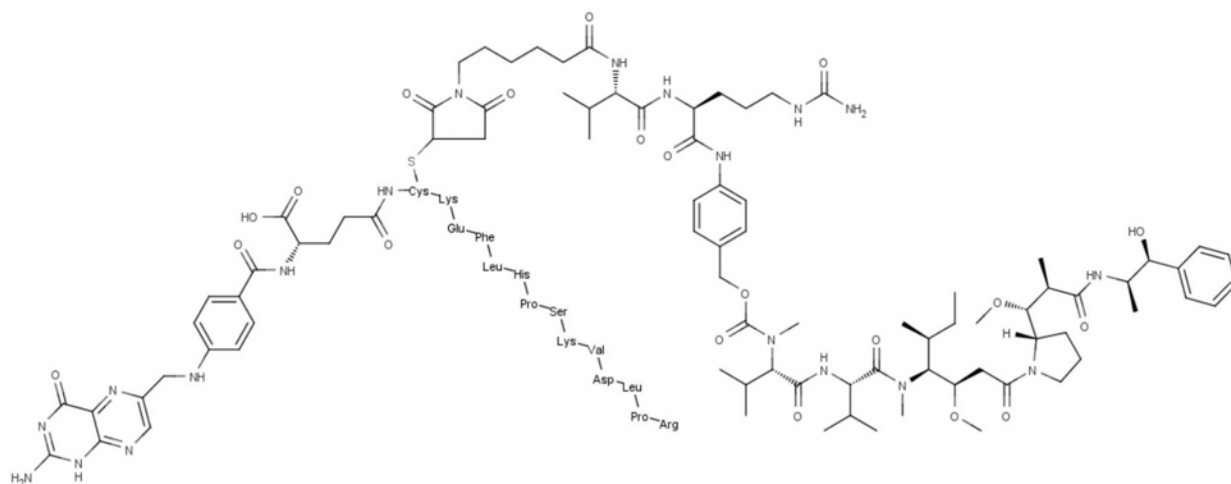
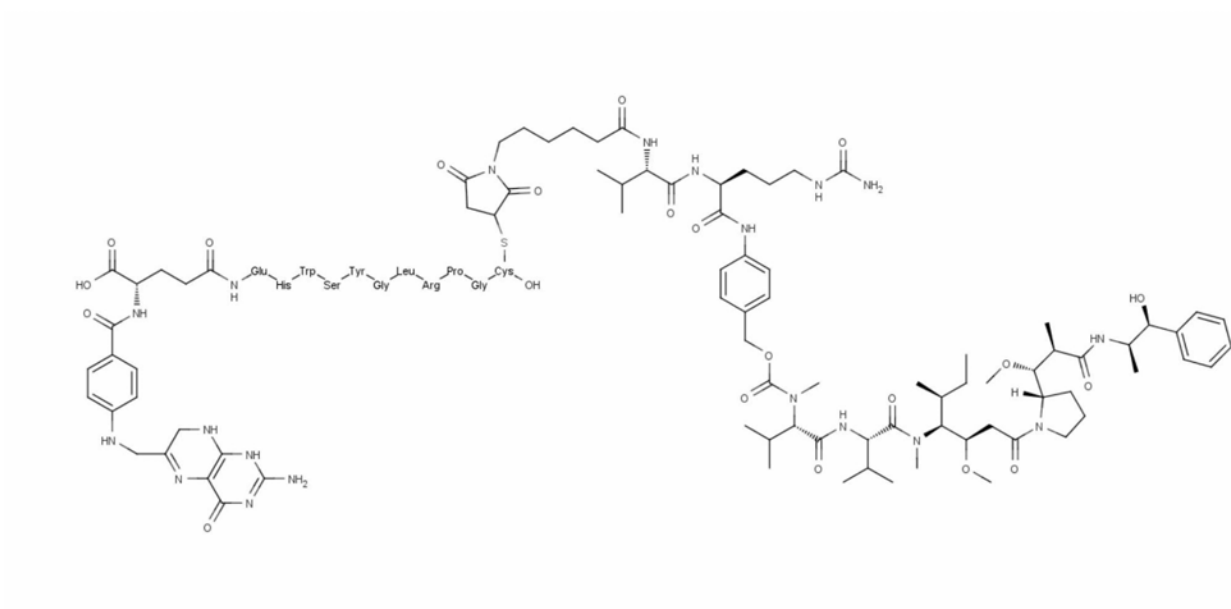
**LDC10B****LDC11B**

