



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104080480 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201280068167. 0

A61P 35/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 12. 31

(30) 优先权数据

61/582, 373 2012. 01. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2012/000405 2012. 12. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/098813 EN 2013. 07. 04

(71) 申请人 奇比艾企业有限公司

地址 以色列耐斯茨奥纳

申请人 雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司

(72) 发明人 埃琳娜·费因斯坦 丹·培尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书44页

序列表24页 附图19页

(54) 发明名称

用于选择性递送治疗剂和诊断剂的 ENDO180
靶向微粒

(57) 摘要

本文公开了包含基于脂质的微粒和抗 ENDO180 抗体的组合物以及使用它们将治疗剂靶向递送至癌症和纤维化细胞以用于治疗包括纤维化、癌症的细胞增生性疾病或病症和减弱肿瘤进展的方法。

1. 一种组合物,其包含 a) 基于脂质的载体部分 ;b)END0180 靶向部分 ;和 c) 有效量的治疗剂或诊断剂或它们的组合 ;其中所述载体部分和所述靶向部分共价结合。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述载体部分和所述靶向部分经由用合成聚合物、天然聚合物或半合成聚合物对所述载体部分进行的表面修饰共价结合。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述合成聚合物包含 PEG 部分。

4. 根据权利要求 3 所述的组合物,其中所述 PEG 部分包括 NHS-PEG-DSPE[3-(N-琥珀酰亚氨基戊二酰基)氨基丙基,聚乙二醇-氨基甲酰基二硬脂酰磷脂酰-乙醇胺]。

5. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中所述天然聚合物包括多糖或糖胺聚糖。

6. 根据权利要求 5 所述的组合物,其中所述糖胺聚糖包括透明质酸。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的组合物,其中所述 END0180 靶向部分包含 END0180 结合蛋白,所述 END0180 结合蛋白结合存在于细胞上的 END0180 多肽的细胞外结构域并通过所述 END0180 多肽被内化至细胞内。

8. 根据权利要求 7 所述的组合物,其中所述 END0180 结合蛋白包括 END0180 抗体或其能够结合 END0180 的功能片段。

9. 根据权利要求 8 所述的组合物,其中所述 END0180 抗体或其能够结合 END0180 的功能片段选自:完整的 IgG、单克隆抗体、多克隆抗体、人抗体、人源化抗体、人源化抗原结合片段、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、其重链和 / 或轻链的可变部分、Fab 微型抗体、和 scFv 或它们的组合。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的组合物,其中所述 END0180 抗体或其功能片段选自:

a. 分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其由以登记号 LMBP7203CB 保藏于 BCCM 的杂交瘤细胞系 E3-8D8 产生;

b. 与 (a) 的抗体结合至相同的表位的抗体或其抗原结合片段;

c. (a) 的抗体或其抗原结合片段的人源化形式,或 (b) 的抗体或抗原结合片段的人源化形式;

d. (a) 的抗体或其抗原结合片段的嵌合形式,或 (b) 的抗体或抗原结合片段的嵌合形式;

e. 包含 (a) 的抗体的抗原结合结构域的重组多肽或其抗原结合片段,其通过所述 END0180 受体被内化至细胞内;

f. 抗体的抗原结合片段,其包含与 SEQ ID NO:6 基本相似的多肽;以及

g. 重组多肽,其包含具有与列于 SEQ ID NO:7 和 8 的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列的 CDR。

11. 根据权利要求 8 至 10 中任一项所述的组合物,其中所述 END0180 抗体或其功能片段包含所述分离的单克隆抗体的人源化形式的抗原结合片段。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的组合物,其中所述基于脂质的载体部分包含脂质微粒。

13. 根据权利要求 12 所述的组合物,其中所述脂质微粒包含选自以下的一种或多种脂质:磷脂酰胆碱或其衍生物、磷脂酰甘油或其衍生物、和磷脂酰乙醇胺 (PE) 或其衍生物、或它们的组合。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的组合物,其中所述脂质微粒还包含一种或多种阳离子

脂质。

15. 根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的组合物,其中所述脂质微粒还包含胆固醇。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物,其中所述脂质微粒包含二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)和胆固醇。

17. 根据权利要求 16 所述的组合物,其中所述脂质微粒还包含氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)。

18. 根据权利要求 17 所述的组合物,其中所述脂质微粒包含摩尔比为约 4.5:20:75:0.5(DOPE:HSPC:Chol:NHS-PEG-DSPE)的DOPE、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、胆固醇(Chol)和PEG部分NHS-PEG-DSPE。

19. 根据权利要求 16 至 18 中任一项所述的组合物,其中所述脂质微粒还包含DOTMA。

20. 根据权利要求 19 所述的组合物,其中所述脂质微粒包含摩尔比为约 4:2:1(DOPE:DOTMA:Chol)的二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二-O-十八烯基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)和胆固醇(Chol)。

21. 根据权利要求 15 所述的组合物,其中所述脂质微粒包含DPPE和胆固醇。

22. 根据权利要求 21 所述的组合物,其中所述脂质微粒还包含大豆PC。

23. 根据权利要求 22 所述的组合物,其中所述脂质微粒包含摩尔比为约 3:1:1(大豆PC:DPPE:胆固醇)的大豆PC、DPPE和胆固醇。

24. 根据权利要求 1 至 23 中任一项所述的组合物,其中所述脂质微粒的直径为约 85 至约 200nm,优选为约 85 至约 130nm。

25. 根据权利要求 1 至 24 中任一项所述的组合物,其中所述脂质微粒包含约(-7)至约(-40)的 ζ 电势。

26. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述组合物包含诊断剂,所述诊断剂为选自放射性同位素、荧光团、发光剂、磁性标记和酶标记的显像剂。

27. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述组合物包含至少一种选自核酸化合物和非核酸化合物或它们的组合的治疗剂。

28. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中所述非核酸化合物选自小分子、肽、多肽、肽模拟物、糖脂和抗体或它们的组合。

29. 根据权利要求 28 所述的组合物,其中所述治疗剂包括多柔比星或丝裂霉素。

30. 根据权利要求 28 所述的组合物,其中所述核酸选自反义化合物、化学修饰的双链RNA化合物、未修饰的双链RNA化合物、化学修饰的shRNA化合物、未修饰的shRNA化合物、化学修饰的miRNA化合物和未修饰的miRNA化合物、化学修饰的siRNA、未化学修饰的siRNA和核酶或它们的组合。

31. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中所述治疗剂为选自化学修饰的siRNA化合物和未修饰的siRNA化合物的dsRNA分子。

32. 一种治疗患有增生性病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1 至 31 中任一项所述的组合物。

33. 根据权利要求 1 至 31 中任一项所述的组合物,其用于治疗。

34. 根据权利要求 33 所述的组合物,其中所述治疗包括增生性病症的治疗。

35. 根据权利要求 32 至 34 中的任一项所述的方法或组合物,其中所述组合物为全身施

用。

36. 根据权利要求 32 或 34 所述的方法或组合物,其中所述增生性病症选自实体瘤、造血系统肿瘤、转移、纤维化和巨噬细胞相关的病症。

37. 根据权利要求 36 所述的方法或组合物,其中所述增生性病症为实体瘤或造血系统肿瘤。

38. 根据权利要求 37 所述的方法或组合物,其中所述肿瘤选自卵巢肿瘤、乳腺肿瘤、成骨性癌 / 骨细胞癌、前列腺癌、头颈癌、白血病、肾细胞癌和移行细胞癌。

39. 根据权利要求 36 所述的方法或组合物,其中所述巨噬细胞相关的病症包括炎症或动脉粥样硬化。

40. 一种用于诊断受试者的增生性病症的方法,所述方法包括使来自所述受试者的身体样品与包含 a) 载体部分 ;b)END0180 靶向部分和 c) 诊断剂的组合物接触 ;并将所述生物样品中诊断剂的水平与来自健康受试者的参考样品中诊断剂的水平或与已知标准进行比较。

用于选择性递送治疗剂和诊断剂的 END0180 靶向微粒

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2012 年 1 月 1 日提交的标题为“END0180-Targeted Particles for Selective Delivery of Therapeutic and Diagnostic Agents”的美国临时申请序列号 61/582373 的权益并且该专利全文出于所有目的以引用方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请通过引用并入存在于文件名为“230-PCT1_SEQLISTING.ST25.txt”中的核苷酸和 / 或氨基酸序列,所述文件大小为 33 千字节,并且以与 MS-Windows 具有操作系统兼容性的 IBM-PCT 机器格式创建于 2012 年 12 月 31 日。

发明领域

[0005] 本文公开了包含载体部分(诸如基于脂质的微粒)和抗 END0180 靶向部分(诸如抗 END0180 抗体)的组合物以及使用其将治疗剂和 / 或诊断剂递送至表达 END0180 的细胞和组织的方法,所述表达 END0180 的细胞和组织包括肿瘤细胞、巨噬细胞、内皮细胞和纤维化细胞。所述组合物和方法可用于治疗细胞增生性疾病或病症(包括纤维化、癌症或炎症)并且用于控制(调节)肿瘤进展。

[0006] 发明背景

[0007] END0180 受体,也称为 CD280、uPARAP(尿激酶纤溶酶原激活物受体相关蛋白)和甘露糖受体 C2 型(MRC2),为指导结合的配体在胞内体中降解的循环内吞受体。它作为与尿激酶型纤溶酶激活物(uPA)和尿激酶型纤溶酶激活物受体(uPAR)形成的三重复合物的部分,并且参与由纤溶酶原生成纤溶酶。进而已知纤溶酶在细胞外基质(ECM)周转(turnover)和潜在的 TGF- β 至其活性形式的蛋白水解转化中起作用。

[0008] END0180 与巨噬细胞甘露糖受体家族:甘露糖受体、磷脂酶 A2 和 DEC-205/MR6 共享同源性(Isacke 等,1990Mol. Cell. Biol. 10:2606-2618;Sheikh 等,2000,J. Cell. Sci. 113:1021-1032;Behrendt 等,2000,J. Biol. Chem. 275:1993-2002)。END0180 在甘露糖受体的家族中是不寻常的,因为它由质膜被靶向循环的胞内体而并不靶向晚期胞内体 / 溶酶体区室(Howard 和 Isacke,2002. JBC 35:32320-31)并且在细胞运动和通过促进细胞迁移和摄取用于细胞内降解的胶原来重塑细胞外基质中起作用(Behrendt. 2004Biol Chem. 385(2):103-36;Kjoller 等,2004Exp Cell Res. 293(1):106-16;Wienke 等,2007Cancer Res. 67(21):10230-40)。

[0009] PCT 专利申请公布号 WO 2004/100759 分别涉及诊断和治疗与 END0180 相关的疾病的方法。PCT 专利申请公布号 WO 2010/111198 提供了抗 END0180 抗体、包含它们的组合物及其用途。

[0010] 脂质复合物

[0011] US 2009/0232730 公开了用于制备免疫脂质体的方法。US2010/0008937 公开了白细胞选择性递送剂。

[0012] 用于递送治疗剂和诊断剂的靶向系统将具有很高的价值。

[0013] 发明概述

[0014] 本文公开了用于将治疗剂和 / 或诊断剂选择性且靶向递送至异常增生细胞的组合物。所述组合物包含 END0180 靶向部分和载体部分,还包含治疗剂和 / 或诊断剂,用于将治疗剂或诊断剂靶向递送至表达 END0180 受体的细胞。所述组合物可用于将至少一种诊断剂和 / 或治疗剂靶向递送至表达 END0180 受体的细胞的细胞内空间,所述至少一种诊断剂和 / 或治疗剂包括小分子诸如寡核苷酸、抗体或其片段、多肽或肽或它们的组合。不希望受到理论的束缚,END0180 受体为在纤维化组织和肿瘤中活化的成肌细胞上以及在肿瘤细胞的亚群上、在巨噬细胞上和在内皮细胞上特异性表达的内吞受体。

[0015] 在一个方面,本文公开了一种组合物,其包含 a) 载体部分 ;b)END0180 靶向部分 ;和 c) 有效量的治疗剂和 / 或诊断剂。

[0016] 在一些实施方案中,所述载体部分包括基于脂质的载体,优选脂质微粒 (也称为基于脂质的纳米微粒)。在一些实施方案中,所述载体部分和所述靶向部分共价结合或非共价缔合。在优选的实施方案中,所述载体部分包括共价结合至所述靶向部分的脂质微粒。在一些实施方案中,所述脂质微粒和所述靶向部分经由用合成聚合物、天然聚合物或半合成聚合物 (包含天然成分和合成成分) 对脂质体进行的表面修饰共价结合。在一些实施方案中,所述合成聚合物包含 PEG 部分。在一些实施方案中,所述 PEG 部分包括 NHS-PEG-DSPE[3-(N- 琥珀酰亚氨基戊二酰基) 氨基丙基,聚乙二醇 - 氨基甲酰基二硬脂酰磷脂酰 - 乙醇胺]。在一些实施方案中,所述天然聚合物包括糖类,所述糖类包括多糖和 / 或糖胺聚糖。在一些实施方案中,所述糖胺聚糖包括透明质酸。

[0017] 可以将所述聚合物从头开始掺入到脂质体组合物或可以与制备的脂质微粒组合。

[0018] 在一些实施方案中,所述 END0180 靶向部分包含 END0180 结合蛋白,所述 END0180 结合蛋白结合存在于细胞上的 END0180 多肽的细胞外结构域并通过所述 END0180 多肽被内化至所述细胞内。在一些实施方案中,所述 END0180 多肽与列于 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列基本相同,所述氨基酸序列由与列于 SEQ ID NO:1 的核酸序列基本相同的多核苷酸编码。在一些实施方案中,所述 END0180 结合蛋白包括 END0180 抗体或其能够结合 END0180 的功能片段。

[0019] 在一些实施方案中,所述 END0180 靶向剂选自

[0020] a. 分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其由以登记号 LMBP7203CB 保藏于 BCCM 的杂交瘤细胞系 E3-8D8 产生 ;

[0021] b. 与 (a) 的抗体结合至相同的表位的抗体或其抗原结合片段 ;

[0022] c. (a) 的抗体或其抗原结合片段的人源化形式,或 (b) 的抗体或抗原结合片段的人源化形式 ;

[0023] d. (a) 的抗体或其抗原结合片段的嵌合形式,或 (b) 的抗体或抗原结合片段的嵌合形式 ;

[0024] e. 包含 (a) 的抗体的抗原结合结构域的重组多肽或其抗原结合片段,其通过 END0180 受体被内化至细胞内 ;

[0025] f. 抗体的抗原结合片段,其包含与 SEQ ID NO:6 基本相似的多肽 ;以及

[0026] g. 重组多肽,其包含具有与列于 SEQ ID NO:7 和 8 的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列的 CDR。

[0027] 在一些实施方案中,所述抗体或其片段为人源化抗体或嵌合抗体或其片段。

[0028] E3-8D8 单克隆抗体也称为 8D8、e3b3 和 8D8E3B3。在优选的实施方案中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段;所述单克隆抗体的人源化形式的抗体或其抗原结合片段;或所述单克隆抗体的嵌合形式的抗体或其抗原结合片段结合于细胞表面上的 ENDO180 并被内化至细胞内。

[0029] 在一些实施方案中,所述 ENDO180 抗体选自:完整的 IgG、单克隆抗体、多克隆抗体、人抗体、人源化抗体、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、其重链和 / 或轻链的可变部分、Fab 微型抗体 (MB) 和 scFv 或它们的组合。在一些实施方案中,所述 ENDO180 抗体为结合于与以登记号 LMBP 7203CB 保藏于 BCCM 的杂交瘤细胞系 E3-8D8 产生的单克隆抗体相同表位的抗体或其片段;在一些实施方案中,所述 ENDO180 抗体为由以登记号 LMBP 7203CB 保藏于 BCCM 的杂交瘤细胞系 E3-8D8 产生的单克隆抗体的人源化形式的抗体或人源化抗体或其片段。在一些实施方案中,所述 ENDO180 抗体为包含含有列于 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的抗原结合结构域的重组多肽或其保留了特异性结合 ENDO180 的能力的变体。在一些实施方案中,所述 ENDO180 抗体为包含 CDR (诸如重链 CDR3 结构域) 的重组多肽,所述重链 CDR3 结构域具有与列于 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列或其含有一个或多个保守氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,所述变体保留了特异性结合 ENDO180 的能力。在一些实施方案中,所述抗体还包含 CDR, 诸如轻链 CDR3 结构域,所述轻链 CDR3 结构域具有与列于 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列或其变体。在一些实施方案中,所述变体保留了特异性结合 ENDO180 的能力。

[0030] 在一些实施方案中,所述 ENDO180 靶向部分包含 scFv 重组多肽,其包含由杂交瘤细胞系 E3-8D8 (BCCM 登记号 LMBP 7203CB) 产生的单克隆抗体的抗原结合结构域。

[0031] 在一些实施方案中,所述 ENDO180 靶向部分包含 scFv 重组多肽,其包含列于 SEQ ID NO:6 (微型抗体, MB) 的氨基酸序列或其变体,所述变体保留了特异性结合 ENDO180 的能力。在具体实施方案中,对 ENDO180 受体表现出结合亲和力且包含列于 SEQ ID NOS:7 和 8 的 CDR3 结构域的抗体在抗体与受体接触时通过所述受体被内化至表达 ENDO180 的细胞内。

[0032] 在一些实施方案中,所述脂质微粒包含磷脂酰胆碱或其衍生物、磷脂酰甘油或其衍生物、或磷脂酰乙醇胺或其衍生物或它们的组合。在一些实施方案中,所述脂质微粒包含二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、大豆磷脂酰胆碱 (大豆 PC)、卵磷脂酰胆碱 (卵 PC)、氢化卵磷脂酰胆碱 (HEPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG)、二月桂酰磷脂酰甘油 (DLPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG)、二肉豆蔻酰磷脂酸 (DMPA)、二硬脂酰磷脂酸 (DSPA)、二月桂酰磷脂酸 (DLPA)、二棕榈酰磷脂酸 (DPPA) 中的一种或多种。在一些实施方案中,所述脂质微粒包含阳离子脂质,诸如一种或多种选自 DOTMA 和 DOTP 或它们的组合的阳离子脂质。

[0033] 在一些实施方案中,所述脂质微粒包含氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、大豆磷脂酰胆碱 (大豆 PC)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 中的一种或多种。在一些实施方案中,所述脂质微粒包含二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)。在一些实施方案中,所述脂质微粒包含 1, 2- 双 (二苯基膦基) 乙烷 (DPPE)。在一些实施方案中,所述脂质微粒还包含胆固醇。在一些实施方案中,所述脂质微粒还包含大豆 PC。

[0034] 在一些实施方案中,所述脂质微粒包含 DOPE 和胆固醇。

[0035] 在一个实施方案中,所述脂质微粒包含 HSPC、胆固醇和 DOPE。在其它实施方案中,所述脂质微粒包含 DOPE、胆固醇和 DOTMA。在其它实施方案中,所述脂质微粒包含 HSPC、胆固醇、DOPE 和 DOTMA。

[0036] 在一些优选的实施方案中,脂质微粒包含摩尔比为约 4 : 2 : 1 (DOPE : DOTMA:Chol) 的二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、1, 2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷 (DOTMA) 和胆固醇 (Chol)。

[0037] 在其它优选的实施方案中,所述脂质微粒包含摩尔比为约 4.5:20:75:0.5 (DOPE:HSPC:Chol:NHS-PEG-DSPE) 的 DOPE、氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、胆固醇和 NHS-PEG-DSPE。在一些实施方案中,所述脂质微粒还包含 DOTMA。

[0038] 在其它优选的实施方案中,所述脂质微粒包含摩尔比为约 3 : 1 : 1 (大豆 PC:DPPE:胆固醇) 的大豆 PC、1, 2-双(二苯基膦基)乙烷 (DPPE) 和胆固醇。

[0039] 在一些实施方案中,所述脂质微粒的直径为约 85nm 至约 300nm,优选小于 200nm,诸如直径为约 85nm 至约 150nm。

[0040] 在一些实施方案中,所述脂质微粒包含约 (-7) 至约 (-60),优选约 (-7) 至 (-40),优选约 (-7) 至 (-18) 的 ζ 电势。

[0041] 在一些实施方案中,所述组合物还包含包括诊断剂和 / 或治疗剂中至少一者的部分。在一些实施方案中,所述诊断剂包含可检测标记,诸如选自放射性同位素、荧光团、发光剂、磁性标记和酶标记的显像剂。

[0042] 在一些实施方案中,所述治疗剂包括化疗剂、核酸、肽、多肽或肽模拟物及其功能性片段的抗体中的一种或多种。在一些实施方案中,所述化疗剂为小分子。在一些实施方案中,所述小分子为多柔比星 (doxorubicin) 或丝裂霉素 (doxorubicin)。

[0043] 在一些实施方案中,所述治疗剂选自核酸和非核酸。

[0044] 在一些实施方案中,所述非核酸化合物选自小分子、肽、多肽、肽模拟物、糖脂和抗体或它们的组合。

[0045] 在一些实施方案中,所述治疗剂为选自以下的核酸:反义化合物、化学修饰的 dsRNA 化合物、未修饰的 dsRNA 化合物、化学修饰的 siRNA 化合物、未修饰的 siRNA 化合物、化学修饰的 shRNA 化合物、未修饰的 shRNA 化合物、化学修饰的 miRNA 化合物和未修饰的 miRNA 化合物、核酶或它们的组合。在各种优选的实施方案中,所述治疗剂为化学修饰的 siRNA。在一些优选的实施方案中,所述治疗剂为未修饰的 siRNA 化合物。

[0046] 在一些优选的实施方案中,所述脂质微粒包含二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、1, 2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷 (DOTMA) 和胆固醇 (Chol)、透明质酸、抗 END0180 抗体或人源化或嵌合抗 END0180 抗体的抗原结合片段以及选自多柔比星、丝裂霉素 C 和治疗性核酸分子的治疗剂。在一些实施方案中,所述二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、1, 2-二-0-十八烯基-3-三甲基铵丙烷 (DOTMA) 和胆固醇 (Chol) 以约 4:2:1 (DOPE:DOTMA:Chol) 的摩尔比存在。

[0047] 在其它优选的实施方案中,所述脂质微粒包含 DOPE、氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、胆固醇和 NHS-PEG-DSPE、抗 END0180 抗体或人源化或嵌合抗 END0180 抗体的抗原结合片段以及选自多柔比星、丝裂霉素 C 和治疗性核酸分子的治疗剂。在一些实施方案中,

所述脂质微粒还包含 DOTMA。在一些实施方案中,所述 DOPE、氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、胆固醇和 NHS-PEG-DSPE 以约 4.5:20:75:0.5 (DOPE:HSPC:Chol:NHS-PEG-DSPE) 的摩尔比存在。

[0048] 在其它优选的实施方案中,所述脂质微粒包含大豆 PC、1,2-双(二苯基膦基)乙烷 (DPPE) 和胆固醇、透明质酸、抗 END0180 抗体或人源化或嵌合抗 END0180 抗体的抗原结合片段以及选自多柔比星、丝裂霉素 C 和治疗性核酸分子的治疗剂。在一些实施方案中,所述大豆 PC、1,2-双(二苯基膦基)乙烷 (DPPE) 和胆固醇以约 3:1:1 (大豆 PC:DPPE:胆固醇) 的摩尔比存在。

[0049] 在另一方面,本文提供了治疗患有增生性病症的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含 a) 载体部分;b)END0180 靶向部分和 c) 治疗剂。

[0050] 在另一方面,本文提供了用于治疗组合物的组合物,所述组合物包含 a) 载体部分;b)END0180 靶向部分和 c) 治疗剂。

[0051] 在另一方面,本文提供了用于治疗增生性病症的组合物,所述组合物包含 a) 载体部分;b)END0180 靶向部分和 c) 治疗剂。

[0052] 在一些实施方案中,所述组合物被全身施用。

[0053] 在一些实施方案中,所述增生性病症选自实体瘤、造血系统肿瘤、转移、纤维化和巨噬细胞相关的病症。在一些实施方案中,所述增生性病症为实体瘤或造血系统肿瘤。

[0054] 在一些实施方案中,所述肿瘤为卵巢肿瘤、乳腺肿瘤、成骨性癌/骨细胞性癌、前列腺癌、头颈癌、白血病、肾细胞癌或移行细胞癌。

[0055] 在一些实施方案中,所述纤维化为肝纤维化、骨髓纤维化、出于任何原因的肾纤维化 (CKD, 包括晚期肾病, ESRD); 肺纤维化 (包括间质性肺纤维化 ILF); 与所有可能类型的皮肤意外损伤和医源性损伤 (操作) 相关的异常疤痕 (瘢痕瘤); 硬皮病; 心肌纤维化、青光眼滤过术故障; 肠粘附。

[0056] 在一些实施方案中,所述巨噬细胞相关的病症为炎症或动脉粥样硬化。

[0057] 疾病和病症的非限制性实例包括:

[0058] 1. 其中 END0180 在肿瘤和肿瘤基质细胞 (活化的肌成纤维细胞、新血管系统和巨噬细胞-单核细胞系的浸润细胞) 中表达的软组织肉瘤;

[0059] 2. 其中 END0180 在肿瘤基质细胞 (活化的肌成纤维细胞、新血管系统和巨噬细胞-单核细胞系的浸润细胞) 中表达的癌;

[0060] 3. 表达 END0180 并经历上皮-间质转换从而获得高转移潜力的癌;

[0061] 4. 例如由巨噬细胞-单核细胞系表达 END0180 的白血病;

[0062] 5. 例如具有活化的肌成纤维细胞的肾脏、肺和肝脏的纤维化疾病

[0063] 6. 与巨噬细胞相关的疾病和病症,包括动脉粥样硬化和慢性炎症。

[0064] 在另一方面,本文提供了诊断受试者的增生性病症的方法,所述方法包括使来自所述受试者的生物样品与包含 a) 载体部分;b)END0180 靶向部分和 c) 诊断剂的组合物接触;并将生物样品中诊断剂的水平与参考样品 (诸如来自健康受试者的生物样品) 中诊断剂的水平进行比较。

[0065] 在一些实施方案中,用于诊断的生物样品可以取自体液或取自组织。在一些实施

方案中,所述体液选自以下流体:血液、淋巴液、腹水、浆液、胸腔积液、痰液、脑脊髓液、泪液、滑液、唾液、粪便、精液、血液和尿液。

[0066] 在以下附图、发明详述和权利要求书中更详细地解释本发明。

[0067] 附图简述

[0068] 图 1 提供了产生用于核酸 (NA) 分子递送的靶向纳米微粒的方法的示意图。

[0069] 图 2A 和 2B 示出了与 $1\mu\text{g/ml}$ 抗 END0180mAb ;克隆 8D8、克隆 10C12、微型抗体和第二抗体 FITC 山羊抗小鼠 ($1.5\mu\text{g/ml}$) 温育的 NRK-END0180 (2A)、A549 (2B) 细胞系的流式细胞术分析。为清楚起见,对示出结合于抗 END0180 的细胞的峰进行了标记。

[0070] 图 3A 和 3B 示出了与 $1\mu\text{g/ml}$ 抗 END0180mAb ;克隆 8D8、克隆 10C12 和微型抗体以及第二抗体 FITC 山羊抗小鼠 ($1.5\mu\text{g/ml}$) 温育的 LLC END0180 (3A)、DU145END0180 (3B) 细胞系的流式细胞术分析。为清楚起见,对示出结合于抗 END0180 的细胞的峰进行了标记。

[0071] 图 4A-4D 示出了与 $1\mu\text{g/ml}$ 抗 END0180mAb 温育的 DU145END0180 (4A)、DU145 初始细胞 (4B)、NRK END0180 (稳定转染) (4C) 和 A549 (4D) 细胞系的流式细胞术分析;与对照未染色的细胞 (红线,在所有图中最左边的峰) 相比,将克隆 8D8 (橙线,在所有图中最右边的峰) 和微型抗体 (新批次,蓝线,在所有图中中间的峰) 均用 Alexa fluor-647 标记。

[0072] 图 5A-5D 使用共聚焦显微镜示出了将 END0180mAb:8D8mAb 内化至 NRK-END0180 (5A) 将新的批次的微型抗体内化至 A549 细胞系 (5B) 和将 8D8mAb 内化至 A549 (5C 和 5D) 的细胞。在 37°C 与 Alexa488 标记的 mAb (红色,左峰), (每个为 $5.0\mu\text{g/ml}$)、Hoechst (天蓝色, H33342) 1:10,000、Cell Tracker™ (绿色, DiI18 (5)-DS 1:5000) 温育 1 小时。图 5A 和 5c 中的箭头示出了指示细胞中存在标记的抗体的荧光。

[0073] 图 6A-6D 示出 8D8HA- 脂质微粒 (用若丹明 -DPPE 制备, $50\mu\text{l}$) 至 A549 的内化:将细胞用 Concavalin A ($1.5\mu\text{g/ml}$) 和 Hoechst 试剂 (1:10,000) 染色分别用于膜和核标记。6A. 将细胞在 37°C 下仅与脂质微粒温育 1h。6B, 6C- 在 37°C 下与涂覆有 8D8 的脂质微粒温育 1h - 检测特异性内化。6D. 在 4°C 下 8D8 脂质微粒的温育 (X525) - 未观察到进入。

[0074] 图 7A-7D 示出 8D8HA- 脂质微粒至 NRK 细胞的内化:将细胞用 Concavalin A ($1.5\mu\text{g/ml}$) 和 Hoechst 试剂 (1:10,000) 染色分别用于膜和核标记。7A. 将 NRK 初始细胞在 37°C 下仅与脂质微粒温育 1h。7B. 将 NRK 初始细胞在 37°C 下与 8D8 脂质微粒温育 1h。7C. 将 NRK END0180 在 37°C 下与 8D8 脂质微粒温育 1h。7D. 将 NRK-END0180 在 37°C 下仅与 HA- 脂质微粒温育 1h (X525)。*NRK-END0180 细胞用支原体污染。图 8 示出了当抗体经由 PEG 间隔基与脂质缀合时由于脂质微粒 - 抗体组合物 (8D8-NP) 与 NRK-END0180 细胞的结合而产生的荧光移动。IgG-Np 是指缀合于 IgG 抗体的脂质微粒。

[0075] 图 9 描述了多柔比星 (DOX) 经由 8D8-NP 特异性递送至 NRK-END0180 细胞之后表达 END0180 的细胞的减少的细胞存活。细胞存活使用 XTT 测定测量。

[0076] 图 10 示出了 8D8AF 488-NP 与 NRK-END0180 的结合。

[0077] 图 11A 和 11B 示出了 Cy3-siRNA 至表达 NRK-END0180 的细胞的递送。

[0078] 图 12 示出了显示 Cy3-siRNA 摄取进入 NRK52-END0180 细胞的多层光切 (Z-Stack) 图像。

[0079] 图 13 示出了经由定位的 8D8-NP 递送至核周焦点的 Cy3-siRNA (白色箭头), 其中在核周焦点也定位了 RNAi 机构。

[0080] 图 14 为示出使用包封 MMC 的 ENDO180 靶向的脂质纳米微粒的 ENDO180+ 细胞的减少细胞存活的图。XTT 测定在温育 72h 后进行。每个条表示 16 个孔 / 处理的平均值和数据点之间的 SD。呈现的数据代表三次独立实验。

[0081] 图 15A 和 15B 示出暴露于包封 siRNA 与 RAC(siRAC1) 的 8D8-NP 的 A549 细胞系中 Rac1mRNA (示出的残余 mRNA 的水平) 的体外敲低。

[0082] 图 16A-16D 呈现描绘鼠癌症模型中 siRNA 在用包封 Cy5-Rac1_28 的涂覆有 ENDO180 的纳米微粒 (NP) 处理的小鼠中的各个身体器官的生物分布的图。每 mg 组织样品中存在的 siRNA 的量 (埃摩尔) 在用不同组合物处理的动物中呈现。

[0083] 图 17A-17D 呈现描绘包封 Rac1_28 的涂覆有 ENDO180 的纳米微粒 (NP) 在来自鼠癌症模型的肿瘤和肾脏中的生物分布的图。每 mg 组织样品中存在的 siRNA 的量 (埃摩尔) 在用不同组合物处理的动物中呈现。

[0084] 发明详述

[0085] 定义

[0086] 为了方便起见,本文描述在说明书、实施例和权利要求中使用的某些术语。

[0087] 应注意,如本文所用,单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数形式,除非内容中另外明确指示。

[0088] 其中方面或实施方案按照马库什组 (Markush group) 或替代物的其它分组描述,本领域技术人员将认识到方面或实施方案从而也按照组中的任何单个成员或成员的亚组描述。

[0089] 在本文中可互换使用的术语“靶向剂”或“靶向部分”是指优先与特定靶标缔合或结合的药剂,所述靶标可以包括特定的细胞类型或组织类型、蛋白质 (包括例如受体)、感染剂或其它目标靶标。适用于所公开组合物的靶向剂必须在生理条件下对靶标具有足够的结合亲和力以通过所需的递送方法 (如、体内、体外、离体) 选择性地识别并结合至表达靶标的合适的细胞类型。靶向剂的实例包括但不限于寡核苷酸 (包括适体)、抗原、抗体或其功能片段、配体、受体、特异结合对中的一员,聚酰胺 (包括对生物受体具有亲和力的肽或肽模拟物)、寡糖、,多糖、类固醇或类固醇衍生物、激素、激素模拟物 (例如,吗啡) 或对靶标具有结合特异性的其它化合物。在本文公开的方法中,靶向部分促进递送系统至目标靶标 (即,表达 ENDO180 受体的细胞) 的递送。

[0090] 本文公开的递送系统可以利用一种或多种不同的靶向剂。可使用特定递送剂上每种具有它们自己的结合靶标的多种靶向剂以有利于至较广泛的细胞类型 (不止一种细胞类型) 递送,或可替代地至较窄的靶细胞类型递送。

[0091] 表现出所需结合活性 (特异地结合所需的细胞表面抗原) 的抗体及其功能片段或衍生物为有用的靶向部分。如本文所用,“抗体”或抗体的“功能片段”涵盖表现出所需的特异性结合活性的抗体或其衍生物。这包括但不限于多克隆抗体和单克隆抗体以及包含杂合抗体或嵌合抗体 (诸如人源化抗体)、变异抗体 (altered antibody)、抗体片段 (诸如 F(ab')₂ 片段、F(ab) 片段、包括 ScFv 的 Fv 片段)、单结构域抗体,二聚和三聚抗体片段构建体,微型抗体及其功能片段的制剂,它们表现出亲本抗体分子的免疫结合特性和 / 或结合细胞表面抗原,即 ENDO180 受体。

