

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：94118131

ABIK 31/00, 31/088, 49/06, 51/00;

※申請日期：94.6.2

※IPC 分類：G61N 33/58

一、發明名稱：(中文/英文)

用以偵測、成像和治療瘤新生或血管新生的血管標的物之用途

USE OF VASCULAR TARGETS FOR DETECTING, IMAGING AND
TREATING NEOPLASIA OR NEOVASCULATURE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

希德妮金梅爾癌症中心 / Sidney Kimmel Cancer Center

代表人：(中文/英文)

亞伯特 B 戴斯羅茲 / DEISSEROTH, ALBERT B.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州 92121 聖地牙哥市冠爾路 10905 號

10905 Road to the Cure, San Diego, CA 92121, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A

三、發明人：(共 2 人)

姓名：(中文/英文)

1. 傑 E 舒尼瑟 / SCHNITZER, JAN E.

2. 菲力普 歐 / OH, PHILIP

國籍：(中文/英文)

1. 美國 / U.S.A.

2. 美國 / U.S.A.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：
美國、2004.06.02、60/576,116

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】：

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

101年8月30日修正卷

101年8月30日修正替換頁

五、中文發明摘要：

本發明說明藉由靶定膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A1 的衍生物或膜聯蛋白 A1 的結合配對者，以組織特異性的方式輸送作用劑之方法。該等方法可用以偵測、成像及/或治療瘤新生、血管生成或血管新生，以及用於作為評估治療功效的診斷法及方法。本發明也說明針對膜聯蛋白 A1 的抗體，以及篩選可改變膜聯蛋白 A1 活性的作用劑之方法。

六、英文發明摘要：

Methods of delivering an agent in a tissue-specific manner, by targeting annexin A1, a derivative of annexin A1, or a binding partner of annexin A1, are described. The methods can be used for detecting, imaging and/or treating neoplasia, angiogenesis or neovasculature, as well as for diagnostics and methods of assessing treatment efficacy. Antibodies to annexin A1 are also described, as are methods screening for agents altering annexin A1 activity.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)



九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於藉由靶定膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A1 的衍生物或膜聯蛋白 A1 的結合配對者，以組織特異性的方式輸送作用劑之方法。本發明亦關於對抗膜聯蛋白 A1 的抗體以及申篩選改變膜聯蛋白 A1 活性的作用劑之方法。

【先前技術】

在活體內選擇性地靶定硬塊腫瘤是高度令人渴望的，但到目前為止，對於癌症治療而言仍是一個捉摸不定的目標（Dvorak H.F. 等人（1991），Cancer Cell 3：77-85；Auerbach R.（1991），Int. J. Radiat. Biol. 60：1-10；Burrows F.J.及 Thorpe P.E.（1994），Pharmacol. Ther. 64：155-74；Schnitzer J.E.（1998），N. Engl. J. Med. 339：472-4）。現今對於硬塊腫瘤的醫療缺少足夠的腫瘤特異性靶定，以避免全身性的副作用（Burrows F.J. 以及 Thorpe P.E.（1994），Pharmacol. Ther. 64：155-74；Schnitzer J.E.（1998），N. Engl. J. Med. 339：472-4；Schnitzer J.E.（2001），Adv. Drug Deliv. Rev. 49：265-80）。當靜脈內注射共軛結合至腫瘤細胞特異性抗體之醫藥品作為“神奇子彈”以靶定腫瘤組織內部的瘤新生細胞時，該醫藥品顯示了在活體外的優秀特異性活性，但在活體內卻面臨重大的障礙，其限制可到達的能力且降低生物可利用率及生物功效（Dvorak H.F. 等人（1991），Cancer Cell 3：77-85）。

【發明內容】

發明概述

本發明是有關於將作用劑以瘤新生物特異性的方式輸送至、輸送進入、及/或輸送穿過血管內皮之方法。在本發明的方法中，作用劑是藉由使血管系的管腔表面或血管系的小凹結構（caveolae）與特異性地結合至膜聯蛋白（annexin）A1、膜聯蛋白 A1 衍生物、膜聯蛋白 A1 的特異性結合配對者、或膜聯蛋白 A1 衍生物的特異性結合配對者的作用劑接觸而輸送；或者，作用劑是藉由使血管系的管腔表面或血管系的小凹結構與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 的衍生物接觸而輸送。

在本發明的特定具體實例中，該方法可用於治療個體中的瘤新生，其係藉由將膜聯蛋白 A1 治療作用劑投藥至個體中。膜聯蛋白 A1 治療作用劑可以是針對膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之抗體；或者，膜聯蛋白 A1 治療作用劑可以是膜聯蛋白 A1 受體或膜聯蛋白 A1 結合作用劑。此外，膜聯蛋白 A1 治療作用劑也可以是具有活性作用劑成分及靶定作用劑成分的作用劑，其中靶定作用劑成分是：特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之作用劑（例如，針對膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之抗體）；膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 的衍生物；膜聯蛋白 A1 的特異性結合配對者或膜聯蛋白 A1 衍生物的特異性結合配對者；或可結合至膜聯蛋白 A1 的特異性結合配對者或膜聯蛋

白 A1 衍生物的特異性結合配對者之作用劑。在這些具體實例中，活性作用劑成分可以是，例如，放射性核素、化學治療作用劑、免疫刺激作用劑、抗瘤新生作用劑、抗發炎作用劑、原細胞自戕作用劑、毒素、抗生素、荷爾蒙、酵素、蛋白質（例如，重組蛋白質或重組經修飾的蛋白質）、運輸蛋白質（例如，白蛋白、經修飾的白蛋白）、溶胞作用劑、小分子、適配子、細胞（包括經修飾的細胞）、奈米顆粒（例如，以白蛋白為基礎的奈米顆粒）、運鐵蛋白、免疫球蛋白、多價抗體、脂質、脂蛋白、脂質體、經改變的天然配位體、基因或核酸、RNA、siRNA、病毒或非病毒基因輸送載體、前藥物、或原分子。本發明也有關於併入膜聯蛋白 A1 治療作用劑的生理組合物。

本發明也有關於評估對於以膜聯蛋白 A1 治療作用劑治療的反應之方法，其係藉由評估以膜聯蛋白 A1 治療作用劑治療之前及以膜聯蛋白 A1 治療作用劑治療期間或之後的個體樣本中膜聯蛋白 A1 之水平，以及比較該等水平；在治療期間或之後膜聯蛋白 A1 的水平顯著低於治療前膜聯蛋白 A1 的水平，係表示以膜聯蛋白 A1 治療作用劑治療的功效。

本發明進一步是有關於實施個體的身體成像之方法，其係使用包括靶定作用劑成分（如以上之說明）及成像作用劑成分之成像作用劑。成像作用劑成分可以是，例如，放射活性作用劑、放射性同位素、或放射性醫藥品；對比作用劑；磁性作用劑或順磁性作用劑；脂質體；超音波作

用劑；誘發一偵測劑的基因載體或病毒；酵素；輔基；螢光物質；冷光物質；或生物冷光物質。在投藥之後，被靶定的成像作用劑可藉由傳統的外部偵測工具（為了成像作用劑而設計）以非侵入性的方式成像，以偵測在瘤新生物中的優先或特異性的累積。此外，本發明是有關於在活體內以瘤新生物特異性的方式輸送該等成像作用劑，然後評估活組織切片樣本中成像作用劑之存在的方法；該方法亦是有關於以瘤新生物特異性的方式輸送成像作用劑至組織樣本。本發明也有關於以下方法：其評估個體存在或不存在瘤新生物，將包括成像作用劑成分及靶定作用劑成分之有興趣的作用劑投藥至個體，如以上之說明，並評估個體存在或不存在一定濃度之有興趣的作用劑，其中存在一定濃度之有興趣的作用劑係表示存在瘤新生物。

本發明也有關於以血管新生特異性的方式，將作用劑輸送至、輸送進入、及/或輸送穿過血管內皮之方法。在本發明的方法中，作用劑是藉由使血管系的管腔表面與特異性地結合至膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A1 衍生物、膜聯蛋白 A1 的特異性結合配對者、或膜聯蛋白 A1 衍生物的特異性結合配對者的作用劑接觸而輸送；或者，作用劑是藉由使血管系的管腔表面與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 的衍生物接觸而輸送。

在本發明的特定具體實例中，該方法可用於治療個體中的血管新生（例如，血管生成、不想要的血管新生之發展），其係藉由將膜聯蛋白 A1 治療作用劑投藥至個體中。

膜聯蛋白 A1 治療作用劑可以是針對膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之抗體；或者，膜聯蛋白 A1 治療作用劑可以是膜聯蛋白 A1 受體或膜聯蛋白 A1 結合作用劑。此外，膜聯蛋白 A1 治療作用劑也可以是具有活性作用劑成分及靶定作用劑成分的作用劑，其中靶定作用劑成分是：可特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之作用劑（例如，針對膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之抗體）；膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物；膜聯蛋白 A1 的特異性結合配對者或膜聯蛋白 A1 衍生物的特異性結合配對者；或可結合至膜聯蛋白 A1 的特異性結合配對者或膜聯蛋白 A1 衍生物的特異性結合配對者之作用劑。在這些具體實例中，活性作用劑成分可以是，例如，放射性核素、化學治療作用劑、免疫刺激作用劑、抗瘤新生作用劑、抗發炎作用劑、原細胞自戕作用劑、毒素、抗生素、荷爾蒙、蛋白質、溶胞作用劑、小分子、適配子、細胞、奈米顆粒、脂質、脂蛋白、脂質體、經改變的天然配位體、基因或核酸、病毒或非病毒基因輸送載體、前藥物或原分子。

在本發明之其他特定具體實例中，該方法可用於提昇或增加個體中的血管新生，其係藉由將膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑投藥至個體。

此外，本發明也有關於在活體內以血管新生特異性的方式輸送該等成像作用劑，然後評估活組織切片樣本有關成像作用劑之存在之方法；該方法亦是有關於以血管新生特異性的方式輸送成像作用劑至組織樣本。本發明也關於

以下方法：其評估個體存在或不存在血管新生，將包括成像作用劑成分及靶定作用劑成分之有興趣的作用劑投藥至個體，如以上之說明，並評估個體存在或不存在一定濃度之有興趣的作用劑，其中存在一定濃度之有興趣的作用劑係表示存在血管新生。

本發明也有關於鑑定改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之活性之作用劑之方法，其係藉由評估膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物在待測作用劑存在及不存在的情況下之活性之水平，其中，如膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物在作用劑存在的情況下之活性之水平，就統計上具顯著性的含量而言，不同於膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物在作用劑不存在的情況下之活性之水平，則作用劑便是改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之活性之作用劑。改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之活性之作用劑，其可由該等方法鑑定者，亦為本發明所考慮。

本發明之前述的及其他的目的、特徵及優點，將因以下本發明之較佳具體實例之更具體說明而更為清楚明白，如附圖中所說明者。

【實施方式】

發明詳述

以下是本發明之較佳具體實例之說明。本發明是基於發現硬塊腫瘤會誘發在血管新生的小凹結構中之膜聯蛋白 A1 及膜聯蛋白 A1 衍生物之抗體可接近的轉移。

血管內皮及腫瘤之可接近性：

稱為小凹結構的質膜小泡 (plasmalemmal vesicle) ，在內皮細胞表面上很多，其功能是營養物的選擇性內噬作用及轉胞吞作用，並提供進入內皮細胞 (內噬作用) 及/或穿透內皮細胞障礙供運輸至下面的組織細胞 (轉胞吞作用) 之工具。現在的焦點是放在接觸循環血液之血管內皮細胞表面，以跳過進入腫瘤之不佳的穿透能力之問題；這個血管內皮表面提供天生可接近的且因此是可靶定的表面。誘發於腫瘤且於正常器官之內皮細胞不表現或外部化之靜脈內可接近的新生血管標的物，是有用於這種策略。

過去的工作已經廣泛地繪製出在正常血管內皮之細胞表面的分子結構及功能並描繪出其特徵 (特別是小凹結構)，主要在大鼠的肺臟組織 (Schnitzer J.E. 及 Oh P. (1994) , J. Biol. Chem. 269 : 6072-82 ; Schnitzer J.E. 等人 (1994) , J. Cell Biol. 127 : 1217-32 ; Schnitzer J.E. 等人 (1995) , Science 269 : 1435-9 ; Schnitzer J.E. 等人 (1996) [發表者的勘誤表出現在 Science , 1996 年 11 月 15 日 , 274 (5290) : 1069] , Science 274 : 239-42 ; Schnitzer J.E. 等人 (1995) , J. Biol. Chem. 270 : 14399-404 ; Schnitzer J.E. 等人 (1995) , Am. J. Physiol. , 268 : H48-55 ; McIntosh D.P. 及 Schnitzer J.E. (1999) , Am. J. Physiol. 277 : H2222-32) 。對於這些正常的大鼠肺臟內皮小凹結構相對於來自腫瘤之內皮小凹結構之等同物，甚至是人類小凹結構之等同物已

經展開研究。正常的大鼠肺臟內皮小凹結構包含膜聯蛋白 A2 (AnnA2)，但不含膜聯蛋白 A1 (AnnA1，其被認為是限於表現在神經及選出的分泌細胞 (McKanna J.A.及 Zhang M.Z.(1997), J. Histochem. Cytochem. 45, 527-38; Savchenko V.L.等人 (2000), Neurosc. 96: 195-203; Naciff J.M.等人 (1996), J. Comp. Neurol. 368: 356-70; Eberhard D.A.等人 (1994), Am. J. Pathol. 145: 640-9))。包括膜聯蛋白 A1 之膜聯蛋白通常是細胞質蛋白質，其可以鈣依賴的方式與脂質膜結合 (Gerke V.及 Moss S.E., Physiol. Rev. 2002, 82: 331-71)。當存在於細胞表面時，他們通常以結合在雙層的內部小葉之情形存在，但一些膜聯蛋白可能改變位置穿過脂質雙層，以維持在外部表面結合至質膜之情形 (Gerke V.及 Moss S.E. (2002), Physiol. Rev. 82: 331-71)。

令人驚訝地，內皮及其小凹結構的蛋白質體圖譜，如例證中所述者，顯示硬塊腫瘤會誘發在血管新生的小凹結構中之 34 仟道耳吞 (kDa) 形式的膜聯蛋白 A1 之抗體可接近的轉移。經由膜聯蛋白 A1 靶定腫瘤內皮的小凹結構容許了在活體內及活體外到達硬塊腫瘤之特異性運輸、進入硬塊腫瘤之穿透、硬塊腫瘤之成像、以及硬塊腫瘤之破壞。此外，有鑑於血管生成及血管新生之發展在硬塊瘤新生物之發展及維持的角色，經由膜聯蛋白 A1 靶定內皮的小凹結構亦容許了在活體內及活體外到達瘤新生物及血管新生之特異性運輸、進入瘤新生物及血管新生之穿透、瘤

新生物及血管新生之成像、以及瘤新生物及血管新生之破壞。

本發明之方法：

作為此發現之結果，以瘤新生物特異性的方式將作用劑輸送至、輸送進入、及/或輸送穿過血管內皮之方法，現在是可獲得的，其係使用膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A1 衍生物、特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之作用劑，或使用特異性地結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1 衍生物之結合配對者之作用劑。我們相信，輸送至、輸送進入及/或輸送穿過瘤新生物之血管內皮可容許作用劑輸送進入瘤新生物之間質(interstitium)，容許作用劑被輸送至瘤新生物之所有區域（包括腫瘤之內皮、基質及其他部位）。同樣地，作為此發現之結果，以血管新生特異性的方式將作用劑輸送至、輸送進入及/或輸送穿過血管內皮之方法，現在也是可獲得的，其係使用膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A1 衍生物、特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之作用劑，或使用特異性地結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1 衍生物之結合配對者之作用劑。我們相信，輸送至、輸送進入、及/或輸送穿過血管內皮，可容許作用劑被輸送至包括血管新生之區域。

在本發明之特定具體實例中，該方法以瘤新生物特異性的方式將膜聯蛋白 A1 治療作用劑輸送至、輸送進入及/

或輸送穿過血管內皮。該等方法可用於治療個體中之瘤新生或其他疾病狀態。此處所使用之名詞“瘤新生物”具體而言是指惡性的瘤新生物，且不但包括肉瘤（例如，纖維肉瘤、肌肉瘤、脂肉瘤、軟骨肉瘤、血管肉瘤、間皮瘤、白血病、淋巴瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤），而且還包括癌瘤（例如，腺癌、乳頭狀癌、囊腺癌、黑色素瘤、腎細胞癌、肝細胞癌、絨毛膜癌、精母細胞瘤）以及混合的瘤新生物（例如，畸胎瘤）。因此，“瘤新生物”不但考慮了硬塊腫瘤，而且還考慮了所謂的“軟性”腫瘤。此外，“瘤新生物”不但考慮了原發性瘤新生物，而且還考慮了轉移。在個別的具體實例中，可被靶定的瘤新生物包括腦部、胸部、肺臟、腎臟、前列腺、卵巢、頭及頸、以及肝臟腫瘤。在本發明之其他具體實例中，該方法以瘤新生物特異性的方式將成像作用劑輸送至、輸送進入及/或輸送穿過血管內皮。

在本發明之其他特定具體實例中，該方法以血管新生特異性的方式將膜聯蛋白 A1 治療作用劑輸送至、輸送進入及/或輸送穿過血管內皮。這些方法可用於治療個體中之不想要的血管新生或其他疾病狀態。在本發明之其他具體實例中，該方法以血管新生特異性的方式將成像作用劑輸送至、輸送進入及/或輸送穿過血管內皮。在本發明之進一步的具體實例中，該方法以血管新生特異性的方式將膜聯蛋白 A1 治療作用劑輸送至、輸送進入及/或輸送穿過血管內皮，以提昇或增加血管新生，如果想要的話。還可獲得

的是在活體內及離體 (ex vivo) 之診斷，利用特異性地結合於膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之作用劑，包括評估治療功效及評估疾病預後之方法。鑑定改變膜聯蛋白 A1 之活性之作用劑之篩選方法亦有所描述，例如，針對膜聯蛋白 A1 之抗體，其可用於本發明之方法中。

此處所使用的膜聯蛋白 A1 之“衍生物”是指變異的膜聯蛋白 A1 多胜肽，其與膜聯蛋白 A1 (例如，人類膜聯蛋白 A1、大鼠膜聯蛋白 A1、牛膜聯蛋白 A1) 共同具有顯著的同源性。衍生物可包括片段及/或序列變異體。變異體包括由生物體中相同的基因位點所編碼之實質上同源的多胜肽，也就是等位基因變異體，以及其他的剪接變異體。變異體亦包括衍生自生物體中之其他基因位點的多胜肽，但其具有對於膜聯蛋白 A1 之實質上的同源性。變異體亦包括實質上同源於或相同於這些多胜肽但衍生自其他生物體之多胜肽，也就是同源基因 (ortholog)。變異體亦包括實質上同源於或相同於這些多胜肽 (其係由化學合成所製得) 之多胜肽。變異體亦包括實質上同源於或相同於這些多胜肽 (其係由重組方法所製得) 之多胜肽。

如此處所使用者，當二個多胜肽 (或多胜肽之一段區域) 胺基酸序列至少有大約 45-55%、典型地至少有大約 70-75%、更典型地至少有大約 80-85% 以及更典型地有大於約 90% 或更多是同源的或相同的時，該等多胜肽是實質上同源或相同的。為決定二段胺基酸序列或二段核酸序列之百分比同源性或相同性，將該等序列以最理想的比較目

