



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102083850 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 12

(21) 申请号 200980122906. 8

(22) 申请日 2009. 04. 21

(30) 优先权数据

61/046, 712 2008. 04. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 12. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/041276 2009. 04. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/132020 EN 2009. 10. 29

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 劳伦斯利弗莫尔国家安全有限责
任公司

(72) 发明人 S · J · 德纳多 G · L · 德纳多

R · L · 巴尔霍恩

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

44202

代理人 温旭 郝传鑫

(51) Int. Cl.

C07J 43/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2006/0084115 A1, 2006. 04. 20, 说明书第
[12]、[18]、[19]、[69]、[93] 段、表格 2、表格 3.

US 2006/0084115 A1, 2006. 04. 20, 说明书第
[12]、[18]、[19]、[69]、[93] 段、表格 2、表格 3.

审查员 汪泉

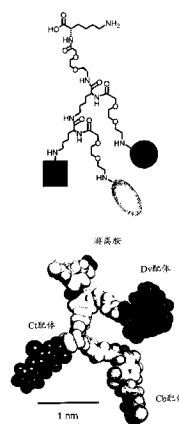
权利要求书3页 说明书74页 附图29页

(54) 发明名称

选择性高亲和力多齿配体及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了新型选择性高亲和力多齿配体 (SHAL), SHAL 可以以类似于使用抗体的方式用于多种用途。多齿配体通常包含多个配体, 各配体结合靶分子上的不同区域。配体直接连接或通过连接体连接, 因此形成通常以高选择性和高亲和力结合靶分子的多齿部分。



1. 一种选择性高亲和力配体 (SHAL), 所述 SHAL 由第一配体、第二配体和第三配体构成, 所述第一配体、所述第二配体和所述第三配体分别结合至 HLA-DR10 表面抗原上的不同位点,

其中, 所述第一配体为 3-(2-([3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氧)苯胺基)-3-氧丙酸, 并且, 所述第二配体和所述第三配体分别独立地选自表 1、表 7 或表 8, 并且

其中, 所述第一配体、所述第二配体和所述第三配体通过连接体相互连接, 所述连接体选自: 包含聚乙二醇 PEG 的连接体或肽, 其中, 所述肽包含天然存在的氨基酸残基的聚合物或氨基酸残基的化学类似物的聚合物, 所述肽具有连接构成多肽的氨基酸的传统肽键的变异体。

2. 一种选择性高亲和力配体 (SHAL), 所述 SHAL 由第一配体、第二配体和第三配体构成, 所述第一配体、所述第二配体和所述第三配体分别结合至 HLA-DR10 表面抗原上的不同位点,

其中:

所述第一配体是 4-(二甲氨基)偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸;

所述第二配体是 4-[4-(4-氯苄基)哌嗪并]-3-硝基苯甲酸; 以及

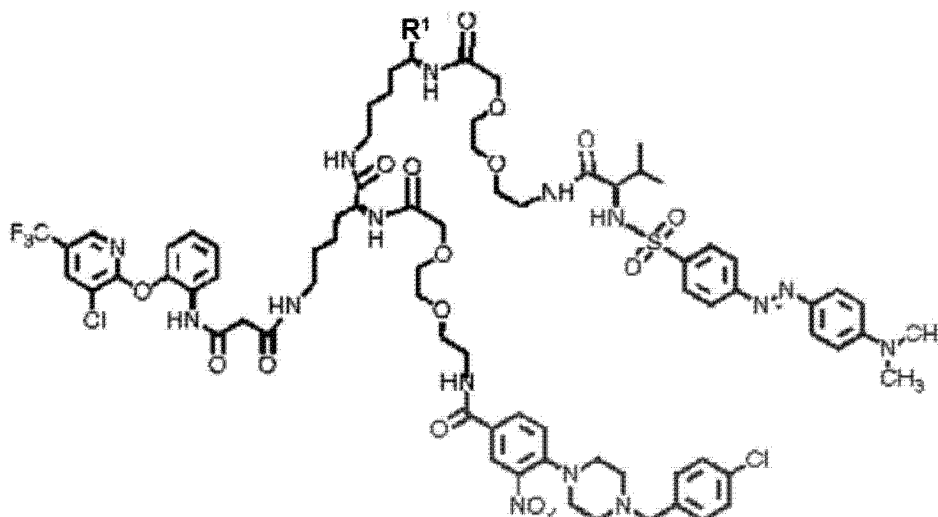
所述第三配体是 3-(2-([3-氯-5-三氟甲基)-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸, 并且

其中, 所述第一配体、所述第二配体和所述第三配体通过连接体相互连接, 所述连接体选自: 包含聚乙二醇 PEG 的连接体或肽, 其中, 所述肽包含天然存在的氨基酸残基的聚合物或氨基酸残基的化学类似物的聚合物, 所述肽具有连接构成多肽的氨基酸的传统肽键的变异体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 SHAL, 其中, 所述连接体由聚乙二醇构成。

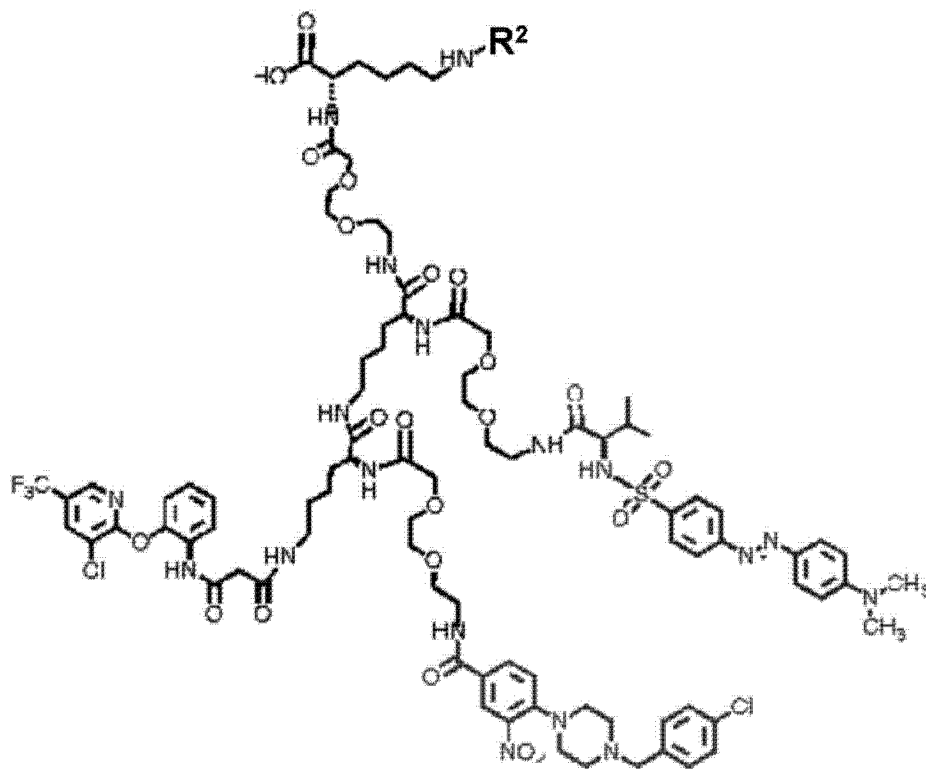
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的 SHAL, 其中, 所述连接体由聚乙二醇和赖氨酸构成。

5. 一种选择性高亲和力配体 (SHAL), 其具有如下结构:



其中, R^1 选自 $COOH$ 或连接体、效应剂以及与效应剂连接的连接体, 所述连接体选自: 包含聚乙二醇 PEG 的连接体或肽, 其中, 所述肽包含天然存在的氨基酸残基的聚合物或氨基酸残基的化学类似物的聚合物, 所述肽具有连接构成多肽的氨基酸的传统肽键的变异体。

6. 一种选择性高亲和力配体 (SHAL), 其具有如下结构:



其中, R^2 包括效应剂。

7. 一种由权利要求 1 至 6 任一项所述的 SHAL 构成的分子, 所述 SHAL 与转导肽连接。

8. 根据权利要求 7 所述的分子, 其中, 所述转导肽选自: SV40 的核定位信号、HIV Tat 蛋白的蛋白转导结构域、整合素结合肽 RGD 肽、玻璃粘连蛋白 VN 肽的肝素结合结构域、果蝇的触角蛋白、VP22、寡精氨酸、乳糖基化聚-L-赖氨酸或其他寡聚物、S-G-E-H-T-N-G-P-S-K-T-S-V-R-W-V-W-D、S-M-T-T-M-E-F-G-H-S-M-I-T-P-Y-K-I-D、Q-D-G-G-T-W-H-L-V-A-Y-C-A-K-S-H-R-Y、M-S-D-P-N-M-N-P-G-T-L-G-S-S-H-I-L-W、S-P-G-N-Q-S-T-G-V-I-G-T-P-S-F-S-N-H、S-S-G-A-N-Y-F-F-N-A-I-Y-D-F-L-S-N-F 以及 G-T-S-R-A-N-S-Y-D-N-L-L-S-E-T-L-T-Q。

9. 根据权利要求 8 所述的分子, 其中, 所述转导肽是六精氨酸。

10. 一种由权利要求 1 至 6 任一项所述的 SHAL 构成的分子, 所述 SHAL 与效应剂连接。

11. 根据权利要求 10 所述的分子, 其中, 所述效应剂选自附加表位、抗体、第二 SHAL、标记物、细胞毒素、脂质体、放射性核素、药物、病毒颗粒、细胞因子以及螯合剂。

12. 根据权利要求 11 所述的分子, 其中, 所述药物包括酶抑制剂。

13. 根据权利要求 11 所述的分子, 其中, 所述药物包括前药。

14. 根据权利要求 11 所述的分子, 其中, 所述效应剂是选自亲和素和生物素的附加表位。

15. 根据权利要求 11 所述的分子, 其中, 所述效应剂是选自白喉毒素、假单胞菌外毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素以及胸苷激酶的细胞毒素。

16. 根据权利要求 11 所述的分子, 其中, 所述效应剂是由下列金属同位素构成的螯合剂: ^{99}Tc 、 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{97}Ru 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{52}Fe 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{77}As 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{169}Er 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{161}Tb 、 ^{109}Pd 、 ^{165}Dy 、 ^{149}Pm 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{157}Gd 、 ^{159}Gd 、

¹⁶⁶Ho、¹⁷²Tm、¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb、¹⁷⁷Lu、¹⁰⁵Rh 以及 ¹¹¹Ag。

17. 根据权利要求 11 所述的分子,其中,所述效应剂是由 α 发射体构成的螯合剂。

18. 根据权利要求 17 所述的分子,其中,所述 α 发射体是铋 213。

19. 根据权利要求 11 所述的分子,其中,所述效应剂是由 DOTA 构成的螯合剂。

20. 根据权利要求 10 所述的分子,其中,所述效应剂是脂质或脂质体。

21. 根据权利要求 10 所述的分子,其中,所述效应剂选自:3-(2-([3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸、4[[5-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧]苯基]N-苯基氨基甲酸酯、(R)-2-[4-(5-氯-3-氟-2-吡啶基氧)苯氧基]丙酸、2-(((3-氯-5(三氟甲基)吡啶-2-基氧)苯氧基)甲基)丙烯酸酯、2-(((3-氯-5(三氟甲基)吡啶-2-基氧)苯基)甲基)丙烯酸酯、2-(((3-氯-5(三氟甲基)吡啶-2-基氧)苯基)甲基)丙烯腈、3-(3-氯-4-{[5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氧}苯胺基)-3-氧丙酸、稀禾定、烯草酮、5-(四癸基氧)-2-糠酸、2-[(2,6-二氯苯基)氨基]苯乙酸、2-[4-(4-氯苯氧基)苯氧基]丙酸、(RS)-2-{4-[3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氧}苯氧基}丙酸、(RS)-2-[4-(6-氯-1,3-苯噁唑-2-基氧)苯氧基]丙酸、(RS)-2-[4-(2,4-二氯苯氧基)苯氧基]丙酸、(RS)-2-{4-[5-(三氟甲基)-2-吡啶基氧]苯氧基}丙酸、(RS)-2-[4-(6-氯喹啉-2-基氧)苯氧基]丙酸以及 (RS)-2-[4-(α,α,α-三氟-p-甲苯氧基)苯氧基]丙酸。

22. 权利要求 1 至 6 中任一项所述的选择性高亲和力多齿配体 (SHAL) 或权利要求 7 至 21 任一项所述的分子在制备抑制癌细胞生长或增殖的药物中的应用,所述癌细胞表达 HLA-DR10 表面抗原。

23. 根据权利要求 22 所述的应用,其中,所述细胞是转移细胞。

24. 根据权利要求 22 所述的应用,其中,所述细胞是实体瘤细胞。

25. 根据权利要求 22 所述的应用,其中,所述癌细胞是恶性 B 淋巴细胞。

26. 根据权利要求 22 所述的应用,其中,所述癌细胞与非何杰金氏淋巴瘤或白血病或其他 B 细胞衍生的恶性肿瘤有关。

27. 一种药物制剂,所述制剂由药学上可接受的赋形剂和权利要求 1 至 6 中任一项所述的 SHAL 或权利要求 7 至 21 中任一项所述的分子构成。

28. 根据权利要求 27 所述的药物制剂,其中,所述制剂是单位剂型制剂。

选择性高亲和力多齿配体及其制备方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 4 月 21 日提交的 USSN 61/046,712 的优先权和权益, USSN 61/046,712 在此通过引用完整并入本文用于所有目的。

[0003] 关于联邦政府资助的研究和研制下进行的发明的权利的声明

[0004] 本研究部分受来自美国国立卫生研究院国家癌症研究所的第 CA047829 号资助金的资助。另外,根据美国能源部与劳伦斯·利弗莫尔国家实验室之间对于劳伦斯·利弗莫尔国家实验室施行的第 DE-AC52-07NA27344 号合同,美国政府具有本发明的一些权益。

技术领域

[0005] 本发明涉及靶向分子的研制。更具体地,本发明涉及可以以类似于抗体和 / 或肽配体的方式使用的选择性高亲和力多齿配体 (SHAL) 的研制,所述多齿配体作为亲和试剂或用于诊断和治疗多种疾病 (例如,癌症)。

背景技术

[0006] 总体而言,已发现诸如化学治疗剂之类的杀癌药物对正常组织的细胞也具有毒性。因此,这些药物的副作用可以对患者具有几乎如同恶性病本身一样程度的害处。多克隆抗体和肽配体的出现提供了改进药物特异性 / 选择性的新方法。通过将例如细胞毒性剂与针对存在于恶性细胞但不存在于正常细胞的抗原的抗体或肽配体共轭,已经实现了对于恶性细胞的选择性杀伤。已经制备了许多针对多种细胞表面抗原的包含与细胞毒性剂连接的抗体的不同免疫共轭物。

[0007] 用于这些免疫共轭物的细胞毒性剂包括放射性同位素、多种植物和细菌毒素 (例如,假单胞菌外毒素、白喉毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素等)、多种生长因子以及最近的诸如半胱天冬酶之类的制剂。尽管已经取得了一些成功,特别是在淋巴瘤和白血病方面,但是无论是单独使用抗体还是使用免疫共轭物的基于抗体的治疗通常都没有实现预期的潜力。

[0008] 尽管在恶性病的治疗中已经取得了显著的进步,但是用于大多数患者的治愈性方案尚未被研制研究出或者与对于患者来说无毒性有关。因此,需要用于治疗大多数恶性病的新策略。这些策略应该将毒性最小化与治疗作用最大化结合起来作为其目标。一种方法涉及使用细胞表面受体的特异性配体或恶性细胞相关抗原的特异性抗体作为将药物或放射性同位素靶向恶性细胞的方式。该方法对于治疗许多恶性病来说具有吸引力,这是因为恶性细胞在其细胞表面呈现了多种可用于靶向的肿瘤限制的或上调的抗原和 / 或受体。迄今,已发现抗体 / 抗原系统优于配体受体系统,因为它们比受体更受限制并且在恶性细胞上具有更大的丰度。

[0009] 尽管抗体具有这些优点,但是因为许多原因尚未实现其潜力。在这些原因中,抗体是通常不有效接近并穿透恶性肿瘤的高分子 (大分子)。另外,抗体通常是大的免疫原性分子,可诱导患者针对该治疗剂的免疫反应。另外,抗体通常不显示对于靶 (例如,癌症) 组织的足够的特异性,因此仅可用于有限的治疗方案。

发明内容

[0010] 在一些实施方式中,本发明提供了新型选择性高亲和力多齿配体 (SHAL), SHAL 可以以类似于抗体结合的方式起到特异性结合特定靶分子的作用。本发明描述了设计和生成 SHAL 的方法以及将 SHAL 施用于患有感染性和 / 或恶性疾病的患者的方法,所述 SHAL 作为用于基础性研究或应用性研究或用于诊断和治疗感染性疾病和 / 或恶性疾病的亲和试剂。

[0011] SHAL 通常包括两个或两个以上配体 (结合部分 (binding moiety)),各配体结合至期望的靶上的不同区域,所述区域彼此之间直接连接或通过连接体连接。在 SHAL 针对癌细胞上的标志物的情况中,相对于正常细胞,SHAL 以较大的密度 (丰度) 或趋近性在靶细胞上结合。因此,SHAL 具有适于诊断或治疗靶细胞的选择性。可容易地生成不同 SHAL 用于不同恶性细胞和恶性疾病。SHAL 表现了核心构建块 (例如,靶向部分),所述核心构建块可掺入较大的分子 (例如嵌合分子) 以影响向靶特异性递送效应剂。

[0012] 因此,在一种实施方式中,本发明提供了一种特异性结合靶分子的选择性高亲和力多齿配体 (SHAL) 的制备方法。在一些实施方式中,所述方法通常涉及下述步骤:筛选第一配体文库以鉴定结合靶分子的第一配体;筛选第二配体文库以鉴定结合靶分子的第二配体,其中,第二配体不同于第一配体;使第一配体与第二配体连接以形成 SHAL;以及筛选 SHAL 特异性结合靶分子的能力。在一些实施方式中,靶分子是蛋白质。在一些实施方式中,靶分子是癌症标志物 (例如,Lym-1 表位、Muc-1、C-myc、p53、Ki67、Her2、Her4、BRCA1、BRCA2、Lewis Y、CA 15-3、G250、HLA-DR 细胞表面抗原,CEA、CD20、CD22、整合素、癌胚抗原、16、EGFr、AR、PSA 以及其他生长因子受体等)。所述方法还可任选地进一步包括筛选 SHAL 以鉴定以高于含有 SHAL 的任一配体的亲和力和 / 或特异性结合靶的 SHAL。第一配体文库和第二配体文库可为相同的文库或可为不同的文库。在一些实施方式中,第一和 / 或第二配体文库是有机小分子文库。在一些实施方式中,筛选第一配体文库和 / 或筛选第二配体文库包括计算机虚拟筛选。计算机虚拟筛选可包括使用用于 DOCK 程序的一种或一种以上算法筛选化合物数据库 (例如,MDL® Available Chemicals Directory, ChemSpider, GNU-Darwin)。计算机虚拟筛选可包括使用 DOCK 程序筛选化合物数据库。计算机虚拟筛选可包括筛选结合蛋白质上的“口袋 (pocket)”的第一配体和 / 或多个配体。在一些实施方式中,使用 SPHGEN 程序的算法来鉴定“口袋”。在一些实施方式中,使用 SPHGEN 程序来鉴定“口袋”。计算机虚拟筛选可包括筛选第二配体或第三配体,与筛选第一配体文库时鉴定的配体相比,该第二配体或该第三配体结合靶的不同区域。

[0013] 在一些实施方式中,筛选第一配体文库和 / 或筛选第二配体文库还包括在物理测定中筛选计算机虚拟筛选所鉴定的一种或一种以上配体结合靶的能力。合适的物理测定包括但不限于 BIAcore 测定、饱和转移差异核磁共振光谱法、转移核欧沃豪斯效应 (trNOE) 核磁共振光谱法、ELISA、竞争性测定、组织结合测定、活细胞结合测定、细胞提取物测定等。

[0014] 配体的连接可包括直接连接两个或两个以上配体或使用连接体 (例如,PEG 型连接体、肽连接体、亲和素 / 生物素连接体、直链碳连接体、杂环连接体、支链碳连接体、树状聚合物、核酸连接体、硫醇连接体、酯连接体、包含胺的连接体、包含羧基的连接体等) 连接两个或两个以上配体。所述连接可任选包括下述步骤:使用不同长度的连接体连接两个或两个以上配体以产生具有不同长度连接体的 SHAL 文库;任选地,筛选具有不同长度连接体

的 SHAL 文库以鉴定文库中对于靶具有最高亲和力和 / 或特异性的成员。在一些实施方式中,所述方法还涉及包括筛选 SHAL 以鉴定出以高于含有 SHAL 的任一配体的亲和力和 / 或特异性结合靶的 SHAL。筛选单个配体和 / 或二价或多价 SHAL 可通过多种方法中的任何方法,所述多种方法包括但不限于:BIACore 测定、饱和转移差异核磁共振光谱法、转移核欧沃豪斯效应 (trNOE) 核磁共振光谱法、ELISA、竞争性测定、组织结合测定、活细胞结合测定、细胞提取物测定等。在一些实施方式中,靶分子是蛋白质和 / 或癌症标志物 (例如, Lym1 表位、Muc-1、C-myc、p53、Ki67、Her2、Her4、BRCA1、BRCA2、Lewis Y、CA 15-3、G250、HLA-DR 细胞表面抗原等)。

[0015] 本发明还提供了一种酶或其他结合蛋白或受体的抑制剂的合成方法。在一些实施方式中,所述方法通常涉及鉴定酶或其他结合蛋白或受体中第一“口袋”(或“隆起”)和第二或第三“口袋”(或“隆起”),其中,第一、第二和第三“口袋”侧邻所述酶或其他结合蛋白或受体的活性位点或结合位点的相对侧;筛选第一配体文库以鉴定结合第一“口袋”(或“隆起”)的第一配体;筛选第二配体文库以鉴定结合第二“口袋”(或“隆起”)的第二配体;筛选第三配体文库以鉴定结合第三“口袋”(或“隆起”)的第三配体;使第一配体与第二和第三配体连接以形成选择性高亲和力多齿配体 (SHAL);以及筛选 SHAL 的特异性结合并抑制酶或其他结合蛋白的能力。在一些实施方式中,“口袋”或“隆起”不必须位于酶或结合蛋白或受体的活性位点或结合位点的相对侧,而其位置仅使得 SHAL 的结合阻断天然同源配体与该位点结合。在一些实施方式中,靶分子包括选自下列的分子:蛋白质、酶、核酸、核酸结合蛋白以及碳水化合物。在一些实施方式中,所述方法还涉及筛选 SHAL 以鉴定出以高于组成 SHAL 的任一配体的亲和力和 / 或特异性结合靶的 SHAL。第一、第二以及第三配体文库可为相同的文库或可为不同的文库。在一些实施方式中,第一和 / 或第二和 / 或第三配体文库为有机小分子文库。在一些实施方式中,筛选第一、第二和 / 或第三配体文库包括计算机虚拟筛选。计算机虚拟筛选可包括使用 DOCK 程序的一种或一种以上算法筛选化合物数据库 (例如, MDL ® Available Chemicals Directory)。计算机虚拟筛选可包括使用 DOCK 程序筛选化合物数据库。计算机虚拟筛选可涉及筛选结合蛋白质上的“口袋”的第一、第二和 / 或第三配体。在一些实施方式中,使用 SPHGEN 程序的算法鉴定“口袋”。在一些实施方式中,使用 SPHGEN 程序鉴定“口袋”。计算机虚拟筛选可涉及筛选第二配体,与筛选第一配体文库时鉴定的配体相比,该第二配体结合靶的不同区域。

[0016] 在一些实施方式中,筛选第一、第二或第三配体文库和 / 或筛选第二配体文库还包括在物理测定中筛选计算机虚拟筛选所鉴定的一种或一种以上配体结合靶的能力。合适的物理测定包括但不限于:BIACore 测定、饱和转移差异核磁共振光谱法、转移核欧沃豪斯效应 (trNOE) 核磁共振光谱法、ELISA、竞争性测定、组织结合测定、活细胞结合测定、细胞提取物测定等。

[0017] 配体的连接可涉及直接连接两个或两个以上配体或使用连接体 (例如, PEG 型连接体、肽连接体、亲和素 / 生物素连接体、直链碳连接体、杂环连接体、支链碳连接体、树状聚合物、核酸连接体、巯基连接体、酯连接体、包含胺的连接体、包含羧基的连接体等) 连接两个或两个以上配体。所述连接可任选包括下述步骤:使用不同长度的连接体连接配体以产生具有不同长度连接体的 SHAL 文库;以及任选地,筛选具有不同长度连接体的 SHAL 文库以鉴定文库中对于靶具有最高亲和力和 / 或特异性的成员。

[0018] 本发明还提供了特异性结合期望的靶（例如，癌细胞）的选择性高亲和力多齿配体（SHAL）。在靶是癌细胞的情况下，SHAL 通常包含结合癌细胞标志物上第一位点的第一配体，该第一配体与第二或第三配体连接，所述第二或第三配体结合癌细胞相同标志物或不同标志物上的第二或第三位点（在第一位点、第二位点以及第三位点是不同位点的情况下）（例如，所有三种配体均能够同时结合靶）。在一些实施方式中，第一位点、第二位点和 / 或第三位点是标志物上的“口袋”（或“隆起”）。合适的标志物包括但不限于 Lym-1 表位、Muc-1、C-myc、p53、Ki67、Her2、Her4、BRCA1、BRCA2、Lewis Y、CA 15-3、G250、HLA-DR 细胞表面抗原、CEA、CD20、CD22、整合素、CEA、16、EGFr、AR、PSA、其他生长因子受体等。

[0019] 在一些优选的实施方式中，标志物是 HLA-DR 细胞表面抗原。在一些实施方式中，所述三种配体结合由 Lym-1 或其他 HLA-DR 特异性抗体识别的表位中的位点。在一些实施方式中，所述三种配体各自为有机小分子。在一些实施方式中，第一配体是选自表 1 的配体，第二和第三配体（当存在时）独立地选自表 1、5、6、7 或 8 中的配体。在一些实施方式中，SHAL 包括选自表 2、3 或 4 的第一、第二和 / 或第三配体。在一些实施方式中，SHAL 包括选自表 4 的第一、第二和 / 或第三配体。所述三种配体可直接连接在一起，或者第一配体可通过连接体（例如，PEG 型连接体、肽连接体、亲和素 / 生物素连接体、直链碳连接体、杂环连接体、支链碳连接体、树状聚合物、核酸连接体、巯基连接体、酯连接体、包含胺的连接体、包含羧基的连接体等）与第二和 / 或第三配体连接。在一些实施方式中，SHAL 对于标志物具有大于约 10^{-6} M 的亲和力，而组成 SHAL 的单个配体各自对于标志物具有小于约 10^{-6} M 的结合亲和力。在一些实施方式中，SHAL 具有本文和附图中显示的化学式，或是其类似物。

[0020] 本发明还提供了包含与效应剂（例如，附加表位、第二 SHAL、抗体、标记物、细胞毒素、脂质体、放射性核素、药物、前药、病毒颗粒、细胞因子以及螯合剂）连接的本发明所述的 SHAL 的嵌合分子。在一些实施方式中，所述效应剂选自亲和素和生物素的附加表位。在一些实施方式中，所述效应剂选自下述的细胞毒素：白喉毒素、假单胞菌外毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素以及胸苷激酶。在一些实施方式中，所述效应剂是包含选自下述金属同位素的螯合剂： ^{99}Tc 、 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{111}In 、 ^{113}mIn 、 ^{97}Ru 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{52}Fe 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{77}As 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{169}Er 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{161}Tb 、 ^{109}Pd 、 ^{165}Dy 、 ^{149}Pm 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{157}Gd 、 ^{159}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{172}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{105}Rh 以及 ^{111}Ag 。在一些实施方式中，效应剂是包含 α 发射体（例如，铋 213 ）的螯合剂。在一些实施方式中，效应剂是包含 DOTA 的螯合剂。在一些实施方式中，效应剂是脂质或脂质体（例如，含有药物的脂质体）。

[0021] 在又一种实施方式中，本发明提供了一种药物制剂，所述制剂包含本发明所述的特异性结合癌细胞的选择性高亲和力多齿配体（SHAL）和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中，所述制剂可作为单位剂型制剂提供。在一些实施方式中，所述制剂可作为时间释放制剂来提供。

[0022] 本发明还提供了一种药物制剂，所述制剂包含含有本发明所述的 SHAL 的嵌合分子和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中，所述制剂可作为单位剂型制剂提供。在一些实施方式中，所述制剂可作为时间释放制剂来提供。

[0023] 本发明提供了用于抑制癌细胞生长或增殖的方法。所述方法通常包括使癌细胞（例如，转移细胞、肿瘤细胞等）与特异性结合癌细胞的选择性高亲和力多齿配体（SHAL）接触和 / 或与含有特异性结合连接至效应剂（例如，药物、脂质体、细胞毒素、放射性核素或螯

合剂)的癌细胞的选择性高亲和力多齿配体(SHAL)的嵌合分子接触。

[0024] 在一些实施方式中,本发明提供了特异性结合期望的靶的 SHAL。所述靶可为期望生成结合部分的任何靶。所述 SHAL 通常包含直接连接或通过连接体连接的两个或两个以上配体,其中,在第一、第二和 / 或第三位点是不同位点的情况中,第一配体结合所述靶上的第一位点,第二和 / 或第三配体结合靶上的相同靶标志物的第二和 / 或第三位点(例如,所有三种配体均能够同时结合靶)。在一些实施方式中,第一、第二和 / 或第三位点是靶上的“口袋”(或“隆起”)。在一些实施方式中,第一、第二和 / 或第三位点位于相同的靶分子上。

[0025] 本发明还提供了各种检测方法。在一些实施方式中,本发明提供了一种检测癌细胞的方法。所述方法通常包括以下步骤:使癌细胞与包含特异性结合连接至可检测标记物(例如, γ 发射体、正电子发射体、X 射线发射体、 α 发射体、荧光发射体等)的癌细胞(例如,结合癌症标志物)的 SHAL 的嵌合分子接触,并检测可检测标记物是否存在。在一些实施方式中,所述方法通常包括以下步骤:使癌细胞与包含特异性结合连接至附加表位的癌细胞(例如,结合癌症标志物)的 SHAL 的嵌合分子接触;使所述嵌合分子与包含可检测部分的螯合剂接触,由此所述螯合剂结合附加表位,从而使所述可检测部分与所述螯合剂结合;以及检测所述可检测部分。在一些实施方式中,所述可检测部分是放射性核素(例如, γ 发射体、正电子发射体、 α 发射体、X 射线发射体等)。在一些实施方式中,所述检测包括外部成像和 / 或内部成像。在一些实施方式中,所述可检测部分包括选自下述的金属同位素: ^{99}Tc 、 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{97}Ru 、 ^{62}Cu 、 $^{64\text{t}}\text{Cu}$ 、 ^{52}Fe 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{77}As 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{169}Er 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{161}Tb 、 ^{109}Pd 、 ^{165}Dy 、 ^{149}Pm 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{157}Gd 、 ^{159}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{172}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{105}Rh 以及 ^{111}Ag 。在一些实施方式中,所述螯合剂包括 DOTA。在一些实施方式中,所述附加表位是亲和素或生物素。

[0026] 本发明还考虑了用于制备和 / 或使用本发明的 SHAL 和 / 或包含本发明的 SHAL 的嵌合分子的试剂盒。在一些实施方式中,所述试剂盒包括含有本发明所述的 SHAL 的容器和 / 或含有用于组装成本发明所述的 SHAL 的配体的容器。类似物还可任选包括一种或一种以上连接体、一种或一种以上效应剂(螯合剂,放射性核素等),等等。在一些实施方式中,所述 SHAL 处于药理学上可接受的赋形剂中。

[0027] 在一些实施方式中,本发明明确排除了组成 SHAL 的结合部分为抗体、单链抗体等情况下的 SHAL。在一些实施方式中,SHAL 不是多价抗体或多价单链抗体。在一些实施方式中,所述组成 SHAL 的配体不是蛋白质。在一些实施方式中,本发明明确排除了组成 SHAL 的结合部分优先和 / 或特异性结合核酸的情况下的 SHAL。在一些实施方式中,所述组成 SHAL 的配体为有机小分子。

[0028] 定义

[0029] 术语“特异性结合”或“优先结合”是指诸如酶 / 底物、受体 / 激动剂、抗体 / 抗原以及凝集素 / 碳水化合物之类的配对物之间发生的结合,所述结合可由共价和 / 或非共价相互作用介导。当两种物质的相互作用通常产生非共价结合复合物时,所发生的结合通常为静电和 / 或氢键合和 / 或亲脂相互作用的结果。因此,在产生结合复合物 (bound complex) 的两种物质之间具有相互作用的情况中,物质对之间产生“特异性结合”。具体地,所述特异性结合的特征是:与特定物质所属的化合物家族中的其他物质的结合相比,物质对的一个

成员与该特定物质优先结合。因此,例如,配体可显示对于 HLA-DR10 分子上的特定“口袋”的亲和力比对于相同或相关蛋白质上的不同“口袋”的亲和力要大至少两倍、优选至少 10 倍、更优选至少 100 倍、至少 1000 倍或至少 10000 倍。

[0030] 本发明使用的术语“配体”或“结合部分”通常是指结合特定靶分子并形成如上所述的结合复合物的分子。所述结合可为高度特异性结合,然而,在一些实施方式中,单个配体与靶分子的结合可具有较低的亲和力和/或特异性。配体及其相应靶分子形成特定的结合对。配体的实例包括但不限于有机小分子、糖、凝集素、核酸、蛋白质、抗体、细胞因子、受体蛋白、生长因子、核酸结合蛋白等,它们特异性结合期望的靶分子、靶分子集合、靶受体、靶细胞等。

[0031] 术语“有机小分子”是指其尺寸与通常用于药物制剂的那些有机分子具有可比性的分子。该术语排除了天然的生物大分子(例如,蛋白质、核酸等)。优选的有机小分子的尺寸范围为约 5000Da,更优选为 2000Da,最优选为约 1000Da。

[0032] 术语“配体文库”是指配体或潜在配体的集合(例如,多个)。所述配体文库可为配体的实际物理文库和/或数据库(例如,包含对于多个潜在配体的说明的化合物数据库,例如 MDL® Available Chemicals Directory, ChemSpider 等)。

[0033] 术语“SHAL”是指包含多个配体的分子,各配体结合 SHAL 定向的靶分子的不同区域。所述配体直接连接在一起或通过连接体连接,形成通常显示对靶分子高亲和力的多齿部分。在一些实施方式中,SHAL 包含以低亲和力结合其靶的两个或两个以上配体(例如, $< 10^{-6}\text{M}$ 和/或在数秒或更短时间内解离),当所述配体偶联在一起时形成以高亲和力结合靶的 SHAL(例如, $> 10^{-6}\text{M}$,或 $> 10^{-7}\text{M}$,或 $> 10^{-8}\text{M}$,或缓慢解离,例如数小时至数天解离)。

[0034] 当用于 SHAL 时,术语“多齿”表示 SHAL 包含两个或两个以上配体。所述配体通常结合 SHAL 定向的靶的不同部分。

[0035] 当用于 SHAL 时,术语“二齿”、“三齿”等是指由两个配体组成的 SHAL、由三个配体组成的 SHAL,等等。

[0036] 术语“多价 SHAL”是指其中两个或两个以上 SHAL 连接在一起的分子(例如,两个或两个以上二齿 SHAL)。因此,例如二价 SHAL 是指其中两个 SHAL 连接在一起的分子。三价 SHAL 是指其中三个 SHAL 连接在一起的分子,等等。在图 14 中描述了二齿 SHAL JP459B 的二价形式。

[0037] “多特异性 SHAL”是指两个或两个以上 SHAL 连接在一起,其中,各个 SHAL 为多齿,且任一者或两者可为多价合成(或以其他方式生成),这样它们具有各个 SHAL 的两个或两个以上靶(多聚配体集合)。例如,可使用 HLA-DR 的空穴(cavity)和 CDXX(例如 CD20 或 CD22)或所有这三者等上的空穴的两个或两个以上配体来合成 SHAL。另一个实例涉及连接 MUC-1SHAL 和抗淋巴瘤 SHAL,这是因为一些淋巴瘤过表达传统的 HLA-DR 和 CD 受体以及 MUC-1(上调的)。在单价或二价 SHAL 靶向恶性细胞和单价或二价第二分子捕获随后递送的制剂(例如 DOTA 螯合的放射性金属或前药)期望通过第一 SHAL 激活运输至所述恶性细胞的药物的情况中,使用 HLA-DR 的空穴和螯合剂(例如 DOTA 等)的空穴的两个或两个以上配体来合成 SHAL。

[0038] 当用于例如筛选方法时,术语“计算机虚拟”是指在不对主题部分(subject moiety)实际物理筛选的情况下实施的方法。通常,计算机虚拟筛选计算完成,例如利用特

定的有关的分子模型。在一些实施方式中,所述虚拟方法可使用主题分子的物理模型和/或通过简单的目测观察和操作来实施。

[0039] 词语“SHAL 的靶”是指待由二齿或多齿 SHAL 特异性结合的部分。

[0040] 词语“见于..... 的算法”(例如“见于 SPHGEN 的算法”)是指由参考软件实施(可见于参考软件)的算法。然而,所述算法可人工或通过不同于参考软件的程序来进行,并且仍旧表现为使用见于参考软件的算法。

[0041] 当指蛋白质中的“口袋”时,术语“口袋”是指由于肽链折叠成使得蛋白质具有功能性的三维结构而在蛋白质分子表面产生的空穴、凹陷或凹窝。通过观察蛋白质结构和/或通过利用可商购获得的建模软件(例如,DOCK)可容易地识别“口袋”。

[0042] 术语“癌症标志物”是指可用于癌症诊断和预后判断的诸如蛋白质之类的生物分子。本文使用的“癌症标志物”包括但不限于:PSA、人绒毛膜促性腺激素、 α 胎儿蛋白、癌胚抗原、癌症抗原(CA)125、CA 15-3、CD20、CDH13、CD 31、CD34、CD105、CD146、D16S422HER-2、磷脂酰肌醇 3- 激酶(PI 3- 激酶)、胰蛋白酶、与 α (1)- 抗胰蛋白酶复合的胰蛋白酶-1、雌激素受体、孕酮受体、c-erbB-2、bcl-2、S 期级分(SPF)、p185erbB-2、低亲和力胰岛素样生长因子结合蛋白、尿组织因子、血管内皮生长因子、表皮生长因子、表皮生长因子受体、细胞凋亡蛋白(p53、Ki67)、因子 VIII、粘附蛋白(CD-44、唾液酸化 TN、A 血型、细菌 lacZ、人胎盘碱性磷酸酶(ALP)、 α - 二氟甲基鸟氨酸(DFMO)、胸苷磷酸化酶(dTHdPase)、血栓调节素、层粘连蛋白受体、纤维结合素、抗细胞周期蛋白、抗细胞周期蛋白 A、B 或 E、增殖相关核抗原、凝集素 UEA-1、CEA, 16 以及冯维勒布兰德氏因子。

[0043] 术语“多肽”、“肽”以及“蛋白质”在本文中可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于其中一种或一种以上氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,并且适用于天然存在的氨基酸聚合物。这些术语还包括连接构成多肽的氨基酸的传统肽键的变体。

[0044] 在本文中,术语“核酸”或“寡核苷酸”或语法上的等同描述是指共价连接在一起的至少两个核苷酸。本发明的核酸优选是单链或双链,通常含有磷酸二酯键,但是在一些情况中(如下文所列的),包括可具有替代骨架的核酸类似物,所述替代骨架包含例如磷酸胺(Beaucage 等人(1993)Tetrahedron 49(10):1925)及其中的参考文献; Letsinger(1970)J. Org. Chem. 35:3800;Sprinzl 等人(1977)Eur. J. Biochem. 81:579; Letsinger 等人(1986)Nucl. Acids Res. 14:3487;Sawai 等人(1984)Chem. Lett. 805, Letsinger 等人(1988)J. Am. Chem. Soc. 110:4470; 以及 Pauwels 等人(1986)Chemica Scripta 26:1419)、磷硫酰(Mag 等人(1991)Nucleic Acids Res. 19:1437; 和 第 5,644,048 号美国专利)、二硫代磷酸酯(Briu 等人(1989)J. Am. Chem. Soc. 111:2321)、O-methylphosphoramidite linkages(见 Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press)以及肽核酸骨架和连接键(见 Egholm(1992)J. Am. Chem. Soc. 114:1895;Meier 等人,(1992)Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008; Nielsen(1993)Nature, 365:566;Carlsson 等人,(1996)Nature 380:207)。其他核酸类似物包括具有正性骨架(Denpcy 等人,(1995)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097)、非离子骨架(美国专利第 5,386,023 号、第 5,637,684 号、第 5,602,240 号、第 5,216,141 号以及第 4,469,863 号;Angew. (1991)Chem. Intl. Ed. English 30:423;Letsinger 等

人 (1988) J. Am. Chem. Soc. 110 :4470 ;Letsinger 等 人 (1994) Nucleoside & Nucleotide 13 :1597 ;ASC Symposium Series 580, " Carbohydrate Modifications in Antisense Research " , Ed. Y. S. Sanghui 和 P. Dan Cook, 第 2 章和第 3 章 ;Mesmaeker 等人 (1994), Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4 :395 ;Jeffs 等人 (1994) J. Biomolecular NMR 34 : 17 ;Tetrahedron Lett. 37 :743(1996)) 以及非核糖骨架 (包括美国专利第 5, 235, 033 号 和第 5, 034, 506 号中以及 ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghui 和 P. Dan Cook 第 6 章和第 7 章描述的那些) 的那些。含有一个或一个以上碳环糖的核酸也包括在核酸的定义中 (见, Jenkins 等人, (1995), Chem. Soc. Rev. 第 169-176 页)。在 "Rawls, C & E News June 2, 1997, 第 35 页" 中描述了几种核酸类似物。可对磷酸核糖骨架进行这些改变以促进添加诸如标记物之类的另外的部分, 或增加这些分子在生理环境中的稳定性和半衰期。

[0045] 术语“生物素”是指能够结合亲和素或各种亲和素类似物的生物素和修饰的生物素或生物素类似物。尤其可通过添加一种或一种以上附加物来修饰“生物素”, 通常通过其游离羧基残基添加。有用的生物素衍生物包括但不限于与所添加的化合物或聚合物上的诸如胺、酰基或烷基、羰基、烷基卤或迈克尔型受体之类的互补反应基团偶联的活性酯、胺、肼以及巯基。

[0046] 通常可见于蛋清中的亲和素对生物素 (一种 B 族复合维生素) 具有非常高的结合亲和力 (Wilcheck 等人 (1988) Anal. Biochem, 171 :1)。衍生自阿维丁链霉菌 (*Streptomyces avidinii*) 的链霉亲和素与亲和素相似, 但具有较低的非特异性组织结合, 因此常替代亲和素使用。本文使用的“亲和素”包括其天然状态或修饰形式的生物形式。例如, 被处理以去除蛋白质的碳水化合物残基 (“去糖基化亲和素”) 和 / 或其高碱性电荷 (“中性亲和素”) 的亲和素的修饰形式也可用于本发明。

[0047] 本文使用的术语“残基”是指天然、合成或修饰的氨基酸。

[0048] 本文使用的“抗体”是指实质上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的一种或一种以上多肽所构成的蛋白质。被识别的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 以及 μ 恒定区基因, 以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分为 κ 或 λ 。重链分为 γ 、 μ 、 δ 或 ϵ (又分别定义免疫球蛋白类型 IgG、IgM、IgA、IgD 以及 IgE)。

[0049] 已知典型的免疫球蛋白 (抗体) 结构单元包括四聚体。各四聚体由两个相同的多肽链对组成, 各对多肽链具有一个“轻”链 (约 25kD) 和一个“重”链 (约 50-70kD)。各链的 N 端定义主要负责抗原识别的具有约 100 至 110 或更多氨基酸的可变区。术语“轻链可变区” (V_L) 和“重链可变区” (V_H) 分别是指这些轻链和重链。

[0050] 抗体作为完整的免疫球蛋白存在或作为使用多种肽酶消化而产生的许多良好表征的片段存在。因此, 例如胃蛋白酶在绞链区的二硫键下消化抗体而产生 $F(ab)'_2$ ——Fab (自身是通过二硫键与 V_H - C_H1 连接的轻链) 二聚体。可在温和条件下还原 $F(ab)'_2$ 以破坏绞链区中的二硫键, 从而将 $(Fab')_2$ 二聚体转化为 Fab' 单体。 Fab' 单体基本上是具有绞链区部分的 Fab (对于其他抗体片段的详细描述见, Fundamental Immunology, W. E. Paul 编辑, Raven Press, N. Y. (1993))。尽管根据对于完整抗体的消化定义了多种抗体片段, 本领域技术人员应理解这些 Fab' 片段可化学合成或通过利用 DNA 重组方法来从头合成。因此, 本文使用的术语“抗体”还包括通过对完整抗体进行修饰而产生的抗体片段

或使用 DNA 重组方法从头合成的抗体片段。优选的抗体包括单链抗体（作为单链多肽存在的抗体），更优选其中重链可变区和轻链可变区连接在一起（直接连接或通过肽连接体连接）而形成连续多肽的单链 Fv 抗体（sFv 或 scFv）。单链 Fv 抗体为共价连接的 V_H - V_L 异源二聚体，可由包括直接连接或通过肽编码连接体连接的 V_H 和 V_L 编码序列的核酸表达而来。Huston 等人 (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85 :5879-5883。在 V_H 和 V_L 各自作为单链多肽彼此连接时， V_H 和 V_L 结构域非共价结合。在丝状噬菌体表面表达的第一功能性抗体分子为单链 Fv (scFv)，然而，可选的表达策略也是成功的。例如，如果其中一个链（重链或轻链）与 g3 衣壳蛋白和作为可溶性分子输出至周质的互补链融合，Fab 分子可展示于噬菌体上。可在相同或不同复制子上编码两条链，重点是各 Fab 分子中的两条抗体链翻译后组装，并且该二聚体通过其中一条链与例如 g3p 键合而掺入至噬菌体颗粒中（见，例如，美国专利第 5733743 号）。本领域技术人员已知 scFv 抗体和许多其他结构，所述结构是将天然聚集的但从抗体可变区（V 区）化学分离的轻链和重链多肽转化为折叠成基本与抗原结合位点的结构相似的三维结构的分子（见，例如，美国专利第 5,091,513 号、第 5,132,405 号以及第 4,956,778 号）。特别优选的抗体应包括展示于噬菌体或酵母菌上的所有抗体（例如，scFv、Fv、Fab 以及二硫键连接的 Fv (Reiter 等人 (1995) Protein Eng. 8 :1323-1331)）。

[0051] 本文使用的术语“特异性结合”，当涉及 SHAL 或生物分子（例如，蛋白质、核酸、抗体等）时，是指对异源群体分子（例如，蛋白质和其他生物制剂）中的 SHAL 或生物分子的存在具有决定性的结合反应。因此，在指定条件下（例如，SHAL 情况的结合测定条件或核酸情况的严谨杂交条件），特定配体或 SHAL 优先结合其特定“靶”分子且不优先以显著量结合样品中存在的其他分子。

[0052] “效应剂”是指其活性为对于递送至和 / 或定位于靶（例如，在展示特征性标志物的细胞）所需的任何分子或分子的组合。效应剂包括但不限于标记物、细胞毒素、酶、生长因子、转录因子、药物、脂质、脂质体等。

[0053] “报告剂”是提供可检测信号的效应剂（例如，是可检测的标记物）。在一些实施方式中，报告剂自身不需要提供可检测的信号，但可仅提供随后可结合可检查标记物的部分。

