

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780011707.0

[51] Int. Cl.

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 4 月 22 日

[11] 公开号 CN 101415431A

[22] 申请日 2007.3.23

[21] 申请号 200780011707.0

[30] 优先权

[32] 2006.3.31 [33] AU [31] 2006901708

[86] 国际申请 PCT/AU2007/000359 2007.3.23

[87] 国际公布 WO2007/112475 英 2007.10.11

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.28

[71] 申请人 阿尔奇米亚肿瘤学有限公司

地址 澳大利亚昆士兰

[72] 发明人 T·布朗 G·布朗利

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 4 页 说明书 24 页 附图 14 页

[54] 发明名称

治疗癌症和/或细胞增殖性疾病的方法以及用于治疗癌症和/或细胞增殖性疾病的靶向透明质酸合成代谢的制剂

[57] 摘要

本发明涉及特异性靶向 HAS 分子的部分的化合物、制剂、药物活性剂、药剂、治疗剂、活性物、药物等，所述 HAS 分子的部分在第一种形式的细胞中易于接近细胞外环境，但在其它形式的细胞中或在来自相同或相关细胞的转化细胞中却不能接近细胞外环境。特别地，本发明提供了靶向 HAS 的部分的化合物，所述 HAS 的部分在恶性或炎症性或增殖性细胞中易于接近细胞外环境，但在“正常”细胞中却不能接近外界环境。此处，“正常”细胞指非-恶性、炎症性或增殖性细胞。

1. 用于降低或改变透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平分离的化合物, 其中所述化合物靶向 HAS 氨基酸序列的表位, 所述表位在病变细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

2. 能够降低或改变透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平分离的化合物, 其中所述化合物靶向 HAS 氨基酸序列的表位, 所述表位在病变细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

3. 权利要求 1 或 2 的分离的化合物, 其中所述表位在病变细胞中呈递于细胞外空间以及在非病变细胞中呈递于细胞内空间或质膜。

4. 权利要求 1 或 2 的分离的化合物, 其中所述表位在病变细胞中呈递于细胞内空间以及在非病变细胞中呈递于细胞外空间或质膜。

5. 权利要求 1 或 2 的分离的化合物, 其中所述表位在病变细胞中呈递于质膜以及在非病变细胞中呈递于细胞外或细胞内空间。

6. 权利要求 1-5 中任一项的分离的化合物, 其中所述化合物是治疗性抗体、其表位结合片段、衍生物、部分、嵌合体或去免疫形式。

7. 权利要求 1-6 中任一项的分离的化合物, 其降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平, 其中所述化合物靶向功能上与 HAS 的 INT-2 或 EX-1 序列相似的氨基酸序列。

8. 权利要求 1-6 中任一项的分离的化合物, 其降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平, 其中所述化合物靶向选自 HAS 氨基酸序列的 INT-2 或 EX-1 的氨基酸序列, 或靶向含有 INT-2 或 EX-1 的一或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

9. 权利要求 8 的分离的化合物，其中所述化合物靶向氨基酸序列 INT-2 或 INT-2 的保守氨基酸取代。

10. 治疗恶性或病变细胞的方法，该方法包括施用一种分离的化合物，其中所述化合物降低或改变透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，且所述化合物靶向 HAS 氨基酸序列的表位，所述序列在病变细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述化合物选自治疗性抗体、或其表位结合片段、衍生物、部分、嵌合体或去免疫形式。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述表位在病变细胞中呈递于细胞外空间以及在非病变细胞中呈递于细胞内空间或质膜。

13. 权利要求 10 的方法，其中所述表位在病变细胞中呈递于质膜以及在非病变细胞中呈递于细胞外或细胞内空间。

14. 权利要求 10 的方法，其中所述化合物降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，并靶向选自 INT-2 或 EX-1 的、含有一或多个保守取代的氨基酸序列。

15. 权利要求 11 的方法，其中所述化合物降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，其中所述化合物靶向功能上与 HAS 的 INT-2 或 EX-1 序列相似的氨基酸序列。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述化合物靶向 INT-2。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述化合物靶向 EX-1。

18. 权利要求 10-17 中任一项的方法，其中所述病变细胞是癌细胞。

19. 权利要求 10-17 中任一项的方法，其中所述病变细胞是乳腺癌细胞。

20. 权利要求 10 的方法，其中所述 HAS 选自亚型 HAS I、HAS II 和 HAS III。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述亚型是 HAS II。

22. 权利要求 1 的化合物，其中所述 HAS 选自亚型 HAS I、HAS II 和 HAS III。

23. 权利要求 1 的化合物，其中所述亚型是 HAS II。

24. 化合物在制备用于治疗恶性或病变细胞的药物中的用途，其中所述化合物降低或改变透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，并靶向含于 HAS 氨基酸序列内的表位，所述表位在疾病相关细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

25. 能够降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平分离抗体、或其片段、衍生物、部分、嵌合体或完全去免疫形式，其中所述抗体、或其片段、衍生物、部分、嵌合体或完全去免疫形式靶向 HAS 氨基酸序列的表位，所述表位在疾病相关细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

26. 权利要求 25 的分离抗体、或其表位结合片段、衍生物、部分、嵌合体或完全去免疫形式，其靶向 INT-2。

27. 权利要求 1-9 中任一项的化合物，其中所述病变细胞是癌细胞。

28. 权利要求 1-9 中任一项的化合物，其中所述病变细胞是乳腺癌细胞。

29. 权利要求 1-7 中任一项的分离的化合物，其降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，其中所述化合物靶向含有 INT-2 或 EX-1 的一或多个保守取代的氨基酸序列或序列。

30. 权利要求 1-6 中任一项的分离的化合物，其降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，其中所述化合物靶向 HAS 的亲水区域。

31. 权利要求 1-6 中任一项的分离的化合物，其降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，其中所述化合物靶向氨基酸序列 INT-2 或 EX-1 或其功能性等价变异体。

32. 权利要求 11 的方法，其中所述化合物降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，其中所述化合物靶向 HAS 的亲水区域。

治疗癌症和/或细胞增殖性疾病的方法以及用于治疗癌症和/或 细胞增殖性疾病的靶向透明质酸合成代谢的制剂

发明背景

技术领域

本发明一般地涉及细胞增殖尤其是癌症和炎症性疾病（包括过度增殖性病征）的治疗和预防。更具体地，本发明致力于透明质酸 (hyaluronan) 合成代谢以促进细胞增殖性病征（例如癌症和炎症）的控制。

背景技术

本说明书中所涉及出版物的目录详情也收录于本说明书的末尾。

本说明书中对任何现有技术的引用不是，也不应被认为是对该现有技术在任何国家形成了部分常识的承认或任何形式的暗示。

透明质酸 (HA) 代谢是 HA 合成与降解速率之间的复杂平衡，其中根据 HA 发挥的生理作用，可对同时存在着的合成与降解进行精细地控制。透明质酸由一类各不相同却又相互关联的称作透明质酸合酶 (HAS) 亚型 HAS1、2 和 3 的膜蛋白合成，这些膜蛋白可分别根据在小鼠胚胎发生过程中和在成熟组织中的时空和差异表达以及所产生 HA 的分子量相互区分开。胞外基质多糖 HA 或其酸性形式，透明质酸，是一种线性的、由重复的 (β 1-3) D-葡萄糖醛酸(β 1-4)-N-乙酰-D-葡萄糖胺二糖单位组成的高分子量聚合物 (Weissman & Meyer, *J Am. Chem. Soc.* 76:1753, 1954)。

胞外基质 (ECM) 是影响肿瘤细胞行为的关键环境因素之一。ECM 可充当肿瘤细胞粘附和迁移的支架，还可用作对恶性细胞具有潜在益处的生长因子和细胞因子的储存地 (Ruoslahti & Yamaguchi, *Cell* 64:867-869, 1991)。透明质酸 (HA) 是一种负电荷的高分子量多糖，是胞外基质的主要成分。多年以来，HA 被认为是 ECM 的“空间填充物 (space filler)”，但随着 HA 细胞表面受体的发现，其在细胞行为中发挥更为复杂的作用也变得明朗起来 (Laurent & Fraser, *FASEB J* 6:2397-2404, 1992)。最近，HA 被认为与许多不同的细胞过度增殖过程包括发育过程中的细胞分裂和迁移 (Toole,

J Internal Medicine 242:35-40, 1981), 组织重构 (Knudson & Knudson, *FASEB J* 7:1233, 1993), 炎症以及肿瘤发生、进展与侵袭 (Knudson *et al*, *The Biology of Hyaluronan* 143:150-169, 1989) 相关。

三种 HAS 蛋白中活性最低的 HAS1 可以驱动高分子量 HA (2×10^6 D) 的合成, 因此, HAS1 可以在许多细胞类型中维持低的、但是必需水平的 HA 合成。HAS2 在整个胚胎发育过程中都广泛地表达, 其活性高于 HAS1 并同样能合成以细胞外周凝胶的形式附着于质膜的高分子量 HA (2×10^6 D) (Fulop, *Arch. Biochem. Biophys.* 337:261-266, 1997)。大量高分子量 HA 的 HAS2 产生对组织结构和体积有显著的影响, 从而在涉及肿瘤生长的发育过程中发挥重要作用。HAS3 是 3 种 HAS 蛋白中活性最高的一种, 但却驱动短 ($< 2 \times 10^5$ D - 3×10^5 D) HA 链的合成。HAS3 表达可被激活从而产生大量低分子量 HA, 其能够与细胞表面 HA 受体相互作用, 触发导致细胞行为变化的信号级联。

HAS2 在高侵袭性乳腺癌细胞系中非常重要 (Udabage *et al*, *Cancer Res* 65:6139-6150, 2005)。利用反义技术对 HAS2 的抑制导致对细胞侵袭力 97% 的抑制。此外, 当将反义 HAS2 癌细胞移植到裸鼠中时, 肿瘤并未发生, 突显了在恶性状态下抑制功能性透明质酸合酶的潜在治疗价值。

前述这些研究突显了与癌症相关的 HAS 亚型的重要性, 其中 HA 合成能够促进不依赖贴壁生长并增强作为恶性表型标志的肿瘤侵袭力、特性。

本申请人令人惊讶地发现与 HAS 氨基酸序列的不同部分相互作用并特异性地靶向含于 HAS 表位中的结合表位的化合物 (例如抗体), 所述 HAS 表位在与疾病相关细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

发明概述

本发明涉及特异性靶向 HAS 分子的部分的化合物、试剂、药物活性剂、药剂、治疗剂、活性物、药物等, 所述 HAS 分子的部分在第一种形式的细胞中易于接近细胞外环境, 但在其它形式的细胞中或在来自相同或相关细胞的转化细胞中却不能接近细胞外环境。特别地, 本发明提供了靶向 HAS 的部分的化合物, 所述 HAS 的部分在恶性或炎症性或增殖性细胞中易于接近细胞外环境, 但在“正常”细胞中却不能接近外界环境。此处, “正常”细胞指非-恶性、炎症性或增殖性细胞。

优选的化合物等是抗体，例如单克隆或多克隆抗体。同样还提供了包含本发明的化合物的药物及其他组合物。本发明还提供了在细胞、组织或动物中筛选 HAS 活性的调节剂的方法，所述包括对恶性、炎症性和增殖性细胞并由此对涉及所述恶性、炎症性和增殖性细胞的病症进行诊断性测定。本发明还阐述了对被怀疑患有或有患与 HA 水平或 HAS 活性相关的疾病或病症的倾向的动物（特别是人）进行治疗的方法。这种方法包括向需要接受治疗或被怀疑需要接受治疗或预防的患者施用治疗或预防有效量的一或多种本发明的化合物或组合物。

因此，在一个实施方式中，本发明提供了选择性地选定的细胞类型中降低 HAS 活性而在非选定的细胞类型中基本上不降低 HAS 活性的化合物。特别地，本发明涉及选择性靶向 HAS 分子的部分的化合物，所述 HAS 分子的部分在恶性、炎症性、增殖性或其他疾病相关细胞中易于接近细胞外环境但该部分在非疾病相关细胞中却基本上不接近细胞外环境。

一方面，本发明提供了用于降低或改变透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平分离的化合物，其中所述化合物靶向 HAS 氨基酸序列的表位，所述表位在病变细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

