(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119630407 A
(43)申请公布日 2025.03.14

(21)申请号 202380056783.2

(22)申请日 2023.07.05

(30)优先权数据
63/367,783 2022.07.06 US
63/477,160 2022.12.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/069652 2023.07.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/011135 EN 2024.01.11

(71)申请人 达因疗法公司
地址 美国

(72)发明人 内尔松·赫西亚 蒂莫西·威登
斯特凡诺·扎诺蒂
奥克萨娜·别斯克罗夫纳亚
约亨·德克特
汉斯-彼得·福恩洛克
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
布伦丹·奎因 约翰·纳吉姆
马库斯·霍斯巴赫
卡特林·胡尔奇 邱奇峰
斯科特·希尔德布兰德

(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 张珊珊 陈九洲

(51)Int.Cl.
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
A61K 38/40(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

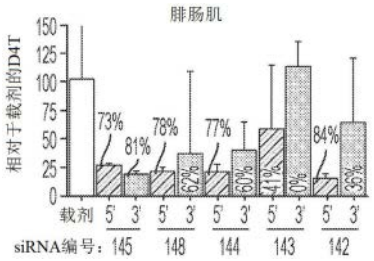
权利要求书3页 说明书145页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

肌肉靶向复合物及其用于治疗面肩肱型肌营养不良的用途

(57)摘要

本公开内容的一些方面涉及旨在靶向DUX4RNA的寡核苷酸(例如,RNAi寡核苷酸,例如siRNA)和用于将所述寡核苷酸递送至细胞(例如,肌细胞)的靶向复合物及其用途,特别是涉及疾病(例如,FSHD)治疗的用途。



CN 119630407 A

1.复合物,其包含与靶向双同源框4(DUX4)RNA的寡核苷酸共价连接的肌肉靶向剂,其中所述寡核苷酸包含长度为18至25个核苷酸的反义链,并且包含与SEQ ID NO:200、191、189、186、190、174至185、187、188、192至199和201至235中所示靶序列的互补区,并且其中所述互补区的长度为至少16个连续核苷。

2.权利要求1所述的复合物,其中所述肌肉靶向剂是抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体。

3.权利要求1或权利要求2所述的复合物,其中所述寡核苷酸是RNAi寡核苷酸。

4.权利要求1至3中任一项所述的复合物,其中所述反义链包含SEQ ID NO:262、253、251、262、248、252、236至247、249、250、254至261、263至266中任一者的核苷酸序列。

5.权利要求1至4中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸还包含有义链,所述有义链包含与所述反义链互补的至少18个连续核苷,任选地,其中所述有义链包含与所述反义链互补的21个连续核苷。

6.权利要求5所述的复合物,其中所述有义链包含SEQ ID NO:231、222、220、217、221、205至216、218、219、223、230、232至235中任一者的核苷酸序列。

7.权利要求5或权利要求6所述的复合物,其中所述肌肉靶向剂与所述有义链的5'末端或3'末端共价连接。

8.权利要求1至7中任一项所述的复合物,其中所述反义链还包含5'-(E)-乙烯基膦酸酯。

9.权利要求1至8中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含一个或更多个经修饰核苷。

10.权利要求9所述的复合物,其中所述一个或更多个经修饰核苷是2'经修饰核苷酸,任选地,其中一个或更多个2'经修饰核苷选自: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-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA))。

11.权利要求10所述的复合物,其中每个2'经修饰核苷酸是2'-O-甲基(2'-O-Me)或2'-氟(2'-F)。

12.权利要求1至11中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联。

13.权利要求12所述的复合物,其中所述一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联存在于所述寡核苷酸的反义链上,任选地,其中所述反义链的3'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联,和/或其中所述反义链的5'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

14.权利要求12或权利要求13所述的复合物,其中所述一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联存在于所述寡核苷酸的有义链上,任选地,其中所述有义链的3'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联,和/或其中所述有义链的5'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

15.权利要求6至14中任一项所述的复合物,其中所述反义链选自表8中所列SEQ ID NO:236至266的经修饰形式(例如,MAS1至MAS4),和/或其中所述有义链选自表8中所列SEQ ID NO:205至235的经修饰形式(例如,MS1至MS6)。

16.权利要求6至14中任一项所述的复合物,其中所述反义链选自表9中所列SEQ ID NO:262、253、251、248和252的经修饰形式(例如,VP-MAS5、VP-MAS6和VP-MAS7),并且/或者其中所述有义链选自表9中所列SEQ ID NO:231、222、220、217和221的经修饰形式(例如,MS7至MS9)。

17.权利要求1至15所述的复合物,其中所述寡核苷酸是选自表8中所列siRNA的siRNA分子。

18.权利要求1至14或16所述的复合物,其中所述寡核苷酸是选自表9中所列siRNA的siRNA分子。

19.权利要求2至18中任一项所述的复合物,其中抗TfR1抗体包含表2中所列任何抗TfR1抗体的重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)、重链互补决定区3(CDR-H3)、轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)、轻链互补决定区3(CDR-L3)。

20.权利要求2至18中任一项所述的复合物,其中抗TfR1抗体包含表3中所列任何抗TfR1抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。

21.权利要求2至18中任一项所述的复合物,其中抗TfR1抗体是Fab,任选地,其中所述Fab包含表5中所列任何抗TfR1 Fab的重链和轻链。

22.权利要求2至21中任一项所述的复合物,其中抗TfR1抗体包含:

(i)含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;

(ii)含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;或者

(ii)含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-L3。

23.权利要求22所述的复合物,其中所述抗TfR1抗体包含VH和VL,所述VH含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列,所述VL含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

24.权利要求23所述的复合物,其中所述抗TfR1抗体是Fab并且包含重链和轻链,所述重链含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列,所述轻链含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列。

25.权利要求1至24中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向剂与该反义寡核苷酸通过接头共价连接,任选地,其中所述接头包含缬氨酸-瓜氨酸序列。

26.降低肌细胞中DUX4表达的方法,所述方法包括使所述肌细胞与有效量的权利要求1至25中任一项所述的复合物接触,以促进所述寡核苷酸内化到所述肌细胞中。

27.权利要求26所述的方法,其中降低DUX4表达包括降低DUX4蛋白和/或mRNA水平。

28.治疗面肩肱型肌营养不良(FSHD)的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用有

效量的权利要求1至25中任一项所述的复合物,其中所述对象具有DUX4蛋白的异常产生。

29.寡核苷酸,其包含选自表8中所列siRNA寡核苷酸的siRNA寡核苷酸。

30.寡核苷酸,其包含选自表9中所列siRNA寡核苷酸的siRNA寡核苷酸。

31.产生包含与寡核苷酸共价连接的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体的复合物的方法,所述方法包括:

(i)获得包含式(B)结构的化合物,其中所述寡核苷酸包含siRNA寡核苷酸的有义链,任选地,其中所述siRNA寡核苷酸靶向DUX4 RNA;

(ii)使所述siRNA寡核苷酸的反义链与所述有义链退火;

(iii)使所述包含式(B)结构的化合物与包含式(C)结构的化合物反应,以获得包含式(D)结构的化合物;以及

(iv)使抗TfR1抗体与带有肌肉靶向剂的所述包含式(D)结构的化合物共价连接,以获得包含式(E)结构的化合物,

任选地,其中步骤(ii)中的退火在30℃下进行,

还任选地,其中所述方法还包括在步骤(iii)之后和在步骤(iv)之前分离所述包含式(D)结构的化合物;

还任选地,其中所述抗TfR1抗体与该靶向DUX4 RNA的siRNA寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。

32.产生包含与寡核苷酸共价连接的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体的复合物的方法,所述方法包括:

(i)获得包含式(B)结构的化合物,其中所述寡核苷酸包含siRNA寡核苷酸的有义链,任选地,其中所述siRNA寡核苷酸靶向DUX4 RNA;

(ii)使所述siRNA寡核苷酸的反义链与所述有义链退火;

(iii)使抗TfR1抗体与包含式(C)结构的化合物共价连接,以获得包含式(F)结构的化合物;以及

(iv)使所述包含式(F)结构的化合物与所述包含式(B)结构的化合物反应,以获得包含式(E)结构的化合物,

任选地,其中步骤(ii)中的退火在30℃下进行,

还任选地,其中所述抗TfR1抗体与该靶向DUX4 RNA的siRNA寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。

肌肉靶向复合物及其用于治疗面肩肱型肌营养不良的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求于2022年7月6日提交的题为“MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY”的美国临时申请No.63/367,783和于2022年12月23日提交的题为“MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY”的美国临时申请No.63/477,160的权益;其各自的内容均通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及旨在靶向DUX4 RNA的寡核苷酸和用于将分子有效载荷(例如,寡核苷酸)递送至细胞的靶向复合物及其用途,特别是涉及疾病治疗的用途。

[0004] 电子序列表的引用

[0005] 电子序列表的内容(D082470078WO00-SEQ-CBD.xml;大小:339,190字节;以及创建日期:2023年6月30日)通过引用整体并入本文。

背景技术

[0006] 肌营养不良(muscular dystrophy,MD)是一组以进行性无力和肌肉量减少为特征的疾病。这些疾病是由编码健康肌肉组织所需蛋白质的基因中的突变引起的。面肩肱型肌营养不良(facioscapulohumeral muscular dystrophy,FSHD)是一种显性遗传类型的MD,其主要影响面部、肩胛和上臂的肌肉。FSHD的其他症状包括腹肌无力、视网膜异常、听力下降以及关节痛和炎症。FSHD是影响成人和儿童二者的九种MD类型中最普遍的,其中全世界发病率为约每8,300人中1人。FSHD是由双同源框4(double homeobox 4,DUX4)的异常产生引起的,双同源框4是调节基因表达的蛋白质。编码DUX4蛋白的DUX4基因位于4号染色体上的D4Z4重复区域中,并且通常在成人睾丸和胸腺以及在2-细胞期胚胎中表达,此后,其会被围绕DUX4基因并使之紧凑的D4Z4重复的超甲基化所抑制。已经描述了两种类型的FSHD,1型和2型。占病例中约95%的1型与4号染色体的亚端粒区中D4Z4重复的缺失相关。未受影响的个体通常具有在4号染色体的亚端粒区中排列的多于10个重复,然而FSHD的最常见形式(FSHD1)是由阵列收缩至少于10个重复引起的,与骨骼肌中DUX4的多样化表达和表观遗传抑制降低相关。染色体4q的两种等位基因变体(4qA和4qB)存在于D4Z4重复的最远端单元中。4qA处于具有功能性多腺苷酸化共有位点的顺式形式。4qA等位基因的收缩是致病性的,因为DUX4转录物被多腺苷酸化并是稳定的。占病例中约5%的2型FSHD与18号染色体上SMCHD1基因的突变相关。2型FSHD也可能与DNMT3B基因或LRIF1基因相关。除了支持性护理和应对疾病症状的治疗外,尚无用于FSHD的有效治疗。

