



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107427550 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 08

(21) 申请号 201680015852.5
(22) 申请日 2016.01.15
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107427550 A
(43) 申请公布日 2017.12.01
(30) 优先权数据
62/104,653 2015.01.16 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.14
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/013668 2016.01.15
(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/115500 EN 2016.07.21
(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 38/14 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61K 39/08 (2006.01)
(56) 对比文件
US 2010239504 A1,2010.09.23
US 2010239504 A1,2010.09.23
US 2011218334 A1,2011.09.08
US 8586708 B2,2013.11.19
RUBEN J. BOADO等.Drug Delivery of
Antisense Molecules to the Brain for
Treatment of Alzheimer's Disease and
Cerebral AIDS.《Journal of Pharmaceutical
Sciences》.1998,第87卷(第11期),
审查员 吴至芳

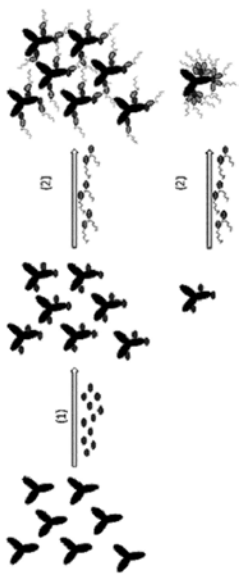
权利要求书3页 说明书40页 附图19页

(54) 发明名称

细胞穿透抗体

(57) 摘要

本文提供了细胞穿透缀合物。所述缀合物包括非细胞穿透蛋白,所述非细胞穿透蛋白通过非共价接头附着至硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架,其中所述非共价接头包括生物素结合结构域和生物素结构域,其中所述硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架增强了非细胞穿透蛋白的细胞内递送。还提供了包含所述缀合物的组合物和试剂盒。



1. 细胞穿透缀合物, 其包含: (i) 非细胞穿透蛋白, 其中所述非细胞穿透蛋白是抗体; (ii) 硫代磷酸核酸; 和 (iii) 将所述硫代磷酸核酸附着至所述非细胞穿透蛋白的非共价接头, 所述非共价接头包含非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域; 其中所述抗体结合细胞内靶标; 和其中所述硫代磷酸核酸长度为10个至30个核酸残基, 且增强所述非细胞穿透蛋白的细胞内递送。

2. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述生物素结合结构域是亲和素结构域。

3. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述生物素结合结构域是链霉亲和素结构域。

4. 权利要求3的细胞穿透缀合物, 其中所述链霉亲和素结构域结合多个生物素结构域。

5. 权利要求4的细胞穿透缀合物, 其中所述链霉亲和素结构域结合4个生物素结构域。

6. 权利要求1-5任一项的细胞穿透缀合物, 其中所述生物素结合结构域共价附着至所述非细胞穿透蛋白。

7. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中多个生物素结合结构域附着至所述非细胞穿透蛋白。

8. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述生物素结构域附着至所述硫代磷酸核酸。

9. 权利要求8的细胞穿透缀合物, 其中所述生物素结构域共价附着至所述硫代磷酸核酸。

10. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中多个硫代磷酸核酸附着至所述生物素结构域。

11. 权利要求1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. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述非细胞穿透蛋白具有超过25 kD的分子量。

13. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述非细胞穿透蛋白具有25 kD至750 kD的分子量。

14. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述抗体是IgG抗体。

15. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述抗体是IgA、IgM、IgD、或IgE抗体。

16. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述抗体是Fv片段。

17. 权利要求16的细胞穿透缀合物, 其中所述抗体是人源化的抗体。

18. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述细胞内靶标是选自以下组的疾病的靶标: 自身免疫疾病、炎症性疾病、代谢失调、发育障碍、心血管疾病、肝病、肠疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经障碍、和癌症。

19. 权利要求18的细胞穿透缀合物, 其中所述细胞内靶标是信号分子或转录因子。

20. 权利要求19的细胞穿透缀合物, 其中所述信号分子是磷酸酶或激酶。

21. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述细胞内靶标是癌症靶标。

22. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述细胞内靶标选自由STAT3、和Src所组成的组。

23. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述细胞内靶标是磷酸化的Src。

24. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述非细胞穿透蛋白还包含附着至所述蛋白的标签、小分子或功能性核酸。

25. 权利要求1的细胞穿透缀合物, 其中所述细胞穿透缀合物结合至细胞内靶标。

26. 形成细胞穿透缀合物的方法, 所述方法包括使非细胞穿透蛋白与硫代磷酸核酸接触, 其中所述非细胞穿透蛋白附着至生物素结合配对的第一成员并且所述硫代磷酸核酸附

着至所述生物素结合配对的第二成员,由此形成包含生物素结构域和生物素结合结构域之间非共价键的细胞穿透缀合物,其中所述非细胞穿透蛋白是抗体,且所述抗体结合细胞内靶标。

27. 权利要求26的方法,其中所述生物素结合配对的所述第一成员是生物素结合结构域。

28. 权利要求26的方法,其中所述生物素结合配对的所述第二成员是生物素结构域。

29. 权利要求26的方法,其中所述生物素结合配对的所述第一成员是生物素结构域。

30. 权利要求26的方法,其中所述生物素结合配对的所述第二成员是生物素结合结构域。

31. 权利要求26的方法,其中所述硫代磷酸核酸包含共价反应性部分。

32. 药物组合物,其包含权利要求1的细胞穿透缀合物和药物可接受的载体。

33. 权利要求32的药物组合物,其还包含含有第二非共价接头的第二非细胞穿透蛋白,其中所述第二非共价接头将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白。

34. 权利要求33的药物组合物,其中所述非共价接头包含非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域。

35. 权利要求33的药物组合物,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标。

36. 权利要求35的药物组合物,其中相对于权利要求1的所述非细胞穿透蛋白而言,所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的不同的表位。

37. 权利要求36的药物组合物,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。

38. 权利要求33-37任一项的药物组合物,其中所述第二非细胞穿透蛋白是抗体。

39. 试剂盒,其包含权利要求1的细胞穿透缀合物或权利要求32的药物组合物以及使用说明。

40. 权利要求39的试剂盒,其还包含含有第二非共价接头的第二非细胞穿透蛋白,其中所述第二非共价接头将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白。

41. 权利要求40的试剂盒,其中权利要求1的所述缀合物和所述第二非细胞穿透蛋白在不同的容器中。

42. 权利要求40或41的试剂盒,其中相对于权利要求1的非细胞穿透蛋白而言,所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的不同的表位。

43. 权利要求40的试剂盒,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。

44. 权利要求40的试剂盒,其中所述第二非细胞穿透蛋白配制为药物组合物,所述药物组合物包含第二非细胞穿透蛋白和药物可接受的载体。

45. 权利要求40的试剂盒,其中所述第二非细胞穿透蛋白是抗体。

46. 权利要求1的所述细胞穿透缀合物在制备通过以下方法将非细胞穿透蛋白递送至细胞内的试剂中的用途,所述方法包括使所述细胞与权利要求1的所述细胞穿透缀合物接触。

47. 权利要求46的用途,其中所述非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白,由此形成非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物。

48. 权利要求47的用途,其中所述非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物不能进入细胞的核内。

49. 权利要求1的细胞穿透缀合物在制备通过以下方法在有需要的对象中治疗疾病的药物组合物中的用途,所述方法包括向对象施用有效量的权利要求1的细胞穿透缀合物。

50. 权利要求49的用途,还包括向所述对象施用包含第二非共价接头的第二非细胞穿透蛋白,其中所述第二非共价接头将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白。

51. 权利要求50的用途,其中所述非共价接头包含非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域。

52. 权利要求51的用途,其中相对于权利要求1-25任一项的缀合物而言,所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的不同的表位。

53. 权利要求52的用途,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。

54. 权利要求50-53任一项的用途,其中权利要求1的所述缀合物与所述第二非细胞穿透蛋白是同时施用的。

55. 权利要求50的用途,其中权利要求1的所述缀合物与所述第二非细胞穿透蛋白是顺次施用的。

56. 权利要求50的用途,其中所述第二非细胞穿透蛋白是抗体。

57. 权利要求50的用途,还包括向所述对象施用第二种治疗剂。

58. 权利要求50的用途,其中所述疾病选自以下组:自身免疫疾病、发育障碍、炎症性疾病、代谢失调、心血管疾病、肝病、肠疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经障碍、和癌症。

59. 权利要求58的用途,其中所述疾病是癌症。

60. 权利要求50的用途,其中所述缀合物的非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标,并且所述细胞内靶标是STAT3或Src。

61. 权利要求50的用途,其中所述缀合物的非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标,并且所述细胞内靶标是磷酸化的Src。

62. 权利要求50的用途,其中所述缀合物的非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3的抗体,并且所述第二非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3另一表位的抗体。

细胞穿透抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年1月16日提交的美国专利申请号62/104,653的优先权,其以整体援引加入本文。

[0003] 对于联邦资助的研发中所得出的发明权利的声明

[0004] 此发明使用了国立卫生研究院(National Institutes of Health)所授予的项目编号CA122976的支持。政府对此发明有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 抗体由于其相对于其它类型的药物(如小分子药物)而言易于产生、特异性和生物持久性,而已经证明为有效的药物形态。目前的抗体治疗仅能够靶向于细胞外分子。然而,许多用于疾病治疗和疾病诊断的重要靶标是细胞内的。例如,许多转录因子,如STAT3,就属于用于癌症治疗的最关键但却具有挑战性的靶标。本文提供了用于本领域中这些和其它需求的解决方案。

[0007] 发明概述

[0008] 在一方面,提供了细胞穿透缀合物。所述细胞穿透缀合物包括(i)非细胞穿透蛋白、(ii)硫代磷酸核酸和(iii)将硫代磷酸核酸附着至所述非细胞穿透蛋白的非共价接头。所述非共价接头包括非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域,并且所述硫代磷酸核酸增强了非细胞穿透蛋白的细胞内递送。

[0009] 在另一方面,提供了形成细胞穿透缀合物的方法。所述方法包括使非细胞穿透蛋白与硫代磷酸核酸接触,其中所述非细胞穿透蛋白附着至生物素结合配对的第一成员并且所述硫代磷酸核酸附着至生物素结合配对的第二成员,由此形成细胞穿透缀合物,其包括生物素结构域和生物素结合结构域之间的非共价键。

[0010] 在另一方面,提供了细胞,其包括本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)。

[0011] 在另一方面,提供了药物组合物,其包括本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)和药物可接受的载体。

[0012] 在另一方面,提供了试剂盒,其包括本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)或者本文所提供的药物组合物(包括其实施方案)以及使用说明。

[0013] 在另一方面,提供了将非细胞穿透蛋白递送至细胞内的方法。所述方法包括使所述细胞与本文所提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)接触。

[0014] 在另一方面,提供了在有需要的对象中治疗疾病的方法。所述方法包括向对象施用有效量的本文所提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案),由此在所述对象中治疗疾病。

[0015] 附图简述

[0016] 图1:缀合方案:亲和素缀合至抗体/肽以及生物素-寡聚物缀合至亲和素。(1) IgG的亲和素化(avidinylation);(2)添加生物素化的递送实体(也即PS-寡聚物)。可以使用链霉亲和素(或亲和素衍生物)来代替亲和素;链霉亲和素提供了接受4个生物素的机会,而亲和素只接受1个生物素。PS,硫代磷酸。

[0017] 图2:纯化方案:亲和素/生物素推动的缀合提高了分子量,使得能够纯化经修饰的抗体。

[0018] 图3:DNA-寡聚物经亲和素-生物素而对抗体蛋白的非共价连接,使得抗体/蛋白能够进行细胞穿透/抗原识别。将人神经胶质瘤U251细胞与抗-STAT3抗体(如所示那样经修饰)以10mg/ml温育1h。制备了全细胞裂解物并清除了细胞碎片,之后添加琼脂糖珠并在4℃摇动下与裂解物温育过夜。蛋白通过SDS-PAGE进行分离,转移至硝酸纤维素膜,并用抗体探测STAT3蛋白。Av,亲和素;SAv,链霉亲和素;B,生物素;PO,磷酸;PS,硫代磷酸。

[0019] 图4A和图4B:对于经生物素-亲和素/链霉亲和素以用于细胞穿透和细胞内靶标识别,抗体蛋白经硫代磷酸化的DNA-寡聚物附着与抗体蛋白经聚乙二醇化的直接对比。DNA-寡聚物经亲和素-生物素而对抗体蛋白的非共价连接优于抗体聚乙二醇化。将人神经胶质瘤U251细胞与抗-STAT3抗体(兔,如所示那样经修饰)以10mg/ml温育1h。图4A,制备了单细胞悬液,并通过由流式细胞术分析的细胞内染色程序来对兔IgG进行了评估。图4B,制备了全细胞裂解物并清除了细胞碎片,之后添加琼脂糖珠并在4℃摇动下与裂解物温育过夜。蛋白通过SDS-PAGE进行分离,转移至硝酸纤维素膜,并探测STAT3蛋白。-PEG,聚乙二醇。

[0020] 图5A和图5B:DNA寡聚物对抗体的非共价连接。非DNA寡聚物的蛋白优于乙烯砜化学推动的共价连接。如所示地将10μg/ml抗体与U251细胞温育1h(A,6孔平板;BC,12孔平板),用PBS洗涤并制备了裂解物;将琼脂糖珠添加至清澈的裂解物并进行了WB。

[0021] 图6:通过链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物的经修饰的抗-STAT3抗体能够进行细胞穿透以及靶标识别。

[0022] 图7A和图7B:通过链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物(20聚体)的经修饰的抗-STAT3抗体在细胞穿透中是最有效的。

[0023] 图8A和图8B:通过链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物(20聚体)的经修饰的抗-STAT3抗体能够进行细胞穿透。

[0024] 图9A和图9B:通过链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物(20聚体)的经修饰的抗-STAT3抗体能够进行细胞穿透。

[0025] 图10:在用经修饰的抗-T-Bet抗体治疗后,小鼠B16黑色素瘤的肿瘤生长。在第0日将 1×10^5 个B16肿瘤细胞皮下注射至C57/BL6小鼠,随后是局部施用载剂(PBS),经修饰的对照(IgG)和T-bet抗体(10ug/剂量),从第7日开始。每隔一天给予抗体治疗。SD已显示;T-检验:***) $P < 0.001$ 。

[0026] 图11:经修饰的T-Bet抗体在肿瘤中增强了表达IFN γ 的CD4⁺和CD8⁺T细胞。通过流式细胞术对B16肿瘤相关的淋巴细胞分析了CTL成熟和Th1群体以及由CD4⁺T细胞对T-bet的表达。

[0027] 图12A和图12B:T-Bet抗体在肿瘤部位促进DC功能。在CD3⁺或CD3⁻肿瘤相关的淋巴细胞(以PBS、未修饰的T-Bet、PO或PS修饰的T-Bet抗体治疗)中T-Bet抗体摄入的流式细胞术分析(图12A),和这些组里的CD11c⁺DC中CD86、MHC II的表达(图12B)。

[0028] 图13:细胞穿透FoxP3抗体的特异性。将10μg/ml经修饰的抗体(同种型或 α Foxp3)与从Foxp3-GFP转基因小鼠新鲜分离的脾细胞(2×10^6 /ml)一起培养2小时,并将所有细胞收集且进行流式细胞术分析。

[0029] 图14:通过细胞穿透抗体靶向FoxP3降低了肿瘤相关的Treg和肿瘤生长。皮下注射

0.2百万的B16肿瘤细胞,随后是一天之后静脉内施用经修饰的对照(IgG)和Foxp3抗体(10ug/小鼠)。每隔一天全身给予另4种抗体的治疗直至第11天(注:在第11天之后不再有治疗)。在第20天将所有动物安乐死并通过梯度离心来分离肿瘤淋巴细胞。继而将肿瘤浸润淋巴细胞固定和透化以用于FoxP3和CTLA4的细胞内染色。

[0030] 发明详述

[0031] 定义

[0032] 在虽然本文中显示了描述的本发明的各个实施方案和方面,但是对于本领域技术人员来说显然此类实施方案和方面仅仅是以实例的方式提供的。本领域技术人员现在将会想到许多的变体、改变、和替换而不偏离本发明。应当理解的是,在本发明的实施中可以使用本文所描述的本发明实施方案的各种变化。

[0033] 本文所使用的章节标题仅仅是用于文字组织的目的,而不应理解为对所描述主体的限制。本申请中引用的所有文献、或文献的部分(包括但不限于专利、专利申请、文章、书、手册、以及专著)在此对于任何目的而言都以其整体援引加入本文。

[0034] 本文所使用的缩写具有其在化学和生物学领域内的常规含义。本文所示的化学结构和化学式根据化学领域内已知的化学价标准规则来理解。

[0035] 除非另有定义,本文所使用的技术和科学术语具有本领域技术人员所通常理解的含义。参见,例如Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY 2nd ed.,J.Wiley&Sons(New York,NY 1994);Sambrook等人,MOLECULAR CLONING,A LABORATORY MANUAL,Cold Springs Harbor Press(Cold Springs Harbor,NY 1989)。与本文所描述的那些类似或等同的方法、设备和材料可以用于本发明的实施。提供以下定义是用于辅助对本文经常使用的某些术语的理解,而不是意味着要对本公开的范围进行限定。

[0036] 本文所使用的“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”或语法上的等同词语是指共价连接在一起的至少两个核苷酸。术语“核酸”是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸以及其聚合物(以单链或双链的形式),或者其互补体。术语“多核苷酸”是指核苷酸的线性序列。术语“核苷酸”通常是指多核苷酸的单一单元,也即,单体。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、或其经修饰的版本。本文所涉及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的混合物的杂合分子。该术语还涵盖了含有已知核苷酸类似物或经修饰的骨架残基或连接的核酸,其是合成的、天然发生的、和非天然发生的,其具有与参照核酸类似的结合特性,并且其通过与参照核酸类似的方式代谢。此种类似物的实例包括但不限于硫代磷酸、氨基磷酸、甲基磷酸、手性-甲基磷酸、和2-O-甲基核糖核苷酸。

[0037] 术语“硫代磷酸核酸”是指其中一或多个核苷酸之间的连接是通过硫代磷酸部分(硫代磷酸酯)部分的核酸。所述硫代磷酸部分可以是单硫代磷酸酯($-P(O)_3(S)^{3-}$)或二硫代磷酸酯($-P(O)_2(S)_2^{3-}$)。在实施方案中,所述硫代磷酸部分是单硫代磷酸酯($-P(O)_3(S)^{3-}$)。在实施方案中,所述硫代磷酸核酸是单硫代磷酸酯核酸。在实施方案中,硫代磷酸核酸的一或多个核苷酸通过硫代磷酸部分(例如单硫代磷酸酯)部分连接,而其余的核苷酸则通过磷酸二酯部分($-P(O)_4^{3-}$)连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸的一或多个核苷酸通过硫代磷酸部分(例如单硫代磷酸酯)部分连接,而其余的核苷酸则通过甲基磷酸连接。在实施方案中,硫代磷酸核酸所有的核苷酸都通过硫代磷酸部分(例如单硫代磷酸酯)部分连接。

[0038] 硫代磷酸寡核苷酸(硫代磷酸核酸)通常长度为大约5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、40、50或更多个核苷酸,长度达到大约100个核苷酸。硫代磷酸核酸长度也可以更长,例如,200、300、500、1000、2000、3000、5000、7000、10,000个等等。如上文所述,在某些实施方案中,本文的硫代磷酸核酸含有一或多个磷酸二酯键。在其它实施方案中,所述硫代磷酸核酸包括另外的骨架(例如,本领域已知的磷酸二酯的模拟物或类似物,如硼烷磷酸酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯、或0-甲基亚磷酰胺连接(参见Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press)。所述硫代磷酸核酸也可包括本领域已知的一或多个核酸类似物单体,诸如,肽核酸单体或聚合物、锁核酸单体或多聚体、吗啉基单体或多聚体、乙二醇核酸单体或多聚体,或苏糖核酸单体或多聚体。其它类似物核酸包括那些具有带正电骨架的;非离子骨架的、和非核糖骨架的,包括在美国专利号5,235,033和5,034,506、以及ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Sanghui&Cook, eds的第6章和第7章中所描述的那些。含有一或多个碳环糖的核酸也包括在核酸的一个定义中。可以由于多种原因而对核糖磷酸骨架进行修饰,例如,为了提高此类分子在生理环境中或在生物芯片上作为探针的稳定性和半衰期。可以制备天然发生的核酸与类似物的混合物;或者,可以制备不同核糖类似物的混合物、以及天然发生核酸与类似物的混合物。硫代磷酸核酸和硫代磷酸聚合物骨架可以是线性的或分支的。例如,分支的核酸反复进行分支以形成更高级的结构如树型化合物等等。

[0039] 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)(例如将糖亚基、环状亚基、或烷基亚基连接在一起)的化学聚合物。硫代磷酸聚合物骨架可以是硫代磷酸糖聚合物,其是其中一或多个(或全部)戊糖糖链缺乏正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个或更多个硫代磷酸连接。所述硫代磷酸聚合物骨架可包括5、6、7、8、9、10、12、15、25、30、40、50或更多个连接并且可含有达大约100个硫代磷酸连接。硫代磷酸聚合物骨架也可以含有更大数目的连接,例如,200、300、500、1000、2000、3000、5000、7000、10,000等等。

[0040] 硫代磷酸核酸和硫代磷酸聚合物骨架可以是部分或完全硫代磷酸化的。例如,50%或更多的硫代磷酸核酸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,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,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,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,其余的核苷酸间是磷酸二酯连接。在实施方案中,其余的核苷酸间是甲基磷酸连接。在实施方案中,100%的硫代磷酸核酸的核苷酸间连接是硫代磷酸连接。类似地,5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或99%的硫代磷酸聚合物骨架中的糖间连接可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或99%的硫代磷酸聚合物骨架中的糖间连接可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,75%、80%、85%、90%、95%、或99%的硫代磷酸聚合物骨架中的糖间连接可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,90%、95%、或99%的硫代磷酸聚合物骨架中的糖间连接

可以是硫代磷酸连接。在实施方案中,其余的核苷酸间是磷酸二酯连接。在实施方案中,其余的核苷酸间是甲基磷酸连接。在实施方案中,100%的硫代磷酸聚合物骨架中的糖间连接是硫代磷酸连接。

[0041] 核酸可包括非特异性的序列。如本文所用,术语“非特异性的序列”是指含有未设计为与任何其它核酸序列互补或仅仅是部分互补的一系列残基的核酸序列。作为实例,非特异性的核酸序列是当与细胞或生物体接触时不作为抑制性核酸发挥功能的核酸残基的序列。“抑制性核酸”是能够结合至靶标核酸(例如可翻译成蛋白的mRNA)并减少该靶标核酸的转录(例如从DNA到mRNA)、或减少该靶标核酸的翻译(例如mRNA)、或改变转录物的剪接(例如单链吗啉基寡聚物)的核酸(例如DNA、RNA、核苷酸类似物的聚合物)。

[0042] “经标记的核酸或寡核苷酸”是共价地(通过接头或化学键)、或非共价地(通过离子、范德华力、静电、或氢键)结合至标记的核酸或寡核苷酸,从而可以通过检测结合至核酸的可检测标记来检测所述核酸的存在。或者,使用高亲和性相互作用的方法可以实现同样的结果,其中一对结合配偶体中的一个结合至另一个,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括可检测的标记,如本文所公开的以及本领域一般已知的。

[0043] 词语“互补”或“互补性”是指多核苷酸中的核酸与第二个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。互补性可以是部分的(其中仅有一些核酸根据碱基配对是匹配的)、或是完全的(其中所有核酸根据碱基配对是匹配的)。

[0044] 核酸当与另一核酸序列置于功能性关系时,则其是“可操作地连接的”。例如,用于前序列或分泌前导序列的DNA,如果其表达为参与多肽分泌的前蛋白,则其是可操作地连接至用于所述多肽的DNA的;启动子或增强子如果影响编码序列的转录,则其是可操作地连接至该序列的;或者核糖体结合位点如果其位置促进翻译,则其是可操作地连接至编码序列的。一般而言,“可操作地连接”意味着所连接的DNA序列彼此接近,并且,在分泌前导序列的情况中,是邻接的且是在阅读框(reading phase)中的。然而,增强子并不必须要是邻接的。连接是通过在方便的限制性位点的连接来实现的。如果不存在此类位点,则依照常规实践使用合成的寡核苷酸连接物或接头。

[0045] 术语“基因”是指参与产生蛋白的DNA区段;其包括在编码区之前或之后的区域(前导序列和尾随序列)、以及在个体编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。前导序列、尾随序列、以及内含子包括在基因的转录和翻译期间必须的调节元件。另外,“蛋白基因产物”是从特定基因表达的蛋白。

[0046] 词语“表达”或“表达的”如本文所用于指基因的时候,是指该基因的转录/或表达产物。细胞中DNA分子的表达水平可以基于以下而进行确定:细胞中存在相应mRNA的量或者细胞产生的该DNA所编码的蛋白的量。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印迹方法来进行确定。参见,Sambrook等人,1989Molecular Cloning:A Laboratory Manual,18.1-18.88。

[0047] 术语“重组的”当用于指,例如细胞、或核酸、蛋白、或载体时,表明所述细胞、核酸、蛋白或载体已经通过引入异源核酸或蛋白、或者改变天然的核酸或蛋白而进行了修饰,或者说该细胞是衍生自经如此修饰的细胞。因而,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式中未发现的基因、或者表达天然基因(否则其会异常表达、低表达、或根本不表达)。转

