



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201718023 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：105124954

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 05 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/48 (2006.01)**A61K38/00 (2006.01)**A61K39/00 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61K31/7088(2006.01)*

(30)優先權：2015/08/06 美國

62/202,006

(71)申請人：世代好公司 (美國) CITY OF HOPE (US)

美國

(72)發明人：何曼 安德魯 HERRMANN, ANDREAS (DE) ; 余 華 YU, HUA (US)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：59 項 圖式數：4 共 109 頁

(54)名稱

細胞滲透性蛋白質－抗體結合物及使用方法

CELL PENETRATING PROTEIN-ANTIBODY CONJUGATES AND METHODS OF USE

(57)摘要

本文係提供細胞滲透性結合物。該結合物包括經由硫代磷酸酯核酸連接之非細胞滲透性蛋白質，其中該硫代磷酸酯核酸增強該非細胞滲透性蛋白質之細胞內傳遞。亦提供包括本文所提供之結合物的方法及套組。

Provided herein are cell penetrating conjugates. The conjugates include non-cell penetrating proteins connected through a phosphorothioate nucleic acid, wherein the phosphorothioate nucleic acid enhances intracellular delivery of the non-cell penetrating proteins. Also provided are methods and kits including the conjugates provided herein.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

細胞滲透性蛋白質-抗體結合物及使用方法

CELL PENETRATING PROTEIN-ANTIBODY

CONJUGATES AND METHODS OF USE

【技術領域】

相關申請案之交叉引用

【0001】本申請案主張於 2015 年 8 月 6 日申請之美國臨時申請案第 62/202,006 號的優先權，該臨時申請案以全文引用的方式併入本文中且達成所有目的。

關於對在聯邦政府贊助之研究及開發下進行之發明的權利的聲明

【0002】本發明係使用由美國國立衛生研究院(the National Institutes of Health)及美國國立癌症研究院(National Cancer Institute)頒予之許可號 R01CA122976 下之支持進行的。政府對本發明具有某些權利。

【先前技術】

【0003】抗體由於相對於諸如小分子藥物之其他類型藥物容易產生、具有特異性及生物耐久性而已證明為一種有效之藥物模態。當前抗體療法僅可鎖定(target)細胞外分子。然而，疾病治療及疾病診斷之許多重要標靶處於細胞內。舉例而言，諸如 STAT3 之大量轉錄因子為癌症療法最關鍵但仍具有挑戰之標靶。本文中提供此等需求及此項技

術中其他需求之解決方案。

【發明內容】

【0004】需要使用肽及蛋白質(例如抗體)鎖定細胞內分子。然而，已證明肽及蛋白質(例如抗體)難以以有效方式鎖定細胞內分子。如以下實例通篇描述及證明，本文中尤其提供新穎細胞滲透性組成物(例如抗體、抗體結合物)以及其製備及使用方法。本文所提供之組成物及方法允許有效鎖定大量細胞內分子(例如蛋白質(例如致癌蛋白質、細胞內存在之病毒蛋白質及其他蛋白質))且可用於例如全身性給藥。

【0005】本文中尤其提供細胞滲透性結合物。在一個態樣中，細胞滲透性結合物包括將第一非細胞滲透性蛋白質連接至第二蛋白質之硫代磷酸酯核酸。該硫代磷酸酯核酸增強該兩種蛋白質之細胞內傳遞。

【0006】在另一個態樣中，提供一種形成細胞滲透性結合物之方法。該方法包括使附接於第一非細胞滲透性蛋白質之第一硫代磷酸酯核酸與附接於第二蛋白質之第二硫代磷酸酯核酸雜交，從而形成細胞滲透性結合物。

【0007】在另一個態樣中，提供一種細胞，其包括本文所提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例。

【0008】在另一個態樣中，提供一種醫藥組成物，其包括本文所提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例，及醫藥學上可接受之載劑。

【0009】在另一個態樣中，提供一種套組，其包括本

文所提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例，或本文所提供之醫藥組成物，包括其實施例，及使用說明書。

【0010】在另一個態樣中，提供一種傳遞非細胞滲透性蛋白質至細胞中之方法，其包括使該細胞與本文所提供之細胞滲透性結合物(包括其實施例)接觸。

【0011】在另一個態樣中，提供一種治療個體之疾病之方法。該方法包括向有需要之個體給藥有效量之本文所提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例，從而治療該個體之疾病。

【圖式簡單說明】

【0012】第 1 圖：展示經由附接之 DNA 寡核苷酸雜交產生雙特異性抗體之頻率圖。經由凝膠過濾，使用抗 STAT3 抗體(右上圖；STAT3-SAv-Biot-Cy5-PS 反義寡核苷酸)、NFkB(p65)抗體(左上圖；NFkB/p65-SAv-Biot-Cy5-PS 有義寡核苷酸)或其組合(左下圖；STAT3/NFkB/p65-SAv-Biot-Cy5-PS 雙股寡核苷酸，及右下圖；STAT3/NFkB/p65-SAv-Biot-Cy5-FAM 雙股寡核苷酸)測定雜交。為確保雜交產生之連接抗體之 dsDNA，選擇併有用於修飾 NFkB (p65)之螢光團 Quasar/Cy5 及用於修飾 STAT3 之 FAM 的 ssDNA 寡核苷酸。兩種螢光團與雙 IgG 同時溶離表明連接抗體之 dsDNA 的成功雜交及產生(右下圖)。所展示之所有抗體均藉由凝膠過濾來純化，且在蛋白質(280 nm)、DNA (260 nm)及螢光團(647 nm 及 495 nm)之重疊最大振幅下收集溶離份以供將來表徵(第 2 圖)。偵測通

道獲得在如下所示之 λ [nm] 的吸收；260 nm 指示 DNA 吸收，280 nm 指示蛋白質吸收，647 nm 及 495 nm 指示併入 DNA 寡核苷酸中之螢光團的吸收。

【0013】第 2 圖：一 SDS page 凝膠之攝影影像，其展示細胞滲透性雙特異性抗體對細胞內抗原 STAT3 及 NF κ B (p65) 之同時識別。人類淋巴瘤 Ly3 細胞藉由與 10 mg/ml 所指示之純化抗體一起培育 2 小時來評估。將蛋白 G-瓊脂糖珠粒添加至不含細胞碎片之全細胞溶解物中，且進行西方墨點分析以偵測 NF κ B (p65) 及 STAT3 蛋白質。

【0014】第 3 圖：展示經修飾之細胞內鎖定抗體對細胞滲透之流動式細胞量測術研究的直方圖。將人類 B 細胞淋巴瘤 Ly3 用 10 μ g/ml 所指示之修飾抗體處理 2 小時(上圖)；以及人類 B 細胞淋巴瘤細胞與 10 μ g/ml 之螢光標記之修飾抗體一起培育的共焦顯微術研究。規模 10 μ m (下圖)。兩個研究均證實經修飾之單一抗體及藉由寡核苷酸-有義/反義雜交產生之雙特異性抗體對細胞滲透。

【0015】第 4A 及 4B 圖：B16 黑色素瘤之雙特異性抗體處理。第 4A 圖：將 0.1×10^6 個 B16 腫瘤細胞皮下注射且在腫瘤接種後，自第 8 天至第 26 天，每隔一天給藥所指示之抗體(1 微克/小鼠)。第 4B 圖：所有小鼠均在第 28 天處死且稱重腫瘤質量；腫瘤質量以公克展示。

【實施方式】

【0016】雖然本文中展示及描述本發明之各種實施例及態樣，但熟習此項技術者將顯而易見此類實施例及態樣

僅僅作為實例來提供。在不脫離本發明下，熟習此項技術者現將想到許多變化、改變及取代。應瞭解本文中描述的本發明之實施例之各種替代可用于實施本發明。

【0017】本文中使用的章節標題僅僅係出於組織之目的，且不應看作限制所描述之主題物質。本申請案中引用之所有文獻或文獻部分，包括不限於專利、專利申請案、文章、書籍、手冊及論文以全文引用的方式明確併入本文中以達成任何目的。

【0018】本文中使用的縮寫具有其在化學及生物技術內之習知含義。本文中闡述之化學結構及式係根據化學技術中已知之化合價標準規則構築。

【0019】除非另外定義，否則本文中使用的技術及科學術語均具有與一般技術者通常所瞭解之含義相同的含義。參見例如 Singleton 等人, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY 第 2 版, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook 等人, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)。與本文中描述之方法、裝置及材料類似或同等的任何方法、裝置及材料可用于實施本發明。提供以下定義以有助於對本文中常用之某些術語的瞭解且不意圖限制本發明之範疇。

【0020】本文中使用的「核酸」或「寡核苷酸」或「聚核苷酸」或語法上同等物意謂至少兩個共價連接在一起之核苷酸。術語「核酸」係指呈單股或雙股形式之去氧核糖

核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物，或其補體。術語「聚核苷酸」係指核苷酸線性序列。術語「核苷酸」通常係指聚核苷酸之單個單元，亦即單體。核苷酸可為核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸或其經修飾型式。本文中涵蓋之聚核苷酸之實例包括單股及雙股 DNA、單股及雙股 RNA (包括 siRNA) 以及具有單股及雙股 DNA 及 RNA 之混合物的雜交分子。該等術語亦涵蓋含有已知之核苷酸類似物或經修飾之主鏈殘基或鏈結的核酸，其係合成、天然存在及非天然存在的，具有與參考核酸類似之結合性質，且以類似於參考核苷酸之方式代謝。此類類似物之實例包括(不限於)硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、膦酸甲酯、對掌性膦酸甲酯及 2-O-甲基核糖核苷酸。

【0021】術語「硫代磷酸酯核酸」係指其中一或多個核苷酸間鏈結係經由硫代磷酸酯部分(硫代磷酸酯基)之核酸。硫代磷酸酯部分可為單硫代磷酸酯基($-\text{P}(\text{O})_3(\text{S})^{3-}$)或二硫代磷酸酯基($-\text{P}(\text{O})_2(\text{S})_2^{3-}$)。在實施例中，硫代磷酸酯部分為單硫代磷酸酯基($-\text{P}(\text{O})_3(\text{S})^{3-}$)。在實施例中，硫代磷酸酯核酸為單硫代磷酸酯核酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸之一或多個核苷經由硫代磷酸酯部分(例如單硫代磷酸酯基)連接，且剩餘核苷經由磷酸二酯部分($-\text{P}(\text{O})_4^{3-}$)連接。在實施例中，硫代磷酸酯核酸之一或多個核苷經由硫代磷酸酯部分(例如單硫代磷酸酯基)連接，且剩餘核苷經由甲基膦酸酯鏈結連接。在實施例中，硫代磷酸酯核酸之所有核苷均經由硫代磷酸酯部分(例如單硫代磷酸酯基)連接。

【0022】硫代磷酸酯寡核苷酸(硫代磷酸酯核酸)通常長度為約 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、12 個、15 個、20 個、25 個、30 個、40 個、50 個或更多個核苷酸，長度多達約 100 個核苷酸。硫代磷酸酯核酸長度亦可更長，例如 200 個、300 個、500 個、1000 個、2000 個、3000 個、5000 個、7000 個、10,000 個等等。如上所述，在某些實施例中，本文中之硫代磷酸酯核酸含有一或多個磷酸二酯鍵。在其他實施例中，硫代磷酸酯核酸包括交替主鏈(例如如此項技術中已知之磷酸二酯之模擬物或類似物，諸如硼烷磷酸酯、甲基膦酸酯、胺基磷酸酯或 O-甲基胺基膦酸酯鍵結(參見 Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press))。硫代磷酸酯核酸亦可包括一或多種此項技術中已知之之核酸類似物單體，諸如肽核酸單體或聚合物、鎖核酸單體或聚合物、嗎啉基單體或聚合物、二醇核酸單體或聚合物或蘇糖核酸單體或聚合物。其他類似核酸包括具有陽性主鏈、非離子主鏈及非核糖主鏈之類似核酸，包括以下中描述之類似核酸：美國專利第 5,235,033 號及第 5,034,506 號，及第 6 及 7 章，ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Sanghui 及 Cookeds。含有一或多個碳環糖之核酸亦包括在核酸之一個定義內。可出於種種原因，對核糖-磷酸主鏈進行修飾，例如以增加此類分子在生理環境中之穩定性及半衰期或作為生物晶片上之探針。可製備天然存在之核酸及類似物的混合物；或者，可製備不

同核酸類似物之混合物及天然存在之核酸及類似物之混合物。硫代磷酸酯核酸及硫代磷酸酯聚合物主鏈可為線性或分支的。舉例而言，分支核酸係重複分支以形成高級結構，諸如樹枝狀聚合物及其類似物。

【0023】在實施例中，硫代磷酸酯核酸包括硫代磷酸酯聚合物主鏈。如本文所用，「硫代磷酸酯聚合物主鏈」為具有至少兩個硫代磷酸酯鍵結(例如單硫代磷酸酯基)(例如將糖次單元、環狀次單元或烷基次單元連接在一起)之化學聚合物。硫代磷酸酯聚合物主鏈可為硫代磷酸酯糖聚合物，其為其中戊糖之一或多個(或所有)鏈缺乏通常存在於核酸中之鹼基(核酸鹼基)的硫代磷酸酯核酸。硫代磷酸酯聚合物主鏈可包括兩個或超過兩個硫代磷酸酯鍵結。硫代磷酸酯聚合物主鏈可包括 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、12 個、15 個、25 個、30 個、40 個、50 個或更多個鍵結且可含有多達約 100 個硫代磷酸酯鍵結。硫代磷酸酯聚合物主鏈亦可含有更大數目之鍵結，例如 200 個、300 個、500 個、1000 個、2000 個、3000 個、5000 個、7000 個、10,000 個及其類似數目。

【0024】硫代磷酸酯核酸及硫代磷酸酯聚合物主鏈可經部分或完全硫代磷酸酯化。舉例而言，硫代磷酸酯核酸之 50%或更多核苷酸間鍵結可為硫代磷酸酯鍵結。在實施例中，硫代磷酸酯核酸之 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%核苷酸間鍵結為硫代磷酸酯鍵結。

在實施例中，硫代磷酸酯核酸之 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%核苷酸間鍵結為硫代磷酸酯鍵結。在實施例中，硫代磷酸酯核酸之 75%、80%、85%、90%、95%或 99%核苷酸間鍵結為硫代磷酸酯鍵結。在實施例中，硫代磷酸酯核酸之 90%、95%或 99%核苷酸間鍵結為硫代磷酸酯鍵結。在實施例中，剩餘核苷酸間鍵結為磷酸二酯鍵結。在實施例中，剩餘核苷酸間鍵結為甲基磷酸酯鍵結。在實施例中，硫代磷酸酯核酸之 100%核苷酸間鍵結為硫代磷酸酯鍵結。同樣地，硫代磷酸酯聚合物主鏈中 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%糖間鍵結可為硫代磷酸酯鍵結。在實施例中，硫代磷酸酯聚合物主鏈中 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%糖間鍵結可為硫代磷酸酯鍵結。在實施例中，硫代磷酸酯聚合物主鏈中 75%、80%、85%、90%、95%或 99%糖間鍵結可為硫代磷酸酯鍵結。在實施例中，硫代磷酸酯聚合物主鏈中 90%、95%或 99%糖間鍵結可為硫代磷酸酯鍵結。在實施例中，剩餘核苷酸間鍵結為磷酸二酯鍵結。在實施例中，剩餘核苷酸間鍵結為甲基磷酸酯鍵結。在實施例中，硫代磷酸酯聚合物主鏈之 100%糖間鍵結為硫代磷酸酯鍵結。

【0025】核酸可包括非特定序列。如本文所用，術語「非特定序列」係指含有一系列未設計成與任何其他核酸序列互補或僅僅部分與任何其他核酸序列互補之殘基的核

酸序列。舉例而言，非特定核酸序列為當與細胞或生物體接觸時並不用作抑制性核酸之核酸殘基序列。「抑制性核酸」為能夠結合於標靶核酸(例如可轉譯成蛋白質之 mRNA)且減少標靶核酸(例如 mRNA 自 DNA)轉錄或減少標靶核酸(例如 mRNA)轉譯或改變轉錄本剪接(例如單鏈嗎啉基寡核苷酸)的核酸(例如 DNA、RNA、核苷酸類似物之聚合物)。

【0026】「標記核酸或寡核苷酸」為經由連接子或化學鍵共價結合或經由離子、凡得瓦力(van der Waals)、靜電或氫鍵非共價結合於標籤，使得可藉由偵測結合於核酸之可偵測標籤之存在來偵測核酸之存在的核酸或寡核苷酸。或者，使用高親和力相互作用之方法可實現相同結果，其中一對結合搭配物之一者係結合於另一個，例如生物素、鏈霉抗生物素蛋白(streptavidin)。在實施例中，硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈包括如本文揭示及此項技術中一般已知之可偵測標籤。

【0027】詞語「互補」或「互補性」係指聚核苷酸中之核酸能夠與第二聚核苷酸中之另一核酸形成鹼基對。舉例而言，序列 A-G-T 與序列 T-C-A 互補。互補性可為部分的，其中僅僅一些核酸根據鹼基配對匹配，或為完全的，其中所有核酸均根據鹼基配對匹配。

【0028】當核酸與另一核酸序列處於功能關係中時，其「可操作地連接」。舉例而言，若前序列或分泌前導序列之 DNA 表現為參與多肽分泌之前蛋白，則其可操作地連接該多肽之 DNA；若啟動子或強化子影響編碼序列之轉錄，

則其可操作地連接於該序列；或若核糖體結合位點經定位以便促進轉譯，則其可操作地連接於編碼序列。一般而言，「可操作地連接」意謂所連接之 DNA 序列彼此靠近，且在分泌前導序列之情況下連續且處於閱讀相(reading phase)中。然而，強化子不必為連續的。連接藉由在便利限制性位點接合來實現。若此類位點不存在，則根據習知作法，使用合成寡核苷酸接附子或連接子。

【0029】術語「基因」意謂與產生蛋白質有關之 DNA 區段；其包括在編碼區域之前及之後(前導序列及尾部序列)的區域以及個別編碼區段(外顯子)之間的插入序列(內含子)。前導序列、尾部序列以及內含子包括在基因轉錄及轉譯期間必需之調節元件。此外，「蛋白質基因產物」為自特定基因表現之蛋白質。

【0030】如本文關於基因所用之詞語「表現(expression)」或「表現(expressed)」意謂該基因之轉錄及/或轉譯產物。細胞中 DNA 分子之表現量可基於細胞內存在之對應 mRNA 之量或者該細胞產生之 DNA 編碼的蛋白質之量確定。非編碼核酸分子(例如 siRNA)之表現量可藉由此項技術中熟知之標準 PCR 或北方墨點方法偵測。參見 Sambrook 等人, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 18.1-18.88。

【0031】當提及例如細胞或核酸、蛋白質或載體使用時術語「重組」指示細胞、核酸、蛋白質或載體已藉由引入異源核酸或蛋白質或改變天然核酸或蛋白質或細胞來源

於如此修飾之細胞來修飾。因此，舉例而言，重組細胞表現在細胞之天然(非重組)形式內未發現的基因或表現以其他方式異常表現、表現不足或一點不表現之天然基因。轉殖基因細胞及植物為通常作為重組方法之結果，表現異源基因或編碼序列之細胞及植物。

【0032】當提及核酸部分使用時術語「異源」指示核酸包含兩個或超過兩個在自然界中未發現彼此處於相同關係中的子序列。舉例而言，該核酸通常重組產生，具有兩個或超過兩個來自不相關基因之序列，該等序列經排列以形成新功能性核酸，例如來自一個來源之啟動子及來自另一來源之編碼區域。同樣地，異源蛋白指示蛋白質包含兩個或超過兩個在自然界中未發現彼此處於相同關係中的子序列(例如融合物)。

