



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117980006 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 03

(21) 申请号 202280059167.8

(22) 申请日 2022.07.08

(30) 优先权数据

63/220,426 2021.07.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.02.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/073540 2022.07.08

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/283623 EN 2023.01.12

(71) 申请人 达因疗法公司

地址 美国

(72) 发明人 布伦丹·奎因 约翰·纳吉姆

斯科特·希尔德布兰德

科迪·A·德雅尔丹

穆罕默德·T·卡塔纳尼

肖恩·斯普林

罗梅什·R·苏布拉马尼亚

沈佩仪 蒂莫西·威登

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 刘振佳

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/113 (2006.01)

权利要求书6页 说明书49页

序列表(电子公布) 附图4页

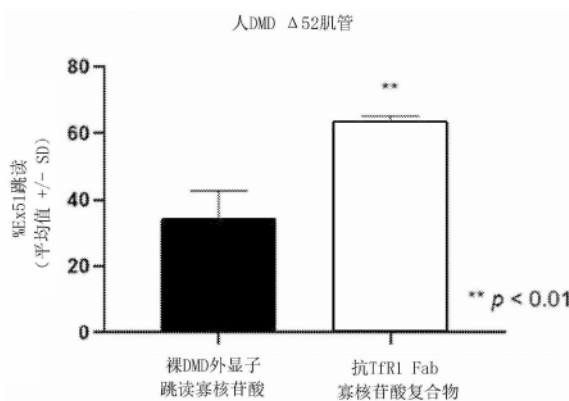
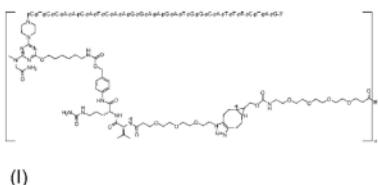
(54) 发明名称

用于治疗肌养蛋白病的肌肉靶向复合物和制剂

(57) 摘要

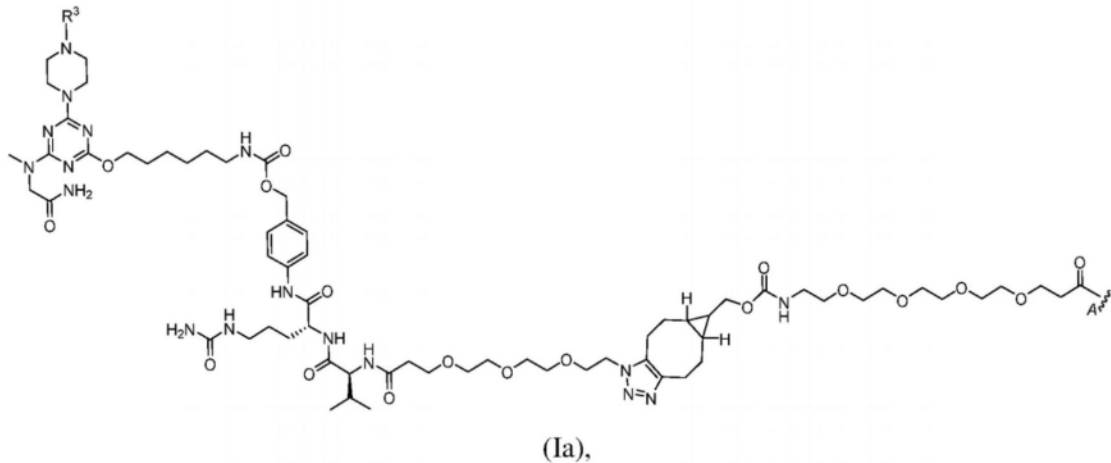
本公开内容的一些方面涉及复合物并且另一些方面涉及包含这样的复合物(例如,其中每种复合物具有以下示出的示例性通式)的制剂(例如,水性形式、冻干形式),所述复合物包含与抗体(例如,抗TfR1抗体)共价连接的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(例如,可用于靶向DMD)。在一些实施方案中,所述复合物与组氨酸(例如L-组氨酸)和蔗糖在特定的pH(例如,约5.0至7.0)下配制在一起。还提供了这些制剂用于治疗具有与迪谢内肌营养不良相关的突变DMD等位基因的对象的应用。

途。(式I)



1. 包含复合物的制剂,所述复合物包含与抗转铁蛋白受体1 (TfR1) 抗体共价连接的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO),其中所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1 (CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2 (CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3 (CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1 (CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2 (CDR-L2),以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3 (CDR-L3),并且其中所述复合物与组氨酸和蔗糖配制在一起。

2. 包含复合物的制剂,所述复合物包含式 $[R^1]_{n1}-R^2$ 的结构,其中每个 $R^1$ 独立地包含下式 (Ia) 的基团:



其中:

$R^2$ 包含抗体,并且

$R^3$ 包含磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO);

其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接;并且

其中 $n1$ 是一或更大的整数,其表示 $R^1$ 的个数,其中每个 $R^1$ 与所述抗体的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸;

其中所述复合物与组氨酸和蔗糖配制在一起,

任选地,其中所述抗体是抗TfR1抗体,并且任选地其中所述制剂中复合物的 $n1$ 的平均值为1至5。

3. 权利要求2所述的制剂,其中所述抗体包含:

含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1 (CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2 (CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3 (CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1 (CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2 (CDR-L2),以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3 (CDR-L3)。

4. 权利要求1至3中任一项所述的制剂,其中所述制剂为冻干形式、水溶液或冷冻固体形式。

5. 权利要求4所述的制剂,其中所述制剂为水溶液,并且其中所述组氨酸以10mM至50mM的浓度存在于所述水溶液中。

6. 权利要求4或5所述的制剂,其中所述制剂为水溶液,并且其中所述蔗糖以5%至15%

重量/体积(w/v%)的浓度存在于所述水溶液中。

7. 权利要求4至6中任一项所述的制剂,其中所述制剂为水溶液,并且其中所述水溶液的pH为5.0至7.0。

8. 权利要求4至7中任一项所述的制剂,其中所述制剂为水溶液,并且其中所述组氨酸以25mM的浓度存在于所述水溶液中,和/或所述蔗糖以10w/v%的浓度存在于所述水溶液中,和/或所述水溶液的pH为6.0。

9. 权利要求1至8中任一项所述的制剂,其中所述抗体是Fab片段、全长IgG、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、scFv或Fv。

10. 权利要求9所述的制剂,其中所述抗体是Fab片段。

11. 权利要求1至10中任一项所述的制剂,其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL),任选地其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

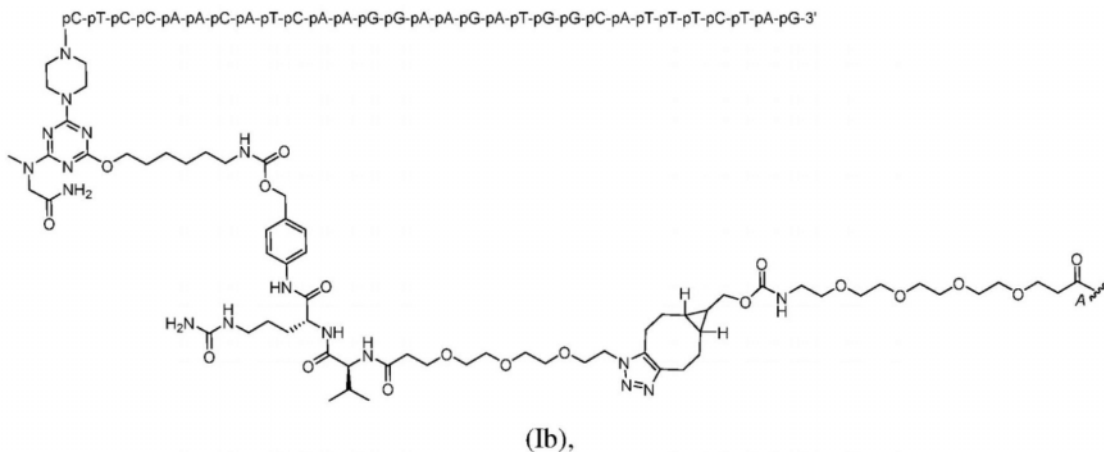
12. 权利要求1至11中任一项所述的制剂,其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链,任选地其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

13. 权利要求1至12中任一项所述的制剂,其中所述PMO包含长度为15至35个核苷酸的核碱基序列。

14. 权利要求1至13中任一项所述的制剂,其中所述PMO包含具有针对SEQ ID NO:23、针对SEQ ID NO:24或针对SEQ ID NO:22的至少8个连续核苷酸长的互补区的核苷酸序列。

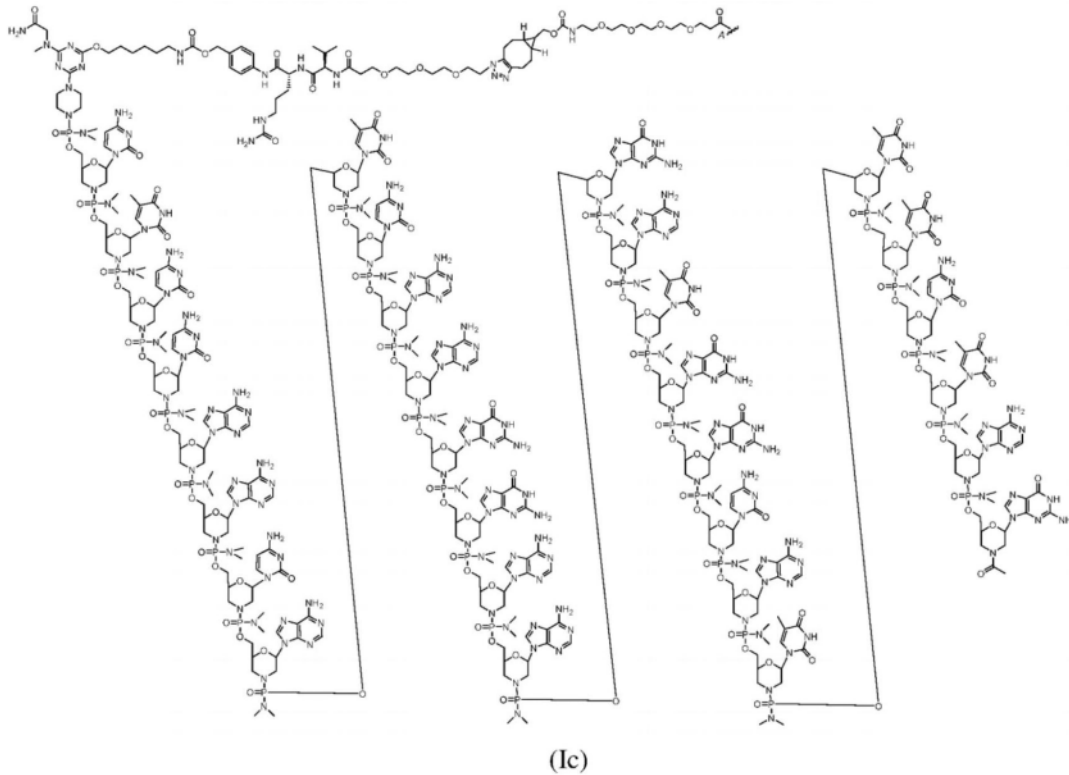
15. 权利要求1至14中任一项所述的制剂,其中所述PMO包含SEQ ID NO:21中所示核苷酸序列的至少8个连续核苷酸,任选地其中所述PMO包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

16. 权利要求2至15中任一项所述的制剂,其中每个R<sup>1</sup>包含下式(Ib)的基团:



其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置,其中-p反映磷酸二酰胺键连,其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得所述PMO具有CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG(SEQIDNO:21)的核碱基序列,并且其中R<sup>1</sup>在连接点A处与R<sup>2</sup>共价连接。

17. 权利要求2至16中任一项所述的制剂,其中每个R<sup>1</sup>包含下式(Ic)的基团:



18. 权利要求1至17中任一项所述的制剂,其中所述复合物以10mg/mL至50mg/mL的浓度存在于所述制剂中。

19. 促进对象中肌养蛋白的表达或活性的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求1至18中任一项所述的制剂。

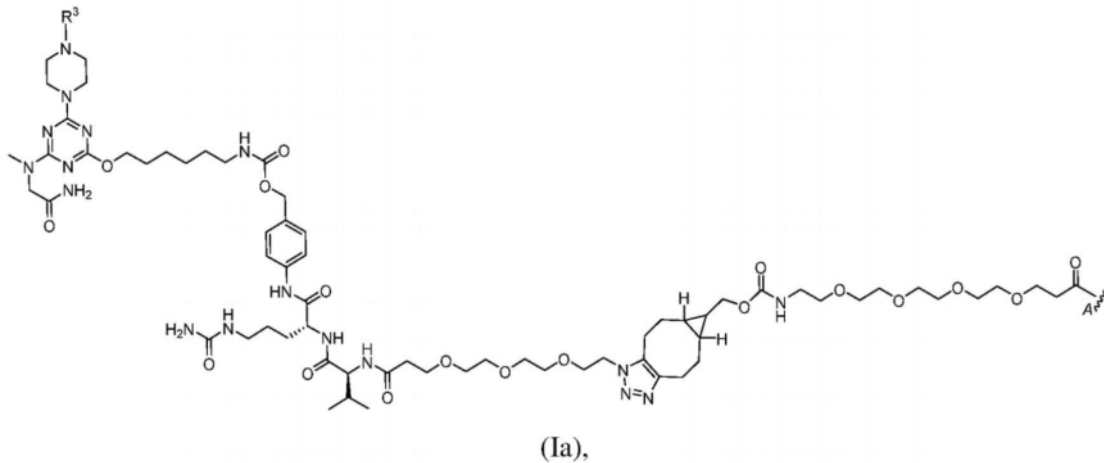
20. 权利要求19所述的方法,其中所述肌养蛋白是截短的肌养蛋白。

21. 治疗具有与迪谢内肌营养不良相关的突变DMD等位基因的对象的方法,所述方法包括向所述对象施用权利要求1至18中任一项所述的制剂。

22. 权利要求21所述的方法,其中所述突变的DMD等位基因包含适合于外显子51跳读的突变。

23. 权利要求21或权利要求22所述的方法,其中所述突变的DMD等位基因包含外显子51中的移码突变。

24. 复合物,其包含式(I)  $[R^1]_{m1}-R^2$  的结构,其中每个 $R^1$ 包含下式(Ia)的基团:



其中R<sup>3</sup>包含含有CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO:21)的碱基序列的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO) ;

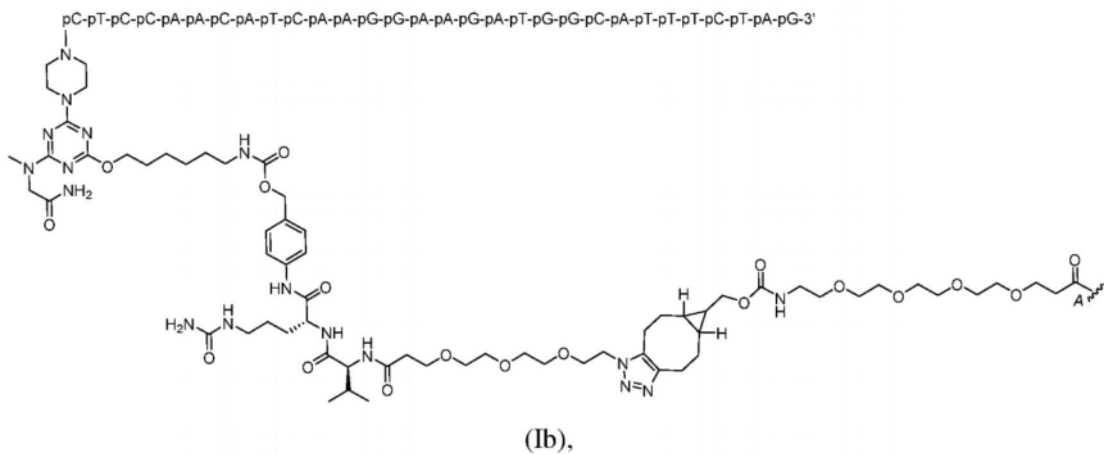
其中R<sup>2</sup>包含Fab,并且其中所述Fab包含选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

任选地其中所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

还任选地其中所述Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链,

其中R<sup>1</sup>在连接点A处与R<sup>2</sup>共价连接;并且其中n1独立地是一或更大的整数,其表示每个复合物中R<sup>1</sup>的个数,其中每个R<sup>1</sup>与所述Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

25. 复合物,其包含式 (I) [R<sup>1</sup>]<sub>n1</sub>-R<sup>2</sup>的结构,其中每个R<sup>1</sup>包含下式 (Ib) 的基团:



其中R<sup>2</sup>包含Fab,并且其中所述Fab包含选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

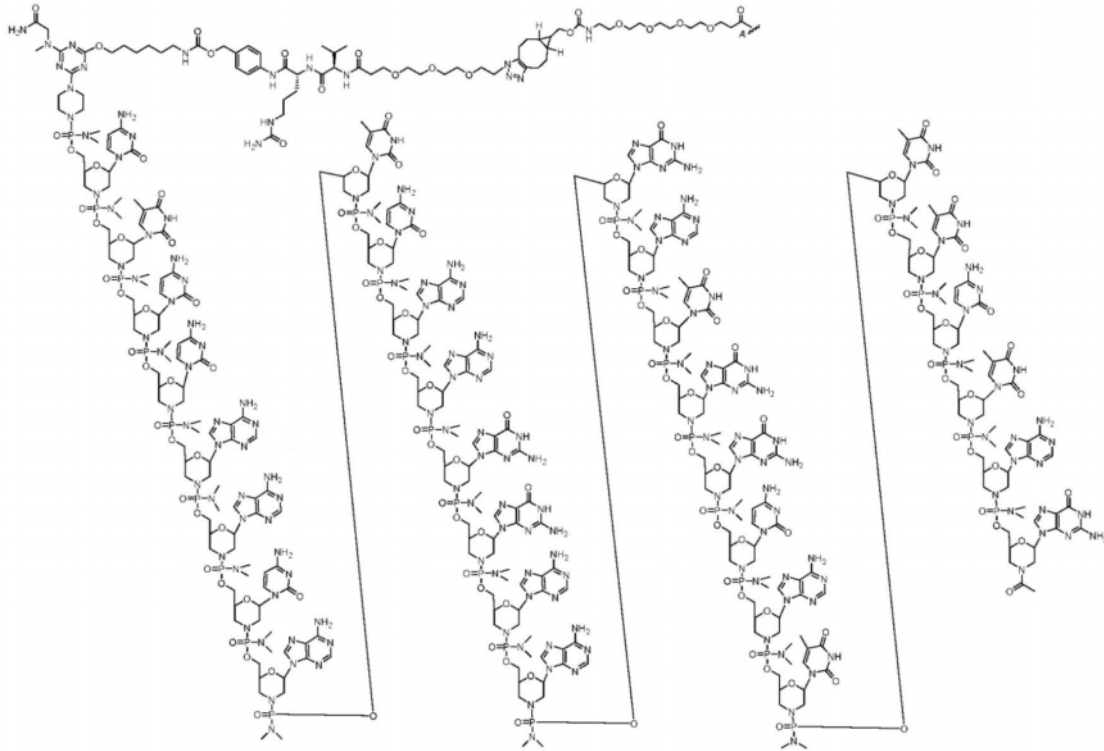
任选地其中所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

还任选地其中所述Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链,

其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置,其中-p反映磷酸二酰胺键连,并且其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得所述寡核苷酸PMO具有CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO: 21)的核碱基序列;

其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接;并且其中 $n_1$ 是一或更大的整数,其表示 $R^1$ 的个数,其中每个 $R^1$ 与所述Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

26. 复合物,其包含式(I)  $[R^1]_{n_1}-R^2$ 的结构,其中每个 $R^1$ 包含下式(Ic)的基团:

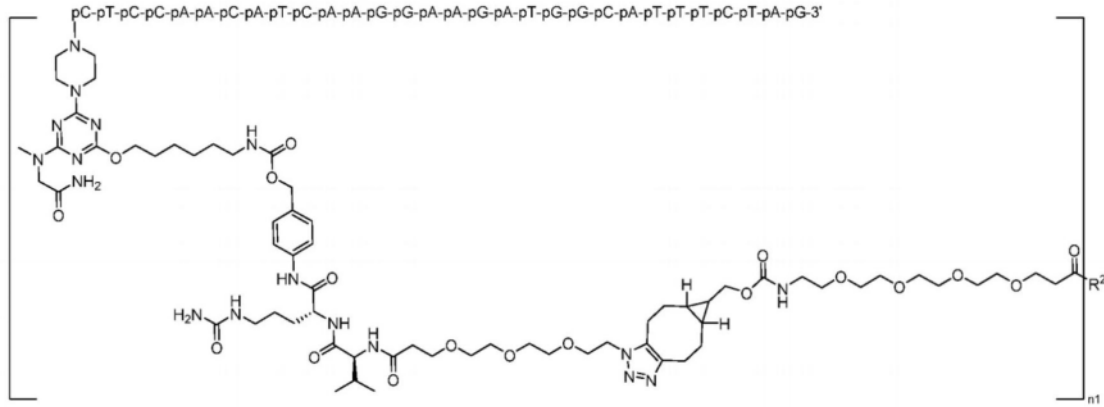


(Ic).

其中 $R^2$ 包含含有选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的Fab, 任选地其中 $R^2$ 包含Fab,所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

还任选地其中 $R^2$ 包含Fab,所述Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链;其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接;其中 $n_1$ 是一或更大的整数,其表示 $R^1$ 的个数,其中每个 $R^1$ 与所述Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

27. 复合物,其包含下式(Id)的结构:



(Id),

其中 $R^2$ 包含含有选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的Fab，  
 任选地其中 $R^2$ 包含Fab，所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有  
 SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL，

还任选地其中 $R^2$ 包含Fab，所述Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含  
 含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链；

其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO) 的碱基位置；其中-p反映磷酸二酰胺键  
 连，并且其中N对应于腺嘌呤 (A)、胞嘧啶 (C)、鸟嘌呤 (G) 或胸腺嘧啶 (T) 的核碱基，使得所述  
 PMO包含CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO:21) 的碱基序列；

其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接；其中 $n_1$ 是一或更大的整数，其表示 $R^1$ 的个数，其中每  
 个 $R^1$ 与所述Fab的不同氨基酸残基共价连接，任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

## 用于治疗肌养蛋白病的肌肉靶向复合物和制剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C§119(e)要求2021年7月9日提交的标题为“MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND FORMULATIONS FOR TREATING DYSTROPHINOPATHIES”的美国临时申请No.63/220,426的申请日权益,其内容通过引用整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本申请涉及用于将寡核苷酸分子载荷递送至细胞的靶向复合物、包含这样的复合物的制剂及其用途,特别是涉及疾病治疗的用途。

[0004] 电子序列表的引用

[0005] 电子序列表(D082470061W000-SEQ-CBD.xml;大小:55,409字节;和创建日期:2022年7月6日)的内容通过引用整体并入本文。

### 背景技术

[0006] 肌养蛋白病是由DMD基因突变引起的一组不同的神经肌肉疾病。肌养蛋白病包括迪谢内肌营养不良、贝克肌营养不良和X连锁的扩张型心肌病。编码肌养蛋白的DMD是包含79个外显子和约260万总碱基对的大基因。DMD中的许多突变(包括外显子移码、缺失、替换和重复突变)能够降低功能性肌养蛋白的表达,导致肌养蛋白病。

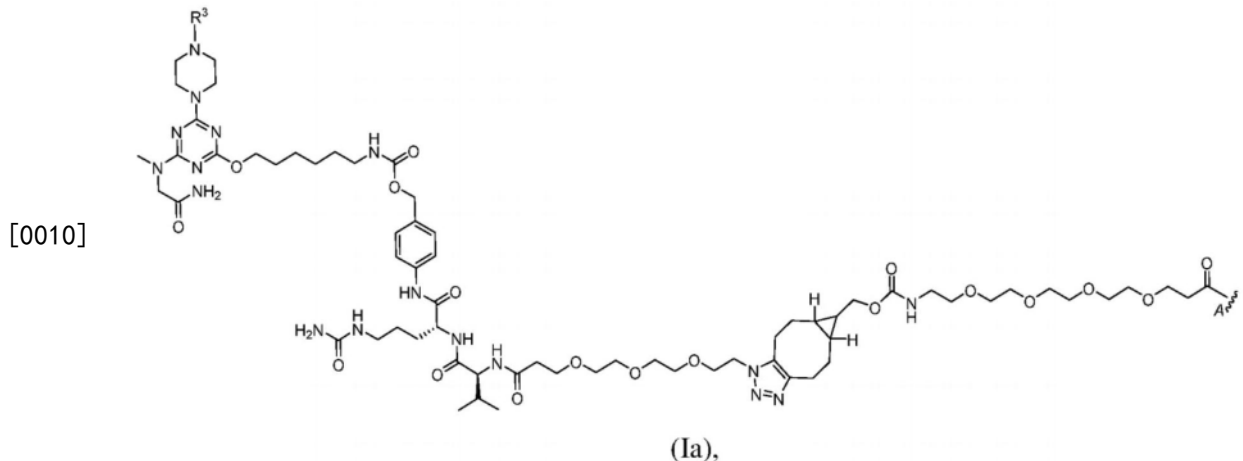
### 发明内容

[0007] 根据一些方面,本公开内容提供了复合物和包含这样的复合物的制剂。在一些实施方案中,本文中提供的复合物与组氨酸(例如,L-组氨酸)和蔗糖配制在一起。在一些实施方案中,本文中提供的复合物被配制成水性或冻干(例如,冻干粉)形式。在一些实施方案中,本文中提供的复合物被配制成冷冻形式。在一些实施方案中,本文中提供的复合物包含与抗体共价连接的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(phosphorodiamidate morpholino oligomer,PMO)。在一些实施方案中,本文中提供的复合物包含肌肉靶向复合物,所述肌肉靶向复合物包含与抗转铁蛋白受体1(anti-transferrin receptor 1,TfR1)抗体共价连接的PMO。在一些实施方案中,抗TfR1抗体已经历由翻译后修饰引起的焦谷氨酸形成。在一些实施方案中,复合物包含肌肉靶向复合物,所述肌肉靶向复合物包含与例如具有表2中所示的序列的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体共价连接的PMO。在一些实施方案中,PMO靶向DMD等位基因(例如,突变的DMD等位基因)。还提供了使用本文中所述的复合物和制剂用于治疗具有与迪谢内肌营养不良相关的突变DMD等位基因的对象的方法(例如,其中突变的DMD等位基因包含适合于外显子跳读的突变)和/或促进细胞(例如,肌细胞)中肌养蛋白(例如,截短的肌养蛋白)的表达或活性的方法。