发明内容

[0007] 本公开内容的一些方面提供了旨在靶向DUX4 RNA的寡核苷酸。在一些实施方案

中,本公开内容提供了与DUX4 RNA互补的寡核苷酸,其可用于降低DUX4 RNA和/或蛋白质的水平。在一些实施方案中,本公开内容提供了与DUX4 RNA的外显子3互补的寡核苷酸,其可用于降低DUX4 RNA的水平。在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸旨在指导RNAi介导的DUX4 RNA的降解。在一些实施方案中,寡核苷酸旨在有效地接合RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC)以用于降解DUX4 RNA而且还具有降低的脱靶效应。在一些实施方案中,所述寡核苷酸旨在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,所述寡核苷酸旨在具有期望的结合亲和力特性。在一些实施方案中,所述寡核苷酸旨在具有期望的毒性和/或免疫原性谱。肌肉中DUX4 RNA和/或蛋白质的异常(例如,提高)表达与面肩肱型肌营养不良(FSHD)病理学的特征相关,所述特征包括肌肉萎缩、炎症、和降低的分化潜能以及氧化应激。在一些实施方案中,本文中所述的降低DUX4 RNA和/或蛋白质水平的寡核苷酸在治疗FSHD方面是有效的。

[0008] 根据一些方面,本公开内容提供了靶向肌细胞(例如,原代成肌细胞)以用于将分子有效载荷(例如,本文中所述的寡核苷酸)递送至那些细胞的目的的复合物。在一些实施方案中,本文中提供的复合物特别可用于递送抑制DUX4的表达或活性(例如在患有或怀疑患有FSHD的对象中)的分子有效载荷。因此,在一些实施方案中,本文中提供的复合物包含与肌细胞表面上的受体特异性结合以用于将分子有效载荷递送至肌细胞的目的的肌肉靶向剂(例如,肌肉靶向抗体)。在一些实施方案中,所述复合物通过受体介导的内化被摄取到细胞中,然后分子有效载荷可被释放以在细胞内部执行功能。例如,经改造以递送寡核苷酸的复合物可释放该寡核苷酸,使得该寡核苷酸可抑制肌细胞中的DUX4基因表达。在一些实施方案中,通过对连接复合物中的寡核苷酸和肌肉靶向剂的共价接头进行内体切割而释放该寡核苷酸。

[0009] 本公开内容的一些方面提供了复合物,其包含与靶向双同源框4(DUX4)RNA(例如,mRNA)的寡核苷酸共价连接的肌肉靶向剂,其中寡核苷酸包含长度为18至25个核苷酸的反义链,并且包含SEQ ID NO:174至235中所示的靶序列的互补区,并且其中所述互补区的长度为至少16个连续的核苷。

[0010] 本公开内容的一些方面提供了复合物,其包含与靶向双同源框4(DUX4)RNA(例如,mRNA)的寡核苷酸共价连接的肌肉靶向剂,其中寡核苷酸包含长度为18至25个核苷酸的反义链,并且包含与SEQ ID NO:200、191、189、186、190、174至185、187、188、192至199和201至235中所示靶序列的互补区,并且其中所述互补区的长度为至少16个连续的核苷。

[0011] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是抗转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1,TfR1)抗体。

[0012] 在一些实施方案中,寡核苷酸是RNAi寡核苷酸。

[0013] 在一些实施方案中,反义链包含SEQ ID NO:236至266中任一者的核苷酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,反义链包含SEQ ID NO:262、253、251、248、252、236至247、249、250、254至261、263至266中任一者的核苷酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,寡核苷酸还包含含有与反义链互补的至少18个连续核苷的有义链。

[0016] 在一些实施方案中,有义链包含与反义链互补的21个连续核苷。

[0017] 在一些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:205至235中任一者的核苷酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,有义链包含SEQ ID NO:231、222、220、217、221、205至216、218、219、223、230、232至235中任一者的核苷酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂与有义链的5'末端或3'末端共价连接。

[0020] 在一些实施方案中,RNAi寡核苷酸的反义链还包含5'-(E)-乙烯基膦酸酯。

[0021] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或更多个经修饰核苷。

[0022] 在一些实施方案中,一个或更多个经修饰核苷是2'经修饰核苷酸,任选地,其中一个或更多个2'经修饰核苷选自: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-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA))。

[0023] 在一些实施方案中,每个2'经修饰核苷酸是2'-O-甲基(2'-O-Me)或2'-氟(2'-F)。在一些实施方案中,2'经修饰核苷酸是2'-O-甲基(2'-O-Me)。在一些实施方案中,2'经修饰核苷酸是2'-氟(2'-F)。

[0024] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联。

[0025] 在一些实施方案中,一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联存在于寡核苷酸的反义链上。

[0026] 在一些实施方案中,反义链3'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链5'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链3'末端处的两个核苷间键联和反义链5'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0027] 在一些实施方案中,一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联存在于寡核苷酸的有义链上。

[0028] 在一些实施方案中,有义链3'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链5'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链3'末端处的两个核苷间键联和有义链5'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0029] 在一些实施方案中,寡核苷酸的一个或更多个胞苷是2'修饰的5-甲基胞苷,任选地,其中2'修饰的5-甲基胞苷是2'-O-Me修饰的5-甲基胞苷或2'-F修饰的5-甲基胞苷。

[0030] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链选自表8中所列SEQ ID NO:236至266的经修饰形式(例如,MAS1至MAS4)。例如,在一些实施方案中,反义链选自:

[0031] MAS1-236,MAS1-237,MAS1-238,MAS2-236,MAS2-237,MAS2-238,MAS2-239,MAS2-240,MAS2-241,MAS2-242,MAS2-243,MAS2-244,MAS2-245,MAS2-246,MAS2-247,MAS2-248,MAS2-249,MAS2-250,MAS2-251,MAS2-252,MAS2-253,MAS2-254,MAS2-255,MAS2-256,MAS2-257,MAS3-236,MAS3-237,MAS3-238-MAS3-239,MAS3-240,MAS3-241,MAS3-242,MAS3-243,MAS3-244,MAS3-245,MAS3-246,MAS3-247,MAS3-248,MAS3-249,MAS3-250,MAS3-251,MAS3-252,MAS3-253,MAS3-254,MAS3-255,MAS3-256,MAS3-257,MAS3-258,MAS3-259,MAS3-260,MAS3-261,MAS3-262,MAS3-263,MAS3-264,MAS3-265,MAS3-266,MAS4-236,MAS4-237,MAS4-238,MAS4-239,MAS4-240,MAS4-241,MAS4-242,MAS4-243,MAS4-244,MAS4-245,MAS4-246,MAS4-247,MAS4-248,MAS4-249,MAS4-250,MAS4-251,MAS4-252,MAS4-253,MAS4-254,MAS4-

255,MAS4-256,和MAS4-257

[0032] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链选自表8中所列SEQ ID NO:205至235的经修饰形式(例如,MS1至MS6)。例如,在一些实施方案中,有义链选自:

[0033] MS1-205,MS1-206,MS1-207,MS2-208,MS2-209,MS2-210,MS2-211,MS2-212,MS2-213,MS2-214,MS2-215,MS2-216,MS2-217,MS2-218,MS2-219,MS2-220,MS2-221,MS2-222,MS2-223,MS2-224,MS2-225,MS2-226,MS3-205,MS3-206,MS3-207,MS3-208,MS3-209,MS3-210,MS3-211,MS3-212,MS3-213,MS3-214,MS3-215,MS3-216,MS3-217,MS3-218,MS3-219,MS3-220,MS3-221,MS3-222,MS3-223,MS3-224,MS3-225,MS3-226,MS3-227,MS3-228,MS3-229,MS3-230,MS3-231,MS3-232,MS3-233,MS3-234,MS3-235,MS4-205,MS4-206,MS4-207,MS4-208,MS4-209,MS4-210,MS4-211,MS4-212,MS4-213,MS4-214,MS4-215,MS4-216,MS4-217,MS4-218,MS4-219,MS4-220,MS4-221,MS4-222,MS4-223,MS4-224,MS4-225,MS4-226,MS5-205,MS5-206,MS5-207,MS5-208,MS5-209,MS5-210,MS5-211,MS5-212,MS5-213,MS5-214,MS5-215,MS5-216cMS5-217,MS5-218,MS5-219,MS5-220,MS5-221,

[0034] MS5-222,MS5-223,MS5-224,MS5-225,MS5-226,MS6-205,MS6-206,MS6-207,MS6-208,MS6-209,MS6-210,MS6-211,MS6-212,MS6-213,MS6-214,MS6-215,MS6-216,MS6-217,MS6-218,MS6-219,MS6-220,MS6-221,MS6-222,MS6-223,MS6-224,MS6-225,和MS6-226。

[0035] 在一些实施方案中,反义链选自表9中所列SEQ ID NO:262、253、251、248和252的经修饰形式(例如,VP-MAS5、VP-MAS6和VP-MAS7),以及/或者其中有义链选自表9中所列SEQ ID NO:231、222、220、217和221的经修饰形式(例如,MS7至MS9)。

[0036] 在一些实施方案中,寡核苷酸是siRNA分子,其选自表8中所列siRNA。

[0037] 在一些实施方案中,寡核苷酸是siRNA分子,其选自表9中所列siRNA。

[0038] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体包含表2中所列任何抗TfR1抗体的重链互补决定区1(heavy chain complementarity determining region 1,CDR-H1)、重链互补决定区2(heavy chain complementarity determining region 2,CDR-H2)、重链互补决定区3(heavy chain complementarity determining region 3,CDR-H3)、轻链互补决定区1(light chain complementarity determining region 1,CDR-L1)、轻链互补决定区2(light chain complementarity determining region 2,CDR-L2)、轻链互补决定区3(light chain complementarity determining region 3,CDR-L3)。

[0039] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体包含表3中所列任何抗TfR1抗体的重链可变区(heavy chain variable region,VH)和轻链可变区(light chain variable region,VL)。

[0040] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体是Fab,任选地,其中Fab包含表5中所列任何抗TfR1 Fab的重链和轻链。

[0041] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体包含:

[0042] (i)含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR-H1、含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR-H2、含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR-H3、含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR-L1、含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;

[0043] (ii)含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR-H1、含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR-H2、含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR-H3、含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的

CDR-L1、含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;或者

[0044] (ii)含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR-H1、含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR-H2、含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H3、含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-L1、含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-L3。

[0045] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL。

[0046] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体是Fab并且包含含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0047] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂与反义寡核苷酸通过接头共价连接,任选地,其中接头包含缬氨酸-瓜氨酸序列。

[0048] 本文中还提供了降低肌细胞中DUX4表达的方法,该方法包括使肌细胞与有效量的本文中所述复合物接触以促进寡核苷酸内化至肌细胞。在一些实施方案中,降低DUX4表达包括降低DUX4蛋白和/或mRNA水平。