[0092] 如本文所公开的“脂质微粒”也可以称为“载体部分”并且是指但不限于可以包含

非脂质组分的脂质微粒。本文公开了包含脂质微粒的组合物。本文公开的组合物包含脂质微粒,所述脂质微粒已经通过连接靶向部分而修饰。

[0093] 如本文所公开的脂质微粒在本文也被称为基于脂质的纳米微粒。脂质体为含有包埋水体积的封闭的脂质双层膜。脂质体可以为具有单个膜双层的单层囊泡 (ULV) 或具有特征在于多个双层膜的洋葱状结构的多层囊泡 (MLV), 其中每个双层膜与下一个双层膜通过水层分离。在一个优选的实施方案中, 本文公开的脂质微粒为单层囊泡。双层由两个脂质单层组成, 所述脂质单层具有疏水性“尾部”区域和亲水性“头部”区域。膜双层的结构使得脂质单层的疏水性 (非极性) “尾部”朝向双层的中央定向, 而亲水性“头部”朝向水相定向。

[0094] 本文公开的基于脂质的纳米微粒可以由本领域熟知的且常规用于制备脂质体的脂质材料的组合制备。脂质体涵盖较坚硬的类型诸如鞘磷脂, 或流体类型诸如具有不饱和和酰基链的磷脂。“磷脂”指任何一种磷脂或能够形成脂质体的磷脂的组合。磷脂酰胆碱 (PC), 包括获自蛋、大豆或其它植物来源的磷脂酰胆碱或部分或完全是合成的磷脂酰胆碱, 或具有可变脂质链长和不饱和的磷脂酰胆碱是适用的, 如本文所公开。合成的、半合成的和天然产物磷脂酰胆碱, 包括但不限于二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、大豆磷脂酰胆碱 (大豆 PC)、卵磷脂酰胆碱 (卵 PC)、氢化卵磷脂酰胆碱 (HEPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 和二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC), 为用于本文公开的组合物的合适的磷脂酰胆碱。所有这些磷脂可商购获得。此外, 磷脂酰甘油 (PG) 和磷脂酸 (PA)、磷脂酰乙醇胺 (PE) 也为用于本文公开的组合物的合适的磷脂, 并且包括但不限于二肉豆蔻酰磷脂酰甘油 (DMPG)、二月桂酰基磷脂酰甘油 (DLPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、二肉豆蔻酰磷脂酸 (DMPA)、二硬脂酰磷脂酸 (DSPA)、二月桂酰磷脂酸 (DLPA) 和二棕榈酰磷脂酸 (DPPA)。当用于组合物时, 二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG) 为优选的带负电荷的脂质。其它合适的磷脂包括磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、鞘磷脂和含有月桂酸链、肉豆蔻酸链、硬脂酸链、棕榈酸链的磷脂酸。为了稳定脂质膜, 优选添加另外的脂质组分, 诸如胆固醇 (Chol)。用于制备本文公开的基于脂质的纳米微粒的某些优选的脂质包括磷脂酰乙醇胺 (PE)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和与胆固醇 (CH) 进一步组合的磷脂酰胆碱 (PC)。其它合适的脂质包括阳离子脂质 N-[1-(2, 3-二油基氧基) 丙基]-N, N, N-三甲基氯化铵 (DOTMA) 和 N-[1-(2, 3-二油酰基氧基) 丙基]-N, N, N-三甲基氯化铵 (DOTAP) 及其类似物。

[0095] 非阳离子脂质包括二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC)、二油酰磷脂酰甘油 (DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱 (POPC)、棕榈酰油酰-磷脂酰乙醇胺 (POPE) 和二油酰-磷脂酰乙醇胺 4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺 (DPPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)、16-0-单甲基 PE、16-0-二甲基 PE、18-1-反式 PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺 (SOPE)、固醇 (如, 胆固醇) 及其混合物。

[0096] 在一些实施方案中, 用于制备本文公开的脂质体的脂质和胆固醇的组合包含约 3:1:1 或约 4:2:1 的 PE:PC:Chol 摩尔比。

[0097] 本发明的基于脂质的纳米微粒可以通过本领域技术人员已知的任何方法获得。例

如,本文公开的脂质微粒制剂可通过反相蒸发(REV)方法(参见美国专利号4,235,871)、注入过程或去垢剂稀释制备。用于制备脂质体的这些和其它方法的综述可见于文本Liposomes, Marc Ostro编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, 第1章, 也参见Szoka Jr.等, (1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467)。用于形成ULV的方法描述于Cullis等, 1986年1月16日, 标题为“Extrusion Technique for Producing Unilamellar Vesicles”的PCT公布号87/00238。多层脂质体(MLV)可通过脂质-膜方法制备, 其中脂质被溶解在氯仿-甲醇溶液(3:1, 体积/体积)中, 在减压下蒸发至干燥并通过溶胀溶液水合。然后, 使溶液经受充分搅拌并例如在37℃下温育2小时。在温育之后, 通过挤出获得单层脂质体(ULV)。挤出步骤通过将脂质体的尺寸减小至优选的且基本均一的平均直径来修饰脂质体。或者, 可以使用诸如过滤或其它尺寸选择技术等的技术来选择所需尺寸的脂质体。尽管本文公开的选择尺寸的脂质体具有小于约200nm的平均直径, 但优选的是选择小于约150nm的平均直径, 特别优选的是约90-150nm的平均直径。当本文公开的脂质微粒为单层脂质体时, 优选的是选择小于约200nm的平均直径。本文公开的最优选的单层脂质微粒具有小于约150nm的平均直径。

[0098] 可以修饰基于脂质的纳米微粒的外表面以有利于连接靶向部分。此类修饰的一个实例为用天然或合成聚合物, 例如聚乙二醇(PEG)或透明质酸(HA)修饰基于脂质的纳米微粒的外表面。其它聚合物包括糖类, 诸如海藻糖、蔗糖、甘露糖或葡萄糖。在一个优选的实施方案中, 基于脂质的纳米微粒用HA涂覆。不希望受到理论的束缚, HA用作长循环剂(long-circulating agent)和冷冻保护剂。可以将所述聚合物从头开始掺入到脂质体组合物或可以与制备的基于脂质的纳米微粒组合。

[0099] 可以将基于脂质的纳米微粒的外表面用试剂进一步修饰以增强将基于脂质的纳米微粒摄取进入目标组织并防止或减少将基于脂质的纳米微粒摄取进入细胞内皮系统。用亲水性聚合物作为长循环剂修饰基于脂质的纳米微粒延长血液中基于脂质的纳米微粒的半衰期。适合使用的亲水性聚合物的实例包括聚乙二醇(PEG)、聚甲基乙二醇、聚羟基丙二醇、聚丙二醇、聚甲基丙二醇和聚羟基环氧丙烷(polyhydroxypropylene oxide)。也可以将糖胺聚糖(例如, 透明质酸)用作长循环剂。

[0100] 基于脂质的纳米微粒通过连接靶向部分修饰。在一个实施方案中, 将所述靶向部分共价缀合至冷冻保护剂, 如HA。这可通过使用交联试剂(如戊二醛(GAD)、双功能环氧乙烷(OXR)、乙二醇二缩水甘油醚(EGDE)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和水溶性碳二亚胺, 例如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC))来实现。如本领域技术人员所知, 可使用任何化学交联剂, 包括但不限于硫醚、硫酯、马来酰亚胺和硫醇、胺-羧基、胺-胺等。通过交联, 建立靶向部分的胺残基和基于脂质的纳米微粒的连接。

[0101] 修饰的基于脂质的纳米微粒由空微-或纳米级脂质体制备, 所述脂质体由当时已知的任何脂质体材料通过本领域技术人员已知的任何方法制备。基于脂质的纳米微粒优选第一层表面修饰通过共价结合修饰。第一层优选包含聚合物诸如PEG或糖胺聚糖诸如透明质酸。通过共价连接至第一层, 可以向此添加第二层的表面修饰。第二层包含如本文描述的靶向剂或部分, 如, 抗体或其功能片段。可以将另外的层添加至基于脂质的纳米微粒的另外的试剂(如另外的靶向部分)。或者, 第二层可以包含靶向部分的多相混合物。在添加最后层之后, 可以冻干基于脂质的纳米微粒组合物。可以通过将基于脂质的纳米微粒用含

有治疗剂或诊断剂的水溶液再水合由基于脂质的纳米微粒包封目标治疗剂。在制备基于脂质的纳米微粒期间,可以将难溶于水溶液的治疗剂或疏水性的药剂添加至组合物。在添加第一层之后的任何时间,任选使基于脂质的纳米微粒组合物冻干和复水。

[0102] 在一个实施方案中,两种目标药剂(如,治疗剂)可通过脂质微粒递送。一种药剂可为疏水的,并且另一种为亲水的。在形成脂质微粒期间,可以将疏水性药剂添加至脂质微粒。疏水性药剂与脂质微粒的脂质部分缔合。将亲水性药剂添加至使冻干脂质微粒再水化的水溶液中。两种药剂递送的示例性实施方案描述如下:其中浓缩的 siRNA 被包封在基于脂质的纳米微粒中并且其中难溶于水溶液的药物与脂质微粒的脂质部分缔合。如本文所用,“难溶于水溶液”是指小于约 10%溶于水的组合物。

[0103] 除了脂质,所述脂质微粒还可以包含另外的药剂,所述另外的药剂包括天然或合成聚合物,包括蛋白质或非蛋白质聚合物。可以类似于本文描述的针对基于脂质的纳米微粒载体部分的修饰对此类脂质微粒进行修饰和增强。所述脂质微粒还可以包含合成聚合物诸如聚(乳酸)(PLA)和聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)。在另一个实施方案中,所述组合物还包含蛋白质(如多肽)或蛋白质的核酸结合结构域。在一个实施方案中,所述结合部分为选自以下的蛋白质的核酸结合结构域:存在于选自鱼精蛋白、GCN4、Fos、Jun、TFIIS、FMRI、酵母蛋白 HX、Vigillin、Mer1、细菌多核苷酸磷酸化酶、核糖体蛋白 S3 和热休克蛋白的蛋白中核酸结合结构域。在一个实施方案中,所述结合部分为鱼精蛋白或鱼精蛋白的 RNA 干扰-诱导分子结合片段。

[0104] “抑制剂”为能够将基因的表达或这种基因的产物的活性减少(部分或完全)至足以实现所需生物或生理作用的程度的化合物。本文所用术语“抑制剂”包括核酸抑制剂,包括 siRNA、shRNA、合成 shRNA;miRNA;反义 RNA 和 DNA 以及核酶中的一种或多种。“抑制性核酸”包括反义化合物、化学修饰的 siRNA 化合物、未修饰的 siRNA 化合物、化学修饰的 shRNA 化合物、未修饰的 shRNA 化合物、化学修饰的 miRNA 化合物和未修饰的 miRNA 化合物。

[0105] “siRNA 抑制剂”为能够将基因的表达或这种基因的产物的活性减少至足以实现所需生物或生理作用的程度的化合物。本文所用术语“siRNA 抑制剂”是指 siRNA、shRNA、合成 shRNA、miRNA 中的一种或多种。也可以将抑制称为下调,或者对于 RNAi 来说称为沉默。

[0106] 本文所用术语“抑制”是指将基因的表达或这种基因的产物的活性减少至足以实现所需生物或生理作用的程度。抑制可以是完全的或部分的。如本文所用,术语“END0180 基因”被定义为与 SEQ ID NO:1 的氨基酸编码区域或在高度严格杂交条件下结合于 END0180 基因的核酸序列具有优选 90%同源性、更优选具有 95%同源性、并且甚至更优选具有 98%同源性的 END0180 基因的任何同源物,所述高度严格杂交条件在本领域为熟知的(例如,参见 Ausubel 等,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 和 Sons, Baltimore, Maryland(1988),在 1995 年和 1998 年更新)。

[0107] 如本文所用,术语“END0180”或“END0180 多肽”或“END0180 受体”被定义为与 SEQ ID NO:2 具有优选至少 90%同源性、更优选具有至少 95%同源性、并且甚至更优选具有至少 98%同源性或 100%同一性的 END0180 多肽的任何同源物、定义为全长或其片段或其结构域、定义为由剪接变体核酸序列编码的突变体或多肽、定义为与其它多肽的嵌合体,条件是上述任一者具有与 END0180 受体相同的或基本上相同的生物学功能。END0180 多肽或 END0180 多肽同源物可以以不同的形式存在,包括但不限于可溶性蛋白、膜-结合(在纯化

的膜制备物或在细胞表面上)、珠结合或呈现 END0180 蛋白或其衍生的片段和多肽的任何其它形式。本文所用术语“抑制”是指将基因的表达或这种基因的产物的活性减少至足以实现所需生物或生理作用的程度。抑制是完全的或部分的。

[0108] 术语“mRNA 多核苷酸序列”、“mRNA 序列”和“mRNA”可互换使用。

[0109] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“核酸”可以互换使用并且是指包含脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)的核苷酸序列。应当理解所述术语包括作为等同物的由核苷酸类似物制成的 RNA 或 DNA 的类似物。在整个本申请中,将 mRNA 序列列为表示对应的基因。

[0110] “寡核苷酸”或“寡聚物”是指约 2 个至约 50 个核苷酸的脱氧核糖核苷酸序列或核糖核苷酸序列。每个 DNA 或 RNA 核苷酸可以独立地为天然的或合成的、并且或修饰的或未修饰的。修饰包括糖部分、碱基部分和或寡核苷酸的核苷酸间的键合的改变。本文公开的核酸分子涵盖包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸和它们的组合的分子。

[0111] 如本文所用,术语“核酸分子”或“核酸”可互换使用并且是指寡核苷酸、核苷酸或多核苷酸。“核酸分子”的变型在本文得到更详细的描述。如本文所述,核酸分子涵盖单链(即反义)和双链分子(即 dsRNA、siRNA)、修饰的核酸分子和未修饰的核酸分子。核酸分子可以包括任何组合的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或核苷酸类似物。

[0112] “基本上互补”是指与另一个序列大于约 84% 的互补性。例如,在由 19 个碱基对组成的双链体区域,一次错配导致 94.7% 的互补性,两次错配导致约 89.5% 的互补性,并且 3 次错配导致约 84.2% 的互补性,从而使得双链体区域基本上互补。因此“基本上相同”是指与另一序列大于约 84% 的同一性。

[0113] 如本文公开的“接头”为例如将抗体连接至治疗性分子或将抗体连接至脂质或将抗体连接至 GAG 或将 GAG 连接至脂质的核苷酸或非核苷酸部分。在一些实施方案中,所述接头为可裂解部分。优选的可裂解基团包括二硫键、酰胺键、硫代酰胺键、酯键、硫酯键、邻二醇键或半缩醛。其它可裂解键包括酶可裂解的键,诸如肽键(由肽酶裂解)、磷酸键(由磷酸酶裂解)、核酸键(由内切核酸酶裂解)和糖键(由糖苷酶裂解)。

[0114] 在一些实施方案中,所述接头非核苷酸接头,包括肽接头。肽序列的选择对于缀合物的成功至关重要。在一些实施方案中,所述接头对血清蛋白酶是稳定的,但由靶细胞中的溶酶体酶裂解。在非限制性实例中,所述接头为选自以下的肽:列于美国 5574142 的接头、鱼精蛋白、鱼精蛋白的片段、(Arg)9、生物素-亲和素、生物素-链霉亲和素和触足肽(antennapedia peptide)。例如,肽接头被用于将抗体连接至基于核酸的治疗剂。其它非核苷酸接头包括约 5 个原子至约 100 个原子的烷基或芳基链。

[0115] 在一些实施方案中,所述接头为核苷酸接头。在某些实施方案中,所述核酸接头的长度范围为 2-100、优选 2-50 或 2-30 个核苷酸。

[0116] 寡核苷酸的化学修饰

[0117] 在一些实施方案中,所述治疗剂和/或诊断剂包含寡核苷酸分子。在一些实施方案中,所述寡核苷酸为单链或双链的。在一些实施方案中,所述寡核苷酸为反义或 RNAi 试剂。

[0118] “核苷酸”意图涵盖脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸,其可以为天然的或合成的和/或修饰的或未修饰的。修饰包括糖部分、碱基部分和/或寡核糖核苷酸的核糖核苷酸间的

键合的改变。如本文所用,术语“核糖核苷酸”涵盖天然和合成的、未修饰的和修饰的核糖核苷酸。修饰包括糖部分、碱基部分和 / 或寡核苷酸的核糖核苷酸间的键合的改变。

[0119] 用于制备治疗剂的核苷酸(即核酸分子)包括天然存在的或合成修饰的碱基。天然存在的碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶。核苷酸的修饰碱基包括肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-甲基、2-丙基和其它烷基腺嘌呤、5-卤代尿嘧啶、5-卤代胞嘧啶、6-氮杂胞嘧啶和 6-氮杂胸腺嘧啶、假尿嘧啶、4-硫脲嘧啶、8-卤代腺嘌呤、8-氨基腺嘌呤、8-硫醇腺嘌呤、8-硫醇烷基腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤和其它 8-取代的腺嘌呤、8-卤代鸟嘌呤、8-氨基鸟嘌呤、8-硫醇鸟嘌呤、8-硫代烷基鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤和其它取代的鸟嘌呤、其它氮杂和脱氮腺嘌呤、其它氮杂和脱氮鸟嘌呤、5-三氟甲基尿嘧啶和 5-三氟胞嘧啶。在一些实施方案中,寡聚物中的一个或多个核苷酸被肌苷取代。

[0120] 根据本文提供的一些实施方案为包含未修饰的和修饰的核苷酸和 / 或非常规部分的抑制性寡核苷酸化合物。在某些实施方案中,治疗剂为寡核苷酸 / 核酸分子。在各种优选实施方案中,治疗剂为双链寡核苷酸并且优选为 siRNA。在一些实施方案中,化学修饰的 siRNA 分子为优选的。

[0121] 已广泛报道了对应于已知基因的 siRNA 的选择和合成;(参见例如 Ui-Tei 等,2006. J Biomed Biotechnol. ;2006:65052;Chalk 等,2004. BBRC. 319(1):264-74;Sioud 和 Leirdal,2004. Met. Mol Biol. ;252:457-69;Levenkova 等,2004, Bioinform. 20(3):430-2;Ui-Tei 等,2004. NAR 32(3):936-48)。

[0122] 例如修饰的 siRNA 的用途和制备参见例如 Braasch 等,2003. Biochem., 42(26):7967-75;Chiu 等,2003, RNA, 9(9):1034-48;PCT 公布 WO 2004/015107(atugen AG) 和 WO 02/44321(Tuschl 等)。美国专利号 5,898,031 和 6,107,094 教导了化学修饰的寡聚物。美国专利号 7,452,987 涉及具有交替的未修饰的和 2' 糖修饰的核糖核苷酸的寡聚化合物。美国专利公布号 2005/0042647 描述了具有化学修饰的核苷间键合的 dsRNA 化合物。

[0123] Amarzguioui 等(2003, NAR, 31(2):589-595) 示出 siRNA 活性取决于 2'-O-甲基修饰的定位。Holen 等(2003, NAR, 31(9):2401-2407) 报道与野生型相比具有小数目 2'-O-甲基修饰的核苷的 siRNA 示出良好的活性但是随着 2'-O-甲基修饰的核苷的数目增加,所述活性降低。Chiu 和 Rana(2003, RNA, 9:1034-1048) 提出相对于未修饰的 siRNA,将 2'-O-甲基修饰的核苷掺入有义或反义链(完全修饰的链)严重降低 siRNA 活性。据报道在反义链上 5' -末端处放置 2'-O-甲基基团严重限制活性然而在反义链的 3' -末端处和有义链的两端处放置为耐受的(Czaderna 等,2003, NAR, 31(11), 2705-2716)。

[0124] 据此通过引用整体并入的 PCT 专利申请号 PCT/IL2008/000248 和 PCT/IL2008/001197 公开了用于制备化学修饰的 siRNA 化合物的基序。PCT 专利公布号 WO 2008/020435 公开了本文列出的靶基因的抑制剂,包括一些 siRNA 化合物。

[0125] 所述化合物包含至少一种选自以下的修饰的核苷酸:糖修饰、碱基修饰和核苷酸间键合的修饰并且可以含有 DNA 和修饰的核苷酸诸如 LNA(锁核酸)、ENA(亚乙基-桥接的核酸)、PNA(肽核酸)、阿糖胞苷、磷酸羧酸酯(phosphonocarboxylate)或磷酸羧酸酯核苷酸(PACE 核苷酸)、镜像核苷酸或具有 6 碳糖的核苷酸。

[0126] 核苷酸 / 寡核苷酸的所有类似物或修饰可以与本文公开的组合物一起使用,条件

是所述类似物或修饰基本上不会不利地影响核苷酸 / 寡核苷酸的功能。可接受的修饰包括糖部分的修饰、碱基部分的修饰、核苷酸间键合的修饰和它们的组合。

[0127] 糖修饰包括糖残基的 2' 部分上的修饰且涵盖氨基、氟、烷氧基如甲氧基、烷基、氨基、氟、氯、溴、CN、CF、咪唑、羧酸酯、硫酯、C₁ 至 C₁₀ 低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基或芳烷基、OCF₃、OCN、O-、S- 或 N- 烷基 ; O-、S 或 N- 烯基 ; SOCH₃ ; SO₂CH₃ ; ONO₂ ; NO₂、N₃ ; 杂环烷基 ; 杂环烷芳基 ; 氨基烷基氨基 ; 聚烷基氨基或取代的甲硅烷基等, 如欧洲专利 EP 0 586 520 B1 或 EP 0 618 925 B1 中所描述。

[0128] 在一个实施方案中, 所述 siRNA 化合物包含至少一个核糖核苷酸, 所述核糖核苷酸在糖部分上包含 2' 修饰 (“2' 糖修饰”)。在某些实施方案中, 所述化合物包含 2'-O- 烷基或 2'-氟或 2'-O- 烯丙基或任选地在其它位置上的任何其它 2' 修饰。其它稳定化的修饰也是可能的 (如末端修饰)。在一些实施方案中, 优选的 2'-O- 烷基为 2'-O- 甲基 (甲氧基) 糖修饰。

[0129] 在一些实施方案中, 所述寡核苷酸的主链被修饰并且包含磷酸 -D- 核糖实体但是也可能含有硫代磷酸 -D- 核糖实体、三酯、硫酯、2'-5' 桥接的主链 (也可以称为 5'-2')、PACE 等。

[0130] 如本文所用, 术语 “非配对的核苷酸类似物” 意指包含非碱基配对部分的核苷酸类似物, 包括但不限于 : 6 脱氨基 (des amino) 腺苷 (Nebularine)、4-Me- 吡啶、3- 硝基吡咯、5- 硝基吡啶、Ds、Pa、N3-Meribo U、N3-Me riboT、N3-Me dC、N3-Me-dT、N1-Me-dG、N1-Me-dA、N3- 乙基 -dC、N3-Me dC。在一些实施方案中, 所述非碱基配对核苷酸类似物为核糖核苷酸。在其它实施方案中, 其为脱氧核糖核苷酸。另外, 可以制备多核苷酸的类似物, 其中一个或多个核苷酸的结构根本地改变并且更适合作为治疗试剂或实验试剂。核苷酸类似物的一个实例为肽核酸 (PNA), 其中 DNA (或 RNA) 中的脱氧核糖 (或核糖) 磷酸主链被聚酰胺主链代替, 这与肽中发现的相似。已经示出 PNA 类似物对酶降解具有抗性并且具有延长的体内和体外稳定性。可对寡核苷酸进行的其它修饰包括聚合物主链、环主链、无环主链、硫代磷酸 -D- 核糖主链、三酯主链、硫酯主链、2'-5' 桥接的主链、人工核酸、吗啉代核酸、二醇核酸 (GNA)、苏糖核酸 (TNA)、阿糖胞苷和镜像核苷 (例如, β -L- 脱氧核糖核苷代替 β -D- 脱氧核糖核苷)。包含 LNA 核苷酸的 siRNA 化合物的实例公开于 Elmen 等, (NAR 2005, 33(1):439-447)。

[0131] 对寡核苷酸的其它修饰包括在末端的一个或多个中存在核苷酸部分和或非核苷酸部分。

[0132] 本文公开的目前核酸分子的化合物可以使用一个或多个反向核苷酸, 例如反向胸腺嘧啶或反向腺嘌呤合成 (参见, 例如, Takei 等, 2002, JBC, 277(26):23800-06)。

[0133] 本文有时称为 “脱碱基核苷酸” 或 “脱碱基核苷酸类似物” 的物质称为假核苷酸或非常规部分更适当。核苷酸为核酸的单体单元, 其由核糖或脱氧核糖、磷酸和碱基 (DNA 中为腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶 ; RNA 中为腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶或胞嘧啶) 组成。经修饰的核苷酸含糖、磷酸和或碱基中的一个或多个的修饰。脱碱基假核苷酸不含碱基, 因此不是严格的核苷酸。

[0134] 其它修饰包括选自核苷酸、修饰的核苷酸、脂质、肽、糖和反向脱碱基部分的末端修饰。

[0135] 在一些实施方案中, siRNA 治疗剂包含封端部分。本文所用术语“封端部分”包括脱碱基核糖部分、脱碱基脱氧核糖部分、脱碱基核糖部分和脱碱基脱氧核糖部分的修饰, 包括 2'-O 烷基修饰; 反向脱碱基核糖和脱碱基脱氧核糖部分及其修饰物; C6- 亚氨基 -Pi; 镜像核苷酸包括 L-DNA 和 L-RNA; 5'-O-Me 核苷酸; 和核苷酸类似物包括 4', 5'- 亚甲基核苷酸; 1-(β -D- 赤呋喃糖基) 核苷酸; 4'- 硫代核苷酸; 碳环核苷酸; 5'- 氨基 - 烷基磷酸酯; 1, 3- 二氨基 -2- 丙基磷酸酯、3- 氨基丙基磷酸酯; 6- 氨基己基磷酸酯、12- 氨基十二烷基磷酸酯; 羟丙基磷酸酯; 1, 5- 无水己糖醇核苷酸; α - 核苷酸; 苏式 - 呋喃戊糖基核苷酸; 无环 3', 4'- 开环核苷酸; 3, 4- 二羟丁基核苷酸; 3, 5- 二羟基戊基核苷酸、5'-5'- 反向脱碱基部分; 1, 4- 丁二醇磷酸酯; 5'- 氨基; 以及桥接或非桥接甲基磷酸酯和 5'- 巯基部分。

[0136] 某些优选的封端部分为脱碱基核糖或脱碱基脱氧核糖部分; 反向脱碱基核糖或脱碱基脱氧核糖部分; C6- 氨基 -Pi; 镜像核苷酸, 包括 L-DNA 和 L-RNA。

[0137] 在一些实施方案中, 所述治疗性 siRNA 包含除核苷酸之外的部分。本文所用术语“非常规部分”是指脱碱基核糖部分、脱碱基脱氧核糖部分、脱氧核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、镜像核苷酸、非碱基配对核苷酸类似物和通过 2'-5' 核苷酸间磷酸酯键连接到相邻核苷酸的核苷酸; 桥接核酸 (包括 LNA) 和亚乙基桥接的核酸。

[0138] “镜像”核苷酸为与天然存在的或通常使用的核苷酸具有反向手性的核苷酸, 即, 在镜像核糖核苷酸和“镜像异构体 (spiegelmer)”的情况下, 天然存在的 (D- 核苷酸) 的镜像 (L- 核苷酸) 也称为 L-RNA。核苷酸可为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸并且还可包含糖、碱基和或主链修饰中的至少一种。参见美国专利号 6, 586, 238。另外, 美国专利号 6, 602, 858 公开了包含至少一种 L- 核苷酸取代的核酸催化剂。镜像核苷酸包括例如 L-DNA (L- 脱氧核糖腺苷 -3'- 磷酸 (镜像 dA); L- 脱氧核糖胞苷 -3'- 磷酸 (镜像 dC); L- 脱氧核糖鸟苷 -3'- 磷酸 (镜像 dG); L- 脱氧核糖胸苷 -3'- 磷酸 (镜像 dT)) 和 L-RNA (L- 核糖腺苷 -3'- 磷酸 (镜像 rA); L- 核糖胞苷 -3'- 磷酸 (镜像 rC); L- 核糖鸟苷 -3'- 磷酸 (镜像 rG); L- 核糖尿苷 -3'- 磷酸 (镜像 dU))。

[0139] 修饰的脱氧核糖核苷酸包括, 例如可用作 5' 末端位置 (位置编号 1) 中的核苷酸的 5' OMe DNA (5- 甲基 - 脱氧核糖鸟苷 -3'- 磷酸); PACE (脱氧核糖腺嘌呤 3' 磷酸基乙酸酯、脱氧核糖胞苷 3' 磷酸基乙酸酯、脱氧核糖鸟苷 3' 磷酸基乙酸酯、脱氧核糖胸苷 3' 磷酸基乙酸酯)。

[0140] 桥接的核酸包括 LNA (2'-O, 4'-C- 亚甲基桥接的核酸腺苷 3' 单磷酸、2'-O, 4'-C- 亚甲基桥接的核酸 5- 甲基 - 胞苷 3' 单磷酸、2'-O, 4'-C- 亚甲基桥接的核酸鸟苷 3' 单磷酸、5- 甲基 - 尿苷 (或胸苷) 3' 单磷酸); 和 ENA (2'-O, 4'-C- 亚乙基桥接的核酸腺苷 3' 单磷酸、2'-O, 4'-C- 亚乙基桥接的核酸 5- 甲基 - 胞苷 3' 单磷酸、2'-O, 4'-C- 亚乙基桥接的核酸鸟苷 3' 单磷酸、5- 甲基 - 尿苷 (或胸苷) 3' 单磷酸)。

[0141] 根据一个方面, 本文提供了包含未修饰的和修饰的核苷酸的抑制性寡核苷酸化合物。所述化合物包含至少一种选自以下的修饰的核苷酸: 糖修饰、碱基修饰和核苷酸间键合的修饰, 并且可以含有 DNA 和修饰的核苷酸诸如 LNA (锁核酸) 包括 ENA (亚乙基 - 桥接的核酸); PNA (肽核酸); 阿糖胞苷; PACE (磷酸基乙酸酯及其衍生物)、镜像核苷酸或具有 6 碳糖的核苷酸。在一些实施方案中, 本文提供了用于抑制靶基因体内表达的方法和组合物。通常, 所述方法包括施用递送 - 治疗剂缀合物。在特定实施方案中, 所述缀合物包含小干扰

RNA (即 siRNA), 所述小干扰 RNA 以足以例如通过 RNA 干扰 (RNAi) 机制下调靶基因的表达 (降低 mRNA 水平, 降低蛋白质水平) 的量靶向由靶基因转录的 mRNA。特别地, 可将主题方法用于抑制靶基因的表达以治疗疾病。针对靶基因的核酸分子可用作治疗剂以治疗各种病状。在一个实施方案中, 所述核酸分子下调靶多肽, 由此靶多肽的下调包括靶多肽功能的下调 (这可以通过例如酶测定或与天然基因 / 多肽的已知交互子 (interactor) 的结合测定检查)、靶蛋白的下调 (这可以通过例如 Western 印记、ELISA 或免疫沉淀检查) 和靶多肽 mRNA 表达的下调 (这可以通过 Northern 印迹、定量 RT-PCR、原位杂交或微阵列杂交、RACE 检查)。

[0142] 本文描述的核酸分子的合成在其中一种领域的技术范围内。除了别的以外, 此类合成描述于 Beaucage SL 和 Iyer RP, 1992Tetrahedron ;48:2223-2311, Beaucage S. 和 Iyer RP, 1993Tetrahedron ;49:6123-6194 和 Caruthers MH 等, 1987Methods Enzymol. ; 154:287-313, 除了别的以外, 硫酯的合成描述于 Eckstein F., 1985Annu. Rev. Biochem. ; 54:367-402, RNA 分子的合成描述于 Sproat B., Humana Press 2005, Herdewijn P. 编辑; Kap. 2:17-31 和除了别的以外, 各自的下游加工描述于 Pingoud A 等, IRL Press 1989, Oliver R. W. A 编辑; Kap. 7:183-208 和 Sproat B., Humana Press 2005, Herdewijn P. 编辑; Kap. 2:17-31 (见上文)。

[0143] 基于靶 mRNA 的已知序列, 针对任一靶基因的 siRNA 使用如以上描述本领域已知的方法合成并如本文描述通过各种修饰使其对血清和 / 或细胞核酸酶稳定。

[0144] 靶基因

[0145] 本文公开的递送系统可用于将治疗剂和 / 或诊断剂递送至表达 END0180 的细胞。在一些实施方案中, 所述治疗剂包括抗细胞增生剂。

[0146] 在一些实施方案中, 所述治疗剂包括抑制靶基因或靶基因的表达的核酸化合物, 所述靶基因与选自增生性疾病、转移性疾病和纤维化的疾病或病症相关。

[0147] 靶基因包括抗细胞凋亡基因、与基本细胞分裂机制相关的基因、与细胞周期调控 / 细胞增生相关的基因、与限速代谢 (核苷酸 / 核酸合成、蛋白质合成、能量代谢) 相关的基因、与蛋白质运输 (如, 分泌) 相关的基因; 促炎性基因、细胞因子、趋化因子、NFkB、生长因子 / 受体 (TGF β 1 和 2、CTGF、IGF1、PDGF1、PDGF2、VEGF、EGFR、HER2 等)、与纤维化相关的基因 (HSP47、TGF β 1、IL-10)。

[0148] 根据专用和公共可获得的方法和算法选择可用于合成 siRNA 的有义序列和反义序列。

[0149] 以上提供的化学修饰可用于合成尤其表现出血清稳定性、活性、降低的免疫反应、降低的脱靶作用的核苷酸治疗剂。

[0150] 抗体

[0151] 术语“抗体”尤其是指 IgG、IgM、IgD、IgA 和 IgE 抗体。定义包括多克隆抗体或单克隆抗体。该术语是指包含抗原结合结构域的完整抗体或抗体片段, 例如不含 Fc 部分的抗体、单链抗体、微型抗体、基本上仅由可变区组成的片段、抗体的抗原结合结构域等。术语“抗体”也可以指针对通过 cDNA 接种获得的多核苷酸序列的抗体。术语还涵盖了保留与其抗原或受体选择性结合的能力并尤其如下例证的抗体片段:

[0152] (1) Fab, 含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段, 其可通过以下方式产生: 用木

瓜蛋白酶消化完整抗体以产生轻链和重链的一部分；

[0153] (2) (Fab')₂, 可通过用胃蛋白酶处理完整抗体无需随后的还原获得的抗体的片段；F(ab')₂ 为通过两个二硫键结合在一起的两个 Fab 片段的二聚体；

[0154] (3) Fv, 被定义为表达为两条链的含有轻链的可变区和重链的可变区的基因工程改造片段；以及

[0155] (4) 单链抗体 (SCA), 被定义为含有由合适的多肽连接子连接为基因融合单链分子的轻链的可变区和重链的可变区的基因工程改造分子, 包括 scFv。

[0156] 可以进行 CDR 接枝 (CDR grafting) 来改变抗体分子的某些特性, 包括亲和力或特异性。CDR 接枝的非限制性实例公开于美国专利号 5, 225, 539。

