双配体药物偶联体及其用途

技术领域

本申请涉及生物医药化学领域。更具体地，本申请涉及双配体药物偶联体、包括所述双配体药物偶联体的药物组合物以及使用所述双配体药物偶联体向有需要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

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大的局限性。

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 主要用于肿瘤治疗领域。在一些情况下，靶向抗体对癌细胞表面抗原的亲和性能够高达 10^{-9} ~ 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。

PDC 在临床或临床前研究中用于治疗多种疾病，但这些只是简单的把化疗药物与多肽连接，或在包埋了化疗药物的纳米颗粒或高分子材料里添加多肽，这样会使得大部分多肽由于分子量较大以及带有电荷导致其无法进入细胞，因此目前此类 PDC 大多数只适用于胞外治疗，严重限制了 PDC 的应用范围和药效。

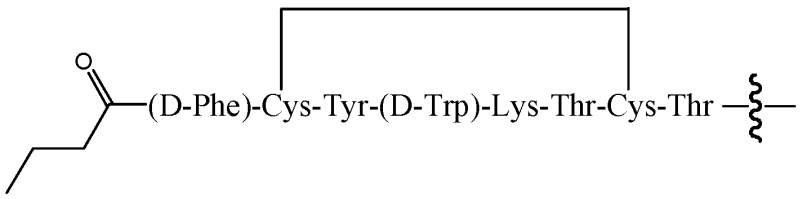
药物偶联体化合物还可以是配体-药物偶联体（LDC），其中配体可以是肽或小分子。然而，从生物利用度、稳定性、疗效到毒性等方面，LDC 的应用存在很多问题。例如，很多配体由于其具有较大分子量、亲脂性或其他属性使其不能进入细胞，这限制了其治疗应用。此外，如果配体与常规化疗药物（例如，多柔比星、紫杉醇等）偶联，则疗效通常较低，而如果其与高效药物分子（例如，MMAE、DM1）偶联，则毒性较大，甚至可能在达到肿瘤治疗的治疗有效量之前就导致动物中毒死亡。

因此领域内还迫切需要获得改进的 LDC，使其可以作用于病变细胞表面广泛存在的较高表达受体、拓宽靶向范围和治疗窗口以及增强药效避免药物副作用。

发明内容

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个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及前列腺特异性膜抗原配体部分。

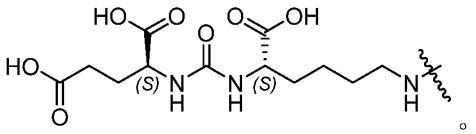
本申请的另一方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及具有式（I）所示的配体部分：



（I）。

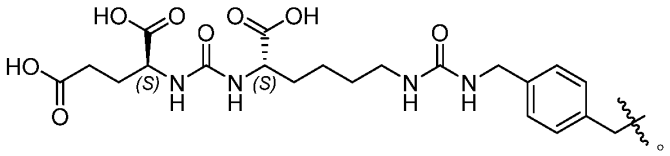
本申请的另一方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及 P10，并且所述有效载荷为喜树碱及其任何衍生物。

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的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



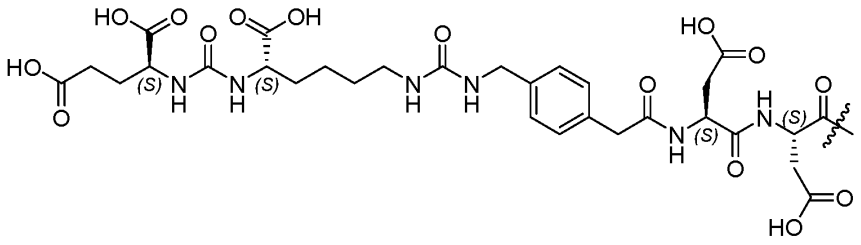
。

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的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：

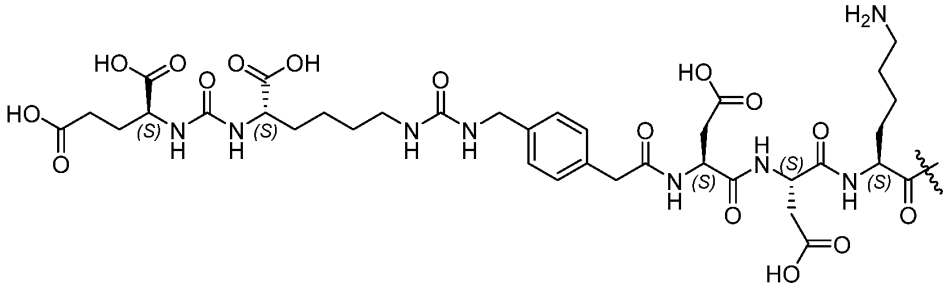


。

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的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



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的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



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的两个靶向分子是不同的。

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的协同作用分子是细胞相互作用分子。

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的两个靶向分子与不同的细胞分子相互作用的细胞相互作用分子。

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的协同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，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的协同作用分子与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)、GNRHR、Her2、Trop2、Her3、NECTIN4、LRP1、GLUT1、EGFR1、AXL、CA9、CD44、Claudin18.2、APN、DLL3、CEACAM5、FZD10、TFRC、MET、IGFR1、SSTR2、CCKBR、LFA1、ICAM、GPR87、GM-CSF、GM-CSFR、TIM3、TLR 家族、CD40、CD40L、OX40、OX40L、GITRL、GITR、4-BBL、4-1BB、CD70、CD27、ICOSL、ICOS、HHLA2、CD28、CD86/80、CD28、MHCII 抗原、TCR、CTLA-4、CD155、CD122、CD113、IGIT、PD-L1、PD1、Galectin-9、TIM-3、HVEM、BTLA、CD160、VISTA、B7-H4、B7-H3、磷脂酰丝氨酸、HHLA2、LAG3、Galectin-3、LILRB4、SIGLEC15、NKG2A、NKG2D、SLAMF7、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、FGFR1、FGFR2、FGFR4、NeuGcGM3 和 CXCR4。

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前列腺特异性膜抗原配体部分以及协同作用分子部分，所述协同作用分子部分与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)、SSTR2 和 GNRHR。

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式（I）所示的配体部分以及协同作用分子部分，所述协同作用分子部分与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、SSTR2 和 GNRHR。

在又一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含 P10 以及协同作用分子部分，所述协同作用分子与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)和 GNRHR。

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的协同作用分子是叶酸或其类似物。在一些实施方式中，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。

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。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、和蛋白。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：喜树碱及其任何衍生物、澳瑞他汀及其任何衍生物、美登素及其任何衍生物、放射性核素络合物、环氧化酶-2 抑制剂、紫杉醇及其任何衍生物、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，小分子化合物是喜树碱及其任何衍生物、澳瑞他汀及其任何衍生物、美登素及其任何衍生物、放射性核素络合物或者环氧化酶-2 抑制剂。

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包含的有效载荷通过连接子与至少一个所述靶向分子连接。

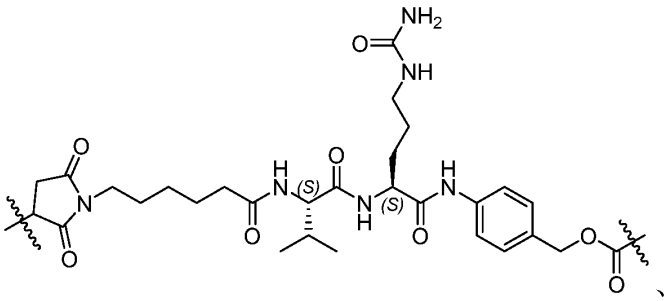
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的连接子是肽类连接子、二硫化物连接子、pH 依赖型连接子或者上述连接子的组合。

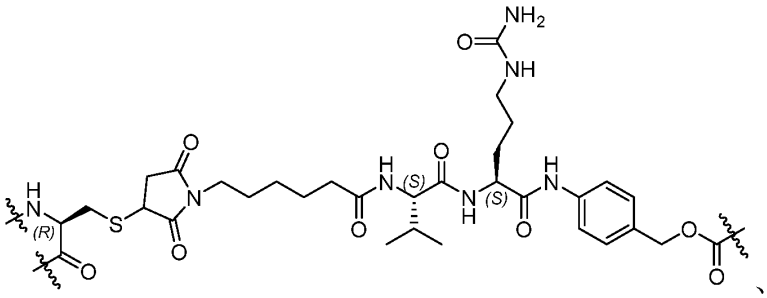
在一些实施方式中，肽类连接子可在特定的生理环境下通过蛋白酶裂解或还原裂解。在一些实施方式中，肽类连接子选自下组：半胱氨酸、赖氨酸、赖氨酸-赖氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-赖氨酸、半胱氨酸-赖氨酸、半胱氨酸-谷氨酸、天冬氨酸-天冬氨酸和天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸，可选的，上述氨基酸中的羧酸被酰胺化。

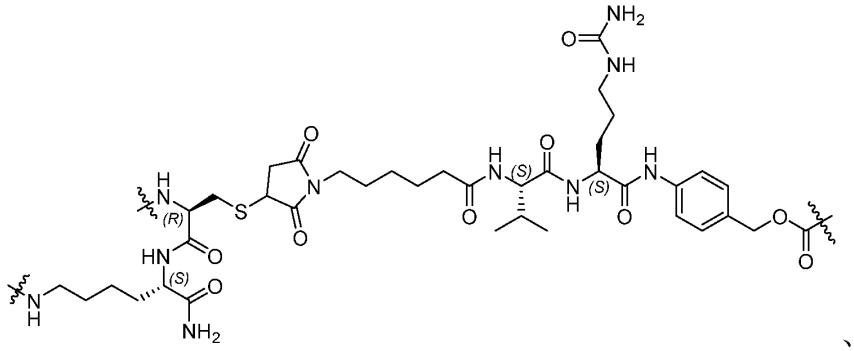
在一些实施方式中，二硫化物连接子选自下组：DMDS、MDS、DSDM 和 NDMDS。

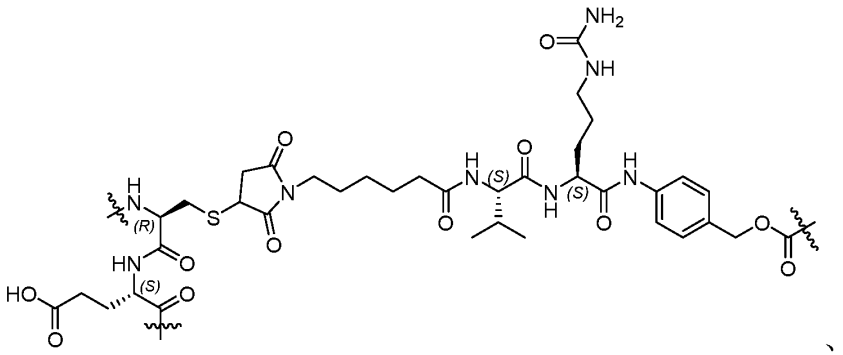
在一些实施方式中，pH 依赖型连接子是顺乌头酸酐。

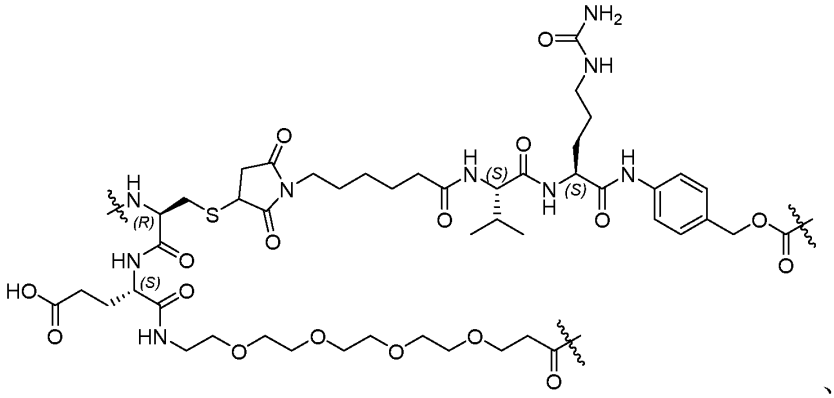
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子包括如下结构：

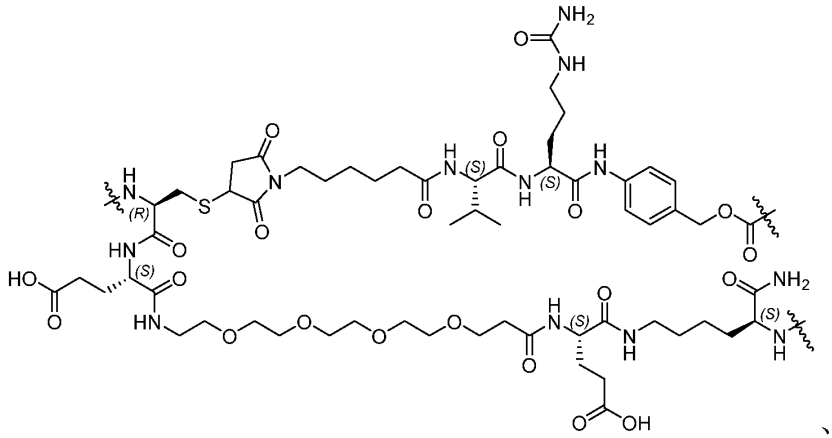


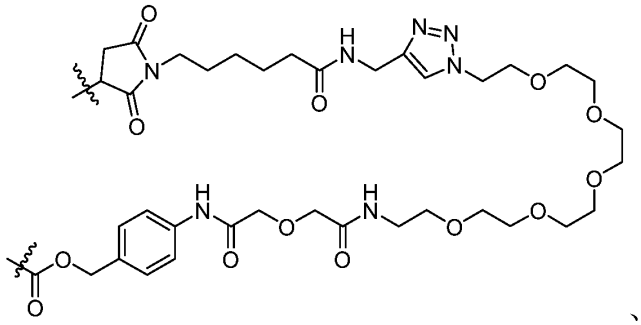


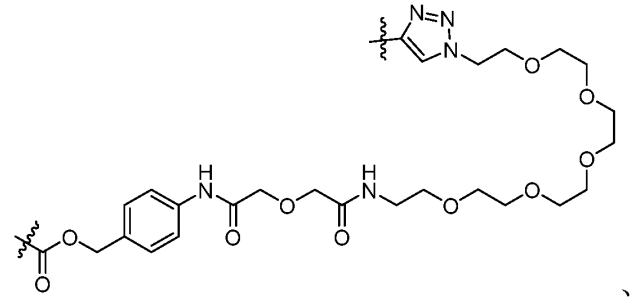


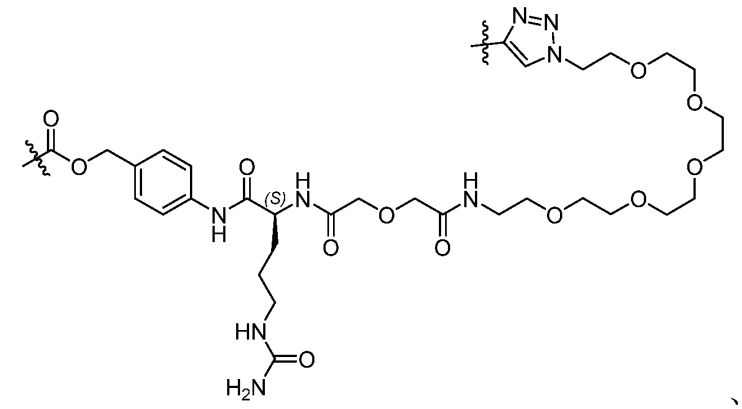




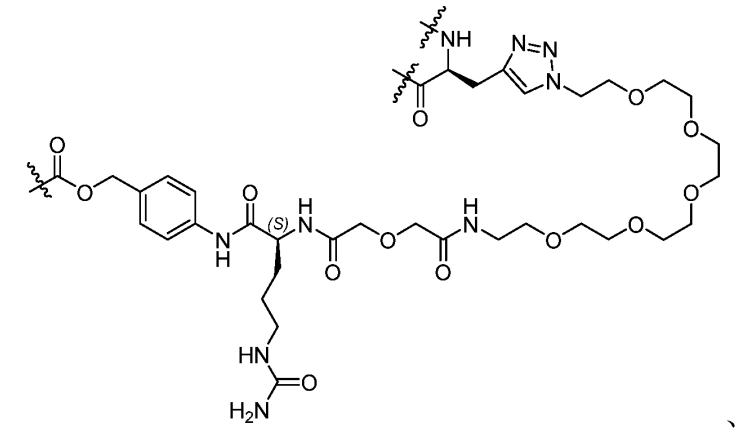




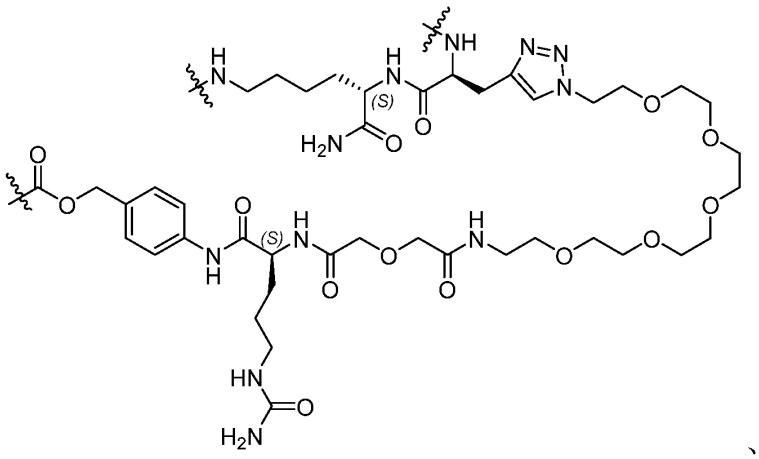




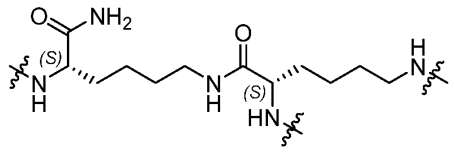
、



、



、

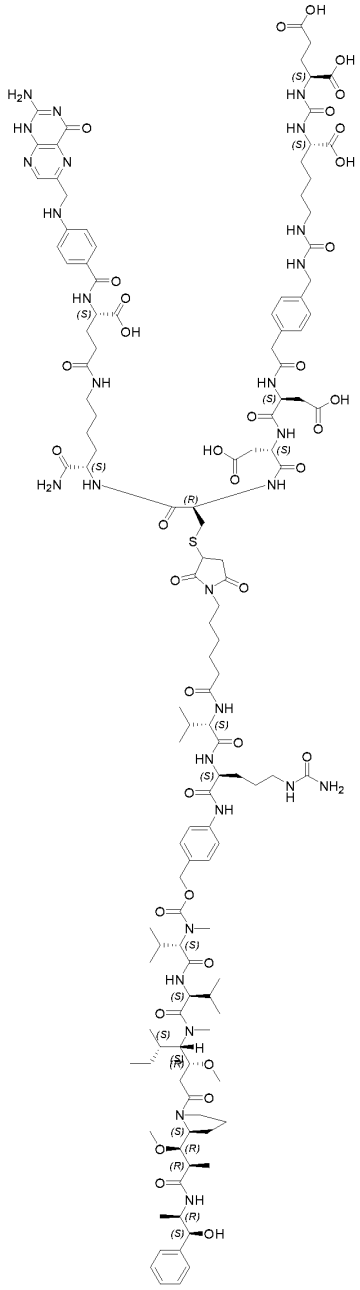


，

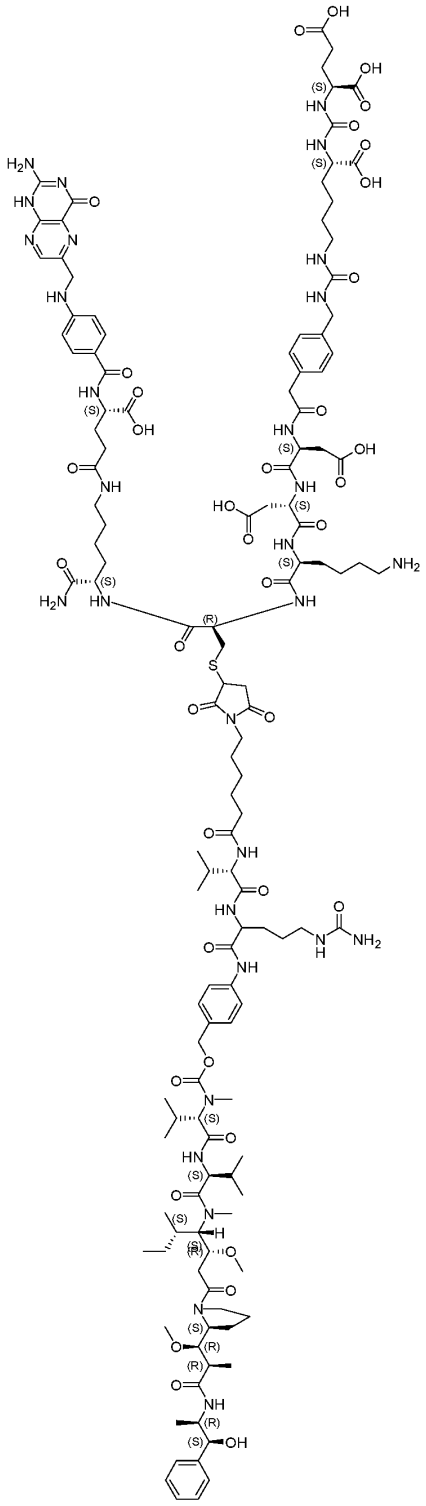
或者所述连接子是上述结构与肽类连接子的组合。

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包含的两个靶向分子通过间隔区连接。在一些实施方式中，本申请所述的间隔区包含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。

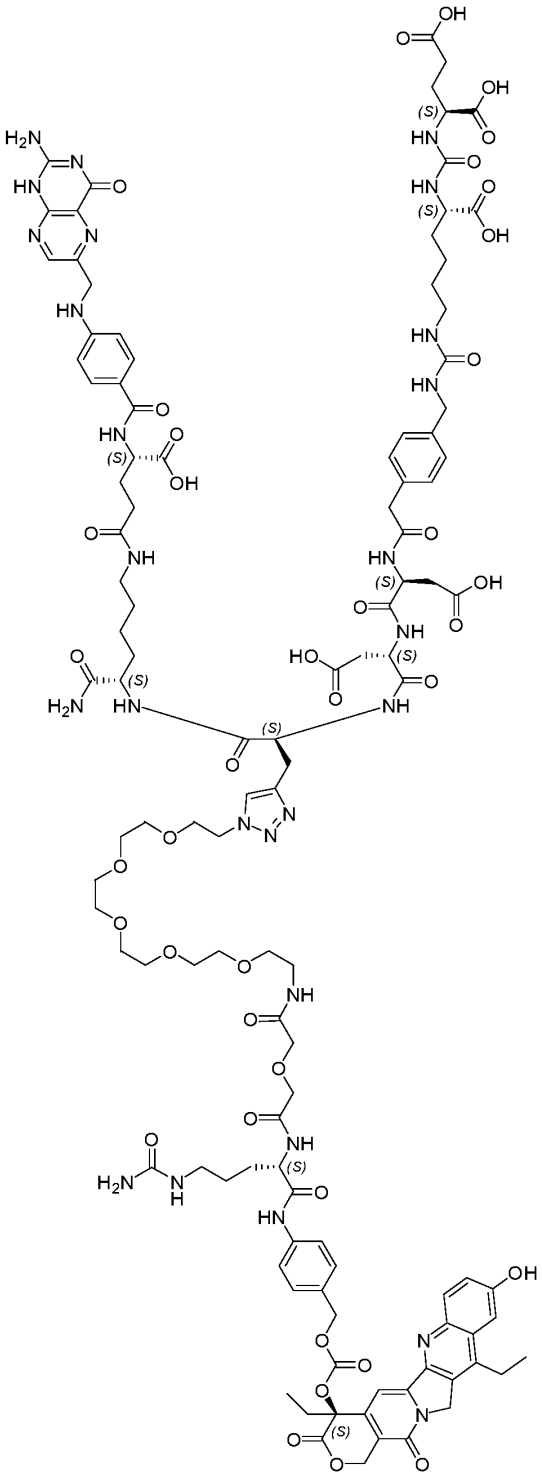
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-20B，其结构式如下：



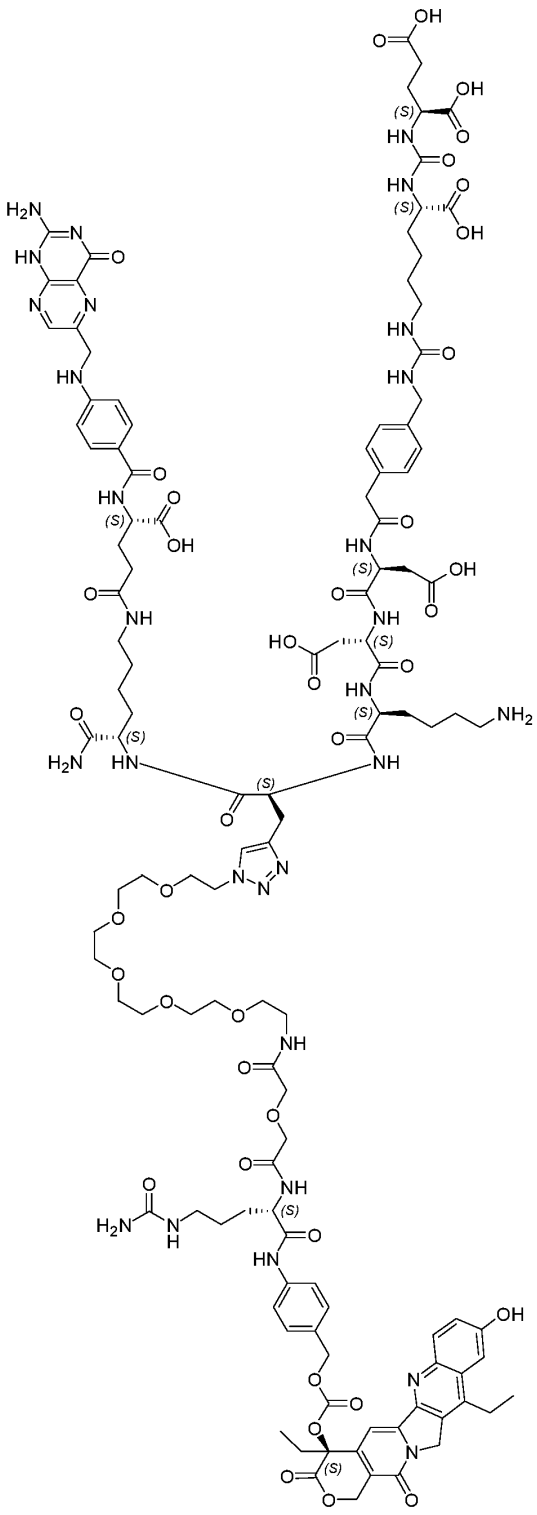
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-20BK，其结构式如下：



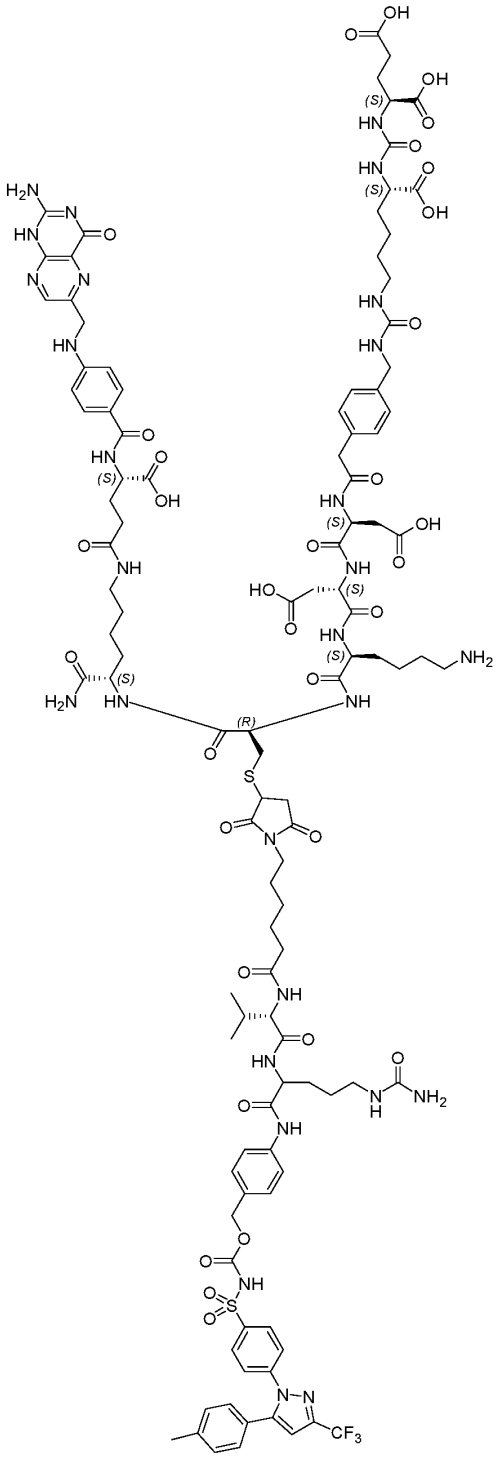
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-60S，其结构式如下：



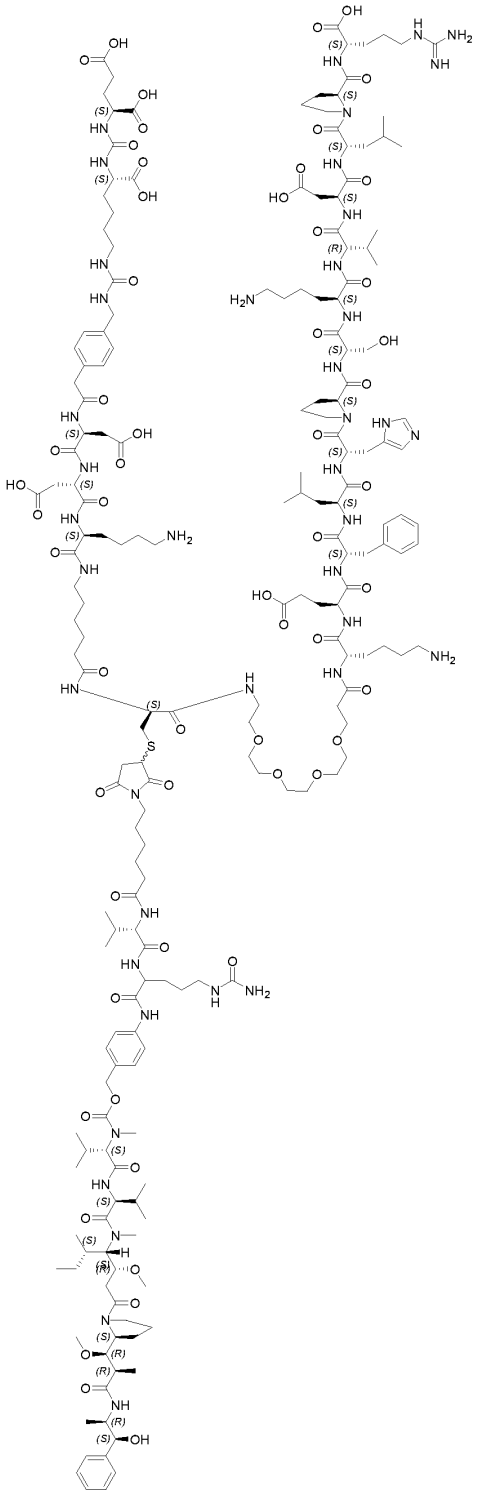
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-60SK，其结构式如下：



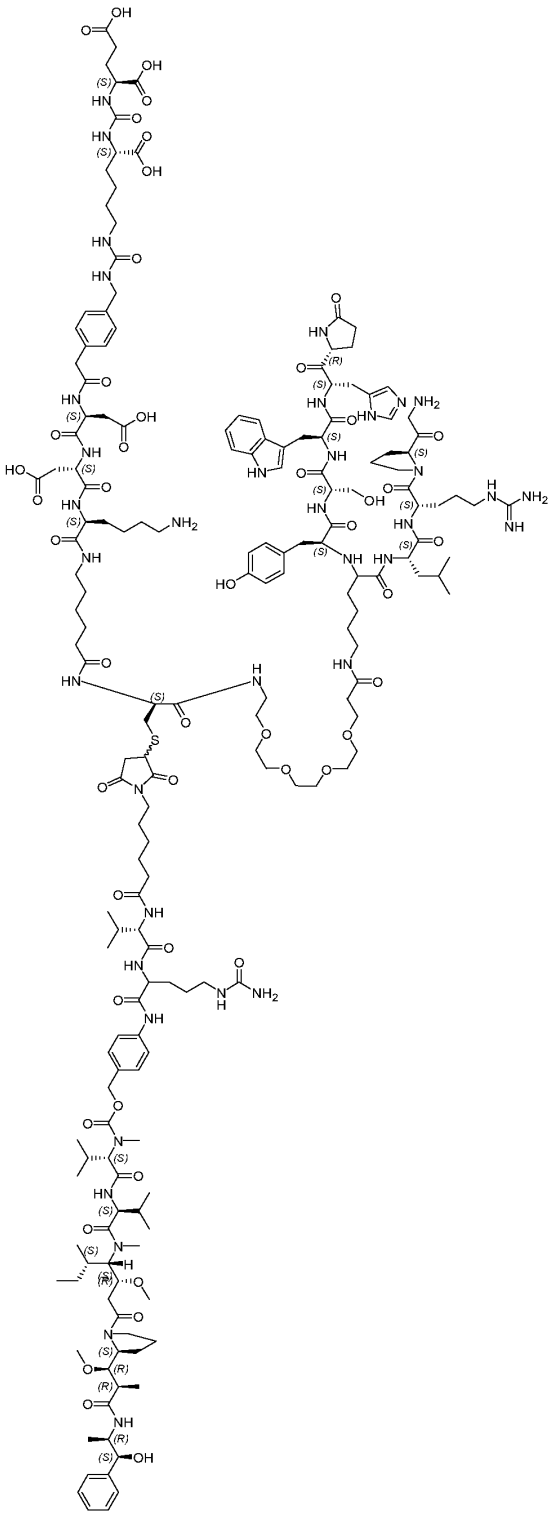
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-20C，其结构式如下：



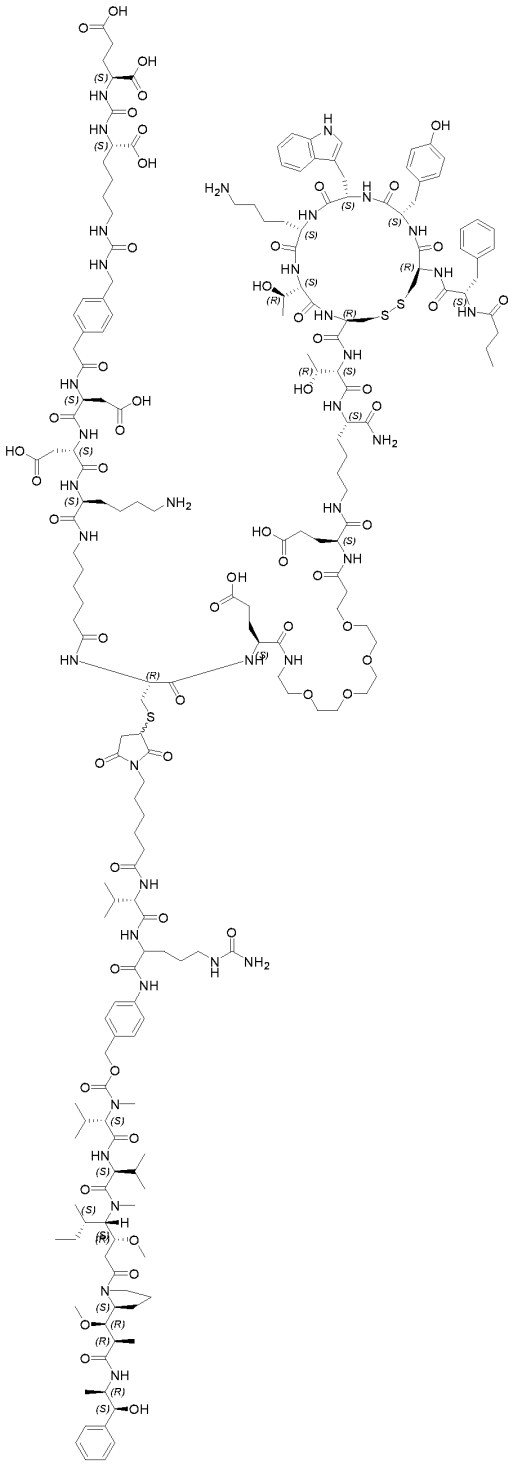
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为CB-1020，其结构式如下：