[0049] 本文中还提供了治疗面肩肱型肌营养不良(FSHD)的方法,该方法包括向有此需要的对象施用有效量的本文中提供的复合物。在一些实施方案中,对象具有DUX4蛋白的异常产生。

[0050] 本公开内容的另一些方面提供了包含siRNA寡核苷酸的寡核苷酸,所述siRNA寡核苷酸选自表8中所列siRNA寡核苷酸。

[0051] 本公开内容的另一些方面提供了包含siRNA寡核苷酸的寡核苷酸,所述siRNA寡核苷酸选自表9中所列siRNA寡核苷酸。

[0052] 本文中还提供了产生复合物的方法,所述复合物包含与寡核苷酸共价连接的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体,该方法包括:(i)获得包含式(B)结构的化合物,其中寡核苷酸包含siRNA寡核苷酸的有义链,任选地,其中siRNA寡核苷酸靶向DUX4 RNA;(ii)使siRNA寡核苷酸的反义链与有义链退火;(iii)使包含式(B)结构的化合物与包含式(C)结构的化合物反应,以获得包含式(D)结构的化合物;以及(iv)使抗TfR1抗体与带有肌肉靶向剂的包含式(D)结构的化合物共价连接,以获得包含式(E)结构的化合物,任选地,其中步骤(ii)中的退火在30℃下进行,还任选地,其中该方法还包括在步骤(iii)之后和在步骤(iv)之前分离包含式(D)结构的化合物;还任选地,其中抗TfR1抗体与靶向DUX4 RNA的siRNA寡核苷酸的有义链5'末端共价连接。

[0053] 本文中还提供了产生复合物的方法,所述复合物包含与寡核苷酸共价连接的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体,该方法包括:(i)获得包含式(B)结构的化合物,其中寡核苷酸包含siRNA寡核苷酸的有义链,任选地,其中siRNA寡核苷酸靶向DUX4 RNA;(ii)使siRNA寡核苷酸的反义链与有义链退火;(iii)将抗TfR1抗体与包含式(C)结构的化合物共价连接,以获得包含式(F)结构的化合物;以及(iv)使包含式(F)结构的化合物与包含式(B)结构的化合物反应,以获得包含式(E)结构的化合物,任选地其中步骤(ii)中的退火在30℃下进行,还任选地,其中抗TfR1抗体与靶向DUX4 RNA的siRNA寡核苷酸的有义链5'末端共价连接。

附图说明

[0054] 图1示出了显示用siRNA转染细胞的效果的非限制性示意图。图示出了siRNA对HPRT mRNA水平的作用。

[0055] 图2示出了显示包含siRNA的肌肉靶向复合物的活性的非限制性示意图。根据培养的肌细胞中的HPRT mRNA水平测量复合物的体外活性。该复合物包含与肌肉靶向抗体连接的siRNA。

[0056] 图3A至3B示出了显示相对于经载剂处理的对照,小鼠肌肉组织(腓肠肌和心脏)中的体内活性的非限制性示意图。(N＝4只C57BL/6WT小鼠)测量复合物的体内活性。该复合物包含与肌肉靶向抗体连接的siRNA。

[0057] 图4A至4E示出了显示包含siRNA的肌肉靶向复合物的组织选择性的非限制性示意图。该复合物包含与肌肉靶向抗体连接的siRNA。

[0058] 图5示出了在与包含与siRNA-A、siRNA-B或siRNA-C共价连接的抗TfR Fab 3M12 VH4/Vκ3的siRNA缀合物一起孵育之后,AB1080永生化FSHD患者来源肌管中的三种DUX4转录组标志物(MBD3L2、TRIM43和ZSCAN4)的mRNA水平的综合评分。抗TfR Fab通过接头与每个siRNA有义链的3’末端共价连接,并且对应的反义链与有义链退火。

[0059] 图6示出了在用选自siRNA7、49、50、53、54、136、19、114、137、138、32、35、33、36、73、74、77、76、75、78、83、68、103、104、107、106、105、108、85、86、89、88、87、90、133、135、140、97、128、132、134、47、91、92、95、94、93和96的siRNA以0.2nM或20nM的浓度转染之后,FSHD患者来源C6肌管中DUX4转录组标志物MBD3L2,TRIM43和ZSCAN4的mRNA水平的综合评分。siRNA编号对应于表8中的siRNA编号。

[0060] 图7A至7C示出了siRNA 7、136、137、74、77、78、104、107、106、86、89、133、97、128、92、95和94产生的剂量响应曲线。siRNA编号对应于表8中的siRNA编号。在用一定浓度范围(2pM至40nM)的指定siRNA处理的细胞中,使用DUX4转录组标志物MBD3L2、TRIM43和ZSCAN4的综合评分产生剂量响应曲线。

[0061] 图8示出了在用浓度为10nM、100nM或1000nM的siRNA抗体复合物处理之后,FSHD患者来源C6肌管中三种DUX4转录组标志物(MBD3L2、TRIM43和ZSCAN4)的mRNA水平的综合评分。siRNA-抗体复合物包含与DUX4靶向siRNA共价连接的抗TfR1 Fab 3M12VH4/Vκ3。测试的SiRNA是SiRNA 142至148。siRNA编号对应于表9中的siRNA编号。靶向siRNA的外显子1用作阳性对照。

[0062] 图9A至9B示出了相对于经载剂处理的对照,小鼠股四头肌(图9A)和腓肠肌(图9B)中三种DUX4小鼠转录组标志物(Wfdc3、Sord、Serpinb6c)的mRNA水平的综合评分。在以剂量为10mg/kg的siRNA单次静脉内注射与抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3共价连接的DUX4靶向siRNA复合物之后4周收集组织。测试的siRNA是siRNA145、siRNA148、siRNA144、siRNA143和siRNA142。siRNA编号对应于表9中的siRNA编号。

[0063] 图10示出了举例说明如何制备本文中所述抗TfR1-siRNA复合物的示意图的实例。

具体实施方式

[0064] 本公开内容的一些方面提供了旨在靶向DUX4 RNA的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开内容提供了与DUX4 RNA互补的寡核苷酸,其可用于降低DUX4 RNA和/或蛋白质的

水平。在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸旨在指导RNAi介导的DUX4 RNA的降解。在一些实施方案中,寡核苷酸旨在有效地接合RNA诱导的沉默复合物(RISC)以降解DUX4 RNA而且还具有降低的脱靶效应。在一些实施方案中,寡核苷酸旨在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,寡核苷酸旨在具有期望的结合亲和力特性。在一些实施方案中,寡核苷酸旨在具有期望的毒性和/或免疫原性谱。DUX4 RNA和/或蛋白质的异常(例如,提高)表达与面肩肱型肌营养不良(FSHD)病理学的特征相关,所述特征包括肌肉萎缩、炎症、和降低的分化潜能以及氧化应激。在一些实施方案中,本文中所述的降低DUX4 RNA和/或蛋白质水平的寡核苷酸在治疗FSHD方面是有效的。

[0065] 在一些方面中,本公开内容提供了复合物,其包含与寡核苷酸共价连接以用于将寡核苷酸有效递送至肌细胞的肌肉靶向剂。在一些实施方案中,所述复合物特别可用于递送抑制肌细胞中靶基因的表达或活性(例如,在患有或怀疑患有罕见肌肉疾病的对象中)的分子有效载荷。例如,在一些实施方案中,提供了用于治疗患有FSHD的对象的复合物。在一些实施方案中,提供了用于治疗患有FSHD1的对象的复合物。在一些实施方案中,提供了用于治疗患有FSHD2的对象的复合物。在一些实施方案中,提供了用于靶向DUX4以治疗患有FSHD的对象的复合物。在一些实施方案中,本文中提供的复合物包含在对象中抑制DUX4的表达的寡核苷酸,该对象在4号染色体上具有一个或更多个D4Z4重复缺失。在一些实施方案中,本文中提供的复合物包含在对象中抑制DUX4表达的寡核苷酸,该对象具有SMCHD1或另一DUX4调节基因中的突变。

[0066] 下文提供了本公开内容的另一些方面,包括对定义术语的描述。

[0067] I.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,以治疗对象中的病症)。

[0069] 大约:本文中使用的术语“大约”或“约”,如应用于一个或更多个目的值时,是指类似于陈述的参考值的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指落入陈述的参考值的任一方向上(大于或小于)15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或更小以内的值的范围,除非另有说明或在其他情况下从上下文中可以明显看出(除非这样的数字超过可能值的100%)。

[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恒定结构域或轻链恒定结构域。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描述,例如,参见美国专利No.5,693,780和Kabat E A et al.,(1991)同上。在一些实施方案中,VH结构域包含与本文中提供的任何可变链恒定区具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,对抗体进行修饰,例如,通过糖基化、磷酸化、SUMO化(sumoylation)和/或(例如,和)甲基化进行修饰。在一些实施方案中,抗体是与一个或更多个糖或碳水化合物分子缀合的糖基化抗体。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子通过N-糖基化、O-糖基化、C-糖基化、糖基磷脂酰肌醇化(GPI锚定附着)和/或(例如,和)磷酸糖基化(phosphoglycosylation)与抗体缀合。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、寡糖或聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是支化的寡糖或支化的聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子包含甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡糖胺单元、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)Structure 2:1121-1123)。另外,抗体可以是更大的免疫黏附分子的一部分,免疫黏附分子通过抗体或抗体部分与一个或更多个其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合而形成。这样的免疫黏附分子的一些实例包括使用链霉亲和素核芯区域来制备四聚体scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1995)Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101),以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1994)Mol.Immunol.31:1047-1058)。

[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区可进一步细分为高变区,也称为“互补决定区”(“complementarity determining region,CDR”),其中散布有更保守的称为“框架区”(“framework region,FR”)的区域。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR构成,从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。可使用本领域已知的方法,例如通过Kabat定义、IMGT定义、Chothia定义、AbM定义和/或(例如,和)接触定义(所有这些都是本领域公知的)来精确鉴定框架区和CDR的范围。参见,例如Kabat,E.A.,et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;IMGT®,the international ImMunoGeneTics information system® www.imgt.org,Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,27:209-212(1999);Ruiz,M.et al.,Nucleic Acids Res.,28:219-221(2000);Lefranc,M.-P.,

Nucleic Acids Res.,29:207-209(2001);Lefranc,M.-P.,Nucleic Acids Res.,31:307-310(2003);Lefranc,M.-P.et al.,In Silico Biol.,5,0006(2004)[Epub],5:45-60(2005);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,33:D593-597(2005);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,37:D1006-1012(2009);Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,43:D413-422(2015);Chothia et al.,(1989)Nature 342:877;Chothia,C.et al.(1987)J.Mol.Biol.196:901-917;Al-lazikani et al(1997)J.Molec.Biol.273:927-948;以及Almagro,J.Mol.Recognit.17:132-143(2004)。还参见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)确定的。