[0008] 本公开内容的一些方面提供了包含复合物的制剂,所述复合物包含与抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体共价连接的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO),其中所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(heavy chain complementarity

determining region 1, CDR-H1), 含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2 (heavy chain complementarity determining region 2, CDR-H2), 含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3 (heavy chain complementarity determining region 3, CDR-H3), 含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1 (light chain complementarity determining region 1, CDR-L1), 含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2 (light chain complementarity determining region 2, CDR-L2) 以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3 (light chain complementarity determining region 3, CDR-L3), 并且其中所述复合物与组氨酸和蔗糖配制在一起。

[0009] 本公开内容的一些方面提供了包含复合物的制剂, 所述复合物包含式 $[R^1]_{n1}-R^2$ 的结构, 其中每个 $R^1$ 独立地包含下式(Ia)的基团:



[0011] 其中:

[0012]  $R^2$ 包含抗体, 并且

[0013]  $R^3$ 包含磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO);

[0014] 其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接; 并且

[0015] 其中 $n1$ 是一或更大的整数, 其表示 $R^1$ 的个数,

[0016] 其中每个 $R^1$ 与抗体的不同氨基酸残基共价连接;

[0017] 其中复合物与组氨酸和蔗糖配制在一起。

[0018] 在一些实施方案中, 每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

[0019] 在一些实施方案中, 抗体是抗TfR1抗体。

[0020] 在一些实施方案中, 制剂中复合物的 $n1$ 的平均值为1至5。

[0021] 在一些实施方案中, 抗体包含: 含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1 (CDR-H1), 含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2 (CDR-H2), 含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3 (CDR-H3), 含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1 (CDR-L1), 含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2 (CDR-L2) 以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3 (CDR-L3)。

[0022] 在一些实施方案中, 制剂为冻干形式、水溶液或冷冻固体形式。

[0023] 在一些实施方案中, 制剂为水溶液, 并且组氨酸以10mM至50mM的浓度存在于水溶液中。

[0024] 在一些实施方案中, 制剂为水溶液, 并且所述蔗糖以5%至15%重量/体积(w/v%)

的浓度存在于水溶液中。

[0025] 在一些实施方案中,制剂为水溶液并且所述水溶液的pH为5.0至7.0。

[0026] 在一些实施方案中,制剂为水溶液,并且所述组氨酸以25mM的浓度存在于水溶液中,和/或所述蔗糖以10w/v%的浓度存在于水溶液中,和/或所述水溶液的pH为6.0。

[0027] 在一些实施方案中,抗体是Fab片段、全长IgG、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、scFv或Fv。

[0028] 在一些实施方案中,抗体是Fab片段。

[0029] 在一些实施方案中,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0030] 在一些实施方案中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

[0031] 在一些实施方案中,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链。

[0032] 在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

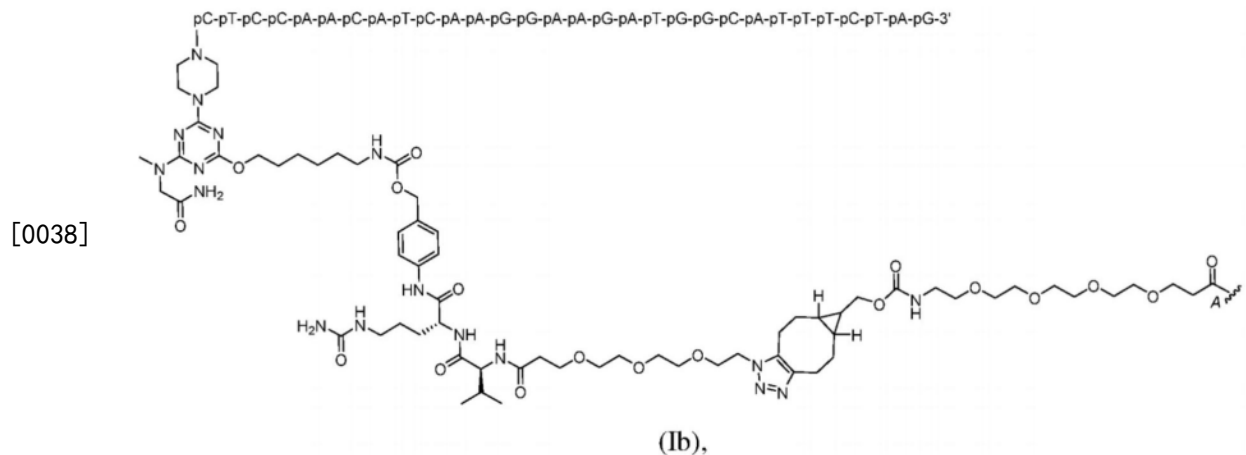
[0033] 在一些实施方案中,PMO包含长度为15至35个核苷酸的核碱基序列。

[0034] 在一些实施方案中,PMO包含具有针对SEQ ID NO:23、针对SEQ ID NO:24或针对SEQ ID NO:22的至少8个连续核苷酸长的互补区的核苷酸序列。

[0035] 在一些实施方案中,PMO包含SEQ ID NO:21中所示核苷酸序列的至少8个连续核苷酸。

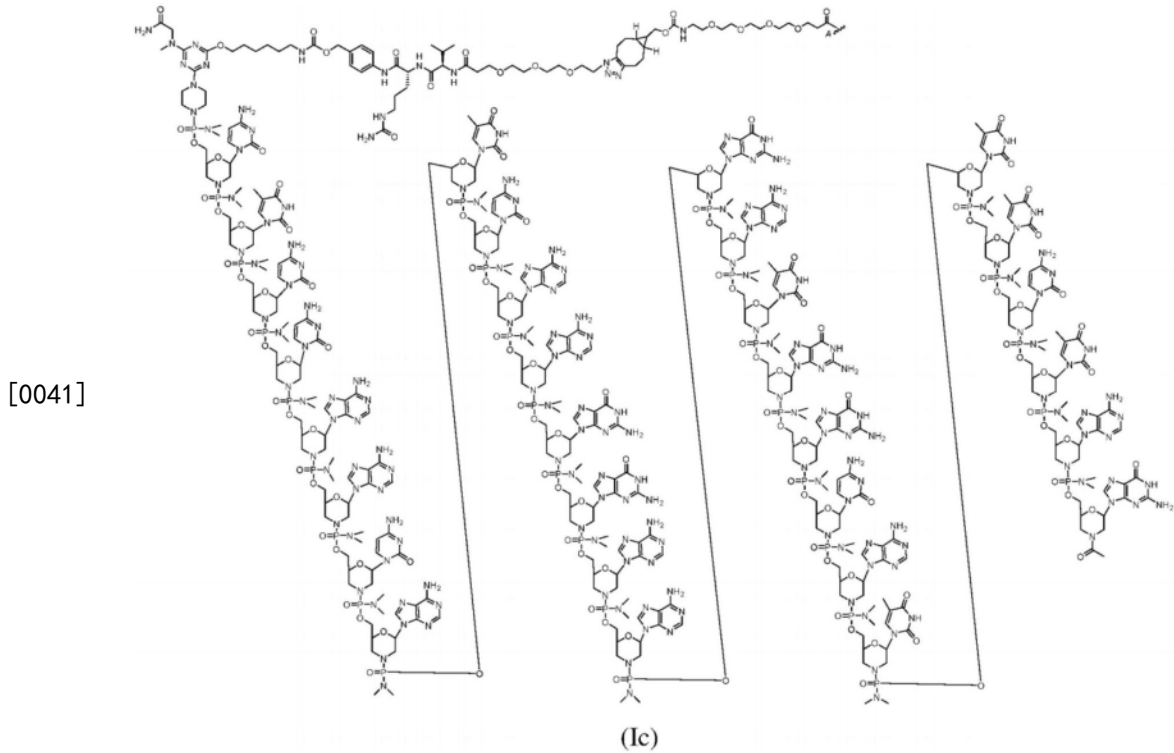
[0036] 在一些实施方案中,PMO包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

[0037] 在一些实施方案中,每个R<sup>1</sup>包含下式(Ib)的基团:



[0039] 其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置,其中-p反映磷酸二酰胺键连,其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得所述PMO具有CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG(SEQ ID NO:21)的核碱基序列,并且其中R<sup>1</sup>在连接点A处与R<sup>2</sup>共价连接。

[0040] 在一些实施方案中,每个R<sup>1</sup>包含下式(Ic)的基团:



[0042] 在一些实施方案中,所述复合物以10mg/mL至50mg/mL的浓度存在于所述制剂中。

[0043] 本文中还提供了促进对象中肌养蛋白的表达或活性的方法,所述方法包括向对象施用本文中所述的制剂。

[0044] 在一些实施方案中,肌养蛋白是截短的肌养蛋白。

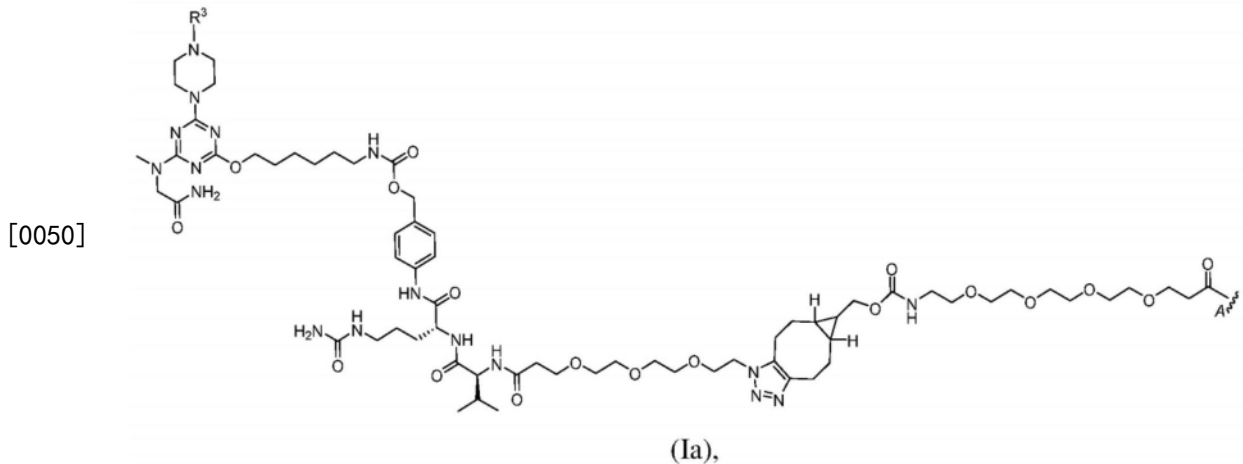
[0045] 本文中还提供了治疗具有与迪谢内肌营养不良相关的突变DMD等位基因的对象的方法,所述方法包括向对象施用本文中所述的制剂。

[0046] 在一些实施方案中,突变的DMD等位基因包含适合于外显子51跳读的突变。

[0047] 在一些实施方案中,突变的DMD等位基因包含外显子51中的移码突变。

[0048] 本公开内容的一些方面提供了包含式 (I) :  $[R^1]_{n1}-R^2$  结构的复合物,其中

[0049] 每个  $R^1$  包含下式 (Ia) 的基团:



[0051] 其中  $R^3$  包含含有CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO:21) 的碱基序列的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO); 其中  $R^2$  包含Fab, 并且其中Fab包含选自表2的CDR-H1、

CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0052] 其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接;并且其中 $n_1$ 独立地是一或更大的整数,其表示每个复合物中 $R^1$ 的个数,其中每个 $R^1$ 与Fab的不同氨基酸残基共价连接。

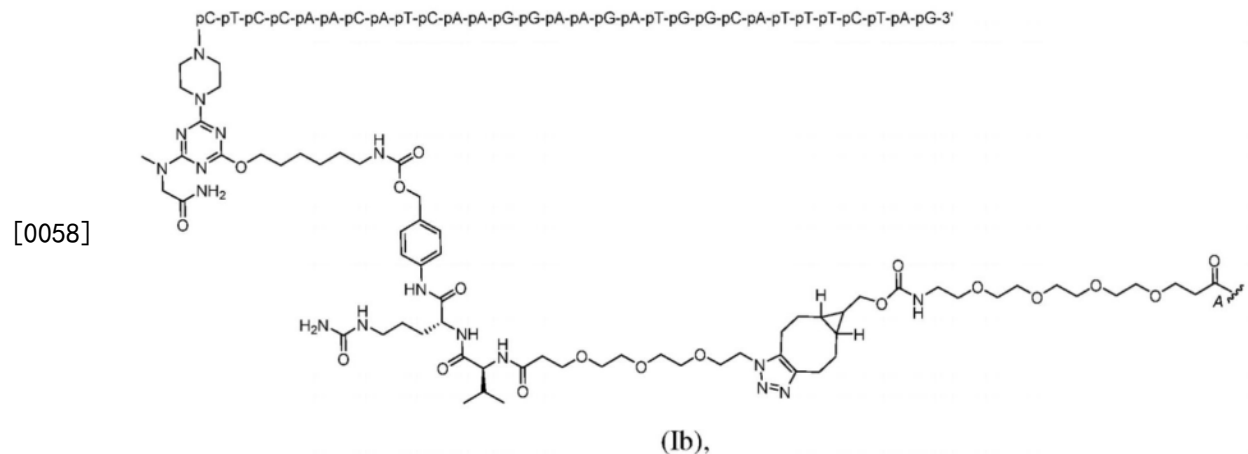
[0053] 在一些实施方案中,Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

[0054] 在一些实施方案中,Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0055] 在一些实施方案中,每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

[0056] 本公开内容的另一些方面提供了包含式(I): $[R^1]_{n_1}-R^2$ 结构的复合物;其中

[0057] 每个 $R^1$ 包含下式(Ib)的基团:



[0059] 其中 $R^2$ 包含Fab,并且其中Fab包含选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0060] 其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置,其中-p反映磷酸二酰胺键连,并且其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得所述寡核苷酸PMO具有CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG(SEQ ID NO:21)的核碱基序列;

[0061] 其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接;并且其中 $n_1$ 是一或更大的整数,其表示 $R^1$ 的个数,其中每个 $R^1$ 与Fab的不同氨基酸残基共价连接。

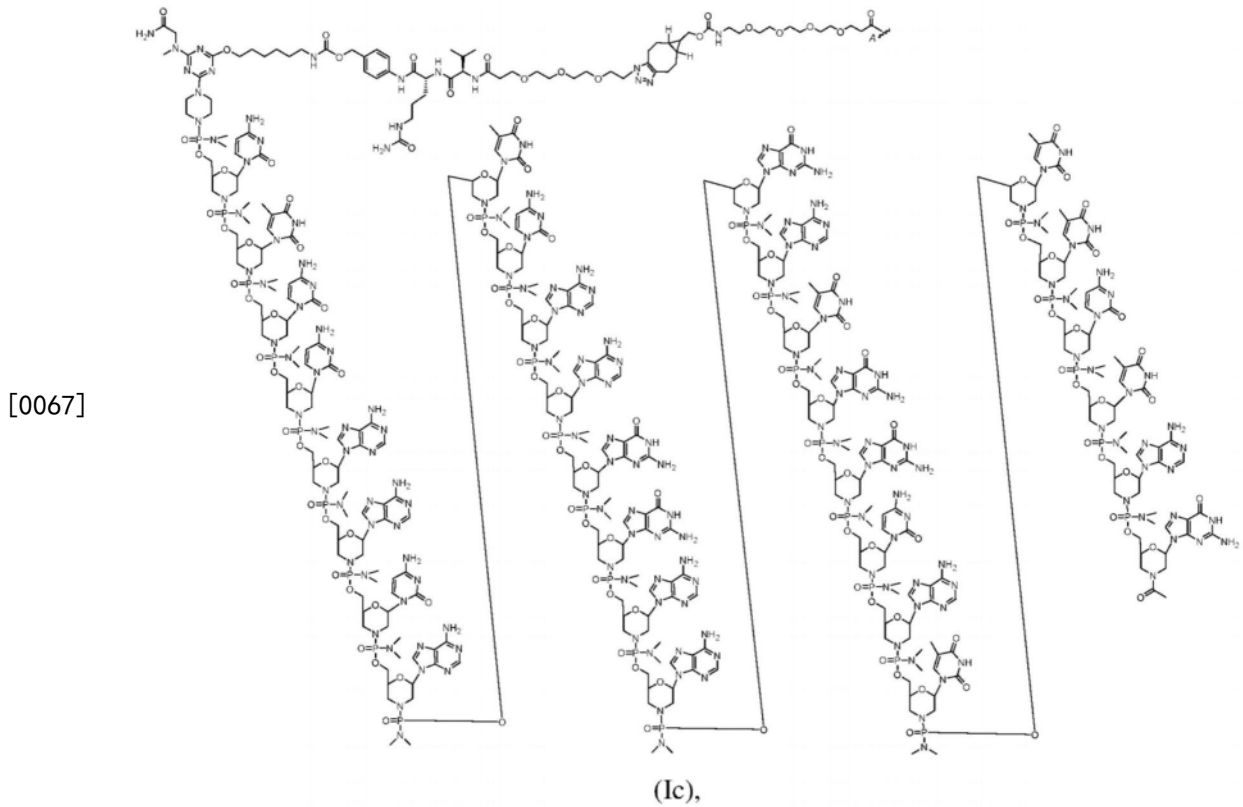
[0062] 在一些实施方案中,Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

[0063] 在一些实施方案中,Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链,

[0064] 在一些实施方案中,每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

[0065] 本公开内容的另一些方面提供了包含式(I): $[R^1]_{n_1}-R^2$ 结构的复合物,其中

[0066] 每个 $R^1$ 包含下式(Ic)的基团:



[0068] 其中R<sup>2</sup>包含含有选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的Fab;

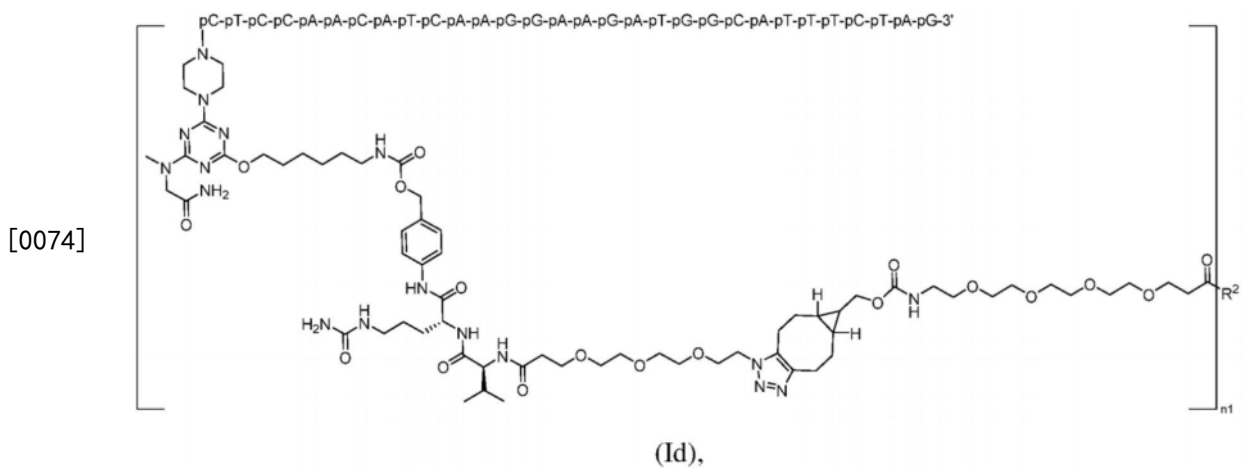
[0069] 其中R<sup>1</sup>在连接点A处与R<sup>2</sup>共价连接;其中n1是一或更大的整数,其表示R<sup>1</sup>的个数,其中每个R<sup>1</sup>与Fab的不同氨基酸残基共价连接。

[0070] 在一些实施方案中,R<sup>2</sup>包含Fab,所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

[0071] 在一些实施方案中,R<sup>2</sup>包含Fab,所述Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0072] 在一些实施方案中,每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

[0073] 本公开内容的另一些方面提供了包含下式(Id)结构的复合物:



[0075] 其中R<sup>2</sup>包含含有选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3的Fab;

[0076] 其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置;其中-p反映磷酸二酰胺键连,并且其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得所述PMO包含CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG(SEQ ID NO:21)的碱基序列;

[0077] 其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接;其中n1是一或更大的整数,其表示 $R^1$ 的个数,其中每个 $R^1$ 与Fab的不同氨基酸残基共价连接。

[0078] 在一些实施方案中, $R^2$ 包含Fab,所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

[0079] 在一些实施方案中, $R^2$ 包含Fab,所述Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0080] 在一些实施方案中,每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

## 附图说明

[0081] 图1示出了这样的数据,其表明在匹配的等摩尔剂量的寡核苷酸下,与迪谢内肌营养不良患者肌管中的裸DMD外显子跳读寡核苷酸相比,包含含有具有表2中所示VH/VL序列的抗TfR1 Fab的缀合物的组合物导致外显子跳读增强,其中所述Fab通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与DMD外显子跳读寡核苷酸共价连接(通过赖氨酸缀合)。

[0082] 图2示出了制剂1(在25mM组氨酸、10%蔗糖中的25mg/mL缀合物,pH 6)中包含缀合物的组合物相对于缀合物浓度随时间的稳定性,所述缀合物包含具有表2中所示的VH/VL序列的抗TfR1 Fab,所述抗TfR1 Fab通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与DMD外显子51跳读反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide,ASO)共价连接(通过赖氨酸缀合)(也称为“缀合物1”)。

[0083] 图3示出了包含抗TfR1 Fab的制剂1的BCA测定结果,所述抗TfR1 Fab具有表2中所示的VH/VL序列,所述TfR1 Fab通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与DMD外显子51跳读ASO共价连接(通过赖氨酸缀合)(“缀合物1”)。一旦抗TfR1 Fab-ASO缀合物1的浓度达到25mg/mL,就将缀合物的样品添加至期望的容器(玻璃、EVA、PC、HDPE)并在-80°C下冷冻过夜,然后在2至8°C下解冻4小时。产生 $R^2$ 值为0.9998的标准曲线。基于该曲线计算样品的浓度。

[0084] 图4示出了制剂1的SEC-HPLC结果,所述制剂1包含具有表2中所示的VH/VL序列的抗TfR1 Fab,所述抗TfR1 Fab通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与DMD外显子51跳读ASO共价连接(通过赖氨酸缀合)(“抗TfR1 Fab-ASO缀合物”)。所有样品制剂中的峰组成均无实质性变化。HMWS1是指高分子量标准1并且LMWS1是指低分子量标准1。

[0085] 发明内容

[0086] 根据一些方面,本公开内容提供了复合物和包含这样的复合物的制剂。在一些实施方案中,复合物与组氨酸(例如L-组氨酸)和蔗糖配制在一起。在一些实施方案中,复合物被配制成水性或冻干(例如,冻干粉)形式。在一些实施方案中,复合物包含与抗体共价连接的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)。在一些实施方案中,复合物包含肌肉靶向复合物,所述肌肉靶向复合物包含与抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体共价连接的PMO。在一些实施方案中,复合物包含肌肉靶向复合物,所述肌肉靶向复合物包含与表2中所示的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体共价连接的PMO。还提供了使用本文中所述的复合物和制剂用于治疗具有与迪谢内肌营养不良相关的突变DMD等位基因的对象的方法(例如,其中所述突变的DMD等位基

因包含适合于外显子跳读的突变)和/或促进细胞中肌养蛋白(例如,截短的肌养蛋白)的表达或活性的方法。

[0087] 下面提供了本公开内容的另一些方面,包括对定义术语的描述。

[0088] I. 定义

[0089] 施用:本文中使用的术语“施用”意指以生理和/或(例如,和)药理学上可用的方式向对象提供复合物(例如,以治疗对象中的病症)。

[0090] 大约:本文中使用的术语“大约”或“约”,如应用于一个或更多个目的值时,是指类似于陈述的参考值的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指落入陈述的参考值的任一方向上(大于或小于)15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或更小以内的值的范围,除非另有说明或在其他情况下从上下文中可以明显看出(除非这样的数字超过可能值的100%)。

[0091] 抗体:本文中使用的术语“抗体”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域或至少一个抗原决定簇(例如,与抗原特异性结合的互补位(paratope))的多肽。在一些实施方案中,抗体是全长抗体。在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。然而,在一些实施方案中,抗体是Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fv片段或scFv片段。在一些实施方案中,抗体是来源于骆驼科抗体的纳米抗体或来源于鲨鱼抗体的纳米抗体。在一些实施方案中,抗体是双抗体。在一些实施方案中,抗体包含具有人种系序列的框架。在另一个实施方案中,抗体包含选自IgG、IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG2C、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgM和IgE恒定结构域的重链恒定结构域。在一些实施方案中,抗体包含重(H)链可变区(在本文中简称为VH)和/或(例如,和)轻(L)链可变区(在本文中简称为VL)。在一些实施方案中,抗体包含恒定结构域,例如Fc区。免疫球蛋白恒定结构域是指重链或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列及其功能变异是已知的。关于重链,在一些实施方案中,本文中所述的抗体的重链可以是alpha( $\alpha$ )、delta( $\Delta$ )、epsilon( $\epsilon$ )、gamma( $\gamma$ )或mu( $\mu$ )重链。在一些实施方案中,本文中所述的抗体的重链可包含人alpha( $\alpha$ )、delta( $\Delta$ )、epsilon( $\epsilon$ )、gamma( $\gamma$ )或mu( $\mu$ )重链。在一个具体实施方案中,本文中所述的抗体包含人 $\gamma$ 1CH1、CH2和/或(例如,和)CH3结构域。在一些实施方案中,VH结构域的氨基酸序列包含人gamma( $\gamma$ )重链恒定区的氨基酸序列,例如本领域已知的任何。人恒定区序列的非限制性实例已在本领域中描述,例如,参见美国专利No.5,693,780和Kabat E A et al.,(1991)同上。在一些实施方案中,VH结构域包含与本文中提供的任何可变链恒定区具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,对抗体进行修饰,例如,通过糖基化、磷酸化、SUMO化(sumoylation)和/或(例如,和)甲基化进行修饰。在一些实施方案中,抗体是与一个或更多个糖或碳水化合物分子缀合的糖基化抗体。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子通过N-糖基化、O-糖基化、C-糖基化、糖基磷脂酰肌醇化(GPI锚定附着)和/或(例如,和)磷酸糖基化(phosphoglycosylation)与抗体缀合。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、寡糖或聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是支化的寡糖或支化的聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子包含甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡萄糖胺单元、N-乙酰半乳糖胺单元、半乳糖单元、岩藻糖单元或磷脂单元。在一些实施方案中,抗体是包含多肽的构建体,所述多肽包含与接头多肽或免

