



(10) 授权公告号 CN 108135958 B

(45) 授权公告日 2022.03.04

(21) 申请号 201680058266.9

(22) 申请日 2016.08.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108135958 A

(43) 申请公布日 2018.06.08

(30) 优先权数据
62/202,006 2015.08.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.04.04

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/045817 2016.08.05

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/024238 EN 2017.02.09

(73) 专利权人 希望之城
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·赫尔曼 H·于

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 左路 林晓红

(51) Int.Cl.
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/14 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2015031837 A, 2015.03.05
WO 2009012356 A, 2009.01.22
CN 103221549 A, 2013.07.24
CN 104755620 A, 2015.07.01
Maxim Antopolsky等. Peptide-
Oligonucleotide Phosphorothioate
Conjugates with.《Bioconjugate Chem》.1999,
第10卷(第4期), 598-606.

审查员 李浩然

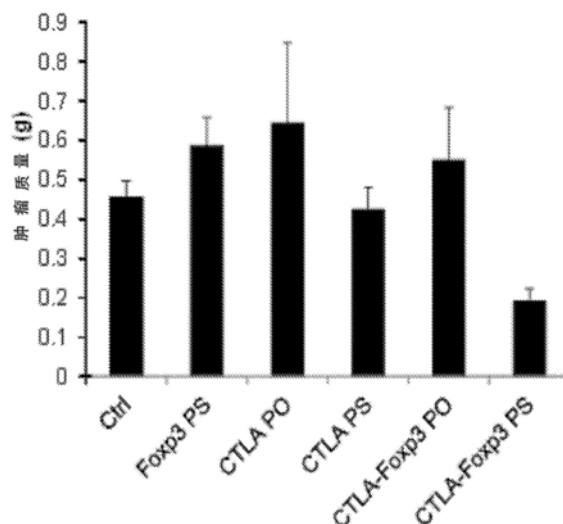
权利要求书3页 说明书37页 附图4页

(54) 发明名称

细胞穿透蛋白-抗体缀合物及其使用方法

(57) 摘要

本方面提供了细胞穿透缀合物。所述缀合物包括通过硫代磷酸核酸连接的非细胞穿透蛋白，其中硫代磷酸核酸增强非细胞穿透蛋白的细胞内输送。本发明还提供了包括本发明提供的缀合物的方法和试剂盒。



1. 一种细胞穿透缀合物, 包含连接第一非细胞穿透蛋白与第二非细胞穿透蛋白的硫代磷酸核酸, 其中所述硫代磷酸核酸增强所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白的细胞内输送,

其中所述硫代磷酸核酸长度为10-30个核酸残基, 且

其中所述第一非细胞穿透蛋白是第一抗体, 且所述第二非细胞穿透蛋白是第二抗体。

2. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸是单链核酸。

3. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸包含与第二硫代磷酸核酸杂交的第一硫代磷酸核酸, 所述第一硫代磷酸核酸与所述第一非细胞穿透蛋白连接, 且所述第二硫代磷酸核酸与所述第二非细胞穿透蛋白连接。

4. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸与所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白共价连接。

5. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸与所述第一非细胞穿透蛋白的赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸或组氨酸独立地连接。

6. 如权利要求5所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸与所述第一非细胞穿透蛋白的半胱氨酸连接。

7. 如权利要求6所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸与所述第二非细胞穿透蛋白的赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸或组氨酸独立地连接。

8. 如权利要求7所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸与所述第二非细胞穿透蛋白的半胱氨酸连接。

9. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸通过第一接头与所述第一非细胞穿透蛋白连接, 及通过第二接头与所述第二非细胞穿透蛋白连接。

10. 如权利要求9所述的细胞穿透缀合物, 其中所述第一接头和所述第二接头独立地是非共价接头。

11. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述硫代磷酸核酸长度为20个核酸残基。

12. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白独立地具有大于25kD的分子量。

13. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白独立地具有25kD-750kD的分子量。

14. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述第一抗体和所述第二抗体独立地是IgG抗体。

15. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述第一抗体和所述第二抗体独立地是IgA、IgM、IgD或者IgE抗体。

16. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述第一抗体和所述第二抗体独立地是scFv片段。

17. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述第一抗体和所述第二抗体独立地是人源化抗体。

18. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物, 其中所述第一抗体和所述第二抗体独立地是治疗性抗体。

19. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白或者所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。

20. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。

21. 如权利要求20所述的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合不同的细胞内靶位。

22. 如权利要求20所述的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位上的不同表位。

23. 如权利要求19所述的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是选自如下的疾病的靶位:自身免疫疾病、炎性疾病、代谢紊乱、发育紊乱、心血管疾病、肝脏疾病、肠道疾病、传染病、内分泌疾病、神经紊乱和癌症。

24. 如权利要求19所述的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是信号传导分子或者转录因子。

25. 如权利要求24所述的细胞穿透缀合物,其中所述信号传导分子是磷酸酶或者激酶。

26. 如权利要求24所述的细胞穿透缀合物,其中所述转录因子是活化的B细胞的核因子 κ 轻链增强子(NF κ B)蛋白。

27. 如权利要求26所述的细胞穿透缀合物,其中所述NF κ B蛋白是p65。

28. 如权利要求24所述的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白结合STAT3蛋白,及所述第二非细胞穿透蛋白结合NF κ B蛋白。

29. 如权利要求19所述的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是癌症靶位。

30. 如权利要求19所述的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位选自STAT3、NF κ B和Src。

31. 如权利要求30所述的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是STAT3。

32. 如权利要求31所述的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是p65。

33. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白进一步包含与所述第一非细胞穿透蛋白或所述第二非细胞穿透蛋白连接的标记、小分子或功能性核酸。

34. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物,与细胞内靶位结合。

35. 一种形成细胞穿透缀合物的方法,所述方法包括将与第一非细胞穿透蛋白连接的第一硫代磷酸核酸和与第二非细胞穿透蛋白连接的第二硫代磷酸核酸杂交,从而形成所述细胞穿透缀合物。

36. 如权利要求35所述的方法,进一步包括在所述杂交之前:

(i) 将所述第一非细胞穿透蛋白与所述第一硫代磷酸核酸接触,从而形成第一蛋白质硫代磷酸核酸复合物;

(ii) 将所述第二非细胞穿透蛋白与所述第二硫代磷酸核酸接触,从而形成第二蛋白质硫代磷酸核酸复合物;及

(iii) 将所述第一蛋白质硫代磷酸核酸复合物与所述第二蛋白质硫代磷酸核酸复合物接触。

37. 药物组合物,包含如权利要求1所述的细胞穿透缀合物及药物可接受的载体。

38. 试剂盒, 包含如权利要求1所述的细胞穿透缀合物或者如权利要求37所述的药物组合物及使用说明。

39. 如权利要求38所述的试剂盒, 其中所述硫代磷酸核酸包含第一硫代磷酸核酸和第二硫代磷酸核酸, 所述第一硫代磷酸核酸连接所述第一非细胞穿透蛋白, 且所述第二硫代磷酸核酸连接所述第二非细胞穿透蛋白,

其中所述第一硫代磷酸核酸能够与所述第二硫代磷酸核酸杂交, 且

其中所述第一非细胞穿透蛋白、所述第二非细胞穿透蛋白、所述第一硫代磷酸核酸及所述第二硫代磷酸核酸在单独的容器中。

40. 一种将非细胞穿透蛋白输送至细胞中的方法, 包括将所述细胞与权利要求1的所述细胞穿透缀合物接触。

41. 如权利要求40所述的方法, 其中所述第一非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白质, 从而形成第一非细胞穿透蛋白质-核蛋白质复合物。

42. 如权利要求41所述的方法, 其中所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白质, 从而形成第二非细胞穿透蛋白质-核蛋白质复合物。

43. 如权利要求42所述的方法, 其中所述第一非细胞穿透蛋白-核蛋白质复合物和所述第二非细胞穿透蛋白-核蛋白质复合物不能进入细胞核。

44. 如权利要求1所述的细胞穿透缀合物在制备用于治疗有需要的对象的疾病的药物中的用途, 其中所述疾病选自自身免疫疾病、发育紊乱、炎症疾病、代谢紊乱、心血管疾病、肝脏疾病、肠道疾病、传染病、内分泌疾病、神经紊乱和癌症。

45. 如权利要求44所述的用途, 其中所述疾病是癌症。

46. 如权利要求44所述的用途, 其中所述第一非细胞穿透蛋白或者所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。

47. 如权利要求44所述的用途, 其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。

48. 如权利要求47所述的用途, 其中所述第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合不同的细胞内靶位。

49. 如权利要求47所述的用途, 其中所述第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位上的不同表位。

50. 如权利要求46所述的用途, 其中所述细胞内靶位是STAT3、NFκB蛋白或者Src。

51. 如权利要求50所述的用途, 其中所述细胞内靶位是p65。

52. 如权利要求51所述的用途, 其中所述细胞内靶位是STAT3。

53. 如权利要求46所述的用途, 其中所述第一非细胞穿透蛋白结合STAT3且所述第二非细胞穿透蛋白结合NFκB蛋白。

细胞穿透蛋白-抗体缀合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2015年8月6日提交的美国临时申请No.62/202,006的优先权,其在此以其全部内容及出于所有目的并入作参考。

[0003] 关于在联邦资助的研究和开发下对发明的权利的声明

[0004] 本发明使用国立卫生研究院和国立癌症研究所提供的Grant Number R01CA122976的支持而完成。政府对本发明享有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 相对于其它类型的药物如小分子药物,抗体由于其易于产生、特异性和生物耐久性已被证明是一种有效的药物形式。目前的抗体治疗只能靶向细胞外分子。然而,疾病治疗和疾病诊断的许多重要靶位是细胞内的。例如,许多转录因子如STAT3是癌症治疗最重要但最具挑战性的靶位。本发明提供了本领域的这些及其它需求的解决方案。

[0007] 发明概述

[0008] 有需要使用肽和蛋白质(例如抗体)来靶向细胞内分子。然而,肽和蛋白质(例如抗体)以有效方式靶向细胞内分子的能力已被证实是困难的。如在全文所描述的及在下文的实施例中所证实的,本文提供了,尤其是,新的细胞穿透组合物(例如抗体、抗体缀合物)以及制备和使用其的方法。本文提供的组合物和方法允许有效靶向广泛的细胞内分子(例如,蛋白质(例如致癌蛋白、细胞内存在的病毒蛋白等)),及可用于例如全身施用。

[0009] 本文提供了,尤其是,细胞穿透缀合物。一方面,细胞穿透缀合物包括连接第一非细胞穿透蛋白与第二蛋白质的硫代磷酸核酸。所述硫代磷酸核酸增强了这两种蛋白质的细胞内输送。

[0010] 另一方面,提供了形成细胞穿透缀合物的方法。所述方法包括将与第一非细胞穿透蛋白连接的第一硫代磷酸核酸和与第二蛋白质连接的第二硫代磷酸核酸杂交,从而形成细胞穿透缀合物。

[0011] 另一方面,提供了包含本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)的细胞。

[0012] 另一方面,提供了包含本发明提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)及药物可接受的载体的药物组合物。

[0013] 另一方面,提供了包含本发明提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)或者本发明提供的药物组合物(包括其实施方案)及使用说明的试剂盒。

[0014] 另一方面,本文提供了将非细胞穿透蛋白输送至细胞中的方法,包括将所述细胞与本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)接触。

[0015] 另一方面,本文提供了治疗患者疾病的方法。所述方法包括给有需要的对象施用有效量的本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案),从而治疗所述对象的疾病。

[0016] 附图简述

[0017] 图1:示出通过连接的DNA寡聚物的杂交产生双特异性抗体的柱状图。使用抗STAT3抗体(右上幅;STAT3-SAv-Biot-Cy5-PS反义寡核苷酸)、NFkB(p65)抗体(左上幅;NFkB/p65-SAv-Biot-Cy5-PS有义寡核苷酸)或其组合(左下幅;STAT3/NFkB/p65-SAv-Biot-Cy5-PS双

链寡核苷酸,及右下幅;STAT3/NFkB/p65-SAv-Biot-Cy5-FAM双链寡核苷酸)。为了确保杂交产生的dsDNA连接抗体,选择ssDNA寡核苷酸掺入荧光团Quasar/Cy5用于修饰NFkB(p65)及掺入FAM以修饰STAT3。通过bi-IgG同时洗脱这两个荧光团而指示成功杂交并产生连接抗体的dsDNA(右下幅)。通过凝胶过滤纯化显示的所有抗体,在最大重叠幅度(overlaying maximal amplitude)收集蛋白质(280nm)、DNA(260nm)和荧光团(647nm和495nm)的流分用于进一步表征(图2)。检测通道获得 λ [nm]表示的吸光度:260nm表示DNA吸收,280nm表示蛋白质吸收,647nm和495nm表示掺入DNA寡核苷酸的荧光团的吸收。

[0018] 图2:通过细胞穿透性双特异性抗体同时识别细胞内抗原STAT3和NFkB(p65)的SDS聚丙烯酰胺凝胶的摄影图像。通过用10mg/ml的指定的纯化抗体温育2小时评估人淋巴瘤Ly3细胞。将蛋白质G-琼脂糖珠加入从细胞碎片澄清的全细胞裂解物中,并且进行Western印迹分析以检测NFkB(p65)和STAT3蛋白质。

[0019] 图3:示出通过修饰的细胞内靶向抗体进行细胞穿透的流式细胞研究的柱状图。用10 μ g/ml指定的(indicated)修饰的抗体处理人B细胞淋巴瘤Ly32小时(上幅);以及用10 μ g/ml荧光标记的修饰的抗体温育的人B细胞淋巴瘤细胞的共聚焦显微镜研究。比例尺10 μ m(下幅)。通过寡核苷酸有义/反义杂交产生的修饰的单特异性抗体和双特异性抗体的两项研究均证实细胞穿透。

[0020] 图4A和4B:B16黑素瘤的双特异性抗体治疗。图4A:皮下注射10万个B16肿瘤细胞,及在肿瘤接种后第8天至第26天每隔一天施用指定的抗体(1 μ g/小鼠)。图4B:所有小鼠在第28天进行安乐死,称重肿瘤质量;肿瘤质量以克表示。

[0021] 发明详述

[0022] 虽然本文示出和描述了本发明的多种实施方案和方面,但对本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案和方面仅作为示例提供。本领域技术人员可以对本发明进行各种改变、变化和替代而不偏离本发明。应该理解的是,在实践本发明时可以采用本文所述本发明实施方案的各种替代方案。

[0023] 这里使用的章节标题仅用于组织文章结构之目的,不应被解释为限制所描述的主题。本申请中引用的所有文件或部分文件,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册和论文和专著在此处于任何目的均并入本文作参考。

[0024] 本文使用的缩写具有其在化学和生物学领域的常规含义。本文所述化学结构和化学式是根据化学领域已知的化学价的标准规则构建的。

[0025] 除非另外定义,本文使用的技术和科学术语具有与本领域技术人员通常理解的相同的含义。见例如Singleton et al.,*DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* 2nd ed.,J.Wiley&Sons(New York,NY 1994);Sambrook et al.,*MOLECULAR CLONING,A LABORATORY MANUAL*,Cold Springs Harbor Press(Cold Springs Harbor,NY 1989)。与本文所述相似或等同的任何方法、装置和材料均可用于本发明的实践中。提供以下定义以便于理解本文中经常使用的某些术语,这不意味着限制本公开的范围。

[0026] 本文使用的“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”或语法等价物是指共价连接在一起的至少两个核苷酸。术语“核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物,或其互补物。术语“多核苷酸”是指核苷酸的线性序列。术语“核苷酸”通常指多核苷酸的单个单位,即单体。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或其修饰形式。本文

考虑的多核苷酸的实例包括单链和双链DNA、单链和双链RNA (包括siRNA) 以及具有单链和双链DNA和RNA混合物的杂交分子。该术语还包括含有已知的核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸,其是合成的、天然存在的和非天然存在的,其具有与参考核酸相似的结合特性,并且其以相似于参考核苷酸的方式代谢。这种类似物的实例包括但不限于硫代磷酸、氨基磷酸、甲基膦酸、手性甲基膦酸和2-0-甲基核糖核苷酸。

[0027] 术语“硫代磷酸核酸”是指其中一个或多个核苷酸间的连接是通过硫代磷酸部分(硫代磷酸)的核酸。硫代磷酸部分可以是单硫代磷酸($-P(O)_3(S)^{3-}$)或二硫代磷酸($P(O)_2(S)_2^{3-}$)。在实施方案中,硫代磷酸部分是单硫代磷酸($P(O)_3(S)^{3-}$)。在实施方案中,硫代磷酸核酸是单硫代磷酸核酸。在实施方案中,硫代磷酸核酸的一个或多个核苷是通过硫代磷酸部分(例如单硫代磷酸)连接,剩余的核苷通过磷酸二酯部分($-P(O)_4^{3-}$)连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸的一个或多个核苷通过硫代磷酸部分(例如单硫代磷酸)连接,剩余核苷通过甲基膦酸连接而连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸的所有核苷是通过硫代磷酸部分(例如单硫代磷酸)连接。

[0028] 硫代磷酸寡核苷酸(硫代磷酸核酸)的长度通常为大约5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、40、50或更多个核苷酸,直至大约100个核苷酸。硫代磷酸核酸的长度也可以更长,例如200、300、500、1000、2000、3000、5000、7000、10,000个核苷酸等。如上所述,在某些实施方案中,本文的硫代磷酸核酸含有一个或多个磷酸二酯键。在其它实施方案中,硫代磷酸核酸包括替代的骨架(例如本领域已知的磷酸二酯的模拟物或类似物,如硼烷磷酸、甲基膦酸、酰胺磷酸或0-methylphosphoroamidite连接)(参见Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press)。硫代磷酸核酸还可以包括本领域已知的一种或多种核酸类似物单体,例如肽核酸单体或聚合物、锁核酸单体或聚合物、吗啉代单体或聚合物、乙二醇核酸单体或聚合物或者苏糖核酸单体或聚合物。其它类似核酸包括具有阳性骨架、非离子骨架和非核糖骨架的那些核酸;包括在如下美国专利文献中描述的那些核酸:美国专利Nos. 5,235,033和5,034,506以及Chapters 6 and 7, *ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Sanghui&Cook, eds.。含有一个或多个碳环糖的核酸也包括在核酸的一个定义内。可以出于各种原因对核糖-磷酸骨架进行修饰,例如增加这些分子在生理环境中的稳定性和半衰期或作为生物芯片上的探针。可以制备天然存在的核酸和类似物的混合物;或者可以制备不同核酸类似物的混合物以及天然存在的核酸和类似物的混合物。硫代磷酸核酸和硫代磷酸聚合物骨架可以是直链或分支的。例如,分支的核酸再分支形成更高级的结构,例如树状聚合物等。