[0072] 重链和轻链的每个可变区中有三个CDR,对于每个可变区分别称为CDR1、CDR2和CDR3。本文中使用的术语“CDR组”是指出现在单个可变区内的能够结合抗原的三个CDR的组。这些CDR的确切边界已根据不同的系统进行了不同的定义。Kabat描述的系统(Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)and(1991))不仅提供了适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,而且还提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可被称为Kabat CDR。CDR的子部分可被指定为L1、L2和L3或H1、H2和H3,其中“L”和“H”分别指定轻链区域和重链区域。这些区域可称为Chothia CDR,其具有与Kabat CDR重叠的边界。Padlan(FASEB J.9:133-139(1995))和MacCallum(J Mol Biol 262(5):732-45(1996))已经描述了定义与Kabat CDR重叠的CDR的其他边界。另一些CDR边界定义可能并不严格遵循上述系统之一,但仍与Kabat CDR重叠,尽管可根据预测或者根据特定残基或残基的组或甚至整个CDR不会显著影响抗原结合的实验发现来缩短或延长它们。本文中使用的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。

[0073] 表1.CDR定义

[0074]

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

[0075] [1] IMGT®,the international ImMunoGeneTics informationsystem®,imgt.org,Lefranc,M.-P.et al.,Nucleic Acids Res.,27:209-212(1999)

[0076] [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

[0077] [3]Chothia et al.,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))

[0078] CDR接枝抗体(CDR-grafted antibody):术语“CDR接枝抗体”是指包含来自一个物种的重链可变区序列和轻链可变区序列但是其中VH和/或(例如,和)VL的一个或更多个CDR区的序列被来自另一物种的CDR序列替代的抗体,例如具有鼠重链可变区和轻链可变区并

且其中一个或更多个鼠CDR(例如,CDR3)已被人CDR序列替代的抗体。

[0079] 嵌合抗体:术语“嵌合抗体”是指包含来自一个物种的重链可变区序列和轻链可变区序列以及来自另一物种的恒定区序列的抗体,例如具有与人恒定区连接的鼠重链可变区和轻链可变区的抗体。

[0080] 互补:本文中使用的术语“互补”是指在两个核苷或两组核苷之间精确配对的能力。特别地,互补是表征引起两个核苷或两组核苷之间结合的氢键配对的程度的术语。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杂交并且被认为与任何A、C、U或T互补。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。

[0081] 保守氨基酸替换:本文中使用的“保守氨基酸替换”是指不改变进行氨基酸替换的蛋白质的相对电荷或尺寸特征的氨基酸替换。可根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备变体,所述方法例如可在汇编这样的方法的参考文献中找到:例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J,Sambrook,et al.,eds.,Fourth Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,2012,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel,et al.,eds.,John Wiley& Sons,Inc.,New York。氨基酸的保守替换包括在以下组内的氨基酸之间进行的替换:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。

[0082] 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。

[0083] 交叉反应性:如本文中使用以及在靶向剂(例如,抗体)的情况下,术语“交叉反应性”是指物质能够以相似亲和力或亲合力与相似类型或类别的超过一种抗原(例如,多个同源物、旁系同源物或直系同源物的抗原)特异性结合的性质。例如,在一些实施方案中,对相似类型或类别的人和非人灵长类抗原(例如,人转铁蛋白受体和非人灵长类转铁蛋白受体)具有交叉反应性的抗体能够以相似亲和力或亲合力与人抗原和非人灵长类抗原结合。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的人抗原和啮齿动物抗原具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的啮齿动物抗原和非人灵长类抗原具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的人抗原、非人灵长类抗原和啮齿动物抗原具有交叉反应性。

[0084] DUX4:本文中使用的术语“DUX4”是指编码双同源框4的基因,双同源框4是通常在胎儿发育期间和成年雄性的睾丸中表达的蛋白质。在一些实施方案中,DUX4可以是人基因(基因ID:100288687)、非人灵长类基因(例如,基因ID:750891,基因ID:100405864)或啮齿

动物基因(例如,基因ID:306226)。在人中,在胎儿发育和睾丸以外的DUX4基因的表达与面肩肱型肌营养不良相关。另外,已经表征了编码不同蛋白质同种型的多种人转录物变体(例如,如以以下GenBank RefSeq登录号进行注释:NM_001293798.2、NM_001306068.3、NM_001363820.1)。

[0085] 面肩肱型肌营养不良(FSHD):本文中使用的术语“面肩肱型肌营养不良(FSHD)”是指由DUX4基因、SMCHD1基因、DNMT3B基因,或LRIF1基因中的突变引起的遗传性疾病,其以主要在面部、肩肱和上臂肌肉中的肌肉量减少和肌肉萎缩为特征。已经描述了两种类型的该疾病,1型和2型。1型与4号染色体上包含DUX4基因的D4Z4重复区的缺失相关。在一些实施方案中,1型与4号染色体等位基因变体4qA上包含DUX4基因的D4Z4重复区的缺失相关。2型与SMCHD1基因、DNMT3B基因、或LRIF1基因中的突变相关(参见,例如Jia et al.,“Facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2:an update on the clinical,genetic,and molecular findings”Neuromuscul Disord.(2021),31(11):1101-1112)。1型和2型FSHD二者均以在胎儿发育之后除睾丸外的DUX4蛋白的异常产生为特征。面肩肱型肌营养不良、该疾病的遗传基础以及相关症状已在本领域中进行了描述(参见,例如Campbell,A.E.,et al.,“Facioscapulohumeral dystrophy:Activating an early embryonic transcriptional programin human skeletal muscle”Human Mol Genet.(2018);以及Tawil,R.“Facioscapulohumeral muscular dystrophy”Handbook Clin.Neurol.(2018),148:541-548)。1型FSHD与在线人类孟德尔遗传(Online Mendelian Inheritance in Man,OMIM)Entry#158900相关。2型FSHD与OMIM Entry#158901相关。

[0086] 框架:本文中使用的术语“框架”或“框架序列”是指可变区减去CDR的剩余序列。由于CDR序列的确切定义可通过不同的系统确定,因此框架序列的含义相应地具有不同解释。六个CDR(轻链的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3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。如本文中使用的,FR代表四个子区域之一,并且FRs代表构成框架区的四个子区域中的两个或更多个。人重链和轻链接受体序列是本领域已知的。在一个实施方案中,本领域已知的接受体序列可用于本文中公开的抗体中。

[0087] 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。

[0088] 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)的重链可变区序列和轻链可变区序列但是其中VH和/或(例如,和)VL序列的至少一部分已被改变为更加“人样”(即,更类似于人种系可变序列)的抗体。一种类型的人源化抗体是CDR接枝抗体,其中人CDR序列被引入非人VH和VL序列中以替代相应的非人CDR序列。在一个实施方案中,提供了人源化抗TfR1抗体和抗原结合部分。这样的抗体可通过使用传统的杂交瘤技术获得鼠抗TfR1单克隆抗体随后使用体外遗传改造进行人源化来产生,例如在Kasaian et al的

PCT公开No.WO 2005/123126 A2中公开的那些。

[0089] 内化细胞表面受体:本文中使用的术语“内化细胞表面受体”是指例如在外部刺激(例如,配体与受体结合)下被细胞内化的细胞表面受体。在一些实施方案中,内化细胞表面受体通过内吞作用内化。在一些实施方案中,内化细胞表面受体通过网格蛋白介导的内吞作用内化。然而,在一些实施方案中,内化细胞表面受体通过网格蛋白非依赖性途径内化,例如如吞噬作用、巨胞饮作用、小窝和筏介导的摄取或组成型网格蛋白非依赖性内吞作用。在一些实施方案中,内化细胞表面受体包含胞内结构域、跨膜结构域和/或(例如,和)胞外结构域,其可任选地还包含配体结合结构域。在一些实施方案中,细胞表面受体在配体结合之后变得被细胞内化。在一些实施方案中,配体可以是肌肉靶向剂或肌肉靶向抗体。在一些实施方案中,内化细胞表面受体是转铁蛋白受体。

[0090] 分离的抗体:本文中使用的“分离的抗体”旨在是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合转铁蛋白受体的分离的抗体基本上不含特异性结合转铁蛋白受体以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合转铁蛋白受体复合物的分离的抗体可能与其他抗原(例如来自其他物种的转铁蛋白受体分子)具有交叉反应性。此外,分离的抗体可基本上不含其他细胞材料和/或(例如,和)化学物质。

[0091] 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可变区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。

[0092] 分子有效载荷:本文中使用的术语“分子有效载荷”是指发挥调节生物学结局作用的分子或物质。在一些实施方案中,分子有效载荷与肌肉靶向剂连接或以其他方式缔合。在一些实施方案中,分子有效载荷是小分子、蛋白质、肽、核酸或寡核苷酸。在一些实施方案中,分子有效载荷发挥调节DNA序列的转录、调节蛋白质的表达或调节蛋白质的活性的作用。在一些实施方案中,分子有效载荷是寡核苷酸,其包含具有靶基因的互补区的链。

[0093] 肌肉靶向剂:本文中使用的术语“肌肉靶向剂”是指与肌细胞上表达的抗原特异性结合的分子。肌细胞内或上的抗原可以是膜蛋白,例如整合膜蛋白或外周膜蛋白。通常来说,肌肉靶向剂与肌细胞上的抗原特异性结合,这有助于将肌肉靶向剂(和任何缔合的分子有效载荷)内化到肌细胞中。在一些实施方案中,肌肉靶向剂与肌肉上的内化细胞表面受体特异性结合,并且能够通过受体介导的内化而内化到肌细胞中。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是小分子、蛋白质、肽、核酸(例如,适配体)、或抗体。在一些实施方案中,肌肉靶向剂与分子有效载荷连接。

[0094] 肌肉靶向抗体:本文中使用的术语“肌肉靶向抗体”是指作为与存在于肌细胞内或上的抗原特异性结合的抗体的肌肉靶向剂。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体与肌细胞上的抗原特异性结合,这有助于将肌肉靶向抗体(和任何缔合的分子有效载荷)内化到肌细胞

中。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体与存在于肌细胞上的内化细胞表面受体特异性结合。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是与转铁蛋白受体特异性结合的抗体。