[0157] 单结构域抗体分离自免疫的骆驼科 (包括骆驼和美洲驼) 的独特的重链抗体。小抗体非常稳健并且在单体状态下以高亲和力结合抗原。美国专利 6838254 描述了来源于骆驼科的重链免疫球蛋白的抗体或其片段的产生。

[0158] 单克隆抗体 (mAb) 为对特异性抗原为基本上均一的抗体群体。单克隆抗体 (mAb) 通过本领域技术人员已知的方法获得。参见, 例如 Kohler 等 (1975); 美国专利 4, 376, 110; Ausubel 等 (1987-1999); Harlow 等 (1988); 和 Colligan 等 (1993), 这些文献的内容通过引用整体并入本文。本文公开的 mAb 可以是任何免疫球蛋白类型, 包括 IgG、IgM、IgE、IgA 及其任何亚类。产生的 mAb 杂交瘤可以在体外或体内培养。mAb 的高滴度的在体内获得, 例如其中将来自单个杂交瘤的细胞腹膜内注射入原始引发的 (pristine-primed) Balb/c 小鼠中以产生含有高浓度所需的 mAb 的腹水。可以使用本领域技术人员熟知的柱色谱法将同种型 IgM 或 IgG 的 mAb 从这种腹水或从培养上清液中纯化。

[0159] 所谓“特异性结合亲和力”意指在类似条件下抗体以比其结合于另一多肽较大的亲和力结合于 END0180 多肽或其片段。

[0160] 术语“表位”意指能够被抗体结合也可被所述抗体识别的分子的部分。“抗原”为能够被抗体结合的分子或分子的一部分, 其另外能够诱导动物产生能够结合该抗原的表位的抗体。抗原可以具有一个或不止一个表位。以上提及的特异性反应意图表明抗原将以高度选择性方式与其对应抗体反应且不与可以由其它抗原激发的多个其它抗体反应。

[0161] 表位或抗原决定簇通常由分子 (诸如氨基酸) 的化学活性表面基团或糖侧链组成并且具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。

[0162] 在一个实施方案中, 所述抗体为单克隆抗体。在一个实施方案中, 所述单克隆抗体为 IgG、IgM、IgD、IgA 或 IgE 单克隆抗体。IgG 亚类也为本领域技术人员熟知的并且包括但不限于人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。在一个实施方案中, 所述单克隆抗体为 IgG 单克隆抗体。在一个实施方案中, 所述单克隆抗体为人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一个实施方案中, 所述抗体的部分为抗体的 Fab 片段。在一个实施方案中, 所述抗体的部分包含抗体的可变结构域。在一个实施方案中, 所述抗体的部分包含抗体的 CDR 部分。在其它实施方案中, 所述抗体为 scFv 分子。可以通过重组产生抗体 (一般参见 Marshak 等, 1996 “Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual.” Plainview, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996) 并且可以通过翻译后加工产生类似物。糖基化的不同可提供多肽类似物。

[0163] 抗体可以为人抗体或非人抗体。非人抗体可以通过重组方法人源化以降低它在人

中的免疫原性。用于使抗体人源化的方法为本领域技术人员已知的。

[0164] 本申请提供了上述抗体的人源化形式。如本文所用,“人源化”描述了其中 CDR 区外部的一些、大部分或全部氨基酸被来源于人免疫球蛋白分子的对应的氨基酸替换的抗体,如人框架区替换非人区。在人源化形式的抗体的一个实施方案中,CDR 区外部的一些、大部分或全部氨基酸已经被来自人免疫球蛋白分子的氨基酸替换,但是其中一个或多个 CDR 区内的一些、大部分或全部氨基酸保持不变。氨基酸的少量添加、缺失、插入、取代或修饰是允许的只要它们不消除抗体结合抗原 (END0180) 的能力。

[0165] “人源化”抗体将保留与初始抗体类似的抗原特异性,即,结合 END0180,特别是人 END0180 受体的能力并将由受体类似地内化。

[0166] 本领域技术人员将知道如何制备本发明的人源化抗体。各种出版物描述了如何制备人源化抗体,其中一些出版物在此通过引用并入本申请。

[0167] 例如,在美国专利号 4,816,567 和 6,331,415 中描述的方法包括具有一种抗体的可变区和另一抗体的恒定区的嵌合抗体的制备。

[0168] 美国专利号 5,225,539、6,548,640 和 6,982,321 描述了使用重组 DNA 技术制备人源化抗体,其中一种免疫球蛋白的 CDR 被替换为来自具有不同特异性的免疫球蛋白的 CDR,使得人源化抗体将识别靶抗原但不会引发免疫应答。具体地讲,使用定点诱变将 CDR 引入框架区上。

[0169] 使抗体人源化的其它方法描述于 WO 90/07861 和对应的专利包括美国专利号 5,585,089 ;5,693,761 ;6,180,370 和 7,022,500。这些专利描述了通过将小鼠单克隆抗体的 CDR 与人免疫球蛋白框架和恒定区组合来增加抗体对所需抗原的亲合力的方法。可选择人框架区以使与小鼠序列的同源性最大化。可使用计算机建模鉴定框架区中可能与 CDR 或特异性抗原相互作用的氨基酸,然后可在这些位置使用小鼠氨基酸以产生人源化抗体。

[0170] 上述方法仅为本领域技术人员可以用于制备人源化抗体的一些示例性方法。

[0171] 单克隆抗体 E3-8D8 表示用于本文公开的组合物和方法中的合适的抗 END0180 抗体。根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 杂交瘤细胞 E3-8D8 被保藏在比利时微生物保藏中心 (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-Organisms, BCCM) 并且给出登记号 LMBP7203CB。

[0172] 表位定位

[0173] 表位定位研究鉴定了对于抗体结合重要的残基。用于表位定位的各种方法在本领域为已知的并且易于由本领域技术人员进行。某些方法描述于 Epitope Mapping: A Practical Approach (O. M. R. Westwood, F. C. Hay ;Oxford University Press, 2000), 通过引用并入本文。

[0174] 表位定位技术的一个实例为合成标记肽表位定位 (Synthetic Labeled Peptides Epitope Mapping), 由此合成一组重叠的合成肽, 每个对应于蛋白抗原的线性序列的一小段, 即 END0180 的细胞外结构域, 并排列在固相上。然后将肽的平面用测试抗体探测, 并使用酶标记的第二抗体检测结合的抗体。

[0175] 其它技术包括蛋白抗原的碎裂或裂解和凝胶分离、转移至膜上、通过测试抗体探测并使用酶标记的第二抗体检测结合的抗体。

[0176] 抗体药物开发

[0177] 通常单克隆抗体需要被设计成保持结合特性（选择性、内化等）并减少受体中的免疫应答。具体地讲，可以通过本领域技术人员已知的若干种方法中的一种将由杂交瘤 3E-8D8 分泌的单克隆抗体进行优化以用于人治疗剂。在一种方法中，对单克隆抗体的可变重链 (V_H) 和可变轻链 (V_L) 进行测序。一旦已知氨基酸序列，鉴定互补决定区 (CDR)、重链和轻链 CDR3 并使用简并寡核苷酸将合成的 CDR3 克隆至载体以产生重组载体或构建体。该构建体可以为例如 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、单链片段或完整的 IgG 分子。表达该构建体并分离多肽。在一些实施方案中，所述单克隆抗体可以通过诱变（最佳通过定点诱变）进一步优化以产生与原始 CDR3 具有显著同一性的 CDR3 结构域。

[0178] 治疗剂

[0179] 可用于制备和使用本文公开的组合物治疗剂或活性剂包括核苷酸剂和非核苷酸剂，包括寡核苷酸诸如反义 (AS)、miRNA 和未修饰的和化学修饰的 siRNA 化合物。优选的治疗剂为 siRNA 化合物。

[0180] 在一些实施方案中，所述 siRNA 通过 RNA 干扰靶向并降低靶基因的表达。

[0181] 本文公开的组合物和方法可用于由异常细胞增生产生的或者说涉及异常细胞增生的疾病的治疗或诊断。作为术语在本文使用的治疗剂为药剂，当将其递送至靶细胞时，能使靶细胞以有助于治疗患有疾病的受试者的方式发挥作用，即减轻或改善接受者中疾病的症状。如本文所用，术语疾病的“治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”包括预防疾病，即预防受试者中疾病的临床症状，所述受试者可能被暴露于、或易患疾病，但是还未经历或显示疾病的症状；抑制疾病，即，阻止疾病或其临床症状的发展；或缓解疾病，即，引起疾病或其临床症状的消退。治疗剂也可以为对疾病诊断或疾病进展有用或对治疗疾病有效的药剂。

[0182] 在一个实施方案中，所述组合物被施用于在一个或多个器官中表现异常细胞增生的受试者。

[0183] 有用的治疗剂包括核酸、小分子、多肽、抗体或其功能片段。可以进一步修饰作为治疗剂的这些核心组分以增强功能或存储（例如提高细胞摄取、增加对靶标的特异性、增加半衰期、有利于生成或存储）。核酸治疗剂包括单链和双链的 DNA 和 RNA 分子。不止一种治疗剂可以通过本文公开的组合物递送。

[0184] 通过本文公开的方法递送的治疗剂包括小分子和肽以阻断细胞内信号级联、酶（激酶）、蛋白酶体、脂质代谢、细胞周期、膜运输。通过本文公开的组合物和方法递送的治疗剂包括化疗剂。

[0185] 治疗剂可以通过技术人员已知的任何方法与脂质微粒缔合并包括但不限于包封在内部、与分子的脂质部分缔合或与脂质微粒的外部缔合。可以将溶于水溶液的小分子药物包封在脂质微粒的内部。难溶于水溶液的小分子药物可以与脂质微粒的脂质部分缔合。基于核酸的治疗剂可以与脂质微粒的外部缔合。此类核酸可以与阳离子聚合物（例如，PEI）或阳离子肽（例如，鱼精蛋白）缔合并包封在脂质微粒的内部。可以将治疗性肽包封在脂质微粒的内部。可以将治疗性肽共价结合至脂质微粒的外部。

[0186] 在其中治疗剂为核酸的实施方案中，脂质微粒特别适用于核酸运输。

[0187] 在一个实施方案中，所述治疗剂为核酸，诸如 RNA 或 DNA 分子（例如双链 RNA 或单链 DNA 寡核苷酸）。有用的 DNA 分子为反义以及有义（例如编码和 / 或调节）DNA。反

义 DNA 分子包括短寡核苷酸。有用的 RNA 分子包括 RNA 干扰分子,其中存在几种已知类型。RNA 干扰分子的领域中最近几年已经得到大大地扩展。有用的 RNA 干扰分子的实例为 dsRNA,包括 siRNA、siNA、shRNA 和 miRNA(例如,小时序 RNA 和小调节 RNA(Kim. 2005. Mol. Cells. 19:1-15)). 如本文所用,“双链 RNA”或“dsRNA”是指由两条链构成的 RNA 分子。本文公开的治疗性寡核苷酸通过本领域已知的针对核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的任何方法合成。例如,可使用商业多核苷酸合成仪(例如 Applied Biosystems 380B DNA 合成仪)。当使用片段时,可合成两个或更多个此类序列并连接在一起用于本文公开的组合物中。

[0188] 在一些实施方案中,所述治疗剂选自烷化剂诸如塞替派和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺;烷基磺酸酯类诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙撑亚胺(ethylenimine)和甲基蜜胺类(methylamelamine)包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(acetogenin)(特别是布拉他辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚,**MARINOL®**); β -拉帕醌(beta-lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙碱;白桦脂酸;喜树碱(包括合成类似物托泊替康(topotecan)(**HYCAMTIN®**))、CPT-11(伊立替康(irinotecan),**CAMPTOSAR®**)、乙酰喜树碱(acetylcamptothecin)、东莨菪亭(scopolectin)和 9-氨基喜树碱);苔藓抑素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括它的阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);鬼臼毒素;鬼臼酸;替尼泊苷(teniposide);隐藻素类(cryptophycin)(特别为隐藻素 1 和隐藻素 8);多拉司他汀(dolastatin);多米卡星(duocarmycin)(包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1);五加苷素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);sarcodictyin;海绵抑素(spongistatin);氮芥类,诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥;硝基脲(nitrosurea)类,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,诸如烯二炔类抗生素(如,加利车霉素(calicheamicin),特别为加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II(参见,如, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 1994. 33:183-186);dynemicin,包括 dynemicin A;埃斯波霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、氮苄霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博莱霉素(bleomycin)、放线菌素 C(cactinomycin)、carabycin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素 D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧

代-L-正亮氨酸、多柔比星（包括 **ADRIAMYCIN®**、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂（**DOXIL®**）和脱氧多柔比星）、表柔比星（epirubicin）、依索比星（esorubicin）、伊达比星（idarubicin）、麻西罗霉素（marcellomycin）；丝裂霉素类诸如丝裂霉素 C、酶酚酸（mycophenolic acid）、诺加霉素（nogalamycin）、橄榄霉素（olivomycin）、培来霉素（peplomycin）、potfiromycin、嘌呤霉素（puromycin）、三铁阿霉素（quelamycin）、罗多比星（rodorubicin）、链黑霉素（streptonigrin）、链脲霉素（streptozocin）、杀结核菌素（tubercindin）、乌苯美司（ubenimex）、净司他丁（zinostatin）、佐柔比星（zorubicin）；抗代谢物类，诸如氨甲喋呤、吉西他滨（gemcitabine）（**GEMZAR®**）、替加氟（tegafur）（**UFTORAL®**）、卡培他滨（capecitabine）（**XELODA®**）、埃博霉素（epothilone）和 5-氟尿嘧啶（5-FU）；叶酸类似物诸如二甲叶酸（denopterin）、甲氨蝶呤、蝶罗呤（pterapterin）、三甲曲沙（trimetrexate）；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨（fludarabine）、6-巯基嘧啶、硫咪嘌呤（thiamiprine）、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，诸如安西他滨（ancitabine）、阿扎胞苷（azacitidine）、6-氮杂尿苷、卡莫氟（carmofur）、阿糖胞苷、双脱氧尿苷（dideoxyuridine）、去氧氟尿苷（doxifluridine）、依诺他滨（enocitabine）、氟尿苷（floxuridine）；雄激素类，诸如卡普睾酮（calusterone）、屈他雄酮丙酸酯（dromostanolone propionate）、环硫雄醇（epitiostanol）、美雄烷（mepitiostane）、睾内酯（testolactone）；抗肾上腺类诸如氨鲁米特（aminoglutethimide）、米托坦（mitotane）、曲洛司坦（trilostane）；叶酸补充剂，诸如亚叶酸（frolinic acid）；醋葡萄糖内酯（aceglatone）；醛磷酸胺糖苷；氨基酮戊酸；恩尿嘧啶（eniluracil）；安吡啶（amsacrine）；bestrabucil；比生群（bisantrene）；依达曲沙（edatraxate）；地磷酰胺（defofamine）；地美可辛（demecolcine）；地吡醌（diaziquone）；依洛尼塞（elfornithine）；依利醋铵（elliptinium acetate）；依托格鲁（etoglucid）；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖（lentinan）；氯尼达明（lonidainine）；美登木素生物碱类（maytansinoids），诸如美登素（maytansine）和安丝菌素（ansamitocin）；米托胍脲（mitoguazone）；米托蒽醌（mitoxantrone）；莫哌达醇（mopidanmol）；二胺硝吡啶（nitraerine）；喷司他丁（pentostatin）；蛋氨酸芥（phenamet）；吡柔比星（pirarubicin）；洛索蒽醌（losoxantrone）；2-乙酰肼；丙卡巴肼（procarbazine）；**PSK®** 多糖复合物；雷佐生（razoxane）；根霉素（rhizoxin）；西佐喃（sizofiran）；锗螺胺（spirogermanium）；细交链孢菌酮酸（tenuazonic acid）；三亚胺醌（triaziquone）；2, 2', 2'' - 三氯乙胺；单端孢霉烯（trichothecene）类（特别为 T-2 毒素、抚孢菌素（verracurin）A、杆孢菌素（roridin）A 和蛇形菌素（anguidine））；乌拉坦（urethan）；长春地辛（**ELDISINE®**, **FILDESIN®**）；达卡巴嗪（dacarbazine）；甘露莫司汀（mannomustine）；二溴甘露醇（mitobronitol）；二溴卫矛醇（mitolactol）；哌泊溴烷（pipobroman）；gacytosine；阿糖胞苷（“Ara-C”）；塞替派（thiotepa）；紫杉烷类如，紫杉醇（**TAXOL®**）、紫杉醇的白蛋白-工程化的纳米微粒组合物（ABRAXANE. TM.）和多西他赛（doxetaxel）（**TAXOTERE®**）；苯丁酸氮芥（chlorambucil）；6-硫代鸟嘌呤；硫嘌呤；甲氨蝶呤；铂类似物诸如顺铂和卡铂；长春碱（**VELBAN®**）；铂；依托泊苷（etoposide）

(VP-16) ; 异环磷酰胺 ; 米托蒽醌 (mitoxantrone) ; 长春新碱 (**ONCOVIN®**) ; 奥沙利铂 (oxaliplatin) ; 亚叶酸 (leucovorin) ; 长春瑞滨 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**) ; 米托蒽醌 (novantrone) ; 依达曲沙 (edatrexate) ; 道诺霉素 (daunomycin) ; 氨基蝶呤 ; 伊班膦酸盐 (ibandronate) ; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000 ; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine) (DMFO) ; 类维 A 酸诸如视黄酸 ; 上述任一项的药理学上可接受的盐、酸或衍生物 ; 以及上述两种或更多种的组合诸如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙的组合治疗的缩写) 和 FOLFOX (用与 5-FU 和亚叶酸组合的奥沙利铂 (**ELOXATIN®**) 的治疗方案的缩写) 。

[0189] 在本定义中还包括用以调节、降低、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的作用并且常常以系统的或全身治疗施用的抗激素剂。它们可以为激素本身。实例包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene) (**EVISTA®**)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4- 羟他莫昔芬 (4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和托瑞米芬 (toremifene) (**FARESTON®**) ; 抗黄体酮类 ; 雌激素受体下调剂 (ERD) ; 起到抑制或关闭卵巢功能的药剂, 例如, 促黄体素释放激素 (LHRH) 激动剂诸如醋酸亮丙瑞林 (**LUPRON®** 和 **ELIGARD®**)、醋酸戈舍瑞林、醋酸布舍瑞林和曲普瑞林 (tripterelin) ; 其它抗雄激素类诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡鲁胺 (bicalutamide) ; 以及芳香酶抑制药诸如, 例如, 4(5)- 咪唑类、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、醋酸甲地孕酮 (**MEGASE®**)、依西美坦 (exemestane) (**AROMASIN®**)、福美司坦 (formestane)、法偈唑 (fadrozole)、伏氯唑 (vorozole) (**RIVISOR®**)、来曲唑 (letrozole) (**FEMARA®**) 和阿那曲唑 (anastrozole) (**ARIMIDEX®**)。另外, 双磷酸盐类诸如氯膦酸盐 (例如, **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、依替膦酸 (etidronate) (**DIDROCAL®**)、NE-58095、唑来膦酸 (zoledronic acid) / 唑来膦酸盐 (zoledronate) (**ZOMETA®**)、阿仑膦酸盐 (alendronate) (**FOSAMAX®**)、氨羟二磷酸二钠 (pamidronate) (**AREDIA®**)、替鲁膦酸 (tiludronate) (**SKELID®**) 或利塞膦酸盐 (risedronate) (**ACTONEL®**) ; 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物) ; siRNA、核酶和反义寡核苷酸类, 特别为在牵涉异常细胞增生的信号转导通路中抑制基因表达的那些 ; 疫苗类诸如 **THERATOPE®** 疫苗和基因治疗疫苗, 例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗 ; 拓扑异构酶 1 抑制剂 (如, **LURTOTECAN®**) ; rmRH (如, **ABARELIX®**) ; 二甲苯磺酸拉帕替尼 (lapatinib ditosylate) (ErbB-2 和 EGFR 双重酪氨酸激酶小分子抑制剂也称为 GW572016) ; COX-2 抑制剂诸如塞来昔布 (celecoxib) (**CELEBREX®**) ; 4-(5-(4- 甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑-1- 基) 苯磺酰胺 ; 以及上述任一项的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0190] 如本文所用, 术语“多肽”是指除了多肽之外的肽和全蛋白并包括分离的和重组多

肽。如本文所用,“生物功能”是指分子的生物学特性并且在本文中意指体内效应物或抗原功能或活性,其直接或间接由天然存在的多肽或核酸分子进行。生物功能包括但不限于受体结合、任何酶活性或酶调节活性、任何载体结合活性、任何激素活性、内化分子或从一个室移位到另一个室的任何活性、在促进或抑制细胞粘附于细胞外基质或细胞表面分子的任何活性或任何结构作用以及具有编码功能性蛋白并且为可表达的核酸序列。抗原功能基本上意指具有能够与针对天然存在的蛋白产生的抗体进行交叉反应的表位或抗原位点。生物活性类似物共享天然多肽的效应功能,其可以但不需要另外具有抗原功能。

[0191] END0180 多肽的水平的测量可以通过选自以下的方法确定:免疫组织化学、蛋白质印迹、ELISA 抗体微阵列杂交和靶向分子成像。这些方法在本领域为熟知的,例如免疫组织化学、蛋白质印迹、抗体微阵列杂交和靶向分子成像。

[0192] END0180 多核苷酸水平的测量可以通过选自 RT-PCR 分析、原位杂交、多核苷酸微阵列和 Northern 印迹确定。此类方法在本领域为熟知的。

[0193] 反义分子

[0194] 在一些实施方案中,所述治疗剂为反义寡核苷酸。术语“反义”(AS)或“反义片段”意指具有抑制性反义活性的多核苷酸片段(包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或两者的混合物),所述活性引起对应基因的内源性基因组拷贝的表达下降。AS 多核苷酸为包含具有足够长度并且与靶基因的序列内存在的序列同源以允许 AS 与基因杂交的序列的连续核苷酸的多核苷酸。许多综述已经涵盖了反义(AS)技术及其治疗潜力的主要方面(Aboul-Fadl T., Curr Med Chem. 2005, 12(19):2193-214; Crooke ST, Curr Mol Med. 2004, 4(5):465-87; Crooke ST, Ann Rev Med. 2004, 55:61-95; Vacek M 等, Cell Mol Life Sci. 2003, 60(5):825-33; Cho-Chung YS, Arch Pharm Res. 2003, 26(3):183-91。存在 AS 技术的化学(Crooke 等, Hematol Pathol. 1995, 9(2):59-72)、细胞(Wagner, Nature. 1994, 372(6504):333-5)和治疗(Scanlon 等 FASEB J. 1995, 9(13):1288-96)方面的综述。在表达特定基因中反义干预可通过使用修饰的 AS 寡核苷酸序列实现(对于最近的报道参见 Lefebvre-d'Hellencourt 等, 1995; Agrawal, 1996; Lev-Lehman 等, 1997)。

[0195] AS 寡核苷酸序列可以为短的 DNA 序列,通常为 15-30mer,但可以小至 7-mer(Wagner 等, Nat. Biotech. 1996, 14(7):840-4),被设计与目标靶 mRNA 互补并形成 RNA:AS 双链体。该双链体的形成可防止相关 mRNA 的加工、剪接、运输或翻译。此外,当与它们的靶 mRNA 杂交时,某些 AS 核苷酸序列可引发细胞 RNA 酶 H 活性,导致 mRNA 降解(Calabretta 等, Semin Oncol. 1996, 23(1):78-87)。在此情况下, RNA 酶 H 将裂解双链体的 RNA 组分并且可能释放 AS 以与靶 RNA 的其它分子进一步杂交。另外的作用方式由 AS 与基因组 DNA 的相互作用产生以形成三螺旋,所述三螺旋可为转录失活的。

[0196] 选择反义寡核苷酸的序列靶标片段使得序列表现出对与其互补模板形成寡核苷酸双链体重要的合适的能量相关特性,并且对于自身二聚化或自身互补显示出低的可能性(Anazodo 等, 1996, BBRC. 229:305-309)。例如,可使用计算机程序 OLIGO(引物分析软件,版本 3.4)确定反义序列的解链温度、自由能特性并估计可能的自身二聚体形成和自身互补特性。所述程序允许确定这两个参数(可能的自身二聚体形成及自身互补)的定性估算并提供“不可能”或“一些可能”或“基本完全可能”的指示。使用该程序通常选择在这些参数中估算为不可能的靶向区段。然而,可以使用在类别中的一种中具有“一些可能”的区

段。参数的平衡用于如本领域已知的选择。此外,也按需要选择寡核苷酸以便类似物取代基本上不会影响功能。

[0197] 硫代磷酸酯反义寡核苷酸通常在有效的浓度处不示出显著的毒性并在动物中表现出足够的药效动力学半衰期(Agrawal等,PNAS U S A. 1997, 94(6):2620-5)并且对核酸酶具有抗性。具有促有丝分裂和血管生成特性的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的反义寡核苷酸抑制以可饱和的和特异性方式抑制80%的神经胶质瘤细胞的生长(Morrison, J Biol Chem. 1991;266(2):728-34)。疏水性反义寡核苷酸与磷脂膜相互作用良好(Akhter等, NAR. 1991, 19:5551-5559)。它们与细胞质膜相互作用之后,它们以预测涉及特异性受体的可饱和机制(Yakubov等,PNAS, 1989;86(17):6454-58)主动地(或被动地)转运入活细胞内(Loke等,PNAS 1989, 86(10):3474-8)。

[0198] siRNA 和 RNA 干扰

[0199] RNA 干扰(RNAi)为涉及双链(ds)RNA 依赖性基因特异性转录后沉默的现象。研究这种现象并实验性地处理哺乳动物细胞的初始尝试受到主动的、非特异性的抗病毒防御机制的阻止,所述抗病毒防御机制响应于长的 dsRNA 分子而被激活(Gil等,Apoptosis, 2000, 5:107-114)。后来发现21个核苷酸RNA的合成双链体能在哺乳动物细胞中介导基因特异性RNAi,而不刺激通用抗病毒防御机制Elbashir等.Nature 2001, 411:494-498和Caplen等.PNAS 2001, 98:9742-9747)。因此,小干扰RNA(siRNA),其为短的双链RNA,已被广泛用于抑制基因表达和理解基因功能。

[0200] RNA 干扰(RNAi)由小的干扰RNA(siRNA)(Fire等,Nature 1998, 391:806)或微小RNA(miRNA)(Ambros V. Nature 2004, 431:350-355);和Bartel DP. Cell. 2004;116(2):281-97)介导。当在植物中观察时,对应的过程通常被称为特异性转录后基因沉默,并且当在真菌中观察时,通常被称为抑制(quelling)。

[0201] siRNA 为下调或沉默(即完全地或部分抑制)内源基因或外源基因/mRNA 的表达的双链RNA。RNA 干扰基于某些 dsRNA 物质能够进入特定的蛋白质复合物,在所述蛋白质复合物中 dsRNA 物质然后被靶向它们特异性地降解或裂解的互补细胞 RNA(即 mRNA)。因此, RNA 干扰应答特征为含有 siRNA 的内切核酸酶复合物,通常被称为 RNA 诱导的沉默复合物(RISC),所述内切核酸酶复合物介导具有与 siRNA 双链体的反义链互补的序列的单链 RNA 的裂解。靶 RNA 的裂解可能发生在与 siRNA 双链体的反义链互补的区域的中间(Elbashir等,Genes Dev., 2001, 15:188)。更详细地,较长的 dsRNA 被 III 型 RNA 酶(DICER、DROSHA 等)消化成短的(17-29bp)dsRNA 片段(也称为短的抑制性 RNA 或“siRNA”)(参见 Bernstein 等, Nature, 2001, 409:363-6 和 Lee 等, Nature, 2003, 425:415-9)。RISC 蛋白复合物识别这些片段和互补的 mRNA。整个过程通过内切核酸酶裂解靶 mRNA 达到顶点(McManus 和 Sharp, Nature Rev Genet, 2002, 3:737-47;Paddison 和 Hannon, Curr Opin Mol Ther. 2003, 5(3):217-24)。(对于这些术语和提出的机制的额外信息,参见例如 Bernstein 等, RNA. 2001, 7(11):1509-21;Nishikura, Cell. 2001, 107(4):415-8 和 PCT 公布号 WO 01/36646)。

[0202] 研究已揭示 siRNA 在哺乳动物(包括人)体内为有效的。具体地讲,Bitko 等示出当鼻内施用,针对呼吸道合胞体病毒(RSV)病毒粒子 N 基因的特异性 siRNA 可有效治疗小鼠(Nat. Med. 2005, 11(1):50-55)。对于 siRNA 的治疗应用的综述参见例如 Barik(Mol.

Med2005, 83:764-773) 和 Chakraborty (Current Drug Targets 20078(3):469-82)。另外,使用靶向 VEGFR1 受体以便治疗年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的短 siRNA 的临床研究已经在人患者中进行 (Kaiser, Am J Ophthalmol. 2006142(4):660-8)。关于将 siRNA 用作治疗剂的更多信息可以见于 Durcan, 2008. Mol. Pharma. 5(4):559 - 566 ;Kim&Rossi, 2008. BioTechniques 44:613-616 ;Grimm&Kay, 2007, JCI, 117(12):3633-41。

[0203] 如本文公开的 dsRNA 为未修饰的、重组的或化学修饰的。可用于合成 dsRNA, 包括 siRNA 和 siNA 的化学修饰的实例公开于 PCT 专利公布号 WO 2009/044392、WO 2011/066475、WO 2011/085056 并且据此通过引用整体并入。

[0204] 对于本文目的的药学“有效量”因此通过如本领域已知的考虑因素确定。所述量必须有效以达到改善,所述改善包括但不限于如由本领域技术人员选择作为适当的量度的提高的存活率或更快的恢复、或改善或消除症状和其它指示。本文公开的组合物通过任何常规的施用途径施用。应该注意的是可单独施用该组合物或与药学上可接受的载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂和媒介物一起施用。可口服、皮下或肠胃外包括静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内和鼻内施用以及鞘内和输注技术施用该化合物。化合物的植入物也是有用的。可以制备用于注射的液体形式,该术语包括皮下、经皮、静脉内、肌肉内、鞘内和其它肠胃外施用途径。液体组合物包括水溶液、含有和不含有有机共溶剂、水或油悬浮液、含有食用油的乳液以及类似的药学媒介物。

[0205] 另外,在某些情况下用于本发明的新型治疗的组合物可以形成为气溶胶用于鼻内类似施用。所治疗的患者为温血动物并且特别为哺乳动物,包括人。药学上可接受的载体、溶剂、稀释剂、赋形剂、佐剂和媒介物以及植入载体通常是指惰性、非毒性固体或液体填充物、稀释剂或不与本文公开的活性成分反应的封装材料并且它们包括脂质体、脂质化糖胺聚糖和微球体。用于本发明递送系统的实例包括美国专利号 5, 225, 182 ;5, 169, 383 ;5, 167, 616 ;4, 959, 217 ;4, 925, 678 ;4, 487, 603 ;4, 486, 194 ;4, 447, 233 ;4, 447, 224 ;4, 439, 196 ;和 4, 475, 196。许多其它的这种植入物、递送系统和模块为本领域技术人员所熟知。

[0206] 通常,在一次剂量/天或两次/天或三次/天或更多次/天持续 1-2 周或更长的时期,优选持续 24- 至 48 小时或通过 1-2 周或更长时期连续输注的给药方案中,用于人的化合物的活性剂量的范围为 1ng/kg 体重/天至约 20-100mg/kg 体重/天,优选为约 0.01mg/kg 体重/天至约 2-10mg/kg 体重/天。

[0207] 此外,本文提供了与对照相比将靶基因的表达下调至少 50% 的方法,所述方法包括使基因的 mRNA 转录物与本文公开的组合物或核酸分子中的一种或多种接触。

[0208] 在一个实施方案中,所述治疗制剂抑制靶基因,由此抑制选自基因功能的抑制、多肽的抑制和 mRNA 表达的抑制。

[0209] 配制所述药物组合物以提供单剂量施用或多剂量施用。

[0210] 在各种实施方案中,所述药物组合物通过静脉内、肌肉内、局部或皮下施用于受试者。

[0211] 本文公开的药物组合物也可用于预防和 / 或治疗本文公开的疾病的方法,由此所述方法包括将本文公开的组合物或药物施用于有需要的受试者以用于治疗本文描述的任何疾病。

[0212] 诊断

[0213] 本文公开的组合物可用于诊断生物样品中表达 END0180 的细胞。递送系统可以包括在正常或患病细胞中可检测的部分。本文预期的可检测部分包括但不限于荧光、金属、酶和放射性标记,诸如生物素、金、铁蛋白、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、过氧化物酶、脲酶、荧光素、若丹明和放射性同位素(包括氚)¹⁴C 和碘。

[0214] 递送

[0215] 在一些实施方案中,本文公开的组合物通过全身施用被递送至靶组织。

[0216] 根据良好的医学实践,考虑到各个患者的临床状况、待治疗的疾病、施用的位点和方法、施用的时间表、患者年龄、性别、体重和医疗从业者已知的其它因素对本文公开的组合物进行施用和给药。

[0217] 对于本文目的的“治疗有效剂量”因此通过本领域已知的此类考虑因素确定。剂量必须有效以达到改善,所述改善包括但不限于如由本领域技术人员选择作为适当的量度的提高的存活率或更快的恢复、或改善或消除症状和其它指示。

[0218] 在一些实施方案中,所述组合物为“稳定的”并且在暴露于血清或细胞蛋白酶、脂酶和或核酸酶之后不会发生显著降解。用于确定稳定性的合适的测定包括本领域已知的血清稳定性测定或细胞提取物测定。

[0219] 如本文所用,“全身递送”是指引起组合物在受试者内广泛的生物分布的递送。本文公开的组合物的全身递送可通过本领域已知的任何方法实现,包括,例如,静脉内、皮下或腹膜内施用。在优选的实施方案中,所述组合物通过静脉内递送进行全身递送。

[0220] 在优选的实施方案中,所述治疗的受试者为温血动物并且特别为哺乳动物,包括人。

[0221] 用于将本文公开的组合物递送至分离的细胞的合适的方法包括,除了别的以外,转染、脂质转染和电穿孔。

[0222] 组合治疗

[0223] 在各种实施方案中,提供了组合治疗。在一个实施方案中,两种或更多种治疗剂的共同施用实现协同作用,即,大于组合的各个组分的治疗作用的总和的治疗作用。在另一个实施方案中,两种或更多种治疗剂的共同施用实现累加作用。

[0224] 可以经由单一剂型或通过单独施用每种活性药剂来一起施用组成组合治疗的活性成分。在某些实施方案中,所述第一治疗剂和第二治疗剂以单一剂型施用。或者,所述第一治疗剂和第二治疗剂可以作为单独的组合物施用。所述第一活性剂可以与所述第二活性剂同时施用或所述第一活性剂可以与所述第二活性剂间歇施用。可以调整施用第一治疗剂与第二治疗剂之间的时长以实现所需的治疗效果。例如,在施用第一治疗剂之后仅几分钟(例如,1、2、5、10、30 或 60 分钟)或几小时(例如,2、4、6、10、12、24 或 36 小时)可以施用第二治疗剂。在某些实施方案中,可能有利的是在施用第二治疗剂之间施用多于一种剂量的治疗剂中的一种。例如,可以在施用第一治疗剂之后 2 小时,然后在 10 小时再次施用第二治疗剂。或者,可能有利的是在施用第二治疗剂之间施用多于一种剂量的第一治疗剂。重要地是,优选每种活性成分的治疗效果重叠每种治疗剂的至少一部分持续时间使得组合治疗的整个治疗效果部分归因于组合治疗的组合作用或协同作用。