另一方面，本发明提供了能够降低或改变透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平分离的化合物，其中所述化合物靶向 HAS 氨基酸序列的表位，所述表位在病变细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

优选地，所述表位在病变细胞中呈递于细胞外空间以及在非病变细胞中呈递于细胞内空间或质膜。

优选地，所述表位在病变细胞中呈递于细胞内空间以及在非病变细胞中呈递于细胞外空间或质膜。

优选地，所述表位在病变细胞中呈递于质膜以及在非病变细胞中呈递于细胞外或细胞内空间。

优选地，所述化合物是治疗性抗体、其表位结合片段、衍生物、部分、嵌合体或去免疫形式。

优选地，所述化合物特异性地靶向选自 HAS 内的 INT-2 或 EX-1 的氨基酸序列或含有 INT-2 或 EX-1 的一或多个保守氨基酸取代的序列。

优选地，所述化合物特异性地靶向氨基酸序列 INT-2。

另一方面，本发明提供了治疗恶性或病变细胞的方法，该方法包括施用一种分离的化合物，其中所述化合物降低或改变透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平；且所述化合物靶向 HAS 氨基酸序列的表位，所述序列在病变细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

优选地，根据这一方法，所述化合物选自由治疗性抗体、其表位结合片段、衍生物、部分、嵌合体或去免疫形式组成的组。

优选地，根据这一方法，所述表位在病变细胞中呈递于细胞外空间以及在非病变细胞中呈递于细胞内空间或质膜。

优选地，根据这一方法，所述表位在病变细胞中呈递于质膜以及在非病变细胞中呈递于细胞外或细胞内空间。

优选地，根据这一方法，所述化合物降低透明质酸合酶 (HAS) 活性的水平，其中所述化合物靶向选自 HAS 内的 INT-2 或 EX-1 的氨基酸序列或含有 INT-2 或 EX-1 的一或多个保守氨基酸取代的序列。

优选地，根据这一方法，所述化合物特异性地靶向选自 INT-2 或 EX-1 的氨基酸序列。

优选地，根据这一方法，所述化合物靶向 INT-2。

优选地，根据这一方法，所述化合物靶向 EX-1。

优选地，根据这一方法，所述恶性或病变细胞是乳腺癌细胞。

优选地，根据这一方法，所述透明质酸合酶选自由亚型 HAS I、HAS II 和 HAS III 组成的组。

优选地，根据这一方法，所述亚型是 HAS II。

优选地，根据这一方法，所述透明质酸合酶选自由亚型 HAS I、HAS II 和 HAS III 组成的组。

优选地，根据这一方法，所述亚型是 HAS II。

另一方面，本发明提供了化合物在制备用于治疗恶性或病变细胞的药物中的用途，其中所述化合物降低或改变透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平，并靶向含于 HAS 氨基酸序列内的表位，所述表位在疾病相关细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

另一方面，本发明提供了能够降低透明质酸合酶 (HAS) 活性或 HA 细胞外释放的水平的分离的抗体，或其片段、衍生物、部分、嵌合体或完全

去免疫形式，其中所述抗体，或其片段、衍生物、部分、嵌合体或完全去免疫形式靶向 HAS 氨基酸序列的表位，所述表位在疾病相关细胞中比在正常细胞中更易于接近细胞外环境。

优选地，所述分离的抗体、其表位结合片段、衍生物、部分、嵌合体或完全去免疫形式特异性地靶向 HAS 表位 INT-2。

表 1 序列标识符

序列标识符	序列
1	免疫肽-HAS418 (INT-1)
2	免疫肽-HAS419 (EX-1)
3	免疫肽-HAS421 (INT-2)
4	人蛋白酶
5	人蛋白酶
6	人蛋白酶

附图说明

图 1 为人透明质酸合酶 (HAS) 家族间的多重氨基酸比对的图示。

图 2 为在非恶性状态下所预测的拓扑学的图示。

图 3 是显示在非还原条件下检测到分子量标准外的单一条带的照片。估计该条带大于 210,000Da 并可能代表驱动供应 HA 前体所必需的辅助蛋白质，特别是 HA 合成所必需的 UDP-葡萄糖醛酸和 UDP-N-乙酰葡萄糖胺。

图 4 为在 INT-1 或 INT-2 或 EX-1 存在的条件下，未受影响的皮肤成纤维细胞的生长速率的示意图。

图 5 是显示当皮肤成纤维细胞与绵羊 IgG 发生反应时所获得的典型直方图的结果的示意图。

图 6A-C 是显示 HAS 抗体在皮肤成纤维细胞上的流式细胞分析的示意图。皮肤成纤维细胞与 a) INT-1、b) INT-2、和 c) EX-1 反应。填充的 (灰色) 区域代表 HAS 抗体，而未填充区域则代表由对应的对照抗体产生的背景荧光。需要注意的是，在 c 中有荧光强度的迁移，这表明在细胞表面存在反应性表位。

图 7 为显示 HAS 抗体对细胞增殖的影响的示意图。

图 8 为显示在恶性乳腺癌细胞中 HAS 抗体的应用对 HA 生成的抑制的示意图。

图 9 为 HAS 抗血清对细胞形态学的影响的照片。所示细胞系：MDA-MB-231。每张显微照片的放大倍数为 400 倍。

图 10A 和 B 为 DAPI 染色的照片。(A) MDA-MB-231; (B) MDA-MD-468。注意：未检测到核碎裂。

图 11A 和 B 为照片：(A) 将乳腺癌细胞与 HAS 抗血清温育之后从细胞团中提取的 DNA。未检测到 DNA 片段。(B) 从代表胞质组分的细胞裂解液中提取的 DNA。在细胞溶胶中未检测到片段化 DNA。

图 12 为 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 的示意图。

图 13 为 ZRL-75-1 和 MDA-MB-435 的示意图。注意：灰色填充的区域代表对 HAS 抗体的反应性，而未填充的区域代表对应的抗体对照。以黑线表示的区域代表对仅有次级-FITC 的对照进行测定所得的背景荧光。绿色区域代表每种 HAS 抗体对所引述的乳腺癌细胞系的反应性。从 4 种被检测乳腺癌细胞系所得的 FACS 数据强烈地表明在恶性状态下，EX-1 和 INT-2 的表位在细胞外被表达。

发明详述

在本说明书中，除非另有说明，“包含 (comprise)” 或其变化形式 (例如 “comprises” 或 “comprising”) 将被理解为意指包括规定元素和整数 (integers) 或者元素或整数的组但并不排除任何其他元素或整数或者元素或整数的组。

对推测的 HAS 的胞内环的检测显示存在最显著的同源和保守基序 (图 1: 粗体/下划线所示氨基酸)。HAS 蛋白家族如图 1 中所示，其中对蛋白质序列进行了比对。HAS1、2 和 3 分别为 578、552 和 553 个氨基酸长，预测分子量范围从 63.1-64.8 Mr ($\times 10^3$)。在氨基酸水平上，所有成员显示出约 52-85% 的相同性。根据对氨基酸取代的研究，已表明关键基序 (用粗体表示) 对 HAS 活性是必需的。当 SGPL 基序 (粗体) 中的亮氨酸残基被缬氨酸取代时可导致 HAS 活性的丧失。

因此，本发明鉴定了在与疾病相关的细胞 (例如癌细胞或炎症性或增殖性细胞) 中，HAS 的部分 (例如但不限于 INT-a) 易于接近细胞外环境。在

“正常”细胞 (即不与癌症、炎症或增殖相关的细胞) 中, 这些部分不能接近细胞外环境。因此, 根据能使新的靶产生在疾病相关细胞中选择性靶向 HAS 的化合物的细胞的状态, HAS 分子的拓扑学发生改变。

因此, 本发明的一个方面涉及选择性靶向 HAS 分子的部分的化合物, 所述 HAS 分子的部分在恶性、炎症性、增殖性或其他疾病相关细胞中易于接近细胞外环境, 但该部分在非疾病相关细胞中基本上不能接近细胞外环境。

术语“化合物”、“制剂”、“试剂”、“药理学活性制剂”、“药剂”、“治疗剂”、“活性物”和“药物”在本申请中可以相互交换使用, 指能够结合 HAS 的部分的抗体或其他活性分子, 所述 HAS 的部分在恶性、炎症性或增殖性细胞中易于接近细胞外环境, 但在正常细胞中基本上不能接近细胞外环境。该术语还包括在本申请中特别提到的那些活性制剂的药物上可接受的和药理学活性成分。当使用术语“制剂”、“试剂”、“化合物”、“药理学活性制剂”、“药剂”、“治疗剂”、“活性物”和“药物”时, 应该理解这包括活性成分本身以及抗体的药物上可接受的、药理学活性的盐、嵌合体和重组形式。

提及“制剂”、“化学制剂”、“化合物”、“药理学活性制剂”、“药剂”、“治疗剂”、“活性成分”和“药物”时, 其包括两种或更多种活性剂的组合。“组合”还包括多部分 (例如两部分) 组合物, 其中所述制剂独立提供并独立给予或分发, 或者在分发之前混合在一起。例如, 多部分药物包装可含有两种或更多种保持互相独立的制剂。因此, 本发明的这一方面包括联合治疗。联合治疗包括两种抗体的同时施用, 每一种抗体都特异于仅在疾病相关细胞中易于接近外界环境的 HAS 的部分。

本申请所使用的制剂的“有效量”和“治疗有效量”意指能提供所需的治疗或生理学效果或结果的制剂的足够的量。这样的效果或结果包括细胞疾病的症状的减轻或改善。不需要的效果 (例如副作用) 有时也会伴随着所需的治疗效果出现; 因此, 医师是在潜在的益处和潜在的危险风险间进行平衡以确定何为适当的“有效量”。所需要的确切量将根据对象的物种、年龄和总体状况、施用方式等在对象之间有所不同。因此, 不可能对确切的“有效量”进行具体说明。然而, 在任何个体病例中, 适当的“有效量”可通过本领域技术人员应用常规实验加以确定。一般地, 所述制剂是以足

以减轻细胞 (包括恶性细胞) 的炎症和/或增殖的量和条件下进行给药的。

本发明使用化合物, 例如但不限于, 靶向对象 HAS 分子用于调节 HAS 的功能的抗体和其他免疫球蛋白 (包括其片段、衍生物、抗原结合部分、重组形式、嵌合形式、以及去免疫形式包括人源化形式), 以及在特定的实施方式中的 HAS1、HAS2 和/或 HAS3。在本申请中, 提及 HAS 包括具有相同功能的任何分子。优选地, 提及“HAS”包括亚型 HAS1、HAS2 或 HAS3。所述抗体对在疾病相关细胞中暴露于或易接近于细胞外环境的 HAS 的部分具有特异性。

因此, 本发明提供了能够在疾病和非病变细胞中选择性地影响 HAS 的功能或活性的分离的化合物。

本发明因此提供了 HAS 功能或活性的拮抗剂。这样的拮抗剂可用于降低 HAS 的效力并由此降低或提高 HAS 的水平。

因此, 在一个优选的方面, 本发明提供了在疾病相关细胞而非正常细胞中与 HAS 结合、相互作用或相关并降低 HAS 功能或活性的抗体。

如上面所指出的那样, “正常”细胞是与恶性、炎症或增殖无关的细胞。

所述抗体虽然优选单克隆抗体, 但其可以是单克隆或多克隆抗体。一般地, 所述抗体是分离的、同质的或者完全或部分纯化的形式。

所述抗体可以是人源化的或嵌合的, 或者是适于施用给人类抗体。这些包括, 例如从鼠单克隆抗体制备的人源化抗体、以及可以例如使用如下所述的转基因小鼠或通过噬菌体展示制备的人单克隆抗体。“人源化”抗体包括去免疫的抗体。

优选地, 抗体是针对 HAS 例如 HAS1、2 或 3 或其免疫原性部分或免疫同源分子而产生的。优选地, 抗体是针对在疾病和非病变细胞中有区别地暴露于细胞外环境的 HAS 表位而产生的。

提及“抗体 (antibody 或 antibodies)”, 其包括所有各种形式的抗体, 包括但不限于: 完全抗体 (例如, 具有完整 Fc 区域), 包括例如单克隆抗体; 抗原结合抗体片段, 包括例如 Fv、Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段; 人源化抗体; 人类抗体 (例如, 在转基因动物中产生的或通过噬菌体展示产生的); 以及通过遗传工程技术衍生自免疫球蛋白的多肽。除非另有说明, 本申请所使用的术语“抗体 (antibody 或 antibodies)”包括完全抗体及其抗原结合片段。