的進行校準（也就是，間隙可導入於一個多胜肽或核酸分子之序列中，以獲得與其他多胜肽或核酸分子之最理想的校準）。在對應的胺基酸位置或核苷酸位置之胺基酸殘基或核苷酸接著進行比對。當一段序列的一個位置在其他序列中的對應位置由相同胺基酸殘基或核苷酸所佔據時，則該等分子在那個位置是同源的。如此處所使用者，胺基酸或核酸“同源性”是等同於胺基酸或核酸“相同性”。二段序列之間的百分比同源性是該等序列所共同擁有之相同位置之數目/位置之總數目乘以 100）。

本發明亦包括衍生的多胜肽，其具有較低程度的相同性，但具有足夠的相似性以進行膜聯蛋白 A1 所進行的一種或多種相同功能，例如具有取代之衍生物，該取代係保守性地由另一個具有相似特徵之胺基酸代替多胜肽的一個指定胺基酸。保守性取代可能在性狀上是不表現出來的。典型地被視為保守性取代的是在脂肪族的胺基酸 Ala、Val、Leu 及 Ile 之間的替代，一個取代另一個；羥殘基 Ser 及 Thr 之交換；酸性殘基 Asp 及 Glu 之交換；醯胺殘基 Asn 及 Glu 之間的取代；鹼性殘基 Lys 及 Arg 的交換以及芳香族殘基 Phe 及 Tyr 之間的替代。有關何種胺基酸改變可能在性狀上是不表現出來的之指導原則，可見於 Bowie 等人，*Science* 247: 1306-1310 (1990)。

衍生的膜聯蛋白 A1 多胜肽可藉由一個或多個取代、刪除、插入、反轉、融合及截短或前述任一者之組合，而

在胺基酸序列上有所不同。在較佳具體實例中，膜聯蛋白 A1 衍生物包括對於膜聯蛋白 A1 之功能是必要的胺基酸。對於功能是必要的胺基酸可藉由在此技藝中已知的方法而鑑定，例如，定點突變法或丙胺酸掃描突變法（Cunningham 等人，*Science* 244：1081-1085（1989））。後者的方法是在分子中的每個殘基上導入單一丙胺酸突變。所導致的突變分子接著測試活體外生物活性或活體外增生活性。對於多胜肽活性是關鍵的位置，亦可由結構分析而測定，例如，結晶化、核磁共振或光親和標示（Smith 等人，*J. Mol. Biol.* 244：899-904（1992）；de Vos 等人，*Science* 255：306-312（1992））。

膜聯蛋白 A1 衍生物包括活性片段（長度為，例如，6、9、12、15、16、20、30、35、36、37、38、39、40、50、100 或更多胺基酸之胜肽），其可包括已經藉由使用熟知的方法分析多胜肽序列而鑑定之功能區域、片段或結構區域，例如，訊息胜肽、細胞外功能區域、一個或多個穿膜片段或環狀物、配位體結合區域、鋅指功能區域、DNA 結合功能區域、醯基化位置、糖基化位置或磷酸化位置。片段可以是分離的（不融合至其他胺基酸或多胜肽）或可在一較大段的多胜肽之中。

作用劑之輸送：

在本發明之方法中，作用劑係以瘤新生物特異性的方式或血管新生特異性的方式而輸送，其利用特異性地結合

至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之作用劑。在此處所使用之名詞“特異性地結合”至膜聯蛋白 A1(膜聯蛋白 A1 結合配對者)或膜聯蛋白 A1 衍生物之作用劑，是優先地或選擇性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之作用劑。雖然在特異性地結合之作用劑與膜聯蛋白 A1 之間可能發生特定程度的非特異性交互作用，然而特異性結合仍可區隔為透過膜聯蛋白 A1 之特異性確認而調節者，全部地或部分地。典型地，特異性結合導致了作用劑及膜聯蛋白 A1 之間遠比作用劑及其他蛋白質(例如，其他血管蛋白質)之間更強的聯結。作用劑對於其同族之親和力常數(K_a ，相對於 K_d)是至少 10^6 或 10^7 、通常是至少 10^8 、或者是至少 10^9 、或者是至少 10^{10} 或或者是至少 10^{11} M。也應該要注意的是，“特異性”結合可能是充分地有位置特異性，以至於有效地成為“特異性”：例如，當結合的程度是以較高的程度而成為較大的時候(例如，等同於或大於 10 倍、等同於或大於 20 倍、或甚至等同於或大於 100 倍)，則結合可能成為在功能上等同於在特定位置上完全結合至標的蛋白質：發生導向及有效的結合，而僅具有最小的輸送或無輸送至其他組織之情形。因此，在功能上等同於特異性結合之含量可予以測定，其是藉由評估作用劑的有效輸送之目的是否符合了最小的結合或無結合至其他組織。

在特定具體實例中，作用劑是抗體或包括抗體，其係特異性地結合膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物，或是抗

體片段或包括抗體片段（例如，Fab'片段）。或者，作用劑是另一作用劑或包括另一作用劑，其係特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物（另一個“特異性結合配對者”）。代表性的特異性結合配對者包括，例如，天然配位體、胜肽、小分子（例如，無機小分子、有機小分子、小分子之衍生物、複合的小分子）、適配子、細胞、奈米顆粒（例如，以脂質或非脂質為基礎的調配物）、脂質、脂蛋白、脂胜肽、脂質衍生物、脂質體、用於攜帶化學治療藥品之經修飾的內生血液蛋白質。

在另一具體實例中，作用劑是膜聯蛋白 A1 本身或膜聯蛋白 A1 之衍生物，或包括膜聯蛋白 A1 本身或膜聯蛋白 A1 之衍生物。在另一具體實例中，作用劑特異性地結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1 的衍生物之結合配對者。作用劑亦可包括第一成分，其係靶定膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物，或靶定膜聯蛋白 A1 之結合配對者，如以上之說明，以及第二成分，其為活性成分（例如，治療作用劑或成像作用劑，如以下之詳細說明）。作用劑可自行投藥或在包括作用劑之組合物（例如，醫藥或生理組合物）中投藥。它可在活體內（例如，投藥至個體）或活體外（例如，投藥至組織樣本）投藥。本發明之方法不但可用於人類個體，亦可適用於獸醫用途，例如，用於其他哺乳動物，包括經馴養的動物（例如，馬、牛、綿羊、山羊、豬、狗、貓）及非馴養的動物。

在本發明之方法中，作用劑可自行投藥或在包括作用

劑之組合物（例如，生理或醫藥組合物）中投藥。例如，作用劑可與生理上可接受之載劑或賦形劑調配在一起，以製備醫藥組合物。載劑及組合物可以是無菌的。調配物應適合投藥的模式。

適合的醫藥上可接受之載劑包括，但並不限於，水、鹽溶液（例如，NaCl）、鹽水、緩衝的鹽水、酒精、甘油、乙醇、阿拉伯樹膠、蔬菜油、苯甲醇、聚乙二醇、動物明膠、碳水化合物，例如，乳糖、澱粉糖或澱粉、葡聚糖、硬脂酸鎂、滑石、矽酸、黏石蠟、芳香油、脂肪酸酯、羥甲基纖維素、聚乙烯吡咯烷酮等等及其組合。如果想要的話，該醫藥製備物可與輔助劑混合，例如，潤滑油、防腐劑、安定劑、潤濕劑、乳化劑、供影響滲透壓的鹽類、緩衝劑、著色、調味及/或芳香物質及類似物，其不會有害地與活性作用劑產生反應。

如果想要的話，組合物亦可包含少量的潤濕劑或乳化劑或 pH 緩衝劑。組合物可以是水溶液、懸浮劑、乳化劑、錠劑、丸劑、膠囊、持續釋放調配物或粉末。組合物可與傳統結合劑及載劑（例如，三酸甘油酯）而調配成栓劑。口服調配物可包括標準載劑，例如，醫藥等級的甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、聚乙烯吡咯烷酮、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等等。

這些組合物之導入方法包括，但並不限於，皮內、肌肉內、腹膜內、眼內、靜脈內、皮下、局部、經口及經鼻。其他適合的導入方法亦可包括可再填充的或可生物降解的

裝置、顆粒加速裝置（“基因槍”）及慢速釋放聚合物裝置。如果想要的話，組合物可投藥進入特定組織或進入血管以供應至特定組織（例如，頸動脈至標的物腦）。醫藥組合物亦可投藥為連同其他作用劑之組合治療之部分，同時地或在附近地（例如，隔開數小時、數天、數週、數月）。組合物可能藉由其他同時地或在附近地投藥之作用劑而產生活性。

組合物可依據例行方法而調配成適用於投藥至人類或動物之組合物。例如，用於靜脈內投藥之組合物典型地是在無菌的等張水溶性緩衝液中之溶液。當必要的時候，組合物亦可包括溶解化作用劑及局部麻醉劑，以減輕注射位置之疼痛。一般而言，該等成分是分開地供應或一起混合在單位劑型中，例如，作為在密封容器（例如，指出活性作用劑之量的安瓿或小瓶）中的冷凍乾燥粉末或無水濃縮物。當組合物欲藉由灌流而投藥時，其可以包含無菌醫藥等級的水、鹽水或葡聚糖/水之灌流瓶而配用。當組合物是藉由注射而投藥時，可提供含有注射用無菌水或鹽水之安瓿，以便該等成分可在投藥前混合。

為了局部施用，可使用非可噴霧形式、黏性至半固態或固態形式，其包括與局部施用相容且具有較佳是大於水的動態黏性之載劑。適當的調配物包括但並不限於溶液、懸浮液、乳劑、乳霜、油膏、粉末、灌腸劑、乳液、溶膠、擦劑、軟膏、氣溶膠等等，其如果想要的話係經過消毒的或與輔助劑混合，例如，防腐劑、安定劑、潤濕劑、供影

響滲透壓之緩衝劑或鹽類等等。作用劑可併入化妝用的調配物。為了局部施用，亦適用者為可噴霧的氣溶膠製備物，其中活性成分，較佳係與固態或水溶液的惰性載劑物質結合，是包裝於擠壓瓶中或與加壓揮發性的，通常是氣態的推進劑（例如，加壓氣體）混合。

此處所說明的作用劑可調配成中性或鹽類形式。醫藥上可接受之鹽類包括與游離胺基形成者，例如，衍生自鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等等的鹽類，以及與游離羧基形成者，例如，衍生自鈉、鉀、銨、鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙胺基乙醇、組胺酸、普魯卡因（procaine）等等的鹽類。

以下說明有關治療、成像及診斷之以瘤新生物特異性的方式或以血管生成或血管新生特異性的方式輸送作用劑之代表性方法。

治療：

在本發明的具體實例中，藉由投藥膜聯蛋白 A1 治療作用劑以治療個體中之瘤新生物或其他病變的方法是可獲得的。此處所使用之“治療”可指改善與瘤新生物或病變有關之症狀；減少、預防或延遲瘤新生物之轉移；減少一個或多個瘤新生物之數目、體積及/或大小；及/或減輕瘤新生物或病變之症狀的嚴重度、持續期間或頻率。此處所使用之“膜聯蛋白 A1 治療作用劑”是指靶定瘤新生物或其他病變以供破壞之用的作用劑（例如，化學治療作用

劑)，或治療瘤新生物或減少或消除個體上之瘤新生物或病變的作用之作用劑。因為膜聯蛋白 A1（或膜聯蛋白 A1 衍生物）似乎在瘤新生物血管發展上是重要的，如它在血管新生中之出現所證實者，所以抑制或從細胞表面移除膜聯蛋白 A1 及/或膜聯蛋白 A1 衍生物將停止血管生成，且藉此治療瘤新生物或病變。

在本發明的另一具體實例中，藉由投藥膜聯蛋白 A1 治療作用劑以治療個體中之血管生成或血管新生之發展或其他病變的方法是可獲得的。可使用此處所說明之方法治療的其他代表性症狀，包括動脈硬化、糖尿病及相關後遺症、黃斑部退化、心臟疾病（例如，來自局部缺血）、肺氣腫、慢性阻塞性肺臟疾病、心肌炎、肺臟及全身性高血壓及其他後遺症、感染及其他與發炎、血管生成或血管新生相關蛋白質之表現有關的症狀，例如，此處所說明者。血管生成相關蛋白質之表現是各種惡性、局部缺血性、發炎性、感染性及免疫疾病之促成因素（參見，例如，Carmeliet P., Nat. Med. 9 (6) : 653-660 (2003) ; Carmeliet P. 以及 Jain R., Nature 407 : 249-257 (2000))。因此，該方法同樣地可適用於該等症狀，在此處合稱為“病變”。

此處所使用之“治療”可指改善與血管生成、血管新生之發展或其他病變有關之症狀；減少、預防或延遲血管生成或血管新生之發展；減少一個或多個血管生成或血管新生之區域的數目、體積及/或大小；及/或減輕血管生成、血管新生或其他病變之症狀的嚴重度、持續期間或頻率。

因此，此處所使用之“膜聯蛋白 A1 治療作用劑”是指靶定血管生成、血管新生之發展或其他病變以供破壞之用的作用劑（例如，化學治療作用劑），或治療血管生成或血管新生或減少或消除個體上之血管生成、血管新生或其他病變的負面作用。

在本發明的另一具體實例中，藉由投藥膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑以提昇或增加個體中之血管生成或血管系之發展的方法是可獲得的。此處所使用之“膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑”是指提昇或增加血管生成或血管新生之發展，或治療疾病或症狀（其可經由提昇或增加的血管生成或增加的血管新生之發育而改善）的作用劑。

在一具體實例中，膜聯蛋白 A1 治療作用劑或膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑，包括特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物的作用劑。在一特定具體實例中，膜聯蛋白 A1 治療作用劑或膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑是特異性地結合膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物的抗體，或包括特異性結合膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物的抗體，或是抗體之片段或包括抗體之片段（例如，Fab' 片段或其他抗體結合片段）。“抗體”是藉由體液反應之活體外或活體內產生所獲得之免疫球蛋白分子，且包括多株及單株抗體兩者。該名詞亦包括基因工程建造的形式，例如嵌合型抗體（例如，人類化鼠類抗體）、異源共軛的抗體（例如，雙特異性抗體）及重組單鏈 Fv 片段（scFv）。名詞“抗體”亦包括多價抗體及抗體之抗原結合片段，例

如，Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG 及反轉 IgG，以及變異性重鏈及變異性輕鏈功能區域。與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物免疫性地反應之抗體可在活體內產生或經由重組方法產生，例如，篩選在噬菌體或類似載體中之重組抗體的資料庫。參見，例如，Huse 等人 (1989)，Science 246:1275-1281；及 Ward 等人 (1989)，Nature 341:544-576；及 Vaughan 等人 (1996)，Nat. Biotech. 14:309-314。“抗原結合片段”包括抗體之任何部分，其可結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物。一段抗原結合片段可能是，例如，包括 CDR 區域之多胜肽或免疫球蛋白分子之其他片段，其保留對於膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之親和力及特異性。代表性抗體包括商業上可獲得的抗體（如 Linscott 氏指南所列者），例如，EH17A mAb (SCB)；Zym RB pAb (Zymed)；II-29 mAb (ICN 生物醫藥)；29 mAb (BD 轉導實驗室)；C19 pAb (SCB)；N19 pAb (SCB)；以及 H65 pAb (SCB)。

在另一具體實例中，膜聯蛋白 A1 之其他特異性結合配對者，如前所述，可用作為特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物的作用劑。在另一具體實例中，膜聯蛋白 A1 治療作用劑或膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑是膜聯蛋白 A1 本身或膜聯蛋白 A1 之衍生物，或包括膜聯蛋白 A1 本身或膜聯蛋白 A1 之衍生物。在另一具體實例中，膜聯蛋白 A1 治療作用劑或膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑是特異性地結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1

之衍生物的結合配對者之作用劑，或包括特異性地結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1 之衍生物的結合配對者之作用劑。在另一具體實例中，膜聯蛋白 A1 治療作用劑或膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑是膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1 之衍生物的結合配對者，或包括膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1 之衍生物的結合配對者。

在另一具體實例中，膜聯蛋白 A1 治療作用劑或膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑包括活性作用劑成分及靶定作用劑成分。靶定作用劑成分是特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物，或特異性地結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者的作用劑，或包括特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物或特異性地結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者的作用劑，如以上之說明。如果想要的話，靶定作用劑成分亦可特異性地結合至一種以上的目標（例如，結合至膜聯蛋白 A1 及膜聯蛋白 A1 之衍生物；結合至膜聯蛋白 A1 及結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者，舉例而言）。或者，靶定作用劑本身是膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物，或膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1 之衍生物的結合配對者，或包括膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物或膜聯蛋白 A1 之結合配對者或膜聯蛋白 A1 之衍生物的結合配對者。膜聯蛋白 A1 結合至出現在腫瘤內皮上之交互作用的配對者；當交互作用位置不飽和時，膜聯蛋白 A1（或衍生物）可回到該位置並結合。

在一代表性膜聯蛋白 A1 的靶定作用劑中，使用的是多價抗體。多價抗體之一個分子部分可作為靶定作用劑成分，且多價抗體之第二分子部分可作為活性作用劑成分。

靶定作用劑成分可連結至活性作用劑成分。例如，它們可共價地直接鍵結至另一個。當這兩者係藉由共價鍵結而直接地鍵結至另一個時，鍵結可藉由透過在每個分子部分上之活性基團形成一適當的共價連結而形成之。例如，在一個化合物上之酸基團可與在另一者上之胺、酸或醇類縮合，以分別形成對應的醯胺、酐或酯類。

除了羧酸基團、胺基團及羥基團之外，其他適合的活性基團，其係用於形成靶定作用劑成分及活性作用劑成分之間的連結，包括了礬基團、巰基團及羧酸之鹵酸及酸酐衍生物。

在其他的具體實例中，靶定作用劑成分及活性作用劑成分可透過中間的連結物而共價地連結至另一者。連結物有利地具有二種活性基團，其中之一者是互補於在靶定作用劑成分上之活性基團，另一者是互補於在活性作用劑成分上之活性基團。例如，當這兩者具有游離的羥基團，則連結物可能適當地是一種二酸，其將與兩種化合物反應，以形成這兩個殘基之間的雙醚連結物。除了羧酸基團、胺基團及羥基團之外，其他適合的活性基團，其係用於形成醫藥上的活性分子部分之間的連結，包括了礬基團、巰基團及羧酸之鹵酸及酸酐衍生物。

適當的連結物列在以下的表格中。

| 第一活性基團 | 第二活性基團 | 適當的連結物 |
|--------|--------|-------------|
| 胺 | 胺 | 二酸 |
| 胺 | 羥 | 二酸 |
| 羥 | 胺 | 二酸 |
| 羥 | 羥 | 二酸 |
| 酸 | 酸 | 二胺 |
| 酸 | 羥 | 胺基酸、羥烷酸、巰烷酸 |
| 酸 | 胺 | 胺基酸、羥烷酸、巰烷酸 |

適當的二酸連結物包括草酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、己二酸、棕櫚酸、辛二酸、壬二酸、癸二酸、順丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、酞酸、異酞酸及對苯二甲酸。當被稱為二酸時，熟習該項技術者將確認在特定情況下，較佳是對應的酸鹵化物或酸酐（單側或雙側）作為連結物再製藥物（reprodrug）。較佳的酐是琥珀酸酐。另一較佳的酐是順丁烯二酸酐。其他的酐及/或酸鹵化物可能由熟習該項技術者使用以達良好作用。