[0054] 术语“保守性取代”用于蛋白质或肽以反映基本不改变该分子的活性（特异性或结合亲和力）的氨基酸取代。通常，保守性氨基酸取代涉及一种氨基酸取代另一种具有相似化学特性（例如，电荷或疏水性）的氨基酸。下列六组各自包含典型的相互保守性取代的氨基酸：1) 丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)；2) 天门冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E)；3) 天门冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)；4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K)；5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V)；以及 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)。

[0055] 术语“附加表位”或“亲和标签”在本文中可互换使用，通常是指由抗体或其他结合配偶体特异性识别的分子或分子的结构域。该术语还指结合配偶体复合物。因此，例如，将生物素或生物素 / 亲和素复合物均视为亲和标签。除了在表位 / 抗体相互作用中识别的表位外，亲和标签还包括由其他结合分子识别的“表位”（例如，受体结合的配体），其他配体结合以形成异源二聚体或同源二聚体的配体，Ni-NTA 结合的 His₆，亲和素、链霉亲和素结合的生物素，或抗生物素抗体等。

[0056] 附加表位为本领域技术人员公知。另外，许多种附加表位的特异性抗体可商购获得。这些包括但不限于针对 DYKDDDDK (SEQ ID NO :1) 表位的抗体，c-myc 抗体（可获自

Sigma, St. Louis), HNK-1 碳水化合物表位, HA 表位, HSV 表位, His 表位特异性抗体 (见, 例如 Qiagen) 识别的 His₄、His₅ 以及 His₆ 表位等。另外, 表位标记的蛋白质的载体可商购获得。因此, 例如, pCMV-Tag1 载体是一种被设计用于在哺乳动物细胞中基因表达的表位标记载体。插入 pCMV-Tag1 载体中的靶基因可使用 FLAG[®] 表位 (N 末端、C 末端或内部标记)、c-myc 表位 (C 末端) 来标记或同时使用 FLAG 表位 (N 末端) 和 c-myc 表位 (C 末端) 两者来标记。

[0057] PEG 型连接体是指包含聚乙二醇 (PEG) 的连接体。

附图说明

[0058] 图 1 描述了一种生成 SHAL 的方法, 该方法通过如下步骤进行: 鉴定结合靶 (例如, 包含 Lym-1 表位 (红色、绿色、黄色氨基酸) 的 HLA-DR10) 表面上的两个独特位点的单个配体 (蓝色) 并将它们合成性连接在一起以产生结合所述两个位点的分子。

[0059] 图 2 描述了含有例如大量正常组织和淋巴细胞新生物之类的组织微点阵的使用。这些组织可使用生物素标记的 SHAL 来处理, 使用若丹明标记的链霉亲和素进行漂洗, 并通过荧光显微术来评价 SHAL 的结合。

[0060] 图 3 描述了包括苏木素和伊红染色、福尔马林固定、石蜡包埋组织核心的人组织微点阵。所有四个小图均来自单个的 ScanScope 数字化图像。这描述了所记录的图像的高分辨率。可捕获免疫组织化学或 SHAL 结合研究的相似图像。以该方式, 使用点阵的研究者具有所有适用于点阵的研究的容易的共享途径。

[0061] 图 4A 描述了正常 MUC-1 的结构。异常 MUC1 (也是良好的靶) 较少糖基化, 具有暴露的 VNTR, 和串联重复单元: 20aa GVT SAPDTRPAPGSTAPPAH (SEQ ID NO: 2)。图 4B 描述了 MUC-1 的串联重复结构域的保守性结构特征。这些特征包括由跨越串联重复界面 (残基 17-27、37-47) 的连续回折构成的重复突出把手样结构, 和由聚脯氨酸 II 和 β 链结构构成的扩展区 (残基 10-15、30-35、50-55)。由于缺乏邻接的串联重复, N 末端和 C 末端 2-3 个残基是无序的。

[0062] 图 5 描述了由抗 muc-1 单克隆抗体染色的前列腺癌组织点阵。

[0063] 图 6 显示了前列腺癌具有与分级和分期相关的 MUC-1 肽染色增加。

[0064] 图 7 显示了在 4 级前列腺癌中表现靶表位的抗 MUC1 肽核心 MoAb BrE-3。在不同分级的前列腺癌中 MUC-1 上的“把手”不同。因此, 可将 SHAL 设计成结合“把手”和可用于对恶性组织进行分级。

[0065] 图 8 描述了 HLA-DR 分子与已知的晶体结构的氨基酸序列比对。PDB 密码子鉴定 HLA-DR1 (1aqd)、HLA-DR2 (1bx2)、HLA-DR3 (1a6a) 以及 HLA-DR4 分子 (1dm5) 序列。1i3r 是同源性 MHC 融合蛋白。Hla_DR10: (SEQ ID NO: 3), 1aqd_B: (SEQ ID NO: 4), 1d5m_B: (SEQ ID NO: 5), 1bx2_B: (SEQ ID NO: 6), 1a6a_B: (SEQ ID NO: 7), 1i3r_B: (SEQ ID NO: 8)。

[0066] 图 9 是显示两个结构域的 HLA-DR10 的 β 亚单位的同源性模型 (见附录颜色)。

[0067] 图 10 显示了 HLA-DR3 晶体结构 (淡蓝色, 透明原子) 和 HLA-DR10 的同源性模型 (深蓝色, 实心原子) 的重叠, 显示在包含 Lym-1 表位的 β 亚单位区域中的结构相似性。对于 Lym-1 结合来说关键的氨基酸残基显示为空间填充原子。

[0068] 图 11 显示了 HLA-DR10 和 HLA-DR3 的 β 亚单位的表面图, 显示在包含 Lym-1 表位

的蛋白质的区域中“口袋”结构的差异。电荷分布显示为深蓝色（阳性或碱性）、红色（阴性或酸性）以及淡蓝色（中性或疏水性）。半胱氨酸中的硫原子以黄色显示。

[0069] 图 12 描述了定义为位点 1（红色）和位点 2（蓝色）的两个“口袋”的位置，它们围绕在对于 HLA-DR10 的 β 亚单位上的 Lym-1 结合（黄色）而言关键的氨基酸周围。这两个位点被靶向用以配体结合，并用于计算对接研究。

[0070] 图 13A 和 13B 描述了通过将被鉴定结合 HLA-DR10 的单个配体的合适配对进行组合而合成的二齿 SHAL。图 13A 描述了三种分子。图 13B 描述了通过将脱氧胆酸和 5-亮氨酸-脑啡肽连接在一起而合成的两种 SHAL，这两种 SHAL 显示以 nM 亲和力结合分离的 HLA-DR10。红色部分是一种配体（脱氧胆酸），绿色是另一种配体（例如，5-亮氨酸-脑啡肽），蓝色是用于形成最短连接体的赖氨酸，黑色是下列物质的组合：用于使两种配体之间的连接体较长的 PEG 分子，和与 SHAL 连接用于检测目的的生物素分子。

[0071] 图 14 描述了 JP459B 的二价形式的结构。红色为脱氧胆酸，绿色是 5-亮氨酸-脑啡肽，蓝色是赖氨酸连接体，黑色是 PEG 连接体和生物素。

[0072] 图 15 显示了描述基于同源性的蛋白质建模的主要步骤的流程图。

[0073] 图 16 描述了 DOCK 算法。(1)“负像”通过使用球体填充“口袋”而生成。(2)候选配体通过对数据库检索得到。(3)在亚组球体中心和配体原子之间对内部距离进行匹配（通常选择 3 至 8 个中心）。(4)使配体朝向活性位点。(5)通过评分函数来评价该朝向的相互作用；对于新的朝向重复该过程——通常每个配体产生 10,000 个朝向。保留最高评分的朝向。对于数据库中的新配体重复该过程。

[0074] 图 17A 和图 17B 描述了 SHAL JP459B 与展示 HLA-DR10 的细胞的结合。图 17A 描述了与小细胞淋巴瘤相比在大细胞淋巴瘤上 SHAL JP459B 和 Lym-1MAb（单克隆抗体）结合增加（小图 A-D），并且在使用链霉亲和素辣根过氧化物酶（SHRP）和生物素化 SHAL 包被的培养板上 SHAL JP459B 选择性结合活 Raji 细胞（结晶紫染色），但不结合其他细胞类型（小图 E-H）。（小图 A-D）将 SHAL 与 SAHRP 一起预孵育并通过 DAB 试剂进行检测。使用生物素化抗小鼠 MAbs 检测 Lym-1 结合，之后使用 SAHRP 和 DAB 检测 Lym-1 结合。小图 A）大细胞淋巴瘤上的 SHAL；小图 B）小细胞淋巴瘤上的 SHAL；小图 C）大细胞淋巴瘤上的 Lym-1MAb；小图 D）小细胞淋巴瘤上的 Lym-1MAb。（小图 E-H）图像显示了 SHAL JP459B 与活 Raji 细胞的选择性结合（小图 E），但不与非淋巴瘤 LnCAP（小图 F）、22RV（小图 G）或 DU145（小图 H）细胞系结合。图 17B 显示 SHAL JP459B 仅与含有 HLA-DR10 的活培养肿瘤细胞结合，使用链霉亲和素过夜包被培养板，洗涤培养板并然后添加 SHAL，孵育 2 小时，之后再洗涤以去除未结合的 SHAL。然后，添加细胞。洗涤细胞并使用甲酚紫染色。

[0075] 图 18 显示了非何杰金氏淋巴瘤的组织切片，描述了淋巴瘤细胞的 JP459B 染色定位于细胞膜。

[0076] 图 19 描述了 Raji 肿瘤小鼠中的 ^{111}In -DOTA[SHAL 070804(LeacPLD)₂LPDo] 的生物分布。

[0077] 图 20 描述了在存在和不存在 Lym-1 抗体的情况中，单价二齿 SHAL 和二价二齿 SHAL 070804LeacPLDB 与 Raji 细胞的结合。

[0078] 图 21 描述了多种类型的 SHAL 靶。

[0079] 图 22 描述了与 DOTA 连接的 SHAL。红色部分是一种配体（脱氧胆酸），绿色是另

一种配体 (5-亮氨酸-脑啡肽), 蓝色是用于形成最短连接体的赖氨酸, 黑色是下列物质的组合: 用于使两种配体之间的连接体较长的 PEG 分子, 与用以结合放射性金属的 SHAL 连接的 DOTA 环。

[0080] 图 23 显示了 JP7001.2 和三碘甲状腺原氨酸-脱氧胆酸 SHAL 的化学式。

[0081] 图 24A 和 24B 显示了下列物质的二维化学结构和首字母缩略词: 三齿 SHAL (图 24A) DvLPLLtPCbPLDo ; 具有 Ct 配体的 (4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸 PEG 赖氨酸赖氨酸 3-(2-([3-氯-5-三氟甲基]-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸 PEG 4-[4-(4-氯苄基)哌嗪并]-3-硝基苯甲酸赖氨酸-DOTA (图 24A 插图); 以及二聚体三齿 SHAL (图 24B) $(\text{DvLPLLtPCbPPP})_2\text{LLDo}$; ((4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸 PEG 赖氨酸赖氨酸 3-(2-([3-氯-5-三氟甲基]-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸 PEG 4-[4-(4-氯苄基)哌嗪并]-3-硝基苯甲酸 PEG PEG PEG) $_2$ 赖氨酸赖氨酸-DOTA。在多种实施方式中, 生物素化 SHAL 类似物仅仅在生物素取代 DOTA 螯合剂方面不同, 各 SHAL 的右上方。

[0082] 图 25A 和图 25B 描述了二聚体 SHAL $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$ (图 25A) 和六精氨酸类似物 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$ (图 25B) 的结构。

[0083] 图 26 描述了 ^{111}In 放射性标记的 SHAL $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$ 与其六精氨酸类似物 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$ 与 Raji 细胞的结合。与 Raji 细胞 (未洗涤) 结合的总 ^{111}In - $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$, 实心方块; 与 Raji 细胞 (未洗涤) 结合的总 ^{111}In - $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$, 空心方块。将含有 10^6 个细胞的细胞沉淀重悬浮于含有 0-25ng 的 ^{111}In 标记 SHAL 的 $150\ \mu\text{L}$ 5% BSA/PBS 缓冲液中, 并在室温下孵育 1 小时。对样品进行离心, 以将细胞与上清液分离, 在校准 γ 井式计数器中对两者进行计数以对结合的 SHAL 和未结合的 SHAL 进行定量。对于各数据点包括误差条, 但在大多数情况中, 误差小于数据点且误差条是不可见的。

[0084] 图 27 显示了与其六精氨酸类似物 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$ (中行) 相比母体 SHAL $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$ (上行) 与活 Raji 细胞结合的荧光三维共聚焦显微图像。显示了 Raji 细胞中的两个中间细胞焦平面 (左向右)。使用 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$ 处理的 Jurkat 细胞 (左小图, 底行) 显示了 SHAL 摄取最少。Lym-1 (右小图, 底行) 主要表现了与 Raji 细胞的细胞表面膜结合。母体 SHAL 显示了细胞内结合, 而六精氨酸类似物不仅表现了显著的细胞质结合还表现了核内靶向。在这些合并的连续激光图像中, DAPI 用作核染料, AlexaFluor 610 显示了 SHAL 的位置。

[0085] 图 28 显示了含有 Ct 配体的三齿 SHAL 的结构的二维示意分子结构 (上图) 和三维空间填充分子结构 (下图)。用于产生该 SHAL 的配体为 4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸 (Dv), 4-[4-(4-氯苄基)哌嗪并]-3-硝基苯甲酸 (Cb) 和 (3-(2-([3-氯-5-三氟甲基]-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸 (Ct)。第一赖氨酸残基提供了用于诸如金属结合大环和生物素之类的部分的共价结合的游离胺。另外的赖氨酸残基用于生成连接体中的分枝点, PEG 单体用于提供配体之间合适的距离。通过将三种配体与 HLA-DR10 的 β 亚单位中的空穴 (侧邻显示对于 Lym-1 结合和细胞毒性来说关键的精氨酸 70) 对接来鉴定这三种配体。可通过嵌入另外的赖氨酸残基并将它们与原赖氨酸的游离 ϵ 胺连接而在沿连接体的特定位置掺入功能性分子。

[0086] 图 29 表达人 HLA-DR10 的 Raji 淋巴瘤细胞中 SHAL 细胞毒活性的滴定。在以所示

的浓度添加 SHAL 之后 1、2 或 3 天观察无活力的细胞的绝对数量。在第 2 天分别测定 SHAL 阈值和 IC_{50} 浓度为 0.7 和 2.5nM (pm/ml 培养基) (平均值 $\pm$ SD)。

[0087] 图 30 是带有 Raji 异种移植物的老鼠中治愈的摄影证据：在 SHAL 处理前（上图），在初始和第二次的 100ng SHAL 剂量腹腔内注射之后一周。在初始剂量之后 3 周，异种移植物完全消退，并在持续小鼠观察期内表现了治愈（> 84 天，下图）。

[0088] 图 31 显示了 SHAL 对于带有建立的 Raji 或 Jurkat 淋巴瘤异种移植物的老鼠总存活期影响。每周一次使用 100ng SHAL 腹腔内注射来处理每只带有 Raji 或 Jurkat 异种移植物的老鼠，连续 3 周，或不处理。带有处理的 Raji 异种移植物的老鼠（黑圆）具有最长的存活期，而带有处理的 Jurkat 异种移植物的老鼠（方框）存活不超过 56 天。带有扩大异种移植物的两只未处理的老鼠（空心环）存活 84 天。

[0089] 图 32 从未处理的老鼠和在 SHAL 处理后 24 小时的老鼠移除的 Raji 异种移植物的电子显微镜照片。未受处理（左图）的侵袭性异种移植物的细胞结构正常，而 SHAL 处理的异种移植物中的细胞显示染色质浓集和断裂以及与自体吞噬死亡一致的细胞质结构丧失（右图）（刻度条，5 μ m）。

具体实施方式

[0090] 本发明涉及研制一类可用于特异性结合几乎任何靶分子的新型结合分子。该类结合分子在本文被称为选择性高亲和力配体或“SHAL”。SHAL 可以以类似于抗体的方式用于许多种情况，所述情况包括但不限于在亲和柱中用于纯化生物物质或其他物质的捕获试剂、生物传感器中的结合剂、用于组装纳米颗粒或纳米仪器的制剂、诊断制剂以及治疗剂。

[0091] SHAL 还可用于检测可区分多种病原体类型或株系的分子标志物。SHAL 还用于生物防御用途，用于检测存在于毒素中和病原生物表面的独特蛋白标志物，并将这些生物威胁因子与天然存在的无害物质进行区分。因为当 SHAL 暴露于环境时可相对稳定，它们尤其特别适用于生物防御的生物传感器、诊断以及其他应用。

[0092] 在一些优选的实施方式中，SHAL 用于癌症诊断和 / 或治疗。在这些实施方式中，将 SHAL 定向癌症（例如，多种恶性细胞）表面的独特和 / 或特异性位点（例如，癌症特异性标志物）。

[0093] 在一些实施方式中，当以其自身进行给药时（例如，以类似于抗体治疗剂 Herceptin™ 的方式），SHAL 可具有治疗作用。SHAL，与抗体类似，可对恶性细胞具有导致细胞死亡的直接作用，这是因为 SHAL 用作针对正常途径的激动剂，从而启动或阻断关键的细胞功能并导致恶性细胞死亡。SHAL 还可用作疫苗，这是因为它表现了畸变细胞表面标志物或增强常见的恶性细胞标志物而提供了恶性细胞识别。

[0094] 另外（或可选地），SHAL 可用作靶（当与靶细胞结合时），或用作其他效应剂的运载体（靶向部分），所述效应剂包括但不限于诸如细胞毒性剂、免疫系统识别的标志物、可检测标记物（用于成像）等之类的试剂。

[0095] 放射性同位素是细胞毒性效应剂的有吸引力的实例，所述细胞毒性效应剂可连接至载体 SHAL 以选择性递送放射性治疗剂至恶性细胞。该治疗剂可作为单剂型治疗剂给药，或与骨髓重建联合给药以实现较大的剂量强度，或与可增强对恶性病的辐射效应的其他药物联合给药。尽管具有许多可与 SHAL 联合的不同药物（化疗制剂、生物制剂以及其他种

该分子可结合更多种蛋白质的几率,但我们观察到,该非特异性结合是微弱的(大约与游离配体相同),且仅通过其中一个配体与非靶蛋白连接的那些分子不会保留长时间结合。当二齿 SHAL 中的两个配体或所有组成多齿 SHAL 的配体均结合其各自的靶(例如,靶蛋白上的“口袋”)时所观察到的亲和力和选择性提高源于下列与 SHAL-靶相互作用性质相关的三种因素:首先,连接体的存在防止与其靶解离的组成 SHAL 的单个配体从靶表面扩散,显著增加游离配体再结合的速率;其次,下述事实说明了二齿或多齿 SHAL 释放速率下降:即,组成 SHAL 的两个(或所有)配体同时从其靶释放的概率显著低于任一配体释放的概率;组成 SHAL 的配体之间的距离(通过连接化学方法(例如,连接体)测定)使得组成 SHAL 的配体同时与其靶结合,只要配体由正确的距离分开。如果 SHAL 中的任一配体独立地与另一靶结合,其低亲和力(对于我们鉴定的配体,通常为 1-10 微摩尔亲和力)会导致配体迅速解离(解离速率高)。因此,其中二齿或多齿 SHAL 与期望的靶紧密结合(纳摩尔亲和力或更高)的情形仅为组成 SHAL 的两个配体均同时与靶分子(例如,靶蛋白)结合。一旦两个或所有配体均被结合,整个分子(SHAL)的解离速率显著降低。如果配体结合位点选择合适(例如,通过在蛋白靶的情况中氨基酸序列或结构不同的靶向区域),在由相同距离分开的另一靶上可见相同位点变得可能性极低。如果该极不可能的事件发生,则可鉴定另外的配体结合位点(例如,近邻位点 1 和位点 2 的第三结合位点),且另外的配体可掺入 SHAL(例如,生成三齿、四齿等的 SHAL)。

[0104] SHAL 相对于抗体具有一些优点,特别是在治疗和/或诊断用途中。通常,SHAL 比抗体小得多。因此,它们能够实现较大的肿瘤穿透。在一些实施方式中,它们还能够跨越血脑屏障,例如,用于治疗脑肿瘤。我们相信 SHAL 还常常比抗体的免疫原性低,且常常较慢从循环中清除。

[0105] 在一些实施方式中,本文描述的 SHAL 通常是多齿,即,SHAL 包含两个或两个以上配体,所述配体直接连接在一起或通过一个或一个以上连接体连接在一起。在一些实施方式中,配体结合 SHAL 所定向的靶的不同部分(例如,单个蛋白质上的不同表位)。在一些实施方式中,配体结合不同分子,例如,癌细胞上的不同癌症标志物,包含受体的不同蛋白质,等等。在一些实施方式中,多特异性 SHAL 可用于交联相同细胞上的相同或不同抗原,从而增强信号转导,或用于预靶向,例如,其中,一个 SHAL 被设计成靶向恶性细胞并与被设计成“捕获”继后给药的细胞毒性剂的载体(例如,螯合的放射性金属等)的其他 SHAL 连接,募集免疫原性活性细胞(例如,巨噬细胞、T 细胞等)至位点、激活靶向 SHAL 上的前药,等等。

[0106] 在一些实施方式中,该“多特异性”是通过使用多价 SHAL 来实现。多价 SHAL 为其中两个或两个以上 SHAL(例如,两个或两个以上二齿 SHAL)连接在一起的分子。组成多价 SHAL 的不同 SHAL 可定向至相同或不同的靶,例如,如上所述的靶。

[0107] I. SHAL 的构建

[0108] 本发明的 SHAL 通过鉴定结合(在一些实施方式中特异性(或优先)结合)靶分子或分子的不同区域的配体(结合部分)来生成。然后将结合靶分子不同区域的配体直接连接或通过连接体连接,以产生包含两个不同结合部分的二齿 SHAL 或包含两个或两个以上不同结合部分的多齿 SHAL。然后可对 SHAL 筛选其结合期望的靶的能力。

[0109] 结合靶的不同区域的配体的初始鉴定可使用计算机虚拟方法(例如,计算方法)和/或经验方法(例如,如本文所述)来实现。

[0110] 一旦鉴定了两个或两个以上合适的配体（结合部分），则可任选地筛选（有效）它们在不同位点结合靶的能力。然后，可将合适的结合配体直接偶联在一起或通过连接体偶联在一起，以形成二齿或多齿 SHAL，之后可任选地筛选所述二齿或多齿 SHAL 结合靶的能力。

[0111] A) 靶选择

[0112] 实际上，任何分子、受体、分子的组合可用作 SHAL 的靶（见，例如图 21）。通过 SHAL 的预期用途来确定靶选择。因此，例如，在 SHAL 有待掺入亲和柱（例如，用以纯化蛋白质或核酸）的情况中，所述靶是有待使用包含 SHAL 的亲和柱纯化的分子（例如，蛋白质、核酸等）。

[0113] 在 SHAL 用于治疗 and / 或诊断癌症的情况中，所述靶通常为分子、分子集合、受体、酶或其他癌症特征性结构（例如，相对于正常健康细胞，允许 SHAL 优先结合癌细胞的结构）。

[0114] 许多癌症特异性标志物为本领域技术人员已知。这样的标志物包括但不限于 Lym-1 表位、Muc-1、C-myc、p53、Ki67、erbB-2、Her2、Her4、BRCA1、BRCA2、Lewis Y、CA 15-3、G250、HLA-DR 细胞表面抗原、CD2、CD3、CD7、CD19、CD20、CD22、整合素、EGFr、AR、PSA、癌胚抗原（CEA）、L6 细胞表面抗原（见，例如，Tuscano 等人（2003）*Neoplasia*, 3641-3647 ;Howell 等人（1995）*Int J Biol Markers* 10 :126-13 ;Marken 等人（1992）*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 :3503-3507, 1992）、生长因子受体和 / 或多种细胞内靶（例如，受体、核酸、磷酸激酶等），等等。

[0115] 在一些实施方式中，可将 SHAL 生成用于细胞表面膜靶蛋白，所述细胞表面膜靶蛋白影响细胞内功能，从而通过阻断其他分子结合或导致抑制性细胞内信号或增强的细胞内信号（例如磷酸激酶信号传导）来促进这些功能（激动剂）或抑制这些功能（拮抗剂）。可将 SHAL 生成用于可被内化至细胞内的诸如抗原和抗体之类的细胞表面膜靶蛋白。与靶向内化抗原的抗体和靶向内化受体的肽配体相同，这些 SHAL 将被内化，并位于细胞中，在细胞中因为它们的激动剂或拮抗剂功能或因为它们递送毒素或放射性同位素有效载荷，它们可对关键的细胞功能（例如，原癌基因、磷酸激酶、溶酶体以及 DNA/RNA/mRNA）具有激动剂或拮抗剂作用。SHAL 相对于抗体和肽配体具有几种优点。它们包括尺寸小，以及当细胞内分子为原始靶时可用于允许自由移动至细胞内并位于细胞内的电荷范围。

[0116] SHAL 可通过其膜靶用于优先选择特异性细胞，当从靶细胞表面膜解离时，可自由穿过细胞表面膜移动而达到细胞内。可将 SHAL 制备成具有多特异性，使得当其被内化时或当其从细胞表面膜解离并穿透细胞表面膜时，第二特异性可允许靶向内部的细胞分子，例如，磷酸激酶、溶酶体酶、激素受体、基因和原癌基因蛋白产物、DNA/RNA/mRNA，等等。在一些实施方式中，可生成下述非特异性但多价 SHAL，即，两者均靶向细胞表面分子，并与这些分子交联，导致生物效应（已对于交联的抗体 - 抗原系统作过描述）提高。

[0117] 与通常不能直接并容易地穿透细胞表面膜的抗体和肽配体相比，由于 SHAL 尺寸小并且具有选择 SHAL 的疏水或亲水特性的能力，可生成能够穿透细胞膜和多种细胞内腔室的 SHAL。这使得可以出于靶向对于细胞功能（例如原癌基因、磷酸激酶、溶酶体酶和其他酶、DNA/RNA/mRNA 等）来说重要的细胞内分子的目的来生成 SHAL。该能力使得靶向对于细胞功能来说极其重要的细胞内分子的全部类型成为可能，而这是先前通过特异性靶向分子

不能实现的能力。除了这些 SHAL 的直接作用以外,它们还可用作有效载荷的载体(如本文所述)。

[0118] 原癌基因产物提供了一类可由 SHAL 靶向并在癌症治疗中产生有效效应的细胞内靶的实例。注意到,原癌基因编码的 Ras 蛋白在体外被注射至细胞中的抗体靶向,该阻断导致细胞不再分裂。突变与这些产物的调控活性受损有关。

[0119] 许多信号传导途径易受 SHAL 对细胞内分子的一步靶向(直接细胞内)或两步靶向(膜靶向,然后内化)的干扰。这些包括但不限于如下关键途径,例如,“G”蛋白信号传导,酪氨酸特异性蛋白激酶活性,例如 EGFR、Neu 等。多种激素受体干扰也可被 SHAL 靶向而产生细胞功能和/或细胞生长的变化。激素或酶靶可被结合并且其功能被阻断。可有用的激素受体阻断包括使用 SHAL 来阻断雌激素样分子与 ER(雌激素受体)结合并对 AR(雄激素受体)具有相似效应。这继而干扰该复合物的 DNA 结合,导致干扰激素敏感性肿瘤细胞生长和活力。

[0120] 本发明还考虑了使用 SHAL 来治疗感染性疾病(例如,AID、流行性感冒等),这是通过 SHAL 主要结合感染原和/或阻断细胞侵袭和/或通过 SHAL 阻断对于所述感染原的增殖关键的代谢途径(例如,通过阻断 CCR5 来防止细胞的 HIV 感染)而进行的。

[0121] 在 SHAL 所定向的靶包括蛋白质的情况中,在一些实施方式中,组成 SHAL 的至少一个配体(结合部分)与蛋白质中的“口袋”结合。在一些实施方式中,在组成 SHAL 的至少两个结合部分与蛋白质的“口袋”结合的情况中,这两个配体结合不同“口袋”。在一些实施方式中,组成 SHAL 的所有配体均与靶蛋白中的“口袋”结合。这并非表明,所有组成 SHAL 的配体均必须与蛋白质“口袋”结合。本发明考虑了其中一个配体结合“口袋”而另一个配体结合非“口袋”的区域或其中无一配体结合“口袋”的一些实施方式。

[0122] 当不能获得特定靶(例如,癌症标志物或癌症标志物中的结构域或表位)的结构信息时,可将靶或靶中的结构域建模成鉴定用于设计用以该特异性靶的 SHAL 的配体结合位点。如果已经对靶进行了结构上的表征,则可以以该方式使用相关分子的晶体结构或核磁共振结构。在不能获得信息的情况(较不常见的情况)中,则可使用经验方法来鉴定用于构建本文所述的 SHAL 的合适配体。

[0123] 本文所述的经验方法还可用于加速 SHAL 研制的进程。在该情况中,可在本文所述的 SHAL 的经验研制之后进行建模和其他分析性步骤,以更好地理解 SHAL 和/或指导随后阶段的 SHAL 研制。

[0124] 尽管实施例描述了下述一种优选实施方式:即,其中预期 SHAL 作为成像和治疗性的放射性同位素(例如,铟-111 和钇-90)的载体用于诊断和治疗以及期望的靶是可见于恶性和正常 B 淋巴细胞上的 HLA-DR 细胞表面分子,因此可用于大多数淋巴瘤和白血病的实施方式,但是应该强调这仅仅是许多实施方式中的一种,即使在 B 细胞淋巴瘤和白血病中也是如此。例如,已知抗体用以鉴定已知对于 B 细胞淋巴瘤和白血病的抗体靶向具有吸引力的许多其他细胞表面抗原。这些还可出于与 HLA-DR 相同的目的和与其相同的方式来使用。另外令人感兴趣的是,由所设计的用于靶向 HLA-DR 的 SHAL 靶向的区域是已知对于免疫识别和免疫排斥重要的肽呈递的“凹坑”。甚至更重要的是,抗原和表位已经被表征,显示对于所有类型的腺癌的抗体靶向重要,包括乳腺癌、前列腺癌以及结肠恶性病。腺癌的异常粘蛋白和可丰富见于许多腺癌的 CEA 也提供了已相当良好表征的具有吸引力的靶。

[0125] 在一些实施方式中,我们相信粘蛋白(MUC1)的核心串联重复蛋白(见,例如,图4)提供了用以癌症定向的SHAL的良好靶。已显示在上皮癌上调和容易获得MUC-1,所述上皮癌例如前列腺癌、乳腺癌、结肠癌以及卵巢癌(见,例如,图5、6以及7)。

[0126] 使用位于多种单克隆抗体(mAb,包括针对MUC-1的那些抗体)上的Y-90的放射免疫疗法(RIT)已显示在患者的临床前研究和试验中的前景。这些研究已显示可使用放射性标记的mAb有效靶向上皮癌,MUC-1是较有吸引力的靶之一。然而,全部抗体均不容易在实体癌中浓集,且通常不穿透实体癌。因此,这些部分的治疗指数显示较低。

[0127] 然而,预期针对MUC1的蛋白核心串联重复(在患者的临床前研究和RIT试验中显示为在上皮癌上调的独特的抗原表位的一种表位)的MUC1定向的SHAL(例如,根据本文所述方法制备的)非常有效。SHAL(选择性高亲和力配体)相对于完整抗体(大约150,000D)、甚至单链可变区片段(大约25,000D)要小得多(大约2000D),以致SHAL容易穿透恶性肿瘤并在恶性肿瘤中浓集,或容易被肾脏清除或分泌。

[0128] 在一些实施方式中,除了被选择用于令人感兴趣的表位区域中的对接位点的一种或一种以上配体之外,另外的配体被选择用于靶上令人感兴趣的区域外的对接位点。这提供了较大的选择性和“有效的”亲和力。在多聚体靶(例如,HLA-DR)的情况下,可使另外的配体定向靶的相同亚单位或不同亚单位。具体地,在HLA-DR的情况下,可使一种或两种配体定向表位区域中已知的对接位点(因为Lym-1单克隆抗体反应性而定义的),并且可选择另外的配体用于相同或不同多聚体中的对接位点,例如,HLA-DR的 β 亚单位或 α 亚单位。

[0129] 其他实例是具有被选择与粘蛋白(例如上述MUC-1)的串联重复反应的配体的SHAL。在该情况中,核心蛋白以10mer的间距重复,使得具有相似或相同性质的SHAL可被连接,从而向相同或相似但不同的重复的已知(或未知)距离提供多价化学键。可选地,SHAL可具有第三配体,该第三配体与初始配体之一相同但以一定距离与MUC-1的核心串联重复的远区的对接位点连接。

[0130] 另外,除了空穴以外,对接位点还可为突起(protrusion),但空穴由于较多接触相互作用的潜能而可能赋予更大的亲和力。

[0131] B) 待筛选的化合物(推定的配体/结合部分)

[0132] 实质上,根据本发明的方法可以筛选任何制剂的结合靶的能力和因此掺入SHAL的适合度。这样的制剂包括但不限于核酸、蛋白质/肽、核酸或肽类似物、金属、糖、多糖、糖蛋白、脂质、凝集素、有机大分子和有机小分子、抗体CDR等。

[0133] 在一种优选的实施方式中,高通量筛选方法涉及提供含有大量潜在配体(结合部分)的组合性化学文库。然后,如本文所述地,以一种或一种以上测定筛选这样的“组合性化学文库”以鉴定表现所需结合活性的那些文库成员(特定的化学物质或其亚类)。因此所鉴定的化合物可用作SHAL的组分。

[0134] 组合性化学文库是通过将多种化学“基础材料”(例如试剂)组合的化学合成或生物合成而生成的不同化学化合物的集合。例如,诸如多肽(例如,突变蛋白)之类的线性组合性化学文库是通过将一组被称为氨基酸的化学基础材料基础材料以用于给定的化合物长度(即,多肽化合物中氨基酸的数量)的每一种可能方式组合而形成的。数百万化学化合物可通过这样的对化学基础材料的组合性混合而合成。例如,一位评论者发现,100种可互换的化学基础材料的组合性混合导致理论上合成1亿种四聚体化合物或100亿种五聚体

化合物 (Gallop 等人 (1994) J. Med. Chem., 37 (9) :1233-1250)。

[0135] 组合性化学文库的制备为本领域技术人员公知。这样的组合性化学文库包括但不限于肽文库 (见,例如,美国专利第 5,010,175 号; Furka (1991) Int. J. Pept. Prot. Res., 37 : 487-493; Houghton 等人 (1991) Nature, 354 :84-88)。肽合成决非本发明想象和预期的唯一方法。也可以使用其他用于生成化学物质多样性文库的化学方法。这样的化学方法包括但不限于:类肽 (PCT 公布第 W091/19735 号),编码肽 (PCT 公布第 W0 93/20242 号),随机生物寡聚物 (PCT 公布第 W0 92/0009 1 号),苯并二氮卓 (美国专利第 5,288,514 号),诸如海因 (hydantoin)、苯并二氮卓以及二肽之类的 diversomer (Hobbs 等人 (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90 :6909-6913),乙烯多肽 (Hagihara 等人 (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114 :6568),具有 β -D-葡萄糖支架的非肽肽模拟物 (Hirschmann 等人 (1992) J. Amer. Chem. Soc. 114 : 9217-9218),小化合物文库的类似有机合成 (Chen 等人 (1994) J. Amer. Chem. Soc. 116 : 2661),寡氨基甲酸酯 (Cho 等人 (1993) Science 261 :1303),和 / 或肽基磷酸酯 (Campbell 等人 (1994) J. Org. Chem. 59 :658)。通常见 Gordon 等人 (1994) J. Med. Chem. 37 :1385,核酸文库 (见,例如,Strategene, Corp.),肽核酸文库 (见,例如,美国专利第 5,539,083 号),抗体文库 (见,例如,Vaughn 等人 (1996) Nature Biotechnology, 14 (3) :309-314),和 PCT/US96/10287),碳水化合物文库 (见,例如,Liang 等人 (1996) Science, 274 :1520-1522,和美国专利 5,593,853),以及有机小分子文库 (见,例如,苯并二氮卓, Baum (1993) C&EN, Jan 18, 第 33 页,异戊间二烯,美国专利 5,569,588,噻唑烷酮和间噻嗪酮,美国专利 5,549,974,吡咯烷,美国专利 5,525,735 和 5,519,134,吗啉代化合物,美国专利 5,506,337,苯并二氮卓,美国专利 5,288,514,等等)。

[0136] 用于制备组合性文库的装置可商购获得 (见,例如,357MPS,390MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA)。

[0137] 在一些实施方式中,可以通过计算机虚拟筛选方法来进行用于构建 SHAL 的配体的初始筛选,在该情况中,不必要使用实质的化合物进行。在这样的情况中,化学结构数据库提供了宽范围的部分,所述部分因其适于包含在本文所述的 SHAL 中而可被筛选。

[0138] 化学结构数据库为本领域技术人员公知。例如,MDL® Available Chemicals Directory (MDL ACD) 目前是世界上可商购获得的化学物质的最大的结构可检索数据库,可获自 MDL Information Systems, Inc., San Leandro, California。该数据库仅用于示例,非意在限制。其他化学结构数据库 (例如,ChemSpider, ZINC 等) 为本领域技术人员公知,包括但不限于多种有机分子、肽、碳水化合物或核酸结构数据库。

[0139] C) 结合靶的配体的计算鉴定

[0140] 使用计算机虚拟方法,计算方法可用于表征 (例如,建模) 靶 (例如,靶蛋白) 并鉴定预期特异性结合靶的一些区域的分子 (结合部分)。使用计算方法来鉴定特异性结合特定靶的分子常常被称为“对接”。

[0141] 对接方法为本领域技术人员公知。两种对接的方法为“刚性分子对接”和柔性 (软性) 对接,在“刚性分子对接”中,所涉及的分子被作为在对接过程中不能改变其空间形状的刚性物体来处理,在柔性 (软性) 对接中,当分子对接时使 (计算地) 其改变形状。

[0142] 有几种在两个分子之间相互作用的物理力和化学力。这些力用于定义测量各解决

方法的质量的多种对接评分。这些评分考虑了这些力的强度和对接解决方法的合理性。在对接算法中通常考虑的最显著的力包括静电力、范德华力以及氢键。

[0143] 对接问题通常在形式上如下所述：使 A、B 为在 R3 中具有其几何表述的两种刚性分子（例如，靶和将与靶结合的潜在配体）。我们希望发现使得 $T \cdot A$ 和 B 之间的接触表面最大的刚性转化 $T : R3 \rightarrow R3$ 。通常将接触表面定义为其中分子之间的距离小于给定阈值的表面。通常对接算法试图实现“足够大”代替“最大”的接触表面，我们设法最大化的不是接触表面的尺寸，而是测量所建议的对接解决方法的质量评分。这两个参数具有相关性但非等同。

[0144] 1. 刚性对接

[0145] 刚性对接算法的一种方法由 Kuntz 等人 (1982) J. Mol. Biol., 161 :269-288 描述。Kuntz 等人的算法主要用于解决配体 - 蛋白质对接，与此同时设法集中于分子表面上的“令人感兴趣的”位点。该算法的基本阶段包括首先使用 Connolly 方法计算分子表面（见，例如，Connolly (1983) J. Appl. Crystallography, 16 :548-558 ;Connolly (1983) Science, 221 :709-713）。这产生了在“平滑的”分子表面上具有其法线的一组点。然后，使用“假原子”“球体发生器”（例如，SPHGEN）生成靶（例如，蛋白质）和配体分子表面的新的表述，然后使用该表述来发现分子表面上的合理对接位点——SPHGEN 所寻找的这些对接位点为受体表面中的空穴。

[0146] SPHGEN 通常由下述五个阶段组成：首先，对于 Connolly 点 p_i, p_j 上的各配对，放置穿过该配对的球体，使得其中心位于法线点之一上。然后该算法定义 $S_{\text{norm}}(i) = \{ \text{中心位于 } p_i \text{ 法线点上的球体} \}$ 。假定具有 n 个 Connolly 点，那么，对于各 $1 \leq i \leq n$ 且 p_i 位于靶表面上，我们舍弃 $S_{\text{norm}}(i)$ 中的所有球体，并仅留具有最小半径的一个。这舍弃了所有穿透靶表面的球体。然后该算法通常仅留其中 θ （例如， p_i 法线点和 p_j 至球体中心的半径之间的角度） $< 90^\circ$ 的球体。除非限定球体的点 (p_i 和 p_j) 相互之间太近，并因此不位于靶表面上的空穴内。随后该算法通常对于各原子仅保留具有最大半径的球体。该步骤仅保留“碰触”原子表面的球体。最后，如果限定球体的点 (p_i 和 p_j) 属于两个不同的原子，且分子序列上的这些原子之间的距离小于 4，则舍弃球体。这样做是因为 α 螺旋上的弯曲长度为 3.6，这些位点通常不作为可能的对接位点来处理。

[0147] 剩下的球体被称为假原子。下一阶段寻找成簇的交叉假原子。该类型的簇的存在表明分子表面中空穴的存在，所述空穴被认为是良好的对接位点。

[0148] 毕竟这是对于靶进行处理（对于配体进行相同处理），但这次我们取与其法线相对的点和矢量，以在表面内产生球体，而不是在表面外。关于靶的 SPHGEN 结果有时被称为“阴性图像”，关于配体的 SPHGEN 结果被称为“阳性图像”。在一些实施方式中，关于配体和靶的矢量可以逆转（例如，从而发现在配体的空穴内对接的靶成分）。

[0149] 然后通常进行“匹配”。在该操作中，对于各对接位点，该算法设法找到转化 T ，该转化 T 给出了靶的假原子中心与配体的那些假原子中心之间的良好对应（在有些情况中，配体的真原子的中心代替其假原子的中心使用）。在一些形式的 DOCK 中，将假原子簇分成亚簇，以改进该阶段的复杂性。这样做的一种方式舍弃簇中最大的球体，这有时导致簇分成两个亚簇。

[0150] 在刚性对接的匹配问题中，进行搜索以发现一个分子的平移和旋转，使得两个分

子中的令人感兴趣的点之间形成良好的匹配。在一些实施方式中,代替点位置使用的点之间的距离为:对于各分子,靶 (T) 和配体 (L),合适的距离点阵分别被定义为 $d_{i,j}^T$ 和 $d_{i,j}^L$ 。然后进行搜索以发现 T 和 L 中两个亚组,使得在容许一些误差的情形下它们的距离相同。这两个亚组定义了其顶点之间具有几乎相似距离的两幅子图。这可使用类似于 Grimson 和 Lozano-Perez 的解释树的方法来进行。

[0151] 解决匹配问题的另一种方式是发现匹配图中的“足够大的”分团 (clique)。如果靶中具有 n 个点,配体中具有 m 个点,则匹配图具有 $n*m$ 个顶点,其中各顶点代表来自靶的点和来自配体的点。使 $G = (V, E)$ 为匹配图,使 u, v 为 V 中的顶点,其中 u 代表 u_L 和 u_T (分别为配体的点和靶中的点), v 代表 v_L 和 v_T 。只有当 $ABS[d^L(u_L, v_L) - d^T(u_T, v_T)] < \text{容许误差}$ 时,将边 $e = (u, v)$ 添加至 E 。因此,匹配图中的分团定义了配体和受体中具有相似距离的点的子集。

[0152] 为了评估匹配的质量,计算评分。评分优选考虑分子之间接触表面的尺寸,且通常不允许一个分子穿透另一个分子。DOCK 算法使用填充结合位点的立方网格,该网格中的每个单元具有依据其与受体原子中心的距离的评分:如果距离为 $2.8\text{\AA} - 4.5\text{\AA}$,评分为 1,如果距离小于 $2.8\text{\AA}$,评分为 -127,如果距离大于 $4.5\text{\AA}$,评分为 0。(在一些情况中,距离 $2.8\text{\AA}$ 被 $2.4\text{\AA}$ 取代)。对于各个建议的转化,计算网格中配体点(即,其原子或假原子的中心)的位置,并将评分作为这些点的评分的总和来计算。在该算法的多种形式中可使用另外的或可选的评分。例如,在一种形式中,对于具有良好匹配评分的转化可计算范德华能量评分。

[0153] 构建 HLA-DR 10 的计算机模型。本文实施例中描述了:使用已确定用于四种密切相关的人类 HLA-DR 分子 (HLA-DR 1-4) 的晶体结构,鉴定蛋白质表面上的独特“口袋”,鉴定结合一些独特“口袋”的配体,以及使用这些配体构建 SHAL。

[0154] 前述说明意在描述一种刚性对接的方法,而并非意在限制。其他方法对于本领域技术人员来说是已知的。应注意,SPHGEN 和 DOCK 程序可商购获得(例如,从加利福尼亚大学和多个软件制造商直接获得)。

[0155] 2. 柔性(软性)对接

[0156] 柔性对接算法也为本领域技术人员公知(见,例如, Jiang 和 Kim(1991) J. Mol. Biol., 219:79-102; Katchalski-Katzir 等人 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89(6): 2195-2199, 等)。

[0157] 在 Jiang 和 Kim 描述的方法(见上文)中,对于刚性转化的六维空间进行计数,并根据这些转化的能量值来对这些转化进行评分。将两个分子置于网格上,并使用网格单元之间的距离、穿透的数量以及点法线的方向来评估匹配。对于 Connolly 算法的输出值来运行该算法并对于整个分子表面来运行该算法(即,没有寻找空穴——与 DOCK 算法相对)。为了减少计数,该算法通常使用两种分辨率——低分辨率和高分辨率。低分辨率每平方埃使用大约 0.3 点,高分辨率每平方埃使用大约 1 点。

[0158] 网格中的各单元被标记为“表面”(如果它含有至少一个 Connolly 点)或“体积”(如果它不含有任何 Connolly 点)。通常,各表面单元含有 2-3 个 Connolly 点。

[0159] 对于分子之一(通常较小的一个)的旋转进行计数。对于各旋转进行下述操作:计算分子的表面和体积单元。假定具有通过转化匹配的至少一对表面单元(来自各分子的一

个),对于这些所有配对进行计数。对于各配对计算转化,并通过检查法线的方向、表面-表面匹配的数目以及穿透的数目来评估转化。良好的转化是具有少数穿透和许多表面-表面匹配的那些转化。这首先在低分辨率进行,然后再在高分辨率下增加近似的能量评分来计算最好结果。根据“有利”和“不利”相互作用的数目来计算近似的能量评分。有几种对于各分子的原子分类,如果这些分类的组合良好促进匹配的能量合理性,则被标记为“有利”,否则被标记为“不利”。

[0160] 例如,将具有阳性电荷的原子置于接近具有阳性电荷的另一原子为不利,但如果其中之一是 H 供体而另一个是 H 受体的两个原子邻近,则为有利。

[0161] Katchalski-Katzir 等人的方法(见上文)是对于可能的平移进行计算,同时使用 FFT 来高效计算匹配评分。与前述算法相似,将两个分子均置于三维网格上,但这里三种类型的网格单元被定义为——“体积”、“表面”以及“中间”。如果分子为 A 和 B,则点阵 $A_{l,m,n}$ 和 $B_{l,m,n}$ 如下定义(l,m,n 为网格坐标):如果 (l,m,n) 是“表面”单元, $A_{l,m,n} = 1$, 如果 (l,m,n) 是“中间”单元, $A_{l,m,n} = q$, 否则, $A_{l,m,n} = 0$; 如果 (l,m,n) 是“表面”单元, $B_{l,m,n} = 1$, 如果 (l,m,n) 是“中间”单元, $B_{l,m,n} = r$, 否则, $B_{l,m,n} = 0$ 。

[0162] 在一些实施方式中,如下选择参数:使得 $q < 0$, $r > 0$, $|q|$ 大, $|r|$ 小。使用 FFT 来高效计算这些点阵的标量积,因此显著改进该算法的性能。

