



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I429453 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：100105865

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 02 月 22 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/48 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
C07K16/30 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2010/02/23 美國 61/307,338
 2010/02/26 美國 61/308,791

(71)申請人：建南德克公司(美國) GENENTECH, INC. (US)
 美國

(72)發明人：波拉基斯 保羅 POLAKIS, PAUL (US)；阿桑狄 喬蒂 ASUNDI, JYOTI (US)；費爾斯丹 朗 FIRESTEIN, RON (US)；凱力 羅伯特 F KELLEY, ROBERT F. (US)；麥庫雀恩 克莉絲塔 MCCUTCHEON, KRISTA (CA)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US	2006/009476A1	US	2007/0269442A1
US	2008/0075712A1	WO	00/067024A1
WO	2009/012256A1		

Yamaguchi T et al., "Characterization and application of monoclonal antibodies against human endothelin B receptor expressed in insect cells", BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol.26, no.4, p.293-299, 2004/02

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：30 項 圖式數：9 共 0 頁

(54)名稱

抗 TAT419 抗體及其用途

ANTI-TAT419 ANTIBODIES AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於適用於診斷及治療哺乳動物腫瘤的組合物，及使用彼等組合物診斷及治療哺乳動物腫瘤的方法。

The present invention is directed to compositions of matter useful for the diagnosis and treatment of tumor in mammals and to methods of using those compositions of matter for the same.

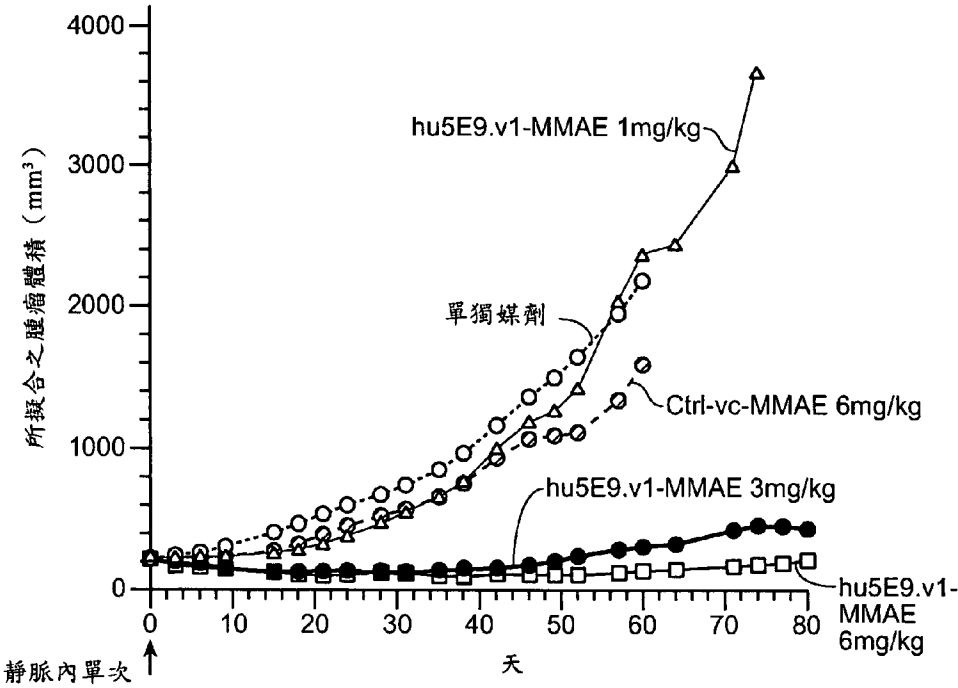


圖9

發明專利說明書

中文說明書替換頁(102年12月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：100105865

※ 申請日：100.02.22

※IPC 分類：A61K 47/48 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗TAT419抗體及其用途

ANTI-TAT419 ANTIBODIES AND USES THEREOF

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係關於適用於診斷及治療哺乳動物腫瘤的組合物，及使用彼等組合物診斷及治療哺乳動物腫瘤的方法。

三、英文發明摘要：

The present invention is directed to compositions of matter useful for the diagnosis and treatment of tumor in mammals and to methods of using those compositions of matter for the same.

102年12月24日修(成)止替換頁

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(9)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於適用於診斷及治療哺乳動物之腫瘤的組合物，及使用彼等組合物來診斷及治療哺乳動物之腫瘤的方法。

本申請案主張2010年2月23日申請之美國臨時專利申請案第61/307,338號及2010年2月26日申請之美國臨時專利申請案第61/308,791號的優先權，該兩個申請案以全文引用之方式併入本文中。

【先前技術】

在美國，惡性腫瘤(癌症)為繼心臟病之後導致死亡之第二大原因(Boring等人，CA Cancer J. Clin. 43:7 (1993))。癌症之特徵在於源自正常組織之異常或贅生性細胞之數目增加，該等細胞增殖形成腫瘤塊；該等贅生性腫瘤細胞侵襲相鄰組織；及產生惡性細胞，該等惡性細胞最終經由血液或淋巴系統擴散至局部淋巴結且經由稱作轉移之過程擴散至遠端位點。在癌性狀況下，細胞在正常細胞不會生長之條件下增殖。癌症本身以特徵在於不同程度之侵襲性及侵犯性的多種形式表現。

在發現癌症診斷及療法之有效細胞標靶的嘗試中，研究者已設法鑑別相較於表現於一或多個正常非癌性細胞上，特異性表現於一或多個特定類型之癌細胞表面上的跨膜或膜相關多肽。通常，相較於表現於非癌性細胞表面上，該等膜相關多肽較大量地表現於癌細胞表面上。鑑別該等腫

瘤相關之細胞表面抗原多肽可獲得特異性靶向癌細胞以經由基於抗體之療法破壞癌細胞的能力。在此方面，注意到基於抗體之療法已經證實極有效地治療某些癌症。舉例而言，HERCEPTIN®及RITUXAN®(兩者均來自 Genentech Inc., South San Francisco, California)分別為已成功地用於治療乳癌及非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之抗體。更特定言之，HERCEPTIN®為一種重組DNA源性人類化單株抗體，其選擇性結合於人類表皮生長因子受體2(HER2)原致癌基因之細胞外域。在25-30%原發性乳癌中觀察到HER2蛋白質過度表現。RITUXAN®為一種針對在正常及惡性B淋巴細胞表面上發現之CD20抗原的經遺傳工程改造之嵌合鼠類/人類單株抗體。該兩種抗體均在CHO細胞中重組產生。

儘管哺乳動物癌症療法已取得上述進展，但仍迫切需要分別能夠偵測哺乳動物之腫瘤之存在及有效抑制贅生性細胞生長的其他診斷及治療劑。因此，本發明之一目標在於鑑別相較於表現於正常細胞或其他不同癌細胞上而較大量地表現於一或多種類型之癌細胞上的細胞膜相關多肽，且在於使用彼等多肽及其編碼核酸來製造適用於治療性治療及診斷性偵測哺乳動物之癌症的組合物。

【發明內容】

在本說明書中，申請者第一次描述了相較於表現於一或多種類型之正常非癌細胞表面上而較高度地表現於一或多種類型之癌細胞表面上的細胞多肽(及其編碼核酸或其

片段)的鑑別。該等多肽在本文中稱為腫瘤相關抗原標靶多肽(「TAT」多肽)，且預期其可用作哺乳動物之癌症療法及診斷之有效標靶。

因此，在本發明之一個實施例中，本發明提供一種分離之核酸分子，其核苷酸序列編碼腫瘤相關抗原標靶多肽或其片段(「TAT」多肽)。

在某些態樣中，分離之核酸分子包含與以下具有至少約80%核酸序列一致性，或者至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性的核苷酸序列：(a)編碼具有本文所揭示之胺基酸序列之全長TAT多肽、本文所揭示之缺少信號肽之TAT多肽胺基酸序列、本文所揭示之有或無信號肽的跨膜TAT多肽之細胞外域、或本文所揭示之全長TAT多肽胺基酸序列的任何其他特別定義之片段的DNA分子；或(b)(a)之DNA分子之互補序列。

在其他態樣中，分離之核酸分子包含與以下具有至少約80%核酸序列一致性，或者至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性的核苷酸序列：(a)包含本文所揭示之全長TAT多肽cDNA之編碼序列、本文所揭示之缺少信號肽之TAT多肽之編碼序列、本文所揭示之有或無信號肽的跨膜TAT多肽之細胞外域之編碼序列、或本文所揭示之全長TAT多肽胺

基酸序列的任何其他特別定義之片段之編碼序列的DNA分子；或(b)(a)之DNA分子之互補序列。

本發明之另一態樣提供一種分離之核酸分子，其包含編碼缺失跨膜域或跨膜域失活之TAT多肽的核苷酸序列，或與所述編碼核苷酸序列互補，其中所述多肽之跨膜域如本文所揭示。因此，涵蓋本文所述之TAT多肽之可溶性細胞外域。

在其他態樣中，本發明係關於分離之核酸分子，其與以下雜交：(a)編碼本文所揭示之具有全長胺基酸序列之TAT多肽、本文所揭示之缺少信號肽之TAT多肽胺基酸序列、本文所揭示之有或無信號肽的跨膜TAT多肽之細胞外域、或本文所揭示之全長TAT多肽胺基酸序列的任何其他特別定義之片段的核苷酸序列；或(b)(a)之核苷酸序列之互補序列。就此而論，本發明之一個實施例係關於本文所揭示之全長TAT多肽編碼序列之片段或其互補序列，其可例如用作適用作例如診斷探針的雜交探針、PCR引子、反義寡核苷酸探針，或可用於編碼可視情況編碼包含抗TAT多肽抗體之結合位點之多肽的全長TAT多肽之片段。該等核酸片段之長度通常為至少約5個核苷酸，或者長度為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、

195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、
290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、
390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、
490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、
590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、
690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、
790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、
890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、
990或1000個核苷酸，其中在此情況下，術語「約」意謂
參考核苷酸序列長度加上或減去參考長度之10%。此外，
該等核酸片段通常包含源自TAT多肽之全長編碼序列或其
互補序列的連續核苷酸。應注意，編碼TAT多肽之核苷酸
序列之新穎片段或其互補序列可以常規方式藉由使用若干
熟知序列比對程式中之任一種比對編碼TAT多肽之核苷酸
序列與其他已知核苷酸序列及測定哪個(些)編碼TAT多肽
之核苷酸序列片段或其互補序列為新穎的來測定。本文涵
蓋編碼TAT多肽之核苷酸序列之所有該等新穎片段或其互
補序列。亦涵蓋由該等核苷酸分子片段編碼之TAT多肽片
段，較佳為彼等包含抗TAT抗體之結合位點的TAT多肽片
段。

在另一實施例中，本發明提供分離之TAT多肽，其由上
文鑑別之任何分離之核酸序列編碼。

在某一態樣中，本發明係關於一種分離之TAT多肽，其
包含與以下具有至少約80%胺基酸序列一致性或者至少約

81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%胺基酸序列一致性的胺基酸序列：本文所揭示之具有全長胺基酸序列之TAT多肽、本文所揭示之缺少信號肽之TAT多肽胺基酸序列、本文所揭示之有或無信號肽的跨膜TAT多肽蛋白質之細胞外域、由本文所揭示之任何核酸序列編碼的胺基酸序列、或本文所揭示之全長TAT多肽胺基酸序列的任何其他特別定義之片段。

在又一態樣中，本發明係關於一種分離之TAT多肽，其包含由與編碼以下之DNA分子之互補序列雜交的核苷酸序列編碼之胺基酸序列：(a)本文所揭示之具有全長胺基酸序列之TAT多肽；(b)本文所揭示之缺少信號肽之TAT多肽胺基酸序列；(c)本文所揭示之有或無信號肽的跨膜TAT多肽蛋白質之細胞外域；(d)由本文所揭示之任何核酸序列編碼的胺基酸序列；或(e)本文所揭示之全長TAT多肽胺基酸序列的任何其他特別定義之片段。

在一個特定態樣中，本發明提供一種分離之TAT多肽，其無N末端信號序列及/或無起始甲硫胺酸且由編碼上文所述之此種胺基酸序列之核苷酸序列編碼。產生該多肽之方法亦描述於本文中，其中彼等方法包含在適於表現TAT多肽之條件下培養包含包括適當的編碼核酸分子之載體之宿主細胞及自細胞培養物中回收TAT多肽。

本發明之另一態樣提供一種分離之TAT多肽，其缺失跨膜域或跨膜域已失活。產生該多肽之方法亦描述於本文

中，其中彼等方法包含在適於表現TAT多肽之條件下培養包含包括適當的編碼核酸分子之載體之宿主細胞及自細胞培養物中回收TAT多肽。

在本發明之其他實施例中，本發明提供包含編碼任何本文所述之多肽之DNA的載體。亦提供包含任何該載體之宿主細胞。舉例而言，宿主細胞可為CHO細胞、大腸桿菌細胞或酵母細胞。另外提供一種產生任何本文所述之多肽的方法，且該方法包含在適於表現所需多肽之條件下培養宿主細胞及自細胞培養物中回收所需多肽。

在其他實施例中，本發明提供分離之嵌合多肽，其包含與異源(非TAT)多肽融合之任何本文所述之TAT多肽。該等嵌合分子之實例包含與異源多肽(諸如免疫球蛋白之抗原決定基標籤序列或Fc區)融合之任何本文所述之TAT多肽。

在另一實施例中，本發明提供一種抗體，其較佳特異性結合於任何上述或下述多肽。該抗體視情況為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或競爭性抑制抗TAT多肽抗體與其各別抗原性抗原決定基結合的抗體。本發明抗體可視情況與生長抑制劑或細胞毒性劑(諸如毒素，包括例如類美登素(maytansinoid)或卡奇黴素(calicheamicin)；抗生素、放射性同位素、核酸分解酶；或其類似物)結合。本發明抗體可視情況在CHO細胞或細菌細胞中產生且較佳抑制其所結合之細胞之生長或增殖或誘導其死亡。出於診斷目的，本發明抗體可加上可偵測之標記，附著於固體支撐物或作類似處理。

在本發明之其他實施例中，本發明提供包含編碼任何本文所述之抗體之DNA的載體。亦提供包含任何該載體之宿主細胞。舉例而言，宿主細胞可為CHO細胞、大腸桿菌細胞或酵母細胞。另外提供一種產生任何本文所述之多肽的方法，且該方法包含在適於表現所需抗體之條件下培養宿主細胞及自細胞培養物中回收所需抗體。

在另一實施例中，本發明係關於一種組合物，其包含本文所述之TAT多肽、本文所述之嵌合TAT多肽、或本文所述之抗TAT抗體與載劑組合。視情況而定，載劑為醫藥學上可接受之載劑。

在又一實施例中，本發明係關於一種製品，其包含一容器及包含於該容器內之組合物，其中該組合物可包含本文所述之TAT多肽、本文所述之嵌合TAT多肽、或本文所述之抗TAT抗體。該物品可視情況進一步包含黏貼於容器上之標籤，或包括在容器內之包裝插頁，其涉及該組合物治療性治療或診斷性偵測腫瘤之用法。

本發明之另一實施例係關於本文所述之TAT多肽、本文所述之嵌合TAT多肽、或本文所述之抗TAT多肽抗體的用途，其係用於製備適用於治療對TAT多肽、嵌合TAT多肽或抗TAT多肽抗體起反應之病狀的藥劑。

本發明之其他實施例係關於包含本文所揭示之CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2或CDR-H3序列中之一或多個序列的任何分離之抗體，或與任何該抗體結合相同抗原決定基之任何抗體。

本發明之另一實施例係關於一種抑制表現TAT多肽之細胞生長的方法，其中該方法包含使該細胞與可結合於TAT多肽之抗體接觸，且其中該抗體與TAT多肽之結合引起對表現TAT多肽之細胞之生長的抑制。在較佳實施例中，該細胞為癌細胞，且該抗體與TAT多肽之結合引起該表現TAT多肽之細胞死亡。視情況而定，該抗體為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體或單鏈抗體。本發明方法中所採用之抗體可視情況與生長抑制劑或細胞毒性劑(諸如毒素，包括例如類美登素或卡奇黴素；抗生素、放射性同位素、核酸分解酶；或其類似物)結合。本發明方法中所採用之抗體可視情況於CHO細胞或細菌細胞中產生。

本發明之又一實施例係關於一種治療性治療具有包含表現TAT多肽之細胞之癌性腫瘤的哺乳動物之方法，其中該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之可結合於TAT多肽之抗體，從而能有效地治療性治療該腫瘤。視情況而定，該抗體為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體或單鏈抗體。本發明方法中所採用之抗體可視情況與生長抑制劑或細胞毒性劑(諸如毒素，包括例如類美登素或卡奇黴素；抗生素、放射性同位素、核酸分解酶；或其類似物)結合。本發明方法中所採用之抗體可視情況於CHO細胞或細菌細胞中產生。

本發明之又一實施例係關於一種測定疑似含有TAT多肽之樣品中TAT多肽之存在的方法，其中該方法包含將該樣

品暴露於(或使該樣品接觸)可結合TAT多肽之抗體，且測定或偵測該抗體與該樣品中之TAT多肽之結合，其中該結合之存在指示該樣品中存在TAT多肽。視情況而定，樣品可含有疑似表現TAT多肽之細胞(其可為癌細胞)。該方法中所採用之抗體可視情況加上可偵測之標記，附著於固體支撐物或作類似處理。

本發明之另一實施例係關於一種診斷哺乳動物之腫瘤之存在的方法，其中該方法包含偵測(a)自該哺乳動物獲得之組織細胞之測試樣品及(b)源於相同組織或相同類型的已知正常非癌性細胞之對照樣品中編碼TAT多肽之基因的表現量，其中相較於對照樣品，測試樣品中TAT多肽之表現量較高，表明測試樣品所獲自之哺乳動物中存在腫瘤。

本發明之另一實施例係關於一種診斷哺乳動物之腫瘤之存在的方法，其中該方法包含(a)使包含獲自該哺乳動物之組織細胞的測試樣品與可結合於TAT多肽之抗體接觸，及(b)偵測該抗體與測試樣品中之TAT多肽之間的複合物之形成，其中複合物之形成指示哺乳動物中存在腫瘤。視情況而定，所採用之抗體加上可偵測標記，附著於固體支撐物或作類似處理，及/或組織細胞之測試樣品係獲自疑似具有癌性腫瘤之個體。

本發明之又一實施例係關於一種治療或預防與TAT多肽之表現或活性改變、較佳為增加相關之細胞增殖病症的方法，該方法包含向需要該治療之個體投與有效量之TAT多肽拮抗劑。較佳的是，細胞增殖病症為癌症，且TAT多肽

拮抗劑為抗TAT多肽抗體或反義寡核苷酸。細胞增殖病症之有效治療或預防可為直接殺滅表現TAT多肽之細胞或抑制該等細胞生長或拮抗TAT多肽增強細胞生長之活性的結果。

本發明之又一實施例係關於一種使抗體與表現TAT多肽之細胞結合的方法，其中該方法包含使表現TAT多肽之細胞與該抗體在適於該抗體與該TAT多肽結合之條件下接觸及使其之間產生結合。在較佳實施例中，用適用於定性及/或定量測定抗體與細胞結合之位置及/或量的分子或化合物標記抗體。

本發明之又一實施例係關於一種將細胞毒性劑或診斷劑傳遞至表現TAT多肽之細胞的方法，其中該方法包含提供結合於可結合該TAT多肽之抗體以形成抗體-藥劑結合物的細胞毒性劑或診斷劑，及使該細胞暴露於抗體-藥劑結合物。該抗體視情況為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體或單鏈抗體。

本發明之其他實施例係關於TAT多肽、編碼TAT多肽之核酸、或包含該核酸之載體或宿主細胞、或抗TAT多肽抗體的用途，其係用於製備適用於以下之藥劑：(i)治療性治療或診斷性偵測癌症或腫瘤，或(ii)治療性治療或預防細胞增殖病症。

本發明之另一實施例係關於一種抑制癌細胞生長之方法，其中該癌細胞之生長至少部分依賴於TAT多肽增強生長之作用(其中TAT多肽可能由癌細胞本身或產生對癌細胞

具有增強生長之作用之多肽的細胞表現)，其中該方法包含使TAT多肽與可結合於TAT多肽之抗體接觸，從而拮抗TAT多肽增強生長之活性，且又抑制癌細胞之生長。癌細胞之生長較佳完全受抑制。甚至更佳的是，抗體與TAT多肽之結合誘發癌細胞死亡。視情況而定，該抗體為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體或單鏈抗體。本發明方法中所採用之抗體可視情況與生長抑制劑或細胞毒性劑(諸如毒素，包括例如類美登素或卡奇黴素；抗生素、放射性同位素、核酸分解酶；或其類似物)結合。本發明方法中所採用之抗體可視情況於CHO細胞或細菌細胞中產生。

本發明之又一實施例係關於一種治療性治療哺乳動物之腫瘤的方法，其中該腫瘤之生長至少部分依賴於TAT多肽增強生長之作用，其中該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量的可結合於TAT多肽之抗體，從而拮抗該TAT多肽增強生長之活性並有效地治療性治療該腫瘤。視情況而定，該抗體為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體或單鏈抗體。本發明方法中所採用之抗體可視情況與生長抑制劑或細胞毒性劑(諸如毒素，包括例如類美登素或卡奇黴素；抗生素、放射性同位素、核酸分解酶；或其類似物)結合。本發明方法中所採用之抗體可視情況於CHO細胞或細菌細胞中產生。

在其他實施例中，本發明係關於本申請案或未來申請案之以下一組可能的技術方案：

1. 一種分離之核酸，其具有與以下具有至少80%核酸序列一致性之核苷酸序列：(a)編碼如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列的DNA分子，(b)編碼如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之胺基酸序列的DNA分子，(c)編碼如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域的DNA分子，(d)編碼如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽之細胞外域的DNA分子，(e)如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列，(f)如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼序列，或(g)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)之互補序列。

2. 一種分離之核酸，其具有(a)編碼如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列的核苷酸序列，(b)編碼如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之胺基酸序列的核苷酸序列，(c)編碼如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域的核苷酸序列，(d)編碼如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽之細胞外域的核苷酸序列，(e)如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列，(f)如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區，或(g)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)之互補序列。

3. 一種分離之核酸，其與以下雜交：(a)編碼如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列的核酸，(b)編碼如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之胺基酸序列的核酸，(c)編碼如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域的核酸，(d)編碼如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽

之細胞外域的核酸，(e)如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列，(f)如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區，或(g)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)之互補序列。

4. 如技術方案3之核酸，其中該雜交在嚴格條件下進行。

5. 如技術方案3之核酸，其長度為至少約5個核苷酸。

6. 一種表現載體，其包含如技術方案1、2或3之核酸。

7. 如技術方案6之表現載體，其中該核酸可操作地連接於由經該載體轉型之宿主細胞識別的控制序列。

8. 一種宿主細胞，其包含如技術方案7之表現載體。

9. 如技術方案8之宿主細胞，其為CHO細胞、大腸桿菌細胞或酵母細胞。

10. 一種製造多肽之方法，其包含在適於表現該多肽之條件下培養如技術方案8之宿主細胞及自其細胞培養物中回收該多肽。

11. 一種分離之多肽，其與以下具有至少80%胺基酸序列一致性：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽。

12. 一種分離之多肽，其具有(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

13. 一種嵌合多肽，其包含如技術方案11或12之多肽融合於異源多肽。

14. 如技術方案13之嵌合多肽，其中該異源多肽為免疫球蛋白之抗原決定基標籤序列或Fc區。

15. 一種分離之抗體，其結合於與以下具有至少80%胺基酸序列一致性之多肽：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽。

16. 一種分離之抗體，其結合於具有以下之多肽：(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序

列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

17. 如技術方案15或16之抗體，其為單株抗體。

18. 如技術方案15或16之抗體，其為抗體片段。

19. 如技術方案15或16之抗體，其為嵌合抗體或人類化抗體。

20. 如技術方案15或16之抗體，其結合於生長抑制劑。

21. 如技術方案15或16之抗體，其結合於細胞毒性劑。

22. 如技術方案21之抗體，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：毒素、抗生素、放射性同位素及核酸分解酶。

23. 如技術方案21之抗體，其中該細胞毒性劑為毒素。

24. 如技術方案23之抗體，其中該毒素係選自由類美登素、卡奇黴素及奧瑞他汀(auristatin)組成之群。

25. 如技術方案23之抗體，其中該毒素為類美登素。

26. 如技術方案15或16之抗體，其係在細菌中產生。

27. 如技術方案15或16之抗體，其係在CHO細胞中產生。

28. 如技術方案15或16之抗體，其誘發所結合之細胞死亡。

29. 如技術方案15或16之抗體，其係經可偵測標記。

30. 一種分離之核酸，其具有編碼如技術方案15或16之

抗體的核苷酸序列。

31. 一種表現載體，其包含如技術方案30之核酸，該核酸可操作地連接於由經該載體轉型之宿主細胞識別之控制序列。

32. 一種宿主細胞，其包含如技術方案31之表現載體。

33. 如技術方案32之宿主細胞，其為CHO細胞、大腸桿菌細胞或酵母細胞。

34. 一種製造抗體之方法，其包含在適於表現該抗體之條件下培養如技術方案32之宿主細胞及自其細胞培養物中回收該抗體。

35. 一種組合物，其包含(a)如技術方案11之多肽，(b)如技術方案12之多肽，(c)如技術方案13之嵌合多肽，(d)如技術方案15之抗體，或(e)如技術方案16之抗體與載劑組合。

36. 如技術方案35之組合物，其中該載劑為醫藥學上可接受之載劑。

37. 一種製品，其包含(a)容器；及(b)該容器內所含之如技術方案35之組合物。

38. 如技術方案37之製品，其進一步包含黏貼於該容器之標籤、或連同該容器所包括之包裝插頁，其涉及該組合物治療性治療或診斷性偵測癌症之用法。

39. 一種抑制表現與以下具有至少80%胺基酸序列一致性之蛋白質之細胞生長的方法：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，

(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽，該方法包含使該細胞與可結合於該蛋白質之抗體接觸，從而該抗體與該蛋白質之結合引起對該細胞之生長的抑制。

40. 如技術方案39之方法，其中該抗體為單株抗體。

41. 如技術方案39之方法，其中該抗體為抗體片段。

42. 如技術方案39之方法，其中該抗體為嵌合抗體或人類化抗體。

43. 如技術方案39之方法，其中該抗體結合於生長抑制劑。

44. 如技術方案39之方法，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

45. 如技術方案44之方法，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：毒素、抗生素、放射性同位素及核酸分解酶。

46. 如技術方案44之方法，其中該細胞毒性劑為毒素。

47. 如技術方案46之方法，其中該毒素係選自由類美登素、卡奇黴素及奧瑞他汀組成之群。

48. 如技術方案46之方法，其中該毒素為類美登素。

49. 如技術方案39之方法，其中該抗體係在細菌中產生。

50. 如技術方案39之方法，其中該抗體係在CHO細胞中產生。

51. 如技術方案39之方法，其中該細胞為癌細胞。

52. 如技術方案51之方法，其中該癌細胞進一步被暴露於放射治療或化療劑中。

53. 如技術方案51之方法，其中該癌細胞係選自由以下組成之群：乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、卵巢癌細胞、中樞神經系統癌細胞、肝癌細胞、膀胱癌細胞、胰腺癌細胞、子宮頸癌細胞、黑素瘤細胞及白血病細胞。

54. 如技術方案51之方法，其中相較於源於相同組織之正常細胞，該癌細胞對該蛋白質有較大量的表現。

55. 如技術方案39之方法，其引起該細胞死亡。

56. 如技術方案39之方法，其中該蛋白質具有(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

57. 一種治療性治療具有癌性腫瘤之哺乳動物的方法，其中該癌性腫瘤包含表現與以下具有至少80%胺基酸序列一致性之蛋白質的細胞：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如

SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，
(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，
(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，
或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽，該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量的可結合於該蛋白質之抗體，從而有效地治療該哺乳動物。

58. 如技術方案57之方法，其中該抗體為單株抗體。

59. 如技術方案57之方法，其中該抗體為抗體片段。

60. 如技術方案57之方法，其中該抗體為嵌合抗體或人類化抗體。

61. 如技術方案57之方法，其中該抗體結合於生長抑制劑。

62. 如技術方案57之方法，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

63. 如技術方案62之方法，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：毒素、抗生素、放射性同位素及核酸分解酶。

64. 如技術方案62之方法，其中該細胞毒性劑為毒素。

65. 如技術方案64之方法，其中該毒素係選自由類美登素、卡奇黴素及奧瑞他汀組成之群。

66. 如技術方案64之方法，其中該毒素為類美登素。

67. 如技術方案57之方法，其中該抗體係在細菌中產生。

68. 如技術方案57之方法，其中該抗體係在CHO細胞中

產生。

69. 如技術方案57之方法，其中該腫瘤進一步被暴露於放射治療或化療劑中。

70. 如技術方案57之方法，其中該腫瘤為乳房腫瘤、結腸直腸腫瘤、肺腫瘤、卵巢腫瘤、中樞神經系統腫瘤、肝腫瘤、膀胱腫瘤、胰臟腫瘤或子宮頸腫瘤。

71. 如技術方案57之方法，其中相較於源於相同組織之正常細胞，該腫瘤之癌細胞對該蛋白質有較大量的表現。

72. 如技術方案57之方法，其中該蛋白質具有(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

73. 一種測定疑似含有蛋白質之樣品中該蛋白質之存在的方法，其中該蛋白質與以下具有至少80%胺基酸序列一致性：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽，該方法

包含將該樣品暴露於可結合於該蛋白質之抗體，及測定該抗體與該樣品中之該蛋白質之結合，其中該抗體與該蛋白質之結合表明該樣品中存在該蛋白質。

74. 如技術方案73之方法，其中該樣品包含疑似表現該蛋白質之細胞。

75. 如技術方案74之方法，其中該細胞為癌細胞。

76. 如技術方案73之方法，其中該抗體係經可偵測標記。

77. 如技術方案73之方法，其中該蛋白質具有(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

78. 一種診斷哺乳動物之腫瘤之存在的方法，該方法包含測定自該哺乳動物獲得之組織細胞之測試樣品中及源於相同組織之已知正常細胞之對照樣品中的編碼與以下具有至少80%胺基酸序列一致性之蛋白質之基因的表現量：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示

之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽，其中相較於該對照樣品，該測試樣品中該蛋白質之表現量較高，表明該測試樣品所獲自之該哺乳動物中存在腫瘤。

79. 如技術方案78之方法，其中該測定編碼該蛋白質之基因之表現量的步驟包含在原位雜交或RT-PCR分析中採用寡核苷酸。

80. 如技術方案78之方法，其中該測定編碼該蛋白質之基因之表現量的步驟包含在免疫組織化學或西方墨點分析中採用抗體。

81. 如技術方案78之方法，其中該蛋白質具有(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

82. 一種診斷哺乳動物之腫瘤之存在的方法，該方法包含使自該哺乳動物獲得之組織細胞之測試樣品與可結合於與以下具有至少80%胺基酸序列一致性之蛋白質之抗體接觸：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示

但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽；及偵測該抗體與該測試樣品中之該蛋白質之間的複合物形成，其中該複合物形成表明該哺乳動物中存在腫瘤。

83. 如技術方案82之方法，其中該抗體係經可偵測標記。

84. 如技術方案82之方法，其中該組織細胞測試樣品係自疑似具有癌性腫瘤之個體獲得。

85. 如技術方案82之方法，其中該蛋白質具有(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

86. 一種治療或預防與一蛋白質之表現或活性增加相關之細胞增殖病症的方法，該蛋白質與以下具有至少80%胺基酸序列一致性：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如

SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽，該方法包含向需要該治療之個體投與有效量之該蛋白質之拮抗劑，從而有效地治療或預防該細胞增殖病症。

87. 如技術方案86之方法，其中該細胞增殖病症為癌症。

88. 如技術方案86之方法，其中該拮抗劑為抗TAT多肽抗體或反義寡核苷酸。

89. 一種使抗體與表現一蛋白質之細胞結合的方法，該蛋白質與以下具有至少80%胺基酸序列一致性：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽，該方法包含使該細胞與可結合於該蛋白質之抗體接觸，及使該抗體與該蛋白質發生結合，從而使該抗體與該細胞結合。

90. 如技術方案89之方法，其中該抗體為單株抗體。

91. 如技術方案89之方法，其中該抗體為抗體片段。

92. 如技術方案89之方法，其中該抗體為嵌合抗體或人類化抗體。

93. 如技術方案89之方法，其中該抗體結合於生長抑制劑。

94. 如技術方案89之方法，其中該抗體結合於細胞毒性

劑。

95. 如技術方案94之方法，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：毒素、抗生素、放射性同位素及核酸分解酶。

96. 如技術方案94之方法，其中該細胞毒性劑為毒素。

97. 如技術方案96之方法，其中該毒素係選自由類美登素、卡奇黴素及奧瑞他汀組成之群。

98. 如技術方案96之方法，其中該毒素為美癸醇。

99. 如技術方案89之方法，其中該抗體係在細菌中產生。

100. 如技術方案89之方法，其中該抗體係在CHO細胞中產生。

101. 如技術方案89之方法，其中該細胞為癌細胞。

102. 如技術方案101之方法，其中該癌細胞進一步被暴露於放射治療或化療劑中。

103. 如技術方案101之方法，其中該癌細胞係選自由以下組成之群：乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、卵巢癌細胞、中樞神經系統癌細胞、肝癌細胞、膀胱癌細胞、胰腺癌細胞、子宮頸癌細胞、黑素瘤細胞及白血病細胞。

104. 如技術方案103之方法，其中相較於源於相同組織之正常細胞，該癌細胞對該蛋白質有較大量的表現。

105. 如技術方案89之方法，其引起該細胞死亡。

106. 一種如技術方案1至5或30中任一項之核酸的用

途，其係用於製備用以治療性治療或診斷性偵測癌症之藥劑。

107. 一種如技術方案1至5或30中任一項之核酸的用途，其係用於製備用以治療腫瘤之藥劑。

108. 一種如技術方案1至5或30中任一項之核酸的用途，其係用於製備用以治療或預防細胞增殖病症之藥劑。

109. 一種如技術方案6、7或31中任一項之表現載體的用途，其係用於製備用以治療性治療或診斷性偵測癌症之藥劑。

110. 一種如技術方案6、7或31中任一項之表現載體的用途，其係用於製備用以治療腫瘤之藥劑。

111. 一種如技術方案6、7或31中任一項之表現載體的用途，其係用於製備用以治療或預防細胞增殖病症之藥劑。

112. 一種如技術方案8、9、32或33中任一項之宿主細胞的用途，其係用於製備用以治療性治療或診斷性偵測癌症之藥劑。

113. 一種如技術方案8、9、32或33中任一項之宿主細胞的用途，其係用於製備用以治療腫瘤之藥劑。

114. 一種如技術方案8、9、32或33中任一項之宿主細胞的用途，其係用於製備用以治療或預防細胞增殖病症之藥劑。

115. 一種如技術方案11至14中任一項之多肽的用途，其係用於製備用以治療性治療或診斷性偵測癌症之藥劑。

116. 一種如技術方案11至14中任一項之多肽的用途，其係用於製備用以治療腫瘤之藥劑。

117. 一種如技術方案11至14中任一項之多肽的用途，其係用於製備用以治療或預防細胞增殖病症之藥劑。

118. 一種如技術方案15至29中任一項之抗體的用途，其係用於製備用以治療性治療或診斷性偵測癌症之藥劑。

119. 一種如技術方案15至29中任一項之抗體的用途，其係用於製備用以治療腫瘤之藥劑。

120. 一種如技術方案15至29中任一項之抗體的用途，其係用於製備用以治療或預防細胞增殖病症之藥劑。

121. 一種如技術方案35或36中任一項之組合物的用途，其係用於製備用以治療性治療或診斷性偵測癌症之藥劑。

122. 一種如技術方案35或36中任一項之組合物的用途，其係用於製備用以治療腫瘤之藥劑。

123. 一種如技術方案35或36中任一項之組合物的用途，其係用於製備用以治療或預防細胞增殖病症之藥劑。

124. 一種如技術方案37或38中任一項之製品的用途，其係用於製備用以治療性治療或診斷性偵測癌症之藥劑。

125. 一種如技術方案37或38中任一項之製品的用途，其係用於製備用以治療腫瘤之藥劑。

126. 一種如技術方案37或38中任一項之製品的用途，其係用於製備用以治療或預防細胞增殖病症之藥劑。

127. 一種抑制細胞生長之方法，其中該細胞之生長至

少部分依賴於與以下具有至少80%胺基酸序列一致性之蛋白質增強生長之作用：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽，該方法包含使該蛋白質與可結合於該蛋白質之抗體接觸，從而抑制該細胞之生長。

128. 如技術方案127之方法，其中該細胞為癌細胞。

129. 如技術方案127之方法，其中該蛋白質係由該細胞表現。

130. 如技術方案127之方法，其中該抗體與該蛋白質之結合拮抗該蛋白質增強細胞生長之活性。

131. 如技術方案127之方法，其中該抗體與該蛋白質之結合誘發該細胞死亡。

132. 如技術方案127之方法，其中該抗體為單株抗體。

133. 如技術方案127之方法，其中該抗體為抗體片段。

134. 如技術方案127之方法，其中該抗體為嵌合抗體或人類化抗體。

135. 如技術方案127之方法，其中該抗體結合於生長抑制劑。

136. 如技術方案127之方法，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

137. 如技術方案136之方法，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：毒素、抗生素、放射性同位素及核酸分解酶。

138. 如技術方案136之方法，其中該細胞毒性劑為毒素。

139. 如技術方案138之方法，其中該毒素係選自由類美登素、卡奇黴素及奧瑞他汀組成之群。

140. 如技術方案138之方法，其中該毒素為類美登素。

141. 如技術方案127之方法，其中該抗體係在細菌中產生。

142. 如技術方案127之方法，其中該抗體係在CHO細胞中產生。

143. 如技術方案127之方法，其中該蛋白質具有(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

144. 一種治療性治療哺乳動物之腫瘤的方法，其中該腫瘤之生長至少部分依賴於與以下具有至少80%胺基酸序列一致性之蛋白質增強生長之作用：(a)如SEQ ID NO:2所示之多肽，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽之多

肽，(c)如 SEQ ID NO:2 所示且具有相關信號肽之多肽之細胞外域，(d)如 SEQ ID NO:2 所示但缺乏相關信號肽之多肽的細胞外域，(e)由如 SEQ ID NO:1 所示之核苷酸序列編碼之多肽，或(f)由如 SEQ ID NO:1 所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的多肽，該方法包含使該蛋白質與可結合於該蛋白質之抗體接觸，從而有效地治療該腫瘤。

145. 如技術方案 144 之方法，其中該蛋白質係由該腫瘤之細胞表現。

146. 如技術方案 144 之方法，其中該抗體與該蛋白質之結合拮抗該蛋白質增強細胞生長之活性。

147. 如技術方案 144 之方法，其中該抗體為單株抗體。

148. 如技術方案 144 之方法，其中該抗體為抗體片段。

149. 如技術方案 144 之方法，其中該抗體為嵌合抗體或人類化抗體。

150. 如技術方案 144 之方法，其中該抗體結合於生長抑制劑。

151. 如技術方案 144 之方法，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

152. 如技術方案 151 之方法，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：毒素、抗生素、放射性同位素及核酸分解酶。

153. 如技術方案 151 之方法，其中該細胞毒性劑為毒素。

154. 如技術方案 153 之方法，其中該毒素係選自由類美

登素、卡奇黴素及奧瑞他汀組成之群。

155. 如技術方案153之方法，其中該毒素為類美登素。

156. 如技術方案144之方法，其中該抗體係在細菌中產生。

157. 如技術方案144之方法，其中該抗體係在CHO細胞中產生。

158. 如技術方案144之方法，其中該蛋白質具有(a)如SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列，(b)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之胺基酸序列，(c)如SEQ ID NO:2所示且具有相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(d)如SEQ ID NO:2所示但缺乏相關信號肽序列之多肽之細胞外域的胺基酸序列，(e)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列編碼之胺基酸序列，或(f)由如SEQ ID NO:1所示之核苷酸序列之全長編碼區編碼的胺基酸序列。

159. 一種分離之抗體，其結合於由如技術方案15至29中任一項之抗體所結合之相同抗原決定基。

160. 如技術方案159之抗體，其為單株抗體。

161. 如技術方案159之抗體，其為抗體片段。

162. 如技術方案159之抗體，其為嵌合抗體或人類化抗體。

163. 如技術方案159之抗體，其結合於生長抑制劑。

164. 如技術方案159之抗體，其結合於細胞毒性劑。

165. 如技術方案164之抗體，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：毒素、抗生素、放射性同位素及核酸分

解酶。

166. 如技術方案164之抗體，其中該細胞毒性劑為毒素。

167. 如技術方案166之抗體，其中該毒素係選自由類美登素、卡奇徵素及奧瑞他汀組成之群。

168. 如技術方案166之抗體，其中該毒素為類美登素。

169. 如技術方案159之抗體，其係在細菌中產生。

170. 如技術方案159之抗體，其係在CHO細胞中產生。

171. 如技術方案159之抗體，其誘發所結合之細胞死亡。

172. 如技術方案159之抗體，其係經可偵測標記。

173. 如技術方案159之抗體，其包含如技術方案15至29之任何抗體的至少一個互補決定區。

174. 一種融合瘤細胞，其產生可結合於TAT多肽之單株抗體。

175. 一種鑑別結合於由如技術方案15至29之任何抗體所結合之抗原決定基之抗體的方法，該方法包含測定測試抗體阻斷如技術方案15至29之任何抗體之結合的能力，其中在相等抗體濃度下該測試抗體阻斷該如技術方案15至29之任何抗體與TAT多肽之結合達至少40%的能力表明該測試抗體能夠結合於由該如技術方案15至29之任何抗體所結合之抗原決定基。

在閱讀本說明書之後，熟習此項技術者將顯而易知本發明之其他實施例。

【實施方式】

I. 定義

如本文所使用之術語「TAT多肽」及「TAT」當緊接著有數字標號時係指各種多肽，其中完整標號(亦即TAT/數字)係指本文所述之特異性多肽序列。如本文所使用之術語「TAT/數字多肽」及「TAT/數字」(其中術語「數字」以實際數字標號提供)涵蓋天然序列多肽、多肽變異體、及天然序列多肽及多肽變異體之片段(其進一步在本文中加以定義)。本文所述之TAT多肽可自多種來源(諸如人類組織類型或另一來源)分離或利用重組或合成方法製備。術語「TAT多肽」係指本文所揭示之各個別TAT/數字多肽。本說明書中提及「TAT多肽」之所有揭示內容個別地以及共同地指各多肽。舉例而言，關於製備、純化、衍生、對於或針對...之抗體之形成、對於或針對...之TAT結合寡肽之形成、對於或針對...之TAT結合有機分子之形成、投與、含有...之組合物、用...治療疾病等的描述個別地涉及本發明之各多肽。術語「TAT多肽」亦包括本文所揭示之TAT/數字多肽之變異體。在一個實施例中，TAT419多肽序列如SEQ ID NO:2所示。