[0095] 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,其可为Rp或Sp立体化学构象。

[0096] 重组抗体:本文中使用的术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(在本公开内容中更详细地描述),从重组、组合人抗体文库分离的抗体(Hoogenboom H.R.,(1997)TIB Tech.15:62-70;Azzazy H.,and Highsmith W.E.,(2002)Clin.Biochem.35:425-445;Gavilondo J.V.,and Larrick J.W.(2002)BioTechniques 29:128-145;Hoogenboom H.,and Chames P.(2000)Immunology Today 21:371-378),从人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如,小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor,L.D.,et al.(1992)Nucl.Acids Res.20:6287-6295;Kellermann S-A.,and Green L.L.(2002)Current Opinion in Biotechnology 13:593-597;Little M.et al(2000)Immunology Today 21:364-370),或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,对这样的重组人抗体进行体外诱变(或当使用人Ig序列转基因的动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列,尽管其来源于人种系VH和VL序列并与之相关,但可能不是体内人抗体种系库中天然存在的。本公开内容的一个实施方案提供了能够结合人转铁蛋白受体的完全人抗体,其可使用本领域公知的技术产生,例如但不限于使用人Ig噬菌体文库,例如Jermutus et al.的PCT公开No.WO 2005/007699 A2中公开的那些。

[0097] 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。

[0098] 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伴侣结合的能力,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伴侣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^{-}

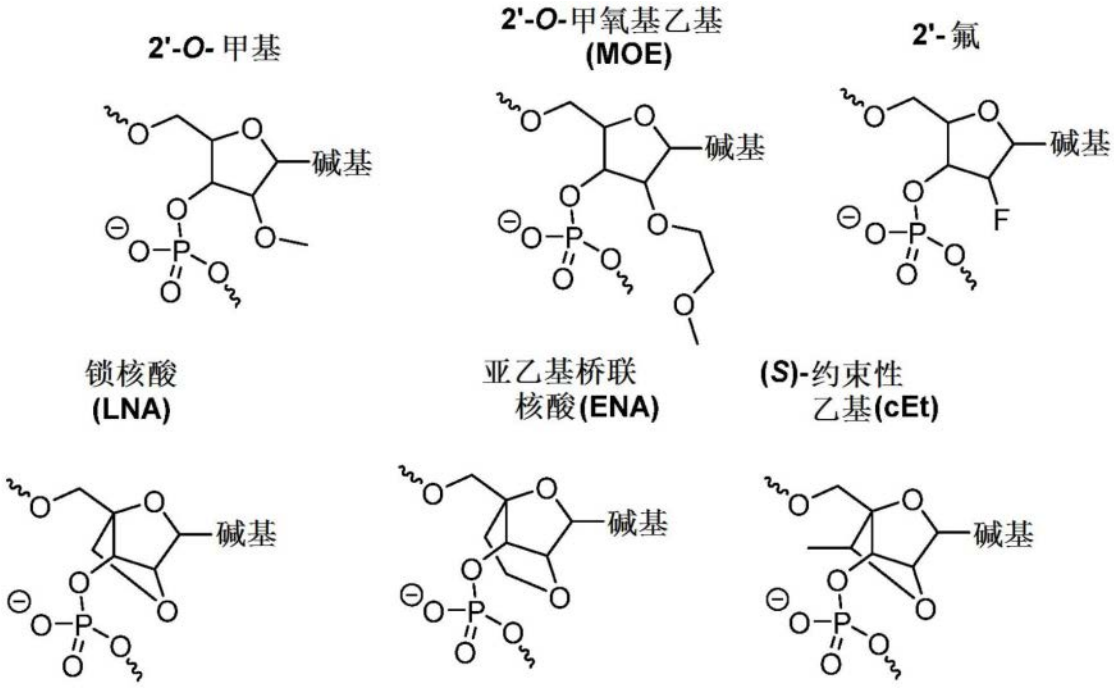
^{12}M、10^{-13}M或更小,则抗体与靶标特异性结合。在一些实施方案中,抗体与转铁蛋白受体(例如,转铁蛋白受体的顶端结构域(apical domain)的表位)特异性结合。

[0099] 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FSHD的人患者。

[0100] 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、TFR1)是指结合转铁蛋白以促进通过内吞作用摄取铁的内化细胞表面受体。在一些实施方案中,转铁蛋白受体可以是人来源的(NCBI基因ID 7037)、非人灵长类来源的(例如,NCBI基因ID 711568或NCBI基因ID 102136007)或啮齿动物来源的(例如,NCBI基因ID 22042)。另外,已经表征了编码受体的不同同种型的多种人转录物变体(例如,如以以下GenBank RefSeq登录号进行注释:NP_001121620.1、NP_003225.2、NP_001300894.1和NP_001300895.1)。

[0101] 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-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)、锁核酸(locked nucleic acid,LNA,亚甲基桥联核酸)、亚乙基桥联核酸(ethylene-bridged nucleic acid,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。下面提供了2'-经修饰核苷之结构的一些实例:

[0102]



[0103] 这些实例在有磷酸基团的情况下示出,但是在2'-经修饰核苷之间考虑任何核苷

间键联。

[0104] II.复合物

[0105] 本文中提供了包含与分子有效载荷共价连接的靶向剂(例如,抗体)的复合物。在一些实施方案中,复合物包含与寡核苷酸共价连接的肌肉靶向抗体。复合物可包含特异性结合单个抗原位点或结合可存在于相同或不同抗原上的至少两个抗原位点的抗体。

[0106] 复合物可用于调节至少一种基因、蛋白质和/或(例如,和)核酸的活性或功能。在一些实施方案中,复合物中存在的分子有效载荷负责基因、蛋白质和/或(例如,和)核酸的调节。分子有效载荷可以是能够调节细胞中基因、蛋白质和/或(例如,和)核酸的活性或功能的小分子、蛋白质、核酸、寡核苷酸或任何分子实体。在一些实施方案中,分子有效载荷是靶向肌细胞中DUX4的寡核苷酸。

[0107] 在一些实施方案中,复合物包含与分子有效载荷(例如靶向DUX4的反义寡核苷酸)共价连接的肌肉靶向剂,例如,抗转铁蛋白受体抗体。在一些实施方案中,复合物包含与分子有效载荷(例如靶向DUX4的siRNA)共价连接的肌肉靶向剂,例如抗转铁蛋白受体抗体。

[0108] A.肌肉靶向剂

[0109] 本公开内容的一些方面提供了肌肉靶向剂,例如用于将分子有效载荷递送至肌细胞。在一些实施方案中,这样的肌肉靶向剂能够例如通过与肌细胞上的抗原特异性结合而与肌细胞结合,并且将缔合的分子有效载荷递送至肌细胞。在一些实施方案中,分子有效载荷与肌肉靶向剂结合(例如,共价结合),并且在肌肉靶向剂与肌细胞上的抗原结合之后内化到肌细胞中,例如通过内吞作用。应理解,根据本公开内容可使用多种类型的肌肉靶向剂。例如,肌肉靶向剂可包含以下或由以下组成:核酸(例如,DNA或RNA)、肽(例如,抗体)、脂质(例如,微泡(microvesicle))或糖部分(例如,多糖)。示例性的肌肉靶向剂在本文中进一步详细描述,然而,应理解,本文中提供的示例性肌肉靶向剂并不意味着是限制性的。

[0110] 本公开内容的一些方面提供了与肌肉(例如骨骼肌、平滑肌或心肌)上的抗原特异性结合的肌肉靶向剂。在一些实施方案中,本文中提供的任何肌肉靶向剂均与骨骼肌细胞、平滑肌细胞和/或(例如,和)心肌细胞上的抗原结合(例如,与之特异性结合)。

[0111] 通过与肌肉特异性细胞表面识别元件(例如,细胞膜蛋白)相互作用,可实现组织定位和选择性摄取到肌细胞中二者。在一些实施方案中,作为肌肉摄取转运体之底物的分子可用于将分子有效载荷递送到肌肉组织中。与肌肉表面识别元件结合之后是内吞作用,其可允许甚至大分子(例如,抗体)进入肌细胞。作为另一个实例,与转铁蛋白或抗TfR1抗体缀合的分子有效载荷可通过与转铁蛋白受体结合而被肌细胞摄取,然后可例如通过网格蛋白介导的内吞作用被内吞。

[0112] 肌肉靶向剂的使用可用于将分子有效载荷(例如,寡核苷酸)集中在肌肉中,同时降低与其他组织中的作用相关的毒性。在一些实施方案中,与对象内的另一种细胞类型相比,肌肉靶向剂将结合的分子有效载荷集中在肌细胞中。在一些实施方案中,肌肉靶向剂将结合的分子有效载荷以是非肌细胞(例如,肝、神经元、血液或脂肪细胞)中的量的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍高的量集中在肌细胞(例如,骨骼肌、平滑肌或心肌细胞)中。在一些实施方案中,当分子有效载荷在与肌肉靶向剂结合时递送至对象时,其在对象中的毒性降低至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或95%。

[0113] 在一些实施方案中,为了实现肌肉选择性,可能需要肌肉识别元件(例如,肌细胞抗原)。作为一个实例,肌肉靶向剂可以是为肌肉特异性摄取转运体之底物的小分子。作为另一个实例,肌肉靶向剂可以是通过转运体介导的内吞作用进入肌细胞的抗体。作为另一个实例,肌肉靶向剂可以是与肌细胞上的细胞表面受体结合的配体。应理解,尽管基于转运体的方法为细胞进入提供了直接途径,但是基于受体的靶向可能涉及刺激的内吞作用以达到期望的作用部位。

[0114] i.肌肉靶向抗体

[0115] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是抗体。通常来说,抗体对其靶抗原的高特异性提供了用于选择性靶向肌细胞(例如,骨骼肌、平滑肌和/或(例如,和)心肌细胞)的潜力。这种特异性也可限制脱靶毒性。能够靶向肌细胞表面抗原的抗体的一些实例已经报道并且在本公开内容的范围内。例如,靶向肌细胞表面的抗体在以下中有描述:Arahata K.,et al.“Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide”Nature 1988;333:861-3;Song K.S.,et al.“Expression of caveolin-3in skeletal,cardiac,and smooth muscle cells.Caveolin-3is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins”J Biol Chem 1996;271:15160-5;以及Weisbart R.H.et al.,“Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of a monoclonal antibody that binds myosin IIb”Mol Immunol.2003Mar,39(13):78309;其各自的全部内容均通过引用并入本文。

[0116] a.抗转铁蛋白受体(Anti-Transferrin Receptor,TfR)抗体

[0117] 本公开内容的一些方面是基于这样的认识:与转铁蛋白受体结合的物质(例如,抗转铁蛋白受体抗体)能够靶向肌细胞。转铁蛋白受体是内化细胞表面受体,其穿过细胞膜转运转铁蛋白并参与胞内铁水平的调节和稳态。本公开内容的一些方面提供了能够与转铁蛋白受体结合的转铁蛋白受体结合蛋白。因此,本公开内容的一些方面提供了与转铁蛋白受体结合的结合蛋白(例如,抗体)。在一些实施方案中,与转铁蛋白受体结合的结合蛋白与任何结合的分子有效载荷一起被内化到肌细胞中。本文中使用的与转铁蛋白受体结合的抗体可以可互换地称为转铁蛋白受体抗体、抗转铁蛋白受体抗体或抗TfR1抗体。与转铁蛋白受体结合(例如,特异性结合)的抗体可在与转铁蛋白受体结合之后例如通过受体介导的内吞作用而被内化到细胞中。