[0225] 本文公开了组合物和可用于将治疗货物(therapeutic cargo)和诊断货物

(diagnostic cargo) 靶向递送至细胞的组合物的用途并且所述组合物可以有益地用于治疗患有增生性疾病包括癌症和纤维化疾病的受试者。

[0226] 治疗方法

[0227] 本公开的另一个方面提供了治疗患有增生性疾病包括癌症、转移性疾病和纤维化的受试者的方法。提供了用于治疗与不受控制的、病变细胞生长例如癌症和器官纤维化相关的疾病和病症的方法。特别地，本文公开的组合物可用于治疗其中 ENDO180 在患病细胞和或组织的至少一部分中表达的增生性疾病，。还提供了用于治疗或预防有需要的受试者的疾病或病患的发生或严重性和 / 或用于减少有需要的受试者的疾病或病患的风险或严重性的方法，其中所述的疾病或病患和 / 或与其相关的症状和 / 或风险和与 ENDO180 的异常表达相关的基因的表达相关。在优选的实施方案中，所述受试者为人受试者。

[0228] 癌症治疗

[0229] “癌症”或“肿瘤”是指细胞的异常增生。这些术语包括原发性肿瘤，其可以是良性的或恶性的，以及继发性肿瘤或扩散至体内其它部位的转移。增生性疾病的实例特别包括：癌（例如：乳腺癌、结肠癌和肺癌）、白血病（诸如 B 细胞白血病）、淋巴瘤（诸如 B 细胞淋巴瘤）、母细胞瘤（诸如神经母细胞瘤）和黑素瘤以及肉瘤。应当知道本文公开的药物组合物用于涉及不希望的脉管系统的形成或生长（包括血管生成）的任何疾病以及本文描述的任何疾病和病患，特别是表现出异常 ENDO180 表达的疾病和病症。

[0230] 本文提供了用于治疗患有增生性疾病的患者的方法和组合物，所述增生性疾病包括癌性增生性疾病（例如，肺癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胃癌、肾癌、白血病、肝癌、淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、直肠癌、肉瘤、皮肤癌、睾丸癌和子宫癌），其中所述癌细胞表达 ENDO180 多肽。在一个特定实施方案中，所述癌症为肾癌，包括 RCC 和 TCC。

[0231] “癌症”和“癌性疾病”可互换使用并且是指由不适当高水平的细胞分裂、不适当低水平的细胞凋亡或二者引起或导致不适当高水平的细胞分裂、不适当低水平的细胞凋亡或二者的疾病。癌性疾病的实例包括但不限于白血病（例如，急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性骨髓单核细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病）、真性红细胞增多症、淋巴瘤（霍奇金氏病、非霍奇金氏病）、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链病和实体瘤诸如肉瘤和癌（例如，纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肉瘤 (Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤 (hepatoma)、胆管癌 (bile duct carcinoma)、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤 (Wilm's tumor)、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤 (craniopharyngioma)、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤 (oligodendroglioma)、神经鞘瘤 (schwannoma)、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。包括治疗原发性癌的转移。在一些优选实施方案中，所述组合物可用于治疗肾癌、乳腺癌、卵巢癌及其在各种器官（包括肺和骨骼）中的转移。

[0232] 如本文所用,术语“增生性疾病”是指其中恶性或良性的细胞增生导致病患的病变的任何疾病。这种不想要的增生为癌症和许多慢性炎症性疾病的标志,因此“增生性疾病”的实例包括上文所列的癌症和慢性炎症性增生性疾病诸如银屑病、炎性肠病和类风湿性关节炎;增生性心血管疾病诸如再狭窄;增生性眼部病症诸如糖尿病性视网膜病变;和良性的过增生疾病诸如血管瘤。

[0233] 纤维化疾病

[0234] 纤维化疾病为一组慢性疾病,其特征在于过量产生被称为细胞外基质的纤维材料,所述纤维材料导致组织结构的异常变化并干扰正常器官功能。全世界数百万人患有这些慢性疾病,它们通常危及生命。不幸的是,尽管纤维化相当普遍、使人虚弱并且通常危及生命,但是当前没有可用的有效治疗。

[0235] 人体通过瘢痕形成响应于创伤和损伤。当正常的伤口愈合响应被干扰时会发生纤维化,所述纤维化为以过量瘢痕形成为特征的一种病症。在纤维化期间,伤口愈合响应持续引起胶原的过量生成和沉积。

[0236] 尽管纤维化病症可为急性的或慢性的,但是当正常组织被疤痕组织替换时,该病症共享过量胶原积聚和相关功能丧失的共同特征。

[0237] 纤维化由不同原因引起并且可以在各种器官中形成。硬化、肺纤维化、结节病、瘢痕瘤、高血压和肾纤维化均为能诱导引起组织功能持续丧失的逐渐纤维化的慢性疾病。

[0238] 在一些实施方案中,优选的适应症包括肝纤维化和肺纤维化,例如由于肝移植后丙型肝炎或非酒精性脂肪性肝炎(NASH)引起的肝硬化;特发性肺纤维化;导致肺纤维化的放射性肺炎;糖尿病性肾病;与连续非卧床腹膜透析(CAPD)相关的腹膜硬化和眼部瘢痕性类天疱疮。以对各种形式的创伤的常见响应发生急性纤维化(通常具有突然的和严重的发作和短的持续时间),所述创伤包括意外损伤(特别是对脊柱和中枢神经系统的损伤)、感染、外科手术(在心脏病发作后的心脏瘢痕形成)、烧伤、环境污染物、醇和其它类型的毒素、急性呼吸窘迫综合征和辐射和化学疗法治疗。由创伤损伤的所有组织易于结疤并且变得纤维化,特别是如果重复损伤。深层器官纤维化常常极其严重因为器官功能的逐渐丧失导致发病、住院、透析、残疾并且甚至死亡。纤维化疾病或其中纤维化明显的疾病包括肺纤维化、间质性肺病、人纤维化肺病、肝纤维化、心脏纤维化、黄斑变性、视网膜和玻璃体视网膜病变、心肌纤维化、Grave 眼病、药物诱发的麦角中毒、心血管疾病、动脉粥样硬化/再狭窄、瘢痕瘤和肥大性疤痕、汉森病(Hansen's disease)和炎性肠病,包括胶原性结肠炎。

[0239] 关于不同类型的纤维化的更多信息可以见于例如 Yu 等(2002),“Therapeutic strategies to halt renal fibrosis”,Curr Opin Pharmacol.2(2):177-81; Keane 和 Lyle(2003),“Recent advances in management of type 2 diabetes and nephropathy:lessons from the RENAAL study”,Am J Kidney Dis.41(3 增刊 2):S22-5; Bohle 等(1989),“The pathogenesis of chronic renal failure”,Pathol Res Pract.185(4):421-40;Kikkawa 等(1997),“Mechanism of the progression of diabetic nephropathy to renal failure”,Kidney Int 增刊 62:S39-40;Bataller 和 Brenner(2001),“Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis”,Semin Liver Dis.21(3):437-51;Gross 和 Hunninghake(2001)“Idiopathic pulmonary fibrosis”,N Engl J Med.345(7):517-25;Frohlich(2001)“Fibrosis and

ischemia:the real risks in hypertensive heart disease”,Am J Hypertens ;14(6Pt 2):194S-199S。

[0240] 糖尿病性肾病

[0241] 糖尿病性肾病（其标志为肾小球硬化症和肾纤维化）为现代世界晚期肾病的单个最普遍的原因，并且糖尿病患者构成了透析的最大群体。此种治疗昂贵并且非常不理想。移植提供较好的结果，但是经受供体的严重紧缺。针对糖尿病性肾病（以及针对其它类型的肾病变）的更多靶向治疗未得到开发，因为这些病变的潜在分子机制大部分为未知的。基本功能性靶基因的鉴定具有高的诊断以及治疗价值，所述基本功能性靶基因在疾病中得到调节并影响糖尿病性肾病的结果的严重性。

[0242] 本领域已知的是肾中的许多病理过程最终以类似的或相同的形态变化，即肾小球硬化症和纤维化达到顶点。人肾疾病可能演化自各种来源，包括肾小球肾炎、与全身性红斑狼疮相关的肾炎、癌症、物理障碍物、毒素、代谢疾病和免疫疾病，所有这些在肾纤维化中达到顶点。这种现象的意义为不同类型的损伤会聚在相同的单个遗传程序上，产生纤维化的两个标志：成纤维细胞的增生和由它们过量产生结缔组织的各种蛋白组分。另外，肾小球中基膜的增厚伴随间质纤维化并在肾小球硬化症中达到顶点。不希望受到理论的束缚，编码参与肾纤维化和肾小球硬化症的蛋白质的基因可以大致分为两组：

[0243] 1. 其表达引发成纤维细胞的增生和它们过量产生结缔组织的各种蛋白组分的基因。这些对于不同病理状况可能为特异的；和

[0244] 2. 其表达导致“纤维化或硬化程序”的执行的基因。这些对于导致纤维化和肾小球硬化症的所有肾病理学可能为常见的。

[0245] 属于第二组的基因的鉴定应当有助于理解伴随成纤维细胞以及系膜细胞增生和分泌过多的分子机制并可建立针对预防肾衰竭的药物开发的基因靶标。预期应用此类药物来阻遏、延迟、防止、抑制或减弱纤维化和肾小球硬化症的进展。

[0246] 试剂盒

[0247] 还提供了包括全部或部分组合物的试剂盒。“试剂盒”是指包括组合物或组合物的组分的任何产品（如，包装或容器）。可以将该试剂盒用于进行本文公开的方法，包括治疗性处理和诊断。另外，试剂盒可以含有描述试剂盒、其内容物和使用方法的包装说明书。

[0248] 本发明已经以示例性方式得到描述，并且应当理解已经使用的术语旨在描述词语的本质而非限制。

[0249] 本文引用任何文献并不旨在承认此类文件与现有技术相关或将材料考虑为本申请的任何权利要求的专利性。关于任何文件的内容或日期的任何陈述基于在提交时申请人可用的信息并且不构成承认关于此类陈述的正确性。

实施例

[0250] 分子生物学中的一般方法

[0251] 本领域已知的并且未具体描述的标准分子生物学技术一般遵循 Sambrook 等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1989)，和 Ausubel 等，Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989)，以及 Perbal,A Practical Guide to

Molecular Cloning, John Wiley&Sons, New York(1988), 和 Watson 等, Recombinant DNA, Scientific American Books, New York 和 Birren 等 (编辑) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, 第 1-4 卷 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York(1998) 和如在美国专利 4,666,828 ;4,683,202 ;4,801,531 ;5,192,659 和 5,272,057 中列出的方法并通过引用并入本文。聚合酶链式反应 (PCR) 一般如在 PCR Protocols :A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA(1990) 中进行。可使用原位 (细胞中)PCR 结合流式细胞术检测含有特定 DNA 和 mRNA 序列的细胞 (Testoni 等, 1996, Blood 87:3822.)

[0252] 免疫学中的一般方法:在本领域已知的并且未具体描述的免疫学中的标准方法一般遵循 Stites 等 (编辑), Basic and Clinical Immunology (第 8 版), Appleton& Lange, Norwalk, CT(1994) 以及 Mishell 和 Shiigi (编辑), Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., New York(1980)。

[0253] 免疫测定:ELISA 免疫测定为本领域的技术人员所熟知。多克隆抗体和单克隆抗体均可用于所述测定。在适当的情况下,如本领域技术人员所已知,可使用其它免疫测定诸如放射性免疫测定 (RIA)。可用的免疫测定在专利和科学文献中广泛描述。参见,例如,美国专利号 3,791,932 ;3,839,153 ;3,850,752 ;3,850,578 ;3,853,987 ;3,867,517 ;3,879,262 ;3,901,654 ;3,935,074 ;3,984,533 ;3,996,345 ;4,034,074 ;4,098,876 ;4,879,219 ;5,011,771 和 5,281,521 以及 Sambrook 等, Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor, New York, 1989。

[0254] 抗体产生

[0255] 本文所用术语“抗体”意指多克隆完整抗体和单克隆完整抗体及其片段,诸如 Fab、F(ab')₂、scFv 和 Fv,它们能够结合表位决定簇。这些抗体片段保留了与其抗原或受体选择性结合的能力并尤其如下例证:

[0256] Fab, 含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段可通过以下产生:用木瓜蛋白酶消化完整抗体以产生轻链和重链的一部分;

[0257] (Fab')₂, 可通过用胃蛋白酶处理完整抗体无需随后的还原获得的抗体片段; F(ab')₂ 为通过两个二硫键结合在一起的两个 Fab 片段的二聚体;

[0258] Fv, 被定义为含有表达为两条链的轻链的可变区和重链的可变区的基因工程改造片段;以及

[0259] scFv 片段 (即单链抗体 (“SCA”), 被定义为含有由合适的多肽连接子连接为基因融合单链分子的轻链的可变区和重链的可变区的基因工程改造分子。

[0260] 具有抗体功能活性的此类片段可通过本领域技术人员已知的方法制备 (Bird 等. (1988) Science 242:423-426)。(Mab 或 mAb 在本文被用作单克隆抗体的缩写。MB 在本文被用作微型抗体的缩写。)

[0261] 方便地,可以制备针对免疫原或其部分的抗体,所免疫原或其部分例如基于序列或通过克隆技术重组制备的合成肽,或者可以分离天然基因产物和 / 或其部分并将它们用作免疫原。可通过本领域技术人员熟知的标准抗体产生技术使用免疫原产生抗体,如通常描述于 Harlow 和 Lane(1988), Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 以及 Borrebaeck(1992), Antibody Engineering-A

Practical Guide, W. H. Freeman and Co., NY。

[0262] 为了制备多克隆抗体,用通常含有佐剂并且,如果需要,偶联至载体的免疫原或免疫原片段免疫宿主诸如兔或山羊;从血清收集免疫原的抗体。此外,多克隆抗体可以被吸附使得抗体为单特异性的;即,血清可针对相关免疫原被吸附从而血清中不含交叉反应性抗体,使得所述抗体为单特异性的。

[0263] 为了产生单克隆抗体,所述技术包括用免疫原使适当的供体(通常为小鼠)超免疫,和分离产生抗体的脾细胞。将这些细胞与永生细胞(诸如骨髓瘤细胞)融合以提供永生的并且分泌所需抗体的融合杂种细胞。然后将细胞大量培养并从培养基中收获单克隆抗体以便使用。

[0264] 对于产生重组抗体,通常参见 Huston 等(1991)“Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins”在 Methods in Enzymology(JJ Langone 编辑,Academic Press, New York, NY)203:46-88 中;Johnson 和 Bird(1991)“Construction of single-chain Fv derivatives of monoclonal antibodies and their production in Escherichia coli in Methods in Enzymology(JJ Langone 编辑;Academic Press, New York, NY)203:88-99;Mernaugh 和 Mernaugh(1995)“An overview of phage-displayed recombinant antibodies”在 Molecular Methods In Plant Pathology(RP Singh 和 US Singh 编辑;CRC Press Inc., Boca Raton, FL:359-365) 中。另外,可将来自动物的抗体生成 B 淋巴细胞或杂交瘤的信使 RNA 反向转录以获得互补 DNA(cDNA)。扩增抗体 cDNA 并克隆至噬菌体或质粒,所述抗体 cDNA 可为全长或部分长度。所述 cDNA 可为重链和轻链 cDNA 的部分长度,可为分离的或通过连接子连接。使用合适的表达系统表达所述抗体或抗体片段以获得重组抗体。也可通过筛选相关的表达文库获得抗体 cDNA。

[0265] 如本领域所熟知可将所述抗体结合于固体载体基底或与可检测部分缀合或结合且缀合。(对于荧光或酶部分的缀合的综述性讨论,参见 Johnstone 和 Thorpe(1982.), Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, Oxford)。抗体与固体载体基质的结合也为本领域熟知的(对于综述性讨论,参见 Harlow 和 Lane(1988)Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York; 和 Borrebaeck(1992), Antibody Engineering-A Practical Guide, W. H. Freeman and Co.)。本文涵盖的可检测部分或标记包括但不限于荧光、金属、酶和放射性标记,诸如生物素、金、铁蛋白、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、过氧化物酶、脲酶、荧光素、若丹明、氘、 ^{14}C 和碘。

[0266] 重组蛋白纯化:对于标准的纯化,参见 Marshak 等(1996),“Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual.”CSHL Press。

[0267] 实施例 1:抗 END0180 抗体

[0268] END0180 也称为 C 型甘露糖受体 2 前体。人 END0180mRNA 的多核苷酸序列列于登记号 NM_006039 中。该多核苷酸序列的 3:5983 碱基中,开放阅读框(ORF)为 4439 个碱基(从 117-4441);1479 个氨基酸(aa)的多肽序列列于登记号 NP_006030 中,其中基因标识号为 GI:110624774。小鼠 mRNA 序列为 5818 个碱基,登记号为 MMU56734,其中 ORF 为 1479 个氨基酸。

[0269] END0180 包含如下若干蛋白质结构域:1-31 个氨基酸的 SP(信号肽);41-161 个氨基酸富含半胱氨酸的 N 末端结构域;180-228 个氨基酸的 FNII(纤连蛋白类型 II)结构域、8 个 CDR(碳水化合物识别结构域)结构域 1CRD-8CRD(235-360 个氨基酸的 1CRD、382-505 个氨基酸的 2CRD、521-645 个氨基酸的 3CRD、669-809 个氨基酸的 4CRD、825-951 个氨基酸的 5CRD、972-1108 个氨基酸的 6CRD、1161-1244 个氨基酸的 7CRD、1261-1394 个氨基酸的 8CRD);1413-1435 个氨基酸的 1TM(跨膜结构域)、1437-1479 个氨基酸的细胞质结构域。在一些实施方案中,所述 END0180 多肽与列于 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列(NCBI 标识:gi|110624774|ref|NP_006030.2|)基本相同,所述氨基酸序列由与列于 SEQ ID NO:1 的核酸序列(NCBI 标识:gi|110624773|ref|NM_006039.3|)基本相同的多核苷酸编码。

[0270] 以下提供本文公开的多核苷酸和氨基酸序列:具有 FLAG 序列(pcDNA3-5' hEND0180-FLAG 构建体,SEQ ID NO:3)的人 END0180 的细胞外结构域的多核苷酸序列(氨基酸 1-522);SEQ ID NO:3(SEQ ID NO:4)的多肽序列;scFv 克隆 G7V 的多核苷酸序列(SEQ ID NO:5);scFv 克隆 G7V 的多肽序列(SEQ ID NO:6;也称为微型抗体或“MB”);G7V 的重链 CDR3(SEQ ID NO:7);G7V 的轻链 CDR3(SEQ ID NO:8)。

[0271] 由杂交瘤细胞系 E3-8D8(在本文中也称作 8D8 或 e3b3 或 8d8e3b3;以登记号 LMBP 7203CB 保藏于 BCCM)产生的抗体和本文公开的重组抗 END0180 抗体描述于 PCT 专利公布 W02010/111198,在此通过引用整体并入。在一些实施方案中,所述优选的 END0180 靶向剂选自

[0272] a. 分离的单克隆抗体或其抗原结合片段,其由以登记号 BCCM LMBP 7203CB 保藏的杂交瘤细胞系 E3-8D8 产生;

[0273] b. 与(a)的抗体结合至相同的表位的抗体或其抗原结合片段;

[0274] c. (a)的抗体或其抗原结合片段的人源化形式,或(b)的抗体或抗原结合片段的人源化形式;

[0275] d. (a)的抗体或其抗原结合片段的嵌合形式,或(b)的抗体或抗原结合片段的嵌合形式;

[0276] e. 包含(a)中的抗体的抗原结合结构域的重组多肽或其抗原结合片段,其通过 END0180 受体被内化至细胞内;

[0277] f. 抗体的抗原结合片段,其包含与 SEQ ID NO:6 基本相似的多肽;以及

[0278] g. 重组多肽,其包含具有与列于 SEQ ID NO:7 和 8 的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列的 CDR。

[0279] 实施例 2. 脂质组合物

[0280] 目标:本研究的主要目标为开发将包括小分子和寡核苷酸的货物(诸如反义和 dsRNA)选择性地递送至靶细胞的平台。具体地讲,所述货物被递送至表达内吞 END0180 受体的细胞,所述受体在纤维化组织和肿瘤中活化的肌成纤维细胞上、肿瘤细胞的侵袭性亚群上并且特别是在肉瘤上以及新血管内皮上过度表达。

[0281] 用抗 END0180 抗体修饰的基于脂质的纳米微粒(“脂质微粒”、“脂质 NP”)的细胞摄取的特异性使用被稳定转染以表达 END0180(NRK-ENDO 或 NRK-END0180)的 NRK52(也称为 NRK)细胞系来实现。作为对照,使用由 pIRESpuro 空载体稳定转染的 NRK52 细胞系。

[0282] 材料和方法:

[0283] 组合物和物理化学表征：

[0284] 如下开发包含用于靶向递送治疗货物或诊断货物的脂质和 END0180 靶向部分的组合物：

[0285] 1- 携带小分子的脂质微粒（例如包括多柔比星或丝裂霉素作为小的亲水性模型药物的癌症治疗剂）；

[0286] 2- 携带 dsRNA 的脂质微粒（例如 Cy3-siRNA 作为模型 dsRNA）。

[0287] Cy3 标记的 siRNA 包括在位置 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 中具有未修饰的核糖核苷酸，和在位置 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 中具有 2' O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸以及共价连接至反义链的 3' 末端的 Cy3 部分的反义链；以及在位置 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 中具有未修饰的核糖核苷酸和在位置 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 中具有 2' O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸的有义链。材料：高纯度氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、胆固醇 (Chol)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 购自 Avanti Polar lipids Inc., (Alabaster, AL, USA)。大豆磷脂酰胆碱（大豆-PC）和 1,2- 双（二苯基膦基）乙烷 (DPPE) 购自 Avanti polar lipids, (Alabaster, AL, USA)。NHS-PEG-DSPE[3-(N- 琥珀酰亚氨基戊二酰基) 氨基丙基，聚乙二醇- 氨基甲酰基二硬脂酰磷脂酰- 乙醇胺] 购自 NOF cooperation, Tokyo, Japan。高分子量透明质酸来自 Genzyme Corporation (Cambridge, MA, USA)。细胞培养板和培养皿来自 Corning Glass Works (New York, NY, USA)。聚碳酸酯膜来自 Nucleopore (Pleasanton, CA, USA)。总 RNA 用来自 Qiagen (Valencia, CA, USA) 的 RNeasy[®] 微型试剂盒提取并通过来自 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) 的 Superscript III 进行逆转录。用于定量 RT-PCR 的引物获自 Syntheza, Inc. (Rehovot, Israel)。多柔比星和丝裂霉素购自 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)。所有其它试剂为分析级。

[0288] 用 Alexa Fluor 488 对 8D8mAb 进行荧光染料标记。

[0289] 使用 Alexa Fluor 488 和 647 蛋白标记试剂盒 (Invitrogen 目录号 A10235)，将 1mg E3-8D8 单克隆抗体 (8D8) 用于标记。根据制造商的说明书进行标记程序并在脱盐柱上纯化以分离未结合的染料。

[0290] 组合物 1. 基于脂质的纳米微粒制剂 - PEG- 间隔基，涂覆有抗 END0180 抗体并携带多柔比星作为治疗剂（货物）。

[0291] 组合物 1 包含摩尔比为约 75:20:4.5:0.5 (HSPC:chol:DOPE:NHS-PEG-DSP E) 的氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC)、胆固醇 (Chol)、二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 和 NHS-PEG-DSPE[3-(N- 琥珀酰亚氨基戊二酰基) 氨基丙基，聚乙二醇- 氨基甲酰基二硬脂酰磷脂酰- 乙醇胺] (NOF cooperation, Tokyo)。

[0292] 简言之，多层囊泡 (MLV) 通过脂质-膜方法制备并使用步琪-旋转蒸发器 (buchi-rotovap) 蒸发至干燥 (Peer 和 Margalit, 2000, Arch Biochem Biophys 383(2):185-90; Peer 和 Margalit, 2004, Neoplasia 6(4):343-53; Peer 等, 2008, Science 319(5863):627-630)。将该脂质膜用在 pH7.4 的盐水中重悬的多柔比星水合以产生 MLV。如先前描述测量脂质质量 (Peer 等, 2008)。在 60°C 于 300 至 550psi 的氮气压力下将所得 MLV 用 Thermobarrel Lipex 挤出机 (Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, British Columbia, Canada) 挤出至最小的单层纳米级囊泡 (SUV) 中。使用逐渐减小孔径尺寸的膜（从 1、0.8、0.6、0.4、0.2 至 0.1 μ m）(Nucleopore, Whatman) 用 10 个循环/孔尺寸以逐步的方式

进行挤出。

[0293] 涂覆有抗 ENDO180 的脂质纳米微粒和同种型对照微粒的表面修饰和纯化

[0294] 使用 Amicon 管 (MW 截留值为 100KDa) 将抗 ENDO180 (克隆 8D8) 或同种型对照 (非结合小鼠 IgG2a) 抗体浓缩至终浓度为 10mg/mL, 如通过使用 NanoDrop 1000 分光光度计 (Thermo Scientific) 在 280nm 处 IgG 的吸光度所确定的。

[0295] 抗体与脂质的共价缔合用 EDC-NHS 交联剂在 1mL 反应小瓶中的 PBS 中于室温下过夜进行, 所述反应小瓶含有 50 μ L mAb (10mg/mL) 和 950 μ L 10mg/mL 的脂质微粒。

[0296] 过量 8D8mAb 的纯化使用 pH 7.4 下用 HEPES 缓冲盐水平衡的琼脂糖凝胶 CL-4B 柱进行。

[0297] 使用针对每个实验新鲜绘制的标准曲线通过荧光定量多柔比星 (DOX)。

[0298] 组合物 2 基于脂质的纳米微粒制剂 - 透明质酸间隔基, 涂覆有抗 ENDO180 抗体并携带标记的 siRNA

[0299] 包含均来自 Avanti Polar Lipids, Inc., (Alabaster, AL, USA) 摩尔比为约 4 : 2 : 1 (DOPE : DOTMA : Chol) 的二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE)、1, 2-二-0-十八烷基-3-三甲基铵丙烷 (DOTMA) 和胆固醇 (Chol) 的多层囊泡 (MLV) 通过脂质-膜方法制备 (Peer 和 Margalit 2004)。将该脂质膜用在 DEPC- 水中悬浮的 Cy3 标记的 siRNA 水合以产生 MLV。

[0300] siRNA 包封的功效: 货物负载根据 Landesman-Milo 等公开的方法 (2012, Cancer Lett. pii: S0304-3835(12)00512-5) 进行, 所述文献通过引用整体并入。简言之, siRNA 包封功效由 Quant-iTTM RiboGreen[®] RNA 测定试剂盒 (Invitrogen) 确定并在存在和不存在去污剂的情况下通过比较 LNP (脂质纳米微粒) 中结合染料 RiboGreen 的 RNA 和 HA-LNP (透明质酸结合脂质纳米微粒) 样品中的荧光进行。在未经处理的样品中, 由未包封的 siRNA (游离 siRNA) 测量荧光, 而在去污剂处理的样品中, 由总 siRNA 测量荧光。如下计算包封%:

[0301] $\text{siRNA 包封\%} = [1 - (\text{游离 siRNA 浓度} / \text{总 siRNA 浓度})] \times 100$ 。

[0302] 脂质质量如先前描述测量 (Peer 等, 2008)。在室温下于 300 至 550psi 的氮气压力下将所得 MLV 用 Thermobarrel Lipex 挤出机 (Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, British Columbia, Canada) 挤出至单层纳米级囊泡 (ULV) 中。使用逐渐减小孔径尺寸的膜 (从 1、0.8、0.6、0.4、0.2 至 0.1 μ m) (Nucleopore, Whatman) 用 10 个循环 / 孔尺寸以逐步的方式进行挤出。

[0303] 涂覆有抗 ENDO180 的脂质纳米微粒和同种型对照微粒的表面修饰和纯化。

[0304] 将 ULV 用高分子量透明质酸 (HA) 涂覆, 所述透明质酸使微粒稳定并充当 mAb 结合的支架 (Peer 等, 2008)。简言之, 将 HA 溶解于水并在 37 $^{\circ}$ C 于 pH 4.0 下用 EDC 预活化 2h。将所得活化的 HA 添加至含有 DOPE 的 ULV 在 0.1M 硼酸盐缓冲液 (pH 8.6) 的悬浮液中并在 37 $^{\circ}$ C 在轻微搅拌下温育过夜。将所得 HA-ULV 通过离心 (1.3x 10⁵g, 40C, 1h) 分离并洗涤四次。最终 HA/ 脂质比通常为 57-70 μ g HA/ μ mol 脂质, 如通过 3H-HA (ARC, Saint Louis, MI) 测定。

[0305] 将 HA- 修饰的纳米微粒 (NP) 使用胺-偶联方法偶联至抗 ENDO180 或抗 IgG mAb。简言之, 于室温在轻微搅拌下, 将 50 μ L HA- 修饰的脂质微粒 (40mg/mL) 与 200 μ L 400mmol/L 1-(3- 二甲基氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDAC, Sigma-Aldrich, Saint

Louis, MI) 和 200 μ L 100mmol/L-N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS, Fluka, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI) 温育 20 分钟。将所得 NHS- 活化的 HA-NP 与 50 μ L mAb (在 HBS (pH 7.4) 中 10mg/mL 的抗 END0180 克隆 8D8 或其同种型对照小鼠 IgG2a) 混合并于室温在轻微搅拌下温育过夜。然后添加 20 微升 1M 乙醇胺 HCl (pH 8.5) 以封闭反应性残基。将所得免疫-NP 使用填充有琼脂糖凝胶 CL-4B 珠 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) 的尺寸排阻柱纯化并用 HBS (pH 7.4) 平衡以除去未结合的 mAb。

[0306] 图 1 示出用于产生涂覆有 HA 的脂质微粒的示意图。

[0307] 组合物 3 基于脂质的纳米微粒制剂 - 透明质酸间隔基, 涂覆有抗 END0180 抗体

[0308] 包含 60% 的大豆磷脂酰胆碱 (大豆-PC)、20% 的 DPPE 和 20% 的胆固醇 (mol/mol) 浓度为 40mg/ml (大豆 PC 273mg、DPPE 81.2mg、胆固醇 145.4mg 在 10ml 乙醇中) 的多层囊泡通过脂质-膜方法制备并如上所述在旋转蒸发器 (BUCHI R-210) 中蒸发至干燥。在蒸发后, 将干燥的脂质膜在 10ml HBS (150mM NaCl、20mM Hepes) (pH7.4) 中水合并振摇所述溶液 (2 小时 65°C) 以产生 MLV。如先前描述测量脂质质量 (Peer 等, 2008)。如上所述, 将所得 MLV 用 Thermobarrel Lipex 挤出机 (Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, British Columbia, Canada) 挤出至平均尺寸为约 150nm (Zetasizer Nano ZS 系统) 的单层纳米级囊泡 (ULV)。

[0309] 涂覆有抗 END0180 的脂质纳米微粒和同种型对照微粒的表面修饰和纯化。

[0310] 将高分子量的透明质酸 (HA) (700Kda Lifecore) 溶解于 0.2M MES 缓冲液 (pH 5.5) 至 5mg/ml 的终浓度, 并以 1 : 1 : 6 的摩尔比用 EDC 和磺基-NHS 活化。在活化 30 分钟后, 添加 ULV 并将 pH 调节至 7.4。将溶液在室温温育 (2 小时)。通过 3 次超速离心循环除去游离的 HA。所得 HA-ULV 的平均尺寸为 130nm。

[0311] mAb 结合和纯化

[0312] 将抗 END0180 8D8mAb 浓缩至终浓度为 10mg/ml (Centricon 离心过滤器装置 (Centricon Centrifugal Filter units))。将 20 μ l 抗体用 1.2 μ g EDC 和 1.44 μ g 磺基-NHS (pH 5.5) 活化。在室温下温育 30 分钟之后, 添加 0.8mg 脂质微粒并将 pH 调至 pH7.4。将所述脂质微粒在 4°C 下温育过夜。将脂质微粒和游离抗体在 CL-4B 柱上分离。

[0313] 实施例 3: 组合物的分析

[0314] 荧光激活细胞分选 (FACS) 研究。

[0315] 对于结合分析, 将 3.5×10^5 个细胞用胰蛋白酶消化、离心沉淀、用 FACS 缓冲液 (于 1xPBS 中的 1% 的胎牛血清) 重悬, 与抗 END0180mAb (1 μ g) 在冰上温育 30 分钟并用 1ml FACS 缓冲液洗涤。将 mAb 样品与 50 μ l FACS 缓冲液中的第二 FITC 缀合的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (115-095-072) (1:100, 150 μ g/ml) 的在冰上温育 30 分钟, 重悬于 1ml FACS 缓冲液并使用 FACS Calibur 流式细胞仪分析。

[0316] 粒度分布和 ζ 电势测量。

[0317] NP 或涂覆有 8D8 的 NP 的粒度分布和平均直径使用自动算法模式在 Malvern Zetasizer Nano ZS ζ 电势和动态光散射仪器 (Malvern Instruments, Southborough, MA) 上测量并用 PCS 1.32a 分析。所有测量在室温下于 0.01mol/l NaCl (pH 6.7) 中进行。

[0318] 涂覆有 8D8 的 NP 与细胞的结合。

[0319] 每个 FACS 管收集约 0.5×10^6 个表达 END0180 的 NRK52 细胞 (NRK-END0180), 在 1mL

DMEM 培养基中离心沉淀并再悬于 1mL FACS 缓冲液 (99% PBS+1% FCS) 中。离心沉淀细胞。丢弃上清液并将沉淀用 Alexa 488 标记的涂覆有 8D8 的 NP 或 IgG-NP (以 1:25-1:75 稀释对应于 10-30 μ g/mL) 重悬并在 4°C 下温育 30 分钟。添加 1mL FACS 缓冲液并离心沉淀细胞。丢弃上清液。然后将细胞重悬于 200 μ L FACS 缓冲液 (用于立即分析)。在 FACSscan (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 上进行流式细胞术分析并使用 flowjo 软件 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) 分析。

[0320] 共聚焦显微镜分析

[0321] 为了检测细胞中 siRNA 递送, 使用包埋在涂覆有 8D8 的 NP 中的 Cy5- 标记的 siRNA (组合物 2)。使用 Zeiss LSM 510META 的扫描模块进行综合的共聚焦分析。