「天然序列TAT多肽」包含胺基酸序列與源自自然界之相應TAT多肽相同的多肽。該天然序列TAT多肽可自自然界中分離，或可利用重組或合成方法製備。術語「天然序列TAT多肽」特別涵蓋特定TAT多肽的天然存在之截短或分泌形式(例如細胞外域序列)、該多肽之天然存在之變異

形式(例如替代性剪接形式)及天然存在之對偶基因變異體。在本發明之某些實施例中，本文所揭示之天然序列TAT多肽為包含附圖所示之全長胺基酸序列的成熟或全長天然序列多肽。起始及終止密碼子(若指出時)在圖式中以粗體顯示且加有下劃線。附圖中以「N」或「X」指出之核酸殘基為任何核酸殘基。然而，儘管圖上展示附圖中所揭示之TAT多肽以甲硫胺酸殘基(在本文之圖式中指作胺基酸位置1)起始，但可設想且有可能位於圖式中胺基酸位置1之上游或下游的其他甲硫胺酸殘基可用作TAT多肽之起始胺基酸殘基。

TAT多肽「細胞外域」或「ECD」係指一種TAT多肽形式，其基本上不含跨膜及細胞質域。通常，TAT多肽ECD應具有少於1%之該等跨膜及/或細胞質域，且較佳應具有少於0.5%之該等域。應瞭解，針對本發明之TAT多肽鑑別出的任何跨膜域係根據此項技術中常規用於鑑別此類疏水域之標準鑑別。跨膜域之精確邊界可能在且很可能在如本文最初鑑別之域的任一端處的不超過約5個胺基酸中有所不同。因此，視情況而定，TAT多肽之細胞外域在如實例或說明書中所鑑別出之跨膜域/細胞外域邊界之任一側可含有約5個或更少胺基酸，且本發明涵蓋該等有或無相關信號肽之多肽及編碼該等多肽之核酸。

本文所揭示之各種TAT多肽之「信號肽」的近似位置可展示於本說明書及/或附圖中。然而，應注意，信號肽C末端邊界可能在且很可能在本文最初鑑別之信號肽C末端邊

界之任一側的不超過約5個胺基酸中有所不同，其中信號肽之C末端邊界可根據此項技術中常規用於鑑別此類胺基酸序列要素的標準鑑別(例如Nielsen等人，Prot. Eng. 10:1-6 (1997)及 von Heinje 等人，Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986))。此外，亦應認識到，在一些情況下，分泌之多肽之信號序列的裂解並不完全均一，從而產生一種以上分泌之物質。本發明涵蓋此等成熟多肽，其中信號肽在如本文所鑑別信號肽之C末端邊界的任一側的不超過約5個胺基酸內裂解，及編碼該等多肽之聚核苷酸。

「TAT多肽變異體」意謂如本文所定義之與以下具有至少約80%胺基酸序列一致性的TAT多肽、較佳活性TAT多肽：本文所揭示之全長天然序列TAT多肽序列、本文所揭示之缺少信號肽的TAT多肽序列、本文所揭示之有或無信號肽之TAT多肽的細胞外域、或本文所揭示之全長TAT多肽序列的任何其他片段(諸如由僅代表全長TAT多肽之完整編碼序列之一部分的核酸所編碼的片段)。該等TAT多肽變異體包括例如在全長天然胺基酸序列之N末端或C末端添加或缺失一或多個胺基酸殘基的TAT多肽。通常，TAT多肽變異體應與以下具有至少約80%胺基酸序列一致性，或者至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性：本文所揭示之全長天然序列TAT多肽序列、本文所揭示之缺少信號肽的TAT多肽序列、本文所揭示之有或無信號肽之的TAT多肽的細

胞外域、或本文所揭示之全長TAT多肽序列的任何其他特別定義之片段。通常，TAT變異多肽之長度為至少約10個胺基酸，或者長度為至少約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600個胺基酸或更多。視情況而定，TAT變異多肽相較於天然TAT多肽序列應具有不超過一個保守性胺基酸取代，或相較於天然TAT多肽序列具有不超過2、3、4、5、6、7、8、9或10個保守性胺基酸取代。

關於本文鑑別之TAT多肽序列的「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為比對序列且必要時引入缺口以獲得序列一致性最大百分比，且不將任何保守性取代視為序列一致性之部分之後，候選序列中胺基酸殘基與特定TAT多肽序列中之胺基酸殘基一致的之百分比。可以此項技術內之多種方式，例如使用公開可得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)軟體，達成比對以測定胺基酸序列一致性百分比。熟習此項技術者可決定量測比對之適當參數，包括達成比較序列全長的最大比對所需之任何演算法。然而，為本文目的，胺基酸序列一致性%值係如下述使用序列比較電腦程式ALIGN-2獲得，其中ALIGN-2程式之完整原始程式碼提供

於美國專利第7,160,985號中，其以引用之方式併入本文中。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech, Inc.編寫，且其原始程式碼已經以使用說明書申請於美國著作權局(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)，以美國著作權註冊編號TXU510087註冊。ALIGN-2程式經由Genentech, Inc.(South San Francisco, California)公開可得，或可由原始程式碼編譯。ALIGN-2程式應編譯用於UNIX操作系統，較佳數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不變。

在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情況下，如下計算既定胺基酸序列A對於、與、或相對於既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%(或者可稱為既定胺基酸序列A具有或包含某一對於、與、或相對於既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%)：

$$100 \times \text{分數 } X/Y$$

其中X為經序列比對程式ALIGN-2在該程式比對A與B中評為一致匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數。應瞭解，當胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度時，A對B之胺基酸序列一致性%將不等於B對A之胺基酸序列一致性%。

「TAT變異聚核苷酸」或「TAT變異核酸序列」意謂編碼如本文所定義之TAT多肽、較佳活性TAT多肽且與編碼以下之核苷酸序列具有至少約80%核酸序列一致性的核酸分子：本文所揭示之全長天然序列TAT多肽序列、本文所

揭示之缺少信號肽的全長天然序列TAT多肽序列、本文所揭示之有或無信號肽之TAT多肽的細胞外域、或本文所揭示之全長TAT多肽序列之任何其他片段(諸如由僅代表全長TAT多肽之完整編碼序列之一部分的核酸所編碼的片段)。通常，TAT變異聚核苷酸應與編碼以下之核酸序列具有至少約80%核酸序列一致性，或者至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列一致性：本文所揭示之全長天然序列TAT多肽序列、本文所揭示之缺少信號肽的全長天然序列TAT多肽序列、本文所揭示之有或無信號序列之TAT多肽的細胞外域、或本文所揭示之全長TAT多肽序列之任何其他片段。變異體不涵蓋天然核苷酸序列。

通常，TAT變異體聚核苷酸之長度為至少約5個核苷酸，或者長度為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、

660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000個核苷酸，其中在此情況下，術語「約」意謂參考核苷酸序列長度加上或減去參考長度之10%。

關於本文鑑別之TAT編碼核酸序列的「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為比對序列且必要時引入缺口以獲得序列一致性最大百分之後，候選序列中核苷酸與相關TAT核酸序列中之核苷酸一致之百分比。可以此項技術內之多種方式，例如使用公開可得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)軟體，達成比對以測定核酸序列一致性百分比。然而，為本文目的，核酸序列一致性%值係如下述使用序列比較電腦程式ALIGN-2獲得，其中ALIGN-2程式之完整原始程式碼提供於美國專利第7,160,985號中，其以引用之方式併入本文中。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech, Inc.編寫，且其原始程式碼已經以使用說明書申請於美國著作權局(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)，以美國著作權註冊編號TXU510087註冊。ALIGN-2程式經由Genentech, Inc.(South San Francisco, California)公開可得，或可由原始程式碼編譯。ALIGN-2程式應編譯用於UNIX操作系統，較佳數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不變。

在採用 ALIGN-2 進行核酸序列比較之情況下，如下計算既定核酸序列 C 對於、與、或相對於既定核酸序列 D 之核酸序列一致性 % (或者可稱為既定核酸序列 C 具有或包含某一對於、與、或相對於既定核酸序列 D 之核酸序列一致性 %)：

$$100 \times \text{分數 } W/Z$$

其中 W 為經序列比對程式 ALIGN-2 在該程式比對 C 與 D 中評為一致匹配之核苷酸的數目，且其中 Z 為 D 中核苷酸之總數。應瞭解，當核酸序列 C 之長度不等於核酸序列 D 之長度時，C 對 D 之核酸序列一致性 % 將不等於 D 對 C 之核酸序列一致性 %。

在其他實施例中，TAT 變異聚核苷酸為編碼 TAT 多肽且能夠較佳在嚴格雜交及洗滌條件下與編碼本文所揭示之全長 TAT 多肽的核苷酸序列雜交的核酸分子。TAT 變異多肽可為由 TAT 變異聚核苷酸編碼之 TAT 多肽。

術語「全長編碼區」當關於編碼 TAT 多肽之核酸使用時，係指編碼本發明之全長 TAT 多肽的核苷酸序列 (在附圖中，其通常展示於起始密碼子與終止密碼子之間，包括起始密碼子及終止密碼子)。術語「全長編碼區」當關於 ATCC 寄存之核酸使用時，係指插入以 ATCC 寄存之載體中之 cDNA 的編碼 TAT 多肽的部分 (在附圖中，其通常展示於起始密碼子與終止密碼子之間，包括起始密碼子及終止密碼子)。

「分離之」當用於描述本文所揭示之各種 TAT 多肽時，

意謂已鑑別且自自然環境之組分分離及/或回收的多肽。其自然環境之污染組分為通常可干擾多肽之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。在較佳實施例中，多肽將純化：(1)至足以獲得N末端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度，利用旋杯式測序儀；或(2)至均質，利用SDS-PAGE在非還原或還原條件下使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳銀染色。因為TAT多肽自然環境中之至少一個組分將不存在，所以分離之多肽包括重組細胞內之原位多肽。然而，通常分離之多肽將由至少一個純化步驟來製備。

「分離之」編碼TAT多肽之核酸或編碼其他多肽之核酸為經鑑別且自至少一種污染核酸分子中分離之核酸分子，該核酸分子在編碼多肽之核酸的自然來源中通常與該污染核酸分子相關。分離之編碼多肽之核酸分子不為自然界中其發現所呈之形式或不處於自然界中其發現所在之環境中。因此，分離之編碼多肽之核酸分子不同於天然細胞中呈現之編碼多肽之特定核酸分子。然而，分離之編碼多肽之核酸分子包括通常表現該多肽之細胞中所含的編碼多肽的核酸分子，其中例如核酸分子所處之染色體位置不同於天然細胞中。

術語「控制序列」係指在特定宿主生物體中表現可操作地連接之編碼序列所需之DNA序列。適於原核生物之控制序列例如包括啟動子、視情況選用之操縱子序列(operator sequence)及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、

聚腺苷酸化信號及增強子。

當核酸與另一核酸序列呈功能關係置放時，核酸與另一核酸序列「可操作地連接」。舉例而言，若前序列或分泌性前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前體蛋白，則其與該多肽之DNA可操作地連接；若啟動子或增強子影響編碼序列之轉錄，則其與該序列可操作地連接；或若核糖體結合位點經定位以便有助於轉譯，則其與編碼序列可操作地連接。一般而言，「可操作地連接」意謂所連接之DNA序列相鄰且在分泌性前導序列之情況下，相鄰且在閱讀相(reading phase)中。然而，增強子不必為相鄰的。連接係藉由在適宜限制位點處連接來實現。若該等位點不存在，則根據慣例使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

雜交反應之「嚴格度」可由熟習此項技術者容易地確定，且通常視探針長度、洗滌溫度及鹽濃度憑經驗加以考慮。一般而言，較長探針需要較高溫度以達成合適黏接，而較短探針需要較低溫度。雜交一般視已變性DNA在互補股存在於低於其熔融溫度之環境中時能夠再黏接而定。探針與可雜交序列之間的同源性程度越高，可使用之相對溫度越高。因此，由此可見較高相對溫度將傾向於使得反應條件更為嚴格，而較低溫度將傾向於使得反應條件並不如此嚴格。關於雜交反應嚴格度之額外詳情及解釋，參見 Ausubel 等人，Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

如本文所定義之「嚴格條件」或「高嚴格度條件」可由

以下條件鑑別：(1)採用低離子強度及高溫進行洗滌，例如 0.015 M 氯化鈉 / 0.0015 M 檸檬酸鈉 / 0.1% 十二烷基硫酸鈉，50°C；(2)雜交期間採用變性劑，諸如甲醯胺(例如 50% (v/v) 甲醯胺)以及 0.1% 牛血清白蛋白 / 0.1% 聚蔗糖 (Ficoll) / 0.1% 聚乙炔吡咯啉酮 / 50 mM 磷酸鈉緩衝液 (pH 6.5) 以及 750 mM 氯化鈉、75 mM 檸檬酸鈉，42°C；或(3)在採用 50% 甲醯胺、5×SSC (0.75 M NaCl、0.075 M 檸檬酸鈉)、50 mM 磷酸鈉 (pH 6.8)、0.1% 焦磷酸鈉、5×登哈特氏溶液 (Denhardt's solution)、經音波處理鮭魚精子 DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS 及 10% 硫酸聚葡萄糖之溶液中雜交隔夜，42°C，且在 42°C 下用 0.2×SSC (氯化鈉 / 檸檬酸鈉) 洗滌 10 分鐘，繼而在 55°C 下用由含 EDTA 之 0.1×SSC 組成的高嚴格度洗滌液洗滌 10 分鐘。

「中嚴格條件」可如 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 所述鑑別，且包括使用嚴格度小於上述者之洗滌溶液及雜交條件(例如溫度、離子強度及 % SDS)。中嚴格條件之實例為在 37°C 下於包含 20% 甲醯胺、5×SSC (150 mM NaCl、15 mM 檸檬酸鈉)、50 mM 磷酸鈉 (pH 7.6)、5×登哈特氏溶液、10% 硫酸葡聚糖及 20 mg/ml 已變性剪切之鮭魚精 DNA 之溶液中培育隔夜，接著在約 37-50°C 下於 1×SSC 中洗滌過濾器。熟習此項技術者將認識到如何根據需要來調整溫度、離子強度等以適應諸如探針長度及其類似者之因素。

術語「標記之抗原決定基」當在本文中使用时係指包含融合至「標籤多肽」的TAT多肽或抗TAT抗體的嵌合多肽。標籤多肽具有足夠殘基來提供可針對製備抗體之抗原決定基，然而又足夠短以致其不干擾其所融合之多肽的活性。標籤多肽較佳亦極獨特，以致抗體實質上不與其他抗原決定基交叉反應。適合之標籤多肽一般具有至少6個胺基酸殘基，且通常約8個至50個胺基酸殘基(較佳約10個至20個胺基酸殘基)。

「活性的」或「活性」出於本文之目的係指TAT多肽之形式保留天然或天然存在之TAT的生物及/或免疫活性，其中「生物」活性係指由天然或天然存在之TAT引起的生物功能(抑制或刺激)，而非針對天然或天然存在之TAT所具有之抗原性抗原決定基誘發抗體產生之能力，且「免疫」活性係指針對天然或天然存在之TAT所具有之抗原性抗原決定基誘發抗體產生之能力。

術語「拮抗劑」以最廣泛意義使用，且包括部分或完全阻斷、抑制或中和本文所揭示天然TAT多肽之生物活性的任何分子。以類似方式，術語「促效劑」以最廣泛意義使用，且包括模擬本文所揭示天然TAT多肽之生物活性的任何分子。適合之促效劑或拮抗劑分子特別包括促效劑或拮抗劑抗體或抗體片段、天然TAT多肽之片段或胺基酸序列變異體、肽、反義寡核苷酸、小有機分子等。鑑別TAT多肽之促效劑或拮抗劑的方法可包含使TAT多肽與候選促效劑或拮抗劑分子接觸，及量測通常與TAT多肽相關之一或

多個生物活性的可偵測變化。

「治療」或「緩和」係指治療性治療與防治性或預防性措施，其中目的在於預防或延緩(減輕)所靶向的病理學病狀或病症。需要治療者包括已患有病症之個體以及傾向於患上病症之個體或欲預防病症之個體。若在根據本發明方法接受治療量之抗TAT抗體、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子之後，個體或哺乳動物展示以下中之一或多者可觀察及/或可量測之減少或不存在以下中之一或多者，則成功地「治療」該患者之表現TAT多肽的癌症：癌細胞數減少或癌細胞不存在；腫瘤大小減小；抑制(亦即在某種程度上延緩，且較佳終止)癌細胞浸潤於周邊器官中，包括癌症擴散於軟組織及骨中；抑制(亦即在某種程度上延緩，且較佳終止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上緩解一或多個與特定癌症相關之症狀；降低發病率及死亡率，及提高生活品質問題。達到抗TAT抗體或TAT結合寡肽可阻止所存在之癌細胞生長及/或殺滅所存在之癌細胞的程度，該抗TAT抗體或TAT結合寡肽可具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。患者亦可感覺到此等病徵或症狀之減少。

評估成功治療及改良疾病之上述參數可由醫師熟知之常規程序容易地量測。對於癌症療法而言，可例如藉由評估疾病進展時間(TTP)及/或測定反應率(RR)來量測功效。轉移可藉由分期測試及藉由骨掃描及測試鈣含量及其他酶來測定以確定至骨中之擴散。亦可進行CT掃描以查找至該區

域中骨盆及淋巴結中之擴散。分別使用胸部X射線及藉由已知方法量測肝酶含量來查找至肺及肝中之轉移。其他監測疾病之常規方法包括經直腸超音波掃描術(TRUS)及經直腸針刺活檢(TRNB)。

「長期」投藥係指與短暫模式相反，以連續模式投與藥劑，以便長時間維持初始治療作用(活性)。「間歇式」投藥為不是連續不中斷地進行而是本質上循環進行之治療。

「哺乳動物」出於對癌症進行治療、緩和症狀或診斷之目的係指任何歸屬於哺乳動物之動物，包括人類、家畜及農畜及動物園動物、運動型動物或寵物動物，諸如狗、貓、牛、馬、綿羊、豬、山羊、兔等。哺乳動物較佳為人類。

「組合」一或多種其他治療劑之投藥包括同時(並行)投藥及依任何次序之連續投藥。

本文所使用之「載劑」包括在所採用之劑量及濃度下，對暴露其中之細胞或哺乳動物無毒之醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑。通常，生理學上可接受之載劑為pH緩衝水溶液。生理學上可接受之載劑之實例包括緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘氨酸、麩氨胺酸、天冬氨酸、精氨酸或離氨酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，

諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN®、聚乙二醇(PEG)及PLURONICS®。

「固相」或「固體支撐物」意謂本發明抗體、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子可黏附或附著之非水性基質。本文所涵蓋之固相之實例包括部分或完全由玻璃(例如受控微孔玻璃)、多醣(例如瓊脂糖)、聚丙烯醯胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇及聚矽氧形成之固相。在某些實施例中，視情況而定，固相可包含分析板之孔；在其他實施例中，其為純化管柱(例如親和層析管柱)。此術語亦包括離散粒子之不連續固相，諸如美國專利第4,275,149號中所述之固相。

「脂質體」為由適用於將藥物(諸如TAT多肽、其抗體或TAT結合寡肽)傳遞至哺乳動物之各種類型之脂質、磷脂及/或界面活性劑構成的小微脂粒。脂質體之組分通常排列為雙層形式，類似於生物膜之脂質排列。

「小」分子或「小」有機分子在本文中定義為分子量小於約500道爾頓。

本文所揭示多肽、抗體、TAT結合寡肽、TAT結合有機分子或其促效劑或拮抗劑之「有效量」為足以達到特別說明之目的的量。「有效量」可關於所說明之目的，憑經驗且以常規方式確定。

術語「治療有效量」係指抗體、多肽、TAT結合寡肽、TAT結合有機分子或其他藥物之量有效「治療」個體或哺乳動物之疾病或病症。術語「治療有效量」係指抗體、多

肽、TAT結合寡肽、TAT結合有機分子或其他藥物有效「治療」個體或哺乳動物之疾病或病症之量。在癌症之狀況下，治療有效量之藥物可減少癌細胞之數目；減小腫瘤大小；抑制(亦即在一定程度上延緩，且較佳終止)癌細胞浸潤於周邊器官中；抑制(亦即在一定程度上延緩，且較佳終止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上緩解一或多個與癌症相關之症狀。參見本文中「治療」之定義。達到藥物可阻止所存在之癌細胞生長及/或殺滅所存在之癌細胞的程度，藥物可具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。

抗TAT抗體、TAT多肽、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子之「生長抑制量」為能夠活體外或活體內抑制細胞、尤其腫瘤、例如癌細胞之生長的量。抗TAT抗體、TAT多肽、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子之「生長抑制量」出於抑制贅生性細胞生長之目的可憑經驗及以常規方式確定。

抗TAT抗體、TAT多肽、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子之「細胞毒性量」為能夠活體外或活體內破壞細胞、尤其腫瘤、例如癌細胞之量。抗TAT抗體、TAT多肽、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子之「細胞毒性量」出於抑制贅生性細胞生長之目的可憑經驗及以常規方式確定。

術語「抗體」以最廣泛意義使用且特別涵蓋例如單一抗TAT單株抗體(包括促效劑、拮抗劑及中和抗體)、具有多抗原決定基特異性之抗TAT抗體組合物、多株抗體、單鏈

抗TAT抗體及抗TAT抗體片段(參見下文)，只要其展現所需生物或免疫活性即可。術語「免疫球蛋白」(Ig)可與本文之抗體互換使用。

「分離之抗體」為已經鑑別且自其自然環境之組分中分離及/或回收的抗體。其自然環境之污染組分為將干擾抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。在較佳實施例中，抗體將純化(1)至如Lowry方法所測定，大於95重量%之抗體，且最佳大於99重量%；(2)至足以獲得N末端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度，利用旋杯式測序儀；或(3)至均質，利用SDS-PAGE在非還原或還原條件下使用考馬斯藍或較佳銀染色。由於抗體之自然環境之至少一個組分將不存在，所以分離之抗體包括重組細胞內之原位抗體。然而，分離之抗體通常將由至少一個純化步驟來製備。

基本4鏈抗體單元為異源聚醣蛋白，其由兩條相同之輕(L)鏈及兩條相同之重(H)鏈構成(IgM抗體由基本異源四聚體單元以及另一稱作J鏈之多肽的5鏈組成，且因此含有10個抗原結合位點，而分泌之IgA抗體可聚合形成多價群集，其包含2-5個基本4鏈單元以及J鏈)。在IgG之情況下，4鏈單元一般為約150,000道爾頓。各L鏈經由一個共價二硫鍵連接於H鏈，而兩條H鏈視H鏈同型而定經由一或多個二硫鍵彼此連接。各H及L鏈亦具有規則間隔之鏈內二硫橋。各H鏈在N端具有可變域(VH)，其後為各 α 及 γ 鏈之三個恆定域(CH)及 μ 及 ϵ 同種型之四個CH域。各L鏈在N端具

有可變域(VL)，其後為位於其另一端之恆定域(CL)。VL與VH對準且CL與重鏈之第一恆定域(CH1)對準。咸信，特定胺基酸殘基在輕鏈與重鏈可變域之間形成界面。VH與VL配對一起形成單一抗原結合位點。關於不同類別抗體之結構及特性，參見例如 Basic and Clinical Immunology, 第8版，Daniel P. Stites, Abba I. Terr及 Tristram G. Parslow (編)，Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994，第71頁及第6章。

任何脊椎動物物種之L鏈可基於其恆定域之胺基酸序列指定為稱為 κ 及 λ 之兩個明顯不同類型之一。視重鏈之恆定域(CH)之胺基酸序列而定，免疫球蛋白可歸於不同類別或同型。存在5種類別之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，分別具有稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 之重鏈。基於CH序列及功能之相對較小的差異，將 γ 及 α 類別進一步分成亞類，例如人類表現以下亞類：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。

術語「可變」係指抗體之可變域之某些區段的序列廣泛不同。V域介導抗原結合且限定特定抗體對其特定抗原之特異性。然而，可變性並非均勻分佈在可變域之110個胺基酸範圍內。實情為，V區由相對不變之15-30個胺基酸的延伸片段(稱作構架區「FR」)組成，該等延伸片段經長度各為9-12個胺基酸之可變性極大的較短區(稱作「高變區」)隔開。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含四個主要採用 β -片構型且藉由三個高變區連接之FR，該三個高變區形

成連接 β -片結構且在一些情況下形成 β -片結構之一部分的環。各鏈中之高變區由FR緊密結合在一起，且與另一鏈之高變區一起促使形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。雖然恆定域不直接涉及抗體與抗原之結合，但其展現各種效應功能，諸如抗體參與抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

如本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上均質之抗體群體獲得之抗體，亦即構成此群體之個別抗體除可少量存在之可能天然存在之突變外為相同的。單株抗體針對單一抗原位點具高度特異性。此外，與包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑對比，各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。除其特異性外，單株抗體之優勢在於其可在未受其他抗體污染之情況下合成得之。修飾語「單株」不應解釋為需要藉由任何特定方法製造抗體。舉例而言，適用於本發明之單株抗體可由最先由Kohler等人，Nature, 256:495 (1975)描述之融合瘤方法來製備，或可使用重組DNA方法在細菌、真核動物或植物細胞中製備(參見例如美國專利第4,816,567號)。「單株抗體」亦可使用例如Clackson等人，Nature, 352:624-628(1991)及Marks等人，J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)中描述之技術自噬菌體抗體庫中分離。

本文之單株抗體包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕

鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體中之相應序列相同或同源，而鏈其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體中之相應序列以及只要顯示所需生物活性之該等抗體之片段相同或同源(參見美國專利第4,816,567號及Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。本文相關之嵌合抗體包括包含源自非人類靈長類動物(例如舊大陸猴(Old World Monkey)、猿(Ape)等)之可變域抗原結合序列及人類恆定區序列的「靈長類化」抗體。

「完整」抗體為包含抗原結合位點以及CL及至少重鏈恆定域CH1、CH2及CH3之抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。完整抗體較佳具有一或多種效應功能。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳為完整抗體之抗原結合或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；微型雙功能抗體；線性抗體(參見美國專利第5,641,870號，實例2；Zapata等人，Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995])；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

木瓜蛋白酶消化抗體產生稱為「Fab」片段及殘餘「Fc」片段之兩個相同之抗原結合片段，命名反映易於結晶之能力。Fab片段由完整L鏈以及H鏈可變區域(VH)及一條重鏈之第一恆定域(CH1)組成。各Fab片段對於抗原結合而言為單價的，亦即其具有單一抗原結合位點。用胃蛋白

酶處理抗體產生單一大F(ab')₂片段，其大致對應於具有二價抗原結合活性之兩個二硫鍵鍵聯之Fab片段且仍能夠交叉連接抗原。Fab'片段與Fab片段之不同之處在於CH1域之羧基末端具有少數其他殘基，包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸。Fab'-SH在本文中指代恆定域之半胱胺酸殘基帶有游離硫醇基之Fab'。最初F(ab')₂抗體片段經製造為其間具有鉸鏈區半胱胺酸之Fab'片段對。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

Fc片段包含由二硫鍵固持在一起之兩個H鏈之羧基端部分。抗體之效應功能由Fc區中之序列決定，該區亦為由在某些細胞類型上發現之Fc受體(FcR)識別之部分。

「Fv」為含有完整抗原識別位點與抗原結合位點的最小抗體片段。此片段由一個重鏈可變區域與一個輕鏈可變區域緊密非共價締合之二聚體組成。此兩個域摺疊產生六個高變環(H鏈及L鏈各3個環)，其提供用於抗原結合之胺基酸殘基，且賦予抗體抗原結合特異性。然而，即使單個可變域(或包含僅三個對抗原具有特異性之CDR之一半Fv)亦具有識別及結合抗原之能力，但親和力比整個結合位點低。

「單鏈Fv」，亦縮寫為「sFv」或「scFv」，為包含連接於單一多肽鏈中之VH及VL抗體域的抗體片段。sFv多肽較佳在VH與VL域之間進一步包含使sFv能夠形成抗原結合所需結構之多肽連接子。關於scFv之綜述，參見Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷，

Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York, 第269-315頁(1994)；Borrebaeck 1995，見下文。

術語「微型雙功能抗體」係指藉由在VH與VL域之間用短連接子(約5-10個殘基)構築sFv片段(參見先前段落)以致實現V域之鏈間配對而非鏈內配對，藉此產生二價片段(亦即具有兩個抗原結合位點之片段)所製備之小抗體片段。雙特異性微型雙功能抗體為兩個「交叉」sFv片段之異源二聚體，其中兩個抗體之VH域及VL域存在於不同多肽鏈上。微型雙功能抗體更詳細地描述於例如EP 404,097、WO 93/11161及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)中。

非人類(例如齧齒動物)抗體之「人類化」形式為含有源自非人類抗體之最小序列的嵌合抗體。在最大程度上，人類化抗體為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中受者之高變區經具有所需抗體特異性、親和力及能力之來自諸如小鼠、大鼠、家兔之非人類物種(供者抗體)或非人類靈長類動物之高變區的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應之非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含受體抗體或供者抗體中未見之殘基。進行此等修飾以進一步改善抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含實質上所有至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或實質上所有FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一

部分，通常人類免疫球蛋白之恆定區之至少一部分。欲知詳情，參見 Jones 等人，Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，Nature 332:323-329 (1988)；及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。

「物種依賴性抗體」(例如哺乳動物抗人類IgE抗體)為對來自第一哺乳動物物種之抗原的結合親和力大於對來自第二哺乳動物物種之該抗原之同源物的結合親和力的抗體。通常，物種依賴性抗體「特異性結合」人類抗原(亦即結合親和力(Kd)值不超過約 1×10^{-7} M，較佳不超過約 1×10^{-8} ，且最佳不超過約 1×10^{-9} M)，但對來自第二非人類哺乳動物物種之該抗原之同源物的結合親和力為其對人類抗原之結合親和力的至少約1/50或至少約1/500或至少約1/1000。雖然物種依賴性抗體可為如上所定義之各種抗體中之任一者，但較佳為人類化或人類抗體。

術語「如Kabat中之可變域殘基編號」或「如Kabat中之胺基酸位置編號」及其變化形式係指Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中用於編譯抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有對應於可變域之FR或CDR之縮短或插入的較少或額外胺基酸。舉例而言，重鏈可變域可包括在H2之殘基52之後之單一胺基酸插入(根據Kabat之殘基52a)及在重鏈FR殘基82之後之插入殘基(例如根據Kabat之殘基82a、82b及

82c等)。可藉由將抗體序列與「標準」Kabat編號序列之同源區相比對來確定既定抗體中殘基之Kabat編號。

如本文所使用之片語「實質上類似」或「實質上相同」表示兩個數值(一般一個與本發明抗體相關且另一個與參考/比較抗體相關)之間具有足夠高之相似度，以致熟習此項技術者認為在由該等值(例如Kd值)量測之生物特徵情況下，該兩個值之間的差異具有極小或不具有生物學及/或統計學顯著性。該兩個值之間的差異隨參考/比較抗體之值而變化較佳小於約50%，較佳小於約40%，較佳小於約30%，較佳小於約20%，較佳小於約10%。

「結合親和力」一般係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用的總強度。除非另作說明，否則本文所使用之「結合親和力」係指反映結合對成員(例如抗體與抗原)之間1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所述之方法)量測親和力。低親和力抗體一般與抗原緩慢結合且傾向於容易解離，而高親和力抗體一般與抗原結合較快且傾向於保持較長時間結合。此項技術中已知多種量測結合親和力之方法，該等方法中之任一者均可用於達成本發明之目的。以下描述特定例示性實施例。

在一個實施例中，本發明之「Kd」或「Kd值」係藉由經放射性標記之抗原結合檢測(RIA)來量測，該檢測用相關抗體之Fab形式及其抗原如以下檢測所述執行：藉由在

一系列滴定用未標記抗原存在下以最低濃度之(^{125}I)標記之抗原平衡Fab，隨後以塗有抗Fab抗體之板捕捉結合之抗原來量測Fab對抗原之溶液結合親和力(Chen等人，(1999) *J. Mol Biol* 293:865-881)。為建立檢測條件，以於50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 $\mu\text{g/ml}$ 之捕捉抗Fab抗體(Cappel Labs)塗佈微量滴定板(Dynex)隔夜，隨後在室溫下(約23°C)以含2%(w/v)牛血清白蛋白之PBS阻斷2至5小時。在非吸附性板(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [^{125}I]抗原與相關Fab之連續稀釋液(例如與抗VEGF抗體Fab-12之評估一致，Presta等人，(1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599)混合。隨後培育相關Fab隔夜；然而，培育可持續一段較長之時間(例如65小時)以確保達到平衡。此後，在室溫下將混合物轉移至捕捉板中以用於培育(例如1小時)。隨後移除溶液並用含0.1% Tween-20之PBS洗滌板8次。當板乾燥時，添加150微升/孔閃爍體(MicroScint-20；Packard)，且在Topcount伽瑪計數儀(Packard)上將板計數10分鐘。選擇提供小於或等於20%最大結合之各Fab的濃度用於競爭性結合檢測。根據另一實施例，使用BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，使用表面電漿子共振檢測，在25°C下，以約10個反應單元(RU)之固定抗原CM5晶片量測Kd或Kd值。簡而言之，根據供應商之說明書用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore Inc.)。將抗原以10 mM乙酸鈉(pH 4.8)

稀釋成 5 $\mu\text{g/ml}$ (約 0.2 μM)，再以 5 微升/分鐘流速注射，以獲得約 10 個反應單元(RU)之偶合蛋白質。注射抗原後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應之基團。為進行動力學量測，在 25°C 下將 Fab 之兩倍連續稀釋液(0.78 nM 至 500 nM)以約 25 $\mu\text{l/min}$ 之流速注射於含 0.05% Tween 20 之 PBS(PBST) 中。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(one-to-one Langmuir binding model, BIAcore Evaluation 軟體 3.2 版本)藉由同時擬合締合及解離感應圖計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。以 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 比率來計算平衡解離常數(K_d)。參見例如 Chen, Y. 等人，(1999) J. Mol Biol 293:865-881。若由上述表面電漿子共振檢測獲得之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則可藉由使用螢光淬滅技術測定締合速率，在如光譜儀(諸如具有攪拌式紅色比色管之止流裝備型光譜儀(Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度計(ThermoSpectronic))所量測，該技術量測在 25°C 下，在遞增濃度之抗原存在下，PBS(pH 7.2)中之 20 nM 抗抗原抗體(Fab 形式)之螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm 帶通)的增加或減少。

根據本發明，「締合速率」或「 k_{on} 」亦可在 25°C 下使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)以約 10 反應單元(RU)之固定抗原 CM5 晶片根據上述相同的表面電漿子共振技術來測定。簡而言之，根據供應商之說明書用 N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及 N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚

糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore Inc.)。將抗原以10 mM 乙酸钠(pH 4.8)稀釋成5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)，再以5微升/分鐘流速注射，以獲得約10個反應單元(RU)之偶合蛋白質。之後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。為進行動力學量測，在25°C下將Fab之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)以約25 $\mu\text{l/min}$ 之流速注射於含0.05% Tween 20之PBS(PBST)中。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(BIAcore Evaluation軟體3.2版本)藉由同時擬合締合及解離感應圖計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。以 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 之比率來計算平衡解離常數(K_d)。參見例如Chen, Y.等人，(1999) J. Mol Biol 293:865-881。然而，若由上述表面電漿子共振檢測獲得之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則可較佳藉由使用螢光淬滅技術測定締合速率，如光譜儀(諸如具有攪拌式紅色比色管之止流裝備型光譜儀(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic))所量測，該技術量測在25°C下，在遞增濃度之抗原存在下，PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)的增加或減少。在一個實施例中，藉由經放射性標記之抗原結合檢測(RIA)量測本發明之「 K_d 」或「 K_d 值」，該檢測用抗體之Fab形式與抗原分子如以下檢測所述執行：藉由在一系列滴定用未標記抗原存在下以最低濃度之(^{125}I)標記之抗原平衡Fab，隨後以塗有抗Fab抗體之板捕捉結合之抗原來量測Fab對抗原之溶液結合親和力(Chen

等人，(1999) J. Mol Biol 293:865-881)。為建立檢測條件，以 50 mM 碳酸鈉 (pH 9.6) 中之 5 $\mu\text{g/ml}$ 之捕捉抗 Fab 抗體 (Cappel Labs) 塗佈微量滴定板 (Dynex) 隔夜，隨後在室溫下 (約 23°C) 以含 2% (w/v) 牛血清白蛋白之 PBS 阻斷 2 至 5 小時。在非吸附性板 (Nunc #269620) 中，將 100 pM 或 26 pM [125I] 抗原與相關 Fab 之連續稀釋液混合 (與抗 VEGF 抗體 Fab-12 之評估一致，Presta 等人，(1997) Cancer Res. 57:4593-4599)。接著培育相關 Fab 隔夜；然而，培育可持續一段較長之時間 (例如 65 小時) 以確保達到平衡。此後，將混合物轉移至捕捉板中，在室溫下培育 1 小時。接著移除溶液並用含 0.1% Tween-20 之 PBS 洗滌板 8 次。當板乾燥時，添加 150 微升/孔閃爍體 (MicroScint-20; Packard)，且在 Topcount 伽瑪計數儀 (Packard) 將板計數 10 分鐘。選擇提供小於或等於 20% 最大結合之各 Fab 濃度用於競爭性結合檢測。根據另一實施例，在 25°C，使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，使用表面電漿子共振檢測，以約 10 反應單元 (RU) 之固定抗原 CM5 晶片量測 K_d 或 K_d 值。簡而言之，根據供應商之說明書用 N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基) 碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) 及 N-羥基丁二醯亞胺 (NHS) 活化羧甲基化葡聚糖生物感測器晶片 (CM5, BIAcore Inc.)。將抗原以 10 mM 乙酸鈉 (pH 4.8) 稀釋成 5 $\mu\text{g/ml}$ (約 0.2 μM)，再以 5 微升/分鐘流速注射，以獲得約 10 個反應單元 (RU) 之偶合蛋白質。注射抗原後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應之基團。為進行動力學量測，

在25℃下，將Fab之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)以約25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速注射於含0.05% Tween 20(PBST)之PBS中。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(BIAcore Evaluation軟體3.2版本)藉由同時擬合締合及解離感應圖計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。以 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 比率來計算平衡解離常數(K_d)。參見例如Chen, Y.等人，(1999) J. Mol Biol 293:865-881。若藉由上述表面電漿子共振檢測獲得之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則可藉由使用螢光淬滅技術測定締合速率，如光譜儀(諸如具有攪拌式紅色比色管之止流裝備型光譜儀(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic))所量測，該技術量測在25℃下，在遞增濃度之抗原存在下，PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)的增加或減少。

在一個實施例中，「締合速率」或「 k_{on} 」亦可在25℃下使用BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)以約10個反應單元(RU)之固定抗原CM5晶片，利用上述相同的表面電漿子共振技術測定。簡而言之，根據供應商之說明書用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore Inc.)。將抗原以10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋成5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (約0.2 μM)，再以5微升/分鐘流速注射，以獲得約10個反應單元(RU)之偶合蛋白質。之後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基

團。為進行動力學量測，在25°C下將Fab之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)以約25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流速注射於含0.05% Tween 20之PBS(PBST)中。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(BIAcore Evaluation軟體3.2版本)藉由同時擬合締合及解離感應圖計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。以 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 比率來計算平衡解離常數(K_d)。參見例如Chen, Y. 等人，(1999) J. Mol Biol 293:865-881。然而，若藉由上述表面電漿子共振檢測獲得之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則較佳藉由使用螢光淬滅技術測定締合速率，如光譜儀(諸如具有攪拌式紅色比色管之止流裝備型光譜儀(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic))所量測，該技術量測在25°C下，在遞增濃度之抗原存在下，PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)的增加或減少。

如本文所用之片語「實質上減少」或「實質上不同」表示兩個數值之間具有足夠高之差異程度(一般一個與本發明之抗體相關且另一個與參考/比較抗體相關)，以致熟習此項技術者認為在由該等值(例如 K_d 值，HAMA反應)所量測之生物特徵之情況下，兩個值之間的差異具有統計顯著性。該兩個值之間的差異隨參考/比較抗體之值變化較佳大於約10%，較佳大於約20%，較佳大於約30%，較佳大於約40%，較佳大於約50%。

「抗原」為抗體可選擇性結合之預定抗原。標靶抗原可

為多肽、醣、核酸、脂質、半抗原或其他天然存在或合成之化合物。標靶抗原較佳為多肽。「接受體人類構架」出於本文之目的為包含源自人類免疫球蛋白構架或源自人類共同構架之VL或VH構架之胺基酸序列的構架。「源自」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含其相同胺基酸序列或可含有預先存在之胺基酸序列變化。在存在預先存在之胺基酸變化的情況下，較佳存在不超過5處，且較佳4處或4處以下或3處或3處以下預先存在之胺基酸變化。若原有胺基酸變化存在於VH中，則彼等變化僅在位置71H、73H及78H之三處、兩處或一處較佳；例如彼等位置處之胺基酸殘基可為71A、73T及/或78A。在一個實施例中，VL受體人類構架之序列與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列一致。

本發明之抗體可能能夠競爭以結合與第二抗體所結合之抗原決定基相同的抗原決定基。若各單株抗體在標準活體外抗體競爭結合分析中在相同抗體濃度下阻斷彼此之結合達40%或更高，則其被認為共有「相同抗原決定基」。

「人類共同構架」為表示在一系列所選人類免疫球蛋白VL或VH構架序列中最常存在之胺基酸殘基的構架。一般而言，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之亞群。一般而言，該序列亞群為如Kabat等人中之亞群。在一個實施例中，對於VL而言，亞群為如Kabat等人中之亞群κI。在一個實施例中，對於VH而言，亞群為如Kabat等人中之亞群III。

「VH亞群III共同構架」包含獲自Kabat等人之可變重鏈亞群III之胺基酸序列的共同序列。

「VL亞群I共同構架」包含獲自Kabat等人之可變輕鏈 κ 亞群I之胺基酸序列的共同序列。

「未修飾人類構架」為具有與接受體人類構架相同之胺基酸序列的人類構架，例如接受體人類構架中無人類胺基酸取代為非人類胺基酸。

「改變之高變區」出於本文目的為包含一或多個(例如1至約16個)胺基酸取代之高變區。

「未修飾之高變區」出於本文之目的為與獲得其之非人類抗體具有相同胺基酸序列的高變區，亦即其中無一或多個胺基酸取代的高變區。

術語「高變區」、「HVR」、「HV」或「CDR」當在本文中使用時係指抗體可變域中序列高變及/或形成結構限定環之區。一般而言，抗體包含六個高變區；三個在VH中(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)，且三個在VL中(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。本文中使用的且包含許多有關高變區之描繪。Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且使用最常見(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia另外指出結構環之位置(Chothia及Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。

「接觸」高變區係基於對可用複雜晶體結構之分析。以下指示來自此等高變區中之每一者的殘基。除非另外說明，

否則將採用 Kabat 編號。高變區位置一般如下：胺基酸 24-34(CDR-L1)、胺基酸 49-56(CDR-L2)、胺基酸 89-97(CDR-L3)、胺基酸 26-35A(CDR-H1)、胺基酸 49-65(CDR-H2)及胺基酸 93-102(CDR-H3)。

高變區亦可於 VL 中包含如下「延長高變區」：胺基酸 24-36(L1)及胺基酸 46-56(L2)。可變域殘基係根據 Kabat 等人(同上)針對此等定義各者進行編號。

「構架」或「FR」殘基為除如本文中所定義之高變區殘基以外的彼等可變域殘基。

「人類抗體」為具有對應於由人類產生之抗體的胺基酸序列之胺基酸序列及/或已使用如本文所揭示的用於製備人類抗體之任一技術製備之抗體。人類抗體之此定義尤其排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「親和力成熟」抗體為在一或多個 CDR 中具有一或多個變化之抗體，與不具有彼等變化之親本抗體相比，彼等變化使得抗體對抗原之親和力增加。較佳親和力成熟抗體將對標靶抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳之親和力。親和力成熟抗體可由此項技術中已知之程序製備。Marks 等人，Bio/Technology 10:779-783 (1992)描述藉由 VH 及 VL 域改組實現之親和力成熟。以下文獻描述 CDR 及/或構架殘基之隨機突變誘發：Barbas 等人，Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994)；Schier 等人，Gene 169:147-155 (1995)；Yelton 等人，J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Jackson 等人，J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)；及

Hawkins等人，J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

「阻斷」抗體或「拮抗劑」抗體為抑制或降低所結合之抗原的生物活性的抗體。較佳阻斷抗體或拮抗劑抗體實質或完全抑制抗原之生物活性。

「TAT結合寡肽」為結合、較佳特異性結合本文所述之TAT多肽之寡肽。TAT結合寡肽可使用已知寡肽合成方法化學合成或可使用重組技術製備及純化。TAT結合寡肽之長度通常為至少約5個胺基酸，或者長度為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100個胺基酸或更多，其中該等寡肽能夠結合、較佳特異性結合本文所述之TAT多肽。TAT結合寡肽可使用熟知技術而無需過度實驗來鑑別。就此而論，應注意，此項技術中熟知篩選寡肽庫獲得能夠特異性結合多肽標靶之寡肽之技術(參見例如 美國專利第5,556,762號、第5,750,373號、第4,708,871號、第4,833,092號、第5,223,409號、第5,403,484號、第5,571,689號、第5,663,143號；PCT公開案第WO 84/03506號及第WO 84/03564號；Geysen等人，Proc. Natl. Acad.

Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984) ; Geysen 等人 , Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985) ; Geysen 等人 , Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986) ; Geysen 等人 , J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987) ; Schoofs 等人 , J. Immunol., 140:611-616 (1988) ; Cwirla, S. E. 等人 , (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 ; Lowman, H.B. 等人 , (1991) Biochemistry, 30:10832 ; Clackson, T. 等人 , (1991) Nature, 352: 624 ; Marks, J. D. 等人 , (1991), J. Mol. Biol., 222:581 ; Kang, A.S. 等人 , (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 ; 及 Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668) 。

「TAT結合有機分子」為除本文所定義結合、較佳特異性結合本文所述TAT多肽之寡肽或抗體以外的有機分子。TAT結合有機分子可使用已知方法學鑑別及化學合成(參見例如PCT公開案第WO 00/00823號及第WO 00/39585號)。TAT結合有機分子之大小通常小於約2000道爾頓，或者小於約1500、750、500、250或200道爾頓，其中該等能夠結合、較佳特異性結合本文所述之TAT多肽之有機分子可使用熟知技術不經過度實驗鑑別。就此而言，應注意此項技術中熟知用於篩選能夠結合多肽標靶之分子之有機分子庫的技術(參見例如PCT公開案第WO 00/00823號及第WO 00/39585號)。

「結合」相關抗原(例如腫瘤相關之多肽抗原標靶)之抗體、寡肽或其他有機分子為以足夠親和力結合該抗原者，

以致該抗體、寡肽或其他有機分子適於用作靶向表現該抗原之細胞或組織之診斷劑及/或治療劑且不與其他蛋白質顯著交叉反應。在該等實施例中，如螢光活化細胞分選(FACS)分析或放射免疫沈澱(RIA)所測定，該抗體、寡肽或其他有機分子與「非標靶」蛋白質之結合程度小於該抗體、寡肽或其他有機分子與特定標靶蛋白質之結合約10%。就抗體、寡肽或其他有機分子與標靶分子之結合而言，術語「特異性結合」或「特異性針對」特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基意謂顯著不同於非特異性相互作用的結合。特異性結合可以例如藉由測定一種分子之結合相較於對照分子(一般為不具結合活性的類似結構分子)之結合來量測。舉例而言，特異性結合可藉由與類似於標靶之對照分子(例如過量未標記標靶)競爭來測定。在此情況下，若標記之標靶與探針之結合由過量未標記標靶競爭抑制，則表明特異性結合。本文所用之術語「特異性結合」或「特異性針對」特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基可以例如對該標靶之 K_d 為至少約 10^{-4} M、或者至少約 10^{-5} M、或者至少約 10^{-6} M、或者至少約 10^{-7} M、或者至少約 10^{-8} M、或者至少約 10^{-9} M、或者至少約 10^{-10} M、或者至少約 10^{-11} M、或者至少約 10^{-12} M或更大的分子展現。在一個實施例中，術語「特異性結合」係指一種分子結合特定多肽或特定多肽上之抗原決定基而實質上不結合任何其他多肽或多肽抗原決定基之結合。

「抑制表現TAT多肽之腫瘤細胞生長」之抗體、寡肽或

其他有機分子或「生長抑制」抗體、寡肽或其他有機分子為對表現或過度表現適當TAT多肽之癌細胞產生可量測生長抑制的抗體、寡肽或其他有機分子。TAT多肽可為表現於癌細胞表面上之跨膜多肽或可為癌細胞產生及分泌之多肽。相較於適當對照組，較佳生長抑制性抗TAT抗體、寡肽或有機分子抑制表現TAT之腫瘤細胞的生長大於20%，較佳約20%至約50%，且甚至更佳大於50%(例如約50%至約100%)，該對照組通常為未用測試抗體、寡肽或有機分子處理之腫瘤細胞。在一個實施例中，生長抑制可在細胞培養物中之抗體濃度為約0.1至30 $\mu\text{g/ml}$ 或約0.5 nM至200 nM下量測，其中生長抑制在腫瘤細胞暴露於抗體之後1-10天測定。活體內腫瘤細胞之生長抑制可以多種方式測定，諸如下文實驗實例章節中所述之方式。若投與每公斤體重約1 μg 至每公斤體重約100 mg抗TAT抗體在首次投與抗體約5天至3個月內、較佳約5天至30天內使腫瘤大小或腫瘤細胞增殖減少，則該抗體在活體內具有生長抑制性。

「誘發細胞凋亡」之抗體、寡肽或其他有機分子為如藉由磷脂結合蛋白V之結合、DNA之斷裂、細胞萎縮、內質網之膨脹、細胞破碎及/或膜囊(稱作細胞凋亡體)形成所確定誘發漸進式細胞死亡的抗體、寡肽或其他有機分子。細胞通常為過度表現TAT多肽之細胞。細胞較佳為腫瘤細胞，例如前列腺、乳房、卵巢、胃、子宮內膜、肺、腎、直腸、膀胱細胞。可利用多種方法評估與細胞凋亡相關之細胞事件。舉例而言，可藉由磷脂結合蛋白結合來量測磷

脂醯絲胺酸 (PS) 易位；可經由 DNA 梯度變化 (DNA laddering) 評估 DNA 斷裂；及可藉由亞二倍體細胞之任何增加評估核/染色質凝縮以及 DNA 斷裂。誘發細胞凋亡之抗體、寡肽或其他有機分子較佳為在磷脂結合蛋白結合檢測中導致磷脂結合蛋白結合之誘發性為相對於未處理細胞之約 2 至 50 倍，較佳約 5 至 50 倍且最佳約 10 至 50 倍的抗體、寡肽或其他有機分子。

抗體「效應功能」係指由抗體之 Fc 區 (天然序列 Fc 區或胺基酸序列變異體 Fc 區) 引起之彼等生物活性，且其隨抗體同型而變化。抗體效應功能之實例包括：C1q 結合性及補體依賴性細胞毒性、Fc 受體結合性、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性 (ADCC)、吞噬作用、細胞表面受體 (例如 B 細胞受體) 之下調作用及 B 細胞活化。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指一種細胞毒性形式，其中由分泌之 Ig 結合於某些細胞毒性細胞 (例如自然殺手 (NK) 細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞) 上所存在 Fc 受體 (FcR)，使得該等細胞毒性效應細胞能夠特異性結合具有抗原之標靶細胞，且隨後用細胞毒素殺滅該標靶細胞。抗體「配備」細胞毒性細胞且此殺滅作用絕對必需此「配備」。用於介導 ADCC 之初級細胞 (NK 細胞) 僅表現 Fc γ RIII，而單核細胞表現 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII。造血細胞上之 FcR 表現概括於 Ravetch 及 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991) 之第 464 頁之表 3 中。為評估相關分子的 ADCC 活性，可執行活體外 ADCC 檢測，諸如美國

專利第5,500,362號或第5,821,337號中所述之檢測。用於該等檢測之適用效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，相關分子的ADCC活性可於活體內，例如在動物模型(諸如Clynes等人，(USA) 95:652-656 (1998)中所揭示之彼動物模型)中評估。

「Fc受體」或「FcR」描述結合抗體之Fc區的受體。較佳FcR為天然序列人類FcR。此外，較佳FcR為結合IgG抗體之FcR(γ 受體)且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亞類之受體，包括此等受體之等位基因變異體及交替剪接形式。Fc γ RII受體包括Fc γ RIIA(「活化受體」)及Fc γ RIIB(「抑制受體」)，其具有主要在其細胞質域中不同之相似胺基酸序列。活化受體Fc γ RIIA在其細胞質域中含有免疫受體酪胺酸基活化基元(ITAM)。抑制受體Fc γ RIIB在其細胞質域中含有免疫受體酪胺酸基抑制基元(ITIM)。(參見M.於Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)中之綜述)。FcR綜述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)；Capel等人，*Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，*J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)中。其他FcR，包括欲於將來識別之彼等FcR，皆涵蓋於本文中之術語「FcR」。該術語亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))。

「人類效應細胞」為表現一或多個FcR且執行效應功能

之白血球。該等細胞較佳表現至少FcγRIII並執行ADCC效應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球；其中PBMC及NK細胞較佳。效應細胞可自天然來源(例如血液)中分離。

「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指在補體存在下標靶細胞之溶解。經典補體路徑之活化係藉由補體系統之第一組分(C1q)結合至與其同源抗原結合之(適當亞類之)抗體而起始。為評估補體活化，可執行例如如Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述之CDC檢測。

術語「癌症」及「癌性」係指或描述特徵通常為未經調節細胞生長之哺乳動物生理學病狀。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴惡性病。該等癌之更具體實例包括：鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺之腺癌及肺之鱗狀癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胰腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌、直腸癌、陰莖癌、黑色素瘤、多發性骨髓瘤及B細胞淋巴瘤、腦癌，以及頭頸癌，及相關癌轉移。

術語「細胞增殖病症」及「增殖病症」係指與某種程度

之異常細胞增殖相關之病症。在一個實施例中，細胞增殖病症為癌症。

如本文所使用之「腫瘤」係指所有的贅生性細胞生長及增殖，無論惡性或良性，以及所有的癌變前及癌細胞及組織。

「誘發細胞死亡」之抗體、寡肽或其他有機分子為使得活細胞變得不能存活的抗體、寡肽或其他有機分子。細胞為表現TAT多肽之細胞，較佳與相同組織類型之正常細胞相比，過度表現TAT多肽之細胞。TAT多肽可為表現於癌細胞表面上之跨膜多肽或可為癌細胞產生及分泌之多肽。細胞較佳為癌細胞，例如乳房、卵巢、胃、子宮內膜、唾液腺、肺、腎、結腸、甲狀腺、胰臟或膀胱細胞。活體外細胞死亡可在無補體及免疫效應細胞的情況下測定以區別抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)或補體依賴性細胞毒性(CDC)誘發之細胞死亡。因此，可使用熱滅活血清(亦即在無補體的情況下)及在無免疫效應細胞的情況下執行細胞死亡檢測。為判定抗體、寡肽或其他有機分子是否能夠誘發細胞死亡，可相對於未處理細胞評估膜完整性之損失，膜完整性之損失係藉由碘化丙錠(PI)、錐蟲藍(trypan blue)(參見 Moore 等人，Cytotechnology 17:1-11 (1995))或7AAD之吸收來評估。較佳誘發細胞死亡之抗體、寡肽或其他有機分子為在PI吸收檢測中誘發BT474細胞中PI吸收的抗體、寡肽或其他有機分子。

「表現TAT之細胞」為在細胞表面上或以分泌形式表現

內源或轉染TAT多肽的細胞。「表現TAT之癌症」為包含細胞表面上存在TAT多肽或產生及分泌TAT多肽的細胞的癌症。「表現TAT之癌症」視情況在其細胞表面上產生足量之TAT多肽，以致抗TAT抗體、寡肽或其他有機分子可結合該TAT多肽且對該癌症具有治療作用。在另一實施例中，「表現TAT之癌症」視情況產生且分泌足量之TAT多肽，以使抗TAT抗體拮抗劑可結合於該TAT多肽且對該癌症具有治療作用。就後者而言，拮抗劑可為反義寡核苷酸，其減少、抑制或阻止腫瘤細胞分泌之TAT多肽的產生及分泌。「過度表現」TAT多肽之癌症為相較於相同組織類型之非癌性細胞，細胞表面具有顯著較高含量之TAT多肽或產生及分泌顯著較高含量之TAT多肽的癌症。該過度表現可由基因擴增或藉由經增加之轉錄或轉譯引起。可在診斷或防治檢測中，藉由評估細胞表面上存在之TAT蛋白質或細胞分泌之TAT蛋白質之增加含量(例如經由免疫組織化學檢測，其使用針對可使用重組DNA技術自編碼TAT多肽之分離之核酸製備的分離之TAT多肽製備的抗TAT抗體；FACS分析等)來確定TAT多肽過度表現。或者或另外，可例如經由螢光原位雜交使用對應於編碼TAT之核酸或其互補序列的基於核酸的探針(FISH；參見1998年10月公開之WO 98/45479)、南方墨點法、北方墨點法或聚合酶鏈反應(PCR)技術(諸如即時定量PCR(RT-PCR))量測細胞中編碼TAT多肽之核酸或mRNA的含量。亦可藉由例如使用基於抗體之檢測量測排入生物流體(諸如血清)中之抗原來研究

TAT多肽過度表現(亦參見例如1990年6月12日頒佈之美國專利第4,933,294號; 1991年4月18日公開之WO 91/05264; 1995年3月28日頒佈之美國專利5,401,638; 及Sias等人, J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990))。除上述檢測以外, 熟練從業者亦可利用各種活體內檢測。舉例而言, 可使患者體內之細胞暴露於視情況用可偵測標記(例如放射性同位素)進行標記之抗體, 且可例如藉由外部掃描放射能或藉由分析取自先前暴露於抗體之患者之活檢物來評估患者體內抗體與細胞之結合。

如本文所使用之術語「免疫黏附素」指示兼有異源蛋白(一種「黏附素」)之結合特異性與免疫球蛋白恆定域之效應功能的抗體樣分子。在結構上, 免疫黏附素包含具有所需結合特異性之胺基酸序列(其並非抗體之抗原識別及結合位點, 亦即為「異源」的)與免疫球蛋白恆定域序列的融合物。免疫黏附素分子之黏附素部分通常為至少包含受體或配體之結合位點的毗連胺基酸序列。免疫黏附素中之免疫球蛋白恆定域序列可獲自任何免疫球蛋白, 諸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亞型、IgA(包括IgA-1及IgA-2)、IgE、IgD或IgM。

措辭「標記」當本文使用時係指直接或間接結合於抗體、寡肽或其他有機分子以產生「標記之」抗體、寡肽或其他有機分子的可偵測化合物或組合物。標記自身可偵測(例如放射性同位素標記或螢光標記)或在酶標記的情況下, 可催化受質化合物或組合物的化學變化, 該變化為可

偵測的。

如本文中所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或防止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如, At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32及Lu之放射性同位素)、化療劑、酶及其片段(諸如核酸分解酶)、抗生素及毒素(諸如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素, 包括其片段及/或變異體)及下文所揭示之各種抗腫瘤或抗癌劑。其他細胞毒性劑在下文中描述。殺腫瘤劑可使腫瘤細胞毀壞。

「化學治療劑」為適用於治療癌症之化合物。化學療劑之實例包括烷基化劑, 諸如塞替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺; 磺酸烷酯, 諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶, 諸如苯佐多帕(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、麥曲多帕(meturedopa)及尤利多帕(uredopa); 伸乙基亞胺及伸甲基胺, 包括六甲蜜胺、三亞乙基蜜胺、三亞乙基磷醯胺、三乙烯硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺; 內酯(尤其為泡番荔枝辛(bullatacin)及泡番荔枝辛酮(bullatacinone)); δ -9-四羥基大麻酚(曲大麻酚(dronabinol), MARINOL®); β -拉帕酮(beta-lapachone); 拉帕醇(lapachol); 秋水仙鹼(colchicine); 樺木酸(betulinic acid); 喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康

(irinotecan) , CAMPTOSAR®) 、 乙 醯 基 喜 樹 鹼 (acetylcamptothecin)、司考波萊辛(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚蟲素(bryostatin)；開利斯塔汀(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼白毒素(podophyllotoxin)；鬼白毒素酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycins)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；多卡黴素(duocarmycin)(包括合成類似物，KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；潘卡替斯汀(pancratistatin)；沙科地辛(sarcodictyin)；斯旁斯汀(spongistatin)；芥子氮，諸如苯丁酸氮芥、羥氮芥、膽磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、氮芥、鹽酸氧化氮芥、美法倫(melphalan)、新恩比興(novembichin)、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥子氮(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及萊尼莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 ω II(參見例如 Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))；地奈黴素(dynemicin)，包括地奈黴素A；艾司匹拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白發色團及相關色素蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克萊諾米星

(aclacinomysins)、放線菌素、奧萊米星(authramycin)、偶氮絲胺酸、博萊黴素(bleomycins)、放線菌素C、卡拉比星(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、卡莫黴素(chromomycinis)、放線菌素D、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®小紅莓(包括嗎啉基-小紅莓、氰基嗎啉基-小紅莓、2-吡咯基-小紅莓及去氧小紅莓)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、黃膽素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、諸如絲裂黴素C之絲裂黴素、黴酚酸、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、波替諾黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、炔萊黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈佐星(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝劑，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉賓(fludarabine)、6-巰嘌呤(mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、

依諾他濱(enocitabine)、氮尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酪(testolactone)；抗腎上腺素，諸如胺魯米特(aminogluthethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充物，諸如醛葉酸(frolic acid)；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸；尹陸萊辛(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝曲布辛(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；伊達曲仙(edatraxate)；德弗法明(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；伊弗尼辛(elfornithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；艾普塞隆(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基尿素；蘑菇多糖(lentinan)；洛尼達寧(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安沙米托辛(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫吡丹莫(mopidanmol)；尼曲伊寧(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；比柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；2-乙醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端

孢徽烯 (trichothecenes)(尤 其 T-2 毒 素 、 維 萊 庫 寧
 A(verracurin A) 、 桿 孢 菌 素 A(roridin A) 及 安 古 定
 (anguidine)) ； 烏 拉 坦 (urethan) ； 長 春 地 辛 (vindesine)
 (ELDISINE®、FILDESIN®) ； 達 卡 巴 嗪 (dacarbazine) ； 甘
 露 莫 司 汀 (mannomustine) ； 二 溴 甘 露 醇 (mitobronitol) ； 二
 溴 衛 矛 醇 (mitolactol) ； 哌 泊 溴 烷 (pipobroman) ； 瓜 西 托 辛
 (gacytosine) ； 阿 拉 伯 糖 苷 (arabinoside)(「Ara-C」) ； 塞 替
 派 ； 紫 杉 醇 類 ， 例 如 TAXOL®太 平 洋 紫 杉 醇 (Bristol-Myers
 Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 、 無 十 六 醇 聚 氧 乙 烯 醚
 之 ABRAXANETM、太 平 洋 紫 杉 醇 之 經 工 程 加 工 白 蛋 白 奈
 米 粒 子 調 配 物 (American Pharmaceutical Partners,
 Schaumburg, Illinois) 及 TAXOTERE®多 烯 紫 杉 醇 (Rhône-
 Poulenc Rorer, Antony, France) ； 氯 萊 布 辛 (chloranbucil) ；
 吉 西 他 賓 (gemcitabine)(GEMZAR®) ； 6-硫 烏 嘌 呤 ； 巯 嘌
 呤 ； 甲 胺 喋 呤 ； 鉑 類 似 物 ， 諸 如 順 鉑 (cisplatin) 及 卡 鉑
 (carboplatin) ； 長 春 花 鹼 (vinblastine)(VELBAN®) ； 鉑 ； 依
 託 泊 苷 (VP-16) ； 異 環 磷 醯 胺 ； 米 托 蒽 醌 (mitoxantrone) ；
 長 春 新 鹼 (vincristine)(ONCOVIN®) ； 奧 賽 力 鉑 (oxaliplatin) ；
 氯 扣 沃 新 (leucovovin) ； 長 春 瑞 賓 (vinorelbine) (NAVELBINE®) ；
 諾 消 靈 (novantrone) ； 依 達 曲 沙 (edatrexate) ； 道 諾 黴 素 ；
 胺 基 蝶 呤 (aminopterin) ； 伊 班 膦 酸 鹽 (ibandronate) ； 拓 撲
 異 構 酶 抑 制 劑 RFS 2000 ； 二 氟 甲 基 烏 胺 酸 (DMFO) ； 諸 如
 視 黃 酸 之 類 視 色 素 ； 卡 西 他 賓 (capecitabine)(XELODA®) ；
 以 上 之 任 何 醫 藥 學 上 可 接 受 之 鹽 、 酸 或 衍 生 物 ； 以 及 以 上

兩者或兩者以上之組合，諸如CHOP(環磷醯胺、小紅莓、長春新鹼與潑尼龍(prednisolone)之組合療法之縮寫)及FOLFOX(使用奧賽力鉑(oxaliplatin)(ELOXATINTM)與5-FU及氟沃新之組合治療療程的縮寫)。

該定義中亦包括具有調節、減少、阻斷或抑制可促進癌生長之激素之效應之作用的抗激素劑，該等抗激素劑通常為系統性或全身性治療之形式。其可為激素本身。實例包括抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括例如他莫西芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®他莫西芬)、EVISTA®雷洛西芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫西芬(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬鹽酸鹽(keoxifene)、LY117018、歐納氏酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抗黃體酮；雌激素受體下調劑(ERD)；具有抑制或制止卵巢之功能的藥劑，例如黃體素釋放激素(LHRH)促效劑，諸如LUPRON®及ELIGARD®醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林(buserelin acetate)及曲特瑞林(tripterelin)；其他抗雄性激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)及必卡他胺(bicalutamide)；及抑制芳香酶的芳香酶抑制劑(芳香酶可調節腎上腺中之雌激素產生)，諸如4(5)-咪唑、胺基苯乙哌啶酮(aminoglutethimide)、MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、弗米斯坦(formestane)、法偈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏

氯唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX®瑞寧德(anastrozole)。此外，化學治療劑之該定義包括：雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)(例如，BONEFOS®或OSTAC®)、DIDROCAL®依替膦酸鹽(etidronate)、NE- 58095、ZOMETA®唑來膦酸/唑來膦酸鹽、FOSAMAX®阿倫膦酸鹽(alendronate)、AREDIA®帕米膦酸鹽(pamidronate)、SKELID®替魯膦酸鹽(tiludronate)或ACTONEL®利塞膦酸鹽(risedronate)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制基因在與異常細胞增殖相關之信號傳導通道中之表現的反義寡核苷酸，諸如PKC- α 、Raf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R)；疫苗，諸如THERATOPE®疫苗及基因治療疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；拉帕替尼對甲苯磺酸鹽(lapatinib ditosylate)(ErbB-2與EGFR二元酪胺酸激酶小分子抑制劑，亦稱GW572016)；及以上任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

「生長抑制劑」當在本文中使用时係指活體外或活體內抑制細胞、尤表現TAT之癌細胞生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低S期之表現TAT之細胞百分比的藥劑。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程(除S期以外之其他位置)之藥劑，諸如誘導G1停滯及M期停滯之藥劑。經典M期阻斷劑包括長春鹼類(長春新鹼及長

春鹼)、紫杉烷(taxane)及拓撲異構酶II抑制劑(諸如多柔比星、表柔比星、柔紅黴素、依託泊苷及博萊黴素)。彼等使G1停滯之藥劑亦外溢引起S期停滯，例如DNA烷化劑，諸如他莫西芬、潑尼松(prednisone)、氮烯唑胺、氮芥、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。其他資訊可見於The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及Israel編，第1章，Murakami等人之題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)中，尤其第13頁。紫杉烷(太平洋紫杉醇及多西他賽)為源自紫杉樹之抗癌藥。源自歐洲紫杉之多西他賽(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)為太平洋紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。太平洋紫杉醇及多西他賽促進自微管蛋白二聚體組裝成微管且藉由防止解聚作用而使微管穩定，此將導致細胞有絲分裂抑制。

「多柔比星」為一種蒽環黴素類抗生素。阿黴素之全化學名稱為(8S-順)-10-[(3-胺基-2,3,6-三去氧- α -L-水解-六呋喃糖基)氧基]-7,8,9,10-四氫-6,8,11-三羥基-8-(羥基乙醯基)-1-甲氧基-5,12-萘二酮。

術語「細胞激素」為由一個細胞群體釋放之作為細胞內介體作用於另一細胞的蛋白質之通用術語。該等細胞激素之實例為淋巴激素、單核球激素及傳統多肽激素。細胞激素包括生長激素，諸如人類生長激素、N-甲硫胺醯基人類生長激素及牛生長激素；副甲狀腺激素；甲狀腺素；胰島

素；胰島素原；鬆弛素；鬆弛素原；醣蛋白激素，諸如促濾泡激素(FSH)、促甲狀腺激素(TSH)及促黃體激素(LH)；肝生長因子；纖維母細胞生長因子；促乳素；胎盤促乳素；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；苗勒管抑制物質(mullerian-inhibiting substance)；小鼠促性腺激素相關肽；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；整合素；血小板生成素(TPO)；神經生長因子，諸如NGF- β ；血小板生長因子；轉型生長因子(TGF)，諸如TGF- α 及TGF- β ；胰島素樣生長因子-I及胰島素樣生長因子-II；紅細胞生成素(EPO)；骨誘導因子；干擾素，諸如干擾素- α 、干擾素- β 及干擾素- γ ；群落刺激因子(CSF)，諸如巨噬細胞-CSF(M-CSF)；粒細胞-巨噬細胞-CSF(GM-CSF)；及粒細胞-CSF(G-CSF)；介白素(IL)，諸如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘤壞死因子，諸如TNF- α 或TNF- β ；及其他多肽因子(包括LIF及kit配位體(KL))。本文所用之術語細胞激素包括來自天然來源或來自重組細胞培養物之蛋白質及天然序列細胞激素之生物活性等效物。

術語「藥品說明書」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於與使用該等治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投藥、禁忌症及/或警告之資訊。

II. 本發明之組合物及方法

A. 抗TAT抗體

在一個實施例中，本發明提供可用作本文之治療劑及/或診斷劑之抗TAT抗體。例示性抗體包括多株、單株、人類化、雙特異性及異源結合抗體。

1. 多株抗體

多株抗體較佳藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射相關抗原及佐劑而在動物體內產生。使相關抗原(尤其在使用合成肽時)結合於欲免疫之物種中具有免疫原性之蛋白質可為有用的。舉例而言，抗原可使用雙官能或衍生試劑(例如馬來醯亞胺基苯甲醯基磺酸基丁二醯亞胺酯(經由半胱胺酸殘基結合)、N-羥基丁二醯亞胺(經由離胺酸殘基)、戊二醛、丁二酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中R及 R_1 為不同烷基)結合於匙孔螺血氫蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑。

藉由將例如100 μg 或5 μg 蛋白質或結合物(分別針對兔或小鼠)與3體積弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)組合並在多個位點皮內注射該溶液使動物對抗原、免疫原結合物或衍生物免疫。1個月以後，用含初始量1/5至1/10的肽或結合物之弗氏完全佐劑藉由在多個位點皮下注射使動物加強免疫。7至14天後，使該等動物出血且檢測血清之抗體力價。使動物加強免疫直至力價平穩。結合物亦可在重組體細胞培養物中作為蛋白質融合物產生。同樣，諸如明礬之聚集劑適用於增強免疫反應。

2. 單株抗體

單株抗體可使用由Kohler等人，Nature, 256:495 (1975)

首次描述之融合瘤法製備或可藉由重組DNA方法(美國專利第4,816,567號)製備。

在融合瘤法中，如上所述使小鼠或其他適當宿主動物(諸如倉鼠)免疫以誘發淋巴細胞，該等淋巴細胞產生或能夠產生將特異性結合用於免疫之蛋白質的抗體。或者，可於活體外使淋巴細胞免疫。免疫後，分離淋巴細胞，接著使用適合的融合劑(諸如聚乙二醇)使淋巴細胞與骨髓瘤細胞株融合，形成融合瘤細胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。

將由此製備出之融合瘤細胞接種且生長於適合之培養基中，該培養基較佳含有一或多種抑制未融合親本骨髓瘤細胞(亦稱作融合搭配物)之生長或存活的物質。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤之選擇性培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質阻止缺乏HGPRT之細胞生長。

較佳融合搭配物骨髓瘤細胞為有效融合、支持所選抗體產生細胞穩定高含量產生抗體且對針對未融合親本細胞選擇之選擇性培養基敏感的骨髓瘤細胞。較佳骨髓瘤細胞株為鼠類骨髓瘤株，諸如源自MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤的骨髓瘤細胞株(購自薩克研究院細胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center), San Diego, California USA)及SP-2及衍生物，例如X63-Ag8-653細胞(購自美國菌

種保存中心(American Type Culture Collection), Manassas, Virginia, USA)。亦已描述人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞株用於產生人類單株抗體(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984) ; Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

就針對抗原之單株抗體產量來檢測融合瘤細胞於其中生長之培養基。較佳地, 藉由免疫沈澱或藉由活體外結合檢測(諸如放射免疫檢測(RIA)或酶聯免疫吸附檢測(ELISA))測定融合瘤細胞所產生之單株抗體之結合特異性。

單株抗體之結合親和力可例如 Munsont 等人, Anal. Biochem., 107:220 (1980) 中所述之斯卡查德分析(Scatchard analysis)來測定。

鑑別產生所需特異性、親和力及/或活性之抗體之融合瘤細胞之後, 可將該等純系藉由限制性稀釋程序次選殖且利用標準方法使其生長(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 頁 (Academic Press, 1986))。適用於此目的之培養基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培養基。另外, 融合瘤細胞可例如藉由腹膜內注射該等細胞於小鼠體內使其在動物中以腹水性腫瘤形式活體內生長。

藉由習知抗體純化程序(諸如親和層析(例如使用蛋白質 A 或蛋白質 G-瓊脂糖)或離子交換層析、羧磷灰石層析、凝膠電泳、透析等)使次純系所分泌之單株抗體與培養基、

腹水性流體或血清適合地分離。

編碼單株抗體之DNA使用習知程序(例如藉由使用能夠與編碼鼠類抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合之寡核苷酸探針)容易地分離並測序。融合瘤細胞用作該DNA之較佳來源。DNA一旦分離即可放入表現載體中，接著將其轉染至諸如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或不另外產生抗體蛋白質之骨髓瘤細胞的宿主細胞中以在重組宿主細胞中合成單株抗體。關於細菌中編碼抗體之DNA之重組表現的綜述文章包括 Skerra 等人，*Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)及 Plückthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992)。

在另一實施例中，單株抗體或抗體片段可自使用 McCafferty 等人，*Nature*, 348:552-554 (1990)中所述之技術產生的抗體噬菌體庫分離。Clackson 等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)及 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)分別描述使用噬菌體庫分離鼠類及人類抗體。後續公開案描述藉由鏈改組(Marks 等人，*Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))以及組合感染及活體內重組作為構築極大噬菌體庫之策略(Waterhouse 等人，*Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993))來產生高親和力(nM範圍)人類抗體。因此，該等技術為用於分離單株抗體之傳統單株抗體融合瘤技術之可行替代方案。

可例如藉由用人類重鏈及輕鏈恆定域(CH及CL)序列取代同源鼠類序列(美國專利第4,816,567號；及 Morrison等

人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984))或藉由使免疫球蛋白編碼序列與非免疫球蛋白多肽(異源多肽)之整個或部分編碼序列融合來修飾編碼抗體之DNA以產生嵌合或融合抗體多肽。非免疫球蛋白多肽序列可取代抗體之恆定域，或其取代抗體之一個抗原結合位點的可變域以產生包含對一種抗原具有特異性之一個抗原結合位點及對不同抗原具有特異性之另一個抗原結合位點的嵌合二價抗體。

3. 人類及人類化抗體

本發明之抗TAT抗體可進一步包含人類化抗體或人類抗體。非人類(例如鼠類)抗體之人類化形式為含有源自非人類免疫球蛋白之極少序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(諸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗體之其他抗原結合子序列)。人類化抗體包括人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中該接受者之互補決定區(CDR)之殘基已經具有所需特異性、親和力及能力之非人類物種(諸如小鼠、大鼠或兔)抗體(供者抗體)之CDR的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架殘基係經相應非人類殘基置換。人類化抗體亦可包含既不存在於接受者抗體中亦不存在於輸入CDR或構架序列中之殘基。一般而言，人類化抗體將包含實質上所有之至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有CDR區對應於非人類免疫球蛋白之彼等CDR區且所有或實質上所有FR區為人類免疫球蛋白共同序列之彼等FR區。人類化抗體最佳亦包含至少一部分免疫球蛋白恆定區(Fc)，通常為人類免疫球蛋白之恆定區 [Jones

等人，*Nature*, 321: 522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature*, 332: 323-329 (1988)；及 Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)]。

用於使非人類抗體人類化之方法為此項技術中所熟知。一般而言，人類化抗體具有一或多個自非人類來源引入其中之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基通常稱為「輸入」殘基，其通常取自「輸入」可變域。人類化可基本上根據 Winter 及合作者之方法 [Jones 等人，*Nature*, 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature*, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen 等人，*Science*, 239:1534-1536 (1988)]，藉由用齧齒動物 CDR 或 CDR 序列取代人類抗體之相應序列來執行。因此，該等「人類化」抗體為嵌合抗體(美國專利第 4,816,567 號)，其中實質上小於完整人類可變域經來自非人類物種之相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為一些 CDR 殘基及可能之一些 FR 殘基經來自齧齒動物抗體之類似位點之殘基取代的人類抗體。

欲用於製備人類化抗體之人類可變域(輕鏈與重鏈)之選擇對抗體欲用於人類治療用途時降低抗原性及 HAMA 反應(人類抗小鼠抗體)而言極其重要。根據所謂「最佳匹配」方法，針對已知人類可變域序列之完整庫篩選齧齒動物抗體之可變域序列。已鑑別與齧齒動物之 V 域序列最接近之人類 V 域序列且其內部之人類構架區(FR)為人類化抗體所接受(Sims 等人，*J. Immunol.* 151:2296 (1993)；Chothia 等人，*J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。另一方法使用來源於

輕鏈或重鏈特定亞群之所有人類抗體之共同序列的特定構架區。若干不同人類化抗體可使用同一構架(Carter等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等人, J. Immunol. 151:2623 (1993))。

更重要的是，將抗體人類化而保留對抗原之高結合親和力及其他有利生物特性。為實現該目標，根據一較佳方法，人類化抗體藉由使用親本及人類化序列之三維模型分析親本序列及各種設想之人類化產物的方法來製備。三維免疫球蛋白模型普遍可得且為熟習此項技術者熟知。可獲得說明及呈現所選擇之候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構的電腦程式。對該等呈現之檢查允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列起作用過程中可能的作用，亦即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式，可自接受者及輸入序列選擇FR殘基並與接受者及輸入序列組合以便獲得所需抗體特徵，諸如對標靶抗原之親和力增加。一般而言，高變區殘基直接且極大體上涉及影響抗原結合。

涵蓋各種形式之人類化抗TAT抗體。舉例而言，人類化抗體可為抗體片段(諸如Fab)，其視情況與一或多種細胞毒性劑結合以產生免疫結合物。或者，人類化抗體可為完整抗體，諸如完整IgG1抗體。

作為人類化之代替，可產生人類抗體。舉例而言，目前有可能產生在無內源免疫球蛋白產生存在時一旦免疫即能夠產生人類抗體完整譜系之轉殖基因動物(例如小鼠)。舉

例而言，已描述嵌合及生殖系突變小鼠中抗體重鏈連接區(JH)基因的純合子缺失導致對於內源抗體產生之完全抑制。人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等生殖系突變小鼠中將在抗原攻毒之後產生人類抗體。參見例如 Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature, 362: 255 (1993)；Bruggermann等人，Year in Immunol., 7: 33 (1993)；美國專利第5,545,806號、第5,569,825號、第5,591,669號(全部屬於GenPharm)；第5,545,807號；及 WO 97/17852。

或者，可使用噬菌體呈現技術(McCafferty等人，Nature, 348:552-553 [1990])自未免疫供者之免疫球蛋白可變(V)域基因譜系活體外產生人類抗體及抗體片段。根據此技術，使抗體V域基因同框選殖至絲狀噬菌體(諸如M13或fd)之主要或次要鞘蛋白基因中，且以功能性抗體片段之形式呈現於噬菌體粒子之表面上。由於該絲狀顆粒含有噬菌體基因譜之單鏈DNA複本，基於抗體功能性質之選擇亦導致編碼該抗體之基因選擇性展示彼等性質。因此，噬菌體模擬B細胞之一些特性。可以各種格式執行噬菌體呈現，該等格式綜述於例如 Johnson, Kevin S. 及 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993) 中。噬菌體呈現可使用若干V基因區段來源。Clackson等人，Nature, 352:624-628 (1991)自源自免疫小鼠之脾的V基因的隨機組合小庫分離出多樣性抗噁唑酮抗體陣列。可構築未免疫人類供者之V基因的譜系且針對多樣性抗原(包

括自體抗原)陣列之抗體可基本上按照由Marks等人，J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)或Griffith等人，EMBO J. 12:725-734 (1993)所述之技術來分離。亦參見美國專利第5,565,332號及第5,573,905號。

如上所討論，人類抗體亦可由活體外活化B細胞產生(參見美國專利5,567,610及5,229,275)。

4. 抗體片段

在某些情形下，使用抗體片段而非使用整個抗體具有優點。較小大小之片段允許迅速清除且可導致對進入實體腫瘤之改良。

已開發出各種技術用於產生抗體片段。傳統上，該等片段可經由完整抗體之蛋白水解消化獲得(參見例如Morimoto等人，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；及Brennan等人，Science, 229:81 (1985))。然而，該等片段現在可由重組宿主細胞直接產生。Fab、Fv及ScFv抗體片段皆可表現於大腸桿菌中並自大腸桿菌中分泌，因此允許容易地產生大量此等片段。可自上文所討論之抗體噬菌體庫中分離抗體片段。或者，可直接自大腸桿菌中回收Fab'-SH片段且使其化學偶合形成F(ab')₂片段(Carter等人，Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根據另一方法，F(ab')₂片段可直接自重組宿主細胞培養物中分離。美國專利第5,869,046號中描述具有延長之活體內半衰期的Fab及F(ab')₂片段，其包含結合抗原決定基殘基之救助受體(salvage receptor)。其他產生抗

體片段之技術對熟習此項技術者而方將為顯而易知的。在其他實施例中，所選抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參見WO 93/16185；美國專利第5,571,894號及美國專利第5,587,458號。Fv及sFv為唯一具有完整結合位點而無恆定區之物質；因此，其適合於減少活體內使用期間的非特異性結合。sFv融合蛋白質可經構築以在sFv之胺基或羧基末端實現效應蛋白質之融合。參見Antibody Engineering, Borrebaeck編，同上。抗體片段亦可例如為例如美國專利第5,641,870號中所述之「線性抗體」。該等線性抗體片段可為單特異性或雙特異性的。

5. 雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少兩個不同抗原決定基具有結合特異性之抗體。例示性雙特異性抗體可結合本文所述之TAT蛋白質之兩個不同抗原決定基。其他該等抗體可組合TAT結合位點與另一蛋白質之結合位點。或者，抗TAT臂可與結合白血球上之觸發分子(諸如T細胞受體分子(例如CD3)；或IgG之Fc受體(FcγR)，諸如FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)及FcγRIII(CD16))的臂組合，以便將細胞防禦機制集中且定位於表現TAT之細胞。雙特異性抗體亦可用以將細胞毒性劑定位於表現TAT之細胞中。此等抗體具有TAT結合臂及結合細胞毒性劑(例如沙泊寧(saporin)、抗干擾素-α、長春花生物鹼、蓖麻素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段(例如F(ab')₂雙特異性抗體)。

WO 96/16673描述一種雙特異性抗 ErbB2/抗 Fc γ RIII 抗體，且美國專利第 5,837,234 號揭示一種雙特異性抗 ErbB2/抗 Fc γ RI 抗體。WO 98/02463 中展示雙特異性抗 ErbB2/Fc α 抗體。美國專利第 5,821,337 號教示雙特異性抗 ErbB2/抗 CD3 抗體。

製備雙特異性抗體之方法為此項技術中已知。全長雙特異性抗體之傳統產生係基於共表現兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對，其中兩個鏈具有不同特異性(Millstein 等人，Nature 305:537-539 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈及輕鏈之隨機分配，此等融合瘤(四源融合瘤)產生 10 種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。一般藉由親和層析步驟進行之正確分子之純化相當麻煩，且產量低。類似程序揭示於 WO 93/08829 中及 Traunecker 等人，EMBO J. 10:3655-3659 (1991) 中。