[0163] 另外,应注意的是前述说明意在描述一种刚性对接的方法,并非意在限制。其他方法为本领域技术人员已知。例如,另外的方法/程序包括但不限于:来自 Tripos(<http://www.biosolveit.de/FlexX/>) 的 FlexX,通常用于高通量筛选。它使用经验评分函数。它允许通过在扭转的化学键周围旋转以实现柔性对接。它作为 Sybyl 程序的模块(Tripos, Inc., St. Louis 发售)来售出;来自 CCDC 的 GOLD(<http://www.ccdc.cam.ac.uk/prods/gold/>),它使用遗传算法来生成配体的构象异构体。它还使得能够对于分子的较小片段内的扭转能量定制化,并可容纳局部蛋白柔性。Autodock UCSD(<http://www.scripps.edu/pub/olson-web/doc/autodock/>),它使用 Lamarckian 遗传算法来生成配体的构象异构体,当仅有少数配体且结合能量需要较准确时,AutoDock 最好用。关于对接的一些好的评述包括 Lyne(2002)Drug Discovery Today. 7(20):1047, 和 Taylor 等人(2002) J. Computer-Aided Mol. Design., 16:151。

[0164] D) 经验方法和配体结合的验证

[0165] 使用计算机方法来鉴定用于构建 SHAL 的配体至少需要关于靶分子结构的一些信息。本发明还构思了使用不需要关于 SHAL 有待定向的靶的结构的信息的方法。

[0166] 在一些“经验”实施方式中,针对靶分子和/或展示靶分子的细胞、细菌、病毒等来筛选单个配体或配体文库,以鉴定结合所需靶(至少低亲和力)的配体。鉴定结合靶分子不同区域的配体。在一些实施方式中,鉴定结合靶分子不同区域的配体且从这样的结合不相互排斥的配体。

[0167] 然后,可将可同时结合靶但不相互排斥的配体直接连接在一起或通过连接体连接在一起,以生成多齿 SHAL,随后所述多齿 SHAL 因其结合(例如以高亲和力)靶分子的能力可任选地被筛选出。

[0168] 除了用于配体鉴定的经验方法之外,对于证实使用上述计算机虚拟方法鉴定的配体的结合而言,物理筛选方法也是理想的。此外,另外确定两个或两个以上配体的结合方向

是理想的,例如,当配体掺入 SHAL 时用以证实配体结合靶上的不同位点和 / 或用以估计间距。

[0169] 用于检测一种或一种以上配体与靶结合的测定为本领域技术人员公知。例如,在一种简单的实施方式中,可使用可检测标记物来标记配体并使之与固定于基质上的靶分子接触。在洗涤之后,检测到与固定的靶分子结合的标记物表明配体与靶结合。在一些实施方式中,可使用不同的标记物(例如,不同颜色荧光标记物)来标记不同的配体,并可观察多种配体的同时结合。

[0170] 可选地,可进行竞争性结合测定。在这样的测定中,使靶分子与已知结合靶的一种配体接触。还使靶与“试验”配体接触,并评价在存在第一配体的情形下该试验配体与靶结合的能力。

[0171] 还可进行流体相测定。例如,可使用不同标记物来标记配体和靶。可使配体与靶分子接触,并可容易地评价(例如使用流式细胞仪)两者的结合。流式细胞计量术方法为本领域技术人员公知(见,例如, Omerod(1994)Flow Cytometry: A Practical Approach. IRL Press, Oxford.; Shapiro Practical Flow Cytometry. 第3版, Alan R Liss, Inc.; Givan(1992)Flow Cytometry. First Principles. Wiley-Liss, New York; Robinson(1993)Handbook of Flow Cytometry Methods, Wiley-Liss, New York, 等等)。

[0172] 还可使用多种不同方法来测定配体结合和方向。这些方法包括但不限于饱和转移差异核磁共振(Mayer 和 Meyer(1999)Angew Chem Int Edit, 38:1784-1788), 转移核欧沃豪斯效应(trNOE)核磁共振(NMR)光谱法(Henrichsen 等人(1999)Angew Chem Int Edit., 38:98-102; Cosman 等人(2002)Chem Res Toxicol 15:1218-1228)。这些方法可用于在每个实验中筛选混合物中的几种至几百种配体,以确定哪些配体与靶分子结合(例如,在生物相关条件下)并确定哪些配体与相同(或不同)位点结合。还可对于已经被确定结合的那些配体进行扩散实验(Lin 等人(1997)J. Organic Chem., 62:8930-8931)以评价各化合物的相对结合亲和力。

[0173] 其他检测配体与靶分子结合的方法包括但不限于表面等离子共振(BIAcore 测定)、饱和转移差异核磁共振光谱法、其他核磁共振光谱法检测、质谱法、捕获微点阵、基于微珠的文库测定以及其他物理结合测定。

[0174] 前述测定意在为说明性,并非限制性。使用本发明提供的教导,用于检测配体与靶分子结合的其他许多测定将是本领域技术人员知道的。

[0175] 在鉴定结合靶分子(例如,HLA-DR10)的一组配体之后,可进行竞争实验,例如,通过 NMR 来检测它们是否结合包含靶分子的“口袋”之一(例如,在 HLA-DR10 的情况中,结合包含 Lym-1 表位的“口袋”之一)。

[0176] 如上所述,这可通过制备靶和已知结合配体之间的复合物并确定是否第二配体可结合该复合物来容易地实现。因此,例如,在 HLA-DR10 靶的情况中,可制备 Lym-1:HLA-DR10 复合物,并可再检测结合 HLA-DR10 的那组配体,以确定当 Lym-1 抗体被结合时这些配体是否仍与蛋白结合。

[0177] 可鉴定不再结合 Lym-1:HLA-DR10 复合物的那些配体(这些配体结合区分 HLA-DR10 与其他 HLA-DR 分子的独特位点),并将它们用于第二组竞争实验,以鉴定结合 Lym-1 表位中不同位点的那些分子。在使用配体对进行的实验中,可将在缺乏 Lym-1 抗体的

情况下结合的配体和 HLA-DR10 蛋白之间发生的转移核欧沃豪斯效应 (trNOE) (Cosman 等人 (2002) *Chem Res Toxicol* 15:1218-1228) 用于鉴定结合相同和不同位点的那些配体。结合的配体表现阴性核欧沃豪斯效应 (NOE) 信号,而未结合的配体具有阳性信号 (见上文)。如果配对中的两种配体均被观察到同时与蛋白结合,则结果将表明两种配体必须结合不同位点。因此,筛选可容易地鉴定结合靶分子中不同位点 (例如,结合 HLA-DR10 的 Lym-1 表位中的不同位点 (位点 1 和位点 2)) 的多组配体。

[0178] 在鉴定了结合靶上不同位点的多组配体之后,可任选使用传统分子动力学模拟进一步评估结合位点中配体的方向。分子动力学的模拟方法在实施例清楚地描述。例如,对于各配体,可模拟结合“口袋”中的 1 至 3 个方向持续 500 微微秒。这将有助于确定配体上的哪些官能团可能与靶接触和哪些官能团易受溶剂影响。该信息可用于鉴定具有修饰的或不同的官能团 (可检测它们结合靶的能力) 的类似物,并证实特定官能团可用作连接体连接的位点而不破坏配体与靶的结合。

[0179] 文献中描述了使用这些方法用于鉴定结合多种靶上的特异性位点的配体。例如,这些方法已用于鉴定结合破伤风神经毒素的靶向结构域上的特异性位点的配体 (Cosman 等人 (2002) *Chem Res Toxicol* 15:1218-1228; Lightstone 等人 (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, 13:356-362), 和鉴定我们已经鉴定的结合 HLA-DR10 的 11 种配体。

[0180] 我们先前的研究使用相似方法鉴定结合破伤风神经毒素 (见上文) 靶向结构域上两个位点的配体,该研究要求实验性筛选少于 30 种配体。观察到超过半数的被预测结合蛋白质的配体实验性结合。因此,我们认为每个位点筛选一组 30 种配体会提供足够数量的结合以启动 SHAL 合成的化合物。然而,如果在一些实施方式中,在第一轮 NMR 筛选中没有鉴定出合适数量的配体 (例如,3-5) 以结合,则可选择另外的数组配体,并且对它们进行筛选,直至发现结合靶中两个不同位点的合适配体。

[0181] 在一些实施方式中,有待连接在一起的配体对 (或其他多配体组合) 的选择基于下列标准 (重要性逐级降低): 1) 结合位点 (构成一对的两种配体优选结合不同位点); 2) 所获得的可利用的官能团的信息的可靠性,该官能团可用于将分子与连接体连接而不破坏结合 (优选被证实结合的已知衍生物的类似物,表明特定官能团的修饰不影响结合); 3) 配体与连接体连接的期望的容易度 (配体优选具有促进将不同配体置于连接体的相对端的不对称连接化学方法的官能团); 4) 相对结合亲和力,例如通过 NMR 扩散实验检测的 (通常首先选择表现对蛋白质最强结合的配体); 5) 关于它们在动物或人类中的毒性的已知信息 (通常优选使用已知无毒性或已被允许用于其它药物制剂的配体); 以及 6) 配体价格。

[0182] 因为有可能许多单个配体 (单个部分) 可与其他蛋白质微弱结合,在单个配体用于生成 SHAL 之前预筛选单个配体以确定它们是否结合可在循环中遇到的其他蛋白质是不必要的 (或者无意义的)。预期任何单个配体 (用于生成二齿 SHAL 的配对的一半) 与其他蛋白质结合是微弱的 (充其量是微摩尔)。因此,分子的解离速率高,仅通过一个配体与其他蛋白结合的 SHAL 将从组织和循环快速去除。只有当配对中的两个配体同时与由合适距离 (由连接它们的连接体的长度来说明) 分开的位点结合时,才获得高亲和力 (和低解离速率)。只有当 SHAL 与期望的靶接触时才满足这两个标准。一旦结合,预期解离速率比对于任一配体单独观察到降低 1000 倍至 1,000,000 倍 (基于先前的研究)。出于该原因,预期交叉反应不会是显著的复杂情况。

[0183] E) 组合的计算方法 / 经验方法

[0184] SHAL 与其靶的区域的结合基于适合度 (fit) 和电荷,并取决于结合部分的三维结构和组成。在上述计算方法中,生成 SHAL 可涉及定义 / 鉴定靶分子上的有吸引力的区域。因此,例如,可对于所有类型的蛋白质,包括抗原、受体以及信号传导蛋白,进行建模以发现对接位点和配体。随后可使用经验方法检测配体。这些方法通常要求在建模中所包括的组成性分子的信息。

[0185] 上述经验方法依赖于筛选潜在配体文库 (例如,组合性文库) 以发现合适的结合剂。在该方法中,不需要除了令人感兴趣的靶 (例如,蛋白质、细胞等) 的可用性以外的预知信息。实验性筛选用于结合剂的文库。这之后可进行与分子的竞争,所述分子例如抗体、肽或已知与被选择用于靶向的区域中的分子反应的化学物质 (配体)。该方法允许去除令人不感兴趣的结合化学物质或肽,并定义结合令人感兴趣的区域的那些结合化学物质或肽。

[0186] 第三种方法在性质上处于中性,利用有吸引力的靶分子和这些分子的区域的信息用于初始的竞争性筛选和反筛选。因此,例如,可计算性预测初始靶或配体文库组分。然后,如本文所述,可筛选和反筛选优化的靶或靶集合和 / 或优化的文库,以鉴定最佳的结合剂。

[0187] F) 基于微珠的文库筛选

[0188] 用于筛选结合靶分子的配体的一种方法涉及产生包含大量潜在配体的组合性文库,所述配体各自附着于不同微珠 / 固体载体。组合性文库可为“随机”文库,或可被合成以提供多种具有例如特定 (例如,优化的) 核心化学性质的变异体。

[0189] 组合性合成方法是公知的并被用于快速制备不同化合物的大“文库”。在多种实施方式中,将初始材料 (例如,氨基酸) 共价锚定于固体载体。这之后分步添加诸如氨基酸、核苷酸、有机小分子等之类的单体 (通常为受保护的单体)。数百万的不同分子可通过许多不同步骤和许多反应试剂来生成 (例如,在分开 - 混合合成方法中),但通常各微珠仅含有一种化合物。

[0190] 可在组成文库的化合物仍与微珠结合的时候对其进行筛选。可使用比色法、荧光方法、放射摄影方法或其他方法观察阳性 (结合的) 微珠。这些可被捕获 (例如,使用移液管,如果微珠是磁性微珠则使用金属棒),然后可对化合物进行表征。

[0191] 因此,例如,可以合成结合 HLA-DR10 分子的肽配体的文库。已有对肽合成化学方法的完善研究。然而,为了获得在体内具有较长半衰期的肽配体,可以选择生成其中肽包含 D 氨基酸的肽配体文库。预期这样的肽对于体内蛋白水解具有更大的抵抗力。另外,通常认为 D 氨基酸无毒性。

[0192] HLA-DR10 上的 Lym-1 表位为高度极性。因此,在合成潜在结合剂的文库中,可以选择极性 D 氨基酸用于合成 (例如,Ser、Asp 等)。使用分开 / 混合合成 (见,例如,美国专利 5,574,656) 生成与微珠结合的 D 肽的文库。

[0193] 然后将 HRP 标记的 HLA-DR10 添加至微珠混合物。显现 HRP 的颜色标记物,并移取阳性微珠。然后,可针对例如 HLA-DR10 阳性细胞系来检测阳性微珠。在该测定中检测为阳性的微珠随后可针对例如组织切片来检测,以确保结合为 HLA-DR10 特异性。然后,可对该测定中的特异性结合剂进行表征 (例如,使用埃德曼降解、质谱法等来测序)。

[0194] 可选地,在文库合成过程中具有用于对各化合物的身份进行编码的策略 (见,

例如, 美国专利 5,565,324 ;5,723,598 ;5,834,195 ;6,060,596 ;6,503,759 ;6,507,945 ;6,721,665 ;6,714,875 ;等等)。从而,使用这样的“标记”策略,可容易地确定阳性结合剂的身份。

[0195] G) 连接配体(结合部分)以生成多齿 SHAL

[0196] 一旦鉴定了结合靶上不同位点的两种或两种以上配体(结合部分),则将所述配体直接连接或通过连接体连接,以生成多齿 SHAL。在仅两种配体被连接的情况中,SHAL 是二齿的。在三种配体被连接的情况中,SHAL 是三齿的,诸如此类。

[0197] 用于直接连接分子或通过连接体连接分子的许多化学方法是本领域技术人员公知的。用于将配体(结合部分)相互连接以形成 SHAL 的具体化学方法将取决于所需的配体的化学性质和“中间配体”间距。配体通常含有许多种官能团,例如,羧酸(COOH),游离胺基(-NH₂),所述官能团可用于与连接体上或其他配体上的合适官能团反应而在此结合配体。

[0198] 可选地,可将配体衍生成暴露或连接另外的反应性官能团。该衍生可涉及许多连接体分子中的任何连接体的连接,例如可获自 Pierce Chemical Company, Rockford Illinois 的那些连接体分子。

[0199] 本文所使用的“连接体”是用于连接两种或两种以上配体(结合部分)而形成多齿 SHAL 的分子。通常选择能够与组成 SHAL 的所有配体形成共价键的连接体。合适的连接体为本领域技术人员公知,包括但不限于直链或支链碳连接体、杂环碳连接体、氨基酸、核酸、树状聚合物、合成聚合物、肽连接体、肽以及核酸类似物、碳水化合物、聚乙二醇等。在组成 SHAL 的一种或一种以上配体为多肽的情况中,可通过连接体的侧基(例如,通过与半胱氨酸的二硫键)或通过末端氨基酸的 α 碳氨基或羧基将之与组成性氨基酸连接。

[0200] 在一些实施方式中,具有与第一配体上的基团反应的官能团和与第二配体上的官能团反应的另一基团的双官能连接体可用于形成期望的 SHAL。可选地,衍生可涉及配体的化学处理,例如,糖蛋白、碳水化合物或的核酸糖部分与高碘酸盐的乙二醇裂解,生成游离醛基。可使游离醛基与连接体上的游离胺基或胍基反应而使连接体与配体结合(见,例如,美国专利第 4,671,958 号)。用于生成多肽(例如抗体或抗体片段)上游离巯基的操作程序也是已知的(见,美国专利第 4,659,839 号)。

[0201] 在一些实施方式中,将基于赖氨酸、谷氨酸以及聚乙二醇(PEG)的具有不同长度的连接体用于偶联配体。已经使用赖氨酸和 PEG 的组合生成连接体来合成许多 SHAL(见,例如,实施例和图 13)。分子与 PEG 共轭的化学方法是本领域技术人员公知的(见,例如,Veronese(2001)Biomaterials,22:405-417;Zalipsky 和 Menon-Rudolph(1997),Poly(ethyleneglycol)Chemistry and Biological Applications.J.M.Harris 和 X.Zalipsky(编辑),Am.Chem.Soc.Washington,D.C.第 318-341 页;Delgado 等人(1992)Drug Carrier Syst.,9:249-304;Pedley 等人(1994)Br.J.Cancer,70:1126-113-0;Eyre 和 Farver(1991),Textbook of Clinical Oncology,Holleb 等人(编辑),Am.Cancer Soc.,Atlanta GA 第 377-390 页;Lee 等人(1999)Bioconjug.Chem.,10:973-981;Nucci 等人(1991)Adv.Drug Deliv.,6:133-151;Francis 等人(1996)J.Drug Targeting,3:321-340)。

[0202] 用于生成这些 SHAL 的合成方案的一个有利特点是所述方法允许几乎任何类型的

分子与连接体上的第三位点连接。在第一轮的 SHAL 合成中,生物素已连接在该位点以促进体外结合研究。生物素标记物使得可以通过表面等离子共振来快速检测与分离的蛋白质结合并检测 SHAL 结合活细胞和组织切片的选择性。

[0203] 一旦检测并证实 SHAL 与靶(例如,HLA-DR10)结合,可在最后一轮合成中连接诸如 DOTA 的金属螯合物(或其他效应剂),以使得能够将放射性核素或其他效应剂递送至带有靶的细胞(例如,肿瘤细胞)。

[0204] 在再检测效应剂-SHAL 共轭物以再证实它们结合靶的能力之后,可任选检测表现出对其靶具有最好选择性的共轭物在试验生物(例如,小鼠)中的生物分布。在后续的研究中也可将其他独特分子连接至该位点,使得这些相同的 SHAL 也可用于例如检测用于放射性同位素递送的预靶向方法的实用性。

[0205] H) 分步固相 SHAL 合成

[0206] 在一些实施方式中,通过分步固相合成方法进行 SHAL 合成。在该方法中,将各连接体组分或配体连接至与树脂表面共价连接的生长分子(SHAL)上。在各化学反应之后,可充分洗涤树脂,以去除未反应的产物。

[0207] 在一种方法中,在合成开始时,将 DOTA 与连接体连接。在洗除多余的 DOTA 之后,在树脂上进行多个额外的化学反应,以添加多种连接体和配体,并且在各反应之后,再洗除未反应的产物。在 SHAL 合成完成时,存在于样品中的游离 DOTA 的量是检测不到的(当通过 HPLC 和质谱法检测时)。DOTA 连接极其稳定,因此一旦 DOTA 被连接,则不会从 SHAL 解离。

[0208] I) 筛选 SHAL 的亲力和选择性

[0209] 在一些实施方式中,筛选包含不同配体(结合部分)和/或包含不同长度连接体的 SHAL 的文库,以鉴定对于靶具有最好亲力和/或选择性的那些 SHAL。可以以许多方式进行这样的筛选测定,包括但不限于筛选与分离的靶结合,筛选与培养物中的细胞结合,筛选与组织点阵中的细胞结合,以及筛选在体内与期望的靶结合。

[0210] 1. SHAL 与分离的靶(例如,蛋白质)结合

[0211] 在一些实施方式中,可通过下述方法来评估最佳 SHAL 的结合亲和力:对于 SHAL-靶复合物进行质谱检测,随后使用例如 IASYS Plus 或 BiaCore 仪器对 SHAL-靶结合亲和力进行更准确的表面等离子共振 (SPR) 光谱检测 (Shuck(1997) Annu Rev Biophys Biomol Struct., 26:541-566; Van Regenmortel(2001) Cell Mol Life Sci., 58:794-800)。为了进行 SPR 检测,可通过第三官能团(如上所述)将生物素添加至连接体,并且可使 SHAL 与可商购获得的链霉亲和素包被的芯片结合。在一些优选的实施方式中,认为仅表现出 nM 或更高结合亲和力的那些 SHAL 是有用的。然后,可对表现最大亲和力的 SHAL 检测其选择性。可进行实验来检测在与靶相关的分子的存在下 SHAL 结合靶的选择性。因此,例如,在 SHAL 定向 HLA-DR10 的情况中,可评估 SHAL 在由亲和色谱法提取和分离的 Raji 细胞表面蛋白的存在下结合靶分子的能力。在使用生物素化 SHAL 处理凝胶并洗除多余的未结合的 SHAL 之后,可通过使用若丹明标记的链霉亲和素染色来检测结合的 SHAL 的位置。在一些实施方式中,被认为表现合理的蛋白质选择性的 SHAL 可为其中 95% 或更多荧光与 HLA-DR10 单体和多聚体峰值相关的那些分子。

[0212] 2. SHAL 与培养物中的细胞结合

[0213] 在 SHAL 靶是细胞上的标志物（例如，癌细胞标志物）的情况下，期望评估 SHAL 与完整细胞结合的特异性。

[0214] 利用例如结合的若丹明标记的链霉亲和素的荧光，可使用生物素化（或否则标记的）SHAL 进行细胞结合研究，以证实 SHAL 与靶（例如，Raji）细胞结合。如果观察到 SHAL 结合，可进行 SPR 检测以确定完整细胞与 SHAL 的亲合力。在一些实施方式中，可选择在靶（例如，肿瘤）细胞的染色强度相对于对照表现至少 2 倍、优选至少 5 倍以及更优选至少 10 倍差异的那些 SHAL 用于进一步检测和研制。可使用与连接体连接的 DOTA 分子来合成最有前景的 SHAL 的类似物，并可使用放射性核素标记的 SHAL 进行结合实验来获得更多的定量数据，还使用 NanoSIMS 或其他方法设法确定 SHAL 是保留在细胞表面还是被内化。该信息可用于决定关于有待载入整合剂的放射性同位素的类型。如果 SHAL 仍位于表面，通常单独使用 SHAL 或与不需要内化的效应剂（例如，诸如 ^{90}Y 之类的 α 发射体，多种可检测标记物等）一起使用。如果获得证据表明当 SHAL 与靶细胞结合时被内化，则可将 SHAL 与当内化时具有活性的效应剂一起使用。

[0215] 3. 使用组织点阵分析细胞选择性

[0216] 组织点阵技术可用于筛选 SHAL 以确定组织特异性（例如，在抗肿瘤 SHAL 的情况中恶性组织和正常组织反应性）。组织点阵为本领域技术人员公知（见，例如，Kononen 等人（1998）*Nat Med.*, 4:844-847; Torhorst 等人（2001）*Am J Pathol.*, 159:2249-2256; Nocito 等人（2001）*Int J Cancer*, 94:1-5, 等等）。以其基本形式，通过取各单个肿瘤小块 / 大块的小核心并将这些核心组装成单块（见上文）来形成组织微点阵。通过对该新块进行切片，可使用标准免疫组织化学方法和原位杂交技术。因此，可以在一个实验中测定数百组织样品而不必要进行数百不同的实验。图 2 和 3 描述了可如何使用组织点阵，并显示了示例的组织点阵的图。

[0217] 在一种实施方式中，对于正常组织点阵，我们已经鉴定了 80 种独特的组织，包括置于组织微点阵上的口咽、心脏、肺脏、胃、脾脏、肝脏、肾脏、肠、骨髓、胰腺、膀胱、肌肉、肾上腺、乳房、脑、正常前列腺和皮肤。对于淋巴细胞特异性组织点阵，我们包括新生物淋巴细胞系、异种移植物以及从 UC Davis 的人类生物样品库收集的患者材料。使用这些或相似的组织点阵，可确定 SHAL 与正常组织的非特异性结合以及与淋巴细胞和前列腺肿瘤新生物的特异性结合。SHAL 与组织点阵的杂交是直接的。使用本文所述的生物素化 SHAL，可容易地将标记的链霉亲和素（例如，若丹明标记的链霉亲和素）用于鉴定结合 SHAL 的那些细胞。当需要时，可通过传统组织学和免疫组织学方法来验证组织微点阵结果。

[0218] 在一种示例性方法中，可使用组织微点阵仪（例如，Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland）和 Kononen 等人（1998）*Nat Med.*, 4:844-847 描述的技术，从各“供体”组织块的受选择区打孔获得具有 0.6-mm 直径的 2-4 个组织圆柱体，并将其带入接受体石蜡块，以组装组织微点阵。然后，可以以 4 μm 厚度对含有例如 200-400 个核心的组织微点阵载玻片制作切片。可进行常规苏木素伊红染色以证实各核心代表其选择的组织病理。对于免疫组织化学，可将柠檬酸盐缓冲液中的微波用于抗原修复。可通过共聚焦扫描仪来捕获载玻片的图像（ScanScope, Mountain View, CA）并如下所述使用 MrSid Viewer 2.0 (LizardTech, Inc.) 来观察。在计算机而非显微镜上观察组织点阵图像的能力显著增加了分析的效率。

[0219] 数字化病理学方法的主要障碍是载玻片的数字化形式显示。与以 CT、MRI 或现在的“数字化平片”赋予患者的数字化显示开始的放射学方法不同,病理学方法需要对所有组织样品进行加工并将其制备成用于判读的固定于载玻片上的染色组织切片。新的技术生成了整个载玻片的图像,因此生成整个组织病理样品的真实数字化显示(整张载玻片成像(Whole Slide Imaging))。大多数目前的仪器使用配备数字化摄影机的显微镜和滑台以捕获数千个单独的图像。由内容专家对各图像进行聚焦。一旦需要,则通常将这些图像合并(或)在一起以形成载玻片的最终显示。该方法非常耗时,而且由于涉及大量图像,图像通常对不准。

[0220] ScanScope(Aperio® Technology)是一种新型数字化载玻片扫描仪,在3-5分钟内扫描载玻片,以50,000dpi捕获8至12十亿位元组图像。然后,对图像进行压缩、加工以及储存用以显示(见下文)。Lizardtech®的MrSid®使用专属多层小波Jpeg格式以达20:1的压缩比压缩8至12千兆字节的图像,而无显著的图像衰减。然后可局部观察图像或从万维网服务器获得服务。与标准的基于万维网的静止图像(通常下载在浏览器内观察)不同,MrSid加工的图像是从万维网观察,且浏览器应用从不下载完整图像。因为图像是以其最大分辨率取得,通过服务器构建图像的“较低”放大率视图。使用ScanScope和Zoomify浏览器的组合,可在少于20分钟内捕获并处理整个载玻片(12十亿位元组)。

[0221] 4. 选择性的体内分析

[0222] 当然,也可容易地检测SHAL的体内选择性。这可通过将SHAL给药于包含展示SHAL所定向的靶的细胞或组织的试验动物(例如,实验大鼠)而实现。在足够的时间之后,可处死动物,并检测(例如,组织学方法)靶组织和正常组织以评估SHAL的特异性和递送量。在一些实施方式中,可将SHAL与允许非侵入性成像的成像剂偶联并因此允许实时药效动力学评估。

[0223] 通过示例,可使用建立的方法进行药物代谢动力学和放射剂量测定小鼠研究(例如,对于实施例描述的SHAL),以生成用以选择用于患者药效动力学和放射剂量测定的临床试验的数据。可使用建立的方法对带有限定尺寸的Raji人淋巴瘤异种移植物的雌性裸小鼠进行药物代谢动力学研究(DeNardo等人(1998)Clin. Cancer Res., 4:2483-2490; Kukis等人(1995)Cancer Res., 55:878-884)。可使用含有¹¹¹In或⁹⁰Y的DOTA标记的SHAL注射小鼠,并可处死小鼠,例如,在至少5个时间点的各时间点处死,以提供用于分析的样品。可在预期这些小分子的早期时间点和晚期时间点的极端值进行初始研究,这样可确定中间时间点。可将肽的数据用于定义极端时间点。当将¹¹¹In或⁹⁰Y用作示踪剂时,最长的时间点通常为约5天。可使用碘化钠检测仪系统来确定机体总清除率。可通过从小鼠尾静脉取循环血样品来监测血清除率。在处死时,可移取异种移植物和正常组织,对其进行称重并在γ井式计数器中计数,以提供器官分布数据。

[0224] 为了评价SHAL剂量(质量)效应,可在例如5个剂量水平进行研究(再次以小量SHAL和大量SHAL开始以指导待研究的中间量的选择)。因为SHAL的新颖性,可获得的小鼠抗体(例如,Lym-1)研究和例如生长抑素受体肽配体的信息通常指导研究时间点和剂量水平的选择。

[0225] 在一些实施方式中,实现本发明SHAL的理想药物代谢动力学和放射剂量测定是在甲状腺瘤治疗中使用碘化钠(NaI)实现的那些方法。SHAL应小至足够完全穿透恶性肿瘤

并容易在尿中分泌。通常,对于淋巴瘤和白血病的靶识别和结合亲和力优于现有抗体至少一个数量级将提供所需的肿瘤细胞选择性。尽管,较小的分子(例如 SHAL)从循环快速清除可被认为是缺点,但 NaI 在甲状腺瘤治疗中的显著效果已经显示如果该试剂具有亲和力和选择性的合适组合,则这种“缺点”可转化为优点。如果 SHAL 被很好地摄取、仅靶向特异性的细胞家族(例如, B 淋巴细胞及其恶性相关物)、以低解离速率紧密结合以及被快速从系统清除,则正常组织(相对于恶性组织)接受的剂量应显著低于使用现有的靶向抗体获得的剂量。

[0226] 使用作为指导方法的建立的方法(DeNardo 等人(2000)J. Nucl. Med., 41: 952-958; DeNardo 等人(1999)J. Nucl. Med., 40: 1317-1326; DeNardo 等人(1999)J. Nucl. Med., 40: 302-310; Shen 等人(1994)J. Nucl. Med., 35: 1381-1389; Siegel(1994)J. Nucl. Med., 35: 1213-1216),可容易地研制用于患有 B 细胞型淋巴瘤性疾病或其他癌症的患者的药物代谢动力学和放射剂量测定研究的方案。可使用在小鼠中生成的数据确定突出的 SHAL 剂量(质量)水平,并使用已知方法调整所述 SHAL 剂量(质量)水平用于小鼠和患者的相关 BSA(见,例如,Freireich 等人(1996)Cancer Chemother. Rep., 50: 219-244)。在一些实施方式中,使用关于非骨髓性策略的肿瘤至骨髓的治疗指数的信息和关于骨髓性策略的肿瘤至剂量限制性非骨髓器官的治疗指数的信息选择提供最佳剂量水平的方案。

[0227] J) 通过改变连接体长度以及连接体和配体的结构来优化 SHAL 亲和力、选择性以及代谢

[0228] 可使用计算机建模和实验性研究通过改变连接体长度和/或连接体和配体的结构来优化 SHAL 亲和力、选择性和代谢。可减小或增加连接体长度,以改进 SHAL 对其靶的亲和力。还可对用于生成 SHAL 的单个配体进行改变或对单个配体结构进行变化来改进结合、靶选择性以及优化未结合的 SHAL 从生物体的清除。如果需要,还可考虑通过掺入连接螯合剂与 SHAL 的可裂解的化学键(例如,肽或其他可裂解连接体)对连接体自身的结构进行修饰以促进 SHAL 从正常组织和外周血清除。

[0229] 如果观察到特定 SHAL 表现非特异性结合(例如,与细胞提取物中的许多蛋白结合或与 Raji 和对照细胞结合),可使用不同配体对来合成另外的 SHAL,直至鉴定出合适的特异性的 SHAL。

[0230] 1. SHAL 对于靶分子的结合亲和力的最大化

[0231] 通过改变和优化分隔配体的连接体的长度可使多齿试剂与蛋白质或细胞表面靶的结合亲和力增加一个至一些数量级。在不受特定理论限制的情况下,我们相信该种增加与下列因素有关:实现配体之间的最佳分隔以使得它们结合各自的位点,以及与提供连接体自身中足够旋转柔性以优化其结合位点(例如,结合“口袋”)中各配体的相互作用。

[0232] 在一些实施方式中,通过估计有待于连接在一起的两个(或两个以上)结合的配体之间的距离来鉴定被选择用于初始的 SHAL 的初始连接体长度。一旦已经确定所连接的配体的特定组合实际上与靶结合,可进行另外的建模来进一步精化连接体的长度并优化 SHAL 结合亲和力。

[0233] 例如,在靶是 HLA-DR10 的情况中,可使用分别在“口袋”中结合的两个配体来对 HLA-DR10 β 亚单位的结构进行建模,并且所述配体通过多种长度 PEG 连接体相互连接(见,例如,本文实施例)。从分子动力学研究来讲,可评估结合的配体的方向以改进连接体设

计。可进行进一步的分子动力学模拟以包括连接体和配体,从而模拟与靶相互作用的多齿配体,例如本文所述。

[0234] 一旦获得这些建模实验的结果,可使用涵盖被预测为最佳尺寸范围的连接体来合成另外一组 SHAL,并实验性检测其结合亲和力。

[0235] 2. SHAL 的靶选择性和代谢的优化

[0236] 还可使用计算方法以确定是否被连接在一起而产生 SHAL 的单个配体的结构的变化改进了靶选择性并优化了 SHAL 代谢以及其从正常组织和外周循环的清除。这可通过例如检查靶向的结合“口袋”中存在的官能团的类型及其与结合的配体相关的位置来实现。

[0237] 可使用配体的不同构象和所选择的配体类似物来帮助鉴定最佳适配各结合位点(例如,“口袋”)的配体衍生物,从而进行分子动力学研究。可进行扩散 NMR 实验(Lin 等人(1997) *J. Organic Chem.*, 62 :8930-8931)来对亚组配体类似物的亲和力进行比较并分级。通常基于计算机建模提供的结果和类似物的商业可用性或合成的容易度来筛选被选择用于分析的特定类似物。如果实验性地鉴定了较高亲和力的类似物,则可合成一组新的 SHAL 并检测它们的亲和力、结合靶的选择性以及理想的代谢特性(例如,从外周循环、肝脏以及肾脏的快速清除)。

[0238] 在一些实施方式中,SHAL 的小尺寸可导致其从组织过于快速清除而不能将合适量的效应剂有效递送至靶细胞。如果观察到这个现象,可将多种方法用于优化 SHAL 在靶组织中的滞留时间。一种方法涉及使用连接体上的生物素连接位点以添加结合靶上另一位点的第三配体。预期这增加 SHAL 的亲和力至亚皮摩尔水平并显著降低结合分子的解离速率。可选地,可通过将 SHAL 与较大的多臂 PEG 分子和 / 或其他分子连接而显著增加其有效尺寸。

[0239] K) 示例性 SHAL

[0240] 使用本文提供的教导,可容易地制备结合例如癌症标志物(例如,HLA-DR10)的许多不同 SHAL。在多种实施方式中,SHAL 包括但不限于二齿 SHAL(包含两个结合配体)、三齿 SHAL(包含三个结合配体)、四齿 SHAL(包含四个结合配体)、五齿 SHAL(包含五个结合配体),等等。在多种实施方式中,SHAL 可为多聚体(例如,包含两个、三个、四个、五个或更多 SHAL 的结构和 / 或复合物)。SHAL 可为同源多聚体(包含两个、三个、四个、五个或更多 SHAL),或异源多聚体(包含例如两个、三个、四个、五个或更多 SHAL,其中至少两个为不同种类的 SHAL)。

[0241] 在一些实施方式中,SHAL 包含表 1、5、6、7 或 8 的任何表格中描述的一种或一种以上、优选两种或两种以上或三种或三种以上配体和 / 或其类似物。一些优选的 SHAL 包括但不限于二齿 SHAL(见,例如图 22 和 23)、三齿 SHAL(见,例如图 24A)、二聚体二齿 SHAL、二聚(双)三齿 SHAL(见,例如,图 24B),等等。在一些实施方式中,SHAL 包含表 1 中所示的一种或一种以上配体。

[0242] 表 1. 可包含在本文所述的 SHAL 中的示例配体。其中一些(使用 * 标记)可替代 Ct 配体使用或作为第四组分与连接体连接,其不起帮助 SHAL 更好结合蛋白质的作用但一旦 SHAL 进入细胞则作为抑制剂。

[0243]

1	BOC-4-氨基甲基-L-苯丙氨酸
2	*4[[5-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧]苯基]N-苯基氨基甲酸酯
3	*(R)-2-[4-(5-氯-3-氟-2-吡啶基氧)苯氧基]丙酸
4	*2-(((3-氯-5(三氟甲基)吡啶-2-基氧)苯氧基)甲基)丙烯酸酯
5	*2-(((3-氯-5(三氟甲基)吡啶-2-基氧)苯基)甲基)丙烯酸酯
6	*2-(((3-氯-5(三氟甲基)吡啶-2-基氧)苯基)甲基)丙烯腈
7	*3-(3-氯-4-{[5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氧}苯胺基)-3-氧丙酸
8	*稀禾定 (Sethoxydim)
9	*烯草酮 (Clethodim)
10	*5-(四癸基氧)-2-糠酸
11	*2-[(2,6-二氯苯基)氨基]苯乙酸
12	*2-[4-(4-氯苯氧基)苯氧基]丙酸
13	*(RS)-2-{4-[3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氧}苯氧基}丙酸
14	*(RS)-2-[4-(6-氯-1,3-苯噁唑-2-基氧)苯氧基]丙酸

[0244]

15	*(RS)-2-[4-(2,4-二氯苯氧基)苯氧基]丙酸
16	*(Rs)-2-{4-[5-(三氟甲基)-2-吡啶基氧]苯氧基}丙酸
17	*(RS)-2-[4-(6-氯喹啉-2-基氧)苯氧基]丙酸
18	*(RS)-2-[4-(α , α , α -三氟-p-甲苯氧基)苯氧基]丙酸
19	5-([4,6-二氯三嗪基]氨基)荧光素氢氯化物
20	3-[N-(4-乙酰基苯基)氨基甲酰基]吡啶-2-羧酸
21	3-(2-{[3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氧}苯胺基)-3-氧丙酸
22	L-鸟氨酸- β -丙氨酸
23	2-甲基-1-(3-吗啉代丙基)-5-苯基-1H-吡咯-3-羧酸
24	马尿酸
25	马尿酰基-D-赖氨酸
26	马尿酰基-L-苯丙氨酸

[0245] 一些示例的 SHAL 还示于表 2。

[0246] 表 2. 示例的多齿和二聚体多齿 SHAL 及其分子量（以道尔顿表示分子量）列表。
SHAL 上的 DOTA 导致另外的 400（或对于生物素为 244）道尔顿。

[0247]

首字母缩略词	成分	MW
多齿		
LeacPLD	乙酰化5-亮氨酸脑啡肽PEG赖氨酸脱氧胆酸	1,505
ItPLD	三碘甲状腺原氨酸PEG赖氨酸脱氧胆酸	1,559
DvLPBaPL	4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸赖氨酸PEG N-苯 甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基-苯甲酸 PEG赖氨酸	1,317
CtLPTPL	3-(2-([3-氯-5-三氟甲基)-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸 赖氨酸PEG L-甲状腺原氨酸PEG赖氨酸	1,163
CtLPBaPL	3-(2-([3-氯-5-三氟甲基)-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸 赖氨酸PEG N-苯甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基-苯甲酸PEG 赖氨酸	1,287
DvPLLCTPCbL	4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸PEG赖氨酸赖氨酸	1,765

[0248]

	酸 3-(2-([3-氯-5-三氟甲基]-2-吡啶基)氧)-苯胺基)-3-氧丙酸PEG 4-[4-(4-氯苄基)哌嗪并]-3-硝基苯甲酸赖氨酸	
二聚体, 多齿		
(LeacPLD) ₂ LP	(乙酰化5-亮氨酸脑啡肽PEG赖氨酸脱氧胆酸) ₂ 赖氨酸PEG	3,006
(ItPDP) ₂ LL	(三碘甲状腺原氨酸PEG脱氧胆酸PEG) ₂ 赖氨酸赖氨酸	3,113
(DvLPBaP) ₂ LL	(4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸赖氨酸PEG N-苯甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基苯甲酸PEG) ₂ 赖氨酸赖氨酸	2,626
(DvLPBaPP) ₂ LL	(4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸赖氨酸PEG N-苯甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基苯甲酸PEG PEG) ₂ 赖氨酸赖氨酸	2,921
(DvLPBaPPP) ₂ LL	(4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸赖氨酸PEG N-苯甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基苯甲酸PEG PEG PEG) ₂ 赖氨酸赖氨酸	3,210
(DvLPBaPPPP) ₂ LL	(4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸赖氨酸PEG N-苯甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基苯甲酸PEG PEG PEG PEG) ₂ 赖氨酸赖氨酸	3,501
(DvLCsPBaPPP) ₂ CsLL	(4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸赖氨酸磺丙氨酸PEG N-苯甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基苯甲酸PEG PEG PEG) ₂ 磺丙氨酸赖氨酸赖氨酸	3,666
(DvPLLCTcBcPPP) ₂ LL	(4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸PEG 赖氨酸 赖氨酸3-(2-([3-氯-5-三氟甲基]-2-吡啶基)氧)-苯胺基)-3-氧丙酸PEG 4-[4-(4-氯苄基)哌嗪并]-3-硝基苯甲酸PEG PEG PEG) ₂ 赖氨酸赖氨酸	4,267

[0249] 发现本文所描述的多种 SHAL 单独有效抑制癌细胞生长和 / 或增殖且在一些情况杀伤癌细胞。因此,可单独使用 SHAL,或将其与一种或一种以上效应剂(例如,本文所述)连接使用。

[0250] L) 与转导肽连接的 SHAL

[0251] 在一些实施方式中, SHAL 包括一种或一种以上转导肽(例如,与一种或一种以上转导肽连接)。转导肽是一种用作促进肽进入细胞(例如,促进穿透细胞膜)的“跨膜

梭 (transmembrane shuttle)”的肽。转导肽为本领域技术人员公知。这样的肽包括但不限于如下肽：猿病毒 40(SV40)T 抗原的核定位信号 (NLS) (Yoneda(1997)J. Biochem., 121:811-817), HIV Tat 蛋白的蛋白转导结构域 (Tat 肽) (Vives 等人 (1997)J. Biol. Chem. 272:16010-16017;Schwarze 等人 (1999)Science 285:1569-1572;Torchilin 等人 (2003)Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 100:1972-1977.), 整合素结合肽 (RGD 肽) (Hart 等人 (1994)J. Biol. Chem. 269:12468-12474), 玻璃粘连蛋白 (VN 肽) 的发夹结合结构域 (Vogel 等人 (1993)J. Cell Biol. 121:461-468), 果蝇的触角足蛋白 (见, 例如, Joliot 等人 (1991)Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:1864-1868), 穿透素 (Tseng 等人 (2002)Mol Pharmacol., 62:864-887), 天然穿过细胞膜的完整蛋白 (疱疹病毒蛋白 VP22 (Phelan 等人 (1998)Nat Biotechnol., 16:440-443), 诸如寡精氨酸之类的合成的阳离子肽运载体 (Tung 和 Weissleder (2003)Adv. Drug Delivery Rev., 55:281-294;Futaki (2005)Adv. Drug Delivery Rev., 57:547-558), 乳糖基化聚-L-赖氨酸 (Midoux 等人 (1993)Nucl Acids Res., 21:871-878), 表现出与已知肽梭具有序列相似性的选自噬菌体展示文库的短肽序列 (Kamada 等人 (2007)Biol Pharm Bull. 30:218-223;还参见表 3 中的肽 1-6), 等等。

[0252] 表 3. 示例的转导肽的氨基酸序列

[0253]

肽	序列	Seq ID No.
1	S-G-E-H-T-N-G-P-S-K-T-S-V-R-W-V-W-D	9
2	S-M-T-T-M-E-F-G-H-S-M-I-T-P-Y-K-I-D	10
3	Q-D-G-G-T-W-H-L-V-A-Y-C-A-K-S-H-R-Y	11
4	M-S-D-P-N-M-N-P-G-T-L-G-S-S-H-I-L-W	12
5	S-P-G-N-Q-S-T-G-V-I-G-T-P-S-F-S-N-H	13
6	S-S-G-A-N-Y-F-F-N-A-I-Y-D-F-L-S-N-F	14
8	G-T-S-R-A-N-S-Y-D-N-L-L-S-E-T-L-T-Q	15
Tat13	G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R-P-P-Q	16

[0254]

触角足	R-Q-I-K-I-WF-Q-N-R-R-M-K-WK-K	17
VP22	N-A-K-T-R-R-H-E-R-R-K-L-A-I-E-R	18
六精氨酸	R-R-R-R-R-R	19

[0255] 前文的转导肽列表意在示例且非限制。其他转导肽为本领域普通技术人员已知和容易获得, 使用本文提供的教导可将它们容易地掺入 / 连接至 SHAL。Derossi 等人 (1998)

Trends Cell Biol. 8 :84-87 提供了示例的转导肽的综述。

[0256] II. 包含 SHAL(例如,癌特异性 SHAL)的嵌合部分

[0257] 本发明的 SHAL 被选择用以特异性地结合特定的靶。在靶是特定细胞类型(例如,肿瘤细胞)的特征性标志物的情况中,可使用 SHAL 将一种或一种以上效应剂特异性递送至靶细胞。

[0258] 在一些实施方式中,SHAL 特异性地结合癌细胞。在这些实施方式中,SHAL 可单独用作治疗剂(例如,抑制癌细胞的生长和/或增殖)和/或可将它们与效应剂偶联以将效应剂(例如,诸如细胞毒素、放射性标记物等之类的效应剂分子)高效地和特异性地递送至多种癌细胞(例如,分离的细胞、转移细胞、实体瘤细胞等)。

[0259] 在一些优选的实施方式中,以“预靶向”策略使用本发明的 SHAL(导致在效应剂部分给药后在靶位点形成嵌合部分),或者在将 SHAL 用于提供嵌合分子之前使 SHAL 与效应剂分子偶联的情形中,以“靶向”策略使用本发明的 SHAL。

[0260] 嵌合分子或嵌合组合物或嵌合部分是指这样的分子或组合物,即,其中以天然状态分开存在的两种或两种以上分子连接在一起形成具有其组成分子的期望功能的单个分子。通常,嵌合分子的组成分子之一是在该情况中的一种或一种以上 SHAL 的“靶向分子”。所述靶向分子将嵌合分子定向至其特定的靶,例如癌细胞。

[0261] 所述嵌合分子的另一种组分是“效应剂”。效应剂分子是指被特异性地运输至靶细胞(例如,癌细胞)的分子或分子组。应注意,在这种情况下,这样的特异性运输不需要排他性到达或进入癌细胞,而仅需要提供与正常健康细胞相比将效应剂优先递送到达或进入癌细胞。

[0262] 效应剂分子通常具有待递送至靶细胞的特征性活性。效应剂分子包括但不限于细胞毒素、标记物、放射性核素、配体、抗体、药物、脂质体、纳米颗粒、病毒颗粒、细胞因子,等等。

[0263] 在一些实施方式中,效应剂是可检测的标记物,优选的可检测标记物包括放射性核素。在可用于本发明的放射性核素-螯合剂-(例如,生物素)共轭物的放射性核素和标记物中, γ 发射体、正电子发射体、X 射线发射体以及荧光发射体适于定位、诊断和/或分期,和/或治疗,而 β 和 α 发射体以及电子和中子捕获剂(例如硼和铀)也可用于治疗。

[0264] 可检测标记物可与外部检测剂和/或内部检测剂联合使用,并提供一种有效定位和/或观察前列腺癌细胞的方式。这样的检测/观察可用于多种情况,包括但不限于手术前和手术中的情境。因此,在一些实施方式中,本发明涉及一种手术中检测哺乳动物机体中的癌症的方法。这些方法通常涉及对哺乳动物进行组合物给药,该组合物包含足以由检测剂(例如, γ 检测探针)检测到的量的使用可检测标记物(例如,使用放射性同位素(例如 ^{161}Tb 、 ^{123}I 、 ^{125}I) 标记的本发明的抗体,等)标记的癌症特异性 SHAL,在使得活性物质被靶组织摄取之后,优选在标记物的血清除之后,使所述哺乳动物在机体的相关区域经受放射免疫检测技术(例如,使用 γ 检测探针)。

