(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119183457 A
(43)申请公布日 2024.12.24

(21)申请号 202380040194.5

(22)申请日 2023.04.14

(30)优先权数据
63/331,727 2022.04.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/065753 2023.04.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/201318 EN 2023.10.19

(71)申请人 达因疗法公司
地址 美国

(72)发明人 斯科特·希尔德布兰德
蒂莫西·威登 约翰·纳吉姆
斯特凡诺·扎诺蒂
罗梅什·R·苏布拉马尼亚
穆罕默德·T·卡塔纳尼
科迪·A·德雅尔丹 基姆·唐
布伦丹·奎因

(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 韩晓帆

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 47/66(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)

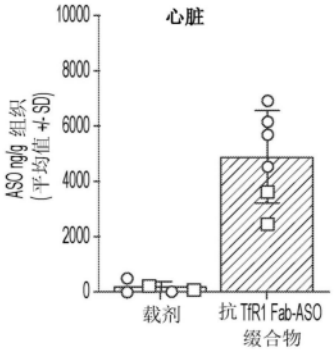
权利要求书3页 说明书66页 附图14页

(54)发明名称

用于治疗强直性肌营养不良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)共价连接的寡核苷酸(例如,可用于靶向DMPK)。



CN 119183457 A

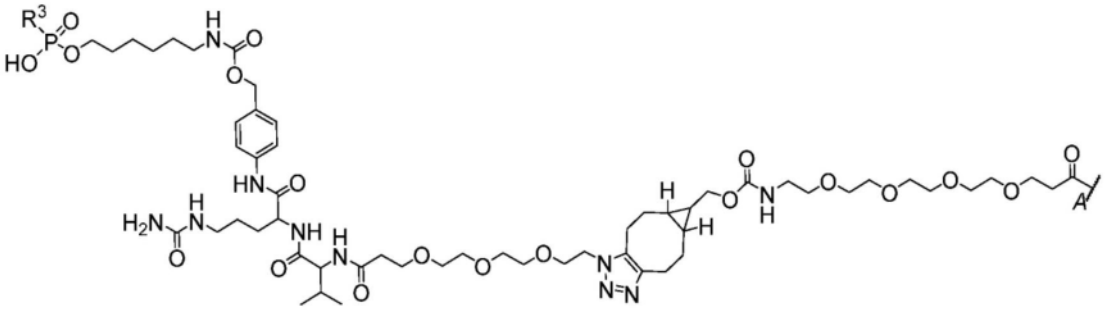
1.包含复合物的制剂,所述复合物包含与抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体共价连接的寡核苷酸,

其中所述抗TfR1抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2),以及含有SEQ ID NO:6或16中所示的序列的轻链互补决定区3(CDR-L3),

其中所述寡核苷酸包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z是包含一个或更多个经修饰核苷的侧翼区,并且Y是包含一个或更多个2'-脱氧核糖核苷的间隔区,

并且其中所述复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖配制在一起。

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



(Ia),其中

R^2包含抗体,并且

R^3包含寡核苷酸,所述寡核苷酸包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z是包含一个或更多个经修饰核苷的侧翼区,并且Y是包含一个或更多个2'-脱氧核糖核苷的间隔区,

其中R^1在连接点A处与R^2共价连接;并且

其中n1是整数,其表示R^1的实例数,其中R^1的每个实例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;

其中所述复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖配制在一起,

任选地,其中所述抗体是抗TfR1抗体。

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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示的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或冷冻固体形式。

5.权利要求1至3中任一项所述的制剂,其中所述制剂为水溶液。

6.权利要求5所述的制剂,其中所述三(羟甲基)氨基甲烷以5mM至50mM的浓度存在于所述水溶液中。

7.权利要求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。

8.权利要求5至7中任一项所述的制剂,其中所述水溶液的pH为6.5至8.5。

9.权利要求5至8中任一项所述的制剂,其中所述三(羟甲基)氨基甲烷以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7.5。

10.权利要求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、$F(ab')_2$片段、scFv或Fv。

11.权利要求10所述的制剂,其中所述抗体是Fab片段。

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: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/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

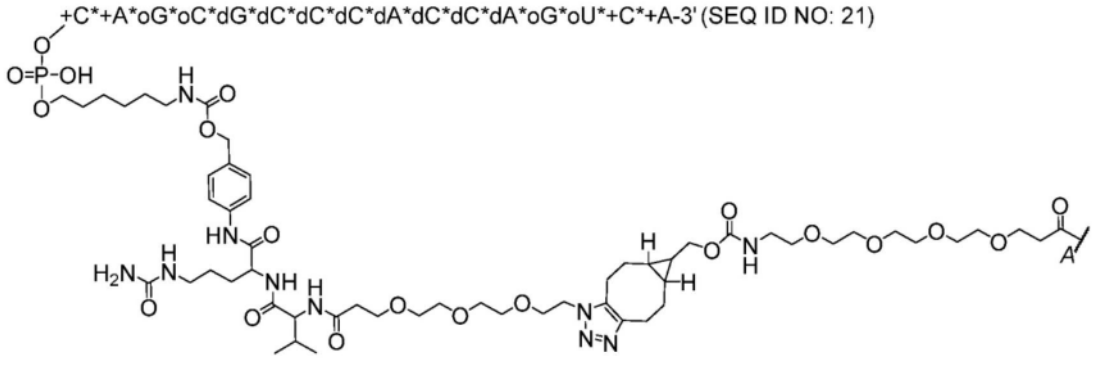
13.权利要求1至12中任一项所述的制剂,其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:19具有至少85％同一性的氨基酸序列的重链;和/或其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:20具有至少85％同一性的氨基酸序列的轻链,

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/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

14.权利要求1至13中任一项所述的制剂,其中所述寡核苷酸的长度为10至30个核苷酸,任选地其中所述寡核苷酸包含具有针对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,其中所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列的至少8个连续核苷酸,任选地其中所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

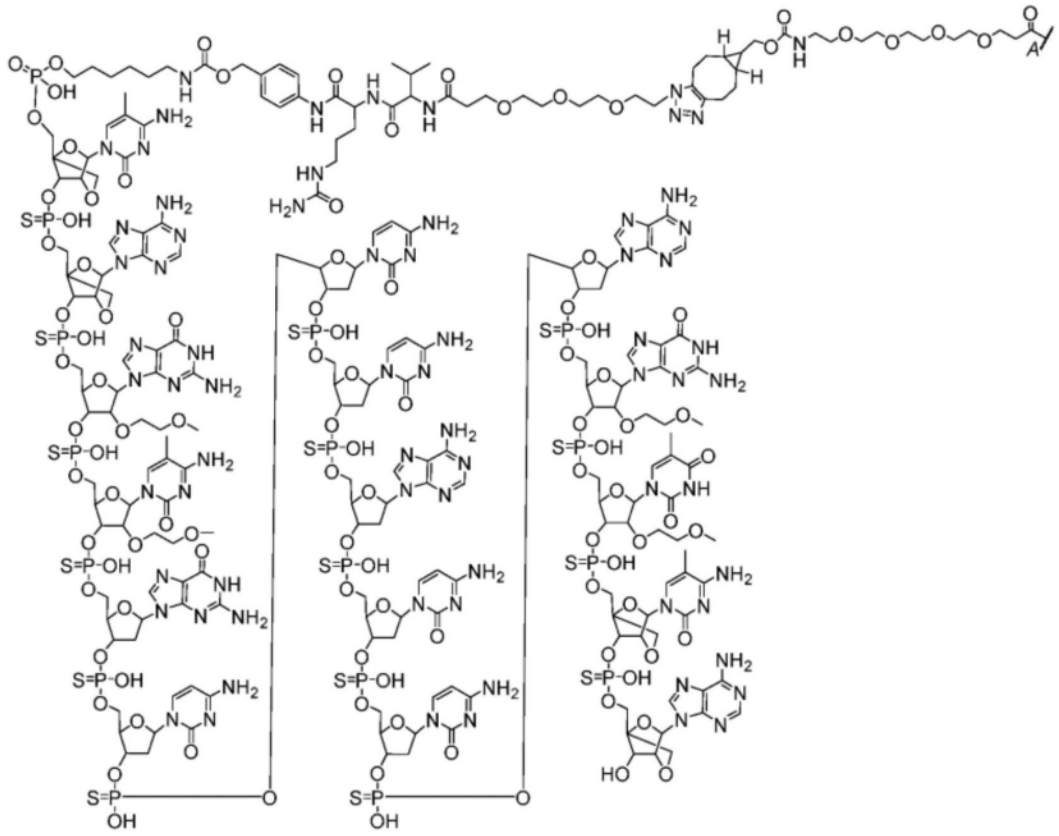
16.权利要求2至15中任一项所述的制剂,其中每个R^1包含下式(Ib)的基团:



(Ib),

其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联,使得所述寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列。

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



(Ic)

18.权利要求5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.权利要求1至18中任一项所述的制剂,其还包含一种或更多种未与寡核苷酸共价连接的抗体。

20.权利要求19所述的制剂,其中所述制剂中复合物的n1的平均值为0.5至5。

21.在对象中降低DMPK表达和/或治疗强直性肌营养不良的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的权利要求1至20中任一项所述的制剂。

22.权利要求21所述的方法,其中所述对象具有与强直性肌营养不良相关的DMPK等位基因疾病相关性重复的扩增,任选地其中所述疾病相关性重复包含CTG三核苷酸序列的重复单元。

23.权利要求21或权利要求22所述的方法,其中所述复合物在所述对象中降低DMPK表达。

用于治疗强直性肌营养不良的肌肉靶向复合物和制剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求以下提交日期的权益:2022年4月15日提交的标题为“MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND FORMULATIONS FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY”的美国临时申请No.63/331,727;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、以及它们的用途,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(D082470076WO00-SEQ-COB.xml;大小:58,346字节;以及创建日期:2023年3月22日)的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0006] 强直性肌营养不良(myotonic dystrophy,DM)是显性遗传的遗传疾病,其特征在于肌强直、肌肉损失或变性、肌肉功能减弱、胰岛素抵抗、心律不齐、平滑肌功能障碍和神经系统异常。DM是成人发病的肌营养不良的最常见形式,全世界发病率为全世界8000人中约1人。已经描述了该疾病的两种类型,即1型强直性肌营养不良(myotonic dystrophy type 1,DM1)和2型强直性肌营养不良(myotonic dystrophy type 2,DM2)。DM1是该疾病的更常见形式,其由19号染色体上DMPK的3’非编码区中CTG三核苷酸重复的重复扩增引起;DM2是由3号染色体上ZNF9的第一内含子中CCTG四核苷酸重复的重复扩增引起。在DM1患者中,可包含大于约50至约3,000或更多的总重复的CTG三核苷酸重复的重复扩增导致产生有毒的RNA重复,所述有毒的RNA重复能够形成以高亲和力结合必需的胞内蛋白(例如肌盲样蛋白(muscleblind-like protein))的发夹结构,从而导致蛋白质隔离(protein sequestration)和疾病特征性的功能丧失表型。除了支持性护理和用于解决疾病症状的治疗之外,目前尚无可用于DM1的有效治疗剂。

[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。

[0008] 根据一些方面,本文中提供的制剂包含复合物,所述复合物包含与抗转铁蛋白受体1(anti-transferrin receptor 1,TfR1)抗体共价连接的寡核苷酸,

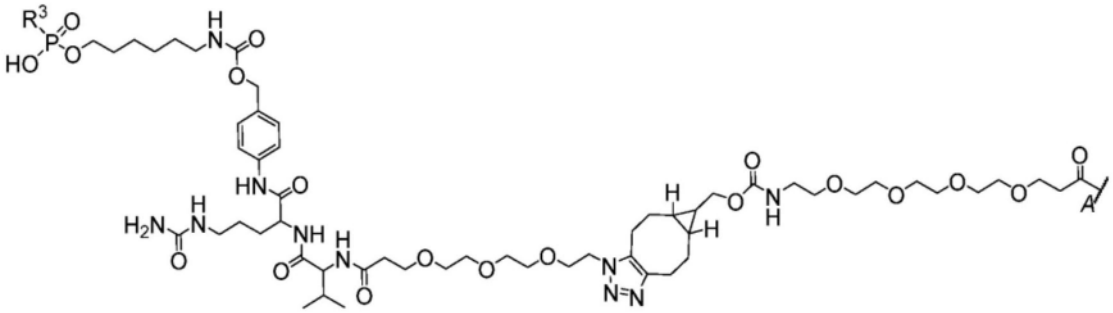
[0009] 其中所述抗TfR1抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示的序列的重链互补决定区1(heavy chain complementarity determining region 1,CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(heavy chain complementarity determining region 2,CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(heavy chain complementarity determining region 3,CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的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中所示的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中所示的序

列的轻链互补决定区3(light chain complementarity determining region 3,CDR-L3),

[0010] 其中所述寡核苷酸包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z是包含一个或更多个经修饰核苷的侧翼区,并且Y是包含一个或更多个2'-脱氧核糖核苷的间隔区,

[0011] 并且其中所述复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖配制在一起。

[0012] 根据一些方面,本文中提供的制剂包含复合物,所述复合物包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构,其中每个R^1独立地包含下式(Ia)的基团:

[0013] 

[0014] (Ia),其中

[0015] R^2包含抗体,并且

[0016] R^3包含寡核苷酸,所述寡核苷酸包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z是包含一个或更多个经修饰核苷的侧翼区,并且Y是包含一个或更多个2'-脱氧核糖核苷的间隔区,

[0017] 其中R^1在连接点A处与R^2共价连接;并且

[0018] 其中n1是整数,其表示R^1的实例数,其中R^1的每个实例与抗体的不同氨基酸残基共价连接;

[0019] 其中复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖配制在一起。在一些实施方案中,抗体的每个不同的氨基酸残基是赖氨酸。在一些实施方案中,所述抗体是抗TfR1抗体。

[0020] 在一些实施方案中,所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示的序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

[0021] 在一些实施方案中,制剂为冻干形式或冷冻固体形式。

[0022] 在一些实施方案中,制剂为水溶液。

[0023] 在一些实施方案中,三(羟甲基)氨基甲烷以5mM至50mM的浓度存在于水溶液中。

[0024] 在一些实施方案中,蔗糖以5%至15%重量/体积(w/v%)的浓度存在于所述水溶液中。

[0025] 在一些实施方案中,水溶液的pH为6.5至8.5。

[0026] 在一些实施方案中,三(羟甲基)氨基甲烷以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7.5。

[0027] 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。

[0028] 在一些实施方案中,抗体是Fab片段。

[0029] 在一些实施方案中,抗体包含含有与SEQ ID NO:17具有至少85%同一性的氨基酸

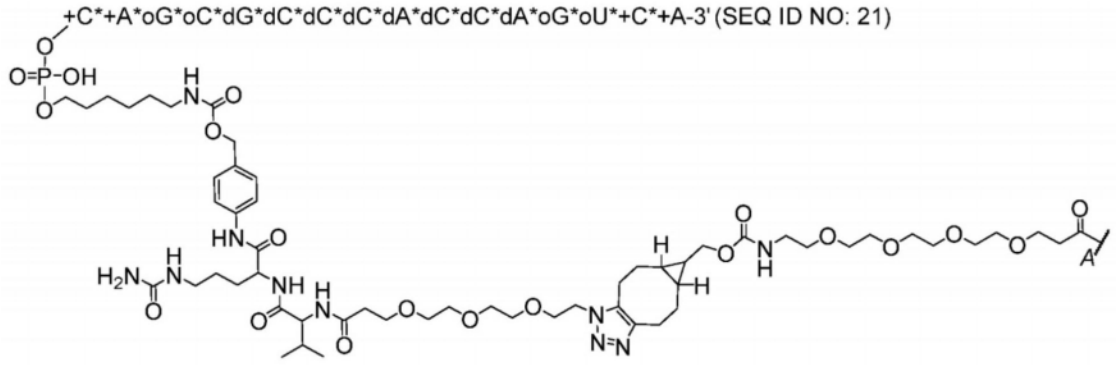
序列的重链可变区(VH);和/或其中所述抗体包含含有与SEQ ID NO:18具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

[0030] 在一些实施方案中,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。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。

[0031] 在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为10至30个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含具有针对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。

[0032] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列的至少8个连续核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

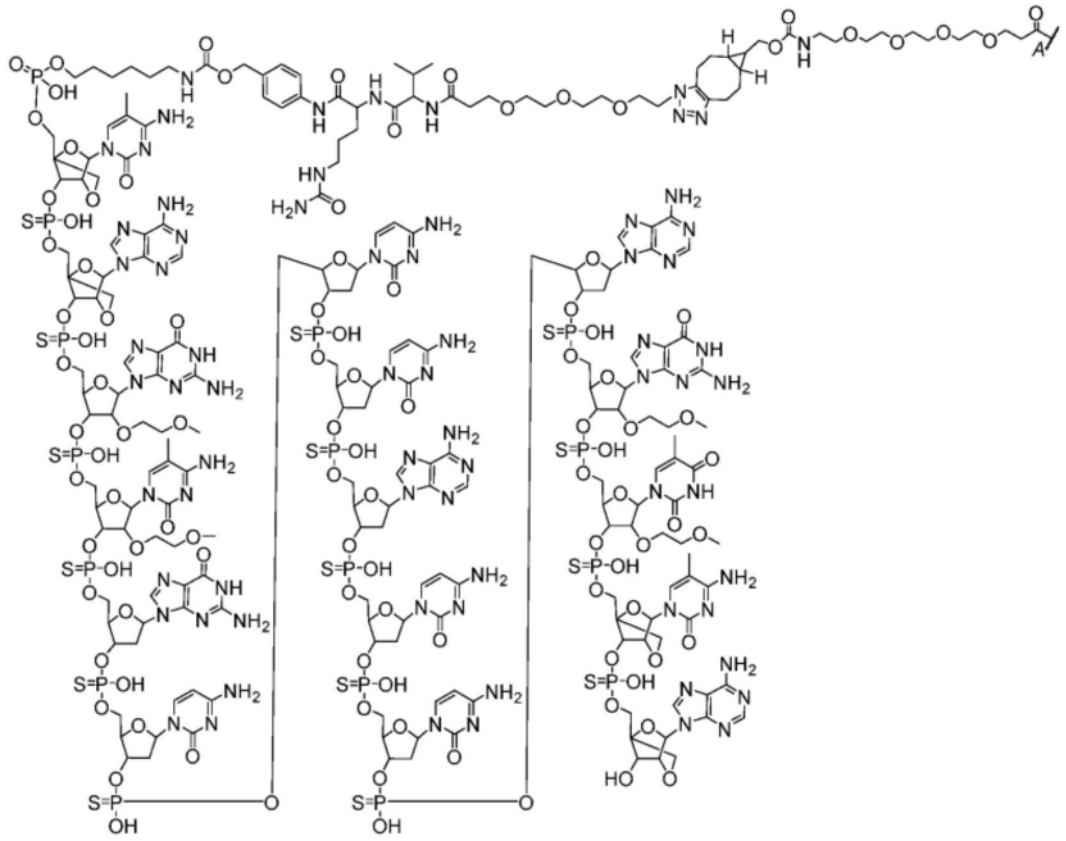
[0033] 在一些实施方案中,每个R^1包含下式(Ib)的基团:

[0034] 

(Ib),

[0035] 其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联,使得所述寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列。

[0036] 在一些实施方案中,每个R^1包含下式(Ic)的基团:

[0037] 

(Ic)

。

[0038] 在一些实施方案中,复合物以10mg/mL至50mg/mL的浓度存在于制剂中。

[0039] 在一些实施方案中,制剂还包含一种或更多种未与寡核苷酸共价连接的抗体。

[0040] 在一些实施方案中,制剂中复合物的n1的平均值为0.5至5。

[0041] 根据一些方面,本文中提供了在对象中降低DMPK表达和/或治疗强直性肌营养不良的方法,所述方法包括向对象施用有效量的本文中提供的制剂。

[0042] 在一些实施方案中,对象具有与强直性肌营养不良相关的DMPK等位基因疾病相关性重复的扩增。在一些实施方案中,疾病相关性重复包含CTG三核苷酸序列的重复单元。

[0043] 在一些实施方案中,复合物在所述对象中降低DMPK表达。

附图说明

[0044] 图1A至1D示出了在施用含有与ASO共价连接的抗TfR1 Fab的缀合物之后,分别在心脏(图1A)、膈肌(图1B)、腓肠肌(图1C)或胫骨前肌(图1D)中的DMPK靶向寡核苷酸(ASO)的量。

[0045] 图2A至2D示出了含有与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)缀合的抗TfR1 Fab的缀合物在小鼠的心脏(图2A)、膈肌(图2B)、胫骨前肌(图2C)和腓肠肌(图2D)中敲低人DMPK RNA的能力,所述小鼠表达人TfR1和两个拷贝的含有扩增的CTG重复的突变体人DMPK转基因二者。

[0046] 图3A至3B示出了在表达人TfR1和两个拷贝的含有扩增的CTG重复的突变体人DMPK转基因二者以及用与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)缀合的抗TfR1 Fab进行处理的小鼠中的心肌纤维的核中减少的DMPK病灶。图3A示出了在以下之后的样品的代表性图像:针对DMPK病灶

的原位杂交染色和肌纤维的荧光染色(插图)。在图3A中示出的显微术图像中,浅色圆形显示细胞核,并且核内的明亮斑点显示DMPK病灶。图3B示出了对DMPK病灶的量化。

[0047] 图4示出了包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1Fab的缀合物在小鼠(hTfR1/DMSXL小鼠)心脏中的剪接校正活性,所述小鼠表达人TfR1和两个拷贝的含有扩增的CTG重复的突变体人DMPK转基因二者。示出了针对用载剂对照处理的对照小鼠("hTfR1-PBS")、用载剂对照处理的hTfR1/DMSXL小鼠("hTfR1/DMSXL-PBS")和用抗TfR1Fab-ASO缀合物处理的hTfR1/DMSXL小鼠("hTfR1/DMSXL-缀合物")的基于Ldb3外显子11、Mbnl2外显子6和Nfix外显子7的剪接的复合剪接指数。

[0048] 图5示出了包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1Fab的缀合物在小鼠(hTfR1/DMSXL小鼠)膈肌中的剪接校正活性,所述小鼠表达人TfR1和两个拷贝的含有扩增的CTG重复的突变体人DMPK转基因二者。示出了针对用载剂对照处理的对照小鼠("hTfR1-PBS")、用载剂对照处理的hTfR1/DMSXL小鼠("hTfR1/DMSXL-PBS")和用抗TfR1Fab-ASO缀合物处理的hTfR1/DMSXL小鼠("hTfR1/DMSXL-缀合物")的基于Bin1外显子11、Insr外显子11、Ldb3外显子11和Nfix外显子7剪接的复合剪接指数。

[0049] 图6示出了包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1Fab的缀合物在小鼠(hTfR1/DMSXL小鼠)胫骨前肌中的剪接校正活性,所述小鼠表达人TfR1和两个拷贝的含有扩增的CTG重复的突变体人DMPK转基因二者。示出了针对用载剂对照处理的对照小鼠("hTfR1-PBS")、用载剂对照处理的hTfR1/DMSXL小鼠("hTfR1/DMSXL-PBS")和用抗TfR1Fab-ASO缀合物处理的hTfR1/DMSXL小鼠("hTfR1/DMSXL-缀合物")的基于Bin1外显子11、Ldb3外显子11、Mbnl2外显子6和Nfix外显子7剪接的复合剪接指数。

[0050] 图7示出了包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1Fab的缀合物在小鼠(hTfR1/DMSXL小鼠)腓肠肌中的剪接校正活性,所述小鼠表达人TfR1和两个拷贝的含有扩增的CTG重复的突变体人DMPK转基因二者。示出了针对用载剂对照处理的对照小鼠("hTfR1-PBS")、用载剂对照处理的hTfR1/DMSXL小鼠("hTfR1/DMSXL-PBS")和用抗TfR1Fab-ASO缀合物处理的hTfR1/DMSXL小鼠("hTfR1/DMSXL-缀合物")的基于Mbnl2外显子6、Nfix外显子7和Ttn外显子313剪接的复合剪接指数。

[0051] 图8示出了在DM1患者肌管和野生型非人灵长类(non-human primate,NHP)肌管中的DMPK敲低,其由与包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1 Fab的缀合物一起孵育产生。示出的结果针对仅用载剂处理的DM1患者肌管或NHP肌管中的表达进行了归一化。数据示出了每个条件下n=4次重复的平均值+标准偏差。通过单因素ANOVA计算数据(*,P<0.05,**,P<0.01)

[0052] 图9示出了抗TfR1 Fab-ASO缀合物的冻干制剂的x射线衍射(x-ray diffraction,XRD)图。

[0053] 图10A至10C示出了在重构之后,在2至8℃下,在0周(T0)、4周(T4w)和8周(T8w)时,从抗TfR1 Fab-ASO缀合物的冻干制剂的吸光度数据中计算出的蛋白质浓度。图10A示出了缀合物的Fab浓度,以mg/ml计。图10B示出了缀合物的Fab浓度,以μM计。图10C示出了缀合物的寡核苷酸浓度,以μM计。

[0054] 图11A至11B示出了在重构之后,在2至8℃下,在T0、T4w和T8w时,抗TfR1 Fab-ASO缀合物的冻干制剂的平均回收百分比(average percent recovery)(图11A)和药物抗体比

(DAR;图11B)。

[0055] 图12A至12C示出了在重构之后,在25℃下,在0周(T0)、2周(T2w)、4周(T4w)和8周(T8w)时,从抗TfR1 Fab-ASO缀合物的冻干制剂的吸光度数据中计算出的蛋白质浓度。图12A示出了缀合物的Fab浓度,以mg/ml计。图12B示出了缀合物的Fab浓度,以μM计。图12C示出了缀合物的寡核苷酸浓度,以μM计。

[0056] 图13A至13B示出了在重构之后,在25℃下,在T0、T2w、T4w和T8w时,抗TfR1 Fab-ASO缀合物的冻干制剂的平均回收百分比(图13A)和药物抗体比(DAR;图13B)。

[0057] 图14A至14C示出了在重构之后,在40℃下,在T0、T2w、T4w和T8w时,从抗TfR1 Fab-ASO缀合物的冻干制剂的吸光度数据中计算出的蛋白质浓度。图14A示出了缀合物的Fab浓度,以mg/ml计。图14B示出了缀合物的Fab浓度,以μM计。图14C示出了缀合物的寡核苷酸浓度,以μM计。

[0058] 图15A至15B示出了在重构之后,在40℃下,在T0、T2w、T4w和T8w时,冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物的平均回收百分比(图15A)和药物抗体比(DAR;图15B)。

[0059] 图16A至16B示出了在重构之后,在2至8℃下,在T0、T4w和T8w时,使用尺寸排阻色谱(size exclusion chromatography,SEC)测量的冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物的峰1和2(图16A)以及峰3和4(图16B)的相对面积的总和。

[0060] 图17A至17B示出了在重构之后,在25℃下,在T0、T2w、T4w和T8w时,使用尺寸排阻色谱(SEC)测量的冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物的峰1和2(图17A)以及峰3和4(图17B)的相对面积的总和。

[0061] 图18A至18B示出了在重构之后,在40℃下,在T0、T2w、T4w、T8w时,使用尺寸排阻色谱(SEC)测量的冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物的峰1和2(图18A)以及峰3和4(图18B)的相对面积的总和。

[0062] 图19示出了在重构之后,在2至8℃下,在T0、T4w和T8w时,使用毛细管电泳(capillary electrophoresis,CE-SDS)测量的冻干的抗TfR1Fab-ASO缀合物的主峰的纯度百分比。

[0063] 图20示出了在重构之后,在25℃下,在T0、T2w、T4w和T8w时,使用CE-SDS测量的冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物的主峰的纯度百分比。

[0064] 图21示出了在重构之后,在40℃下,在T0、T2w、T4w和T8w时,使用CE-SDS测量的冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物的主峰的纯度百分比。

具体实施方式

[0065] 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,复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖配制在一起。在一些实施方案中,复合物被配制成水性或冻干(例如,冻干粉末)形式。在一些实施方案中,复合物包含与抗体共价连接的寡核苷酸(例如,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)。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)抗体共价连接的寡核苷酸(例如,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)。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中提供的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体共价连接的寡核苷酸(例如,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)。还提供了使用本文中所述复合物和制

剂用于治疗患有强直性肌营养不良(例如,DM1)的对象的方法和/或在细胞中降低DMPK(例如,DMPK RNA)的表达或活性的方法。

[0066] 以下提供了本公开内容的另外的方面,包括对限定术语的描述。

[0067] 定义

[0068] 施用:本文中使用的术语“施用”或其变化形式意指以生理和/或(例如,和)药理学上可用的方式向对象提供复合物(例如,以在对象中治疗病症)。

[0069] 大约:本文中使用的术语“大约”或“约”当应用于一个或更多个目的值时,是指与陈述的参考值类似的值。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明显看出(除非这样的数字超过可能值的100%)。

[0070] 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、$F(ab')_2$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(α)、delta(Δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)或mu(μ)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(α)、delta(Δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)或mu(μ)重链。在一个具体实施方案中,本文中所述的抗体包含人γ1CH1、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(γ)重链恒定区的氨基酸序列,例如本领域已知的任何。人恒定区序列的一些非限制性实例已在本领域中有所描述,例如,参见美国专利No.5,693,780和Kabat E Aet 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链的寡糖或支链的聚糖。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.USA90:6444-6448;Poljak,R.J.,et al.(1994)Structure2:1121-1123)。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)。

[0071] 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区可进一步细分成高变区,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,从氨基端至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)contact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,

[0072] Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of

[0073] 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.etal.,Nucleic Acids Res.,28:219-221(2000);Lefranc,M.-P.,Nucleic Acids Res.,29:207-209

[0074] (2001);Leffanc,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);Leffanc,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;和Almagro,J.Mol.Recognit.17:132-143(2004).