图1



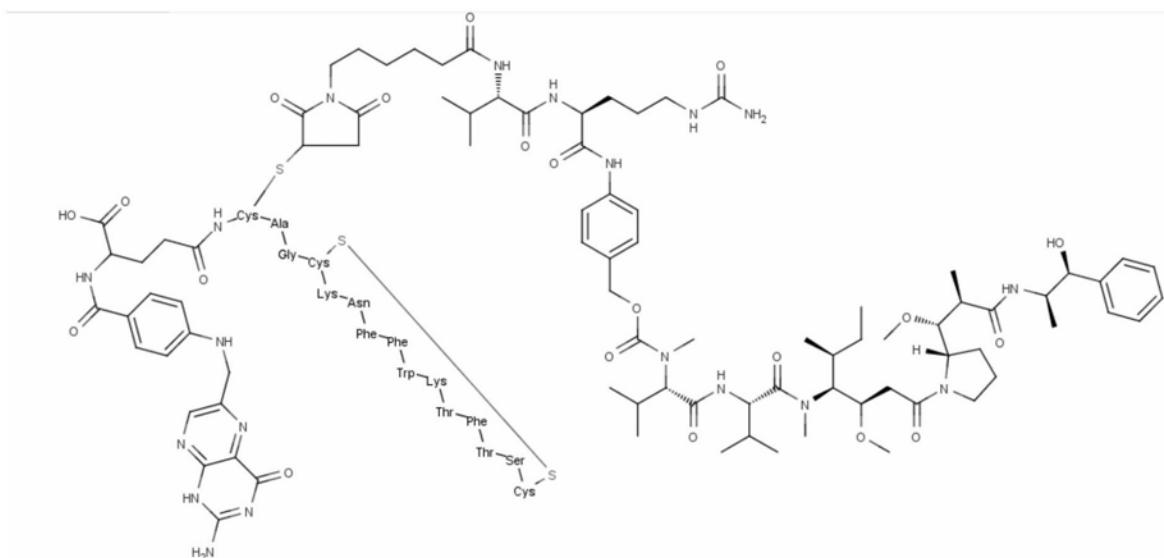
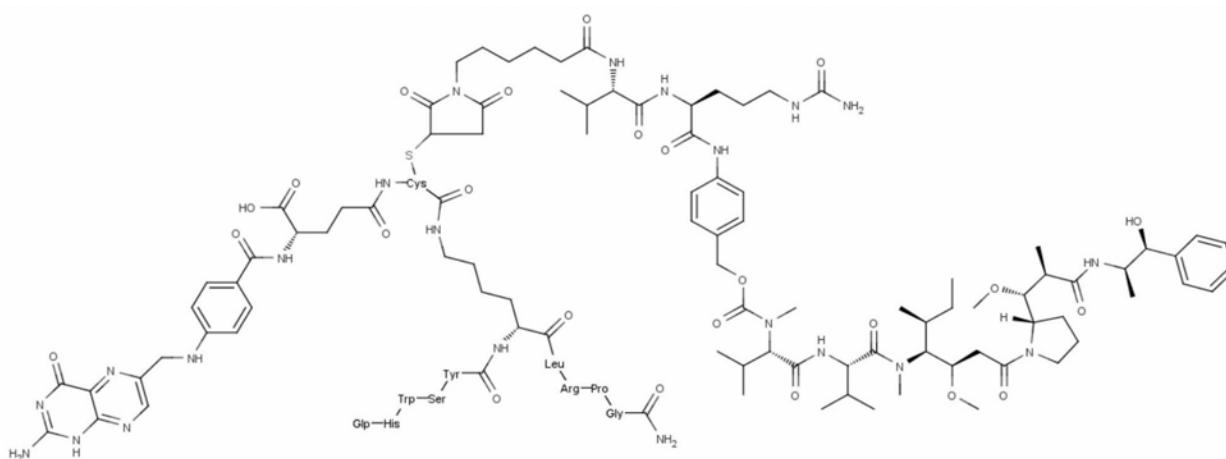
**LDC12B****LDC13B**

图1(续)