[0265] 标记物结合的 SHAL 可用于放射指导的外科手术技术,其中可通过检测剂(例如 γ 检测探针)的方式在手术中检测和定位受治疗者的机体中相关组织。外科医生可手术中使用该探针来寻找其中发生了使用放射性同位素(即,例如,低能量 γ 光子发射体)标记的化合物摄取的组织。

[0266] 除了可检测标记物以外,优选的效应剂包括细胞毒素(例如,假单胞菌外毒素、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素等)或细胞毒性药物或前药,在该情况中,嵌合分子可用作将细胞毒素特异性靶向癌细胞的强效细胞杀伤剂。

[0267] 在又一些其他实施方式中,效应剂可包括包裹药物的脂质体(例如,诸如多柔比星、长春碱、紫杉酚等的抗癌药物)、刺激免疫系统组分识别结合的细胞的抗原、特异性结合免疫系统组分并将它们定向于癌的抗体,等等。

[0268] A) 一些优选的效应剂

[0269] 1) 成像组合物

[0270] 在一些实施方式中,本发明的嵌合分子可用于将可检测标记物定向于肿瘤位点。这可促进肿瘤检测和/或定位。在一些特别优选的实施方式中,嵌合分子的效应剂组分为“不透射线的”标记物,例如可使用X射线容易观察的标记物。不透射线的材料为本领域技术人员公知。最常见的不透射线的材料包括碘、溴或钡盐。其他不透射线的材料也是已知的,包括但不限于有机铋衍生物(见,例如,美国专利 5,939,045)、不透射线的聚氨基甲酸酯(见,美国专利 5,346,981)、有机铋复合物(见,例如,美国专利 5,256,334)、不透射线的钡聚合物复合物(见,例如,美国专利 4,866,132),等等。

[0271] 可将本发明的 SHAL 直接与不透射线的部分偶联,或可将它们与载有或含有下文所述不透射线的材料的“口袋”(例如,螯合剂、脂质体、聚合物微珠等)连接。

[0272] 除了不透射线的标记物以外,其他标记物也适用于本发明。适于用作本发明嵌合分子的效应剂分子组分的可检测的标记物包括通过光谱方法、光化学方法、生物化学方法、免疫化学方法、电学方法、光学方法或化学方法可检测到的任何组合物。本发明中有用的标记物包括磁珠(例如, Dynabeads™)、荧光染料(例如,异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、若丹明、绿色荧光蛋白等)、放射性标记物(例如, ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{18}F 等)或其他用于成像的标记物、酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶以及其他常用于 ELISA 的酶),以及诸如胶体金或有色玻璃或塑料(例如,聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)微珠之类的比色标记物。

[0273] 多种优选的放射性标记物包括但不限于 ^{99}Tc 、 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{111}In 、 ^{113}mIn 、 ^{97}Ru 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{52}Fe 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{77}As 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{169}Er 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{161}Tb 、 ^{109}Pd 、 ^{165}Dy 、 ^{149}Pm 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{157}Gd 、 ^{159}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{172}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{105}Rh 以及 ^{111}Ag 。

[0274] 检测这些标记物的方法为本领域技术人员公知。因此,例如,可使用摄影胶片、闪烁检测器等来检测放射性标记物。可使用光检测器来检测发射的光照以检测荧光标记物。通常通过提供酶与底物并检测由酶对底物的作用而产生的反应产物来检测酶标记物,并通过简单目测有色标记物来检测比色标记物。

[0275] 2) 放射增敏剂

[0276] 在另一种实施方式中,效应剂可为提高对细胞电离放射(例如,可由 ^{60}Co 或 X 射线源来产生)的细胞毒性效应的放射增敏剂。多种放射增敏剂是已知的,包括但不限于苯并卟啉衍生物化合物(见,例如,美国专利 5,945,439)、1,2,4-苯并三唑氧化物(见,例如,美国专利 5,849,738)、含有一些二胺的化合物(见,例如,美国专利 5,700,825)、BCNT(见,例如,美国专利 5,872,107)、放射增敏性硝基苯甲酸酰胺衍生物(见,例如,美国专利 4,474,814)、多种杂环衍生物(见,例如,美国专利 5,064,849)、铂复合物(见,例如,

美国专利 4,921,963), 等等。

[0277] 3) 放射性同位素

[0278] 在一些实施方式中, 效应剂包括一种或一种以上当递送至靶细胞时导致放射诱导的细胞死亡的放射性同位素。

[0279] 出于医学目的, 最重要的衰变类型为 γ 发射、 β 衰变、 α 衰变以及电子捕获。诸如 ^{131}I 之类的放射性核素发射的 γ 射线排出机体, 允许使用外部闪烁摄影成像以测定放射性标记的抗体的生物分布 (免疫闪烁摄影的最佳能量范围为 100–250keV)。相比之下, β 粒子在衰变点的数毫米内堆积其大部分能量。来自诸如 ^{131}I 或 ^{90}Y 之类已靶向抗原-阳性肿瘤细胞的放射性核素的 β 发射可通过“交叉火力 (crossfire)”效应杀伤附近的抗原-阴性肿瘤细胞。

[0280] 钇-90 (一种纯 β 发射体) 具有使之成为用于放射免疫治疗的具有吸引力的选择的如下几种特性: 1) 使之能够杀伤邻近肿瘤细胞的高 β 能量 ($E_{\max} = 2.29\text{MeV}$; 组织中微粒能量的最大范围 = 11.9mm); 2) 促进合成放射性同位素-抗体共轭物和使用预靶向方法的金属化学性质; 以及 3) 用于与 SHAL 接触的足够长的生理半衰期 (2.67 天), 该半衰期可耗费 1–3 天而达到其在肿瘤中的峰值浓度。

[0281] 在一些实施方式中, 效应剂可包括 α 发射体, 即, 发射 α 粒子和 / 或俄歇电子发射体的放射性同位素。最近 α 发射体和俄歇电子发射体已显示可有效治疗癌症 (见, 例如, Bodei 等人 (2003) Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 18:861)。合适的 α 发射体包括但不限于 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 等。

[0282] 表 4 描述了适于放射免疫治疗的一些放射性核素。该列表意在示例且非限制。

[0283] 表 4: 适于放射免疫治疗的示例放射性核素

[0284]

放射性核素	衰变模式	生理半衰期	最大微粒能量 (%)	优点	缺点
I-131	β 、 γ	8d	807keV (1) * 606keV (86) * 336keV (13) *	碘化学方法, 不昂贵	考虑脱卤化、放射安全性
Cu-67	β 、 γ	62h	577keV (20) * 484keV (35) * 395keV (45) *	图像, 金属化学方法, 在肿瘤中长时间滞留	稀少
Lu-177	β 、 γ	6.7d	497keV (90) * 384keV (3) * 175keV (7) *	图像	稀少、骨导向剂
Re-186	β 、 γ 、电子捕获	91h	1.07MeV (77) * 934keV (23) *	^{99m}Tc 化学方法	稀少
Y-90	β	64h	2.29MeV (100) *	金属化学方法	不成像、骨导向剂
Re-188	β	17h	2.13MeV (100) *		稀少、短半衰期
Bi-212	α 、 β	1h	6.09MeV (27) ** 6.05MeV (70) ** 5.77MeV (2) ** 5.61MeV (1) **		不成像、短半衰期、不稳定的子体产物
At-211	α 、电子捕获	7h	5.87MeV (100) **	高RBE、缺氧较不重要、短射程	不成像、短半衰期、不稳定的子体产物
I-125	电子捕获	60d	35keV (100)	短射程	不成像、长半衰期

[0285] * β 辐射[0286] ** α 辐射

[0287] RBE, 相对生物效应

[0288] 4) 配体

[0289] 在多种实施方式中, 效应剂分子还可为配体、表位标志物或抗体。特别优选那些结合免疫细胞上的表面标志物的配体和抗体。利用这些抗体作为效应剂分子的嵌合分子用

作双官能连接体,所述双官能连接体建立带有配体或抗体的结合配对物的免疫细胞和前列腺癌细胞之间的结合。

[0290] 5) 螯合剂

[0291] 本文描述的许多药剂和 / 或放射性标记物优选作为螯合剂提供,特别是在利用预靶向策略的情况中。螯合分子通常与特异性结合连接本发明的前列腺癌特异性抗体的表位标志物的分子(例如,生物素、亲和素、链霉亲和素等)偶联。

[0292] 螯合基团为本领域技术人员公知。在一些实施方式中,螯合基团衍生自乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、环己基 1,2-二胺四乙酸(CDTA)、乙二醇-0,0'-双(2-氨基乙基)-N,N,N',N'-四乙酸(EGTA)、N,N-双(羟基苄基)-乙二胺-N,N'-二乙酸(HBED)、三亚乙基四胺六乙酸(TTHA)、1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)、羟乙二胺三乙酸(HEDTA)、1,4,8,11-四氮杂环十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(TETA)、取代的 DTPA、取代的 EDTA,等等(见,例如,图 22)。

[0293] 一些优选的螯合剂的实例包括未取代或取代的 2-亚氨基四氢噻吩和 2-亚氨基硫杂环己烷,特别是 2-亚氨基-4-巯基甲基四氢噻吩。

[0294] 一种螯合剂-1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N,N'',N'''-四乙酸(DOTA)因为其螯合许多诊断和治疗上重要的金属的能力(例如放射性核素和放射性标记物)而特别令人感兴趣。

[0295] DOTA 和诸如抗体之类的蛋白质的共轭物已有描述。例如,美国专利第 5,428,156 号教导了一种用于将 DOTA 与抗体及抗体片段共轭的方法。为了制备这些共轭物,将 DOTA 的一个羧酸基团转化为可与抗体或抗体片段上的胺基或巯基反应的活性酯。Lewis 等人(1994)Bioconjugate Chem. 5:565-576 描述了一种相似的方法,其中将 DOTA 的一个羧酸基团转化为活性酯,并将活化的 DOTA 与抗体混合,通过抗体的赖氨酸残基的 ε-氨基将抗体与 DOTA 连接,因此将 DOTA 的一个羧基转化为酰胺部分。

[0296] 可选地,螯合剂可直接或通过连接体与表位标志物或与结合表位标志物的部分偶联。DOTA 和生物素的共轭物已有描述(见,例如, Su(1995)J. Nucl. Med., 36(5Suppl):154P),该文献公开了通过诸如 DOTA-LC-生物素或 DOTA-苄基-4-(6-氨基-己酰胺)-生物素之类的可获得的氨基侧链生物素衍生物将 DOTA 与生物素连接。Yau 等人的 WO 95/15335 公开了一种制备可与生物素共轭的硝基-苄基-DOTA 化合物。该方法包括通过羟基的瞬时投影的环化反应;胺的甲苯磺酰化;瞬时保护的羟基的脱保护;脱保护的羟基的甲苯磺酰化;分子内甲苯磺酸盐环化。Wu 等人(1992)Nucl. Med. Biol., 19(2):239-244 公开了使用 ^{111}In 和 ^{90}Y 来放射性标记蛋白的大环螯合剂的合成。Wu 等人制备了标记的 DOTA-生物素共轭物来研究带有亲和素(一种用于研究的模型蛋白)的共轭物的稳定性和生物分布。使用生物素酰肼来制备该共轭物,所述生物素酰肼含有与原位产生的活化的 DOTA 衍生物反应的游离氨基。

[0297] 注意到,大环螯合剂 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)以异常的稳定性结合 ^{90}Y 和 ^{111}In 。在有前景的放射药剂学标记下可进行用以估计放射性标记反应次数的在所选择的缓冲液中的动力学研究,从而确定最佳的放射性标记条件,以提供与符合放射性药剂的 FDA(美国食品药品监督管理局)要求的高产物产率。还注意到 Kukis 等人(1998)J. Nucl. Med., 39(12):2105-2110 详细描述了用于制备钇-90-DOTA 螯合剂的方法。

案。

[0298] 6) 细胞毒素

[0299] 本发明的 SHAL 可用于递送多种包含治疗药物的细胞毒性药物、发射放射线的化合物、植物、真菌或细菌来源的分子,生物蛋白,以及它们的混合物。所述细胞毒性药物可为细胞内作用的细胞毒性药物,例如,短射程放射线发射体,包括,例如上文所述的短射程高能 α 发射体,或酶抑制剂。

[0300] 酶活性毒素及其片段的例子是例如白喉毒素 A 片段、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A(来自绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -sacrin、一些油桐蛋白、一些石竹素蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 蛋白 (PAP、PAPII 以及 PAP-S)、苦瓜 (*Morodica charantia*) 抑制剂、泻果素、巴豆毒素、石碱草 (*Saponaria officinalis*) 抑制剂、白树毒素、丝林霉素、局限曲菌素、酚霉素以及依诺霉素。

[0301] 特别优选的细胞毒素包括假单胞菌外毒素、白喉毒素、蓖麻毒素以及相思豆毒素。假单胞菌外毒素 A (PE) 是绿脓假单胞菌分泌的极具活性的单体蛋白 (分子量 66kD),其通过催化延长因子 2 (EF-2) 的 ADP 核糖基化 (催化氧化的 NAD 的 ADP 核糖基部分转移至 EF-2 上) 而灭活延长因子 2 来抑制真核细胞中的蛋白质合成。

[0302] 该毒素含有三个协同作用而导致细胞毒性的结构域。结构域 Ia (氨基酸 1-252) 介导细胞结合。结构域 II (氨基酸 253-364) 负责移位至胞质溶胶,结构域 III (氨基酸 400-613) 介导延长因子 2 的 ADP 核糖基化,这灭活该蛋白并导致细胞死亡。结构域 Ib (氨基酸 365-399) 的功能仍旧不确定,但可删除其大部分 (氨基酸 365-380) 而不丧失细胞毒性 (见,例如, Siegall 等人 (1989) *J. Biol. Chem.* 264 :14256-14261)。

[0303] 在 SHAL 与 PE 连接的情况中,一种优选的 PE 分子是其中删除结构域 Ia (氨基酸 1 至 252) 且从结构域 Ib 删除了氨基酸 365 至 380 的一种分子。然而,可删除整个结构域 Ib 和结构域 II 的一部分 (氨基酸 350 至 394),特别是使用诸如 GGGGS (SEQ ID NO :20) 之类的连接肽取代删除的序列的情况。

[0304] 另外,可使用定点诱变或本领域已知的其他技术来进一步修饰 PE 分子,以改变分子用于特定期望的应用。也可使用以不显著影响本文描述的 PE 分子所提供的功能性优点的方式来改变 PE 分子的方法,并且这样产生的分子意于涵盖在本发明之内。

[0305] 对于优选的 PE 分子的最大细胞毒性特性,推荐几种对于该分子的修饰方式。优选重组分子的合适的羧基端序列来将该分子转移至靶分子的胞质溶胶。已发现有效的氨基酸序列包括 :REDLK (SEQ ID NO :21) (在天然 PE 中)、REDL (SEQ ID NO :22)、RDEL (SEQ ID NO :23) 或 KDEL (SEQ ID NO :24),它们的重复序列,或维持蛋白进入内质网中或使蛋白质再循环至内质网的其他序列 (本文中被称为“内质网滞留序列”)。见,例如, Chaudhary 等人 (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 :308-312 和 Seetharam 等人, *J. Biol. Chem.* 266 :17376-17381。优选的 PE 形式包括被命名为 PE38QQR 的 PE 分子 (Debinski 等人 *Bioconj. Chem.* , 5 :40 (1994)) 和 PE4E (见,例如, Chaudhary 等人 (1995) *J. Biol. Chem.* , 265 :16306)。

[0306] 克隆编码 PE 的基因并将这些细胞毒素与靶向部分偶联的方法为本领域技术人员公知 (见,例如, Siegall 等人 (1989) *FASEB J.* , 3 :2647-2652 和 Chaudhary 等人 (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 :4538-4542, 以及其中的参考文献)。

[0307] 与 PE 类似,白喉毒素 (DT) 通过对延长因子 2ADP 核糖基化从而抑制蛋白质合成来杀伤细胞。然而,白喉毒素被分成 A 和 B 两条链,它们通过二硫键连接。与 PE 相比,羧基端的 DT 的 B 链负责受体结合,存在于氨基端的 A 链含有酶活性 (Uchida 等人 (1972) Science, 175 :901-903 ;Uchida 等人 (1973) J. Biol. Chem. ,248 :3838-3844)。

[0308] 在优选的实施方式中,本发明的 SHAL 白喉毒素嵌合分子具有被白喉毒素 B 链截断而去除的天然受体结合结构域。特别优选的是 DT388- 一种其中去除开始于残基 389 的羧基端序列的 DT。Chaudhary 等人 (1991) Bioch. Biophys. Res. Comm. ,180 :545-551。与 PE 嵌合细胞毒素类似,可将 DT 分子与前列腺癌特异性抗体化学共轭,但是在一些优选的实施方式中,通过重组方法将抗体与白喉毒素融合 (见,例如,Williams 等人 (1990) J. Biol. Chem. 265 :11885-11889)。

[0309] 7) 病毒颗粒

[0310] 在一些实施方式中,效应剂包含病毒颗粒。可将 SHAL 与病毒颗粒共轭,例如通过表达于病毒颗粒 (例如,线状噬菌体) 表面的蛋白质共轭。病毒颗粒还可包含有待于递送至靶 (前列腺癌) 细胞的核酸。病毒颗粒递送核酸至细胞的应用在 WO 99/55720 中详细描述。

[0311] 8) 其他治疗剂部分

[0312] 其他合适的效应剂分子包括药剂或含有多种药剂的包囊系统。因此,可将 SHAL 与有待于直接递送至肿瘤的药物直接连接。这类药物对于本领域技术人员来说是公知的,所述药物包括但不限于多柔比星、长春碱、金雀异黄素以及反义分子等。

[0313] 可选地,效应剂分子可包括含有治疗组合物的包囊系统 (例如病毒衣壳、脂质体或胶束),所述治疗组合物例如药物、核酸 (例如,有待于递送至细胞的反义核酸或其他核酸) 或优选被隔离而避免直接暴露于循环系统的其他治疗剂部分。制备与抗体连接的脂质体的方法为本领域技术人员公知 (见,例如,美国专利第 4,957,735 号,Connor 等人 (1985) Pharm. Ther. ,28 :341-365),相似的方法可以用于偶联 SHAL。

[0314] B) SHAL 与效应剂连接

[0315] 本领域技术人员应理解,本发明的 SHAL 可以以任何次序与效应剂分子连接在一起。因此,在多种实施方式中,可将效应剂与组成 SHAL 的任何配体连接和 / 或与连接组成 SHAL 的多种配体的连接体连接。

[0316] 可通过本领域技术人员公知的许多方法中的任何方法来连接 SHAL 和效应剂。通常,效应剂与 SHAL 直接共轭或通过连接体 (间隔体) 与 SHAL 共轭。

[0317] 在一种实施方式中,将 SHAL 与效应剂分子 (例如,细胞毒素、标记物、配体、药物或脂质体等) 化学共轭。对分子进行化学共轭的方法为本领域技术人员公知。

[0318] 将效应剂与 SHAL 连接的操作程序根据效应剂和 / 或 SHAL 的化学结构而不同。组成 SHAL 的配体和 / 或连接配体的连接体的配体可含有多种官能团,例如,羧酸 (COOH)、游离胺 ($-NH_2$)、羟基 ($-OH$)、巯基 ($-SH$) 以及其他基团,这些官能团可用于与效应剂分子上的合适官能团反应,或与连接效应剂分子以有效地将该效应剂与 SHAL 结合的连接体上的合适官能团反应。

[0319] 可选地,可将组成 SHAL 的配体和 / 或连接配体的连接体的配体衍生为暴露或连接另外的反应性官能团。所述衍生可涉及许多连接体分子中的任何分子的连接,所述连接体

分子例如上述用于将配体相互偶联的那些分子。

[0320] 在一些情况中,当嵌合分子已达到其靶位点时,从 SHAL 释放效应剂是理想的。因此,当效应剂有待于从 SHAL 释放时,可使用包含例如靶位点附近的可裂解化学键的嵌合共轭物。通过酶活性或共轭物属于例如在靶细胞内或在靶位点附近的情形,可促进裂解化学键以从抗体释放药剂。当靶位点是肿瘤时,可使用在存在于肿瘤位点(例如,当暴露于肿瘤相关的酶或酸性 pH)的条件下可裂解的连接体。

[0321] 在一些情况中,可裂解的连接体可为可经受蛋白酶水解的肽。在一些实施方式中,可裂解的连接体包括具有蛋白酶识别位点的肽。

[0322] 许多不同的可裂解连接体为本领域技术人员公知。参见美国专利第 4,618,492 号以及第 4,625,014 号。从这些连接体基团释放药剂的机制包括,例如,对于对光不稳的化学键的辐射和酸催化的水解。美国专利第 4,671,958 号包括例如对于免疫共轭物的描述,所述免疫共轭物包含在靶位点被患者补体系统的蛋白水解酶体内裂解的连接体。鉴于已报道用于将多种放射性诊断化合物、放射性治疗化合物、药物、毒素以及其他制剂与抗体连接的大量方法,本领域技术人员应能够确定用于将给定的制剂与抗体或其他多肽连接的合适方法。

[0323] 1) 螯合剂的共轭

[0324] 在一些优选的实施方式中,效应剂包含与抗体连接的或与表位标志物连接的螯合剂。癌症特异性 SHAL 带有相应的表位标志物或抗体,使得 SHAL 与螯合剂的简单接触导致 SHAL 与效应剂连接。可在使用部分之前进行组合步骤(靶向策略),或可在递送螯合剂之前使靶组织与 SHAL 结合。产生适于与多种靶向部分偶联的螯合剂的方法为本领域技术人员公知(见,例如,美国专利第 6,190,923 号、第 6,187,285 号、第 6,183,721 号、第 6,177,562 号、第 6,159,445 号、第 6,153,775 号、第 6,149,890 号、第 6,143,276 号、第 6,143,274 号、第 6,139,819 号、第 6,132,764 号、第 6,123,923 号、第 6,123,921 号、第 6,120,768 号、第 6,120,751 号、第 6,117,412 号、第 6,106,866 号、第 6,096,290 号、第 6,093,382 号、第 6,090,800 号、第 6,090,408 号、第 6,088,613 号、第 6,077,499 号、第 6,075,010 号、第 6,071,494 号、第 6,071,490 号、第 6,060,040 号、第 6,056,939 号、第 6,051,207 号、第 6,048,979 号、第 6,045,821 号、第 6,045,775 号、第 6,030,840 号、第 6,028,066 号、第 6,022,966 号、第 6,022,523 号、第 6,022,522 号、第 6,017,522 号、第 6,015,897 号、第 6,010,682 号、第 6,010,681 号、第 6,004,533 号、第 6,001,329 号等)。

[0325] III. 抑制受体、酶以及其他生物分子的 SHAL

[0326] 在一些实施方式中,本发明提供了抑制酶、受体活性或其他生物分子活性的 SHAL。通常这样的 SHAL 包含与酶或受体的活性位点或结合位点周围或附近不同位点结合的配体。在一些实施方式中,所选择的配体结合酶、受体或其他结合蛋白中的第一“口袋”和第二“口袋”,其中,所述第一“口袋”和所述第二“口袋”侧邻所述酶、受体或其他结合蛋白的活性位点或结合位点的相对侧,或所述第一“口袋”包含或位于活性位点且所述第二“口袋”接近/邻近所述第一“口袋”,或任一“口袋”或两个“口袋”位于或足以接近蛋白质、酶或受体用来结合另一分子的位点,使得在任一“口袋”或两个“口袋”破坏或阻断酶、受体或其他分子与配体结合的为同源配体。当使 SHAL 与其靶接触时,所述 SHAL 结合靶,有效阻断活性位点和/或结合位点,从而抑制酶、受体或其他生物分子的活性。

[0327] IV) 药物组合物

[0328] 本发明的 SHAL 和 / 或螯合剂和 / 或嵌合分子（特别是那些对于癌症或其他病理细胞具有特异性的）可用于胃肠外给药、经皮肤给药、口服给药或局部给药（例如，注射至肿瘤位点中）、喷雾剂给药或经粘膜给药，用于预防性治疗，但主要用于治疗性治疗。根据给药方法可以以多种单剂型进行药物组合物的给药。例如，适于口服给药的单剂型包括粉剂、片剂、丸剂、胶囊以及锭剂。我们认为，当口服给药时，本发明的药物组合物可受保护避免被消化。这通常通过将活性组分（例如，SHAL、嵌合分子等）与组合物复合以使之对酸性水解和酶水解具有抵抗力或通过将活性成分包裹在具有合适抵抗力的载体（例如脂质体）中来实现。保护组分避免被消化的方法为本领域技术人员公知。

[0329] 本发明的药物组合物特别可用于胃肠外给药，例如静脉内给药或给药至体腔或器官的内腔。用于给药的组合物通常包含溶解于药学上可接受的载体、优选水性载体的 SHAL 溶液和 / 或嵌合分子。可使用多种水性载体，例如，缓冲盐水等。这些溶液为无菌的，通常无不需要的物质。通过传统公知的灭菌技术来对这些组合物进行灭菌。所述组合物可含有按需要达近似于生理条件的药学上可接受的辅助物质，例如 pH 调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等，例如，乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的嵌合分子浓度可有很大不同，主要基于流体体积、粘滞度、体重等根据所选的特定给药模式和患者的需要来选择。

[0330] 因此，用于静脉内给药的典型药物组合物为每一患者每天约 0.1 至 10mg。特别当将药物给药至隔离位点而非给药至血流中（例如给药至体腔或给药至器官内腔）时，可以使用每一患者每天 0.1 达约 100mg 的剂量。用于制备可胃肠外给药的组合物的实际方法为本领域技术人员已知或显而易见，在诸如“Remington's Pharmaceutical Science, 第 15 版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania(1980)”之类的出版物中较详细描述。

[0331] 可进行含有本发明 SHAL 和 / 或嵌合分子或其混合物（即，与其他治疗剂的混合物）的组合物的给药以用于治疗性治疗。在治疗性应用中，以足以治愈或至少部分阻抑疾病及其并发症的量将组合物给药于患有疾病（例如癌症）的患者。足以实现这点的量被定义为“治疗有效剂量”。用于该用途的有效量将取决于疾病的严重性和患者的一般健康状况。

[0332] 组合物的单次或多次给药可根据患者所需和耐受的剂量和频率来给药。在任何情况中，组合物应提供足量的 SHAL 以有效地治疗患者。

[0333] 本领域技术人员应理解，有一些没有被严重血管化的区域，或有一些受到由紧密连接连接的细胞保护的区域和 / 或由主动转运机制保护的区域，所述主动运转机制降低或预防存在于血流中的大分子进入。

[0334] 本领域技术人员应理解，在一些情况中，可将本发明的治疗组合物直接给药至肿瘤位点。因此，例如，可通过将治疗组合物直接给药至肿瘤位点（例如，通过外科植入导管）以治疗脑肿瘤。

[0335] 可选地，可以以缓释制剂将治疗组合物置于靶位点。这样的制剂可包括，例如以治疗组合物浸渍的生物相容的海绵或其他惰性材料或可吸收基质材料、缓慢溶解的时间释放胶囊或微胶囊等等。

[0336] 通常将导管或时间释放制剂作为外科手术的部分置于肿瘤位点。因此，例如，在手

术移除较大肿瘤块的情况,可将灌注导管或时间释放制剂埋植于肿瘤位点作为辅助治疗。当然,在本发明的治疗组合物的递送可构成主要的治疗方式的情况中,可不期望、不要求或不可能肿瘤块的外科移除。

[0337] V. 试剂盒

[0338] 在放射性效应剂或其他效应剂用作诊断性制剂和 / 或治疗性制剂的情况中,将备用的组合物受使用者自行支配常常是不可能的,这是因为放射性标记的化合物贮存寿命短和 / 或所使用的放射性核素的半衰期短。在这样的情况中,使用者可在临床医院、医生办公室或实验室中实施使用放射性核素的标记反应。出于该目的或其他目的,然后可以以所谓的“试剂盒”的形式将多种反应组分提供给使用者。优选将所述试剂盒按如下设计:使得进行所需反应必要的操作应尽可能简单,以使使用者能够通过使用在其医院的设施来从所述试剂盒准备所需的组合物。

[0339] 根据本发明的这样的试剂盒优选包含本文所述的 SHAL。如果需要,可以添加药学上可接受的惰性载体和 / 或配方制剂和 / 或助剂来提供 SHAL。另外,所述试剂盒任选包含合适的放射性核素(或其他活性剂)的盐或螯合剂溶液,以及用于进行存在于试剂盒中的组分的给药和 / 或使存在于试剂盒中的组分反应的处方的使用说明书。

[0340] 提供给使用者的试剂盒还可以包含上文定义的组分和使用说明书,而可将可具有有限贮存寿命的放射性核素的盐或螯合剂溶液分开供使用者自行支配。

[0341] 所述试剂盒可任选地另外包含还原剂,和 / 或包含螯合剂(如果需要),和 / 或组合物的使用说明书,和 / 或用于使所述试剂盒的组分反应而形成所需产物的处方。如果需要,所述试剂盒的组分可以组合,只要它们相容。

[0342] 在一些实施方式中,通过在天然介质中对组分进行组合并导致它们反应可以简单地产生与 SHAL 的复合物形成反应。出于该目的,可以以螯合剂形式将效应剂提供至 SHAL。

[0343] 当试剂盒组分用作药物给药(例如,作为注射液)的组分时,它们优选是无菌的。当以干燥状态提供所述组分时,使用者应该优选使用无菌生理盐水溶液作为溶剂。如果需要,可以使用合适的稳定剂以传统方式使所述组分稳定,所述稳定剂例如抗坏血酸、龙胆酸或这些酸的盐,或者所述组分可以含有其他助剂,例如,填充剂(例如葡萄糖、乳糖、甘露醇等)。

[0344] 尽管指导材料(当存在时)通常包含书写或印刷材料,但它们并不受限于此。本发明考虑了能够贮存这样的说明书和将它们传达给终端使用者的任何介质。这样的介质包括但不限于电子贮存介质(例如,磁盘、磁带、磁带插盒、芯片)、光学介质(例如,CD ROM)等。这样的介质可包括提供这样的指导材料的互联网地址的地址。

[0345] 实施例

[0346] 提供下列实施例来说明但非限制所要求权利的本发明。

[0347] 实施例 1 HLA-DR10 特异性 SHAL 的生成

[0348] 临床前和临床研究已经揭示:HLA-DR 10 β 亚单位上的表位区(由抗体识别的独特区)和相关的 HLA-DR 主要组织相容性细胞表面蛋白是用于 B 细胞淋巴瘤和白血病全身放射性同位素治疗的特别有吸引力的靶,并提供了用于癌症治疗和预防的其他机会。尽管 HLA-DR 10 具有与其他 B 细胞表面蛋白(例如 CD20)相同的特性(这使之成为合适的靶),但是它具有我们认为提供了很大吸引力的不同特性。

[0349] 与 CD20 抗原相同,HLA-DR 10 蛋白位于 B 淋巴细胞表面,通过 B 细胞分化持续位于 B 淋巴细胞表面,但在淋巴细胞转化为浆细胞的过程中消失 (Epstein 等人, (1987) *Cancer Res.*, 47 :830-840)。不连续的 Lym-1 抗原表位出现在定型的细胞前体上,但在 B 细胞发育过程的早期不表达。另外,它通常不见于 T 细胞或其他正常细胞上。B 细胞上 MHC 2 类分子的表达受到发育控制。早期 B 细胞和前 B 细胞为 2 类 m RNA 阴性,不能被诱导表达 2 类抗原。在晚期前 B 细胞阶段,需要 HLA-DR 抗原。因为 B 细胞上 2 类表达的基础水平比见于恶性 B 细胞系上的要低大约 100 倍 (Rose 等人 (1996) *Cancer Immunol Immunother*, 43 :26-30. ; Rose 等人 (1999) *Mol Immunol.*, 36 :789-797),这提供了对于下列观察结果的解释:即,仅需要 5mg 的 Lym-1 抗体来靶向血管外恶性淋巴瘤 (DeNardo 等人 (1998) *J Clin Oncol.*, 16 :3246-3256),而由于正常淋巴细胞上的 CD22 和 CD20 抗原的密度需要 50mg CD22 和数百 mg 的 CD20 抗体 (Press (1999) *Semin Oncol.*, 26 :58-65;Knox 等人 (1996) *Clin Cancer Res.*, 2 :457-470)。附着于小量 Lym-1 的碘 -131、铜 -67 或钇 -90 治愈了大多数带有 Raji 异种移植物的老鼠 (DeNardo 等人 (1991) *Antibody Immunoconj Radiophar.*, 4 :777-785; DeNardo 等人 (1997) *Clin Cancer Res.*, 3 :71-79),人类 Burkitt 恶性淋巴瘤细胞系用作生成 Lym-1 的免疫原 (Epstein 等人 (1987) *Cancer Res.*, 47 :830-840)。相似地,在患有 B 细胞非何杰金氏淋巴瘤和患有慢性淋巴细胞白血病的亚组患者的 I/II 期试验中,这些放射性药剂当用作单剂型治疗时诱导了高的并且持久的应答率,具有常见完全缓解和一些长期存活。HLA-DR 提供了细胞识别,且在 HLA-DR 上展示了抗原性肽。这可解释在患有侵袭性淋巴瘤的我们的亚组患者中异常长的存活,文献记载了在所述患者中包括对于 Raji 细胞和 Raji 肿瘤具有细胞毒性的人类多克隆抗体的独特型抗体级联 (DeNardo 等人 (1998) *Cancer Biother Radiopharm.*, 13 :1-12;Lamborn 等人 (1997) *Clin Cancer Res.*, 3 :1253-1260)。

[0350] 然而,尽管这些抗体有效,还需要对于它们进行改进。所述抗体是低效地穿过血管屏障和肿瘤且与多种受体相互作用的大分子,这限制了它们作为放射性同位素屏障的选择性并增加了不良事件。使用“人源化”抗体可以使基于抗体的试剂的免疫原性最小化,但不能使之消除 (Brown 等人 (2001) *Clin Lymphoma.*, 2 :188-90;Kostelny 等人 (2001) *Int J Cancer*, 93 :556-65;Leonard 等人 (2002) *Semin Oncol.*, 29 :81-6;Lundin 等人 (2002) *Blood*, 100 :768-73;Ligibel 和 Winer (2002) *Semin Oncol.*, 29 :38-43)。可通过生成基于非蛋白质的试剂来避免免疫原性。完整的抗体还表现了对非靶细胞的可观的反应性 (例如, Fc 相互作用),这降低选择性并增加不良事件。即使靶向制剂的选择性的小改进也可用于使附随损害最小化并提高药物的治疗指数。

[0351] Lym-1 是选择性结合高度表达于恶性人类 B 细胞表面的蛋白质的小鼠 IgG-2a 单克隆抗体 (MAb) (Epstein 等人 (1987) *Cancer Res.*, 47 :830-840)。我们已经揭示了 HLA-DR 10 上不连续的表位是生成 Lym-1MAb 的 Raji 细胞中的原始抗原,而且该表位并非所有 HLA-DR 亚型共有 (Rose 等人 (1996) *Cancer Immunol Immunother.*, 43 :26-30;Rose 等人 (1999) *Mol Immunol.*, 36 :789-797)。我们的数据表明,在相关的 HLA-DR 10 β 亚单位与非反应性、具有高度同一性的 HLA-DR 3 和 HLA-DR 52 β 亚单位之间氨基酸序列的 19 个差异中含有重要的 Lym-1 结合残基。这用作含有 HLA-DR 的白细胞中 Lym-1 表位或结合位点的选择性的基础,还提供了在几乎所有具有恶性 B 细胞的患者中存在该蛋白的基础。在组成重要的 Lym-1 结合区的 19 个残基中,仅氨基酸 Q70 或 R70、之后是 R71 见于所有 Lym-1 反应性样品并且不存

在于 Lym-1 非反应性样品中。在许多非反应性 HLA-DR 分子中,这两个残基常常被 D70 和 / 或 E71 取代。含有推定的重要的 Lym-1 结合残基 (Q/R70-R71) 的亚型为最具反应性的假说已经在一系列研究中得以证实,所述研究包括在掺入 31 种 HLA-DR 基因型的 B 和 T 细胞类型的淋巴母细胞系中的广泛细胞毒性测定 (Rose 等人 (1999) Mol Immunol., 36 :789-797)。所有强反应性细胞均表达含有 Q/R70-R71 至少之一的 HLA-DR 等位基因,而最小反应性细胞系无一表达位于 β 链的 70-71 位置的序列。细胞毒性测定还显示了前者比后者受影响显著 (见上文)。尽管 Lym-1 与来自健康供体的外周血淋巴细胞反应,但亲和力低得多,这与正常淋巴细胞上较低的 HLA-DR 蛋白密度一致并可发生单价而非二价结合的假说一致,这进一步解释了 Lym-1 对于淋巴瘤患者的恶性细胞的选择性 (见上文)。因此,看起来重要的 Lym-1 谷氨酰胺 / 精氨酸残基和阈值抗原密度均导致相对于正常淋巴细胞而言 Lym-1 结合恶性 B 细胞的选择性。在任何情况中,数据证明,相对于正常 PBL 而言, Lym-1 优先结合淋巴母细胞以提供了与其他恶性 B 细胞靶向蛋白的具有吸引力的差异 (见上文)。

[0352] 我们使用 CMRIT 的经验使得我们意识到操作的复杂性,并认识到许多患有晚期 NHL 的患者因为他们的疾病和骨髓产量不够而不适于 BMT。因为这些原因以及因为使用研制可显著改进治疗指数的靶向分子的新型方法来进行剂量加强的独特机会,我们已经研制了甲状腺癌中模拟 ^{131}I - 碘化物的高亲和力配体 (SHAL)。甲状腺癌中的模拟 ^{131}I - 碘化物—放射性同位素分子靶向的全身放射性治疗的原型已经导致治愈其他方法不可治愈的甲状腺癌,这是因为 ^{131}I 被快速捕获并由癌保留或在泌尿道中排泄,提供了接近无穷大的治疗指数,和进行几乎无限制的放射性同位素的给药而无显著毒性的机会。

[0353] 我们相信 SHAL 小分子可更好地实现“RIT”的潜能,并且表现出我们进行的转换活动的天然延伸,所述转换活动涉及 HLA-DR 作为放射性同位素载体分子递送全身放射性治疗的靶。如下所述,我们已经合成了许多二齿 SHAL,并确定这些 SHAL 中至少一种结合分离的 HLA-DR10。

[0354] A) 含有显示对于 Lym-1 抗体与恶性 B 细胞结合重要的区域的 HLA-DR 10 β 亚单位的分子结构的计算机模型的研制并将所述结构与其他 HLA-DR 分子进行比较

[0355] 四种密切相关的不同分子 (HLA-DR 1-4) 的晶体结构先前已被确定,并由他人贮存在 PDB 结构数据库中 (Jardetzky 等人 (1994) Nature, 368 :711-718 ;Bolin 等人 (2000) J. Med. Chem., 43 :2135-2148 ;Smith 等人 (1998) J. Exp. Med., 188 :1511-1520 ;Ghosh 等人 (1995) Nature, 378 :457-462)。将这四种蛋白质 HLA-DR 1、HLA-DR 2、HLA-DR 3 以及 HLA-DR 4 的蛋白质序列与 HLA-DR 10 序列进行比对,并进行比较以鉴定可变的氨基酸的位置和含有被鉴定为 Lym-1 抗体重要表位的氨基酸残基的 HLA-DR10 分子的那些区域 (Rose 等人 (1996) Cancer Immunol Immunother., 43 :26-30 ;Rose 等人 (1999) Mol Immunol., 36 :789-797)。该比对揭示了所有五种蛋白质均表现了高度的序列相似性 (图 8),以致于我们能够通过同源性建模并使用模型的坐标并使用 DOCK 程序来筛选配体结合而生成 HLA-DR10 β 亚单位的足够准确的三维模型。

[0356] 使用两种不同的方法生成用于配体对接的 HLA-DR10 β 亚单位的模型。第一种方法使用 HLA-DR3 的完整结构的坐标作为用于生成同源性模型的模板,在 HLA-DR3 序列中对于 HLA-DR3 和 HLA-DR10 之间不同的 19 个氨基酸进行突变 (改变)。从 HLA-DR1 结构获得存在于 HLA-DR10、HLA-DR1 以及 HLA-DR2 但不存在于 HLA-DR3 中的氨基末端四种氨基酸的

坐标,并将之用于完成模型。在第二种方法中,使用从 HLA-DR1、HLA-DR2 以及 HLA-DR4 晶体结构的不同片段获得的原子坐标来生成杂交模型。用于模型的三种 HLA 晶体结构的特定片段基于其二级结构元素的相似性来选择。使用 Smith-Waterman (Smith 和 Waterman (1981) J. Mol. Biol., 147 :195-197), FASTA (Pearson (1991) Genomics, 11 :635-650)、BLAST 以及 PSI-BLAST (Altschul 等人 (1997) Nucleic Acids Res., 25 :3389-3402) 算法来产生序列-结构比对,使用 AS2TS 系统 (见, <http://sb9.llnl.gov/adamz/LGA/AL2TS/as2ts.html> 网站) 来自动化生成模型的骨架。从 HLA-DR1 的 1seB 晶体结构取结构的四种残基的氨基末端的坐标,从 HLA-DR1 的 1aqd 结构获得残基 5-122,从 1d5m HLA DR4 结构取残基 123-170,从 HLA-DR2 的 1bx2 结构获得其余的残基 (aa171-193)。使用 LLNL 研制的 LGA 程序 (见,网站 <http://predictioncenter.llnl.gov/local/lga/lga.html>) 来进行末端区域和环的构建、氨基酸插入和删除以及模板——模型结构比较。由于其高水平的同源性,从四种结构模板 (如上所述) 掺入大多数侧链原子的坐标。使用 SCWRL 程序建立蛋白质模型的所选区域中的侧链 (见上文)。对于两种结构均进行能量最小化以消除不合适的侧链接触,使用分子动力学“优化”产生的结构。

[0357] 对生成的模型的分析揭示了两种方法产生了显著相似的结构。延长的分子动力学运行显示出提供了很小的额外改进。建模的结果揭示 HLA-DR10 分子的结构由通过铰链连接一个 Lym-1 反应性残基 (V85, 直接侧邻铰链的位置) 连接的两个结构域组成 (图 9)。

[0358] 当将 HLA-DR10 松散结构与 HLA-DR3 晶体结构进行比较时,发现其核心的大部分基本一致 (图 10)。被观察到在结合 R70、R71 以及 A74 中起作用的其他三种氨基酸 (在该位置的 A 或 E 显示对于 Lym-1 结合是重要的) 均位于紧邻铰链的长 α 螺旋的暴露表面上 (图 9 和 10)。

[0359] B) 可被靶向用于配体结合的 Lym-1 表位内 HLA-DR10 表面上独特位点的鉴定

[0360] 使用从蛋白质数据库 (Protein Data Bank) 获得的坐标和我们的 HLA-DR10 模型来计算溶剂可及的 HLA-DR10 蛋白表面和 HLA-DR3 的晶体结构。检测并比较表位中三种重要的氨基酸周围的位点 ($6\text{\AA}$ 内)。如图 11 所示,HLA-DR10 序列中这三种氨基酸变化 (Q70R、K71R 以及 R74A) 改变了该区域中被暴露的蛋白质表面的电荷分布和拓扑结构。

[0361] 所研制用于鉴定蛋白质表面上的“口袋”的程序 (SPHGEN) 用于鉴定可被靶向用于配体结合的潜在的空穴。所使用的程序的细节在实施例 2 中描述。基于在建模的 HLA-DR10 表面中两个近邻的“口袋” (空穴) 彼此接近、三个 Lym-1 反应性残基以及沿所述“口袋”的氨基酸的独特性,选择建模的 HLA-DR 10 表面中两个相邻的“口袋” (空穴) 作为配体结合的合适位点 (图 12)。对其他四种 HLA-DR 分子的晶体结构的检测也显示了“口袋”存在于各 HLA-DR 分子的这些位点处或位于这些位点附近,但如预期的 (基于 HLA-DR 结构的该区域中肽链的氨基酸序列差异),存在于各上的“口袋”的尺寸、形状以及分开它们的距离不同。由于这两个位点周围的氨基酸“景象 (landscape)”在 HLA-DR3 和 HLA-DR10 中显著不同,在两个位点进行的对接运行预期会鉴定选择性结合 HLA-DR10 上的“口袋”而不结合 HLA-DR3 的配体。被鉴定为位点 1 和位点 2 并在图 12 中显示填充红色和蓝色球体的这些位点侧邻 Lym-1 表位 R70 中最重要的氨基酸的两个位点。已经对第三独特位点进行了定位和表征,如果合适的配体不能被鉴定为结合位点 1 或位点 2 的配体,则第三独特位点作为后备被靶向。

[0362] C) 计算筛选“虚拟”配体文库以鉴定可结合包含 Lym-1 表位的 HLA-DR10 上的特异

性“口袋”的小分子

[0363] 使用 DOCK(UCSF) 程序实施对于小分子的可获得的化学目录数据库的“虚拟”筛选,以鉴定被预测结合被鉴定为位点 1 和位点 2(图 12)的两个独特“口袋”的位于前列的 1,000 个分子。计算对接操作程序的细节在实施例 2 中描述。

[0364] 然后目测观察位于前列的 2,500 个分子,向下筛选用于实验结合测定的 35 个分子(表 5)。该最后的筛选过程基于包括疏水相互作用、氢键合和分子尺寸之类的化学特性以及包括商购容易度和成本、合成性连接的容易度、一系列分子的总体结构差异性之类的实践标准,。

[0365] 表 5. 通过计算对接预测结合 HLA-DR 10 β 亚单位上的位点 1 的配体

[0366]

编号	化合物
1.	7-氨基-4-氯甲基香豆素、苄基氨基-1-脯氨酸酰胺、氢氯化物
2.	5-([4,6-二氯三嗪-2-基]氨基)-荧光素氢氯化物
3.	2-[2-[3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]carbohydrazonoyl]苯羧酸
4.	4-[[2-(4-氯基-3-苯基-5-异噁唑基)乙烯基]氨基]苯甲酸
5.	4-[2-(2,4-二氯苄基)肼并]-4-氧-2-苯基-2-丁烯酸
6.	3-(2-[[3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氧]苄胺基)-3-氧丙酸
7.	3-[(4-氯苄基)巯基]咪唑[1,5-a]吡啶-1-羧酸
8.	2-[[[1,1'-二苯基]-4-基氨基]羰基]苯甲酸
9.	双[4-(3-氨基苯氧基)苯基]砷
10.	4,4'-双(4-氨基苯氧基)联苯基
11.	5(6)-羧基四甲基若丹明 n-琥珀酸亚胺酯
12.	1,4-次苯基双[[4-(4-氨基苯氧基)苯基]甲酮]
13.	H-Tyr(Br-Z)-OEt
14.	'7-氨基-4-氯甲基香豆素, 1-丙基氨基-1-脯氨酸酰胺, 氢氯化物
15.	'5-(N'-[2-氨基乙基]巯基脲基荧光素)
16.	玛瑙四肽 I (Achatin I), 铵盐
17.	Fmoc-Asp(OBzl)-OH
18.	Fmoc-Bip-OH

[0367]