疫球蛋白恒定结构域连接的一个或更多个本公开内容的抗原结合片段。接头多肽包含通过肽键连接的两个或更多个氨基酸残基,并且用于连接一个或更多个抗原结合部分。接头多肽的一些实例已有报道(参见,例如,Holliger,P.,et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.,et al.(1994)Structure 2:1121-1123)。另外,抗体可以是更大的免疫黏附分子的一部分,免疫黏附分子通过抗体或抗体部分与一个或更多个其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合而形成。这样的免疫黏附分子的一些实例包括使用链霉亲和素核芯区域来制备四聚体scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1995)Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101),以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1994)Mol.Immunol.31:1047-1058)。

[0092] CDR:本文中使用的术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。典型的抗体分子包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其通常参与抗原结合。VH区和VL区可进一步细分为高变区,也称为“互补决定区”(“complementarity determining region,CDR”),其中散布有更保守的称为“框架区”(“framework region,FR”)的区域。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR构成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。可使用本领域已知的方法,例如通过Kabat定义、IMGT定义、Chothia定义、AbM定义和/或(例如,和)接触定义(所有这些都是本领域公知的)来精确鉴定框架区和CDR的范围。参见,例如Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;IMGT®,the international ImMunoGeneTics information system®<http://www.imgt.org>,Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,27:209-212(1999);Ruiz,M.et al.,Nucleic Acids Res.,28:219-221(2000);Lefranc,M.-P.,Nucleic Acids Res.,29:207-209(2001);Lefranc,M.-P.,Nucleic Acids Res.,31:307-310(2003);Lefranc,M.-P.et al.,In Silico Biol.,5,0006(2004)[Epub],5:45-60(2005);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,33:D593-597(2005);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,37:D1006-1012(2009);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,43:D413-422(2015);Chothia et al.,(1989)Nature342:877;Chothia,C.et al.(1987)J.Mol.Biol.196:901-917;Al-lazikani et al(1997)J.Molec.Biol.273:927-948;以及Almagro,J.Mol.Recognit.17:132-143(2004)。还参见bioinf.org.uk/abs。本文中使用的CDR可以是指由本领域已知的任何方法定义的CDR。具有相同CDR的两种抗体意指这两种抗体的该CDR的氨基酸序列相同,如通过相同的方法(例如IMGT定义)确定的。

[0093] 重链和轻链的每个可变区中有三个CDR,对于每个可变区分别称为CDR1、CDR2和CDR3。本文中使用的术语“CDR组”是指出现在单个可变区内的能够结合抗原的三个CDR的组。这些CDR的确切边界已根据不同的系统进行了不同的定义。Kabat描述的系统(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)and(1991))不仅提供了适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,而且还提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可被称为Kabat CDR。CDR的子部分可被指定为L1、L2和L3或H1、H2和H3,其中“L”和“H”分别指定轻链和重链区域。这些区域可称为Chothia CDR,其具有与Kabat CDR重叠的边界。Padlan(FASEB J.9:133-139

(1995))和MacCallum(J Mol Biol 262(5):732-45(1996))已经描述了定义与Kabat CDR重叠的CDR的其他边界。另一些CDR边界定义可能并不严格遵循上述系统之一,但仍与Kabat CDR重叠,尽管可根据预测或者根据特定残基或残基的组或甚至整个CDR不会显著影响抗原结合的实验发现来缩短或延长它们。本文中使用的可利用根据这些系统中的任何一个定义的CDR。表1中提供了CDR定义系统的一些实例。

[0094] 表1.CDR定义

[0095]	IMGT <sup>1</sup>	Kabat <sup>2</sup>	Chothia <sup>3</sup>
CDR-H1	27-38	31-35	26-32
CDR-H2	56-65	50-65	53-55
CDR-H3	105-116/117	95-102	96-101
CDR-L1	27-38	24-34	26-32
CDR-L2	56-65	50-56	50-52
CDR-L3	105-116/117	89-97	91-96

[0096] <sup>1</sup>IMGT<sup>®</sup>, the international ImMunoGeneTics information system<sup>®</sup>, imgt.org, Lefranc, M.-P. et al..Nucleic Acids Res.,27:209-212(1999)

[0097] <sup>2</sup>Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242

[0098] <sup>3</sup>Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917(1987)

[0099] 互补:本文中使用的术语“互补”是指在两个核苷酸或两组核苷酸之间精确配对的能力。特别地,互补是表征氢键配对引起两个核苷酸或两组核苷酸之间结合的程度术语。例如,如果寡核苷酸的一个位置处的碱基能够与靶核酸(例如,mRNA)的相应位置处的碱基进行氢键合,则认为在该位置处碱基彼此互补。碱基配对可包括规范的沃森-克里克碱基配对和非沃森-克里克碱基配对(例如,Wobble碱基配对和Hoogsteen碱基配对)二者。例如,在一些实施方案中,对于互补碱基配对,腺苷型碱基(A)与胸苷型碱基(T)或尿嘧啶型碱基(U)互补,胞嘧啶型碱基(C)与鸟苷型碱基(G)互补,并且通用碱基如3-硝基吡咯或5-硝基吡咯可与任何A、C、U或T杂交并被认为是互补的。肌苷(I)在本领域中也被认为是通用碱基,并且被认为与任何A、C、U或T互补。

[0100] 共价连接:本文中使用的术语“共价连接”是指两个或更多个分子通过至少一个共价键连接在一起的特征。在一些实施方案中,两个分子可以通过充当分子之间的接头的单键例如二硫键或二硫桥共价连接在一起。然而,在一些实施方案中,两个或更多个分子可以通过充当接头的分子共价连接在一起,该接头通过多个共价键将两个或更多个分子连接在一起。在一些实施方案中,接头可以是可切割接头。然而,在一些实施方案中,接头可以是不可切割接头。

[0101] DMD:本文中使用的术语“DMD”是指编码肌养蛋白的基因,所述肌养蛋白是在肌细胞(特别是肌纤维)中桥接内部细胞骨架和胞外基质的肌养蛋白-糖蛋白复合物的关键组分。DMD中的缺失、重复和点突变可引起肌养蛋白病,例如迪谢内肌营养不良、贝克肌营养不良或心肌病。选择性启动子使用和选择性剪接导致该基因的大量不同的转录物变体和蛋白

质同种型。在一些实施方案中,DMD基因可以是人基因(基因ID:1756)、非人灵长类基因(例如,基因ID:465559)或啮齿动物基因(例如,基因ID:13405;基因ID:24907)。另外,已经表征了编码不同蛋白质同种型的多种人转录物变体(例如,如在以下GenBank RefSeq登录号下注释的:NM\_000109.3、NM\_004006.2(SEQ ID NO:24)、NM\_004009.3、NM\_004010.3和NM\_004011.3)。

[0102] DMD等位基因:本文中使用的术语“DMD等位基因”是指DMD基因的任一种替代形式(例如,野生型或突变体形式)。在一些实施方案中,DMD等位基因可编码保留其正常和典型功能的肌养蛋白。在一些实施方案中,DMD等位基因可包含一个或更多个导致肌营养不良的突变。导致迪谢内肌营养不良的常见突变涉及DMD等位基因中存在的79个外显子中的一个或更多个(例如,外显子8、外显子23、外显子41、外显子44、外显子50、外显子51、外显子52、外显子53或外显子55)的移码、缺失、替换和重复突变。DMD突变的另外的一些实例公开于,例如Flanigan KM, et al., *Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort.* Hum Mutat. 2009 Dec; 30 (12): 1657-66, 其内容通过引用以其整体并入本文。

[0103] 肌养蛋白病:本文中使用的术语“肌养蛋白病”是指由一种或更多种突变的DMD等位基因引起的肌肉疾病。肌养蛋白病包括病症(从轻到严重)的谱系,其包括迪谢内肌营养不良、贝克肌营养不良和DMD相关扩张型心肌病(DMD-associated dilated cardiomyopathy, DCM)。在一些实施方案中,在谱系的一端,肌养蛋白病在表型上与肌酸磷酸激酶(CK)的血清浓度的无症状增加和/或(例如,和)伴随有肌红蛋白尿的肌肉痉挛相关。在一些实施方案中,在谱系的另一端,肌养蛋白病在表型上与进行性肌肉疾病相关,该进行性肌肉疾病当骨骼肌最初受影响时通常归类为迪谢内或贝克肌营养不良,并且当心脏最初受影响时被归类为DMD相关扩张型心肌病。迪谢内肌营养不良的症状包括肌肉损失或变性、肌肉功能减弱、舌和小腿肌肉的假性肥大、神经系统异常的高风险和寿命缩短。迪谢内肌营养不良与在线人类孟德尔遗传(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) Entry# 310200相关。贝克肌营养不良与OMIM Entry# 300376相关。扩张型心肌病与OMIM Entry X# 302045相关。

[0104] 外显子剪接增强子(ESE):本文中使用的术语“外显子剪接增强子”或“ESE”是指基因、前体mRNA或mRNA的外显子内指导或增强将前体mRNA剪接为mRNA的核酸序列基序,例如Blencowe et al., *Trends Biochem Sci* 25, 106-10. (2000) 中所述,所述文献通过引用并入本文。ESE是剪接特征。ESE可指导或增强剪接例如以从基因转录物中去除一个或更多个内含子和/或者一个或更多个外显子。ESE基序的长度通常是6至8个核碱基。SR蛋白(例如,由基因SRSF1、SRSF2、SRSF3、SRSF4、SRSF5、SRSF6、SRSF7、SRSF8、SRSF9、SRSF10、SRSF11、SRSF12、TRA2A或TRA2B编码的蛋白质)通过其RNA识别基序区与ESE结合以促进剪接。ESE基序可通过多种方法鉴定,包括Cartegni et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, No. 13, 3568-3571中所述的那些,所述文献通过引用并入本文。

[0105] 框架:本文中使用的术语“框架”或“框架序列”是指可变区减去CDR的剩余序列。由于CDR序列的确切定义可通过不同的系统确定,因此框架序列的含义相应地具有不同解释。六个CDR(轻链的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3和重链的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)也将轻链和重

链上的框架区分为每条链上的四个子区域 (FR1、FR2、FR3和FR4), 其中CDR1位于FR1和FR2之间, CDR2位于FR2和FR3之间, 并且CDR3位于FR3和FR4之间。在未将特定子区域指定为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下, 其他人提到的框架区代表单个天然存在的免疫球蛋白链的可变区内的组合的FR。如本文所使用的, FR代表四个子区域之一, 并且FRs代表构成框架区的四个子区域中的两个或更多个。人重链和轻链接受体序列是本领域已知的。在一个实施方案中, 本领域已知的受体序列可用于本文中公开的抗体中。

[0106] 人抗体: 本文中使用的术语“人抗体”旨在包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本公开内容的人抗体可包含不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基 (例如, 通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变), 例如在CDR中, 特别是在CDR3中。然而, 本文中使用的术语“人抗体”不意图包括其中来源于另一哺乳动物物种 (例如小鼠) 种系的CDR序列已接枝到人框架序列上的抗体。

[0107] 人源化抗体: 术语“人源化抗体”是指包含来自非人物种 (例如, 小鼠) 的重链和轻链可变区序列但是其中VH和/或 (例如, 和) VL序列的至少一部分已被改变为更加“人样” (即, 更类似于人种系可变序列) 的抗体。一种类型的人源化抗体是CDR接枝抗体, 其中人CDR序列被引入非人VH和VL序列中以替代相应的非人CDR序列。在一个实施方案中, 提供了人源化抗转铁蛋白受体抗体和抗原结合部分。这样的抗体可以通过使用传统的杂交瘤技术获得鼠抗转铁蛋白受体单克隆抗体随后使用体外基因工程化进行人源化来产生, 例如在Kasaian et al的PCT公开No.WO 2005/123126 A2中公开的那些。

[0108] Kabat编号: 术语“Kabat编号”、“Kabat定义和“Kabat标记”在本文中可互换使用。在本领域中公认的这些术语是指对抗体或其抗原结合部分的重链和轻链可变区中的比其他氨基酸残基更加可变 (即高变) 的氨基酸残基进行编号的系统 (Kabat et al. (1971) Ann.NY Acad, Sci.190:382-391以及, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242)。对于重链可变区, CDR1的高变区为第31至35位氨基酸, CDR2的高变区为第50至65位氨基酸, 并且CDR3的高变区为第95至102位氨基酸。对于轻链可变区, CDR1的高变区为第24至34位氨基酸, CDR2的高变区为第50至56位氨基酸, 并且CDR3的高变区为第89至97位氨基酸。

[0109] 吗啉代: 本文中使用的术语“吗啉代”, 也称为“磷酸二酰胺吗啉代寡聚物”, 是指包含与通过磷酸二酰胺基连接的亚甲基吗啉代环的骨架连接的核碱基的分子结构。在一些实施方案中, 寡核苷酸可以是基于吗啉代的化合物。基于吗啉代的寡聚化合物描述于: Dwaine A. Braasch and David R. Corey, Biochemistry, 2002, 41 (14), 4503-4510; Genesis, volume 30, issue 3, 2001; Heasman, J., Dev. Biol., 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., Nat. Genet., 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97, 9591-9596; 和1991年7月23日授权的美国专利No. 5, 034, 506。在一些实施方案中, 基于吗啉代的寡聚化合物是磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO) (例如, 如 Iverson, Curr. Opin. Mol. Ther., 3:235-238, 2001; 和 Wang et al., J. Gene Med., 12:354-364, 2010 中所述的; 其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0110] 寡核苷酸: 本文中使用的术语“寡核苷酸”是指长度高至200个核苷酸的寡聚核酸化合物。寡核苷酸的实例包括但不限于RNAi寡核苷酸 (例如, siRNA、shRNA)、微RNA、间隔聚

体、混合聚体、磷酸二酰胺吗啉代、肽核酸、适配体、指导核酸(例如,Cas9指导RNA)等。寡核苷酸可以是单链或双链的。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或多个经修饰核苷(例如,2'-O-甲基糖修饰、嘌呤或嘧啶修饰)。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或多个经修饰核苷间键连。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或多个硫代磷酸酯键连,其可以是Rp或Sp立体化学构型。

[0111] 互补区:本文中使用的术语“互补区”是指与例如靶核酸的同源核苷酸序列充分互补的例如寡核苷酸的核苷酸序列,使得两个核苷酸序列能够在生理条件下(例如,在细胞中)彼此退火。在一些实施方案中,互补区与靶核酸的同源核苷酸序列完全互补。然而,在一些实施方案中,互补区与靶核酸的同源核苷酸序列部分互补(例如,至少80%、90%、95%或99%互补)。在一些实施方案中,与靶核酸的同源核苷酸序列相比,互补区包含1、2、3或4个错配。

[0112] 特异性结合:本文中使用的术语“特异性结合”是指分子以一定程度的亲和力或亲合力与结合配偶体结合的能力,该亲和力或亲合力使得分子能够用于在结合测定或其他结合环境中将结合配偶体与合适的对照区分开。关于抗体,术语“特异性结合”是指与合适的一种或更多种参考抗原相比,抗体以一定程度的亲和力或亲合力与特异性抗原结合的能力,该亲和力或亲合力使得抗体能够用于将特异性抗原与其他抗原区分开,例如至允许通过与如本文中所述的抗原结合而优先靶向某些细胞(例如,肌细胞)的程度。在一些实施方案中,如果抗体与靶标结合的 $K_D$ 为至少约 $10^{-4}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $10^{-13}M$ 或更小,则抗体与靶标特异性结合。在一些实施方案中,抗体与转铁蛋白受体(例如,转铁蛋白受体的顶端结构域(apical domain)的表位)特异性结合。

[0113] 对象:本文中使用的术语“对象”是指哺乳动物。在一些实施方案中,对象是非人灵长类或啮齿动物。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是患者,例如患有或怀疑患有疾病的人患者。在一些实施方案中,对象是患有或怀疑患有由突变的DMD基因序列(例如,DMD基因序列外显子中的突变)引起的疾病的人患者。在一些实施方案中,对象患有肌营养不良病,例如迪谢内肌营养不良。

[0114] 转铁蛋白受体:本文中使用的术语“转铁蛋白受体”(也称为TFRC、CD71、p90、TFR或TFR1)是指结合转铁蛋白以促进通过内吞作用摄取铁的内化细胞表面受体。在一些实施方案中,转铁蛋白受体可以是人来源的(NCBI基因ID 7037)、非人灵长类来源的(例如,NCBI基因ID 711568或NCBI基因ID 102136007)或啮齿动物来源的(例如,NCBI基因ID 22042)。另外,已经表征了编码受体的不同同种型的多种人转录物变体(例如,如以下GenBank RefSeq登录号注释的:NP\_001121620.1、NP\_003225.2、NP\_001300894.1和NP\_001300895.1)。

[0115] 范围:本公开内容中提供的所有范围包括端点。

[0116] 复合物

[0117] 本文中提供了包含与寡核苷酸共价连接的靶向剂(例如抗体)的复合物。在一些实施方案中,复合物包含与一种或更多种寡核苷酸共价连接的肌肉靶向抗体。在一些实施方案中,寡核苷酸是PMO。在一些实施方案中,寡核苷酸是靶向突变的DMD等位基因以促进外显子跳读的寡核苷酸。

[0118] 本文中所述的复合物通常包含将本文中所述的抗体(例如,抗TfR1抗体中的任一

种)与寡核苷酸(例如,PMO)共价连接的接头。接头包含至少一种共价键。

[0119] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物(例如,本文中所述的组合物或制剂中的复合物)包含式(I)  $[R^1]_{n1}-R^2$  的结构,其中每个  $R^1$  独立地包含含有寡核苷酸(例如,PMO)的化合物,并且  $R^2$  包含抗体(例如,抗TfR1抗体),并且其中  $n1$  是表示复合物中  $R^1$  的个数的整数(例如,一或更大的整数)。在一些实施方案中,在每个复合物中,  $n1$  独立地是表示每个复合物中  $R^1$  的个数的整数(例如,零或更大的整数)。在一些实施方案中,每个  $R^1$  独立地包含含有寡核苷酸的基团。在一些实施方案中,每个  $R^1$  独立地包含含有除寡核苷酸之外的其他要素的基团。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体(例如,抗TfR1抗体),所述抗体包含含有重链可变区(VH)和重链恒定区的重链,以及包含含有轻链可变区(VL)和轻链恒定区的轻链。在一些实施方案中,复合物的每个  $R^1$  独立地与  $R^2$  的不同氨基酸残基(例如,赖氨酸或半胱氨酸)共价连接。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗TfR1 Fab。

[0120] 在一些实施方案中,在每个复合物中,  $n1$  独立地是零或更大的整数。在一些实施方案中,在每个复合物中,  $n1$  独立地是一或更大的整数。在一些实施方案中,  $n1$  是一或更大的整数。在一些实施方案中,抗体包含含有表2中所示的序列。例如,在一些实施方案中,抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3);和/或包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中,抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85%(例如,至少95%)同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH),和/或包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85%(例如,至少95%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,抗体是Fab片段、全长IgG、Fab' 片段、 $F(ab')_2$  片段、scFv或Fv。在一些实施方案中,抗体是Fab片段。

[0121] 在一些实施方案中,每种或任何复合物(例如,在本文中公开的任何组合物或制剂中的任何复合物)的  $n1$  的值是一至高至抗体中期望或靶向缀合的氨基酸残基数目(例如,赖氨酸残基数目)的整数。在一些实施方案中,  $n1$  的值选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26和27。在一些实施方案中,  $n1$  的值选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26。在一些实施方案中,  $n1$  的值为1至27、1至26、1至10、1至5或1至3。在一些实施方案中,在每个复合物中,  $n1$  的值独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26和27。在一些实施方案中,在每个复合物中,  $n1$  的值独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26。在一些实施方案中,在每个复合物中,  $n1$  的值独立地为1至27、1至26、1至10、1至5或1至3。在一些实施方案中,组合物的复合物的  $n1$  的平均值为1至5(例如1至5、1至4、1至3、3至5或1至2)。在一些实施方案中,本文中

所述的组合物包含含有式(I) :  $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的复合物,其中 $n1$ 为0。在一些实施方案中,组合物的复合物的 $n1$ 的平均值为1至5(例如,1至5、1至4、1至3、1至2、2至4、3至5、1至4.6、1至4.5、1至4.4、1至4.3、1至4.2、1至3.5、1至2.5、1.1至5、1.1至4.5、1.1至4、1.1至3.5、1.1至3、1.1至2.5、1.1至2.2、1.2至5、1.2至4.5、1.2至4、1.2至3.5、1.2至3、1.2至2.5、1.2至2.2、1.3至5、1.3至4.5、1.3至4、1.3至3.5、1.3至3、1.3至2.5、1.3至2.2、1.4至5、1.4至4.5、1.4至4、1.4至3.5、1.4至3、1.4至2.5、1.4至2.2、1.5至5、1.5至4.5、1.5至4、1.5至3.5、1.5至3、1.5至2.5、1.5至2.2、1.6至3、1.6至2.5、1.6至2.2、1.7至3、1.7至2.5、1.7至2.2、1.8至3、1.8至2.5、或1.8至2.2)。在一些实施方案中,在每种复合物类型中, $n1$ 独立地是一或更大的整数,其表示复合物类型的每种复合物中 $R^1$ 的个数,并且其中组合物的不同复合物类型的特征在于具有不同的 $n1$ 值(例如, $n1$ 值为1至27、1至26、1至25、1至20、1至15、1至10、1至5或1至3)。

[0122] 在一些实施方案中,提供了包含多种不同复合物的组合物(例如,如本文中所述的包含组氨酸和/或蔗糖的制剂)。在一些实施方案中,多个不同的复合物包含共同的靶向剂(例如,抗体)和共同的寡核苷酸(例如PMO)。在这样的实施方案中,不同复合物类型的特征在于具有不同数目的与抗体共价连接的寡核苷酸。例如,在一些实施方案中,提供了包含多种复合物类型的组合物,其中每种复合物类型包含式(I) :  $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构,其中每个 $R^1$ 独立地包含含有寡核苷酸(例如,PMO)的化合物,并且 $R^2$ 包含抗体(例如,抗TfR1抗体),并且其中在每种复合物类型中, $n1$ 独立地是一或更大的整数,其表示该复合物类型的每种复合物中 $R^1$ 的个数,并且其中组合物的不同复合物类型的特征在于具有不同的 $n1$ 值(例如,1至27、1至26的 $n1$ 值)。在一些实施方案中,组合物的每种不同复合物类型具有1至27、1至26、1至25、1至20、1至15、1至10、1至5或1至3的不同 $n1$ 值。在一些实施方案中,在组合物的复合物中, $n1$ 独立地是整数。在一些实施方案中,组合物的复合物的 $n1$ 的平均值为1至5(例如,1至5、1至4、1至3、1至2、2至4、3至5、1至4.6、1至4.5、1至4.4、1至4.3、1至4.2、1至3.5、1至2.5、1.1至5、1.1至4.5、1.1至4、1.1至3.5、1.1至3、1.1至2.5、1.1至2.2、1.2至5、1.2至4.5、1.2至4、1.2至3.5、1.2至3、1.2至2.5、1.2至2.2、1.3至5、1.3至4.5、1.3至4、1.3至3.5、1.3至3、1.3至2.5、1.3至2.2、1.4至5、1.4至4.5、1.4至4、1.4至3.5、1.4至3、1.4至2.5、1.4至2.2、1.5至5、1.5至4.5、1.5至4、1.5至3.5、1.5至3、1.5至2.5、1.5至2.2、1.6至3、1.6至2.5、1.6至2.2、1.7至3、1.7至2.5、1.7至2.2、1.8至3、1.8至2.5、或1.8至2.2)。在一些实施方案中,本文中所述的组合物包含其中 $n1$ 为0的复合物。