基因细胞和植物是表达异源基因或编码序列的那些,这通常是重组方法造成的结果。

[0048] 术语“异源的”当用于指核酸的部分时,表明该核酸包含两个或更多个在自然中彼此不会在同一关系中发现的亚序列。例如,核酸通常是经重组产生的,具有两个或更多个来自不相关基因的序列(排列成为新的功能性核酸),例如,来自一个来源的启动子和来自另一来源的编码区。类似地,异源蛋白表明该蛋白包含两个或更多个在自然中彼此不会在同一关系中发现的亚序列(例如,融合蛋白)。

[0049] 术语“外源的”是指源自给定细胞或生物体外部的分子或物质(例如,化合物、核酸或蛋白)。例如,如本文所提到的“外源启动子”,是并不来自表达其的植物的启动子。相反,术语“内源的”或“内源启动子”是指对于给定细胞或生物体是天然的、或者源自给定细胞或生物体内的分子或物质。

[0050] 术语“分离的”,当应用于核酸或蛋白时,表示所述核酸或蛋白基本上没有在天然状态下其所关联的其它细胞成分。其可以例如是在均质状态,并且可以是干燥的或水成的溶液中。纯度和均质性通常是使用分析化学技术来确定的,如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱。在制剂中是占主导地位的种类的蛋白,是基本上纯化的。

[0051] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换地用于指氨基酸残基的聚合物,其中所述聚合物在实施方案中,可以缀合至不含氨基酸的部分。该术语适用于其中一或多个氨基酸残基是相应天然发生的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及适用于天然发生的氨基酸聚合物和非天然发生的氨基酸聚合物。“融合蛋白”是指编码两个或更多个分别的蛋白序列(其重组表达为单一部分)的嵌合蛋白。

[0052] 术语“肽基”和“肽基部分”意指单价肽。

[0053] 术语“氨基酸”是指天然发生的和合成的氨基酸,以及以与天然发生的氨基酸类似方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然发生的氨基酸是由遗传密码所编码的那些,以及随后经修饰的那些,例如,羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然发生的氨基酸具有相同基本化学结构(也即结合至氢的 α 碳、羧基基团、氨基基团、和R基团)的化合物,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫。此类类似物具有经修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或经修饰的肽骨架,但是却保留与天然发生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、但是却以与天然发生的氨基酸类似方式发挥作用的化合物。术语“非天然发生的氨基酸”和“非天然氨基酸”是指自然中未发现的氨基酸类似物、合成氨基酸、和氨基酸模拟物。

[0054] 氨基酸在本文中可以其通常已知的三字母符号或IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission推荐的单字母符号来进行指代。同样,核苷酸可以通过其通常接受单字母编码来进行指代。

[0055] “经保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。对于特定的核酸序列,“经保守修饰的变体”是指编码相同或基本上相同氨基酸序列的那些核酸。由于遗传密码的简并性,许多的核酸序列将会编码任何给定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU全都编码氨基酸丙氨酸。因而,在每个通过密码子指定为丙氨酸的位置处,该密码子可以改变为所述的任何相应密码子而不会改变所编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其是一类保守修饰的变异。本文每个编码多肽的核酸序列,也都描述了该核酸的每种可能的沉默变异。本领域技术人员会意识到,核酸中的每个密码子(除了AUG,其一般是甲硫氨酸的唯一密码子,以及

TGG,其一般是色氨酸的唯一密码子)都可以经修饰以产生功能上等同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异都暗含在每个所述的序列中。

[0056] 对于氨基酸序列,本领域技术人员会意识到,对核酸、肽、多肽、或蛋白序列的个别取代、缺失或添加(其在编码的序列中改变、添加或缺失单一氨基酸或小百分比的氨基酸),当改变导致氨基酸被化学上类似的氨基酸取代时,是“经保守修饰的变体”。提供功能上类似的氨基酸的保守取代表是本领域熟知的。此类经保守修饰的变体是在本发明的多态变体、种间同源、和等位基因之外的(并且并不排除)。

[0057] 以下八组每组含有彼此互为保守取代的氨基酸:

[0058] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0059] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0060] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0061] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0062] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0063] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0064] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和

[0065] 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)

[0066] (参见,例如Creighton,Proteins(1984))。

[0067] 术语“相同的”或百分比“相同性”,在两个或更多个核酸或多肽序列的背景下,是指相同的或具有指定百分比的氨基酸残基或核苷酸相同的两个或更多个序列或亚序列,其中指定百分比相同也即,当在比较窗口或指定区域进行比较或比对最大对应时,在指定的区域大约60%的相同性,优选65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更高的相同性,其中是使用BLAST或BLAST 2.0序列比对算法(以下文所述缺省参数)、或通过人工比对和肉眼检查来进行的测量(参见,例如NCBI网址<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>或其它类似的等)。此类序列则称之为“基本上相同的”。此定义也是指、或者可以适用于,测试序列的互补序列(compliment)。该定义还包括具有缺失和/或添加的序列、以及具有取代的那些。如下文所述,优选的算法可以虑及缺口等。优选地,相同性存在于长度至少约25个氨基酸或核苷酸的区域上,或更优选存在于长度50-100个氨基酸或核苷酸的区域上。

[0068] “抗体”是指包含来自免疫球蛋白基因的框架区的多肽或其片段(其特异性地结合并识别抗体)。所识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 、和 μ 恒定区基因,以及多种多样的免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 κ 或 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 、或 ϵ ,其然后分别定义了免疫球蛋白的类别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将是最关键的。在一些实施方案中,抗体或抗体的片段可以源自不同的生物体,包括人、小鼠、大鼠、仓鼠、骆驼等。本发明的抗体可包括已经在一或多个氨基酸位点进行了修饰或突变的抗体,以改善或调节抗体的期望功能(例如糖基化、表达、抗原识别、效应功能、抗原结合、特异性等)。

[0069] 示例性的免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每个四聚体由相同得两对多肽链组成,每对具有一个“轻链”(大约25kD)和一个“重链”(大约50-70kD)。每个链的N末端定义大约100-110个或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(VL)和可

变重链 (VH) 分别是指这些轻链和重链。Fc (也即可结晶片段区) 是免疫球蛋白的“基础”或“尾部”并且通常由两个重链 (为两个或三个恒定结构域做出贡献, 取决于抗体的类别) 组成。通过结合至特异性的蛋白, Fc 区确保了每个抗体产生了对给定抗原的适宜免疫应答。Fc 区还结合各种细胞受体 (如 Fc 受体)、以及其它免疫分子 (如补体蛋白)。

[0070] 抗体, 例如, 作为完整的免疫球蛋白或作为许多经良好表征的片段 (经各种肽酶的消化而产生) 而存在。因而, 例如, 胃蛋白酶在铰链区中二硫连接之下消化抗体, 以产生 F(ab)'₂, 其是 Fab (其本身是通过二硫键接合至 VH-CH1 的轻链) 的二聚体。F(ab)'₂ 在温和条件下可以被还原以破坏铰链区的二硫连接, 由此将 F(ab)'₂ 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体基本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)。虽然各种抗体片段是就完整抗体的消化而言来进行的定义, 但是本领域技术人员会理解此类片段可以经化学重新合成或通过使用重组 DNA 方法来重新合成。因而, 如本文所用, 术语抗体也包括通过抗体的修饰而产生的抗体片段、或使用重组 DNA 方法重新合成的那些 (例如, 单链 Fv)、或使用噬菌体展示文库所鉴别的那些 (参见, 例如 McCafferty 等人, Nature 348:552-554 (1990))。

[0071] 单链可变片段 (scFv) 通常是免疫球蛋白的重链 (VH) 和轻链 (VL) (用 10 至约 25 个氨基酸的短接头肽连接) 的融合蛋白。所述接头通常可富含甘氨酸以用于弹性、以及丝氨酸或苏氨酸以用于可溶性。所述接头可将 VH 的 N 末端与 VL 的 C 末端连接, 或者反之。

[0072] 为了制备适宜的本发明的抗体以及为了根据本发明的用途, 例如重组、单克隆、或多克隆抗体, 可以使用许多本领域已知的技术 (参见, 例如 Kohler & Milstein, Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor 等人, Immunology Today 4:72 (1983); Cole 等人, pp. 77-96 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); 和 Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed. 1986))。可以从细胞克隆编码感兴趣抗体的重链和轻链的基因, 例如, 可以从杂交瘤细胞克隆编码单克隆抗体的基因, 并用于产生重组单克隆抗体。也可以从杂交瘤或浆细胞制备编码单克隆抗体的重链和轻链的基因文库。重链和轻链基因产物的随机组合, 产生了具有不同抗原特异性的抗体的大汇集 (参见例如 Kuby, Immunology (3rd ed. 1997))。可以对用于产生单链抗体或重组抗体的技术 (美国专利 4,946,778、美国专利号 4,816,567) 进行调整, 以产生本发明多肽的抗体。还有, 转基因小鼠、或其它生物体如其它哺乳动物, 也可用于表达人源化的或人抗体 (参见, 例如美国专利号 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, Marks 等人, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg 等人, Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-13 (1994); Fishwild 等人, Nature Biotechnology 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); 和 Lonberg & Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995))。或者, 可以使用噬菌体展示技术来鉴别特异性结合选定抗原的抗体和异聚的 Fab 片段 (参见, 例如 McCafferty 等人, Nature 348:552-554 (1990); Marks 等人, Biotechnology 10:779-783 (1992))。抗体也可以制备为双特异性的, 也即, 能够识别两种不同的抗原 (参见, 例如 WO 93/08829, Traunecker 等人, EMBO J. 10:3655-3659 (1991); 和 Suresh 等人, Methods in Enzymology 121:210 (1986))。抗体也可以是异缀合物 (heteroconjugate), 例如, 两个共价接合的抗体、

或免疫毒素(参见,例如美国专利号4,676,980;WO 91/00360;WO 92/200373;和EP 03089)。

[0073] 用于将非人抗体人源化或灵长源化的方法是本领域熟知的(例如,美国专利号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;欧洲专利申请0173494;Jones等人(1986) *Nature* 321:522;和Verhoyen等人(1988) *Science* 239:1534)。人源化的抗体在例如, Winter and Milstein(1991) *Nature* 349:293中有进一步描述。一般而言,人源化的抗体具有来自非人来源的一或多个氨基酸残基引入其中。这些非人氨基酸残基常常称作为输入残基,其通常取自输入的可变结构域。人源化基本上可以依照Winter与其合作者的方法进行(参见,例如Morrison等人,PNAS USA,81:6851-6855(1984);Jones等人, *Nature* 321:522-525(1986);Riechmann等人, *Nature* 332:323-327(1988);Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*,44:65-92(1988), Verhoeyen等人, *Science* 239:1534-1536(1988) 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992), Padlan, *Molec. Immun.*,28:489-498(1991);Padlan, *Molec. Immun.*,31(3):169-217(1994)),其中是通过用啮齿类CDR或CDR序列来取代人抗体的相应序列。因此,此类人源化的抗体是嵌合抗体(美国专利号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所取代。在实践中,人源化的抗体通常是其中一些CDR残基以及可能的一些FR残基被来自啮齿类抗体中类似位点的残基所取代的人抗体。例如,包含编码人源化的免疫球蛋白框架区的第一序列和编码期望的免疫球蛋白互补决定区的第二序列组的多核苷酸,其可以通过合成产生或者通过组合适宜的cDNA和基因组DNA区段来产生。人恒定区DNA序列可以依照熟知的程序从多种人细胞分离。

[0074] “嵌合抗体”是这样的抗体分子,其中:(a) 恒定区、或其部分经过改变、替代、或更换,从而使抗原结合位点(可变区)连接至不同的或改变的类别、效应功能和/或物种的恒定区,或者连接至完全不同的分子(其赋予嵌合抗体新的特性),例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或者(b) 可变区、或其部分经改变、替代、或更换为具有不同的或改变的抗原特异性的可变区。本发明的(以及根据本发明使用的)优选抗体包括人源化的和/或嵌合的单克隆抗体。

[0075] 用于将治疗剂缀合至抗体的技术是熟知的(参见,例如Arnon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*;Reisfeld等人(eds.), pp.243-56(Alan R.Liss, Inc.1985);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”, *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.);Robinson等人(eds.), pp.623-53(Marcel Dekker, Inc.1987);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”, *Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications*;Pinchera等人(eds.), pp.475-506(1985);和Thorpe等人,“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”是指缀合至又或者是共价结合至抗体的治疗剂。“治疗剂”如本文所提到的,是可用于治疗或预防疾病如癌症的组合物。

[0076] 表述“特异性地(或选择性地)结合”至抗体或“特异性地(或选择性地)与”抗体免疫反应,当指的是蛋白或肽时,是指可确定蛋白存在(常常是在蛋白和其它生物制剂的异质

性群体中)的结合反应。因而,在给定的免疫测定条件下,指定的抗体结合至特定的蛋白(至少是背景的两倍,且更通常是背景的超过10-100倍)。在此类条件下特异性结合至抗体,需要其对特定蛋白的特异性经过选择的抗体。例如,可以对多克隆抗体进行选择,以便仅获得与选定抗原(而不与其它蛋白)有特异性免疫反应的抗体的亚集。此选择可以通过排除与其它分子交叉反应的抗体来实现。许多的免疫测定形式可以用于选择与特定抗原特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定常规用于选择与蛋白有特异性免疫反应的抗体(参见,例如Harlow&Lane,Harlow&Lane,Using Antibodies,A Laboratory Manual (1998) for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity)。

[0077] “配体”是指能够结合受体的物质,例如,多肽或其它分子。

[0078] “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、或其它物理手段进行检测的成分。例如,可用的标记包括³²P、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如,通常用于ELISA的)、生物素、异羟基洋地黄毒苷元(digoxigenin)、或半抗原和蛋白或者其它可以使得能够检测的实体,例如,通过将放射性标记掺入至特异性地与靶标肽反应的肽或抗体中。可以使用本领域已知的用于将抗体缀合至标记的任何方法,例如,使用Hermanson,Bioconjugate Techniques 1996,Academic Press,Inc.,San Diego中所描述的方法。

[0079] 如本文所提供的术语“生物素”是指特征在于与四氢噻吩环耦合的脲基(四氢咪唑啉酮)环的化合物。如本文所提供的“生物素”是指5-[(3aS,4S,6aR)-2-氧六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基]戊酸,并在在常规含义上,是指CAS Registry No.58-85-5。如本文所用的“生物素结合结构域”是能够结合生物素的蛋白结构域。生物素结合结构域的非限制性实例包括亲和素、链霉亲和素和中和亲和素。

[0080] 如本文所提供的术语“亲和素”或“链霉亲和素”包括亲和素或链霉亲和素任何天然发生的形式、同源物、变体或衍生物(例如,中和亲和素)(其保留了天然发生形式的活性(例如,与天然蛋白相比至少在50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性))。在一些实施方案中,变体在完整的序列或在一部分的序列(例如50、100、150或200个连续的氨基酸部分)与天然发生的形式相比具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列相同性。

[0081] “接触”依照其惯常的含义使用,并且是指使至少两个不同的种类(例如化合物(包括生物分子)或细胞)足够接近以反应、相互作用或物理触碰的过程。然而,应当理解的是,所得的反应产物可以从所添加的试剂之间的反应直接产生,或者从可在反应混合物中产生的一或多种所添加试剂的中间体产生。

[0082] 术语“接触”可包括使两个种类反应、相互作用或物理触碰,其中所述两个种类可以例如是如本文所述的生物素结构域和生物素结合结构域。在实施方案中,接触例如包括,使本文所述的生物素结构域与生物素结合结构域相互作用。

[0083] “对照”样品或值是指用作参照(通常是已知参照)的样品,以用于比较测试样品。例如,测试样品可以取自测试条件(例如,在测试化合物的存在下),并且与已知条件比较(例如,缺乏测试化合物(阴性对照),或在已知化合物的存在下(阳性对照))。对照还可以代表从许多测试或结果收集的平均值。本领域技术人员会认识到,对照可以设计为用于评估

任何数目的参数。例如,对照可以设想为基于药理学数据(例如,半衰期)或治疗措施(例如,副作用的比较)来比较治疗价值。本领域技术人员会知晓那些对照在给定的情况中是有价值的,并且能够基于与对照值的比较来分析数据。对照对于确定数据的显著性也是有价值的。例如,如果给定参数的值在对照中有广泛变化,那么测试样品中的差异就不会被认为是显著的。

[0084] “患者”或“有需要的对象”是指患有(或易患)疾病或病征的活的生物体,所述疾病或病征可以通过使用本文所提供的组合物或药物组合物来进行治疗。非限制性实例包括人、其它哺乳动物、牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、奶牛、鹿、和其他非哺乳类的动物。在一些实施方案中,患者是人。

[0085] 术语“疾病”或“病征”是指能够用本文提供的化合物、药物组合物、或方法进行疗的患者或对象的生存状态或健康状况。在实施方案中,所述疾病是癌症(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、黑色素瘤、乳腺癌、成神经细胞瘤)。所述疾病可以是自身免疫疾病、炎症性疾病、癌症疾病、感染性疾病、代谢疾病、发育疾病、心血管疾病、肝病、肠病、内分泌疾病、神经疾病、或其它疾病。

[0086] 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、赘生物、或恶性肿瘤,包括白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、神经内分泌肿瘤、癌变和肉瘤。可以用本文提供的化合物、药物组合物、或方法进行治疗的示例性的癌症包括淋巴瘤、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(例如三阴性的、ER阳性的、ER阴性的、化疗抗性的、赫赛汀抗性的、HER2阳性的、阿霉素抗性的、他莫昔芬抗性的、导管癌、小叶癌、原发的、转移的)、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、肉瘤)、多形性成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、黑色素瘤、前列腺癌、去势难治性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如,头部、颈部、或食道)、结肠直肠癌、白血病、急性髓系白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、或多发性骨髓瘤。另外的实例包括,甲状腺癌、内分泌系统癌症、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、食道癌、肝癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、肉瘤、胃癌、子宫癌或成神经管细胞瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤病、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、原发性脑肿瘤、癌症、恶性胰岛素瘤、恶性类癌、膀胱癌、皮肤癌前病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、成神经细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌症、恶性高钙血症、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、胰腺内分泌或外分泌的赘生物、髓样甲状腺癌、髓样甲状腺癌变、黑色素瘤、结肠直肠癌、乳突状甲状腺癌、肝细胞癌、乳头Paget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。

[0087] 术语“白血病”广泛的是指血液形成器官的进行性的、恶性疾病,并且一般特征在于血液中和骨髓中白细胞及其前体的异常增殖和发育。白血病一般在临床上基于以下而进行分类:(1)疾病急性或慢性的期间和特征;(2)所涉及的细胞类型;髓系的(髓性的)、淋巴系的(淋巴性的)、或单核细胞的;和(3)白血病或白细胞缺乏症(亚白血病)的血液中异常细胞数目的增加或不增加。可以用本文提供的化合物、药物组合物、或方法进行治疗的示例性

白血病包括,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、慢性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、成人T-细胞白血病、白细胞缺乏白血病、白血病性白血病、嗜碱性粒细胞白血病、母细胞白血病、牛白血病、慢性髓细胞白血病、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、血胚细胞白血病、成血细胞白血病、组织细胞白血病、干细胞白血病、急性单核细胞白血病、白细胞减少性白血病、淋巴性白血病、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴生成型白血病、淋巴系白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞性白血病、小成髓细胞性白血病、单核细胞性白血病、成髓细胞性白血病、髓细胞性白血病、髓样粒细胞白血病、髓单核细胞性白血病、Naegeli白血病、血浆细胞白血病、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。

[0088] 术语“肉瘤”一般是指由好像胚性结缔组织这样的物质所构成的肿瘤,并且一般是由嵌入至纤维状或均质性物质内的紧密堆积的细胞所组成。可以用本文提供的化合物、药物组合物、或方法进行治疗的肉瘤包括软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、Abemethy肉瘤、脂肉瘤、脂肪肉瘤、腺泡状软组织肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄样肉瘤、绿色瘤肉瘤、绒毛膜癌、胚胎性肉瘤、Wilms肿瘤肉瘤、子宫内膜肉瘤、间质肉瘤、Ewing肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金肉瘤、特发性多发性色素沉着出血性肉瘤肉瘤、B细胞的成免疫细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞的成免疫细胞肉瘤、Jensen肉瘤、Kaposi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、网状细胞肉瘤、Rous肉瘤、浆液性囊肿肉瘤、华液肉瘤、或毛细血管扩张肉瘤。

[0089] 术语“黑色素瘤”是用来指产生于皮肤和其它器官的黑色细胞系统的肿瘤。可以用本文提供的化合物、药物组合物、或方法进行治疗的黑色素瘤包括,例如,肢端雀斑样痣性黑色素瘤、非黑色素性黑色素瘤、良性幼年黑色素瘤、Cloudman黑色素瘤、S91黑色素瘤、Harding-Passey黑色素瘤、幼年黑色素瘤、恶性雀斑样痣黑色素瘤、恶性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、指甲下黑色素瘤、或表浅蔓延型黑色素瘤。

[0090] 术语“癌变(癌变)”是指由上皮细胞构成的恶性新生物,其中所述上皮细胞倾向于浸润周围的组织并引起转移瘤。可以用本文提供的化合物、药物组合物、或方法进行治疗的示例性癌变包括,例如,髓样甲状腺癌变、家族性髓样甲状腺癌变、腺泡状癌变、腺泡癌变、腺囊癌变、腺样囊性癌变、腺瘤癌变、肾上腺皮质的癌变、肺泡癌变、肺泡细胞癌变、基底细胞癌变、基底样细胞癌变、基底细胞样癌变、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌变、细支气管癌变、支气管源的癌变、髓样癌变、胆管细胞癌变、绒毛膜癌变、胶样癌变、粉刺癌变、子宫体癌变、筛状癌变、铠甲状癌变、癌疮、柱状癌变、柱状细胞癌变、胆管癌变、导管癌变、硬癌变、胚胎性癌变、髓样癌变、表皮样癌变、腺样上皮癌变、外植癌变、溃疡性癌变、纤维癌变、胶样癌变、胶状癌变、巨细胞癌变、巨细胞癌、腺体癌变、粒膜细胞癌变、毛发基质癌变、血样癌变、肝细胞癌变、Hurthle细胞癌变、胶样癌变、肾上腺样癌变、婴儿胚胎性癌变、原位癌变、表皮内癌变、上皮内癌变、Krompecher癌变、Kulchitzky-细胞癌变、大细胞癌变、豆状癌变、豆状癌、脂肪瘤癌变、小叶癌、淋巴上皮癌变、骨髓癌变、骨髓癌、黑色素癌变、软癌变、粘液癌变、粘液癌、粘液细胞癌变、粘液表皮样癌变、粘膜癌、粘膜癌变、粘液瘤癌变、鼻咽癌变、燕麦细胞癌变、骨化性癌变、骨样癌变、乳突状癌变、门静脉周癌变、浸润前癌变、棘细胞

癌变、脑样癌变、肾脏的肾细胞癌、补充细胞癌变、肉瘤样癌变、施耐德氏癌变、硬癌变、阴囊癌变、印指环状细胞癌变、单纯癌变、小细胞癌变、马铃薯状癌变、球状细胞癌变、皮质层细胞癌变、海绵体癌变、鳞状癌变、鳞状细胞癌变、绳捆癌变、毛细血管扩张癌变、毛细血管扩张癌、移行细胞癌变、结节性皮癌、管状癌变、结节性皮癌变、疣状癌变、或绒毛状癌变。

[0091] 如本文所用,术语“转移”、“转移的”、“和”转移癌”可互换使用,并且是指增殖性疾病或病征(例如癌症)从一个器官或另一非相邻器官或身体部分的扩散。癌症在初始位点(例如,乳房)发生,该位点称作原发性肿瘤,例如,原发性乳腺癌。原发性肿瘤或初始位点中的一些癌细胞获得了在局部区域穿透和浸润周围正常组织的能力、和/或穿透淋巴系统或血管系统的壁从而通过所述系统循环至身体其它位点和组织的能力。从原发性肿瘤的癌细胞所形成的第二个临床可检测的肿瘤则称作是转移肿瘤或次发性肿。当癌细胞转移时,转移肿瘤及其细胞推定为与原始肿瘤的细胞类似。因而,如果肺癌转移至乳房,那么在乳房位点的次发性肿瘤由异常的肺细胞(而不是异常的乳房细胞)组成。乳房中的次发性肿瘤称作转移肺癌。因而,表述转移癌症是指这样的疾病,其中对象具有或曾具有原发肿瘤,并且其具有一或多个次发性肿瘤。表述非转移癌症或具有不是转移的癌症的对象是指这样的疾病,其中具有原发性肿瘤但却不具有一或多个次发性肿瘤。例如,转移肺癌是指对象中这样的疾病,其中所述对象具有原发性肺肿瘤(或其病史),并且在第二部位或多个部位(例如,在乳房中)具有一或多个次发性肿瘤。

[0092] 如本文所用,“自身免疫疾病”是指由对象免疫系统(例如针对通常存在于对象身体内的物质组织和/或细胞)改变的免疫反应所产生的疾病或病征。自身免疫疾病包括但不限于,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、全身性硬皮病、多发性硬化、全身性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、幼发型糖尿病、1型糖尿病、吉兰-巴雷综合征、桥本氏脑炎、桥本氏甲状腺炎、强直性脊柱炎、银屑病、干燥综合征、脉管炎、肾小球性肾炎、自身免疫甲状腺炎、Behcet病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、大疱性类天疱疮、肉状瘤病、银屑病、鱼鳞癣、Graves眼病、炎症性肠病、爱迪生氏病、白癜风、哮喘、和过敏性哮喘。