根據不同方法，將具所需結合特異性之抗體可變域(抗體-抗原結合部分)融合至免疫球蛋白恆定域序列。較佳與包含鉸鏈區、CH2 區及 CH3 區之至少一部分的 Ig 重鏈恆定域融合。較佳使含有輕鏈結合所必需之位點的第一重鏈恆定區(CH1)存在於至少一種融合物中。將編碼免疫球蛋白重鏈融合物及(必要時)免疫球蛋白輕鏈之 DNA 插入獨立表現載體中且共同轉染至適合之宿主細胞中。當用於構築之不等比率之三個多肽鏈提供所需雙特異性抗體之最佳產率時，此舉提供調節實施例中三個多肽片段之相互比例的極大靈活性。然而，當等比率之至少兩個多肽鏈的表現產生

高產率時或當比率對產生所需鏈組合無重要影響時，有可能將兩個或所有三個多肽鏈之編碼序列插入單一表現載體中。

在該方法之一較佳實施例中，該等雙特異性抗體由一臂中之具有第一結合特異性之雜交免疫球蛋白重鏈及另一臂中之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)構成。已發現由於免疫球蛋白輕鏈僅存在於一半雙特異性分子中提供一種簡便之分離方式，故此不對稱結構促進所需雙特異性化合物與非吾人所需之免疫球蛋白鏈組合之分離。此方法揭示於WO 94/04690中。關於產生雙特異性抗體之詳情，參見例如Suresh等人，Methods in Enzymology 121:210 (1986)。

根據美國專利第5,731,168號中所述之另一方法，可將一對抗體分子之間的界面工程改造以使自重組細胞培養物中回收之異源二聚體之百分比最大。較佳界面包含CH3域之至少一部分。在此方法中，一或多個來自第一抗體分子之界面的小胺基酸側鏈經較大側鏈(例如，酪胺酸或色胺酸)置換。藉由以較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈，在第二抗體分子之界面上產生具有與大側鏈相同或類似大小之補償「空腔」。此提供使異源二聚體之產率增加超過其他不合需要之最終產物(諸如同源二聚體)的機制。

雙特異性抗體包括交聯或「異源結合」抗體。舉例而言，呈異源結合物形式之抗體中之一者可與抗生物素蛋白

偶合，另一者與生物素偶合。舉例而言，已提出該等抗體使免疫系統細胞靶向非所需之細胞(美國專利第4,676,980號)，且用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373及EP 03089)。異源結合抗體可使用任何便利的交聯方法製備。適合之交聯劑為此項技術中所熟知，且與多種交聯技術一起揭示於美國專利第4,676,980號中。

文獻中亦已描述自抗體片段產生雙特異性抗體之技術。舉例而言，可使用化學鍵聯製備雙特異性抗體。Brennan等人，*Science*, 229: 81 (1985)描述一種蛋白水解裂解完整抗體產生F(ab')₂片段之程序。在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下，將此等片段還原以使鄰近二硫醇穩定且阻止形成分子間二硫基。接著將所產生之Fab'片段轉化為硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。接著藉由用巰基乙胺還原將一種Fab'-TNB衍生物再轉化為Fab'-硫醇，且將其與等莫耳量之另一Fab'-TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作用於選擇性固定酶之試劑。

近期發展已促進自大腸桿菌中直接回收Fab'-SH片段，該等片段可經化學偶合形成雙特異性抗體。Shalaby等人，*J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992)描述完全人類化之雙特異性抗體F(ab')₂分子之產生。各Fab'片段分開自大腸桿菌中分泌且經受活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。由此形成之雙特異性抗體能夠結合過度表現ErbB2受體之細胞及正常人類T細胞，而且激發人類細胞毒素淋巴細胞對人類乳房腫瘤標靶之溶胞活性。亦已描述多種直接

由重組細胞培養物製備及分離雙特異性抗體片段之技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等人，J. Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白質之白胺酸拉鏈肽連接至兩種不同抗體之Fab'部分。在鉸鏈區還原抗體同源二聚體以形成單體，且接著使其再氧化以形成抗體異源二聚體。此方法亦可用於產生抗體同源二聚體。Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)所述之「微型雙功能抗體」技術為製備雙特異性抗體片段提供了替代機制。該等片段包含VH經由過短而使得同一鏈上之兩個域之間無法配對的连接子連接至VL。因此，迫使一個片段之VH及VL域與另一片段之互補VL及VH域配對，藉此形成兩個抗原結合位點。亦已報導另一種藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體來製備雙特異性抗體片段之策略。參見Gruber等人，J. Immunol., 152:5368 (1994)。

具有兩價以上的抗體亦考慮在內。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tutt等人，J. Immunol. 147:60 (1991)。

6. 異源結合抗體

異源結合抗體亦在本發明之範疇內。異源結合抗體由兩個共價接合之抗體構成。舉例而言，已提出該等抗體使免疫系統細胞靶向非所需之細胞[美國專利第4,676,980號]，且用於治療HIV感染[WO 91/00360；WO 92/200373；EP 03089]。預期該等抗體可在活體外使用合成蛋白質化學中已知之方法(包括涉及交聯劑之方法)製備。舉例而言，可

使用二硫基交換反應或藉由形成硫醚鍵來構築免疫毒素。適於此目的之試劑之實例包括亞胺基硫醇鹽(iminothiolate)及甲基-4-巰基丁醯亞胺酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate)及例如美國專利第4,676,980號中所揭示之試劑。

7. 多價抗體

多價抗體可比二價抗體更快地由表現抗體所結合抗原之細胞內化(及/或異化)。本發明之抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點之多價抗體(IgM類別之抗體除外)(例如四價抗體)，多價抗體可藉由重組表現編碼抗體多肽鏈之核酸容易地產生。多價抗體可包含二聚化域及三個或三個以上抗原結合位點。較佳二聚化域包含Fc區或鉸鏈區(或由其組成)。在此情形下，抗體將包含一Fc區及Fc區胺基末端之三個或三個以上抗原結合位點。本文中之較佳多價抗體包含三至約八個，但較佳四個抗原結合位點(或由其組成)。多價抗體包含至少一條多肽鏈(且較佳兩條多肽鏈)，其中多肽鏈包含兩個或兩個以上可變域舉例而言，多肽鏈可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc，其中VD1為第一可變域，VD2為第二可變域，Fc為Fc區之一條多肽鏈，X1及X2表示胺基酸或多肽，且n為0或1。舉例而言，多肽鏈可包含VH-CH1-可撓性連接子-VH-CH1-Fc區鏈或VH-CH1-VH-CH1-Fc區鏈。本文之多價抗體較佳進一步包含至少兩個(且較佳四個)輕鏈可變域多肽。本文之多價抗體可例如包含約兩個至約八個輕鏈可變域多肽。本文所涵蓋之輕鏈

可變域多肽包含輕鏈可變域且視情形進一步包含CL域。

8. 效應功能工程改造

可能需要關於效應功能修飾本發明抗體，例如以便增強抗體之抗原依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。此可藉由將一或多個胺基酸取代引入抗體之Fc區中來達成。或者或另外，可將半胱胺酸殘基引入Fc區中，藉此允許在此區中形成鏈間二硫鍵。由此產生之同源二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增加之補體介導之細胞殺滅及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參見 Caron 等人，J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) 及 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)。具有增強之抗腫瘤活性的同源二聚抗體亦可使用如 Wolff 等人，Cancer Research 53:2560-2565 (1993) 所述之雜雙官能交聯劑來製備。或者，抗體可經工程改造而具有雙Fc區且由此可具有增強之補體溶解及ADCC能力。參見 Stevenson 等人，Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。為延長抗體之血清半衰期，可將救助受體結合抗原決定基併入抗體(尤其抗體片段)中，例如如美國專利 5,739,277 所述。如本文所用，術語「救助受體結合抗原決定基」係指IgG分子(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)之Fc區之抗原決定基，其負責增加IgG分子之活體內血清半衰期。

9. 免疫結合物

本發明亦關於免疫結合物，其包含結合於細胞毒性劑(諸如化學治療劑)、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、

植物或動物來源之酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素(亦即放射性結合物)的抗體。

上文已描述適用於產生該等免疫結合物之化學治療劑。可使用的酶促活性毒素及其片段包括：白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、葫蘆根毒蛋白A鏈、 α -帚麴菌素(*alpha-sarcin*)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白質、康乃馨蛋白質、美洲商陸(*Phytolaca americana*)蛋白質(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(*curcin*)、巴豆毒蛋白(*crotin*)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制劑、重組植物毒素(*gelonin*)、有絲分裂素(*mitogellin*)、局限麴菌素(*restrictocin*)、酚黴素、伊諾黴素(*enomycin*)及黴菌毒素(*tricothecene*)。多種放射性核種可用於產生放射性結合抗體。實例包括²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及¹⁸⁶Re。抗體與細胞毒性劑之結合物可使用多種雙官能蛋白質偶合劑來製備，該等蛋白質偶合劑諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻免疫毒素可如 Vitetta

等人，Science, 238: 1098 (1987)所述製備。碳14標記之1-異硫氰氧基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。

本文亦涵蓋抗體與一或多種小分子毒素(諸如卡奇黴素(calicheamicin)、類美登素、單端孢黴毒素及CC1065以及此等毒素之具有毒素活性之衍生物)之結合物。

美登素與類美登素

在一較佳實施例中，本發明抗TAT抗體(全長或片段)結合於一或多種類美登素分子。

類美登素為藉由抑制微管蛋白聚合發揮作用之有絲分裂抑制劑。美登素最先係自東非灌木齒葉美登木(Maytenus serrata)分離(美國專利第3,896,111號)。隨後，發現某些微生物亦產生類美登素，諸如美登醇及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及其衍生物及類似物揭示於例如美國專利第4,137,230號、第4,248,870號、第4,256,746號、第4,260,608號、第4,265,814號、第4,294,757號、第4,307,016號、第4,308,268號、第4,308,269號、第4,309,428號、第4,313,946號、第4,315,929號、第4,317,821號、第4,322,348號、第4,331,598號、第4,361,650號、第4,364,866號、第4,424,219號、第4,450,254號、第4,362,663號及第4,371,533號中，其揭示內容明確地以引用之方式併入本文中。

類美登素抗體結合物

在嘗試提高美登素與類美登素之治療指數中，使其與特异性結合腫瘤細胞抗原之抗體結合。含有類美登素之免疫結合物及其治療用途揭示於例如美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，其揭示內容明確地以引用之方式併入本文中。Liu等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)描述包含連接至針對人類結腸直腸癌之單株抗體C242之類美登素(命名為DM1)的免疫結合物。已發現該結合物對所培養之結腸癌細胞具有高細胞毒性且在活體內腫瘤生長檢測中展示抗腫瘤活性。Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)描述免疫結合物，其中類美登素經由二硫基連接子與結合人類結腸癌細胞株上之抗原的鼠類抗體A7結合，或與結合HER-2/neu致癌基因之另一鼠類單株抗體TA.1結合。活體外測試TA.1-類美登素結合物對人類乳癌細胞株SK-BR-3的細胞毒性，該細胞株每個細胞表現 3×10^5 個HER-2表面抗原。藥物結合物達成與游離類美登素藥物類似之細胞毒性程度，該細胞毒性程度可藉由增加每個抗體分子類美登素分子之數目而增加。A7-類美登素結合物在小鼠體內展示出低全身性細胞毒性。

抗ATA多肽抗體-類美登素結合物(免疫結合物)

可藉由在不顯著降低抗體或類美登素分子之生物學活性的情況下將抗體與類美登素分子化學連接來製備抗體-類美登素結合物。平均每個抗體分子結合3-4個類美登素分

子已展示出增強標靶細胞之細胞毒性之功效而對抗體功能或溶解性並無不利影響，但預期即使1個毒素/抗體分子亦可增強細胞毒性超過使用裸抗體。類美登素為此項技術中所熟知，且可藉由已知技術合成或自天然來源分離。適合之類美登素揭示於例如美國專利第5,208,020號及上文提及之其他專利及非專利公開案中。較佳類美登素為美登醇及在美登醇分子之芳環中或其他位置處修飾之美登醇類似物，諸如各種美登醇酯。

存在此項技術中已知之用於製備抗體-類美登素結合物的多種連接基團，包括例如美國專利第5,208,020號或歐洲專利 0425235B1；Chari等人，Cancer Research 52:127-131(1992)及2004年10月8日申請之美國專利申請案第10/960,602號中所揭示的彼等連接基團，該等文獻之揭示內容明確地以引用之方式併入本文中。可如2004年10月8日申請之美國專利申請案第10/960,602號中所揭示，製備包含連接子組分SMCC之抗體-類美登素結合物。如以上鑑別之專利中所揭示，連接基團包括二硫基、硫醚基、酸不穩定性基團、光不穩定性基團、肽酶不穩定性基團或酯酶不穩定性基團，較佳為二硫基及硫醚基。本文中描述且例示性說明額外的連接基團。

抗體與類美登素之結合物可使用多種雙功能蛋白質偶合劑製備，該等蛋白質偶合劑諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷

(IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙-(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。特別較佳之偶合劑包括提供二硫鍵聯之N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)(Carlsson等人, Biochem. J. 173:723-737 [1978])及N-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)。

可視連接類型而定使連接子連接於類美登素分子之各個位置。舉例而言,可藉由使用習知偶合技術與羥基反應形成酯鍵。反應可發生在具有羥基之C-3位置、經羥甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置處。在一較佳實施例中,鍵聯形成於美登醇或美登醇類似物之C-3位置處。

奧瑞他汀及海兔毒素(Dolostatin)

在一些實施例中,免疫結合物包含本發明抗體與海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物、奧瑞他汀結合(美國專利第5,635,483號、第5,780,588號)。海兔毒素及奧瑞他汀已顯示干擾微管動力學、GTP水解及核及細胞分裂(Woyke等人, (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584), 且具有抗癌活性(US 5,663,149)及抗真菌活性(Pettit等人, (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-

2965)。海兔毒素或奧瑞他汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端連接於抗體(WO 02/088172)。

例示性奧瑞他汀實施例包括N末端連接型單甲基奧瑞他汀藥物部分DE及DF(亦即MMAE及MMAF)，揭示於如下文獻中：Senter等人，Proceedings of the American Association for Cancer Research，第45卷，摘要編號623，於2004年3月28日提出，其揭示內容明確地以全文引用之方式併入本文中。

肽基藥物部分通常可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵來製備。此等肽鍵可例如根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(參見E. Schröder及K. Lübke, 「The Peptides」, 第1卷, 第76-136頁, 1965, Academic Press)製備。奧瑞他汀/海兔毒素藥物部分可根據以下之方法製備：US 5,635,483；US 5,780,588；Pettit等人，(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit等人，(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R.等人，Synthesis, 1996, 719-725；Pettit等人，(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；及Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784。

卡奇黴素

另一相關之免疫結合物包含與一或多個卡奇黴素分子結合之抗TAT抗體。抗生素之卡奇黴素家族能夠在亞皮莫耳濃度下產生雙股DNA碎片。關於卡奇黴素家族結合物之製備，參見美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第

5,739,116 號、第 5,767,285 號、第 5,770,701 號、第 5,770,710 號、第 5,773,001 號、第 5,877,296 號(均屬於 American Cyanamid Company)。可使用之卡奇黴素之結構類似物包括(但不限於) γ 1I、 α 2I、 α 3I、N-乙醯基- γ 1I、PSAG 及 θ 1I(Hinman 等人, Cancer Research 53:3336-3342 (1993); Lode 等人, Cancer Research 58:2925-2928 (1998); 及屬於 American Cyanamid 之上述美國專利)。可與抗體結合之另一抗腫瘤藥物為 QFA, 其為抗葉酸劑。卡奇黴素與 QFA 均具有細胞內作用位點且不易於跨過質膜。因此, 細胞經由抗體介導之內化作用攝取此等藥劑顯著增強其細胞毒性作用。

其他細胞毒性劑

可與本發明抗 TAT 抗體結合之其他抗腫瘤劑包括 BCNU、鏈脲佐菌素(streptozotycin)、長春新鹼及 5-氟尿嘧啶, 美國專利第 5,053,394 號、第 5,770,710 號中所述之共同稱為 LL-E33288 複合物的藥劑家族以及伊斯帕黴素(esperamicins)(美國專利第 5,877,296 號)。

可使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉 A 鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素 A 鏈(獲自綠膿假單胞菌)、蓖麻毒素 A 鏈、相思豆毒素 A 鏈、葫蘆根毒素 A 鏈、 α -帶麴菌素、油桐蛋白、康乃馨蛋白、美洲商陸蛋白(PAPI、PAPII 及 PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(saponaire officinalis)抑制劑、重組植物毒素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌

毒素。參見例如1993年10月28日公開之WO 93/21232。

本發明另外涵蓋抗體與具有核分解活性之化合物(例如核糖核酸酶或DNA內切酶，諸如去氧核糖核酸酶；DNA酶)之間所形成的免疫結合物。

為選擇性破壞腫瘤，抗體可包含高度放射性原子。多種放射性同位素可用於產生放射性結合抗TAT抗體。實例包括At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212及Lu之放射性同位素。當使用結合物進行診斷時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如Tc99m或I123；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如碘-123及碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、鈷、錳或鐵。

可以已知方式將放射性標記或其他標記併入結合物中。舉例而言，肽可生物合成，或可藉由使用涉及例如以氟-19替代氫之適合胺基酸前驅物進行化學胺基酸合成來合成。諸如tc99m或I123、Re186、Re188及In111之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。釷-90可經由離胺酸殘基連接。可使用IODOGEN方法(Fraker等人，(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)來合併碘-123。

「 Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy 」(Chatal, CRC Press 1989)詳細描述其他方法。

抗體與細胞毒性劑之結合物可使用多種雙功能蛋白質偶合劑製備，該等蛋白質偶合劑諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-馬來醯

亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人，*Science*, 238:1098 (1987) 中所述來製備。碳14標記之1-異硫氰氧基苯甲基-3-甲基二仲乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸與抗體結合之例示性螯合劑。參見 WO 94/11026。連接子可為利於在細胞中釋放細胞毒性藥物之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定性連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定性連接子、二甲基連接子或含二硫基連接子 (Chari 等人，*Cancer Research* 52:127-131 (1992)；美國專利第 5,208,020 號)。

本發明之化合物明確涵蓋(但不限於)用如下交聯劑試劑製備之 ADC：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺酸基-EMCS、磺酸基-GMBS、磺酸基-KMUS、磺酸基-MBS、磺酸基-SIAB、磺酸基-SMCC 及磺酸基-SMPB 及 SVSB(丁二醯亞胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)，該等交聯劑試劑為可購得的(例如購自 Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。參見 2003-

2004 Applications Handbook and Catalog第467-498頁。

或者，可例如藉由重組技術或肽合成製造包含抗TAT抗體及細胞毒性劑之融合蛋白質。DNA之長度可包含編碼結合物之兩個部分的各別區，該等區可彼此相鄰或由編碼不破壞結合物所需特性之連接子肽之區分開。

在另一實施例中，抗體可與用於預靶向腫瘤中之「受體」(諸如抗生蛋白鏈菌素)結合，其中將抗體-受體結合物投與患者，繼之使用清除劑將未結合之結合物自循環系統中移除，且接著投與與細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)結合的「配位體」(例如抗生物素蛋白)。

10. 免疫脂質體

本文所揭示之抗TAT抗體亦可調配為免疫脂質體。「脂質體」為由各種類型之脂質、磷脂及/或適用於傳遞藥物至哺乳動物之界面活性劑組成之小微脂粒。脂質體之組分通常排列為雙層形式，類似於生物膜之脂質排列。含有抗體之脂質體由此項技術熟知之方法製備，諸如以下文獻中所述：Epstein等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)；Hwang等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)；美國專利第4,485,045號及第4,544,545號；及1997年10月23日公開之WO 97/38731。循環時間增長之脂質體揭示於美國專利第5,013,556號中。

尤其適用之脂質體可藉由用包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及PEG衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)之脂質組合物以逆相蒸發法來產生。脂質體經具有界定孔徑之過濾器擠出以產生

具有所需直徑之脂質體。本發明抗體之Fab'片段可經由二硫基交換反應而結合於如Martin等人，J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)所述之脂質體。該脂質體中視情況含有化學治療劑。參見Gabizon等人，J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)。

B. TAT結合寡肽

本發明TAT結合寡肽為結合、較佳特異性結合本文所揭示之TAT多肽之寡肽。TAT結合寡肽可使用已知寡肽合成方法化學合成或可使用重組技術製備及純化。TAT結合寡肽之長度通常為至少約5個胺基酸，或者長度為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100個胺基酸或更多，其中該等寡肽能夠結合、較佳特異性結合本文所述之TAT多肽。可使用熟知技術，在無過度實驗下鑑別TAT結合寡肽。就此而論，應注意，此項技術中熟知篩選寡肽庫獲得能夠特異性結合多肽標靶之寡肽之技術(參見例如美國專利第5,556,762號、第5,750,373號、第4,708,871號、第4,833,092號、第5,223,409號、第5,403,484號、第

5,571,689號、第5,663,143號；PCT公開案第WO 84/03506號及第WO 84/03564號；Geysen等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等人，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等人，Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等人，J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等人，J. Immunol., 140:611-616 (1988)；Cwirla, S. E.等人，(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378；Lowman, H.B.等人，(1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson, T.等人，(1991) Nature, 352: 624；Marks, J. D.等人，(1991), J. Mol. Biol., 222:581；Kang, A.S.等人，(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363；及Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。

就此而論，細菌噬菌體(噬菌體)呈現為一種熟知的技術，其允許篩選大寡肽庫來鑑別彼等庫之能夠特異性結合多肽標靶之成員。噬菌體呈現為一種於細菌噬菌體粒子表面上呈現變異體多肽為融合於鞘蛋白之融合蛋白質的技術(Scott, J.K.及Smith, G. P. (1990) Science 249: 386)。噬菌體呈現之效用在於以下事實：可針對彼等與標靶分子以高親和力結合之序列將選擇性隨機化蛋白質變異體(或隨機選殖之cDNA)之大庫快速且有效地分類。肽(Cwirla, S. E.等人，(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378)或蛋白質(Lowman, H.B.等人，(1991) Biochemistry, 30:10832；Clackson, T.等人，(1991) Nature, 352: 624；Marks, J. D.

等人，(1991), J. Mol. Biol., 222:581；Kang, A.S.等人，(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363)庫之噬菌體呈現已用於篩選數百萬多肽或寡肽以獲得具有特異性結合特性的多肽或寡肽 (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。分選隨機突變體之噬菌體庫需要一種構築及繁殖大量變異體之策略、一種使用標靶受體之親和純化程序、及一種評估結合富集結果之方法。美國專利第 5,223,409 號、第 5,403,484 號、第 5,571,689 號及第 5,663,143 號。

雖然大多數噬菌體呈現方法已使用絲狀噬菌體，但亦已知 λ 形噬菌體呈現系統(WO 95/34683; U.S. 5,627,024)、T4噬菌體呈現系統(Ren等人，Gene, 215: 439 (1998)；Zhu等人，Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998)；Jiang等人，Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997)；Ren等人，Gene, 195(2):303-311 (1997)；Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996)；Efimov等人，Virus Genes, 10: 173 (1995))及T7噬菌體呈現系統(Smith及Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993)；U.S. 5,766,905)。

現已開發基本噬菌體呈現概念之許多其他改進及變化。該等改進增強呈現系統就結合所選標靶分子篩選肽庫及呈現具有就所需特性篩選該等蛋白質之潛能的功能蛋白質的能力。已開發用於噬菌體呈現反應之組合反應裝置(WO 98/14277)，且已使用噬菌體呈現庫分析及控制雙分子相互作用(WO 98/20169；WO 98/20159)及限制螺旋肽之性質

(WO 98/20036)。WO 97/35196描述一種分離親和力配位體之方法，在該方法中，噬菌體呈現庫與配位體將結合標靶分子之一種溶液及親和力配位體不結合標靶分子之第二溶液接觸以選擇性分離結合配位體。WO 97/46251描述一種用親和力純化抗體生物淘選隨機噬菌體呈現庫且隨後分離結合噬菌體，接著為使用微板孔分離高親和力結合噬菌體之微淘選過程的方法。亦已報導使用金黃色葡萄球菌蛋白質A作為親和標籤(Li等人，(1998) Mol Biotech., 9:187)。WO 97/47314描述受質減去庫藉由使用可為噬菌體呈現庫之組合庫區分酶特異性之用途。使用噬菌體呈現選擇適合用於清潔劑中之酶之方法描述於WO 97/09446中。選擇特異性結合蛋白質之其他方法描述於美國專利第5,498,538號、第5,432,018號及WO 98/15833中。

產生肽庫及篩選該等庫之方法亦揭示於美國專利第5,723,286號、第5,432,018號、第5,580,717號、第5,427,908號、第5,498,530號、第5,770,434號、第5,734,018號、第5,698,426號、第5,763,192號及第5,723,323號中。

C. TAT結合有機分子

TAT結合有機分子為除如本文所定義結合、較佳特異性結合本文所述之TAT多肽之寡肽或抗體以外的有機分子。可使用已知方法學鑑別及化學合成TAT結合有機分子(參見例如PCT公開案第WO 00/00823號及第WO 00/39585號)。TAT結合有機分子之大小通常小於約2000道爾頓，或者小

於約1500、750、500、250或200道爾頓，其中該等能夠結合、較佳特異性結合本文所述之TAT多肽之有機分子使用熟知技術不經過度實驗即可鑑別。就此點而言，應注意此項技術中熟知篩選能夠結合多肽標靶之分子之有機分子庫的技術(參見例如PCT公開案第WO 00/00823號及第WO 00/39585號)。TAT結合有機分子可為例如醛類、酮類、肟類、胺類、半卡巴胺、卡肟、一級胺、二級胺、三級胺、N-取代肟、肟胺類、醇類、醚類、硫醇類、硫醚、二硫化物、羧酸、酯類、肟胺類、脲類、胺基甲酸酯、碳酸酯、縮酮、酮縮硫醇、縮醛、硫縮醛、芳基鹵、芳基磺酸酯、鹵烷、烷基磺酸酯、芳族化合物、雜環化合物、苯胺、烯類、炔類、二醇類、胺基醇、噁唑烷、噁唑啉、噻唑啉、噻唑啉、烯胺、磺肟胺、環氧化物、氮丙啶、異氰酸酯、磺肟氣、重氮化合物、酸氯化物或其類似物。

D. 篩選具有所需特性之抗TAT抗體、TAT結合寡肽及TAT結合有機分子

上文已描述產生結合TAT多肽之抗體、寡肽及有機分子之技術。需要時，可進一步選擇具有某些生物特徵之抗體、寡肽或其他有機分子。

本發明之抗TAT抗體、寡肽或其他有機分子的生長抑制作用可藉由此項技術中已知之方法，例如使用內源表現TAT多肽或在轉染有TAT基因之後表現TAT多肽的細胞評估。舉例而言，可用各種濃度之本發明抗TAT單株抗體、寡肽或其他有機分子處理適當腫瘤細胞株及轉染有TAT之

細胞數天(例如2-7天)，且用結晶紫或MTT染色或由某另一比色檢測分析。量測增殖之另一方法將為藉由比較在有或無本發明之抗TAT抗體、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子存在時所處理細胞之³H-胸苷吸收。處理之後，收集細胞且在閃爍計數器中定量併入DNA中之放射活性之量。適當陽性對照組包括用已知抑制所選細胞株生長之生長抑制性抗體處理該細胞株。活體內腫瘤細胞之生長抑制可以此項技術中已知之多種方式測定。腫瘤細胞較佳為過度表現TAT多肽之細胞。較佳地，在一個實施例中，在約0.5至30 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下，相較於未處理腫瘤細胞，抗TAT抗體、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子將活體外或活體內抑制表現TAT之腫瘤細胞的細胞增殖達約25-100%，更佳約30-100%，且甚至更佳約50-100%或70-100%。可在細胞培養物中在約0.5至30 $\mu\text{g/ml}$ 或約0.5 nM至200 nM之抗體濃度下量測生長抑制，其中生長抑制在腫瘤細胞暴露於抗體後1-10天測定。若投與每公斤體重約1 μg 至每公斤體重約100 mg抗TAT抗體，在首次投與抗體後約5天至3個月內、較佳約5天至30天內，使腫瘤大小減小或腫瘤細胞增殖減少，則該抗體在活體內具有生長抑制性。

為選擇誘發細胞死亡之抗TAT抗體、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子，可相對於對照組評估如例如碘化丙錠(PI)、錐蟲藍或7AAD吸收所指示之膜完整性損失。PI吸收檢測可在無補體及免疫效應細胞的情況下執行。與單獨培養基或含有適當抗TAT抗體(例如約10 $\mu\text{g/ml}$)、TAT結合寡

肽或TAT結合有機分子之培養基一起培育表現TAT多肽之腫瘤細胞。將細胞培育3天的時間。每次處理之後，洗滌細胞且等分於35 mm過濾器封端之12×75管中(每管1 ml，每處理組3管)以移除細胞團塊。隨後管接收PI(10 µg/ml)。可使用FACSCAN®流式細胞儀及FACSCONVERT® CellQuest軟體(Becton Dickinson)分析樣品。可選擇如PI吸收所測定誘發統計上顯著程度之細胞死亡之彼等抗TAT抗體、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子作為誘發細胞死亡之抗TAT抗體、TAT結合寡肽或TAT結合有機分子。

為篩選結合於相關抗體所結合的TAT多肽上之抗原決定基的抗體、寡肽或其他有機分子，可執行常規交叉阻斷檢測，諸如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及David Lane編(1988)中所述之檢測。該檢測可用於判定測試抗體、寡肽或其他有機分子是否與已知抗TAT抗體結合相同位點或抗原決定基。或者或另外，可藉由此項技術中已知之方法執行抗原決定基定位。舉例而言，可諸如藉由丙胺酸掃描使抗體序列突變誘發以鑑別接觸殘基。最初測試突變抗體與多株抗體之結合以確保合適摺疊。在另一方法中，可在與測試抗體或與測試抗體及具有已表徵或已知抗原決定基之抗體的競爭檢測中使用對應於TAT多肽之不同區的肽。

E. 抗體依賴性酶介導之前藥療法(ADEPT)

本發明之抗體亦可藉由使抗體結合於將前藥(例如肽基化學治療劑，參見WO 81/01145)轉化為活性抗癌藥之前藥

活化酶而用於ADEPT中。參見例如WO 88/07378及美國專利第4,975,278號。

免疫結合物中適用於ADEPT之酶組分包括能夠以一定方式作用於前藥以使其轉化為其更具活性之細胞毒性形式的任何酶。

適用於本發明方法之酶包括(但不限於)鹼性磷酸酶，其適用於將含磷酸酯前藥轉化為游離藥物；芳基硫酸酯酶，其適用於將含硫酸酯前藥轉化為游離藥物；胞嘧啶去胺酶，其適用於將無毒5-氟胞嘧啶轉化為抗癌藥5-氟尿嘧啶；蛋白酶，諸如沙雷氏菌蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶、羧基肽酶及組織蛋白酶(諸如組織蛋白酶B及L)，其適用於將含肽前藥轉化為游離藥物；D-丙胺鹽基羧基肽酶，其適用於轉化含有D-胺基酸取代基之前藥；碳水化合物裂解酶，諸如 β -半乳糖苷酶及神經胺糖酸苷酶，其適用於將糖基化前藥轉化為游離藥物； β -內鹽胺酶，其適用於將用 β -內鹽胺衍生之藥物轉化為游離藥物；及青黴素鹽胺酶，諸如青黴素V鹽胺酶或青黴素G鹽胺酶，其適用於將胺氮分別經苯氧基乙鹽基或苯基乙鹽基衍生之藥物轉化為游離藥物。或者，可使用具有酶促活性之抗體(在此項技術中亦稱作「抗體酶」)將本發明之前藥轉化為游離活性藥物(參見例如Massey, Nature 328:457-458 (1987))。抗體-抗體酶結合物可如本文所述製備以將抗體酶傳遞至腫瘤細胞群。

本發明之酶可藉由此項技術中熟知之技術(諸如使用上

述雜雙官能交聯試劑)共價結合於抗TAT抗體。或者，可使用此項技術中熟知之重組DNA技術(參見例如Neuberger等人，Nature 312:604-608 (1984))構築包含本發明抗體之至少抗原結合區連接於本發明酶之至少一個功能活性部分的融合蛋白質。

F. 全長TAT多肽

本發明亦提供新鑑別及分離之編碼本申請案中稱為TAT多肽之多肽之核苷酸序列。詳言之，已鑑別及分離編碼各種TAT多肽之cDNA(部分及全長)，如下文實例中更詳細地揭示。

如下文實例中所揭示，各種cDNA純系已寄存於ATCC。彼等純系之實際核苷酸序列可由熟習此項技術者藉由使用此項技術中之常規方法測定寄存之純系的序列容易地確定。預測胺基酸序列可使用常規技術自該核苷酸序列確定。對於本文所述之TAT多肽及編碼核酸，在一些情況下，申請者已鑑別出咸信為可用此時可用之序列資訊最佳鑑別之閱讀架構者。

G. 抗TAT抗體及TAT多肽變異體

除本文所述之抗TAT抗體及全長天然序列TAT多肽以外，亦涵蓋抗TAT抗體及TAT多肽變異體可經製備。抗TAT抗體及TAT多肽變異體可藉由將適當核苷酸變化引入編碼DNA中及/或藉由合成所需抗體或多肽來製備。熟習此項技術者應瞭解，胺基酸變化可改變抗TAT抗體或TAT多肽之轉譯後加工，諸如改變糖基化位點之數目或位置或改變

膜錨定特徵。

舉例而言，可使用任何例如美國專利第5,364,934號中所述之用於保守及非保守突變之技術及指南製備本文所述之抗TAT抗體及TAT多肽之變化。變化可為取代、缺失或插入一或多個編碼抗體或多肽之密碼子，該等變化使得抗體或多肽相較於天然序列抗體或多肽，胺基酸序列發生變化。變化視情況為在抗TAT抗體或TAT多肽之一或多個域中用任何其他胺基酸取代至少一個胺基酸。可藉由比較抗TAT抗體或TAT多肽之序列與同源已知蛋白分子之序列且使高同源性區中所產生之胺基酸序列變化數減至最小而發現確定可插入、取代或缺失何種胺基酸殘基而不會不利地影響所需活性的規則。胺基酸取代可為用另一具有類似結構及/或化學特性之胺基酸置換一個胺基酸(諸如用絲胺酸置換白胺酸，亦即保守胺基酸置換)的結果。插入或缺失可視情況在約1至5個胺基酸範圍內。允許之變化可藉由以下確定：系統地在序列中插入、缺失或取代胺基酸，及測試所得變異體之由全長或成熟天然序列所展現之活性。

本文提供抗TAT抗體及TAT多肽片段。該等片段例如當與全長天然抗體或蛋白質比較時可在N末端或C末端處截短或可缺失內部殘基。某些片段缺乏對抗TAT抗體或TAT多肽之所需生物活性並非必需的胺基酸殘基。

抗TAT抗體及TAT多肽片段可由若干習知技術中之任一種來製備。所需肽片段可化學合成。替代性方法涉及藉由酶促消化產生抗體或多肽片段，例如藉由用已知在由特定

胺基酸殘基界定之位點處裂解蛋白質的酶處理蛋白質，或藉由用適合之限制酶消化DNA及分離所需片段。另一適合之技術涉及分離編碼所需抗體或多肽片段之DNA片段且藉由聚合酶鏈反應(PCR)擴增。在PCR中在5'及3'引子處採用界定DNA片段之所需末端的寡核苷酸。抗TAT抗體及TAT多肽片段較佳與本文所揭示之天然抗TAT抗體或TAT多肽共享至少一種生物及/或免疫活性。

在特定實施例中，相關之保守性取代以表頭較佳取代展示於表6中。若該等取代引起生物活性變化，則可引入更多實質性變化(表1中稱作例示性取代，或如下文參考胺基酸類別進一步描述)，且篩選產物。

表 1

初始示例		較佳
殘基取代		取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp ; Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Pro ; Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg

Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; Leu	正白胺酸
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

可藉由選擇取代基來實質上改變抗TAT抗體之功能或免疫學一致性，該等取代基在其對維持以下之作用方面顯著不同：a)取代區中多肽骨架之結構(例如呈薄片或螺旋構形)，(b)標靶位點處分子的電荷或疏水性，或(c)側鏈之大小。可基於共同側鏈特性將天然存在之殘基分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈取向的殘基：Gly、Pro；及

(6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代將需要將此等類別中之一者之成員換成另一類別。亦可將該等經取代之殘基引入保守性取代位點中或更佳引入其餘(非保守性)位點中。

該等變化可使用此項技術中已知之方法(諸如寡核苷酸介導之(定點)突變誘發、丙胺酸掃描及PCR突變誘發)進行。可對選殖之DNA進行定點突變誘發[Carter等人, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller等人, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)]、序列盒突變誘發[Wells等人, Gene, 34:315 (1985)]、限制選擇突變誘發[Wells等人, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)]或其他已知技術來製造抗TAT抗體或TAT多肽變異體DNA。

亦可採用掃描胺基酸分析沿相鄰序列鑑別一或多個胺基酸。較佳掃描胺基酸為相對較小中性胺基酸。該等胺基酸包括丙胺酸、甘胺酸、絲胺酸及半胱胺酸。在此群中，丙胺酸通常為較佳掃描胺基酸，因為其去除 β -碳上之側鏈且不太可能改變變異體之主鏈構形[Cunningham及Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]。丙胺酸通常亦較佳，因為其為最常見胺基酸。此外，其通常存在於埋藏及暴露位置中[Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]。若丙胺酸取代未能產生足量變異體，則可使用電子等排胺基酸。

一般亦可用絲胺酸取代任何與維持抗TAT抗體或TAT多肽之合適構形無關的半胱胺酸殘基以改良分子之氧化穩定

性及防止異常交聯。相反地，可將半胱胺酸鍵添加至抗TAT抗體或TAT多肽中以改良其穩定性(尤其當抗體為諸如Fv片段之抗體片段時)。

尤其較佳之取代變異體類型涉及取代親本抗體(例如人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選擇用於進一步研究之所得變異體應相對於產生其之親本抗體具有經改良之生物特性。產生該等取代變異體之適宜方法涉及使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡言之，使數個高變區位點(例如6-7個位點)突變以於各位點處產生所有可能之胺基取代。所產生之抗體變異體以單價方式以融合至封裝於各顆粒中之M13之基因III產物的融合物形式自絲狀噬菌體顆粒呈現。隨後如本文所揭示針對生物活性(例如結合親和力)篩選噬菌體呈現變異體。為鑑別用於修飾之候選高變區位點，可進行丙胺酸掃描突變誘發以鑑別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。或者或另外，分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與人類TAT多肽之間的接觸點可為有益的。該等接觸殘基及鄰近殘基為用於根據本文中詳述之技術取代的候選物。在產生此等變異體後，如本文所述對變異體組合進行篩選，且可在一或多個相關檢測中選擇具有優良特性之抗體用於進一步研究。

編碼抗TAT抗體之胺基酸序列變異體之核酸分子係由此項技術已知之多種方法製備。該等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在之胺基酸序列變異體之情況下)，或由早期製備之抗TAT抗體之變異體或非變異體形式

的寡核苷酸介導(或定點)突變誘發、PCR突變誘發及序列盒突變誘發製備。

H. 修飾抗TAT抗體及TAT多肽

本發明之範圍內包括共價修飾抗TAT抗體及TAT多肽。一種類型之共價修飾包括使抗TAT抗體或TAT多肽之靶向胺基酸殘基與有機衍生劑反應，該有機衍生劑能夠與抗TAT抗體或TAT多肽之所選側鏈或N末端或C末端殘基反應。用雙官能劑衍生適用於例如使抗TAT抗體或TAT多肽交聯於水不溶性支撐基質或表面以用於純化抗TAT抗體之方法，且反之亦然。常用交聯劑包括例如1,1-雙(重氮基乙醯基)-2-苯基乙烷；戊二醛；N-羥基丁二醯亞胺酯，例如與4-疊氮基水楊酸形成之酯；同雙官能醯亞胺酯，包括二丁二醯亞胺酯，諸如3,3'-二硫基雙(丙酸丁二醯亞胺酯)；雙官能順丁烯二醯亞胺，諸如雙-N-順丁烯二醯亞胺基-1,8-辛烷；及諸如甲基-3-[(對疊氮基苯基)二硫基]丙醯亞胺酯之試劑。

其他修飾包括分別將麩醯胺醯基及天冬醯胺醯基殘基去醯胺化為相應麩胺醯基及天冬胺醯基，使脯胺酸及離胺酸羥基化，使絲胺醯基或蘇胺醯基殘基之羥基磷酸化，使離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之 α -胺基甲基化 [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86頁(1983)]，使N末端胺乙醯化及使任何C末端羧基醯胺化。

本發明之範疇內所包括之抗TAT抗體或TAT多肽之另一

類共價修飾包含改變抗體或多肽之天然糖基化模式。出於本文之目的，「改變天然糖基化模式」意欲意謂缺失天然序列抗TAT抗體或TAT多肽中所存在之一或多個碳水化合物部分(藉由移除潛在糖基化位點或藉由化學及/或酶促方式缺失糖基化)及/或添加一或多個天然序列抗TAT抗體或TAT多肽中不存在之糖基化位點。另外，該片語包括天然蛋白質之糖基化的性質變化(qualitative change)，涉及所存在之各種碳水化合物部分之性質及比例變化。

抗體及其他多肽之糖基化通常N連接型或O連接型。N連接型係指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基之側鏈連接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈酶促連接的識別序列。因此，多肽中任一此等三肽序列之存在產生潛在糖基化位點。O連接型糖基化係指糖N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖中之一者連接至羥基胺基酸，最常見為絲胺酸或蘇胺酸，不過亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

宜藉由改變胺基酸序列以使其含有上述三肽序列中之一或多者向抗TAT抗體或TAT多肽中添加糖基化位點(對於N連接型糖基化位點而言)。亦可藉由將一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至原始抗TAT抗體或TAT多肽之序列中或用該一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代原始抗TAT抗體或TAT多肽之序列來進行改變(對於O連接型糖基化位點而言)。抗TAT抗體或TAT多肽胺基酸序列可視情況經由DNA

層面之變化而改變，尤其藉由使編碼抗TAT抗體或TAT多肽之DNA在預選鹼基處突變以便產生轉譯為所需胺基酸之密碼子。

增加抗TAT抗體或TAT多肽上之碳水化合物部分數目之另一方式係藉由使醣苷化學或酶促偶合於多肽。該等方法描述於此項技術中，例如於1987年9月11日公開之WO 87/05330；及Aplin及Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 第259-306頁(1981)中。

