配体药物偶联物及其应用

技术领域

[1] 本申请涉及生物医药化学领域。更具体地，本申请涉及一种配体药物偶联体，以及所述所述配体药物偶联体的应用。

背景技术

[2] 抗体-药物偶联体（ADC）是一种通过化学连接将能够靶向细胞表面分子的抗体和具有生物活性的分子进行偶联，借助抗体的靶向作用，将生物活性分子定向运输到目标细胞中，可提高疗效并降低细胞毒素对正常组织、细胞的毒性。但是，由于 ADC 中抗体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。此外，在抗体药物偶联体的制备中，药物与抗体之比通常不能确定，影响了 ADC 的药效和毒性评价。

[3] 将具有生物活性的分子靶向运输到目标细胞中的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。与抗体药物偶联体中以抗体进行靶向定位相比，配体药物偶联体则是采取肽或小分子定向，配体药物偶联体中的具有靶向作用的配体和药物通常都会有准确值。然而，从生物利用度、稳定性、疗效到毒性等方面，LDC 的应用也面临很多挑战。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，通过连接子适时和精确的释放具有生物活性的分子也十分重要，例如，过早释放药物可能达不到理想的疗效甚至可能导致动物中毒死亡。而对于生物活性分子的选择，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 等）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，配体、连接子、生物活性分子的选择是 LDC 设计的关键要素。

[4] 靶向配体设计需要考虑结合亲和力、靶标选择性和化合物的大小。良好的配体结合亲和力和选择性能合理地降低实现高效治疗所需的药物剂量，减少毒副作用。配体的大小也会通过不同的机制影响生物活性分子向目标细胞（例如，毒性剂向实体瘤）的递送，包括渗透性。低分子量的治疗药物更容易释放和扩散，同时，也更容易被代谢。因此，即使药物脱靶，通常也能够及时从体内排泄，从而减少正常细胞中的不良毒性。配体的选择范围更广，但却不如抗体那样直接，筛选合适的配体通常需要耗费很多精力。连接子（Linker）作为靶向配体和生物活性分子之间的链接，为了保留靶向配体的亲和力和选择性，以及生物活性分子的功效，需要被精心设计，以实现优化药物释放、药代动力学和药效学性质等功能。对于细胞毒性分子的选择，则需要考虑释放速率、细胞活性、胞内的稳定性等。

[5] 因此领域内还迫切需要获得改进的 LDC。尤其是设计精良的连接子，以使得 LDC 获得期待的效果，配体部分和生物活性分子保留期待的性质和功能，增强药效或降低药物副作用。

发明内容

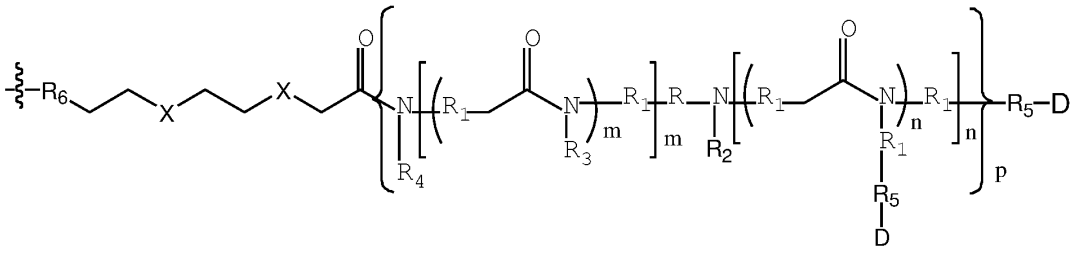
[6] 本申请的一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

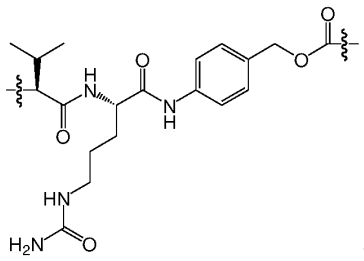
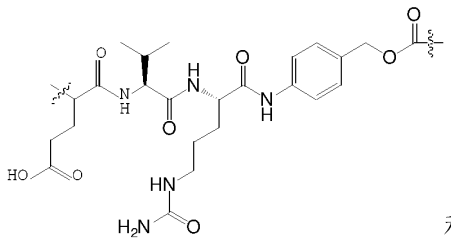
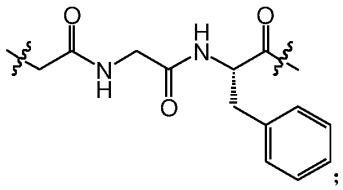
其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

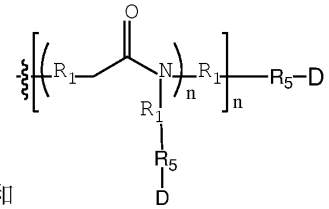
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

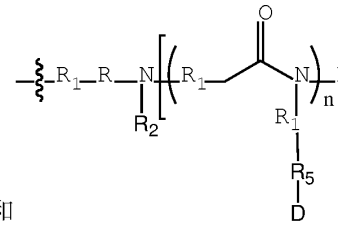


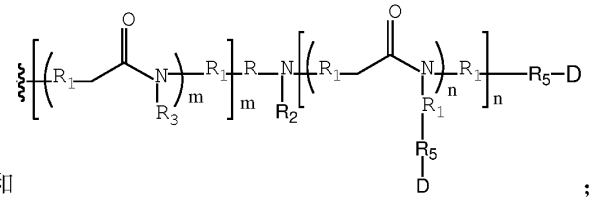
其中：

R 选自 、和；

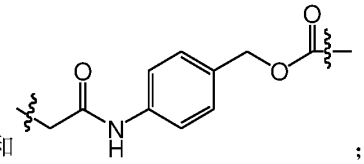
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

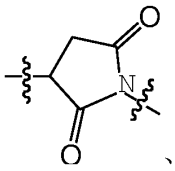
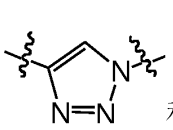
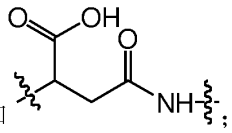


R_2 各自独立地选自氢和 ；

R_3 各自独立地选自氢和 ；

R_4 各自独立地选自氢和 ；

R_5 各自独立地选自键、-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-、-$CH_2C(O)$-、-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-和 ；

R_6 各自独立地选自键、、和；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

m 各自独立地为 0 或 1；

n 各自独立地为 0 或 1；

p 为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

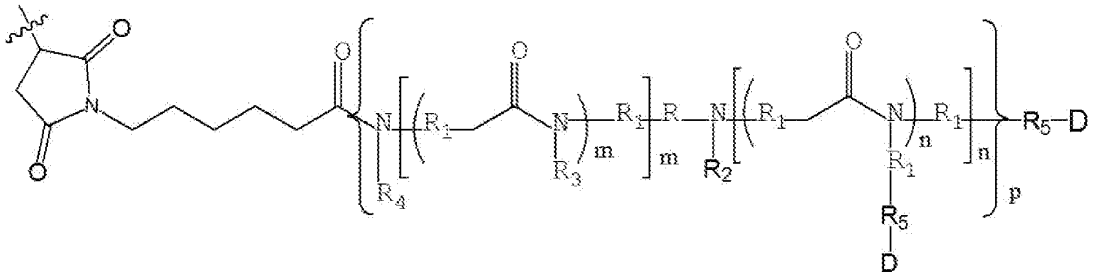
[7] 本申请的另一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

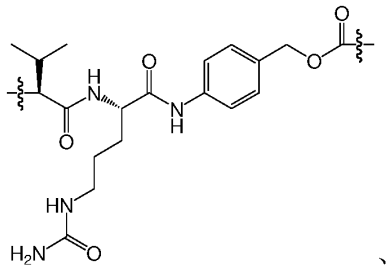
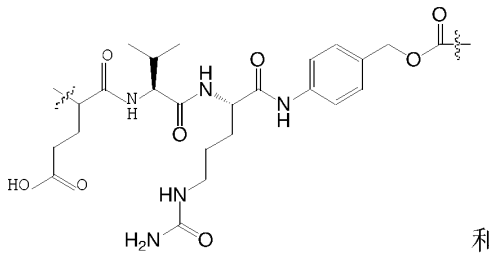
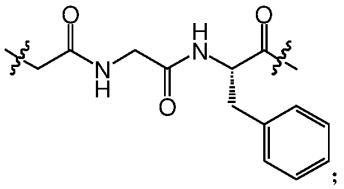
其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

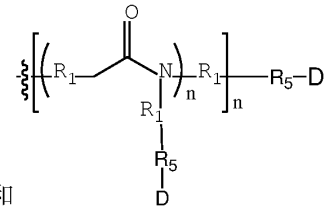
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：



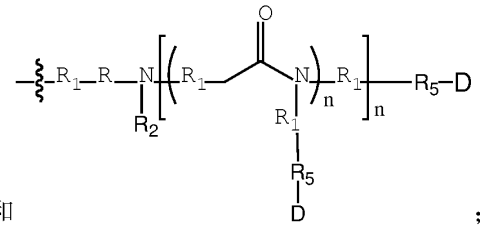
其中：

R 选自  、  和 ；

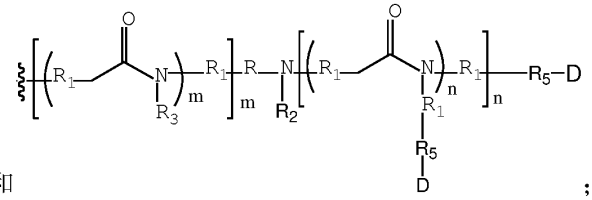
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；



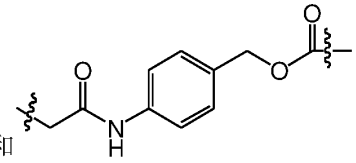
R_2 各自独立地选自氢和 ；



R_3 各自独立地选自氢和 ；



R_4 各自独立地选自氢和 ；

R_5 各自独立地选自键、-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-、-$CH_2C(O)$-、-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-和  ；

m 各自独立地为 0 或 1；

n 各自独立地为 0 或 1；

p 为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

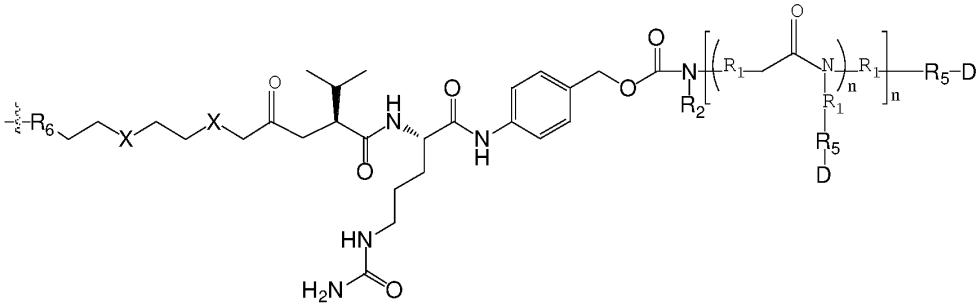
[8] 本申请的另一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

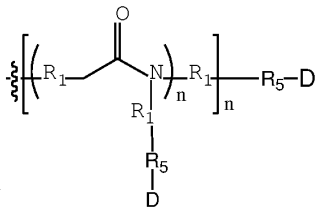
所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：



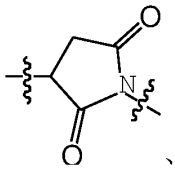
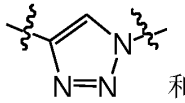
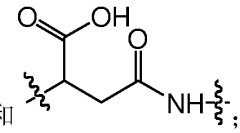
其中：

R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；



R_2 各自独立地选自氢和 ；

R_5 各自独立地选自键、-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-、-$CH_2C(O)$-、-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-和 ；

R_6 各自独立地选自键、、和；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

n 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

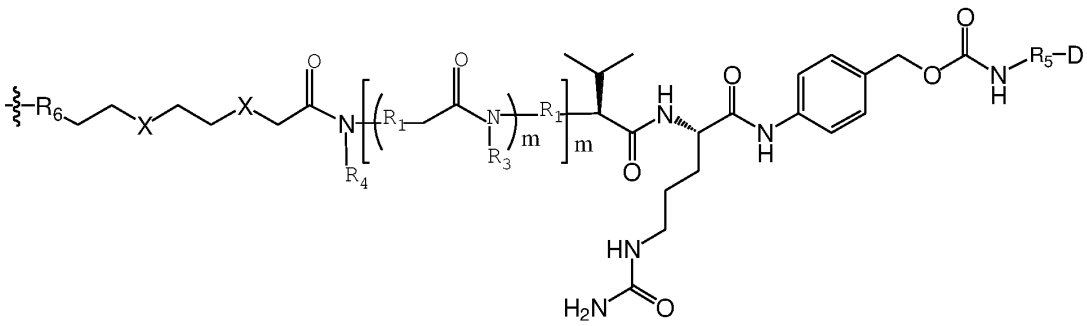
[9] 本申请的另一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

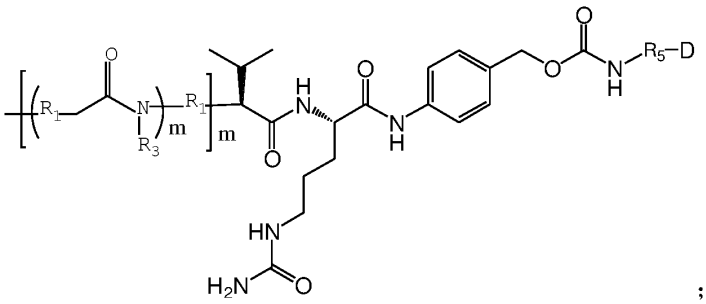
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

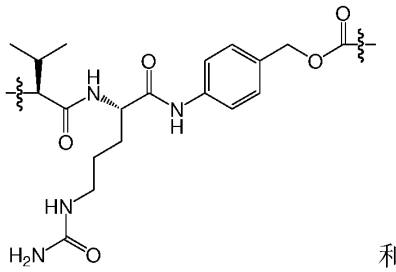
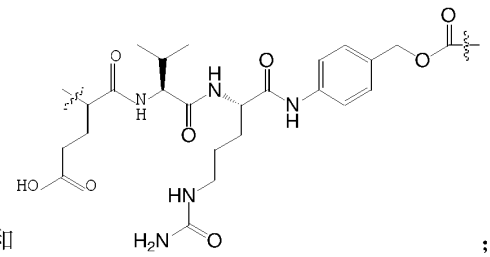


其中：

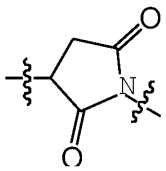
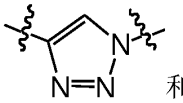
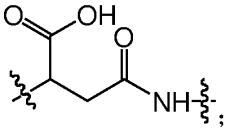
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_3 各自独立地选自氢和-R_1-R-NH-R_5-D；

R_4 为氢或  ；

R 选自  和  ；

R_5 各自独立地选自键、$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2C(O)-$和$-CH_2C(O)-$；

R_6 各自独立地选自键、  、  和  ；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

m 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

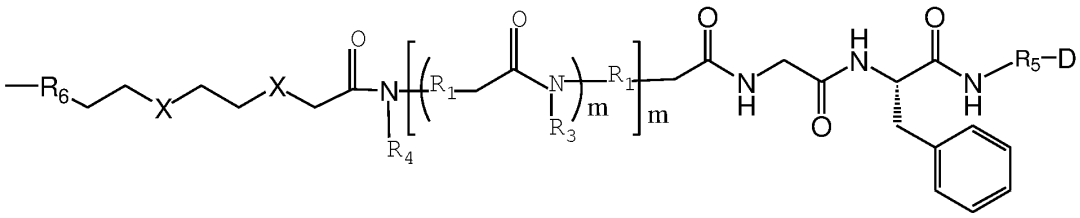
[10] 本申请的另一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

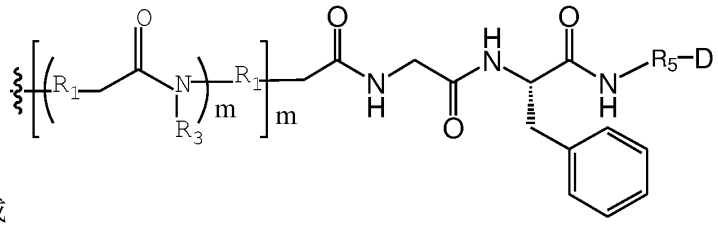
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：



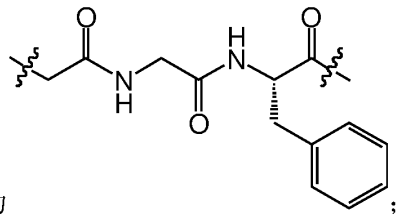
其中：

R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_3 各自独立地选自氢和-R_1-R-NH-R_5-D；

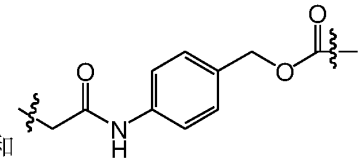


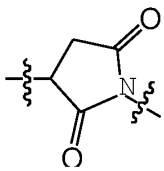
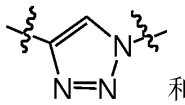
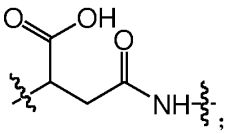
R_4 为氢或 ；



R 为 ；

R_5 各自独立地选自键、-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-、-$CH_2C(O)$-和 ；



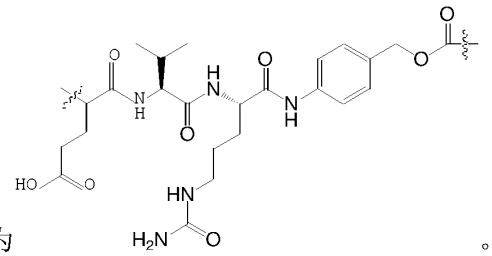
R_6 各自独立地选自键、  、  和 ；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

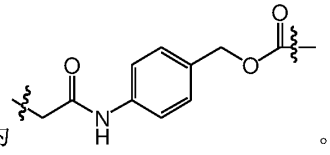
m 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

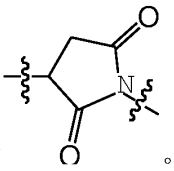
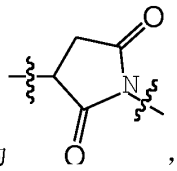
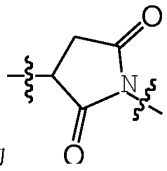
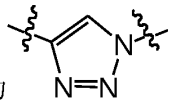
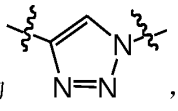
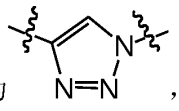
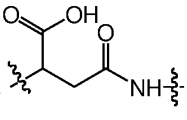
D 为有效载荷。

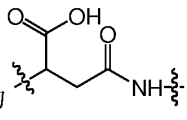
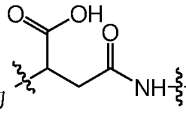
[11] 在一些实施方式中，R 为  。

[12] 在一些实施方式中，R_1 为-$CH_2CH_2C(O)$-NH-。

[13] 在一些实施方式中，R_5 为-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-。在另一些实施方式中，R_5 为-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-。在又一些实施方式中，R_5 为-$CH_2C(O)$-。在一些实施方式中，R_5 为  。在另一些实施方式中，R_5 为-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-。在又一些实施方式中，R_5 不是-$CH_2C(O)$-NH-CH_2。

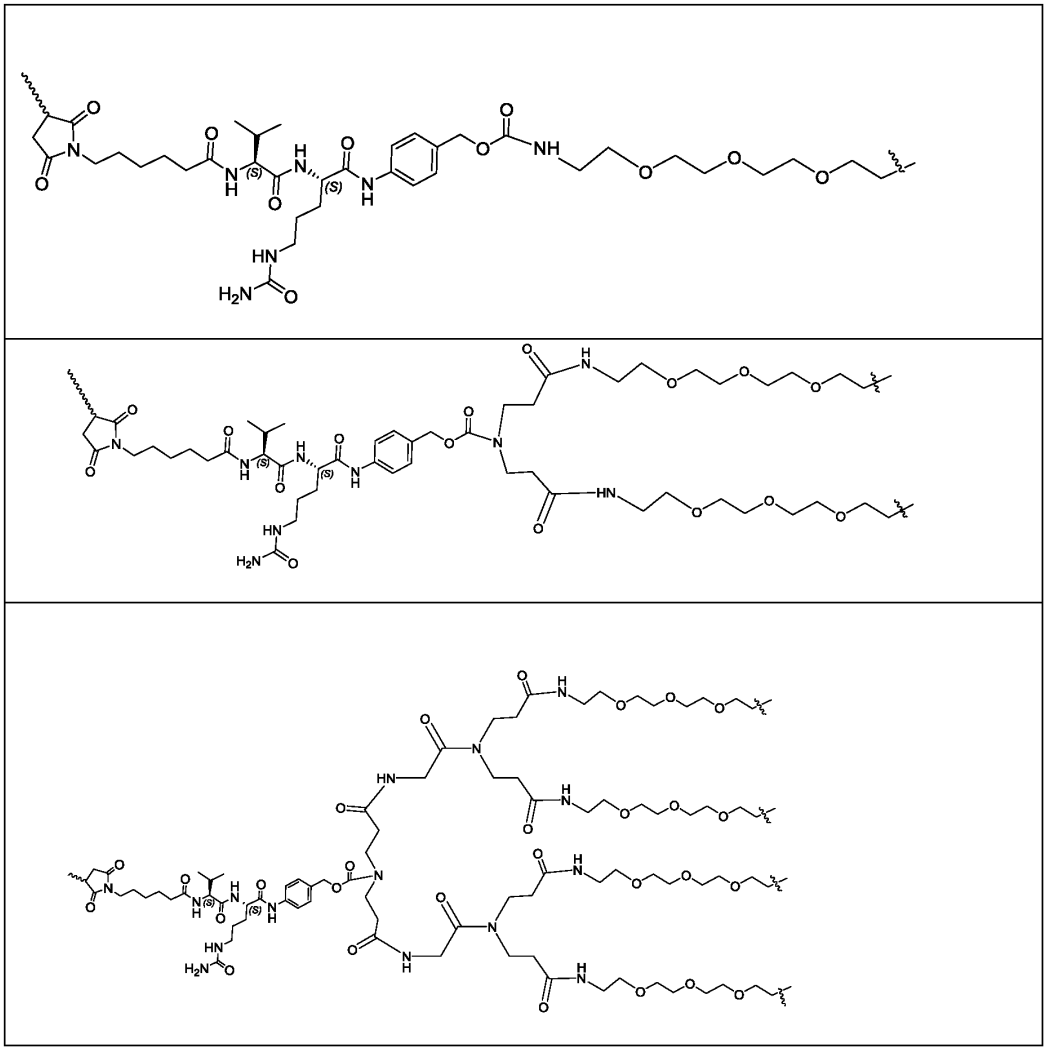
[14] 在一些实施方式中，m 各自独立地为 0 或 1，且 n 为 0。在一些实施方式中，m 为 0，且 n 各自独立地为 0 或 1。在一些实施方式中，m 为 0，且 n 为 0。在又一些实施方式中，m 为 0，n 为 0，且 R_5 不是-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-。

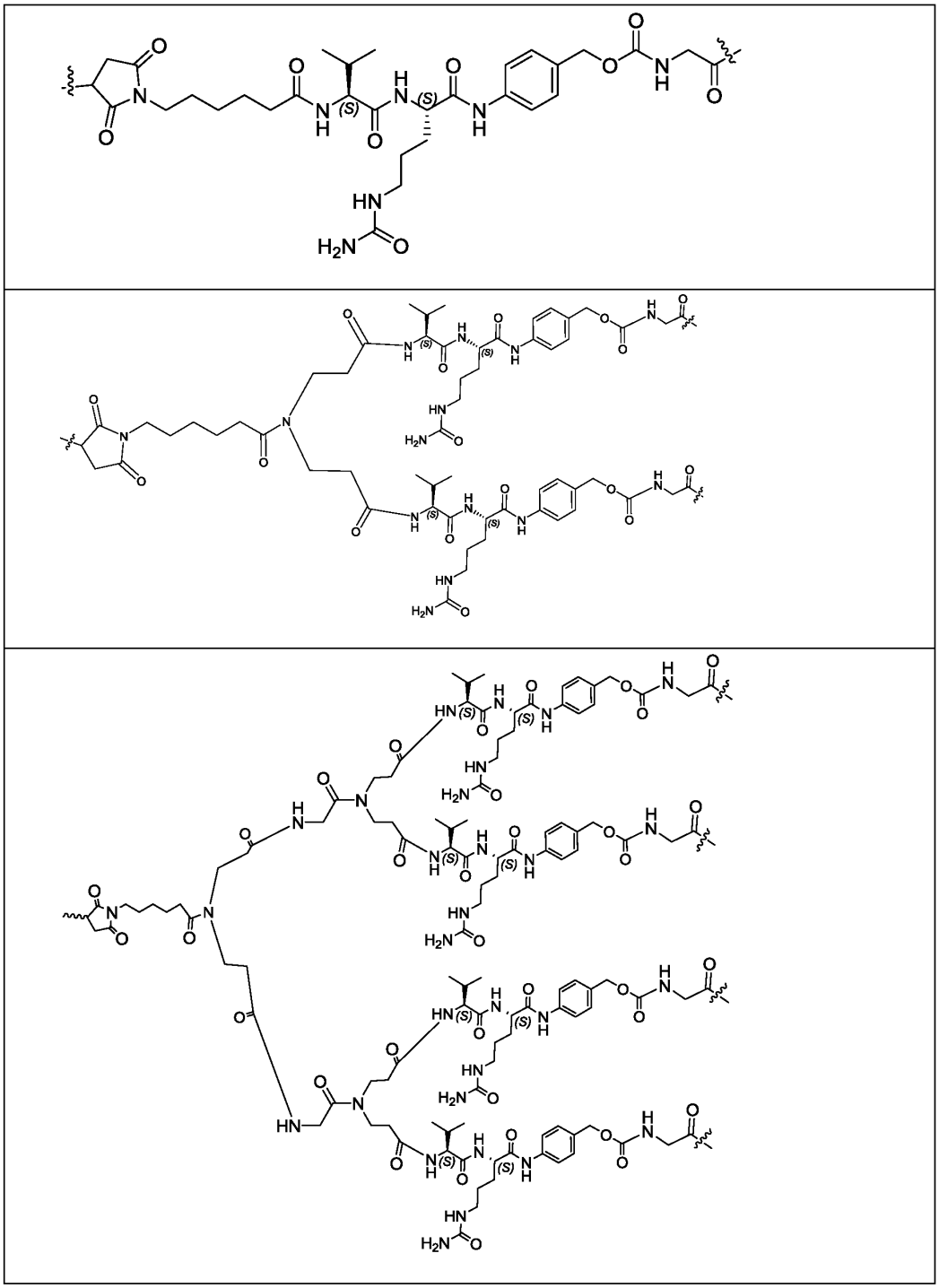
[15] 在一些实施方式中，R_6 为  。在一些实施方式中，R_6 为  ，且 X 为键。在一些实施方式中，R_6 为  ，且 X 为 O。在一些实施方式中，R_6 为  。在一些实施方式中，R_6 为  ，X 为键。在又一些实施方式中，R_6 为  ，X 为 O。在一些实施方式中，R_6 为  。在一些

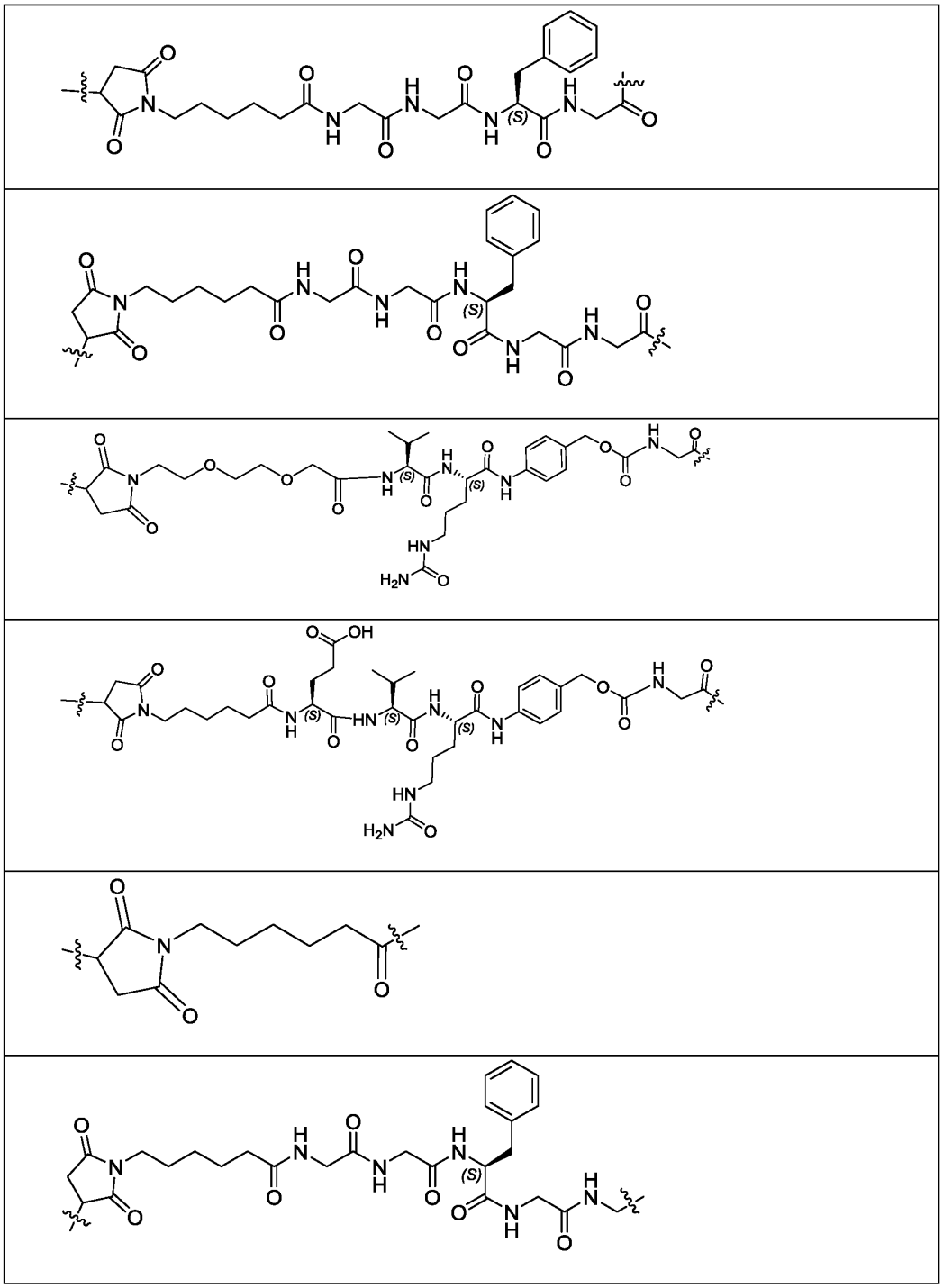
实施方式中，R_6 为 ，X 为键。在又一些实施方式中，R_6 为 ，X 为 O。

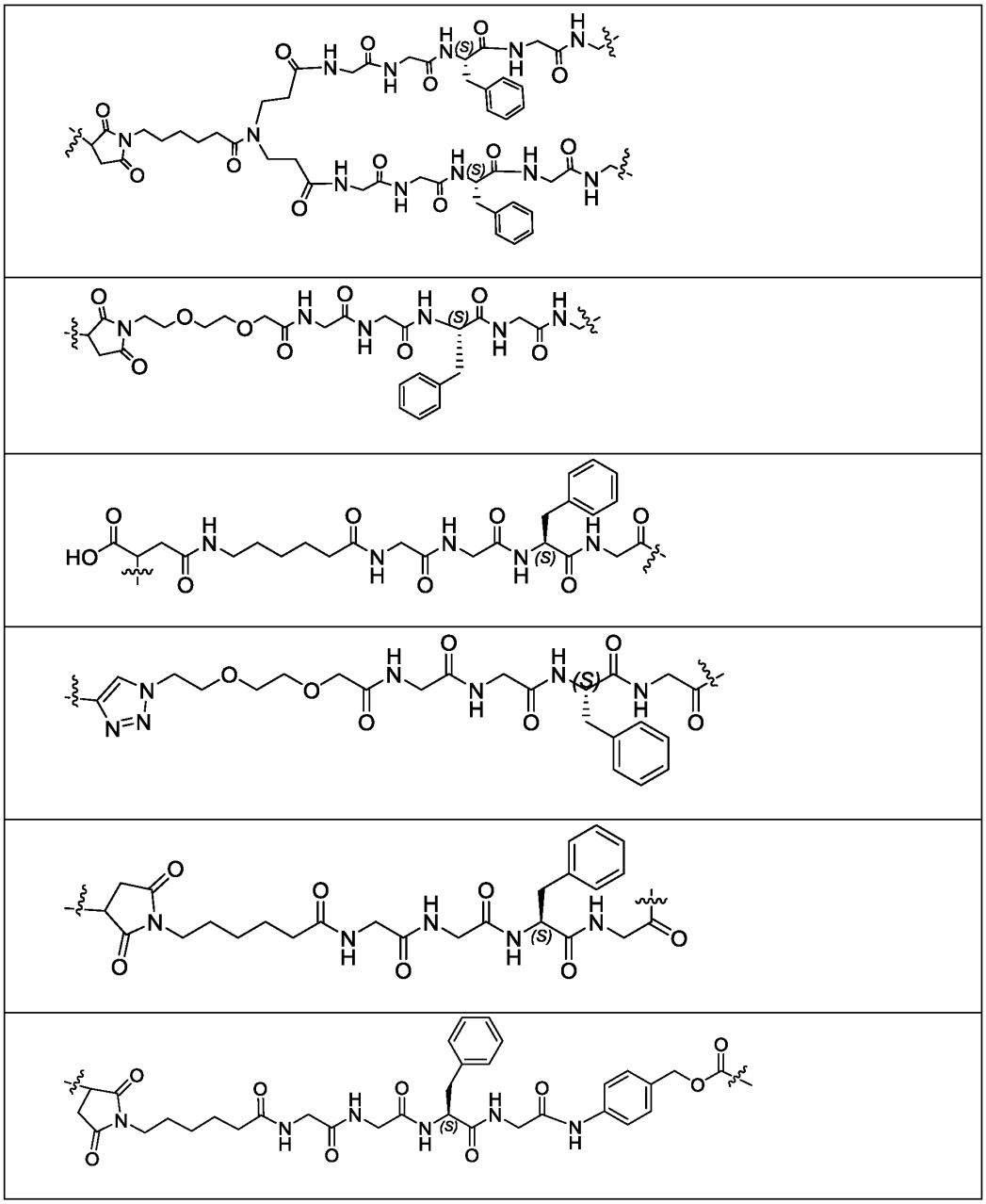
[16] 在一些实施方式中，p 为 0。

[17] 在一些实施方式中，所述连接子具有选自下组的结构：





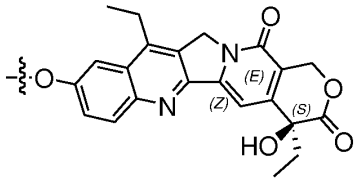
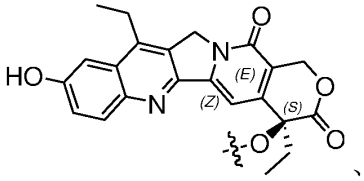
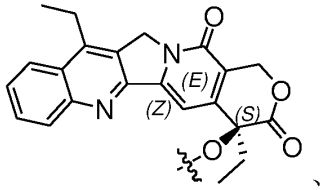
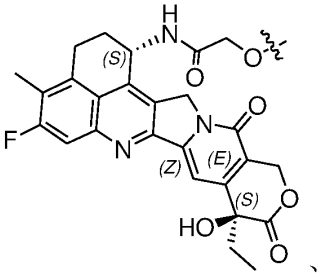
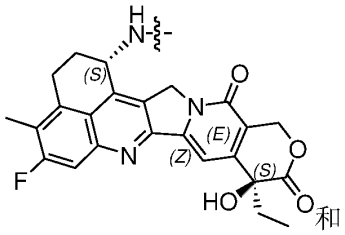
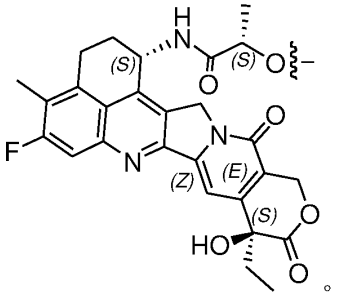




[18] 在一些实施方式中，有效载荷选自下组：小分子化合物、核苷酸和肽，优选地，所述有效载荷是小分子化合物。

[19] 在一些实施方式中，所述小分子化合物选自下组：喜树碱及其任何衍生物、美登素及其任何衍生物、放射性金属络合物、环氧化酶-2 抑制剂及其任何衍生物、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、和丝裂霉素 C 及其任何衍生物。在一些优选的实施方式中，所述小分子化合物是喜树碱及其任何衍生物。在一些优选的实施方式中，所述喜树碱是依喜替康。

[20] 在一些实施方式中，D 各自独立地选自 、、、、和。

[21] 在一些实施方式中，细胞表面分子选自 TRPV6、FOLR1、PSMA 和 SSTR2。

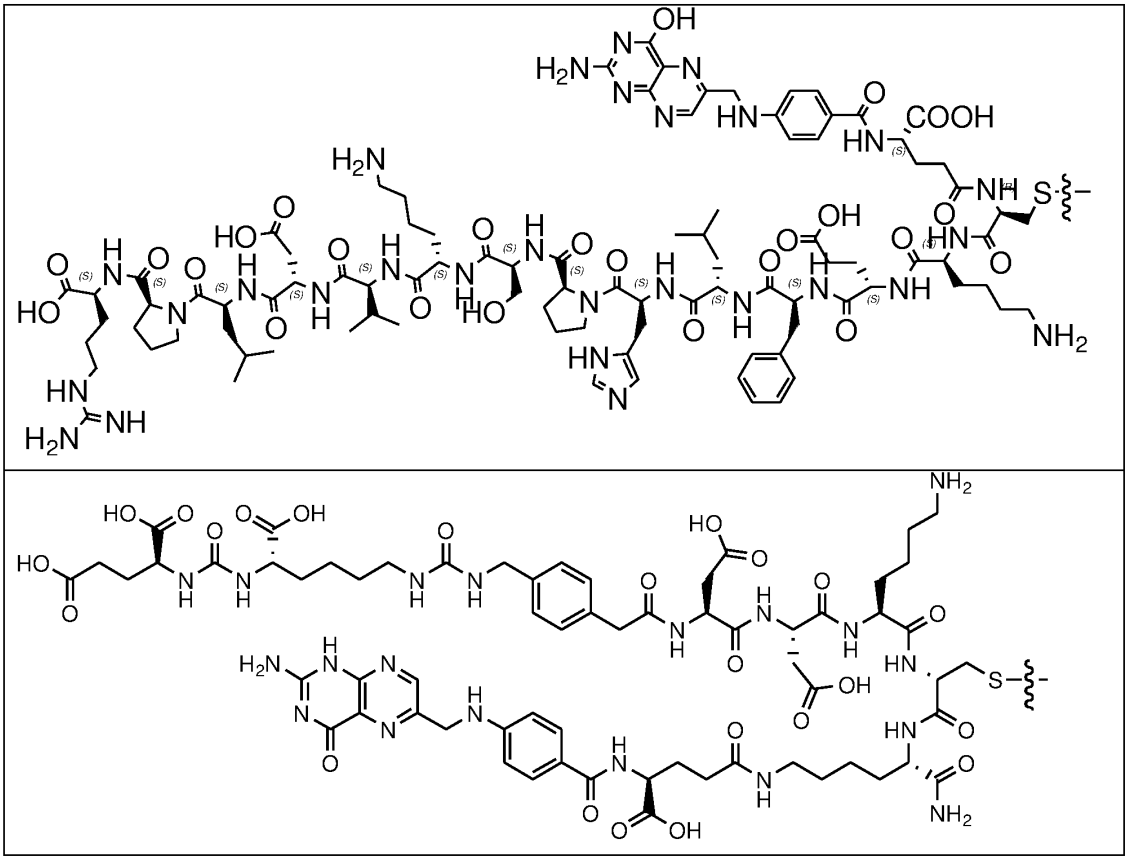
[22] 在一些实施方式中，细胞表面分子分别为 TRPV6 和 FOLR1、PSMA 和 FOLR1、或 SSTR2 和 FOLR1。在一些优选的实施方式中，细胞表面分子分别为 TRPV6 和 FOLR1。在一些实施方式中，靶向 FOLR1 的配体选自叶酸或其类似物。在一些优选的实施方式中，所述叶酸类似物选自 5-甲基四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸、甲氨蝶呤和 5,10-亚甲基四氢叶酸。在一些实施方式中，靶向 SSTR2 的配体选自奥曲肽及其任何类似物。

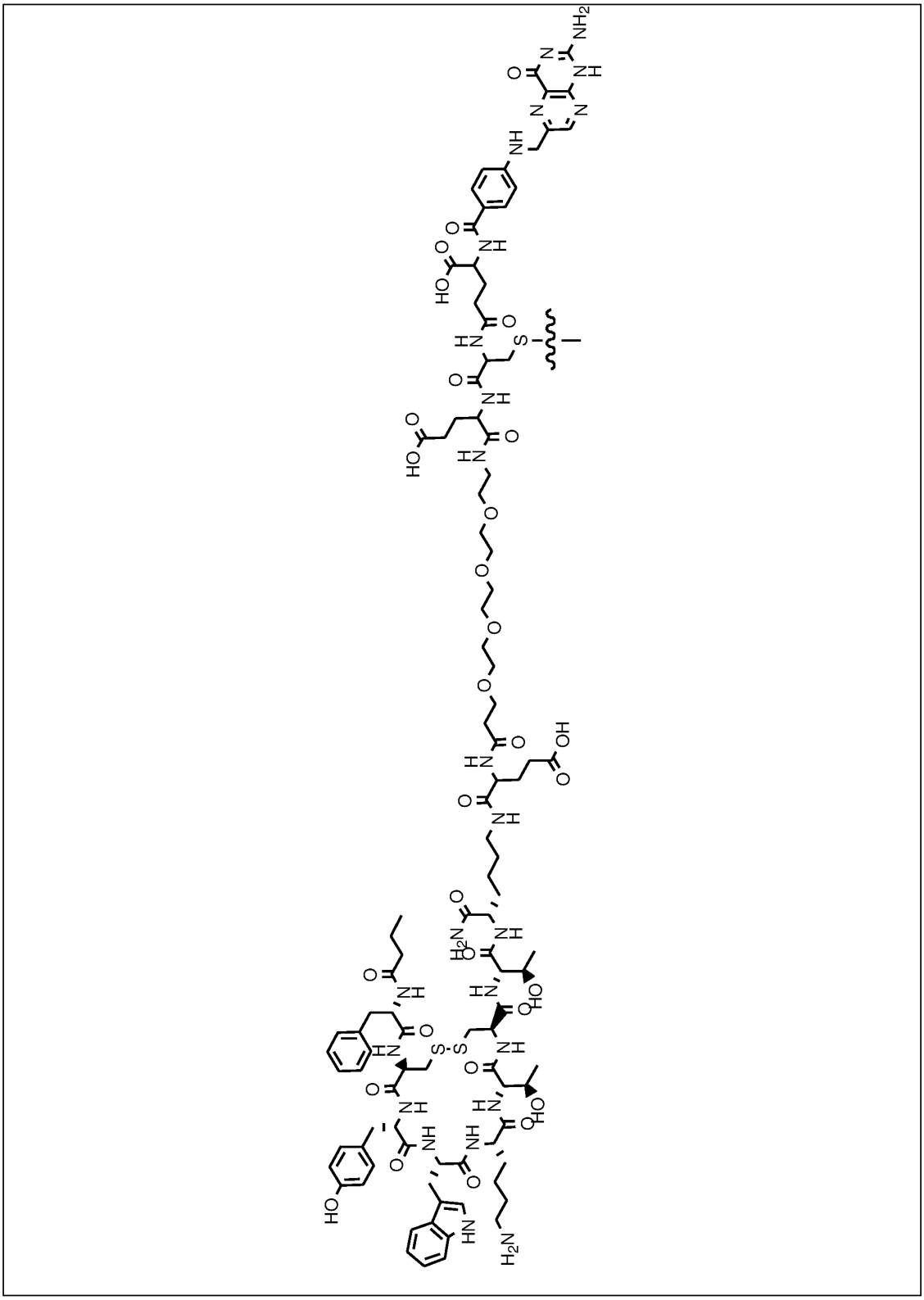
[23] 在一些实施方式中，配体部分包含三个以上的靶向细胞表面分子的配体。在一些优选的实施方式中，所述细胞表面分子选自 TRPV6、FOLR1、PSMA 和 SSTR2。

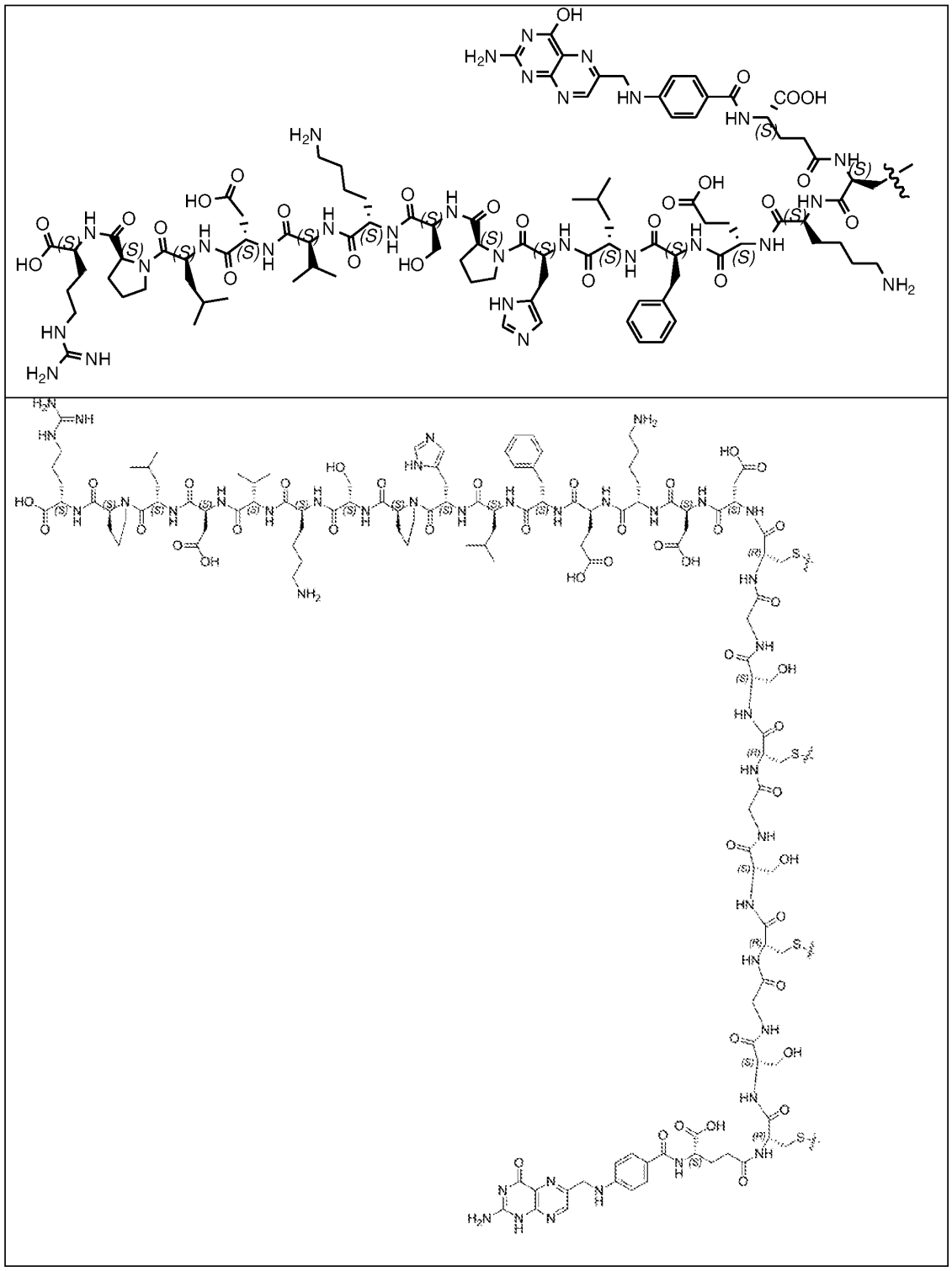
[24] 在一些实施方式中，靶向不同细胞表面分子的配体彼此直接连接、或通过间隔区彼此连接。在一些实施方式中，所述间隔区由氨基酸组成。在一些优选的实施方式中，

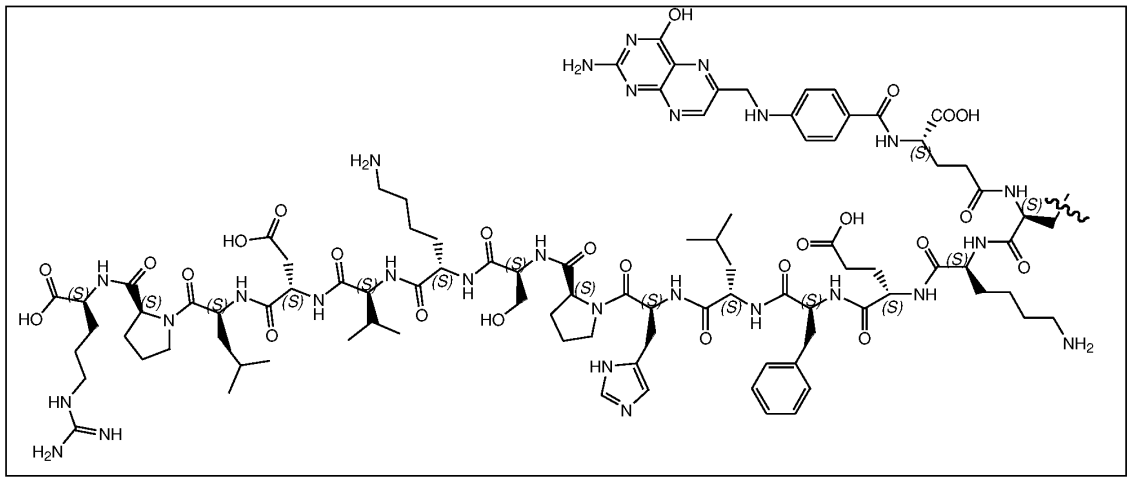
所述间隔区由天然氨基酸或非天然氨基酸组成。在又一些优选的实施方式中，所述间隔区为甘氨酸。在一些实施方式中，所述间隔区可在特定的生理环境下通过蛋白酶裂解或还原裂解。

[25] 在一些实施方式中，所述配体部分具有以下结构：



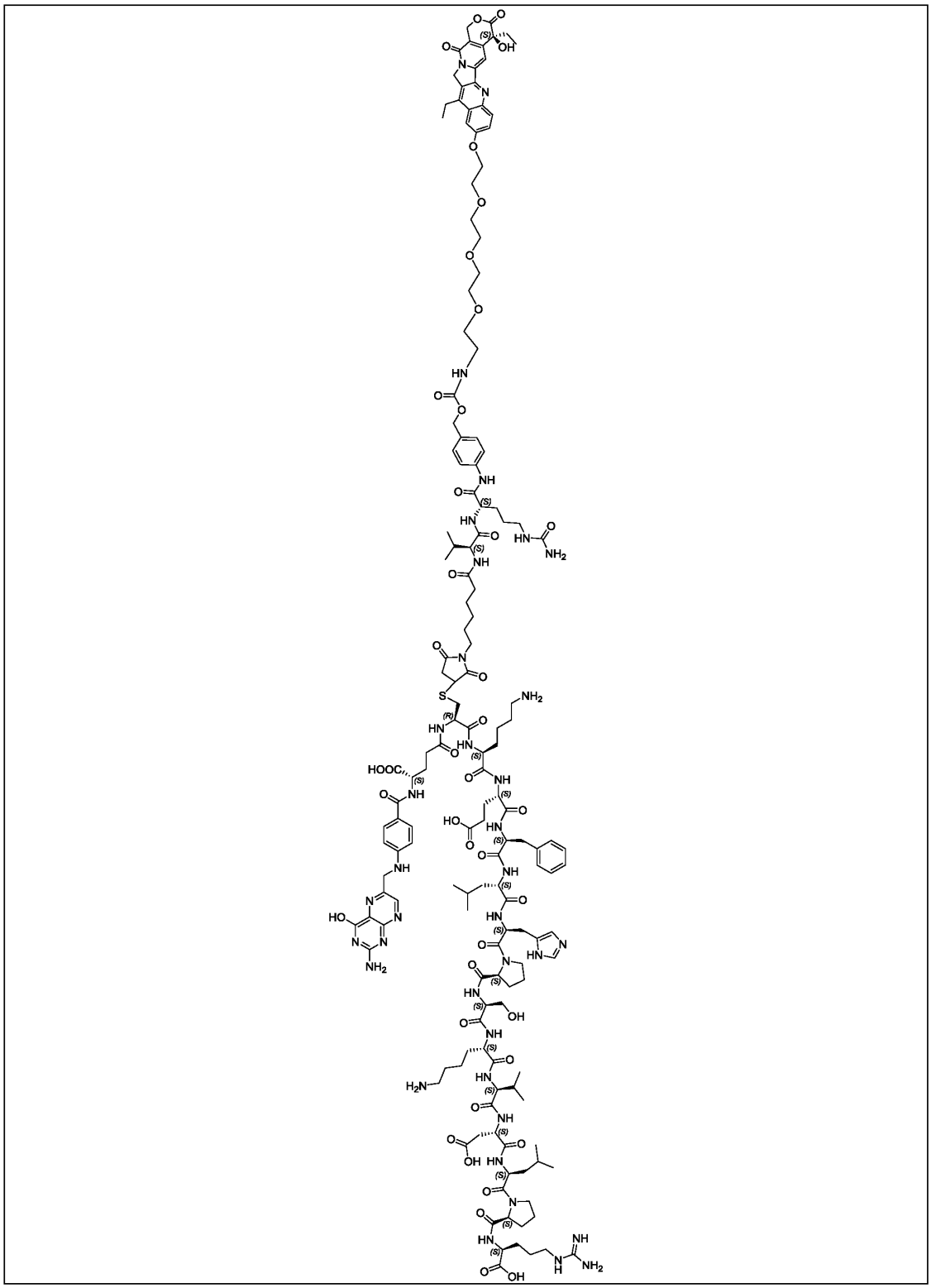


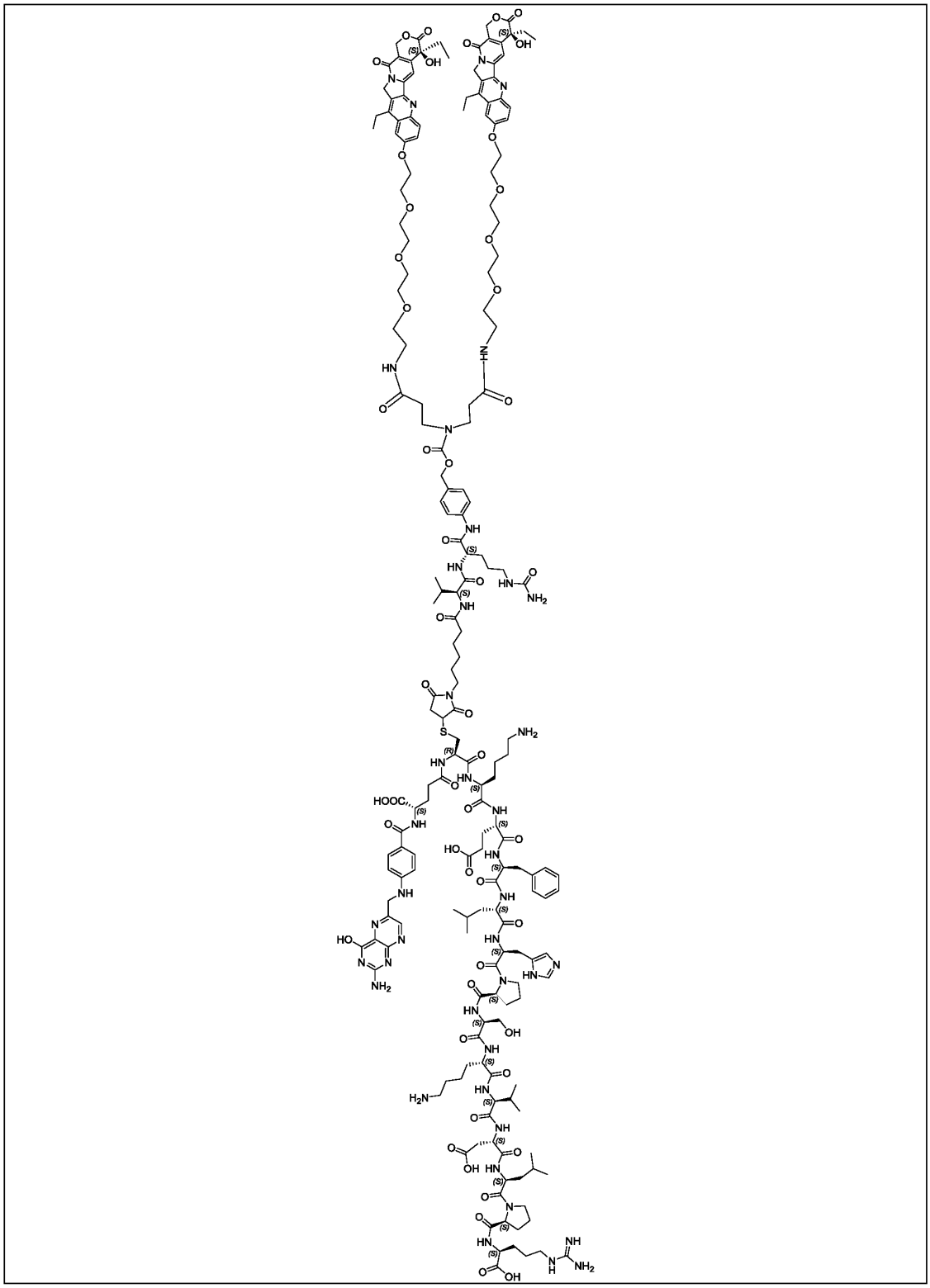


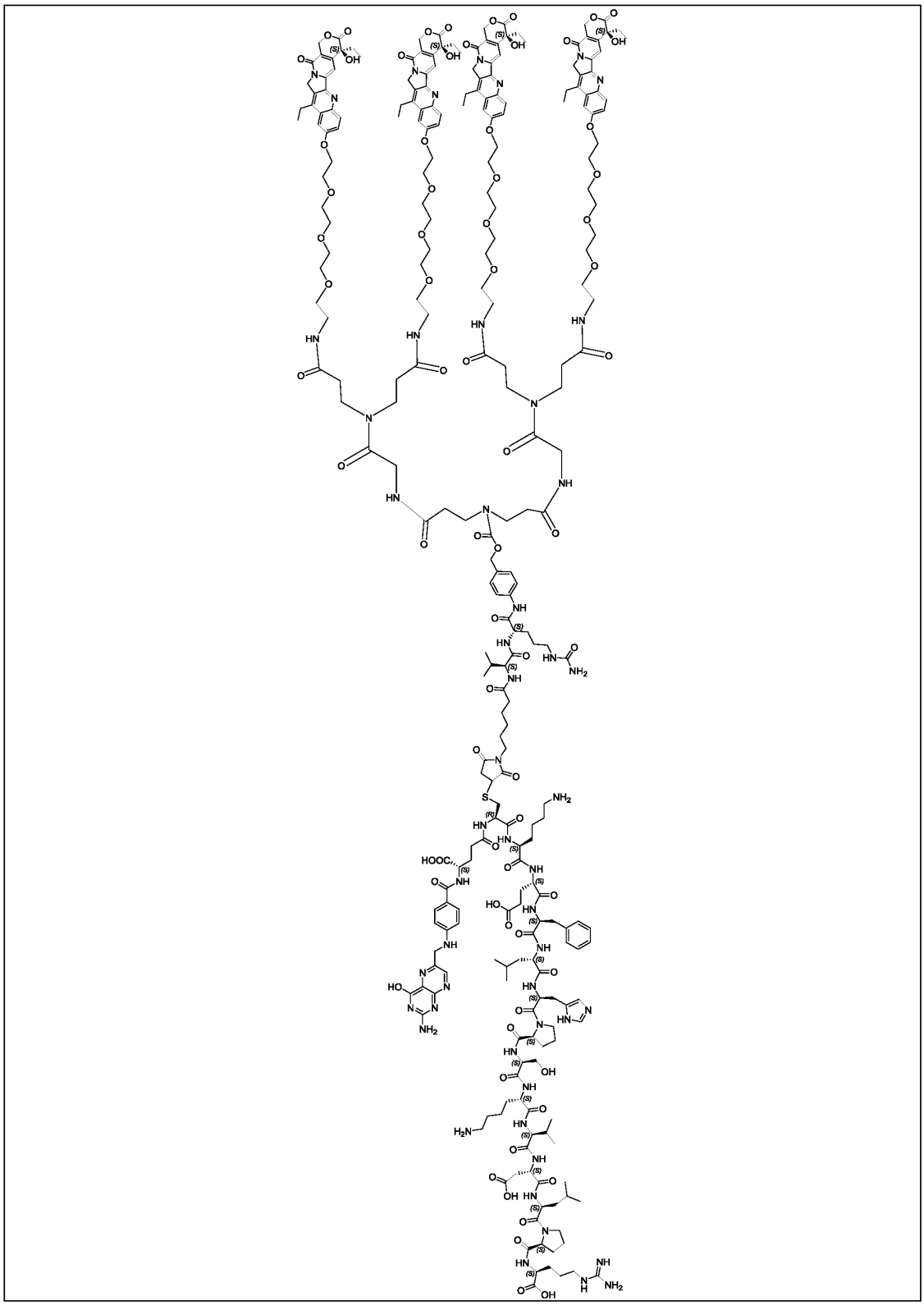


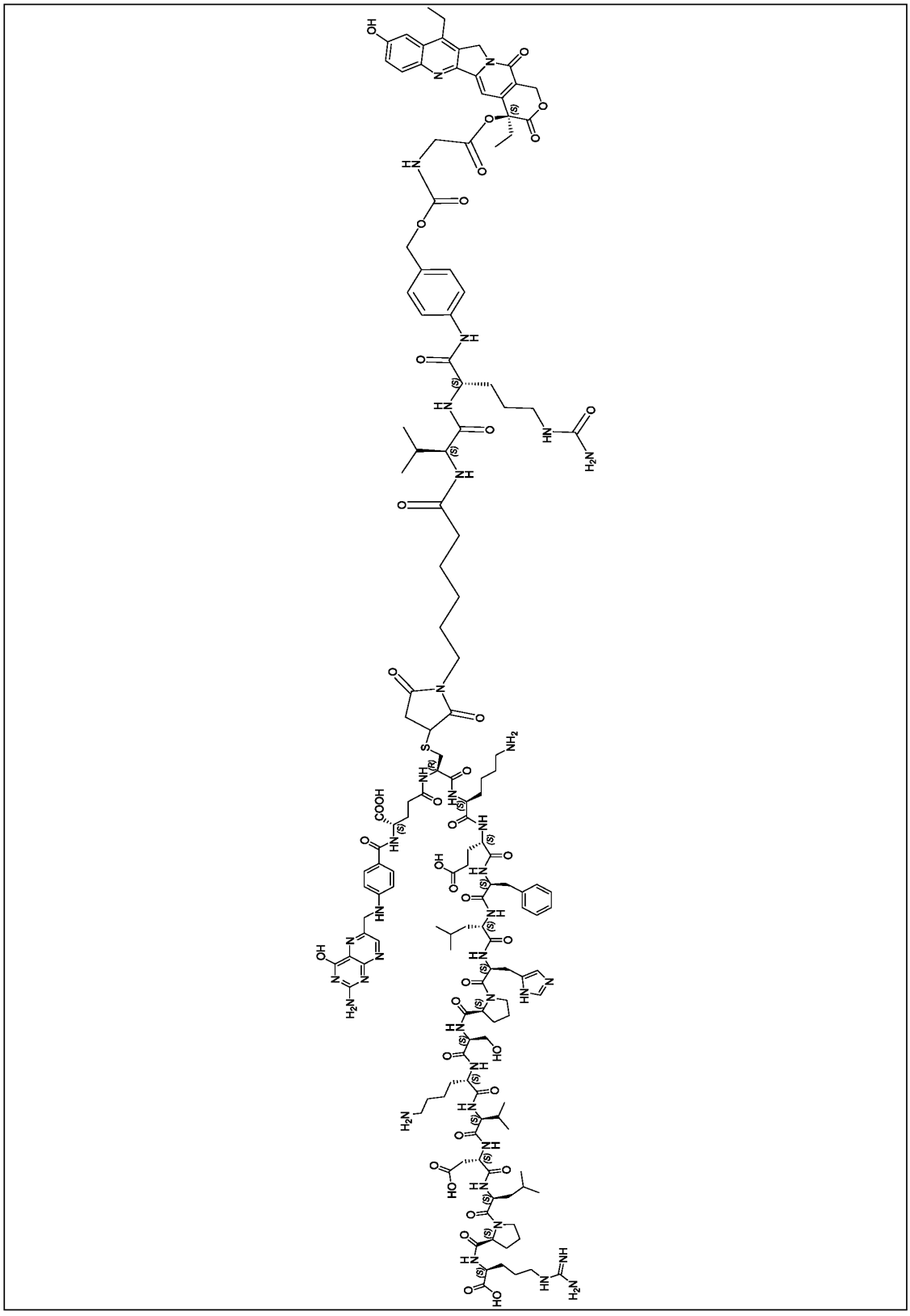
[26] 在一些实施方式中，q 为 1。在一些实施方式中，q 为 2。在一些实施方式中，q 为 3。在一些实施方式中，q 为 4。

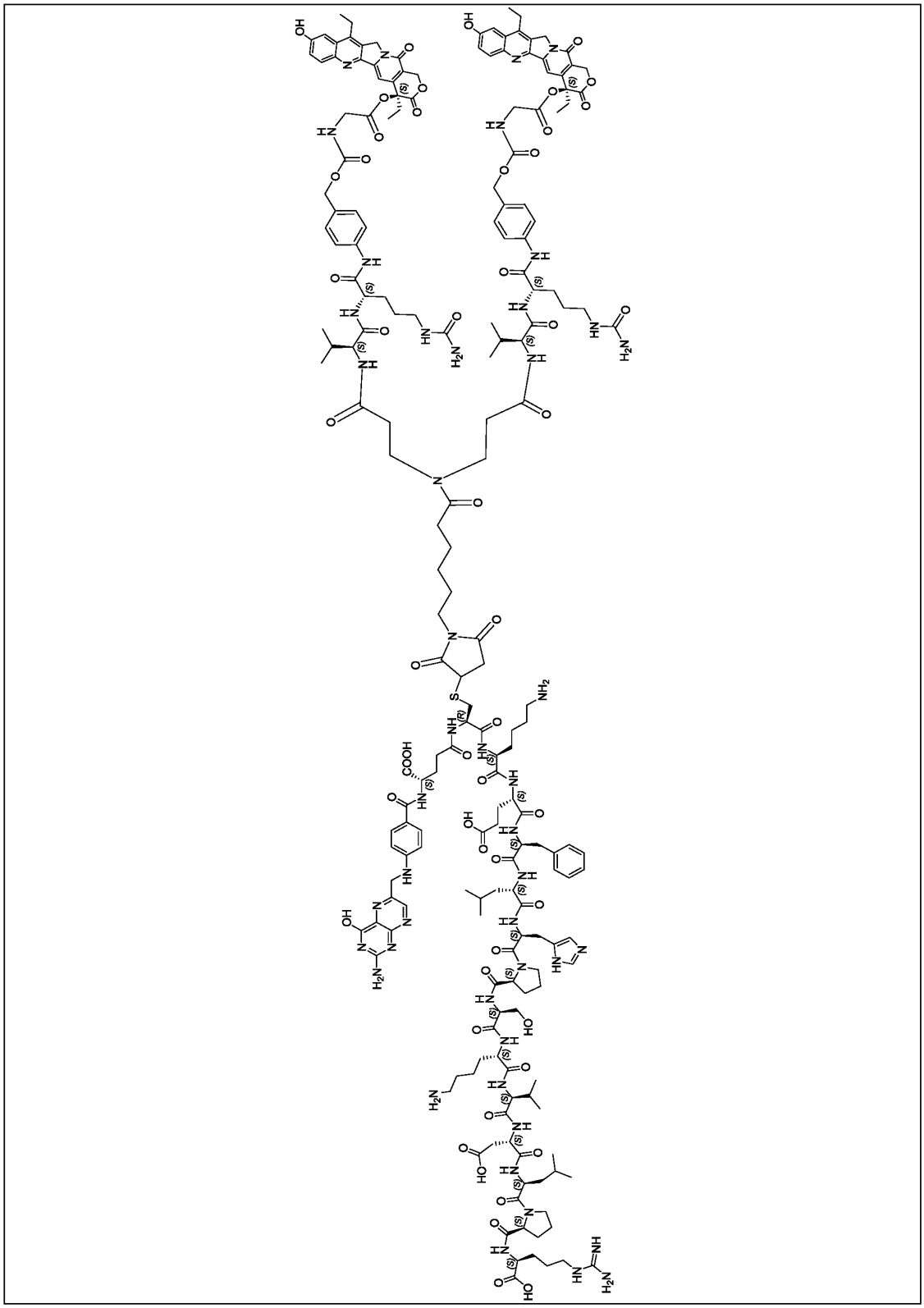
[27] 本申请的一个方面提供了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物选自：