[0093] 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病征。炎症是由免疫系统所发起的生物学应答,作为应对病原体、损伤的细胞或组织或刺激物的愈合过程的一部分。慢性炎症可导致多种疾病。炎症性疾病包括但不限于,动脉粥样硬化、过敏、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、骨盆炎症性疾病、和炎症性肌病。

[0094] 如本文所用,“代谢失调”是指涉及多种分子和物质的异常代谢的疾病或病征,所述分子和物质包括,例如,碳水化合物、氨基酸、有机酸。代谢失调包括但不限于,碳水化合物代谢的失调(例如糖原贮积症),氨基酸代谢的失调(例如苯丙酮尿症、枫糖尿症、1型戊二酸血症),尿素循环障碍或尿素循环缺陷(例如,氨甲酰磷酸合成酶I缺乏症),有机酸代谢的障碍(有机酸尿症)(例如尿黑酸尿症),脂肪酸氧化和线粒体代谢的障碍(例如中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症),卟啉代谢的障碍(例如急性间歇性卟啉病),嘌呤或嘧啶代谢的障碍(例如Lesch-Nyhan综合征),类固醇代谢的障碍(例如类脂性肾上腺皮质增生症、先天性肾上腺皮质增生症),线粒体功能的障碍(例如,Kearns-Sayre综合征),过氧化物酶体功能的障碍(例如Zellweger综合征),以及溶酶体贮积症(例如高雪氏症、和Niemann Pick病)。

[0095] 如本文所用,“发育障碍”是指常常源自童年且与语言障碍、学习障碍、运动障碍和

神经发育障碍相关联的疾病或病征。实例包括但不限于,自闭症谱系障碍和注意力缺陷障碍。

[0096] 如本文所用,“心血管疾病”是指与心脏、血管或者二者相关的疾病。心血管疾病包括但不限于,冠心病、心肌病、高血压性心脏病、心脏衰竭、心脏节律不齐、炎症性心脏病、外周动脉疾病、脑血管疾病和炎症性心脏病。

[0097] 如本文所用,“肝病”是指与肝脏和/或肝功能异常相关联的疾病。肝病包括但不限于,肝炎、酒精性肝病、脂肪肝、肝硬化、Budd-Chiari综合征、Gilbert综合征以及癌症。

[0098] 如本文所用,术语“肠疾病”是指与肠(小肠或大肠)中的异常相关联的疾病或病征。肠疾病包括但不限于,肠胃炎、大肠炎、回肠炎、阑尾炎、乳糜泻、Chron病、肠道病毒、肠易激综合征、和憩室病。

[0099] 如本文所用,术语“内分泌疾病”是指内分泌系统的疾病或病征,包括内分泌腺分泌不足、内分泌腺分泌过多以及肿瘤。内分泌疾病包括但不限于,爱迪生氏病、糖尿病、Conn综合征、Cushing综合征、糖皮质激素可抑制醛固酮增多症、低血糖症、甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退、甲状腺炎、垂体功能减退、性腺功能减退、以及甲状旁腺病征。

[0100] 如本文所用,术语“神经障碍”是指身体神经系统的疾病或病征,包括结构性的、生化的、或电性的异常。神经障碍包括但不限于,脑损伤、脑功能失调、脊髓病征、外周神经病变、颅神经病征、自主神经系统失调、癫痫症、运动障碍(例如帕金森病和多发性硬化)、以及中枢神经病变。

[0101] 如本文所用,术语“感染性疾病”是指在宿主对象中与病原物质的感染、存在和/或生长相关联的疾病或病征。感染性病原物质包括但不限于,病毒、细菌、真菌、原生动物、多细胞寄生虫、以及畸变蛋白(例如朊病毒)。与感染性疾病相关联的病毒包括但不限于,单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、Epstein-Barr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、呼吸道合胞体病毒、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、Rous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。与感染性疾病相关联的细菌包括但不限于,结核分歧杆菌(*M. tuberculosis*)、沙门氏菌(*Salmonella*)种类、大肠杆菌(*E. coli*)、衣原体(*Chlamydia*)种类、葡萄球菌(*Staphylococcus*)种类、芽孢杆菌(*Bacillus*)种类、以及假单胞菌(*Pseudomonas*)种类。

[0102] 术语“相关的”或“与……相关联的”在与疾病(例如,糖尿病、癌症(例如前列腺癌、肾癌、转移癌症、黑色素瘤、去势难治性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如,头部、颈部、或食道)、结肠直肠癌、白血病、急性髓系白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、或多发性骨髓瘤))相关的物质或物质活性或功能的背景下,意味着所述疾病(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、头颈癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、成神经细胞瘤)、或者该疾病的症状,是(全部或部分)由所述物质或物质活性或功能所引起的。

[0103] 术语“畸变的”如本文所用是指与正常的不同。当用于描述酶活性的时候,畸变是指活性大于或小于正常对照或正常非疾病对照样品的平均。畸变的活性可以是指导致疾病的活性的量,其中将畸变的活性恢复至正常的或非疾病相关的量(例如通过使用如本文所

述的方法),导致疾病或者一或多种疾病症状的减弱。

[0104] 如本文所用,术语“细胞穿透的”或“细胞穿透”是指分子(例如蛋白)以显著的或有效的量从细胞外环境穿入至细胞内的能力。因而,细胞穿透缀合物是从细胞外环境经过膜穿入至细胞内的分子。

[0105] 如本文所用,术语“非细胞穿透的”或“非细胞穿透”是指分子不具有以显著的或有效的量从细胞外环境穿入至细胞内的能力。因而,非细胞穿透肽或蛋白一般不能够从细胞外环境经过膜穿入至细胞内的分子以实现细胞群体、器官或生物体的显著生物学作用。该术语并不排除一或多种小数目肽或蛋白可以进入细胞的可能性。然而,该术语是指一般而言不能从细胞外环境以显著的程度进入细胞的分子。非细胞穿透分子和物质的实例包括但不限于大分子,如例如,高分子量蛋白。肽或蛋白可以使用本领域技术人员已知的方法来确定为非细胞穿透的。作为实例,肽或蛋白可以经荧光标记,并且可以通过流式细胞术分析或共聚焦显微镜在体外确定肽或蛋白从细胞外环境穿入细胞的能力。在一些实施方案中,“非细胞穿透蛋白”是指这样的蛋白,其穿透细胞比附着至硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架的相同蛋白至少低大约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”是指不能可测量地穿透细胞的蛋白。

[0106] 如本文所用,“分子量”(M.W.)或“分子质量”是指分子中所有源自的源自重量之和。对于分子,具有高分子量的分子通常具有25kDa或更高的分子量。作为实例,高分子量蛋白可以具有从大约25kDa至1000kDa或更高的M.W.。

[0107] 如本文所用,术语“细胞内”意味着在细胞之内。如本文所用,“细胞内靶标”是位于细胞之内的靶标,例如,核酸、多肽或其它分子(例如碳水化合物),并且是本文所提供的非细胞穿透蛋白所结合的靶标。结合可以是直接的或间接的。在实施方案中,非细胞穿透蛋白选择性地结合细胞内靶标。对于选择性地结合、选择性的结合或特异性的结合,是指物质(例如,非细胞穿透蛋白)结合一种物质(例如,细胞内靶标)而部分或完全排除其它物质。对于结合意味着相对于测定方法的背景至少1.5倍的可检测结合。对于选择性的或特异性的结合,此种可检测结合对于给定物质是能够检测到而对于对照物质则不能。或者或另外,对结合的检测可以通过测定下游分子或事件的存在来进行确定。

[0108] 如本文所用,术语“缀合”是指原子或分子之间的关联。该关联可以是直接的或间接的。例如,核酸和蛋白之间的缀合可以是直接的(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、卤键)、范德华相互作用(例如偶极-偶极、偶极诱导的偶极、伦敦色散)、环堆积(π 效应)、疏水相互作用以及类似的等)。在实施方案中,缀合物是使用缀合化学所形成的,所述缀合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)以及对碳-碳和碳-杂原子多重键的加成(例如,Michael反应、Diels-Alder加成)。这些以及其它可用的反应在例如以下中有讨论:March,ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY,3rd Ed.,John Wiley&Sons,New York,1985;Hermanson,BIOCONJUGATE TECHNIQUES,Academic Press,San Diego,1996;和Feeney等人,MODIFICATION OF PROTEINS;Advances in Chemistry Series,Vol.198,American Chemical Society,Washington,D.C.,1982。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,通过硫代磷酸核酸、硫代磷酸骨架聚合物(例如单硫代磷酸酯)

或非细胞穿透蛋白的成分与生物素结合结构域或生物素结构域的成分(例如氨基酸)之间的非共价反应,非共价地附着至生物素结合结构域或生物素结构域。在其它实施方案中,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或多个反应性部分,例如,如上文所述的共价反应性部分(例如,氨基酸反应性部分如乙烯砜部分(-S(O)₂CH=CH₂)。

[0109] 包括用于本文缀合化学的共价反应性部分或官能团的可用反应部分例如包括:

[0110] (a) 羧基基团以及其各种衍生物,包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯,N-羟基苯并三唑酯,酸性卤化物,酰基咪唑,硫酯,对-硝基苯基酯,烷基、烯基、炔基和芳香酯;

[0111] (b) 羟基基团,其可以被转化为酯、醚、醛等。

[0112] (c) 卤代烷基基团,其中卤素可以随后替换为亲核基团,如例如,胺、羧酸阴离子、硫醇阴离子、碳负离子、或醇盐离子,由此导致新的基团共价附着在卤素原子的位点处;

[0113] (d) 亲二烯基团,其能够参与Diels-Alder反应,如例如,马来酰亚胺基团;

[0114] (e) 醛或酮基团,从而可以经过羰基衍生物(例如,亚胺、腙、缩氨基脲或肟)的形成、或者经过如Grignard加成或烷基锂加成这样的机制而进行随后的衍生化;

[0115] (f) 磺酰卤基团,以用于随后与胺反应,例如以形成磺胺;

[0116] (g) 硫醇基团,其能够被转化为二硫化物、与酰基卤反应、或结合至金属(如金);

[0117] (h) 胺或巯基基团,其例如可以是,经酰基化的、烷基化的或氧化的;

[0118] (i) 烯烃,其例如可以进行环加成、酰基化、Michael加成等;

[0119] (j) 环氧化物,其可以例如与胺和羟基化合物反应;

[0120] (k) 亚磷酰胺和其它用于核酸合成的标准官能团;

[0121] (l) 金属氧化硅键合(bonding);

[0122] (m) 金属,键合至反应磷基团(例如磷化氢),以形成例如,磷酸二酯键;和

[0123] (n) 砜,例如,乙烯砜。

[0124] 反应官能团可以经过选择,从而使它们不会参与或者干扰本文所述蛋白的化学稳定性。作为实例,核酸可以包括乙烯砜或其它反应性部分。例如,具有乙烯砜反应性部分的核酸可以从具有S-S-R部分的核酸形成,其中R是-(CH₂)₆-OH。还可以进一步从具有末端磷酸(PS)的核酸形成具有乙烯砜的核酸。

[0125] “对照”或“标准对照”是指用作参考(通常是已知参考)的样品、量度、或值,以用于与测试样品、量度、或值进行比较。例如,可以从疑似患有给定疾病(例如自身免疫疾病、炎症性自身免疫疾病、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,并与已知正常(非疾病)个体(例如标准对照对象)比较。标准对照也可以代表从不具有给定疾病的相似个体(例如标准对照对象,例如,具有相似医学背景、相同的年龄、重量等的个体)的群体(也即标准对照群体)收集的平均量度或值。标准对照值也可以从同一个体获得,例如较早地从疾病爆发前的该患者所获得。本领域技术人员会意识到,标准对照可以设计为用于评估任何数目的参数(例如RNA水平、蛋白水平、具体细胞类型、具体体液、具体组织、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)。

[0126] 本领域技术人员会知晓哪种标准对照在给定的情形中最适宜,并且能够就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有广泛变化,那么测试样品中的差异就不会被认为是显著的。

[0127] 术语“诊断”是指对象中存在疾病(例如自身免疫、炎症性自身免疫、癌症、感染性的、免疫、或其它疾病)的相对可能性。类似地,术语“预后”是指对象中关于疾病状态某种未来结果会发生的相对可能性。例如,在本发明的背景下,预后可以是指个体发展出疾病(例如自身免疫、炎症性自身免疫、癌症、感染性的、免疫、或其它疾病)的可能性、或者是该疾病的严重性(例如,疾病的持续期间)。该术语并不是绝对的,如医疗诊断领域内的技术人员所能够理解的那样。

[0128] “生物样品”或“样品”是指源自对象或患者或者从对象或患者获得的材料。生物样品包括组织的切片如活检或尸检样品,以及用于组织学目的而获取的冷冻切片。此类样品包括体液,如血液和血液部分或产品(例如,血清、血浆、血小板、红细胞以及类似的等)、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。生物样品通常得自真核生物体,如哺乳动物如灵长类,例如,黑猩猩或人类;奶牛;狗;猫;啮齿类,例如,豚鼠、大鼠、小鼠;兔;或鸟类;爬行动物;或鱼类。

[0129] “细胞”如本文所用,是指进行代谢或进行其它足以保持或复制其基因组DNA的功能的细胞。细胞可以通过本领域熟知的方法来进行鉴别,包括例如,存在完整的膜、被特定的染料所染色、产生后代的能力、或者(在配子的情形中)与第二配子组合以产生存活后代的能力。细胞可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衍生于植物或动物的细胞,例如哺乳动物、昆虫(例如灰翅夜蛾)和人类细胞。细胞可以当其是天然非附着时而使用,或者其已经经过处理而不会附着至表面(例如通过胰蛋白酶化)。

[0130] 细胞穿透缀合物

[0131] 本文提供的是(在其它之外)细胞穿透缀合物,其包括附着至硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架的非细胞穿透蛋白(例如,抗体)。所述非细胞穿透蛋白通过非共价接头附着至硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架,其中所述非共价接头包括生物素结合配对的第一成员以及生物素结合配对的第二成员。所述生物素结合配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)。所述生物素结合配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)。所述非共价接头通过生物素结合配对的第一成员与生物素结合配对的第二成员之间的非共价结合而形成。在实施方案中,所述生物素结合配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),而所述生物素结合配对的第二成员是生物素结构域(例如,生物素)。在实施方案中,所述生物素结合配对的第一成员是生物素结构域(例如,生物素),而所述生物素结合配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)。

[0132] 所述生物素结合配对的第一成员与所述生物素结合配对的第二成员可以共价地或非共价地附着至非细胞穿透蛋白、硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,所述非细胞穿透蛋白共价地附着至生物素结合配对的第一成员(例如,亲和素、链霉亲和素),而硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架共价地附着至生物素结合配对的第二成员(例如,生物素)。硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架通过非共价接头的附着,形成了本文提

供的非细胞穿透蛋白,其能够通过穿透而进入细胞。本文所提供的缀合物可用于(在其它之外)抗体的细胞内递送以及细胞内靶标(例如信号蛋白)的靶向,以用于治疗 and 诊断目的。

[0133] 在一方面,提供了细胞穿透缀合物。所述细胞穿透缀合物包括(i)非细胞穿透蛋白;(ii)硫代磷酸核酸;和(iii)将硫代磷酸核酸附着至所述非细胞穿透蛋白的非共价接头。所述非共价接头包括非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域,并且硫代磷酸核酸增强了非细胞穿透蛋白的细胞内递送。

[0134] 非细胞穿透蛋白可通过非共价接头而附着至硫代磷酸聚合物骨架。因而,在另一方面,提供了细胞穿透缀合物。所述细胞穿透缀合物包括(i)非细胞穿透蛋白;(ii)硫代磷酸聚合物骨架;和(iii)将硫代磷酸聚合物骨架附着至非细胞穿透蛋白的非共价接头。所述非共价接头包括非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域,并且硫代磷酸聚合物骨架增强了非细胞穿透蛋白的细胞内递送。如上文所讨论的,聚合物骨架含有与核酸序列相同的结构(也即,含有彼此连接在一起的两个或更多个糖残基的链),除了该聚合物骨架缺乏通常存在于核酸序列中的碱基之外。还提供了包含细胞穿透缀合物的细胞。

[0135] 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4个生物素结构域。在实施方案中,生物素结合结构域附着至非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结合结构域共价附着至非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结合结构域非共价附着至非细胞穿透蛋白。在实施方案中,多个生物素结合结构域附着至非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结合结构域附着至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附着至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附着至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附着至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附着至生物素结构域,由此形成非共价接头。

[0136] 在实施方案中,生物素结构域附着至硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架。在实施方案中,生物素结构域共价附着至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附着至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附着至生物素结构域。在实施方案中,生物素结构域附着至非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域共价附着至非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域非共价附着至非细胞穿透蛋白。在实施方案中,多个生物素结构域附着至非细胞穿透蛋白。在实施方案中,生物素结构域非共价附着至生物素结合结构域,由此形成非共价接头。

[0137] 如上文所讨论的,所述核酸,例如所述硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架,通过非共价接头附着至非细胞穿透蛋白,其中所述非共价接头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。所述核酸,例如所述硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架可通过多种机制附着至生物素结合结构域或生物素结构域。类似地,非细胞穿透蛋白可通过多种机制附着至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非细胞穿透蛋白可以共价地或非共价地附着至生物素结合结构域或生物素结构域。非细胞穿透蛋白可以共价地附着至生物素结合结构域或生物素结构域。当非细胞穿透

蛋白共价地附着至生物素结合结构域或生物素结构域的时候,生物素结合结构域或生物素结构域共价地结合蛋白的氨基酸。在实施方案中,非细胞穿透蛋白包括共价反应性部分(如上文所述),并且反应性部分与生物素结合结构域或生物素结构域反应。在实施方案中,所述生物素结合结构域或生物素结构域包括共价反应性部分,并且反应性部分与非细胞穿透蛋白反应。

[0138] 在实施方案中,硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架包括共价反应性部分,并且反应性部分与生物素结合结构域或生物素结构域反应。如上文所述,共价反应性部分可以与蛋白的赖氨酸、精氨酸、半胱氨酸、或组氨酸反应(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是保护基团。在实施方案中,R是己醇(单价取代)。如本文所用,术语己醇包括具有式C₆H₁₃OH的化合物,并且包括1-己醇、2-己醇、3-己醇、2-甲基-1-戊醇、3-甲基-1-戊醇、4-甲基-1-戊醇、2-甲基-2-戊醇、3-甲基-2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-甲基-3-戊醇、3-甲基-3-戊醇、2,2-二甲基-1-丁醇、2,3-二甲基-1-丁醇、3,3-二甲基-1-丁醇、2,3-二甲基-2-丁醇、3,3-二甲基-2-丁醇、和2-乙基-1-丁醇。在实施方案中,R是1-己醇。在实施方案中,硫代磷酸核酸共价地连接至生物素结合结构域或生物素结构域。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,反应性部分是乙烯砜或者是具有式S-S-R的反应性部分,如上文所述。在实施方案中,R是己醇,例如,1-己醇。

[0139] 在实施方案中,当多个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架附着至生物素结合结构域或生物素结构域的时候,该多个中的每个都可以共价地或非共价地附着。在实施方案中,当多个生物素结合结构域或生物素结构域附着至非细胞穿透蛋白的时候,该多个中的每个都可以共价地或非共价地附着。所述硫代磷酸核酸、硫代磷酸聚合物骨架、或非细胞穿透蛋白可含有反应性部分(例如氨基酸反应性部分或共价反应性部分),其促进所述硫代磷酸核酸、硫代磷酸聚合物骨架、或非细胞穿透蛋白附着至生物素结合结构域或生物素结构域。因而,所述硫代磷酸核酸、硫代磷酸聚合物骨架、或非细胞穿透蛋白可以通过如本文所述的反应性部分附着至生物素结合结构域或生物素结构域。

[0140] 提供了多个包括非细胞穿透蛋白的细胞穿透缀合物,所述非细胞穿透蛋白通过非共价接头附着至硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架,其中所述非共价接头包括非共价地附着至生物素结构域的生物素结合结构域(例如,亲和素或链霉亲和素)。硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架共价地或非共价地附着至非共价接头的生物素结合结构域或生物素结构域。在实施方案中,所述多个包括共价地附着至生物素结合结构域或生物素结构域的硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架,并且不包括非共价地附着至硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架生物素结合结构域或生物素结构域。在实施方案中,所述硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架非共价地附着至生物素结合结构域或生物素结构域,并且所述多个不包括具有共价附着的硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架的生物素结合结构域或生物素结构域。在一些实施方案中,所述多个包括一或多个生物素结合结构域或生物素结构域(包括非共价附着的硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架)、以及一或多个生物素结合结构域或生物素结构域(包括共价附着的硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架)。因而,所述多个可包括生物素结合结构域或生物素结构域(包括共价和非共价附着的硫代磷酸核酸或硫代磷

酸聚合物骨架)。

[0141] 在实施方案中,硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架长度为大约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长度为大约10个至大约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其长度都各自独立地为5至50、10至50、15至50、20至50、25至50、30至50、35至50、40至50、45至50、5至75、10至75、15至75、20至75、25至75、30至75、35至75、40至75、45至75、50至75、55至75、60至75、65至75、70至75、5至100、10至100、15至100、20至100、25至100、30至100、35至100、40至100、45至100、50至100、55至100、60至100、65至100、70至100、75至100、80至100、85至100、90至100、95至100、或更多个残基。在实施方案中,每个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架其长度都各自独立地为10至15、10至20、10至30、10至40、或10至50个残基。

[0142] 在实施方案中,一个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架的长度与另一个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架不同。作为实例,如果两个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架通过非共价接头附着至非细胞穿透蛋白,那么第一个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架可以是一种长度(例如,22个残基),而第二个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架可以是不同的长度(例如25个残基)。因而,如果多个硫代磷酸核酸和硫代磷酸聚合物骨架通过非共价接头附着至非细胞穿透蛋白,那么所述硫代磷酸核酸和硫代磷酸聚合物骨架可以具有许多不同的长度,例如,长度范围在10至30个残基。

[0143] 在实施方案中,多个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架附着至通过多个非共价接头非细胞穿透蛋白,其中所述多个非共价接头包括非共价结合至生物素结构域的生物素结合结构域。在实施方案中,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、或更多个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架附着至蛋白。在实施方案中,多个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架附着至非共价接头的生物素结合结构域或生物素结构域。在实施方案中,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、或更多个硫代磷酸核酸或硫代磷酸聚合物骨架附着至非共价接头的生物素结合结构域或生物素结构域。在实施方案中,多个生物素结合结构域或生物素结构域附着至蛋白。在实施方案中,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、或更多个生物素结合结构域或生物素结构域附着至蛋白。

[0144] 在实施方案中,非细胞穿透蛋白具有超过25kD的分子量。在实施方案中,非细胞穿透蛋白具有大约25kD至大约750kD的分子量。因而,非细胞穿透蛋白可以具有至少大约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)的分子量。在实施方案中,非细胞穿透蛋白具有至少大约25至100kD、至少大约25至150kD、至少大约25至200kD、至少大约25至250kD、至少大约25至300kD、至少大约25至350kD、至少大约25至400kD、至少大约25至450kD、至少大约25至500kD、至少大约25至550kD、至少大约25至600kD、至少大约25至650kD、至少大约25至700kD、或至少大约25至750kD的分子量。

[0145] 在实施方案中,非细胞穿透蛋白是抗体。如上文中更详细地讨论的,抗体可以是全长抗体如IgG、IgA、IgM、IgD或IgE抗体或者其片段。在实施方案中,抗体是IgG抗体或者其片段。在实施方案中,抗体是IgG抗体或者其片段。在实施方案中,抗体是Fv片段或人源化的抗体。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Fv片段。在实施方案中,抗体是人源化的抗体。因而,提供了经非共价接头而附着至硫代磷酸核酸或聚合物骨架的抗体,其中所述非共价接头包括生物素结合结构域和生物素结构域,其中所述硫代磷酸核酸或聚合物骨架增强抗体向细胞内的递送。在实施方案中,抗体是治疗性抗体,也即,用于疾病的治疗的抗体。因而,还提供了附着至一或多个硫代磷酸核酸或聚合物骨架的治疗性抗体,其中所述抗体结合细胞内靶标。