[0075] 还参见hgmp.mrc.ac.uk和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)所确定的。

[0076] 重链和轻链的每个可变区中有三个CDR,对于每个可变区称为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。通过Kabat描述的系统(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)和(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可以被称为Kabat CDR。CDR的子部分可以被命名为L1、L2和L3或H1、H2和H3,其中“L”和“H”分别命名轻链和重链区域。这些区域可以称为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边界定义可并不严格遵循上述系统之一,但仍将与Kabat CDR重叠,尽管可以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。本文中使用的方法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。

[0077] 表1.CDR定义

	IMGT[1]	Kabat[2]	Chothia[3]
CDR-H1	27-38	31-35	26-32
CDR-H2	56-65	50-65	53-55

[0078]

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

[1] IMGT®, the international

[0079] ImMunoGeneTics informationsystem®,imgt.org,Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,27:209-212(1999)

[0080] [2]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

[0081] [3]Chothia et al.,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))

[0082] 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的术语。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,并且通用碱基例如3-硝基吡咯或5-硝基吲哚可与任何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。

[0083] 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。

[0084] 疾病相关性重复:本文中使用的术语“疾病相关性重复”是指在一定基因组位置处的重复核苷酸序列,其中重复核苷酸序列的单元数目与遗传疾病相关和/或者(例如,和)直接或间接促成或造成遗传疾病。疾病相关性重复的每个重复单元的长度可以是2、3、4、5或更多个核苷酸。例如,在一些实施方案中,疾病相关性重复是二核苷酸重复。在一些实施方案中,疾病相关性重复是三核苷酸重复。在一些实施方案中,疾病相关性重复是四核苷酸重复。在一些实施方案中,疾病相关性重复是五核苷酸重复。在一些实施方案中,疾病相关性重复包含CAG重复、CTG重复、CUG重复、CGG重复、CCTG重复、或其任何的互补核苷酸。在一些实施方案中,疾病相关性重复在基因的非编码部分中。然而,在一些实施方案中,疾病相关性重复在基因的编码区中。在一些实施方案中,疾病相关性重复从正常状态扩增到直接或间接促成或造成遗传疾病的长度。在一些实施方案中,疾病相关性重复在RNA(例如,RNA转录物)中。在一些实施方案中,疾病相关性重复在DNA(例如,染色体、质粒)中。在一些实施方案中,疾病相关性重复在生殖细胞的染色体中扩增。在一些实施方案中,疾病相关性重复在体细胞的染色体中扩增。在一些实施方案中,疾病相关性重复扩增到与疾病的先天性发作相关的重复单元数目。在一些实施方案中,疾病相关性重复扩增到与儿童期疾病发作相关的重复单元数目。在一些实施方案中,疾病相关性重复扩增到与成人疾病发作相关的重复单元数目。在DM1中,DMPK基因包含CTG单元的疾病相关性重复。

[0085] DMPK:本文中使用的术语“DMPK”是指编码作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的肌强直蛋白激酶(也称为强直性肌营养不良蛋白激酶或营养不良肌强直蛋白激酶)的基因。这种酶的底物可包括肌细胞生成蛋白(myogenin)、L型钙通道的β亚基和phospholemman。在一些实施方案中,DMPK可以是人基因(Gene ID:1760)、非人灵长类基因(例如,Gene ID:456139、Gene ID:715328、Gene ID:102125829)或啮齿动物基因(例如,Gene ID:13400)。在人中,DMPK的3’非编码、非翻译区中的CTG重复扩增与I型强直性肌营养不良(DM1)相关。另外,已经表征了编码不同的蛋白质异形体(protein isoform)的多个人转录物变体(例如,如以以下GenBank RefSeq登录号进行注释的:NM_001081563.2、NM_004409.4、NM_001081560.2、NM_001081562.2、NM_001288764.1、NM_001288765.1和NM_001288766.1)。

[0086] DMPK等位基因:本文中使用的术语“DMPK等位基因”是指DMPK基因的替代形式(例如,野生型或突变体形式)中的任一种。在一些实施方案中,DMPK等位基因可编码保留其正常和典型功能的野生型肌强直蛋白激酶。在一些实施方案中,DMPK等位基因可包含一个或更多个疾病相关性重复扩增。在一些实施方案中,正常对象具有两个包含5至37个重复单元的DMPK等位基因。在一些实施方案中,患有DM1的对象中CTG重复单元的数目为约50至约3,000或更多,重复数目越高导致疾病的严重程度越高。在一些实施方案中,轻度受影响的DM1对象具有至少一个具有50至150个重复单元的DMPK等位基因。在一些实施方案中,患有典型DM1的对象具有至少一个具有100至1,000个或更多个重复单元的DMPK等位基因。在一些实施方案中,患有先天性发作的DM1的对象可具有至少一个包含多于2,000个重复单元的DMPK等位基因。

[0087] 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来确定,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以及重链的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。本文中使用的FR代表四个子区域之一,并且多个FR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,本领域已知的接受体序列可用于本文中所公开的抗体中。

[0088] 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者通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中,并且特别是在CDR3中。然而,本文中使用的术语“人抗体”不旨在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。

[0089] 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序列被引入到非人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遗传工程化进行人源化来产生,例如在Kasaian et al的PCT公开No.WO 2005/123126A2中所公开的那些。

[0090] 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。

[0091] 强直性肌营养不良(DM):本文中使用的术语“强直性肌营养不良(DM)”是指由DMPK基因或CNBP(ZNF9)基因中的突变引起的遗传疾病,其特征在于肌肉损失、肌肉变弱和肌肉功能。已经描述了该疾病的两种类型,即1型强直性肌营养不良(DM1)和2型强直性肌营养不良(DM2)。DM1与DMPK的3’非编码区中CTG三核苷酸重复的扩增相关。DM2与ZNF9的第一内含子中CCTG四核苷酸重复的扩增相关。在DM1和DM2二者中,核苷酸扩增导致有毒的RNA重复,所述有毒的RNA重复能够形成以高亲和力结合关键的胞内蛋白(例如肌盲样蛋白)的发夹结构。强直性肌营养不良、该疾病的遗传基础和相关症状在本领域中有所描述(参见例如Thornton,C.A.,“Myotonic Dystrophy”Neurol Clin.(2014),32(3):705-719.;和Konieczny et al.“Myotonic dystrophy:candidate small molecule therapeutics”Drug Discovery Today(2017),22:11)。在一些实施方案中,对象出生时患有称为先天性强直性肌营养不良的DM1变异。先天性强直性肌营养不良的症状从出生开始就存在,并且包括

所有肌肉的无力、呼吸问题、畸形足、发育迟缓和智力障碍。DM1与在线人类孟德尔遗传(Online Mendelian Inheritance in Man,OMIM)Entry#160900相关。DM2与OMIM Entry#602668相关。

[0092] 寡核苷酸:本文中使用的术语“寡核苷酸”是指长度长至200个核苷酸的寡聚核酸化合物。寡核苷酸的一些实例包括但不限于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。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或更多个经修饰核苷(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更多个经修饰核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或更多个硫代磷酸酯键联,其可以是Rp或Sp立体化学构象。

[0093] 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。

[0094] 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(binding partner)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。

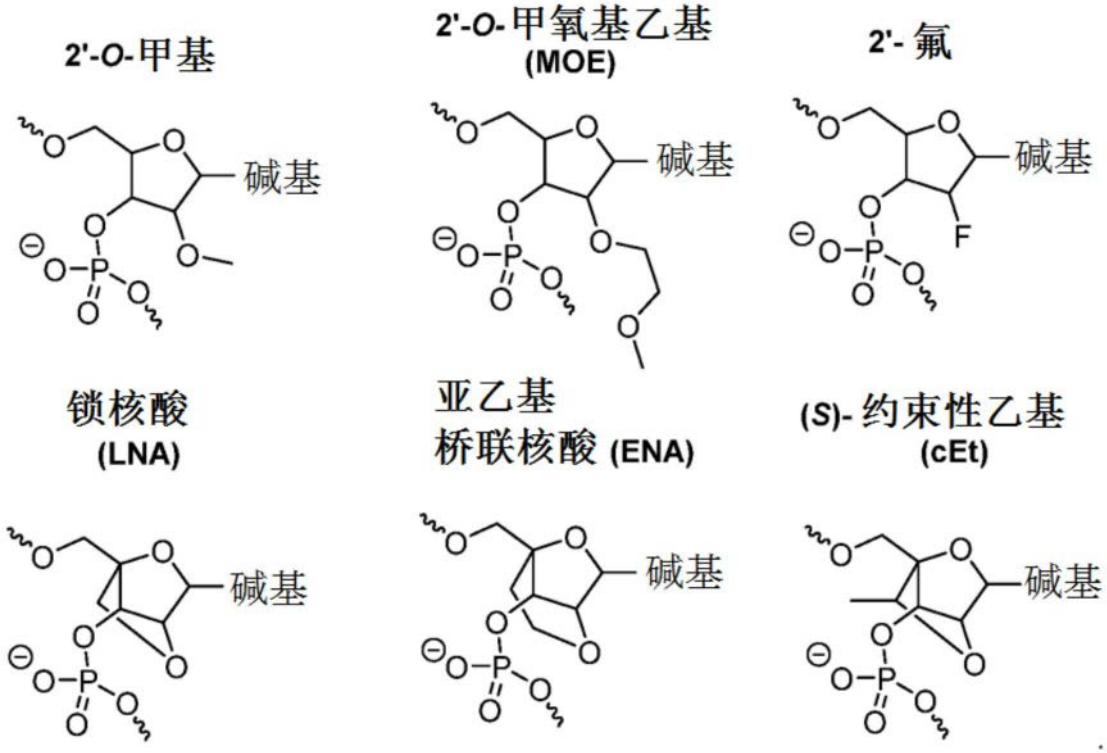
[0095] 对象:本文中使用的术语“对象”是指哺乳动物。在一些实施方案中,对象是非人灵长类或啮齿动物。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是患者,例如患有或怀疑患有疾病的人患者。在一些实施方案中,对象是患有或怀疑患有由疾病相关性重复扩增(例如,在DMPK等位基因中的疾病相关性重复扩增)导致的疾病的人患者。

[0096] 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 Gene ID 7037)、非人灵长类来源的(例如,NCBI Gene ID 711568或NCBI Gene ID 102136007)或啮齿动物来源的(例如,NCBI Gene 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,如以以下GenBank RefSeq登录号注释的:NP_001121620.1、NP_003225.2、NP_001300894.1和NP_001300895.1)。

[0097] 2’-经修饰核苷:本文中使用的术语“2’-经修饰核苷”和“2’-经修饰核糖核苷”可互换使用,并且是指在2’位置处具有经修饰糖部分的核苷。在一些实施方案中,2’-经修饰

核苷是2'-4'双环核苷,其中糖的2'和4'位置是桥联的(例如,通过亚甲基、亚乙基或(S)-约束性乙基桥而桥联)。在一些实施方案中,2'-经修饰核苷是非双环的2'-经修饰核苷,例如,其中糖部分的2'位置被取代。2'-经修饰核苷的一些非限制性实例包括:2'-脱氧、2'-氟(2'-F)、2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)、锁核酸(LNA,亚甲基桥联核酸)、亚乙基桥联核酸(ENA)和(S)-约束性乙基桥联核酸(cEt)。在一些实施方案中,本文中所述的2'-经修饰核苷是高亲和力的经修饰核苷酸和寡核苷酸,其包含相对于未经修饰的寡核苷酸而对靶序列具有提高的亲和力的2'-经修饰核苷。以下提供了2'-经修饰核苷之结构的一些实例:

[0098]



[0099] 这些实例显示带有磷酸基团,但是任何核苷间键联都被考虑在2'-经修饰核苷之间。

[0100] 范围:本公开内容中提供的所有范围都包括端点。

[0101] 复合物

[0102] 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,复合物包含与一个或更多个寡核苷酸共价连接的肌肉靶向抗体。在一些实施方案中,寡核苷酸是靶向DMPK RNA的反义寡核苷酸,用于降低DMPK的表达或活性(例如,降低突变体或野生型DMPK RNA的水平,或DMPK基因产物的活性)。

[0103] 本文中所述的复合物通常包含接头,所述接头将本文中所述的抗体(例如,抗TfR1抗体)与寡核苷酸(例如,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)共价连接。接头包含至少一个共价键。

[0104] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含式(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,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)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独立地为整数(例如,一或更大),其表示每个复合物中R^1的实例数。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独立地包含除寡核苷酸之外还含有另外的要素的基团。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,复合物中的每个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。

[0105] 在一些实施方案中,在每个复合物中,n1独立地为整数(例如,一或更大)。在一些实施方案中,抗体包含如表2中所示的序列。例如,在一些实施方案中,所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含:含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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/或者包含含有与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/或者包含含有与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/或者包含含有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。

[0106] 在一些实施方案中,每个或任何复合物(例如,本文中公开的组合物或制剂中的任一者的任何复合物)的n1的值为多至抗体中期望或靶向缀合的氨基酸残基数目(例如,赖氨酸残基的数目)的整数。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复合物,所述复合物包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构,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0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。在一些实施方案中,在每个复合物类型中,n1独立地为一或更大的整数,其表示复合物类型的每个复合物中R^1的实例数,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)。

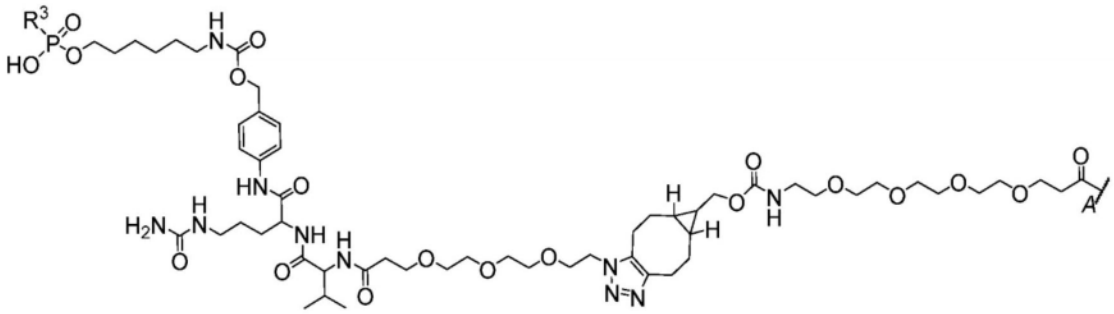
[0107] 在一些实施方案中,提供了包含多个不同的复合物的组合物(例如,如本文中所述

的包含三(羟甲基)氨基甲烷和/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(例如包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸,例如DMPK靶向寡核苷酸)。在这样的实施方案中,不同复合物类型的特征在于具有与抗体共价连接的不同数目的寡核苷酸。例如,在一些实施方案中,提供了包含多个复合物的组合物,所述复合物包含式(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,DMPK靶向寡核苷酸)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实例数的整数,并且其中组合物的不同复合物可具有不同的n1值(例如,n1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0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。在一些实施方案中,本文中所述的组合物还包含其中n1为0的复合物。

[0108] 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)以及与一个或更多个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的结构的化合物,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施用于对象的组合物包含含有式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的化合物(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独立地为零或更大的整数,其反映了每个化合物(例如,复合物)中R^1的实例数。在一些实施方案中,与组合物中n1为1或更大的具有式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的所有化合物相比,组合物中n1为零的包含该结构的化合物的级分小于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的复合物的n1的平均值为0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。

[0109] 在一些实施方案中,复合物中R^1的每个实例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^1共价连接的氨基酸包含ε-氨基(例如,赖氨酸、精氨酸)。然而,在一些实施方案中,与R^1共价连接的氨基酸是半胱氨酸。在一些实施方案中,R^1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^1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。在一些实施方案中,R^1未与存在于抗体的CDR区中的氨基酸残基共价连接。

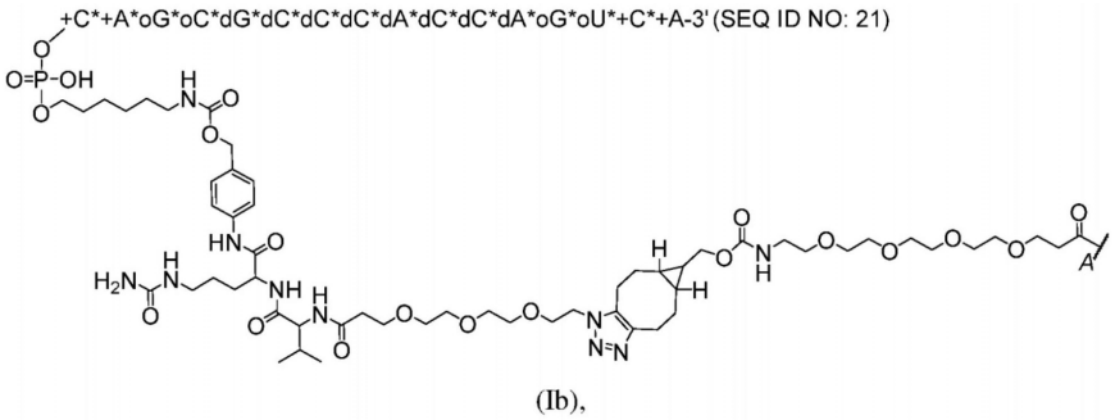
[0110] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物(例如,本文中所述的组合物或制剂中的复合物)包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构,其中R^1的每个实例独立地包含下式(Ia)基团:

[0111] 

(Ia),

[0112] 其中R^3包含寡核苷酸,例如包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸;并且R^1在连接点A处与R^2共价连接(例如间接连接或直接连接,例如直接连接)。在一些实施方案中,R^2包含含有如表2中所示的序列的抗体。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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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^3包含含有CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列的寡核苷酸。在一些实施方案中,R^3包含含有+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU+C*+A(SEQ ID NO:21)的结构的寡核苷酸,其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-MOE修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,以及*表示硫代磷酸酯核苷间键联。

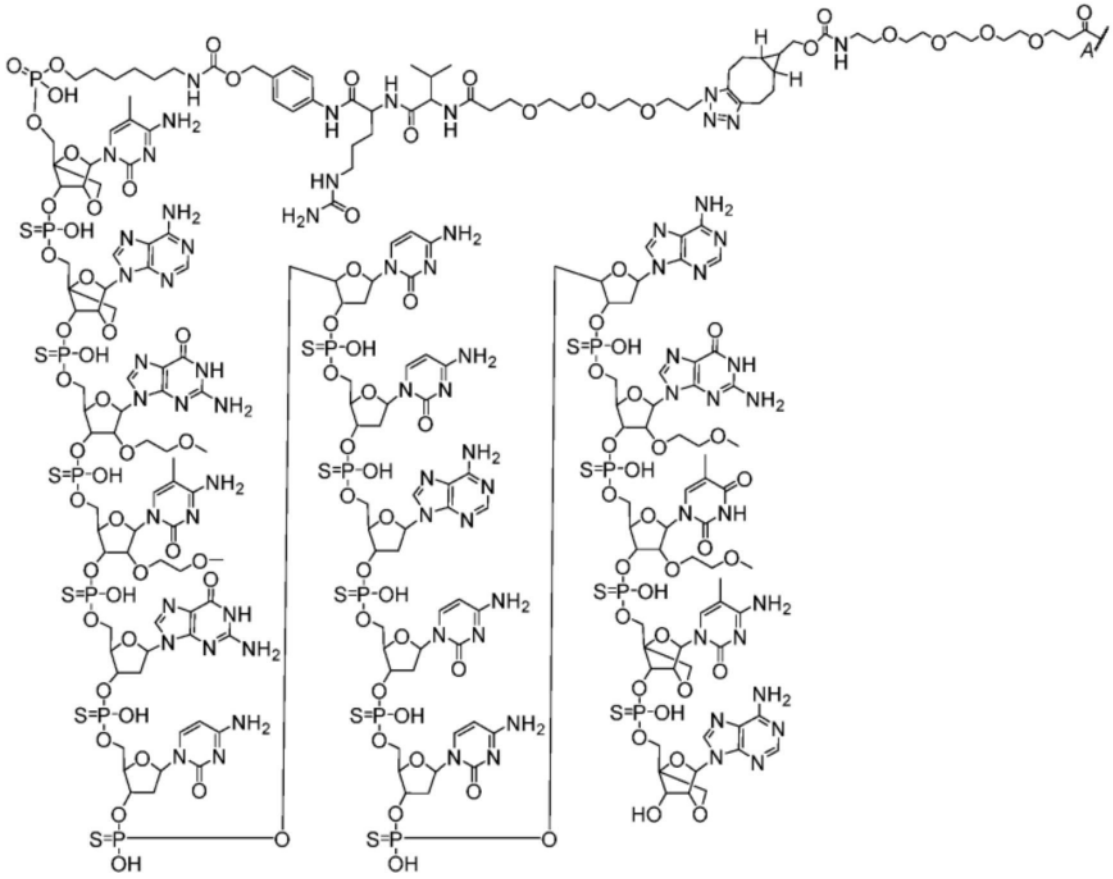
[0113] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物(例如,本文中所述的组合物或制剂中的复合物)包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2结构,其中每个R^1包含下式(Ib)的基团:

[0114] 

(Ib),

[0115] 其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联,并且其中寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列,其中n1是整数(例如一或更大),其表示每个复合物中R^1的实例数,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包含含有如表2中所示的序列的抗体。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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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。

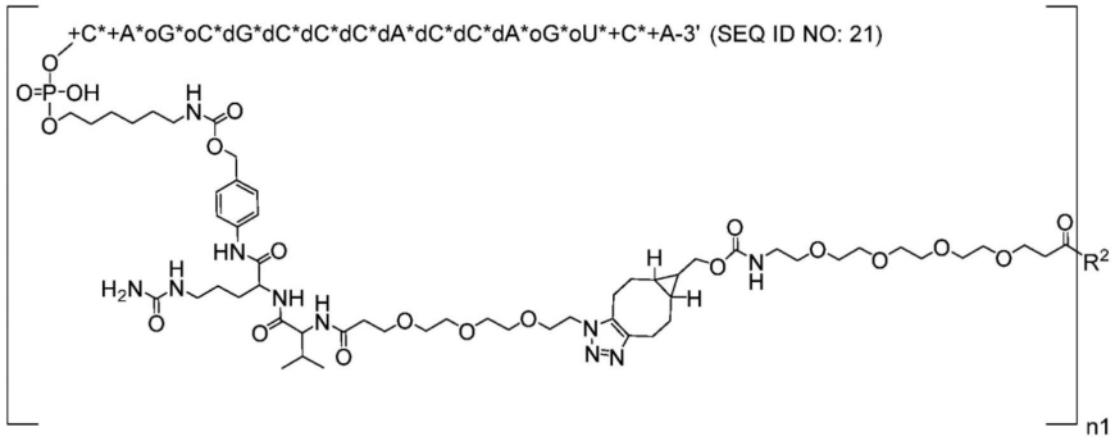
[0116] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物(例如,本文中所述组合物或制剂中的复合物)包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构,其中每个R^1包含下式(Ic)基团:

[0117] 

(Ic),

[0118] 其中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包含含有如表2中所示的序列的抗体。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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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。

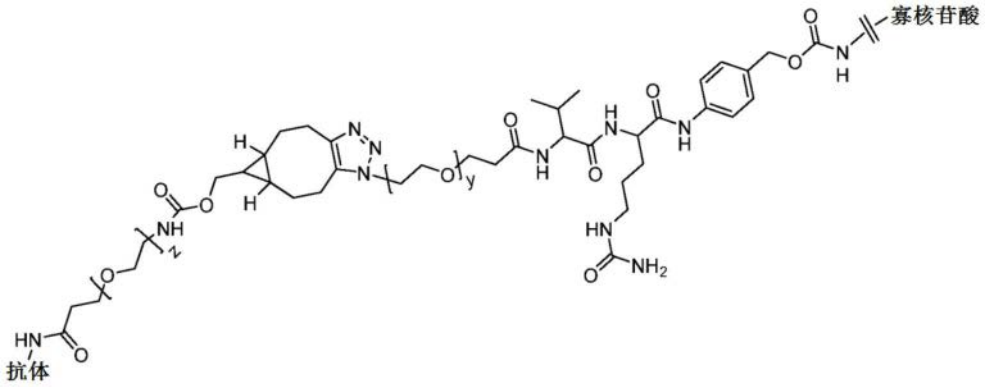
[0119] 在一些实施方案中,本文中提供的复合物(例如,本文中所述的组合物或制剂中的复合物)包含下式(Id)的结构:

[0120] 

(Id),

[0121] 其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联,并且其中寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列;其中R^2包含含有表2中所示序列的抗体;其中n1是整数(例如,一或更大),其表示由方括号包括的基团的实例数,其中每个由方括号包括的基团的实例与抗体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,所述抗体包含含有SEQ ID NO:1、7或12中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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。

[0122] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含式(A)的结构:

[0123] 

[0124] (A),其中y为0至15(例如,3),并且z为0至15(例如,4)。在一些实施方案中,在结构(A)中示出的与抗体(例如,抗TfR1抗体)相邻的酰胺由与抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗体的赖氨酸与寡核苷酸(例如,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)的5'末端共价连接的抗TfR1抗体(例如,抗TfR1 Fab)。在一些实施方案中,抗体包含如表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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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/或者包含含有与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。

[0125] 抗体

[0126] 在一些实施方案中,本文中所述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TfR1氨基酸序列如下:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANV
TKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDF
PAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF

REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTG
KLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKF
PIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGN
[0127] MEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVG
AQRDAWGPGAAKSGVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVG
ATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQ
FLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIE
RIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEM
GLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSP
KESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANAL
SGDVWDIDNEF (SEQ ID NO: 23)