除非另有说明, 本发明抗体的特异性是指所述抗体基本上仅与其靶抗

原结合而与无关蛋白没有明显的结合。然而，有可能抗体将被设计成或被选择与两种或更多种相关蛋白结合。相关蛋白包括不同的剪接变体或相同蛋白质的片段或来自不同物种的同源蛋白质。这样的抗体仍然被认为对那些蛋白质具有特异性并且包含于本发明中。在本申请中，术语“基本上”意指与非靶抗原在基础（即非特异性）水平之上没有可检测的结合。

本发明的抗体可通过公知的技术制备。参见，例如，*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet *et al*, (eds.), Plenum Press, New York (1980); and *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)。

本发明还涉及用于制备杂交瘤细胞系的方法，包括用 HAS 或其免疫原性部分免疫非人动物（例如小鼠或转基因小鼠）；从被免疫的动物收获脾细胞；将所收获的脾细胞与骨髓瘤细胞系融合从而产生杂交瘤细胞；以及鉴定产生与 HAS 结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

这样的杂交瘤细胞系和通过它们所制备的 HAS 单克隆抗体也包括在本发明中。可通过常规技术对由所述杂交瘤细胞系分泌的单克隆抗体进行纯化。由此产生的杂交瘤或单克隆抗体可进一步进行筛选从而鉴定出具有特定所需特性的单克隆抗体。

可用于在制备本发明的抗体的最初阶段免疫动物的 HAS 分子或其免疫原性部分可以来自任何哺乳动物来源。

本发明的抗体的抗原结合片段可通过常规技术制备。这类片段的实例包括但不限于，Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段（包括单链 Fv 片段（称为 sFv 或 scFv））。通过遗传工程技术制备的抗体片段及衍生物，例如二硫化物稳定的 Fv 片段（dsFv）、单链可变区结构域（Abs）分子、微抗体（minibody）和双链抗体（diabodies）也可用于本发明。

可通过已知的技术（包括在本申请中所描述的分析方法）制备这类抗 HAS 分子的单克隆抗体的片段和衍生物并筛选所需的特性。其中某些技术涉及分离编码感兴趣的 mAb 的多肽链（或其部分）的 DNA，以及通过重组 DNA 技术操纵所述 DNA。所述 DNA 可与另一种感兴趣的 DNA 融合，或被改变（例如，通过诱变或其他常规技术）从而例如添加、或取代一或多个氨基酸残基。

可从已用经修饰的 LIF 分子免疫的小鼠的 B-细胞中分离编码抗体多肽 (例如, 重链或轻链、仅可变区或全长) 的 DNA。可利用常规方法分离所述 DNA。噬菌体展示是公知技术的另一实例, 利用该技术可制备抗体的衍生物。在一种方法中, 作为感兴趣的抗体的成分的多肽可在任何适当的重组表达系统中表达, 且所表达的多肽能够装配形成抗体分子。

单链抗体可通过经氨基酸键 (短肽接头) 连接重链和轻链可变区 (Fv 区域) 片段而形成, 从而产生单独的多肽链。这种单链 Fv (scFv) 可通过将编码肽接头的 DNA 融合于编码两个可变区多肽 (VL 和 VH) 的 DNA 之间进行制备。衍生自本申请所提供的抗体的单链抗体也包括在本发明之中。

在一个实施方式中, 本发明提供了结合 HAS (例如 HAS1、2 和/或 3) 的本发明的抗体的抗体片段或嵌合、重组或合成形式。

用于从感兴趣的抗体获得不同亚型或同种型抗体的方法是已知的, 即亚型转换。因此, IgG1 或 IgG4 单克隆抗体例如可衍生自 IgM 单克隆抗体, 反之亦然。这种技术允许制备不仅具有给定抗体 (亲本抗体) 的抗原结合特性还展示出与亲本抗体所不同的抗体同种型或亚型相关的生物学特性的新抗体。可采用重组 DNA 技术。编码特定抗体多肽的克隆 DNA 也可用于这种方法中, 例如编码所需同种型抗体的恒定区的 DNA。

上述的单克隆制备方法可用于动物 (例如小鼠) 以制备单克隆抗体。已知衍生自所述动物的常规抗体 (例如鼠抗体) 通常不适于施用给人, 因为其有可能引起免疫应答。因此, 可能需要对此类抗体进行修饰从而提供适于施用给人的抗体。用于制备嵌合和/或人源化抗体的方法在本领域中是已知的并将在下文中进行进一步详细描述。

本申请中的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体, 其中重链和/或轻链的可变区与衍生自非人物种 (例如鼠) 的抗体中的对应序列相同或同源; 而所述链的剩余部分则与衍生自人的抗体中的对应序列以及这种抗体的片段相同或同源, 只要它们能够呈现所需的生物学活性。

非人 (例如鼠) 抗体的“人源化”形式是嵌合抗体, 其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。通常, 人源化抗体是人免疫球蛋白 (受体抗体), 其中所述受体的互补决定区 (CDR) 被来自具有所需特性 (例如特异性和亲和力) 的非人物种 (例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类) 的对应的 CDR (供体抗体) 所取代。在一些情况下, 人免疫球蛋白的骨架区残基被对应的非人

残基所取代。此外，人源化抗体可以包含在受体抗体或在供体抗体中没有的残基。

进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含基本上至少一个（典型地为两个）可变区中的全部，其中全部或基本上全部互补决定区对应于非人免疫球蛋白的相应部分，且全部或基本上全部骨架区残基为人免疫球蛋白序列的相应部分。人源化抗体还可任选地包含免疫球蛋白（典型地为人免疫球蛋白）的恒定区（Fc）的至少一部分。

在非人动物中制备人类抗体的方法已被开发，且为本领域技术人员所公知。例如，已导入编码一或多种人免疫球蛋白链的遗传材料的转基因小鼠可用于制备本发明的抗体。在动物中制备的抗体掺入了由导入所述动物的人类遗传材料编码的人免疫球蛋白多肽链。

用于产生人类抗体的另一方法是噬菌体展示。用于产生人类抗体的噬菌体展示技术是本领域技术人员所公知的，包括诸如 Cambridge Antibody Technology 和 MorphoSys 等公司所使用的方法。

本发明的化合物还可应用于药物发现和靶标确认领域。本发明涵盖了所述化合物以及本申请中所鉴定的优选的靶区段在药物发现成果中的用途，以阐明存在于 HA、HAS 或 HA/HAS 相互作用与疾病状态、表型或病症之间的关系。这些方法包括检测或调节 HAS，包括将样本、组织、细胞或有机体与本发明的化合物接触，在治疗之后的某一时间测量 HAS 的核酸或蛋白质水平和/或相关的表型或化学终点，以及任选地将测量值与非处理样本或用本发明其他化合物进行处理的样本进行比较。这些方法还可与其他实验平行或结合进行以确定用于靶标确认的方法中的未知基因的功能，或确定特定基因产物作为治疗或预防特定疾病、病症或表型的靶的效力。

本发明涉及将本申请中所描述的化合物作为治疗剂治疗患有与 HA 相关的疾病和不适的对象的用途。使用本发明的组合物和化合物治疗的对象包括可从此类治疗获益的任何动物。这些动物包括但不限于人、狨猴、猩猩和大猩猩、家畜动物（例如，奶牛、绵羊、猪、马、驴）、实验室实验动物（例如，小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔）、伴侣动物（例如，猫、狗）和捕获的野生动物（例如，啮齿动物、狐狸、鹿、袋鼠）。特别优选的宿主是人、灵长类动物或家畜动物。

本发明的化合物可用于诊断、治疗、预防以及研究试剂和试剂盒。此

外，能够影响 HAS 并具有精确的特异性的抗 HAS 抗体，通常被本领域技术人员用来阐明特定基因或基因产物的功能或用来区别生物代谢途径中各成员间的功能。

就在试剂盒和诊断中的应用而言，可单独使用或与其他化合物或治疗剂联合使用的本发明的化合物可用作示差和/或组合分析的工具来阐明在细胞或组织内表达的基因的部分或完整补体的表达模式。

本发明的化合物可用于研究与诊断，因为这些化合物可与 HAS 本身相结合。例如，可使用报道分子（包括用于成像目的、诊断目的或定量目的的酶和放射性标记）对抗体进行标记。还可以制备利用这种检测方法用于检测样本中的 HAS 水平的试剂盒。

抗体的特异性和灵敏性可由本领域技术人员进行控制以满足治疗用途。这种化合物在对动物（包括人）中的疾病状态的治疗中已用作治疗部分。

就治疗而言，可通过调节 HAS 的表达进行治疗的怀疑患有疾病或病症的动物（优选人）可使用抗体进行治疗以抑制 HAS 活性。例如，在一个非限制性的实施方式中，所述方法包括给需要治疗的动物施用在病变细胞中选择性地抑制 HAS 表达的治疗有效量的抗体的步骤。在一个实施方式中，动物体内 HAS 的活性或表达被抑制约 10%。优选地，动物体内 HAS 的活性或表达被抑制约 30%。更优选地，动物体内 HAS 的活性或表达被抑制约 50%或更多。

例如，HAS 基因表达的降低可在所述动物的血清、脂肪组织、皮肤细胞、肝脏或任何其他体液、组织或器官中检测到。优选地，含于被分析的所述液体、组织或器官内的细胞都含有编码 HAS 蛋白的核酸分子。

因此，本发明涉及筛选化合物的方法，该方法包括，例如，用 HAS 接触候选化合物。所述筛选方法包括分析 (i) 在所述药物和 HAS 之间复合体的存在；以及 (ii) 筛选在疾病和非病变细胞中 HAS 表达水平的改变。也可将全部细胞用于筛选所述细胞与药物之间的相互作用。

一种形式的分析涉及竞争性结合分析。在这种竞争性结合分析中，候选化合物或 HAS 典型地是被标记的。可从任何推定的复合体分离游离的 HAS，且游离（即，未复合）的标记的量是被测制剂结合于靶分子的度量。还可测量结合的而非游离的 HAS 的量。还有可能对化合物而非 HAS 进行

标记从而测量在存在和不存在被测化合物的条件下结合化合物的 HAS 的量。此类化合物可抑制可用于例如寻找 HAS 抑制剂的 HAS。

用于药物筛选的另一技术提供了对靶具有适当的结合亲和力的化合物的高通量筛选。简言之，可在固体基质（例如塑料针（plastic pin）或某些其他表面）上合成大量不同的小肽检测化合物。将所述肽检测化合物与 HAS 反应并进行洗涤。结合的 HAS 分子可随后通过本领域公知的方法进行检测。这一方法可适于筛选非肽、化学实体。因此，这一方面扩展为筛选 HAS 拮抗剂或激动剂的组合方法。

纯化的 HAS 可直接包被在板上用于前述的药物筛选技术。然而，也可以使用针对靶的非中和抗体将所述靶固化于固相上。

如上所述，本发明还可扩展至如上述所鉴定的并结合和抑制 HAS 活性的小分子抑制剂。

应当理解，除非另有说明，本发明不局限于特定的组分配制品、制备方法、剂量方案、治疗方法等，因为这些可以发生改变。还应当理解，本申请中所使用的术语都是出于对特定的实施方式进行描述的目而不是限制性的。

必需注意，在本申请中，除非上下文中另外清楚地指明，单数形式“a”、“an”和“the”也包括复数方面。因此，例如，提及“化合物”时包括单种化合物，以及两种或更多种化合物；提及“抗体”时包括单种抗体，以及两种或更多种抗体；等等。

术语“化合物”、“活性剂”、“药理学活性制剂”、“药剂”、“活性物”和“药物”在本申请中可相互替换使用，指 HAS 功能或活性的拮抗剂或编码 HAS 的遗传物质的表达的拮抗剂，其诱导所需的药理和/或生理效应（例如但不限于控制炎症和减少癌生长）。所述术语还包括在本申请中特别提及的那些活性剂的药物可接受的和药理学活性成分，包括但不限于盐、酯、酰胺、前体药物、活性代谢物、类似物等。当使用术语“化合物”、“活性剂”、“药理学活性制剂”、“药剂”、“活性物”和“药物”时，应当理解其包括活性剂本身以及药物可接受的、药理学活性的盐、酯、酰胺、前体药物、代谢产物、类似物等。

