

多肽偶联物、包含所述多肽偶联物的药物组合物及其用途

相关申请的交叉引用

本申请要求对 2023 年 6 月 25 日提交的申请 PCT/CN2023/102220 享有优先权。在先申请视为本申请公开的一部分，并整体纳入本申请。

技术领域

本申请涉及一种多肽偶联物、包含所述多肽偶联物的药物组合物及其用途。

背景技术

2021 年初，世界卫生组织国际癌症研究机构发布了 2020 年全球最新癌症数据，数据显示，中国新发癌症人数及癌症死亡人数均位居全球第一。

目前治疗癌症的方法主要有手术治疗、化学治疗以及放射治疗。在化学治疗中，多西他赛、紫杉醇等紫杉烷类药物为经典的微管蛋白酶抑制剂，可通过抑制微管解聚从而抑制肿瘤细胞有丝分裂并触发细胞凋亡。紫杉醇被认为是应用最广泛的天然抗癌药物之一，已广泛应用于乳腺癌、大肠癌、膀胱鳞状细胞癌、头颈部癌症、小细胞以及非小细胞肺癌等疾病的治疗。多西他赛的抗癌谱较广，可用于晚期乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、头颈部癌、胰腺癌、小细胞肺癌、胃癌、黑色素瘤、软组织肉瘤等疾病的治疗。

但是紫杉醇与多西他赛等紫杉烷类药物对正常细胞的损害较大，随着在临床的广泛应用，其不良反应的发生率明显增多，用药量受到了很大的限制，治疗效果也不尽人意。同时，紫杉醇、多西他赛等紫杉烷类药物几乎不溶于水，给临床应用带来了限制。

因此提高紫杉烷类抗肿瘤药物的药效以及降低其毒副作用具有重要意义。

发明内容

本申请提供了一种多肽偶联物，其通过连接子将特定肽序列共价连接到化合物，可选择性地将化合物传递到目标细胞，从而提高细胞毒性化合物的疗效，降低全身毒性。进一步地，通过与本申请的多肽偶联，本申请的多肽偶联物以及本申请的药物组合物具有较好的水溶性，提高了紫杉醇、多西他赛等紫杉烷类药物的水溶性。

第一方面，本申请提供了一种具有式 (I) 结构的多肽偶联物：

多肽-连接子-化合物 式 (I)

其中，

所述多肽为间充质-上皮过渡因子靶向肽，

所述化合物为紫杉烷类化合物或其对映异构体、非对映异构体、溶剂合物或药学上可接受的盐。

间充质-上皮过渡因子 (C-Met) 是一种由肝细胞生长因子激活的酪氨酸激酶受体，可以调节多种生物过程。C-Met 靶向肽能与胃癌、肝癌、肺癌、结直肠癌等多种 C-Met 阳性的肿瘤细胞特异性结合，因此，与 C-Met 靶向多肽偶联的紫杉烷类化合物具有良好的靶向性，可提高紫杉烷类化合物的药效，减少其用量以及降低其毒副作用，从而更有效的进行肿瘤治疗。

第二方面，本申请提供了一种药物组合物，所述药物组合物包括如本申请所述的多肽偶联物，以及药学上可接受的载体。

第三方面，本申请提供了如本申请所述的多肽偶联物或如本申请所述的药物组合物在制备用于预防或治疗疾病的药物中的用途，可选地，所述疾病包括肿瘤，更可选地，所述肿瘤包括甲状腺癌、食管癌、肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、肝癌、胆管癌、肾癌、胰腺癌、肠癌、结直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、输卵管癌、皮肤癌、脑瘤、脑胶质瘤、星形胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨肉瘤、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病或慢性髓细胞白血病中的一种或多种。

附图说明

以下提供附图的简要说明，其用于说明本文所公开的示例性实施方式，而不是为了限制这些实施方式。

图 1 的 A 示出了实施例 3 中肿瘤细胞横向迁移图，具体示出了 0h 和 48h 时，空白组、阳性对照组和给药组的肿瘤细胞横向迁移图；图 1 的 B 示出了实施例 3 中肿瘤细胞横向迁移率统计图，具体示出了空白组、阳性对照组和给药组的肿瘤细胞横向迁移率统计图。

图 2 的 A 示出了实施例 4 中肿瘤细胞纵向迁移图，具体示出了 48h 时，空白组、阳性对照组和给药组的肿瘤细胞纵向迁移图；图 2 的 B 示出了实施例 4 中肿瘤细胞纵向迁移率统计图，具体示出了空白组、阳性对照组和给药组的肿瘤细胞纵向迁移率统计图。

图 3 的 A 示出了实施例 5 中，针对接种非小细胞肺癌 A549 细胞的裸小鼠，分别经生理盐水、DOC 以及不同浓度的 DOC-AI 处理后肿瘤体积变化直观图；图 3 的 B 示出了实施例 5 中，针对接种非小细胞肺癌 A549 细胞的裸小鼠，分别经生理盐水、DOC 以及不同浓度的 DOC-AI 处理后肿瘤体积变化曲线图。

图 4 示出了实施例 5 中，针对接种非小细胞肺癌 A549 细胞的裸小鼠，分别经生理盐水、DOC 以及不同浓度的 DOC-AI 处理后裸鼠体重变化曲线图。

图 5 示出了实施例 5 中，针对接种非小细胞肺癌 A549 细胞的裸小鼠，分别经生理盐水、DOC 以及不同浓度的 DOC-AI 处理后肿瘤瘤体重量统计图。

图 6 示出了实施例 5 中，针对接种胃癌细胞 MKN-45 的裸小鼠，分别经生理盐水、PTX 以及不同浓度的 PTX-AI 处理后肿瘤体积变化图。

图 7 示出了实施例 6 中 DOC-AI 的肝微粒体代谢曲线图。

图 8 示出了实施例 6 中 PTX-AI 的肝微粒体代谢曲线图。

图 9 的 A 示出了实施例 5 中，针对接种胃癌细胞 MKN-45 的裸小鼠，经 DOC 以及 DOC-AI 处理后的抑瘤率统计图；图 9 的 B 示出了实施例 5 中，针对接种胃癌细胞 MKN-45 的裸小鼠，经生理盐水、DOC 以及 DOC-AI 处理后的裸鼠肿瘤体积变化曲线图；图 9 的 C 示出了实施例 5 中，针对接种胃

癌细胞 MKN-45 的裸小鼠，经生理盐水、DOC 以及 DOC-AI 处理后的裸鼠体重变化曲线图。

图 10 的 A 示出了实施例 7 中 DOC 标准溶液的浓度-峰面积标准曲线；图 10 的 B 示出了实施例 7 中 DOC-AI 标准溶液的浓度-峰面积标准曲线；图 10 的 C 示出了实施例 7 中 PTX 标准溶液的浓度-峰面积标准曲线；图 10 的 D 示出了实施例 7 中 PTX-AI 标准溶液的浓度-峰面积标准曲线。

具体实施方式

除非另有说明，否则在本说明书和权利要求书中使用的表示含量、浓度、比例、重量、粒径、百分比、技术效果等的所有数字在任何情况下均应理解为由术语“约”或“大致”修饰。因此，除非有相反的指示，否则以下说明书和所附权利要求书中列出的数字参数是近似值。

除非另有说明，本文使用的术语对所属技术领域的技术人员具有通常的理解含义。对于本领域技术人员来说，其可以根据通过本申请寻求得到的期望性质和效果而变化，应根据有效数字位数和常规舍入方法或者本领域技术人员理解的方式来解释每个数值参数。一般而言，本文使用的命名和本文所描述的有机化学、药物化学、生物学的实验操作是本领域公知的，而且在本领域中普遍采用。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语一般具有本申请所属领域的普通技术人员通常理解的含义。在本文使用的术语存在多个定义的情况下，除非另有说明，以本部分的定义为准。

在本文中使用时，表述“A 和/或 B”包括三种情况：(1) A；(2) B；以及 (3) A 和 B。表述“A、B 和/或 C”包括七种情况：(1) A；(2) B；(3) C；(4) A 和 B；(5) A 和 C；(6) B 和 C；以及 (7) A、B 和 C。类似表述的含义可以此类推。

多肽偶联物

第一方面，本申请提供了一种具有式 (I) 结构的多肽偶联物：

多肽-连接子-化合物 式 (I)