[0322] 独特的扫描模块为 LSM 510META 的核心。它含有电动准直器、扫描镜、单独可调节且可定位的销孔以及包括 META 检测器的高灵敏检测器。设置所有这些部件被以确保最佳的标本照明和反射光或发射光的高效收集。高效的光学光栅提供了分离 META 检测器中荧光发射的新方法。光栅将整个荧光光谱投射在 META 检测器的 32 个信道上。因此, 获得对于每个像素的扫描图像的光谱特征并随后可将所述光谱特征用于数字分离成组分染料。

[0323] 内化研究

[0324] 内化测定在 24 孔板中进行。将 1×10^5 个 A549 或 NRK-ENDO180 或 NRK 初始细胞分别接种在补充有抗生素、L- 谷氨酰胺和 10% 胎牛血清 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) 的 RPMI 或 DMEM 培养基中的盖玻片上。

[0325] 对于膜染色, 将细胞用 CellTracker™ DilC18(5)-DS 溶液 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 染色, 所述溶液用 PBS 以 1:5000 稀释。对于细胞膜标记, 使用伴刀豆球蛋白 A, Alexa fluor 647 缀合物 (10 μ g/mL) (C21421, Invitrogen)。对于核染色, 用 Hoechst (在 PBS 中为 1:10,000) (33258, Sigma) 对细胞染色。在 37°C 下于含有 5% CO₂ 的湿润气氛中将细胞暴露于含缀合于抗 ENDO180mAb 的组合物 3 的脂质微粒 (50 μ L 来自储备溶液, 根据制备方法) 或单独组合物 3 的脂质微粒 (50 μ L 来自制备的脂质体储备溶液) 的无血清培养基中持续 1 小时。随后, 将细胞使用冷的 PBS 洗涤两次, 用 4% 多聚甲醛 (PFA) 固定并再用冷的 PBS 洗涤。固定之后进行膜和核染色。

[0326] 将细胞使用荧光封片液 (fluorescent mounting medium) (Golden Bridge international, Mukilteo, WA, USA) 固定并使用 Andor 转盘共聚焦显微镜 (Andor Spinning disc confocal microscope) 和 Meta 510Zeiss LSM 共聚焦显微镜测量荧光。将在 405、488、561 和 650nm 处的激光束分别用于 UV、若丹明、Concavaline A 和 CellTracker™ 荧光团激发。记录每种处理的细胞的连续光学部分 (serial optical section) 并使用 Zeiss LSM Image 浏览器软件处理图像。

[0327] 用包埋于 8D8-NP 中的多柔比星对表达 ENDO180 的 NRK 细胞进行选择性杀伤。

[0328] 为了检查靶向递送系统的特异性和选择性地递送小分子实体的能力, 如以上实验部分所详述, 将 DOX 包埋在 8D8-NP 或 IgG-NP 中。在 37°C 下 (在含有 5% CO₂ 的湿润气氛下) 将表达 ENDO180 受体的细胞 (NRK-ENDO180+ 细胞) 和缺乏所述受体的细胞 (NRK-ENDO180-/- 细胞) 温育在 0.5 μ M 不含 DOX 或包埋 DOX 的 8D8-NP 或 IgG-NP 中 (浓度相同) 持续 0.5h。然后, 洗涤细胞并与不含药物的培养基温育另外 72h (在 37°C 培养箱中), 随后进行 XTT 测定。

[0329] 结果

[0330] 脂质组合物的结构和物理化学表征。

[0331] 表 1 示出了组合物 1 和 2 在所有 mAb- 缀合的 NP 中的直径和表面电荷特性。

[0332] 表 1

[0333]

类型	尺寸(直径nm) (平均值±SD)	ζ电势(mV) (平均值±SD)
未涂覆的	138.9 ± 1.115	-8.88 ± 0.4
X 1HA	131 ± 1.424	-19.2 ± 0.757
X 3HA	136.1 ± 0.5568	-28.3 ± 0.3
X 6HA	136.3 ± 0.3606	-35.7 ± 1.51

[0334] 此处呈现的数据示出对于 PC : DPPE: 胆固醇 (摩尔比为约 3 : 1 : 1) 脂质纳米微粒的 3 个独立批次的平均 ±SD。术语 X1HA、X3HA 和 X6HA 是指结合至脂质纳米微粒的 HA 的量,其随 EDC 和磺基-NHS 交联剂浓度变化。在每种配制的 HA-NP 中,HA 浓度为 5mg/ml。EDC 和磺基-NHS 交联剂的浓度:在 X1HA 中:EDC 7.24mM;磺基-NHS6mM(终浓度);在 X3 HA 中:EDC 21mM;磺基-NHS 17.6mM(终浓度);和在 X6 HA 中:EDC 40.8mM;磺基 NHS 34mM(终浓度)。

[0335] X1HA、X3HA 或 X6HA NP 的 ζ 电 势 范 围 如 下:X1HA:-20-(-30mV); X3HA:-28-(-40mV) 和 X6HA:-35-(-60mV)。

[0336] 每种类型的微粒的尺寸分布窄,并且表面电荷为负。最近已显示尽管基于阳离子脂质的 NP 可经由 TLR4 诱导免疫激活,但是带负电和中性电荷的微粒不会 (Kedmi 等 2010,Biomaterials 31(26):6867-75;Kedmi 和 Peer 2009,Nanomed 4(8):853-5)。

[0337] 表达不同 ENDO180 的细胞系与不同抗 ENDO180Ab 的结合能力筛选

[0338] 对表达不同 ENDO180 受体水平的细胞系进行测试:NRK+(正常大鼠肾脏)、DU145+(人前列腺癌)、LLC+(小鼠 Lewis 肺癌)、DU145⁻ 和 LLC⁻(对照细胞系,其为 ENDO180 受体水平的低表达子,即表达 PIRE5 Puro 空质粒)、A549(人肺癌)和 CT26(小鼠结肠癌)。NRK+、DU145⁺ 和 LLC⁺ 稳定地表达 ENDO180 受体水平。A549 和 CT26 表达天然未知水平的 ENDO180 受体。以上细胞系的结合能力使用以下 4 种不同 Ab 进行比较:mAb 8D8 克隆、mAb10C12 克隆、微型抗体 (MB) 和抗 wnt 微型抗体 (阴性对照)。用 NRK-ENDO180 ;8D8mAb 对观察到最佳的结合效果 (图 2A)。在 A549 ;8D8 (图 2B) 和 LLC ;ENDO180 对 (图 3A) 中也观察到显著的结合效果,尽管不如 NRK-ENDO180 强效。用 Du145-ENDO180 ;8D8 对观察到弱的结合效果 (图 3B)。

[0339] MB 示出与所有测试细胞系的弱结合能力。对新一批进行测试并改变第二抗 Ab(FITC 缀合的山羊抗小鼠 IgG F(ab)2 片段,115-095-072,Jackson ImmunoResearch)。新的 MB 批直接用蛋白标记试剂盒进行标记。未观察到结合能力的显著改善 (图 4A-D)。附加组的结合实验使用 Alexa 488 缀合的第一 mAb (克隆 8D8) 进行,其显示与用第一未缀合的 mAb 获得的那些相似的结合结果 (在所有扫描中 4A-4D:右峰:8D8;中心峰:微型抗体;左峰:对照未染色的细胞)。

[0340] 不同抗 ENDO180 抗体内化至不同细胞系的比较

[0341] 为了鉴定最佳内化至以上细胞系的 ENDO180 抗体,使用 META510LSM 共聚焦显微镜,用不同的抗体和六种不同细胞系中的每种进行内化测试。根据第一组实验(细胞首先被暴露于未缀合的 Ab 随后被暴露于第二 FITC 山羊抗小鼠 Ab),用以下细胞观察到最佳内化效果:NRK-ENDO180 细胞;8D8mAb-A549 细胞;和 DU145-ENDO180;10C12mAb-DU145 细胞系对。然而未观察到 MB 至测试的细胞系的内化。另外,使用蛋白标记试剂盒(Invitrogen),将 MB 和 mAb 8D8 用 Alexa Fluor 488 进行标记。测试两种标记的 mAb 的内化。仅 8D8 示出显著的内化(图 5A-D)。

[0342] 将 mAb 8D8 共价涂覆至 HA- 的溶胀溶液中脂质微粒并将微粒与 A549、初始 NRK 和 NRK ENDO180 细胞温育以实现内化。与在 4℃ 下与细胞温育的未涂覆的脂质微粒(图 6)和涂覆有 8D8 的溶胀溶液中脂质微粒相比,在 37℃ 下与 A549 温育的涂覆有 8D8 的溶胀溶液中脂质微粒表现出显著的至细胞的内化。用 NRK 初始细胞未观察到内化(图 7)。

[0343] 如以上详述制备包埋有模型小分子药物(DOX)的 8D8-NP 和同种型对照微粒(IgG-NP)(组合物 1)。将 8D8mAb 和单独的同种型对照 mAb 用 Alexa 488 标记并使用脱盐柱纯化。然后将 mAb 经由 NHS 缀合于 NP 并使用尺寸排阻柱纯化(参见实验部分)。使用流式细胞术确定与表达 NRK-ENDO180 的细胞的结合。如图 8 所示,8D8-NP 的结合水平较高并且与对照微粒(IgG-NP)相比观察到荧光的明显位移。

[0344] 经由 8D8-NP 的 DOX 的细胞特异性递送

[0345] 为了检查使用 8D8-NP 药物(多柔比星,DOX)的选择性递送,将表达 ENDO180 的细胞(NRK ENDO180+/+)和缺乏该受体的细胞(NRK ENDO180-/-)进行培养并在 37℃ 下与低剂量的 DOX 温育 30 分钟或与包埋于 8D8-NP 或 IgG-NP 中的相同剂量温育。将细胞充分地洗涤并用不含药物的培养基温育以模拟体内条件。不希望受到理论的束缚,紧密结合于 ENDO180 受体的 8D8-NP 被内化至细胞并且不会和对照一样被洗掉。使用细胞存活测定(XTT)检测细胞存活。

[0346] 如图 9 所示,使用 8D8-NP, DOX 至表达 ENDO180 的细胞的递送为选择性的。当将 IgG-NP 或当将 8D8-NP 用于缺乏 ENDO180 受体的 NRK 细胞中时,示出最小的非特异性摄取。

[0347] 使用具有 HA 间隔基的 NP 进行的 8D8-NP 与表达 NRK ENDO180 的细胞的结合。

[0348] 使用 HA 间隔基制备 8D8-NP 和包埋有 siRNA 的同种型对照微粒(IgG-NP)(即组合物 1)(参见图 1 中的示意图)。将每个 8D8mAb 和同种型对照 mAb 用 Alexa 488 标记并使用脱盐柱纯化。然后将 mAb 经由 EDC 和 NHS 缀合于 NP 并使用尺寸排阻柱纯化(参见实验部分)。使用流式细胞术确定与表达 NRK-ENDO180 的细胞的结合(参见图 10)。如图 10 所示,用 HA 间隔基制备的 8D8-NP 的结合极高并且与对照微粒(IgG-NP)相比观察到荧光的明显位移。

[0349] 8D8-NP(组合物 3)将 siRNA 递送至 NRK-ENDO180+/+ 细胞。

[0350] 为了检查将 siRNA 递送至表达 NRK-ENDO180 的细胞的能力,将 siRNA 经由 HA 间隔基包埋在用 8D8mAb 涂覆的脂质纳米微粒中。将细胞与范围为 0、0.1、0.25、0.5、1 和 2 μ M siRNA 的不同 siRNA 浓度温育 1h。洗涤细胞并进行流式细胞术(图 11A)。另外在高 siRNA 浓度(2 μ M)下,使用荧光显微镜也观察到细胞(图 11B)。Cy3-siRNA 至表达 NRK-ENDO180 的细胞的递送的剂量响应曲线示于图 11A。在较高剂量下,用高含量(>90%)的 Cy3-siRNA,

递送为特异性的。结果通过荧光显微图像反映,所述荧光纤维图像显示使用 8D8-NP 的选择性递送。

[0351] 8D8-NP 将 Cy3-siRNA 递送至表达 NRK-ENDO180 的细胞并且 siRNA 被定位至核周焦点。

[0352] 共聚焦显微镜分析(图 12 和 13)揭示经由 8D8-NP 递送的 Cy3-siRNA 事实上定位在细胞内部(图 12)并定位至核周焦点,其中在核周焦点也定位了 RNAi 机构(图 13- 参见白色箭头指向核周焦点)。

[0353] 这些结果显示 8D8-NP 能够将货物(如由 DOX 表示的小分子和如由 Cy3-siRNA 表示的 dsRNA)直接选择性递送至表达 ENDO180 的细胞中。

[0354] 涂覆有 8D8 的微粒在 A549 细胞中的治疗益处。

[0355] 将涂覆有 8D8 的微粒在 A549 细胞中的治疗益处与非靶向的、常规的纳米的溶胀溶液中脂质微粒进行比较。丝裂霉素 C(MMC) 用作治疗货物。对于脂质体和其它基于脂质的纳米微粒,如先前描述将 MMC 掺入的溶胀溶液中脂质微粒(Peer&Margalit, Int J Cancer 108, 780-789 (2004); Bachar 等, Biomaterials 32, 4840-4848 (2011))。将浓度均为 50 μ g/mL 的涂覆有 8D8 的微粒(组合物 1)、常规的微粒和游离的 MMC 与 A549 细胞在 37°C 下温育 1h。在 1h 后,将细胞用 PBS 洗涤两次并用不含药物的培养基温育另外 72h。图 14 示出了与游离药物或未经涂覆的纳米脂质体相比,使用靶向形式的治疗益处。不希望受到理论的束缚,所述治疗益处归因于涂覆有 8D8 的脂质微粒被细胞的特异性摄取并将它们的 MMC 载荷释放到靶细胞中。与未充分内化进入这些细胞并因此在温育 1h 后洗去的小的、未经涂覆的脂质体的作用形成对比。推测涂覆有 8D8 的纳米微粒与 ENDO180 受体的结合和活性循环过程是在这些细胞中观察到的结果的主要决定因素。

[0356] 实施例 4:用携带 siRAC1 的涂覆有 8D8 的微粒进行的靶基因的体外敲低。

[0357] 将 A549 细胞系用作癌症细胞模型。将细胞以 7.0×10^5 个细胞/孔接种在补充有抗生素、L-谷氨酰胺和 10% 胎牛血清(Biological Industries, Beit Haemek, Israel) 的 RPMI 培养基中的六孔培养板上。接种后 24 小时,除去培养基并用含有谷氨酰胺和 10% 血清,不含抗生素的 RPMI 培养基替换。将细胞用 8d8-HA-NP 或用包封 CY5 标记的 Rac1_28 或 eGFP siRNA 的 IgGCtrl-HA-NP 转染。作为阳性对照,根据制造商的说明书使用脂质体(Oligofectamine)(Invitrogen)。在温育一小时后,除去培养基,并且洗涤细胞并补充完全培养基。在转染后 6 天,将细胞以 1:3 分流(split)。施加于细胞的脂质纳米微粒中的最终 siRNA 浓度为 20-100nM。在转染后 6 天,使用 EzRNA RNA 纯化试剂盒(Biological industries, Beit Haemek, Israel) 分离总 RNA。使用高性能 cDNA 逆转录试剂盒(High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit)(Applied Biosystems, Foster City, CA) 将 1 μ g RNA 逆转录成 cDNA,使用 Syber green(Applied Biosystems) 在 step one 序列检测系统(step one Sequence Detection System)(Applied Biosystems, Foster City, CA) 上进行 cDNA 的定量(总计 5ng)。选择 GAPDH 作为看家基因。

[0358] 体外结果示于图 15A-15B。图 15A 和 15B 示出暴露于包封 siRNA 与 RAC 的 8D8-NP 的 A549 细胞系中 Rac1 mRNA(示出的残余 mRNA 的水平)的体外敲低。图 15A 示出了在 2 天和 6 天之后的敲低。图 15B 示出了在 6 天之后的敲低。Rac1:8d8lip 是指包封 siRAC1 的涂覆有 8D8 的脂质纳米微粒。Rac1:IgGlip 是指包封 siRAC1 的涂覆有 IgG 的脂质纳米微粒。

[0359] EGFP(增强的绿色荧光蛋白)siRNA 具有以下结构:在位置 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 中具有未修饰的核糖核苷酸和在位置 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 中具有 2' O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸的有义链 GCCACAACGUCUAUAUCAU (SEQ ID NO:9);和在位置 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 中具有未修饰的核糖核苷酸和在位置 1、3、5、7、9、11、13、15、17 和 19 中具有 2' O- 甲基糖修饰的核糖核苷酸,以及共价连接于 3' 末端的 Cy5 荧光部分的反义链 5' AUGAUAUAGACGUUGUGGC 3' (SEQ ID NO:10)。

[0360] 被鉴定为 RAC1_28_S1842(BioSpring, Frankfurt, DE) 的 siRNA 靶向 RAC1 基因并具有以下链:在位置 2、4、6、7、8、9、11、12、14、15、17 和 19 中具有未修饰的核糖核苷酸和在位置 1、3、5、10、13、16 和 18 中具有 2' O 甲基糖修饰的核糖核苷酸的有义链 5' GUGCAAAGUGGUAUCCUA 3' (SEQ ID NO:11)。在位置 2、3、4、5、7、8、10、12、14、16 和 18 中具有未修饰的核糖核苷酸和在位置 1、6、9、11、13、15、17 和 19 中具有 2' O 甲基糖修饰的核糖核苷酸以及共价连接于 3' 末端的 Cy5 荧光部分的反义链:5' UAGGAUACCACUUUGCACG 3' (SEQ ID NO:12)。

[0361] 实施例 5:靶向 ENDO180 的纳米微粒在携带肿瘤的无胸腺裸小鼠中的生物分布

[0362] 目标:为了评估配制的 Cy5 标记的 RAC1_28_S1842siRNA 在携带 A549(腺癌人肺泡基底上皮细胞)肿瘤的无胸腺裸小鼠(TBM)中的生物分布(BD)。

[0363] 材料和方法:

[0364] 测试制品:鉴定为 RAC1_28_S1842 的 siRNA(BioSpring, Frankfurt, DE)。将 30.179mg siRNA 溶解于 1.501ml 注射用水(WFI Norbrook)以获得 20mg/ml 的储备溶液。将 0.35ml 储备溶液冻干至 7mg,将其溶解于 14ml DEPC 处理的水中以获得 0.5mg/ml 储备溶液。

[0365] 在未经涂覆的 NP 中配制的 RAC1_28_S1842:未经涂覆的 NP 由纯大豆磷脂酰胆碱(Phospholipon 90G, Phospholipid GMBH Germany)1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺(DPPE)和胆固醇(Chol)(Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA))组成。PC:Chol:DPPE 的摩尔比为约 60:20:19.9。将该脂质溶解于乙醇,在旋转蒸发器(Buchi Rotary Evaporator Vacuum System Flawil, Switzerland)中于减压下蒸发直至干燥。蒸发之后,将干燥的脂质膜在 10ml HEPES(pH 7.4)中水合,随后使用涡流装置充分搅拌并于 65°C 下在振荡水槽中温育 2 小时。将 MLV 通过在 65°C 和在 200-500psi 的氮气压力下操作的 Lipex 挤出装置(Northern Lipids, Vancouver, CA)挤出。使用逐渐减小孔径的聚碳酸酯膜(Whatman Inc, UK),用若干循环/孔径分阶段进行挤出以获得直径的最终尺寸范围为约 100nm 的单层囊泡(ULV)。将获得的 NP 冻干直至完全干燥(48 小时)。冻干的微粒用含有 0.5mg/ml siRNA RAC1_28_S1842 的 DEPC 处理的水进行水合。

[0366] 在涂覆有 HA 的 NP 中配制 RAC1_28_S1842:将高分子量透明质酸(HA)(700KDa)(Lifecore Biomedical LLC Chaska, MN, U.S.A)溶解于 0.2M MES 缓冲液(pH 5.5)至终浓度为 5mg/ml。以摩尔比为 1:1:6 将 HA 用 EDC 和磺基-NHS 活化。在活化 30 分钟之后,添加单层囊泡并将 pH 调节至 7.4。将溶液在室温温育(2 小时)。经由离心(1.3X 10⁵g, 4°C, 60 分钟)通过 3 次循环的重复洗涤除去游离的 HA。将获得的涂覆有 HA 的 NP 冻干直至完全干燥(48 小时)。冻干的微粒用含有 0.5mg/ml siRNA RAC1_28_S1842 的 DEPC 处理的水进行水合。

[0367] 在涂覆有抗 ENDO180-HA 的 NP 中配制 RAC1_28_S1842 :将 ENDO1808D8 抗体和小鼠 IgG 对照 (I 8765) 浓缩至终浓度为 10mg/ml (Centricon 离心过滤器装置)。将 20 μ l 用 1.2 μ g EDC 和 1.44 μ g 磺基 -NHS (pH 5.5) 活化。在室温下温育 30 分钟之后,将 0.8mg 涂覆有 HA 的 NP (参见上文,添加涂覆有 HA 的 NP 然后冻干) 添加至活化的选择抗体 (Ab) 并将 pH 调节至 pH7.4。将脂质体在 4℃ 下温育。在 CL-4B 柱上分离脂质体和游离抗体。将溶液在室温温育 (2 小时)。经由离心 (1.3X 10⁵g, 4℃, 60 分钟) 通过 3 次循环的重复洗涤除去游离的 HA。将获得的涂覆有 8D8-HA 的 NP 冻干直至确保完全除去水 (48 小时)。冻干的微粒用含有 0.5mg/ml siRNA RAC1_28_S1842 的 DEPC 处理的水进行水合。

[0368] HBSS 是指媒介物 :150mM NaCl, 20mM Hepes, pH = 7.4

[0369] 测试系统 : 种 / 株 : 无胸腺裸小鼠 (Harlan) ;11 周龄雌性 ;体重范围 :20-22 克, 组大小 :1-3 只 ;研究中动物的总数目 :40 只肿瘤注射小鼠中的 36 只

[0370] 动物饲养 : 对动物随意提供商业啮齿动物饮食的常规食物并自由饮水。

[0371] 环境 : (i) 至少 5 天的驯化。

[0372] (ii) 在整个研究期间将所有动物限制在具有环境控制的饲养条件的有限的使用设备中,并根据批准的标准操作程序 (SOP) 进行维持。

[0373] 细胞 :A549 (腺癌人肺泡基底上皮细胞) (ATCC#CCL-185)

[0374] 在到达后一周,对 40 只无胸腺裸小鼠皮下注射 A549 细胞到侧腹区域。每天视觉上检查小鼠的肿瘤发展和不适。在达到约 5mm 的足够的肿瘤体积时,根据下文表 2 中的研究设计,对小鼠静脉内注射不同的配制的 RAC1_28_S1842siRNA (未经涂覆的、涂覆有 HA 的和 8D8-HA)。

[0375] 表 2 :

[0376]

组号	组	处理					组大小
		siRNA	制剂	剂量(μ g)	施用途径	终止 (小时)	
1	对照(注射 HBSS)	无	HBSS	200 μ l	I.V.	6, 24	3, 3
2	未经涂覆的 NP-RAC1	RAC1_28_S1842	PC:Chol:DPPE	100 μ g/200 μ l	I.V.	6, 24	3, 3
3	HA-NP-RAC1	RAC1_28_S1842	涂覆有透明质酸的 PC:Chol:DPPE	100 μ g/200 μ l	I.V.	6, 24	3, 3
4	8d8-HA-NP-RAC1	RAC1_28_S1842	ENDO180-8D8-透明质酸-PC:Chol:DPPE	100 μ g/200 μ l	I.V.	6, 24	3, 3
5	裸露的RAC1	RAC1_28_S1842	水	100 μ g/200 μ l	I.V.	6, 24	3, 3

[0377] [0378] 肿瘤细胞悬浮液的制备 :0.5x10⁶ 个 A945 细胞 (腺癌人肺泡基底上皮细胞) / 小鼠

[0379] 肿瘤诱导 :使用 27G 针将浓度为 2.5x10⁶ 个细胞 /ml 的细胞悬浮液通过皮下 (sc) 单次施用注射进入每只动物的侧腹区域。在细胞制备之后尽快进行施用。

[0380] 测试制品的制备 :在实验的当天,将所有载体制剂 (未经涂覆的、涂覆有 HA 的和

8D8-HA) 冻干并分批地储存在玻璃瓶中 (-20°C)。在实验之前,取出单剂量的冻干颗粒、再水化并通过动态光散射检查尺寸。将冻干的载体用溶解于 DEPC 处理的水的 siRNA (0.5mg/ml) 再水化, siRNA 与脂质的比率为 1:2。在室温下于定轨振荡器上轻微振荡 30 分钟之后,将载体经静脉内注射入小鼠中。

[0381] 测试制品的施用:单一静脉内 (iv) 施用在肿瘤接种后 30 天进行。配制的 siRNA 的剂量为 0.5mg/ml, 注射体积 200 μL , 使用 27G 注射针。

[0382] 在细胞注射和载体注射之后,每天检查小鼠痛苦和肿瘤生长的迹象。6 小时后用 Maestro 成像系统对处死的小鼠进行尸检。将载体注射后 24 小时处死的小鼠进行解剖用于生物分布分析。

[0383] 研究结束:在测试制品注射之后 6 小时,将半数小鼠用 CO_2 处死(根据大学的标准和规则)并成像。在注射后约 24 小时,对剩余动物取血,并且然后用 CO_2 处死。摘除器官(肿瘤、肺、肝脏、脾脏和脏肾)。将一个肾脏、一个肝叶、一半肺、一半脾脏和肿瘤在液氮中快速冷冻。剩余的器官保存在 4% 甲醛 (1ml/ 器官) 中。

[0384] 评估和结果

[0385] 组织和肿瘤中的 siRNA 定量:通过茎环 qPCR 检查 RAC1_28_S1842 siRNA 的量。在 Applied Biosystem 7300PCR 系统中使用 SY BR Green 法,根据标准方法通过在 0.25% triton 中裂解样品随后进行 qPCR 来检测组织裂解物中的 siRNA。

[0386] 使用 qPCR 测量由所有冷冻组织和细胞制备的 RNA 中的 RAC1 mRNA 水平和 RACE 分析。根据标准方法制备 cDNA。对于 RAC1 裂解产物的 RACE 分析 - 将通过总 RNA 分离制备 RNA

[0387] 还通过原位杂交 (ISH) 评估 siRNA 分布。

[0388] 在携带肿瘤的小鼠的肿瘤、肝脏和肾脏中观察到 Cy5 标记的 siRNA。在肿瘤和两个肾脏中均观察到强的 Cy5 荧光,未示出。在用经由透明质酸 (HA) 部分缀合于抗 END0180 抗体 (8D8) 的脂质纳米微粒注射的动物的肿瘤中观察到高水平的 siRNA,如图 16A-16D 中的图所示。图 16A-16D 呈现描绘鼠癌症模型中 siRNA 在用包封 Cy5-Rac1_28 的涂覆有 END0180 的纳米微粒 (NP) 处理的小鼠中的各个身体器官的生物分布的图。每 mg 组织样品中存在的 siRNA 的量 (埃摩尔) 呈现在如下用不同组合物处理的动物中:在肿瘤 (16A)、脾脏 (16B)、肝脏 (16C) 和肾脏 (16D) 中包封 siRAC1 的纳米微粒 (NP-RAC1_28);包封 siRAC1 的涂覆有透明质酸的纳米微粒 (HA-NP-RAC1_28);包封 siRAC1 的涂覆有 8D8 和透明质酸的纳米微粒 (8d8-HA-NP-RAC1_28);单独的 siRAC1 (RAC1_28)。脾脏、肝脏和肾脏平均来自至少 3 只小鼠)。

[0389] 实施例 6:靶向 END0180 的纳米微粒在携带肿瘤的无胸腺裸小鼠中的生物分布

[0390] 目标:为了评估配制的 RAC1_28_S1908 siRNA 在携带 A549 (腺癌人肺泡基底上皮细胞) 肿瘤的无胸腺裸小鼠 (TBM) 的生物分布 (BD)。

[0391] 材料和方法:

[0392] 测试制品:鉴定为 RAC1_28_S1908 (BioSpring, Frankfurt, DE) 的 siRNA 靶向 RAC1 基因并具有以下链:

[0393] 在位置 2、4、6、7、8、9、11、12、14、15、17 和 19 中具有未修饰的核糖核苷酸和在位置 1、3、5、10、13、16 和 18 中具有 2' O 甲基糖修饰的核糖核苷酸的有义链

5' GUGCAAAGUGGUAUCCUA 3' (SEQ ID NO:9)。

[0394] 在位置 2、3、4、5、7、8、10、12、14、16 和 18 中具有未修饰的核糖核苷酸和在位置 1、6、9、11、13、15、17 和 19 中具有 2' O 甲基糖修饰的核糖核苷酸的反义链 5' UAGGAUACCACUUUGCACG3' (SEQ ID NO:10)。

[0395] siRNA 的制备:将 5mg 溶解于 513 μ l DEPC 处理的水中以获得 9.75mg/ml 储备溶液。

[0396] 配制的化合物, 8d8-HA-NP (ENDO180-8D8-透明质酸-PC:Chol:DPPE) 中的 0.4mg/ml RAC1_28_S1908:将 ENDO180 mAb8D8 浓缩至终浓度为 10mg/ml (Centricon 离心过滤器装置)。将 20 μ l 用 1.2 μ g EDC 和 1.44 μ g 磺基-NHS (pH 5.5) 活化。在室温下温育 30 分钟之后, 用 0.8mg HA 涂覆 NP。未经涂覆的 NP 为摩尔比约 60:20:19.9 的 PC:Chol:DPPE。将该脂质溶解于乙醇中, 在旋转蒸发器中于减压下蒸发至干燥。蒸发之后, 将干燥的脂质膜在 10ml HEPES (pH 7.4) 中水合, 随后充分搅拌 (涡流) 并于 65°C 下在振荡水槽中温育 2 小时。将 MLV 通过在 65°C 和在 200-500psi 的氮气压力下操作的 Lipex 挤出装置挤出。使用逐渐减小孔径的聚碳酸酯膜 (Whatman Inc, UK), 用若干循环 / 孔径分阶段进行挤出以获得直径的最终尺寸范围为约 100nm 的 ULV。将脂质体添加至活化的选择抗体 (Ab) 并将 pH 值调节至 pH7.4。将脂质体在 4°C 过夜 (0.N) 温育。在 CL-4B 柱上分离脂质体和游离抗体。将溶液在室温下温育 2 小时。经由离心 (1.3x 10⁵g, 4°C, 60 分钟) 通过 3 次循环的重复洗涤除去游离的 HA。将涂覆有 8D8-HA 的 NP 冻干直至完全干燥 (48 小时)。将一部分 1mg 冻干微粒用 20.5 μ l 9.75mg/ml (200 μ g) 储备液 RAC1_28_S1908_S18siRNA 和 479.5 μ l DEPC-处理的水进行水合以获得 500 μ l 8d8-HA-NP 中的 0.4mg/ml siRNA。将该制备的 siRNA 储备液用于 2 只小鼠。将该程序重复 3 次。

[0397] 配制的化合物, 涂覆有对照抗体的 NP:NMIgG-HA-NP (NMIgG-透明质酸-PC:Chol:DPPE) 中的 0.4mg/ml RAC1_28_S1908:测试材料的描述:将小鼠 IgG 对照 (I 8765) 浓缩至终浓度为 10mg/ml (Centricon 离心过滤器装置)。将 20 μ l 用 1.2 μ g EDC 和 1.44 μ g 磺基-NHS (pH 5.5) 活化。在室温温育 30 分钟之后, 将 0.8mg 涂覆有 HA 的 NP 添加至活化的选择性抗体 (Ab) 并将 pH 调节至 pH7.4。将脂质体在 4°C 过夜 (0.N) 温育。在 CL-4B 柱上分离脂质体和游离抗体。将溶液在室温温育 (2 小时)。经由离心 (1.3x 10⁵g, 4°C, 60 分钟) 通过 3 次循环的重复洗涤除去游离的 HA。将获得的涂覆有 IgG-HA 的 NP 冻干直至确保完全除去水 (48 小时)。将一部分 1mg 冻干颗粒用 20.5 μ l 9.75mg/ml (200 μ g) 储备液 RAC1_28_S1908_S18siRNA 和 479.5 μ l DEPC-处理的水水合以获得 500 μ l NMIgG-HA-NP 中的 0.4mg/ml siRNA。将该制备的 siRNA 储备液施用于 2 只小鼠。将该程序重复 3 次。

[0398] HBSS 是指媒介物:150mM NaCl, 20mM Hepes, pH = 7.4

[0399] 测试系统:种/株:无胸腺裸小鼠 (Harlan);11 周龄雌性;体重范围:20-22 克, 组大小:5-8 只;研究中动物的总数为 18 只。

[0400] 动物饲养和细胞系:如上文实施例 5 中提供。

[0401] 在适应之后两周, 对将无胸腺裸小鼠皮下注射 A549 细胞至侧腹区域内。每天视觉上观察小鼠的肿瘤发展和不适。在达到约 5mm 的足够的肿瘤体积时, 根据表 3 中的研究设计 (T = 0), 对小鼠静脉内注射 4mg/kg 不同配制的 RAC1_28_S1908siRNA (8D8-HA 和 IgG Ctrl 复合制剂)。

[0402] 在 siRNA/ 载体注射之后约 24 小时 ($T = 24h$), 注射另一剂量的 4mg/kg siRNA/ 载体。在第一次 siRNA/ 载体注射后约 48 小时 ($T = 48h$), 对动物取血, 然后将动物用 CO_2 处死。收集器官 (肿瘤、肺、肝脏、脾脏和肾脏)。

[0403] 表 3

[0404]

组号	组标题	处理						组大小
		siRNA	制剂	剂量(μg)	施用途径	注射天数	终止。在第二次注射之后(小时)	
1	8d8-HA-NP-RAC1	RAC1_28_S1908	ENDO180-8D8-透明质酸-PC:Chol:DPPE	2x80 μg /200 μl	I.V.	0, 1	48	8
2	HA-IgGCtrl-NP-RAC1	RAC1_28_S1908	NMIgG-透明质酸-PC:CHOL:DPPE	2x80 μg /200 μl	I.V.	0, 1	48	7
3	对照HBSS	不适用	HBSS	2x200 μl	I.V.	0, 1	48	5

[0405] 肿瘤细胞的制备: 肿瘤细胞悬浮液: 2.0×10^6 A549 (腺癌人肺泡基底上皮细胞) / 小鼠。

[0406] 肿瘤诱导: 使用 27G 针将浓度为约 10^6 个细胞 / ml 的细胞悬浮液以 0.2ml / 动物的剂量体积皮下 (sc) 注射至每只动物的侧腹区域。在细胞制备之后尽快进行施用。