在本申请中，化合物的“有效量”和“治疗有效量”意指足以提供所需的治疗或生理学效应（例如抑制炎症或减少癌细胞的生长或蔓延）的制

剂的量。不需要的效果 (例如副作用) 有时也会伴随着所需的治疗效果一起出现; 因此, 医师是在潜在的益处和潜在的危险风险间进行平衡以确定何为适当的“有效量”。所需要的确切量将根据对象的物种、年龄和总体状况、施用方式等在对象之间有所不同。因此, 不可能对确切的“有效量”进行具体说明。然而, 在任何个体病例中, 适当的“有效量”可通过本领域技术人员仅应用常规实验加以确定。本发明还延伸至治疗或预防的方法。

至于“药物可接受的”载体、赋形剂或稀释剂意指由非生物学或不需要的材料组成的药物载体, 即所述材料可与选定的活性剂一起施用给对象而不会引起任何的或实质上的副作用。载体可包括赋形剂和其他添加剂例如稀释剂、去污剂、着色剂、湿润或乳化剂、pH 缓冲剂、防腐剂等。

类似地, 本申请中提供的化合物的“药理学可接受的”盐、酯、酰胺、前体药物或衍生物不是生物学上或其他方面不需要的盐、酯、酰胺、前体药物或衍生物。

本申请所使用术语“治疗 (“treating” 和 “treatment”)” 指疾病或不适的症状的严重性和/或频率的降低, 或症状和/或潜在原因的生理状态消除, 疾病症状的发生和/或其潜在原因的预防以及与细胞因子活性相关的病症的改善或补救。

“治疗” 患者可包括在易感个体中预防不适或疾病状态或生理事件以及通过抑制疾病或不适治疗表现出临床症状的个体。

因此, 本发明的另一方面涉及包含能够减低 HAS 的水平或活性由此降低 HAS 的水平化合物的治疗性或预防性组合物。

本发明的组合物和化合物可用于治疗或预防与 HA 相关的疾病。

通过将有效量的化合物添加至适当的药物可接受的稀释剂或载体, 可将本发明的化合物用于药物组合物中。本发明的化合物和方法的应用也可以是预防上有用的。

可将本发明的化合物与其他分子、分子结构或化合物混合物 (例如脂质体, 靶向受体的分子, 口服、直肠、局部或其他配制品) 混合、胶囊化、连接或结合, 从而协助摄取、分配和/或吸收。

术语“前体药物” 是指以非活性形式制备的治疗剂, 其通过与内源酶或其他化学制品和/或条件发生反应在机体或其细胞内转化为活性形式 (即, 药物)。

术语“药物可接受的盐”是指本发明的化合物的生理和药物可接受的盐：即，保留亲本化合物所需的生物学活性且不会产生不需要的毒理效应的盐。

本发明还包括本发明的活性化合物或抗体的药物组合物和配制品。可根据是希望进行局部还是全身治疗以及待治疗的区域，以任何数量的方式施用本发明的药物组合物。施用可以是局部的（包括眼和粘膜包括阴道和直肠递送）、肺的（例如通过吸入或吹入粉末或气雾剂（包括通过喷雾器）、气管内、鼻内、表皮和经皮、口服或肠胃外。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或灌注；或颅内（例如鞘内或心室内）施用。可对所述化合物进行修饰供口服施用。用于局部施用的药物组合物和配制品可包括皮肤贴片、软膏、洗液、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、水、粉末或含油基质、增稠剂等也可以是必需的或所需的。包被的避孕套、手套等也是可是有用的。

可方便地以单位剂式存在的本发明的药物配制品可根据制药工业中公知的常规技术进行制备。这样的技术包括将活性成分与药物载体或赋形剂相结合的步骤。一般而言，所述配制品通过将所述活性成分与液体载体或精细分割的固体载体或二者均匀地并直接地结合而制备；然后，如果需要，成型为产品。

本发明的组合物可配制成多种可能剂式的任意种类，例如但不限于，片剂、胶囊、凝胶胶囊、液体糖浆、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物还可配制成水、非水或混合介质中的悬液。水混悬液还可含有增加所述悬液的粘度的物质包括，例如，羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。所述悬液还可含有稳定剂。

本发明的药物组合物包括但不限于溶液、乳剂、泡沫和含脂质体的配制品。本发明的药物组合物和配制品可包含一或多种穿透促进剂、载体、赋形剂或其他活性或非活性成分。

典型地，乳剂是一种液体以通常超过 0.1 μ m 直径的小滴的形式分散于另一种液体中的异质体系。乳剂可含有除分散相和活性药物之外的其他成分，所述活性药物可以以水相、油相或本身作为分离相的形式作为溶液存在。微乳剂也包括在本发明的实施方式中。

本发明的配制品包括脂质体配制品。在本申请中，术语“脂质体”意

指由排列在球形双分子层中的两性脂质组成的小泡。脂质体是单层或多层小泡，其具有由亲脂材料形成的膜和含有待递送的组合物水性内容物。

脂质体还包括“空间稳定的”脂质体，该术语在本申请中指包含一或多种专门化脂质的脂质体，与缺乏这些专门化脂质的脂质体相比，当将这些专门化脂质掺入脂质体时，能够增强所述脂质体的循环寿命。空间稳定的脂质体的实例是这样的脂质体，该脂质体形成小泡的脂质部分的一部分包含一或多种糖脂，或是利用一或多种亲水聚合物例如聚乙二醇 (PEG) 部分衍生而来。

本发明的药物配制品和组合物还可包括表面活性剂。在药物制品、配制品和乳剂中使用表面活性剂是本领域公知的。

本领域技术人员将认识到，配制品是通常根据其预期用途 (即施用途径) 常规地进行设计的。

用于局部施用的优选的配制品包括那些配制品，其中本发明的化合物或抗体与局部递送制剂例如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂相混合。优选的脂质和脂质体包括中性的 (例如，二油酰磷脂酰 DOPE 乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性的 (例如，二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 DMPG) 和阳离子的 (例如，二油酰四甲氨基丙基 DOTAP 和二油酰磷脂酰乙醇胺 DOTMA)。

对于局部或其他施用，本发明的化合物或抗体可被胶囊化于脂质体内或与脂质体特别是阳离子脂质体形成复合物。或者，化合物或活性分子 (例如抗体) 可与脂质 (特别是阳离子脂质) 复合。

用于口服施用的组合物和配制品包括粉末或颗粒、微颗粒、纳米颗粒、于水或非水性介质中的悬液或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或小片。增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、分散辅助剂或粘合剂也可是需要的。优选的口服配制品是这样的配制品，即，其中本发明的寡核苷酸与一或多种穿透促进剂、表面活性剂和螯合剂联合施用。优选的表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆汁酸和/或其盐。同样优选的是穿透促进剂的组合，例如脂肪酸/盐与胆汁酸/盐的组合。特别优选的组合是月桂酸、羊蜡酸和 UDCA 的钠盐的组合。其他的穿透促进剂包括聚氧乙烯-9-月桂酸酯、聚氧乙烯-20-十六烷基酯。本发明的化合物或抗体或其他活性分子可以包括喷雾干燥颗粒或复合形成微粒或毫微粒的颗粒形式口服递送。

用于肠胃外、鞘内或心室内施用的组合物和配制品可包括无菌的水溶液，所述水溶液还可含缓冲剂、稀释剂和其他适当的添加剂（例如但不限于穿透促进剂、载体化合物和其他药物可接受的载体或赋形剂）。

本发明的某些实施方式提供了含有一或多种化合物或抗体以及一或多种其他化疗剂的药物组合物。这种化疗剂的实例包括但不限于癌症化疗药物（例如，柔红霉素、道诺霉素、更生霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、依索比星、博来霉素、马磷酰胺、异环磷酰胺、阿糖胞苷（cytosine arabinoside）、双-氯乙基硝基脲（bis-chloroethylnitrosurea）、白消安、丝裂霉素 C、放线菌素 D、光神霉素、强的松、羟孕酮、睾酮、他莫西芬、达卡巴嗪、丙卡巴肼、六甲密胺、五甲密胺、米托蒽醌、安吡啶、苯丁酸氮芥、甲基环己基硝基脲（methylcyclohexylnitrosurea）、氮芥、美法仑、环磷酰胺、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷（cytarabine）、5-氮胞苷、羟基脲、脱氧助间型霉素、4-羟基过氧环磷酰胺、5-氟尿嘧啶（5-FU）、5-氟脱氧尿苷（5-FUdR）、甲氨蝶呤（MTX）、秋水仙碱、紫杉醇、长春新碱、长春碱、依托泊苷（VP-16）、三甲曲沙、伊立替康、托泊替坎、吉西他滨、替尼泊苷、顺铂和己烯酚（DES）。当与本发明的化合物共同使用时，这类化疗剂可以单独使用（例如，5-FU 和寡核苷酸）、顺序使用（例如，5-FU 和寡核苷酸使用一段时间后使用 MTX 和寡核苷酸）、或与一或多种其他此类化疗剂共同使用（例如，5-FU、MTX 和寡核苷酸，或 5-FU、放疗和寡核苷酸）。抗炎药（包括但不限于非类固醇类抗炎药和皮质类固醇）以及抗病毒药物（包括但不限于三氮唑核苷（ribivirin）、阿糖腺苷、阿昔洛韦和更昔洛韦），还可与本发明的组合物组合。两种或更多种组合的化合物可以共同或顺序使用。

在另一个相关的实施方式中，本发明的组合物可含有一或多种活性分子例如靶向第一种蛋白质的抗体以及靶向第二种蛋白质的一或多种其他化合物。或者，本发明的组合物可含有靶向相同蛋白质的不同区域的两种或更多种活性化合物。

治疗性组合物的配制品及其随后的施用（配量（dosing））落入本领域技术人员应知的范围之内。配量依赖于待治疗的疾病状态的严重性和反应性，同时疗程可从几天持续至数月或直至治疗效果表现出来或疾病状态的减轻得以实现。最佳的配量方案可从对患者体内药物蓄积的测量计算出来。本领域普通技术人员可容易地确定最佳剂量、配量方法和重复率。最佳剂

量可根据个体化合物的相对功效而发生变化, 并通常可基于在体外和体内动物模型中被发现有效的 EC_{50} 进行估计。一般而言, 剂量是从 $0.01\mu\text{g}$ - 100g/kg 体重, 可以每天、每周、每月或每年给药一次或多次, 或者甚至每 2-20 年给药一次。本领域普通技术人员可容易地根据所测定的体液或组织中所述药物的滞留时间和浓度估计用于配量的重复率。在成功的治疗之后, 希望让患者经受维持治疗从而预防疾病状态的复发, 其中所述化合物以维持剂量进行施用, 可从 $0.01\mu\text{g}$ - 100g/kg 体重, 每天一次或多次, 直到每 20 年一次。有效量的实例包括 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2、3、4、5、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 和 100g/kg 体重。

对所有 HAS 蛋白而言共有的是它们的结构中可预测质膜结合的疏水序列。预测的跨膜结构域的簇可在所述蛋白质的任意末端看到, 其可在氨基末端有 1-2 个, 在羧基末端有 4-6 个。真核成员细胞溶质环的长度可在 307-3328 个残基之间变化并有可能含有指导 HAS 合成的催化结构域。

基于预测的 HAS1 的氨基酸序列 (由 Itano & Kimata, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 222:816-821, 1996 测定), 设计并通过固相氨基酸合成以及通过反相高压层析纯化三种短抗原肽。如通过质谱法显示那样, 所述肽被测定为 99.9% 纯。所述肽的制备、纯化、与白喉类毒素 (DT) 的结合、以及纯化检测都通过 Chiron Mimitopes (Melbourne, Victoria, Australia) 进行。三种免疫肽中的每一种的序列被指定为 HAS418 (INT-1), HAS419 (EX-1) 和 HAS421 (INT-2)。这些免疫肽是本发明人在先专利申请中的主题 (PCT/AU04/01383、WO05/035548)。

利用跨膜预测程序 (TM 预测), 每种合酶含有 6-7 个推定的跨膜结构域。根据之前基于 HAS 抗血清对非恶性细胞 (例如皮肤成纤维细胞) 的反应性所得数据, 可以得到在质膜中合酶是如何定向的推定模型 (参见图 2)。EX-1