19.	Menai H535
20.	2'-甲氧基-5'-甲基-3,4,5,6-四氯苯酞氨酸
21.	4-二甲基氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸
22.	Bigchap
23.	Arg-gly-asp-thr (SEQ ID NO:9)
24.	n-Allyl-2-[(1-苯甲基-2-氧-1,2-二氢-3-吡啶基)羰基]-1-胍碳硫酰胺
25.	n'-甲氧基-n-[7-(4-苯氧基苯基)[1,2,4]三唑[1,5-a]嘧啶-2-基]亚胺基甲酰胺
26.	n-[[6-(4-氯苯氧基)-3-吡啶基]羰基]-n'-[3-(三氟甲基)苯基]脲
27.	n-[[6-(4-氯苯氧基)-3-吡啶基]羰基]-n'-(4-氯苄基)脲
28.	n,n'-二苯基联苯胺
29.	Rcl s16,963-3
30.	N,N'-双-(4-氨基-2-氯-苯基)-对邻苯二甲酰胺 4-[[5-(三氟甲基)吡啶-2-基]oxy]phenyl N-苯基氨基甲酸酯
31.	甲铵丙基乙二胺四乙酸
32.	N-(4-[[3-氯-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]甲基]苯基)-4-碘苯羧酰胺
33.	2-(4-氯苄基)-2-[6-[(4-氯苄基)sulfanyl]-3-吡嗪基]乙酰胺
34.	6-氯-n4-(4-苯氧基苯基)-2,4-嘧啶二胺
35.	4-氨基-2-苯胺基-5-苯甲酰基-3-硫代苯腈

[0368] 重复该程序用于鉴定位点 2 的 35 个潜在的结合剂。表 6 列出了由分子对接预测与位点 2 结合的那些配体。

[0369] 表 6. 通过计算对接预测与 HLA-DR10 β 单位上的位点 2 结合的配体

[0370]

1.	亮氨酸脑啡
2.	4-[4-(4-氯苄基)哌嗪并]-3-硝基苯甲酸
3.	β -酪氨酸啡肽 (1-2)
4.	L-天门冬氨酸, α -(4,5-二甲氧基-2-硝基苄基)酯, 氯化氢
5.	头孢羟氨苄
6.	3,3',5-三碘-dl-甲状腺原氨酸

[0371]

7.	H-Glu(苯胺)-OH
8.	H-Trp-phe-OH
9.	Glycylglycyl-D,L-苯丙氨酸
10.	胸腺生成素II (33-36)
11.	巯基正磷酸S-(3-(3-氨基-丙氨基)-丙基)酯, 二水化物
12.	强啡肽A (13-17), 猪
13.	L-丙氨酰基-L-丙氨酰基-L-色氨酸
14.	Asp-arg-val-tyr (SEQ ID NO:10)
15.	A-VI-5
16.	Glu-thr-pro NH ₂ (SEQ ID NO:27)
17.	(D-ala2)- β -酪吗啡 (1-5) (牛)
18.	Tyr-D-ala-gly-phe-D-met 醋酸盐 (SEQ ID NO:28)
19.	Arg-gly-asn-thr (SEQ ID NO:29)
20.	N- α ,n- ω -di-cbz-L-精氨酸
21.	Asp-lys 乙酸盐
22.	(+)-Allo-章鱼肉碱
23.	钠 7-[(2-氨基-2-苯乙酰基)氨基]-3-甲基-8-氧-5-硫代-1-Azabicyclo[4.2.0]辛-2-烯-2-羧酸钠
24.	Val-ile-his-asn
25.	2-氨基-8-(二苯基氧磷基)-辛酸
26.	Glu-His-Pro NH ₂ (SEQ ID NO:30)
27.	Bapaba
28.	H-glu(lys)-OH
29.	Bis-boc-L-arg
30.	H-arg(mtr)-OH
31.	4-氯甲基-L-苯丙氨酸boc
32.	H-met-met-OH
33.	H-trp-ile-OH
34.	N- α -苯氧基-精氨酸-4-氨基苯甲酸

[0372]

35.	(Thr46)- 鲑鱼降钙素 (45-49) (人)
-----	----------------------------

[0373] 由于计算对接,通过 NMR 从位点 1 和位点 2 列表实验性筛选了 30 种化合物。发现 11 种化合物结合 HLA-DR10,提供了 37%的成功命中率。这些配体列于表 7。

[0374] 表 7. NMR 筛选被发现结合 HLA-DR10 的配体。通过计算预测的对接位点分离配体。

[0375]	位点1:	位点2:
	5 (6) 羧基四甲基若丹明-n-琥珀酸亚胺酯	N- α 苯酰基-精氨酸-4-氨基苯甲酸
	甲铵丙基乙二胺四乙酸	5-亮氨酸脑啡肽 (YAGFM)
	脱氧胆酸	N α N ω -二苄酯基精氨酸
	FMOC-天门冬氨酸 (O-苄基)-OH	血管紧张素II (DRVY)
	4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基-L-缬氨酸	双-BOC-L-精氨酸
	4-[[5-(三氟甲基)吡啶-2-基]氧]苄基 N-苄基氨基甲酸	

[0376] 从表 7 看出,已经合成了含有不同系列的位点 1 和位点 2 配体的 5 种合成性高亲和力和配体 (SHAL)。这些分子中的三种 (图 13A) (所有均含有配体对脱氧胆酸和 5-亮氨酸脑啡肽) 已显示结合分离的 HLA-DAR10。这三种 SHAL 无一结合白蛋白或链霉亲和素。已经使用表面等离子共振确定有待于更广泛检测的这三种中的第一种——JP459B (图 13B) 以 $K_d = 23\text{nM}$ 结合 HLA-DR10。使用 Raji 膜萃取物,该 SHAL 与 Lym-1 竞争结合 HLA-DR10。使用活细胞进行的结合研究显示 JP459B 结合 Raji 人淋巴瘤细胞,但不结合正常的 DU145、LnCAP 或 22RV 细胞 (图 17E-H)。使用冷冻的人淋巴瘤组织切片的实验也证实了 JP459B 结合过度增生的大细胞淋巴瘤,但较少结合小细胞淋巴瘤细胞 (图 17A-D)。对于 Lym-1 抗体获得了相似的结果。对于正常和肿瘤组织点阵列的更为广泛的检测在进行中。

[0377] 在随后的筛选中,其他配体已显示结合 HLA-DRA10。这些示于表 8。

[0378] 表 8. 其他结合 HLA-DR10 的配体

[0379]

配体识别号	种类
11	3,3',5-三碘-dl-甲状腺原氨酸 (预测的位点 2) (TI)
7	2-(4-氯苄基)-2-[6-[(4-氯苄基)sulfany]-3-噻嗪基]乙酰胺 (12F)
9	4-氨基-2-苯胺基-5-苯甲酰基-3-噻吩腈 (5K)
8	6-氯-n4-(4-苯氧基苄基)-2,4-嘧啶二胺 (7L)
6	N-(4-[[3-氯-5(三氟甲基)-2-吡啶基]甲基]苄基)-4-碘苯基甲酰胺(6J)

[0380] 此外,1,4- 次苄基双 [[4-(4- 氨基苯氧基) 苄基] 甲酮] 沉淀至靶蛋白上。

[0381] 实施例 2 :用于生成 SHAL 的计算方法

[0382] A) 分子模拟的作用的概括和方法

[0383] 如本文所述,可使用分子建模初始鉴定用于构建 SHAL 和 / 或用于优化 SHAL 的配体。目前,没有可用于对靶分子进行建模、对于结合配体进行筛选、模拟多齿 SHAL 的结合以及预测最佳 SHAL 结构的单独的分子建模方法。然而,许多良好建立的建模方法可用于促进本文所述的这些任务。

[0384] 在最高水平开始,通常使用基于与具有实验性已知结构的蛋白质具有同源性的基本序列的高度经验方法来预测三级结构靶分子(例如,蛋白质癌症标志物)。这些所谓的基于同源性的蛋白质结构预测方法的准确性取决于同源的蛋白质结构的可用性和各建模者的技能。为了鉴定特异性结合蛋白质“口袋”的小分子(配体),可如本文所述地应用计算“对接”。对接使用相对简单的经验力场来描述配体-蛋白质相互作用并可因此快速筛选 100,000 种可能的配体。为了确定优选的大分子构象和相互作用,可使用经典的分子动力学方法,所述方法使用经验球-弹簧力场对分子进行建模。最后,对于小分子结构和相互作用的精确预测,可以计算地解决描述分子内电子和原子核的量子力学方程式。该所谓的第一原理方法可用于确定分子的静止“快照”的结构和能量或模拟分子系统的原子运动。前一种方法被称为初始量子化学方法,而后一种方法被称为第一原理分子动力学(与经典的分子动力学方法相比)并构成几乎完整的天然模拟。

[0385] B) 基于同源性的蛋白质结构预测

[0386] 基于同源性的蛋白质结构预测的基本概念依赖于下述观察结果,即,在达到比其序列高得多的程度的演变过程中蛋白质的结构特点是保守的,因此,可预期甚至远序列相似性相关的蛋白质具有相似的三维结构(Chothia 和 Lesk(1986)EMBO J., 5:823-826)。因此,一旦对于至少一个典型的蛋白质家族确定了三维结构,对于其他家族成员的模型可使用已知的结构作为模板来衍生。基于同源性的蛋白质建模由四个步骤组成:找到与待建模的蛋白质序列相关的已知结构,将所述序列与这些结构进行比对,构建三维模型,以及评价该模型(Marti-Renom 等人(2000)Annu Rev Biophys Biomol Struct., 29:291-325)。

[0387] 基于同源性的蛋白质结构预测(也称为比较建模)根据序列与一种或一种以上相关的蛋白质结构比对而产生了该序列的所有原子模型。三维模型自身的构建包括蛋白质、环以及侧链的核心的顺序或同时建模。图 15 显示了基于同源性的蛋白质建模中的主要步骤的流程图。

[0388] 使用比较建模技术构建的模型的准确性通常与序列和其基于的结构序列同一性的百分数相关。高准确性比较建模基于与其模板超过 50% 的序列同一性。对于主要侧链原子来说,它们往往具有约 1 Å 的均方根(RMS)误差。这样的准确性与中等分辨率核磁共振(NMR)或低分辨率 X 射线结构具有可比性。这些情况中的误差通常限于侧链旋转异构体设置的错误,核心主链区域中的小移位或变形,以及环中偶尔较大的误差。

[0389] 一种常见的建模方法与之前成功用于对高同源性和低同源性靶蛋白进行建模的方法相似(Venclovas 等人(1999)Proteins-Structure Function and Genetics, 73-80)。由于我们的建模物体(例如,诸如 HLA-DR10 之类的癌症标志物)可具有高序列同源性(> 50% 序列同一性),我们可依赖于建模靶(查询)与已知结构的蛋白质(来自蛋白质数据库(PDB))的配对序列比较来鉴定最接近的结构模板。为了做到这个,可使用在 SSEARCH 程序(Pearson(1991)Genomics 11:635-650)中实施的敏感性 Smith-Waterman 配对序列比较算

法 (Smith 和 Waterman(1981) *J. Mol. Biol.*, 147 :195-197)。对于保守性结构区域可以将高水平序列同源性结构比对直接用于模型构建。

[0390] 当可获得具有可比较的相似性的许多结构模板时,可使用 MODELLER——能够自动化将许多模板结构进行组合以更好地表现查询的结构的比较性建模程序。在重要区域存在于靶分子的情况中,可以特别关注比对这些区域的构象。这些区域的候选构象可通过检索也满足这些区域的立体结构限制的相同长度片段的同源性结构的数据库来产生。在选择实际构象中,可考虑接近区域的序列相似性和结构。可使用依赖骨架的旋转异构体文库来对模型中的侧链进行定位 (Bower 等人 (1997) *J. Mol. Biol.* 267 :1268-1282)。

[0391] 可使用几种技术评价所获得的模型。这些技术中的一种——用于检测蛋白质结构中的误差的 ProsaII (Sippl (1993) *Proteins*, 17 :355-362, ;Aloy 等人 (2000) *J. Comput. Aided Mol. Des.* 14 :83-92) 生成沿蛋白质序列的能量图。通过 ProsaII 进行高能量值比对的区域常常用作表现这些特定区域的结构误差的良好指标。对于建模的结构详细检查,可与虚拟检查一起使用 WHATIF 程序的结构验证模块 (Vriend (1990) *J. Mol. Graph.* 8 :52-56)。如果这些模型质量的评价鉴定了建模结构中的任何问题,以迭代方式重复合适的步骤(诸如环比对或侧链定位)直至获得三维模型的可接受质量。

[0392] 使用这些方法,研制了含有显示对于 Lym-1 抗体与恶性 B 细胞结合重要的区域的 HLA-DR 10 β 亚单位的分子结构的计算机模型,并将该结构与其他 HLA-DR 分子的结构进行比较(见上文实施例 1)。该模型用于研制本文所述的 HLA-DR10 特异性 SHAL。

[0393] C) 计算对接

[0394] 通过筛选大量分子并预测它们是否结合靶蛋白的活性位点,可使用诸如对接之类的计算方法加速药物研制和抑制剂设计的进程 (Desjarlais 等人 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87 :6644-6648 ;Mao 等人 (1998) *Bioorganic and Medicinal Chem. Letts.*, 8 :2213-2218 ;Olson 和 Goodsell (1998) *Environmental Res.*, 8 :273-285 ;Rutenber 等人 (1993) *J. Biol. Chem.*, 268 :15343-15346)。这些努力已经在有效抵抗对于疾病感染和传播重要的 HIV 蛋白的新药设计中取得了适当的成功。

[0395] 在一些实施方式中,该方法通常可用作通常以微摩尔范围结合靶分子的配体(结合部分)的鉴定中的第一步骤。文献中已描述了使用 SPHGEN 和 DOCK 的对接方法的详细方案。例如,这些方法已经用于鉴定结合破伤风神经毒素的靶向结构域上的特异性位点结合的配体 (Cosman 等人 (2002) *Chem Res Toxicol* 15 :1218-1228 ;Lightstone 等人 (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, 13 :356-362)。

[0396] 使用 DOCK 4.0 程序计算地筛选可获得的小分子化学目录(大约 300,000)以鉴定被预测结合所鉴定的位点 1 和位点 2 的位于前列的 2,500 个分子(图 12)。

[0397] 可认为计算对接有三步过程:1) 蛋白质表面的位点鉴定;2) 将配体与所鉴定的结合位点进行对接;以及 3) 对配体进行评分和分级 (Halperin 等人 (2002) *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 47 :409-443)。对于位点鉴定而言,通常计算靶蛋白的溶剂可及表面。使用 DOCK (Moustakas 和 Kuntz (2002). DOCK5.0 (San Francisco, UCSF)) 中的工具 -SPHGEN 程序,可通过使用不同尺寸半径的球体来填充“口袋”而鉴定蛋白质表面的凹“口袋”。基本上,这计算了“口袋”的体积。基于蛋白质的尺寸和形状,蛋白质的表面无论何处可具有三十至数百个“口袋”。一旦鉴定了这些“口袋”,基于“口袋”尺寸,目测检查

“口袋”鉴定结合位点和可获得的实验证据,该证据例如结合或催化中涉及的已知氨基酸。然后将所选择的结合“口袋”用于随后的对接程序。

[0398] 对接研究鉴定了可特异性结合蛋白质上所选结合位点的小分子。DOCK5.0 程序在计算机上筛选化合物数据库并预测哪些分子可能紧密结合所述结合位点。在图 16 中描述了该程序。我们使用来自 MDL 的可获得的化学物质目录 (ACD) 作为我们的待筛选的化合物的数据库。

[0399] 通过预过滤去除 soaps 和 dyes 来制备数据库。在通过使用 Sybyl 的 Gasteiger-Marsili 电荷 (Gasteiger 和 Marsili(1978)Tetrahedron Letts.,34:3181-3184;Gasteiger 和 Marsili(1980)Tetrahedron 36:3219-3288;Gasteiger 和 Marsili(1981)Organic Magnetic Resonance 15:353-360) 计算化合物的部分电荷之后,通过总化合物电荷来划分数据库,并滤除具有 $> \pm 3$ 的有效电荷的化合物。另外,去除 < 10 和 > 80 的重原子(非氢)的化合物以集中于具有前导(主要)药物化合物的尺寸范围内的化合物。该预过滤使得数据库更高效并消除了对于已知不结合或无差别地结合的化合物的不必要的计算。为了模拟柔性对接技术,对于数据库中的各化合物生成了 20 种独特的构象。然后将这些构象中的各构象与结合位点进行刚性对接。对于各配体的各构象,检查结合位点中的不同方向。在分子间范德华和静电相互作用源于 AMBER(Weiner(1984)J. Am. Chem. Soc.,106:765-784) 的情况下,通过能量最小化对所有化合物进行评分。尽管基于评分对分子进行了分级,评分函数并不预测结合亲和力。

[0400] 然后如实施例 1 所述地,目测观察位于前列的 2,500 个分子以向下筛选用于实验结合测定的 35 个分子。筛选配体并构建二齿 SHAL 并如实施例 1 所述地进行检测。

[0401] 前导化合物与靶结合可通过使用连接在一起的多个(2-3)化合物而改进一些数量级。对于有效的抑制剂,需要特异性识别靶蛋白并以高亲和力结合。

[0402] D) 量子化学计算

[0403] 已经研究出许多种化学模拟方法,范围自经验球-弹簧型分子力学模型至初始(ab initio)(第一原理)量子化学方法,所述多种化学模拟方法计算对描述电子和原子核的准确量子力学方程式的近似解。通常,方法的选择涉及准确性、化学系统的尺寸以及计算成本之间的权衡取舍。这些建模方法可大体分为分子动力学方法和静态方法,所述分子动力学方法模拟化学方法的时间演化,所述静态方法预测诸如分子的最低能量配构型或化学反应的能量之类的不依赖于时间的分子特性。人们可以使用下文所述的所有三种分子建模方法:初始量子化学方法、经典的分子动力学方法以及本文所述的 SHAL 设计和优化中的第一原理分子动力学方法。

[0404] 1. 初始量子化学方法(QM)

[0405] 初始量子化学方法涉及计算描述分子系统的准确的非相对论 Schroedinger 方程式(Jensen(1999)Introduction to Computational Chemistry,New York,John Wiley and Sons)的近似解。原则上,这些方法可预测任何化学系统的特性至任意的准确性,但在实践上,计算成本限制了这些方法的准确性和它们可适用的分子系统的尺寸。尽管如此,初始量子化学计算通常适用于计算用于包含达数百个原子的分子系统的准确结构和反应能量。

[0406] 具有不同初始量子化学方法的体系,涉及关于电波函数的准确性逐渐增加的数学描述—在分子的原子核周围电子分布的数学描述(见上文)。量子化学方法的应用通常

需要选择电子-电子相互作用的描述(理论水平)和电子空间柔性(基础)。已经研究出一类被称为密度官能度理论(DFT)的非常新的方法,该方法包括电子-电子相互作用的经验参数化,并且常常提供与早期高水平量子化学方法具有可比性的准确性(诸如偶联簇方法之类),但具有低得多的计算成本。所应用的经验电子-电子“官能度”方法通常指明DFT方法。两种广泛使用的DFT官能度为Becke 3-参数杂交更换官能度(Becke(1993) J. Chem. Phys. 98 :5648-5652)和Lee-Yang-Parr 梯度校正电子相关性官能度(Lee 等人(1988) Chemical Physics 123 :1-25)。已经广泛证明了当这些与足够的基础集合一起使用时产生大多数分子的准确的化学结构和反应能量(Jensen(1999) Introduction to Computational Chemistry, New York, John Wiley and Sons)。

[0407] 本文描述的量子化学模拟用于研究在紧密细胞外环境中发生的化学过程。上述的量子化学方法通常仅描述分离(通常被描述为“气相”)的分子,因此不包括通常对于生物分子的结构和能量来说是关键的化学环境,例如溶剂分子和平衡离子。明确地包括周围的水分子和平衡离子通常在计算上不实际,然而,已经在用于有效包括溶剂相互作用的量子方法中研究出几种方法。通常,这些方法将溶剂建模为响应量子化学衍生电荷而极化的连续介质。尽管,具有许多有必要明确包括溶剂的情形,但这些所谓的可极化连续模型已经证明了在预测包括总溶剂化能量和酸常数的溶剂相化学特性中相当准确(Schüürmann 等人(1998) J. Physical Chemistry A 102 :6706-6712; Tran 和 Colvin(2000) J. Molecular Structure, Theochem 532 :127-137)。

[0408] Warshel 的 Langevin 偶极子方法与这些可极化连续模型相关,但包括极性溶剂的较现实的表现。Langevin 偶极子方法将溶剂建模为在固定的三维网格上的一大组可极化偶极子(Luzhkov 和 Warshel(1992) J. Computational Chemistry 13 :199-213)。最近已经将该方法参数化用于初始衍生的溶质电荷,并显示产生用于与上述 PCM 方法相比具有可比性或较好的中性分子和离子分子的溶剂化能量(Florian 和 Warshel(1997a) J Am Chem Soc., 119 :5473-5474)。

[0409] 2. 第一原理分子动力学方法(FPMD)

[0410] 通过将 QM 方法直接确定的力组合而驱动在模拟中的所有原子的经典运动,可以使用经典分子动力学实现量子力学(QM)的准确性。基于密度官能度理论(DFT)(Kohn Sham(1965) Physical Review 140 :A1133)的新技术发展,该方法变得在计算上可行,所述DFT将相同时间的电子自由度作为运动的原子核方程来处理(Car 和 Parrinello(1985) Physical Review Letters 55 :2471-2474; Galli 和 Parrinello(1991), Computer Simulation in Materials Science, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 第283-304页)。由于所述方法应用QM理论来描述整个系统,它常被称为第一原理分子动力学(FPMD)。在FPMD的典型实施中,仅使用平面波基础的扩展来明确描述化学有效化合价,而化学惰性核心电子通过假电位来表现(Galli 和 Pasquarello(1993) Computer Simulation in Chemical Physics, 第261-313页, D. J. Tildesley, ed. Dordrecht, Kluwer; Yin 和 Cohen(1982) Physical Review B(Condensed Matter) 25 :7403-7412)。因为假电位通过设计是可转移的,当研究新系统时该方法不需要再参数化。另外,使用平面波基础集合天然地赋予自身至循环边界条件的应用,所以该方法非常适于浓缩相中的建模系统。该方法与几种其他计算改进相结合(Gygi(1993) Physical Review B 48 :11692-11700; Hutter 等

人 (1994) Computational Materials Science 2:244-248;Payne 等人 (1992) Rev. Modern Physics 64:1045-1097) 可作为解决整合 QM 和 MD 的问题中的手段。

[0411] FPMD 模拟的首要应用限于诸如晶片的小系统 (Car 和 Parrinello (1985) Physical Review Letters 55:2471-2474;Stich 等人 (1989) Physical Review Letters 63:2240-2243)。由于这些方法已经得以连续改进,先进的计算资源变得可获得 (例如, DOE teraflop scale 超计算机),目前持续微微秒时间量程来研究含有几百原子的生物化学系统是可能的 (Carlioni 和 Alber (1998) Perspectives in Drug Discovery and Design 9/11:169-179;Pantano 等人 (2000) J. Molecular Structure (Theochem) 530:177-181;Rovia 和 Parrinello (2000) International Journal of Quantum Chemistry 80:1172-1180)。例如,最近我们模拟了 DNA 骨架的小化学分子模型在溶液中的构象动力学。由于使用该新方法研究的系统的数量增加,以极其准确的结构和动力学特性的形式所回报的计算费用增加则变得明显。特别地,这些方法潜在地允许包括螯合剂-金属离子相互作用和酶-催化反应的化学现象的非常准确的动力学模拟。

[0412] E). 经典分子动力学方法 (MD)

[0413] 经典的分子动力学方法可用于鉴定靶分子的结合位点中配体的确切方向 (例如, HLA-DR 10 结合位点 (位点 1 和位点 2))。该信息可用于设计多价配体来将放射性同位素选择性带至靶分子和 / 或带至展示靶分子的细胞。

[0414] 特别地,该结构数据有助于鉴定配体上的哪些官能团可用于合成地连接连接体。对于被实验性证实结合靶的所有配体来说,可对于靶结合位点中的配体进行经典的分子动力学来确定配体的构象和方向以及介导结合特异性的特定相互作用 (例如,氢键、静电相互作用和范德华力相互作用)。在一些实施方式中,分子动力学模拟包括靶和在循环水箱中溶剂化的配体。对于各配体,可使用多重初始的方向来进行 500 微微秒至几纳秒的模拟。

[0415] 本发明多齿 SHAL 的一个重要组分是在组成 SHAL 的各配体 (结合部分) 之间的分子连接体。通常,该连接体采用水相构象 (或构象组),所述水相构象 (或构象组) 在合适的距离容纳两个 (或两个以上) 配体以高效结合靶表面上的其结合位点。为了有助于设计该连接体,可对单独的连接体分子或与特异性配体化合物结合的连接体进行经典的分子动力学方法。

[0416] CHARMM 程序可用于对多种连接体进行经典分子动力学模拟。例如,使用 PEG 连接体进行的模拟可利用分子中不同数量的 PEG 单元 (4、6 以及 8)。用于所有四种模拟的初始结构可具有完全伸展构象的分子。这些伸展的分子可在水箱中溶剂化,并且将钠离子添加至各水箱以中和系统。将这些溶剂化系统加热至例如 300K 并使得平衡 200 微微秒。通常,可在恒温 (NVT 总和) 和由粒子筛网 Ewald (PME) 总和处理的静电相互作用下来运行模拟。

[0417] 一开始,如使用计算机制图法通过对接和分子动力学方法所测定地,可将待连接的两种化合物目测检查与蛋白质一起结合。例如,使用两种化合物之间的分子画图软件 (AMPAC) 来构建聚乙二醇 (PEG) 连接体。然后可在循环水箱中使用经典分子动力学方法来模拟该结构,例如,使用如上所述的持续几纳秒的经典分子动力学方法。人们可分析有关动力学运动所产生的数据以测量平均配体-配体距离和相关的配体方向。可将该数据与配体之间的距离和靶表面上的相关方向进行比较以确定用于连接体的最佳长度。

[0418] 还可使用分子动力学模拟研究关于总体 SHAL 的许多其他特性以优化它们的治疗

有效性。特别地,可将分子动力学模拟用于研究许多修饰,包括连接体自身的化学结构,和各末端的两个配体。这些模拟的目的是在昂贵的合成修饰之前鉴定这样的修饰对于靶结合效率和特异性的可能影响,

[0419] 分子动力学方法使用经验衍生的经典力场来模拟化学系统中各原子的运动。对于该方法进行了高度研制以用于模拟核酸 (Beveridge 和 McConnell (2000) *Curr. Opinion in Structural Biology* 10:182-196) and proteins (Brooks 等人 (1983) *J. Computational Chemistry* 4:187-217; Cheatham 和 Brooks (1998) *Theoretical Chemistry Accounts* 99:279-288; Doniach 和 Eastman (1999) *Curr. Opinion in Structural Biology* 9:157-163)。公布的典型的分子动力学模拟涉及被持续多纳秒时间模拟的 10-100,000 个原子 (包括被模拟的生物分子以及水和平衡离子的周围外壳),所公布的最大模拟为对小蛋白质的 1 纳秒模拟 (Duan 和 Kollman (1998) *Science* 282:740-744)。认为多纳秒时间量程足以捕获结构松弛和溶剂重构,并且在一些情况中时间足够长以模拟不同大分子构象之间的转变 (Cheatham 和 Kollman (1996) *J. Mol. Biol.*, 259:434-444; Yang 和 Pettitt (1996) *J. Physical Chemistry A* 100:2564-2566)。

[0420] 最近已经公布了与 SHAL 的 PEG 连接体的设计相关的聚乙二醇 (PEG) 分子动力学模拟。Heymann 和 Grubmüller 使用经典动力学方法来描述各 PEG 链的构象和静电特性 (Heymann 和 Grubmüller (1999) *Chemical Physics Letters* 307:425-432; Young 和 Lovell (1992) *Introduction to Polymeres*, New York, Chapman and Hall)。他们模拟了在水相 (由 1539 个水分子溶剂化) 和气相 (在诸如十六烷之类的非极性溶剂中达近似的溶剂化) 中的 PEG18-mer (约 1 千道尔顿分子量)。他们发现在气相中 PEG 迅速瓦解成无局部结构的紧密结构,如具有螺旋局部结构的 PEG 测量到的程度。在水中,PEG 的行为完全不同。它显示了与完全伸展的结构相比回转半径减小,但保留显著的螺旋程度并因此保留一定程度的硬度。这些模拟表明 PEG 结构的局部变硬是由在 PEG 链的连续氧之间形成氢键桥的水分子形成。他们进一步模拟了 PEG 链具有自 0 至 500 纳牛顿的范围的力的伸展 (这模拟了使用原子力显微镜的实验性研究)。他们在他们所预测的力和具有最近在单个 PEG 分子中测量的数值的伸展曲线之间发现了良好的一致性 (Oosterhelt 等人 (1999) *New Journal of Physics* 1:6.1-6.11)。

[0421] 这些结果证明了 PEG 的经典分子动力学方法模拟可准确再生成诸如力 / 伸展曲线之类的复杂特性,并强有力地支持所推荐的 PEG 化的支架模拟的准确性。尽管目前使用的 PEG 化支架 (13.6 千道尔顿分子量) 比 Heymann 和 Grubmüller 模拟的 PEG 18-mer 大得多,但它仍很好地在常规分子动力学模拟的范围内。

[0422] 使用 CHARMM 软件包 (Brooks 等人, (1983) *J. Computational Chemistry* 4:187-217) 并使用 22 版参数组 (MacKerell 等人 (1998) *J. Physical Chemistry B* 102:3586-3616) 可容易地进行分子动力学模拟。可使用 CHARMM 和 VMD 分布的分析工具 (一种图解分子动力学分析工具) 进行分析 (Humphrey 等人 (1996) *J. Molecular Graphics* 14:33-38)。

[0423] 典型设置和模拟运行中的步骤如下:

[0424] 初步设置:

[0425] 1. 对于不包括在 CHARMM 力场中的原子类型的部分电荷的计算。在 Hartree-Fock

理论级别使用 6-31G(d) 基础组来对含有非参数化的原子类型的模型化合物进行优化。收敛后,使用 Merz-Kollman 电荷适配方案来计算各原子的部分电荷 (Besler 等人 (1990) J. Computational Chemistry 11:431-439)。这些电荷可取代缺省原子电荷。

[0426] 2. 待模拟的分子:

[0427] a. 分子结构的构建

[0428] 可使用 QUANTA 来构建待模拟的分子,并如上述步骤 1 所述地获得原子电荷。然后可计算整个化合物的净电荷。

[0429] b. 分子结构的溶剂化:

[0430] 在步骤 2a 中构建的分子和分子复合物可使用 SOLVATE 程序定位的 Na^+ 离子来中和。然后可在水分子箱中对整个系统进行溶剂化,并然后可调整该模拟箱以产生合适的密度。

[0431] B. 运行模拟:

[0432] 1. 分子 / 水 / 平衡离子系统的平衡:

[0433] a. 最小化:为了从构建相去除存留在分子结构中的残留张力,可将上述步骤 2b 的溶剂化分子最小化 10,000 级,对于最先的 1,000 个迭代使用最陡的坡度来进行,其余的使用所采用的基础牛顿-Raphson 方法来进行。

[0434] b. 平衡:在最小化之后,可经 10 纳秒将温度从 0K 升至 300K,之后在 300K 固定。可在恒温下持续 200 纳秒来平衡系统。通过颗粒筛网 Ewald 方法来处理长程力 (Essmann 等人, (1995) J. Chemical Physics 103:8577-8593)。水分子为 TIP3P (Jorgensen 等人 (1983) J. Chemical Physics 79:926-935)。可使用 2 飞秒的整合时间步骤,并应用 SHAKE 算法来限制氢原子的所有运动 (Reichert 和 Welch (2001) Coordination Chemistry Reviews 212:111-131)。

[0435] c. 生成运行:对于生成模拟,可使用恒温分子动力学方法 (使用 NVT 总和)。颗粒筛网 Ewald 方法 (Essmann 等人, (1995) J. Chemical Physics 103:8577-8593) 可用于长程力。在动力学运行过程中,对于随后的分析可以每 0.1 皮秒节省一组完整的原子坐标。对于最初的模拟,以每纳秒 625cpu 小时 (大约 4 周) 的相应速度在我们的 Compac Alpha 计算机上运行分子动力学模拟,因此,这些系统的多纳秒模拟通常适用于我们的大网络的工作站。

[0436] 实施例 3 二齿 SHAL 的合成和检测

[0437] 二价 SHAL (LeacPLD)₂LPDo 被合成,通过 HPLC 纯化,并通过质谱法来表征。该 SHAL 具有两个经连接体相互连接的 JP459B 二齿配体和第三臂上连接的 DOTA (见,例如,图 14)。

[0438] 在正交保护的赖氨酸残基周围设计 SHAL 来促进固相树脂上的合成。可商购获得的 Fmoc 保护性氨基酸样小 PEG (2CH₂O) 用作连接体来逐步增加脑啡肽和脱氧胆酸部分之间的距离。使用 Fmoc-生物素基-赖氨酸将生物素引入 SHAL 以用于 biacore 实验。所有 SHAL 均遵从相同的配置:CO₂H: 生物素-赖氨酸:赖氨酸:(a 赖氨酸 NH₂:0,1,2 小 peg 连接体,脱氧胆酸)(g 赖氨酸 NH₂:LFGGY-NHAc)。双二齿 SHAL 遵从下列规定:CO₂H: 生物素-赖氨酸:赖氨酸:[(a 赖氨酸 NH₂:0,1,2 小 peg 连接体,脱氧胆酸)(g 赖氨酸 NH₂:LFGGY-NHAc)]₂-因此第二赖氨酸残基附近是非对称的。

[0439] 所有使用的化学物质均购自 Aldrich 或 Nova Biochem。在氯三苯甲基氯树脂上使用标准的 Fmoc 固相合成来合成 SSHAL。从树脂裂解配体,并使用合适的试剂去除保护基团。通过在碳酸氢铵中搅拌去除在从树脂裂解过程中在脱氧胆酸的伯醇上形成的三氟乙酸树脂。使用反相高效液相色谱 (HPLC) 纯化 SHAL。在 Agilent 1100 仪器 (Waters Symmetry C18, 5mm, 4.2×150mm 柱) 上以 1mL/分钟进行分析性 HPLC,并在 Waters 预备性仪器 (Waters Symmetryprep C18, 7mm, 19×300mm 柱) 上以进行预备性 HPLC。使用核磁共振 (NMR) 光谱法和电喷射质谱法来表征 SHAL。于 Bruker DRX 500MHz 光谱仪上记录 ¹H 和 ¹³C 核磁共振光谱。在以阳离子模式运行 Micromass Quattro Micro API 质谱仪上获得质谱。

[0440] (LeacPLD)₂LPDo 的质谱显示其不含有任何游离的 DOTA。基于用于合成 SHAL 的工艺,预期不存在游离的 DOTA。通过将各连接体组分或配体连接至生长链上来合成 (LeacPLD)₂LPDo,所述生长链共价地连接至树脂表面。在各化学反应之后,广泛洗涤树脂来去除未反应的产物。在合成的开始,将 DOTA 与连接体连接。在洗除剩余的 DOTA 之后,在树脂上进行多个另外的化学反应来添加多种连接体和配体,在各反应之后,再洗除未反应的产物。在 SHAL 合成完成之时,样品中存在的游离的 DOTA 的量为 HPLC 和质谱检测不到的测量值。DOTA 连接极其稳定,因此一旦它被连接,它不会从 SHAL 解离。

[0441] 在放射性化学方法过程中,可具有相关放射性同位素标记的早期径流峰值中可存在的组分包括缓冲盐(碳酸氢铵)、在最终的合成步骤过程中从 SHAL 羟基去除的可能痕量的三氟乙酸盐、未结合 DOTA 的多余的 EDTA 以及游离的和 EDTA 复合的同位素。透析可不仅是用于高效去除所有该物质的优选方法。反向透析是一种用于纯化的优选方法。可选地,在放射性化学方法之后使用 EDTA 微珠柱来进行螯合剂(EDTA) 涤气,以去除已经被 DOTA 螯合或以非特异性方式松弛连接的放射性金属。

[0442] 为了高效地将金属带至 DOTA 中,将反应混合物调整至合适的碱性 pH 也是重要的。由于作为分子的 SHAL 与抗体-DOTA 分子相当不同,用于对 SHAL-DOTA 复合物引发 pH 的方法还优选足以在 SHAL 上提升 pH。人们可以容易地将其他金属带入 DOTA,如果它们在任何阶段存在的话。可通过检查化合物的质谱来检测这些金属。我们已经观察了来自纯化的 SHAL 的光谱,其中观察到很少的金属或没有金属。

[0443] 以类似方式来合成生物素化的脱氧胆酸-碘化甲状腺原氨酸 SHAL。

[0444] ELISA 测定显示 SHAL, LeacPLBD(单价二齿 SHAL) 结合并区分含有 HLA-DR10 的细胞和不含有 HLA-DR10 的那些细胞(见,图 20)。

[0445] 进行的一些药物代理动力学、生物分布以及成像研究,其具有一致的结果。在一些实施方式中,在 Raji 肿瘤小鼠中测定 ¹¹¹In-DOTA[SHAL 070804 (LeacPLD)₂LPDo] 的生物分布(见,例如,图 19A)。

[0446] 实施例 4 结合肿瘤细胞受体 HLA-DR10 上的结构表位的合成性高亲和力配体的研究

[0447] 已经鉴定了区分恶性癌细胞与其正常相应细胞的许多细胞表面蛋白受体。尽管显示出这些受体中的一些在癌细胞上较丰富(例如 CD20, CD22),而其他受体已被证实与存在于正常细胞上的相同或密切相关的受体在结构上不同(例如,HLA-DR10, Muc-1)。这已经导致了用于放射免疫治疗的与放射性同位素共轭的多种基于抗体的、受体特异性试剂的研制。Lym-1(被研制出的结合仅存在于人类淋巴瘤和正常 B 细胞淋巴瘤上的丰富细胞表面

受体 HLA-DR10 上的独特结构表位的抗体)已经在非何杰金氏淋巴瘤的治疗中取得一些成功。在研制用于治疗非何杰金氏淋巴瘤的较小和较有效的治疗剂的努力中,在结合该相同的 HLA-DR 10 结构表位的一系列小 (< 3kD) 选择性高亲和力配体 (SHAL) 中我们已经合成了第一种。使用四种已知的相关 HLA-DR 分子的晶体结构来生成 HLA-DR10 的同源性模型。鉴定出位于蛋白质表面与 Lym-1 结合所需的关键氨基酸邻近的两个独特的“口袋”,并使用计算对接技术预筛选小分子的大文库以预测哪种化合物与各位点结合。使用核磁共振分光术来实验性地检测小量的这些化合物以证实其与分离的 HLA-DR10 蛋白结合,并使用固相合成化学方法将与两个不同“口袋”结合的化合物对连接在一起以生成具有不同长度连接体的一系列二齿试剂。对于分离的 HLA-DR10 (大约 23nM) 表现出最高亲和力的 SHAL 显示出与含有 HLA-DR10 的九种不同培养细胞系选择性结合并与从具有小细胞和大细胞人类淋巴瘤的患者获得的冷冻和固定组织切片结合。也合成了该 SHAL 的二齿形式,该 SHAL 的二齿形式显示出进一步提高细胞结合。

[0448] 实施例 5 六精氨酸提高 Raji 淋巴瘤细胞对选择性高亲和力配体的摄取和残留概况

[0449] 已将与见于病毒蛋白的那些肽序列相似的多种富含精氨酸的肽序列与其他分子共轭以促进其运输至靶细胞的细胞质和细胞核。已将选择性高亲和力配体 (SHAL) (DvLPBaPPP)₂LLDo (被研制仅与表达 HLA-DR10 的细胞结合) 与这些肽转导结构域之一 (六精氨酸) 共轭以评价关于 Raji 细胞 (一种 B 细胞淋巴瘤) 对 SHAL 摄取和内化相关的肽的完整性。

[0450] 通过将六 D-精氨酸残基顺序添加至嵌入 SHAL 的连接体中的赖氨酸来生成含有六精氨酸肽的 SHAL (DvLPBaPPP)₂LLDo 的类似物。使用完整细胞结合测定和共聚焦显微术来检测表达 HLA-DR10 的 Raji 细胞 SHAL 结合、内化以及残留。观察到 Raji 细胞与 ¹¹¹In 标记的六精氨酸 SHAL 类似物结合比使用母体 SHAL 处理的 Raji 细胞要高两倍。在洗涤之后多三倍的六精氨酸 SHAL 仍与 Raji 细胞结合,表明该肽也提高运输至细胞内的 ¹¹¹In 的残留。共聚焦显微术显示了两种 SHAL 均集中在 Raji 细胞的细胞质中,而六精氨酸 SHAL 的级分集中在细胞核。

[0451] 六 D-精氨酸肽掺入 SHAL (DvLPBaPPP)₂LLDo 的连接体中提高了 Raji 细胞对 SHAL 类似物的摄取和残留。与所观察到的与 Lym-1 抗体的丰富细胞表面结合相比,大部分 (DvLPBaPPP)₂LArg6AcLLDo 和母体 SHAL 被内化。一些内化的六精氨酸 SHAL 类似物也与细胞核结合。这些结果证明了一些重要的 SHAL 特性,包括摄取、内化、滞留和可能的细胞内分布,可通过将 SHAL 与短多肽共轭来提高或修饰。

[0452] 背景

[0453] 已使用一些策略选择性递送毒性化学物质或放射线至癌细胞 (DeNardo (2005) Semin Oncol., 32 :S27-35 ;Torchilin (2007) AAPS J., 9 :E128-147), 用于基因治疗 (Jeong 等人 (2005) J Control Release 107 :562-570 ;Xia 等人 (2007) J Gene Med 10 :306-315) 或作为用于转染细胞的工具 (Shigeta K (2007) J Control Release 118 :262-270) 和使基因沉默的工具 (Liu (2007) Brief Funct Genomic Proteomic 6 :112-119)。一些用于提高治疗剂和其他分子 (荧光染料、酶、抗体以及其他蛋白质) 的细胞摄取的最早期的方法涉及将分子导入脂质体或胶束 (Constantinides 等人 (2008) Adv Drug Deliv Rev 60 :757-767 ;

Samad 等人 (2007) *Curr Drug Deliv* 4:297-305)。这样的构建体显示与细胞膜融合,将内容物导入细胞内或将结合脂质的组分转移至细胞膜内。另一种非常成功的方法研究了靶向细胞特异性膜蛋白的抗体并将这些抗体用于递送放射性同位素或其他细胞毒性分子至特异性细胞群表面 (Brumlik 等人 (2008) *Expert Opin Drug Deliv* 5:87-103; DeNardo 等人 (1998) *Cancer Biother Radilpharm* 13:239-254; Tolmachev 等人 (2007) *Cancer Res.* 67:2773-2782)。最近,已经通过将待运输的分子与容易穿过细胞膜的天然存在的跨膜“支架”、肽或蛋白质连接而实现细胞内递送。一种较成功的支架是衍生自 SV40T 抗原的细胞核内化信号肽 (Yoneda (1997) *J Biochem* 121:811-817)。该序列、衍生自 HIV-1 蛋白 Tat (Schwarze 等人 (1999) *Science* 285:1569-1572; Torchilin 等人 (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 100:1972-1977)、穿透素 (Tseng 等人 (2002) *Mol Pharmacol* 62:864-872) 以及诸如疱疹病毒蛋白 VP22 (Phelan 等人 (1998) *Nat Biotechnol* 16:440-443) 和抗 DNA 抗体 (Avrameas 等人 (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95:5601-5606) 之类的完整蛋白的转导结构域的其他肽序列目前用于促进脂质体、病毒、酶、抗体和多种其他蛋白运输至细胞中。使用诸如寡精氨酸 (Futaki (2005) *Adv Drug Deliv Rev* 57:547-558; Han 等人 (2001) *Mol Cells* 12:267-271; Kim 等人 (2007) *Int J Pharm* 335:70-78; Tung 和 Weissleder (2003) *Adv Drug Deliv Rev* 55:281-294), lactosylated poly-L-lysine (Midoux 等人 (1993) *Nucleic Acids Res* 21:871-878)、乳糖基化的聚左旋赖氨酸 (Midoux 等人 (1993) *Nucleic Acids Res* 21:871-878) 和选自表现了与已知肽支架具有序列相似性的噬菌体展示文库 (Kamada 等人 (2007) *Biol Pharm Bull* 2007, 30:218-223) 的短肽序列之类的合成性阳离子肽运载体已经实现了相当大的成功。

[0454] 最近,已经合成了显示作为癌症成像或治疗的靶向制剂前景的一些小分子抗体模拟物 [24-28]。除了表现与抗体相似的选择性和亲和力 (nM 至 pM) 以外,这些分子还具有潜能使基于蛋白质的药物递送系统的使用相关的一些困难最小化。它们保留了小分子的更理想的药物代理动力学特性,较不可能具有免疫原性,可显示足以用于口服递送的稳定性,以及与制备药物相关的成本显著降低。还可容易地对抗体模拟物的 SHAL 家族进行修饰以携带放射性金属、使得它们用作成像剂的多种标记物以及其他小分子 (例如,毒素或抑制剂)。另一种可能有用的修饰包括促进靶向细胞的 SHAL 摄取和内化的改变,预期该改变增加肿瘤滞留时间并将 SHAL 递送至它可导致其他损害的环境中 (细胞质或细胞核)。

[0455] 对于先前研制的用于靶向 HLA-DR10 (一种在 B 细胞恶性肿瘤上过表达的丰富细胞表面受体) 的 SHAL 的研究,我们通过将一种肽类似物与六精氨酸 (先前已经证明促进蛋白质和核酸运输至细胞中的一种肽) 共轭而合成 SHAL 的肽类似物。使用表达 HLA-DR10 的 Raji 细胞并利用 SHAL 及其六精氨酸类似物进行的体外结合研究显示了六精氨酸序列显著改变了 SHAL 特性、提高 SHAL 内化和放射性核素的残留。

[0456] 方法

[0457] SHAL 设计

[0458] 先前已经报道了生成用于 HLA-DR10 的同源性模型、鉴定 Lym-1 表位中独特结合空穴、选择在这些空穴中结合的配体以及生成 (DvLPBaPPP)₂LLDo SHAL 的方法 (Balhorn 等人 (2007) *Clin Cancer Res* 13:5621s-5628s)。通过下述方式研究出用于生成该母体 SHAL 六精氨酸肽 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo 的方法:将合成修饰成包括将另外的赖氨酸残基掺入

连接两个 SHAL 单体的连接体的中间,并将精氨酸六肽与该赖氨酸上的游离胺连接。

[0459] SHAL 合成

[0460] 使用正交保护的赖氨酸残基(L)和小 PEG(P)来连接如先前所述用于(DvLPBaPPP)₂LLA 的两个小配体 Dv 和 Ba,在氯三苯甲基氯树脂上合成了两种二聚体 SHAL(DvLPBaPPP)₂LLA 和 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA(Balhorn 等人(2007)Clin Cancer Res 13:5621s-5628s;Hok 等人(2007)Bioconj Chem18:912-921)。为了生成六精氨酸 SHAL(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA 的胺衍生物,在 SHAL 合成过程中通过进行两个顺序的 Dde-D-Lys(Fmoc)-OH 偶联步骤而将第二 Dde-D-Lys(Fmoc)-OH 赖氨酸残基嵌入连接体中。在第三赖氨酸的 α 位置上,通过使树脂与 Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH 反应六次来嵌入六个连续的精氨酸残基。通过与 N,N 二异丙基乙胺(DIEA)/二甲基甲酰胺(DMF)中的乙酸酐反应而使用乙酸(Ac)来保护六个 Arg 残基。在其余的合成中,所有六个精氨酸残基上的胍基仍旧使用三氟乙酸(TFA)-敏感性 2,2,4,6,7-戊甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰(Pbf)保护基团来保护。然后如先前对于(DvLPBaPPP)₂LLA 所述完成剩余物的合成(见上文)。通过 HPLC 和电喷雾电离质谱法(ESI-MS)分析以证实(DvLPBaPPP)₂LLA 和 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA 游离胺 SHAL 的纯度和同一性。

[0461] (DvLPBaPPP)₂LLA:

[0462] 以 50mg(0.07mmol)树脂和 30mg(0.07mmol)Fmoc-D-Lys(Boc)-OH 开始,在纯化后分离 34mg 红色固体的(DvLPBaPPP)₂LLA(Rt = 7.86 分钟, Waters Symmetry C18, 5 μm, 4.2×150mm 柱,具有从 95% H₂O、1% TFA 至 80% 乙腈(MeCN)的线性梯度的二极管阵列检测器,1% TFA 经 12 分钟)。ESI-MS:C₁₅₀H₂₂₄N₃₄O₄₁S₂(M+3H)³⁺的 m/z 计算值为 1075.60,实际值为 1075.62;(M+4H)⁴⁺的 m/z 计算值为 806.95,实际值为 806.93;(M+5H)⁵⁺的 m/z 计算值为 (M+5H)⁵⁺645.76,实际值为 645.68;(M+6H)⁶⁺的 m/z 计算值为 538.30,实际值为 538.21。

[0463] (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA:

[0464] 在纯化之后从 90mg(0.12mmol)树脂和 154mg(0.29mmol)Fmoc-D-Lys(Boc)-OH 开始分离红色固体的 81mg(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA(Rt = 8.30 分钟)。ESI-MS:C₁₉₄H₃₁₀N₆₀O₄₉S₂(M+3H)³⁺的 m/z 计算值 1444.71,实际值 1444.65;(M+4H)⁴⁺的 m/z 计算值为 1083.76,实际值为 1083.78;(M+5H)⁵⁺的 m/z 计算值为 867.23,实际值为 867.18;(M+6H)⁶⁺的 m/z 计算值为 722.86,实际值为 722.78;(M+7H)⁷⁺的 m/z 计算值为 619.74,实际值为 619.62。

[0465] DOTA 与 SHAL 连接:

[0466] 将 SHAL 的胺类似物(在第一赖氨酸上具有游离 ε 胺的 DOTA-SHAL 前体)溶于 500 μl 无水 DMF 和 100 μl DIEA 中。将 DOTA N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯的六氟磷酸(PF₆)盐(933.36g/mol, 1-1.5 等同物)作为固体添加至混合物。使混合物下垂 15 分钟,并通过分析 HPLC 监测反应。当完成时,使用 300 μl H₂O 和 300 μl MeCN(均含有 1% TFA)稀释反应溶液,并经 25 分钟运行使用 85% H₂O(0.1% TFA)至 70% MeCN(0.1% TFA)梯度的 HPLC 纯化。冷冻干燥所产生的纯化的 DOTA-SHAL,并随后通过分析 HPLC 进行分析(Waters Symmetry C18, 5 μm, 4.2×150mm 柱,二极管阵列检测器)使用 95% H₂O(1% TFA)至 80% MeCN(1% TFA)的线性梯度,经 12 分钟),并通过 ESI-MS 进行表征。

[0467] (DvLPBaPPP)₂LLDo:

[0468] (DvLPBaPPP)₂LLA 胺 SHAL(6.0mg, 1.86 μmol)与 DOTA NHS 酯(2.0mg, 2.14 μmol)

的反应产生 100% ($R_t = 7.664$ 分钟) 的转变 (通过粗分析 HPLC 分析) 并在纯化后产生 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$ (8.0mg, 红色固体)。ESI-MS: $\text{C}_{166}\text{H}_{250}\text{N}_{38}\text{O}_{48}\text{S}_2(\text{M}+2\text{H})^{2+}$ 的 m/z 计算值为 1806.09, 实际值为 1806.22; $(\text{M}+3\text{H})^{3+}$ 的 m/z 计算值为 1204.40, 实际值为 1204.49; $(\text{M}+4\text{H})^{4+}$ 的 m/z 计算值为 903.55, 实际值为 903.61; $(\text{M}+5\text{H})^{5+}$ 的 m/z 计算值为 723.04, 实际值为 723.07; $(\text{M}+6\text{H})^{6+}$ 的 m/z 计算值为 602.70, 实际值为 602.64。

[0469] $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$:

[0470] $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLA}$ 胺 SHAL (15.0mg, $3.46 \mu\text{mol}$) 与 DOTA NHS 酯 (5.0mg, $5.36 \mu\text{mol}$) 的反应产生 100% ($R_t = 7.70$ 分钟) 的转变 (通过粗分析 HPLC 分析) 并在纯化后产生 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$ (12.0mg, 红色固体)。ESI-MS: $\text{C}_{210}\text{H}_{336}\text{N}_{64}\text{O}_{56}\text{S}_2(\text{M}+3\text{H})^{3+}$ 的 m/z 计算值为 1573.51, m/z 实际值为 573.54; $(\text{M}+4\text{H})^{4+}$ 的 m/z 计算值为 1180.38, m/z 实际值为 1180.43; $(\text{M}+5\text{H})^{5+}$ 的 m/z 计算值为 944.51, m/z 实际值为 944.52; $(\text{M}+6\text{H})^{6+}$ 的 m/z 计算值为 787.26, m/z 实际值为 787.26; $(\text{M}+7\text{H})^{7+}$ 的 m/z 计算值为 674.94, m/z 实际值为 674.88; $(\text{M}+8\text{H})^{8+}$ 的 m/z 计算值 590.69, m/z 实际值为 590.58。

[0471] 放射化学方法:

[0472] 如先前所述 (见上文), 使用下列方法 (DeNardo 等人 (2007) J Nucl Med 48:1338-1347) 以载体-游离 $^{111}\text{InCl}_3$ (MDS Nordion, Vancouver, Canada) 标记 DOTA-SHAL。将一等份 $^{111}\text{InCl}_3$ ($15-20 \mu\text{l}$) 添加至溶于 0.1M NH_4OAc (pH 5.3, $50 \mu\text{l}$) 中的 DOTA-SHAL ($25-50 \mu\text{g}$) 溶液, 通过添加 4M NH_4OAc 将反应混合物的最终 pH 调整至 6.5, 并在 37°C 下孵育混合物 1 小时, 然后将 $10-20 \mu\text{l}$ 的 0.1M 乙二胺四乙酸 (EDTA) 添加至 sequester excess (游离的 $^{111}\text{In}^{3+}$)。使用 HPLC 纯化放射性标记的产物, 随后在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中使用 1kD 截留膜来透析。通过薄层色谱 (TLC) ($10\% \text{NH}_4\text{OAc}-\text{MeOH}$ 1:1)、HPLC 以及乙酸纤维素电泳 (CAE) 检测 ^{111}In 标记的 SHAL。CAE 解析 ^{111}In -DOTA-SHAL 和 ^{111}In -EDTA, 分别在 2.3-3.0cm 和 $> 6.5\text{cm}$ 下观察放射性峰值。在 TLC 测定中观察到相似的结果, ^{111}In -DOTA-SHAL 显示了来自应用点很小的迁移 ($R_f = 0.25-0.3$), 而 ^{111}In -EDTA 向溶剂前沿移动 ($R_f = 0.5$)。通过 HPLC, 在 2.5-3.0ml 洗脱 ^{111}In -EDTA 并在 9.5-10ml 洗脱 ^{111}In -DOTA-SHAL。使用 RP-HPLC 或 1kD 透析膜纯化 ^{111}In 标记的 SHAL 在 PBS 中纯化 ^{111}In 标记的 SHAL, 并使用 Savant Speedvac SC110 (Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, MA, USA) 浓缩。使用 C18-RP-TLC (EM Science, DC-Plastikfolien kieselgel 60 F254, Cherry Hill, NJ)、HPLC 以及 CAE 测定最终的放射性化学纯度。 ^{111}In -DOTA-SHAL 产物的产率范围是 70-90%, 产物的纯度范围为 90-95%。将最终的产物溶解于在 PBS 中的 10% 二甲基亚砜 (DMSO), 并显示在室温下经 72 小时稳定。

[0473] SHAL 结合分离的 HLA-DR10 蛋白

[0474] 在 Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ) 上于 25°C 下使用表面等离子共振进行蛋白质结合实验。使研究级链霉亲和素固定的芯片 (SA chip, Biacore) 预先具备条件, 并根据制造商的说明书进行标准化。将生物素标记的 SHAL 溶解于 DMSO 中, 并在 $1.05 \times \text{PBS}$ (Biacore) 中稀释至 $1 \times \text{PBS}$ pH 7.4, 5% DMSO 的终浓度以与电泳缓冲液相匹配。将这些 SHAL 注射至流动细胞上而产生 500-1000RU (反应单位) 的表面密度。在 $20 \mu\text{l}$ /分钟下经 1 分钟将生物素 (50 μM ME-Z Link Amine-PEO2-Biotin, Pierce) 作为封闭剂注射至所有细胞上以减轻非特异性结合。一个流动细胞被用作参考细胞, 并将不同 SHAL 固定在三

个其他细胞中的各细胞上。

[0475] 使用所有4个流动细胞在30 μ l/分钟流速下在PBS pH7.4电泳缓冲液中进行检测HLA-DR10与SHAL的结合的实验。将从Raji细胞分离的HLA-DR10(Rose等人(1996)Cancer Immunol Immunother 43:26-30)稀释于电泳缓冲液中达到范围为10nM至1 μ M的最终浓度,并以一式三份随机运行一系列浓度。持续3分钟注射蛋白质,使得解离5分钟,随后使用0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)注射1分钟来再生表面,之后进行使用电泳缓冲液注射2分钟的洗涤步骤。使用SCRUBBER程序(犹他州大学)来处理通过扣除空白参考面和5个空白注射的平均值而双倍参考的数据。

[0476] 细胞结合测定

[0477] 在添加10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、1%非必需氨基酸(GIBCO #11140-050)以及100单位/ml青霉素G、100 μ g/ml链霉素以及0.25 μ g/ml两性霉素B的RPMI-1640培养基中在37℃下在增湿的5% CO₂氛围中维持Burkitt氏Raji人淋巴瘤B细胞(美国典型培养物保藏所,Manassas,VA)。在添加10mM 4-(2-羟乙基)-1-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)的相同培养基中维持Jurkat细胞(美国典型培养物保藏所,Manassas,VA)(一种急性白血病T细胞系)。

[0478] 进行一系列实验来对Raji细胞(一种先前显示表达HLA-DR10变异体的细胞)对于¹¹¹In标记的母体SHAL(DvLPBaPPP)₂LLDo及其六精氨酸类似物(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo的摄取进行定量。使用含有悬浮于具有5%牛血清白蛋白(BSA)的150 μ l PBS的10⁶个细胞的等份来进行测定。使用0.1、1、5、10或25ng ¹¹¹In标记的(DvLPBaPPP)₂LLDo或(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo在4℃和22℃下处理细胞等份1小时。对含有处理的细胞的试管进行离心以将细胞沉淀与上清液进行分离,并在标度 γ 井式计数器中对两种级分进行计数以测定结合和游离的SHAL的量。使用PBS洗涤一半细胞沉淀,并在22℃下孵育15分钟,然后再对它们进行离心。随后在 γ 井式计数器中对汇集的洗涤物和洗涤的细胞沉淀进行计数以评价有多少结合的SHAL可通过洗涤去除。

[0479] 三维共聚焦显微术

[0480] 使用O'Donnell等人(O'Donnell等人(1998)Prostate 37:91-97)先前所述的方法来评价Raji细胞和Jurkat细胞的SHAL结合和内化。进行实验对(DvLPBaPPP)₂LLDo(母体SHAL)、其六精氨酸类似物(DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo以及嵌合Lym-1(chLym-1)与Raji细胞的结合进行比较。除非指明,所有步骤均在20℃下进行。

[0481] 在300 $\times$ g下沉淀对数期生长的4百万Raji细胞(>92%活力),并在1ml于PBS中的1%级分V BSA中等速旋转封闭30分钟。然后以1百万/250 μ l将细胞与于PBS中的1% BSA或生物素化初级试剂:10nM chLym-1,10 μ M母体SHAL或10 μ M六精氨酸SHAL一起孵育1小时。在洗涤4次之后(2次在PBS中的1% BSA中,2次在PBS中),将50 μ l细胞悬浮物涂覆于新鲜的聚左旋赖氨酸包被的载玻片上,使细胞在湿度培养箱中附着10分钟。通过在-20℃下使用4分钟暴露于甲醇来进行固定和透化。以相同方式处理作为对照的Jurkat细胞。

[0482] 在PBS中洗涤载玻片两次,在PBS中的10% fetaplex血清(GeminiBioproducts, West Sacramento, CA)中封闭15分钟并在PBS中洗涤1次。在稀释剂中1/500稀释检测试剂Streptavidin AlexaFluor 610(Invitrogen, Carlsbad, CA),涂覆100 μ l,将石蜡膜

盖玻片铺于溶液上以防止蒸发。在湿度培养箱中孵育盖玻片 30 分钟,在 PBS 中各洗涤 5 分钟,并在双蒸水中简单冲洗。在盖玻片干燥之后,使用具有 4',6-二脒基-2-苯吡啶盐酸(一种染料)(DAPI,Invitrogen,Carlsbad,CA)的 ProlongGold 固定盖玻片。使用 Olympus FV1000 激光扫描共焦显微镜观察盖玻片,并在 160× 下将数据作为 Z 扫描来采集,通过细胞移取 1 μm 聚焦切片。

[0483] 统计分析

[0484] 将数据报告为平均值 ±SD。统计比较基于 Wilcoxon 秩和检验 (Hollander 和 Wolfe(1973)Nonparametric statistical methods.New York:Wiley Publications)-基于对两个试验组数值进行分级的程序。如果 p 值 ≤ 0.05 则认为差异在统计上是显著的。通过对于相关系数的转化 $Z = \text{TANH}^{-1}r$ (CRC Handbook of Tables for Probabilities and Statistics. 2nd edn. Boca Raton, FL: CRC Press; 1968) 来确定 p 值。

[0485] 结果

[0486] SHAL 设计和合成

[0487] 以多毫克量来合成两种形式—游离胺 SHAL (DvLPBaPPP)₂LLA 及六精氨酸类似物 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA, 并通过高效液相色谱法 (HPLC) 来纯化。使生物素与 (DvLPBaPPP)₂LLA 和 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA 上的末端胺 (A) 的 ε-氨基连接以产生生物素化形式用于细胞和蛋白结合实验。使 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA) 在相同位点与 (DvLPBaPPP)₂LLA 和 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLA 连接以使得能以 ¹¹¹In 标记 SHAL。使用 ¹¹¹In 在高效率下 (> 90%) 以范围为 70–85 μCi/μg SHAL 的特异性活性来标记 DOTA SHAL (DvLPBaPPP)₂LLDo (图 25A) 及六精氨酸 SHAL 类似物 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo (图 25B)。通过 HPLC 和乙酸纤维素电泳 (CAE) 对所产生的放射性标记的 SHAL 的分析显示了产物的纯度大于 90%。在 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo 中的六精氨酸序列的合成过程中掺入的精氨酸的右旋体用于使肽的蛋白水解敏感性降低。尽管需要较详细的实验来合适地评价 SHAL 的体内稳定性,但当在 37℃ 下在人血浆中孵育六 D-精氨酸 SHAL 类似物 24 时从一个初级 CAE 实验获得的数据没有显示降解的迹象(数据未显示)。

[0488] SHAL 对于 HLA-DR10 蛋白的亲合力

[0489] 使用两种 SHAL 进行表面等离子共振结合研究来评估和比较两种 SHAL 对于分离的 HLA-DR10 蛋白的亲合力。在一系列其中 SHAL 的生物素化形式固定于链霉亲和素芯片表面上的动力学实验中,观察到母体 SHAL (DvLPBaPPP)₂LLDo 以大约 21nM 的 K_d 与 HLA-DR10 结合。对于含有类似物 (DvLPBaPPP)₂LArg₆AcLLDo 的六精氨酸获得了相似的 K_d, 大约 34nM。

[0490] 表达 HLA-DR10 的 Raji 细胞的 SHAL 摄取的分析

[0491] 使用 ¹¹¹In 标记的母体 SHAL 和六精氨酸 SHAL 类似物来进行体外细胞结合实验以对 SHAL 摄取进行定量并评价添加六精氨酸标记物的影响。使用 Raji 细胞(一种表达 HLA-DR10 的淋巴瘤细胞系)来评价摄取。使用增加量的含有 ¹¹¹In 标记的 SHAL 的 SHAL 作为示踪剂来孵育含有 10⁶ 个细胞的等份,并在洗涤细胞沉淀之前和之后来检测细胞结合的 ¹¹¹In。

[0492] 未洗涤的细胞沉淀的分析显示母体 SHAL 和六精氨酸 SHAL 均被 Raji 细胞结合。细胞结合的 SHAL 线性增加,两种 SHAL 在培养基中均具有增加的 SHAL 浓度(图 26),结合的 SHAL 的量没有显示达到所检测的 SHAL 浓度范围的饱和度的迹象。与使用母体 SHAL 处

理的那些 Raji 细胞相比,使用六精氨酸 SHAL 处理的 Raji 细胞的结合是 SHAL 的两倍(表 9)。在六精氨酸 SHAL 与母体 SHAL(大约 46%)比较时,在洗涤之后也有较大比例的六精氨酸 SHAL(67%)被细胞保留,导致最终的六精氨酸 SHAL 含量是其母体的三倍。

[0493] 表 9. Raji 细胞对结合的 SHAL 的滞留(残留)。图 27 中显示的用于实验的相同细胞样品如先前所述使用 $5.3\text{pmol } ^{111}\text{In}$ 标记的 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$ 或 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg6AcLLDo}$ 孵育并然后使用 BSA/缓冲液洗涤两次。然后对细胞沉淀进行计数以提供对于洗涤之后仍结合的 SHAL 的估计。

[0494]

SHAL	pmol结合的SHAL/ 10^6 个细胞		保留的SHAL 的 百分数
	未洗涤的	洗涤的	
$(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$	0.568 ± 0.091	0.263 ± 0.000	46
$(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$	1.300 ± 0.038	0.876 ± 0.017	67

[0495] 三维共聚焦显微术的 SHAL 定位

[0496] 在接近使用生物素化形式的母体 SHAL 和六精氨酸 SHAL 仅处理 1 小时的 Raji 细胞中心处,通过焦平面采集的荧光图像证明两种 SHAL 均被 Raji 细胞摄取(图 27)。与结合细胞表面上的 HLA-DR10 的 Lym-1 抗体相比,从细胞中心所取的断面图像显示两种 SHAL 均集中在 Raji 细胞内并分布于整个细胞质。与母体 SHAL 相比,Raji 细胞显著摄取更多六精氨酸 SHAL,如使用相当浓度的两种 SHAL 处理的细胞的细胞质更强烈的染色所证明的。在对照 Jurkat 细胞中没有观察到 SHAL 摄取(缺乏 HLA-DR10 的细胞)。六精氨酸 SHAL 的级分也显示与细胞核结合。在使用母体 SHAL 处理的细胞中没有观察到核染色。

[0497] 讨论

[0498] 衍生自病毒蛋白和穿过细胞膜和核膜的其他蛋白的多种细胞穿透肽(CPP)已经用作改进脂质体、外源性蛋白质以及核酸和其他分子运输至细胞的细胞质和细胞核中的效率的梭子(Schwarze 等人(1999)Science 285:1569-1572;Torchilin 等人(2003)Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 100:1972-1977;Tseng 等人(2002)Mol Pharmacol 62:864-872;Phelan 等人(1998)Nat Biotechnol 16:440-443;Avrameas 等人(1998)Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 95:5601-5606;Futaki(2005)Adv Drug Deliv Rev 57:547-558;Han 等人(2001)Mol Cells 12:267-271;Kim 等人(2007)Int J Pharm 335:70-78;Tung 和 Weissleder(2003)Adv Drug Deliv Rev 55:281-294;Midoux 等人(1993)Nucleic Acids Res 21:871-878;Kamada 等人(2007)Biol Pharm Bull 2007, 30:218-223)。对不同 CPP 序列(所有序列均具有高精氨酸残基含量(Futaki(2006)Biopolymers 84:241-249)内化的效率进行表征的研究已显示含有小至 6 个精氨酸残基的精氨酸均聚物可高效运输有机小分子(Kirschberg 等人(2003)Org Lett 5:3459-3462;Rothbard 等人(2000)Nat Med 6:1253-1257)和大蛋白至细胞(Futaki 等人(2001)J Biol Chem 276:5836-5840)。

[0499] 在研制更高效地被 SHAL 靶向的细胞内化或残留的 SHAL 的努力中,我们合成了 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$ (一种含有先前显示选择性结合表达 HLA-DR10 的细胞系的两种配体 4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基缬氨酸(Dv)和 N-苯甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基

苯甲酸 (Ba) 的 SHAL) 的六精氨酸共轭物 (Balhorn 等人 (2007) Clin Cancer Res 13 : 5621s-5628s)。因为六精氨酸可与嵌合 SHAL 共轭而不显著改变其分子质量,因此选择六精氨酸作为待检测其促进 SHAL 运输至细胞中的第一支架穿梭序列,因此保留 SHAL 作为小分子治疗剂的有利特性。对 SHAL 和六精氨酸 SHAL 类似物与纯化的 HLA-DR10 蛋白结合进行比较的表面等离子共振实验显示将六精氨酸肽添加至嵌合 SHAL 不干扰 SHAL 与蛋白结合。

[0500] 三维共聚焦显微术实验显示母体 SHAL 及其六精氨酸类似物均被表达 HLA-DR10 的 Raji 细胞摄取和内化。在 Jurkat 细胞 (一种缺乏 HLA-DR10 的细胞系) 中没有观察到 SHAL 摄取。通过 Raji 细胞所取的光学切面显示 SHAL 的结合部限于细胞表面 (Lym-1 抗体结合所特有的)。从使用 SHAL 处理的细胞所取的正中平面显示 SHAL 结合的荧光分布在整个细胞内部。在一些图像中,在细胞质中的高 SHAL 浓度区显示与小细胞器样结构结合。在使用六精氨酸 SHAL 类似物处理的 Raji 细胞中细胞质结合的荧光显著较高,说明添加六精氨酸肽提高 SHAL 的细胞摄取。

[0501] 对 ^{111}In 标记的 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LLDo}$ 和 $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$ 与活 Raji 细胞结合进行比较的实验证实了六精氨酸标记物提高 SHAL 摄取。该标记物的存在还增加 Raji 细胞保留的 ^{111}In 标记的 SHAL 的量。在洗涤之后保留的 SHAL 的量没有达到超过所检测的浓度范围的饱和度,说明比这些实验中达到的甚至更高的 SHAL 浓度可在表达 HLA-DR10 的细胞中积累。在细胞结合研究中检测的六精氨酸 SHAL 的最高浓度,残留的 SHAL 的量与大约 1.1×10^6 SHAL 分子 / 细胞相当—先前报道的存在于各 Raji 细胞表面上的相同数量的 HLA-DR10 分子 (Epstein 等人 (1987) Cancer Res 47 : 830-840)。这些结果与显示大部分六精氨酸 SHAL 被内化的共聚焦图像一起表明 SHAL 的一种显著级分可与已知存在于细胞内的 HLA-DR10 池库结合。

[0502] 所观察到的 Raji 细胞对 ^{111}In 标记的六精氨酸 SHAL 的残留提高,以及 ^{111}In - 标记物的级分与细胞核的潜在结合提高也都是重要的,因为放射性同位素内化和残留已显示对于癌症治疗是非常有利的 (Brouwers 等人 (2003) Clin Cancer Res 9 : 3953S-3960S ; Chen 等人 (2006) J Nucl Med 2006, 47 : 827-836 ; Michel 等人 (2002) Clin Cancer Res 8 : 2632-2639 ; Stein 等人 (1995) Clin Cancer Res 11 : 2727-2734)。已将癌症治疗剂与多种发射 β 颗粒、 α 颗粒或俄歇电子的放射性同位素连接。通常在放射性免疫治疗中使用的诸如碘-131、钇-90 以及铼-188 之类的同位素的 β 发射的射程扩散几毫米,携带这些放射性核素的治疗剂产生破坏靶向药剂不直接结合恶性细胞的“交叉火力”作用 (DeNardo (2005) Semin Oncol., 32 : S27-35 ; Bischof 1999) Leuk Lymphoma 44 Suppl 4 : S29-36) 或“旁观者” (Boyd 等人 (2006) J Nucl Med 47 : 1007-1015)。以该方式, β 发射体可潜在克服由于抗原阴性肿瘤细胞导致的抵抗力。这些特性使得 β 颗粒治疗更适于治疗大块肿瘤或大体积疾病。然而,较长射程的 β 发射还可破坏附近的正常细胞。

[0503] 可将诸如六精氨酸 SHAL $(\text{DvLPBaPPP})_2\text{LArg}_6\text{AcLLDo}$ 之类的靶向制剂的内化作为将俄歇电子发射的 ^{111}In 引入细胞的细胞质和细胞核的方式来研制,其中俄歇电子具有非常短的亚细胞路径长度和高线性能量转移 (Bodei 等人 (2003) Cancer Biother Radiopharm 18 : 861-877 ; Kassis (2003) J Nucl Med 44 : 1479-1481 ; McDevitt 等人 (1998) Eur J Nucl Med 25 : 1341-1351)。当分别将细胞核中的 ^{111}In 衰变与细胞质或细胞表面发生的衰变进行比较时,估计细胞核的辐射吸收剂量高 2 倍和 35 倍 (Goddu 等人 (1994) J Nucl Med

35:303-316;Hindorf 等人 (2007)Cancer Biother Radiopharm 22:357-366)。当 ^{111}In 和其他俄歇电子发射体紧靠细胞核衰变时,这些特性赋予它们高度的细胞毒性并损害 DNA(Costantini 等人 (2007)J Nucl Med 48:1357-1368)。通过将俄歇发射体与在肿瘤细胞中积累至高浓度的高度选择性、残留的靶向制剂偶联时,可研制一类可更有效治疗许多类型的转移癌的非常强力的治疗剂。

[0504] 总结

[0505] 通过将六精氨酸肽与 SHAL 共轭实现的表达 HLA-DR10 的淋巴瘤细胞对六精氨酸 SHAL 内化的提高和 SHAL 残留增加的强度是重要的,这是因为它们显示了诸如 SHAL 之类的小分子可被设计成在导致显著浓度的放射性核素残留于细胞内的条件下将放射性核素递送至恶性细胞。携带俄歇发射的放射性核素的 SHAL 可提供用于将 SHAL 实现的治疗指数增加至超过通过将放射性核素标记的靶向制剂积累于肿瘤细胞表面而获得的治疗指数的可选方法。因为基于 SHAL 的方法治疗其他形式的癌症的关联性,这些结果也是激动人心的。还将使靶向次糖基化 MUC1、雄激素受体和其他使其携带的放射性同位素残留的肿瘤特异性细胞表面蛋白的内化 SHAL 作为小分子治疗剂来研制用于许多种其他类型的转移癌。

[0506] 该实施例中使用的缩略语

[0507] Ac,乙酸盐;Ba,N-苯甲酰基-L-精氨酸基-4-氨基苯甲酸;Boc,叔丁氧羰基;BSA,牛血清白蛋白;CAE,乙酸纤维素电泳;CPP,细胞穿透肽;DAPI,4',6-二脒基-2-苯吡啶;Dde,1-(4,4-二甲基-2,6-二氧环己-1-亚基)乙基;DIEA,N,N-二异丙基-乙胺;DMF,二甲基甲酰胺;DMSO,二甲基亚砷;DOTA,1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸;Dv,4-二甲氨基偶氮苯-4'-磺酰基缬氨酸;EDTA,乙二胺四乙酸;ESI-MS,电喷雾电离质谱法;Fmoc,芴甲氧基;HEPES,4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸;HPLC,高效液相色谱法;MeCN,乙腈;NHS,N-羟基琥珀酰亚胺;Pbf,2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰;PBS,磷酸盐缓冲盐水;PF6,六氟磷酸盐;RP-HPLC,反相高效液相色谱法;SDS,十二烷基硫酸钠;SHAL,选择性高亲和力配体;TFA,三氟乙酸;TLC,薄层色谱法。

[0508] 实施例 6 新型合成的 HLA-DR 抗体模拟物诱导的对于淋巴瘤和白血病的分子特异性和细胞选择性细胞毒性

[0509] 内容

[0510] 与利妥昔单抗相似,与人类白细胞抗原具有反应性的单克隆抗体具有强力的抗淋巴瘤活性。然而,其尺寸限制了其血管和组织穿透性。为了模拟单克隆抗体结合,已合成纳米分子,显示出对于 HLA-DR10 的 β 亚单位具有特异性,并对于表达该蛋白的细胞具有选择性。含有 3-(2-([3-氯-5-三氟甲基)-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸 (Ct) 配体的选择性高亲和力配体残留并具有针对表达细胞的抗淋巴瘤活性。在本发明中,我们显示了含有该配体的三齿 SHAL 在具有人淋巴瘤异种移植物的鼠中特别效力。在细胞培养物中滴定抗淋巴瘤活性之后,在具有建立的侵袭性人淋巴瘤异种移植物的鼠中进行含有 Ct 配体的三齿 SHAL 的随机临床前研究。对于具有表达 HLA-DR10 的 Raji B 淋巴瘤异种移植植物或 Jurkat T 淋巴瘤异种移植植物的小鼠随机进行分配以接受在 100ng 剂量腹腔内注射一周一次连续三周的 SHAL 处理,或不处理。主要终点是治愈全部应答率和存活率。还评价了这些小鼠中的毒性,并在健康 Balb/c 小鼠中进行了 USFDA 一般安全性研究,在 Raji 细胞培养物中,细胞毒性活性的阈值和 IC_{50} 浓度分别为 0.7 和 2.5nmol (pm/ml 培养基)。当与处理

的 Jurkat 异种移植物或未处理的异种移植物相比,使用 SHAL 处理的 Raji 异种移植物显示了死亡风险降低 85% ($P = 0.014$; 95% 置信区间, 减少 32-95%)。甚至在比与带有 Raji 异种移植物的大部分小鼠的治愈相关的治疗剂量大 2000 倍的腹腔内注射剂量之后也无毒性的迹象。当与对照组相比时,在与患者的有害事件和容易实现无关的剂量下在带有表达 HLA-DR10 的人淋巴瘤异种移植物的小鼠中,治疗选择性改进了应答率和存活率。

[0511] 介绍

[0512] 诸如 CD20、CD22 以及 MHCII HLA-DR 之类的细胞表面蛋白已被证明为用于非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 的治疗剂的具有吸引力的靶。当与正常 B 淋巴细胞相比时,这些蛋白质其中之一——人类白细胞抗原 (HLA) 在恶性 B 淋巴细胞表面上调。另外,细胞内 HLA-DR 蛋白甚至更丰富。HLA-DR 蛋白用作跨膜和细胞质信号传导受体并用作免疫系统的肽梭 (Leveille 等人 (2002) Eur. J. Immunol. 32 :2282-2289 ;Klemm 等人 (1998) Annu. Rev. Immunol. ,16 :569-592 ;Lane 等人 (1990) J. Immunol. ,144 :3684-3692)。单克隆抗体 (MAb) Lym-1 与 HLA DR 的 β 亚单位上的良好表征的表位结合,并分别与来自约 90% 和 50% 的患有 B 细胞淋巴瘤和白血病的患者的淋巴瘤组织反应 (DeNardo 等人 (1998) J. Clin. Oncol. ,16 :3246-3256 ;Rose 等人 1996) Cancer Immunol. Immunother. ,43 :26-30 ;Rose 等人 (1999) Mol. Immunol. ,36 :789-797)。尽管 Lym-1 的结合限于细胞表面 (Epstein 等人 (1987) Cancer Res 47 :830-840),但 Lym-1 针对培养物和小鼠中的恶性 B 细胞具有高度活性 (DeNardo 等人 (2005) Clin. Cancer Res. ,11 :7075-7079 ;Tobin 等人 (2007) Leuk. Lymphoma 48 :944-956, 2007 ;Zhang 等人 (2007) Cancer Biother. Radiopharm. ,22 :342-356)。

[0513] 为了模拟 MAb 与结合,在降低尺寸的同时,已经基于计算机建模和实验性研究合成了结合 HLA-DR 蛋白的 β 亚单位的 Lym-1 表位区域的 < 5kDa 尺寸的一系列选择性高亲和力配体 (SHAL)。这些新型纳米分子的二齿形式在体外和在小鼠中显示了许多所需的特性 (Balhorn 等人 (2007) Clin. Cancer Res. ,13 (Suppl. 18) :S5621-S5628 ;DeNardo 等人 (2007) J. Nucl. Med. ,48 :1338-1347),但无抗淋巴瘤活性 (West 等人 (2006) Cancer Biother. Radiopharm. ,21 :645-654)。惊人地,含有 Ct 配体 (3-(2-([3-氯-5-三氟甲基)-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸) 的三齿 SHAL 残留在培养物中的 B 淋巴瘤细胞内并对其具有细胞毒性。本发明中,我们对于该 SHAL 的细胞选择性抗淋巴瘤活性进行了滴定,证明了 SHAL 在带有人类淋巴瘤异种移植物的小鼠中的显著效力、选择性以及安全性,并显示了 SHAL 诱导的自体吞噬的电子显微镜证据。

[0514] 材料与方法

[0515] 试剂和细胞系

[0516] 结合在恶性 B 细胞上表达的 HLA-DR 10 β 亚单位的鼠 Lym-1 (Peregrine Pharmaceuticals, Tustin, CA) 和嵌合 Lym-1 (A. Epstein, Los Angeles, CA) 和如先前所述使用 Lym-1 亲和柱从 Raji Burkitt B 细胞分离的蛋白 (Balhorn 等人 (2007) Clin. Cancer Res. ,13 (Suppl. 18) :S5621-S5628) 用参照物。在添加丙酮酸钠、非必需氨基酸和抗生素 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) 的含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 中在增湿的 5% CO₂ 气氛中在 37°C 培养的 HLA-DR10 的人 B 淋巴瘤细胞系 Raji 细胞 (美国典型培养物保藏所, Manassas, VA) 和如 ATCC 推荐培养的非表达的人 T 淋巴瘤细胞系 Jurkat 细胞 (美国典型模式培养物保藏所, Manassas, VA) 用于这些实验。

[0517] 药物设计和化学

[0518] 使用同源性建模,在 HLA-DR10 β 亚单位的三维模型上对于 Lym-1 结合重要的 HLA-DR 氨基酸残基进行制图 (Balhorn 等人 (2007) Clin. Cancer Res., 13 (Suppl. 18) : S5621-S5628)。使用 SPHGEN 鉴定蛋白质的 Lym-1 表位表面中的空穴 (Kuntz 等人 (1982) J. Mol. Biol. 161 :269-288 ;Desjarlais 等人 (1988) J. Med. Chem., 31 :722-729)。在计算的配体对于各空穴的对接之后,将核磁共振分光术、表面等离子共振 (BIAcore 3000 ; Biacore, Piscataway, NJ) 以及竞争性结合实验的组合用于证实配体与 HLA-DR 10 蛋白的结合。然后如先前所述将数组配体连接以生成 SHAL (Balhorn 等人 (2007) Clin. Cancer Res., 13 (Suppl. 18) :S5621-S5628)。使用 9- 芴甲氧羰基 (Fmoc) 固相化学方法在聚乙烯柱 (Pierce Biotechnology, Inc.) 中的氯三苯甲基氯树脂上合成各 SHAL,从而通过 N 末端赖氨酸的 ϵ 胺来将 PEG 单体单元和所选的配体共轭来合成各 SHAL。为了合成三齿 SHAL,将 4-(二甲氨基)偶氮苯-4'- 磺酰基-缬氨酸 (Dv) 配体与共轭至 PEG 间隔体的末端胺的第二赖氨酸残基的 α 胺连接,并将 4-[4-(4-氯苄基)哌嗪并]-3- 硝基苯羧酸 (Cb) 与共轭至第三赖氨酸的 α 胺的 PEG 的末端胺连接。最后,还将 Ct 配体与第三赖氨酸的 ϵ 胺连接 (图 28)。如先前所述完成向 DOTA (或生物素化的) SHAL 衍生物的转化。通过分析高效液相色谱法 (HPLC) 来监测反应,并使用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 来纯化 DOTA (或生物素化的) 衍生物。分析性电喷雾电离质谱法 (Agilent 1100 instrument, Waters Symmetry C18 柱) 用于证实 SHAL 的元素和质量组成 (在理论分子量的 0.07% 之内的分子量)。为了检测 SHAL 与分离的或重组的 HLA-DR10 蛋白的结合,如先前所述进行表面等离子共振实验 (见上文)。SHAL 结合优于纳摩尔,并通过添加 Lym-1 而阻断。

[0519] 细胞毒性测定

[0520] 如先前所述 (West 等人 (2006) Cancer Biother. Radiopharm., 21 :645-654) 对对数生长期收获的 Raji 细胞进行离心,将其重悬浮于新鲜培养基中,并在 10% 台盼蓝染料中进行计数以确定初始和随后的活力。当未处理时,细胞继续增殖,在测定过程中,初始总细胞的 < 5% 的无活力细胞仍旧增殖。为了滴定细胞毒性活性,将浓度范围 0 和 7nM 之间 (pm/ml 培养基) 的生物素化的三齿 SHAL 与 0.5×10^6 个细胞 /ml 在 5% CO₂、增湿的气氛中在 37°C 下一起孵育 (NAPCO, Portland, OR)。在 1、2 以及 3 天之后,将细胞重悬浮于台盼蓝染料中并在血细胞计数器中进行计数。测定有活力和无活力的细胞 /ml 的级分活力和绝对数量。

[0521] 小鼠中的效力和毒性

[0522] 根据加利福尼亚大学动物管理指南在无热原条件下并正常任意进食来维持七至九周龄的雌性无胸腺的 Balb/c nu/nu 小鼠 (Harlan Sprague Dawley, Inc., Frederick, MD)。在对小鼠进行照射 (400cGy) 3-4 天以抑制异种移植物排斥之后,皮下移植在对数期收获并具有 > 95% 活力的 Raji 或 Jurkat 细胞。当异种移植物达到通过测径器检测的 20-500mm³, 通过异种移植物体积将小鼠分选为 4 组 :SHAL 处理的带有 Raji 异种移植物的 小鼠、SHAL 处理的带有 Jurkat 异种移植物的 小鼠、未处理的带有 Raji 异种移植物的 小鼠或未处理的带有 Jurkat 异种移植物的 小鼠。各小鼠使用 100 μ l 的 PBS 或 100ng DOTA 螯合的三齿 SHAL 在第 0、7 以及 14 天腹腔内注射。监测异种移植物体积和存活率 $\geq$ 84 天。还对小鼠进行称重一周 2-3 次,持续 4 周,然后每周 1 次。在各 SHAL 或 PBS 给药之前检测血液计

数,并在最终给药之后使用 Z Series Coulter Counter(Beckman Coulter Inc.,Hialeah, FL) 和相差显微镜 (Zeiss, Jena, Germany) 一周一次检测,持续 4 周。

[0523] 通过公式来计算用于半椭圆体的异种移植物的体积 (DeNardo 等人 (1997) Clin. Cancer Res. 3 :71-79)。将反应表征为治愈、异种移植物完全消失以及到 84 天不再生长,形式检查天数 (至今 > 210 天) 完全缓解 (CR),异种移植物消失持续至少 7 天,但再生长,以及部分缓解 (PR),异种移植物体积减小至少 75% 并仍旧稳定持续至少 7 天。在 SHAL 治疗的小鼠中所有均在第 84 天治愈持续对于小鼠的 210 天观察时间。如果异种移植物变成 > 2000mm³,根据加利福尼亚大学动物管理指南对小鼠进行安乐死,并将其评分为疾病相关的死亡。

[0524] 小鼠中的安全性

[0525] 对 3 组 7 只健康 Balb/c 小鼠的各组给予腹腔内注射 20 或 200 μ g DOTA 螯合的 SHAL (SHAL 效力剂量的 200 或 2,000 倍)。在介入之前立即观察小鼠,称重,并获得血液计数 (红细胞、白细胞以及血小板),然后每天观察小鼠一次,每周称重 3 次,并在介入之后每周一次进行血液计数,持续 4 周。

[0526] 电镜术 (EM)

[0527] 对于来自小鼠的 EM,收获 Raji 异种移植物 (53-132mm³),不处理 (对照) 以及在 100ng 生物素化 SHAL 之后 2、4 或 24 小时。如所述 (18),使用在 0.1M Sorenson 氏磷酸盐缓冲液 (pH7.35) 中的 4% 多聚甲醛固定异种移植物。在使用 70% 乙醇的 4% 乙酸双氧铈处理 1 小时并使用 LR White 丙烯酸树脂过夜处理之后,在微波中实现聚合 (Pelco 34700 BioWave, Pella Inc., Redding, CA)。在金网格上捕获超薄切片 (Leica Ultracut UCT, Leica, Vienna, Austria),并将其漂浮于链霉亲和物 -20nm 金 (BB International from Ted Pella Inc.) 上,使用乙酸双氧铈和柠檬酸铅漂洗和染色,然后使用 Philips CM120 Biotwin 透镜 (FEI, Hillsboro, OR, Eindhoven, The Netherlands and Gatan MegaScan 制造,794/20 型号,数字摄影机 (2K $\times$ 2K), Pleasanton, CA. Gatan BioScan,792 型号, Pleasanton, CA) 观察。

[0528] 生物统计方法

[0529] 初始分析通过精确检验比较了应答率并通过对于未处理的 Raji 和 Jurkat 小鼠的对数秩试验比较了存活时间,且未发现显著差异,因此将这些组进行汇集用于随后的分析。通过 χ^2 检验和精确检验对处理的 Raji、处理的 Jurkat 以及未处理的小鼠的应答率进行比较。在 84 天对于未死亡的小鼠或因为肿瘤生长而在该时间之前被安乐死的小鼠检查存活时间。通过卡普兰 - 迈耶曲线和生存中值来描述性总结时间,并通过乘积极限估计获得 95% 置信界限。使用对数秩检验来将两个处理的组与未处理的齐性交叉组进行比较,然后通过比例风险模型来估计与未处理相比处理的作用。使用 SAS/SAS[®] 软件 (SAS Institute, Inc. SAS/STAT Version 9.0. 2004. Cary, NC :SAS Institute) 进行分析。所有检验均在 0.05 水平双侧进行。

[0530] 结果

[0531] 细胞毒性测定

[0532] 当未处理时,经 3 天的观察,无活力 (死亡的) Raji 细胞仍旧为总细胞的 < 5%。当与未处理的对照相比较时,经 3 天时间,使用 SHAL 处理的 Raji 细胞 (0-70nM (pm/ml 培养

基) 的浓度范围) 显示了级分或绝对较多的死亡细胞。在第 2 天在 2.3 和 7nM 之间的 SHAL 浓度观察到最大数量的无活力细胞, 阈值和 IC_{50} SHAL 细胞毒性浓度分别为 0.7 和 2.5nM (pm/ml 培养基) (图 29)。

[0533] 效力和毒性

[0534] 在处理的 Raji 异种移植物中的退化通常在初始的 SHAL 处理之后约 7 天开始, 并在初始的 SHAL 处理之后约 30 天达到完全缓解 (图 30)。尽管在 84 天观察, 但 SHAL 处理的 Raji 异种移植物的所有治愈均持续至目前, 似乎表现永久性治愈。因为在未处理的 Raji 和 Jurkat 小鼠的应答和存活率之间无显著差异 ($P > 0.08$), 将它们合并起来对处理的小鼠进行比较。带有 Raji 异种移植物和使用 SHAL 处理的小鼠具有 69% 的治愈率和 77% 的总体应答率, 显著优于使用 Jurkat 异种移植物处理的 Raji 小鼠和未处理的小鼠 (15% 应答) ($P < 0.001$) (表 10)。未处理的小鼠的生存中值为 25 天, 带有 Jurkat 异种移植物的处理的小鼠的生存中值为 21 天。因为几乎所有小鼠在 84 天存活, 带有 Raji 异种移植物的处理的小鼠的生存中值不可估计 (图 31)。比例风险模型估计了 Raji 小鼠与未处理的和处理的 Jurkat 小鼠相比死亡的风险降低约 85% ($P < 0.001$)。

[0535] 表 10. 带有淋巴瘤异种移植物的无胸腺小鼠 (SHAL 处理或未处理的)

[0536]

处理组	小鼠	应答率 (%) 治愈率 (%)	ORR (%) ^a
Raji	13	69	77
Jurkat	9	0	0
未处理的	13	15	15
^a 总应答率			

[0537] 小鼠中的安全性

[0538] 在总体安全性研究中的所有小鼠, 包括用于效力试验的 SHAL 剂量的 2000 倍的那些小鼠, 增重, 在 4 周的观察过程中显示了稳定的血液计数和无副作用, 因此超过美国食品药品监督管理局“总体安全性”试验指导的要求。

[0539] 电镜术

[0540] 来自未处理的小鼠的 Raji 异种移植物显示了具有良好建立的细胞膜和核膜以及细胞质细胞器 (包括内质网、高尔基氏器以及脂质体) 的健康细胞 (图 32)。相比之下, 在 SHAL 处理之后收获的 Raji EM 通过高浓缩核染色质和成片段的细胞器来表征, 所见与自体吞噬 (程序性) 细胞死亡一致。

[0541] 讨论

[0542] 恶性细胞表面的蛋白质已用于鉴定这些恶性细胞并用作治疗和成像的靶。II 类主要组织相容性复合体, 人白血病抗原 (HLA) 在恶性 B 淋巴细胞表面及其内均丰富 (Epstein 等人 (1987) Cancer Res 47:830-840)。这些蛋白质为细胞死亡的主要信号传导受体 (Leveille 等人 (2002) Eur. J. Immunol. 32:2282-2289; Lane 等人 (1990) J. Immunol., 144:

3684-3692)。而完整的 MAb 选择性识别恶性细胞,其尺寸限制了其血液清除和组织穿透性。基于从计算机建模和来自经验试验的预测,已经选择了有机小配体来结合 HLA-DR10 的 Lym-1MAb 表位区域内的位点。通过将数组这些配体共价连接在一起,已经生成了 SHAL 来靶向 B 细胞衍生的淋巴瘤和白血病 (Hok 等人 (2007) *Bioconjug. Chem.*, 18 :912-921)。这些新型纳米分子模拟 MAb 的亲力和选择性,因为 SHAL 中的多重配体和靶蛋白的表位内的多个位点之间的三维相互作用。SHAL 被表达的异种移植物快速摄取,并从正常组织快速清除 (DeNardo 等人 (2007) *J. Nucl. Med.*, 48 :1338-1347),因为 SHAL 比免疫球蛋白 G 分子小约 50 倍。组织化学分析已经显示 SHAL 与来自患者和来自小鼠的 NHL 组织结合 (Balhorn 等人 (2007) *Clin. Cancer Res.*, 13 (Suppl. 18) :S5621-S5628)。先前的研究显示 SHAL 容易地进入细胞,但它们不离开表达 HLA-DR10 和相关的 HLA-DR 的细胞,其行为类似龙虾及其捕笼。

[0543] 这些 SHAL 高效穿过细胞屏障,在表达 HLA-DR10 的细胞中似乎不受细胞抽送机制的影响。含有 Ct (3-(2-([3-氯-5-三氟甲基)-2-吡啶基]氧)-苯胺基)-3-氧丙酸) 配体的 SHAL 在表达人类 HLA-DR 10 的淋巴瘤细胞内残留并表现针对活的表达人类 HLA-DR 10 的淋巴瘤细胞的强力的抗淋巴瘤活性 (DeNardo 等人 (2007) *J. Nucl. Med.*, 48 :1338-1347)。目前的实验证明了含有三齿 SHAL 的 Ct 配体在带有 Raji 异种移植物的小鼠中也表现了显著的效力,所述三齿 SHAL 在培养物中对表达 HLA-DR10 的细胞具有 2.5nM (pm/ml 培养基) 的 IC_{50} 。在小于最大剂量的 2000 倍的 SHAL 处理剂量下在 69% 的这些小鼠中实现了永久性的治愈,并在健康小鼠中被证实是安全的。在带有表达 HLA-DR10 的异种移植物的小鼠中仅观察到抗淋巴瘤作用, Jurkat 异种移植物不受 SHAL 处理影响。因为使用超过 2000 倍的 SHAL 处理的小鼠未表现不良事件的迹象, SHAL 似乎具有作为潜在治疗剂的异常安全范围。未来在小鼠中使用三齿 SHAL 进行剂量反应研究以确定使用较大的 SHAL 剂量是否可增加治愈率是重要的。