[0128] 表2提供了可用于本文中提供的复合物之抗TfR1抗体的序列的一些实例。

[0129] 表2.抗TfR1抗体序列的一些实例

特征	IMGT	Kabat	Chothia
CDR-H1	GYSITSGYY (SEQ ID NO: 1)	SGYYWN (SEQ ID NO: 7)	GYSITSGY (SEQ ID NO: 12)
CDR-H2	ITFDGAN (SEQ ID NO: 2)	YITFDGANNYNPSLKN (SEQ ID NO: 8)	FDG (SEQ ID NO: 13)
CDR-H3	TRSSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 3)	SSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 9)	SYDYDVLD (SEQ ID NO: 14)
CDR-L1	QDISNF (SEQ ID NO: 4)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO: 10)	SQDISNF (SEQ ID NO: 15)
CDR-L2	YTS (SEQ ID NO: 5)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 11)	YTS (SEQ ID NO: 5)
CDR-L3	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 6)	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 6)	GHTLPY (SEQ ID NO: 16)
VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWI GYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR SSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWYQQKPGQPVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
Fab HC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWI GYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR SSYDYDVLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 19)		

Fab LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWYQQKPGQPVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)

[0130]

[0131] 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)和SEQ ID NO:6的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据IMGT定义系统)。

[0132] 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)和SEQ ID NO:6的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Kabat定义系统)。

[0133] 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)和SEQ ID NO:16的轻链互补决定区3(CDR-L3)(根据Chothia定义系统)。

[0134] 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(VH)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(VL)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)。

[0135] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含VH,所述VH在框架区中包含与包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH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在框架区中包含与包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL具有至少75%(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。

[0136] 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:17的氨基酸序列的VH。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抗体包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

[0137] 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。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。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。

[0138] 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。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,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抗体是包含轻链的Fab,所述轻链包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0139] 在一些实施方案中,本文中提供的抗TfR1抗体可具有一种或更多种翻译后修饰。在一些实施方案中,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N端环化,也称为焦谷氨酸(pyro-Glu)形成。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已经历由翻译后修饰引起的焦谷氨酸形成的抗体。在一些实施方案中,焦谷氨酸形成发生于重链序列中。在一些实施方案中,焦谷氨酸的形成发生于轻链序列中。

[0140] 寡核苷酸

[0141] 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DMPK(例如,用于降低DMPK RNA的表达或活性,例如突变体或野生型DMPK RNA的水平)。在一些实施方案中,可用于靶向DMPK RNA(例如,用于降低DMPK RNA的表达或活性,例如突变体或野生型DMPK RNA的水平)的寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含DMPK RNA的互补区。在一些实施方案中,寡核苷酸可用于降低具有疾病相关性重复扩增的毒性DMPK的水平,例如在患有或怀疑患有强直性肌营养不良的对象中。在一些实施方案中,寡核苷酸被设计成指导RNA酶H介导的位于细胞(例如肌细胞(例如肌管)或神经系统细胞(例如中枢神经系统(central nervous system,CNS)细胞)的核中的靶DMPKRNA的降解。在一些实施方案中,寡核苷酸被设计成具有期望的生物利用度和/或血清稳定性特性。在一些实施方案中,寡核苷酸被设计成具有期望的结合亲和力特性。在一些实施方案中,寡核苷酸被设计成具有期望的毒性特征。在一些实施方案中,寡核苷酸被设计成具有低补体激活和/或细胞因子诱导特性。

[0142] 在一些实施方案中,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸被设计成引起RNA酶H介导的DMPK mRNA的降解。应理解,在一些实施方案中,可通过将功能序列(例如,反义链序列)从一种形式并入另一种形式来使一种形式的寡核苷酸(例如,反义寡核苷酸)适当地适应于另一种形式(例如,siRNA寡核苷酸)。

[0143] 可用于靶向DMPK的寡核苷酸的一些实例在以下中提供:美国专利申请公开20100016215A1,其于2010年1月1日公开,标题为Compound And Method For Treating Myotonic Dystrophy;美国专利申请公开20130237585A1,其于2010年7月19日公开,Modulation OfDystrophia Myotonica-Protein Kinase(DMPK)Expression;美国专利申请公开20150064181A1,其于2015年3月5日公开,标题为“Antisense Conjugates For Decreasing Expression Of Dmpk”;美国专利申请公开20150238627A1,其于2015年8月27日公开,标题为“Peptide-Linked Morpholino Antisense Oligonucleotides For Treatment Of Myotonic Dystrophy”;和美国专利申请公开20160304877A1,其于2016年10

月20日公开,标题为“Compounds And Methods For Modulation Of Dystrophia Myotonica-Protein Kinase(Dmpk)Expression”,其各自的内容以其整体并入本文。

[0144] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含如下所示序列的互补区,所述序列是示例性人DMPK基因序列(基因ID 1760;NM_001081560.2):

[0145]
AGGGGGGCTGGACCAAGGGGTGGGGAGAAGGGGAGGAGGCCTCGGCCGGCCGCA
GAGAGAAGTGGCCAGAGAGGCCCAGGGGACAGCCAGGGACAGGCAGACATGCAG
CCAGGGCTCCAGGGCCTGGACAGGGGCTGCCAGGCCCTGTGACAGGAGGACCCCG
AGCCCCCGGCCCGGGGAGGGGCCATGGTGCTGCCTGTCCAACATGTCAGCCGAGG
TGCGGCTGAGGCGGCTCCAGCAGCTGGTGTTGGACCCGGGCTTCCTGGGGCTGGA
GCCCCTGCTCGACCTTCTCCTGGGCGTCCACCAGGAGCTGGGCGCCTCCGAACTGG
CCCAGGACAAGTACGTGGCCGACTTCTTGCAGTGGGCGGAGCCCATCGTGGTGAG
GCTTAAGGAGGTCCGACTGCAGAGGGACGACTTCGAGATTCTGAAGGTGATCGGA
CGCGGGGCGTTCAGCGAGGTAGCGGTAGTGAAGATGAAGCAGACGGGCCAGGTG
TATGCCATGAAGATCATGAACAAGTGGGACATGCTGAAGAGGGGCGAGGTGTCGT
GCTTCCGTGAGGAGAGGGACGTGTTGGTGAATGGGGACCGGCGGTGGATCACGCA
GCTGCACTTCGCCTTCCAGGATGAGAACTACCTGTACCTGGTCATGGAGTATTACG

[0146]

TGGGCGGGGACCTGCTGACACTGCTGAGCAAGTTTGGGGAGCGGATTCCGGCCGA
GATGGCGCGCTTCTACCTGGCGGAGATTGTCATGGCCATAGACTCGGTGCACCGG
CTTGGCTACGTGCACAGGGACATCAAACCCGACAACATCCTGCTGGACCGCTGTG
GCCACATCCGCCTGGCCGACTTCGGCTCTTGCCTCAAGCTGCGGGCAGATGGAAC
GGTGCGGTCGCTGGTGGCTGTGGGCACCCCAGACTACCTGTCCCCCGAGATCCTGC
AGGCTGTGGGCGGTGGGCCTGGGACAGGCAGCTACGGGCCCGAGTGTGACTGGTG
GGCGCTGGGTGTATTCGCCTATGAAATGTTCTATGGGCAGACGCCCTTCTACGCGG
ATTCCACGGCGGAGACCTATGGCAAGATCGTCCACTACAAGGAGCACCTCTCTCT
GCCGCTGGTGGACGAAGGGGTCCCTGAGGAGGCTCGAGACTTCATTCAGCGGTTG
CTGTGTCCCCCGGAGACACGGCTGGGCCGGGGTGGAGCAGGCGACTTCCGGACAC
ATCCCTTCTTCTTTGGCCTCGACTGGGATGGTCTCCGGGACAGCGTGCCCCCCTTTA
CACCGGATTTCGAAGGTGCCACCGACACATGCAACTTCGACTTGGTGGAGGACGG
GCTCACTGCCATGGAGACACTGTCGGACATTCGGGAAGGTGCGCCGCTAGGGGTC
CACCTGCCTTTTGTGGGCTACTCCTACTCCTGCATGGCCCTCAGGGACAGTGAGGT
CCCAGGCCCCACACCCATGGAACTGGAGGCCGAGCAGCTGCTTGAGCCACACGTG
CAAGCGCCCAGCCTGGAGCCCTCGGTGTCCCCACAGGATGAAACAGCTGAAGTGG
CAGTTCCAGCGGCTGTCCCTGCGGCAGAGGCTGAGGCCGAGGTGACGCTGCGGGA
GCTCCAGGAAGCCCTGGAGGAGGAGGTGCTCACCCGGCAGAGCCTGAGCCGGGA
GATGGAGGCCATCCGCACGGACAACCAGAACTTCGCCAGTCAACTACGCGAGGCA
GAGGCTCGGAACCGGGACCTAGAGGCACACGTCCGGCAGTTGCAGGAGCGGATG
GAGTTGCTGCAGGCAGAGGGAGCCACAGCTGTCACGGGGGTCCCCAGTCCCCGGG
CCACGGATCCACCTTCCCATCTAGATGGCCCCCCGGCCGTGGCTGTGGGCCAGTGC
CCGCTGGTGGGGCCAGGCCCCATGCACCGCCGCCACCTGCTGCTCCCTGCCAGGGT
CCCTAGGCCTGGCCTATCGGAGGCGCTTTCCCTGCTCCTGTTCGCCGTTGTTCTGTC
TCGTGCCGCCGCCCTGGGCTGCATTGGGTTGGTGGCCCACGCCGGCCAACTCACCG
CAGTCTGGCGCCGCCCAGGAGCCGCCCGCGCTCCCTGAACCCTAGAACTGTCTTCG
ACTCCGGGGCCCCGTTGGAAGACTGAGTGCCCGGGGCACGGCACAGAAGCCGCGC
CCACCGCCTGCCAGTTCACAACCGCTCCGAGCGTGGGTCTCCGCCCAGCTCCAGTC
CTGTGATCCGGGCCCGCCCCCTAGCGGCCGGGGAGGGAGGGGCCGGGTCCGCGGC
CGGCGAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCGGGAATGCTGCTGCTGCTGCTGC
TGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGGGGGATCACAG
ACCATTTCTTTCTTTCGGCCAGGCTGAGGCCCTGACGTGGATGGGCAAACTGCAGG
CCTGGGAAGGCAGCAAGCCGGGCCGTCCGTGTTCCATCCTCCACGCACCCCCACCT
ATCGTTGGTTCGCAAAGTGCAAAGCTTTCTTGTGCATGACGCCCTGCTCTGGGGAG

[0147] CGTCTGGCGCGATCTCTGCCTGCTTACTCGGGAAATTTGCTTTTGCCAAACCCGCTT
TTTCGGGGATCCCGCGCCCCCCTCCTCACTTGCGCTGCTCTCGGAGCCCCAGCCGG
CTCCGCCCGCTTCGGCGGTTTGGATATTTATTGACCTCGTCCTCCGACTCGCTGACA
GGCTACAGGACCCCCAACAACCCCAATCCACGTTTTGGATGCACTGAGACCCCGA
CATTCCTCGGTATTTATTGTCTGTCCCCACCTAGGACCCCCACCCCCGACCCTCGCG
AATAAAAGGCCCTCCATCTGCCCAAAGCTCTGGA(SEQ ID NO: 24)。

[0148] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含如下所示序列的互补区,所述序列是示例性小鼠DMPK基因序列(基因ID 13400;NM_001190490.1)。

[0149] GAACTGGCCAGAGAGACCCAAGGGATAGTCAGGGACGGGCAGACATGCAGCTAG
GGTTCTGGGGCCTGGACAGGGGCAGCCAGGCCCTGTGACGGGAAGACCCCGAGCT
CCGGCCCGGGGAGGGGCCATGGTGTTGCCTGCCCAACATGTCAGCCGAAGTGCGG
CTGAGGCAGCTCCAGCAGCTGGTGCTGGACCCAGGCTTCCTGGGACTGGAGCCCC
TGCTCGACCTTCTCCTGGGCGTCCACCAGGAGCTGGGTGCCTCTCACCTAGCCCAG
GACAAGTATGTGGCCGACTTCTTGCAGTGGGTGGAGCCCATTGCAGCAAGGCTTA
AGGAGGTCCGACTGCAGAGGGATGATTTTGAGATTTTGAAGGTGATCGGGCGTGG
GGCGTTCAGCGAGGTAGCGGTGGTGAAGATGAAACAGACGGGCCAAGTGTATGCC
ATGAAGATTATGAATAAGTGGGACATGCTGAAGAGAGGCGAGGTGTCGTGCTTCC
GGGAAGAAAGGGATGTATTAGTGAAAGGGGACCGGCGCTGGATCACACAGCTGC
ACTTTGCCTTCCAGGATGAGAACTACCTGTACCTGGTCATGGAATACTACGTGGGC
GGGGACCTGCTAACGCTGCTGAGCAAGTTTGGGGAGCGGATCCCCGCCGAGATGG
CTCGCTTCTACCTGGCCGAGATTGTCATGGCCATAGACTCCGTGCACCGGCTGGGC
TACGTGCACAGGGACATCAAACCAGATAACATTCTGCTGGACCGATGTGGGCACA
TTCGCCTGGCAGACTTCGGCTCCTGCCTCAAACTGCAGCCTGATGGAATGGTGAGG
TCGCTGGTGGCTGTGGGCACCCCGGACTACCTGTCTCCTGAGATTCTGCAGGCCGT
TGGTGGAGGGCCTGGGGCAGGCAGCTACGGGCCAGAGTGTGACTGGTGGGCACTG
GGCGTGTTCGCCTATGAGATGTTCTATGGGCAGACCCCCTTCTACGCGGACTCCAC
AGCCGAGACATATGCCAAGATTGTGCACTACAGGGAACACTTGTCGCTGCCGCTG
GCAGACACAGTTGTCCCCGAGGAAGCTCAGGACCTCATTCGTGGGCTGCTGTGTCC
TGCTGAGATAAGGCTAGGTCGAGGTGGGGCAGACTTCGAGGGTGCCACGGACACA
TGCAATTTCGATGTGGTGGAGGACCGGCTCACTGCCATGGTGAGCGGGGGCGGGG
AGACGCTGTCAGACATGCAGGAAGACATGCCCCTTGGGGTGCGCCTGCCCTTCGT
GGGCTACTCCTACTGCTGCATGGCCTTCAGAGACAATCAGGTCCCGGACCCCACCC
CTATGGAACTAGAGGCCCTGCAGTTGCCTGTGTCAGACTTGCAAGGGCTTGACTTG

[0150] CAGCCCCCAGTGTCCCCACCGGATCAAGTGGCTGAAGAGGCTGACCTAGTGGCTG
TCCCTGCCCCTGTGGCTGAGGCAGAGACCACGGTAACGCTGCAGCAGCTCCAGGA
AGCCCTGGAAGAAGAGGTTCTCACCCGGCAGAGCCTGAGCCGCGAGCTGGAGGCC
ATCCGGACCGCCAACCAGAACTTCTCCAGCCAACTACAGGAGGCCGAGGTCCGAA
ACCGAGACCTGGAGGCGCATGTTCGGCAGCTACAGGAACGGATGGAGATGCTGCA
GGCCCCAGGAGCCGCAGCCATCACGGGGGTCCCCAGTCCCCGGGCCACGGATCCA
CCTTCCCATCTAGATGGCCCCCCGGCCGTGGCTGTGGGCCAGTGCCCGCTGGTGGG
GCCAGGCCCCATGCACCGCCGTCACCTGCTGCTCCCTGCCAGGATCCCTAGGCCTG
GCCTATCCGAGGCGCGTTGCCTGCTCCTGTTCGCCGCTGCTCTGGCTGCTGCCGCC
ACACTGGGCTGCACTGGGTTGGTGGCCTATACCGGCGGTCTCACCCCAGTCTGGTG
TTTCCCGGGAGCCACCTTCGCCCCCTGAACCCTAAGACTCCAAGCCATCTTTCATT
TAGGCCTCCTAGGAAGGTCGAGCGACCAGGGAGCGACCCAAAGCGTCTCTGTGCC
CATCGCGCCCCCCCCCCCCCCCCCACCGCTCCGCTCCACACTTCTGTGAGCCTGGGT
CCCCACCCAGCTCCGCTCCTGTGATCCAGGCCTGCCACCTGGCGGCCGGGGAGGG
AGGAACAGGGCTCGTGCCCAGCACCCCTGGTTCCTGCAGAGCTGGTAGCCACCGC
TGCTGCAGCAGCTGGGCATTCGCCGACCTTGCTTTACTCAGCCCCGACGTGGATGG
GCAAACTGCTCAGCTCATCCGATTTCACTTTTTCACTCTCCCAGCCATCAGTTACAA
GCCATAAGCATGAGCCCCCTATTTCCAGGGACATCCCATTCCCATAGTGATGGATC
AGCAAGACCTCTGCCAGCACACACGGAGTCTTTGGCTTCGGACAGCCTCACTCCTG
GGGGTTGCTGCAACTCCTTCCCCGTGTACACGTCTGCACTCTAACAACGGAGCCAC
AGCTGCACTCCCCCCTCCCCCAAAGCAGTGTGGGTATTTATTGATCTTGTTATCTG
ACTCACTGACAGACTCCGGGACCCACGTTTTAGATGCATTGAGACTCGACATTCCT
CGGTATTTATTGTCTGTCCCCACCTACGACCTCCACTCCCGACCCTTGCGAATAAA
ATACTTCTGGTCTGCCCTAAA (SEQ ID NO: 25)

[0151] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含多个物种(例如,选自人、小鼠和非人物种(例如食蟹猴))的DMPK基因序列之互补区。

[0152] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含DMPK的突变体形式之互补区,所述突变体形式例如如在以下中报道的突变体形式:Botta A.et al.“The CTG repeat expansion size correlates with the splicing defects observed in muscles from myotonic dystrophy type 1patients.”J Med Genet.20080ct;45(10):639-46.;和Machuca-Tzili L.et al.“Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies:a review.”Muscle Nerve.2005Jul;32(1):1-18.;其各自的内容以其整体并入本文。

[0153] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸是靶向DMPK的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,靶向DMPK的寡核苷酸是靶向DMPK的任一种反义寡核苷酸,如美国专利申请公开US20160304877A1中所述,其于2016年10月20日公开,标题为“Compounds And Methods For Modulation Of Dystrophia Myotonica-Protein Kinase(DMPK)Expression,”其通过引用并入本文)。在一些实施方案中,DMPK靶向寡核苷酸靶向如Genbank登录No.NM_001081560.2中所示的DMPK基因序列(SEQ ID NO:24)或如Genbank登录No.NG_009784.1中

所示的DMPK基因序列(SEQ ID NO:26)的区域。

[0154] 在一些实施方案中,本文中提供的DMPK靶向寡核苷酸包含含有靶区域之互补区的核苷酸序列,所述靶区域是SEQ ID NO:24的至少8个连续核苷酸(例如,至少8个、至少9个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个或更多个连续核苷酸)。

[0155] 在一些实施方案中,本文中提供的DMPK靶向寡核苷酸的长度为10至35(例如,10至35、10至30、10至25、10至20、10至15、15至35、15至30、15至25、15至20、20至35、20至30、13至18、14至17、15至18、20至30、15至17、27至30、25至35或30至35)个核苷酸。在一些实施方案中,本文中提供的DMPK靶向寡核苷酸的长度为10、11、12、13、14、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15至30或16个核苷酸。在一些实施方案中,本文中提供的DMPK靶向寡核苷酸的长度为16个核苷酸。

[0156] 在一些实施方案中,本文中提供的DMPK靶向寡核苷酸包含DMPK 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、30或更多个)连续核苷酸的互补区。

[0157] 在一些实施方案中,本文中提供的DMPK靶向寡核苷酸包含SEQ ID NO:24或25中所示的DMPK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、30或更多个)连续核苷酸的互补区。

[0158] 在一些实施方案中,本文中提供的DMPK靶向寡核苷酸包含SEQ ID NO:22(TGACTGGTGGGCGCTG)中所示的靶序列的至少8个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15或16个)连续核苷酸的互补区。在一些实施方案中,可用于靶向DMPK的寡核苷酸包含SEQ ID NO:21(CAGCGCCCACCAGUCA)中所示的序列的至少8个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15或16个)连续核苷酸。在一些实施方案中,可用于靶向DMPK的寡核苷酸包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

[0159] 在一些实施方案中,DMPK靶向寡核苷酸包含5'-X-Y-Z-3'构型。包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸可指这样的嵌合反义化合物:其中具有多个支持RNA酶H切割的核苷的间隔区位于具有一个或更多个核苷的侧翼区之间,其中包含间隔区的核苷在化学上不同于包含侧翼区的一个或更多个核苷。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z作为间隔区Y周围的侧翼区。在一些实施方案中,间隔区Y包含一个或更多个2'-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔区Y中的每个核苷均是2'-脱氧核糖核苷,并且侧翼区X或侧翼区Z均不包含任何2'-脱氧核糖核苷。

[0160] 在一些实施方案中,间隔区Y包含6个或更多个2'-脱氧核糖核苷的连续区段,其能够募集RNA酶,例如RNA酶H。在一些实施方案中,寡核苷酸与靶核酸结合,在该点募集RNA酶,并随后可切割该靶核酸。在一些实施方案中,侧翼区X和Z各自包含一个或更多个经修饰核苷。在一些实施方案中,侧翼区X和Z各自包含一个或更多个高亲和力经修饰核苷,例如一至六个高亲和力经修饰核苷。高亲和力经修饰核苷的一些实例包括但不限于2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE、2'-O-Me、2'-F)或2'-4'-双环核苷(例如,LNA、cEt、ENA)。在一些实施方案中,侧翼区X和Z的长度可以是1至20个核苷酸、1至8个核苷酸或1至5个核苷酸。侧翼区X和Z可具有相似的长度或不同的长度。在一些实施方案中,间隔区Y可包含长度为5至20个核苷酸、5至15个核苷酸、5至12个核苷酸或6至10个核苷酸的核苷酸序列。

[0161] 在一些实施方案中,间隔区Y包含一个或更多个未经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,一个或两个侧翼区X和Z在至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个核苷酸之间各自独立地包含硫代磷酸酯核苷间键联(例如,硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联)。在一些实施方案中,间隔区Y和两个侧翼区X和Z在至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个核苷酸之间各自独立地包含经修饰的核苷间键联(例如,硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联)。

[0162] 在一些实施方案中,间隔聚体中间隔区Y的长度为5至20个核苷。例如,间隔区Y的长度可以是5至20、5至15、5至10、10至20、10至15或15至20个核苷。在一些实施方案中,间隔区Y的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷。在一些实施方案中,间隔区Y中的每个核苷是2'-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔区Y中的所有核苷均是2'-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔区Y中的一个或更多个核苷是经修饰核苷(例如,2'经修饰核苷,例如本文中所述的那些)。在一些实施方案中,间隔区Y中的一个或更多个胞嘧啶任选地是5-甲基-胞嘧啶。在一些实施方案中,间隔区Y中的每个胞嘧啶是5-甲基-胞嘧啶。

[0163] 在一些实施方案中,寡核苷酸的侧翼区X(5'-X-Y-Z-3'构型中的X)和寡核苷酸的侧翼区Z(5'-X-Y-Z-3'构型中的Z)独立地为1至20个核苷长。例如,寡核苷酸的侧翼区X和寡核苷酸的侧翼区Z可独立地为1至20、1至15、1至10、1至7、1至5、1至3、1至2、2至5、2至7、3至5、3至7、5至20、5至15、5至10、10至20、10至15或15至20个核苷长。在一些实施方案中,寡核苷酸的侧翼区X和寡核苷酸的侧翼区Z独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷长。在一些实施方案中,寡核苷酸的侧翼区X和寡核苷酸的侧翼区Z具有相同的长度。在一些实施方案中,寡核苷酸的侧翼区X和寡核苷酸的侧翼区Z具有不同的长度。在一些实施方案中,寡核苷酸的侧翼区X比寡核苷酸的侧翼区Z长。在一些实施方案中,寡核苷酸的侧翼区X比寡核苷酸的侧翼区Z短。

[0164] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,DMPK靶向寡核苷酸)包含以下5'-X-Y-Z-3'构型:

[0165] 5-10-5,4-12-4,3-14-3,2-16-2,1-18-1,3-10-3,2-10-2,1-10-1,2-8-2,4-6-4,3-6-3,2-6-2,4-7-4,3-7-3,2-7-2,4-8-4,3-8-3,2-8-2,1-8-1,2-9-2,1-9-1,2-10-2,1-10-1,1-12-1,1-16-1,2-15-1,1-15-2,1-14-3,3-14-1,2-14-2,1-13-4,4-13-1,2-13-3,3-13-2,1-12-5,5-12-1,2-12-4,4-12-2,3-12-3,1-11-6,6-11-1,2-11-5,5-11-2,3-11-4,4-11-3,1-17-1,2-16-1,1-16-2,1-15-3,3-15-1,2-15-2,1-14-4,4-14-1,2-14-3.3-14-2,1-13-5,5-13-1,2-13-4,4-13-2,3-13-3,1-12-6,6-12-1,2-12-5,5-12-2,3-12-4,4-12-3.1-11-7,7-11-1,2-11-6.6-11-2,3-11-5,5-11-3,4-11-4,1-18-1.1-17-2,2-17-1,1-16-3,1-16-3,2-16-2,1-15-4,4-15-1,2-15-3,3-15-2,1-14-5,5-14-1,2-14-4,4-14-2,3-14-3,1-13-6,6-13-1,2-13-5,5-13-2,3-13-4,4-13-3.1-12-7,7-12-1,2-12-6.6-12-2,3-12-5,5-12-3,1-11-8.8-11-1,2-11-7,7-11-2,3-11-6,6-11-3,4-11-5,5-11-4,1-18-1,1-17-2,2-17-1,1-16-3.3-16-1,2-16-2,1-15-4,4-15-1,2-15-3,3-15-2,1-14-5,2-14-4,4-14-2,3-14-3,1-13-6,6-13-1,2-13-5,5-13-2,3-13-4,4-13-3.1-12-7,7-12-1,2-12-6,6-12-2,3-12-5,5-12-3,1-11-8,8-11-1,2-11-7,7-11-2,3-11-6,6-11-3,4-11-5,5-11-4,1-19-1,1-18-2,2-18-1,1-17-3,3-17-1,2-17-2,1-16-4,4-16-1,2-16-3,3-16-2,1-15-5,2-15-4,4-

15-2,3-15-3.1-14-6,6-14-1,2-14-5,5-14-2,3-14-4,4-14-3,1-13-7,7-13-1,2-13-6,6-13-2,3-13-5,5-13-3,4-13-4,1-12-8,8-12-1,2-12-7,7-12-2,3-12-6,6-12-3,4-12-5,5-12-4,2-11-8,8-11-2,3-11-7,7-11-3,4-11-6,6-11-4,5-11-5,1-20-1,1-19-2,2-19-1,1-18-3,3-18-1,2-18-2,1-17-4,4-17-1,2-17-3,3-17-2,1-16-5,2-16-4,4-16-2,3-16-3,1-15-6,6-15-1,2-15-5,5-15-2,3_15-4,4-15-3,1-14-7,7-14-1,2-14-6,6-14-2,3-14-5,5-14-3.4-14-4,1-13-8.8-13-1,2-13_7,7-13-2,3-13-6,6-13-3,4-13-5,5-13-4,2-12-8,8-12-2,3-12-7,7-12-3,4-12-6.6-12-4,5-12-5,3-11-8,8-11-3,4-11-7,7-11-4,5-11-6,6-11-5,1-21-1,1-20-2,2-20-1,1-20-3,3-19-1,2-19-2,1-18-4,4-18-1,2-18-3,3-18-2,1-17-5,2-17-4,4-17-2,3-17-3,1-16-6,6-16-1,2-16-5,5-16-2,3-16-4,4-16-3,1-15-7,7-15-1,2-15-6,6-15-2,3-15-5,5-15-3,4-15-4,1-14-8,8-14-1,2-14-7,7-14-2,3-14-6,6-14-3,4-14-5,5-14-4,2-13-8,8-13-2,3-13-7,7-13-3.4-13-6,6-13-4,5-13-5,1-12-10,10-12-1,2-12-9,9-12-2,3-12-8,8-12-3,4-12-7,7-12-4,5-12-6,6-12-5,4-11-8,8-11-4,5-11-7,7-11-5,6-11-6,1-22-1,1-21-2,2-21-1,1-21-3,3-20-1,2-20-2,1-19-4,4-19-1,2-19-3,3-19-2,1-18-5,2-18-4,4-18-2,3-18-3,1-17-6,6-17-1.2-17-5,5-17-2,3-17-4,4-17-3,1-16-7,7-16-1,2-16-6,6-16-2,3-16-5,5-16-3,4-16-4,1-15-8.8-15-1,2-15-7,7-15-2,3-15-6,6-15-3,4-15-5,5-15-4,2-14-8,8-14-2,3-14-7,7-14-3,4-14-6.6-14-4,5-14-5,3-13-8,8-13-3,4-13-7,7-13-4,5-13-6,6-13-5,4-12-8,8-12-4,5-12-7,7-12-5.6-12-6,5-11-8,8-11-5,6-11-7或7-11-6.