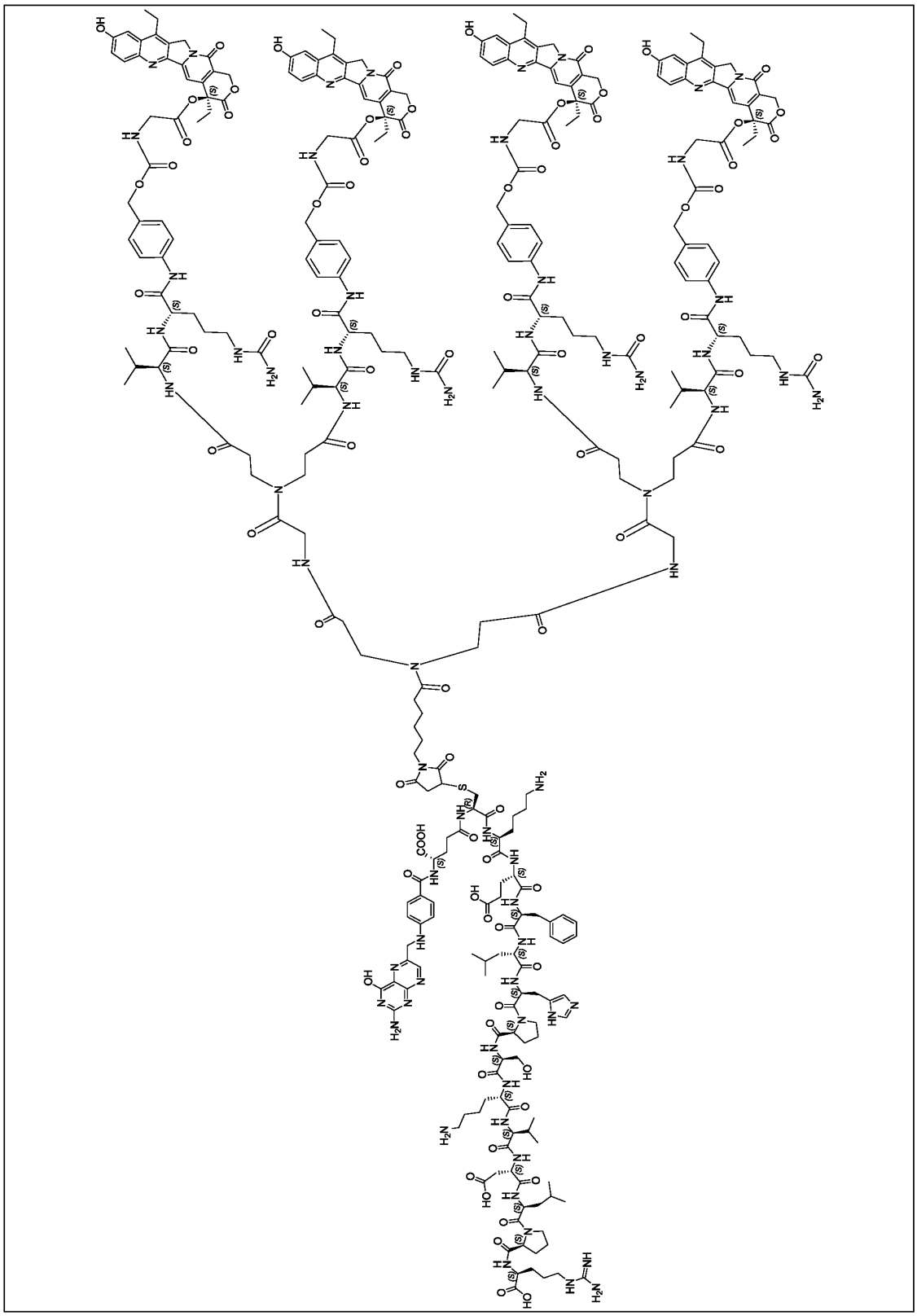


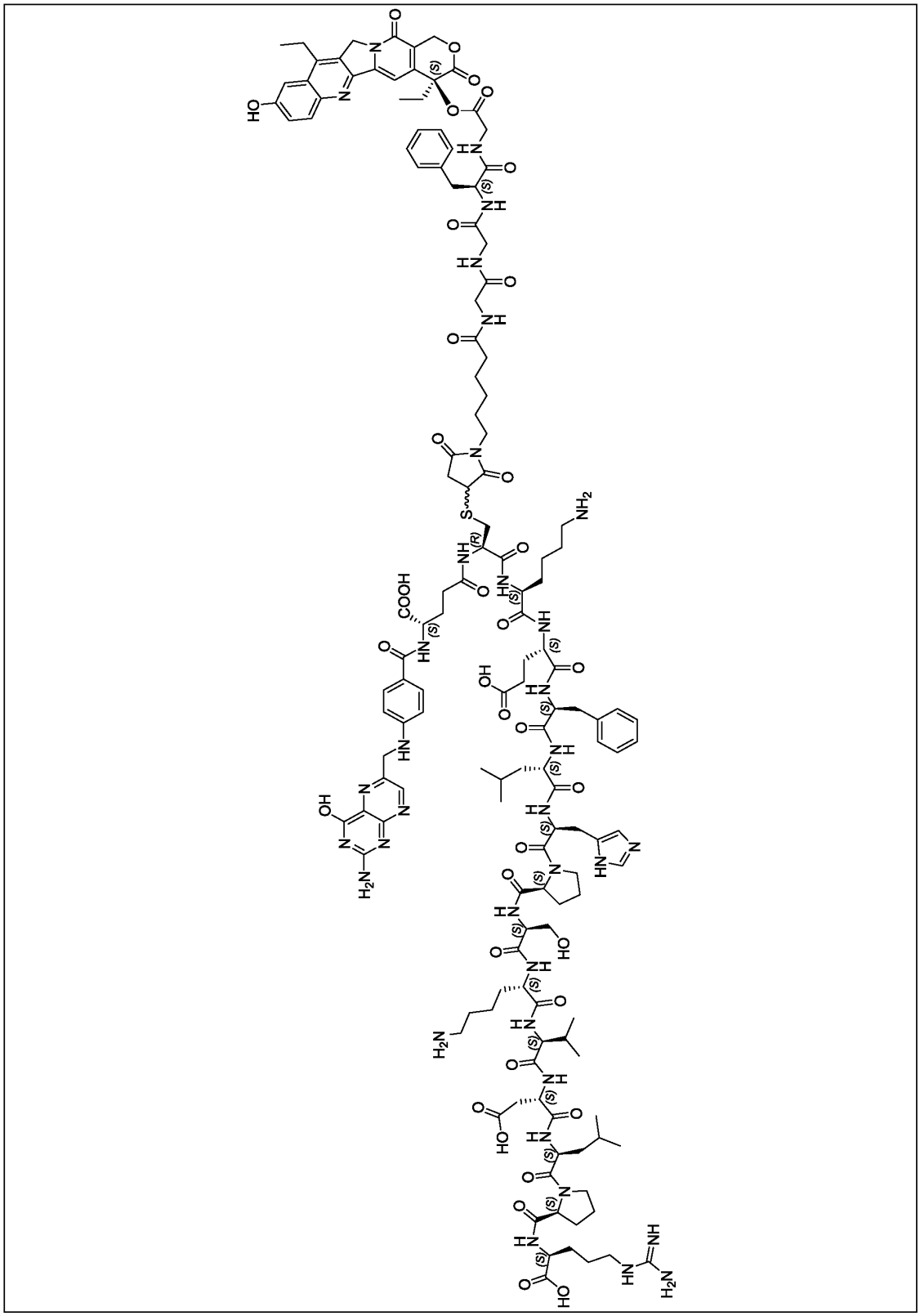


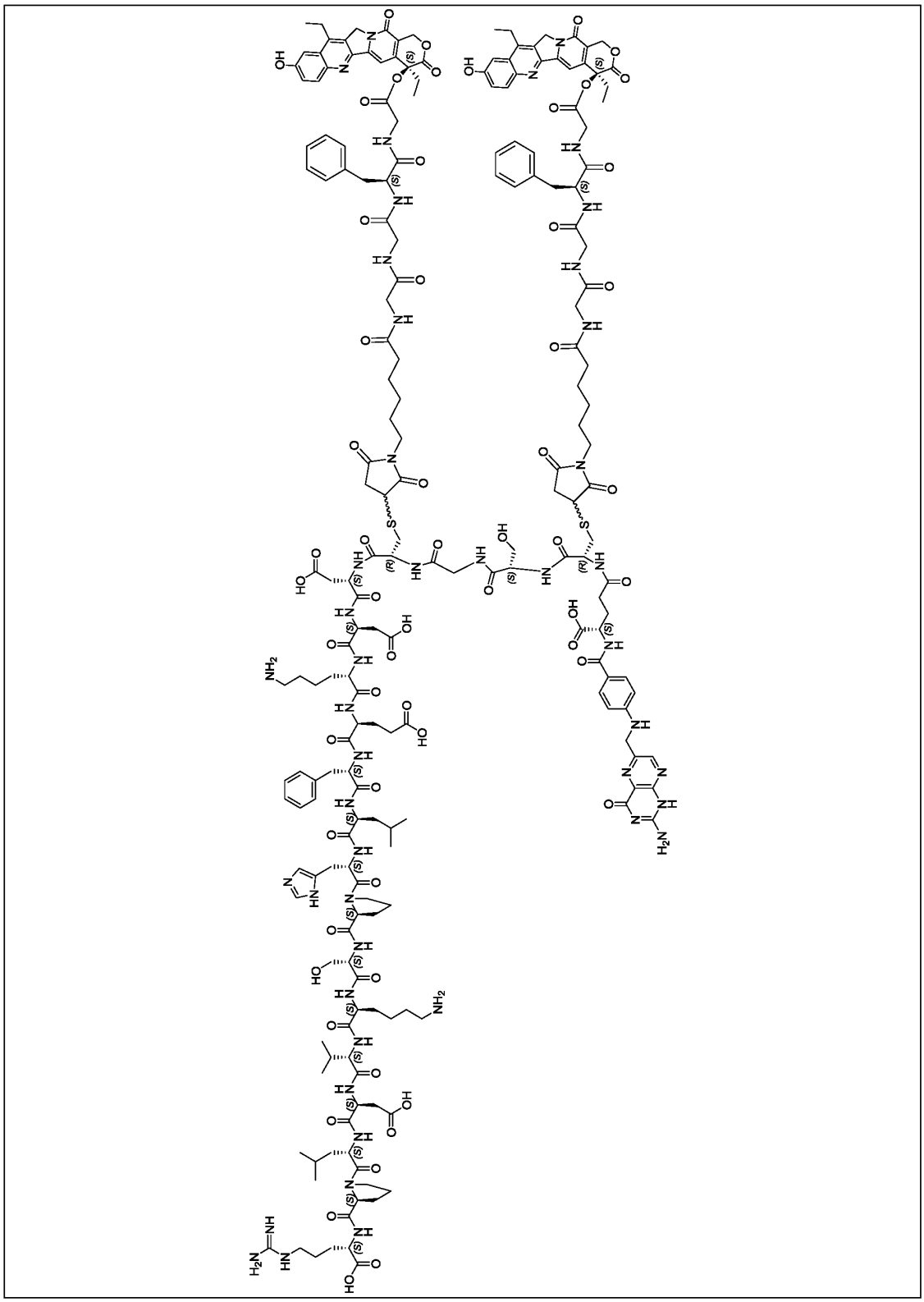


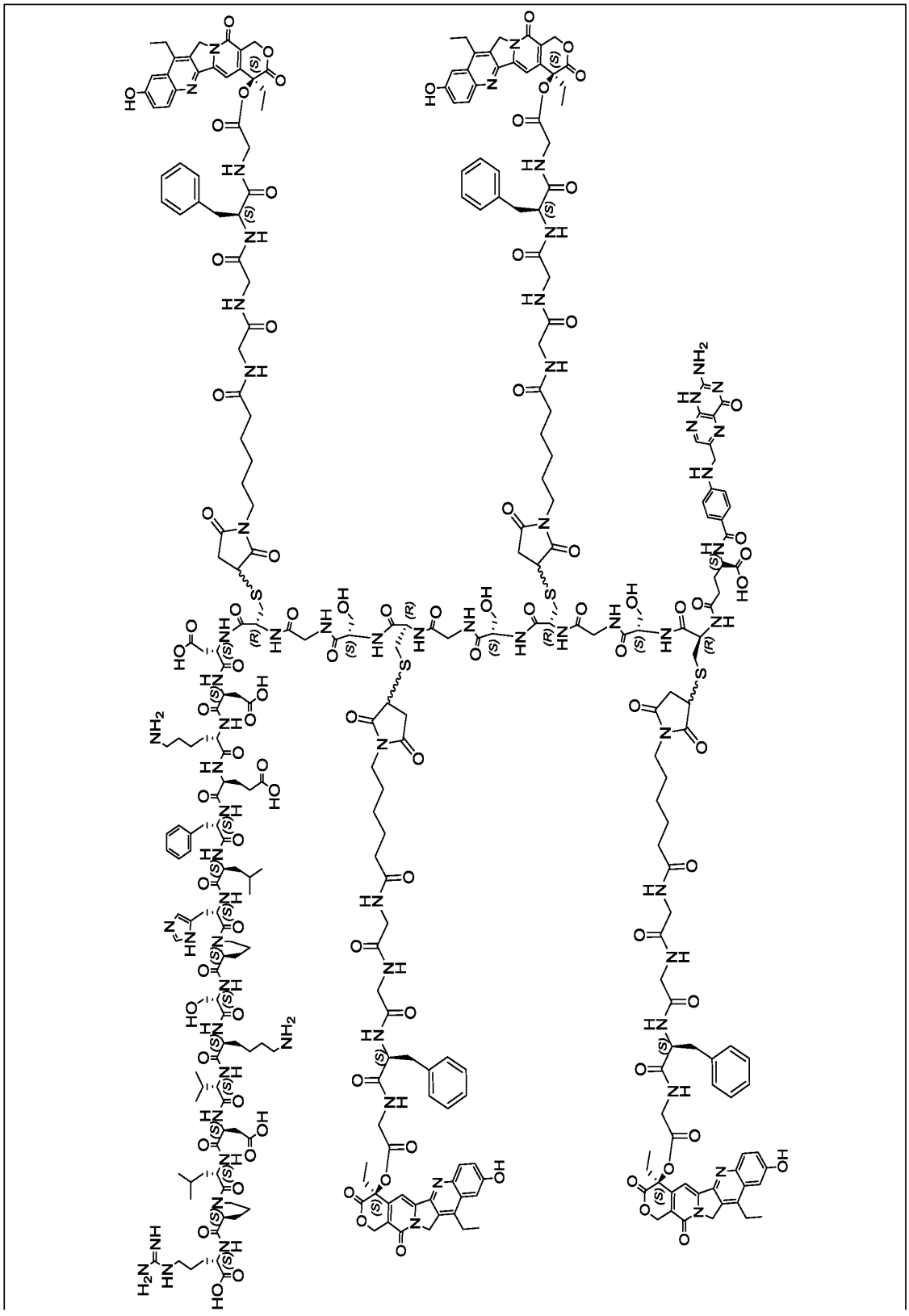


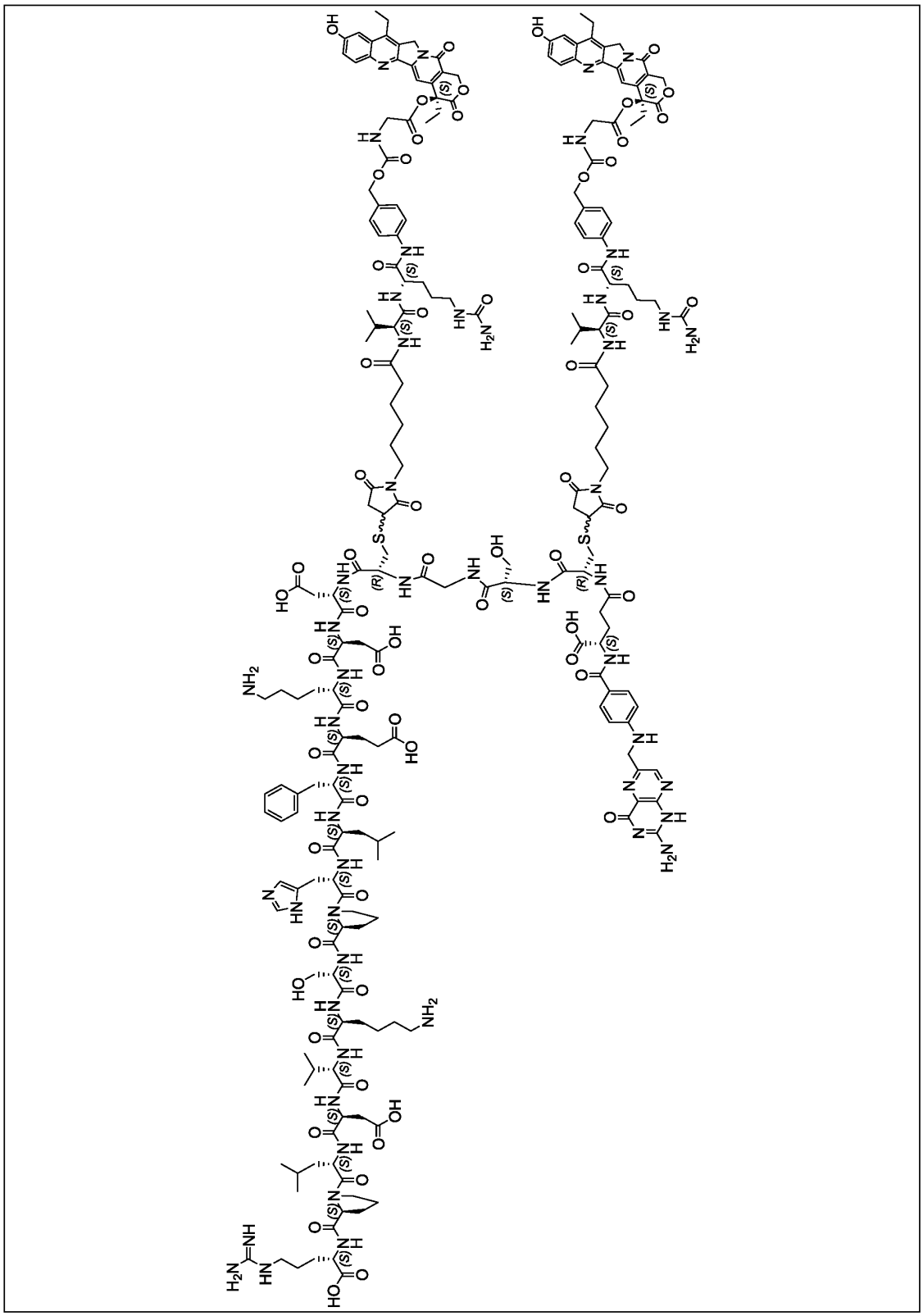


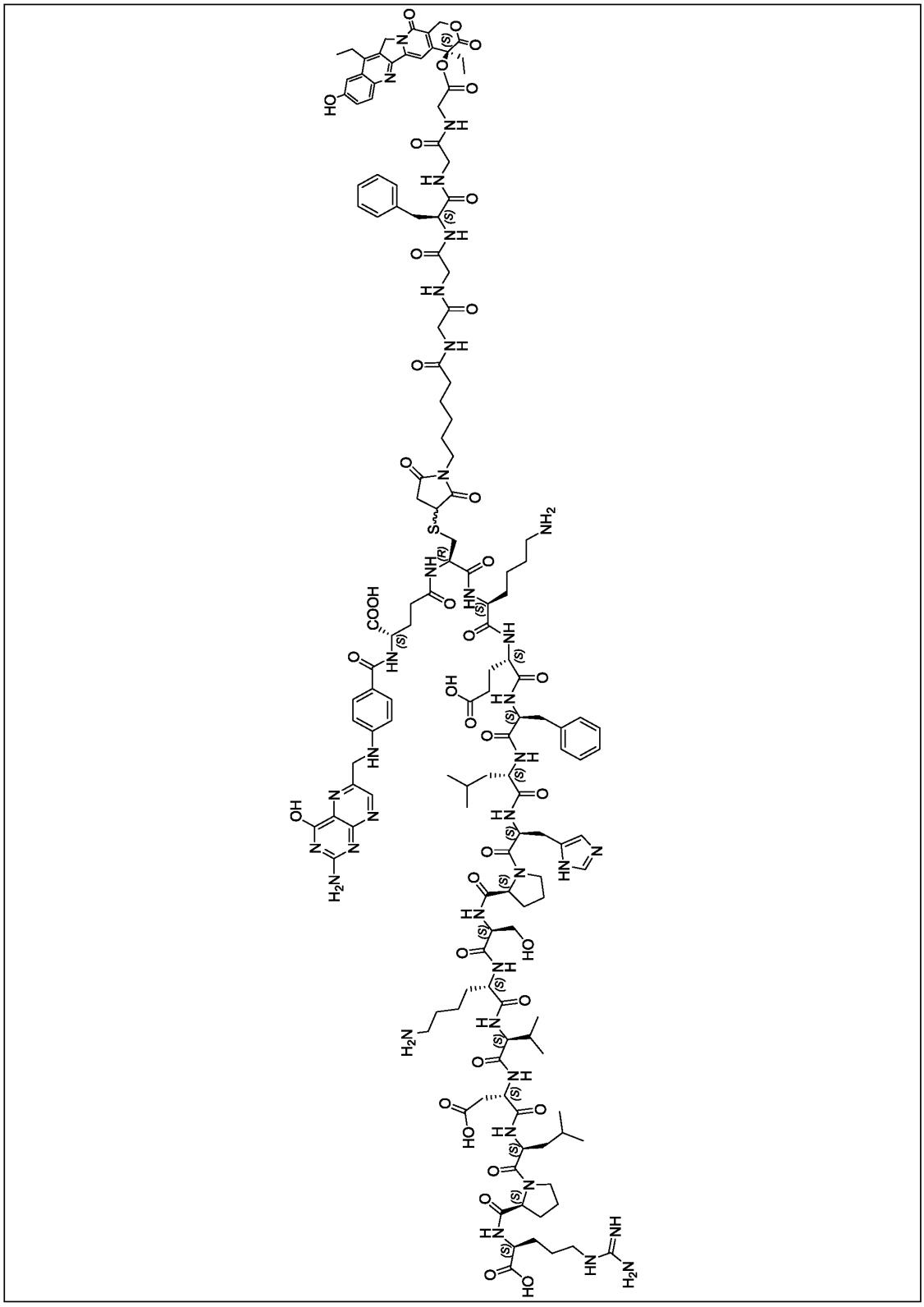


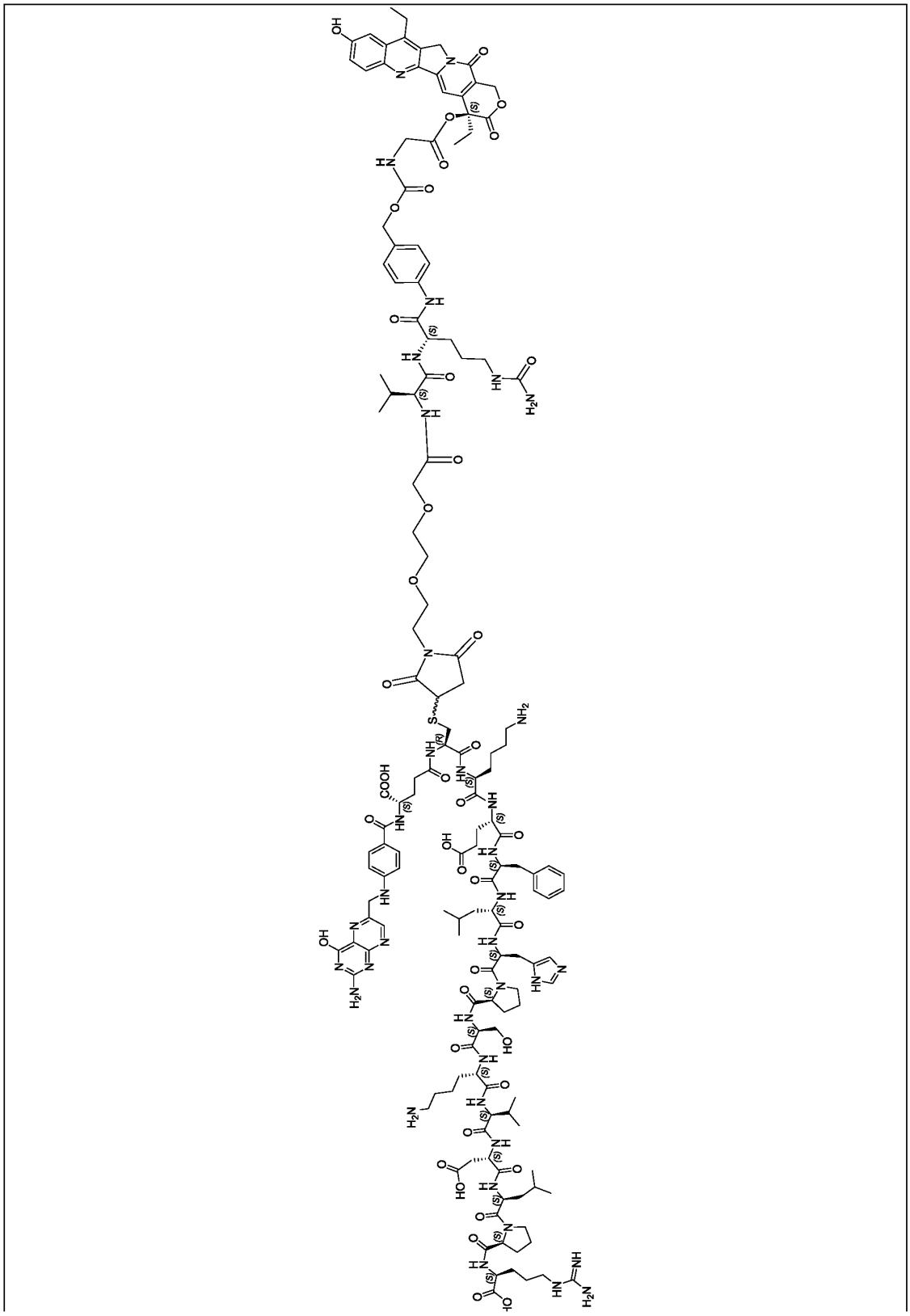


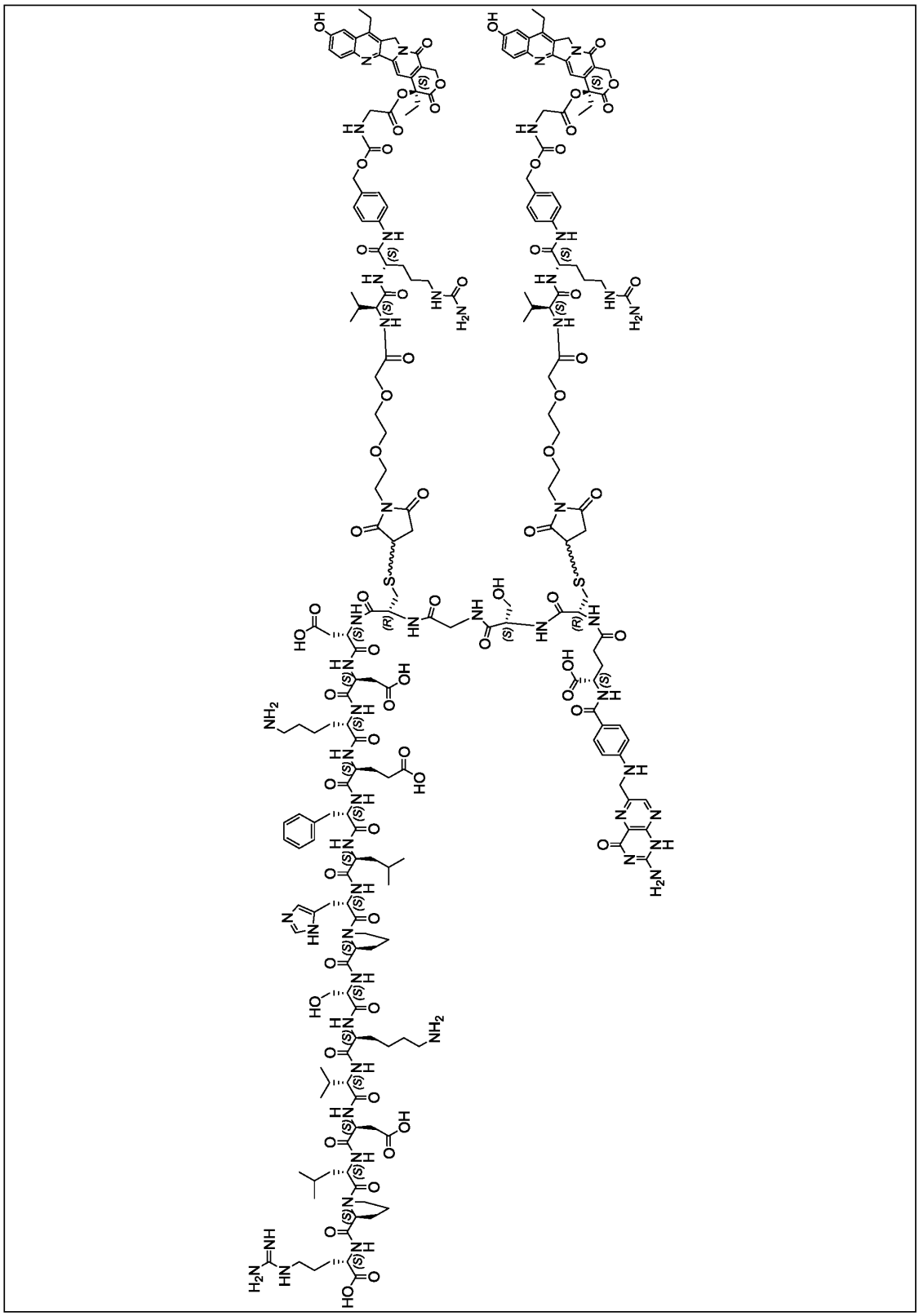


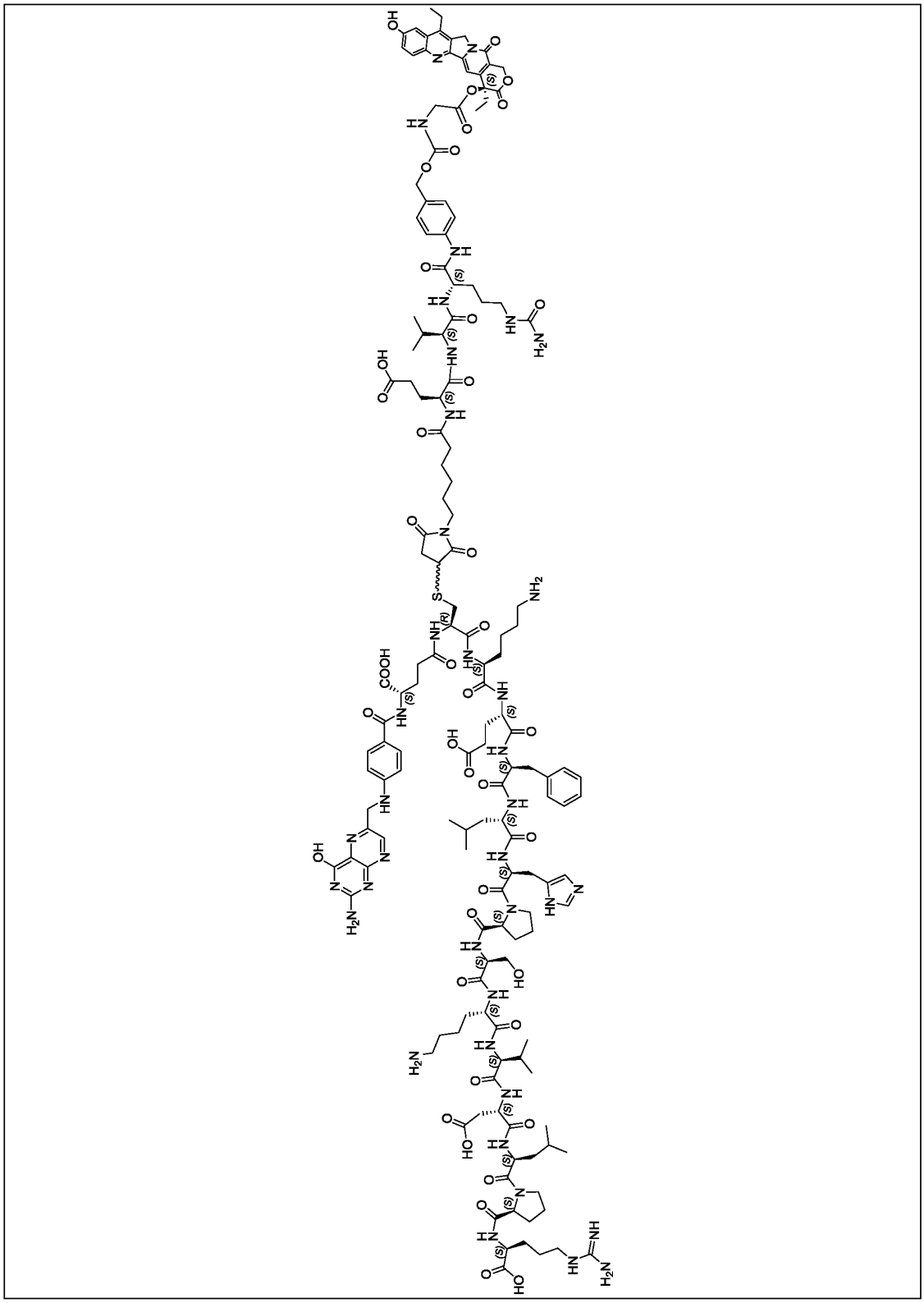


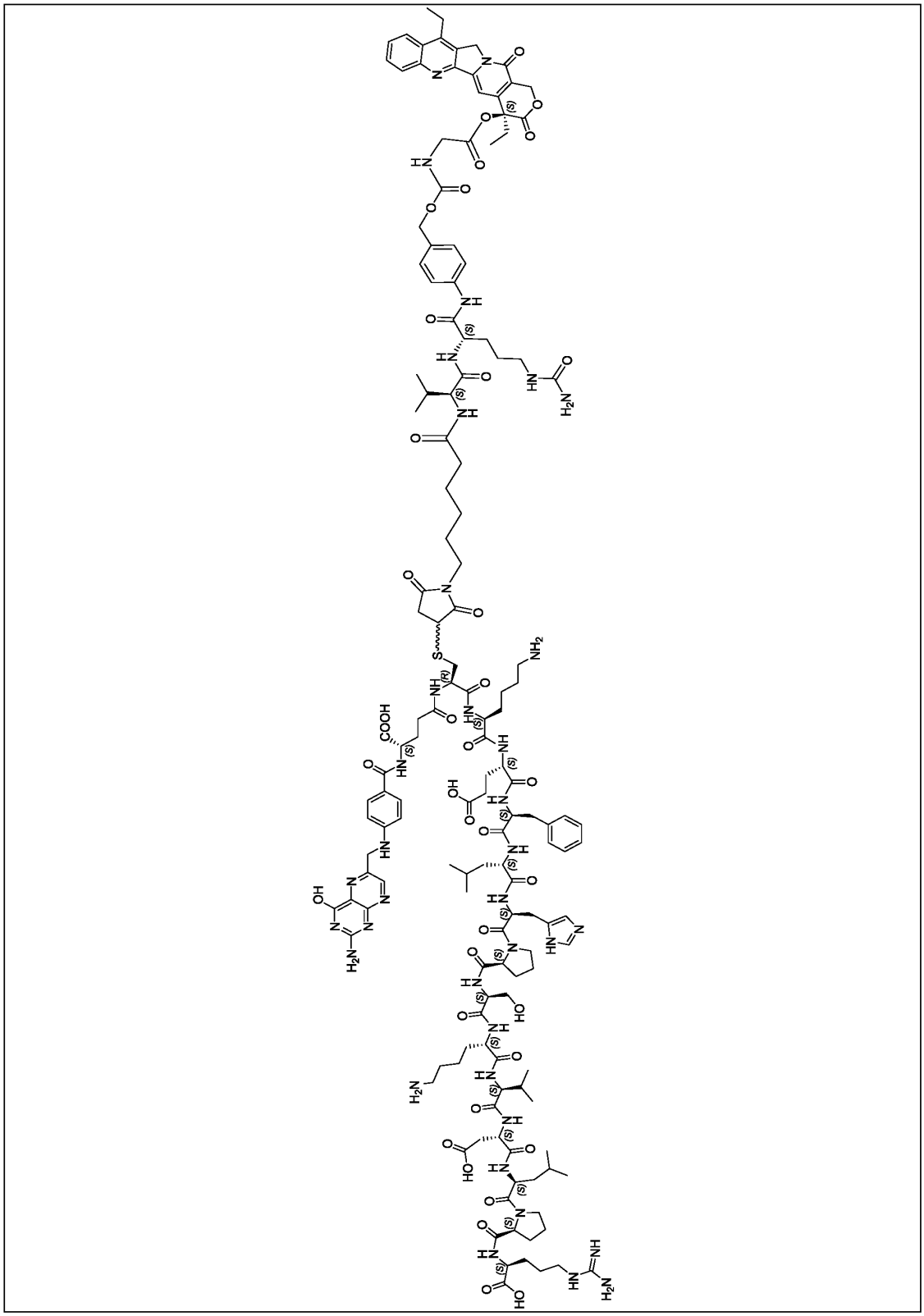


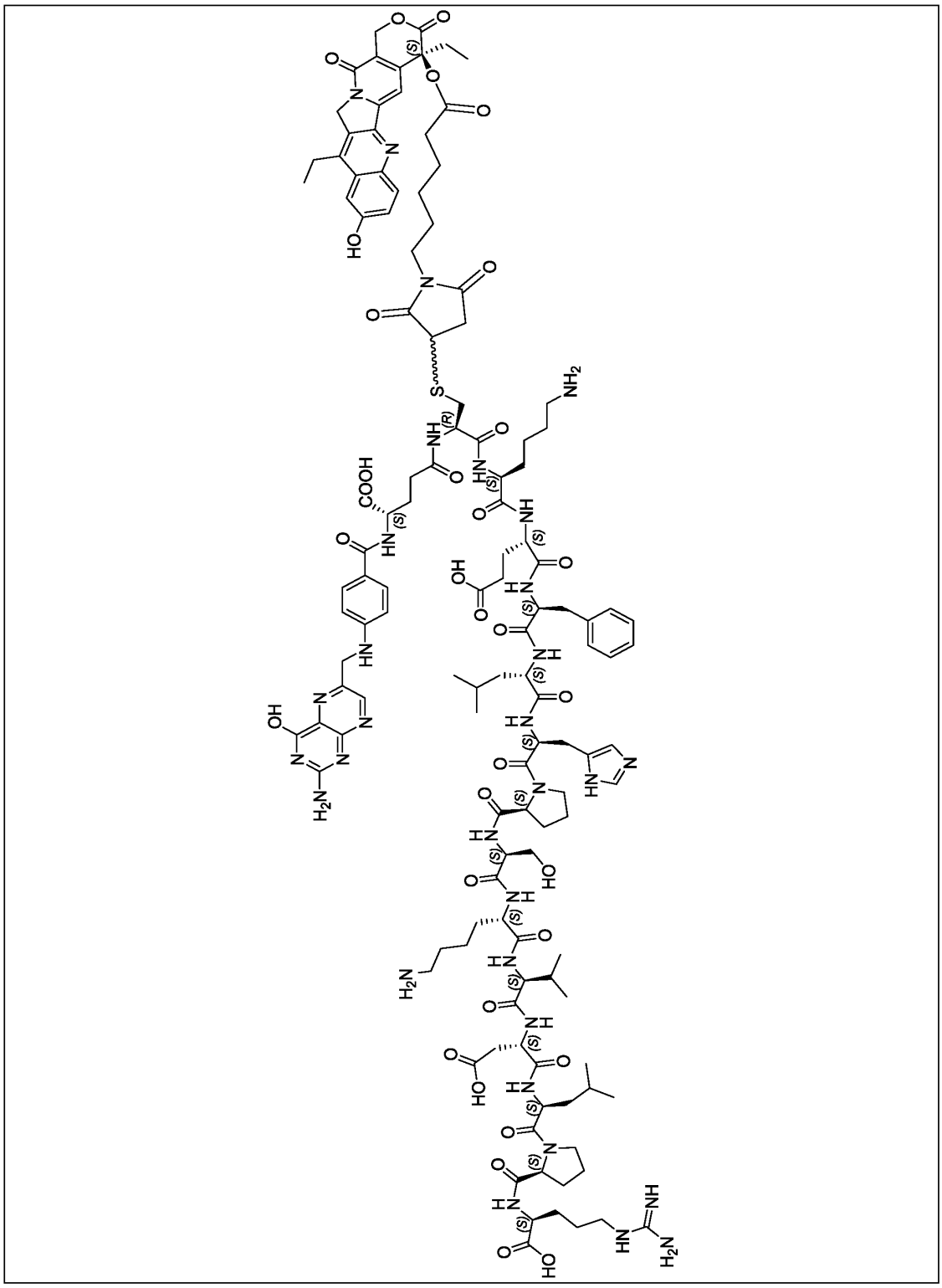


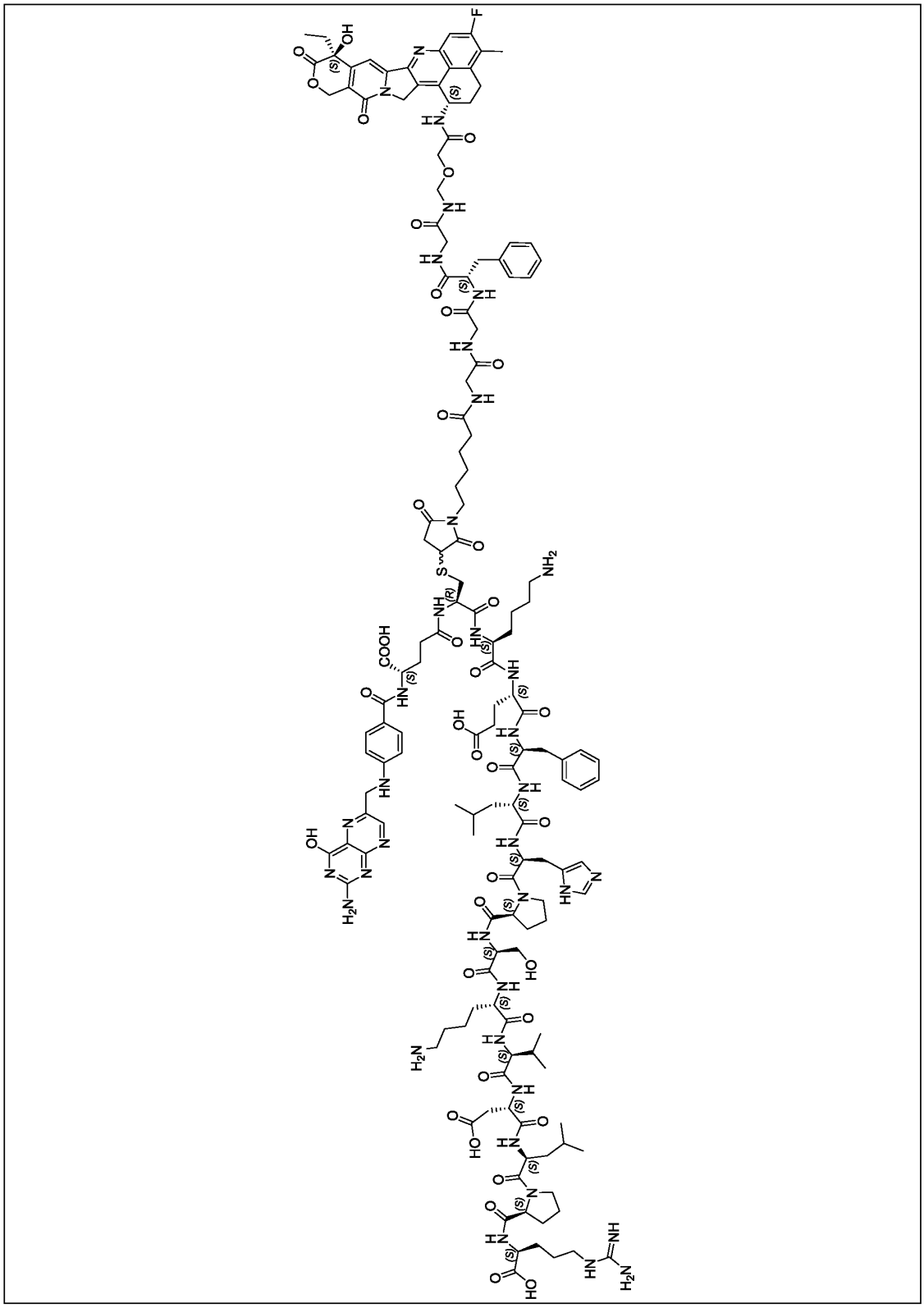


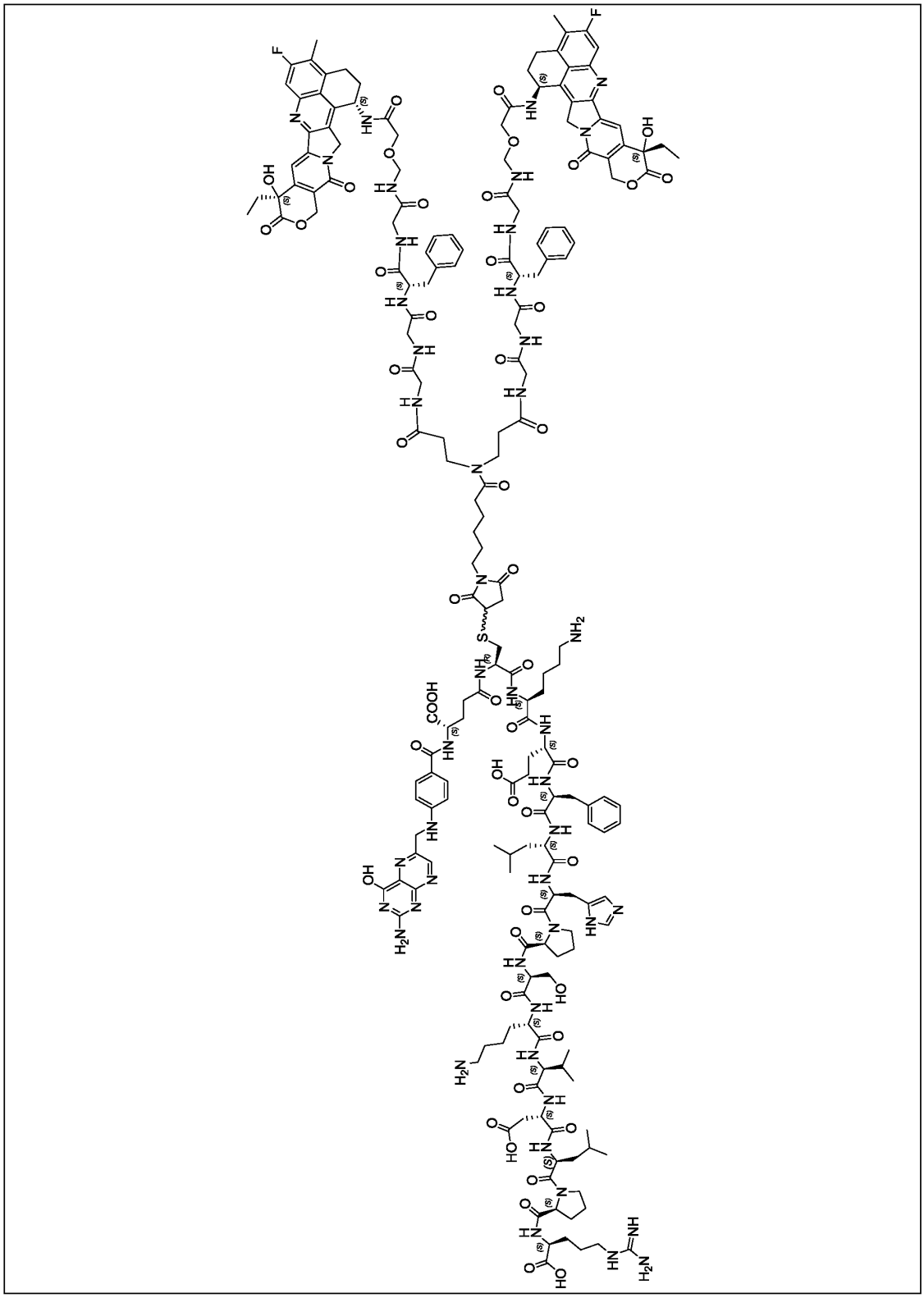


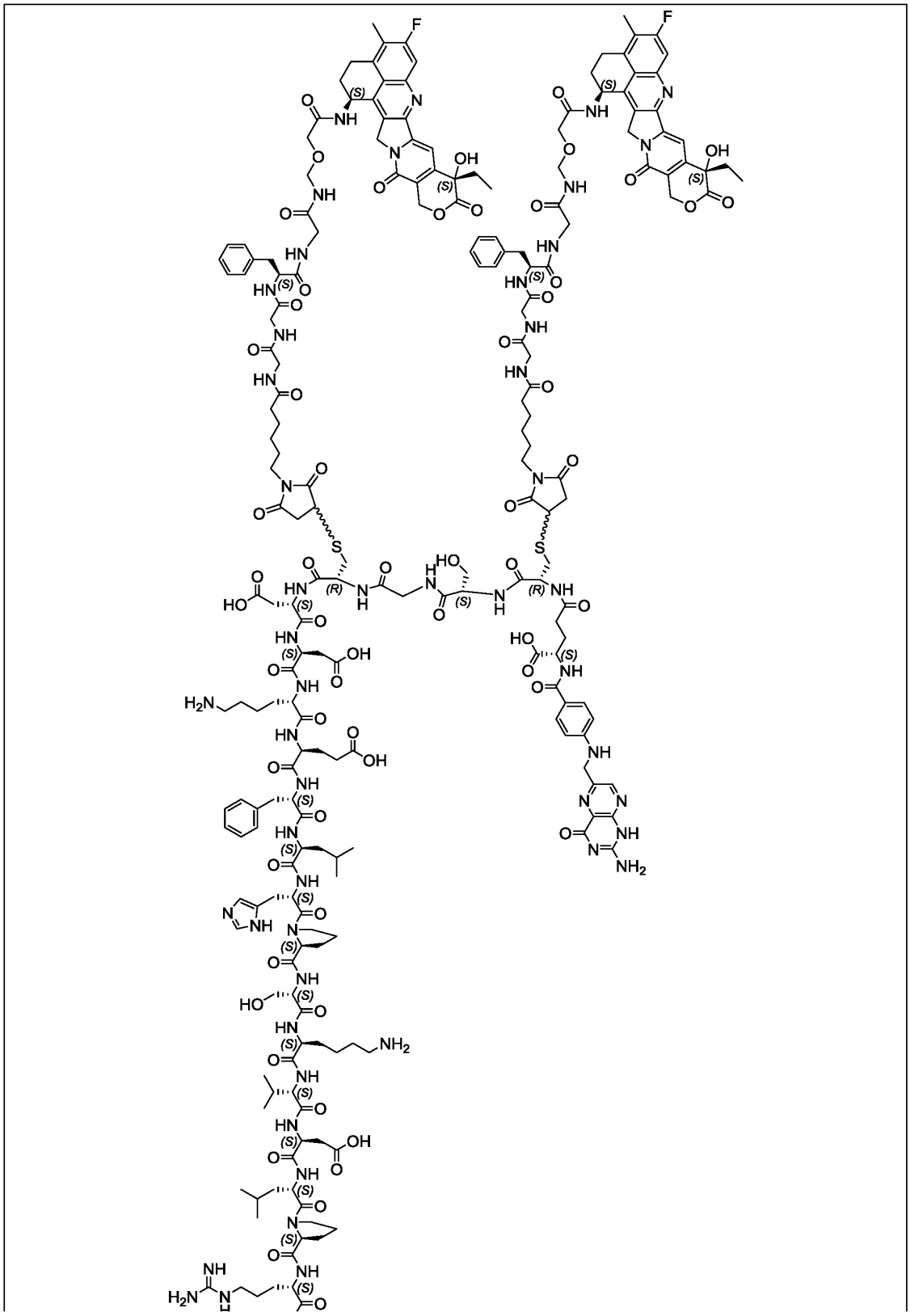


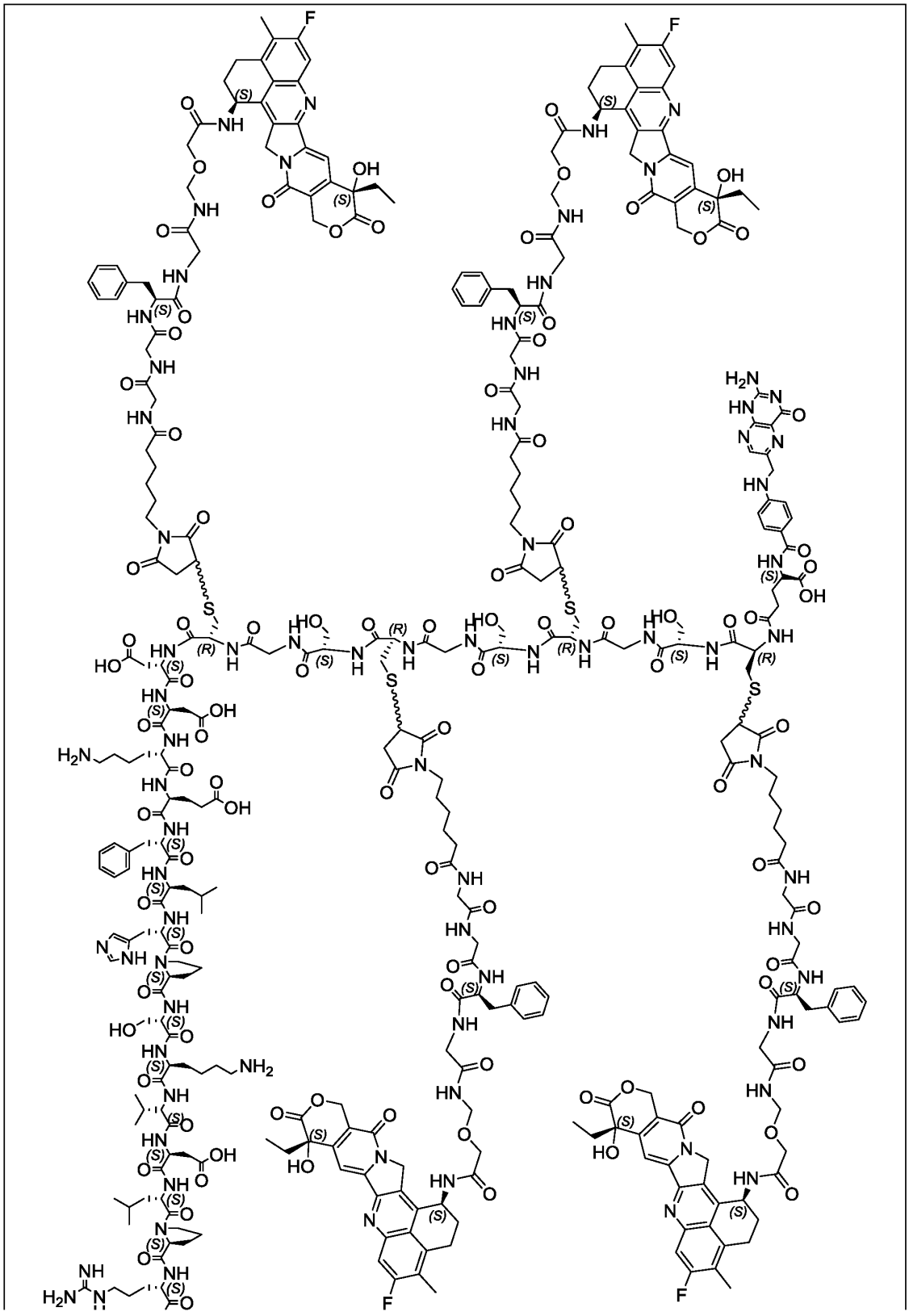


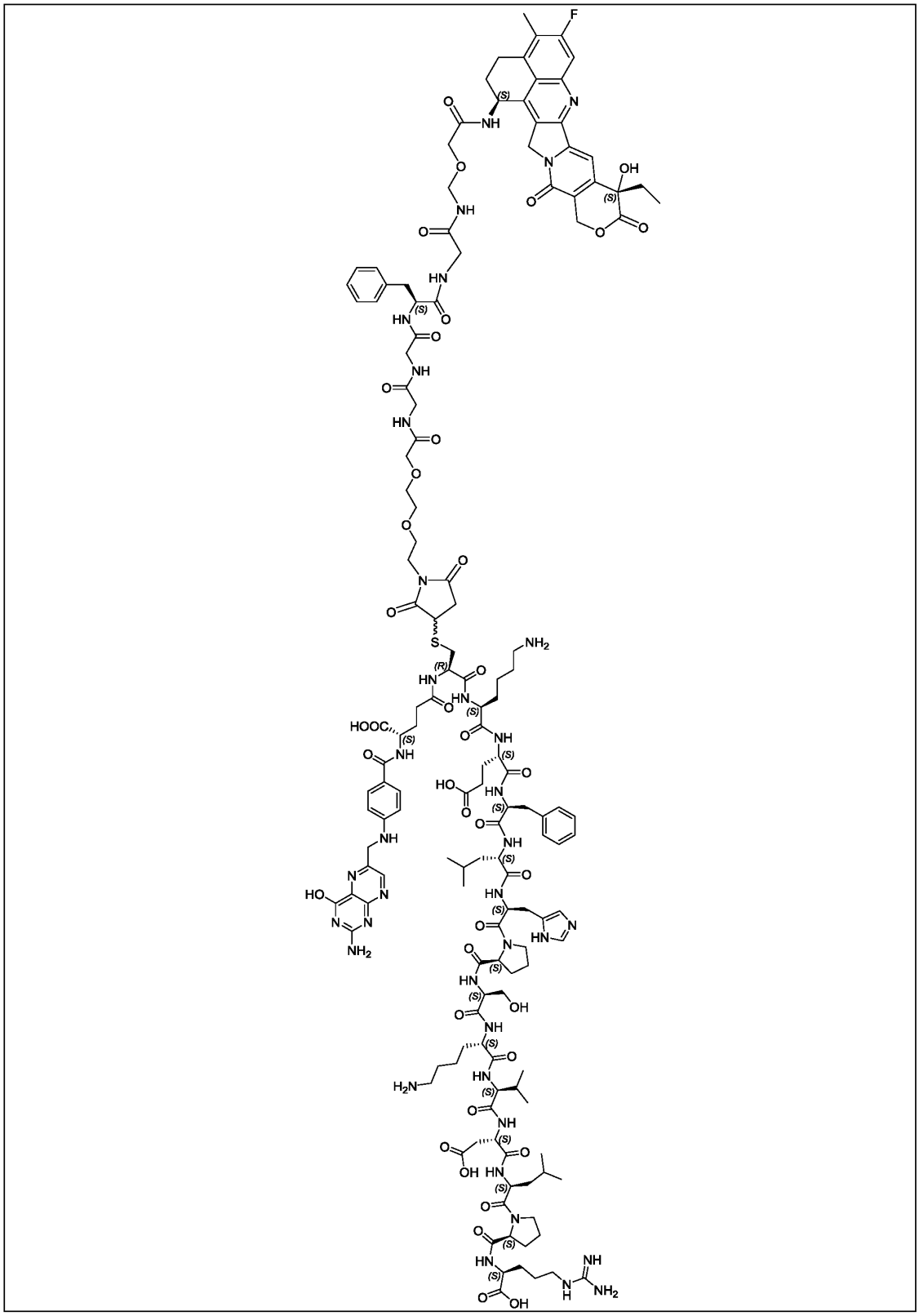


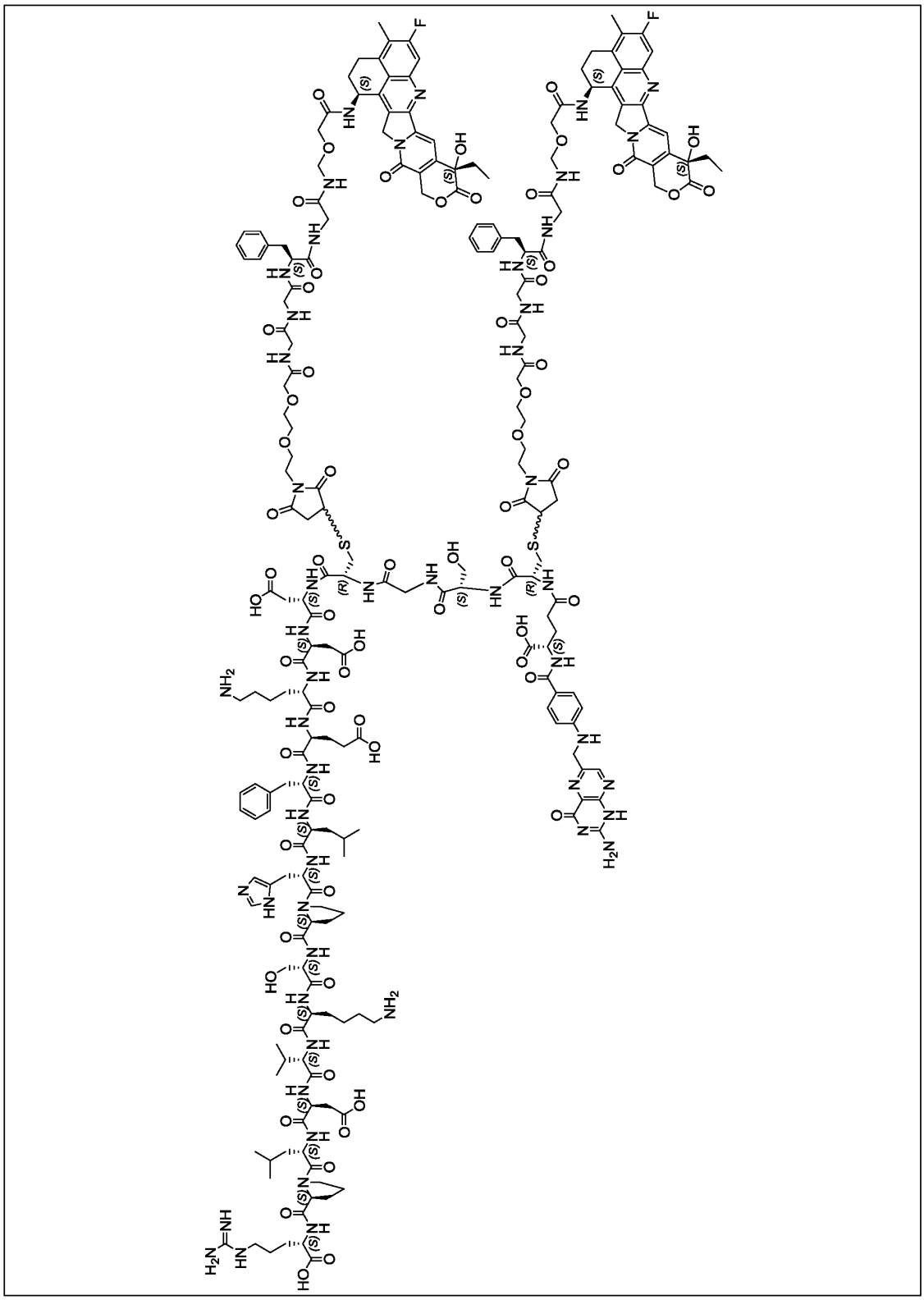


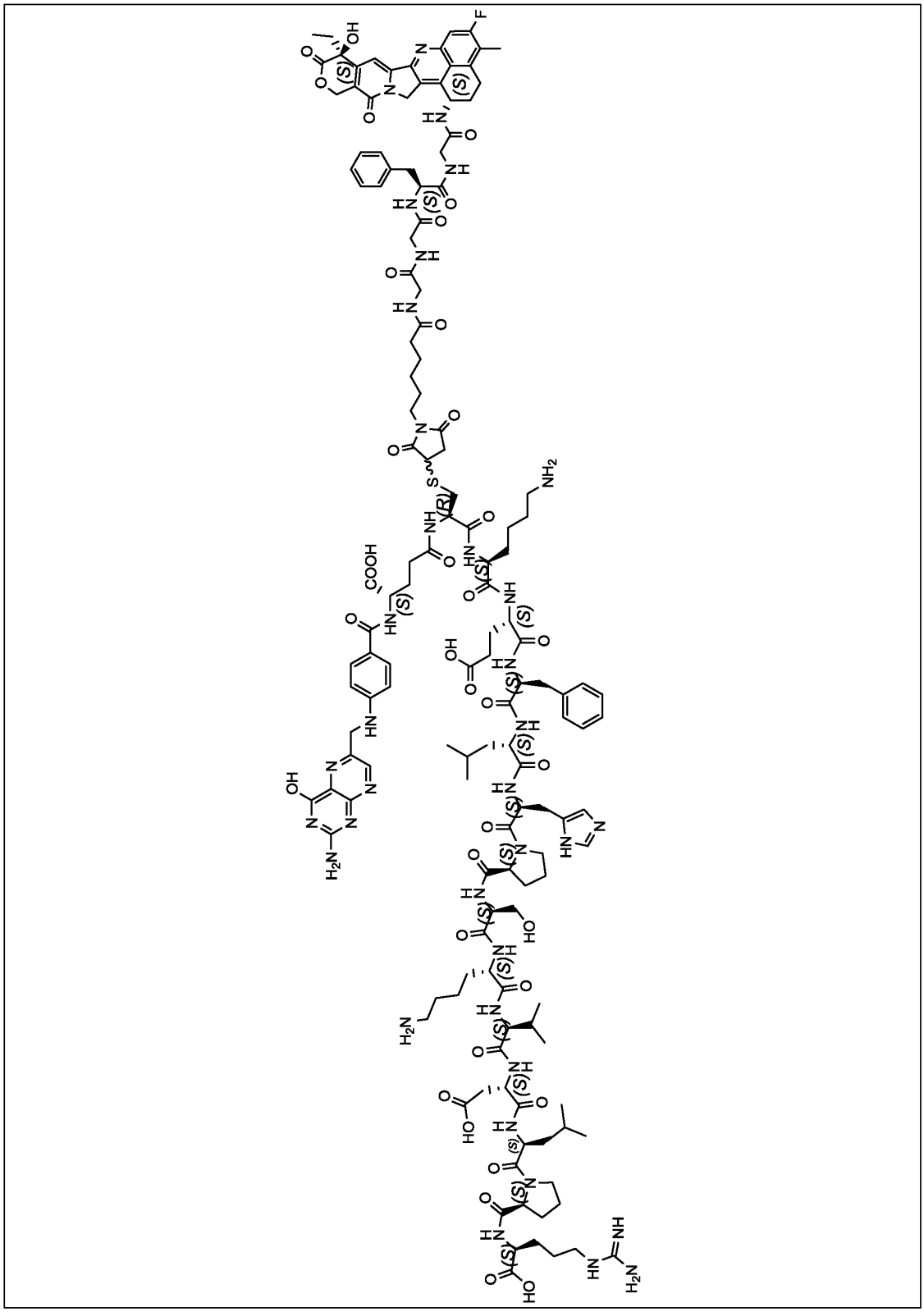


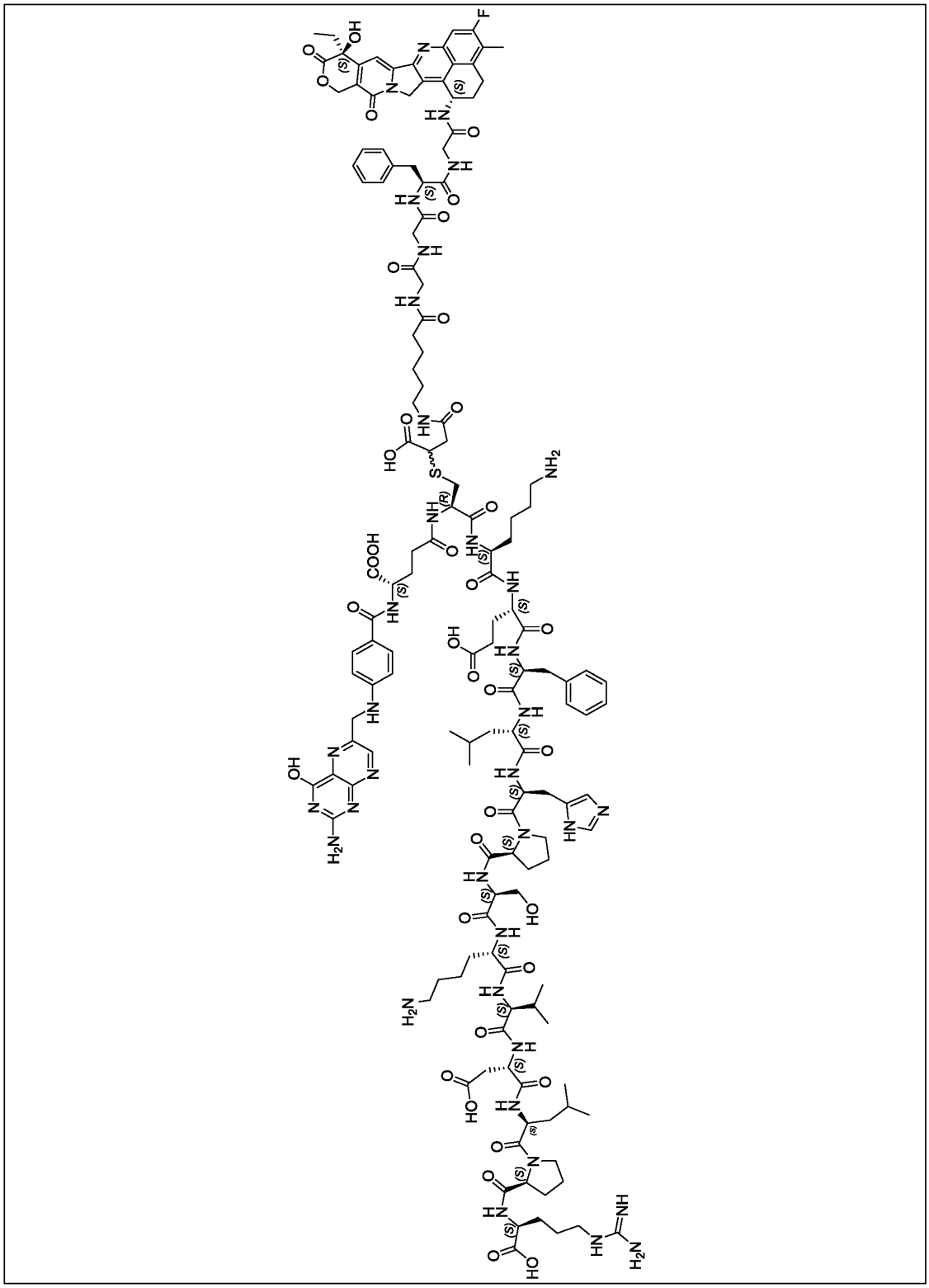


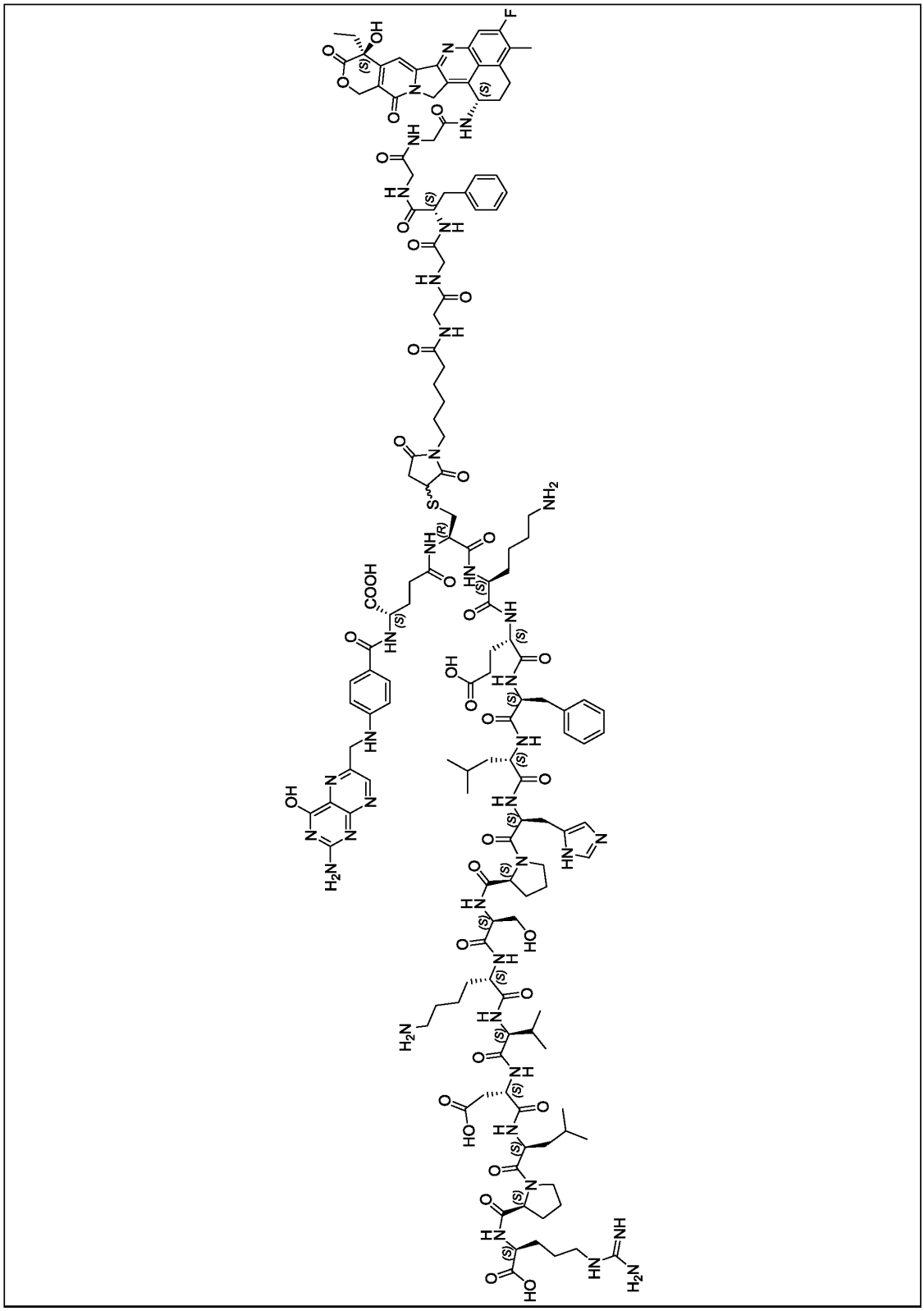


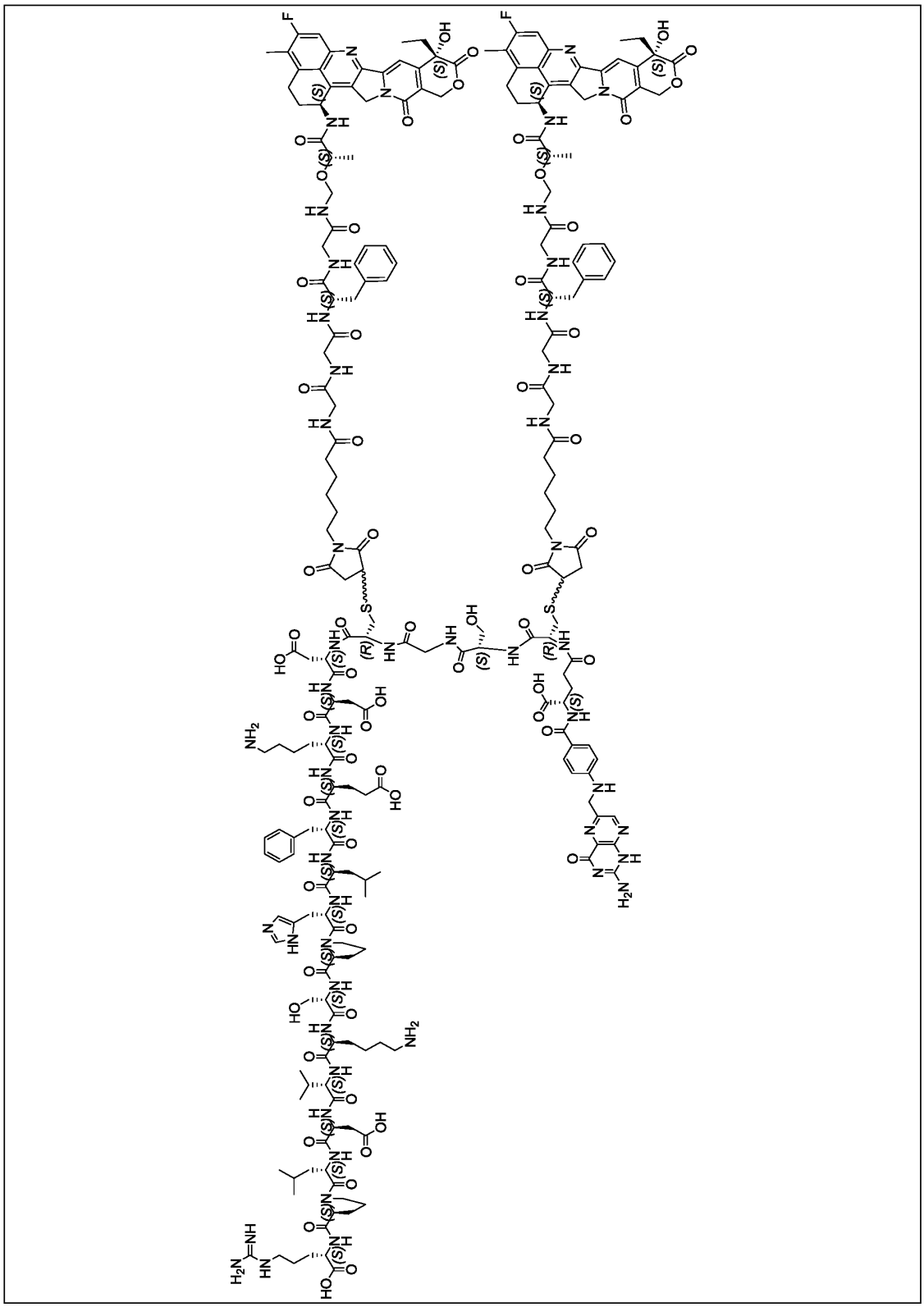


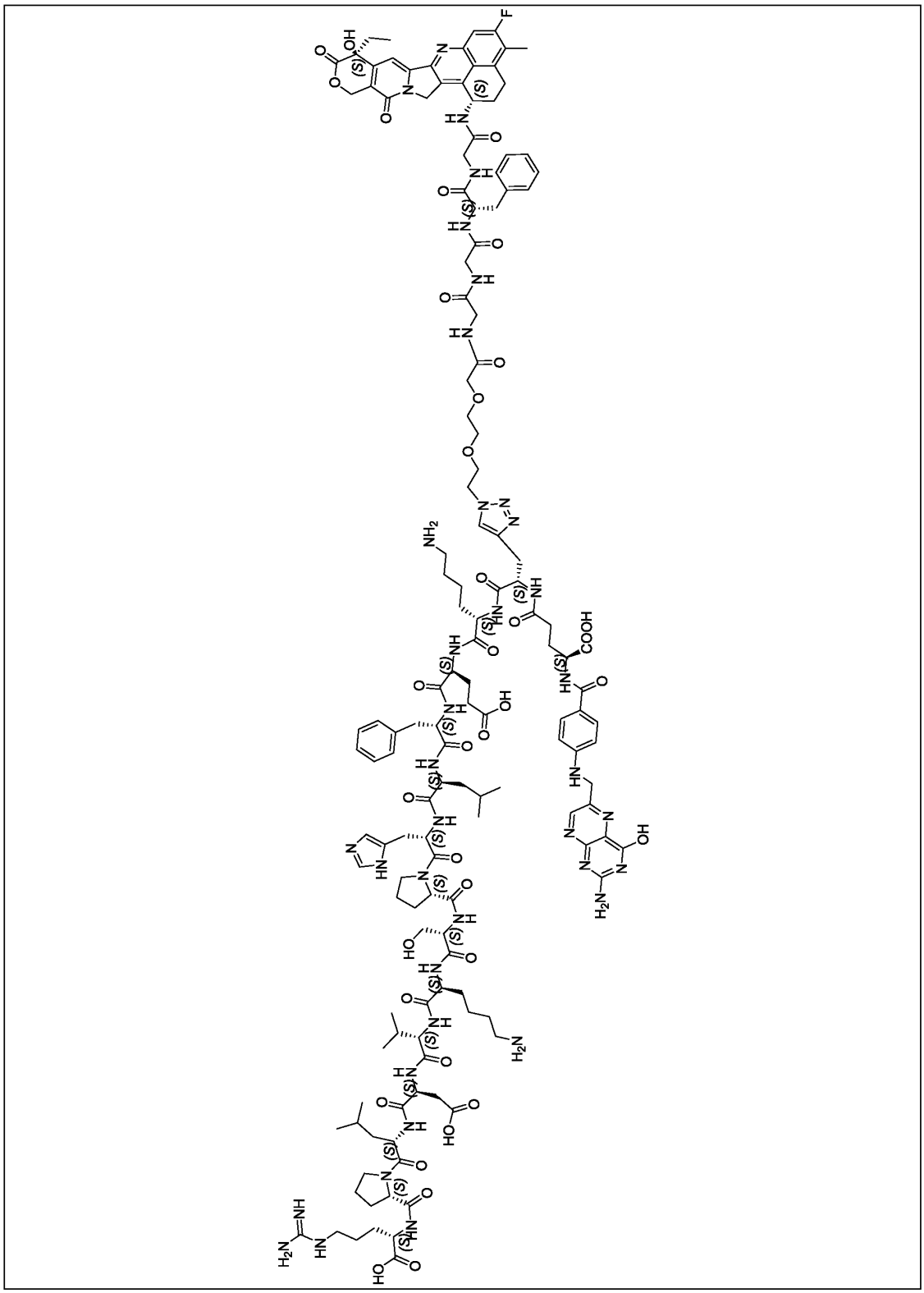


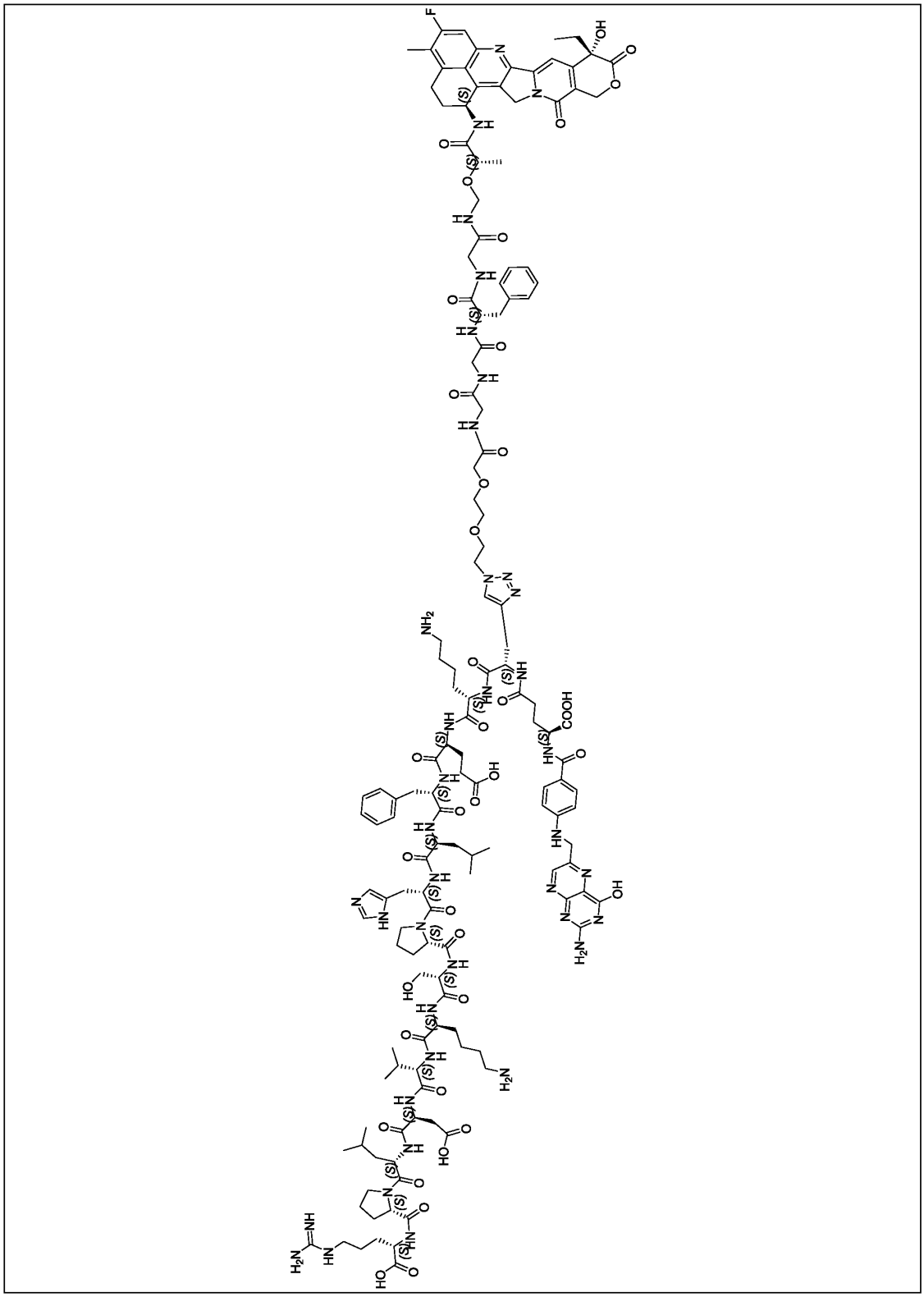


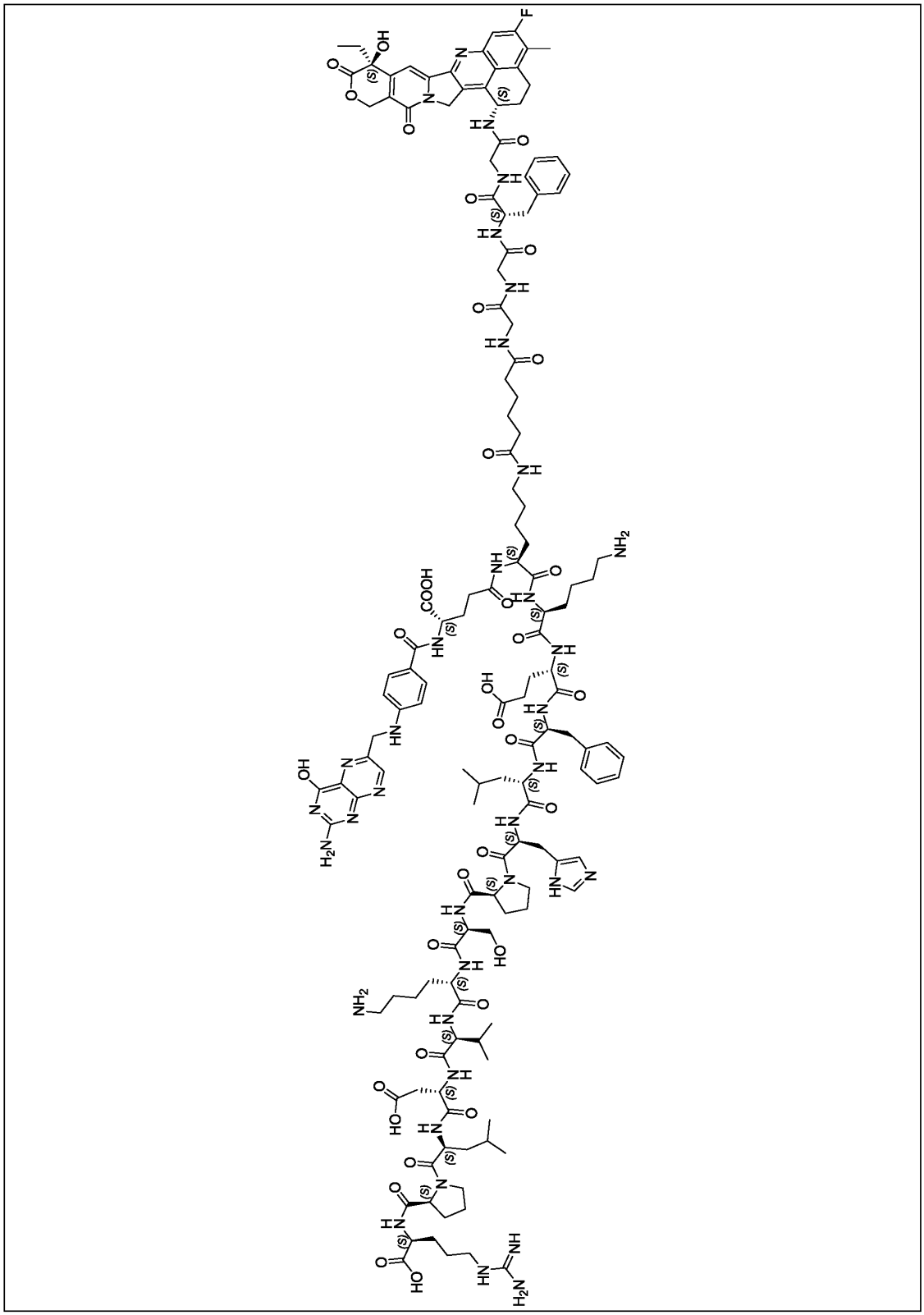


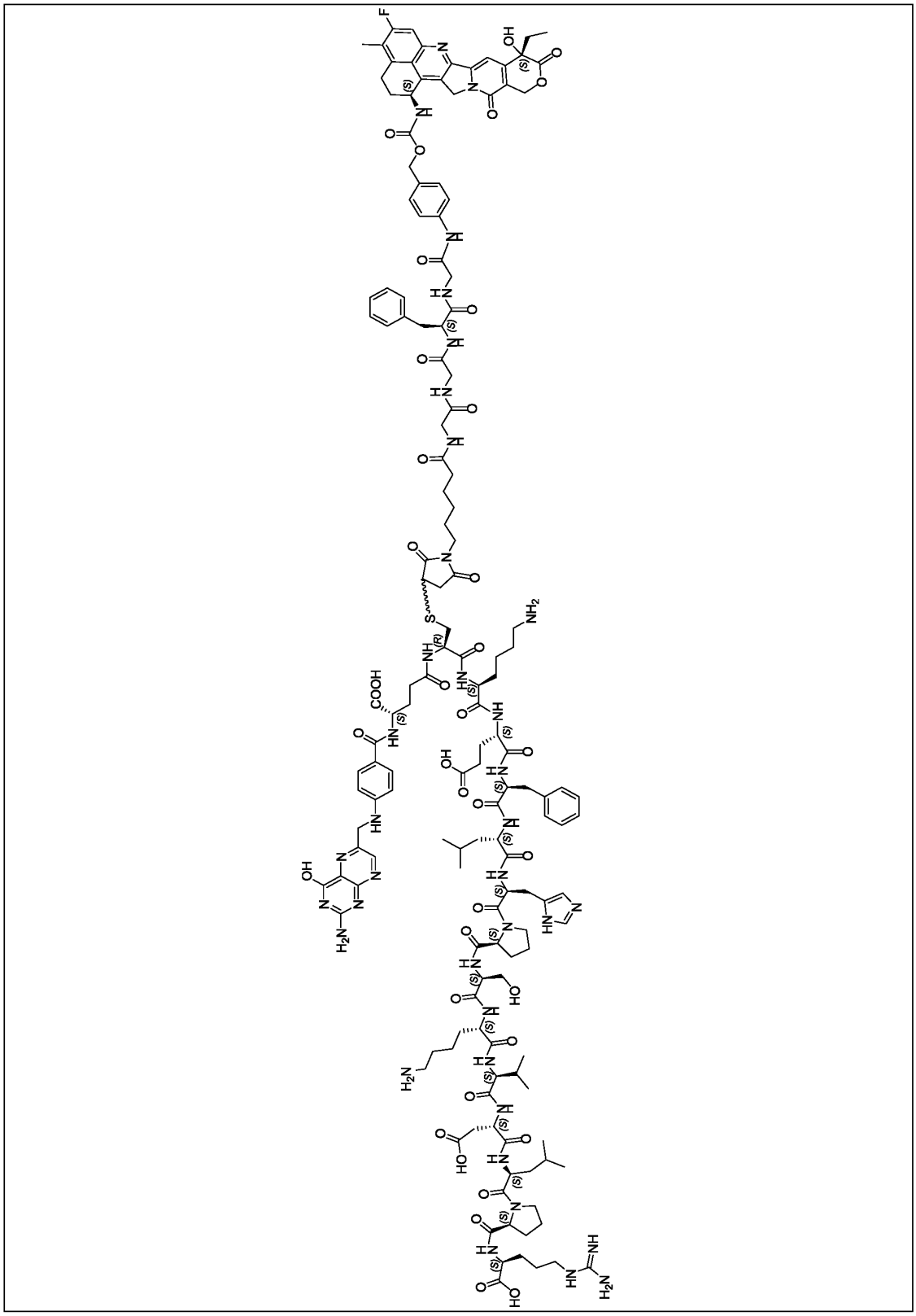


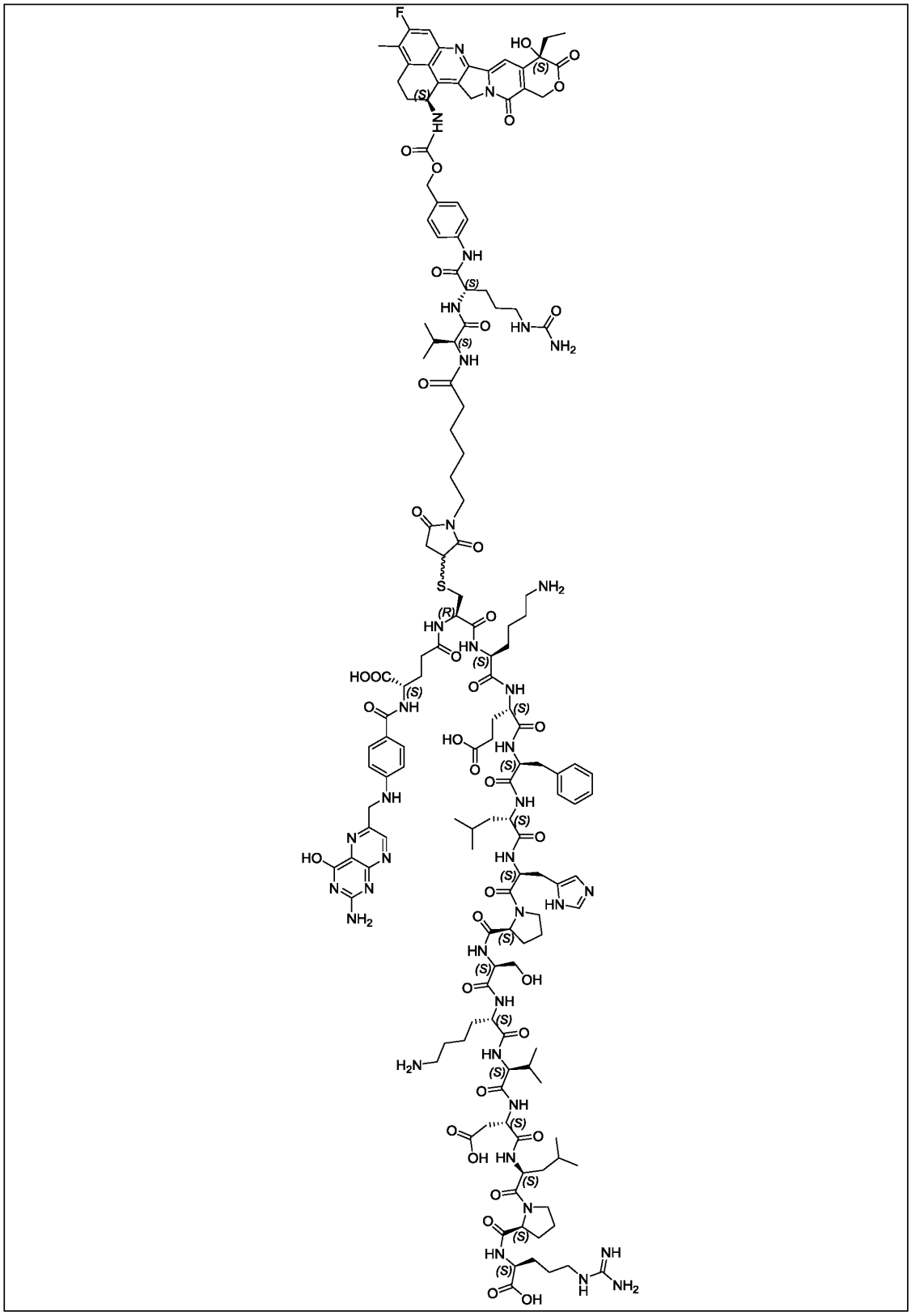


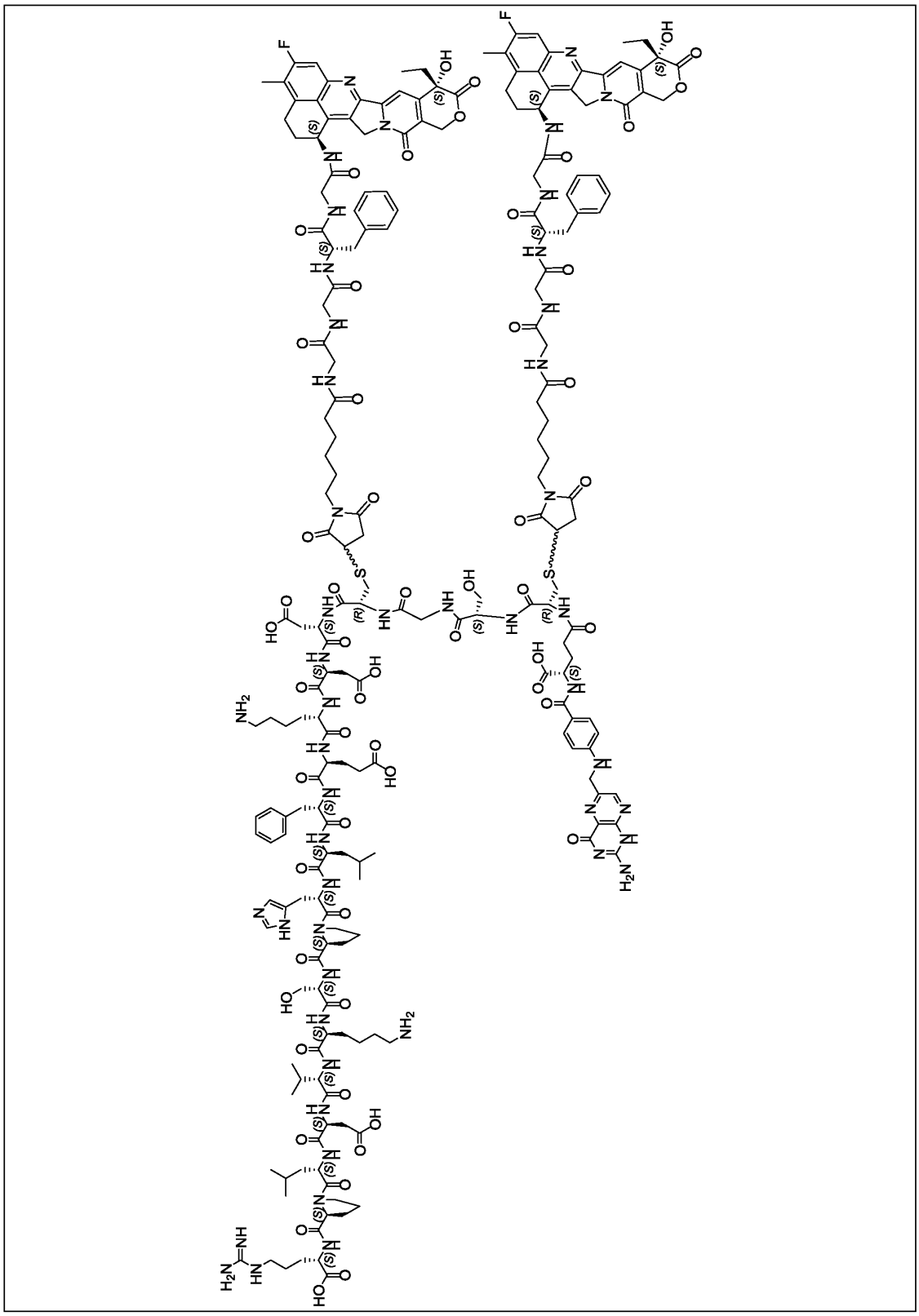


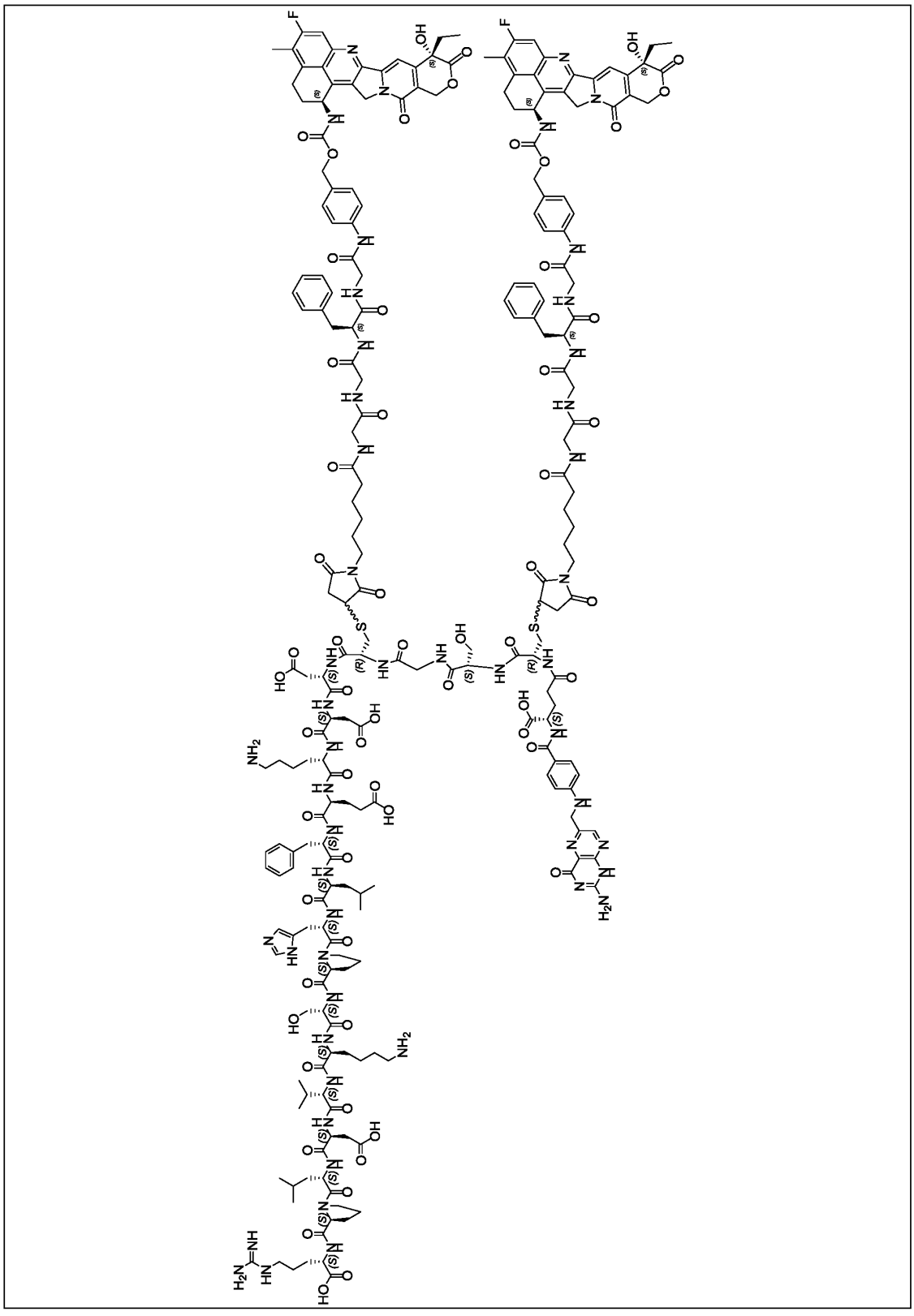


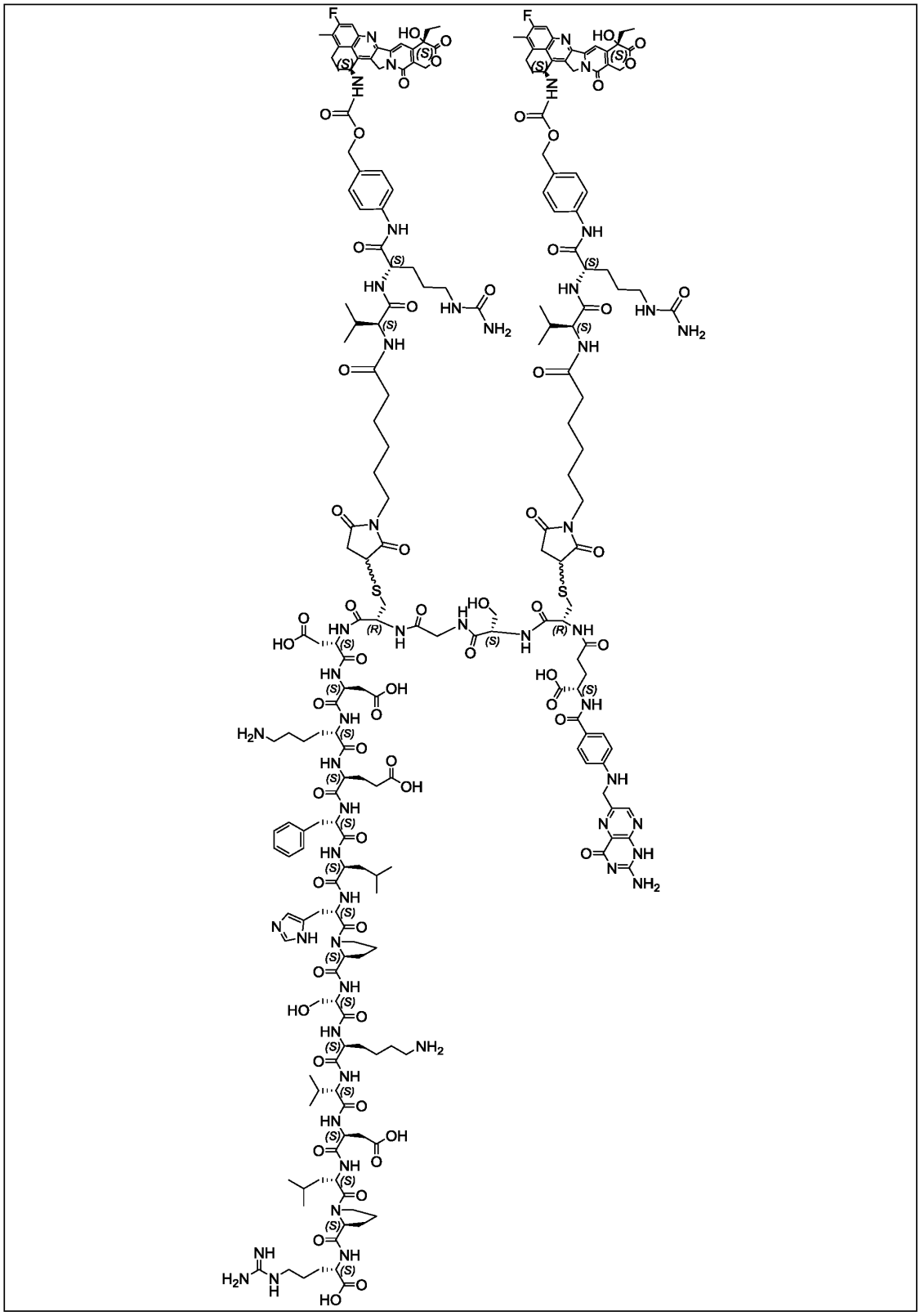












[28] 本申请的另一个方面提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体。在一些实施方式中，本申请所述的药物组合物用于静脉内、皮下、口服、肌内或心室内施用。

[29] 本申请的又一个方面提供了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本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请所述的药物组合物。

[30] 本申请的另一个方面提供了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本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请所述的药物组合物。在一些实施方式中，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。

[31] 本申请的另一个方面提供了本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请所述的药物组合物在用于制备治疗对象中的疾病的药物中的用途。

[32] 在一些实施方式中，本申请所述疾病选自下组：癌症、免疫性疾病、代谢疾病和神经疾病。在一些实施方式中，所述癌症选自胰腺癌、胆道癌、肝癌、乳腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、食道癌、肺癌、肾癌、白血病、卵巢癌、胃癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、睾丸癌、皮肤癌、前列腺癌、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，优选地，所述自身免疫性疾病选自结缔组织病、系统性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。代谢疾病选自糖尿病、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。

[33] 在一些实施方式中，本申请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。

[34] 在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每周一次、每周两次、每周三次、每三天一次、每两天一次、每天一次、每天两次或每天三次。在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每周一次。在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每天三次。

[35] 在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物以 1-150mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量范围施用。在一些实施方式中其中所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物以 1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 或 150mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量施用。在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物以 50 mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量施用。在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物以 25 mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量施用。

附图说明

[36] 图 1A 为试验中的小鼠体重随给药时间的变化，图 1B 为 MIAPaCa-2 移植瘤模型各组肿瘤体积随时间变化曲线，图 1A-1B 显示了本申请的化合物在 MIAPaCa-2 移植瘤模型的抑瘤效果较好。

[37] 图 2A 为试验中的小鼠体重随给药时间的变化，图 2B 为试验中的小鼠相较初始体重随给药时间的变化情况。

[38] 图 3A 为试验中的大鼠体重随给药时间的变化，图 3B 为给药期间各组试验动物摄食量变化。

发明详述

[39] 以下描述只为说明本申请的多种实施方式。因此，此处的具体实施方式不应理解为对申请范围的限制。本领域的技术人员基于本发明的宗旨和本文的描述，可很容易地得出多种等同方式和修改，应理解这样的等同实施方式包含在本发明范围内。在本申请中引用的所有文献，包含公开出版物、专利和专利申请都通过引用的方式全文并入本申请。

[40] 除非上下文另外明确指出，否则本文所使用的单数形式“一”、“一个”、“一种”和“该”或“所述”包括复数引用。

[41] 本文所使用的诸如“包括”、“包含”、“含有”、“含有”和“具有”等术语是包括性的或开放式的，并且不排除额外的、未叙述的要素或方法步骤。术语“由……组成”是封闭式的。

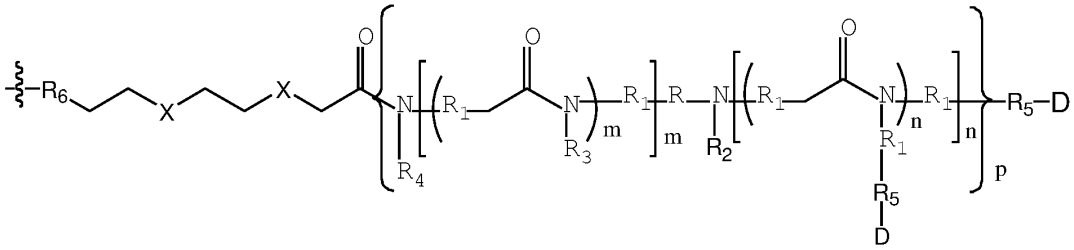
[42] 本申请的一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

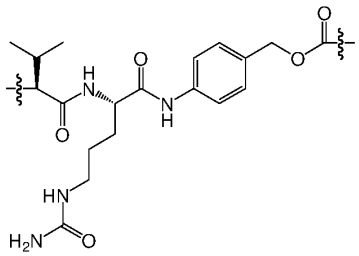
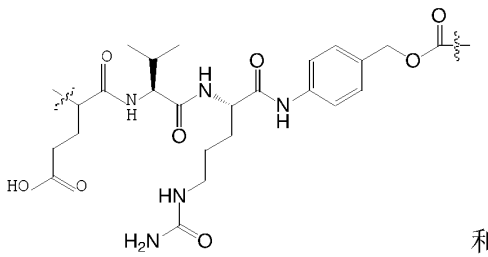
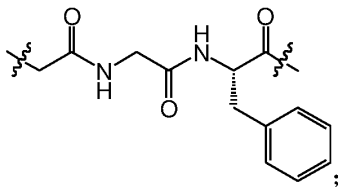
其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

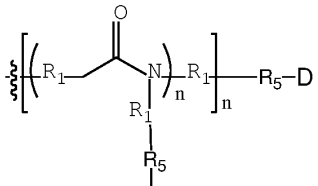
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：



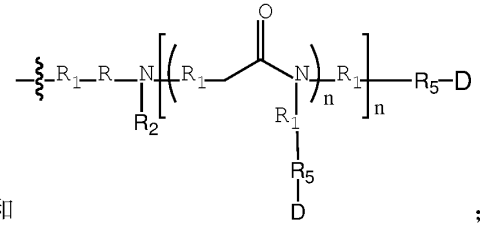
其中：

R 选自 、和；

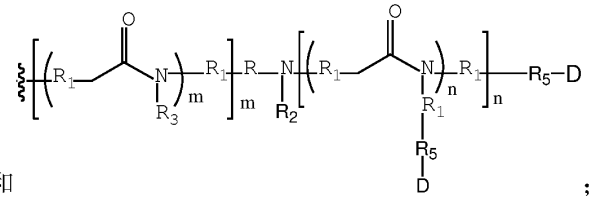
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；



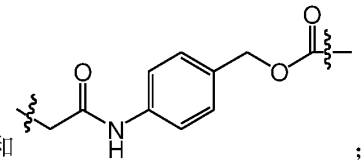
R_2 各自独立地选自氢和 ；

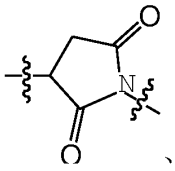
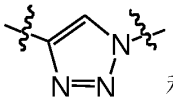
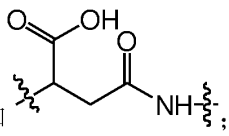


R_3 各自独立地选自氢和 ；



R_4 各自独立地选自氢和 ；

R_5 各自独立地选自键、$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2-$、$-CH_2C(O)-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2C(O)-$和  ；

R_6 各自独立地选自键、  、  和  ；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

m 各自独立地为 0 或 1；

n 各自独立地为 0 或 1；

p 为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

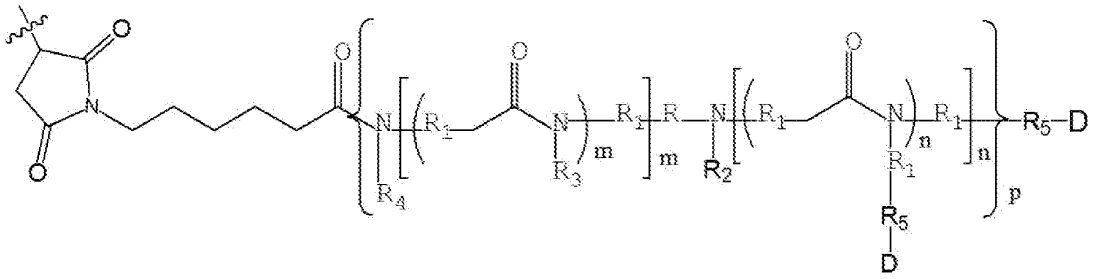
[43] 本申请的另一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

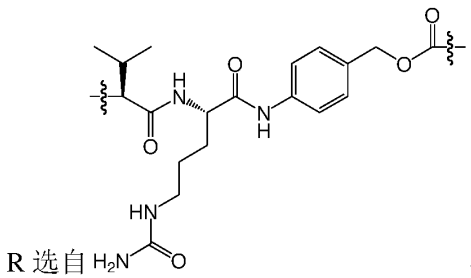
其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

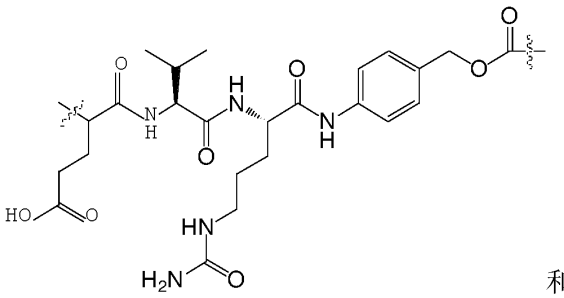
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

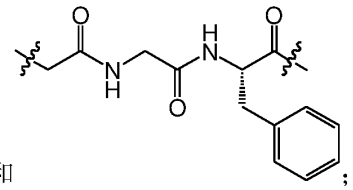


其中：

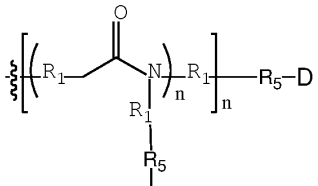


R 选自 、

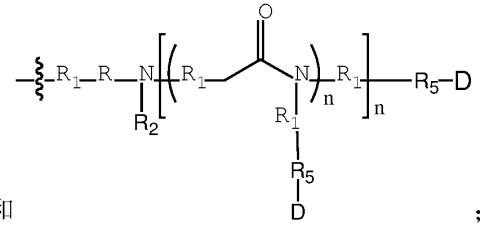


和 ；

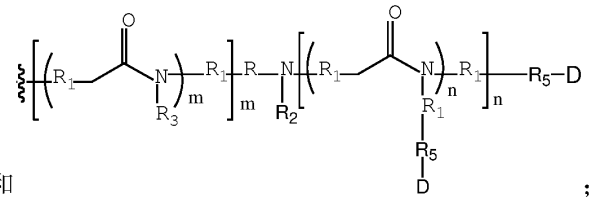
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；



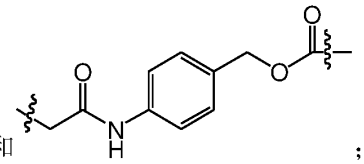
R_2 各自独立地选自氢和 ；



R_3 各自独立地选自氢和 ；



R_4 各自独立地选自氢和 ；

R_5 各自独立地选自键、$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2-$、$-CH_2C(O)-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2C(O)-$和  ；

m 各自独立地为 0 或 1；

n 各自独立地为 0 或 1；

p 为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

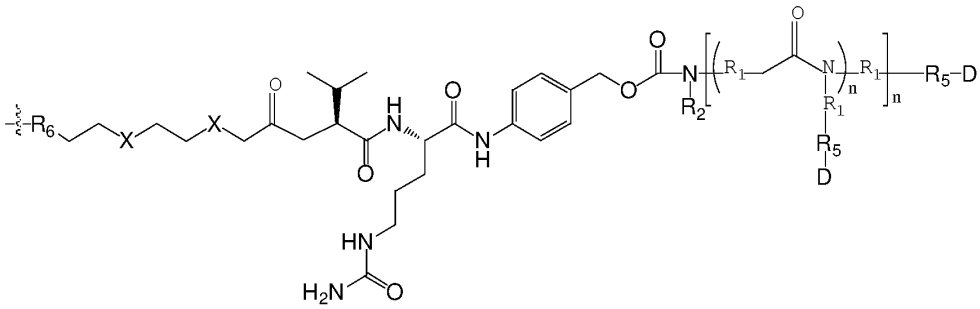
[44] 本申请的另一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

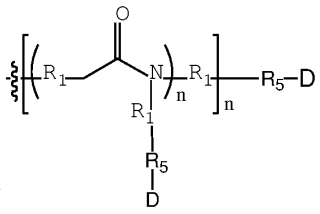
所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

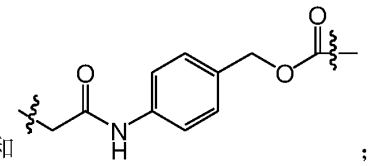
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

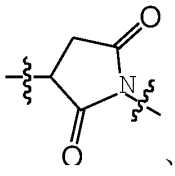
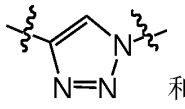
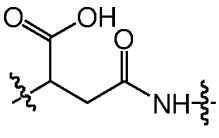


其中：

R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_2 各自独立地选自氢和  ；

R_5 各自独立地选自键、-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-、-$CH_2C(O)$-、-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-和  ；

R_6 各自独立地选自键、  、  和  ；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

n 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

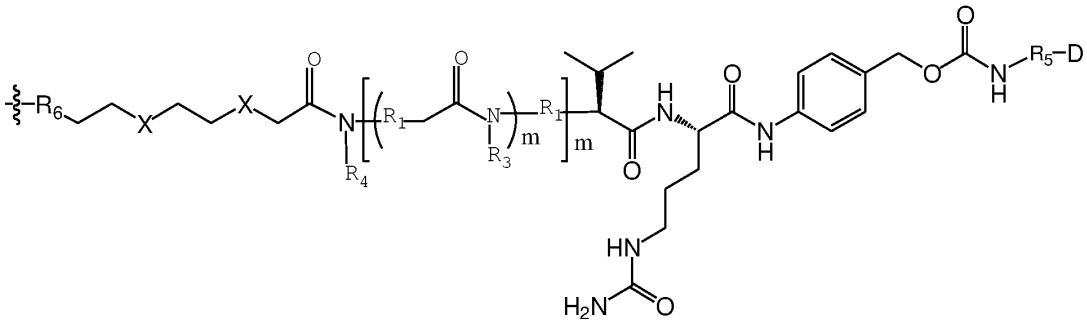
[45] 本申请的另一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

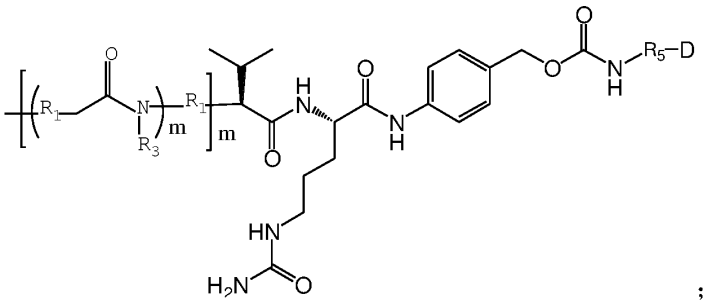
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

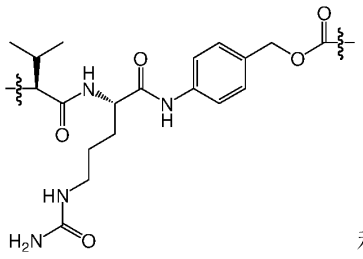
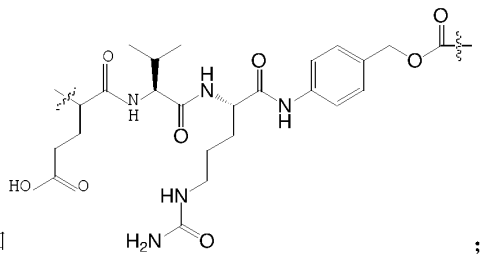


其中：

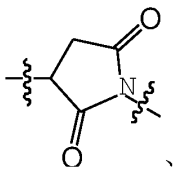
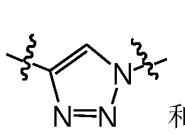
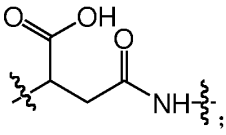
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_3 各自独立地选自氢和-R_1-R-NH-R_5-D；

R_4 为氢或  ；

R 选自  和  ；

R_5 各自独立地选自键、$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2C(O)-$和$-CH_2C(O)-$；

R_6 各自独立地选自键、、和；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

m 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

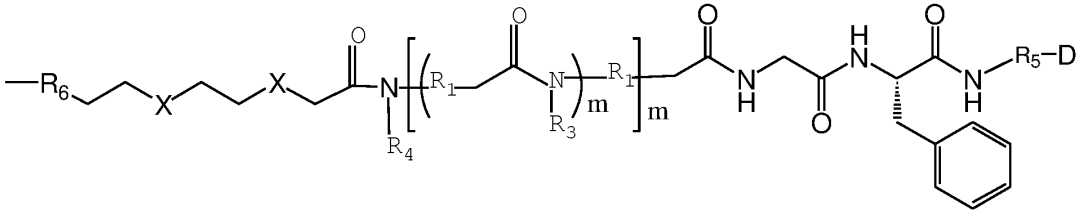
[46] 本申请的另一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

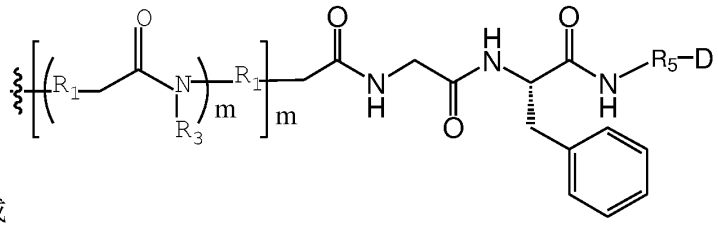
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：



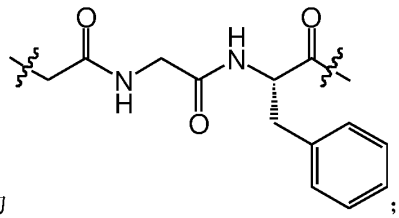
其中：

R_1 各自独立地选自键和$-CH_2CH_2C(O)-NH-$；

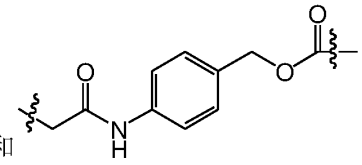