可以化學或酶促方式或藉由突變取代編碼充當糖基化標靶之胺基酸殘基的密碼子來移除抗TAT抗體或TAT多肽上所存在之碳水化合物部分。化學去糖基化技術為此項技術中所知，且描述於例如Hakimuddin等人，Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987)及Edge等人，Anal. Biochem., 118:131 (1981)中。可藉由使用多種如Thotakura等人，Meth. Enzymol., 138:350 (1987)所述之內切及外切醣苷酶酶促裂解多肽上之碳水化合物部分。

抗TAT抗體或TAT多肽之另一類共價修飾包含使抗體或多肽以美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號或第4,179,337號中所述之方式連接於多種非蛋白性聚合物(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧伸烷基)中之一種。抗體或多肽亦可包埋於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合製備之微膠囊(分別例如羥甲基纖維素微膠囊或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中；包埋於膠態藥物傳遞

系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中；或包埋於巨乳液中。該等技術揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A. 編，(1980)中。

本發明之抗TAT抗體或TAT多肽亦可以某種方式修飾以形成包含抗TAT抗體或TAT多肽融合於另一異源多肽或胺基酸序列之嵌合分子。

在一個實施例中，該嵌合分子包含抗TAT抗體或TAT多肽與標籤多肽之融合物，該標籤多肽提供抗標籤抗體可選擇性結合之抗原決定基。抗原決定基標籤一般置於抗TAT抗體或TAT多肽之胺基或羧基末端。可使用針對標籤多肽之抗體偵測抗TAT抗體或TAT多肽之該等抗原決定基標記之形式的存在。提供抗原決定基標籤亦使得抗TAT抗體或TAT多肽能夠容易地藉由親和力純化使用抗標籤抗體或結合抗原決定基標籤之另一類親和力基質純化。各種標記多肽及其各自抗體為此項技術所熟知。實例包括聚組胺酸(poly-his)或聚-組胺酸-甘胺酸(poly-his-gly)標籤；flu HA標籤多肽及其抗體12CA5[Field等人，Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]；c-myc標籤及其8F9、3C7、6E10、G4、B7及9E10抗體[Evan等人，Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]；及單純性疱疹病毒糖蛋白D(gD)標籤及其抗體[Paborsky等人，Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]。其他標籤多肽包括Flag-肽[Hopp等人，BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]；KT3抗原決定基

肽 [Martin 等人, *Science*, 255:192-194 (1992)] ; α -微管蛋白抗原決定基肽 [Skinner 等人, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)] ; 及 T7 基因 10 蛋白質肽標籤 [Lutz-Freyermuth 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)]。

在一替代性實施例中，嵌合分子可包含抗 TAT 抗體或 TAT 多肽與免疫球蛋白或免疫球蛋白之特定區之融合物。對於嵌合分子之二價形式(亦稱為「免疫黏附素」)，該融合可為 IgG 分子之 Fc 區。Ig 融合物較佳包括以可溶性(跨膜域缺失或失活)形式之抗 TAT 抗體或 TAT 多肽取代 Ig 分子中之至少一個可變區。在一尤佳實施例中，免疫球蛋白融合物包括 IgG1 分子之鉸鏈區、CH2 及 CH3 區或鉸鏈區、CH1、CH2 及 CH3 區。關於免疫球蛋白融合物之產生，亦參見 1995 年 6 月 27 日頒佈之美國專利第 5,428,130 號。

I. 製備抗 TAT 抗體及 TAT 多肽

下文描述主要關於藉由培養經含有編碼抗 TAT 抗體及 TAT 多肽之核酸之載體轉型或轉染的細胞來製造抗 TAT 抗體及 TAT 多肽。當然，預期此項技術中所熟知之替代性方法可用於製備抗 TAT 抗體及 TAT 多肽。舉例而言，適當胺基酸序列或其部分可藉由使用固相技術直接肽合成來產生 [參見例如 Stewart 等人, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969) ; Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]。可使用手動技術或藉由自動化活體外進行蛋白質合成。可例如使用

Applied Biosystems肽合成儀(Foster City, CA)使用製造商之說明書自動化合成。抗TAT抗體或TAT多肽之各部分可分開化學合成且使用化學或酶促方法組合以產生所需抗TAT抗體或TAT多肽。

1. 分離編碼抗TAT抗體或TAT多肽之DNA

編碼抗TAT抗體或TAT多肽之DNA可自咸信具有抗TAT抗體或TAT多肽 mRNA且以可偵測含量表現該抗TAT抗體或TAT多肽 mRNA之組織製備之cDNA庫獲得。因此，人類抗TAT抗體或TAT多肽DNA宜自由人類組織製備之cDNA庫獲得。編碼抗TAT抗體或TAT多肽之基因亦可自基因組庫獲得或藉由已知合成程序(例如自動化核酸合成)獲得。

庫可用經設計以鑑別相關基因或該基因所編碼之蛋白質的探針(諸如具有至少約20-80個鹼基之寡核苷酸)篩選。可使用諸如 Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述之標準程序以所選探針篩選cDNA或染色體組庫。分離編碼抗TAT抗體或TAT多肽之基因的替代方式為使用PCR方法[Sambrook 等人，同上；Dieffenbach 等人，PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

篩選cDNA庫之技術為此項技術所熟知。選擇作為探針之寡核苷酸序列應具有足夠長度且足夠明確以使假陽性(false positives)減至最低。寡核苷酸較佳經標記以便其可在雜交於所篩選之庫中之DNA之後可偵測。標記方法為此

項技術所熟知，且包括使用放射性標記，如經 ^{32}P 標記之ATP、生物素化或酶標記。Sambrook等人，同上中提供雜交條件，包括中嚴格度及高嚴格度。

該等庫篩選方法所鑑別出之序列可與寄存於及獲自公用資料庫(諸如GenBank)或其他私人序列資料庫的其他已知序列比較及比對。可使用此項技術中已知及本文所述之方法測定分子限定區內或整個全長序列之序列一致性(胺基酸或核苷酸層面)。

可藉由篩選所選cDNA或基因組庫，使用本文首次揭示之推斷胺基酸序列，且必要時，使用如Sambrook等人，同上所述之習知引子延伸程序以偵測可能不能逆轉錄為cDNA之mRNA的前驅物及加工中間物來獲得具有蛋白質編碼序列之核酸。

2. 宿主細胞之選擇及轉型

以本文中關於抗TAT抗體或TAT多肽產生所述之表現或選殖載體轉染或轉型宿主細胞，且在酌情改良之習知營養培養基中培養以誘導啟動子、選擇轉型體或擴增編碼所需序列之基因。諸如培養基、溫度、pH值及其類似條件之培養條件可由熟習此項技術者在不進行過度實驗下選擇。一般而言，使細胞培養物之生產力最大的原理、方案及實用技術可見於Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編(IRL Press, 1991)及Sambrook等人，同上中。

真核細胞轉染及原核細胞轉型之方法為一般技術者所

知，例如 CaCl_2 、 CaPO_4 、脂質體介導及電穿孔。視所用宿主細胞而定，使用適於該等細胞之標準技術來轉型。採用氯化鈣之鈣處理(如 Sambrook 等人，同上所述)或電穿孔法一般用於原核生物。使用以根癌土壤桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感染進行某些植物細胞之轉型，如 Shaw 等人，Gene, 23:315 (1983)及1989年6月29日公開之 WO 89/05859 所述。對於無該等細胞壁之哺乳動物細胞，可採用 Graham 及 van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)之磷酸鈣沈澱法。哺乳動物細胞宿主系統轉染之通用態樣已描述於美國專利第 4,399,216 號中。通常根據 Van Solingen 等人，J. Bact., 130:946 (1977)及 Hsiao 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)之方法轉型於酵母中。然而，亦可使用將 DNA 引入細胞中之其他方法，諸如藉由核微注射、電穿孔法、使細菌原生質體與完整細胞融合、或聚陽離子(例如，凝聚胺(polybrene)、聚鳥氨酸(polyornithine))。關於用於轉型哺乳動物細胞之各種技術，參見 Keown 等人，Methods in Enzymology, 185:527-537(1990)及 Mansour 等人，Nature, 336:348-352 (1988)。

適用於選殖或表現本文載體中 DNA 的宿主細胞包括原核生物、酵母或高級真核生物細胞。適合之原核生物包括(但不限於)真細菌，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)或革蘭氏陽性(Gram-positive)生物體，例如腸內菌科(Enterobacteriaceae)，諸如大腸桿菌(*E. coli*)。各種大腸桿菌菌株可公開獲得，諸如大腸桿菌 K12 菌株 MM294(ATCC

31,446)；大腸桿菌 X1776(ATCC 31,537)；大腸桿菌菌株 W3110(ATCC 27,325)及 K5 772(ATCC 53,635)。其他適合之原核宿主細胞包括腸內菌科，諸如埃希氏菌 (*Escherichia*)，例如大腸桿菌，腸桿菌 (*Enterobacter*)，歐文氏菌 (*Erwinia*)，克雷伯氏菌 (*Klebsiella*)，變形桿菌 (*Proteus*)；沙氏桿菌 (*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*)；沙雷氏菌 (*Serratia*)，例如黏質沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)及志賀氏菌 (*Shigella*)；以及芽胞桿菌 (*Bacilli*)，諸如枯草芽胞桿菌 (*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis*) (例如，1989年4月12日公開之 DD 266,710 中所揭示之地衣芽孢桿菌 41P)；假單胞菌 (*Pseudomonas*)，諸如綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*)；及鏈黴菌 (*Streptomyces*)。此等實例為例示性的而非限制性的。菌株 W3110為一種尤佳宿主或親本宿主，因為其為重組 DNA 產物發酵之常用宿主菌株。宿主細胞較佳分泌極少量之蛋白水解酶。舉例而言，菌株 W3110可經改良以在編碼宿主內源性蛋白質之基因中實現遺傳突變，該等宿主之實例包括大腸桿菌 W3110菌株 1A2，其具有完整基因型 *tonA*；大腸桿菌 W3110菌株 9E4，其具有完整基因型 *tonA ptr3*；大腸桿菌 W3110菌株 27C7(ATCC 55,244)，其具有完整基因型 *tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT kanr*；大腸桿菌 W3110菌株 37D6，其具有完整基因型 *tonA ptr3 phoA E15(argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanr*；大腸桿菌 W3110菌株 40B4，其為具有非卡那黴素 (*non-kanamycin*) 抗

性degP缺失突變之菌株37D6；及1990年8月7日頒佈之美國專利第4,946,783號中揭示之具有突變周質蛋白酶之大腸桿菌菌株。或者，例如PCR或其他核酸聚合酶反應之活體外選殖方法為適合的。

可於細菌中產生全長抗體、抗體片段及抗體融合蛋白質，尤其當不需要糖基化及Fc效應功能時，諸如當治療抗體結合於細胞毒性劑(例如毒素)且免疫結合物自身展示破壞腫瘤細胞之有效性時。全長抗體在循環中具有較大半衰期。在大腸桿菌中產生更快且更具成本效率。關於在細菌中表現抗體片段及多肽，參見例如U.S. 5,648,237(Carter等人)、U.S. 5,789,199(Joly等人)及U.S. 5,840,523(Simmons等人)(其描述轉譯起始區(TIR)及使表現及分泌最佳化之信號序列)，此等專利以引用之方式併入本文中。表現後，可將抗體自大腸桿菌細胞糊狀物可溶部分中分離且可視同型而定經由例如蛋白質A或G管柱純化。可類似於用於純化在例如CHO細胞中表現之抗體的方法來進行最終純化。

除原核生物以外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適合用於編碼抗TAT抗體或TAT多肽之載體之選殖或表現宿主。釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)為常用低級真核宿主微生物。其他包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)(Beach及Nurse, (1981) *Nature*, 290: 140[1981]；1985年5月2日公開之EP 139,383)；刻魯維拉菌(*Kluyveromyces*)宿主(美國專利第4,943,529號；Fleer等人，*Bio/Technology*, 9:968-975(1991))，諸如乳酸刻魯維拉酵

母 (*K. lactis*)(MW98-8C、CBS683、CBS4574；Louvencourt 等人，*J. Bacterid.*, 154(2):737-742[1983])、脆壁克魯維拉酵母 (*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維拉酵母 (*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、魏氏克魯維拉酵母 (*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、沃氏克魯維拉酵母 (*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅克魯維拉酵母 (*K. drosophilum*)(ATCC 36,906；Van den Berg 等人，*Bio/Technology*, 8:135(1990))；耐熱克魯維拉酵母 (*K. thermotolerans*)及馬克斯克魯維拉酵母 (*K. marxianus*)；耶氏酵母 (*Yarrowia*)(EP 402,226)；甲醇酵母 (*Pichia pastoris*)(EP 183,070；Sreekrishna 等人，*J. Basic Microbiol.*, 28:265-278[1988])；假絲酵母 (*Candida*)；里氏木黴 (*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；粗糙脈孢菌 (*Neurospora crassa*)(Case 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263[1979])；許旺酵母 (*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*)(EP 394,538，1990 年 10 月 31 日公開)；及絲狀真菌，諸如脈孢菌 (*Neurospora*)、青黴菌 (*Penicillium*)、彎頸黴菌 (*Tolypocladium*)(WO 91/00357，1991 年 1 月 10 日公開)及曲黴菌 (*Aspergillus*) 宿主，諸如構巢麴黴 (*A. nidulans*) (Ballance 等人，*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289[1983]；Tilburn 等人，*Gene*, 26:205-221[1983]；Yelton 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474[1984])及黑麴黴 (*A. niger*)(Kelly 及 Hynes，*EMBO J.*, 4:475-

479[1985])。嗜甲醇酵母在本文中為適合的且包括(但不限於)能夠在甲醇上生長之選自由以下組成之屬的酵母：漢森酵母(*Hansenula*)、念珠菌、克勒克酵母(*Kloeckera*)、畢赤氏酵母(*Pichia*)、酵母菌(*Saccharomyces*)、球擬酵母(*Torulopsis*)及紅酵母(*Rhodotorula*)。例示此類別酵母之特定物種的清單可見於 C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)中。

適用於表現糖基化抗TAT抗體或TAT多肽之宿主細胞源自多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括昆蟲細胞(諸如果蠅S2及夜蛾Sf9)以及植物細胞(諸如棉花、穀類、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄及菸草之細胞培養物)。已鑑別多種桿狀病毒株及變異體以及來自諸如草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)之宿主的相應許可昆蟲宿主細胞。用於轉染之多種病毒株公開可得，例如苜蓿丫紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV之L-1變異體及家蠶NPV之Bm-5病毒株，且根據本發明該等病毒可用作本文中之病毒，尤其用於轉染草地黏蟲細胞。

然而，脊椎動物細胞最受關注，且脊椎動物細胞於培養物(組織培養物)中之繁殖已成為一種常規程序。適用哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉型之猴腎CV1細胞株(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚腎細胞株(293細胞或經

次選殖以供在懸浮培養物中生長之293細胞，Graham等人，J. Gen Virol. 36:59 (1977))；幼倉鼠腎臟細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO，Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠足細胞(TM4，Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；猴腎臟細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎臟細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人類宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎臟細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；布法羅大鼠肝細胞(buffalo rat liver cell，BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝腫瘤株(Hep G2)。

用上述用於產生抗TAT抗體或TAT多肽之表現或選殖載體轉型宿主細胞，且在酌情改良以誘導啟動子、選擇轉型體或擴增編碼所需序列之基因的習知營養培養基中培養。

3. 可複製載體之選擇及使用

可將編碼抗TAT抗體或TAT多肽之核酸(例如cDNA或染色體組DNA)插入用於選殖(擴增DNA)或用於表現之可複製載體中。可公開獲得各種載體。載體可例如呈質體、黏質體、病毒粒子或噬菌體形式。可藉由多種程序將適當核酸序列插入載體中。一般而言，使用此項技術中已知之技術，將DNA插入適當限制性核酸內切酶位點中。載體組分

一般包括(但不限於)一或多個以下者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列。含有一或多個此等組分之適合載體的構築採用熟習此項技術者已知之標準連接技術。

TAT不僅可直接重組產生，而且可作為與異源多肽之融合多肽產生，該異源多肽可為信號序列或在成熟蛋白質或多肽之N末端具有特異性裂解位點之其他多肽。一般而言，信號序列可為載體之組分，或其可為插入載體中之編碼抗TAT抗體或TAT多肽之DNA的一部分。信號序列可為選自例如鹼性磷酸酶、青黴素酶(penicillinase)、lpp或熱穩定腸毒素II前導序列之群的原核生物信號序列。對於酵母分泌，信號序列可為例如酵母轉化酶前導序列、 α 因子前導序列(包括酵母菌及克魯維拉菌 α 因子前導序列，後者描述於美國專利第5,010,182號中)或酸性磷酸酶前導序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖澱粉酶前導序列(1990年4月4日公開之EP 362,179)或1990年11月15日公開之WO 90/13646中所述之信號。在哺乳動物細胞表現中，可使用哺乳動物信號序列直接分泌蛋白質，諸如來自相同或相關物種之分泌多肽的信號序列以及病毒分泌前導序列。

表現與選殖載體均含有使載體能夠在一或多種所選宿主細胞中複製的核酸序列。熟知用於多種細菌、酵母及病毒之該等序列。來自質體pBR322之複製起點適於大部分革蘭氏陰性細菌(Gram-negative bacteria)，2 μ 質體起點適於酵母，且各種病毒起點(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV

或BPV)適用於於哺乳動物細胞中選殖載體。

表現及選殖載體通常將含有選擇基因，亦稱作可選標記物。典型選擇基因編碼以下蛋白質：(a)賦予抗抗生素或其他毒素(例如安比西林(ampicillin)、新黴素(neomycin)、甲胺喋呤(methotrexate)或四環素(tetracycline))性，(b)補充營養缺陷缺乏，或(c)供應不可自複雜培養基中得到之關鍵營養，例如供給桿菌編碼D-丙胺酸消旋酶之基因。

哺乳動物細胞之適合之可選標記物的實例為使得能夠鑑別勝任吸收抗TAT抗體或TAT多肽編碼核酸之細胞的標記物，諸如DHFR或胸苷激酶。當採用野生型DHFR時，適當宿主細胞為缺乏DHFR活性之CHO細胞株，其如Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980)所述製備及繁殖。適用於酵母之選擇基因為存在於酵母質體YRp7中的trp1基因[Stinchcomb等人，Nature, 282:39 (1979)；Kingsman等人，Gene, 7:141 (1979)；Tschemper等人，Gene, 10:157 (1980)]。trp1基因提供用於在色胺酸中缺乏生長能力的酵母突變株(例如ATCC編號44076或PEP4-1)之選擇標記物[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

表現及選殖載體通常含有可操作地連接於編碼抗TAT抗體或TAT多肽之核酸序列的啟動子以引導mRNA合成。熟知由多種潛在宿主細胞識別之啟動子。適用於原核宿主之啟動子包括 β -內醯胺酶及乳糖啟動子系統[Chang等人，Nature, 275:615 (1978)；Goeddel等人，Nature, 281:544 (1979)]、鹼性磷酸酶、色胺酸(trp)啟動子系統[Goeddel,

Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980) ; EP 36,776]及雜交啟動子，諸如 tac 啟動子 [deBoer 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]。用於細菌系統之啟動子亦應含有可操作地連接於編碼抗 TAT 抗體或 TAT 多肽之 DNA 的 莎林-達卡諾 (Shine-Dalgarno, S.D.) 序列。

適用於酵母宿主之啟動序列之實例包括用於 3-磷酸甘油酸激酶 [Hitzeman 等人，J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 或以下之其他糖酵解酶 [Hess 等人，J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968) ; Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)] 的啟動子：諸如 烯醇酶、甘油醛-3-磷酸去氫酶、己糖激酶、丙酮酸去羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸變位酶 (mutase)、丙酮酸激酶、磷酸丙糖異構酶、磷酸葡萄糖異構酶及葡糖激酶。

具有轉錄受生長條件控制之其他優點之誘導型啟動子的其他酵母啟動子為用於以下之啟動子區：醇去氫酶 2、異細胞色素 C、酸性磷酸酶、與氮代謝相關之降解酶、金屬硫蛋白、甘油醛-3-磷酸去氫酶及負責麥芽糖及半乳糖利用之酶。適用於酵母表現之載體及啟動子進一步描述於 EP 73,657 中。

在哺乳動物宿主細胞中自載體轉錄抗 TAT 抗體或 TAT 多肽例如由獲自以下之啟動子控制：病毒 (諸如多瘤病毒、禽痘病毒 (1989 年 7 月 5 日公開之 UK 2,211,504)、腺病毒 (諸如腺病毒 2)、牛乳突狀瘤病毒、禽類肉瘤病毒、巨細胞病毒、反轉錄病毒、B 型肝炎病毒及猿猴病毒 40 (SV40)) 之基

因組之啟動子、異源哺乳動物啟動子(例如肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子)及熱休克啟動子，只要該等啟動子與宿主細胞系統相容。

由高級真核生物轉錄編碼抗TAT抗體或TAT多肽之DNA可由增強子序列插入載體中增強。增強子為DNA之順式作用元件，通常為約10至300 bp，作用於啟動子以增強其轉錄。目前已知許多來自哺乳動物基因(血球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素)之增強子序列。然而，吾人通常使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括複製起點後側之SV40增強子(bp 100-270)、巨細胞病毒早期啟動子增強子、複製起點後側之多瘤病毒增強子及腺病毒增強子。增強子可剪接於載體中抗TAT抗體或TAT多肽編碼序列之5'或3'位置，但較佳位於啟動子之5'位點。

用於真核宿主細胞(酵母、真菌、昆蟲、植物、動物、人類或來自其他多細胞生物體之有核細胞)之表現載體亦含有終止轉錄及穩定mRNA所必需的序列。此等序列通常可自真核或病毒DNA或cDNA之5'且有時3'非轉譯區獲得。此等區含有轉錄為編碼抗TAT抗體或TAT多肽之mRNA之非轉譯部分中之聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。

適用於經改變以適應在重組脊椎動物細胞培養物中合成抗TAT抗體或TAT多肽的其他方法、載體及宿主細胞描述於Gething等人，Nature, 293:620-625 (1981)；Mantei等人，Nature, 281:40-46 (1979)；EP 117,060及EP 117,058中。

4. 培養宿主細胞

可在多種培養基中培養用於產生本發明之抗TAT抗體或TAT多肽的宿主細胞。市售培養基，諸如漢氏F10(Ham's F10, Sigma)、最低必需培養基(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及杜貝可氏改良型伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(Sigma)，適用於培養宿主細胞。另外，Ham等人，Meth. Enz. 58:44 (1979)；Barnes等人，Anal. Biochem. 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195或國專利Re. 30,985中所述之任何培養基均可用作此等宿主細胞之培養基。任何此等培養基必要時均可補充激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCIN™藥物)、示蹤元素(定義為無機化合物，通常以在微莫耳範圍內之最終濃度存在)及葡萄糖或等效能源。亦可包括熟習此項技術者已知之適當濃度的任何其他必需補充劑。培養條件(諸如溫度、pH值及其類似條件)為先前選擇進行表現之宿主細胞所用的條件，且為熟習此項技術者所瞭解。

5. 偵測基因擴增/表現

可例如藉由習知南方墨點法(Southern blotting)、北方墨點法(Northern blotting)定量mRNA之轉錄[Thomas, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]、點漬墨法 (DNA分析)或原位雜交，使用適當標記之探針基於本文提供之序列直接量測樣品中之基因擴增及/或表現。或者，可採用能識別特異性雙鏈體(包括DNA雙鏈體、RNA雙鏈體及DNA-RNA雜交雙鏈體或DNA-蛋白質雙鏈體)之抗體。抗體又可進行標記，且可進行檢測，其中雙鏈體結合於表面，使得於表面上形成雙鏈體之後，可偵測結合於雙鏈體之抗體的存在。

或者，基因表現可藉由免疫學方法(諸如細胞或組織切片之免疫組織化學染色及細胞培養物或體液之檢測)量測以直接定量基因產物之表現。適用於樣品液體之免疫組織化學染色及/或檢測的抗體可為單株或多株抗體，且可在任何哺乳動物體中製備。抗體宜針對天然序列TAT多肽，或針對基於本文提供之DNA序列的合成肽，或針對融合於TAT DNA且編碼特異性抗體抗原決定基之外源序列製備。

6. 純化抗TAT抗體及TAT多肽

可自培養基或宿主細胞溶解物中回收抗TAT抗體及TAT多肽之各形式。若與膜結合，則可使用適合之清潔劑溶液(例如Triton-X 100)或藉由酶促裂解使其自膜中釋放。可藉由各種物理或化學方式破壞表現抗TAT抗體或TAT多肽所用之細胞，該等方式諸如凍融循環、超音波處理、機械破壞或細胞溶解劑。

可能希望自重組細胞蛋白質或多肽純化抗TAT抗體及TAT多肽。以下程序例示適合之純化程序：藉由離子交換

管柱部分分離；乙醇沈澱；逆相HPLC；二氧化矽或陽離子交換樹脂(諸如DEAE)層析；層析聚焦；SDS-PAGE；硫酸銨沈澱；使用例如Sephadex G-75進行之凝膠過濾；蛋白質A瓊脂糖管柱，以移除諸如IgG之污染物；及結合抗TAT抗體及TAT多肽之經抗原決定基標記之形式的金屬螯合管柱。可採用各種蛋白質純化方法，且該等方法在此項技術中為已知的且描述於例如Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990)；Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York(1982)中。所選純化步驟將視例如所用產生方法之性質及所產生之特定抗TAT抗體或TAT多肽而定。

當使用重組技術時，抗體可於細胞內、周質間隙中產生或直接分泌於培養基中。若抗體於細胞內產生，則作為第一步驟，例如藉由離心或超濾移除宿主細胞或已溶解片段之顆粒碎片。Carter等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992)描述分離分泌至大腸桿菌之周質間隙中之抗體的程序。簡言之，經約30分鐘在乙酸鈉(pH 3.5)、EDTA及苯基甲基磺醯基氟(PMSF)存在下將細胞糊狀物解凍。可藉由離心移除細胞碎片。在抗體分泌至培養基中之情形下，通常首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元)濃縮此等表現系統之上清液。在任何先前步驟中可包括諸如PMSF之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以防止外來污染物生長。

由該等細胞所製備之抗體組合物可使用例如羶磷灰石層

析、凝膠電泳、透析及親和層析來純化，其中親和層析為較佳純化技術。蛋白質A作為親和配位體之適用性視物種及存在於抗體中之任何免疫球蛋白Fc域的同型而定。蛋白質A可用於純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等人，J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。對所有小鼠同型及人類 $\gamma 3$ 而言，推薦蛋白質G(Guss等人，EMBO J. 5:1567-1575(1986))。雖然親和配位體所連接之基質最常為瓊脂糖，但可利用其他基質。與用瓊脂糖可達成之流動速率及處理時間相比，機械穩定性基質(諸如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)流動速率更快且處理時間更短。當抗體包含CH3域時，Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)適用於純化。亦可視欲回收之抗體而定，利用其他用於蛋白質純化之技術，諸如離子交換柱部分分離、乙醇沈澱、逆相HPLC、二氧化矽層析、肝素層析、SEPHAROSE™陰離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸管柱)層析、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。

繼任何初步純化步驟之後，可使用pH值為約2.5-4.5之間的溶離緩衝液對包含相關之抗體及污染物之混合物進行低pH值疏水性相互作用層析，且較佳在低鹽濃度(例如約0-0.25 M鹽)下進行。

J. 醫藥調配物

根據本發明使用之抗TAT抗體、TAT結合寡肽、TAT結合有機分子及/或TAT多肽之治療調配物藉由將具有所需純度之抗體、多肽、寡肽或有機分子與可選醫藥學上可接受之

載劑、賦形劑或穩定劑混合製備成凍乾調配物或水溶液形式以供儲存(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A.編(1980))。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒, 且包括緩衝劑, 諸如乙酸鹽、Tris、磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸; 抗氧化劑, 包括抗壞血酸及甲硫胺酸; 防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨; 氯化六氫季銨; 氯化苯甲煙銨、氯化苯甲索銨(benzethonium chloride); 苯酚、丁醇或苯甲醇; 對羥苯甲酸烷基酯, 諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯; 兒茶酚; 間苯二酚; 環己醇; 3-戊醇; 及間甲酚); 低分子量(小於約10個殘基)多肽; 蛋白質, 諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白; 親水性聚合物, 諸如聚乙基吡咯啶酮; 胺基酸, 諸如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸; 單醣、雙醣及其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合劑, 諸如EDTA; 張力調節劑, 諸如海藻糖及氯化鈉; 糖, 諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇; 界面活性劑, 諸如聚山梨醇酯; 成鹽相對離子, 諸如鈉; 金屬錯合物(例如鋅-蛋白質複合物); 及/或非離子性界面活性劑, 諸如TWEEN®、PLURONICS®或聚乙二醇(PEG)。抗體較佳包含濃度為5-20 mg/ml、較佳10-100 mg/ml之抗體。

本文之調配物亦可含有一種以上所治療之特定適應症所必需的活性化合物, 較佳為具有彼此並無不利影響之互補活性的活性化合物。舉例而言, 除抗TAT抗體、TAT結合

寡肽或TAT結合有機分子以外，在一種調配物中可能需要包括另一抗體，例如結合TAT多肽上之不同抗原決定基的第二抗TAT抗體或針對某另一標靶之抗體(諸如影響特定癌症生長之生長因子)。或者或另外，組合物可進一步包含化學治療劑、細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑、抗激素劑及/或保心藥。該等分子適合以可有效地達成預期目的之量組合存在。

亦可例如藉由凝聚技術或藉由介面聚合將活性成份圈閉於所製備之微囊中，例如羥基甲基纖維素或明膠微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊分別圈閉於膠狀藥物輸送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)中或於巨乳液中。該等技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版，Osol, A.編(1980)中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半滲透性基質，該等基質呈成型物品(例如膜或微膠囊)形式。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯)或聚(乙醇醇))、聚丙交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與L-麩胺酸 γ 乙酯之共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT®(由乳酸-乙醇酸共聚物與柳菩林(leuprolide acetate)構成之可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

欲用於活體內投藥之調配物必須無菌。其可容易地藉由經由無菌過濾膜過濾來實現。

K. 用抗TAT抗體、TAT結合寡肽及TAT結合有機分子診斷及治療

為測定TAT在癌症中之表現，可利用各種診斷檢測。在一個實施例中，可藉由免疫組織化學(IHC)分析TAT多肽過度表現。來自腫瘤活檢之經石蠟包埋的組織切片可進行IHC檢測且遵循如下TAT蛋白質染色強度標準：

0分-未觀察到染色，或少於10%腫瘤細胞中觀察到膜染色。

1+分-超過10%腫瘤細胞中偵測到模糊/勉強可覺察的膜染色。僅對細胞之部分膜染色。

2+分-超過10%腫瘤細胞中觀察到微弱至中度完整膜染色。

3+分-超過10%腫瘤細胞中觀察到中度至高度完整膜染色。

TAT多肽表現為0分或1+分之彼等腫瘤可表徵為非過度表現TAT，而2+分或3+分之彼等腫瘤可表現為過度表現TAT。

或者或另外，可對福馬林(formalin)固定、石蠟包埋之腫瘤組織進行FISH檢測，諸如INFORM®(由Ventana, Arizona出售)或PATHVISION®(Vysis, Illinois)，以測定腫瘤中TAT過度表現之程度(若存在)。

TAT過度表現或擴增可使用活體內診斷檢測，例如藉由投與結合欲偵測分子且標記有可偵測標記(例如放射性同位素或螢光標記)之分子(諸如抗體、寡肽或有機分子)且外

部掃描患者以將標記定位來評估。

如上所述，本發明之抗TAT抗體、寡肽及有機分子獲得各種非治療性應用。本發明之抗TAT抗體、寡肽及有機分子可適用於診斷及分期表現TAT多肽之癌症(例如在放射成像中)。抗體、寡肽及有機分子亦適用於將TAT多肽自細胞純化或免疫沈澱，活體外偵測及定量TAT多肽(例如用ELISA或西方墨點法)，作為純化其他細胞之一個步驟自混合細胞群殺滅及去除表現TAT之細胞。

當前，視癌症分期而定，癌症治療包括以下療法中之一者或組合：手術移除癌性組織、放射療法及化學療法。抗TAT抗體、寡肽或有機分子療法可尤其適合用於不能充分地耐受化學療法之毒性及副作用的老齡患者及放射療法具有有限效用之轉移性疾病。靶向腫瘤之本發明抗TAT抗體、寡肽及有機分子適用於在疾病最初診斷之後或復發期間減輕表現TAT之癌症。對於治療應用，抗TAT抗體、寡肽或有機分子可單獨使用，或以與例如激素、抗血管生成劑或放射性標記化合物或與手術、冷凍療法及/或放射療法之組合療法使用。抗TAT抗體、寡肽或有機分子治療可與其他形式之習知療法結合(與習知療法連續，在習知療法之前或之後)投與。化學治療藥物(諸如TAXOTERE®(多西他賽)、TAXOL®(太平洋紫杉醇)、雌莫司汀及米托蒽醌)用於治療癌症，尤其低風險(good risk)患者之癌症。在本發明之治療或緩和癌症的本發明方法中，可向癌症患者投與抗TAT抗體、寡肽或有機分子與用一或多種前述化學

治療劑治療結合。詳言之，涵蓋與太平洋紫杉醇及經修飾衍生物之組合療法(參見例如EP 0600517)。抗TAT抗體、寡肽或有機分子將與治療有效劑量之化療劑一起投與。在另一實施例中，抗TAT抗體、寡肽或有機分子與化學療法結合投與以提高化學治療劑(例如太平洋紫杉醇)之活性及功效。Physicians' Desk Reference(PDR)揭示此等藥劑用於治療各種癌症之劑量。此等上述化學治療藥物之治療有效給藥方案及劑量將取決於所治療之特定癌症、疾病之程度及熟習此項技術之醫師熟知之其他因素且可由醫師確定。

在一特定實施例中，向患者投與包含抗TAT抗體、寡肽或有機分子與細胞毒性劑結合之結合物。結合於TAT蛋白質之免疫結合物較佳被細胞內化，從而增強免疫結合物殺滅其所結合之癌細胞之治療功效。在一較佳實施例中，細胞毒性劑靶向或干擾癌細胞中之核酸。該等細胞毒性劑之實例如上所述且包括類美登素、卡奇黴素、核糖核酸酶及DNA核酸內切酶。

根據已知方法，諸如以例如大丸劑形式經靜脈內投與，或藉由經一段時間連續輸注，藉由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、經口、局部或吸入路徑，將抗TAT抗體、寡肽、有機分子或其毒素結合物投與人類患者。較佳靜脈內或皮下投與抗體、寡肽或有機分子。

其他治療療程可與投與抗TAT抗體、寡肽或有機分子組合。組合投藥包括共投藥，使用單獨調配物或單個醫藥調

配物，及以任何順序連續投藥，其中較佳存在一時間階段，此時兩種(或所有)活性藥劑同時發揮其生物活性。該組合療法較佳產生協同治療作用。

亦希望組合抗TAT抗體、寡肽或有機分子投藥與針對與特定癌症相關之另一腫瘤抗原的抗體的投藥。

在另一實施例中，本發明之治療性治療方法涉及組合投與抗TAT抗體(或抗體)、寡肽或有機分子及一或多種化療劑或生長抑制劑，包括共投與不同化療劑之混合物。化學治療劑包括磷酸雌莫司汀、發尼莫司汀、順鉑、5-氟尿嘧啶、美法倫、環磷醯胺、羥基脲及紫杉烷(諸如太平洋紫杉醇及多西他賽)及/或蒽環黴素抗生素。可根據製造商之說明書或如熟練從業者根據經驗所確定來使用該等化學治療劑之製劑及給藥時程。該化學療法之製備及給藥方案亦描述於Chemotherapy Service, M.C. Perry編，Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)中。

抗體、寡肽或有機分子可與如下抗激素化合物組合；例如抗雌激素化合物，諸如他莫昔芬；抗黃體酮，諸如奧那司酮(參見EP 616 812)；或抗雄激素，諸如氟他胺，其劑量為該等分子之已知劑量。若欲治療之癌症為雄激素非依賴性癌症，則患者可預先進行抗雄激素療法，且在癌症不依賴於雄激素之後，可向患者投與抗TAT抗體、寡肽或有機分子(及如本文所述視情況選用之其他藥劑)。

有時，向患者共投與保心藥(以預防或減少與該療法相關之心肌功能障礙)或一或多種細胞激素亦為有利的。除

上述治療療程以外，患者亦可在抗體、寡肽或有機分子療法之前、同時或之後進行外科手術去除癌細胞及/或放射療法。上述共投與藥劑中之任一者的適合劑量為目前所用劑量且可因該藥劑與抗TAT抗體、寡肽或有機分子之組合作用(協同作用)而降低。

為預防或治療疾病，投藥劑量及模式應由醫師根據已知標準選擇。抗體、寡肽或有機分子之適當劑量將視以下因素而定：欲治療疾病之類型(如上所定義)、疾病之嚴重性及病程、抗體、寡肽或有機分子是出於預防性抑還是治療性目的投與、先前療法、患者之臨床病史及對抗體、寡肽或有機分子之反應以及主治醫師之判斷。抗體、寡肽或有機分子適於一次性或經一系列治療投與患者。抗體、寡肽或有機分子較佳藉由靜脈內輸注或皮下注射投與。視疾病之類型及嚴重性而定，無論例如藉由一或多次各別投藥還是藉由連續輸注投藥，每公斤體重約1 µg至約50 mg(例如，每劑每公斤約0.1-15 mg)抗體可為向患者投與之最初候選劑量。給藥方案可包含投與約4 mg/kg抗TAT抗體之最初起始劑量，繼而約2 mg/kg抗TAT抗體之每週維持劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。視上述因素而定，典型日劑量範圍可為約1 µg/kg至100 mg/kg或更多。對於經數天或更長時間重複投藥而言，視病狀而定，持續治療直至出現對疾病症狀之所需抑制為止。此療法之進展可藉由習知方法及檢測且基於醫師或熟習此項技術之其他人員已知之標準容易地監測。

除向患者投與抗體蛋白質以外，本申請案亦涵蓋藉由基因療法投與抗體。該投與編碼抗體之核酸由表述「投與治療有效量之抗體」涵蓋。關於使用基因治療來產生細胞內抗體，參見例如1996年3月14日公開之WO 96/07321。

存在兩種使核酸(視情況含於載體內)進入患者細胞中之主要方法；活體內及離體。對於活體內傳遞，通常在需要抗體之位點處將核酸直接注射於患者中。對於離體治療，移除患者細胞，將核酸引入此等分離細胞中且將經修飾細胞直接投與患者，或例如囊封於植入患者中之多孔膜內(參見例如美國專利第4,892,538號及第5,283,187號)。存在多種可用於將核酸引入活細胞中之技術。該等技術可視將核酸活體外轉移至培養細胞中還是活體內轉移至預期宿主之細胞中而不同。適用於活體外傳遞核酸於哺乳動物細胞中之技術包括使用脂質體、電穿孔、顯微注射、細胞融合、DEAE-聚葡萄糖、磷酸鈣沈澱法等。離體傳遞基因之常用載體為反轉錄病毒載體。

當前較佳之活體內核酸傳遞技術包括用病毒載體(諸如腺病毒、疱疹單純型I病毒或腺相關病毒)及基於脂質之系統(適用於脂質介導之基因傳遞的脂質為例如DOTMA、DOPE及DC-Chol)轉染。關於當前已知之基因標記及基因療法方案的綜述，參見Anderson等人，Science 256:808-813 (1992)。亦參見WO 93/25673及其中引用之參考文獻。

本發明之抗TAT抗體可呈本文中「抗體」之定義所涵蓋的不同形式。因此，抗體包括全長或完整抗體、抗體片

段、天然序列抗體或胺基酸變異體、人類化抗體、嵌合抗體或融合抗體、免疫結合物及其功能片段。在融合抗體中，抗體序列融合於異源多肽序列。抗體可在Fc區中經修飾以提供所需效應功能。如本文各部分中更詳細論述，在存在適當Fc區的情況下，結合於細胞表面之裸抗體可例如經由抗體依賴性細胞細胞毒性(ADCC)或藉由使補體補充補體依賴性細胞毒性或某另一機制誘發細胞毒性。或者，若需要去除或減少效應功能以便使副作用或治療併發症減至最小，則可使用某些其他Fc區。

在一個實施例中，抗體競爭以結合或實質上結合與本發明抗體相同之抗原決定基。亦涵蓋具有本發明抗TAT抗體之生物特徵的抗體，該等生物特徵特別包括活體內腫瘤靶向及任何細胞增殖抑制或細胞毒性特徵。

產生上述抗體之方法詳細描述於本文中。

本發明抗TAT抗體、寡肽及有機分子適用於治療哺乳動物之表現TAT之癌症或減輕癌症之一或多種症狀。該癌症包括前列腺癌、尿路癌、肺癌、乳癌、結腸癌及卵巢癌，更尤其前列腺癌、腎細胞癌、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺鱗狀細胞癌及胸膜間皮瘤。癌症涵蓋任何前述各者之轉移性癌症。抗體、寡肽或有機分子能夠結合在哺乳動物中表現TAT多肽之癌細胞的至少一部分。在一較佳實施例中，抗體、寡肽或有機分子在活體外或活體內，在結合細胞上之TAT多肽之後，有效破壞或殺滅表現TAT之腫瘤細胞或抑制該等腫瘤細胞生長。該抗體包括裸抗TAT抗體(未

結合於任何藥劑)。具有細胞毒性或細胞生長抑制特性之裸抗體可另外擁有細胞毒性劑以使其甚至更有效地破壞腫瘤細胞。可藉由例如使抗體與細胞毒性劑結合以形成如本文所述之免疫結合物而賦予抗TAT抗體細胞毒性特性。細胞毒性劑或生長抑制劑較佳為小分子。諸如卡奇黴素或類美登素及其類似物或衍生物的毒素較佳。

本發明提供一種組合物，其包含本發明之抗TAT抗體、寡肽或有機分子及載劑。出於治療癌症之目的，可向需要該治療之患者投與組合物，其中該組合物可包含一或多種呈現為免疫結合物或裸抗體形式的抗TAT抗體。在另一實施例中，組合物可包含此等抗體、寡肽或有機分子與其他治療劑(諸如細胞毒性劑或生長抑制劑，包括化學治療劑)組合。本發明亦提供調配物，其包含本發明之抗TAT抗體、寡肽或有機分子及載劑。在一個實施例中，調配物為包含醫藥學上可接受之載劑的治療調配物。

本發明之另一態樣為編碼抗TAT抗體之分離之核酸。涵蓋編碼H鏈與L鏈及尤其高變區殘基之核酸、編碼天然序列抗體以及變異體之鏈、該抗體之修飾及人類化型式。

本發明亦提供適用於治療哺乳動物之表現TAT多肽之癌症或緩和該癌症之一或多個症狀的方法，該方法包含向哺乳動物投與治療有效量之抗TAT抗體、寡肽或有機分子。抗體、寡肽或有機分子治療組合物可如醫師所指導短期(短暫)或長期或間歇式投與。亦提供抑制表現TAT多肽之細胞的生長及殺滅該細胞之方法。