[0029] 在实施方案中,硫代磷酸核酸包括硫代磷酸聚合物估计。如本文所用,“硫代磷酸聚合物骨架”是具有至少两个硫代磷酸连接(例如单硫代磷酸)的化学聚合物(例如将糖亚基、环形亚基或烷基亚基连接在一起)。硫代磷酸聚合物骨架可以是硫代磷酸糖聚合物,其是其中成链的戊糖的一个或多个(或全部)缺少通常存在于核酸中的碱基(核碱基)的硫代磷酸核酸。硫代磷酸聚合物骨架可以包括两或更多个硫代磷酸连接。硫代磷酸聚合物骨架可包含5、6、7、8、9、10、12、15、25、30、40、50或更多个连接,并且可以含有至多约100个硫代磷酸连接。硫代磷酸聚合物骨架还可以含有大量的连接,例如200、300、500、1000、2000、3000、5000、7000、10,000个等。

[0030] 硫代磷酸核酸和硫代磷酸聚合物骨架可以部分或完全被硫代磷酸化。例如,硫代磷酸核酸的50%或更多的核苷酸间连接可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的硫代磷酸核酸的核苷酸间连接是硫代磷酸连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸的核苷酸间键的50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%是硫代磷酸键。在实施方案中,硫代磷酸核酸的核苷酸间连接的75%、80%、85%、90%、95%或99%是硫代磷酸连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸的90%、95%或99%的核苷酸间连接是硫代磷酸连接。在实施方案中,剩余的核苷酸间连接是磷酸二酯连接。在实施方案中,其余的核苷酸间键是甲基磷酸酯键。在实施方案中,硫代磷酸核酸的100%核苷酸间键是硫代磷酸键。类似地,硫代磷酸聚合物骨架中5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的糖间连接可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,硫代磷酸聚合物骨架中50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%的糖间连接可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,硫代磷酸聚合物骨架中75%、80%、85%、90%、95%或99%的糖间连接可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,硫代磷酸聚合物骨架中的90%、95%或99%的糖间连接可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,其余的核苷酸间键是磷酸二酯连接。在实施方案中,其余的核苷酸间键是甲基磷酸酯连接。在实施方案中,硫代磷酸聚合物骨架的100%糖间连接是硫代磷酸连接。

[0031] 核酸可包括非特异性序列。如本文所用,术语“非特异性序列”是指含有一系列非设计为与任何其它核酸序列互补或仅部分互补的残基的核酸序列。举例来说,非特异性核酸序列是当与细胞或生物体接触时不起抑制性核酸作用的核酸残基序列。“抑制性核酸”是能够结合靶核酸(例如可翻译成蛋白质的mRNA)并降低靶核酸的转录(例如从DNA转录为mRNA)或者降低靶核酸(例如mRNA)的翻译或者改变转录物剪接(例如单链吗啉代寡核苷酸)的核酸(例如DNA、RNA、核苷酸类似物的聚合物)。

[0032] “标记的核酸或寡核苷酸”是通过接头或化学键与标记共价结合或通过离子、范德华力、静电或氢键与标记非共价结合的核酸或寡核苷酸,由此可以通过检测与核酸结合的可检测标记的存在检测所述核酸的存在。或者,使用高亲和力相互作用的方法可以获得相同的结果,其中一对结合配对体之一结合另一个,例如生物素、链霉亲和素。在实施方案中,硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架包含如本文所述及本领域通常已知的可检测标记。

[0033] 单词“互补”或“互补性”是指多核苷酸中的核酸与第二多核苷酸中的另一核酸形成碱基对的能力。例如,序列A-G-T与序列T-C-A互补。互补性可以是部分互补,其中根据碱基配对只有一些核酸匹配或者其中根据碱基配对所有核酸均匹配的完全互补。

[0034] 当核酸置于与另一核酸序列的功能相关联中时,其是“可操作地连接的”。例如,如果前序列或分泌性前导序列的DNA表达为参与多肽分泌的前蛋白,则其与多肽的DNA是可操纵地连接的;如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则其与编码序列是可操作地连接的;或者如果核糖体结合位置被定位以便于翻译,则该核酸体结合位点与编码序列是可操作地连接。通常地,“可操作地连接”是指被连接的DNA序列彼此靠近,及在分泌性前导序列的情况下是连续的并处于阅读相。但是,增强子不必是连续的。通过在方便的限制性位点连接完成连接。如果不存在这样的位点,则根据常规实践使用合成的寡核苷酸适体或接头。

[0035] 术语“基因”是指参与产生蛋白质的DNA区段;其包括在编码区之前和之后的区域

(前导区和尾部区)以及在各编码区段(外显子)之间的中间序列(内含子)。前导区、尾部区以及内含子包括在基因转录和翻译期间必需的调节元件。此外,“蛋白质基因产物”是从特定基因表达的蛋白质。

[0036] 如本文所用的关于基因的“表达”或“表达”一词是指该基因的转录和/或翻译产物。细胞中DNA分子的表达水平可以基于细胞内存在的相应mRNA的量或者由细胞产生的DNA编码的蛋白质的量来确定。非编码核酸分子(例如siRNA)的表达水平可以通过本领域熟知的标准PCR或Northern印迹方法检测。参见Sambrook et al.,1989Molecular Cloning:A Laboratory Manual,18.1-18.88。

[0037] 当对于例如细胞、或核酸、蛋白质或载体使用时,术语“重组”是指所述细胞、核酸、蛋白质或载体已通过导入异源核酸或蛋白质或者改变天然核酸或蛋白质或者细胞衍生自如此修饰的细胞等方式而被修饰。因此,例如重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞内未发现的基因,或者表达异常表达、低表达或完全不表达的天然基因。典型地由于重组方法的结果,转基因细胞和植物表达异源基因或编码序列。

[0038] 当对于核酸部分使用时,术语“异源”表示所述核酸包含两或更多个子序列,这些子序列在自然界中未发现彼此处于相同的关联。例如,所述核酸通常是重组产生的,其具有来自不相关基因的两个或更多个序列,排列产生新的功能核酸,例如启动子来自一个来源,编码区来自另一个来源。类似地,异源蛋白质表示该蛋白质包含两或更多个子序列,这些子序列在自然界中彼此没有发现相同的关联(例如融合)。

[0039] 术语“外源”是指某分子或物质(例如化合物、核酸或蛋白质)源自指定细胞或生物体之外。例如,本文所述“外源启动子”是不源自其表达的细胞或生物的启动子。相反,术语“内源”或“内源启动子”是指指定细胞或生物体天然的或源自其中的分子或物质。

[0040] 当应用于核酸或蛋白质时,术语“分离的”表示该核酸或蛋白质基本上没有在天然状态下与其相关的其它细胞组分。其可以是例如处于均质状态,及可以是无水的或水溶液。纯度和均质性通常使用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或者高效液相层析技术确定。作为制备物中存在的主要物质的蛋白质基本上被纯化。

[0041] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物,其中在实施方案中,聚合物可以与不由氨基酸组成的部分缀合。该术语适用于其中一或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。“融合蛋白”是指编码重组表达为单一部分的一个或多个单独的蛋白质序列的嵌合蛋白。

[0042] 术语“肽基”和“肽组分”是指一价肽。

[0043] 术语“氨基酸”是指天然存在的及合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸相似方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及随后修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢结合的 α 碳、羧基、氨基和R基团,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这种类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或者修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构的化学化合物,但其功能与天然存在的氨基酸类似。术语“非天然存在的氨基酸”和“非天然氨基酸”是

指天然不存在的氨基酸类似物、合成的氨基酸和氨基酸模拟物。

[0044] 氨基酸在本文中可以通过其熟知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号表述。核苷酸同样可以通过它们通常接受的单字母代码表述。

[0045] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列，“保守修饰的变体”是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸。由于遗传密码的简并性，许多核酸序列将编码任何指定蛋白质。例如，密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此，在其中丙氨酸由密码子指定的每个位置，密码子可以改变为所述的任何相应密码子而不改变编码的多肽。这种核酸变异是“沉默变异”，是保守修饰变异的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列还描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到，核酸中的每个密码子(除了通常为甲硫氨酸的唯一密码子的AUG，和通常为色氨酸的唯一密码子的TGG)可被修饰以产生功能相同的分子。因此，每个描述的序列包括编码多肽的核酸的每种沉默变异。

[0046] 关于氨基酸序列，技术人员将认识到在核酸、肽多肽或者蛋白质序列中的改变、增加或缺失编码序列中单个氨基酸或少量氨基酸的各种取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”，其中所述改变导致氨基酸由化学上相似的氨基酸取代。提供功能相似的氨基酸的保守取代表为本领域熟知。这些保守修饰的变体另外并且不排除本发明的多态性变体、种间同系物和等位基因。

[0047] 如下8组均包含彼此保守取代的氨基酸：

[0048] 1) 丙氨酸(A)，甘氨酸(G)；

[0049] 2) 天冬氨酸(D)，谷氨酸(E)；

[0050] 3) 天冬酰胺(N)，谷氨酰胺(Q)；

[0051] 4) 精氨酸(R)，赖氨酸(K)；

[0052] 5) 异亮氨酸(I)，亮氨酸(L)，甲硫氨酸(M)，缬氨酸(V)；

[0053] 6) 苯丙氨酸(F)，酪氨酸(Y)，色氨酸(W)；

[0054] 7) 丝氨酸(S)，苏氨酸(T)；及

[0055] 8) 半胱氨酸(C)，甲硫氨酸(M)

[0056] (见例如Creighton, Proteins (1984))。

[0057] 在两个或更多个核酸或多肽序列中，术语“相同”或“相同性”是指两个或更多个序列或子序列是相同的或者指定百分比的氨基酸残基或核苷酸是相同的(即当在对比窗或指定区域进行最大相应程度比较和比对时，在指定区域大约60%相同性，优选65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高相同性)，使用如下文描述默认参数的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法或者通过人工排列和目测进行测量(见例如NCBI网站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>等)。然后这样的序列被称作“基本相同的”。这个定义还涉及或可以应用于测试序列的补充。这个定义还包括具有缺失和/或添加的序列以及具有取代的序列。如下文所述，优选的算法可以解决缺口等问题。优选地，相同性存在于长度为至少约25个氨基酸或核苷酸的区域，或更优选地在长度为50-100个氨基酸或核苷酸的区域。

[0058] 对于本文描述的特定蛋白质(例如NFkB, STAT3)，所述蛋白质包括任何蛋白质的天然存在形式，或者保持蛋白质转录因子活性(例如与天然蛋白质相比至少50%、80%、90%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%以内的活性)的变体或同系物。在一些实施方案中,变体或同系物与天然存在的形式相比在整个序列或部分序列(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)上具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列相同性。在其它实施方案中,蛋白质是通过其NCBI序列参考鉴定的蛋白质。在其它实施方案中,蛋白质是通过其NCBI序列参考鉴定的蛋白质或者其功能片段或同系物。

[0059] 因此,本文所指的“STAT3蛋白质”包括保持STAT3蛋白质活性(例如与STAT3相比至少具有50%,80%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%以内的活性)的任何重组或天然形式的保持STAT3蛋白质活性的信号转导体和转录激活因子3(STAT3)蛋白质或其变体或同源物。在一些方面,与天然存在的STAT3多肽相比,所述变体或同源物在整个序列或部分序列(例如,50、100、150或200个氨基酸)中具有至少90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%的氨基酸序列相同性。在实施方案中,STAT3蛋白与由UniProt参考号P40763鉴定的蛋白或与其具有高相同性的变体或同系物基本上相同。

[0060] 如本文所提及的“NFkB蛋白质”包括保留NFkB蛋白质活性的任何重组或天然形式的活化的B细胞的核因子κ-轻链-增强子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)(NFkB)或其变体或同系物,其保持NFkB蛋白质活性(例如与NFkB相比至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%以内的活性)。在一些方面,与天然存在的NFkB多肽相比,所述变体或同源物在整个序列或部分序列(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)中具有至少90%,95%,96%,97%,98%,99%或100%氨基酸序列相同性。在实施方案中,NFkB蛋白质与由UniProt参考号P19838鉴定的蛋白质或者与其具有高相同性的变体或同系物基本相同。在实施方案中,NFkB蛋白与由UniProt参考号Q04206鉴定的蛋白质或与其具有高相同性的变体或同系物基本相同。在实施方案中,NFkB蛋白与由UniProt参考号Q00653鉴定的蛋白质或与其具有高相同性的变体或同系物基本相同。在实施方案中,NFkB蛋白与由UniProt参考号Q01201鉴定的蛋白质或与其具有高相同性的变体或同系物基本相同。在实施方案中,NFkB蛋白与由UniProt参考号Q048648鉴定的蛋白质或与其具有高相同性的变体或同系物基本相同。

[0061] 本文提到的“p65蛋白质”包括任何重组或天然形式的转录因子p65,也称为核因子NF-κ-Bp65亚基(p65)蛋白,或者其保持p65蛋白质活性(例如与p65相比至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%以内的活性)的变体或同系物。在一些方面,与天然存在的p65多肽相比,所述变体或同系物在整个序列或部分序列(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)中具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列相同性。在实施方案中,p65蛋白与由UniProt参考号Q04206鉴定的蛋白质或与其具有高相同性的变体或同系物基本相同。

[0062] 如本文提供的术语“CTLA-4”或者“CTLA-4蛋白”包括任何重组或天然存在形式的细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),或者其保留CTLA-4蛋白质活性的变体或者同系物(例如与CTLA-4相比至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%以内的活性)。在一些方面中,与天然存在的CTLA-4多肽相比,所述变体或同系物在全部序列或者部分序列(例如50、100、150或者200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列相同性。在实施方案中,CTLA-4是由NCBI序列参考GI:83700231鉴定的蛋白质、其同系物或功能片段。

[0063] 如本文所提供的术语“FOXP3”包括任何重组或天然形式的叉头框P3 (FOXP3) 转录因子或者其保持FOXP3蛋白活性 (例如与FOXP3相比至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%以内的活性) 的变体或同系物。在一些方面,所述变体或同源物在整个序列或部分序列 (例如50、100、150或200个连续氨基酸部分) 中具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列相同性。在实施方案中,FOXP3是由UniProt参考号Q9BZS1鉴定的蛋白质、其同源物或功能片段。在实施方案中,FOXP3是由UniProt参考号Q99JB6鉴定的蛋白质、其同源物或功能片段。

[0064] “抗体”是指包含特异性结合和识别抗原的来自免疫球蛋白基因或其片段的框架区的多肽。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因以及无数的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 κ 或者 λ 轻链。重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其分别定义免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。通常,抗体的抗原结合区在结合的特异性和亲和性方面是最关键的。在一些实施方案中,抗体或抗体片段可衍生自不同生物体,包括人、小鼠、大鼠、仓鼠、骆驼等。本发明的抗体可包括在一个或多个氨基酸位置修饰或突变 (例如糖基化、表达、抗原识别、效应子功能、抗原结合、特异性等) 以改善或调节抗体的期望功能的抗体。

[0065] 示例的免疫球蛋白 (抗体) 结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一个“轻链” (约25kD) 和一个“重链” (约50-70kD)。每个链的N末端限定了主要负责抗原识别的大约100至110个或更多个氨基酸的可变区。术语可变轻链 (VL) 和可变重链 (VH) 分别指这些轻链和重链。Fc (即片段可结晶区) 是免疫球蛋白的“基体”或“尾部”,并且通常由两个重链组成,根据抗体的类别组成两个或三个恒定结构域。通过与特定蛋白质结合,Fc区确保每个抗体应答指定抗原产生适当的免疫应答。Fc区还结合各种细胞受体如Fc受体及其它免疫分子如补体蛋白。

[0066] 抗体例如以完整的免疫球蛋白形式存在,或作为通过用各种肽酶消化产生的许多充分鉴定的片段存在。因此,例如胃蛋白酶在铰链区中二硫键下消化抗体以产生F(ab)'2,这是Fab的二聚体,Fab本身是通过二硫键与VH-CH1连接的轻链。F(ab)'2在适度条件下可以被还原以破坏铰链区中的二硫键,从而将F(ab)'2二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体实质上是具有部分铰链区的抗原结合部分 (参见Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993))。尽管根据完整抗体的消化来定义各种抗体片段,但本领域技术人员意识到这些片段可以通过化学方法或通过使用重组DNA方法重新合成。因此,如本文所用,术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段,或者使用重组DNA方法重新合成的那些抗体 (例如单链Fv),或者使用噬菌体展示文库鉴定的那些抗体 (参见例如McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990))。

[0067] 单链可变片段 (scFv) 通常是免疫球蛋白的重链 (VH) 和轻链 (VL) 的可变区的融合蛋白,其用大约10-25个氨基酸的短接头肽连接。接头通常可富含甘氨酸以获得灵活性,以及丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性。接头可以连接VH的N末端与VL的C末端,反之亦然。

[0068] 为了制备合适的本发明的抗体和根据本发明加以使用,例如重组抗体、单克隆抗体或多克隆抗体,可以使用本领域已知的许多技术 (参见例如Kohler&Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., pp.77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow&Lane, Antibodies, A

Laboratory Manual (1988); and Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed. 1986)). 编码感兴趣抗体的重链和轻链的基因可以从细胞中克隆, 例如可以从杂交瘤中克隆编码单克隆抗体的基因并用于产生重组单克隆抗体。编码单克隆抗体的重链和轻链的基因文库也可以由杂交瘤或浆细胞制备。重链和轻链基因产物的随机组合产生具有不同抗原特异性的大量抗体集合 (参见例如 Kuby, Immunology (3rd ed. 1997))。用于生产单链抗体或重组抗体的技术 (美国专利 No. 4,946,778, 美国专利 No. 4,816,567) 可适用于产生针对本发明多肽的抗体。转基因小鼠或其它生物如其它哺乳动物也可用于表达人源化抗体或人抗体 (见例如美国专利 Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); 及 Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995))。或者, 噬菌体展示技术可用于鉴定特异性结合所选抗原的抗体和杂聚 (heteromeric) Fab 片段 (参见例如 McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992))。抗体也可以制成双特异性的, 即能够识别两种不同的抗原 (见例如 WO 93/08829, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991); 及 Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986))。抗体也可以是异源缀合物, 例如两个共价结合的抗体, 或者免疫毒素 (见例如美国专利 No. 4,676,980, WO 91/00360; WO 92/200373; 及 EP 03089)。