R_3 各自独立地选自氢和$-R_1-R-NH-R_5-D$；

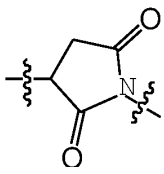
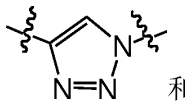
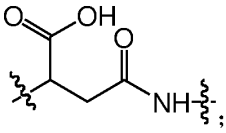


R_4 为氢或 ；



R 为 ；

R_5 各自独立地选自键、$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2C(O)-$、$-CH_2C(O)-$和  ；

R_6 各自独立地选自键、  、  和  ；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

m 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

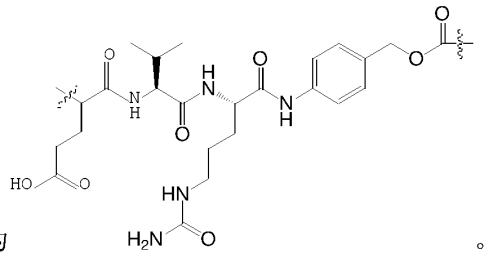
[47] 本申请使用的术语“配体”可以包括各种各样的化学分子或肽，其对所选定的靶点具有特异性的结合亲和性，所选定的靶点可以是例如细胞表面受体、细胞表面抗原、细胞、组织、器官等。在一些实施方式中，配体可以与靶细胞表面上表达的蛋白或标记物特异性结合。在一些实施方式中，本申请的配体以 10^{-6}~10^{-11}M（K_d 值）的亲和性与细胞表面蛋白或标记物结合。在一些实施方式中，本申请的配体以至少 10^{-7}、至少 10^{-8}、至少 10^{-9} M（K_d 值）的亲和性与细胞表面蛋白或标记物结合。在一些实施方式中，本申请的配体以低于 10^{-6}、低于 10^{-7}、低于 10^{-8} 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。

[48] 本申请中所述的“多配体部分”包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体。在一些实施方式中，多配体部分包含三个配体，其中第一配体和第二配体靶向不同的细胞表面分子，第三配体靶向的细胞表面分子可以与前述两个配体靶向的细胞表面分子相同，也可以不同。在一些实施方式中，多配体部分可以包含四个或更多个配体。

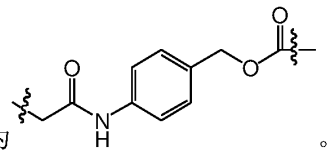
[49] 在本申请中使用的术语“靶向”指的是指配体或含有配体的偶联体化合物与细胞表面分子的特异性结合，触发或促进靶细胞对配体或含有配体的偶联体化合物的内吞作用，触发或促进配体或含有配体的偶联体化合物在靶细胞周围富集和/或进入靶细胞。

[50]

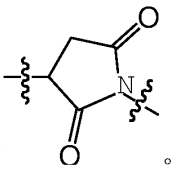
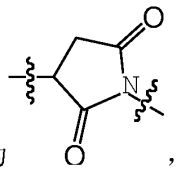
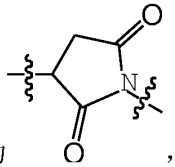
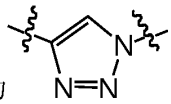
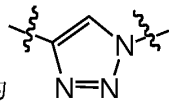
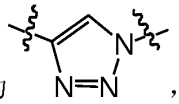
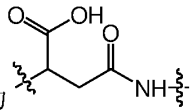
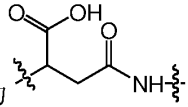
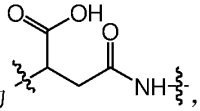


[51] 在一些实施方式中，R 为 。

[52] 在一些实施方式中，R_1 为-$CH_2CH_2C(O)$-NH-。

[53] 在一些实施方式中，R_5 为-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-。在另一些实施方式中，R_5 为-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-。在又一些实施方式中，R_5 为-$CH_2C(O)$-。在一些实施方式中，R_5 为。在另一些实施方式中，R_5 为-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-。在又一些实施方式中，R_5 不是-$CH_2C(O)$-NH-CH_2。

[54] 在一些实施方式中，m 各自独立地为 0 或 1，且 n 为 0。在一些实施方式中，m 为 0，且 n 各自独立地为 0 或 1。在一些实施方式中，m 为 0，且 n 为 0。在又一些实施方式中，m 为 0，n 为 0，且 R_5 不是-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-。

[55] 在一些实施方式中，R_6 为 。在一些实施方式中，R_6 为 ，且 X 为键。在一些实施方式中，R_6 为 ，且 X 为 O。在一些实施方式中，R_6 为 。在一些实施方式中，R_6 为 ，X 为键。在又一些实施方式中，R_6 为 ，X 为 O。在一些实施方式中，R_6 为 。在一些实施方式中，R_6 为 ，X 为键。在又一些实施方式中，R_6 为 ，X 为 O。

[56] 在一些实施方式中，p 为 0。

[57] 在本申请中使用的术语“连接子”指的是将有效载荷与多配体部分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配体连接的官能团。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，另一个用于与配体连接。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）。在一些实施方案中，连接子含有叠氮基团。在一些实施方案中，连接子含有炔基基团。

[58] 在一些实施方式中，在形成本申请所述的连接子前，这些用于连接有效载荷和配体的分子通过 Click 反应实现连接。本申请所述的“click 反应”为一类具有高效性和高选择性的化学合成方法。click 反应通过形成高效连接单元把几个分子片段拼接起来，整个反应过程简单、快捷且副产物少。一些 click 反应的实例包括但不限于硫醇与烯烃的加成反应、叠氮化物与炔烃的环化反应。

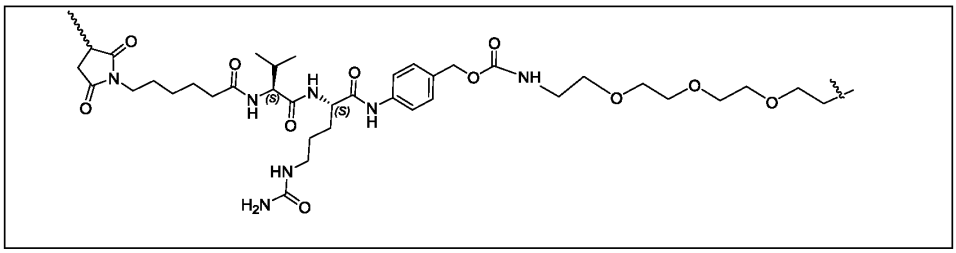
[59] 在一些实施方式中，连接子足够稳定以避免在血液循环过程中意外释放有效载荷，以增加有效载荷到靶细胞或组织的有效量并避免毒性。在一些实施方式中，连接子能够在靶细胞周围或内部释放有效载荷以有效杀死靶细胞或阻断靶细胞的功能。

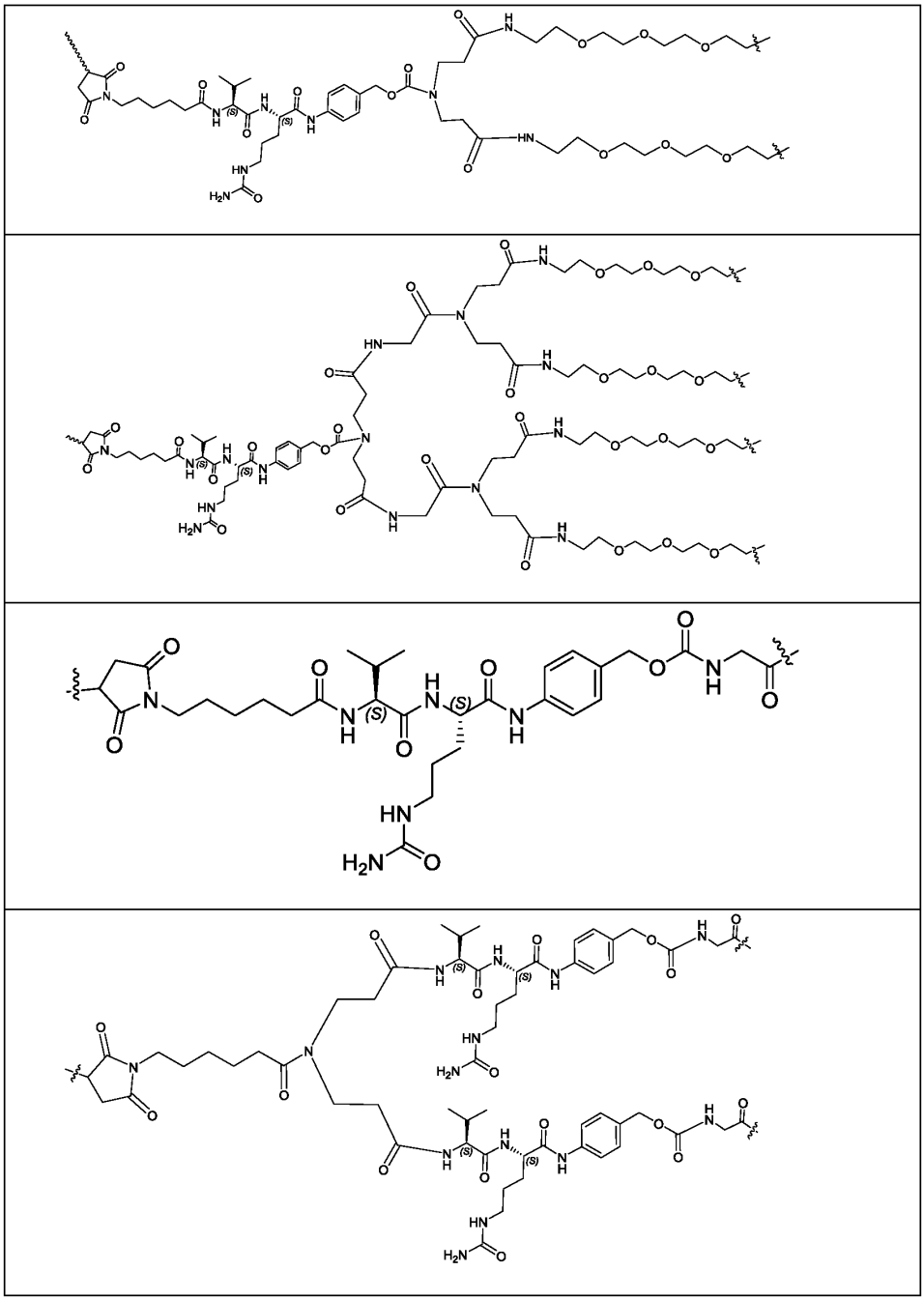
[60] 在一些实施方式中，连接子是不可裂解的。在本申请中使用的术语不可裂解连接子指的是在细胞内代谢期间基本保持完整的连接子。

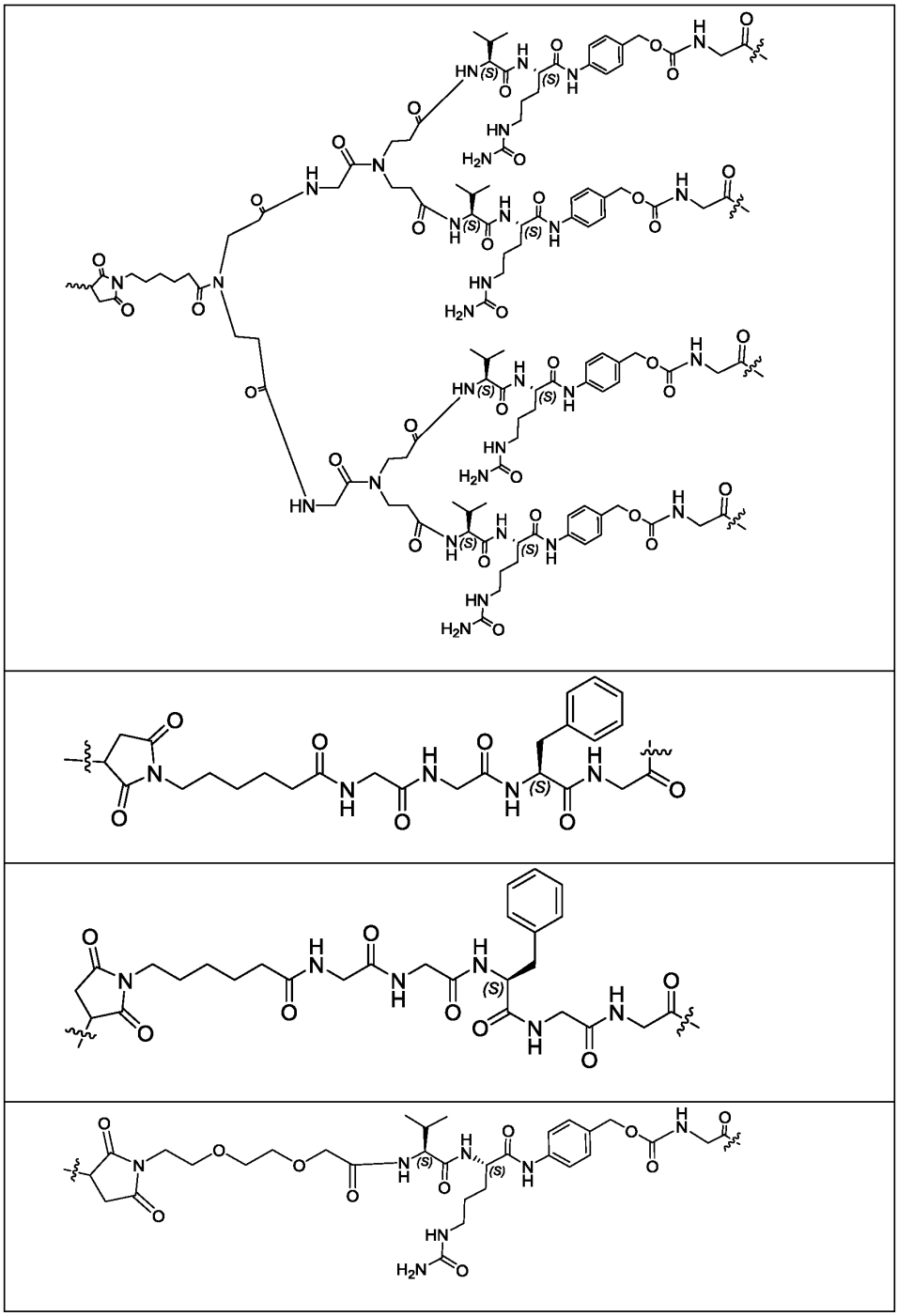
[61] 在一些实施方式中，连接子是可裂解的。在一些实施方式中，可裂解官能团在靶细胞外足够稳定，但是其在进入靶细胞后裂解以释放有效载荷。在一些实施方式中，可裂解官能团在靶细胞中的裂解效率比在血液或血清中的裂解效率高至少 10、20、30、50、100 倍或更多倍。在一些实施方式中，本申请的可裂解连接子可以被水解、酶促反应、或还原反应、或通过 pH 改变所裂解。在一些实施方式中，连接子在特定生理环境下（例如，在适宜 pH 环境下）是可裂解的。在一些实施方式中，连接子可在 pH 约 6.5 或更低的酸性环境中裂解，或通过诸如酶等试剂裂解。在一些实施方式中，连接子对裂解剂敏感。例如，pH、氧化还原电位或存在降解分子。

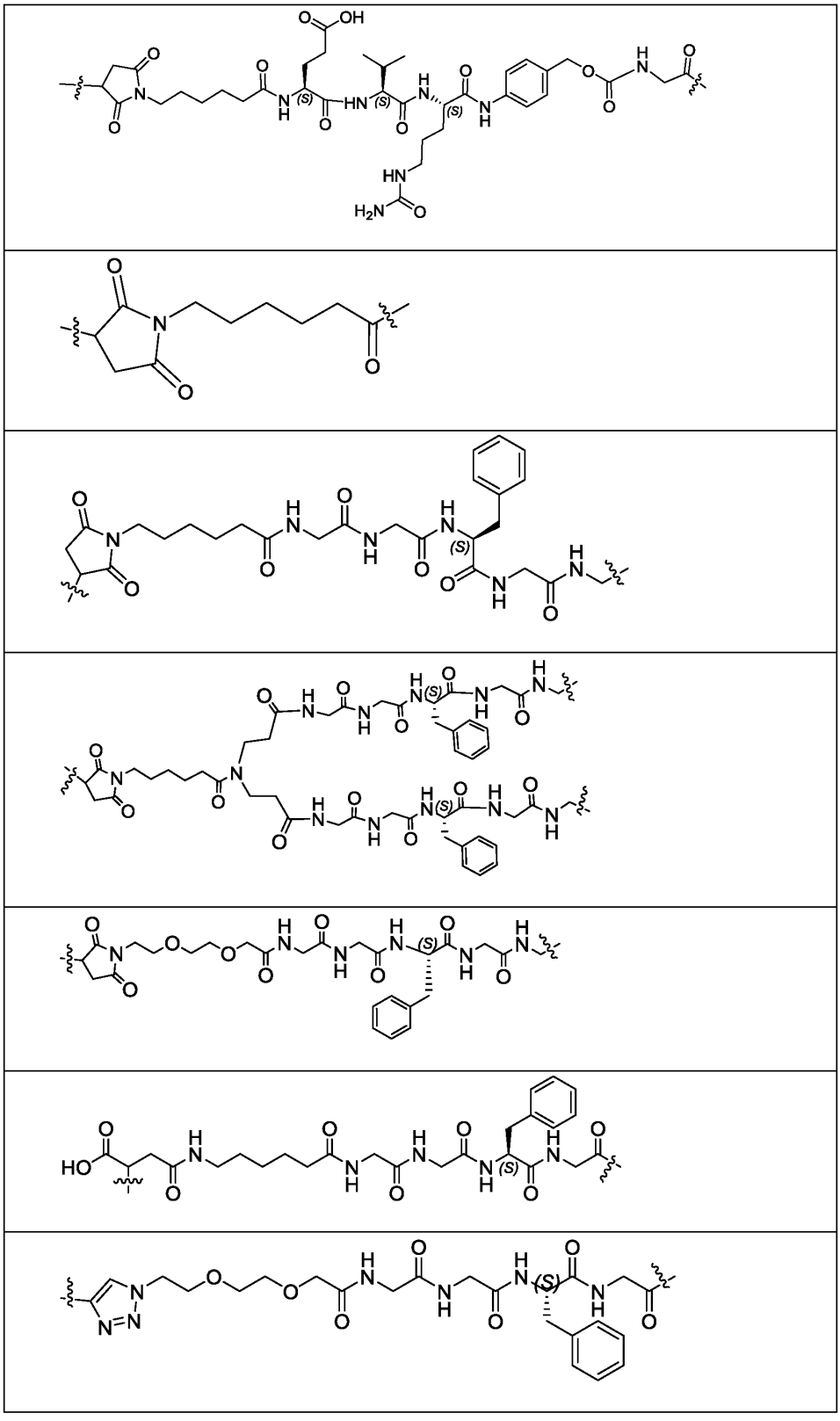
[62] 在一些实施方式中，连接子内部通过肽键连接。在一些实施方式中，这些肽键可被在靶细胞周围或靶细胞中高度或特异性表达的蛋白酶裂解，例如在溶酶体或胞内体中的组织蛋白酶 B。

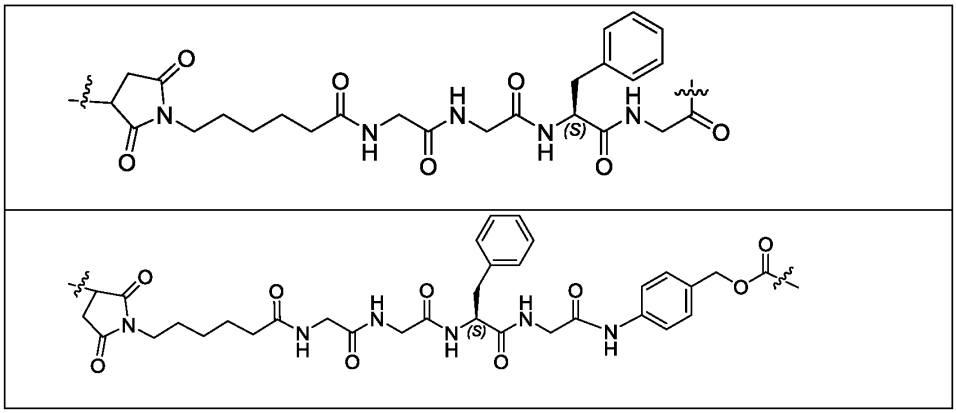
[63] 在一些实施方式中，所述连接子具有选自下组的结构：











[64] 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。该分子可以是具有生物活性的分子，例如具有毒性。在某些情况下，有效载荷和生物活性分子可以互换使用。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。在一些实施方式中，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。

[65] 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。

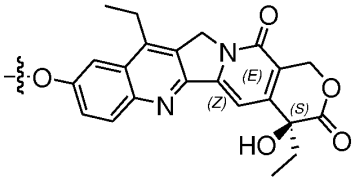
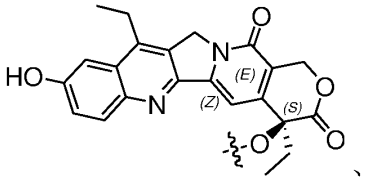
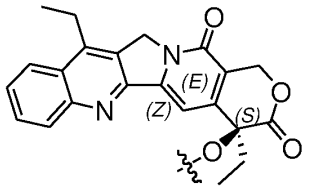
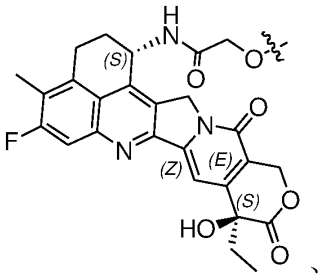
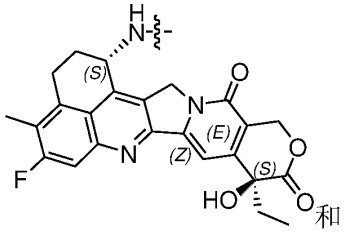
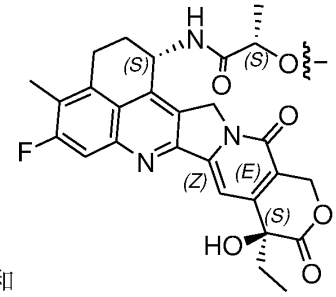
[66] 在一些实施方式中，本申请的有效载荷在连接至本申请的偶联体化合物之前具有游离的氨基或者羧基，有效载荷通过上述氨基或者羧基与偶联体化合物的相应部分（例如，连接子）的基团发生酰化反应或 click 反应从而偶联至偶联体化合物。

[67] 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，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或肽。

[68] 在一些实施方式中，作为有效载荷的肽所包含的氨基酸残基至少为 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、12 个、15 个、18 个或 20 个。在一些实施方式中，作为有效载荷的肽所包含的氨基酸残基至多为 4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、12 个、15 个、18 个或 20 个。

[69] 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、Dx 或 Dxd）、美登素及其任何衍生物、放射性金属络合物、环氧化酶-2 抑制剂及其任何衍生物（例如，塞来昔布）、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、和丝裂霉素 C 及其任何衍生物。在一些优选的实施方式中，所述小分子化合物是喜树碱及其任何衍生物。在一些优选的实施方式中，所述喜树碱是依喜替康。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。

[70] 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、SN38、SN22、Dxd、依喜替康（DX-8951）、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。在一些实施方式中，小分子化合物为 SN38、SN22、Dxd 和依喜替康（DX-8951）。在一些实施方式中，小分子化合物为乳酸-依喜替康。在一些实施方式中，所述小分子化合物为依喜替康（DX-8951）。

[71] 在一些实施方式中，D 各自独立地选自 、、、、和。

[72] 在一些实施方式中，细胞表面分子选自 TRPV6、FOLR1、PSMA、SSTR2、PD-L1、PD1、Her2、Trop2、Her3、4-BBL、4-1BB、CD70、CD27、CD155、CD122、CD113、CD28、CD86/80、CD160、ICOSL、ICOS、CD40、CD40L、OX40、OX40L、GITRL、GITR、NECTIN4、LRP1、GLUT1、EGFR1、AXL、CD44、Claudin18.2、APN、DLL3、CEACAM5、FZD10、TFRC、MET、IGFR1、CCKBR、LFA1、GPR87、GM-CSF、GM-CSFR、TIM3、TLR 家族、HHLA2、MHCII 抗原、TCR、CTLA-4、IGIT、Galectin-3、Galectin-9、TIM-3、HVEM、BTLA、VISTA、磷脂酰丝氨酸、LAG3、LILRB4、SIGLEC15、NKG2A、NKG2D、SLAMF7、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、FGFR1、FGFR2、FGFR4 和 NeuGcGM3。

[73] 在一些实施方式中，细胞表面分子选自 TRPV6、FOLR1、PSMA 和 SSTR2。

[74] 在一些实施方式中，细胞表面分子分别为 TRPV6 和 FOLR1、PSMA 和 FOLR1、或 SSTR2 和 FOLR1。在一些优选的实施方式中，细胞表面分子分别为 TRPV6 和 FOLR1。

[75] 在一些实施方式中，靶向 FOLR1 的配体选自叶酸或其类似物。在一些优选的实施方式中，所述叶酸类似物选自 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。

[76] 在一些实施方式中，靶向 SSTR2 的配体选自奥曲肽及其任何类似物。

[77] 在一些实施方式中，配体部分包含三个以上的靶向细胞表面分子的配体。在一些优选的实施方式中，所述细胞表面分子选自 TRPV6、FOLR1、PSMA 和 SSTR2。

[78] TRPV6 即瞬时受体阳离子通道亚家族 V 成员 6（transient receptor potential cation channel subfamily V member 6），是一种高选择性钙离子跨膜转运通道，介导钙离子由细胞外向细胞内的主动转运。在人正常的肾脏、胃肠道、胰腺、乳腺、唾液腺等，主要表达于肠上皮细胞，参与钙离子向细胞内的转运，因此当 TRPV6 通道的数量或功能发生改变时，可引起钙离子调节的变化，进一步导致与其相关组织器官的结构或功能异常。和正常组织相比，TRPV6 在乳腺癌、胆管癌、卵巢癌、肺鳞癌、前列腺癌等恶性肿瘤中表达明显升高，其异常表达可能与肿瘤的形成与进展有关。

[79] FOLR1 是一种糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚定的糖蛋白，它以纳摩尔的亲和力结合叶酸，从而促进受体介导的内吞作用。快速生长的实体恶性肿瘤，包括卵巢癌和肺癌，都依赖于叶酸进行代谢和核酸合成。在一些实施方式中，本申请所述的靶向分子包括靶向 FOLR1 的配体。

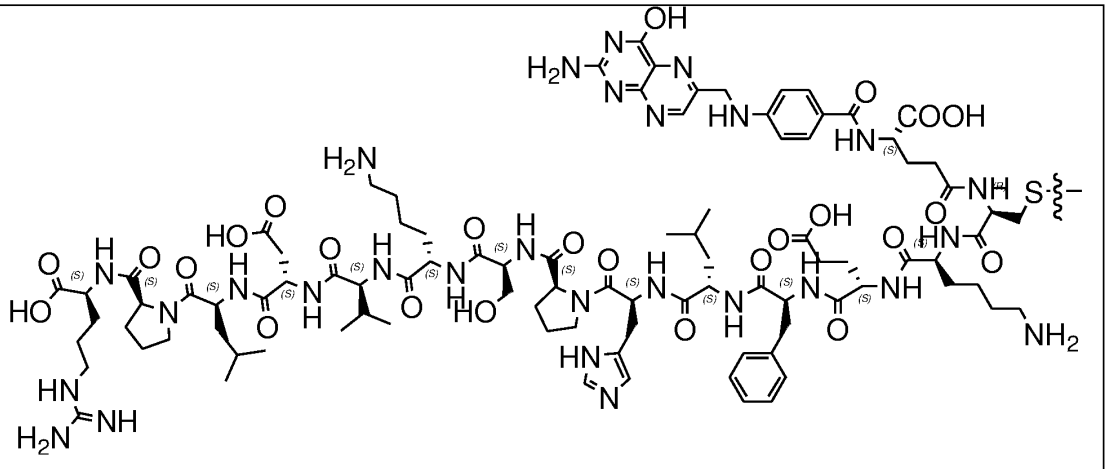
[80] PSMA 是指“前列腺特异性膜抗原”，一种存在于前列腺上皮细胞膜的Ⅱ型跨膜糖蛋白，由 750 个氨基酸组成，其具有 19 个胞内区氨基酸、24 个跨膜区氨基酸和 707 个胞外区氨基酸。前列腺特异性膜抗原在正常前列腺上皮细胞中表达，但其在前列腺癌细胞中的表达水平要高得多。相对于传统用于临床检测的前列腺特异抗原，前列腺特异性膜抗原是一种更加敏感和特异的前列腺癌肿瘤标记物，尤其是在激素难治性前列腺癌及前列腺癌转移灶中均为高表达，在区分前列腺癌和其他类型恶性肿瘤时具有高敏感度和特异性。同时，在多种非前列腺来源的实体瘤（如肺癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾癌和结直肠癌等）中，前列腺特异性膜抗原也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

[81] SSTR2 即生长抑素受体-2，是一种 G 蛋白偶联受体，可以被生长抑素或其合成类似物激活。SSTR2 是生长抑素受体五种亚型中的一种，被认为与肿瘤的发展有关。生长抑素或生长抑素类似物可通过 SSTR2 抑制肿瘤细胞的增生。

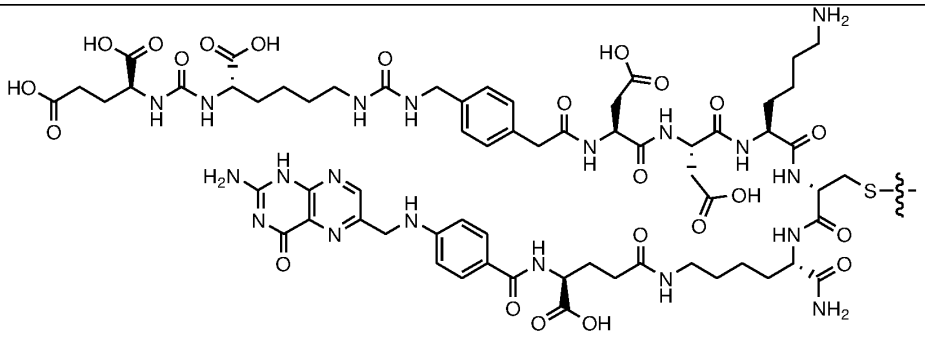
[82] 在一些实施方式中，靶向不同细胞表面分子的配体彼此直接连接、或通过间隔区彼此连接。在一些实施方式中，所述间隔区由氨基酸组成。在一些优选的实施方式中，所述间隔区由天然氨基酸或非天然氨基酸组成。在又一些优选的实施方式中，所述间隔区为甘氨酸。在一些实施方式中，间隔区为 Arg-Arg、Ala-Ser-Asn、Ala-Ala-Ala、Ser-Ser-Arg、Pro-Arg 和 Pro-Leu-Gly。在一些实施方式中，所述间隔区可在特定的生理环境下通过蛋白酶裂解或还原裂解。在一些实施方式中，间隔区可以被由靶细胞特异性表达或将由靶细胞表达的蛋白酶裂解。