[0544] 来自使用 SHAL 处理的小鼠的异种移植物组织的电子显微镜照片证实了 SHAL 对 Raji 淋巴瘤细胞的细胞毒性。广泛的空泡化和细胞结构的丧失表明 SHAL 结合 HLA-DR 诱导了最终导致细胞凋亡和自体吞噬细胞死亡的细胞信号传导。需要更广泛的研究来证实该假说并鉴定 SHAL 作用的机制。

[0545] 该结果提供了下列具有说服力的证据:即, SHAL 具有作为用于靶向淋巴瘤和白血病以进行分子治疗的新型纳米分子的异常潜能。SHAL 表现为其生物相似物具有吸引力的替代物,这是因为这些化学物质小约 50 倍,较不昂贵,更容易一致性产生,稳定以及预期具有长贮存期且当口服给药时有效。另外,基于 SHAL 的治疗剂可在这些恶性肿瘤细胞内的重要位点附近运输和存留其他制剂。SHAL 制备平台高效、具有弹性并且允许快速合成和修改。

[0546] 应理解,本发明描述的实施例和实施方式仅用于说明性目的,对于本领域技术人员来说可以做多种修改或改变,并且所述修改或改变包括在本申请的精神和范围内和所附权利要求的范围内。本发明所引用的所有出版物、专利以及专利申请因此通过引用完整并入本文用于所有目的。

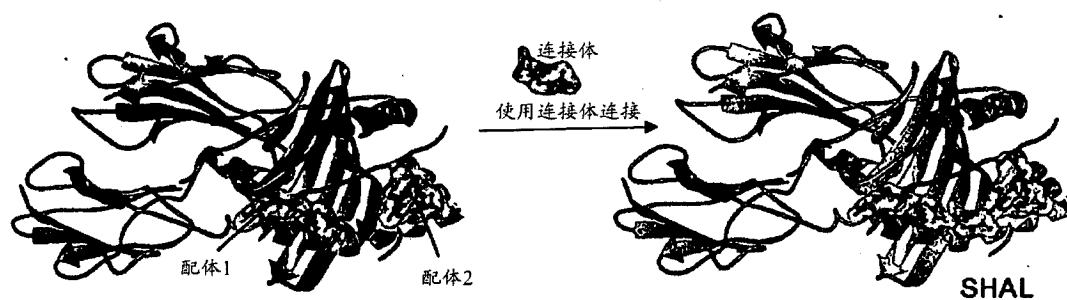


图 1

组织点阵：技术

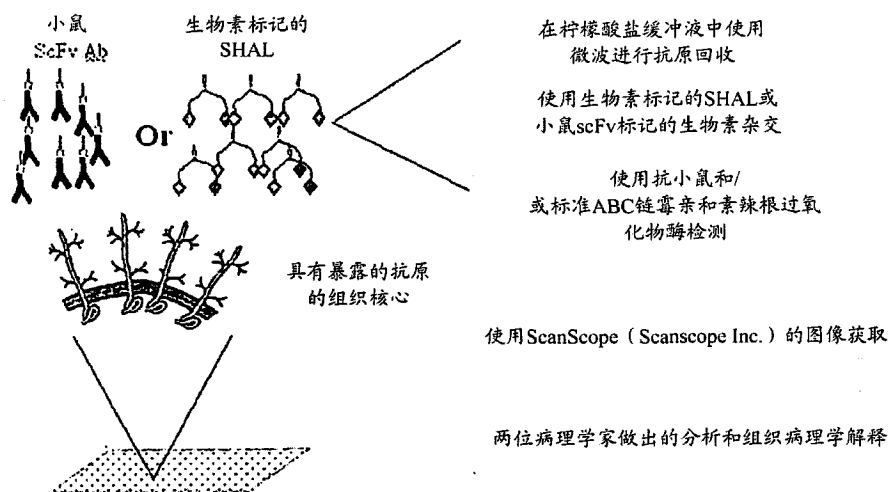


图 2

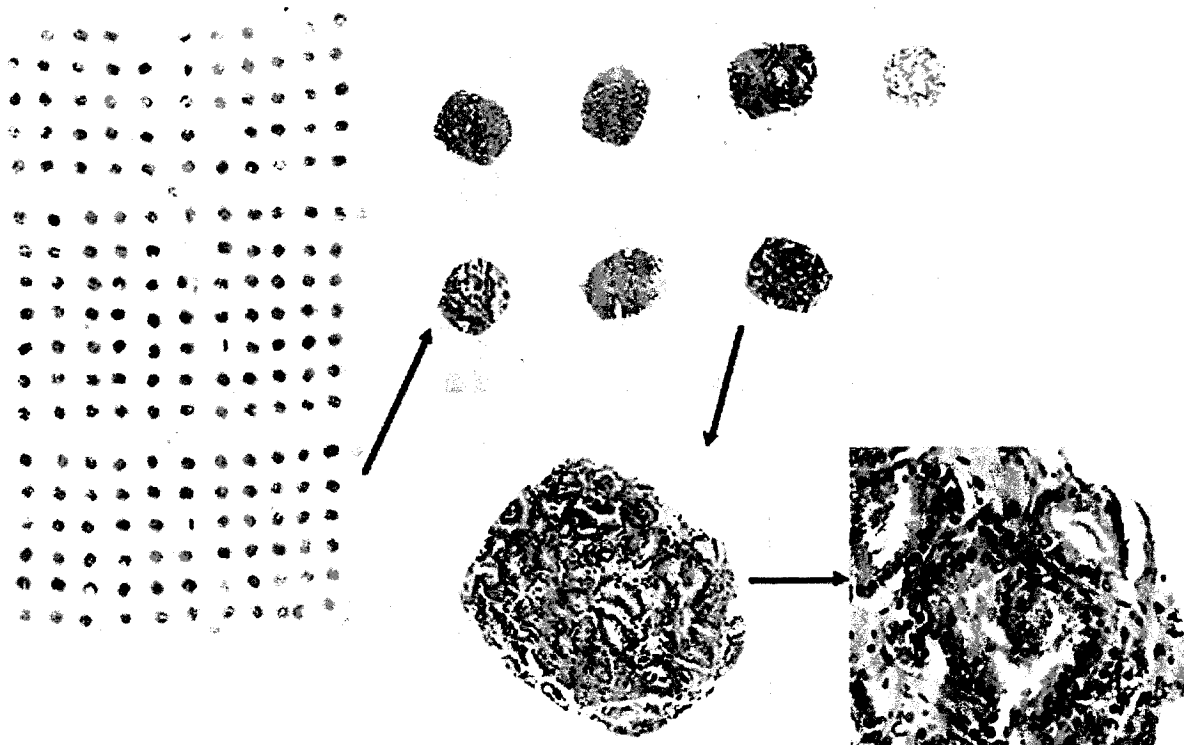


图 3

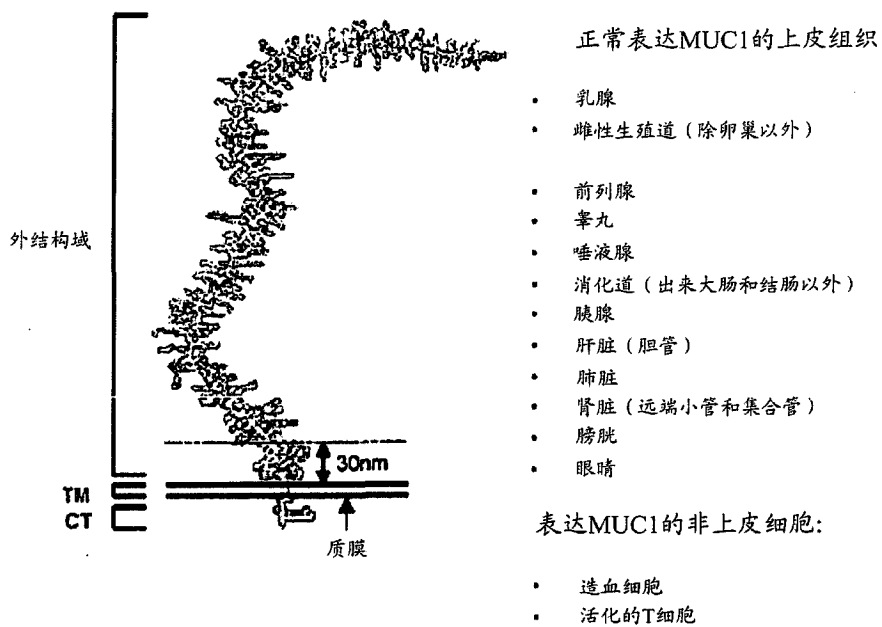


图 4A

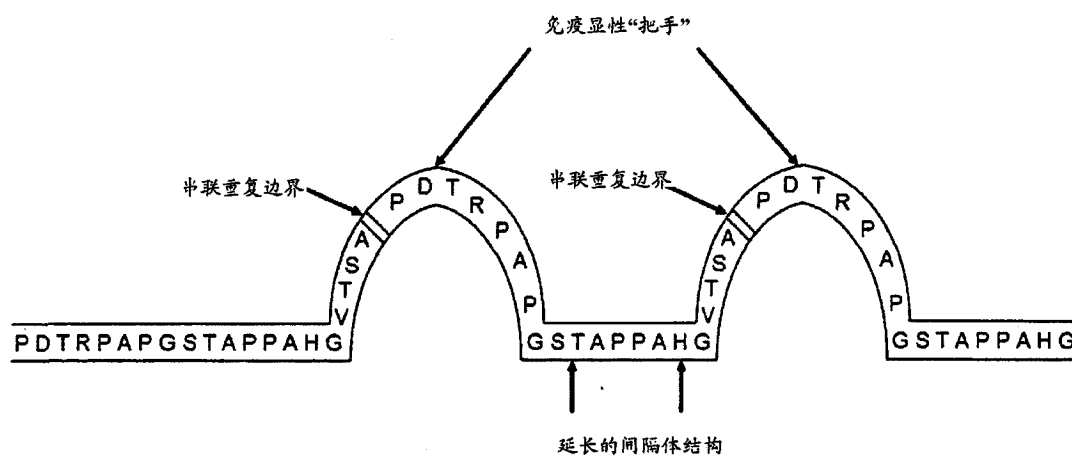


图 4B

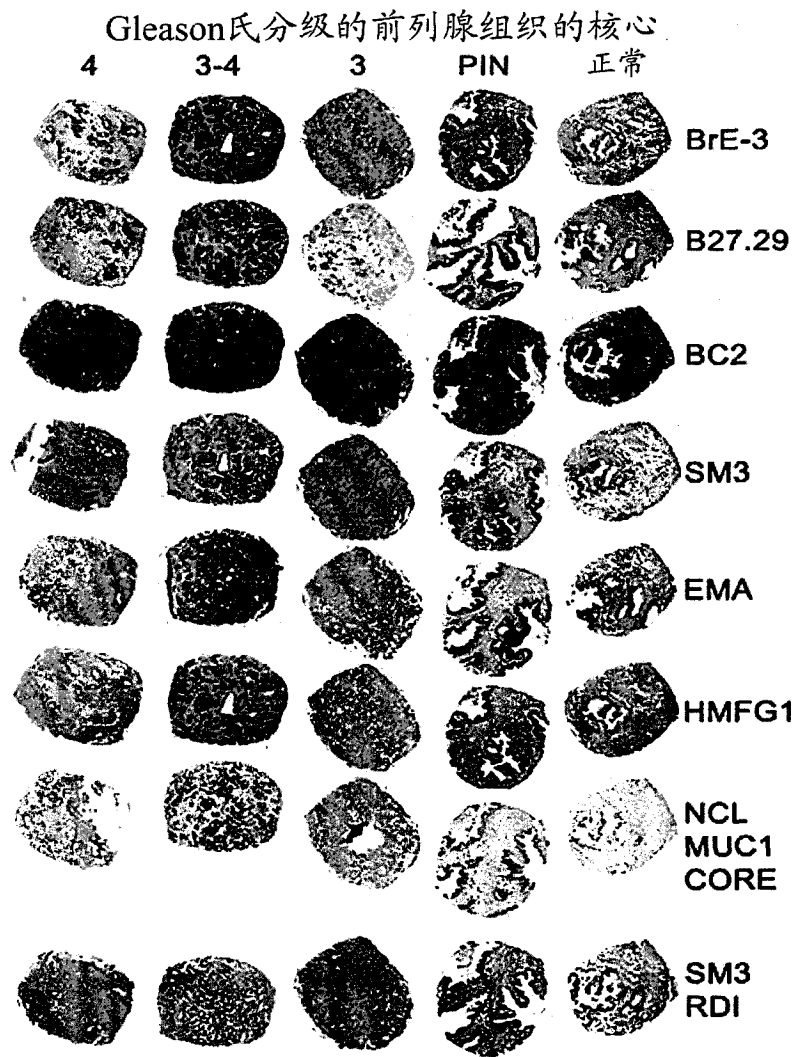


图 5

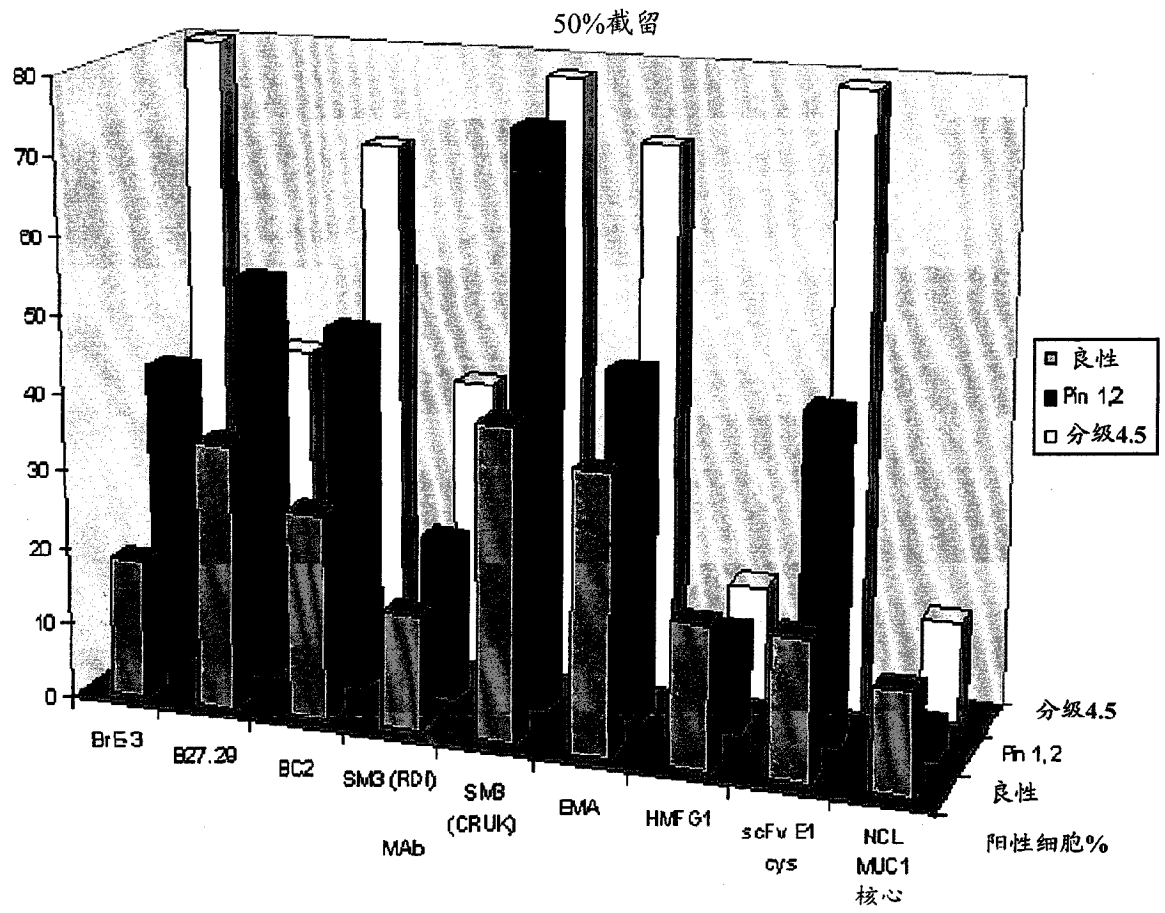


图 6



图 7

```

* * * * * : * * * * * : * * * * *
hla_dr10 -----GDTRPRFLEEVKFECHFFNGTERVRLLERR
laqd_B -----GDTRPRFLWOLKFECHFFNGTERVRLLERC
ld5m_B -----GDTRPRFLEQVKFECHFFNGTERVRFLLDRY
lbx2_B -----TRPRFLWOPKFECHFFNGTERVRFLLDRY
la6a_B -----PRFLEYSTSECHFFNGTERVRFLLDRY
li3r_B RDSRGKKVITAFNEGLKGGGSLVGGGSGGGGSRPWELEYCKSECHFFNGTERVRLLERR

* * * * * : * * * * * : * * * * *
hla_dr10 VINQEEYARSDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWN SQKDLLEIRRAAVDTYCRHNTGVGESFT
laqd_B IYNQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWN SQKDLIEORRAAVDTYCRHNYGVGESFT
ld5m_B FYHQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWN SQKDLLEQKRAAVDTYCRHNYGVGESFT
lbx2_B FYNQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWN SQKDLIEQRAAVDTYCRHNYGVGESFT
la6a_B FYNQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWN SQKDLIEQKRAVDTYCRHNYGVGESFT
li3r_B TYNQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWN SQKDLIEQKRAVDTYCRHNYGVGESFT

* * * * * : * * * * * : * * * * *
hla_dr10 VQRRVQPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKYGVVSTGLIQN
laqd_B VQRRVEPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKYGVVSTGLIQN
ld5m_B VQRRVQPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKYGVVSTGLIQN
lbx2_B VQRRVQPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKYGVVSTGLIQN
la6a_B VQRRVQPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKYGVVSTGLIQN
li3r_B VQRRVEPKVTVPYPSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKYGVVSTGLIQN

* * * * * : * * * * * : * * * * *
hla_dr10 GDWTFQTLVMLETVPSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGL
laqd_B GDWTFQTLVMLETVPSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSK-----
ld5m_B GDWTFQTLVMLETVPSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSE-----
lbx2_B GDWTFQTLVMLETVPSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSE-----
la6a_B GDWTFQTLVMLETVPSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSE-----
li3r_B GDWTFQTLVMLETVPSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQNK-----

hla_dr10 LFLGAGLFIYFRNQKGHSGLPPTGFLS 237
laqd_B ----- 198
ld5m_B ----- 192
lbx2_B ----- 191
la6a_B ----- 187
li3r_B ----- 228