[0069] 人源化或者灵长类源化非人抗体的方法为本领域熟知 (见美国专利 Nos. 4,816,567; 5,530,101; 5,859,205; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,777,085; 6,180,370; 6,210,671 和 6,329,511; WO 87/02671; EP Patent Application 0173494; Jones et al. (1986) Nature 321:522; 及 Verhoyen et al. (1988) Science 239:1534)。人源化抗体在例如 Winter and Milstein (1991) Nature 349:293 中进一步描述。通常, 人源化抗体具有从非人源导入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为输入残基, 其通常取自输入可变结构域。人源化可以基本上按照 Winter 和同事的方法进行 (见例如 Morrison et al., PNAS USA, 81:6851-6855 (1984); Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988) 及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31 (3):169-217 (1994)), 通过啮齿类动物 CDR 或者 CDR 序列取代人抗体的相应序列。因此, 这种人源化抗体是嵌合抗体 (美国专利 No. 4,816,567), 其中基本上少于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的相应序列取代。实际上, 人源化抗体通常是人抗体, 其中一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基由来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代。例如, 包含编码人源化免疫球蛋白构架区的第一序列和编码所需免疫球蛋白互补决定区的第二序列组的多核苷酸可以合成产生或通过组合适当的 cDNA 和基因组 DNA 区段产生。人恒定区 DNA 序列可根据熟知的程序从各种人细胞中分离出来。

[0070] “嵌合抗体”是这样的抗体分子, 其中 (a) 恒定区或其一部分被改变、替换或置换, 由此抗原结合位点 (可变区) 连接至不同或另外类别的效应子功能和/或物种的恒定区, 或者完全不同的分子, 其赋予嵌合抗体新的性质, 如酶、毒素、激素、生长因子、药物等; 或者

(b) 可变区或其一部分由具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或者置换。本发明优选的抗体和根据本发明使用的抗体包括人源化的和/或嵌合的单克隆抗体。

[0071] 将治疗剂与抗体缀合的技术为本领域熟知(见例如Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp.243-56 (Alan R. Liss, Inc.1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc.1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp.475-506 (1985); and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982))。如本文所用, 术语“抗体-药物缀合物”或“ADC”是指缀合或以其它方式共价结合于抗体的治疗剂。如本文所提及的“治疗剂”是用于治疗或预防疾病如癌症的组合物。在实施方案中, 治疗剂是抗体。

[0072] 当涉及蛋白质或肽时, 所用术语“特异性(或选择性地)结合”抗体或者“与……具有特异性(或选择性)免疫反应性”是指在异源蛋白质群及其它生物制剂中确定蛋白质存在的结合反应。因此, 在指定的免疫测定条件下, 特定的抗体与特定的蛋白质的结合是与背景结合的至少两倍, 更通常超过10-100倍的背景。在这种条件下与抗体的特异性结合需要选择特异于特定蛋白质的抗体。例如, 可以选择多克隆抗体, 仅获得与选择的抗原特异性免疫反应而与其它蛋白质不反应的抗体子集。这种选择可以通过减去与其它分子交叉反应的抗体实现。多种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如, 常规使用固相ELISA免疫测定以选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体(见例如Harlow&Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998) 关于可用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件所述)。

[0073] “配体”是指能结合受体的物质, 例如多肽或者其它分子。

[0074] “标记”或者“可检测部分”是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组合物。例如, 有用的标记包括³²P、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如通常用于ELISA中的酶)、生物素、地高辛, 或通过例如将放射标记引入与靶肽特异性反应的肽或抗体而使其可检测的半抗原和蛋白质或其它实体(entity)。可以使用本领域已知的用于使抗体与标记缀合的任何适当方法, 例如使用Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego所述方法。

[0075] 如本文所提供术语“生物素”是指特征在于脲基(四氢咪唑并酮)环与四氢噻吩环融合的化合物。因此, 本文提供的“生物素”是指5-[(3aS, 4S, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基]戊酸, 并且在常规意义上是指CAS登记号58-85-5所示。如本文所用, “生物素结合结构域”是能结合生物素的蛋白质结构域。生物素结合结构域的非限制性例子包括亲和素、链霉亲和素和中性亲和素。在实施方案中, 生物素结合结构域非共价结合生物素。

[0076] 如本文所提供的术语“亲和素”或“链霉亲和素”包括保持天然存在形式的亲和素或链霉亲和素活性(与天然蛋白质相比至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%

或100%以内的活性)的亲合素或链霉亲和素的任何天然存在形式、同系物、变体或衍生物(例如中性亲和素)。在一些实施方案中,与天然存在形式相比,变体在整个序列或部分序列(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)上具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列相同性。在实施方案中,亲和素是由UniProt序列参考P02701所鉴定的蛋白质、其同系物或功能片段。在实施方案中,链霉亲和素是由UniProt序列参考P22629鉴定的蛋白质、其同源物或功能片段。

[0077] “接触”根据其普通含义使用,是指允许至少两种不同种类(例如包括生物分子或细胞的化学化合物)变得足够接近以反应、相互作用或物理触碰的过程。然而,应意识到所得反应产物可以在加入的试剂之间的反应中直接产生或者从可以在反应混合物中产生的一或多种加入的试剂的中间体中产生。

[0078] 术语“接触”可包括允许两种物质反应、相互作用或物理触碰,其中两种物质可以是例如本文所述生物素结构域和生物素结合结构域。在实施方案中,接触包括例如允许如本文所述的生物素结构域与生物素结合结构域相互作用。

[0079] “对照”样品或值是指通常已知参考值而用作参考的样品或值,用于与测试样品进行比较。例如,测试样品可以取自测试条件,例如在测试化合物存在条件下,并且与已知条件的样品比较,例如在不存在测试化合物(阴性对照)或在存在已知化合物(阳性对照)条件下比较。对照也可以表示从大量测试或结果中收集的平均值。本领域的技术人员认识到可以设计对照以评估任何数量的参数。例如,可以设计对照以比较基于药理学数据(例如半衰期)或治疗措施(例如副作用比较)的治疗益处。本领域技术人员了解哪些对照在指定情况下是有价值的,并且能够基于与对照值对比分析数据。对照对于确定数据的意义也很有价值。例如,如果给定参数的值在对照中广泛变化,则测试样本中的变化不会被认为是有意

义的。

[0080] “对照”或“标准对照”是指用作参考(通常为已知参考)的样品、测量或值,用于与测试样品、测量或值进行比较。例如,可从怀疑患有给定疾病(例如自身免疫疾病、炎性自身免疫疾病、癌症、感染性疾病、免疫疾病或其它疾病)的患者获取测试样品,并与已知的正常(未患病的)个人(例如标准对照对象)对比。标准对照也可以表示从没有给定疾病的相似个体(例如标准对照对象)的群体(例如标准对照群体)收集的平均测量或值,例如具有相似医学背景、相同年龄、体重等的健康个体。标准对照值也可以得自同一个体,例如得自疾病发作前患者较早获得的样品。技术人员认识到可以设计标准对照用于评估任何数量的参数(例如RNA水平、蛋白质水平、特定细胞类型、特定体液、特定组织、滑膜细胞、滑液、滑膜组织、成纤维细胞样滑膜细胞、巨噬细胞样滑膜细胞等)。

[0081] 本领域技术人员了解哪些标准对照在给定情况下是最合适的,并且能够基于与标准对照值的比较来分析数据。标准对照对于确定数据的意义(例如统计学意义)也是有价值的。例如,如果给定参数的值在标准对照中变化很大,则测试样本的变化不会被认为是有意

义的。

[0082] “患者”或“有需要的对象”是指患有可通过施用本方面提供的组合物或药物组合物进行治疗的疾病或病症或有所述疾病或病症倾向的活的生物体。非限制性例子包括人、其它哺乳动物,牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、奶牛、鹿和其它非哺乳动物。在一些实施方案中,患者是人。

[0083] 术语“疾病”或“病症”是指能够用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的患者或对象的生存状态或健康状态。在实施方案中，疾病是癌症（例如肺癌，卵巢癌，骨肉瘤，膀胱癌，宫颈癌，肝癌，肾癌，皮肤癌（例如Merkel细胞癌），睾丸癌，白血病，淋巴瘤，头颈癌，结肠直肠癌，前列腺癌，胰腺癌，黑素瘤，乳腺癌，神经母细胞瘤）。所述疾病可能是自身免疫性、炎症性、癌症、感染性、代谢性、发育、心血管、肝脏、肠道、内分泌、神经或其它疾病。

[0084] 如本文所用，术语“癌症”是指在哺乳动物中发现的所有类型的癌症、肿瘤或恶性肿瘤，包括白血病、淋巴瘤、黑素瘤、神经内分泌肿瘤，癌和肉瘤。可用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的癌症例如包括淋巴瘤、肉瘤、膀胱癌、骨癌、脑肿瘤、宫颈癌、结肠癌、食道癌、胃癌、头颈癌、肾癌、骨髓瘤、甲状腺癌、白血病、前列腺癌、乳腺癌（例如三阴性、ER阳性、ER阴性、化疗耐药性、赫赛汀耐药性、HER2阳性、阿霉素耐药性、他莫西芬耐药性、导管癌、小叶癌、原发性、转移性）、卵巢癌、胰腺癌、肝癌（例如肝细胞癌）、肺癌（例如非小细胞肺癌、鳞状细胞肺癌、腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、类癌瘤、肉瘤）、多形性成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、黑素瘤、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、成胶质细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌（例如头、颈部或食道）、结肠直肠癌、白血病、急性骨髓性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。其它实例包括甲状腺癌、内分泌系统癌、脑癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、头颈癌、食道癌、肝癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、黑素瘤、间皮瘤、卵巢癌、肉瘤、胃癌、子宫癌或成神经细胞瘤、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、卵巢癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、原发性脑瘤、癌症、恶性胰insulanoma、恶性类癌瘤、尿膀胱癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、成神经细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、内分泌或外分泌胰腺肿瘤、甲状腺髓样癌、甲状腺髓样癌、黑素瘤、结肠直肠癌、甲状腺乳头状癌、肝细胞癌、乳头佩吉特病、叶状肿瘤、小叶癌、导管癌、胰腺星状细胞癌、肝星状细胞癌或前列腺癌。

[0085] 术语“白血病”广泛地指血液形成器官的进行性恶性疾病，通常以血液和骨髓中白细胞及其前体的变形增殖和发育为特征。白血病在临床上通常基于如下情况分类：(1) 疾病的持续时间和特征-急性或慢性；(2) 涉及的细胞类型：髓样（骨髓性）、淋巴样（淋巴性）或单核细胞样；及(3) 血液中异常细胞数量的增加或未增加-白细胞过多或白细胞减少性（亚白血病）。可用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的白血病例例如包括例如急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、慢性粒细胞性白血病、急性早幼粒细胞白血病、成人T细胞白血病、非白血病性白血病、leukocythemiac白血病、basophylic白血病、母细胞白血病、牛白血病、慢性粒细胞性白血病、皮肤白血病、胚胎性白血病、嗜酸性粒细胞白血病、Gross白血病、毛细胞白血病、成血细胞性白血病（hemoblastic leukemia）、成血细胞性白血病（hemocytoblastic leukemia）、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞白血病、白细胞减少性白血病、淋巴细胞性白血病（lymphatic leukemia）、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病（lymphocytic leukemia）、淋巴源性白血病、淋巴样白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞性白血病、微小粒细胞白血病、单核细胞白血病、成髓细胞性白血病、髓细胞性白血病、髓粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、Naegeli白血病、浆细胞白血病、多发性骨髓瘤、浆细胞性白血病、早幼粒细胞白血病、Rieder细胞白血病、Schilling's白血病、干细胞白血病、亚白血病性白血病或未分化细胞

白血病。

[0086] 术语“肉瘤”通常指由类似胚胎结缔组织的物质组成的肿瘤,通常由包埋在纤维状或均质物质中的密集的细胞组成。可以用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的肉瘤包括软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、Abemethy's肉瘤、脂肉瘤、脂肪肉瘤、肺泡样软组织肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄肉瘤、绿色瘤、绒毛膜癌、胚胎肉瘤、Wilms'瘤肉瘤、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、Ewing's肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、Hodgkin's肉瘤、特发性多发性色素性出血性肉瘤、B细胞免疫母细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞免疫母细胞肉瘤、Jensen氏肉瘤、Kaposi's肉瘤、Kupffer细胞肉瘤、血管肉瘤、白细胞肉瘤、恶性间叶瘤肉瘤、骨膜外肉瘤、网状肉瘤、Rous肉瘤、serocystic肉瘤、滑膜肉瘤或telangiectaltic肉瘤。

[0087] 术语“黑素瘤”被认为是指由皮肤和其它器官的黑素细胞系统引起的肿瘤。可用本发明提供的化合物、药物组合物或方法治疗的黑素瘤包括例如肢端-雀斑样痣黑色素瘤、无黑色素性黑色素瘤、良性幼年黑素瘤、Cloudman黑素瘤、S91黑素瘤、Harding-Passey黑素瘤、幼年黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、恶性黑素瘤、结节性黑素瘤、甲下黑色素瘤或表面扩散黑素瘤。

[0088] 术语“癌”是指由上皮细胞构成的恶性新生长,其倾向于浸润周围组织并引起转移。可用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的癌症包括例如甲状腺髓样癌、家族性甲状腺髓样癌、腺泡癌(acinar carcinoma)、腺泡状癌(acinous carcinoma)、腺样囊性癌(adenocystic carcinoma)、腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma)、腺癌(carcinoma adenomatosum)、肾上腺皮质癌、肺泡上皮癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌、基底上皮细胞癌、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、髓样癌(cerebriform carcinoma)、胆管细胞癌、绒毛膜癌、胶样癌、粉刺癌、子宫体癌、筛状癌、铠甲状癌、皮肤癌、柱状细胞癌(cylindrical carcinoma)、柱状细胞癌、导管癌(duct carcinoma)、导管癌(ductal carcinoma)、导管癌(carcinoma durum)、胚胎性癌、髓样癌、表皮样癌(epiermoid carcinoma)、腺样上皮癌、外生性癌、前癌性溃疡、纤维癌、gelatiniforni癌、胶状癌、巨细胞癌、巨细胞癌、腺癌、颗粒细胞癌、毛基质癌、多血癌、肝细胞癌、Hurthle细胞癌、胶样癌、肾上腺样癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、Krompecher's癌、Kulchitzky细胞癌、大细胞癌、豆状癌、豆状癌、脂肪瘤癌、小叶癌、淋巴上皮癌、髓样癌(carcinoma medullare)、髓样癌(medullary carcinoma)、黑色素癌、carcinoma molle、粘液癌(mucinous carcinoma)、粘液癌(carcinoma muciparum)、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液癌(carcinoma mucosum)、粘液癌、粘液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌(oat cell carcinoma)、骨样癌(carcinoma ossificans)、骨样癌、乳头状癌、门静脉周围癌、蔓延前癌、棘细胞癌、脑样癌、肾脏肾细胞癌、储藏细胞癌、肉瘤样癌、schneiderian癌、硬癌、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、solanoid癌、球状细胞癌、梭形细胞癌、髓样癌、鳞状癌、鳞状细胞癌、string癌、血管扩张性癌(carcinoma telangiectaticum)、癌毛细血管扩张、移行细胞癌、结节性肝癌、肾小管癌、结节性肝癌、疣状癌或乳头状癌。

[0089] 如本文所用,术语“转移”,“转移性”和“转移性癌症”可互换使用,是指增生性疾病或紊乱(例如癌症)从一个器官或另一个非相邻器官或身体部分扩散。癌症发生在原发部位,例如乳房,该部位被称为原发性肿瘤,例如原发性乳腺癌。原发性肿瘤或原发部位中的

一些癌细胞获得穿透和浸润局部区域中周围正常组织的能力和/或穿透淋巴系统或血管系统壁的能力,通过系统循环至身体的其它部位和组织。由原发性肿瘤的癌细胞形成的第二临床可检测肿瘤称为转移性或继发性肿瘤。当癌细胞转移时,推测转移性肿瘤及其细胞与原始肿瘤相似。因此,如果肺癌转移到乳房,乳房部位的继发性肿瘤由异常肺细胞组成,而不是异常的乳房细胞。乳房中的继发性肿瘤是指转移性肺癌。因此,术语转移性癌症是指其中对象患有或具有原发性肿瘤并具有一种或多种继发性肿瘤的疾病。短语非转移性癌症或具有非转移性癌症的对象是指对象患有原发性肿瘤但不具有一种或多种继发性肿瘤的疾病。例如,转移性肺癌是指患有或具有原发性肺肿瘤病史并且在第二位置或多个位置处(例如在乳房中)具有一个或多个继发性肿瘤的对象中的疾病。

[0090] 如本文所用,“自身免疫性疾病”是指由对象的免疫系统改变的免疫反应引起的疾病或紊乱,例如针对通常存在于对象体内的物质组织和/或细胞。自身免疫性疾病包括但不限于关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年特发性关节炎、硬皮病、系统性硬皮病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、幼年型糖尿病、1型糖尿病、格林巴利综合征、桥本氏脑炎、桥本氏甲状腺炎、强直性脊柱炎、牛皮癣、干燥综合征、血管炎、肾小球肾炎、自身免疫性甲状腺炎、Behcet's病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、大疱性类天疱疮、结节病、牛皮癣、鱼鳞病、Graves眼病、炎症性肠病、Addison's病、白癜风、哮喘和过敏性哮喘。

[0091] 如本文所用,“炎症性疾病”是指与异常或改变的炎症相关的疾病或紊乱。炎症是由免疫系统启动的生物反应,作为对病原体、受损细胞或组织或刺激物的应答的愈合过程的一部分。慢性炎症会导致各种疾病。炎症性疾病包括但不限于动脉粥样硬化、变态反应、哮喘、类风湿性关节炎、移植排斥、乳糜泻、慢性前列腺炎、炎症性肠病、盆腔炎症和炎症性肌病。