[0146] 在实施方案中,非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标。细胞内靶标可以是治疗性靶标或诊断性靶标或者位于细胞内的其它感兴趣的靶标,例如,要通过例如共聚焦显微镜来成像的靶标或结构,例如组蛋白。因而,提供了结合至细胞内靶标的细胞穿透缀合物。在实施方案中,细胞内靶标是选自以下组的疾病的靶标:自身免疫疾病、炎症性疾病、代谢失调、发育障碍、心血管疾病、肝病、肠疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经障碍、和癌症。细胞内靶标的实例包括(而不局限于)致肿瘤转录因子,包括但不限于STAT3、Myc、NFkB、AP1、HIF、突变体p53;肿瘤蛋白,包括但不限于Ras、Raf、MAPK、PI3激酶、AKT、BTK、JAK、SRC家族成员;免疫调节分子,包括FOXP3, T-BET, GATA3, STAT1、2、3、4、5、6。疾病的靶标可以是诊断性靶标或治疗性靶标或者与疾病相关联的其它感兴趣的靶标。示例性的癌症细胞内靶标包括但不限于, 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(RTK)、EGFR、VEGFR、PDGFR、Src家族成员、Ras、Abl、BCR-Abl、NPM-Alk、Janus激酶(JAK)、Bruton酪氨酸激酶(BTK)、以及病毒肿瘤蛋白(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靶标是病毒蛋白或病毒转录物。因而,细胞内靶标可以是人免疫缺陷病毒(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,细胞内靶标是DNA结合蛋白,包括但不限于转录因子、转录增强子、转录阻抑剂、组蛋白或经翻译后修饰的组蛋白。在实施方案中,细胞内靶标经表观遗传学修饰的DNA,例如,经甲基化的或羟甲基化的胞嘧啶(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,细胞内靶标是核酸,例如, RNA转录物或核酸。例如,细胞内靶标可以是感染性病原体(例如,寄生虫、病毒或细菌)的核酸。在实施方案中,细胞内靶标是信号分子或转录因子。在实施方案中,信号分子是磷酸酶或激酶。在实施方案中,细胞内靶标是癌症靶标者是位于癌细胞内。在实施方案中,细胞内靶标是STAT,例如, STAT3或输出蛋白7。在实施方案中,细胞内靶标选自以下组: STAT3、输出蛋白7、和Src。在实施方案中,细

胞内靶标是磷酸化的Src。在实施方案中,细胞内靶标是FOXp3。在实施方案中,细胞内靶标是T-BET。在实施方案中,非细胞穿透蛋白还包含标记、小分子或功能性核酸(附着至该蛋白)。在实施方案中,细胞穿透缀合物结合至细胞内靶标。

[0147] 细胞组合物

[0148] 在另一方面,提供了包括本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)的细胞。提供了包括一或多个所提供的细胞穿透缀合物的细胞,例如,所述细胞可包括多个细胞穿透缀合物。在实施方案中,所述细胞是癌细胞。在实施方案中,所述细胞是非癌细胞。在实施方案中,所述细胞是T细胞。在实施方案中,所述细胞是调节性T细胞。在实施方案中,所述缀合物在细胞内结合至细胞内靶标。作为实例,所述细胞可包括经非共价接头附着至一或多个硫代磷酸核酸或聚合物骨架的第一非细胞穿透蛋白和第二非细胞穿透蛋白,其中所述非共价接头包括非共价结合至生物素结构域的生物素结合结构域。第一和第二非细胞穿透蛋白在细胞内可以结合至细胞内靶标。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的相对于第一非细胞穿透蛋白而言不同的表位。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。在实施方案中,第一和/或第二非细胞穿透蛋白是抗体。因而,第一和第二非细胞穿透蛋白可以是相同的蛋白或不同的蛋白。

[0149] 药物组合物

[0150] 本文提供了药物组合物,其包含细胞穿透缀合物和药物可接受的载体。所提供的组合物(在其他之外)适宜用于体内或体外的制剂和施用。适宜的载体和赋形剂以及其制剂在以下中有描述,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st Edition,David B.Troy,ed.,Lippicott Williams&Wilkins(2005)。对于药物可接受的载体,意味着在生物学上或其它方面并非是不期望的材料,也即,该材料施用至对象而不会引起不期望的生物学效应或者与含有其的组合物中其它成分之间以有害的方式相互作用。如果施用至对象,载体任选是经过选择的,以便在对象中使活性成分的降解最小化以及使不良副作用最小化。

[0151] 本发明提供的药物组合物包括这样的组合物,其中以治疗有效的量(也即,以实现其所要达到的目标的量)含有活性成分(例如本文所述的组合物,包括实施方案或实施例)。对于特定应用有效的实际量将(在其它之外)取决于所治疗的病况。当在方法中施用来治疗疾病时,本文所述的重组蛋白将含有一定量的活性成分来实现期望的结果,例如,调节靶标分子的活性,和/或减少、消除、或减缓疾病症状的进展。对本发明化合物治疗有效量的确定在本领域技术人员的能力范围内,尤其是在参考本文的详细公开后。

[0152] 在另一方面,提供了药物组合物,其包括本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)和药物可接受的载体。在实施方案中,所述药物组合物还包括第二非细胞穿透蛋白,所述第二非细胞穿透蛋白包括将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白的第二非共价接头。在实施方案中,所述非共价接头包括非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的相对于本文提供的非细胞穿透蛋白(包括其实施方案)而言不同的表位。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白是抗体。

[0153] 所提供的组合物可以包括单一物质(agent)或者超过一种物质。在一些实施方案

中,组合物还包括经非共价接头附着至一或多种硫代磷酸核酸或聚合物骨架的第二非细胞穿透蛋白,其中所述非共价接头包括非共价结合至生物素结构域的生物素结合结构域。因而,本文提供的是这样的组合物,其包括第一细胞穿透缀合物和第二细胞穿透缀合物,其中第一非细胞穿透蛋白经第一非共价接头(包括非共价结合至第一生物素结构域的第一生物素结合结构域)附着至一或多个硫代磷酸核酸或聚合物骨架,以及其中第二非细胞穿透蛋白第二非共价接头(包括非共价结合至第二生物素结构域的第二生物素结合结构域)附着至一或多个硫代磷酸核酸或聚合物骨架。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的相对于第一非细胞穿透蛋白而言不同的表位。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。在实施方案中,第一和/或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或不同的蛋白。

[0154] 用于施用的组合物将通常包括本文所述的物质(溶解于药物可接受的载体,优选水成载体)。可以使用多种水成载体,例如,缓冲盐水以及类似的等。这些溶液是无菌的并且一般没有不期望的物质。这些组合物可以用常规的、熟知的消毒技术来进行消毒。所述组合物可根据需要含有药物可接受的辅助物质,以接近生理学条件,如pH调节和缓冲物质、毒性调节物质以及类似的等,例如,乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠以及类似的等。这些制剂中的活性物质的浓度可以广泛变化,并且将依照所选择的特定施用模式以及对象的需求而主要基于液体体积、粘性、体重以及类似的等来进行选择。

[0155] 活性化合物作为游离碱或药学可接受的盐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。也可以在甘油、液体聚乙二醇、和其混合物以及在油中制备分散系(dispersion)。在储存和使用的普通条件下,这些制剂可以含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0156] 药物组合物可以经鼻内或可吸入溶液或喷雾、气雾剂或吸入剂来进行递送。鼻溶液可以是设计为要以滴和喷雾来施用至鼻通道的水成溶液。可以制备鼻溶液,从而使其在许多方面都与鼻分泌物类似。因而,水成鼻溶液通常是等渗的并且稍经缓冲以保持5.5至6.5的pH。另外,可以在制剂中包括抗微生物的防腐剂(类似于眼科制剂中所用的那些)以及适当的药物稳定剂(如果需要的话)。各种商业鼻制剂是已知的,并且包括例如抗生素和抗组胺剂。

[0157] 口服制剂可以包括赋形剂,例如,药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁以及类似的等。这些组合物采用溶液、悬液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或散剂的形式。在一些实施方案中,口服药物组合物将包含惰性稀释剂或可同化食用载体,或者其可以被封装在硬壳或软壳的明胶胶囊中,或者其可以被压缩成片剂,或者其可以直接与饮食的食品掺合。对于口服治疗性施用,活性化合物可以与赋形剂掺合,并以可摄取片剂、颊含片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬液、浆液、饼剂(wafer)以及类似的等形式来进行使用。此类组合物和制剂应当含有至少0.1%得活性化合物。组合物和制剂的百分比,当然可以变化,并且常规可以是在2%至大约75%得重量单位之间(或者优选25-60%)。此类组合物中活性化合物的量是使得可以获得适宜剂量的。

[0158] 对于以水成溶液肠胃外施用,例如,所述溶液应当经过适当缓冲,并且液体稀释剂首先以充足的盐水或葡萄糖赋予等渗。水成溶液,特别是无菌水成介质,尤其适宜用于静脉

内、肌内、皮下和腹膜内施用。例如，一个剂量可以溶解在1ml的等渗NaCl溶液中，并加入至1000ml的皮下输液中或注射至建议的灌注部位。

[0159] 可以通过将活性化合物或构建物以所需的量掺入至适当的溶剂中，随后进行过滤消毒，来制备无菌可注射溶液。一般来说，分散剂是通过将各种经消毒的活性成分掺入至无菌载剂（其含有碱性分散介质）中来制备的。可以使用真空干燥和冷冻干燥技术（其产生活性成分外加另外期望的成分的粉末），来制备无菌粉末以用于重构建无菌可注射溶液。也涵盖了制备更加浓缩、或高度浓缩的溶液用于直接注射。DMSO可以作为用于极快速渗透的溶剂来使用，将高浓度的活性物质递送至小的区域。

[0160] 化合物的制剂可以存在于单位剂量或多剂量封装的容器中，如安瓿和小瓶。因而，组合物可以是单位剂量的形式。以此种形式将制剂再细分为含有适当量活性组分的单位剂量。因而，组合物可以多种单位剂量形式（取决于施用方法）来施用。例如，适用于口服施用的单位剂量形式包括但不限于，散剂、片剂、丸剂、胶囊和锭剂。

[0161] 施用于哺乳动物的剂量和频率（单次或多次剂量）可以根据多种因素而变化，例如，该哺乳动物是否患有另一种疾病、以及其施用途径；受体的大小、年龄、性别、健康、体重、身体质量指数、和饮食；所治疗疾病症状的性质和程度（例如癌症的症状以及此类症状的严重性）、同时进行治疗的类型、所治疗疾病的并发症或其它健康相关的问题。其它治疗方案或物质可以与本发明的方法和化合物联合使用。对已经确立的剂量的调整和操作（例如，频率和持续时间）是在本领域技术人员能力范围内的。

[0162] 对于本文所述的任何组合物（例如，所提供的细胞穿透缀合物），治疗有效量初始可以从细胞培养的测定来确定。目标浓度是能够实现本文所述方法的那些活性化合物的浓度（使用本文所述方法或本领域已知方法测量）。如本领域所熟知的那样，用于人类的有效量也可以从动物模型来确定。例如，可以配制用于人类的剂量，来实现在动物中已经发现有效的浓度。人类中的剂量可以通过检测有效性和向上或向下调整剂量来进行调整，如上文所述。基于上文所述的方法和其它方法来调整剂量以实现最大效力，是在本领域技术人员能力范围内的。

[0163] 剂量可以依据患者的需求以及所使用的化合物来进行变化。在本发明的背景下，施用于患者的剂量随着时间应当足以在患者中实现有益的治疗应答。剂量的大小还将通过任何不良副作用的存在、性质和程度来确定。对于特定情况确定适宜剂量是在从业者能力范围内的。一般来说，用低于化合物最佳剂量的较小的剂量来起始治疗。之后，通过小的提升来提高剂量，直至达到情况下的最佳效果。

[0164] 剂量的量和间隔可以进行个别调整，以提供对所治疗的特定临床适应症有效的施用化合物水平。这将会提供与个体疾病状态的严重性相称的治疗方案。

[0165] 利用本文所提供的技术，可以计划有效的预防性或治疗性的治疗方案，其不会引起严重毒性并且对治疗临床症状依然有效（通过特定患者证明）。此计划应当涉及对活性化合物的仔细选择，其中是通过考虑一下因素，如化合物的效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的存在及严重性，优选的。

[0166] “药物可接受的赋形剂”和“药物可接受的载体”是指辅助活性物质施用于对象并被对象吸收的物质，并且其可以包括在本发明组合物中而不会对患者引起显著的不良毒理学作用。药物可接受的赋形剂的非限制性实例包括水、NaCl、生理盐水、乳酸林格液、正常蔗

糖、正常葡萄糖、粘合剂、填充剂、分解质、润滑剂、涂层、甜味剂、调味剂、盐溶液(如林格液)、醇、油、明胶、碳水化合物(如乳糖、淀粉糖或淀粉)、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、和颜料,以及类似的等。此类制剂可以经过消毒,以及在期望时与辅助物质混合,所述辅助物质如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、颜料、和/或芳香物质以及类似的等(不会与本发明的化合物产生有害的反应)。本领域技术人员将会意识到其它药物赋形剂可用于本发明。

[0167] 术语“药物可接受的盐”是指衍生自本领域已知的多种有机和无机抗衡离子的盐,并且包括(仅仅是以实例的方式)钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵以及类似的等;以及当分子含有碱性官能性的时候,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、草酸盐以及类似的等。

[0168] 术语“制剂”是要包括活性化合物的制剂,其具有封装材料作为载体以提供胶囊,活性组分(有或无其它载体)在其中被载体(因而与其相关联)所围绕。类似地,包括了扁囊剂(cachets)和锭剂。片剂、散剂、胶囊、丸剂、扁囊剂、和锭剂可以用作适于口服施用的固体剂量形式。

[0169] 形成缀合物的方法

[0170] 在另一方面,提供了形成细胞穿透缀合物的方法。所述方法包括使非细胞穿透蛋白与硫代磷酸核酸接触,其中所述非细胞穿透蛋白附着至生物素结合配对的第一成员,并且硫代磷酸核酸附着至生物素结合配对的第二成员,由此形成细胞穿透缀合物,其包括生物素结构域和生物素结合结构域之间的非共价键。如上文所述,生物素结合配对的第一成员可以是生物素结合结构域或生物素结构域,而生物素结合配对的第二成员可以是生物素结合结构域或生物素结构域。在实施方案中,生物素结合配对的第一成员是生物素结合结构域。在实施方案中,生物素结合配对的第二成员是生物素结构域。在实施方案中,生物素结合配对的第一成员是生物素结构域。在实施方案中,生物素结合配对的第二成员是生物素结合结构域。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,非共价地结合至生物素结构域的生物素结合结构域形成非共价接头。

[0171] 递送方法

[0172] 在另一方面,提供了将非细胞穿透蛋白递送至细胞内的方法。所述方法包括使所述细胞与本文所提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)接触。在实施方案中,非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白,由此形成非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物。在实施方案中,非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物不能够进入细胞的细胞核。

[0173] 在实施方案中,细胞穿透缀合物用于在对象中诊断疾病。因而,提供了在对象中诊断疾病的方法,包括向所述对象施用有效量的本文所述的细胞穿透缀合物或包含细胞穿透缀合物的组合物。缀合物的施用在对象中诊断疾病或者疾病的一或多种症状。所公开的方法涉及将来自测试样品的生物标志物(例如疾病的细胞内靶标)的水平或活性与对照样品比较。如上文所讨论的,对照样品或值是指用作参考(通常是已知参考)的样品,以用于与测试样品进行比较。对照也可以代表从相似个体(例如具有相似医学背景、相同年龄、体重等的癌症患者或健康个体)的群体收集的平均值。对照值也可以从同一个体获得,例如,从较早获得的样品(在疾病之前、或在治疗之前)中获得。也如上文所讨论的,诊断是指疾病(例如自身免疫、炎症性自身免疫、癌症、感染性的、免疫、或其它疾病)在对象中存在的相对可

能性。

[0174] 针对疾病风险因素的确定,术语比较、关联和相关,是指将个体中风险因素的存在或量(例如疾病的细胞内靶标的量),与已知患有该疾病(或已知有该疾病的风险)的人、或已知没有该疾病的人中的存在或量进行比较,并基于测定结果来给出个体患有/发展处该疾病的提高的或降低的可能性。

[0175] 检测方法

[0176] 本文还提供了在细胞中检测细胞内靶标的方法,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,并检测所述细胞穿透缀合物对细胞内靶标的结合。所述细胞可以是经固定的细胞或者活细胞。在实施方案中,所述细胞位于体外或体内。结合可以直接或间接检测。本文中理解并涵盖的是,可以使用许多的方法来检测细胞穿透缀合物对其细胞内靶标的结合。例如,可以通过测定细胞穿透缀合物与其细胞内靶标之间的偶合来直接对结合进行检测。可以例如通过从以下组选择测定来对结合进行确定:共免疫沉淀测定、共定位测定、或荧光偏振测定,如下文所述。所述测定在本领域中是已知的,例如,参见Sambrook等人,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);和Zinchuk等人,Acta Histochem.Cytochem.40(4):101-11(2007)。

[0177] 在实施方案中,通过成像方法或系统来对结合进行确定。因而,本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)也可以用于成像应用或其它应用来用于分析细胞内靶标水平和/或活性。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标的体内或体外成像。在实施方案中,所述细胞穿透缀合物用于活细胞成像。例如,可以使用活细胞成像来监测活细胞内的细胞内靶标分布和/或动力学,并且其也适用于检测靶标相互作用。例如,在实施方案中,在活细胞中,所述细胞穿透缀合物可用于免疫沉淀和共免疫沉淀测定,来研究细胞中的蛋白-蛋白相互作用。在实施方案中,所述细胞穿透缀合物用于通过流式细胞术来分析细胞内靶标。在成像应用中,在实施方案中,所述细胞穿透缀合物经过标记(适宜于所使用的应用)。如上文所述,标记或可检测部分是可以通过光谱、光化学、生化、免疫化学、化学、或其他物理手段来检测的成分。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ELISA中通常使用的)、生物素、异羟基洋地黄毒苷元、或半抗原和蛋白或者其它实体,其可以通过将放射标记掺入与靶标肽特异性反应的肽或抗体而变得可检测。可以使用本领域已知的用于将抗体缀合至标记的任何方法,例如,使用Hermanson,Bioconjugate Techniques 1996,Academic Press,Inc.,San Diego中描述的方法。

[0178] 治疗方法

[0179] 本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)以及包括本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)的组合物,可以用于预防性的和治疗性的治疗。对于预防性的用途,在发作前或在早期发作期间(例如在自身免疫疾病的初始迹象和症状时)将治疗有效量的本文所述物质施用至对象。治疗性的治疗涉及在疾病的诊断和发展之后将治疗有效量的本文所述物质施用至对象。因而,在另一方面,提供了在有需要的对象中治疗疾病的方法。所述方法包括向对象使用有效量的本文所提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案),由此在所述对象中治疗疾病。

[0180] 在实施方案中,所述方法包括向所述对象施用第二非细胞穿透蛋白,所述第二非细胞穿透蛋白包括将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白的第二非共价接头。在实施方案中,所述非共价接头包括非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的相对于本文提供的缀合物(包括其实施方案)而言不同的表位。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。在实施方案中,本文提供的缀合物(包括其实施方案)以及第二非细胞穿透蛋白同时施用。在实施方案中,本文提供的缀合物(包括其实施方案)以及第二非细胞穿透蛋白顺次施用。

[0181] 在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白是抗体。在实施方案中,所述方法包括向对象施用第二治疗剂。在实施方案中,所述疾病选自以下组:自身免疫疾病、发育障碍、炎症性疾病、代谢失调、心血管疾病、肝病、肠疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经障碍、和癌症。在实施方案中,所述疾病是自身免疫疾病。在实施方案中,所述疾病是发育障碍。在实施方案中,所述疾病是炎症性疾病。在实施方案中,所述疾病是代谢失调。在实施方案中,所述疾病是心血管疾病。在实施方案中,所述疾病是肝病。在实施方案中,所述疾病是肠疾病。在实施方案中,所述疾病是感染性疾病。在实施方案中,所述疾病是内分泌疾病。在实施方案中,所述疾病是神经障碍。在实施方案中,所述疾病是癌症。在实施方案中,所述缀合物的非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标,并且所述细胞内靶标是STAT3、输出蛋白7、或Src。在实施方案中,所述缀合物的非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标,并且所述细胞内靶标是磷酸化的Src。在实施方案中,所述缀合物的非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3的抗体,而第二非细胞穿透蛋白是特异性结合输出蛋白7的抗体。在实施方案中,所述缀合物的非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3的抗体,而第二非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3另一表位的抗体。

[0182] 在所提供的治疗方法,可以使用适宜于所治疗疾病的另外的治疗剂。因而,在一些实施方案中,所提供的治疗方法还包括向所述对象施用第二种治疗剂。适宜的另外的治疗剂包括但不限于,选自以下组的治疗剂:镇痛剂、麻醉剂、兴奋剂、皮质类固醇、抗胆碱剂、抗胆碱酯酶、抗痉挛剂、抗肿瘤剂、变构抑制剂、合成代谢类固醇、抗风湿剂、心理治疗剂、神经阻断剂、抗炎症剂、抗蠕虫剂、抗生素、抗凝血剂、抗真菌剂、抗组织胺剂、抗毒蕈碱剂、抗分支杆菌剂、抗原生动物剂、抗病毒剂、多巴胺类、血液学物质、免疫学物质、毒蕈碱类、蛋白酶抑制剂、维生素、生长因子、和激素。对于物质和剂量的选择可以由本领域技术人员基于给定的所治疗疾病来容易地确定。

[0183] 物质或组合物的组合可以伴随地(例如作为混合物)、分别但同时地(例如经分别的静脉内线路)、或顺次地(例如施用一种物质随后再施用第二种物质)施用。因而,术语组合是用于指两种或更多种2物质或组合物的伴随、同时或顺次施用。治疗的进程最好是在个体的基础上进行确定(取决于对象的特定特征和所选治疗的类型)。治疗(如本文所述的那些),可以每日、每双周、每月或任何治疗有效的适用基础来施用至对象。治疗可以单独施用、或者与本文公开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种治疗同时、在不同时间、或者以完全不同的治疗方案(例如第一种治疗可以是每天的,而另外的治疗是每周的)来施用。

[0184] 根据本发明提供的方法,对象施用了有效量的一或多种本文所提供的物质。术语有效量和有效剂量可互换使用。术语有效量定义为产生期望的生理应答(例如炎症的减少)

所必须的量。对于施用物质的有效量和方案可以由本领域技术人员依照经验来确定。用于施用的剂量范围大到足以产生期望效果(其中疾病或病征的一或多种症状收到影响,例如减少了或延缓了)的那些。剂量不应太大以致于引起重大的不良副作用,如不期望的交叉反应、过敏反应、以及类似的等。一般来说,剂量将会随着年龄、条件、性别、疾病类型、疾病或病征的程度、施用途径、或方案中是否包括其它药物而变化,并且其可以由本领域技术人员确定。剂量可以由个别医师在任何禁忌症的事件中进行调整。剂量可以变化并且可以每天以一或多个剂量来施用,并进行一或若干天。对于给定类别的药物产品适宜的剂量可以在文献中找到指引。例如,对于给定的参数,有效量将会显示出少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、或至少100%的提高或降低。效力可以表示为“-倍”提升或降低。例如,治疗有效量可以具有对照至少1.2-倍、1.5-倍、2-倍、5-倍、或更多倍的作用。确切的剂量和制剂将取决于治疗的目标,并且将可以由本领域技术人员使用已知的技术来确定(参见,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))。

[0185] 公开了材料、组合物和组分,其可用于所公开的方法和组合物、可以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品。本文公开了这些和其它材料,并且应理解当公开了这些材料的组合、亚集、相互作用、分组等的时候,而各种个别的和集体的组合中每个的具体提及以及这些化合物的排序可能并未明确公开,但是每个都具体在本文中得到涵盖和描述。例如,如果公开了并讨论了方法,并且讨论了可以对一些分子包括所述方法所进行的一些修改,那么所述方法的每种组合和排序、以及可能的修改都具体得到了涵盖,除非有明确的相反陈述。同样地,这些的任何亚集或组合都具体得到涵盖和描述。此概念适用于本公开的所有方面,包括但不限于使用所公开组合物的方法中的步骤。因而,如果有许多可以进行的额外的步骤,那么应理解这些额外的步骤的每一个都可以与任何具体的方法步骤或所公开方法的方法步骤组合一起进行,并且每个此种组合或组合的亚集都具体得到涵盖且应认为是得到了公开。

[0186] 术语“对象”、“患者”、“个体”等并不是要进行限制,并且一般可以互换。也就是说,描述为“患者”的个体并不必然具有给定的疾病,而是可能仅仅在寻求医疗建议。

[0187] 如本文所用,“治疗”病况、疾病或病征(或与病况、疾病或病征相关联的症状)、或者病况、疾病或病征(或与病况、疾病或病征相关联的症状)“的治疗”,是指用于获得有益的或期望的结果(包括临床结果)的手段。有益的或期望的临床结果可包括但不限于,一或多种症状或病况的缓解或改善,病况、疾病或病征程度的减轻,病况、病征或疾病状态的稳定,防止病况、病征或疾病的发展,防止病况、病征或疾病的扩散,病况、病征或疾病进展的延迟或减缓,病况、病征或疾病发作的延迟或减缓,病况、病征或疾病状态的改善或缓和,以及减轻(部分或全部)。“治疗”也可以意味着延长对象的存活超过缺乏该治疗时的预期。“治疗”也可以意味着抑制病况、病征或疾病的进展,暂时减缓病况、病征或疾病的进展,但在某些情形中,其涉及永久地停止病况、病征或疾病的进展。如本文所用,术语治疗是指减少特征在于表达蛋白酶的疾病或病征的一或多种症状的作用、或者减少特征在于表达蛋白酶的疾病或病征的症状。因而在所公开的方法中,治疗可以是指以确立的疾病、病征、或者疾病或

病征的症状的严重性降低了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%。例如,如果与对照相比,对象中疾病的一或多种症状减少了10%,则认为用于治疗疾病的方法是治疗。因而所述减少可以是与天然或对照水平相比,减少了10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、或10%至100%之间任何百分比的减少。应理解治疗并不必然是指疾病、病况、或者疾病或病况的症状的治愈或完全消除。另外,如本文所用,对于降低、减少、或抑制,其包括与对照水平相比10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的变化,并且此类术语可以包括但并不必然包括完全的去除。