[0166] 数字分别表示包含5’-X-Y-Z-3’构型的寡核苷酸中X、Y和Z区中的核苷的数目。

[0167] 在一些实施方案中,寡核苷酸的侧翼区X(5’-X-Y-Z-3’构型中的X)或寡核苷酸的侧翼区Z(5’-X-Y-Z-3’构型中的Z)中的一个或更多个核苷是经修饰核苷(例如,高亲和力经修饰核苷)。在一些实施方案中,经修饰核苷(例如,高亲和力经修饰核苷)是2’-经修饰核苷。在一些实施方案中,2’-经修饰核苷是2’-4’双环核苷或非双环2’-经修饰核苷。在一些实施方案中,高亲和力经修饰核苷是2’-4’双环核苷(例如,LNA、cEt或ENA)或非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-氟(2’-F)、2’-O-甲基(2’-O-Me)、2’-O-甲氧基乙基(2’-MOE)、2’-O-氨基丙基(2’-O-AP)、2’-O-二甲基氨基乙基(2’-O-DMAOE)、2’-O-二甲基氨基丙基(2’-O-DMAP)、2’-O-二甲基氨基乙基氧基乙基(2’-O-DMAEOE)、2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA))。

[0168] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含5’-X-Y-Z-3’构型,其中X和Z的长度独立地为2至7个(例如,2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中X中的第1、2、3、4、5、6或7位(最5’的位置是第1位)中的至少一个但不是全部(例如,1、2、3、4、5或6个)是非双环2’-经修饰核苷(例如2’-MOE或2’-O-Me),其中X和Z二者中的剩余核苷是2’-4’双环核苷(例如LNA或cEt),并且其中Y中的每个核苷是2’脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含5’-X-Y-Z-3’构型,其中X和Z的长度独立地为2至7个(例如,2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中Z中的第1、2、3、4、5、6或7位(最5’的位置是第1位)中的至少一个但不是全部(例如,1、2、3、4、5或6个)是非双环2’-经修饰核苷(例如2’-MOE或2’-O-Me),其中X和Z二者中的剩余核苷是2’-4’双环核苷(例如LNA或cEt),并且其中Y中的每个核苷是2’脱氧核糖核苷。

在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z的长度独立地为2至7个(例如,2、3、4、5、6或7个)核苷,并且Y的长度为6至10个(例如,6、7、8、9或10个)核苷,其中X中的第1、2、3、4、5、6或7位(最5'的位置是第1位)中的至少一个但不是全部(例如,1、2、3、4、5或6个)和Z中的第1、2、3、4、5、6或7位(最5'的位置是第1位)中的至少一个但不是全部(例如,1、2、3、4、5或6个)是非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me),其中X和Z二者中的剩余核苷是2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt),并且其中Y中的每个核苷是2'脱氧核糖核苷。

[0169] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,DMPK靶向寡核苷酸)的长度为10至20个核苷(例如,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷),包含SEQ ID NO:22(TGACTGGTGGGCGCTG)的至少8个连续核苷(例如,至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或16个连续核苷)之互补区,并且包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X包含3至5个(例如3、4或5个)连接的核苷,其中X中的至少一个核苷是2'-经修饰核苷(例如2'-MOE修饰的核苷、2'-O-Me修饰的核苷、LNA、cEt或ENA);Y包含6至10个(例如6、7、8、9或10个)连接的2'-脱氧核糖核苷,其中Y中的每个胞嘧啶任选且独立地是5-甲基-胞嘧啶;并且Z包含3至5个(例如3、4或5个)连接的核苷,其中Z中的至少一个核苷是2'-经修饰核苷(例如2'-MOE修饰的核苷、2'-O-Me修饰的核苷、LNA、cEt或ENA)。

[0170] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含SEQ ID NO:21(CAGCGCCCACCAGUCA)的核苷酸序列的至少8个连续核苷(例如,至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或16个连续核苷连续核苷),并且包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X包含3至5个(例如3、4或5个)连接的核苷,其中X中的至少一个核苷是2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE修饰的核苷、2'-O-Me修饰的核苷、LNA、cEt或ENA);Y包含6至10个(例如6、7、8、9或10个)连接的2'-脱氧核糖核苷,其中Y中的每个胞嘧啶任选且独立地是5-甲基-胞嘧啶;并且Z包含3至5个(例如3、4或5个)连接的核苷,其中Z中的至少一个核苷是2'-经修饰核苷(例如2'-MOE修饰的核苷、2'-O-Me修饰的核苷、LNA、cEt或ENA)。在一些实施方案中,反义寡核苷酸的核苷酸序列的每个胸腺嘧啶碱基(T)可独立且任选地被尿嘧啶碱基(U)替代,并且每个U可独立且任选地被T替代。

[0171] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列,并且包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X包含3至5个(例如,3、4或5个)连接的核苷,其中X中的至少一个核苷是2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE修饰的核苷、2'-O-Me修饰的核苷、LNA、cEt或ENA);Y包含6至10个(例如6、7、8、9或10个)连接的2'-脱氧核糖核苷,其中Y中的每个胞嘧啶任选且独立地是5-甲基-胞嘧啶;并且Z包含3至5个(例如3、4或5个)连接的核苷,其中Z中的至少一个核苷是2'-经修饰核苷(例如2'-MOE修饰的核苷、2'-O-Me修饰的核苷、LNA、cEt或ENA)。在一些实施方案中,反义寡核苷酸的核苷酸序列的每个胸腺嘧啶碱基(T)可独立且任选地被尿嘧啶碱基(U)替代,并且每个U可独立且任选地被T替代。

[0172] 在一些实施方案中,X包含至少一个2'-4'双环核苷(例如,LNA、cEt或ENA)和至少一个非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE修饰的核苷或2'-O-Me修饰的核苷),和/或(例如,和)Z包含至少一个2'-4'双环核苷(例如,LNA、cEt或ENA)和至少一个非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE修饰的核苷或2'-O-Me修饰的核苷)。

[0173] 在一些实施方案中,2'-4'双环核苷选自LNA、cEt和ENA核苷。在一些实施方案中,非双环2'-经修饰核苷是2'-MOE修饰的核苷或2'-OMe修饰的核苷。

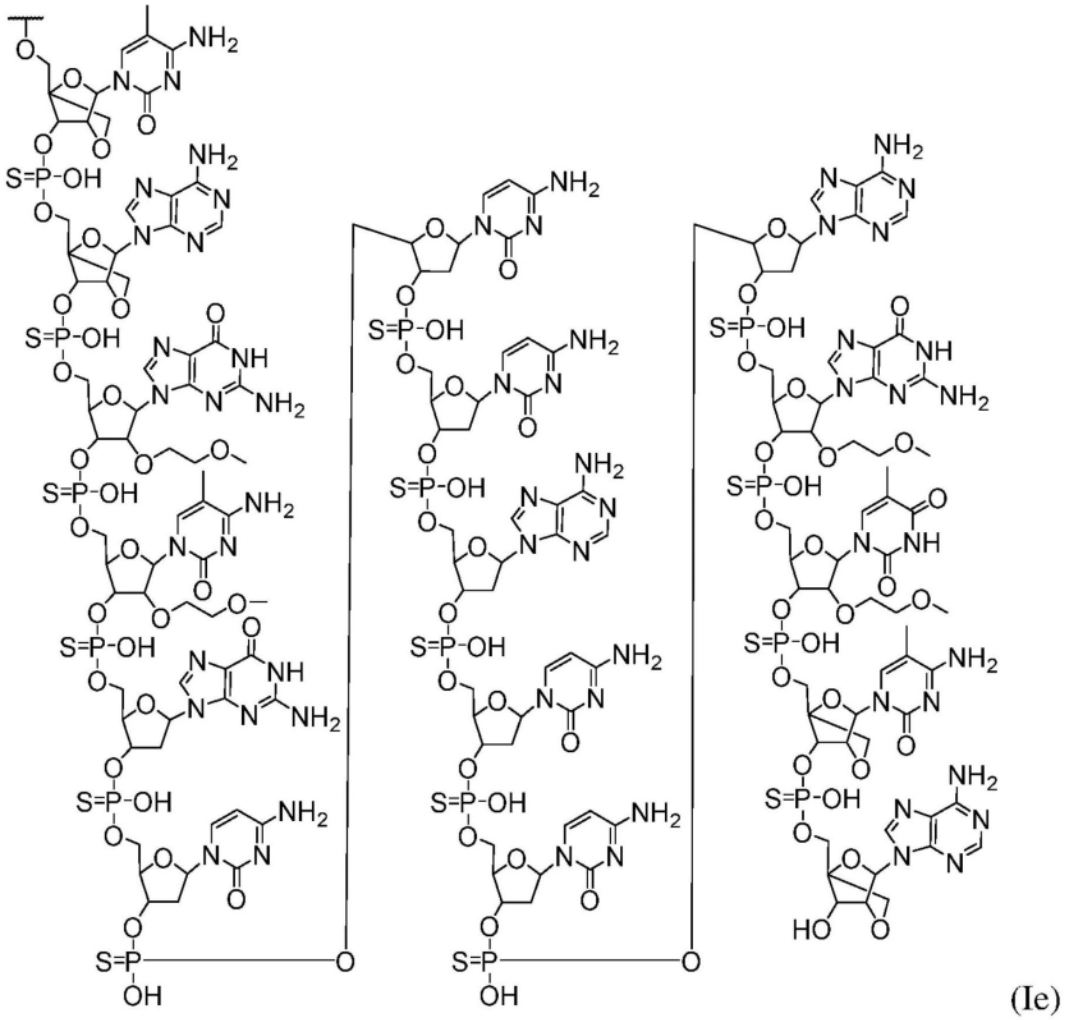
[0174] 在一些实施方案中,寡核苷酸的核苷通过硫代磷酸酯核苷间键联、磷酸二酯核苷间键联或其组合连接在一起。在一些实施方案中,寡核苷酸仅包含连接每个核苷的硫代磷酸酯核苷间键联(即寡核苷酸包含完全硫代磷酸酯骨架)。在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸包含硫代磷酸酯核苷间键联和磷酸二酯核苷间键联的混合物。在一些实施方案中,寡核苷酸仅包含连接每对2'-脱氧核糖核苷的硫代磷酸酯核苷间键联,以及连接剩余核苷的硫代磷酸酯核苷间键联和磷酸二酯核苷间键联的混合物。

[0175] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含LLEE-$(D)_8$-EELL的5'-X-Y-Z-3'构型,其中"E"是2'-MOE修饰的核糖核苷;"L"是LNA;"D"是2'-脱氧核糖核苷;并且"10"或"8"是Y中2'-脱氧核糖核苷的数目,并且其中寡核苷酸包含硫代磷酸酯核苷间键联、磷酸二酯核苷间键联或其组合。

[0176] 在一些实施方案中,寡核苷酸的X和/或Z中的每个胞苷(例如,2'-经修饰胞苷)任选且独立地是5-甲基-胞苷,和/或者X和/或Z中的每个尿苷(例如,2'-经修饰尿苷)任选且独立地是5-甲基-尿苷。

[0177] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含5'-X-Y-Z-3'构型,并且包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dA*dC*dA*oG*oU+C*+A(SEQ ID NO:21)的结构,其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联。

[0178] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)包含式(Ie)的结构:

[0179] 

(Ie)

。

[0180] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)可以是盐形式,例如,钠盐、钾盐或镁盐。

[0181] 在一些实施方案中,寡核苷酸的5'或3'核苷(例如末端核苷)任选地通过间隔基与胺基缀合。在一些实施方案中,间隔基包含脂族部分。在一些实施方案中,间隔基包含聚乙二醇部分。在一些实施方案中,间隔基与寡核苷酸的5'或3'核苷之间存在磷酸二酯键联。在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的5'或3'核苷(例如,末端核苷)与间隔基共价连接,所述间隔基是经取代或未经取代的脂族、经取代或未经取代的杂脂族、经取代或未经取代的亚碳环基、经取代或未经取代的亚杂环基、经取代或未经取代的亚芳基、经取代或未经取代的亚杂芳基、-O-,-N(R^A)-,-S-,-C(=O)-,-C(=O)O-,-C(=O)NR^A-,-NR^AC(=O)-,-NR^AC(=O)RA-,-C(=O)R^A-,-NRAC(=O)O-,-NR^AC(=O)N(R^A)-,-OC(=O)-,-OC(=O)O-,-OC(=O)N(R^A)-,-S(O)$_2$$NR^A$-,-$NR^A$S(O)$_2$-,或其组合;每个$R^A$独立地是氢或者经取代或未经取代的烷基。在某些实施方案中,间隔基是经取代或未经取代的亚烷基、经取代或未经取代的亚杂环基、经取代或未经取代的亚杂芳基、-O-、-N(R^A)-或-C(=O)N(R^A)$_2$,或其组合。

[0182] 在一些实施方案中,寡核苷酸的5'或3'核苷与式-NH_2-(CH_2)$_n$-化合物缀合,其中n为1至12的整数。在一些实施方案中,n是6、7、8、9、10、11或12。在一些实施方案中,在式-NH_2-(CH_2)$_n$-化合物与寡核苷酸的5'或3'核苷之间存在磷酸二酯键联。在一些实施方案中,式-NH_2-(CH_2)$_6$-化合物通过6-氨基-1-己醇(NH_2-(CH_2)$_6$-OH)与寡核苷酸的5'磷酸之间的反

应与寡核苷酸缀合。

[0183] 在一些实施方案中,寡核苷酸例如通过靶向剂的赖氨酸的胺基与靶向剂,例如肌肉靶向剂(例如抗TfR1抗体)缀合。

[0184] 在一些实施方案中,应该理解在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)的核苷酸或核苷可以等同地鉴定为胸腺嘧啶核苷酸或核苷。

[0185] 在一些实施方案中,本文中提供的任一种寡核苷酸中的任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/或本文中提供的寡核苷酸(例如,SEQ ID NO:21中所示的寡核苷酸)中的任一个或更多个U可独立且任选地为T。

[0186] 组合物

[0187] 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个或更多个寡核苷酸(例如,本文中所述的DMPK靶向寡核苷酸)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。本文中所述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。

[0188] 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的结构,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DMPK靶向寡核苷酸)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。

[0189] 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,组合物中每个复合物的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,组合物中每个复合物的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,组合物中每个复合物的n1的值独立且任选地选自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n1的值为0的复合物。在一些实施方案中,组合物的复合物的n1的平均值为0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。

[0190] 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)和与一个或更多个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的结构的化合物,其中n1为零。因此,在一些实施方案

中,用于在本文中所述方法中向对象施用的组合物包含含有式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的化合物(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的实例数。在一些实施方案中,与组合物中n1为1或更大的所有具有该结构的化合物相比,组合物中n1为零的包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的化合物的级分小于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0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。

[0191] 制剂

[0192] 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共价连接的寡核苷酸的复合物)与三(羟甲基)氨基甲烷(也被称为氨丁三醇或THAM)和/或蔗糖配制在一起对于药物用途(例如如本文中所述的)特别有利。因此,在一些实施方案中,本文中提供了包含与三(羟甲基)氨基甲烷和/或蔗糖一起的复合物的制剂(例如水溶液、冻干形式或冷冻形式)。这样的制剂可适当地制备,使得当施用于对象时,无论是施用到靶细胞的直接环境中或全身性施用,都会有足够量的复合物进入靶肌细胞。

[0193] 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,所述复合物包含与抗体共价连接的寡核苷酸(例如,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)。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抗体共价连接的寡核苷酸(例如,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸),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,其中复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖配制在一起。在一些实施方案中,抗体是抗TfR1抗体。

[0194] 在一些实施方案中,提供了包含复合物的制剂,所述复合物包含式(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,例如,包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)的化合物,并且R^2包含抗体(例如,抗TfR1抗体),并且其中n1是整数,其表示复合物中R^1的实例数。

[0195] 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以及包含含有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含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0196] 在一些实施方案中,本文中所述的制剂包含浓度为1至50mg复合物/mL制剂的本文中所述的复合物。在一些实施方案中,本文中所述的制剂包含浓度为10至50mg/ml或20至35mg/mL(例如,15至45mg/mL、20至40mg/mL、25至35mg/mL、25.5至34.5mg/mL、26至34mg/mL、27至33mg/mL、28至32mg/mL、29至31mg/mL、29.5至30.5mg/mL、10至40mg/mL、15至35mg/mL、

20至30mg/mL、21至29mg/mL、21.2至28.8mg/mL、22至28mg/mL、23至27mg/mL、24至26mg/mL、或24.5至25.5mg/mL)的复合物。在一些实施方案中,本文中所述的制剂包含浓度为约25mg/mL(例如,25mg/mL)的复合物。在一些实施方案中,本文中所述的制剂包含浓度为约30mg/mL(例如,30mg/mL)的复合物。在一些实施方案中,制剂中复合物的浓度可在设定值的最多至20%(例如,+/-最多至20%,+/-最多至15%,+/-最多至10%,或+/-最多至5%)的范围内变化。例如,在一些实施方案中,制剂中复合物的浓度为30mg/mL+/-最多至15%(例如,30+/-4.5mg/mL)。在一些实施方案中,制剂中复合物的浓度为25mg/mL+/-最多至15%(例如,25+/-3.8mg/mL)。

[0197] 在一些实施方案中,本文中所述的任何一种或多种复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖在水溶液中配制在一起。在一些实施方案中,三(羟甲基)氨基甲烷以5至50mM(例如,5至40mM、5至35mM、5至30mM、10至50mM、15至45mM、10至40mM、20至40mM、20至35mM、20至30mM、21至29mM、22至28mM、23至27mM、24至26mM)的浓度存在于水溶液中。在一些实施方案中,三(羟甲基)氨基甲烷以约25mM(例如,25mM)的浓度存在于水溶液中。在一些实施方案中,蔗糖以5%至15%重量/体积(w/v%)例如,7至13w/v%、8至15%w/v%、9至15%w/v%、9至11%w/v%、9.5至11%w/v%,或例如,9至10w/v%、10至11w/v%、10至12w/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7至13w/v%、8至12w/v%或9至11w/v%的浓度存在于水溶液中。在一些实施方案中,蔗糖以约10w/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6.5至8.5,例如,6.5至6.5、6.7至6.9、6.9至7.1、7.1至7.3、7.2至7.8、7.3至7.5、7.4至7.5、7.4至7.6、7.5至7.6;例如7.0至8.0,或者例如pH为7.0至7.3、7.2至7.8、7.3至7.5、7.4至7.6、7.5至7.6、7.5至7.7、7.7至7.9、7.9至8.0、8.0至8.2、8.2至8.4、8.3至8.4、8.4至8.5、8.5至8.6或7.3至7.7。在一些实施方案中,水溶液的pH为7.0至8.0(例如,7.0至7.8、7.1至7.8、7.2至7.8、7.3至7.7、7.3至7.5、7.3至7.6、7.4至7.6或7.4至7.8)。在一些实施方案中,水溶液的pH为约7.5(例如7.5)。在一些实施方案中,水溶液的pH为7.4至7.7。在一些实施方案中,水溶液的pH为7.4至7.6(例如,7.5或约7.5)。

[0198] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种制剂为水溶液,其中三(羟甲基)氨基甲烷以约25mM(例如,25mM)的浓度存在于水溶液中,其中蔗糖以约10w/v%(例如,10w/v%)的浓度存在于水溶液中,并且其中水溶液的pH为约7.5(例如,7.5)。

[0199] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种制剂为水溶液,其中三(羟甲基)氨基甲烷以约25mM(例如,25mM)的浓度存在于水溶液中,其中蔗糖以约10w/v%(例如,10w/v%)的浓度存在于水溶液中,其中复合物以约20至35mg/ml(例如,25mg/ml或30mg/ml)的浓度存在于水溶液中,并且其中水溶液的pH为约7.5(例如,7.5)。

[0200] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种或多种复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖一起配制成冻干形式(例如,冻干粉末)。在一些实施方案中,冻干形式(例如,冻干粉末)通过冻干本文中所述的任一种水溶液获得。

[0201] 在一些实施方案中,冻干形式为冻干饼。在一些实施方案中,冻干饼包含本文中提供的多个复合物、三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖。在一些实施方案中,冻干饼包含1×10^{-2}mg至1.5mg(例如,$1x10^{-2}$ mg至1.5mg、4.02×10^{-2}mg至1.21mg、6×10^{-2}mg至1mg、8×10^{-2}mg至1mg、0.1mg至1mg、0.05mg至0.2mg、0.05mg至0.3mg、0.05mg至0.4mg、0.1mg至0.2mg、0.1mg至

0.3mg、0.1mg至0.4mg、0.1mg至0.5mg、0.2mg至0.3mg、0.2mg至0.4mg、0.2mg至0.4mg、0.3mg至0.4mg、或0.3mg至0.5mg)三(羟甲基)氨基甲烷/g饼。在一些实施方案中,冻干饼包含900mg至1100mg(例如,900mg至1100mg、989mg至999mg、950mg至1000mg、980mg至1000mg、980mg至990mg、990mg至1000mg、995mg至1000mg、992mg至998mg、994mg至999mg)蔗糖/g饼。在一些实施方案中,冻干饼包含0.5mg至10mg(例如,0.5mg至10mg、0.5mg至1.5mg、1mg至2mg、1.5mg至3mg、1mg至8mg、0.5mg至6mg、0.5mg至5mg、1.5mg至3.5mg、1.5mg至4mg、1.5mg至5mg、2mg至5mg、2.5mg至5mg、2mg至3mg、3mg至4mg、4mg至5mg)复合物/g饼。

[0202] 在一些实施方案中,冻干饼包含0.303mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,998.6mg蔗糖/g饼,和/或(例如,和)0.999mg复合物/g饼。在一些实施方案中,冻干饼包含0.302mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,997.7mg蔗糖/g饼,和/或(例如和)1.995mg复合物/g饼。在一些实施方案中,冻干饼包含0.302mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼、997.2mg蔗糖/g饼和/或(例如和)2.49mg复合物/g饼。在一些实施方案中,冻干饼包含0.302mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼、996.7mg蔗糖/g饼和/或(例如和)2.99mg复合物/g饼。在一些实施方案中,冻干饼包含0.302mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼、995.7mg蔗糖/g饼和/或(例如和)3.98mg复合物/g饼。在一些实施方案中,冻干饼包含0.301mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,994.7mg蔗糖/g饼,和/或(例如和)4.97mg复合物/g饼。

[0203] 在一些实施方案中,冻干饼的重构(例如,用水重构)产生了包含浓度为5至50mM的三(羟甲基)氨基甲烷、浓度为5w/v%至15w/v%的蔗糖,和/或(例如,和)浓度为10mg/mL至50mg/mL的复合物的溶液。在一些实施方案中,用溶剂(例如,水)重构10.053g冻干饼以形成1mL重构溶液,产生包含浓度为5至50mM(任选地为25mM)的三(羟甲基)氨基甲烷、浓度为5w/v%至15w/v%(任选地为10w/v%)的蔗糖和/或(例如,和)浓度为10mg/mL至50mg/mL的复合物的溶液。在一些实施方案中,用溶剂(例如,水)重构约10g冻干饼以形成1mL重构溶液,产生包含浓度为5至50mM(任选地为25mM)的三(羟甲基)氨基甲烷、浓度为5w/v%至15w/v%(任选地为10w/v%)的蔗糖和/或(例如,和)浓度为10mg/mL至50mg/mL的复合物的溶液。

[0204] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种或多种复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖一起配制成冷冻形式(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)通过冷冻本文中所述的任一种水溶液来获得。可将冷冻形式冷冻至低于-20℃(例如,低于-20℃、低于-30℃、低于-40℃、低于-50℃、低于-60℃、低于-70℃、低于-80℃或更低)的温度。

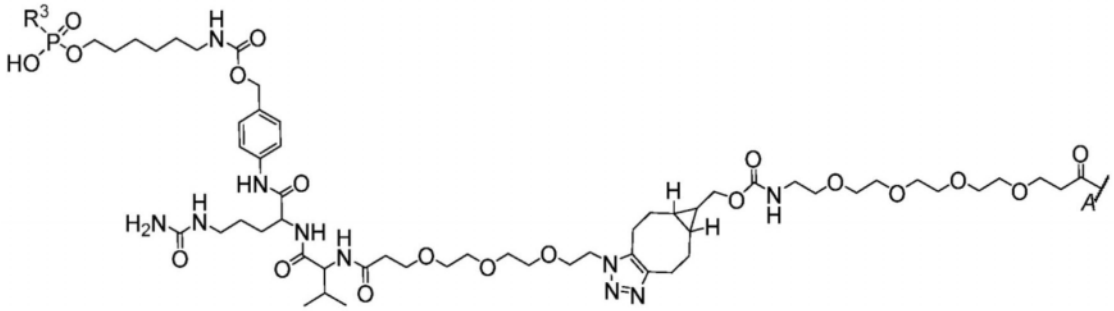
[0205] 在一些实施方案中,制剂中每种复合物的n1的值独立且任选地为零至抗体(R^2)中期望或靶向缀合的氨基酸残基的数目(例如,赖氨酸残基的数目)的整数。在一些实施方案中,制剂中每种复合物的n1值独立且任选地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26和27。在一些实施方案中,制剂中每种复合物的n1的值独立且任选地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25和26。在一些实施方案中,制剂中每种复合物的n1的值独立且任选地选自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,制剂中复合物的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,本文中所述的制剂包含含有式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2结构的复合物,其中n1是0。在一些实施方案中,制剂的复合物的n1的平均值为0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至

1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。

[0206] 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R^1的每个实例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ε-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^1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。在一些实施方案中,提供了制剂,其中复合物的R^1与存在于抗体的CDR区中的氨基酸残基共价连接仅以痕量存在,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到的。

[0207] 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的结构的复合物,其中R^1的每个实例独立地包含下式(Ia)的基团:

[0208]



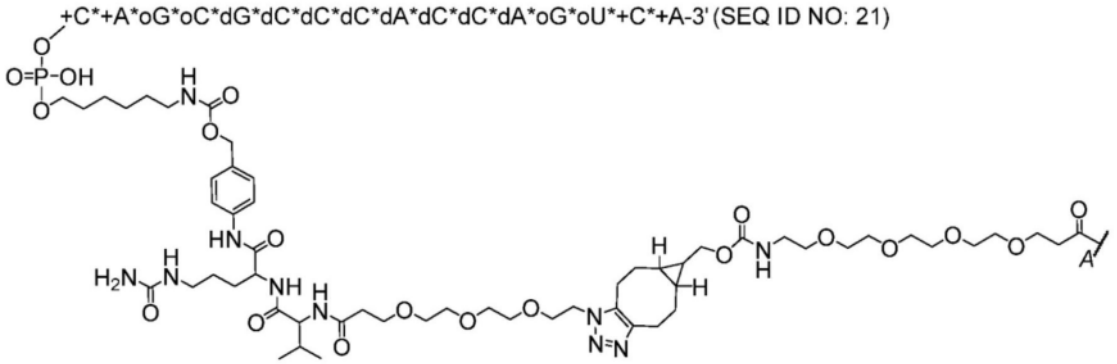
(Ia),

[0209] 其中R^3包含寡核苷酸,例如包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸;并且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中所示的序列的抗体。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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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^3包含含有CAGCGCCCACCAGUCA