其中，

所述多肽为间充质-上皮过渡因子靶向肽或其衍生物，

所述化合物为紫杉烷类化合物或其对映异构体、非对映异构体、溶剂合物或药学上可接受的盐。

在本文中使用时，术语“间充质-上皮过渡因子”是一种由肝细胞生长因子激活的酪氨酸激酶受体，调节多种生物过程，可用 c-Met 表示。

在本文中使用时，除非另有说明或与上下文向矛盾，否则术语“多肽”或“肽”或“靶向肽”涵盖所提及的肽本身及其药学上可接受的盐、前体药和代谢物。

在本文中使用时，术语“药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐。适当的酸加成盐是由形成无毒性盐的酸所形成的。其实例包括但不限于：乙酸盐、己二酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、硼酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环己胺磺酸盐、乙二磺酸盐、甲酸盐、反丁烯二酸盐、葡萄糖庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、六氟磷酸盐、2-(4-羟苄基)苯甲酸盐、氯化物/氯化物、氢溴化物/溴化物、氢碘化物/碘化物、2-羟乙磺酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、茶酸盐、2-茶磺酸盐、烟碱酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、草酸盐、十六酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、焦谷氨酸盐、葡萄糖二酸盐、硬脂酸盐、水杨酸盐、单宁酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和三氟乙酸盐。适当的碱加成盐是由形成无毒性盐的碱所形成的。其实例包括但不限于：铝、精氨酸、钙、胆碱、二乙胺、二乙醇胺、甘氨酸、赖氨酸、镁、葡甲胺、乙醇胺、钾、钠、氮丁三醇和锌盐。还可形成酸和碱的半盐，例如半硫酸盐和半钙盐。关于合适的盐的综述，参见 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002)。

在一些实施方式中，术语“前体药”指的是通过在生理条件下在活体内例如通过在酶、胃酸等作用下进行的氧化、还原、水解等反应而转化为式 I 的肽或其衍生物的所有分子。

在本文中使用时，术语“代谢物”指的是在细胞或有机体（优选人）中的源自式 I 的肽或其衍生物的所有分子。

在本文中使用时，术语“对映异构体”是指两个化合物平面结构相同，在立体结构上互为实物与镜像而不可重叠的立体异构体。

在本文中使用时，术语“非对映异构体”是指两个化合物平面结构相同，具有多个构型不同的不对称原子，该两个化合物不呈实物与镜像的关系。

在本文中使用时，术语“溶剂合物”是指一种或多种溶剂分子与本申请的化合物或其盐缔合。形成药学上可接受的溶剂合物的溶剂包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、乙酸乙酯或乙酸等。

在一些实施方式中，所述间充质-上皮过渡因子靶向肽具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。

在本文中使用时，术语“氨基酸”涵盖 L 型氨基酸和 D 型氨基酸。

在一些实施方式中，所述衍生物与所述间充质-上皮过渡因子靶向肽相比包含选自以下的任意一种或多种修饰：氨基酸修饰、保守氨基酸取代或氨基酸残基中的氢被取代。

在本文中使用时，术语“多种”是指两种或大于两种。

在本文中使用时，多肽的“衍生物”是指：在所述间充质-上皮过渡因子靶向肽的基础上进行氨基酸修饰、保守氨基酸取代和/或氨基酸残基中的氢被取代而得到的产物。

在本文中使用时，术语“氨基酸修饰”的种类包括但不限于 N-末端修饰、C-末端修饰和侧链修饰。“氨基酸修饰”的方式包括但不限于羟基化、羧基化、烷基化、酰化、磷酸化、磺酸化、酰胺化、醛基化、醇基化、巯基乙胺化、酯基化、糖基化等修饰。

在本文中使用时，术语“保守氨基酸取代”指的是将一种氨基酸用具有相似的结构和/或化学特性的另一种氨基酸取代，诸如用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸、用谷氨酸取代天冬氨酸、或用丝氨酸取代苏氨酸。因此，“保守氨基酸取代”意味着取代对于肽的活性不重要的氨基酸，或用将一种氨基酸用具有相似特性（例如，酸性、碱性、带正电或带负电、极性或非极性等）的其它氨基酸取代，使得即使取代重要氨基酸也不会降低所述肽的活性。提供功能相似的氨基酸的保守氨基酸取代是本领域众所周知的。例如，以下六组各自含有彼此是保守取代的氨基酸：1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3) 天冬酰胺(N)、谷氨

酰胺(Q); 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K); 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V); 和 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

在本文中关于多肽使用时,“氨基酸”与“氨基酸残基”具有相同含义,是指当氨基酸之间通过化学键而连接时,其部分基团由于参与了连接键的形成而损失,剩余的氨基酸部分即为氨基酸残基。

在一些实施方式中,所述保守氨基酸取代包括,例如,如 RSPYANS 所示的氨基酸序列中的 S 被 A 或 T 取代,如 RSPYANS 所示的氨基酸序列中的 Y 被 F 或 W 取代,如 RSPYANS 所示的氨基酸序列中的 A 被 S 或 T 取代。

在一些实施方式中,所述氨基酸残基中的氢被取代可以是氨基酸残基中的氢被本领域已知的任何常规取代基取代,包括但不限于烷基、烯基、炔基、芳香基、烷氧基、羧基、醛基、羰基、羟基、卤素、氰基、酰基、磺酸基、氨基、巯基或硝基等。

在一些实施方式中,所述紫杉烷类化合物为二环类紫杉烷类化合物、三环类紫杉烷类化合物、四环类紫杉烷类化合物或五环类紫杉烷类化合物中的一种或多种。

在本文中使用时,术语“紫杉烷类化合物”主要包括具有紫杉烷骨架结构的化合物。

在本文中使用时,术语“m 环类紫杉烷类化合物”是指所述紫杉类化合物具有 m 个稠和环的骨架,例如,二环类紫杉烷类化合物是指具有两个稠和环骨架的紫杉烷类化合物。类似表述的含义可以此类推。

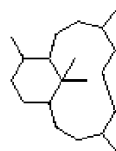
在本文中使用时,术语化合物的“骨架”是指化合物的核心结构,可以在骨架上进行多个取代基取代以形成不同的化合物,具体到本申请,可以得到不同的紫杉烷类化合物。

在本文中使用时,术语“稠和”是指两个环之间共用的原子(包括碳原子或杂原子)大于等于两个。

在本文中使用时,术语“环”包括饱和环、不饱和环。

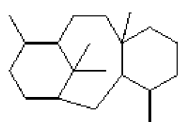
在一些实施方式中,所述二环紫杉烷类化合物包括 6 元环稠和 12 元环紫杉烷类化合物。在一些实施方式中,所述 6 元环稠和 12 元环紫杉烷类化合物的骨架具有式 A 的结构。在一些实施方式中,所述 6 元环稠和 12 元环

紫杉烷类化合物可在式 A 骨架的基础上进行多种取代基的取代以形成不同种类的 6 元环稠和 12 元环紫杉烷类化合物。

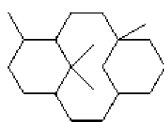


式 A

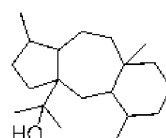
在一些实施方式中，所述三环紫杉烷类化合物包括 6 元环稠和 8 元环稠和 6 元环、6 元环稠和 10 元环稠和 6 元环、5 元环稠和 7 元环稠和 6 元环、或 5 元环稠和 6 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物中的一种或多种。在一些实施方式中，所述 6 元环稠和 8 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物的骨架具有式 B 的结构。在一些实施方式中，所述 6 元环稠和 10 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物的骨架具有式 C 的结构。在一些实施方式中，所述 5 元环稠和 7 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物的骨架具有式 D 的结构。在一些实施方式中，所述 5 元环稠和 6 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物的骨架具有式 E 的结构。在一些实施方式中，所述紫杉烷类化合物可在式 B-E 骨架的基础上进行多种取代基的取代以形成不同种类三环紫杉烷类化合物。



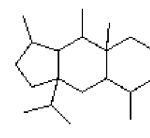
式B



式C

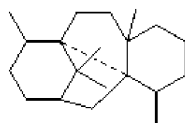


式D

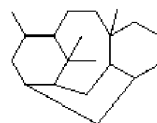


式E

在一些实施方式中，所述四环紫杉烷类化合物包括 6 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 6 元环、或 6 元环稠和 8 元环稠和 6 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物中的一种或多种。在一些实施方式中，所述 6 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物的骨架具有式 F 的结构。在一些实施方式中，所述 6 元环稠和 8 元环稠和 6 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物的骨架具有式 G 的结构。在一些实施方式中，所述紫杉烷类化合物可在式 F 或 G 骨架的基础上进行多种取代基的取代以形成不同种类的四环紫杉烷类化合物。