本發明亦提供套組及製品，其包含至少一種抗TAT抗體、寡肽或有機分子。含有抗TAT抗體、寡肽或有機分子之套組可用於例如TAT細胞殺滅檢測、自細胞純化或免疫沈澱TAT多肽。舉例而言，為分離及純化TAT，套組可含有偶合於珠粒(例如瓊脂糖珠粒)之抗TAT抗體、寡肽或有機分子。可提供如下套組，其含有用於在例如ELISA或西方墨點法中活體外偵測及定量TAT的抗體、寡肽或有機分子。該適用於偵測之抗體、寡肽或有機分子可具有諸如螢光或放射性標記之標記。

L. 製品及套組

本發明之另一實施例為一種含有適用於治療表現抗TAT之癌症之材料的製品。該製品包含容器及該容器上黏貼或該容器隨附之標籤或包裝插頁。適合之容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。該容器容納對治療癌症病狀有效之組合物且可具有無菌入口孔(例如該容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之抗TAT抗體、寡肽或有機分子。標籤或包裝插頁指示該組合物用於治療癌症。標籤或包裝插頁應進一步包含向癌症患者投與抗體、寡肽或有機分子組合物之說明書。此外，製品可進一步包含第二容器，該容器包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝之生理食鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可另外包括就商業及使用者觀點而言所

需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

亦提供適用於各種目的之套組，例如用於表現TAT之細胞殺滅檢測，用於TAT多肽自細胞純化或免疫沈澱。對於TAT多肽之分離及純化，套組可含有偶合於珠粒(例如瓊脂糖珠粒)之抗TAT抗體、寡肽或有機分子。可提供其含有用於例如在ELISA或西方墨點法中活體外偵測及定量TAT多肽的抗體、寡肽或有機分子的套組。如同製品一樣，該套組包含容器及容器上黏附或容器隨附之標籤或包裝插頁。容器容納包含本發明之至少一種抗TAT抗體、寡肽或有機分子之組合物。可包括含有例如稀釋劑及緩衝劑、對照抗體之其他容器。標籤或包裝插頁可提供組合物之描述以及用於所欲活體外或診斷用途的說明。

M. TAT多肽及編碼TAT多肽之核酸的用途

編碼TAT多肽之核苷酸序列(或其互補序列)在分子生物學技術中得到各種應用，包括用作雜交探針、用於染色體及基因定位中及用於產生反義RNA及DNA探針。TAT編碼核酸亦將適用於利用本文所述之重組技術製備TAT多肽，其中彼等TAT多肽可用於例如製備本文所述之抗TAT抗體。

全長天然序列TAT基因或其部分可用作用於cDNA庫之雜交探針以分離全長TAT cDNA或分離與本文所揭示之天然TAT序列具有所需序列一致性的其他cDNA(例如編碼來自其他物種之TAT或TAT之天然存在的變異體之cDNA)。探

針之長度視情況應為約20至約50個鹼基。雜交探針可源自全長天然核苷酸序列之至少部分新穎之區，其中彼等區可不經過度實驗即確定或來自包括天然序列TAT之啟動子、增強子元件及內含子之基因組序列。舉例而言，篩選法將包含使用已知DNA序列合成約40個鹼基之選擇探針來分離TAT基因之編碼區。雜交探針可經多種標記標記，包括放射性核苷酸，例如³²P或³⁵S；或酶促標記，例如經由抗生物素蛋白/生物素偶合系統偶合於探針之鹼性磷酸酶。自身序列與本發明之TAT基因之序列互補的經標記之探針可用於篩選人類cDNA、基因組DNA或mRNA庫以確定探針與該等庫之哪些成員雜交。雜交技術更詳細地描述於下文實例中。本申請案揭示之任何EST序列可使用本文所揭示之方法類似地用作探針。

TAT編碼核酸之其他適用片段包括反義或有義寡核苷酸，其包含能夠結合於標靶TAT mRNA(有義)或TAT DNA(反義)序列之單股核酸序列(RNA或DNA)。根據本發明之反義或有義寡核苷酸包含TAT DNA之編碼區之片段。該種片段一般包含至少約14個核苷酸，較佳約14至30個核苷酸。基於編碼既定蛋白質之cDNA序列衍生反義或有義寡核苷酸的能力描述於例如Stein及Cohen(Cancer Res. 48:2659, 1988)及van der Krol等人(BioTechniques 6:958, 1988)中。

反義或有義寡核苷酸與標靶核酸序列之結合形成雙螺旋體，其可經由數種方法中之一種阻斷標靶序列之轉錄或轉

譯，該等方法包括增強雙螺旋體降解、提前終止轉錄或轉譯、或其他方式。本發明涵蓋該等方法。因此反義寡核苷酸可用於阻斷TAT蛋白質之表現，其中彼等TAT蛋白質可在於哺乳動物中誘發癌症中起作用。反義或有義寡核苷酸另外包含具有經修飾糖-磷酸二酯主鏈(或其他糖鍵聯，諸如WO 91/06629中所述之糖鍵聯)之寡核苷酸，且其中該等糖鍵聯對內源性核酸酶具有抗性。該等具有抗性糖鍵聯之寡核苷酸為活體內穩定的(亦即能夠抗酶促降解)，且保留能夠結合標靶核苷酸序列之序列特異性。

反義結合之較佳基因內位點包括合併基因之開放閱讀架構(ORF)之轉譯起始密碼子(5'-AUG/5'-ATG)或終止密碼子(5'-UAA、5'-UAG及5'-UGA/5'-TAA、5'-TAG及5'-TGA)之區。該等區係指在轉譯起始或終止密碼子之任一方向(亦即5'或3')上涵蓋約25至約50個鄰接核苷酸之mRNA或基因之一部分。反義結合之其他較佳區包括：內含子；外顯子；內含子-外顯子結合；為介於轉譯起始密碼子與轉譯終止密碼子之間的區之開放閱讀構架(ORF)或「編碼區」；mRNA之5'帽，包含經由5'-5'三磷酸鍵聯連接於mRNA之5'大多數殘基的N7甲基化鳥苷殘基且包括5'帽結構本身以及鄰接該帽之頭50個核苷酸；5'非轉譯區(5' UTR)，mRNA之轉譯起始密碼子之5'方向上的部分，且因此包括5'帽位點與mRNA之轉譯起始密碼子之間的核苷酸或基因上之相應核苷酸；及3'非轉譯區(3' UTR)，mRNA之轉譯終止密碼子之3'方向上的部分，且因此包括轉譯終止密碼子與mRNA

之3'端之間的核苷酸或基因上之相應核苷酸。

適用於抑制TAT蛋白質之表現的較佳反義化合物之具體實例包括含有經修飾主鏈或非天然核苷間鍵聯的寡核苷酸。具有經修飾主鏈之寡核苷酸包括主鏈中保留磷原子之寡核苷酸及主鏈中不具有磷原子之寡核苷酸。出於本說明書之目的及有時在此項技術中提及，核苷間主鏈中不具有磷原子之經修飾寡核苷酸亦可被認為是寡核苷。較佳經修飾寡核苷酸主鏈包括例如具有正常3'-5'鍵聯之硫代磷酸酯、對掌性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、胺基烷基磷酸三酯、甲基及其他烷基磷酸酯(包括3'-伸烷基磷酸酯、5'-伸烷基磷酸酯及對掌性磷酸酯)、磷酸酯、磷醯胺酸(包括3'-胺基磷醯胺酸及胺基烷基磷醯胺酸)、硫代磷醯胺酸、硫代烷基磷酸酯、硫代烷基磷酸三酯、碲代磷酸酯及碲代磷酸酯、其2'-5'鍵聯類似物及具有反極性者，其中一或多個核苷酸間鍵聯為3'-3'、5'-5'或2'-2'鍵聯。具有反極性之較佳寡核苷酸在3'-大多數核苷酸間鍵聯處包含單一3'-3'鍵聯(亦即單一反轉核苷殘基)，其可能不為鹼性(核鹼基丟失或經羥基取代)。亦包括各種鹽、混合鹽及游離酸形式。教示含磷鍵聯之製備的代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第3,687,808號、第4,469,863號、第4,476,301號、第5,023,243號、第5,177,196號、第5,188,897號、第5,264,423號、第5,276,019號、第5,278,302號、第5,286,717號、第5,321,131號、第5,399,676號、第5,405,939號、第5,453,496號、第

5,455,233 號、第 5,466,677 號、第 5,476,925 號、第 5,519,126 號、第 5,536,821 號、第 5,541,306 號、第 5,550,111 號、第 5,563,253 號、第 5,571,799 號、第 5,587,361 號、第 5,194,599 號、第 5,565,555 號、第 5,527,899 號、第 5,721,218 號、第 5,672,697 號及第 5,625,050 號，各以引用之方式併入本文中。

不包括磷原子之較佳經修飾寡核苷酸主鏈具有由短鏈烷基或環烷基核苷間鍵聯、混合雜原子及烷基或環烷基核苷間鍵聯、或一或多個短鏈雜原子或雜環核苷間鍵聯形成之主鏈。此等物質包括具有以下之物質：(N-嗎啉基)鍵聯(部分自核苷之糖部分形成)；矽氧烷主鏈；硫化物、亞碲及碲主鏈；甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基主鏈；亞甲基甲醯乙醯基及硫代甲醯乙醯基主鏈；核糖乙醯基主鏈；含有烯烴之主鏈；胺基磺酸酯基主鏈；亞甲基亞胺基及亞甲基胍基主鏈；磺酸酯及磺醯胺主鏈；醯胺主鏈；及具有混合 N、O、S 及 CH₂ 構成部分之其他主鏈。教示該等寡核苷之製備的代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第 5,034,506 號、第 5,166,315 號、第 5,185,444 號、第 5,214,134 號、第 5,216,141 號、第 5,235,033 號、第 5,264,562 號、第 5,264,564 號、第 5,405,938 號、第 5,434,257 號、第 5,466,677 號、第 5,470,967 號、第 5,489,677 號、第 5,541,307 號、第 5,561,225 號、第 5,596,086 號、第 5,602,240 號、第 5,610,289 號、第 5,602,240 號、第 5,608,046 號、第 5,610,289 號、第

5,618,704 號、第 5,623,070 號、第 5,663,312 號、第 5,633,360 號、第 5,677,437 號、第 5,792,608 號、第 5,646,269 號及第 5,677,439 號，各以引用之方式併入本文中。

在其他較佳反義寡核苷酸中，核苷單元之糖與核苷間鍵聯(亦即主鏈)均經新基團置換。保持鹼基單元與適當核酸標靶化合物雜交。一種此寡聚化合物，即已顯示具有優良雜交特性之寡核苷酸模擬物稱為肽核酸(PNA)。在 PNA 化合物中，寡核苷酸之糖主鏈係經含醯胺之主鏈、詳言之胺基乙基甘胺酸主鏈置換。核鹼基保留且直接或間接結合於主鏈之醯胺部分之氮雜氮原子。教示 PNA 化合物之製備的代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第 5,539,082 號、第 5,714,331 號及第 5,719,262 號，各以引用之方式併入本文中。PNA 化合物之其他教示可見於 Nielsen 等人，Science, 1991, 254, 1497-1500 中。

較佳反義寡核苷酸合併有硫代磷酸酯主鏈及/或雜原子主鏈，且詳言之為以上提及之美國專利第 5,489,677 號中所述之 $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ [稱為亞甲基(甲基亞胺基)或 MMI 主鏈]、 $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ 及 $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ [其中天然磷酸二酯主鏈表示為 $-\text{O-P-O-CH}_2-$]，及上提及之美國專利第 5,602,240 號之醯胺主鏈。較佳亦為以上提及之美國專利第 5,034,506 號之具有 N-嗎啉基主鏈結構之反義寡核苷酸。

經修飾寡核苷酸亦可含有一或多個經取代糖部分。較佳

寡核苷酸在2'位置處包含一個以下者：OH；F；O-烷基，S-烷基或N-烷基；O-烯基、S-烯基或N-烯基；O-炔基、S-炔基或N-炔基；或O-烷基-O-烷基，其中烷基、烯基及炔基可為經取代或未經取代的C1至C10 烷基或C2至C10烯基及炔基。尤佳為 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ 、 $O(CH_2)_nOCH_3$ 、 $O(CH_2)_nNH_2$ 、 $O(CH_2)_nCH_3$ 、 $O(CH_2)_nONH_2$ 及 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ ，其中n及m為1至約10。其他較佳反義寡核苷酸在2'位置處包含一個以下者：C1至C10 低碳烷基、經取代低碳烷基、烯基、炔基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂ CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、雜環烷基、雜環烷芳基、胺基烷基胺基、多烷基胺基、經取代矽烷基、RNA裂解基、報導基團、嵌入基、改良寡核苷酸之藥物動力學特性之基團、或改良寡核苷酸之藥效學特性之基團、及具有類似特性之其他取代基。較佳修飾包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃，亦稱為2'-O-(2-甲氧基乙基)或2'-MOE)(Martin等人，*Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504)，亦即烷氧基烷氧基。另一較佳修飾包括2'-二甲基胺基氧基乙氧基，亦即 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ ，亦稱為2'-DMAOE，如下文實例中所述，及2'-二甲基胺基乙氧基乙氧基(此項技術中亦稱為2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基或2'-DMAEOE)，亦即2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)。

另一較佳修飾包括鎖核酸(LNA)，其中2'-羥基連接於糖

環之3'或4'碳原子，從而形成雙環糖部分。該鍵聯較佳為使 2'氧原子與4'碳原子橋聯之亞甲基(-CH₂-)_n基團，其中 n 為 1 或 2。LNA 及其製備描述於 WO 98/39352 及 WO 99/14226 中。

其他較佳修飾包括 2'-甲氧基(2'-O-CH₃)、2'-胺基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)、2'-烯丙基(2'-CH₂-CH=CH₂)、2'-O-烯丙基(2'-O-CH₂-CH=CH₂)及 2'-氟(2'-F)。2'-修飾可位於阿拉伯糖(上)位置或核糖(下)位置。較佳 2'-阿拉伯糖修飾為 2'-F。類似修飾亦可在寡核苷酸之其他位置進行，尤其 3'末端核苷酸上或 2'-5'鍵聯之寡核苷酸中糖之 3'位置及 5'末端核苷酸之 5'位置。寡核苷酸亦可用糖模擬物(諸如環丁基部分)替代戊呋喃糖基糖。教示該等經修飾糖結構之製備的代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第 4,981,957 號、第 5,118,800 號、第 5,319,080 號、第 5,359,044 號、第 5,393,878 號、第 5,446,137 號、第 5,466,786 號、第 5,514,785 號、第 5,519,134 號、第 5,567,811 號、第 5,576,427 號、第 5,591,722 號、第 5,597,909 號、第 5,610,300 號、第 5,627,053 號、第 5,639,873 號、第 5,646,265 號、第 5,658,873 號、第 5,670,633 號、第 5,792,747 號及第 5,700,920 號，各以全文引用之方式併入本文中。

寡核苷酸亦可包括核鹼基(此項技術中通常簡稱為「鹼基」修飾或取代。如本文中所用，「未經修飾」或「天然」核鹼基包括嘌呤鹼基腺嘌呤(A)及鳥嘌呤(G)，及嘧啶

鹼基胸嘧啶(T)、胞嘧啶(C)及尿嘧啶(U)。經修飾核鹼基包括其他合成及天然核鹼基，諸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羥甲基胞嘧啶、黃嘌呤、次黃嘌呤、2-胺基腺嘌呤、腺嘌呤及鳥嘌呤之6-甲基及其他烷基衍生物、腺嘌呤及鳥嘌呤之2-丙基及其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶及2-硫胞嘧啶、5-鹵尿嘧啶及胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH₃或-CH₂-C≡CH)尿嘧啶及胞嘧啶及嘧啶鹼基之其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶及胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-鹵、8-胺基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羥基及其他8-取代腺嘌呤及鳥嘌呤、5-鹵(尤其5-溴)、5-三氟甲基及其他5-取代尿嘧啶及胞嘧啶、7-甲基鳥嘌呤及7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-胺基-腺嘌呤、8-氮雜鳥嘌呤及8-氮雜腺嘌呤、7-去氮鳥嘌呤及7-去氮腺嘌呤及3-去氮鳥嘌呤及3-去氮腺嘌呤。其他經修飾核鹼基包括三環嘧啶，諸如啡噁嗟胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗟-2(3H)-酮)、啡噁嗟胞苷(1H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗟-2(3H)-酮)；G-鉗狀物，諸如經取代啡噁嗟胞苷(例如9-(2-胺基乙氧基)-H-嘧啶并[5,4-b][1,4]苯并噁嗟-2(3H)-酮)、咔唑胞苷(2H-嘧啶并[4,5-b]吲哚-2-酮)、吡啶并吲哚胞苷(H-吡啶并[3',2':4,5]吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-酮)。經修飾核鹼基亦可包括嘌呤或嘧啶鹼基經其他雜環置換之核鹼基，例如7-去氮-腺嘌呤、7-去氮鳥苷、2-胺基吡啶及2-吡啶酮。其他核鹼基包括美國專利第3,687,808號中所揭示之核鹼基、在The Concise Encyclopedia Of Polymer Science

And Engineering, 第858-859頁, Kroschwitz, J. I. 編, John Wiley & Sons, 1990中所揭示之核鹼基、及在Englisch等人, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613中所揭示之核鹼基。該等核鹼基中之某些尤其適用於增加本發明之寡聚化合物之結合親和力。此等鹼基包括5-取代嘧啶、6-氮雜嘧啶及N-2、N-6及O-6取代嘌呤, 包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶及5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已顯示增加核酸雙鏈穩定性達0.6-1.2°C (Sanghvi等人, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, 第276-278頁), 且為較佳鹼基取代, 當與2'-O-甲氧基乙基糖修飾組合時甚至尤其更佳。教示經修飾核鹼基之製備的代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第3,687,808號以及美國專利第4,845,205號、第5,130,302號、第5,134,066號、第5,175,273號、第5,367,066號、第5,432,272號、第5,457,187號、第5,459,255號、第5,484,908號、第5,502,177號、第5,525,711號、第5,552,540號、第5,587,469號、第5,594,121、5,596,091號、第5,614,617號、第5,645,985號、第5,830,653號、第5,763,588號、第6,005,096號、第5,681,941號及第5,750,692號, 各以引用之方式併入本文中。

反義寡核苷酸之另一修飾為使增強寡核苷酸活性、細胞分佈或細胞攝取之一或多個部分或結合物化學連接於寡核苷酸。本發明之化合物可包括共價結合諸如一級羥基或二

級羥基之官能基的結合基。本發明之結合基包括嵌入劑、報導分子、聚胺、聚醯胺、聚乙二醇、聚醚、增強寡聚物之藥效學特性之基團及增強寡聚物之藥物動力學特性之基團。典型的結合基包括膽固醇、脂質、陽離子脂質、磷脂、陽離子磷脂、生物素、吩嗪、葉酸酯、啡啶、蔥醌、吡啶、螢光素、玫瑰紅、香豆素及染料。增強藥效學特性之基團在本發明之情況下包括改良寡聚物攝取、增強寡聚物降解抗性及/或增強與RNA序列特異性雜交的基團。增強藥物動力學特性之基團在本發明之情況下包括改良寡聚物攝取、分佈、代謝或排出之基團。結合部分包括(但不限於)脂質部分，諸如膽固醇部分(Letsinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556)、膽酸(Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060)、硫醚，例如己基-S-三苯甲基硫醇(Manoharan等人，Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309；Manoharan等人，Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770)、硫代膽酯醇(Oberhauser等人，Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538)、脂肪鏈，例如十二烷基二醇或十二烷基殘基(Saison-Behmoaras等人，EMBO J., 1991, 10, 1111-1118；Kabanov等人，FEBS Lett., 1990, 259, 327-330；Svinarchuk等人，Biochimie, 1993, 75, 49-54)、磷脂，例如二-十六烷基-rac-甘油或三乙基-銨1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-H-膦酸酯(Manoharan等人，Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654；Shea等人，Nucl. Acids Res., 1990,

18, 3777-3783)、聚胺或聚乙二醇鏈(Manoharan等人, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973)或金剛烷乙酸(Manoharan等人, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654)、棕櫚基部分(Mishra等人, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237)或十八烷基胺或己基胺基-羰基-羥膽固醇部分。本發明之寡核苷酸亦可與活性藥物物質結合, 例如阿司匹林(aspirin)、華法林(warfarin)、苯基丁氮酮、布洛芬(ibuprofen)、舒洛芬(suprofen)、芬布芬(fenbufen)、酮基布洛芬(ketoprofen)、(S)-(+)-普拉洛芬((S)-(+)-pranoprofen)、卡洛芬(carprofen)、丹磺醯基肌氨酸(dansylsarcosine)、2,3,5-三碘苯甲酸、氟芬那酸(flufenamic acid)、亞葉酸(folinic acid)、苯并噻二嗪、氯噻嗪(chlorothiazide)、二氮唑(diazepine)、吲哚美辛(indomethacin)、巴比妥酸鹽(barbiturate)、頭孢菌素(cephalosporin)、磺胺藥(sulfa drug)、抗糖尿病藥、抗細菌劑或抗生素。寡核苷酸-藥物結合物及其製備描述於以下中: 美國專利申請案第09/334,130號(1999年6月15日申請)及美國專利第4,828,979號、第4,948,882號、第5,218,105號、第5,525,465號、第5,541,313號、第5,545,730號、第5,552,538號、第5,578,717, 5,580,731號、第5,580,731號、第5,591,584號、第5,109,124號、第5,118,802號、第5,138,045號、第5,414,077號、第5,486,603號、第5,512,439號、第5,578,718號、第5,608,046號、第4,587,044號、第4,605,735號、第

4,667,025 號、第 4,762,779 號、第 4,789,737 號、第 4,824,941 號、第 4,835,263 號、第 4,876,335 號、第 4,904,582 號、第 4,958,013 號、第 5,082,830 號、第 5,112,963 號、第 5,214,136 號、第 5,082,830 號、第 5,112,963 號、第 5,214,136 號、第 5,245,022 號、第 5,254,469 號、第 5,258,506 號、第 5,262,536 號、第 5,272,250 號、第 5,292,873 號、第 5,317,098 號、第 5,371,241 號、第 5,391,723 號、第 5,416,203, 5,451,463 號、第 5,510,475 號、第 5,512,667 號、第 5,514,785 號、第 5,565,552 號、第 5,567,810 號、第 5,574,142 號、第 5,585,481 號、第 5,587,371 號、第 5,595,726 號、第 5,597,696 號、第 5,599,923 號、第 5,599,928 號及第 5,688,941 號，各以引用之方式併入本文中。

不必既定化合物中之所有位置均均一地經修飾，且實際上一個以上前述修飾可併入單一化合物中或甚至寡核苷酸內之單一核苷中。本發明亦包括為嵌合化合物之反義化合物。「嵌合」反義化合物或「嵌合體」在本發明之情況下為反義化合物，尤其寡核苷酸，含有兩個或兩個以上化學上獨特的區，各由至少一個單體單元構成，亦即在寡核苷酸化合物之情況下為核苷酸。該等寡核苷酸通常含有至少一個寡核苷酸經修飾之區以便賦予寡核苷酸增加之核酸酶降解抗性、增加之細胞攝取及/或對標靶核酸之增加之結合親和力。寡核苷酸之另一區可用作能夠裂解 RNA:DNA 或 RNA:RNA 雜交體之酶之受質。舉例而言，RNase H 為裂

解 RNA:DNA 雙螺旋體之 RNA 鏈的細胞內切核酸酶。因此，RNase H 之活化引起 RNA 標靶裂解，從而大大增強寡核苷酸抑制基因表現之效率。因此，當使用嵌合寡核苷酸時，與雜交相同標靶區之硫代磷酸酯去氧寡核苷酸相比，較短寡核苷酸通常可獲得可比結果。本發明之嵌合反義化合物可形成為如上所述之兩個或兩個以上寡核苷酸、經修飾寡核苷酸、寡核苷及/或寡核苷酸模擬物之複合結構。較佳嵌合反義寡核苷酸在 3' 末端合併有至少一個 2' 修飾糖（較佳為 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃）以賦予核酸酶抗性，及含至少 4 個鄰接 2'-H 糖之區以賦予 RNase H 活性。該等化合物在此項技術中亦稱為雜交體或帽合物 (gapmer)。較佳帽合物在由至少一個含至少 4 個鄰接 2'-H 糖之區隔開之 3' 末端及 5' 末端具有 2' 修飾糖之區（較佳為 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃）且較佳合併有硫代磷酸酯主鏈鍵聯。教示該等雜交結構之製備的代表性美國專利包括（但不限於）美國專利第 5,013,830 號、第 5,149,797 號、第 5,220,007 號、第 5,256,775 號、第 5,366,878 號、第 5,403,711 號、第 5,491,133 號、第 5,565,350 號、第 5,623,065 號、第 5,652,355 號、第 5,652,356 號及第 5,700,922 號，各以全文引用之方式併入本文中。

根據本發明使用之反義化合物可經由熟知的固相合成技術方便且按常規製備。用於該等合成之設備由若干供應商銷售，包括例如 Applied Biosystems (Foster City, Calif.)。或者或另外，可採用此項技術中已知之用於該等合成之任

何其他方法。亦熟知使用類似技術來製備寡核苷酸，諸如硫代磷酸酯及烷基化衍生物。本發明之化合物亦可混合、囊封、結合或締合於其他分子、分子結構或化合物之混合物，例如脂質體、受體靶向分子、口服、直腸、表面或其他調配物，以幫助攝取、分佈及/或吸收。教示該等幫助攝取、分佈及/或吸收之調配物的製備之代表性美國專利包括(但不限於)美國專利第5,108,921號、第5,354,844號、第5,416,016號、第5,459,127號、第5,521,291號、第5,543,158號、第5,547,932號、第5,583,020號、第5,591,721號、第4,426,330號、第4,534,899號、第5,013,556號、第5,108,921號、第5,213,804號、第5,227,170號、第5,264,221號、第5,356,633號、第5,395,619號、第5,416,016號、第5,417,978號、第5,462,854號、第5,469,854號、第5,512,295號、第5,527,528號、第5,534,259號、第5,543,152號、第5,556,948號、第5,580,575號及第5,595,756號，各以引用之方式併入本文中。

有義或反義寡核苷酸之其他實例包括共價連接於有機部分之寡核苷酸，諸如WO 90/10048中所述之寡核苷酸；及增加寡核苷酸對標靶核酸序列之親和力的其他部分，諸如聚-(L-離胺酸)。另外，諸如玫瑰樹鹼(ellipticine)之插入劑及烷化劑或金屬錯合物可連接於有義或反義寡核苷酸以修飾反義或有義寡核苷酸對標靶核苷酸序列之結合特異性。

可利用任何基因轉移法，包括例如CaPO₄介導之DNA轉

染、電穿孔或藉由使用基因轉移載體(諸如埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus))，將反義或有義寡核苷酸引入含有標靶核酸序列之細胞中。在一較佳程序中，反義或有義寡核苷酸插入適合的反轉錄病毒載體中。活體內或離體使含有標靶核酸序列之細胞與重組反轉錄病毒載體接觸。適合的反轉錄病毒載體包括(但不限於)源自鼠類反轉錄病毒M-MuLV之載體、N2(一種源自M-MuLV之反轉錄病毒)、或指定為DCT5A、DCT5B及DCT5C之雙複本載體(參見WO 90/13641)。

有義或反義寡核苷酸亦可藉由與配位體結合分子形成結合物引入含有標靶核苷酸序列之細胞中，如WO 91/04753中所述。適合的配位體結合分子包括(但不限於)細胞表面受體、生長因子、其他細胞激素或結合細胞表面受體之其他配位體。配位體結合分子之結合較佳實質上不干擾配位體結合分子結合其相應分子或受體的能力或阻斷有義或反義寡核苷酸或其結合形式進入細胞內。

或者，有義或反義寡核苷酸可藉由形成寡核苷酸-脂質複合物引入含有標靶核酸序列之細胞中，如WO 90/10448中所述。有義或反義寡核苷酸-脂質複合物較佳在細胞內由內源性脂肪酶解離。

反義或有義RNA或DNA分子之長度一般為至少約5個核苷酸，或者長度為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、

70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000個核苷酸，其中在此情況下，術語「約」意謂參考核苷酸序列長度加或減參考長度之10%。

探針亦可用於PCR技術中來產生鑑別密切相關TAT編碼序列之序列池。

編碼TAT之核苷酸序列亦可用於構築用於定位編碼該TAT之基因及基因分析遺傳病症個體之雜交探針。本文提供之核苷酸序列可使用例如原位雜交、針對已知染色體標記物之連接分析及篩選庫之雜交之已知技術定位於染色體及染色體之特異性區。

當TAT之編碼序列編碼結合另一蛋白質之蛋白質時(例如，當TAT為受體時)，TAT可用於鑑別涉及結合相互作用之其他蛋白質或分子之檢測中。利用該等方法，可鑑別受體/配位體結合相互作用之抑制劑。涉及該等結合相互作用

用之蛋白質亦可用於篩選結合相互作用之肽或小分子抑制劑或促效劑。又，受體TAT可用於分離相關配位體。篩選檢測可經設計以尋找模擬天然TAT或TAT受體之生物活性的前導化合物。該等篩選檢測將包括適於高產量篩選化學庫從而使其尤其適於鑑別小分子藥物候選物之檢測。所涵蓋之小分子包括合成有機或無機化合物。檢測可以多種格式進行，包括蛋白質-蛋白質結合檢測、生物化學篩選檢測、免疫檢測及基於細胞之檢測，其在此項技術中已充分表徵。

編碼TAT或其修飾形式之核酸亦可用於產生轉殖基因動物或「基因剔除」動物，該等動物又可用於開發及篩選治療上有用的試劑。轉殖基因動物(例如小鼠或大鼠)為具有含有轉殖基因之細胞的動物，該轉殖基因在動物出生前(例如胚胎期)引入動物或動物祖先中。轉殖基因為整合於產生轉殖基因動物之細胞之基因組內的DNA。在一個實施例中，編碼TAT之cDNA可用於根據完善技術選殖編碼TAT之基因組DNA，且該基因組序列可用於產生含有表現編碼TAT之DNA之細胞的轉殖基因動物。產生轉殖基因動物、尤其例如小鼠或大鼠之動物之方法在此項技術已成為習知的，且描述於例如美國專利第4,736,866號及第4,870,009號中。特定細胞通常可用於使TAT轉殖基因合併有組織特異性增強子。包括編碼引入胚胎期動物之生殖系中之TAT之轉殖基因的複本的轉殖基因動物可用於檢查編碼TAT之DNA之表現增加的作用。該等動物可用作認為可賦予保護

作用以防止例如與過度表現相關之病理性病狀的試劑的測試動物。根據本發明之此態樣，用該試劑處理動物，且與具有轉殖基因之未處理動物相比病理性病狀之發生率降低，將指示病理性病狀之潛在性治療干預。

或者，可使用TAT之非人類同源物建構TAT「基因剔除」動物，該動物因編碼TAT之內源基因與引入該動物之胚細胞內的編碼TAT之改動基因組DNA之間發生同源重組而具有編碼TAT之缺陷基因或改動基因。舉例而言，編碼TAT之cDNA可用於根據完善技術選殖編碼TAT之基因組DNA。編碼TAT之基因組DNA之一部分可缺失或經另一基因置換，諸如編碼可用於監測整合之可選擇標記物的基因。通常，載體中包括未改變側接DNA(5'端與3'端)之數千個鹼基[關於同源重組載體之描述，參見例如Thomas及Capecchi, Cell, 51:503 (1987)]。載體引入胚胎幹細胞株(例如藉由電穿孔)中，且選擇引入之DNA與內源性DNA同源重組之細胞[參見例如Li等人, Cell, 69:915 (1992)]。隨後將所選細胞注入動物(例如小鼠或大鼠)囊胚以形成聚集嵌合體[參見例如Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson編, (IRL, Oxford, 1987), 第113-152頁]。隨後可將嵌合胚植入適合的假懷孕雌性養育動物中，且妊娠期結束之胚胎產生「基因剔除」動物。生殖細胞中含有同源重組DNA之後代可藉由標準技術鑑別且可用於繁殖全部細胞均含有同源重組之DNA之動物。基因剔除動物之特徵可在於例如其抵禦某些

病理學病狀之能力及因缺乏TAT多肽而發展病理學病狀。

編碼TAT多肽之核酸亦可用於基因療法中。在基因療法應用中，將基因引入細胞中，以活體內合成例如用於置換缺陷性基因之治療有效性基因產物。「基因療法」包括習知基因療法，其中藉由單一治療實現持續作用；及投與基因治療劑，其涉及一次或重複投與治療有效性DNA或mRNA。反義RNA及DNA可用作阻斷某些基因在活體內表現之治療劑。已展示短反義寡核苷酸當其充當抑制劑時可輸入細胞中，即使其因細胞膜所致之限制吸入而導致細胞內濃度較低。(Zamecnik等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4143-4146 [1986])。寡核苷酸可經修飾以增強其吸收，例如藉由以不帶電基團取代其帶負電磷酸二酯基。

存在多種可用於將核酸引入活細胞中之技術。該等技術可視將核酸活體外轉移至培養細胞中還是活體內轉移至預期宿主之細胞中而不同。適於活體外轉移核酸至哺乳動物細胞內之技術包括使用脂質體、電穿孔、顯微注射、細胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸鈣沈澱法等。目前較佳之活體內基因轉移技術包括用病毒(通常逆轉錄病毒)載體轉染和病毒鞘蛋白-脂質體介導之轉染(Dzau等人，Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993])。在某些情況下，可能需要向核酸源提供靶向標靶細胞之藥劑，諸如對細胞表面膜蛋白質或標靶細胞具有特異性之抗體，標靶細胞上的受體之配位體等。若採用脂質體，則可將結合與內飲作用相關的細胞表面膜蛋白質之蛋白質用於靶向及/或促進吸收

例如對特定細胞類型具有向性之衣殼蛋白質或其片段，在循環中經歷內化的蛋白質之抗體，靶向細胞內定位且增強細胞內半衰期之蛋白質。受體介導之胞吞作用之技術描述於例如 Wu等人，J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987)；及Wagner等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)中。關於基因標記及基因療法方案的綜述，參見Anderson等人，Science 256:808-813 (1992)。

編碼本文所述之TAT多肽或其片段之核酸分子適用於染色體鑑別。就此而論，不斷需要鑑別新穎染色體標記物，因為基於實際序列資料，目前可用之染色體標記試劑相對較少。本發明之各TAT核酸分子可用作染色體標記物。

本發明之TAT多肽及核酸分子亦可在診斷上用於組織分型，其中本發明之TAT多肽於一種組織中之表現可能與另一組織有差異，較佳於疾病組織中之表現與相同組織類型之正常組織有差異。TAT核酸分子可用於產生用於PCR、北方分析(Northern analysis)、南方分析(Southern analysis)及西方分析(Western analysis)之探針。

本發明涵蓋篩選化合物以鑑別模擬TAT多肽之化合物(促效劑)或阻礙TAT多肽之作用的化合物(拮抗劑)的方法。篩選拮抗劑藥物候選物之檢測經設計以鑑別與本文鑑別出之基因所編碼之TAT多肽結合或複合，或以其他方式干擾編碼多肽與其他細胞蛋白質之相互作用(包括例如抑制TAT多肽自細胞表現)的化合物。該等篩選檢測將包括適於高產量篩選化學庫從而使其尤其適於鑑別小分子藥物候選物之

檢測。

檢測可以多種格式進行，包括蛋白質-蛋白質結合檢測、生物化學篩選檢測、免疫檢測及基於細胞之檢測，其在此項技術中已充分表徵。

所有拮抗劑之檢測的共同之處在於其需要使藥物候選物與本文鑑別出之核酸所編碼的TAT多肽在足以允許此兩種組分相互作用之條件及時間下接觸。

在結合檢測中，相互作用為結合且可分離或偵測反應混合物中所形成之複合物。在一特定實施例中，將本文鑑別出之基因所編碼的TAT多肽或藥物候選物藉由共價或非共價連接固定於固相(例如微量滴定板)上。非共價連接一般藉由用TAT多肽之溶液塗佈固體表面並乾燥來實現。或者，可使用對欲固定之TAT多肽具有特異性的固定抗體(例如單株抗體)將該TAT多肽錨定於固體表面。藉由將可經可偵測標記加以標記之未固定組分添加至固定組分(例如含有所錨定組分之塗佈表面)進行檢測。當反應完成時，例如藉由洗滌來移除未反應組分，且偵測錨定於固體表面上之複合物。當最初未固定組分帶有可偵測標記時，偵測到固定於表面上之標記表明發生複合。當最初未固定組分不帶有標記時，可例如藉由使用特異性結合固定之複合物的標記抗體來偵測複合。

若候選化合物與本文鑑別出之基因所編碼之特定TAT多肽相互作用但不結合，則其與該多肽之相互作用可由熟知用於偵測蛋白質-蛋白質相互作用之方法檢測。該等檢測

包括傳統方法，諸如交聯、共免疫沈澱及經由梯度或層析管柱共純化。另外，蛋白質-蛋白質相互作用可藉由使用Fields及同事(Fields及Song, Nature (London), 340:245-246 (1989); Chien等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991))所述之基於酵母之遺傳系統如Chevray及Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991)所揭示來監測。許多諸如酵母GAL4之轉錄活化劑由兩個物理離散之模組化域組成，一個充當DNA結合域，另一個充當轉錄活化域。前述公開案中所述之酵母表現系統(通常稱為「雙雜交系統」)利用該性質且採用兩個雜交蛋白質，在一個中標靶蛋白質與GAL4之DNA結合域融合，且在另一個中候選活化蛋白質與活化域融合。在GAL4活化啟動子控制下GAL1-lacZ報導基因之表現係依賴於GAL4活性經由蛋白質-蛋白質相互作用之重構。用 β -半乳糖苷酶之發色受質偵測含有相互作用多肽之群落。藉由使用雙雜交技術鑑別兩個特定蛋白質之間的蛋白質-蛋白質相互作用之完整套組(MATCHMAKERTM)可購自Clontech。該系統亦可經擴展以定位參與特異性蛋白質相互作用之蛋白質域以及精確定位對該等相互作用而言關鍵之胺基酸殘基。

干擾本文鑑別出之編碼TAT多肽之基因與其他細胞內或細胞外組分相互作用的化合物可如下測試：通常在使基因產物及細胞內或細胞外組分可相互作用及結合的條件及時間下製備含有該兩種產物的反應混合物。為測試候選化合物抑制結合之能力，在無及有測試化合物存在下進行反

應。另外，可將安慰劑添加至第三反應混合物中以充當陽性對照組。如上文所述監測混合物中所存在之測試化合物與細胞內或細胞外組分之間的結合(複合物形成)。對照反應物形成複合物，但含有測試化合物之反應混合物未形成複合物，表明測試化合物干擾測試化合物與其反應搭配物之相互作用。

為檢測拮抗劑，可將TAT多肽與欲針對特定活性篩選之化合物一起添加至細胞中，且在TAT多肽存在下該化合物能夠抑制相關活性表明該化合物為TAT多肽之拮抗劑。或者，可藉由將TAT多肽及潛在拮抗劑與膜結合TAT多肽受體或重組受體在適當條件下組合進行競爭抑制檢測來偵測拮抗劑。TAT多肽可諸如由放射活性標記，以便可使用結合於受體之TAT多肽分子數目來測定潛在拮抗劑之有效性。編碼受體之基因可由熟習此項技術者已知之多種方法鑑別，例如配位體淘選及FACS分選。Coligan等人，*Current Protocols in Immun.*, 1(2): 第5章(1991)。較佳採用表現選殖，其中由對TAT多肽具有反應性之細胞製備聚腺苷酸化RNA，且將由此RNA產生之cDNA庫分組，且用於轉染COS細胞或對TAT多肽不具反應性之其他細胞。將於玻璃載片上生長之轉染細胞暴露於標記之TAT多肽。TAT多肽可藉由多種方式標記，包括碘化或包括位點特异性蛋白質激酶之識別位點。固定且培育之後，對載片進行自動放射照像分析。鑑別陽性組且製備亞組，且使用相互作用亞組集合(sub-pooling)及再篩選方法再轉染，最終產

生編碼推定受體之單一純系。

作為受體鑑別之替代方法，可使標記之TAT多肽與表現受體分子之細胞膜或提取製劑光親和連接。藉由PAGE解析交聯物質，且暴露於X射線膠片(X-ray film)。可切除含有受體之標記之複合物，解析成肽片段，且進行蛋白質微量測序。可使用獲自微量測序之胺基酸序列設計一組簡併寡核苷酸探針以篩選cDNA庫來鑑別編碼推定受體之基因。

在拮抗劑之另一檢測中，在候選化合物存在下將表現受體之哺乳動物細胞或膜製劑與標記之TAT多肽一起培育。隨後可量測化合物提高或阻斷此相互作用之能力。

潛在拮抗劑之更特定實例包括結合免疫球蛋白與TAT多肽之融合物的寡核苷酸，且尤其為抗體，包括(但不限於)多株及單株抗體及抗體片段、單鏈抗體、抗基因型抗體及該等抗體或片段之嵌合或人類化形式，以及人類抗體及抗體片段。或者，潛在拮抗劑可為密切相關蛋白質，例如TAT多肽之識別受體但不賦予作用，從而競爭性抑制TAT多肽之作用的突變形式。

另一潛在TAT多肽拮抗劑為使用反義技術製備之反義RNA或DNA構築體，在該技術中，例如反義RNA或DNA分子之作用在於藉由與靶向mRNA雜交且防止蛋白質轉譯直接阻斷mRNA之轉譯。反義技術可用於經由三螺旋形成或反義DNA或RNA控制基因表現，該兩種方法均基於聚核苷酸與DNA或RNA之結合。舉例而言，使用編碼本文之成熟

TAT多肽之聚核苷酸序列之5'編碼部分設計長度為約10至40個鹼基對之反義RNA寡核苷酸。DNA寡核苷酸係經設計以與涉及轉錄之基因之區互補(三螺旋-參見Lee等人, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney等人, Science, 241:456 (1988); Dervan等人, Science, 251:1360 (1991)), 從而防止TAT多肽轉錄及產生。反義RNA寡核苷酸活體內與mRNA雜交且阻斷mRNA分子轉譯至TAT多肽中(反義-Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988))。上述寡核苷酸亦可傳遞至細胞以使反義RNA或DNA可活體內表現以抑制TAT多肽之產生。當使用反義DNA時, 源自轉譯起始位點之例如在標靶基因核苷酸序列之約-10與+10位置的寡去氧核糖核苷酸較佳。

潛在拮抗劑包括小分子, 其結合於TAT多肽之活性位點、受體結合位點或生長因子或其他相關結合位點, 從而阻斷TAT多肽之正常生物活性。小分子之實例包括(但不限於)小肽或肽樣分子(較佳為可溶性肽)及合成非肽基有機或無機化合物。