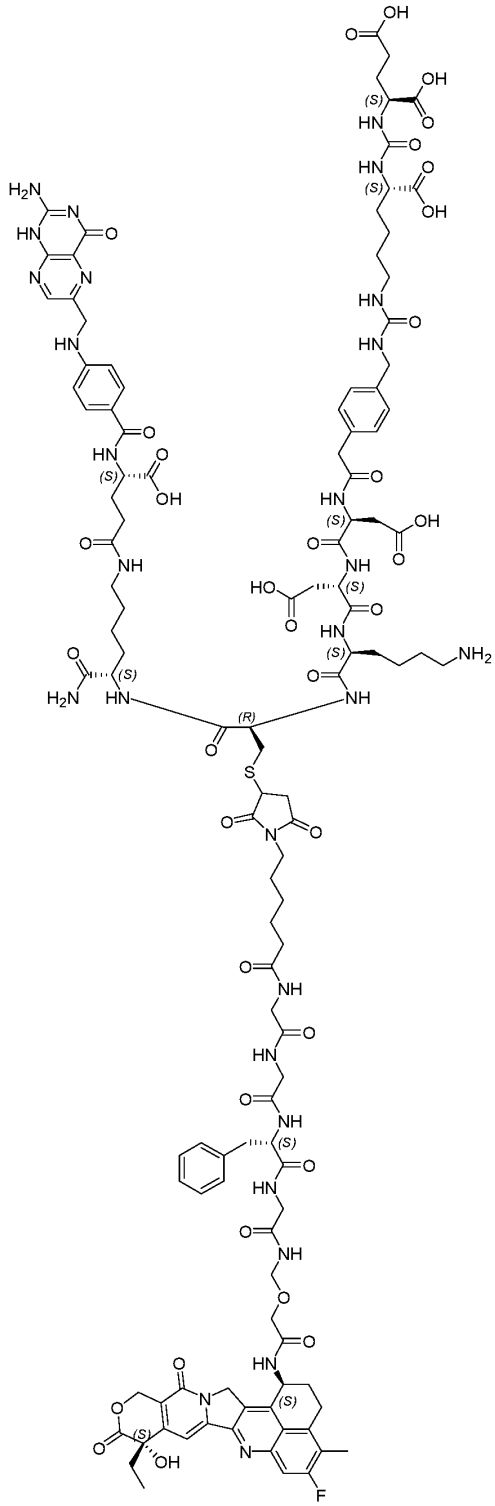
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-1320，其结构式如下：



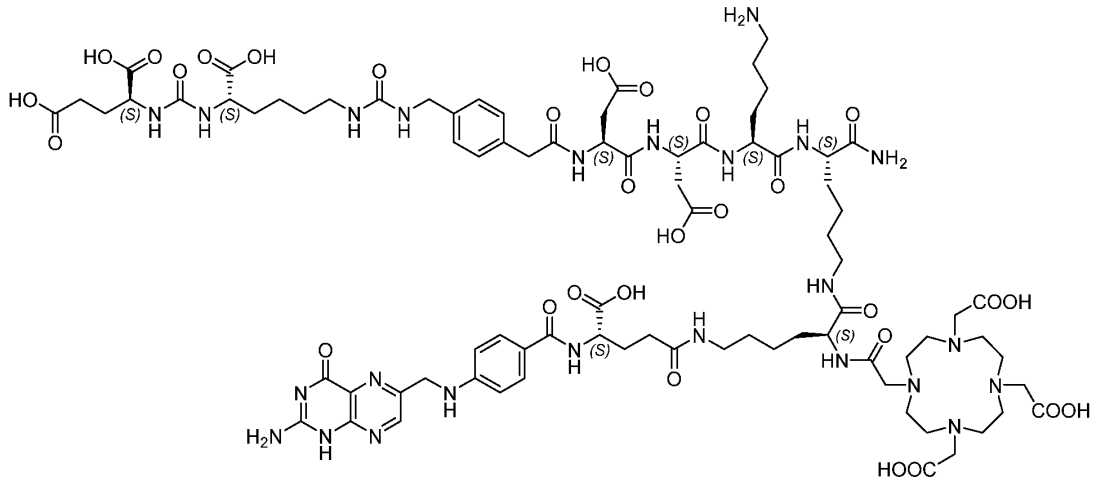
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-1820，其结构式如下：



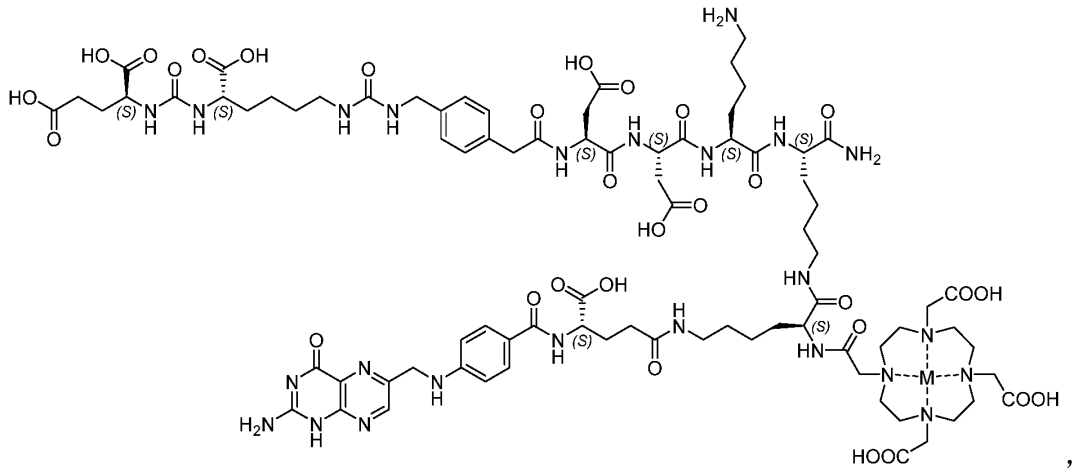
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为CR19428，其结构式如下：



在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 20R-SM09，其结构式如下：



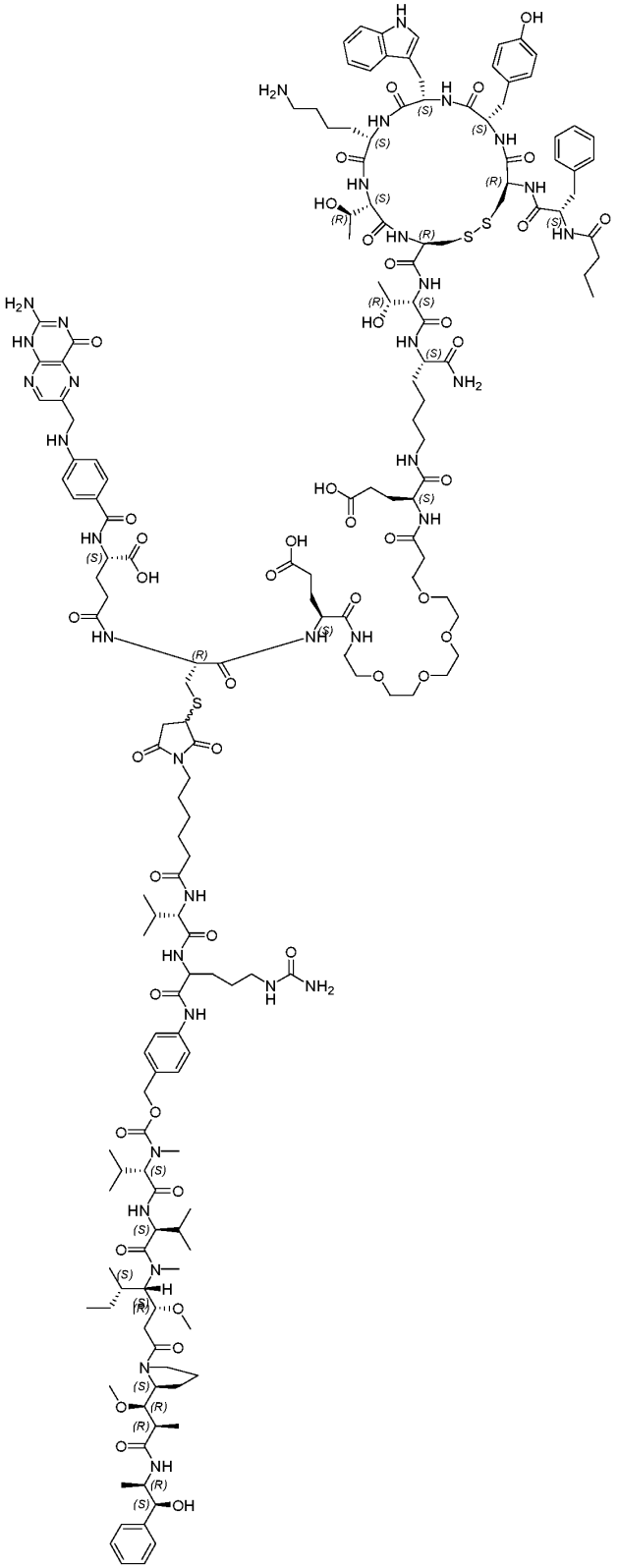
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-20R，其结构式如下：



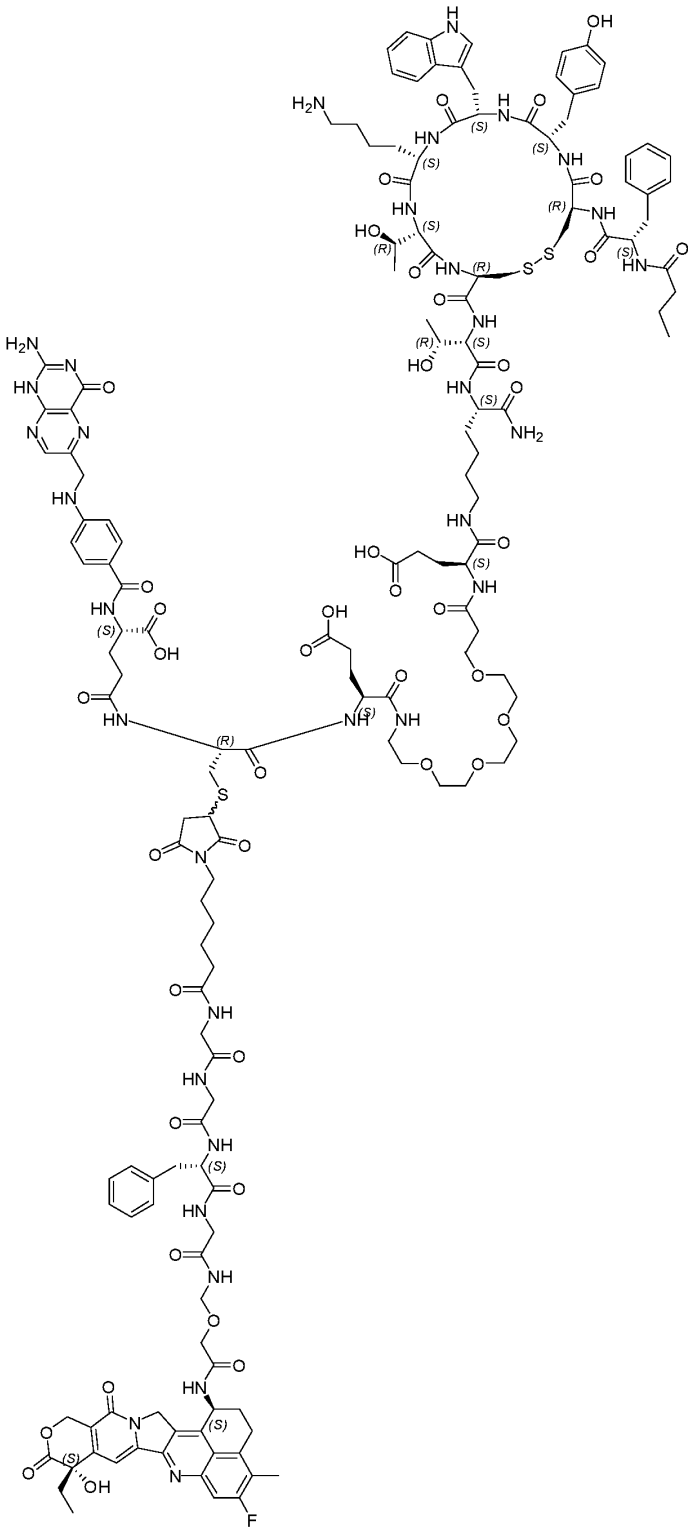
，

其中 M 为放射性核素。

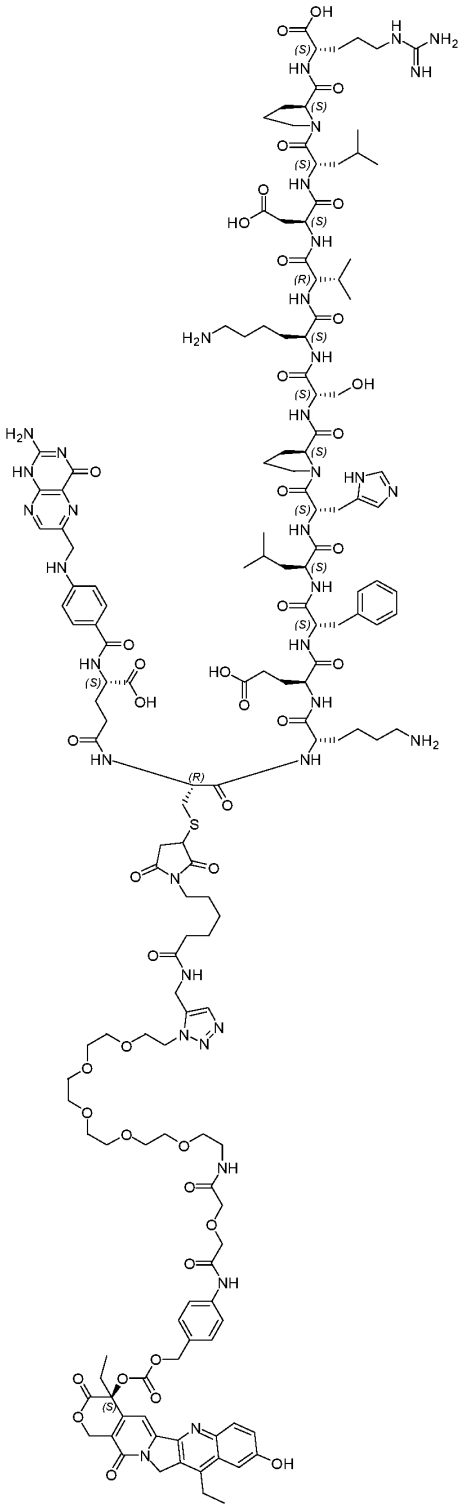
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-18G，其结构式如下：



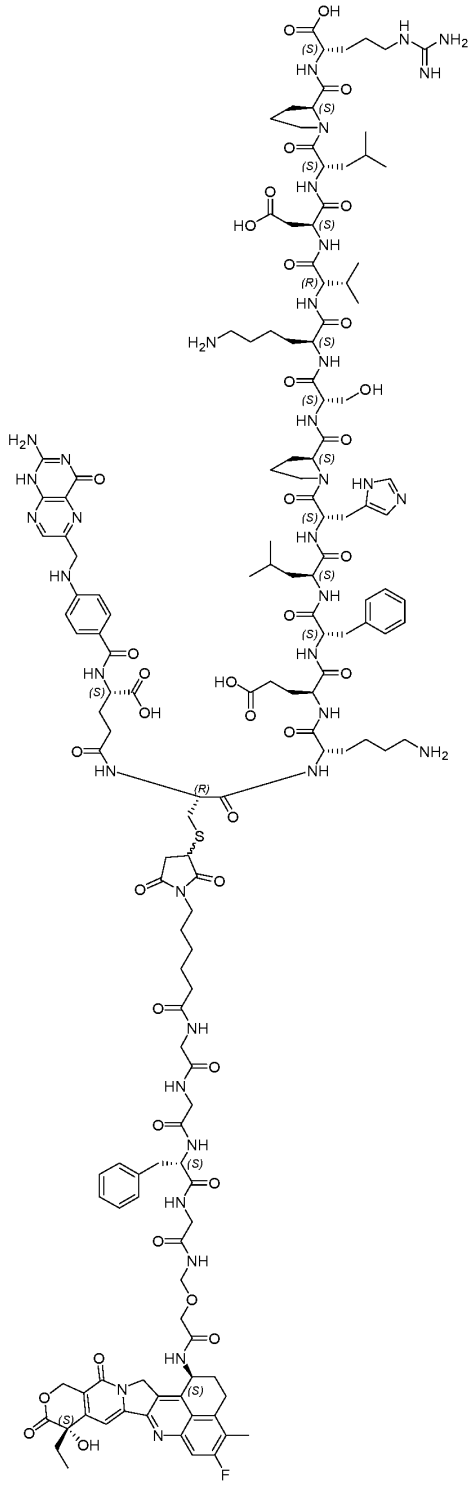
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CR19426，其结构式如下：



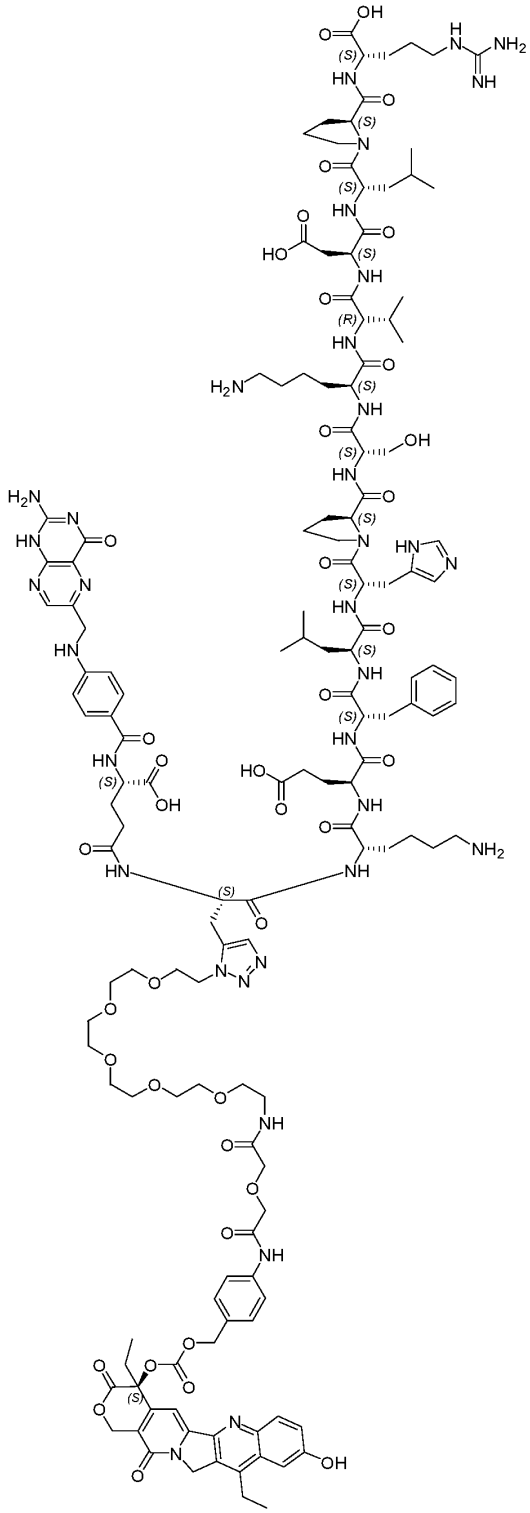
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为CB-10S，其结构式如下：



在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为CR19425，其结构式如下：



在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物为 CB-50S，其结构式如下：



本申请的另一方面公开了一种药物组合物，其包含本申请中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，所述组合物用于静脉内、皮下、口服、肌内或心室内施用。

本申请的另一方面公开了用于向有需要的对象递送有效载荷的方法，包括向所述对象施用治疗有效量的本申请中所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐、或者本申请中所述的药物组合物。

本申请的另一方面公开了一种用于治疗对象中的疾病的方法，包括向所述对象施用治疗有效量的本申请中所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请中所述的药物组合物。

在一些实施方式中，本申请中用于治疗对象中的疾病的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。

本申请的又一方面公开了一种本申请中所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请中所述的药物组合物在制备治疗对象中疾病的药物中的用途。

本申请的又一方面公开了一种用于治疗对象中疾病的本申请中所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请中所述的药物组合物。

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。

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

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。

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。

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。

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。

附图说明

图 1 显示了偶联体化合物 CB-20B、CB-20BK、CB-60S、CB-60SK、CB-20C、CB-1020、CB-1320、CB-1820、CR19428、20R-SM09、CB-20R、CB-18G、CR19426、CB-10S、CR19425 和 CB-50S 的化学结构式。

图 2A 显示了 Cy5-pep-20BK 与不同细胞结合和内吞的随时间变化的曲线（从上往下依次为LNCaP 细胞、SKOV3 细胞、DU145 细胞和 NCI-H460 细胞）。图 2B 显示了 Cy5-pep-20AK 与不同细胞结合和内吞的随时间变化的曲线（从上往下依次为 LNCaP 细胞、SKOV3 细胞、DU145 细胞和 NCI-H460 细胞）。

图 3 显示了 Cy5-FA 与不同细胞结合和内吞的随时间变化的荧光照片。其中显示完整的圆形的为细胞核的荧光，呈点状分布的为 Cy5-FA 的荧光。

图 4A 显示了偶联体化合物 CB-20BK 对图示的肿瘤细胞扩增的抑制活性。图 4B 显示了偶联体化合物 CB-20B 对图示的肿瘤细胞扩增的抑制活性。图 4C 显示了偶联体化合物 CB-10S 对图示的肿瘤细胞扩增的抑制活性。图 4D 显示了偶联体化合物 CB-60S 对图示的肿瘤细胞扩增的抑制活性。图 4E 显示了偶联体化合物 CB-60SK 对图示的肿瘤细胞扩增的抑制活性。图 4F 显示了偶联体化合物 CB-18G 对图示的肿瘤细胞扩增的抑制活性。图 4G 显示了偶联体化合物 CB-50S 对图示的肿瘤细胞扩增的抑制活性。

图 5A-5E 显示了偶联体化合物 CB-20BK 在小鼠体内对肿瘤的抑制效果。

图 6A-6C 显示了偶联体化合物 CB-20B 在小鼠体内对肿瘤的抑制效果。

图 7A-7E 显示了偶联体化合物 CB-18G 在小鼠体内对肿瘤的抑制效果。

图 8A-8B 显示了注射用 CBP-1018 对肺癌 LU2505 模型和肺癌 LU1206 模型肿瘤体积的影响。

具体实施方式

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。

如本文和所附权利要求中所使用的，单数形式“一”、“一个”、“一种”和“所述”包括复数对象，除非上下文清楚地表示不是这样。术语“一”（或“一个”）、“一个或

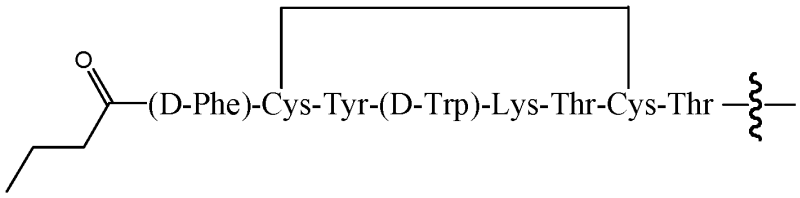
多个”和“至少一个”在本申请中可以互换使用。还应当注意的是，术语“包含”、“包括”和“具有”可以互换使用。

如本文和所附权利要求中所使用的，术语“类似物”包括结构类似物与功能类似物。其中结构类似物是指具有相似化学结构的一类化合物，它们之间可以存在一个或多个不同的原子、或一个或多个不同的官能团。功能类似物是指具有相同或相似的化学作用、生物作用或药理学作用的一类化合物。例如，叶酸类似物包括了 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。

如本文和所附权利要求中所使用的，术语“衍生物”是指针对某一母体化合物分子，其一个或多个原子或原子团被其他原子或原子团取代而衍生出的一类较复杂的化合物。例如，喜树碱衍生物包括了伊立替康、SN-38、Dxd、拓扑替康、GI-147211C、托泊替康、9-氨基喜树碱、7-羟甲基喜树碱、7-氨基甲基喜树碱、10-羟基喜树碱、(20S)-喜树碱、9-硝基喜树碱、吉马替康、karenitecin、silatecan、勒托替康、依沙替康、二氟替康、贝洛替康、勒托替康和 S39625

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个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及前列腺特异性膜抗原配体部分。

本申请的另一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个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及具有式（I）所示的配体部分：



（I）。

本申请的另一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个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及 P10，并且所述有效载荷为喜树碱及其任何衍生物。

在本申请中使用的术语“有效载荷”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分子或物质。在一些实施方案中，所述有效载荷具有小于或等于约 5kDa 的分子量。在一些实施方案中，所述有效载荷具有小于或等于约 1.5kDa 的分子量。在一些实施方案中，所述有效载荷是已

经被适当的药物审批和注册机构（例如，FDA，EMEA 或 NMPA）认为使用安全且有效的药物或诊断试剂。

在一些实施方式中，本申请的有效载荷是小分子化合物、核苷酸（例如，DNA、质粒 DNA、RNA、siRNA、反义寡核苷酸或核酸适体等）、肽或蛋白（例如，酶）。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，本申请的有效载荷包括但不限于：抗癌药、放射性物质、维生素、抗-AIDS 药物、抗生素、免疫抑制剂、抗病毒药物、酶抑制剂、神经毒素、阿片样药物、细胞-胞外基质相互作用的调节剂、血管扩张剂、抗高血压药、安眠药、抗组胺剂、抗惊厥药、肌肉松弛药、抗-帕金森物质、抗-痉挛药和肌肉收缩药、抗-寄生虫和/或抗-原生动物药、镇痛药、解热剂、甾体和非甾体抗炎药、抗-血管生成因子、抗分泌因子、抗凝血剂和/或抗血栓形成剂、局部麻醉药、前列腺素、抗抑郁剂、抗精神病药物、止吐药或成像剂。

在一些实施方式中，本申请的有效载荷在连接至本申请的偶联体化合物之前具有游离的氨基或者羧基，有效载荷通过上述氨基或者羧基与偶联体化合物的相应部分（例如，连接子）的基团发生酰化反应从而偶联至偶联体化合物。在一些实施方式中，对上述游离的氨基或者羧基的修饰（例如，通过偶联至本申请的偶联体化合物）会显著降低有效载荷的活性（例如，降低至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%）。

在本申请中使用的“小分子化合物”指的是具有小于或等于约 2kDa 分子量的化合物。在一些实施方式中，小分子化合物具有小于或等于约 1.5kDa 的分子量。在一些优选的实施方式中，小分子化合物具有小于或等于约 1kDa、800Da、700Da、600Da 或 500Da 的分子量。在一些实施方式中，本申请的小分子化合物选自下组：喜树碱及其任何衍生物（例如，SN38 或 Dxd）、澳瑞他汀及其任何衍生物（例如，MMAE 和 MMAF）、美登素及其任何衍生物、环氧化酶-2 抑制剂（例如，塞来昔布）、放射性核素络合物、紫杉醇及其任何衍生物、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，小分子化合物是喜树碱及其任何衍生物、澳瑞他汀及其任何衍生物、放射性核素络合物或者环氧化酶-2 抑制剂。在一些实施方式中，本申请所述的小分子化合物是用于缓解或治疗癌症的药物。在一些实施方式中，本申请所述的小分子化合物是用于缓解或治疗自身免疫性疾病的药物。

本申请中使用的术语“喜树碱”是指一种细胞毒性生物碱，主要来源于珙桐科植物喜树，其显示出较强的抗肿瘤活性。本申请的喜树碱及其衍生物包括目前已经存在的或者之后产生的喜树碱及其衍生物。本申请的喜树碱及其衍生物包括但不限于：喜树碱、伊立替康、SN-38、Dxd、拓扑替康、GI-147211C、托泊替康、9-氨基喜树碱、7-羟甲基喜树碱、7-氨基甲基喜树碱、10-羟基喜树碱、(20S)-喜树碱、9-硝基喜树碱、吉马替康、karenitecin、silatecan、勒托替康、依沙替康、二氟替康、贝洛替康、勒托替康和 S39625。

本申请中使用的术语“澳瑞他汀及其任何衍生物”是指天然抗肿瘤产品海兔毒素 10 以及其一系列衍生物，该类化合物通过干扰微观自组装使细胞停滞于有丝分裂期，对细胞具有很强的杀伤力。本申请的澳瑞他汀及其任何衍生物包括目前已经存在的或者之后产生的澳瑞他汀及其任何衍生物。本申请的奥瑞他汀及其衍生物包括但不限于澳瑞他汀、单甲基澳瑞他汀 E（MMAE）、单甲基澳瑞他汀 F（MMAF）、一甲基澳瑞他汀 D（MMAD）、AFP 和 AFHPA。

本申请中使用的术语“环氧化酶-2 抑制剂”是一类特异性的环氧化酶-2 抑制剂。环氧化酶-2 通过多种机制参与恶性肿瘤的发展和浸润，环氧化酶-2 抑制剂能抑制肿瘤细胞的迁移和黏附以及血管内浸润，从而抑制恶性肿瘤的发生和发展。本申请的环氧化酶-2 抑制剂包括目前已经存在的或者之后产生的环氧化酶-2 抑制剂。环氧化酶-2 抑制剂包括但不限于塞来昔布、罗非昔布、帕瑞昔布、瓦德昔布和依妥昔布。

本申请中使用的术语“放射性核素络合物”是指含有放射性核素的一类特殊络合物，络合物中的螯合剂能够与放射性核素螯合，并提供更稳定地结合靶向物质的连接部分。本申请中使用的术语“放射性核素”是指能自发地放出射线（例如 α 射线、β 射线或 γ 射线等）的元素。本申请的放射性核素包括目前已经存在的或者之后产生的所有能用于治疗和诊断的放射性核素。本申请的放射性核素包括但不限于 ^{67}Cu、^{64}Cu、^{90}Y、^{109}Pd、^{111}Ag、^{149}Pm、^{153}Sm、^{165}Ho、^{166}Ho、^{177}Lu 、^{186}Re、^{188}Re、^{99m}Tc、^{67}Ga、^{68}Ga、^{111}In、^{90}Y、^{177}Lu、^{186}Re、^{188}Re、^{197}Au、^{198}Au、^{199}Au、^{105}Rh、^{161}Tb、^{149}Pm、^{44}Sc、^{47}Sc、^{70}As、^{71}As、^{72}As、^{73}As、^{74}As、^{76}As、^{77}As、^{212}Pb、^{212}Bi、^{213}Bi、^{225}Ac、^{117m}Sn、^{67}Ga、^{201}Tl、^{123}I、^{131}I、^{160}Gd、^{148}Nd、^{89}Sr 和 ^{211}At。在一些实施方式中，螯合剂是大环螯合剂。本申请的螯合剂包括但不限于 H2dedpa、H4octapa、H2azapa、DTPA、CHX-A’’-DTPA、DTPA-bis anhydride、Maleimide-DTPA、DTPA(tBu)4、DiamSar CB-TE2A、Cyclam、DO2A、DOTA、OTA-GA(tBu)$_4$、Maleimide-DOTA-GA、p-NCS-Bz-DOTA-GA、NH2-DOTA-GA、DOTA-GA anhydride、DOTA-tris(tBu) ester、Propargyl-DOTA-tris(tBu) ester、DO3AM-acetic acid、DO3AM-N-(2-aminoethyl)ethanamide、DO3AtBu-N-(2-aminoethyl)ethanamide、DOTA-di(tBu)ester、DOTA-tris(tBu)ester NHS ester、DOTA-NHS ester、Propargyl-DOTA-tris(tBu) ester、DOTADOTA-GA anhydride、DOTA-GA(tBu)$_4$、p-NCS-Bz-DOTA-GA、NH2-DOTA-GA、Maleimide-DOTA-GA、AGuIX、Gado-H、CYCLEN、DO2AtBu、DO3AtBu、DO3AEt、DO3AM、DOTAEt、DOTPrEt、cis-Glyoxal-Cyclen、Mono-N-Benzyl-Cyclen、trans-N-Dibenyl-Cyclen、TriBOC-Cyclen、Mono-N-Benzyl-TACN、DiBOC-TACN、Cross-bridge-Cyclam (CB-Cyclam)、(13)aneN4、TACN、TACN·3HCl、TACD、Mono-N-benzyl-TACD、DiBOC-TACD、1,7-Dioxa-4,10-diazacyclododecane、C-Methyl-Ester-Cyclam、C-Carboxylic-Acid-Cyclam、trans-N-Dimethyl-Cyclam、TETRAM、TETAEt、TETAMEt2、TETAMMe2、TETAM、CPTA、CB-Cyclam derivatives、CB-TE2A、Methylamino-(13)aneN4、Bis-(13)aneN4、Oxo-(13)aneN4、Mono-N-Benzyl-(13)aneN4、

TriBOC-(13)aneN4、TRITRAM、TRI3AEt、TRI3AtBu、TRITAM、TRITA、Mono-N-Benzyl-Cyclam、Formaldehyde-Cyclam、cis-Glyoxal-Cyclam、Dioxocyclam、Oxocyclam、trans-N-Dibenzyl-Cyclam、TriBOC-Cyclam、DOTP、DOTMA、TETA、DOTAM、DiAmSar、CB-Cyclam、CB-TE2A、NOTA、NOTAM、NH_2-NODA-GA、Iodo-NODA-GA、NCS-MP-NODA、NH2-MPAA-NODA、NODA-GA$(tBu)_3$、NODA-GA-NHS ester、Maleimide-NODA-GA、NOTA-NHS ester、Maleimide-NOTA、Propargyl-NOTA$(tBu)_2$、p-NCS-benzyl-NODA-GA、NOTA$(tBu)_2$、NCS-MP-NODA、NH_2-MPAA-NODA、NH_2-NODA-GA、Iodo-NODA-GA 和 TACN。

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包含一个有效载荷。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包含两个或两个以上有效载荷。例如，本申请的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化合物中，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。

在本申请中使用的术语“靶向分子”指的是能够将本申请的偶联体化合物靶向至靶部位、靶组织、靶器官、靶细胞或靶细胞内区域的任意分子或部分。在一些实施方式中，靶向分子使得，相比于非靶部位、非靶组织、非靶器官、非靶细胞或非靶细胞内区域，靶向分子使得本申请的偶联体化合物在靶部位、靶组织、靶器官、靶细胞或靶细胞内区域分配的更多，例如，多至少 10%、20%、50%、80%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更高。在一些实施方式中，靶向分子使得，相比于不带靶向分子，带有靶向分子的偶联体化合物在靶部位、靶组织、靶器官、靶细胞或靶细胞内区域分配的更多，例如，多至少 10%、20%、50%、80%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更高。在一些实施方式中，靶向分子能够触发或促进含有此类靶向分子的偶联体化合物与靶分子的特异性结合，触发或促进靶细胞对偶联体化合物的内吞作用，触发或促进偶联体化合物在靶细胞周围富集和/或进入靶细胞。

在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物包括至少两个靶向分子。在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物包括的两个或更多的靶向分子是相同的或不同的。在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物包括的两个或更多的靶向分子中至少两个靶向分子是不同的。在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物包括的两个或更多的靶向分子彼此之间都是不同的。在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物包括的两个或更多的靶向分子中至少两个靶向分子是能够与不同的细胞表面蛋白或标记物特异性结合。在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物包括的两个或更多的靶向分子能够与不同的细胞表面蛋白或标记物特异性结合。

在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物包含至少两个靶向分子，其中至少一个为协同作用分子。

在本申请中使用的术语“协同作用分子”是指能够与本申请的偶联体化合物包含的其它靶向分子协同作用，以更好的触发或促进偶联体化合物与靶分子的特异性结合，触发或促进靶细胞对偶联体化合物的内吞作用，触发或促进偶联体化合物在靶细胞周围富集和/或进入靶细胞，和/或以其他形式引起偶联体化合物与靶细胞特异性结合和保留的任意分子或部分。在一些实施方式中，协同作用分子使得，相比于非靶部位、非靶组织、非靶器官、非靶细胞或非靶细胞内区域，协同作用分子分子使得本申请的偶联体化合物在靶部位、靶组织、靶器官、靶细胞或靶细胞内区域分配的更多，例如，多至少 10%、20%、50%、80%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更高。在一些实施方式中，协同作用分子使得，相比于不带协同作用分子，带有协同作用分子的偶联体化合物在靶部位、靶组织、靶器官、靶细胞或靶细胞内区域分配的更多，例如，多至少 10%、20%、50%、80%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更高。在一些实施方式中，协同作用分子使得，相比于不带协同作用分子，带有协同作用分子的偶联体化合物对靶细胞的作用活性更高，例如，高至少 10%、20%、50%、80%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更多。