式F



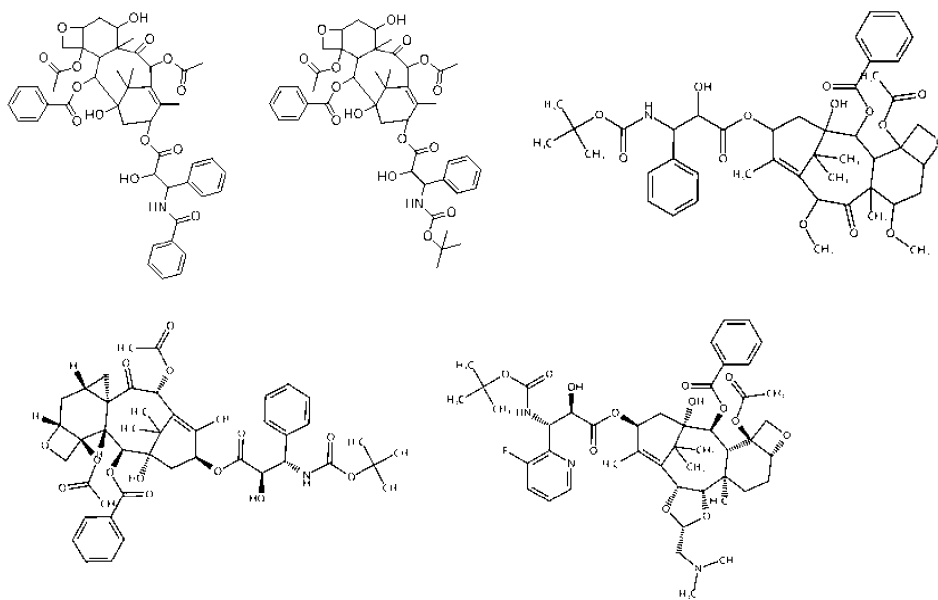
式G

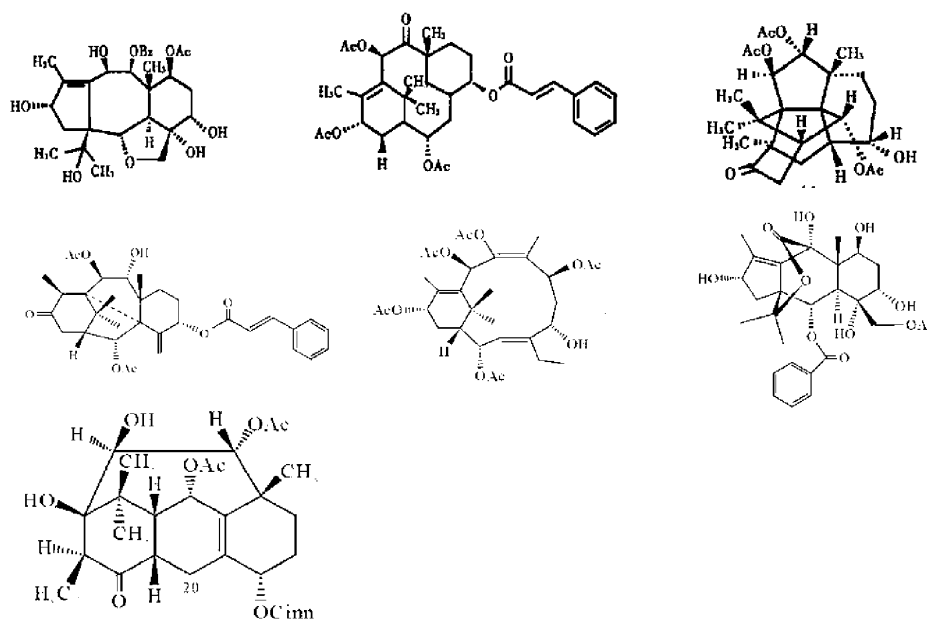
在一些实施方式中，所述五环紫杉烷类化合物包括 6 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物。在一些实施方式中，所述 6 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物的骨架具有式 H 的结构。在一些实施方式中，所述紫杉烷类化合物可在式 H 骨架的基础上进行多种取代基的取代以形成不同种类的五环紫杉烷类化合物。



式H

在一些实施方式中，所述紫杉烷类化合物包括如下任一所示的结构





关于更多的紫杉烷类化合物，参见付焱等.紫杉烷类化合物研究进展[J].天然产物研究与开发, 2004.Vol.16, No.3, P258-264；霍长虹等.天然紫杉烷类化合物的核磁共振氢谱特征[J].波谱学杂志, 2007. Vol.24, No.1, P101-118；王春霖等.紫杉烷类化合物的研究进展[J]. 河北医药, 2005。在一些实施方式中，本领域已知的紫杉烷类化合物都可以引入本申请，成为本申请所述的紫杉烷类化合物。

在一些实施方式中，所述紫杉烷类化合物包括紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、拉洛他赛或替司他赛中的一种或多种，可选地，所述紫杉烷类化合物包括紫杉醇或多西他赛中的一种或多种。在一些实施方式中，所述紫杉烷类化合物是紫杉醇。在一些实施方式中，所述紫杉烷类化合物是多西他赛。

紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、拉洛他赛和替司他赛均具有6元环稠和8元环稠和6元环的骨架结构，具有相同骨架的化合物生物活性接近。

在一些实施方式中，所述连接子为 $\text{CO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ， n 为 2-6 的整数。在一些实施方式中，所述连接子为 $\text{CO}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ， n 选自 2、3、4、5 或 6。

在一些实施方式中，所述连接子为琥珀酸、戊二酸、己二酸、庚二酸或辛二酸。

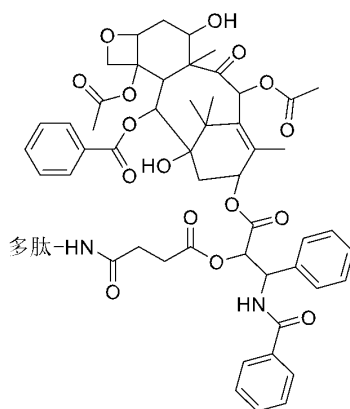
在本文中使用时，术语“连接子”是指连接所述多肽和所述紫杉烷类化合物的结构。

在本文中使用时，术语“琥珀酸”是指化学结构为 $\text{HOC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)OH}$ 的化合物。

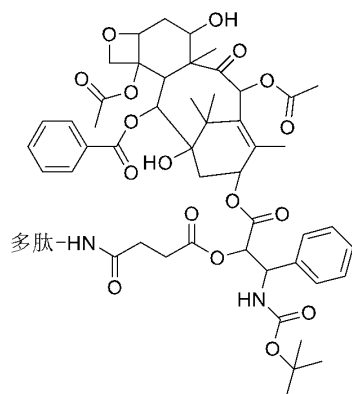
在一些实施方式中，所述连接子与所述多肽通过形成酰胺键连接。在具体的实施方式中，所述连接子的羧基与所述多肽的氨基形成酰胺键，所述连接子与所述多肽通过酰胺键连接。在一些实施方式中，所述连接子的羧基与所述多肽中氮端氨基酸的氨基形成酰胺键，所述氮端氨基酸的氨基不是侧链氨基。在一些实施方式中，所述连接子的羧基与所述多肽中精氨酸的非侧链氨基形成酰胺键。

在一些实施方式中，所述连接子与所述紫杉烷类化合物通过形成酯键连接。在具体的实施方式中，所述连接子的羧基与所述紫杉烷类化合物的羟基形成酯键，所述连接子与所述紫杉烷类化合物通过酯键连接。在一些实施方式中，所述连接子的羧基与所述紫杉烷类化合物 2' 位的羟基形成酯键。

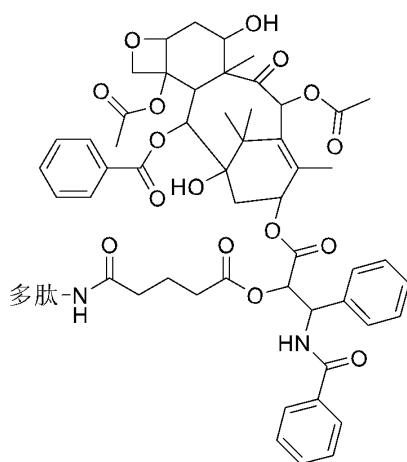
在一些实施方式中，所述多肽偶联物具有下式 (II)、(III) 或 (IV) 的结构：