(SEQ ID NO:21)的核碱基序列的寡核苷酸。在一些实施方案中,R^3包含含有+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A(SEQ ID NO:21)的结构的寡核苷酸,其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-MOE修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,以及*表示硫代磷酸酯核苷间键联。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,本文中所述的制剂还包含含有式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的复合物,其中n1是0。在一些实施方案中,组合物的复合物的n1的平均值为0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。在一些实施方案中,制剂还包含三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖。在一些实施方案中,制剂包含浓度为25mM的三(羟甲基)氨基甲烷和/或(例如,和)浓度为10w/v%的蔗糖,任选地其中制剂的pH为7.5。在一些实施方案中,制剂包含浓度为30mg/mL的复合物。

[0210] 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的结构的复合物,其中本文中提供的制剂的复合物中的R^1的每个实例包含下式(Ib)的基团:

[0211]



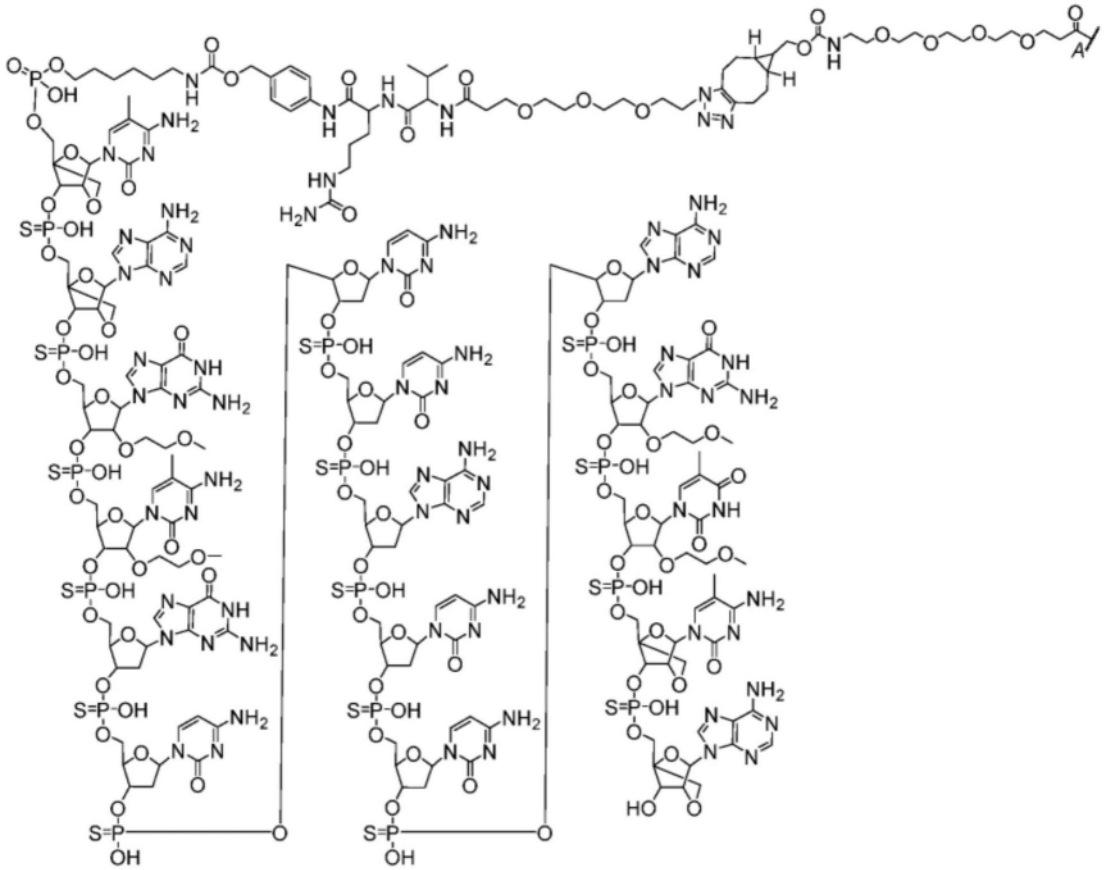
(Ib),

[0212] 其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联,并且其中寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列,其中n1是整数(例如一或更大),其表示每个复合物中R^1的实例数,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包含含有表2中所示的序列的抗体。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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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,本文中所述的制剂还包含含有式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的复合物,其中n1是0。在一些实施方案中,组合物的复合物的n1的平均值为0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)在一些实施方案中,制剂还包含三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖。在一些实施方案中,制剂包含浓度为25mM的三(羟甲基)氨基甲烷和/或(例如,和)浓度为10w/v%的蔗糖,任选地其中所述制剂的pH为7.5。在一些实施方案中,制剂包含浓度为30mg/mL的复合物。

[0213] 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的结构的复合物,其中每个R^1包含下式(Ic)的基团:

[0214]



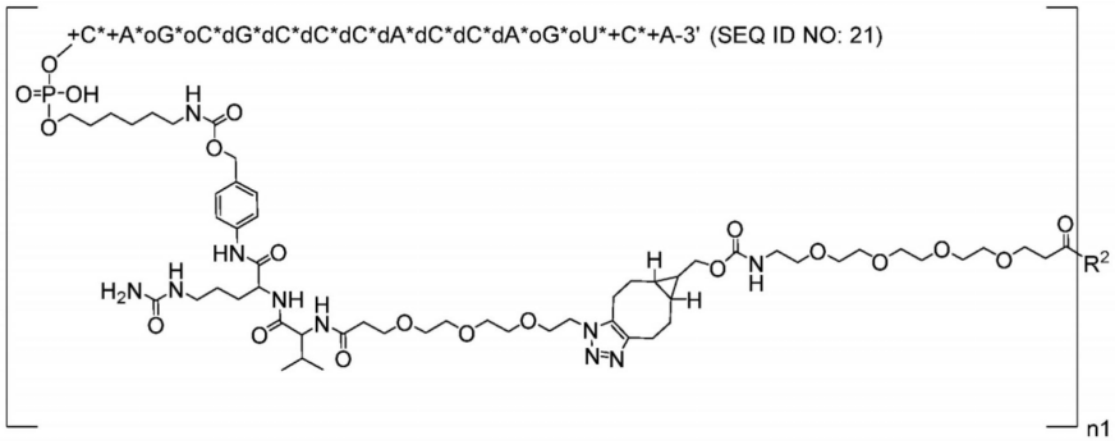
(Ic),

[0215] 其中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中所示的序列的抗体。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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链

互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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,本文中所述的制剂还包含含有式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的复合物,其中n1是0。在一些实施方案中,组合物的复合物的n1的平均值为0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。在一些实施方案中,制剂还包含三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖。在一些实施方案中,制剂包含浓度为25mM的三(羟甲基)氨基甲烷和/或(例如,和)浓度为10w/v%的蔗糖,任选地,其中所述制剂的pH为7.5。在一些实施方案中,制剂包含浓度为30mg/mL的复合物。

[0216] 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:

[0217]

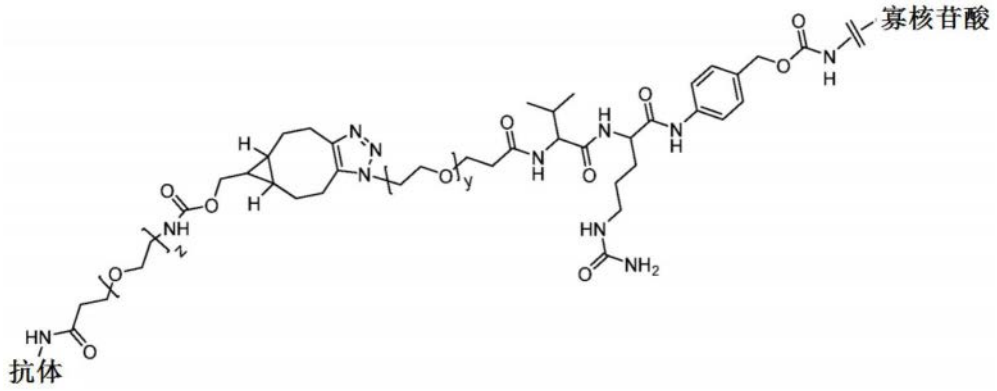


(Id),

[0218] 其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联,并且其中寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列;其中R^2包含含有表2中所示的序列的抗体;其中n1是整数(例如,一或更大),其表示由方括号包括的基团的实例数,其中每个由方括号包括的基团的实例与抗体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,所述抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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,本文中所述的制剂还包含其中n1为0的复合物。在一些实施方案中,组合物的复合物的n1的平均值为0.5至5(例如,0.5至5、1至5、1至4、1至3、3至5、0.5至4、0.5至3、0.5至2、0.5至1.5、0.5至1、0.7至1.5、1至1.6、1至1.5、1至1.4、1至1.3、1至1.2、1.1至1.5、0.8至2、0.8至1.5、0.8至1.3、0.8至1.2、0.8至1.1、0.9至3、0.9至2、0.9至1.8、0.9至1.6、0.9至1.5、0.9至1.4、0.9至1.3、或0.9至1.2)。在一些实施方案中,制剂还包含三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖。在一些实施方案中,制剂包含浓度为25mM的三(羟甲基)氨基甲烷和/或(例如,和)浓度为10w/v%的蔗糖,任选地,其中所述制剂的pH为7.5。在一些实施方案中,制剂包含浓度为30mg/mL的复合物。

[0219] 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:

[0220] 

[0221] (A),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,在结构(A)中示出的与抗体(例如,抗TfR1抗体)相邻的酰胺是由与抗体的胺(例如赖氨酸ε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抗体的赖氨酸与寡核苷酸(例如包含5'-X-Y-Z-3'构型的寡核苷酸)的5'末端共价连接的抗TfR1抗体(例如,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中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8

或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3);以及/或者包含含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)和含有SEQ ID NO:6或16中所示的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。在一些实施方案中,制剂还包含三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖。在一些实施方案中,制剂包含浓度为25mM的三(羟甲基)氨基甲烷和/或(例如,和)浓度为10w/v%的蔗糖,任选地其中制剂的pH为7.5。在一些实施方案中,制剂包含浓度为30mg/mL的复合物。

[0222] 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(root vegetable))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)。

[0223] 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),其通过包括冻干本文中所述制剂(例如,水性形式)的水溶液的方法产生。

[0224] 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。施用途径的一些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。

[0225] 用途/治疗方法

[0226] 如本文中所述的,包含与分子载荷(例如,DMPK靶向寡核苷酸)共价连接的抗TfR1抗体(例如,Fab)的复合物在治疗患有强直性肌营养不良(例如,DM1)的对象中是有效的。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DMPK的表达或活性降低(例如,突变体或野生型DMPK RNA水平降低)的寡核苷酸。

[0227] 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,对象可患有强直性肌营养不良。在一些实施方案中,对象具有DMPK等位基因,其可任选地包含疾病相关性重复,例如CTG三核苷酸重复扩增。在一些实施方案中,对象可具有DMPK等位基因,所述DMPK等位基因具有扩增的疾病相关性重复,所述扩增的疾病相关性重复包含约2至10个重复单元、约2至50个重复单元、约2至100个

重复单元、约50至1,000个重复单元、约50至500个重复单元、约50至250个重复单元、约50至100个重复单元、约500至10,000个重复单元、约500至5,000个重复单元、约500至2,500个重复单元、约500至1,000个重复单元、或约1,000至10,000个重复单元。在一些实施方案中,对象可患有强直性肌营养不良,例如DM1。在一些实施方案中,对象患有DM1的症状,例如肌肉萎缩、肌肉损失、日间过度嗜睡或认知延迟。在一些实施方案中,对象未患有DM1的症状。在一些实施方案中,对象患有先天性强直性肌营养不良。在一些实施方案中,对象是可走动的。在一些实施方案中,对象是不可走动的。

[0228] 本公开内容的一个方面包括方法,该方法包括向对象施用包含有效量的本文中所述的复合物的制剂。在一些实施方案中,可向需要治疗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,DMPK靶向寡核苷酸)共价连接的本文中所述的抗体(例如,Fab)。在一些实施方案中,可通过合适的途径施用包含如本文中所述复合物的药物组合物,所述合适的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,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,水性或液体形式可以被雾化或冻干。在一些实施方案中,冻干形式可用水溶液或液体溶液重构。

[0229] 在一些实施方案中,提供了用于治疗具有DMPK等位基因的对象的方法和/或用途,所述等位基因可任选地包含疾病相关重复,所述方法包括向所述对象施用本文中所述的制剂,所述制剂包含有效量的本文中所述的复合物。在一些实施方案中,提供了用于降低细胞(例如,肌细胞)中DMPK的表达或活性(例如,降低突变体或野生型DMPK RNA的水平,或DMPK基因产物的活性)的方法和/或用途,所述方法包括将细胞与包含有效量的本文中所述的复合物的本文中所述的制剂接触。在一些实施方案中,所述方法包括施用本文中所述制剂的冻干形式(例如,冻干粉末),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,冻干形式的制剂以冻干形式运输和/或储存,在用于施用制剂的水溶液的场所(例如,健康护理提供者场所)中重构,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)施用。

[0230] 在一些实施方案中,药物组合物通过位点特异性递送技术或局部递送技术施用。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、直接注射或直接施加。

[0231] 在一些实施方案中,包含含有与分子载荷(例如,DMPK靶向寡核苷酸)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以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。

[0232] 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:通过对与强直性肌

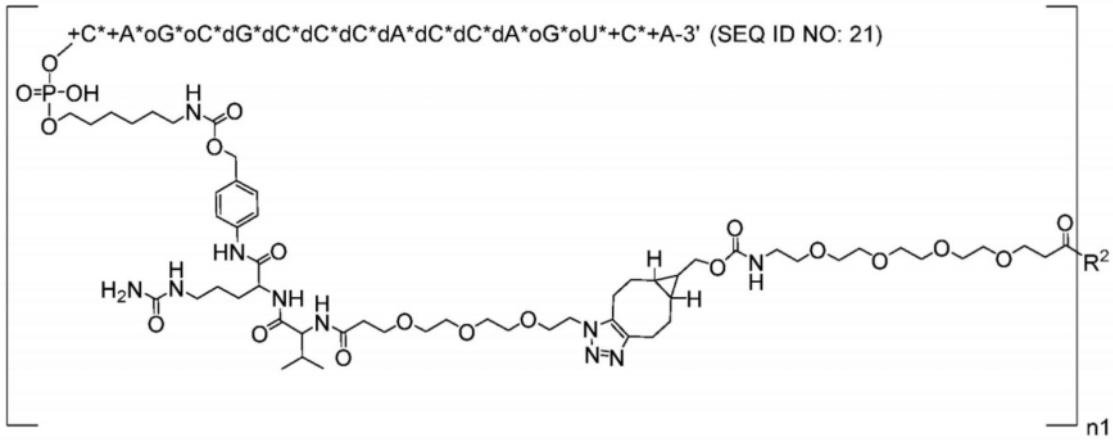
营养不良相关的症状(例如肌肉萎缩或肌无力)的观察结果或评价,通过对对象的自我报告结局(例如移动性、自我护理、日常活动、疼痛/不适和焦虑/抑郁)的测量,或通过生活质量指标(例如寿命)。在一些实施方案中,将本文中所述的包含含有与分子载荷共价连接的肌肉靶向剂的复合物的药物组合物以相对于对照(例如治疗之前基因表达的基线水平)足以调节至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的靶基因活性或表达的有效浓度施用于对象。

[0233] 实施例

[0234] 实施例1.DM1小鼠模型中包含与DMPK靶向寡核苷酸缀合的抗TfR1Fab的缀合物的体内组织分布

[0235] 在小鼠模型中测试了包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)缀合的抗TfR1 Fab的缀合物,所述小鼠模型表达人TfR1和含有扩增的CUG重复的人DMPK突变体二者。所使用的抗TfR1 Fab具有表2中提供的VH/VL序列。Fab通过包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头与包含SEQ ID NO:21的核碱基序列的DMPK靶向寡核苷酸共价连接(通过赖氨酸缀合)。该缀合物包含下式(Id)的结构:

[0236]



[0237] (Id),其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联,并且其中寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列,并且其中R^2包含表2中提供的抗TfR1抗体,并且其中在每个缀合物中,n1独立地是1至3的整数。

[0238] 在第0天和第7天,将缀合物静脉内施用于小鼠,每次剂量相当于9.7mg/kg ASO。ASO的组织暴露通过杂交ELISA(Burki et al.,Nucleic Acid Ther.2015Oct;25(5):275-84;其通过引用并入本文)测试,并对组织中的ASO水平作图。图1A、1B、1C和1D分别示出了在第一次注射之后两周心脏、膈肌、腓肠肌或胫骨前肌中的ASO的量。这些结果表明包含抗TfR1抗体(例如,具有表2中提供的VH和VL序列的抗TfR1 Fab)的缀合物能够在静脉内施用之后将寡核苷酸(例如,DMPK靶向ASO)递送至多种肌肉组织。

[0239] 实施例2.在重复给药抗TfR1 Fab-ASO缀合物之后4周时hTfR1/DMSXL纯合小鼠中毒性人DMPK的持续敲低

[0240] 在小鼠模型(hTfR1/DMSXL小鼠)中测试了如实施例1中所述的包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1 Fab的缀合物(在该实施例中标记为"抗TfR1 Fab-ASO缀合

物"),所述小鼠模型表达人TfR1和两个拷贝的含有扩增的CUG重复的突变体人DMPK转基因二者。在第0天和第7天,将载剂对照(PBS)或10mg/kg ASO当量剂量的抗TfR1Fab-ASO缀合物施用于小鼠。在第28天(在施用第一剂抗TfR1 Fab-ASO缀合物之后四周)处死小鼠,并收集组织。提取RNA并将所选的组织样品进行固定、石蜡包埋和切片,然后进行原位杂交。进行RNA样品的逆转录-定量聚合酶链式反应(Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)以测量人DMPK和小鼠Ppib(肽基脯氨酰异构酶)作为内部对照。DMPK表达在图2A至2D中以几何平均值+/-标准偏差显示(n=6至9)。通过Student t检验评估显著性(****P<0.0001)。

[0241] 图2A示出了相对于经PBS处理的小鼠,抗TfR1 Fab-ASO缀合物将心脏中的DMPK表达敲低了49%。图2B示出了相对于经PBS处理的小鼠,抗TfR1 Fab-ASO缀合物将膈肌中的DMPK表达敲低了40%。图2C示出了相对于经PBS处理的小鼠,抗TfR1 Fab-ASO缀合物将胫骨前肌中的DMPK表达敲低了49%。图2D示出了相对于经PBS处理的小鼠,抗TfR1 Fab-ASO缀合物将腓肠肌中的DMPK表达敲低了44%。

[0242] 图3A和3B示出了抗TfR1 Fab-ASO缀合物减少了肌纤维核内的DMPK病灶。图3A通过原位杂交示出了减少的DMPK病灶,以及图3B示出了荧光显微术图像中DMPK病灶的量化,这表明缀合物将病灶面积降低了49%。数据表示为平均值+/-标准偏差(n=7)。通过t检验评估显著性(*P<0.05)。

[0243] 这些结果表明,抗TfR1 Fab-ASO缀合物的施用导致心肌和骨骼肌中人毒性DMPK的稳健、持续的敲低。

[0244] 实施例3.通过抗TfR1 Fab-ASO缀合物校正hTfR1/DMSXL纯合子小鼠的剪接缺陷

[0245] 在小鼠模型("hTfR1/DMSXL")中测试了如实施例1中所述的包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1 Fab的缀合物(在该实施例中标记为"抗TfR1 Fab-ASO缀合物"),所述小鼠模型表达人TfR1和两个拷贝的含有扩增的CUG重复的突变体人DMPK转基因二者。已知这些小鼠表现出与在患有DM1的患者中观察到的那些一致的剪接缺陷(Huguet,et al.(2012)PLOS Genetics 8(11):e1003043)。在第0天和第7天,向小鼠施用载剂对照("hTfR1/DMSXL-PBS")或10mg/kg ASO当量剂量的抗TfR1 Fab-ASO缀合物("hTfR1/DMSXL-缀合物")。将仅表达人TfR1但不表达突变体人DMPK转基因的小鼠(hTfR1小鼠)和用PBS处理的小鼠("hTfR1-PBS")用作另一对照,以确定hTfR1/DMSXL小鼠中剪接表型的程度,并评估缀合物对剪接的影响程度。在第28天(在施用第一剂抗TfR1 Fab-ASO缀合物之后四周)处死小鼠,收集组织并提取RNA。进行逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)以测量已知在人和小鼠的DM1进展期间被错误剪接的一组RNA中的外显子包涵(Nakamori,et al.(2013)Ann.Neurol.74(6):862-872;Huguet,et al.(2012)PLOS Genetics 8(11):e1003043)。将外显子包涵以每个剪接RNA标志物的归一化剪接百分比(percent spliced in,PSI)计算,并使用来自心脏(图4)、膈肌(图5)、胫骨前肌(图6)和腓肠肌(图7)中的剪接标志物的经归一化PSI值来计算复合剪接指数。如前所述计算复合剪接指数(Tanner MK,et al.(2021)Nucleic Acids Res.49:2240-2254),并以平均值+/-标准偏差显示。

[0246] 图4示出了抗TfR1 Fab-ASO缀合物校正了hTfR1/DMSXL小鼠心脏组织中的剪接,如复合剪接指数数据所示。用于产生复合剪接指数数据的经归一化PSI值显示出用抗TfR1 Fab-ASO缀合物的处理对hTfR1/DMSXL小鼠的心脏组织中的Mbnl2外显子6(E6)和Nfix E7剪

接的校正,但未显示出对Ldb3 E11剪接的校正。图4示出的复合剪接指数数据基于Ldb3E11、Mbnl2 E6和Nfix E7剪接数据;Bin1 E11、Dtna E12、Insr E11和Mbnl2E5没有包括在内,因为在测试的实验条件下,相对于hTfR1小鼠,它们在心脏组织中的经归一化PSI值在hTfR1/DMSXL小鼠中没有改变。

[0247] 图5示出了抗TfR1 Fab-ASO缀合物校正了hTfR1/DMSXL小鼠膈肌组织中的剪接,如复合剪接指数数据所示。用于产生复合剪接指数数据的经归一化PSI值显示出用抗TfR1 Fab-ASO缀合物的处理对hTfR1/DMSXL小鼠的膈肌组织中的Bin1 E11、Insr E11、Ldb3 E11和Nfix E7剪接的校正。图5示出的复合剪接指数数据基于Bin1 E11、Insr E11、Ldb3 E11和Nfix E7剪接数据;Dtna E12、Mbnl2 E5、Mbnl2 E6和Ttn E313没有包括在内,因为在测试的实验条件下,相对于hTfR1小鼠,它们在膈肌组织中的经归一化PSI值在hTfR1/DMSXL小鼠中没有改变。

[0248] 图6示出了抗TfR1 Fab-ASO缀合物校正了hTfR1/DMSXL小鼠胫骨前肌组织中的剪接,如复合剪接指数数据所示。用于产生复合剪接指数数据的经归一化PSI值显示出用抗TfR1 Fab-ASO缀合物的处理对hTfR1/DMSXL小鼠的胫骨前肌组织中的Bin1 E11、Ldb3 E11和Nfix E7剪接的校正,但未显示出对Mbnl2 E6剪接的校正。图6中示出的复合剪接指数数据基于Bin1 E11、Ldb3 E11、Mbnl2 E6和Nfix E7剪接数据;Dtna E12、Insr E11、Mbnl2 E5和Ttn E313没有包括在内,因为在测试的实验条件下,相对于hTfR1小鼠,它们在胫骨前肌组织中的经归一化PSI值在hTfR1/DMSXL小鼠中没有改变。

[0249] 图7示出了抗TfR1 Fab-ASO缀合物校正了hTfR1/DMSXL小鼠腓肠肌组织中的剪接,如复合剪接指数数据所示。用于产生复合剪接指数数据的经归一化PSI值显示出用抗TfR1 Fab-ASO缀合物的处理对hTfR1/DMSXL小鼠的腓肠肌组织中的Mbnl2 E6、Nfix E7和Ttn E313剪接的校正。图7中示出的复合剪接指数数据基于Mbnl2 E6、Nfix E7和Ttn E313剪接数据;Bin1 E11、Dtna E12、Insr E11、Ldb3 E11和Mbnl2 E5没有包括在内,因为在测试的实验条件下,相对于hTfR1小鼠,它们在腓肠肌组织中的经归一化PSI值在hTfR1/DMSXL小鼠中没有改变。

[0250] 这些结果表明抗TfR1 Fab-ASO缀合物的施用有助于心肌和骨骼肌中的DM1剪接缺陷的校正。

[0251] 实施例4.非人灵长类和DM1患者肌管中的DMPK敲低

[0252] 在人DM1患者肌管(32F细胞)和非人灵长类(NHP)肌管中测试了如实施例1中所述的包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1 Fab的缀合物(在该实施例中标记为“抗TfR1 Fab-ASO缀合物”)。使用的DM1患者肌管表达含有380个CUG重复的突变体DMPK mRNA和野生型DMPK mRNA二者。使用的NHP肌管仅表达野生型DMPK。

[0253] 将DM1患者细胞或NHP细胞以50,000个细胞/孔的密度接种到生长培养基中的96孔板中并使其过夜恢复。第二天,将生长培养基更换成低血清分化培养基,并用浓度相当于125nM、250nM或500nM ASO的缀合物处理细胞。将细胞孵育十天,然后使用Cells-to-Ct试剂盒合成cDNA,其中将粗细胞裂解物作为总RNA的来源。

[0254] 将cDNA用于使用Taqman PCR评估总DMPK敲低。将数据归一化为PPIB表达,并使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法来确定与经PBS处理的对照(“载剂”)相比的DMPK敲低。图8中示出的数据表示为相对于物种匹配的载剂对照的平均值DMPK表达+标准偏差(每种条件n=4个重复)。

[0255] 结果显示,当以生理相关浓度处理时,抗TfR1 Fab-ASO缀合物在正常NHP肌管和DM1患者肌管二者中均实现了DMPK表达的敲低,其中与NHP细胞(仅表达野生型DMPK mRNA)相比,在DM1患者细胞(表达野生型DMPK mRNA和含有380个CUG重复的DMPK mRNA二者)中DMPK表达的敲低程度更高(图8)。在125nM的ASO等效浓度下,相对于仅载剂的对照,缀合物在NHP肌管中实现了约40% DMPK敲低,并且在DM1患者肌管中实现了约65% DMPK敲低。在250nM的ASO等效浓度下,相对于仅载剂的对照,缀合物在NHP肌管中实现了约45%DMPK敲低,并且在DM1患者肌管中实现了约80% DMPK敲低。在500nM的ASO等效浓度下,相对于仅载剂的对照,缀合物在NHP肌管中实现了约60% DMPK敲低,并且在DM1患者肌管中实现了约90% DMPK敲低。

[0256] 这些结果表明,相对于表达野生型DMPK的食蟹猴肌管,包含与DMPK靶向寡核苷酸共价连接的抗TfR1 Fab的缀合物可在表达野生型DMPK mRNA和突变体DMPK mRNA(具有扩增的CUG重复)二者的人肌管中实现更大程度的DMPK敲低。

[0257] 实施例5.不同示例性制剂的热稳定性比较

[0258] 制备包含实施例1中所述缀合物的制剂,所述缀合物包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1 Fab。抗TfR1 Fab-寡核苷酸缀合物起始物质(“SM(starting material)”)在pH 7.4的含有100mM磷酸钠和100mM氯化钠的缓冲剂中的浓度为33mg/mL。为了进行稳定性测试,将抗TfR1 Fab-寡核苷酸缀合物配制在浓度为约40mg/mL的不同的缓冲剂中。四种制剂中每一者的缓冲条件如下:

[0259] 制剂缓冲剂1:25mM琥珀酸盐,10%(w/v)蔗糖,pH 5.2。

[0260] 制剂缓冲剂2:25mM琥珀酸盐,10%(w/v)蔗糖,pH 6.0。

[0261] 制剂缓冲剂3:25mM三(羟甲基)氨基甲烷,10%(w/v)蔗糖,pH 7.5。制剂缓冲剂4:100mM磷酸钠,100mM氯化钠,pH 7.4。

[0262] 使用Vivaspin®6离心膜过滤器(截留分子量为30kDa)将制剂药物物质(具有本文中所述缀合物的制剂)缓冲剂交换到如上提供的制剂缓冲剂1至4中。在缓冲剂交换之后,将抗TfR1 Fab-寡核苷酸缀合物浓缩至约40mg/ml。将来自每个浓缩样品的约150μL的等分式样用于研究每个制剂中缀合物的热稳定性。将样品在-20℃、2至8℃、25℃或40℃下在玻璃瓶中孵育1周(“T1”)、2周(“T2”)、4周(“T4”)或8周(“T8”)。在测试的任何温度下或时间点处,在任何测试样品中均没有观察到颜色、外观或pH的变化。

[0263] 首先通过在T0(第0周)、T4和T8时以及在特定温度下测量多种样品中缀合物的浓度来测试每种制剂的热稳定性。使用标准BCA(Bicinchoninic Acid,二喹啉甲酸)分析来测量浓度。使用标准操作进行BCA测定:

[0264] 1)通过将20mLBCA试剂A与200μL BCA试剂B充分混合来制备工作试剂(Working Reagent,WR)。

[0265] 2)制备测试样品的标准曲线和稀释曲线。首先将测试样品以1:4稀释,然后将20μL每种测试样品或标准品与200μL WR充分混合,并在60℃下孵育10分钟。将得到的溶液添加至96孔板的第一行,并连续稀释。制备6点标准曲线。

[0266] 3)在平板读数器上测量在480nm处的吸光度。

[0267] 4)将标准曲线用于确定每个测试样品的蛋白质浓度。测量每个测试样品的五个稀释度。

[0268] 热稳定性研究的浓度测量的结果在下表3中示出。

[0269] 表3.