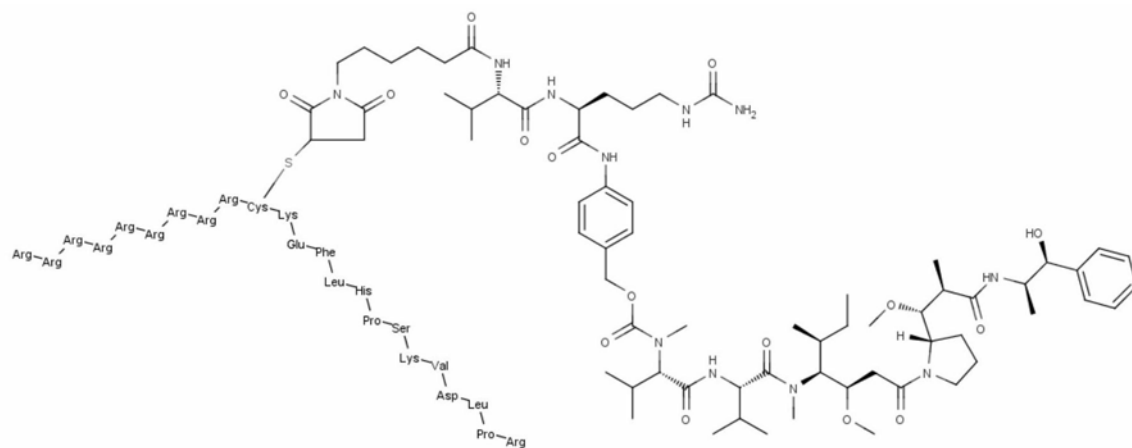
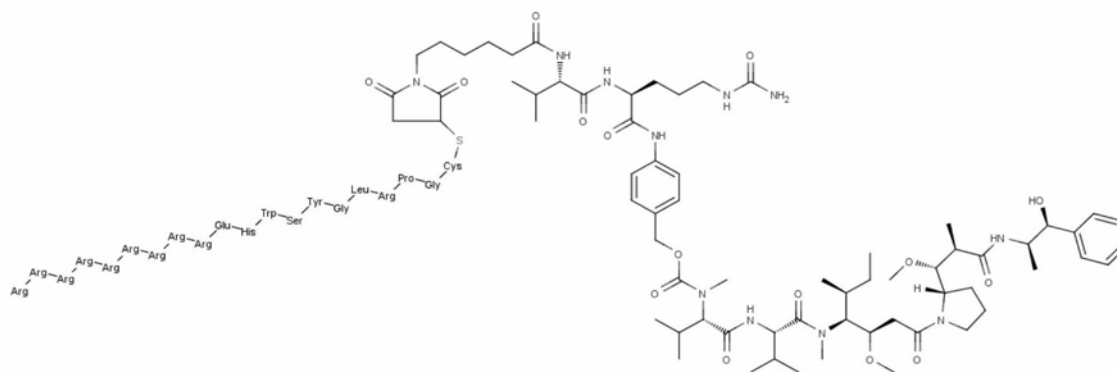
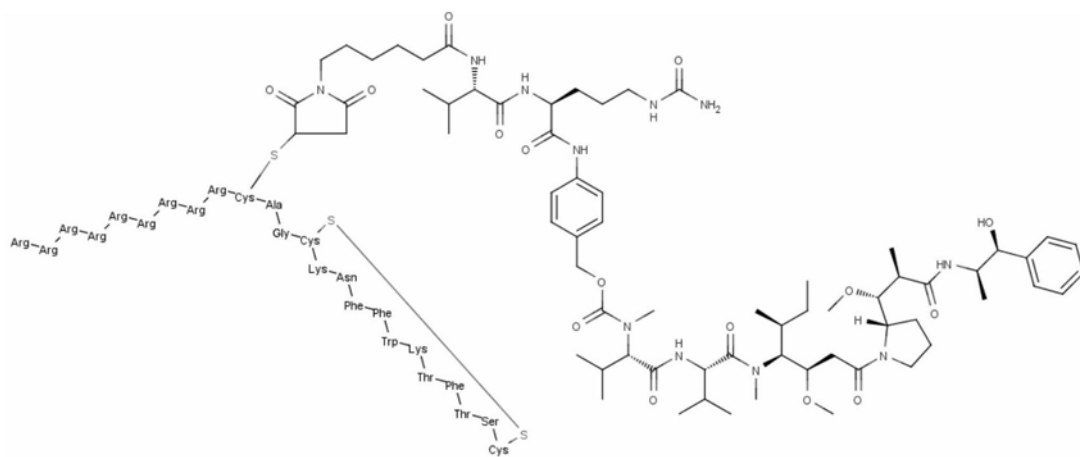
**LDC10H****LDC11H****LDC12H**