```

图 8

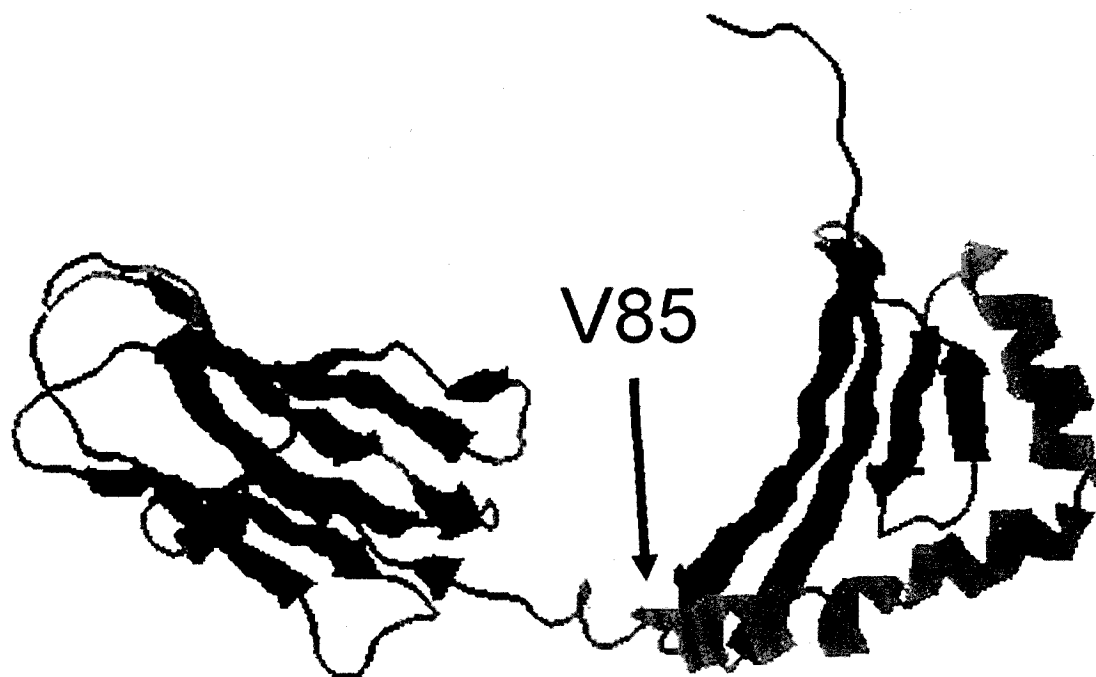


图 9

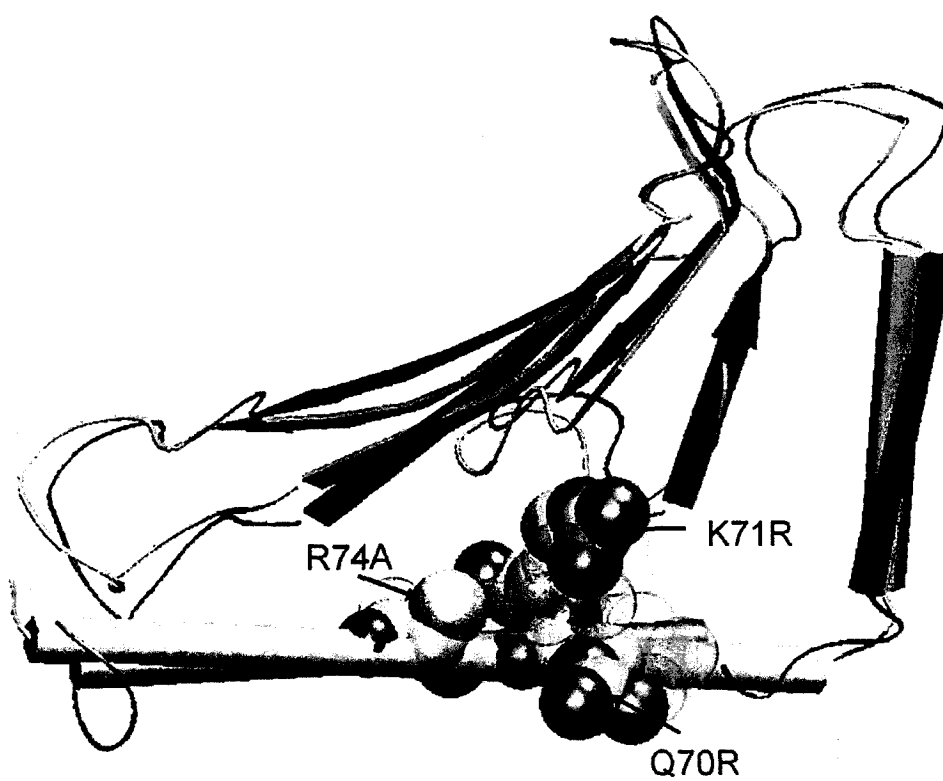


图 10

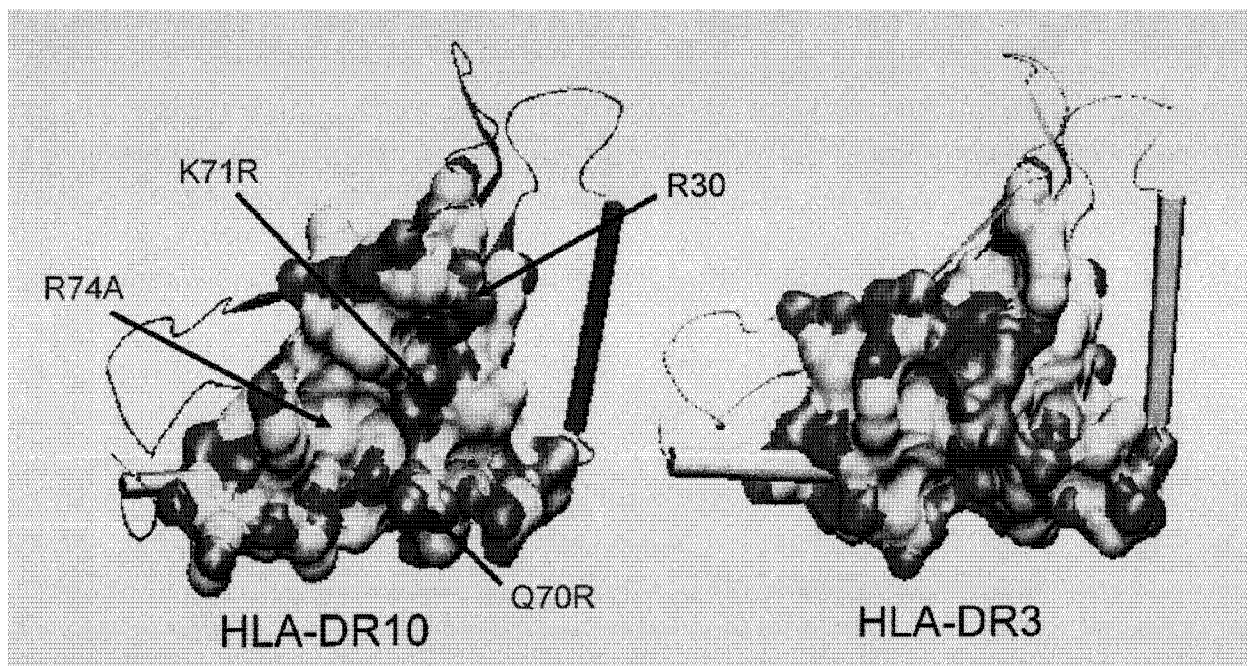


图 11

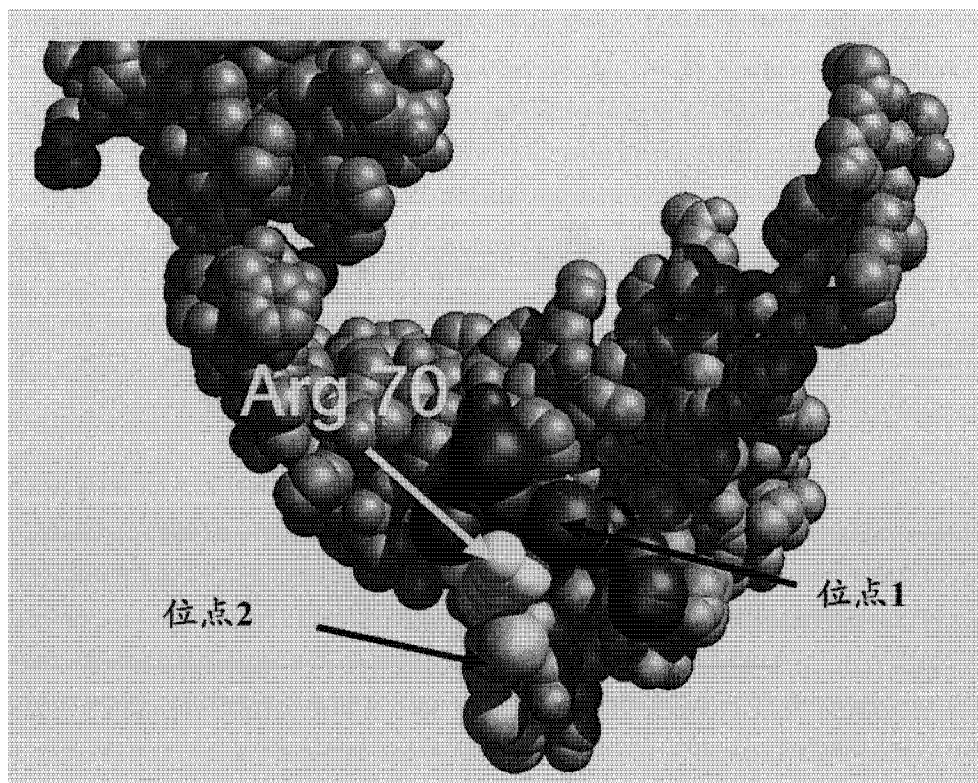


图 12

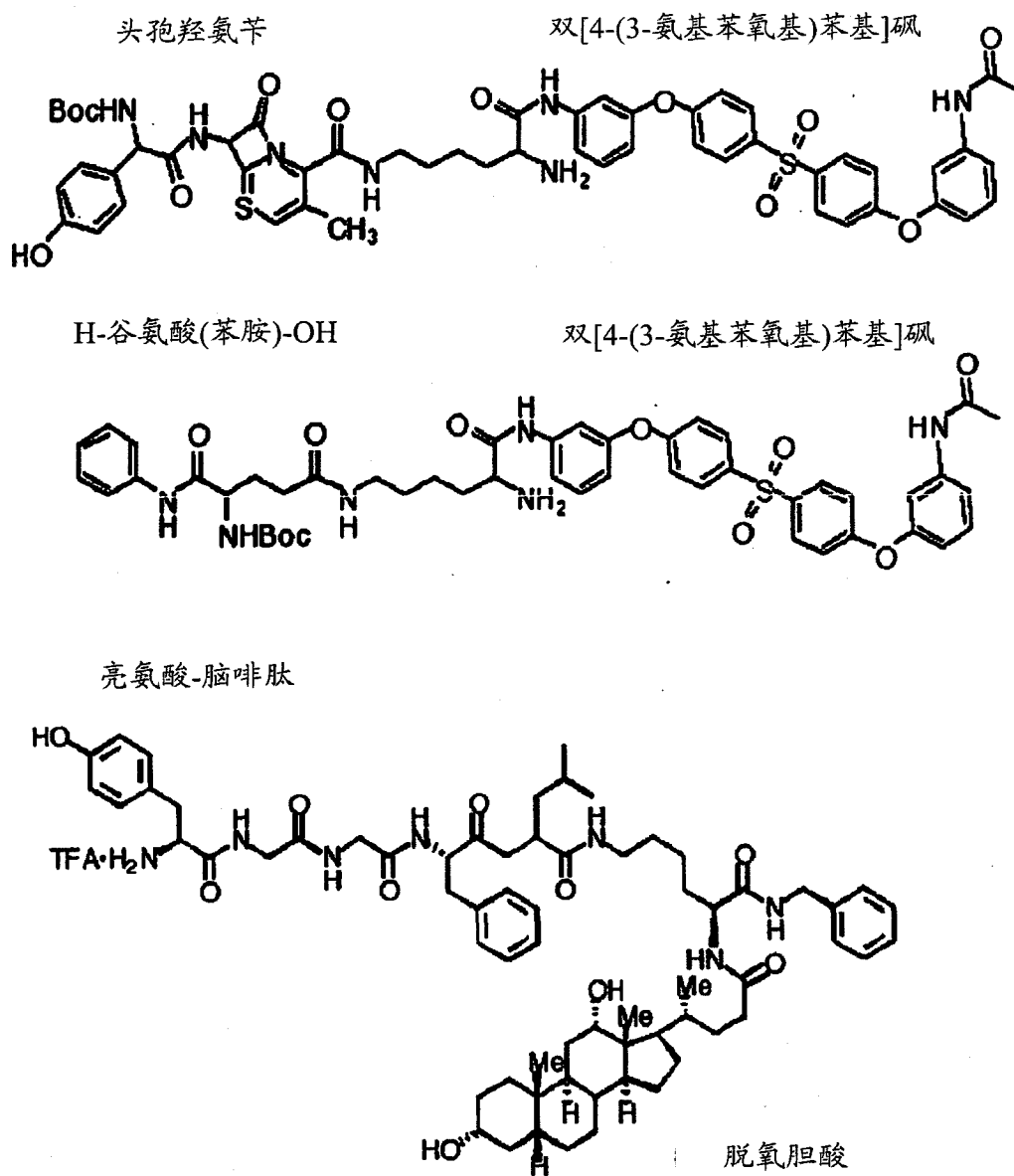


图 13A

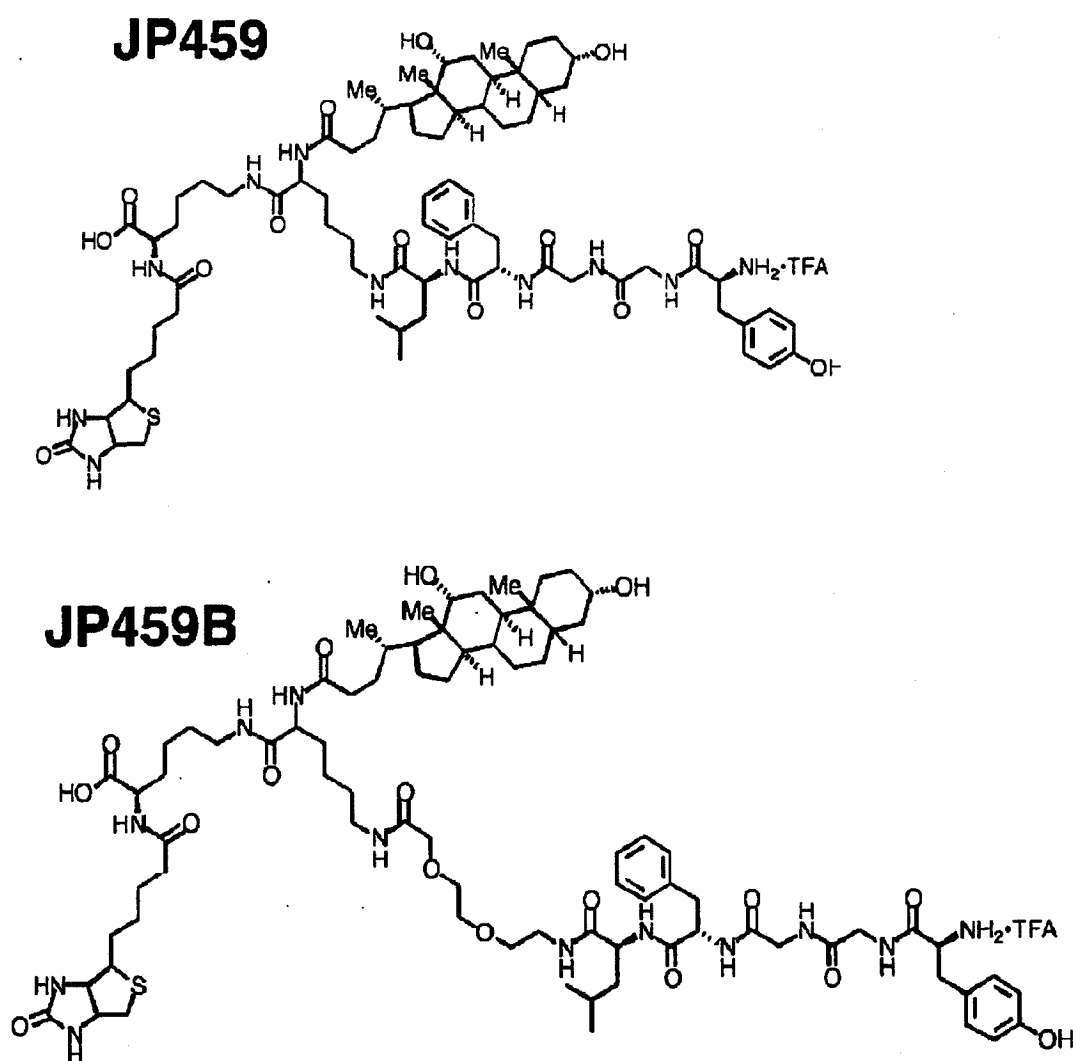


图 13B

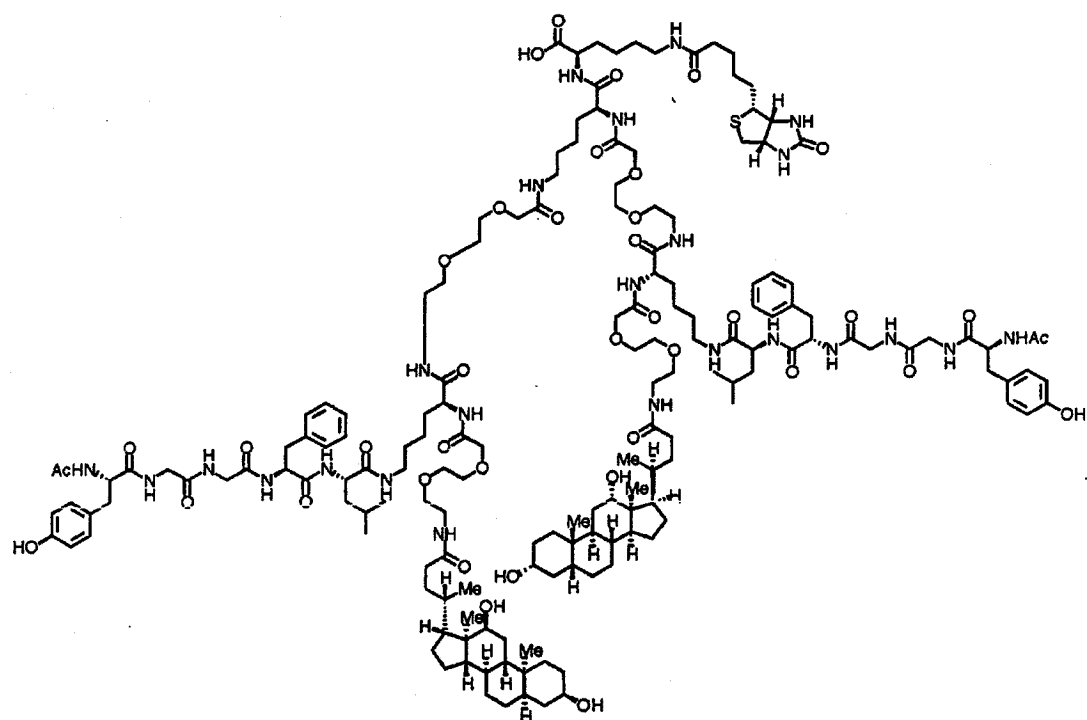


图 14

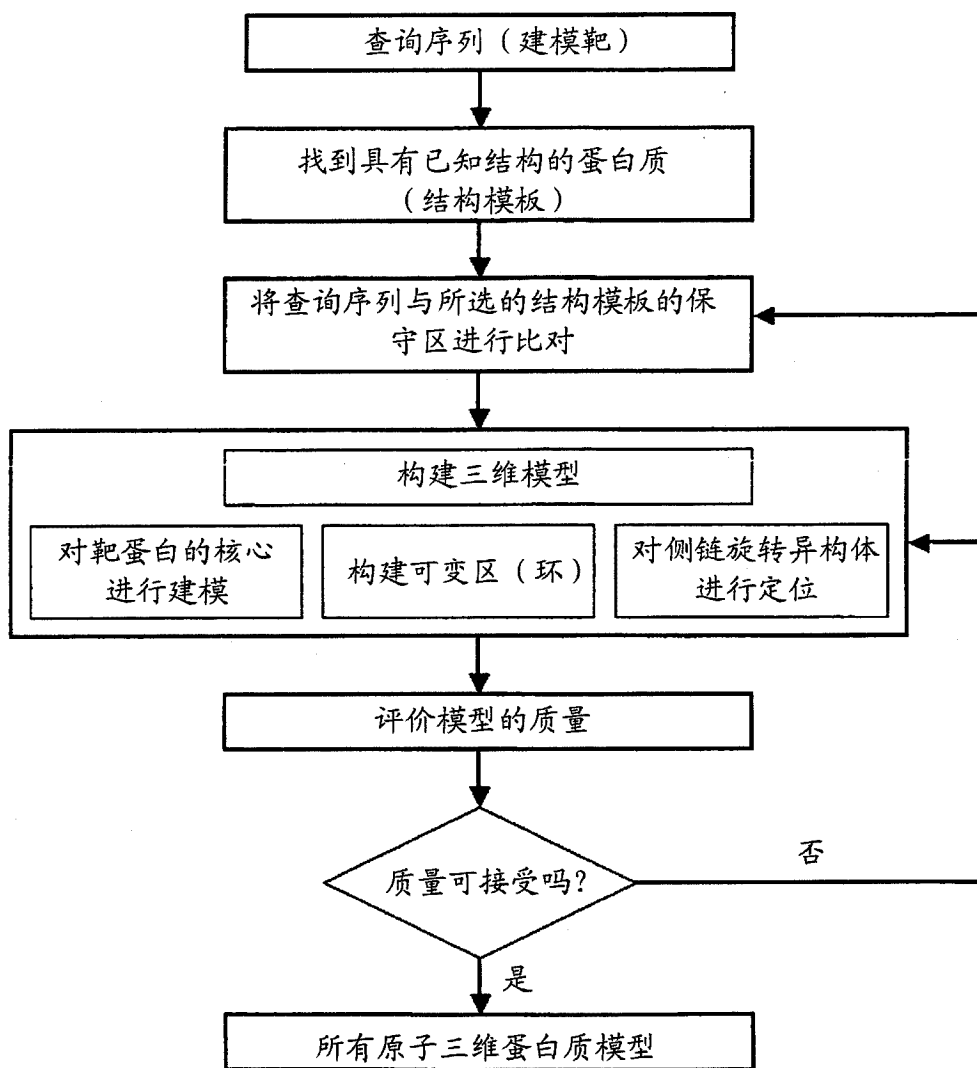


图 15

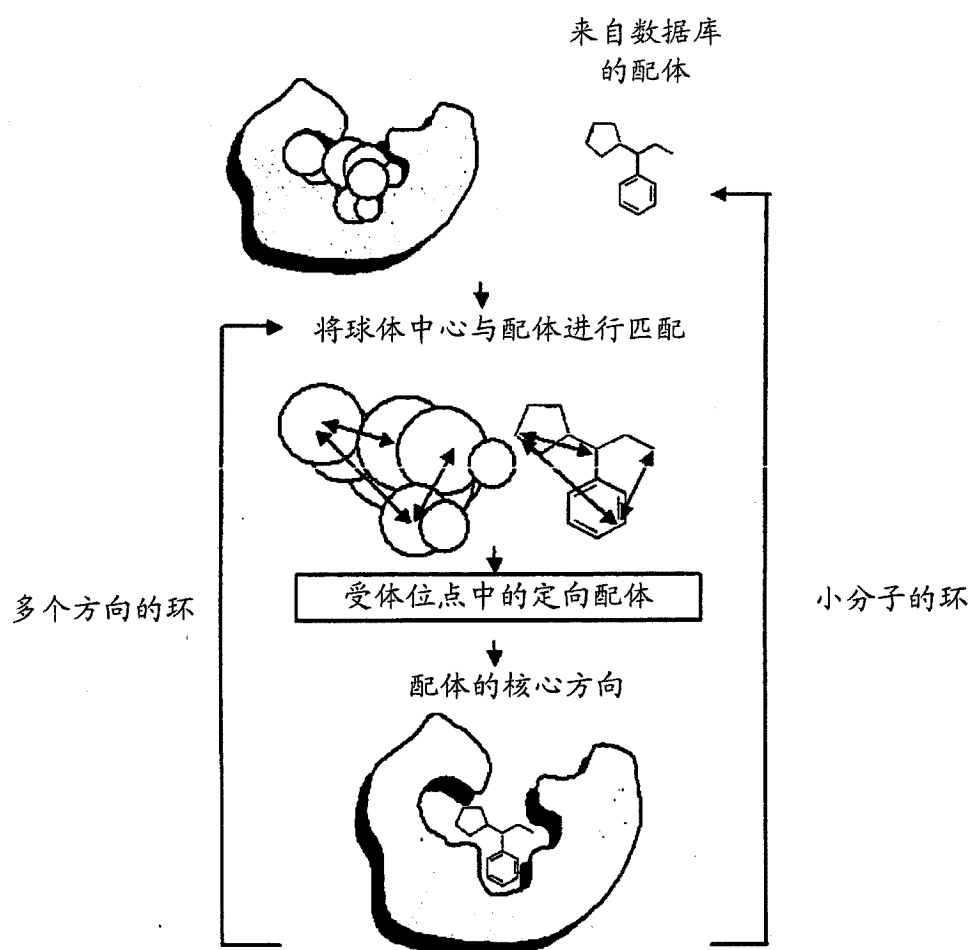


图 16

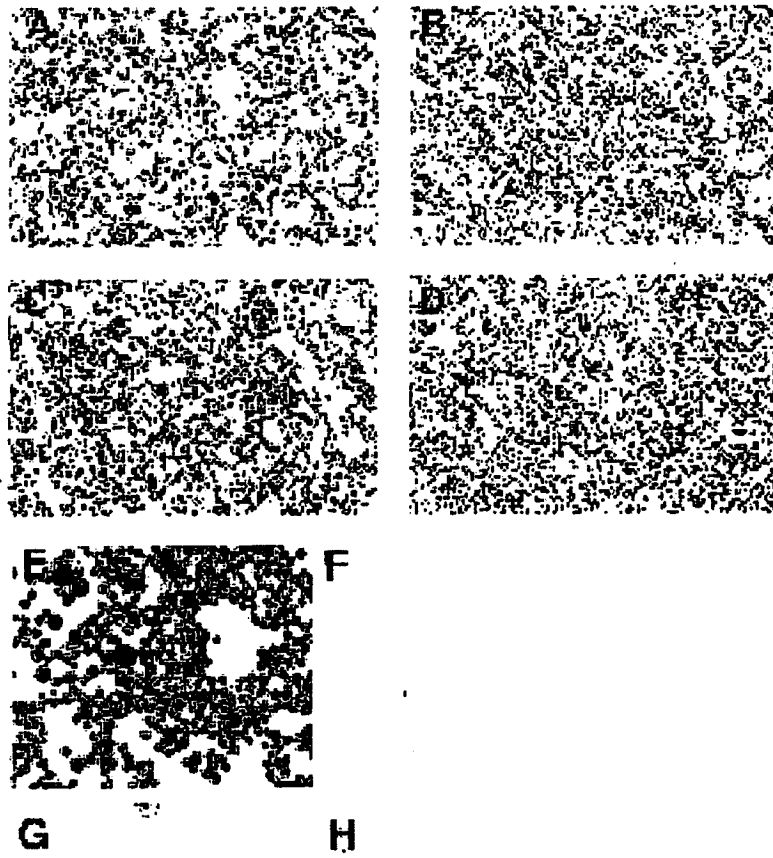


图 17A

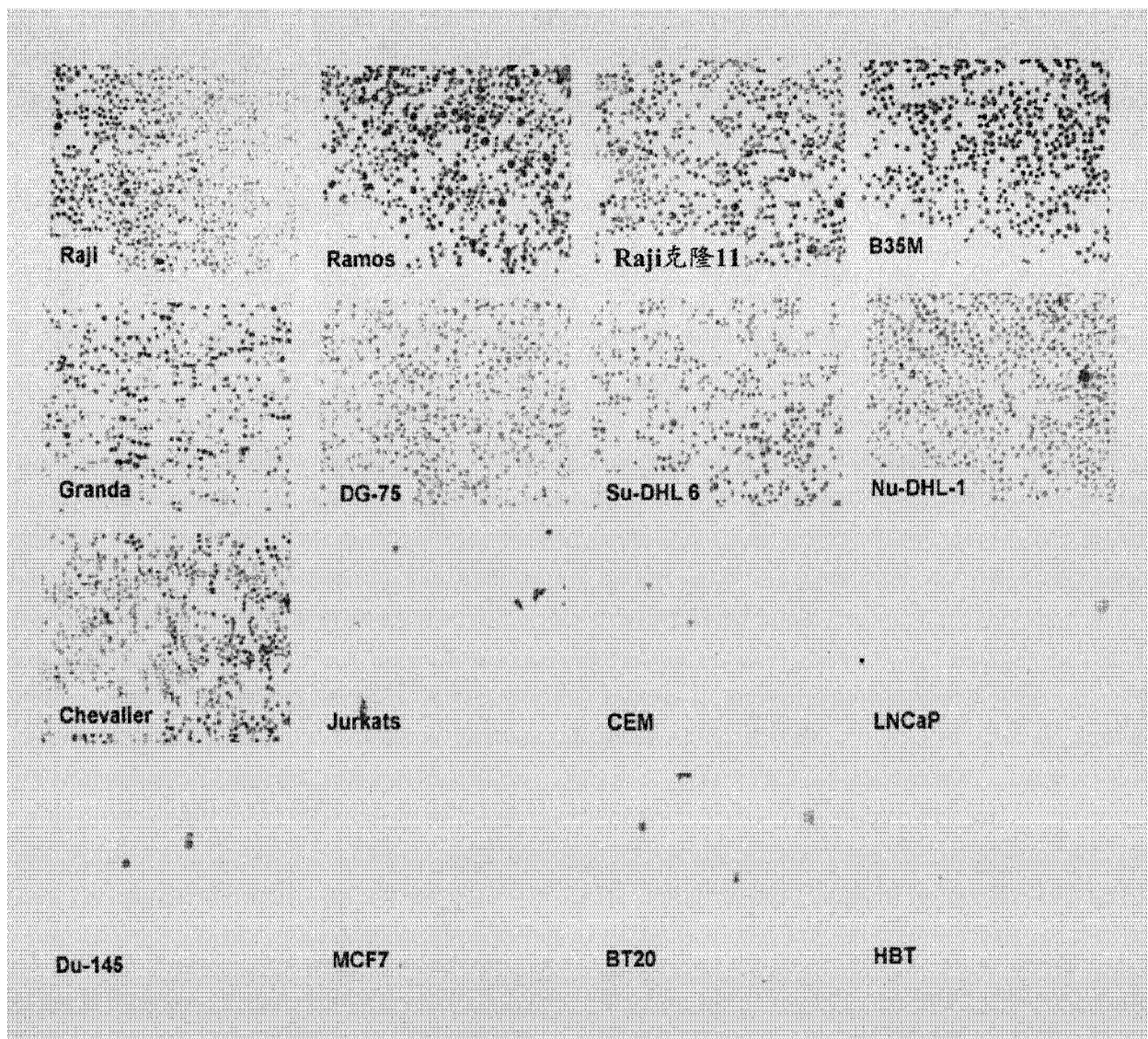


图 17B

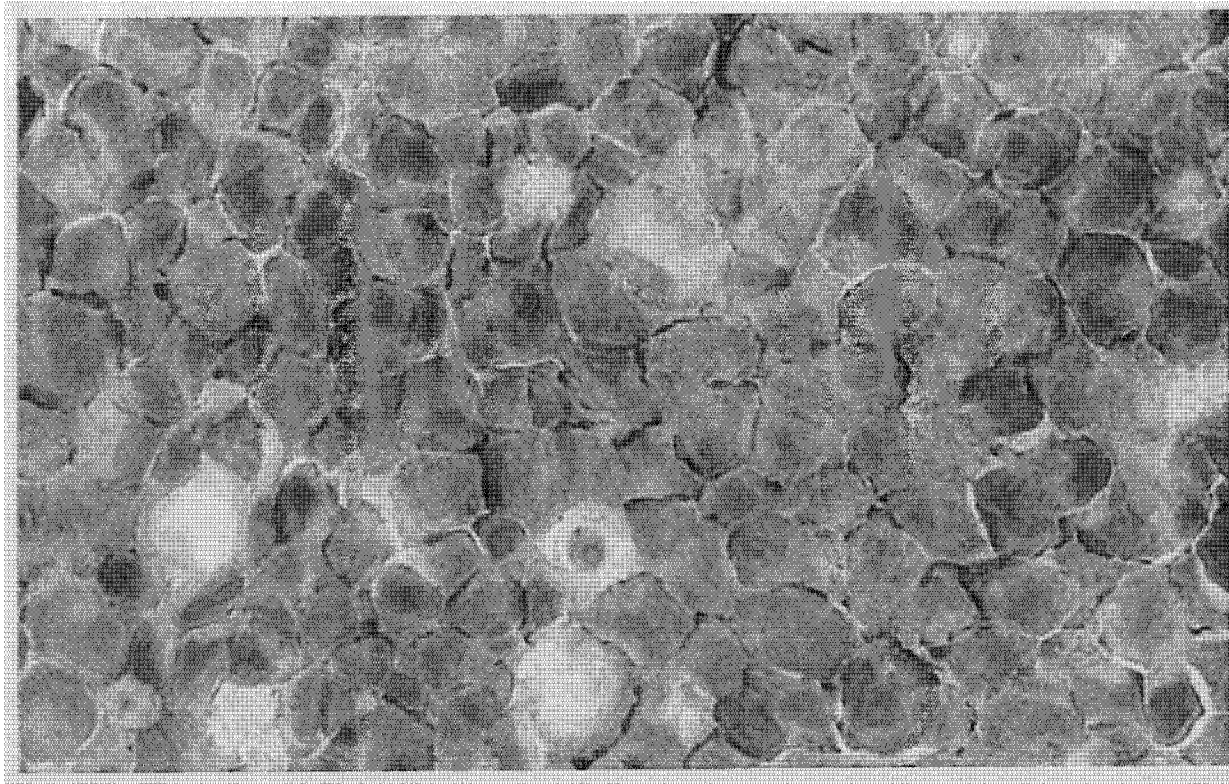


图 18

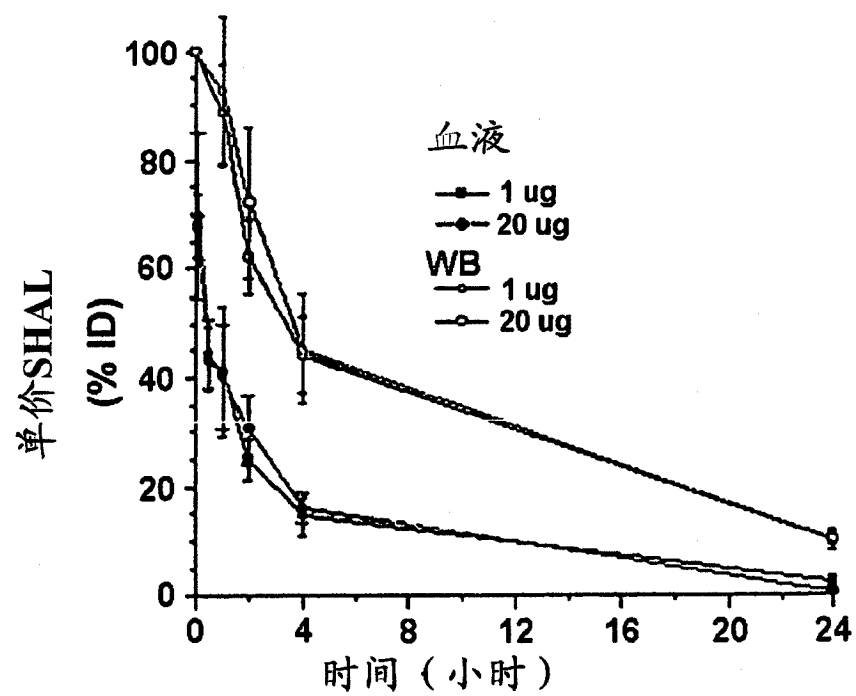


图 19

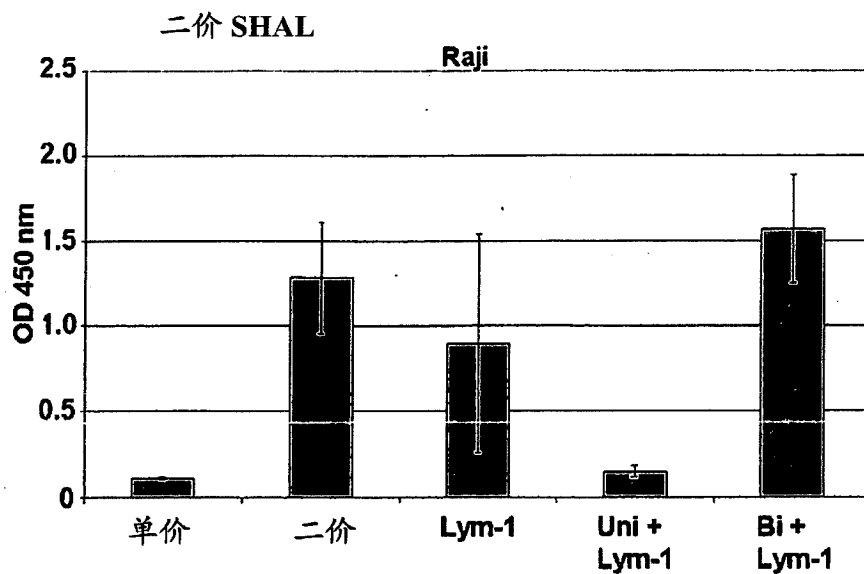


图 20

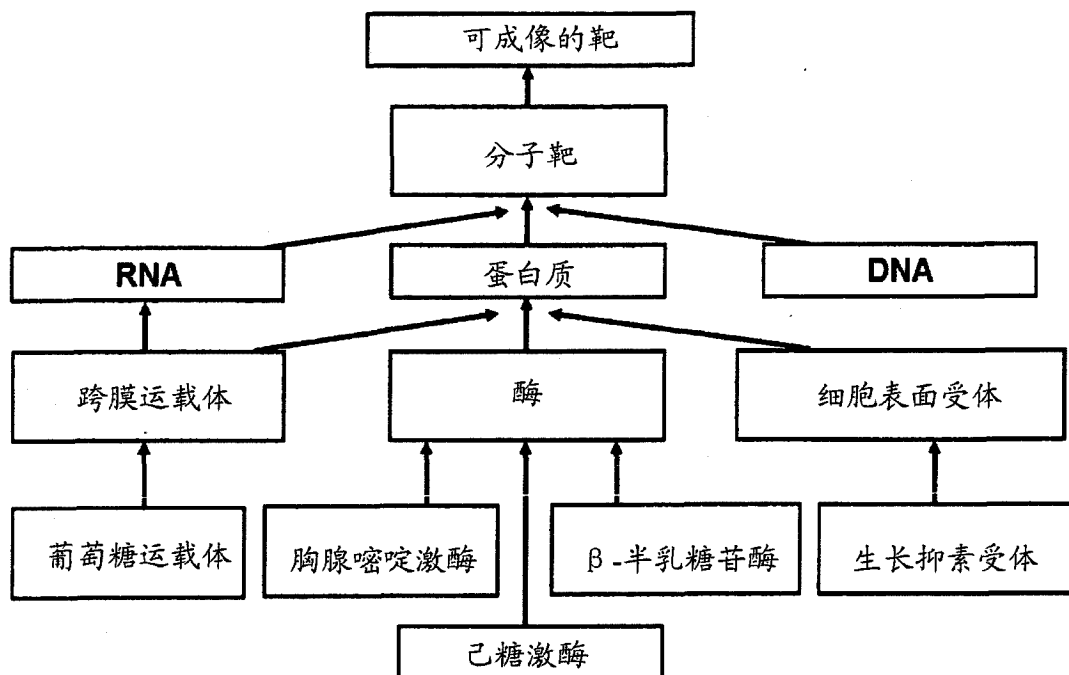


图 21

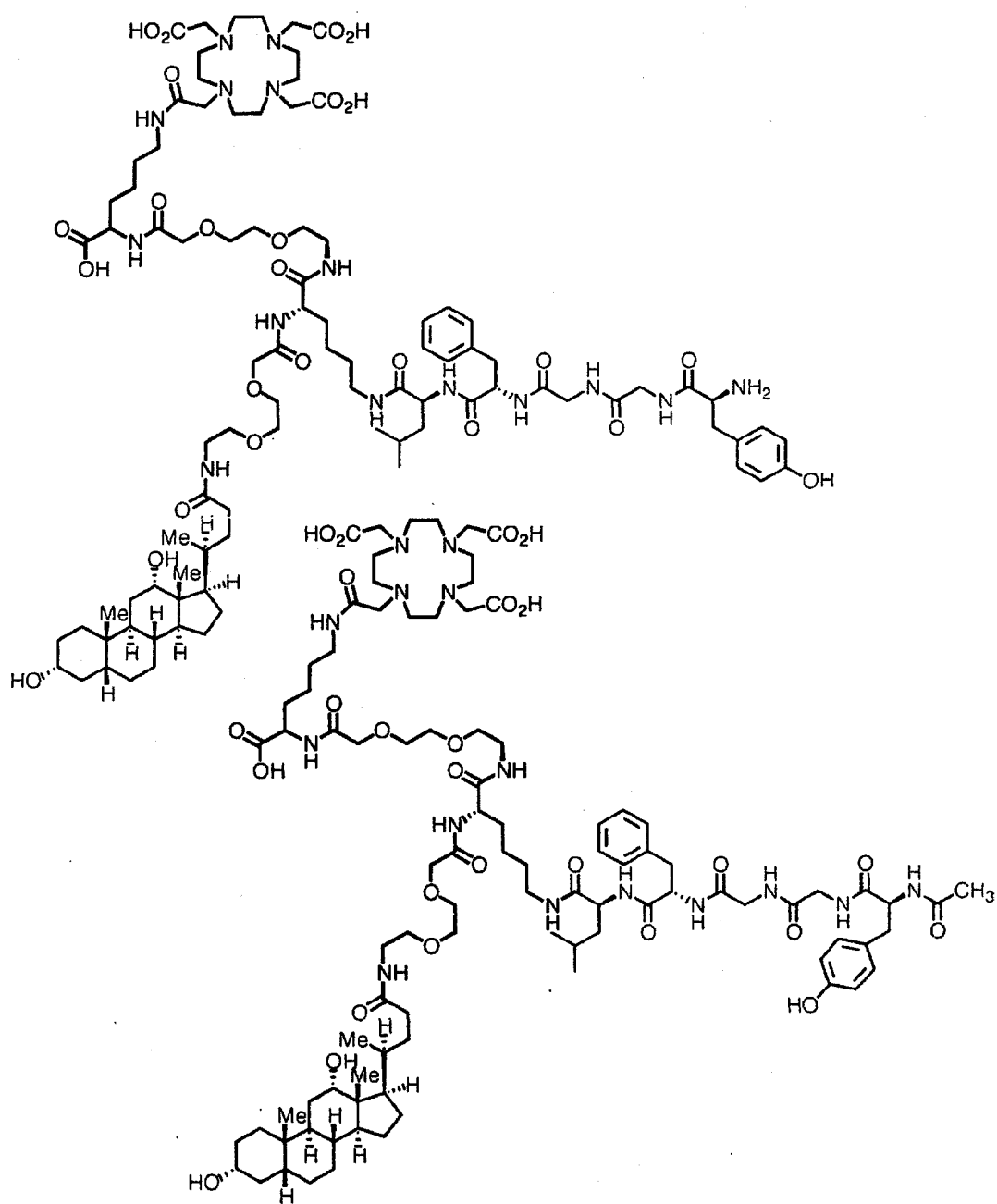


图 22

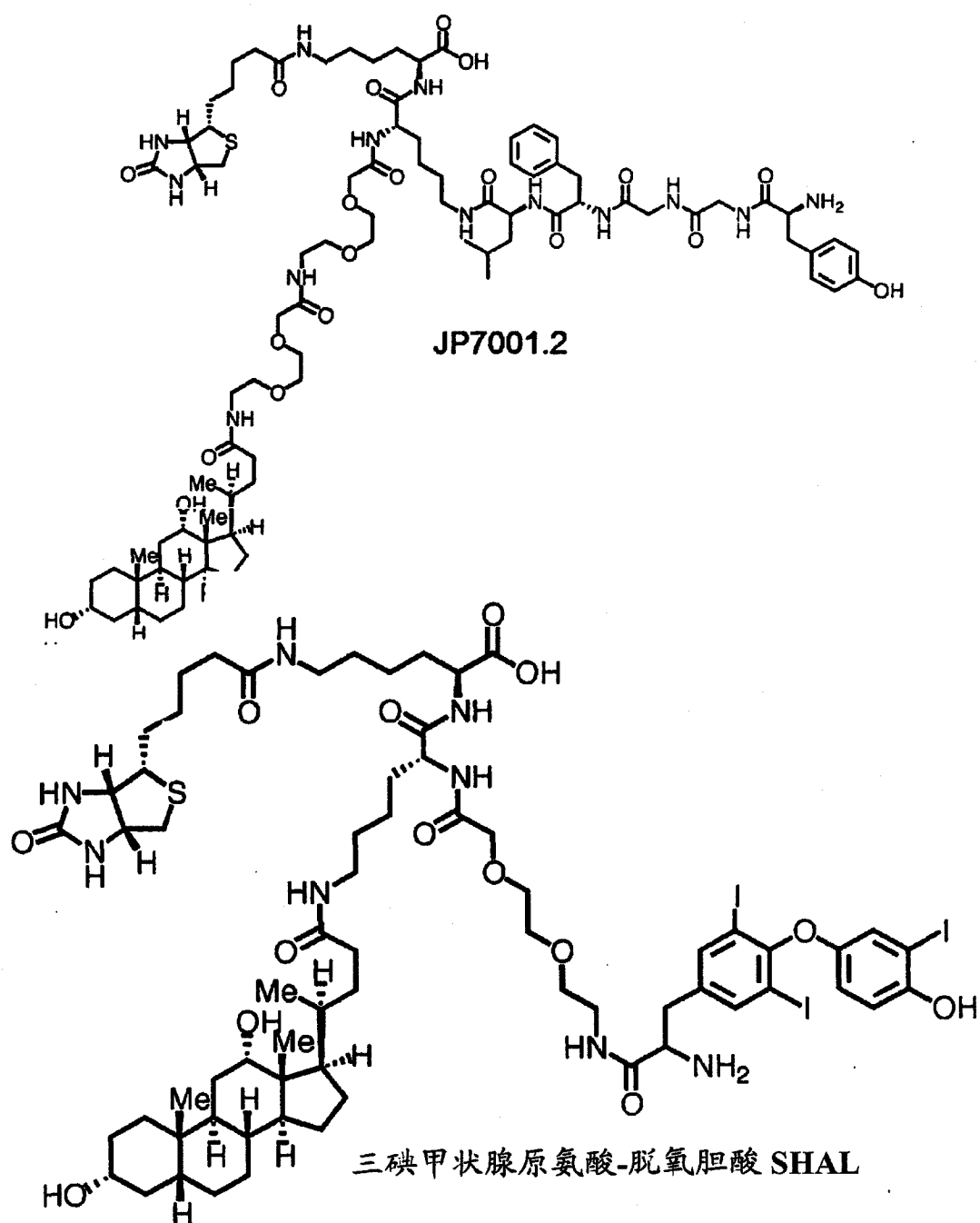


图 23

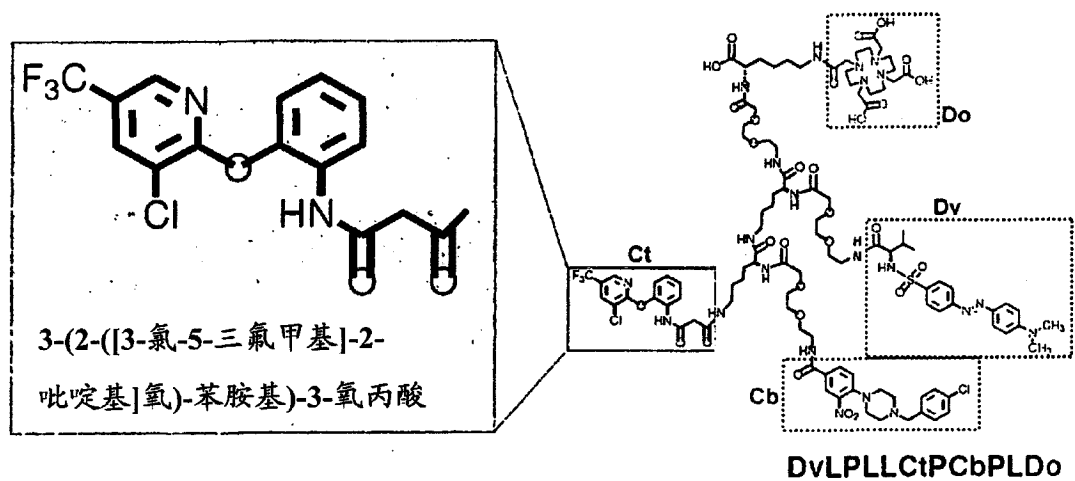


图 24A

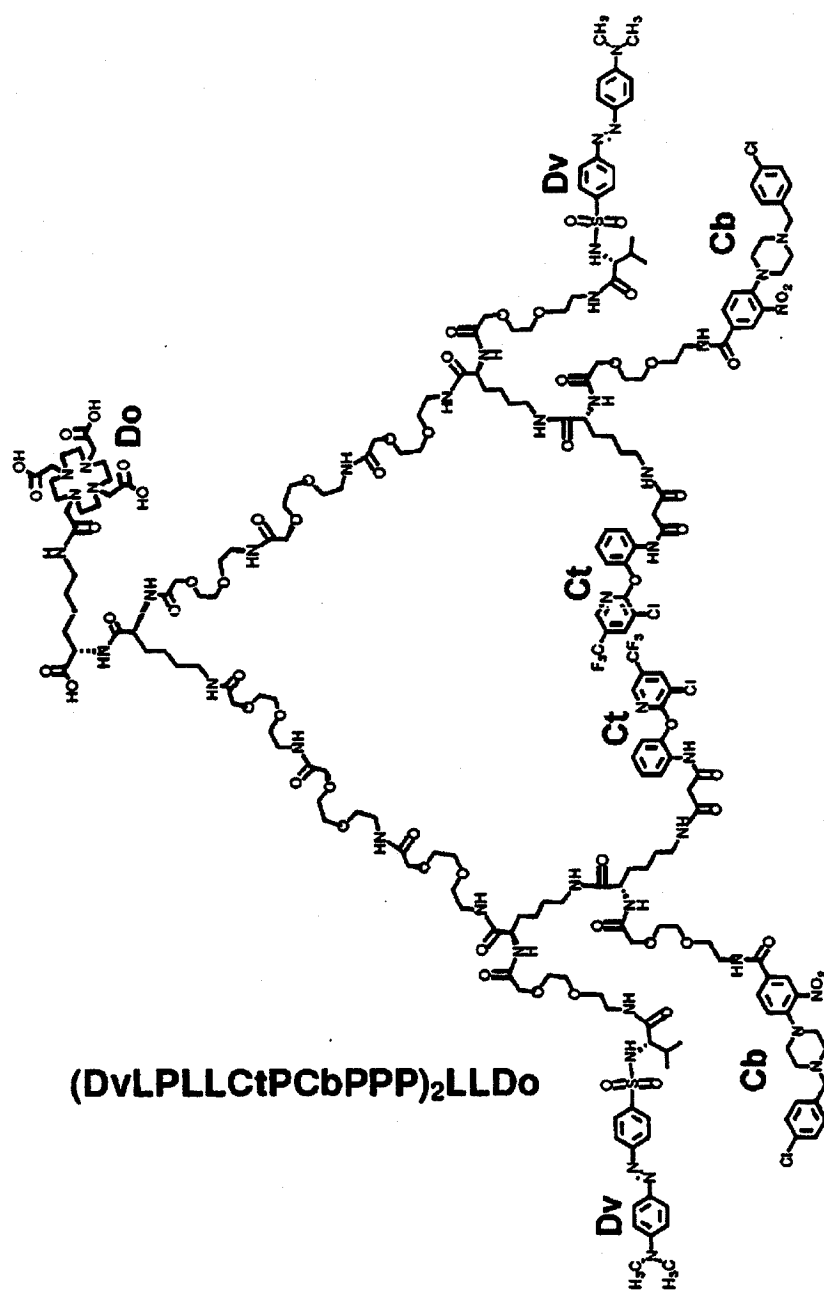


图 24B

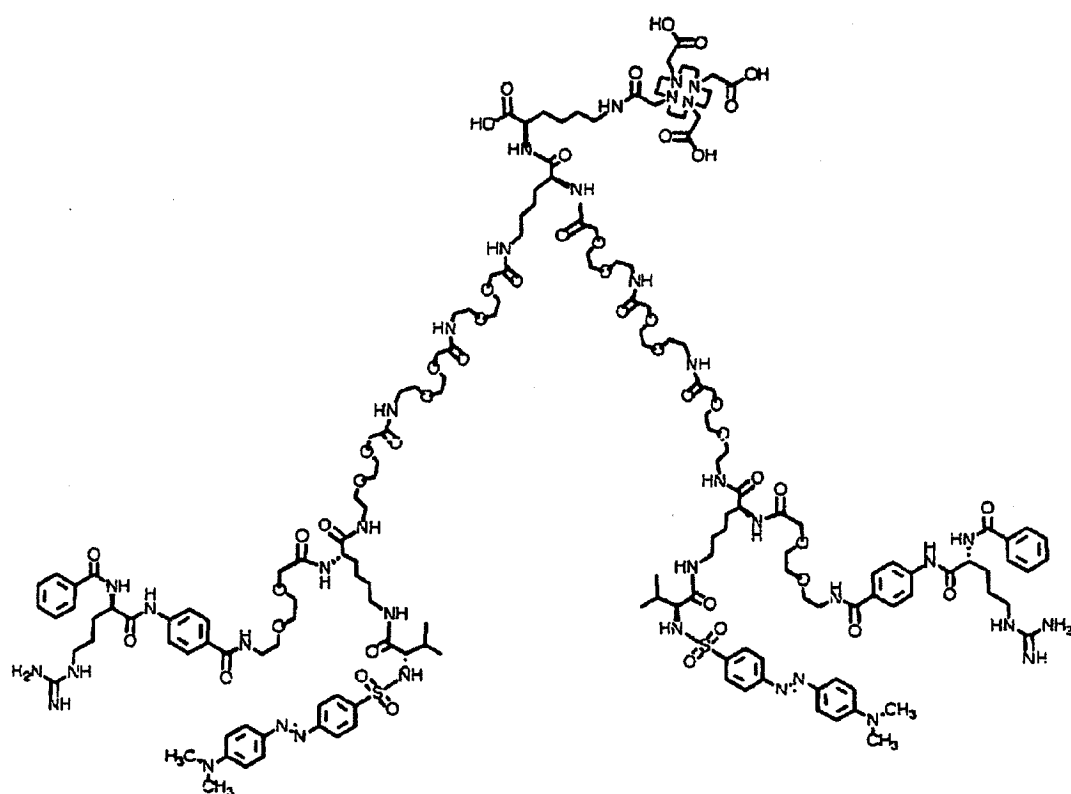


图 25A

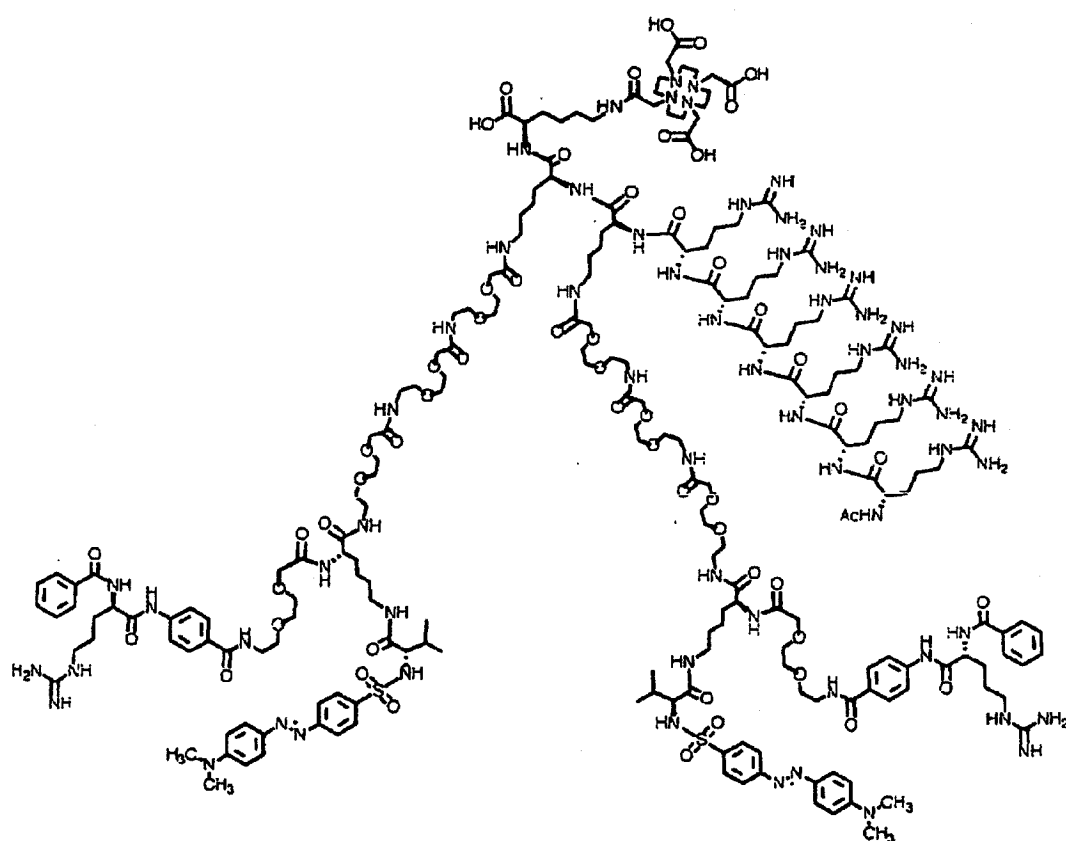


图 25B

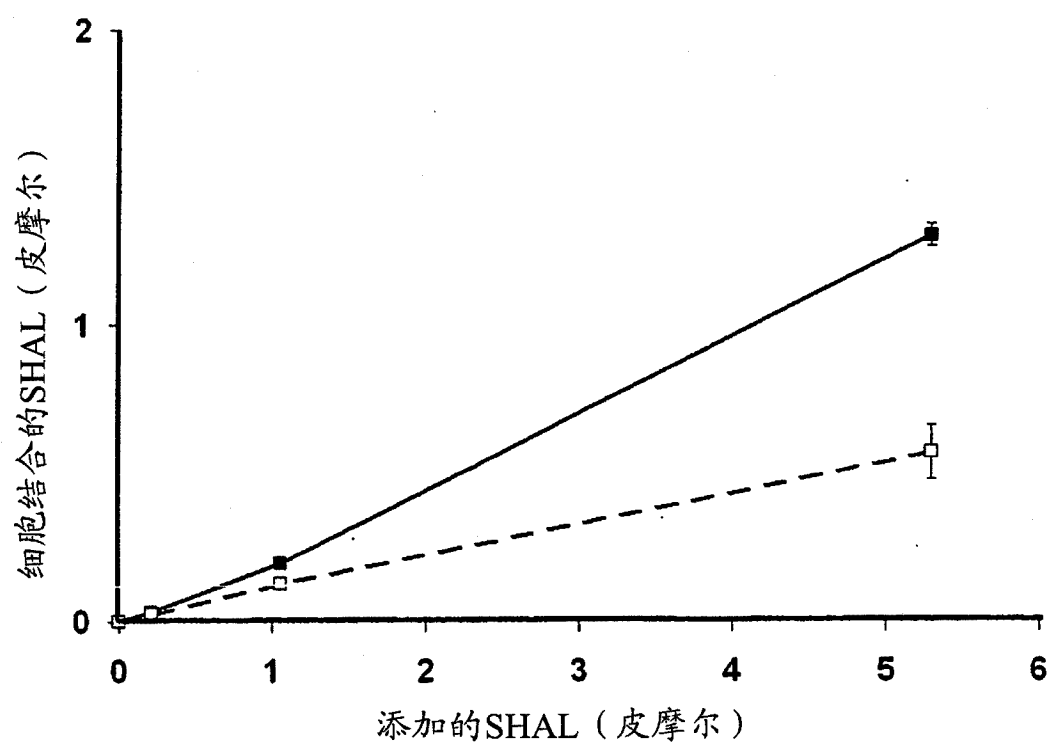


图 26

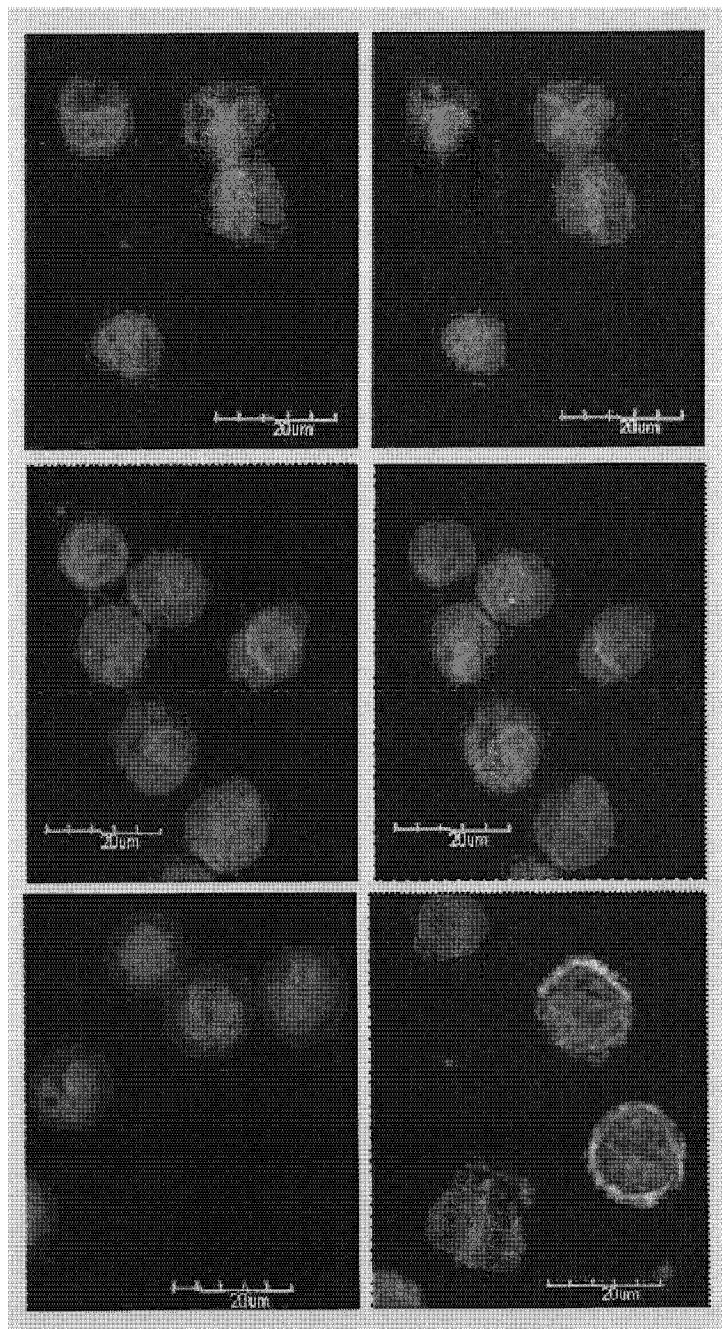


图 27

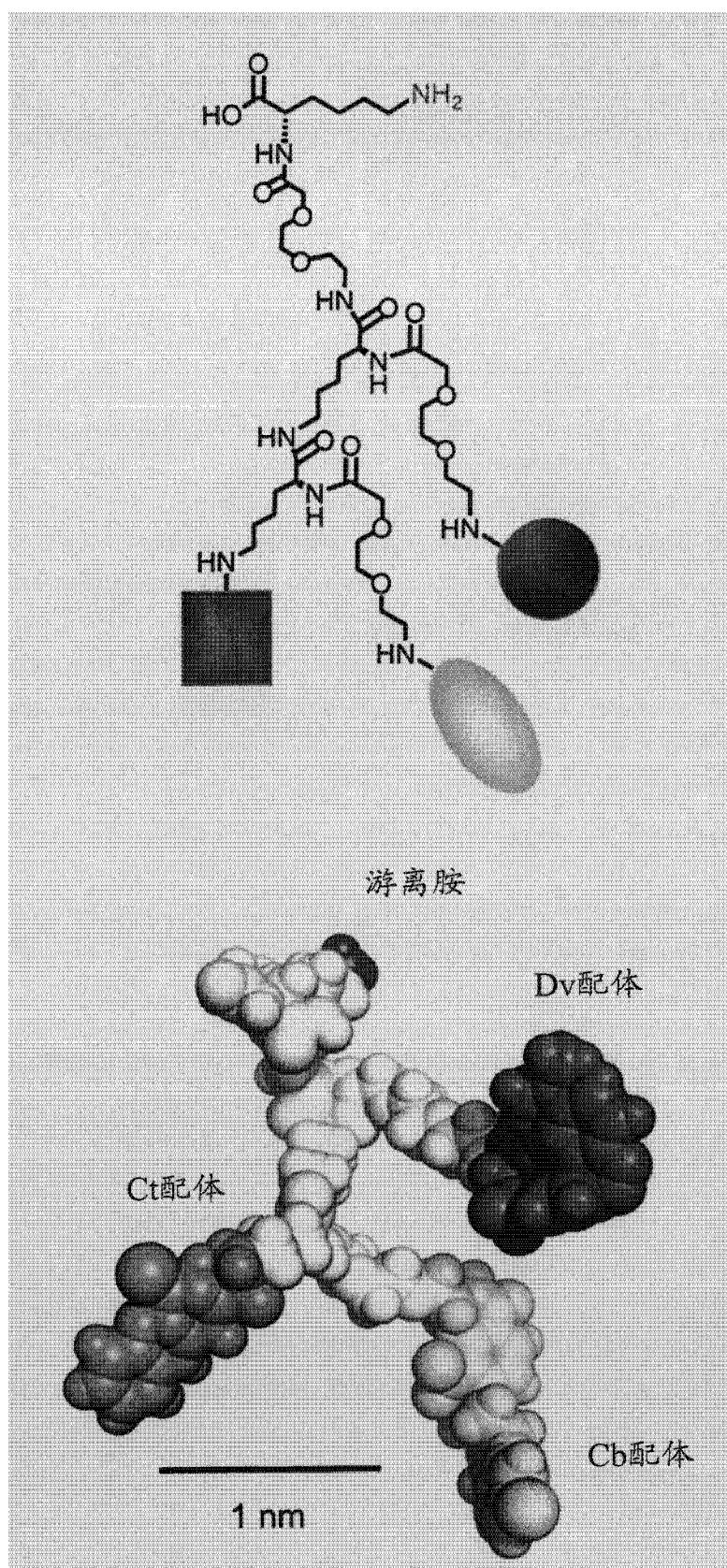


图 28

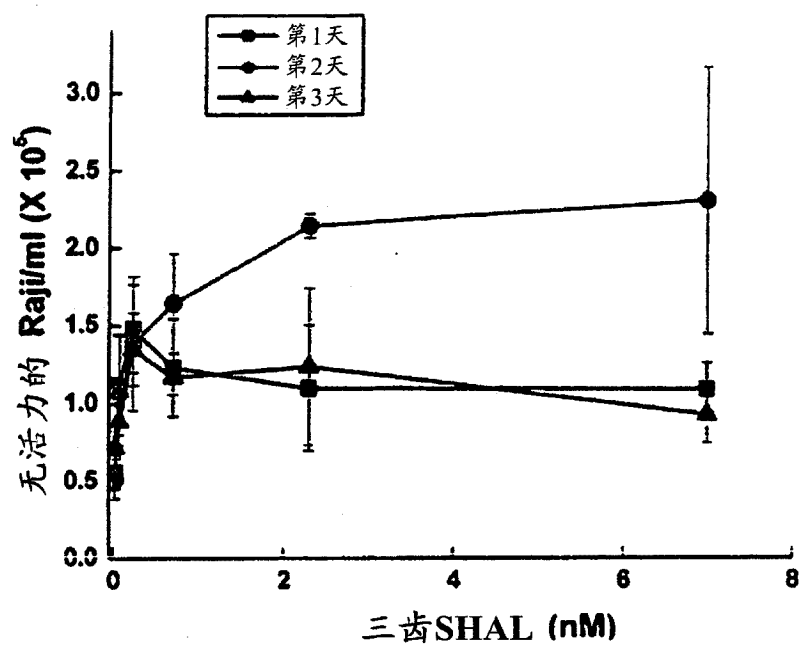


图 29

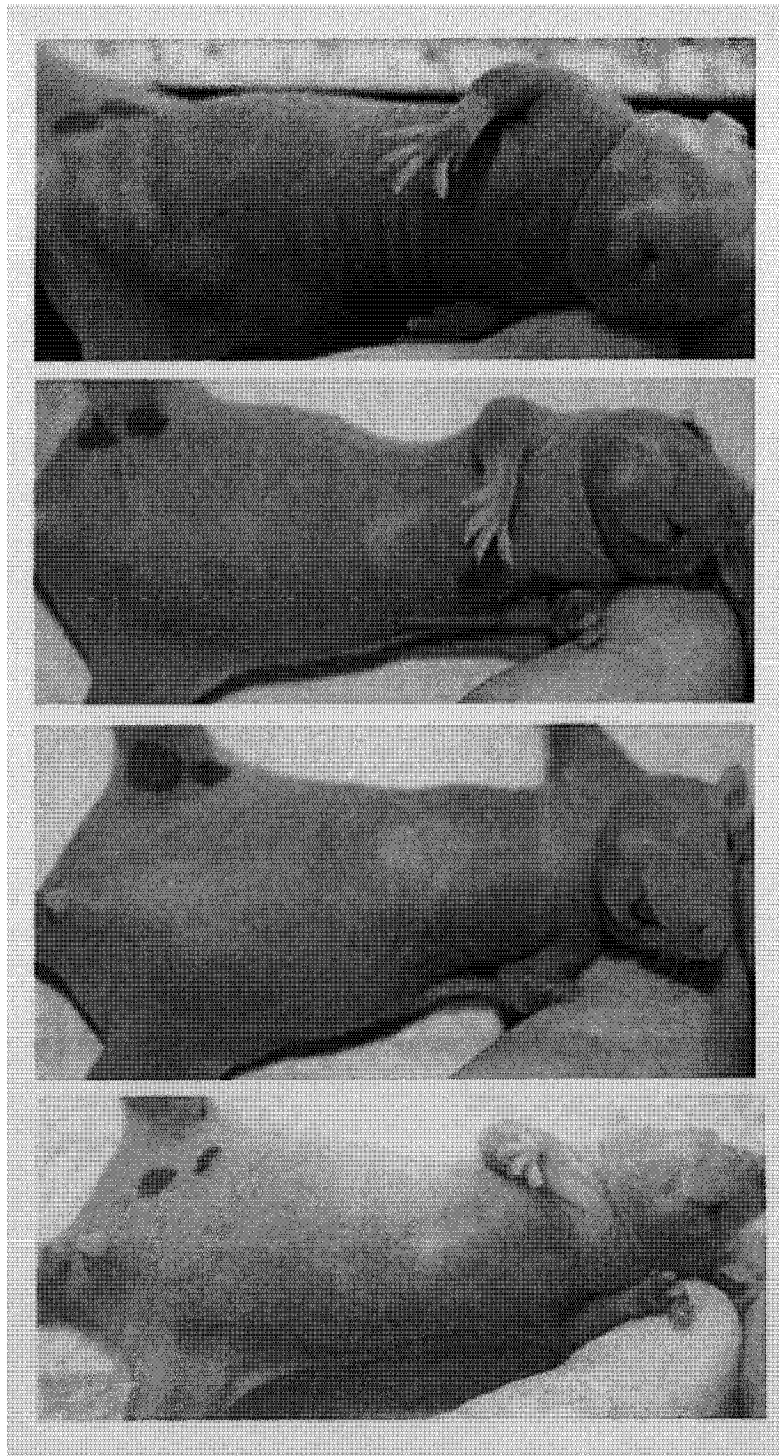


图 30

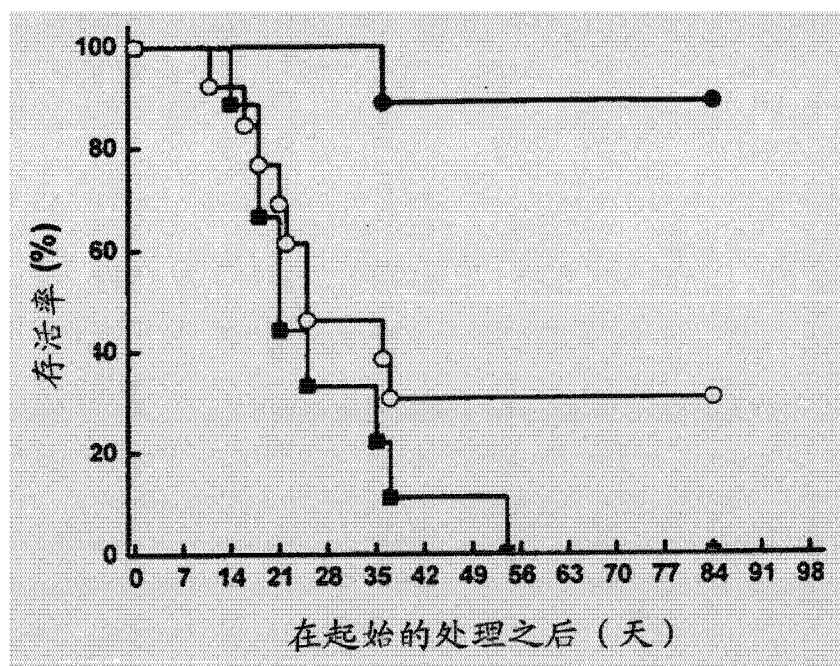


图 31

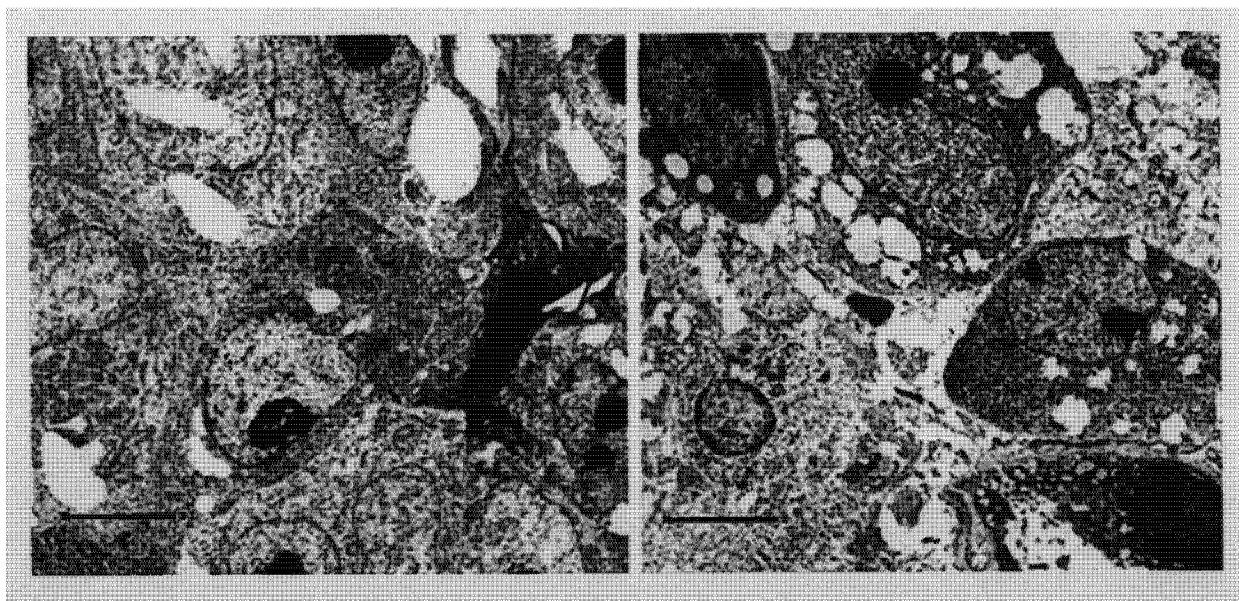


图 32