[0118] 应理解,可使用数种已知的方法(例如使用噬菌体展示的文库设计)来产生、合成和/或(例如,和)衍生抗TfR1抗体。示例性方法已经在本领域中表征并且通过引用并入(Díez,P.et al.“High-throughput phage-display screening in array format”,Enzyme and microbial technology,2015,79,34-41.;Christoph M.H.and Stanley,J.R.“Antibody Phage Display:Technique and Applications”J Invest Dermatol.2014,134:2.;Engleman,Edgar(Ed.)“Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies.”1985,Springer.)。在另一些实施方案中,抗TfR1抗体先前已被表征或公开。与转铁蛋白受体特异性结合的抗体是本领域中已知的(参见,例如1979年12月4日提交的美国专利No.4,364,934,“Monoclonal antibody to a human early thymocyte antigen and methods for preparing same”;2006年6月14日提交的美国专利No.8,409,573,“Anti-CD71 monoclonal

antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells";2014年5月20日提交的美国专利No.9,708,406,"Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use";2014年12月19日提交的US 9,611,323,"Low affinity blood brain barrier receptor antibodies and uses therefor";2014年12月24日提交的WO 2015/098989,"Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier";Schneider C.et al."Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9."J Biol Chem.1982,257:14,8516-8522.;Lee et al."Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse"2000,J Pharmacol.Exp.Ther.,292:1048-1052)。

[0119] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体以高特异性和亲和力与转铁蛋白受体结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体与转铁蛋白受体的任何胞外表位或变得暴露于抗体的表位特异性结合。在一些实施方案中,本文中提供的抗TfR1抗体与来自人、非人灵长类、小鼠、大鼠等的转铁蛋白受体特异性结合。在一些实施方案中,本文中提供的抗TfR1抗体与人转铁蛋白受体结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体与人或非人灵长类转铁蛋白受体的氨基酸区段(如SEQ ID NO:105至108中提供的)结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体与这样的氨基酸区段结合:对应于人转铁蛋白受体(如SEQ ID NO:105中所示)的第90至96位氨基酸,其不在转铁蛋白受体的顶端结构域中。在一些实施方案中,本文中所述的人源化抗TfR1抗体与TfR1结合,但不与TfR2结合。

[0120] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体(例如,下表2中的抗TfR克隆8)结合TfR1中的表位,其中所述表位包含SEQ ID NO:105的第214至241位氨基酸和/或第354至381位氨基酸中的残基。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体结合包含SEQ ID NO:105的第214至241位氨基酸和第354至381位氨基酸中的残基的表位。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体结合包含SEQ ID NO:105中所示的人TfR1的一个或更多个残基Y222、T227、K231、H234、T367、S368、S370、T376和S378的表位。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体结合包含SEQ ID NO:105中所示的人TfR1的残基Y222、T227、K231、H234、T367、S368、S370、T376和S378的表位。

[0121] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体(例如,下表2中的3M12及其变体)结合TfR1中的表位,其中所述表位包含SEQ ID NO:105的第258至291位氨基酸和/或第358至381位氨基酸中的残基。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体(例如,下表2中的3M12及其变体)结合包含SEQ ID NO:105的第258至291位氨基酸和第358至381位氨基酸中的残基的表位。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体(例如,下表2中的3M12及其变体)结合包含SEQ ID NO:105中所示的人TfR1的一个或更多个残基K261、S273、Y282、T362、S368、S370和K371的表位。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体(例如,下表2中的3M12及其变体)结合包含SEQ ID NO:105中所示的人TfR1的残基K261、S273、Y282、T362、S368、S370和K371的表位。

[0122] 对应于NCBI序列NP_003225.2(转铁蛋白受体蛋白1同种型1,智人)的示例性人转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

[0123] MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAVDEEENADNNTKANV
TKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDF
PAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF
REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTG
KLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKF
PIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGN
MEGDCPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVG
AQRDAWGPGAAKSGVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVG
ATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQ
FLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIE
RIPELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEM
GLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSP
KESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANAL
SGDVWDIDNEF (SEQ ID NO: 105)

[0124] 对应于NCBI序列NP_001244232.1(转铁蛋白受体蛋白1,恒河猴(Macaca mulatta))的示例性非人灵长类转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDEEENTDNNTKPNG
TKPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFP
AAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFRE
FKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPI
VKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNM
EGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGA
QRDAWGPGAAKSSVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGAT
EWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSL
YQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERI
PELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGL

SLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKE
SPFRHVFWGSGSHTLSALLESLKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGD
VWDIDNEF (SEQ ID NO: 106)

[0125] 对应于NCBI序列XP_005545315.1(转铁蛋白受体蛋白1,食蟹猴(Macaca fascicularis))的示例性非人灵长类转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

[0126] MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDEEENTDNNTKANG TKPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFP AAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFRE FKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPI VKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNM EGDCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGA QRDAWGPGAAKSSVGTALLLKLAQMFSDMVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGAT EWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSL YQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERI PELNKVARAAAEVAGQFVIKLTHDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGL SLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKE SPFRHVFWGSGSHTLSALLESLKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGD VWDIDNEF (SEQ ID NO: 107)

[0127] 对应于NCBI序列NP_001344227.1(转铁蛋白受体蛋白1,小家鼠(Mus musculus))的示例性小鼠转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

[0128] MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAADEEENADNNMKASV RKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLGYCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMET EDVPTSSRLYWADLKTLLSEKLNSIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIENQ FHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVSG KLVHANFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKF PVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFG KMEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVV GAQRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFSDMISKDGFRPSRSIIFASWTAGDFGAVG ATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDG KSLYRDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALT QKVPQLNQMVRTAAEVAGQLIIKLTHDVELNLDYEMYNSKLLSFMKDLNQFKTDIRD MGLSLQWLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNRFVMREINDRIMKVEYHFLSPYVS PRESPFRHIFWGSGSHTLSALVENLKLRQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALS GDIWNIDNEF (SEQ ID NO: 108)

[0129] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体与如下的受体氨基酸区段结合:

[0130] FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDF EDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAH LGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDS TCRMVTSESKNVKLTVSNVLKE (SEQ ID NO: 109)

[0131] 并且不抑制转铁蛋白受体与转铁蛋白和/或(例如,和)人血色素沉着蛋白(human hemochromatosis protein,也称为HFE)之间的结合相互作用。在一些实施方案中,本文中

所述的抗TfR1抗体不与SEQ ID NO:109中的表位结合。

[0132] 可使用适当的方法来获得和/或(例如,和)产生抗体、抗体片段或抗原结合剂,例如,通过使用重组DNA方案。在一些实施方案中,也可通过杂交瘤的产生来产生抗体(参见,例如,Kohler,G and Milstein,C.“Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”Nature,1975,256:495-497)。目的抗原可以以任何形式或实体(例如,重组或天然存在的形式或实体)用作免疫原。使用标准方法(例如,ELISA筛选)筛选杂交瘤,以发现至少一种产生靶向特定抗原之抗体的杂交瘤。也可通过筛选表达抗体的蛋白质表达文库(例如,噬菌体展示文库)来产生抗体。在一些实施方案中,也可使用噬菌体展示文库设计(参见,例如,1991年3月1日提交的美国专利No 5,223,409,“Directed evolution of novel binding proteins”;1992年4月10日提交的WO 1992/18619,“Heterodimeric receptor libraries using phagemids”;1991年5月1日提交的WO 1991/17271,“Recombinant library screening methods”;1992年5月15日提交的WO 1992/20791,“Methods for producing members of specific binding pairs”;1992年2月28日提交的WO 1992/15679,and“Improved epitope displaying phage”)。在一些实施方案中,目的抗原可用于对非人动物,例如啮齿动物或山羊进行免疫接种。在一些实施方案中,然后从非人动物获得抗体,并且可任选地使用多种方法(例如,使用重组DNA技术)对其进行修饰。抗体产生的其他实例和方法是本领域已知的(参见,例如Harlow et al.“Antibodies:A Laboratory Manual”,Cold Spring Harbor Laboratory,1988.)。

[0133] 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)磷酸糖基化与抗体缀合。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、寡糖或聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是支化的寡糖或支化的聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子包含甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡糖胺单元、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,存在约1至10、约1至5、约5至10、约1至4、约1至3或约2个糖分子。在一些实施方案中,糖基化抗体是完全或部分糖基化的。在一些实施方案中,通过化学反应或通过酶促手段使抗体糖基化。在一些实施方案中,抗体在体外或细胞内被糖基化,其可任选地缺少N-或O-糖基化途径中的酶,例如糖基转移酶。在一些实施方案中,用糖或碳水化合物分子对抗体进行官能化,如2014年5月1日公开的标题为“Modified antibody,antibody-conjugate and process for the preparation thereof”的国际专利申请公开WO2014065661中所述。

[0134] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含选自表2至7中任一项的抗TfR1抗体中任一者的VL结构域和/或(例如,和)VH结构域,并且包含恒定区,所述恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类(例如,IgG2a和IgG2b)的恒定区的氨基酸序列。本领域中描述了人恒定区的一些非限制性实例,例如参见上文Kabat E A et al.,(1991)。

[0135] 在一些实施方案中,与转铁蛋白受体结合的物质,例如抗TfR1抗体,能够靶向肌细胞和/或(例如,和)介导物质穿过血脑屏障的转运。转铁蛋白受体是将转铁蛋白转运穿过细

胞膜并参与胞内铁水平的调节和稳态的内化细胞表面受体。本公开内容的一些方面提供了能够与转铁蛋白受体结合的转铁蛋白受体结合蛋白。与转铁蛋白受体结合(例如,特异性结合)的抗体可在与转铁蛋白受体结合之后例如通过受体介导的内吞作用而被内化到细胞中。

[0136] 在一些实施方案中,抗TFR1抗体以至少约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或更小的结合亲和力(例如,如由Kd所示)特异性结合TfR1(例如,人或非人灵长类TfR1)。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体以亚纳摩范围的KD与TfR1结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体选择性地与转铁蛋白受体1(TfR1)结合但不与转铁蛋白受体2(transferrin receptor2,TfR2)结合。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体与人TfR1和食蟹猴TfR1结合(例如,Kd为10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M、10^{-13}M或更小),但不与小鼠TfR1结合。抗TfR1抗体的亲和力和结合动力学可使用任何合适的方法测试,包括但不限于生物传感器技术(例如,OCTET或BIACORE)。在一些实施方案中,本文中所述的任一种抗TfR1抗体的结合不竞争或抑制转铁蛋白与TfR1的结合。在一些实施方案中,本文中所述的任一种抗TfR1抗体的结合不竞争或抑制HFE-β-2-微球蛋白与TfR1的结合。

[0137] 表2中提供了抗TfR1抗体的一些非限制性实例。

[0138] 表2.抗TfR1抗体的一些实例

[0139]