[83] 在本申请中使用的“可裂解”或“裂解”包括了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，从而将有效载荷与多配体部分之间的连接子，或配体之间的间隔区破坏以释放游离的有效载荷或配体。

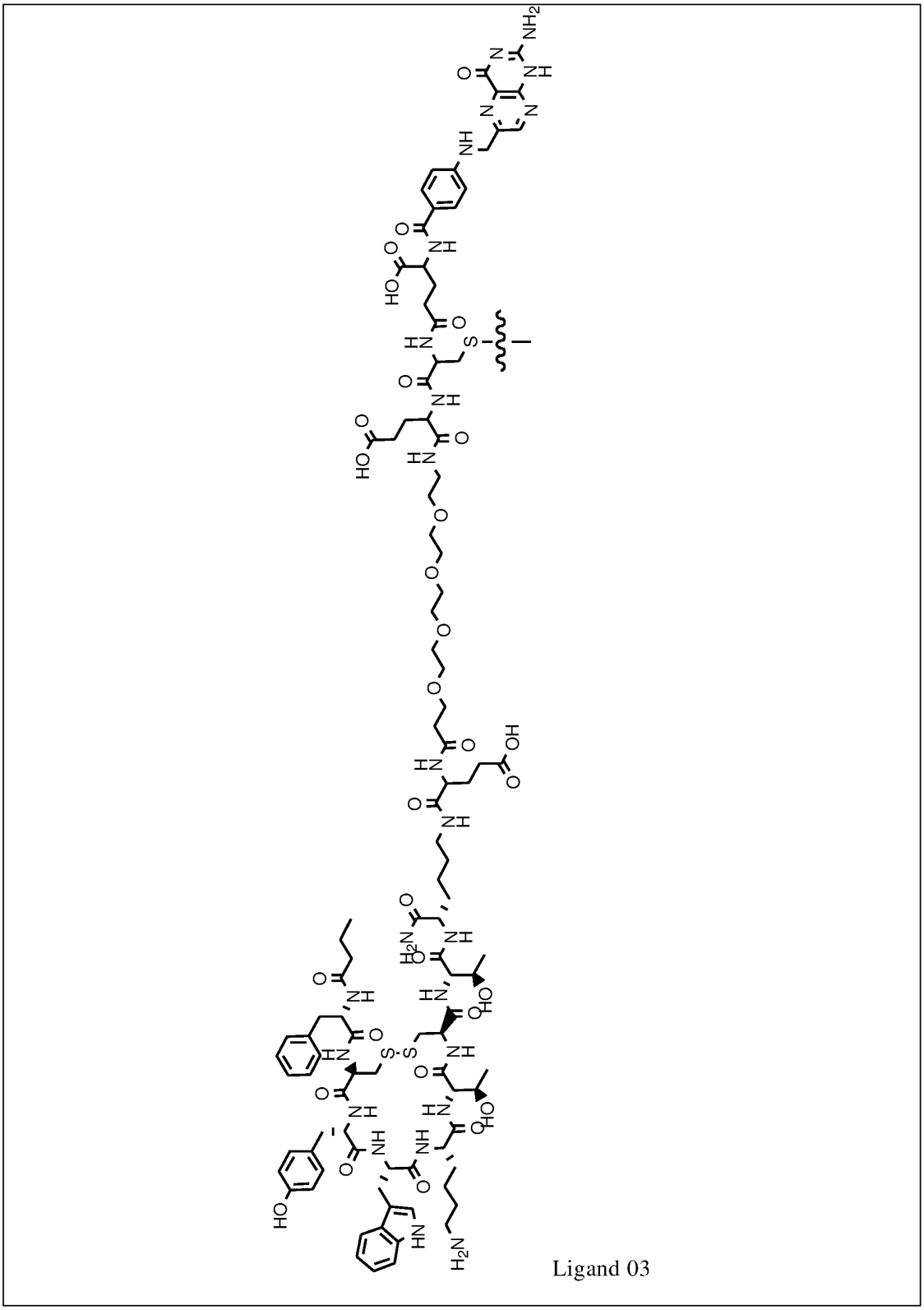
[84] 在一些实施方式中，所述配体部分具有以下结构：



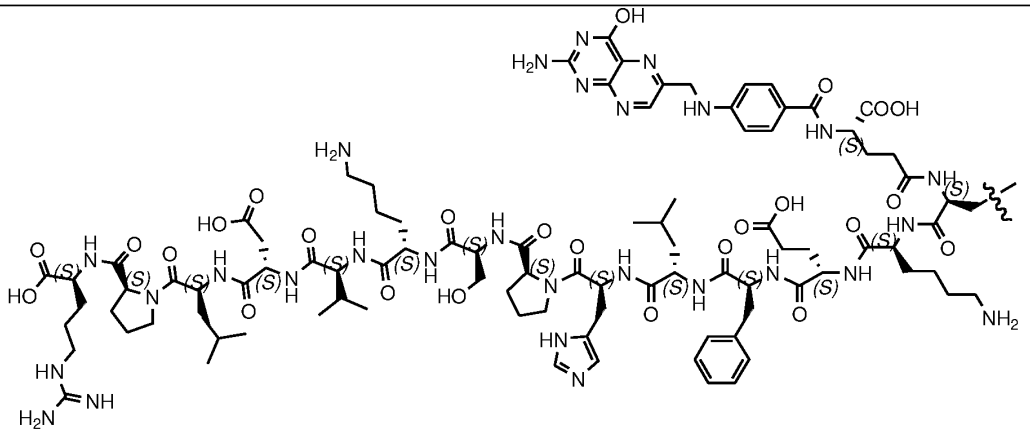
Ligand 01



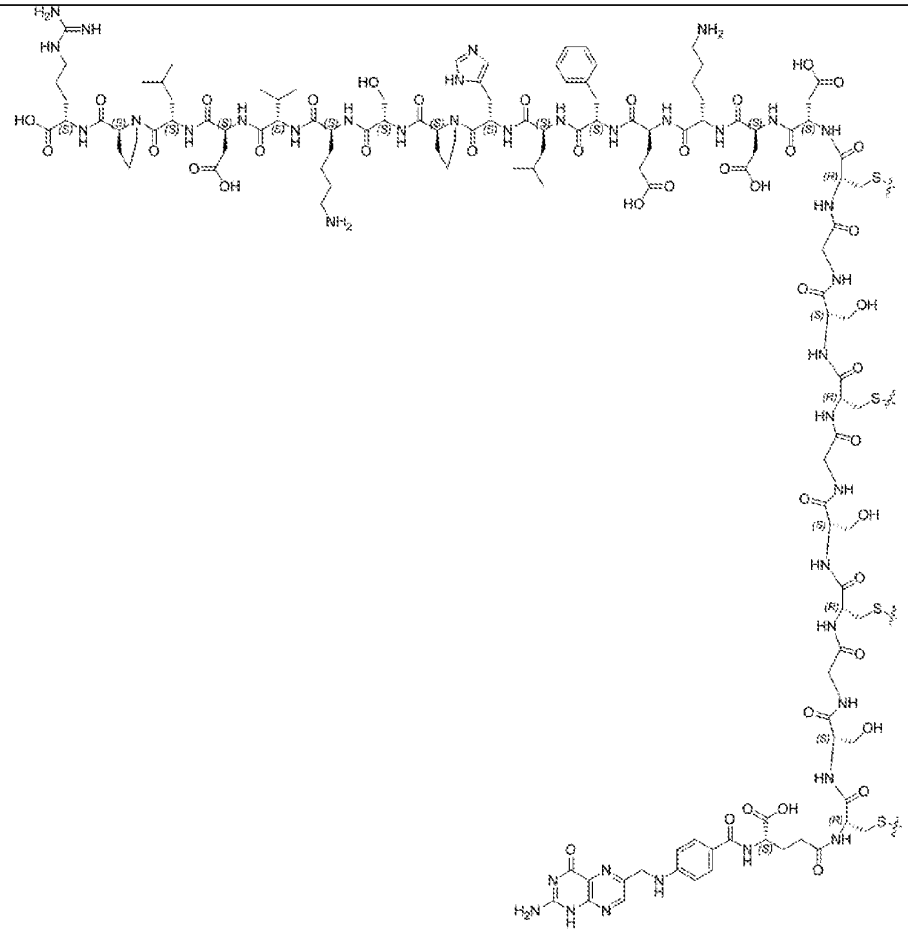
Ligand 02



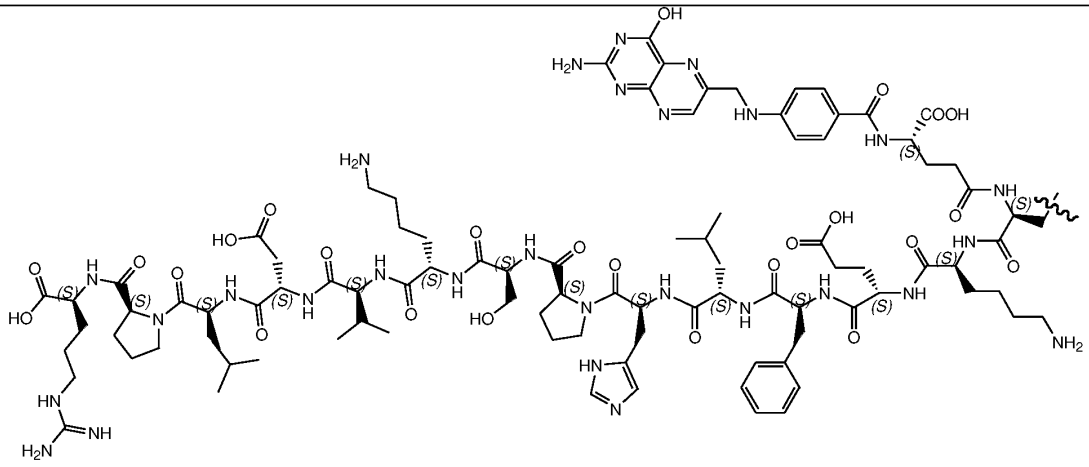
Ligand 03



Ligand 04



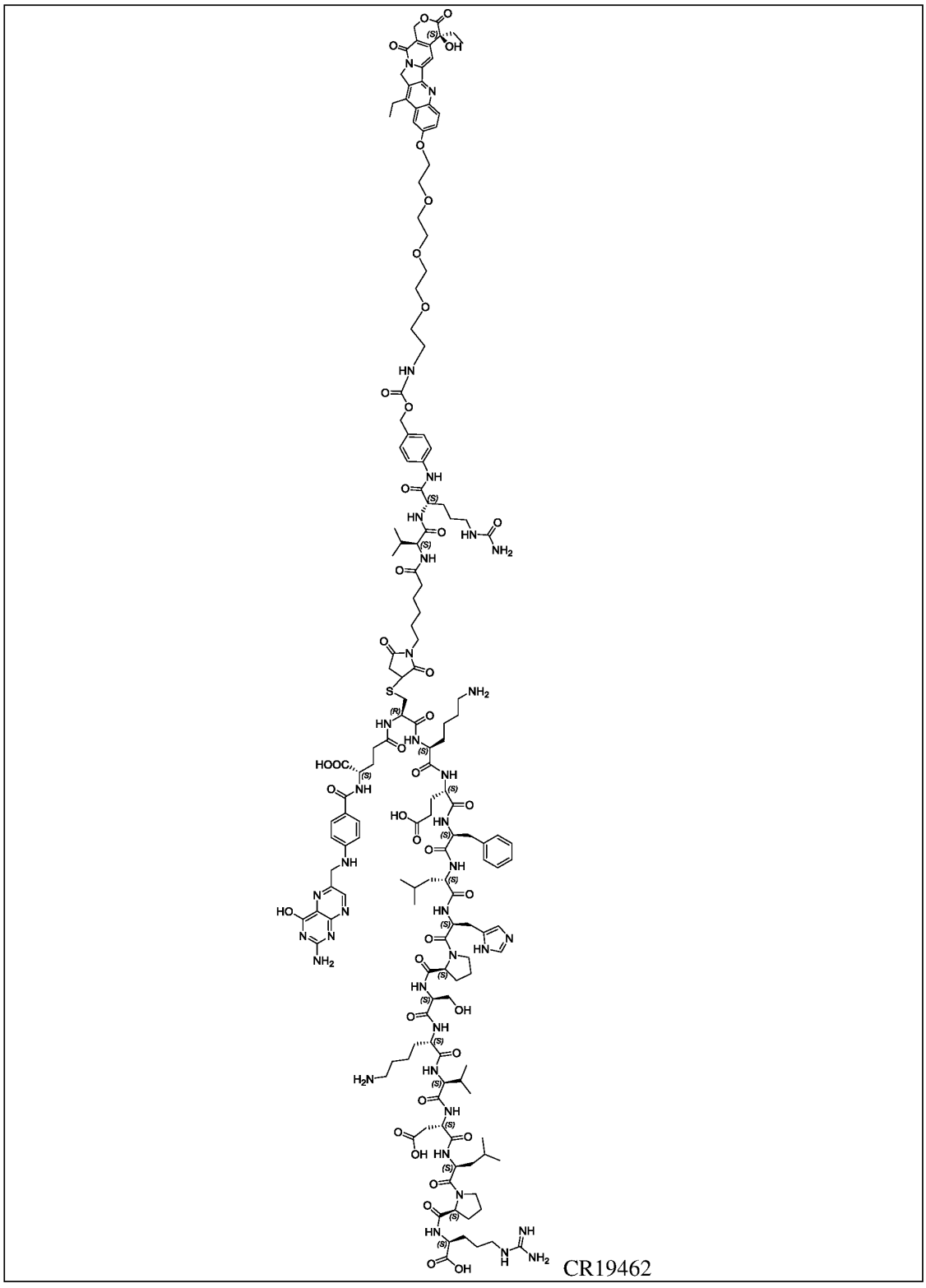
Ligand 05

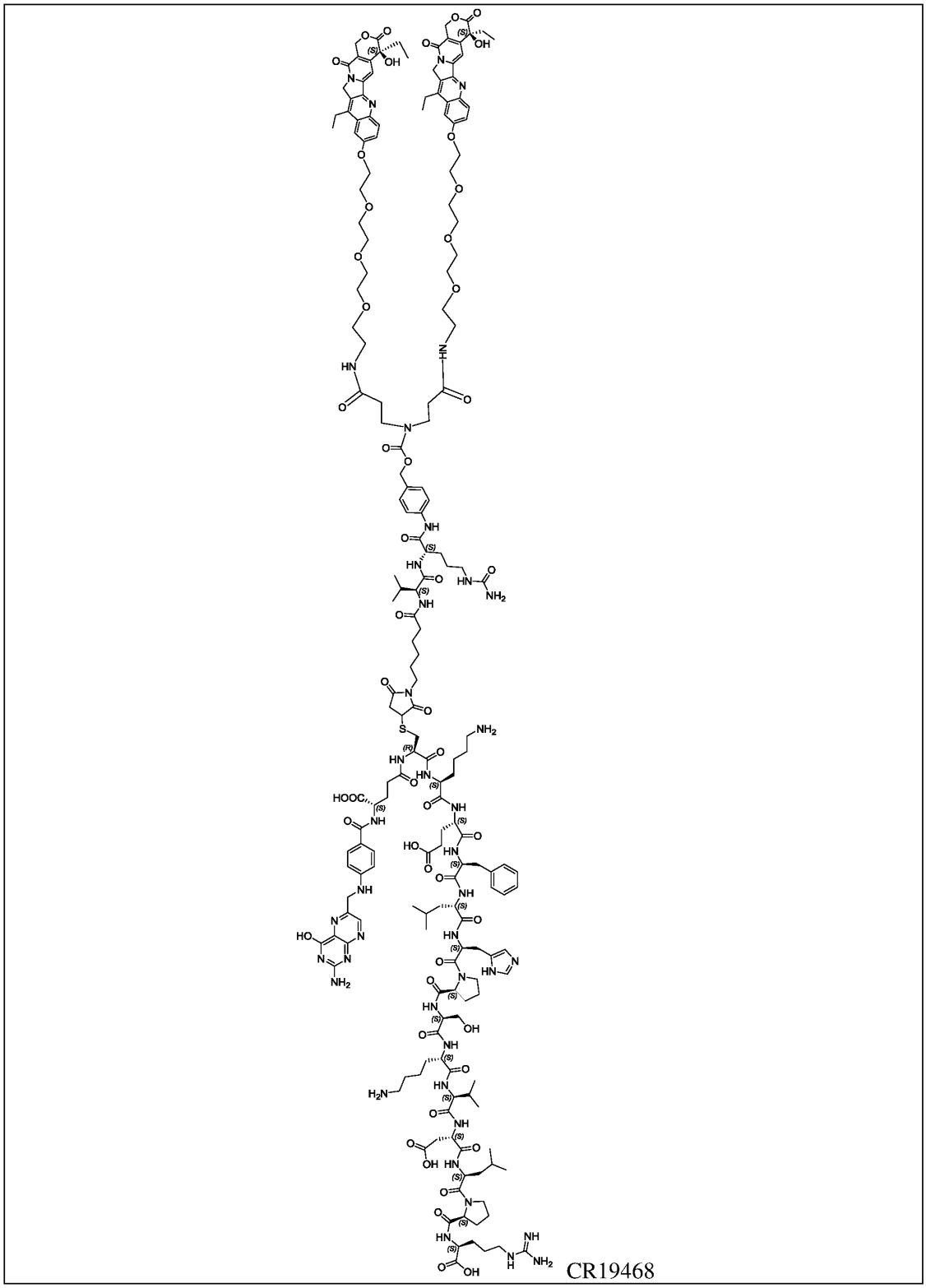


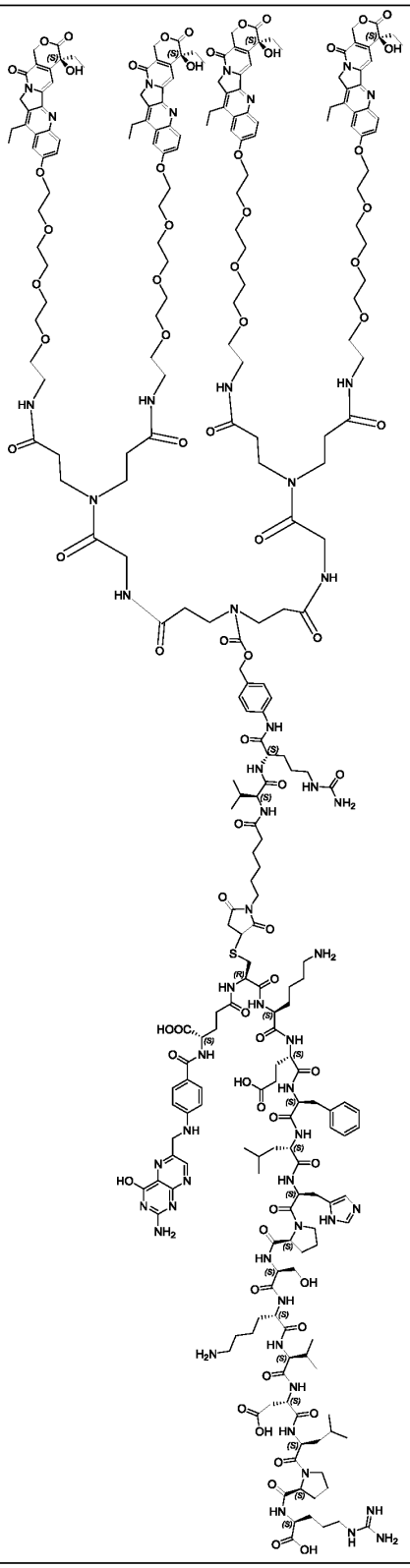
Ligand 06

[85] 在一些实施方式中，q 为 1。在一些实施方式中，q 为 2。在一些实施方式中，q 为 3。在一些实施方式中，q 为 4。

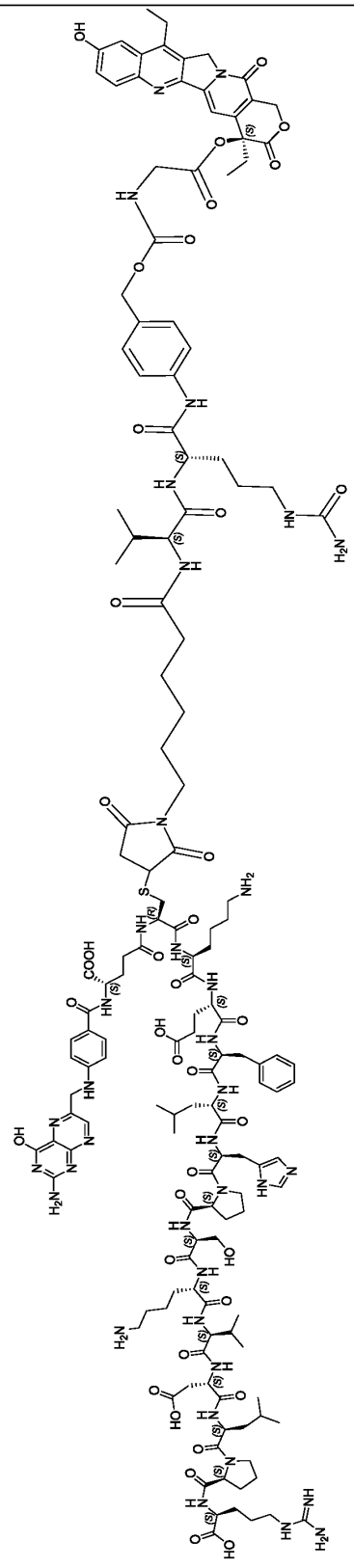
[86] 本申请的一个方面公开了一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物选自：