[0407] 在注射之后监测, 每天视觉上观察小鼠的肿瘤发展和不适。监测、测量并记录肿瘤尺寸。当肿瘤体积达到约 5mm 时, 将小鼠分成 3 组。

[0408] 测试制品制备: 在实验之前, 将所有载体制剂 (涂覆有 IgGCtrl-HA 和涂覆有 8D8-HA) 冻干并分批储存在玻璃瓶中 ($-20^\circ C$)。取出单剂量的冻干微粒、再水化并通过动态光散射检查尺寸。在实验当天, 将 1mg 冻干的载体 (0.5mg / 小鼠 / 单剂量) 用 siRNA 和 DEPC 处理的水再水化, siRNA 与脂质比率为 1 : 10。在室温下于定轨振荡器上轻微振荡 30 分钟以确保完全溶解之后, 将载体经静脉内注射入小鼠中 (200 μl , 4mpk)。

[0409] 测试制品施用: 单一静脉内 (i. v.) 施用在肿瘤接种后 14 天进行。配制的 siRNA 的剂量为 0.32mg/ml, 注射体积 250 μl , 使用 27G 注射针。第二次静脉内施用以相同方式在第一次静脉内注射 24h 之后进行。

[0410] 第一测试制品 / 媒介物注射之后 48 小时研究结束, 对所有小鼠取血, 并且然后用 CO_2 处死。收集器官 (肿瘤、肺、肝脏、脾脏和肾脏)。

[0411] 血浆分离: 将血液样品在室温下以 1000g 离心 15 分钟。将血浆立即冷冻在液氮中。将所有血浆样品保持在 $-80^\circ C$ 直至 qPCR。

[0412] 对于 qPCR 和 ISH 的组织收集: 自组 2 和组 3 的 6 只小鼠以及组 1 的 4 只小鼠收集冷冻组织。自组 1 的 2 只小鼠以及组 2 和组 3 的一只小鼠收集固定的组织。

[0413] 对于冷冻组织: 收获两个肾脏、肺、肝脏、脾脏和肿瘤, 收集到预先标记的管中并立即在液氮中快速冷冻。

[0414] 用于组织病理学的肿瘤采集 (组 1-3)。收集来自组 1 的两只动物、组 2 的一只动物和组 3 的一只动物的肿瘤, 并立即置于 10% 福尔马林 (每个肿瘤独立地在 15ml 福尔马林管中) (pH 7.4) 并进行石蜡包埋用于切片制备。收集这些动物的其它器官并在液氮中快速

冷冻。

[0415] 评估和结果

[0416] 组织和肿瘤中的 siRNA 定量:通过茎环 qPCR 检查 RAC1_28_S1908siRNA 的量。在 Applied Biosystem 7300PCR 系统中使用 SYBR Green 法,根据标准方法通过在 0.25% triton 中裂解样品随后进行 qPCR 来检测组织裂解物中的 siRNA。

[0417] 使用 qPCR 测量由所有冷冻组织和细胞制备的 RNA 中 RAC1mRNA 水平和 RACE 分析。根据标准方法制备 cDNA 并如以上描述进行 qPCR。对于 RAC1 裂解产物的 RACE 分析 - 使用 EZ RNA 试剂盒通过总 RNA 分离制备 RNA。

[0418] 将进行原位杂交 siRNA 分布以检测各种组织样品中的 RAC1_28siRNA。

[0419] 在携带肿瘤的小鼠的肿瘤、肝脏和肾脏中观察到 siRNA。在用经由透明质酸 (HA) 部分缀合于抗 END0180 抗体 (8D8) 的脂质纳米微粒注射的动物的肿瘤中观察到高水平的 siRNA,如图 17A-17D 中的图所示。图 17A-17D 呈现描绘包封 Rac1_28 的涂覆有 END0180 的纳米微粒 (NP) 在来自鼠癌症模型的肿瘤和肾脏中的生物分布的图。每 mg 组织样品中存在的 siRNA 的量 (埃摩尔) 呈现在用如下不同组合物处理的动物中:在肿瘤 (17A 和 17B) 和肾脏 (17C 和 17D) 中包封 siRAC1 的涂覆有 8D8 和透明质酸的纳米微粒 (8d8-HA-NP-si);包封 siRAC1 的涂覆有 IgG 和透明质酸的纳米微粒 (IgGctr-HA-NP-si);缓冲液 (HBSS) 中的 siRAC1_28。“n”是指以平均值表示的所包括的动物数目 (17B 和 17D)。

[0420] 实施例 7:siRNA 活性

[0421] 使用本领域技术人员已知的标准方法评估包封 siRNA 的脂质纳米微粒敲低靶基因或裂解靶 mRNA 的功效,并且包括测量残余 mRNA 水平和残余蛋白质水平和 RACE (裂解)。

[0422] 尽管实施例利用有限数目的 siRNA 分子,应当理解如本文公开的组合物可被配制或涵盖包括反义分子、dsRNA、siRNA 等的寡核苷酸,所述寡核苷酸靶向生物体中的任何基因 (即抑制基因表达 / 下调基因表达) 并优选与疾病相关的基因,其中此类基因的抑制 / 下调对所述生物体将为有益的。

[0423] 本文公开的方法和组合物已经得到广泛和一般描述。落入一般公开的较窄物种和亚属群组中的每种也形成本公开的部分。这包括从属中去除任何主题的附带条件或否定限制的本公开的一般描述,不管去除的材料是否在本文具体列举。其它实施方案在以下权利要求范围内。

[0001]

序列表

<110> 奇比艾企业有限公司
 雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司
 埃琳娜·费因斯坦
 丹·培尔

<120> 用于选择性递送治疗剂和诊断剂的 ENDO180 靶向微粒

<130> 230/PCT1

<150> US 61/582373
 <151> 2012-01-01

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 5983
 <212> RNA
 <213> 智人 (Homo_sapiens)

<300>
 <308> NM_006039.3
 <309> 2011-12-17
 <313> (1).. (5983)

<400> 1
 gaaggcgagg cggggagaga cugggaaaca gacgagcaag agaaaggcg cacgcugggg 60
 ucuucugga cccggcgugu ccuucuucc gccacccuu ucucuccuc cgaagcucu 120
 agccccagac ccgcgcucc ucccuuccc cucccaagcu gcccacuucc cuuuccucu 180
 acccucgaa ccuucuccc cggucucug cccuuccuc cgcuccucc ccgcccggc 240
 ugcuccucc cuccuccucc ccgggaggca uacuucguc ccgaccggga ggaggacgcg 300
 agcccccug gggcggucau cacagcccag ccucggggcu gccacagcg guugcgccug 360
 ugcgcuccg guccccgcu ccacugagcg ccgcgcucgg ggauggggcc cggccggccg 420
 gccccgcgc ccuggcucg ucaccugug cgcugcgucc ugcuccucgg gugccugac 480

[0002]

cucggccguc ccggcgcccc uggggacgcc gccuccccgg aacccaacgu cuuccucauc	540
uucagccaug gacugcaggg cugccuggag gccagggcg ggcaggucag agucaccccg	600
gcuugcaaua ccageccucc ugcccagcgc uggaaguggg ucucccgaaa ccggcuauuc	660
aaccugggua ccaugcagug ccugggcaca ggcuggccag gcaccaaac cagggccucc	720
cugggcaugu augaguguga ccgggaagca cugaauuuu gcuggcauug ucguacacug	780
ggugaccagc uguccuugcu ccugggggccc cgcaccagca acauaucua gccuggcacc	840
cuugagcgug gugaccagac ccgcaguggc caguggcgca ucuacggcag cgaggaggac	900
cuangugcuc ugcccuacca cgaggucua accauccagg gaaacucca ccgaaagccg	960
ugcaccaucc ccuucuaaua ugacaaccag ugguuccacg gcugcaccag cacgggcccgc	1020
gaggaugguc accuguggug ugccaccacc caggacuacg gcaaagacga gcgcuggggc	1080
uucugcccca ucaagagua ccgacugcag accuucuggg acaaggacca gcugacugac	1140
agcugcuacc aguuuaacuu ccaguccacg cugueugga gggaggccug ggccagcugc	1200
gagcagcagg gugcggaucu gcugagcauc acggagauc acgagcagac cuacauaac	1260
ggccuccuca cuggguacag cuccaccucg uggaucggcu ugaaugacuu ggacacgagc	1320
ggaggcuggc aguggucgga caacucgccc cucaaguacc ucaacuggga gagugaccag	1380
ccggacaacc ccagugagga gaacugugga gugaucgca cugaguccuc gggeggcugg	1440
cagaaccgug acugcagcau cgcgcugccc uaugugugca agaagaagcc caacgccacg	1500
gccgagccca cccuccaga caggugggcc aaugugaagg uggagugcga gccgagcugg	1560
cagcccuucc agggccacug cuaccgccug caggccgaga agcgcagcug gcaggagucc	1620
aagaaggeau gucuacgggg eggugcgac cuggucagca uccacagcau ggcgagcug	1680
gaauucauca ccaagcagau caagcaagag guggaggagc uguggaucgg ccucaacgau	1740
uugaaacugc agaugaauuu ugaguggucu gacgggagcc uuugagacuu caccacugg	1800

[0003]

caccccuuug agcccaacaa cuuccgggac agucuggagg acugugucac caucuggggc	1860
ccggaaggcc gcuggaacga cagucccugu aaccaguuccu ugccauccau cugcaagaag	1920
gcaggccagc ugagccaggg gcccgccgag gaggaccaug gcugccggaa gggguaggac	1980
uggcacagcc caucugcua cuggcuggga gaagaccaag ugaccuacag ugaggcccgg	2040
cgcugugca cugaccaugg cucucagcug gucaccauca ccaacagguu cgagcaggcc	2100
uucgucagca gccucaucua caacugggag ggcgaguacu ucuggacggc ccugcaggac	2160
cucaacagca ccggcuccuu cuucuggcuc agugggggag aagucaugua caccacugg	2220
aaccgggacc agcccgggua cagccguggg ggcugcgugg cgugggccac uggcagcgcc	2280
auggggcugu gggaggugaa gaacuguacc ucguuccggg cccgcuaau cugccggcag	2340
agccugggca cuccagugac gccggagcug ccggggccag aucccaagcc cagcucacu	2400
ggcuccuguc cccagggcug ggccueggac accaaacucc gguauugcua uaagguguuc	2460
agcucagagc ggcugcagga caagaagagc uggguccagg cccagggggc cugccaggag	2520
cugggggccc agcugcugag ccuggccagc uacgaggagg agcacuuugu ggccaacau	2580
cucaacaaga ucuucgguga aucagaacct gagauccacg agcagcacug guucuggauc	2640
ggccugaacc gucgggaucc cagagggggg cagaguuggc gcuggagcga cggcguaggg	2700
uuucuuacc acaauuucga ccggagccgg cacgacgacg acgacauccg aggcugugcg	2760
guuugggacc ugccucccu gcagugggug gccaugcagu gcgacacaca guggacuug	2820
aucugcaaga uccccagagg uacggacgug cgggagcccg acgacagccc ucaaggccga	2880
cgggaauggc ugcgcuucca ggaggccgag uacaaguucu uugagcacca cuccacugg	2940
gcgcaggcgc agcgcaucug cacugguuc caggccgagc ugaccucggu gcacagccag	3000
gcggagcuag acuuccugag ccacaacuug cagaaguucu cccgggcccga ggagcagcac	3060
ugguggaucg gccugcacac cucugagagc gaugggcgc ucagauggac agaugguucc	3120

[0004]

auuauaaacu ucaucuccug ggcaccaggc aaaccucgge cugucggcaa ggacaagaag	3180
ugcguguaca ugacagccag ccgagaggac uggggggacc agaggugccu gacagccuug	3240
cccuacaucu gcaagcgag caacgucacc aaagaaacgc agccccaga ccugccaacu	3300
acagcccugg ggggcugccc cucugacugg auccaguucc ucaacaagug uuucagguc	3360
cagggccagg aaccccagag ccgggugaag uggucagagg cacaguucuc cugugaacag	3420
caagaggccc agcuggucac caucacaaac ccuuagagc aagcauucac cacagccagc	3480
cugcccaaug ugaccuuuga ccuuuggauu ggccuccaug ccucgcagag ggacuuccag	3540
uggguggagc aggagecuu gaugaugcc aacugggcac euggggagcc cucuggcccu	3600
agcccugcuc ccaguggcaa caaacgcacc agcugugcag ugguccugca cagccccuca	3660
gccacuuca cuggccgug ggacgaucgg agcugcacgg aggagacca ugguucauc	3720
ugccagaagg gcacggacc cuccugagc ccgucaccag cagcgcugcc ccccgccccg	3780
ggcacugagc ucuccuaccu caacggcacc uuccggcugc uucagaagcc gcugcgcugg	3840
cacgaugccc uccugcugug ugagagccgc aaugccagcc ugccuacgu gcccacccc	3900
uacacccagg ccuuccuac gcaggcugcc cgagggcugc gcacgccgu cuggauuggg	3960
cuggcuggcg aggagggcuc ucggcgguac uccuggguu cagaggagcc gcugaacuac	4020
gugggcuggc aggaaggga gccgcagcag ccggggggcu guaccuacgu agaugggac	4080
ggggccuggc gaaccaccag cugugacacc aagcugcagg gggcugugug ugggguuagc	4140
agugggcccc cuccucccg aagaauaagc uaccauggca gcuguccca gggacuggca	4200
gacuccgcu ggauuccuu ccgggagcac ugcuaucuu uccacaugga gcugcugcug	4260
ggccacaagg aggcgcgaca gcgcugccag agagegggug gggccguccu gucuauccug	4320
gaugagaugg agaauuguu ugucugggag caccugcaga gcuaugaggg ccagagucgg	4380
ggcgcuggc ugggcaugaa cuucaacccc aaaggaggca cucuggucug gcaggacaac	4440

[0005]

acagcuguga	acuacuccaa	cuggggggccc	cegggcuuagg	gccccagcau	gcugagccac	4500
aacagcugcu	acuggauuca	gagcaacagc	gggcuauggc	gccccggcgc	uugaccaac	4550
aucaccaugg	gugucgucug	caagcuuccu	cgugcugage	agagcagcuu	cuccccauca	4620
gcgcuuccag	agaaccacgc	ggcccuggug	guggugcuga	uggcggugcu	gcugcuuccg	4680
gccuugcuga	ccgcagcccu	cauccuuuac	cggaggcgcc	agagcaucga	gcgcggggcc	4740
uuugagggug	ccgcuaacag	ccgcagcagc	uccagcccca	ccgaggccac	ugagaagaac	4800
auccuggugu	cagacaugga	aaugaauag	caacaagaau	agagccaggc	gcuggggcag	4860
ggccagggcg	ggaggagcug	gggagcuggg	gccuuggguc	agucuggccc	cccaccagcu	4920
gccuguccag	uuggccuau	gaaggugccc	cuugggaguc	gcuguuggga	gccggagcug	4980
ggcagagccu	gggcuggugg	ggugccacc	uccacaagg	gcugggcuga	gaccagcug	5040
agugcagcgu	ggcguuucc	uuucuggggg	ggccugaggu	cuugucaccu	gguccuguc	5100
ccccacagga	accagaggua	ggaugggagg	gggaacgaga	gccucuuucu	ccccagagcc	5160
cccggcccag	gccuguugau	ccgcgcccc	ggacccccuu	cuuugcagag	cccagaggag	5220
cuccccuguc	ccucgggca	gaucuguugu	gucucucuc	ccaccuggca	gccucagcuc	5280
ugugccccuc	accucgcucc	cucucgccc	uucucucca	ccccuuccu	cugagccggg	5340
ccucggggau	uggggagccc	uccuuguucc	gaugaggguc	agcugagggg	gcugagcauc	5400
caucacuccu	gugccugcug	ggguggcugu	ggggcguggc	aggaggggcc	uagguggguu	5460
gggcccugaga	accagggcac	ggguguggug	ucugcugggc	uggagauaag	acuggggaga	5520
gacaccccaa	ccucccagg	ugggagcugg	gccgggcugg	gaugucaucu	ccugccgggc	5580
gggggagggc	ucugccccug	gaagaguccc	cuguggggac	caaaauaagu	ucccuacau	5640
cuccagcucc	uggcucuggu	uuggagcaag	gggaaggguu	gccagagucc	ugggggcccc	5700
agaggagcag	gagucuggga	gggcccagag	uucacccucu	aguggaucca	ggaggagcag	5760

[0006]

cacccgagcc cuggaguggc ccaguaccu uccaagaggc cacagucca gccaggacaa 5820
aguaugcggc ccauccuggu gcgacagegu gggacaangu gaacauggac ucgaagacau 5880
ggcccuuucu cuguaguuga uuuuuuuuuu gugccauuu uuuuuuuuuu aaaaaaggaa 5940
aaaagaaaag caaacaaua aaacaccuuu aagaggeuug aaa 5983

<210> 2
<211> 1479
<212> PRT
<213> 智人 (Homo_sapiens)

<300>
<308> NP_006030.2
<309> 2012-11-17
<313> (1).. (1479)

<400> 2

Met Gly Pro Gly Arg Pro Ala Pro Ala Pro Trp Pro Arg His Leu Leu
1 5 10 15

Arg Cys Val Leu Leu Leu Gly Cys Leu His Leu Gly Arg Pro Gly Ala
20 25 30

Pro Gly Asp Ala Ala Leu Pro Glu Pro Asn Val Phe Leu Ile Phe Ser
35 40 45

His Gly Leu Gln Gly Cys Leu Glu Ala Gln Gly Gly Gln Val Arg Val
50 55 60

Thr Pro Ala Cys Asn Thr Ser Leu Pro Ala Gln Arg Trp Lys Trp Val
65 70 75 80

Ser Arg Asn Arg Leu Phe Asn Leu Gly Thr Met Gln Cys Leu Gly Thr
85 90 95

[0007]

Gly Trp Pro Gly Thr Asn Thr Thr Ala Ser Leu Gly Met Tyr Glu Cys
100 105 110

Asp Arg Glu Ala Leu Asn Leu Arg Trp His Cys Arg Thr Leu Gly Asp
115 120 125

Gln Leu Ser Leu Leu Leu Gly Ala Arg Thr Ser Asn Ile Ser Lys Pro
130 135 140

Gly Thr Leu Glu Arg Gly Asp Gln Thr Arg Ser Gly Gln Trp Arg Ile
145 150 155 160

Tyr Gly Ser Glu Glu Asp Leu Cys Ala Leu Pro Tyr His Glu Val Tyr
165 170 175

Thr Ile Gln Gly Asn Ser His Gly Lys Pro Cys Thr Ile Pro Phe Lys
180 185 190

Tyr Asp Asn Gln Trp Phe His Gly Cys Thr Ser Thr Gly Arg Glu Asp
195 200 205

Gly His Leu Trp Cys Ala Thr Thr Gln Asp Tyr Gly Lys Asp Glu Arg
210 215 220

Trp Gly Phe Cys Pro Ile Lys Ser Asn Asp Cys Glu Thr Phe Trp Asp
225 230 235 240

Lys Asp Gln Leu Thr Asp Ser Cys Tyr Gln Phe Asn Phe Gln Ser Thr
245 250 255

Leu Ser Trp Arg Glu Ala Trp Ala Ser Cys Glu Gln Gln Gly Ala Asp
260 265 270

[0008]

Leu Leu Ser Ile Thr Glu Ile His Glu Gln Thr Tyr Ile Asn Gly Leu
275 280 285

Leu Thr Gly Tyr Ser Ser Thr Leu Trp Ile Gly Leu Asn Asp Leu Asp
290 295 300

Thr Ser Gly Gly Trp Gln Trp Ser Asp Asn Ser Pro Leu Lys Tyr Leu
305 310 315 320

Asn Trp Glu Ser Asp Gln Pro Asp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly
325 330 335

Val Ile Arg Thr Glu Ser Ser Gly Gly Trp Gln Asn Arg Asp Cys Ser
340 345 350

Ile Ala Leu Pro Tyr Val Cys Lys Lys Lys Pro Asn Ala Thr Ala Glu
355 360 365

Pro Thr Pro Pro Asp Arg Trp Ala Asn Val Lys Val Glu Cys Glu Pro
370 375 380

Ser Trp Gln Pro Phe Gln Gly His Cys Tyr Arg Leu Gln Ala Glu Lys
385 390 395 400

Arg Ser Trp Gln Glu Ser Lys Lys Ala Cys Leu Arg Gly Gly Gly Asp
405 410 415

Leu Val Ser Ile His Ser Met Ala Glu Leu Glu Phe Ile Thr Lys Gln
420 425 430

Ile Lys Gln Glu Val Glu Glu Leu Trp Ile Gly Leu Asn Asp Leu Lys
435 440 445

[0009]

Leu Gln Met Asn Phe Glu Trp Ser Asp Gly Ser Leu Val Ser Phe Thr
450 455 460

His Trp His Pro Phe Glu Pro Asn Asn Phe Arg Asp Ser Leu Glu Asp
465 470 475 480

Cys Val Thr Ile Trp Gly Pro Glu Gly Arg Trp Asn Asp Ser Pro Cys
485 490 495

Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ile Cys Lys Lys Ala Gly Gln Leu Ser Gln
500 505 510

Gly Ala Ala Glu Glu Asp His Gly Cys Arg Lys Gly Trp Thr Trp His
515 520 525

Ser Pro Ser Cys Tyr Trp Leu Gly Glu Asp Gln Val Thr Tyr Ser Glu
530 535 540

Ala Arg Arg Leu Cys Thr Asp His Gly Ser Gln Leu Val Thr Ile Thr
545 550 555 560

Asn Arg Phe Glu Gln Ala Phe Val Ser Ser Leu Ile Tyr Asn Trp Glu
565 570 575

Gly Glu Tyr Phe Trp Thr Ala Leu Gln Asp Leu Asn Ser Thr Gly Ser
580 585 590

Phe Phe Trp Leu Ser Gly Asp Glu Val Met Tyr Thr His Trp Asn Arg
595 600 605

Asp Gln Pro Gly Tyr Ser Arg Gly Gly Cys Val Ala Leu Ala Thr Gly
610 615 620

[0010]

Ser Ala Met Gly Leu Trp Glu Val Lys Asn Cys Thr Ser Phe Arg Ala
625 630 635 640

Arg Tyr Ile Cys Arg Gln Ser Leu Gly Thr Pro Val Thr Pro Glu Leu
645 650 655

Pro Gly Pro Asp Pro Thr Pro Ser Leu Thr Gly Ser Cys Pro Gln Gly
660 665 670

Trp Ala Ser Asp Thr Lys Leu Arg Tyr Cys Tyr Lys Val Phe Ser Ser
675 680 685

Glu Arg Leu Gln Asp Lys Lys Ser Trp Val Gln Ala Gln Gly Ala Cys
690 695 700

Gln Glu Leu Gly Ala Gln Leu Leu Ser Leu Ala Ser Tyr Glu Glu Glu
705 710 715 720

His Phe Val Ala Asn Met Leu Asn Lys Ile Phe Gly Glu Ser Glu Pro
725 730 735

Glu Ile His Glu Gln His Trp Phe Trp Ile Gly Leu Asn Arg Arg Asp
740 745 750

Pro Arg Gly Gly Gln Ser Trp Arg Trp Ser Asp Gly Val Gly Phe Ser
755 760 765

Tyr His Asn Phe Asp Arg Ser Arg His Asp Asp Asp Ile Arg Gly
770 775 780

Cys Ala Val Leu Asp Leu Ala Ser Leu Gln Trp Val Ala Met Gln Cys
785 790 795 800

[0011]

Asp Thr Gln Leu Asp Trp Ile Cys Lys Ile Pro Arg Gly Thr Asp Val
805 810 815

Arg Glu Pro Asp Asp Ser Pro Gln Gly Arg Arg Glu Trp Leu Arg Phe
820 825 830

Gln Glu Ala Glu Tyr Lys Phe Phe Glu His His Ser Thr Trp Ala Gln
835 840 845

Ala Gln Arg Ile Cys Thr Trp Phe Gln Ala Glu Leu Thr Ser Val His
850 855 860

Ser Gln Ala Glu Leu Asp Phe Leu Ser His Asn Leu Gln Lys Phe Ser
865 870 875 880

Arg Ala Gln Glu Gln His Trp Trp Ile Gly Leu His Thr Ser Glu Ser
885 890 895

Asp Gly Arg Phe Arg Trp Thr Asp Gly Ser Ile Ile Asn Phe Ile Ser
900 905 910

Trp Ala Pro Gly Lys Pro Arg Pro Val Gly Lys Asp Lys Lys Cys Val
915 920 925

Tyr Met Thr Ala Ser Arg Glu Asp Trp Gly Asp Gln Arg Cys Leu Thr
930 935 940

Ala Leu Pro Tyr Ile Cys Lys Arg Ser Asn Val Thr Lys Glu Thr Gln
945 950 955 960

Pro Pro Asp Leu Pro Thr Thr Ala Leu Gly Gly Cys Pro Ser Asp Trp
965 970 975

[0012]

Ile Gln Phe Leu Asn Lys Cys Phe Gln Val Gln Gly Gln Glu Pro Gln
 980 985 990

Ser Arg Val Lys Trp Ser Glu Ala Gln Phe Ser Cys Glu Gln Gln Glu
 995 1000 1005

Ala Gln Leu Val Thr Ile Thr Asn Pro Leu Glu Gln Ala Phe Ile
 1010 1015 1020

Thr Ala Ser Leu Pro Asn Val Thr Phe Asp Leu Trp Ile Gly Leu
 1025 1030 1035

His Ala Ser Gln Arg Asp Phe Gln Trp Val Glu Gln Glu Pro Leu
 1040 1045 1050

Met Tyr Ala Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Ser Gly Pro Ser Pro
 1055 1060 1065

Ala Pro Ser Gly Asn Lys Pro Thr Ser Cys Ala Val Val Leu His
 1070 1075 1080

Ser Pro Ser Ala His Phe Thr Gly Arg Trp Asp Asp Arg Ser Cys
 1085 1090 1095

Thr Glu Glu Thr His Gly Phe Ile Cys Gln Lys Gly Thr Asp Pro
 1100 1105 1110

Ser Leu Ser Pro Ser Pro Ala Ala Leu Pro Pro Ala Pro Gly Thr
 1115 1120 1125

Glu Leu Ser Tyr Leu Asn Gly Thr Phe Arg Leu Leu Gln Lys Pro
 1130 1135 1140

[0013]

Leu Arg Trp His Asp Ala Leu Leu Leu Cys Glu Ser Arg Asn Ala
1145 1150 1155

Ser Leu Ala Tyr Val Pro Asp Pro Tyr Thr Gln Ala Phe Leu Thr
1160 1165 1170

Gln Ala Ala Arg Gly Leu Arg Thr Pro Leu Trp Ile Gly Leu Ala
1175 1180 1185

Gly Glu Glu Gly Ser Arg Arg Tyr Ser Trp Val Ser Glu Glu Pro
1190 1195 1200

Leu Asn Tyr Val Gly Trp Gln Asp Gly Glu Pro Gln Gln Pro Gly
1205 1210 1215

Gly Cys Thr Tyr Val Asp Val Asp Gly Ala Trp Arg Thr Thr Ser
1220 1225 1230

Cys Asp Thr Lys Leu Gln Gly Ala Val Cys Gly Val Ser Ser Gly
1235 1240 1245

Pro Pro Pro Pro Arg Arg Ile Ser Tyr His Gly Ser Cys Pro Gln
1250 1255 1260

Gly Leu Ala Asp Ser Ala Trp Ile Pro Phe Arg Glu His Cys Tyr
1265 1270 1275

Ser Phe His Met Glu Leu Leu Leu Gly His Lys Glu Ala Arg Gln
1280 1285 1290

Arg Cys Gln Arg Ala Gly Gly Ala Val Leu Ser Ile Leu Asp Glu
1295 1300 1305

[0014]

Met	Glu	Asn	Val	Phe	Val	Trp	Glu	His	Leu	Gln	Ser	Tyr	Glu	Gly
1310							1315					1320		

Gln	Ser	Arg	Gly	Ala	Trp	Leu	Gly	Met	Asn	Phe	Asn	Pro	Lys	Gly
1325							1330					1335		

Gly	Thr	Leu	Val	Trp	Gln	Asp	Asn	Thr	Ala	Val	Asn	Tyr	Ser	Asn
1340							1345					1350		

Trp	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Met	Leu	Ser	His	Asn	Ser
1355							1360					1365		

Cys	Tyr	Trp	Ile	Gln	Ser	Asn	Ser	Gly	Leu	Trp	Arg	Pro	Gly	Ala
1370							1375					1380		

Cys	Thr	Asn	Ile	Thr	Met	Gly	Val	Val	Cys	Lys	Leu	Pro	Arg	Ala
1385							1390					1395		

Glu	Gln	Ser	Ser	Phe	Ser	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Glu	Asn	Pro	Ala
1400							1405					1410		

Ala	Leu	Val	Val	Val	Leu	Met	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu
1415							1420					1425		

Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Tyr	Arg	Arg	Arg	Gln	Ser	Ile	Glu
1430							1435					1440		

Arg	Gly	Ala	Phe	Glu	Gly	Ala	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser
1445							1450					1455		

Pro	Thr	Glu	Ala	Thr	Glu	Lys	Asn	Ile	Leu	Val	Ser	Asp	Met	Glu
1460							1465					1470		

[0015]

Met Asn Glu Gln Gln Glu
1475

<210> 3

<211> 1593

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 克隆在 FLAG 序列内的人 END0180 的细胞外结构域(氨基酸 1-522)

<400> 3

atggggcccg gccggccgce ccccgccccc tggcctcgtc acctgetgeg ctgcgtcctg	60
ctcctcgggt gectgcacct cggccgtccc ggcgccctg gggacgccgc cctcccggaa	120
cccaacgtct tctcatctt cagccatgga ctgcagggtt gcctggagge ccagggcggg	180
caggtcagag tcaccccgge ttgcaatacc agcctccctg ccagcgcctg gaagtgggtc	240
tccegaaaac ggctattcaa cctgggtacc atgcagtgcc tgggcacagg ctggccagge	300
accaacaacca cgccctccct gggcatgtat gagtgtgacc gggaagcact gaatcttcgc	360
tggcattgtc gtacactggg tgaccagctg tcttgcctc tgggggcccg caccagcaac	420
atatecaage ctggcaccct tgagcgtggt gaccagaccc gcagtggcca gtggcgcate	480
tacggcagcg aggaggacct atgtgctctg ccctaccaag aggtctacac catccaggga	540
aactcccaag gaaagccgtg caccatcccc ttcaaatatg acaaccagtg gttccacgge	600
tgcaccagea cgggcccgga ggatgggtcac ctgtggtgtg ccaccacca ggactacgge	660
aaagacgagc gctggggctt ctgcccctc aagagtaacg actgcgagac cttctgggac	720
aaggaccage tgactgacag ctgctaccag tttaacttcc agtccacgct gtctggagg	780
gaggcctggg ccagctgcca gcagcagggt geggatctgc tgagcatcac ggagatccac	840

[0016]

```

gagcagaact acatcaacgg cctcctcact gggtaacagct ccacctgtg gatcggttg 900
aatgacttgg acacgagcgg aggctggcag tggteggaca actcgcccct caagtacctc 960
aactgggaga gtgaccagcc ggacaacccc agtgaggaga actgtggagt gatccgcaact 1020
gagtccctgg gcggetggca gaaccgtgac tgcagcatcg cgtgccccta tgtgtgcaag 1080
aagaagccca acgccacggc cgagcccacc cctccagaca ggtgggceaa tgtgaaggtg 1140
gagtgcgagc cgagctggca gcccttcag ggccactgct accgcctgca ggccgagaag 1200
cgcagctggc aggagtccaa gaaggcatgt ctacggggcg gtggcgacct ggtcagcatc 1260
cacagcatgg cggagctgga attcatcacc aagcagatca agcaagaggt ggaggagctg 1320
tggatcggcc tcaacgattt gaaactgcag atgaattttg agtggctga cgggagcctt 1380
gtgagcttca cccactggca cccctttgag cccaacaact tccgggacag tctggaggac 1440
tgtgtcacca tctggggccc ggaaggccgc tggaaagaca gtccctgtaa ccagtccttg 1500
ccatccatct gcaagaaggc aggccagctg agccaggggg ccgcccagga ggaccatggc 1560
tgccgggatt acaaggacga cgacgataag tga 1593

```

<210> 4

<211> 530

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 由 SEQ ID NO:3 编码的多肽

<400> 4

```

Met Gly Pro Gly Arg Pro Ala Pro Ala Pro Trp Pro Arg His Leu Leu
1           5           10           15

```

```

Arg Cys Val Leu Leu Leu Gly Cys Leu His Leu Gly Arg Pro Gly Ala
20           25           30

```

[0017]

Pro Gly Asp Ala Ala Leu Pro Glu Pro Asn Val Phe Leu Ile Phe Ser
35 40 45

His Gly Leu Gln Gly Cys Leu Glu Ala Gln Gly Gly Gln Val Arg Val
50 55 60

Thr Pro Ala Cys Asn Thr Ser Leu Pro Ala Gln Arg Trp Lys Trp Val
65 70 75 80

Ser Arg Asn Arg Leu Phe Asn Leu Gly Thr Met Gln Cys Leu Gly Thr
85 90 95

Gly Trp Pro Gly Thr Asn Thr Thr Ala Ser Leu Gly Met Tyr Glu Cys
100 105 110

Asp Arg Glu Ala Leu Asn Leu Arg Trp His Cys Arg Thr Leu Gly Asp
115 120 125

Gln Leu Ser Leu Leu Leu Gly Ala Arg Thr Ser Asn Ile Ser Lys Pro
130 135 140

Gly Thr Leu Glu Arg Gly Asp Gln Thr Arg Ser Gly Gln Trp Arg Ile
145 150 155 160

Tyr Gly Ser Glu Glu Asp Leu Cys Ala Leu Pro Tyr His Glu Val Tyr
165 170 175

Thr Ile Gln Gly Asn Ser His Gly Lys Pro Cys Thr Ile Pro Phe Lys
180 185 190

Tyr Asp Asn Gln Trp Phe His Gly Cys Thr Ser Thr Gly Arg Glu Asp
195 200 205

[0018]

Gly His Leu Trp Cys Ala Thr Thr Gln Asp Tyr Gly Lys Asp Glu Arg
210 215 220

Trp Gly Phe Cys Pro Ile Lys Ser Asn Asp Cys Glu Thr Phe Trp Asp
225 230 235 240

Lys Asp Gln Leu Thr Asp Ser Cys Tyr Gln Phe Asn Phe Gln Ser Thr
245 250 255

Leu Ser Trp Arg Glu Ala Trp Ala Ser Cys Glu Gln Gln Gly Ala Asp
260 265 270

Leu Leu Ser Ile Thr Glu Ile His Glu Gln Thr Tyr Ile Asn Gly Leu
275 280 285

Leu Thr Gly Tyr Ser Ser Thr Leu Trp Ile Gly Leu Asn Asp Leu Asp
290 295 300

Thr Ser Gly Gly Trp Gln Trp Ser Asp Asn Ser Pro Leu Lys Tyr Leu
305 310 315 320

Asn Trp Glu Ser Asp Gln Pro Asp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly
325 330 335