图1 (续)

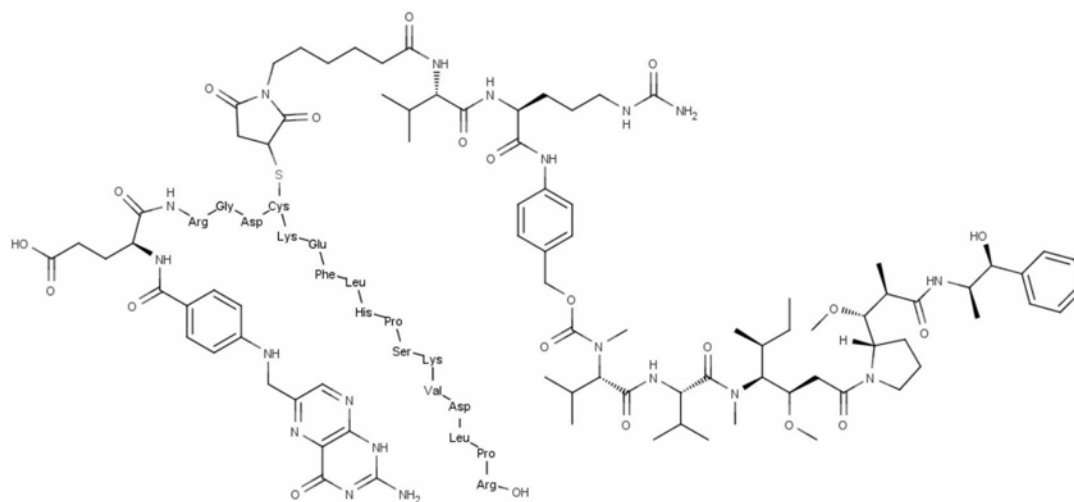
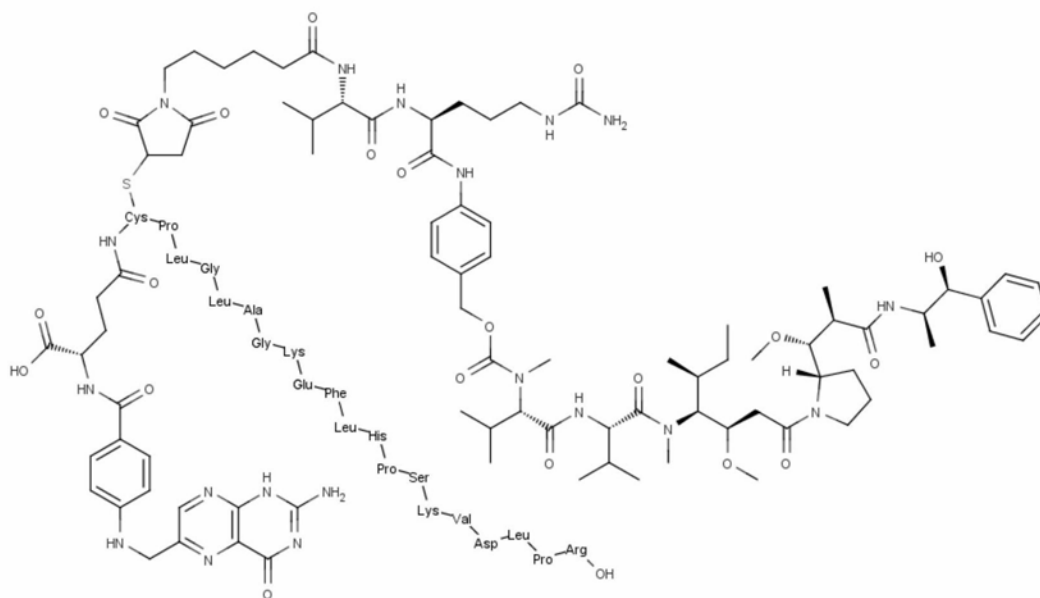
**LDC10BR****LDC10BX**

图1(续)