式 (II)



式 (III)



式 (IV)

所述多肽具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或是其衍生物, 所述连接子的羧基与所述多肽氮端氨基酸的氨基通过形成酰胺键连接。

多肽偶联物的制备方法

根据本申请的一种实施方式, 本申请提供了一种制备如本申请所述的多肽偶联物的方法, 所述方法包括:

- (1) 提供所述多肽;
- (2) 连接所述紫杉烷类化合物和所述连接子, 得到所述连接子-紫杉烷类化合物;
- (3) 将所述多肽和所述连接子-紫杉烷类化合物混合进行液相反应, 得到所述多肽偶联物。

在一些实施方式中，在步骤（1）中，可以根据本领域已知的任何方式合成本申请所述的多肽，例如，可以通过固相反应合成所述多肽，也可以通过液相反应合成所述多肽。

在一些实施方式中，所述固相反应为 Fmoc 固相多肽反应。在一些实施方式中，Fmoc 固相多肽反应为本领域多肽合成的现有技术，本领域技术人员可以根据实际情况进行合成。

在一些实施方式中，按照所述多肽序列氨基酸顺序，将碳端氨基酸，例如 Fmoc-碳端氨基酸-OH 偶联到 Wang 树脂上，脱除 Fmoc 后按照所述多肽氨基酸顺序依次偶联剩余氨基酸，每次偶联新的氨基酸后需脱除 Fmoc，得到多肽树脂。在一些实施方式中，所述剩余氨基酸以 Fmoc-氨基酸-OH 的形式加入。

在一些实施方式中，所述氨基酸的侧链可选地采用保护基团进行保护，具体地，氨基酸侧链保护基团包括叔丁基（t-Bu）、三苯甲基（Trt）或 Pbf。在一些实施方式中，丝氨酸（Ser）、酪氨酸（Tyr）、苏氨酸（Thr）可以采 t-Bu 进行保护。在一些实施方式中，天冬酰胺（Asn）、谷氨酰胺（Gln）可以采用 Trt 进行保护。在一些实施方式中，精氨酸（Arg）可以采用 Pbf 进行保护。

在一些实施方式中，在所述多肽树脂中加入裂解试剂，得到所述多肽。在一些实施方式中，所述裂解试剂包括三氟乙酸（TFA）或三异丙基硅烷（Tis）中的一种或两种。

在一些实施方式中，在步骤（2）中，所述紫杉烷类化合物和所述连接子的反应温度为室温，反应时间 $\geq 3\text{h}$ 。

在本文中使用时，术语“室温”是指常温或室内温度，例如室温可以为 $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、 $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 或 $20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

在一些实施方式中，在步骤（3）中，所述连接子-紫杉烷类化合物与所述多肽反应的温度为室温，反应时间为 3h-8h 或 4h-6h。

在一些实施方式中，可以使用 HPLC、薄层色谱、MR、熔点、质谱来验证得到的所述多肽偶联物。在一些实施方式中，可以通过质谱和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来验证得到的所述多肽偶联物。

药物组合物

第二方面，本申请提供了一种药物组合物，所述药物组合物包括如本申请所述的多肽偶联物，以及药学上可接受的载体。

在本文中使用时，术语“药学上可接受的载体”指赋予所述药物组合物形态或一致性的药学上可接受的原料、组分或载体。当混合时，各载体可与所述药物组合物的其他成分相容，从而避免在给药至受试者时显著降低本申请多肽偶联物的效力以及避免将导致药学上不可接受的药物成分的相互作用。

在一些实施方式中，所述药学上可接受的载体包括但不限于：稀释剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、成粒剂、包衣剂、润湿剂、溶剂、共溶剂、悬浮剂、乳化剂、增甜剂、调味剂、掩味剂、着色剂、抗结块剂、保湿剂、螯合剂、增塑剂、增粘剂、抗氧化剂、防腐剂、稳定剂、表面活性剂或缓冲剂等。本领域技术人员可以根据药物组合物的剂型选择性使用上述药学上可接受的载体。

在一些实施方式中，本申请的多肽偶联物和一种或多种所述药学上可接受的载体配制成适用于通过所需要的给药途径给药至受试者的剂型。在一些实施方式中，所述药物组合物的剂型包括但不限于片剂、胶囊、囊片、药丸、锭剂、粉末、糖浆、酏剂、混悬液、溶液、乳剂、透皮贴片、栓剂、吸入剂、霜剂、膏剂、洗液、糊剂、喷雾剂、注射剂或凝胶等。

用途

第三方面，本申请提供了如本申请所述的多肽偶联物或如本申请所述的药物组合物在制备用于预防或治疗疾病的药物中的用途。

在本文中使用时，术语“疾病”是指机体或一些器官的状态的任何改变，其中断或干扰功能的执行和/或引起患病的人或与其接触的人的症状(如不适、功能障碍、不良应激乃至死亡)。

在本文中使用时，术语“治疗”是指缓解或改善疾病或障碍(即，减慢或阻止疾病或至少一种临床症状的发展)；或缓解或改善与该疾病或障碍相关的至少一种物理参数或生物标记。

在一些实施方式中，所述疾病为肿瘤。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括甲状腺癌、食管癌、肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、肝癌、胆管癌、肾癌、胰腺癌、肠癌、结直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、输卵管癌、皮肤癌、脑瘤、脑胶质瘤、星形胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨肉瘤、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病或慢性髓细胞白血病中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括肺癌、胃癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、肾癌、子宫癌、甲状腺癌、胰腺癌、结直肠癌、食管癌、胆管癌、皮肤癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脑胶质瘤、黑色素瘤、子宫内膜癌、骨肉瘤、宫颈癌、膀胱癌或白血病中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括非小细胞肺癌、肺巨细胞癌、胃癌、肝癌、卵巢癌、食管癌、结肠癌、乳腺癌、胆管癌、骨肉瘤、宫颈癌、黑色素瘤、膀胱移行细胞癌、胰腺癌、星形胶质母细胞瘤、慢性髓原白血病细胞或淋巴瘤中的一种或多种。

治疗方法

根据本申请的一种实施方式，本申请提供了一种用于预防或治疗疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用如本申请所述的多肽偶联物或如本申请所述的药物组合物。

在本文中使用时，术语“受试者”是指灵长类动物(例如，人)、狗、兔、豚鼠、猪、大鼠和小鼠。在一些实施方式中，受试者是灵长类动物。在一些具体的实施方式中，受试者是人。

在本文中使用时，如果受试者在生物学上、在医学上或在生活质量上从治疗中获益，则这样的受试者是“需要”这种治疗的。

在本文中使用时，术语“治疗有效剂量”是指相比于未接受该量的相应受试者，导致从中获益或治疗疾病的量，但该量在合理医学判断的范围内足够低以避免严重副作。多肽偶联物的治疗有效剂量将随着选择的具体多肽偶联物(例如考虑到多肽偶联物的效力、功效和半衰期)；选择的给药途径；治疗的疾病；治疗的疾病的严重性；治疗患者的年龄、体型、体重和

身体状况；治疗患者的医疗史；治疗的持续时间；并行治疗的性质；所需治疗效果等因素而改变，但仍可通过本领域技术人员以常规方式确定。

在一些实施方式中，所述疾病为肿瘤。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括甲状腺癌、食管癌、肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、肝癌、胆管癌、肾癌、胰腺癌、肠癌、结直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、输卵管癌、皮肤癌、脑瘤、脑胶质瘤、星形胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨肉瘤、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病或慢性髓细胞白血病中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括肺癌、胃癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、肾癌、子宫癌、甲状腺癌、胰腺癌、结直肠癌、食管癌、胆管癌、皮肤癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脑胶质瘤、黑色素瘤、子宫内膜癌、骨肉瘤、宫颈癌、膀胱癌或白血病中的一种或多种。

在一些实施方式中，所述肿瘤包括非小细胞肺癌、肺巨细胞癌、胃癌、肝癌、卵巢癌、食管癌、结肠癌、乳腺癌、胆管癌、骨肉瘤、宫颈癌、黑色素瘤、膀胱移行细胞癌、胰腺癌、星形胶质母细胞瘤、慢性髓原白血病细胞或淋巴瘤中的一种或多种。