【0033】術語「外源性」係指來源於給定細胞或生物體外部之分子或物質(例如化合物、核酸或蛋白質)。舉例而言，如本文中提及之「外源性啟動子」為不源於表現其之細胞或生物體的啟動子。相反，術語「內源性」或「內源性啟動子」係指給定細胞或生物體內天然或起源之分子或物質。

【0034】當應用於核酸或蛋白質時，術語「經分離」表示該核酸或蛋白質基本上不含其在自然狀態下所締合之其他細胞組分。其可例如呈均質狀態，且可處於無水或者水溶液中。純度及均質性通常使用分析化學技術，諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳或高效液相層析法確定。作為製劑中存

在之主要物種之蛋白質實質上經純化。

【0035】術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用，係指胺基酸殘基之聚合物，其中聚合物在實施例中可結合於未由胺基酸組成之部分。該等術語適用於其中一或多個胺基酸殘基為相應天然存在之胺基酸之人工化學模擬物的胺基酸聚合物，以及天然存在之胺基酸聚合物及非天然存在之胺基酸聚合物。「融合蛋白」係指編碼兩個或超過兩個重組表現為單一部分之獨立蛋白質序列的嵌合蛋白質。

【0036】術語「肽基」及「肽基部分」意謂單價肽。

【0037】術語「胺基酸」係指天然存在及合成之胺基酸，以及以類似于天然存在之胺基酸的方式起作用的胺基酸類似物及胺基酸模擬物。天然存在之胺基酸為藉由遺傳密碼編碼之胺基酸，以及隨後修飾之彼等胺基酸，例如羧脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸及 O-磷酸絲胺酸。胺基酸類似物係指基礎化學結構與天然存在之胺基酸相同，亦即 α 碳結合於氫、羧基、胺基及 R 基團之化合物，例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砷、甲硫胺酸甲基鎂。此類類似物具有經修飾之 R 基團(例如正白胺酸)或經修飾之肽主鏈，但保留與天然存在之胺基酸相同的基礎化學結構。胺基酸模擬物係指結構與胺基酸之通用化學結構不同，但以類似于天然存在之胺基酸之方式起作用的化合物。術語「非天然存在之胺基酸」及「非天然胺基酸」係指在自然界中未發現之胺基酸類似物、合成胺基酸及胺基酸模擬物。

【0038】胺基酸在本文中可藉由其通常已知之三字母符號或者藉由 IUPAC-IUB 生物化學命名委員會推薦之單字母符號提及。同樣，核苷酸可藉由其通常公認之單字母編碼提及。

【0039】「保守修飾之變異體」適用於胺基酸與核酸序列。關於特定核酸序列，「保守修飾之變異體」係指編碼一致或基本上一致胺基酸序列之彼等核酸。因為遺傳密碼簡併，所以大量核酸序列將編碼任何給定蛋白質。舉例而言，密碼子 GCA、GCC、GCG 及 GCU 均編碼胺基酸丙胺酸。因此，在丙胺酸用密碼子說明之每個位置，密碼子可在不改變編碼多肽下改變成所描述之任何相應密碼子。該等核酸變異為「沉默變異」，其為保守修飾之變異之一種。本文中編碼多肽之每個核酸序列亦描述核酸之每個可能沉默變異。熟習此項技術者將認識到，核酸中之每一密碼子(除了通常為甲硫胺酸之唯一密碼子的 AUG 及通常為色胺酸之唯一密碼子的 TGG)可經修飾以產生功能相同分子。因此，編碼多肽之核酸的每一沉默變異隱含於每一描述之序列中。

【0040】關於胺基酸序列，本領域技術人員將認識到改變、添加或缺失編碼序列中單一胺基酸或小百分比胺基酸的對核酸、肽、多肽或蛋白質序列之個別取代、缺失或添加為「保守修飾之變異體」，其中改變引起胺基酸經化學上類似之胺基酸取代。提供功能類似胺基酸之保守取代表為此項技術中所熟知。此類保守修飾之變異體除此之外不

排除本發明之多態變異體、種間同源物及對偶基因。

【0041】以下八組各含有彼此為保守取代之胺基酸：

- 1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；
- 2) 天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；
- 3) 天冬醯胺(N)、麩醯胺酸(Q)；
- 4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；
- 5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；
- 6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；
- 7) 絲胺酸(S)、酥胺酸(T)；及
- 8) 半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M)

(參見例如 Creighton, *Proteins* (1984))。

【0042】在兩個或超過兩個核酸或多肽序列之上下文中術語「一致」或「一致性」百分比係指當如使用 BLAST 或 BLAST 2.0 序列比較演算法，利用下述預設參數(default parameter)或藉由人工比對及肉眼觀察進行量測時，相同或具有指定百分比之相同胺基酸殘基或核苷酸(亦即，當在比較窗或指定區域上進行比較及比對以最大程度對應時，在指定區域上約 60%一致性、較佳 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高一致性)的兩個或超過兩個序列或子序列(參見例如 NCBI 網站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>或其類似網站)。接著此類序列稱為「實質上一致」。此定義亦係指或可應用於測試序列之互補序列。該定義亦包括具有缺失及/或添加之序列，以及具有取代之序列。如下所述，較

佳演算法可解釋間隙及其類似物。較佳地，一致性存在於長度為至少約 25 個胺基酸或核苷酸之區域上，或更佳，在長度為 50-100 個胺基酸或核苷酸之區域上。

【0043】對於本文中描述之特定蛋白質(例如 NFkB、STAT3)，所提及之蛋白質包括任何蛋白質之天然存在形式，或維持蛋白質轉錄因子活性(例如與天然蛋白質比較至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%活性內)之變異體或同源物。在一些實施例中，跨越整個序列或一部分序列(例如 50 個、100 個、150 個或 200 個連續胺基酸部分)，變異體或同源物與天然存在之形式比較具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%胺基酸序列一致性。在其他實施例中，蛋白質為如藉由其 NCBI 序列參考鑒別之蛋白質。在其他實施例中，蛋白質為如藉由其 NCBI 序列參考或其功能片段或同源物鑒別之蛋白質。

【0044】因此，如本文中提及之「STAT 3 蛋白質」包括信號傳導子及轉錄活化子 3 (STAT3)蛋白質的任何重組或天然存在之形式或維持 STAT3 蛋白質活性(例如與 STAT3 比較至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%活性內)之其變異體或同源物。在一些態樣中，跨越整個序列或一部分序列(例如 50 個、100 個、150 個或 200 個連續胺基酸部分)，變異體或同源物與天然存在之 STAT3 多肽比較具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%胺基酸序列一致性。在實施例中，STAT3 蛋白質實質上與由 UniProt 參考號 P40763 鑒別之蛋白質或與其

具有實質一致性之變異體或同源物一致。

【0045】如本文中提及之「NFκB 蛋白質」包括核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈強化子(NFκB)蛋白質的任何重組或天然存在之形式或維持 NFκB 蛋白質活性(例如與 NFκB 比較至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%活性內)之其變異體或同源物。在一些態樣中，跨越整個序列或一部分序列(例如 50 個、100 個、150 個或 200 個連續胺基酸部分)，變異體或同源物與天然存在之 NFκB 多肽比較具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%胺基酸序列一致性。在實施例中，NFκB 蛋白質實質上與由 UniProt 參考號 P19838 鑒別之蛋白質或與其具有實質一致性之變異體或同源物一致。在實施例中，NFκB 蛋白質實質上與由 UniProt 參考號 Q04206 鑒別之蛋白質或與其具有實質一致性之變異體或同源物一致。在實施例中，NFκB 蛋白質實質上與由 UniProt 參考號 Q00653 鑒別之蛋白質或與其具有實質一致性之變異體或同源物一致。在實施例中，NFκB 蛋白質實質上與由 UniProt 參考號 Q01201 鑒別之蛋白質或與其具有實質一致性之變異體或同源物一致。在實施例中，NFκB 蛋白質實質上與由 UniProt 參考號 Q048648 鑒別之蛋白質或與其具有實質一致性之變異體或同源物一致。

【0046】如本文中提及之「p65 蛋白質」包括轉錄因子 p65 (亦稱核因子 NFκ Bp65 次單元(p65))蛋白質的任何重組或天然存在之形式或維持 p65 蛋白質活性(例如與 p65

比較至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 活性內)之其變異體或同源物。在一些態樣中，跨越整個序列或一部分序列(例如 50 個、100 個、150 個或 200 個連續胺基酸部分)，變異體或同源物與天然存在之 p65 多肽比較具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 胺基酸序列一致性。在實施例中，p65 蛋白質實質上與由 UniProt 參考號 Q04206 鑒別之蛋白質或與其具有實質一致性之變異體或同源性一致。

【0047】如本文中提供之術語「CTLA-4」或「CTLA-4 蛋白質」包括細胞毒性 T-淋巴細胞締合蛋白質 4 (CTLA-4) 的任何重組或天然存在之形式或維持 CTLA-4 蛋白質活性(例如與 CTLA-4 比較至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 活性內)之其變異體或同源物。在一些態樣中，跨越整個序列或一部分序列(例如 50 個、100 個、150 個或 200 個連續胺基酸部分)，變異體或同源物與天然存在之 CTLA-4 多肽比較具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 胺基酸序列一致性。在實施例中，CTLA-4 為如藉由 NCBI 序列參考 GI:83700231 鑒別之蛋白質、其同源物或功能性片段。

【0048】如本文中提供之術語「FOXP3」包括叉頭框 P3 (FOXP3) 轉錄因子的任何重組或天然存在之形式或維持 FOXP3 蛋白質活性(例如與 FOXP3 比較至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 活性內)之其變異體或同源物。在一些態樣中，跨越整個序列或一部分序

列(例如 50 個、100 個、150 個或 200 個連續胺基酸部分)，變異體或同源物與天然存在之 FOXP3 多肽比較具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%胺基酸序列一致性。在實施例中，FOXP3 為如藉由 UniProt 參考號 Q9BZS1 鑒別之蛋白質、其同源物或功能性片段。在實施例中，FOXP3 為如藉由 UniProt 參考號 Q99JB6 鑒別之蛋白質、其同源物或功能性片段。

【0049】「抗體」係指包含來自免疫球蛋白基因或其片段之構架區的多肽，其特異性結合及識別抗原。公認之免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 及 μ 恒定區基因以及無數免疫球蛋白可變區基因。輕鏈分成 κ 或者 λ 。重鏈分成 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，其又分別界定免疫球蛋白類別 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE。通常，抗體之抗原結合區在結合特異性及親和力中為最關鍵。在一些實施例中，抗體或抗體片段可來源於不同生物體，包括人類、小鼠、大鼠、倉鼠、駱駝等。本發明之抗體可包括在一或多個胺基酸位置經修飾或突變以提高或調節抗體之所需功能(例如糖基化、表現、抗原識別、效應功能、抗原結合、特異性等)的抗體。

【0050】示例性免疫球蛋白(抗體)結構單元包含四聚體。各四聚體由兩對一致多肽鏈構成，各對具有一條「輕」鏈(約 25 kD)及一條「重」鏈(約 50-70 kD)。每條鏈之 N 端界定約 100 至 110 個或更多個胺基酸之可變區，主要對負責抗原識別。術語可變輕鏈(VL)及可變重鏈(VH)分別係指

此等輕鏈及重鏈。Fc (亦即片段可結晶區)為免疫球蛋白之「基礎」或「尾」且通常由兩條重鏈構成，該兩個重鏈影響兩或三個恒定域，視抗體類別而定。藉由結合於特定蛋白質，Fc 區確保各抗體對給定抗原產生適當免疫反應。Fc 區亦結合於各種細胞受體，諸如 Fc 受體，及其他免疫分子，諸如補體蛋白質。

【0051】抗體例如呈完整免疫球蛋白或呈藉由用各種肽酶消化所產生之大量良好表徵之片段存在。因此，舉例而言，胃蛋白酶在鉸鏈區中之二硫鍵結下面消化抗體以產生 $F(ab)'_2$ ， $F(ab)'_2$ 為自身為藉由二硫鍵結接合於 VH-CH1 之輕鏈之 Fab 的二聚體。 $F(ab)'_2$ 可在溫和條件下還原，以使鉸鏈區中之二硫鍵結斷裂，從而將 $F(ab)'_2$ 二聚體轉變成 Fab' 單體。Fab' 單體基本上為具有一部分鉸鏈區之抗原結合部分(參見 Fundamental Immunology (Pauley., 第 3 版 1993))。雖然各種抗體片段可根據完整抗體之消化界定，但本領域技術人員將瞭解此類片段可重新化學上合成或者藉由使用重組 DNA 方法合成。因此，如本文所用，術語抗體亦包括藉由整個抗體之修飾產生的抗體片段，或使用重組 DNA 方法重新合成之抗體片段(例如單鏈 Fv)，或者使用噬菌體展示庫(phage display library)鑒別之抗體片段(參見例如 McCafferty 等人, Nature 348:552-554 (1990))。

【0052】單鏈可變片段(scFv)通常為免疫球蛋白之重鏈(VH)及輕鏈(VL)之可變區的融合蛋白，該等可變區用 10 個至約 25 個胺基酸之短連接肽連接。連接子通常可富含甘胺

酸以具可撓性，以及富含絲胺酸或酰胺酸以具溶解性。連接子可將 VH 之 N 端與 VL 之 C 端連接，或反之亦然。

【0053】為製備本發明及根據本發明使用之適合抗體，例如重組、單株或多株抗體，可使用此項技術中已知之許多技術(參見例如 Kohler 及 Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)；Kozbor 等人, *Immunology Today* 4: 72 (1983)；Cole 等人，第 77-96 頁, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)；Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991)；Harlow 及 Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)；及 Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (第 2 版 1986))。編碼相關抗體之重鏈及輕鏈之基因可自細胞選殖，例如編碼單株抗體之基因可自融合瘤選殖且用於產生重組單株抗體。編碼單株抗體之重鏈及輕鏈的基因庫亦可由融合瘤或漿細胞構成。重鏈及輕鏈基因產物之隨機組合產生一大群(pool)具有不同抗原特異性之抗體(參見例如 Kuby, *Immunology* (第 3 版 1997))。用於產生單鏈抗體或重組抗體之技術(美國專利 4,946,778、美國專利第 4,816,567 號)可適合於產生本發明之抗體至多肽。轉殖基因小鼠或諸如其他哺乳動物之其他生物體亦可用於表現人源化或人類抗體(參見例如美國專利第 5,545,807 號、第 5,545,806 號、第 5,569,825 號、第 5,625,126 號、第 5,633,425 號、第 5,661,016 號；Marks 等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)；Lonberg 等人, *Nature* 368:856-859 (1994)；Morrison, *Nature* 368:812-13

(1994)；Fishwild 等人, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996)；及 Lonberg 及 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995))。或者，噬菌體呈現技術可用於鑒別特異性結合於所選抗原之抗體及異聚 Fab 片段(參見例如 McCafferty 等人, *Nature* 348:552-554 (1990)；Marks 等人, *Biotechnology* 10:779-783 (1992))。亦可使抗體為雙特異性，亦即能夠識別兩種不同抗原(參見例如 WO 93/08829；Traunecker 等人, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991)；及 Suresh 等人, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986))。抗體亦可為異結合物，例如兩種共價接合之抗體或免疫毒素(參見例如美國專利第 4,676,980 號、WO 91/00360；WO 92/200373；及 EP 03089)。

【0054】用於人源化或靈長類動物化非人類抗體之方法為此項技術中所熟知(例如美國專利第 4,816,567 號、第 5,530,101 號、第 5,859,205 號、第 5,585,089 號、第 5,693,761 號、第 5,693,762 號、第 5,777,085 號、第 6,180,370 號、第 6,210,671 號及第 6,329,511 號；WO 87/02671；EP 專利申請案 0173494；Jones 等人(1986) *Nature* 321:522；及 Verhoyen 等人(1988) *Science* 239:1534)。人源化抗體進一步描述於例如 Winter 及 Milstein (1991) *Nature* 349:293 中。一般而言，人源化抗體具有一或多個自非人類之來源引入其中之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基常常稱為輸入殘基，通常取自輸入可變域。人源化可基本上按照 Winter 及同事之方法(method of Winter and coworkers，參見例如 Morrison 等

人, PNAS USA, 81:6851-6855 (1984); Jones 等人, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann 等人, Nature 332:323-327 (1988); Morrison 及 Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen 等人, Science 239:1534-1536 (1988)及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994)), 藉由用齧齒動物 CDR 或 CDR 序列取代人類抗體之對應序列來進行。因此, 此類人源化抗體為嵌合抗體(美國專利第 4,816,567 號), 其中實質上少於完整之人類可變域已經來自非人類物種之對應序列取代。實際上, 人源化抗體通常為其中一些 CDR 殘基及可能一些 FR 殘基經來自齧齒動物抗體中類似位點之殘基取代的人類抗體。舉例而言, 包含編碼人源化免疫球蛋白構架區之第一序列及編碼所需免疫球蛋白互補決定區之第二序列組的聚核苷酸可藉由合成方法或藉由將適當 cDNA 及基因組 DNA 區段組合來產生。人類恒定區 DNA 序列可根據熟知之程序自多種人類細胞分離。

【0055】「嵌合抗體」為一種抗體分子, 其中(a)恒定區或其一部分經改變、替換或交換, 使得抗原結合位點(可變區)連接於不同或改變類別、效應功能及/或物種之恒定區, 或賦予嵌合抗體新特性之完全不同分子, 例如酶、毒素、激素、生長因子、藥物等等; 或(b)可變區或其一部分經具有不同或改變抗原特異性之可變區改變、替換或交換。本發明及根據本發明使用之較佳抗體包括人源化及/

或嵌合單株抗體。

【0056】熟知用於將治療劑結合於抗體之技術(參見例如 Arnon 等人,「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy; Reisfeld 等人 (eds.), 第 243-56 頁 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等人,「Antibodies For Drug Delivery」, Controlled Drug Delivery (第 2 版); Robinson 等人 (eds.), 第 623-53 頁 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe,「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera 等人 (eds.), 第 475-506 頁 (1985); 及 Thorpe 等人,「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982))。如本文所用,術語「抗體藥物結合物」或「ADC」係指結合或以其他方式共價結合於抗體之治療劑。如本文中提及之「治療劑」為適用於治療或預防諸如癌症之疾病的組成物。在實施例中,治療劑為抗體。

【0057】當提及蛋白質或肽時短語「特異性(或選擇性)結合」於抗體或「特異性(或選擇性)免疫活性」係指常常在蛋白質及其他生物製劑之異源群體中決定蛋白質存在之結合反應。因此,在指定免疫分析條件下,指定抗體結合於特定蛋白質至少為背景兩倍,且更通常超過背景 10 至 100 倍。在此類條件下特異性結合於抗體需要因對特定蛋白質之特異性而選擇的抗體。舉例而言,可選擇多株抗體

以僅僅獲得與所選抗原而非與其他蛋白質具有特異性免疫活性的抗體子集。此選擇可藉由去除與其他分子交叉反應之抗體來實現。多種免疫分析格式可用於選擇與特定蛋白質具有特異性免疫活性的抗體。舉例而言，固相 ELISA 免疫分析法通常用於選擇與蛋白質具有特異性免疫活性的抗體(關於可用於確定特異性免疫反應性之免疫分析格式及條件的描述參見例如 Harlow 及 Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998))。