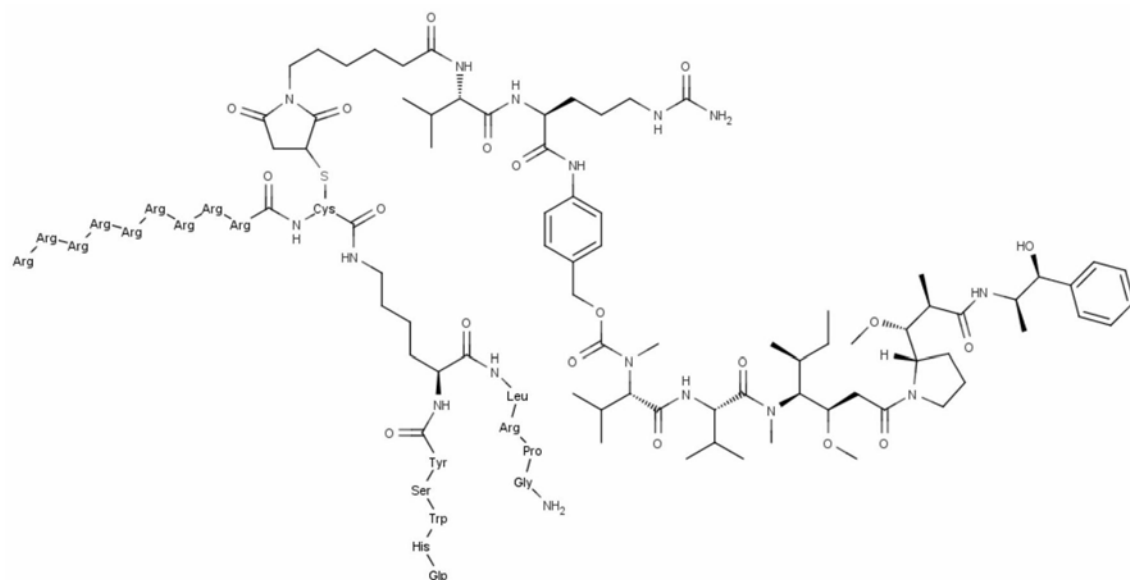
**LDC1013**

图1 (续)