[0188] 当涵盖组合治疗时,并不是要用该组合的特定性质来限定本文所述的物质(也即核糖核酸化合物)。例如,本文所述的物质可以作为简单的混合物以及化学杂交剂来组合施用。后者的实例是当物质共价连接至靶向载体或连接至活性药物时。共价结合可以许多方式来实现,如(但是却不限于)施用商业可得的交联剂。

[0189] 如本文所用,术语“药物可接受的”与“生理学可接受的”和“药学可接受的”作为同义词使用。药物组合物通常将包含用于缓冲和储藏中防腐的物质,并且可以包括用于适宜的递送的缓冲液和载体(取决于施用途径)。

[0190] “有效量”是足以实现一定目标的量(例如实现其所施用的作用、治疗疾病、降低酶活性、减少疾病或病征的一或多种症状)。“有效量”的实例是足以促成疾病的一或多种症状的治疗、预防或减少的量,其也称作“治疗有效量”。一或多种症状的“减少”以及此表述语法上的等同)意味着症状严重性或频率的降低、或症状的去除。药物的“预防有效量”是当药物施用至对象时,将会具有所要的预防作用的量,例如,防止或延迟损伤、疾病、病理或病况的发作(或复发),或者减少损伤、疾病、病理或病况(或其症状)发作(或复发)的可能性。通过施用一个剂量并不必然发生完全的预防效果,并且可能仅在施用一系列剂量之后才可发生。因而,预防有效量可以在一或多次施用中进行施用。如本文所用,“活性降低量”是指降低酶活蛋白的活性(相对于缺乏拮抗剂时)所需拮抗剂的量。如本文所用,“功能干扰量”是指干扰酶活蛋白的功能(相对于缺乏拮抗剂时)所需拮抗剂的量。对于给定类别的药物产品适宜的剂量可以在文献中找到指引。例如,对于给定的参数,有效量将会显示出少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、或至少100%的提高或降低。效力可以表示为“-倍”提升或降低。例如,治疗有效量可以具有对照至少1.2-倍、1.5-倍、2-倍、5-倍、或更多倍的作用。确切的量将取决于治疗的目的,并且将可以由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见,例如Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols.1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); 和 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins)。

[0191] 如本文所用,术语“施用”意味着向对象口服施用、作为栓剂施用、局部接触、静脉内施用、腹膜内施用、肌肉内施用、病灶内施用、鞘内施用、鼻内施用或皮下施用、或者植入缓释装置(例如,微量渗透泵)。施用是通过任何途径,包括肠胃外和穿粘膜的途径(例如,口腔颊、舌下、腭部、牙龈、阴道、直肠、或经皮)。肠胃外施用包括,例如,静脉内、肌肉内、细动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内、以及颅内。其它递送模式包括但不限于,使用脂质体制剂、静脉输注、透皮贴片等。对于“共施用”,其意味着本文所述的组合物与一或多种另外的疗法施用的同时、紧接在其之前、或紧接在其之后,来进行施用,所述一或多种另外的疗法例如

为癌症疗法如化疗、激素疗法、放疗、或免疫疗法。本发明的化合物可以单独施用,或者可以共施用至患者。共施用意味着包括同时或顺次施用个别的化合物或者组合(超过一种化合物)。因而,当期望的时候,制剂也可以是与其它活性物质组合的(例如以降低代谢降解)。本发明组合物可以通过经皮施用,通过外用途径施用,配制为敷药棒、溶液、悬液、乳剂、凝胶、霜、软膏、糊状物、胶状物、涂料、散剂、和气雾剂。

[0192] 本发明组合物可以另外包括成分来提供持续释放和/或舒适性。此类成分包括高分子量的、阴离子拟粘膜聚合物(anionic mucomimetic polymer),凝胶多糖和细碎的药物载体底物。这些成分在美国专利号4,911,920;5,403,841;5,212,162;和4,861,760中有大量详细讨论。这些专利的全部内容对于所有目的都以其整体援引加入本文。本发明组合物也可以作为微球递送,以用于在身体内缓慢释放。例如,微球可以经含药微球(其缓慢皮下释放)的皮内注射来施用(参见Rao,J.Biomater Sci.Polym.Ed.7:623-645,1995;可以作为生物可降解和可注射凝胶制剂来施用(参见,例如Gao Pharm.Res.12:857-863,1995);或者,可以作为微球用于口服施用(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细胞吞噬的脂质体来递送,也即,通过使用附着至脂质体(其结合至导致细胞吞噬的表面膜蛋白受体)的受体配体。通过使用脂质体,特别是当脂质体表面携带有特异于靶细胞的受体配体的时候、又或者优先涉及具体的器官的时候,则可以在体内将本发明组合物的递送集中在靶细胞中(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)。本发明组合物也可以作为纳米颗粒来进行递送。

[0193] 利用本文提供的教导,可以计划有效的预防性或治疗性的治疗方案,其不会引起严重的毒性并且治疗临床症状依然有效(经特定患者证实)。此计划应当涉及对活性化合物的小心选择,这是通过考虑以下因素,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性、优选的施用模式、以及选定物质的毒性特征。

[0194] “抗癌物质”依照其惯常含义使用,并且是指具有抗肿瘤特性或抑制细胞生长或增殖能力的成分(例如化合物、药物、拮抗剂、抑制剂、调节剂)。在实施方案中,抗癌物质是化疗剂。在实施方案中,抗癌物质是本文鉴定的在治疗癌症的方法中有作用的物质。在实施方案中,抗癌物质是由FDA(或美国之外其它国家类似的监管机构)所许可的用于治疗癌症的物质。

[0195] 试剂盒

[0196] 在另一方面,提供了包括本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)或本文所提供的药物组合物(包括其实施方案)以及使用说明的试剂盒。在实施方案中,所述试剂盒包括第二非细胞穿透蛋白,所述第二非细胞穿透蛋白包括将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白的第二非共价接头。在实施方案中,第二非共价接头包括非共价结合至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,本文提供的缀合物(包括其实施方案)和第二非细胞穿透蛋白在不同的容器中。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的相对于本文提供的非细胞穿透蛋白(包括其实施方案)而言不同的表位。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。在实施方案中,第二非细胞穿透蛋白被配制为药物组合物,其中包括第二非细胞穿透蛋白和药物可接受的载体。在

实施方案中,第二非细胞穿透蛋白是抗体。在实施方案中,试剂盒包括用于治疗或预防疾病的一或多种症状的一或多种另外的物质。在实施方案中,试剂盒包括施用组合物的器具(means),如例如,注射器、针头、管、导管、贴片以及类似的等。试剂盒还可以包括需要在使用前进行消毒和/或稀释的制剂和/或材料。

实施例

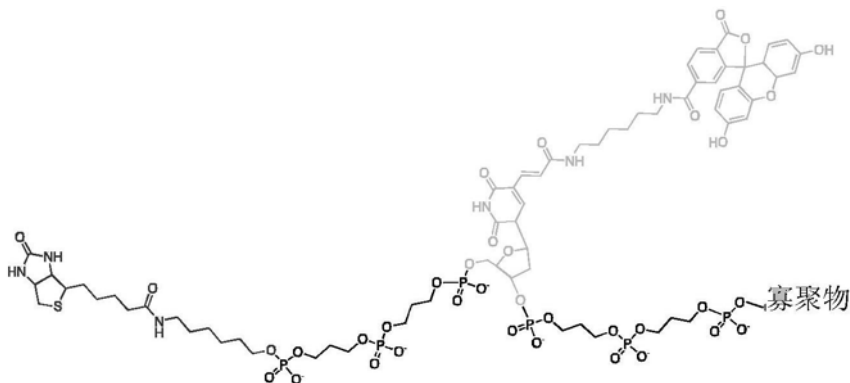
[0197] 实施例1

[0198] 申请人证明了硫代磷酸化的(PS)DNA寡聚物(长度20聚体)使得抗体能够穿透至活细胞内并识别预期的抗原。硫代磷酸化在DNA寡聚物的糖磷酸骨架中发生。申请人证明了PS DNA寡聚物的附着有助于抗体的细胞内递送以及有效的靶标识别,且20聚体PS DNA寡聚物是非常有效的。对于DNA寡聚物,经聚乙二醇化缀合,经2' 氟-、2' 甲基A-、或2' 甲基G-修饰并不会有助于抗体的细胞内摄取,而PS RNA寡聚物的附着并不会有助于细胞内递送。和成了(具有附着的生物的)有上文提到的各种修饰的DNA寡聚物、以及有PS修饰的RNA(20聚体);用亲和素/链霉亲和素标记抗体,以使得寡聚物与抗体能够非共价连接。

[0199] 所提供的方法和组合物可用于本文提供的细胞穿透缀合物(包括其实施方案)的纯化。附着的非共价接头(包括非共价结合至生物素结构域的生物素结合结构域)引起缀合物分子量的提高(相对于缺乏非共价接头)。因此,使用本领域通常熟知的大小排阻方法可以方便地纯化本文所提供的缀合物。

[0200] 结构

[0201]



[0202] 5'-生物素寡聚物:红色=生物素,黑色=C3,而绿色=荧光素dT单元

[0203] 经链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物的经修饰的抗-STAT3抗体能够进行细胞穿透。图4A显示了流式细胞术分析(用以使用第二抗体来检测所递送的抗体-抗原复合物)。使用经链霉亲和素/生物素缀合至PO-DNA寡聚物(20聚体)(红线)、PS-DNA寡聚物(20聚体)(红色区域)、1kPEG(蓝线)、和30kPEG(虚线)的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞(人神经胶质瘤干细胞)。用10 μ g/ml的特定的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在洗涤步骤(PBS/1%BSA)之后,收获所述细胞,并用500 μ l的2%多聚甲醛进行固定(15分钟),随后是洗涤步骤(PBS/1%BSA)以及通过500冰冷的甲醇处理(10分钟)。在洗涤(PBS/1%BSA)之后,用PBS/1%BSA/1%小鼠血清在4 $^{\circ}$ C将所述细胞封闭1小时。之后洗涤(PBS/1%BSA)所述细胞,并用第二抗体(1:4,000在PBS中的抗兔AF647)在黑暗中染色30分钟。在三个最终的洗涤步骤(PBS/1%BSA)之后进行流式细胞术分析,并将细胞收集至300 μ l的洗涤缓冲液中。未染色的U251用作空白对照(灰色区域)。

[0204] 图4B显示了另外的Western印迹分析以检测所递送的抗体-抗原复合物。使用经链霉亲和素/生物素缀合至P0-DNA寡聚物(20聚体)(第一泳道)、PS-DNA寡聚物(20聚体)(第二泳道)、PEG-1k-DNA寡聚物(第三泳道)、和PEG-30k-DNA寡聚物(第四泳道)的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞。用10 μ g/ml所示的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在温育和两个用PBS(2ml)的洗涤步骤之后,经在冰上于500 μ l RIPA缓冲液中温育(30分钟)而将所述细胞裂解,随后是剧烈涡旋。通过在离心步骤(10分钟13.000rpm,4 $^{\circ}$ C)之后收集上清来收获全细胞裂解物。向每个全细胞裂解物添加30 μ l的重组蛋白G琼脂糖珠,并在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C温育过夜。将所述珠沉淀成丸(2分钟,2.400rpm,4 $^{\circ}$ C)并用500 μ l冰冷的PBS洗涤2次。在用30 μ l Laemmli缓冲液将干燥的琼脂糖珠装满并在95 $^{\circ}$ C温育5分钟之后,将20 μ l装载至10%SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)上并在125V运行。在将凝胶印迹至硝化纤维素印迹膜(0.45 μ m)上之后,在摇动平台上于室温用10%的BSA/TBS-T(0.1%Tween 20)对所述膜进行1小时封闭。之后在摇动平台上将所述膜与初级抗体(1:1.000在TBS-T中的抗STAT3)于4 $^{\circ}$ C温育过夜。在三个洗涤步骤(15分钟、10分钟、10分钟,用TBS-T)之后,在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C将所述膜与ECLTM抗兔IgG、辣根过氧化物酶(在TBS-T中1:10.000)温育2-4小时。在四个最终的洗涤步骤(每个5分钟,用TBS-T)之后,使用SuperSignal[®]West Dura Extended检测试剂盒进行检测。

[0205] 经链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物的经修饰的抗-STAT3抗体能够进行细胞穿透以及靶标识别。图6显示了另外的Western印迹分析以检测所递送的抗体-抗原复合物。使用经链霉亲和素/生物素缀合至P0-2' 氟-寡聚物(第一泳道)、P0-2' 甲基A-寡聚物(第二泳道)、P0-2' 甲基G-寡聚物(第三泳道)、P0-寡聚物DNA(20聚体)(第四泳道)、PS-寡聚物DNA(20聚体)(第五泳道)、以及未经修饰的抗体(第六泳道)的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞。用10 μ g/ml所示的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在温育和两个用PBS(2ml)的洗涤步骤之后,经在冰上于500 μ l RIPA缓冲液中温育(30分钟)而将所述细胞裂解,随后是剧烈涡旋。通过在离心步骤(10分钟13.000rpm,4 $^{\circ}$ C)之后收集上清来收获全细胞裂解物。向每个全细胞裂解物添加30 μ l的重组蛋白G琼脂糖珠,并在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C温育过夜。将所述珠沉淀成丸(2分钟,2.400rpm,4 $^{\circ}$ C)并用500 μ l冰冷的PBS洗涤2次。在用30 μ l Laemmli缓冲液将干燥的琼脂糖珠装满并在95 $^{\circ}$ C温育5分钟之后,将20 μ l装载至10%SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)上并在125V运行。在将凝胶印迹至硝化纤维素印迹膜(0.45 μ m)上之后,在摇动平台上于室温用10%的BSA/TBS-T(0.1%Tween20)对所述膜进行1小时封闭。之后在摇动平台上将所述膜与初级抗体(1:1.000在TBS-T中的抗STAT3)于4 $^{\circ}$ C温育过夜。在三个洗涤步骤(15分钟、10分钟、10分钟,用TBS-T)之后,在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C将所述膜与ECLTM抗兔IgG、辣根过氧化物酶(在TBS-T中1:10.000)温育2-4小时。在四个最终的洗涤步骤(每个5分钟,用TBS-T)之后,使用SuperSignal[®]WestDura Extended检测试剂盒检测。

[0206] 通过链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物(20聚体)的经修饰的抗-STAT3抗体在细胞穿透中是最有效的。图7A上图显示了流式细胞术分析,用以检测所递送的抗体(使用抗兔抗体)。使用经链霉亲和素/生物素缀合至所示的PS DNA-寡聚物:(80聚体)(点线)、PS-寡聚物DNA(40聚体)(虚线)、以及PS-寡聚物DNA(20聚体)(红色区域)的经修饰的抗-STAT3抗体(兔)治疗U251细胞(人神经胶质瘤干细胞)。图7A下图显示的与图7A一样,但是使用经

链霉亲和素/生物素缀合至PS-寡聚物DNA (20聚体) (红色区域)、PS-寡聚物DNA (10聚体) (蓝线)、PS-寡聚物DNA (5聚体) (红线)、PS-寡聚物DNA (3聚体) (橙线)、PS-寡聚物DNA (2聚体) (浅绿线)、以及PS-寡聚物DNA (单体) (深绿线) 的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞。用10 μ g/ml所示的经修饰的抗-STAT3抗体(兔) 治疗U251细胞,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在洗涤步骤(PBS/1%BSA) 之后,收获细胞并用500 μ l的2%多聚甲醛固定(15分钟),随后是洗涤步骤(PBS/1%BSA) 以及通过500冰冷的甲醇处理(10分钟)。在洗涤(PBS/1%BSA) 之后,用PBS/1%BSA/1%小鼠血清在4 $^{\circ}$ C将所述细胞封闭1小时。之后洗涤(PBS/1%BSA) 所述细胞,并用第二抗体(灰线,上图和下图) (1:4,000在PBS中的 α Rb AF647) 在黑暗中染色30分钟。在三个最终的洗涤步骤(PBS/1%BSA) 之后进行流式细胞术分析,并将细胞收集至300 μ l的洗涤缓冲液中。未染色的U251用作空白对照(灰色区域,上图和下图)。

[0207] 图7B显示了另外的Western印迹分析以检测所递送的抗体-抗原复合物。使用经链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物DNA (80聚体) (第一泳道)、PS-寡聚物DNA (40聚体) (第二泳道)、PS-寡聚物DNA (20聚体) (第三泳道)、PS-寡聚物DNA (10聚体) (第四泳道)、PS-寡聚物DNA (5聚体) (第五泳道)、PS-寡聚物DNA (3聚体) (第六泳道)、PS-寡聚物DNA (2聚体) (第七泳道)、以及PS-寡聚物DNA (单体) (第八泳道) 的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞。用10 μ g/ml所示的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在温育和两个用PBS (2ml) 的洗涤步骤之后,经在冰上于500 μ l RIPA缓冲液中温育(30分钟) 而将所述细胞裂解,随后是剧烈涡旋。通过在离心步骤(10分钟13,000rpm,4 $^{\circ}$ C) 之后收集上清来收获全细胞裂解物。向每个全细胞裂解物添加30 μ l的重组蛋白G琼脂糖珠,并在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C温育过夜。将所述珠沉淀成丸(2分钟,2,400rpm,4 $^{\circ}$ C) 并用500 μ l冰冷的PBS洗涤2次。在用30 μ l Laemmli缓冲液将干燥的琼脂糖珠装满并在95 $^{\circ}$ C温育5分钟之后,将20 μ l装载至10% SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 上并在125V运行。在将凝胶印迹至硝化纤维素印迹膜(0.45 μ m) 上之后,在摇动平台上于室温用10%的BSA/TBS-T (0.1% Tween20) 对所述膜进行1小时封闭。之后在摇动平台上将所述膜与初级抗体(1:1,000在TBS-T中的抗STAT3) 于4 $^{\circ}$ C温育过夜。在三个洗涤步骤(15分钟、10分钟、10分钟,用TBS-T) 之后,在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C将所述膜与ECLTM抗兔IgG、辣根过氧化物酶(在TBS-T中1:10,000) 温育2-4小时。在四个最终的洗涤步骤(每个5分钟,用TBS-T) 之后,使用SuperSignal[®] West Dura Extended检测试剂盒检测。

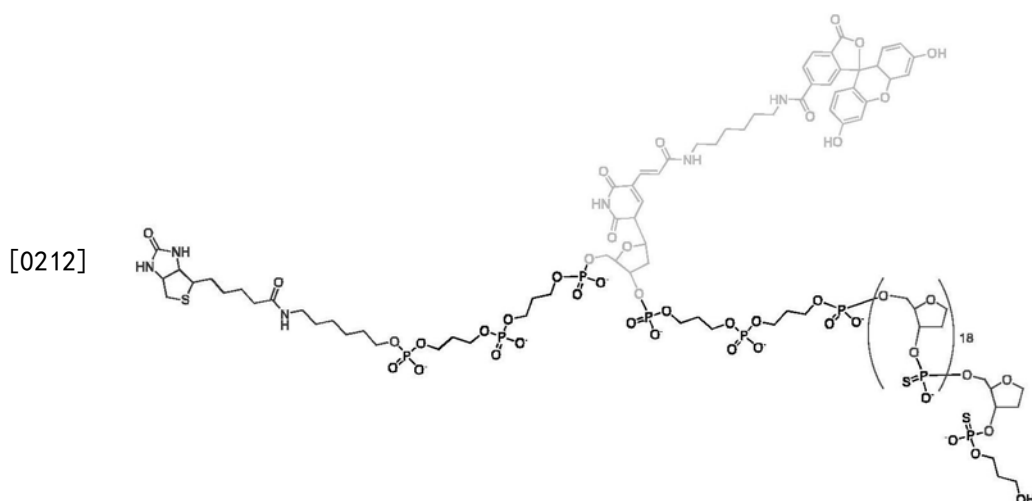
[0208] 通过链霉亲和素/生物素缀合至PS-DNA寡聚物 (20聚体) 的经修饰的抗-STAT3抗体能够进行细胞穿透。图8A:U251细胞另外的Western印迹分析:使用经链霉亲和素/生物素缀合至PS-寡聚物DNA (20聚体) (第一泳道)、以及PS-寡聚物RNA (20聚体) (第二泳道) 的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞。用10 μ g/ml所示的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在温育和两个用PBS (2ml) 的洗涤步骤之后,经在冰上于500 μ l RIPA缓冲液中温育(30分钟) 而将所述细胞裂解,随后是剧烈涡旋。通过在离心步骤(10分钟13,000rpm,4 $^{\circ}$ C) 之后收集上清来收获全细胞裂解物。向每个全细胞裂解物添加30 μ l的重组蛋白G琼脂糖珠,并在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C温育过夜。将所述珠沉淀成丸(2分钟,2,400rpm,4 $^{\circ}$ C) 并用500 μ l冰冷的PBS洗涤2次。在用30 μ l Laemmli缓冲液将干燥的琼脂糖珠装满并在95 $^{\circ}$ C温育5分钟之后,将20 μ l装载至10% SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 上并在125V运行。在将凝胶印迹至硝化纤维素印迹膜(0.45 μ m) 上之后,在摇动平台上于室温

用10%的BSA/TBS-T (0.1% Tween 20) 对所述膜进行1小时封闭。之后在摇动平台上将所述膜与初级抗体 (1:1.000在TBS-T中的抗STAT3) 于4℃温育过夜。在三个洗涤步骤 (15分钟、10分钟、10分钟, 用TBS-T) 之后, 在摇动平台上于4℃将所述膜与ECLTM抗兔IgG、辣根过氧化物酶 (在TBS-T中1:10.000) 温育2-4小时。在四个最终的洗涤步骤 (每个5分钟, 用TBS-T) 之后, 使用 **SuperSignal® West Dura Extended** 检测试剂盒检测。

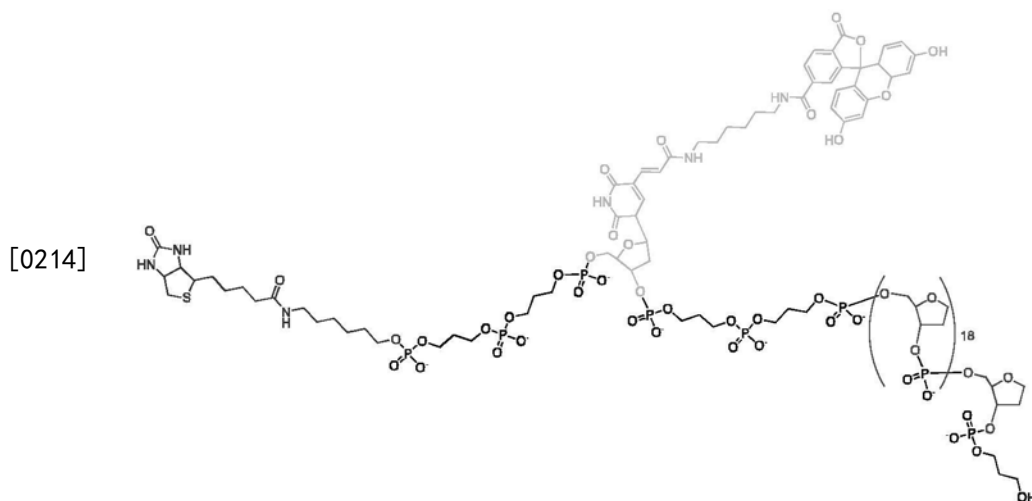
[0209] 图8B: 流式细胞术分析: 使用经链霉亲和素/生物素缀合至PS-RNA寡聚物 (20聚体) (黑线)、以及PS-DNA寡聚物 (20聚体) (红色区域) 的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞 (人神经胶质瘤干细胞)。用10μg/ml所示的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞, 并在37℃温育1小时。在洗涤步骤 (PBS/1% BSA) 之后, 收获细胞并用500μl的2%多聚甲醛固定 (15分钟), 随后是洗涤步骤 (PBS/1% BSA) 以及通过500冰冷的甲醇处理 (10分钟)。在洗涤 (PBS/1% BSA) 之后, 用PBS/1% BSA/1% 小鼠血清在4℃将所述细胞封闭1小时。之后洗涤 (PBS/1% BSA) 所述细胞, 并用第二抗体 (灰线) (1:4.000在PBS中的αRb AF647) 在黑暗中染色30分钟。在三个最终的洗涤步骤 (PBS/1% BSA) 之后进行流式细胞术分析, 并将细胞收集至300μl的洗涤缓冲液中。未染色的U251用作空白对照 (灰色区域)。

[0210] 5'-生物素脱碱基 (abasic) 寡聚物的结构

[0211] dR之间的PS连接:



[0213] dR之间的PO连接



[0215] 图9A示出了U251细胞(人神经胶质瘤干细胞)的流式细胞术分析:其中使用经链霉亲和素/生物素缀合至PO-聚合物(20聚体)(虚线)、PS-聚合物(20聚体)(黑线)、PS-寡聚物DNA(20聚体)(红色区域)的抗-STAT3抗体治疗所述U251细胞。用10 μ g/ml特定的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在洗涤步骤(PBS/1%BSA)之后,收获细胞并用500 μ l的2%多聚甲醛固定(15分钟),随后是洗涤步骤(PBS/1%BSA)以及通过500冰冷的甲醇处理(10分钟)。在洗涤(PBS/1%BSA)之后,用PBS/1%BSA/1%小鼠血清在4 $^{\circ}$ C将所述细胞封闭1小时。之后洗涤(PBS/1%BSA)所述细胞,并用第二抗体(灰线)(1:4,000在PBS中的 α Rb AF647)在黑暗中染色30分钟。在三个最终的洗涤步骤(PBS/1%BSA)之后进行流式细胞术分析,并将细胞收集至300 μ l的洗涤缓冲液中。未染色的U251用作空白对照(灰色区域)。