[0270]

时间点	温度 (°C)	测量的缀合物的平均浓度 (mg/mL)†			
		制剂 1	制剂 2	制剂 3	制剂 4
T0	N/A	36.90	42.44	44.28	44.29
T4	-20	32.16	43.72	43.50	43.28
	2-8	31.70	42.62	39.31	40.42
	25	34.52	40.02	42.69	41.94
	40	41.00	41.40	42.60	42.03
T8	-20	32.43	42.15	42.01	42.67
	2-8	32.83	41.18	41.49	42.09
	25	34.23	43.80	42.16	43.15
	40	42.90	45.40	42.37	43.32

[0271] †示出的浓度是从每个测试样品的5个连续稀释度的测量值的平均值计算的。

[0272] 表3中的结果显示,制剂2、3和4中的Fab-寡核苷酸缀合物的浓度在T0、T4和T8时是一致的。与T0测量值相比,在T4和T8时制剂1中Fab-寡核苷酸缀合物的浓度在更低的储存温度下显示出降低的浓度。

[0273] 通过测量浓度为40mg/mL的聚集体形成,进一步研究Fab-寡核苷酸缀合物的热稳定性。在稀释至1mg/mL之后,使用Waters ACQUITY UPLC Protein BEH SEC柱(125Å,1.7μm,4.6x150 mm),流动相为0.2M磷酸钾pH 6.8,0.2M氯化钾等度洗脱,15%异丙醇,通过尺寸排阻色谱(SEC-UV,size exclusion chromatography)分析在不同指定温度下孵育的T0、T1、T2、T4和T8样品。柱温为30℃并且使用10μg进样量(injection)。流量为0.35mL/分钟,并在280nm的波长下进行分析。

[0274] 在SEC热稳定性分析中,测量每个样品的高分子量(high molecular weight,HMW)物质、Fab寡核苷酸缀合单体和低分子量(low molecular weight,LMW)物质的百分比。结果在下表4中示出。将起始物质(SM)的值显示在顶行用于比较。

[0275] 表4.

[0276]

时间点	温度 (°C)	% HMW 物质	% 单体	% LMW 物质
SM		10.0	89.9	0.2
制剂 1				
T0	N/A	7.6	92.0	0.4
T1	-20	5.7	93.6	0.7
	2-8	4.4	94.8	0.8
	25	4.8	94.0	1.2
	40	4.4	94.0	1.6
T2	-20	7.5	91.8	0.7
	2-8	7.5	91.8	0.7
	25	7.5	90.5	2.0
	40	6.6	91.2	2.1
T4	-20	7.5	92.4	0.1
	2-8	8.1	91.5	0.5
	25	7.2	90.7	2.1
	40	6.6	88.3	5.1
T8	-20	8.8	90.7	0.5
	2-8	8.9	90.3	0.8
	25	8.6	89.2	2.2
	40	8.3	85.8	5.9
制剂 2				
T0	N/A	10.0	89.7	0.2
T1	-20	9.8	90.0	0.2
	2-8	9.9	89.9	0.2
	25	9.3	90.2	0.6
	40	8.6	89.9	1.5
T2	-20	9.3	90.4	0.3
	2-8	9.4	90.2	0.4
	25	9.1	90.0	0.9
	40	8.4	89.2	2.3
T4	-20	9.1	90.8	0.1
	2-8	9.4	90.4	0.2
	25	8.3	90.6	1.1
	40	7.9	89.7	2.4
T8	-20	9.5	90.3	0.2

[0277]

时间点	温度 (°C)	% HMW 物质	% 单体	% LMW 物质
	2-8	9.6	89.9	0.5
	25	8.7	89.4	1.9
	40	8.8	87.0	4.2
制剂 3				
T0	N/A	9.8	89.8	0.5
T1	-20	10.1	89.6	0.3
	2-8	9.8	89.8	0.4
	25	9.2	89.8	1.0
	40	8.7	89.6	1.7
T2	-20	9.5	90.1	0.4
	2-8	9.3	90.1	0.6
	25	8.5	90.2	1.3
	40	8.8	89.2	2.0
T4	-20	8.7	91.1	0.2
	2-8	7.8	90.9	1.3
	25	7.9	90.8	1.3
	40	8.8	88.7	2.5
T8	-20	8.9	90.6	0.5
	2-8	8.5	90.7	0.8
	25	8.6	89.8	1.6
	40	11.0	86.0	3.0
制剂 4				
T0	N/A	9.6	90.2	0.2
T1	-20	9.1	90.8	0.2
	2-8	9.7	90.1	0.2
	25	9.2	90.2	0.7
	40	9.2	88.9	1.9
T2	-20	9.5	90.2	0.3
	2-8	9.6	90.0	0.4
	25	9.6	89.3	1.2
	40	9.2	88.4	2.5
T4	-20	8.5	91.4	0.1
	2-8	8.7	91.0	0.2
	25	8.9	89.8	1.3
	40	9.0	87.4	3.6
T8	-20	9.7	90.0	0.3
	2-8	9.7	89.8	0.5
	25	9.9	88.3	1.8
	40	11.1	83.8	5.1

[0278] 结果显示单体的百分比随着温度的升高或随着时间的推移无显著变化,并且随着温度的升高,观察到LMW物质随着时间的推移略有提高。

[0279] 总体而言,SEC分析表明,与制剂4相比,制剂1、2和3在8周时间点提供了相对于%单体的略微改善的稳定性。制剂3显示出相对于%LMW物质的变化的最佳稳定性。

[0280] 通过使用毛细管电泳(capillary electrophoresis,CE-SDS)的非还原蛋白质表

达测定,进一步研究了40mg/mL的Fab-寡核苷酸缀合物的热稳定性。对于通过该方法的分析,将样品稀释至1mg/mL,然后与PBS中的10mM N-乙基马来酰亚胺以1:1混合。然后将5μL的这些样品中的每一种添加至96孔板中的7μL样品缓冲剂(Protein Express Reagent试剂盒,Perkin Elmer CLS960008)。将样品在70℃下孵育10分钟,然后在冰上冷却5分钟。将32μL水添加至每个样品孔,并在分析之前将板以1200g离心2分钟。在HT Protein Express LabChip(Perkin Elmer 760499)上,使用LabChip GXII Touch HT(Perkin Elmer),使用测量方法HT High Sensitivity Antibody Analysis 200分析样品。

[0281] 非还原CE-SDS分析的结果在下表5中示出。为了比较,起始物质显示62.4kDa的尺寸和100.0%的纯度。

[0282] 表5.

[0283]

时间点	(°C)	尺寸 † 和 % 纯度			
		制剂 1	制剂 2	制剂 3	制剂 4
T0	N/A	65.0 (100.0)	63.5 (100.0)	63.3 (100.0)	62.6 (100.0)
T1	-20	66.0 (100.0)	64.3 (100.0)	65.1 (100.0)	64.2 (100.0)
	2-8	66.2 (100.0)	65.4 (100.0)	64.0 (100.0)	63.7 (100.0)
	25	66.3 (98.4)	64.1 (98.9)	64.1 (98.8)	63.3 (98.7)
	40	65.1 (97.4)	63.1 (97.8)	62.9 (97.9)	63.2 (96.8)
T2	-20	66.0 (100.0)	64.6 (100.0)	63.5 (100.0)	63.2 (100.0)
	2-8	66.4 (100.0)	64.6 (100.0)	63.0 (100.0)	63.3 (100.0)
	25	66.1 (97.7)	64.0 (98.8)	63.3 (98.8)	63.4 (98.5)
	40	66.3 (95.7)	64.3 (97.5)	63.3 (97.9)	63.5 (96.7)
T4	-20	66.6 (100.0)	63.7 (100.0)	63.5 (100.0)	64.9 (100.0)
	2-8	67.0 (100.0)	63.7 (100.0)	63.2 (100.0)	64.0 (100.0)
	25	66.2 (97.0)	63.5 (98.5)	63.8 (98.6)	64.7 (98.2)
	40	66.0 (84.1)	64.1 (96.6)	63.7 (97.1)	64.3 (95.9)
T8	-20	66.4 (100.0)	65.9 (100.0)	65.4 (100.0)	64.2 (100.0)
	2-8	66.7 (100.0)	65.9 (100.0)	65.7 (100.0)	64.2 (100.0)
	25	67.1 (96.9)	64.6 (98.8)	64.9 (98.2)	63.7 (97.7)
	40	67.4 (74.8)	65.9 (95.0)	64.7 (96.4)	64.1 (94.9)

[0284] †尺寸以kDa示出。括号中的值表示纯度百分比。

[0285] 结果显示,从T1至T8,制剂1中缀合物的纯度百分比在25℃和40℃下逐渐降低,并且观察到新物质的形成,这表明制剂1中的缀合物在更高温度下更不稳定。结果还显示,在测试的所有温度和时间点下,制剂2、3和4中的缀合物具有良好的纯度百分比。制剂3中的缀合物在更高温度下的高纯度百分比表明它们相对于其他制剂在制剂3中具有改善的稳定性。

[0286] 通过使用毛细管电泳(CE-SDS)的还原蛋白质表达测定,进一步研究了40mg/mL的Fab-寡核苷酸缀合物的热稳定性。对于通过该方法的分析,用PBS将样品稀释至0.5mg/mL。接下来将样品与变性溶液混合:将24.5μL 14.2Mβ-巯基乙醇(BME)添加至700μL蛋白质表达样品缓冲剂(蛋白质表达试剂盒,Perkin Elmer CLS960008),并随后将5μL每种经稀释样品添加至96孔板中的7μL样品变性溶液中。将样品在70℃下孵育10分钟,然后在冰上冷却5分钟。将32μL水添加至每个样品孔,并在分析之前将板在1200g下离心2分钟。在HT Protein Express LabChip(Perkin Elmer 760499)上,使用LabChip GXII Touch HT(Perkin Elmer),使用测量方法HT High Sensitivity Antibody Analysis 200分析样品。

[0287] 还原CE-SDS分析的结果在下表6中示出。起始物质(SM)的值在顶行中示出用于比

较。

[0288] 表6.

[0289]

时间点	温度 (°C)	LC 片段 尺寸†	% LC 片段	Fab H/L 片段 尺寸†	% Fab H/L 片段	其他片段 尺寸 †	%其他 片段
SM		28.4	3.0	34.9	87.3	41.7	9.7
制剂 **1**							
T0	N/A	27.7	15.3	35.6	79.9	41.7	5.2
T1	-20	27.0	3.9	34.2	89.8	41.0	6.4
	2-8	26.9	3.9	33.8	89.9	40.7	6.3
	25	27.8	4.0	34.9	89.7	42.0	6.3
	40	27.8	4.4	34.9	89.0	42.1	6.6
T2	-20	27.6	3.9	34.4	44.9	42.4	5.6
	2-8	27.4	4.0	34.1	45.8	42.0	5.6
	25	27.5	4.3	34.0	46.7	42.1	5.3
	40	27.4	4.9	33.9	45.3	41.8	5.2
T4	-20	27.1	3.7	33.7	48.0	41.5	6.2
	2-8	27.2	3.8	33.8	46.9	41.9	6.1
	25	26.9	4.4	33.4	47.2	41.3	5.4
	40	27.3	5.6	33.7	50.0	41.6	4.5
T8	-20	27.3	3.1	34.3	48.1	41.8	5.0
	2-8	27.6	3.4	34.3	46.1	42.2	5.1
	25	27.3	3.8	34.0	47.1	41.7	4.8
	40	27.5	6.4	33.9	53.9	41.7	4.3
制剂 **2**							
T0	N/A	28.2	3.0	34.8	87.5	41.4	9.4
T1	-20	27.3	3.8	33.8	87.0	40.9	9.2
	2-8	27.1	3.7	33.5	86.5	40.6	8.8

[0290]

时间点	温度 (°C)	LC 片段 尺寸†	% LC 片段	Fab H/L 片段 尺寸†	% Fab H/L 片段	其他片段 尺寸 †	% 其他 片段
	25	27.6	4.0	34.4	87.5	41.8	8.4
	40	28.1	4.3	34.8	87.4	42.3	8.3
T2	-20	27.5	4.5	34.3	87.5	42.0	8.0
	2-8	27.4	4.2	34.1	88.2	41.8	7.6
	25	26.7	4.7	33.2	87.0	40.9	7.3
	40	26.8	5.3	33.3	87.7	40.9	7.0
T4	-20	27.1	4.3	33.8	87.7	41.3	8.0
	2-8	27.0	4.2	33.7	88.2	41.2	7.6
	25	27.4	4.7	34.1	86.9	41.8	7.2
	40	27.0	5.1	33.6	85.8	41.1	6.6
T8	-20	27.5	3.7	34.3	89.1	41.8	7.2
	2-8	27.2	3.8	34.0	89.3	41.5	6.9
	25	27.1	6.3	33.7	87.7	41.1	6.0
	40	27.2	4.6	34.0	88.7	41.4	6.7
制剂 **3**							
T0	N/A	28.3	3.1	34.8	87.6	41.4	9.4
T1	-20	27.2	3.8	33.7	87.0	41.1	9.2
	2-8	27.3	4.0	33.8	86.9	41.1	9.2
	25	28.0	4.1	34.7	87.0	42.2	8.8
	40	28.0	4.5	34.7	87.3	42.0	8.2
T2	-20	26.8	4.6	33.4	87.5	40.9	8.0
	2-8	27.2	4.6	33.8	87.5	41.4	7.9
	25	26.6	5.1	33.2	86.3	40.6	7.7
	40	26.8	5.5	33.2	82.4	40.6	6.1
T4	-20	26.9	4.4	33.5	87.5	41.0	8.1
	2-8	26.8	4.9	33.4	86.8	40.9	8.3
	25	27.2	4.9	33.8	86.7	41.4	7.4
	40	27.3	6.0	33.9	84.6	41.5	6.8
T8	-20	26.9	4.2	33.5	88.0	41.0	7.8
	2-8	27.0	4.3	33.6	88.4	41.0	7.3
	25	27.0	5.1	33.7	88.5	41.1	7.0
	40	27.2	6.3	33.8	84.3	41.3	5.7
制剂 **4**							
T0	N/A	28.0	3.0	34.5	87.6	41.1	9.4
T1	-20	27.1	3.7	33.6	87.6	40.9	8.7
	2-8	27.1	3.8	33.7	87.4	40.9	8.8
	25	27.6	3.9	34.2	87.4	41.6	8.7
	40	27.4	4.9	34.1	87.0	41.5	8.1
T2	-20	27.0	4.3	33.6	87.3	41.2	8.1
	2-8	27.4	4.4	33.9	87.6	41.4	8.0
	25	27.0	4.7	33.7	87.8	41.2	7.5
	40	26.8	5.9	33.5	86.9	40.8	7.2
T4	-20	27.2	3.8	33.8	89.1	41.4	7.1
	2-8	26.7	4.3	33.8	88.0	40.6	7.7
	25	27.1	4.9	33.7	87.8	41.3	7.3
	40	27.2	6.3	33.8	86.8	41.4	6.7

[0291]

时间点	温度 (°C)	LC 片段 尺寸†	% LC 片段	Fab H/L 片段 尺寸†	% Fab H/L 片段	其他片段 尺寸†	% 其他 片段
T8	-20	26.9	4.2	33.5	87.7	40.9	8.1
	2-8	26.8	4.1	33.5	88.6	40.8	7.3
	25	26.7	5.1	33.4	88.0	40.7	5.4
	40	26.8	6.8	33.4	87.7	40.7	5.4

[0292] †尺寸以kDa示出。

[0293] 在制剂1中,在T2、T4和T8的所有样品中观察到两个另外的峰,包括一个另外的HC峰,这表明该制剂中缀合物的不稳定性。通过还原CE-SDS观察到,制剂2、3和4中缀合物的总体稳定性没有显著差异。

[0294] 总的来说,本文中给出的多种热稳定性测试的结果表明,制剂3为Fab-寡核苷酸缀合物提供了最佳的稳定性。

[0295] 实施例6.不同示例性制剂的冻/融稳定性的比较

[0296] 制备包含实施例1中所述缀合物的制剂,所述缀合物包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1 Fab。抗TfR1 Fab-寡核苷酸缀合物起始物质(“SM”)在pH 7.4的含有100mM磷酸钠和100mM氯化钠的缓冲剂中的浓度为33mg/mL。对于冻/融稳定性测试,将抗TfR1 Fab-寡核苷酸缀合物配制在浓度为约40mg/mL的不同的缓冲剂中。四种制剂中每一种的缓冲条件如下:

[0297] 制剂缓冲剂1:25mM琥珀酸盐,10%(w/v)蔗糖,pH 5.2。

[0298] 制剂缓冲剂2:25mM琥珀酸盐,10%(w/v)蔗糖,pH 6.0。

[0299] 制剂缓冲剂3:25mM三(羟甲基)氨基甲烷,10%(w/v)蔗糖,pH 7.5。制剂缓冲剂4:100mM磷酸钠,100mM氯化钠,pH 7.4。

[0300] 为了测试每种制剂中缀合物的冻/融稳定性,制备等分试样并进行0、1、3或5次冻/融循环,在该时间之后评估视觉外观、蛋白质浓度和聚集体/片段形成。

[0301] 对于制剂1、2、3和4中的每一种,视觉外观评估显示溶液是澄清的、无色的,并且在0、1、3和5次冻/融循环之后无可见的聚集体。

[0302] 如实施例5中所述进行的每种制剂的BCA分析表明,在5次冻/融(“F/T”)循环之后,复合物的浓度没有显著变化。结果在下表7中示出。起始物质(SM)的值显示在顶行中用于比较。

[0303] 表7

[0304]

F/T 循环	浓度 (mg/mL)			
	制剂 1	制剂 2	制剂 3	制剂 4
0	34.4	42.4	40.6	44.2
1	35.5	42.3	41.9	44.7
3	35.4	42.1	43.3	43.2
5	36.4	42.5	42.9	44.1

[0305] 如实施例5中所述进行的每种制剂的尺寸排阻色谱(SEC)分析表明,在5次冻/融(“F/T”)循环中,四种制剂在低分子量(LMW)物质、单体和高分子量(HMW)物质方面没有显著差异。结果在下表8中示出。起始物质(SM)的值显示在顶行中用于比较。

[0306] 表8

[0307]

F/T循环	% HMW物质	%单体	% LMW物质
SM	9.48	89.70	0.83
制剂 1			
0	8.15	89.99	1.86
1	7.68	91.20	1.11
3	7.62	90.83	1.55
5	7.68	91.08	1.25
制剂 2			
0	9.50	89.66	0.84
1	9.45	89.71	0.84
3	9.49	89.68	0.82
5	9.55	89.67	0.78
制剂 3			
0	8.61	90.03	1.36
1	8.73	89.81	1.46
3	8.76	89.74	1.50
5	8.77	89.77	1.46
制剂4			
0	9.73	89.24	1.03
1	9.63	89.46	0.92
3	9.56	89.45	1.00
5	9.48	89.52	0.99

[0308] 实施例7.缀合物的冻干制剂的稳定性的评价

[0309] 制备如实施例1中所述的包含与DMPK靶向寡核苷酸(ASO)共价连接的抗TfR1 Fab的缀合物(在该实施例中标记为“抗TfR1 Fab-ASO缀合物”),并在pH 7.5下与三(羟甲基)氨基甲烷(25mM)、蔗糖(10％(w/v))冻干在一起,并测试稳定性。在重构之前,在所有时间点和温度下的所有样品都被目测鉴定为白色饼且形状均匀。另外,样品在不到1分钟的时间内重构,并且变得澄清且无色,其中少于10个颗粒。通过目测分析,认为所有样品在重构之前和重构之后在高至40℃下在至少8周内都是稳定的。

[0310] 进行X射线衍射分析以评价冻干组合物的晶体学结构。将约20mg冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物置于塑料样品保持器中,并用载玻片压平以确保表面平整。当进行该分析时,将Proto AXRD®台式功率X射线衍射仪与细焦点铜阳极金属/陶瓷结构1500瓦X射线管一起使用。

[0311] 测量衍射图案(图9)并识别出宽的“晕圈”(图9中的圆圈),这表明该物质在时间0(T0)时是无定形的。

[0312] 为了测试样品的吸光度,将冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物首先用水重构,并随后使用制剂缓冲剂(25mM三(羟甲基)氨基甲烷,10％(w/v)蔗糖,pH 7.5)稀释至0.2mg/ml的浓度。使用DeNovix DS11+分光光度计测量在260nm和280nm处的吸光度。将读数以一式三份进行并取平均值。将这些结果用于计算在多个时间点的浓度(Fab(mg/mL和μM)和寡核苷酸(μM))、回收百分比和药物抗体比(DAR))。对于所有蛋白质浓度、回收百分比和DAR测试,将牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)用作阳性对照,将PBS用作BSA的空白和阴性对照,并将制剂缓冲剂用作缀合物样品的空白和阴性对照。

[0313] 在2至8℃下,当与4周(T4w)或8周(T8w)相比时,Fab的重复的平均浓度(图10A和图

10B)显示从时间0(T0)起没有显著变化。另外,当比较4周与8周时间点时,不存在显著变化。在2至8℃下,当比较T0、T4w和T8w时,寡核苷酸的重复的平均浓度(图10C)显示无显著差异。在2至8℃下,所有样品在所有时间点的平均回收百分比(图11A)均接近100%。在2至8℃下,平均DAR(图11B)在所有时间点均接近1.0。

[0314] 在25℃下,当与2周(T2w)、4周(T4w)或8周(T8w)相比时,Fab的重复的平均浓度(图12A和图12B)显示相对于时间0(T0)无显著变化,并且当T2w、T4w和T8w与彼此相互比较时不存在显著变化。在25℃下,寡核苷酸的重复的平均浓度(图12C)确实没有显示出随时间的显著变化。在25℃下,所有时间点的平均回收百分比(图13A)均接近100%。在25℃下,平均DAR(图13B)在所有时间点均接近1.0。

[0315] 在40℃下,当与T2w、T4w或T8w相比时,Fab的重复的平均浓度(图14A和图14B)显示相对于T0无显著变化。在40℃下,寡核苷酸的重复的浓度的平均浓度(图10C)在任何时间点都没有显著变化。在40℃下,所有样品在所有时间点的平均回收百分比(图15A)接近100%。在40℃时,平均DAR(图15B)在所有时间点均接近1.0。

[0316] 接下来,使用尺寸排阻色谱(SEC)分析抗TfR1 Fab-ASO缀合物。在分析之前,使用制剂缓冲剂(25mM三(羟甲基)氨基甲烷,10%(w/v)蔗糖,pH 7.5)将所有样品稀释至1.0mg/ml的浓度。对于色谱条件的流动相,使用含有磷酸钾(200mM)、氯化钾(200mM)、5%(v/v)异丙醇(isopropanol,IPA)(pH 6.8)的等度洗脱,流量为0.250ml/分钟,使用20分钟的运行时间。用于测量的波长是280nm。使用的高效液相色谱系统是Dionex Ultimate 3000UPLC系统,具有Waters BEH SEC柱(200 Å,300x 4.6mm,1.7μm,P/N 186005226)。

[0317] 在2至8℃下,当比较T0、T4w和T8w时,第一和第二(主)峰的相对面积的总和(图16A)显示无显著差异。此外,当比较T0、T4w和T8w时,第三和第四(高分子量物质(HMWS))峰的相对面积的总和(图16B)也显示没有显著差异。

[0318] 在25℃下,当比较T0、T2w、T4w和T8w时,第一和第二(主)峰的相对面积的总和(图17A)显示无显著差异。此外,当比较T0、T2w、T4w和T8w时,第三和第四(HMWS)峰的相对面积的总和(图17B)也显示没有显著差异。

[0319] 在40℃下,当比较T0、T2w、T4w和T8w时,第一和第二(主)峰的相对面积的总和(图18A)显示无显著差异。此外,当比较T0、T2w、T4w和T8w时,第三和第四(HMWS)峰的相对面积的总和(图18B)也显示没有显著差异。

[0320] 为了进行非还原毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)分析,将样品在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释至1mg/ml。然后用PBS中的10mM N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide,NEM)以1:1进一步稀释经稀释的样品。然后将5.0μl所得溶液添加至7.0μl样品缓冲剂。然后将样品在70℃下孵育10分钟。在孵育之后,添加32μl水,并将样品在1200g下离心2分钟。然后使用HT High Sensitivity Antibody Analysis 200,使用HT Protein Express LabChip(Perkin Elmer,760499)和蛋白质表达试剂盒(Perkin Elmer,CLS960008)分析样品。在LabChip GXII Touch HT(Perkin Elmer)上进行分析。

[0321] 在2至8℃下(图19),主峰的纯度在T0、T4w和T8w之间没有显著变化。在25℃(图20)和40℃(图21)下,主峰的纯度在T0、T2w、T4w和T8w之间没有显著变化。

[0322] 为了进行还原CE-SDS分析,将样品在PBS中稀释至0.5mg/ml。将5.0μl稀释的样品添加至7.0pl样品变性溶液(将24.5μL 1M二硫苏糖醇(DTT)添加至700μl蛋白质表达样品缓

冲剂)。然后将样品在70℃下孵育10分钟。在孵育之后,添加32μl水并将样品以1200g离心2分钟。然后使用HT High Sensitivity Antibody Analysis 200,使用HT Protein Express LabChip(Perkin Elmer,760499)和蛋白质表达试剂盒(Perkin Elmer,CLS960008)分析样品。在LabChip GXII Touch HT(Perkin Elmer)上进行分析。

[0323] 在2至8℃下(表9),峰1、2、3和4的纯度在T0、T4w和T8w之间无显著变化。在25℃下(表10)和40℃(表11)下,峰1、2、3和4的纯度在T0、T2w、T4w和T8w之间没有显著变化。

[0324] 总体而言,这些结果表明冻干的抗TfR1 Fab-ASO缀合物在测试的所有温度和时间点下均是稳定的。

[0325] 表9.在2至8℃下的毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)结果(还原)

[0326]

时间点	峰1(%)	峰2(%)	峰3(%)	总计(%)
T0	3.05	89.97	6.09	99.11
T4w	2.87	88.40	8.42	99.69
T8w	4.12	85.15	8.41	97.68