Ab	编号系统	IMGT	Kabat	Chothia
3-A4	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPENGDT (SEQ ID NO: 2)	WIDPENGDTEYASKFQD (SEQ ID NO: 8)	ENG (SEQ ID NO: 13)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLHSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLHSNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLHSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGYTYLFWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-A4 N54T*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-	IDPETGDT (SEQ ID NO:	WIDPETGDTEYASKFQD	ETG (SEQ ID NO: 21)

[0140]

	H2	19)	(SEQ ID NO: 20)	
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLHSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLHSNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLHSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGLEWIGWIDPET GDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTLWLRRGLDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 22)		
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGYTYLFWFLQRPGQSPQLLIYRMSN LASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-A4 N54S*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPESGDT (SEQ ID NO: 23)	WIDPESGDTEYASKFQD (SEQ ID NO: 24)	ESG (SEQ ID NO: 25)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLHSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLHSNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLHSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGLEWIGWIDPES GDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTLWLRRGLDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 26)		
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGYTYLFWFLQRPGQSPQLLIYRMSN LASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-M12	CDR-H1	GYSITSGYY (SEQ ID NO: 27)	SGYYWN (SEQ ID NO: 33)	GYSITSGY (SEQ ID NO: 38)
	CDR-H2	ITFDGAN (SEQ ID NO: 28)	YITFDGANNYNPSLKN (SEQ ID NO: 34)	FDG (SEQ ID NO: 39)
	CDR-H3	TRSSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 29)	SSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 35)	SYDYDVLD (SEQ ID NO: 40)
	CDR-L1	QDISNF (SEQ ID NO: 30)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO: 36)	SQDISNF (SEQ ID NO: 41)
	CDR-L2	YTS (SEQ ID NO: 31)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 37)	YTS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	GHTLPY (SEQ ID NO: 42)

[0141]

	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYITFDG ANNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSVTTEDTATYYCTRSSYDYDVLDYWGQG TTLTVSS (SEQ ID NO: 43)		
	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWYQQRPDGTVKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDFSLTVSNLEQEDIATYFCQQGHTLPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 44)		
5-H12	CDR-H1	GYSFTDYC (SEQ ID NO: 45)	DYCIN (SEQ ID NO: 51)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYCINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGN TRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQ GTSVTVSS (SEQ ID NO: 61)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASN LESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33Y*	CDR-H1	GYSFTDYY (SEQ ID NO: 63)	DYYIN (SEQ ID NO: 64)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYYINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSG NTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWG QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 65)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASN LESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33D*	CDR-H1	GYSFTDYD (SEQ ID NO: 66)	DYDIN (SEQ ID NO: 67)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-	AREDYYPYHGMDY	EDYYPYHGMDY (SEQ ID	DYYPYHGMD (SEQ ID

[0142]

	H3	(SEQ ID NO: 47)	NO: 53)	NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYDINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGNT RYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO: 68)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASN LESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
抗TfR克隆8	CDR-H1	GYSFTSYW (SEQ ID NO: 138)	SYWIG (SEQ ID NO: 144)	GYSFTSY (SEQ ID NO: 149)
	CDR-H2	IYPGDSDT (SEQ ID NO: 139)	IIYPGDSDTRYSPSFQGQ (SEQ ID NO: 145)	GDS (SEQ ID NO: 150)
	CDR-H3	ARFPYDSSGYYSFDY (SEQ ID NO: 140)	FPYDSSGYYSFDY (SEQ ID NO: 146)	PYDSSGYYSFD (SEQ ID NO: 151)
	CDR-L1	QSISSY (SEQ ID NO: 141)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 147)	SQSISSY (SEQ ID NO: 152)
	CDR-L2	AAS (SEQ ID NO: 142)	AASSLQS (SEQ ID NO: 148)	AAS (SEQ ID NO: 142)
	CDR-L3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 143)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 143)	SYSTPL (SEQ ID NO: 153)

[0143] *突变位置根据包含突变的相应VH序列的Kabat编号

[0144] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体是表2中提供的任一种抗TfR1抗体的变体。在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含与表2中提供的任一种抗TfR1抗体中的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且包含人源化重链可变区和/或(例如,和)人源化轻链可变区。

[0145] 表3中提供了本文中所述的抗TfR1抗体的氨基酸序列的一些实例。

[0146] 表3.抗TfR1抗体的可变区

[0147]

抗体	可变区氨基酸序列**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	V_H: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPE TGDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY** WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 69)
	V_L: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RM SNLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 70)

[0148]

抗体	可变区氨基酸序列**
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	V_H: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPE** **SGDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY** WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 71)
	V_L: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RM** **SNLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 70)
3A4 VH3 /Vκ4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPE** **NGDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY** WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72)
	VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RM** **SNLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 70)
3M12 VH3/Vκ2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWMG**YITF** **DGANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY** WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLH** **S**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)
3M12 VH3/Vκ3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWMG**YITF** **DGANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY** WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLH** **S**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)
3M12 VH4/Vκ2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWIG**YITFD** **GANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**W GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLH** **S**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)
3M12 VH4/Vκ3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWIG**YITFD** **GANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**W GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLH** **S**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYYIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIY** **PGSGNTRYSERFKG**RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHG** **MDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)
	VL: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**RA** **SNLES**GVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLEI K (SEQ ID NO: 78)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYDIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIY**

[0149]

抗体	可变区氨基酸序列**
	PGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHG MDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 79)
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**R ASNLES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLE IK (SEQ ID NO: 80)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYYIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIY PGSGNTRYSERFKG**RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHG MDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**R ASNLES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLE IK (SEQ ID NO: 80)
抗TfR 克隆 8	VH: QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYWIG**WVRQMPGKGLEWMG**IIYPG DSDTRYSPSFQGQ**VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR**FPYDSSGYYSF DY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 154)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 155)

[0150] *突变位置根据包含突变的相应VH序列的Kabat编号

[0151] **根据Kabat编号系统的CDR被加粗

[0152] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含VH,所述VH含有表3中提供的任一种抗TfR1抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且与表3中提供的相应VH相比,在框架区中包含一个或更多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)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VL,所述VL含有表3中提供的任一种抗TfR1抗体的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且与表3中提供的相应VL相比,在框架区中包含一个或更多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸变异。

[0153] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含VH,所述VH含有表3中提供的任一种抗TfR1抗体的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,并且与表3中提供的相应VH相比,在框架区中包含具有至少70%(例如,至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少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VL,所述VL含有表3中提供的任一种抗TfR1抗体的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且与表3中提供的相应VL相比,在框架区中包含具有至少70%(例如,至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%)同一性的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL。

[0155] 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:71的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL。

[0156] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的VL。

[0157] 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:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL。

[0158] 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:73的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL。

[0159] 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:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的VL。

[0160] 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:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL。

[0161] 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:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的VL。

[0162] 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:79的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL。

[0163] 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:77的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的VL。

[0164] 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:154的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:155的氨基酸序列的VL。

[0165] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体是全长IgG,其可包含来自人抗体的重恒定区和轻恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的任何抗TfR1抗体的重链可包含重链恒定区(heavy chain constant region,CH)或其一部分(例如,CH1、CH2、CH3或其组合)。重链恒定区可具有任何合适的来源,例如人、小鼠、大鼠或兔。在一个具体实例中,重链恒定区来自人IgG例如IgG1、IgG2或IgG4(γ重链)。以下给出了人IgG1恒定区的一个实例:

[0166] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)
。

[0167] 在一些实施方案中,本文中所述的任何抗TfR1抗体的重链包含突变体人IgG1恒定区。例如,已知在人IgG1的CH2结构域中引入LALA突变(来源于mAb b12的突变体,其已突变以用Ala234和Ala235替代较低的铰链残基Leu234 Leu235)降低了Fcγ受体结合(Bruhns,P.,et al.(2009)和Xu,D.et al.(2000))。以下提供了突变体人IgG1恒定区(突变加粗并带有下划线):

[0168] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**A**
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)
。

[0169] 在一些实施方案中,本文中所述的任何抗TfR1抗体的轻链还可包含轻链恒定区(CL),其可以是本领域已知的任何CL。在一些实例中,CL是κ轻链。在另一些实例中,CL是λ轻链。在一些实施方案中,CL是κ轻链,以下提供了其序列:

[0170] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 83)。

[0171] 其他抗体重链恒定区和轻链恒定区是本领域公知的,例如在IMGT数据库(www.imgt.org)或www.vbase2.org/vbstat.php.中提供的那些,二者均通过引用并入本文。

[0172] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含表3中所列任一种VH或其任意变体以及与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:82具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的重链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含表3中所列任一种VH或其任意变体以及与SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:82相比包含不超过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)的重链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含表3中所列任一种VH或其任意变体以及SEQ ID NO:81中所示的重链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含表3中所列任一种VH或其任意变体以及SEQ ID NO:82中所示的重链恒定区。

[0173] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含表3中所列任一种VL或其任意变体以及与SEQ ID NO:83具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的轻链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含表3中所列任一种VL或其任意变体以及与SEQ ID NO:83相比包含不超过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)的轻链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含表3中所列任一种VL或其任意变体以及SEQ ID NO:83中所示的轻链恒定区。

[0174] 下表4中提供了所述抗TfR1抗体的IgG重链和轻链氨基酸序列的一些实例。

[0175] 表4.抗TfR1 IgG的一些实例的重链序列和轻链序列

[0176]

抗体	IgG 重链 /轻链序列**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPET** **GDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY**WG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RMS** **NLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPES** **GDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY**WG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RMS** **NLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 /Vκ4	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPEN** **GDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY**WG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RMS** **NLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3M12 VH3/Vκ2	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWMG**YITFD** **GANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**WG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK

[0177]

抗体	IgG 重链 /轻链序列**
	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLHS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH3/Vκ3	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWMG**YITFD GANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**WG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLHS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
3M12 VH4/Vκ2	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWIG**YITFDG ANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**WGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLHS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH4/Vκ3	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWIG**YITFDG ANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**WGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLHS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYYIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIYP GSGNTRYSERFKG**RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHGM DY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP

抗体	IgG 重链 /轻链序列 **
	KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 92)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**RAS NLES**GVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYDIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIYP GSGNTRYSERFKG**RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHGM DY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 94)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**RAS NLES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYYIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIYP GSGNTRYSERFKG**RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHGM DY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 92)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**RAS NLES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
抗TfR克隆8	重链(具有野生型人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYWIG**WVRQMPGKGLEWMG**IIYPGD SDTRYSPSFQGQ**VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR**FPYDSSGYYSFDY** WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 156)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**G VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)

[0178]