上文针对本申请的多肽偶联物、多肽、紫杉烷类化合物、连接子所述的各种实施方式也适用于本申请的药物组合物、用途和方法（只要它们彼此之间不是内在矛盾的），由此组合而形成的各种实施方式都视为本申请的一部分。

下面将结合实施例以例证的方式更清楚、明确地阐述本申请的技术方案。应该理解的是，这些实施例仅用于例证的目的，绝不旨在限制本申请的保护范围。本申请的保护范围仅通过权利要求来限定。因此，本领域普通技术人员应当认识到，可以对这里描述的实施例做出各种改变和修改，而不会背离本申请的范围。同样，为了清楚和简明，以下的描述中省略了对公知功能和结构的描述。

实施例

除非另有说明，否则以下实施例中所采用的试剂和仪器均为可以通过市购获得的常规产品。除非另有说明，否则按照常规条件或制造商建议的条件进行实验。

实施例 1：多肽偶联紫杉醇（PTX-AI）的制备

1. P1-AI 肽的制备

称取 10g 的 Wang 树脂（CAS: 1365700-43-1），取代度为 0.91 mmol/g，加入多肽固相反应器（玻璃仪器，厂家定制）中，用 DMF 洗涤 2 次。用 DMF 溶胀 Wang 树脂 60 分钟后，取 12.71 g 的 Fmoc-Ser (tBu) -OH、1.35g 的 HOBt 1.73 g 的 DIC 和 0.11 g 的 DMAP，使用 60mL DMF 作为溶剂，加入固相反应器中，室温反应 3 小时。反应结束后用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次；

加入封端液（9.29g 醋酸酐、3.53g DIEA、0.22g DMAP 溶于 60mL DMF）封端 1.5h。封端后用 DMF 洗涤 3 次，DCM 洗涤 3 次，甲醇洗涤 3 次，收缩抽干，得到 Fmoc-Ser (tBu) -Wang 树脂，检测取代值为 0.68 mmol/g；

称取取代值为 0.68 mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Wang 树脂 2g(1.36 mmol)，加入固相反应器中用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后抽干，再用 DMF 洗涤 4 次。加入 20%的哌啶/DMF（100 mL/400 mL）脱除 Fmoc 两次，脱 Fmoc 时间分别为 3 min 和 7 min，反应结束后用 DMF 洗涤 6 次；

称取 Fmoc-Asn(Trt)-OH（3 eq）和 HOBt（3.6 eq）溶于 DMF 中，于 0℃冰浴下加入 DIC（3.6 eq）活化 4 min，活化结束后加入至固相反应器中，在 25℃条件下，使用氮气保护，反应 1 h。使用茚三酮法（茚三酮：苯酚：派啶=2:1:1）进行氨基检测，如果树脂无色透明，则反应完全，如果树脂显色，表示反应不完全，需延长偶联反应时间，例如 0.5~1 h，至茚三酮法检测树脂至无色透明。抽干 DMF 洗涤 4 次，加入 20%的哌啶/DMF（100 mL/400 mL）脱除 Fmoc 两次，脱 Fmoc 时间分别为 3 min 和 7 min，反应结束后用 DMF 洗涤 6 次；

重复以上步骤,按照所述多肽序列依次加入每一个氨基酸。按照 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列依次偶联 Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Arg(pbf)-OH,氨基酸的偶联采用 HOBt/DIC 作为缩合剂,每次反应 0.5 h。每次偶联后用茚三酮法检测树脂无色透明,然后用 20%的派啉/DMF 溶液(100mL/400mL)脱除 Fmoc 保护基。得到的产物经 DMF 洗涤 4 次、DCM 洗涤 3 次、MeOH 洗涤 3 次,干燥后得到 P1-AI 肽树脂。

取 P1-AI 肽树脂置于裂解反应器中,以 10 mL/g 树脂的比例加入裂解试剂,裂解试剂的比例为 TFA:Tis:水=95:2.5:2.5(V/V/V)。室温搅拌反应 2.0h 后,生成物用砂心漏斗过滤,收集滤液,再用少量 TFA 洗涤 3 次,合并滤液后减压浓缩。将浓缩液加入冷却的甲基叔丁基醚中沉降,析出固体、离心,再用甲基叔丁基醚洗涤、离心 4 次,真空干燥得到 P1-AI 线形肽粗品,粗品纯度为:60.8%,收率为 37.21%。采用 HPLC 制备纯化,色谱柱为反相 C18 色谱柱,检测波长为 220 nm,以体积分数为 0.1%的 TFA 水溶液和乙腈作为流动相 A 和 B,进行纯化洗脱,收集目标峰的洗脱液,旋转蒸发浓缩,冻干后得到 P1-AI 多肽,纯度>99%。

2. 连接子-紫杉醇的制备

将 1.20 g 紫杉醇(PTX,安徽泽升科技有限公司)与 0.21 g 琥珀酸酐噻啉(安徽泽升科技有限公司)在室温下反应 3 小时,得到琥珀酰-紫杉醇。

3. 多肽偶联物

将 0.88g 琥珀酰-紫杉醇与溶于 DCM 中的 0.53g EDC(安徽泽升科技有限公司)/0.21g NHS(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)在室温条件下反应 9 h,得到琥珀酰-紫杉醇-NHS 活化酯。将 0.51g 琥珀酰-紫杉醇-NHS 活化酯与 0.58 g P1-AI 多肽溶于溶剂(水:氮甲基吡咯烷酮=1:2.5, V:V)中,并加入三乙胺调节 pH 呈弱碱性,在室温条件下反应 4 h,得到 0.32g PTX-AI 并将其冻干,所述 PTX-AI 的纯度为 96.7%,收率为 37.21%。在反应过程中,通过 HPLC 监控偶联反应的反应程度。

4. 其它多肽偶联物的制备

使用上述方法得到了多肽偶联多西他赛（DOC-AI），区别仅在于将紫杉醇替换为了多西他赛（安徽泽升科技有限公司）。

使用上述方法得到了多肽 PTX-5-AI，区别仅在于将 PTX-AI 中的琥珀酸替换为了戊二酸（安徽泽升科技有限公司）。

实施例 2：多肽偶联物的肿瘤增殖抑制作用检测

选择人高转移肝癌细胞 HCCLM3、人高转移胃癌细胞 MKN45、人胃癌细胞 BGC-823、MGC-803、非小细胞肺癌细胞 A549、人胰腺癌细胞 ASPC-1、人结肠癌细胞 LoVo、人卵巢癌细胞 A2780、人宫颈癌细胞 SiHa、人恶性黑色素瘤细胞 SK-mel-2、M14、人成骨肉瘤细胞 Saos-2、人膀胱移行细胞癌细胞 T24、人脑星形胶质母细胞瘤细胞 U87-MG、人淋巴瘤细胞 Raji、人表皮癌细胞 A431 进行实验。其中，HCCLM3 细胞、MKN45 细胞、BGC-823 细胞、MGC-803 细胞、A431 细胞和 A549 细胞由南京安吉生物科技有限公司提供，其他细胞由南京欧际医药科技服务有限公司提供。

上述肿瘤细胞保存在含 10% 胎牛血清，1% 青霉素链霉素的培养基中，在 37℃，5% CO₂，95% 湿度下孵育。上述肿瘤细胞在 T75 培养瓶中培养，实验使用细胞密度为 80%，上述肿瘤细胞系支原体阴性。

取对数生长期肿瘤细胞进行实验。细胞经消化、计数、制成 1×10^5 个/mL 的细胞悬液，接种于 96 孔板中（100 μ L/孔），将 96 孔板置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时；针对不同的肿瘤细胞，给药组每孔分别加入含 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM 的 PTX-AI、或 DOC-AI、或 PTX-5-AI，阳性对照组每孔分别加入含 10 μ M、1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM 的 PTX 或 DOC，空白组每孔加入 100 μ L 基础培养基，每组设置 3 个复孔；将板置于培养箱中培养 72h 后，在显微镜下观察各组细胞形态，每孔加入 10 μ L 的 CCK8 溶液（南京恩晶生物科技有限公司），在细胞培养箱内继续孵育 4 小时，孵育结束后，在 450 nm 下测定吸光值，并计算肿瘤细胞增殖抑制率，效能比为游离药物的 IC₅₀ 值与多肽偶联物的 IC₅₀ 值的比值。