CR19462

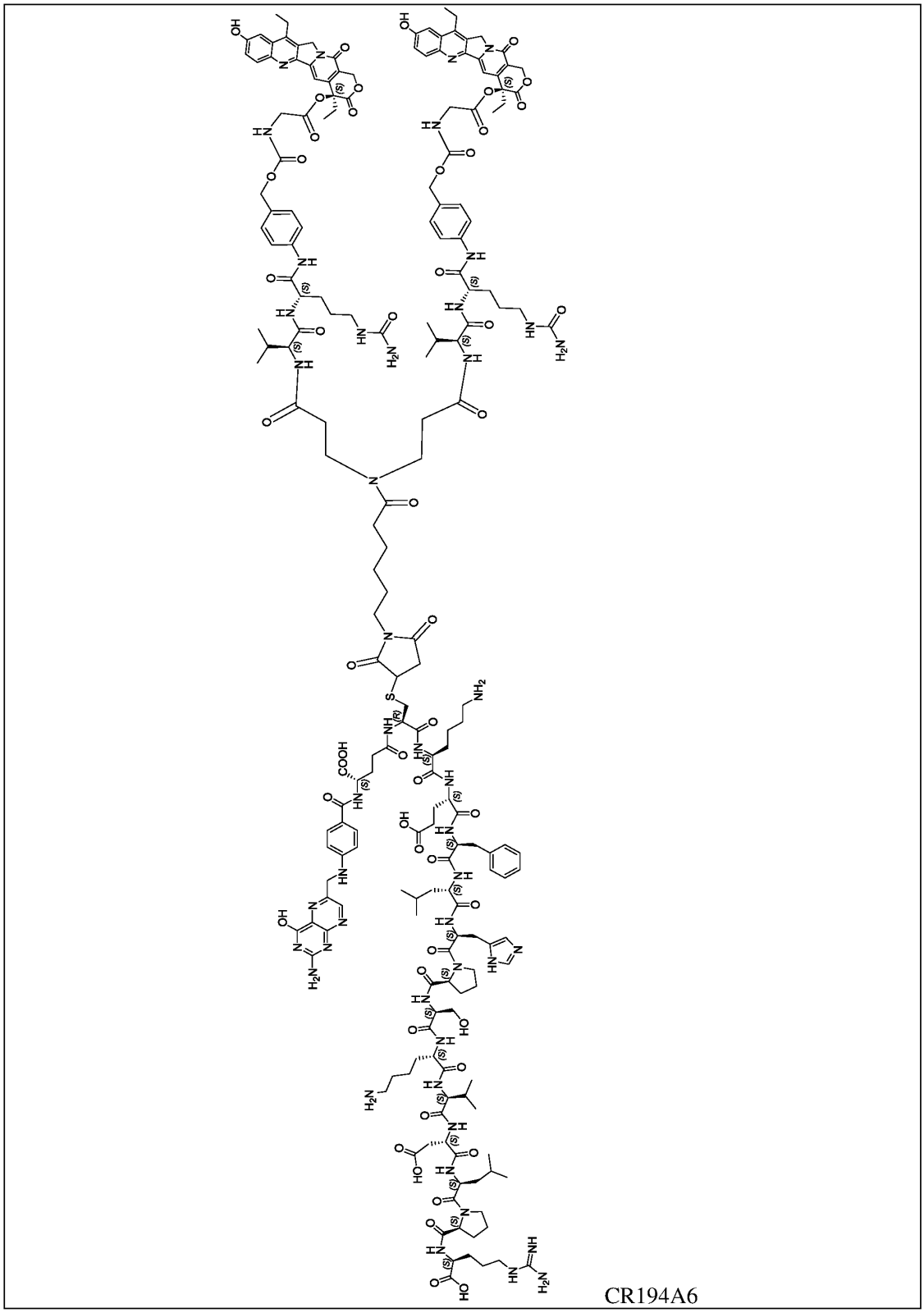

CR19468



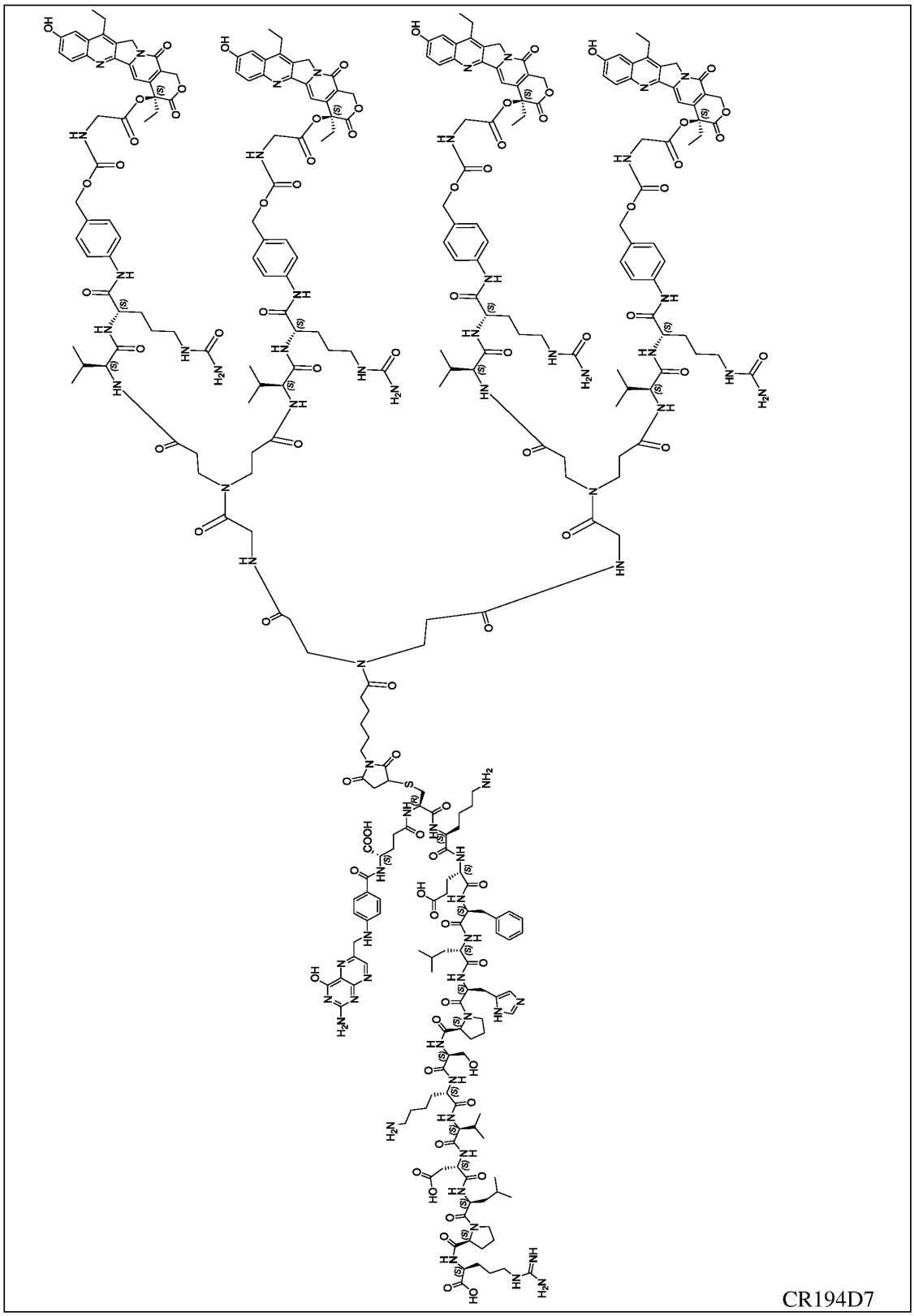
CR194C5

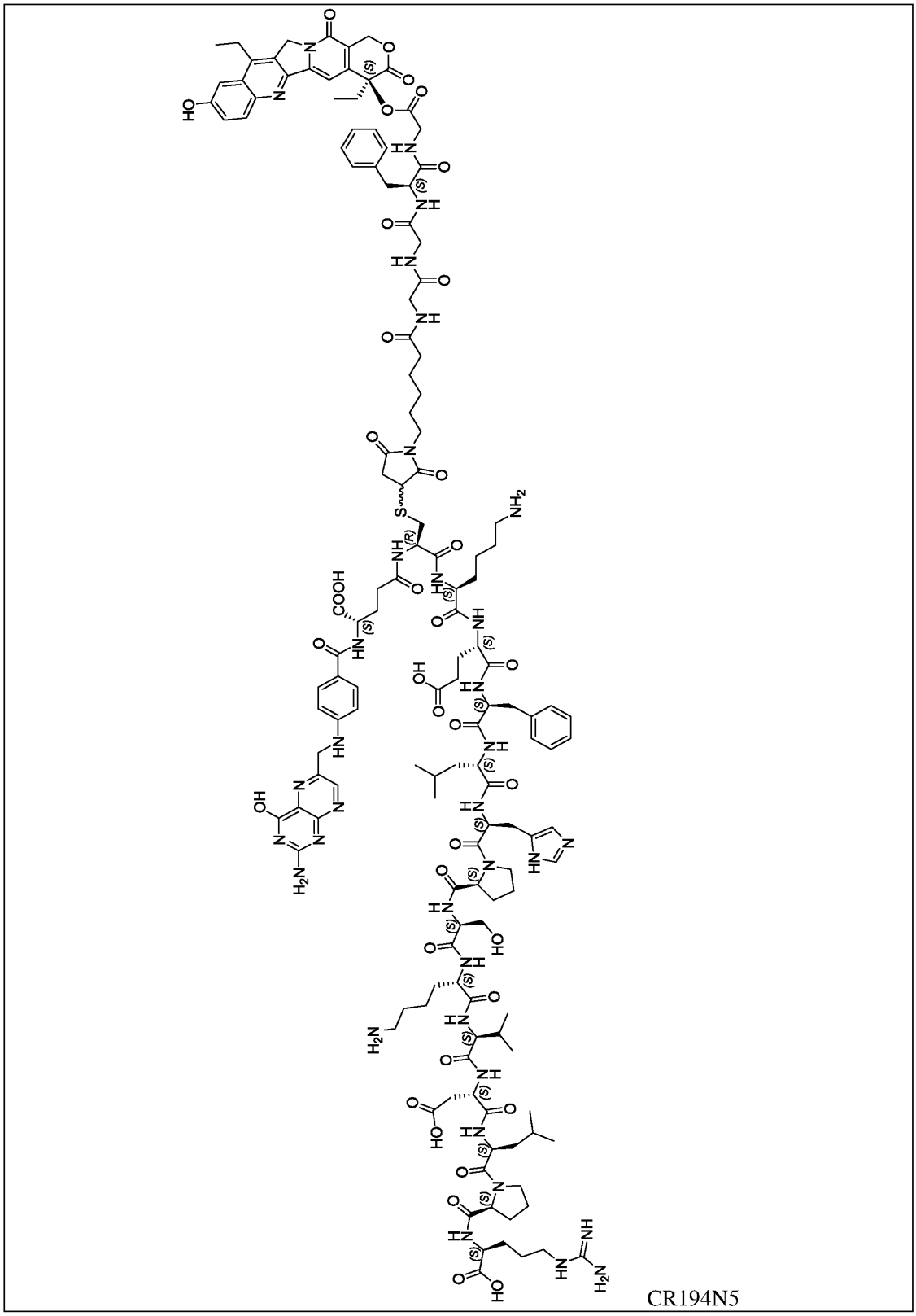


CR194A2

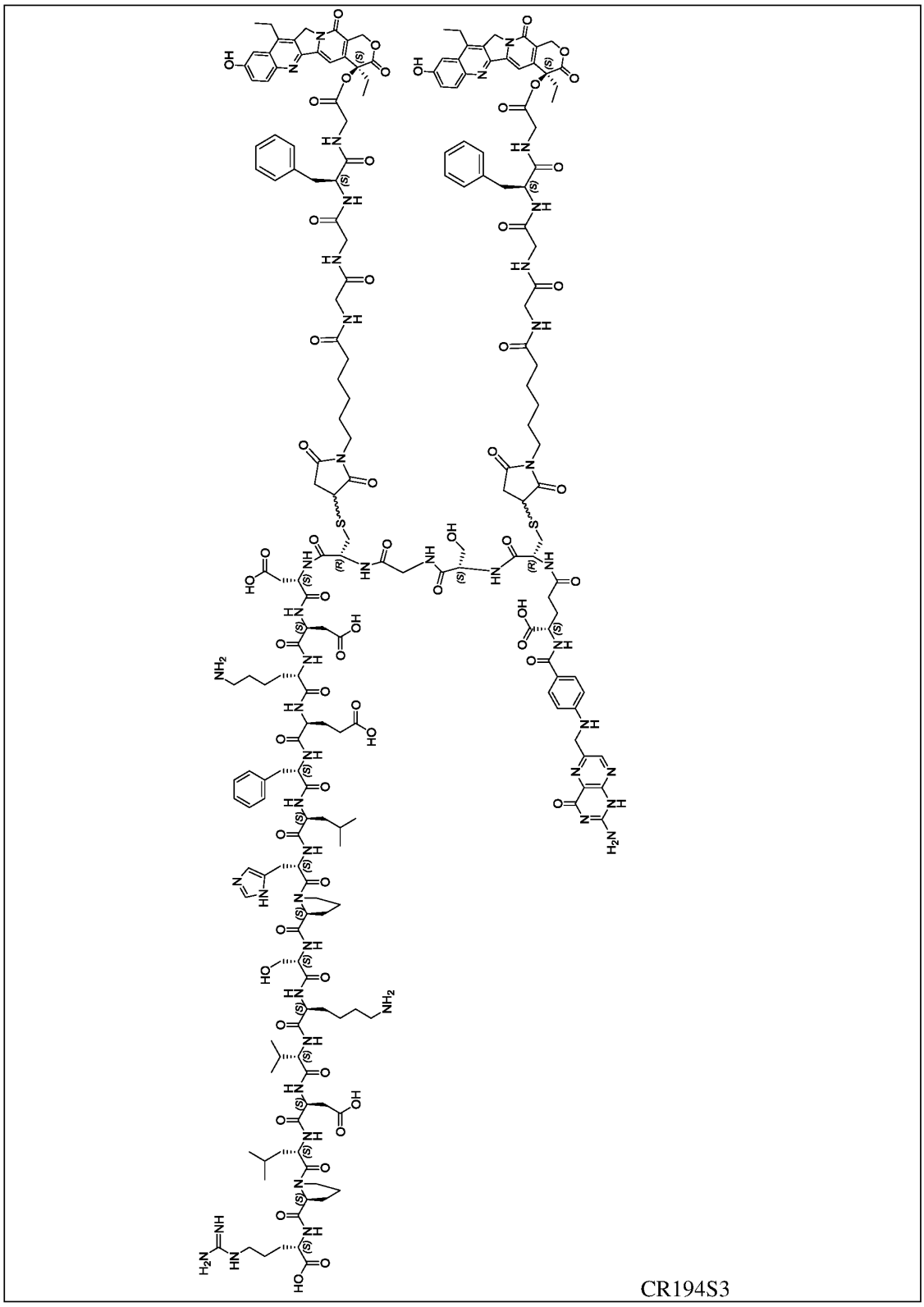


CR194A6

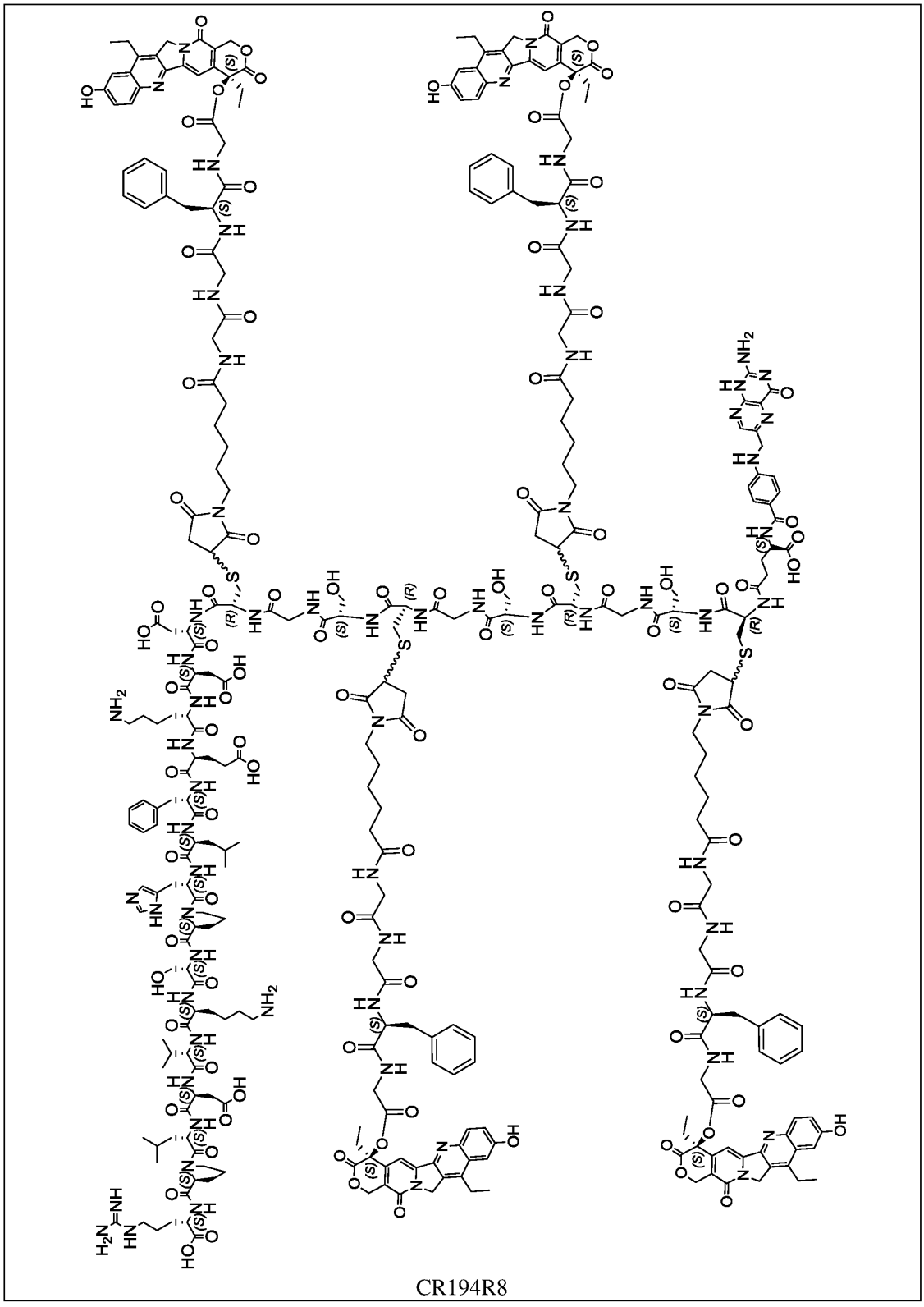

CR194D7



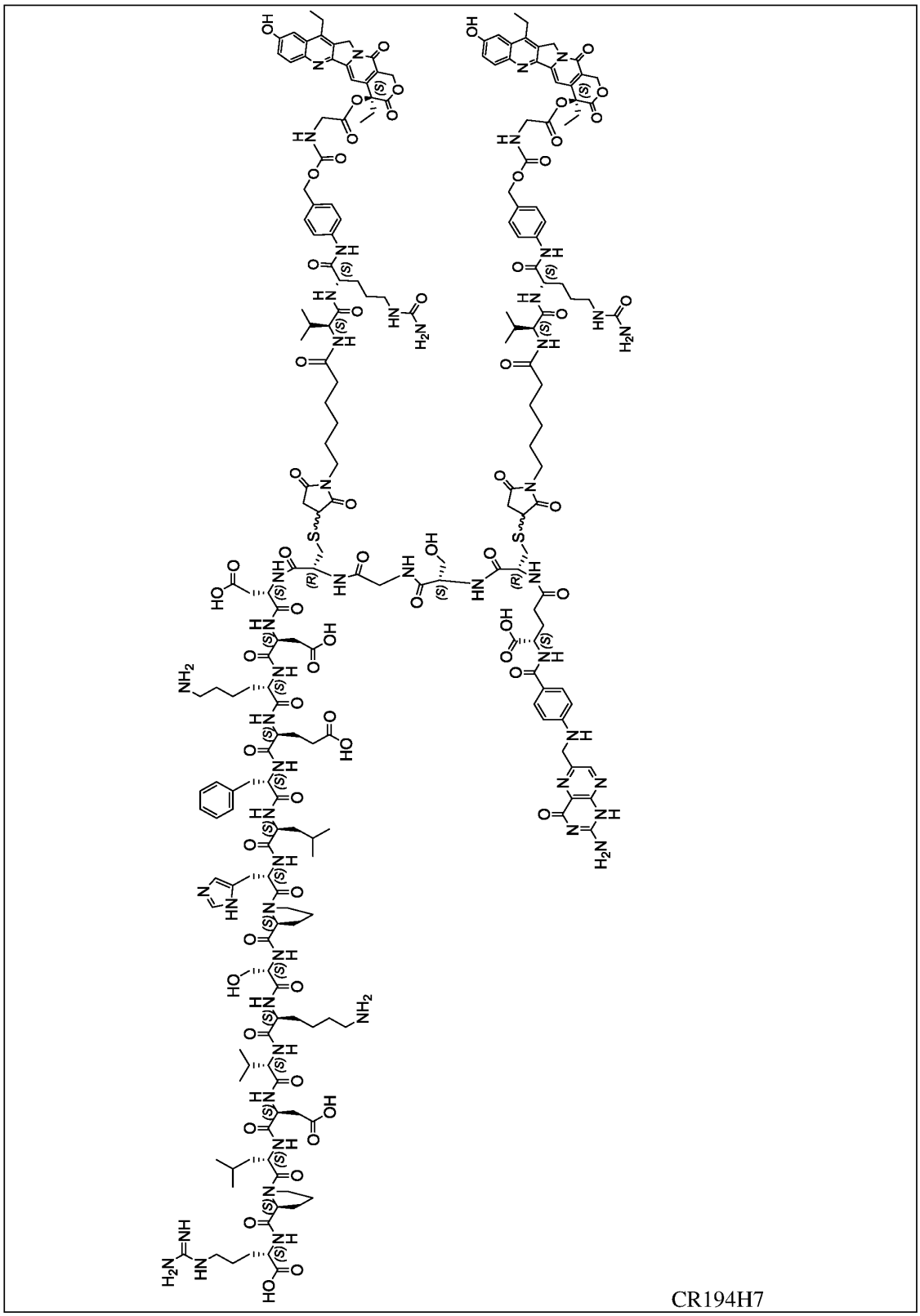
CR194N5



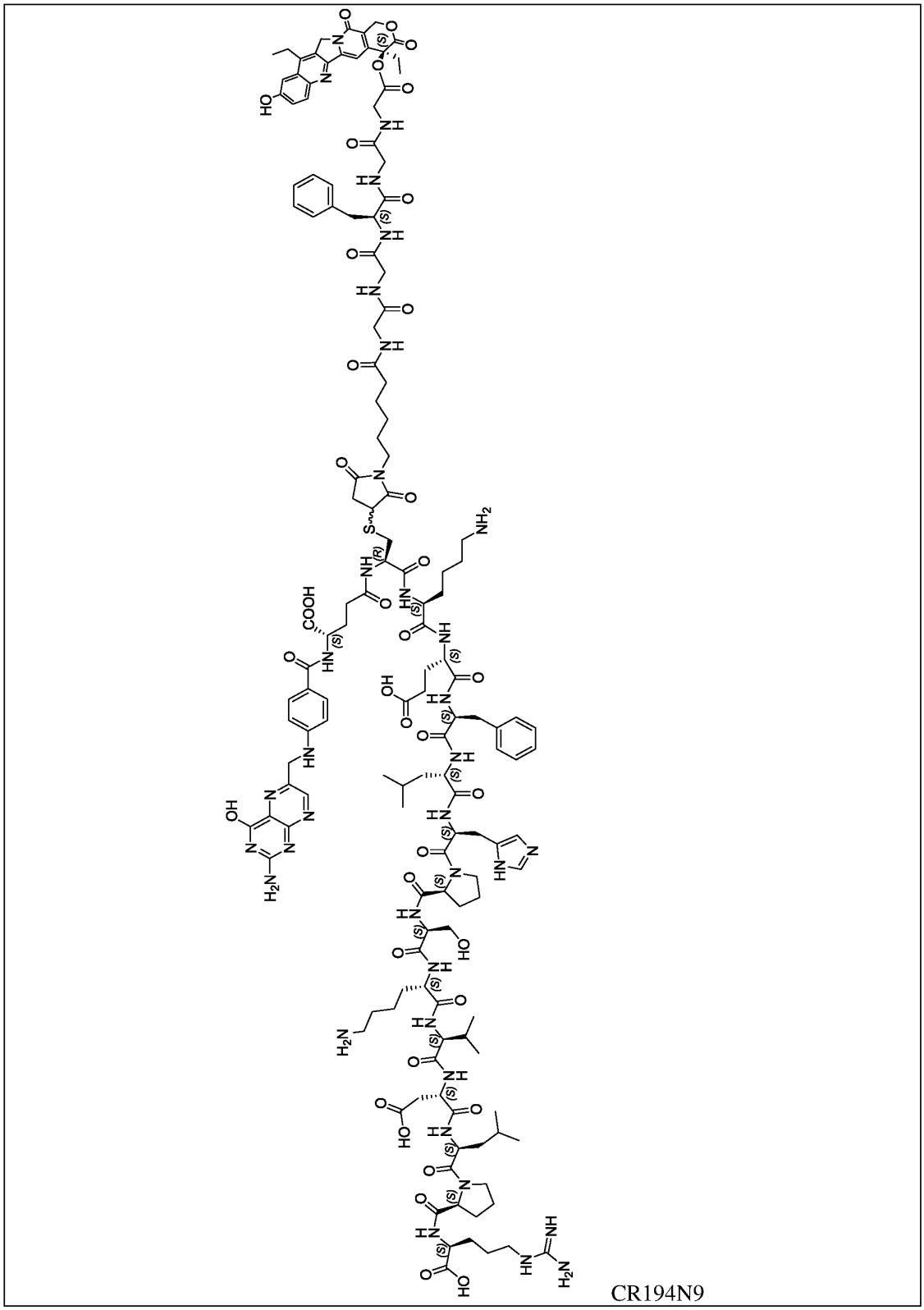
CR194S3



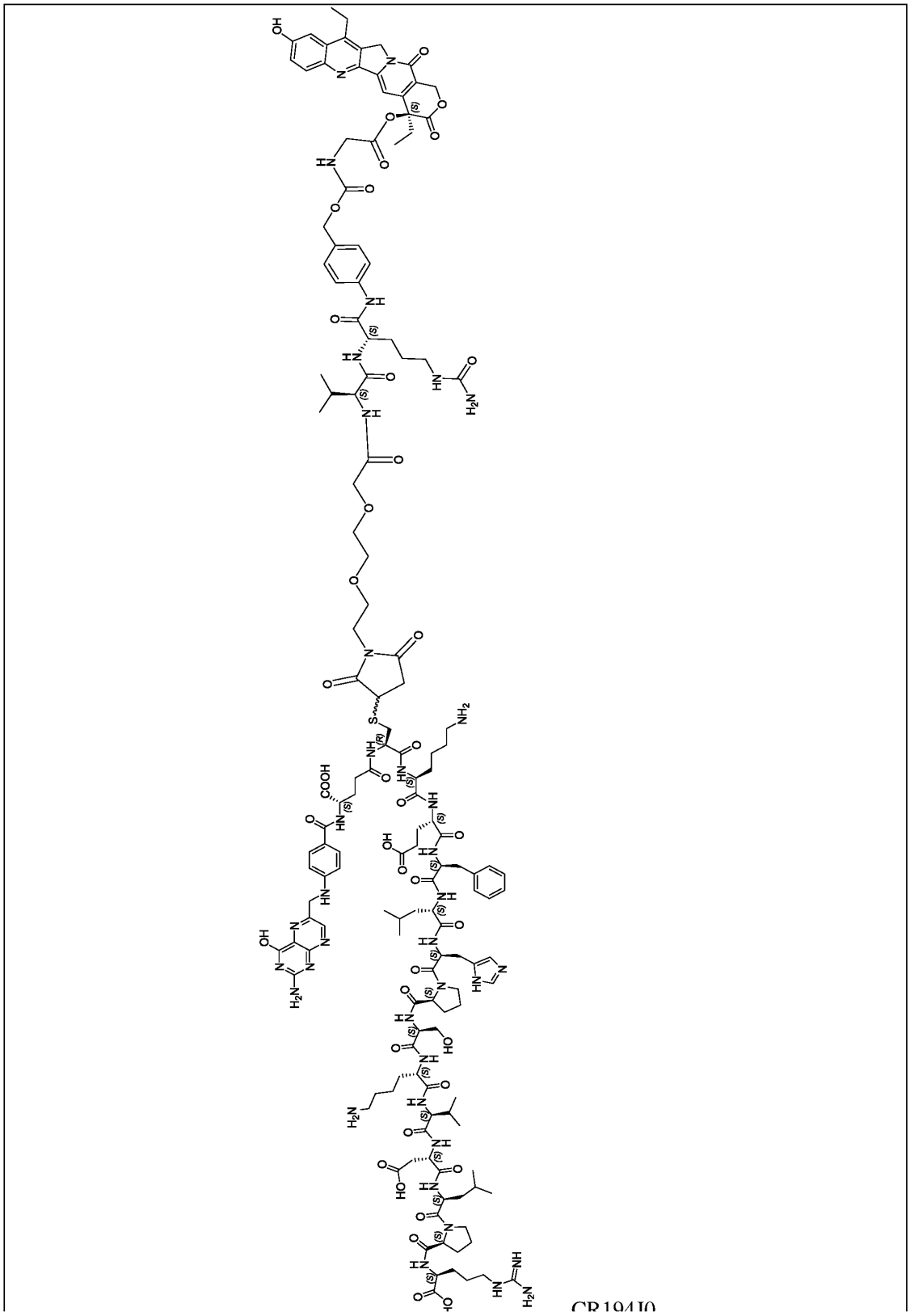
CR194R8



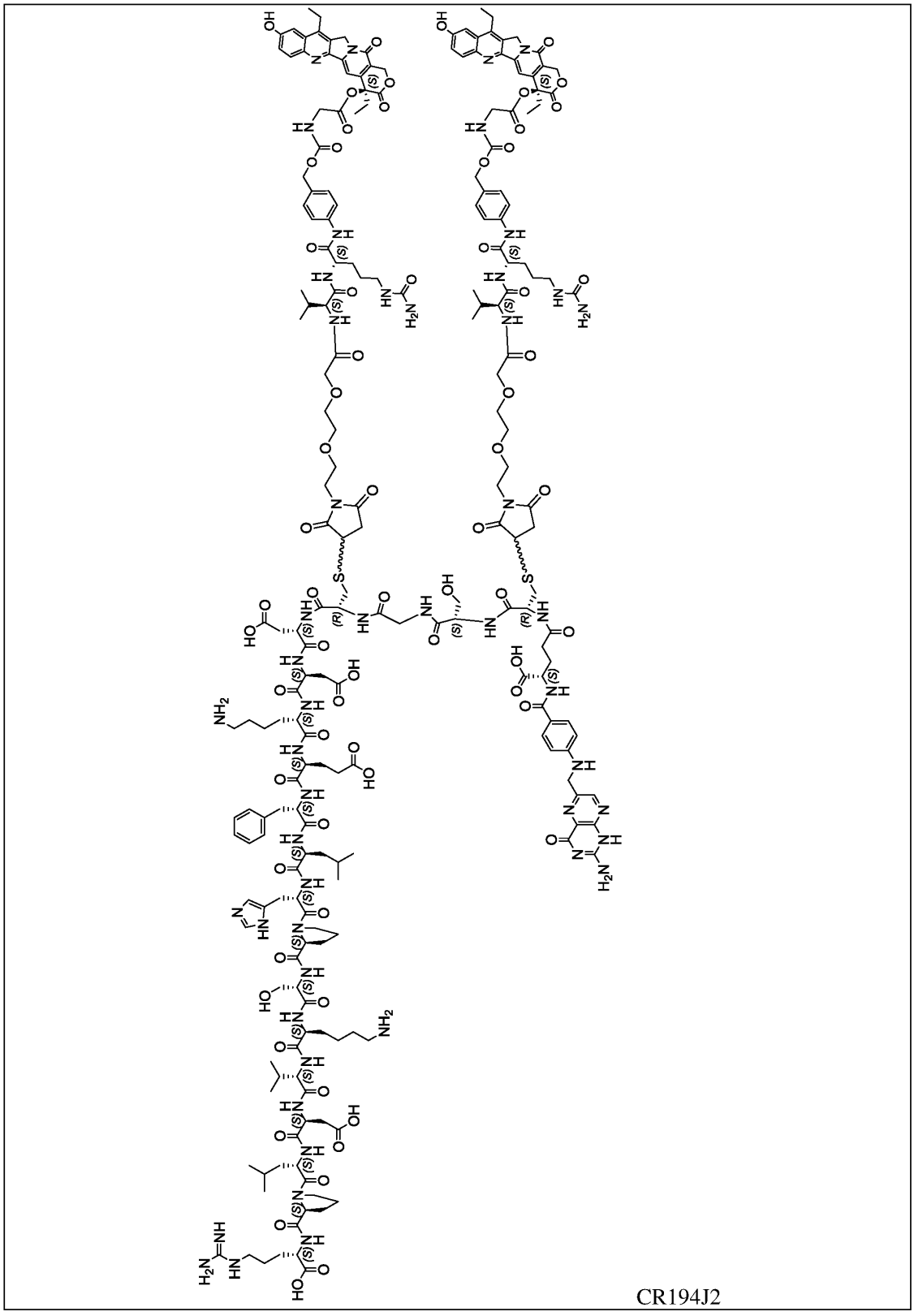
CR194H7



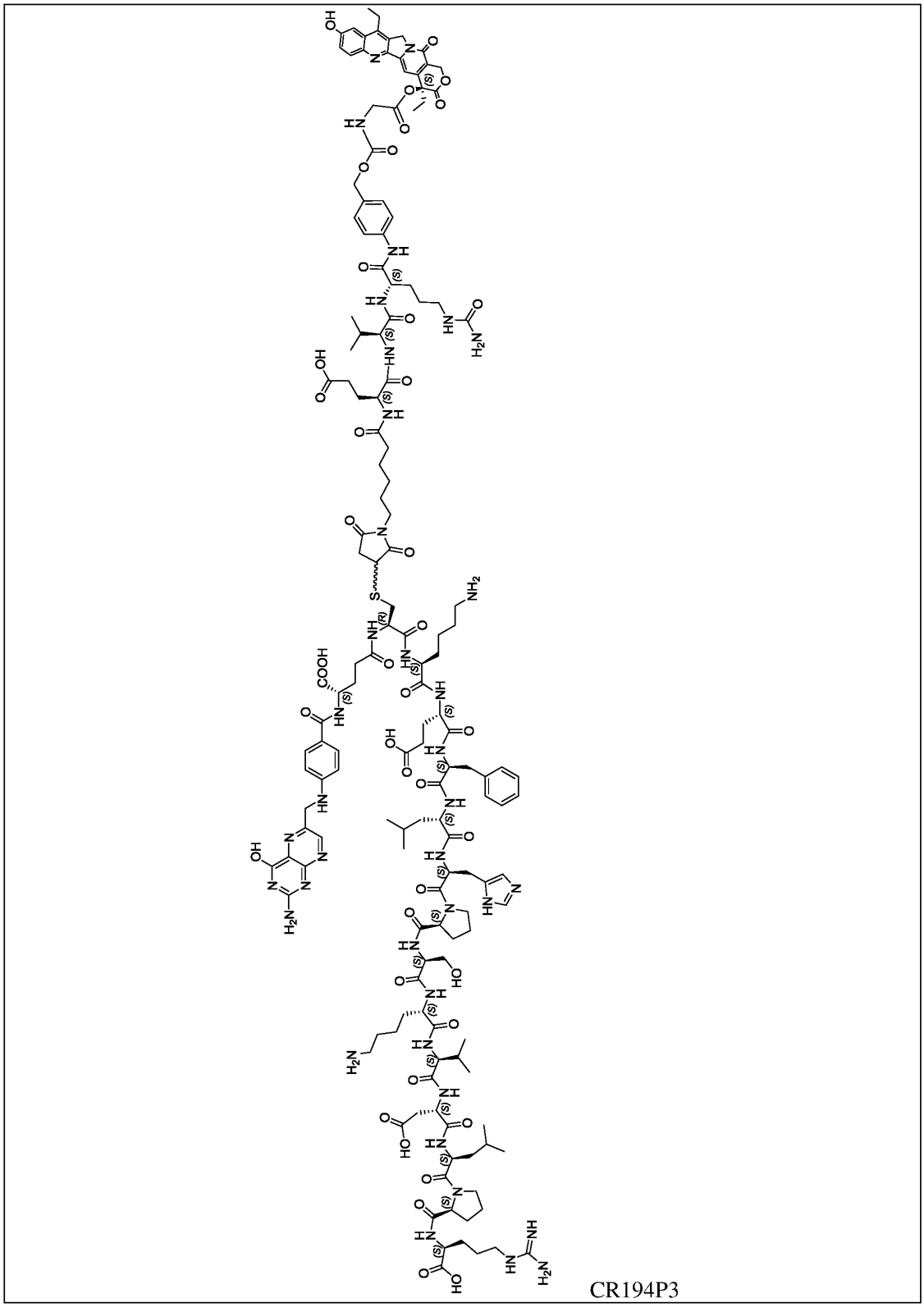
CR194N9



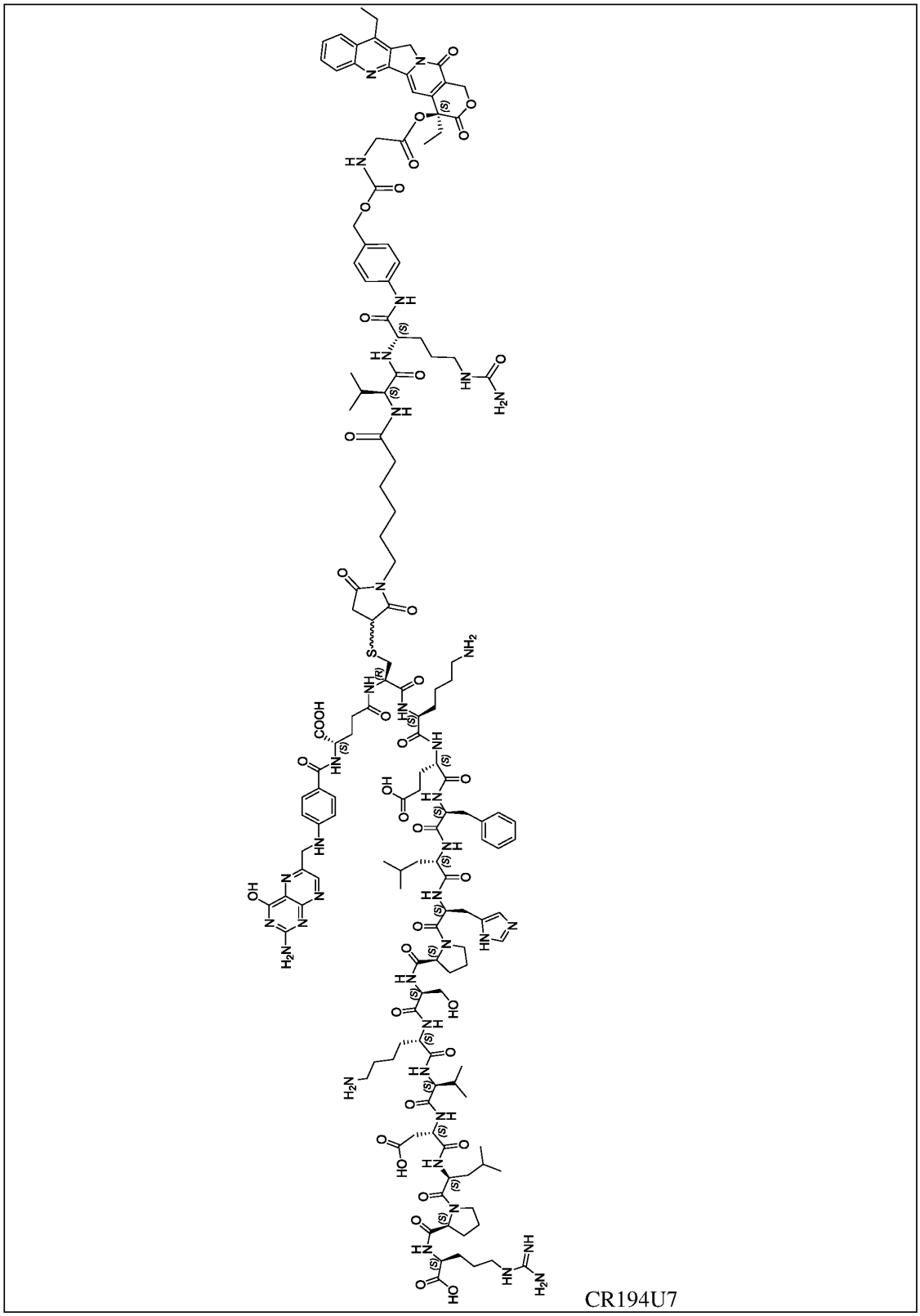
CR19410



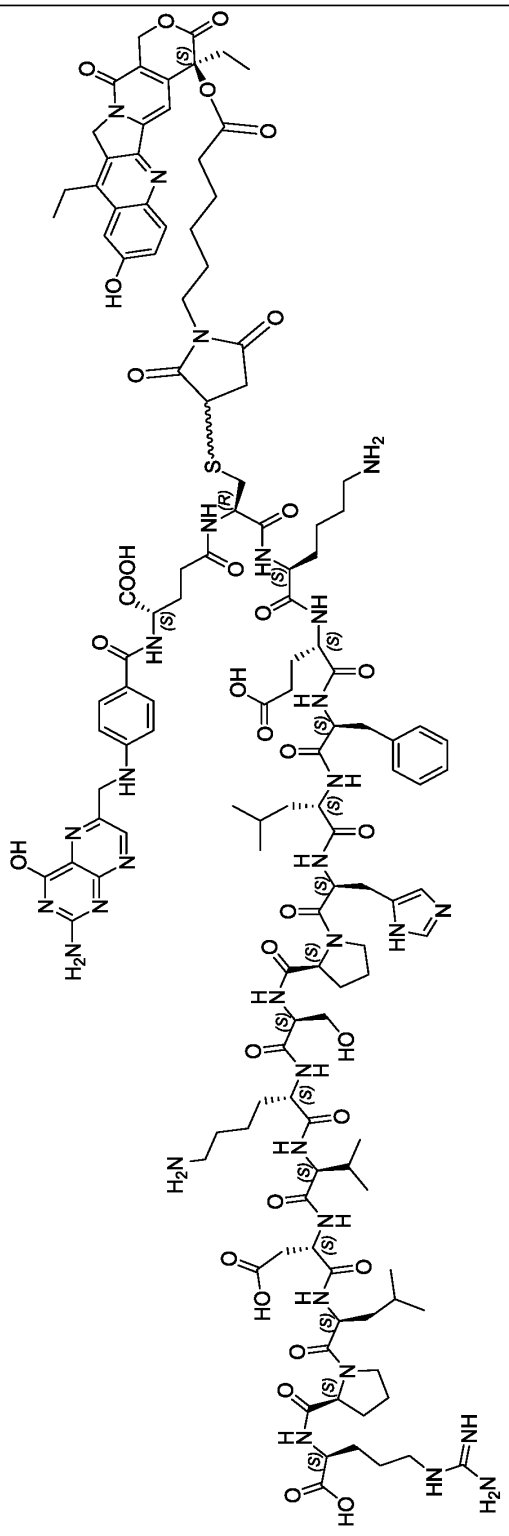
CR194J2



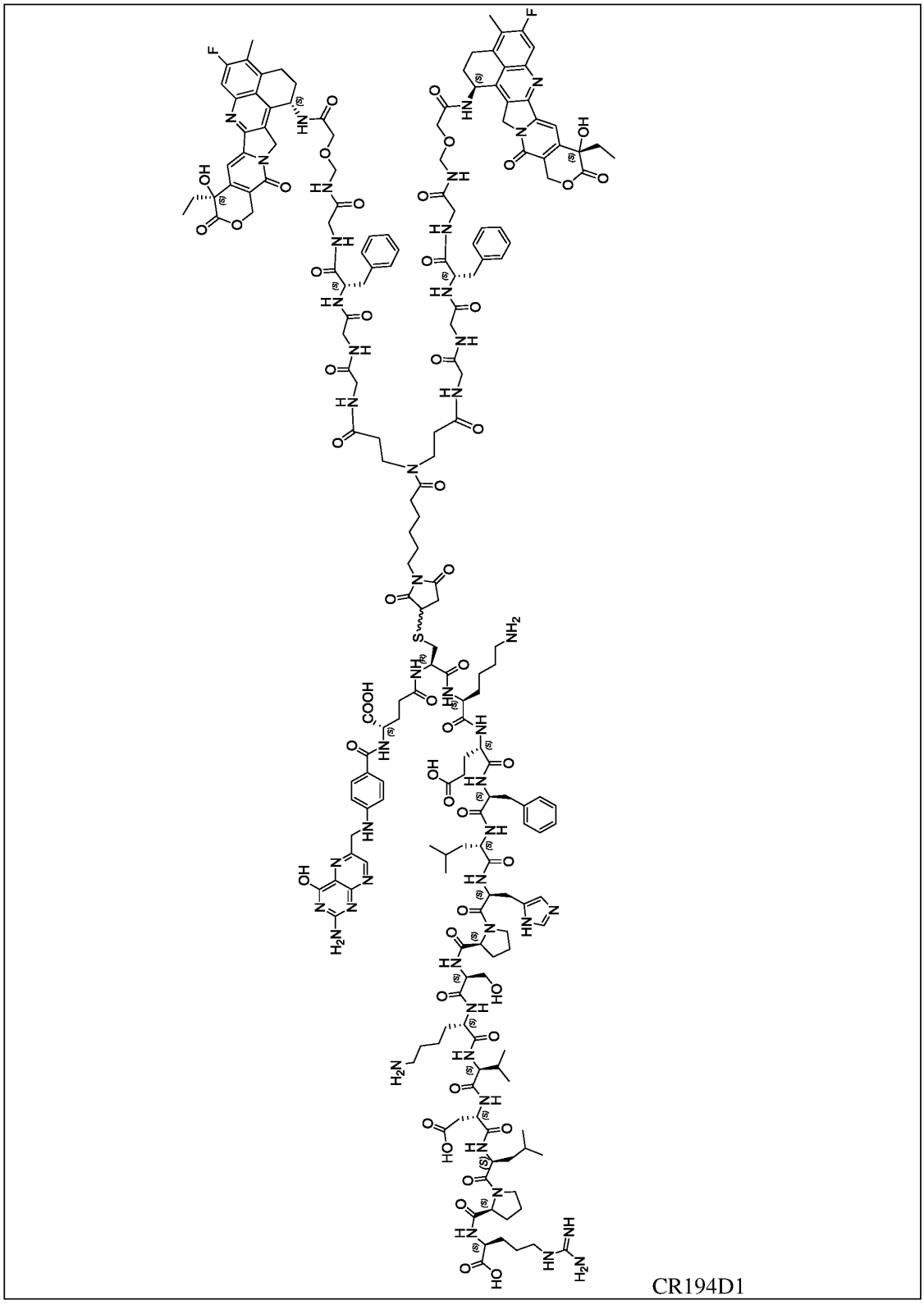
CR194P3



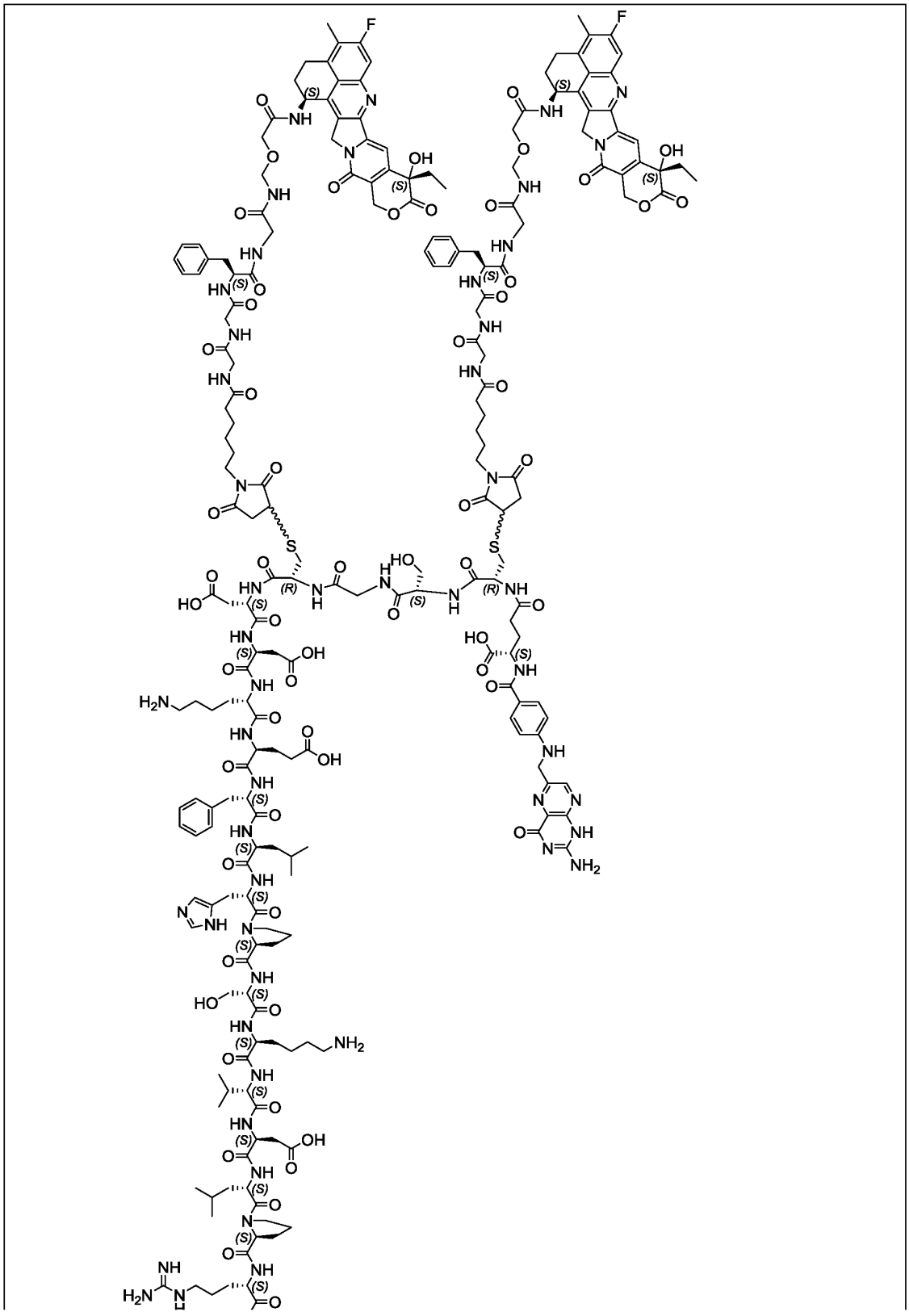
CR194U7

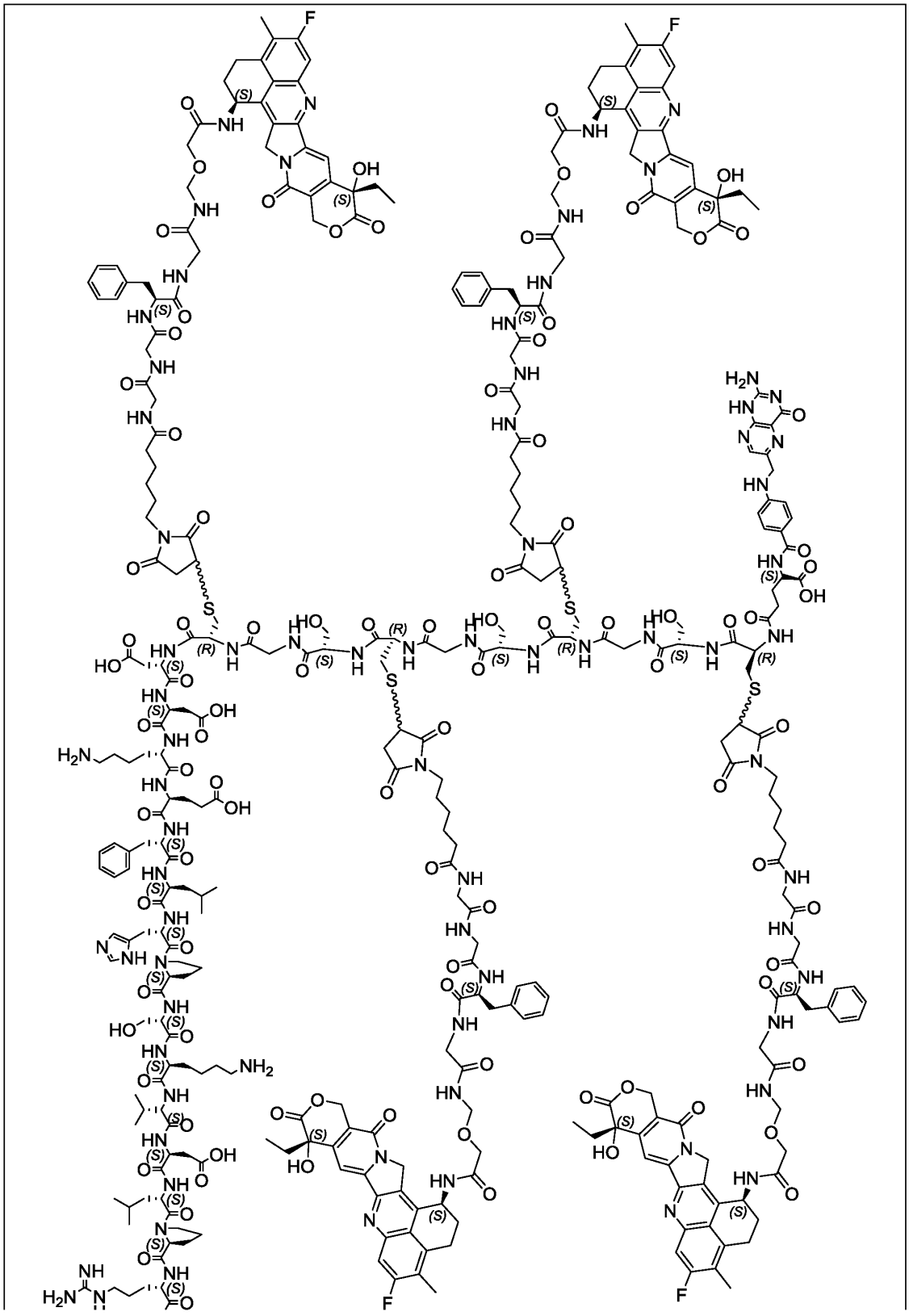


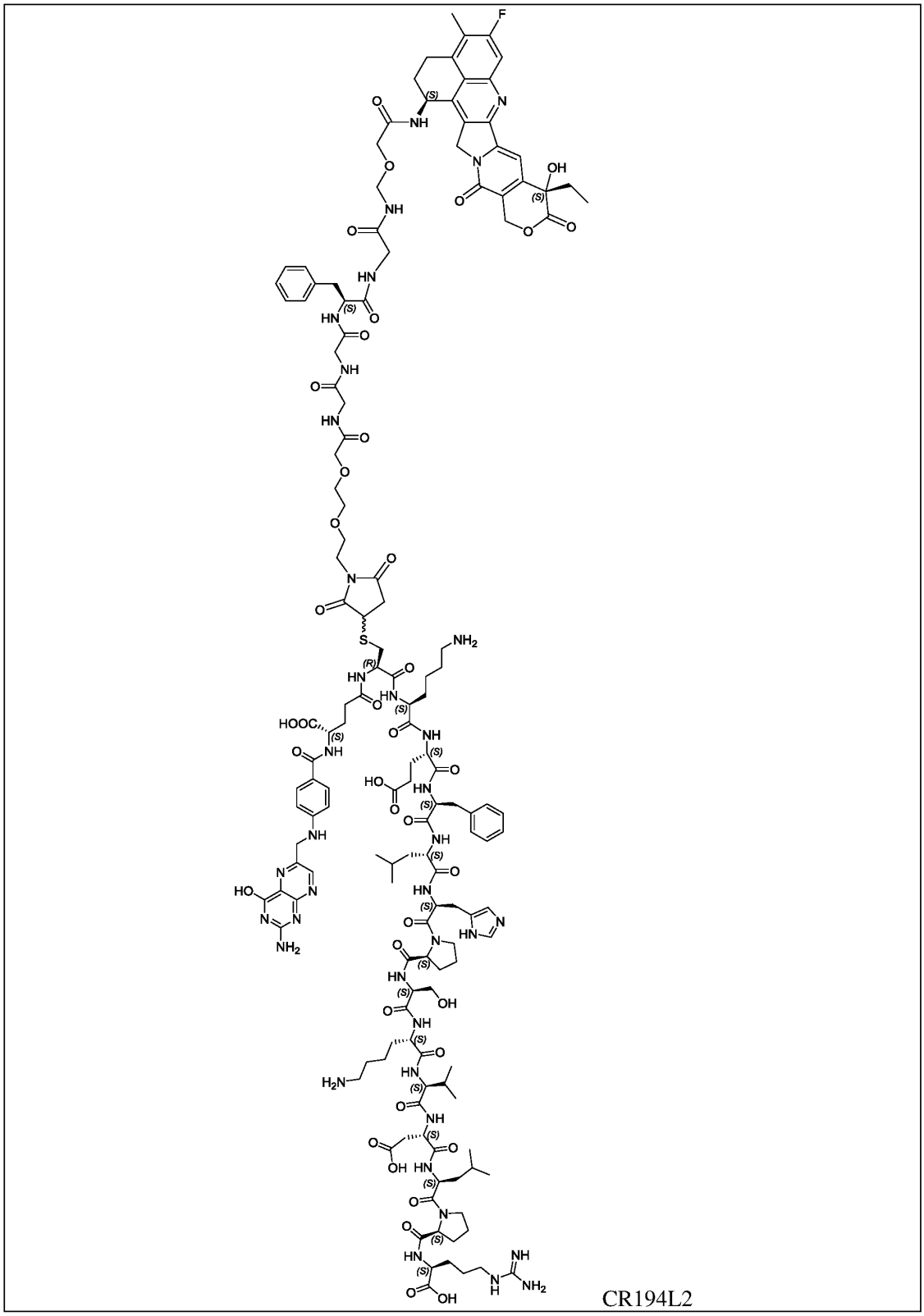
CR194P6



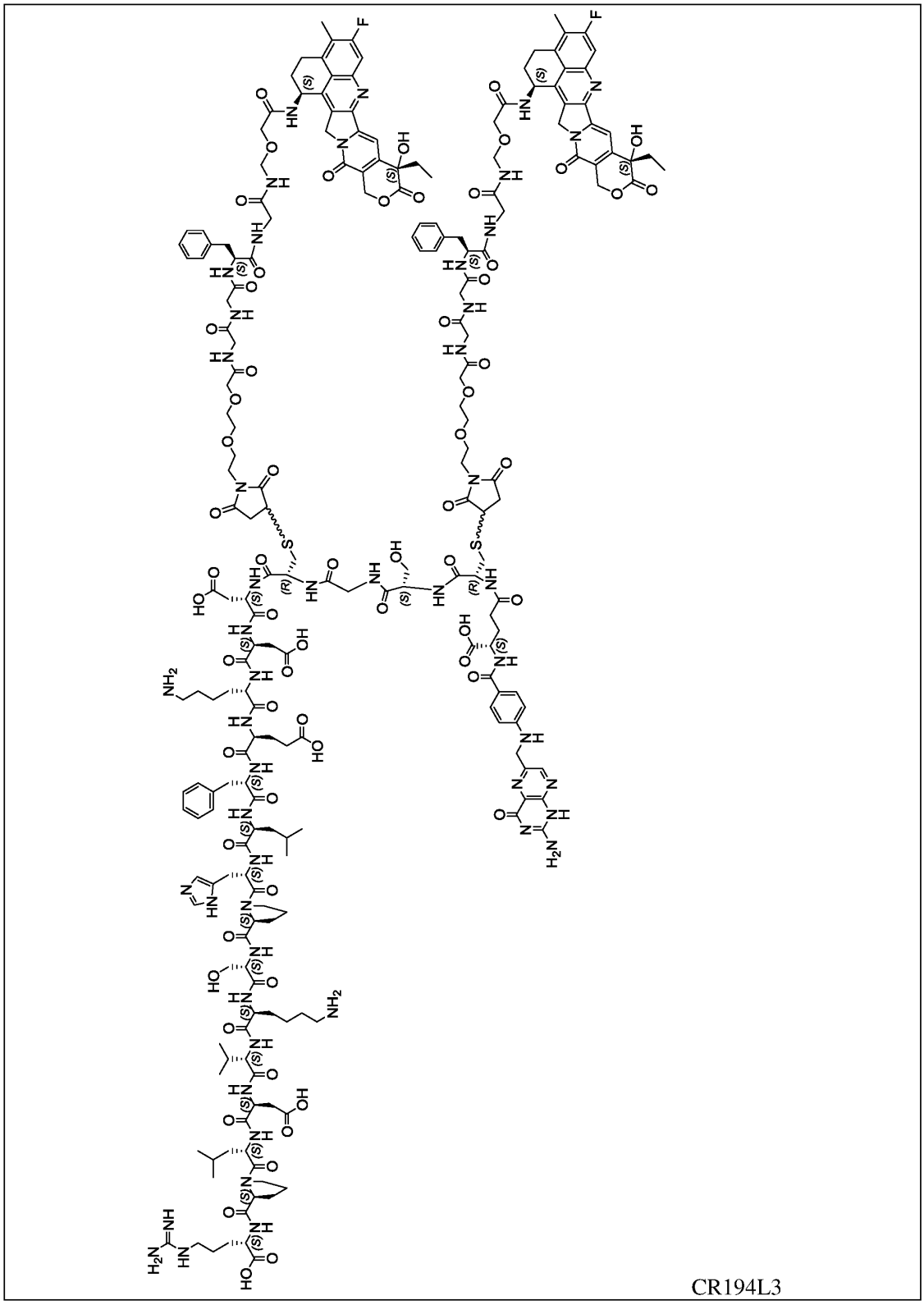
CR194D1



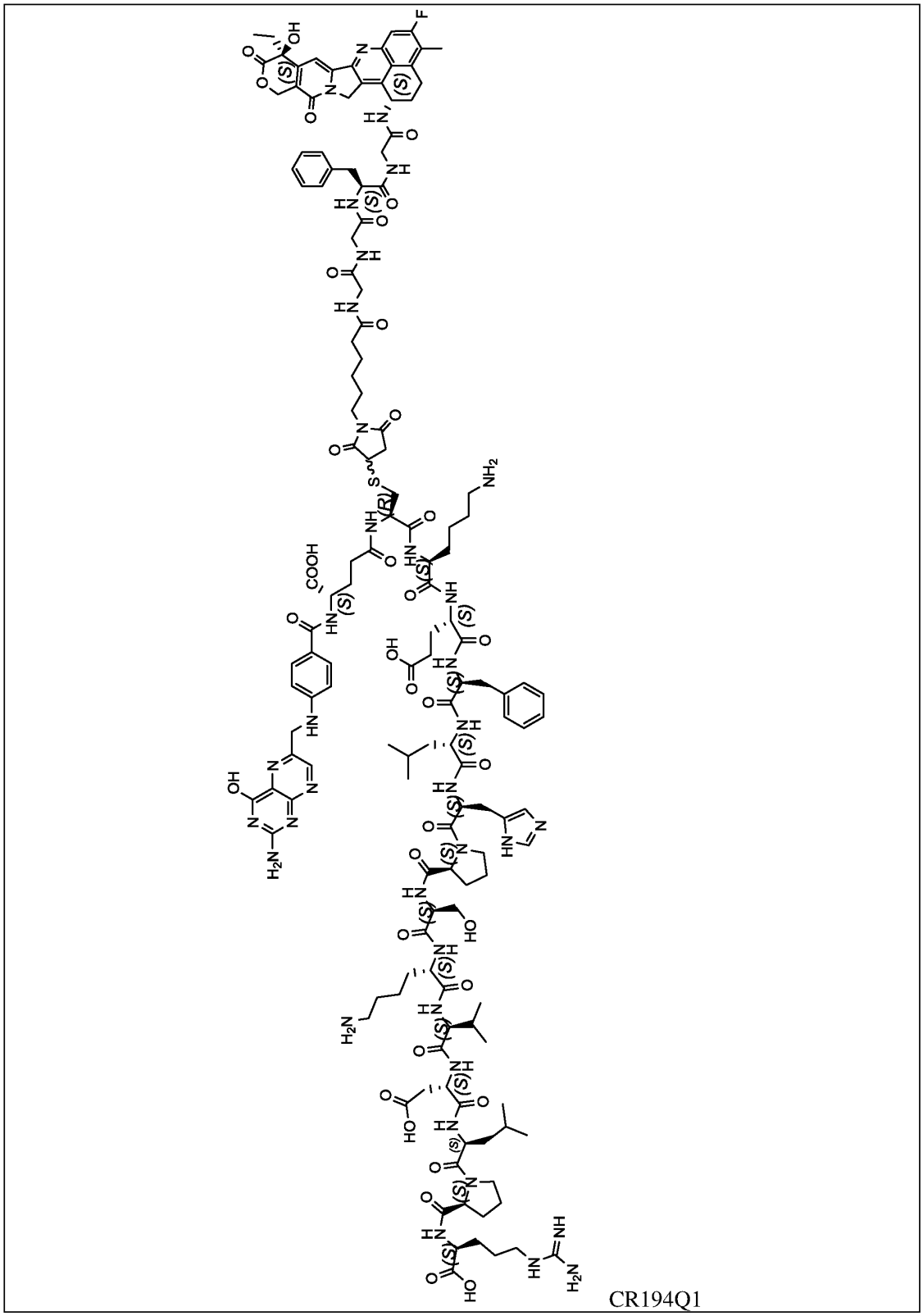




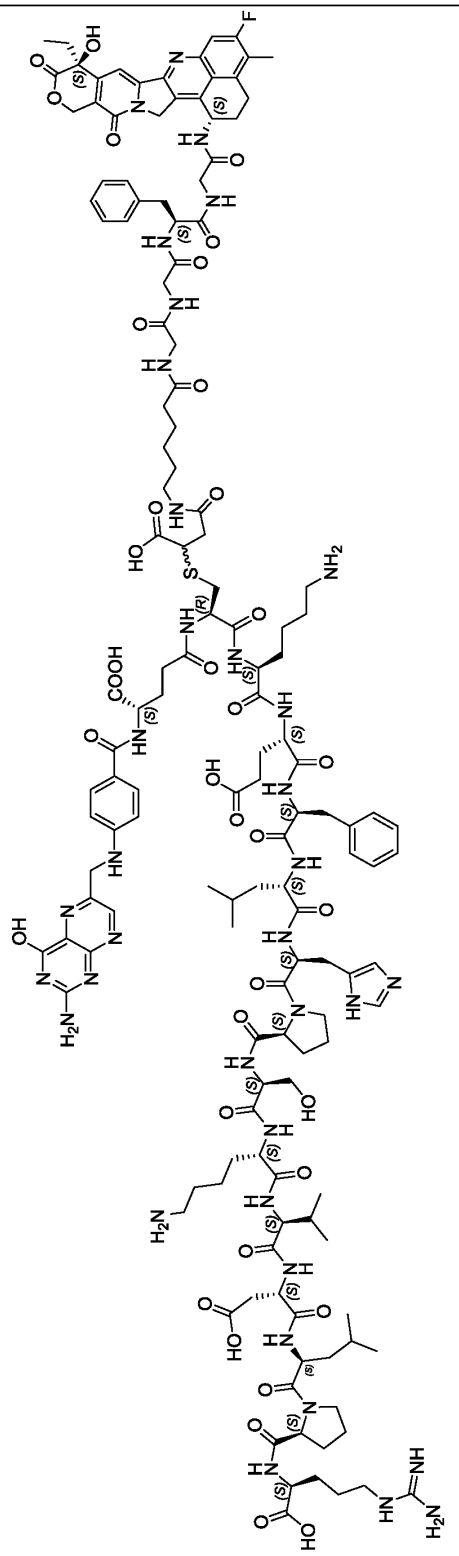
CR194L2



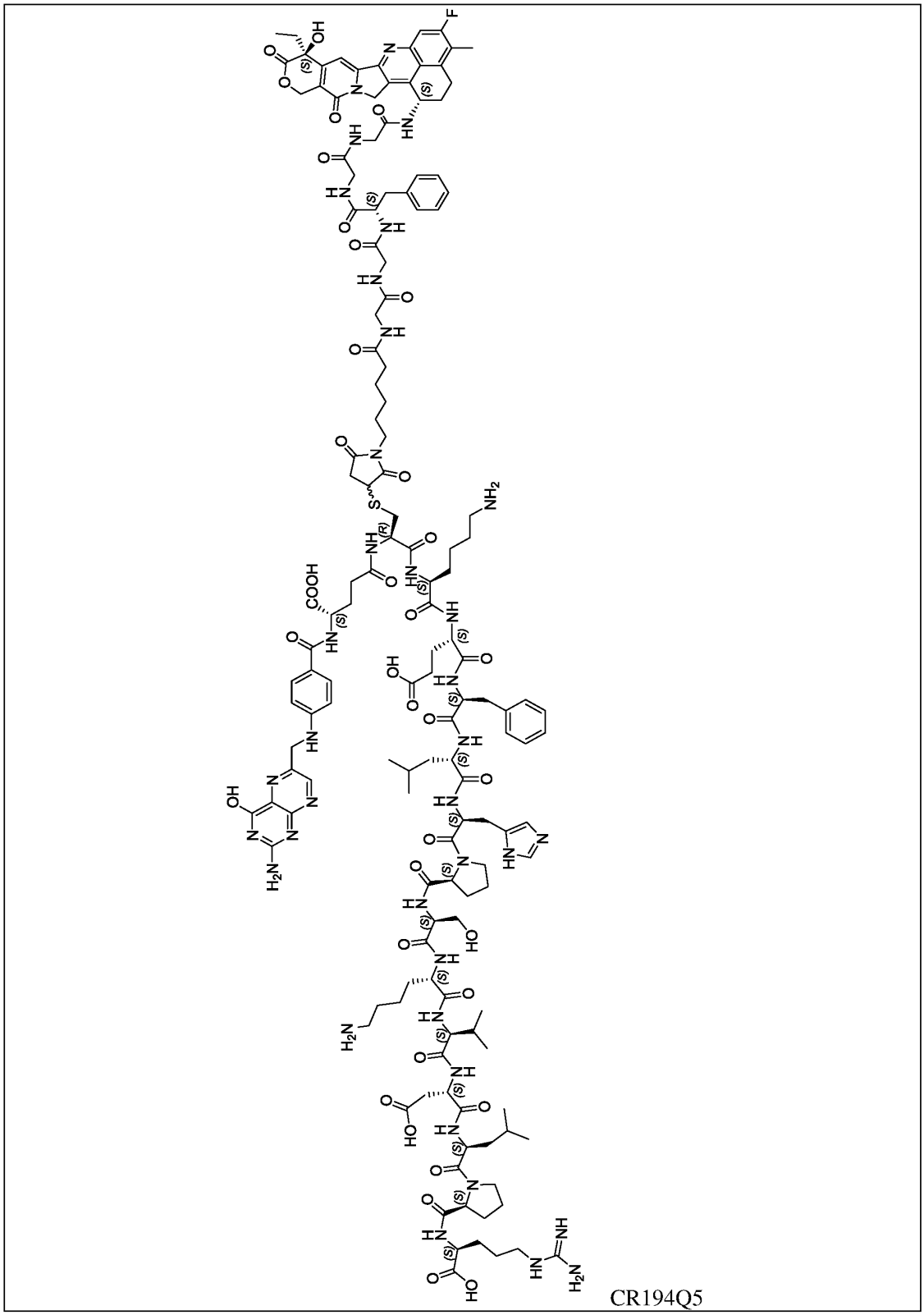
CR194L3



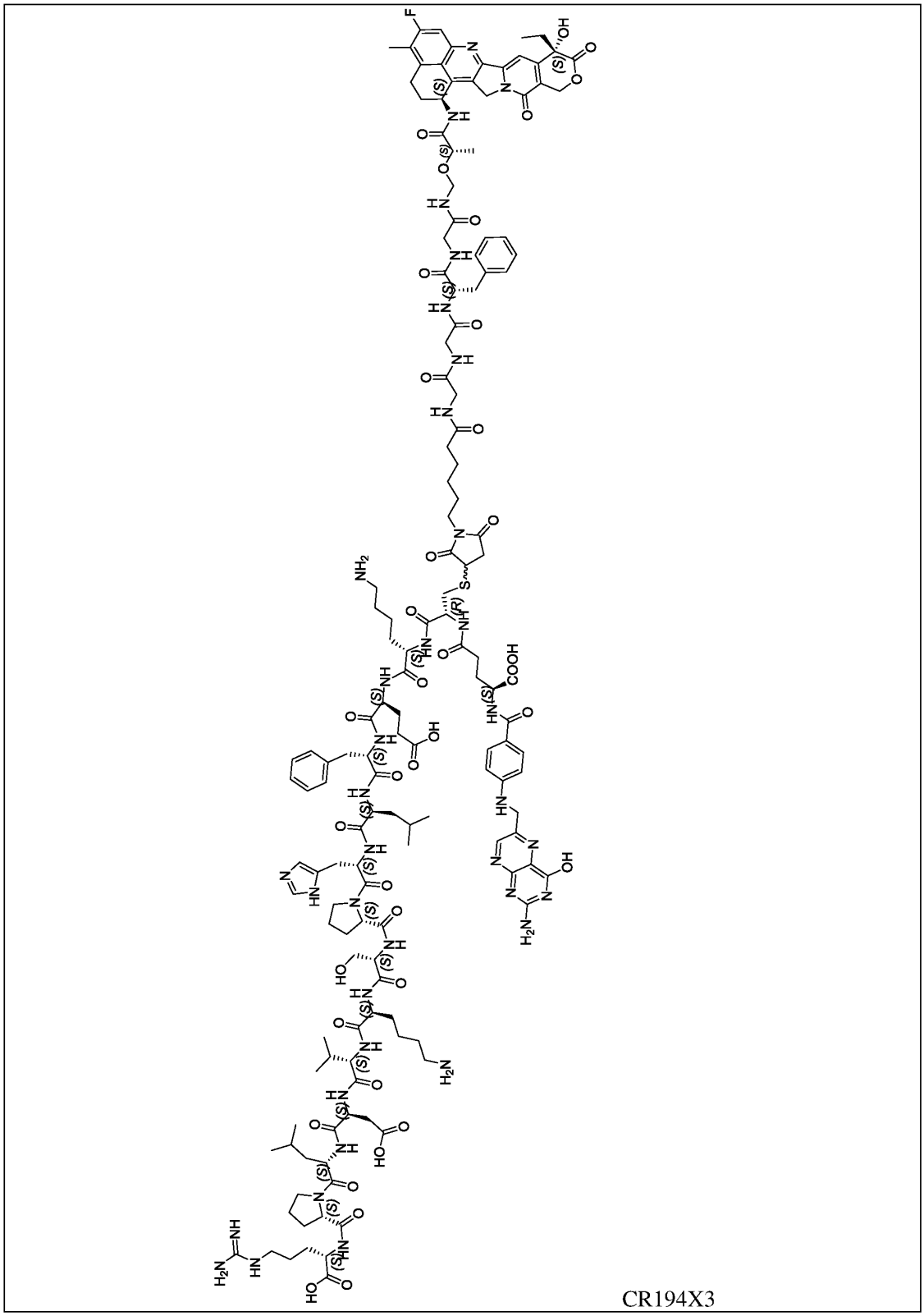
CR194Q1



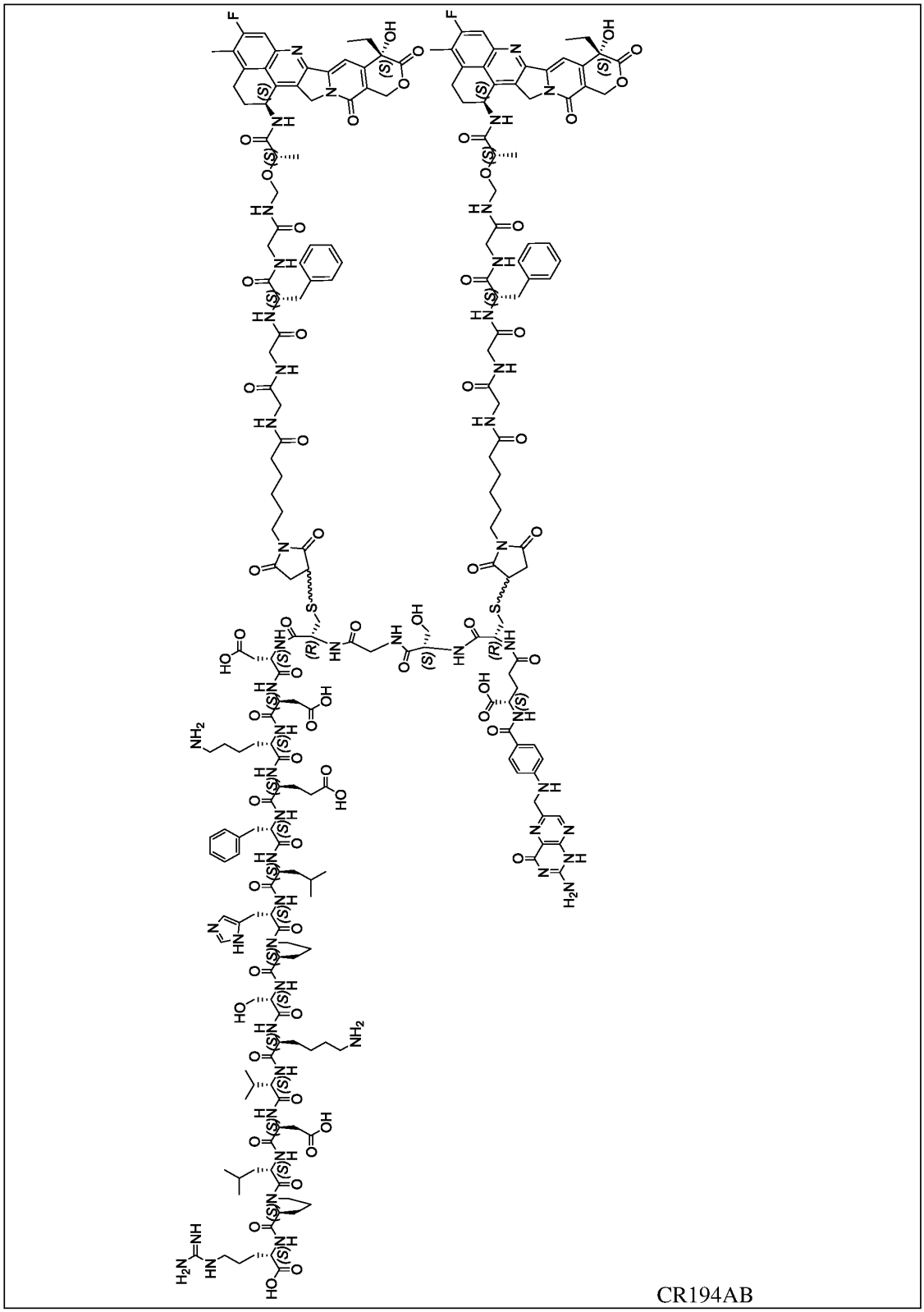
CR194AY



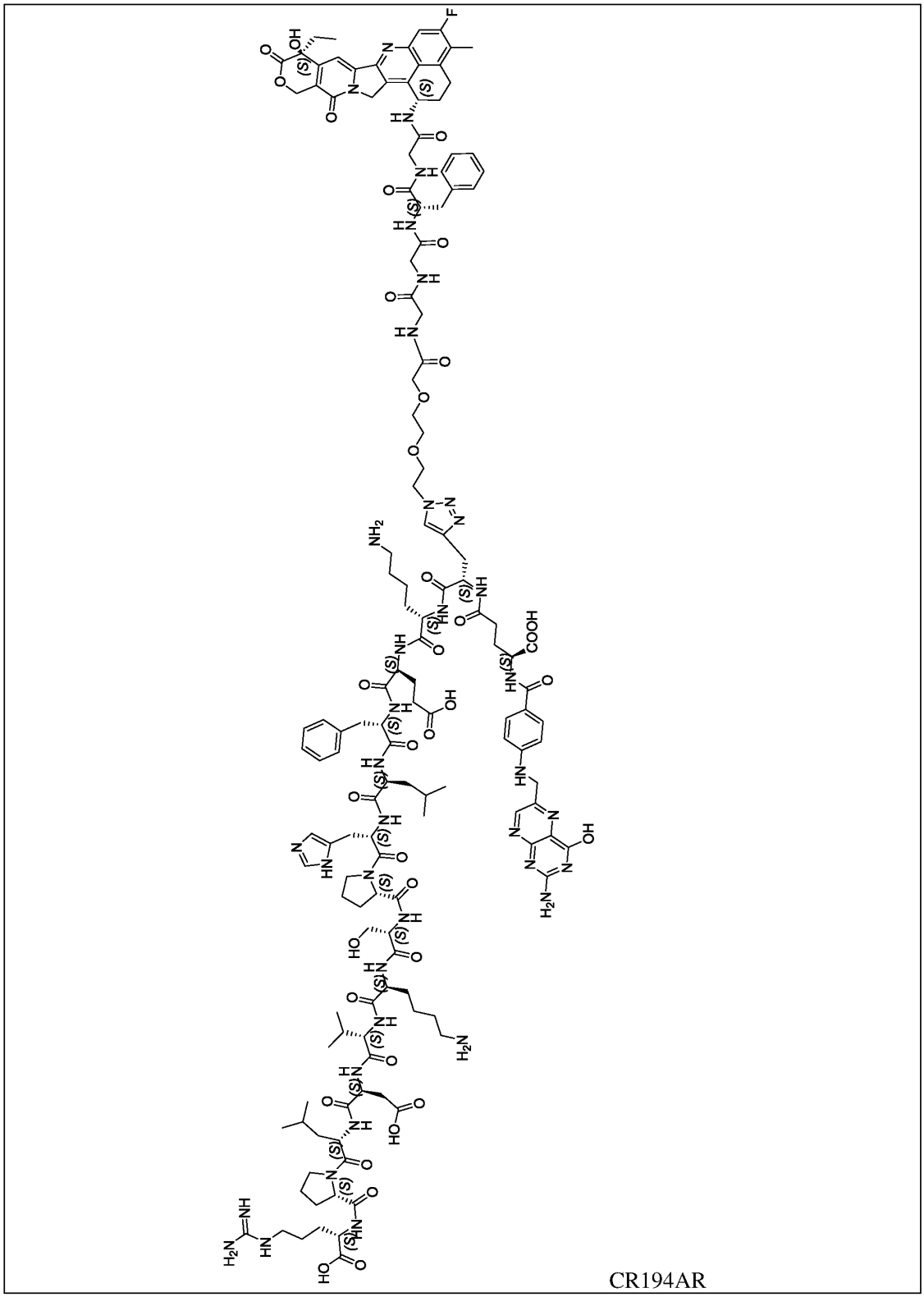
CR194Q5



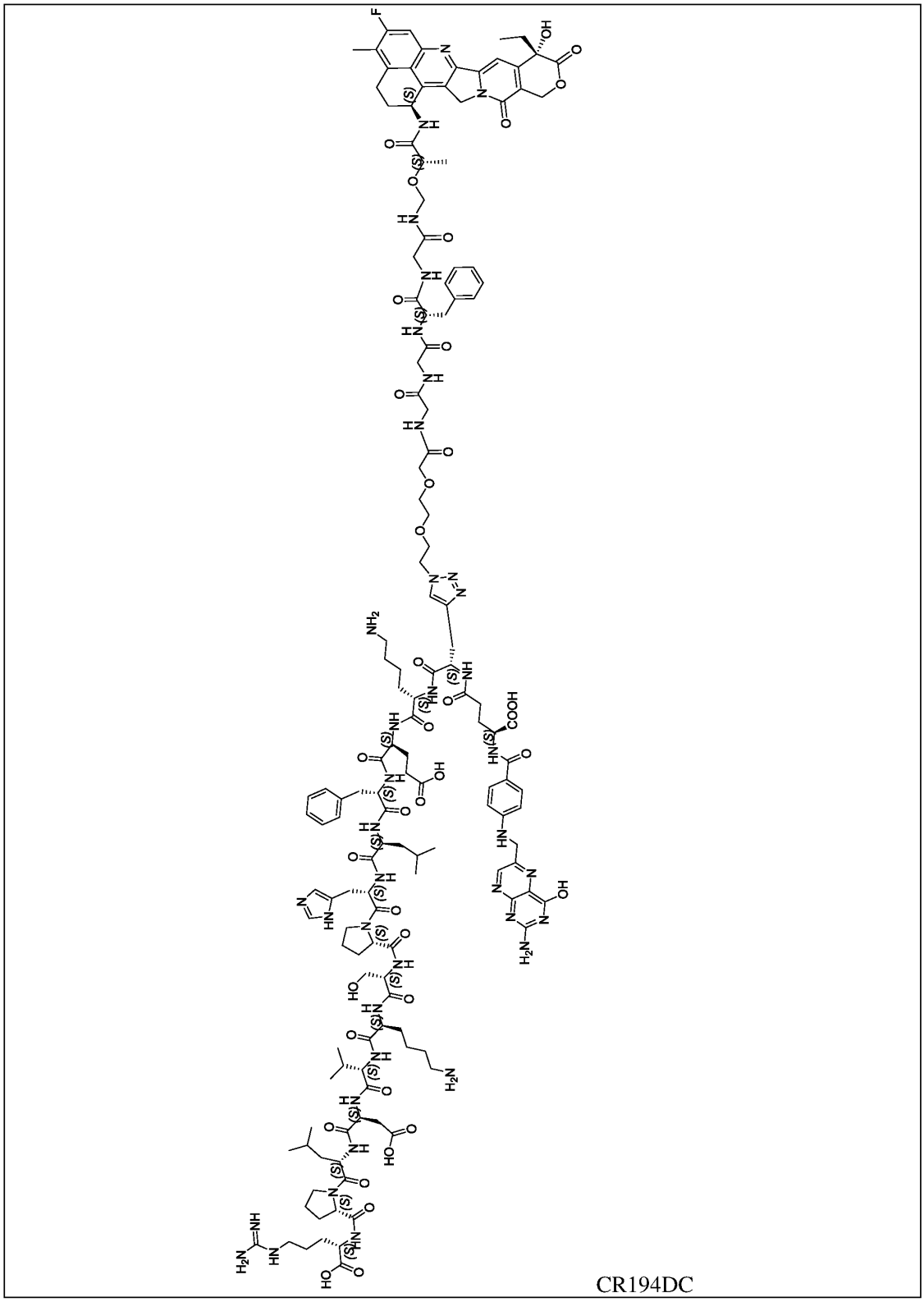
CR194X3



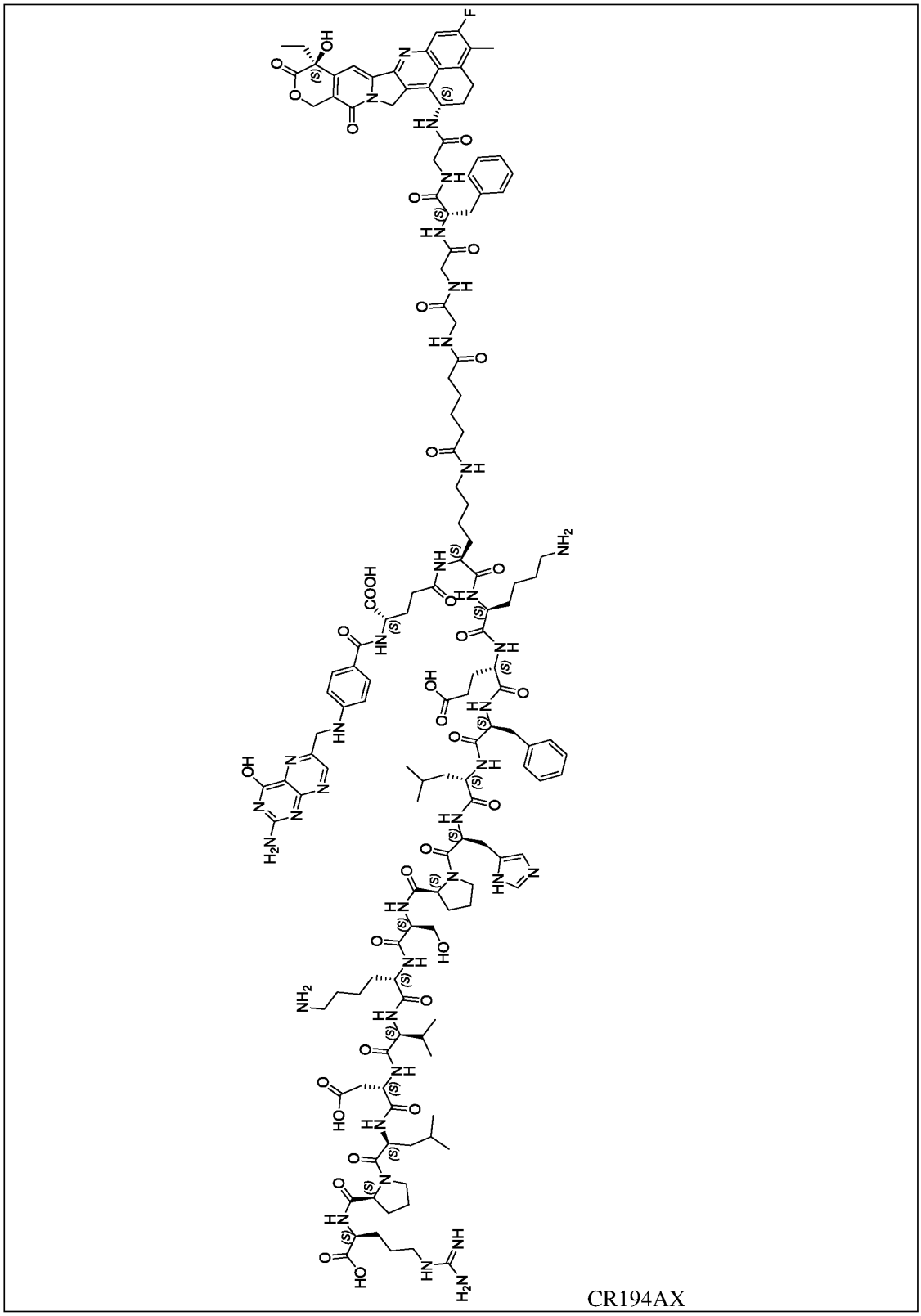
CR194AB



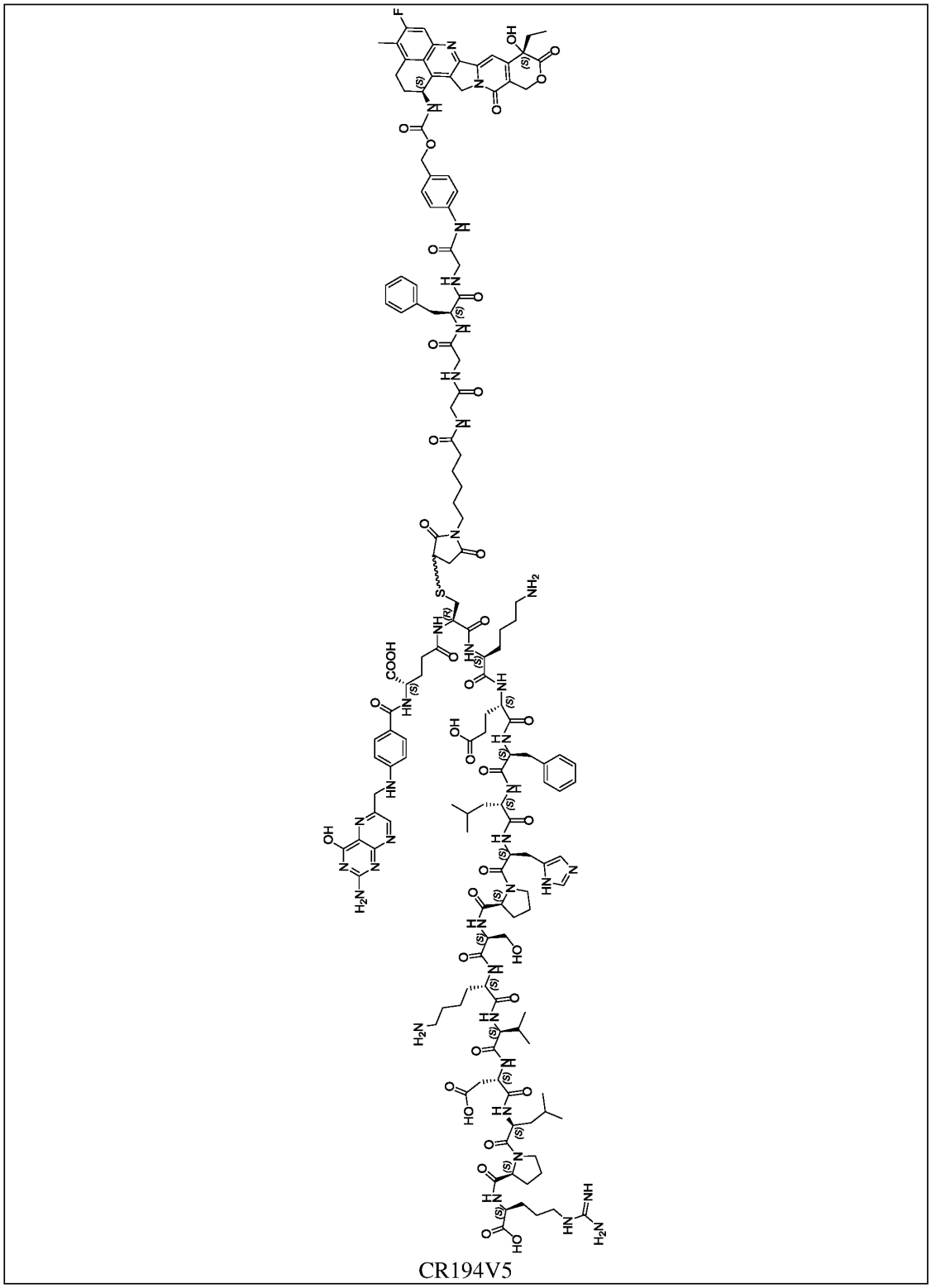
CR194AR



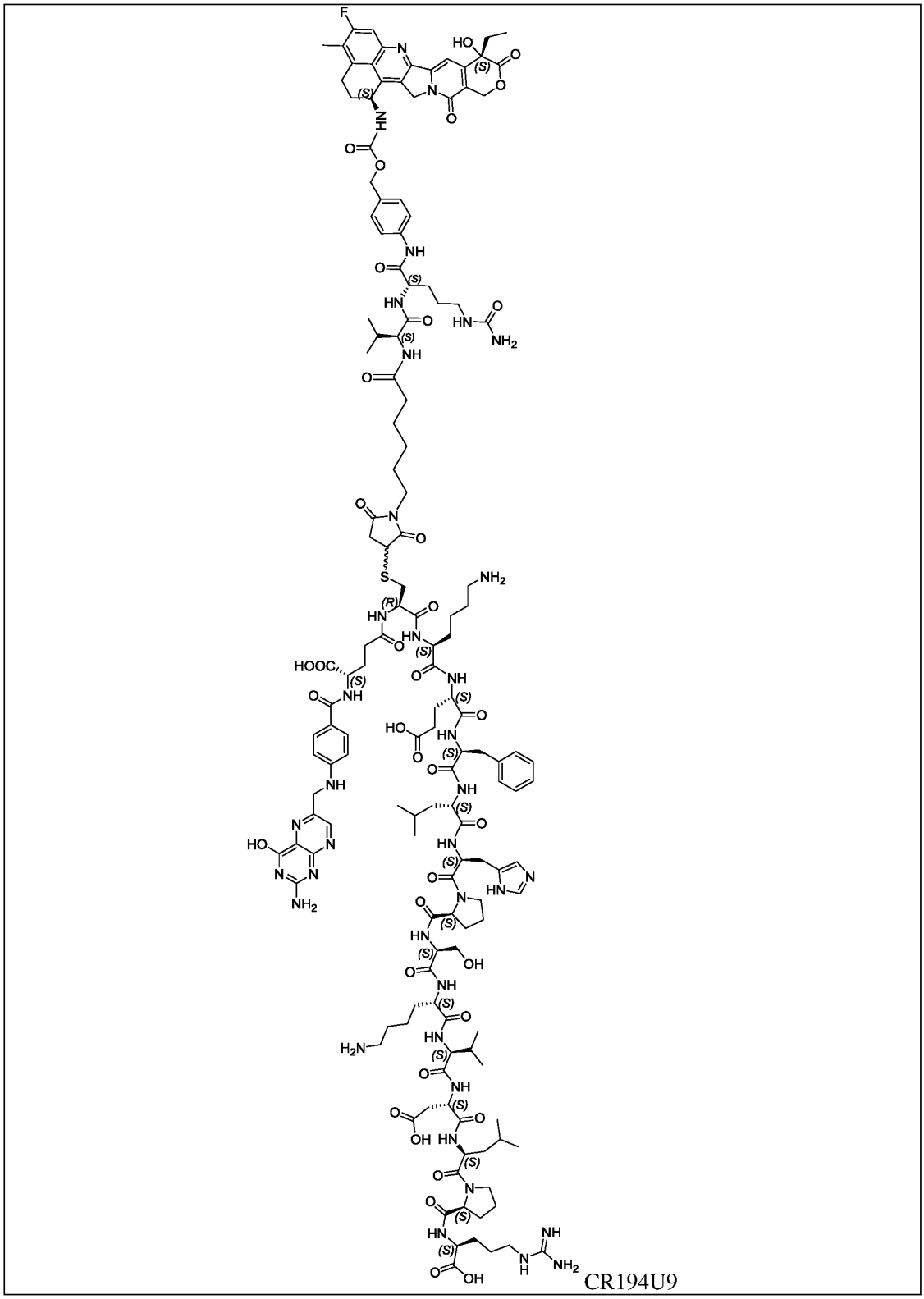
CR194DC



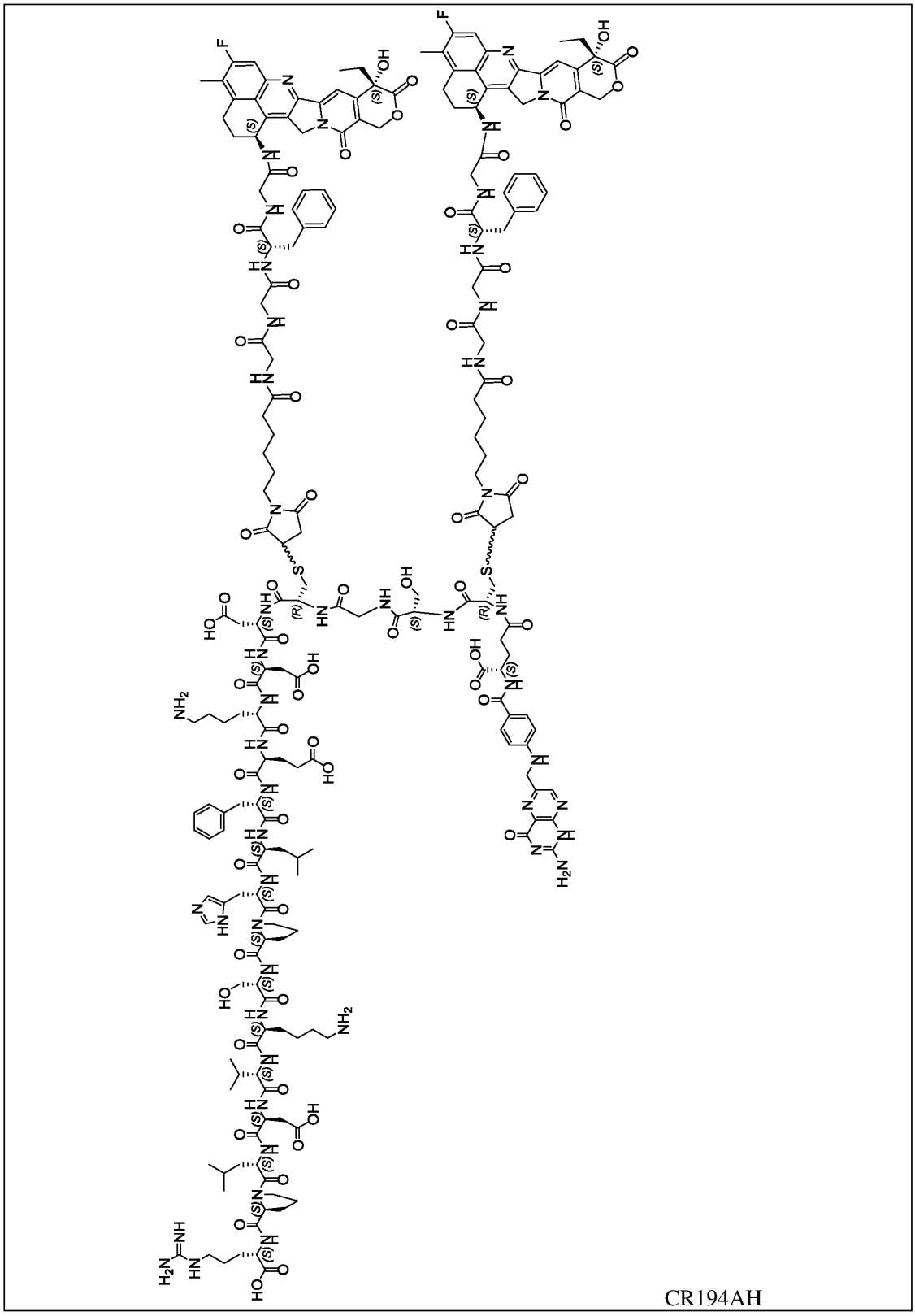
CR194AX



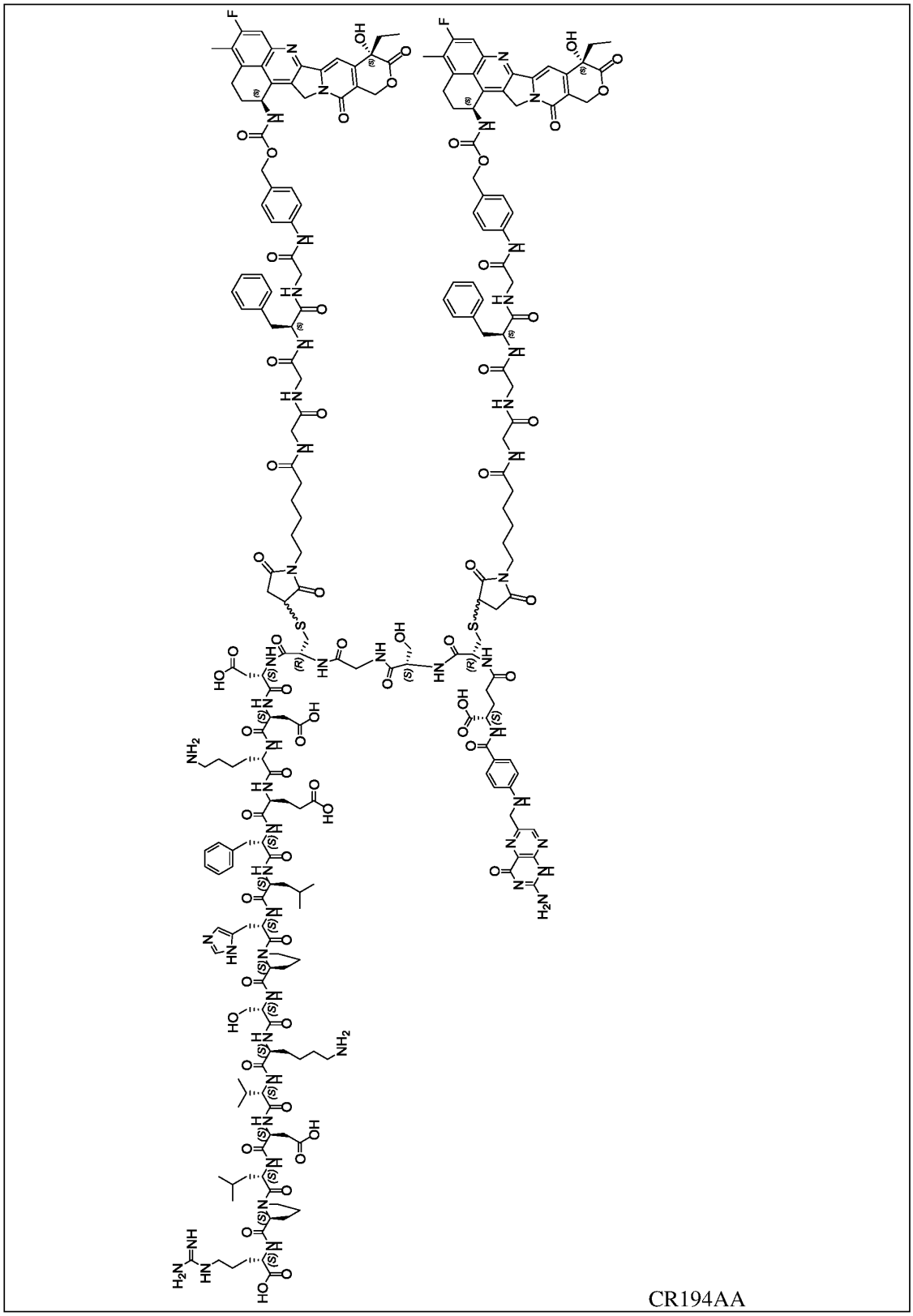
CR194V5



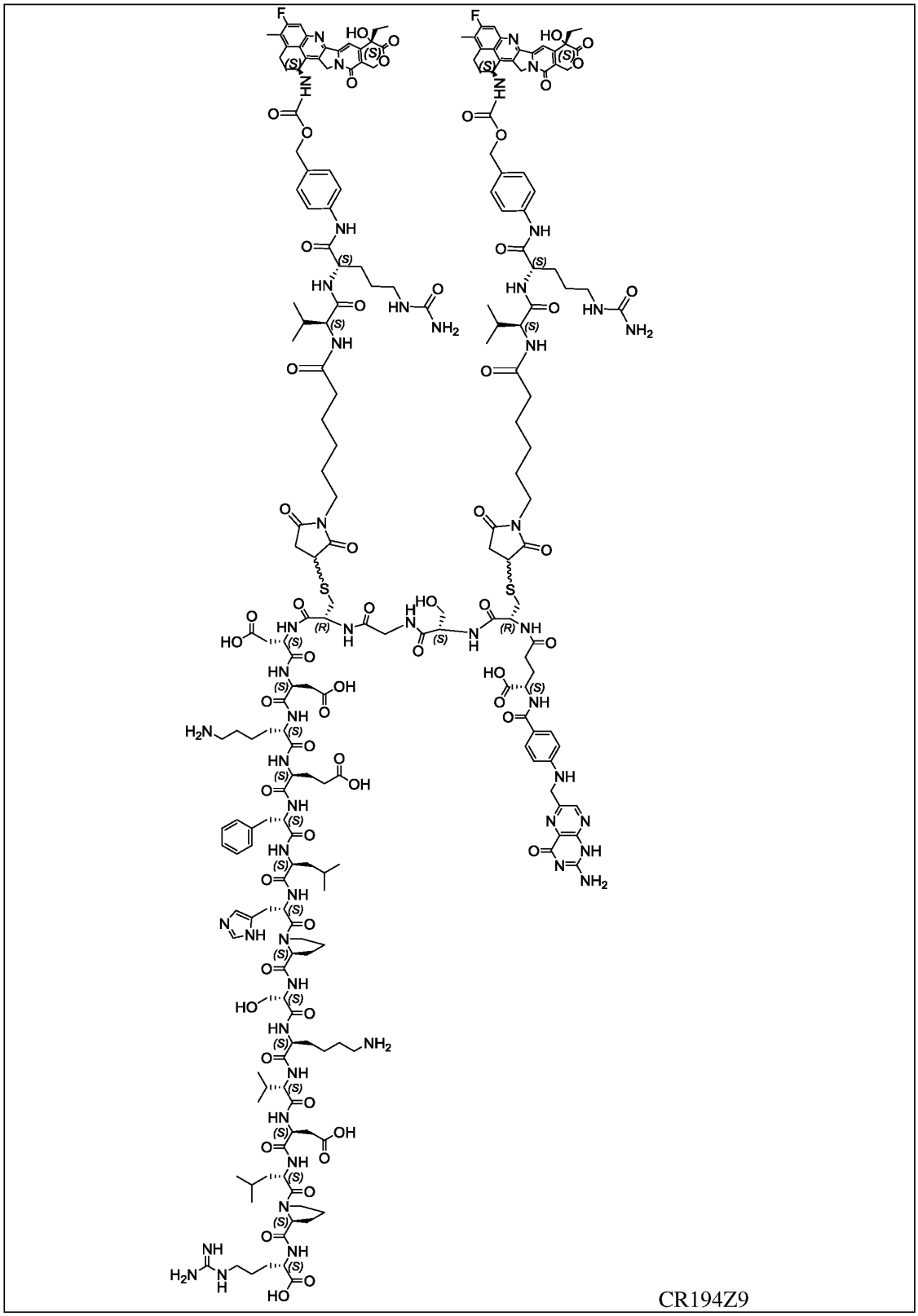
CR194U9



CR194AH



CR194AA



CR194Z9

[87] 本申请的另一个方面公开了一种药物组合物，所述药物组合物包含本申请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。在一些实施方式中，本申请所述的药物组合物用于静脉内、皮下、口服、肌内或心室内施用。

[88] 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。

[89] 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。

[90] 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。

[91] 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。

[92] 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。

[93] 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。

[94] 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。

[95] 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。

[96] 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。

[97] 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。

[98] 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。

[99] 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。

[100] 本申请的另一个方面公开了一种用于治疗对象中的疾病的方法，所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请所述的药物组合物。在一些实施方式中，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。

[101] 本申请的另一个方面公开了本申请所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，或者本申请所述的药物组合物在用于制备治疗对象中的疾病的药物中的用途。

[102] 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。

[103] 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 150 mg/kg，例如 0.01 至 140 mg/kg、0.01 至 130 mg/kg、0.01 至 120 mg/kg、0.01 至 110 mg/kg、0.01 至 0 mg/kg 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。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或其药物组合物以 1-150mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量范围施用。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或其药物组合物以 1-25 mg/kg、1-50 mg/kg、1-75 mg/kg、1-100 mg/kg、1-125 mg/kg、1-150 mg/kg、25-75 mg/kg、25-50 mg/kg、25-40 mg/kg、25-30 mg/kg、1-20 mg/kg、1-15 mg/kg、1-10 mg/kg、1-5 mg/kg、1-3 mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量施用。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或其药物组合物以 1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg、

150mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量施用。在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物可以每天（例如：每天一次，两次，三次或四次）施用，或者间隔一天或多天（例如：每周，每两周，每三周，每月或每季度一次）施用。在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每周一次、每周两次、每周三次、每三天一次、每两天一次、每天一次、每天两次或每天三次。在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每周一次。在一些实施方式中，本申请所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每天三次。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。

[104] 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。

[105] 在一些实施方式中，本申请所述疾病选自下组：癌症、免疫性疾病、代谢疾病和神经疾病。在一些实施方式中，所述癌症选自胰腺癌、胆道癌、肝癌、乳腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、食道癌、肺癌、肾癌、白血病、卵巢癌、胃癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、睾丸癌、皮肤癌、前列腺癌、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，优选地，所述自身免疫性疾病选自结缔组织病、系统性硬化症、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。代谢疾病选自糖尿病、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。

[106] 在一些实施方式中，本申请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。

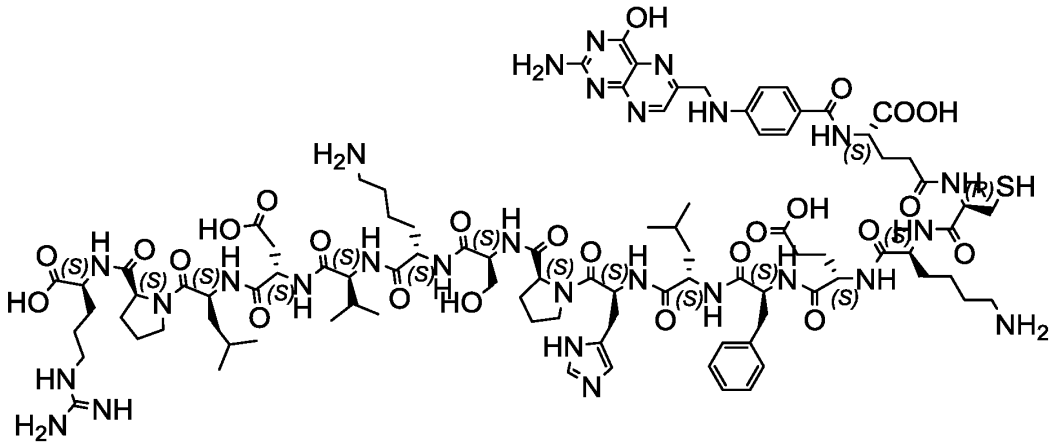
[107] 以下将通过具体实施例更详细地描述本申请。提供以下实施例仅用于说明目的，并且不旨在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地意识到可以对多种非关键参数进行改变或修改以产生基本上相同的结果。

实施例

[108] 以下实施例旨在更好地说明本发明，且不应理解为限制本发明的范围。所有下述的特定组合物、材料和方法，其整体或部分，都在本发明的范围内。这些特定的组合物、材料和方法不是为了限制本发明，而只是为说明特定的实施方式在本发明的范围内。本领域技术人员可不添加创造性及不偏离本发明范围而开发出等同的组合物、材料和方法。应理解，在对本发明的方法作出的多种改动可以仍然包含在本发明范围内。发明人意在将这样的变动包含在本发明的范围内。

实施例 1 多配体部分的制备

[109] 双配体 Ligand-01 的制备



[110] 用固相合成 Fmoc 化学氨基树脂合成 Pteroic acid（蝶酸）-Glu-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro -Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH 肽序。将树脂装载于固相反应柱中，加入 DMF，氮气鼓泡至溶剂中，使树脂溶胀 30 分钟；加入 Fmoc-Arg-OH、DCC 和 DMAP，25℃，反应 3 小时，后用醋酸酐和吡啶封端 1 小时，再用 DMF 洗涤 3 次，用 DBLK 脱除树脂上的 Fmoc 保护基团，再用 DMF 洗涤 5 次，称取 Fmoc-Pro-OH 和 HOBt，用 DMF 溶解，0℃冰水浴下向上述溶液中加入 DIC，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。随后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团，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-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Glu-OtBu 以及蝶酸。树脂用裂解液裂解后，过滤，裂解液倒

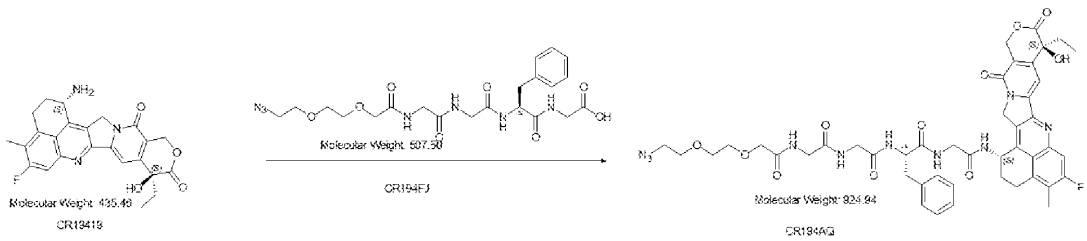
入 MTBE 中，析出固体，用 MTBE 洗，得到粗品，将粗品经 Pre-HPLC 纯化，制备得到 Ligand01。

[111] 同理，通过与以上方法类似的步骤可获得到 Ligand02、Ligand03、Ligand04、Ligand05 和 Ligand06。

实施例 2 偶联体化合物的制备

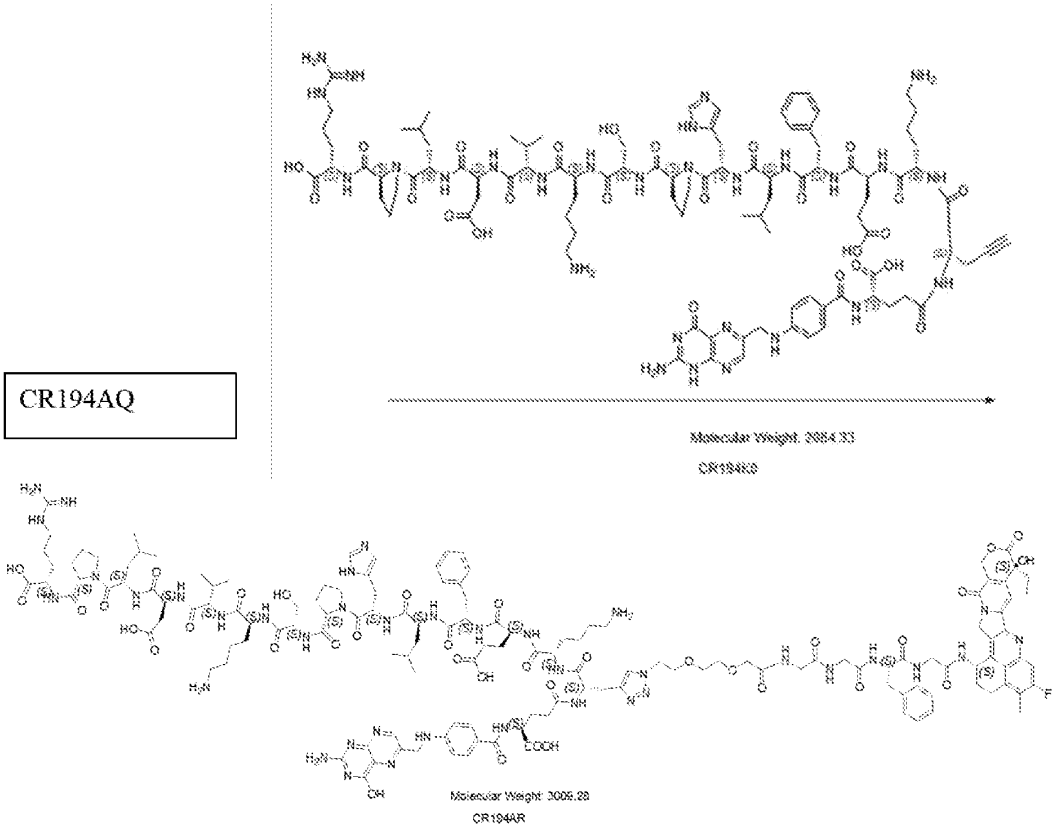
[112] 1. 偶联体化合物 CR194AR 的合成

[113] 步骤 1（Step 1）：CR194AQ 的制备



[114] 称取 CR19419（1.0 eq，结构参见图示）于 50 mL 单口瓶中，加入 DMF 使其溶解，随后加入 CR194FJ（1.0 eq，结构参见图示）、HATU（1.1 eq）和 DIPEA（2.5 eq），25℃下，搅拌 4 小时。反应完毕后，将反应液倒入醋酸水中，用乙酸乙酯萃取三遍，有机相用水洗涤，饱和食盐水洗，有机相干燥得到 CR194AQ（结构参见图示）。

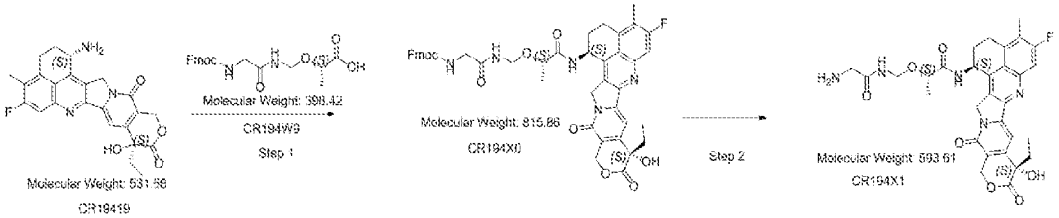
[115] 步骤 2（Step 2）：CR194AR 的制备



[116] 称取 CR194AQ（1.0 eq）于 50 mL 单口瓶中，加入 DMF:水=1:1 的混合溶液使其溶解，随后加入 CR194K0（1.2 eq，结构参见图示）和 CuI（1.0 eq），25℃下，搅拌 4 小时。反应完毕后，反应液交制备纯化，制备纯品冻干得到 CR194AR。

[117] 2. 偶联体化合物 CR194X3 的合成

[118] 步骤 1：CR194X0 的制备



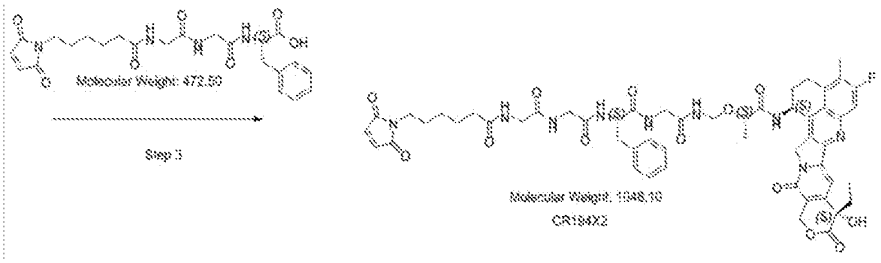
[119] 称取 CR19419（1.0 eq，结构参见图示）于 50 mL 单口瓶中，加入 DMF 使其溶解，然后加入 CR194W9（1.0 eq，结构参见图示）、HATU（1.1 eq）和 DIPEA（2.5 eq），25℃下，搅拌 4 小时。反应完毕后，将反应液倒入醋酸水中，析出固体，过滤，滤饼用醋酸水洗涤，滤饼干燥得到 CR194X0（结构参见图示）。

[120] 步骤 2：CR194X1 的制备

[121] 称取 CR194X0（1.0 eq，结构参见图示）于 50 mL 单口瓶中，加入 DMF 使其溶解，冰浴降温，然后加入 DBU（1.1 eq）冰浴反应 3 小时，反应完毕后将反应液倒入 MTBE 中析出固体，过滤，滤饼用 MTBE 洗三遍，真空干燥得 CR194X1（结构参见图示）。

[122] 步骤 3（Step 3）：CR194X2 的制备

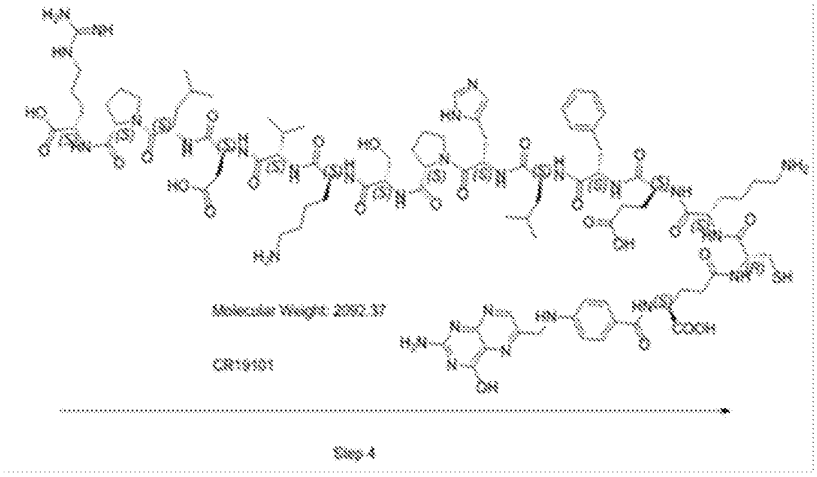
CR194X1

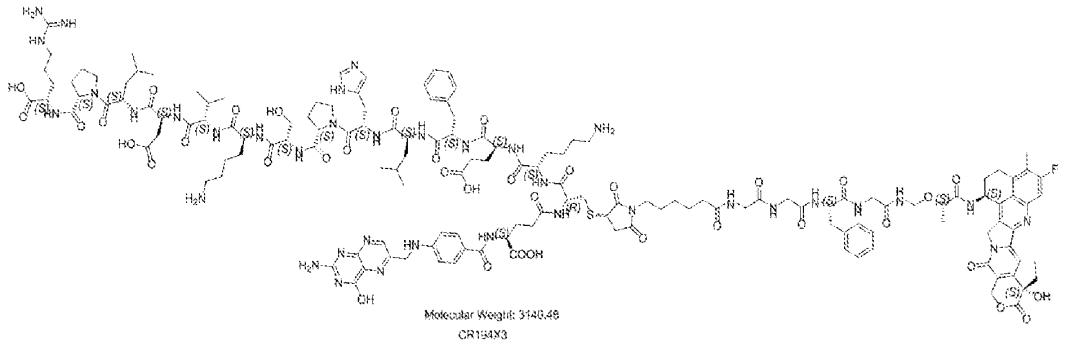


[123] 称取 CR194X1（1.0 eq）于 50 mL 单口瓶中，加入 DMF 使其溶解，随后加入 CR19424（1.0 eq，结构参见图示）、HATU（1.1 eq）和 DIPEA（2.5 eq），25℃下，搅拌 4 小时。反应完毕后，将反应液倒入醋酸水中，用乙酸乙酯萃取三遍，有机相用水洗涤，饱和食盐水洗，有机相干燥得到 CR194X2（结构参见图示）。

[124] 步骤 4（Step 4）：CR194X3 的制备

CR194X2

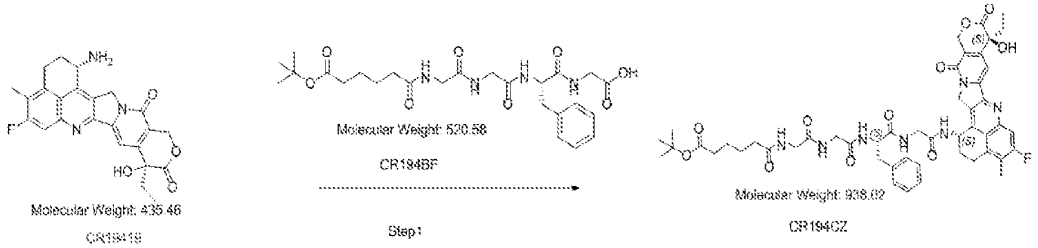




[125] 称取 CR194X2（1.0 eq）于 50mL 单口瓶中，加入甲醇使其溶解，随后加入 10 mM PBS 缓冲液，冰浴冷却搅拌 10 分钟，呈白色悬浊液，pH=8-9，加入 0.1 M NaH_2PO_4 调节 pH 至 pH=7，称取 CR19101（结构参见图示）分批加入，控制 pH=7，反应冰浴搅拌 15 分钟，HPLC 中控原料反应完全，反应液交制备提纯冻干得到 CR194X3（结构参见图示）。