【0058】「配位體」係指能夠結合於受體之試劑，例如多肽或其他分子。

【0059】「標籤」或「可偵測部分」為可藉由光譜、光化學、生物化學、免疫化學、化學或其他物理方式偵測之組成物。舉例而言，適用標籤包括 ^{32}P 、螢光染料、電子緻密試劑、酶(例如如 ELISA 中所常用)、生物素、地殼新配質或半抗原及蛋白質或可例如藉由將放射性同位素標籤併入與標靶肽特異性反應之肽或抗體中而可偵測之其他實體。可採用此項技術中已知之將抗體結合於標籤之任何適當方法，例如使用 Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego 中描述之方法。

【0060】如本文所提供之術語「生物素」係指特徵為與四氫噻吩環稠合之脲基(四氫咪唑啉酮)環的化合物。因此，如本文所提供之「生物素」係指 5-[(3aS,4S,6aR)-2-側氧基六氫-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基]戊酸，且在通常意義上，係指 CAS 登記號 58-85-5。如本文所用，「生物素結合

域」為能夠結合生物素之蛋白質域。生物素結合域之非限制性實例包括抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白及中性抗生物素蛋白。在實施例中，生物素結合域非共價地結合生物素。

【0061】如本文所提供之術語「抗生物素蛋白」或「鏈霉抗生物素蛋白」包括任何抗生物素蛋白或鏈霉抗生物素蛋白之天然存在之形式、維持抗生物素蛋白或鏈霉抗生物素蛋白之天然存在之形式的活性(例如與天然蛋白質比較至少 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100% 活性內)之同源物、變異體或衍生物(例如中性抗生物素蛋白)。在一些實施例中，跨越整個序列或一部分序列(例如 50 個、100 個、150 個或 200 個連續胺基酸部分)，變異體與天然存在之形式比較具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%胺基酸序列一致性。在實施例中，抗生物素蛋白為如藉由 UniProt 序列參考 P02701 鑒別之蛋白質、其同源物或功能性片段。在實施例中，鏈霉抗生物素蛋白為如藉由 UniProt 序列參考 P22629 鑒別之蛋白質、其同源物或功能性片段。

【0062】「接觸」係根據其簡單常規含義使用，且係指允許至少兩種不同物質(例如包括生物分子或細胞之化合物)變得足夠靠近，從而反應、相互作用或實體觸碰到之過程。然而，應瞭解，所得反應產物可直接由添加試劑之間的反應產生，或由可在反應混合物中產生之來自一或多種添加試劑之中間物產生。

【0063】術語「接觸」可包括允許兩種物質反應、相互作用或實體接觸，其中兩種物質可例如為如本文中描述之生物素結構域及生物素結合域。在實施例中，接觸包括例如允許如本文中描述之生物素結構域與生物素結合域相互作用。

【0064】「對照」樣品或數值係指用作參考，通常已知參考，用於與測試樣品比較之樣品。舉例而言，測試樣品可自測試條件，例如在測試化合物存在下取得，且與來自已知條件，例如在缺乏測試化合物下(陰性對照)或在已知化合物存在下(陽性對照)之樣品比較。對照亦可表示自大量測試或結果集合之平均值。熟習此項技術者將認識到對照可設計用於評估許多參數。舉例而言，對照可經設計以基於藥理學資料(例如半衰期)或治療量度(例如比較副作用)比較治療益處。熟習此項技術者將瞭解何種對照在給定環境中 useful 且能夠基於與對照值之比較來分析資料。對照對於確定資料顯著性亦很重要。舉例而言，若給定參數之值在對照中廣泛變化，則不認為測試樣品之變化為顯著的。

【0065】「對照」或「標準對照」係指用作參考，通常已知參考，用於與測試樣品、量測結果或數值比較之樣品、量測結果或數值。舉例而言，測試樣品可取自懷疑患有給定疾病(例如自體免疫疾病、發炎性自體免疫疾病、癌症、傳染性疾病、免疫疾病或其他疾病)之患者且與已知之正常(未患病)個體(例如標準對照個體)比較。標準對照亦可表示自未患給定疾病之類似個體(例如標準對照個體)群體(亦

即標準對照群體)，例如具有類似醫學背景、相同年齡、體重等之健康個體集合之平均量測結果或數值。標準對照數值亦可自相同個體，例如自疾病發作之前較早自患者獲得之樣品獲得。本領域技術人員將認識到標準對照可設計用於評估許多參數(例如 RNA 含量、蛋白質含量、特定細胞類型、特定體液、特定組織、滑膜細胞、滑液、滑液組織、纖維母細胞樣滑膜細胞、巨噬細胞樣滑膜細胞等等)。

【0066】熟習此項技術者將瞭解何種標準對照在給定環境中最適當且能夠基於與標準對照值之比較來分析資料。標準對照對於確定資料顯著性(例如統計顯著性)亦很重要。舉例而言，若給定參數之值在標準對照中變化範圍廣泛，則不認為測試樣品之變化為顯著的。

【0067】「患者」或「有需要之個體」係指罹患或傾向於患上可藉由給藥如本文所提供之組成物或醫藥組成物治療之疾病或病狀的活生物體。非限制性實例包括人類、其他哺乳動物、牛類、大鼠、小鼠、犬、猴、山羊、綿羊、母牛、鹿及其他非人類動物。在一些實施例中，患者為人類。

【0068】術語「疾病」或「病狀」係指能夠用本文所提供之化合物、醫藥組成物或方法治療的生物狀態或能夠用其治療之患者或個體的健康狀態。在實施例中，疾病為癌症(例如肺癌、卵巢癌、骨肉瘤、膀胱癌、子宮頸癌、肝癌、腎癌、皮膚癌(例如默克爾細胞癌(Merkel cell carcinoma)))、睪丸癌、白血病、淋巴瘤、頭頸部癌、結腸

直腸癌、前列腺癌、胰臟癌、黑色素瘤、乳癌、神經母細胞瘤)。該疾病可為自體免疫疾病、發炎性疾病、癌症、傳染性疾病、代謝疾病、發育疾病、心血管疾病、肝病、腸病、內分泌疾病、神經疾病或其他疾病。

【0069】如本文所用，術語「癌症」係指在哺乳動物中發現之所有類型癌症、贅生物或惡性腫瘤，包括白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、神經內分泌腫瘤、癌及肉瘤。可用本文所提供之化合物、醫藥組成物或方法治療之示例性癌症包括淋巴瘤、肉瘤、膀胱癌、骨癌、腦腫瘤、子宮頸癌、結腸癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、腎癌、骨髓瘤、甲狀腺癌、白血病、前列腺癌、乳癌(例如三陰性、ER 陽性、ER 陰性、化學療法抵抗性、赫賽汀(herceptin)抵抗性、HER2 陽性、小紅黴(doxorubicin)抵抗性、他莫昔芬(tamoxifen)抵抗性、導管癌、小葉癌、原發性、轉移性)、卵巢癌、胰臟癌、肝癌(例如肝細胞癌)、肺癌(例如非小細胞肺癌、鱗狀細胞肺癌、腺癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌、類癌、肉瘤)、多形性神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、黑色素瘤、前列腺癌、抗去勢型前列腺癌、乳癌、三陰性乳癌、神經膠母細胞瘤、卵巢癌、肺癌、鱗狀細胞癌(例如頭部、頸部或食道)、結腸直腸癌、白血病、急性骨髓性白血病、淋巴瘤、B 細胞淋巴瘤或多發性骨髓瘤。其他實例包括甲狀腺癌、內分泌系統癌、腦癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、頭頸部癌、食道癌、肝癌、腎癌、肺癌、非小細胞肺癌、黑色素瘤、間皮瘤、卵巢癌、肉瘤、胃癌、子宮癌或髓母細胞瘤、霍

奇金氏病(Hodgkin's Disease)、非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤、多形性神經膠母細胞瘤、卵巢癌、橫紋肌肉瘤、原發性血小板增多、原發性巨球蛋白血症、原發性腦腫瘤、癌症、惡性胰島細胞瘤、惡性類癌、膀胱癌、惡變前皮膚病變、睪丸癌、淋巴瘤、甲狀腺癌、神經母細胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、惡性血鈣過多、子宮內膜癌、腎上腺皮質癌、內分泌或外分泌腺之贅生物、甲狀腺髓樣癌、甲狀腺髓樣癌、黑色素瘤、結腸直腸癌、乳頭狀甲狀腺癌、肝細胞癌、佩吉特氏乳頭病(Paget's Disease of the Nipple)、葉狀腫瘤、小葉癌、管癌、胰臟星形細胞癌、肝星形細胞癌或前列腺癌。

【0070】術語「白血病」廣義上係指形成血液器官之漸進性惡性疾病，且一般特徵為白血球及其前驅物在血液及骨髓中變形之增殖及發育。白血病一般臨床上基於以下分類：(1)疾病之持續時間及特徵-急性或慢性；(2)所涉及之細胞類型；骨髓(骨髓性)、淋巴(淋巴生成)或單核細胞；及(3)血液中異常細胞數目增加或未增加-白血病性或非白血病性(亞白血病)。可用本文所提供之化合物、醫藥組成物或方法治療的示例性白血病包括例如急性非淋巴細胞性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、急性顆粒細胞性白血病、慢性顆粒細胞性白血病、急性前髓細胞性白血病、成人T細胞白血病、非白血病性白血病、白血病性白血病、嗜鹼粒細胞性白血病、胚細胞白血病、牛白血病、慢性骨髓細胞性白血病、皮膚白血病、胚細胞性白血病、嗜酸粒性白

血病、格羅斯白血病(Gross' leukemia)、毛細胞白血病、血母細胞性白血病、血胚細胞性白血病、組織細胞性白血病、幹細胞性白血病、急性單核細胞性白血病、白細胞減少性白血病、淋巴性白血病、淋巴母細胞性白血病、淋巴細胞性白血病、淋巴源性白血病、淋巴細胞性白血病、淋巴肉瘤細胞性白血病、肥大細胞白血病、巨核細胞性白血病、小骨髓母細胞性白血病、單核細胞性白血病、骨髓母細胞性白血病、骨髓性白血症、脊髓性顆粒細胞性白血病、單核細胞性白血病、格利白血病(Naegeli leukemia)、漿細胞性白血病、多發性骨髓瘤、漿細胞性白血病、前髓細胞性白血病、裏德爾白血病(Rieder cell leukemia)、席林氏白血病(Schilling's leukemia)、幹細胞性白血病、亞白血病性白血病或未分化細胞性血病。

【0071】術語「肉瘤」一般係指由如胚期結締組織之物質組成的腫瘤且一般由嵌入纖維狀或均質物質中之緊密堆積細胞構成。可用本文所提供之化合物、醫藥組成物或方法治療之肉瘤包括軟骨肉瘤、纖維肉瘤、淋巴肉瘤、黑肉瘤、黏液肉瘤、骨肉瘤、阿伯梅西氏肉瘤(Abemethy's sarcoma)、脂肉瘤、脂肪肉瘤、軟組織腺泡狀肉瘤、釉質母細胞肉瘤、葡萄樣肉瘤、綠色癌肉瘤、絨毛膜瘤、胚性肉瘤、韋爾姆斯氏瘤肉瘤(Wilms' tumor sarcoma)、子宮內膜肉瘤、基質肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、筋膜肉瘤、纖維母細胞性肉瘤、巨細胞肉瘤、顆粒細胞性肉瘤、霍奇金氏肉瘤、特發性多色素出血性肉瘤、B細胞之免疫

母細胞性肉瘤、淋巴瘤、T細胞之免疫母細胞性肉瘤、傑森氏肉瘤(Jensen's sarcoma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、枯氏細胞肉瘤(Kupffer cell sarcoma)、血管肉瘤、白血病性肉瘤、惡性間葉瘤肉瘤、骨膜外肉瘤、網狀細胞肉瘤、勞斯肉瘤(Rous sarcoma)、漿液性囊腫肉瘤、滑膜肉瘤或毛細血管擴張肉瘤。

【0072】術語「黑色素瘤」意謂由皮膚及其他器官之黑素細胞系統產生的腫瘤。可用本文所提供之化合物、醫藥組成物或方法治療的黑色素瘤包括例如肢端雀斑樣痣黑色素瘤、無黑色素性黑色素瘤、良性幼年性黑色素瘤、克勞德曼氏黑色素瘤(Cloudman's melanoma)、S91黑色素瘤、哈丁-帕西黑色素瘤(Harding-Passey melanoma)、幼年性黑色素瘤、惡性小痣黑色素瘤、惡性黑色素瘤、結節性黑色素瘤、指甲下黑色素瘤或淺表擴散性黑色素瘤。

【0073】術語「癌」(carcinoma)係指由往往浸潤周圍組織且產生轉移之上皮細胞構成的惡性腫瘤。可用本文所提供之化合物、醫藥組成物或方法治療的示例性癌包括例如甲狀腺髓樣癌、家族性甲狀腺髓樣癌、腺泡性癌、腺泡癌、腺囊狀癌(adenocystic carcinoma)、腺囊癌(adenoid cystic carcinoma)、腺癌、腎上腺皮質癌、肺泡癌、肺泡細胞癌、基底細胞癌(basal cell carcinoma)、基底細胞癌(carcinoma basocellulare)、肛管基底細胞樣癌(basaloid carcinoma)、基底鱗狀細胞癌、細支氣管肺泡癌、細支氣管肺泡癌、支氣管癌、腦狀癌、肝小膽管癌、絨膜癌、膠樣癌、粉刺癌、

子宮體癌、篩狀癌、鎧甲狀癌、癌瘡、柱狀癌、柱狀細胞癌、導管癌、管癌、硬癌、胚胎癌、類腦癌、鱗狀細胞癌、腺狀上皮癌、外植體癌、潰瘍性癌、纖維癌、膠樣癌、凝膠狀癌、巨細胞癌、巨細胞癌、腺癌、粒層細胞癌、毛髮母質癌、血樣癌、肝細胞癌、許特萊氏細胞腺癌(Hurthle cell carcinoma)、透明癌、腎上腺樣癌、嬰兒胚胎癌、原位癌、表皮內癌、上皮內癌、克龍派切爾氏癌(Krompecher's carcinoma)、庫爾切茨基細胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、大細胞癌、扁豆狀癌(lenticular carcinoma)、豆狀癌(carcinoma lenticular)、脂瘤樣癌、小葉癌、淋巴上皮癌、髓樣癌(carcinoma medullare)、髓樣癌(medullary carcinoma)、黑色素癌、軟癌、膠樣癌、黏液癌、黏液細胞癌、黏液表皮樣癌、黏液癌(carcinoma mucosum)、黏液癌(mucous carcinoma)、黏液瘤樣癌、鼻咽癌、燕麥細胞癌、骨化性癌、骨質癌(osteoid carcinoma)、乳頭狀癌、門靜脈周癌、未侵襲癌(preinvasive carcinoma)、棘細胞癌(prickle cell carcinoma)、糜爛性癌(pultaceous carcinoma)、腎細胞癌、儲備細胞癌(reserve cell carcinoma)、肉瘤性癌、施耐德癌(schneiderian carcinoma)、硬癌、陰囊癌、印戒細胞癌、單純癌、小細胞癌、馬鈴薯狀癌、球狀細胞癌、梭形細胞癌、髓狀癌(carcinoma spongiosum)、鱗狀癌、鱗狀細胞癌、繩捆癌(string carcinoma)、毛細血管增生性癌、毛細血管擴張性癌、轉移細胞癌、塊狀癌(carcinoma tuberosum)、管狀癌、結節性皮癌(tuberous carcinoma)、疣狀癌或絨毛狀癌。

【0074】如本文所用，術語「轉移」、「轉移性」及「轉移性癌症」可互換使用且係指增生性疾病或病症，例如癌症自一個器官或另一非相鄰器官或身體部分擴散。癌症出現在起始部位，例如乳房，該部位稱為原發性腫瘤，例如原發性乳癌。原發性腫瘤或起始部位中的一些癌細胞能夠滲透及浸潤局部區域中之周圍正常組織及/或能夠滲透在系統中循環之淋巴系統或血管系統的壁至體內其他部位及組織。由原發性腫瘤之癌細胞形成的第二臨床上可偵測腫瘤稱為轉移性或繼發性腫瘤。當癌細胞轉移時，假定轉移性腫瘤及其細胞類似於原始腫瘤。因此，若肺癌轉移至乳房，則乳房部位之繼發性腫瘤由異常肺細胞與非異常乳房細胞組成。乳房中之繼發性腫瘤稱為轉移性肺癌。因此，短語轉移性癌症係指其中個體現患或曾換原發性腫瘤且具有一或多個繼發性腫瘤之疾病。短語非轉移性癌症或非轉移性癌症個體係指其中個體具有原發性腫瘤而非一或多個繼發性腫瘤之疾病。舉例而言，轉移性肺癌係指具有原發性肺腫瘤或具有原發性肺腫瘤歷史且在第二位置或多個位置，例如在乳房中具有一或多個繼發性腫瘤之個體中的疾病。

【0075】如本文所用，「自體免疫疾病」係指由個體之免疫系統例如針對通常存在於個體體內之物質組織及/或細胞的免疫反應改變所引起的疾病或病症。自體免疫疾病包括(但不限於)關節炎、類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、幼年特發性症候群(juvenile idiopathic arthritis)、硬皮

病、全身性硬皮病(systemic scleroderma)、多發性硬化、全身性紅斑狼瘡(SLE)、重症肌無力、幼年發作性糖尿病、1型糖尿病、格林-巴厘症候群(Guillain-Barre syndrome)、橋本氏腦炎(Hashimoto's encephalitis)、橋本氏甲狀腺炎、僵直性脊椎炎、牛皮癬、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、血管炎、血管球性腎炎、自體免疫甲狀腺炎、白塞氏病(Behcet's disease)、克羅恩氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、大皰性類天皰瘡、結節病、牛皮癬、鱗癬、格瑞夫氏眼病(Graves ophthalmopathy)、發炎性腸病、阿迪森氏病(Addison's disease)、白斑病、氣喘及過敏性氣喘。

【0076】如本文所用，「發炎疾病」係指與異常或改變之發炎相關之疾病或病症。發炎為對病原體、破壞之細胞或組織或刺激物起反應，由免疫系統引起之作為痊癒過程之一部分的生物反應。慢性發炎可引起多種疾病。發炎疾病包括(但不限於)動脈粥樣硬化、過敏症、氣喘、類風濕性關節炎、移植排斥反應、乳糜瀉、慢性前列腺炎、發炎性腸病、骨盆發炎疾病及發炎肌病。

【0077】如本文所用，「代謝病症」係指涉及多種分子及物質，包括例如碳水化合物、胺基酸及有機酸之異常代謝的疾病或病症。代謝病症包括(但不限於)碳水化合物代謝病症，例如肝醣儲積症(glycogen storage disease)；胺基酸代謝病症，例如苯丙酮酸尿症、楓糖漿尿病、戊二酸血症1型；尿素循環障礙或尿素循環不足，例如胺甲醯基磷

酸合成酶 I 不足；有機酸代謝病症(有機酸尿)，例如尿黑酸尿症；脂肪酸氧化及粒線體代謝病症，例如中鏈醯基-輔酶 A 去氫酶不足；卟啉代謝病症，例如急性間歇性血紫質病；嘌呤或嘧啶代謝病症，例如萊希-尼亨症候群(Lesch-Nyhan syndrome)；類固醇代謝病症，例如類脂先天性腎上腺增生、先天性腎上腺增生；粒線體功能病症，例如卡恩斯-塞爾症候群(Kearns-Sayre syndrome)；過氧化物酶體功能紊亂，例如齊威格氏症(Zellweger syndrome)；及溶酶體儲存病症，例如高雪氏病(Gaucher's disease)及尼曼皮克病(Niemann Pick disease)。