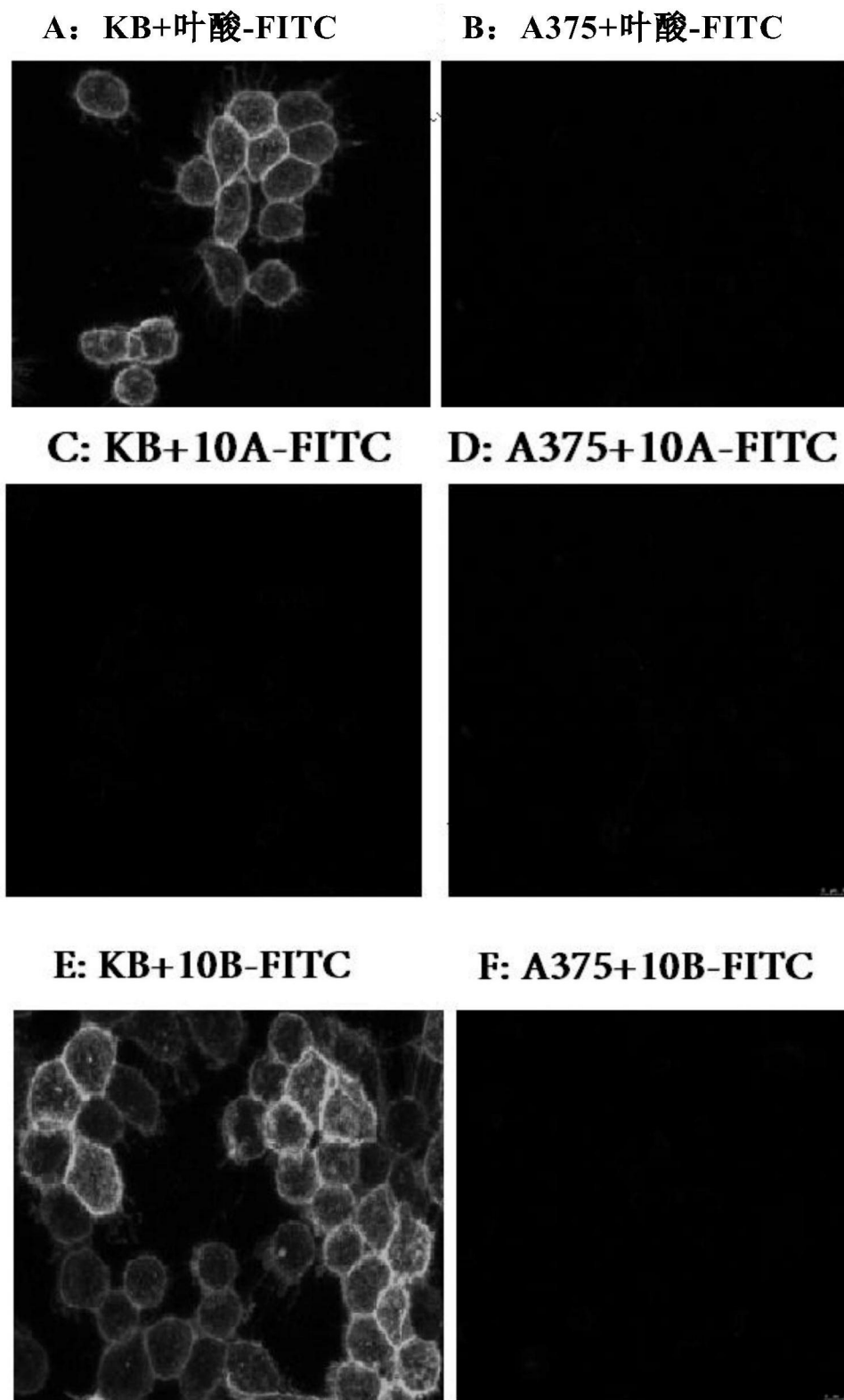
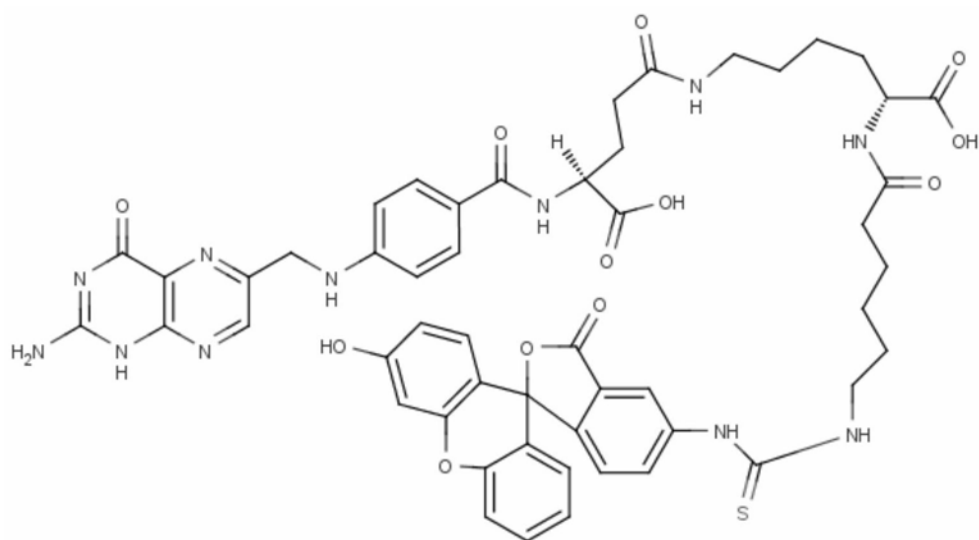
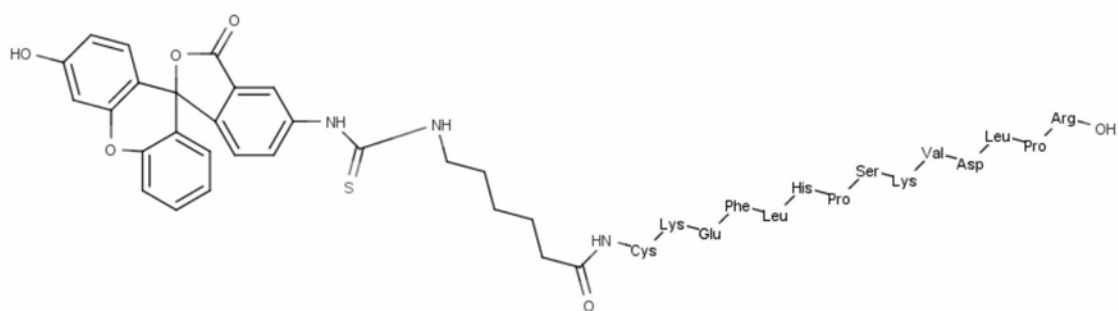