在一些实施方式中，本申请的协同作用分子是细胞相互作用分子。

在本申请中使用的术语“细胞相互作用分子”指的是能够与靶细胞的细胞表面物质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化合物与细胞的特异性结合，触发或促进靶细胞对偶联体化合物的内吞作用，和/或触发或促进偶联体化合物在靶细胞周围富集和/或进入靶细胞。

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小分子化合物或者是多肽。在一些实施方式中，细胞相互作用分子是小分子化合物或者是包括 2-50、2-40、2-30、2-25、2-22、2-20、2-18、2-15、2-12、2-10、2-8、4-50、5-50、5-40、5-30、5-25、5-22、5-20、5-18、5-15、5-12、5-10、6、7、8、9 个氨基酸的多肽。

在一些实施方式中，靶向分子是能够与细胞表面受体或其它分子结合的配体。在一些实施方式中，至少一个靶向分子是能够与细胞表面受体或其它分子结合的配体。

本申请的配体可以包括各种各样的化学或生物分子，其可以对所选定的靶点具有特异性的结合亲和性，所选定的靶点可以是例如细胞表面受体、细胞表面抗原、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^{-11}M（K_d 值）的亲和性与细胞表面蛋白或标记物结合。在一些实施方式中，本申请的配体以至少 10^{-7}、至少 10^{-8}、至少 10^{-9} M（K_d 值）的亲和性与细胞表面蛋白或标记物结合。在一些实施方式中，本申请的配体以低于 10^{-6}、低于 10^{-7}、低于 10^{-8} M（K_d 值）的亲和性与细胞表面蛋白或标记物结合。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蛋白或标记物结合，所述一定的亲和性是指与同非靶细胞表面蛋白或标记物的亲和性相比，配体对靶细胞表面蛋白或标记物的亲和性高至少两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、八倍、十倍、二十倍、五十倍、一百倍或更多倍。在一些实施方式中，本申请的细胞表面蛋白或标记物在靶细胞（例如，癌细胞）中的表达显著高于在正常细胞中的表达。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。

在一些实施方式中，本申请的细胞表面蛋白或标记物在靶细胞（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 倍至 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 倍至 10 倍、2 倍至 100 倍、2 倍至 1,000 倍、2 倍至 10,000 倍、2 倍至 100,000 倍、2 倍至 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）上的细胞表面蛋白或标记物的水平比较时，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蛋白或标记物在正常细胞中是不能检测到的。

在一些实施方式中，本申请的细胞表面蛋白或标记物是细胞表面受体。

在一些实施方式中，本申请的细胞表面受体选自下组：转铁蛋白受体（TFR）、低密度脂蛋白受体（LDLR）、叶酸受体（FR）、生长素抑制激素受体、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（SSTR2）、GNRH 受体（GNRHR）、TRPV6 和整合素 α 受体。

在一些实施方式中，本申请的细胞表面蛋白或标记物是细胞表面抗原。

在一些实施方式中，本申请的细胞表面抗原选自下组：前列腺特异性膜抗原、MUC1 粘蛋白、急性淋巴母细胞共同抗原、Thy-1 细胞表面抗原、Melan-A 蛋白、鳞状细胞癌抗原、半乳糖凝集素 3 和人类白细胞抗原。

在一些实施方式中，本申请的细胞相互作用分子能与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)、GNRHR、Her2、Trop2、Her3、NECTIN4、LRP1、GLUT1、EGFR1、AXL、CA9、CD44、Claudin18.2、APN、DLL3、CEACAM5、FZD10、TFRC、MET、IGFR1、SSTR2、CCKBR、LFA1、ICAM、GPR87、GM-CSF、GM-CSFR、TIM3、TLR 家族、CD40、CD40L、OX40、OX40L、GITRL、GITR、4-BBL、4-1BB、CD70、CD27、ICOSL、ICOS、HHLA2、CD28、CD86/80、CD28、MHCII 抗原、TCR、CTLA-4、CD155、CD122、CD113、IGIT、PD-L1、PD1、Galectin-9、TIM-3、HVEM、BTLA、CD160、VISTA、B7-H4、B7-H3、磷脂酰丝氨酸、HHLA2、LAG3、Galectin-3、LILRB4、SIGLEC15、NKG2A、NKG2D、SLAMF7、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、FGFR1、FGFR2、FGFR4、NeuGcGM3 和 CXCR4。

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包含前列腺特异性膜抗原配体部分以及协同作用分子部分，所述协同作用分子部分与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)、SSTR2 和 GNRHR。

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包含式（I）所示的配体部分以及协同作用分子部分，所述协同作用分子部分与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、SSTR2 和 GNRHR。

在又一些实施方式中，本申请的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含 P10 以及协同作用分子部分，所述协同作用分子与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)和 GNRHR。

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中的一个协同作用分子是能够介导内吞作用的内吞作用分子部分。在本申请中使用的术语“内吞作用”指的是偶联体化合物或其药学上可接受的盐与靶细胞相互作用后，能够介导其自身被内吞、内化或摄取进入靶细胞。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。

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。

在一些实施方式中，本申请的内吞作用分子是叶酸或其类似物。

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，并且其还能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。

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、甲氨蝶呤和 5, 10-亚甲基四氢叶酸。

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，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、Arg-Gly-Asp（称为 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。

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。

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 β-氟丙氨酸、1-甲基-组氨酸、γ-亚甲基-谷氨酸、α-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。

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. Boil.*, 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的知识范围内。

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得以保持。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。

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。

在一些实施方式中，内吞作用分子是穿膜肽。穿膜肽（**C**ell-**P**enetrating **P**eptides, 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）。

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中的一个靶向分子是前列腺特异性膜抗原配体部分。

在本申请中使用的术语“前列腺特异性膜抗原”，是指存在于前列腺上皮细胞膜的一种II型跨膜糖蛋白，由750个氨基酸组成，其具有19个胞内区氨基酸、24个跨膜区氨基酸和707个胞外区氨基酸。前列腺特异性膜抗原在正常前列腺上皮细胞中表达，但其在前列腺癌细胞中的表达水平要高得多。相对于传统用于临床检测的前列腺特异抗原，前列腺特异性膜抗原是一种更加敏感和特异的前列腺癌肿瘤标记物，尤其是在激素难治性前列腺癌及前列腺癌转移灶中均为高表达，在区分前列腺癌和其他类型恶性肿瘤时具有高敏感度和特异性。同时，在多种非前列腺来源的实体瘤（如肺癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾癌和结直肠癌等）中，前列腺特异性膜抗原也高度特异地表达于肿瘤血管内皮细胞上。

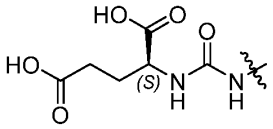
在本申请中使用的术语“前列腺特异性膜抗原配体”是指能特异性识别并结合前列腺特异性膜抗原的抗体、核酸适配体和小分子等。本申请的前列腺特异性膜抗原配体包括目前已经存在的或者之后产生的前列腺特异性膜抗原配体，还包括前述配体的片段，只要这些片段还保留与前列腺特异性膜抗原结合的能力。抗体类配体是最常见的前列腺特异性膜抗原配体，其包括但不限于单克隆抗体J591、J533、J415和E99（例如，参见Liu H, Rajasekaran AK, Moy P等人 *Constitutive and antibody-induced internalization of prostate-specific memberane antigen* [J]. Cancer Res, 1998, 58 (18): 4055-4060）。核酸适配体是经过指数富集配体系统进行技术筛选得到的能与前列腺特异性膜抗原高亲和性、高特异性结合的单链DNA或RNA，该类前列腺特异性膜抗原配体包括但不限于xPSM-A10核酸适配体及其衍生物和xPSM-A9核酸适配体及其衍生物（例如，参见Lupoid SE等人，*Identification and Characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen*, Cncer Res, 2002, 62(14):4029-4033）。相比于抗体类和核酸适配体类配体，前列腺特异性膜抗原小分子配体具有分子量小、高渗透性、低免疫原性、易于合成等优势，其包括但不限于谷胺酰脲类小分子配体和氨基磷酸酯类小分子配体。

在一些实施方式中，本申请的前列腺特异性膜抗原小分子配体可以选自由以下组成的组：2-[[甲基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[乙基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[丙基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[丁基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[环己基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[苯基羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[2-(四氢呋喃基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[(2-四氢吡喃基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[((4-吡啶基)甲基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[((2-吡啶基)甲基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[(苯基甲基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[((2-苯基乙基)甲基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[((3-苯基丙基)甲基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；

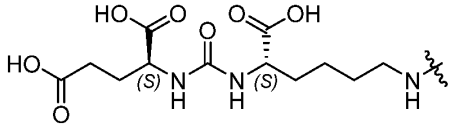
2-[[((3-苯基丁基)甲基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[((2-苯基丁基)甲基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[(4-苯基丁基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；和 2-[[(氨甲基)羟基氧膦基]甲基]戊二酸；2-[[甲基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[乙基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[丙基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[丁基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[苯基羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[((4-吡啶基)甲基)羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[((2-吡啶基)甲基)羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[(苯基甲基)羟基氧膦基]氧]戊二酸；和 2[[((2-苯基乙基)甲基)羟基氧膦基]氧]戊二酸；2-[[(N-羟基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-羟基-N-甲基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-丁基-N-羟基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-苄基-N-羟基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-羟基-N-苯基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-羟基-N-2-苯基乙基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-乙基-N-羟基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-羟基-N-丙基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-羟基-N-3-苯基丙基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-羟基-N-4-吡啶基)氨基甲酰]甲基]戊二酸；2-[[(N-羟基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[N-羟基(甲基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[N-羟基(苄基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[N-羟基(苯基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[N-羟基(2-苯基乙基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[N-羟基(乙基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[N-羟基(丙基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[[N-羟基(3-苯基丙基)酰胺]甲基]戊二酸；和 2-[[N-羟基(4-吡啶基)酰胺]甲基]戊二酸；2-[(亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[(甲基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[(乙基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[(丙基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[(丁基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[(苯基亚硫酰基]甲基]戊二酸；2-[[(2-苯基乙基)亚硫酰基]甲基]戊二酸；2-[[(3-苯基丙基)亚硫酰基]甲基]戊二酸；2-[[(4-吡啶基)亚硫酰基]甲基]戊二酸；2-[(苄基亚硫酰基)甲基]戊二酸；2-[(磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(甲磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(乙磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(丙磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(丁磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(苯基磺酰基]甲基]戊二酸；2-[[(2-苯基乙基)磺酰基]甲基]戊二酸；2-[[(3-苯基丙基)磺酰基]甲基]戊二酸；2-[[(4-吡啶基)磺酰基]甲基]戊二酸；2-[(苄基磺酰基)甲基]戊二酸；2-[(亚砜亚胺基(sulfoximinyl))甲基]戊二酸；2-[(甲基亚砜亚胺基)甲基]戊二酸；2-[(乙基亚砜亚胺基)甲基]戊二酸；2-[(丙基亚砜亚胺基)甲基]戊二酸；2-[(丁基亚砜亚胺基)甲基]戊二酸；2-[(苯基亚砜亚胺基]甲基]戊二酸；2-[[(2-苯基乙基)亚砜亚胺基]甲基]戊二酸；2-[[(3-苯基丙基)亚砜亚胺基]甲基]戊二酸；2-[[(4-吡啶基)亚砜亚胺基]甲基]戊二酸；和 2-[(苄基亚砜亚胺基)甲基]戊二酸；N-[甲基羟基氧膦基]谷氨酸；N-[乙基羟基氧膦基]谷氨酸；N-[丙基羟基氧膦基]谷氨酸；N-[丁基羟基氧膦基]谷氨酸；N-[苯基羟基氧膦基]谷氨酸；N-[(苯基甲基)羟基氧膦基]谷氨酸；N-[((2-苯基乙基)甲基)羟基氧膦基]谷氨酸；和 N-甲基-N-[苯基羟基氧膦基]谷氨酸。本申请的前列腺特异性膜抗原配体还包括 PCT 申请 WO2010/108125 和 WO2006/093991 中公开的所有前列腺特异性膜抗原小分子配体，上述两个专利申请以其全部内容并入本文。

在一些实施方式中，本申请的前列腺特异性膜抗原小分子配体是戊二酸衍生物。在一些实施方式中，本申请的前列腺特异性膜抗原小分子配体是戊二酸的氨羰基衍生物。

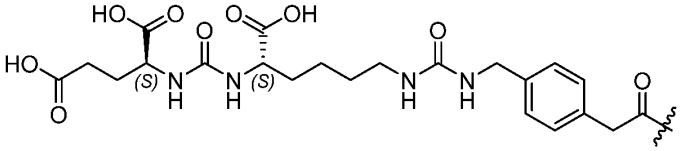
在一些实施方式中，本申请的前列腺特异性膜抗原小分子配体包括如下结构：



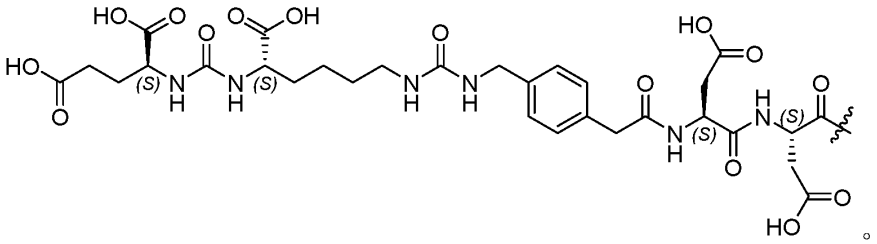
在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



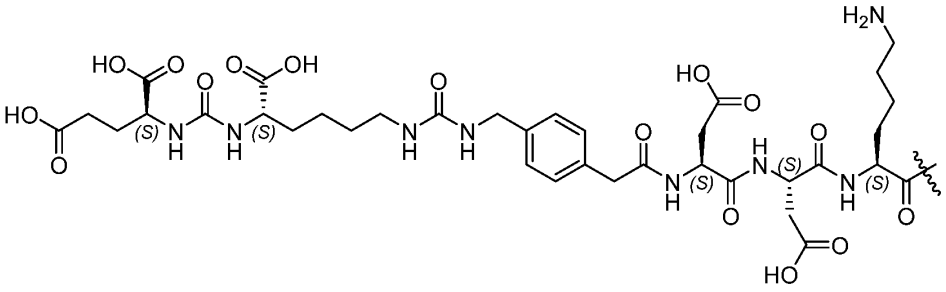
在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



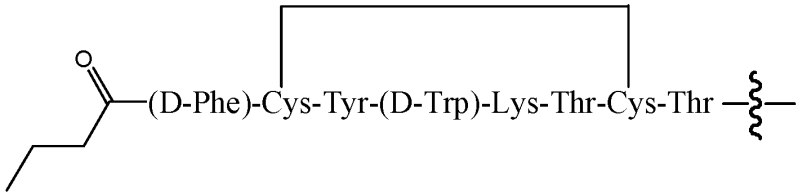
在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



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的前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



在一些实施方式中，本申请的的偶联体化合物或其药学上可接受的盐中一个靶向分子是具有式（I）所示的配体部分：



（I），

或者与其具有至少 70%、至少 80%、至少 85%或至少 90%的氨基酸序列同源性的配体部分或者与其具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸替换（例如，保守性替换）。

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中一个靶向分子是 P10 或者与其具有至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%或至少 93%的氨基酸序列同源性的配体部分或者与其具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸替换（例如，保守性替换）。

在本申请中使用的术语“P10”指的是具有氨基酸序列 Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg 的肽。

在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物具有选自下组组合的靶向分子：（1）叶酸配体和前列腺特异性膜抗原配体；（2）TRPV6 配体和前列腺特异性膜抗原配体；（3）GNRHR 配体和前列腺特异性膜抗原配体；（4）SSTR2 配体和前列腺特异性膜抗原配体；（5）叶酸配体和 SSTR2 配体；或（6）TRPV6 配体和叶酸配体。

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的两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及前列腺特异性膜抗原配体部分。在一些实施方式中，所述协同作用分子能够介导内吞作用。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的两个靶向分子分别为叶酸或其类似物以及前列腺特异性膜抗原配体部分。不希望受到理论的限制，选取特定的叶酸或其类似物以及前列腺特异性膜抗原配体部分，会比现有技术中的配体组合有更好的稳定性。

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的两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及具有式（I）所示的配体部分。在一些实施方式中，所述协同作用分子能够介导内吞作用。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的两个靶向分子分别为叶酸或其类似物以及具有式（I）所示的配体部分。

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的两靶向分子分别为协同作用分子部分以及 P10。在一些实施方式中，所述协同作用分子能够介导内吞作用。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的两个靶向分子分别为叶酸或其类似物以及 P10。

在一些实施方式中，本申请提供的偶联体化合物仅包含与两个靶向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化合物包含与两个靶向分子偶联的多个有效载荷。

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。

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（例如，1 个）和两个靶向分子，其中有效载荷与至少一个靶向分子直接共价连接。在一些实施方式中，有效载荷与两个靶向分子均直接共价连接。

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（例如，1 个）和两个靶向分子，其中有效载荷与至少一个靶向分子通过连接子共价连接。在一些实施方式中，有效载荷与两靶向分子均通过连接子共价连接。

在本申请中使用的术语“连接子”指的是将有效载荷与靶向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靶向分子连接的官能团。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，另一个用于与靶向分子连接。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。在一些实施方式中，连接子含有氨基酸。在一些实施方案中，连接子含有的氨基酸中的羧酸被酰胺化。在一些实施方案中，连接子含有短链的聚乙二醇（例如，包括 2-10、2-8、3-8、4-8、4-7、4-6 或 5 个重复单元）。

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 1 个靶向分子的多价连接子。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靶向分子可以是相同的或不同的。

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血液或血清中的裂解效率高至少 10、20、30、50、100 倍或更多倍。

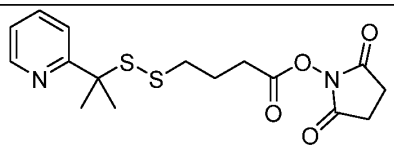
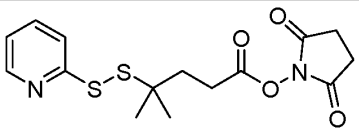
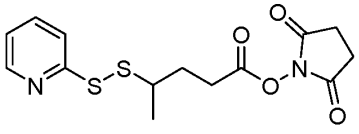
可裂解连接子可以被水解、酶促反应、或还原反应、或通过 pH 改变所裂解。在一些实施方式中，连接子在特定生理环境下（例如，在适宜 pH 环境下）是可裂解的。在一些实施方式中，连接子可在 pH 约 6.5 或更低的酸性环境中裂解，或通过诸如酶等试剂裂解。在一些实施方式中，连接子对裂解剂敏感。例如，pH、氧化还原电位或存在降解分子。

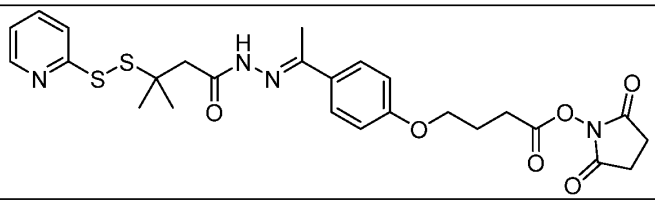
在一些实施方式中，连接子是不可裂解的。在本申请中使用的不可裂解连接子指的是在细胞内代谢期间基本保持完整的连接子。

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 1 至 45、1 至 40、1 至 35、1 至 30、1 至 25、1 至 20、1 至 15、1 至 10、1 至 9、1 至 8、1 至 7、1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3 个、1 至 2 个或 1 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 个或 2 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 1、2、3、4 或 5 个氨基酸。在一些实施方式中，肽类连接子是半胱氨酸、赖氨酸、赖氨酸-赖氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-赖氨酸、半胱氨酸-赖氨酸、半胱氨酸-谷氨酸天冬氨酸-天冬氨酸和天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸，可选的，上述氨基酸中的羧酸被酰胺化。

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。

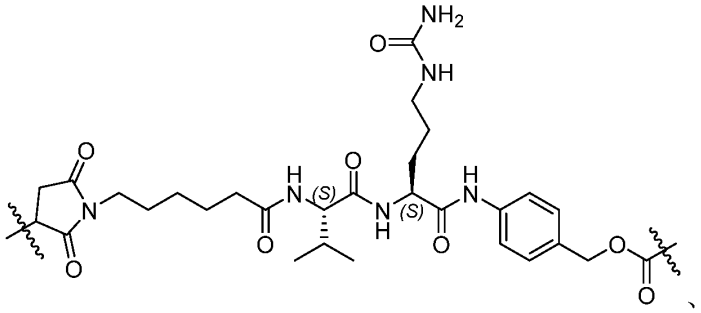
表 1：DSDM、DMDS、MDS 和 NDMDS 的结构

名称	结构
DSDM	
DMDS	
MDS	

NDMDS	

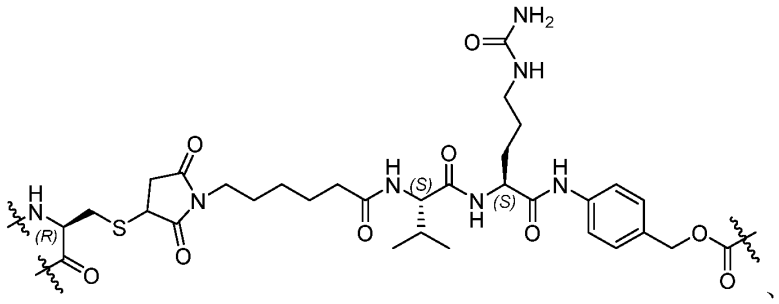
在一些实施方式中，连接子是 pH 依赖型连接子。本申请所述的 pH 依赖型连接子可以在特定 pH 环境下裂解。在一些实施方式中，pH 依赖型连接子可以在碱性条件下稳定，但在酸性条件下（例如，在 6.5 或更低的 pH 值下）裂解。在一些实施方式中，pH 依赖型连接子是顺乌头酸酐。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子是



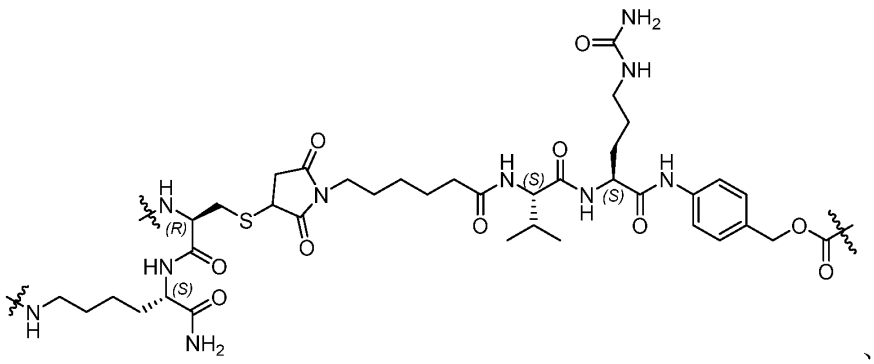
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



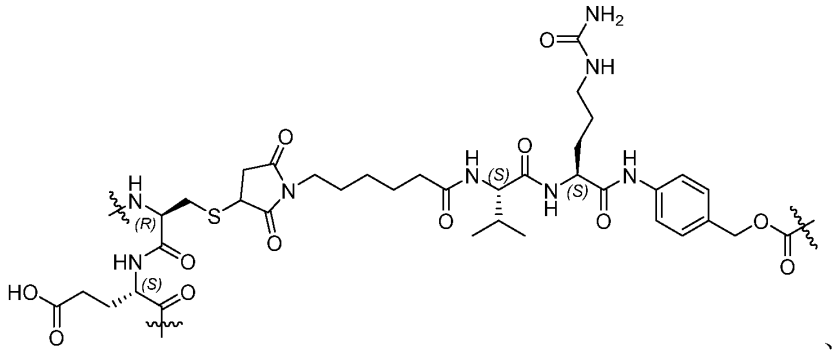
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



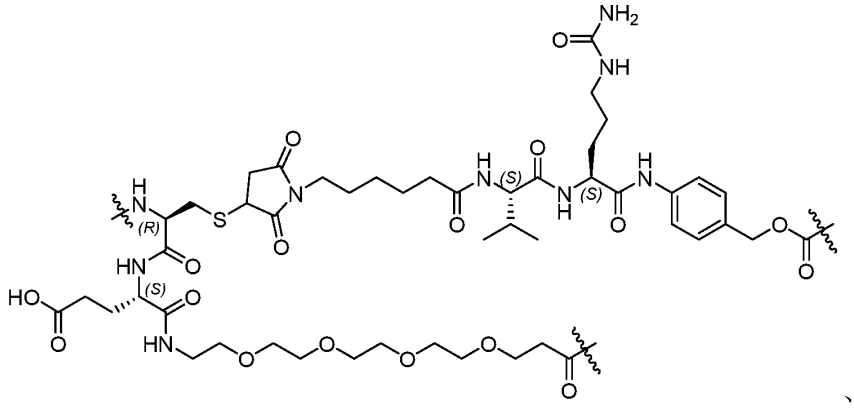
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



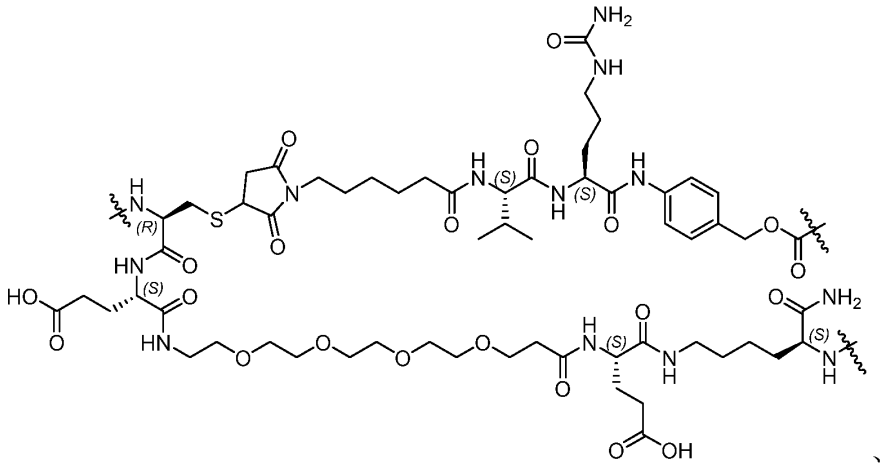
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



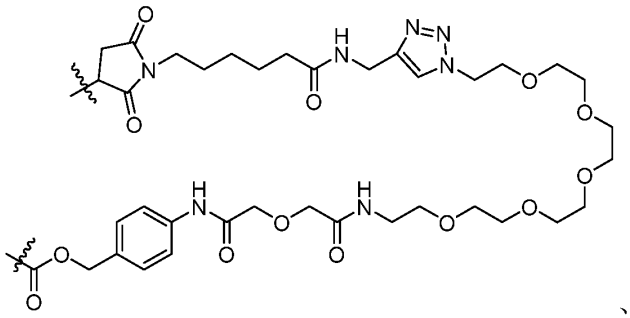
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



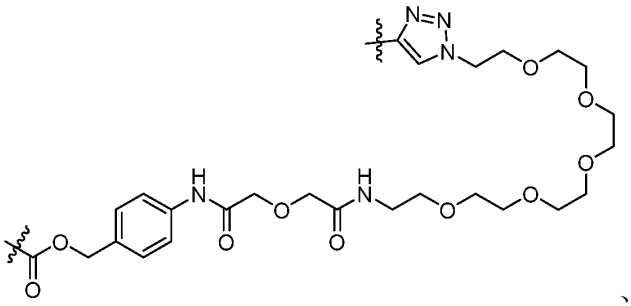
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



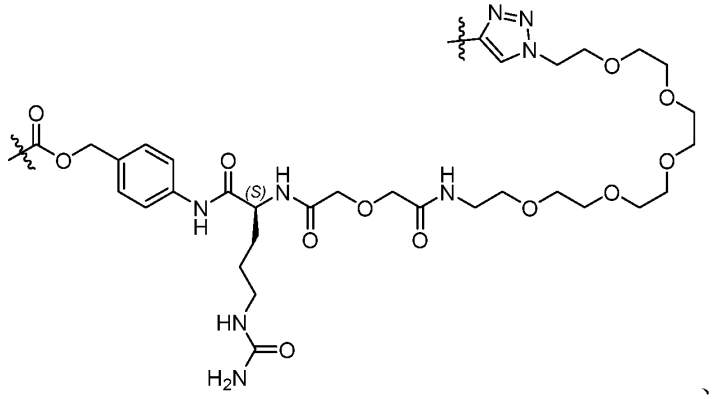
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



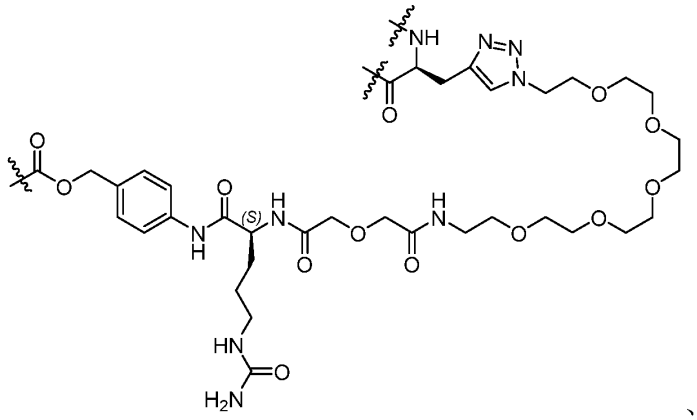
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



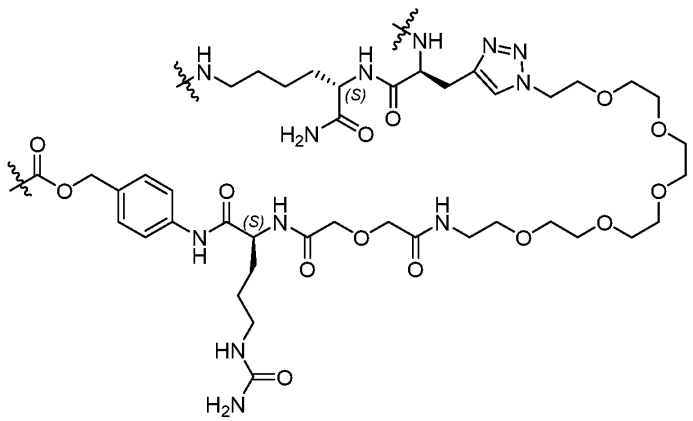
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



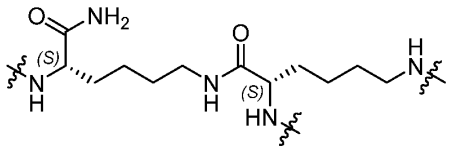
或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

在一些实施方式中，偶联体化合物或其药学上可接受的盐的连接子具有如下结构：



，

或者是上述结构与肽类连接子的组合（例如，通过含有 1-3 个氨基酸的肽类连接子与靶向分子连接）。

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，有效载荷与第一靶向分子直接或间接偶联，并且第一靶向分子与第二靶向分子直接或间接偶联。在一些实施方式中，有效载荷与第一靶向分子和第二靶向分子均是直接偶联。在一些实施方式中，有效载荷与第一靶向分子和第二靶向分子均是间接偶联。在一些实施方式中，有效载荷与第一靶向分子间接（例如，通过连接子）偶联，并且第一靶向分子与第二靶向分子直接或间接偶联。在一些实施方式中，有效载荷与第一靶向分子通过第一连接子偶联，并且有效载荷与第二靶向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）有效载荷和两个靶向分子结合的多价连接子。

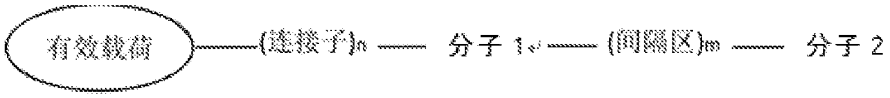
在一些实施方式中，两个靶向分子彼此之间通过间隔区连接。在一些实施方式中，间隔区可以被由靶细胞特异性表达或将由靶细胞表达的蛋白酶裂解。此类蛋白酶包括例如在下表 2 中列出的蛋白酶。在一些实施方式中，间隔区包含选自在下表 2 中列出的氨基酸序列的任意一个的氨基酸序列。

表 2：酶促可裂解序列列表

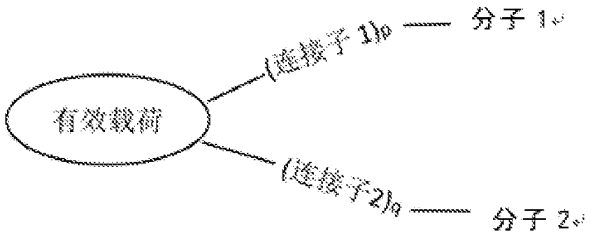
蛋白酶	识别位点的氨基酸序列	SEQ ID NO.
组织蛋白酶 B	RR	-
豆荚蛋白	ASN	-
Matripase	KSRAEDE	SEQ ID NO: 1
MMP-2	PLGLAG	SEQ ID NO: 2
前列腺特异性抗原	SSLY	SEQ ID NO: 3
基质溶解素-3	AAA	-
TMPRSS2	LLRSLIG	SEQ ID NO: 4
尿激酶型纤溶酶原激活物	SSR	-
活化的蛋白 C	LVKR	SEQ ID NO: 5
因子 Ixa	LVVR	SEQ ID NO: 6
因子 VIIa	QLTR	SEQ ID NO: 7
因子 Xa	LEGR	SEQ ID NO: 8
凝血酶	PR	-
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
钙蛋白酶-3	VGVF	SEQ ID NO: 14

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，从而将有效载荷与靶向分子之间的连接子，或靶向分子之间的间隔区破坏以释放游离的有效载荷或靶向分子。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。

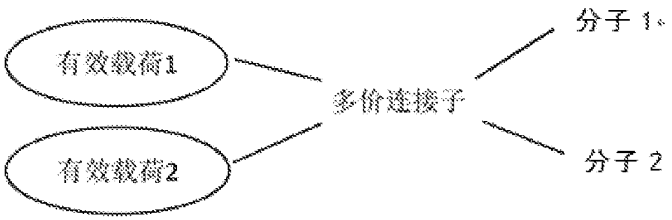
在一些实施方式中，偶联体化合物具有下述式 I、II、III 或 IV 所示的结构，其中 n、m、p 和 q 独立地为 0 或 1，其代表独立地存在或不存在连接子或间隔区。下式中的“分子”为“靶向分子”的简称。



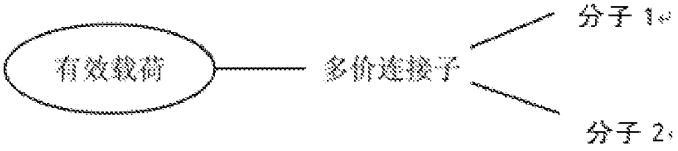
(式 I)



(式II)



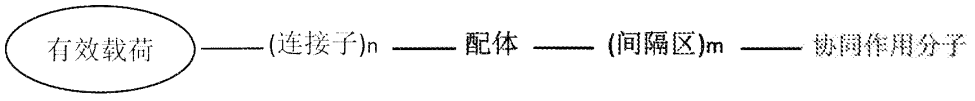
(式 III)



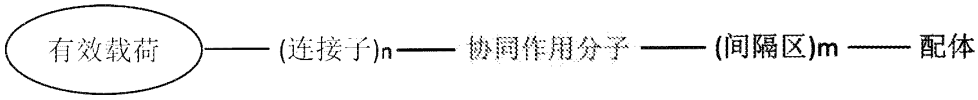
(式 IV)

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、如本申请所提供的两个靶向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与细胞表面蛋白或标记物特异性结合的配体、如本申请所提供的一个协同作用分子、以及如本申请所提供的连接子或间隔区。

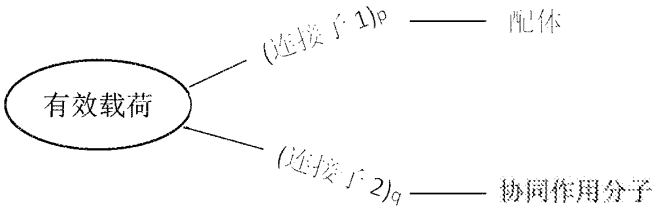
在一些实施方式中，偶联体化合物具有如下所示的式V、VI、VII或VIII的结构，其中 n、m、p、q 和 s 独立地为 0 或 1，其独立地表示存在或不存在连接子、多价连接子和间隔区。