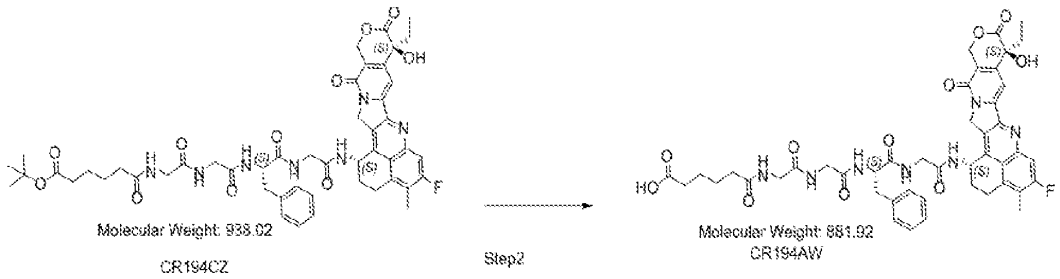
[126] 3. 偶联体化合物 CR194AX 的合成

[127] 步骤 1：CR194CZ 的制备



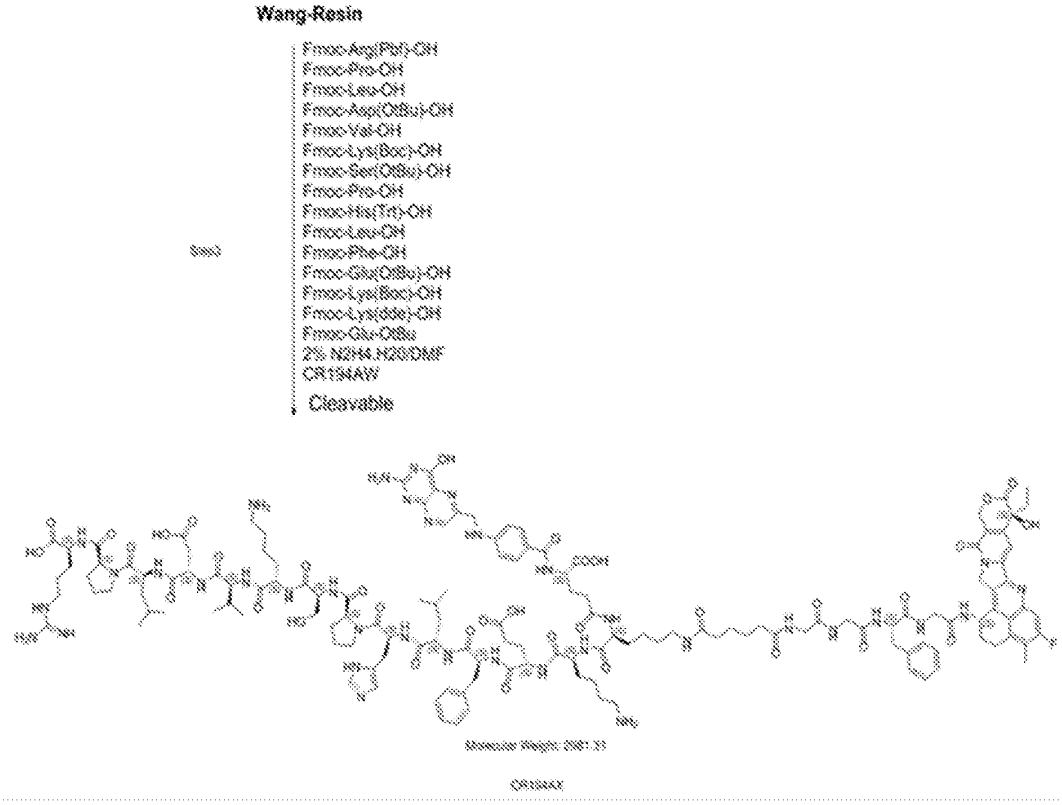
[128] 称取 CR19419（1.0 eq）于 50mL 单口瓶中，加入 DMF 使其溶解，然后加入 CR194BF（1.0 eq），HATU（1.1 eq）和 DIPEA（2.5eq），25℃搅拌 4 小时。反应完毕后，将反应液倒入醋酸水中，用乙酸乙酯萃取三遍，有机相用水洗涤，饱和食盐水洗，有机相干燥得到 CR194CZ。

[129] 步骤 2：CR194AW 的制备



[130] 称取 CR194CZ（1.0 eq）于 50 mL 单口瓶中，加入 TFA:DCM=1:1 溶液，反应 5 小时，反应完毕后，反应完毕后将反应液倒入 MTBE 中析出固体，过滤，滤饼用 MTBE 洗三遍，真空干燥得 CR194AW。

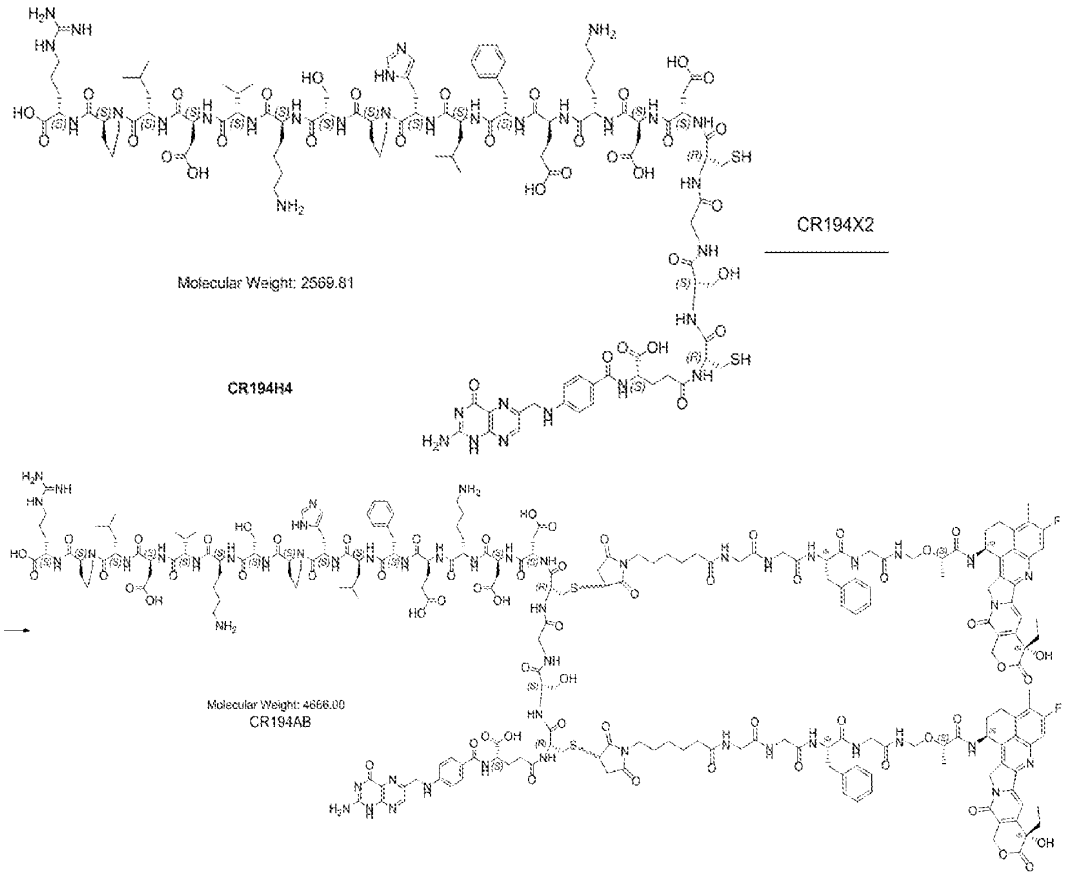
[131] 步骤 3：CR194AX 的制备



[132] 用固相合成 Fmoc 化学氨基树脂实现 CR194AX 的合成。将树脂装载于固相反应柱中，加入 DMF，氮气鼓泡至溶剂中，使树脂溶胀 30 分钟；加入 Fmoc-Arg-OH、DCC 和 DMAP，25℃，反应 3 小时，后用醋酸酐和吡啶封端 1 小时，再用 DMF 洗涤 3 次，用 DBLK 脱除树脂上的 Fmoc 保护基团，再用 DMF 洗涤 5 次，称取 Fmoc-Pro-OH，HOBt，

用 DMF 溶解，0℃冰水浴下向上述溶液中加入 DIC，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。随后用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基团，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(dde)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Glu-OtBu 以及蝶酸，用 4%水合肼/DMF 溶液脱 dde 保护基，再用 DMF 洗涤 5 次，加入 CR194AW，HBTU，DIEA，反应 3 小时，反应完毕后 DMF 洗涤，DCM 洗涤，MeOH 洗涤，树脂氮气吹干，树脂用裂解液裂解后，过滤，裂解液倒入 MTBE 中，析出固体，用 MTBE 洗，得到粗品，粗品经 Pre-HPLC 制备得到 CR194AX。

[133] 4. 偶联体化合物 CR194AB 的合成

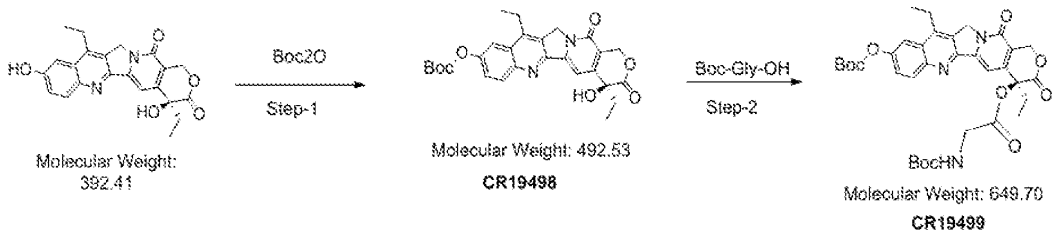


[134] 称取 CR194X2（1.0 eq）于 50 mL 单口瓶中，加入甲醇使其溶解，随后加入 10mM PBS 缓冲液，冰浴冷却搅拌 10 分钟，呈白色悬浊液，pH=8-9，加入 0.1M NaH_2PO_4 调

节 pH 至 pH=7，称取 CR194H4（结构参见图示）加入，控制 pH=7，反应冰浴搅拌 15 分钟，HPLC 中控原料反应完全，反应液交制备提纯冻干得到 CR194AB（结构参见图示）。

[135] 5. 偶联体化合物 CR194A2 的合成

[136] 步骤 1：CR19498 的制备

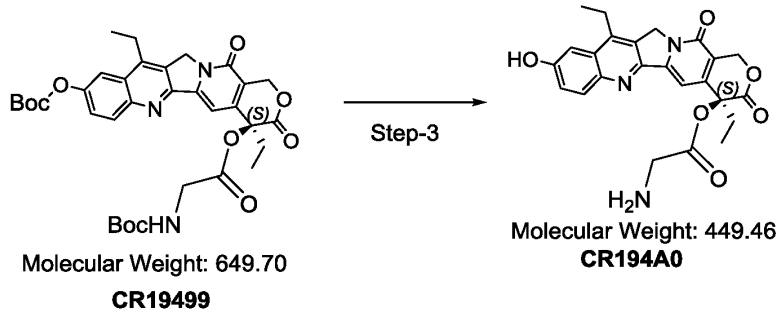


[137] 称取 SN38（1.0 eq）于 50mL 单口烧瓶中，加入 DMF 溶解，随后加入$(Boc)_2O$（1.2 eq）和 DIPEA（1.5 eq），室温搅拌过夜，TLC 中控原料反应完，将反应液倒入水中，EtOAc 萃取，有机相经无水硫酸钠干燥，减压旋蒸得到 CR19498（结构参见图示）。

[138] 步骤 2：CR19499 的制备

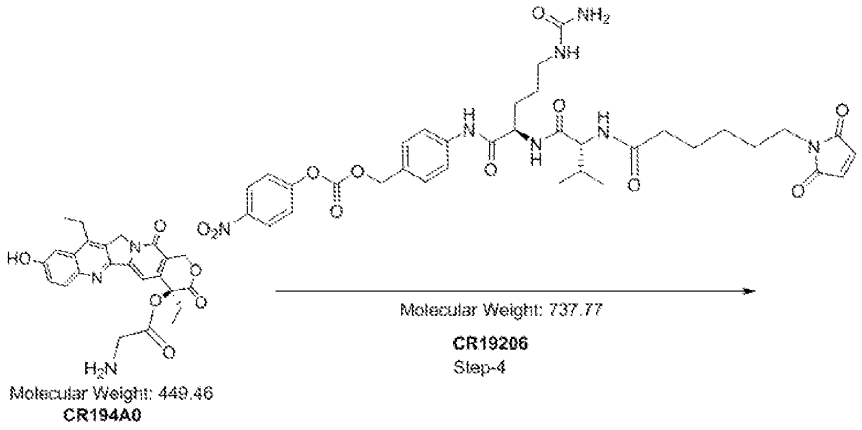
[139] 称取 CR19498（1.0 eq）和 Boc-Gly-OH（1.1 eq）于 50 mL 单口烧瓶中，加入 DMF 溶解，冰浴冷却，加入 HATU（1.1 eq），DMAP（0.1 eq）和 DIPEA（2 eq），随后移去冰浴室温搅拌 1 小时，加入水淬灭，EtOAc 萃取，有机相经无水硫酸钠干燥，减压旋蒸得到 CR19499（结构参见图示）。

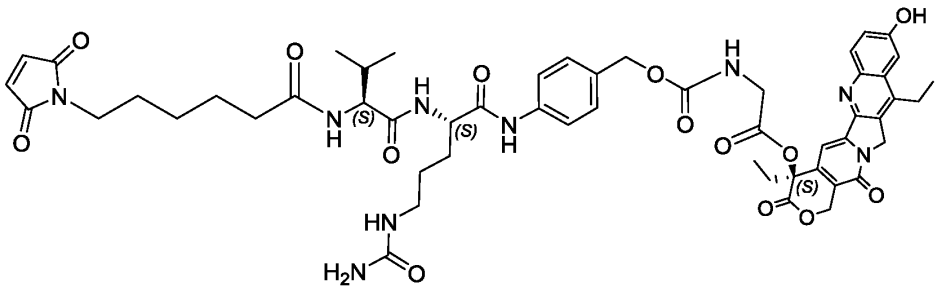
[140] 步骤 3：CR194A0 的制备



[141] 称取 CR19499（1.0eq）溶于 30% TFA 二氯甲烷溶液中，室温搅拌 1 小时，将反应液减压旋蒸除去 DCM 和 TFA，随后加入 MTBE，析出固体，抽滤得到 CR194A0（结构参见图示）。

步骤 4：CR194A1 的制备



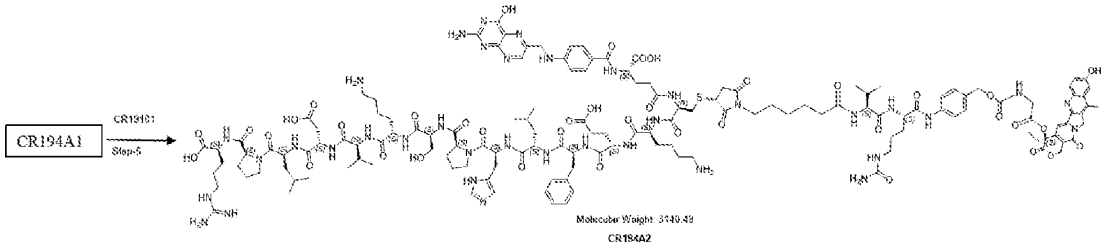


Molecular Weight: 1048.12

CR194A1

[142] 称取 CR194A0（1.0 eq）和 CR19206（1.05 eq），HOBT（0.1 eq）于 50 mL 单口烧瓶，加入 DMF 溶解，然后加入 DIPEA（2 eq），室温搅拌过夜，反应液交制备提纯冻干得到 CR194A1（结构参见图示）。

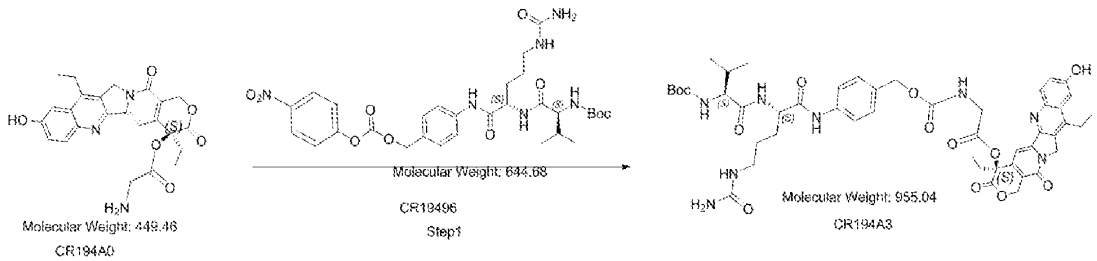
[143] 步骤 5（Step 5）：CR194A2 的制备



[144] 称取 CR194A1（1.0 eq）于 50 mL 单口瓶中，加入甲醇使其溶解，随后加入 10 mM PBS 缓冲液，冰浴冷却搅拌 10 分钟，pH=8-9，加入 0.1M NaH_2PO_4 调节 pH 至 pH=7，称取 CR19101（1.0 eq）加入，控制 pH=7，反应冰浴搅拌 15 分钟，HPLC 中控原料反应完全，反应液交制备提纯冻干得到 CR194A2（结构参见图示）。

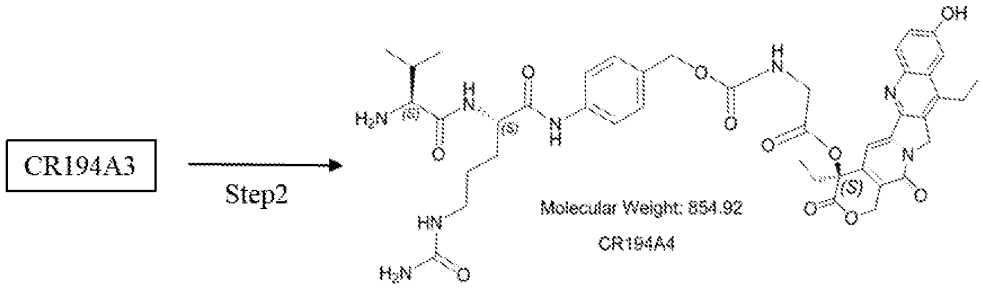
[145] 6. 偶联体化合物 CR194A6 的合成

[146] 步骤 1：CR194A3 的制备



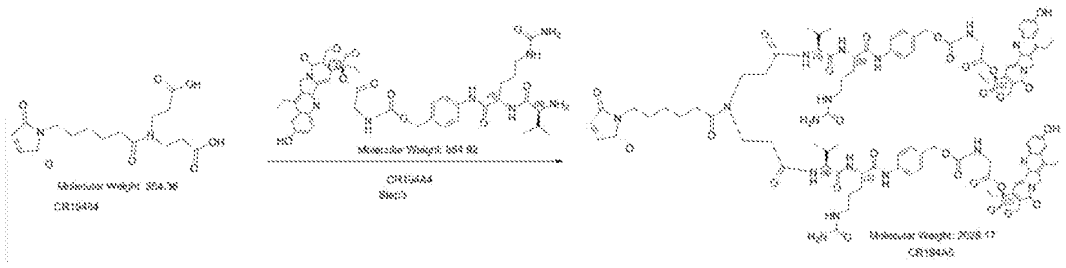
[147] 称取 CR194A0（1.0 eq）和 CR19496（1.05 eq），HOBT（0.1 eq）于 50 mL 单口烧瓶，加入 DMF 溶解，随后加入 DIPEA（2 eq），室温搅拌过夜，反应液交制备提纯冻干得到 CR194A3（结构参见图示）。

[148] 步骤 2：CR194A4 的制备



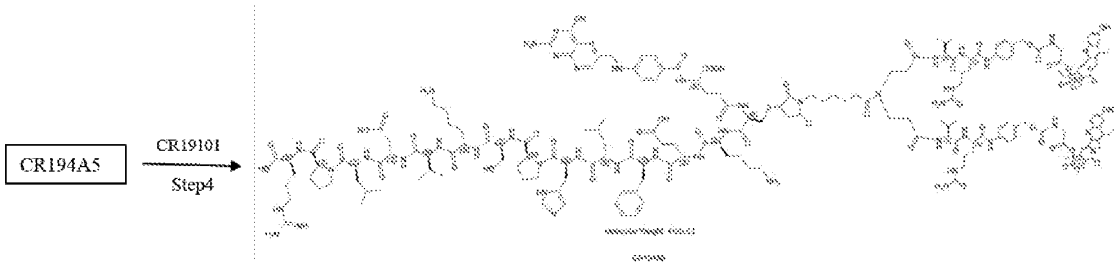
[149] 称取 CR194A3（1.0 eq）溶于 30% TFA 二氯甲烷溶液中，室温搅拌 1 小时，将反应液减压旋蒸除去 DCM 和 TFA，随后加入 MTBE，析出固体，抽滤得到 CR194A4（结构参见图示）。

[150] 步骤 3：CR194A5 的制备



[151] 称取 CR19484（1.0 eq）和 CR194A4（2.0 eq）于 50mL 单口烧瓶中，加入 DMF 溶解，冰浴冷却，随后加入 HATU（2.1 eq）和 DIPEA（3 eq），室温搅拌 2 小时，加 5%醋酸水淬灭，析出固体，抽滤得到 CR194A5 粗品，交制备纯化冻干得到 CR194A5（结构参见图示）。

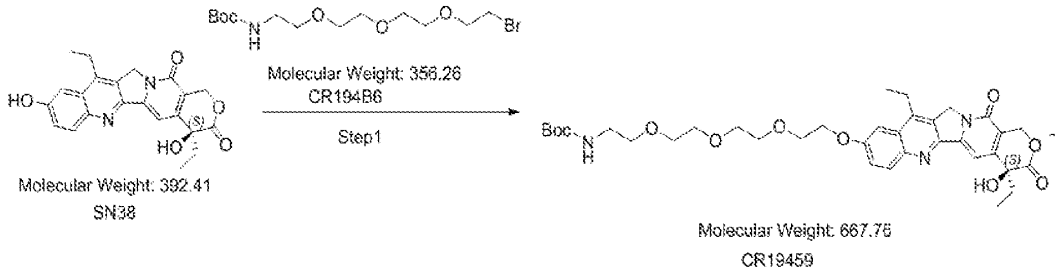
[152] 步骤 4：CR194A6 的制备



[153] 称取 CR194A5（1.0 eq）于 50 mL 单口瓶中，加入甲醇使其溶解，随后加入 10 mM PBS 缓冲液，冰浴冷却搅拌 10 分钟，pH=8-9，加入 0.1 M NaH_2PO_4 调节 pH 至 pH=7，称取 CR19101（1.0 eq）加入，控制 pH=7，反应冰浴搅拌 15 分钟，HPLC 中控原料反应完全，反应液交制备提纯冻干得到 CR194A6（结构参见图示）。

[154] 7. 偶联体化合物 CR19462 的合成

[155] 步骤 1：CR19459 的制备



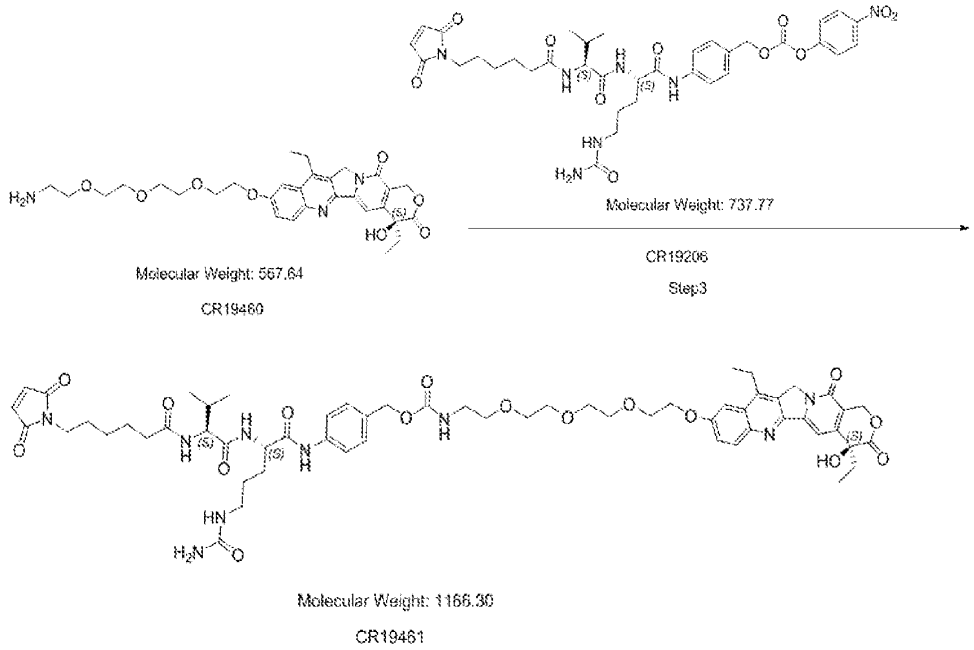
[156] 称取 SN38（1.0 eq）于 50mL 单口烧瓶中，加入 DMF 溶解，随后加入碳酸钾（1.5eq），CR194B6（1.2 eq），加热至 50℃，搅拌 5 小时，将反应液冰浴冷却，加入水淬灭，乙酸乙酯萃取，有机相用饱和氯化钠洗，经无水硫酸钠干燥后，浓缩除去溶解，硅胶柱纯化得到 CR19459（结构参见图示）。

[157] 步骤 2：CR19460 的制备



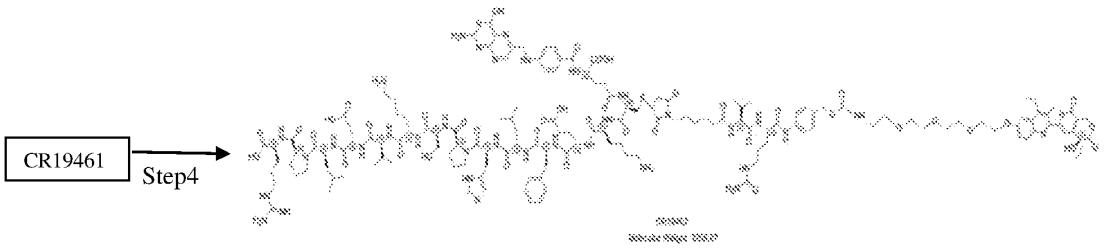
[158] 称取 CR19459（1.0 eq）于 50 mL 单口烧瓶中，加入 30% TFA 二氯甲烷溶液，室温搅拌 1 小时，减压旋蒸除去溶解，加入 MTBE，析出固体，抽滤，得到 CR19460（结构参见图示）。

[159] 步骤 3：CR19461 的制备



[160] 称取 CR19460（1.0 eq）和 CR19206（1.05 eq），HOBT（1.0 eq）于 50 mL 单口烧瓶，加入 DMF 溶解，随后加入 DIPEA（2.0 eq），室温搅拌过夜，反应液交制备提纯冻干得到 CR19461（结构参见图示）。

[161] 步骤 4：CR19462 的制备



[162] 称取 CR19461（1.0 eq）于 50 mL 单口瓶中，加入甲醇使其溶解，随后加入 10 mM PBS 缓冲液，冰浴冷却搅拌 10 分钟，pH=8-9，加入 0.1 M NaH_2PO_4 调节 pH 至 pH=7，称取 CR19101（1.0 eq）加入，控制 pH=7，反应冰浴搅拌 15 分钟，HPLC 中控原料反应完全，反应液交制备提纯冻干得到 CR19462。（结构参见图示）。

[163] 采用类似于上述的制备方法，可以制备其它本申请所述的偶联体化合物。

实施例 3 亲和实验

[164] 按照 Reichert SPR4 使用手册进行实验，分别测定分析物 CR194AR 与 FOLR1、TRPV6 的亲和力。其中 CM5 芯片分别偶联配体 FOLR1（义翘神州，货号 11241-H08H）、TRPV6（Acro，货号 MAES）。实验结果如下表 1 所示：

表 1：亲和力测试结果

名称	（FOLR1 端）KD (M)	（TRPV6 端）KD (M)
CR194AR	4.54E-10	7.88E-5

[165] 结果显示，CR194AR 和 FOLR1、TRPV6 均特异性结合，并显示出较高的亲和力。

[166] 与上述检测方式类似，本申请的其他偶联体化合物与相应的细胞表面受体均具有良好的亲和力。

实施例 4 细胞扩增抑制实验

[167] 样品信息：CR194AR、CR194X3、CR194V5、CR194AA、CR194AB、CR194U9、CR194Z9、CR194AH、CR194AY、CR194AX 和 Dx。

[168] 细胞系：HEK293T-FOLR1（FOLR1 过表达的稳转细胞株）、SK-BR-3（人乳腺癌细胞）和 HEK293T（人胚胎肾细胞）。FOLR1 在不同细胞系中的蛋白表达水平如下表 2 所示。

表 2：FOLR1 在不同细胞系中的蛋白表达水平

细胞系	**FOLR1**
HEK293T-FOLR1	+++（高表达）

SK-BR-3	+（低表达）
HEK293T	-（无可见表达）

[169] 主要试剂：1640 无叶酸培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺和 CCK8。

[170] 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 HEK293T-FOLR1 和 HEK293T 细胞稀释成 6×10^3 个细胞/ml，SK-BR-3 细胞稀释成 1.5×10^4 个细胞/ml，铺 96 孔板，每个孔加入 100 μl 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℃，5%CO_2 培养箱培养过夜。

(2) 稀释加样：将样品用培养基进行梯度稀释（开始浓度 30 μM，5 倍梯度稀释），共设置 10 个浓度梯度。按照每孔 50 μl 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℃，5%CO2 培养箱培养 72 小时。

(3) 显色读板：取 CCK-8 显色液，每孔加入 15 μl（孔内液体体积的 10%），37℃孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.5 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices SpectraMax iD5），450nm 读取数值。

(4) 数据处理：用 SoftMax Pro 7.1 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

[171] 实验结果如下表 3 所示：

表 3：对 HEK293T-FOLR1、SK-BR-3 和 HEK293T 细胞的抑制活性

样品名称	**HEK293T-FOLR1** IC_{50}	**HEK293T** IC_{50}	**SK-BR-3** IC_{50}
CR194AR	0.4	2371	52
CR194X3	1.594	5.035	4.024
CR194V5	2.17	8.284	4.961
CR194AA	0.633	18.13	5.085
CR194AB	0.58	27.38	6.149

CR194U9	1.541	180.6	35.37
CR194Z9	1.19	145.7	20.06
CR194AH	0.308	346	38.78
CR194AY	0.755	5143	50.42
CR194AX	0.195	1211	132.6
Dx	1.017	1.12	0.599

[172] 由表 3 可知，CR194AR、CR194AB、CR194U9、CR194Z9、CR194AH、CR194AY、CR194AX、CR194X3、CR194V5 和 CR194AA 针对受体相对高表达的细胞株 HEK293T-FOLR1 和 SK-BR-3 显示出的 IC_{50} 明显低于受体相对低表达的细胞株 HEK293T。可见上述化合物显示出了与细胞相关受体表达水平相关的抑瘤效果，在抑制肿瘤细胞增殖的过程中起重要作用。

[173] 样品信息：CR194A2、CR194A6、CR194N5、CR194N9、CR194P6、CR194P3、CR194S3、CR194R8、、CR194L4、CR194U7、CR194Q1、CR194Q5、CR194U9、CR194R7、Dxd、Dx 和 SN38。

[174] 细胞系：HEK293T-FOLR1（FOLR1 过表达的稳转细胞株）、SK-BR-3（人乳腺癌细胞，低表达 FOLR1）和 MIA PaCa-2（人胰腺癌细胞，不表达 FOLR1）。

[175] 主要试剂：1640 无叶酸培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液、L-谷氨酰胺和 CCK8。

[176] 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 SK-BR-3 细胞稀释成 3.0×10^4 个细胞/ml，HEK293T-FOLR1 细胞稀释成 1.5×10^4 个细胞/ml，MIA PaCa-2 细胞稀释成 2.0×10^4 个细胞/ml，铺 96 孔板，每个孔加入 100 μl 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℃，5%CO_2 培养箱培养过夜。

(2) 稀释加样：将样品用培养基进行梯度稀释（开始浓度 30 μM，5 倍梯度稀释），共设置 10 个浓度梯度。按照每孔 50 μl 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℃，5%CO2 培养箱培养 72 小时。

(3) 显色读板：取 CCK-8 显色液，每孔加入 15 μl（孔内液体体积的 10%），37℃孵育适宜时间（尽量使 OD 值在 1.0-2.5 范围内），96 孔板去掉培养板盖，置于酶标仪（Molecular Devices SpectraMax iD5），450nm 读取数值。

(4) 数据处理：用 SoftMax Pro 7.1 进行数据编辑，绘四参数拟合曲线。

[177] 实验结果如下表 4 所示：

表 4：对 HEK293T-FOLR1、SK-BR-3 和 MIA PaCa-2 细胞的抑制活性

样品名称	**HEK293T-FOLR1** IC_{50}	**MIAPACA-2** IC_{50}	**SK-BR-3** IC_{50}
CR194A2	1.069	20.15	12.6
CR194A6	2.513	15.54	1.719
CR194N5	2.754	19.79	3.204
CR194N9	4.957	16.9	3.239
CR194P6	200.9	434.8	283.1
CR194P3	1.473	75.28	20.27
CR194S3	0.76	10.04	1.051
CR194R8	0.269	0.412	0.537
CR194L4	0.436	23.76	/
CR194U7	18.66	148.8	29
CR194Q1	0.935	/	2508
CR194Q5	0.908	1.35	126
CR194U9	26.04	1064	237.5
CR194R7	0.132	262.5	62.42
Dxd	1.677	110.9	/
Dx	0.995	5.529	0.569

SN38	0.943	7.027	0.947

注：“/”表示未拟合出有效的 IC_{50} 值。

实施例 5 CR194AX、CR194X3 和 CR194AR 在 CDX 模型中的药效学研究

[178] 实验目的：研究偶联物化合物 CR194AX、CR194X3 和 CR194AR 在 FOLR1 过表达的 293T-FOLR1 细胞株皮下异体移植模型（CDX）中的药效。

[179] CDX 模型：293T-FOLR1

[180] 实验方案：将准备好的细胞，接种于 BALB/c-nude 小鼠右侧皮下，当肿瘤体积扩增到 100-150 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。

[181] 实验结果如下表 5 所示。由实验结果可知，测试样品 CR194AX、CR194X3 和 CR194AR 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。CR194AX、CR194X3 和 CR194AR 在中剂量（3 mg/kg）下，与阴性对照组相比，都有一定的抗肿瘤生长的作用；在高剂量（10 mg/kg）下，与阴性对照组相比，都有优异的抗肿瘤生长的作用，抗肿瘤作用显示出剂量相关性，数据如表 5 所示。

表 5：在 293T-FOLR1 细胞株皮下异体移植模型（CDX）中的药效

测试样品	模型	FOLR1 表达水平	TRPV6 表达水平	抑瘤率（TGI）(%)	给药剂量（时间）
CR194AX	293T-FOLR1	+++	-	-5.94	1 mg/kg（第 1、8、15 天）
				73.35	3 mg/kg （第 1、8、15 天）
				97.95	10 mg/kg（第 1、8、15 天）
CR194X3				53.15	1 mg/kg（第 1、8、15 天）
				64.80	3 mg/kg（第 1、8、15 天）
				89.98	10 mg/kg（第 1、8、15 天）
CR194AR				-9.95	1 mg/kg（第 1、8、15 天）
				58.21	3 mg/kg（第 1、8、15 天）
				96.37	10 mg/kg（第 1、8、15 天）

实施例 6 偶联体化合物在在 CDX 模型中的药效学研究

[182] 实验目的：研究偶联体化合物 CR194Q1、CR194V5、CR194AH、CR194X3、CR194U9、CR194Z9、CR194AB、CR194AX、CR194AY 和 CR194AR 在 CFPAC-1 的 CDX 模型中的药效。

[183] CDX 模型：CFPAC-1（人胰腺癌细胞）

[184] 实验方案：将准备好的细胞，接种于 BALB/c-nude 小鼠右侧皮下，当肿瘤体积扩增到 100-150 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。

[185] 实验结果如下表 6 所示。由实验结果可知，测试样品 CR194Q1、CR194V5、CR194AH、CR194X3、CR194U9、CR194Z9、CR194AB、CR194AX、CR194AY 和 CR194AR 对小鼠 CFPAC-1 的 CDX 肿瘤模型均有较好的抑制作用。

测试样品	模型	FOLR1 表达水平	TRPV6 表达水平	抑瘤率（TGI）(%)	给药剂量/时间
CR194V5	CFPAC-1	++	-	85.11	25 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194AH				81.64	25 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194U9				88.85	25 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194Z9				90.26	25 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194AB				71.60	25 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194Q1				93.84	25 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
				99.84	50 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
				99.75	75 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194X3				87.71	25 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
				98.53	50 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
				99.70	75 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194AX				99.54	50 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194AY				33.46	50 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）
CR194AR				99.55	50 mg/kg（第 1、4、7、10、13 天）

实施例 7 偶联体化合物对 HuPrime®异体移植 PDX 模型的抑瘤实验

[186] 实验目的：偶联体化合物 CR194Q1、CR194X3、CR194AX、CR194AR 和 CR194AY 在 OV2423 的 PDX 模型上的药效学研究

[187] 模型：卵巢癌动物模型 OV2423，来源于中美冠科生物技术（太仓）有限公司

[188] 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 80-160 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、相对肿瘤增值率和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。

[189] 实验结果如下表 7 所示。由实验结果可知，测试样品 CR194Q1、CR194X3、CR194AX、CR194AR 和 CR194AY 在 FOLR1 单表达模型 OV2423 中显现出优异的抗肿瘤生长的作用。

测试样品	模型	FOLR1	TRPV6	TGI(%)	剂量/时间
CR194Q1	OV2423	9+	-	100	25 mg/kg,（第 1、4、7、10、13、16 天）
CR194Q1				100	50 mg/kg,（第 1、4、7、10、13、16 天）
CR194X3				84.02	10 mg/kg,（第 1、4、7、10、13、16 天）
CR194X3				94.92	25 mg/kg,（第 1、4、7、10、13、16 天）
CR194AX				99.41	25 mg/kg,（第 1、4、7、10、13、16 天）
CR194AR				99.37	25 mg/kg,（第 1、4、7、10、13、16 天）
CR194AY				92.16	25 mg/kg,（第 1、4、7、10、13、16 天）

实施例 8 偶联体化合物在 MIAPaca-2 人胰腺癌模型 BALB/c nude 小鼠上的安全性评价

[190] 实验目的：测试偶联体化合物等剂量条件下对 MIAPaCa-2 人胰腺癌细胞皮下移植荷瘤裸鼠模型毒性的影响。

[191] 样品准备：称取适量的化合物，用 PBS 溶解，加适量的碱性溶液配制成 PH 为中性的样品母液，过滤，用已过滤生理盐水稀释母液到工作浓度样品溶液，备用。

[192] 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 80-160 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；同时每周 2 次以游标卡尺测量肿瘤长径、短径，并计算肿瘤体积、相对肿瘤增值率和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。实验设计如下表 8 所示。

组别	动物数	测试物	剂量（mg/kg）	给药方式	计划给药周期
1	6	对照	-	-	-
3	6	CR194L4	100	iv	每 3 天一次，共给药 6 次（q3d*6）
4	6	CR194A6	100	iv	每 3 天一次，共给药 3 次（q3d*3）
5	6	CR194N5	100	iv	q3d*3
6	6	CR194P6	100	iv	q3d*3

[193] 如图 1A-1B 所示，CR194L4（100mg/kg iv q3d*6）和 CR194A6（100mg/kg iv q3d*3）对 MIAPaCa-2 抑瘤性效果较好。CR194L4（100mg/kg iv q3d*6）在第一次给药后，整组体重值一直缓慢降低，但是在第四次给药后，停止给药，动物体重值呈缓慢上升状态；CR194A6（100mg/kg iv q3d*3）在实验日 d2 死亡一只实验动物，同组实验动物的体重值呈缓慢增加状态；其余组实验动物的体重值呈缓慢波动状态，但是整体趋势是增加的。

实施例 9 偶联体化合物 CR194AX 在 ICR 小鼠上的安全性评价

[194] 实验目的：CR194AX 在 ICR 小鼠上的安全性评价

[195] 样品准备：称取适量的 CR194AX，用 PBS 溶解，加适量的碱性溶液配制成 pH 为中性的样品母液，过滤，用已过滤 PBS 稀释母液到工作浓度样品溶液，备用。

[196] 实验设计：将 ICR 小鼠（雌性，6-8 周龄，体重 25g 左右）根据体重随机分组，分组第一天开始给药，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，检测药物对动物正常行为的影响，包括实验动物的活动性、摄食和饮水情况、体重、眼睛、被毛、粪便、分泌物以及其它异常情况。每周测量 2 次小鼠

体重，最后一次给药后观察 8 天。实验结束时，肝脏、脾脏称重，取肝、脾、肺、肾和胃置于 10%福尔马林中性固定液中做 HE 分析。样品准备：称取适量的化合物，用 PBS 溶解，加适量的碱性溶液配制成 PH 为中性的样品母液，过滤，用已过滤生理盐水稀释母液到工作浓度样品溶液，备用。

[197] 实验结果与分析： CR194AX 50mg/kg，每周给药一次，给药 3 次（qw*3）和每三天给药一次，给药 6 次（q3d*6），给药期间未出现小鼠死亡，小鼠平均体重下降未超过 10%，显示较好的耐受性；CR194AX 25 mg/kg q3d*6 给药期间未出现小鼠死亡，小鼠平均体重下降未超过 5%，显示良好的耐受性（见图 2A-2B）。实验终点取肝脏、脾脏结果显示：和阴性对照组相比，各给药组小鼠的肝脏、脾脏重量无显著性差异。

实施例 10 偶联体化合物 CR194X3 在 BALB/c nude 小鼠上的安全性评价

[198] 实验目的：CR194X3 在 BALB/c nude 小鼠上的安全性评价

[199] 样品准备：称取适量的 CR194X3，用 PBS 溶解，加适量的碱性溶液配制成 pH 为中性的样品母液，过滤，用已过滤 PBS 稀释母液到工作浓度样品溶液，备用。

[200] 将 BALB/c nude 小鼠（雌性、6-8 周龄、体重 25 g 左右），根据体重随机分组（每组 6 只），分组第一天开始给药，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，检测药物对动物正常行为的影响，包括实验动物的活动性、摄食和饮水情况、体重、眼睛、被毛、粪便、分泌物以及其它异常情况。每周测量 2 次小鼠体重，最后一次给药后观察 7 天。实验结束时，肝脏、脾脏称重，取肺、肝、脾、小肠，置于 10%福尔马林中性固定液中做 HE 分析。

[201] 实验结果与分析：小鼠对测试物 CR194X3（150 mg/kg）耐受较好。实验终点取肝脏、脾脏结果显示：和阴性对照组相比，各给药组小鼠的肝脏、脾脏重量无显著性差异。

实施例 11 CR194AX 和 CR194X3 在 SD 大鼠上的安全性评价

[202] 实验目的：CR194 系列化合物在 SD 大鼠上的安全性评价

[203] 样品准备：称取适量的化合物，用生理盐水溶解，加适量的碱性溶液配制成 PH 为中性的样品母液，过滤，用已过滤生理盐水稀释母液到工作浓度样品溶液，备用。

[204] 实验方案：将 SD 大鼠（雌性、体重 160-180 g），根据体重随机分组（每组 5 只），分组第一天开始给药，根据大鼠最近一次的体重调整给药量，尾静脉注射，给药体积为 10 ml/kg。分组给药后，检测药物对动物正常行为的影响，包括实验动物的活动性、摄食和饮水情况、体重、眼睛、被毛、粪便、分泌物以及其它异常情况。每周测量 2 次大鼠体重，给药后观察 14 天。

[205] 实验结果与分析：各给药组动物体重从给药后到第 3 天持续下降，但未超过 10%。临床观察无异常情况（图 3A-3B）。

权 利 要 求 书

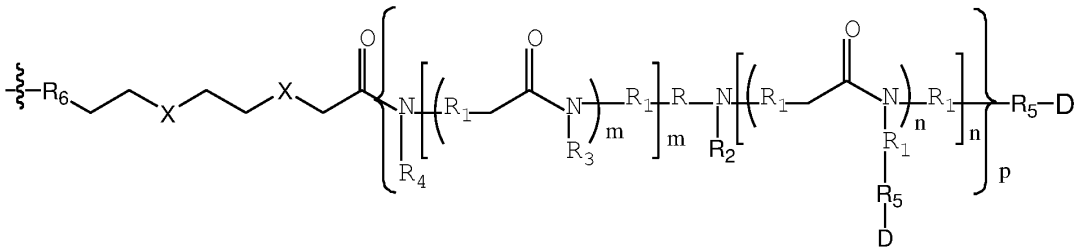
1. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

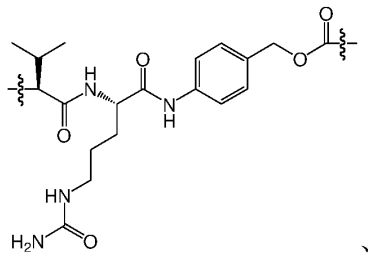
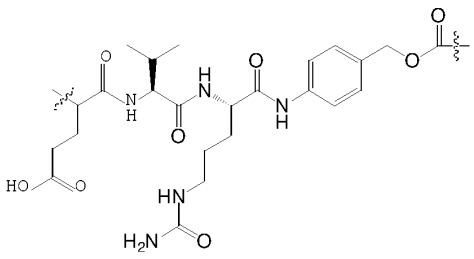
其中：

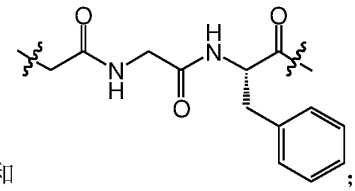
所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

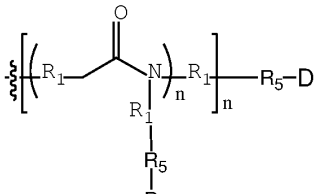


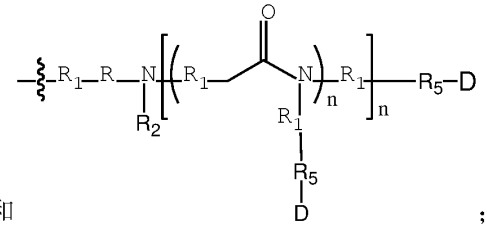
其中：

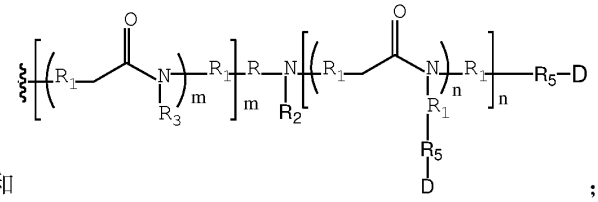
R 选自 、

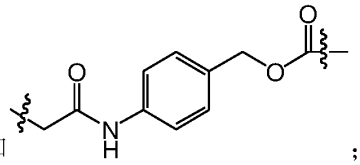
和 ；

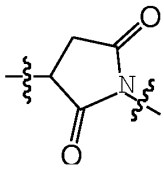
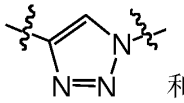
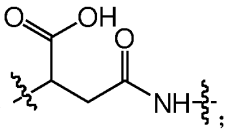
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_2 各自独立地选自氢和  ；

R_3 各自独立地选自氢和  ；

R_4 各自独立地选自氢和  ；

R_5 各自独立地选自键、$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2-$、$-CH_2C(O)-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2C(O)-$和  ；

R_6 各自独立地选自键、  、  和  ；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

m 各自独立地为 0 或 1；

n 各自独立地为 0 或 1；

p 为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

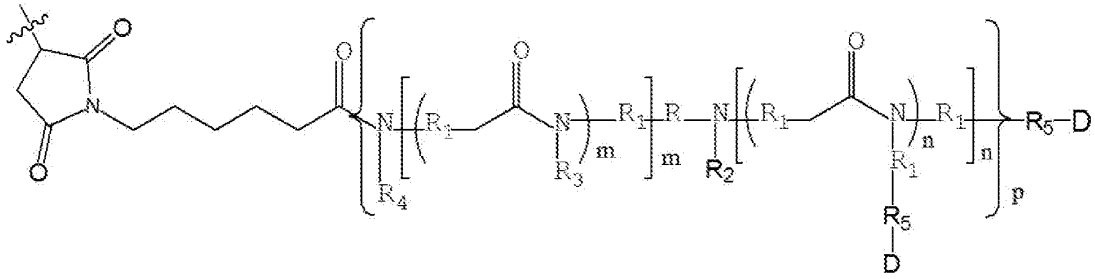
2. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

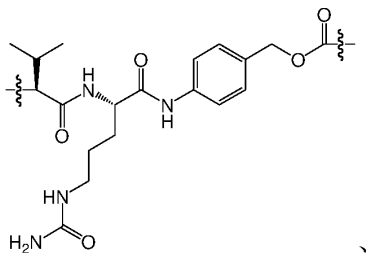
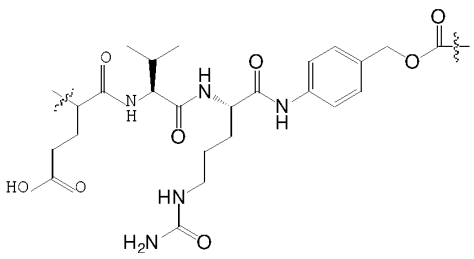
其中：

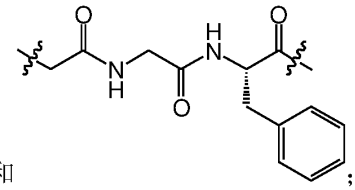
所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

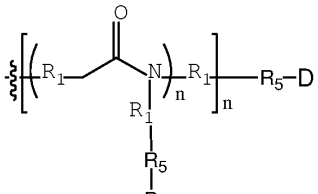


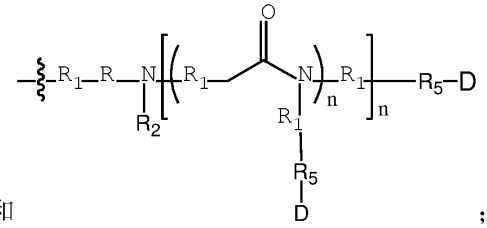
其中：

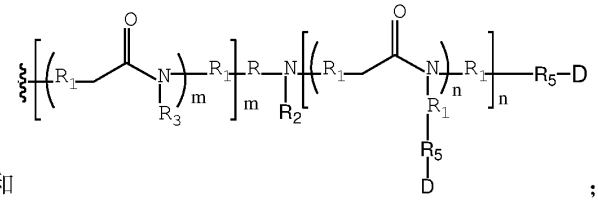
R 选自 、

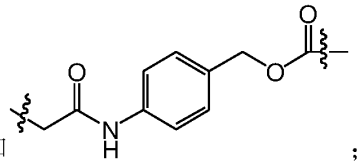
和 ；

R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_2 各自独立地选自氢和  ；

R_3 各自独立地选自氢和  ；

R_4 各自独立地选自氢和  ；

R_5 各自独立地选自键、$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2-$、$-CH_2C(O)-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2C(O)-$和  ；

m 各自独立地为 0 或 1；

n 各自独立地为 0 或 1；

p 为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

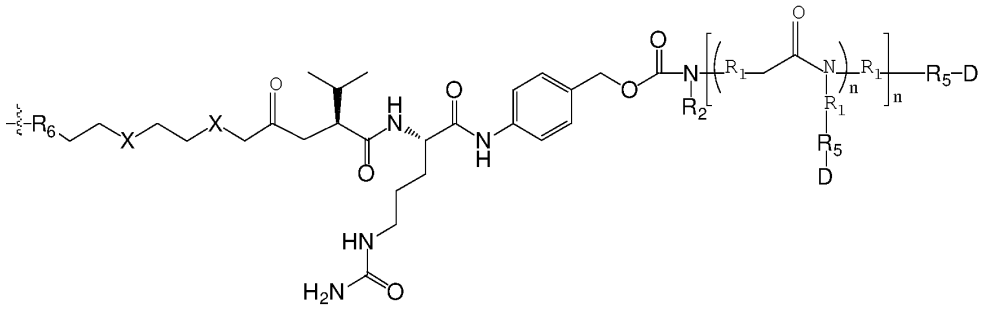
3. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

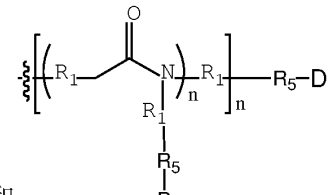
所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

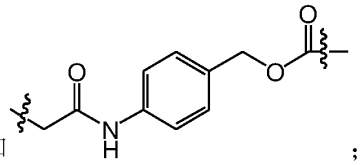
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

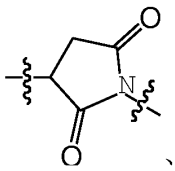
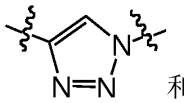
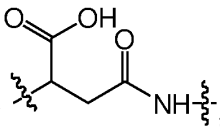


其中：

R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_2 各自独立地选自氢和  ；

R_5 各自独立地选自键、-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-、-$CH_2C(O)$-、-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-和  ；

R_6 各自独立地选自键、  、  和  ；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

n 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

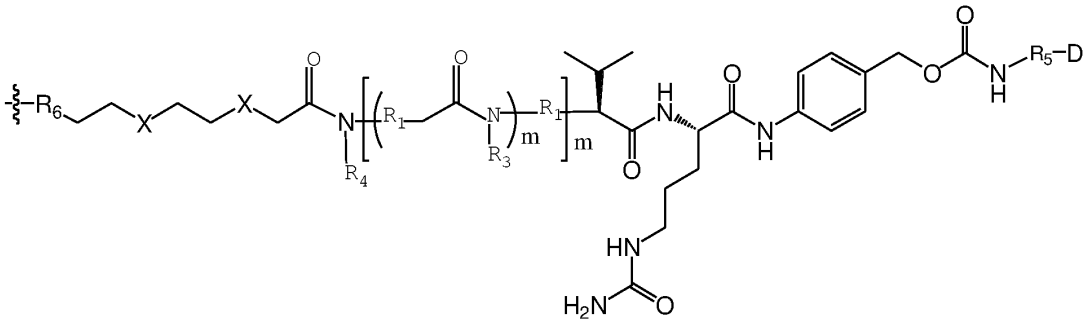
4. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

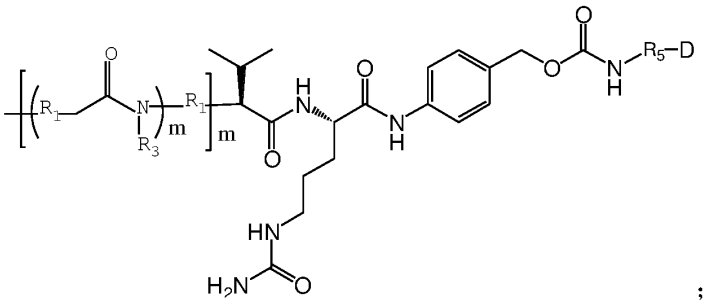
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

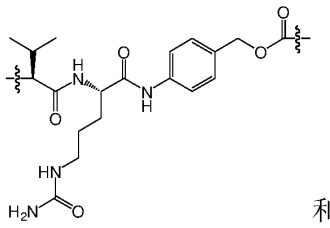
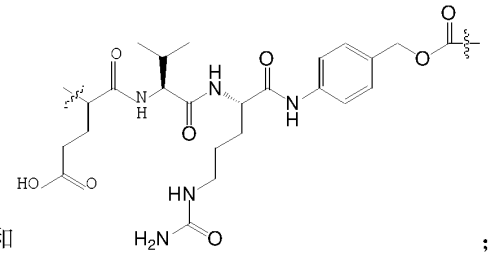


其中：

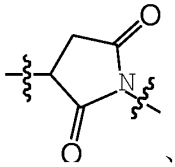
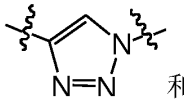
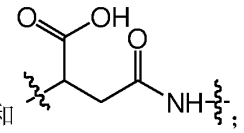
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_3 各自独立地选自氢和-R_1-R-NH-R_5-D；

R_4 为氢或  ；

R 选自  和 ；

R_5 各自独立地选自键、$-(CH_2CH_2O)_3-CH_2CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2-$、$-CH_2C(O)-NH-CH_2C(O)-$和$-CH_2C(O)-$；

R_6 各自独立地选自键、、和；

X 各自独立地选自键、C 和 O；

m 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

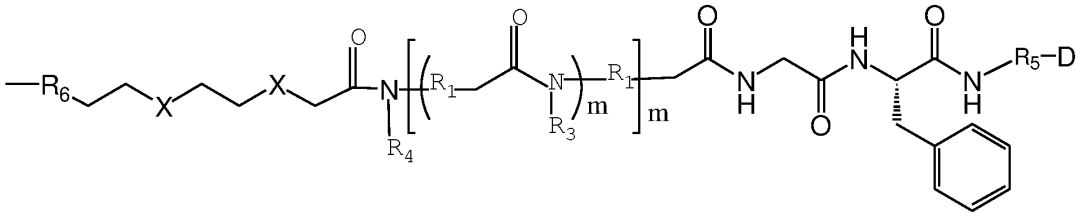
5. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，所述偶联体化合物具有以下结构：

多配体部分—(连接子—有效载荷)$_q$，

其中：

所述多配体部分包含至少两个靶向不同细胞表面分子的配体，

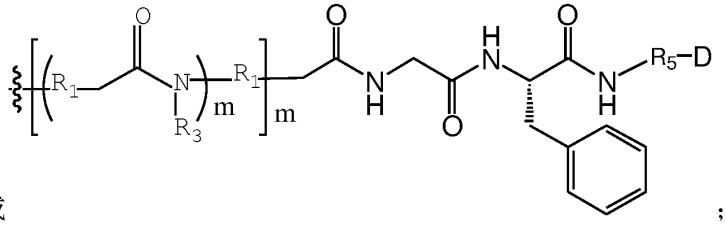
所述连接子-有效载荷部分具有以下结构：

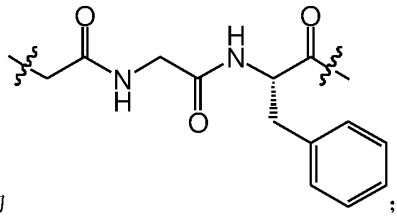


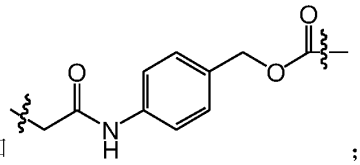
其中：

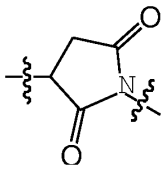
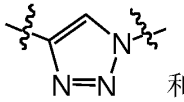
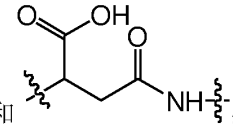
R_1 各自独立地选自键和-$CH_2CH_2C(O)$-NH-；

R_3 各自独立地选自氢和-R_1-R-NH-R_5-D；

R_4 为氢或  ；

R 为  ；

R_5 各自独立地选自键、-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-、-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-、-$CH_2C(O)$-和  ；

R_6 各自独立地选自键、  、  和  ；

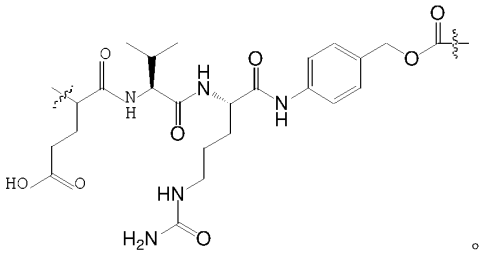
X 各自独立地选自键、C 和 O；

m 各自独立地为 0 或 1；

q 为 1 至 4 的整数；

D 为有效载荷。

6. 根据权利要求 1 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 R 为



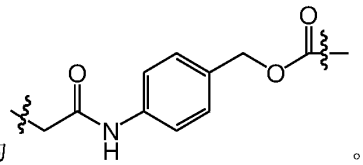
。

7. 根据权利要求 1-6 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 R_1 为-$CH_2CH_2C(O)$-NH-。

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 R_5 为-$(CH_2CH_2O)_3$-CH_2CH_2-。

9. 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 R_5 为-$CH_2C(O)$-NH-$CH_2C(O)$-。

10. 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 R_5 为-$CH_2C(O)$-。

11. 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 R_5 为  。

12. 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 R_5 为-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-。

13. 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 R_5 不是-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-。

14. 根据权利要求 1-13 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 m 各自独立地为 0 或 1，且 n 为 0。

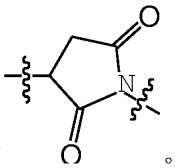
15. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其

中 m 为 0，且 n 各自独立地为 0 或 1。

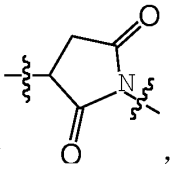
16. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 m 为 0，且 n 为 0。

17. 根据权利要求 1-13 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 m 为 0，n 为 0，且 R_5 不是-$CH_2C(O)$-NH-CH_2-。

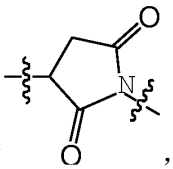
18. 根据权利要求 1 或 3-17 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，

其中 R_6 为  。

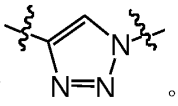
19. 根据权利要求 1 或 3-18 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，

其中 R_6 为  ，且 X 为键。

20. 根据权利要求 1 或 3-18 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，

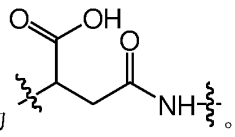
其中 R_6 为  ，且 X 为 O。

21. 根据权利要求 1 或 3-17 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 R_6 为  。

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 X 为键。

23. 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 X 为 O。

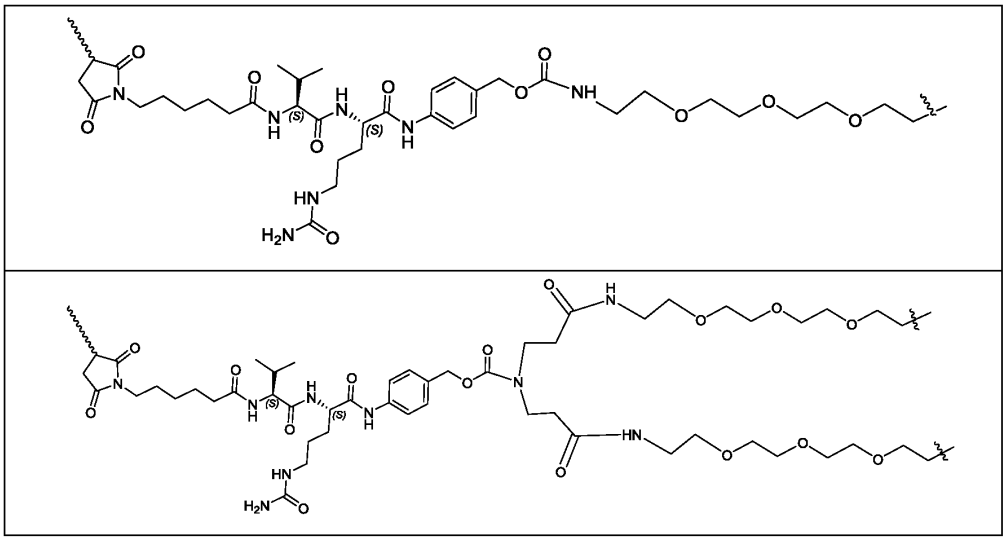
24. 根据权利要求 1 或 3-17 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 R_6 为 。

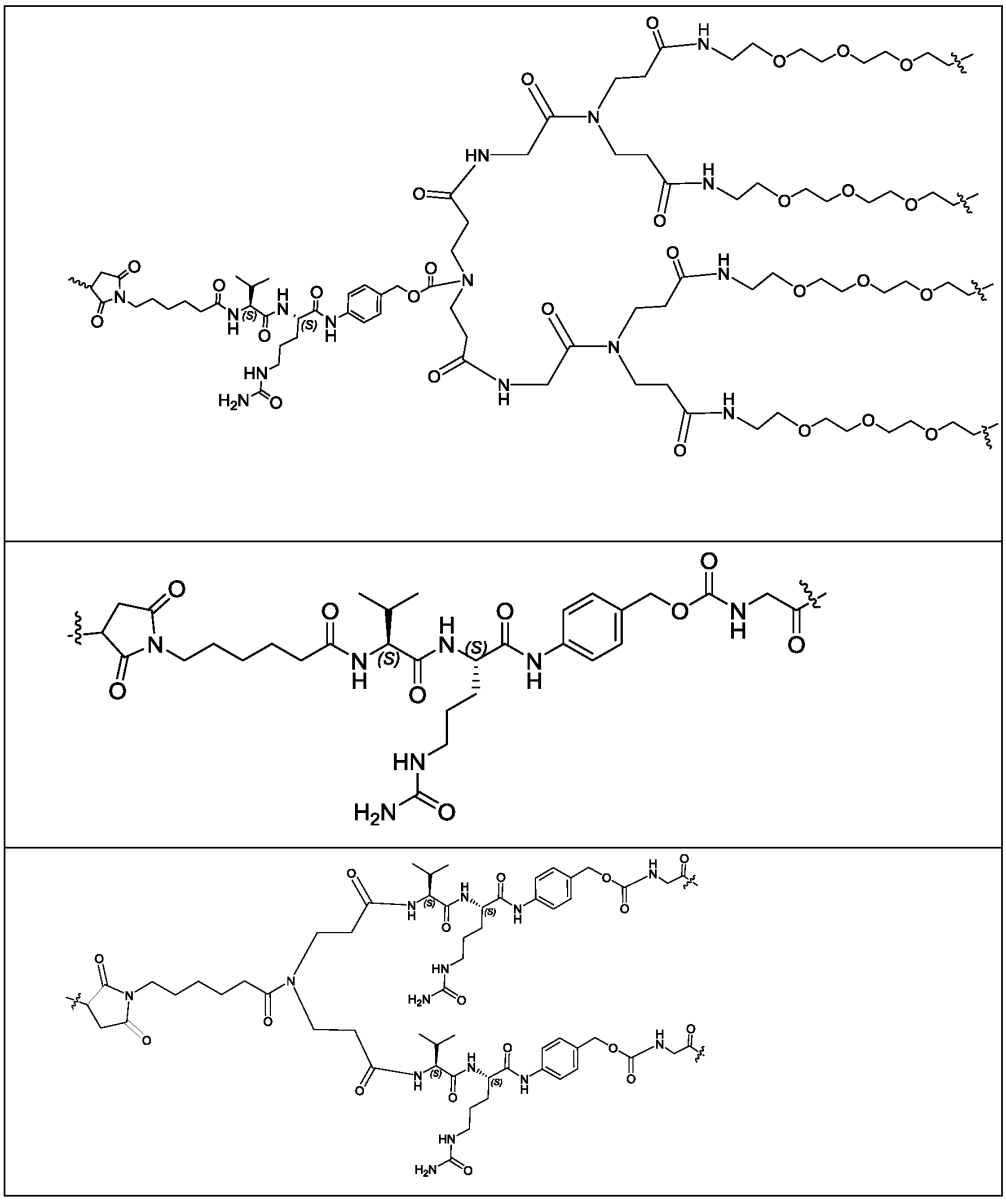
25. 根据权利要求 24 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 X 为键。

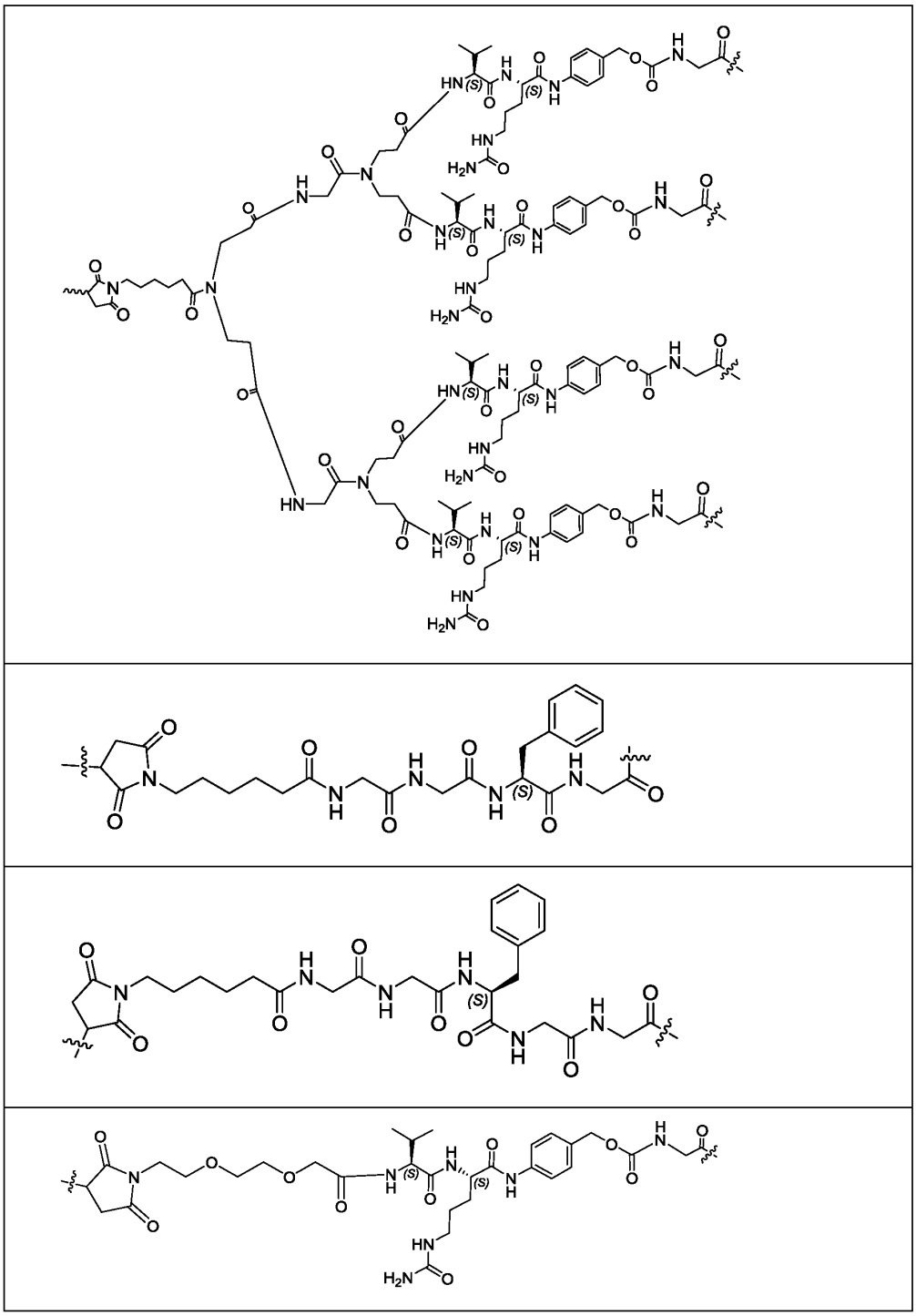
26. 根据权利要求 24 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 X 为 O。

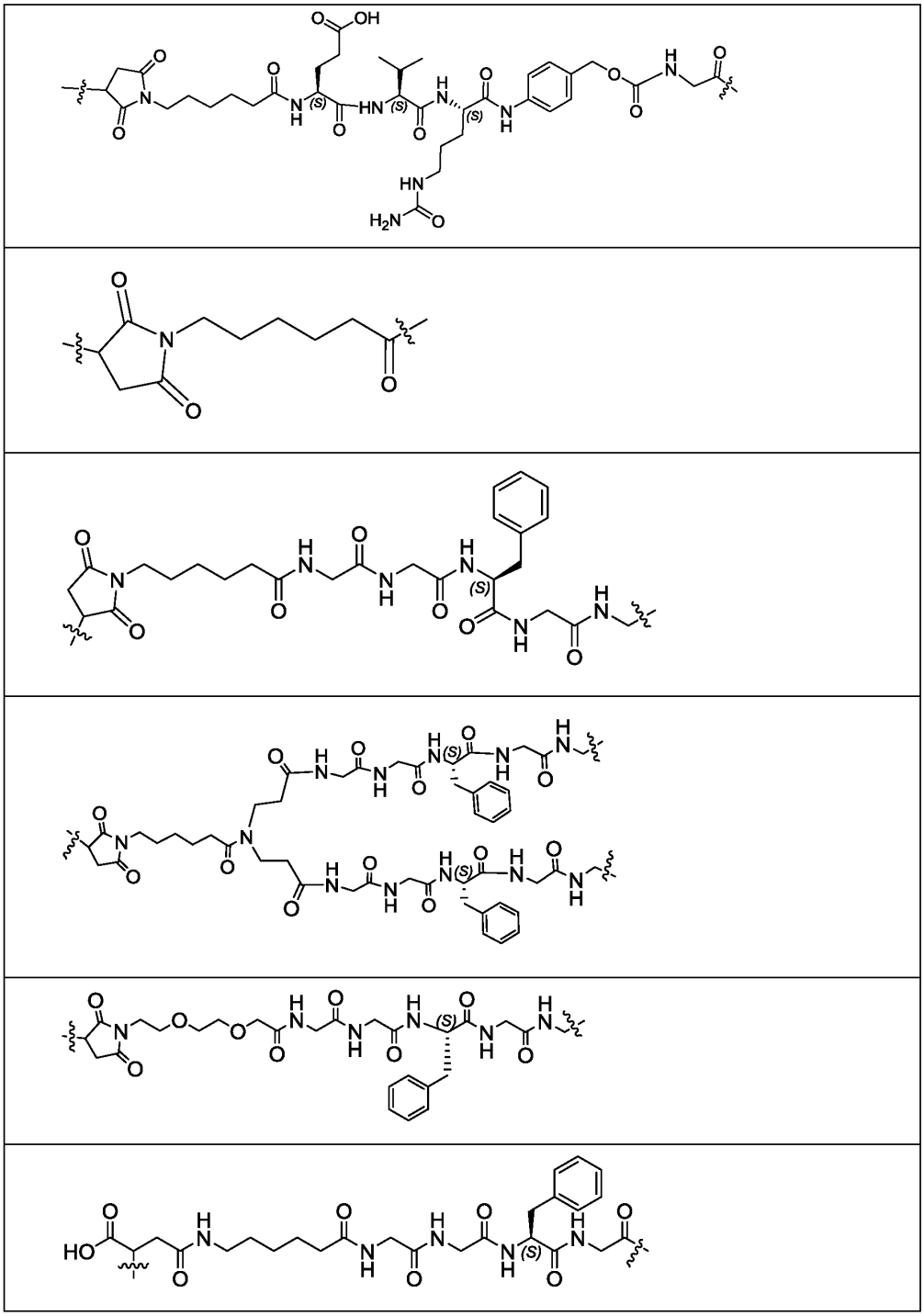
27. 根据权利要求 1-2 或 7-26 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 p 为 0。

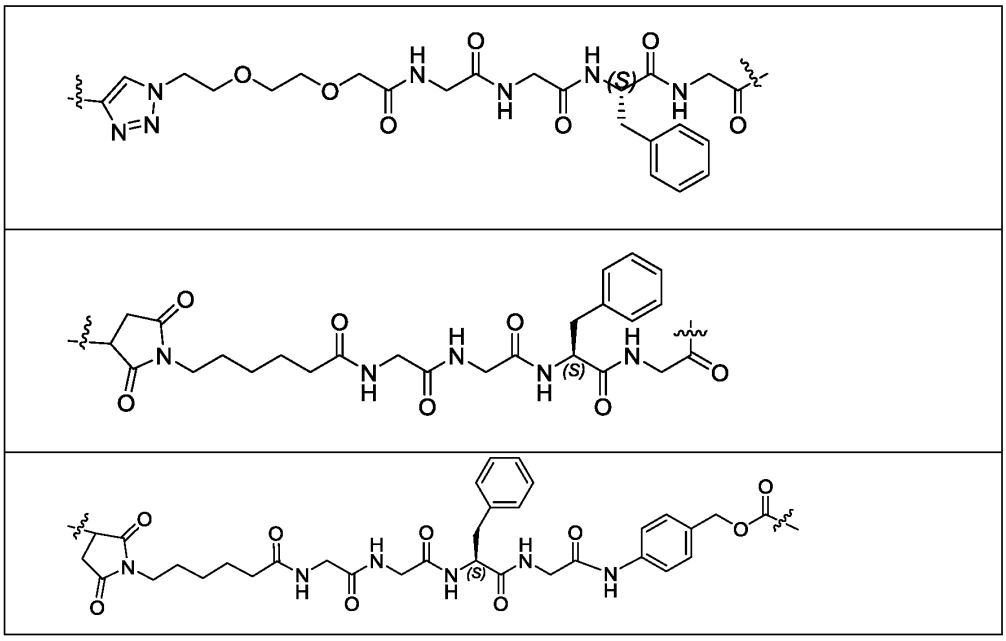
28. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述连接子具有选自下组的结构：