[0092] 如本文所用,“代谢紊乱”是指涉及多种分子和物质(包括例如碳水化合物、氨基酸和有机酸)的异常代谢的疾病或紊乱。代谢紊乱包括但不限于碳水化合物代谢紊乱,例如糖原贮积症,氨基酸代谢紊乱,例如苯丙酮尿症、枫糖尿症、1型戊二酸血症,尿素循环紊乱或尿素循环缺陷,例如,氨基甲酰磷酸合成酶I缺乏症,有机酸代谢紊乱(有机酸尿症),例如尿黑酸症,脂肪酸氧化和线粒体代谢的紊乱,例如中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症,卟啉代谢紊乱,例如急性间歇性卟啉症,嘌呤或嘧啶代谢紊乱,例如Lesch-Nyhan综合征,类固醇代谢紊乱,例如类脂先天性肾上腺增生、先天性肾上腺增生,线粒体功能紊乱例如Kearns-Sayre综合征,过氧化物酶体功能紊乱,例如Zellweger综合征,和溶酶体贮积症,例如Gaucher's病和Niemann Pick病。

[0093] 如本文所用,“发育紊乱”是指通常在童年发生的与语言障碍、学习障碍、运动失常和神经发育紊乱的相关的疾病或紊乱。实例包括但不限于自闭症谱系障碍和注意缺失紊乱。

[0094] 如本文所用,“心血管疾病”是指与心脏、血管或两者相关的疾病。心血管疾病包括但不限于冠心病、心肌病、高血压性心脏病、心力衰竭、心脏节律失常、炎症性心脏病、外周动脉疾病、脑血管疾病和炎症性心脏病。

[0095] 如本文所用,“肝脏疾病”是指与肝脏和/或肝脏功能异常有关的疾病。肝脏疾病包括但不限于肝炎、酒精性肝病、脂肪肝疾病、肝硬化、Budd-Chiari综合征、Gilbert's综合征和癌症。

[0096] 如本文所用,术语“肠道疾病”是指与肠(小肠或大肠)中异常相关的疾病或病症。

肠道疾病包括但不限于胃肠炎、结肠炎、回肠炎、阑尾炎、乳糜泻、克罗恩病、肠病毒、肠易激综合征和憩室病。

[0097] 如本文所用,术语“内分泌疾病”是指内分泌系统的疾病或病症,包括内分泌腺分泌过少、内分泌腺分泌过多和肿瘤。内分泌疾病包括但不限于Addison's病、糖尿病、Conn's综合征、Cushing's综合征、糖皮质激素可治性醛固酮增多症、低血糖症、甲亢、甲状腺功能减退症、甲状腺炎、垂体机能减退症、性腺机能减退症和甲状旁腺紊乱。

[0098] 如本文所用,术语“神经紊乱”是指身体神经系统的疾病或紊乱,包括结构性、生化或电异常。神经紊乱包括但不限于脑损伤、脑功能障碍、脊髓紊乱、外周神经病、颅神经紊乱、自主神经系统紊乱、癫痫、运动失常例如帕金森病和多发性硬化以及中枢神经病。

[0099] 如本文所用,术语“感染性疾病”是指与感染、宿主对象中病原体的存在和/或生长相关的疾病或紊乱。感染性病原体包括但不限于病毒、细菌、真菌、原生动物、多细胞寄生虫和异常蛋白质例如朊病毒。与感染性疾病相关的病毒包括但不限于单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、EB病毒、水痘-带状疱疹病毒、疱疹病毒、水泡性口炎病毒、肝炎病毒、鼻病毒、冠状病毒、流感病毒、麻疹病毒、多瘤病毒、人乳头瘤病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、柯萨奇病毒、登革病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、劳氏肉瘤病毒、黄热病病毒、埃博拉病毒、猿免疫缺陷病毒、人免疫缺陷病毒。与感染性疾病有关的细菌包括但不限于结核分枝杆菌、沙门氏菌属、大肠杆菌、衣原体属、葡萄球菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属。

[0100] 在与疾病(例如糖尿病、癌症(例如前列腺癌、肾癌、转移癌、黑素瘤、去势抵抗性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、神经胶质瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如头、颈或食管)、结肠直肠癌、白血病、急性髓样白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或者多发性骨髓瘤))相关的物质或物质活性或功能的上下文中,术语“相关”或“与...相关”是指所述疾病(例如肺癌、卵巢癌、骨肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、肝癌、肾癌、皮肤癌(例如Merkel细胞癌)、睾丸癌、白血病、淋巴瘤、头颈部癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、黑素瘤、乳腺癌、神经母细胞瘤)由所述物质或物质活性或功能(全部或部分)导致,或者所述疾病的症状由所述物质或物质活性或功能(全部或部分)导致。

[0101] 本文使用的术语“异常(aberrant)”是指与正常不同。当用于描述酶活性时,异常是指活性大于或小于正常对照或正常非患病对照样品的平均值。异常活性可以是指导致疾病的活性的量,其中异常活性返回正常或非疾病相关量(例如通过使用本文所述的方法),导致疾病或一种或多种疾病症状的降低。

[0102] 如本文所用,术语“细胞穿透”或“细胞穿透”是指分子(例如抗体)以显著或有效量从细胞外环境进入到细胞中的能力。因此,细胞穿透缀合物是从细胞外环境穿过细胞膜进入细胞的分子。

[0103] 如本文所用,术语“非细胞穿透”或“非细胞穿透”是指分子(例如抗体)不能以显著或有效量从细胞外环境进入细胞中。因此,非细胞穿透肽或蛋白质通常不能从细胞外环境通过细胞膜进入细胞,以实现细胞群体、器官或生物体的显著生物学作用。该术语不排除一种或多种少量肽或蛋白质可以进入细胞的可能性。然而,该术语是指通常不能从细胞外环境进入细胞至显著程度的分子。非细胞穿透分子和物质的实例包括但不限于大分子,例如高分子量蛋白质(例如抗体)。使用本领域技术人员已知的方法可以确定肽或蛋白质是非细胞穿透的。举例来说,可以对肽或蛋白质进行荧光标记,并且肽或蛋白质从细胞外环境进入

细胞的能力可以通过流式细胞术分析或共焦显微镜术在体外测定。在一些实施方案中,“非细胞穿透蛋白”是指穿透细胞的蛋白质(例如抗体)比与硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架连接的相同蛋白质至少低约2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10,000或100,000倍。在一些实施方案中,“非细胞穿透蛋白”是指不可测量地穿透细胞的蛋白质。

[0104] 如本文所用,“分子量”(M.W.)或“分子质量”是指分子中所有原子的原子量的总和。就分子而言,具有高分子量的分子通常具有25kDa或更高的分子量。举例来说,高分子量蛋白质可具有约25kDa至1000kDa或更高的M.W.。

[0105] 如本文所用,术语“细胞内”意指在细胞内。如本文所用,“细胞内靶”是位于细胞内的靶,例如核酸、多肽或其它分子(例如碳水化合物),并且是本文提供的非细胞穿透蛋白结合的靶。结合可以是直接或间接的。在实施方案中,非细胞穿透蛋白选择性结合细胞内靶。选择性结合或特异性结合是指物质(例如非细胞穿透蛋白)结合一种物质(例如细胞内靶),部分或完全排除其他物质。结合是指可检测的结合至少是测定方法背景的约1.5倍。对于选择性或特异性结合,这种可检测的结合可以针对给定的物质而不是对照物质检测到。或者或另外,结合的检测可以通过测定下游分子或事件的存在来确定。

[0106] 如本文所用,术语“缀合物”是指原子或分子之间的缔合。缔合可以是直接或间接的。例如,核酸(例如硫代磷酸核酸)与蛋白质(例如,本文提供的抗体)之间的缀合物可以是直接的,例如通过共价键,或者是间接的,例如通过非共价键(例如静电相互作用(例如离子键、氢键、卤素键)、范德华相互作用(例如偶极-偶极、偶极诱导偶极、London分散)、环堆积(π 效应)、疏水相互作用等)。当缀合物是非共价缀合物时,非细胞穿透蛋白和硫代磷酸核酸通过非共价接头连接。在实施方案中,非共价接头包括生物素结合结构域和生物素结构域。在实施方案中,缀合物使用缀合物化学形成,缀合物化学包括但不限于亲核取代(例如,胺和醇与酰基卤、活性酯的反应),亲电取代(例如烯胺反应)以及碳-碳和碳-杂原子多重键(例如Michael反应,Diels-Alder加成)。这些及其它有用的反应在例如March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; and Feeney et al., MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982中讨论。在实施方案中,硫代磷酸核酸、硫代磷酸骨架聚合物或非细胞穿透蛋白通过组分硫代磷酸核酸、硫代磷酸骨架聚合物(例如单硫代磷酸)或非细胞穿透蛋白与生物素结合结构域或生物素结构域(例如氨基酸)的组分之间的非共价化学反应而非共价连接至生物素结合结构域或生物素结构域。在其他实施方案中,硫代磷酸核酸、硫代磷酸骨架聚合物或非细胞穿透蛋白包括一个或多个反应性部分,例如本文所述的共价反应性部分(例如,氨基酸反应性部分如乙烯基砷部分($-S(O)_2CH=CH_2$))。所述一个或多个反应性部分可以与生物素结合结构域或生物素结构域的第二反应性部分反应,从而形成共价键。不受限制,生物素结构域或生物素结合结构域的反应性部分可以与非细胞穿透蛋白的伯胺、巯基部分、羧基部分、碳水化合物部分、酪氨酸侧链或组氨酸侧链或者硫代磷酸核酸或硫代磷酸支链聚合物的胍或胞嘧啶碱基反应。生物素化(与生物素结构域结合)或者亲和素化(avidinylation)(与生物素结合结构域)的反应化学及其它有用的反应在例如Nelson WM, Wojnar WA. The use of photobiotinylated PCR

primers for magnetic bead-based solid phase sequencing. Human Genome III October 21-23, 1991 San Diego, CA. Poster no. T41; and Thermo Scientific Avidin-Biotin Technical Handbook published March, 2009, as 1601675_AvBi_HB_INTL.pdf 中讨论。

[0107] 包括用于本文的缀合物化学的共价反应性部分或官能团的有用的反应性部分包括, 例如:

[0108] (a) 羧基基团及其各种衍生物, 包括但不限于 N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基苯并三唑酯、酰基卤、酰基咪唑、硫酸酯、对硝基苯基酯、烷基、烯基、炔基和芳香酯;

[0109] (b) 可以被转化为酯、醚、醛等的羟基基团;

[0110] (c) 卤代烷基, 其中卤素可随后用亲核基团例如胺、羧酸根阴离子、硫醇阴离子、负碳离子或醇盐 (alkoxide) 离子置换, 从而导致新基团在卤原子位置共价附着;

[0111] (d) 能够参与 Diels-Alder 反应的亲二烯体基团, 例如马来酰亚胺基团;

[0112] (e) 醛或酮基, 使得可以通过形成羰基衍生物例如亚胺、腙、缩氨基脲或肟或通过例如 Grignard 加成或烷基锂加成这类机理而进行随后的衍生化;

[0113] (f) 磺酰卤基团, 用于随后与胺反应, 例如形成磺酰胺;

[0114] (g) 硫醇基团, 其可以被转化为二硫化物, 与酰基卤反应, 或者与金属如金接合 (bond);

[0115] (h) 胺或巯基基团, 其可以例如被酰基化、烷基化或者氧化;

[0116] (i) 烯, 其可以经历例如环加成、酰基化、Michael 加成等;

[0117] (j) 环氧化物, 其可以与例如胺和羟基化合物反应;

[0118] (k) 亚磷酰胺及核酸合成中有用的其它标准官能团;

[0119] (l) 金属硅氧化物接合;

[0120] (m) 金属, 其与反应性磷基团 (例如磷化氢) 接合, 以形成例如磷酸二酯键; 以及

[0121] (n) 砷类, 例如乙烯基砷。

[0122] 可以选择反应性官能团, 使得它们不参与或干扰本文所述蛋白质的化学稳定性。举例来说, 核酸可以包括乙烯基砷或其他反应性部分。例如, 具有乙烯基砷反应性部分的核酸可以由具有 S-S-R 部分的核酸形成, 其中 R 是 $-(CH_2)_6-OH$ 。具有乙烯基砷的核酸还可以由具有末端磷酸 (PS) 的核酸形成。

[0123] “对照”或“标准对照”是指用作参考 (通常为已知参考) 的样品、量度或值, 用于与测试样品、测量或值进行比较。例如, 可从怀疑患有给定疾病 (例如自身免疫疾病、炎性自身免疫疾病、癌症、感染性疾病、免疫疾病或其他疾病) 的患者获取测试样品, 并与已知的正常 (未患病的) 个体 (例如标准对照对象) 进行比较。标准对照还可以表示从没有给定疾病的相似个体 (例如标准对照对象) 例如具有类似医学背景、相同年龄、体重等的健康个体的群体 (即, 标准对照群体) 收集的平均测量或值。标准对照值也可以从同一个个体得, 例如来自疾病发作前患者较早获得的样品。技术人员将认识到, 可以设计标准对照用于评估任何数量的参数 (例如 RNA 水平、蛋白质水平、特定细胞类型、特定体液、特定组织、滑膜细胞、滑液、滑膜组织、成纤维细胞样滑膜细胞、巨噬细胞样滑膜细胞等)。

[0124] 本领域技术人员将理解哪些标准对照在给定情况下是最合适的, 并且能够基于与标准对照值的比较来分析数据。标准对照对于确定数据的显著性 (例如统计学显著性) 也是

有价值的。例如，如果给定参数的值在标准对照中变化很大，则测试样品中的变化不会被认为是显著的。

[0125] 术语“诊断”是指疾病(例如自身免疫性疾病、炎性自身免疫性疾病、癌症、传染性疾病、免疫疾病或其他疾病)存在于对象中的相对概率。类似地，术语“预后”是指对象中针对一种疾病状态可能出现的某种未来结果的相对概率。例如，在本发明的上下文中，预后可以指个体将要发展疾病(例如自身免疫性疾病、炎性自身免疫性疾病、癌症、传染性疾病、免疫疾病或其他疾病)的可能性或疾病的可能严重性(例如疾病的持续时间)。正如医学诊断领域的技术人员所理解的那样，这些术语不是绝对的。

[0126] “生物样品”或“样品”是指从对象或患者获得的或衍生的材料。生物样品包括组织切片，例如活组织检查样品和尸检样品，以及为了组织学目的而取的冷冻切片。这样的样品包括体液例如血液和血液级分或产品(例如血清、血浆、血小板、红细胞等)、痰、组织、培养的细胞(例如原代培养物、外植体和转化的细胞)、粪便、尿液、滑膜液、关节组织、滑膜组织、滑膜细胞、成纤维细胞样滑膜细胞、巨噬细胞样滑膜细胞、免疫细胞、造血细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、T细胞等。生物样品通常从真核生物获得，例如哺乳动物，如灵长类动物，例如黑猩猩或人类；牛；狗；猫；啮齿动物例如豚鼠、大鼠、小鼠；兔；或鸟类；爬行动物；或鱼。

[0127] 本文使用的“细胞”是指进行足以保存或复制其基因组DNA的代谢或其他功能的细胞。细胞可以通过本领域公知的方法鉴定，包括例如完整膜的存在，由特定染料染色，产生后代的能力，或者在配子的情况下，与第二配子结合而产生生活的后代的能力。细胞可以包括原核细胞和真核细胞。原核细胞包括但不限于细菌。真核细胞包括但不限于酵母细胞和来源于植物和动物的细胞，例如哺乳动物、昆虫(例如夜蛾)和人类细胞。可以在细胞是天然地不粘附的或经处理例如通过胰蛋白酶消化而不粘附于表面时使用细胞。

[0128] 细胞穿透缀合物

[0129] 本文特别提供了细胞穿透缀合物，其包括第一非细胞穿透蛋白和第二蛋白质和硫代磷酸核酸分子。本文提供的第二蛋白质可以是非细胞穿透蛋白。在实施方案中，第二蛋白质是抗体。如本文所提供的缀合物可以包括将第一非细胞穿透蛋白(例如，第一抗体)连接至第二非细胞穿透蛋白(例如第二抗体)的硫代磷酸核酸，其中所述硫代磷酸核酸增强第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白的细胞内输送。第一和第二非细胞穿透蛋白可以结合相同的靶(例如细胞内蛋白质或表面表达的蛋白质)或不同的靶。当第一和第二非细胞穿透蛋白结合相同的靶时，第一非细胞穿透蛋白可以结合与第二非细胞穿透蛋白所结合的不同表位。硫代磷酸核酸与第一和第二非细胞穿透蛋白的共价或非共价连接(例如通过非共价接头)形成本文提供的能够通过穿透进入细胞的非细胞穿透蛋白。本文提供的缀合物尤其可用于细胞内输送抗体和靶向细胞内靶(例如信号蛋白)以用于治疗 and 诊断目的。

[0130] 在一个方面，提供细胞穿透缀合物，其包括将第一非细胞穿透蛋白连接至第二非细胞穿透蛋白的硫代磷酸核酸。所述硫代磷酸核酸增强第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白的细胞内输送。另一方面，提供细胞穿透缀合物，其包括将第一非细胞穿透蛋白连接至第二非细胞穿透蛋白的硫代磷酸聚合物骨架。所述硫代磷酸聚合物骨架增强第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白的细胞内输送。如上所述，除了聚合物骨架没有通常存在于核酸序列中的碱基之外，聚合物骨架含有与核酸序列相同的结构(即，含有连接在一起的两个或更多个糖残基的链)。因此，对于本文提供的所有实施方案和方面，硫代磷酸聚合

物骨架可以代替本文所述的硫代磷酸核酸使用或与本文所述的硫代磷酸核酸组合使用。

[0131] 第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白可以与硫代磷酸核酸共价或非共价连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸与第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白共价连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸与第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白非共价连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸与第一非细胞穿透蛋白共价连接并且与第二非细胞穿透蛋白非共价连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸与第一非细胞穿透蛋白非共价连接并与第二非细胞穿透蛋白共价连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸与第一非细胞穿透蛋白的赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸或组氨酸独立地连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸与第二非细胞穿透蛋白的赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸或组氨酸独立地连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸与第一非细胞穿透蛋白的半胱氨酸连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸与第二非细胞穿透蛋白的半胱氨酸连接。

[0132] 在实施方案中,硫代磷酸核酸通过第一接头与第一非细胞穿透蛋白连接并通过第二接头与第二非细胞穿透蛋白连接。本文提供的第一和第二接头可以是化学接头。在实施方案中,化学接头是共价接头或非共价接头。在实施方案中,共价接头为键、取代或未取代的亚烷基、取代或未取代的杂亚烷基、取代或未取代的环亚烷基、取代或未取代的杂环亚烷基,取代或未取代的亚芳基或取代或未取代的杂亚芳基或其任何组合。因此,如本文所提供的化学接头可以包括多个化学部分,其中多个部分中的每一个在化学上是不同的。