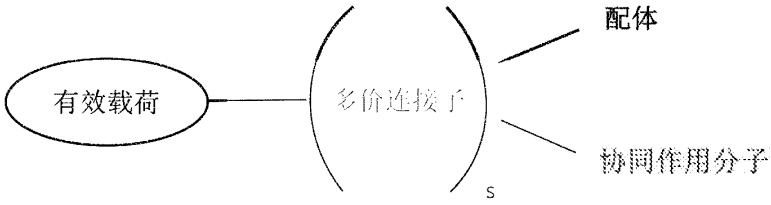
(式V)



(式VI)



(式VII)



(式VIII)

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靶向分子，其中两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及前列腺特异性膜抗原配体部分，例如 CB-20B、CB-20BK、CB-60S、CB-60SK、CB-20C、CB-1020、CB-1320、CB-1820、CR19428、20R-SM09 和 CB-20R。

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一个或多个有效载荷和两个靶向分子，其中两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及具有式（I）所示的配体部分，例如 CB-18G、CB-1820 和 CR19426。

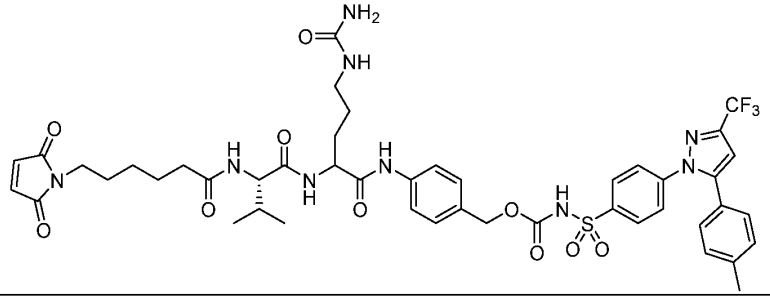
在一些实施方式中，本申请提供的偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含一个有效载荷和两个靶向分子，其中，两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及 P10，有效载荷为喜树碱及其任何衍生物，例如 CB-10S、CR19425 和 CB-50S。

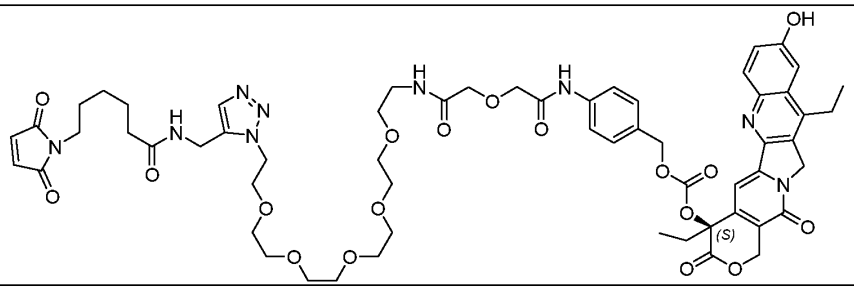
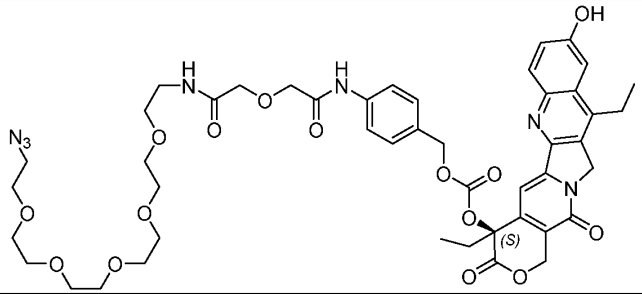
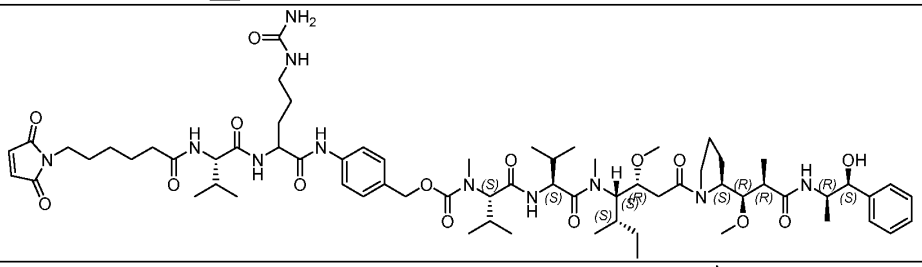
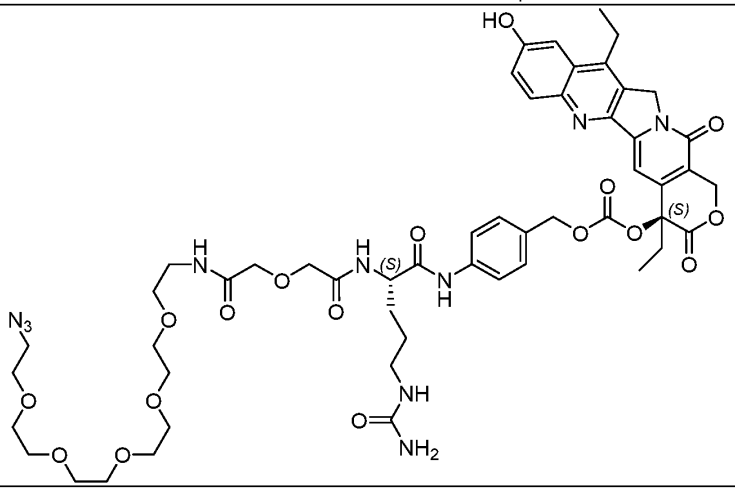
在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物选自由下述化合物组成的组：CB-20B、CB-20BK、CB-60S、CB-60SK、CB-20C、CB-1020、CB-1320、CB-1820、CR19428、20R-SM09、CB-20R、CB-18G、CR19426、CB-10S、CR19425 和 CB-50S（各偶联体化合物的具体结构如图 1 所示）。在一些实施方式中，本申请的偶联体化合物由连接子-药物部分与配体部分

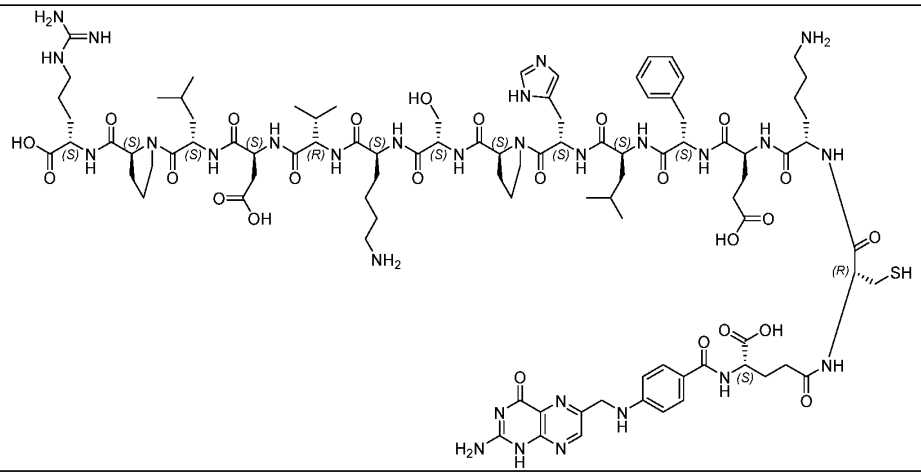
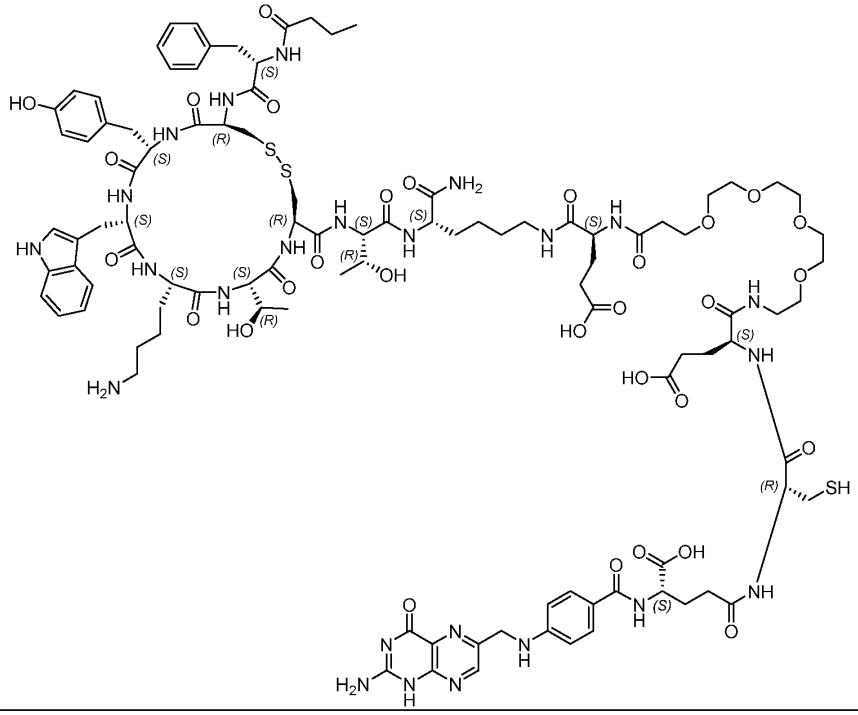
通过共价键连接而成。本申请的连接子-药物部分包括有效载荷和连接子，并且本申请的配体部分包括两个靶向分子以及可选的间隔区或连接子，两部分通过反应形成共价键后形成本申请的偶联体化合物，该共价键可以形成于连接子-药物部分中的连接子与配体部分的配体分子之间，也可以形成于连接子-药物部分中的连接子与配体部分的间隔区或连接子之间。

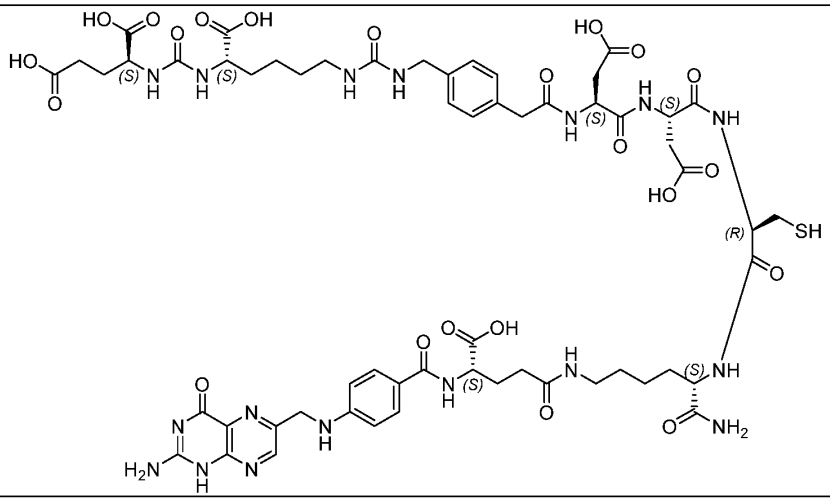
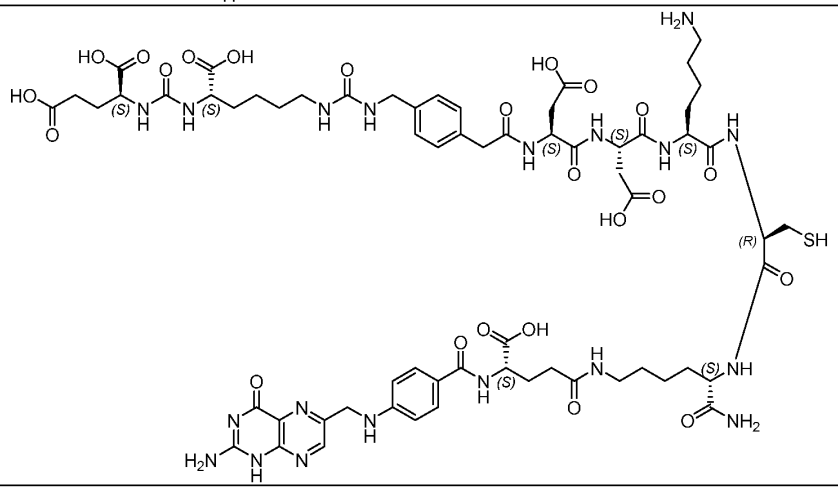
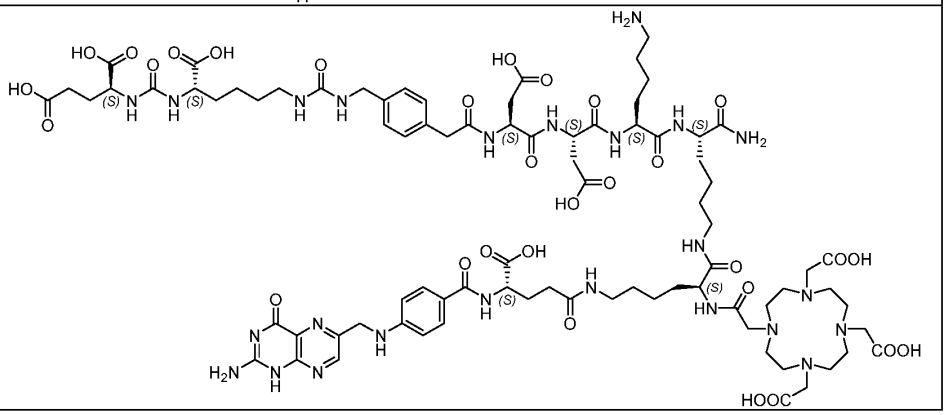
本申请的偶联体化合物 CB-20B 由连接子-药物部分 LT1002 与配体部分 20B-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-20BK 由连接子-药物部分 LT1002 与配体部分 20BK-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-60S 由连接子-药物部分 LT2000C 与配体部分 60S-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-60SK 由连接子-药物部分 LT2000C 与配体部分 60SK-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-20C 由连接子-药物部分 LD1001 与配体部分 20BK-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-1020 由连接子-药物部分 LT1002 与配体部分 1020BK-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-1320 由连接子-药物部分 LT1002 与配体部分 1320BK-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-1820 由连接子-药物部分 LT1002 与配体部分 1820BK-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CR19428 由连接子-药物部分 CR19423 与配体部分 20BK-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-20R 由 20R-SM09 与放射性核素离子 M 络合。本申请的偶联体化合物 CB-18G 由连接子-药物部分 LT1002 与配体部分 18G-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CR19426 由连接子-药物部分 CR19423 与配体部分 18G-SM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-10S 由连接子-药物部分 LT1000 与配体部分 CBSM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CR19425 由连接子-药物部分 CR19423 与配体部分 CBSM09 通过共价键连接而成。本申请的偶联体化合物 CB-50S 由连接子-药物部分 LT1000N3 与配体部分 50S-SM09 通过共价键连接而成。各结构如下表 3 所示。

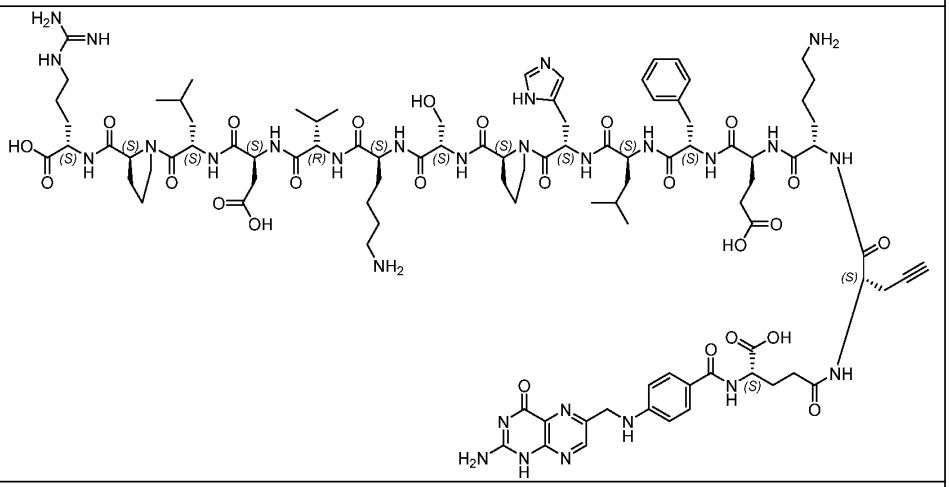
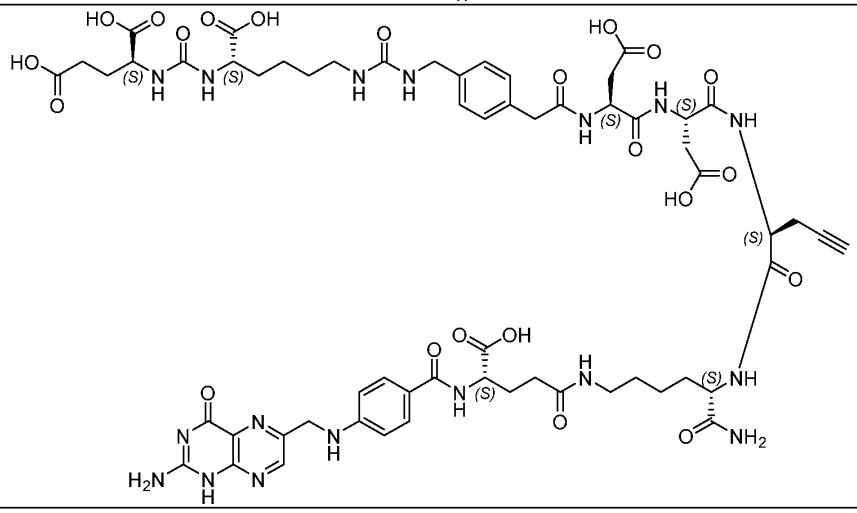
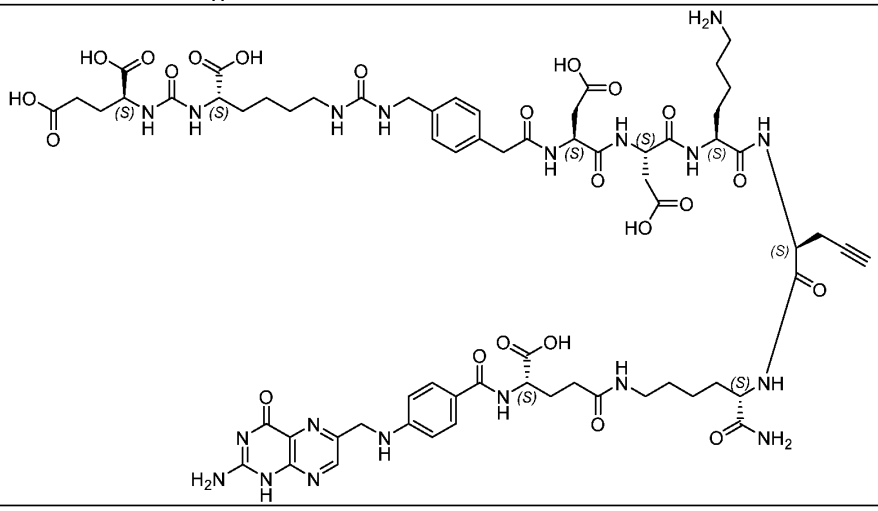
表 3：连接子-药物部分和配体部分的结构

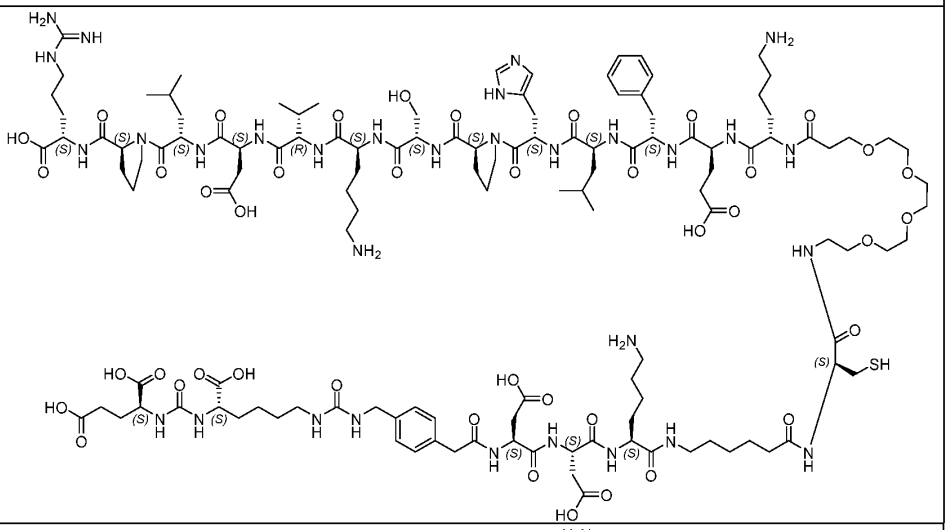
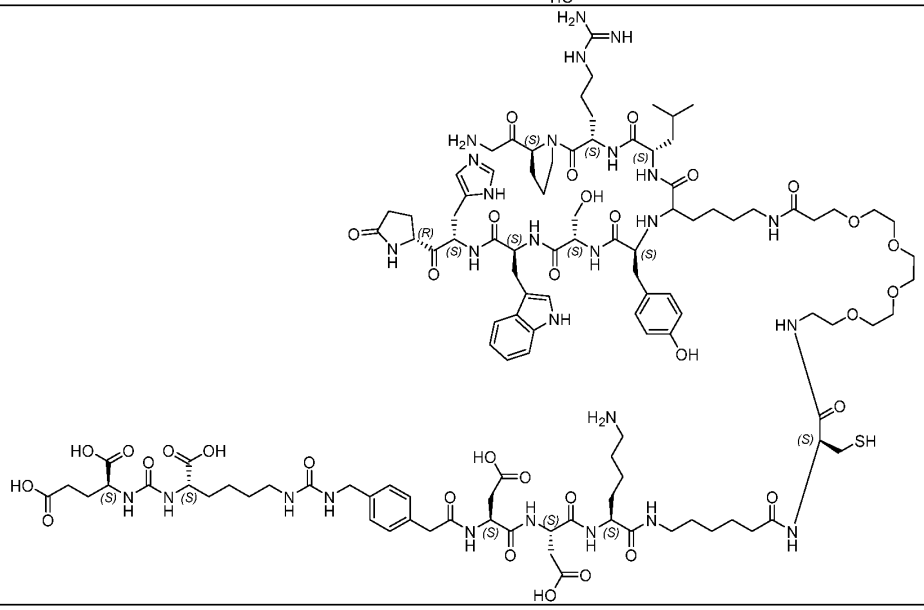
简称	结构
LD1001	

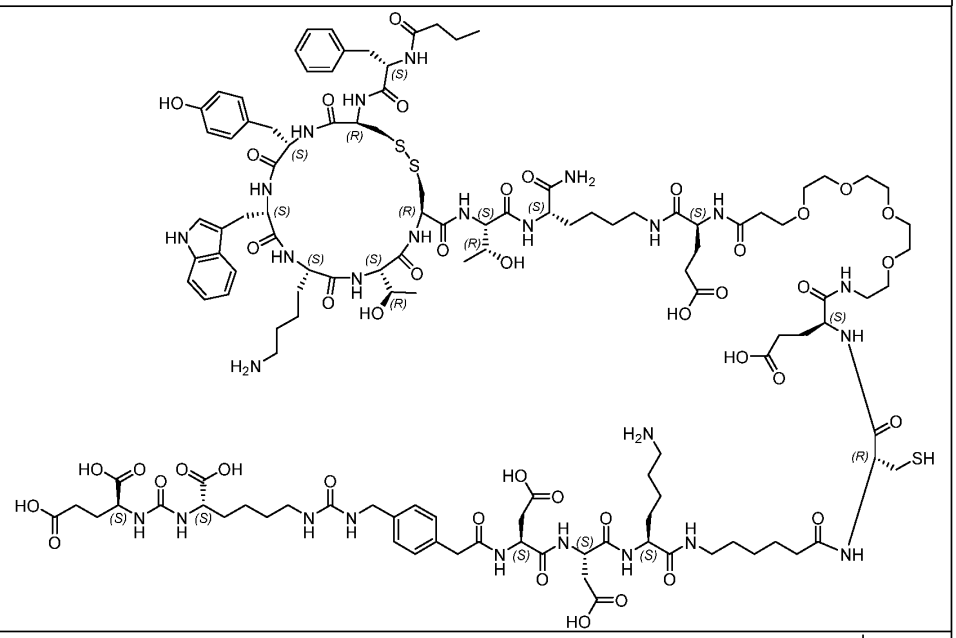
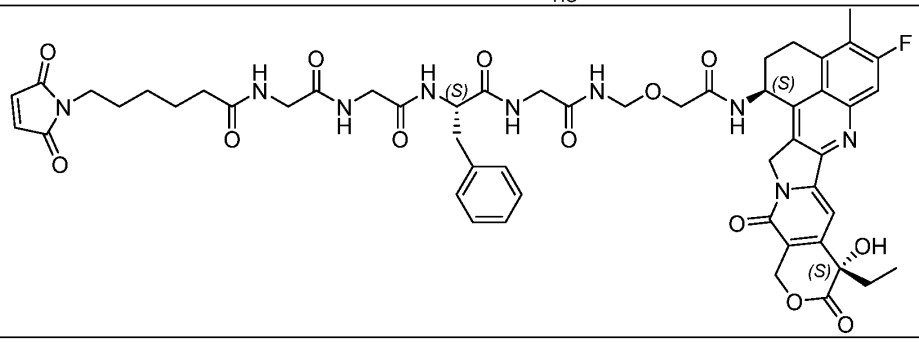
简称	结构
LT1000	
LT1000N3	
LT1002	
LT2000C	

简称	结构
CBSM09	
18G-SM09	

简称	结构
20B-SM09	
20BK-SM09	
20R-SM09	

简称	结构
50S-SM09	
60S-SM09	
60SK-SM09	

简称	结构
1020BK-SM09	
1320BK-SM09	

简称	结构
1820BK-SM09	
CR19423	

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进入血液循环和细胞外部（胞间质），由于连接子在胞外环境非常稳定无法释放药物分子，则药物分子的毒性被封闭。该偶联体是一个无细胞毒性或低毒性的药物，不会对正常细胞产生毒害作用。

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与病变细胞上同时有高表达的多个受体或抗原等作用分子结合，其协同效应大大增加了偶联体化合物对靶细胞的亲和性，降低了与正常细胞结合的可能。从而可以携带高效的毒素药物如MMAE/Dxd/SN38/放射性核素络合物，增强药效并拓宽治疗窗口避免药物副作用。

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进入靶向细胞内部后，通过细胞内部环境的变化（特异性酶切、pH 变化、二硫键还原等）连接子可以裂解释放出药物分子（相当于去除药物分子的修饰基团），对肿瘤细胞产生治疗作用。

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可用于将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，偶联体化合物或其药学上可接

受的盐的两个靶向分子有三个优点。首先，两个靶向分子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，两个靶向分子结合增加了偶联体化合物或其药学上可接受的盐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，两个靶向分子的组合可以满足药物偶联体通常所需的多功能要求。

本申请的偶联体化合物或其药学上可接受的盐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能介导内吞作用的协同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）偶联体化合物或其药学上可接受的盐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，本申请的偶联体化合物或其药学上可接受的盐不仅拓宽了 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。

在本申请中使用的术语“多肽”、“蛋白”和“肽”可以是单个氨基酸或者氨基酸的聚合物。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。

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。

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。

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、萘酸盐、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、二苯羟甲胺、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。

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。

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。

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。可以通过各种抗细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。

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

为酏剂或糖浆、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。

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。

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、糖浆剂和酏剂。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。

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。

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。

在一些实施方式中，可以通过适宜的途径向有需要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。

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有需要的对象递送。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有需要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。

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。对象可以是雄性（例如，男性）或雌性（例如，女性），可以是老年，成年、青少年、儿童或婴儿。人可以是高加索人、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。

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。

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 100 mg/kg，例如 0.01 至 90 mg/kg、0.01 至 80 mg/kg、0.01 至 70 mg/kg、0.01 至 60 mg/kg、0.01 至 50 mg/kg、0.01 至 40 mg/kg、0.01 至 30 mg/kg、0.01 至 20 mg/kg、0.01 至 10 mg/kg、0.01 至 5 mg/kg、0.01 至 4 mg/kg、0.01 至 3 mg/kg、0.01 至 2 mg/kg、0.01 至 1 mg/kg、0.01 至 0.1 mg/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。

本申请的另一个方面公开了一种向有需要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，所述方法包括通过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，疾病是癌症，包括但不限于前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、白血病、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、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

在一些实施方式中，癌症的癌症细胞具有本申请提及的细胞表面受体或抗原的表达。在一些实施方式中，癌症的癌症细胞具有本申请提及的细胞表面受体或抗原的高表达（例如，根据 Depmap 数据（参见 https://depmap.org/portal/），相应的基因表达至少为 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 10 以上）。在一些实施方式中，癌症的癌症细胞具有 FOLR1 和 FOLH1、TRPV6 和 FOLH1、GNRHR 和 FOLH1、SSTR2 和 FOLH1、FOLR1 和 SSTR2、或 TRPV6 和 FOLR1 的高表达。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。

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、风湿性心脏病、心肌病、心脏心律失常和先天性心脏病。

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。

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。

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。

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。

实施例

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。

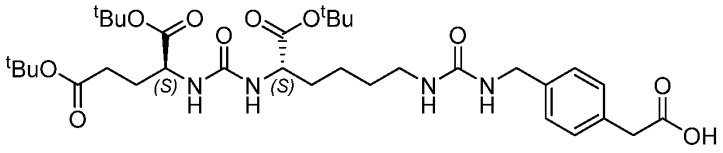
实施例 1：偶联体化合物的制备

偶联体化合物 CB-20BK、CB-18G、CB-20B、CB-10S、CB-20C、FA-MMAE、CB-20AK、CB-1020、CB-1320 和 CB-1820 的合成

1. 称取替代度为 0.45mmol/g 的 Rink amide-am 树脂（下称“Rink Resin”，西安蓝晓科技新材料股份有限公司，货号 183599-10-2）10g，将其装载于固相反应柱中，加入 DCM，氮气鼓泡至溶剂中，使树脂溶胀 30 分钟；抽掉溶剂，用 DBLK 脱除树脂上的 Fmoc 保护基团，再用 DMF 洗涤 5 次。称取 Fmoc-Lys(Dde)-OH 4.79g（9mmol），HOBt 1.47g（10.8mmol），用 DMF 溶解，0°C 冰水浴下向上述溶液中加入 DIC1.67ml（10.8mmol），混合使其活化 5

分钟，将该溶液加入上述反应柱中，反应 3 小时后，抽干溶剂，洗涤反应柱中的树脂 3 遍。然后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团。

2. 重复上述操作，按照结构依次偶联 Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH 以及中间体 108。



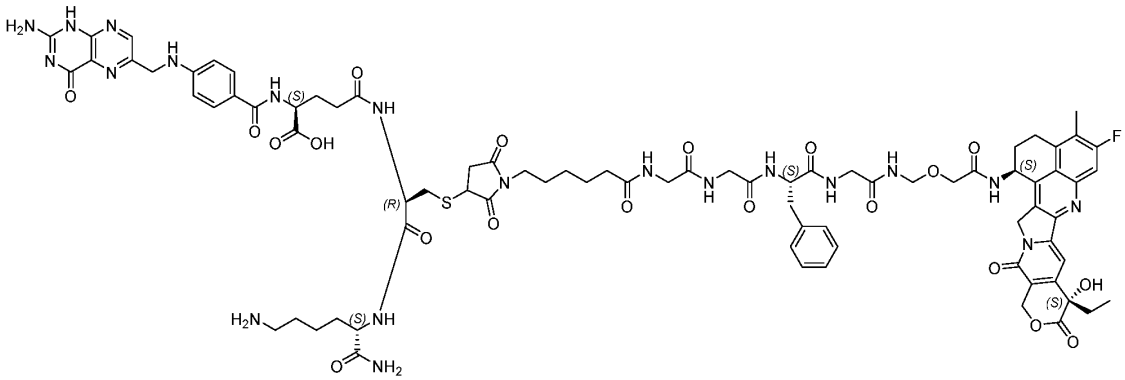
（中间体 108）

3. 用 2%水合肼/DMF 脱除 Dde 保护基两遍，每次 10 分钟，再用 DMF 洗涤树脂 5 次。依次偶联 Fmoc-Glu-OtBu 以及蝶酸。最后用甲醇收缩树脂两遍，抽干溶剂，获得保护肽树脂 17.4g。

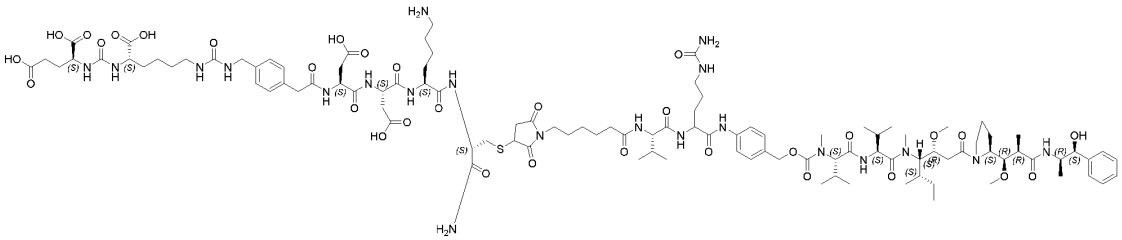
4. 将上一步得到的肽树脂 17.4g 加入到 250ml 单口烧瓶中，预先配置裂解液 139ml，TFA:H_2O:TIS=95:3:2（体积比），并称量 2.1g DTT 加入裂解液中。将裂解液加入到上述烧瓶中，室温反应 2.5 小时，过滤，树脂继续用 30ml TFA 洗涤，合并上述滤液，并加入到 834ml 无水乙醚中，此时有黄色固体析出，离心得到固体，无水乙醚洗涤固体，真空干燥得到黄色固体 6.4 g，粗产物收率 93.4%。HPLC 纯度 82.3%。经 HPLC 制备分离（制备条件：C18 柱子，流动相 A：0.1%三氟乙酸水溶液、B：乙腈，洗脱梯度(15-25)%B，时间 60 分钟，收集馏分），将含有合格产品的馏分冻干得到 20BK-SM09 4.73g，纯度为 98.8%。

5. 称取 Mc-Val-Cit-PAB-MMAE（LT1002）4.09g（3.11mmol）加入到 1000ml 单口烧瓶中，并加入 500ml 磷酸缓冲液和 100ml 乙腈，搅拌，保持 pH=7.2 至澄清，加入中间体 4.73g（3.11mmol）20BK-SM09，室温反应 2 小时，期间 HPLC 监测反应。待反应完全后，过滤，滤液通过 HPLC 制备分离（制备条件：C18 柱子，流动相 A：碳酸氢铵溶液（pH=7.2）、B：乙腈，洗脱梯度(25-35)%B，时间 60 分钟，收集馏分），将含有合格产品的馏分冻干得到 CB-20BK 6.96g 产物，纯度 98.8%，收率为 78.8%。

同理，通过与以上方法类似的步骤可获得偶联体化合物 CB-18G、CB-20B、CB-10S、CB-20C、FA-MMAE（结构如下所示）、CB-20AK（结构如下所示）、CB-1020、CB-1320 和 CB-1820。



（FA-MMAE）



（CB-20AK）

偶联体化合物 CB-50S、CB-60S 和 CB-60SK 的合成

1. 称取替代度为 1.1mmol/g 的王树脂（下称“Wang Resin”，西安蓝晓科技新材料股份有限公司，货号 1365700-43-1）10g，将其装载于固相反应柱中，加入 DMF，氮气鼓泡至溶剂，溶胀 30 分钟；称取 Fmoc-Arg(pbf)-OH 14.3g（22mmol），HOBt 3.56g（26.4mmol），DMAP 0.27g（2.2mmol），用 DMF 溶解，0°C 冰水浴下加入 4.1 ml DIC（26.4mmol），混合使其活化 5 分钟，将该溶液加入反应柱，反应 3 小时后，抽干溶剂，洗涤 3 遍。

2. 将 10.4ml 醋酸酐、8.9ml 吡啶溶于 50ml DMF 中，混合加入以上洗涤后的树脂，室温封闭 5 小时，DMF 洗涤三次，甲醇收缩后抽干树脂，得到 Fmoc-Arg(pbf)-Wang Resin，检测替代度为 0.53mmol/g。