核糖核酸酶為能夠催化RNA之特異性裂解之酶促RNA分子。核糖核酸酶利用與互補標靶RNA序列特異性雜交, 接著內切核苷酸裂解來起作用。潛在RNA標靶內之特異性核糖核酸酶裂解位點可藉由已知技術鑑別。關於其他詳情, 參見例如Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994), 及PCT公開案第WO 97/33551號(1997年9月18日公開)。

用於抑制轉錄之三螺旋形成中之核酸分子應為單股且由去氧核苷酸構成。該等寡核苷酸之鹼基組成經設計以便經由Hoogsteen鹼基配對規則(Hoogsteen base pairing rule)促進三螺旋形成，該等規則一般要求在雙螺旋體之一股上有相當大的嘌呤或嘧啶段。關於其他詳情，參見例如PCT公開案第WO 97/33551號，同上。

該等小分子可藉由上文論述之任何一或多種篩選檢測及/或藉由熟習此項技術者熟知之任何其他篩選技術來鑑別。

分離之編碼TAT多肽之核酸在本文中可用於使用此項技術中熟知及本文所述之技術來重組產生TAT多肽。又，所產生之TAT多肽可用於使用此項技術中熟知及本文所述之技術來產生抗TAT抗體。

可以醫藥組合物之形式投與特異性結合本文鑑別之TAT多肽的抗體以及藉由上文所揭示之篩選檢測所鑑別的其他分子以治療各種病症，包括癌症。

若TAT多肽在細胞內且使用完整抗體作為抑制劑，則內化抗體較佳。然而，亦可使用脂質體轉染法或脂質體將抗體或抗體片段傳遞至細胞中。若使用抗體片段，則特異性結合於標靶蛋白質之結合域的最小抑制性片段較佳。舉例而言，基於抗體之可變區序列，可設計保留結合標靶蛋白質序列之能力的肽分子。該等肽可化學合成得之及/或藉由重組DNA技術產生。參見例如，Marasco等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993)。

本文中之調配物亦可含有一種以上為所治療之特定適應

症所必需之活性化合物，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性化合物。或者或另外，組合物可包含增強其功能之藥劑，諸如細胞毒性劑、細胞激素、化學治療劑或生長抑制劑。該等分子適合以可有效地達成預期目的之量組合存在。

提供以下實例僅用於說明之目的且不意欲以任何方式限制本發明之範疇。

本說明書中所引用之所有專利及參考文獻均以全文引用之方式併入本文中。

實例

除非另外指示，否則實例中提及之市售試劑係根據製造商之說明書使用。在以下實例中及在整個說明書中以ATCC寄存編號標識之彼等細胞的來源為美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA)。

實例 1：使用 GeneExpress® 進行組織表現型態分析

分析含有基因表現資訊之專有資料庫(GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD)以試圖鑑別與在其他人類腫瘤及/或正常人類組織中相比，自身表現在相關特定人類腫瘤組織中有顯著及可偵測之上調的多肽(及其編碼核酸)。特定言之，使用可自 Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD獲得且可供GeneExpress®資料庫使用之軟體或在Genentech, Inc.撰寫及開發且可供GeneExpress®資料庫使用之專屬軟體來分析GeneExpress®資料庫。分析中之陽性命中率的評級係基於若干標準，包括例如組織特

異性、腫瘤特異性、及於正常基本及/或正常增殖組織中之表現量。使用該mRNA表現分析確定，與於相應正常人類皮膚組織中相比，編碼TAT419多肽之mRNA顯著地、可再現地及可偵測地過度表現於人類黑素瘤癌組織中。

實例2：原位雜交

原位雜交為一種用於偵測及定位細胞或組織製劑內之核酸序列的強有力及多用途之技術。其可適用於例如鑑別基因表現位點，分析轉錄組織分佈，鑑別及定位病毒感染，追蹤特異性mRNA合成中之變化及幫助染色體定位。

按照Lu及Gillett, Cell Vision 1:169-176 (1994)之方案的優化版本使用以PCR產生之標記 ^{32}P 之核糖探針進行原位雜交。簡言之，將經福馬林(formalin)固定及經石蠟包埋之人類組織切片，去石蠟，在 37°C 下於蛋白酶K(20 g/ml)中去蛋白質15分鐘，且如Lu及Gillett, 同上所述進一步加工以進行原位雜交。由PCR產物產生標記 ^{32}P -UTP之反義核糖探針且在 55°C 下雜交隔夜。將載片浸漬於Kodak NTB2核徑跡乳膠(nuclear track emulsion)中並暴露4週。

^{32}P -核糖探針合成

利用真空離心乾燥法(Speed Vac)乾燥 $6.0\text{ }\mu\text{l}$ (125 mCi) ^{32}P -UTP(Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol)。向各含有乾燥之 ^{32}P -UTP之管中添加以下成分： $2.0\text{ }\mu\text{l}$ 5×轉錄緩衝液、 $1.0\text{ }\mu\text{l}$ DTT(100 mM)、 $2.0\text{ }\mu\text{l}$ NTP混合物(2.5 mM:10 μ ；各10 mM GTP、CTP & ATP+10 μl H_2O)、 $1.0\text{ }\mu\text{l}$ UTP(50 μM)、 $1.0\text{ }\mu\text{l}$ Rnasin、 $1.0\text{ }\mu\text{l}$ DNA模板(1 μg)、 1.0

μl H_2O 、1.0 μl RNA聚合酶(PCR產物通常為T3=AS、T7=S)。

在37°C下培育各管1小時。添加1.0 μl RQ1 DNase，接著在37°C下培育15分鐘。添加90 μl TE(10 mM Tris pH 7.6/1 mM EDTA pH 8.0)，且將混合物移液至DE81紙上。將剩餘溶液裝載於Microcon-50超濾單元中，且使用程式10旋轉(6分鐘)。將過濾單元倒置於第二管上且使用程式2旋轉(3分鐘)。在最終的回收旋轉之後，添加100 μl TE。將1 μl 最終產物移液至DE81紙上，且於6 ml Biofluor II中計數。

探針在TBE/尿素凝膠上跑膠。向3 μl 裝載緩衝液中添加1-3 μl 探針或5 μl RNA Mrk III。在95°C加熱塊上加熱3分鐘後，立即將探針置放於冰上。沖洗凝膠各孔，裝載樣品，且在180-250伏特下跑膠45分鐘。將凝膠包裹於Saran包裝膜中，且在-70°C冷凍機中暴露於具有增感屏之XAR膜1小時至隔夜。

³²P-雜交

A. 預處理冷凍切片

自冷凍機移出載片，置放於鋁盤上，且在室溫下解凍5分鐘。將盤置放於55°C恆溫箱中5分鐘以減少冷凝。將載片在通風櫥中在冰上於4%三聚甲醛中固定10分鐘，且在室溫下於0.5×SSC中洗滌5分鐘(25 ml 20×SSC+975 ml SQ H₂O)。在37°C下於0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶K(12.5 μl 10 mg/ml於250 ml經預熱、無RNase之RNase緩衝液中的儲備液)中去蛋白質10分鐘後，在室溫下於0.5×SSC中洗滌切片10分

鐘。於70%、95%、100%乙醇中使切片脫水，各2分鐘。

B. 預處理經石蠟包埋之切片

將載片去石蠟，置放於SQ H₂O中，且在室溫下於2×SSC中清洗兩次，每次5分鐘。將切片於20 µg/ml蛋白酶K(500 µl 10 mg/ml，於250 ml無RNase之RNase緩衝液中；37℃，15分鐘)-人類胚胎或8×蛋白酶K(100 µl，於250 ml Rnase緩衝液，37℃，30分鐘)-福馬林組織中去蛋白質。隨後於0.5×SSC中清洗，且如上所述進行脫水。

C. 預雜交

將載片於襯有經Box緩衝液(4×SSC，50%甲醯胺)飽和之濾紙之塑膠箱中展開。

D. 雜交

將每載片 1.0×10^6 cpm探針及1.0 µl tRNA(50 mg/ml儲備液)在95℃下加熱3分鐘。用冰冷卻載片，且每載片添加48 µl雜交緩衝液。在渦旋後，向載片上之50 µl預雜交物中添加50 µl 32 P混合物。在55℃下培育載片隔夜。

E. 洗滌

在室溫下用2×SSC、EDTA洗滌2次，每次10分鐘(400 ml 20×SSC+16 ml 0.25 M EDTA，Vf=4L)，接著在37℃下進行RNaseA處理30分鐘(500 µl 10 mg/ml，於250 ml Rnase緩衝液中=20 µg/ml)。在室溫下用2×SSC、EDTA洗滌載片2次，每次10分鐘。嚴格洗滌條件如下：55℃下2小時，0.1×SSC、EDTA(20 ml 20×SSC+16 ml EDTA，Vf=4L)。

F. 寡核苷酸

對本文所揭示之多種DNA序列進行原位分析。獲得用於該等分析之寡核苷酸以與如附圖所示之核酸(或其互補序列)互補。

G. 結果

關於TAT419，在所測試之大部分正常組織中觀察到弱表現或無可觀察到的表現。相反，在所測試之大部分人類黑色素瘤細胞及組織中，觀察到很強且可定量重現的TAT419表現。

實例3：偵測癌性腫瘤中TAT多肽之上調的微陣列分析

通常含有數千基因序列之核酸微陣列適用於鑑別與正常對應物相比，患病組織中差異表現之基因。利用核酸微陣列，將來自測試及對照組織樣品之測試及對照mRNA樣品逆轉錄並作標記以產生cDNA探針。隨後使cDNA探針雜交於固定於固體支撐物上之核酸陣列。陣列經組態以至於陣列之各成員之序列及位置為已知的。舉例而言，已知在某些疾病狀態下表現之一系列所選基因可排列在固體支撐物上。經標記之探針與特定陣列成員之雜交指示該探針所源自之樣品表現該基因。若來自測試(疾病組織)樣品之探針之雜交信號大於來自對照(正常組織)樣品之探針之雜交信號，則鑑別出疾病組織中過度表現之基因。該結果暗示，患病組織中過度表現之蛋白質不僅適用作疾病病狀存在之診斷標記物，而且適用作治療疾病病狀之治療標靶。

核酸雜交方法及微陣列技術係此項技術中熟知者。在本實例中，雜交用核酸及探針之特定製備、載玻片及雜交條

件全部詳述於2001年3月30日申請之PCT專利申請案第PCT/US01/10482號中，且該申請案以引用之方式併入本文中。

在本實例中，相對於來自不同組織類型之癌性腫瘤及/或非癌性人類組織，研究源自各種人類組織之癌性腫瘤之上調的基因表現，以試圖鑑別在特定癌性腫瘤中過度表現之多肽。在某些實驗中，獲得相同組織類型之癌性人類腫瘤組織及非癌性人類腫瘤組織(通常來自同一患者)並分析TAT多肽表現。另外，獲得來自多種不同人類腫瘤中之任一者的癌性人類腫瘤組織且與藉由混合包括肝臟、腎臟及肺臟之源於上皮之非癌性人類組織而製備的「通用」上皮對照樣品比較。自混合的上皮組織分離之mRNA代表來自各種不同上皮組織之表現基因產物之混合物，由此提供可用於定量比較源於上皮之腫瘤中之基因表現程度的極佳陰性對照物。利用混合的對照樣品之微陣列雜交實驗，在雙色分析中產生線性圖。隨後使用雙色分析中所產生之直線斜率校正各實驗內之比率(測試：對照偵測)。隨後比較各個實驗之校正比率，並用於鑑別基因表現之聚類(clustering)。因此，混合的「通用對照」樣品不僅在簡單的雙樣品比較中提供有效的相對基因表現測定，而且允許橫跨數個實驗之多樣品比較。

在本實驗中，使用源自本文所述之編碼TAT多肽之核酸序列的核酸探針來建立微陣列，且使用來自各種腫瘤組織之RNA與之雜交。將基於校正比率：實驗比率之值指定為

「截止比(cutoff ratio)」。唯有高於該截止比之數值方具顯著性。雖然由與各實驗相關之雜訊或散點之量估算比率的顯著性，但通常使用1.8倍至2倍或更高之截止比與相應正常組織及/或混合的正常上皮通用對照物相比，來鑑別在腫瘤樣品中相對過度表現之候選基因。以此方式鑑別為在腫瘤樣品中相對過度表現之基因的比率自2倍至40倍不等，或甚至更高。相比之下，在以各顏色標記相同RNA且自身雜交之對照實驗中，對於幾乎所有信號高於背景之基因，所觀察到之比率均顯著小於1.8倍。此表明，高於1.8倍比率之實驗雜訊極低，且可預期所觀察到之1.8倍或更大之倍數變化表示所分析與所比較之樣品之間表現的真實、可偵測且可重現的差異。

該等實驗之資料證明，與正常的對應人類組織或細胞及/或混合的正常上皮對照組織相比，TAT419多肽顯著地、可偵測地且可重現地過度表現於人類黑素瘤腫瘤組織及衍生的細胞株中。如上所述，該等資料證明，本發明之TAT419多肽不僅適用作人類之一或多種癌性腫瘤之存在的診斷標記物，而且可充當治療彼等過度表現TAT419多肽之癌性腫瘤的治療標靶。

實例4：製備可結合於TAT419多肽之抗體

此實例說明可特異性結合TAT419之單株抗體的製備。

產生單株抗體之技術在此項技術上係已知的且描述於例如 Goding同上中。可採用之免疫原包括純化之TAT、含有TAT之融合蛋白質、及細胞表面上表現重組TAT之細胞。

免疫原可由熟習此項技術者無需過度實驗即可選定。

用已在完全弗氏佐劑中乳化之TAT免疫原，藉由經皮下或腹膜內注射1-100微克之量來使小鼠(諸如Balb/c)免疫。或者，在MPL-TDM佐劑(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)中乳化免疫原且注射於動物後部足墊中。接著用已在所選佐劑中乳化之額外免疫原使免疫之小鼠加強免疫10至12天以上。此後亦可用額外免疫注射劑來使該等小鼠加強免疫若干週。可週期性地藉由後眼眶採血自小鼠獲得血清樣品以供在ELISA檢測中測試，從而偵測抗TAT抗體。

在偵測到適合之抗體力價之後，可用TAT最終靜脈內注射劑來注射對抗體呈「陽性」之動物。在3至4天後，處死小鼠且收集脾細胞。隨後使脾細胞融合(使用35%聚乙二醇)於所選鼠類骨髓瘤細胞株(諸如P3X63AgU.1，可獲自ATCC，編號CRL 1597)。融合物產生融合瘤細胞，其可隨後塗佈於含有HAT(次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷)培養基之96孔組織培養板中以抑制未融合細胞、骨髓瘤雜交物及脾細胞雜交物之增殖。

將在ELISA中就針對TAT之反應性篩選融合瘤細胞。測定分泌針對TAT之所需單株抗體的「陽性」融合瘤細胞屬於此項技術之技能範疇內。

可於同源Balb/c小鼠中腹膜內注射陽性融合瘤細胞來產生含有抗TAT單株抗體之腹水。或者，可使融合瘤細胞在組織培養燒瓶或滾瓶中生長。可依次使用硫酸銨沈澱法及

凝膠排阻層析法來純化腹水中所產生之單株抗體。或者，可採用基於抗體結合於蛋白質A或蛋白質G之親和層析。

使用上述技術，已產生多種獨立且獨特的融合瘤細胞株，各產生可結合於TAT419多肽之單株抗體。由該等融合瘤細胞株產生之單株抗體之功能在於：已使用熟知及常規採用之技術證實其可結合於TAT419多肽，該等技術例如有西方墨點法、ELISA分析、表現TAT419多肽之細胞(經轉染而表現TAT419多肽於細胞表面之細胞與表現TAT419多肽之某些人類黑素瘤細胞株兩者)之FACS分選分析及/或免疫組織化學分析。

實例5：抗TAT419鼠類單株抗體5E9之輕鏈及重鏈(及可變輕鏈及可變重鏈)的分子選殖

如上所述產生之抗TAT419鼠類單株抗體之一在本文中命名為5E9。該實例展示編碼鼠類抗TAT419單株抗體5E9之可變區之cDNA分子的製備。前置PCR引子經設計以至於其對編碼鼠類單株抗體5E9之V_L及V_H區之核苷酸序列的起始片段之mRNA具有特異性。前置引子經設計以至於頭8至9個N末端胺基酸之大多數可能的密碼子將雜交於PCR引子。

使用表現抗TAT419鼠類單株抗體之融合瘤細胞作為抗體mRNA以及上述寡核苷酸引子之來源。使用由Chomczynski及Sachhi 1987 *Anal. Biochem.* 162:156描述之程序自 1×10^8 個細胞中分離出總RNA。利用RT-PCR及上述簡併N末端引子以及經設計而黏接於在各物種中高度保守的恆定輕鏈域

(CL)及恆定重鏈域1(CH1)中之區域的反置引子來擴增可變輕鏈(V_L)域及可變重鏈(V_H)域。

前置引子對 V_L 及 V_H 區之N末端胺基酸序列具有特異性。LC及HC反置引子分別經設計而黏接於在各物種中高度保守的恆定輕鏈域(CL)及恆定重鏈域1(CH1)中之區域。利用常規測序方法測定插入物之聚核苷酸序列。鼠類5E9單株抗體之全長輕鏈(SEQ ID NO:3)及全長重鏈(SEQ ID NO:4)序列分別展示於圖3及圖4中。鼠類5E9單株抗體之 V_L (SEQ ID NO:5)及 V_H (SEQ ID NO:6)胺基酸序列亦分別展示於圖3及圖4中。該等胺基酸序列之進一步表徵顯示以下關於鼠類抗TAT419 5E9單株抗體之各個CDR區的胺基酸序列：CDR-L1(KSSQSLLDSDGKTYLN；SEQ ID NO:7)、CDR-L2(LVSKLDS；SEQ ID NO:8)、CDR-L3(WQGTHFPYT；SEQ ID NO:9)、CDR-H1(GYTFTSYWMQ；SEQ ID NO:10)、CDR-H2(TIYPGDGDTSYAQKFKG；SEQ ID NO:11)及CDR-H3(WGYAYDIDN；SEQ ID NO:12)。

隨後將抗體輕鏈及重鏈之所擴增的 V_L 及 V_H cDNA選殖於pRK哺乳動物細胞表現載體中。(Shields等人，2000 *J. Biol. Chem.* 276:659-604)。利用EcoRV及KpnI之位點，將所擴增的可變輕鏈 V_L cDNA選殖於含有人類 κ 恆定域之pRK哺乳動物細胞表現載體(pRK.LPG3.HumanKappa；Genentech, South San Francisco, CA)中。利用BsiWI及ApaI之位點，將所擴增的可變重鏈 V_H cDNA插入編碼全長人類IgG1恆定域之pRK哺乳動物細胞表現載體

(pRK.LPG4.HumanHC ; Genentech)中。

實例6：免疫組織化學分析

如上所述製備針對TAT419多肽之抗體，且如下用於免疫組織化學分析。首先將組織切片固定於丙酮/乙醇(已冷凍或經石蠟包埋)中5分鐘。然後於PBS中洗滌切片，隨後用抗生物素蛋白及生物素(Vector kit)阻斷，各10分鐘，接著於PBS中洗滌。隨後用10%血清阻斷切片持續20分鐘，隨後墨點處理以去除過量物。隨後向切片中添加濃度為10 µg/ml之一次抗體持續1小時，隨後於PBS中洗滌切片。隨後向切片中添加經生物素標記之二次抗體(抗一次抗體)持續30分鐘，隨後用PBS洗滌切片。隨後使切片暴露於Vector ABC套組之試劑中持續30分鐘，隨後於PBS中洗滌切片。隨後使切片暴露於二胺基聯苯胺(Pierce)5分鐘，隨後於PBS中洗滌。隨後用梅耶(Mayers)氏蘇木精將切片對比染色，蓋上蓋玻片並觀察。亦可如以下中所述進行免疫組織化學分析：Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989；及 Ausubel 等人，Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)。

該等分析之結果展示，該等分析中所用之單株抗體在所測試之所有獨立的原發性人類黑素瘤癌樣品的約90%中鑑別到可觀察到之TAT419表現，其中約65%顯示中度(2+)至高度(3+)TAT419多肽表現。

實例7：鼠類單株抗體之人類化

該實例證明使針對TAT419之鼠類抗體5E9人類化之方法的適用性。

使TAT419之細胞外域表現於大腸桿菌(未糖基化)中且以免疫黏附素(Fc融合物)形式表現於CHO(糖基化)細胞中，且用習知方式來純化。藉由用源自大腸桿菌之重組TAT419細胞外域使小鼠免疫來獲得表現抗體5E9之鼠類融合瘤，且利用ELISA根據結合於經TAT419塗佈之板的能力來鑑別。

選殖鼠類5E9可變域

使用標準方法自產生5E9之融合瘤細胞提取總RNA。對重鏈及輕鏈使用RT-PCR以簡併引子擴增可變輕鏈(VL)及可變重鏈(VH)域。前置引子對VL區及VH區之N末端胺基酸序列具有特異性。LC及HC反置引子分別經設計以黏接至恆定輕鏈域(CL)及恆定重鏈域1(CH1)中在物種之間高度保守的區域。使用常規測序方法測定插入物之聚核苷酸序列。

於接受體人類共同構架上之直接高變區移植物

用於該研究之噬菌粒為單價Fab-g3呈現載體且由受單一phoA啟動子控制之2個開放閱讀構架組成。第一開放閱讀構架係由stII信號序列融合於接受體輕鏈之VL及CH1域組成，且第二開放閱讀構架係由stII信號序列融合於接受體重鏈之VH及CH1域、繼之以次要噬菌體鞘蛋白P3組成。

比對鼠類5E9之VL及VH域與人類VL κ I(huKI)及人類VH亞群III(huIII)共同序列。為了產生CDR移植物，將5E9之

高變區移植於huKI及huIII共同接受體構架中以產生「5E9-移植物」，即直接CDR移植物。在VL域中，將以下區域移植於人類共同接受體：位置24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)。在VH域中，移植位置26-35(H1)、49-65(H2)及93-102(H3)。MacCallum等人(J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))已分析抗體及抗原複晶體結構，且發現重鏈之位置49及93屬於接觸區，因此當使抗體人類化時，CDR-H2及CDR-H3之定義中包括該等位置似乎為合理的。

藉由Kunkel突變誘發LC及HC表現載體，對各高變區使用獨立的寡核苷酸，以IgG形式產生「5E9-移植物」。亦使用Kunkel突變誘發改變胺基酸以增加親和力或穩定性。藉由DNA測序鑑別正確純系。

高變區之隨機化

使用維持偏向於鼠類高變區序列之軟隨機化策略，分別向5E9-移植物之各高變區中引入序列多樣性。此係使用Gallop等人，J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994)中首次描述之中毒寡核苷酸合成策略來實現。對於高變區內欲突變之特定位置，用核苷酸之70-10-10-10混合物使編碼野生型胺基酸之密碼子中毒，從而在每一位置上產生平均50%之突變率。

軟隨機化寡核苷酸在鼠類高變區序列之後被圖案化且涵蓋由直接高變區移植物界定之相同區。藉由使用密碼子RGC，使VH域中在H2之起點處的胺基酸位置(位置49)之序列多樣性侷限於A、G、S或T。

為了避免重新選擇野生型CDR移植序列，藉由Kunkel突變誘發在5E9-移植物之各CDR中間引入終止密碼子(TAA)，產生6個不同模板，各自之終止密碼子引入不同CDR中。使用隨機化寡核苷酸來引入多樣性以及修復相應模板中之終止密碼子。

產生噬菌體庫

在37°C下，將如上所概述經設計以在各高變區中引入多樣性的隨機化寡核苷酸池分別在20 µl含有660 ng寡核苷酸、50 mM Tris(pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM ATP、20 mM DTT及5U聚核苷酸激酶之反應物中磷酸化1小時。

將旨在於單一CDR中引入多樣性之各磷酸化寡核苷酸池與20 µg含有相應終止密碼子之Kunkel模板組合。在50 mM Tris(pH 7.5)、10 mM MgCl₂中進行反應，最終體積為500 µl，使得寡核苷酸與模板之比率為3。使混合物在90°C下黏接4分鐘，在50°C下5分鐘，隨後在冰上冷卻。隨後，在室溫下藉由添加1 µl 100 mM ATP、10 µl 25 mM dNTP(各為25 mM之dATP、dCTP、dGTP及dTTP)、15 µl 100 mM DTT、25 µl 10×TM緩衝液(0.5 M Tris pH 7.5，0.1 M MgCl₂)、2400 U T4連接酶及30 U T7聚合酶填滿黏接之模板(250 µl)持續3小時。隨後淨化填滿之產物並電穿孔於SS320細胞中，在M13/KO7輔助噬菌體存在下繁殖，如Sidhu等人，Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)所述。庫規模在 $1-2 \times 10^9$ 個獨立的純系範圍內。測序最初庫之隨機純系以評估庫品質。

噬菌體選擇

在噬菌體選擇中，在4℃下將CHO源性TAT419細胞外域(2 µg/ml)在MaxiSorp微量滴定板(Nunc)上固定於PBS中隔夜。使用酪蛋白阻斷劑(Pierce)阻斷板至少1小時。自培養物上清液收集噬菌體且將其懸浮於含有0.5% BSA及0.05% Tween 20之PBS(PBSBT)中。在噬菌體選擇後，用含有0.05% Tween 20之PBS(PBST)徹底洗滌微量滴定孔，且藉由與100 mM HCl一起培育各孔30分鐘來溶離所結合之噬菌體。用1 M Tris(pH 8)中和噬菌體，且使用XL1-藍細胞及M13/KO7輔助噬菌體擴增，且在37℃下於2YT、50 µg/ml卡本西林(carbenicillin)中生長隔夜。將自含標靶之孔中溶離之噬菌體的力價與自不含標靶之孔中回收之噬菌體的力價相比較來評估富集。

Fab及IgG之產生

為了表現Fab蛋白質以用於親和力量測，在噬菌體呈現載體中在重鏈與g3之間引入終止密碼子。將純系轉型於大腸桿菌34B8細胞中，且使其在30℃下在完全C.R.A.P.培養基中生長(Presta等人，Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997))。藉由離心收集細胞，懸浮於PBS、100 µM PMSF、100 µM苯甲脒、2.5 mM EDTA中，且使用微流化器破碎。用蛋白質G親和層析法來純化Fab。

出於篩選目的，最初在293細胞中產生IgG變異體。使用FuGene系統將編碼VL及VH之載體(25 µg)轉染於293細胞中。混合500 µl FuGene與4.5 ml不含FBS之DMEM培養

基，且在室溫下培育5分鐘。向該混合物中添加各鏈(25 μ g)，且在室溫下培育20分鐘，隨後在37°C下在5% CO₂中轉移至5個T-150燒瓶中隔夜以備轉染。第二天，移除含有轉染混合物之培養基且用23 ml含0.1 ml/L微量元素(A0934)及10 mg/L胰島素(A0940)之PS04培養基更換。再培育細胞5天，此後在1000 rpm下收集培養基5分鐘，且使用0.22 μ m低蛋白結合過濾器無菌過濾。樣品可在每125 ml培養基添加2.5 ml 0.1% PMSF之後儲存在4°C下。使用蛋白質G親和層析法純化IgG。

親和力測定

利用 Scatchard 分析及利用表面電漿子共振使用 BIAcore™-2000或A100進行親和力測定。

Biacore 2000

固定(約100-400 RU，於10 mM乙酸鈉(pH 4.8)中，在CM5感測器晶片上)TAT419細胞外域(糖基化)，且5E9抗體變異體用作分析物(以30 μ L/min之流速注射，使用4至1000 nM之於PBST中之2倍連續稀釋液)。用4分鐘締合及10分鐘解離來分析各樣品。在各注射後，使用10 mM甘胺酸(pH 1.7)使晶片再生。

結果及討論

用於人類化之人類接受體構架係基於共同人類 κ I VL域及共同人類亞群III VH域。比對5E9之VL及VH域與人類 κ I及亞群III域；鑑別各互補決定區(CDR)並移植於人類接受體構架中以產生可表現為IgG之CDR移植物(5E9-移植物)。

產生 Fab 呈現噬菌體庫，其中分別在 5E9-移植物之各 CDR 中引入多樣性且針對 CHO 源性 TAT419 細胞外域淘選。在所有 6 個庫中進行第二輪之後，觀察富集度。在第 6 輪之後，自各庫中挑選純系用於 DNA 序列分析，且顯示靶向六個 CDR 中之每一個的序列變化。該等自庫鑑別之序列變化可代表產生結合有改良之變異體的變化或僅指示對 TAT419 細胞外域結合無影響之位置處的胺基酸變化。

使若干所選純系表現為 Fab 且利用 Biacore 表徵其與 TAT419 細胞外域之結合。所有純系結合於細胞表面上之 TAT419，且大多數純系之結合親和力相對於 5E9-移植物大大提高。

在本文中命名為 hu5E9.v1 且具有圖 5 中所示之全長輕鏈胺基酸序列 (SEQ ID NO:13)、圖 6 中所示之全長重鏈胺基酸序列 (SEQ ID NO:14)、圖 5 中所示之 VL 胺基酸序列 (SEQ ID NO:15) 及圖 6 中所示之 VH 胺基酸序列 (SEQ ID NO:16) 的人類化抗 TAT419 抗體顯示以高於鼠類 5E9 之親和力結合於細胞表面上之 TAT419，且因而可選作前導候選物以供進一步研發。hu5E9.v1 之各個 CDR 序列如下：CDR-L1(KSSQSLLDSDGKTYLN；SEQ ID NO:7)、CDR-L2(LVSKLDS；SEQ ID NO:8)、CDR-L3(WQGTHFPYT；SEQ ID NO:9)、CDR-H1(GYTFTSYWMQ；SEQ ID NO:10)、CDR-H2(TIYPGDGDTSYAQKFKG；SEQ ID NO:11) 及 CDR-H3(WGYAYDIDN；SEQ ID NO:12)。

亦鑑別出本文中命名為 hu5E9.v2 之第二人類化抗 TAT419

抗體，其具有與hu5E9.v1相同之VL序列(SEQ ID NO:15)及圖7中所示之VH胺基酸序列(SEQ ID NO:17)。

實例8：結合分析及TAT419抗原決定基定位

各種抗TAT419抗體之結合親和力可在室溫下藉由表面電漿共振法利用 Pharmacia BIAcore® 3000(BIAcore AB, Uppsala, Sweden)來測定(參見例如 Morton 等人，1998 *Methods in Enzymology*, 295, 268-294)。使各種抗TAT419抗體經由一級胺基固定於感測器晶片(CM5)上。藉由以5 ml/min注射20 ml 0.025 M N-羥基丁二醯亞胺與0.1 M N-乙基-N'(二甲基胺基丙基)碳化二亞胺之混合物來活化已羧甲基化之感測器晶片表面基質。以5 ml/min注射5-10 ml 10 mg/ml抗TAT419抗體於10 mM乙酸鈉(pH 4.5)中之溶液。在偶合後，藉由注射20 ml 1 M乙醇胺(pH 8.5)來阻斷晶片上未佔據之位點。操作緩衝液為含0.05%聚山梨醇酯20之PBS。在動力學量測中，在流動池之上以30 ml/min之流動速率注射各種抗TAT419抗體於操作緩衝液中之兩倍連續稀釋液，持續3分鐘，且使所結合之材料解離20分鐘。藉由注射20 ml 10 mM甘胺酸·HCl(pH 1.5)使結合表面再生。使用已被活化但不固定有抗體之流動池1作為參比池。物質與流動池1之非特異性結合可忽略不計。在表觀結合親和力之計算中，使用1:1結合模型利用全面擬合來分析資料。同時擬合締合及解離速率常數(BIA評估軟體)。

由上述各種單株抗體結合之TAT419抗原決定基係用標準競爭性結合分析來測定(Fendly 等人，1990 *Cancer*

Research 50:1550-1558)。藉由對經工程改造而表現 TAT419 多肽之完整細胞採用直接螢光法，使用 PANDEX™ 篩選機測螢光量來對抗體進行交叉阻斷研究。

各單株抗體使用已確立的程序與異硫氰酸螢光素 (FITC) 結合 (Wofsy 等人，1980 *Selected Methods in Cellular Immunology*，第 287 頁，Mishel 及 Schiigi (編) San Francisco: W.J. Freeman Co.)。所測試之樣品為已作胰蛋白酶處理、洗滌一次且以每毫升 1.75×10^6 個細胞再懸浮於含有 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 及 0.1% NaN_3 之冷 PBS 中的表現 TAT419 之細胞之匯合單層。添加最終濃度為 1% 之膠乳粒子 (IDC, Portland, OR) 以減小 PANDEX™ 板膜之堵塞。向 PANDEX™ 板孔中添加 20 μl 細胞懸浮液及 20 μl 經純化之單株抗體 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，且在冰上培育 30 分鐘。向各孔中添加 20 μl 標記 FITC 之單株抗體的預定稀釋液，培育 30 分鐘，洗滌且用 PANDEX™ 篩選機測螢光量。僅當單株抗體阻斷自身之結合的程度與第二單株抗體相等時，方認為其共享抗原決定基。在該實驗中，在本文中命名為 5E9 及 3C3 之鼠類單株抗體各自針對細胞表面表現之 TAT419 多肽上的不同抗原決定基。使用該檢測，一般熟習此項技術者可鑑別與如上所述之單株抗體結合於相同抗原決定基之其他單株抗體。

亦進行結合分析以鑑別抗原決定基之大致位置。使數個 TAT419 源性肽變異體表現於 293 細胞中。利用本文所述之各種鼠類抗 TAT419 單株抗體進行西方墨點分析。該等分析

之結果證明，5E9鼠類抗TAT419抗體識別且結合於表現全長TAT419多肽之293細胞，而第二種獨立的鼠類抗TAT419單株抗體既不識別亦不結合於表現TAT419多肽之293細胞，其N末端的一部分缺失，表明鑑別兩個各別獨特的抗原決定基。

更特定言之，本文中測試之某些鼠類抗TAT419單株抗體顯示結合於位於本文中如SEQ ID NO:2所示之TAT419序列之第27個與第64個胺基酸之間的抗原決定基。此外，其他鼠類抗TAT419單株抗體(包括鼠類5E9單株抗體及其各種人類化形式)顯示結合於位於本文中如SEQ ID NO:2所示之TAT419多肽序列之第65個與第101個胺基酸之間的抗原決定基。

實例9：由表現TAT419多肽之細胞內化抗TAT419抗體

用表現TAT419於表面上之細胞研究抗TAT419抗體之細胞內化。為了研究抗體結合於TAT419之結果，將表現TAT419之黑素瘤細胞株之樣品與各種抗TAT419抗體一起在冰上培育1小時，隨後固定以用二次抗體染色。二次抗體對所測試之5E9鼠類單株抗體及其他抗TAT419鼠類單株抗體而言為抗鼠類Cy3，或對鼠類單株抗體之嵌合形式而言為抗人類Cy3。用表現TAT419之細胞使用去卷積顯微鏡(Deconvolution Microscope)觀察到鼠類單株抗體對質膜有明顯的染色，表明形成抗體-細胞表面蛋白質複合物。

關於後續方法，參見「Internalization studies」，Polson等人，**Blood** 110(2):616-23 (2007)，第618頁。當使用去卷

積顯微術(60倍放大率)觀察時，免疫螢光顯示細胞表面染色及內化。不表現TAT419之對照細胞不顯示質膜染色。將該等觀察結果與保持在冰上1小時隨後轉變至37°C後維持2小時之細胞比較。用表現TAT419之細胞使用鼠類5E9與3C3抗TAT419抗體兩者觀察到明顯的質膜染色及內部細胞染色，表明抗體-細胞表面蛋白質複合物運輸至細胞本身內。在隔夜培育後，觀察到進一步的抗體/TAT419複合物吸收。

用5E9對質膜染色1小時，在4°C下培育，隨後固定細胞並用二次抗體「Cy3小鼠」處理。在37°C下2小時或隔夜培育，接著固定並用二次抗體處理後，顯示內化。

將細胞接種於8孔腔載玻片(Nalge Nunc Intl.)中(約100,000個細胞/孔)並在37°C/5% CO₂下培育24-48小時。在含蛋白酶抑制劑(50 µg/ml亮抑蛋白酶肽(Leupeptin)及5 µg/ml抑肽素(Pepstatin))之生長培養基中添加2-5 µg/ml之抗TAT419抗體隔夜或維持2小時。該等蛋白酶抑制劑阻止一次抗體降解，從而允許偵測溶酶體中之抗體。在活標記中，將細胞與抗體一起在室溫下培育45分鐘。隨後洗滌所有細胞，固定於3%甲醛中維持10分鐘，用0.05%皂素作滲透處理5-10分鐘，且在室溫下用PBS+1% BSA阻斷非特異性抗體結合位點20分鐘。隨後將細胞與標記有Alexa-488(Molecular Probes)之二次抗體一起在37°C下培育1小時，洗滌，隨後移除腔插入物以暴露具有細胞之載玻片。藉由施用含DAPI用於標記細胞核之VectaShield(Vector

Laboratories)來安置載玻片，隨後置放在蓋玻片下並用澄清的指甲油密封。

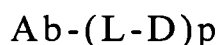
該等分析之結果證明，在向細胞添加抗體後少於20小時內，本文所述之各種抗TAT419抗體(包括鼠類5E9單株抗體及其各種人類化形式)結合於活細胞表面上之TAT419多肽且快速內化於細胞中並定位於細胞之溶酶體。因而，本文所述之抗TAT419抗體為表現TAT419多肽之腫瘤的結合毒素之腫瘤療法的極佳候選物。

實例10：製備結合TAT419之毒素結合抗體

在癌症治療中使用抗體-藥物結合物(ADC)(亦即免疫結合物)局部傳遞細胞毒性劑或細胞生長抑制劑(亦即殺滅或抑制腫瘤細胞之藥物)(Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212 ; Syrigos 及 Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614 ; Niculescu-Duvaz及Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172 ; US 4,975,278)允許靶向傳遞藥物部分至腫瘤且細胞內積聚於其中，其中全身性投與該等非結合藥物劑會對正常細胞以及設法去除之腫瘤細胞產生不可接受之毒性程度(Baldwin等人，(1986) Lancet (3月15日，1986年)第603-05頁；Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera等人(編)，第475-506頁)。因此應設法使毒性最小而功效最大。旨在設計及精製ADC之努力已集中於單株抗體(mAb)之選擇性以及藥物連接及藥物釋放

之性質。已報導，多株抗體與單株抗體均適用於該等策略 (Rowland 等人，(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。該等方法中使用的藥物包括道諾黴素、阿黴素、甲胺蝶呤及長春地辛 (Rowland 等人，(1986) 同上)。抗體-毒素結合物中使用的毒素包括細菌毒素，諸如白喉毒素；植物毒素，諸如蓖麻毒素；小分子毒素，諸如格爾德黴素 (geldanamycin) (Mandler 等人，(2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581；Mandler 等人，(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028；Mandler 等人，(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、類美登素 (EP 1391213；Liu 等人，(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) 及卡奇黴素 (Lode 等人，(1998) *Cancer Res.* 58:2928；Hinman 等人，(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)。

在本發明之抗體藥物結合物 (ADC) 中，抗體 (Ab) 經由連接子 (L) 與一或多個藥物部分 (D) 結合，例如每個抗體約 1 至約 20 個藥物部分。具有下式之 ADC：



可採用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑，藉由數種途徑來製備，該等途徑包括：(1) 使抗體之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成 Ab-L，隨後與藥物部分 D 反應；及 (2) 使藥物部分之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成 D-L，隨後與抗體之親核基團反應。本文描述用於製備 ADC 之其他方法。

連接子可由一或多種連接子組分構成。例示性連接子組分包括6-馬來醯亞胺基己醯基(「MC」)、馬來醯亞胺基丙醯基(「MP」)、纈胺酸-瓜胺酸(「val-cit」)、丙胺酸-苯丙胺酸(「ala-phe」)、對胺基苯甲氧基羰基(「PAB」)、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(「SPP」)、4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SMCC」)及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SIAB」)。此項技術已知其他連接子組分，且一些描述於本文中。

在一些實施例中，連接子可包含胺基酸殘基。例示性胺基酸連接子組分包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。包含胺基酸連接子組分之胺基酸殘基包括天然存在之胺基酸以及次要胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物(諸如瓜胺酸)。可設計胺基酸連接子組分，且優化其對特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D、或纖溶蛋白酶)之酶促裂解之選擇性。

抗體上之親核基團包括(但不限於)：(i)N-末端胺基；(ii)側鏈胺基，例如離胺酸；(iii)側鏈硫醇基，例如半胱胺酸；及(iv)糖羥基或胺基，其中抗體經糖基化。胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡巴脒(thiosemicarbazone)、羧酸肼及芳醯肼基具有親核性且能夠與連接子部分及連接

子試劑上之親電子基團反應形成共價鍵，該等親電子基團包括(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵基甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵基乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基。某些抗體具有可還原之鏈間二硫鍵，亦即半胱胺酸橋。可藉由用諸如DTT(二硫蘇糖醇)之還原劑進行處理而使抗體具有與連接子試劑結合之反應性。由此，理論上各半胱胺酸橋將形成兩個反應性硫醇親核體。可經由離胺酸與2-亞胺基硫雜環戊烷(Traut試劑)反應而將額外親核基團引入抗體中，從而使胺轉化為硫醇。可藉由引入一個、兩個、三個、四個或四個以上半胱胺酸殘基(例如製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之突變體抗體)而將反應性硫醇基引入抗體(或其片段)中。

本發明之抗體藥物結合物亦可藉由修飾抗體以引入可與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應之親電子部分而製得。可將糖基化抗體之糖以例如過碘酸鹽氧化試劑氧化以形成可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應的醛或酮基。所得亞胺希夫鹼(Schiff base)基團可形成穩定鍵，或可經例如硼氫化物試劑還原而形成穩定胺鍵。在一個實施例中，糖基化抗體之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶或偏過碘酸鈉之反應可於蛋白質中產生可與藥物上之適當基團反應的羰基(醛及酮基團)(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一實施例中，含有N末端絲胺酸或蘇胺酸殘基之蛋白質可與偏過碘酸鈉反應，從而產生醛而非第一胺基酸

(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852)。此醛可與藥物部分或連接子親核體反應。

或者，可例如藉由重組技術或肽合成製得包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白質。DNA之長度可包含編碼結合物之兩個部分的各別區域，該等區域彼此相鄰或由編碼不會破壞結合物所需特性之連接子肽之區域隔開。

在另一實施例中，抗體可與用於預靶向腫瘤的「受體」(諸如抗生蛋白鏈菌素)結合，其中將抗體-受體結合物投與患者，接著使用清除劑將未結合之結合物自循環系統中移除，且接著投與與細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)結合的「配位體」(例如抗生物素蛋白)。