[0133] 硫代磷酸核酸可以通过非共价接头与第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白连接。如本文所提供的非共价接头可以包括生物素结合对的第一成员和生物素结合对的第二成员。生物素结合对的第一成员可以是生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)或生物素结构域(例如生物素)。生物素结合对的第二成员可以是生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)或生物素结构域(例如生物素)。非共价接头通过生物素结合对的第一成员和生物素结合对的第二成员之间的非共价结合形成。在实施方案中,生物素结合对的第一成员是生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素),生物素结合对的第二成员是生物素结构域(例如生物素)。在实施方案中,生物素结合对的第一成员是生物素结构域(例如生物素),生物素结合对的第二成员是生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)。

[0134] 在实施方案中,第一接头是非共价接头。在实施方案中,第一接头是共价接头。在实施方案中,第二接头是非共价接头。在实施方案中,第二接头是共价接头。在实施方案中,第一接头是非共价接头并且第二接头是共价接头。在实施方案中,第一接头是共价接头,第二接头是非共价接头。在实施方案中,第一接头或第二接头是键。在实施方案中,第一接头是键。在实施方案中,第二接头是键。

[0135] 在实施方案中,第一接头是非共价接头。如本文所提供的非共价接头是包含与第二结合结构域(例如,生物素结合结构域或生物素结构域)非共价连接的第一结合结构域(例如,生物素结构域或生物素结合结构域)的接头。因此,非共价接头通过第一结合结构域和第二结合结构域之间的非共价结合形成。

[0136] 在实施方案中,第一接头包含第一结合域和第二结合域。在实施方案中,第二接头包含第三结合结构域和第四结合结构域。第一结合结构域、第二结合结构域、第三结合结构域和第四结合结构域可以相同或不同。在实施方案中,第一结合结构域是第一生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)。在实施方案中,第二结合结构域是第一生物素结构域

(例如生物素)。在实施方案中,第三结合结构域是第二生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)。在实施方案中,第四结合结构域是第二生物素结构域(例如生物素)。在实施方案中,第一结合结构域是第一生物素结构域(例如生物素)。在实施方案中,第二结合结构域是第一生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)。在实施方案中,第三结合结构域是第二生物素结构域(例如生物素)。在实施方案中,第四结合结构域是第二生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)。在实施方案中,第一接头包含非共价连接第一生物素结构域的第一生物素结合结构域。在实施方案中,第二接头包括非共价连接第二生物素结构域的第二生物素结合结构域。

[0137] 第一生物素结合结构域、第二生物素结合结构域、第一生物素结构域和第二生物素结构域可以分别与第一非细胞穿透蛋白或第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)共价或非共价连接。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白与第一生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)共价连接并且硫代磷酸核酸与第一生物素结构域(例如生物素)共价连接。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白共价连接第一生物素结构域(例如生物素)并且硫代磷酸核酸共价连接第一生物素结合结构域(例如,亲和素,链霉亲和素)。在实施方案中,第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)共价连接第二生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)并且硫代磷酸核酸共价连接第二生物素结构域(例如生物素)。在实施方案中,第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)共价连接第二生物素结构域(例如生物素)并且硫代磷酸核酸共价连接第二生物素结合结构域(例如亲和素,链霉亲和素)。

[0138] 本文提供的第一接头和第二接头可以是共价接头。本文提供的接头(例如第一接头,第二接头)可以共价连接第一非细胞穿透蛋白或第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白),应用本领域熟知的方法进行,及与接头与第一非细胞穿透蛋白和第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)的组合物相容。本文提供的接头可以包括在连接第一非细胞穿透蛋白的位点、在连接硫代磷酸核酸的位点或者在连接第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)的位点的反应性基团(例如炔烃,叠氮化物,马来酰亚胺或巯基反应性部分)的缀合产物。因此,本文提供的接头可以是多价的并且可以通过缀合化学技术形成。可用于本文提供的组合物和方法中的接头(例如第一接头,第二接头)的非限制性实例包括烷基(包括取代的烷基和含有杂原子部分的烷基)、短烷基、酯、酰胺、胺,环氧基团和乙二醇或其衍生物。本文提供的接头(例如第一接头,第二接头)可以包括砷基,形成磺酰胺,酯基或醚基(例如三乙基醚)。

[0139] 在实施方案中,第一接头包含非共价连接第一生物素结构域的第一生物素结合结构域。在实施方案中,第一生物素结合结构域是第一亲和素结构域。在实施方案中,第一生物素结合结构域是第一链霉亲和素结构域。在实施方案中,第一链霉亲和素结构域结合多个第一生物素结构域。在实施方案中,第一链霉亲和素结构域结合大约四个第一生物素结构域。

[0140] 在实施方案中,第一生物素结合结构域连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,第一生物素结合结构域共价连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,第一生物素结合结构域非共价连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,多个第一生物素结合结构域连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,第一生物素结合结构域连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,第一生物素结合结构域共价连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,第一生物素结合结构域

非共价连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,多个硫代磷酸核酸连接第一生物素结合结构域。

[0141] 在实施方案中,第一生物素结构域连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,第一生物素结构域共价连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,第一生物素结构域非共价连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,多个硫代磷酸核酸连接第一生物素结构域。在实施方案中,第一生物素结构域连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,第一生物素结构域共价连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,第一生物素结构域非共价连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,第一生物素结合结构域非共价连接第一生物素结构域,从而形成第一接头。

[0142] 在实施方案中,第一接头或第二接头是共价接头。在实施方案中,第二接头是共价接头。在实施方案中,第一接头是共价接头。在实施方案中,第一接头是键。在实施方案中,第二接头是键。在实施方案中,第一接头是共价接头,第二接头是共价接头。在实施方案中,第一接头是非共价接头,第二接头是非共价接头。在实施方案中,第一接头是共价接头,第二接头是非共价接头。在实施方案中,第一接头是非共价接头,第二接头是共价接头。在进一步的实施方案中,第二接头是键。

[0143] 在实施方案中,第二接头包括非共价连接第二生物素结构域的第二生物素结合结构域。在实施方案中,第二生物素结合结构域是第二亲和素结构域。在实施方案中,第二生物素结合结构域是第二链霉亲和素结构域。在实施方案中,第二链霉亲和素结构域结合多个第二生物素结构域。在实施方案中,第二链霉亲和素结构域结合约四个第二生物素结构域。

[0144] 在实施方案中,第二生物素结合结构域连接第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)。在实施方案中,第二生物素结合结构域与第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)共价连接。在实施方案中,第二生物素结合结构域非共价连接第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)。在实施方案中,多个第二生物素结合结构域连接第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)。在实施方案中,第二生物素结合结构域连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,第二生物素结合结构域共价连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,第二生物素结合结构域非共价连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,多个硫代磷酸核酸连接第二生物素结合结构域。

[0145] 在实施方案中,第二生物素结构域连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,第二生物素结构域共价连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,第二生物素结构域非共价连接硫代磷酸核酸。在实施方案中,多个硫代磷酸核酸连接第二生物素结构域。在实施方案中,第二生物素结构域连接第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)。在实施方案中,第二生物素结构域共价连接第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)。在实施方案中,第二生物素结构域非共价连接第二蛋白质(例如第二非细胞穿透蛋白)。在实施方案中,第二生物素结合结构域非共价连接第二生物素结构域,由此形成第二接头。

[0146] 生物素结合对的第一成员和生物素结合对的第二成员可以共价或非共价连接第一或第二非细胞穿透蛋白、硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架上。在实施方案中,非细胞穿透蛋白共价连接生物素结合对的第一成员(例如亲和素,链霉亲和素),硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架共价连接生物素结合对的第二成员(例如生物素)。

[0147] 在实施方案中,生物素结合结构域是亲和素结构域。在实施方案中,生物素结合结构域是链霉亲和素结构域。在实施方案中,链霉亲和素结构域结合多个生物素结构域。在实施方案中,链霉亲和素结构域结合大约四个生物素结构域。在实施方案中,生物素结合结构

域连接非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结合结构域共价连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结合结构域共价连接第二非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结合结构域非共价连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结合结构域非共价连接第二非细胞穿透蛋白。在实施方案中,多个生物素结合结构域连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,多个生物素结合结构域连接第二非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结合结构域连接硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,生物素结合结构域共价连接硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,生物素结合结构域非共价连接硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,多个生物素结合结构域连接硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,生物素结合结构域非共价连接生物素结构域,从而形成非共价接头。

[0148] 在实施方案中,生物素结构域连接硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,生物素结构域共价连接硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,生物素结构域非共价连接硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,多个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架连接生物素结构域。在实施方案中,生物素结构域连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域连接第二非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域共价连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域共价连接第二非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域非共价连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域非共价连接第二非细胞穿透蛋白。在实施方案中,多个生物素结构域连接第一非细胞穿透蛋白。在实施方案中,多个生物素结构域连接第二非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域非共价连接生物素结合结构域,从而形成非共价接头。

[0149] 如上所述,核酸例如硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架可以通过包括生物素结合结构域(例如亲和素或链霉亲和素)和生物素结构域的非共价接头连接第一或第二非细胞穿透蛋白。核酸例如硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架可通过多种机制连接生物素结合结构域或生物素结构域。类似地,第一或第二非细胞穿透蛋白可以通过多种机制连接生物素结合结构域或生物素结构域。硫代磷酸核酸、硫代磷酸聚合物骨架或者第一或第二非细胞穿透蛋白可以共价或非共价连接生物素结合结构域或生物素结构域。第一或第二非细胞穿透蛋白可以共价结合生物素结合结构域或生物素结构域。当第一或第二非细胞穿透蛋白与生物素结合结构域或生物素结构域共价结合时,生物素结合结构域或生物素结构域共价结合蛋白质的氨基酸。在实施方案中,第一或第二非细胞穿透蛋白包括共价反应性部分(如上所述),且反应性部分与生物素结合结构域或生物素结构域具有反应性。在实施方案中,生物素结合结构域或生物素结构域包含共价反应性部分,反应性部分与第一或第二非细胞穿透蛋白反应。

[0150] 在实施方案中,硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架包含共价反应性部分,反应性部分与生物素结合结构域或生物素结构域具有反应性。如上所述,共价反应性部分可以与蛋白质的赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸或组氨酸(例如与氨基酸侧链)反应。在实施方案中,共价反应性部分与半胱氨酸反应。共价反应性部分可以是乙烯基砜。在实施方案中,硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架包括具有式S-S-R的反应性部分,其中R是保护基。在实施方案中,R为己醇(一价取代基)。如本文所用,术语己醇包括具有式 $C_6H_{13}OH$ 的化合物及包括1-己醇、2-己醇、3-己醇、2-甲基-1-戊醇、3-甲基-1-戊醇、4-甲基-1-戊醇、2-甲基-2-戊醇、3-

甲基-2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-甲基-3-戊醇、3-甲基-3-戊醇、2,2-二甲基-1-丁醇、2,3-二甲基-1-丁醇、3,3-二甲基-1-丁醇、2,3-二甲基-2-丁醇、3,3-二甲基-2-丁醇和2-乙基-1-丁醇。在实施方案中,R是1-己醇。在实施方案中,硫代磷酸核酸与生物素结合结构域或生物素结构域共价结合。在实施方案中,硫代磷酸核酸包括反应性部分。在实施方案中,反应性部分是乙烯基砜或如上述具有式S-S-R的反应性部分。在实施方案中,R为己醇,例如1-己醇。

[0151] 在一个实施方案中,第一非细胞穿透蛋白是第一抗体,第一接头包含第一生物素结合结构域和第一生物素结构域,其中所述第一生物素结合结构域是亲和素结构域,第二非细胞穿透蛋白是第二抗体,第二接头包含第二生物素结合结构域和第二生物素结构域,其中所述第二生物素结合结构域是亲和素结构域。在另一个实施方案中,第一抗体是抗STAT3抗体,第二抗体是抗NFkB抗体。在另一个实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。

[0152] 在一个实施方案中,所述第一非细胞穿透蛋白是第一抗体,所述第一接头是共价接头,所述第二非细胞穿透蛋白是第二抗体,所述第二接头包含第二生物素结合结构域和第二生物素结构域,其中所述第二生物素结合结构域是亲和素结构域。在另一个实施方案中,第一抗体是抗STAT3抗体,第二抗体是抗NFkB抗体。在另一个实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。

[0153] 在一个实施方案中,第一非细胞穿透蛋白是第一抗体,第一接头包含第一生物素结合结构域和第一生物素结构域,其中所述第一生物素结合结构域是亲和素结构域,第二非细胞穿透蛋白是第二抗体,第二接头是共价接头。在另一个实施方案中,第一抗体是抗STAT3抗体,第二抗体是抗NFkB抗体。在另一个实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。

[0154] 在一个实施方案中,第一非细胞穿透蛋白是第一抗体,第一接头是共价接头,第二非细胞穿透蛋白是第二抗体,第二接头是共价接头。在另一个实施方案中,第一抗体是抗STAT3抗体,第二抗体是抗NFkB抗体。在另一个实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。

[0155] 在一个实施方案中,第一非细胞穿透蛋白是第一抗体,第一接头包含第一生物素结合结构域和第一生物素结构域,其中所述第一生物素结合结构域是亲和素结构域,第二非细胞穿透蛋白是第二抗体,第二接头包含第二生物素结合结构域和第二生物素结构域,其中所述第二生物素结合结构域是亲和素结构域。在另一个实施方案中,第一抗体是抗CTLA-4抗体,第二抗体是抗FOXP3抗体。在另一个实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。

[0156] 在一个实施方案中,所述第一非细胞穿透蛋白是第一抗体,所述第一接头是共价接头,所述第二非细胞穿透蛋白是第二抗体,所述第二接头包含第二生物素结合结构域和第二生物素结构域,其中所述第二生物素结合结构域是亲和素结构域。在另一个实施方案中,第一抗体是抗CTLA-4抗体,第二抗体是抗FOXP3抗体。在另一个实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。

[0157] 在一个实施方案中,第一非细胞穿透蛋白是第一抗体,第一接头包含第一生物素结合结构域和第一生物素结构域,其中所述第一生物素结合结构域是亲和素结构域,第二非细胞穿透蛋白是第二抗体,第二接头是共价接头。在另一个实施方案中,第一抗体是抗CTLA-4抗体,第二抗体是抗FOXP3抗体。在另一个实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。

[0158] 在一个实施方案中,第一非细胞穿透蛋白是第一抗体,第一接头是共价接头,第二非细胞穿透蛋白是第二抗体,第二接头是共价接头。在另一个实施方案中,第一抗体是抗

CTLA-4抗体,第二抗体是抗FOXP3抗体。在另一个实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。

[0159] 在实施方案中,硫代磷酸核酸是单链核酸。在实施方案中,硫代磷酸核酸是双链核酸。当硫代磷酸核酸是双链核酸时,硫代磷酸核酸包括与第二硫代磷酸核酸杂交的第一硫代磷酸核酸,第一硫代磷酸核酸连接第一非细胞穿透蛋白,第二硫代磷酸核酸连接第二非细胞穿透蛋白。在实施方案中,第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸互补。第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸的互补核酸具有至少50%的序列相同性。第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸的互补核酸具有大约50%的序列相同性。第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸的互补核酸具有至少60%的序列相同性。第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸的互补核酸具有至少70%的序列相同性。第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸的互补核酸具有至少80%的序列相同性。第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸的互补核酸具有至少90%的序列相同性。第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸的互补核酸具有至少95%的序列相同性。第一硫代磷酸核酸与第二硫代磷酸核酸的互补核酸具有至少98%的序列相同性。

[0160] 在实施方案中,硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架的长度为约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个核酸残基。在实施方案中,硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架的长度为大约10-30个核酸残基。在实施方案中,硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架的长度为大约20个核酸残基。在实施方案中,每个核酸或聚合物骨架的长度可以是至少大约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个核酸残基或者糖残基。在实施方案中,每个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架独立地长度为5-50、10-50、15-50、20-50、25-50、30-50、35-50、40-50、45-50、5-75、10-75、15-75、20-75、25-75、30-75、35-75、40-75、45-75、50-75、55-75、60-75、65-75、70-75、5-100、10-100、15-100、20-100、25-100、30-100、35-100、40-100、45-100、50-100、55-100、60-100、65-100、70-100、75-100、80-100、85-100、90-100、95-100或者更多残基。在实施方案中,每个硫代磷酸核酸或者硫代磷酸聚合物骨架的长度独立地为10-15、10-20、10-30、10-40或者10-50个残基。

[0161] 在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白独立地具有大于25kD的分子量。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白独立地具有约25kD-750kD的分子量。因此,第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白独立地具有如下所示分子量:至少大约25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、505、510、515、520、525、530、535、540、545、550、555、560、565、570、575、580、585、590、595、600、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750或更多千道尔顿(kD)。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白独立地具有如下范围的分子量:至少

大约25-100kD、至少大约25-150kD、至少大约25-200kD、至少大约2-250kD、至少大约25-300kD、至少大约25-350kD、至少大约25-400kD、至少大约25-450kD、至少大约25-500kD、至少大约25-550kD、至少大约25-600kD、至少大约25-650kD、至少大约25-700kD或者至少大约25-750kD。

[0162] 在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白独立地是抗体。如上面更详细讨论的,抗体可以是全长抗体,例如IgG、IgA、IgM、IgD或IgE抗体或其片段。在实施方案中,抗体是IgG抗体或其片段。在实施方案中,抗体是IgG抗体或其片段。在实施方案中,抗体是scFv片段或人源化抗体。在实施方案中,抗体是IgA、IgM、IgD或IgE抗体。在实施方案中,抗体是scFv片段。在实施方案中,抗体是人源化抗体。因此,本发明提供了通过硫代磷酸核酸连接的第一抗体和第二抗体,其中硫代磷酸核酸增强了第一抗体和第二抗体向细胞的输送。在实施方案中,第一抗体或第二抗体是治疗性抗体,即用于治疗疾病的抗体。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白(例如抗体)或第二非细胞穿透蛋白(例如抗体)结合细胞内靶。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白(例如抗体)和第二非细胞穿透蛋白(例如抗体)结合细胞内靶。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白相对于第二非细胞穿透蛋白结合不同的细胞内靶位。因此,在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白结合第一细胞内靶,第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶。在实施方案中,第一细胞内靶是信号传导分子(例如STAT3蛋白)。在实施方案中,第二细胞内靶是转录因子(例如NFkB蛋白)。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白相对于第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶上的不同表位。