[0216] 图9A示出了U251细胞另外的Western印迹分析:其中使用经链霉亲和素/生物素缀合至PS-寡聚物DNA(20聚体)(第一泳道)、PS-寡聚物RNA(20聚体)(第二泳道)、PO-聚合物(20聚体)(第三泳道)、以及PS-聚合物(20聚体)(第四泳道)的抗-STAT3抗体治疗所述U251细胞。用10 μ g/ml特定的经修饰的抗-STAT3抗体治疗U251细胞,并在37 $^{\circ}$ C温育1小时。在温育之后,经在冰上于500 μ l RIPA缓冲液中温育(30分钟)而将所述细胞裂解,随后是剧烈涡旋。通过在离心步骤(10分钟13,000rpm,4 $^{\circ}$ C)之后收集上清来收获全细胞裂解物。向每个全细胞裂解物添加30 μ l的重组蛋白G琼脂糖珠,并在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C温育过夜。将所述珠沉淀成丸(2分钟,2,400rpm,4 $^{\circ}$ C)并用500 μ l冰冷的PBS洗涤2次。在用30 μ l Laemmli缓冲液将干燥的琼脂糖珠装满并在95 $^{\circ}$ C温育5分钟之后,将20 μ l装载至10%SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)上并在125V运行。在将凝胶印迹至硝化纤维素印迹膜(0.45 μ m)上之后,在摇动平台上于室温用10%的BSA/TBS-T(0.1%Tween 20)对所述膜进行1小时封闭。之后在摇动平台上将所述膜与初级抗体(1:1,000在TBS-T中的抗STAT3)于4 $^{\circ}$ C温育过夜。在三个洗涤步骤(15分钟、10分钟、10分钟,用TBS-T)之后,在摇动平台上于4 $^{\circ}$ C将所述膜与ECLTM抗兔IgG、辣根过氧化物酶(在TBS-T中1:10,000)温育2-4小时。在四个最终的洗涤步骤(每个5分钟,用TBS-T)之后,使用SuperSignal[®] West Dura Extended检测试剂盒进行检测。

[0217] 实施例2

[0218] 通过抗-T-Bet细胞穿透抗体的调节性Th1免疫

[0219] T-bet(T-盒转录因子TBX21(TBX21))是对于Th1分化很关键的转录因子。T-Bet的抑制剂能够治疗2型糖尿病、肥胖和其它炎症性疾病。相反,刺激T-bet可以激活抗肿瘤和抗病毒免疫。然而,没有T-bet调节剂。申请人在此显示了特定的T-bet抗体,在经修饰后(通过亲和素/链霉亲和素非共价连接至硫代磷酸化的(PS)DNA寡聚物(20聚体)),用作有效的T-bet激动剂,刺激Th1免疫应答,通过树突状细胞将CD8⁺T细胞募集至肿瘤,并抑制肿瘤生长。

[0220] 细胞穿透T-Bet抗体治疗限制了小鼠黑色素瘤的发展

[0221] 为了测试经修饰的细胞穿透T-Bet抗体的治疗效力,用10 μ g/剂量每隔一天局部治疗B16小鼠黑色素瘤肿瘤,并监测肿瘤生长。与PBS(载体对照)治疗的或经修饰的非靶向IgG治疗的组相比,施用经修饰的抗T-Bet抗体导致了对肿瘤生长显著的限制(图10)。

[0222] 经修饰的T-Bet抗体激活抗肿瘤适应性免疫应答

[0223] T-Bet已知在不同类型的免疫细胞中表达,尤其是T细胞、B细胞和树突状细胞(DC)。从如图10标注中所述进行治疗的B16小鼠黑色素瘤分离了肿瘤浸润的淋巴细胞,并进

行流式细胞术分析。T-Bet抗体的治疗显著增强了Th1免疫应答以及功能性的细胞毒T淋巴细胞(表达IFN γ 的CD4⁺和CD8⁺T细胞增加)。另外,T-Bet抗体的体内治疗促进了CD4⁺T细胞中的T-Bet表达,表明其用作T-bet激动剂来刺激Th1免疫应答(图11)。

[0224] 细胞穿透T-Bet抗体还靶向DC并增强其抗原呈递功能

[0225] 对不同免疫细胞中T-Bet抗体摄取的分析揭示出,抗体也被CD3⁺细胞所摄取,该细胞经申请人进一步鉴定为CD11c⁺DC(数据未显示)。经修饰的T-Bet抗体的治疗能够促进DC的抗原呈递功能(通过CD86和MHC II的表达)(图12A和图12B)。

[0226] 实施例3

[0227] 用细胞穿透抗体对FoxP3的封闭阻抑了肿瘤Treg和肿瘤的进展

[0228] Treg(调节性T细胞)抑制抗-肿瘤/病毒免疫应答,由此妨碍了各种免疫治疗。开发新的免疫治疗以降低Treg是非常重要的。FoxP3对于Treg的保持和功能是关键必要的。然而,FoxP3由于其细胞内的分布而被视为是不能药用的。申请人在此显示了经PS修饰的FoxP3抗体能够优先靶向FoxP3阳性细胞,抑制FoxP3和下游效应物(CTLA4)的水平。更重要的是,经修饰的FoxP3抗体的全身施用能够降低肿瘤浸润的Treg和肿瘤生长。

[0229] 细胞穿透FoxP3抗体优先被Treg保留

[0230] 为了评估经修饰的细胞穿透FoxP3抗体的特异性,将从FoxP3-GFP-Tg小鼠新鲜分离的脾细胞与10 μ g/ml经修饰的FoxP3抗体或者与10 μ g/ml经修饰的IgG(其用作对照)进行培养。2小时之后将细胞收集、洗涤、并经过流式细胞术分析来用于检测Cy5,其用于标记缀合至抗体的PS寡聚物。值得注意的是,FoxP3+Treg能够保留比非-Treg多得多的经修饰的FoxP3抗体。而且FoxP3抗体Treg中比起对照经修饰IgG组要更加能够检测到得多(图13)。

[0231] 用经修饰的FoxP3抗体进行全身治疗降低了FoxP3阳性的和CTLA4阳性的CD4⁺T细胞(Treg)并且消除了黑色素瘤的生长。

[0232] 为了检验经修饰的FoxP3对T细胞的作用,将经修饰的IgG或FoxP3抗体(10 μ g/小鼠)全身施用至C57BL/6小鼠(就在B16肿瘤细胞接种之后,每隔一天脂质第11天)。每一天或每两天监测肿瘤体积,并在19天后将所有动物处死。继而收集肿瘤,并将肿瘤浸润淋巴细胞分离以用于进一步的流式细胞术分析,以检测FoxP3和CTLA4阳性T细胞。与经修饰的非靶向IgG相比,经修饰的抗-FoxP3抗体的全身施用显著降低了黑色素瘤的进展。对肿瘤浸润淋巴细胞的进一步分析显示出,FoxP阳性和CTLA4阳性的CD4⁺T细胞的百分比降低了,表明经修饰的FoxP3抗体对肿瘤Treg的封闭(图14)。

[0233] 实施方案

[0234] 实施方案1.细胞穿透缀合物,其包含:

[0235] (i) 非细胞穿透蛋白;

[0236] (ii) 硫代磷酸核酸;和

[0237] (iii) 将所述硫代磷酸核酸附着至所述非细胞穿透蛋白的非共价接头,所述非共价接头包含非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域;和其中所述硫代磷酸核酸增强所述非细胞穿透蛋白的细胞内递送。

[0238] 实施方案2.实施方案1的细胞穿透缀合物,其中所述生物素结合结构域是亲和素结构域。

[0239] 实施方案3.实施方案1的细胞穿透缀合物,其中所述生物素结合结构域是链霉亲

和素结构域。

[0240] 实施方案4.实施方案3的细胞穿透缀合物,其中所述链霉亲和素结构域结合多个生物素结构域。

[0241] 实施方案5.实施方案4的细胞穿透缀合物,其中所述链霉亲和素结构域结合大约4个生物素结构域。

[0242] 实施方案6.实施方案1-5任一项的细胞穿透缀合物,其中所述生物素结合结构域共价附着至所述非细胞穿透蛋白。

[0243] 实施方案7.实施方案1-6任一项的细胞穿透缀合物,其中多个生物素结合结构域附着至所述非细胞穿透蛋白。

[0244] 实施方案8.实施方案1-7任一项的细胞穿透缀合物,其中所述生物素结构域附着至所述硫代磷酸核酸。

[0245] 实施方案9.实施方案8的细胞穿透缀合物,其中所述生物素结构域共价附着至所述硫代磷酸核酸。

[0246] 实施方案10.实施方案8或9的细胞穿透缀合物,其中多个硫代磷酸核酸附着至所述生物素结构域。

[0247] 实施方案11.实施方案1-10任一项的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸长度为大约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个核酸残基。

[0248] 实施方案12.实施方案11的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸长度为大约10个至大约30个核酸残基。

[0249] 实施方案13.实施方案11的细胞穿透缀合物,其中所述硫代磷酸核酸长度为大约20个核酸残基。

[0250] 实施方案14.实施方案1-12任一项的细胞穿透缀合物,其中所述非细胞穿透蛋白具有超过25kD的分子量。

[0251] 实施方案15.实施方案1-14任一项的细胞穿透缀合物,其中所述非细胞穿透蛋白具有大约25kD至大约750kD的分子量。

[0252] 实施方案16.实施方案1-15任一项的细胞穿透缀合物,其中所述非细胞穿透蛋白是抗体。

[0253] 实施方案17.实施方案16的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是IgG抗体。

[0254] 实施方案18.实施方案16的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是IgA、IgM、IgD、或IgE抗体。

[0255] 实施方案19.实施方案16的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是Fv片段。

[0256] 实施方案20.实施方案16-19任一项的细胞穿透缀合物,其中所述抗体是人源化的抗体。

[0257] 实施方案21.实施方案1-20任一项的细胞穿透缀合物,其中所述非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标。

[0258] 实施方案22.实施方案21的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶标是选自以下组的疾病的靶标:自身免疫疾病、炎症性疾病、代谢失调、发育障碍、心血管疾病、肝病、肠疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经障碍、和癌症。

[0259] 实施方案23.实施方案21或22的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶标是信号分

子或转录因子。

[0260] 实施方案24.实施方案23的细胞穿透缀合物,其中所述信号分子是磷酸酶或激酶。

[0261] 实施方案25.实施方案21的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶标是癌症靶标。

[0262] 实施方案26.实施方案21的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶标选自STAT3、和Src所组成的组。

[0263] 实施方案27.实施方案21的细胞穿透缀合物,其中所述细胞内靶标是磷酸化的Src。

[0264] 实施方案28.实施方案1-27任一项的细胞穿透缀合物,其中所述非细胞穿透蛋白还包含附着至所述蛋白的标签、小分子或功能性核酸。

[0265] 实施方案29.实施方案1-28任一项的细胞穿透缀合物,其中所述细胞穿透缀合物结合至细胞内靶标。

[0266] 实施方案30.形成细胞穿透缀合物的方法,所述方法包括使非细胞穿透蛋白与硫代磷酸核酸接触,其中所述非细胞穿透蛋白附着至生物素结合配对的第一成员并且所述硫代磷酸核酸附着至所述生物素结合配对的第二成员,由此形成包含生物素结构域和生物素结合结构域之间非共价键的细胞穿透缀合物。

[0267] 实施方案31.实施方案30的方法,其中所述生物素结合配对的所述第一成员是生物素结合结构域。

[0268] 实施方案32.实施方案30的方法,其中所述生物素结合配对的所述第二成员是生物素结构域。

[0269] 实施方案33.实施方案30的方法,其中所述生物素结合配对的所述第一成员是生物素结构域。

[0270] 实施方案34.实施方案30的方法,其中所述生物素结合配对的所述第二成员是生物素结合结构域。

[0271] 实施方案35.实施方案30的方法,其中所述硫代磷酸核酸包含共价反应性部分。

[0272] 实施方案36.细胞,其包含实施方案1-29任一项的细胞穿透缀合物。

[0273] 实施方案37.药物组合物,其包含实施方案1-29任一项的细胞穿透缀合物和药物可接受的载体。

[0274] 实施方案38.实施方案37的药物组合物,其还包含含有第二非共价接头的第二非细胞穿透蛋白,其中所述第二非共价接头将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白。

[0275] 实施方案39.实施方案38的药物组合物,其中所述非共价接头包含非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域。

[0276] 实施方案40.实施方案38的药物组合物,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标。

[0277] 实施方案41.实施方案40的药物组合物,其中相对于实施方案21-27任一项的所述非细胞穿透蛋白而言,所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的不同的表位。

[0278] 实施方案42.实施方案41的药物组合物,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。

[0279] 实施方案43.实施方案38-42任一项的药物组合物,其中所述第二非细胞穿透蛋白

是抗体。

[0280] 实施方案44.试剂盒,其包含实施方案1-29任一项的细胞穿透缀合物或实施方案37的药物组合物以及使用说明。

[0281] 实施方案45.实施方案44的试剂盒,其还包含含有第二非共价接头的第二非细胞穿透蛋白,其中所述第二非共价接头将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白。

[0282] 实施方案46.实施方案45的试剂盒,其中实施方案1-29任一项的所述缀合物和所述第二非细胞穿透蛋白在不同的容器中。

[0283] 实施方案47.实施方案45或46的试剂盒,其中相对于实施方案1-29任一项的非细胞穿透蛋白而言,所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的不同的表位。

[0284] 实施方案48.实施方案45-47任一项的试剂盒,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。

[0285] 实施方案49.实施方案45-48任一项试剂盒,其中所述第二非细胞穿透蛋白配制为药物组合物,所述药物组合物包含第二非细胞穿透蛋白和药物可接受的载体。

[0286] 实施方案50.实施方案45-49任一项的试剂盒,其中所述第二非细胞穿透蛋白是抗体。

[0287] 实施方案51.将非细胞穿透蛋白递送至细胞内的方法,包括使所述细胞与实施方案1-29任一项的所述细胞穿透缀合物接触。

[0288] 实施方案52.实施方案51的方法,其中所述非细胞穿透蛋白结合细胞质中的核蛋白,由此形成非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物。

[0289] 实施方案53.实施方案52的方法,其中所述非细胞穿透蛋白-核蛋白复合物不能进入细胞的核内。

[0290] 实施方案54.在有需要的对象中治疗疾病的方法,所述方法包括向对象施用有效量的实施方案1-29任一项的细胞穿透缀合物,由此在所述对象中治疗所述疾病。

[0291] 实施方案55.实施方案54的方法,还包括向所述对象施用包含第二非共价接头的第二非细胞穿透蛋白,其中所述第二非共价接头将一或多个硫代磷酸核酸附着至所述第二非细胞穿透蛋白。

[0292] 实施方案56.实施方案55的方法,其中所述非共价接头包含非共价附着至生物素结构域的生物素结合结构域。

[0293] 实施方案57.实施方案56的方法,其中相对于实施方案1-29任一项的缀合物而言,所述第二非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标上的不同的表位。

[0294] 实施方案58.实施方案57的方法,其中所述第二非细胞穿透蛋白结合第二细胞内靶标。

[0295] 实施方案59.实施方案55-58任一项的方法,其中实施方案1-29任一项的所述缀合物与所述第二非细胞穿透蛋白是同时施用的。

[0296] 实施方案60.实施方案55-58任一项的方法,其中实施方案1-29任一项的所述缀合物与所述第二非细胞穿透蛋白是顺次施用的。

[0297] 实施方案61.实施方案55-60任一项的方法,其中所述第二非细胞穿透蛋白是抗体。

[0298] 实施方案62.实施方案55-61的方法,还包括向所述对象施用第二种治疗剂。

[0299] 实施方案63.实施方案55-62任一项的方法,其中所述疾病选自以下组:自身免疫疾病、发育障碍、炎症性疾病、代谢失调、心血管疾病、肝病、肠疾病、感染性疾病、内分泌疾病、神经障碍、和癌症。

[0300] 实施方案64.实施方案63的方法,其中所述疾病是癌症。

[0301] 实施方案65.实施方案55的方法,其中所述缀合物的非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标并且所述细胞内靶标是STAT3或Src。

[0302] 实施方案66.实施方案55的方法,其中所述缀合物的非细胞穿透蛋白结合细胞内靶标并且所述细胞内靶标是磷酸化的Src。

[0303] 实施方案67.实施方案55的方法,其中所述缀合物的非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3的抗体,并且所述第二非细胞穿透蛋白是特异性结合STAT3另一表位的抗体。