藉由連接毒素至純化抗體來產生抗體-藥物結合物之特定技術在此項技術中為熟知的且按常規採用。舉例而言，純化單株抗體與毒素DM1結合可如下實現。對純化抗體用N-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸鹽衍生化以引入二硫吡啶基。用SPP(5.3莫耳當量於2.3 mL乙醇中)處理於44.7 mL含有NaCl(50 mM)及EDTA(1 mM)之50 mM磷酸鉀緩衝劑(pH 6.5)中之抗體(376.0 mg, 8 mg/mL)。在環境溫度下、在氬氣氛圍下培育90分鐘後，將反應混合物經由以35 mM檸檬酸鈉、154 mM NaCl及2 mM EDTA平衡之Sephadex G25管柱凝膠過濾。隨後彙集含有抗體的溶離份並檢測。用上述35 mM檸檬酸鈉緩衝液(pH 6.5)稀釋抗體-SPP-Py(337.0 mg, 具有可釋放的2-硫吡啶基團)，最終

濃度為2.5 mg/ml。隨後將含DM1(1.7當量，16.1 mol)之3.0 mM二甲基乙醯胺(DMA，3% v/v於最終反應混合物中)添加至抗體溶液中。在環境溫度下，在氬氣下，繼續進行反應20小時。將反應物裝載於經35 mM檸檬酸鈉、154 mM NaCl(pH 6.5)平衡的Sephacryl S300凝膠過濾管柱(5.0 cm×90.0 cm，1.77 L)上。流速為5.0 ml/min，且收集65個溶離份(各20.0 ml)。彙集溶離份並檢測，其中藉由量測252 nm及280 nm下之吸光度來確定每抗體分子連接之DM1藥物分子的數目(p')。

出於說明性目的，純化單株抗體與毒素DM1結合亦可如下實現。對純化抗體用4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC, Pierce Biotechnology, Inc)衍生化以引入SMCC連接子。將20 mg/ml之抗體於含7.5莫耳當量之SMCC(20 mM於DMSO中，6.7 mg/ml)之50 mM磷酸鉀/50 mM氯化鈉/2 mM EDTA(pH 6.5)中處理。在環境溫度下、在氬氣氛圍下攪拌2小時後，將反應混合物經由以50 mM磷酸鉀/50 mM氯化鈉/2 mM EDTA(pH 6.5)平衡之Sephadex G25管柱過濾。彙集含有抗體的溶離份且檢測。隨後用50 mM磷酸鉀/50 mM氯化鈉/2 mM EDTA(pH 6.5)稀釋抗體-SMCC，最終濃度為10 mg/ml，且與10 mM DM1(假定5個SMCC/抗體，1.7當量，7.37 mg/ml)之二甲基乙醯胺溶液反應。將反應物在環境溫度下、在氬氣下攪拌16.5個小時。接著將結合反應混合物經由Sephadex G25凝膠過濾管柱(1.5×4.9 cm)用1×PBS(pH 6.5)來過濾。隨後根

據 252 nm 及 280 nm 下之吸光度來測定 DM1/抗體比(p)。

此外，所選抗體上之游離半胱胺酸可用雙順丁烯二醯亞胺基試劑 BM(PEO)4(Pierce Chemical)修飾，在抗體表面上留下未反應的順丁烯二醯亞胺基。此可藉由將 BM(PEO)4 溶解於 50% 乙醇/水混合物中至濃度為 10 mM 且將十倍莫耳過量添加至含有濃度為約 1.6 mg/ml (10 微莫耳) 之於磷酸鹽緩衝鹽水中之抗體的溶液中且使其反應 1 小時來實現。過量 BM(PEO)4 藉由在具有 150 mM NaCl 緩衝劑之 30 mM 檸檬酸鹽 (pH 6) 中凝膠過濾來移除。將約 10 倍莫耳過量 DM1 溶於二甲基乙醯胺 (DMA) 中且添加至抗體-BMPEO 中間物中。二甲基甲醯胺 (DMF) 亦可用於溶解藥物部分試劑。使反應混合物反應隔夜，再凝膠過濾或透析於 PBS 中以移除未反應的 DM1。使用 PBS 中之 S200 管柱凝膠過濾來移除高分子量聚集物且得到純化抗體-BMPEO-DM1 結合物。

細胞毒性藥物通常經由抗體之通常為數眾多之離胺酸殘基與抗體結合。亦已經由相關抗體中所存在或經工程改造併入相關抗體中之硫醇基達成結合。舉例而言，已藉由基因工程改造技術在蛋白質中引入半胱胺酸殘基以形成適於配位體之共價連接位點 (Better 等人，(1994) *J. Biol. Chem.* 13:9644-9650；Bernhard 等人，(1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132；Greenwood 等人，(1994) *Therapeutic Immunology* 1:247-255；Tu 等人，(1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:4862-4867；Kanno 等人，(2000) *J. of Biotechnology*, 76:207-214；Chmura 等人，(2001) *Proc. Nat. Acad. Sci.*

USA 98(15):8480-8484；美國專利第6,248,564號)。一旦游離半胱氨酸殘基存在於相關抗體中，毒素即可連接於該位點。舉例而言，將溶解於DMSO中之藥物連接子試劑，即順丁烯二醯亞胺基己醯基-單甲基奧瑞他汀E(MMAE)(亦即MC-MMAE)、順丁烯二醯亞胺基己醯基-單甲基奧瑞他汀F(MMAF)(亦即MC-MMAF)、MC-val-cit-PAB-MMAE或MC-val-cit-PAB-MMAF在乙腈及水中稀釋至已知濃度，且添加至已冷卻的含半胱氨酸衍生之抗體的磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)中。約一小時後，添加過量的順丁烯二醯亞胺來淬滅反應且將任何未反應的抗體硫醇基封端。藉由離心超濾濃縮反應混合物，且純化結合毒素之抗體並藉由經由G25樹脂用PBS溶離來脫鹽，經由0.2 μ m過濾器在無菌條件下過濾，且冷凍以供儲存。

另外，本發明之抗TAT419抗體可使用以下技術結合於奧瑞他汀及海兔毒素(諸如MMAE及MMAF)。用過量100 mM二硫蘇糖醇(DTT)處理溶解於500 mM硼酸鈉及500 mM氯化鈉(pH 8.0)中之抗體。在37°C下培育約30分鐘後，將緩衝劑藉由經Sephadex G25樹脂溶離來置換且以具有1 mM DTPA之PBS溶離。硫醇/Ab值係藉由根據溶液在280 nm下之吸光度來確定還原後抗體濃度以及藉由與DTNB(Aldrich, Milwaukee, WI)反應及測定412 nm之吸光度來確定硫醇濃度而檢驗。將溶於PBS中的還原抗體置於冰上冷卻。

將溶解於DMSO中之藥物連接子試劑(1)順丁烯二醯亞胺

基己醯基-單甲基奧瑞他汀E(MMAE)(亦即MC-MMAE)、(2)MC-MMAF、(3)MC-val-cit-PAB-MMAE或(4)MC-val-cit-PAB-MMAF在乙腈及水中稀釋至已知濃度，且添加至已冷卻的含還原抗體之PBS中。約1小時後，添加過量的順丁烯二醯亞胺來淬滅反應且將任何未反應的抗體硫醇基封端。藉由離心超濾濃縮反應混合物，且純化經結合之抗體並藉由經由G25樹脂用PBS溶離來脫鹽，經由0.2 μ m過濾器在無菌條件下過濾，且冷凍以供儲存。

如所述般製備本文所述之結合毒素之抗TAT419抗體且利用標準FACS分析測試以測定與毒素之結合是否影響抗體結合於表現TAT419之細胞表面上之TAT419多肽的能力。該等分析之結果展示，在抗體與毒素結合之後，觀察到與TAT419多肽之結合無損失。

實例11：活體外腫瘤細胞殺滅檢測

可使用標準表現載體及選殖技術來獲得表現相關TAT419多肽之哺乳動物細胞。或者，許多表現相關TAT419多肽之腫瘤細胞株可例如經由ATCC公開獲得，且可使用標準ELISA或FACS分析按常規來鑑別。隨後可在檢測中採用抗TAT419多肽單株抗體(及其結合毒素之衍生物)來測定抗體活體外殺滅表現TAT419多肽之細胞的能力。

舉例而言，如上所述獲得表現相關TAT419多肽之細胞且塗於96孔培養皿中。在一個分析中，在為期4天之整個細胞培育中包括抗體/毒素結合物(或裸抗體)。在第二個獨立的分析中，與抗體/毒素結合物(或裸抗體)一起培育細胞1

小時，隨後洗滌且在無抗體/毒素結合物存在下培育4天之時間。在又一獨立的分析中，可用結合毒素之抗TAT419抗體處理經遺傳工程改造而表現TAT419多肽於細胞表面上的細胞(及不表現TAT419多肽之對照細胞)，並進行比較。隨後使用Promega之CellTiter-Glo發光細胞活力檢測(目錄號G7571)量測細胞活力。未處理細胞用作陰性對照組。

在第一實驗中且尤其關於本發明，測試各種濃度之某些抗TAT419抗體(包括鼠類5E9鼠類單株抗體及其hu5E9.v1及hu5E9.v2人類化形式)之ADC MC-vc-PAB-MMAE毒素結合物結合及殺滅表現TAT419多肽之黑素瘤細胞株526mel、537mel、888mel、928mel、1300mel、A375、A2058、COLO829、G361、Hs-294-T、Malme3m、SK23、SKmel5、SKmel5-RC、SKmel28、WM-266-4、UACC257及UACC257-NCI60的能力。更特定言之，用PBS(作為陰性對照組)、不結合於TAT419多肽之對照抗體之MC-vc-PAB-MMAE毒素結合物(作為陰性對照組)或抗TAT419-MC-vc-PAB-MMAE毒素結合抗體活體外處理表現TAT419之細胞。該等分析之結果證明，所測試之所有結合毒素之抗TAT419抗體(包括5E9、hu5E9.v1及hu5E9.v2)能夠促成對表面上表現TAT419多肽之細胞有明顯的TAT419標靶特異性細胞殺滅效果，而對任一陰性對照組均未觀察到特異性細胞殺滅。

作為該研究之結果之一個特定說明性實例，用各種濃度之PBS(作為陰性對照組)、不結合於TAT419多肽之對照抗

體之MC-vc-PAB-MMAE毒素結合物(Ctrl-vc-MMAE)或如上所述之5E9-MC-vc-PAB-MMAE毒素結合抗體(5E9-vc-MMAE)活體外處理UACC257X2.2細胞(其表現TAT419多肽於其細胞表面上)。該等分析之資料展示於圖8中，且顯示5E9-vc-MMAE毒素結合抗體能夠殺滅細胞表面表現TAT419之細胞。由表現不同量之TAT419多肽於細胞表面上之不同細胞株所獲得的比較資料證明細胞殺滅之效率與細胞表面上之TAT419表現量成比例。

該等資料證明，該等檢測中所採用之各種抗TAT419抗體(包括5E9、hu5E9.v1及hu5E9.v2)能夠結合細胞表面上之TAT419多肽且誘導抗體所結合之彼等細胞死亡。

實例12：活體內腫瘤細胞殺滅檢測-腹膜內人類異種移植物腫瘤模型

抗體-藥物結合物之活體內效能可藉由處理植有人類腫瘤(所謂的異種移植物)之NCR裸小鼠來量測。該等研究使用在植有腫瘤樣品之小鼠中繁殖之人類黑素瘤細胞株及人類腫瘤。在研究中，每組10隻小鼠，各具有黑素瘤(約100-200 mm³)，用3 mg/kg之劑量經尾巴靜脈作靜脈內處理，且在3週時作再次處理。在整個測試時期進行腫瘤量測，接著收集腫瘤樣品，隨後用福馬林(formalin)固定或快速冷凍以用於「TaqMan®」分析以及組織學檢查。

經腹膜內植入藉由在裸小鼠中連續繼代所建立之人類黑素瘤細胞株及腫瘤，且在研究期間量測生長。一旦腫瘤達到適合的大小，即給小鼠處理組投與抗體-藥物結合物。

異種移植腫瘤生長停滯為相對於媒劑對照組或對照抗體之功效的特徵。總之，該等結果展示抗TAT419藥物結合物在活體內腫瘤生長模型中之特異性及效能。在注射後第0、2、7、10、13、17、20、24及27天，量測各小鼠之腫瘤體積以確定各處理減小腫瘤體積之功效。另外，在處理後，經約30天，每日測定動物存活%。

該等活體內分析之結果展示，單獨用媒劑或用非TAT419特異性毒素結合抗體處理之小鼠顯示在處理之後，腫瘤進展幾乎無可觀察之減慢現象。該等結果證明，不結合於TAT419多肽之抗體，即使與毒素結合，亦不提供特異性(或非特異性)治療性效應。與此相反，測試組中之大多數動物顯示當用結合vc-MMAE之抗TAT419抗體(包括5E9、hu5E9.v1及hu5E9.v2)處理時，在處理後，腫瘤進展有顯著且明顯的可重現的減慢現象，證明抗TAT419抗體藥物結合物對具有表現TAT419多肽之腫瘤之動物提供特異性活體內治療效應。

更特定言之，圖9展示自一個分析hu5E9.v1人類化抗體之vc-MMAE結合物之活體內治療效能的此類實驗獲得之資料。如上所述在裸小鼠中繁殖源自UACC257X2.2人類黑素瘤細胞株(表現TAT419多肽於細胞表面上之細胞)之異種移植動物，且隨後如上所述用單獨媒劑、不結合TAT419多肽之結合MMAE之對照抗體、或各種量之hu5E9.v1-vc-MMAE處理小鼠。該等分析之資料證明hu5E9.v1-vc-MMAE毒素結合抗體能夠殺滅細胞表面表現TAT419之細胞。其他資料

證明，其他結合毒素之抗 TAT419 抗體（包括 5E9 及 hu5E9.v2）亦能夠以標靶特異性且劑量依賴性方式抑制裸小鼠中源自多種不同表現 TAT419 之黑素瘤細胞株之異種移植腫瘤的生長。

該等資料清楚地表明，抗 TAT419 抗體-藥物結合物為治療表現 TAT419 多肽之腫瘤提供特異性、顯著且可重現的體內治療效應。

應認為以上書面說明書足以使熟習此項技術者能夠實施本發明。本發明之範疇不應限於所寄存之構築體，此係因為所寄存之實施例意欲作為本發明之某些態樣的單一說明，且功能等效之任何構築體均屬於本發明之範疇內。本文材料之寄存並非承認本文含有之書面說明不足以實現本發明任何態樣（包括其最佳方式）之實施，亦不應理解為使申請專利範圍之範疇限於其所代表之特定說明。實際上，根據上文描述，除本文中所示及所述之內容外的本發明之各種修改將為熟習此項技術者所顯而易知且屬於隨附申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示 TAT419 cDNA 之核苷酸序列 (SEQ ID NO:1)，其中 SEQ ID NO:1 為本文中命名為「DNA96945」之純系。推定的起始及終止密碼子加有下劃線；

圖 2 展示源自圖 1 所示之 SEQ ID NO:1 之編碼序列的 TAT419 多肽之胺基酸序列 (SEQ ID NO:2)；

圖 3 展示鼠類 5E9 單株抗體之全長輕鏈 (SEQ ID NO:3) 及

鼠類 5E9 單株抗體之可變輕鏈 (SEQ ID NO:5) 之胺基酸序列；

圖 4 展示鼠類 5E9 單株抗體之全長重鏈 (SEQ ID NO:4) 及鼠類 5E9 單株抗體之可變重鏈 (SEQ ID NO:6) 之胺基酸序列；

圖 5 展示人類化 hu5E9.v1 抗體之全長輕鏈 (SEQ ID NO:13) 及人類化 hu5E9.v1 抗體之可變輕鏈 (SEQ ID NO:15) 之胺基酸序列；

圖 6 展示人類化 hu5E9.v1 抗體之全長重鏈 (SEQ ID NO:14) 及人類化 hu5E9.v1 抗體之可變重鏈 (SEQ ID NO:16) 之胺基酸序列；

圖 7 展示人類化 hu5E9.v2 抗體之可變重鏈 (SEQ ID NO:17) 之胺基酸序列；

圖 8 展示不同濃度之 PBS (PBS)、不結合於活細胞表面上之 TAT419 多肽的結合 vc-MMAE 毒素之對照抗體 (Ctrl-vc-MMAE) 及結合 vc-MMAE 毒素之鼠類 5E9 單株抗體 (5E9-vc-MMAE) 在活體外殺滅 UACC257X2.2 細胞所得的結果；及

圖 9 展示在裸小鼠中不同濃度之 hu5E9.v1-vc-MMAE (hu5E9.v1-MMAE)、單獨媒劑 (媒劑) 或不結合於 TAT419 多肽之結合 MMAE 之對照抗體 (Ctrl-vc-MMAE) 的處理針對 UACC257X2.2 異種移植物的活體內治療功效。

序 列 表

<110> 美商建南德克公司

<120> 用於診斷及治療腫瘤之組合物及方法

<130> P4412R1-WO

<140> 100105865

<141> 2011-02-22

<150> 61/307,338 ; 61/308,791

<151> 2010-02-23 ; 2010-02-26

<160> 17

<210> 1

<211> 1453

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

gcatctggtt tgtcagatcc gagaggtctt gaaactgcgg agcggccacc 50

ggaagccttc tggagcaggt agcagcatgc agccgcctcc aagtctgtgc 100

ggacgcgccc tggttgcgt ggttcttgcc tgcggcctgt cgcggatctg 150

gggagaggag agaggcttcc cgcctgacag ggccactccg cttttgcaaa 200

ccgcagagat aatgacgcca ccactaaga cttatggcc caagggttcc 250

aacgccagtc tggcgcggtc gttggcacct gcggaggtgc ctaaaggaga 300

caggacggca ggatctccgc cagcaccat ctcccctccc ccgtgccaag 350

gacccatcga gatcaaggag actttcaaata acatcaaacac ggttgtgtcc 400

tgccttgtgt tcgtgctggg gatcatcggg aactccacac ttctgagaat 450

tatctacaag aacaagtgca tgcgaaacgg tcccaatata ttgatcgcca 500

gcttggctct gggagacctg ctgcacatcg tcattgacat ccctatcaat 550

```

gtctacaagc tgctggcaga ggactggcca tttggagctg agatgtgtaa 600
 gctggtgcct ttcatacaga aagcctccgt gggaatcact gtgctgagtc 650
 tatgtgctct gagtattgac agatatcgag ctgttgcttc ttggagtaga 700
 attaaaggaa ttgggggtcc aaaatggaca gcagtagaaa ttgttttgat 750
 ttgggtggtc tctgtggttc tggctgtccc tgaagccata ggttttgata 800
 taattacgat ggactacaaa ggaagttatc tgcgaatctg cttgcttcat 850
 cccgttcaga agacagcttt catgcagttt tacaagacag caaaagattg 900
 gtggctgttc agtttctatt tctgcttgcc attggccatc actgcatttt 950
 tttatacact aatgacctgt gaaatgttga gaaagaaaag tggcatgcag 1000
 attgctttaa atgatcacct aaagcagaga cggaagtgg ccaaaccgt 1050
 cttttgcctg gtccttgtct ttgccctctg ctggcttccc cttcacctca 1100
 gcaggattct gaagctcact ctttataatc agaatgatcc caatagatgt 1150
 gaacttttga gctttctgtt ggtattggac tatattggta tcaacatggc 1200
 ttcactgaat tcctgcatta acccaattgc tctgtatttg gtgagcaaaa 1250
 gattcaaaaa ctgctttaag tcatgcttat gctgctggtg ccagtcattt 1300
 gaagaaaaac agtccttga gaaaagcag tcgtgcttaa agttcaaagc 1350
 taatgatcac ggatatgaca acttccgttc cagtaataaa tacagctcat 1400
 cttgaaagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1450
 aaa 1453

<210> 2

<211> 442

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Gln Pro Pro Pro Ser Leu Cys Gly Arg Ala Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

Val Leu Ala Cys Gly Leu Ser Arg Ile Trp Gly Glu Glu Arg Gly
20 25 30

Phe Pro Pro Asp Arg Ala Thr Pro Leu Leu Gln Thr Ala Glu Ile
35 40 45

Met Thr Pro Pro Thr Lys Thr Leu Trp Pro Lys Gly Ser Asn Ala
50 55 60

Ser Leu Ala Arg Ser Leu Ala Pro Ala Glu Val Pro Lys Gly Asp
65 70 75

Arg Thr Ala Gly Ser Pro Pro Arg Thr Ile Ser Pro Pro Pro Cys
80 85 90

Gln Gly Pro Ile Glu Ile Lys Glu Thr Phe Lys Tyr Ile Asn Thr
95 100 105

Val Val Ser Cys Leu Val Phe Val Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser
110 115 120

Thr Leu Leu Arg Ile Ile Tyr Lys Asn Lys Cys Met Arg Asn Gly
125 130 135

Pro Asn Ile Leu Ile Ala Ser Leu Ala Leu Gly Asp Leu Leu His
140 145 150

Ile Val Ile Asp Ile Pro Ile Asn Val Tyr Lys Leu Leu Ala Glu
155 160 165

Asp Trp Pro Phe Gly Ala Glu Met Cys Lys Leu Val Pro Phe Ile
170 175 180

Gln Lys Ala Ser Val Gly Ile Thr Val Leu Ser Leu Cys Ala Leu
185 190 195

Ser Ile Asp Arg Tyr Arg Ala Val Ala Ser Trp Ser Arg Ile Lys
200 205 210

Gly Ile Gly Val Pro Lys Trp Thr Ala Val Glu Ile Val Leu Ile

215	220	225
Trp Val Val Ser Val Val Leu Ala Val	Pro Glu Ala Ile Gly Phe	
230	235	240
Asp Ile Ile Thr Met Asp Tyr Lys Gly	Ser Tyr Leu Arg Ile Cys	
245	250	255
Leu Leu His Pro Val Gln Lys Thr Ala	Phe Met Gln Phe Tyr Lys	
260	265	270
Thr Ala Lys Asp Trp Trp Leu Phe Ser	Phe Tyr Phe Cys Leu Pro	
275	280	285
Leu Ala Ile Thr Ala Phe Phe Tyr Thr	Leu Met Thr Cys Glu Met	
290	295	300
Leu Arg Lys Lys Ser Gly Met Gln Ile	Ala Leu Asn Asp His Leu	
305	310	315
Lys Gln Arg Arg Glu Val Ala Lys Thr	Val Phe Cys Leu Val Leu	
320	325	330
Val Phe Ala Leu Cys Trp Leu Pro Leu	His Leu Ser Arg Ile Leu	
335	340	345
Lys Leu Thr Leu Tyr Asn Gln Asn Asp	Pro Asn Arg Cys Glu Leu	
350	355	360
Leu Ser Phe Leu Leu Val Leu Asp Tyr	Ile Gly Ile Asn Met Ala	
365	370	375
Ser Leu Asn Ser Cys Ile Asn Pro Ile	Ala Leu Tyr Leu Val Ser	
380	385	390
Lys Arg Phe Lys Asn Cys Phe Lys Ser	Cys Leu Cys Cys Trp Cys	
395	400	405
Gln Ser Phe Glu Glu Lys Gln Ser Leu	Glu Glu Lys Gln Ser Cys	
410	415	420
Leu Lys Phe Lys Ala Asn Asp His Gly	Tyr Asp Asn Phe Arg Ser	
425	430	435

Ser Asn Lys Tyr Ser Ser Ser
440

<210> 3

<211> 219

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
110 115 120

Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
140 145 150

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
155 160 165

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
185 190 195

Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile
200 205 210

Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
215

<210> 4

<211> 448

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

Ala Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Tyr
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile
95 100 105

Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115 120

Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp
125 130 135

Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr

	140		145		150									
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser
	155		160		165									
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr
	170		175		180									
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser
	185		190		195									
Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys
	200		205		210									
Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	Cys
	215		220		225									
Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
	230		235		240									
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	Ser
	245		250		255									
Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp
	260		265		270									
Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val
	275		280		285									
His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr
	290		295		300									
Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met
	305		310		315									
Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro
	320		325		330									
Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg
	335		340		345									
Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr
	350		355		360									

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
110

<210> 6
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6
Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60
Ala Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Tyr
65 70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
80 85 90
Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile
95 100 105
Asp Asn Trp Gly

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu
1 5 10 15
Asn

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln
5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11
Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 12
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile Asp Asn

5

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1

5

10

15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

20

25

30

Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro

35

40

45

Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp

50

55

60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

65

70

75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr

80

85

90

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln

95

100

105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val

110

115

120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala

125

130

135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

140

145

150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

155

160

165

Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				170					175					180
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
				185					190					195
Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val
				200					205					210
Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
				215										

<210> 14

<211> 448

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Ser	Tyr	Trp	Met	Gln	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Ile	Gly	Thr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr
				50					55					60
Ala	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Thr	Asp	Lys	Ser
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Ile
				95					100					105
Asp	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
				110					115					120
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser

Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
				350					355					360

Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
				365					370					375

Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
				380					385					390

Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
				395					400					405

Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
				410					415					420

Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
				425					430					435

His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
				440					445			

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15

Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu
				20					25					30

Asp	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Gln	Lys	Pro
				35					40					45

Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp
				50					55					60

Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65					70					75

Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
				80					85					90

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
 95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 110

<210> 16

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60

Ala Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Thr Asp Lys Ser
 65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile
 95 100 105

Asp Asn Trp Gly

<210> 17

<211> 109

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly

1	5	10	15
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	20	25	30
Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu	35	40	45
Glu Trp Ile Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Ser Tyr	50	55	60
Ala Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser	65	70	75
Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp	80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Ala Tyr Asp Ile	95	100	105
Asp Asn Trp Gly			

102年12月24日修(更)正本

第100105865號專利申請案

中文申請專利範圍替換本(102年12月)

公告本

七、申請專利範圍：

1. 一種分離之抗體，其特異性結合SEQ ID NO:2之TAT419多肽，該抗體包含：
 - (a) SEQ ID NO:7之CDR-L1序列；
 - (b) SEQ ID NO:8之CDR-L2序列；
 - (c) SEQ ID NO:9之CDR-L3序列；
 - (d) SEQ ID NO:10之CDR-H1序列；
 - (e) SEQ ID NO:11之CDR-H2序列；及
 - (f) SEQ ID NO:12之CDR-H3序列。
2. 如請求項1之抗體，其為具有如請求項1之抗體之抗原結合或變異區之抗體片段。
3. 如請求項1之抗體，其為嵌合抗體或人類化抗體。
4. 如請求項1之抗體，其與細胞毒性劑結合，其中該細胞毒性劑係選自由以下組成之群：毒素、抗生素、放射性同位素及核酸分解酶。
5. 如請求項4之抗體，其中該細胞毒性劑為毒素，其中該毒素係選自由類美登素(maytansinoid)、卡奇黴素(calicheamicin)及奧瑞他汀(auristatin)組成之群。
6. 如請求項5之抗體，其中該奧瑞他汀為單甲基奧瑞他汀E(MMAE)。
7. 如請求項1至3中任一項之抗體，其係與MC-val-cit-PAB-MMAE結合。
8. 如請求項1之抗體，其係在細菌或CHO細胞中產生。
9. 如請求項1之抗體，其誘發所結合之細胞死亡。

10. 如請求項1之抗體，其抑制所結合之細胞增殖。
11. 如請求項9或10之抗體，其中該細胞為人類黑素瘤癌細胞或多發性骨髓瘤癌細胞。
12. 一種分離之抗體，其包含SEQ ID NO:5或15所示之任一VL序列及SEQ ID NO:6所示之VH序列。
13. 一種分離之抗體，其包含SEQ ID NO:6、16或17所示之任一VH序列及SEQ ID NO:5所示之VL序列。
14. 一種分離之抗體，其包含SEQ ID NO:3或13所示之任一輕鏈序列及SEQ ID NO:6、16或17所示之任一重鏈序列。
15. 一種分離之抗體，其包含SEQ ID NO:4或14所示之任一重鏈序列及SEQ ID NO:3、5、13或15所示之任一輕鏈序列。
16. 如請求項15之抗體，其包含SEQ ID NO:14所示之重鏈序列及SEQ ID NO:13所示之輕鏈序列。
17. 一種分離之抗體，其包含SEQ ID NO:15之VL序列及SEQ ID NO:16之VH序列。
18. 一種分離之抗體，其包含SEQ ID NO:15之VL序列及SEQ ID NO:17之VH序列。
19. 如請求項12至18中任一項之抗體，其係與MC-val-cit-PAB-MMAE結合。
20. 一種細胞，其產生如請求項1之抗體。
21. 一種分離之核酸，其編碼如請求項1之抗體。
22. 一種如請求項1、7或19之抗體的用途，其係用於製造抑

- 制過度表現SEQ ID NO:2之TAT419多肽或其細胞外域之細胞增殖的藥劑，其中該抗體與該TAT419多肽之結合造成抑制該細胞之增殖。
23. 一種如請求項1至19中任一項之抗體的用途，其係用於製造治療性治療患有癌性腫瘤之哺乳動物的藥劑，該癌性腫瘤包含過度表現SEQ ID NO:2之TAT419多肽或其細胞外域之細胞。
24. 如請求項23之用途，其中該等細胞為人類黑素瘤癌細胞或多發性骨髓瘤癌細胞。
25. 一種在疑似含有包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之TAT419蛋白質或其細胞外域之樣品中測定該蛋白質之方法，該方法包括使該樣品暴露於如請求項1之抗體，及測定該抗體與該樣品中該蛋白質之結合，其中該抗體與該蛋白質之結合表示該樣品中存在該蛋白質。
26. 如請求項25之方法，其中該抗體係經可偵測標記。
27. 一種診斷哺乳動物中癌症存在之方法，該方法包括使用如請求項1至19任一項之抗體在獲自該哺乳動物之組織細胞之測試樣品中及在源於相同組織之已知正常細胞之對照樣品中測定SEQ ID NO:2之TAT419多肽或其細胞外域之表現量，其中相較於該對照樣品，該測試樣品中該TAT419多肽之表現量較高時，表示提供該測試樣品之該哺乳動物中存在癌症。
28. 如請求項27之方法，其中測定該蛋白質之表現量的步驟包括在免疫組織化學或西方墨點(Western blot)分析中使

用抗體。

29. 一種診斷哺乳動物中癌症存在之方法，該方法包括使獲自該哺乳動物之組織細胞之測試樣品與如請求項1之抗體接觸，及偵測該抗體與該測試樣品中包含 SEQ ID NO:2之胺基酸序列之TAT419蛋白質或其細胞外域之間的複合物形成，其中該複合物形成表示該哺乳動物中存在癌症。
30. 如請求項27至29中任一項之方法，其中該癌症為人類黑色素瘤或多發性骨髓瘤。

八、圖式：

GCATCTGGTTTGTTCAGATCCGAGAGGCTCTGAAACTGCGGAGCGGCCACCGGACGCCTTCTGGA
GCAGGTAGCAGCATGCAGCCGCCTCCAAGTCTGTGCGGACGCGCCCTGGTTGCGCTGGTTCTTG
CCTGCGGCCTGTGCGGATCTGGGGAGAGGAGAGAGGCTTCCCGCCTGACAGGGCCACTCCGCT
TTTGCAAACCGCAGAGATAATGACGCCACCCACTAAGACCTTATGGCCCAAGGGTTCCAACGCC
AGTCTGGCGCGGTTCGTTGGCACCTGCGGAGGTGCCCTAAAGGAGACAGGACGGCAGGATCTCCGC
CACGCACCATCTCCCCCTCCCCCGTGCCAAGGACCCATCGAGATCAAGGAGACTTTCAAATACAT
CAACACGGTTGTGTCTGCCTTGTGTTTCGTGCTGGGGATCATCGGGAACCTCCACACTTCTGAGA
ATTATCTACAAGAACAAGTGCATGCGAAACGGTCCCAATATCTTGATCGCCAGCTTGGCTCTGG
GAGACCTGCTGCACATCGTCATTGACATCCCTATCAATGTCTACAAGCTGCTGGCAGAGGACTG
GCCATTTGGAGCTGAGATGTGTAAGCTGGTGCCTTTCATACAGAAAGCCTCCGTGGGAATCACT
GTGCTGAGTCTATGTGCTCTGAGTATTGACAGATATCGAGCTGTTGCTTCTTGAGTAGAATTA
AAGGAATTGGGGTTCCAAAATGGACAGCAGTAGAAATTGTTTTGATTGGGTGGTCTCTGTGGT
TCTGGCTGTCCCTGAAGCCATAGGTTTTGATATAATTACGATGGACTACAAAGGAAGTTATCTG
CGAATCTGCTTGCTTCATCCCGTTCAGAAGACAGCTTTCATGCAGTTTTACAAGACAGCAAAAG
ATTGGTGGCTGTTTCAGTTTTCTATTTCTGCTTGCCATTGGCCATCACTGCATTTTTTTTATACACT
AATGACCTGTGAAATGTTGAGAAAGAAAAGTGGCATGCAGATTGCTTTAAATGATCACCTAAAG
CAGAGACGGGAAGTGGCCAAAACCGTCTTTTGCCTGGTCCCTTGCTTTGCCCCCTGCTGGCTTC
CCCTTCACCTCAGCAGGATTCTGAAGCTCACTCTTTATAATCAGAATGATCCCAATAGATGTGA
ACTTTTGAGCTTTCTGTTGGTATTGGACTATATTGGTATCAACATGGCTTCACTGAATTCCTGC
ATTAACCCAATTGCTCTGTATTTGGTGAGCAAAAGATTCAAAAAGTCTTTAAGTCATGCTTAT
GCTGCTGGTGGCAGTCATTTGAAGAAAAACAGTCCCTGGAGGAAAAGCAGTCGTGCTTAAAGTT
CAAAGCTAATGATCACGGATATGACAACTTCCGTTCCAGTAATAAATACAGCTCATCTTGAAG
AA (SEQ ID NO:1)

圖 1

MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPDRATPLLQTAEIMTPPTKTLWPKGSNASLAR
SLAPAEVPGKDRTAGSPPTISPPPCQGPPIEIKETFKYINTVVSCLVFLGIIGNSTLLRIIYK
NCKMRNGPNILIASLALGDLHIVIDIPINVYKLLAEDWPF GAEMCKLVPF IQKASVGITVLSL
CALSIDRYRAVASWSRIKGIGVPKWTAVEIVLIWVSVVLAVPEAIGFDIITMDYKGSYLRICL
LHPVQKTA FMQFYKTAKDWLFSFYFCLPLAITAFFYTLMTCEMLRKKSGMQIALNDHLKQRRE
VAKTVFCLVLV FALCWLPLHLSRILKLTLYNQNDPNRCELLSFLLVLDYIGINMASLNSCINPI
ALYLVSKRFKNCFKSCLCCWCQSFEKQSLEEKQSCLKFKANDHGYDNFRSSNKYSSS
(SEQ ID NO:2)

信號序列 .

胺基酸1-26

跨膜域 .

胺基酸101-121、137-157、177-197、216-236、275-295、323-343、362-382

N-糖基化位點 .

胺基酸59-62、119-122

cAMP-及cGMP-依賴性蛋白質激酶磷酸化位點 .

胺基酸302-305

酪胺酸激酶磷酸化位點 .

胺基酸424-430

N-肉豆蔻醯基化位點 .

胺基酸57-62、115-120、170-175、306-311、371-376

7跨膜受體同源性 .

胺基酸118-386

圖2

鼠類5E9之全長輕鏈

DVVMQTPTLTLSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSE
QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYE
RHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:3)

鼠類5E9之VL

DVVMQTPTLTLSVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVIYCWQGTHTFPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:5)

圖3

鼠類5E9之全長重鏈

QVQLLQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGQLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGKATLTDDKYSSAYMQLSSLASEDSAVYYCARWGYAYDIDNWGQGTTVTVSSASTKGPSVYP
LAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSST
WPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIAPPKIKDVLMI
SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWLVNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEF
KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIVVEWTN
NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
(SEQ ID NO:4)

鼠類5E9之VH

QVQLLQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGQLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGKATLTDDKYSSAYMQLSSLASEDSAVYYCARWGYAYDIDNWG (SEQ ID NO:6)

圖4

hu5E9.v1之全長輕鏈

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLDSDGKTYLNWLQKPGKAPKRLIYLVSKLDSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCWQGTHTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIAPPDE
QLKSGTASVVCFLNNFYPRKAVQWVKDNLQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

hu5E9.v1之VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLDSDGKTYLNWLQKPGKAPKRLIYLVSKLDSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCWQGTHTFPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:15)

圖5

hu5E9.v1之全長重鏈

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMQWVRQAPGKGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRATLSTDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYAYDIDNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:14)

hu5E9.v1之VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMQWVRQAPGKGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRATLSTDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGYAYDIDNWG (SEQ ID NO:16)

圖6

hu5E9.v2之VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMQWVRQAPGQGLEWIGTIYPGDGDTSYAQKF
KGRVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCARWGYAYDIDNWG (SEQ ID NO:17)

圖7

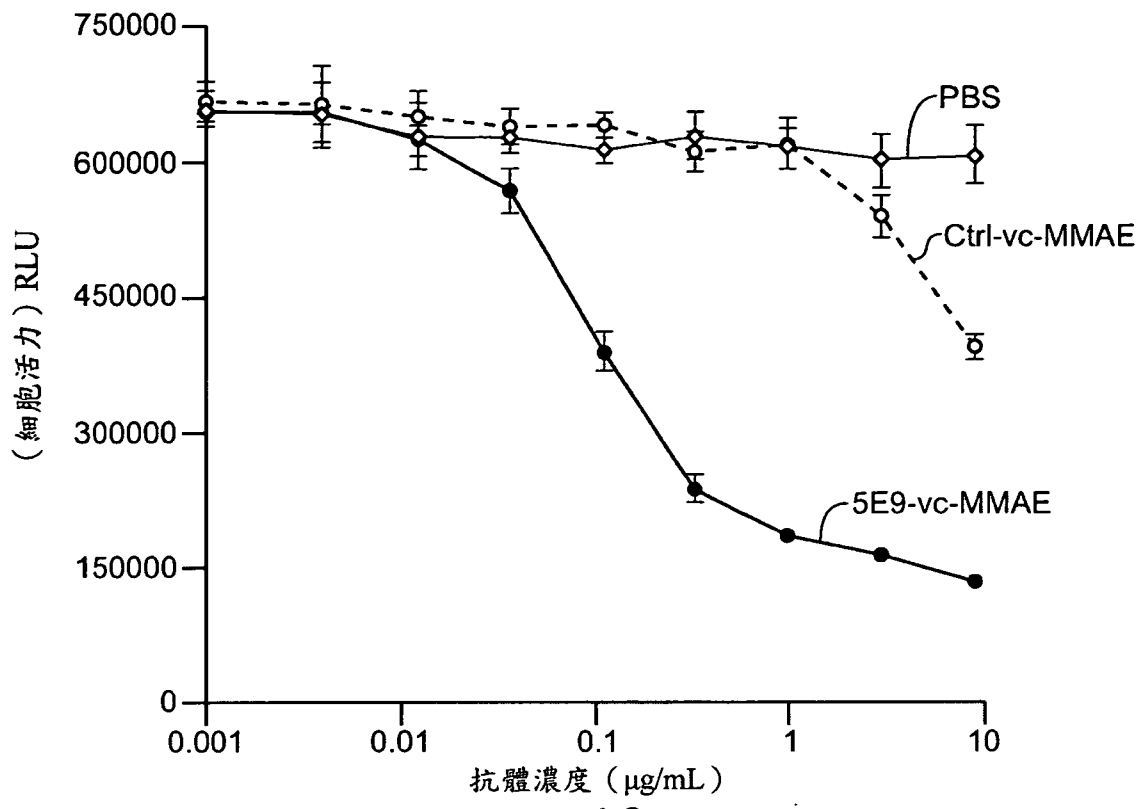


圖8

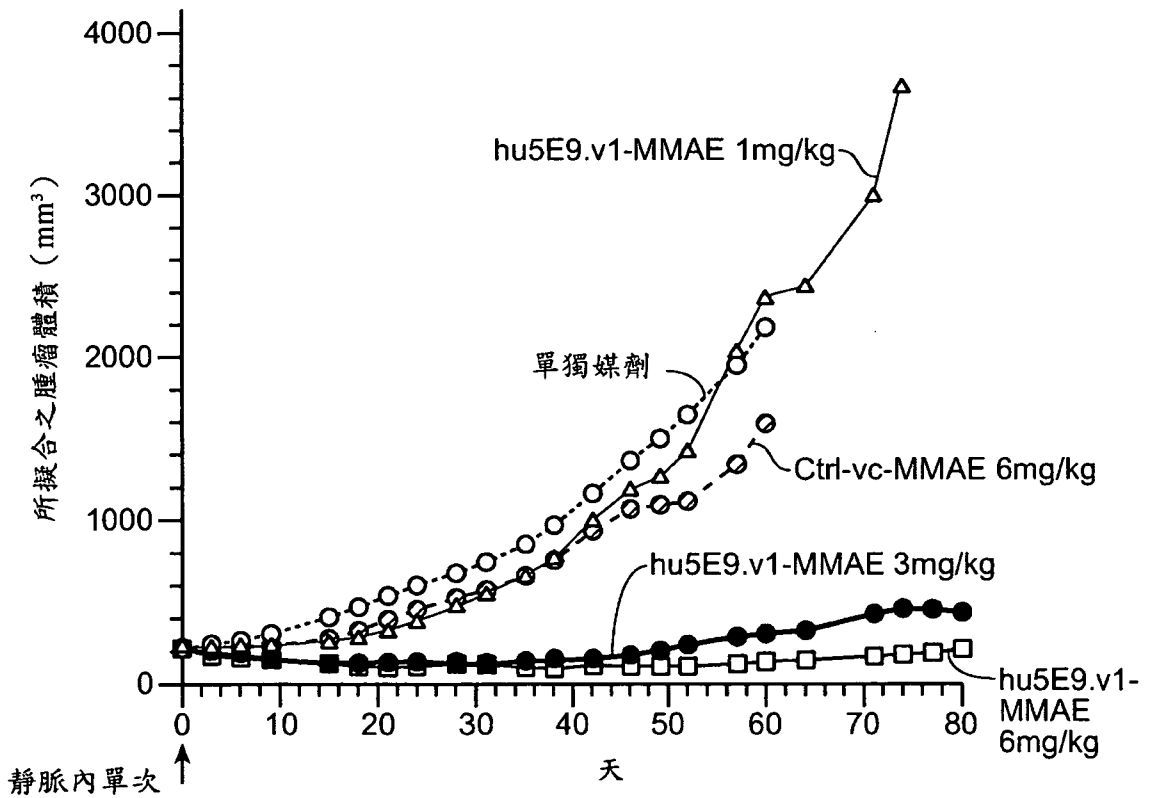


圖9