[0327] 表10.在25℃下的毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)结果(还原)

[0328]

时间点	峰1(%)	峰2(%)	峰3(%)	总计(%)
T0	3.05	89.97	6.09	99.11
T2w	3.21	88.94	7.31	99.46
T4w	2.87	87.62	9.09	99.58
T8w	4.12	85.22	8.38	97.72

[0329] 表11.在40℃下的毛细管电泳十二烷基硫酸钠(CE-SDS)结果(还原)

[0330]

时间点	峰1(%)	峰2(%)	峰3(%)	总计(%)
T0	3.05	89.97	6.09	99.11
T2w	3.21	88.80	7.34	99.35
T4w	2.91	87.80	8.75	99.46
T8w	4.14	85.20	8.41	97.75

[0331] 另外的实施方案

[0332] 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)抗体共价连接的寡核苷酸,

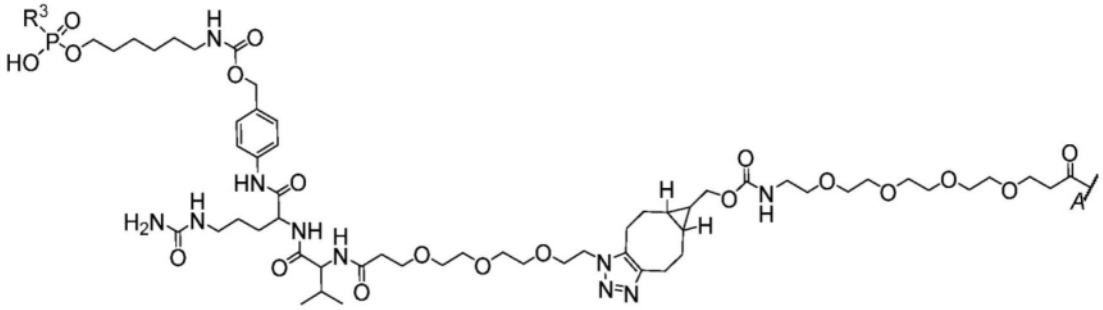
[0333] 其中所述抗TfR1抗体包含:含有SEQ ID NO:1、7或12中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示的序列的轻链互补决定区3(CDR-L3),

[0334] 其中所述寡核苷酸包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z是包含一个或更多个经修饰核苷的侧翼区,并且Y是包含一个或更多个2'-脱氧核糖核苷的间隔区,

[0335] 并且其中所述复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖配制在一起。

[0336] 2.包含含有式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的复合物的制剂,其中每个R^1独立地包含下式

(Ia)的基团:

[0337] 

[0338] (Ia),其中

[0339] R^2包含抗体,并且

[0340] R^3包含寡核苷酸,所述寡核苷酸包含5'-X-Y-Z-3'构型,其中X和Z是包含一个或更多个经修饰核苷的侧翼区,并且Y是包含一个或更多个2'-脱氧核糖核苷的间隔区;

[0341] 其中R^1在连接点A处与R^2共价连接;并且

[0342] 其中n1是表示R^1实例数的整数,其中R^1的每个实例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;

[0343] 其中所述复合物与三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖配制在一起,

[0344] 任选地,其中所述抗体是抗TfR1抗体。

[0345] 3.实施方案2所述的制剂,其中所述抗体包含:

[0346] 含有SEQ ID NO:1、7或12中所示的序列的重链互补决定区1(CDR-H1),含有SEQ ID NO:2、8或13中所示的序列的重链互补决定区2(CDR-H2),含有SEQ ID NO:3、9或14中所示的序列的重链互补决定区3(CDR-H3),含有SEQ ID NO:4、10或15中所示的序列的轻链互补决定区1(CDR-L1),含有SEQ ID NO:5或11中所示的序列的轻链互补决定区2(CDR-L2)以及含有SEQ ID NO:6或16中所示的序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

[0347] 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。

[0348] 5.实施方案1至3中任一项所述的制剂,其中所述制剂为冷冻固体形式。

[0349] 6.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。

[0350] 7.实施方案6所述的制剂,其中所述三(羟甲基)氨基甲烷以5mM至50mM的浓度存在于所述水溶液中。

[0351] 8.实施方案6或7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。

[0352] 9.实施方案6至8中任一项所述的制剂,其中所述水溶液的pH为6.5至8.5。

[0353] 10.实施方案6至9中任一项所述的制剂,其中所述三(羟甲基)氨基甲烷以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7.5。

[0354] 11.实施方案1至10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、$F(ab')_2$片段、scFv或Fv。

[0355] 12.实施方案11所述的制剂,其中所述抗体是Fab片段。

[0356] 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: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),

[0357] 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/或包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL。

[0358] 14.实施方案1至13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,

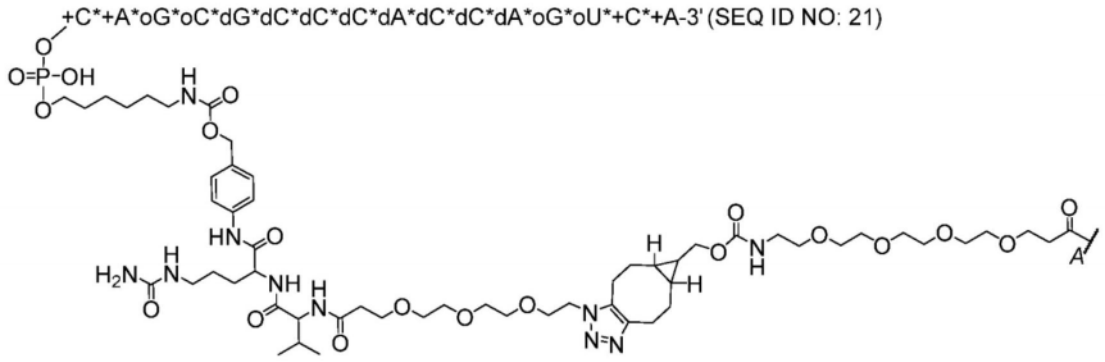
[0359] 任选地其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链和/或包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链。

[0360] 15.实施方案1至14中任一项所述的制剂,其中所述寡核苷酸的长度为10至30个核苷酸。

[0361] 16.实施方案1至15中任一项所述的制剂,其中所述寡核苷酸包含具有针对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。

[0362] 17.实施方案1至16中任一项所述的制剂,其中所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列的至少8个连续核苷酸,任选地其中所述寡核苷酸包含SEQ ID NO:21的核苷酸序列。

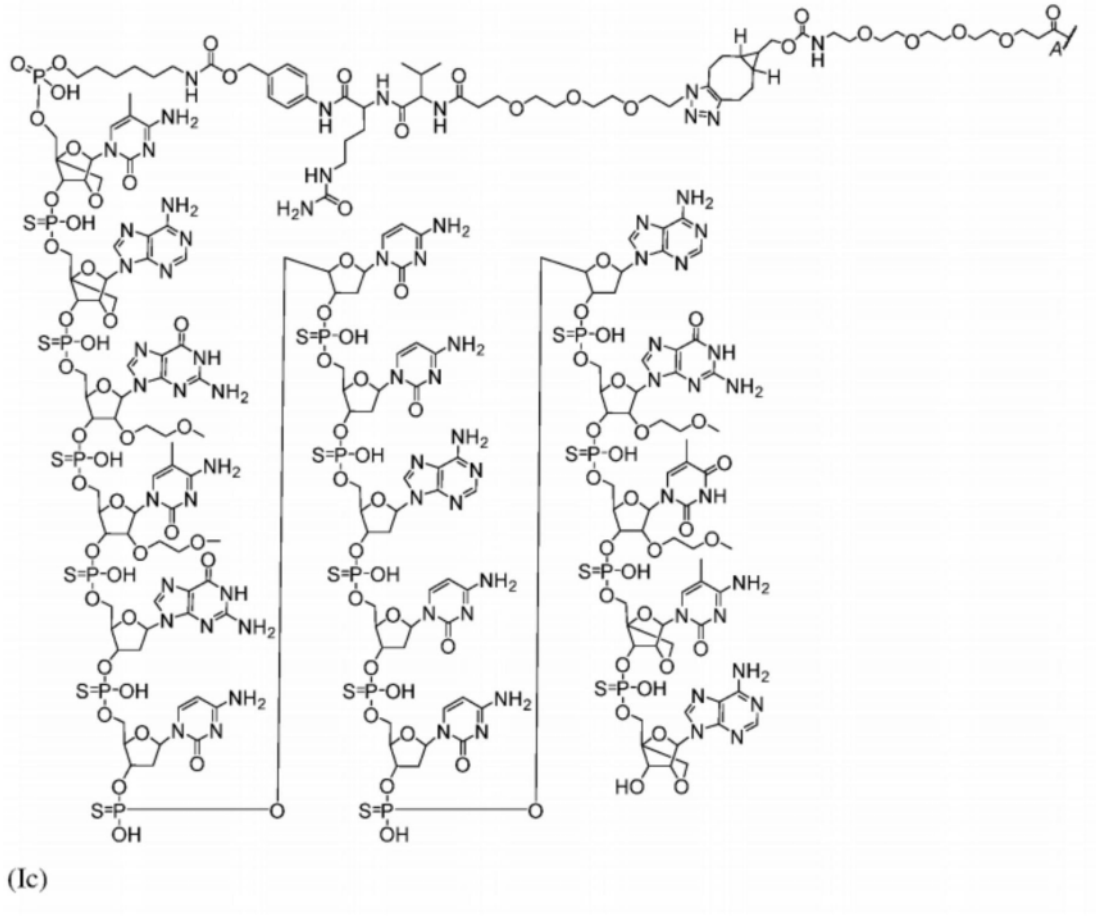
[0363] 18.实施方案2至17中任一项所述的制剂,其中每个R^1包含下式(Ib)的基团:

[0364] 

(Ib),

[0365] 其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联,使得所述寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列。

[0366] 19.实施方案2至17中任一项所述的制剂,其中每个R^1包含下式(Ic)的基团:

[0367] 
(Ic)

[0368] 20.实施方案1至19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。

[0369] 21.实施方案1至20中任一项所述的制剂,其还包含一种或更多种未与寡核苷酸共价连接的抗体。

[0370] 22.实施方案21所述的制剂,其中所述制剂中复合物的n1的平均值为0.5至5。

[0371] 23.在对象中降低DMPK表达的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的实施方案1至22中任一项所述的制剂。

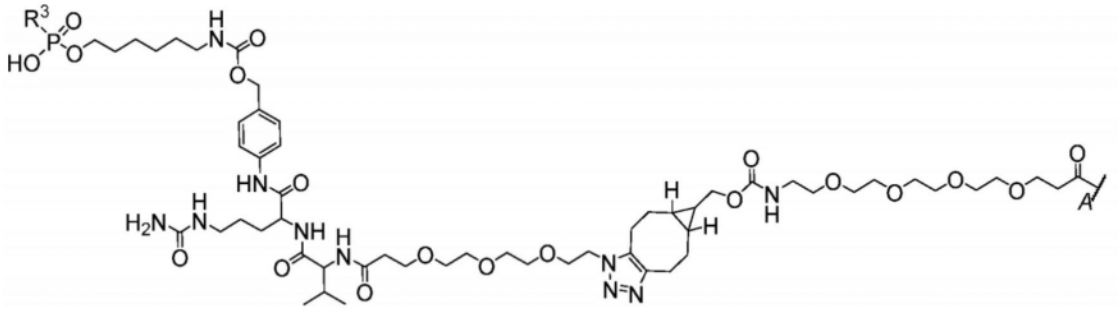
[0372] 24.在对象中治疗强直性肌营养不良的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的实施方案1至22中任一项所述的制剂。

[0373] 25.实施方案23或实施方案24所述的方法,其中所述对象具有与强直性肌营养不良相关的DMPK等位基因疾病相关性重复的扩增。

[0374] 26.实施方案25所述的方法,其中所述疾病相关性重复包含CTG三核苷酸序列的重复单元。

[0375] 27.实施方案23至26中任一项所述的方法,其中所述复合物在所述对象中降低DMPK表达。

[0376] 28.包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的复合物,其中每个R^1包含下式(Ia)的基团:

[0377] 

(Ia),

[0378] 其中R^3包含含有+C*+A*oG*oC*dC*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A(SEQ ID NO:21)的结构的寡核苷酸,其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-MOE修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,以及*表示硫代磷酸酯核苷间键联;

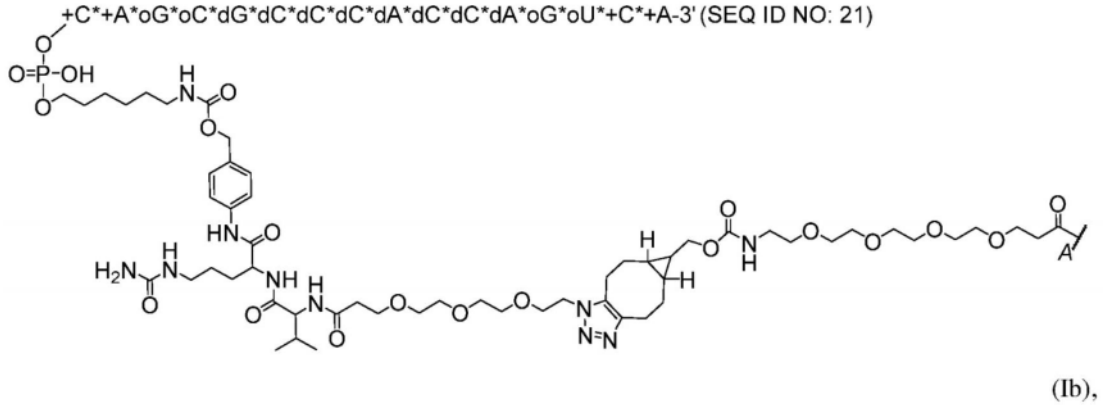
[0379] 其中R^2包含Fab,并且其中Fab包含选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0380] 任选地,其中所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

[0381] 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含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链;

[0382] 其中R^1在连接点A处与R^2共价连接;并且其中n1是表示R^1实例数的整数,其中R^1的每个实例与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。

[0383] 29.包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的复合物,其中每个R^1包含下式(Ib)的基团:

[0384] 

(Ib),

[0385] 其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联;使得所述寡核苷酸包含CAGCGCCCACCAGUCA(SEQ ID NO:21)的核碱基序列。

[0386] 其中R^2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,

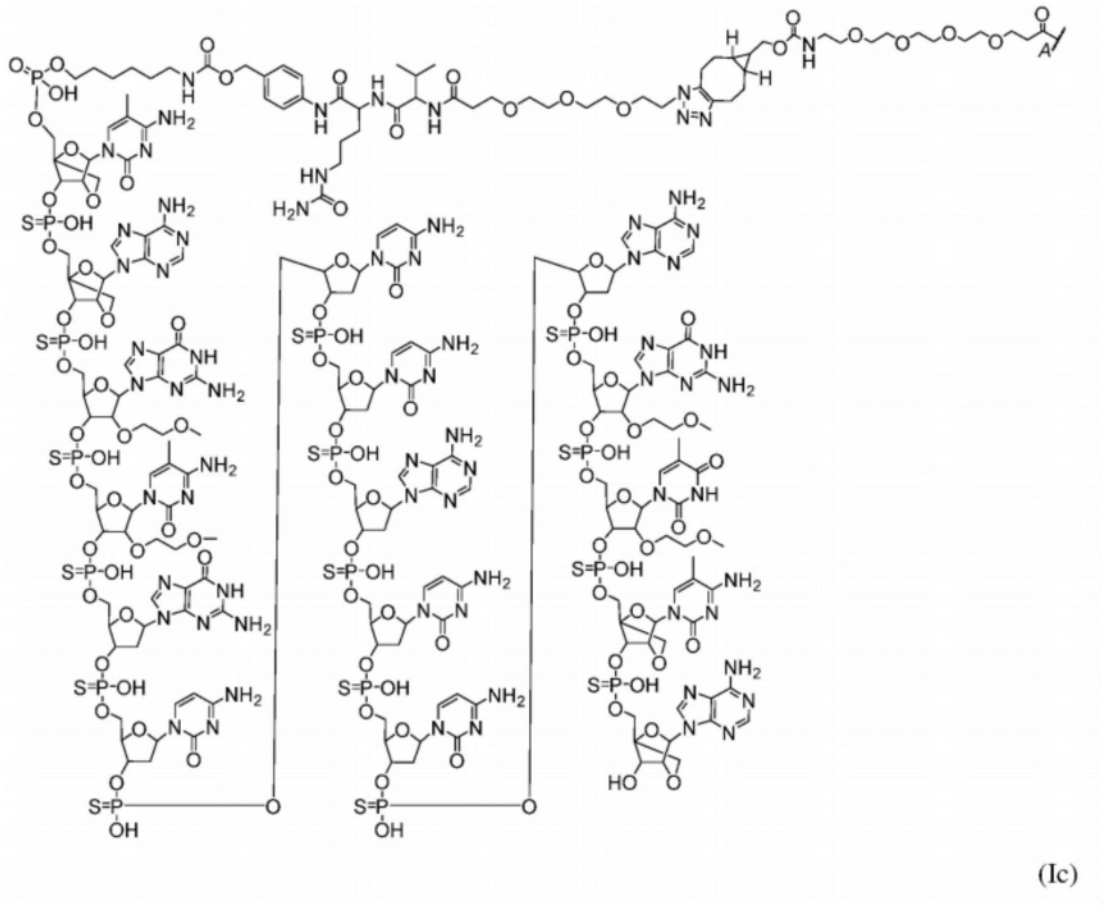
[0387] 任选地,其中所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

[0388] 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含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链;

[0389] 其中R^1在连接点A处与R^2共价连接;并且其中n1是表示R^1的实例数的整数,其中R^1的每个实例与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。

[0390] 30.包含式(I):$[R^1]_{n1}$-R^2的结构的复合物,其中每个R^1包含下式(Ic)的基团:

[0391]



(Ic),

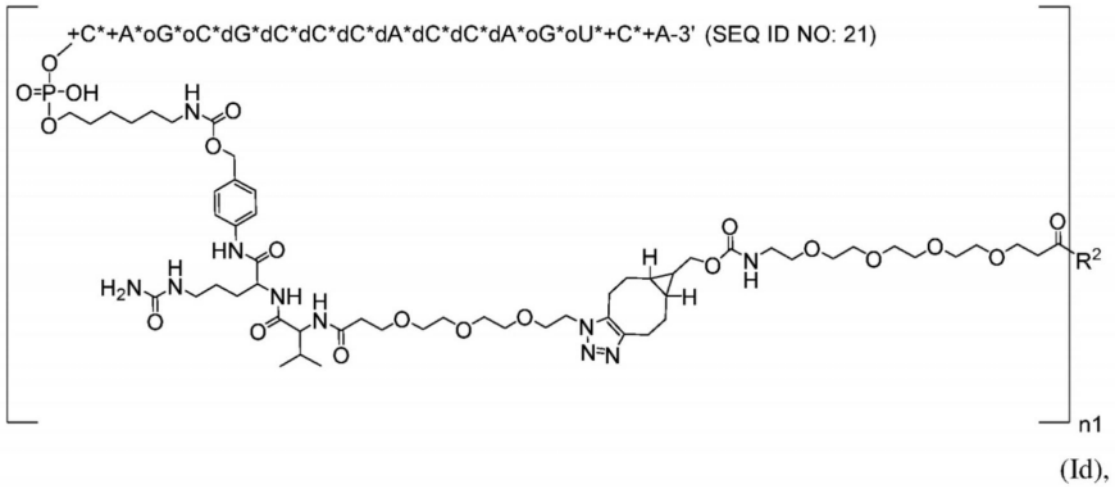
[0392] 其中R^2包含Fab,所述Fab包含选自表2的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,

[0393] 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和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

[0394] 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;

[0395] 其中n1是表示R^1的实例数的整数,其中R^1的每个实例与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。

[0396] 31.包含式(Id)结构的复合物:

[0397] 

(Id),

[0398] 其中+N表示LNA(2'-4'亚甲基桥)核糖核苷,dN表示2'-脱氧核糖核苷,oN表示2'-O-甲氧基乙基(MOE)修饰的核糖核苷,oC表示5-甲基-2'-MOE-胞苷,+C表示5-甲基-2'-4'-双环-胞苷(2'-4'亚甲基桥),oU表示5-甲基-2'-MOE-尿苷,*表示硫代磷酸酯核苷间键联;

[0399] 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,

[0400] 任选地,其中所述Fab包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL,

[0401] 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含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链;

[0402] 其中n1是表示由方括号包括的基团的实例数的整数,其中由方括号包括的基团的每个实例与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。

[0403] 32.制剂,其包含实施方案28至31中任一项所述的多个复合物,和浓度为5至50mM的三(羟甲基)氨基甲烷以及浓度为5w/v%至10w/v%的蔗糖,其中所述制剂是水溶液并且pH为6.5至8.5,任选地其中所述多个复合物的浓度为10mg/mL至50mg/mL。

[0404] 33.实施方案32所述的制剂的冻干形式。

[0405] 34.产品,其通过包括对实施方案32所述的制剂进行冻干的方法来产生。

[0406] 35.实施方案32所述的制剂的冷冻形式。

[0407] 36.产品,其通过包括对实施方案32所述的制剂进行冷冻的方法来产生。

[0408] 37.制剂,其包含实施方案28至31中任一项所述的多个复合物,和浓度为5至50mM的三(羟甲基)氨基甲烷以及浓度为5w/v%至15w/v%的蔗糖,其中所述制剂是水溶液并且pH为6.5至8.5,任选地其中所述多个复合物的浓度为10mg/mL至50mg/mL。

[0409] 38.制剂,其包含实施方案28至31中任一项所述的多个复合物,和浓度为25mM的三(羟甲基)氨基甲烷以及浓度为10w/v%的蔗糖,其中所述制剂是水溶液并且pH为7.5,任选地其中所述多个复合物的浓度为10mg/mL至50mg/mL。

[0410] 39.实施方案32、37和38中任一项所述的制剂,其还包含一种或更多种未与寡核苷酸共价连接的抗体。

[0411] 40.实施方案39所述的制剂,其中所述制剂中复合物的n1的平均值为0.5至5。

[0412] 41.实施方案37至40中任一项所述的制剂的冻干形式。

[0413] 42.冻干饼,其包含实施方案28至31中任一项所述的多个复合物、三(羟甲基)氨基甲烷和蔗糖。

[0414] 43.实施方案42所述的冻干饼,其包含4.02×10^{-2}mg至1.21mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼;989mg至999mg蔗糖/g饼;和/或0.666mg至9.90mg复合物/g饼;

[0415] 任选地,其中所述冻干饼包含:

[0416] (i)0.303mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,998.6mg蔗糖/g饼,和/或0.999mg复合物/g饼;

[0417] (ii)0.302mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,997.7mg蔗糖/g饼,和/或1.995mg复合物/g饼;

[0418] (iii)0.302mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,997.2mg蔗糖/g饼,和/或2.49mg复合物/g饼;

[0419] (iv)0.302mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,996.7mg蔗糖/g饼,和/或2.99mg复合物/g饼;

[0420] (v)0.302mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,995.7mg蔗糖/g饼,和/或3.98mg复合物/g饼;或者

[0421] (vi)0.301mg三(羟甲基)氨基甲烷/g饼,994.7mg蔗糖/g饼,和/或4.97mg复合物/g饼。

[0422] 44.实施方案42或实施方案43所述的冻干饼,其中当约10g所述冻干饼在水中重构以产生1mL溶液时,所述溶液包含浓度为5至50mM的三(羟甲基)氨基甲烷、浓度为5w/v%至15w/v%的蔗糖和浓度为10mg/mL至50mg/mL的复合物,

[0423] 任选地,其中所述三(羟甲基)氨基甲烷的浓度为25mM和/或所述蔗糖的浓度为10w/v%。

[0424] 等同方案和术语

[0425] 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。已采用的术语和表述作为描述而非限制的术语使用,并且使用这样的术语和表述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采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。

[0426] 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。

[0427] 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。在这样的一些实施方案中,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间键联和/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。

[0428] 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书的上下文中)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。除非另外指明,否则本文中的值的范围包括它们的端点(例如,X至Y的范围包括值X和Y)。应理解,本文中对从X至Y的值的记载表明该特定值落入X至Y的范围内。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。

[0429] 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,那些实施方案的变化对于本领域普通技术人员可变得明显。

[0430] 本发明人预期技术人员在适当时采用这样的变化,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书中记载的主题的所有修改和等同方案。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中的上述要素的任何组合。本领域技术人员将认识到或者仅使用常规实验就能够确定本文中描述的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。

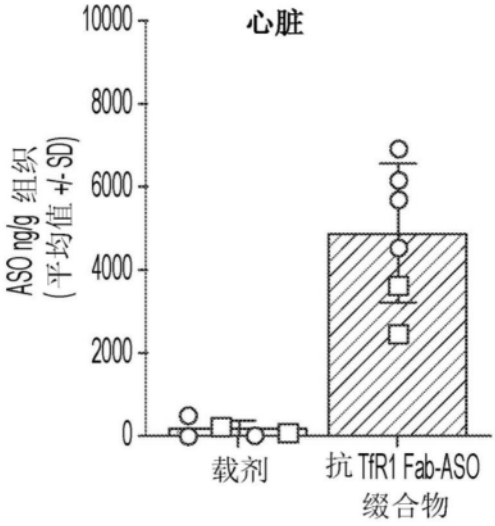

心脏
10000
8000
6000
4000
2000
0
ASO ng/g 组织
(平均值 +/- SD)
载剂
抗 TfR1 Fab-ASO
缀合物

图1A

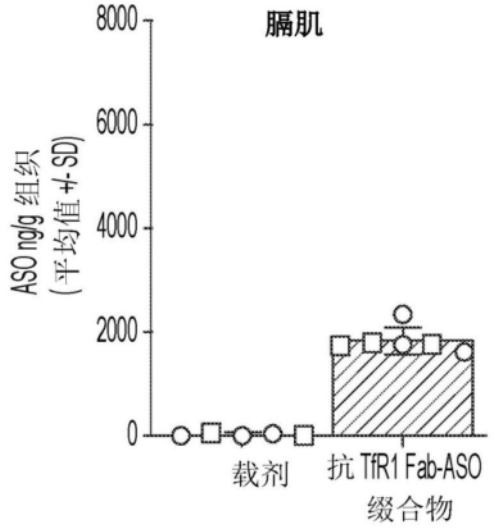

膈肌
8000
6000
4000
2000
0
ASO ng/g 组织
(平均值 +/- SD)
载剂
抗 TfR1 Fab-ASO
缀合物

图1B

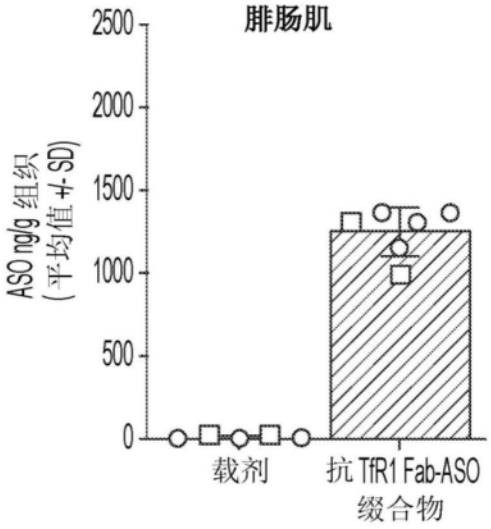

腓肠肌
2500
2000
1500
1000
500
0
ASO ng/g 组织
(平均值 +/- SD)
载剂
抗 TfR1 Fab-ASO
缀合物

图1C

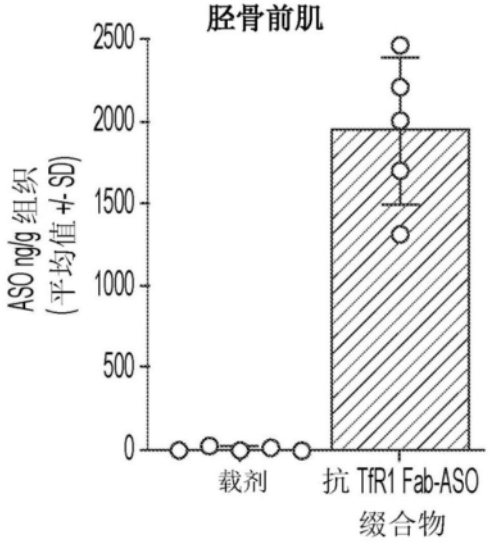

胫骨前肌
2500
2000
1500
1000
500
0
ASO ng/g 组织
(平均值 +/- SD)
载剂
抗 TfR1 Fab-ASO
缀合物

图1D

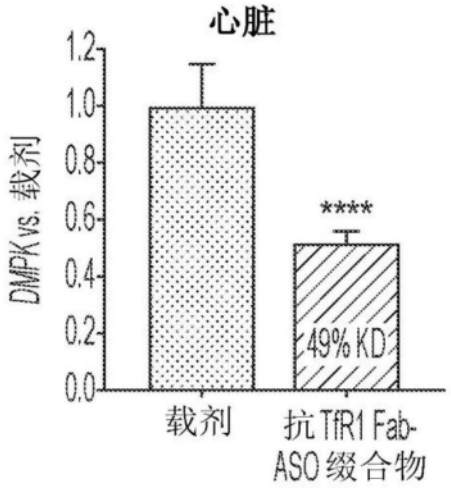

心脏
DMPK vs. 载剂
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
****
49% KD
载剂
抗 TfR1 Fab-ASO 缀合物