適當的胺基酸包括丁酸、2-胺基乙酸、3-胺基丙酸、4-胺基丁酸、5-胺基戊酸、6-胺基己酸、丙胺酸、精胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、甘胺酸、組胺酸、異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、色胺酸、酪胺酸及纈胺酸。再次說明，該適當的胺基酸之酸基團在其作為連

結物基團之用途前，可轉變成酐或酸鹵化物形式。

適當的二胺包括 1,2-二胺基乙烷、1,3-二胺基丙烷、1,4-二胺基丁烷、1,5-二胺基戊烷、1,6-二胺基己烷。適當的胺基醇包括 2-羥基-1-胺基乙烷、3-羥基-1-胺基乙烷、4-羥基-1-胺基丁烷、5-羥基-1-胺基戊烷、6-羥基-1-胺基己烷。

適當的羥烷酸包括 2-羥基乙酸、3-羥基丙酸、4-羥基丁酸、5-羥基戊酸、5-羥基己酸。

在此技藝中之人士將會確認藉由選擇具有適當的活性基團之靶定作用劑成分及活性作用劑成分的成分，以及藉由將其配對至適當的連結物，則可在本發明之範疇內製備出廣泛範圍的創造性化合物。

此外，各種連結物基團可被稱為“弱的”或“強的”，其係基於共價鍵結之安定性，該共價鍵結在間隙與極性脂質載劑或生物活性化合物之間形成了連結物官能基。弱的官能性包括，但並不限於，磷醯胺、磷酸酯、碳酸酯、醯胺、羧基-磷醯基酐、酯及硫酯。強的官能性包括，但並不限於，醚、硫醚、胺、空間障礙的醯胺及酯。在間隙基團與生物活性化合物之間使用強連結物官能基，將傾向降低化合物在目標位置被釋放的速率；反之，在間隙基團與化合物之間使用弱連結物官能基，將達到加速化合物在目標位置釋放之效果。

酵素的釋放也是有可能的，但此種經酵素調節的釋放模式在本發明之該等具體實例中將不必然與鍵結強度相關。包括酵素活性位置確認基團之間隙分子部分，例如，

包括具有在其中的蛋白分解分割位置之胜肽的間隙基團，被視為在本發明之範疇內。在特定具體實例中，連結物分子部分包括間隙分子，其加速活性作用劑成分來自靶定作用劑成分之水解性或酵素性釋放。在特定較佳具體實例中，間隙官能基是藉由存在於目標血管組織之酵素活性而予以水解，例如，酯酶。

連結至靶定作用劑成分之活性作用劑成分，可以是達成想要的治療結果之任何作用劑，或包括達成想要的治療結果之任何作用劑，包括諸如以下之作用劑，其可作為對於膜聯蛋白 A1 治療作用劑或膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑之活性作用劑成分(如果適當的話)：放射性核素(例如，I125、123、124、131 或其他放射活性作用劑)、化學治療作用劑(例如，抗生素、抗病毒劑或抗真菌劑)、免疫刺激作用劑(例如，細胞激素)、抗瘤新生作用劑、抗發炎作用劑、原細胞自戕作用劑(例如，吸引免疫細胞及/或刺激免疫系統之胜肽或其他作用劑)、毒素(例如，蓖麻毒素、內毒素、LPS)、抗生素、荷爾蒙、蛋白質(例如，重組蛋白質或重組經修飾的蛋白質)、運輸蛋白質(例如，白蛋白、經修飾的白蛋白)、酵素、其他蛋白質(例如，界面活性蛋白質、凝血蛋白質)、溶胞作用劑、小分子(例如，無機小分子、有機小分子、小分子之衍生物、複合的小分子)、適配子、細胞(包括經修飾的細胞)、奈米顆粒(例如，以脂質或非脂質為基礎的調配物、以白蛋白為基礎的調配物)、運鐵蛋白、免疫球蛋白、多價抗體、脂

質、脂蛋白、脂胜肽、脂質體、脂質衍生物、天然配位體及經改變的蛋白質（例如，以白蛋白或其他以血液運輸蛋白為基礎的輸送系統，經修飾以增加對於作為標的物的蛋白質之親合力、血清類黏蛋白）、改變作為標的物之細胞的細胞外基質之作用劑、抑制血管結構之生長、移動或形成之作用劑（對於膜聯蛋白 A1 治療作用劑而言）、提昇或增加血管結構之生長、移動或形成之作用劑（對於膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑而言）、基因或核酸（例如，反義寡核苷酸 RNA、siRNA）、病毒或非病毒基因輸送載體、或前藥物或原分子。

例如，在一具體實例中，放射性核素或其他放射活性作用劑可作為膜聯蛋白 A1 治療作用劑之活性作用劑成分。靶定作用劑成分以瘤新生物特異性或血管新生特異性的方式輸送放射活性作用劑，使得局部輻射損害得以產生並造成輻射誘發的細胞自戕及壞死，其係遍及瘤新生物，包括在腫瘤的瘤新生物細胞、基質細胞及內皮細胞中，或遍及具有不想要的血管新生之區域。或者，在另一具體實例中，刺激或增加血管生成或血管新生之發展的作用劑，可作為膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑之活性作用劑成分。靶定作用劑成分以特異性的方式輸送作用劑，造成在膜聯蛋白 A1 存在的特殊位置之增加的血管生成或增加的血管新生之發展。

在另一特定具體實例中，反義寡核苷酸或其他作用劑可作為活性作用劑成分，以改變且特別是抑制在作為標的

物之組織中的基因之製造，例如，在瘤新生物組織中過度表現的基因（例如，致癌基因或與癌瘤相關的基因，例如，c-Jun、c-Fos、HER-2、E2F-1、RAS、FAS、NF、BRCA），或在血管生成中過度表現的基因。或者，寡核苷酸或基因可作為改變且特別是提昇在作為標的物之組織中的蛋白質之產生，例如，控制細胞自戕或調節細胞生長之基因；寡核苷酸或基因亦可用於產生在作為標的物之組織中表現不足或缺少的蛋白質，或用於表現直接或間接地破壞瘤新生物之基因產物。

在另一特定具體實例中，抗發炎作用劑可作為活性作用劑。代表性的作用劑包括非類固醇抗發炎作用劑、類固醇或皮質類固醇抗發炎作用劑或其他抗發炎作用劑（例如，組織胺）。或者，前發炎作用劑可作為活性作用劑（例如，以提昇血管生成或增加血管新生之發展，如此處之說明）。

在另一特定具體實例，用於瘤新生的疾病之化學治療作用劑可作為活性作用劑成分。代表性的作用劑包括烷化作用劑（氮芥氣、次乙亞胺、烷基磺酸、亞硝脲及三氮烯）、抗代謝劑（葉酸類似物，例如，胺甲碟呤、嘧啶類似物及嘌呤類似物）、天然產物及其衍生物（抗生素、生物鹼、酵素）、荷爾蒙及拮抗劑（皮質類固醇、腎上腺皮質類固醇、黃體素、雌激素）及其他類似作用劑。例如，在特定具體實例中，化學治療作用劑可以是無細胞毒性或細胞穩定性藥物。化學治療作用劑亦可能包括對細胞具有其他作

用者，例如，將轉形狀態反轉至分化狀態，或抑制細胞複製者。有用於本發明之已知的細胞毒性劑之例子列於，例如，Goodman 等人，“治療藥物的藥理學基礎”，第六版，A. G. Gilman 等人編輯，Macmillan 出版公司，紐約(1980)。這些包括紫杉醇、氮芥氣，例如，二氯甲基二乙胺 (mechlorethamine)、環磷醯胺、美法侖 (melphalan)、尿嘧啶氮芥及苯丁酸氮芥 (chlorambucil)；次乙亞胺衍生物，例如，噻替哌；烷基磺酸，例如，白消胺 (busulfan)；亞硝脲，例如，卡莫司汀 (carmustine)、洛莫司汀 (lomustine)、司莫司汀 (semustine) 及鏈佐星 (streptozocin)；三氮烯，例如，達卡巴嗪 (dacarbazine)；葉酸類似物，例如，胺甲喋呤；嘧啶類似物，例如，氟尿嘧啶、阿糖胞苷 (cytarabine) 及阿扎立平 (azaribine)；嘌呤類似物，例如，巯基嘌呤及硫基鳥嘌呤；長春花生物鹼，例如，長春花鹼及長春新鹼；抗生素，例如，更生黴素、柔紅黴素、多柔比星、平陽黴素、光輝黴素及絲裂黴素；酵素，例如，L-天冬胺酸酶；鉑配位錯合物，例如，順鉑；經取代的尿素，例如，羥基脲；甲基胍衍生物，例如，丙卡巴胍；腎上腺皮質抑制劑，例如，米托坦 (mitotane)；荷爾蒙及拮抗劑，例如，腎上腺皮質類固醇 (潑尼松 (prednisone))、黃體素 (己酸羥基黃體酮、醋酸甲羥基黃體酮及醋酸甲地孕酮)、雌激素 (二乙基己烯雌酚及乙炔雌二醇)、抗雌激素 (泰莫西芬 (tamoxifen)) 以及雄性素 (丙酸辜固酮及氟甲基辜固酮)。

也可使用會干擾細胞內蛋白質合成的藥物；該等藥物是在此技藝中之人士已知的，並且包括嘌呤黴素、環己醯亞胺及核糖核酸酶。

目前用於治療癌症的大部分化學治療作用劑，都具有經得起直接與靶定作用劑成份的胺基或羧基之化學交聯反應的官能基。例如，游離的胺基可在胺甲碟呤、多柔比星、柔紅黴素、阿糖胞苷、順鉑、長春地辛、絲裂黴素及平陽黴素上獲得，而游離的羧酸基團可在胺甲碟呤、美法倫及苯丁酸氮芥上獲得。這些官能基（即游離的胺基及羧酸）是各種同雙官能或異雙官能的化學交聯作用劑之標的物，其可將這些藥物直接交聯至游離的胺基。

胜肽及多胜肽毒素也可有效作為活性作用劑成份，以及本發明特別涵蓋了活性作用劑成份是毒素的具體實例。毒素一般是各種生物體（包括細菌、植物等）之複合的毒性產物。毒素的例子包括，但並不限於：蓖麻毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A 鏈（蓖麻毒蛋白毒素）、假單胞菌外毒素（PE）、白喉毒素（DT）、產氣莢膜梭狀芽孢桿菌（*Clostridium perfringens*）磷脂酶（PLC）、牛胰臟核糖核酸酶（BPR）、商陸木抗病毒蛋白（PAP）、雞母珠毒蛋白、雞母珠毒蛋白 A 鏈（雞母珠毒蛋白毒素）、眼鏡蛇毒液因子（CVF）、膠質毒素（GEL）、皂毒素（SAP）、莫迪素（modeccin）、槲寄生凝集素及蒴蓮素。

本發明也涵蓋染劑，其係用於例如光動力療法，並且用於結合適當的非離子化放射線。本發明也涵蓋將光及卞

啉用於本發明的方法，以及將它們用於癌症的治療也已被回顧。參見 van den Bergh, Chem. Brit. 22: 430-437(1986)，其完整內容以引用方式納入本文中。

在另一特定具體實例中，抗發炎作用劑可使用作為活性作用劑。代表的作用劑包括非類固醇的抗發炎作用劑；類固醇或皮質類固醇的抗發炎作用劑；或其他抗發炎作用劑（例如，組織胺）。或者，前發炎作用劑可使用作為活性作用劑（例如，以增強血管生成或增加血管新生之發展，如此處之說明）。

前藥物或前分子也可使用作為活性作用劑。例如，使用作為活性作用劑的前藥物，可藉由投予適當的酵素或藉由標的物之組織中的內源性酵素作用，而接著被活化（轉換）。或者，活化的酵素可共同投予或後續投予作為另一活性作用劑，如此處所說明的治療作用劑的一部份；或者前藥物或前分子可藉由在投予後將 pH 改變成生理 pH 而活化。代表的前藥物包括具有核苷酸類似物 GCV 的簡單疱疹病毒胸腺核苷激酶（HSV TK）；胞苷脫胺酶及 t-氟胞苷；鹼性磷酸酶/磷酸依託泊苷；以及其他的前藥物（例如，於 Greco 等人, J. Cell Phys. 187: 22-36(2001)及 Konstantinos 等人, Anticancer Res. 19: 605-614 (1999) 所說明者；也參見 Connors T.A., Stem Cells 13 (5) : 501-511 (1995) ; Knox R.J.、Baldwin A.等人, Arch. Biochem. Biophys. 409 (1) : 197-206 (2003) ; Syrigos K.N.及 Epenetos A.A., Anticancer Res. 19 (1A) : 605-613 (1999) ; Denny W.A.,

JBB 1 : 48-70 (2003)) 。

在本發明的另一具體實例中，靶定作用劑成分及/或活性作用劑成分包括用於與金屬產生螯合作用之螯合分子部分，例如，對於放射性金屬或順磁性離子之螯合劑。在較佳具體實例中，螯合劑是對於放射性核素之螯合劑。在本發明中有用的放射性核素包括伽瑪發射物、陽電子發射物、歐傑 (Auger) 電子發射物、X 射線發射物及螢光發射物，而帶有貝塔或阿法發射物者是較佳於治療用途。在放射線治療中作為毒素之放射性核素的例子包括： ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{43}K 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{71}Ge 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{77}As 、 ^{77}Br 、 $^{81}\text{Rb}/^{81\text{M}}\text{Kr}$ 、 $^{87\text{M}}\text{Sr}$ 、 ^{90}Y 、 ^{97}Ru 、 ^{99}Tc 、 ^{100}Pd 、 ^{101}Rh 、 ^{103}Pb 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{113}In 、 ^{119}Sb 、 ^{121}Sn 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{127}Cs 、 ^{128}Ba 、 ^{129}Cs 、 ^{131}I 、 ^{131}Cs 、 ^{143}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Eu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{191}Os 、 ^{193}Pt 、 ^{194}Ir 、 ^{197}Hg 、 ^{199}Au 、 ^{203}Pb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 及 ^{213}Bi 。較佳的治療放射性核素包括 ^{188}Re 、 ^{186}Re 、 ^{203}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{109}Pd 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{77}Br 、 ^{211}At 、 ^{97}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{198}Au 及 ^{199}Ag 、 ^{166}Ho 或 ^{177}Lu 。在其中螯合劑會配位金屬之環境是說明於，例如，Gansow 等人，美國專利第 4,831,175、4,454,106 及 4,472,509 號。

在一具體實例中，例如， $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 可作為供治療及診斷應用之放射性同位素（如以下之說明），因為其對於所有的核子醫學部門而言是容易獲得的、價格不高、提供最低的病患放射線劑量且具有理想的核子成像性質。它具有 6 小

時之半生期，其表示鎔標示的抗體之快速靶定是需要的。因此，在特定的較佳具體實例中，膜聯蛋白 A1 治療作用劑包括對於鎔之螯合作用劑。

膜聯蛋白 A1 治療作用劑亦可包括放射性致敏作用劑，例如，增加細胞對於放射線之敏感度的分子部分。放射線致敏作用劑之例子包括硝基咪唑、甲硝唑及米索硝唑 (misonidazole) (參見：DeVita V. T. Jr.，於“哈里森氏內科用藥原理”，第 68 頁，McGraw-Hill 圖書公司，紐約 (1983)，在此處以引用方式納入本文中)。包括放射線致敏作用劑作為活性分子部分之膜聯蛋白 A1 治療作用劑，經投藥且在瘤新生物之內皮細胞及/或任何其他細胞局部化。當個體曝露於放射線時，放射線致敏作用劑受到“激發”並引起細胞之死亡。

有廣泛類別的分子部分可作為螯合配位體且可經衍生成為膜聯蛋白 A1 治療作用劑之一部分。例如，螯合配位體可以是 1,4,7,10-四氮四乙酸環十二烷 (DOTA) 之衍生物、乙二胺四乙酸 (EDTA)、二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 及 1-異硫氰酸基-苄基-甲基-二乙烯三胺五乙酸 (ITC-MX)。這些螯合劑典型地在側鏈上具有基團，藉此螯合劑可被用於貼附至靶定作用劑成分。此等基團包括，例如，苄基異硫氰酸酯，藉此 DOTA、DTPA 或 EDTA 可被連結至，例如，抑制劑之胺基。

在一具體實例中，作用劑是“ N_xS_y ”螯合分子部分。如此處之定義，名詞“ N_xS_y 螯合物”包括雙官能的螯合

劑，其有能力配位地結合金屬或放射性金屬，且較佳地具有 N_2S_2 或 N_3S 核心。舉例的 N_xS_y 螯合物說明於，例如，Fritzberg 等人 (1988)，PNAS 85: 4024-29；及 Weber 等人 (1990) Bioconjug. Chem. 1: 431-37；以及在此處所引述之參考資料。Jacobsen 等人之 PCT 申請案 WO 98/12156 提供供鑑定結合至金屬原子之化合物的方法及組合物(也就是結合分子部分的合成資料庫)。說明於該公開案之方法可用於鑑定結合分子部分，其可後續地併入於膜聯蛋白 A1 治療作用劑。

在放射性治療及放射性診斷之應用中使用共軛蛋白質經常遇到的問題是放射性標示的分子部分片段在腎臟中之潛在地危險的累積。當共軛物是使用酸或鹼不穩定的連結物而形成的時候，會有利地發生放射活性螯合物自蛋白質之切割。如果該螯合物具有相對低的分子量，則它不會留在腎臟中，而會排放在尿液中，藉此降低腎臟對於放射活性之曝露。然而，在特定的例子中，在配位體中利用酸或鹼不穩定的連結物可能是有利的，其與它們已用於經標示的蛋白質中之原因相同。

其他適當的活性作用劑包括誘發血管內凝集或損害內皮之作用劑，藉此引起凝集並有效地破壞瘤新生物或其他作為標的之病變。此外，如果想要的話，藉由其他作用劑而活化的酵素(例如，生物素，其藉由抗生物素蛋白而活化)可作為活性作用劑或治療的靶定作用劑的一部分。

膜聯蛋白 A1 治療作用劑可藉由在此一技藝中所知道

的標準方法而合成（例如，藉由重組 DNA 技術或其他方法），以提供反應性的官能基，其可與（例如）配位體之羰基形成酸不穩定的連結物。適當的酸不穩定的連結物之例子包括脙及縮氨基硫脲官能。這些連結物可藉由使氧化的碳水化合物分別與帶有脞、氨基硫脲及硫卡巴脞官能之螯合物反應而形成。或者，可使用鹼性可切割的連結物，其已用於來自腎臟的放射性標示之提昇的廓清。參見，例如，Weber 等人，1990，*Bioconjug. Chem.* 1:431。經由脞連結物之雙官能螯合物的耦合可在連結物間隙臂中併入鹼性敏感的酯類分子部分。此種含酯類的連結物單元之例子為乙烯雙甘醇（琥珀醯亞胺基琥珀酸酯）（EGS，可獲得自 Pierce 化學公司，Rockford Ill.），其具有二個 1,4-二丁酸單元之二個終端 N-羥基琥珀醯亞胺（NHS）酯類衍生物，其各自藉由二個烷酯連結至單一乙烯甘醇分子部分。一個 NHS 酯類可以一個適當的含胺 BFC（例如，2-胺基芞基 DTPA）取代，而其他的 NHS 酯類與有限量的脞反應。所造成的脞是用於耦合至靶定作用劑成分，形成含有二個烷酯官能之配位體-BFC 連結物。此等共軛物在生理上的 pH 是安定的，但在鹼性 pH 容易被切割。