【0078】如本文所用，「發育病症」係指常常源于兒童期，與語言障礙、學習障礙、運動障礙及神經發育病症相關之疾病或病症。實例包括(但不限於)泛自閉症障礙(autism spectrum disorders)及注意力不足缺陷。

【0079】如本文所用，「心血管疾病」係指與心臟、血管或兩者相關之疾病。心血管疾病包括(但不限於)冠狀動脈性心臟病、心肌症、高血壓心臟病、心力衰竭、心臟節律障礙、發炎性心臟病、周圍動脈疾病、腦血管疾病及發炎性心臟病。

【0080】如本文所用，「肝病」係指與肝及/或肝功能異常相關之疾病。肝病包括(但不限於)肝炎、酒精性肝病、脂肪肝病、肝硬化、布加氏症候群(Budd-Chiari syndrome)、吉爾伯特氏症候群(Gilbert's syndrome)及癌症。

【0081】如本文所用，術語「腸病」係指與腸(小或大)

異常相關之疾病或病症。腸病包括(但不限於)腸胃炎、結腸炎、回腸炎、闌尾炎、腹腔病、克羅恩氏病(Chron' s disease)、腸道病毒、大腸急躁症及大腸憩室疾病。

【0082】如本文所用，術語「內分泌病」係指內分泌系統之疾病或病症，包括內分泌腺分泌不足、內分泌腺分泌過多及腫瘤。內分泌疾病包括(但不限於)阿迪森氏病、糖尿病、克羅恩氏症候群(Conn' s syndrome)、庫欣氏症候群(Cushing' s syndrome)、糖皮質激素可醫治之醛固酮過多症、低血糖、甲狀腺機能亢進症、甲狀腺低能症、甲狀腺炎、垂體低能症(hypopituitarism)、性腺低能症(hypogonadism)及副甲狀腺病。

【0083】如本文所用，術語「神經病症」係指身體神經系統之疾病或病症，包括結構、生物化學或電異常。神經病症包括(但不限於)腦損傷、腦功能障礙、脊髓病症、周圍神經病、腦神經病症、自主神經系統病症、抽搐病症、運動障礙(例如帕金森氏病及多發性硬化)及中樞神經病。

【0084】如本文所用，術語「傳染性疾病」係指與宿主個體中病原體之傳染、存在及/或生長相關的疾病或病症。傳染性病原體包括(但不限於)病毒、細菌、真菌、原生動物、多細胞寄生蟲及異常蛋白質，例如普裡昂蛋白(prion)。與傳染性疾病相關之病毒包括(但不限於)單純疱疹病毒、巨細胞病毒、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)、水痘-帶狀疱疹病毒、疱疹病毒、水泡性口膜炎病毒、肝炎病毒、鼻病毒、冠狀病毒、流感病毒、麻疹病毒、多瘤病

毒、人類乳頭瘤病毒、呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus)、腺病毒、柯薩奇病毒(Coxsackie virus)、登革熱病毒(Dengue virus)、腮腺炎病毒、脊髓灰質炎病毒、狂犬病病毒、勞氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)、黃熱病毒、伊波拉病毒(Ebola virus)、猿免疫缺陷病毒、人類免疫缺陷病毒。與傳染性疾病相關之細菌包括(但不限於)結核分歧桿菌(*M. tuberculosis*)、沙門氏菌屬(*Salmonella species*)、大腸桿菌(*E. coli*)、衣原體屬(*Chlamydia species*)、葡萄球菌屬(*Staphylococcus species*)、桿菌屬(*Bacillus species*)及假單胞菌屬(*Pseudomonas species*)。

【0085】在與疾病(例如糖尿病、癌症(例如前列腺癌、腎癌、轉移性癌症、黑色素瘤、抗去勢型前列腺癌、乳癌、三陰性乳癌、神經膠母細胞瘤、卵巢癌、肺癌、鱗狀細胞癌(例如頭部、頸部或食道)、結腸直腸癌、白血病、急性骨髓性白血病、淋巴瘤、B細胞淋巴瘤或多發性骨髓瘤))相關之物質或物質活性或功能之上下文中術語「相關」或「與……相關」意謂該疾病(例如肺癌、卵巢癌、骨肉瘤、膀胱癌、子宮頸癌、肝癌、腎癌、皮膚癌(例如默克爾細胞癌)、睪丸癌、白血病、淋巴瘤、頭頸部癌、結腸直腸癌、前列腺癌、胰臟癌、黑色素瘤、乳癌、神經母細胞瘤)或疾病症狀由該物質或物質活性或功能引起(完全或部分)。

【0086】如本文所用，術語「異常」係指異於正常。當用於描述酶活性時，異常係指活性大於或小於正常未患病對照樣品之正常對照或平均值。異常活性可指引起疾病

之量的活性，其中異常活性返回正常或非疾病相關量(例如藉由使用如本文中描述之方法)引起疾病或一或多個疾病症狀減少。

【0087】如本文所用，術語「細胞滲透性」或「細胞滲透」係指分子(例如抗體)能夠以顯著或有效量自細胞外環境進入細胞。因此，細胞滲透性結合物為自細胞外環境穿過細胞膜且進入細胞內之分子。

【0088】如本文所用，術語「非細胞滲透性」或「非細胞滲透」係指分子(例如抗體)不能以顯著或有效量自細胞外環境進入細胞。因此，非細胞滲透性肽或蛋白質一般不能夠自細胞外環境穿過細胞膜，且進入細胞中，來實現對細胞、器官或生物體之群體的顯著生物作用。該術語不排除少量肽或蛋白質中之一或多個可進入細胞之可能性。然而，該術語係指一般不能夠在有效程度上自細胞外環境進入細胞之分子。非細胞滲透性分子及物質之實例包括(但不限於)大分子，諸如高分子量蛋白質(例如抗體)。肽或蛋白質可使用熟習此項技術者已知之方法確定為非細胞滲透的。舉例而言，肽或蛋白質可經螢光標記，且肽或蛋白質自細胞外環境進入細胞中之能力可在活體外藉由流動血細胞計數分析或共焦顯微術測定。在一些實施例中，「非細胞滲透性蛋白質」係指滲透細胞比附接於硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈之相同蛋白質低至少約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10,000

或 100,000 倍的蛋白質(例如抗體)。在一些實施例中，「非細胞滲透性蛋白質」係指不在可量測程度上滲透細胞之蛋白質。

【0089】如本文所用，「分子量」(M.W.)或「分子質量」係指分子中所有原子之原子重量的和。關於分子，具有高分子量之分子通常具有 25 kDa 或更多之分子量。舉例而言，高分子量蛋白質可具有約 25 kDa 至 1000 kDa 或更多之分子量。

【0090】如本文所用，術語「細胞內」意謂細胞內部。如本文所用，「細胞內標靶」為位於細胞內部之標靶，例如核酸、多肽或其他分子(例如碳水化合物)，且為本文所提供之非細胞滲透性蛋白質結合的標靶。結合可為直接或間接的。在實施例中，非細胞滲透性蛋白質選擇性地結合細胞內標靶。選擇性地結合(selectively binds)、選擇性地結合(selectively binding)或特異性結合係指試劑(例如非細胞滲透性蛋白質)結合一種試劑(例如細胞內標靶)，部分或完全排除其他試劑。結合意謂可偵測結合為分析法背景之至少約 1.5 倍。對於選擇性或特異性結合，此類可偵測結合可針對給定試劑而非對照試劑偵測。或者或另外，結合之偵測可藉由分析下游分子或事件之存在來確定。

【0091】如本文所用，術語「結合物」係指原子或分子之間的締合。締合可為直接或間接的。舉例而言，核酸(例如硫代磷酸酯核酸)與蛋白質(例如本文所提供之抗體)之間的結合物可為直接的，例如藉由共價鍵結，或為間接的，

例如藉由非共價鍵(例如靜電相互作用(例如離子鍵、氫鍵、鹵素鍵)、凡得瓦相互作用(例如偶極-偶極、偶極-誘發偶極、倫敦分散)、環堆疊(π 效應)、疏水性相互作用及其類似物)。在結合物為非共價結合物下，非細胞滲透性蛋白質及硫代磷酸酯核酸經由非共價連接子連接。在實施例中，非共價連接子包括生物素結合域及生物素結構域。在實施例中，使用結合物化學形成結合物，包括且不限於親核取代(例如胺及醇與醯基鹵、活性酯之反應)、親電取代(例如烯胺反應)及與碳-碳及碳-雜原子多重鍵之加成(例如麥可加成反應(Michael reaction)、狄爾斯-亞德加成反應(Diels-Alder addition))。此等及其他適用反應論述於例如 March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 第 3 版, John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; 及 Feeney 等人, MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, 第 198 卷, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982。在實施例中，硫代磷酸酯核酸、硫代磷酸酯主鏈聚合物或非細胞滲透性蛋白質經由硫代磷酸酯核酸、硫代磷酸酯主鏈聚合物(例如單硫代磷酸酯)或非細胞滲透性蛋白質之組分與生物素結合域或生物素結構域之組分(例如胺基酸)之間的非共價化學反應非共價附接於生物素結合域或生物素結構域。在其他實施例中，硫代磷酸酯核酸、硫代磷酸酯主鏈聚合物或非細胞滲透性蛋白質包括一或多個反應性部分，例如如本文中描述之共價反應性部分(例如

胺基酸反應性部分，諸如乙烯磺部分($-\text{S}(\text{O})_2\text{CH}=\text{CH}_2$)。一或多個反應性部分可與生物素結合域或生物素結構域之第二反應性部分反應，從而形成共價鍵。不限於此，生物素結構域或生物素結合域之反應性部分可與非細胞滲透性蛋白質之一級胺、硫氫基部分、羧基部分、碳水化合物部分、酪胺酸側鏈或組胺酸側鏈或硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯主鏈聚合物之胍或胞嘧啶鹼基反應。生物素化(與生物素結構域結合)或抗生物素蛋白化(與生物素結合域結合)之反應化學及其他適用反應論述於例如 Nelson WM, Wojnar WA. The use of photobiotinylated PCR primers for magnetic bead-based solid phase sequencing. Human Genome III 1991 年 10 月 21-23 日, San Diego, CA. Poster no. T41; 及 Thermo Scientific Avidin-Biotin Technical Handbook published March, 2009, 1601675_AvBi_HB_INTL.pdf 中。

【0092】適用於本文中結合物化學之包括共價反應性部分或官能基之反應性部分包括例如：

(a) 羧基及其各種衍生物，包括(但不限於) N-羥基丁二醯亞胺酯、N-羥基苯并三唑酯、酸性鹵化物、醯基咪唑、硫酯、對硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基及芳族酯；

(b) 可轉變成酯、醚、醛等之羥基；

(c) 鹵烷基，其中鹵素隨後可經諸如胺、羧酸根陰離子、硫醇陰離子、負碳離子或醇鹽離子之親核基團置換，從而引起新基團共價附接於鹵素原子位點；

(d) 能夠參與狄爾斯-亞德反應之親二烯體基團，諸如

順丁烯二醯亞胺基；

(e) 醛基或酮基，使得隨後可經由形成羰基衍生物，諸如亞胺、脎、半卡巴脎或脞，或經由諸如格氏加成 (Grignard addition) 或烷基鋰加成之機制而衍生化；

(f) 磺醯基鹵基團，用於隨後與胺反應，以例如形成磺醯胺；

(g) 硫醇基，其可轉變成二硫化物，與醯基鹵反應，或鍵結于金屬，諸如金；

(h) 胺或硫氫基，其可例如醯化、烷基化或氧化；

(i) 烯，其可進行例如環加成、醯化、麥可加成等等；

(j) 環氧基，其可與例如胺及羥基化合物反應；

(k) 胺基磷酸酯及適用於核酸合成之其他標準官能基；

(l) 金屬氧化矽鍵結；

(m) 金屬鍵結於反應性磷基(例如磷)以形成例如磷酸二酯鍵；及

(n) 碲，例如乙烯碲。

【0093】可對反應性官能基進行選擇，使得其不參與或干擾本文中描述之蛋白質之化學穩定性。舉例而言，核酸可包括乙烯碲或其他反應性部分。舉例而言，具有乙烯碲反應性部分之核酸可由具有 S-S-R 部分之核酸形成，其中 R 為 $-(CH_2)_6-OH$ 。具有乙烯碲之核酸可由具有末端磷酸酯基之核酸(PS)進一步形成。

【0094】「對照」或「標準對照」係指用作參考，通常已知參考，用於與測試樣品、量測結果或數值比較之樣品、

量測結果或數值。舉例而言，測試樣品可取自懷疑患有給定疾病(例如自體免疫疾病、發炎性自體免疫疾病、癌症、傳染性疾病、免疫疾病或其他疾病)之患者且與已知之正常(未患病)個體(例如標準對照個體)比較。標準對照亦可表示自未患給定疾病之類似個體(例如標準對照個體)群體(亦即標準對照群體)，例如具有類似醫學背景、相同年齡、體重等之健康個體集合之平均量測結果或數值。標準對照數值亦可自相同個體，例如自疾病發作之前較早自患者獲得之樣品獲得。本領域技術人員將認識到標準對照可設計用於評估許多參數(例如 RNA 含量、蛋白質含量、特定細胞類型、特定體液、特定組織、滑膜細胞、滑液、滑液組織、纖維母細胞樣滑膜細胞、巨噬細胞樣滑膜細胞等等)。

【0095】熟習此項技術者將瞭解何種標準對照在給定環境中最適當且能夠基於與標準對照值之比較來分析資料。標準對照對於確定資料顯著性(例如統計顯著性)亦很重要。舉例而言，若給定參數之值在標準對照中廣泛變化，則不認為測試樣品之變化為顯著的。

【0096】術語「診斷」係指疾病(例如自體免疫、發炎性自體免疫、癌症、傳染性、免疫或其他疾病)存在於個體中之相對概率。同樣地，術語「預後」係指關於疾病病況之某種將來結果可存在於個體中之相對概率。舉例而言，在本發明之上下文中，預後可指個體將出現疾病(例如自體免疫、發炎性自體免疫、癌症、傳染性、免疫或其他疾病)之可能性或疾病之可能嚴重程度(例如疾病持續時間)。如

熟習醫學診斷領域之任一技術者所瞭解，該等術語不意欲為絕對的。

【0097】「生物樣品」或「樣品」係指獲自或來源於個體或患者之材料。生物樣品包括諸如生檢及剖檢(autopsy)樣品之組織的切片，及為達成組織學目的而獲取之冷凍切片。此類樣品包括體液，諸如血液及血液部分或產物(例如血清、血漿、血小板、紅血球及其類似物)、唾液、組織、培養細胞(例如原始培養物、外植體及轉型細胞)、糞便、尿、滑液、關節組織、滑液組織、滑膜細胞、纖維母細胞樣滑膜細胞、巨噬細胞樣滑膜細胞、免疫細胞、造血細胞、纖維母細胞、巨噬細胞、T細胞等等。生物樣品通常自真核生物體獲得，諸如哺乳動物，諸如靈長類動物，例如黑猩猩或人類；奶牛；犬；貓；齧齒動物，例如豚鼠、大鼠、小鼠；兔；或鳥；爬行動物；或魚。

【0098】如本文所用，「細胞」係指進行代謝或足以維持或複製其基因組 DNA 之其他功能的細胞。細胞可藉由此項技術中熟知之方法鑒別，包括例如存在完整膜、藉由特定染料染色、能夠產生子代或在配子情況下能夠與第二配子組合產生生活的後代。細胞可包括原核及真核細胞。原核細胞包括(但不限於)細菌。真核細胞包括(但不限於)酵母細胞及來源於植物及動物，例如哺乳動物、昆蟲(例如夜蛾)及人類細胞之細胞。當細胞天然不附著或例如藉由胰酶消化進行處理而不附著表面時，其可為適用的。

細胞滲透性結合物

【0099】本文特別提供細胞滲透性結合物，其包括第一非細胞滲透性蛋白質及第二蛋白質及硫代磷酸酯核酸分子。本文所提供之第二蛋白質可為非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，第二蛋白質為抗體。如本文所提供之結合物可包括將第一非細胞滲透性蛋白質(例如第一抗體)連接至第二非細胞滲透性蛋白質(例如第二抗體)之硫代磷酸酯核酸，其中該硫代磷酸酯核酸增強第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質之細胞內傳遞。第一及第二非細胞滲透性蛋白質可結合於相同標靶(例如細胞內蛋白質或表面表現之蛋白質)或不同標靶。在第一及第二非細胞滲透性蛋白質結合於相同標靶之情況下，第一非細胞滲透性蛋白質與第二非細胞滲透性蛋白質比較可結合不同抗原決定基。硫代磷酸酯核酸共價或非共價附接(例如經由非共價連接子)於第一及第二非細胞滲透性蛋白質形成本文所提供之非細胞滲透性蛋白質，從而能夠經由滲透進入細胞。本文所提供之結合物尤其可用於抗體之細胞內傳遞及細胞內標靶之標靶(例如信號傳導蛋白質)以達成治療及診斷目的。

【0100】在一個態樣中，提供一種包括將第一非細胞滲透性蛋白質連接至第二非細胞滲透性蛋白質之硫代磷酸酯核酸的細胞滲透性結合物。硫代磷酸酯核酸增強第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質之細胞內傳遞。在另一個態樣中，提供一種包括將第一非細胞滲透性蛋白質連接至第二非細胞滲透性蛋白質之硫代磷酸酯聚合物主鏈的細胞滲透性結合物。硫代磷酸酯聚合物主鏈增強

第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質之細胞內傳遞。如以上所討論，聚合物主鏈含有與核酸序列相同之結構(亦即含有兩個或超過兩個連接在一起之糖殘基的鏈)，其中例外為聚合物主鏈缺乏核酸序列中通常存在之鹼基。因此，對於本文所提供之所有實施例及態樣，代表或與本文所述之硫代磷酸酯核酸組合，可使用硫代磷酸酯聚合物主鏈。

【0101】 第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質可共價或非共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，硫代磷酸酯核酸非共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，硫代磷酸酯核酸共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質且非共價附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，硫代磷酸酯核酸非共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質且共價附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，硫代磷酸酯核酸獨立地附接於第一非細胞滲透性蛋白質之離胺酸、精胺酸、半胱胺酸或組胺酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸獨立地附接於第二非細胞滲透性蛋白質之離胺酸、精胺酸、半胱胺酸或組胺酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸附接於第一非細胞滲透性蛋白質之半胱胺酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸附接於第二非細胞滲透性蛋白質之半胱胺酸。

【0102】 在實施例中，硫代磷酸酯核酸經由第一連接

子附接於第一非細胞滲透性蛋白質且經由第二連接子附接於第二非細胞滲透性蛋白質。本文所提供之第一及第二連接子可為化學連接子。在實施例中，化學連接子為共價連接子或非共價連接子。在實施例中，共價連接子為鍵、經取代或未經取代之伸烷基、經取代或未經取代之伸雜烷基、經取代或未經取代之伸環烷基、經取代或未經取代之伸雜環烷基、經取代或未經取代之伸芳基或經取代或未經取代之伸雜芳基或其任何組合。因此，如本文所提供之化學連接子可包括多個化學部分，其中多個部分中之每一者為化學上不同的。