表 1 多肽偶联物的肿瘤细胞增殖抑制率

细胞系	DOC IC ₅₀ (nM)	DOC-AI IC ₅₀ (nM)	效能比	PTX IC ₅₀ (nM)	PTX-AI IC ₅₀ (nM)	效能比
HCCLM3 (人高转移肝癌细胞)	430.6	264.2	1.63	9.40	2.54	3.70
A549 (非小细胞肺癌细胞)	33.5	24.1	1.39	541.40	264.20	2.05
A2780 (人卵巢癌细胞)	-	-	-	0.19	0.17	1.11
LoVo (人结肠癌细胞)	992.5	837.6	1.18	-	-	-
Saos-2 (人成骨肉瘤细胞)	-	-	-	0.77	0.53	1.47
SiHa (人宫颈癌细胞)	0.2349	0.0603	3.90	-	-	-
SK-mel-2 (人恶性黑色素瘤细胞)	0.2143	0.2135	1.00	-	-	-
T24 (人膀胱移行细胞癌细胞)	-	-	-	38.62	21.72	1.78
M14 (人恶性黑色素瘤细胞)	3.682	3.041	1.21	-	-	-
U87-MG (人脑星形胶质母细胞瘤细胞)	5.400	2.631	2.05	-	-	-
ASPC-1 (人胰腺癌细胞)	4.350	1.881	2.31	-	-	-
Raji (人淋巴瘤细胞)	-	-	-	43.87	40.12	1.09

续表 1

细胞系	PTX IC ₅₀ (nM)	PTX-5-AI IC ₅₀ (nM)	效能比
MKN45 (人高转移胃癌细胞)	3.21	1.94	1.65
BGC-823 (人胃癌细胞)	8.11	4.26	1.90
MGC-803 (人胃癌细胞)	23.60	18.59	1.27
A431(人表皮癌细胞)	0.17	0.08	2.13

结果显示：由表 1 可知，本申请的多肽偶联物 DOC-AI、PTX-AI、PXT-5-AI 对多种肿瘤细胞有较好的肿瘤增殖抑制作用。

实施例 3：多肽偶联物的肿瘤横向迁移抑制作用检测

取对数生长期的 A549 细胞，胰酶消化制成细胞悬液，将 1 mL 细胞悬液接种于 24 孔板中，每孔 3.5×10^5 个细胞。将 24 孔板置于 37℃，5%CO₂ 培养箱中培养 24 h 后，用 200 μL 枪头垂直于板底的横线划痕，每孔划一道，弃去原培养基，用 1 mL PBS 洗涤两遍。设置空白组，阳性药组以及给药组，空白组给予 1 mL 含有 5% FBS 的 F-12K 培养基，阳性药组给予 100 nM 的 DOC 1 mL，给药组分别给予 100 nM、10 nM、1 nM 的 DOC-AI 各 1 mL。分别在 0h 和 48h 时使用显微镜（型号：CKX31SF，厂家：OLYMPUS

CORPORATION) 以 100×放大倍率拍摄细胞迁移状态。同时, 使用 ImageJ 1.74V 对迁移的肿瘤细胞数量进行定量计算, 结果表示为平均值±SD (n = 3)。使用 t 检验对每个时间点进行统计分析 (****表示空白组与其他条件之间的差异的 P 值<0.001)。

结果显示: 由图 1 的 A 和 B 可知, 相较于空白组, DOC-AI 有效的抑制了 A549 细胞的横向迁移, 且具有浓度依赖性。同时, DOC-AI 的有效浓度远低于 DOC, 例如, 1nM 的 DOC-AI 横向迁移率低于 100nM 的 DOC 横向迁移率, 证明本申请的多肽偶联物可以极大的提高化合物的药效。

实施例 4: 多肽偶联物的肿瘤纵向迁移抑制作用检测

取对数生长期的 A549 细胞, 胰酶消化制成细胞悬液, 将 100 μ L 细胞悬液接种于 Transwell 小室中, 每孔 3.5×10^4 个。设置空白组、阳性药组及给药组, 空白组给予 100 μ L 无 FBS 的 F-12K 培养基, 阳性药组给予 10 nM 的 DOC 100 μ L, 给药组给予 1 μ M、100 nM、10 nM、1 nM 的 DOC-AI 各 100 μ L。放置小室的 24 孔板中加入 600 μ L 含有 10%FBS 的 F12-K 培养基, 37°C, 5%CO₂ 培养箱中培养 48 h 后, 用甲醇固定 30 min, 结晶紫染色 10 min, 染色结束后于显微镜下(型号: CKX31SF, 厂家: OLYMPUS CORPORATION) 以 100×放大倍率拍摄细胞迁移状态。同时, 使用 Photoshop 20.0.1 对迁移的肿瘤细胞数量进行定量计算, 结果表示为平均值±SD (n=3)。使用 t 检验对每个时间点进行统计分析 (****表示空白组与其他条件之间的差异的 p 值<0.001)。

结果显示: 由图 2 的 A 和 B 可知, 相较于空白组, DOC-AI 有效的抑制了 A549 细胞的纵向迁移, 且具有浓度依赖性, DOC-AI 的有效浓度低至 1 nM。且 DOC-AI 的效果优于 DOC, 例如, 10nM 的 DOC-AI 纵向迁移率低于 10 nM 的 DOC 纵向迁移率, 证明本申请的多肽偶联物可以极大的提高化合物的药效。

实施例 5: 多肽偶联物体内抑瘤活性检测

将非小细胞肺癌 A549 细胞、人胃癌细胞 MKN-45 保存在含 10%胎牛血清, 1%青霉素+链霉素的 F12-K 培养基中, 在 37°C, 5%CO₂, 95%湿度

下孵育。上述细胞在 T175 培养瓶中培养，实验使用细胞密度为 80%，上述细胞系支原体阴性。A549 细胞、MKN-45 细胞均由南京安吉生物科技有限公司提供。

5.1 DOC-AI 体内抑瘤活性检测

5.1.1 非小细胞肺癌 A549 细胞

取生长旺盛期的非小细胞肺癌 A549 细胞，在无菌条件下，接种于 BALB/c 裸小鼠（南京中骅生物科技有限公司）右侧腋窝皮下，细胞接种量为 1×10^7 。裸鼠移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径，待肿瘤生长至 50 mm³ 左右时挑选生长状态良好且肿瘤大小均一性较好的荷瘤裸鼠 30 只，分成 5 组，每组 6 只，具体分组以及给药方式如下表 2 所示，给药频次为连续给药 4 天后间隔 3 天并以此循环至 21 天。使用测量瘤径的方法，动态观察裸鼠的抗肿瘤效应。肿瘤直径的测量次数为隔天一次，测量肿瘤直径的同时称量裸鼠体重。给药 21 天后对裸鼠进行安乐死，计算抑瘤率(%)并剥取瘤块称重。

表 2 DOC-AI 体内抑瘤活性检测

组别	给药剂量	起始瘤体积	终末瘤体积	瘤重 (mg)	抑瘤率 (%)
模型组	10 ml/kg 生理盐水	91.79±44.26	768.47±228.60	730.32±222.24	-
DOC	6.20μmol/Kg	85.82±27.45	310.83±31.01**	283.00±179.83	59.55
DOC-AI	6.20μmol/Kg	87.14 ±27.23	73.75±23.01***	81.00±40.81***	90.40
DOC-AI	12.40μmol/Kg	88.73±43.55	31.31±22.73***	51.83±31.36***	95.33
DOC-AI	24.80μmol/Kg	86.33±37.21	20.30±20.80***	20.53±20.80***	97.33

注：*P<0.05, **P<0.01 vs 模型组, #P<0.05, ###P<0.01 vs DOC 组

结果显示：由表 2、图 3 和图 5 可知，DOC-AI 对非小细胞肺癌 A549 裸鼠异种移植瘤生长有明显的抑制作用。在同等给药剂量下，例如，6.20 μM 的 DOC 的肿瘤抑制率为 59.55%，等剂量下 DOC-AI 的肿瘤抑制率高达 90.40% 说明多肽偶联物 DOC-AI 的抑瘤效果明显优于阳性药 DOC，且随着剂量的增高，DOC-AI 的抑制率明显升高，呈现剂量依赖性。同时，由图 4 可知，各组裸鼠在给药期间体重均未出现明显下降。