[0163] 细胞内靶可以是治疗靶或诊断靶或位于细胞内的感兴趣的其它靶,例如待通过例如共焦显微镜成像的靶或结构,如组蛋白。因此,本发明提供了与细胞内靶结合的细胞穿透缀合物。在实施方案中,细胞内靶是选自下组的疾病的靶:自身免疫性疾病,炎症性疾病,代谢性疾病,发育性疾病,心血管疾病,肝脏疾病,肠道疾病,感染性疾病,内分泌疾病,神经紊乱和癌症。细胞内靶的实例包括但不限于致癌转录因子,包括但不限于STAT3、Myc、NFkB、AP1、HIF、突变体p53;癌蛋白,包括但不限于Ras、Raf、MAPK、PI3激酶、AKT、BTK、JAKs、SRC家族成员;免疫调节分子,包括FOXp3、T-BET、GATA3、STAT1、2、3、4、5、6。疾病的靶可以是诊断靶或治疗靶或与疾病相关的其它感兴趣的靶。示例的癌症的细胞内的靶包括但不限于STAT(例如STAT3)、NFkB、PKB/Akt、Myc家族成员、类固醇激素受体(例如雌激素受体)、类固醇激素受体的配体(例如细胞周期蛋白D1)、受体酪氨酸激酶(RTKs)、EGFR、VEGFR、PDGFR、Src家族成员、Ras、Ab1、BCR-Ab1、NPM-Alk、Janus激酶(JAK)、Bruton酪氨酸激酶(BTK)和病毒癌蛋白(例如EBV蛋白或HPV蛋白,例如E6和E7)。在实施方案中,感染性疾病的细胞内的靶是病毒蛋白或病毒转录物。因此,细胞内靶可以是人类免疫缺陷病毒(HIV)、流感病毒、单纯疱疹病毒、EB病毒、巨细胞病毒、人乳头瘤病毒或肝炎病毒的病毒蛋白或病毒转录物。在实施方案中,细胞内靶是DNA结合蛋白,包括但不限于转录因子、转录增强子、转录阻遏蛋白、组蛋白或翻译后修饰的组蛋白。在实施方案中,细胞内靶是表观遗传修饰的DNA,例如甲基化或羟甲基化胞嘧啶(5mC或5hmC)、5-甲酰基胞嘧啶(5fC)和5-羧基胞嘧啶(5caC)。在实施方案中,细胞内靶是核酸,例如RNA转录物或核酸。例如,细胞内靶可以是感染性病原体,例如寄生虫、病毒或细菌的核酸。

[0164] 在实施方案中,细胞内靶是信号传导分子或转录因子。在实施方案中,信号传导分子是磷酸酶或激酶。在实施方案中,转录因子是活化的B细胞的核因子 κ -轻链增强子(NFkB)

蛋白。在实施方案中，NFκB蛋白是p65。在实施方案中，第一非细胞穿透蛋白结合STAT3蛋白，第二非细胞穿透蛋白结合NFκB蛋白。在实施方案中，细胞内靶位是癌症靶位或位于癌细胞内。在实施方案中，细胞内靶是STAT蛋白，例如STAT3或输出蛋白7。在实施方案中，细胞内靶选自STAT3、NFκB和Src。在实施方案中，细胞内靶是STAT3。在实施方案中，细胞内靶位是NFκB。在实施方案中，非细胞穿透蛋白进一步包括连接蛋白质的标记、小分子或功能性核酸。在实施方案中，细胞穿透缀合物结合细胞内靶。

[0165] • 细胞组合物

[0166] 另一方面，提供包含本文提供的细胞穿透缀合物及其实施方案的细胞。提供包含一或多种所提供的细胞穿透缀合物的细胞，例如细胞可包含多种细胞穿透缀合物。在实施方案中，缀合物在细胞内结合细胞内靶。例如，细胞可以包含通过硫代磷酸核酸或聚合物骨架连接的第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白。第一和第二非细胞穿透蛋白可以在细胞内结合细胞内靶。在实施方案中，第二非细胞穿透蛋白相对于第一非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位上的不同表位。在实施方案中，第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶。在实施方案中，第一和/或第二非细胞穿透蛋白是抗体。因此，第一和第二非细胞穿透蛋白可以是相同的蛋白质或不同的蛋白质。

[0167] • 药物组合物

[0168] 本文提供药物组合物，其包含本文提供的细胞穿透缀合物包括其实施方案以及药物可接受的载体。所提供的组合物尤其适用于体外或体内的配制和施用。合适的载体和赋形剂及其配制在Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005) 中描述。药物可接受的载体是指不是生物学或其它方面不希望的材料，即将材料施用给对象而不引起不希望的生物学效应或以不利方式与包含其的药物组合物中其它组分相互作用。如果给对象施用，则任选择载体以使活性成分的降解最小化及使对象中的不利副作用最小化。

[0169] 本发明提供的药物组合物包括这样的组合物，其中包含治疗有效量的活性成分（例如本文所述的组合物，包括实施方案或实施例），有效实现其预期目的的量。对于特定应用有效的实际数量取决于被治疗的病症等。当以治疗疾病的方法施用时，本文所述重组蛋白含有有效获得所需结果的量的活性成分，例如调节靶分子的活性，和/或减少、消除或减缓疾病症状进展。确定本发明化合物的治疗有效量完全在本领域技术人员的能力范围内，特别是根据本文的详细揭示内容。

[0170] 另一方面，本文提供了药物组合物，其包含本文提供的细胞穿透缀合物包括其实施方案及药物可接受的载体。在实施方案中，第一非细胞穿透蛋白或第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。在实施方案中，第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。在实施方案中，第二非细胞穿透蛋白相对于第一非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位上的不同表位。在实施方案中，第一非细胞穿透蛋白结合第一细胞内靶位。在实施方案中，第一非细胞穿透蛋白是抗体。在实施方案中，第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶位。在实施方案中，第二非细胞穿透蛋白是抗体。第一和第二非细胞穿透蛋白可以是相同的蛋白质或不同的蛋白质。

[0171] 用于施用的组合物通常包含溶解于药物可接受的载体，优选水性载体中的如本文所述物质。可以使用各种水性载体，例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的及通常没有不希望

的物质。这些组合物可以通过常规熟知的灭菌技术灭菌。所述组合物可以根据需要包含药物可接受的辅助物质以接近生理条件,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些配制物中活性剂的浓度可以变化很大,根据所选的特定给药模式和对象的需要主要基于液体体积、粘度、体重等加以选择。

[0172] 作为游离碱或药物可接受的盐存在的活性化合物的溶液可以在与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合的水中制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制剂可含有防腐剂以防止微生物生长。

[0173] 药物组合物可通过鼻内或可吸入溶液或喷雾剂、气雾剂或吸入剂输送。鼻腔用溶液可以是设计成以滴剂或喷雾剂施用于鼻道的水性溶液。可以制备这样的鼻腔用溶液,使其在许多方面与鼻腔分泌物相似。因此,水相鼻腔用溶液通常是等渗的,且略微缓冲以保持pH5.5-6.5的。另外,如果需要,配制物中可包含与在眼用制剂中相似的抗微生物防腐剂及适当的药物稳定剂中使用的防腐剂。已知各种商业鼻用制剂,可包括例如抗生素和抗组胺剂。

[0174] 口服配制物可以包括赋形剂,例如药物级别的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释配制物或粉剂的形式。在一些实施方案中,口服药物组合物包含惰性稀释剂或可吸收的可食用载体,或者其可以封装在硬或软壳明胶胶囊中,或者其可以被压制成片剂,或者其可以直接掺入饮食食物中。对于口服治疗性施用,活性化合物可以与赋形剂混合并以可摄取的片剂、口腔片剂、锭剂、胶囊、酏剂、混悬剂、糖浆、薄片等形式使用。这种组合物和制备物应含有至少0.1%的活性化合物。当然,组合物和制备物的百分比可以变化,并且可以方便地在单位重量的约2%-75%之间,或者优选在25%-60%之间。这种组合物中的活性化合物的量是由此可以获得合适剂量的量。

[0175] 例如,对于在水溶液中的肠胃外施用,溶液应适当地缓冲且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。水溶液、特别是无菌水相介质特别适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内给药。例如,可以将一个剂量溶解于1ml等渗NaCl溶液中,且可以加入1000ml皮下灌注液中,或者在建议的输注位置注射。

[0176] 无菌注射溶液可以通过将活性化合物或构建物以需要量掺入合适溶剂中,然后过滤灭菌制备。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入含有基本分散介质的无菌载体中制备分散液。真空干燥和冷冻干燥技术(其产生活性成分加任何其它所需成分的粉末)可用于制备重建无菌注射溶液的无菌粉末。还设想了用于直接注射的更浓缩或高度浓缩溶液的制备。DMSO可以用作溶剂以极快速穿透、输送高浓度活性剂至较小区域。

[0177] 化合物的配制物可以存在于单位剂量或多剂量密封的容器如安瓿和小瓶中。因此,组合物可以是单位剂量形式。以这种形式将制备物再分为含有适量活性成分的单位剂量。因此,取决于施用方法,组合物可以以多个单位剂量形式施用。例如,适于口服的单位剂型包括但不限于粉末、片剂、丸剂、胶囊和锭剂。

[0178] 给哺乳动物施用的剂量和频率(单剂量或多剂量)可以根据多种因素而变化,例如所述哺乳动物是否患有其它疾病及其给药途径;接受体的大小、年龄、性别、健康状况、体重、体质指数和饮食;所治疗疾病症状的性质和程度(例如癌症症状和这些症状的严重程度),同时治疗的种类,所治疗疾病的并发症或其它健康相关问题。其它治疗方案或制剂可

以与本发明的方法和化合物联合使用。已确立的剂量的调整和操作(例如频率和持续时间)完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0179] 对于本文所述的任何组合物(例如提供的细胞穿透缀合物),治疗有效量可以首先从细胞培养测定中确定。如使用本文所述或本领域已知的方法所测量的,靶浓度将是能够实现本文所述方法的那些活性化合物浓度。如本领域熟知,用于人体的有效量也可以由动物模型确定。例如,可以配制人用剂量以达到已经发现在动物中有效的浓度。如上所述,人体剂量可以通过监测有效性及向上或向下调整剂量而调整。基于上述方法和其它方法调整剂量以达到在人体中最大效力在本领域技术人员的能力范围内。

[0180] 剂量可根据患者的需求和使用的化合物而变化。在本发明中给患者施用的剂量应该足以在患者中随着时间引起有益治疗反应。剂量的大小还取决于任何不良副作用的存在、性质和程度。特定情况下的适当剂量的确定在医师的技能范围内。通常,以小于化合物最佳剂量的较小剂量开始治疗。此后,剂量以小增量增加直至达到最佳效果。

[0181] 可以单独调整剂量和时间间隔以提供对正在治疗的特定临床指征有效的化合物施用水平。这将提供与个体疾病状态的严重程度相称的治疗方案。

[0182] 利用本发明提供的教导,可以计划有效的预防性或治疗性处理方案,其不会引起实质毒性,并且对于治疗特定患者所表现的临床症状是有效的。这个计划应包括考虑如化合物效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的存在和严重程度等因素仔细选择活性化合物。

[0183] “药物可接受的赋形剂”和“药物可接受的载体”是指有助于给对象施用活性剂并由对象吸收以及可以包含在本发明的组合物中而不会对患者产生显著的不利毒理学作用的物质。药物可接受的赋形剂的非限制性实例包括水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸林格氏液,正常蔗糖、正常葡萄糖、粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、香料、盐溶液(例如林格溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物如乳糖、直链淀粉或淀粉、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷和色素等。这样的制备物可以灭菌,及如果需要则与辅助剂如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲液、着色剂和/或芳香物质等混合,其与本发明的化合物非毒性反应。本领域技术人员将认识到其它药物赋形剂可用于本发明。

[0184] 术语“药物可接受的盐”是指衍生自本领域熟知的各种有机和无机抗衡离子的盐,包括例如钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等;及当分子含有碱性官能团时,该术语包括有机或无机酸的盐如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等。

[0185] 术语“制剂”是指包括活性化合物与作为提供胶囊的载体的成胶囊材料的配制物,其中具有或不具有其它载体的活性成分被载体围绕,因此与其结合。相似地还包括扁囊剂和锭剂。片剂、散剂、胶囊剂、丸剂、扁囊剂和锭剂可以用作适于口服给药的固体剂型。

[0186] • 形成缀合物的方法

[0187] 另一方面,本发明提供了形成细胞穿透缀合物的方法。所述方法包括使连接第一非细胞穿透蛋白的第一硫代磷酸核酸与连接第二非细胞穿透蛋白的第二硫代磷酸核酸杂交,由此形成细胞穿透缀合物。在实施方案中,硫代磷酸核酸共价连接第一或第二硫代磷酸核酸。在实施方案中,硫代磷酸核酸非共价连接第一或第二硫代磷酸核酸。在实施方案中,硫代磷酸核酸通过非共价接头连接第一或第二硫代磷酸核酸。在实施方案中,硫代磷酸核酸包括共价反应性部分。在实施方案中,所述方法包括在杂交之前:(i)使第一非细胞穿透

蛋白与第一硫代磷酸核酸接触,从而形成第一蛋白质-硫代磷酸核酸复合物。使第二非细胞穿透蛋白与第二硫代磷酸核酸接触,从而形成第二蛋白质-硫代磷酸核酸复合物。将第一蛋白质硫代磷酸核酸复合物和第二蛋白质硫代磷酸核酸复合物进行接触。

[0188] • 输送方法

[0189] 另一方面,本发明提供了将本文提供的非细胞穿透蛋白包括其实施方案的输送至细胞中的方法。在实施方案中,非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白质,从而形成第一非细胞穿透性蛋白质-核蛋白质复合物。在实施方案中,非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白质,由此形成第二非细胞穿透蛋白-核蛋白质复合物。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白-核蛋白质复合物和第二非细胞穿透蛋白-核蛋白质复合物不能够进入细胞的细胞核。

[0190] 在实施方案中,细胞穿透缀合物用于诊断对象中的疾病。因此,提供了诊断对象中的疾病的方法,包括给对象施用有效量的本文所述细胞穿透缀合物或的包含细胞穿透缀合物的组合物。施用所述缀合物可以诊断对象中的疾病或者疾病的一或多个症状。所公开的方法包括比较来自测试样品与来自对样品生物标志物例如疾病的细胞内靶位的水平或活性。如上所述,对样品或对照值是指用作参考的样品,通常是已知的参考,用于与测试样品进行比较。对照还可以得自具有相似医学背景、相同年龄、体重等一群相似个体例如癌症患者或健康个体的平均值。对照值也可以得自同一个体,例如得自较早获得的样本、疾病之前或治疗之前。也如上所述,诊断是指疾病(例如自身免疫性疾病、炎症性自身免疫性疾病、癌症、感染性疾病、免疫疾病或其它疾病)在对象中存在的相对概率。

[0191] 关于疾病风险因子的确定所用术语对比、关联和相关是指将个体中的风险因子(例如疾病的细胞内靶位的量)的存在或量与已知患有疾病或者已知处于疾病风险中或者已知没有疾病的个体中的其存在或量进行对比,并基于化验结果指定个体患病/发生所述疾病的概率的增加或减少。

[0192] • 检测方法

[0193] 本文还提供检测细胞中的细胞内靶位的方法,包括将细胞与本文提供的细胞穿透缀合物包括其实施方案接触并检测细胞穿透缀合物与细胞内靶位的结合。如上所述,细胞穿透缀合物可以结合细胞内靶或两个细胞内靶,其中两个细胞内靶可以独立地不同。细胞可以是固定细胞或活细胞。在实施方案中,细胞位于体外或体内。结合可以直接或间接检测。在本发明应理解和预期可以使用多种方法检测细胞穿透缀合物与其细胞内靶位的结合。例如,可以通过测定细胞穿透缀合物与其细胞内靶位之间的结合直接检测所述结合。例如,可以如下所述通过选择选自免疫共沉淀测定、共定位测定或荧光偏振测定的测定法确定结合。所述测定为本领域已知,见例如Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Dickson, *Methods Mol. Biol.* 461:735-44 (2008); Nickels, *Methods* 47(1):53-62 (2009); and Zinchuk et al., *Acta Histochem. Cytochem.* 40(4):101-11 (2007) 所述。

[0194] 在实施方案中,结合是通过成像方法或系统确定的。因此,本文提供的细胞穿透缀合物包括其实施方案也可用于成像应用或其它分析细胞内靶位水平和/或活性的应用中。例如,所提供的细胞穿透缀合物可以用于感兴趣的细胞内靶位的体外或体内成像。在实施方案中,细胞穿透缀合物用于活细胞成像。例如,活细胞成像可用于监测活细胞内部的细胞内靶位分布和/或动力学,且也适用于监测靶位相互作用。例如,细胞穿透缀合物可用于免

疫沉淀和共免疫沉淀测定以研究细胞中的蛋白质-蛋白质相互作用。在实施方案中,是在活细胞中。在实施方案中,细胞穿透缀合物用于通过流式细胞术分析细胞内靶位。在成像应用中,细胞穿透缀合物被标记以适合应用。如上所述,标记或可检测部分是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组合物。可用的标记包括但不限于³²P、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如在ELISA中常用的酶)、生物素、地高辛或半抗原和蛋白质或其它可以被检测的实体,例如通过将放射性标记掺入与靶肽特异性反应的肽或抗体中。可以使用将抗体与标记缀合的任何本领域已知方法,例如使用Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego中所述方法。

[0195] • 治疗方法

[0196] 本文提供的细胞穿透缀合物,包括其实施方案以及如本文所述的包含细胞穿透缀合物的组合物,包括其实施方案可用于预防性和治疗性处理。对于预防性使用,在早期发作之前或期间(例如自身免疫性疾病的初始体征和症状时)给对象施用治疗有效量的本发明所述制剂。治疗性处理包括在诊断或疾病发生后给对象施用治疗有效量的本发明所述制剂。因此,另一方面,提供治疗有需要的对象的疾病的方法。所述方法包括给对象施用有效量的本发明提供的细胞穿透缀合物包括其实施方案,从而治疗对象中疾病。