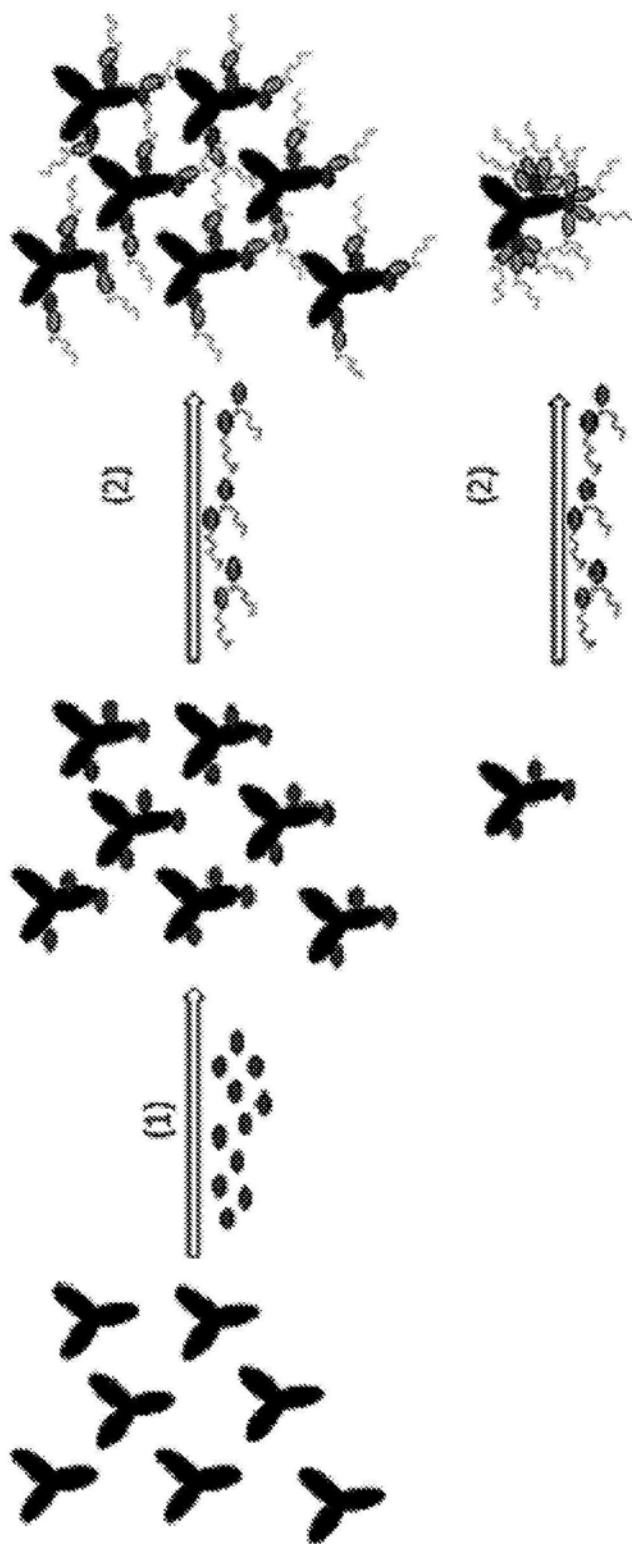


图1

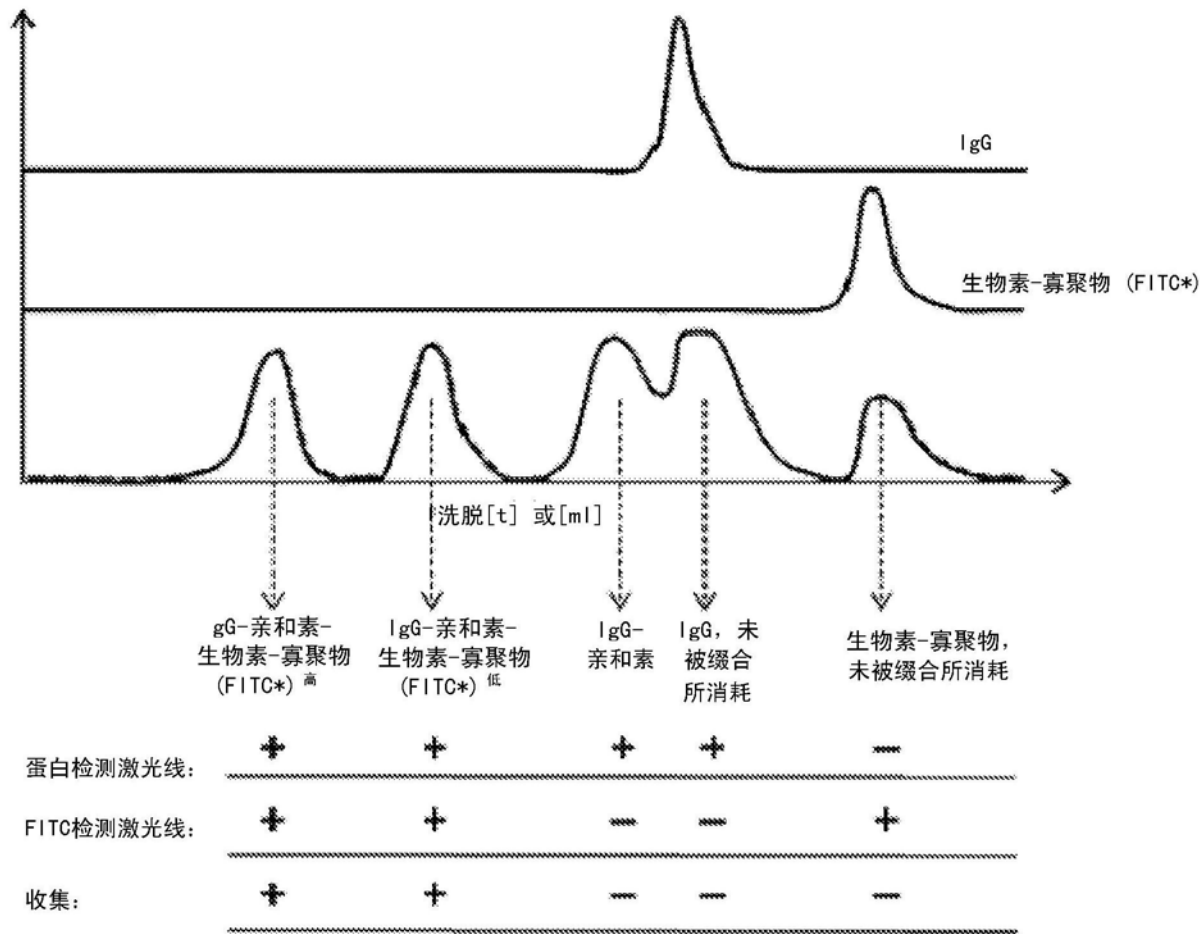


图2

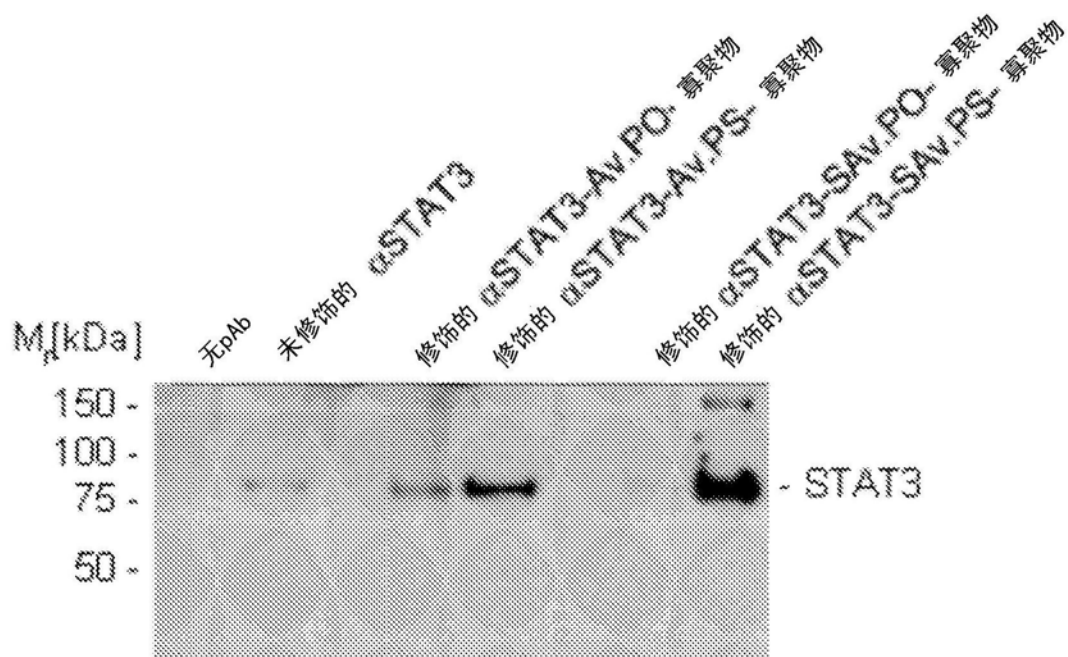


图3

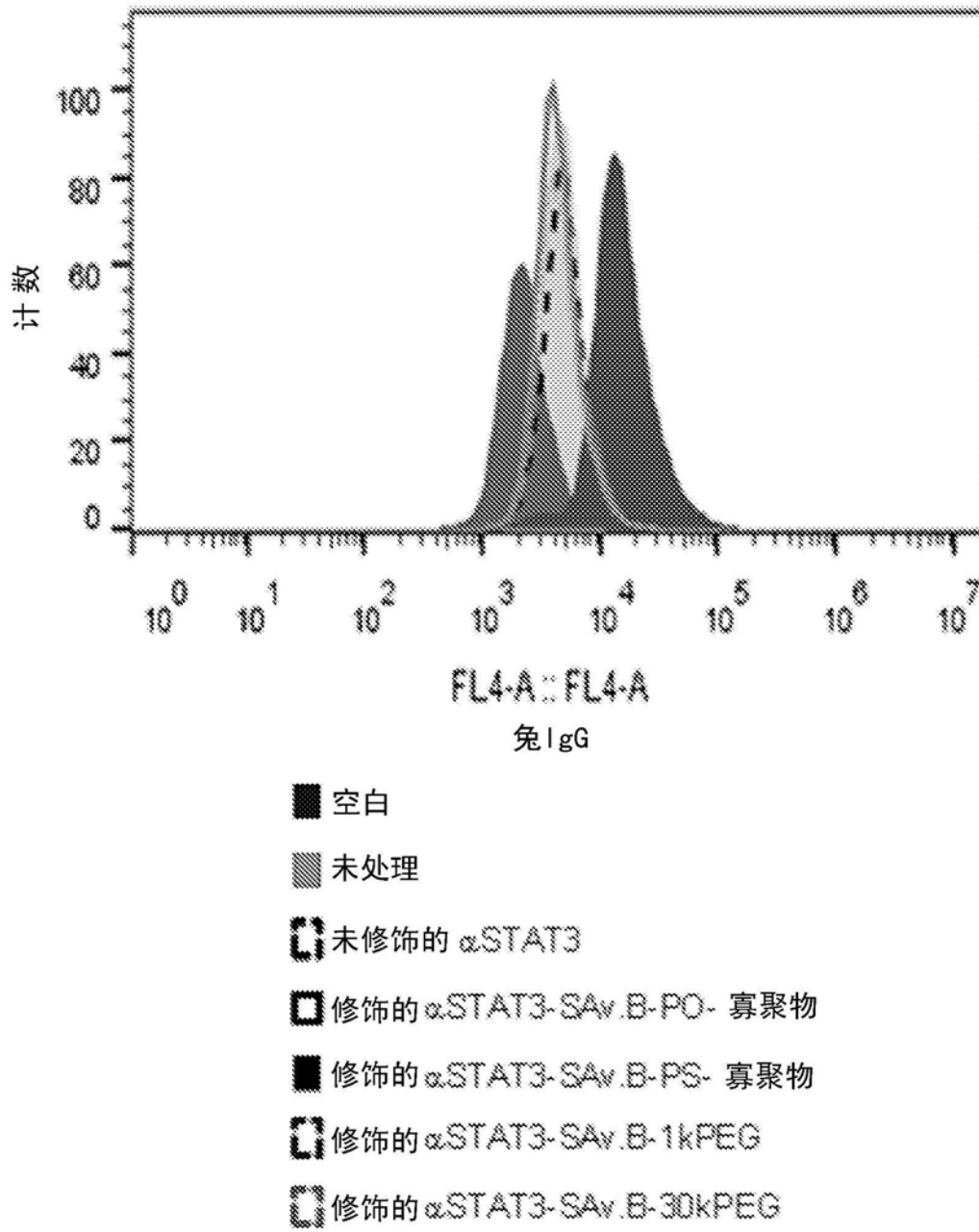


图4A

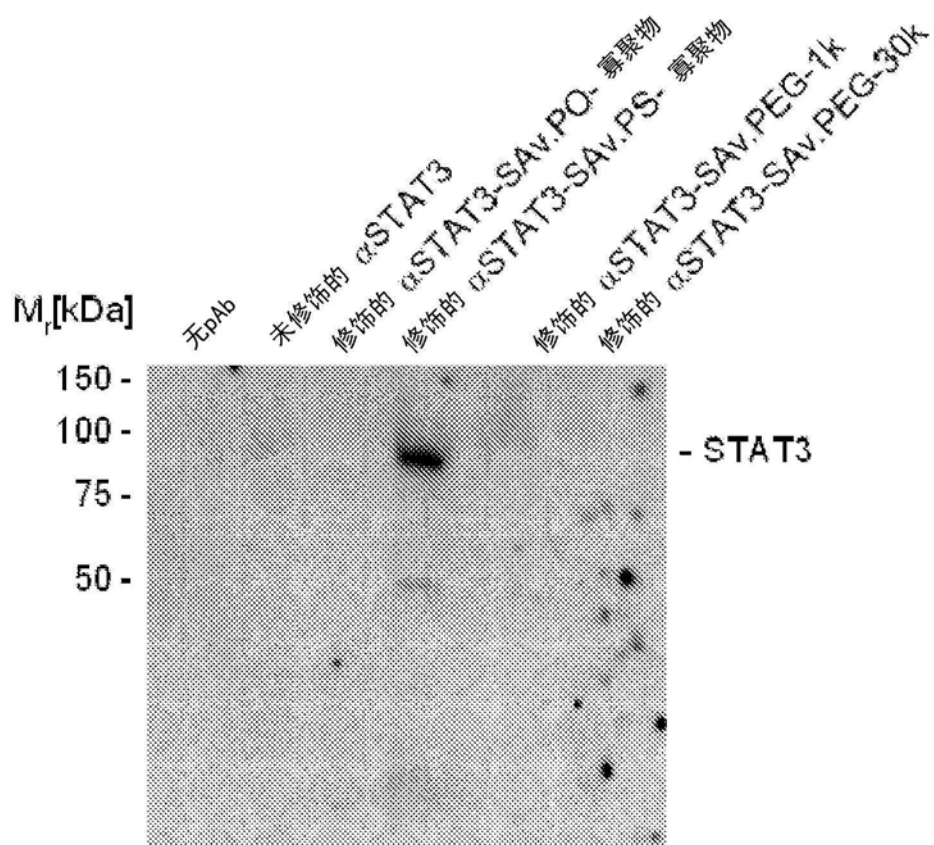


图4B

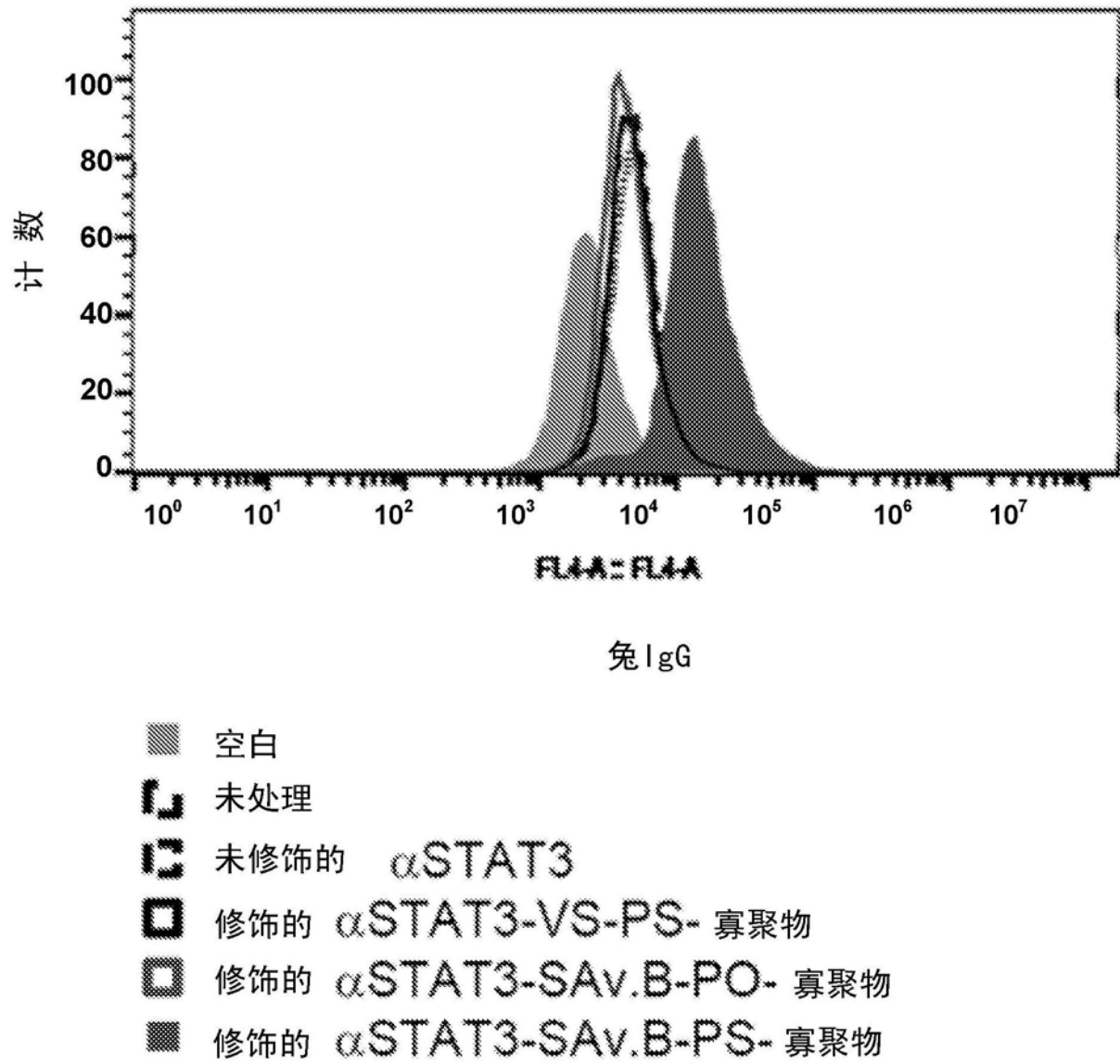


图5A

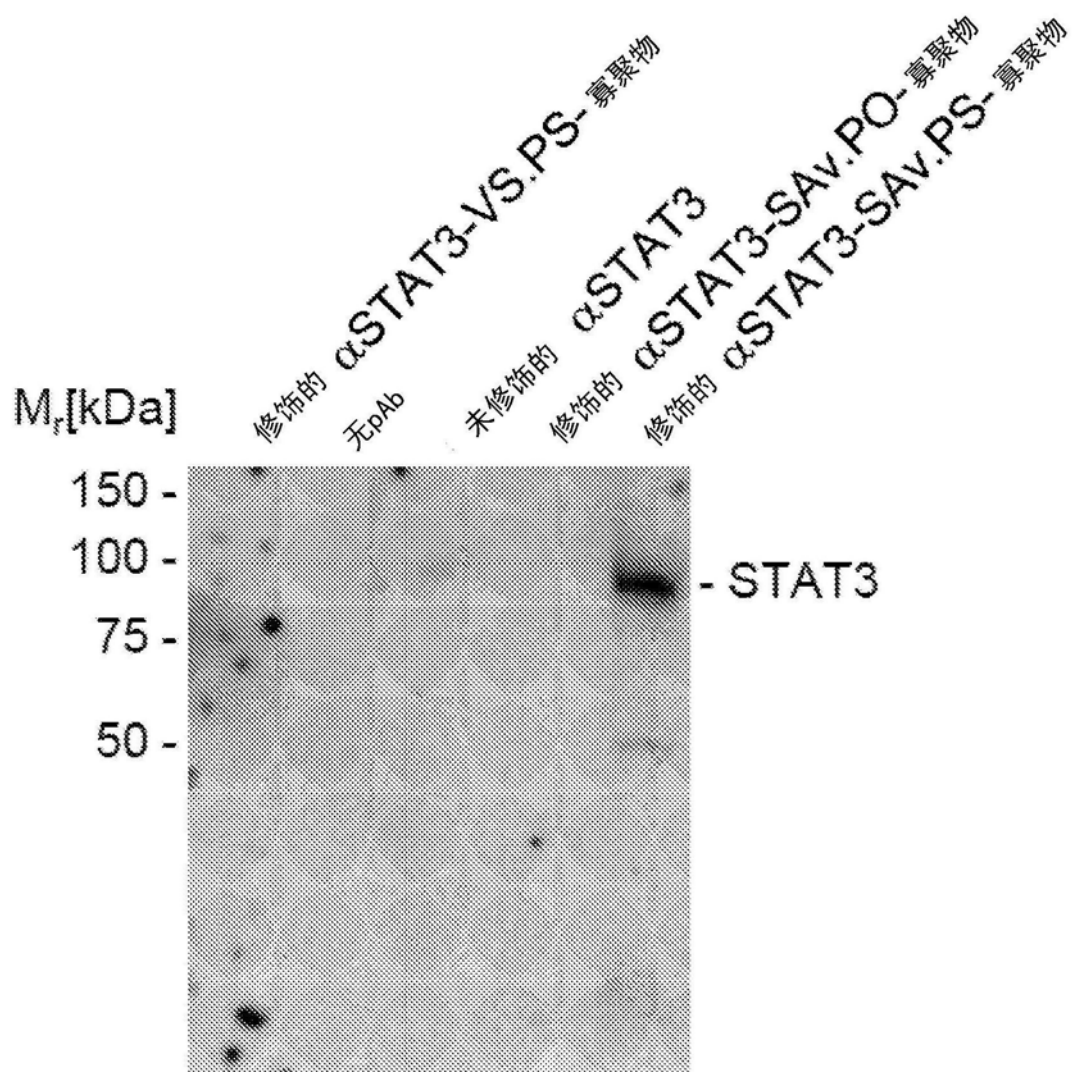


图5B

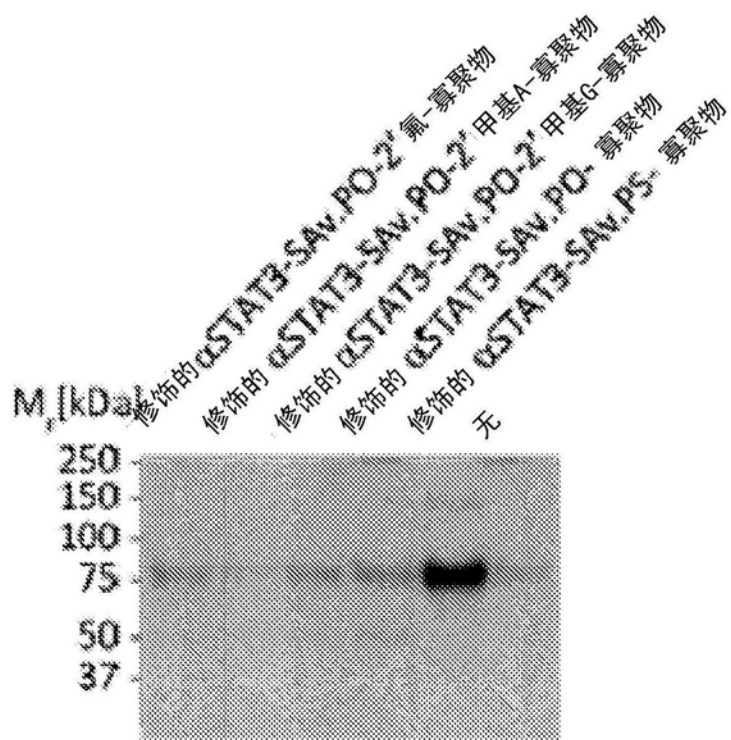


图6

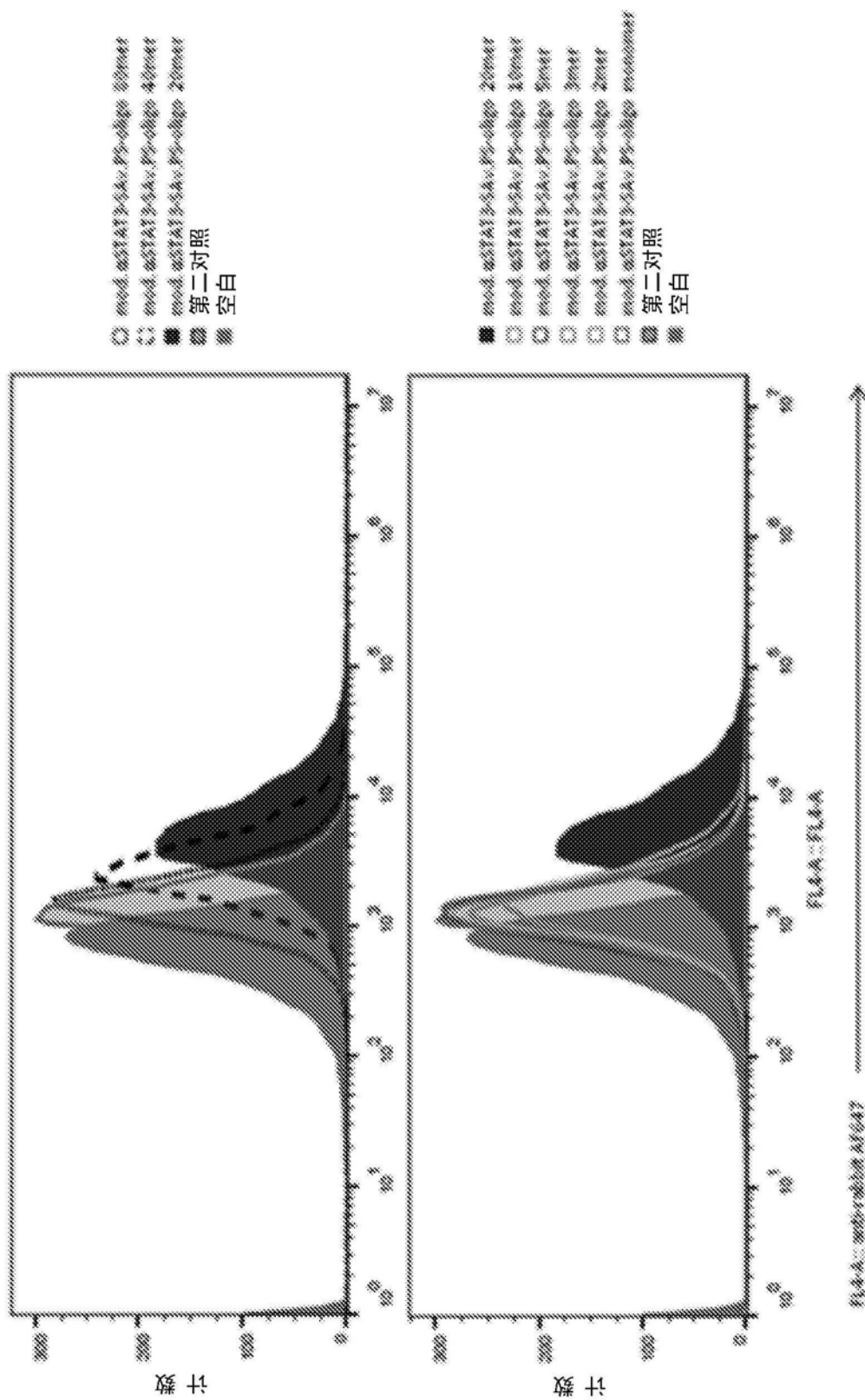


图7A

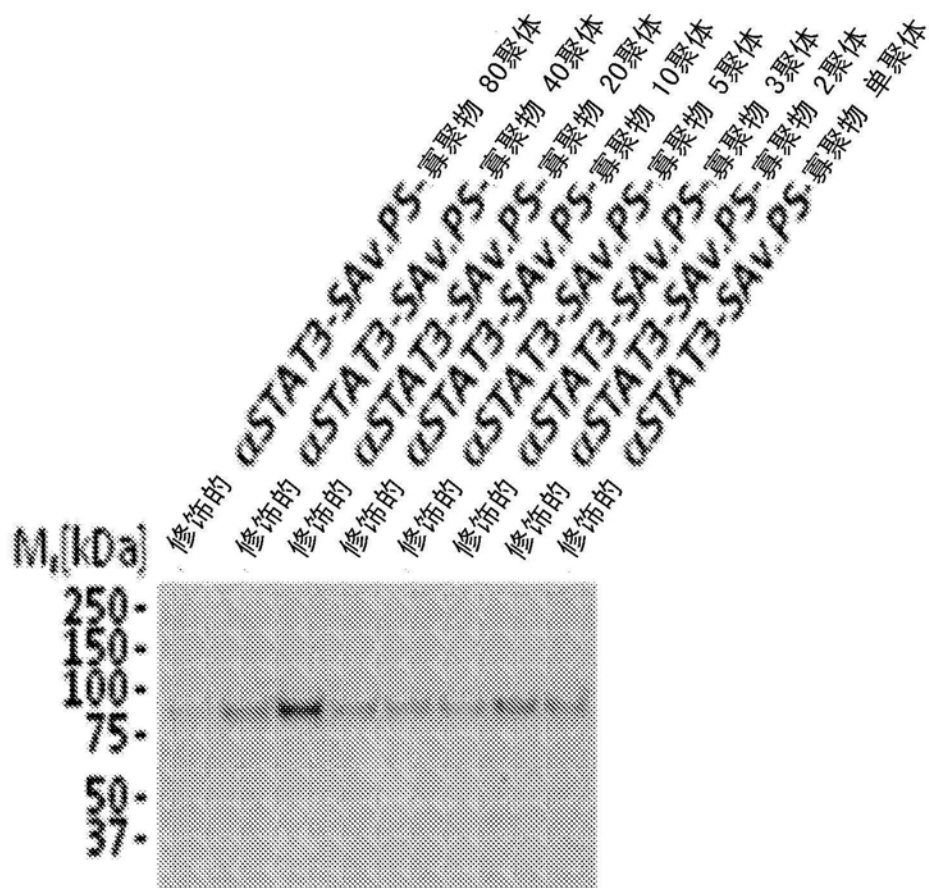