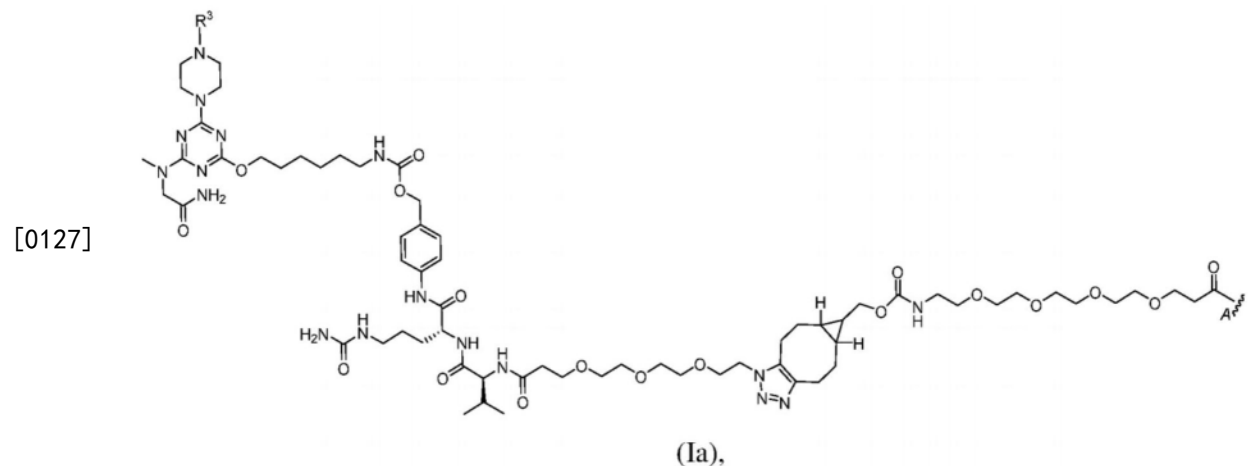
[0123] 在一些实施方案中,本文中提供的组合物(例如,如本文中所述的包含组氨酸和/或蔗糖的制剂)包含未缀合的抗体(例如,以痕量计)和与一种或更多种寡核苷酸缀合的抗体。本文中使用的“未缀合的抗体”是指未与寡核苷酸缀合的抗体。在一些实施方案中,未缀合的抗体可被称为包含式(I) :  $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物,其中 $n1$ 为零。因此,在一些实施方案中,提供了组合物(例如,本文中所述的制剂),其包含含有式(I) :  $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物(例如,复合物),其中每个 $R^1$ 独立地包含含有寡核苷酸的基团, $R^2$ 包含抗体并且 $n1$ 是反映复合物中 $R^1$ 的个数的零或更大的整数。在一些实施方案中, $n1$ 独立地是零或更大的整数,其反映每种化合物(例如,复合物)中 $R^1$ 的个数。在一些实施方案中,与组合物中 $n1$ 为一或更大的具有式(I) :  $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的所有化合物相比,组合物中 $n1$ 为零的包含式(I) :  $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物的比例小于10%、小于5%、小于1%、小于0.5%、小于0.1%、小于0.05%或小于

0.01%。因此,在一些实施方案中,复合物的复合物的n1的平均值为1至5(例如,1至5、1至4、1至3、1至2、2至4、3至5、1至4.6、1至4.5、1至4.4、1至4.3、1至4.2、1至3.5、1至2.5、1.1至5、1.1至4.5、1.1至4、1.1至3.5、1.1至3、1.1至2.5、1.1至2.2、1.2至5、1.2至4.5、1.2至4、1.2至3.5、1.2至3、1.2至2.5、1.2至2.2、1.3至5、1.3至4.5、1.3至4、1.3至3.5、1.3至3、1.3至2.5、1.3至2.2、1.4至5、1.4至4.5、1.4至4、1.4至3.5、1.4至3、1.4至2.5、1.4至2.2、1.5至5、1.5至4.5、1.5至4、1.5至3.5、1.5至3、1.5至2.5、1.5至2.2、1.6至3、1.6至2.5、1.6至2.2、1.7至3、1.7至2.5、1.7至2.2、1.8至3、1.8至2.5、或1.8至2.2)。

[0124] 在一些实施方案中,复合物中每个R<sup>1</sup>与抗体的不同氨基酸残基缀合。在一些实施方案中,复合物中每个R<sup>1</sup>与抗体的不同氨基酸残基共价连接。在一些实施方案中,与R<sup>1</sup>共价连接的氨基酸包含ε-氨基(例如,赖氨酸、精氨酸)。在一些实施方案中,每个不同的氨基酸包含ε-氨基(例如赖氨酸、精氨酸)。然而,在一些实施方案中,与R<sup>1</sup>共价连接的氨基酸是半胱氨酸。在一些实施方案中,与R<sup>1</sup>共价连接的每个不同的氨基酸是半胱氨酸。在一些实施方案中,R<sup>1</sup>与抗体的氨基酸残基直接共价连接。然而,在一些实施方案中,R<sup>1</sup>与抗体的氨基酸间接共价连接,例如与氨基酸上的糖基化位点共价连接。

[0125] 在一些实施方案中,R<sup>1</sup>未与抗体的CDR区中的氨基酸残基共价连接。

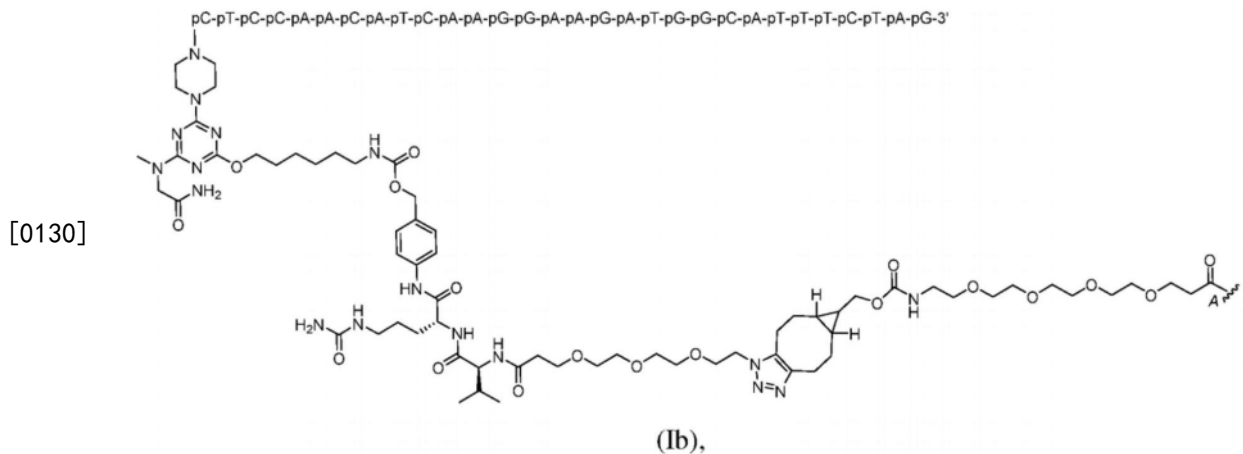
[0126] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物(例如,本文中所述的组合物或制剂中的复合物)包含式(I):[R<sup>1</sup>]<sub>n1</sub>-R<sup>2</sup>结构,其中每个R<sup>1</sup>独立地包含下式(Ia)的基团:



[0128] 其中R<sup>3</sup>包含寡核苷酸,例如磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO);并且R<sup>1</sup>在连接点A处与R<sup>2</sup>共价连接(例如,间接或直接连接,例如,直接连接)。在一些实施方案中,在每个复合物中,n1独立地是整数(例如,一或更大的整数),其表示每个复合物中R<sup>1</sup>的个数。在一些实施方案中,R<sup>2</sup>包含含有表2中所示序列的抗体。例如,在一些实施方案中,R<sup>2</sup>包含抗体,所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3);和/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中,R<sup>2</sup>包含抗体,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH)和/或包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,R<sup>2</sup>包含抗体,所述抗体包含含有SEQ

ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85% (例如,至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85% (例如,至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体是Fab片段、全长IgG、Fab' 片段、 $F(ab')_2$ 片段、scFv或Fv。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体是Fab片段。在一些实施方案中, $R^3$ 包含寡核苷酸,例如包含CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO:21) 的碱基序列的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含Fab,并且每个 $R^1$ 在连接点A处与Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。在一些实施方案中,在每个复合物中, $n_1$ 独立地是整数(例如,1至27、1至26、1至10、1至5或1至3的整数)。

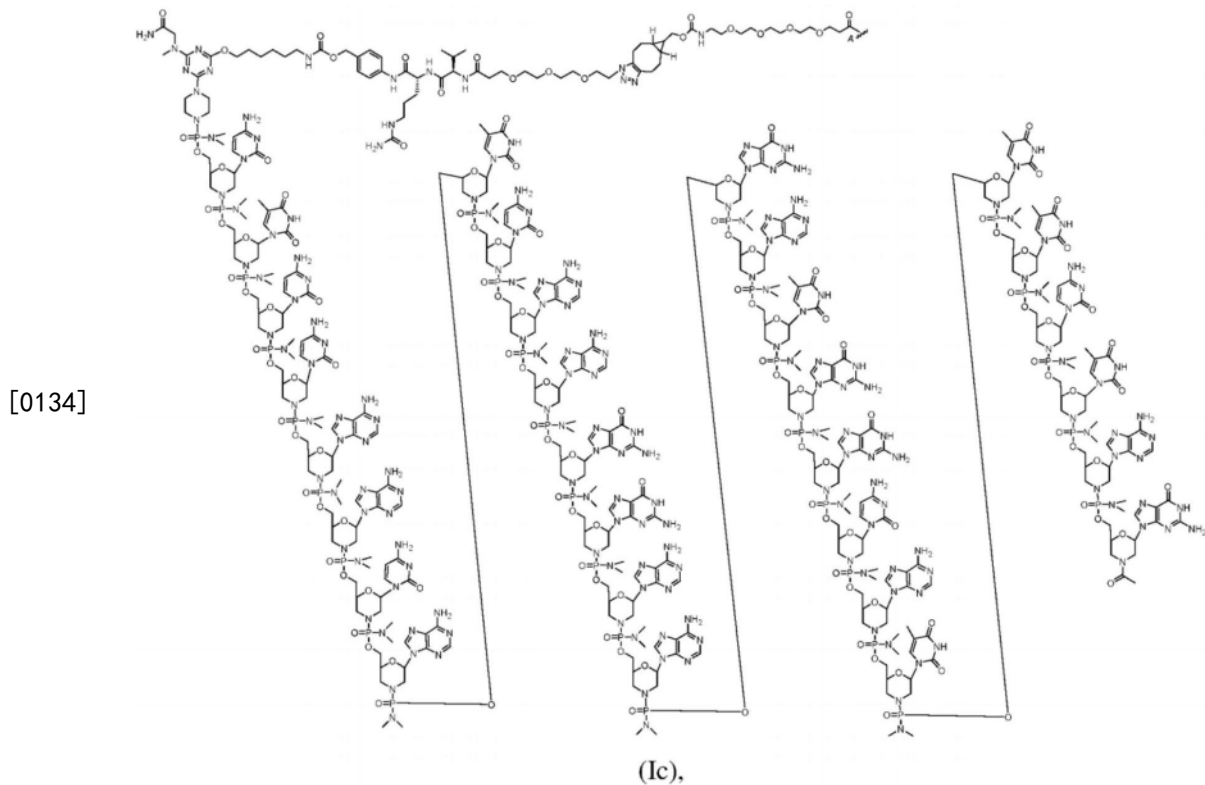
[0129] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物(例如,本文中所述的组合物或制剂中的复合物)包含式(I): $[R^1]_{n_1}-R^2$ 结构,其中每个 $R^1$ 包含下式(Ib)的基团:



[0131] 其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置; $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接(例如间接或直接连接,例如直接连接),其中-p反映磷酸二酰胺键连,并且其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得PMO包含CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO:21)的碱基序列。在一些实施方案中,在每个复合物中, $n_1$ 独立地是整数(例如,一或更大的整数),其表示每个复合物中 $R^1$ 的个数,并且每个 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含表2中所示的序列。例如,在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3);和/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH)和/或包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

[0132] 在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含含有与 SEQ ID NO:19 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与 SEQ ID NO:20 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含含有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的重链和/或包含含有 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体是 Fab 片段、全长 IgG、Fab' 片段、 $F(ab')_2$  片段、scFv 或 Fv。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体是 Fab 片段。在一些实施方案中, 在每个复合物中,  $n_1$  独立地是整数 (例如, 1 至 27、1 至 26、1 至 10、1 至 5 或 1 至 3 的整数)。在一些实施方案中,  $R^2$  包含 Fab, 并且每个  $R^1$  在连接点 A 处与 Fab 的不同氨基酸残基共价连接, 任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

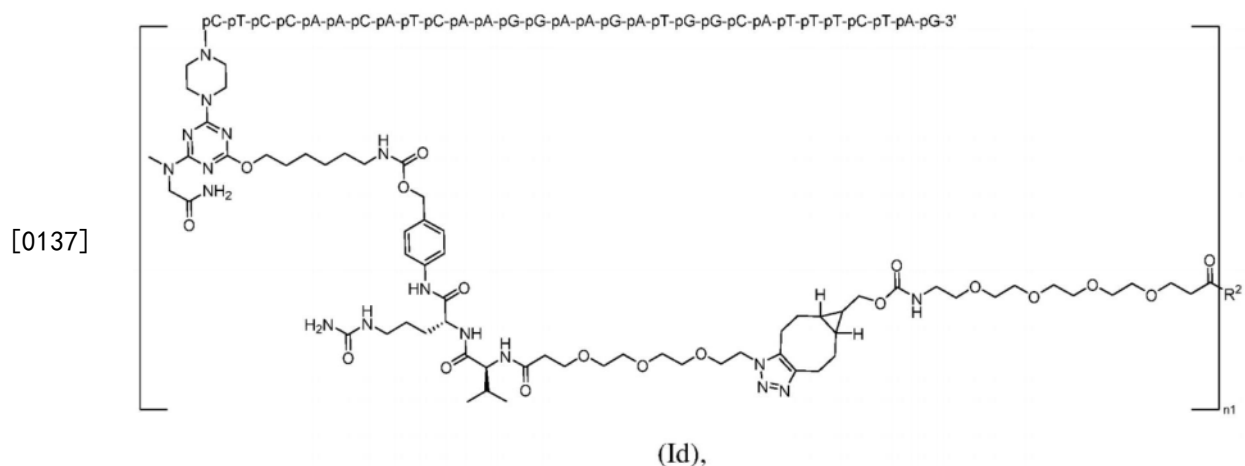
[0133] 在一些实施方案中, 本文中提供的复合物 (例如, 本文中所述的组合物或制剂中的复合物) 包含式 (I):  $[R^1]_{n_1}-R^2$  结构, 其中每个  $R^1$  包含下式 (Ic) 的基团:



[0135] 其中  $R^1$  在连接点 A 处与  $R^2$  共价连接 (例如, 间接或直接连接, 例如, 直接连接)。在一些实施方案中, 在每个复合物中,  $n_1$  独立地是整数 (例如, 一或更大的整数), 其表示每个复合物中  $R^1$  的个数, 其中每个  $R^1$  在连接点 A 处与  $R^2$  共价连接。在一些实施方案中,  $R^2$  包含含有表 2 中所示序列的抗体。例如, 在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含: 含有 SEQ ID NO:1、7 或 12 中所示序列的重链互补决定区 1 (CDR-H1), 含有 SEQ ID NO:2、8 或 13 中所示序列的重链互补决定区 2 (CDR-H2), 含有 SEQ ID NO:3、9 或 14 中所示序列的重链互补决定区 3 (CDR-H3); 和/或包含含有 SEQ ID NO:4、10 或 15 中所示序列的轻链互补决定区 1 (CDR-L1), 含有 SEQ ID NO:5 或 11 中所示序列的轻链互补决定区 2 (CDR-L2) 以及含有 SEQ ID NO:6 或 16 中所示序列的轻链互补决定区 3 (CDR-L3)。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含含有与 SEQ ID NO:17 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和/或包含含有与 SEQ ID NO:18 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的

轻链可变区(VL)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体是Fab片段、全长IgG、Fab' 片段、 $F(ab')_2$ 片段、scFv或Fv。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体是Fab片段。在一些实施方案中,在每个复合物中, $n_1$ 独立地是整数(例如,1至27、1至26、1至10、1至5或1至3的整数)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含Fab,并且每个 $R^1$ 在连接点A处与Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

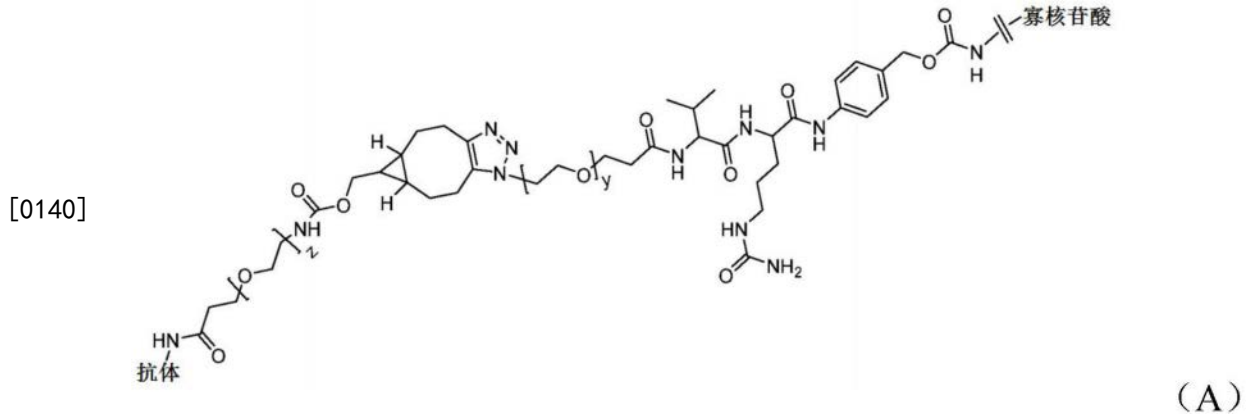
[0136] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物(例如,本文中所述的组合物或制剂中的复合物)包含式(Id)的结构:



[0138] 其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置;其中-p反映磷酸二酰胺键连,并且其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得PMO包含CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG(SEQ ID NO:21)的碱基序列;其中 $R^2$ 包含含有表2中所示序列的抗体;其中在每个复合物中, $n_1$ 独立地是整数(例如一或更大的整数),其表示方括号内所含基团的个数,其中方括号内每个所含基团与抗体(例如Fab)的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同氨基酸残基是赖氨酸。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体(例如,Fab),所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3);和/或包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2),以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体(例如Fab),所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85% (例如,至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH)和/或包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85% (例如,至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体(例如,Fab),所述抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体(例如,Fab),所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85% (例如,至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链

和/或包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85% (例如,至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体(例如,Fab),所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,在每个复合物中, $n_1$ 独立地是整数(例如,1至27、1至26、1至10、1至5或1至3的整数)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含通过抗体(例如,Fab)的不同氨基酸残基共价连接的抗体(例如,Fab),任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

[0139] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含以下结构:



[0141] ,其中 $y$ 是0至15(例如3)并且 $z$ 是0至15(例如4)。在一些实施方案中,抗体是抗TfR1抗体(例如,表2中提供的抗TfR1抗体)。在一些实施方案中,寡核苷酸是PMO并且包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。在一些实施方案中,在结构(A)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸 $\epsilon$ 胺)的反应产生的。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过Fab的赖氨酸与PMO的5'末端的共价连接的抗TfR1 Fab。在一些实施方案中,抗体包含表2中所示的序列。例如,在一些实施方案中,抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3);和/或包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中,抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH),和/或包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85% (例如,至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,抗体是Fab片段、全长IgG、Fab'片段、 $F(ab')_2$ 片段、scFv或Fv。

[0142] 抗体

[0143] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物包含结合人转铁蛋白受体1(TfR1)的抗体。对应于NCBI序列NP\_003225.2(转铁蛋白受体蛋白1同种型1,智人)的示例性人转铁蛋白受体1氨基酸序列如下:

[0144] MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA VDEEENADNNTKANV  
 TKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPREEPGEDF  
 PAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF  
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTG  
 KLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKF  
 PIVNAELSFHGHHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSSLNIPVQTISRAAA EKLFGN  
 MEGDCPSDWKTDSTCRMVTSSEKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVG  
 AQRDAWGPGA AKSGVGTALLLKL AQMFSDMVLK DGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVG  
 ATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQ  
 FLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYS GIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIE  
 RIPELNKVARAAA EVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEM  
 GLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSP  
 KESPRHVFVWGS GSHTLPALLENLKL RKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANAL  
 SGDVWDIDNEF (SEQ ID NO: 35).

[0145] 表2提供了可用于本文中提供的复合物中的抗TfR1抗体的序列的一些实例。

[0146] 表2. 抗TfR1抗体序列的实例

抗体	IMGT	Kabat	Chothia
<b>CDR-H1</b>	GYSITSGYY (SEQ ID NO: 1)	SGYYWN (SEQ ID NO: 7)	GYSITSGY (SEQ ID NO: 12)
<b>CDR-H2</b>	ITFDGAN (SEQ ID NO: 2)	YITFDGANNYNPSL KN (SEQ ID NO: 8)	FDG (SEQ ID NO: 13)

[0148]

<b>CDR-H3</b>	TRSSYDYDVL DY (SEQ ID NO: 3)	SSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 9)	SYDYDVLD (SEQ ID NO: 14)
<b>CDR-L1</b>	QDISNF (SEQ ID NO: 4)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO: 10)	SQDISNF (SEQ ID NO: 15)
<b>CDR-L2</b>	YTS (SEQ ID NO: 5)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 11)	YTS (SEQ ID NO: 5)
<b>CDR-L3</b>	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 6)	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 6)	GHTLPY (SEQ ID NO: 16)
<b>VH</b>	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
<b>VL</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNHWYQQKPGQPVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
<b>Fab HC</b>	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 19)		
<b>Fab LC</b>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNHWYQQKPGQPVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)		

[0149] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含SEQ ID NO:1的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据IMGT定义系统)、SEQ ID NO:2的重链互补决定区2(CDR-H2)(根据IMGT定义系统)、SEQ ID NO:3的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据IMGT定义系统)、SEQ ID NO:4的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据IMGT定义系统)、SEQ ID NO:5的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据IMGT定义系统)以及SEQ ID NO:6的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据IMGT定义系统)。

[0150] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含SEQ ID NO:7的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:8的重链互补决定区2(CDR-H2)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:9的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:10的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据Kabat定义系统)、SEQ ID NO:11的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据Kabat定义系统)以及SEQ ID NO:6的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Kabat定义系统)。

[0151] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含SEQ ID NO:12的重链互补决定区1(CDR-H1)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:13的重链互补决定区2(CDR-H2)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:14的重链互补决定区3(CDR-H3)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:15的轻链互补决定区1(CDR-L1)(根据Chothia定义系统)、SEQ ID NO:5的轻链互补决定区2(CDR-L2)(根据Chothia定义系统)以及SEQ ID NO:16的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Chothia定义系统)。

[0152] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含重链可变区(VH),所述重链可变区与包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH相比在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充(例如补充),本公开内容的抗TfR1抗体包含轻链可变区(VL),所述轻链可变区与包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL相比在框架区中包含不超过25个氨基酸变异(例如,不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0153] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含VH,所述VH包含与含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH在框架区中具有至少75%(例如75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含VL,所述VL包含与含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL在框架区中具有至少75%(例如75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含VH,所述VH包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含VL,所述VL包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

[0155] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少75%(例如75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体是包含重链的Fab,所述重链包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少75%(例如75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少75%(例如75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗TfR1抗体是包含轻链的Fab,所述轻链包含与SEQ ID NO:20的氨基酸序列具有至少75%(例如75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。

[0156] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体是包含重链的Fab,所述重链包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗TfR1抗体是包含轻链的Fab,所述轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0157] 在一些实施方案中,本文中提供的抗TfR1抗体可具有一个或更多个翻译后修饰。在一些实施方案中,N端环化,也称为焦谷氨酸形成(pyro-Glu)可在产生期间在抗体的N端谷氨酸(Glu)和/或谷氨酰胺(Gln)残基处发生。因此,应理解,被指定为具有包含N端谷氨酸或谷氨酰胺残基的序列的抗体涵盖因翻译后修饰而经历焦谷氨酸形成的抗体。在一些实施

方案中,焦谷氨酸形成发生在重链序列中。在一些实施方案中,焦谷氨酸形成发生在轻链序列中。

[0158] 寡核苷酸

[0159] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物的寡核苷酸是单链寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸可用于靶向DMD(例如,用于外显子跳读)。在一些实施方案中,可用于靶向DMD(例如,外显子跳读)的寡核苷酸靶向DMD等位基因(例如,突变的DMD等位基因)。在一些实施方案中,可用于靶向DMD(例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸靶向DMD RNA的区域(例如,SEQ ID NO:24的Dp427m转录物)。在一些实施方案中,可用于靶向DMD(例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸包含DMD RNA(例如,SEQ ID NO:23的Dp427m转录物)的互补区。在一些实施方案中,可用于靶向DMD(例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸包含DMD RNA的外显子(例如外显子8、23、43、44、45、46、50、51、52、53或55)或内含子的互补区。在一些实施方案中,可用于靶向DMD(例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸靶向DMD RNA的剪接供体位点、剪接受体位点、分支点或外显子剪接增强子(ESE)(例如由智人DMD基因编码的DMD前体mRNA(例如NCBI登录No.NG\_012232.1)。在一些实施方案中,可用于靶向DMD(例如用于外显子跳读)的寡核苷酸靶向DMD中的外显子剪接增强子(ESE)序列(例如外显子23、44、45、46、50、51、52、53或55的ESE序列)。

[0160] 下面提供了可被复合物的寡核苷酸靶向的DMD RNA序列和外显子序列的一些实例。

[0161] 智人(*Homo sapiens*)肌养蛋白(DMD),转录物变体Dp427m,mRNA(NCBI参考序列:NM\_004006.2)(SEQ ID NO:23)。

[0162] 智人肌养蛋白(DMD),转录物变体Dp427m,外显子51(NCBI参考序列:NM\_004006.2的第7554至7786位核苷酸)

```
CTCCTACTCAGACTGTTACTCTGGTGACACAACCTGTGGTACTAAGGAACTGCC
ATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCAGA
TTTCAACCGGGCTTGGACAGAAGTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATCAAGTTA
```

[0163]

```
TAAAATCACAGAGGGTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCAT
CAAGCAGAAG (SEQ ID NO: 24)
```

[0164] 智人肌养蛋白(DMD),转录物变体Dp427m,外显子8(NCBI参考序列:NM\_004006.2的第894至1075位核苷酸)

```
ATGTTGATACCACCTATCCAGATAAGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCACTC
TTCCAAGTTTTGCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCCATCCAGGAAGTGGAATGTT
```

[0165]

```
GCCAAGGCCACCTAAAGTGACTAAAGAAGAACATTTTCAGTTACATCATCAAATG
CACTATTCTCAACAG (SEQ ID NO: 25)
```

[0166] 智人肌养蛋白(DMD),转录物变体Dp427m,外显子23(NCBI参考序列:NM\_004006.2的第3194至3406位核苷酸)