3. 称取 Fmoc-Arg(pbf)-Wang Resin（Sub=0.53mmol/g）3.8 克（2mmol）于反应柱中，用 DMF 清洗 3 次，再加入 DMF 使树脂溶胀 30 分钟。然后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团，再用 DMF 洗涤 6 次。称取 Fmoc-Pro-OH 2.0g（6mmol），HOBt 0.97g（7.2mmol），用 DMF 溶解，0°C 冰水浴下加入 1.1ml DIC（7.2mmol），混合使其活化 5 分钟，加入反应柱，反应 2 小时，然后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团。

4. 重复上述操作，按照结构依次偶联 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、Fmoc-propargyl-Gly-OH、Fmoc-Glu-OtBu 以及蝶酸。用甲醇收缩两次，抽干溶剂，获得肽树脂 8.4g。

5. 将上一步得到的肽树脂 8.4g 加入到 250ml 单口烧瓶中，预先配置裂解液 67ml，TFA:H_2O:TIS=95:3:2（体积比），并称量 0.92g DTT 加入裂解液中。将裂解液加入到烧瓶中，室温反应 2.5 小时，滤掉树脂，树脂用 20ml TFA 洗涤，合并滤液，加入到 402ml 无水乙醚中析出黄色固体，离心得到固体，无水乙醚洗涤固体，真空干燥得到黄色固体 4.06g，粗产物收率 97.3%。HPLC 纯度 84.6%。经 HPLC 制备分离（制备条件：C18 柱子，流动相 A：0.1%三氟乙酸水溶液、B：乙腈，洗脱梯度(20-29)%B，时间 60 分钟，收集馏分），将含有合格产品的馏分冻干得到 50S-SM09 2.86g，纯度为 97.6%。

6. 称取 LT1000N3 1.29g（1.37mmol）加入到 500ml 单口烧瓶中，并加入 270ml 混合溶剂（ACN:H_2O=1:4），CuBr 393mg（2.74mmol），搅拌。加入中间体 2.86g（1.37mmol）50S-SM09，室温反应 2-3 小时，期间 HPLC 监测反应。反应完全后，过滤，通过 HPLC 制备分离（制备条件：C18 柱子，流动相 A：0.1%三氟乙酸水溶液、B：乙腈，洗脱梯度(22-40)%B，时间 60 分钟，收集馏分），将含有合格产品的馏分冻干得到 CB-50S 3.17g，纯度 98.6%，收率为 76.4%。

同理，通过与以上方法类似的步骤可获得偶联体化合物 CB-60S 和 CB-60SK。

CB-20R 的合成

1. 称取替代度为 0.45mmol/g 的 Rink Resin 5g，将其装载于固相反应柱中，加入 DCM，氮气鼓泡至溶剂，使树脂溶胀 30 分钟；抽掉溶剂，用 DBLK 脱除树脂上的 Fmoc 保护基团，再用 DMF 洗涤 5 次。称取 Fmoc-Lys(Dde)-OH 2.4g（4.5mmol），HOBt 0.74g（5.4mmol），用 DMF 溶解，0°C 冰水浴下加入 DIC 0.84ml（5.4mmol），混合使其活化 5 分钟，加入反应柱，反应 3 小时后，抽干，洗涤 3 遍。然后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团。

2. 重复上述操作，按照结构依次偶联 Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH 以及中间体 108。

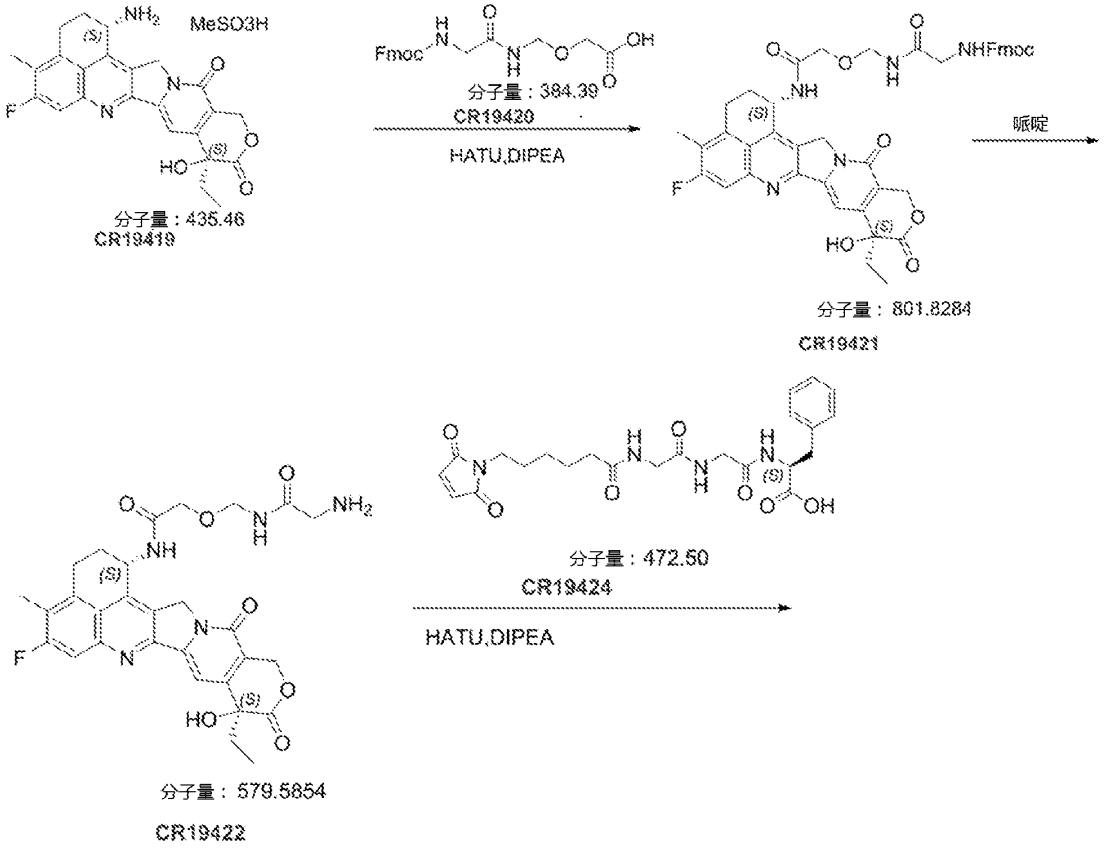
3. 用 2%水合肼/DMF 脱除 Dde 保护基两遍，每次 10 分钟，再用 DMF 洗涤 5 次。偶联 DOTA-tris(tBu) ester。再用 2%水合肼/DMF 脱除 Dde 保护基两遍，每次 10 分钟，再用 DMF 洗涤 5 次。依次偶联 Fmoc-Glu-OtBu 和蝶酸，最后用甲醇收缩两遍，抽干，获得保护肽树脂 9.2g。

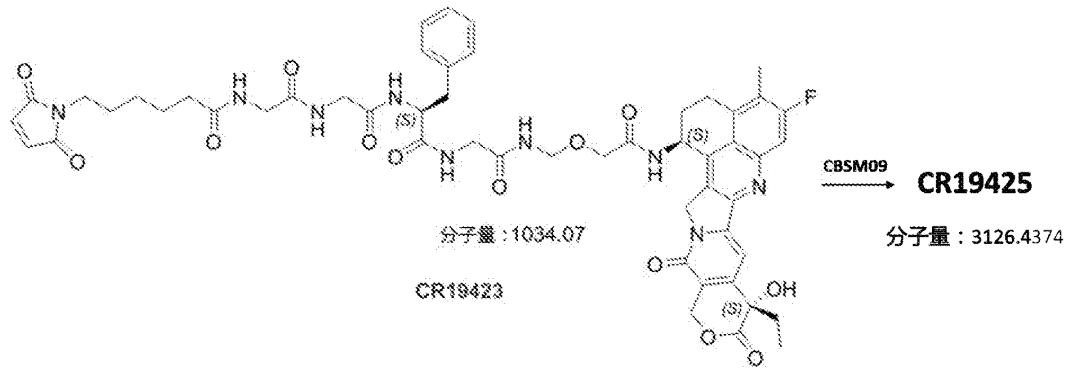
4. 将上一步得到的肽树脂 9.2g 加入到 250ml 单口烧瓶中，预先配置裂解液 74ml，TFA:H_2O:TIS=95:3:2（体积比），并称量 1.05g DTT 加入裂解液中。将裂解液加入到烧瓶

中，室温反应 2.5 小时，滤掉树脂，树脂用 20ml TFA 洗涤，合并滤液，加入到 560ml 无水乙醚中析出黄色固体，离心，无水乙醚洗涤固体，真空干燥得到黄色固体 3.8 g，粗产物收率 87.4%。HPLC 纯度 81.2%。经 HPLC 制备分离（制备条件：C18 柱子，流动相 A：0.1%三氟乙酸水溶液、B：乙腈，洗脱梯度(15-25)%B，时间 60 分钟，收集馏分），将含有合成产品的馏分冻干得到 20R-SM09 2.9g，纯度为 97.8%。

5. 将 20R-SM09 与放射性核素离子 M 络合获得 CB-20R。具体的，将放射性标记物 ^{177}Lu（约 50MBq）与 100μl 0.5M 的乙酸钠缓冲液（pH = 5）混合。将 40μl 溶于 10％DMSO 水溶液的 1mM CB-20R 溶液、2μl 饱和抗坏血酸溶液和 100μl 含 ^{177}Lu 溶液进行混合，加热至 95°C 并保持 10 分钟。所述标记通过 radio-HPLC 检验（在 5 分钟以内，0-100％ACN 水溶液，C18 柱）。

化合物 CR19425 的合成





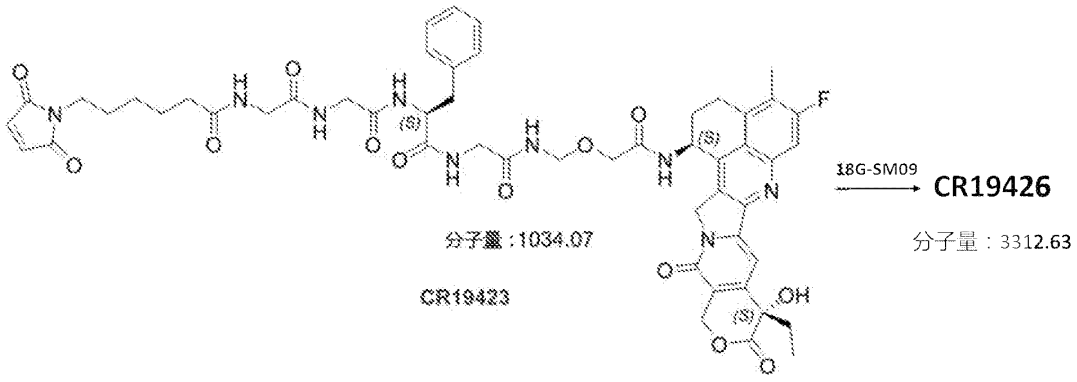
1. N_2 保护下，往反应瓶中加入 441.4mg CR19420（结构如上反应步骤中所示）、8.0mL DMF，搅拌溶解，冰浴降温，加入 459.2mg HATU，加入 380μL DIPEA，搅拌半小时；加入 500.0mg CR19419（结构如上反应步骤中所示），加入 190μL DIPEA，室温反应直至完毕。反应完毕后，将反应液倒入醋酸水中，析出固体，过滤，滤饼用醋酸水洗涤，水洗，真空干燥得到 835.7mg CR19421（结构如上反应步骤中所示），棕色粉末，HPLC 纯度：90.0%，收率：90.6%。

2. N_2 保护下，往反应瓶中加入 835.7mg CR19421、16mL 10%哌啶 DMF 溶液，室温下反应半小时。反应完毕后，将反应液倒入 TFA/MTBE 中，析出固体，过滤，滤饼用 MTBE 洗涤，真空干燥得到 599.7mg CR19422（结构如上反应步骤中所示），土灰色粉末，HPLC 纯度：84.7%，收率：83.0%。

3. N_2 保护下，往反应瓶中加入 599.7mg CR19422、586.7mg CR19424（结构如上反应步骤中所示）、15mL DMF，搅拌溶解，冰浴降温，加入 495.7mg HATU，加入 410μL DIPEA，室温反应。反应完毕后，将反应液制备纯化，制备纯品液减压除去乙腈，二氯甲烷甲醇混合溶剂萃取，浓缩干燥得 674.9mg CR19423（结构如上反应步骤中所示），黄色粉末，HPLC 纯度：88.4%，收率：63.1%。

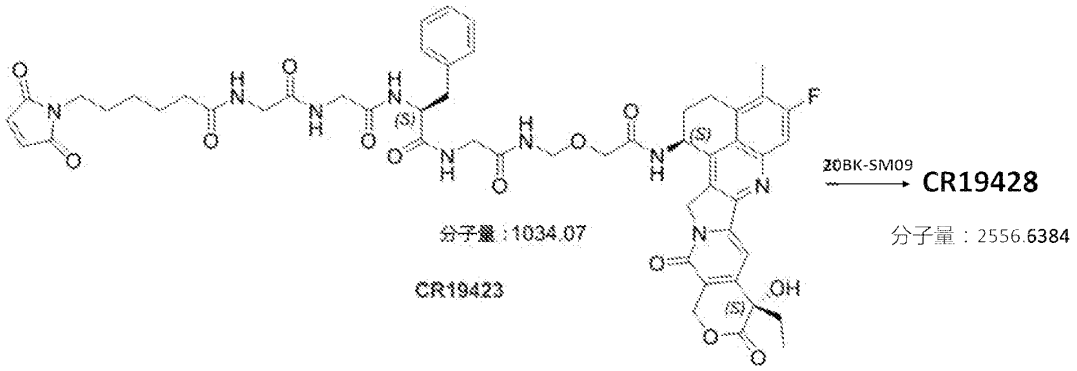
4. N_2 保护下，往反应瓶中加入 14.8mg CR19423，3.0mL pH=6.6 的 PBS 缓冲液，3.0mL 乙腈，搅拌溶解，加入 32.9mg CBSM09，用 Na_2HPO_4 调 pH 至 6.6~6.8，反应半小时。反应完毕后，将反应液制备纯化，制备纯品冷冻干燥得 21.8mg CR19425，黄色粉末，HPLC 纯度：95.6%，收率：48.8%。

化合物 CR19426 的合成



1. N_2 保护下，往反应瓶中加入 25.2mg CR19423，3.0mL pH=6.6 的 PBS 缓冲液，3.0mL 乙腈，搅拌溶解，加入 55.5mg 18G-SM09，用 Na_2HPO_4 调 pH 至 6.6~6.8，反应半小时。反应完毕后，将反应液制备纯化，制备纯品冷冻干燥得 44.6mg CR19426，黄色粉末，HPLC 纯度：95.4%，收率：55.2%。

化合物 CR19428 的合成



1. N_2 保护下，往反应瓶中加入 486mg CR19423，3.0mL pH=6.6 的 PBS 缓冲液，3.0mL 乙腈，搅拌溶解，加入 712mg 20BK-SM09，用 Na_2HPO_4 调 pH 至 6.6~6.8，反应半小时。反应完毕后，将反应液制备纯化，制备纯品冷冻干燥得 508mg CR19428，黄色粉末，HPLC 纯度：96.7%，收率：42.3%。

实施例 2：偶联体化合物与靶蛋白的亲和力测定

1. CB-20BK 与蛋白 FOLR1 结合的亲和力测定

实验仪器、材料及试剂

BIAcore T200（GE）

CM5 芯片（GE，货号：29104988）

缓冲液：HBS-EP+ buffer 10X（GE，货号：BR100669），使用前用去离子水稀释 10 倍。

氨基偶联试剂盒（GE，货号：BR100050）

再生试剂：10mM Glycine 2.0（GE，货号：BR100355）

10mM Glycine 3.0（GE，货号：BR100357）

实验步骤

按照 BIAcore T200（GE）使用手册进行实验，测定分析物 CB-20BK、CB-20AK、叶酸（FA）和 FA-MMAE 与 FOLR1 的亲和力。其中 CM5 芯片偶联配体 FOLR1（R&D System，货号 5646-FR）。实验结果如表 4 所示。

表 4. CB-20BK 和相关化合物与 FOLR1 结合的亲和力

	ka	**kd**	**KD**
FA（叶酸）	3.34×10^{6} $M^{-1}s^{-1}$	2.26×10^{-4} s^{-1}	6.77×10^{-11} M
FA-MMAE	1.79×10^{6} $M^{-1}s^{-1}$	1.15×10^{-4} s^{-1}	6.43×10^{-11} M
CB-20AK	N/D	N/D	N/D
CB-20BK	1.03×10^{6} $M^{-1}s^{-1}$	1.31×10^{-4} s^{-1}	1.27×10^{-10} M

“N/D”表示未检测到特异性结合。

表 4 显示，CB-20BK 和 FOLR1 特异性结合，并显示出良好的亲和力。CB-20BK 和 FOLR1 结合的亲和力比 FA 或 FA-MMAE 与 FOLR1 结合的亲和力稍弱。CB-20AK 没有 CB-20BK 中的叶酸部分，在实验中未检测出它与 FOLR1 特异性结合。

2. CB-20BK 与蛋白 FOLH1 结合的亲和力测定

实验仪器、材料及试剂

Gator™（Probe Life）

SA 探针（Probe Life，货号 1906018）

缓冲液：Q buffer（Probe Life），10 mM，pH=7.4

实验步骤

（1）分析物 Biotin-CB-20BK 的合成步骤

1)称取替代度为 0.45mmol/g 的 Rink Resin 5.1g，将其装载于固相反应柱中，加入 DCM，氮气鼓泡溶胀 30 分钟；抽掉溶剂，用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团，再用 DMF 洗涤 5 次。称取 Fmoc-Lys(Dde)-OH 2.45g，HOBt 0.75g，用 DMF 溶解，0°C 冰水浴下加入 DIC 0.83ml，

活化 5 分钟，加入反应柱，反应 3 小时后，抽干，洗涤 3 遍。然后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团。

2）重复上述操作，按照结构依次偶联 Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH 以及中间体 108。

3）用 2%水合肼/DMF 脱除 Dde 保护基两遍，每次 10 分钟，再用 DMF 洗涤 5 次。依次偶联 Fmoc-Lys(Biotin)-OH、Fmoc-Glu-OtBu 以及蝶酸。偶联蝶酸后，用 DMF 洗涤 2 次，最后用甲醇收缩两遍，抽干，获得保护肽树脂 9.7g。

4）将上一步得到的肽树脂 9.7g 加入到 250ml 单口烧瓶中，预先配置裂解液 77.6ml，TFA:H2O:TIS=95:3:2（体积比），并称量 1.1g DTT 加入裂解液中。将裂解液加入到烧瓶中，室温反应 2.5 小时，滤掉树脂，树脂用 20ml TFA 洗涤，合并滤液，加入到 466ml 甲叔醚中析出黄色固体，离心，甲叔醚洗涤固体，真空干燥得到黄色固体 4.6 g，HPLC 纯度 83.2%。经 HPLC 制备分离，冻干得到 2.1g、纯度 95%以上的 Biotin-20BK-SM09。

5）称取 Mc-Val-Cit-PAB-MMAE（LT1002）500mg 加入到 250ml 单口烧瓶中，并加入 65ml 磷酸缓冲液和 20ml 乙腈，搅拌，保持 pH=7.2 至澄清，加入中间体 785mg Biotin-20BK-SM09，室温反应 2 小时，期间 HPLC 监测反应。反应完全后，过滤，通过 HPLC 制备分离，冻干得到 Biotin-CB-20BK 723mg，纯度 96.8%，收率为 59.4%。

（2）按照 Gator™（Probe Life）使用手册进行试验，测定 Biotin-CB-20BK 与 FOLH1 结合的亲和力。其中 SA 探针结合配体 Biotin-CB-20BK，分析物为 FOLH1（Sino Biologicals，货号，15877-H07H）。实验结果如表 5 所示。

表 5. CB-20BK 与 FOLH1 结合的亲和力

	ka	**kd**	**KD**
FOLH1	$1.19\times10^{4}\ M^{-1}s^{-1}$	$1.70\times10^{-4}\ s^{-1}$	$6.98\times10^{-9}\ M$

表 5 显示，CB-20BK 和 FOLH1 结合，并显示出良好的亲和力。

3. FOLH1 与 CB-20BK- FOLR1 复合物结合

实验材料及试剂

BIAcore T200（GE）

CM5 芯片（GE，货号：29104988）

缓冲液：HBS-EP+ buffer 10X（GE，货号：BR100669），使用前用去离子水稀释 10 倍。

氨基偶联试剂盒（GE，货号：BR100050）

再生试剂：10mM Glycine 2.0（GE，货号：BR100355）

10mM Glycine 3.0（GE，货号：BR100357）

实验步骤

CM5 芯片偶联配体：FOLR1（R&D System，货号 5646-FR）

分析物：CB-20BK，FA-MMAE 和 FOLH1（Sino Biologicals，货号：15877-H07H）

按照 BIAcore T200（GE）操作手册，将 FOLR1 偶联到 CM5 芯片上，先进样 CB-20BK 或 FA-MMAE，然后，进样 FOLH1，检测 FOLH1 与 CB-20BK-FOLR1 复合物的结合。实验结果如表 6 所示。

表 6. 不同浓度的 FOLH1 溶液与 CB-20BK-FOLR1 复合物结合

浓度（μM）	FA-MMAE（RU）	CB-20BK（RU）
0.5	9.8	23.9
0.25	8.4	14.1
0.125	4.2	4.6
0.0625	-1	-0.9

表 6 显示，高浓度的 FOLH1 溶液与 CB-20BK-FOLR1 复合物结合的量显著高于 FOLH1 与 FA-MMAE-FOLR1 复合物结合的量，而且呈继续上升的趋势。FOLH1 与 FA-MMAE-FOLR1 复合物结合在高浓度时趋于饱和。该实验证明，CB-20BK 可以同时与 FOLR1 和 FOLH1 两个受体良好的结合。

实施例 3：配体偶联物与靶细胞的结合和内吞研究

1. 偶联体化合物 CB-20BK 的细胞结合和内吞实验

标记样品 Cy5-pep-20BK、Cy5-FA 和 Cy5-pep-20AK 的合成

（1）称取替代度为 0.45mmol/g 的 Rink Resin 2g，将其装载于固相反应柱中，加入 DCM，氮气鼓泡至溶剂，使树脂溶胀 30 分钟；抽掉溶剂，用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团，再用 DMF 洗涤 5 次。称取 Fmoc-Lys(Dde)-OH 0.96g（1.8mmol），HOBt 0.3g（2.2mmol），用 DMF 溶解，0°C 冰水浴下加入 DIC 0.33ml（2.2mmol），混合使其活化 5 分钟，加入反应柱，反应 3 小时后，抽干，洗涤 3 遍。然后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团。

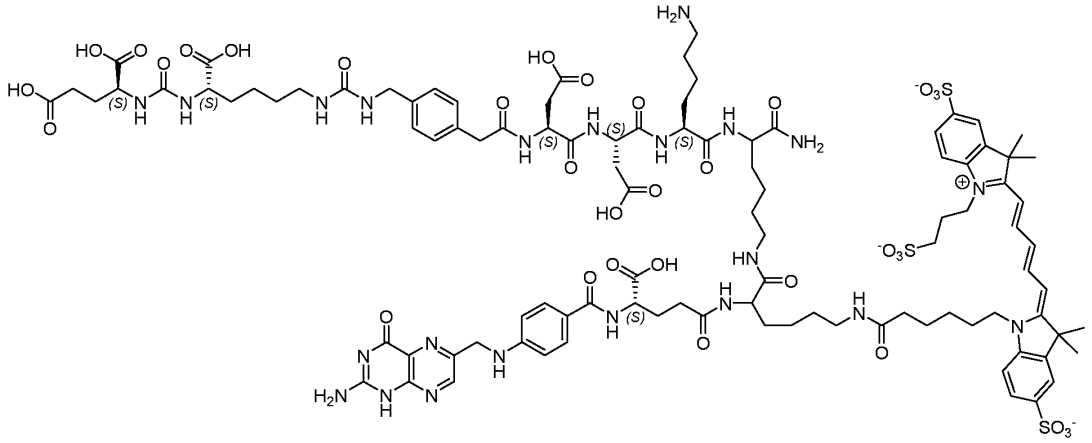
（2）重复上述操作，按照结构依次偶联 Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH 以及中间体 108：

（3）用 2%水合肼/DMF 脱除 Dde 保护基两遍，每次 10 分钟，再用 DMF 洗涤 5 次。依次偶联 Fmoc-Lys(Dde)-OH、Fmoc-Glu-OtBu 以及蝶酸。

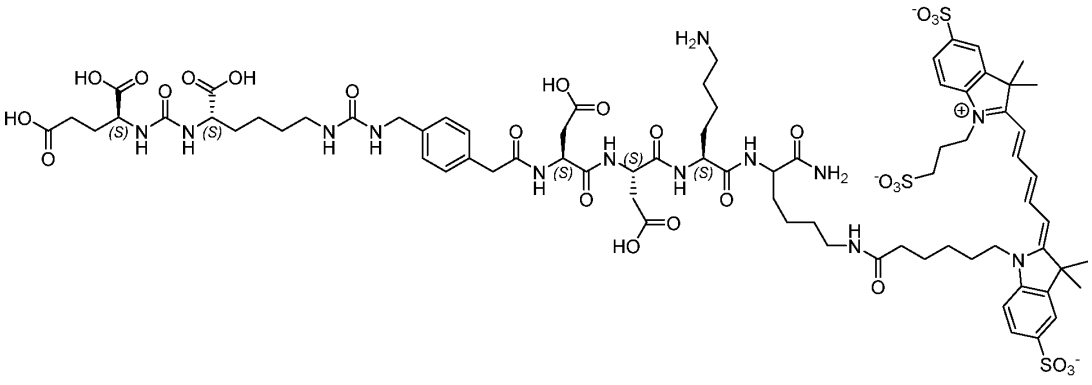
（4）然后用 2%水合肼/DMF 脱除 Dde 保护基两遍，每次 10 分钟，再用 DMF 洗涤 5 次，偶联 Cy5-COOH 后，用 DMF 洗涤 2 次，最后用甲醇收缩两遍，抽干，获得保护肽树脂 3.6g。

（5）将上一步得到的肽树脂 3.6g 加入到 50ml 单口烧瓶中，预先配置裂解液 29ml，TFA:H_2O:TIS=95:3:2（体积比），并称量 0.4g DTT 加入裂解液中。将裂解液加入到烧瓶中，室温反应 2.5 小时，滤掉树脂，树脂用 8ml TFA 洗涤，合并滤液，加入到 173ml 无水乙醚中析出黄色固体，离心，无水乙醚洗涤固体，真空干燥得到蓝色固体 1.9g，粗产物收率 89.6%。HPLC 纯度 76.3%。经 HPLC 制备分离（制备条件：C18 柱子，流动相 A：0.1%三氟乙酸水溶液、B：乙腈，洗脱梯度(20-28)%B，时间 50 分钟，收集馏分），将含有合格产品的馏分冻干得到 Cy5-pep-20BK 736mg，纯度为 93.4%。

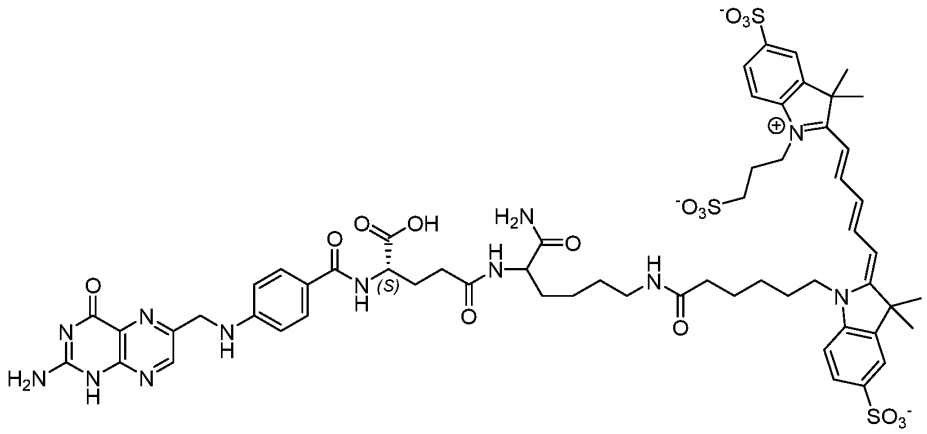
同理，通过与以上方法类似的步骤可获得化合物 Cy5-FA 和 Cy5-pep-20AK。



（Cy5-pep-20BK）



（Cy5-pep-20AK）



（Cy5-FA）

流式细胞仪法检测细胞结合和内吞 Cy5-pep-20AK/Cy5-pep-20BK 样品实验

样品信息：Cy5-pep-20AK、Cy5-pep-20BK

细胞系：LNCaP 人前列腺癌细胞、Du145 人前列腺癌细胞、SKOV3 人卵巢癌细胞、NCI-H460 人肺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、PBS

实验操作：

（1）细胞培养：准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，将细胞加入数个含完全培养基的培养瓶中，置于 37°C，5% CO_2 培养箱中培养，最终收集约 5×10^6 个细胞至离心管中。

（2）样品孵育：使用 PBS 将 Cy5-pep-20AK/Cy5-pep-20BK 样品稀释至 8nmol/L。1000 转离心细胞悬液 5 分钟，去除上清，PBS 清洗一次，均匀悬浊细胞，按实验方案等量分装到不同离心管中，离心去除 PBS，每管加入 200μl 样品工作液，37°C 分别孵育 15、30、60 和 90 分钟，留取 1 管只加 PBS，作为空白对照。全程避光操作。

（3）清洗上机：1000 转离心 5 分钟去除工作液，用 PBS 清洗细胞 3 遍，加适量 PBS 悬浊细胞至 1×10^6 个细胞/ml。提前打开 Beckman CytoFLEX 流式细胞仪，完成开机清洗流程，将细胞样本依次上机，在 APC 通道下读取 10000 个活细胞的荧光量。全程避光操作。

（4）数据分析：分别获取每个细胞样本 APC 荧光的绝对 MFI（平均荧光强度），以及相对空白对照的相对 MFI，并根据相对 MFI 完成数据折线图。

结果与分析

表 7. FOLR1 和 FOLH1 在不同细胞系中的表达水平

（参考 Depmap 的数据，来源：https://depmap.org/portal/）

RNA-Seq	LNCaP	SKOV3	Du145	NCI-H460
FOLR1	+/-	6+	+/-	+/-
FOLH1	10+	+	+/-	+/-

根据Depmap的数据，其中数据为0或者负数的表示为“-”，0.001-0.499的表示为“+/-”，0.500-1.499的表示为“+”，1.500-2.499的为“2+”，以此类推。

分别在孵育 15 分钟、30 分钟、60 分钟和 90 分钟时检测细胞的荧光强度，将结果制图示于图 2A 和 2B。可知样品 Cy5-pep-20BK 细胞的结合并内吞，在 FOLR1 相对高表达的 LNCaP 细胞系和 FOLH1 相对高表达 SKOV3 细胞系中，结合和内吞的 CB-20BK 的荧光强度明显高于它在 FOLR1 和 FOLH1 相对低表达的 DU145 细胞系和 NCI-H460 细胞系中的荧光强度。Cy5-pep-20AK 只有 FOLH1 配体，没有 FOLR1 的配体 FA，所以，Cy5-pep-20AK 在高表达 FOLH1 的 LNCaP 细胞中显示高水平的结合和内吞。在中度表达 FOLH1 的 SKOV3 细胞中，则显示中度水平的结合和内吞；在两个细胞系中，Cy5-pep-20AK 结合和内吞水平较 Cy5-pep-CB-20BK 有显著下降。配体偶联物与细胞结合内化的程度与细胞相关受体表达水平呈现正相关性。

2. 单配体偶联物 Cy5-FA 与细胞的结合和内吞实验

样品信息：Cy5-FA

细胞系：Hela 宫颈癌细胞、SKOV3 人卵巢癌细胞和 A549 人肺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、PBS、含 DAPI 的防荧光淬灭封片剂

实验操作：

（1）细胞爬片：在 24 孔板中放入爬片。准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基将细胞稀释成约 2×10^5 个细胞/ml，在 24 孔板每个孔加入 500μl 稀释的细胞溶液，置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养 48 小时。

（2）样品孵育：使用 IMDM 培养基将 Cy5-FA 样品稀释至 73nmol/L。甩去 24 孔板中培养基，每孔细胞爬片加入样品工作液 200μl，37°C 分别孵育 15、30、60 分钟，留取 1 孔只加 IMDM 培养基，作为空白对照。全程避光操作。

（3）清洗封片：甩去 24 孔板中工作液，用 37°C 预热的 PBS 清洗 3 遍，夹出细胞爬片，在载玻片上滴加 5μl 含 DAPI 的防荧光淬灭封片剂，将细胞爬片覆盖在封片剂上，完成封片。全程避光操作。

（4）样本读片：打开 Leica DM2500 荧光显微镜预热荧光激发器 15 分钟，在相应荧光通道下分别拍摄同一位置细胞核和 Cy5 荧光素，并在软件中完成图片融合。

根据图 3 显示可知，样品 Cy5-FA 在 15 分钟、30 分钟与细胞的结合及内吞，在 FOLR1 高表达的细胞系 Hela 和 SKOV-3 中的荧光强度明显高于 FOLR1 相对低表达的细胞系 A549

中的荧光强度。配体偶联物与细胞结合内化的程度与细胞相关受体表达水平呈现正相关性。

实施例 4：偶联体化合物的细胞扩增抑制实验

1. CB-20BK 肿瘤细胞扩增抑制实验

样品信息：CB-20BK

细胞系：KB 人口腔表皮样癌细胞、T-47D 人乳腺癌细胞、NCI-H460 人肺癌细胞、CALU-3 人肺腺癌细胞、HuH-7 人肝癌细胞和 LNCaP 人前列腺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CCK8

实验操作：

1）细胞铺板

提前准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基将 KB 细胞稀释成 2.5×10^4 个细胞/ml，T-47D 细胞稀释成 1.3×10^4 个细胞/ml，NCI-H460 细胞稀释成 3.5×10^4 个细胞/ml，CALU-3 细胞稀释成 4.0×10^4 个细胞/ml，HuH-7 细胞稀释成 3.0×10^4 个细胞/ml，LNCaP 细胞稀释成 8.0×10^4 个细胞/ml，铺 96 孔板，每个孔加入 100μl 稀释的细胞溶液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养过夜。

2）稀释加样

将样品用培养基稀释到所需浓度（参见表 8）。按照每孔 50μl 加入到过夜培养后的 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养 72 小时。

表 8：样品（CB-20BK）稀释后浓度

管号	稀释后浓度 μmol/L
1	201
2	50
3	13
4	3.1
5	0.8
6	0.2
7	0.05
8	0.01
9	0.003
10	0.0008

3）显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.0 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices Spectra MAX Plus），450nm 读数数值。

4）数据处理

用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

5）实验结果与分析

根据四参数拟合曲线图（图 4A，其中 C 值对应于 IC_{50}），CB-20BK 对 KB、T-47D、NCI-H460、CALU-3、HuH-7 以及 LNCaP 肿瘤细胞系生长扩增都有抑制作用。由于细胞中偶联体化合物相应的受体表达水平有不同，所以抑制水平有所差异。针对受体相对高表达的细胞株 T-47D、KB、LNCaP、HuH-7 和 CALU-3 的 IC_{50} 明显低于受体相对低表达的细胞株 NCI-H460。CB-20BK 显示出了抑瘤效果与细胞相关受体表达水平的相关性。

2. 偶联体化合物 CB-20BK 及相关化合物对肿瘤细胞系 LNCaP（人前列腺癌细胞）和 22RV1（人前列腺癌细胞）扩增的抑制实验

由于不同细胞对配体偶联物中的有效载荷的细胞增殖抑制毒性的敏感度不同，偶尔会干扰定量分析。我们挑选了一系列不同配体的受体表达水平已知的细胞系，同时检测它们对配体偶联物和单独有效载荷细胞增殖抑制作用的反应。取单独有效载荷与配体偶联物在一个细胞系中的 IC_{50} 的比值，从而去除这种干扰。

相关样品：MMAE、CB-20BK、CB-20AK 和 FA-MMAE

实验操作：将提前准备好的 LNCaP 和 22RV1 计数，分别以 4×10^4 细胞/ml 和 2.0×10^4 细胞/ml 的细胞密度铺 96 孔细胞培养板，100μl/孔，每块板设置相应的阴性及空白对照孔，贴壁过夜后，按 50μl/孔加入稀释好的待测样品，放置于 37°C，5% CO_2 培养箱中，培养 68-72 小时，加入 CCK8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育 45-70 分钟，置于酶标仪 450nm 读取数值。用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘 4-P 拟合曲线。计算出的数据如表 9 所示。