图7B

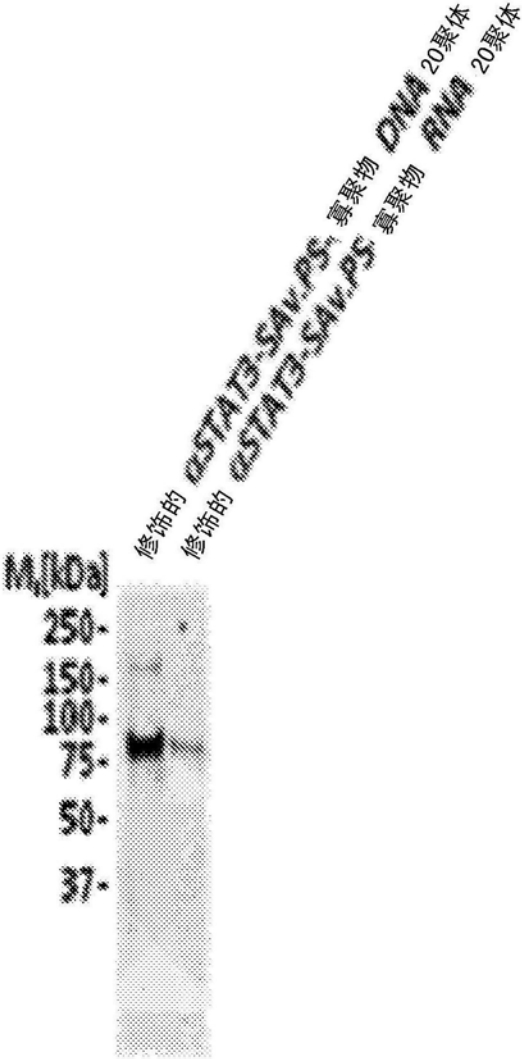


图8A

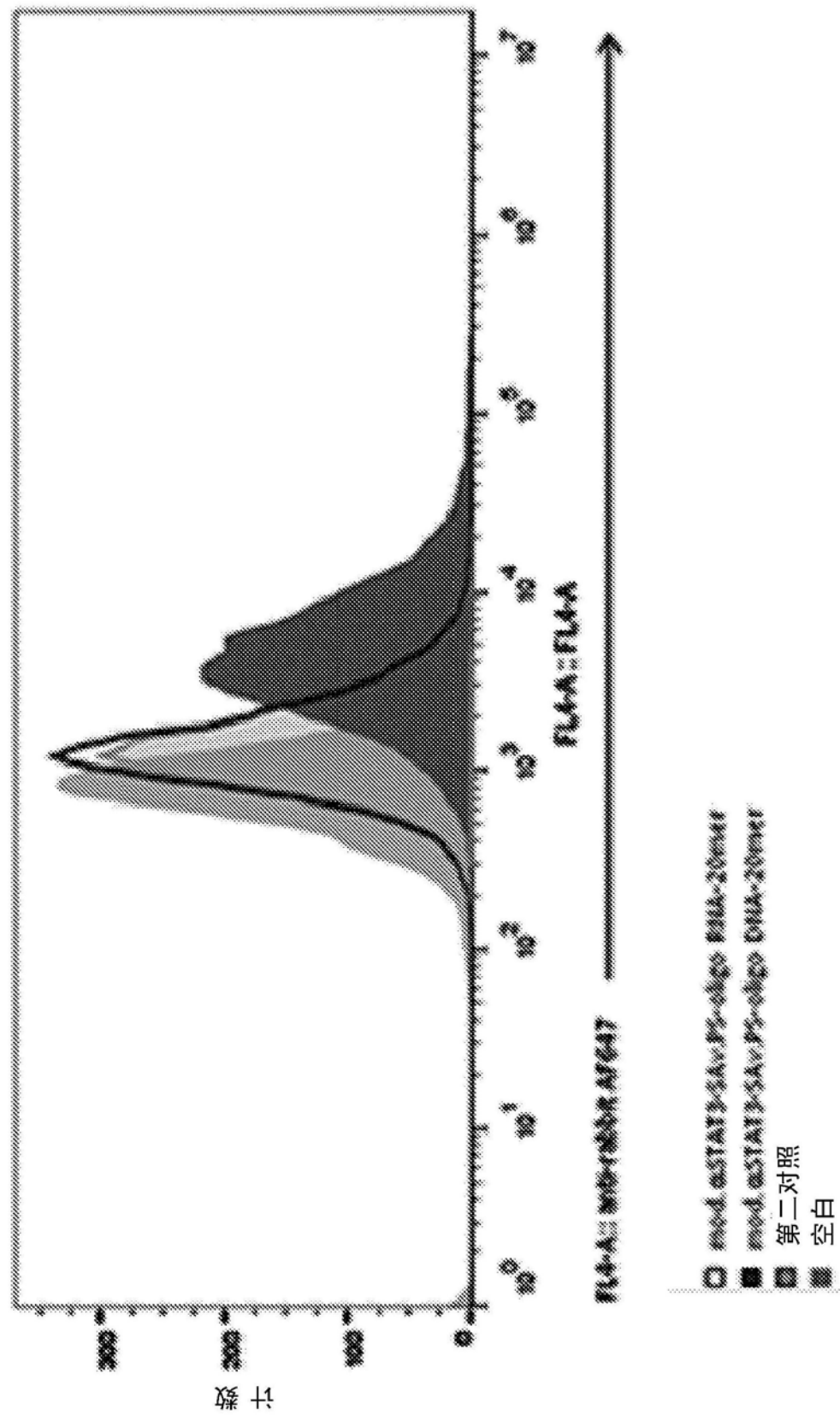


图8B

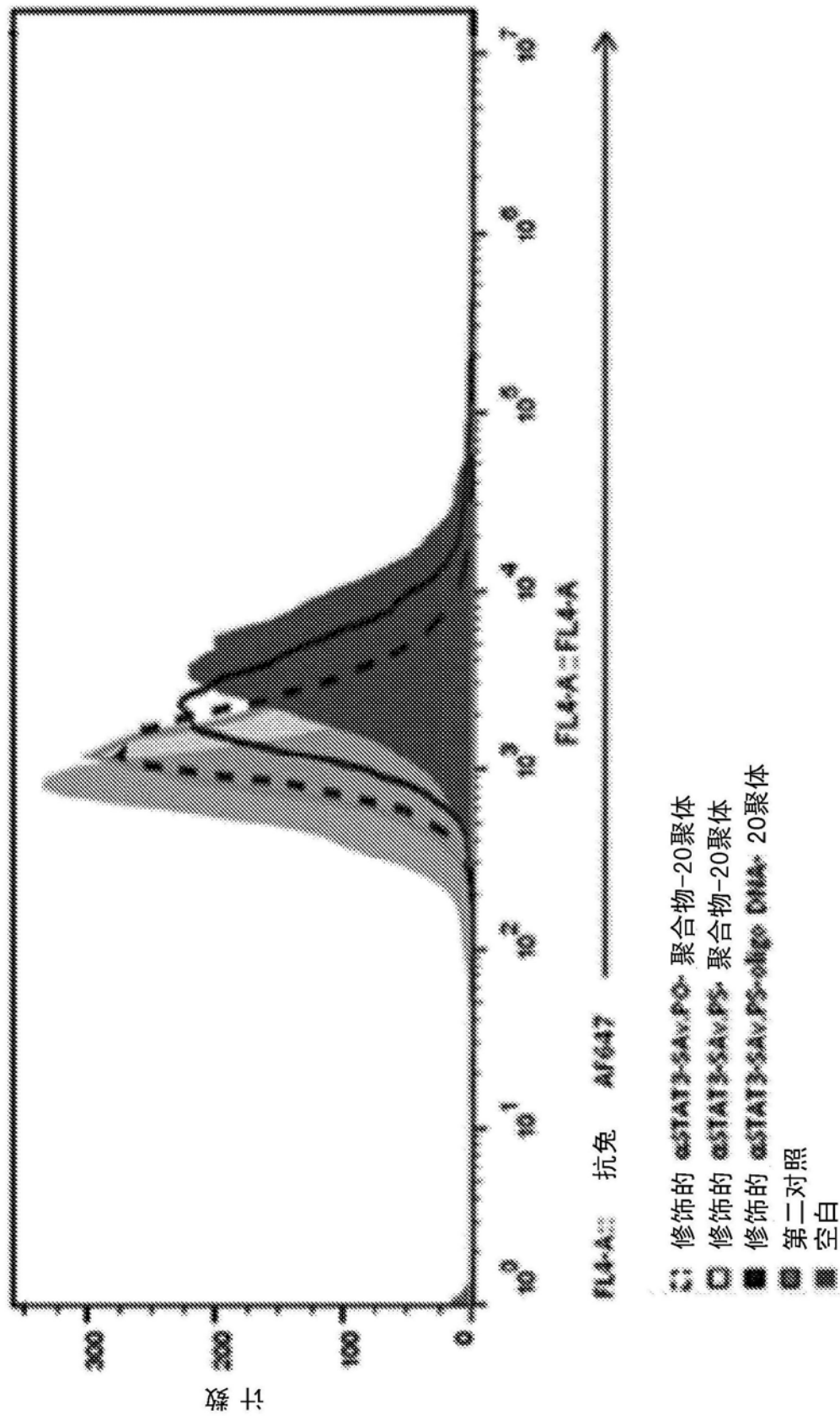


图9A

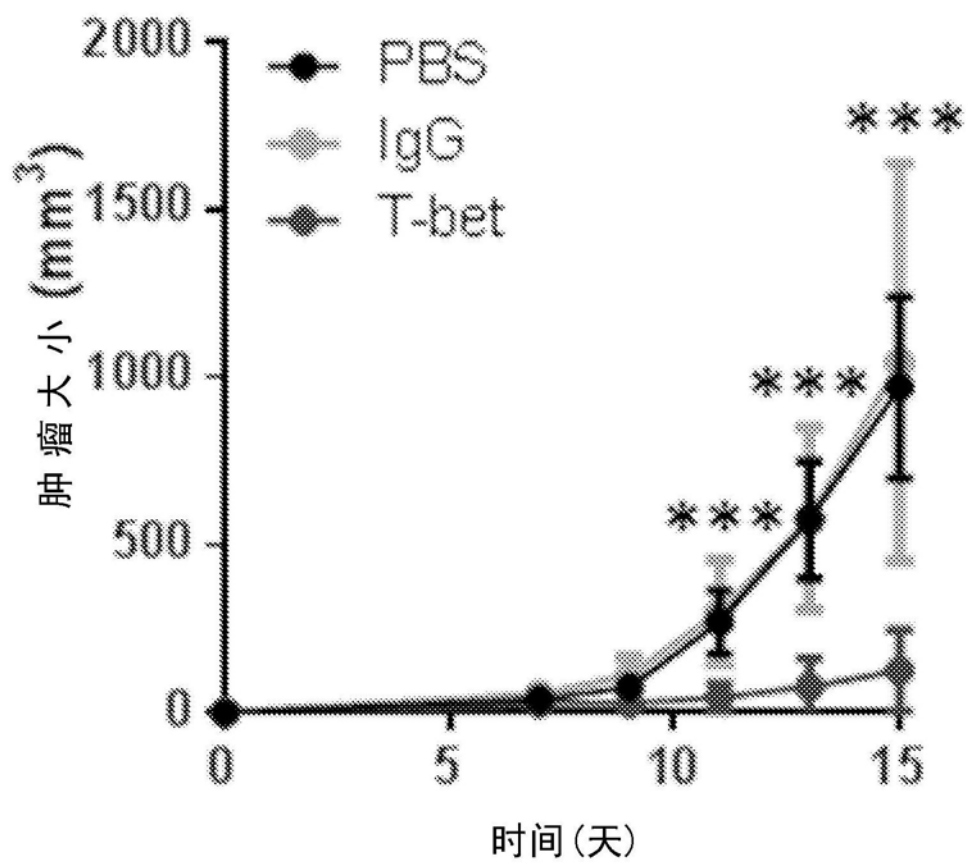


图10

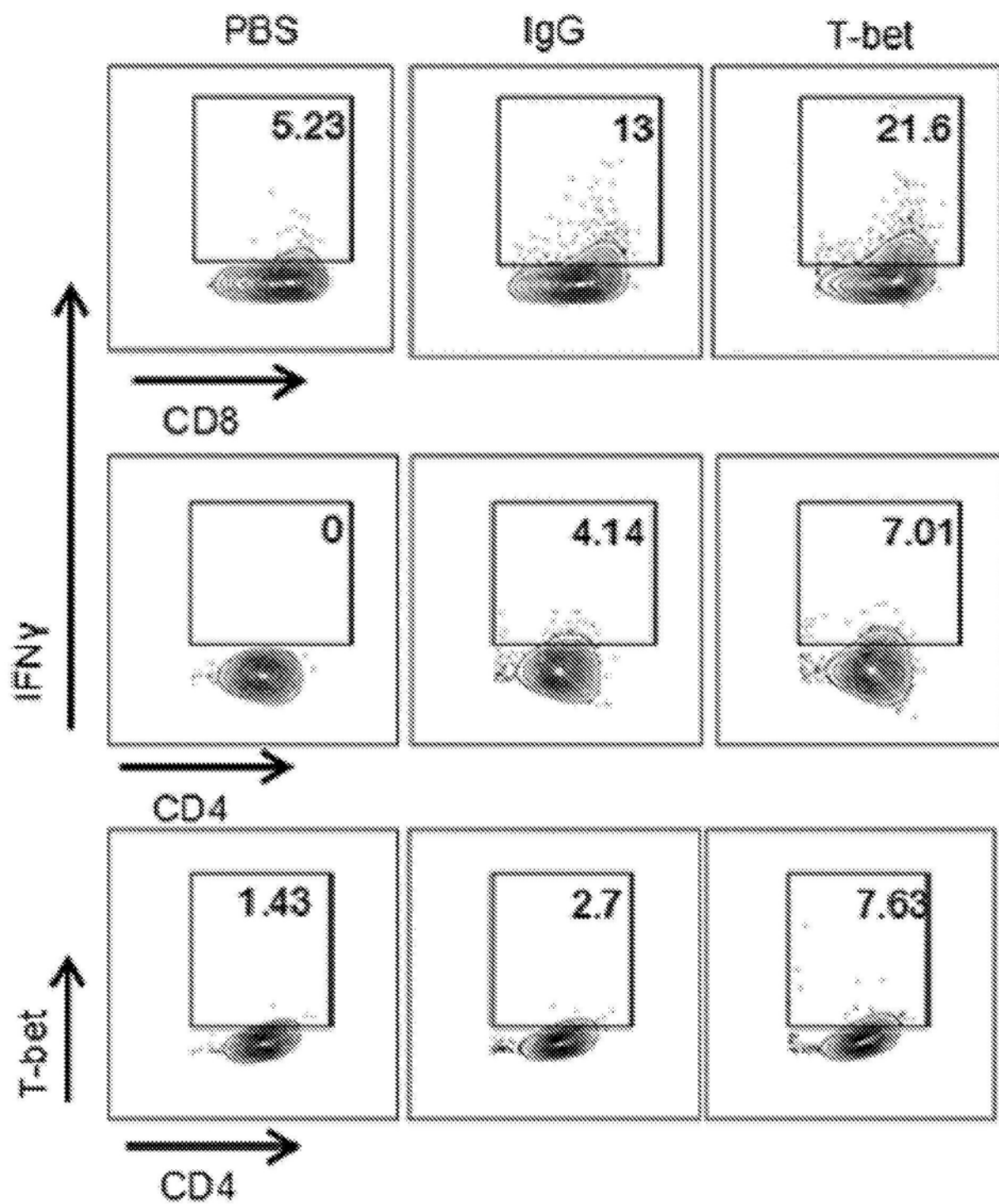


图11

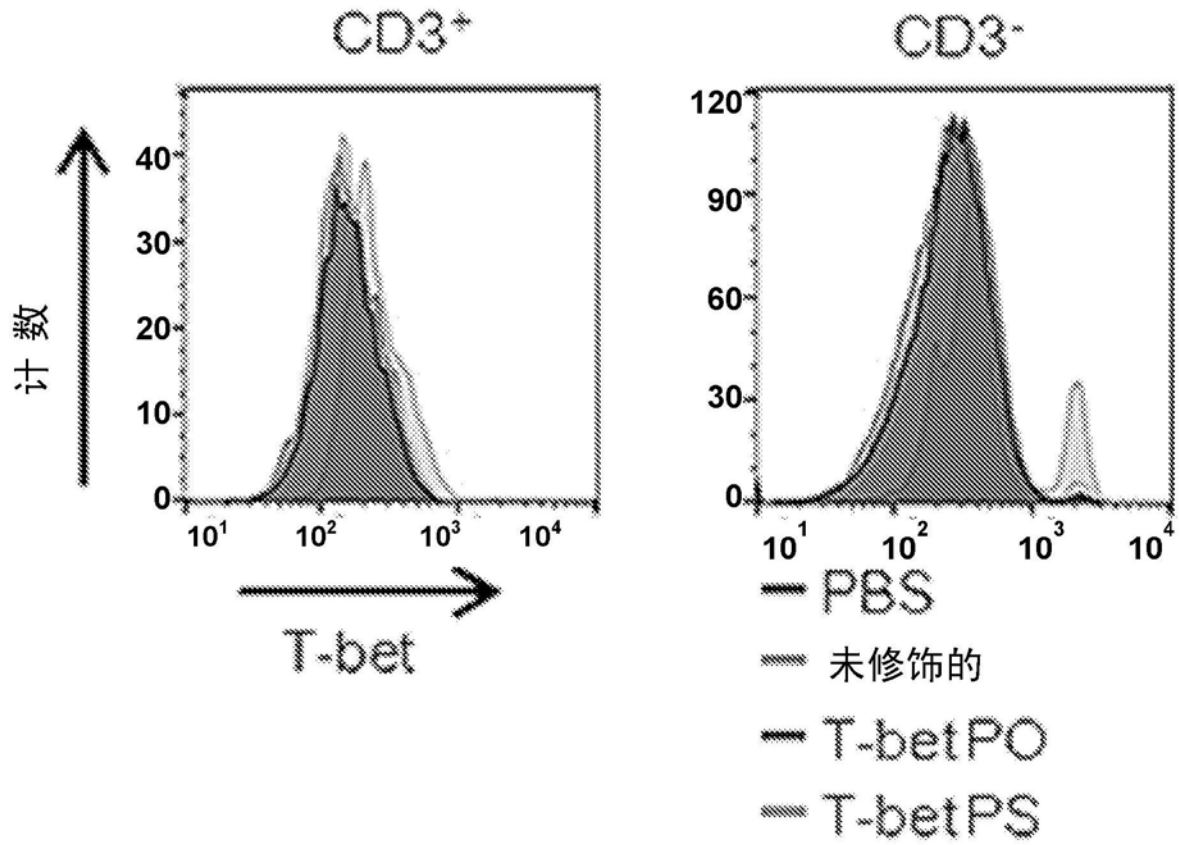


图12A

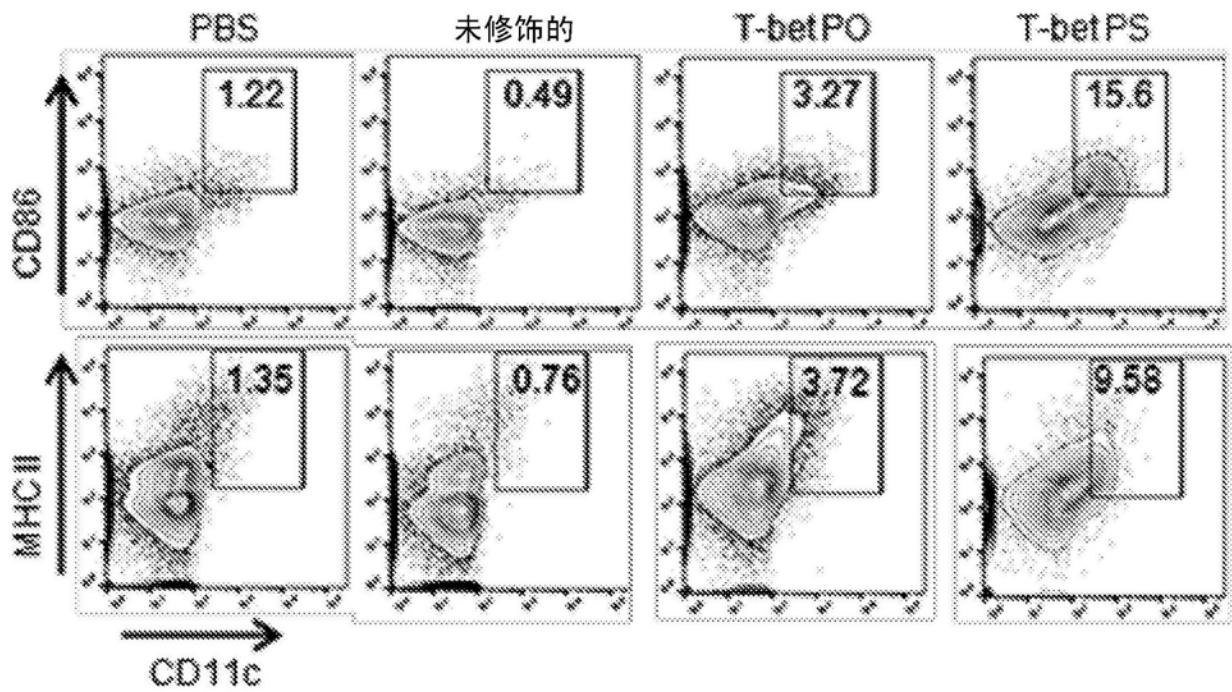


图12B

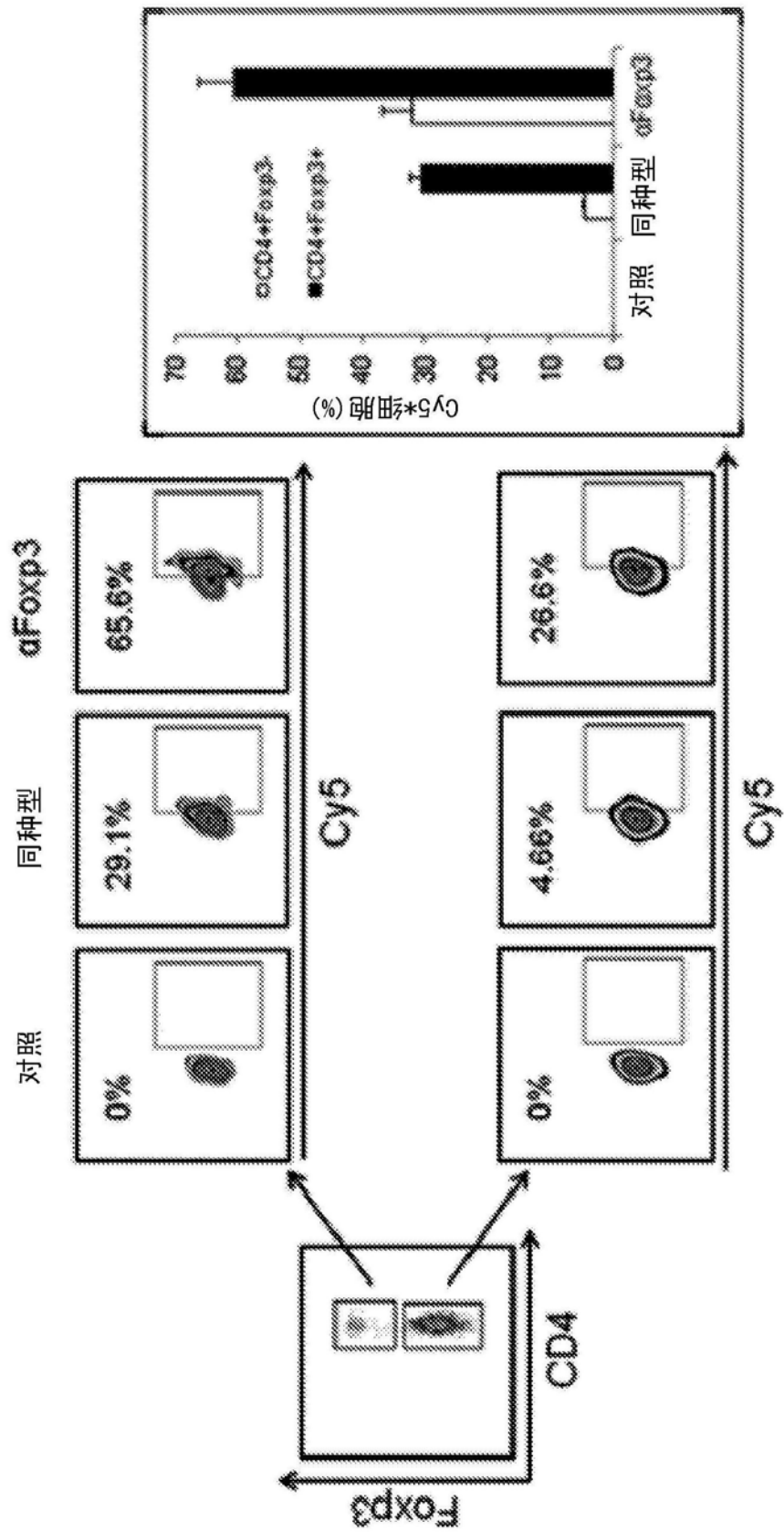


图13

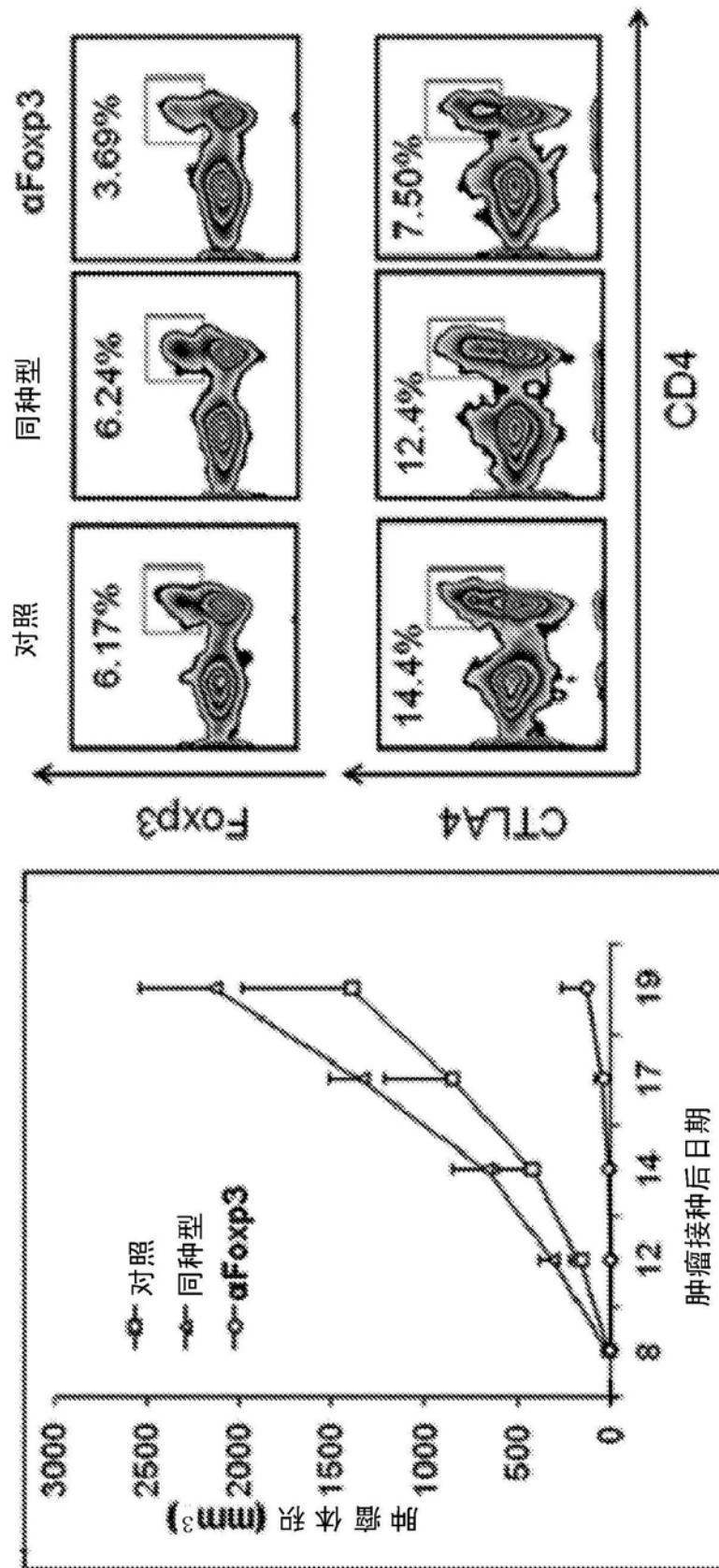


图14