經由螯合作用而標示的膜聯蛋白 A1 治療作用劑會因放射線誘發而使螯合劑被切斷並藉由調和複合體之分離而失去放射性同位素。在一些例子中，從複合體分離的金屬可重新複合，提供非特異性地局部化的同位素之更快的廓清及因此對於非目標的組織之更少的毒性。例如，螯合劑

化合物，例如，EDTA 或 DTPA 可灌流進入病患中，提供螯合劑群以結合釋放的放射性金屬，並加速游離的放射性同位素排放在尿液中。

在其他具體實例中，可使用硼附加物，例如，卡硼烷。例如，卡硼烷可用在下垂側鏈上的羧官能而製得，如在此技藝中所熟知者。將此等卡硼烷貼附於胺官能性，例如，如同可能提供於靶定作用劑成分者，可經由卡硼烷之羧基的活化及與胺基的縮合而達成，以產生共軛物。此等治療作用劑可用於中子擷取治療。

在另一具體實例中係使用 RNAi。“RNAi 構築”是在整篇說明書中所使用的通稱，包括小干擾的 RNA (siRNA)、髮夾結構 RNA 及其他 RNA 種類，其可異位地輸送至細胞、由酵素切割者所切割以及使基因在細胞中不活動。名詞“小干擾的 RNA”或“RNA”是指約 19-30 個核苷酸的長度之核酸，更佳是 21-23 個核苷酸的長度。RNA 是雙股的，並可在每一端包括短的突出物。較佳地，突出物是在 3' 端之 1-6 個核苷酸的長度。在此技藝中已知 RNA 可被化學合成，或從較長的雙股 RNA 或髮夾結構 RNA 分子中藉由酵素消化而衍生。為了效率起見，RNA 一般會具有對於標的物基因序列之顯著的序列相似性。視需要，RNA 分子包括 3' 羥基，但基團可以此處所說明的脂肪酸分子部分而修飾。片語“調節 RNAi”是指（表示）RNA 分子可引導（例如）序列特異性的基因不活動之能力而非誘發序列獨立性雙股 RNA 反應（例如，PKR 反應）之結果。

在特定具體實例中，用於活性作用劑成份的 RNAi 構築是小型干擾 RNA (RNA)，較佳是 19-30 個鹼基對的長度。或者，RNAi 構築是髮夾結構 RNA，其可被細胞加工（例如，是切割者的基質），以在活體內製造與經 RNA 處理的細胞一樣之代謝產物，例如，加工成可誘發序列特異性的使基因不活動之短的（19-22 聚體）引導序列。在一較佳具體實例中，經處理的動物是人類。

RNAi 構築包含核苷酸序列，其可在細胞的生理條件下，雜合到要被抑制的基因（也就是，“標的物”基因）之至少一部份 mRNA 轉錄物的核苷酸序列。雙股 RNA 僅需要足夠類似於具有調節 RNAi 能力的天然 RNA。因此，本發明具有可耐受序列變化之優點，該等變化由於基因突變、品系多形性或演化而可能是預期的。在標的物序列及 RNAi 構築序列之間耐受的核苷酸錯配之數目，在 5 個鹼基對中不超過 1 個，或在 10 個鹼基對中不超過 1 個，或在 20 個鹼基對中不超過 1 個，或在 50 個鹼基對中不超過 1 個。在 siRNA 雙股物的中心之錯配是最關鍵性的，並可本質上破壞標的物 RNA 的切割。相反地，在互補於標的物 RNA 的 RNA 股 3'端之核苷酸，並沒有顯著地促成標的物辨認之特異性。

序列相同性可藉由在此技藝中已知的序列比較及比對演算法（參見 Gribskov 及 Devereux, 序列分析入門, Stockton 出版 (1991)，以及其中所引用的參考文獻），並且計算核苷酸序列間的差異百分比而最適化，例如，藉由 Smith-

Waterman 演算法，在 BESTFIT 軟體程式中利用預設參數而執行（例如，威斯康辛大學遺傳計算組）。在抑制性 RNA 及標的物基因部份之間，大於 90% 的序列相同性，或甚至 100% 的序列相同性是較佳的。或者，RNA 的雙股區域可功能性地定義為可與一部份標的物基因轉錄物雜合的核苷酸序列（例如，400 mM NaCl、40 mM PIPES (pH 6.4)、1 mM EDTA，50°C 或 70°C 雜合 12-16 小時；然後清洗）。

RNAi 構築的製造可藉由化學合成方法或藉由重組核酸技術而進行。經處理的細胞中之內源性 RNA 聚合酶，可在活體內調節轉錄作用，或經選殖的 RNA 聚合酶，可用於在活體外的轉錄作用。

RNAi 構築可包括其他的修飾（例如，對磷酸-糖骨架或核苷的修飾），以（例如）減少對細胞核酸酶的敏感性、改善生物可利用率、改善調配物特性及/或改變其他藥物動力性質。例如，可修飾天然 RNA 的磷酸二酯連結，以納入至少一個氮或硫雜原子。可修改在 RNA 結構中的修飾，以容許特定的基因抑制而避免對於雙股 RNA 之一般的細胞反應（“PKR 調節的反應”）。同樣地，也可修飾鹼基以阻斷腺苷脫氨酶之活性。RNAi 構築可由酵素或藉由部份/全部的有機合成而製造，任何修飾的核糖核苷酸都可藉由活體外的酵素或有機合成而導入。

化學修飾其他 RNA 分子的方法，可適合於修飾 RNAi 構築（例如，參見 Heidenreich 等人(1997), Nucl. Acids Res. 25: 776-780; Wilson 等人(1994), J. Mol. Recog. 7: 89-98;

Chen 等人 (1995), Nucl. Acids Res. 23 : 2661-2668 ; Hirschbein 等人 (1997), Antisense Nucl. Acid Drug Dev. 7 : 55-61)。僅用於說明，RNAi 構築的骨架可以下列基團而修飾：硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、膦酸甲酯、嵌合的膦酸甲酯-磷酸二酯、膦醯胺酸、磷酸硼烷、磷酸三酯、甲乙縮醛、3'-硫基甲乙縮醛、5'-硫基甲乙縮醛、5'-硫醚、碳酸酯、5'-N-氨基甲酸酯、硫酸酯、磺酸酯、氨基磺酸酯、磺醯胺、砒、亞硫酸酯、亞砒、硫化物、羥基胺、亞甲基(甲基亞胺基) (MMI)、亞甲氧基(甲基亞胺基) (MOMI) 連結、胜肽核酸、含有寡聚物或糖修飾的 5-丙炔基嘧啶 (例如，2'-取代的核糖核苷， α -構形)。

雙股的結構可藉由單一自身互補的 RNA 股或兩個互補的 RNA 股而形成。RNA 雙股物的形成可在細胞內部或外部啟動。

在特定具體實例中，為了減少不想要的免疫刺激，因此設計 RNAi 構築以便不會包括存在於鳥嘌呤 5'端之未修飾的胞苷，例如，以避免 B 細胞調節的免疫監督之刺激。

在輸送 RNAi 以用於局部治療作用之特定具體實例中，可選擇骨架連結以便滴定測量核酸酶敏感性，使 RNAi 有足夠的核酸酶抗性，以致於在有興趣的組織 (例如，瘤新生物) 中是有效的，但不會有致使顯著含量的構築可逃脫組織而未被降解的核酸酶抗性。利用這個策略，RNAi 構築可用於在有興趣的組織中使基因不活動，但在它們可進入較廣泛循環之前降解。

RNA 可以使得至少 1 個複製/細胞的輸送的量而導入。較高劑量（例如，至少 5、10、100、500 或 1000 個複製/細胞）的雙股物質，可產生更有效的抑制，然而較低的劑量也可有效於特定的應用。抑制是序列特異性的，因為對應於 RNA 的雙股區域之核苷酸序列被靶定，以用於基因的抑制。

在特定具體實例中，主體的 RNAi 構築是 siRNA。這些核酸是約 19-30 個核苷酸的長度，還要更佳是 21-23 個核苷酸的長度，例如，長度對應於由較長的雙股 RNA 被核酸酶“切割”所產生的片段。siRNA 被瞭解是招募核酸酶複合體並藉由配對至特異性的序列而引導複合體至目標物 mRNA。結果，目標物 mRNA 藉由在蛋白質複合體中的核酸酶而降解。在特定具體實例中，21-23 個核苷酸的 siRNA 分子包括一個 3' 羥基團。

本發明之 siRNA 分子可利用一些在此技藝中之人士已知的技術而獲得。例如，siRNA 可利用在此技藝中已知的方法經化學合成或重組而產生。例如，短的有意義（sense）及反義 RNA 寡聚體可被合成並黏合，以形成雙股 RNA 結構，其各自的端點都具有 2 個核苷酸突出物（Caplen 等人（2001），*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9742-9747；Elbashir 等人（2001），*EMBO J.*, 20: 6877-88）。這些雙股 siRNA 結構可接著藉由被動攝入或選擇的輸送系統而直接導入細胞中，例如，以下所說明者。

在特定具體實例中，siRNA 構築可藉由，例如，在酵

素切割者存在之情況下處理較長的雙股 RNA 而產生。在一具體實例中，係使用果蠅的活體外系統。在這個具體實例中，雙股 RNA 與衍生自果蠅胚胎之可溶性萃取物結合，藉此產生結合物。結合物被維持在以下條件：其中雙股 RNA 經處理成約 21 至約 23 個核苷酸之 RNA 分子。

siRNA 分子可利用一些在此技藝中之人士已知的技術而純化。例如，膠體電泳可用以純化 siRNA。或者，非變性的方法，例如，非變性的管柱層析法，可用以純化 siRNA。此外，層析法（例如，尺寸排除層析法）、甘油梯度離心法、使用抗體之親和力純化法，可用以純化 siRNA。

具有脂肪酸之 siRNA 分子的修飾，可在前驅物之層級或可能更特別地是在 RNA 已經合成之後而完成。後者可在特定例子中達成：其在該聚合物之合成中使用核苷前驅物，其包括用於形成連結物-脂肪酸分子部分之官能基。

在特定較佳具體實例中，siRNA 分子的至少一股具有長度約 1 至約 6 個核苷酸之 3' 突出物，但可能是 2 至 4 個核苷酸的長度。更佳地，3' 突出物是 1-3 個核苷酸的長度。在特定具體實例中，一股具有 3' 突出物，另一股是平鈍端或亦具有突出物。突出物之長度可以相同或各股不同。為了更加提昇 siRNA 之安定性，3' 突出物可經安定化以對抗降解。在一具體實例中，RNA 藉由納入喋呤核苷酸而安定，例如，腺苷或鳥喋呤核苷的核苷酸。或者，藉由經修飾的類似物之嘧啶核苷酸的取代，例如，尿嘧啶核苷的核苷酸 3' 突出物藉由 2'-去氧胸腺核苷之取代，是可以忍受的，且

不影響 RNAi 之效率。缺少 2' 羥基顯著提昇突出物在組織培養的培養液中之核酸酶抗性，且可能在活體內是有益的。

在其他具體實例中，RNAi 構築是長的雙股 RNA 之形式。在特定具體實例中，RNAi 構築是至少 25、50、100、200、300 或 400 個鹼基。在特定具體實例中，RNAi 構築是 400-800 個鹼基的長度。雙股 RNA(例如)經細胞內消化，以在細胞中產生 siRNA 序列。然而，在活體內使用長的雙股 RNA 並不是永遠實用的，這似乎是因為由序列獨立性的雙股 RNA 反應所引起的有害作用所致。在該等具體實例中，較佳係使用局部的輸送系統及/或作用劑，其可降低干擾素或 PKR 的作用。

在特定具體實例中，RNAi 構築是髮夾結構之形式(稱為髮夾結構 RNA)。髮夾結構 RNA 可外部地合成，或藉由在活體內從 RNA 聚合酶 III 啟動子轉錄而形成。在哺乳動物細胞中製造及使用此等髮夾結構 RNA 以用於基因不活動的例子，是說明於，例如，Paddison 等人，Genes Dev. (2002)，16：948-58；McCaffrey 等人，Nature (2002)，418：38-9；McManus 等人，RNA (2002)，8：842-50；Yu 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2002)，99：6047-52。較佳地，此等髮夾 RNA 是在細胞或在動物中建造，以確保想要的基因之持續或安定的抑制。在此技藝中已知的是 siRNA 可藉由在細胞中處理髮夾結構 RNA 而產生。

膜聯蛋白 A1 治療作用劑，單獨的或在組合物中，是

以治療有效量而投藥，該量是用以治療瘤新生物或治療血管生成或不想要的血管新生之發展的量。會是治療有效的量，將取決於瘤新生物、血管新生或血管生成之本質、疾病及/或轉移之程度及其他因素，且可由標準臨床技術決定。此外，可選擇實施活體外或活體內分析，以協助鑑定出最佳劑量範圍。要在調配物中實施的精準劑量，亦會取決於投藥的途徑及症狀的嚴重度，且應該依據執業醫師之判斷及每個病患的情況而決定。有效的劑量可從衍生自活體外或動物模型測試系統之劑量反應曲線外推而得。

雖然以上的具體實例說明不想要的血管生成、血管新生之發展或其他病變之治療，但該方法亦可適用於其中血管生成或血管新生之發展是想要的情況（例如，在重新貼附先前切下的身體部分之後的血管再生；在心肌梗塞後補償受損血管之血管發展；或為了其他傷害或疾病，其可藉由改善血流、組織修復、血管新生之發展及血管生成而治療）。在這個具體實例中，膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑包括提昇血管生成或血管新生之發展的化合物（例如，活性作用劑成分）。在這個特定的具體實例所使用的名詞“治療”是指提昇或增加血管生成或血管新生。作用劑可藉由以上所說明的方法，使用醫藥組合物（例如，以上所說明者）而投藥。

此外，在本發明之更進一步的具體實例中，此處所說明的膜聯蛋白 A1 可作為免疫刺激的病灶點，以使病患本身的免疫系統對抗靶定的作用劑之免疫攻擊。例如，來自

一個體的星狀細胞可予以分離，然後接種膜聯蛋白 A1 或所靶定蛋白質之抗原片段，然後星狀細胞可再次投藥於個體中。這些細胞接著將啟動對抗膜聯蛋白 A1 之免疫攻擊。亦可使用其他用於刺激免疫系統攻擊的標準技術。在這方面，可設計針對各個病患的“個人化藥物”以靶定特定個體的瘤新生物或其他病變。

活體內成像及診斷：

本發明亦有關於以瘤新生物特異性的方式輸送成像作用劑之方法，其係用於身體成像，例如，用於評估個體有關瘤新生物之存在，包括初期及/或二期（轉移）瘤新生物，以及有關於所說明的作用劑之使用以製造用於身體成像的藥物。在本發明之方法中，成像作用劑是以瘤新生物特異性的方式透過有興趣的作用劑，被輸送至、輸送進入及/或輸送穿過血管內皮。“瘤新生物特異性”是表示作用劑優先地或選擇性地結合至瘤新生物。本發明亦有關於以血管新生特異性的方式輸送成像作用劑之方法，其係用於身體成像，例如，用於評估個體有關血管生成或血管新生之存在。在本發明之方法中，成像作用劑是以血管新生特異性的方式透過有興趣的作用劑，被輸送至、輸送進入及/或輸送穿過血管內皮。“血管新生特異性”是表示作用劑優先地或選擇性地結合至新的血管生長。要注意的是，新血管即“血管新生”，可能處於各種變化的發展階段及不同的成熟階段；為了本申請案之目的，“血管新生”是指在階

段性、成熟度或其他的相關特徵方面不同於正常血管系的新血管生長。

有興趣的作用劑包括靶定作用劑成分及成像作用劑成分。在一具體實例中，靶定作用劑成分可以是特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物的作用劑，如以上之說明。在一特定具體實例中，靶定作用劑成分可以是特異性地結合膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物的抗體或抗體之片段（例如，Fab' 片段）。抗體可以是人類化的抗體，如果想要的話。代表性的抗體包括以上所說明的抗體。在另一具體實例中，膜聯蛋白 A1 之其他的特異性結合配對者可作為靶定作用劑成分，包括特異性地結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 之衍生物的作用劑（例如，天然配位體、胜肽）。在另一具體實例中，靶定作用劑成分是膜聯蛋白 A1 本身或膜聯蛋白 A1 之衍生物；或者，靶定作用劑成分可以是特異性地結合至膜聯蛋白 A1 之結合配對者或結合至膜聯蛋白 A1 之衍生物的結合配對者的作用劑。

成像作用劑成分（包括成像作用劑及如果必要的話，其他成分，例如，將成像作用劑成分耦合至靶定作用劑成分之工具）可以是，例如，放射活性作用劑（例如，放射性碘（ ^{125}I 、 ^{131}I ）、鎘、釷、 ^{35}S 或 ^3H ）或其他放射性同位素或放射性醫藥品；對比作用劑（例如，釷、錳、硫酸鋇、碘化或非碘化作用劑、離子作用劑或非離子作用劑）；磁性作用劑或順磁性作用劑（例如，釷、氧化鐵螯合物）；脂質體（例如，攜帶放射活性作用劑、對比作用

劑或其他成像作用劑)；超音波作用劑(例如，微泡釋放作用劑)；誘發偵測作用劑之基因載體或病毒(例如，包括螢光素酶或其他螢光多胜肽)；酵素(馬蘿蔔過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶)；輔基(例如，抗生物素蛋白鏈菌素/生物素及抗生物素蛋白/生物素)；螢光物質(例如，繖形酮、螢光素、螢光素異硫氰酸酯、羅丹明(rhodamine)、二氯三嗪胺螢光素、丹磺醯氯或藻紅素)；冷光物質(例如，魯米諾(luminol)；生物冷光物質(例如，螢光素酶、蟲螢光素、水母素)；或可用於成像研究之任何其他成像作用劑(例如，用於CT、螢光鏡、SPECT成像、光學成像、PET、MRI、伽瑪成像)。

成像作用劑可用於實施個體的身體成像之方法。此處所使用之“身體成像”是指個體的身體之所有或部分的成像(例如，藉由以上所列的成像研究方法)。這些身體成像的方法可用於，例如，評估個體有關於瘤新生物之存在或不存在或程度(例如，藉由“陽性”成像)，包括初期及/或轉移的瘤新生物，或評估個體關於血管生成或血管新生之存在或不存在或程度。在較佳具體實例中，身體成像可以是“陽性”，也就是可用於偵測瘤新生物、血管生成或血管新生之存在。身體成像容許不正常的病變或血管生成或血管新生之顯現形象及/或偵測，且可用於定量或測定一種瘤新生物或新血管生長之程度、大小、位置及/或數目。因此，可估算疾病的程度，以(例如)促進臨床診斷及/或預後。

對於身體成像而言，成像作用劑可自行地或以存在於生理上可接受之載劑的方式而投藥至個體，其係藉由容許成像作用劑接觸內皮細胞表面（例如，靜脈內）之工具；在投藥之後，被靶定的成像作用劑可藉由傳統的外部偵測工具（為了成像作用劑而設計）以非侵入性的方式顯現形象，以偵測有興趣的作用劑在瘤新生物之濃度的優先或特異性的累積。此處所使用的“濃度”是指有興趣的作用劑在個體身體之特定位置的量，其相較於由有興趣之作用劑僅在個體中循環或擴散所預期者為大。濃度是表示有興趣的作用劑結合至瘤新生物或新血管，且因此是表示瘤新生物或血管生成或血管新生之存在。這些方法不但可用於評估個體是否存在原發瘤新生物，亦可評估轉移之存在或不存在，以及血管生成或血管新生是否存在。代表性的新血管生長包括，例如，與各種疾病有關的生長，包括，例如，動脈硬化、黃斑部退化或糖尿病視網膜病變、或急性或慢性發炎。在活體內成像的另一具體實例中，此處所說明的成像作用劑可用於促使瘤新生物之手術移除或促使不想要的新血管生長之手術移除。