表 9. MMAE、FA-MMAE、CB-20BK 和 CB-20AK 对细胞系增殖的抑制作用和细胞系中受体基因的表达水平（参考 Depmap 数据）

细胞系	FOLR1_基因表达水平	FOLH1_基因表达水平	IC_{50}(MMAE)	IC_{50}(FA-MMAE)	IC_{50}(CB-20AK)	IC_{50}(CB-20BK)	IC_{50} 比值(MMAE/FA-MMAE)	IC_{50} 比值(MMAE/CB-20AK)	IC_{50} 比值(MMAE/CB-20BK)

LNCaP	+/-	10+	0.00255	0.264	0.102	0.0958	0.010	0.025	0.0267
22RV1	+/-	6+	0.00648	1.01	1.05	0.502	0.006	0.006	0.013

由上表可知，LNCaP 和 22RV1 的 FOLR1 表达水平差距不大，LNCaP 的 FOLH1 表达量显著高于 22RV1 的 FOLH1 表达量。CB-20BK（有 FOLH1 的配体和 FOLR1 配体）和 CB-20AK（只有 FOLH1 的配体）对 LNCaP 和 22RV1 肿瘤细胞系扩增均有抑制作用。CB-20BK 和 CB-20AK 对于受体 FOLH1 表达水平有不同的细胞抑制程度有所差异，在受体 FOLH1 相对高表达细胞株 LNCaP 中，IC_{50} 比值高于受体相对低表达细胞株 22RV1 的 IC_{50} 比值 2-4 倍。FA-MMAE 对 LNCaP 和 22RV1 肿瘤细胞系扩也有抑制作用，由于 LNCaP 和 22RV1 的 FOLR1 表达水平很低，在 LNCaP 细胞中的表达（FOLR1 基因表达水平为 0.3219，参考 Depmap 数据）略高于在 22RV1 中的表达（FOLR1 基因表达水平为 0.0704，参考 Depmap 数据），FA-MMAE 在 LNCaP 和 22RV1 的 IC_{50} 比值的差距只有 1.5 倍。上述数据表明细胞增殖抑制效果与细胞表达受体 FOLH1 和 FOLR1 表达水平呈现正相关性。

3. 偶联体化合物 CB-20BK 及相关化合物对肿瘤细胞系 PANC-1（人胰腺癌细胞）和 CFPAC-1（人胰腺癌细胞）扩增的抑制实验

相关样品：MMAE 和 CB-20BK

实验操作：提前准备好细胞计数，PANC-1 和 CFPAC-1 以 4×10^4 细胞/ml 的细胞密度铺 96 孔板，100 μl/孔，每块培养板设立相应的阴性及空白对照孔，贴壁过夜后，按 50μl/孔加入稀释好的待测样品，放置于 37°C，5% CO_2 培养箱中，培养 68-72 小时，加入 CCK8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育 45-70 分钟，置于酶标仪 450nm 读取数值。用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘 4-P 拟合曲线。计算出的数据如下表所示：

表 10.CB-20BK 对细胞系增殖的抑制作用和细胞系受体基因的表达水平

（参考 Depmap 数据）

细胞系	FOLR1 基因表达水平	FOLH1 基因表达水平	IC_{50} (MMAE)	IC_{50} (CB-20BK)	IC_{50}(MMAE)/ IC_{50}(CB-20BK)
CFPAC-1	4+	+/-	0.015	0.557	0.027
PANC-1	+/-	+/-	0.002	0.126	0.020

由表 10 可知，CFPAC-1 的 FOLH1 表达水平很低，CFPAC-1 的 FOLR1 表达量显著高于 PANC1 细胞系的表达量。CB-20BK 对 PANC-1 和 CFPAC-1 肿瘤细胞系扩增均有抑制作用。对于受体 FOLR1 表达水平有不同的细胞抑制程度有所差异，在受体 FOLR1 相对高表达细胞株 CFPAC-1 中，IC_{50} 比值显著高于受体 FOLR1 相对低表达 PANC-1 的 IC_{50} 比值，细胞增殖抑制效果与细胞相关受体 FOLR1 表达水平呈现正相关性。

实验 2 和 3 证明，在 CB-20BK 中两个配体和表达在细胞表面的它们的受体（FOLR1 和 FOLH1）在该化合物抑制肿瘤细胞增殖的过程中起重要作用。

4. CB-20B 肿瘤细胞扩增抑制实验

样品信息：CB-20B

细胞系：A549 人肺癌细胞、HuH-7 人肝癌细胞、KB 人口腔表皮样癌细胞、LNCaP 人前列腺癌细胞、DU145 人前列腺癌细胞和 T-47D 人乳腺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CCK8

实验操作：

1）细胞铺板

提前准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基，按 A549 细胞、HuH-7 细胞、KB 细胞和 DU145 细胞以 2×10^4 个细胞/ml 密度铺板；T-47D 细胞以 1×10^5 个细胞/ml 密度铺板；LNCaP 细胞以 6×10^4 个细胞/ml 密度铺 96 孔板，每个孔加入 100μl 稀释的细胞溶液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养过夜。

2）稀释加样

将样品用培养基稀释到所需浓度（参见表 11）。按照每孔 50μl 加入到过夜培养后的 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养 72 小时。

表 11：样品（CB-20B）稀释后浓度

管号	稀释后浓度 μmol/L
1	200
2	66.7
3	22.2
4	7.4
5	2.5
6	0.8
7	0.3
8	0.09
9	0.03
10	0.01

3）显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.0 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices Spectra MAX Plus），450nm 读数数值。

4）数据处理

用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

5）实验结果与分析

根据四参数拟合曲线图（图 4B，其中 C 值对应于 IC_{50}），CB-20B 对 A549、HuH-7、KB、LNcap、DU145 和 T-47D 肿瘤细胞系生长扩增都有抑制作用。由于细胞中偶联体化合物相应的受体表达水平有不同，所以抑制水平有所差异。针对受体相对高表达的细胞株 T-47D、LNcap、KB、HuH-7 和 DU145 的 IC_{50} 明显低于受体相对低表达的细胞株 A549。CB-20B 显示出了抑瘤效果与细胞相关受体表达水平的相关性。

5. CB-10S 肿瘤细胞扩增抑制实验

样品信息：CB-10S

细胞系：KB 人口腔表皮样癌细胞、NCI-H460 人肺癌细胞、RT4 人膀胱癌细胞、T-47D 人乳腺癌细胞和 LNcap 人前列腺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CCK8

实验操作：

1）细胞铺板

提前准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基将 KB 细胞稀释成 3.5×10^4 个细胞/ml，LNCaP 细胞稀释成 8.0×10^4 个细胞/ml，T-47D 细胞稀释成 1.2×10^4 个细胞/ml，NCI-H460 细胞稀释成 2.5×10^4 个细胞/ml，RT4 细胞稀释成 1.2×10^4 个细胞/ml，取 96 孔板，每个孔加入 100μl 稀释的细胞溶液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养过夜。

2）稀释加样

将样品用培养基稀释到所需浓度（参见表 12）。按照每孔 50μl 加入到过夜培养后的 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养 72 小时。

表 12：样品（CB-10S）稀释后浓度

管号	稀释后浓度 μmol/L
1	302
2	43

3	6
4	0.9
5	0.1
6	0.02
7	0.003
8	0.0004
9	0.00005
10	0.000007

3）显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.0 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices Spectra MAX Plus），450nm 读数数值。

4）数据处理

用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

5）实验结果与分析

根据四参数拟合曲线图（图 4C，其中 C 值对应于 IC_{50}），CB-10S 对 KB、LNCaP、T-47D、RT4 和 NCI-H460 肿瘤细胞系生长扩增都有抑制作用。由于细胞中偶联体化合物相应的受体表达水平有不同，所以抑制水平有所差异。对于受体相对高表达的细胞株 KB、LNcap、T-47D 和 RT4 的 IC_{50} 明显低于受体相对低表达细胞株 NCI-H460。CB-10S 显示出了抑瘤效果与细胞相关受体表达水平的相关性。

6. CB-60S 肿瘤细胞扩增抑制实验

样品信息：CB-60S

细胞系：KB 人口腔表皮样癌细胞、T-47D 人乳腺癌细胞、NCI-H460 人肺癌细胞、CALU-3 人肺腺癌细胞、HuH-7 人肝癌细胞和 LNCaP 人前列腺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CCK8

实验操作：

1）细胞铺板

提前准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基将 KB 细胞稀释成 2.0×10^4 个细胞/ml，T-47D 细胞稀释成 1.5×10^4 个细胞/ml，NCI-H460 细胞稀释成 2.0×10^4 个细胞/ml，CALU-3 细胞稀释成 3.0×10^4 个细胞/ml，HuH-7 细胞稀释成 4.0×10^4 个细胞/ml，

LNCaP 细胞稀释成 8.0×10^4 个细胞/ml，取 96 孔板，每个孔加入 100μl 稀释的细胞溶液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养过夜。

2）稀释加样

将样品用培养基稀释到所需浓度（参见表 13）。按照每孔 50μl 加入到过夜培养后的 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C, 5% CO_2 培养箱培养 72 小时。

表 13：样品（CB-60S）稀释后浓度

管号	稀释后浓度 μmol/L
1	320
2	80
3	20
4	5
5	1.3
6	0.3
7	0.08
8	0.02
9	0.005
10	0.001

3）显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.0 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices Spectra MAX Plus），450nm 读数数值。

4）数据处理

用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

5）实验结果与分析

四参数拟合曲线图（图 4D，其中 C 值对应于 IC_{50}），CB-60S 对 KB、T-47D、NCI-H460、CALU-3、HuH-7 和 LNCaP 肿瘤细胞系生长扩增都有抑制作用。由于细胞中偶联体化合物相应的受体表达水平有不同，所以抑制水平有所差异。对于受体相对高表达的细胞株 LNCaP 和 HuH-7 的 IC_{50} 值明显低于受体相对低表达的细胞株 NCI-H460、KB、T-47D 和 CALU-3。CB-60S 显示出了抑瘤效果与细胞相关受体表达水平的相关性。

7. CB-60SK 肿瘤细胞扩增抑制实验

样品信息：CB-60SK

细胞系：KB 人口腔表皮样癌细胞、T-47D 人乳腺癌细胞、NCI-H460 人肺癌细胞、CALU-3 人肺腺癌细胞、HuH-7 人肝癌细胞和 LNCaP 人前列腺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CCK8

实验操作：

1）细胞铺板

提前准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基将 KB 细胞稀释成 2.5×10^4 个细胞/ml，T-47D 细胞稀释成 1.3×10^4 个细胞/ml，NCI-H460 细胞稀释成 3.5×10^4 个细胞/ml，CALU-3 细胞稀释成 4.0×10^4 个细胞/ml，HuH-7 细胞稀释成 3.0×10^4 个细胞/ml，LNCaP 细胞稀释成 8.0×10^4 个细胞/ml，每个孔加入 100μl 稀释的细胞溶液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养过夜。

2）稀释加样

将样品用培养基稀释到所需浓度（参见表 14）。按照每孔 50μl 加入到过夜培养后的 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养 72 小时。

表 14：样品（CB-60SK）稀释后浓度

管号	稀释后浓度 μmol/L
1	289
2	72
3	18
4	4.5
5	1.1
6	0.3
7	0.07
8	0.02
9	0.004
10	0.001

3）显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.0 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices Spectra MAX Plus），450nm 读数数值。

4）数据处理

用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

5）实验结果与分析

根据四参数拟合曲线图（图 4E，其中 C 值对应于 IC_{50}），CB-60SK 对 KB、T-47D、NCI-H460、CALU-3、HuH-7 和 LNCaP 肿瘤细胞系生长扩增都有抑制作用。由于细胞中偶联体化合物相应的受体表达水平有不同，所以抑制水平有所差异。对于受体相对高表达的细胞株 LNCaP 和 HuH-7 的 IC_{50} 值明显低于受体相对低表达的细胞株 T-47D、NCI-H460、CALU-3 和 KB。CB-60SK 显示出了抑瘤效果与细胞相关受体表达水平的相关性。

8. CB-18G 肿瘤细胞扩增抑制实验

样品信息：CB-18G

细胞系：A549 人肺癌细胞、Hela 人宫颈癌细胞、SCLC-21H 小细胞肺癌细胞、U-2 OS 人骨肉瘤细胞、T-47D 人乳腺癌细胞和 NCI-H460 人肺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、P 青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CCK8

实验操作：

1）细胞铺板

提前准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基，按 A549 细胞、Hela 细胞、SCLC-21H 细胞和 U-2 OS 细胞以 2×10^4 个细胞/ml 密度铺板；T-47D 细胞和 NCI-H460 细胞以 3×10^4 个细胞/ml 密度铺 96 孔板，取 96 孔板，每个孔加入 100μl 稀释的细胞溶液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养过夜。

2）稀释加样

将样品用培养基稀释到所需浓度（参见表 15）。按照每孔 50μl 加入到过夜培养后的 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养 72 小时。

表 15：样品（CB-18G）稀释后浓度

管号	稀释后浓度 μmol/L
1	100
2	25
3	6.25
4	1.56
5	0.39
6	0.10
7	0.02
8	0.006
9	0.002
10	0.0004

3）显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.0 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices Spectra MAX Plus），450nm 读数数值。

4）数据处理

用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

5）实验结果与分析

根据四参数拟合曲线图（图 4F，其中 C 值对应于 IC_{50}），CB-18G 对 A549、Hela、SCLC-21H、U-2 OS、T-47D 和 NCI-H460 肿瘤细胞系生长扩增都有抑制作用。由于细胞中偶联体化合物相应的受体表达水平有不同，所以抑制水平有所差异。对于受体相对高表达的细胞株 Hela 的 IC_{50} 低于受体相对低表达的细胞株 NCI-H460。CB-18G 显示出了抑瘤效果与细胞相关受体表达水平的相关性。

9. CB-50S 肿瘤细胞扩增抑制实验

样品信息：CB-50S

细胞系：KB 人口腔表皮样癌细胞、NCI-H460 人肺癌细胞、RT4 人膀胱癌细胞、T-47D 人乳腺癌细胞和 LNCaP 人前列腺癌细胞

主要试剂：IMDM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺、CCK8

实验操作：

1）细胞铺板

提前准备好细胞，Trypsin 消化、收集计数，使用完全细胞培养基将 KB 细胞稀释成 3.5×10^4 个细胞/ml，LNCaP 细胞稀释成 8.0×10^4 个细胞/ml，T-47D 细胞稀释成 1.2×10^4 个细胞/ml，NCI-H460 细胞稀释成 2.5×10^4 个细胞/ml，RT4 细胞稀释成 1.2×10^5 个细胞/ml，取 96 孔板，每个孔加入 100μl 稀释的细胞溶液，每块板设置阴性及空白对照孔。将加好细胞的 96 孔板置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养过夜。

2）稀释加样

将样品用培养基稀释到所需浓度（参见表 16）。按照每孔 50μl 加入到过夜培养后的 96 孔板中，3 个复孔，并设立阴性对照和空白对照，置于 37°C，5% CO_2 培养箱培养 72 小时。

表 16：样品（CB-50S）稀释后浓度

管号	稀释后浓度 μmol/L

1	314
2	45
3	6
4	0.9
5	0.1
6	0.02
7	0.003
8	0.0004
9	0.00005
10	0.000008

3）显色读板

取 CCK-8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.0 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices Spectra MAX Plus），450nm 读数数值。

4）数据处理

用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

5）实验结果与分析

根据四参数拟合曲线图（图 4G，其中 C 值对应于 IC_{50}），CB-50S 对 KB、LNCaP、T-47D、RT4 和 NCI-H460 肿瘤细胞系生长扩增都有抑制作用。由于细胞中偶联体化合物相应的受体表达水平有不同，所以抑制水平有所差异。对于受体相对高表达的细胞株 KB、LNcap、T-47D 和 RT4 的 IC_{50} 明显低于受体相对低表达的细胞株 NCI-H460。CB-50S 显示出了抑瘤效果与细胞相关受体表达水平的相关性。

10. 偶联体化合物 CB-1020 肿瘤细胞扩增抑制实验

实验目的：测试 CB-1020 及相关化合物对肿瘤细胞系 LNCaP（人前列腺癌细胞）、SK-BR-3（人乳腺癌细胞）、NCI-H226（人肺癌细胞）、CFPAC-1（胰腺癌细胞）和 PANC-1（胰腺癌细胞）扩增的抑制作用。

相关样品：MMAE 和 CB-1020

实验操作：将提前准备好的 LNCaP、SK-BR-3、NCI-H226、CFPAC-1 和 PANC-1 计数，用完全培养基（IMDM+10%FBS+1X L-Glutamine+1X P/S）将细胞 LNCaP、SK-BR-3 和 CFPAC-1 稀释成 4×10^4 细胞/ml，NCI-H226 稀释成 2.0×10^4 细胞/ml，PANC-1 稀释成 3.0×10^4 细胞/ml，100μl/孔铺 96 孔板，每板设阴性及空白对照孔，贴壁过夜后，按 50μl/孔

加入稀释好的待测样品，放置于 37°C，5% CO_2 培养箱中，培养 68-72 小时，加入 CCK8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育 45-70 分钟，置于酶标仪 450nm 读取数值。用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘 4-P 拟合曲线。数据如下表所示：

表 17. CB-1020 对细胞系增殖的抑制作用和细胞系受体基因的表达水平
（参考 Depmap 数据）

细胞系	TRPV6 基因表达水平	FOLH1 基因表达水平	IC_{50} (MMAE)	IC_{50} (CB-1020)	IC_{50}(MMAE) /IC_{50}(CB-1020)
LNCap	5+	10+	0.003	0.168	0.0179
SK-BR-3	4+	2+	0.002	0.287	0.0070
CFPAC-1	+	+/-	0.015	3.000	0.005
PANC-1	+/-	+/-	0.002	0.458	0.0044
NCI-H226	+/-	-	0.006	1.570	0.00384

由上表可知，LNCaP 和 SK-BR-3 均表达 TRPV6 和 FOLRH1，但 LNCap 两个受体的表达量相对高一些。NCI-H226、CFPAC-1 和 PANC-1 低表达或微弱表达两个受体。CB-1020 对 LNCaP、SK-BR-3、NCI-H226、CFPAC-1 和 PANC-1 肿瘤细胞系生长扩增均有抑制作用。CB-1020 在受体相对双高表达细胞系 LNCaP 的 IC_{50} 比值高于受体中度表达细胞系 SK-BR-3 的 IC_{50} 比值；SK-BR-3 的 IC_{50} 比值有高于受体相对低的 CFPAC-1 和两个受表达均为微弱表达的细胞株 NCI-H226 和 PANC-1 的 IC_{50} 比值。细胞增殖抑制效果与细胞中两个受体表达水平呈现正相关性。

11. 偶联体化合物 CB-1320 肿瘤细胞扩增抑制实验

实验目的：测试 CB-1320 及相关化合物对肿瘤细胞系 LNCaP（人前列腺癌细胞）、SK-BR-3（人乳腺癌细胞）、MDA-MB-468（人乳腺癌细胞）和 CFPAC-1（胰腺癌细胞）扩增的抑制作用。

相关样品：MMAE 和 CB-1320

实验操作：将提前准备好的 LNCaP、SK-BR-3、MDA-MB-468 和 CFPAC-1 计数，用完全培养基（IMDM+10%FBS+1X L-Glutamine+1X P/S）将细胞 LNCaP、SK-BR-3、MDA-MB-468 和 CFPAC-1 稀释成 4×10^4 细胞/ml，100μl/孔铺 96 孔板，每板设立阴性及空白对照孔，贴壁过夜后，按 50μl/孔加入稀释好的待测样品，放置于 37°C，5% CO_2 培养箱中，培养 68-72 小时，加入 CCK8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育 45-70 分钟，置于酶标仪 450nm 读取数值。用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘 4-P 拟合曲线。具体数据如下表所示：

表 18. CB-1320 对细胞系增殖的抑制作用和细胞系受体基因的表达水平
（参考 Depmap 数据）

细胞系	GNRHR 基因表达水平	FOLH1 基因表达水平	IC_{50} (MMAE)	IC_{50} (CB-1320)	IC_{50}(MMAE) /IC_{50}(CB-1320)
LNCaP	+/-	10+	0.003	0.060	0.043
SK-BR-3	+/-	2+	0.002	0.093	0.016
CFPAC-1	+/-	+/-	0.015	1.090	0.014
MDA-MB-468	+/-	+/-	0.002	0.212	0.011

由上表可知，4 细胞系的 GNRHR 表达水平大体相当，LNCaP 的 FOLH1 表达量显著高于其他细胞系的表达量。CB-1320 对 4 个肿瘤细胞系扩增均有抑制作用。CB-1320 对于受体 FOLH1 表达水平有不同的细胞抑制程度有所差异，在受体 FOLH1 相对高表达细胞株 LNCap 中，IC_{50} 比值显著高于受体相对低表达低的其他细胞株的 IC_{50} 比值。

12．偶联体化合物 CB-1820 肿瘤细胞扩增抑制实验

实验目的：测试 CB-1820 及相关化合物对肿瘤细胞系 LNCaP（人前列腺癌细胞）、MDA-MB-468（人乳腺癌细胞）、CFPAC-1（胰腺癌细胞）和 PANC-1（胰腺癌细胞）扩增的抑制作用。

相关样品：MMAE 和 CB-1820

实验操作：将提前准备好的 LNCaP、MDA-MB-468、CFPAC-1 和 PANC-1 计数，用完全培养基（IMDM+10%FBS+1X L-Glutamine+1X P/S）将细胞 LNCaP、MDA-MB-468 和 CFPAC-1 稀释成 4×10^4 细胞/ml；PANC-1 稀释成 3.0×10^4 细胞/ml，100μl/孔铺 96 孔板，每板设立阴性及空白对照孔，贴壁过夜后，按 50μl/孔加入稀释好的待测样品，放置于 37°C，5% CO_2 培养箱中，培养 68-72 小时，加入 CCK8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育 45-70 分钟，置于酶标仪 450nm 读取数值。用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘 4-P 拟合曲线。具体数值如下表所示：

表 19. CB-1820 对细胞系增殖的抑制作用和细胞系受体基因的表达水平
（参考 Depmap 数据）

细胞系	**SSTR2 基因表达水平**	**FOLH1 基因表达水平**	**IC_{50} (MMAE)**	**IC_{50} (CB-1820)**	**IC_{50}(MMAE) /IC_{50}(CB-1820)**
LNCap	+/-	10+	0.003	0.021	0.1429
MDA-MB-468	+/-	+/-	0.002	0.062	0.0323
CFPAC-1	+/-	+/-	0.015	0.356	0.0421
PANC-1	+/-	+/-	0.002	0.055	0.0364

由上表可知，LNCap、MDA-MB-468、CFPAC-1 和 PANC-1 的 SSTR2 表达水平大体相当，LNCaP 的 FOLH1 表达量显著高于其他细胞的 FOLH1 表达量。CB-1820 对 4 株肿瘤细胞系扩增均有抑制作用。CB-1820 对于受体 FOLH1 表达水平有不同的细胞抑制程度有所差异，在受体相对高表达细胞株 LNCaP 中，IC_{50} 比值显著高于受体相对低表达细胞株其他细胞系的 IC_{50} 比值，细胞增殖抑制效果与细胞相关受体

FOLH1 表达水平呈现正相关性。

13．偶联体化合物 CR19425、CR19426 和 CR19428 肿瘤细胞扩增抑制实验

实验目的：测试 CR19428、CR19425、CR19426 及相关化合物对肿瘤细胞系 NCI--H226（人肺癌细胞）、CFPAC-1（人胰腺癌细胞）和 MDA-MB-468（人乳腺癌细胞）扩增的抑制作用。

相关样品：SN-38、Dxd0017、CR19428、CR19425 和 CR19426

实验操作：将提前准备好的 NCI-H226、CFPAC-1 和 MDA-MB-468 计数，细胞 MDA-MB-468 和 CFPAC-1 铺板密度均为 2×10^4 细胞/ml，NCI-H226 铺板密度均为 1×10^4 细胞/ml，100μl/well 铺 96 孔板，每块培养板设立阴性及空白对照孔，贴壁过夜后，按 50μl/孔加入稀释好的待测样品，放置于 37°C，5% CO_2 培养箱中，培养 68-72 小时，加入 CCK8 显色液，每孔加入 15μl（孔内液体体积的 10%），37°C 孵育 45-70m 分钟，置于酶标仪 450nm 读取数值。用 SoftMax Pro 进行数据编辑，绘 4-P 拟合曲线。具体数据如下表所示：

表 20. CR19428、CR19425 和 CR19426 对细胞系增殖的抑制作用

细胞系	IC_{50} (SN-38)	IC_{50} (Dxd0017)	IC_{50} (CR19428)	IC_{50} (CR19425)	IC_{50} (CR19426)
CFPAC-1	0.0055	0.0064	0.9060	0.6210	1.6600
MDA-MB-468	0.0136	0.0061	1.0700	0.9510	2.3000
NCI-H226	0.0173	0.0080	1.6200	1.0100	4.3900

实施例 5：偶联体化合物在 CDX 模型中的药效学研究

1. CB-20BK 在 CDX 模型中的药效学研究 1

1）样品准备：

称取 CB-20BK 冻干粉，用 PBS 溶解配成样品母液，用注射用生理盐水稀释母液到工作浓度样品溶液，备用。

2）CDX 模型构建

主要细胞系：KB 人口腔表皮样癌细胞、MIA paca-2 人胰腺癌细胞、HCC1954 人乳腺癌细胞、CALU-3 人肺腺癌细胞和 DU145 人前列腺癌细胞。

模型构建：复苏、培养细胞，收集、计数注射于 BALB/c-nude 小鼠右肢皮下，等肿瘤生长扩增到 80-160mm^3 时分组给药或取快速扩增肿瘤块转接扩建小鼠肿瘤模型。

3）分组给药观察

分组：待肿瘤平均长至约 80-160mm^3 进行分组，设置模型对照组和不同剂量给药组。

给药：尾静脉注射。

实验观察与测量：肿瘤接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响。具体内容包括实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增减（体重每周测量 2 次）情况，眼睛、被毛及其它异常情况。

测量小鼠体重及瘤块的长径（a）和短径（b），每周 2 次。肿瘤体积（tumor volume，TV）计算公式为：$TV = 1/2 \times a \times b^2$。

4）实验结果与分析

根据小鼠肿瘤体积的变化（图 5A-5E），可见 CB-20BK 对小鼠 KB、MIA aca-2、HCC1954、CALU-3 和 DU145 细胞系 CDX 肿瘤模型均有较好的抑制作用。

2. CB-20BK 在 CDX 模型中的药效学研究 2

实验目的：偶联物化合物 CB-20BK 在人源 LNCaP、DU145 和 NCI-H460 细胞株皮下异体移植模型（CDX）中的药效研究

主要 CDX 模型：LNCaP、DU145 和 NCI-H460

实验方案：

将准备好的细胞或肿瘤组织块，接种于 BALB/c-nude 小鼠右肢前部皮下，当肿瘤体积扩增到 80-160 mm^3 时随机分组，设置模型对照组和给药组，在分组第 1 天开始给药，根据小鼠最近一次的体重调整给药量，尾静脉注射，给药体积为 10μl/g。分组给药后，监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。分组给药后，每周测量 2 次小鼠体重，计算体重变化率；同时以游标卡尺测量肿瘤长径、短径，并计算肿瘤体积、相对肿瘤增值率、肿瘤体积抑瘤率等指标。肿瘤体积公式为 $TV = 0.5\ a \times b^2$，其中 a 是肿瘤的长径，b 是肿瘤的短径。

表 21. CB-20BK 对 CDX 模型的生长抑制作用和各个模型受体基因的表达水平
（参考中美冠科数据）

模型	FOLR1	FOLH1	抑瘤率（TGI）(%)	给药剂量/时间
LNCaP	5+	10+	95.68	3mg/kg D1,8,15
DU145	-	-	52	5mg/kg D1,4,7
NCI-H460	-	-	32	10mg/kg D1,8,15

由上表可知，测试样品 CB-20BK 的尾静脉给药方案下表现出不同程度的肿瘤生长抑制作用。对于 LNCaP、DU145 和 NCI-H460 人源细胞系 CDX 模型，与阴性对照组相比，

都有一定抗肿瘤生长的作用。FOLR1 和 FOLH1 双表达模型 LNCaP，以 3mg/kg 的剂量，在第 1 天、第 8 天和第 15 天（D1、D8 和 D15）给药，TGI 值为 95.68%，有优异的抗肿瘤生长的作用，明显优于 FOLR1 和 FOLH1 相对低表达的 DU145 和 NCI-H460 模型。抑瘤效果与细胞相关受体表达水平呈现一定相关性。

3. 偶联体化合物 CB-20BK 对 HuPrime®异体移植 PDX 模型的抑瘤实验 1

实验目的：偶联体化合物 CB-20BK 在 PDX 模型上的药效学研究

主要模型：LU1206、LU1380 和 LU0367

实验方案：将准备好的肿瘤组织块，接种于 BALB/c-nude 小鼠右肢前部皮下，当肿瘤体积扩增到 80-160mm^3 时随机分组，设置模型对照组和给药组，在分组第 1 天开始给药，根据小鼠最近一次的体重调整给药量，尾静脉注射，给药体积为 10μl/g，给药剂量为 3mg/kg。分组给药后，监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。分组给药后，每周测量 2 次小鼠体重，计算体重变化率；同时以游标卡尺测量肿瘤长径、短径，并计算肿瘤体积、相对肿瘤增值率、肿瘤体积抑瘤率等指标。肿瘤体积公式为 $TV = 0.5\ a \times b^2$，其中 a 是肿瘤的长径，b 是肿瘤的短径。

表 22. CB-20BK 对肺癌 PDX 模型生长的抑制作用和各个模型受体基因的表达水平（参考中美冠科数据）

模型	FOLR1 基因表达水平	FOLH1 基因表达水平	TGI(%)	剂量
LU1206	4+	2+	90.89	3mg/kg
LU1380	-	4+	30.02	3mg/kg
LU0367	-	5+	71.34	3mg/kg

由表 22 数据可知，测试样品 CB-20BK（3mg/kg）对于 LU1206、LU1380 和 LU0367 人源肺癌 PDX 模型，均表现出一定的抗肿瘤效果。FOLR1 和 FOLH1 双表达模型 LU1206 的 TGI 值为 90.89%，LU1380 和 LU0367 单表达模型，TGI 值分别为 30.02%和 71.34%，在抑瘤实验中抑瘤效果与细胞相关受体表达水平呈现一定相关性。

4. 偶联体化合物 CB-20BK 对 HuPrime®异体移植 PDX 模型的抑瘤实验 2

实验目的：偶联体化合物 CB-20BK 在 PDX 模型上的药效学研究

主要模型：BR1283 和 BR0438

实验方案：将准备好的肿瘤组织块，接种于 BALB/c-nude 小鼠右肢前部皮下，当肿瘤体积扩增到 80-160mm^3 时随机分组，设置模型对照组和给药组，在分组第 1 天开始给药，根据小鼠最近一次的体重调整给药量，尾静脉注射，给药体积为 10μl/g，给药剂量为 3mg/kg。分组给药后，监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，

具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。分组给药后，每周测量 2 次小鼠体重，计算体重变化率；同时以游标卡尺测量肿瘤长径、短径，并计算肿瘤体积、相对肿瘤增值率、肿瘤体积抑瘤率等指标。肿瘤体积公式为 $TV = 0.5\ a \times b^2$，其中 a 是肿瘤的长径，b 是肿瘤的短径。

表 23. CB-20BK 对乳腺癌 PDX 模型生长的抑制作用和各个模型受体基因的表达水平（参考中美冠科数据）

模型	FOLR1 基因表达水平	FOLH1 基因表达水平	TGI(%)	剂量
BR1283	7+	6+	96.49	3mg/kg
BR0438	5+	4+	70.74	3mg/kg

由上表可知，测试样品 CB-20BK 以 3mg/kg 的剂量在 FOLR1 和 FOLH1 双表达模型 BR1283 和 BR0438 中 TGI 值分别为 96.49%、70.74%，显现出优异的抗肿瘤生长的作用。而且，CB-20BK 在 FOLR1 和 FOLH1 表达较高的表达 BR1283 中，TGI 更优。

5. CB-20B 在 CDX 模型中的药效学研究

1）样品准备：

称取 CB-20B 冻干粉，用 PBS 溶解配成样品母液，用注射用生理盐水稀释母液到工作浓度样品溶液，备用。

2）CDX 模型构建

主要细胞系：KB 人口腔表皮样癌细胞、PC-9 人肺癌细胞和 DU145 人前列腺癌细胞。

模型构建：复苏、培养细胞，收集、计数注射于 BALB/c-nude 小鼠右肢皮下，等肿瘤生长扩增到 80-160mm^3 时分组给药或取快速扩增肿瘤块转接扩建小鼠肿瘤模型。

3）分组给药观察

分组：待肿瘤平均长至约 80-160mm^3 进行分组，设置模型对照组和不同剂量给药组。

给药：尾静脉注射。

实验观察与测量：肿瘤接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响。具体内容包括实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增减（体重每周测量 2 次）情况，眼睛、被毛及其它异常情况。

测量小鼠体重及瘤块的长径（a）和短径（b），每周 2 次。肿瘤体积（tumor volume，TV）计算公式为：$TV = 1/2 \times a \times b^2$。

4）实验结果与分析

根据小鼠肿瘤体积的变化（图 6A-6C），可见 CB-20B 对小鼠 KB、PC-9 和 DU145 细胞系 CDX 肿瘤模型均有较好的抑制作用。

6. CB-18G 在 CDX 模型中的药效学研究

1）样品准备：

称取 CB-18G 冻干粉，用 PBS 溶解配成样品母液，用注射用生理盐水稀释母液到工作浓度样品溶液，备用。

2）CDX 模型构建

主要细胞系：KB 人口腔表皮样癌细胞、PC-9 人肺癌细胞、SPC-A1 人肺腺癌细胞、CALU-3 人肺腺癌细胞和 DU145 人前列腺癌细胞

模型构建：复苏、培养细胞，收集、进行细胞计数，将细胞液注射于 BALB/c-nude 小鼠右肢皮下，等肿瘤生长扩增到 80-160mm^3 时分组给药或取快速扩增肿瘤块转接扩建小鼠肿瘤模型。

3）分组给药观察

分组：待肿瘤平均长至约 80-160mm^3 进行分组，设置模型对照组和不同剂量给药组。

给药：尾静脉注射。

实验观察与测量：肿瘤接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响。具体内容包括实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增减（体重每周测量 2 次）情况，眼睛、被毛及其它异常情况。

测量小鼠体重及瘤块的长径（a）和短径（b），每周 2 次。肿瘤体积（TV）计算公式为：$TV = 1/2 \times a \times b^2$。

4）实验结果与分析

根据小鼠肿瘤体积的变化（图 7A-7E），可见 CB-18G 对小鼠 KB、PC-9、SPC-A1、CALU-3 和 DU145 细胞系 CDX 肿瘤模型均有较好的抑制作用。

7. 偶联体化合物 CB-1020、CB-1320 和 CB-1820 对人源 HPAF-II、NCI-H226 和 SCLC-21H 细胞株皮下异体移植模型（CDX）的抑瘤实验

实验目的：配体偶联物 CB-1020、CB-1320 和 CB-1820 在 CDX 模型上的药效学研究

主要 CDX 模型：HPAF-II（人胰腺癌细胞）、NCI-H226（人肺癌细胞）和 SCLC-21H（小细胞肺癌细胞）

实验方案：

将准备好的细胞或肿瘤组织块，接种于 BALB/c-nude 小鼠右肢前部皮下，当肿瘤体积扩增到 80-160 mm^3 时随机分组，设置模型对照组和给药组，在分组第 1 天开始给药，根据小鼠最近一次的体重调整给药量，尾静脉注射，给药体积为 10 μl/g。分组给药后，监测包

括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。分组给药后，每周测量 2 次小鼠体重，计算体重变化率；同时以游标卡尺测量肿瘤长径、短径，并计算肿瘤体积、相对肿瘤增值率、肿瘤体积抑瘤率等指标。肿瘤体积公式为 $TV = 0.5\ a \times b^2$，其中 a 是肿瘤的长径，b 是肿瘤的短径。

表 24. CB-1020、CB-1320 和 CB-1820 对 CDX 模型的抑制作用和各个模型受体基因的表达水平（参考中美冠科数据）

模型	TRPV6 基因表达水平	GNRHR 基因表达水平	SSTR2 基因表达水平	FOLH1 基因表达水平	TGI(%) (CB-1020)	TGI(%) (CB-1320)	TGI(%) (CB-1820)	P 值	剂量
HPAF-II	+	-	+/-	+/-	0.283			0.461	3mg/kg
					0.445			0.153	5mg/kg
					0.899			0.023	10mg/kg
NCIH226	+/-	+/-	+/-	-			0.823	0.011	3mg/kg
						0.962		0.006	3mg/kg
						0.992		0.005	10mg/kg
SCLC-21H	2+	+/-	3+	-			0.995	0.131	3mg/kg
						0.361		0.610	3mg/kg
						0.985		0.134	10mg/kg