表位位于 TMD 5 和 6 之间。由于 TMD 是所述合酶中最后的疏水序列，这使得羧基末端位于细胞质内。给出了带有针对 HAS 抗血清的表位的位置的透明质酸合酶的预测拓扑学。

在导致本发明的工作中，观察到针对 EX-1、INT-1 和 INT-2 的抗体能够在正常和/或恶性细胞中影响的不同 HAS 亚型的活性；尽管事实上，根据预测的氨基酸序列 (图 1)，预期这些抗体仅影响 HAS1 的活性。此外，还发现非恶性细胞的 HA 合酶拓扑学显示出与预测的拓扑学一致，然而，令人惊讶的是，在乳腺癌细胞中改变的拓扑学是显而易见的。这些数据保证了对可能作为透明质酸合成的选择性治疗抑制剂的、对新的 HAS 表位具有特异性的抑制性抗体进行深入评估，从而导致用于癌症的新疗法。因此，HAS，尤其是 HAS1、2 和/或 3 代表有用的药物靶。

通过以下非限制性实施例对本发明进行更详细地描述。

实施例 1 HAS 抗血清的制备

基于预测的 HAS1 的氨基酸序列 (Itano & Kimata, 1996)，设计并通过固相氨基酸合成以及通过反相高压层析纯化三种短抗原肽。如通过质谱法显示那样，所述肽被测定为 99.9% 纯。所述肽的制备、纯化、与白喉类毒素 (DT) 的结合、以及纯化检测都通过 Chiron Mimitopes (Melbourne, Australia) 进行。每种免疫肽的序列示于表 2 中。

表 2 免疫肽序列和定位

免疫肽	氨基酸序列	在 HAS 拓扑学中推测的定位	
		细胞内	细胞外
HAS418 (INT-1)	AARGPLDAATCRALLYPRARV (SEQ ID NO:1) 49→58 ‘Cys’ 94→103	[	
HAS419 (EX-1)	GGLVRSVAHEA (SEQ ID NO:2) 480→490		[
HAS421 (INT-2)	GAYREVEAEDPGRLAVE (SEQ ID NO:3) 146→162	[	

注意：请参考 HAS1 上免疫肽序列的位置的氨基酸比对及 HAS2 和 3 之间所述位置的关系。这些序列没有任何已被鉴定为透明质酸合酶活性所必需的基序配对。

用溶解于弗氏完全佐剂中的肽 (0.2-0.5mg) 在两个部位对 Border Leicester Merino 杂种绵羊进行肌肉注射，并在两周之后用溶解于弗氏不完全佐剂中的肽再次进行肌肉注射。第 35 天，将所述绵羊放血，通过离心分离血清，保存于-20°C。将收集的全部血清进行酶联免疫吸附测定，检测特异的肽和载体蛋白质的抗体。通过溴化氰活化将所述免疫肽与巯代丙基-Sepharose 6B 凝胶 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 结合，并通过亲和层析从多克隆绵羊 HAS 抗血清中提取特异性抗体。简言之，将 5mL 血清与 3mL PBS 混合并与亲和/配体树脂在室温混合 1 小时，然后用 5mL PBS 洗涤三次。将所述抗体洗脱于 0.1M 甘氨酸 (pH2.8) 中，并立即通过添加 0.1M NaOH 中和至 pH7.2。

随后在配有 YM30 Diaflo 过滤器的 Amicon 细胞浓缩器中浓缩 HAS 多克隆抗体。通过 BCA 分析 (Pierce, USA) 确定每种亲和纯化抗体的蛋白浓度。用于免疫组织化学或免疫印迹法中的抗体的无菌性是在等分保存于-20°C 之前通过添加 0.1%w/v 叠氮化钠保证的。欲添加至细胞培养物中的抗体在没有叠氮化物的条件下保存于-20°C。

实施例 2 HAS 抗血清的功能性表征

在还原和非还原条件下将分离自白血细胞的最初的粗制膜制备物溶解于 10%的聚丙烯酰胺凝胶中。Western 印迹分析证实在还原条件下，全部三种抗体都检测到分子量为大约 60,000Da 的单一一条带，这与透明质酸合酶的预测分子量一致。

在非还原条件下，在分子量标准范围之外检测到一条单一一条带。该条带估计大于 210,000Da，并可代表驱动供应 HA 前体所必需的辅助蛋白质，特别是 HA 合成所必需的 UDP-葡萄糖醛酸和 UDP-N-乙酰葡萄糖胺，参见图 3。

实施例 3 在皮肤成纤维细胞培养物中 HAS 抗体对生长率和透明质酸合成的影响

本实施例检测了每种透明质酸合酶抗体对培养的皮肤成纤维细胞的影响。将 3 种皮肤成纤维细胞系的单层培养物建立于 24-孔组织培养板中 (17,000 个细胞/mL 培养基/孔)。于 37°C, 于 5% CO₂ 中, 将细胞培养于添加有 10% v/v FCS、1.9mM 谷氨酰胺、20mM HEPES、0.09% w/v 碳酸氢盐和由 100 单位青霉素、0.1mg 链霉素和 0.25µg/ml 两性霉素 B 的抗生素/抗真菌溶液的 BME 中。在 24 小时的沉降期后, 通过使用于 PBS 中的 0.25% (w/v) 胰蛋白酶/EDTA 对 4 个孔进行胰蛋白酶消化并在 Model-ZM coulter 计数器中进行计数测定平均植板率和细胞数。将 HAS 抗体 418、419、421 和绵羊 IgG 在所述培养基中稀释至终浓度 300µg/ml 并施用于剩余的孔, 每孔的终体积为 1mL。此后, 收集培养基并在第 1、2、4 和 8 天估计细胞计数。将培养基保存于 4°C, 以 0.02% 的叠氮化钠作为防腐剂, 直至使用 HA 放射测定对 HA 进行定量。

当与绵羊 IgG 或没有抗体的对照进行比较时, 在存在 HAS418 (INT-1) 或 421 (INT-2) 的条件下皮肤成纤维细胞的生长速率未受影响。这些结果将与 HAS418 和 421 表位位于细胞内的假设相一致。在所有实验条件下合成的 HA 的量都低于三种检测细胞系中的一种 (图 4), 这有可能反映了当检测生长速率时这种特定细胞系的汇合状态。在活性增殖细胞培养物中, 透明质酸合成的速率比高密度培养物中高出几个细胞分裂。最惊人的结果是 HAS419 (EX-1) 对透明质酸合成的抑制作用 (图 4 和 5)。用 300µg/ml HAS419 温育 24 小时之后, 皮肤成纤维细胞培养物中的透明质酸合成被完全抑制了。在所有组中, 细胞数从 1 或 2 天到 8 天逐步减少。这与细胞数的逐步下降相关。这表明在皮肤成纤维细胞中 HAS419 (EX-1) 的表位位于细胞表面。其他透明质酸合酶抗体, HAS418 (INT-1) 和 421 (INT-2), 未施加任何 HA 合成抑制作用或影响生长速率。用于这些实验的实验系统不含补体以避免抗体-抗原与补体的相互作用而导致的任何急性细胞裂解。

为了确认 HAS 抗体表位的方向, 利用荧光激活细胞分类分析 (FACS) 对非透过性皮肤成纤维细胞进行了深入的工作。图 6a、6b 和 6c 所示为当皮肤成纤维细胞分别为 INT-1、2 和 EX-1 反应时, 所获得的典型直方图的代表性结果。

FACS 结果表明, 两种表位 (INT-1 和 INT-2) 在非透过性皮肤成纤维细胞中都是无活性的, 提示这些表位位于细胞内。这与在 INT-1 和 2 抗体未

扰乱生长速率和透明质酸合成时所进行的功能性研究很好地相关。相反，当通过 FACS 进行分析时，EX-1 的表位显示干扰 HA 合成并引起细胞数的下降以及呈阳性反应。这表明 EX-1 的表位位于细胞表面。

当考虑透明质酸合酶的跨膜结构域 (TMD) 时，发现 EX-1 的表位位于 TMD 5 和 6 之间。这使得这两个 TMD 之间的环位于细胞外。除此之外，由于 TMD 6 是最后的疏水片段，这使得羧基末端位于细胞内。

实施例 4 在乳腺癌细胞系培养物中 HAS 抗体对生长率和透明质酸合成的影响

基于 HA 受体的差异表达，侵袭/转移能力和 HA 产生的程度，选择非整倍体人乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231。

将细胞系置入 24-孔板。在添加了 300 μ g/ml INT-1、INT-2、EX-1 抗血清和绵羊 IgG (物种同种型对照) 的含有 10%未处理 FCS 或 10%补体灭活的 FCS 的细胞特异性培养基添加之前允许所述细胞贴壁 24 小时。在培养建立之后，在 1、2、4、6 和 8 天的每个时间点收集细胞，并利用自动 Coulter 计数法确定细胞数。保留得自每一检测和对照培养物的培养基，并定量分析 HA 的存在。将对照培养基 (没有细胞接触) 中的 HA 的浓度用于测定生长培养基中的 HA 内源水平并从每个后续的 HA 测定中将其扣除。

将细胞在存在每种抗体的条件下温育 24 小时，然后对 MDA-MB-468 和 231 进行 HAS 抗体的初始滴测，然后估计细胞数。每种抗体的滴度范围是 10-10,000 ng/ml。对每种细胞系都观察到类似的趋势，由此得到 MDA-MB-231 的结果。

从图 7 可知，除了针对 EX-1 表位的抗体之外，INT-2 抑制细胞增殖并引起细胞数的显著下降。这说明在恶性状态下，透明质酸合酶的膜拓扑学与在非恶性细胞例如皮肤成纤维细胞中观察到的有所不同。当将两种乳腺癌细胞系都用 300 μ g/ml 的每种抗体进行温育从而进行额外的实验时，这些观测就可翻译成功能上的相关性。在每一时间点收获细胞并使用自动 coulter 计数器估计细胞数。保留得自每一检测和对照培养物的培养基，然后分析 HA 的存在。图 8 清楚地表明，除 EX-1 之外，在两种被检测的乳腺癌细胞系中，HA 的产生也同样被 INT-2 而非 INT-1 抑制。

对 HA 合成的抑制导致活性乳腺癌和非恶性成纤维细胞的分离。加入

抗体 24 小时之后,对所培养的细胞的显微镜检查表明在细胞之间具有明显的形态学差异。针对不同合酶表位的抗体导致不同的细胞变化。例如,针对 INT-1 的抗体不会在细胞形态学上产生任何剧烈的变化。针对 INT-2 和 EX-1 的抗体导致诸如细胞皱缩、膜结合小泡的形成、以及质膜和核膜的扩张性起泡等特征。从在存在每种抗体的条件下生长的 MDA-MB-231 所捕获的影像如图 9 中所示。

需要注意的是,在存在 INT-2 和 EX-1 的条件下生长的细胞的外观,此时可清楚地看到肿大的细胞以及核膜肿胀。确定这些细胞的活力状态是符合逻辑的。进行 DAPI 染色 (以检测核凋亡) 和 DNA 片段化分析。这些结果如下图 10 所示。

当对在存在 HAS 抗血清的条件下生长的分离和吸附细胞进行 DAPI 染色时,细胞核和 DNA 片段化都未显现 (图 10, A 和 B)。当从这些细胞提取 DNA 并在标准电泳技术下进行分辨时,这一观察结果也同样得到了确证。DNA 片段化并未观察到 (图 11, A 和 B))。

为确认 HAS 抗血清对乳腺癌细胞系的细胞反应性,在对皮肤成纤维细胞最初被表征时就以相同的方式进行 FACS。同样也评价了两种其它的乳腺癌细胞系,MDA-MB-435 和 ZRL-75-1,对 HAS 抗血清的反应性。

注意:直方图中灰色填充的区域代表对 HAS 抗体的反应性,而未填充的区域代表对应的抗体对照。以黑线表示的区域代表对仅有次级-FITC 的对照进行测定所得的背景荧光。绿色区域代表每种 HAS 抗体对所选用的乳腺癌细胞系的反应性。从 4 种被检测的乳腺癌细胞系所得的 FACS 数据强烈地表明在恶性状态下,EX-1 和 INT-2 的表位在细胞外表达。