【0103】硫代磷酸酯核酸可經由非共價連接子附接於第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質。如本文所提供之非共價連接子可包括生物素結合對之第一成員及生物素結合對之第二成員。生物素結合對之第一成員可為生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)或生物素結構域(例如生物素)。生物素結合對之第二成員可為生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)或生物素結構域(例如生物素)。非共價連接子經由生物素結合對之第一成員與生物素結合對之第二成員之間的非共價鍵形成。在實施例中，生物素結合對之第一成員為生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)且生物素結合對之第二成員為生物素結構域(例如生物素)。在實施例中，生物素結合對之第一成員為生物素結構域(例如生物素)且生物素結合對之第二成員為生物素結合域(例如抗

生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)。

【0104】在實施例中，第一連接子為非共價連接子。在實施例中，第一連接子為共價連接子。在實施例中，第二連接子為非共價連接子。在實施例中，第二連接子為共價連接子。在實施例中，第一連接子為共價連接子，且第二連接子為共價連接子。在實施例中，第一連接子為共價連接子，且第二連接子為非共價連接子。在實施例中，第一連接子或第二連接子為鍵。在實施例中，第一連接子為鍵。在實施例中，第二連接子為鍵。

【0105】在實施例中，第一連接子為非共價連接子。如本文所提供之非共價連接子為包括第一結合域(例如生物素結構域或生物素結合域)非共價附接於第二結合域(例如生物素結合域或生物素結構域)之連接子。因此，經由第一結合域與第二結合域之間的非共價結合，形成非共價連接子。

【0106】在實施例中，第一連接子包括第一結合域及第二結合域。在實施例中，第二連接子包括第三結合域及第四結合域。第一結合域、第二結合域、第三結合域及第四結合域可為相同的或獨立地不同的。在實施例中，第一結合域為第一生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)。在實施例中，第二結合域為第一生物素結構域(例如生物素)。在實施例中，第三結合域為第二生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)。在實施例中，第四結合域為第二生物素結構域(例如生物素)。

在實施例中，第一結合域為第一生物素結構域(例如生物素)。在實施例中，第二結合域為第二生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)。在實施例中，第三結合域為第二生物素結構域(例如生物素)。在實施例中，第四結合域為第二生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)。在實施例中，第一連接子包括非共價附接於第一生物素結構域之第一生物素結合域。在實施例中，第二連接子包括非共價附接於第二生物素結構域之第二生物素結合域。

【0107】第一生物素結合域、第二生物素結合域、第一生物素結構域及第二生物素結構域可分別共價或非共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質或第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質共價附接於第一生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)且硫代磷酸酯核酸共價附接於第一生物素結構域(例如生物素)。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質共價附接於第一生物素結構域(例如生物素)且硫代磷酸酯核酸共價附接於第一生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)。在實施例中，第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)共價附接於第二生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)且硫代磷酸酯核酸共價附接於第二生物素結構域(例如生物素)。在實施例中，第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)共價附接於第二生物素結構域(例如生物素)且硫代磷酸酯核酸共

價附接於第二生物素結合域(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)。

【0108】本文所提供之第一連接子及第二連接子可為共價連接子。應用此項技術中熟知且與連接子及第一非細胞滲透性蛋白質及第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)之組成物相容的方法，本文所提供之連接子(例如第一連接子、第二連接子)可共價連接第一非細胞滲透性蛋白質或第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。本文所提供之連接子可包括在附接於第一非細胞滲透性蛋白質之點、附接於硫代磷酸酯核酸之點或附接於第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)之點的反應基團(例如炔、疊氮化物、順丁烯二醯亞胺或硫醇反應性部分)之結合產物。因此，本文所提供之連接子可為多價且可藉由結合物化學技術形成。適用於本文所提供之組成物及方法的連接子之非限制性實例(例如第一連接子、第二連接子)包括烷基(包括經取代之烷基及含有雜原子部分之烷基)，與短烷基、酯、醯胺、胺、環氧基及乙二醇或其衍生物。本文所提供之連接子(例如第一連接子、第二連接子)可包括礬基，形成礬醯胺、酯基或醚基(例如三乙基醚)。

【0109】在實施例中，第一連接子包括非共價附接於第一生物素結構域之第一生物素結合域。在實施例中，第一生物素結合域為第一抗生物素蛋白結構域。在實施例中，第一生物素結合域為第一鏈霉抗生物素蛋白結構域。在實施例中，第一鏈霉抗生物素蛋白結構域結合複數個第

一生物素結構域。在實施例中，第一鏈霉抗生物素蛋白結構域結合約四個第一生物素結構域。

【0110】在實施例中，第一生物素結合域附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，第一生物素結合域共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，第一生物素結合域非共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，複數個第一生物素結合域附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，第一生物素結合域附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，第一生物素結合域共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，第一生物素結合域非共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，複數個硫代磷酸酯核酸附接於第一生物素結合域。

【0111】在實施例中，第一生物素結構域附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，第一生物素結構域共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，第一生物素結構域非共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，複數個硫代磷酸酯核酸附接於第一生物素結構域。在實施例中，第一生物素結構域附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，第一生物素結構域共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，第一生物素結構域非共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，第一生物素結合域非共價附接於第一生物素結構域，從而形成第一連接子。

【0112】在實施例中，第一連接子或第二連接子為共價連接子。在實施例中，第二連接子為共價連接子。在實

施例中，第一連接子為共價連接子。在實施例中，第一連接子為鍵。在實施例中，第二連接子為鍵。在實施例中，第一連接子為共價連接子，且第二連接子為共價連接子。在實施例中，第一連接子為非共價連接子，且第二連接子為非共價連接子。在實施例中，第一連接子為共價連接子，且第二連接子為非共價連接子。在實施例中，第一連接子為非共價連接子，且第二連接子為共價連接子。在其他實施例中，第二連接子為鍵。

【0113】在實施例中，第二連接子包括非共價附接於第二生物素結構域之第二生物素結合域。在實施例中，第二生物素結合域為第二抗生物素蛋白結構域。在實施例中，第二生物素結合域為第二鏈霉抗生物素蛋白結構域。在實施例中，第二鏈霉抗生物素蛋白結構域結合複數個第二生物素結構域。在實施例中，第二鏈霉抗生物素蛋白結構域結合約四個第二生物素結構域。

【0114】在實施例中，第二生物素結合域附接於第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。在實施例中，第二生物素結合域共價附接於第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。在實施例中，第二生物素結合域非共價附接於第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。在實施例中，複數個第二生物素結合域附接於第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。在實施例中，第二生物素結合域附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，第二生物素結合域共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，第二生物素結

合域非共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，複數個硫代磷酸酯核酸附接於第二生物素結合域。

【0115】在實施例中，第二生物素結構域附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，第二生物素結構域共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，第二生物素結構域非共價附接於硫代磷酸酯核酸。在實施例中，複數個硫代磷酸酯核酸附接於第二生物素結構域。在實施例中，第二生物素結構域附接於第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。在實施例中，第二生物素結構域共價附接於第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。在實施例中，第二生物素結構域非共價附接於第二蛋白質(例如第二非細胞滲透性蛋白質)。在實施例中，第二生物素結合域非共價附接於第二生物素結構域，從而形成第二連接子。

【0116】生物素結合對之第一成員及生物素結合對之第二成員可共價或非共價附接於第一或第二非細胞滲透性蛋白質、硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈。在實施例中，非細胞滲透性蛋白質共價附接於生物素結合對之第一成員(例如抗生物素蛋白、鏈霉抗生物素蛋白)且硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈共價附接於生物素結合對(例如生物素)之第二成員。

【0117】在實施例中，生物素結合域為抗生物素蛋白結構域。在實施例中，生物素結合域為鏈霉抗生物素蛋白結構域。在實施例中，鏈霉抗生物素蛋白結構域結合複數個生物素結構域。在實施例中，鏈霉抗生物素蛋白結構域

結合約四個生物素結構域。在實施例中，生物素結合域附接於非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結合域共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結合域共價附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結合域非共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結合域非共價附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，複數個生物素結合域附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，複數個生物素結合域附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結合域附接於硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈。在實施例中，生物素結合域共價附接於硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈。在實施例中，生物素結合域非共價附接於硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈。在實施例中，複數個生物素結合域附接於硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈。在實施例中，生物素結合域非共價附接於生物素結構域，從而形成非共價連接子。

【0118】在實施例中，生物素結構域附接於硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈。在實施例中，生物素結構域共價附接於硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈。在實施例中，生物素結構域非共價附接於硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈。在實施例中，複數個硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈附接於生物素結構域。在實施例中，生物素結構域附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結構域附接於第二非細胞滲透性蛋白質。

透性蛋白質。在實施例中，生物素結構域共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結構域共價附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結構域非共價附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結構域非共價附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，複數個生物素結構域附接於第一非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，複數個生物素結構域附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，生物素結構域非共價附接於生物素結合域，從而形成非共價連接子。

【0119】如以上所討論，核酸，例如硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈可經由包括生物素結合域(例如抗生物素蛋白或鏈霉抗生物素蛋白)及生物素結構域之非共價連接子附接於第一或第二非細胞滲透性蛋白質。核酸，例如硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈可經由多種機制附接於生物素結合域或生物素結構域。同樣地，第一或第二非細胞滲透性蛋白質可經由多種機制附接於生物素結合域或生物素結構域。硫代磷酸酯核酸、硫代磷酸酯聚合物主鏈或第一或第二非細胞滲透性蛋白質可共價或非共價附接於生物素結合域或生物素結構域。第一或第二非細胞滲透性蛋白質可共價結合於生物素結合域或生物素結構域。在第一或第二非細胞滲透性蛋白質共價結合於生物素結合域或生物素結構域之情況下，生物素結合域或生物素結構域共價結合蛋白質之胺基酸。在實施例中，第一或第二非細胞滲透性蛋白質包括共價反應性部分(如以上

所述)且反應性部分與生物素結合域或生物素結構域反應。在實施例中，生物素結合域或生物素結構域包括共價反應性部分且反應性部分與第一或第二非細胞滲透性蛋白質反應。

【0120】在實施例中，硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈包括共價反應性部分且反應性部分與生物素結合域或生物素結構域反應。如上所述，共價反應性部分可與蛋白質之離胺酸、精胺酸、半胱胺酸或組胺酸(例如與胺基酸側鏈)反應。在實施例中，共價反應性部分與半胱胺酸反應。共價反應性部分可為乙烯磺。在實施例中，硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈包括具有式 S-S-R 之反應性部分，其中 R 為保護基。在實施例中，R 為己醇(單價取代基)。如本文所用，術語己醇包括具有式 $C_6H_{13}OH$ 之化合物且包括 1-己醇、2-己醇、3-己醇、2-甲基-1-戊醇、3-甲基-1-戊醇、4-甲基-1-戊醇、2-甲基-2-戊醇、3-甲基-2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-甲基-3-戊醇、3-甲基-3-戊醇、2,2-二甲基-1-丁醇、2,3-二甲基-1-丁醇、3,3-二甲基-1-丁醇、2,3-二甲基-2-丁醇、3,3-二甲基-2-丁醇及 2-乙基-1-丁醇。在實施例中，R 為 1-己醇。在實施例中，硫代磷酸酯核酸共價結合於生物素結合域或生物素結構域。在實施例中，硫代磷酸酯核酸包括反應性部分。在實施例中，反應性部分為乙烯磺或如上所述具有式 S-S-R 之反應性部分。在實施例中，R 為己醇，例如 1-己醇。

【0121】在一個實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質

為第一抗體，第一連接子包括第一生物素結合域及第一生物素結構域，其中該第一生物素結合域為抗生物素蛋白結構域，第二非細胞滲透性蛋白質為第二抗體，且第二連接子包括第二生物素結合域及第二生物素結構域，其中該第二生物素結合域為抗生物素蛋白結構域。在另一個實施例中，第一抗體為抗 STAT3 抗體且第二抗體為抗 NFkB 抗體。在另一個實施例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。

【0122】在一個實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質為第一抗體，第一連接子為共價連接子，第二非細胞滲透性蛋白質為第二抗體，且第二連接子包括第二生物素結合域及第二生物素結構域，其中該第二生物素結合域為抗生物素蛋白結構域。在另一個實施例中，第一抗體為抗 STAT3 抗體且第二抗體為抗 NFkB 抗體。在另一個實施例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。

【0123】在一個實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質為第一抗體，第一連接子包括第一生物素結合域及第一生物素結構域，其中該第一生物素結合域為抗生物素蛋白結構域，第二非細胞滲透性蛋白質為第二抗體，且第二連接子為共價連接子。在另一個實施例中，第一抗體為抗 STAT3 抗體且第二抗體為抗 NFkB 抗體。在另一個實施例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。

【0124】在一個實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質為第一抗體，第一連接子為共價連接子，第二非細胞滲透性蛋白質為第二抗體，且第二連接子為共價連接子。在另

一個實施例中，第一抗體為抗 STAT3 抗體且第二抗體為抗 NFkB 抗體。在另一個實施例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。

【0125】在一個實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質為第一抗體，第一連接子包括第一生物素結合域及第一生物素結構域，其中該第一生物素結合域為抗生物素蛋白結構域，第二非細胞滲透性蛋白質為第二抗體，且第二連接子包括第二生物素結合域及第二生物素結構域，其中該第二生物素結合域為抗生物素蛋白結構域。在另一個實施例中，第一抗體為抗 CTLA-4 抗體且第二抗體為抗 FOXP3 抗體。在另一個實施例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。

【0126】在一個實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質為第一抗體，第一連接子為共價連接子，第二非細胞滲透性蛋白質為第二抗體，且第二連接子包括第二生物素結合域及第二生物素結構域，其中該第二生物素結合域為抗生物素蛋白結構域。在另一個實施例中，第一抗體為抗 CTLA-4 抗體且第二抗體為抗 FOXP3 抗體。在另一個實施例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。

【0127】在一個實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質為第一抗體，第一連接子包括第一生物素結合域及第一生物素結構域，其中該第一生物素結合域為抗生物素蛋白結構域，第二非細胞滲透性蛋白質為第二抗體，且第二連接子為共價連接子。在另一個實施例中，第一抗體為抗 CTLA-4 抗體且第二抗體為抗 FOXP3 抗體。在另一個實施

例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。

【0128】在一個實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質為第一抗體，第一連接子為共價連接子，第二非細胞滲透性蛋白質為第二抗體，且第二連接子為共價連接子。在另一個實施例中，第一抗體為抗 CTLA-4 抗體且第二抗體為抗 FOXP3 抗體。在另一個實施例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。

【0129】在實施例中，硫代磷酸酯核酸為單股核酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸為雙股核酸。在硫代磷酸酯核酸為雙股核酸之情況下，硫代磷酸酯核酸包括與第二硫代磷酸酯核酸雜交之第一硫代磷酸酯核酸，第一硫代磷酸酯核酸附接於第一非細胞滲透性蛋白質且第二硫代磷酸酯核酸附接於第二非細胞滲透性蛋白質。在實施例中，第一硫代磷酸酯核酸與第二硫代磷酸酯核酸互補。第一硫代磷酸酯核酸同與第二硫代磷酸酯核酸互補之核酸具有至少 50% 序列一致性。第一硫代磷酸酯核酸同與第二硫代磷酸酯核酸互補之核酸具有約 50% 序列一致性。第一硫代磷酸酯核酸同與第二硫代磷酸酯核酸互補之核酸具有至少 60% 序列一致性。第一硫代磷酸酯核酸同與第二硫代磷酸酯核酸互補之核酸具有至少 70% 序列一致性。第一硫代磷酸酯核酸同與第二硫代磷酸酯核酸互補之核酸具有至少 80% 序列一致性。第一硫代磷酸酯核酸同與第二硫代磷酸酯核酸互補之核酸具有至少 90% 序列一致性。第一硫代磷酸酯核酸同與第二硫代磷酸酯核酸互補之核酸具有至少 95% 序列

一致性。第一硫代磷酸酯核酸同與第二硫代磷酸酯核酸互補之核酸具有至少 98% 序列一致性。

【0130】在實施例中，硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈長度為約 10 個、20 個、30 個、40 個、50 個、60 個、70 個、80 個、90 個、100 個或更多個核酸殘基。在實施例中，硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈長度為約 10 個至約 30 個核酸殘基。在實施例中，硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈長度為約 20 個核酸殘基。在實施例中，各核酸或聚合物主鏈之長度可為至少約 5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、31 個、32 個、33 個、34 個、35 個、36 個、37 個、38 個、39 個、40 個、41 個、42 個、43 個、44 個、45 個、46 個、47 個、48 個、49 個、50 個、51 個、52 個、53 個、54 個、55 個、56 個、57 個、58 個、59 個、60 個、61 個、62 個、63 個、64 個、65 個、66 個、67 個、68 個、69 個、70 個、71 個、72 個、73 個、74 個、75 個、76 個、77 個、78 個、79 個、80 個、81 個、82 個、83 個、84 個、85 個、86 個、87 個、88 個、89 個、90 個、91 個、92 個、93 個、94 個、95 個、96 個、97 個、98 個、99 個、100 個或更多個核酸殘基或糖殘基。在實施例中，各硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈長度獨立地為 5 個至 50 個、10 個至 50 個、15 個至 50 個、20 個至 50 個、25 個至 50 個、30 個至 50

個、35 個至 50 個、40 個至 50 個、45 個至 50 個、5 個至 75 個、10 個至 75 個、15 個至 75 個、20 個至 75 個、25 個至 75 個、30 個至 75 個、35 個至 75 個、40 個至 75 個、45 個至 75 個、50 個至 75 個、55 個至 75 個、60 個至 75 個、65 個至 75 個、70 個至 75 個、5 個至 100 個、10 個至 100 個、15 個至 100 個、20 個至 100 個、25 個至 100 個、30 個至 100 個、35 個至 100 個、40 個至 100 個、45 個至 100 個、50 個至 100 個、55 個至 100 個、60 個至 100 個、65 個至 100 個、70 個至 100 個、75 個至 100 個、80 個至 100 個、85 個至 100 個、90 個至 100 個、95 個至 100 個或更多個殘基。在實施例中，各硫代磷酸酯核酸或硫代磷酸酯聚合物主鏈長度獨立地為 10 個至 15 個、10 個至 20 個、10 個至 30 個、10 個至 40 個或 10 個至 50 個殘基。

【0131】在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質獨立地具有超過 25 kD 之分子量。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質獨立地具有約 25 kD 至約 750 kD 之分子量。因此，第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質獨立地具有至少約 25、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、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、

350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750 或更多千道爾頓(kD)之分子量。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質獨立地具有至少約 25 至 100 kD、至少約 25 至 150 kD、至少約 25 至 200 kD、至少約 25 至 250 kD、至少約 25 至 300 kD、至少約 25 至 350 kD、至少約 25 至 400 kD、至少約 25 至 450 kD、至少約 25 至 500 kD、至少約 25 至 550 kD、至少約 25 至 600 kD、至少約 25 至 650 kD、至少約 25 至 700 kD 或至少約 25 至 750 kD 之分子量。

【0132】在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質獨立地為抗體。如以上更詳細地論述，抗體可為全長抗體，諸如 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 抗體或其片段。在實施例中，抗體為 IgG 抗體或其片段。在實施例中，抗體為 IgG 抗體或其片段。在實施例中，抗體為 scFv 片段或人源化抗體。在實施例中，抗體為 IgA、IgM、IgD 或 IgE 抗體。在實施例中，抗體為 scFv 片段。在實施例中，抗體為人源化抗體。因此，提供經由硫代磷酸酯核酸連接之第一抗體及第二抗體，其中該硫代磷酸酯