Val Ile Arg Thr Glu Ser Ser Gly Gly Trp Gln Asn Arg Asp Cys Ser
340 345 350

Ile Ala Leu Pro Tyr Val Cys Lys Lys Lys Pro Asn Ala Thr Ala Glu
355 360 365

Pro Thr Pro Pro Asp Arg Trp Ala Asn Val Lys Val Glu Cys Glu Pro
370 375 380

[0019]

Ser Trp Gln Pro Phe Gln Gly His Cys Tyr Arg Leu Gln Ala Glu Lys
385 390 395 400

Arg Ser Trp Gln Glu Ser Lys Lys Ala Cys Leu Arg Gly Gly Gly Asp
405 410 415

Leu Val Ser Ile His Ser Met Ala Glu Leu Glu Phe Ile Thr Lys Gln
420 425 430

Ile Lys Gln Glu Val Glu Glu Leu Trp Ile Gly Leu Asn Asp Leu Lys
435 440 445

Leu Gln Met Asn Phe Glu Trp Ser Asp Gly Ser Leu Val Ser Phe Thr
450 455 460

His Trp His Pro Phe Glu Pro Asn Asn Phe Arg Asp Ser Leu Glu Asp
465 470 475 480

Cys Val Thr Ile Trp Gly Pro Glu Gly Arg Trp Asn Asp Ser Pro Cys
485 490 495

Asn Gln Ser Leu Pro Ser Ile Cys Lys Lys Ala Gly Gln Leu Ser Gln
500 505 510

Gly Ala Ala Glu Glu Asp His Gly Cys Arg Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
515 520 525

Asp Lys
530

<210> 5
<211> 1127
<212> DNA

[0020]

<213> 人工的

<220>

<223> 抗-END0180 scFv 克隆 G7V 的多核苷酸序列

<400> 5

taatgtgagt tagetactet taggcaecce aggetttaca etttatgetti ceggetegta	60
tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt	120
acgccaagct tgccaaatc tatttcaagg agacagtcac aatgaaatac ctattgecta	180
cggcagccgc tggattgtta ttactcgcag caagcggcgc gcatgcccag gtgcagctgg	240
tgcagctctgg gggaggcctg gtcaagcctg gggggctccct gagactctcc tgtgcagcct	300
ctggattcac ctccagtagc tatagcatga actgggtccg ccaggtcca gggaaggggc	360
tggagtgggt ggccaacata aagccagatg gaagtgcagc acactctgtg gactctgtga	420
agggcagatt caccatctcc agagacaact ccaagaactc actgtatctg caaatgaaca	480
gcctgcagagc cgaggacaag gctgtttatt actgtgcgcg acccggggct gggcgacttg	540
actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctctcagg tggaggcggc tcaggcggag	600
gtggctctgg cgggtggcga tcgaatttta tgcagactca ggacgtctgt gtgtctgtgg	660
cttgggaca gacagtcagg atcacatgcc aaggagacag cctcagaagc tattatgcaa	720
gctggtaacca acagaagcca ggacaggccc ctgtacttgt cgtctatggt aaaaacaacc	780
gaacctcagg gatcccagac cgattctctg gctccagctc aggaaacaca gcttctctga	840
ccatcactgg ggcctcaggc gaagatgagg ctgactatta ctgtaactcc cgggacagca	900
gtggtaacct ctgggcgttc ggccggaggga ccaaggtagc cgtcctagct agcggcaaac	960
caatcccaaa cccactgctg ggcttgata gtactacca tcaccatcac cattaggcgg	1020
ccgtactgtg tgaaagtgtg ttagcaaaac ctcatacaga aaattcattt actaacgtct	1080
ggaaagacga caaaacttta gatcgttacg ctaactatga gggcttg	1127

[0021]

<210> 6
<211> 284
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 由 SEQ ID NO:5 编码的多肽

<400> 6

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ser Gly Ala His Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Lys Pro Asp Gly Ser Glu Arg
65 70 75 80

His Ser Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95

Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Gly Ala Gly Arg Leu Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser

[0022]

130	135	140	
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln			
145	150	155	160
Asp Ala Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys			
165	170	175	
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys			
180	185	190	
Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro			
195	200	205	
Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala			
210	215	220	
Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr			
225	230	235	240
Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Pro Trp Ala Phe Gly Gly Gly			
245	250	255	
Thr Lys Val Thr Val Leu Ala Ser Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu			
260	265	270	
Leu Gly Leu Asp Ser Thr His His His His His His			
275	280		
<210> 7			
<211> 12			
<212> PRT			
<213> 人工的			

[0023]

<220>

<223> CDR 结构域

<400> 7

Cys Ala Arg Pro Gly Ala Gly Arg Leu Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> CDR 结构域

<400> 8

Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Pro Trp Ala Phe

1 5 10

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 9

gccacaacgu cuauaucuu

19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 10

[0024]

augauauaga cguuguggc

19

<210> 11

<211> 18

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 11

gugcaaagug guauccua

18

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> 化学合成的

<400> 12

uaggauacca cuuugcacg

19

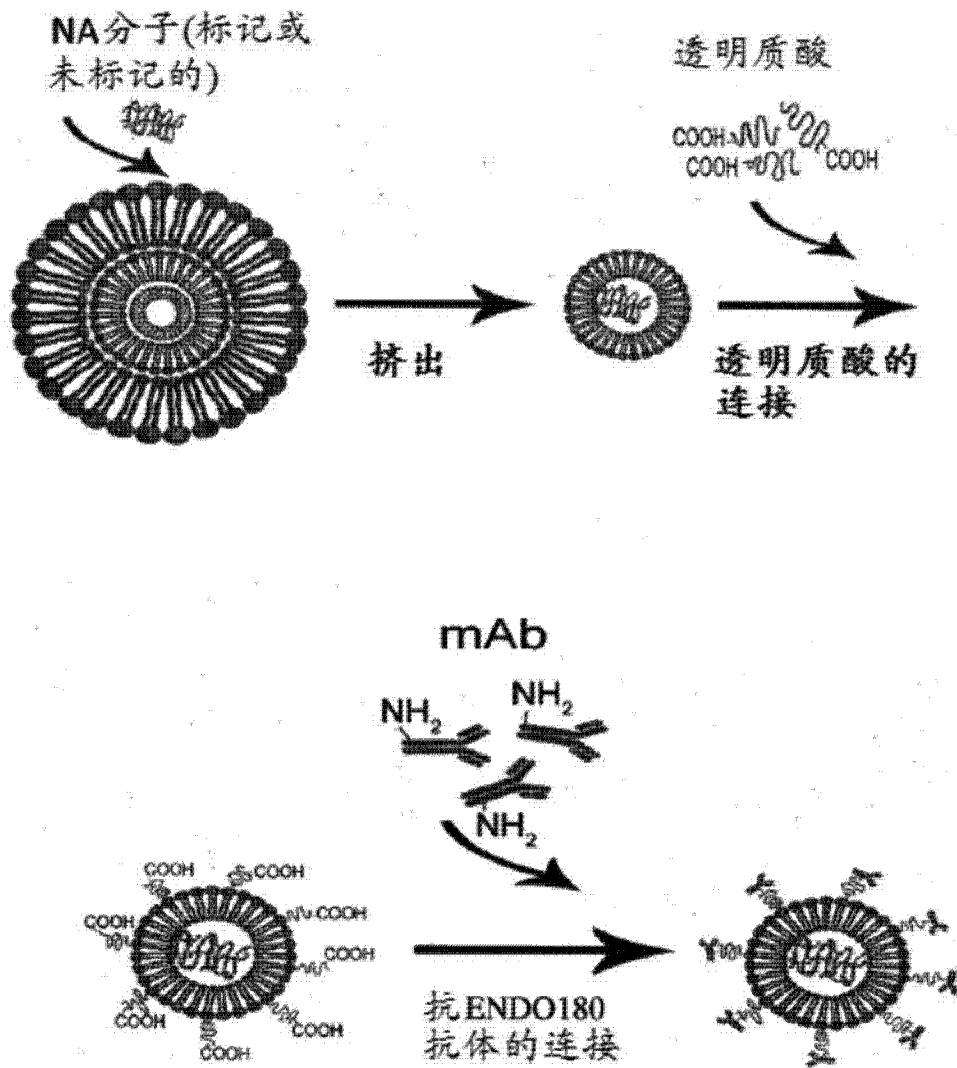


图 1

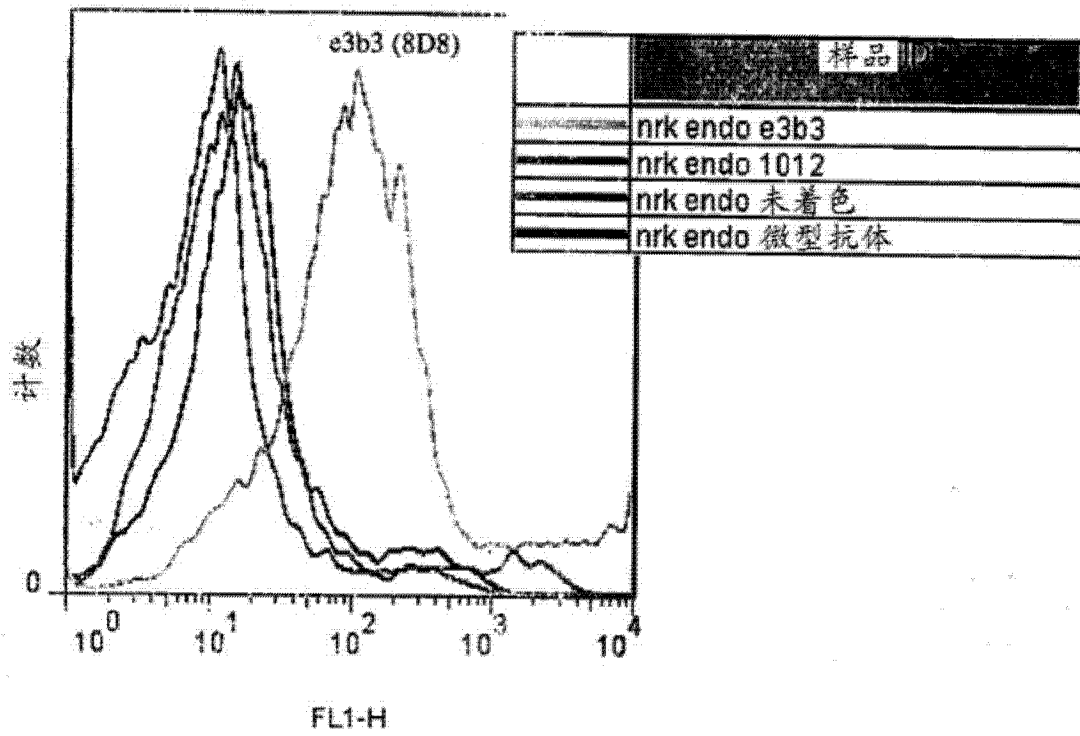


图 2A

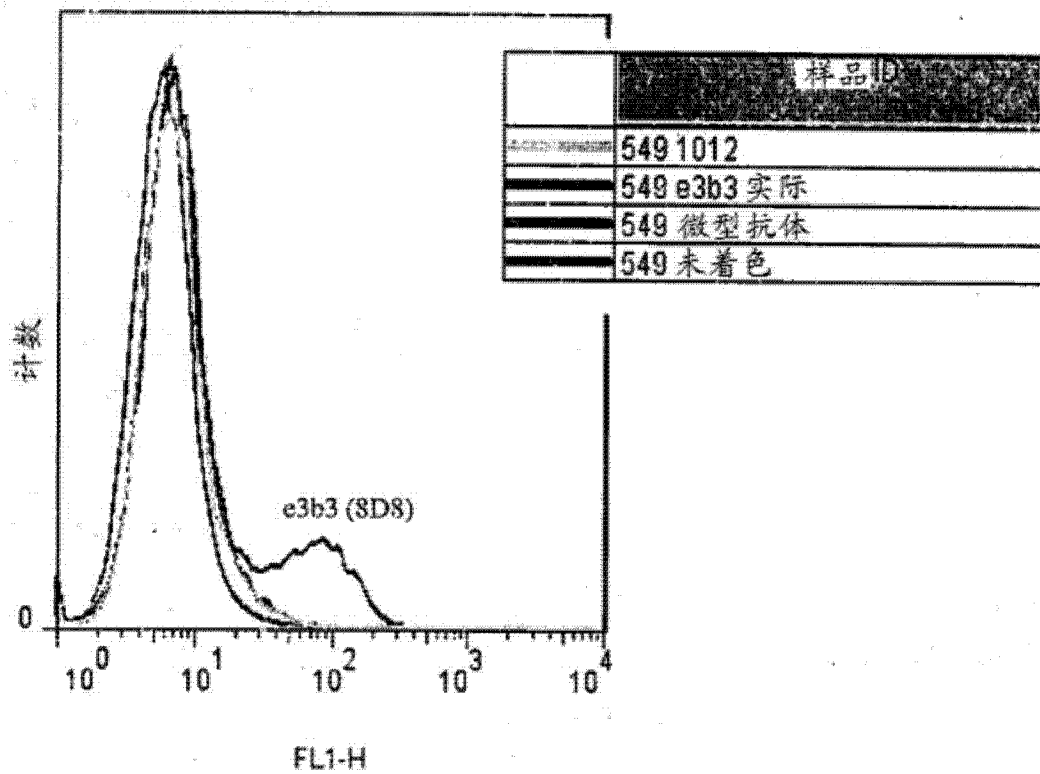


图 2B

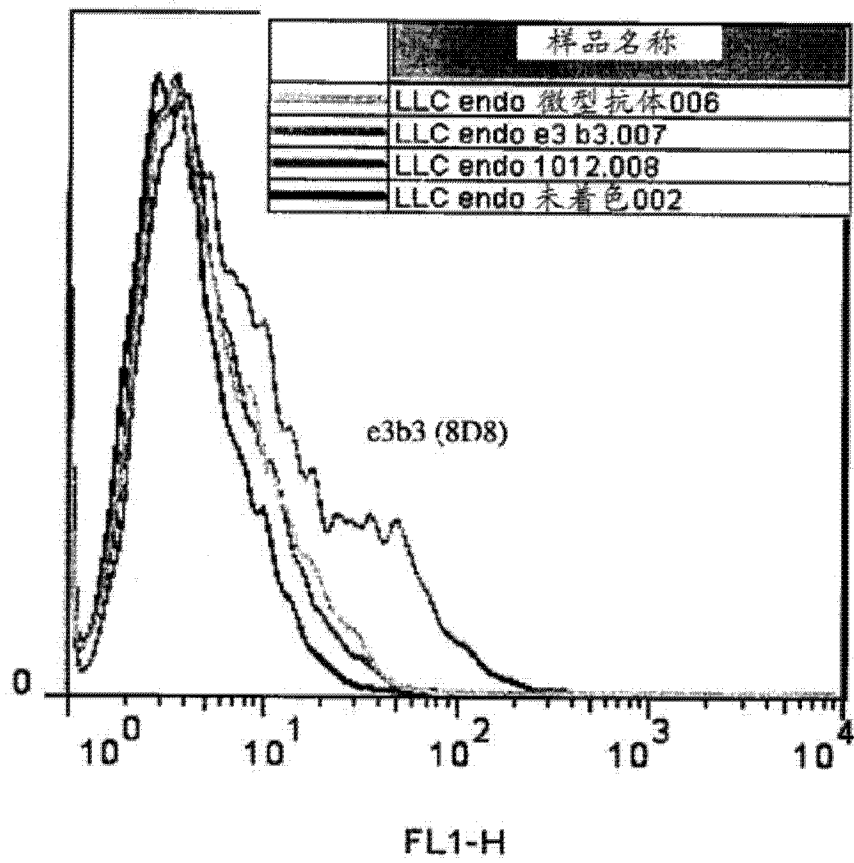


图 3A

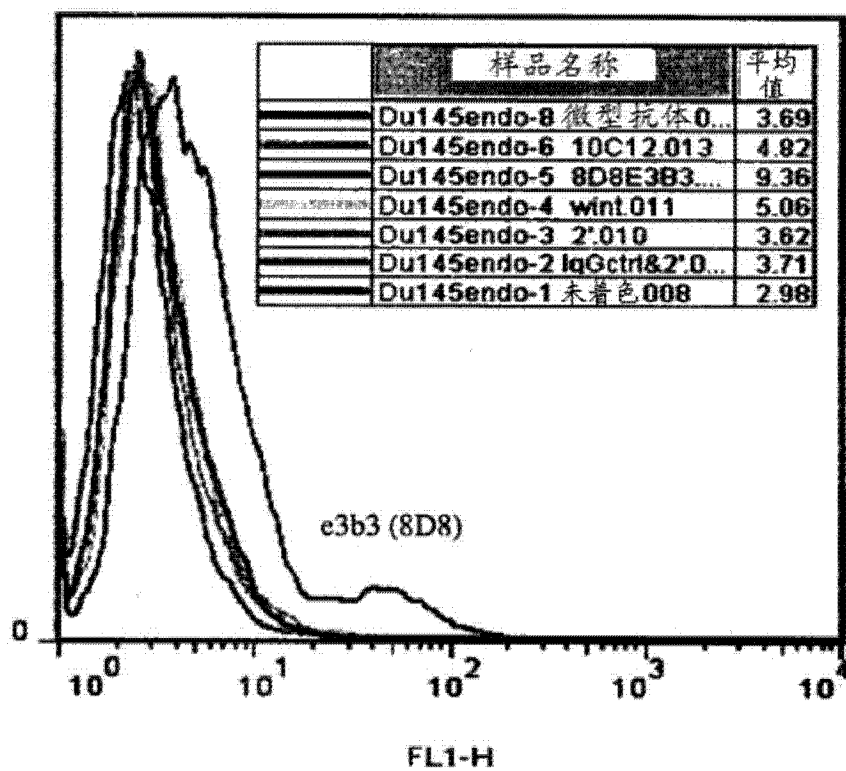
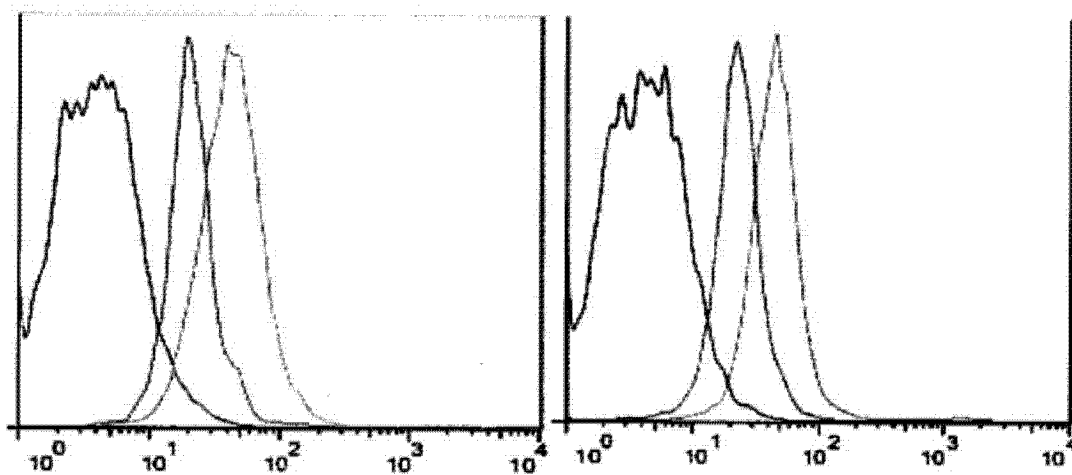