在活體內成像之另一具體實例中，此處所說明的成像作用劑可用於促使瘤新生物之手術移除或促使不想要的新血管生長之手術移除。例如，成像作用劑，例如包括冷光成分之成像作用劑，經投藥至個體，其方式係使得成像作用劑靶定了個體中的瘤新生物或新血管生長。外科醫生可接著鑑定成像作用劑之存在（例如，透過冷光）且能更容

易移除瘤新生的組織或新血管生長（血管生成組織），其已經以成像作用劑加上標籤。

再者，瘤新生物之生長、退化或轉移以及新血管之生長或退化可以這樣的方式由個體的一系列成像而評估；各個成像期提供了瘤新生物或新血管之程度、大小、位置及/或數目之觀察。

如果想要的話，成像作用劑可進一步包括治療作用劑。此處所使用的“治療作用劑”是指靶定瘤新生物、新血管（血管生成組織）或其他病變以供破壞之用的作用劑（例如，化學治療作用劑），或減少或消除個體上之瘤新生物、血管生成組織或病變的作用。治療作用劑關治療的部分之其他用途在以上已說明。

雖然以上的具體實例說明不想要的血管生成或血管新生之成像，但該方法同樣地適用於其中血管生成或血管新生之發展是想要的情況（例如，以上有關治療之說明）。在這些方法中，血管生成或血管新生是同樣地藉由以上所說明的成像作用劑之投藥而評估。如果想要的話，成像作用劑可進一步包括治療作用劑，例如，膜聯蛋白 A1 血管新生作用劑，其提昇/增加血管生成或血管新生之發展，如以上有關治療之說明。

離體成像及診斷：

在另一具體實例中，本發明是有關於以瘤新生物特異性的方式或血管新生特異性的方式輸送成像作用劑之方

法，例如，供離體使用以分析組織樣本或細胞樣本。此處所使用的名詞“組織樣本”不但是指來自組織之樣本（例如，皮膚、腦部、胸部、肺臟、腎臟、前列腺、卵巢、頭及頸、肝臟或其他器官），而且還指血液樣本。組織可以是正常組織、良性或惡性或其組合（例如，活組織切片樣本），且亦可包括未知狀態（正常、良性或惡性）之組織。

在本發明之一具體實例中，以上所說明的成像作用劑是用於實施離體成像。此處所使用的“離體成像”是指已經從個體之身體移除之組織樣本或細胞樣本（例如，藉由手術移除組織樣本，例如，瘤新生物樣本或細胞樣本；藉由靜脈穿刺；或其他方法）的成像。成像容許不正常的病變（例如，瘤新生物或血管生成的組織（新血管生長））之顯現形象及/或偵測，且可用於定量或測定樣本中之一種類型的瘤新生物或新血管生長之程度、大小、位置及/或數目。因此，估算可由疾病的程度所組成，以例如促進臨床診斷及/或預後。

在一具體實例中，為了離體成像，成像作用劑是投藥至個體，如以上所之說明。活組織切片樣本可從個體取得，且活組織切片樣本可接著被評估存在或不存在一定濃度之有興趣的作用劑。或者，在另一離體成像的具體實例中，成像作用劑是施用於組織樣本中。組織樣本可接著被評估存在或不存在一定濃度之有興趣的作用劑。此處所使用的“濃度”是指有興趣的作用劑的量，其相較於由有興趣之作用劑僅在樣本中擴散所預期者為大。濃度是表示有興趣

的作用劑之結合，且因此是表示瘤新生物或瘤新生物或新血管生長（血管生成或血管新生）之存在。這些方法可用於評估活組織切片或組織樣本，以決定是否瘤新生物為惡性（也就是，證實有興趣的作用劑之濃度，對應於膜聯蛋白 A1 之濃度）或良性，或是否有存在新血管生長。在比較佳具體實例中，用於離體成像的組織樣本是活組織切片樣本。此處所使用有關於離體成像的濃度是有興趣的作用劑在樣本中特定位置之量，其相較於由有興趣的作用劑僅循環或擴散於或進入樣本中所預期者為大。濃度是表示有興趣的作用劑結合至瘤新生物，且因此是表示瘤新生物之存在。這些方法不但可用於評估個體是否存在原發瘤新生物，而且還可評估轉移或新血管生長（血管生成或血管新生）之存在或不存在。

雖然以上的具體實例說明不想要的血管生成或血管新生之離體成像，但該方法同樣地適用於其中血管生成或血管新生是想要的情況，如以上有關治療及活體內成像之說明。

治療功效及預後之評估：

因為膜聯蛋白 A1 通常是細胞質蛋白質，其可容易地存在於水溶液中，所以其在血液中之存在是與其在內皮細胞表面之結合相互平衡的。這表示膜聯蛋白 A1 或其衍生物在內皮細胞表面之存在容許了與脂質及/或蛋白質之特異性交互作用，使得在來自個體之血液或血清樣本中之膜聯

蛋白 A1 的水平之評估（個體是以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療之前及期間或之後），可表示是否治療已經成功地降低瘤新生物、血管生成或血管新生，如降低量的膜聯蛋白 A1 所表示者。或者，以上說明的活體外及/或離體診斷方法可用於評估在病患中之治療功效的方法。因此，目前這個發明亦是有關於監測個體對於用治療作用劑治療之反應的方法，例如，治療靶定作用劑，如以上之說明，或其他治療作用劑，以及有關於測定治療功效之方法，其係藉由比較治療之前及期間或之後瘤新生物或新血管生長（血管生成或血管新生）之量、程度、大小及/或數目。

例如，在本發明之一種形態中，可評估個體對於以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療的反應，其係藉由檢查在不同組織、細胞及/或體液中之個體的膜聯蛋白 A1 之水平。膜聯蛋白 A1 之血液、血清、血漿或尿液水平或膜聯蛋白 A1 之離體產量，可在以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療之前及期間或之後測量，組織中的膜聯蛋白 A1 水平亦可如此側量。將治療之前的水平與治療期間或之後進行比較。治療的功效是由膜聯蛋白 A1 的可利用率或產量之降低而表示：治療期間或之後的膜聯蛋白 A1 水平，其顯著低於治療之前的水平，係表示功效。在治療期間或之後較低的水平可藉由，例如，膜聯蛋白 A1 之降低的血清或尿液水平，或膜聯蛋白 A1 之降低的離體產量而顯示。此處所使用的“顯著低的”水平是指少於通

常發現於對照個體或對照樣本之量的水平，或是在與其他測量群（例如，平均或中數、最高的四分位數或最高的五分位數）有關的族群之疾病比較中是較少的，相較於較低的測量群（例如，平均或中數、其他的四分位數、其他的五分位數）。

例如，膜聯蛋白 A1 的水平（例如，在血液或血清樣本中，或在組織樣本中），是在來自於以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療之前，及以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療期間或之後的個體之樣本中評估，並將水平加以比較。治療期間或之後的膜聯蛋白 A1 的水平，其顯著低於治療之前的膜聯蛋白 A1 水平，係表示以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療之功效。在另一形態中，膜聯蛋白 A1 的產量是在來自個體的第一測試樣本中分析，並且在治療期間及之後也在來自個體的第二測試樣本中測定，並將第一測試樣本中的產量水平，與第二測試樣本中的產量水平加以比較。顯著低於第一測試樣本的水平之第二測試樣本的水平，係表示治療的功效。

在另一具體實例中，可使用上述的活體內方法比較以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療之前及之後的影像。治療之前活體內的瘤新生物或血管生成或血管新生之程度、大小、位置及/或數目，是與治療期間或之後的程度、大小、位置及/或數目進行比較。治療的功效是以瘤新生物之程度、大小、位置及/或數目的減少，或新血管

生長（血管生成或血管新生）之程度的減少而表示，如同以減少濃度的成像作用劑表示一般。或者，以上所說明之離體方法可用於比較以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療之前及之後的活組織切片。治療之前樣本中的瘤新生物或血管生成或血管新生之程度、大小、位置及/或數目，是與治療期間或之後樣本中的程度、大小、位置及/或數目進行比較。治療的功效是以瘤新生物之程度、大小、位置及/或數目的減少，或新血管生長（血管生成或血管新生）之大小、位置的減少而表示，如同以減少濃度的成像作用劑表示一般。在另一具體實例中，上述的活體內方法可用於以膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑治療之前、期間及之後的成像。例如，瘤新生物、血管生成或血管新生之程度、大小、位置及/或數目，可藉由活體內的成像而評估，接著並將治療作用劑（例如，膜聯蛋白 A1 治療作用劑或其他治療作用劑）投藥至個體。個體的繼續性、連續性或後續性成像，可顯示瘤新生物細胞或新血管生長的即時靶定及破壞。

在本發明的另一具體實例中，膜聯蛋白 A1 的水平可用於評估樣本的侵入性疾病之存在及/或評估組織樣本來源之患者的預後。因為膜聯蛋白 A1 在腫瘤內皮中的存在係表示血管生成，因此，膜聯蛋白 A1 的量係表示疾病侵入的程度：愈高量的膜聯蛋白 A1 係表示愈高的血管生成，其類似地對應於愈差的預後。侵入性疾病相較於較不侵入性的疾病，會在腫瘤中顯示增加量的膜聯蛋白 A1。例如，

在本發明的一種形態中，可評估個體以測定在不同組織、細胞及/或體液中之膜聯蛋白 A1 水平。可評估膜聯蛋白 A1 之血液、血清、血漿或尿液水平或膜聯蛋白 A1 之離體產量。顯著較高的膜聯蛋白 A1 之水平，係表示侵入性的疾病及/或較差的預後。此處所使用的“顯著高的”水平是大於通常發現於對照個體或對照樣本之量的水平，或是在與其他測量群（例如，平均或中數、最高的四分位數或最高的五分位數）有關的族群之疾病比較中是較大的，相較於較低的測量群（例如，平均或中數、其他的四分位數、其他的五分位數）。或者，可評估個體以經由上述的活體內成像而測定活體內的膜聯蛋白 A1 水平。

上述的這些具體實例可類似地用於評估用以提昇血管生成或血管新生之發展的治療。該等方法是如上述說明而進行，但在這些具體實例中，功效是是以增加的血管生成水平或血管新生的發展而表示，如同以增加濃度的成像作用劑表示一般。

改變膜聯蛋白活性的作用劑之篩選分析：

在另一具體實例中，本發明提供用於鑑定作用劑（例如，融合蛋白質、多胜肽、胜肽模擬物、前藥物、受體、結合作用劑、抗體、小分子或其他藥物或核酶）之方法，該等作用劑可改變（例如，增加或減少）此處所說明的膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的活性，或該等作用劑可與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物交互作用。例如，該

等作用劑可以是結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的作用劑；對於例如膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的活性具有刺激性或抑制性效果的作用劑；可改變（例如，增強或抑制）膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物與結合配對者（例如，受體或其他結合作用劑）交互作用的作用劑；或可改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之轉譯後加工的作用劑（例如，可改變蛋白水解加工的作用劑，以將多胜肽從它們正常合成地方引導至細胞的另一位置，例如，細胞表面；可改變蛋白水解加工的作用劑，使得更有活性的多胜肽從細胞中釋放出來等）。

在一具體實例中，本發明提供篩選可結合或調節膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之活性的候選物或測試作用劑之分析，以及可由該等分析而鑑定之作用劑。測試作用劑可利用在此技藝中已知的組合資料庫中的許多方法之任一種而獲得，包括：生物資料庫；空間可定位的平行固相或溶液相資料庫；需要強化處理的合成資料庫方法；“一珠一化合物”資料庫方法；以及利用親和力色析選擇的合成資料庫方法。生物資料庫方法是限於多胜肽資料庫，而其他四種方法則可應用於多胜肽、非胜肽的寡聚物或化合物的小分子資料庫（Lam K.S.(1997), *Anticancer Drug Des.* 12: 145）。

在一具體實例中，為了鑑定可改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之活性的作用劑，可將包含或表現膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的細胞、細胞溶胞產物或溶

液，與待測作用劑接觸；或者，也可將多胜肽與待測作用劑直接接觸。評估膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的活性水平（量）（例如，直接或間接測量活性的水平（量）），並且與對照組中的活性水平（也就是，在沒有待測作用劑之膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的活性水平）進行比較。如果在作用劑存在的活性水平是以統計上顯著的量而不同於在沒有作用劑的活性水平的話，則作用劑是可改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的活性之作用劑。相較於對照組之活性水平的增加，表示作用劑是可增強活性的作用劑（係活性的激動劑）。同樣地，相較於對照組之活性水平的減少，表示作用劑是可抑制活性的作用劑（係活性的拮抗劑）。在另一具體實例中，在待測作用劑存在的膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之活性水平，是與先前已建立的對照組水平進行比較。以統計上顯著的量而不同於對照組水平之作用劑存在的活性水平，表示作用劑可改變活性。

本發明也有關於鑑定可改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的表現之作用劑（例如，反義核酸、融合蛋白質、多胜肽、胜肽模擬物、前藥物、受體、結合作用劑、抗體、小分子或其他藥物或核酶）之分析，該等作用劑可改變（例如，增加或減少）編碼膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的基因或核酸之表現（例如，轉錄或轉譯），以及可由該等分析而鑑定之作用劑。例如，可將含有編碼膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的核酸之溶液，與待測作用劑接觸。

溶液可包括，例如，含有核酸之細胞或含有核酸之細胞溶胞產物；或者，溶液也可以是另一溶液，其包括核酸的轉錄/轉譯所需之元素。也可使用未懸浮於溶液中之細胞，如果需要的話。評估膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物表現的水平及/或類型（例如，所表現的 mRNA 或蛋白質之水平及/或類型，例如，不同剪接變異物之水平及/或類型），並且與對照組中表現的水平及/或類型（也就是，在沒有待測作用劑之表現的水平及/或類型）進行比較。如果作用劑存在的水平及/或類型是以統計上顯著的量或方式而不同於沒有作用劑的水平及/或類型的話，則該作用劑是改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的表現之作用劑。表現的增強表示作用劑是活性的激動劑。同樣地，表現的抑制表示作用劑是活性的拮抗劑。

在本發明的另一具體實例中，可改變編碼膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的基因或核酸之表現的作用劑，可利用含有編碼膜聯蛋白 A1 基因（可操作地連結至報導子基因）的啟動子區域之核酸的細胞、細胞溶胞產物或溶液而鑑定。在與待測的作用劑接觸之後，評估報導子基因之表現水平（例如，mRNA 或表現的蛋白質之水平），並與在對照組中之表現水平（也就是，報導子基因在待測作用劑不存在之情況下的表現水平）比較。如果作用劑存在的水平以統計上顯著的量或方式不同於沒有作用劑的水平，則作用劑是改變膜聯蛋白 A1 之表現的作用劑，如其改變可操作地連結至編碼膜聯蛋白 A1 啟動子的基因之表現的

能力所表示者。報導子表現的增強表示作用劑是活性的激動劑。同樣地，報導子表現的抑制表示作用劑是活性的拮抗劑。在另一具體實施例中，在待測作用劑存在的報導子之表現水平與先前已經建立的對照水平比較。在作用劑存在的水平以統計上顯著的量或方式不同於對照水平，係表示作用劑可改變膜聯蛋白 A1 表現。

在本發明的另一具體實例中，可使用分析方法評估測試作用劑對於膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物有關於膜聯蛋白 A1 結合配對者的活性之衝擊，如以上之說明。例如，表現可與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物產生交互作用的化合物之細胞，是在測試作用劑存在下與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物接觸，並且測定測試作用劑可改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物與膜聯蛋白 A1 結合配對者之間的交互作用之能力。或者，可使用含有膜聯蛋白 A1 結合配對者之細胞溶胞產物或溶液。可結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物或結合至膜聯蛋白 A1 結合配對者之作用劑，可藉由干擾或增強膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物結合至膜聯蛋白 A1 結合配對者、與其結合或與其產生交互作用的能力而改變交互作用。測定測試作用劑可結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物或結合至膜聯蛋白 A1 結合配對者之能力，可藉由使測試作用劑與放射性同位素或酵素標示耦合，使得測試作用劑與多胜肽之結合可藉由直接或間接偵測 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H 之標示而測定，以及放射性同位素係藉由直接計數放射性發光

或閃爍計數而偵測。或者，測試作用劑可例如以辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶或螢光素酶而酵素地標示，以及酵素標示係藉由測定適當的基質轉換成產物而偵測。測定測試作用劑在無任何交互作用物的標示下，可與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物交互作用的能力，也是在本發明的範疇內。例如，微生理儀可用於偵測測試作用劑與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物或膜聯蛋白 A1 結合配對者之交互作用，而不須標示測試作用劑、膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物或膜聯蛋白 A1 結合配對者。參見 McConnell H.M. 等人 (1992)，*Science* 257: 1906-1912。此處所使用的“微生理儀”（例如，細胞傳感儀™），係可測量細胞利用光可定位的電位感測器（LAPS）而酸化其環境之速率的分析儀器。這個酸化速率的改變，可使用作為配體及多胜肽間之交互作用的指示劑。

在本發明的另一具體實例中，可使用分析方法鑑定可與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物交互作用的多胜肽。例如，酵母菌雙雜合系統（例如，Fields 及 Song 之說明（Fields S. 及 Song O., *Nature* 340: 245-246 (1989)），可用於鑑定與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物交互作用的多胜肽。在這樣的酵母菌雙雜合系統中，載體是根據轉錄因子的彈性而構築，轉錄因子具有兩個功能性的功能部位（DNA 結合功能部位及轉錄活化功能部位）。如果兩個功能部位是分離的但融合至兩個可彼此交互作用的不同蛋白質的話，則可完成轉錄活化，而特定標記（例如，營養

標記，例如，His 及 Ade，或顏色標記，例如，lacZ) 的轉錄可用於鑑定交互作用及轉錄活化的存在。例如，在本發明的方法中，使用一第一載體，其包括編碼 DNA 結合功能部位以及膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的核酸，以及使用一第二載體，其包括編碼轉錄活化功能部位的核酸，以及編碼有潛力可與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物交互作用的多胜肽 (例如，膜聯蛋白 A1 結合配對者或受體) 之核酸。在適當條件下 (例如，交配條件，例如，用於 Clontech 的 Matchmaker™ 系統者)，培養包含第一載體及第二載體的酵母菌，可鑑定表現有興趣的標記之選殖株。可檢驗這些選殖株，以鑑定與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物交互作用的多胜肽。該等多胜肽可有效作為改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物表現的活性之作用劑。

在多於一種上述分析方法的具體實例中，可能希望將膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物或膜聯蛋白 A1 結合配對者或其他分析成份，固定在固體支持物上，以促進複合形式的多胜肽從未複合形式的多胜肽中分離，並可提供自動化的分析。測試作用劑結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物，或膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物與結合配對者在測試作用劑存在及不存在的情況下交互作用，可在適合於包含反應物的任何容器中完成。容器的例子包括微滴定盤、試管及微量離心管。在一具體實例中，可提供融合蛋白質 (例如，穀胱甘肽-S-轉移酶融合蛋白質)，其

將可結合膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物或膜聯蛋白 A1 結合配對者的功能部位，加到基質或其他固體支持物。