[0197] 在实施方案中,第一和第二非细胞穿透蛋白是抗体。在实施方案中,所述疾病选自自身免疫性疾病、发育紊乱、炎症疾病、代谢紊乱、心血管疾病、肝脏疾病、肠道疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经紊乱和癌症。实施方案中,该疾病是自身免疫性疾病。在实施方案中,疾病是发育紊乱。在实施方案中,疾病是炎症疾病。在实施方案中,疾病是代谢紊乱。在实施方案中,疾病是心血管疾病。在实施方案中,疾病是肝脏疾病。在实施方案中,疾病是肠道疾病。在实施方案中,疾病是感染性疾病。在实施方案中,疾病是内分泌疾病。在实施方案中,疾病是神经紊乱。在实施方案中,疾病是癌症。在实施方案中,癌症是淋巴瘤。在实施方案中,癌症是黑素瘤。

[0198] 在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白或第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合不同的细胞内靶位。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白相对于第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位上的不同表位。在实施方案中,细胞内靶位是STAT3、NFκB蛋白或Src。在实施方案中,细胞内靶位是p65。在实施方案中,细胞内靶位是STAT3。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白结合STAT3,第二非细胞穿透蛋白结合NFκB蛋白。在实施方案中,缀合物的第一非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3的抗体,第二非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3的另一个表位的抗体。

[0199] 在所提供的治疗方法中,可以使用适合于所治疗的疾病的另外的治疗剂。因此,在一些实施方案中,提供的治疗方法进一步包括给对象施用第二治疗剂。合适的另外的治疗剂包括但不限于治疗剂选自镇痛剂、麻醉剂、兴奋剂、皮质类固醇、抗胆碱能剂、抗胆碱酯酶、抗惊厥剂、抗肿瘤剂、变构抑制剂、合成代谢类固醇、抗风湿剂、精神治疗剂、神经阻断剂、抗炎剂、抗寄生虫剂、抗生素、抗凝剂、抗真菌剂、抗组胺剂、抗毒蕈碱剂、抗分支杆菌剂、抗原生动物剂、抗病毒剂、多巴胺能药、血液制剂、免疫制剂、毒蕈碱制剂、蛋白酶抑制剂、维生素、生长因子和激素。基于所治疗的指定疾病,本领域技术人员可以容易地确定药物和剂量的选择。

[0200] 物质或组合物的组合可以并存(例如作为混合物)、单独但同时(例如通过单独的静脉内施用通道)或相继(例如首先施用一种制剂,然后施用第二种制剂)施用。因此,术语组合是指并存、同时或相继施用两种或更多种制剂或组合物。治疗过程最好根据对象的特殊性质和选择的治疗类型基于个体确定。可以每日一次、每日两次、每两周一次、每月一次或任何适用的治疗有效方式给对象施用治疗,如本文所公开的治疗。所述治疗可以单独施用或与本方面揭示的或本领域已知的任何其它治疗组合施用。另外的治疗可以与第一次治疗同时、在不同的时间或完全不同的治疗时间表施用(例如第一种治疗可以是每天一次,而另外的治疗是每周一次)。

[0201] 根据本文提供的方法,给对象施用有效量的一或多种本发明提供的制剂。术语有效量和有效剂量可互换使用。术语有效量被定义为产生所需生理反应(例如炎症减轻)需要的任何量。本领域技术人员可凭经验确定施用所述制剂的有效量和时间表。施用的剂量范围足够大以产生其中疾病或病症的一或多个症状受到影响(例如减少或延迟)的希望效果。剂量不应太大以致引起明显的不利副作用,例如不希望的交叉反应、过敏反应等。通常,剂量将随着年龄、病情、性别、疾病类型、疾病或病症程度、施用途径或其它药物是否包括在方案中而变化,可以由本领域技术人员确定。在有任何禁忌症的情况中,可由医生个人调整剂量。剂量可以变化,且可以每天一或多次剂量施用,施用一天或数天。关于指定类别药物产品的合适剂量的指导可见于文献中。例如,对于给定的参数,有效量将表现出至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%的增加或降低。功效也可用增加或减少“倍数”表示。例如,与对照相比,治疗有效量可以具有至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更高的作用。精确的剂量和配方将取决于治疗的目的,可以由本领域技术人员使用已知技术来确定(见例如Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols.1-3,1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003), and Pickar, *Dosage Calculations* (1999))。

[0202] 公开了材料、组合物和成分,其可用于所公开的方法和组合物,可与所公开的方法和组合物联合使用,可用于制备所公开的方法和组合物或者是所公开的方法和组合物的产物。这些和其它材料在本文中揭示,且应了解当揭示这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,尽管可能没有明确揭示这些化合物的各个不同个体和集体组合和变换的具体参考,但是每一个均在此特别考虑和描述。例如,如果揭示和讨论了一种方法,及论述了可以许多分子包括方法进行的许多修改,除非特别指明是相反的,则所述方法的每个组合和变换以及可能的修改都被特别考虑。同样,这些的任何子集或组合也被特别考虑和揭示。这个观念适用于本方面的所有方面,包括但不限于使用所公开的组合物和方法中的步骤。因此,如果存在可以进行的各个额外步骤,则应理解这些额外步骤中的每一个均可以用揭示的方法的任何特定方法步骤或方法步骤的组合来进行,每个这样的组合或子集均特别考虑且应组揭示。

[0203] 术语“对象”、“患者”、“个体”等无限制之意,通常可以互换使用。也就是说,被描述为“患者”的个体非必须具有指定疾病,但可以是仅是寻求医疗建议。

[0204] 如本文所用,“治疗”病症、疾病或紊乱或者治疗与病症、疾病或紊乱相关的症状,是指获得有益或期望结果包括临床结果的方法。有益的或期望的临床结果可以包括但不限于

于一或多种症状或病症的减轻或改善,病症、紊乱或疾病程度的减轻,病症、紊乱或疾病状态的稳定,预防病症、紊乱或疾病的发生,预防病症、紊乱或疾病的传播,延迟或减缓病症、紊乱或疾病进展,延迟或减缓病症、失调或疾病发作,改善或减轻病症、紊乱或疾病状态以及缓解,无论是部分或全部。“治疗”还可以指延长对象的生存期超过未经治疗预期的生存期。“治疗”还意味着暂时抑制病症、紊乱或疾病的进展,减缓病症、紊乱或疾病的进展,但是在某些情况下其包括永久地停止病症、紊乱或疾病的进展。如本文所用,术语治疗是指降低特征在于蛋白酶的表达的疾病或病症的一或多个症状或者特征在于蛋白酶表达的疾病或病症的症状的影响的方法。因此,在所揭示的方法中,治疗可以指使已确定的疾病、病症或者疾病或病症的症状的严重度降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。例如,与对照相比,如果对象的疾病的一或多个症状减少10%,则认为治疗疾病的方法是治疗方法。因此,与天然或对照水平相比,所述减少可以是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或者在10%-100%之间的任何百分比。应该理解治疗不一定是指疾病、病症或者疾病或病症的症状的治愈或完全消除。此外,如本文所用,提及降低、减少或者抑制包括与对照水平相比的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的改变,这种术语可包括但不必然包括完全消除。

[0205] 在预期组合治疗的情况下,不希望本文所述的物质(即核糖核酸化合物)受到特定组合性质的限制。例如,本文所述的物质可以作为简单混合物以及化学混合物组合施用。后者的一个例子是所述物质与靶向载体或活性药物共价连接。共价结合可以以许多方式完成,例如但不限于使用可商购的交联剂。

[0206] 如本文所用,术语“药物可接受的”与“生理可接受的”和“药理可接受的”同义使用。药物组合物通常将包含用于储存中缓冲和保存的试剂,及可以包括用于适当输送的缓冲剂和载体,根据施用途而定。

[0207] “有效量”是足以实现指定目的的量(例如达到施用其的效果、治疗疾病、降低酶活性、减少疾病或病症的一种或多种症状)。“有效量”的实例是足以促进治疗、预防或减轻疾病的症状的量,其也可被称为“治疗有效量”。症状(以及该短语的语法等同词)的“减少”意味着症状的严重程度或频率降低或症状消除。药物的“预防有效量”是指当给对象施用时具有预期的预防效果的药物量,例如预防或延迟损伤、疾病、病理或病症的发作(或复发)的药物的量或减少损伤,疾病,病理或病症或其症状发作(或再发)的可能性。通过施用一次剂量不必须发生完全预防效果,并且可能仅在施用一系列剂量后才发生。因此,预防有效量可以在一次或多次施用。如本文所用,“活性降低量”是指相对于不存在拮抗剂而言降低酶或蛋白质活性所需的拮抗剂的量。如本文所用,“功能破坏量”是指相对于不存在拮抗剂而言破坏酶或蛋白质功能所需的拮抗剂的量。可以在文献中找到给定类别的药物产品的适当剂量的指导。例如,对于给定的参数,有效量将表现出增加或者降低至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%。功效也可以“倍数”增加或减少表示。例如,与对照相比,治疗有效量可以具有至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更高的作用。确切的量将取决于治疗的目的,本领域技术人员使用已知技术可以确定(见例如Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols.1-3,1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); 及 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003,

Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins)。

[0208] 如本文所用,术语“施用”是指口服、作为栓剂施用、局部接触、静脉内、腹膜内、肌内、病灶内、鞘内、鼻内或皮下施用,或者植入缓释装置,例如微型渗透泵给对象施用。通过任何途径施用,包括肠胃外和透粘膜施用(例如经口腔、舌下、腭、牙龈、鼻、阴道、直肠或透皮施用)。肠胃外施用包括例如静脉内、肌内、小动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内施用。其它输送模式包括但不限于脂质体制剂的使用、静脉内输注、透皮贴剂等。“共同施用”是指本文所述的组合物在施用一种或多种另外的疗法例如癌症疗法如化学疗法、激素疗法、放射疗法或免疫疗法的同时、之前或之后施用。本发明的化合物可以单独给患者施用或可以共同给患者施用。共同施用是指同时或相继施用单独或组合的化合物(多于一种化合物)。因此,当需要时,所述制剂也可以与其它活性物质(例如降低代谢降解)组合。本发明的组合物可以通过透皮、局部途径输送、配制成涂抹棒、溶液、悬浮液、乳液、凝胶、乳膏、软膏、糊剂、凝胶剂,涂料、粉末和气雾剂形式施用。

[0209] 本发明的组合物可另外包含提供持续释放和/或舒适性的成分。这些成分包括高分子量阴离子类粘液状聚合物、凝胶多糖和细分的药物载体基质。这些成分在美国专利 Nos. 4,911,920; 5,403,841; 5,212,162; and 4,861,760 中跟更详细论述。所述专利出于所有目的以其全部内容并入本文作参考。本发明的组合物也可以作为微球在体内缓释。例如,微球体可通过皮内注射含药微球体而施用,其缓慢地皮下释放(参见 Rao, J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7:623-645, 1995; 作为生物可降解的和可注射的凝胶制剂(见例如 Gao Pharm. Res. 12:857-863, 1995); 或者作为用于口服给药的微球(参见例如 Eyles, J. Pharm. Pharmacol. 49:669-674, 1997)。在实施方案中,本发明组合物的制剂可以通过使用与细胞膜融合或被胞吞的脂质体输送,即通过使用连接脂质体的受体配体进行,其结合细胞的表面膜蛋白受体导致胞吞作用。通过使用脂质体,特别是在脂质体表面携带特异于靶细胞的受体配体、或者优先针对特定器官的情况下,可以将本发明组合物的输送至体内靶细胞中。(参见例如 Al-Muhammed, J. Microencapsul. 13:293-306, 1996; Chonn, Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708, 1995; Ostro, Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587, 1989)。本发明的组合物也可以作为纳米颗粒输送。

[0210] 利用本文提供的教导,可以计划有效的预防或治疗方案,其不会引起实质毒性,并且对于治疗特定患者所表现的临床症状是有效的。通过考虑如化合物效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的存在和严重程度、优选所选制剂的施用模式和毒性情况等因素,这种计划应谨慎选择活性化合物。

[0211] “抗癌剂”按照其普通含义使用,是指具有抗肿瘤性质或者抑制细胞生长或增殖能力的组合物(例如化合物、药物、拮抗剂、抑制剂、调节剂)。在实施方案中,抗癌剂是化学治疗剂。在实施方案中,抗癌剂是本文鉴定的在治疗癌症方法中具有实用性的物质。在实施方案中,抗癌剂是美国FDA或美国以外其它国家的相似管理机构批准用于治疗癌症的物质。

[0212] • 试剂盒

[0213] 另一方面,本文提供试剂盒,其包含本文提供的细胞穿透缀合物包括其实施方案及本发明提供的药物组合物包括其实施方案以及使用说明。在实施方案中,第一非细胞穿透蛋白、第二非细胞穿透蛋白,第一硫代磷酸核酸和第二硫代磷酸核酸处于单独的容器中。在实施方案中,试剂盒包括一或多种用于治疗或预防疾病的一或多种症状的其它制剂。在

实施方案中,试剂盒包括施用组合物的装置,例如注射器、针、管、导管、贴片等。所述试剂盒还可以包括在使用前需要灭菌和/或稀释的制剂和/或材料。

实施例

[0214] 以下实施例描述了通过连接抗体的硫代磷酸化有义/反义DNA寡核苷酸的杂交,产生细胞穿透性双特异性抗体-抗体缀合物,以进行本发明的靶向细胞内抗原及诊断检测/治疗干预。

[0215] 实施例1.通过附着的DNA寡聚物的杂交产生双特异性抗体

[0216] 如下文更详细描述,本方面证实将双链硫代磷酸化DNA寡核苷酸与抗体缀合使得抗体能够穿透细胞、识别并结合细胞内抗原。此外,申请人例证了这种策略能够产生细胞穿透性双特异性抗体,其能够识别并结合两种预期的细胞内靶蛋白。例如,申请人示出将硫代磷酸化DNA寡核苷酸有义和反义地连接抗STAT3和抗NFkB (p65) 抗体,允许选择的核酸序列杂交。杂交程序完成后,通过预期增加的分子量与单一IgG-抗体相比纯化结合的抗体(图1)。

[0217] 通过选择连接两种不同抗体(例如抗NFkB和抗STAT3)的硫代磷酸化有义寡核苷酸和反义寡核苷酸,可以排除抗-STAT3-抗-STAT3或抗-NFkB-抗-NFkB的形成。所得双特异性抗体群是纯双特异性的。通过凝胶过滤排除过量的寡核苷酸和/或抗体蛋白质。

[0218] 值得注意的是,正义和反义DNA寡聚链的杂交产生连接所选抗体的双链(ds)硫代磷酸化DNA寡聚物。DNA寡聚物的硫代磷酸化作为细胞内输送实体。

[0219] 实施例2.通过细胞穿透双特异性抗体识别细胞内抗原STAT3和NFkB (p65)

[0220] 将人淋巴瘤Ly3细胞与用硫代磷酸化单链(ss)DNA寡聚物修饰的针对STAT3或NFkB (p65)产生的单一抗体温育,实现细胞内靶位的识别(图2)。由于NFkB (p65) IgG用硫代磷酸化的有义ssDNA-寡聚物修饰,及STAT3IgG用硫代磷酸化的反义ssDNA-寡聚物修饰,申请人的结论是核酸序列对于细胞内输送不是关键的,所述细胞内输送是识别细胞内抗原的先决条件。

[0221] 然而,将人淋巴瘤Ly3细胞与通过杂交的硫代磷酸化dsDNA寡核苷酸连接在一起的双特异性抗STAT3-抗NFkB (p65)温育,导致细胞内STAT3蛋白和NFkB (p65)蛋白的同时识别。

[0222] 将所有修饰的抗体通过凝胶过滤纯化,并在37°C以10μg/ml在细胞上温育2小时。值得注意的是,10μg所产生的双特异性抗体在10μg时仅具有每种单一抗体的50%,从而导致靶位识别降低,如Western印迹中的检测所示。

[0223] 流式细胞术研究通过修饰的细胞内抗体以及荧光标记的修饰抗体的图像进一步支持细胞穿透(图3)。

[0224] • 实施方案

[0225] 实施方案1:细胞穿透缀合物,其包含连接第一非细胞穿透蛋白与第二蛋白质的硫代磷酸核酸,其中所述硫代磷酸核酸增强所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二蛋白质的细胞内输送。

[0226] 实施方案2:实施方案1的细胞穿透缀合物,其中所述第二蛋白质是第二非细胞穿透蛋白。

[0227] 实施方案3:实施方案1的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸是单链核酸。

[0228] 实施方案4:实施方案1的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸包含与第二硫代磷酸核酸杂交的第一硫代磷酸核酸,所述第一硫代磷酸核酸连接所述第一非细胞穿透蛋白,所述第二硫代磷酸核酸连接所述第二蛋白质。

[0229] 实施方案5:实施方案1-4之一的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸与所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白共价连接。

[0230] 实施方案6:实施方案1-5任一项的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸独立地连接所述第一非细胞穿透蛋白的赖氨酸,精氨酸,半胱氨酸或组氨酸。

[0231] 实施方案7:实施方案6的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸连接所述第一非细胞穿透蛋白的半胱氨酸。

[0232] 实施方案8:实施方案1至7中任一项的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸独立地连接所述第二非细胞穿透蛋白的赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸或组氨酸。

[0233] 实施方案9:实施方案8的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸连接所述第二非细胞穿透蛋白的半胱氨酸。

[0234] 实施方案10:实施方案1或4的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸通过第一接头连接所述第一非细胞穿透蛋白,通过第二接头连接所述第二蛋白。

[0235] 实施方案11:实施方案10的细胞穿透缀合物,其中所述第一接头和所述第二接头独立地是非共价接头。

[0236] 实施方案12:实施方案1-11任一项的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸的长度为约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个核酸残基。

[0237] 实施方案13:实施方案12的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸的长度为大约10-大约30个核酸残基。

[0238] 实施方案14:实施方案13的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸的长度为大约20个核酸残基。

[0239] 实施方案15:实施方案1-14任一项的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白独立地具有大于25kD的分子量。

[0240] 实施方案16:实施方案1-15任一项的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白独立地具有大约25kD-大约750kD的分子量。

[0241] 实施方案17:实施方案1-16任一项的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白独立地是抗体。

[0242] 实施方案18:实施方案17的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是IgG抗体。

[0243] 实施方案19:实施方案17的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是IgA、IgM、IgD或IgE抗体。

[0244] 实施方案20:实施方案17的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是scFv片段。

[0245] 实施方案21:实施方案17-20任一项的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是人源化抗体。

[0246] 实施方案22:实施方案17-20任一项的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是治疗性抗体。

[0247] 实施方案23:实施方案1-22任一项的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白或所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。

[0248] 实施方案24:实施方案23的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。

[0249] 实施方案25:实施方案24的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合不同的细胞内靶位。

[0250] 实施方案26:实施方案24的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位上的不同表位。