核酸增強第一抗體及第二抗體傳遞至細胞中。在實施例中，第一抗體或第二抗體為治療抗體，亦即用於治療疾病之抗體。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質(例如抗體)或第二非細胞滲透性蛋白質(例如抗體)結合細胞內標靶。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質(例如抗體)及第二非細胞滲透性蛋白質(例如抗體)結合細胞內標靶。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質相對於第二非細胞滲透性蛋白質結合不同細胞內標靶。因此，在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質結合第一細胞內標靶且第二非細胞滲透性蛋白質結合第二細胞內標靶。在實施例中，第一細胞內標靶為信號傳導分子(例如 STAT3 蛋白質)。在實施例中，第二細胞內標靶為轉錄因子(例如 NFkB 蛋白質)。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質相對於第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶上不同之抗原決定基。

【0133】細胞內標靶可為例如藉由共焦顯微術成像之治療標靶或診斷標靶或其他位於細胞內之相關標靶，例如標靶或結構，例如組蛋白。因此，提供結合於細胞內標靶之細胞滲透性結合物。在實施例中，細胞內標靶為選自由以下各者所組成群組的疾病標靶：自體免疫疾病、發炎疾病、代謝病症、發育病症、心血管疾病、肝病、腸病、傳染性疾病、內分泌疾病、神經病症及癌症。細胞內標靶之實例包括不限於致癌轉錄因子，包括(但不限於) STAT3、Myc、NFkB、AP1、HIF、突變 p53；致癌蛋白，包括(但不限於) Ras、Raf、MAPK、PI3 激酶、AKT、BTK、JAK、SRC

家族成員；免疫調節分子，包括 FOXp3、T-BET、GATA3、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5、STAT6。疾病標靶可為診斷標靶或治療標靶或其他與疾病相關之標靶。癌症之示例性細胞內標靶包括(但不限於) STAT (例如 STAT3)、NF κ B、PKB/Akt、Myc 家族成員、類固醇激素受體(例如雌激素受體)、類固醇激素受體之配位體(例如週期素 D1)、受體酪胺酸激酶(RTK)、EGFR、VEGFR、PDGFR、Src 家族成員、Ras、Abl、BCR-Abl、NPM-Alk、Janus 激酶(JAK)、布魯東氏酪胺酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)及病毒性致癌蛋白(例如 EBV 蛋白質或 HPV 蛋白質，例如 E6 及 E7)。在實施例中，傳染性疾病之細胞內標靶為病毒蛋白或病毒轉錄產物。因此，細胞內標靶可為人類免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒、單純性疱疹病毒、艾巴二氏病毒(epstein barr virus)、巨細胞病毒、人類乳頭狀瘤病毒或肝炎病毒之病毒蛋白或病毒轉錄產物。在實施例中，細胞內標靶為 DNA 結合蛋白，包括(但不限於)轉錄因子、轉錄強化子、轉錄抑制子、組蛋白或轉譯後修飾組蛋白。在實施例中，細胞內標靶為表觀遺傳上經修飾之 DNA，例如甲基化或羥甲基化胞嘧啶(5mC 或 5hmC)、5-甲醯基胞嘧啶(5fC)及 5-羧基胞嘧啶(5caC)。在實施例中，細胞內標靶為核酸，例如 RNA 轉錄產物或核酸。舉例而言，細胞內標靶可為傳染性病原體，例如寄生蟲、病毒或細菌之核酸。

【0134】在實施例中，細胞內標靶為信號傳導分子或轉錄因子。在實施例中，信號傳導分子為磷酸酶或激酶。

在實施例中，轉錄因子為核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈強化子(NF κ B)蛋白質。在實施例中，NF κ B 蛋白質為 p65。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質結合 STAT3 蛋白質且第二非細胞滲透性蛋白質結合 NF κ B 蛋白質。在實施例中，細胞內標靶為癌症標靶或位於癌細胞內。在實施例中，細胞內標靶為 STAT 蛋白質，例如 STAT3 或輸出蛋白 7。在實施例中，細胞內標靶係選自由 STAT3、NF κ B 及 Src 所組成之群組。在實施例中，細胞內標靶為 STAT3。在實施例中，細胞內標靶為 NF κ B。在實施例中，非細胞滲透性蛋白質進一步包括附接於蛋白質之標記、小分子或功能性核酸。在實施例中，細胞滲透性結合物結合於細胞內標靶。

細胞組成物

【0135】在另一個態樣中，提供一種細胞，其包括本文中提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例。提供包括一或多種所提供之細胞滲透性結合物的細胞，例如細胞可包括複數種細胞滲透性結合物。在實施例中，結合物在細胞內結合於細胞內標靶。舉例而言，細胞可包括經由硫代磷酸酯核酸或聚合物主鏈連接之第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質。第一及第二非細胞滲透性蛋白質可在細胞內結合於細胞內標靶。在實施例中，第二非細胞滲透性蛋白質相對於第一非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶上不同之抗原決定基。在實施例中，第二非細胞滲透性蛋白質結合第二細胞內標靶。在實施例中，第一及/或第二非細胞滲透性蛋白質為抗體。因此，第一及第二非

細胞滲透性蛋白質可為相同蛋白質或不同蛋白質。

醫藥組成物

【0136】本文提供醫藥組成物，其包含本文所提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例，及醫藥學上可接受之載劑。所提供之組成物尤其適於活體外或活體內調配及給藥。適合載劑及賦形劑及其調配物描述於 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005) 中。醫藥學上可接受之載劑意謂在生物學上或在其他方面並非不合需要之物質，亦即材料給藥於個體，不會引起不良之生物效應或以有害方式與含有其之醫藥組成物之其他組分相互作用。若給藥於個體，則載劑視情況經選擇以將活性成分之降解作用減至最少且將個體中之不良副作用減至最小。

【0137】本發明提供之醫藥組成物包括其中活性成分(例如本文所述之組成物，包括實施例或實例)以治療有效量，亦即有效實現其預期目的之量含有的組成物。有效用於特定應用之實際量將尤其視所治療之病狀而定。當在治療疾病之方法中給藥時，本文所述之重組蛋白質將含有有效實現所需結果之量的活性成分，例如調節標靶分子之活性及/或減慢、消除或減緩疾病症狀之進展。熟習此項技術者特別根據本文中詳述之揭示內容能夠確定本發明化合物之治療有效量。

【0138】在另一個態樣中，提供一種醫藥組成物，其包括本文中提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例，及



醫藥學上可接受之載劑。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質或第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。在實施例中，第二非細胞滲透性蛋白質相對於第一非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶上不同之抗原決定基。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質結合第一細胞內標靶。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質為抗體。在實施例中，第二非細胞滲透性蛋白質結合第二細胞內標靶。在實施例中，第二非細胞滲透性蛋白質為抗體。第一及第二非細胞滲透性蛋白質可為相同蛋白質或不同蛋白質。

【0139】用於給藥之組成物將通常包括如本文所述之藥劑溶於醫藥學上可接受之載劑，較佳水性載劑。可使用多種水性載劑，例如緩衝生理食鹽水及其類似物。此等溶液無菌且一般不含不合需要之物質。此等組成物可藉由熟知之習知殺菌技術殺菌。組成物可根據需要含有醫藥學上可接受之輔助物質以接近生理條件，諸如 pH 值調整及緩衝劑、毒性調整劑及其類似物，例如乙酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、乳酸鈉及其類似物。此等調配物中活性劑之濃度可廣泛地改變，且將主要基於流體體積、黏度、體重及其類似因素，根據所選擇之特定給藥模式及個體需要選擇。

【0140】呈游離鹼或藥理學上可接受之鹽形式的活性化合物溶液可在與界面活性劑，諸如羥丙基纖維素適當混

合之水中製備。分散液亦可在甘油、液體聚乙二醇及其混合物中及油中製備。在通常儲存及使用條件下，此等製劑可含有防腐劑以防止微生物生長。

【0141】醫藥組成物可經由鼻內或可吸入溶液或噴霧、氣溶膠或吸入劑傳遞。鼻用溶液可為經設計以呈液滴或噴霧給藥鼻部通道之水溶液。鼻用溶液可經製備，使得其在許多方面類似於鼻分泌物。因此，水性鼻用溶液通常為等張且略微緩衝以維持 5.5 至 6.5 之 pH 值。另外，需要時，抗微生物防腐劑類似於眼睛製劑及適當藥物穩定劑中所用之防腐劑，可包括在調配物內。已知各種市售鼻用製劑且可包括例如抗生素及抗組胺。

【0142】口服調配物可包括如下賦形劑：例如醫藥等級甘露糖醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂及其類似物。此等組成物採取溶液、懸浮液、錠劑、丸劑、膠囊、持續釋放調配物或散劑之形式。在一些實施例中，經口醫藥組成物將包含惰性稀釋劑或可吸收之可食用載劑，或其可裝入硬或軟殼明膠膠囊中，或其可壓縮成錠劑，或其可直接併入飲食。對於經口治療給藥，活性化合物可併入賦形劑，且呈可攝取之錠劑、頰含片、糖衣錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、糯米片及其類似形式之形式使用。此類組成物及製劑應含有至少 0.1% 活性化合物。當然，組成物及製劑之百分比可改變，且宜在單元重量約 2% 至約 75% 之間，或較佳 25%-60% 之間。此類組成物中活性化合物之量使得可獲得適合劑量。

【0143】對於水溶液中之非經腸給藥，舉例而言，溶液應適當緩衝且用足夠生理食鹽水或葡萄糖首先使得液體稀釋劑等張。水溶液，尤其無菌水性介質，尤其適於靜脈內、肌肉內、皮下及腹膜內給藥。舉例而言，一劑可溶於1 ml 等張 NaCl 溶液中，且添加至 1000 ml 皮下輸液或者在所提議之輸注部位注射。

【0144】無菌可注射溶液可藉由將需要量之活性化合物或構築體併入適當溶劑，接著過濾滅菌來製備。一般而言，分散液藉由將各種殺菌活性成分併入含有基礎分散介質之無菌媒劑中來製備。產生活性成分加上任何額外所需成分之粉末的真空乾燥及凍乾技術可用於製備用於復原無菌可注射溶液之無菌粉末。亦涵蓋更濃縮或高度濃縮溶液之製備以供直接注射。DMSO 可用作溶劑以極度快速滲透，傳遞高濃度之活性劑至小區域。

【0145】化合物之調配物可呈現於單位劑量或多劑量密封容器，諸如安瓿及小瓶中。因此，組成物可呈單位劑型。在此類形式中，製劑再分成含有適當量之活性組分的單位劑量。因此，組成物可呈多種單位劑型給藥，視給藥方法而定。舉例而言，用於經口給藥之固體劑型包括(但不限於)散劑、錠劑、丸劑、膠囊及口含錠。

【0146】給藥哺乳動物之劑量及頻率(單劑量或多劑量)可視多種因素而改變，例如哺乳動物是否罹患另一疾病，及其投藥途徑；接受者之體型、年齡、性別、健康狀態、體重、體重指數及飲食；所治療疾病之症狀的性質及程度

(例如癌症症狀及此類症狀之嚴重程度)、同時進行之治療的種類、自所治療疾病之併發症或其他健康相關問題。其他治療方案或藥劑可結合本發明之方法及化合物使用。建立劑量(例如頻率及持續時間)之調整及操縱完全在熟習此項技術者之能力內。

對於本文所述之任何組成物(例如所提供之細胞滲透性結合物),治療有效量可最初根據細胞培養分析法來確定。目標濃度將為如使用本文所述或此項技術中已知之方法量測,活性化合物能夠實現本文所述之方法之彼等濃度。如此項技術中所熟知,用於人類之有效量亦可自動物模型確定。舉例而言,用於人類之劑量可經調配以實現已發現在動物中有效之濃度。人類中之劑量可藉由監測有效性且如上所述向上或向下調整劑量來調整。一般技術者完全能夠基於上述方法及其他方法調整劑量以實現在人類中之最大功效。

【0147】劑量可視患者需要及所採用之化合物而改變。在本發明上下文中給藥患者之劑量應足以在患者中隨著時間推移影響有益治療反應。劑量尺寸亦將由任何不良副作用之存在、性質及程度決定。開業醫師能夠針對特定狀態確定適當劑量。一般地,治療以較小劑量開始,小於化合物之最佳劑量。此後,劑量以小增量增加,直至達到情形下之最佳作用。

【0148】劑量及時間間隔可個別調整以提供所投化合物有效治療特定臨床適應症之位準。此將提供與個體疾病

病況之嚴重程度相稱之治療方案。

【0149】利用本文所提供之教示內容，可計畫不引起實質毒性，然而有效治療特定患者所顯示之臨床症狀的有效預防性或治療性治療方案。此計畫應包含藉由考慮諸如下列之因素謹慎選擇活性化合物：化合物效力、相對生物可用性、患者體重、不良副作用之存在及嚴重程度、較佳

【0150】「醫藥學上可接受之賦形劑」及「醫藥學上可接受之載劑」係指有助於給藥活性劑至個體且為個體吸收且可包括在本發明之組成物中，而不會對患者引起顯著不利之毒物作用的物質。醫藥學上可接受之賦形劑之非限制性實例包括水、NaCl、生理食鹽水溶液、乳酸林格氏液(lactated Ringer's)、正常蔗糖、正常葡萄糖、結合劑、填充劑、崩解劑、潤滑劑、包衣、甜味劑、調料、鹽溶液(諸如林格氏溶液)、醇、油、明膠、碳水化合物(諸如乳糖)、直鏈澱粉或澱粉、脂肪酸酯、羥甲基纖維素、聚乙烯吡咯啶及著色劑及其類似物。此類製劑可進行殺菌且必要時，與不會不利與本發明之化合物反應的助劑混合，諸如潤滑劑、防腐劑、穩定劑、潤濕劑、乳化劑、影響滲透壓之鹽、緩衝劑、著色劑及/或芳族物質及其類似物。熟習此項技術者將認識到其他醫藥賦形劑可用於本發明。

【0151】術語「醫藥學上可接受之鹽」係指衍生自此項技術中熟知之多種有機及無機相對離子之鹽，且包括如(僅為例示)鈉、鉀、鈣、鎂、銨、四烷基銨及其類似物；且當分子含有鹼性官能基時，係指有機酸或無機酸之鹽，

諸如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、酒石酸鹽、甲磺酸鹽、乙酸鹽、順丁烯二酸鹽、乙二酸鹽及其類似物。

【0152】術語「製劑」意欲包括用囊封材料作為載劑調配活性化合物，提供其中有或無其他載劑之活性組分由載劑圍繞，因此與載劑相連的膠囊。同樣地，包括扁囊劑及口含錠。錠劑、散劑、膠囊、丸劑、扁囊劑及口含錠可用作適於經口給藥之固體劑型。

形成結合物之方法

【0153】在另一個態樣中，提供一種形成細胞滲透性結合物之方法。該方法包括使附接於第一非細胞滲透性蛋白質之第一硫代磷酸酯核酸與附接於第二非細胞滲透性蛋白質之第二硫代磷酸酯核酸雜交，從而形成細胞滲透性結合物。在實施例中，硫代磷酸酯核酸共價附接於第一或第二硫代磷酸酯核酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸非共價附接於第一或第二硫代磷酸酯核酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸經由非共價連接子附接於第一或第二硫代磷酸酯核酸。在實施例中，硫代磷酸酯核酸包括共價反應性部分。在實施例中，該方法包括在雜交之前：(i)使第一非細胞滲透性蛋白質與第一硫代磷酸酯核酸接觸，從而形成第一蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物。第二非細胞滲透性蛋白質與第二硫代磷酸酯核酸接觸，從而形成第二蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物。且第一蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物與第二蛋白質-硫代磷酸酯核酸接觸。

傳遞方法

【0154】在另一個態樣中，提供一種傳遞如本文所提供之非細胞滲透性蛋白質(包括其實施例)至細胞中之方法。在實施例中，非細胞滲透性蛋白質結合細胞質中之核內蛋白，從而形成第一非細胞滲透性蛋白質-核內蛋白複合物。在實施例中，非細胞滲透性蛋白質結合細胞質中之核內蛋白，從而形成第二非細胞滲透性蛋白質-核內蛋白複合物。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質-核內蛋白複合物及第二非細胞滲透性蛋白質-核內蛋白複合物不能夠進入細胞核。

【0155】在實施例中，細胞滲透性結合物用於診斷個體之疾病。因此，提供一種診斷個體之疾病的方法，其包含向該個體給藥有效量之細胞滲透性結合物或包含如本文所述之細胞滲透性結合物的組成物。結合物之給藥診斷個體之疾病或疾病之一或多個症狀。所揭示之方法包含將來自測試樣品之生物標記物(例如疾病之細胞內標靶)之位準或活性與對照樣品比較。如以上所討論，對照樣品或數值係指用作參考，通常已知參考，與測試樣品比較之樣品。對照亦可表示自類似個體群體，例如具有類似醫學背景、相同年齡、體重等之癌症患者或健康個體集合之平均值。對照數值亦可自相同個體，例如在疾病之前或治療之前自早期獲得之樣品獲得。亦如以上所討論，診斷係指疾病(例如自體免疫、發炎性自體免疫、癌症、傳染性、免疫或其他疾病)存在於個體中之相對概率。

【0156】關於確定疾病風險因素之術語比較、關聯及

相關係指將個體中風險因素(例如疾病之細胞內標靶之量)之存在或量與其在已知罹患疾病或已知處於患病風險下之人中或已知未患疾病之人中的存在或量比較，且基於分析結果分配患上/出現疾病之增加或減少的機率分配給個體。

偵測方法

【0157】本文亦提供一種偵測細胞中細胞內標靶之方法，其包括使細胞與如本文所提供之細胞滲透性結合物(包括其實施例)接觸且偵測細胞滲透性結合物與細胞內標靶之結合。如上所述，細胞滲透性結合物可結合於一個細胞內標靶或兩個細胞內標靶，其中兩個細胞內標靶可獨立地為不同的。細胞可為固定細胞或活細胞。在實施例中，細胞位於活體外或活體內。結合可直接或間接偵測。應瞭解且本文中涵蓋許多方法可用於偵測細胞滲透性結合物與其細胞內標靶之結合。舉例而言，結合可藉由分析細胞滲透性結合物與其細胞內標靶之間的偶合來直接偵測。結合可例如藉由自由如下所述之共免疫沉澱分析法、共定位分析法或螢光極化分析法所組成之群組選擇一分析法來確定。該等分析法在此項技術中已知，例如參見 Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*，第 3 版，Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)；Dickson, *Methods Mol. Biol.* 461:735-44 (2008)；Nickels, *Methods* 47(1):53-62 (2009)；及 Zinchuk 等人，*Acta Histochem. Cytochem.* 40(4):101-11 (2007)。

【0158】在實施例中，結合藉由成像方法或系統確定。

因此，本文所提供之細胞滲透性結合物(包括其實施例)亦可用于成像應用或用於分析細胞內標靶含量及/或活性之其他應用。舉例而言，所提供之細胞滲透性結合物可用於相關細胞內標靶之活體外或活體內成像。在實施例中，細胞滲透性結合物用於活細胞成像。舉例而言，活細胞成像可用於監測細胞內標靶分佈及/或活細胞內動力學且亦可應用於監測標靶相互作用。舉例而言，細胞滲透性結合物可用於免疫沉澱及共同免疫沉澱分析法以研究細胞中，在實施例中，活細胞中蛋白質-蛋白質相互作用。在實施例中，細胞滲透性結合物用於藉由流動式細胞量測術分析細胞內標靶。在成像應用中，細胞滲透性結合物被列為適合於所使用之應用。如上所述，標籤或可偵測部分為可藉由光譜、光化學、生物化學、免疫化學、化學或其他物理方式偵測之組成物。適用標籤包括(但不限於) ^{32}P 、螢光染料、電子緻密試劑、酶(例如如 ELISA 中所常用)、生物素、地殼新配質或半抗原及蛋白質或可例如藉由將放射性同位素標籤併入與標靶肽特異性反應之肽或抗體中而可偵測之其他實體。可採用此項技術中已知之將抗體結合於標籤之任何適當方法，例如使用 Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego 中描述之方法。