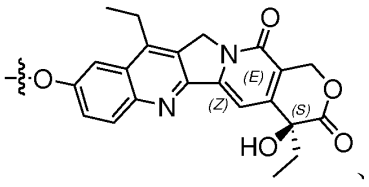
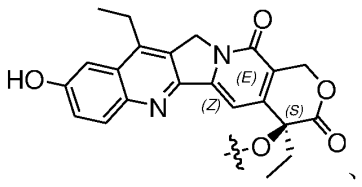


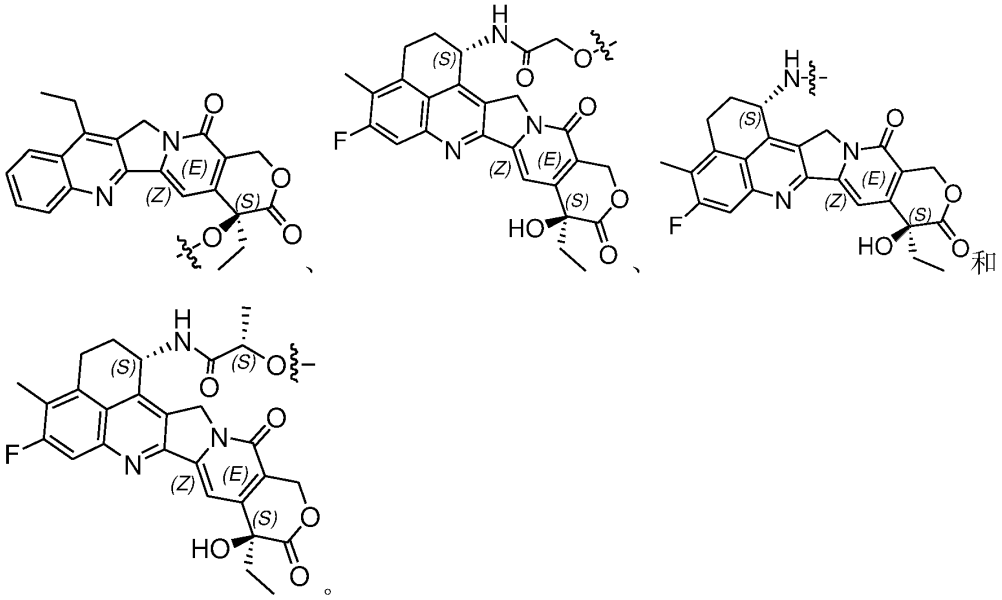




29. 根据权利要求 1-28 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述有效载荷选自下组：小分子化合物、核苷酸和肽，优选地，所述有效载荷是小分子化合物。

30. 根据权利要求 29 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、美登素及其任何衍生物、放射性金属络合物、环氧化酶-2 抑制剂及其任何衍生物、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、和丝裂霉素 C 及其任何衍生物，优选地，所述小分子化合物是喜树碱及其任何衍生物，优选地，所述喜树碱是依喜替康。

31. 根据权利要求 1-30 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 D 各自独立地选自 、、



32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述细胞表面分子选自 TRPV6、FOLR1、PSMA 和 SSTR2。

33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述细胞表面分子分别为 TRPV6 和 FOLR1、PSMA 和 FOLR1、或 SSTR2 和 FOLR1。

34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述细胞表面分子分别为 TRPV6 和 FOLR1。

35. 根据权利要求 32-34 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中靶向 FOLR1 的配体选自叶酸或其类似物，优选的，所述叶酸类似物选自 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，其中靶向 SSTR2 的配体选自奥曲肽及其任何类似物。

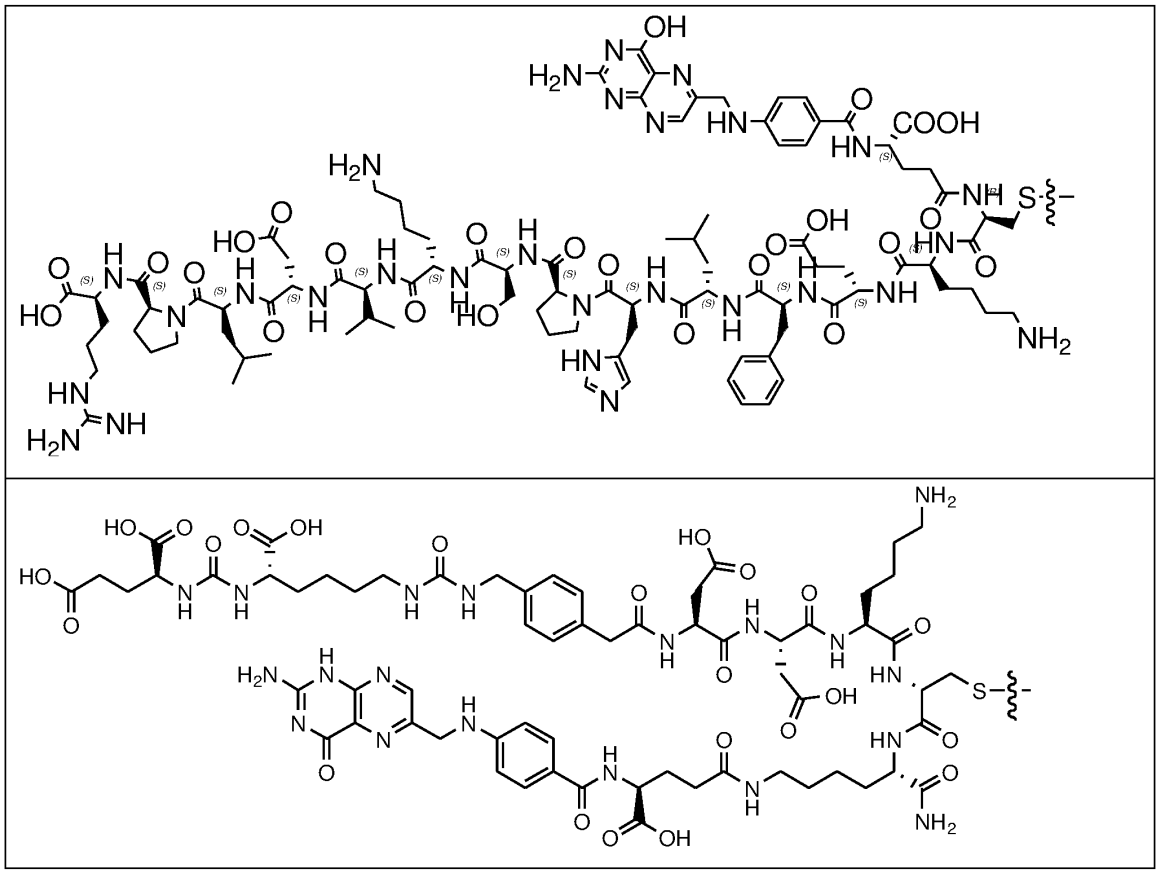
36. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述配体部分包含三个以上的靶向细胞表面分子的配体，优选地，所述细胞表面分子选自 TRPV6、FOLR1、PSMA 和 SSTR2。

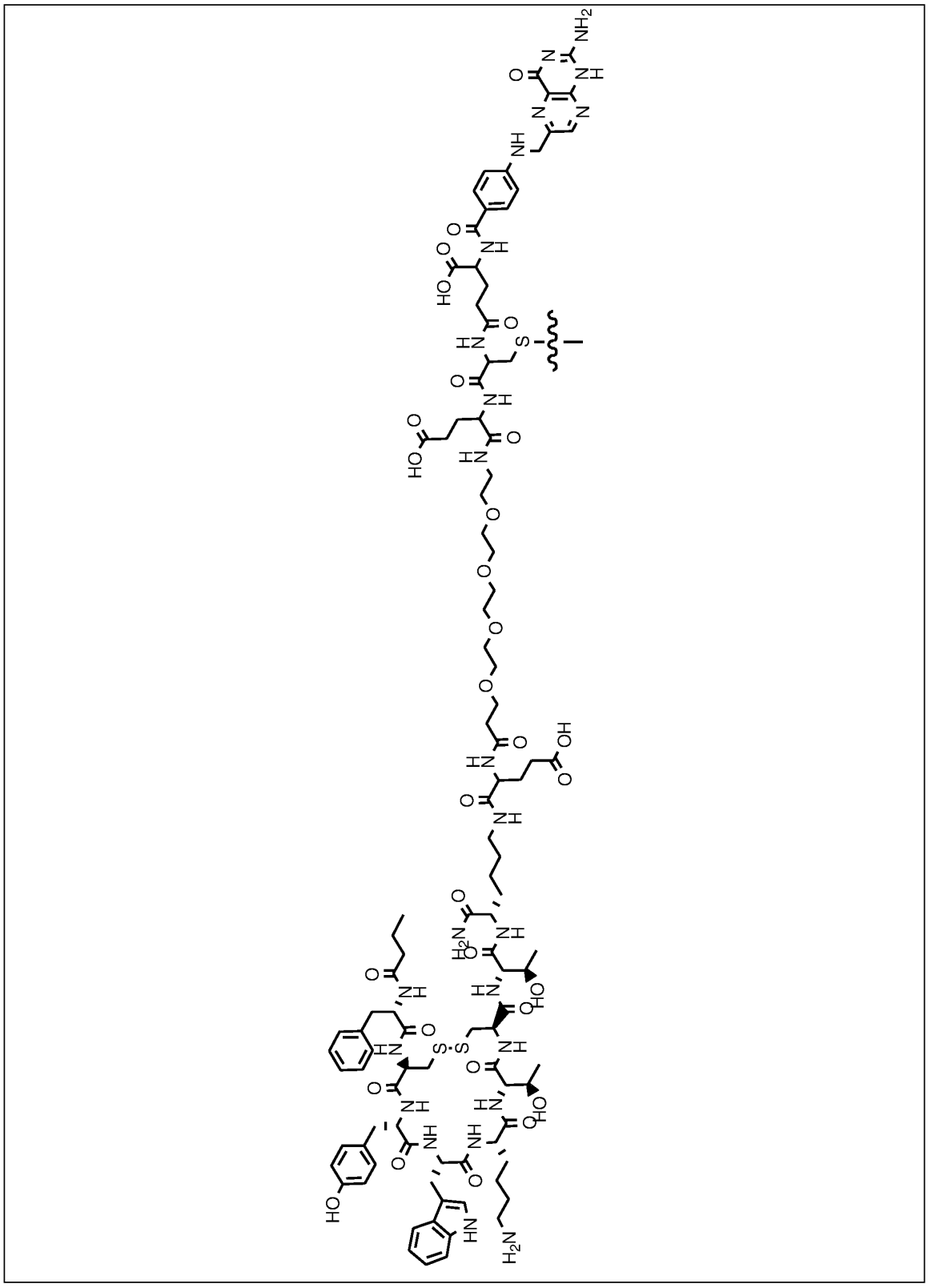
37. 根据权利要求 32-36 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中靶向不同细胞表面分子的配体彼此直接连接、或通过间隔区彼此连接。

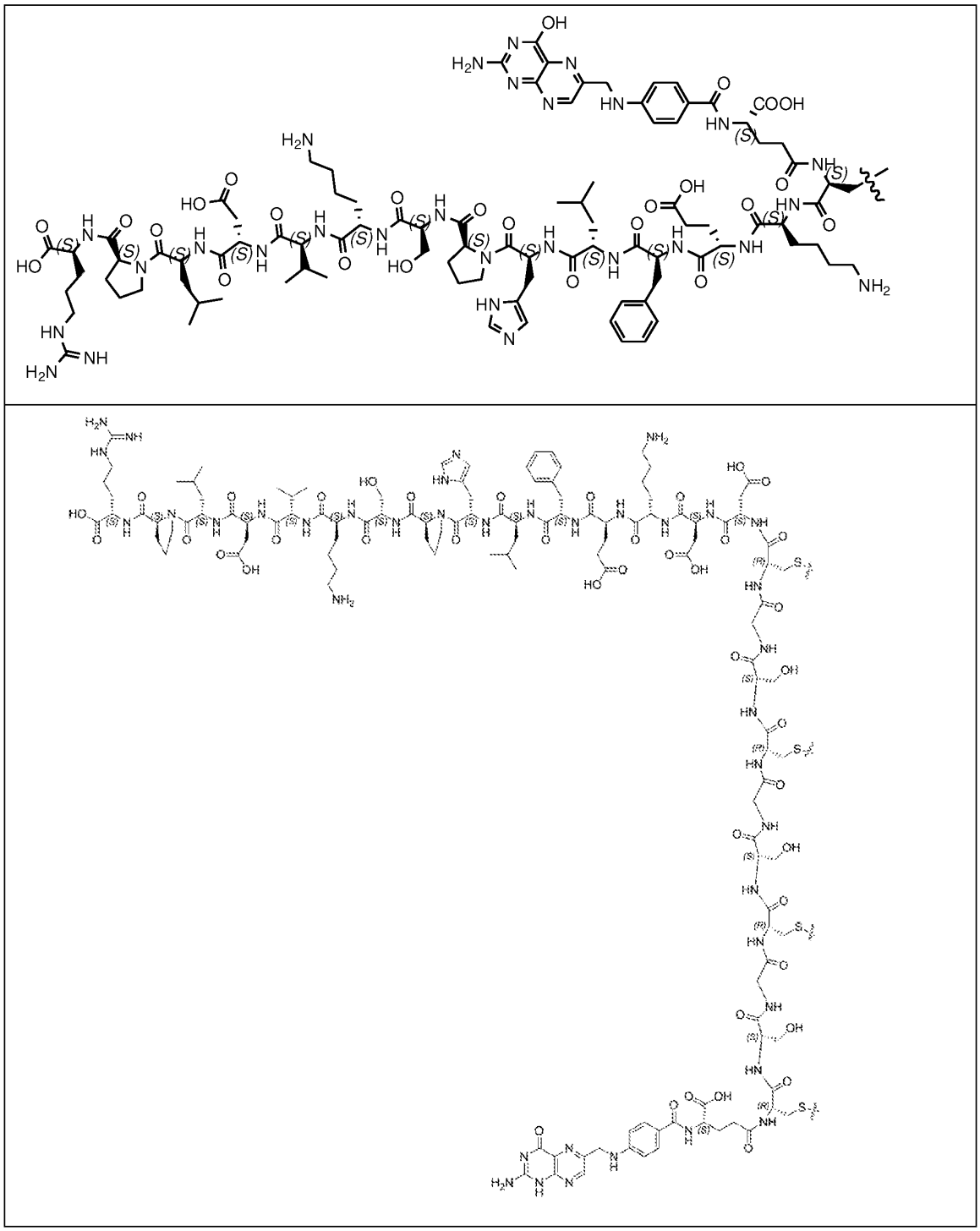
38. 根据权利要求 37 所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述间隔区由氨基酸组成；优选地，所述间隔区由天然氨基酸或非天然氨基酸组成；优选地，所述间隔区为甘氨酸。

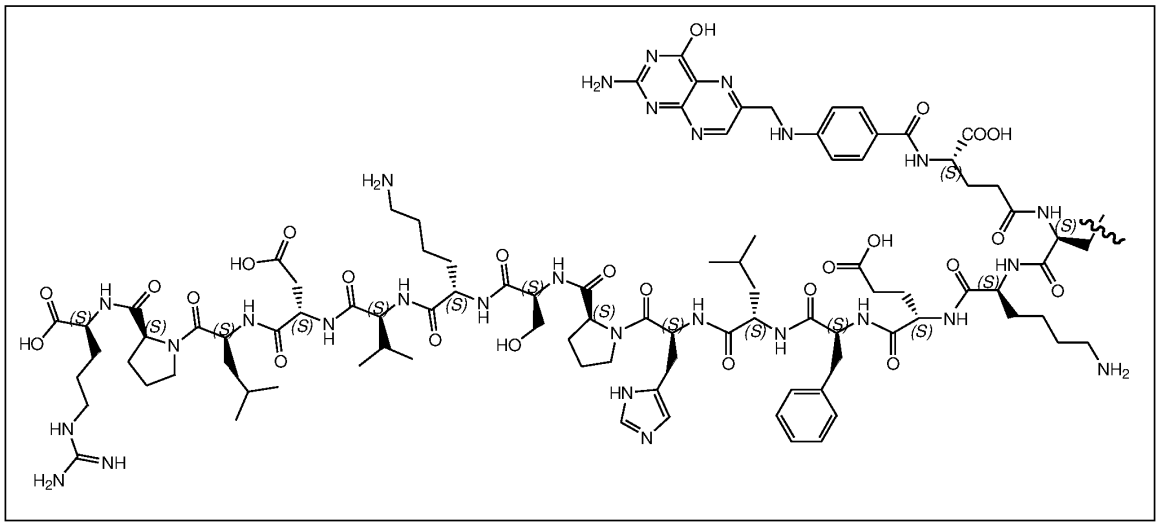
39. 根据权利要求 37-38 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述间隔区可在特定的生理环境下通过蛋白酶裂解或还原裂解。

40. 根据权利要求 1-39 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述配体部分具有以下结构：









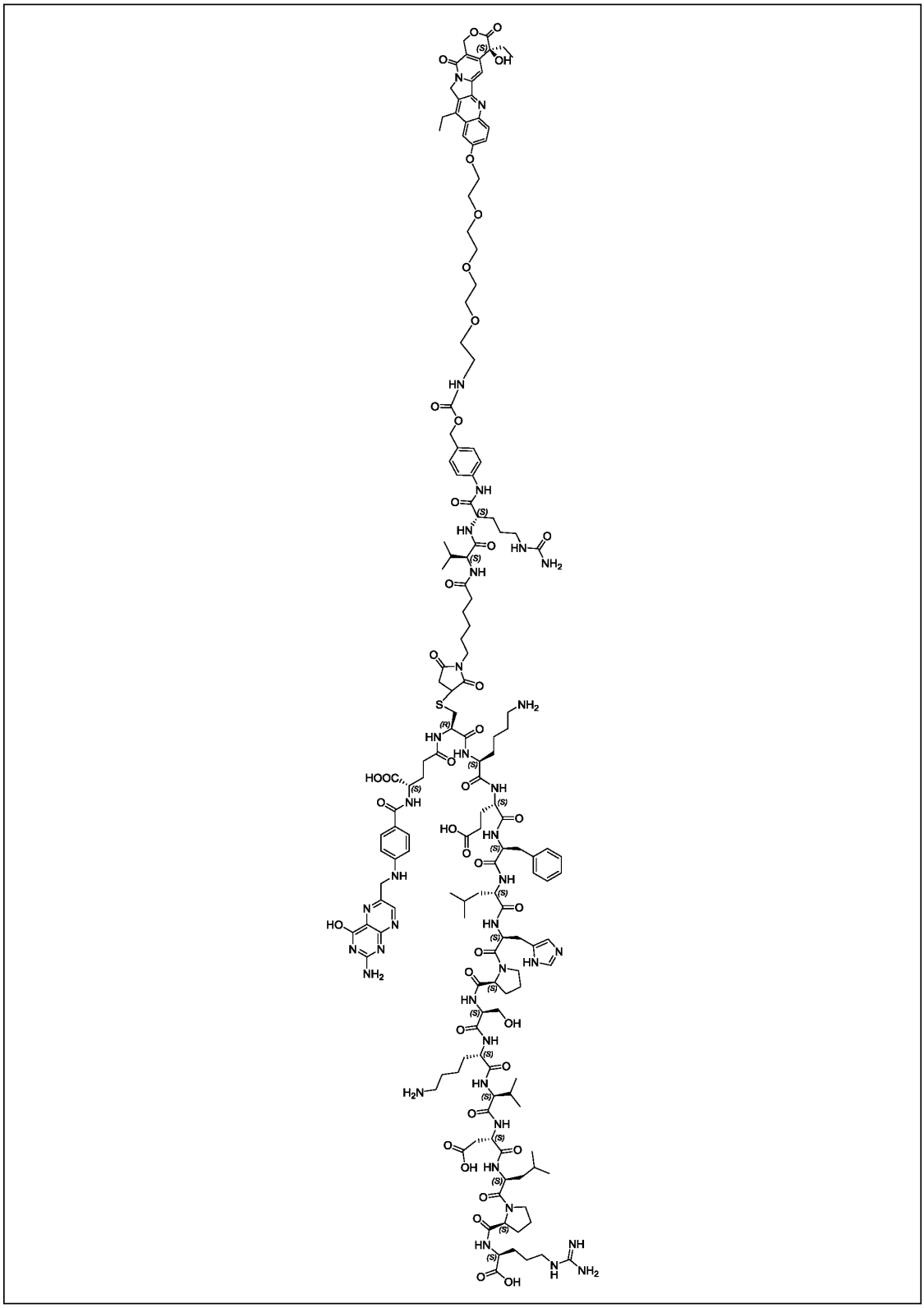
41. 根据权利要求 1-40 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 q 为 1。

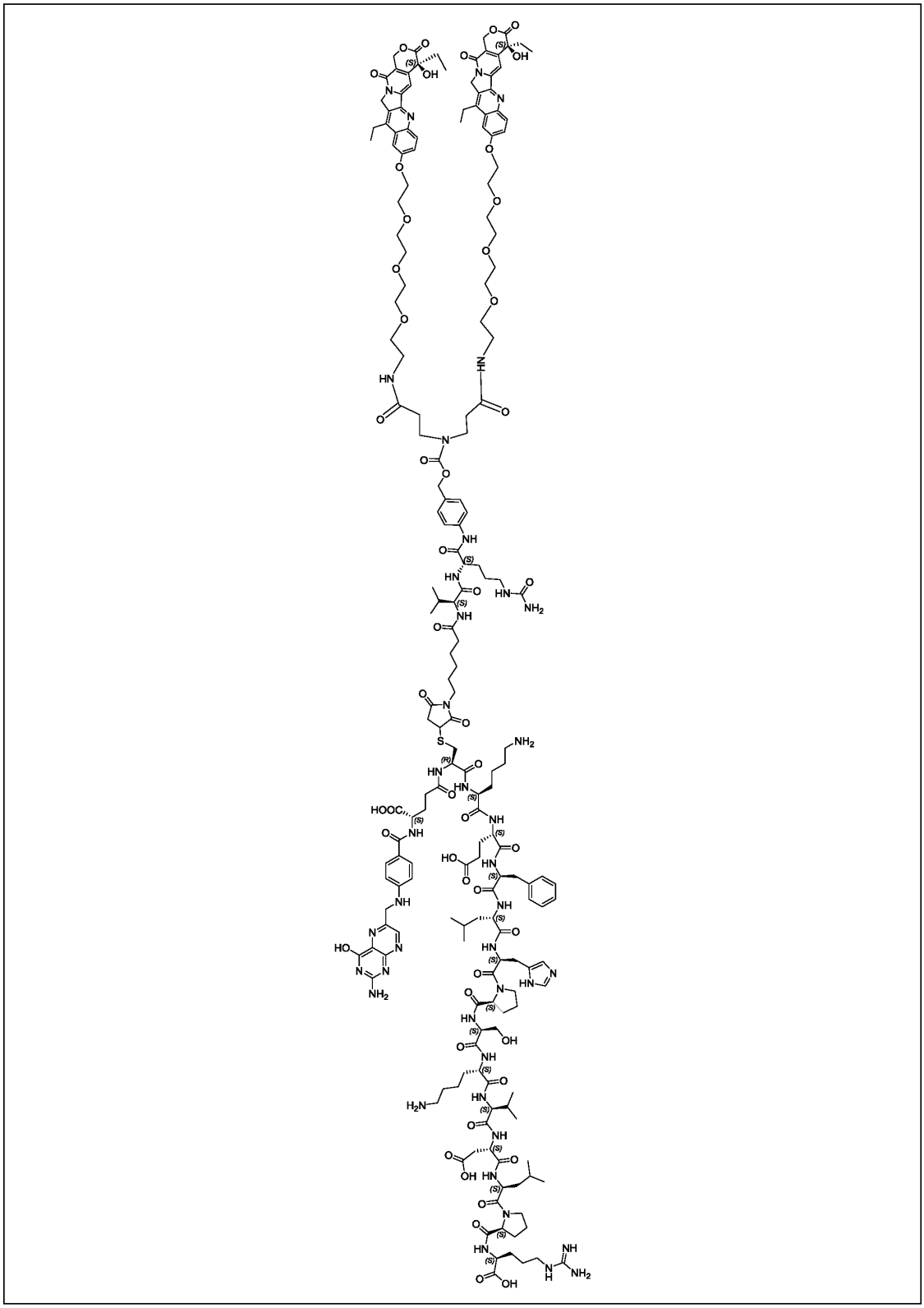
42. 根据权利要求 1-41 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 q 为 2。

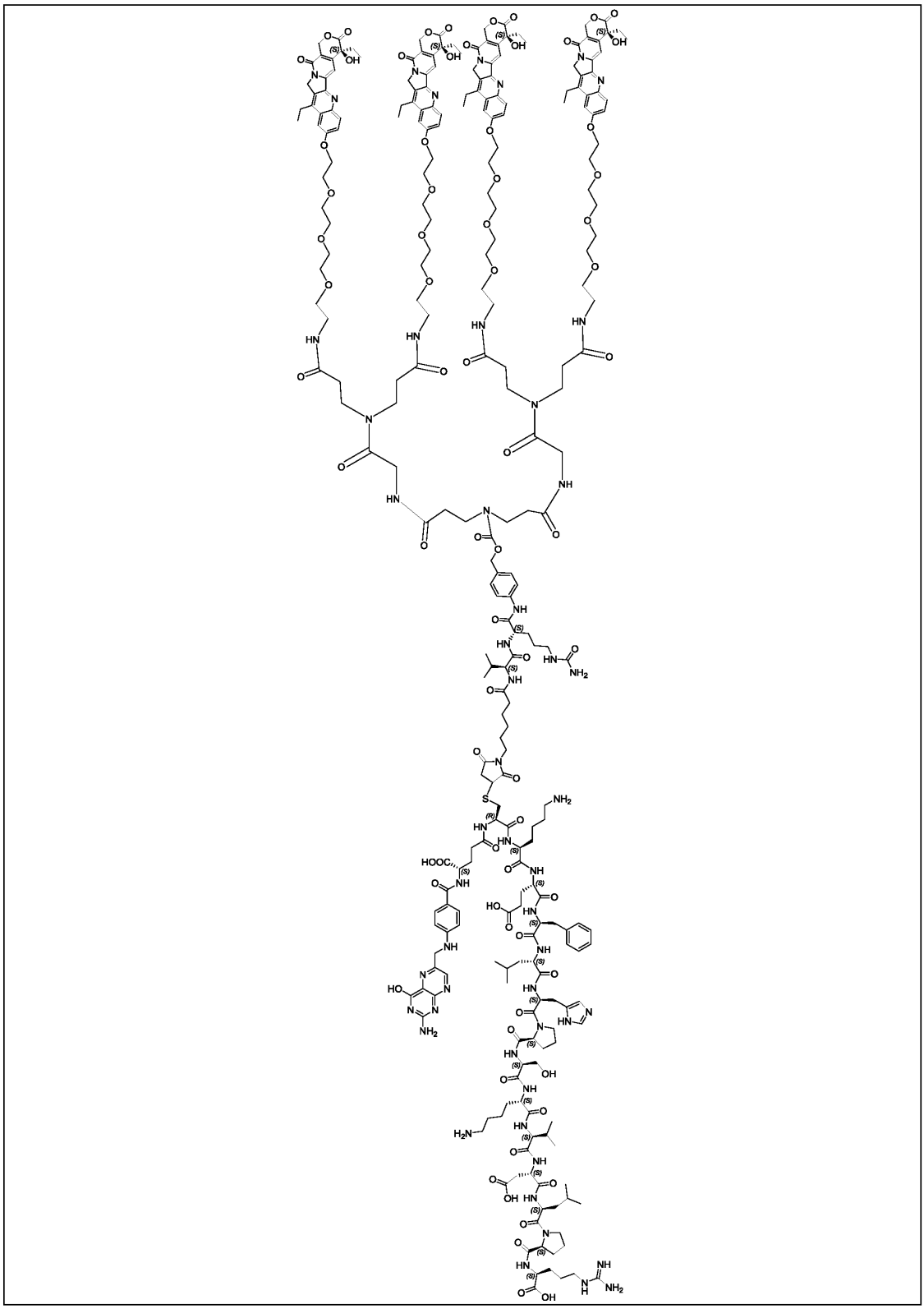
43. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 q 为 3。

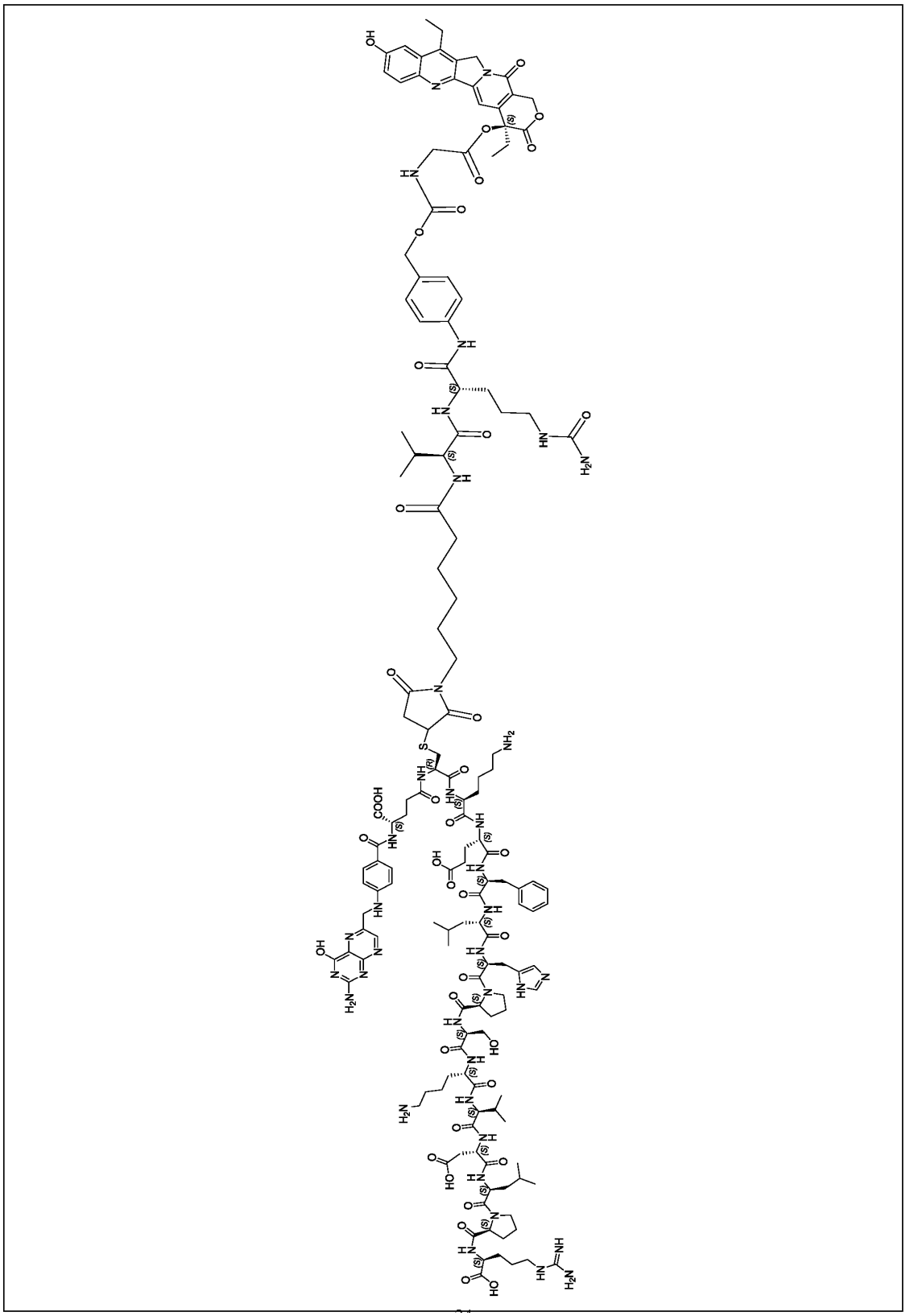
44. 根据权利要求 1-43 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中 q 为 4。