[0251] 实施方案27:实施方案23-26任一项的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位选自自身免疫疾病、炎性疾病、代谢紊乱、发育紊乱、心血管疾病、肝脏疾病、肠道疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经紊乱和癌症。

[0252] 实施方案28:实施方案23-27任一项的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是信号传导分子或者转录因子。

[0253] 实施方案29:实施方案28的细胞穿透缀合物,其中所述信号传导分子是磷酸酶或者激酶。

[0254] 实施方案30:实施方案28的细胞穿透缀合物,其中所述转录因子是活化的B细胞的核因子 κ -轻链-增强子(NF κ B)蛋白。

[0255] 实施方案31:实施方案30的细胞穿透缀合物,其中所述NF κ B蛋白是p65。

[0256] 实施方案32:实施方案28-31任一项的细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白结合STAT3蛋白,所述第二非细胞穿透蛋白结合NF κ B蛋白。

[0257] 实施方案33:实施方案23-26任一项的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是癌症靶位。

[0258] 实施方案34:实施方案23-26任一项的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位选自STAT3、NF κ B和Src。

[0259] 实施方案35:实施方案34的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是STAT3。

[0260] 实施方案36:实施方案35的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶位是p65。

[0261] 实施方案37:实施方案1-36任一项细胞穿透缀合物,其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白进一步包含连接所述蛋白的标记、小分子或功能核酸。

[0262] 实施方案38:实施方案1-37任一项的细胞穿透缀合物,与细胞内靶位结合。

[0263] 实施方案39:一种形成细胞穿透缀合物的方法,所述方法包括将连接第一非细胞穿透蛋白的第一硫代磷酸核酸与连接第二非细胞穿透蛋白的第二硫代磷酸核酸杂交,从而形成细胞穿透缀合物。

[0264] 实施方案40:实施方案39的方法,在所述杂交之前进一步包括如下步骤:(i)将所述第一非细胞穿透蛋白与所述第一硫代磷酸核酸接触,由此形成第一蛋白质硫代磷酸核酸复合物;(ii)将所述第二非细胞穿透蛋白与所述第二硫代磷酸核酸接触,由此形成第二蛋白质硫代磷酸核酸复合物;及(iii)使所述第一蛋白质硫代磷酸核酸复合物与所述第二蛋白质硫代磷酸核酸复合物接触。

[0265] 实施方案41:细胞,其包含实施方案1-38任一项的细胞穿透缀合物。

[0266] 实施方案42:药物组合物,其包含实施方案1-38任一项的细胞穿透缀合物及药物可接受的载体。

[0267] 实施方案43:试剂盒,其包含实施方案1-38任一项的细胞穿透缀合物或者实施方

案42的药物组合物及使用说明。

[0268] 实施方案44:实施方案43的试剂盒,其中所述第一非细胞穿透蛋白、所述第二非细胞穿透蛋白、所述第一硫代磷酸核酸和所述第二硫代磷酸核酸处于单独的容器中。

[0269] 实施方案45:一种将非细胞穿透蛋白输送至细胞中的方法,包括将细胞与实施方案1-38任一项的所述细胞穿透缀合物接触。

[0270] 实施方案46:实施方案45的方法,其中所述第一非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白质,从而形成第一非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物。

[0271] 实施方案47:实施方案46的方法,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白质,从而形成第二非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物。

[0272] 实施方案48:实施方案47的方法,其中所述第一非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物和所述第二非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物不能进入细胞的细胞核。

[0273] 实施方案49:一种治疗有需要的对象中的疾病的方法,所述方法包括给对象给患者有效量的实施方案1-38中任一项的细胞穿透缀合物,由此治疗所述对象中的疾病。

[0274] 实施方案50:实施方案49的方法,其中所述疾病选自自身免疫疾病、发育紊乱、炎症性疾病、代谢紊乱、心血管疾病、肝脏疾病、肠道疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经紊乱和癌症。

[0275] 实施方案51:实施方案50的方法,其中所述疾病是癌症。

[0276] 实施方案52:实施方案49的方法,其中所述第一非细胞穿透蛋白或者所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。

[0277] 实施方案53:实施方案52的方法,其中所述第一非细胞穿透蛋白和所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位。

[0278] 实施方案54:实施方案53的方法,其中所述第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合不同的细胞内靶位。

[0279] 实施方案55:实施方案53所述的方法,其中所述第一非细胞穿透蛋白相对于所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶位上的不同表位。

[0280] 实施方案56:实施方案52-55任一项的方法,其中所述细胞内靶位是STAT3、NFκB蛋白或者Src。

[0281] 实施方案57:实施方案56的方法,其中所述细胞内靶位是p65。

[0282] 实施方案58:实施方案57的方法,其中所述细胞内靶位是STAT3。

[0283] 实施方案59.如实施方案52所述的方法,其中所述第一非细胞穿透蛋白结合STAT3,所述第二非细胞穿透蛋白结合NFκB蛋白。

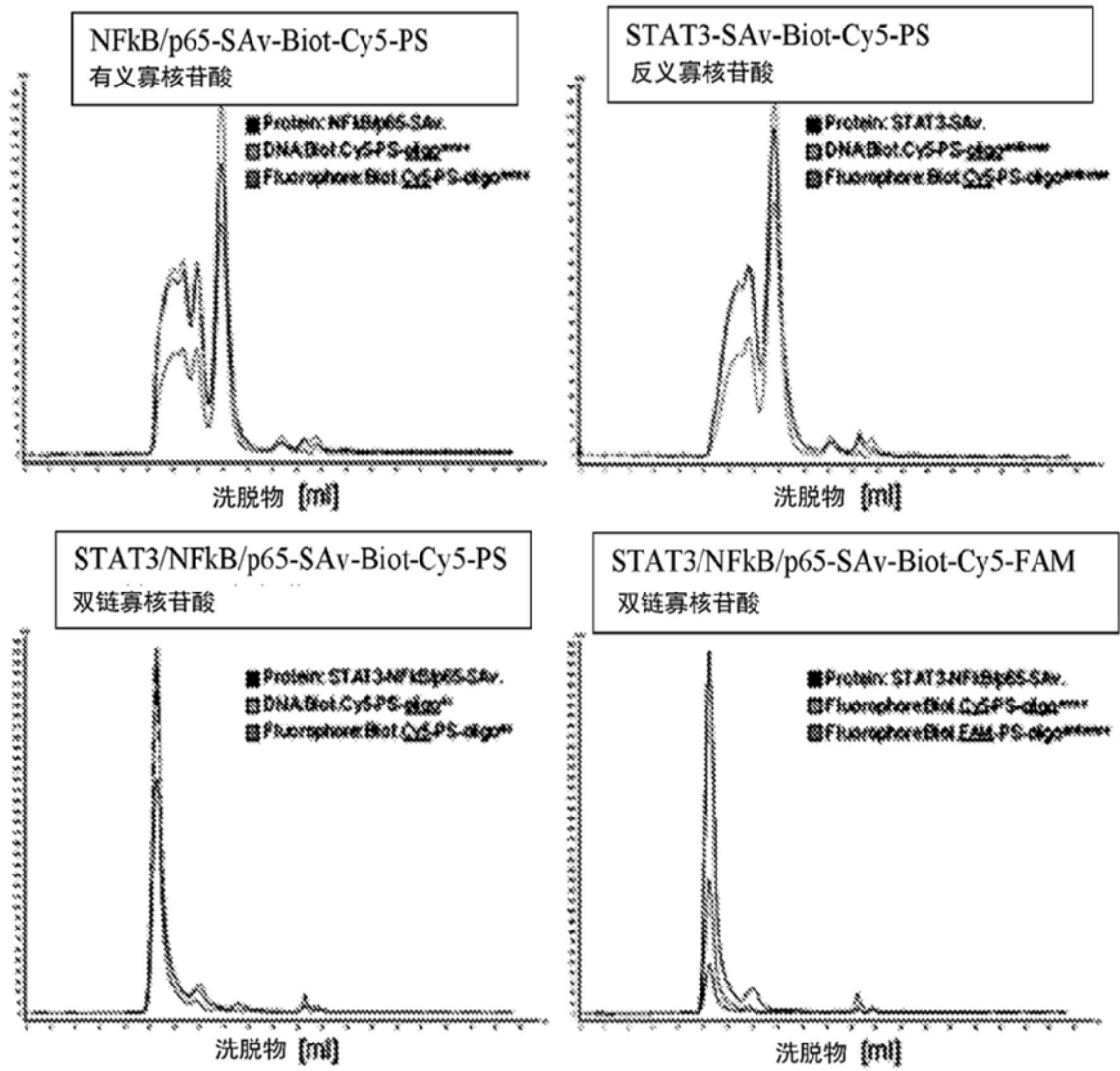


图1

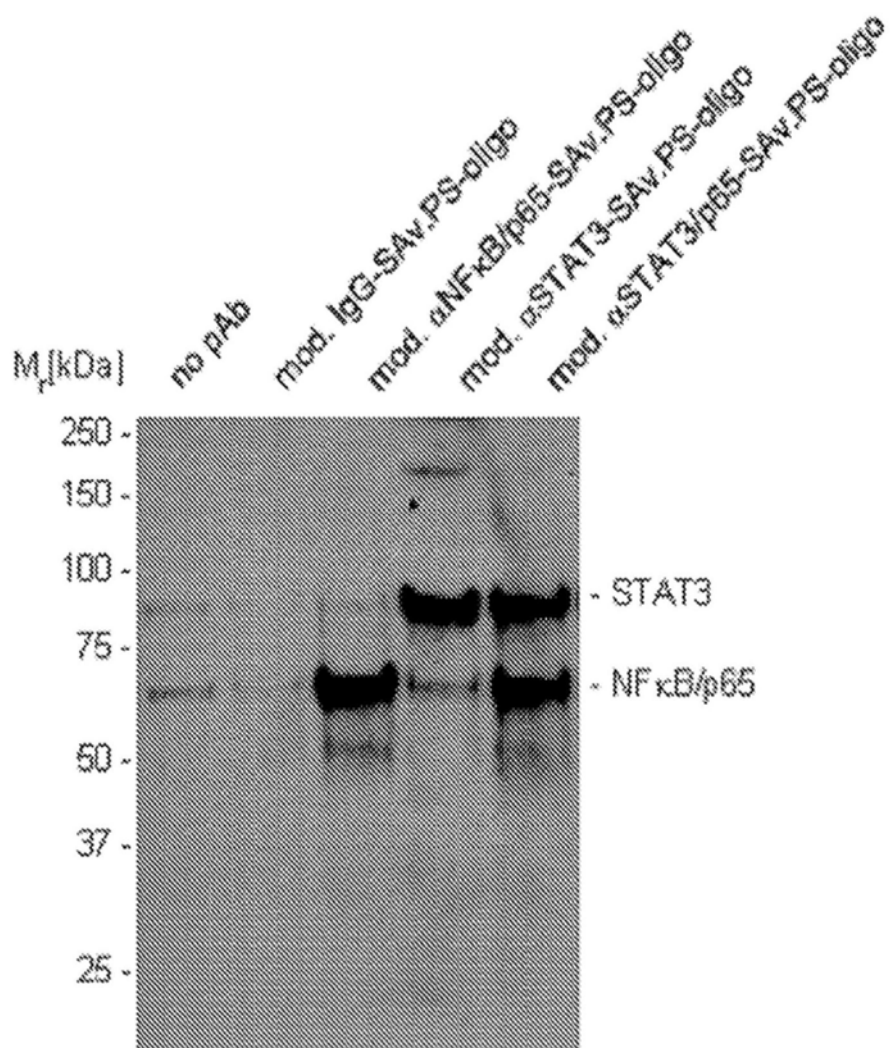


图2

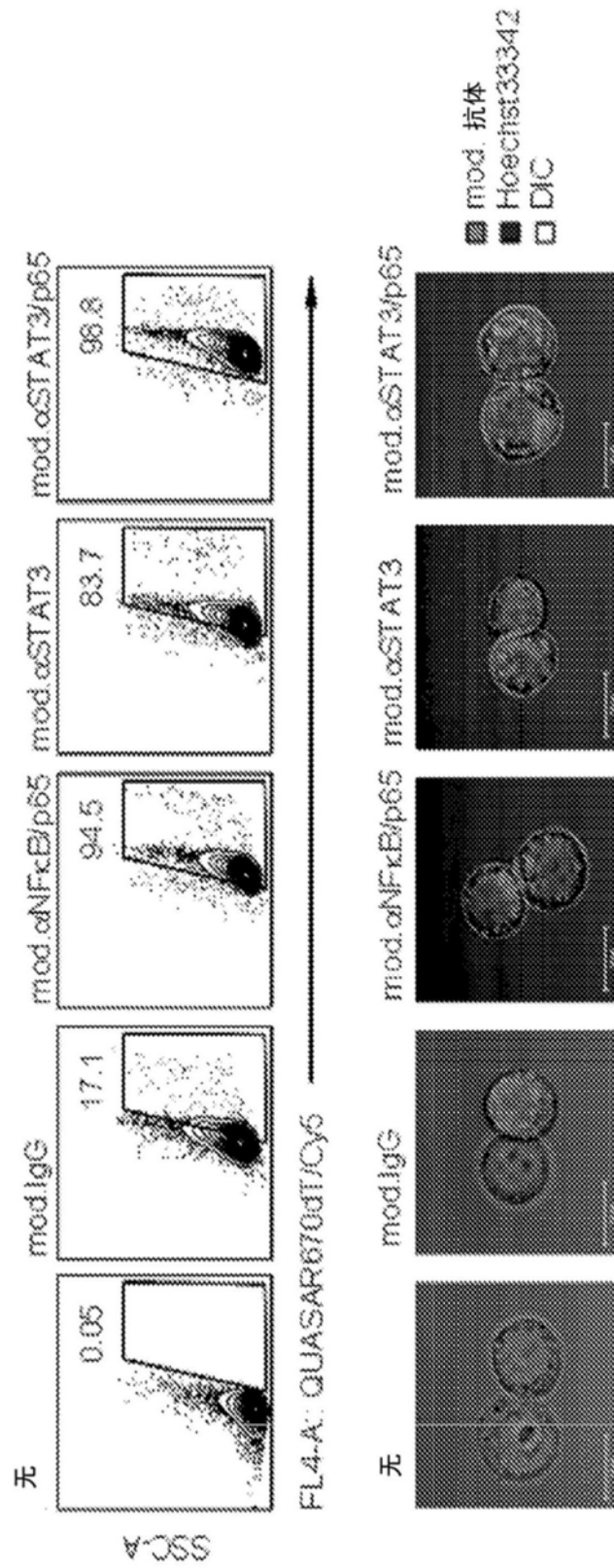


图3

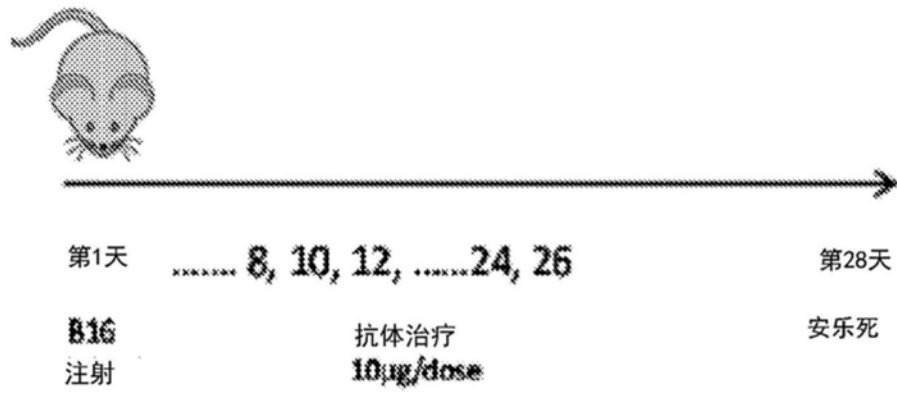


图4A

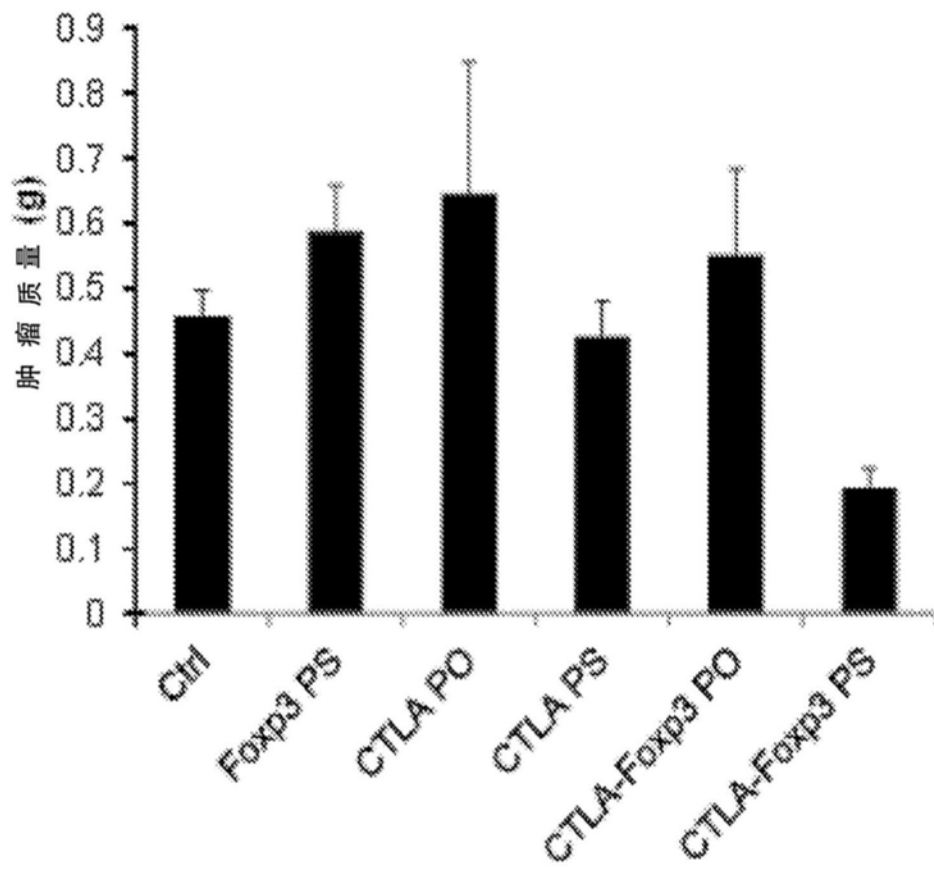


图4B