治療方法

【0159】本文所提供之細胞滲透性結合物(包括其實施例)及包括如本文所述之細胞滲透性結合物之組成物可用

於預防性與治療性治療。對於預防性用途，在早期發作之前或在早期發作期間(例如在自體免疫疾病之初始徵象及症狀後)將治療有效量之本文所述之藥劑給藥於個體。治療性治療包含在診斷或出現疾病後向個體給藥治療有效量之本文所述之藥劑。因此，在另一個態樣中，提供一種治療有需要之個體之疾病的方法。該方法包括向個體給藥有效量之如本文所提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例，從而治療該個體之疾病。

【0160】在實施例中，第一及/或第二非細胞滲透性蛋白質為抗體。在實施例中，疾病係選自由以下所組成之群組：自體免疫疾病、發育病症、發炎疾病、代謝病症、心血管疾病、肝病、腸病、傳染性疾病、內分泌疾病、神經病症及癌症。在實施例中，疾病為自體免疫疾病。在實施例中，疾病為發育病症。在實施例中，疾病為發炎疾病。在實施例中，疾病為代謝病症。在實施例中，疾病為心血管疾病。在實施例中，疾病為肝病。在實施例中，疾病為腸病。在實施例中，疾病為傳染性疾病。在實施例中，疾病為內分泌疾病。在實施例中，疾病為神經病症。在實施例中，疾病為癌症。在實施例中，癌症為淋巴瘤。在實施例中，癌症為黑色素瘤。

【0161】在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質或第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質及第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質係結合

相對於該第二非細胞滲透性蛋白質，不同之細胞內標靶。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質相對於第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶上不同之抗原決定基。在實施例中，細胞內標靶為 STAT3、NF κ B 蛋白質或 Src。在實施例中，細胞內標靶為 p65。在實施例中，細胞內標靶為 STAT3。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質結合 STAT3 且第二非細胞滲透性蛋白質結合 NF κ B 蛋白質。在實施例中，結合物之第一非細胞滲透性蛋白質為特異性結合 STAT3 之抗體，且第二非細胞滲透性蛋白質為特異性結合 STAT3 之另一抗原決定基之抗體。

【0162】在所提供之治療方法中，可使用適於所治療之疾病的其他治療劑。因此，在一些實施例中，所提供之治療方法進一步包含給藥第二治療劑至個體。適合之其他治療劑包括(但不限於)選自由以下所組成群組的治療劑：止痛劑、麻醉劑、強壯劑、皮質類固醇、抗膽鹼激導性藥劑、抗膽鹼酯酶、抗痙攣劑、抗贅生性藥劑、異位抑制劑、合成代謝類固醇、抗風濕藥、精神治療劑、神經阻斷劑、消炎劑、驅腸蟲藥、抗生素、抗凝劑、抗真菌劑、抗組胺、抗蕁毒鹼劑、抗分支桿菌劑、抗原蟲劑、抗病毒劑、多巴胺激導劑、血液藥劑、免疫藥劑、蕁毒鹼劑、蛋白酶抑制劑、維生素、生長因子及激素。藥劑之選擇及劑量可容易由熟習此項技術者基於所治療之給定疾病來確定。

【0163】藥劑或組成物之組合可相伴(例如作為混合物)、分開但同時(例如經由獨立的靜脈內線路)或者依序給

藥(例如一種藥劑首先給藥，接著給藥第二藥劑)。因此，術語組合用以指兩種或超過兩種藥劑或組成物相伴、同時或依序給藥。治療過程最佳基於個體來確定，視個體之具體特性及所選擇之治療類型而定。治療，諸如本文揭示之治療，可每天一次、每天兩次、兩週一次、每月一次或治療有效之任何可應用基礎來給藥於個體。治療可單獨或與本文揭示或此項技術中已知之任何其他治療組合給藥。其他處理可與第一治療同時、在不同時間或根據完全不同之治療時程(例如第一治療可每日給藥，而其他治療每週給藥)給藥。

【0164】根據本文所提供之方法，向個體給藥有效量之一或多種本文所提供之藥劑。術語有效量及有效劑量可互換使用。術語有效量定義為產生所需生理反應(例如減少發炎)所需之任何量。給藥藥劑之有效量及時程可藉由熟習此項技術者憑經驗確定。用於給藥之劑量範圍為足夠大以產生影響(例如減少或延遲)疾病或病症之一或多種症狀之所需作用的劑量範圍。劑量不應大至引起實質不良副作用，諸如不需要之交叉反應、過敏反應及其類似副作用。一般地，劑量將隨年齡、狀況、性別、疾病類型、疾病或病症程度、投藥途徑或其他藥物是否包括在方案中而變，且可藉由熟習此項技術者確定。倘若有任何禁忌症，劑量可由個別醫師進行調整。劑量可變化，且可每日依一個或多個投藥劑量給藥，持續1天或若干天。關於給定類別之藥品之適當劑量的指導可見於文獻中。舉例而言，對於給

定參數，有效量將展示增加或減少至少 5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少 100%。功效亦可表示為增加或減少之「倍數」。舉例而言，治療有效量可具有超過對照至少 1.2 倍、1.5 倍、2 倍、5 倍或更多作用。確切劑量及調配將視治療之目的而定，且將可藉由熟習此項技術者使用已知之技術確定(參見例如 Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (第 1-3 卷, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, Gennaro, Editor (2003); 及 Pickar, Dosage Calculations (1999))。

【0165】揭示可用於所揭示之方法及組成物、可結合所揭示之方法及組成物使用、可用於製備所揭示之方法及組成物或作為所揭示之方法及組成物之產物的材料、組成物及組分。本文揭示此等及其他材料，且應瞭解，當揭示此等材料之組合、子集、相互作用、群組等時，雖然可能未明確地揭示此等化合物之每一不同之個別及集體組合及置換的特定提及，但本文中明確地涵蓋及描述每一者。舉例而言，除非明確地相反指示，否則若揭示及論述方法且論述包括方法之許多分子可進行的許多修改，則明確地涵蓋該方法之每個組合及置換以及可能之修改。同樣，亦明確地涵蓋及揭示此等修改之任何子集或組合。此概念適用於本發明之所有態樣，包括(但不限於)使用所揭示之組成物之方法中的步驟。因此，若存在多種可進行之其他步驟，

則應瞭解此等其他步驟中之每一者可與所揭示之方法的任何特定方法步驟或方法步驟之組合一起進行，且明確地涵蓋每一個此類組合或組合子集且應視為揭示。

【0166】術語「個體(subject)」、「患者」、「個體(individual)」等不意欲為限制性且可一般互換。亦即，描述為「患者」之個體不一定患有給定疾病，而是僅僅可能尋求醫療指導。

【0167】如本文所用，病狀、疾病或病症或與病狀、疾病或病症相關之症狀的「治療(treating)」或「治療(treatment)」係指一種獲得有益或所需結果，包括臨床結果之方法。有益或所需臨床結果可包括(但不限於)減輕或改善一或多種症狀或病狀、減弱病狀、病症或疾病之程度、穩定化病狀、病症或疾病狀況、預防病狀、病症或疾病發展、預防病狀、病症或疾病擴散、延遲或減緩病狀、病症或疾病進展、延遲或減緩病狀、病症或疾病發作、改善或緩和病狀、病症或疾病病況以及緩解症狀，無論部分還是全部。「治療」亦可意謂延長個體之存活期超過在缺乏治療下所預期之存活期。「治療」亦可意謂暫時抑制病狀、病症或疾病之進展、減緩病狀、病症或疾病進展，不過在一些情況下，其包含永久地停止病狀、病症或疾病之進展。如本文所用，術語治療(treatment)、治療(treat)或治療(treating)係指一種減輕特徵為表現蛋白酶之疾病或病狀之一或多種症狀的作用或特徵為表現蛋白酶之疾病或病狀之症狀的方法。因此，在所揭示之方法中，治療可指所建立之疾病、

病狀或疾病病狀之症狀的嚴重程度減輕 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%。舉例而言，若與對照相比，個體之疾病的一或多種症狀減輕 10%，則認為用於治療疾病之方法為治療。因此，與天然或對照位準相比，減輕可為 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或 10%與 100%之間的任何減輕百分比。應瞭解治療不一定指疾病、病狀或疾病或病狀之症狀治癒或完全消除。此外，如本文所用，提及減少、減輕或抑制包括與對照位準相比改變 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更大且此類術語可包括但不一定包括完全消除。

【0168】在涵蓋組合治療下，不意欲本文所述之藥劑(亦即核糖核酸化合物)受組合之特定性質限制。舉例而言，本文所述之藥劑可組合成簡單混合物以及化學混雜物給藥。後者之一個實例為藥劑共價連接于鎖定載劑或活性藥物之情況。共價鍵結可用許多方式實現，諸如(但不限於)使用市售交聯劑。

【0169】如本文所用，術語「醫藥學上可接受」與「生理學上可接受」及「藥理學上可接受」同義使用。醫藥組成物一般將包含用於緩衝及儲存時防腐之試劑，且可包括緩衝劑及載劑用於適當傳遞，視投藥途徑而定。

【0170】「有效量」為足夠實現所述目的(例如實現給藥其為求達成之作用、治療疾病、降低酶活性、減輕疾病或病狀之一或多種症狀)之量。「有效量」之一實例為足夠

促進疾病之症狀之治療、預防或減輕的量，亦可稱為「治療有效量」。症狀之「減輕」(及此短語之語法同等物)意謂降低症狀之嚴重程度或頻率或消除症狀。藥物之「預防有效量」為藥物在給藥於個體時將具有預期作用之量，例如防止或延遲損傷、疾病、病變或病狀之發作(或復發)，或降低損傷、疾病、病變或病狀之發作(或復發)可能性或其症狀。完全預防作用不一定藉由給藥一劑出現，且可能僅僅在給藥一系列劑量後方出現。因此，預防有效量可以一或多次投藥來給藥。如本文所用，「活性降低量」係指相對於拮抗劑缺乏，降低酶或蛋白質之活性所需的拮抗劑之量。如本文所用，「功能破壞量」係指相對於拮抗劑缺乏，破壞酶或蛋白質之功能所需的拮抗劑之量。關於給定類別之藥品之適當劑量的指導可見於文獻中。舉例而言，對於給定參數，有效量將展示增加或減少至少 5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少 100%。功效亦可表示為增加或減少「倍數」。舉例而言，治療有效量可超過對照至少 1.2 倍、1.5 倍、2 倍、5 倍或更多作用。確切量將視治療之目的而定，且將可藉由熟習此項技術者使用已知之技術確定(參見例如 Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (第 1-3 卷, 1992)；Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999)；Pickar, *Dosage Calculations* (1999)；及 *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版, 2003, Gennaro ed., Lippincott, Williams & Wilkins)。

【0171】如本文所用，術語「給藥」意謂經口給藥、作為栓劑給藥、局部接觸、靜脈內、腹膜內、肌肉內、損害內、鞘內、鼻內或皮下給藥，或植入緩釋裝置，例如微型滲透泵至個體。給藥係藉由任何途徑，包括非經腸及經黏膜(例如經頰、舌下、齶、齒齦、鼻、陰道、直腸或經皮)。非經腸給藥包括例如靜脈內、肌肉內、小動脈內、皮內、皮下、腹膜內、心室內及顱內。其他傳遞模式包括(但不限於)使用脂質體調配物、靜脈內輸注、經皮貼片等。「共同給藥」意謂本文所述之組成物之給藥為同時、僅之前或僅之後於一或多種其他療法(例如癌症療法，諸如化學療法、激素療法、放射療法或免疫療法)之給藥。本發明之化合物可單獨給藥或可共給藥患者。共同給藥意謂包括個別或組合(超過一種化合物)之化合物同時或依序給藥。因此，需要時，製劑亦可與其他活性物質(例如減少代謝降解作用)組合。本發明之組成物可藉由經皮，藉由局部途徑傳遞，調配為敷藥棒、溶液、懸浮液、乳液、凝膠、乳膏、軟膏、糊劑、膠凍、塗劑、散劑及氣溶膠。

【0172】本發明之組成物另外可包括提供持續釋放及/或舒適之組分。此類組分包括高分子量之陰離子型黏液模擬聚合物、膠凝多醣及細粉狀藥物載劑基質。此等組分更詳細地論述於美國專利第 4,911,920 號、第 5,403,841 號、第 5,212,162 號及第 4,861,760 號。此等專利之整個內容以全文引用的方式併入本文中以達成所有目的。本發明之組成物亦可呈微球體傳遞以在體內緩釋。舉例而言，微球體

可經由皮內注射含有藥物之皮下緩慢釋放之微球體(參見 Rao, *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* 7:623-645, 1995)、呈生物可降解及可注射之凝膠調配物(參見例如 Gao *Pharm. Res.* 12:857-863, 1995)或呈經口給藥之微球體給藥(參見例如 Eyles, *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669-674, 1997)。在實施例中，本發明組成物之調配物可藉由使用與細胞膜融合或經吞噬之脂質體，亦即藉由採用附接於脂質體之結合於細胞表面膜蛋白受體，引起細胞吞噬之受體配位體傳遞。藉由使用脂質體，特別在脂質體表面載有對標靶細胞具有特異性之受體配位體，或以其他方式優先指向特定器官的情況下，可集中將本發明之組成物活體內傳遞至標靶細胞中。(參見例如 Al-Muhammed, *J. Microencapsul.* 13:293-306, 1996; Chonn, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-708, 1995; Ostro, *Am. J. Hosp. Pharm.* 46:1576-1587, 1989)。本發明之組成物亦可呈奈米粒子傳遞。

【0173】利用本文所提供之教示內容，可計畫不引起實質毒性，然而有效治療特定患者所顯示之臨床症狀的有效預防性或治療性治療方案。此計畫應包含藉由考慮諸如下列之因素謹慎選擇活性化合物：化合物效力、相對生物可用性、患者體重、不良副作用之存在及嚴重程度、較佳給藥模式及所選藥劑之毒性型態。

【0174】「抗癌劑」係根據其簡單常規含義使用且係指具有抗贅生性特性或能夠抑制細胞生長或增殖之組成物(例如化合物、藥物、拮抗劑、抑制劑、調節劑)。在實施

例中，抗癌劑為化學治療劑。在實施例中，抗癌劑為本文中鑒別之用於治療癌症之方法中的藥劑。在實施例中，抗癌劑為經 FDA 或除 USA 以外之國家的類似管理機構批准用於治療癌症之藥劑。

套組

【0175】在另一個態樣中，提供一種套組，其包括本文中提供之細胞滲透性結合物，包括其實施例，或如本文所提供之醫藥組成物，包括其實施例，及使用說明書。在實施例中，第一非細胞滲透性蛋白質、第二非細胞滲透性蛋白質、第一硫代磷酸酯核酸及第二硫代磷酸酯核酸處於獨立容器中。在實施例中，套組包括一或多種用於治療或預防疾病之一或多種症狀的其他藥劑。在實施例中，套組包括給藥組成物之方式，諸如注射器、針、管、導管、貼片及其類似物。套組亦可包括在使用之前需要殺菌及/或稀釋之調配物及/或物質。

實例

【0176】以下實例描述藉由附接於抗體之硫代磷酸酯化有義/反義 DNA 寡核苷酸之雜交，產生細胞滲透性雙特異性抗體-抗體結合物，以鎖定細胞內抗原及診斷偵測/治療介入。

【0177】實例 1. 經由附接之 DNA 寡核苷酸雜交產生雙特異性抗體

【0178】如以下更詳細地描述，本文中證明雙股硫代磷酸酯化 DNA 寡核苷酸結合於抗體使抗體能夠滲透細

胞，識別及結合於細胞內抗原。此外，申請者展示此策略能夠產生細胞滲透性雙特異性抗體，該等抗體可識別且結合於兩種預期細胞內標靶蛋白質。舉例而言，申請者展示附接分別對抗 STAT3 及抗 NFkB (p65) 抗體為有義及反義之硫代磷酸酯化 DNA 寡核苷酸允許使所選之核酸序列雜交。一旦雜交程序完成，與單一 IgG 抗體相比，藉助於預期分子量增加，純化偶合抗體(第 1 圖)。

【0179】藉由選擇附接於兩種不同抗體(例如抗 NFkB 及抗 STAT3)之硫代磷酸酯化寡核苷酸-有義及寡核苷酸-反義，可排除抗 STAT3-抗 STAT3 或抗 NFkB-抗 NFkB 之形成。雙特異性抗體之所得群體為純雙特異性。過量寡核苷酸及/或抗體蛋白質藉由凝膠過濾排除。

【0180】顯著地，有義及反義 DNA 寡核苷酸股之雜交產生連接所選抗體之雙股(ds)硫代磷酸酯化 DNA 寡核苷酸。DNA 寡核苷酸之硫代磷酸酯用作細胞內傳遞實體。

【0181】實例 2. 細胞滲透性雙特異性抗體對細胞內抗原 STAT3 及 NFkB (p65)之識別

【0182】人類淋巴瘤 Ly3 細胞與針對 STAT3 或 NFkB (p65)培養之用硫代磷酸酯化單鏈(ss) DNA 寡核苷酸修飾之單一抗體一起培育實現細胞內標靶之識別(第 2 圖)。因為 NFkB (p65) IgG 用硫代磷酸酯化有義 ssDNA-寡核苷酸修飾且 STAT3 IgG 用硫代磷酸酯化反義 ssDNA-寡核苷酸修飾，所以申請者推斷核酸序列並非細胞內傳遞之關鍵，其為細胞內抗原識別之先決條件。

【0183】然而，人類淋巴瘤 Ly3 細胞與藉由雜交之硫代磷酸酯化 dsDNA-寡核苷酸連接在一起之雙特異性抗 STAT3-抗 NFkB (p65)一起培育使得細胞內 STAT3 蛋白質及 NFkB (p65)蛋白質同時識別。

【0184】所有修飾抗體均藉由凝膠過濾來純化且在細胞上在 $10\ \mu\text{g/ml}$ 下在 37°C 下培育 2 小時。顯著地， $10\ \mu\text{g}$ 所產生之雙特異性抗體僅僅載有 50% $10\ \mu\text{g}$ 各單一抗體，如西方墨點法中之偵測所示，減少標靶識別。

【0185】流動式細胞量測術研究連同螢光標記之修飾抗體的影像一起進一步證明經修飾之細胞內抗體的細胞滲透(第 3 圖)。

實施例

【0186】實施例 1. 一種細胞滲透性結合物，其包含將第一非細胞滲透性蛋白質連接至第二蛋白質之硫代磷酸酯核酸，其中該硫代磷酸酯核酸增強該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二蛋白質之細胞內傳遞。

【0187】實施例 2. 如實施例 1 之細胞滲透性結合物，其中該第二蛋白質為第二非細胞滲透性蛋白質。

【0188】實施例 3. 如實施例 1 之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸為單股核酸。

【0189】實施例 4. 如實施例 1 之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸包含與第二硫代磷酸酯核酸雜交之第一硫代磷酸酯核酸，該第一硫代磷酸酯核酸附接於該第一非細胞滲透性蛋白質且該第二硫代磷酸酯核酸附接

於該第二蛋白質。

【0190】實施例 5. 如實施例 1 至 4 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸共價附接於該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質。