5.1.2 胃癌 MKN45 细胞

取生长旺盛期的胃癌 MKN45 细胞，在无菌条件下，接种于 BALB/c 裸小鼠（杭州子源实验动物科技有限公司）右侧腋窝皮下，细胞接种量为 1×10^7 。裸鼠移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径，待肿瘤生长至 50 mm^3 左右时挑选生长状态良好且肿瘤大小均一性较好的荷瘤裸鼠 18 只，分成 3 组，每组 6 只，具体分组以及给药方式如下表 7 所示，给药频次为隔 3 天给药 1 次并以此循环至 21 天。使用测量瘤径的方法，动态观察裸鼠的抗肿瘤效应。肿瘤直径的测量次数为隔天一次，测量肿瘤直径的同时称量裸鼠体重。给药 21 天后对裸鼠进行安乐死，计算抑瘤率（%）并剥取瘤块称重。

表 7 DOC-AI 体内抑瘤活性检测结果

组别	给药剂量	起始瘤体积	终末瘤体积	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
模型组	10 ml/kg 生理盐水	71.09±22.46	1012.53±301.08	1165.82±301.08	-
DOC	6.20μmol/Kg	73.29±35.78	256.67±391.25**	578.82±391.25**	73.76±13.15
DOC-AI	6.20μmol/Kg	70.50±21.27	191.31±54.48**	204.34±54.48***	84.25±9.15

注：*P<0.05, **P<0.01 vs 模型组; #P<0.05, ##P<0.01 vs DOC 组

结果显示：由表 7、图 9 的 A 和 B 可知，DOC-AI 对胃癌 MKN45 裸鼠异种移植瘤生长有明显的抑制作用。在同等给药剂量下，例如，6.20 μmol/Kg 的 DOC 的肿瘤抑制率为 $73.76 \pm 13.15\%$ ，等剂量下 DOC-AI 的肿瘤抑制率高达 $84.25 \pm 9.15\%$ ，说明多肽偶联物 DOC-AI 的抑瘤效果明显优于阳性药 DOC。同时，由图 9 的 C 可知，DOC-AI 给药组裸鼠在给药期间体重均未出现明显下降，而阳性药 DOC 组裸鼠体重下降，说明 DOC-AI 具有较好的安全性。

5.2 PTX-AI 体内抑瘤活性检测

取生长旺盛期的人胃癌细胞 MKN-45，在无菌条件下，接种于 BALB/c 裸小鼠右侧腋窝皮下，细胞接种量为 5×10^6 。裸鼠移植瘤用游标卡尺测量移植瘤直径，待肿瘤生长至 50 mm^3 左右时挑选生长状态良好且肿瘤大小均一性较好的荷瘤裸鼠 68 只，分成 6 组，其中模型组 10 只，其余每组 8 只，具体分组以及给药方式如下表 3 所示。使用测量瘤径的方法，动态观

察受试物的抗肿瘤效应。肿瘤直径的测量次数为隔天一次，测量肿瘤直径的同时称量裸鼠体重。给药 21 天后安乐死裸鼠，计算抑瘤率 (%) 并剥取瘤块称重。

表 3 PTX-AI 体内抑瘤活性检测

组别	给药剂量	给药频次	起始瘤体积	终末瘤体积	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
模型组	10 ml/kg 生理盐水	隔天给药	49.2±6.0	1499.4±235.0	1.509±0.292	-
PTX	5.28μmol/Kg	3 天给药 1 次	51.4±3.5	782.0±105.9**	0.791±0.151**	47.6
PTX-AI	5.28μmol/Kg	一周连续给药 4 天	50.3±3.1	700.6±59.6**	0.705±0.066**	53.3
PTX-AI	4.07μmol/Kg	隔天给药	49.1±2.4	852.1±137.3**	0.861±0.126**	42.9
PTX-AI	2.64μmol/Kg	隔天给药	49.6±5.5	934.0±125.0**	0.961±0.119**	36.3
PTX-AI	7.92μmol/Kg	隔天给药	50.9±5.9	579.8±91.9**	0.591±0.099**	60.8

注：*P<0.05, **P<0.01 vs 模型组

结果显示:由表 3 和图 6 可知,多肽偶联物 PTX-AI 对人胃癌细胞 MKN45 裸鼠异种移植瘤生长有明显的抑制作用,随着剂量的增高,PTX-AI 的抑制率明显升高,呈现剂量依赖性,当给药剂量为 7.92μmol/Kg 时,PTX-AI 的抑瘤率最高为 60.8%。同时,还可以看出,在同等剂量下,多肽偶联物 PTX-AI 的抑瘤活性优于游离的 PTX,其中,游离的 PTX 的给药频次与多肽偶联药物不同是由于游离的 PTX 对机体的毒副作用较大,在多肽偶联物的给药频次下会给大鼠带来不可逆的损伤,影响后续数据的测量,该现象也证明了本申请的多肽偶联物由于具有靶向性而具有更好的安全性。

实施例 6：多肽偶联物的肝微粒体代谢检测

精密称量 1.85 mg 的 DOC-AI (或 1.81 mg 的 PTX-AI), 加入 1 mL 的 DMSO, 溶解混匀, 得到 1 mM 储备液。用甲醇稀释 1 mM 储备液至 100 μM 工作液, 用于样品孵育。取 20 mg/mL 的肝微粒体 (小鼠来源, 上海权阳贸易有限公司, 批号: MIC255038; 大鼠来源, 上海权阳贸易有限公司, 批号: MIC254034; 犬来源, 上海权阳贸易有限公司批号, MIC257015; 猴来源, 瑞德肝脏疾病研究 (上海) 有限公司, 批号: SYXS; 人来源, 上海权阳贸易有限公司, 批号 1210097) 12.5 μL、100 mM 的 PBS 432.5 μL、20 mM 的

NADPH 25 μL 及 100mM 的 MgCl_2 25 μL 于 96 孔板中，混匀后于 37℃ 预孵育 5 min。在 96 孔板中加入 100 μM 的工作液 5 μL 启动反应。分别于设定时间点取 50 μL 反应样品置于加好 100 μL 冰乙腈的 EP 管中，涡旋灭活，于 -90℃ 保存待测。应用 LC-MS/MS 法定量检测多肽偶联物 DOC-AI 及解离的 DOC 的浓度。

表 4 DOC-AI 肝微粒体代谢检测结果

化合物	肝微粒体 浓度 (mg/mL)	相关参数						
		R ²	k	t _{1/2} (min)	CL _{int(mic)} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	CL _{int(liver)} (mL/min/kg)	肝提取 率(E _H)	清除率等级
小鼠	0.5	0.996	0.0410	16.9	81.9	324	0.783	高
大鼠		0.995	0.0301	23.1	60.1	108	0.662	中
犬		0.996	0.0230	30.2	45.9	66.2	0.682	中
猴		0.995	0.0520	13.3	104	140	0.763	高
人		0.982	0.0130	53.3	26.0	23.4	0.531	中

表 5 PTX-AI 肝微粒体代谢检测结果

化合物	肝微粒体 浓度 (mg/mL)	相关参数						
		R ²	k	t _{1/2} (min)	CL _{int(mic)} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)	CL _{int(liver)} (mL/min/kg)	肝提取 率(E _H)	清除率等级
小鼠	0.5	0.986	0.0511	13.6	102	405	0.818	高
大鼠		0.998	0.0339	20.4	67.8	122	0.689	中
犬		0.993	0.0283	24.5	56.6	81.4	0.725	高
猴		0.997	0.0548	12.7	110	148	0.772	高
人		0.976	0.0148	46.9	29.5	26.6	0.562	中

采用肝微粒体体外代谢孵育体系研究多肽偶联物 DOC-AI 以及 PTX-AI 在小鼠、大鼠、犬、猴、人中的代谢稳定性，分析其在不同种属肝微粒体酶中的代谢半衰期和清除率，为后期临床前体内实验的动物选择提供依。表 4-

5 和图 7-8 的结果显示: DOC-AI 在小鼠和猴体内属于高清除药物, 在大鼠、犬和人体内属于中等清除药物。PTX-AI 在小鼠、犬和猴体内属于高清除药物, 在大鼠和人体内属于中等清除药物。中等清除药物在生物体内有较好的稳定性, 不会被机体迅速降解, 同时也不会 在体内过渡蓄积, 从而避免对机体造成过大的损害。