在另一具體實例中，本發明提供鑑定作用劑（例如，融合蛋白質、多胜肽、胜肽模擬物、前藥物、受體、結合作用劑、結合配對者、抗體、小分子或其他藥物或核酶）之方法，該等作用劑可改變（例如，增加或減少）膜聯蛋白 A1 結合配對者的活性，如此處所說明。例如，該等作用劑可以是對於例如膜聯蛋白 A1 結合配對者的活性具有刺激性或抑制性效果的作用劑；可改變（例如，增強或抑制）膜聯蛋白結合配對者（例如，受體或其他結合作用劑）與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物交互作用的能力之作用劑；或可改變膜聯蛋白 A1 結合配對者之轉譯後加工的作用劑（例如，可改變蛋白水解加工以將膜聯蛋白 A1 結合配對者從它們正常合成地方引導至細胞的另一位置，例如，細胞表面的作用劑；可改變蛋白水解加工使得改變量的活性膜聯蛋白 A1 結合配對者從細胞中釋放出來的作用劑；等等）。

例如，本發明提供篩選可結合膜聯蛋白 A1 結合配對者或調節其活性的候選物或測試作用劑之分析，以及可由該等分析而鑑定之作用劑，其係利用類似於上述有關篩選可調節膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的活性之作用劑的分析方法。如上所述，測試作用劑可利用在此技藝中已知的組合資料庫中的許多方法之任一種而獲得，包括：生物資料庫；空間可定位的平行固相或溶液相資料庫；需要

強化處理的合成資料庫方法；“一珠一化合物”資料庫方法；以及利用親和力色析選擇的合成資料庫方法。生物資料庫方法是限於多胜肽資料庫，而其他四種方法則可應用於多胜肽、非胜肽的寡聚物或化合物的小分子資料庫（Lam K.S. (1997), *Anticancer Drug Des.* 12: 145）。

在一具體實例中，為了鑑定可改變膜聯蛋白 A1 結合配對者之活性的作用劑，可將包含或表現膜聯蛋白 A1 結合配對者的細胞、細胞溶胞產物或溶液，與待測作用劑接觸；或者，也可將膜聯蛋白 A1 結合配對者與待測作用劑直接接觸。評估膜聯蛋白 A1 結合配對者的活性水平（量）（例如，直接或間接測量膜聯蛋白 A1 結合配對者的活性水平（量）），並且與對照組中的活性水平（也就是，在沒有待測作用劑之膜聯蛋白 A1 結合配對者或其片段或衍生物的活性水平）進行比較。如果在作用劑存在的活性水平是以統計上顯著的量而不同於在沒有作用劑的活性水平的話，則作用劑是可改變膜聯蛋白 A1 結合配對者的活性之作用劑。相較於對照組之膜聯蛋白 A1 結合配對者活性水平的增加，表示作用劑是可增強膜聯蛋白 A1 結合配對者活性的作用劑（係膜聯蛋白 A1 結合配對者活性的激動劑）。同樣地，相較於對照組之膜聯蛋白 A1 結合配對者活性水平的減少，表示作用劑是可抑制膜聯蛋白 A1 結合配對者活性的作用劑（係膜聯蛋白 A1 結合配對者活性的拮抗劑）。在另一具體實例中，在待測作用劑存在的膜聯蛋白 A1 結合配對者或其衍生物或片段之活性水平，是與

先前已建立的對照組水平進行比較。以統計上顯著的量而不同於對照組水平之作用劑存在的活性水平，表示作用劑可改變膜聯蛋白 A1 結合配對者活性。

本發明更有關於由上述的篩選分析所鑑定之新穎作用劑。因此，將此處說明所鑑定的作用劑，進一步用於適當的動物模式中，也是在本發明的範疇內。例如，此處說明所鑑定的作用劑（例如，為調節作用劑、反義核酸分子、特定抗體或結合多胜肽的作用劑之測試作用劑）可使用在動物模式中，用於測定以該等作用劑治療的功效、毒性或副作用。或者，此處說明所鑑定的作用劑可使用在動物模式中，以測定該等作用劑的作用機轉。此外，本發明也有關於上述篩選分析所鑑定的新穎作用劑之用途，以用於上述之治療。此外，此處說明所鑑定的作用劑也可用於改變膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的活性，係藉由將膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A1 衍生物、或編碼膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的基因或核酸（或包括膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A1 衍生物、或編碼膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的基因或核酸之細胞），與此處說明所鑑定的作用劑接觸。

膜聯蛋白 A1 結合配對者之篩選分析：

在另一具體實例中，本發明提供鑑定作用劑（例如，融合蛋白質、多胜肽、胜肽模擬物、前藥物、受體、結合作用劑、結合配對者、抗體、小分子或其他藥物或核酶）

之方法，其可結合此處所說明的膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物，或可與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物交互作用。結合配對者可使用作為，例如，靶定作用劑（例如，在此處所說明的方法中）。

在一具體實例中，本發明提供篩選可結合膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的候選物或測試作用劑之分析，以及可由該等分析而鑑定之作用劑。測試作用劑可利用在此技藝中已知的組合資料庫中的許多方法之任一種而獲得，包括：生物資料庫；空間可定位的平行固相或溶液相資料庫；需要強化處理的合成資料庫方法；“一珠一化合物”資料庫方法；以及利用親和力層析選擇的合成資料庫方法。生物資料庫方法是限於多胜肽資料庫，而其他四種方法則可應用於多胜肽、非胜肽的寡聚物或化合物的小分子資料庫（Lam K.S. (1997), *Anticancer Drug Des.* 12 : 145）。國家衛生研究院也具有可用於利用該等方法而篩選的化合物資料庫。也可評估化學化合物的資料庫。也可篩選表現胜肽或抗體或其衍生物的噬菌體資料庫，也可篩選具有工程化以表現不同胜肽之病毒、奈米顆粒或蛋白質的資料庫。

在一具體實例中，為了鑑定可結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的作用劑，可將包含或表現膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的細胞、細胞溶胞產物或溶液，與待測作用劑接觸；或者，也可將多胜肽與待測作用劑直接接觸。評估結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的

水平（量）（例如，直接或間接測量活性的水平（量））。

在本發明的另一具體實例中，可使用酵母菌雙雜合分析，以鑑定可結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的多胜肽。例如，酵母菌雙雜合系統（例如，Fields 及 Song 之說明（Fields S. 及 Song O., Nature 340: 245-246 (1989)），可用於鑑定與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物相互作用的多胜肽。在這樣的酵母菌雙雜合系統中，載體是根據轉錄因子的彈性而構築，轉錄因子具有兩個功能性的功能部位（DNA 結合功能部位及轉錄活化功能部位）。如果兩個功能部位是分離的但融合至兩個可彼此相互作用的不同蛋白質的話，則可完成轉錄活化，以及特定標記的轉錄（例如，營養標記，例如，His 及 Ade，或顏色標記，例如，lacZ）可用於鑑定相互作用及轉錄活化的存在。例如，在本發明的方法中，使用一第一載體，其包括編碼 DNA 結合功能部位以及膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的核酸，以及使用一第二載體，其包括編碼轉錄活化功能部位的核酸，以及編碼有潛力可與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物相互作用的多胜肽（例如，膜聯蛋白 A1 結合配對者或受體）之核酸。在適當條件下（例如，交配條件，例如，用於 Clontech 的 Matchmaker™ 系統者），培養包含第一載體及第二載體的酵母菌，可鑑定表現有興趣的標記之選殖株。可檢驗這些選殖株，以鑑定膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物相互作用的多胜肽。

在本發明的另一具體實例中，可篩選小分子的資料庫

以評估可結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的分子。有許多方法可篩選結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的小分子作用劑。許多的分析形式都將可滿足此目的，並且根據本發明之揭露，此處未明示特別說明者仍將為一般熟悉於此技藝之人士所理解。可結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的待測作用劑，可例如藉由細菌、酵母菌、植物或其他生物體而製造（例如，天然產物），或化學地製造（例如，小分子或胜肽模擬物）或重組地製造。本發明所涵蓋的測試作用劑包括非胜肽基的有機分子、胜肽、多胜肽、胜肽模擬物、糖類、荷爾蒙及核酸分子（例如，核酸配適體）。在一較佳具體實例中，測試作用劑是具有分子量少於約 2,500 道耳吞的小有機分子。

測試作用劑可以單一、分離的實體而提供，或以較大複雜性的資料庫而提供，例如，由組合化學所製得的資料庫。這些資料庫可包括，例如，醇、烷基鹵化物、胺、醯胺、酯、醛、醚及其他類型的有機化合物。可以分離的形式或是化合物的混合物之形式將測試化合物呈現至測試系統，特別是在一開始的篩選步驟中。

在許多可測試化合物資料庫及天然萃取物的藥物篩選程式中，高產量的分析是需要的，以使一段期間內檢驗的化合物數目最大化。在無細胞系統（例如，可源自純化或半純化的蛋白質）中進行的分析，通常較佳是作為“初級”的篩選，因為它們可被產生以提供改變受測試化合物調節的分子標的之快速發展及相當容易的偵測。此外，細胞毒

性的作用及/或測試化合物的生物可利用率，在活體外的系統一般可忽略，取代的是，該分析主要的焦點是在藥物對於分子標的之作用。

本發明之抗體：

本發明的另一形態係提供針對膜聯蛋白 A1 的抗體，其可用於，例如，本發明的方法中。名詞“抗體”是如以上之說明。本發明提供可結合至膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的多株及單株抗體。此處所使用的名詞“單株抗體”或“單株抗體組合物”是指一群抗體分子，其僅包含一個種類的抗原結合位置，抗原結合位置可與膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物的特定抗原決定部位產生免疫反應。

多株抗體可如上述之方法而製備，其係藉由以所要的免疫原（例如，膜聯蛋白 A1 或其衍生物）使適合的個體免疫。在免疫個體中的抗體效價，可藉由標準技術而隨著時間予以監測，例如，利用固定化的多胜肽之酵素連結免疫吸附分析法（ELISA）。如果需要的話，對抗膜聯蛋白 A1 的抗體分子可從哺乳動物中分離（例如，從血液中分離），並且藉由熟知的技術（例如，蛋白質 A 層析）而進一步純化，以得到 IgG 流份。在免疫後的適當時間，例如，當抗體效價是最高時，製造抗體的細胞可從個體中獲得，並且藉由標準技術而用於製備單株抗體，例如，源於 Kohler 及 Milstein (1975)，Nature 256: 495-497 所說明的融合瘤技術、人類 B 細胞融合瘤技術（Kozbor 等人 (1983)），

Immunol. Today 4 : 72) 、EBV-融合瘤技術 (Cole 等人 (1985), 單株抗體及癌症治療, Alan R. Liss 公司, 第 77-96 頁) 或三融合瘤 (trioma) 技術。用於製造融合瘤的技術是熟知的 (一般請參見, 當代免疫學方法 (1994), Coligan 等人編輯, John Wiley & Sons 公司, 紐約市, 紐約州)。簡言之, 將不老衰的細胞株 (通常是黑色素瘤) 融合至來自於以上述免疫原而免疫的哺乳動物之淋巴細胞 (通常是脾臟細胞), 並且篩選所得的融合瘤細胞之培養上清液, 以鑑定可製造出結合本發明多胜肽的單株抗體之融合瘤。

許多用於融合淋巴細胞及不老衰細胞株的熟知方法之任何一種, 都可應用在產生針對膜聯蛋白 A1 的單株抗體之目的 (例如, 參見, 當代免疫學方法, 上述文獻; Galfre 等人 (1977), Nature 266 : 55052; R.H. Kenneth, 單株抗體: 生物學分析的新方面, Plenum 出版公司, 紐約市, 紐約州 (1980); 以及 Lerner (1981), Yale J. Biol. Med. 54 : 387-402)。此外, 一般熟悉於此技藝者將可理解, 有許多該等方法的變化也將可以使用。

除了製備分泌單株抗體的融合瘤, 針對膜聯蛋白 A1 的單株抗體可藉由篩選具有膜聯蛋白 A1 或膜聯蛋白 A1 衍生物之重組的組合免疫球蛋白資料庫 (例如, 抗體噬菌體表現資料庫) 而予以鑑定及分離, 藉此可分離結合至膜聯蛋白 A1 的免疫球蛋白資料庫成員。用於產生及篩選噬菌體表現資料庫的套組, 可在市面上獲得 (例如, Pharmacia 重組噬菌體抗體系統, 目錄編號 27-9400-01; 以及 Stratagene

SurfZAP™噬菌體表現套組，目錄編號 240612)。此外，特別可用於產生及篩選抗體表現資料庫的方法及試劑之例子，可參見例如，美國專利第 5,223,409 號；PCT 公告號 WO 92/18619；PCT 公告號 WO 91/17271；PCT 公告號 WO 92/20791；PCT 公告號 WO 92/15679；PCT 公告號 WO 93/01288；PCT 公告號 WO 92/01047；PCT 公告號 WO 92/09690；PCT 公告號 WO 90/02809；Fuchs 等人 (1991)，Bio/Tech 9：1370-1372；Hay 等人 (1992)，Hum. Antibod. Hybridomas 3：81-85；Huse 等人 (1989)，Science 246：1275-1281；Griffiths 等人 (1993)，EMBO J. 12：725-734。

此外，包括人類及非人類部份兩者的重組抗體（例如，嵌合型及人類化的單株抗體），其可利用標準的重組 DNA 技術而製得，也是在本發明的範疇內。該等嵌合型及人類化的單株抗體，可藉由在此技藝中已知的重組 DNA 技術而製造。

一般而言，本發明的抗體（例如，單株抗體）可用於本發明的方法中。例如，對於膜聯蛋白 A1 特異性的抗體可用於本發明的方法中，以成像腫瘤或瘤新生物，以便評估瘤新生物的豐富性及位置。抗體也可用於診斷，例如，在藉由上述治療療程之前及之後成像而測定所提供的治療療程之功效。

其他膜聯蛋白之用途：

雖然本發明已經藉由膜聯蛋白之用途而予以例示說

明，但此處所說明的方法可以相似方式應用於其他膜聯蛋白。膜聯蛋白具有數個共有的特徵，包括是細胞質的蛋白質，其以鈣依賴性的方式與脂質膜結合（Gerke V.及 Moss S.E. (2002), *Physiol. Rev.*, 82: 331-71），且通常以結合在雙層的內部小葉狀物之情形存在（Gerke V.及 Moss S.E. (2002), *Physiol. Rev.* 82: 331-71）。其他的膜聯蛋白可同樣地作為膜聯蛋白治療作用劑之標的物、作為活體內或活體外之成像標的物、供診斷之用、以及也用於評估疾病的治療功效或預後。像膜聯蛋白 A1 一樣，其他的膜聯蛋白亦可移至或穿過膜（包括細胞膜），而變成曝露於或因此可接近廣泛範圍的作用劑，包括先前無法進入細胞之作用劑。在特定具體實例中，膜聯蛋白 A2 或膜聯蛋白 A8 是以相似於此處所說明之膜聯蛋白 A1 的方式而使用。例如，作用劑（例如，成像作用劑、治療作用劑）可以瘤新生物特異性的方式被輸送至、輸送進入及/或輸送穿過血管內皮，其係藉由使血管系的管腔表面或血管系的小凹結構與特異性地結合至膜聯蛋白（或結合至膜聯蛋白之衍生物）或結合至膜聯蛋白之特異性結合配對者（或結合至膜聯蛋白之衍生物的特異性結合配對者）的作用劑接觸。在特定具體實例中，例如，成像作用劑或治療作用劑之靶定作用劑成分，可以是特異性地結合膜聯蛋白之作用劑。有關其他蛋白質（包括其他膜聯蛋白）作為作用劑之瘤新生物特異性輸送的用途之其他資訊，非常詳細地說明於代理人檔案編號 3649.1001-000，申請日 2004 年 6 月 2 日，名稱為“靶定

表現在腫瘤內皮細胞表面上之蛋白質的腫瘤特異性成像及治療作用劑”，其完整教示以引用方式納入本文中。

本發明進一步由以下實施例說明，其並未意圖以任何方式限制本發明。

實施例

如此處之說明，內皮及其小凹結構之蛋白質體圖譜顯示硬塊腫瘤在血管新生的小凹結構中誘發膜聯蛋白 A1 之抗體可接近的轉移。經由膜聯蛋白 A1 靶定腫瘤內皮小凹結構，提供活體內針對硬塊腫瘤之特異性輸送、治療以及成像。

實施例 1：材料及方法

材料：抗體獲得：膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A3、膜聯蛋白 A5、膜聯蛋白 A7、膜聯蛋白 A8、凹陷蛋白 (caveolin)-1、上皮型鈣黏素 (E-cadherin) 及血管內皮鈣黏素 (VE-cadherin) 是得自聖克魯茲生技公司 (聖克魯茲，加州)；膜聯蛋白 A2、膜聯蛋白 A4 及膜聯蛋白 A6 是得自 BD 生物科學公司 (聖地牙哥，加州)；肌動蛋白是得自 Sigma (聖路易，密蘇里州)；VEGF R2 是得自 Zymed 實驗室公司 (舊金山，加州)；小鼠 IgGs 是得自南方生技公司 (伯明罕，阿拉巴馬州)；VEGF 受體 1 是由 Beth Israel Deaconess 醫學中心 (波士頓，麻薩諸塞州) 的 D. Sanger 博士所提供；半乳糖結合蛋白 1 是 Sidney Kimmel 癌症中心 (聖地

牙哥，加州)的 M. Huflejt 博士所提供；足細胞特異性標誌蛋白 (podocalyxin) 是內部製造的。

膜聯蛋白 A1 cDNA 之選殖及抗體製造：單株抗體是藉由標準的體細胞雜合作用，利用純化的重組膜聯蛋白 A1 作為免疫原而產生，並且藉由 P 吸附在 96 槽孔托盤上的 ELISA 而篩選。

管腔內皮細胞質膜及小凹結構之分離：管腔內皮細胞質膜及其小凹結構是直接從組織中分離，如同以下之說明：Schnitzer J.E.、McIntosh D.P.、Dvorak A.M.、Liu J. 及 Oh P. (1995)，從 GPI-固定蛋白質的相關微功能部位中分離小凹結構，*Science* 269: 1435-9；Oh P.及 Schnitzer J.E.，質膜的分離及次分層以純化分離自糖基-磷脂醯肌醇-固定的蛋白質微功能部位之小凹結構，於“細胞生物學：實驗室手冊”第二冊 (Celis J.編輯)，34-36 (大學出版，奧蘭多，1998)，Schnitzer J.E.等人，*J. Biol. Chem.* 270: 14399-14404 (1995)。

腫瘤模式：將雌性的 Ficher 大鼠 (100-150 克) 經由尾靜脈注射 13762 乳腺癌細胞的細胞懸浮液，以在肺臟得到大量、非常清晰以及高度血管化的腫瘤。為了建立可在肺臟清楚看見的直徑 3-8 公釐之最大密度的腫瘤損傷，將 5×10^5 個 13762 細胞在灌流前 14-15 天予以注射，並且分離帶有腫瘤的肺臟 P。為了得到一些直徑 3-6 公釐之非常清晰的腫瘤，將 1×10^5 個細胞在進行成像實驗前 21 天予以注射。在老鼠中的皮下 (s.c.) 乳房腫瘤模式，是藉由在裸鼠