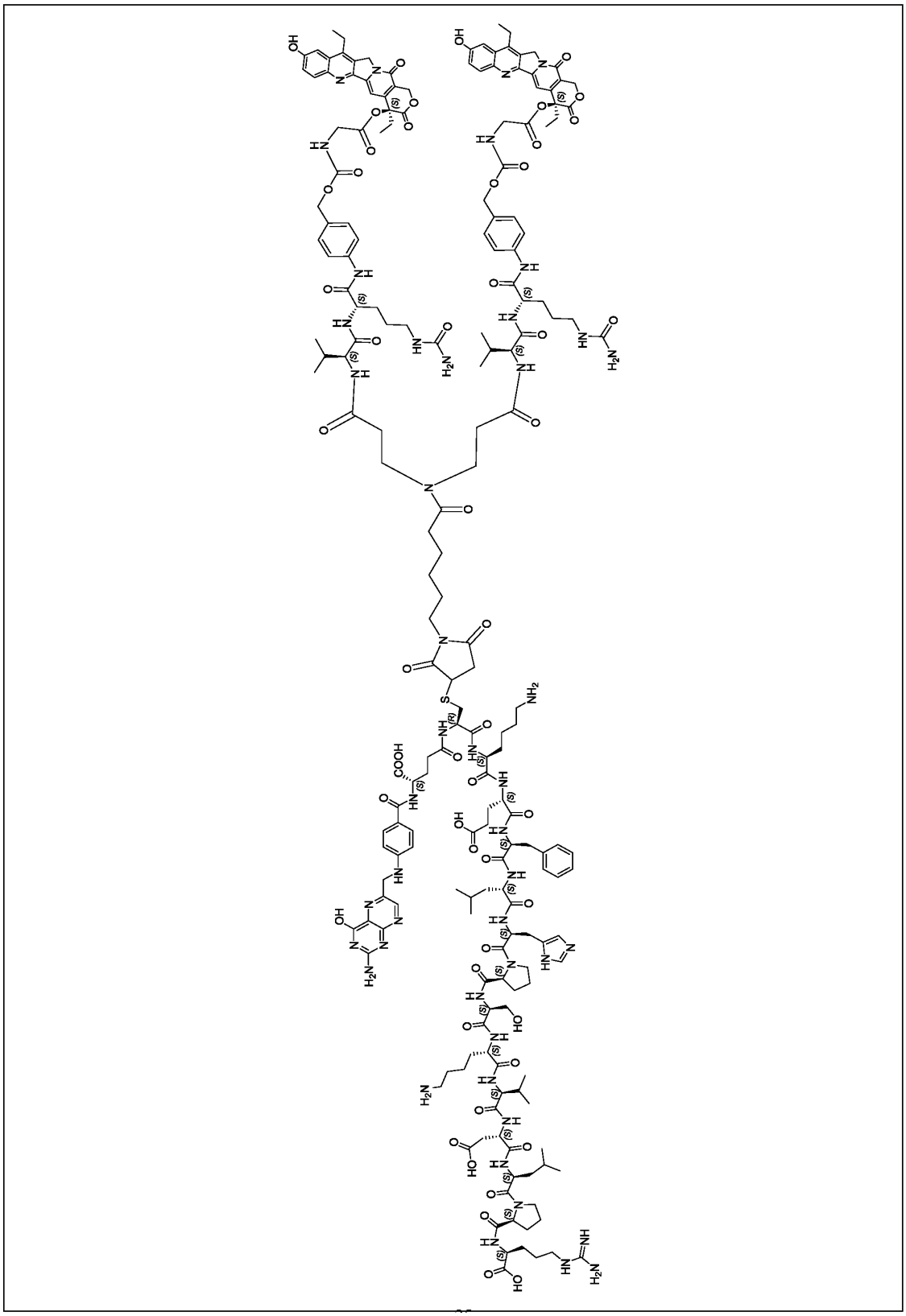
45. 一种偶联体化合物或其药学上可接受的盐，其中所述偶联体化合物选自：

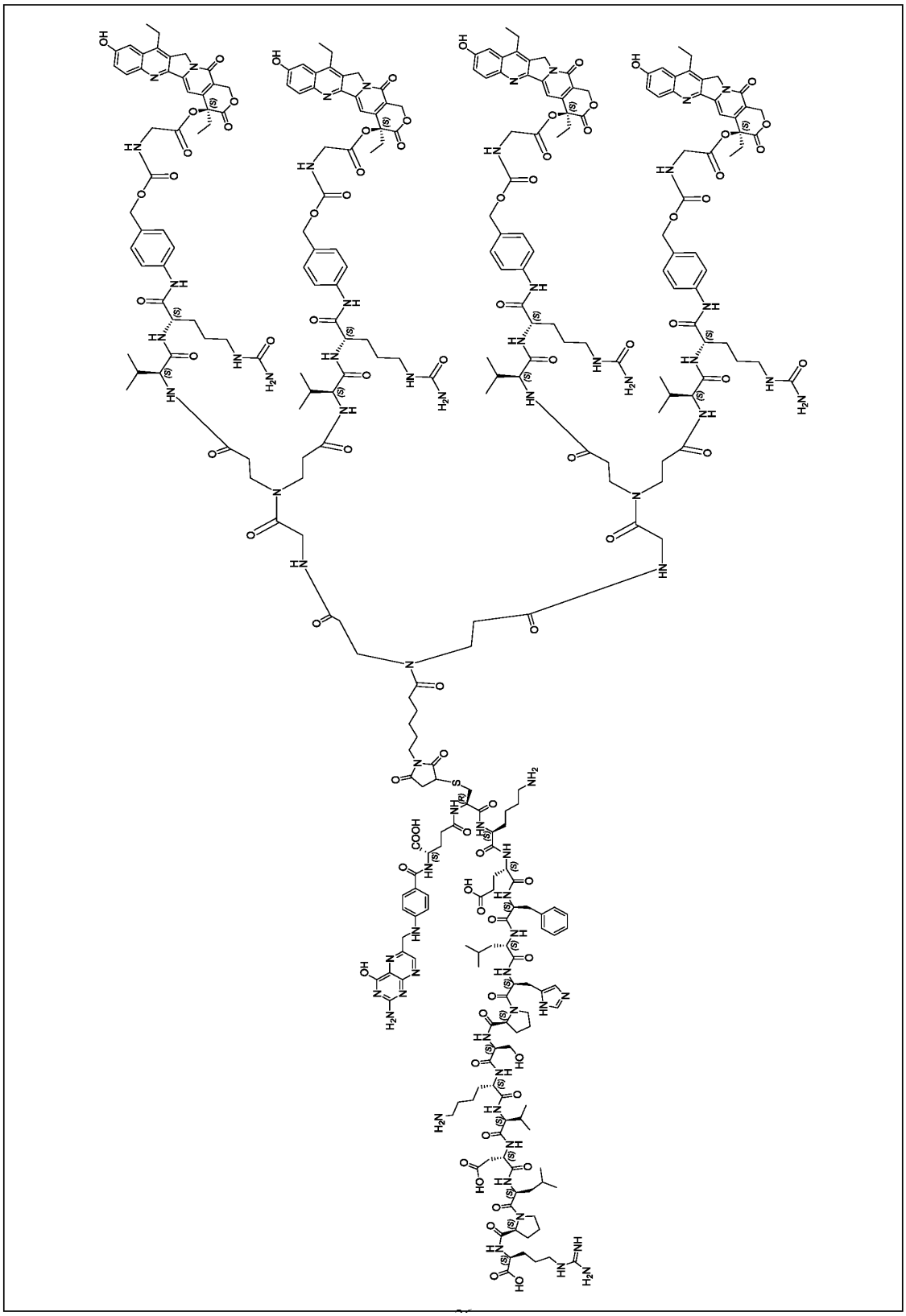


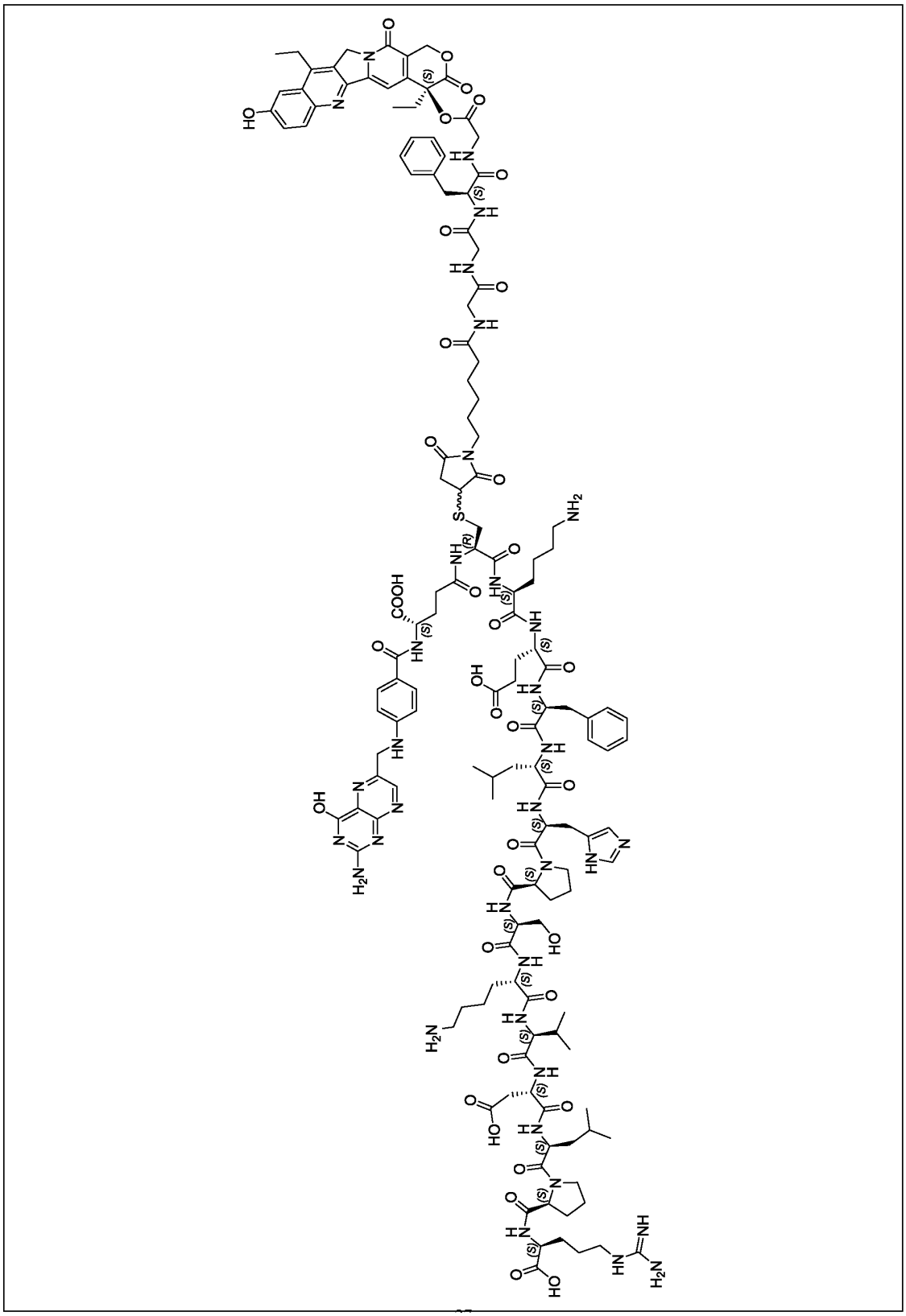


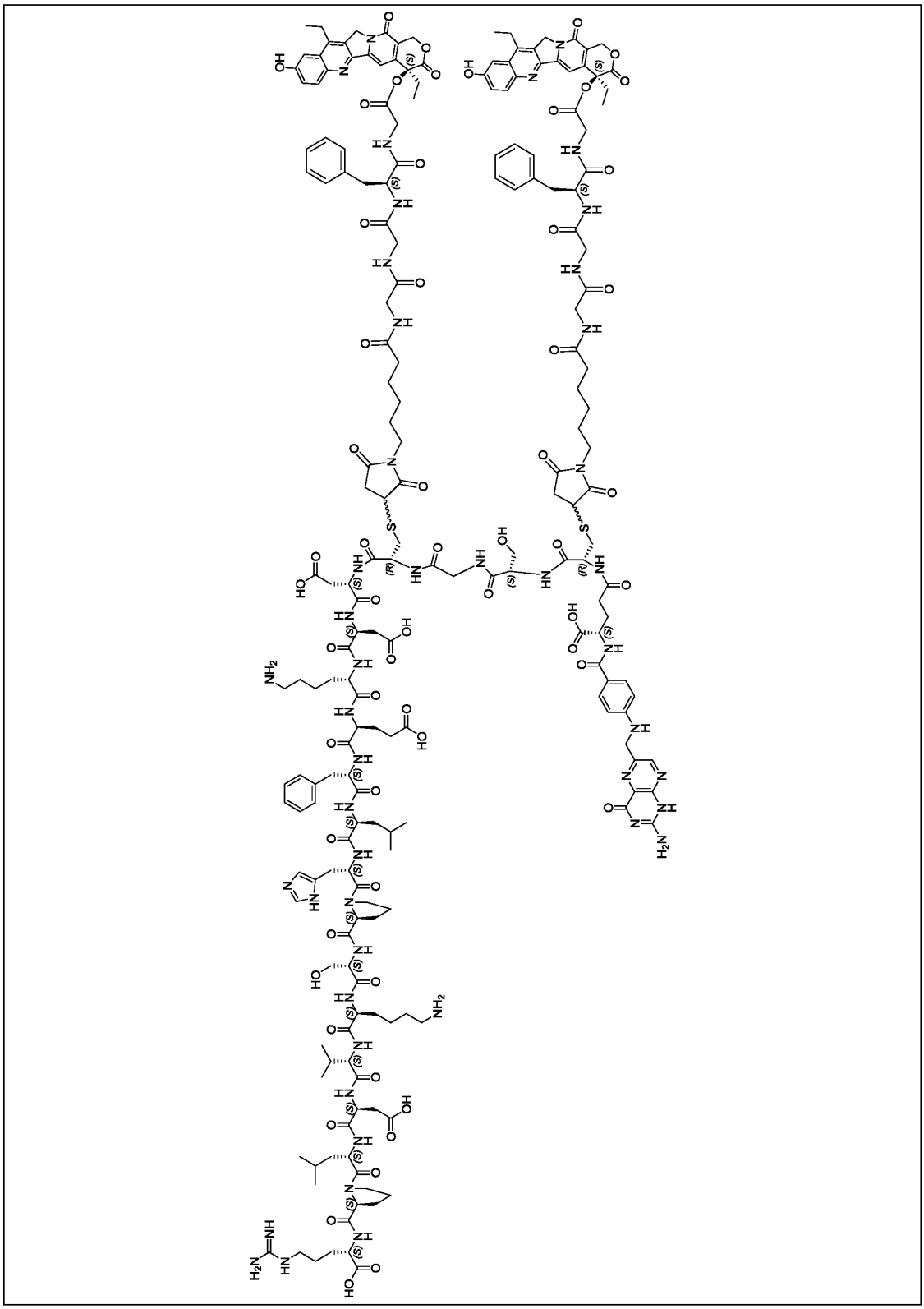


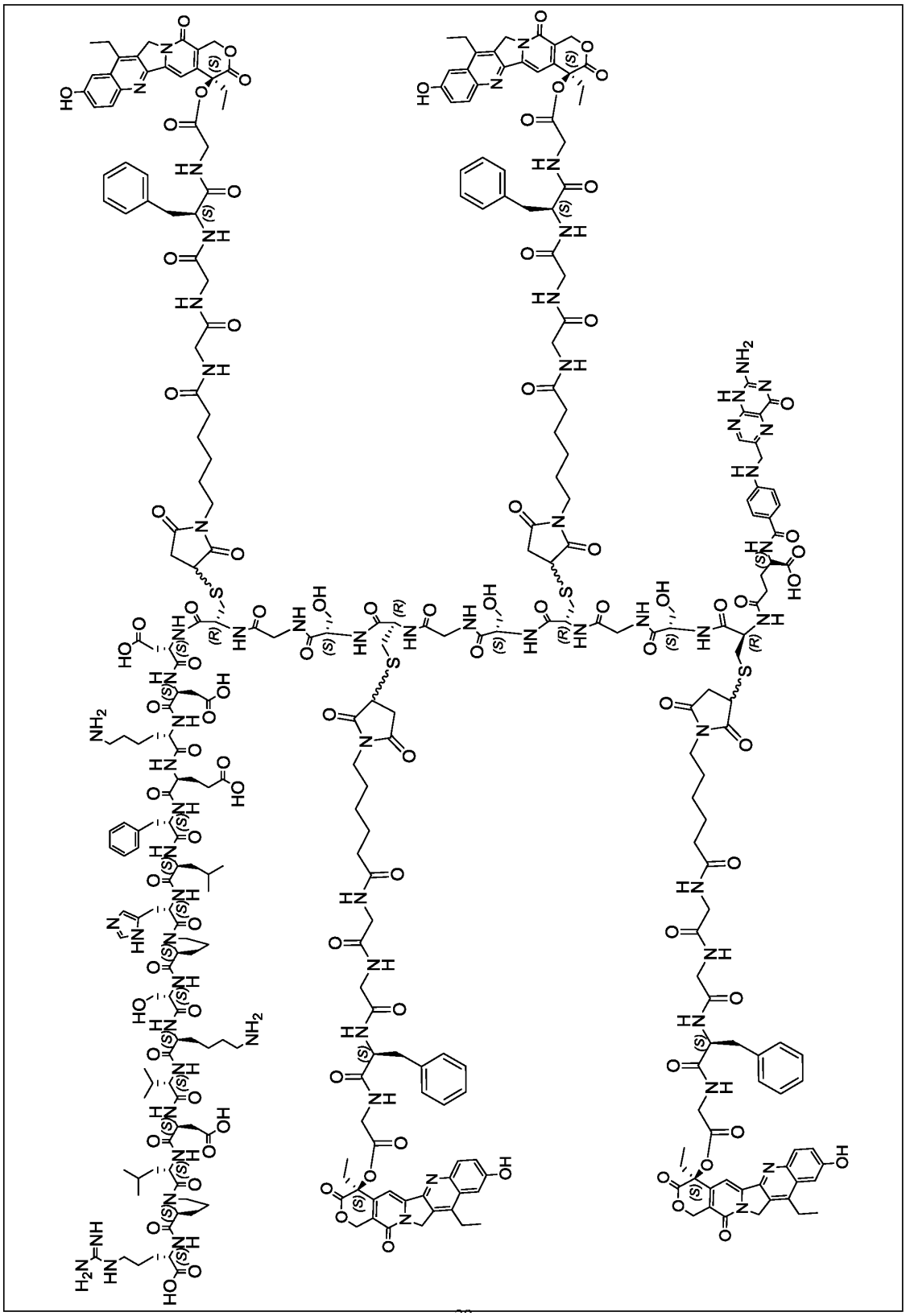


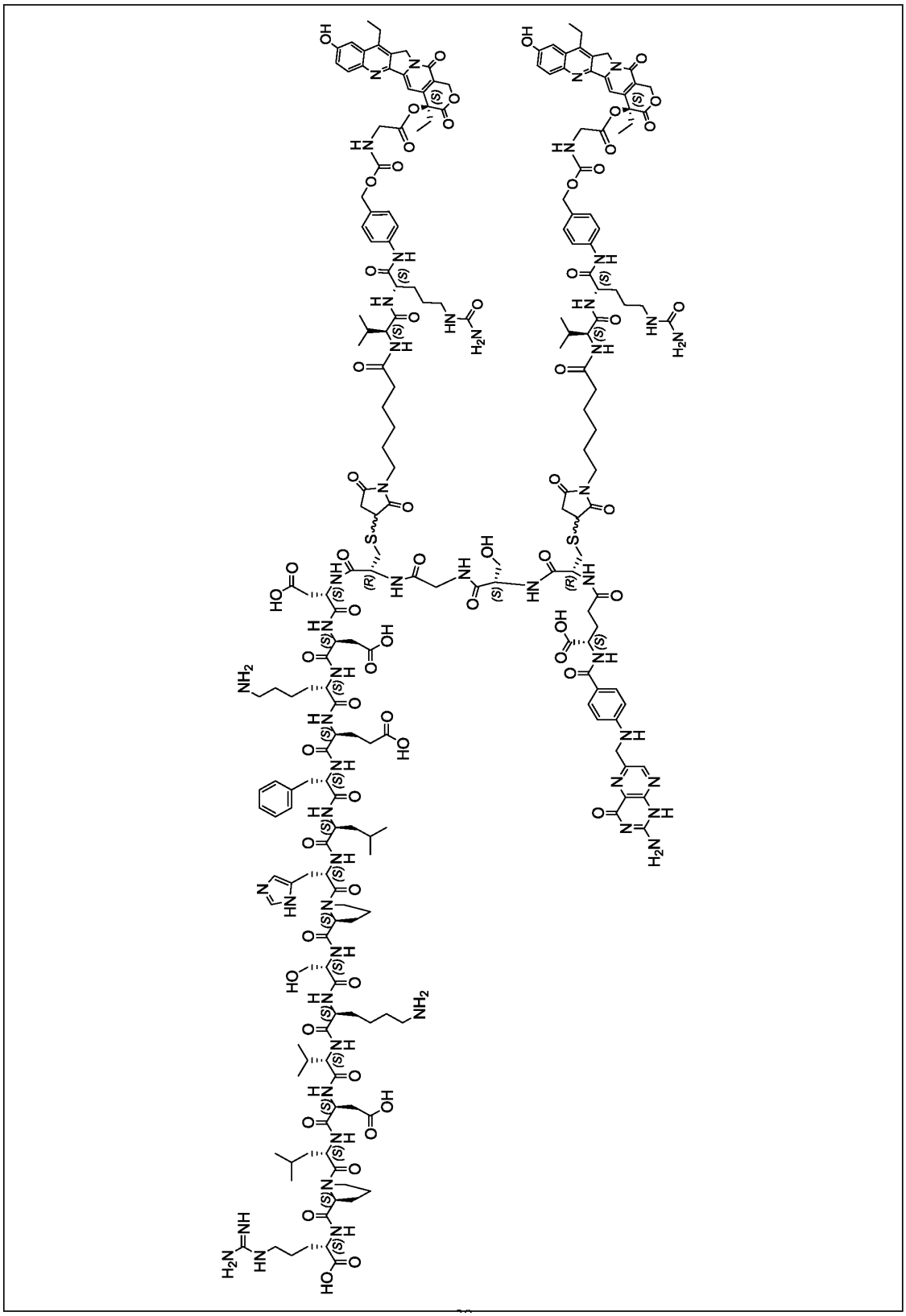


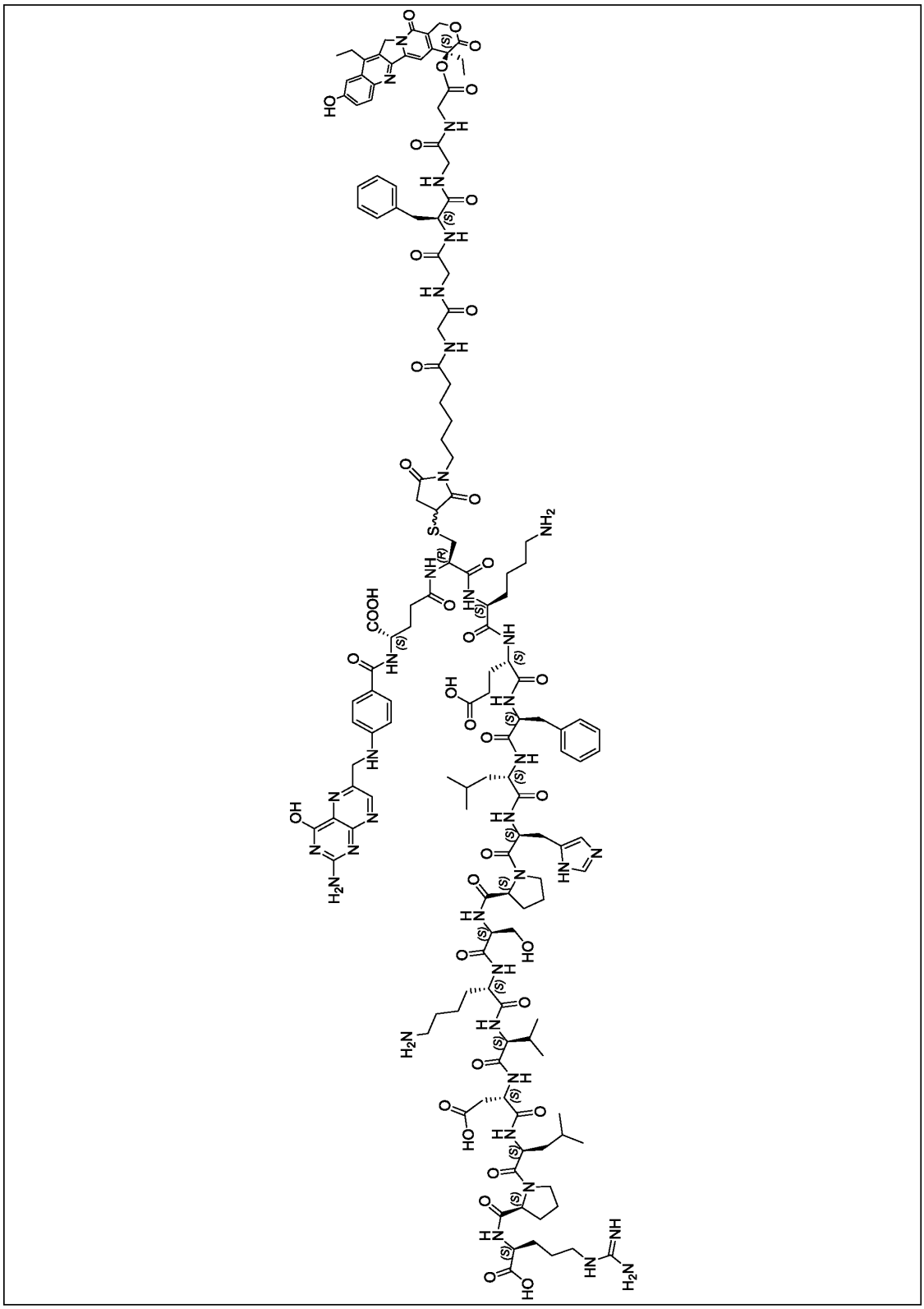


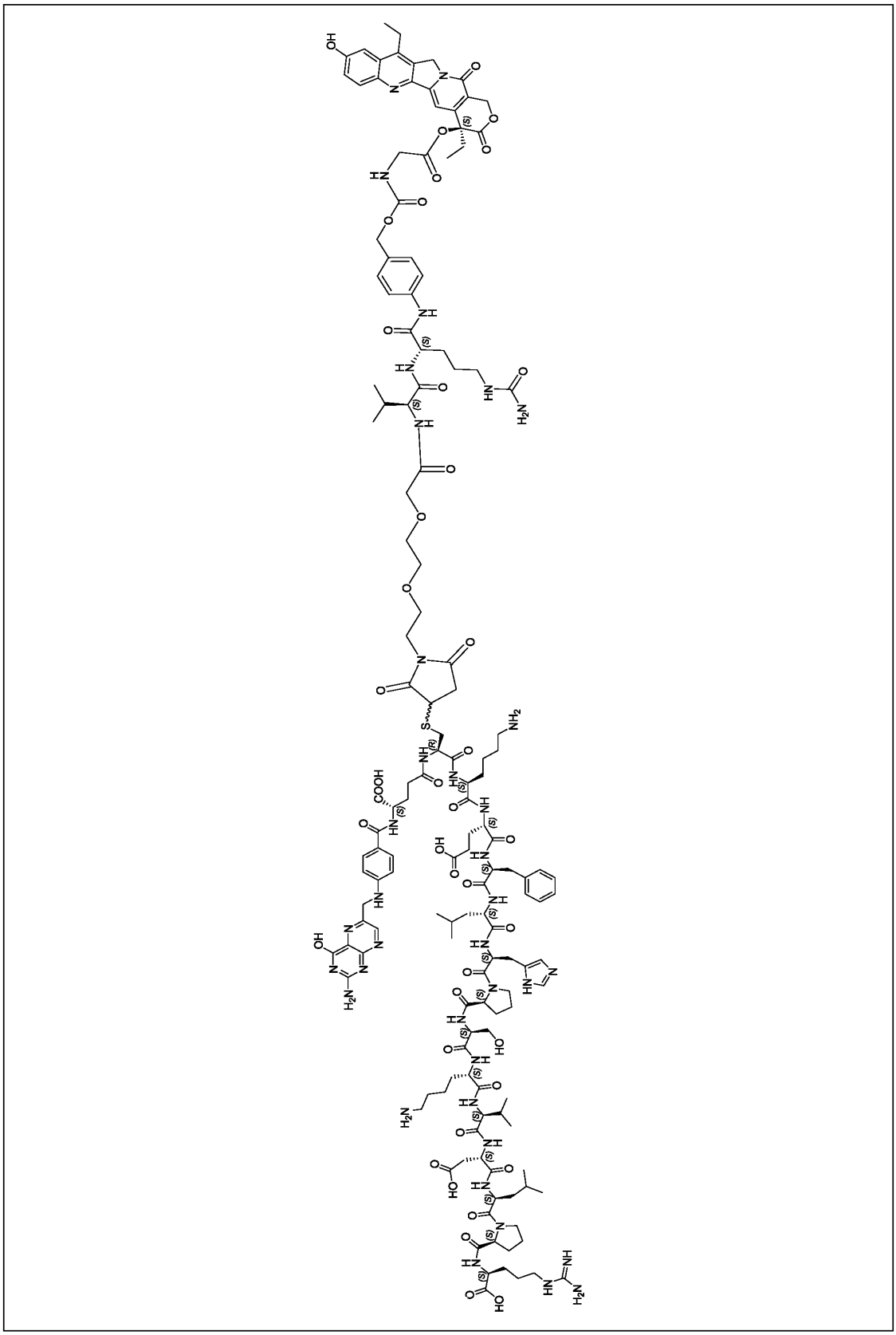


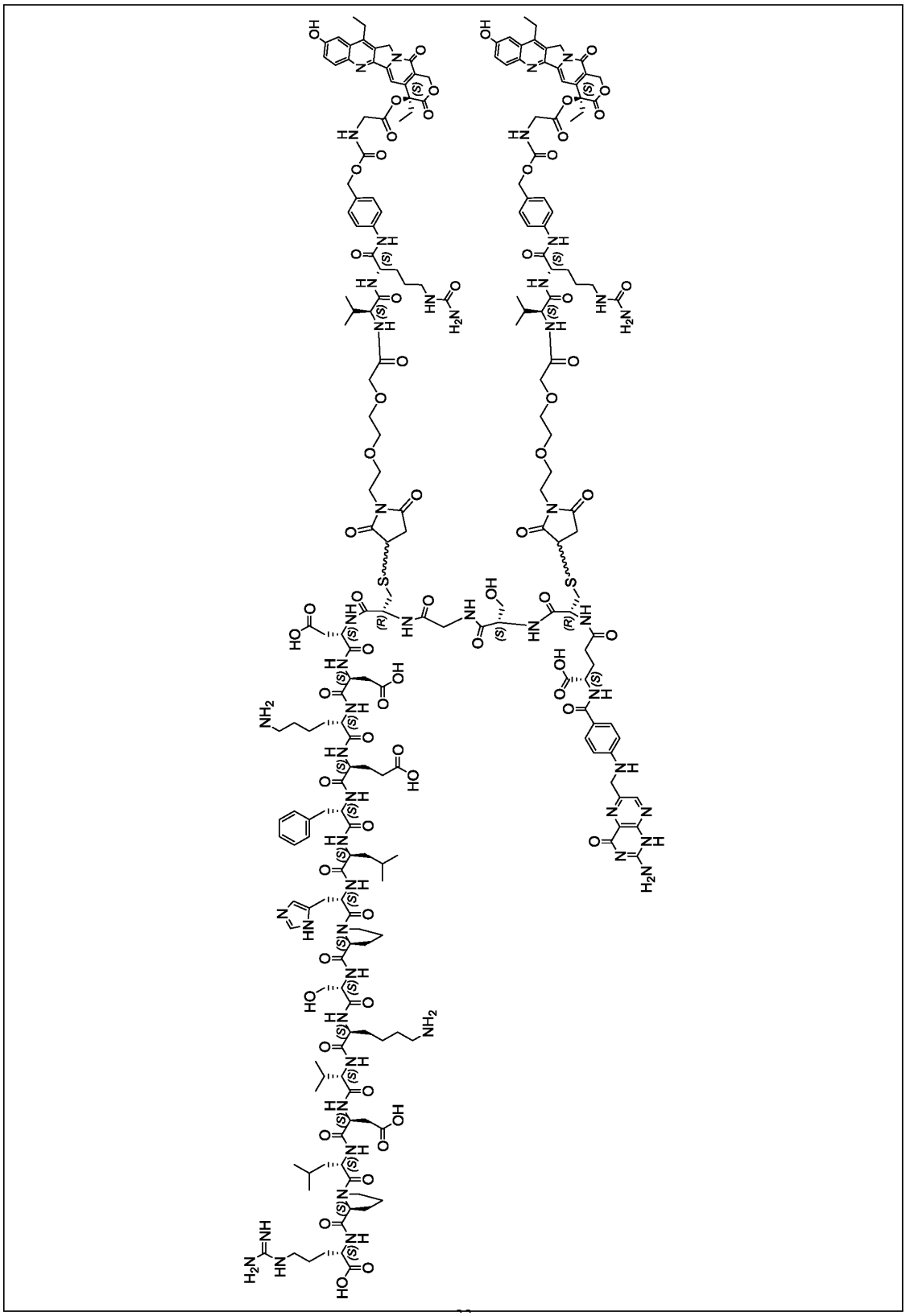


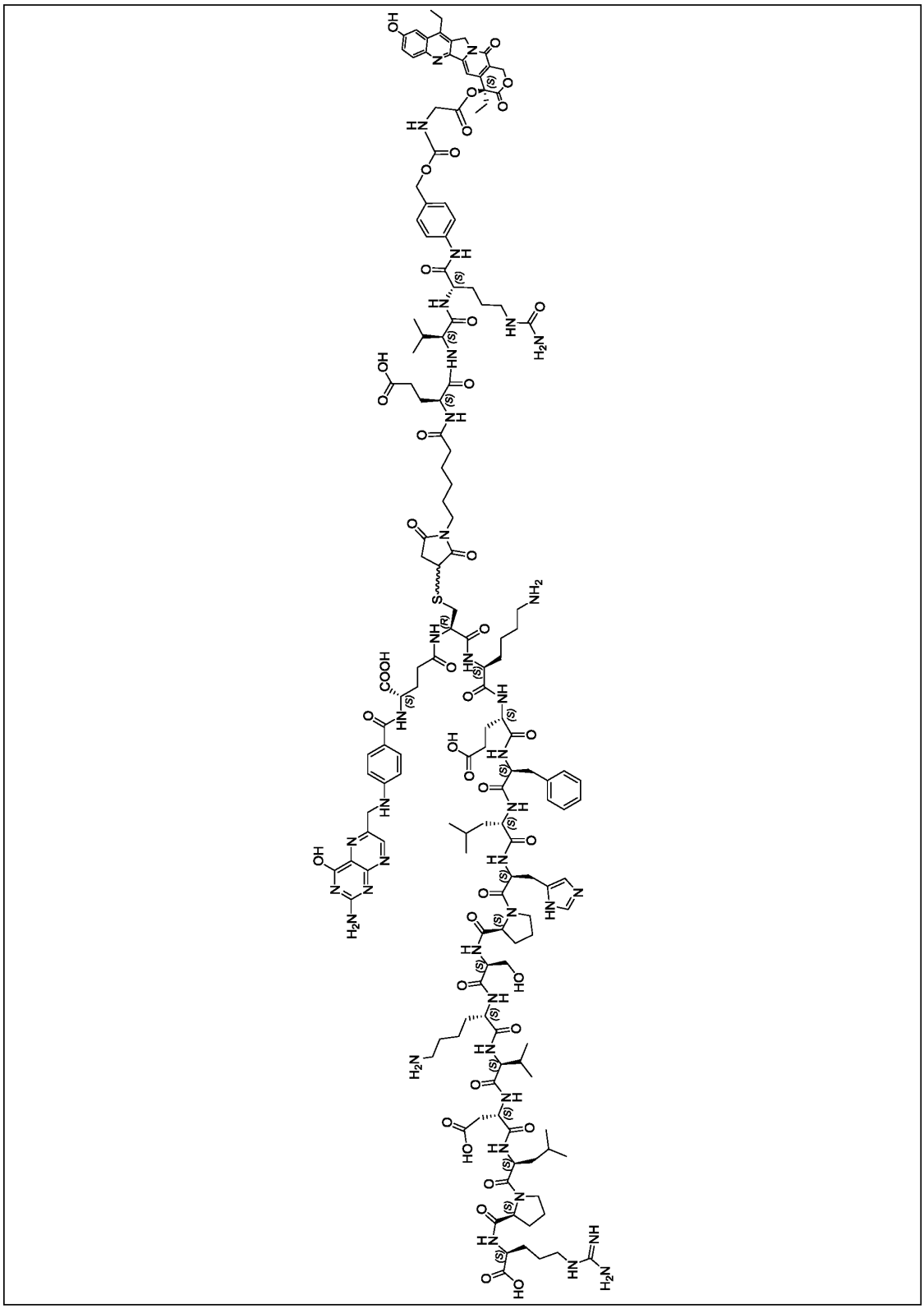


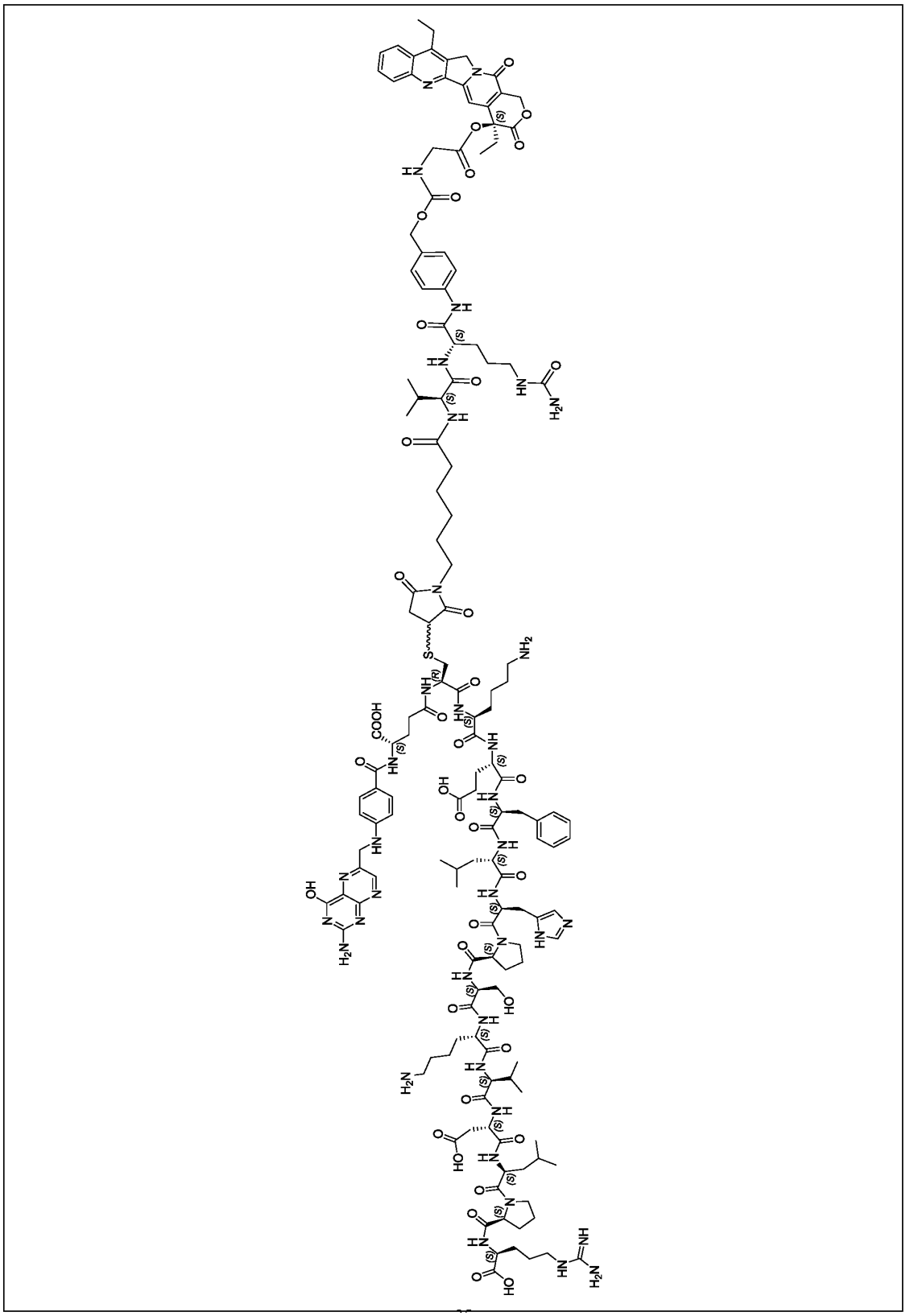


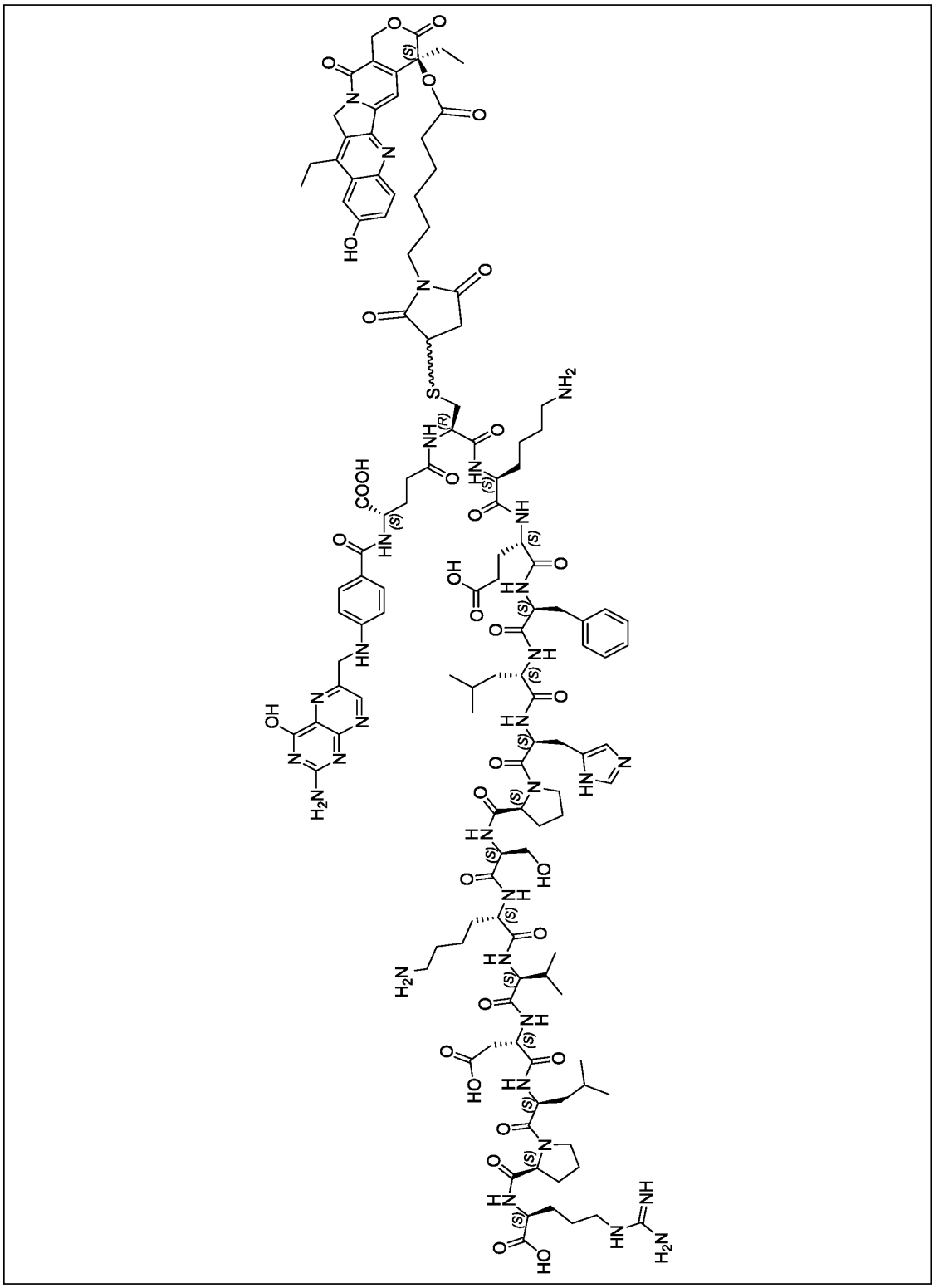


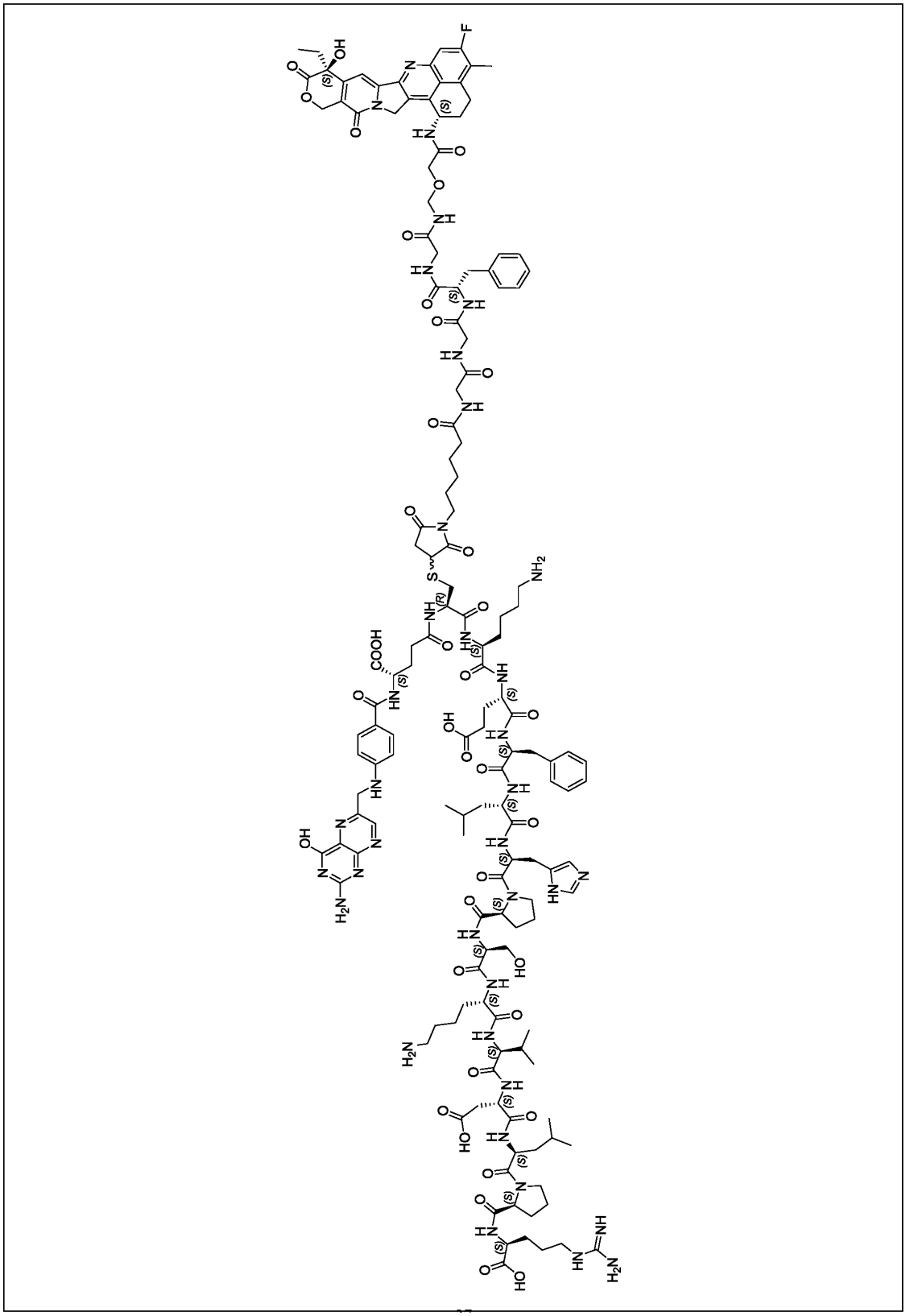


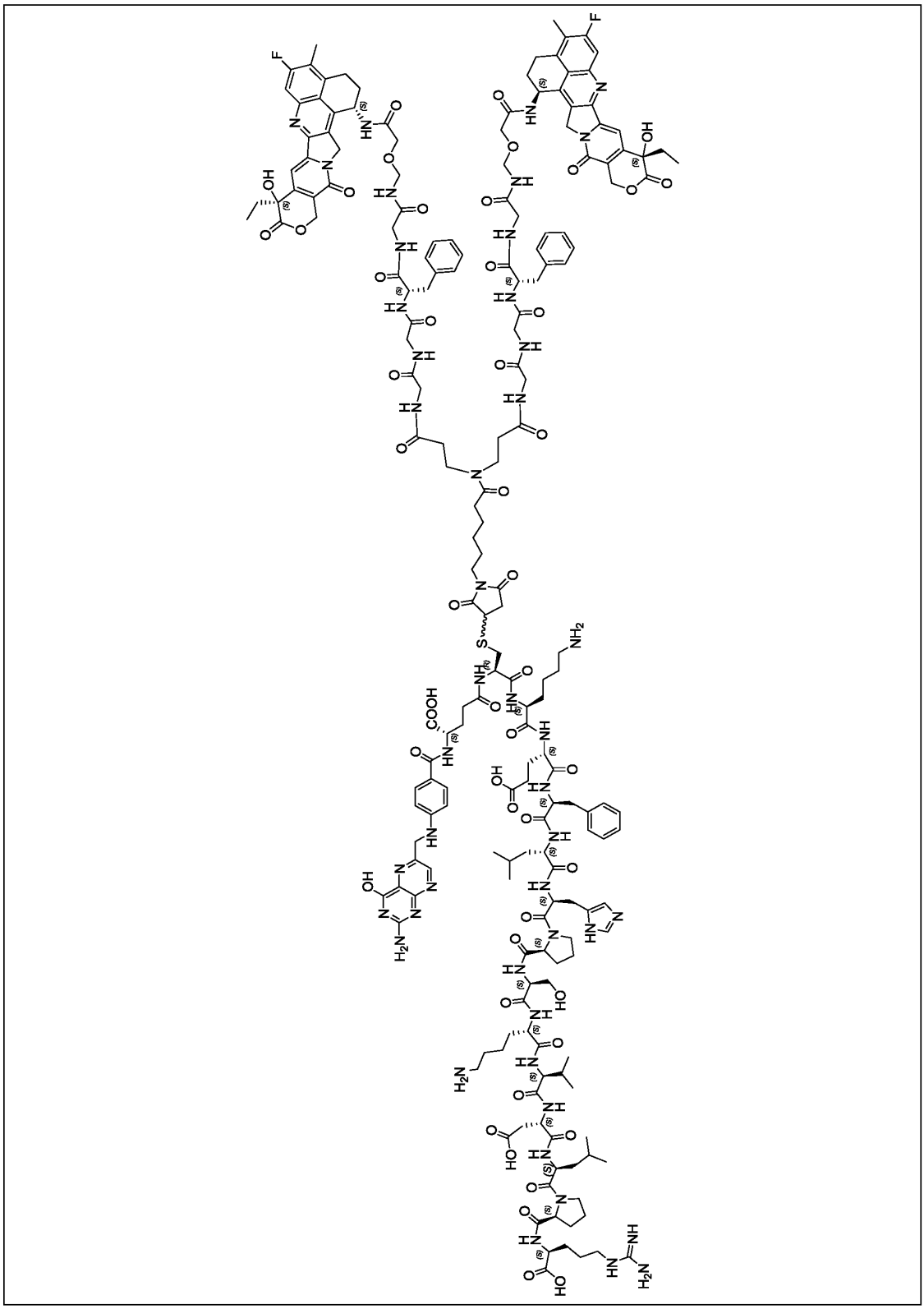


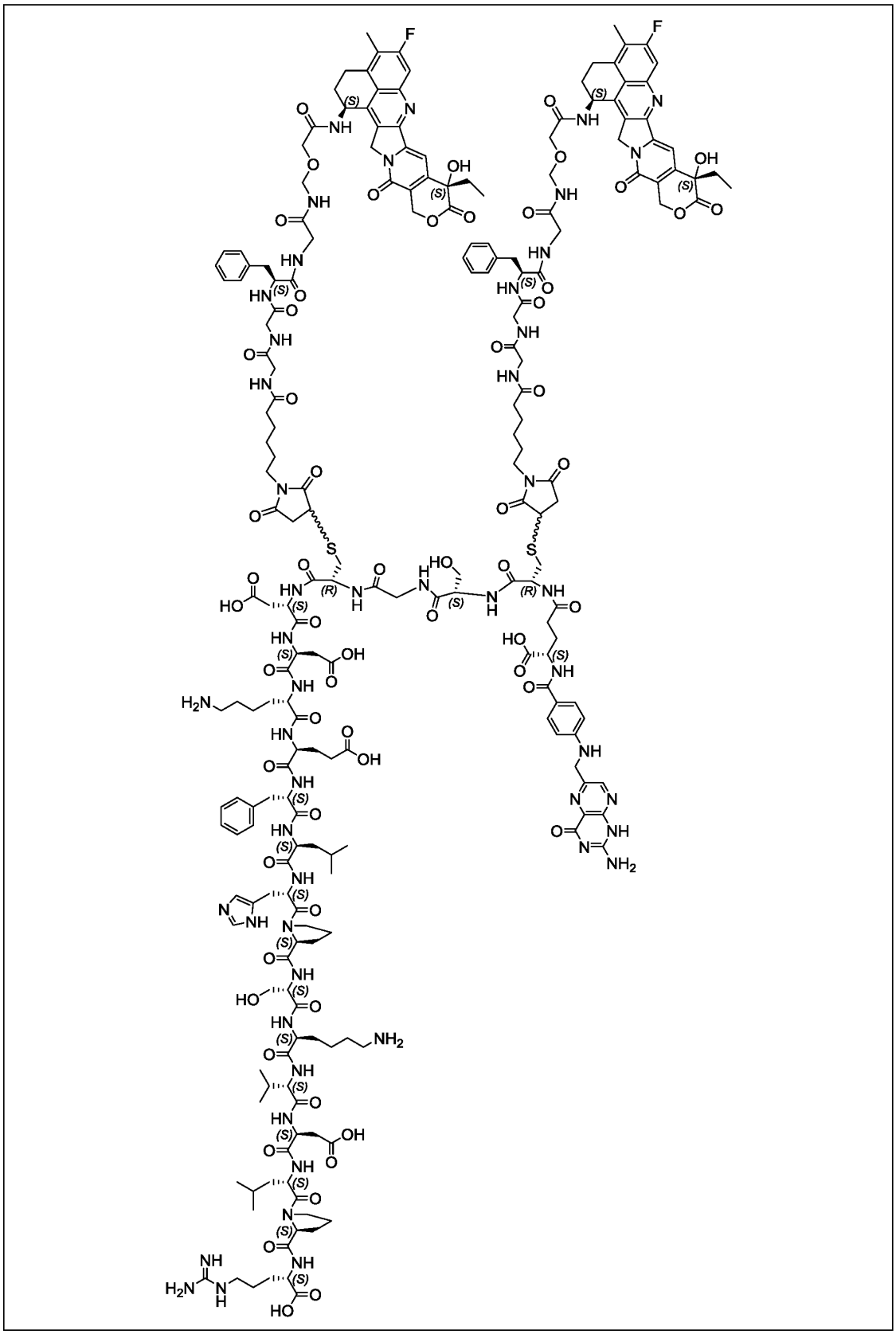


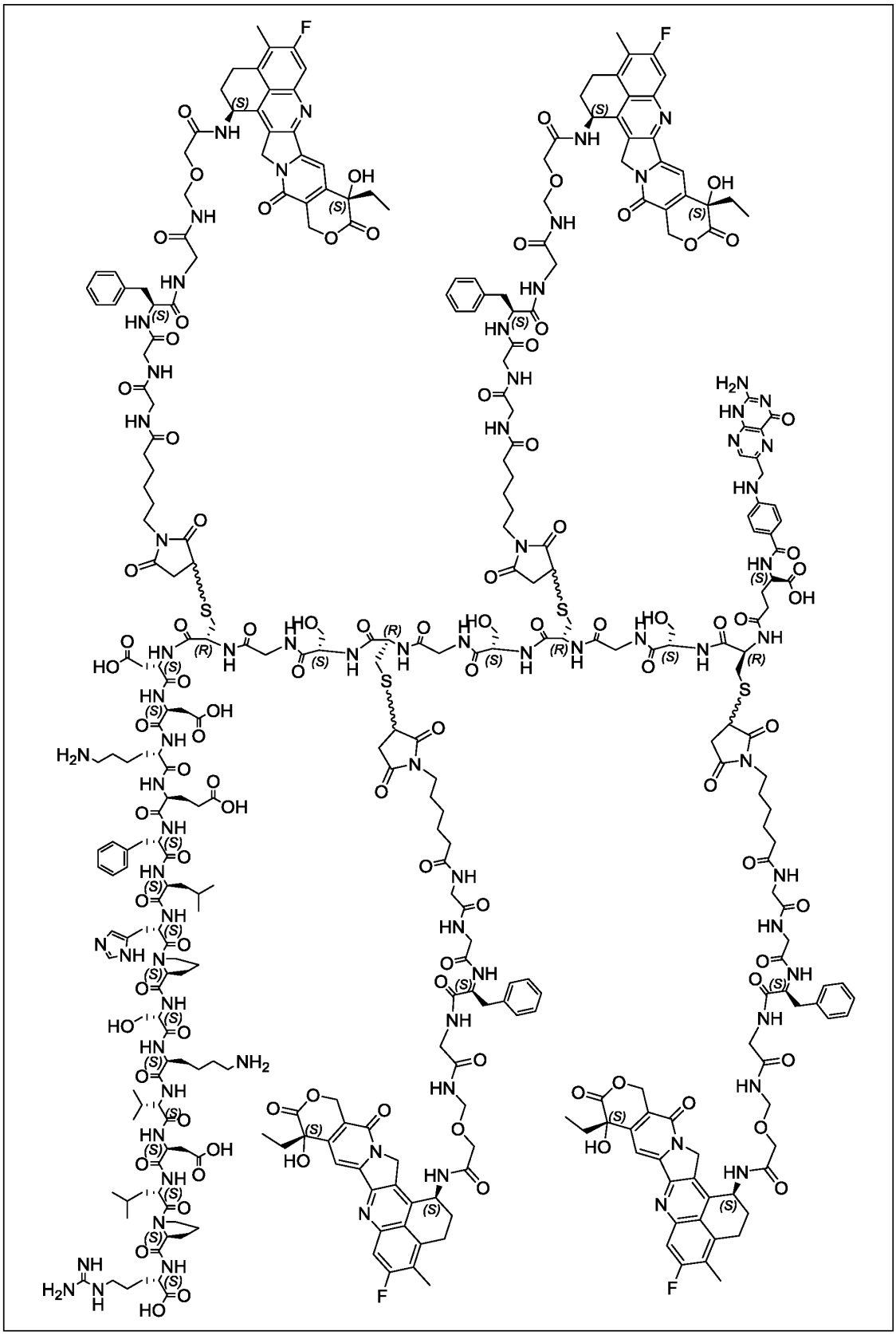


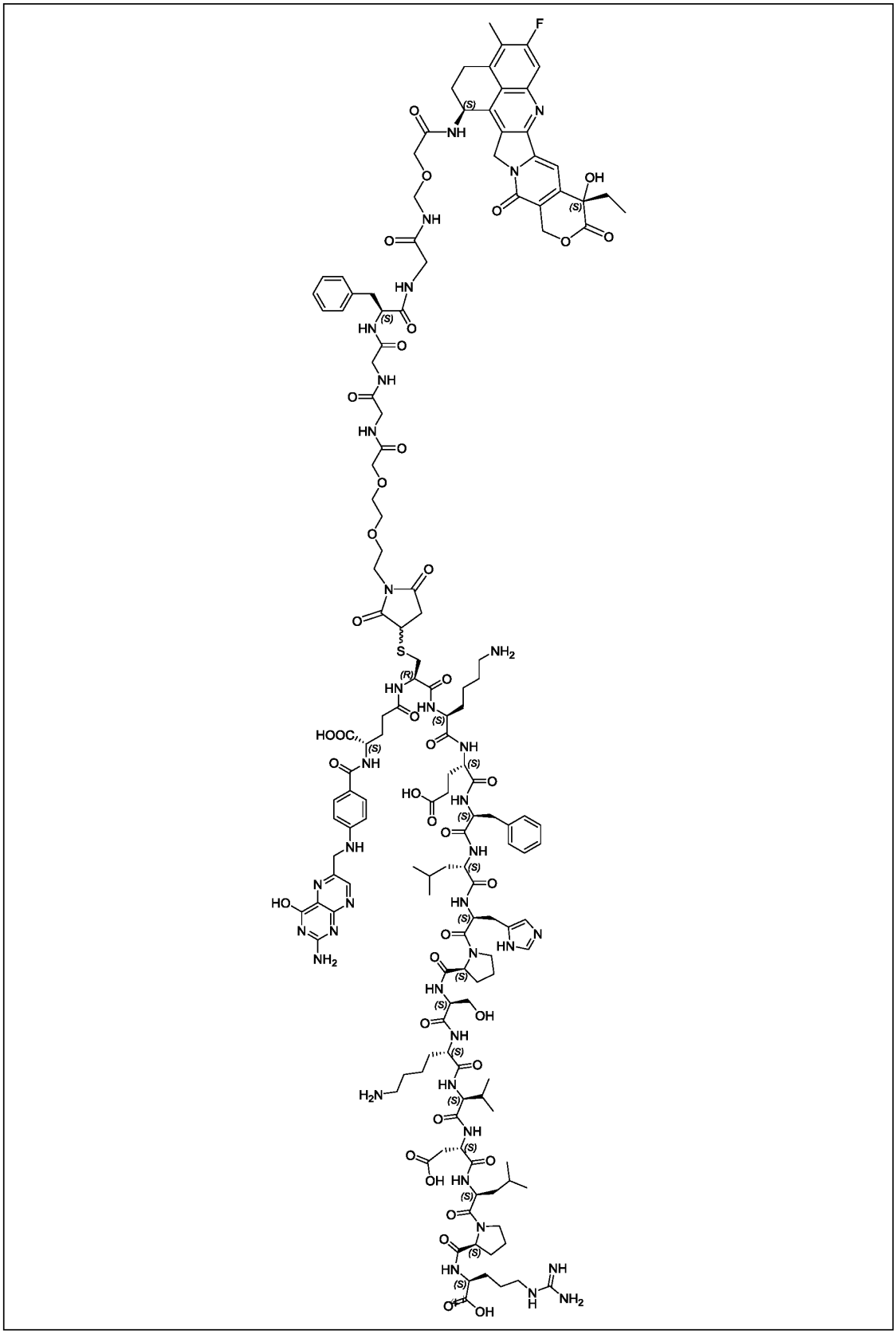


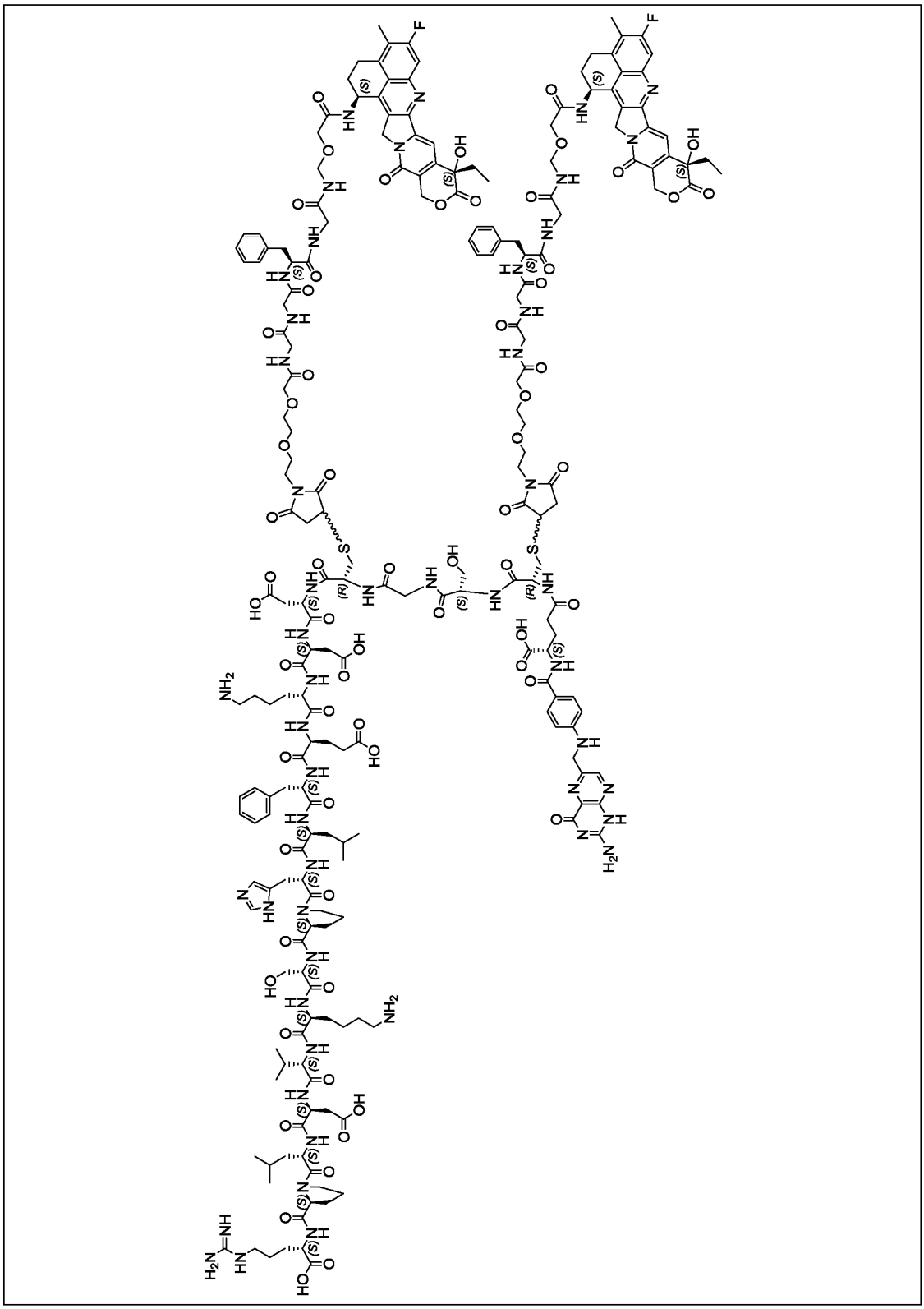


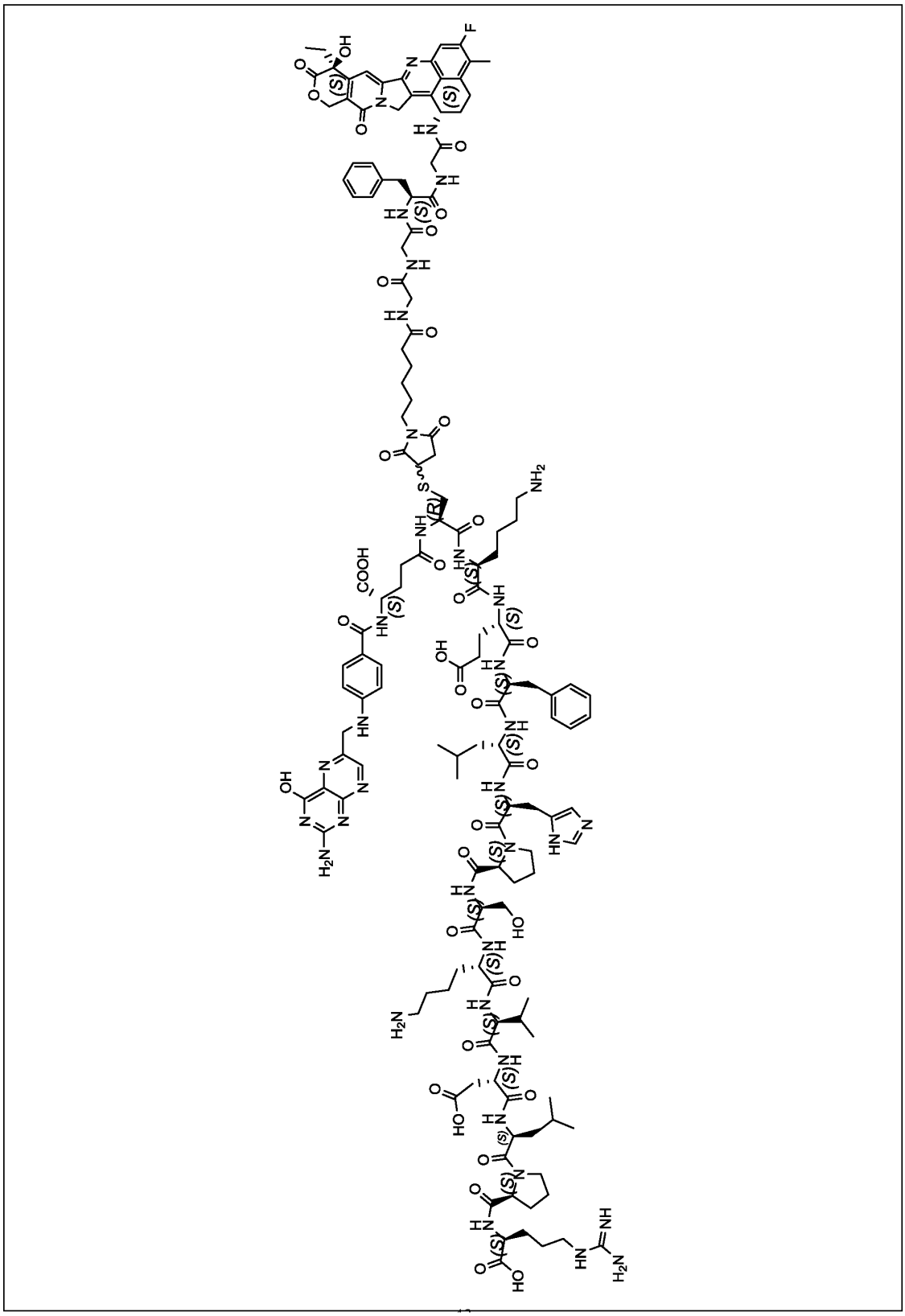


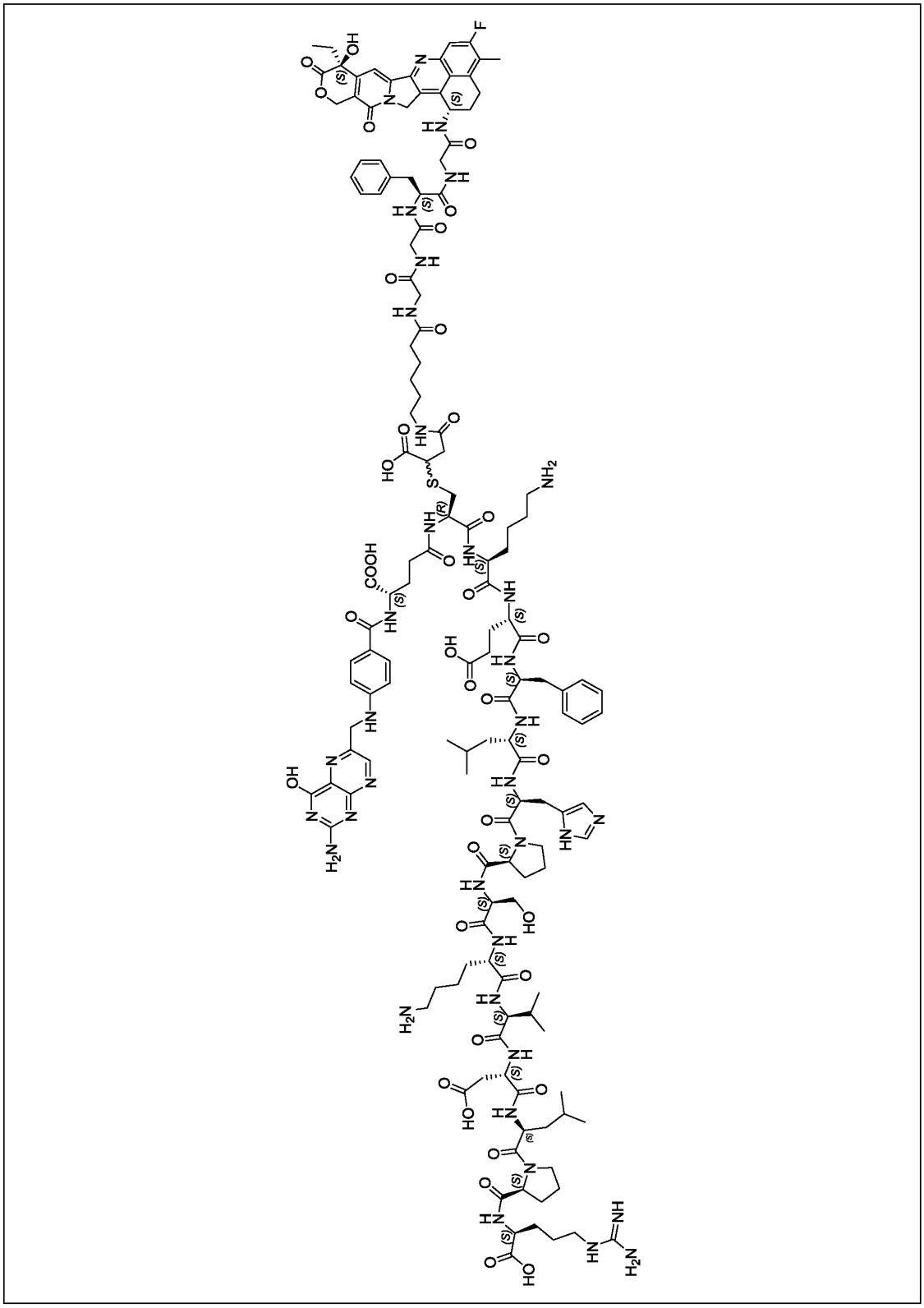


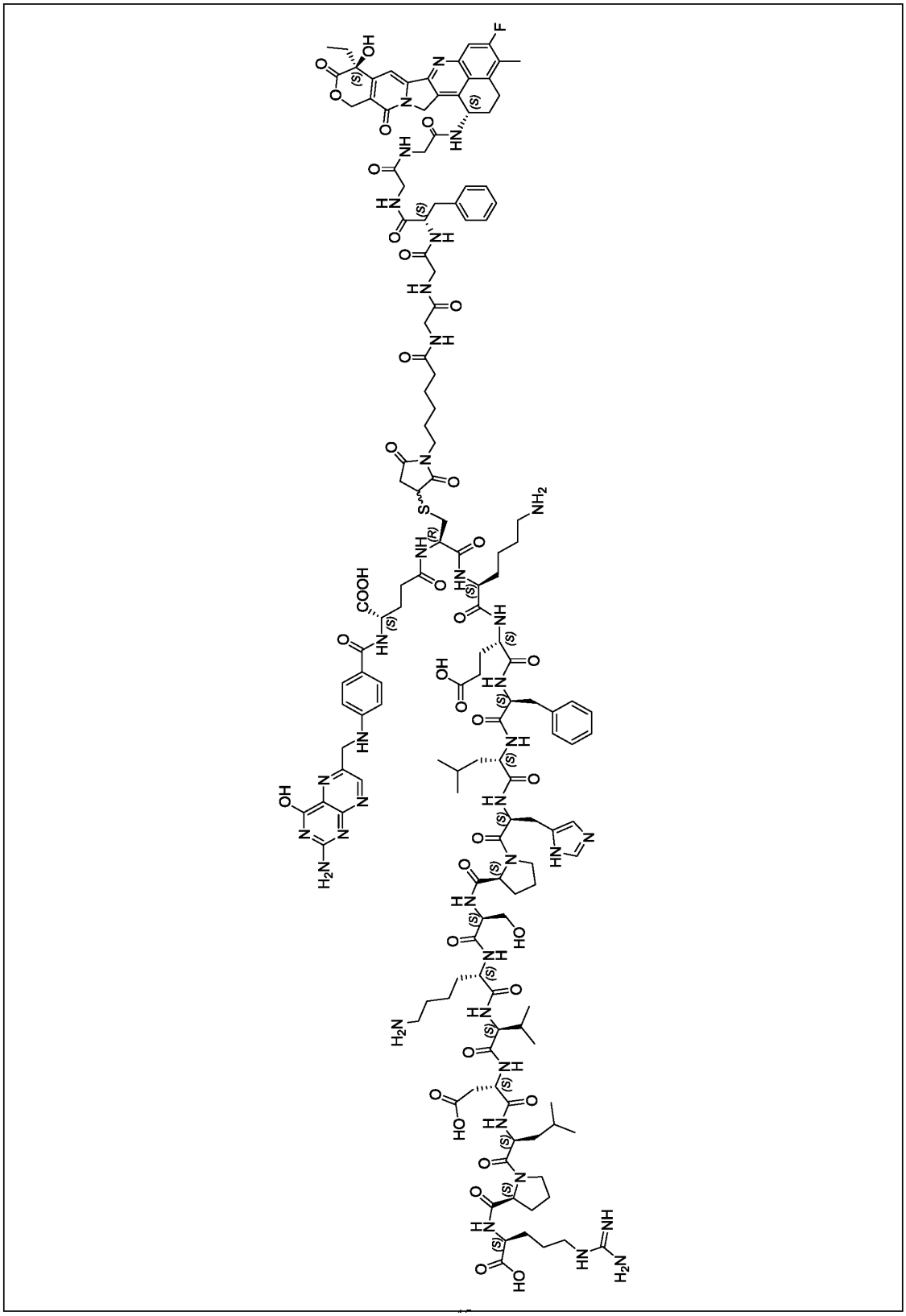


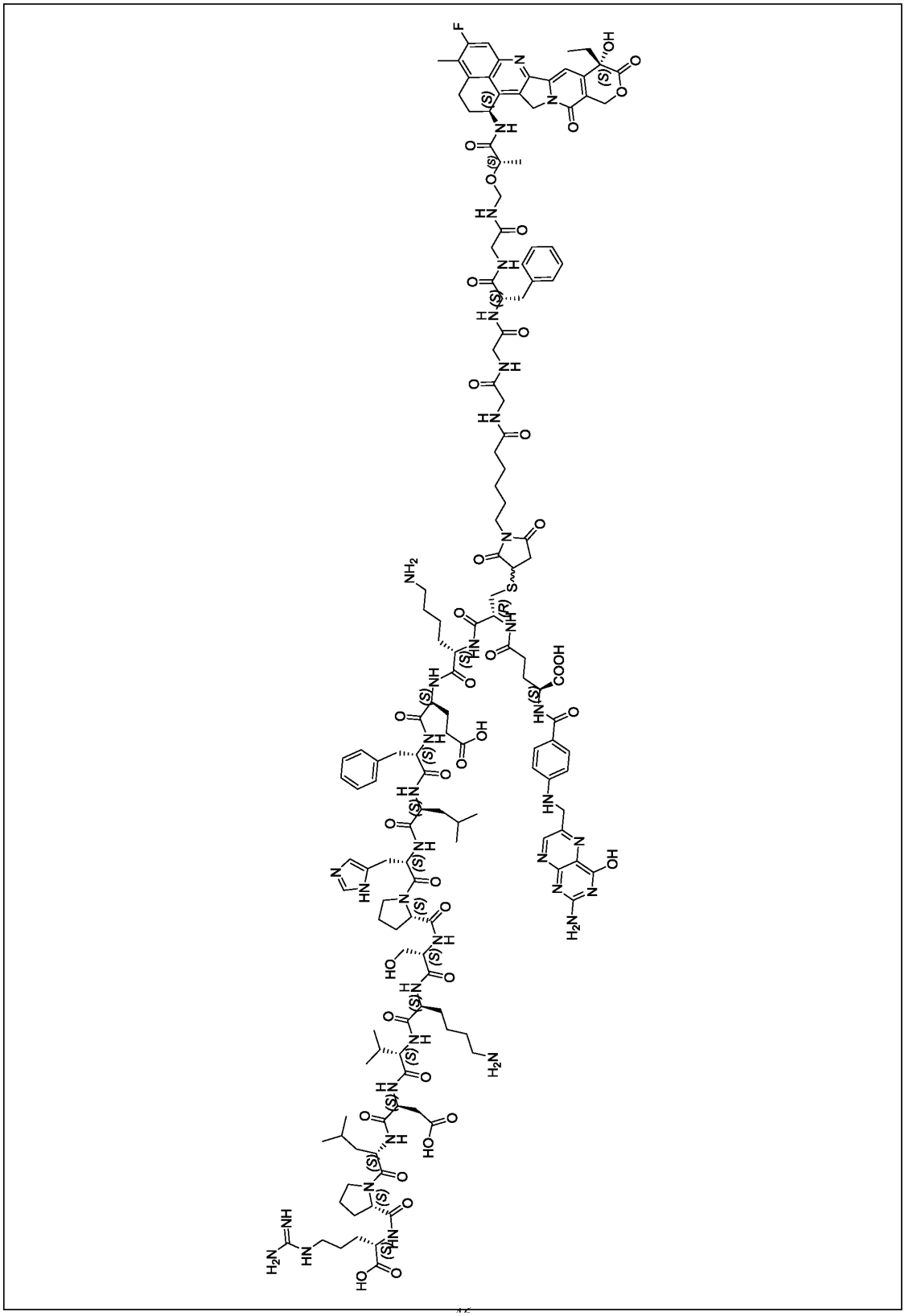


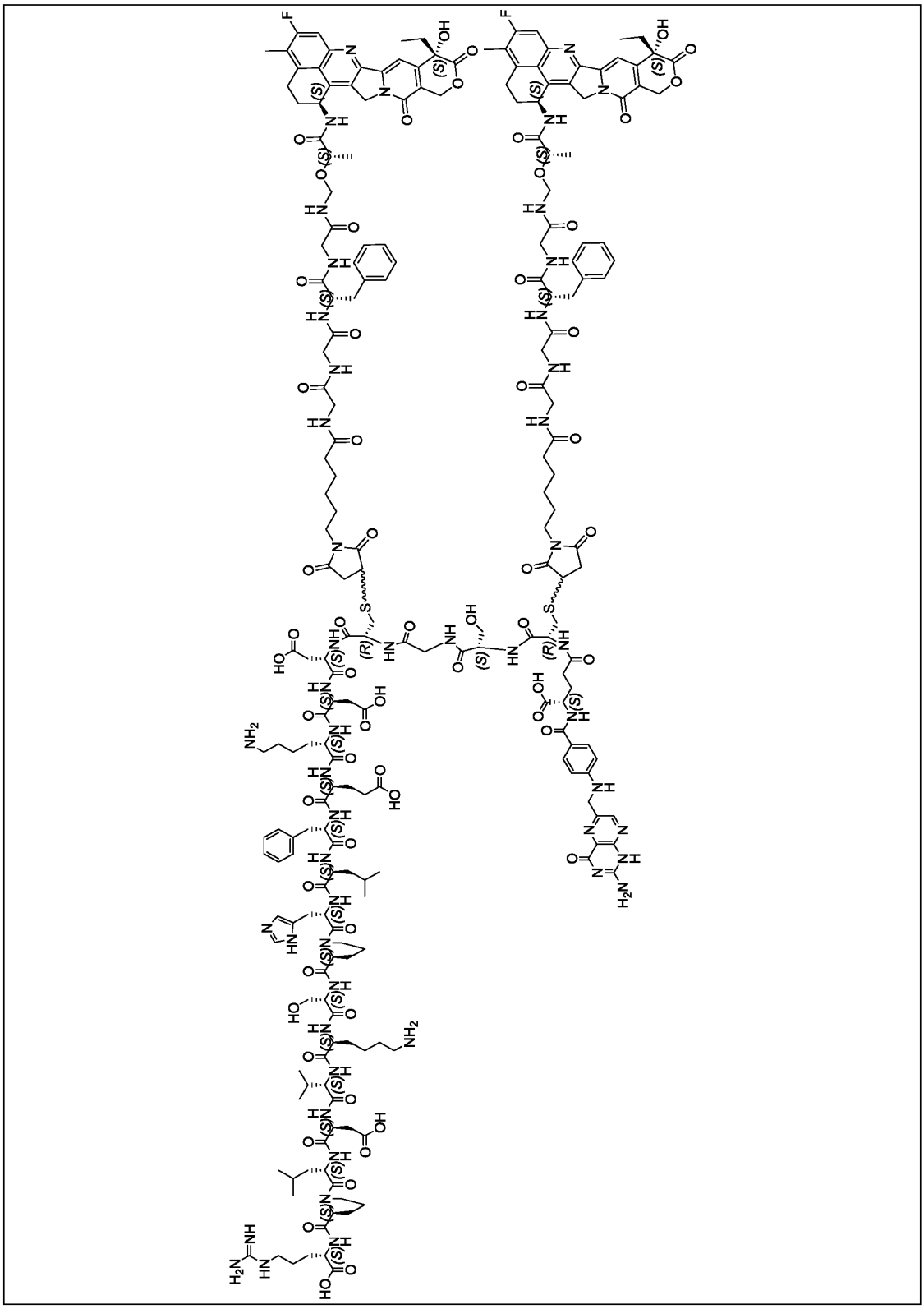


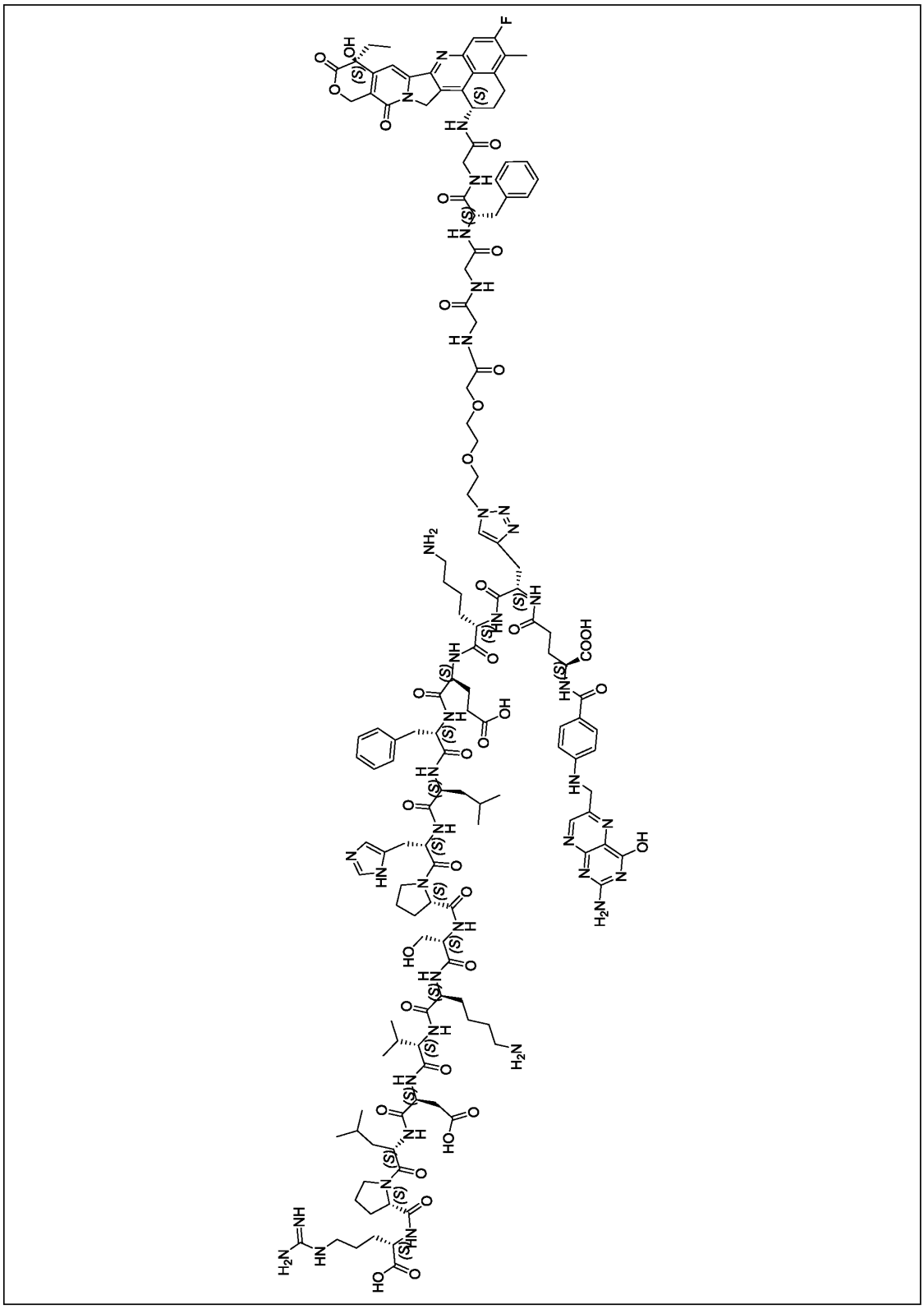


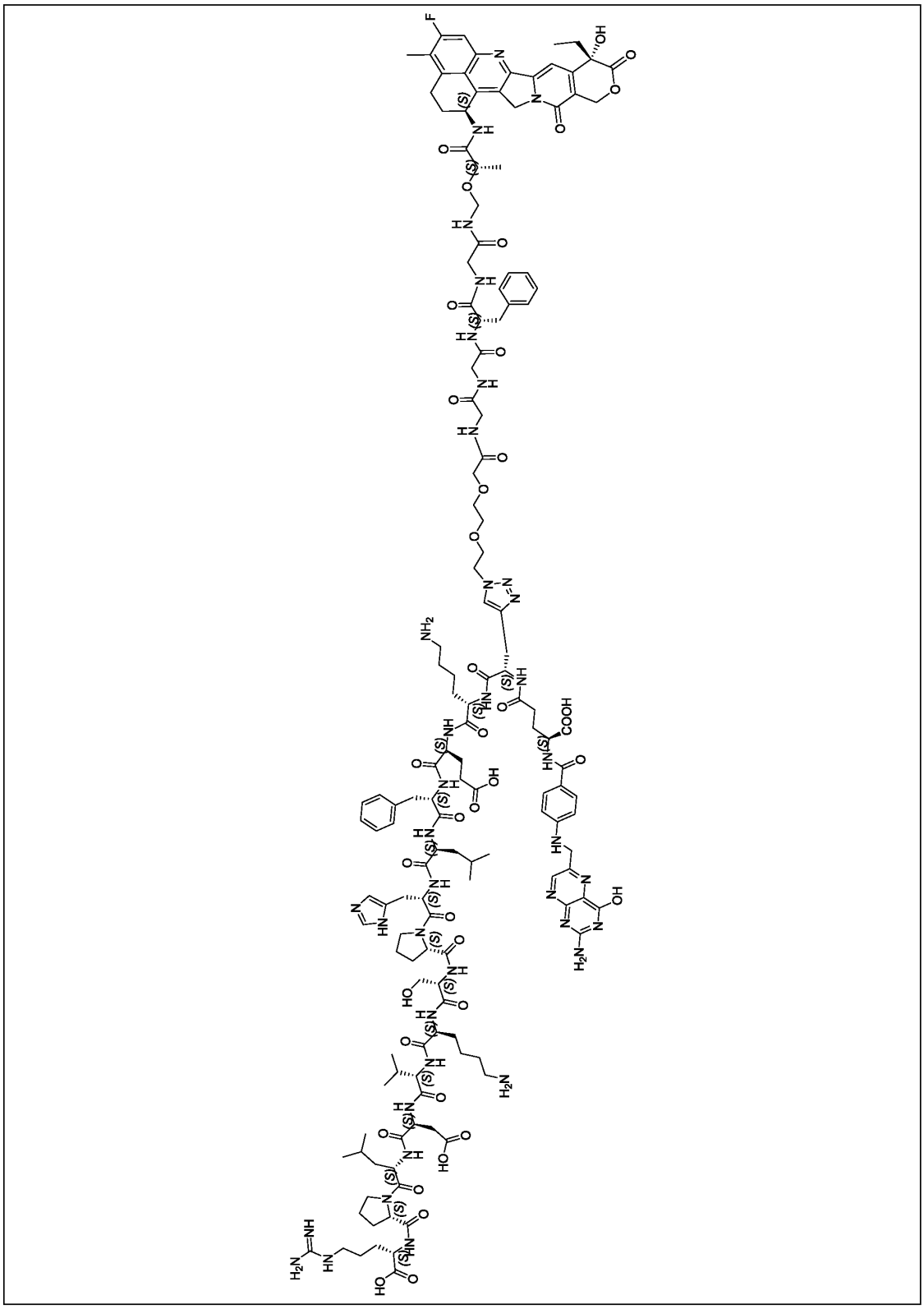


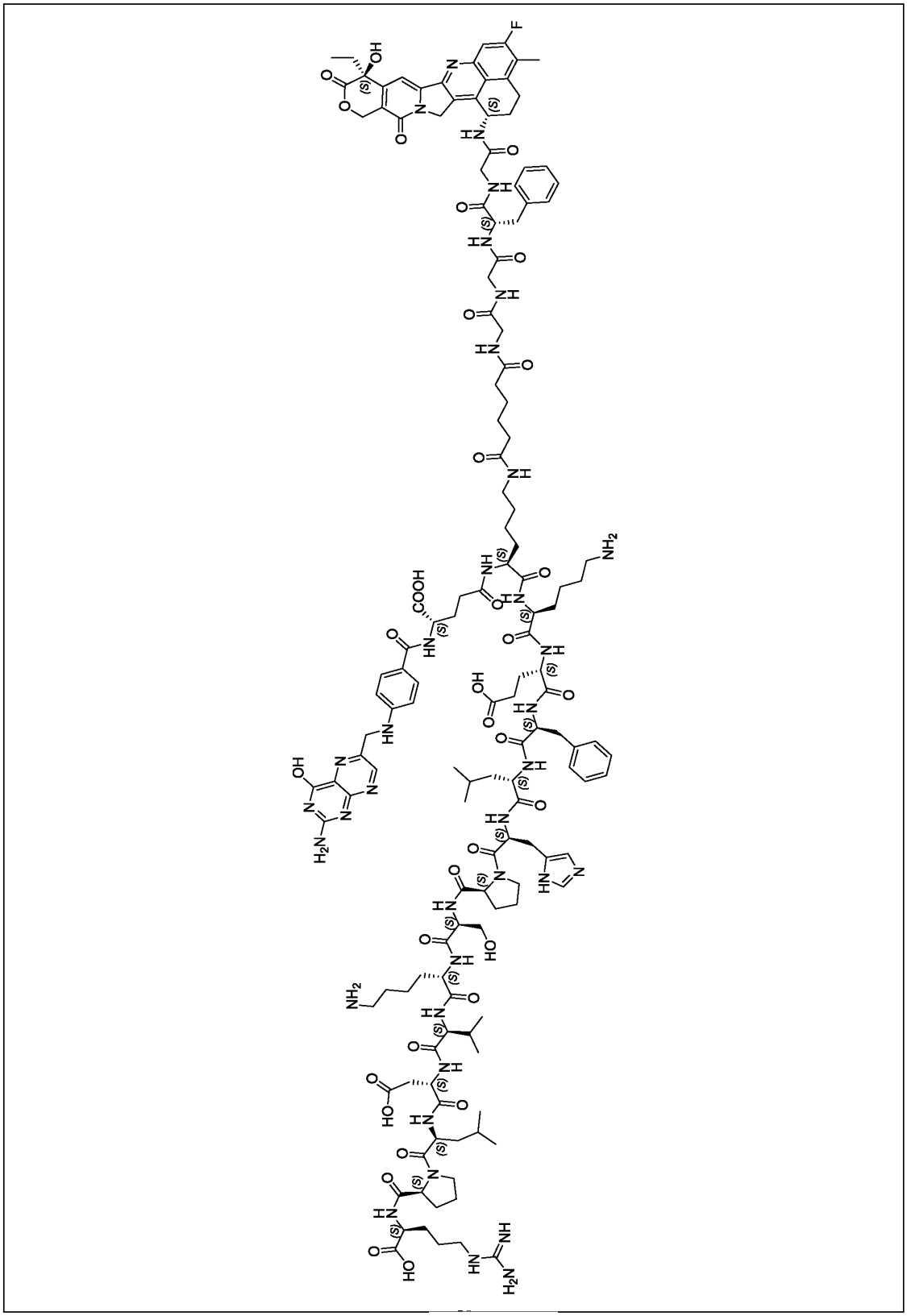


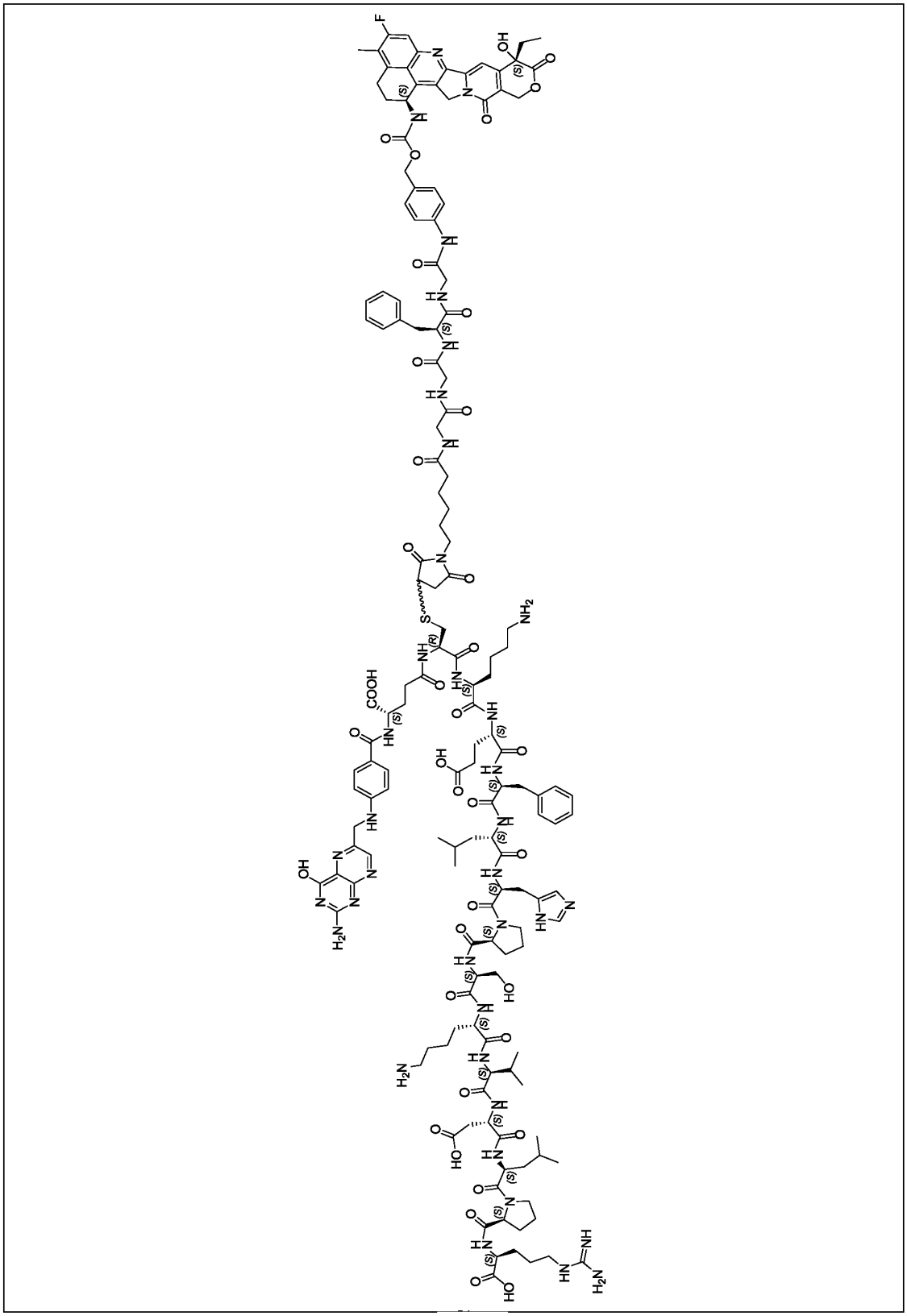


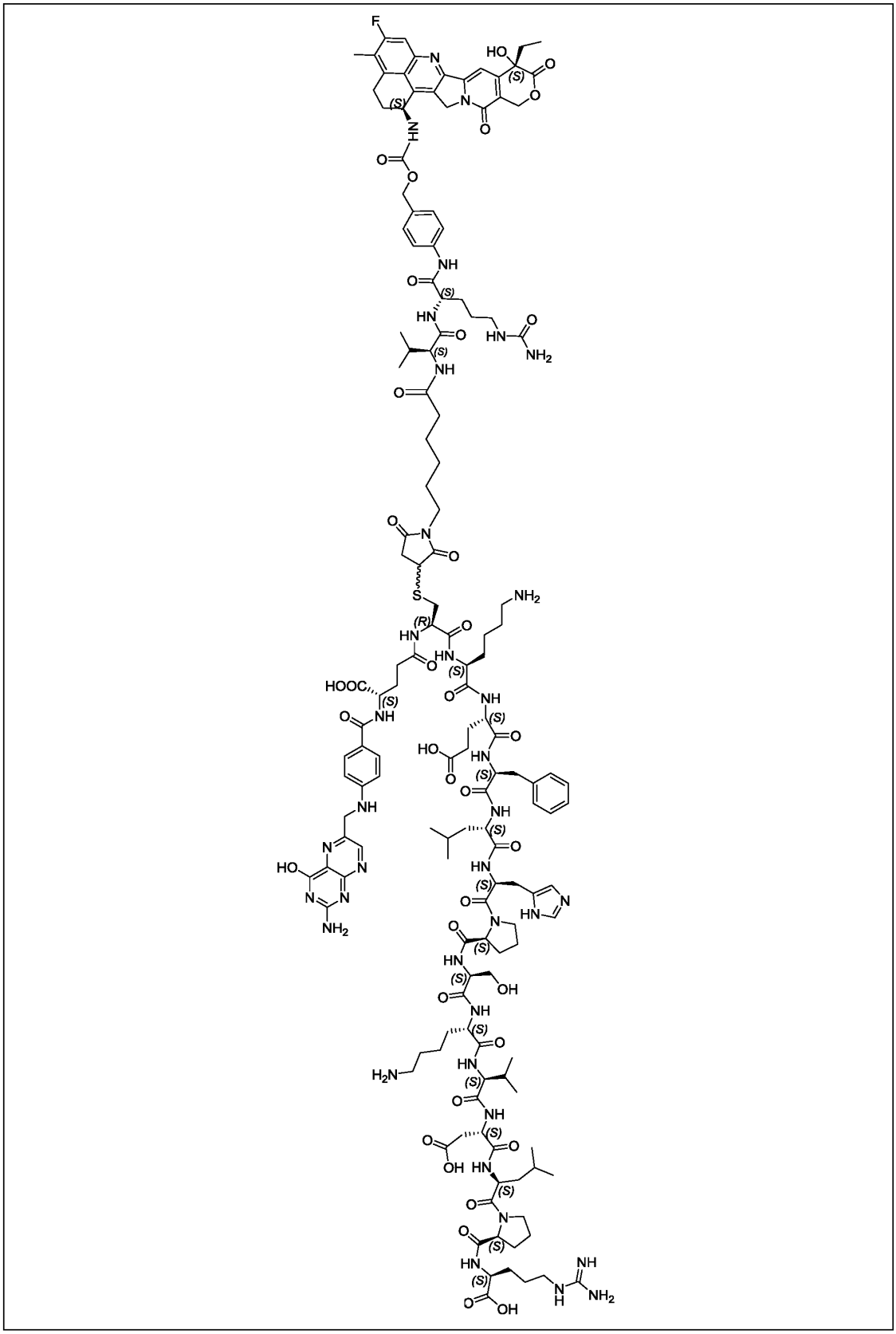


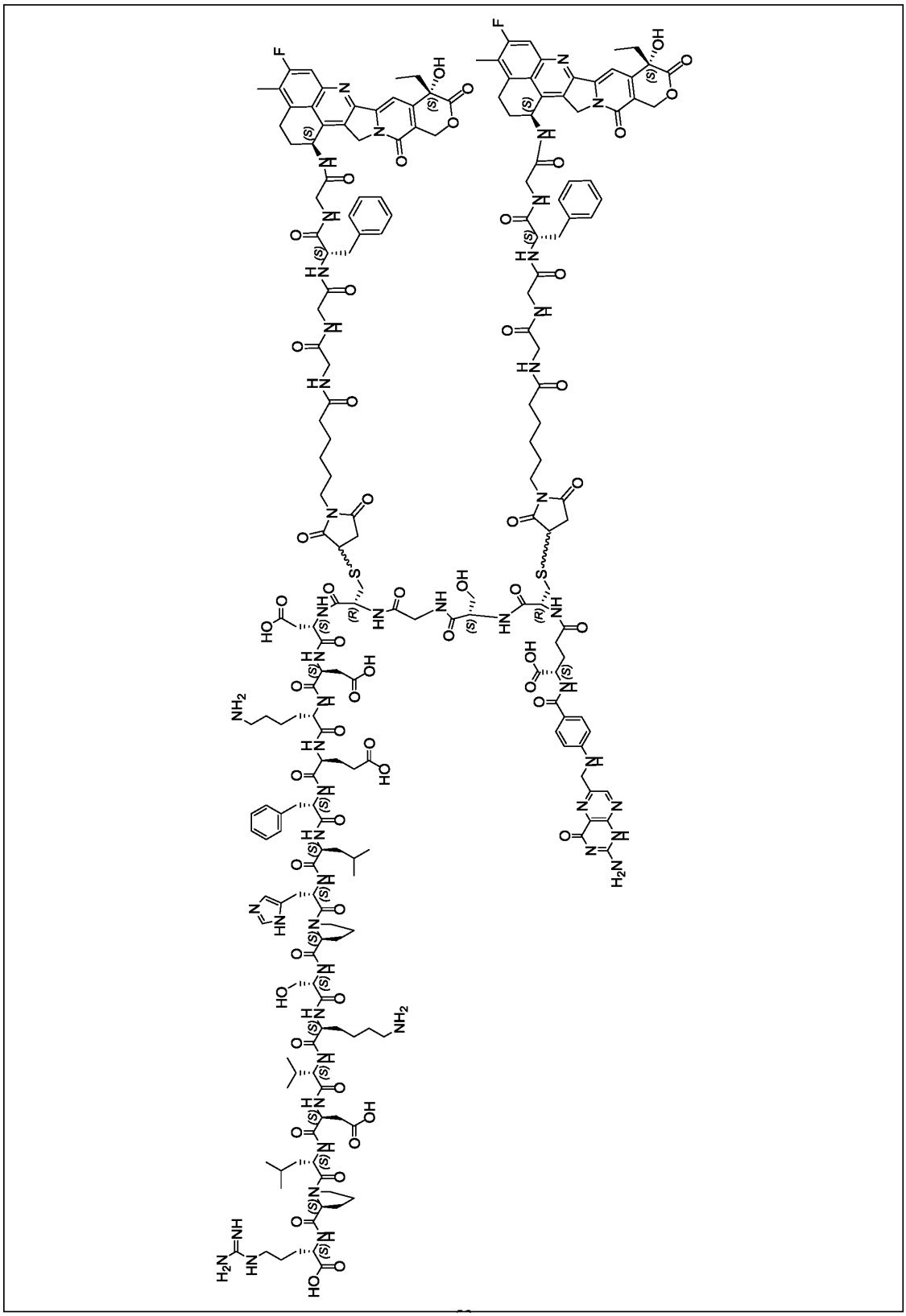


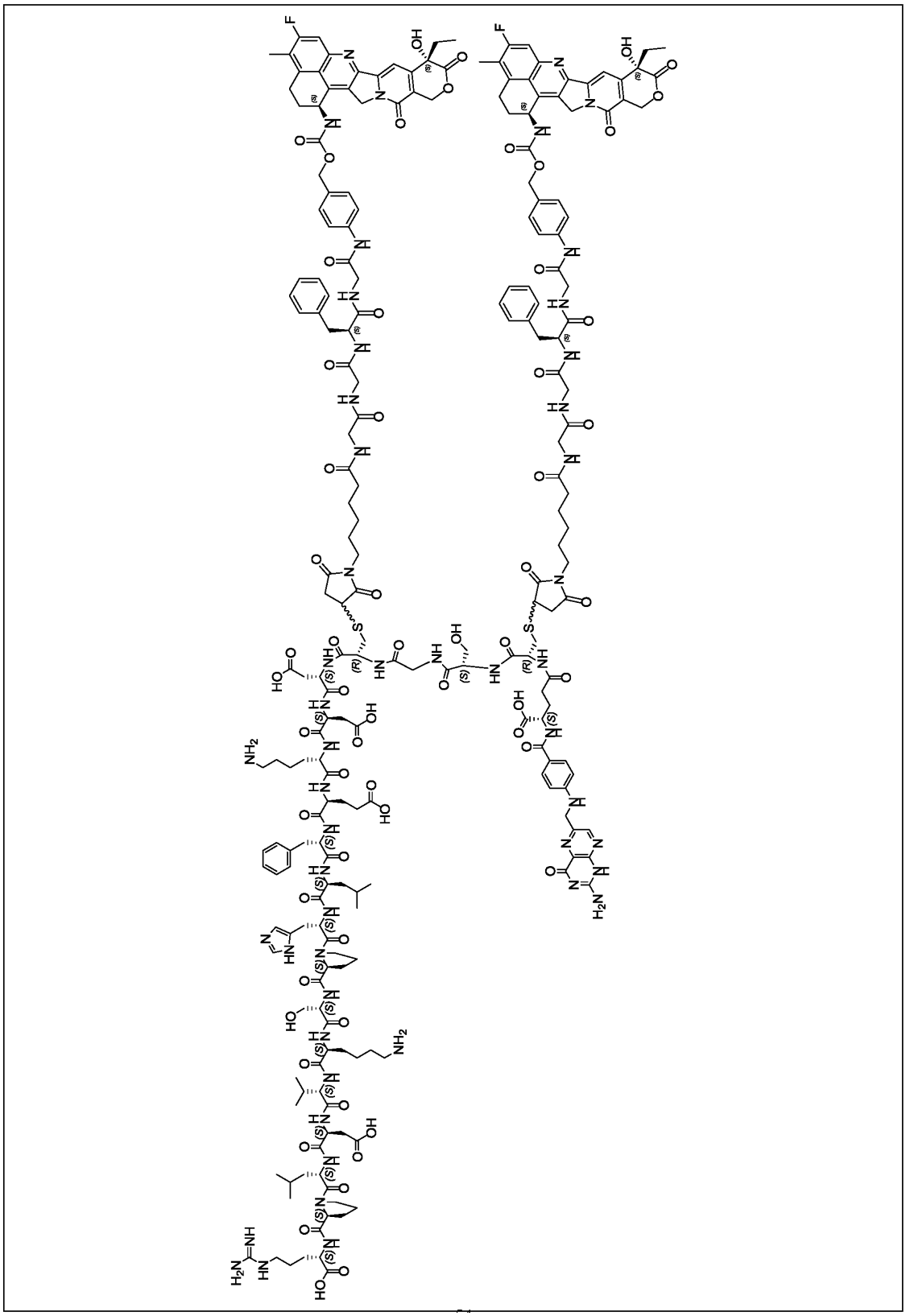


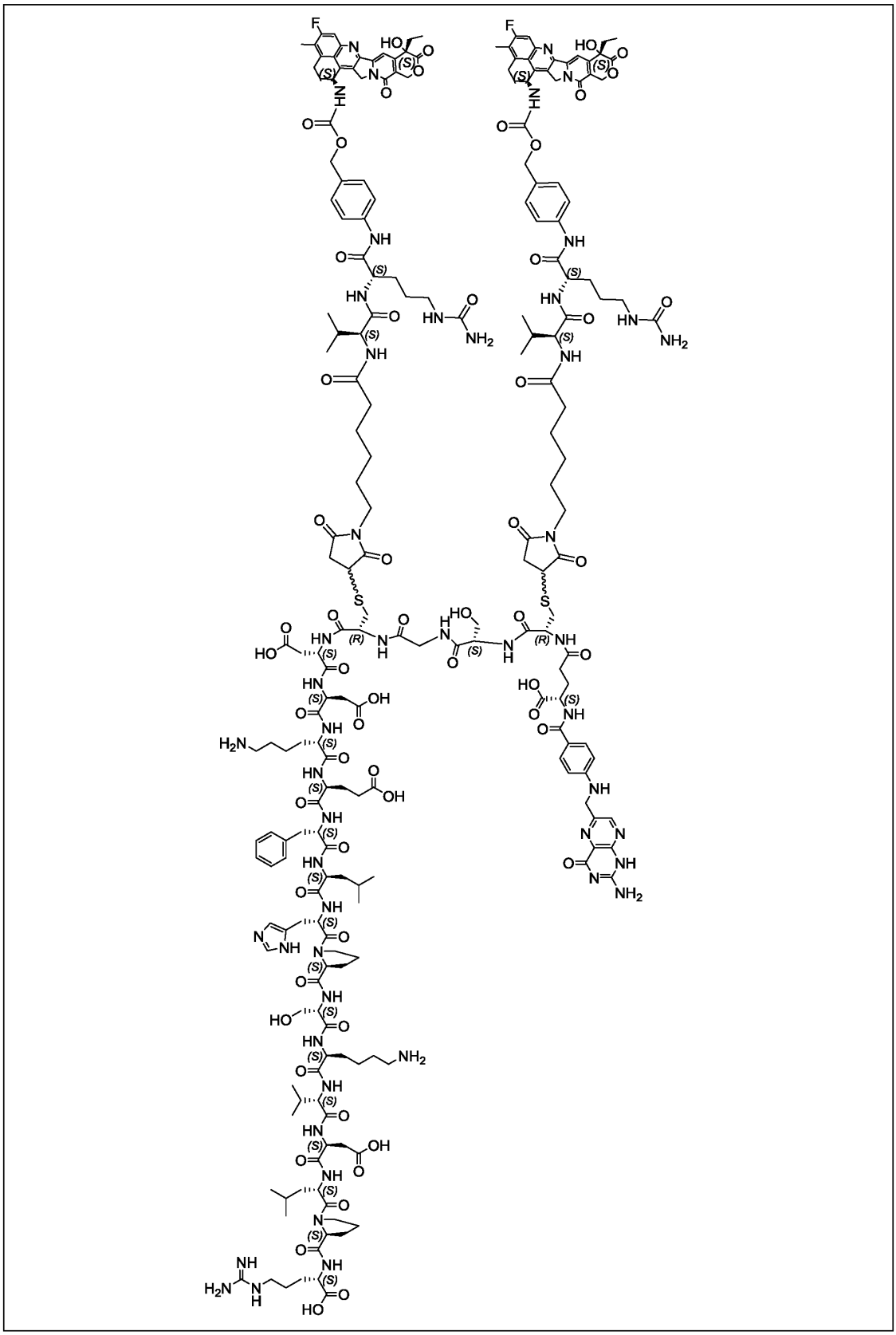












46. 一种药物组合物，所述药物组合物包含根据权利要求 1-45 中任一项所述的偶联体化合物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体。

47. 根据权利要求 46 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。

48. 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 1-45 中任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 46 或 47 所述的药物组合物。

49. 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 1-45 中任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 46 或 47 所述的药物组合物。

50. 根据权利要求 49 所述的方法，其中所述疾病选自下组：癌症、免疫性疾病、代谢疾病和神经疾病。

51. 根据权利要求 50 所述的方法，其中所述癌症选自下组：胰腺癌、胆道癌、肝癌、乳腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、食道癌、肺癌、肾癌、白血病、卵巢癌、胃癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、睾丸癌、皮肤癌、前列腺癌、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

52. 根据权利要求 50 所述的方法，其中所述免疫性疾病是自身免疫性疾病，优选地，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。

53. 根据权利要求 50 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。

54. 根据权利要求 50 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。

55. 根据权利要求 49-54 中任一项所述的方法，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。

56. 根据权利要求 1-45 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 46 或 47 所述的药物组合物在用于制备治疗对象中的疾病的药物中的用途。

57. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述疾病选自下组：癌症、免疫性疾病、代谢疾病和神经疾病。

58. 根据权利要求 57 所述的用途，其中所述癌症选自下组：胰腺癌、胆道癌、肝癌、乳腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、食道癌、肺癌、肾癌、白血病、卵巢癌、胃癌、子宫癌、子宫内膜癌、结肠癌、睾丸癌、皮肤癌、前列腺癌、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

59. 根据权利要求 57 所述的用途，其中所述免疫性疾病是自身免疫性疾病，优选地，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。

60. 根据权利要求 57 所述的用途，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。

61. 根据权利要求 57 所述的用途，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。

62. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每周一次、每周两次、每周三次、每三天一次、每两天一次、每天一次、每天两次或每天三次。

63. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每周一次。

64. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物的给药频次为每天三次。

65. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物以 1-150mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量范围施用。

66. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物以 1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg 或 150mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量施用。

67. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物以 50 mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量施用。68. 根据权利要求 56 所述的用途，其中所述偶联体化合物或其药学上可接受的盐或其药物组合物以 25 mg/kg 的所述偶联体化合物的剂量施用。