实施例 5 HAS 抗血清与不同 HAS 亚型的交叉反应性

使用实时 RT-PCR 对前述的每种乳腺癌细胞系的 mRNA 水平进行表征。还联合进行了比较 RT-PCR 和 Northern 杂交分析以表征皮肤成纤维细胞中的 HAS 亚型表达。这些结果概述于表 3 中。

表 3 在恶性和非恶性细胞中 HAS 亚型表达的定量和与 HAS 抗血清的反应性。乳腺癌细胞系的 HAS 表达表达成相对于最不具侵袭性的细胞系 (MDA-MB-453) 的倍数差异。皮肤成纤维细胞 Northern 杂交数据证明了

HAS2 的高转录本水平和 *HAS3* 的极低水平。ND: 未检测到。

细胞系	合酶基因表达			与 HAS 抗血清的反应性 (FACS 数据)		
	HAS1	HAS2	HAS3	EX-1	INT-1	INT-2
MDA-MB-231	ND	15	1	有	无	有
MDA-MB 468	ND	0.1	3	有	无	有
MDA-MB 435	ND	0.5	0.5	有	无	有
ZRL-75-1	ND	ND	0.5	有	无	有
皮肤成纤维细胞	ND	++++	+	有	无	无

本领域技术人员应该理解本申请所描述的本发明除那些具体描述的内容外，还可进行变化和修饰。应该理解本发明包括全部的这些变化和修饰。本发明还单独地或组合地包括在本说明书中提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物，以及任意两个或更多个步骤或特征的任意和全部组合。

参考文献

Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988

Delpach *et al*, *J. Int. Med.* 242:41-48, 1997

Fulop, *Arch. Biochem. Biophys.* 337:261-266, 1997

Itano & Kimata, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 222:816-821, 1996

Kennet *et al*, (eds.), Plenum Press, New York, 1980

Knudson *et al*, *The Biology of Hyaluronan* 143:150-169, 1989

Knudson & Knudson, *FASEB J* 7:1233, 1993

Knudson, *Am. J. Pathol* 148:1721-1726, 1996

Laurent & Fraser, *FASEB J* 6:2397-2404, 1992

Rooney *et al*, *Int. J. Cancer* 60:632-636, 1995

Ruoslahti & Yamaguchi, *Cell* 64:867-869, 1991

Toole, *J. Internal Medicine* 242:35-40, 1981

Udabage *et al*, *Cancer Res* 65:6139-6150, 2005

Weissman & Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* 76:1753, 1954


```
HAS1      VLRIFYAGRFWALLWVLLCVQGVALAKAFAAWLRGCLRMVLLSLYAPLYMCGLLPAKFL
HAS2      VIQLFYRGKIWNILLFLLTVQLVGLIKSSFASCLRGNIVMVMSLYSVLYMSLLPAKMF
HAS3      VIQLFYRGRIWNILLFLLTVQLVGIKATYACFLRGNAEMIFMSLYSLLYMSLLPAKIF
          *,:*** *: * ;* .** ** *.: *:::*. *** *:::***: ***..*****:;

HAS1      ALVTMNQSGWGTSGRRKLAANYVPLLEPLALWALLLLCGYVSEVAHEARADWSGPSRAAEA
HAS2      AIATINKAGWGTSGRKTIVVNFIGLIPVSVWFTILLGGVIFTIYKESKRPFs---ESKQ
HAS3      AIATINKSGWGTSGRKTIVVNFIGLIPVSIWVAVILLEGLAYTAYCQD--LFS---ETEL
          *:.*:~*~:*****~!~..*~: ~*~::~* ~** *: : : : * ~:

HAS1      YHLAAGAGAYVGYWVAMLTLYWVGVRRLCRRRTGGYRVQV--- (SEQ. ID NO:4)
HAS2      TVLIVGTLLYACYWVMLLTLYVVLINKCGRRKKGQQYDMVLDV (SEQ ID NO:5)
HAS3      AFLVSGAILYGCYWVALIMLYLATIARRCGKKPEQYSLAFAEV (SEQ ID NO:6)
          * *: * *** :* ** . : : ~: .
```

共有符号:“*”指残基在比对的全部序列的该列中是相同的,
“.”指观察到保守取代,
“~”指观察到半保守取代。

序列来自Genebank 数据库 (HAS1 登录号: Q92839; HAS2 登录号: Q92819,
HAS3 登录号: O00219)

图 1B

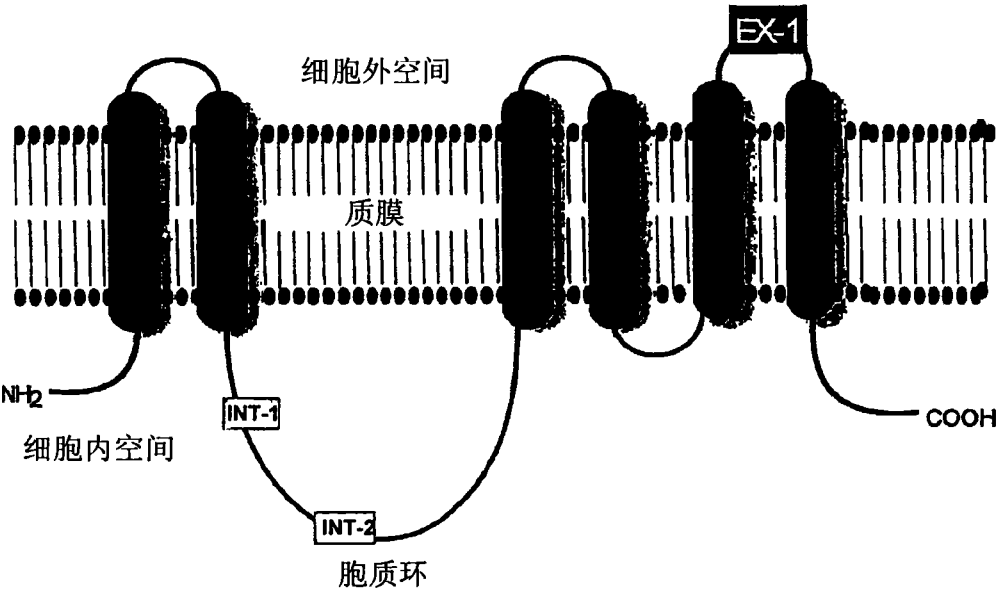
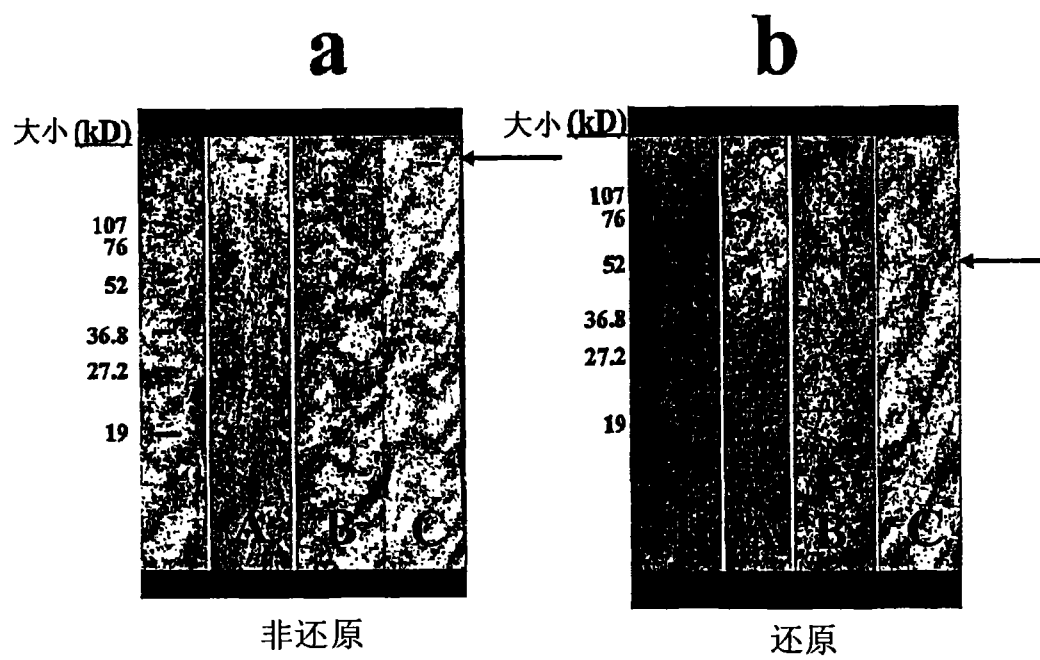


图 2



探测膜的HAS反应性 (参见a和b)
HAS418、HAS419和HAS421分别标记为'A'、'B'和'C'