- GCTTTACAAAGTTCTCTGCAAGAGCAACAAAGTGGCCTATACTATCTCAGCACCAC  
TGTGAAAGAGATGTCGAAGAAAGCGCCCTCTGAAATTAGCCGAAATATCAATCA  
[0167] GAATTTGAAGAAATTGAGGGACGCTGGAAGAAGCTCTCCTCCCAGCTGGTTGAGC  
ATTGTCAAAGCTAGAGGAGCAAATGAATAAACTCCGAAAAATTTCAG (SEQ ID  
NO: 26) ◦
- [0168] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子43 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第6362至6534位核苷酸)
- AATATAAAAGATAGTCTACAACAAAGCTCAGGTCGGATTGACATTATTCATAGCA  
AGAAGACAGCAGCATTGCAAAGTGCAACGCCTGTGGAAAGGGTGAAGCTACAGG  
[0169] AAGCTCTCTCCCAGCTTGATTTCCAATGGGAAAAGTTAACAAAATGTACAAGGA  
CCGACAAGG (SEQ ID NO: 27) ◦
- [0170] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子44 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第6535至6682位核苷酸)
- GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTTCATTATGATATAAAGATAT  
[0171] TTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGA  
GAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG (SEQ ID NO: 28) ◦
- [0172] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子45 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第6683至6858位核苷酸)
- GAACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGCAAACCTGTTGTCAGAACATTGAATGCAA  
CTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTATTCTACAGGA  
[0173] AAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGAC  
AGAAAAAAGAG (SEQ ID NO: 36) ◦
- [0174] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子46 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第6859至7006位核苷酸)
- GCTAGAAGAACAAAAGAATATCTTGTGAGAATTTCAAAGAGATTTAAATGAATTT  
[0175] GTTTTATGGTTGGAGGAAGCAGATAACATTGCTAGTATCCCACTTGAACCTGGAAA  
AGAGCAGCAACTAAAAGAAAAGCTTGAGCAAGTCAAG (SEQ ID NO: 29) ◦
- [0176] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子50 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第7445至7553位核苷酸)
- AGGAAGTTAGAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAG  
[0177] AGCTGAGGGCAAAGCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCCT  
(SEQ ID NO: 30) ◦
- [0178] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子51 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第7554至7786位核苷酸)

- CTCCTACTCAGACTGTTACTCTGGTGACACAACCTGTGGTACTAAGGAACTGCC  
ATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCAGA  
[0179] TTTCAACCGGGCTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATCAAGTTA  
TAAAATCACAGAGGGTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCAT  
CAAGCAGAAG (SEQ ID NO: 31) ◦
- [0180] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子52 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第7787至7904位核苷酸)  
GCAACAATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCCCCAGTTGGAAGAACTCATTACCG  
[0181] CTGCCCAAATTTGAAAAACAAGACCAGCAATCAAGAGGCTAGAACAATCATTAC  
GGATCGAA (SEQ ID NO: 32) ◦
- [0182] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子53 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第7905至8116位核苷酸)  
TTGAAAGAATTCAGAATCAGTGGGATGAAGTACAAGAACACCTTCAGAACCGGAG  
GCAACAGTTGAATGAAATGTAAAGGATTCAACACAATGGCTGGAAGCTAAGGAA  
[0183] GAAGCTGAGCAGGTCTTAGGACAGGCCAGAGCCAAGCTTGAGTCATGGAAGGAG  
GGTCCCTATACAGTAGATGCAATCCAAAAGAAAATCACAGAAACCAAG (SEQ ID  
NO: 33) ◦
- [0184] 智人肌养蛋白 (DMD), 转录物变体Dp427m, 外显子55 (NCBI参考序列:NM\_004006.2  
的第8272至8461位核苷酸)  
GGTGAGTGAGCGAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTCATAGATTACTGCAACAGTTC  
CCCCTGGACCTGGAAAAGTTTCTTGCCTGGCTTACAGAAGCTGAAACAACCTGCCA  
[0185] ATGTCCTACAGGATGCTACCCGTAAGGAAAGGCTCCTAGAAGACTCCAAGGGAGT  
AAAAGAGCTGATGAAACAATGGCAA (SEQ ID NO: 34) ◦
- [0186] 在一些实施方案中,可用于靶向DMD (例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸的长度为  
15至40 (例如,15至40、15至35、15至30、15至25、15至20、20至40、20至35、20至30、20至25、25  
至40、25至35、25至30、25至28、28至30、30至40、30至32、32至35、30至35,或35至40)个核苷  
酸。在一些实施方案中,可用于靶向DMD (例如用于外显子跳读)的寡核苷酸长度为15、16、  
17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸,任选地长度为20至35,或30个  
核苷酸。
- [0187] 在一些实施方案中,可用于靶向DMD (例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸包含针对  
DMD RNA的至少8个 (例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、  
25、26、27、28、29或30个)连续核苷酸的互补区。在一些实施方案中,可用于靶向DMD (例如用  
于外显子跳读)的寡核苷酸包含针对DMD RNA外显子的至少8个 (例如至少8、9、10、11、12、  
13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个)连续核苷酸的互补区。
- [0188] 在一些实施方案中,可用于靶向DMD (例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸包含针对  
SEQ ID NO:23至24中任一者所示的DMD序列的至少8个 (例如,至少8、9、10、11、12、13、14、  
15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个)连续核苷酸的互补区。
- [0189] 在一些实施方案中,可用于靶向DMD (例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸包含针对

SEQ ID NO:22 (CTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAG) 中所示靶序列的至少8个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个)连续核苷酸的互补区。在一些实施方案中,可用于靶向DMD(例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸包含SEQ ID NO:21 (CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG) 中所示序列的至少8个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个)连续核苷酸。

[0190] 在一些实施方案中,可用于靶向DMD(例如,用于外显子跳读)的寡核苷酸包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文中提供的任一种寡核苷酸是PMO。

[0191] 在一些实施方案中,应理解在C5位处核碱基尿嘧啶的甲基化形成胸腺嘧啶。因此,在一些实施方案中,具有C5甲基化尿嘧啶(或5-甲基尿嘧啶)的核苷酸或核苷可等同地鉴定为胸腺嘧啶核苷酸或核苷。

[0192] 在一些实施方案中,本文中提供的任一种寡核苷酸(例如,SEQ ID NO:21中所示的寡核苷酸)中的任意一个或更多个胸腺嘧啶碱基(T)可独立且任选地为尿嘧啶碱基(U),和/或者本文中提供的寡核苷酸中的任意一个或更多个U可独立且任选地为T。

[0193] 组合物

[0194] 在一些实施方案中,本文中所述的组合物包含复合物(即,多个复合物),每个复合物包含与一种或更多种寡核苷酸(例如本文中所述的寡核苷酸)共价连接的抗体(例如,抗TfR1抗体),其中所述抗体包含含有重链可变区(VH)和重链恒定区的重链,以及包含含有轻链可变区(VL)和轻链恒定区的轻链。在一些实施方案中,这样复合物的抗体包含表2中所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。本文中所述的组合物的复合物可包含本文中提供的任何结构,例如式(I)(例如,包含式(Ia)、式(Ib)、式(Ic)或式(Id)的基团)或式(A)的结构。

[0195] 在一些实施方案中,本文中所述的组合物包含复合物(即多个复合物),其中每个复合物包含式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构,其中每个 $R^1$ 独立地包含含有寡核苷酸(例如,本文中所述的寡核苷酸)的化合物并且与 $R^2$ 共价连接,其中 $R^2$ 包含抗体(例如,抗TfR1抗体),所述抗体包含含有重链可变区(VH)和重链恒定区的重链以及包含含有轻链可变区(VL)和轻链恒定区的轻链。在一些实施方案中,复合物的每个 $R^1$ 独立地与 $R^2$ 的不同氨基酸残基(例如,赖氨酸或半胱氨酸)共价连接。

[0196] 在一些实施方案中,组合物中复合物的 $n1$ 的值独立且任选地为从一至高至抗体(例如, $R^2$ 内包含的抗体)中期望或靶向缀合的氨基酸残基的数目(例如,赖氨酸残基的数目)的整数。在一些实施方案中,组合物中每种复合物的 $n1$ 的值独立且任选地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26和27。在一些实施方案中,组合物中每种复合物的 $n1$ 的值独立且任选地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26。在一些实施方案中,组合物中每种复合物的 $n1$ 的值是独立选择的,并且任选地选自1至27、1至26、1至10、1至5或1至3的整数。在一些实施方案中,组合物的复合物的 $n1$ 的平均值为1至2、1至3、1至5、1至10、1至26或1至27。在一些实施方案中,本文中所述的组合物包含其中 $n1$ 值为0的复合物。在一些实施方案中,组合物的复合物的 $n1$ 平均值为1至5(例如,1至5、1至4、1至3、1至2、2至4、3至5、1至4.6、1至4.5、1至4.4、1至4.3、1至4.2、1至3.5、1至2.5、1.1至5、1.1至4.5、1.1至4、1.1至3.5、1.1至3、1.1至2.5、1.1至2.2、1.2至5、1.2至4.5、1.2至4、1.2至3.5、1.2至3、1.2至2.5、1.2至2.2、1.3至5、

1.3至4.5、1.3至4、1.3至3.5、1.3至3、1.3至2.5、1.3至2.2、1.4至5、1.4至4.5、1.4至4、1.4至3.5、1.4至3、1.4至2.5、1.4至2.2、1.5至5、1.5至4.5、1.5至4、1.5至3.5、1.5至3、1.5至2.5、1.5至2.2、1.6至3、1.6至2.5、1.6至2.2、1.7至3、1.7至2.5、1.7至2.2、1.8至3、1.8至2.5、或1.8至2.2)。

[0197] 在一些实施方案中,本文中所述的组合物包含未与寡核苷酸缀合的抗体(例如,以痕量计)和与一种或更多种寡核苷酸缀合的抗体。在一些实施方案中,未与寡核苷酸缀合的抗体可被称为包含式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物,其中 $n1$ 为零。因此,在一些实施方案中,用于在本文中所述的方法中向对象施用的组合物包含含有式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物(例如复合物),其中每个 $R^1$ 独立地包含含有寡核苷酸的基团, $R^2$ 包含抗体,并且 $n1$ 独立地是零或更大的整数,其反映了每个化合物(例如复合物)中 $R^1$ 的个数。在一些实施方案中,与组合物中 $n1$ 为一或更大的式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的所有化合物相比,组合物中 $n1$ 为零的包含式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物的比例小于10%、小于5%、小于1%、小于0.5%、小于0.1%、小于0.05%或小于0.01%。因此,在一些实施方案中,本文中公开的组合物中复合物的 $n1$ 的平均值为1至5(例如,1至5、1至4、1至3、1至2、2至4、3至5、1至4.6、1至4.5、1至4.4、1至4.3、1至4.2、1至3.5、1至2.5、1.1至5、1.1至4.5、1.1至4、1.1至3.5、1.1至3、1.1至2.5、1.1至2.2、1.2至5、1.2至4.5、1.2至4、1.2至3.5、1.2至3、1.2至2.5、1.2至2.2、1.3至5、1.3至4.5、1.3至4、1.3至3.5、1.3至3、1.3至2.5、1.3至2.2、1.4至5、1.4至4.5、1.4至4、1.4至3.5、1.4至3、1.4至2.5、1.4至2.2、1.5至5、1.5至4.5、1.5至4、1.5至3.5、1.5至3、1.5至2.5、1.5至2.2、1.6至3、1.6至2.5、1.6至2.2、1.7至3、1.7至2.5、1.7至2.2、1.8至3、1.8至2.5、或1.8至2.2)。

#### [0198] 制剂

[0199] 本文中提供的复合物以适用于药物用途的方式配制。在一些实施方案中,可使用使降解最小化的制剂将复合物递送至对象,促进递送和/或(例如,和)吸收,或为制剂中的复合物提供另外的有益性质。因此,在一些实施方案中,已经发现将复合物(例如,包含与Fab共价连接的PMO的复合物)与组氨酸和/或蔗糖配制在一起对于药物用途特别有利,例如如本文中所述的。因此,在一些实施方案中,本文中提供了包含与组氨酸和/或蔗糖一起的复合物的制剂(例如水溶液、冻干形式)。在一些实施方案中,本文中提供了冷冻形式的包含与组氨酸和/或蔗糖一起的复合物的制剂。在一些实施方案中,本文中所述的制剂包含复合物(例如,包含含有与Fab共价连接的PMO的多个复合物)、组氨酸和蔗糖。在一些实施方案中,包含肌肉靶向复合物(例如,包含含有与Fab共价连接的PMO的复合物)的制剂与组氨酸和/或蔗糖在水溶液中配制。在一些实施方案中,包含多个复合物、组氨酸和蔗糖的制剂可被冻干(例如,用于储存)。在一些实施方案中,冻干制剂可被重构(例如,用水重构)以施用于对象。这样的制剂可适当地制备,使得当施用于对象时,无论是施用至靶细胞的直接环境中或全身性施用,足够量的复合物进入靶肌细胞。

[0200] 在一些实施方案中,本文中提供了包含复合物(即,多个复合物)的制剂,其中每个复合物包含与抗体共价连接的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)。在一些实施方案中,本文中提供了包含复合物的制剂,其中每个复合物包含与抗TfR1抗体共价连接的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO),任选地其中这样的复合物的抗体包含如表2中所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且此外,在一些实施方案中,其中复合物与组氨酸(例如L-

组氨酸)和蔗糖配制在一起。在一些实施方案中,抗体是抗TfR1抗体。

[0201] 在一些实施方案中,提供了包含式 $[R^1]_{n1}-R^2$ 的复合物的制剂,其中每个 $R^1$ 独立地包含含有寡核苷酸(例如,PMO)的化合物,并且 $R^2$ 包含抗体(例如,抗TfR1抗体),并且其中 $n1$ 是一或更大的整数,其表示复合物中 $R^1$ 的个数。在一些实施方案中,提供了包含多个复合物的制剂,其中每个复合物包含式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构,其中每个 $R^1$ 独立地包含含有寡核苷酸(例如,PMO)的化合物,并且 $R^2$ 包含抗体(例如,抗TfR1抗体),并且其中在每个复合物中, $n1$ 独立地是一或更大的整数,其表示每个复合物中 $R^1$ 的个数。

[0202] 在一些实施方案中,本文中所述的制剂包含含有抗体的复合物,所述抗体包含如表2中所示的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,抗体是Fab并且包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

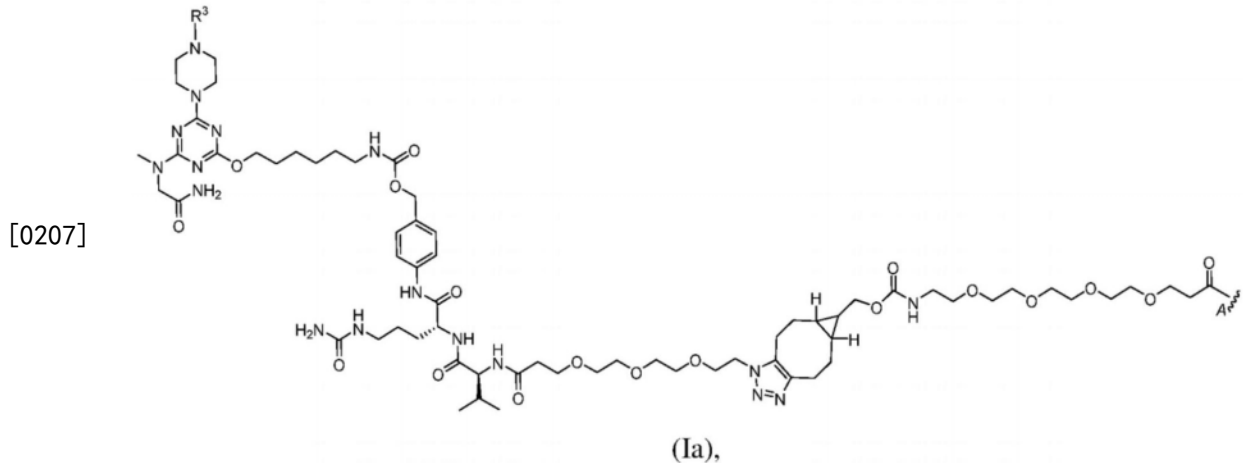
[0203] 在一些实施方案中,制剂中每种复合物的 $n1$ 的值独立且任选地为1至抗体( $R^2$ )中期望或靶向缀合的氨基酸残基的数目(例如赖氨酸残基数目)的整数。在一些实施方案中,制剂中每种复合物的 $n1$ 的值独立且任选地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26和27。在一些实施方案中,制剂中每种复合物的 $n1$ 的值独立且任选地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26。在一些实施方案中,制剂中每种复合物的 $n1$ 的值是独立选择的,并且任选地选自1至27、1至26、1至10、1至5或1至3的整数。在一些实施方案中,制剂的复合物的 $n1$ 的平均值为1至3、1至5、1至10、1至26或1至27。

[0204] 在一些实施方案中,本文中所述的制剂包含未与寡核苷酸缀合的抗体(例如,以痕量计)和与一种或更多种寡核苷酸缀合的抗体。在一些实施方案中,未与寡核苷酸抗体缀合的抗体可被称为包含式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物,其中 $n1$ 为零。因此,在一些实施方案中,提供了包含含有式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物(例如,复合物)的制剂,其中每个 $R^1$ 独立地包含含有寡核苷酸的基团, $R^2$ 包含抗体,并且 $n1$ 独立地是零或更大的整数,其反映了每个化合物(例如,复合物)中 $R^1$ 的个数。在一些实施方案中,与制剂中 $n1$ 为一或更大的具有式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的所有化合物相比,制剂中 $n1$ 为零的包含式(I): $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的化合物的比例小于10%、小于5%、小于1%、小于0.5%、小于0.1%、小于0.05%或小于0.01%。在一些实施方案中,制剂的复合物的 $n1$ 的平均值为1至5(例如,1至5、1至4、1至3、1至2、2至4、3至5、1至4.6、1至4.5、1至4.4、1至4.3、1至4.2、1至3.5、1至2.5、1.1至5、1.1至4.5、1.1至4、1.1至3.5、1.1至3、1.1至2.5、1.1至2.2、1.2至5、1.2至4.5、1.2至4、1.2至3.5、1.2至3、1.2至2.5、1.2至2.2、1.3至5、1.3至4.5、1.3至4、1.3至3.5、1.3至3、1.3至2.5、1.3至2.2、1.4至5、1.4至4.5、1.4至4、1.4至3.5、1.4至3、1.4至2.5、1.4至2.2、1.5至5、1.5至4.5、1.5至4、1.5至3.5、1.5至3、1.5至2.5、1.5至2.2、1.6至3、1.6至2.5、1.6至2.2、1.7至3、1.7至2.5、1.7至2.2、1.8至3、1.8至2.5、或1.8至2.2)。

[0205] 在一些实施方案中,本文中复合物(例如,本文中提供的制剂的复合物)中每个 $R^1$ 与抗体的不同氨基酸残基缀合。在一些实施方案中,每个不同的氨基酸包含 $\epsilon$ -氨基(例如赖氨酸、精氨酸)。然而,在一些实施方案中,与 $R^1$ 共价连接的每个不同的氨基酸是半胱氨酸。在一些实施方案中, $R^1$ 直接与抗体的氨基酸残基共价连接。然而,在一些实施方案中, $R^1$ 间接

与抗体的氨基酸共价连接,例如与氨基酸上的糖基化位点共价连接。在一些实施方案中,提供了制剂,其中 $R^1$ 与存在于抗体的CDR区中的氨基酸残基共价连接的复合物仅以痕量存在,或以不可检测的量存在,或根本不存在。在一些实施方案中,提供了其中复合物的 $R^1$ 与存在于抗体CDR区中的氨基酸残基共价连接的制剂,所述复合物使用标准检测技术在制剂中是不可检测的。

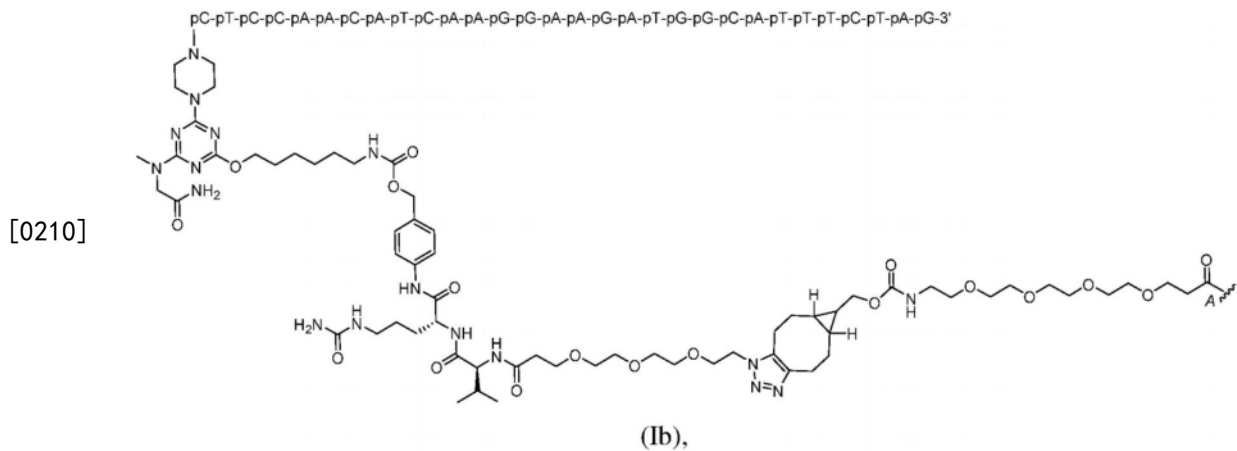
[0206] 在一些实施方案中,本文中提供的制剂包含含有式(I):  $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的复合物,其中本文中提供的制剂的复合物中每个 $R^1$ 独立地包含下式(Ia)的基团:



[0208] 其中 $R^3$ 包含寡核苷酸,例如磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO);并且 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接(例如,间接或直接连接,例如,直接连接)。在一些实施方案中,在每个复合物中, $n1$ 独立地是表示每个复合物中 $R^1$ 个数的整数(例如,一或更大的整数)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含含有表2中所示序列的抗体。例如,在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3);和/或包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH)和/或包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体是Fab片段、全长IgG、Fab'片段、 $F(ab')_2$ 片段、scFv或Fv。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体是Fab片段。在一些实施方案中, $R^3$ 包含寡核苷酸,例如包含CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG(SEQ ID NO:21)的碱基序列的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体Fab,并且每个 $R^1$ 在连接点A处与抗体Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。在一些实施方案中,在每

个复合物中,  $n_1$  独立地是整数 (例如, 1至27、1至26、1至10、1至5或1至3的整数)。在一些实施方案中, 本文中提供的制剂包含含有式 (I) :  $[R^1]_{n_1}-R^2$  结构的复合物, 其中  $n_1$  是0。在一些实施方案中, 组合物的复合物的  $n_1$  平均值为1至5 (例如, 1至5、1至4、1至3、1至2、2至4、3至5、1至4.6、1至4.5、1至4.4、1至4.3、1至4.2、1至3.5、1至2.5、1.1至5、1.1至4.5、1.1至4、1.1至3.5、1.1至3、1.1至2.5、1.1至2.2、1.2至5、1.2至4.5、1.2至4、1.2至3.5、1.2至3、1.2至2.5、1.2至2.2、1.3至5、1.3至4.5、1.3至4、1.3至3.5、1.3至3、1.3至2.5、1.3至2.2、1.4至5、1.4至4.5、1.4至4、1.4至3.5、1.4至3、1.4至2.5、1.4至2.2、1.5至5、1.5至4.5、1.5至4、1.5至3.5、1.5至3、1.5至2.5、1.5至2.2、1.6至3、1.6至2.5、1.6至2.2、1.7至3、1.7至2.5、1.7至2.2、1.8至3、1.8至2.5、或1.8至2.2)。

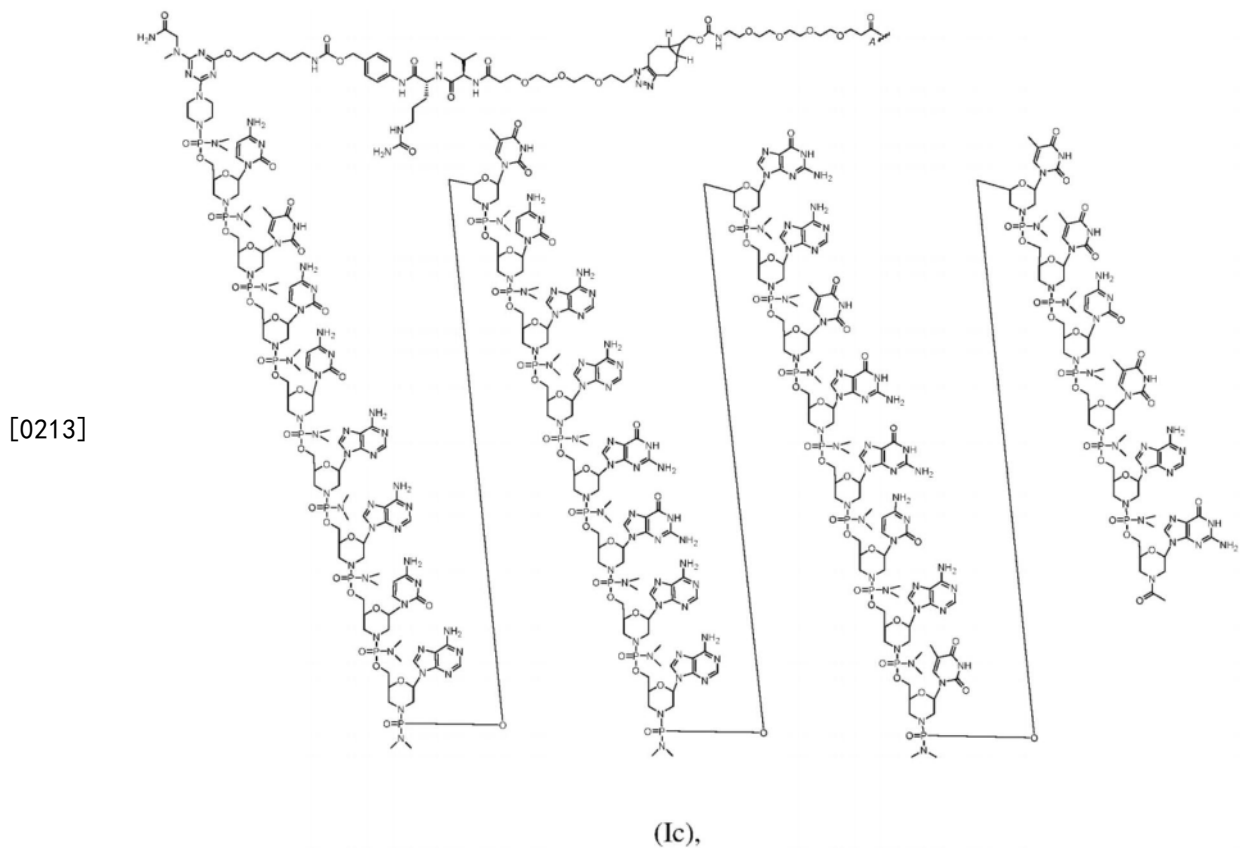
[0209] 在一些实施方案中, 本文中提供的制剂包含含有式 (I) :  $[R^1]_{n_1}-R^2$  结构的复合物, 其中本文中提供的制剂的复合物中每个  $R^1$  包含下式 (Ib) 的基团:



[0211] 其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO) 的碱基位置;  $R^1$  在连接点A处与  $R^2$  共价连接 (例如间接或直接连接, 例如直接连接), 其中-p反映磷酸二酰胺键连, 并且其中N对应于腺嘌呤 (A)、胞嘧啶 (C)、鸟嘌呤 (G) 或胸腺嘧啶 (T) 的核碱基, 使得PMO包含CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO:21) 的碱基序列。在一些实施方案中, 在每个复合物中,  $n_1$  独立地是整数 (例如, 一或更大的整数), 其表示每个复合物中  $R^1$  的个数, 并且每个  $R^1$  在连接点A处与  $R^2$  共价连接。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含表2中所示的序列。例如, 在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含: 含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1 (CDR-H1), 含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2 (CDR-H2), 含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3 (CDR-H3); 和/或包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1 (CDR-L1), 含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2 (CDR-L2) 以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3 (CDR-L3)。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和/或包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85% (例如至少95%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在

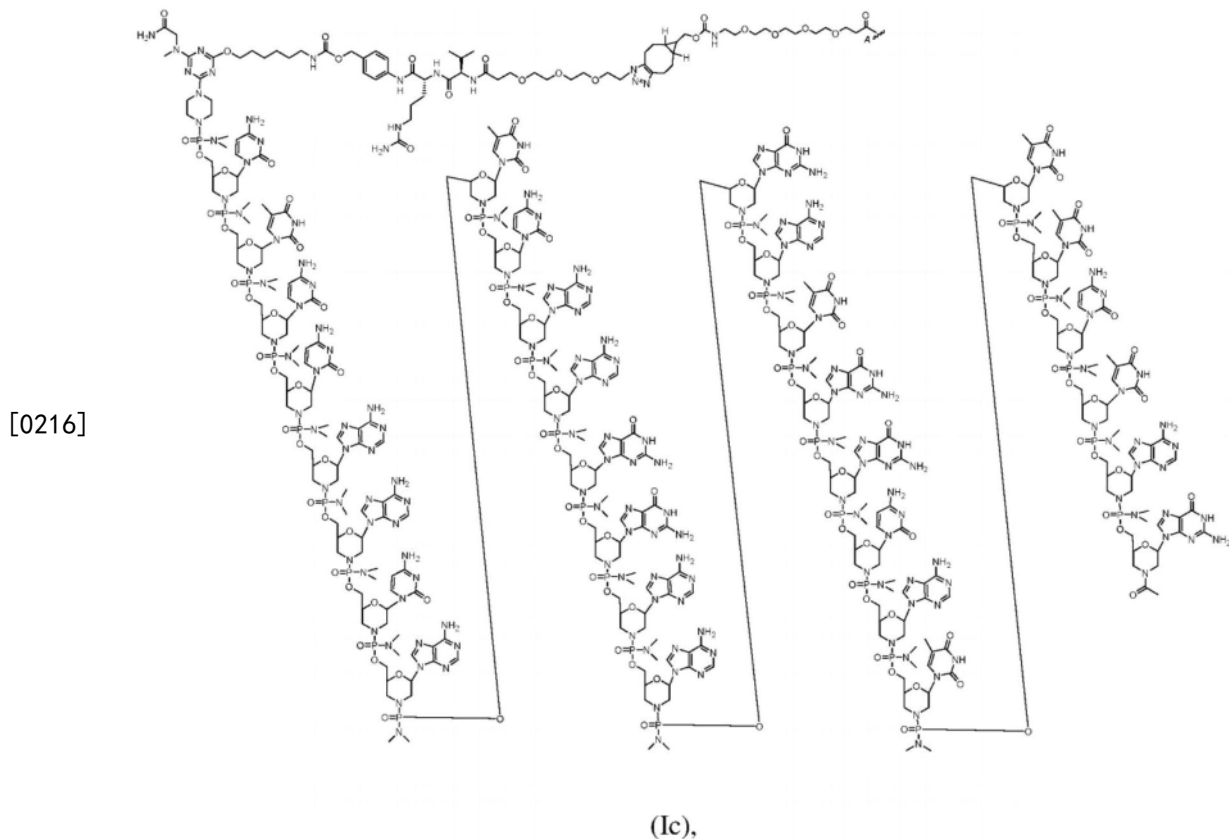
一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体包含含有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的重链和/或包含含有 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体是 Fab 片段、全长 IgG、Fab' 片段、 $F(ab')_2$  片段、scFv 或 Fv。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体, 所述抗体是 Fab 片段。在一些实施方案中, 在每个复合物中,  $n_1$  独立地是整数 (例如, 1 至 27、1 至 26、1 至 10、1 至 5 或 1 至 3 的整数)。在一些实施方案中,  $R^2$  包含 Fab 并且每个  $R^1$  在连接点 A 处与 Fab 的不同氨基酸残基共价连接, 任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。在一些实施方案中, 本文中提供的制剂包含含有式 (I) :  $[R^1]_{n_1} - R^2$  结构的复合物, 其中  $n_1$  是 0。在一些实施方案中, 组合物的复合物的  $n_1$  的平均值为 1 至 5 (例如, 1 至 5、1 至 4、1 至 3、1 至 2、2 至 4、3 至 5、1 至 4.6、1 至 4.5、1 至 4.4、1 至 4.3、1 至 4.2、1 至 3.5、1 至 2.5、1.1 至 5、1.1 至 4.5、1.1 至 4、1.1 至 3.5、1.1 至 3、1.1 至 2.5、1.1 至 2.2、1.2 至 5、1.2 至 4.5、1.2 至 4、1.2 至 3.5、1.2 至 3、1.2 至 2.5、1.2 至 2.2、1.3 至 5、1.3 至 4.5、1.3 至 4、1.3 至 3.5、1.3 至 3、1.3 至 2.5、1.3 至 2.2、1.4 至 5、1.4 至 4.5、1.4 至 4、1.4 至 3.5、1.4 至 3、1.4 至 2.5、1.4 至 2.2、1.5 至 5、1.5 至 4.5、1.5 至 4、1.5 至 3.5、1.5 至 3、1.5 至 2.5、1.5 至 2.2、1.6 至 3、1.6 至 2.5、1.6 至 2.2、1.7 至 3、1.7 至 2.5、1.7 至 2.2、1.8 至 3、1.8 至 2.5、或 1.8 至 2.2)。

[0212] 在一些实施方案中, 本文中提供的制剂包含含有式 (I) :  $[R^1]_{n_1} - R^2$  结构的复合物, 其中本文中提供的制剂的复合物中每个  $R^1$  包含式 (Ic) 的基团:



[0214] 其中  $R^1$  在连接点 A 处与  $R^2$  共价连接 (例如, 间接或直接连接, 例如直接连接)。

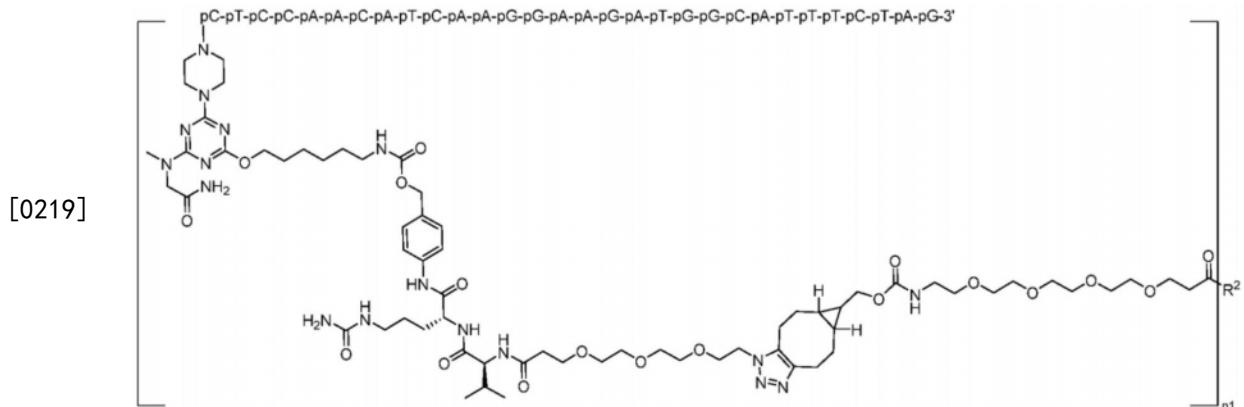
[0215] 在一些实施方案中, 本文中提供的制剂包含含有式 (I) :  $[R^1]_{n_1} - R^2$  结构的复合物, 其中本文中提供的制剂的复合物中每个  $R^1$  为:



[0217] 其中 $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接(例如,间接或直接连接,例如,直接连接)。在一些实施方案中,在每个复合物中, $n_1$ 独立地是整数(例如,一或更大的整数),其表示每个复合物中 $R^1$ 的个数。在一些实施方案中, $R^2$ 包含含有表2中所示序列的抗体。例如,在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3);和/或包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH)和/或包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85%(例如至少95%)同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体是Fab片段、全长IgG、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、scFv或Fv。在一些实施方案中, $R^2$ 包含抗体,所述抗体是Fab片段。在一些实施方案中,在每个复合物中, $n_1$ 独立地是整数(例如,1至27、1至26、1至10、1至5或1至3的整数)。在一些实施方案中, $R^2$ 包含Fab,并且每个 $R^1$ 在连接点A处与Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。在一些实施方案中,本文中所述的制剂还包

含含有式 (I) :  $[R^1]_{n1}-R^2$  结构的复合物, 其中  $n1$  为 0。在一些实施方案中, 组合物的复合物的  $n1$  平均值为 1 至 5 (例如, 1 至 5、1 至 4、1 至 3、1 至 2、2 至 4、3 至 5、1 至 4.6、1 至 4.5、1 至 4.4、1 至 4.3、1 至 4.2、1 至 3.5、1 至 2.5、1.1 至 5、1.1 至 4.5、1.1 至 4、1.1 至 3.5、1.1 至 3、1.1 至 2.5、1.1 至 2.2、1.2 至 5、1.2 至 4.5、1.2 至 4、1.2 至 3.5、1.2 至 3、1.2 至 2.5、1.2 至 2.2、1.3 至 5、1.3 至 4.5、1.3 至 4、1.3 至 3.5、1.3 至 3、1.3 至 2.5、1.3 至 2.2、1.4 至 5、1.4 至 4.5、1.4 至 4、1.4 至 3.5、1.4 至 3、1.4 至 2.5、1.4 至 2.2、1.5 至 5、1.5 至 4.5、1.5 至 4、1.5 至 3.5、1.5 至 3、1.5 至 2.5、1.5 至 2.2、1.6 至 3、1.6 至 2.5、1.6 至 2.2、1.7 至 3、1.7 至 2.5、1.7 至 2.2、1.8 至 3、1.8 至 2.5、或 1.8 至 2.2)。

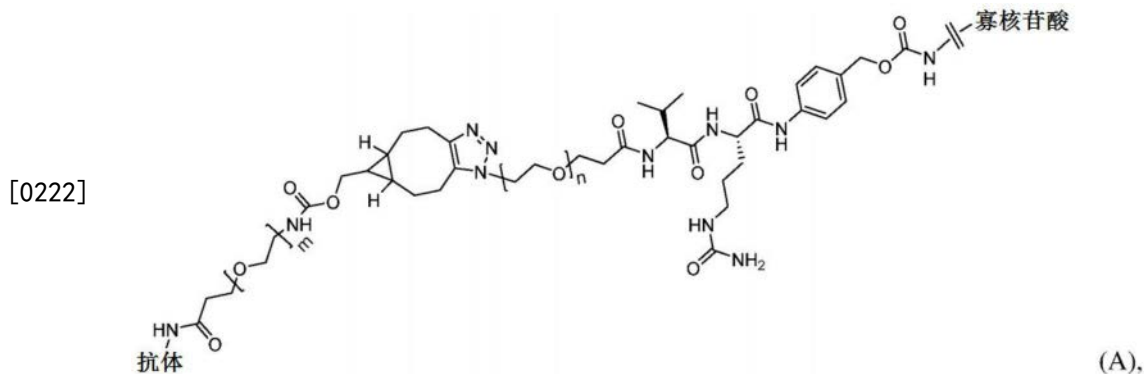
[0218] 在一些实施方案中, 本文中提供的制剂包含含有下式 (Id) 结构的复合物:



[0220] 其中 -pN 表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物 (PMO) 的碱基位置; 其中 -p 反映磷酸二酰胺键连, 并且其中 N 对应于腺嘌呤 (A)、胞嘧啶 (C)、鸟嘌呤 (G) 或胸腺嘧啶 (T) 的核碱基, 使得 PMO 包含 CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO: 21) 的碱基序列; 其中  $R^2$  包含含有表 2 中所示序列的抗体; 其中在每个复合物中,  $n1$  独立地是整数 (例如, 一或更大的整数), 其表示方括号内所含基团的个数, 其中方括号内每个所含基团与抗体 (例如 Fab) 的不同氨基酸残基共价连接, 任选地其中每个不同氨基酸残基是赖氨酸。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体 (例如 Fab), 所述抗体包含: 含有 SEQ ID NO: 1、7 或 12 中所示序列的重链互补决定区 1 (CDR-H1), 含有 SEQ ID NO: 2、8 或 13 中所示序列的重链互补决定区 2 (CDR-H2), 含有 SEQ ID NO: 3、9 或 14 中所示序列的重链互补决定区 3 (CDR-H3); 和/或包含含有 SEQ ID NO: 4、10 或 15 中所示序列的轻链互补决定区 1 (CDR-L1), 含有 SEQ ID NO: 5 或 11 中所示序列的轻链互补决定区 2 (CDR-L2) 以及含有 SEQ ID NO: 6 或 16 中所示序列的轻链互补决定区 3 (CDR-L3)。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体 (例如 Fab), 所述抗体包含含有与 SEQ ID NO: 17 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH) 和/或包含含有与 SEQ ID NO: 18 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体 (例如, Fab), 所述抗体包含含有 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列的 VH 和/或包含含有 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的 VL。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体 (例如, Fab), 所述抗体包含含有与 SEQ ID NO: 19 具有至少 85% (例如, 至少 95%) 同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与 SEQ ID NO: 20 具有至少 85% (例如, 至少 95%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,  $R^2$  包含抗体 (例如 Fab), 所述抗体包含含有 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的重链和/或包含含有 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, 在每个复合物中,  $n1$  独立地是整数 (例如, 1 至 27、1 至 26、1 至 10、1 至 5 或 1 至 3 的整数)。在一些实施方案

中,  $R^2$  包含通过抗体 (例如 Fab) 的不同氨基酸残基共价连接的抗体 (例如 Fab), 任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。在一些实施方案中, 本文中所述的制剂还包含  $n_1$  为 0 的复合物。在一些实施方案中, 组合物的复合物的  $n_1$  平均值为 1 至 5 (例如, 1 至 5、1 至 4、1 至 3、1 至 2、2 至 4、3 至 5、1 至 4.6、1 至 4.5、1 至 4.4、1 至 4.3、1 至 4.2、1 至 3.5、1 至 2.5、1.1 至 5、1.1 至 4.5、1.1 至 4、1.1 至 3.5、1.1 至 3、1.1 至 2.5、1.1 至 2.2、1.2 至 5、1.2 至 4.5、1.2 至 4、1.2 至 3.5、1.2 至 3、1.2 至 2.5、1.2 至 2.2、1.3 至 5、1.3 至 4.5、1.3 至 4、1.3 至 3.5、1.3 至 3、1.3 至 2.5、1.3 至 2.2、1.4 至 5、1.4 至 4.5、1.4 至 4、1.4 至 3.5、1.4 至 3、1.4 至 2.5、1.4 至 2.2、1.5 至 5、1.5 至 4.5、1.5 至 4、1.5 至 3.5、1.5 至 3、1.5 至 2.5、1.5 至 2.2、1.6 至 3、1.6 至 2.5、1.6 至 2.2、1.7 至 3、1.7 至 2.5、1.7 至 2.2、1.8 至 3、1.8 至 2.5、或 1.8 至 2.2)。

[0221] 在一些实施方案中, 本文中所述制剂中提供的复合物包含下式 (A) 的结构:



[0223] 其中  $y$  是 0 至 15 (例如 3), 并且  $z$  是 0 至 15 (例如 4)。在一些实施方案中, 抗体是抗 TfR1 抗体 (例如, 表 2 中提供的抗 TfR1 抗体)。在一些实施方案中, 寡核苷酸是 PMO 并且包含 SEQ ID NO: 21 的碱基序列。在一些实施方案中, 在结构 (A) 中示出的与抗 TfR1 抗体相邻的酰胺是由与抗 TfR1 抗体的胺 (例如赖氨酸  $\epsilon$  胺) 的反应产生的。在一些实施方案中, 本文中所述的复合物包含通过 Fab 的赖氨酸与 PMO 的 5' 末端共价连接的抗 TfR1 Fab。在一些实施方案中, 抗体包含表 2 中所示的序列。例如, 在一些实施方案中, 抗体包含: 含有 SEQ ID NO: 1、7 或 12 中所示序列的重链互补决定区 1 (CDR-H1), 含有 SEQ ID NO: 2、8 或 13 中所示序列的重链互补决定区 2 (CDR-H2), 含有 SEQ ID NO: 3、9 或 14 中所示序列的重链互补决定区 3 (CDR-H3); 和/或包含含有 SEQ ID NO: 4、10 或 15 中所示序列的轻链互补决定区 1 (CDR-L1), 含有 SEQ ID NO: 5 或 11 中所示序列的轻链互补决定区 2 (CDR-L2) 以及含有 SEQ ID NO: 6 或 16 中所示序列的轻链互补决定区 3 (CDR-L3)。在一些实施方案中, 抗体包含含有与 SEQ ID NO: 17 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的重链可变区 (VH), 和/或包含含有与 SEQ ID NO: 18 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中, 抗体包含含有 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列的 VH 和/或包含含有 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的 VL。在一些实施方案中, 抗体包含含有与 SEQ ID NO: 19 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的重链和/或包含含有与 SEQ ID NO: 20 具有至少 85% (例如至少 95%) 同一性的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, 抗体包含含有 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的重链和/或包含含有 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中, 抗体是 Fab 片段、全长 IgG、Fab' 片段、 $F(ab')_2$  片段、scFv 或 Fv。

[0224] 在一些实施方案中, 提供了包含本文中所述复合物的制剂, 其中制剂中复合物的浓度为 1 至 50 mg/mL 复合物, 任选地为 10 至 50 mg/mL 或 20 至 35 mg/mL (例如, 1 至 10 mg/mL、10 至

15mg/mL、15至20mg/mL、20至22mg/mL、22至24mg/mL、24至26mg/mL、24至25mg/mL、25至26mg/mL、22至25mg/mL、25至27mg/mL、27至29mg/mL、29至30mg/mL、25至30mg/mL、29至31mg/mL、30至31mg/mL、31至32mg/mL、30至32mg/mL、32至33mg/mL、32至35mg/mL、30至35mg/mL、35至40mg/mL、40至45mg/mL、45至50mg/mL), 任选地为约25mg/mL(例如25mg/mL)或约30mg/mL(例如30mg/mL)。

[0225] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种或多种复合物与组氨酸(例如L-组氨酸)和蔗糖配制在一起成冻干形式(例如冻干粉)。

[0226] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种或多种复合物与组氨酸(例如L-组氨酸)和蔗糖在水溶液中配制。在一些实施方案中,组氨酸(例如L-组氨酸)在水溶液中的浓度为10至50mM、10至20mM、20mM至30mM、或20mM至40mM,例如20至22mM、22至24mM、24至25mM、25至26mM、24至26mM、26至27mM、24至27mM、27至28mM、28至29mM、29至30mM、27至30mM、约22至27mM、约23至26mM、约24至26mM、约26至28mM、约28至30mM、约30至32mM、约32至35mM、约35至40mM、40至45mM、45至50mM、约25mM、或任选地为25mM。在一些实施方案中,蔗糖以5%至15%重量/体积(w/v%),例如8%至15%w/v%、9%至15%w/v%、9%至11%w/v%、9.5%至11%w/v%、或例如5%至6%w/v%、6%至7%、8%至9w/v%、9%至10w/v%、10%至11w/v%、11%至12%w/v%、10%至12w/v%、12%至13%w/v%、13%至14%w/v%、12%至14w/v%、14%至15w/v%或8%至12w/v%的浓度存在于水溶液中。在一些实施方案中,蔗糖以8%至12w/v%(例如10w/v%)的浓度存在于水溶液中。在一些实施方案中,水溶液的pH为5.0至7.0,例如5.0至5.2、5.2至5.4、5.4至5.6、5.6至5.8、5.8至6.0、5.9至6.0、5.9至6.1、6.0至6.1;例如5.5至6.5,或者例如pH为5.5至5.8、5.8至6.0、5.9至6.1、6.0至6.1、6.0至6.2、6.2至6.4、6.4至6.5、6.5至6.7、6.7至6.8、6.8至6.9、6.9至7.0、7.0至7.1或5.8至6.2。在一些实施方案中,水溶液的pH为5.8至6.2(例如5.8至6.0、5.8至6.1、5.9至6.1)。在一些实施方案中,水溶液的pH为5.9至6.2。在一些实施方案中,水溶液的pH为6.0至6.1(例如,约6.0,或6.0)。

[0227] 在一些实施方案中,提供了本文中所述的包含一种或多种复合物、组氨酸和蔗糖的制剂(例如,在水溶液中)。在一些实施方案中,本文中所述的任一种制剂为水溶液,其中组氨酸(例如,L-组氨酸)以25mM的浓度存在于水溶液中,其中蔗糖以10w/v%的浓度存在于水溶液中,并且其中水溶液的pH为约6.0(例如,6.0、5.9至6.1)。

[0228] 在一些实施方案中,提供了本文中所述的包含多种复合物、组氨酸和蔗糖的制剂(例如,在水溶液中),其中组氨酸(例如,L-组氨酸)以25mM的浓度存在于水溶液中,其中蔗糖以10w/v%的浓度存在于水溶液中,并且其中pH为约6.0(例如,6.0、5.9至6.1),并且制剂中复合物的浓度为10至50mg/mL或20至35mg/mL(例如,1至10mg/mL、10至15mg/mL、15至20mg/mL、20至22mg/mL、22至24mg/mL、24至26mg/mL、22至25mg/mL、25至27mg/mL、27至29mg/mL、29至31mg/mL、29至30mg/mL、30至31mg/mL、31至32mg/mL、25至30mg/mL、30至32mg/mL、32至35mg/mL、30至35mg/mL、35至40mg/mL、40至45mg/mL、45至50mg/mL), 任选地为25mg/mL或30mg/mL。

[0229] 如本文中所述,在一些实施方案中,本文中提供的制剂包含蔗糖。在一些实施方案中,蔗糖至少部分用作冻干保护剂。在一些实施方案中,蔗糖来自植物,例如草、水果或蔬菜(例如,根类蔬菜)来源(例如甜菜,(例如,糖类甜菜(例如,甘蔗属(*Saccharum* spp.)))、甘

蔗(例如甜菜(Beta vulgaris))、棕枣(date)、糖枫、甜高粱、苹果、橙子、胡萝卜、糖蜜、枫糖浆、玉米甜味剂)或动物产品(例如,蜂蜜)。在一些实施方案中,蔗糖来自甜菜或甘蔗(例如,甜菜蔗糖、甘蔗蔗糖)。在一些实施方案中,可使用除蔗糖以外的冻干保护剂,例如海藻糖、甘露醇、乳糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。然而,在一些实施方案中,可在制剂中提供崩解温度调节剂(例如,右旋糖酐、聚蔗糖(ficoll)或明胶)。

[0230] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种或多种复合物与组氨酸和蔗糖配制在一起成冻干形式(例如,冻干粉)。在一些实施方案中,冻干形式(例如,冻干粉)通过对本文中所述的任一种水溶液进行冻干来获得。

[0231] 在一些实施方案中,提供了产品(例如,本文中所述的冻干制剂),其通过包括对本文中所述制剂(例如,水性形式)的水溶液进行冻干的过程来产生。

[0232] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种或多种复合物与组氨酸和蔗糖配制在一起成冷冻形式(例如,冷冻水性固体)。在一些实施方案中,冷冻形式(例如冷冻水性固体)通过对本文中所述的任一种水溶液进行冷冻来获得。冷冻形式可以被冷冻到低于-20°C(例如低于-20°C、低于-30°C、低于-40°C、低于-50°C、低于-60°C、低于-70°C、低于-80°C或更低)的温度。