CB-1020 对人源 HPAF-II，CB-1320 对 NCI-H226 和 SCLC-21H，CB-1820 对 SCLC-21H 细胞株皮下异体移植模型，都有较明显的抗肿瘤生长作用。

8. 偶联体化合物 CR19428 对人源 CALU-3、SCLC-21H 和 SPC-A1 细胞株皮下异体移植模型（CDX）的抑瘤实验

实验方案：将准备好的细胞，接种于 BALB/c-nude 小鼠右肢前部皮下，当肿瘤体积扩增到 80-160mm^3 时随机分组，设置模型对照组和给药组，在分组第 1 天开始给药，根据小鼠最近一次的体重调整给药量，尾静脉注射，给药体积为 10μl/g，每周给药 2 次连续给药 3 周。分组给药后，监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。分组给药后，每周测量 2 次小鼠体重，计算体重变化率；同时以游标卡尺测量肿瘤长径、短径，并计算肿瘤体积、相对肿瘤增值率、肿瘤体积抑瘤率等指标。肿瘤体积公式为 $TV = 0.5\ a \times b^2$，其中 a 是肿瘤的长径，b 是肿瘤的短径。

表 25. CR19428 对肺癌 PDX 模型的抑制作用

模型	TGI(%)	给药剂量/时间
CALU-3	51	50mg/kg q2/w*3
SCLC-21H	66	50mg/kg q2/w*3
SPC-A1	75	50mg/kg q2/w*3
SPC-A1	91	100mg/kg q2/w*3

CR-19428 为 FOLR1 和 FOLH1 的配体和有效载荷 Dxd 的药物偶联体。由上表可知，它对人源 CALU-3、SCLC-21H 和 SPC-A1 细胞株皮下异体移植模型，都有较明显的抗肿瘤生长作用。

9. 偶联体化合物 CBP-1018 肺癌 LU2505 模型有效性研究（PDX 模型）

本实验为肺癌 PDX 模型 LU2505（来自亚洲女性患者）第 3 代，属于快速生长的肿瘤模型。BALB/c 裸小鼠皮下荷瘤，肿瘤体积约 150mm^3 时进行分组：供试品低、中和高组，小分子 MMAE 和靶向多肽 20BK-SM09 对照组，以及空白制剂对照组，共 6 组，8 只/组；分组后第 1、8 和 15 天给药，末次药后继续观察 14 天。供试品 CBP-1018 的活性物质为 CB-20BK，通过将 CB-20BK 与辅料混合后冻干获得。

表 26. 注射用 CBP-1018 在肺癌 LU2505 模型的药效学结果（首次试验）

供试品 /对照品	**剂量 (mg/kg)**	**体重（g）**	**瘤体积（mm^3）**	**抑瘤率 TGI%**	**瘤重（mg）**
空白制剂对照组	/	24.0	2219.62	/	2031.4（D22）
CBP-1018	4.5	22.5	0.00	100.00	0.0（D29）
	1.5	22.1	386.16	82.60	400.7（D29）
	0.5	23.6	1634.50	26.36	2084.7（D26）
20BK-SM09	10	23.8	2024.75	8.78	1811.5（D22）
MMAE	0.375	23.5	1132.61	48.97	1597.1（D29）

注：1）因动物福利要求，组内平均瘤体积达到 2000mm^3，动物需要进行安乐死，因此每组的处死时间不同。2）体重、瘤体积、抑瘤率的数据是第 22 天（D22）的数据。

如表 26 和图 8A 所示：

所有组别动物给药后未见异常临床表现，未见死亡；各组动物体重缓慢增长。

空白制剂对照组、20BK-SM09 组、CBP-1018 低剂量组的动物因平均瘤体积超过 2000mm^3 分别在第 22 天、第 22 天和第 26 天（D26）进行了安乐死。因此表 26 中体重、瘤体积、抑瘤率数据均是 D22 的数据。

注射用 CBP-1018 的有效性具有明显的剂量相关性：低剂量组无效，中和高剂量组有效，高剂量组的肿瘤在第 19 天（D19）就已经被完全治愈，在第 29 天（D29）未见生长迹象。

多肽组 20BK-SM09 未见明显的抑瘤作用；提示单独的靶向性多肽不足以产生明确的抗肿瘤作用。

MMAE 组具有明确的抑瘤作用，0.375mg/kg 的剂量是 CBP-1018 在 1.5mg/kg 含有等摩尔的 MMAE，对比发现，CBP-1018 在 1.5mg/kg 明显优于 MMAE 组，提示配体靶向的优势（82.60% vs 48.97%）。

10. 偶联体化合物 CBP-1018 肺癌 LU1206 模型有效性研究（PDX 模型）

本实验为肺癌 PDX 模型 LU1206（来自亚洲女性患者）第 5 代，属于快速生长的肿瘤模型。BALB/c 裸小鼠皮下荷瘤，肿瘤体积约 150mm^3 时进行分组：供试品低、中和高组，小分子 MMAE 和靶向多肽 20BK-SM09 对照组，以及空白制剂对照组，共 6 组，8 只/组；分组后第 1、8 和 15 天给药，末次药后继续观察 14 天。

表 27. 注射用 CBP-1018 在肺癌 LU1206 模型的药效学结果（首次试验）

组别	剂量（mg/kg）	体重（g）	肿瘤体积（mm^3）	瘤体积抑瘤率（%）	肿瘤重量（mg）	瘤重抑制率（%）
空白制剂对照组	/	22.7	1216.67	/	856.14	/
CBP-1018	4.5	23.4	31.44	97.42	13.55	98.42
	1.5	23.7	301.64	75.21	185.10	78.38
	0.5	22.7	1118.30	8.08	852.19	0.46
20BK-SM09	10	23.3	1158.80	4.76	914.36	-6.80
MMAE	0.375	23.6	778.32	36.03	437.73	54.53

如表 27 和图 8B 所示：

所有组别动物给药后未见异常临床表现，未见死亡，所有动物均在第 29 天进行安乐死。各组动物体重基本维持不变，均稍高于给药的第一天。

注射用 CBP-1018 的有效性具有明显的剂量相关性：低剂量组无效（抑瘤率 8.08%），中和高剂量组有效，抑瘤率分别在 75.21%和 97.42%。低和中剂量的差距比较大。

多肽组 20BK-SM09 未见明显的抑瘤作用，提示单独的靶向性多肽在此模型也不足以产生明确的抗肿瘤作用。

MMAE 组具有明确的抑瘤作用。0.375mg/kg 的剂量是 CBP-1018 在 1.5mg/kg 含有等摩尔的 MMAE；对比发现，CBP-1018 在 1.5mg/kg 明显优于 MMAE 组，提示配体

靶向的优势（瘤体积抑瘤率：75.21%vs 36.03%，瘤重抑瘤率：78.38% vs 54.53%）。

11. 荷瘤小鼠组织分布（PDX 模型 LU2505）

12只接种HuPrime®肺癌LU2505模型瘤块的雌性荷瘤鼠和12只健康雄性BALB/c裸鼠，单次经尾静脉注射给予1.5mg/140μCi/kg的[^{3}H]CBP-1018（同位素标记在MMAE上）。分别于0.5小时、2小时、6小时和24小时取3雄3雌，置于诱导盒内吸入适量二氧化碳麻醉后经心脏穿刺采集血液，然后立即实施安乐死取材。

表28. 单次静脉给予[^{3}H]CBP-1018后不同时间点各组织中的总放射性

组织	放射性浓度 (ng Eq./g)							
	0.5小时		2小时		6小时		24小时 (%C_{max})	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
肿瘤	**763**	/	**643**	/	**566**	/	**413**	/
食管	915	784	628	508	521	172	286	91.7
体脂	341	479	288	276	231	177	67.2	43.7
骨骼肌	321	311	207	137	188	95.5	90.8	61.5
脾脏	744	693	701	524	671	421	253	163
胃壁	658	623	414	370	460	259	211	123
全脑	66.3	67.9	53.8	39.5	82.0	48.2	76.4	68.3
睾丸附睾	350	494	279	298	183	248	92.3	64.8
心脏	785	795	415	326	219	143	114	69.2
肺脏	**1493**	**1807**	997	920	416	392	109	93.7
肾脏	**5682**	**6118**	**3300**	**4197**	**1227**	**1391**	**241**	**238**
肝脏	**1423**	**1306**	**1257**	**865**	**1138**	**599**	**712**	**518**
小肠壁	726	778	641	816	490	334	210	90.9
大肠壁	550	520	672	823	1074	490	215	128
全血	**2087**	**3194**	**684**	**691**	**211**	**132**	**86.5**	**64.6**
血浆	7372	7610	1844	1760	495	306	214	140

由上表可知：动物组织分布未见雌雄差异。给药后，药物主要分布于肾脏、全血（主要分布在血浆）、肝脏和肺脏。各组织0.5小时最高，随后各组织药物迅速消除，肝脏和肿瘤消除最慢。肿瘤内药物的缓慢消除可以解释CBP-1018在有效性方面的优势。

12. 大鼠排泄试验

6只正常SD大鼠，均雌雄各半，单次尾静脉注射给予0.75mg/70μCi/kg的[^{3}H]CBP-1018。在指定时间间隔收集了整体大鼠给药前和给药后0~168小时的尿液、粪便、笼具冲洗/清洗

液及尸体等样品，以及BDC大鼠给药前和给药后0~72小时的胆汁、尿液、粪便及笼具冲洗/清洗液等样品。上述样品均在低温冰箱（-10°C~-30°C）冷冻保存。

每份样品加入适量闪烁液混匀后，使用液体闪烁计数仪测定放射性量。胆汁、尿液、粪便、笼具冲洗及清洗液、尸体等样品中测定的放射性量用于计算占给药量的百分比。血浆样品中的放射性量用于计算每克样品中的总放射性，应用WinNonLin软件（7.0版，Pharsight）按照非房室模型计算血浆总放射性的主要药代动力学参数。

表 29. 整体大鼠给药后物料平衡研究结果

性别（只数）	尿液（%）	粪便（%）	笼具冲/清洗液（%）	尸体（%）	总回收率（%）
雌性（n=3）	50.26±6.11	23.93±0.98	5.70±2.63	4.51±1.19	84.40±4.02
雄性（n=3）	53.60±3.68	20.61±1.74	4.24±2.16	4.83±0.42	83.28±0.71
雌性和雄性（n=3雌3雄）	51.93±4.87	22.27±2.21	4.97±2.30	4.67±0.82	83.84±2.65

由上表可知，CBP-1018主要经过尿液排出，约占到总给药量的约57%；经过粪便排出不足25%。主要经过肾脏从尿液排出的结果与裸鼠的组织分布中在肾脏大量分布是一致的。

13. 血浆稳定性

1 μg/mL、10 μg/mL 和 100 μg/mL 浓度的 CBP-1008（其活性物质为 WO2017025047A1 中记载的 LDC10B，通过将 LDC10B 与辅料混合后冻干获得 CBP-1008。WO2017025047A1 通过引用的方式全文并入）和 CBP-1018，与不同种属的血浆在 37°C 下孵育 2 小时，观察两个化合物的稳定性。结果显示（表 30），CBP-1018 在各种属血浆稳定性，相对 0 小时的浓度，2 小时孵育后剩余百分比均在 90%以上。而 CBP-1008 仅在大鼠血浆稳定（87.92-91.82%），在其他种属血浆中均不稳定，仅剩余 0.751%-24.52%。

试验结果提示 CBP-1018 的血浆稳定性优于 CBP-1008。

表 30. 不同浓度的 CBP-1008 和 CBP-1018 在各种属的血浆稳定性数据汇总（相对 0 小时的%）

化合物	浓度	小鼠	大鼠	食蟹猴	人
CBP-1008	1μg/mL	0.805	87.92	0.961	0.751
	10 μg/mL	1.27	91.47	0.988	0.807
	100 μg/mL	24.52	91.82	1.10	0.953
CBP-1018	1μg/mL	94.4	92.2	97.3	99.1
	10 μg/mL	96.5	95.0	95.8	102
	100 μg/mL	98.1	94.8	101	103

注：

1）表内数据为血浆孵育 2 小时后血浆化合物浓度是 0 小时浓度的百分比；

2）由于本次数据分属于两个试验，小数点后面的有效位数不一致，为了数据的可溯源性和真实性，直接引用报告中数据，未进行统一。

14. PK 中的半衰期

和血浆稳定性比较一致的是，CBP-1018 在大鼠和食蟹猴的药代动力学半衰期（约 1 小时）明显长于 CBP-1008（约 20 分钟），提示 CBP-1018 的稳定性优于 CBP-1008。

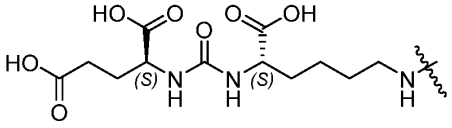
表 31. 在大鼠 PK 中 CBP-1008 和 CBP-1018 的半衰期（小时）比较

	0.15 mg/kg		**0.5 mg/kg**		**1.5 mg/kg**	
	雄	**雌**	**雄**	**雌**	**雄**	**雌**
CBP-1008	0.245	0.215	0.249	0.202	0.222	0.368
CBP-1018	0.928	0.833	1.37	0.952	1.49	1.51

权 利 要 求 书

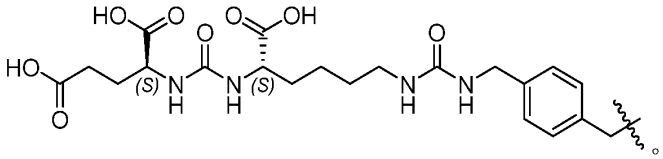
1. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐包含有效载荷和两个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及前列腺特异性膜抗原配体部分。

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，其中所述前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



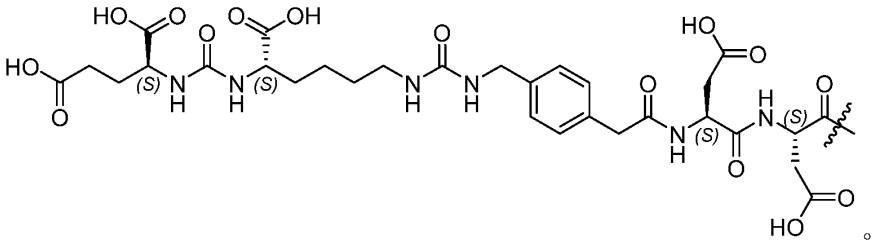
。

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，其中所述前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



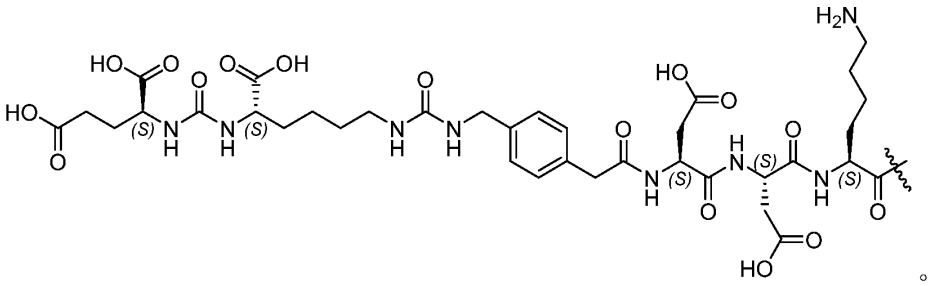
。

4. 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，其中所述前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



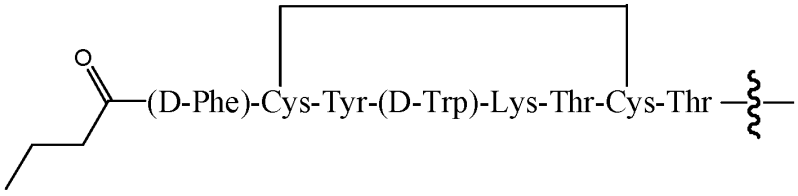
。

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，其中所述前列腺特异性膜抗原配体包括如下结构：



。

6. 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个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及具有式（I）所示的配体部分：



（I）。

7. 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个靶向分子，其中所述两个靶向分子分别为协同作用分子部分以及 P10，并且所述有效载荷为喜树碱及其任何衍生物。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述两个靶向分子是不同的。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述协同作用分子是细胞相互作用分子。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述两个靶向分子是与不同的细胞分子相互作用的细胞相互作用分子。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述协同作用分子是能够介导内吞作用的内吞作用分子。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述协同作用分子与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)、GNRHR、Her2、Trop2、Her3、NECTIN4、LRP1、GLUT1、EGFR1、AXL、CA9、CD44、Claudin18.2、APN、DLL3、CEACAM5、FZD10、TFRC、MET、IGFR1、SSTR2、CCKBR、LFA1、ICAM、GPR87、GM-CSF、GM-CSFR、TIM3、TLR 家族、CD40、CD40L、OX40、OX40L、GITRL、GITR、4-BBL、4-1BB、CD70、CD27、ICOSL、ICOS、HHLA2、CD28、CD86/80、CD28、MHCII 抗原、TCR、CTLA-4、CD155、CD122、CD113、IGIT、PD-L1、PD1、Galectin-9、TIM-3、HVEM、BTLA、CD160、VISTA、B7-H4、B7-H3、磷脂酰丝氨酸、HHLA2、LAG3、Galectin-3、LILRB4、SIGLEC15、NKG2A、NKG2D、SLAMF7、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、FGFR1、FGFR2、FGFR4、NeuGcGM3 和 CXCR4。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述协同作用分子与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)、SSTR2 和 GNRHR。

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，其中所述协同作用分子与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、SSTR2 和 GNRHR。

15. 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，其中所述协同作用分子与选自下组的分子结合：FOLR1、TRPV6、FOLH1(PMSA)和 GNRHR。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述协同作用分子是叶酸或其类似物。

17. 根据权利要求 16 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，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。

18. 根据权利要求 1 或 6 中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。

19. 根据权利要求 1 或 6 中所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述有效载荷选自下组：小分子化合物、核苷酸、肽和蛋白。

20. 根据权利要求 19 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。

21. 根据权利要求 20 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：喜树碱及其任何衍生物、澳瑞他汀及其任何衍生物、美登素及其任何衍生物、放射性核素络合物、环氧化酶-2 抑制剂、紫杉醇及其任何衍生物、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。

22. 根据权利要求 21 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喜树碱及其任何衍生物、澳瑞他汀及其任何衍生物、放射性核素络合物或者环氧化酶-2 抑制剂。

23. 根据权利要求 1-22 中任一项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连接子与至少一个所述靶向分子连接。

24. 根据权利要求 23 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述连接子是肽类连接子、二硫化物连接子、pH 依赖型连接子或者上述连接子的组合。

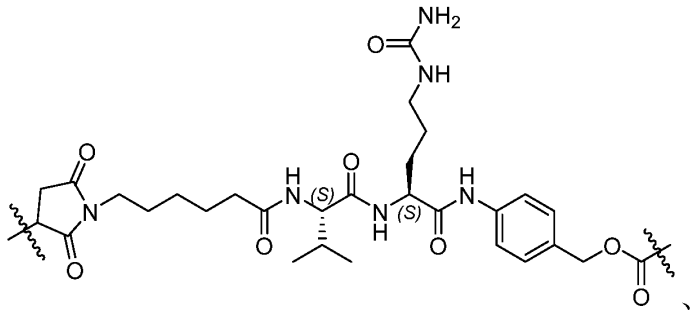
25. 根据权利要求 24 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述肽类连接子可在特定的生理环境下通过蛋白酶裂解或还原裂解。

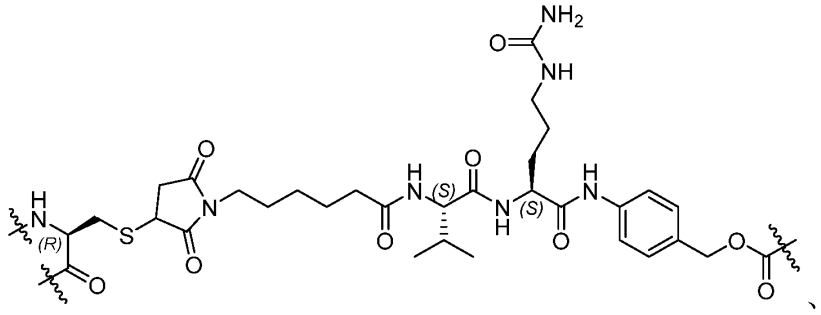
26. 根据权利要求 24 或 25 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述肽类连接子选自下组：半胱氨酸、赖氨酸、赖氨酸-赖氨酸、缬氨酸-瓜氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-赖氨酸、半胱氨酸-赖氨酸、半胱氨酸-谷氨酸、天冬氨酸-天冬氨酸和天冬氨酸-天冬氨酸-赖氨酸，可选的，上述氨基酸中的羧酸被酰胺化。

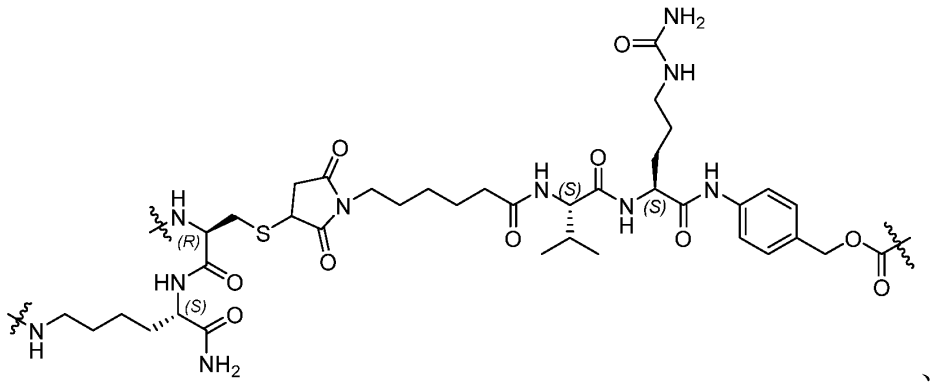
27 根据权利要求 24 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述二硫化物连接子选自下组：DMDS、MDS、DSDM 和 NDMDS。

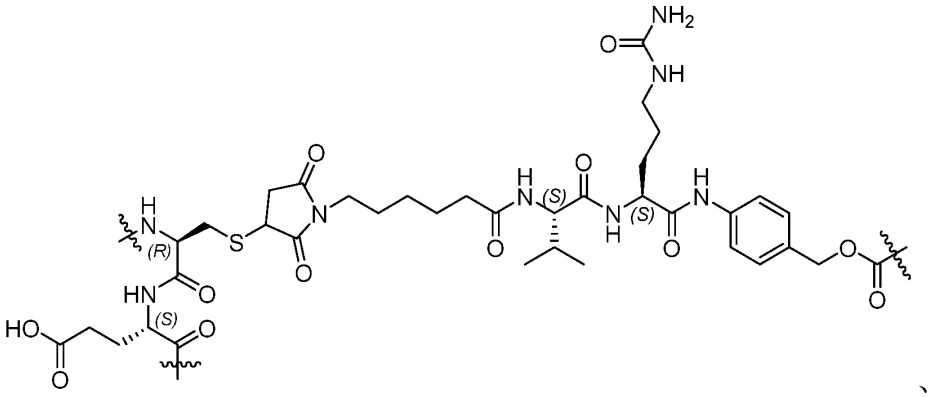
28. 根据权利要求 24 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述 pH 依赖型连接子是顺乌头酸酐。

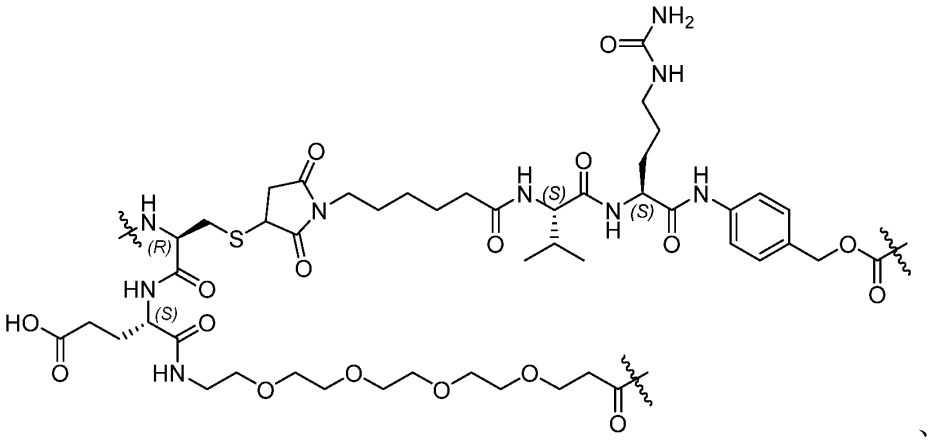
29. 根据权利要求 23 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述连接子包括如下结构：

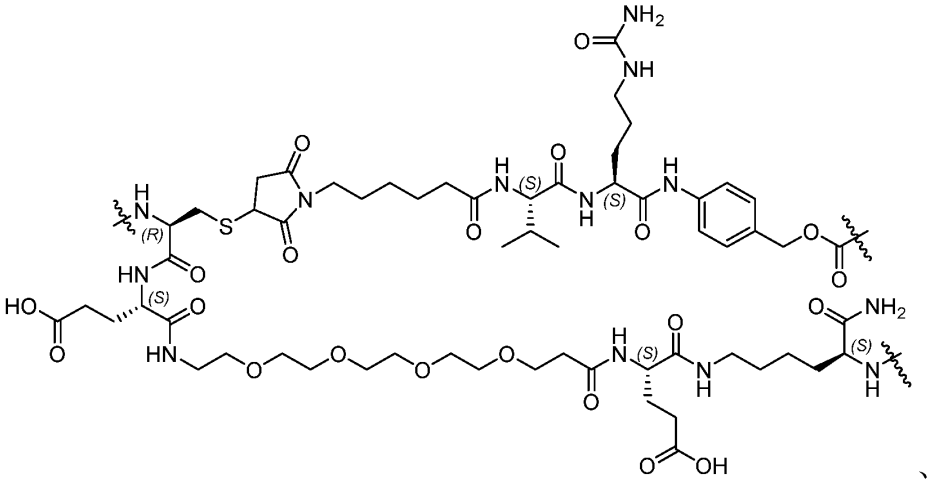


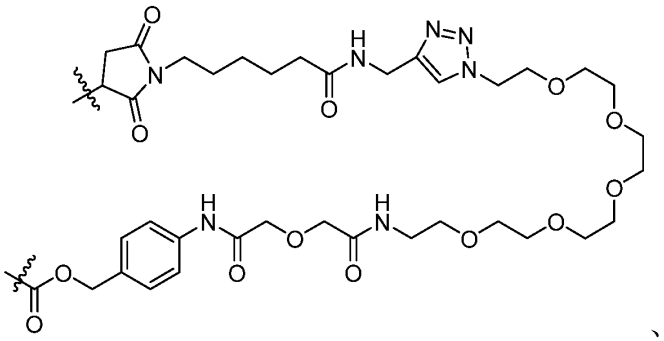


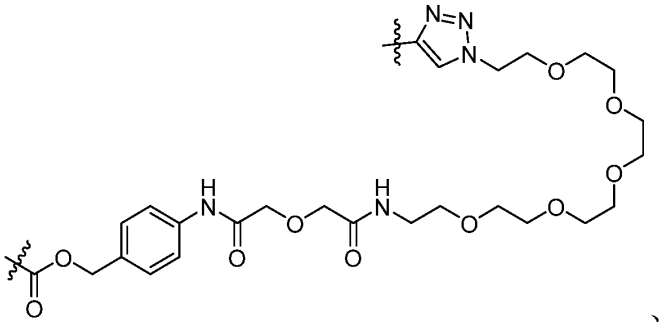


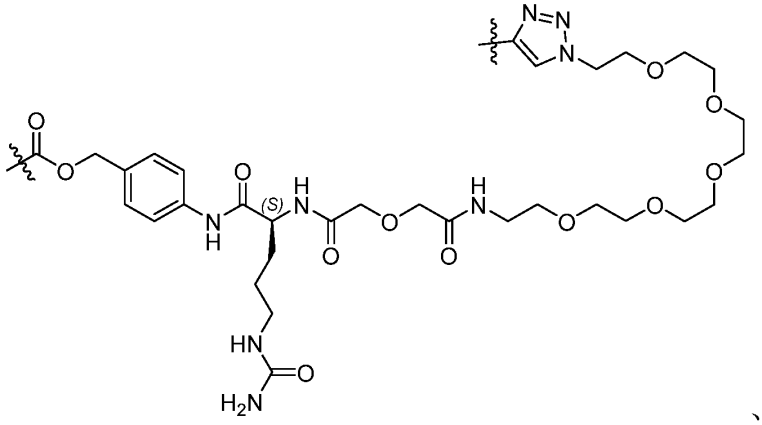


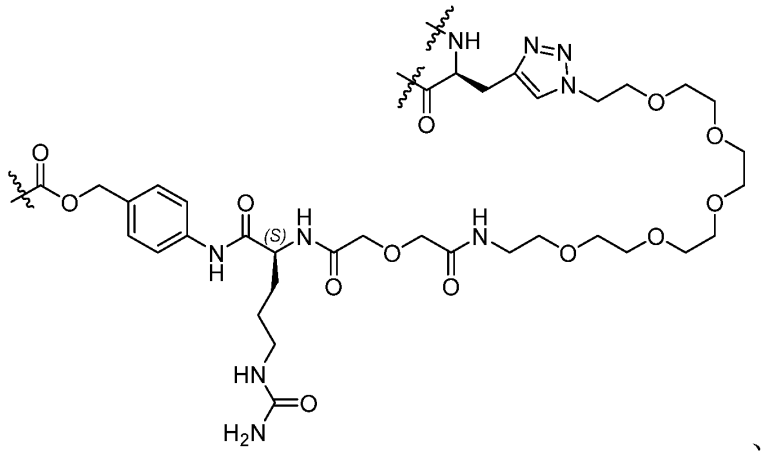




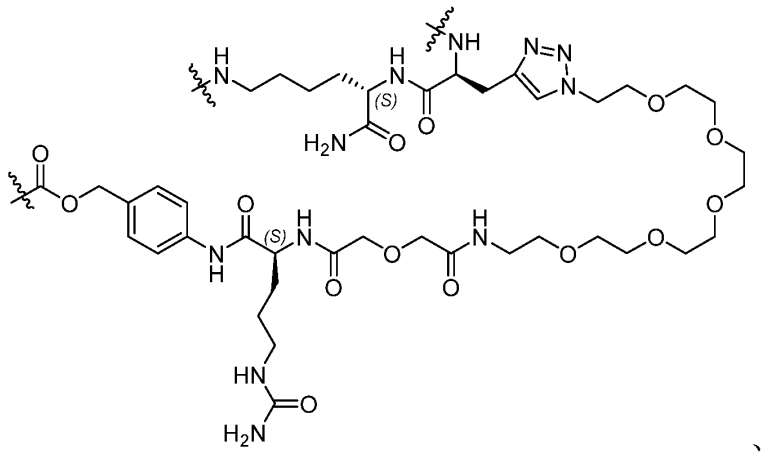




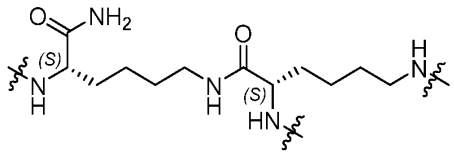




、



、



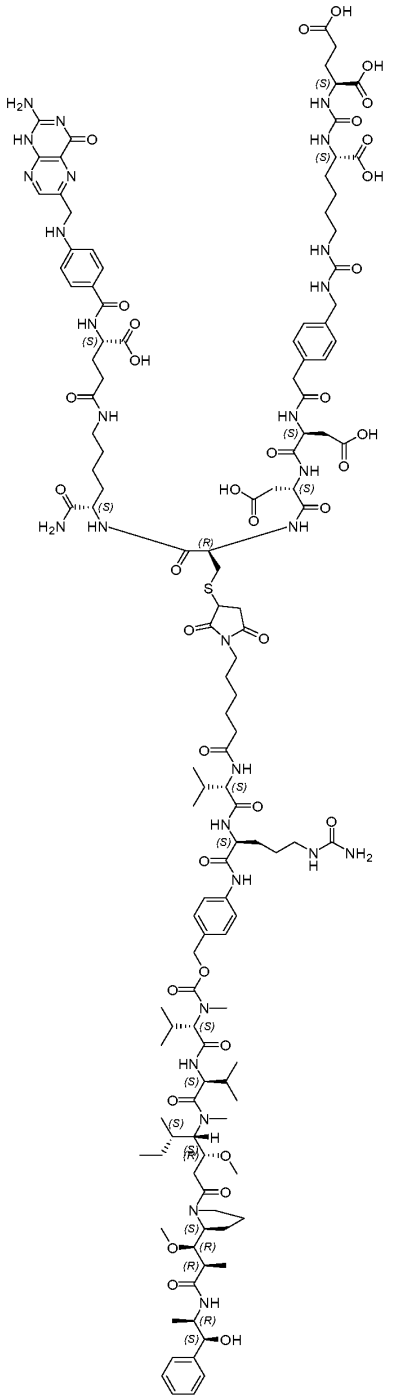
，

或者所述连接子是上述结构与肽类连接子的组合。

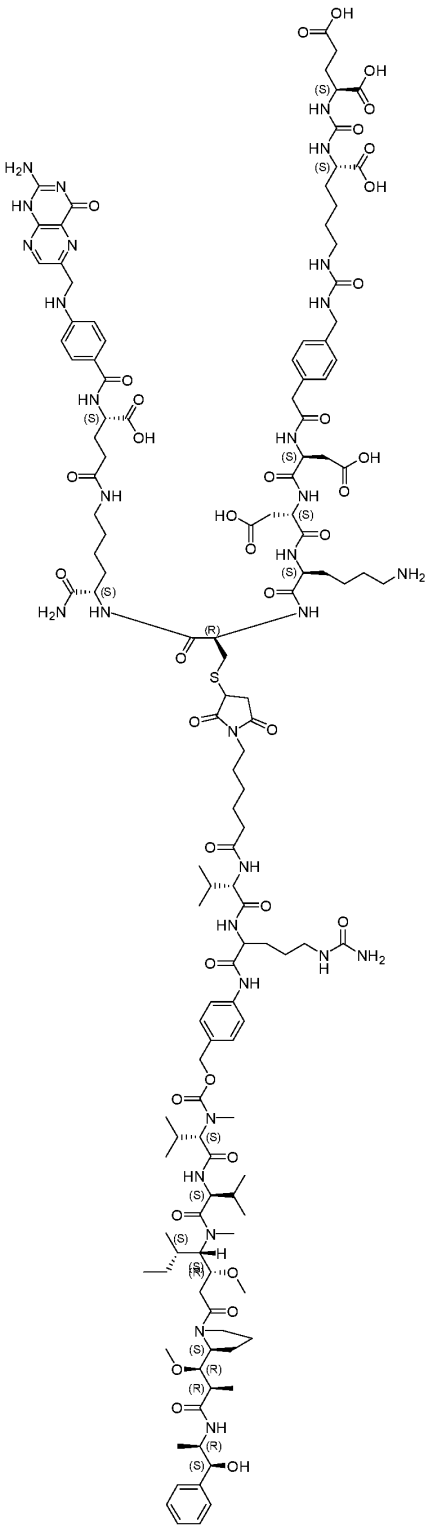
30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述两个靶向分子通过间隔区连接。

31. 根据权利要求 30 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述间隔区包含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。