图2

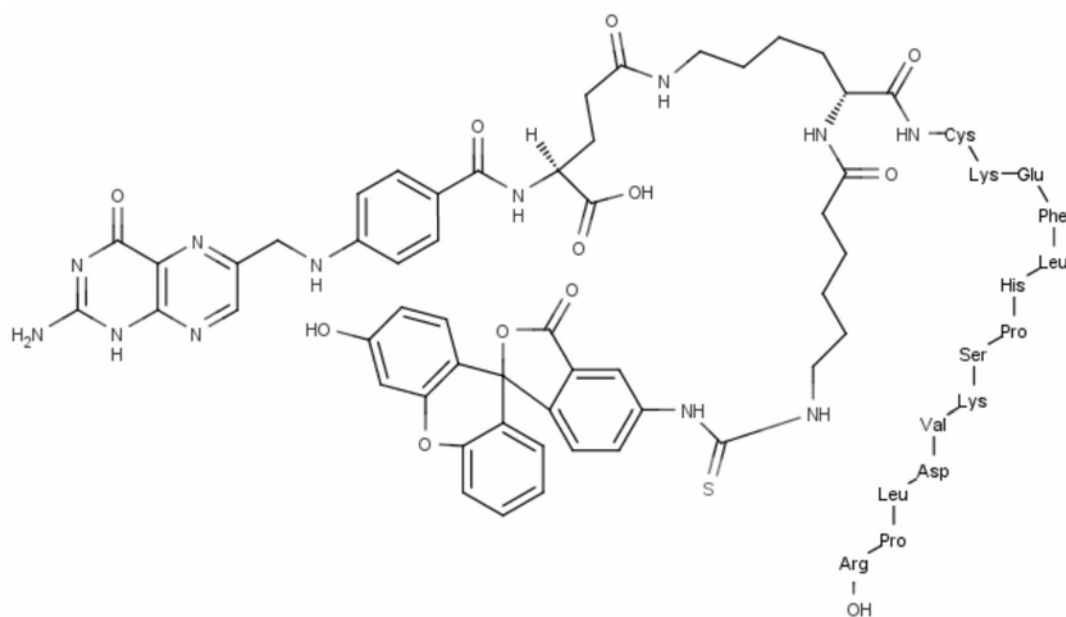


叶酸-FITC



10A-FITC

图3



### 10B-FITC

图3(续)

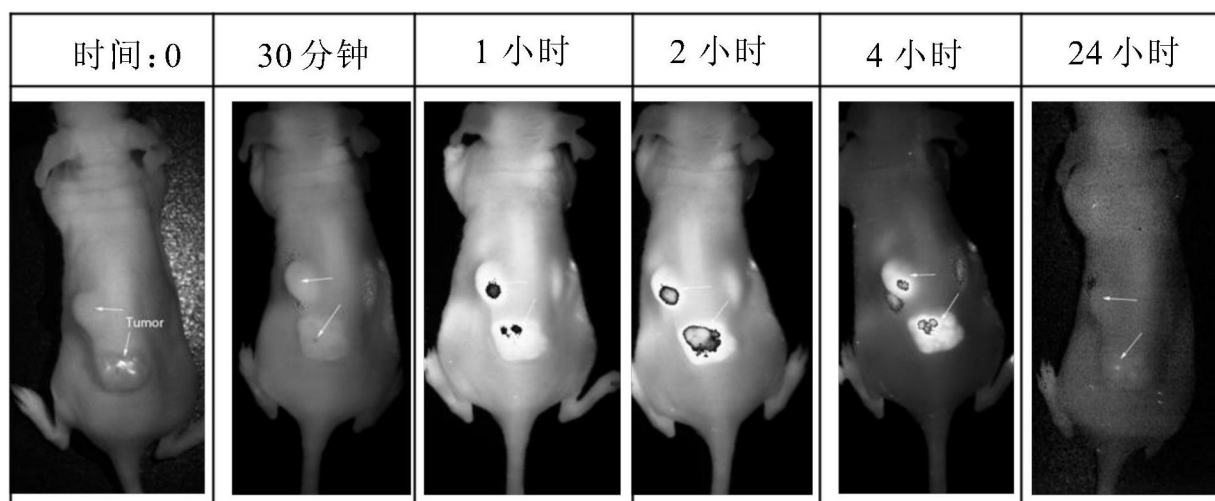


图4