【0191】實施例 6. 如實施例 1 至 5 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸獨立地附接於該第一非細胞滲透性蛋白質之離胺酸、精胺酸、半胱胺酸或組胺酸。

【0192】實施例 7. 如實施例 6 之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸附接於該第一非細胞滲透性蛋白質之半胱胺酸。

【0193】實施例 8. 如實施例 1 至 7 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸獨立地附接於該第二非細胞滲透性蛋白質之離胺酸、精胺酸、半胱胺酸或組胺酸。

【0194】實施例 9. 如實施例 8 之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸附接於該第二非細胞滲透性蛋白質之半胱胺酸。

【0195】實施例 10. 如實施例 1 或 4 之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸經由第一連接子附接於該第一非細胞滲透性蛋白質且經由第二連接子附接於該第二蛋白質。

【0196】實施例 11. 如實施例 10 之細胞滲透性結合物，其中該第一連接子及該第二連接子獨立地為非共價連

接子。

【0197】實施例 12.如實施例 1 至 11 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸長度為約 10 個、20 個、30 個、40 個、50 個、60 個、70 個、80 個、90 個、100 個或更多個核酸殘基。

【0198】實施例 13.如實施例 12 之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸長度為約 10 個至約 30 個核酸殘基。

【0199】實施例 14.如實施例 13 之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸長度為約 20 個核酸殘基。

【0200】實施例 15.如實施例 1 至 14 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質獨立地具有超過 25 kD 之分子量。

【0201】實施例 16.如實施例 1 至 15 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質獨立地具有約 25 kD 至約 750 kD 之分子量。

【0202】實施例 17.如實施例 1 至 16 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質獨立地為抗體。

【0203】實施例 18.如實施例 17 之細胞滲透性結合物，其中該抗體為 IgG 抗體。

【0204】實施例 19.如實施例 17 之細胞滲透性結合物，其中該抗體為 IgA、IgM、IgD 或 IgE 抗體。

【0205】實施例 20.如實施例 17 之細胞滲透性結合物，其中該抗體為 scFv 片段。

【0206】實施例 21.如實施例 17 至 20 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該抗體為人源化抗體。

【0207】實施例 22.如實施例 17 至 20 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該抗體為治療抗體。

【0208】實施例 23.如實施例 1 至 22 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質或該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。

【0209】實施例 24.如實施例 23 之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。

【0210】實施例 25.如實施例 24 之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合相對於該第二非細胞滲透性蛋白質，不同之細胞內標靶。

【0211】實施例 26.如實施例 24 之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合相對於該第二非細胞滲透性蛋白質，該細胞內標靶上不同之抗原決定基。

【0212】實施例 27.如實施例 23 至 26 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為選自由以下所組成群組的疾病標靶：自體免疫疾病、發炎疾病、代謝病症、發育病症、心血管疾病、肝病、腸病、傳染性疾病、內分泌疾病、神經病症及癌症。

【0213】實施例 28.如實施例 23 至 27 中任一項之細胞

滲透性結合物，其中該細胞內標靶為信號傳導分子或轉錄因子。

【0214】實施例 29.如實施例 28 之細胞滲透性結合物，其中該信號傳導分子為磷酸酶或激酶。

【0215】實施例 30.如實施例 28 之細胞滲透性結合物，其中該轉錄因子為核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈強化子 (NF κ B) 蛋白。

【0216】實施例 31.如實施例 30 之細胞滲透性結合物，其中該 NF κ B 蛋白為 p65。

【0217】實施例 32.如實施例 28 至 31 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質結合 STAT3 蛋白且該第二非細胞滲透性蛋白質結合 NF κ B 蛋白。

【0218】實施例 33.如實施例 23 至 26 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為癌症標靶。

【0219】實施例 34.如實施例 23 至 26 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶係選自由 STAT3、NF κ B 及 Src 所組成之群組。

【0220】實施例 35.如實施例 34 之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為 STAT3。

【0221】實施例 36.如實施例 35 之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為 p65。

【0222】實施例 37.如實施例 1 至 36 中任一項之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二

非細胞滲透性蛋白質進一步包含附接於該蛋白質之標籤、小分子或功能性核酸。

【0223】實施例 38. 如實施例 1 至 37 中任一項之細胞滲透性結合物，其結合於細胞內標靶。

【0224】實施例 39. 一種形成細胞滲透性結合物之方法，該方法包含使附接於第一非細胞滲透性蛋白質之第一硫代磷酸酯核酸與附接於第二非細胞滲透性蛋白質之第二硫代磷酸酯核酸雜交，從而形成細胞滲透性結合物。

【0225】實施例 40. 如實施例 39 之方法，其在該雜交之前進一步包含：(i) 使該第一非細胞滲透性蛋白質與該第一硫代磷酸酯核酸接觸，從而形成第一蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物；(ii) 使該第二非細胞滲透性蛋白質與該第二硫代磷酸酯核酸接觸，從而形成第二蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物；以及(iii) 使該第一蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物與該第二蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物接觸。

【0226】實施例 41. 一種細胞，其包含如實施例 1 至 38 中任一項之細胞滲透性結合物。

【0227】實施例 42. 一種醫藥組成物，其包含如實施例 1 至 38 中任一項之細胞滲透性結合物及醫藥學上可接受之載劑。

【0228】實施例 43. 一種套組，其包含如實施例 1 至 38 中任一項之細胞滲透性結合物或如實施例 42 之醫藥組成物及使用說明書。

【0229】實施例 44. 如實施例 43 之套組，其中該第一

非細胞滲透性蛋白質、該第二非細胞滲透性蛋白質、該第一硫代磷酸酯核酸及該第二硫代磷酸酯核酸處於獨立容器中。

【0230】實施例 45.一種將非細胞滲透性蛋白質傳遞至細胞中之方法，其包含使該細胞與如實施例 1 至 38 中任一項之細胞滲透性結合物接觸。

【0231】實施例 46.如實施例 45 之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質結合細胞質中之核蛋白，從而形成第一非細胞滲透性蛋白質-核蛋白複合物。

【0232】實施例 47.如實施例 46 之方法，其中該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞質中之核蛋白，從而形成第二非細胞滲透性蛋白質-核蛋白複合物。

【0233】實施例 48.如實施例 47 之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質-核蛋白複合物及該第二非細胞滲透性蛋白質-核蛋白複合物不能進入該細胞之核。

【0234】實施例 49.一種治療有需要之個體之疾病的方法，該方法包含向個體給藥有效量之如實施例 1 至 38 中任一項之細胞滲透性結合物，從而治療該個體之該疾病。

【0235】實施例 50.如實施例 49 之方法，其中該疾病係選自由以下所組成之群組：自體免疫疾病、發育病症、發炎疾病、代謝病症、心血管疾病、肝病、腸病、傳染性疾病、內分泌疾病、神經病症及癌症。

【0236】實施例 51.如實施例 50 之方法，其中該疾病為癌症。

【0237】實施例 52.如實施例 49 之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質或該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。

【0238】實施例 53.如實施例 52 之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。

【0239】實施例 54.如實施例 53 之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合相對於該第二非細胞滲透性蛋白質，不同之細胞內標靶。

【0240】實施例 55.如實施例 53 之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合相對於該第二非細胞滲透性蛋白質，該細胞內標靶上不同之抗原決定基。

【0241】實施例 56.如實施例 52 至 55 中任一項之方法，其中該細胞內標靶為 STAT3、NF κ B 蛋白或 Src。

【0242】實施例 57.如實施例 56 之方法，其中該細胞內標靶為 p65。

【0243】實施例 58.如實施例 57 之方法，其中該細胞內標靶為 STAT3。

【0244】實施例 59.如實施例 52 之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質結合 STAT3 且該第二非細胞滲透性蛋白質結合 NF κ B 蛋白質。

【符號說明】

無。

發明摘要

※ 申請案號：105124954

※ 申請日：105/08/05

※ I P C 分類：
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

細胞滲透性蛋白質-抗體結合物及使用方法

CELL PENETRATING PROTEIN-ANTIBODY

CONJUGATES AND METHODS OF USE

【中文】

本文係提供細胞滲透性結合物。該結合物包括經由硫代磷酸酯核酸連接之非細胞滲透性蛋白質，其中該硫代磷酸酯核酸增強該非細胞滲透性蛋白質之細胞內傳遞。亦提供包括本文所提供之結合物的方法及套組。

【英文】

Provided herein are cell penetrating conjugates. The conjugates include non-cell penetrating proteins connected through a phosphorothioate nucleic acid, wherein the phosphorothioate nucleic acid enhances intracellular delivery of the non-cell penetrating proteins. Also provided are methods and kits including the conjugates provided herein.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

本案圖式皆為實驗數據，故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

申請專利範圍

1. 一種細胞滲透性結合物，其係包含將第一非細胞滲透性蛋白質連接至第二蛋白質之硫代磷酸酯核酸，其中該硫代磷酸酯核酸增強該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二蛋白質之細胞內傳遞。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第二蛋白質為第二非細胞滲透性蛋白質。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸為單股核酸。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸係包含與第二硫代磷酸酯核酸雜交之第一硫代磷酸酯核酸，該第一硫代磷酸酯核酸係附接於該第一非細胞滲透性蛋白質且該第二硫代磷酸酯核酸係附接於該第二蛋白質。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸係共價附接於該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸係獨立地附接於該第一非細胞滲透性蛋白質之離胺酸、精胺酸、半胱胺酸或組胺酸。
7. 如申請專利範圍第 6 項之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸係附接於該第一非細胞滲透性蛋白質之半胱胺酸。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述之細胞滲透性結合物，其中

該硫代磷酸酯核酸係獨立地附接於該第二非細胞滲透性蛋白質之離胺酸、精胺酸、半胱胺酸或組胺酸。

9. 如申請專利範圍第 8 項之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸係附接於該第二非細胞滲透性蛋白質之半胱胺酸。
10. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸係經由第一連接子附接於該第一非細胞滲透性蛋白質且經由第二連接子附接於該第二蛋白質。
11. 如申請專利範圍第 10 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一連接子及該第二連接子係獨立地為非共價連接子。
12. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸之長度為約 10 個、20 個、30 個、40 個、50 個、60 個、70 個、80 個、90 個、100 個或更多個核酸殘基。
13. 如申請專利範圍第 12 項所述之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸之長度為約 10 個至約 30 個核酸殘基。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述之細胞滲透性結合物，其中該硫代磷酸酯核酸之長度為約 20 個核酸殘基。
15. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質係獨立地具有超過 25 kD 之分子量。

16. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質係獨立地具有約 25 kD 至約 750 kD 之分子量。
17. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質係獨立地為抗體。
18. 如申請專利範圍第 17 項所述之細胞滲透性結合物，其中該抗體為 IgG 抗體。
19. 如申請專利範圍第 17 項所述之細胞滲透性結合物，其中該抗體為 IgA、IgM、IgD 或 IgE 抗體。
20. 如申請專利範圍第 17 項所述之細胞滲透性結合物，其中該抗體為 scFv 片段。
21. 如申請專利範圍第 17 項所述之細胞滲透性結合物，其中該抗體為人源化抗體。
22. 如申請專利範圍第 17 項所述之細胞滲透性結合物，其中該抗體為治療抗體。
23. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質或該第二非細胞滲透性蛋白質係結合細胞內標靶。
24. 如申請專利範圍第 23 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。
25. 如申請專利範圍第 24 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合相對於該第二非

細胞滲透性蛋白質之不同之細胞內標靶。

26. 如申請專利範圍第 24 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合相對於該第二非細胞滲透性蛋白質之該細胞內標靶上不同之抗原決定基。
27. 如申請專利範圍第 23 項所述之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為選自由以下各者所組成群組的疾病標靶：自體免疫疾病、發炎疾病、代謝病症、發育病症、心血管疾病、肝病、腸病、傳染性疾病、內分泌疾病、神經病症及癌症。
28. 如申請專利範圍第 23 項所述之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為信號傳導分子或轉錄因子。
29. 如申請專利範圍第 28 項所述之細胞滲透性結合物，其中該信號傳導分子為磷酸酶或激酶。
30. 如申請專利範圍第 28 項所述之細胞滲透性結合物，其中該轉錄因子為核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈強化子 (NF κ B) 蛋白。
31. 如申請專利範圍第 30 項所述之細胞滲透性結合物，其中該 NF κ B 蛋白為 p65。
32. 如申請專利範圍第 28 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合 STAT3 蛋白且該第二非細胞滲透性蛋白質係結合 NF κ B 蛋白。
33. 如申請專利範圍第 23 項所述之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為癌症標靶。

34. 如申請專利範圍第 23 項所述之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶係選自由 STAT3、NF κ B 及 Src 所組成之群組。
35. 如申請專利範圍第 34 項所述之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為 STAT3。
36. 如申請專利範圍第 35 項所述之細胞滲透性結合物，其中該細胞內標靶為 p65。
37. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質係進一步包含附接於該蛋白質之標籤、小分子或功能性核酸。
38. 如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，其係結合於細胞內標靶。
39. 一種形成細胞滲透性結合物之方法，該方法係包含使附接於第一非細胞滲透性蛋白質之第一硫代磷酸酯核酸與附接於第二非細胞滲透性蛋白質之第二硫代磷酸酯核酸雜交，從而形成細胞滲透性結合物。
40. 如申請專利範圍第 39 項所述之方法，其在該雜交之前進一步係包含：
- (i) 使該第一非細胞滲透性蛋白質與該第一硫代磷酸酯核酸接觸，從而形成第一蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物；
 - (ii) 使該第二非細胞滲透性蛋白質與該第二硫代磷酸酯核酸接觸，從而形成第二蛋白質-硫代磷酸酯核

酸複合物；以及

(iii) 使該第一蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物與該第二蛋白質-硫代磷酸酯核酸複合物接觸。

41. 一種細胞，其係包含如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物。
42. 一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物及醫藥學上可接受之載劑。
43. 一種套組，其係包含如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物或如申請專利範圍第 42 項所述之醫藥組成物及使用說明書。
44. 如申請專利範圍第 43 項所述之套組，其中該第一非細胞滲透性蛋白質、該第二非細胞滲透性蛋白質、該第一硫代磷酸酯核酸及該第二硫代磷酸酯核酸係處於獨立容器中。
45. 一種將非細胞滲透性蛋白質傳遞至細胞中之方法，其係包含使該細胞與如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物接觸。
46. 如申請專利範圍第 45 項所述之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質結合細胞質中之核蛋白，從而形成第一非細胞滲透性蛋白質-核蛋白複合物。
47. 如申請專利範圍第 46 項所述之方法，其中該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞質中之核蛋白，從而形成第二非細胞滲透性蛋白質-核蛋白複合物。
48. 如申請專利範圍第 47 項所述之方法，其中該第一非細

胞滲透性蛋白質-核蛋白複合物及該第二非細胞滲透性蛋白質-核蛋白複合物不能進入該細胞之核。

49. 一種治療有需要之個體疾病的方法，該方法包含向個體給藥有效量之如申請專利範圍第 1 項所述之細胞滲透性結合物，從而治療該個體之該疾病。
50. 如申請專利範圍第 49 項所述之方法，其中該疾病係選自由以下各者所組成之群組：自體免疫疾病、發育病症、發炎疾病、代謝病症、心血管疾病、肝病、腸病、傳染性疾病、內分泌疾病、神經病症及癌症。
51. 如申請專利範圍第 50 項所述之方法，其中該疾病為癌症。
52. 如申請專利範圍第 49 項所述之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質或該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。
53. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質及該第二非細胞滲透性蛋白質結合細胞內標靶。
54. 如申請專利範圍第 53 項所述之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合相對於該第二非細胞滲透性蛋白質之不同之細胞內標靶。
55. 如申請專利範圍第 53 項所述之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質係結合相對於該第二非細胞滲透性蛋白質之該細胞內標靶上不同之抗原決定基。
56. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該細胞內標



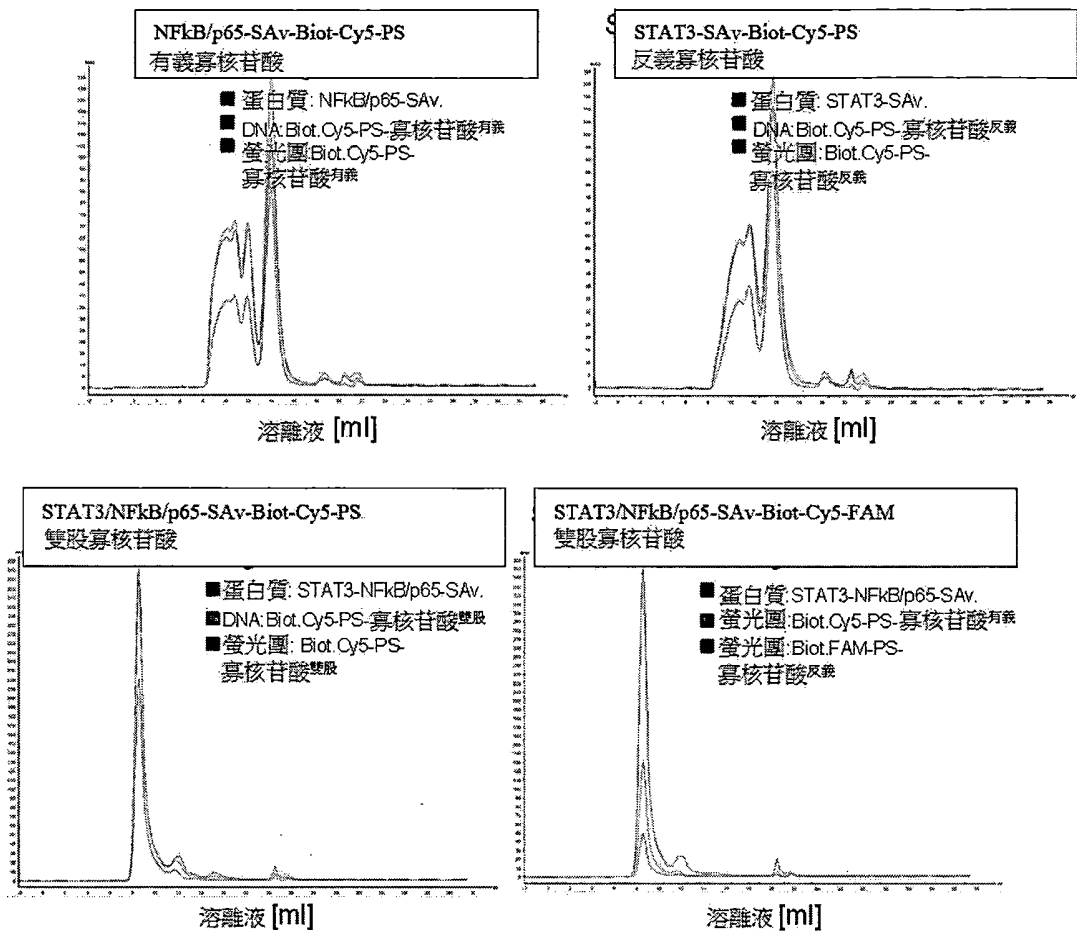
靶為 STAT3、NF κ B 蛋白或 Src。

57. 如申請專利範圍第 56 項所述之方法，其中該細胞內標靶為 p65。

58. 如申請專利範圍第 57 項所述之方法，其中該細胞內標靶為 STAT3。

59. 如申請專利範圍第 52 項所述之方法，其中該第一非細胞滲透性蛋白質結合 STAT3 且該第二非細胞滲透性蛋白質結合 NF κ B 蛋白質。

圖式



第1圖