的背部皮下注射 1.8×10^7 個 MDAMB435 細胞而產生，並且使其生長 12 天，再進行成像研究。

質譜分析：將膜聯蛋白 A1 從分離自 P 及 V 的蛋白質中切下；該等蛋白質是藉由一維及二維膠體電泳而分離。此外，膜聯蛋白 A1 也利用上述之膜聯蛋白 A1 單株抗體，而從 P 中免疫沈澱（Oh P. 及 Schnitzer J.E. (2001)，在細胞表面的微功能部位中隔離異三元體 G 蛋白質：Gq 結合凹陷蛋白以集中在小凹結構，而 Gi 及 Gs 則按照預設地靶定脂筏，Mol. Biol. Cell 12：685-698）。免疫沈澱的物質是藉由 SDS-PAGE 而分析，並將單一的 34 仟道耳吞條帶（由西方分析對應至膜聯蛋白 A1）從膠體中切下。使切下的膠體條帶或斑點進行膠體內的胰蛋白酶消化，然後再進行質譜分析。複雜的肽混合物是利用以反相 C-18 材料堆疊並連接到 HPLC 溶劑輸送系統的微管柱而分離，然後以 60 分鐘的時間經由二元梯度而直接沖提至電噴霧離子阱質譜儀（LCQ Deca, Thermofinnigan, 聖荷西, 加州），其提供 m/z 400 至 1600 間之記錄的質譜。離子光譜之自動化分析是利用 SEQUEST 軟體而進行，其將所獲得的 MS/MS 光譜與公開資料庫可獲得的已知蛋白質光譜進行延伸比較，以鑑定已知的蛋白質。

組織染色：將冷凍的大鼠組織在 Microm HM505E 冷凍微切割器上切出（5 微米）。將切片以中性緩衝的福馬林於室溫固定 5 分鐘，然後在阻斷溶液中（5% 胎牛血清，0.1% Tween 20 於磷酸鹽緩衝溶液中），於室溫培養 1 小時。

在初級抗體中（稀釋於阻斷溶液中）以室溫培養 2 小時之後，將切片清洗，並且接著以適當的生物素連結之二次抗體（KPL 實驗室，蓋斯堡，馬里蘭），於室溫處理 1 小時，再次清洗，然後以抗生物素蛋白鏈菌素-連結的辣根過氧化酶（KPL 實驗室，蓋斯堡，馬里蘭），於室溫處理 1 小時。免疫複合物是利用得自 BioGenex（聖拉蒙，加州）的液態 DAB 染色套組而偵測。將福馬林固定的、石蠟包埋的切片（5 微米）在 Microm HM340E 微切割器上切出。抗原的恢復是利用酸性檸檬酸緩衝溶液，根據標準方法而進行。當切片在水中清洗以移除檸檬酸緩衝溶液之後，將它們如上述之方法而阻斷以及免疫染色。

動物使用：動物實驗是遵循 Sidney Kimmel 癌症中心動物照護及使用委員會之回顧及核准，根據聯邦指導方針而進行。

伽瑪閃爍造影成像及生物分布分析：單株抗體是利用 GammaBind Plus 瓊脂糖 (Sepharose) 而分離 (Amersham, Piscataway, 紐澤西)，並且利用碘化法而連結至 ^{125}I ，如同以下之說明：McIntosh D.P.、Tan X.-Y.、Oh P. 及 Schnitzer J.E. (2002)，靶定內提及其動態小凹結構以用於活體內的組織特異性轉胞吞作用：克服細胞對於藥物及基因輸送障礙的途徑，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99：1996-2001。生物分布分析是如上述相同之方法進行。成像是利用配備平行孔視準器的 A-SPECT 而進行 (McElroy D.、MacDonald L.、Beekman F.、Wang Y.、Patt B.、Iwanczyk J.、

Tsui B.及 Hoffman E. (2002) , A-SPECT 的表現評估：用於使小動物成像之高解像力桌上型針孔 SPECT 系統，IEEE Trans. Nucl. Sci. NS 49：2139-2147) 。將正常及帶有腫瘤的雌性 Fisher 大鼠麻醉，並且經由尾靜脈注射 125I-標示的單株抗體 (5 微克 IgG，10 微居里/微克) ，然後再進行 10 分鐘捕捉的平面伽瑪閃爍造影成像。在整個身體成像之後，在部份的例子中，將肺臟切下以用於離體 10 分鐘捕捉的平面成像。

實施例 2：結果及討論

過去的工作已在正常血管內皮中 (主要是在大鼠的肺臟組織中) ，廣泛地勘測並定性細胞表面的分子構造及功能，特別是其小凹結構 (Schnitzer J.E.及 Oh P. (1994) ，白蛋白受體 (albumin) 調節的對白蛋白之毛細血管通透性：受體在內皮轉胞吞作用以及天然及修飾的白蛋白之內噬作用中的不同角色，J. Biol. Chem. 269: 6072-82; Schnitzer J.E.、Oh P.、Pinney E.及 Allard J. (1994) ，在內皮中非律平 (filipin) 敏感性之小凹結構調節的運送：減少的轉胞吞作用、清除者內噬作用及選擇巨環類的毛細血管通透性，J. Cell Biol. 127：1217-32；Schnitzer J.E.、McIntosh D.P.、Dvorak A.M.、Liu J.及 Oh P. (1995) ，從 GPI-固定蛋白質的相關微功能部位中分離小凹結構，Science 269：1435-9；Schnitzer J.E.、Oh P.及 McIntosh D.P. (1996) ，GTP 水解在小凹結構直接從質膜中分裂的角色 [發表者的勘

誤表出現在 Science, 1996 年 11 月 15 日, 274 (5290) : 1069], Science 274: 239-42; Schnitzer J.E.、Liu J.及 Oh P. (1995), 內皮小凹結構具有用於小泡出芽、停靠及融合之分子運送機構, 包括 VAMP、NSF、SNAP、膜聯蛋白及 GTP 酶, J. Biol. Chem. 270: 14399-404; Schnitzer J.E.、Allard J.及 Oh P. (1995), NEM 抑制轉胞吞作用、內噬作用及毛細血管通透性: 涉及內皮中的小凹結構融合, Am. J. Physiol. 268: H48-55; McIntosh D.P.及 Schnitzer J.E. (1999), 小凹結構需要完整的 VAMP 以在血管內皮中靶定運送, Am. J. Physiol. 277: H2222-32)。

利用次細胞分層以從組織中分離小凹結構 (V) 及/或二氧化矽包覆的管腔內皮細胞質膜 (P), 如先前之說明 (Schnitzer J.E.、McIntosh D.P.、Dvorak A.M.、Liu J.及 Oh P. (1995), 從 GPI-固定蛋白質的相關微功能部位中分離小凹結構, Science 269: 1435-9; Schnitzer J.E.、Oh P.及 McIntosh D.P. (1996), GTP 水解在小凹結構直接從質膜中分裂的角色 [發表者的勘誤表出現在 Science, 1996 年 11 月 15 日, 274 (5290) : 1069], Science 274: 239-42; Schnitzer J.E.、Liu J.及 Oh P. (1995), 內皮小凹結構具有用於小泡出芽、停靠及融合之分子運送機構, 包括 VAMP、NSF、SNAP、膜聯蛋白及 GTP 酶, J. Biol. Chem. 270: 14399-404; Schnitzer J.E.、Allard J.及 Oh P. (1995), NEM 抑制轉胞吞作用、內噬作用及毛細血管通透性: 涉及內皮中的小凹結構融合, Am. J. Physiol. 268: H48-55; McIntosh

D.P.及 Schnitzer J.E. (1999), 小凹結構需要完整的 VAMP 以在血管內皮中靶定運送, *Am. J. Physiol.* 277: H2222-32; Oh P.及 Schnitzer J.E., 質膜的分離及次分層以純化分離自糖基-磷脂醯肌醇-固定的蛋白質微功能部位之小凹結構, 於“細胞生物學: 實驗室手冊”第二冊 (Celis J.編輯), 34-36 (大學出版, 奧蘭多, 1998), 檢驗正常大鼠肺臟內皮小凹結構與得自腫瘤內皮及甚至是得自人類樣本的小凹結構之可能的等同物。正常大鼠肺臟內皮小凹結構包含膜聯蛋白 A2 (AnnA2), 但無膜聯蛋白 A1 (AnnA1), 其先前被認為是限於表現在神經及選出的分泌細胞 (McKanna J.A. 及 Zhang M.Z. (1997), 脂皮素 1 在大鼠腦部中的免疫組織化學位置是對 pH、冷凍及脫水敏感的, *J. Histochem. Cytochem.* 45, 527-38; Savchenko V.L.、McKanna J.A.、Nikonenko I.R.及 Skibo G.G. (2000), 在成年大鼠腦部中的微神經膠質及星狀細胞: 比較的免疫細胞化學分析顯示脂皮素 1 免疫反應性的功效, *Neurosci.* 96: 195-203; Naciff J.M.、Kaetzel M.A.、Behbehani M.M.及 Dedman J.R. (1996), 膜聯蛋白 I-VI 在大鼠背根神經節及脊柱中的表現, *J. Comp. Neurol.* 368: 356-70; Eberhard D.A.、Brown M.D.及 VandenBerg S.R. (1994), 在病理神經元及神經膠質反應中膜聯蛋白表現的改變: 膜聯蛋白 I、II (p36 及 p11 次單元)、IV 及 VI 在人類海馬回中的免疫組織化學位置, *Am. J. Pathol.* 145: 640-9)。

此處所說明的分析證實膜聯蛋白 A2 在小凹結構中表

現，本次從許多人類組織中表現，包括腫瘤。如所預期的，膜聯蛋白 A1 並沒有在正常人類組織的小凹結構中被偵測到，但令人驚訝地，它在分離自多種人類硬塊腫瘤的小凹結構中（腎臟、肝臟、肺臟、腦部、乳房及前列腺），可藉由親和力純化的多株抗體（C19）而易於被偵測為 34 仟道耳吞的條帶（例如，參見美國專利第 6,737,516 號分離人類小凹結構之方法）。

這些結果是藉由分離自多種大鼠腫瘤模式（由注射到大鼠尾靜脈的纖維肉瘤（MR7）及乳腺癌（13762 及 MTLn3）細胞所誘發）的小凹結構之蛋白質體學分析而證實。在肺臟腫瘤小凹結構的 SDS-PAGE 膠體中明顯存在但未在正常肺臟小凹結構存在的 34 仟道耳吞蛋白質條帶中之胰蛋白酶質譜（MS）分析，提供了鑑定蛋白質為膜聯蛋白 A1 的多種肽序列。到目前為止，覆蓋約 55% 膜聯蛋白 A1 的序列範圍之 30 種肽，已藉由在多種以下樣本上執行質譜分析而鑑定：i) 藉由一維膠體分析而在腫瘤中但未在正常小凹結構中發現之切下的 34 仟道耳吞條帶；ii) 從分離自腫瘤而非分離自正常組織的小凹結構之二維膠體上的斑點；iii) 從分離自腫瘤的 P 中之膜聯蛋白 A1 沈澱物；以及 iv) 分離自大鼠腫瘤的 P 及 V 之 MudPIT 分析。

從這些大鼠的肺臟腫瘤模式中之組織次層，利用膜聯蛋白 A1 多株抗體的西方分析，也顯示單一的 34 仟道耳吞條帶，富含於帶有腫瘤的肺臟而非於正常的肺臟之小凹結構中，藉此證實膜聯蛋白 A1 表現集中在分離的小凹結構

中，並且在血管細胞表面上明顯地受腫瘤而誘發。小凹結構的結構蛋白（凹陷蛋白-1）及膜聯蛋白 A2 係富含於 V 層中，如以下之報導：Schnitzer J.E.、McIntosh D.P.、Dvorak A.M.、Liu J.及 Oh P.（1995），從 GPI-固定蛋白質的相關微功能部位中分離小凹結構，*Science* 269：1435-9；Oh P.及 Schnitzer J.E.（1999），具有高親和力抗體結合至寡聚體凹陷蛋白籠的小凹結構之免疫分離：理解純化的基礎[發表者勘誤表出現在 *J. Biol. Chem.* 1999 年 10 月 8 日，274（41）：29582]，*J. Biol. Chem.* 274：23144-54。相反地，並沒有偵測到 Gal-1 及 β -COP，其已知是分別在腫瘤細胞及高基氏體/內小體中表現（Perillo N.L.、Marcus M.E.及 Baum L.G.（1998），半乳糖結合蛋白：細胞附著、細胞增生及細胞死亡之多樣性調節劑，*J. Mol. Med.* 76：402-12；Griffiths G.、Pepperkok R.、Locker J.K.及 Kreis T.E.（1995）， β -COP 在內質網-高基氏體邊界及 TGN 的免疫細胞化學位置，*J. Cell Sci.* 108（Pt8）：2839-56）。此外，ACE、VEGF-R1 及 VEGF-R2 也富含於正常及腫瘤肺臟的管腔內皮細胞質膜，但未在小凹結構中。因此，膜聯蛋白 A1 似乎是在大鼠及人類硬塊腫瘤的血管新生之內皮細胞小凹結構中被誘發。

為了測定在膜聯蛋白間，膜聯蛋白 A1 在腫瘤血管的內皮細胞表面上之表現是否為獨特的，因此，在大鼠的多種正常器官及帶有腫瘤的肺臟之組織均質物（H）及 P 上，利用辨認各種膜聯蛋白的抗體而進行西方分析。膜聯蛋白

A1 是易於偵測的，富含於分離自大鼠肺臟腫瘤的 P 但非於正常的組織。相反地，膜聯蛋白 A2 是易於在正常的肺臟、肝臟、腎臟及心臟 P 中偵測到；膜聯蛋白 A5 在正常的肺臟及腦部 P 中偵測到；以及膜聯蛋白 A8 在正常的肺臟 P 中偵測到。膜聯蛋白 A4、A6 及 A7 甚至是更廣泛地分布。膜聯蛋白 A3 抗體並沒有提供足夠清楚的訊號以精確評估位置。

為了進一步評估膜聯蛋白 A1 表現的腫瘤特異性，將各種大鼠及人類正常及腫瘤組織進行免疫染色。膜聯蛋白 A1 抗體染色了人類前列腺、肝臟、腎臟、乳房、結腸、腦部及肺臟腫瘤的血管，但並未與正常組織相配。人類轉移的腫瘤（結腸轉移至肺臟，以及乳房轉移至腦部）也顯示膜聯蛋白 A1 在血管中表現。針對 PECAM（一種泛-內皮標記）的抗體，染色了正常及腫瘤血管。先前已有報導膜聯蛋白 A1 在多種正常器官的組織切片之血管內皮中缺乏表現（McKanna J.A.及 Zhang M.Z.（1997），脂皮素 1 在大鼠腦部中的免疫組織化學位置是對 pH、冷凍及脫水敏感的，*J. Histochem. Cytochem.* 45，527-38；Eberhard D.A.、Brown M.D.及 VandenBerg S.R.（1994），在病理神經元及神經膠質反應中膜聯蛋白表現的改變：膜聯蛋白 I、II（p36 及 p11 次單元）、IV 及 VI 在人類海馬回中的免疫組織化學位置，*Am. J. Pathol.* 145：640-9；Dreier R.、Schmid K.W.、Gerke V.及 Riehemann K.（1998），膜聯蛋白 I、II 及 IV 在人類組織中的差別表現：免疫組織化學研究，*Histochem.*

Cell Biol. 110 : 137-48 ; Ahn S.H.、Sawada H.、Ro J.Y.及 Nicolson G.L. (1997) , 在正常及良性及惡性乳房組織中 , 膜聯蛋白 I 在人類乳腺管上皮細胞中的差別表現 , Clin. Exp. Metastasis 15 : 151-6) 。因此 , 由西方分析及組織免疫染色所顯示的膜聯蛋白 A1 表現 , 是在大鼠肺臟腫瘤模式以及多種人類硬塊腫瘤的血管新生中被誘發。

部份市售的抗體似乎可優先與膜聯蛋白 A1 的 34 仟道耳吞形式反應 , 並且在腫瘤血管系中得到乾淨的表現訊號 ; 然而 , 為了更佳定性膜聯蛋白 A1 的表現並為了測試可能的活體內靶定 , 因此使用其他高親和力的特異性探針。在測試了市售的膜聯蛋白 A1 單株抗體之後 , 決定產生一組可從多種物種中辨認膜聯蛋白 A1 的單株抗體。將大鼠、老鼠及人類的膜聯蛋白 A1 cDNA 藉由 PCR 而選殖。為了驗證 cDNA 選殖株 , 將培養的細胞以包含 cDNA 的哺乳動物表現載體轉染 , 並且藉由西方分析及免疫螢光顯微鏡而測試相對於未轉染的細胞膜聯蛋白 A1 的反應性。利用這些 cDNAs , 重組蛋白質可從三種物種的每一種中製造作為免疫原 , 以產生一組可辨認大鼠、老鼠及人類的膜聯蛋白 A1 的單株抗體。

膜聯蛋白 (包括膜聯蛋白 A1) 通常是細胞質的蛋白質 , 其通常以鈣依賴性的方式結合在細胞膜的雙層內部小葉狀物 (Schnitzer J.E. (2001) , 小凹結構 : 從基本的運輸機轉至靶定轉胞吞作用 , 以用於活體內組織特異性的藥物及基因輸送 , Adv. Drug. Deliv. Rev. 49 : 265-80) 。但一些膜聯

蛋白可能改變位置穿過脂質雙層，以維持在外部細胞表面結合至質膜（Gerke V.及 Moss S.E.（2002），膜聯蛋白：從結構至功能，*Physiol. Rev.* 82：331-71）。

為了測試在腫瘤內皮細胞表面上誘發的膜聯蛋白 A1 是否暴露至循環系統的抗體，因此將膜聯蛋白 A1 抗體灌流至正常及帶有腫瘤的大鼠肺臟，接著沖洗血管系以移除未結合的抗體。膜聯蛋白 A1 抗體是易於藉由西方分析，在帶有腫瘤的肺臟所分離的 P 中偵測到，但並未在正常的肺臟中偵測到，而對照組 APP 抗體則是結合至正常的肺臟 P。組織切片的免疫組織化學染色也偵測到結合至腫瘤的血管內皮之膜聯蛋白 A1 抗體，但並未在正常的肺臟中偵測到。因此，膜聯蛋白 A1 必為外部化且暴露結合在管腔內皮細胞質膜的外部小葉狀物上，並且因此可易於接近循環系統中的抗體。

為了測試在小凹結構中的膜聯蛋白 A1 是否為足夠靜脈內可接近的以及對於腫瘤血管是特異性的，以提供活體內顯著的腫瘤靶定，因此，在注射抗膜聯蛋白 A1、膜聯蛋白 A2 及膜聯蛋白 A4 之放射性碘化的單株抗體後，進行生物分布分析，如上所示，該等單株抗體在大鼠組織中分別具有腫瘤特異性的、限制的及廣泛的表現。在 60 分鐘之後，將多種器官（包括具有腫瘤的整個肺臟）予以切下、秤重並且計數放射活性。膜聯蛋白 A1 抗體顯著地累積，並且特別在帶有腫瘤的肺臟中，其是約 15% 注射劑量（ID）/公克帶有腫瘤的肺臟之水平，相較於其他器官是小於 1% 注射劑