图 3

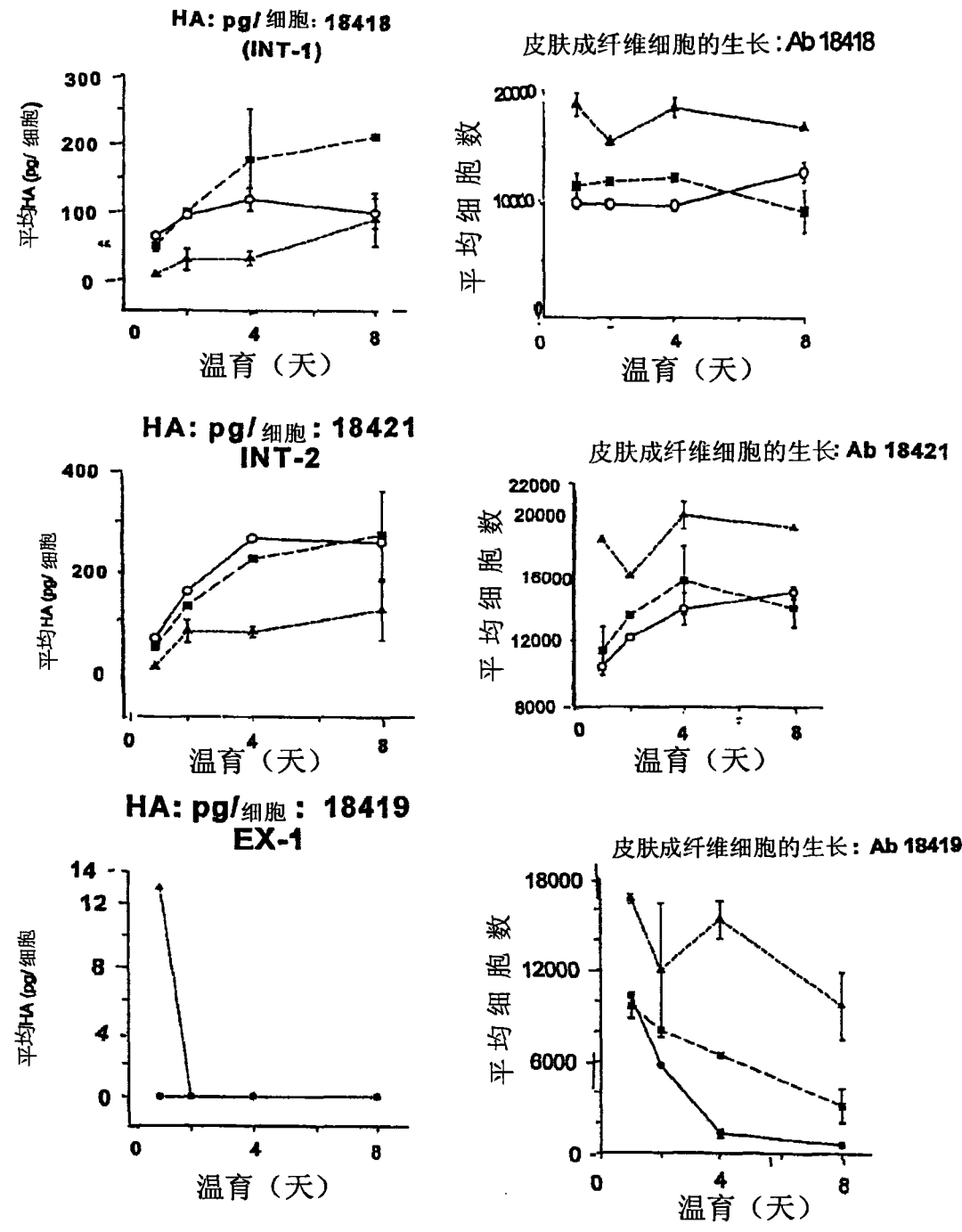


图 4

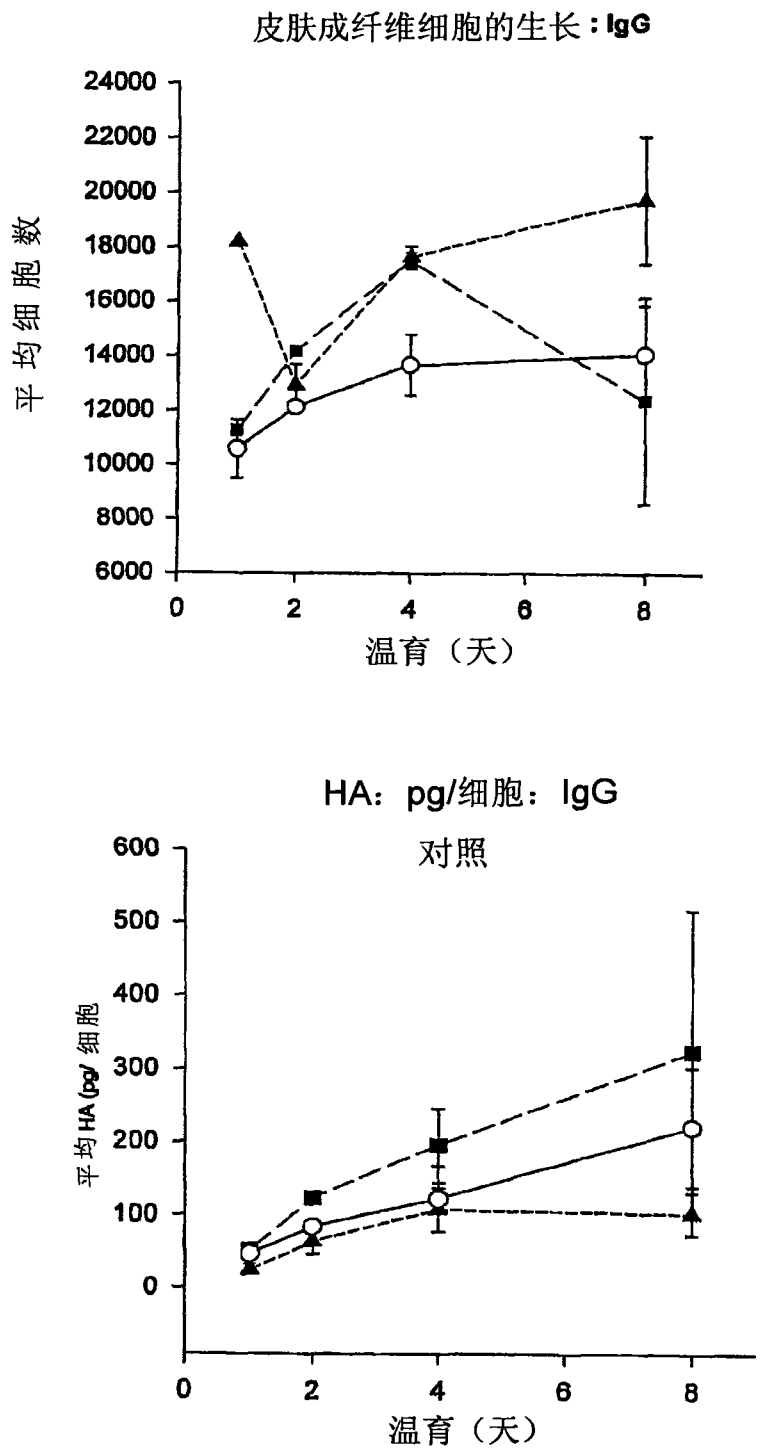


图 5

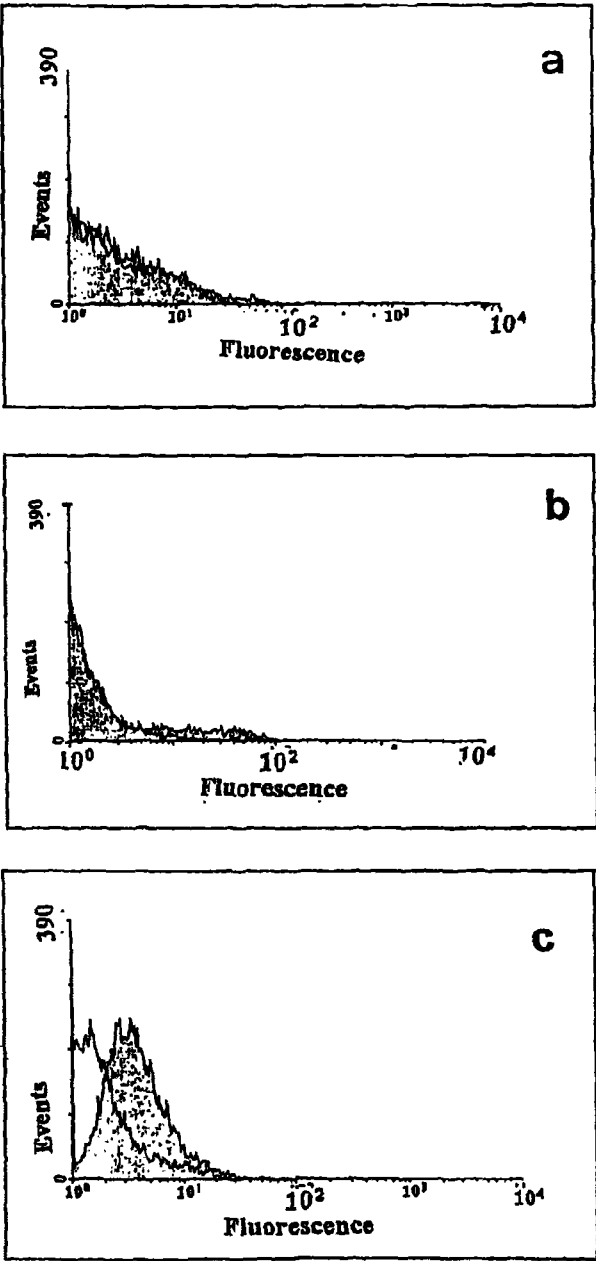


图 6

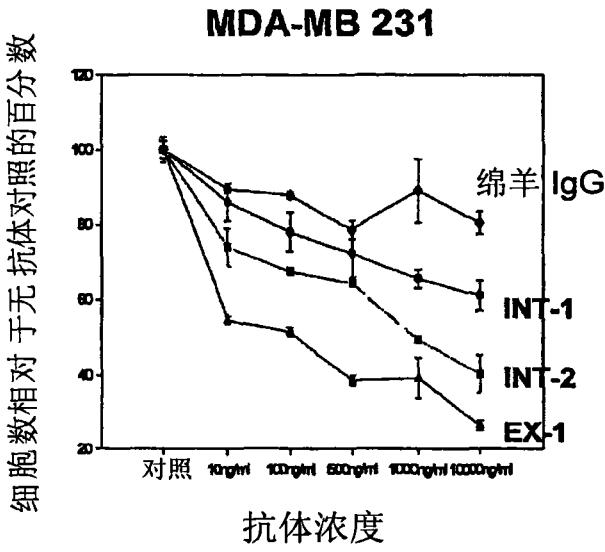


图 7

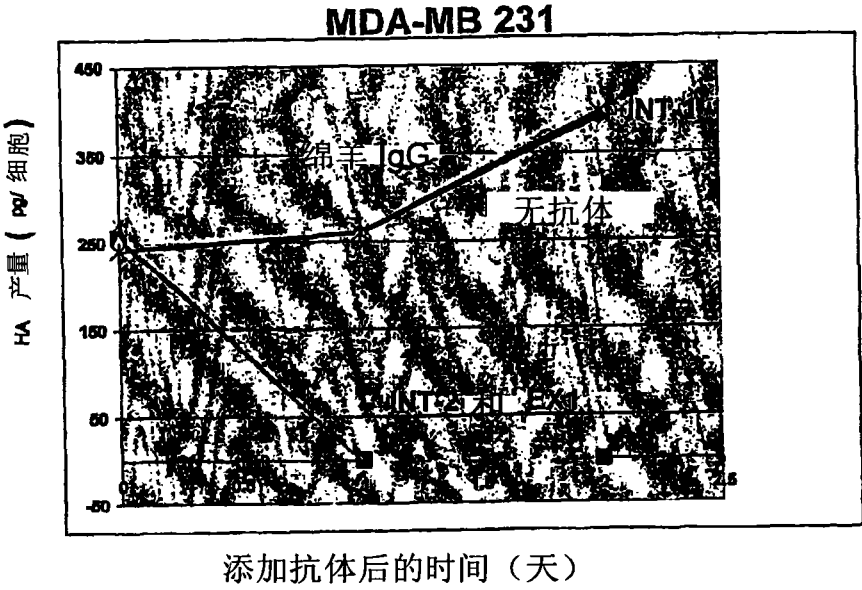


图 8