图 3B



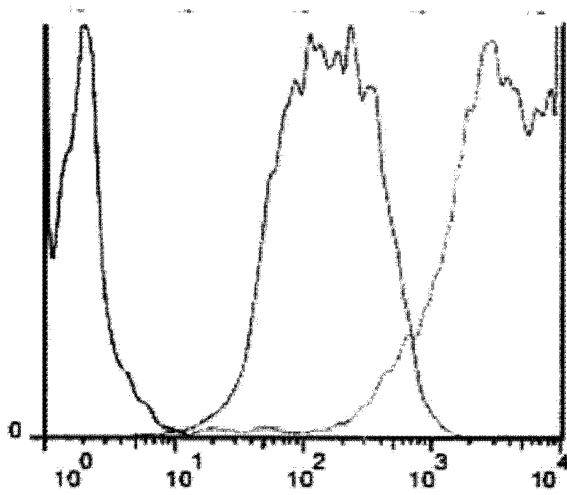


图 4C

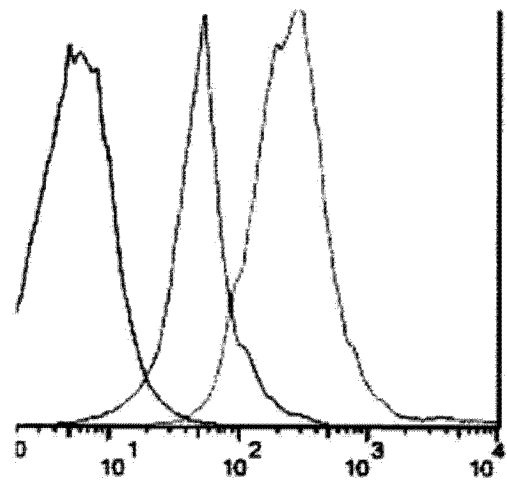


图 4D

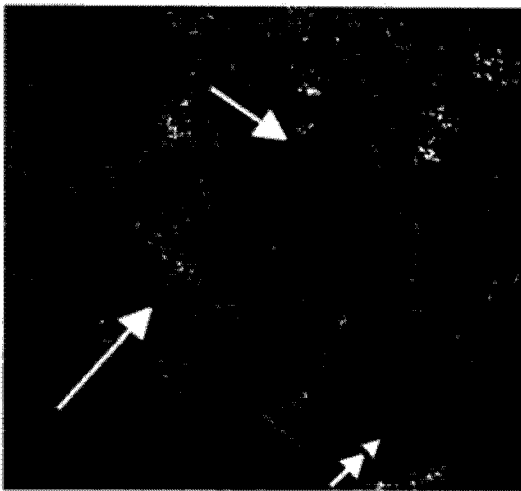


图 5A

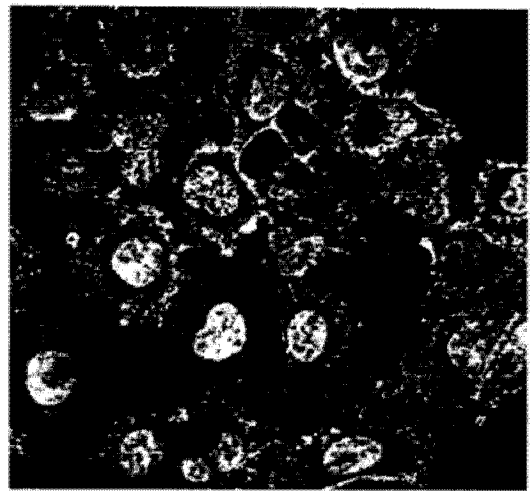


图 5B

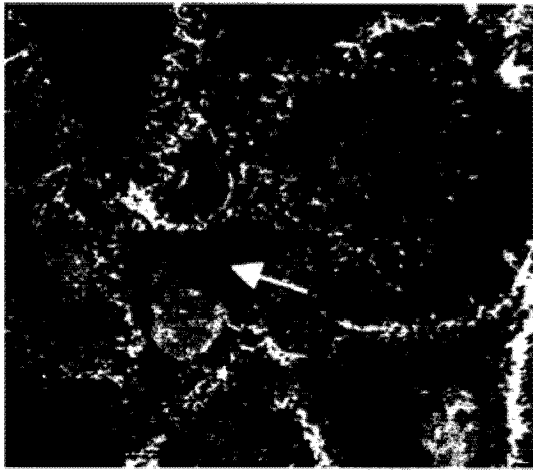


图 5C

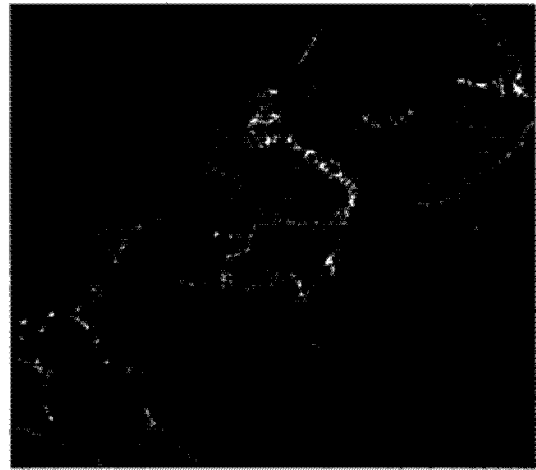


图 5D

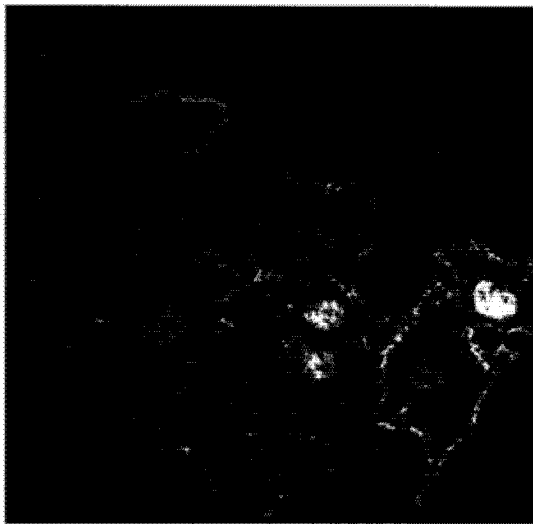


图 6A

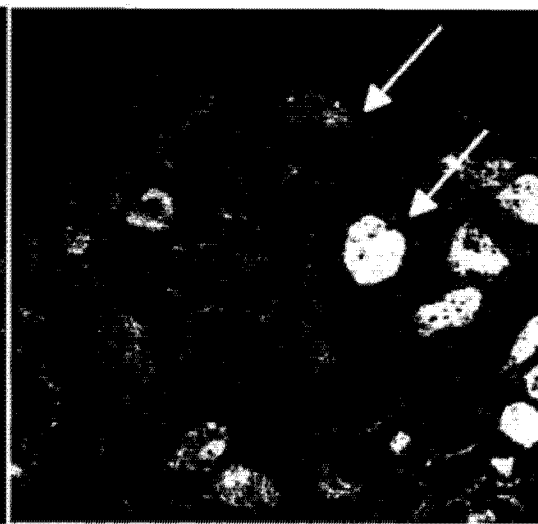


图 6B

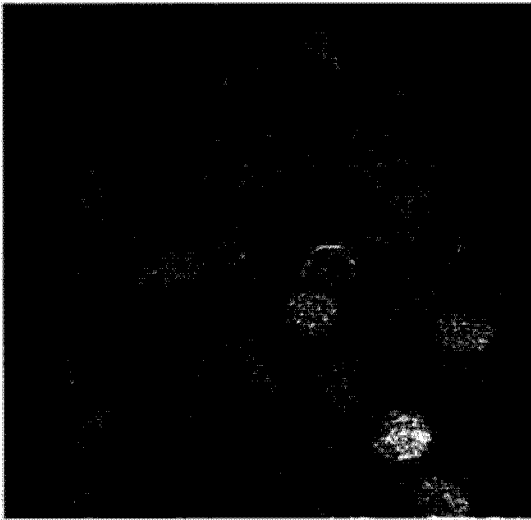


图 6D

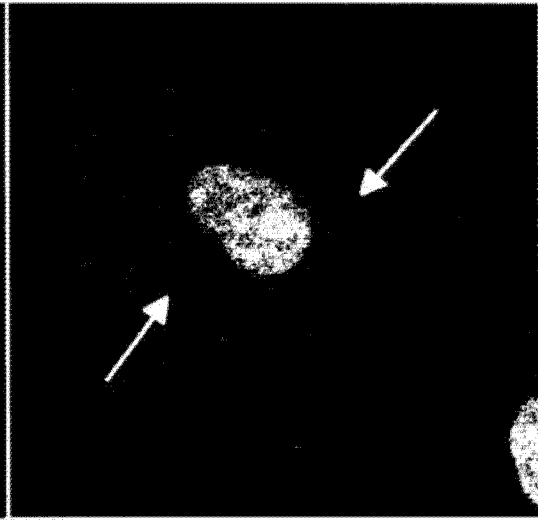


图 6C

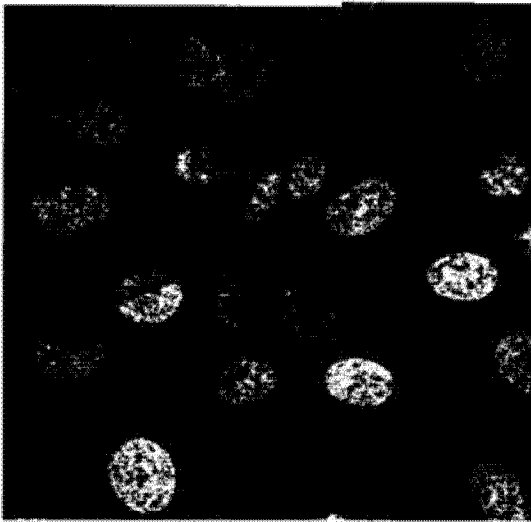


图 7A

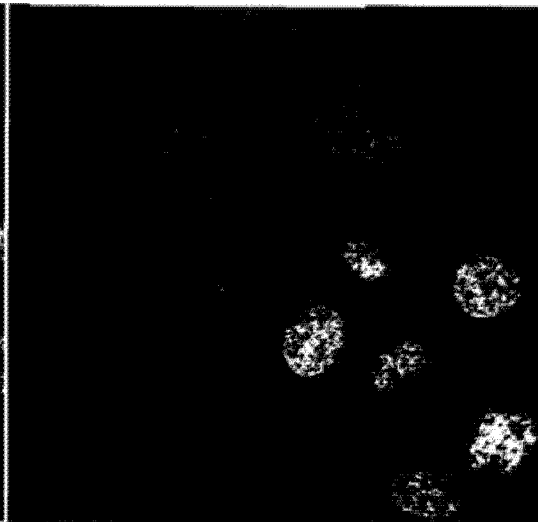


图 7B

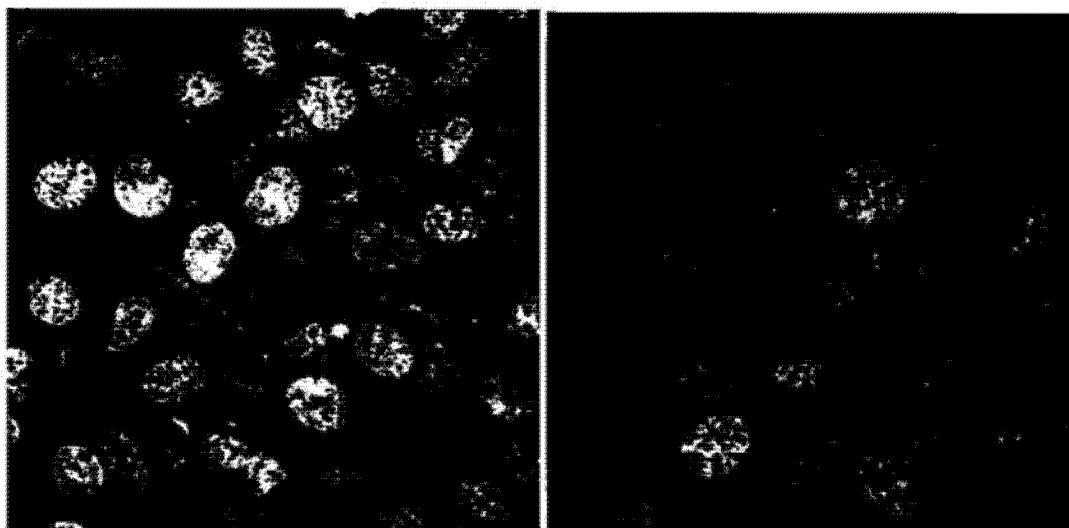


图 7D

图 7C

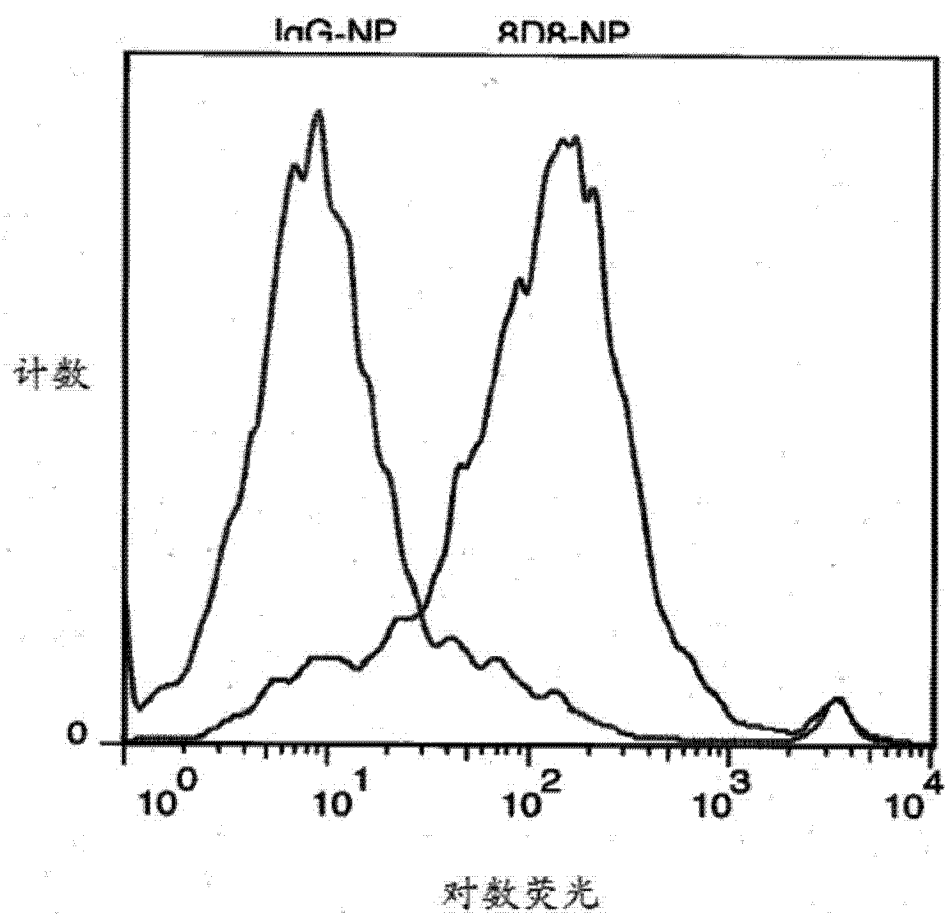


图 8

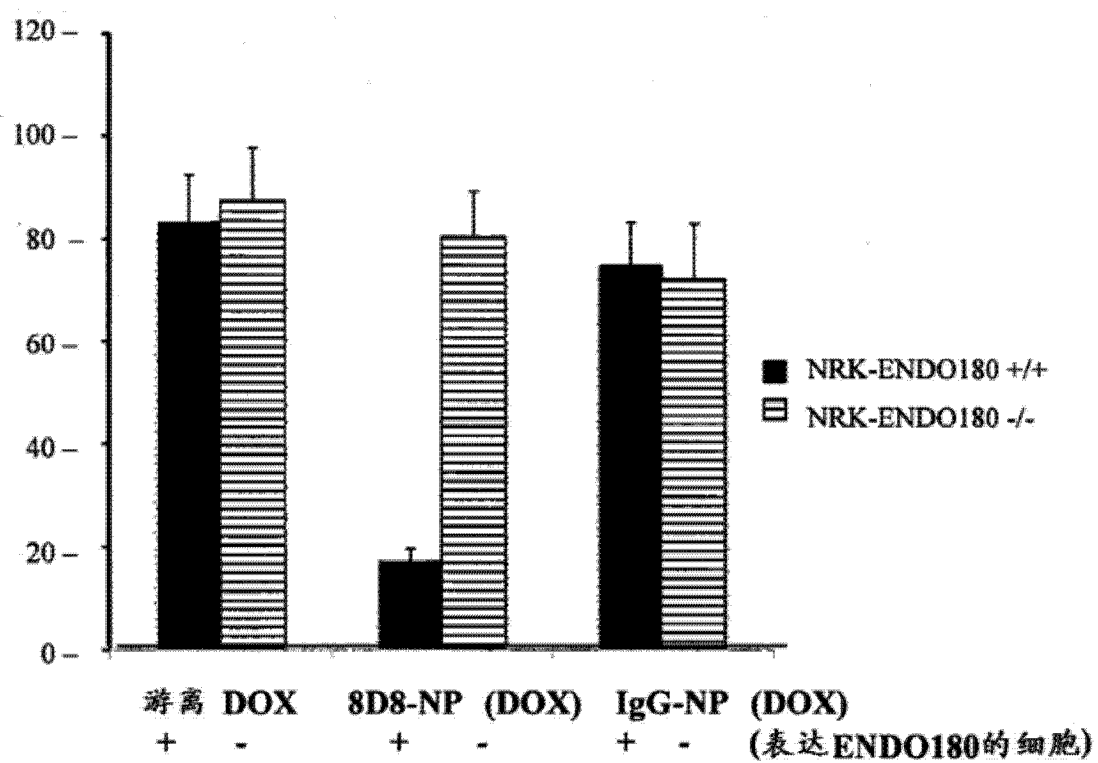
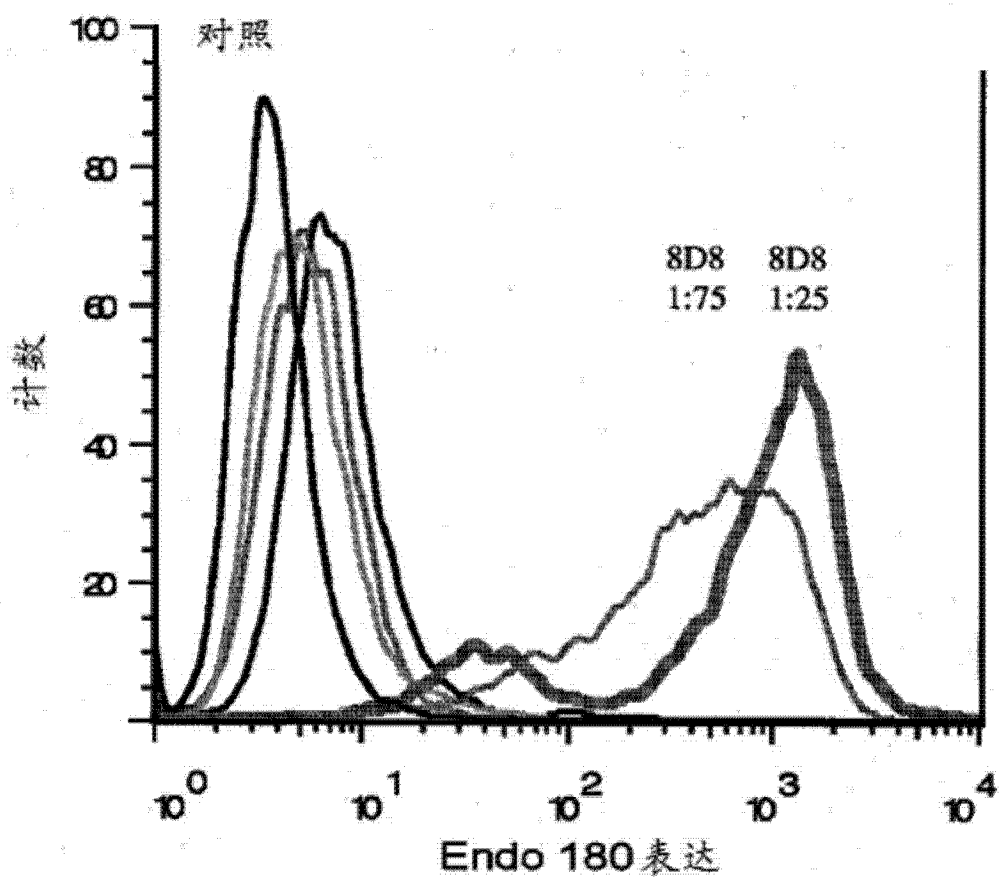


图 9



	样品 ID
	同种型对照 mAb (1:25)
	8D8-NP 1:25 稀释
	8D8-NP 1:75 稀释
	同种型对照 mAb (1:75)
	同种型对照-NP 1:25 稀释
	同种型对照-NP 1:75 稀释

图 10

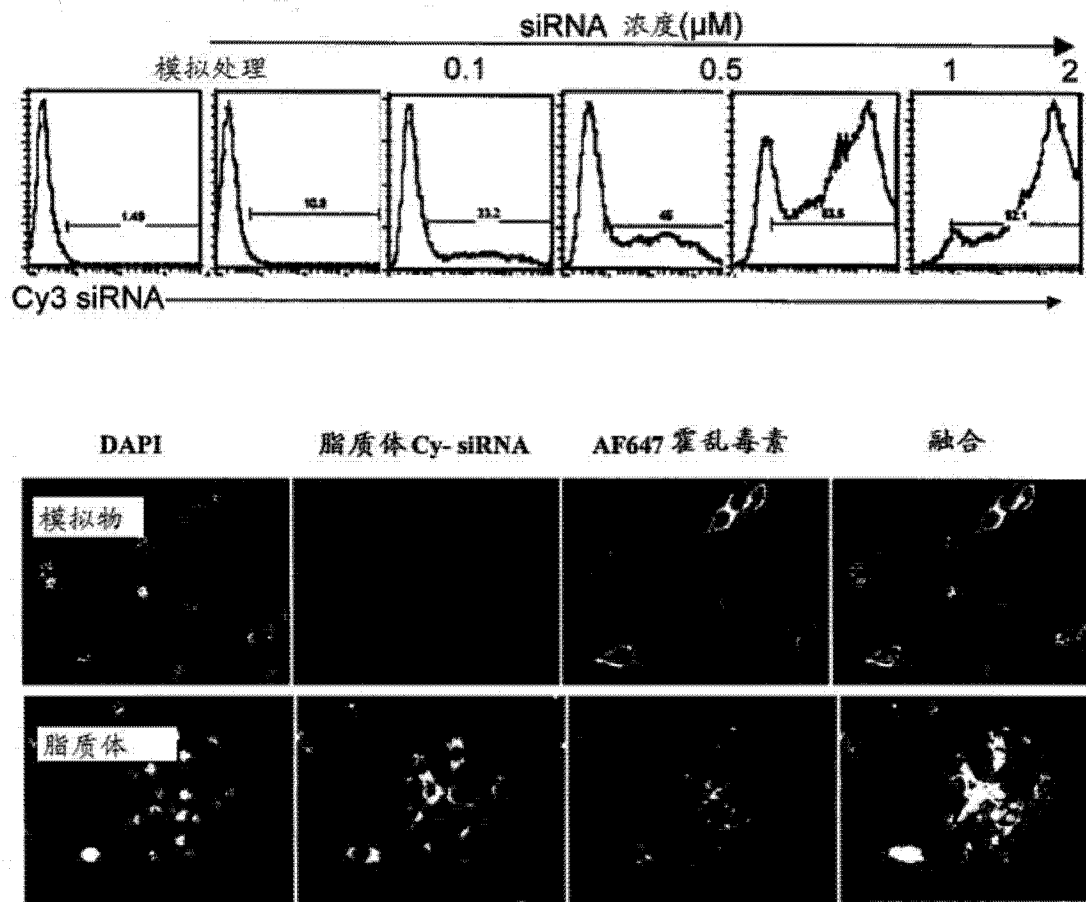


图 11

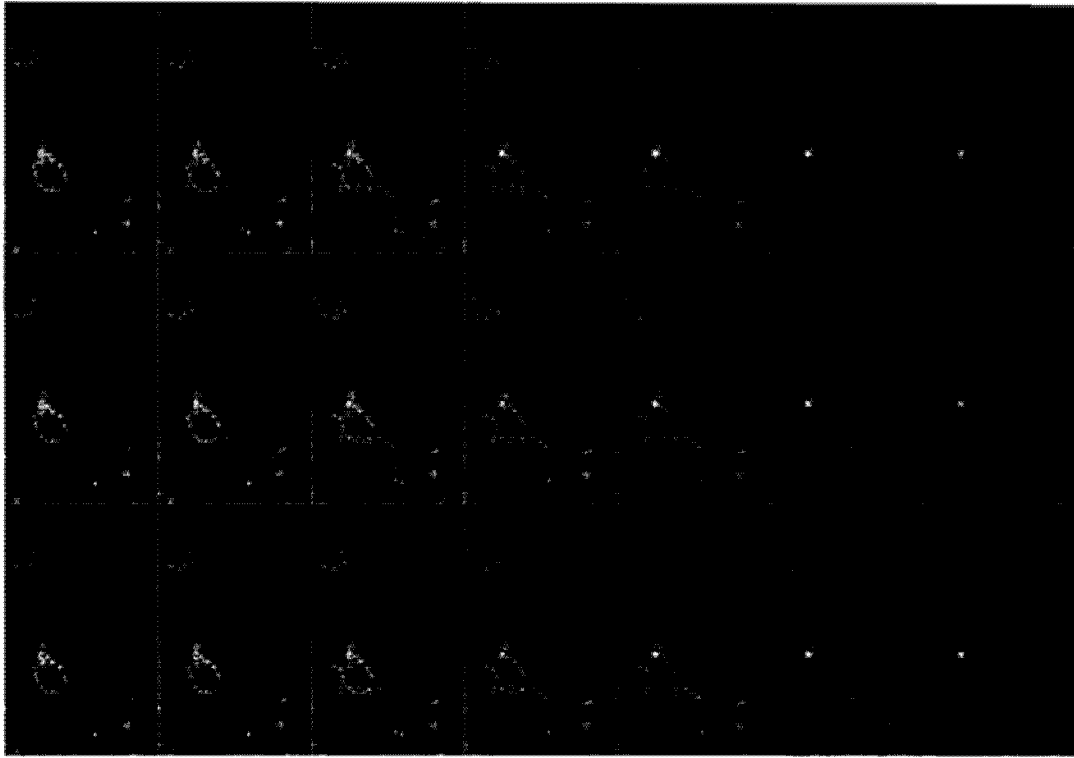


图 12

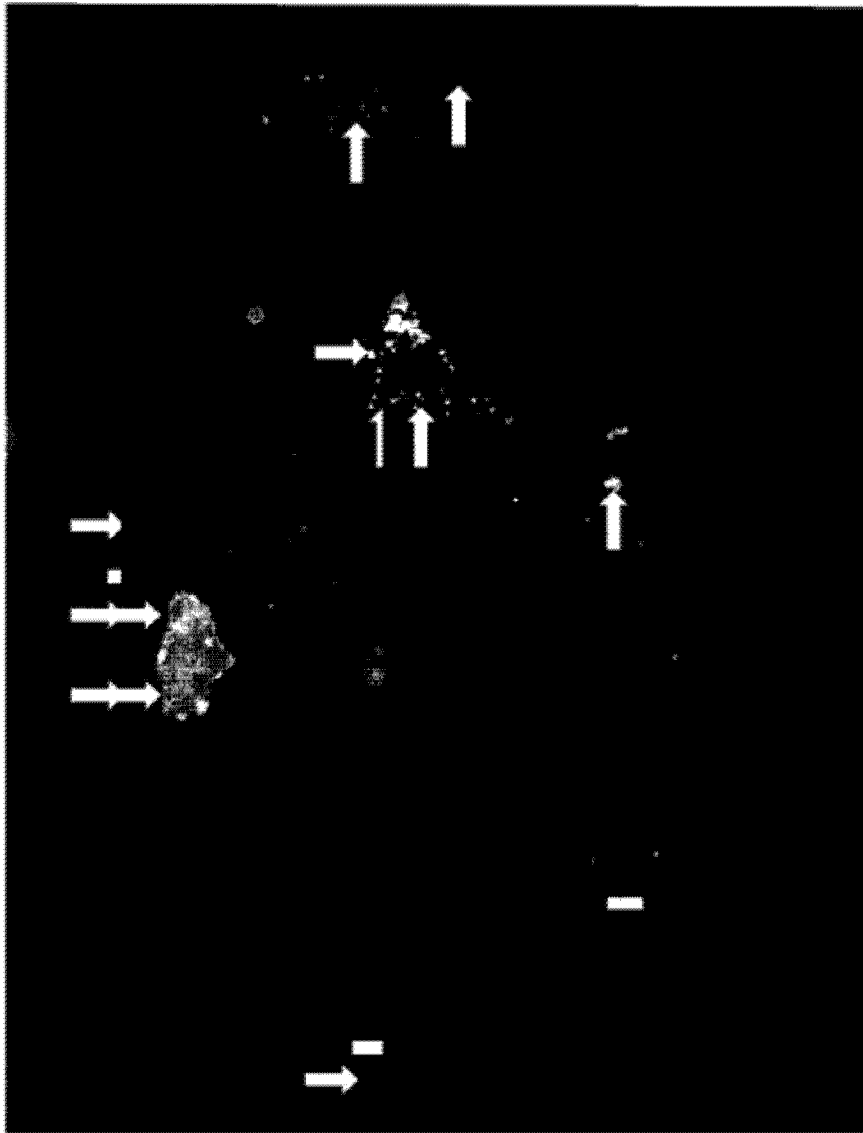


图 13

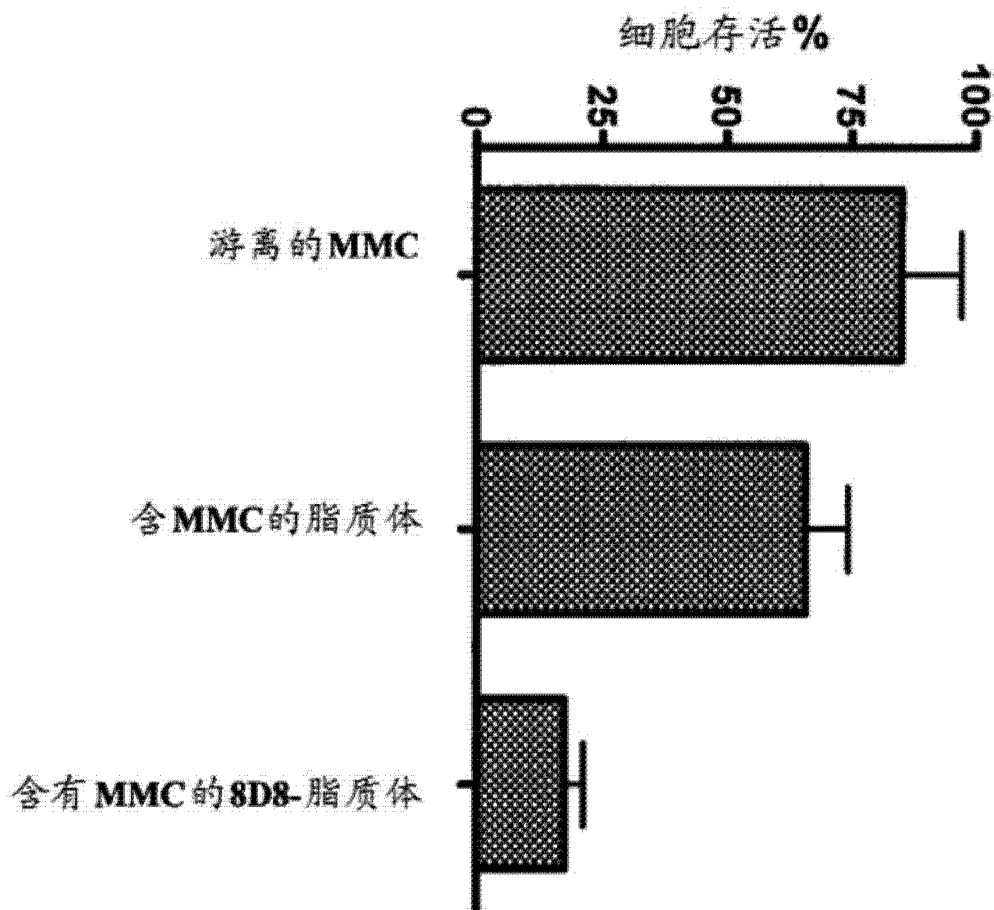


图 14

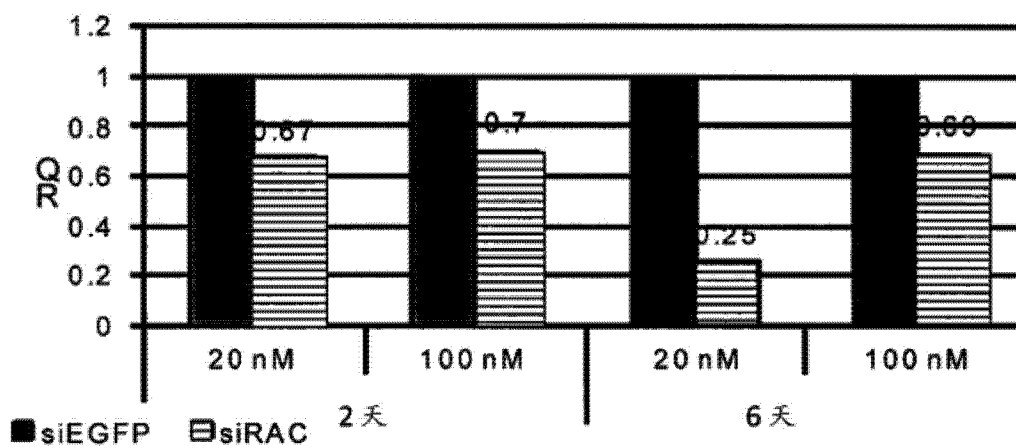


图 15A

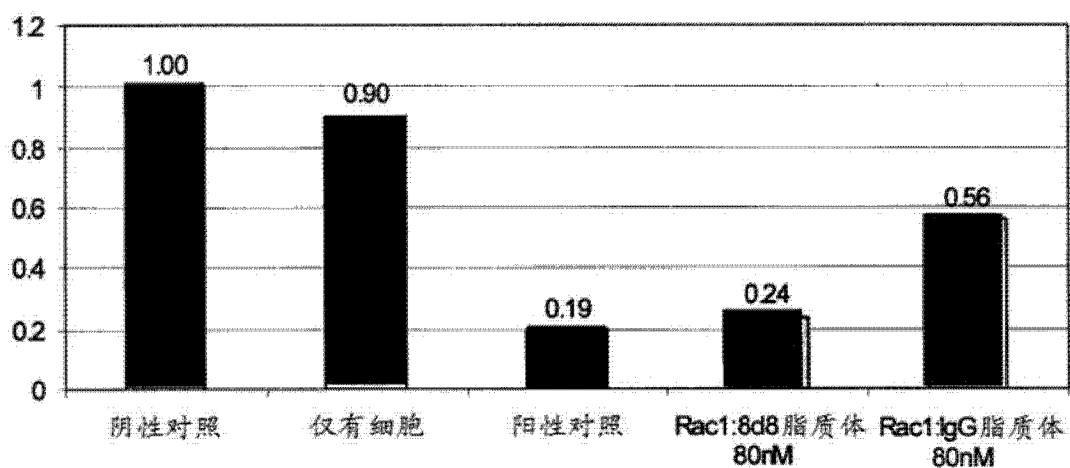


图 15B

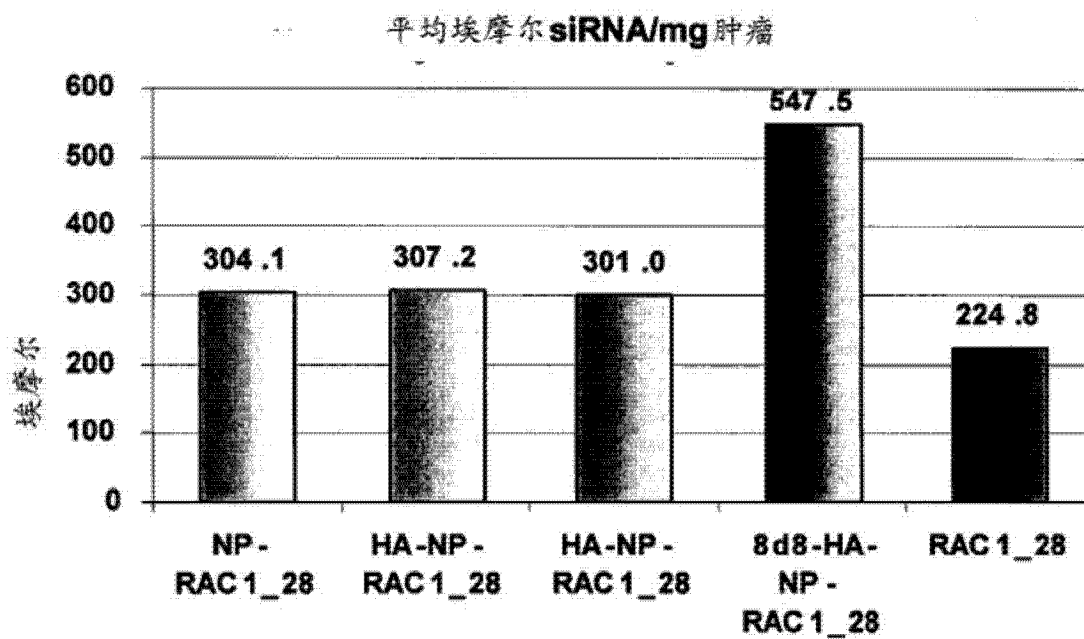


图 16A

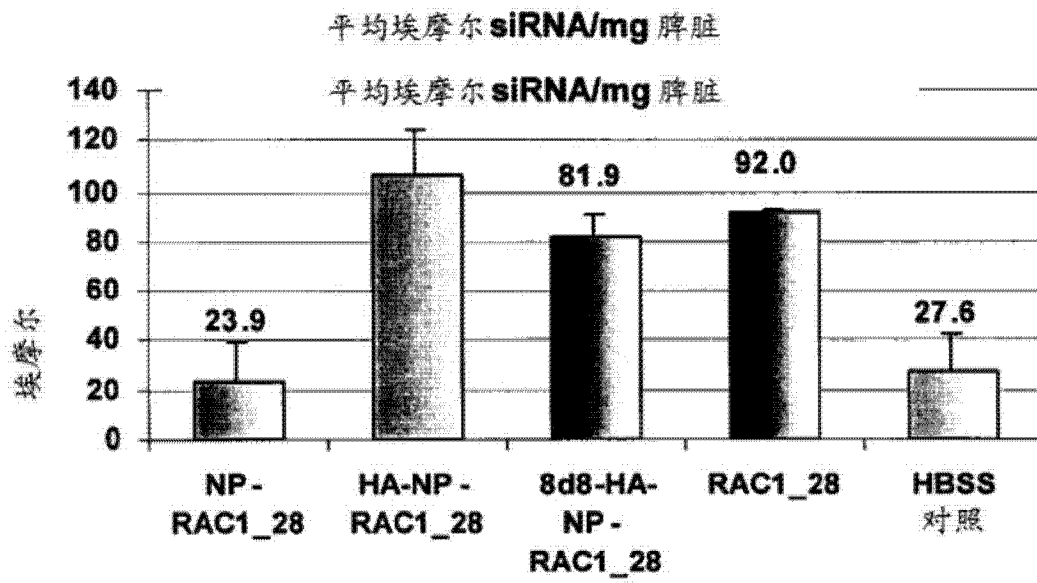


图 16B

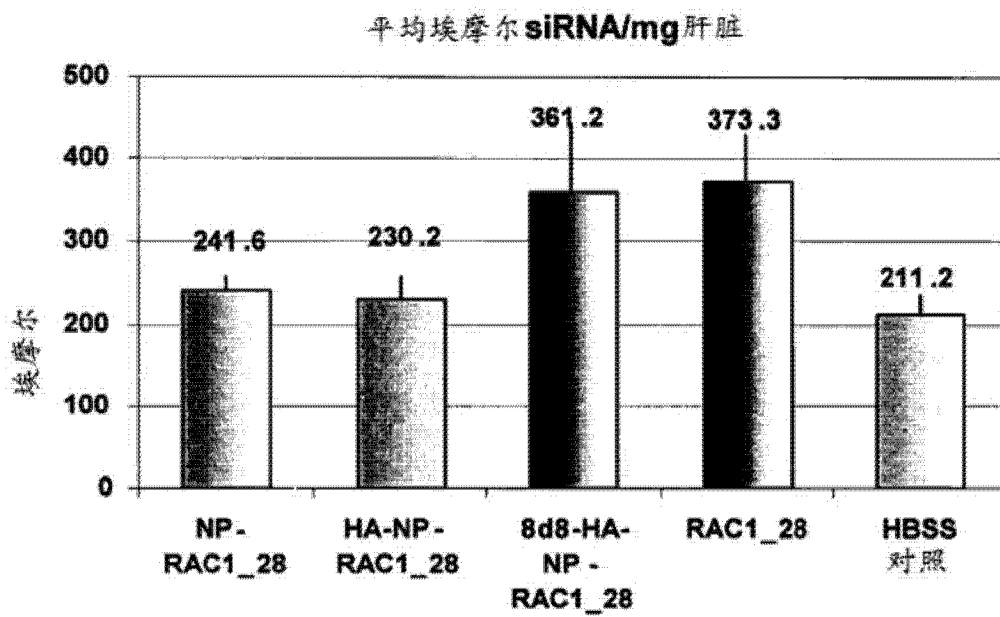


图 16C

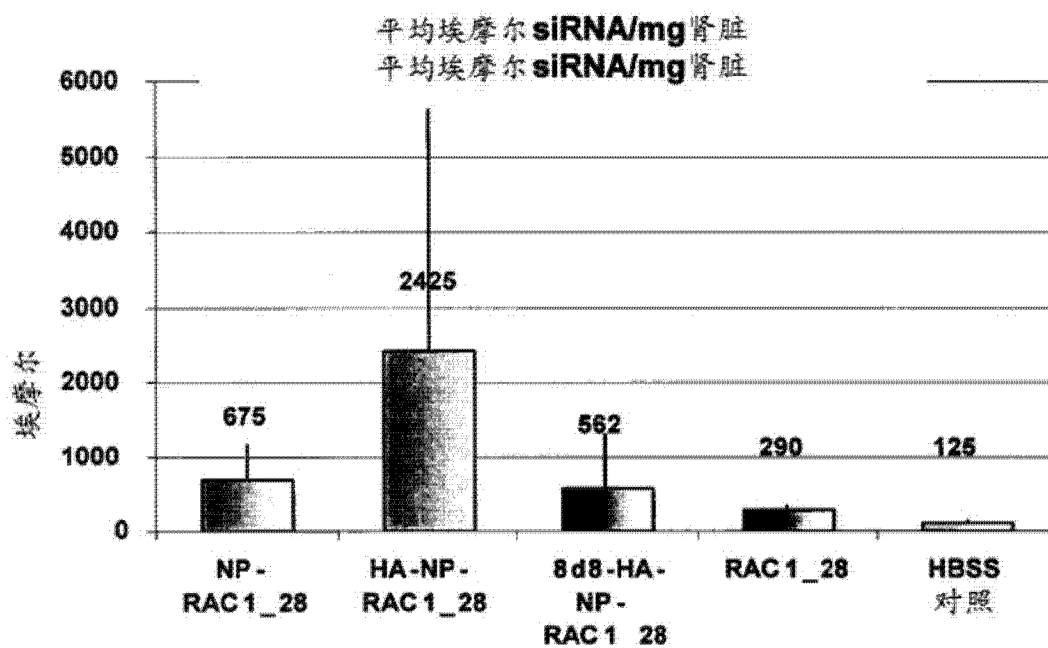


图 16D

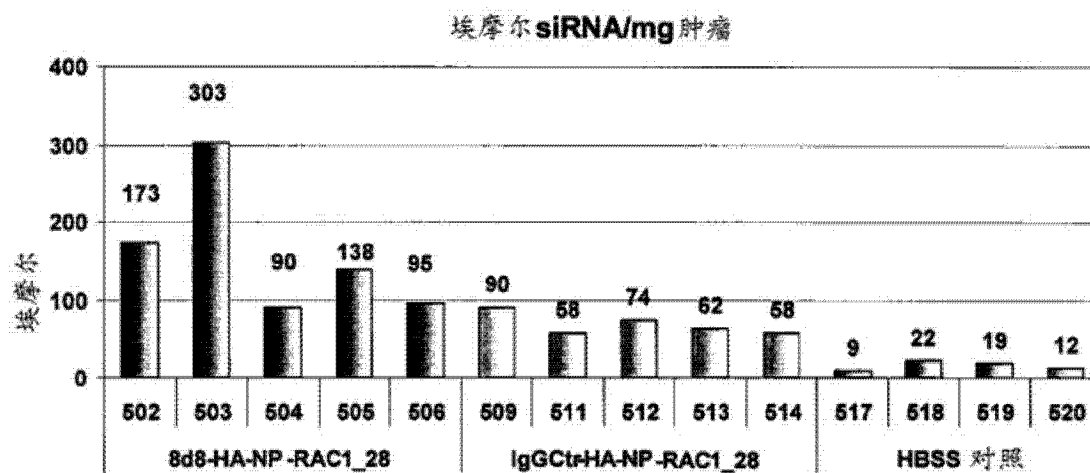


图 17A

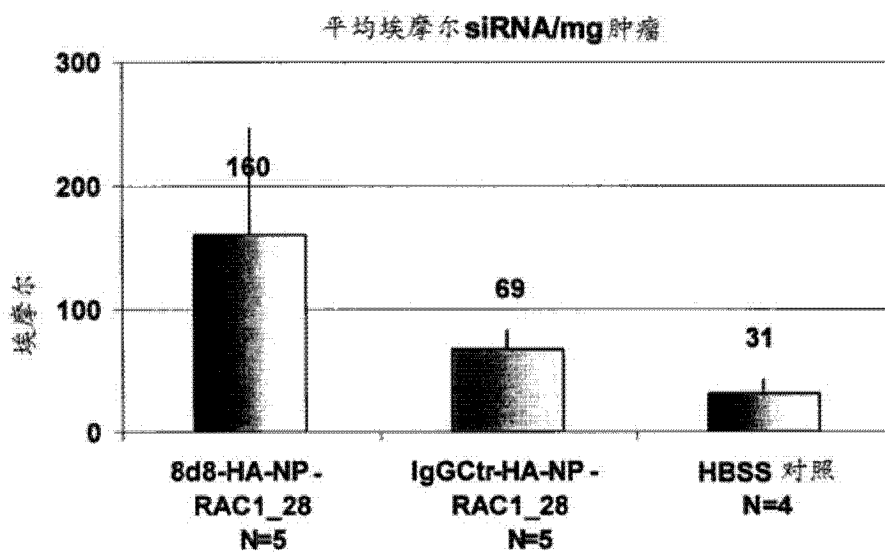


图 17B

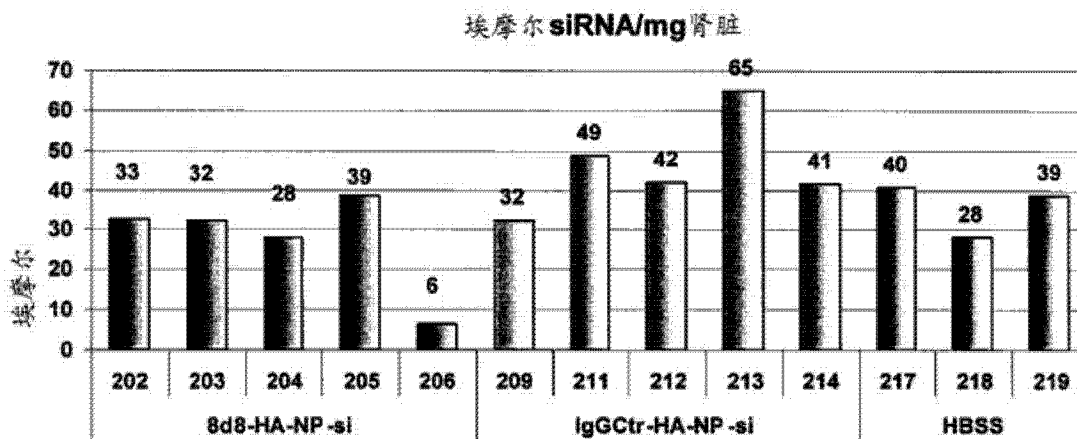


图 17C

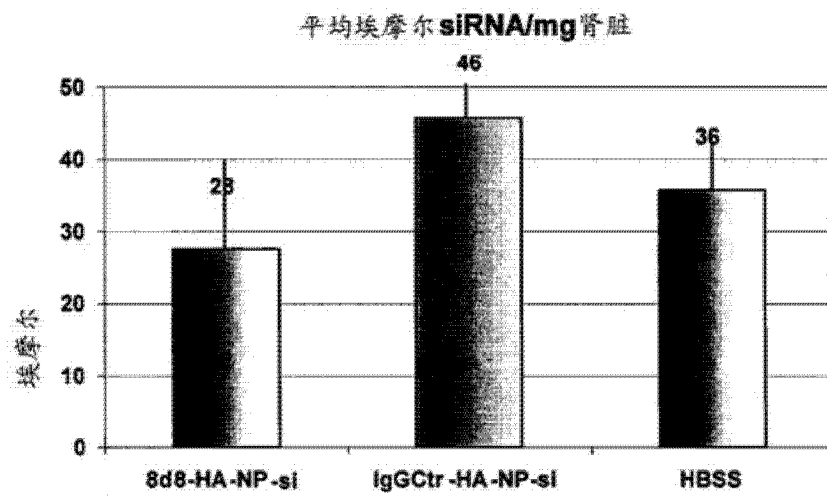


图 17D