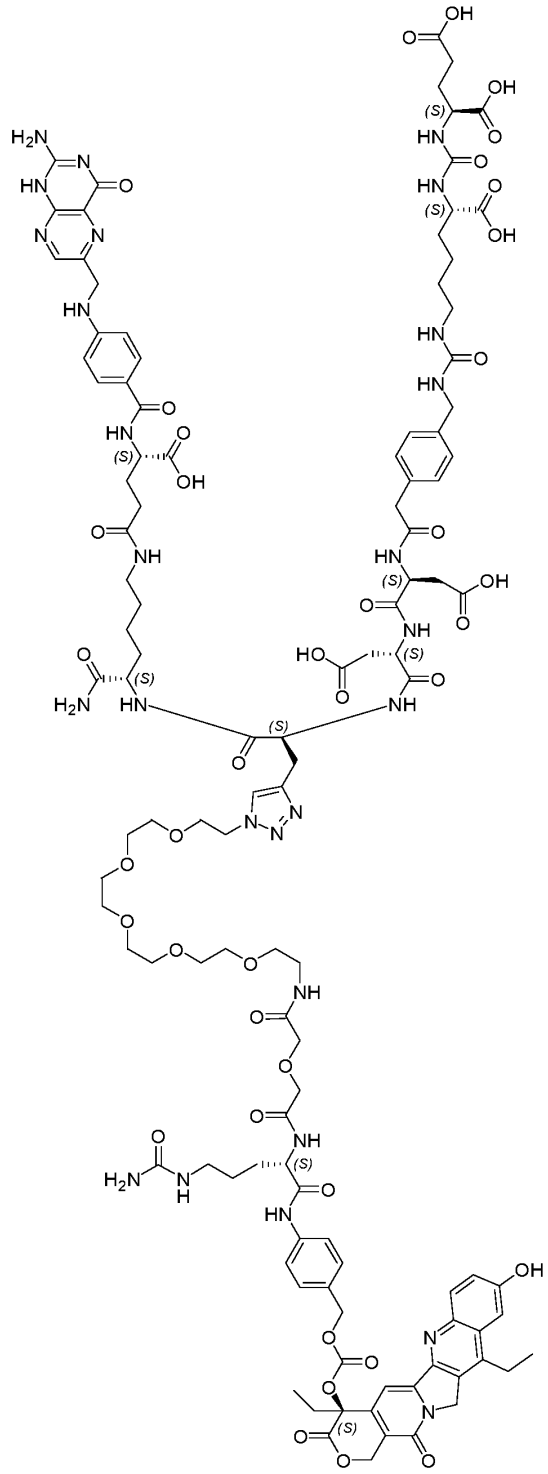
32. 根据权利要求 1 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述偶联体化合物选自由下述化合物组成的组：



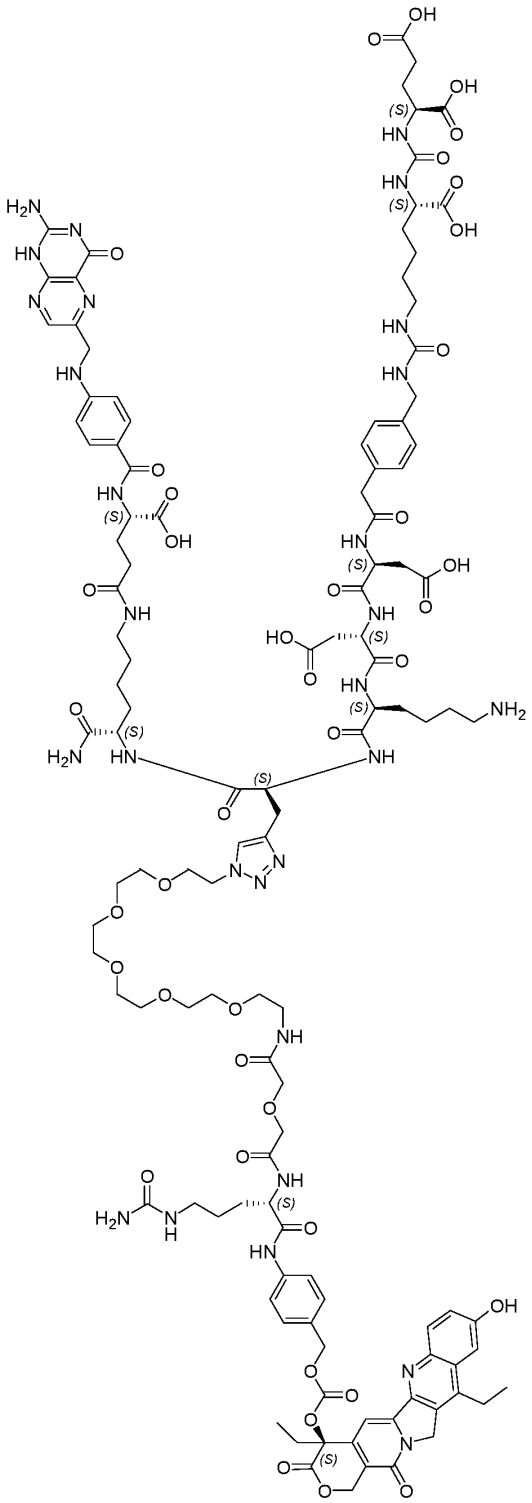
（CB-20B）、



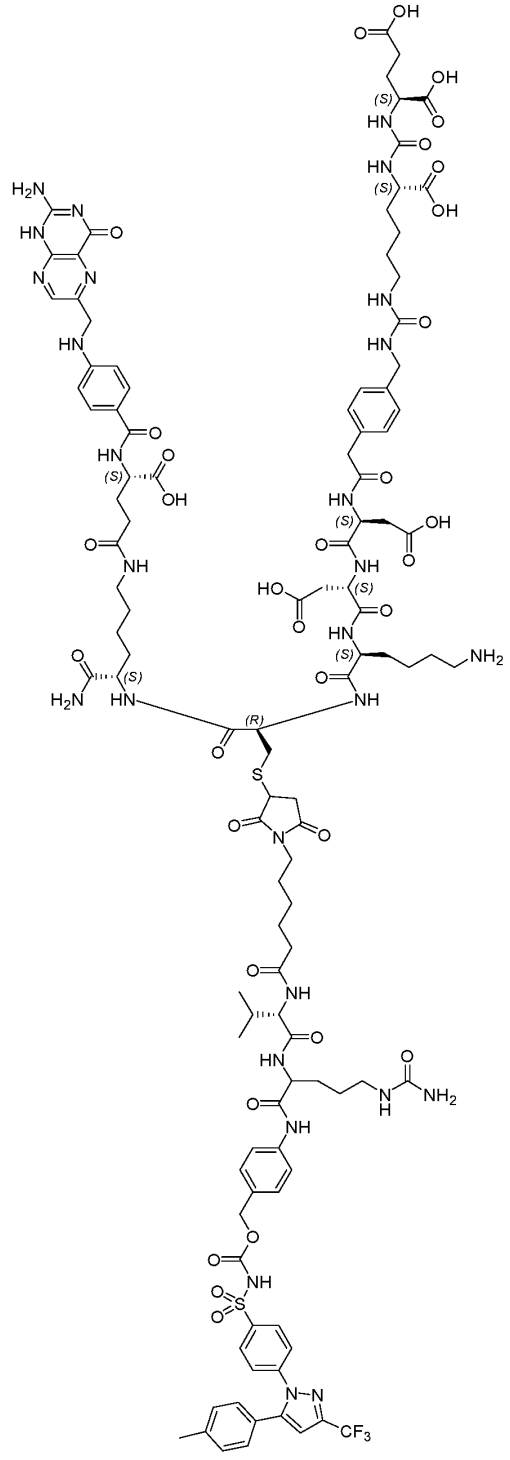
（CB-20BK）、



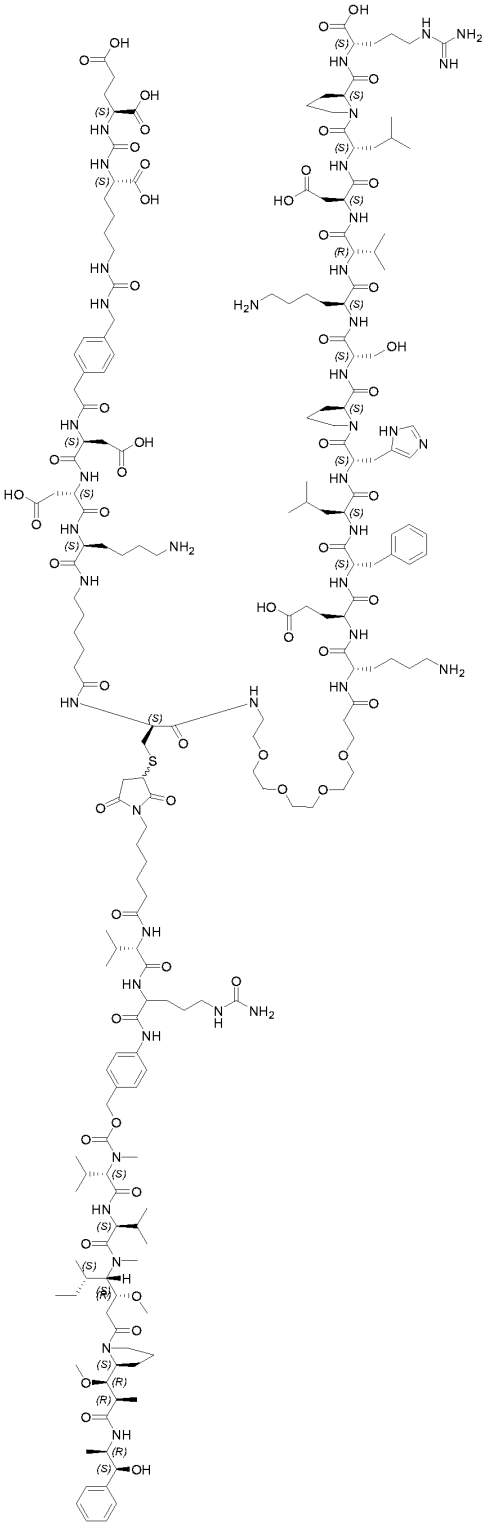
（CB-60S）、



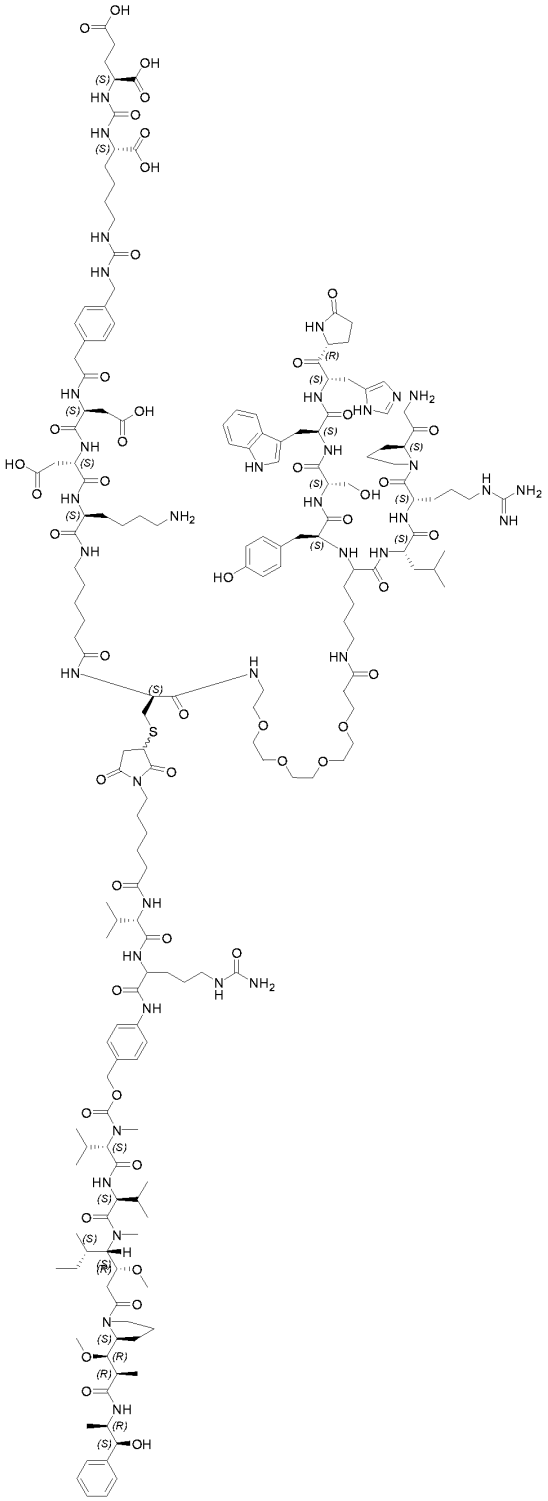
（CB-60SK）、



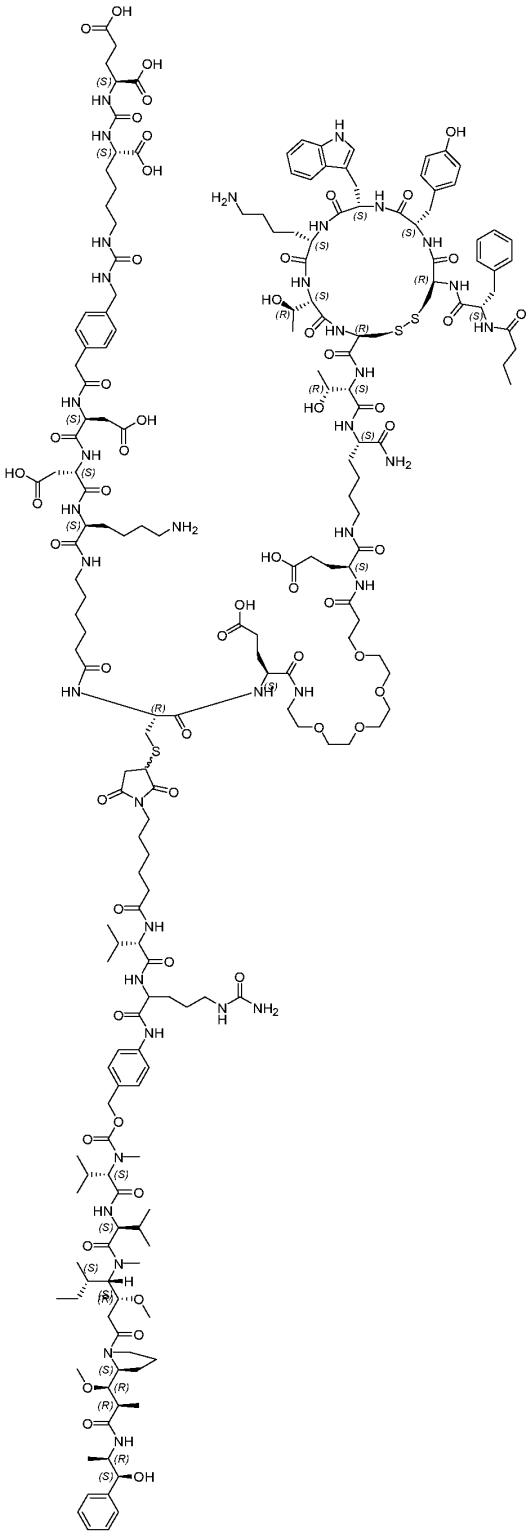
（CB-20C）、



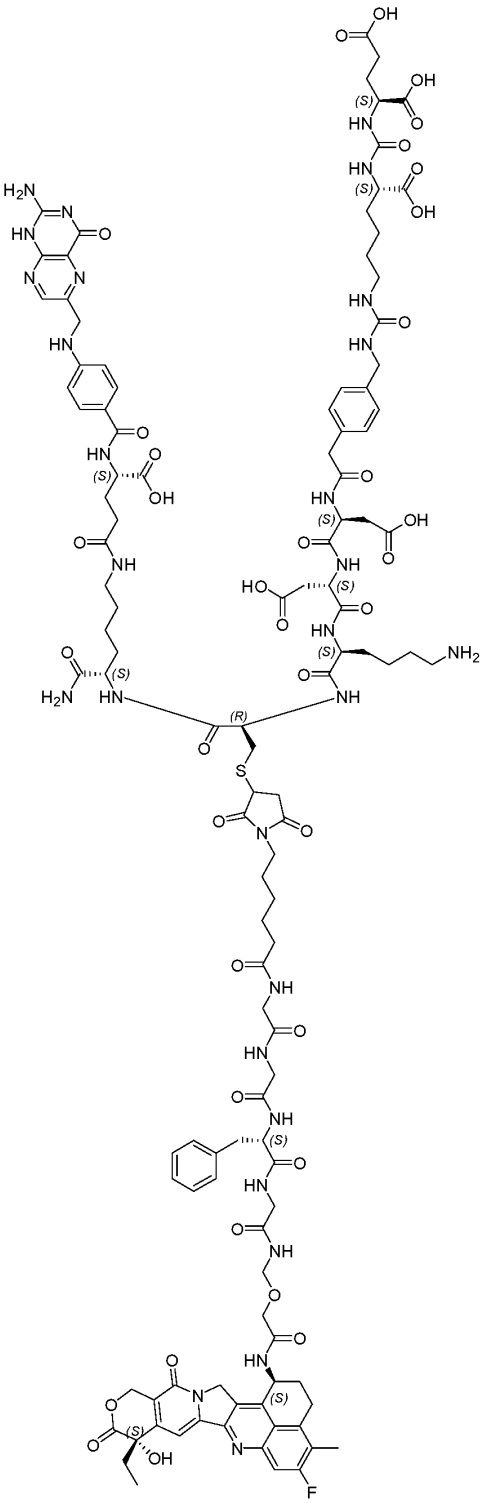
（CB-1020）、



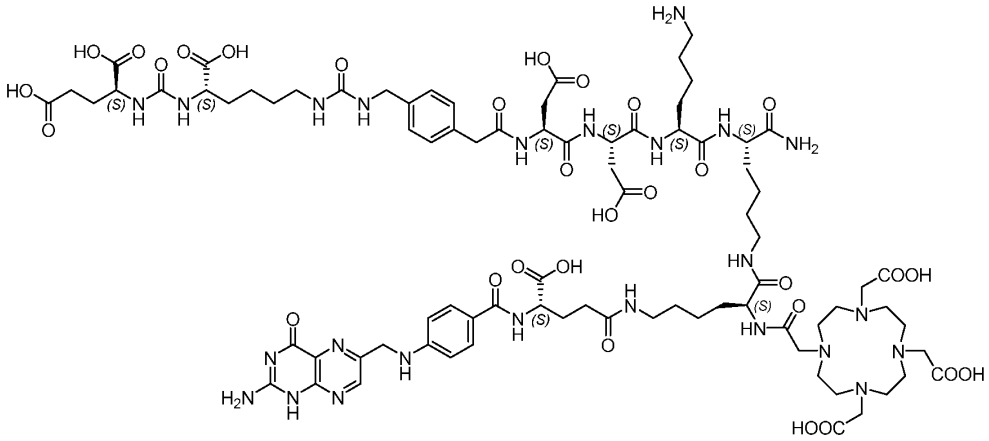
（CB-1320）、



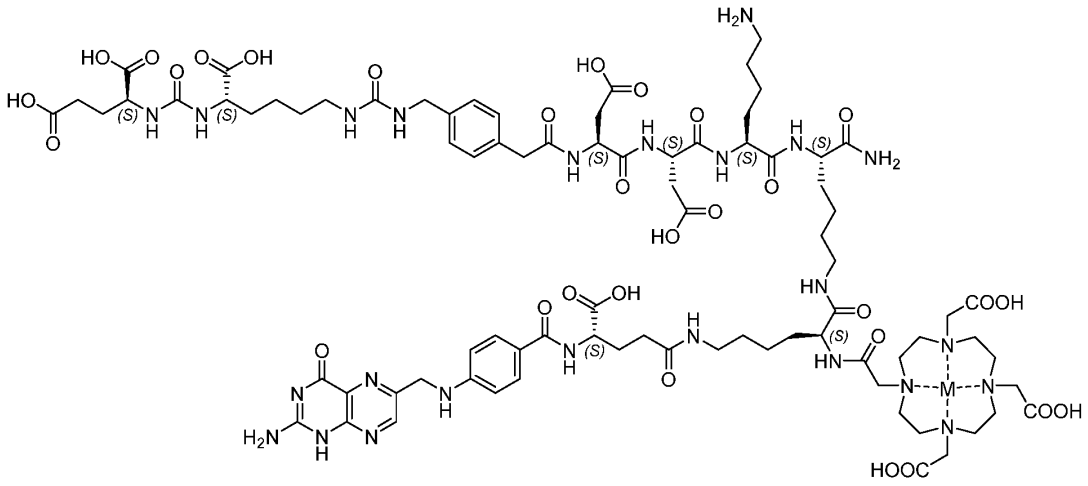
（CB-1820）、



（CR19428）、

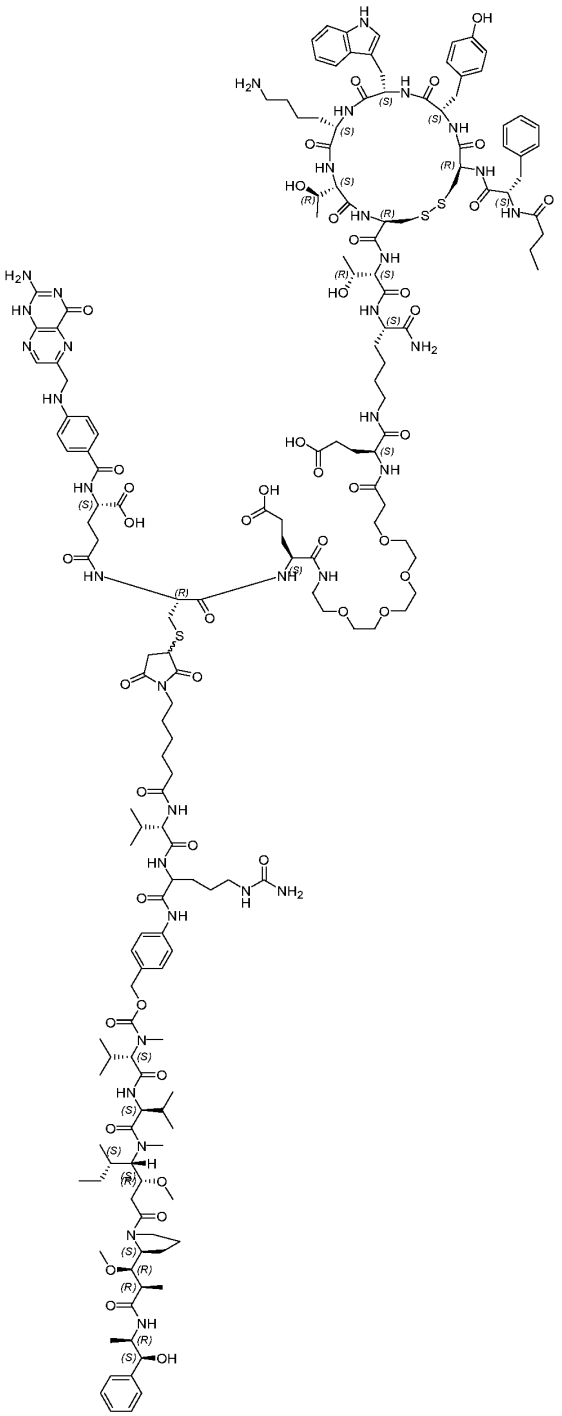


（20R-SM09）和

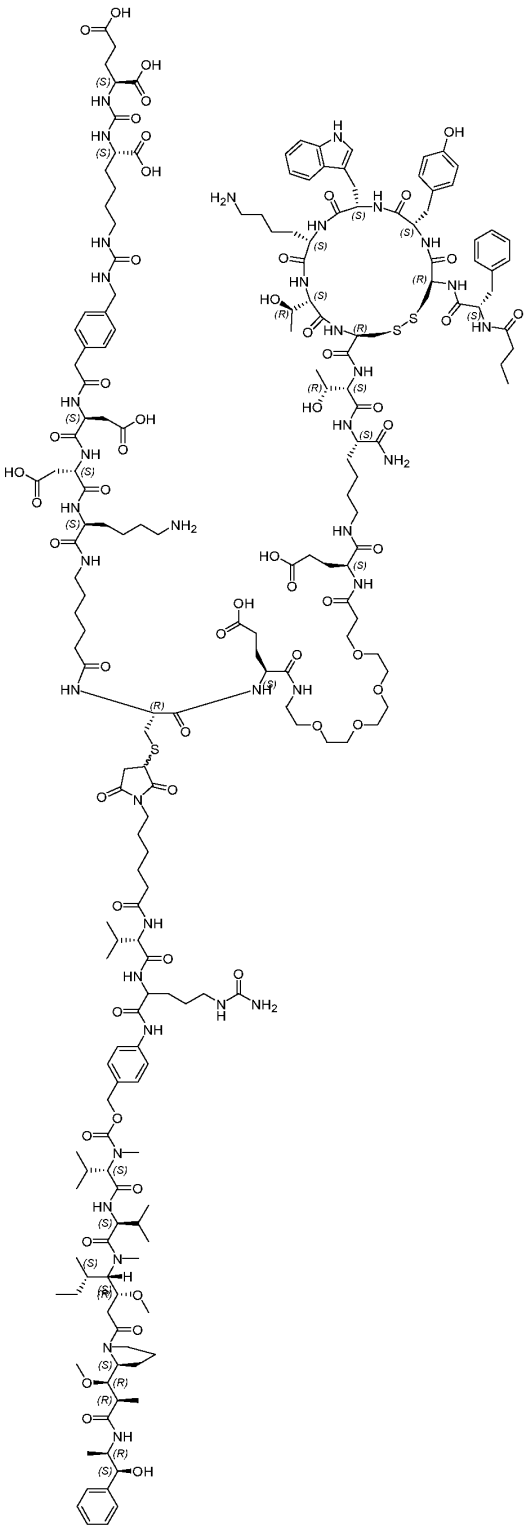


（CB-20R），其中 M 为放射性核素。

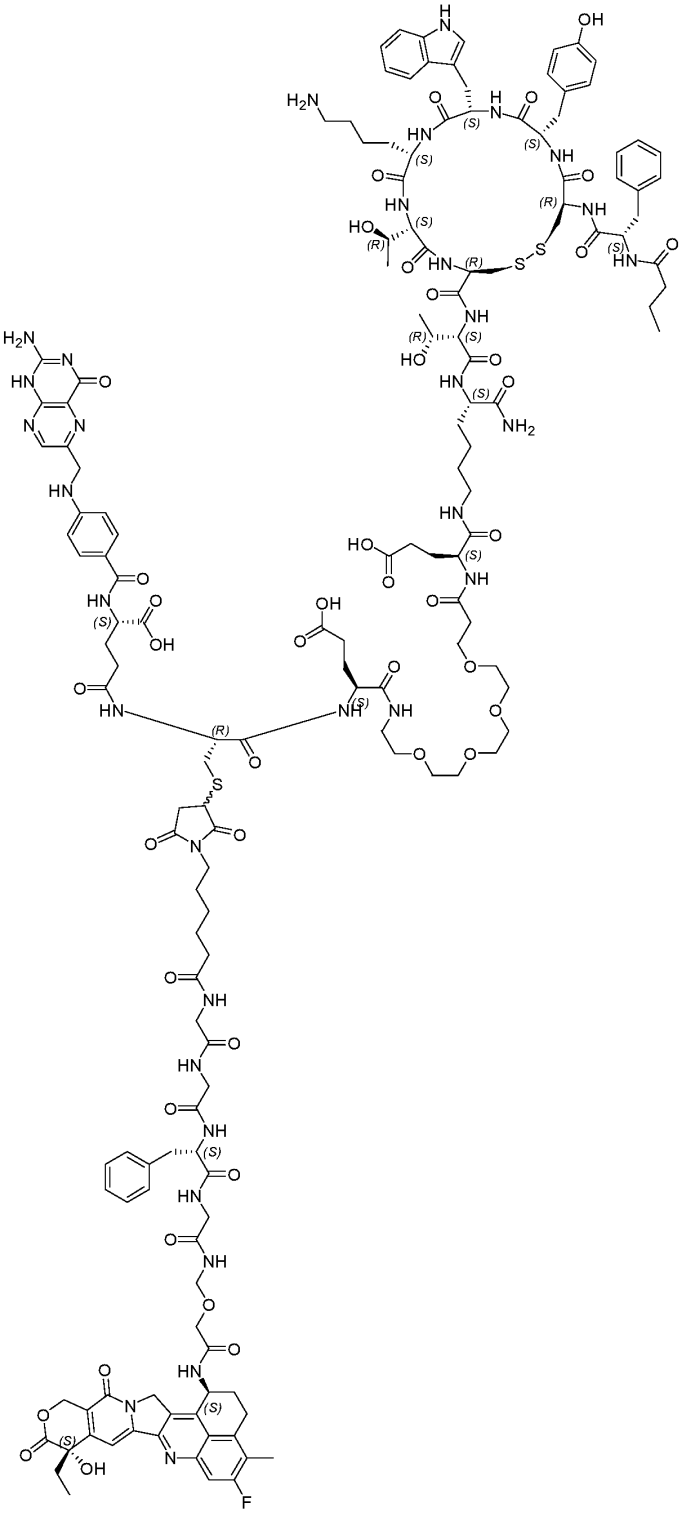
33. 根据权利要求 6 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述偶联体化合物为：



（CB-18G）、

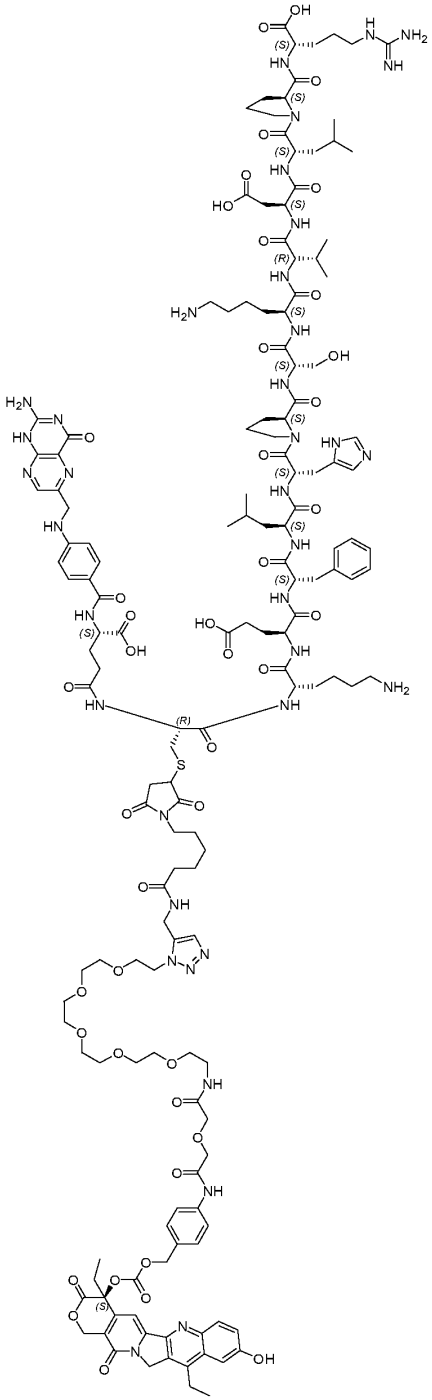


（CB-1820）或

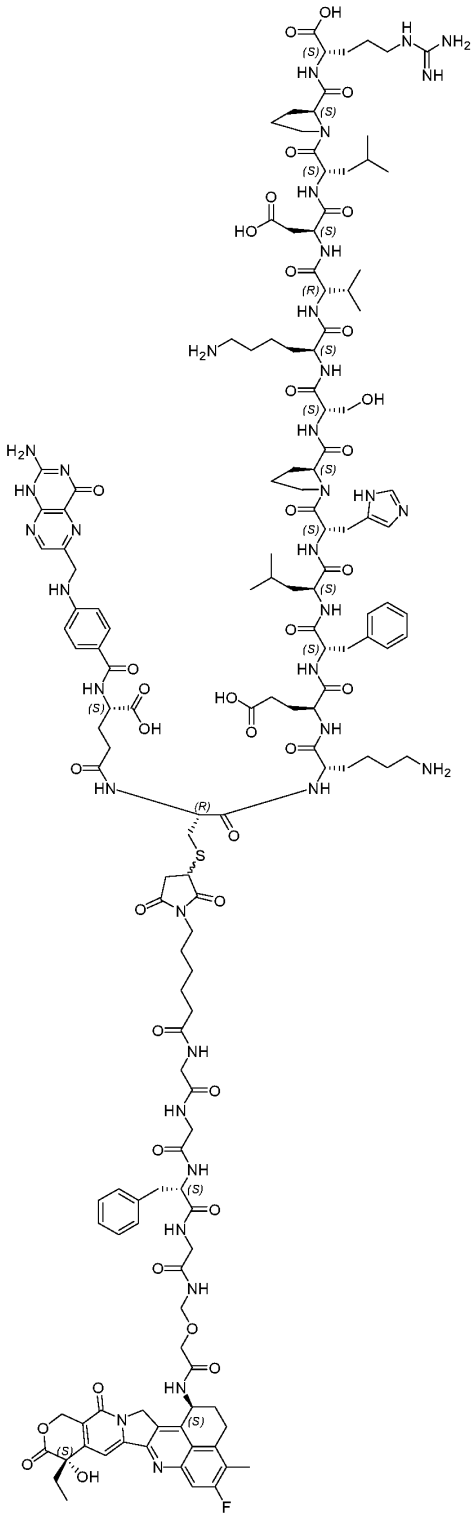


（CR19426）。

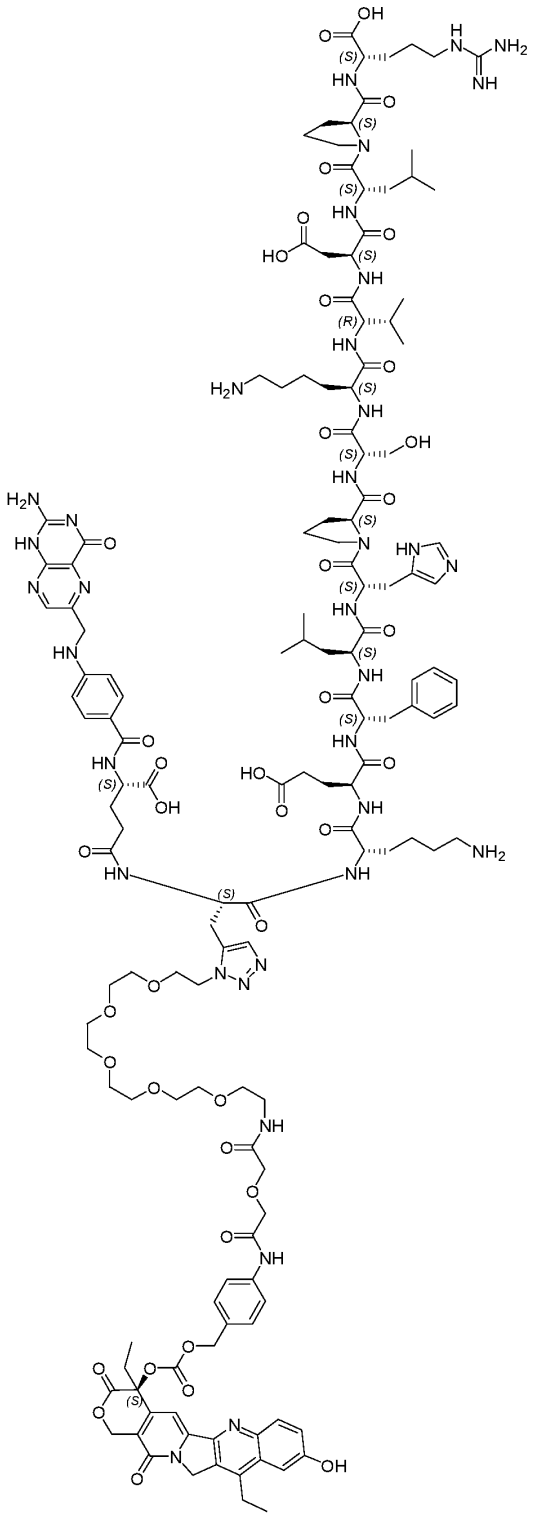
34. 根据权利要求 7 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述偶联体化合物为



（CB-10S）、



（CR19425）或



（CB-50S）。

35. 一种药物组合物，所述药物组合物包含根据权利要求 1-34 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。

36. 根据权利要求 35 所述的药物组合物，其中，所述组合物用于静脉内、皮下、口服、肌内或心室内施用。

37. 一种用于向有需要的对象递送有效载荷的方法，所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的根据权利要求 1-34 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 35 或 36 所述的药物组合物。

38. 一种用于治疗对象中的疾病的方法，所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的根据权利要求 1-34 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 35 或 36 所述的药物组合物。

39. 根据权利要求 38 所述的方法，其中所述疾病选自下组：癌症、免疫性疾病、心血管疾病、代谢疾病和神经疾病。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述癌症选自下组：前列腺癌、乳腺癌、肺癌、肾癌、白血病、卵巢癌、胃癌、子宫癌、子宫内膜癌、肝癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、结直肠癌、食道癌、睾丸癌、皮肤癌、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

41. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述免疫性疾病是自身免疫性疾病。

42. 根据权利要求 41 所述的方法，其中所述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。

43. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述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。

44. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述代谢疾病选自下组：糖尿病、痛风、肥胖症、低血糖症、高血糖症和血脂异常。

45. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述神经疾病选自下组：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。

46. 根据权利要求 38-45 中任意一项所述的方法，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。