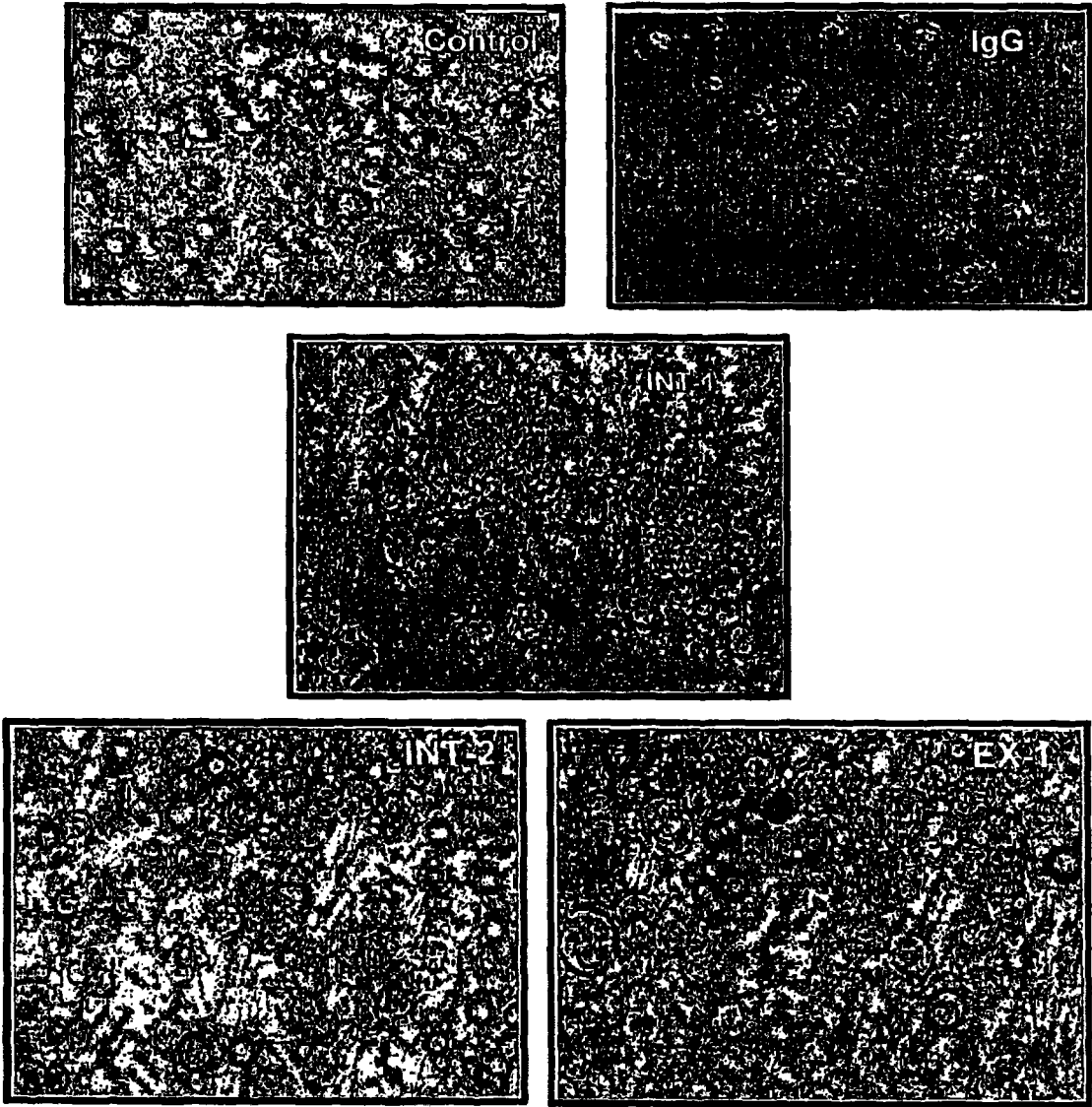


图 9

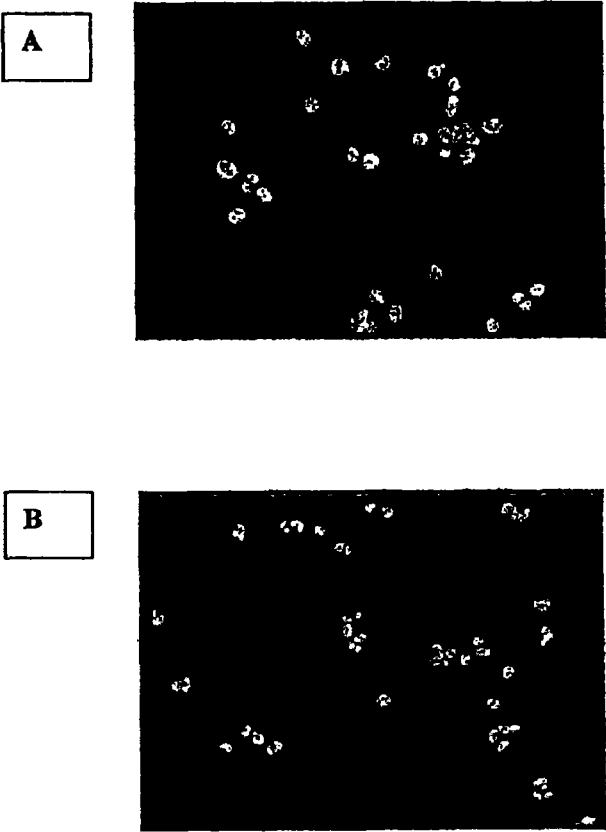


图 10

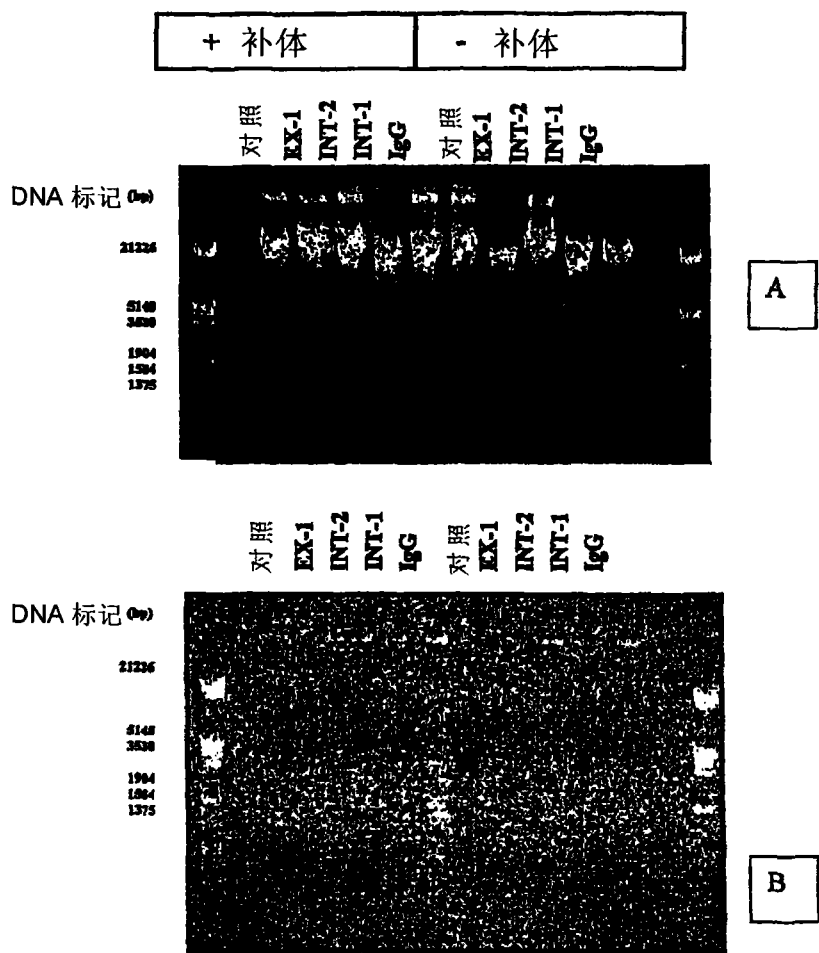


图 11

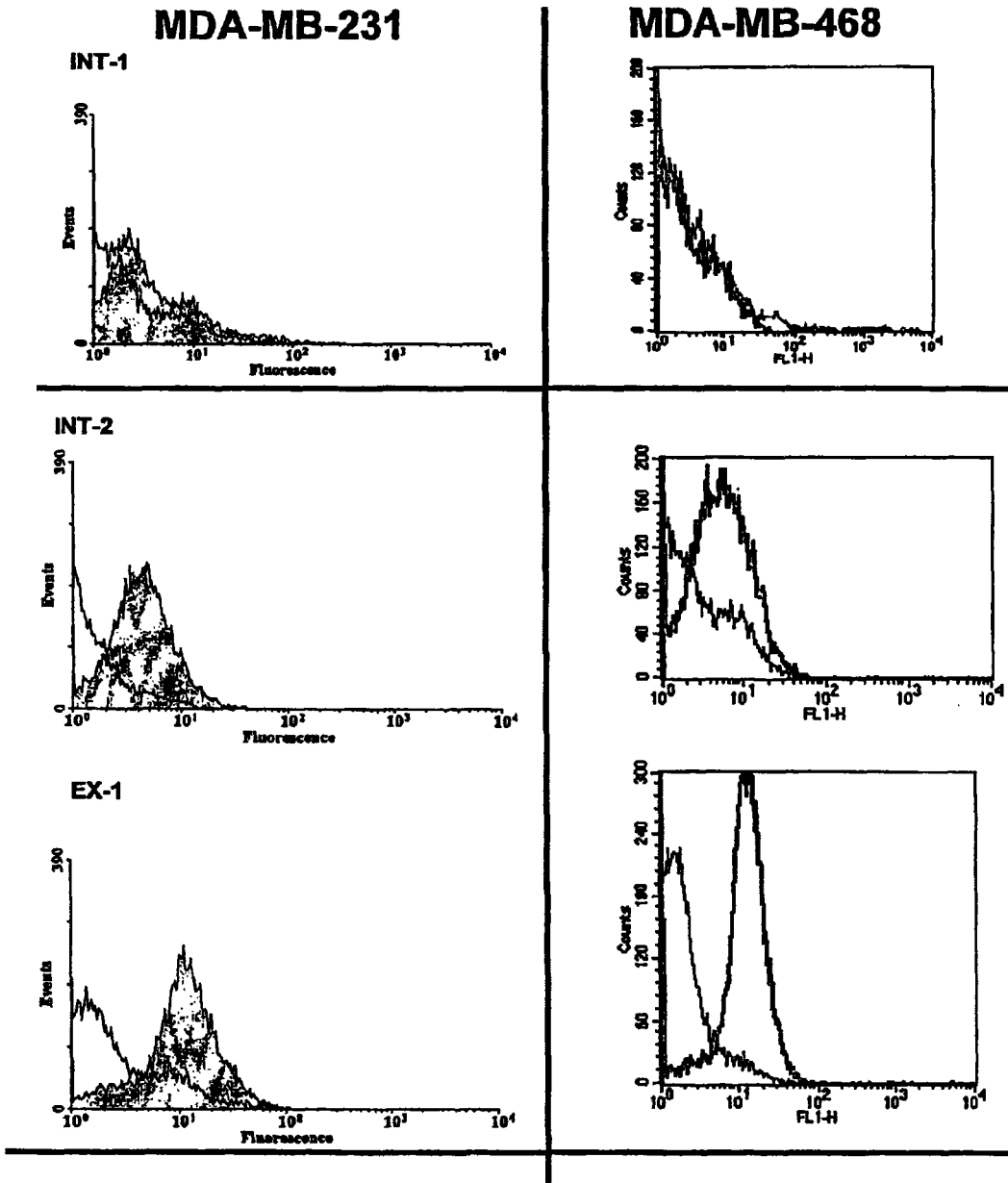


图 12

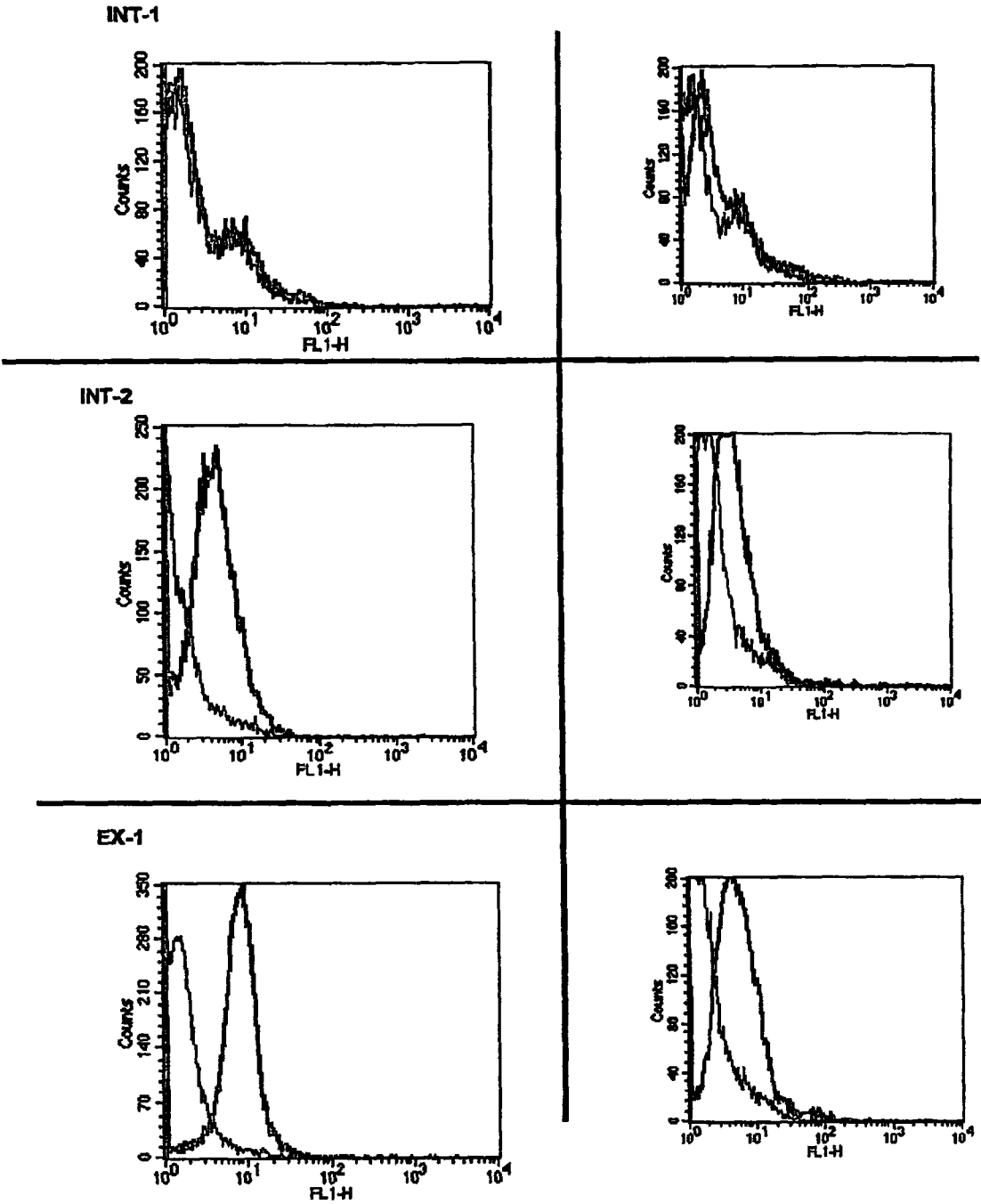


图 13