[0233] 在一些实施方案中,提供了产品(例如,本文中所述的冷冻制剂),其通过包括对本文中所述的制剂(例如,水性形式)的水溶液进行冷冻的过程来产生。

[0234] 在一些实施方案中,药物组合物经配制以与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外施用,例如静脉内、皮内、皮下施用。通常来说,施用途径是静脉内或皮下施用。

[0235] 用途/治疗方法

[0236] 本文中所述的包含与分子载荷(例如,寡核苷酸,例如,磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO))共价连接的抗TfR1抗体(例如,Fab)的复合物可有效治疗患有肌营养不良病(例如,迪谢内肌营养不良)的对象。在一些实施方案中,复合物包含分子载荷,所述分子载荷是寡核苷酸,例如促进由突变的DMD等位基因表达的mRNA的外显子跳读的反义寡核苷酸。

[0237] 在一些实施方案中,对象可以是人对象、非人灵长类对象、啮齿类对象或任何合适的哺乳动物对象。在一些实施方案中,非人灵长类对象是食蟹猴。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是2至60(例如2至60、2至50、2至40、2至30、2至20、2至10)岁的人对象。在一些实施方案中,对象是5至30(例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)岁的人对象。在一些实施方案中,对象是5至12(例如5、6、7、8、9、10、11或12)岁的人对象。在一些实施方案中,对象是4至16(例如,4至16、5至16、6至16、7至16、8至16、9至16、10至16、11至16、12至16、13至16、14至16、15至16、4至15、5至15、6至15、7至15、8至15、9至15、10至15、11至15、12至15、13至15、14至15、4至14、5至14、6至14、7至14、8至14、9至14、10至14、11至14、12至14、13至14、4至13、5至13、6至13、7至13、8至13、9至13、10至13、11至13、12至13、4至12、5至12、6至12、7至12、8至12、9至12、10至12、11至12、4至11、5至11、6至11、7至11、8至11、9至16、10至11、4至10、5至10、6至10、7至10、8至10、9至10、4至9、5至9、6至9、7至9、8至9、4至9、5至9、6至9、7至9、8至9、4至8、5至8、6至8、7至8、4至7、5至7、6至7、4至6、5至6或4至5)岁的人对象。在一些实施方案中,对象是约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16岁的人对象。

[0238] 在一些实施方案中,对象可患有迪谢内肌营养不良或其他肌养蛋白病。在一些实施方案中,对象具有突变的DMD等位基因,其可任选地在DMD外显子中包含至少一个突变,所述突变引起移码突变并导致不正确的RNA剪接/加工。在一些实施方案中,对象患有严重肌养蛋白病的症状,例如肌肉萎缩或肌肉损失。在一些实施方案中,对象具有肌酸磷酸激酶(CK)的血清浓度的无症状提高和/或(例如,和)伴随有肌红蛋白尿的肌肉痉挛。在一些实施方案中,对象患有进行性肌肉疾病,例如迪谢内肌营养不良或贝克肌营养不良或DMD相关的扩张型心肌病(DCM)。在一些实施方案中,对象不患有肌养蛋白病的症状。在一些实施方案中,对象是可走动的。在一些实施方案中,对象是不能走动的。

[0239] 在一些实施方案中,对象在DMD基因中具有适合于外显子51跳读的突变。在一些实施方案中,本文中所述的复合物可有效治疗DMD基因中具有适合于外显子51跳读突变的对象。在一些实施方案中,复合物包含寡核苷酸,例如促进前体mRNA(例如在由突变的DMD基因(例如适合于外显子51跳读的突变的DMD基因)编码的前体mRNA中)的外显子51跳读的寡核苷酸。

[0240] 本公开内容的方面包括涉及向对象施用包含有效量的本文中所述复合物的制剂的方法。在一些实施方案中,可向有治疗需要的对象施用有效量的包含复合物的药物组合物,所述复合物包含与本文中所述的寡核苷酸(例如PMO)共价连接的本文中所述的抗体(例如Fab)。在一些实施方案中,药物组合物被全身施用。在一些实施方案中,可通过合适的途径施用包含本文中所述复合物的药物组合物,所述途径可包括静脉内施用,例如作为推注(bolus)或通过在一段时间内的连续输注。在一些实施方案中,可通过静脉内、肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内或鞘内途径进行施用。在一些实施方案中,包含本文中所述复合物的药物组合物通过输注(例如静脉内输注)施用。在一些实施方案中,包含本文中所述多种复合物的药物组合物可以是固体形式、水性形式或液体形式。在一些实施方案中,可将水性或液体形式雾化或冻干。在一些实施方案中,冻干形式可用水溶液或液体溶液重构。

[0241] 在一些实施方案中,提供了用于治疗具有与迪谢内肌营养不良相关的突变DMD等位基因的对象的方法和/或用途,其包括向对象施用具有有效量的复合物的包含本文中所述的一种或多种复合物的制剂。在一些实施方案中,提供了用于促进对象中肌养蛋白的表达或活性的方法和/或用途,所述方法包括将细胞与具有有效量的复合物的包含本文中所述的多种复合物的制剂接触。在一些实施方案中,肌养蛋白是截短的肌养蛋白。截短的肌养蛋白是功能性的(例如,保留野生型肌养蛋白的活性)。在一些实施方案中,截短的肌养蛋白保留野生型肌养蛋白的部分功能。在一些实施方案中,所述方法包括施用包含本文中所述多种复合物的冻干形式(例如冻干粉)的制剂,包括在水溶液中重构冻干形式的制剂,并将制剂的水溶液施用于有此需要的对象。例如,在一些实施方案中,包含一种复合物或多种复合物的冻干形式的制剂以冻干形式运输和/或储存,在施用制剂水溶液的位置(例如,健康护理提供者位置)处重构,并通过注射或静脉内(例如,通过输注)以重构形式(例如,作为水溶液)来施用。在一些实施方案中,对象具有突变的DMD等位基因,所述突变的DMD等位基因包含适合于外显子51跳读的突变。在一些实施方案中,所述突变的DMD等位基因包含外显子51中的移码突变。

[0242] 在一些实施方案中,通过位点特异性或局部递送技术施用药物组合物。这些技术

的一些实例包括复合物的可植入储库源、局部递送导管、位点特异性载体、直接注射或直接应用。

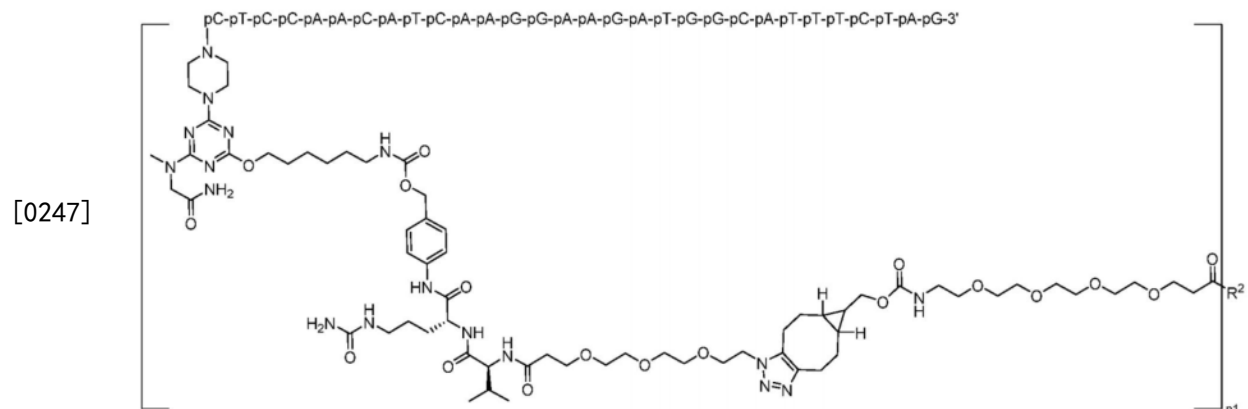
[0243] 在一些实施方案中,包含含有与分子载荷(例如,寡核苷酸,例如磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO))共价连接的抗TfR1抗体(例如,Fab)的复合物的药物组合物以赋予对象治疗作用的有效浓度施用。如本领域技术人员所公认的,有效量根据疾病的严重程度、所治疗对象的独特特征(例如年龄、身体状况、健康或体重)、治疗的持续时间、任何同时治疗的性质、施用途径和相关因素而变化。这些相关因素是本领域技术人员已知的,并且仅通过常规实验即可解决。在一些实施方案中,有效浓度是被认为对患者安全的最大剂量。在一些实施方案中,有效浓度将是提供最大效力的最低的可能浓度。

[0244] 经验考虑因素(例如复合物在对象中的半衰期)通常将有助于确定用于治疗的药物组合物的浓度。施用频率可凭经验确定和调整以使治疗效力最大化。可使用任何合适的方法评估治疗的效力。在一些实施方案中,治疗的效力可如下进行评估:通过对与肌养蛋白病相关的症状(例如肌肉萎缩或肌无力)的观察或评价,通过对象的自我报告结局(例如移动性、自我护理、日常活动、疼痛/不适和焦虑/抑郁)的测度,或通过生活质量指标(例如寿命)。在一些实施方案中,将包含含有与分子载荷共价连接的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物以相对于对照(例如治疗之前基因表达的基线水平)足以调节至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的靶基因活性或表达的有效浓度施用于对象。

## 实施例

[0245] 实施例1. 迪谢内肌营养不良患者肌管中抗TfR1抗体缀合物的外显子跳读活性

[0246] 该研究评价了包含抗TfR1 Fab的抗TfR1缀合物的外显子跳读活性,所述抗TfR1 Fab具有VH和VL序列,如表2中所示,其通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与DMD外显子51跳读反义寡核苷酸(ASO)共价连接(通过赖氨酸缀合)。DMD外显子51跳读ASO是PMO并且包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。缀合物包含以下结构:



[0248] ,其中R<sup>2</sup>是表2中所示的抗TfR1 Fab,并且其中在每个缀合物中n<sub>1</sub>独立地是零或更大的整数。

[0249] 将携带外显子52缺失的永生化人成肌细胞解冻,并以1×10<sup>6</sup>个细胞/烧瓶的密度接种在Promocell骨骼细胞生长培养基(含5% FBS和1×Pen-Strep)中,并使其生长至汇合。一旦汇合,就将细胞进行胰蛋白酶化并通过离心进行沉淀,并重悬于新鲜的Promocell

骨骼细胞生长培养基中。对细胞进行计数,并将细胞以50k个细胞/孔的密度接种到经基质胶(Matrigel)包被的96孔板中。使细胞恢复24小时。通过抽吸生长培养基并用不含血清的分化培养基进行替代来诱导细胞分化。然后用10 $\mu$ M寡核苷酸浓度的DMD外显子51跳读寡核苷酸(未与抗体共价连接-“裸”)或最终浓度为10 $\mu$ M寡核苷酸当量的缀合物处理细胞。将细胞与测试品一起孵育十天,然后从96孔板收获总RNA。对75ng总RNA进行cDNA合成,并进行突变特异性PCR以评价每种细胞类型中外显子51跳读的程度。将突变特异性PCR产物在4%琼脂糖凝胶上运行,并使用SYBR gold使其显现。使用密度测定来计算跳读和未跳读的扩增子的相对量,并将外显子跳读以外显子51跳读的扩增子除以存在的扩增子总量的比确定:

$$[0250] \quad \% \text{外显子跳读} = \frac{\text{跳读扩增子}}{(\text{跳读扩增子} + \text{未跳读扩增子})} * 100$$

[0251] 结果表明,在患者肌管中,与同一DMD外显子51跳读寡核苷酸(未与抗体共价连接)相比,缀合物引起外显子跳读增强(图1)。这表明抗TfR1 Fab(例如,具有表2中所示的序列)促进缀合物细胞内化到肌细胞中,这导致肌细胞中外显子51跳读寡核苷酸的活性。类似地,抗TfR1抗体可促进包含与其他外显子跳读寡核苷酸(例如,本文中提供的外显子跳读寡核苷酸,例如外显子51跳读寡核苷酸)共价连接的抗TfR1抗体的缀合物能够内化到肌细胞中,并促进外显子跳读寡核苷酸在肌细胞中的活性。

[0252] 实施例2. 食蟹猴中抗TfR1 Fab-ASO缀合物的体内外显子跳读活性

[0253] 在健康的非人灵长类中体内测试实施例1中描述的抗TfR1寡核苷酸缀合物的外显子跳读活性。在第1天和第8天,通过静脉内输注向原初雄性食蟹猴(每组n=4至5只)施用两剂的载剂、30mg/kg的裸ASO(即,未与抗体共价连接),或122mg/kg与DMD外显子51跳读寡核苷酸共价连接的抗TfR1 Fab(30mg/kg ASO当量)。在施用第一剂之后2周或4周处死动物并收获组织。使用Promega Maxwell<sup>®</sup> RSC仪器从组织样品中收集总RNA,并使用qScript cDNA SuperMix进行cDNA合成。使用终点PCR进行外显子51跳读的评估。

[0254] 将PCR产物的毛细管电泳用于评估外显子跳读,并且使用下式计算外显子51跳读%:

$$[0255] \quad \% \text{外显子跳读} = \frac{\text{跳读带的摩尔浓度}}{\text{跳读带的摩尔浓度} + \text{未跳读带的摩尔浓度}} * 100.$$

[0256] 经计算的外显子51跳读的结果在表4中示出。

[0257] 表4. 食蟹猴DMD中DMD的外显子51的跳读

时间	2周			4周	
组	载剂	单独的ASO <sup>a</sup>	缀合物	单独的ASO <sup>a</sup>	缀合物
缀合物剂量 <sup>b</sup>	0	n/a	122	n/a	122
单独的ASO剂量 <sup>c</sup>	0	30	30	30	30
四头肌 <sup>d</sup>	0.00 (0.00)	1.216 (1.083)	4.906 (3.131)	0.840 (1.169)	1.708 (1.395)
膈肌 <sup>d</sup>	0.00 (0.00)	1.891 (2.911)	7.315 (1.532)	0.717 (1.315)	9.225 (4.696)
心脏 <sup>d</sup>	0.00 (0.00)	0.043 (0.096)	3.42 (1.192)	0.00 (0.00)	4.525 (1.400)
二头肌 <sup>d</sup>	0.00 (0.00)	0.607 (0.615)	3.129 (0.912)	1.214 (1.441)	4.863 (3.881)
胫骨前肌 <sup>d</sup>	0.00 (0.00)	0.699 (0.997)	1.042 (0.685)	0.384 (0.615)	0.816 (0.915)
腓肠肌 <sup>d</sup>	0.00 (0.00)	0.388 (0.573)	2.424 (2.329)	0.00 (0.00)	5.393 (2.695)

[0258]

[0259] <sup>a</sup>ASO=反义寡核苷酸。

[0260] <sup>b</sup>缀合物剂量作为mg/kg的抗TfR1 Fab-ASO缀合物列出。

[0261] <sup>c</sup>ASO剂量作为mg/kg抗TfR1 Fab-ASO剂量的ASO当量列出。

[0262] <sup>d</sup>外显子跳读值是外显子51跳读的平均%，其中括号中为标准偏差(n=5)。

[0263] 还使用杂交ELISA利用与ASO序列互补的探针对组织ASO累积进行定量。生成标准曲线并从该标准曲线的线性回归推导出ASO水平(以ng/g计)。与施用未缀合(未与抗体共价连接)的ASO相比,在施用抗TfR1 Fab-ASO缀合物之后,ASO以更高水平分布到所有评价的组织。在施用第一剂之后2周和4周,在所有评价的组织中,静脉内施用未缀合的ASO导致ASO水平接近背景水平。缀合物的施用导致在第一次给药之后2周,ASO以以下排列顺序分布在评价的组织中:心脏>膈肌>二头肌>四头肌>腓肠肌>胫骨前肌。还评估了组织浓度的持续时间。在给药之后4周,在所有组织中均可检测到ASO水平(表5)。这表明表2中所示的抗TfR1 Fab使得缀合物能够在体内细胞内化到肌细胞中,这导致肌细胞中外显子跳读寡核苷酸的活性。

[0264] 表5. 食蟹猴中DMD外显子51跳读ASO的组织分布

时间	2周			4周	
组	载剂	单独的ASO <sup>a</sup>	缀合物	单独的ASO <sup>a</sup>	缀合物
缀合物剂量 <sup>b</sup>	0	n/a	122	n/a	122
单独的ASO剂量 <sup>c</sup>	0	30	30	30	30
四头肌 <sup>d</sup>	0 (59.05)	696.8 (868.15)	2436 (954.0)	197 (134)	682 (281)
膈肌 <sup>d</sup>	0± (144.3)	580.02 (360.11)	6750 (2256)	60 (120)	3131 (1618)
心脏 <sup>d</sup>	0 (396.03)	1449 (1337)	27138 (6315)	943 (1803)	30410 (9247)
二头肌 <sup>d</sup>	0 (69.58)	615.63 (335.17)	2840 (980.31)	130 (80)	1326 (623)
胫骨前肌 <sup>d</sup>	0 (76.31)	564.71 (327.88)	1591 (253.50)	169 (110)	1087 (514)
腓肠肌 <sup>d</sup>	0 (41.15)	705.47 (863.75)	2096 (474.04)	170 (69)	1265 (272)

[0265]

[0266] <sup>a</sup>ASO=反义寡核苷酸。[0267] <sup>b</sup>缀合物剂量作为mg/kg的抗TfR1 Fab-ASO缀合物列出。[0268] <sup>c</sup>ASO剂量作为mg/kg的ASO或抗TfR1 Fab-ASO缀合物剂量的ASO当量列出。[0269] <sup>d</sup>ASO值是组织中ASO的平均浓度(以ng/g计),其中括号中为标准偏差(n=5)。

[0270] 实施例3.不同示例性制剂的冻融稳定性测试的比较

[0271] 制备了下列制剂。所述制剂包含抗TfR1 Fab,所述抗TfR1 Fab具有VH和VL序列,如表2中所示,其通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与DMD外显子51跳读ASO共价连接(通过赖氨酸缀合),其中抗TfR1Fab-ASO缀合物在具有500 $\mu$ L填充体积的2mL玻璃瓶中的浓度为25mg/ml。DMD外显子51跳读的ASO是PMO并且包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

[0272] 制剂1:25mM组氨酸,10%蔗糖,pH 6

[0273] 制剂2:25mM组氨酸,10%蔗糖,pH 5.5

[0274] 制剂3:25mM组氨酸,10%蔗糖,pH 6.5

[0275] 制剂4:25mM组氨酸,10%蔗糖,0.02% PS-80,pH 6

[0276] 制剂5:10mM组氨酸,10%蔗糖,pH 6

[0277] 制剂6:50mM组氨酸,10%蔗糖,pH 6

[0278] 制剂7:25mM组氨酸,150mM氯化钠,pH 6

[0279] 制剂8:25mM磷酸盐,150mM氯化钠,pH 7

[0280] 将制剂在-80℃下冷冻,并随后在环境温度(例如,约20℃的室温)下解冻,进行5×F/T(冷冻/解冻)循环,并在分析前在2至8℃下保持3至4小时。

[0281] 制备的制剂缓冲液:将制剂药物物质用适当的制剂缓冲液(具有本文中所述缀合物的制剂)进行缓冲液交换。使用Sartorius Vivaspin过滤器(30kDa MWC0)。在更换5次缓冲液之后,将抗TfR1 Fab-AS0浓缩至25mg/ml。将药品无菌过滤并装载到小瓶中(对于小瓶,使用700μL填充)。将样品制剂在以下时间点:T0(第0周)、T1(第1周)、T2(第2周)、T4(第4周)、T8(第8周)以及在-20℃、2至8℃、25℃和40℃的温度下进行目视观察。

[0282] 在时间点T0、T1、T2、T4和T8,观察到制剂1至6在包括-20℃、2至8℃、25℃和40℃在内的所有温度下均为透明并且无色。观察到制剂7和8在包括-20℃、2至8℃、25℃和40℃的所有温度下均显示出具有乳光和颗粒的沉淀。

[0283] 实施例4. 示例性制剂的热稳定性分析

[0284] 制备了以下制剂。所述制剂包含抗-TfR1 Fab,所述抗-TfR1 Fab具有VH/VL序列,如表2中所示,其通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与DMD外显子51跳读AS0(包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的PMO)共价连接(通过赖氨酸缀合),其中在500μL填充体积的2mL玻璃瓶中,抗-TfR1 Fab-AS0缀合物的浓度为25mg/ml。在该制剂(制剂1)中是:25mM组氨酸,10%蔗糖,pH 6。

[0285] 制备制剂缓冲液:将制剂药物物质(具有本文中所述缀合物的制剂)用适当的制剂缓冲液进行缓冲液交换。使用Sartorius Vivaspin过滤器(30kDa MWC0)。在更换5次缓冲液之后,将抗TfR1 Fab-AS0浓缩至25mg/ml。将药品进行无菌过滤并装载到小瓶中(对于小瓶,使用700μL填充)。接下来,对上述实施例4中描述的制剂(“制剂1”)的热稳定性进行分析。该分析示出了在T0(第0周)和T8(第8周)的特定时间点以及特定温度下抗TfR1 Fab-AS0缀合物的缀合物浓度。参见图2。使用标准BCA(二喹啉甲酸(Bicinchoninic Acid),BCA)分析来测量蛋白质缀合物浓度。使用标准程序进行BCA测定:

[0286] 1) 制备工作试剂(Working Reagent,WR)。微板程序中的每个样品需要100μL WR。通过以50:1(BCA试剂A:BCA试剂B)彻底混合来制备WR。完整的96孔板需要10mL WR试剂。因此,将10mL试剂A与200μL试剂B组合,并确保缓冲液处于RT,并在混合后的90分钟内使用。建议使用新鲜制备的工作溶液。

[0287] 2) 为未知样品制备标准曲线和稀释曲线。将10μL标准或未知样品添加至200μL WR,并在60℃下孵育10分钟。将其添加至板的第一行,并在随后的列中以100μL:100μL进行连续稀释,96孔透明板:标准品:已知Fab:15G11(11mg/mL)。通过对每个点进行1:1稀释来制备8点标准曲线和未知样品稀释曲线。

[0288] 3) 孵育5分钟。

[0289] 4) 在读板仪上在480nm处测量吸光度。

[0290] 5) 使用标准曲线确定每个未知样品的蛋白质浓度(测量6次稀释)。

[0291] 在制剂1中,在不同容器中观察到缀合物的浓度略有降低(具有600μL填充体积的2mL玻璃瓶称为“小瓶”;具有1mL填充体积的塑料Flexboy袋称为“flex”),这表明该制剂在指定温度下和指定容器中的总体稳定性。与温度为-20℃和2至8℃的玻璃瓶相比,在第0周(T0)至第8周(T8)的时间点,观察到塑料Flexboy袋中的制剂的缀合物浓度降低更少。然而,

观察到在40°C下的玻璃瓶中的制剂1在时间点8(T8)的缀合物浓度没有降低。

[0292] 实施例5.对容器类型的物质黏附的分析

[0293] 进行了一项研究,以分析制剂黏附造成的物质损失,以评估对多种塑料的可能黏附,其包含示例性抗TfR1 Fab,所述TfR1 Fab具有VH/VL序列,如表2中所示,其通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与DMD外显子51跳读AS0(包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列的PMO)共价连接(通过赖氨酸缀合)。实施例3中描述的在制剂1(25mM组氨酸,10%蔗糖缓冲液(pH 6))中配制的该TfR1 Fab-AS0缀合物显示出较少的物质损失。该研究如下进行:以25mg/mL重复实施例3的先前研究;将制剂添加到塑料中,并进行1次冷冻/解冻(F/T)循环(在-80°C下冷冻过夜,在2至8°C下解冻4小时);并通过标准测试进行分析,包括目测、BCA、SEC-HPLC(SEC)。如上所讨论,在-80°C下进行一次冻融循环之后,测量制剂1中缀合物的浓度。如实施例4中所公开的,使用标准BCA(二喹啉甲酸)分析来测量蛋白质缀合物浓度。

[0294] SEC-HPLC分析方法如下:

[0295] • HPLC系统Thermo Ultimate-3000UHPLC系统

[0296] • 样品浓度:1mg/mL(用HPLC级水稀释);注射体积:10 $\mu$ L

[0297] • 缓冲液:100mM磷酸钠,100mM NaCl,15%乙腈,pH 7.0

[0298] • 运行:Isocratic,0.25mL/分钟,20分钟

[0299] • 柱温箱温度:环境。柱:Waters AQUITY UPLC Protein BEH SEC柱200 $\text{\AA}$ ,1.7 $\mu$ m,4.6 $\times$ 300mm(P/N:186005226)

[0300] • 波长:280nm和260nm样品以一式两份注入,报告平均值。

[0301] 使用25mM组氨酸、10%蔗糖、pH 6.0制剂的缀合物对不同塑料容器类型(乙烯乙酸乙烯酯(ethylene vinyl acetate,EVA)塑料、聚碳酸酯(polycarbonates,PC)塑料、高密度聚乙烯(High Density Poly Ethylene,HDPE)塑料)的强稳定性和缺乏的表面黏附性在图3和4中得到集中表明。图3和4显示了良好的稳定性和缺乏的表面黏附性,这通过与玻璃容器的较低浓度的缀合物相比,塑料容器类型的制剂1中的缀合物浓度更高来表明。图4显示,通过SEC分析,所有样品中的HPLC峰组成没有显著变化,所述样品包括具有10mg/mL玻璃标准的样品(将约10mg/mL的FDC缀合物储存在玻璃中,并使其经历一次冻融循环(从运输时冷冻并保持在2至8°C))以及玻璃或特定塑料中的25mg/mL的样品(在旋转过滤器中浓缩的25mg/mL缀合物,然后将其添加至指定的塑料或玻璃,并经历一次F/T循环)。