图2A

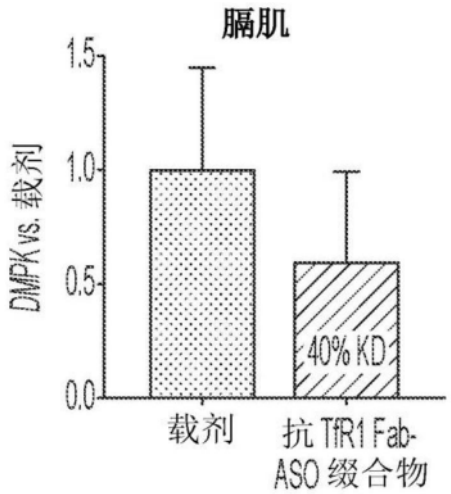

膈肌
DMPK vs. 载剂
1.5
1.0
0.5
0.0
40% KD
载剂
抗 TfR1 Fab-ASO 缀合物

图2B

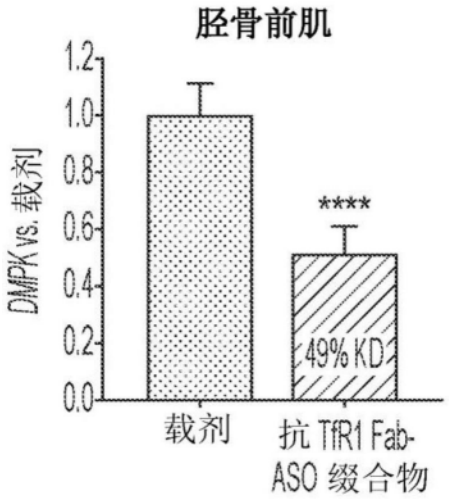

胫骨前肌
DMPK vs. 载剂
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
****
49% KD
载剂
抗 TfR1 Fab-ASO 缀合物

图2C

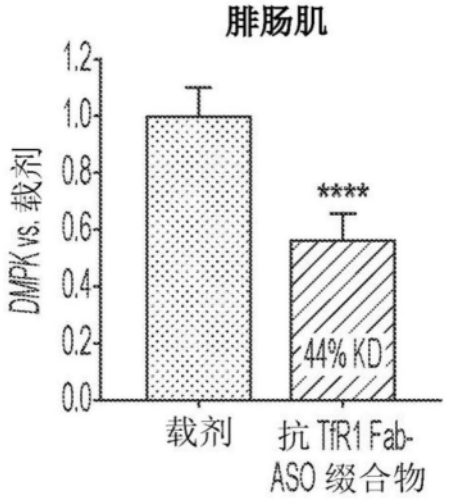

腓肠肌
DMPK vs. 载剂
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
****
44% KD
载剂
抗 TfR1 Fab-ASO 缀合物

图2D

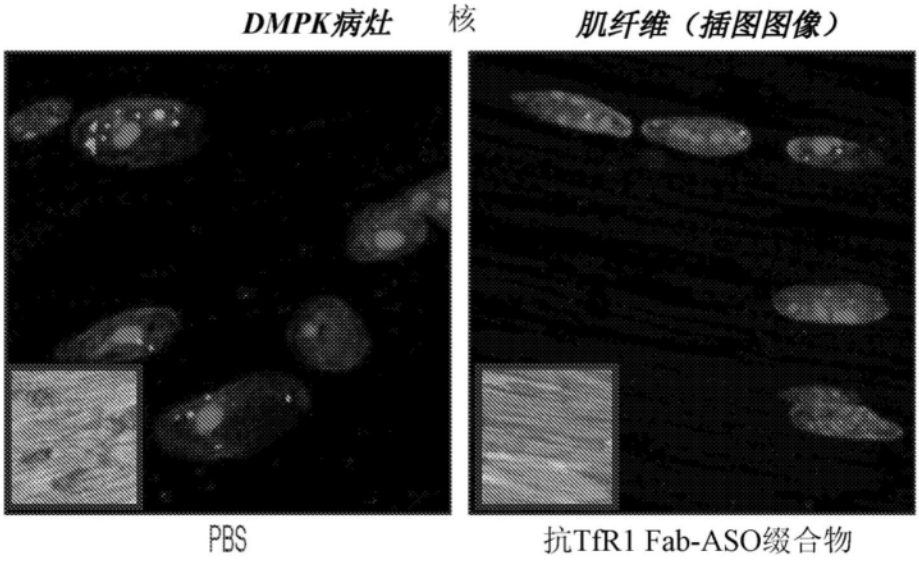

DMPK病灶
核
肌纤维（插图图像）
PBS
抗TfR1 Fab-ASO缀合物

图3A

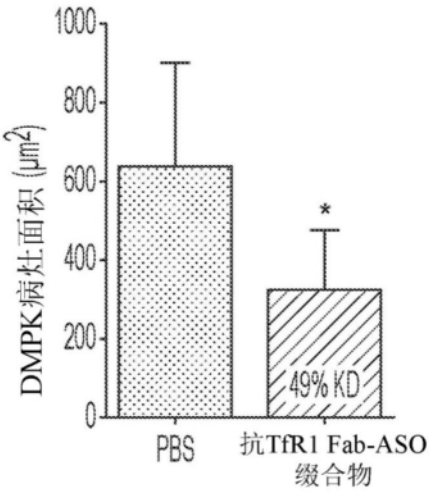

1000
800
600
400
200
0
DMPK病灶面积 (μm²)
*
49% KD
PBS
抗TfR1 Fab-ASO
缀合物

图3B

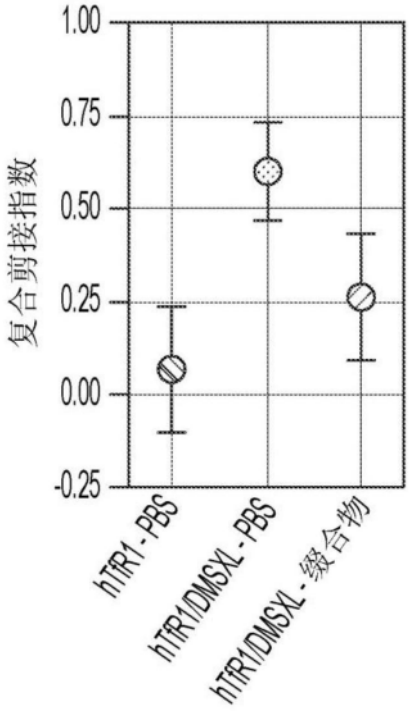

1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
-0.25
复合剪接指数
hTR1 - PBS
hTR1/DMSXL - PBS
hTR1/DMSXL - 缀合物

图4

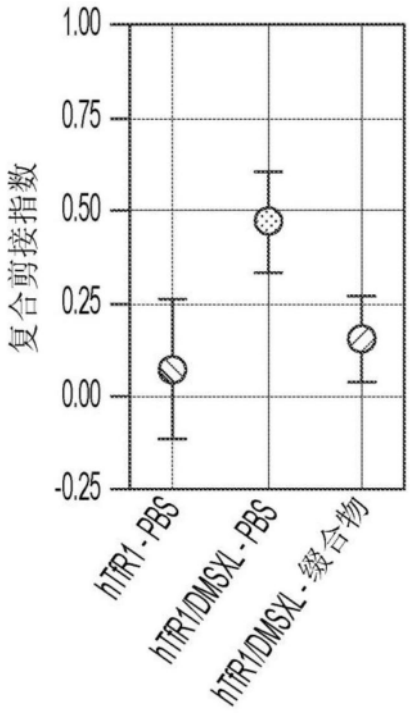

1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
-0.25
复合剪接指数
hTR1 - PBS
hTR1/DMSXL - PBS
hTR1/DMSXL - 缀合物

图5

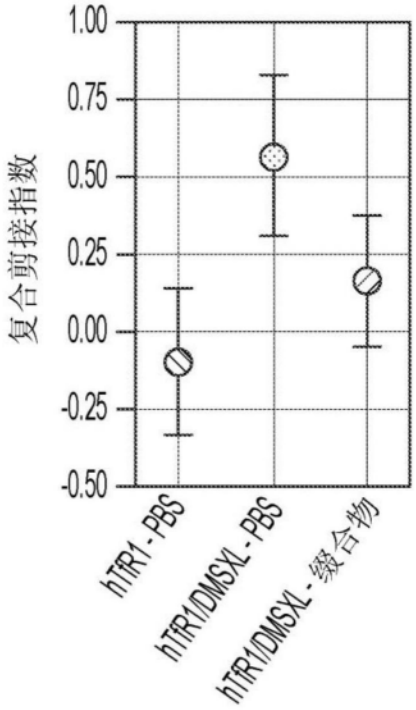

1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
-0.25
-0.50
复合剪接指数
hTR1 - PBS
hTR1/DMSXL - PBS
hTR1/DMSXL - 缀合物

图6

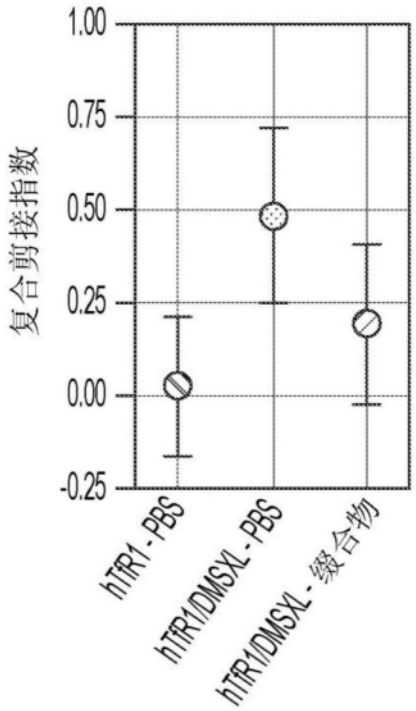

1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
-0.25
复合剪接指数
hTR1 - PBS
hTR1/DMSXL - PBS
hTR1/DMSXL - 缀合物

图7

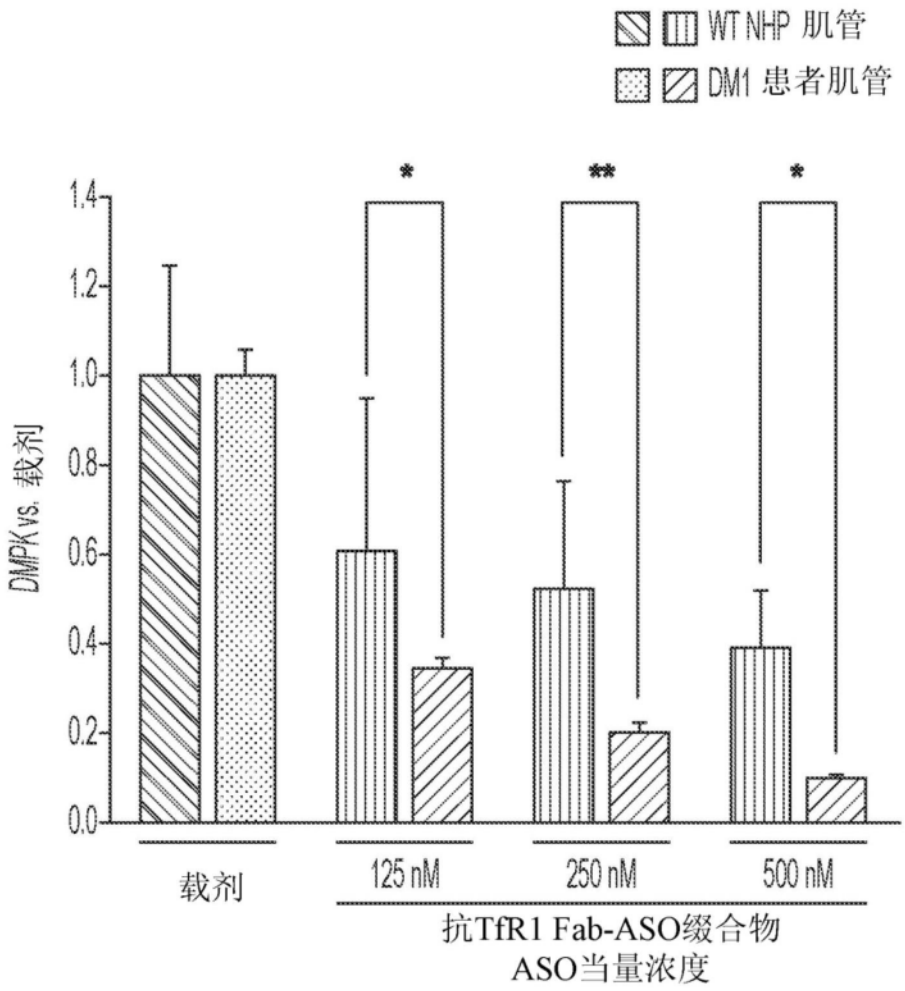

WT NHP 肌管
DM1 患者肌管
DMPK vs. 载剂
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
**
*
载剂
125 nM
250 nM
500 nM
抗TfR1 Fab-ASO缀合物
ASO当量浓度

图8

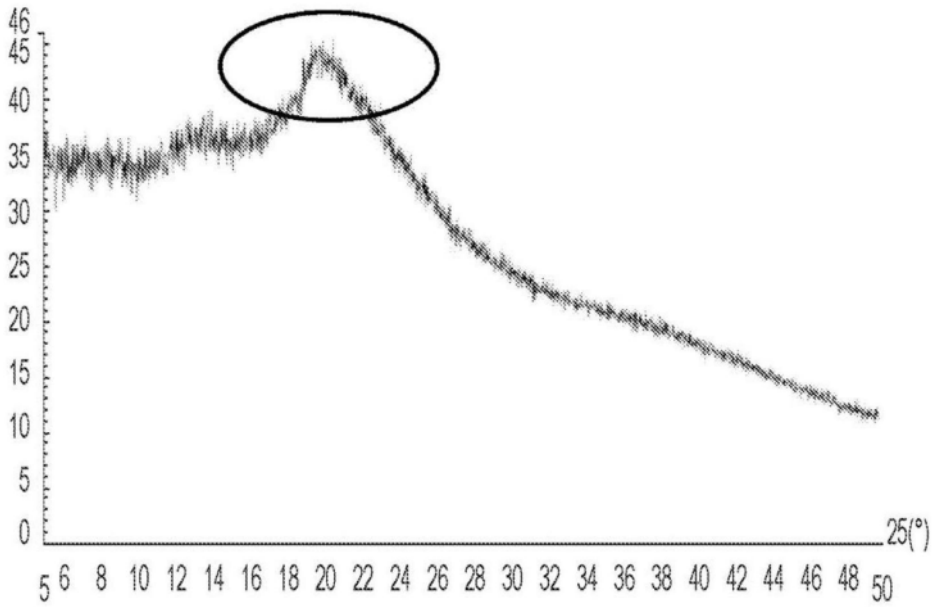

46
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
25(°)
5 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50

图9

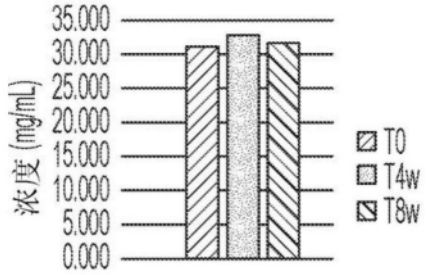


图10A

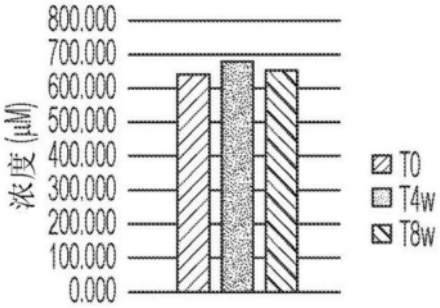


图10B

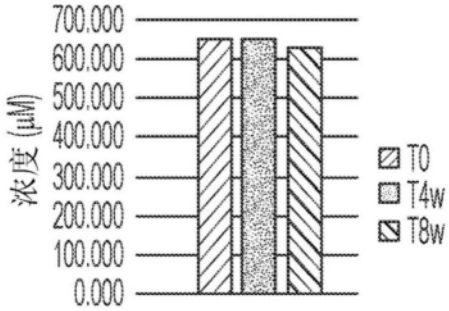


图10C

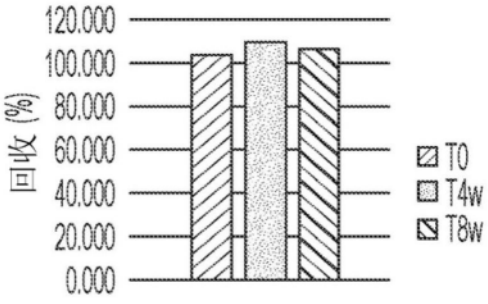


图11A

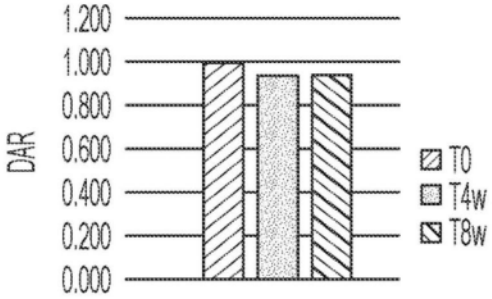


图11B

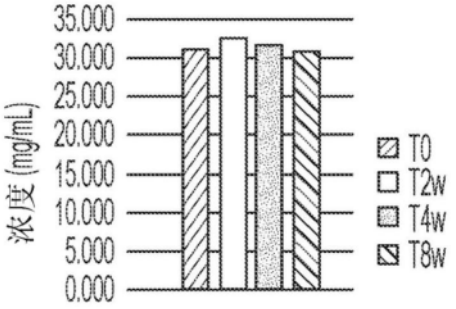


图12A

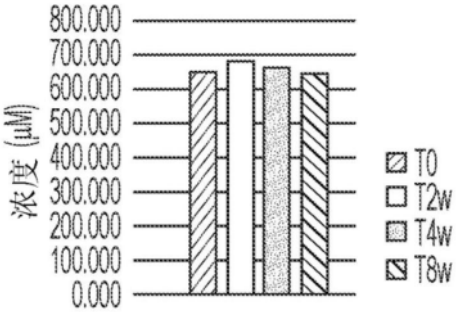


图12B

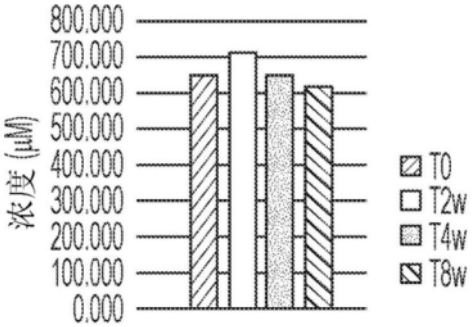


图12C

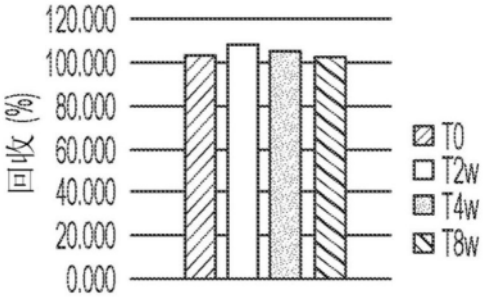


图13A

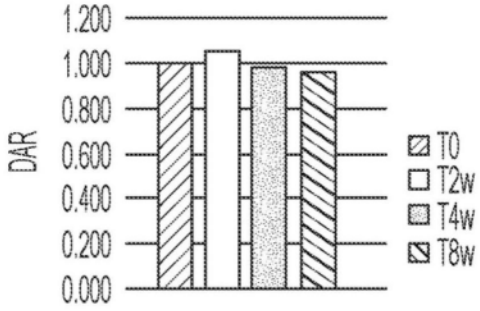


图13B

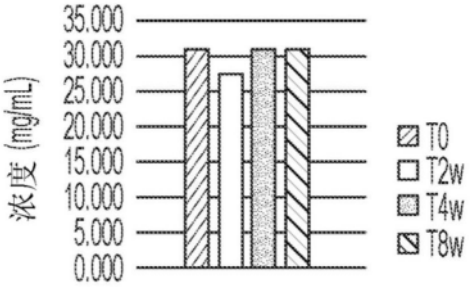


图14A

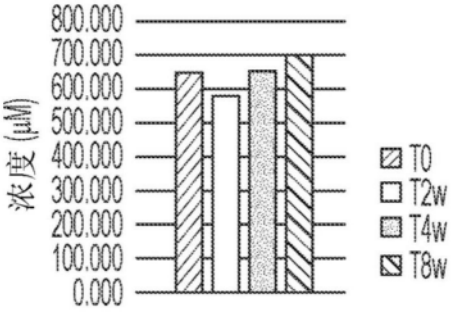


图14B

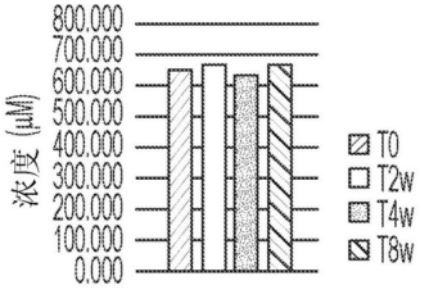


图14C

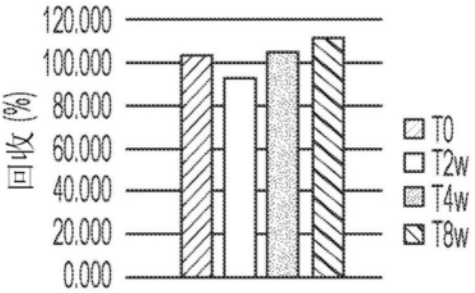


图15A

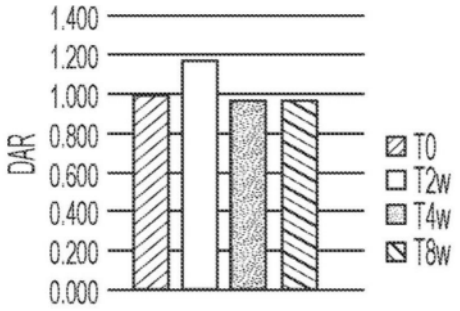


图15B

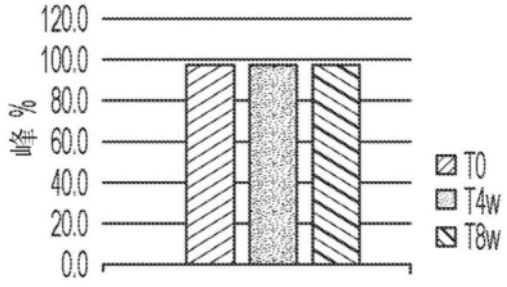


图16A

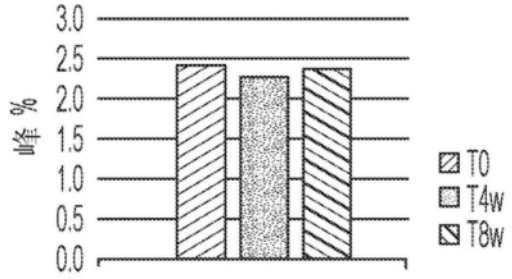


图16B

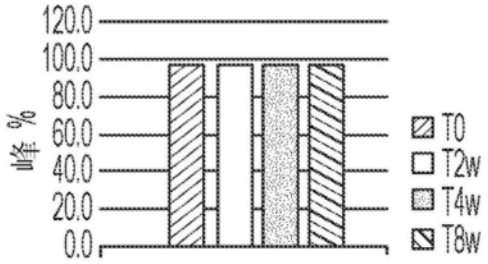


图17A

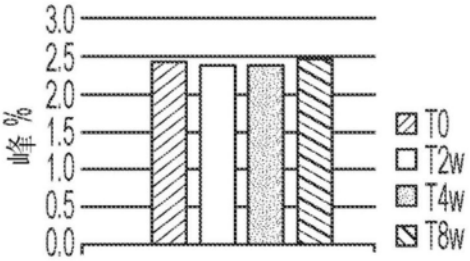


图17B

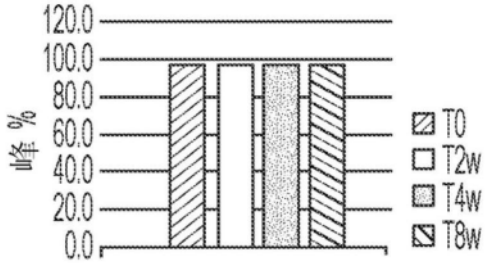


图18A

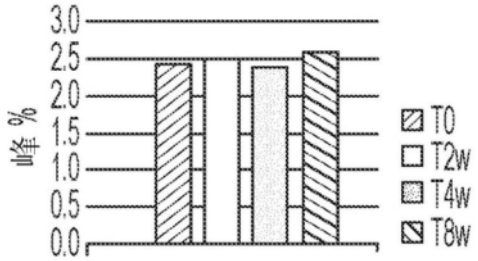


图18B

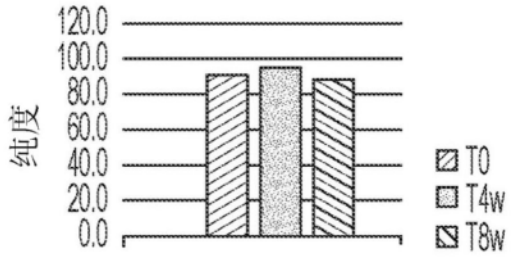


图19

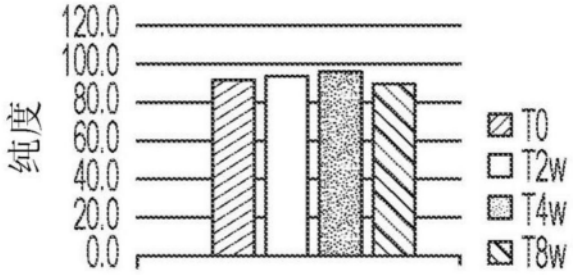


图20

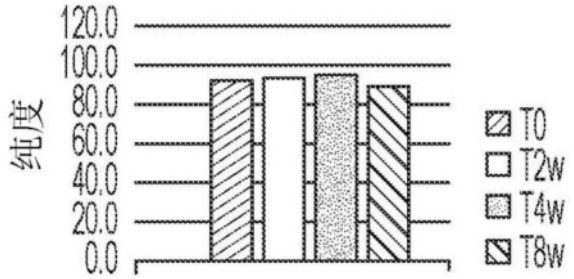


图21