量/公克組織。在沒有腫瘤的動物中，膜聯蛋白 A1 抗體顯示沒有專一性的靶定肺臟，偵測到具有小於 1% 注射劑量/公克。膜聯蛋白 A2 在大鼠肺臟腫瘤中顯示部份靜脈內可接近的暴露之證據，導致中度到顯著的累積於肺臟腫瘤，在腫瘤肺臟中具有 4.22% 注射劑量/公克，相較於非常低的累積於正常組織中（小於 1% 注射劑量/公克）。膜聯蛋白 A4 抗體顯示沒有專一性的腫瘤靶定，大部分的抗體仍保留在血液中，與這個蛋白質預期的細胞內分布一致。在時間歷程的研究中，顯著累積的膜聯蛋白 A1 抗體是在 30 分鐘時觀察到（7% 注射劑量/公克），於 2 個小時達到最大值（17% 注射劑量/公克），其維持至少 24 小時。當腫瘤從正常的肺臟組織中切開並且計數放射活性時，腫瘤靶定是更加顯著的，在 30 分鐘時具有 11.5% 注射劑量/公克腫瘤的累積，在 2 小時達到 33% 注射劑量/公克腫瘤的最大值。這些數據顯示，在腫瘤內皮細胞小凹結構中的膜聯蛋白 A1（以及可能少數的膜聯蛋白 A2 但無膜聯蛋白 A4），是暴露在細胞的外部上，並且可藉由靜脈內注射而易於接近，以用於活體內腫瘤敏感性的輸送。

提供顯示有希望的腫瘤靶定之生物分布分析，腫瘤靶定可藉由高解像力針孔微-SPECT 成像帶有肺臟腫瘤的大鼠，而進一步活體內檢視。將 ^{125}I -膜聯蛋白 A1 單株抗體注射到安靜大鼠的尾靜脈中，4 小時之後捕捉的影像，顯示在肺臟中有數個清楚集中點的不同大小之增加的放射活性（“熱點”）。當具有多個腫瘤的肺臟以離體成像時，這

是特別明顯的，使得腫瘤可被觀察到，以直接與熱點重疊。SPECT 影像的 3D 電影顯示進一步的靶定。此外，在腫瘤中 125I-膜聯蛋白 A1 單株抗體的累積是特異性的，因為共同注射 30 倍過量未標示的膜聯蛋白 A1 單株抗體（但未超過非標的未標示的 IgG）與腫瘤膜聯蛋白 A1 單株抗體的結合競爭。將 125I-膜聯蛋白 A1 單株抗體也注射到帶有皮下乳房腫瘤模式的老鼠尾靜脈，並在 3 小時之後使老鼠成像。產生外部明顯腫瘤之清楚特異性的標示。非標的 125I-標示的 IgGs 並未靶定任何特異性組織，具有反映慣常低水平擴散的“血液群”成像之訊號。因此，SPECT 成像顯示 125I-膜聯蛋白 A1 單株抗體在腫瘤而不在其他地方之特異性的累積，表示膜聯蛋白 A1 單株抗體確實在大鼠及老鼠模式中特異性地靶定多種腫瘤。

靶定小凹結構的抗體可被運送穿過內皮細胞障礙進入組織薄壁組織（McIntosh D.P.、Tan X.-Y.、Oh P.及 Schnitzer J.E.（2002），靶定內皮及其動態小凹結構以用於活體內的組織特異性轉胞吞作用：克服細胞對於藥物及基因輸送障礙的途徑，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99：1996-2001）。為了評估膜聯蛋白 A1 抗體在特定腫瘤內皮細胞表面結合之後可能穿透至腫瘤內，因此將膜聯蛋白 A1 單株抗體注射到帶有生長在肺臟的轉移性乳房腫瘤之大鼠尾靜脈內。4 小時之後，沖洗帶有肺腫瘤的肺臟、切下、切片，並且利用辣根過氧化酶結合的二次抗體染色膜聯蛋白 A1 單株抗體的存在。膜聯蛋白 A1 單株抗體的結合是在腫瘤上偵測到，但並

未在正常的肺臟內皮偵測到，進一步證實膜聯蛋白 A1 單株抗體在腫瘤微血管系中的內皮細胞表面之特異性結合。此外，從血管發散至組織內的棕色訊號之“光環”是持續地觀察到，表示膜聯蛋白 A1 單株抗體穿透至相鄰於微血管系的腫瘤組織內。這個抗體穿透至腫瘤空隙，並沒有立即在注射後 1 小時偵測到。因此，在大鼠及老鼠模式中，辨認膜聯蛋白 A1 的單株抗體特異性地靶定及橫跨多種腫瘤類型中的血管，以在 4 小時內增加接近至腫瘤空隙。

當進行 125I-膜聯蛋白 A1 抗體的生物分布及成像實驗時，應注意的是，以 125I-膜聯蛋白 A1 抗體靜脈內注射之帶有腫瘤的大鼠，是比未注射的動物及以非靶定的對照組抗體（125I-IgG）注射動物存活更長。注射三天之後，從 125I-膜聯蛋白 A1 抗體處理的動物及對照組動物中，組織學的組織檢視帶有腫瘤的肺臟之切片，顯示在處理的動物中更加廣泛的腫瘤壞死。相鄰的正常肺臟組織以及身體的其他主要器官，都顯示未受損害。在 125I-膜聯蛋白 A1 抗體處理的動物中腫瘤，是明顯較小的（小約 50% 的直徑）。

進行存活研究。圖 1 顯示在 Kaplan-Meier 存活曲線上作圖的存活。將雌性 Fisher 大鼠靜脈內注射 13762 細胞以誘發腫瘤（第 0 天）。Kaplan-Meier 存活曲線比較了以 125I-膜聯蛋白 A1 抗體接種腫瘤細胞後 15 天注射之帶有腫瘤的大鼠（50 克，10 居里/公克；紅線；n= 10）與對照組非靶定的 125I-IgG（藍線；n= 10）與未處理的動物（綠線；n = 3）之存活。圖 1 顯示在 Kaplan-Meier 存活曲線上作圖的

60天之存活。觀察到帶有腫瘤的大鼠之顯著增加的存活，80%的動物在注射之後存活8天，相較於對照組大鼠在注射後7天的100%死亡率。使125I-膜聯蛋白A1抗體注射的大鼠成像，顯示大鼠肺臟腫瘤的預期分布以及125I-膜聯蛋白A1抗體在腫瘤中的累積。此外，所有大鼠的體重在第8天都開始偏離正常體重，並且在靜脈內接種腫瘤細胞之後10天竟然下降。未處理的大鼠及以125I-標示的非靶定對照抗體所注射的大鼠，持續減少體重，直到牠們在少於正常體重25-30%的時點死亡為止。相反地，以125I-膜聯蛋白A1抗體處理的大鼠，在處理之後3天內停止減少體重，接著增加體重，在處理之後20天達到正常的體重。這個極端增加的存活是令人驚訝的，因為處理動物的時間點是動物可能死亡的兩天內，使得牠們可能缺少足夠的時間受惠於對內皮及腫瘤細胞之任何廣泛的放射線損害。如果大鼠在注射後可存活到第一週（該時間點所有的對照組動物均已死亡），則存活率接近90%。一隻在兩週之後死亡的大鼠必須使其安樂死，因為腿部的腫瘤及大的尾巴腫瘤在注射部位處發展。因此，單一注射125I-膜聯蛋白A1抗體，事實上確實是安全的，即使在後階段的疾病中也可產生顯著的緩解。

當產生重組膜聯蛋白A1 (rAnnA1) 以及我們新的膜聯蛋白A1單株抗體時，藉由SDS-PAGE觀察到重組膜聯蛋白A1的38千道耳吞之分子量，這與一級序列數據的37千道耳吞之分子量以及文獻之報導一致 (Chapman L.、

Nishimura A、Buckingham J.C.、Morris J.F 及 Christian H.C. (2002)，類濾泡星狀細胞的膜聯蛋白 A1 之外部化，*Endocrinol.* 143：4330-8)。當分析帶有腫瘤的肺臟之次層時，膜聯蛋白 A1 單株抗體在正常 H 中偵測到 38 仟道耳吞的條帶，這與利用重組膜聯蛋白 A1 所觀察到的大小一致。然而，腫瘤肺臟 P 的西方分析顯示，在組織中，膜聯蛋白 A1 條帶似乎遷移至約 34 仟道耳吞而非遷移至預期的 38 仟道耳吞大小。34 仟道耳吞的條帶確實是膜聯蛋白 A1，因為：i) 質譜分析鑑定在 34 仟道耳吞及 38 仟道耳吞處切下的 SDS-PAGE 膠體切片是膜聯蛋白 A1；ii) 腫瘤肺臟均質物利用膜聯蛋白 A1 單株抗體的免疫沈澱，也產生 34 仟道耳吞及 38 仟道耳吞的條帶，其經質譜分析鑑定為膜聯蛋白 A1。已有報導指出膜聯蛋白 A1 之截短的 32-34 仟道耳吞形式 (Taylor A.D.、Cowell A.M.、Flower R.J. 及 Buckingham J.C. (1993)，脂皮素 1 調節糖皮質激素對於大鼠前腦下垂體活體外促腎上腺皮質激素 (ACTH) 分泌之早期抑制作用，*Neuroendocrinol.* 58：430-9；Philip J.G.、Flower R.J. 及 Buckingham J.C. (1997)，糖皮質激素在大鼠腦部活體內及活體外調節脂皮素 1 的細胞配置，*Neuroreport* 8：1871-6；Croxtall J.D. 及 Flower R.J. (1992)，脂皮素 1 調節 A549 肺腺癌細胞株之地沙美松誘發的生長停止，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89：3571-5；Taylor A.D.、Christian H.C.、Morris J.F.、Flower R.J. 及 Buckingham J.C. (1997)，脂皮素 1 的反義寡核苷酸逆轉地沙美松對於促

腎上腺皮質激素從大鼠腦垂體組織活體外的釋放之抑制作用，Endocrinol. 138: 2909-18)。此處的數據顯示，就是這個較小的形式特異性地存在於肺臟腫瘤內皮細胞的小凹結構中。有趣地，C19 抗體似乎喜愛膜聯蛋白 A1 的 34 仟道耳吞形式。

為了測定膜聯蛋白 A1 的 34 仟道耳吞形式是否確實為暴露至內皮細胞表面上的血管之蛋白質形式，將生物素基化的膜聯蛋白 A1 單株抗體靜脈內注射到帶有肺臟腫瘤的大鼠，並使其循環 2 小時，然後再經由灌注 DTSSP 至肺動脈而化學交聯。在分離腫瘤 P 之後，將細胞表面的膜聯蛋白 A1 利用抗生物素蛋白鏈菌素磁珠而沈澱。當膜聯蛋白 A1 單株抗體免疫沈澱物在非還原的條件下被分離時，一個約 180 仟道耳吞的條帶被抗-IgG 及膜聯蛋白 A1 抗體所辨認。在還原的條件下，抗-IgG 抗體偵測到 25 仟道耳吞及 50 仟道耳吞的兩個條帶，其分別對應到免疫球蛋白的輕鏈及重鏈，而膜聯蛋白 A1 抗體主要是辨認在 34 仟道耳吞的單一條帶。為了證實免疫沈澱的膜聯蛋白 A1 抗體反應性條帶之來源，將 SDS-PAGE 膠體以考馬斯藍染色，以使所有存在於樣本中的蛋白質顯像。衍生自這個條帶的胰蛋白酶肽之質譜分析，證實其相同於膜聯蛋白 A1 (數據未顯示)。因此，膜聯蛋白 A1 的 34 仟道耳吞形式確實是在小凹結構的內皮細胞表面上外部化的膜聯蛋白 A1 之主要形式。

發現膜聯蛋白 A1 (主要是其 34 仟道耳吞的切割形式)

作為可接近的血管腫瘤標的物，已利用蛋白質體學及分子成像工具之組合而達成，該等工具包括組織次細胞分層、膠體電泳、質譜分析、組織免疫染色以及 SPECT 成像。

雖然本發明已參考較佳具體實例而特定顯示以及說明，但熟悉於此技藝者將理解到，形式及細節的各種改變都可在不脫離本發明附屬申請專利範圍所涵蓋的範疇外而完成。

【圖式簡單說明】

圖 1 是描述以 Kaplan-Meier 存活曲線繪製的存活情形。觀察到帶有腫瘤的大鼠之顯著增加的生存情形，有 80% 的動物在注射後存活 8 天或更長時間，相較於對照組的大鼠在以膜聯蛋白 A1 抗體注射後 7 天之前有 100% 死亡率。膜聯蛋白 A1 標定的放射性免疫治療增加大鼠的存活。將雌性 Fisher 大鼠靜脈內注射 13762 細胞以誘發肺臟腫瘤（第 0 天）。(a) Kaplan-Meier 存活曲線，其比較在接種腫瘤細胞 15 天後以 125I-膜聯蛋白 A1 抗體（50 毫克，10 毫居里/毫克；紅線；n=10）與對照組非標定的 125I-IgG（藍線；n=10）注射的帶有腫瘤的大鼠與未處理的動物（綠線 n=3）之存活。(b) 每天測量大鼠的體重並作圖。紅色：以 125I-膜聯蛋白 A1 抗體處理之帶有腫瘤的大鼠；藍色：以對照組 125I-IgG 處理之帶有腫瘤的大鼠；綠色：未處理之帶有腫瘤的動物；黑色：未處理的正常大鼠。N=3。對於每個作圖的重量，最大標準偏差 < 10 克。

十、申請專利範圍：

1. 一種可特異性地結合至膜聯蛋白 (annexin) A1 且為特異於膜聯蛋白 A1 的抗體或抗體片段的作用劑之用途，其係用於製造將作用劑以瘤新生物特異性的方式輸送進入及/或輸送穿過血管內皮之醫藥品，其中該醫藥品係用以與血管系的管腔內皮表面及/或小凹結構(caveolae)接觸。

2. 一種膜聯蛋白 A1 治療作用劑之用途，其係用於製造治療個體的瘤新生物之醫藥品，其中該膜聯蛋白 A1 治療作用劑是以瘤新生物特異性的方式靶定進入及/或靶定穿過血管內皮。

3. 如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該膜聯蛋白 A1 治療作用劑是針對膜聯蛋白 A1 的抗體或抗體片段。

4. 如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該膜聯蛋白 A1 治療作用劑是包括活性作用劑成分及靶定作用劑成分的作用劑，其中該活性作用劑成分是選自由以下者所組成的族群中：放射性核素；化學治療作用劑；免疫刺激作用劑；抗瘤新生作用劑；抗發炎作用劑；原細胞自戕作用劑；毒素；抗生素；荷爾蒙；酵素；蛋白質（例如，重組蛋白質或重組經修飾的蛋白質）；運輸蛋白質（例如，白蛋白、經修飾的白蛋白）；溶胞作用劑；小分子；適配子；細胞（包括經修飾的細胞）；奈米顆粒（例如，以白蛋白為基礎的奈米顆粒）；運鐵蛋白；免疫球蛋白；多價抗體；脂質；脂蛋白；脂質體；經改變的天然配位體；基因或核酸；RNA；siRNA；病毒或非病毒基因輸送載體；前藥物；或原

分子。

5. 如申請專利範圍第 4 項之用途，其中該靶定作用劑成分是可特異性地結合至膜聯蛋白 A1 且為特異於膜聯蛋白 A1 的抗體或抗體片段的作用劑。

6. 如申請專利範圍第 5 項之用途，其中該靶定作用劑成分是針對膜聯蛋白 A1 的抗體。

7. 一種有興趣的作用劑之用途，其係用於製造評估個體存在或不存在瘤新生物血管內皮之醫藥品，其中：

a) 該有興趣的作用劑包括成像作用劑成分及靶定作用劑成分，且該靶定作用劑成分係特異性地結合至膜聯蛋白 A1 且係特異於膜聯蛋白 A1 的抗體或抗體片段；以及

b) 在該醫藥品被投藥後該個體被評估存在或不存在一定濃度之該有興趣的作用劑，

其中存在一定濃度之該有興趣的作用劑係表示存在瘤新生物血管內皮。

8. 如申請專利範圍第 7 項之用途，其中該靶定作用劑成分是針對膜聯蛋白 A1 的抗體。

9. 一種將成像作用劑以瘤新生物特異性的方式輸送進入及/或輸送穿過組織樣本中的血管內皮之方法，其包括將該組織樣本與包括成像作用劑成分及靶定作用劑成分之有興趣的作用劑接觸，其中該靶定作用劑成分係特異性地結合至膜聯蛋白 A1 且係特異於膜聯蛋白 A1 的抗體或抗體片段。

10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該靶定作用劑

成分是針對膜聯蛋白 A1 的抗體。

11. 一種評估個體對於使用靶定進入及/或靶定穿過血管內皮的膜聯蛋白 A1 治療作用劑的抗瘤新生物治療的反應之方法，其包括：

a) 評估以膜聯蛋白 A1 治療作用劑治療之前，在從該個體得到的樣本中之膜聯蛋白 A1 水平；

b) 評估以該膜聯蛋白 A1 治療作用劑治療期間或之後，在從該個體得到的樣本中之膜聯蛋白 A1 水平；

c) 將治療之前的水平與治療期間或之後的水平進行比較，

其中在治療期間或之後膜聯蛋白 A1 的水平顯著低於治療之前膜聯蛋白 A1 的水平，係表示以該膜聯蛋白 A1 治療作用劑治療的功效，且其中該方法並非實施於有生命的人體或動物體上。

12. 一種鑑定可改變膜聯蛋白 A1 活性且靶定進入及/或靶定穿過血管內皮的抗瘤新生物作用劑之試管內方法，其包括：

a) 將膜聯蛋白 A1 與待測作用劑接觸；

b) 評估膜聯蛋白 A1 的活性水平；以及

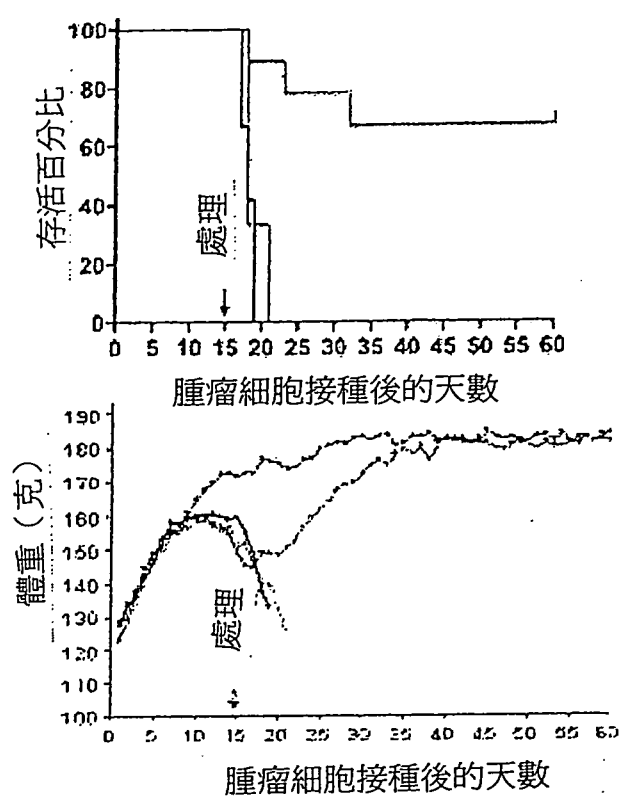
c) 將該活性水平與沒有該作用劑的膜聯蛋白 A1 之活性水平進行比較，

其中如果在該作用劑存在的膜聯蛋白 A1 之活性水平，是以統計上顯著的量而不同於在沒有該作用劑的膜聯蛋白 A1 之活性水平的話，則該作用劑是可改變膜聯蛋白 A1 的

活性之作用劑。

十一、圖式：

如次頁。



第 1 圖