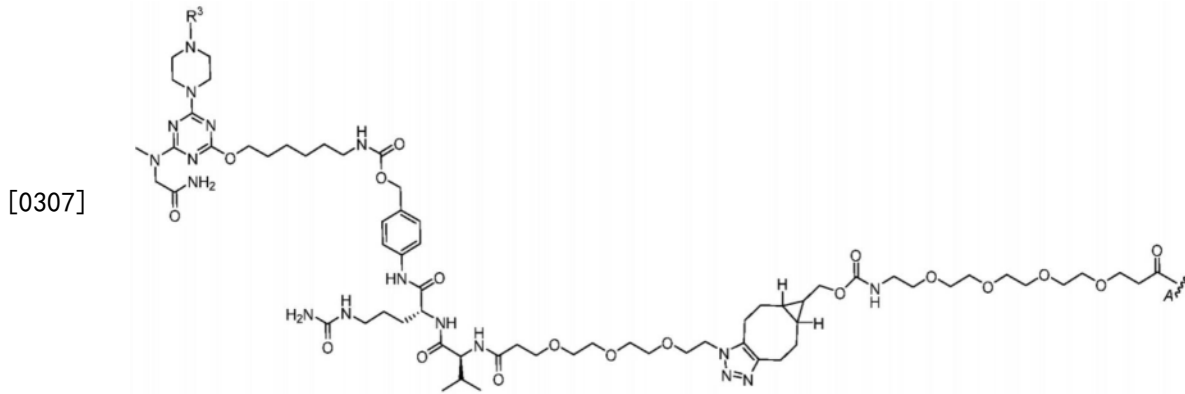
[0302] 图4的结果表明制剂1的良好稳定性。

[0303] 另外的实施方案

[0304] 1.包含复合物的制剂,所述复合物包含与抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体共价连接的磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO),其中所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3),并且其中所述复合物与组氨酸和蔗糖配制在一起。

[0305] 2.包含式 $[R^1]_{n1}-R^2$ 的复合物的制剂,其中

[0306] 每个 $R^1$ 独立地包含下式的基团:



[0308] R<sup>2</sup>包含抗体,并且

[0309] R<sup>3</sup>是磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO);

[0310] 其中R<sup>1</sup>在连接点A处与R<sup>2</sup>共价连接;并且

[0311] 其中n1是1或更大的整数,其表示R<sup>1</sup>的个数,其中每个R<sup>1</sup>与抗体的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸;

[0312] 其中所述复合物与组氨酸和蔗糖配制在一起,

[0313] 任选地,其中所述抗体是抗TfR1抗体,并且任选地其中所述制剂中复合物的n1的平均值为1至5。

[0314] 3.实施方案2所述的制剂,其中所述抗体包含:

[0315] 含有SEQ ID NO:1、7或12中所示序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示序列的重链互补决定区3(CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

[0316] 4.实施方案1至3中任一项所述的制剂,其中所述制剂为冻干形式。

[0317] 5.实施方案1至3中任一项所述的制剂,其中所述制剂为水溶液。

[0318] 6.实施方案5所述的制剂,其中所述组氨酸以10mM至50mM的浓度存在于所述水溶液中。

[0319] 7.实施方案5或6所述的制剂,其中所述蔗糖以5%至15%重量/体积(w/v%)的浓度存在于所述水溶液中。

[0320] 8.实施方案5至7中任一项所述的制剂,其中所述水溶液的pH为5.0至7.0。

[0321] 9.实施方案5至8中任一项所述的制剂,其中所述组氨酸以25mM的浓度存在于所述水溶液中,和/或所述蔗糖以10w/v%的浓度存在于所述水溶液中,和/或所述水溶液的pH为6.0。

[0322] 10.实施方案1至9中任一项所述的制剂,其中所述抗体是Fab片段、全长IgG、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、scFv或Fv。

[0323] 11.实施方案10所述的制剂,其中所述抗体是Fab片段。

[0324] 12.实施方案1至11中任一项所述的制剂,其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH);和/或其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL),任选地其中所述抗体包含

含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

[0325] 13.实施方案1至12中任一项所述的制剂,其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链;和/或其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链,任选地其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0326] 14.实施方案1至13中任一项所述的制剂,其中PMO包含长度为15至35个核苷酸的核苷酸序列。

[0327] 15.实施方案1至14中任一项所述的制剂,其中PMO包含具有针对SEQ ID NO:23、针对SEQ ID NO:24或针对SEQ ID NO:22的至少8个连续核苷酸长的互补区的核苷酸序列。

[0328] 16.实施方案1至15中任一项所述的制剂,其中PMO包含SEQ ID NO:21中所示核苷酸序列的至少8个连续核苷酸,任选地其中PMO包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

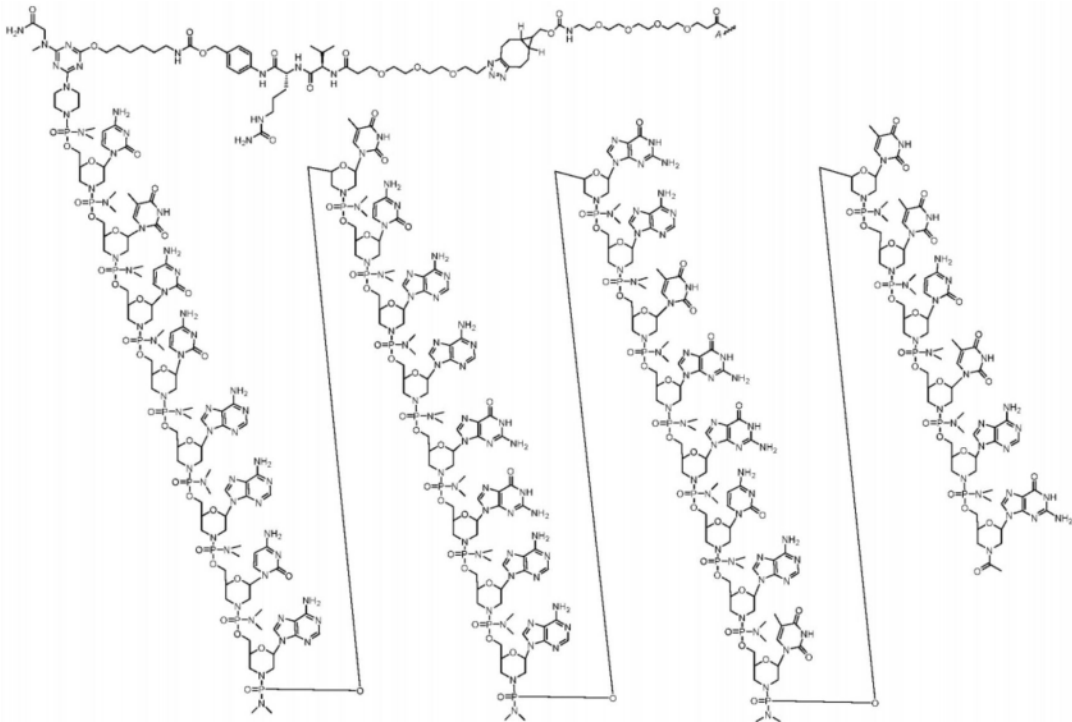
[0329] 17.实施方案2至16中任一项所述的制剂,其中每个 $R^1$ 包含下式:



[0331] 其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置, $R^1$ 在连接点A处与 $R^2$ 共价连接;其中-p反映磷酸二酰胺键连,其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得PMO具有CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG(SEQ ID NO:21)的核碱基序列。

[0332] 18.实施方案2至16中任一项所述的制剂,其中每个 $R^1$ 包含下式:

[0333]



[0334] 19. 实施方案1至18中任一项所述的制剂,其中所述复合物以10mg/mL至50mg/mL的浓度存在于所述制剂中。

[0335] 20. 促进对象中肌养蛋白的表达或活性的方法,所述方法包括向对象施用实施方案1至19中任一项所述的制剂。

[0336] 21. 实施方案20所述的方法,其中所述肌养蛋白是截短的肌养蛋白。

[0337] 22. 治疗具有与迪谢内肌营养不良相关的突变DMD等位基因的对象的方法,所述方法包括向对象施用实施方案1至19中任一项所述的制剂。

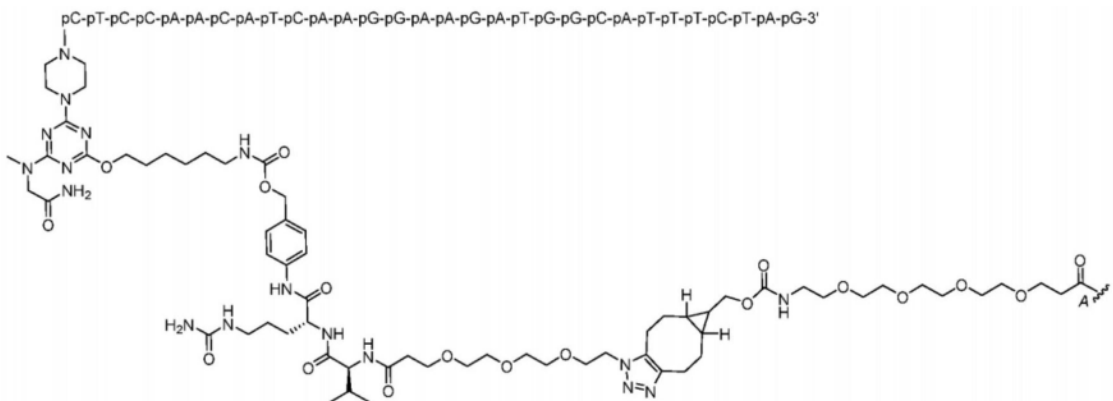
[0338] 23. 实施方案22所述的方法,其中所述突变的DMD等位基因包含适合于外显子51跳读的突变。

[0339] 24. 实施方案22或实施方案23所述的方法,其中所述突变的DMD等位基因包含外显子51中的移码突变。

[0340] 25. 包含式 $[R^1]_{n1}-R^2$ 结构的复合物,其中

[0341] 每个 $R^1$ 包含下式的基团:

[0342]

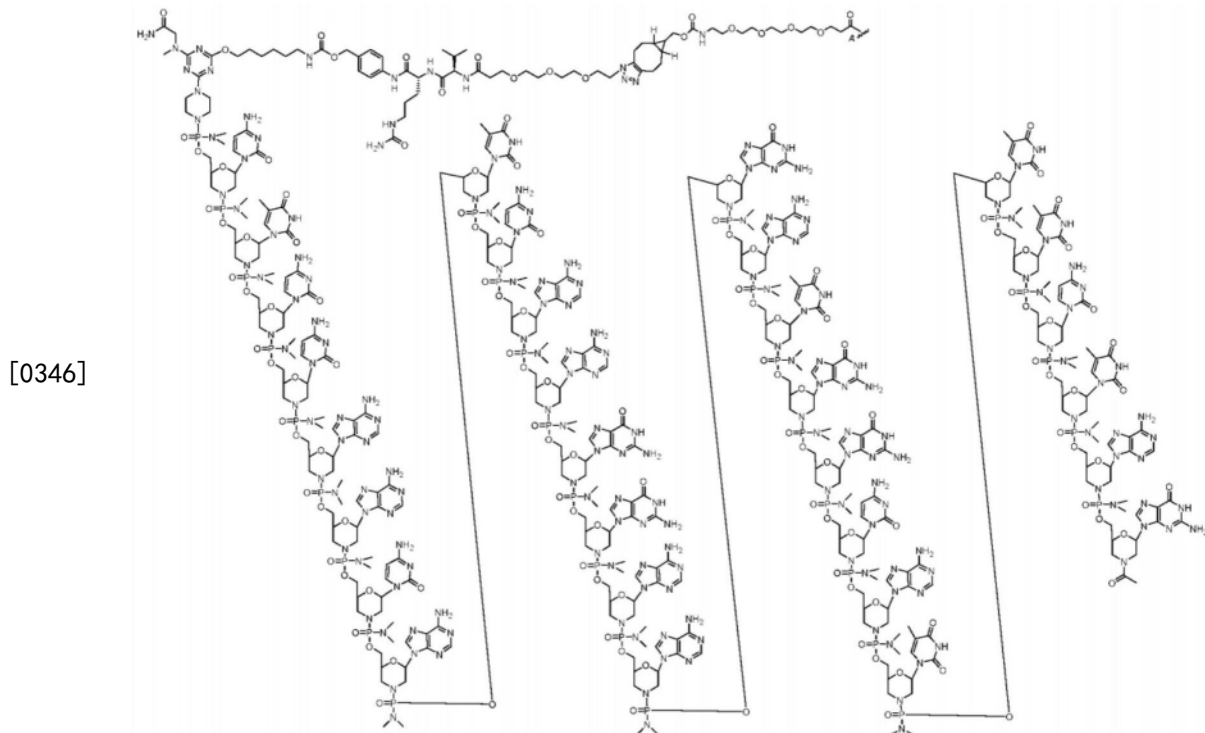


[0343] 其中 $R^2$ 包含Fab,并且其中Fab包含选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、

CDR-L2和CDR-L3,任选地其中Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,还任选地其中所述Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链,其中-pN表示磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)的碱基位置,其中-p反映磷酸二酰胺键连,并且其中N对应于腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T)的核碱基,使得所述寡核苷酸PMO具有CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG(SEQ ID NO:21)的核碱基序列;其中R<sup>1</sup>在连接点A处与R<sup>2</sup>共价连接;其中n1是一或更大的整数,其表示R<sup>1</sup>的个数,其中每个R<sup>1</sup>与Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

[0344] 26. 包含式[R<sup>1</sup>]<sub>n1</sub>-R<sup>2</sup>结构的复合物,其中

[0345] R<sup>1</sup>包含下式基团:



[0347] 其中R<sup>2</sup>包含Fab,所述Fab包含选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,任选地其中R<sup>2</sup>包含Fab,所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,还任选地其中R<sup>2</sup>包含Fab,所述Fab包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链;其中R<sup>1</sup>在连接点A处与R<sup>2</sup>共价连接;其中n1是一或更大的整数,其表示R<sup>1</sup>的个数,其中每个R<sup>1</sup>与Fab的不同氨基酸残基共价连接,任选地其中每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。

[0348] 27. 制剂,其包含实施方案25或实施方案26所述的多种复合物、浓度为25mM的组氨酸和浓度为10w/v%的蔗糖,其中所述制剂为水溶液并且pH为6.0。

[0349] 28. 实施方案27所述的制剂的冻干形式。

[0350] 29. 产品,其通过包括对实施方案27所述的制剂进行冻干的方法来产生。

[0351] 30. 实施方案27所述的制剂的冷冻形式。

[0352] 31. 产品,其通过包括对实施方案27所述的制剂进行冻干的方法来产生。

[0353] 等同方案和术语

[0354] 本文中举例说明性地描述的公开内容可在不存在本文中未具体公开的任何一个或更多个要素、一个或更多个限制的情况下适当地实践。因此,例如,在本文中的每种情况下,术语“包含/包括”、“基本上由.....组成”和“由.....组成”中的任一个可用其他两个术语中的任一个替换。已采用的术语和表达作为描述而非限制的术语使用,并且使用这样的术语和表达不旨在排除所示出和所描述的特征的任何等同形式或其一部分,而是应认识到,在所公开内容的范围内可进行多种修改。因此,应理解,尽管已通过一些优选的实施方案、任选的特征具体公开了本公开内容,但是本领域技术人员可获取本文中所公开概念的修改和变化,并且这样的修改和变化被认为是在本公开内容的范围内。

[0355] 另外,在根据马库什组 (Markush group) 或其他替代组描述本公开内容的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本公开内容也因此以马库什组或其他组的任何个体成员或成员亚组的方式描述。

[0356] 应理解,在一些实施方案中,在描述寡核苷酸或其他核酸的结构时可参考序列表中所示的序列。在这样的实施方案中,实际的寡核苷酸或其他核酸与指定序列相比可具有一个或更多个替代核苷酸(例如,DNA核苷酸的RNA对应物或RNA核苷酸的DNA对应物)和/或者(例如,和)一个或更多个经修饰核苷酸和/或者(例如,和)一个或更多个经修饰核苷酸间键连和/或者(例如,和)一个或更多个其他修饰,同时保留与指定序列基本相同或相似的互补特性。

[0357] 除非在本文中另外指明或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(尤其是在所附权利要求的上下文中)使用没有数量词修饰的名词将被解释为一个/种或更多个/种。除非另有说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”将被解释为开放式术语(即,意指“包括但不限于”)。除非本文中另外指明,否则本文中值范围的记载仅旨在用作分别指代落入该范围内的每个单独值的速记方法,并且每个单独值均被并入说明书中,如同其在本文中被单独记载一样。除非在本文中另外指明或在其他情况下与上下文明显矛盾,否则本文中所述的所有方法均可以以任何合适的顺序进行。除非另有说明,否则本文中提供的任何和所有实例或示例性语言(如“例如”)的使用仅仅旨在更好地说明本发明,并且不对本发明的范围构成限制。说明书中的语言均不应被解释为表示对本发明的实践必要的任何未要求保护的要素。

[0358] 本文中描述了本发明的一些实施方案。在阅读前述说明之后,那些实施实施方案的变化方案对于本领域普通技术人员可变得明显。

[0359] 本发明人预期技术人员在适当时采用这样的变化方案,并且本发明人希望以除本文中具体描述的之外的方式实践本发明。因此,如适用法律所允许的,本发明包括在此所附权利要求中记载的主题的所有修改方案和等同方案。此外,除非在本文中另外指明或在其他情况下与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖其所有可能变化方案中的上述要素的任何组合。本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文中所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案旨在由所附权利要求书涵盖。

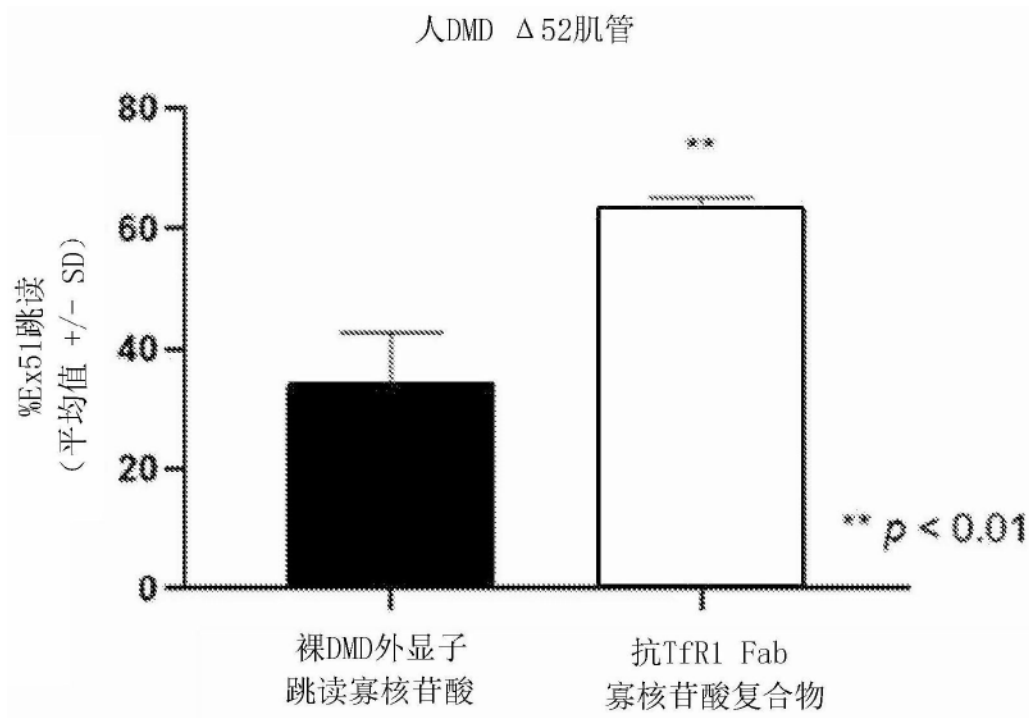


图1

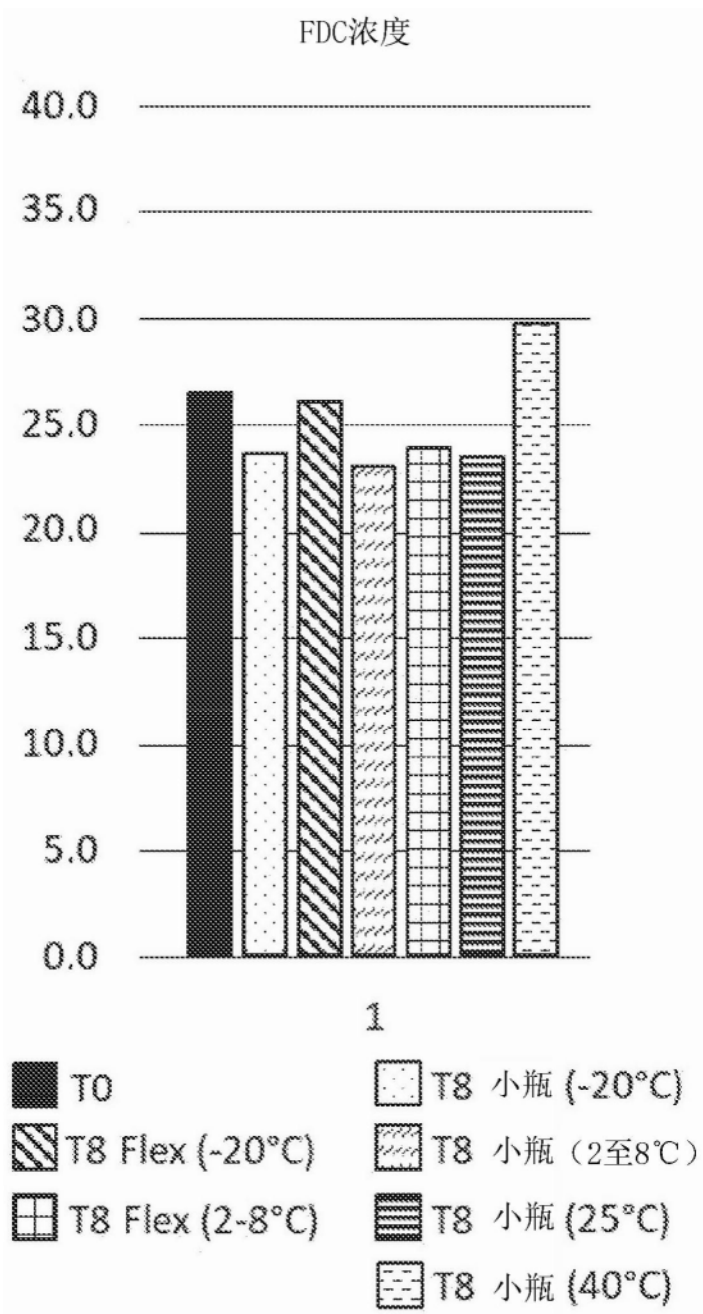
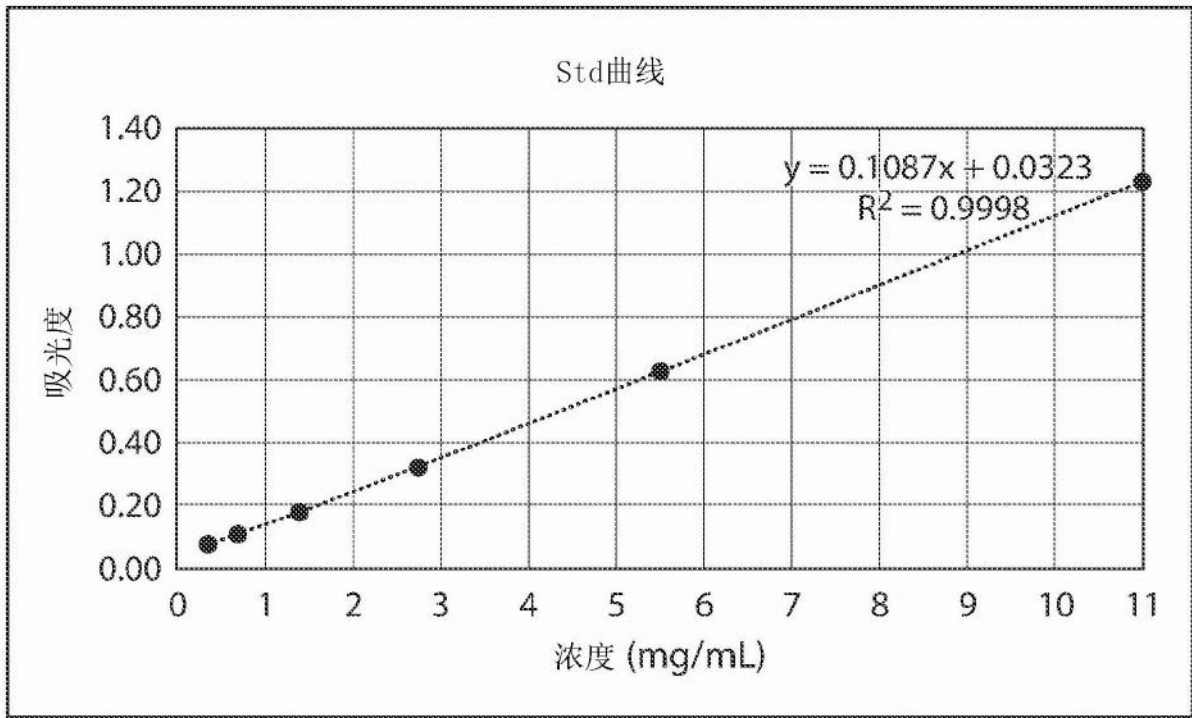


图2



物质	浓度 (mg/mL)
玻璃	21.7
EVA	23.3
PC	22.4
HDPE	22.6

图3

注射名称	% HMWS 1	% 二聚体	% 总 HMWS	% 峰 1	% 峰 2	% 峰 3	% LMWS	% 游离寡核苷酸
10 mg/mL 玻璃标准	n.a.	7.8	7.8	26	40	23.8	1.2	1.1
25 mg/mL 玻璃	n.a.	7.8	7.9	25.9	40.1	23.8	1.2	1.1
25 mg/mL EVA	n.a.	7.8	7.9	26	40.1	23.8	1.2	1.1
25 mg/mL HDPE	n.a.	7.8	7.8	26.1	39.9	23.9	1.2	1.1
25 mg/mL PC	n.a.	7.8	7.9	26.1	39.9	23.8	1.2	1.1

图4