实施例 7：多肽偶联物的溶解度测定

制备 DOC、DOC-AI、PTX 以及 PTX-AI 的系列标准溶液：

称取 DOC、DOC-AI、PTX、PTX-AI 各 2 mg 至 2 mL 容量瓶，加入甲醇至刻度线，摇匀，得到 1 mg/mL 贮备液。精密量取上述贮备液 25、50、100、200、300、400 μL 于 1 mL 容量瓶中，甲醇定容至刻度，分别得到浓度为 25、50、100、200、300、400 μg/ml 的系列标准溶液，通过 HPLC（流动相：0.065% TFA 水+0.05% TFA；色谱柱：YMC-TriartC18；波长：220 nm）检测系列标准溶液的峰面积，构建浓度-峰面积标准曲线，其中，横坐标代表浓度，纵坐标代表峰面积。

制备 DOC、DOC-AI、PTX 以及 PTX-AI 过饱和水溶液：

称取 DOC、DOC-AI、PTX、PTX-AI 各 10 mg 至 5 mL 超纯水中，加入 1 mL 超纯水，超声 15 min，有机滤膜过滤至液相小瓶，HPLC 检测样品的峰面积，通过浓度-峰面积标准曲线计算其在水中饱和度，结果见表 6。

表 6 多肽偶联物在水中溶解度检测结果

样品	峰面积	溶解度 (mg/mL)	提升倍数
DOC	0.29	2.74×10^{-5}	-
DOC-AI	35583.20	4.43	1.62×10^5
PTX	2.64	1.2×10^{-4}	-
PTX-AI	42.59	5.56×10^{-3}	46.33

由图 10 可知, DOC、DOC-AI、PTX、PTX-AI 浓度-峰面积标准曲线 $R^2>0.99$, 说明拟合度良好。由表 6 可知，DOC、PTX，在水中的溶解度分别为 2.74×10^{-5} mg/mL、 1.2×10^{-4} mg/mL，几乎不溶于水。DOC-AI 在水中具有良好的溶解度，为 4.43 mg/mL，相比于阳性药 DOC 提升了 1.62×10^5 倍，PTX-AI 相比于阳性药 PTX，溶解度提升了 46.33 倍。

Machulkin 等通过连接子二肽将靶向 PSMA 配体与 DOC 偶联得到了 PSMA-DOC, 其在水中的溶解度为 130 $\mu\text{g/mL}$ (Machulkin AE, Uspenskaya AA, Zyk NY, et al. PSMA-targeted small-molecule docetaxel conjugate: Synthesis and preclinical evaluation. Eur J Med Chem. 2022;227:113936.), 仍对 PSMA-DOC 的应用有较大限制, 而本申请的多肽偶联物在水中的溶解度为 4.43 mg/mL, 比 DOC 单药溶解度提高了 1.62×10^5 倍, 可以极大的改善 DOC 的应用。将 PTX 分子与 19 个氨基酸肽 Angiopep-2 进行偶联形成的化合物 SNG-1005 已完成 III 期临床。但是, SNG1005 与水接触仍存在不溶解现象, 导致其在批次生产过程中难度较大, 相关临床试验被迫推迟。由此可知, 本申请的多肽偶联物极大的增加了 DOC 以及 PTX 的水溶性。

尽管具体的实施方式已被描述, 然而对于申请人或其它本领技术人员而言, 可能存在或目前无法预见上述实施方式的替代、修改、变化、改进和实质等效物。因此, 提交的所附的权利要求以及可能被修改的权利要求旨在涵盖所有这样的替代、修改、变化、改进和实质等效物。

权利要求书

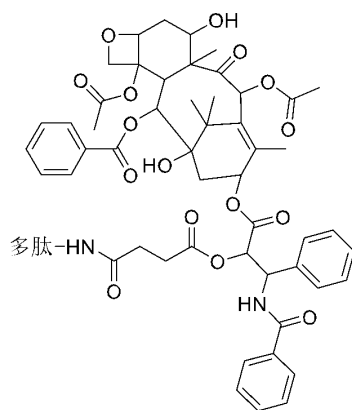
- 1、一种具有式 (I) 结构的多肽偶联物：

多肽-连接子-化合物

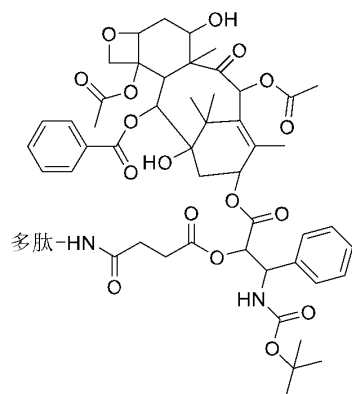
式 (I)

其中，
所述多肽为间充质-上皮过渡因子靶向肽或其衍生物，
所述化合物为紫杉烷类化合物或其对映异构体、非对映异构体、溶剂合物或药学上可接受的盐。
- 2、如权利要求 1 所述的多肽偶联物，其中，所述间充质-上皮过渡因子靶向肽具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。
- 3、如权利要求 1 或 2 所述的多肽偶联物，其中，所述衍生物与所述间充质-上皮过渡因子靶向肽相比包含选自以下的任意一种或多种修饰：氨基酸修饰、保守氨基酸取代或氨基酸残基中的氢被取代。
- 4、如权利要求 1-3 中任一项所述的多肽偶联物，其中，所述紫杉烷类化合物为二环紫杉烷类化合物、三环紫杉烷类化合物、四环紫杉烷类化合物或五环紫杉烷类化合物中的一种或多种，可选地，所述二环紫杉烷类化合物包括 6 元环稠和 12 元环紫杉烷类化合物，所述三环紫杉烷类化合物包括 6 元环稠和 8 元环稠和 6 元环、6 元环稠和 10 元环稠和 6 元环、5 元环稠和 7 元环稠和 6 元环、或 5 元环稠和 6 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物中的一种或多种，所述四环紫杉烷类化合物包括 6 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 6 元环、或 6 元环稠和 8 元环稠和 6 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物中的一种或多种，所述五环紫杉烷类化合物包括 6 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 5 元环稠和 6 元环紫杉烷类化合物。
- 5、如权利要求 1-4 中任一项所述的多肽偶联物，其中，所述紫杉烷类化合物包括紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、拉洛他赛或替司他赛中的一种或多种，可选地，所述紫杉烷类化合物包括紫杉醇或多西他赛中的一种或多种。

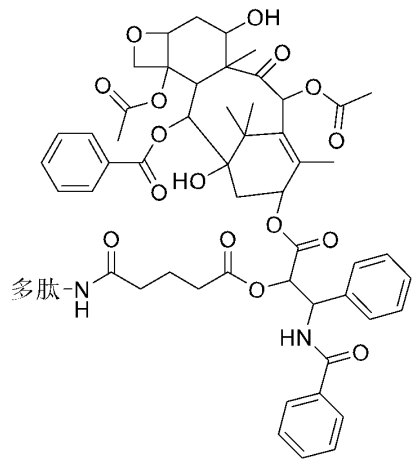
- 6、如权利要求 1-5 中任一项所述的多肽偶联物，其中，所述连接子为 $\text{CO(O)C(CH}_2\text{)}_n\text{C(O)OH}$, n 为 2-6 的整数，可选地，所述连接子为琥珀酸、戊二酸、己二酸、庚二酸或辛二酸。
- 7、如权利要求 1-6 中任一项所述的多肽偶联物，其中，所述连接子与所述多肽通过形成酰胺键连接，所述连接子与所述紫杉烷类化合物通过形成酯键连接。
- 8、如权利要求 1-7 中任一项所述的多肽偶联物，其中，所述多肽偶联物具有下式 (II)、(III) 或 (IV) 的结构：



式 (II)



式 (III)



式 (IV)

所述多肽具有 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或是其衍生物，所述连接子的羧基与所述多肽氮端氨基酸的氨基通过形成酰胺键连接。

- 9、一种药物组合物，所述药物组合物包括如权利要求 1-8 中任一项所述的多肽偶联物，以及药学上可接受的载体。
- 10、如权利要求 1-8 中任一项所述的多肽偶联物或如权利要求 9 所述的药物组合在制备用于预防或治疗疾病的药物中的用途，可选地，所述疾病包括肿瘤，更可选地，所述肿瘤包括甲状腺癌、食管癌、肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、肝癌、胆管癌、肾癌、胰腺癌、肠癌、结直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、输卵管癌、皮肤癌、脑瘤、脑胶质瘤、星形胶质母细胞瘤、黑色素瘤、骨肉瘤、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病或慢性髓细胞白血病中的一种或多种。