[0179] *突变位置根据包含突变的相应VH序列的Kabat编号

[0180] **根据Kabat编号系统的CDR被加粗;VH/VL序列带有下划线

[0181] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含重链,所述重链与SEQ ID NO:84、86、87、88、91、92、94和156中任一者所示的重链相比包含不超过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,所述轻链与SEQ ID NO:85、89、90、93、95和157中任一者所示的轻链相比包含不超过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)。

[0182] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:84、86、87、88、91、92、94和156中的任一者具有至少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),本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:85、89、90、93、95和157中的任一者具有至少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,本文中所述的抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:84、86、87、88、91、92、94和156中任一者的氨基酸序列的重链。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:85、89、90、93、95和157中任一者的氨基酸序列的轻链。

[0183] 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:84的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0184] 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:86的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0185] 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:87的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0186] 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:88的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0187] 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:88的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0188] 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:91的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0189] 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:91的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0190] 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:92的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

[0191] 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:94的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0192] 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:92的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0193] 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:156的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:157的氨基酸序列的轻链。

[0194] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体是完整抗体(全长抗体)的Fab片段、Fab'片段或F(ab')$_2$片段。完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段可通过常规方法制备(例如,重组地制备或通过使用酶例如木瓜蛋白酶消化全长IgG的重链恒定区来制备)。例如,F(ab')$_2$片段可通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化抗体分子产生,并且Fab片段可通过还原F(ab')$_2$片段的二硫桥产生。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体的Fab片段中的重链恒定区包含以下

氨基酸序列：

[0195] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 96)。

[0196] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含表3中所列任一种VH或其任意变体以及与SEQ ID NO:96具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的重链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含表3中所列任一种VH或其任意变体以及与SEQ ID NO:96相比包含不超过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)的重链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含表3中所列任一种VH或其任意变体以及SEQ ID NO:96中所示的重链恒定区。

[0197] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含表3中所列任一种VL或其任意变体以及与SEQ ID NO:83具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性的轻链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含表3中所列任一种VL或其任意变体以及与SEQ ID NO:83相比包含不超过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)的轻链恒定区。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含表3中所列任一种VL或其任意变体以及SEQ ID NO:83中所示的轻链恒定区。

[0198] 下表5中提供了所述抗TfR1抗体的Fab重链和轻链氨基酸序列的一些实例。

[0199] 表5.抗TfR1 Fab的一些实例的重链和轻链序列

[0200]

抗体	Fab重链/轻链序列**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	重链(具有部分人 IgG1恒定区): EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPET GDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY**WG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THT (SEQ ID NO: 97)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RMS NLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	重链(具有部分人 IgG1恒定区): EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPES GDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY**WG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THT (SEQ ID NO: 98)
	轻链(具有κ轻链恒定区):

[0201]

抗体	Fab重链 /轻链序列 **
	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RMS NLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 /Vκ4	重链(具有部分人 IgG1恒定区): EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK**DDYMY**WVRQPPGKGLEWIG**WIDPEN GDTEYASKFQD**RVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCTL**WLRRGLDY**WG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THT (SEQ ID NO: 99)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSKSLLHSNGYTYLF**WFQQRPGQSPRLLIY**RMS NLAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**MQHLEYPFT**FGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3M12 VH3/Vκ2	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWMG**YITFD GANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**WG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THT (SEQ ID NO: 100)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLHS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH3/Vκ3	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCSVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWMG**YITFD GANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**WG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THT (SEQ ID NO: 100)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLHS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
3M12 VH4/Vκ2	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWIG**YITFDG ANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**WGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HT (SEQ ID NO: 101)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLHS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH4/Vκ3	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTGYSIT**SGYYWN**WIRQPPGKGLEWIG**YITFDG ANNYNPSLKN**RVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTR**SSYDYDVLDY**WGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HT (SEQ ID NO: 101)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNFLN**WYQQKPGQPVKLLIY**YTSRLHS** GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQGHTLPYT**FGQGTKLEIKRTVAAP

[0202]

抗体	Fab重链/轻链序列**
	SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYYIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIYP GSGNTRYSERFKG**RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHGM DY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHT (SEQ ID NO: 102)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVLTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**RAS NLES**GVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYDIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIYP GSGNTRYSERFKG**RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHGM DY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHT (SEQ ID NO: 103)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**RAS NLES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**DYYIN**WVRQAPGQGLEWMG**WIYP GSGNTRYSERFKG**RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EDYYPYHGM DY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHT (SEQ ID NO: 102)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**RASESVDGYDNSFMH**WYQQKPGQPPKLLIF**RAS NLES**GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC**QQSSEDPWT**FGQGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
抗TfR克隆8 变体1	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYWIG**WVRQMPGKGLEWMG**IIYPGD SDTRYSPSFQGQ**VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR**FPYDSSGYYSFDY** WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCP (SEQ ID NO: 158)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**G VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)
抗TfR克隆8 变体2	重链(具有部分人 IgG1恒定区): QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT**SYWIG**WVRQMPGKGLEWMG**IIYPGD SDTRYSPSFQGQ**VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR**FPYDSSGYYSFDY** WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHT (SEQ ID NO: 159)
	轻链(具有κ轻链恒定区): DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISSYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**G VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQSYSTPLT**FGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)

[0203] *突变位置根据包含突变的相应VH序列的Kabat编号

[0204] **根据Kabat编号系统的CDR被加粗;VH/VL序列带有下划线

[0205] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含重链,所述重链与SEQ ID NO: 97至103、158和159中的任一者中所示的重链相比包含不超过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,所述轻链与SEQ ID NO:85、89、90、93、95和157中的任一者中所示的轻链相比包含不超过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)。

[0206] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:97至103、158和159中的任一者具有至少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),本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:85、89、90、93、95和157中的任一者具有至少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,本文中所述的抗TfR1抗体包含重链,所述重链包含SEQ ID NO:97至103、158和159中任一者的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的抗TfR1抗体包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:85、89、90、93、95和157中任一者的氨基酸序列。

[0207] 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:97的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0208] 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:98的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0209] 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:99的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的轻链。

[0210] 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:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0211] 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:100的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0212] 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:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的轻链。

[0213] 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:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0214] 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:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的轻链。

[0215] 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:103的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0216] 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:102的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链。

[0217] 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:158的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:157的氨基酸序列的轻链。

[0218] 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:159的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:157的氨基酸序列的轻链。

[0219] 其他已知的抗TfR1抗体

[0220] 本领域中已知的任何其他合适的抗TfR1抗体均可用作本文中公开的复合物中的

肌肉靶向剂。表6中列出了已知的抗TfR1抗体的一些实例,包括相关参考文献和结合表位。在一些实施方案中,抗TfR1抗体包含本文中提供的任何抗TfR1抗体(例如表6中所列抗TfR1抗体)的互补决定区(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)。

[0221] 表6-抗TfR1抗体克隆的列表,包括相关参考文献和结合表位信息。

[0222]

抗体克隆名称	参考文献	表位/注释
OKT9	1979 年 12 月 4 日提交的美国专利 No. 4,364,934，标题为“MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME” Schneider C. et al. “Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9.” J Biol Chem. 1982, 257:14,	TfR1 的顶端结构域（人 TfR1 序列 XM_052730.3 的第 305 至 366 位残基，可在 GenBank 获得）

[0223]

	8516-8522.	
（来自 JCR） 克隆 M11 克隆 M23 克隆 M27 克隆 B84	• 2014 年 12 月 24 日提交的 WO 2015/098989，“Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier” • 2014 年 12 月 24 日提交的美国专利 No. 9,994,641，“Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier”	顶端结构域（TfR1 的第 230 至 244 位和第 326 至 347 位残基）和蛋白酶样结构域（第 461 至 473 位残基）
（来自 Genentech） 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12, 和 13D4	• 2016 年 5 月 26 日提交的 WO 2016/081643，标题为“ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE” • 2014 年 5 月 20 日提交的美国专利 No. 9,708,406，“Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use”	顶端结构域和非顶端区
（来自 Armagen） 8D3	• Lee et al. “Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse” 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052. • 2008 年 9 月 11 日提交的美国专利申请 2010/077498，标题为“COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE”	
OX26	• Haobam, B. et al. 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806-21.	

[0224]

DF1513	• Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. Plant J 48:757-70 (2006).	
1A1B2, 66IG10, MEM-189, JF0956, 29806, 1A1B2, TFRC/1818, 1E6, 66Ig10, TFRC/1059, Q1/71, 23D10, 13E4, TFRC/1149, ER-MP21, YTA74.4, BU54, 2B6, RI7 217	• 市售抗转铁蛋白受体抗体。	Novus Biologicals 8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120
（来自 INSERM） BA120g	• 2005 年 6 月 15 日提交的美国专利申请 2011/0311544A1，标题为“ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS”	不与 OKT9 竞争
LUCA31	• 2004 年 6 月 7 日提交的美国专利 No. 7,572,895，标题为“TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES”	“LUCA31 表位”
（Salk Institute） B3/25 T58/30	• Trowbridge, I.S. et al. “Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells.” Nature, 1981, 第 294 卷, 第 171 至 173 页	
R17 217.1.3、5E9C11、OKT9（BE0023	• 市售抗转铁蛋白受体抗体。	BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B

[0225]

克隆）		West Lebanon, NH 03784-1671 USA
BK19.9、B3/25、T56/14 和 T58/1	• Gatter, K.C. et al. “Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance.” J Clin Pathol. 1983 May;36(5):539-45.	

[0226] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含来自选自表6的任一种抗TfR1抗体的一个或更多个CDR-H(例如,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TfR1抗体包含如针对选自表6的任一种抗TfR1抗体所提供的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,抗TfR1抗体包含如针对选自表6的任一种抗TfR1抗体所提供的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0227] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包括包含任何抗TfR1抗体(例如选自表6的任一种抗TfR1抗体)的重链可变结构域和/或(例如,和)轻链可变结构域的任何抗体。在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包括包含任何抗TfR1抗体(例如选自表6的任一种抗TfR1抗体)的重链可变和轻链可变对的任何抗体。

[0228] 本公开内容的一些方面提供了抗TfR1抗体,其具有与本文中所述的那些中的任何同源的重链可变(VH)和/或(例如,和)轻链可变(VL)结构域氨基酸序列。在一些实施方案中,抗TfR1抗体包含与任何抗TfR1抗体(例如选自表6的任一种抗TfR1抗体)的重链可变序列和/或任何轻链可变序列具有至少75%(例如80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的重链可变序列或轻链可变序列。在一些实施方案中,同源重链可变和/或(例如,和)轻链可变氨基酸序列在本文中提供的任何CDR序列内均不变化。例如,在一些实施方案中,序列变异的程度(例如,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)可发生在不包括本文中提供的任何CDR序列的重链可变和/或(例如,和)轻链可变序列中。在一些实施方案中,本文中提供的任何抗TfR1抗体均包含重链可变序列和轻链可变序列,其包含与任何抗TfR1抗体(例如选自表6的任一种抗TfR1抗体)的框架序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的框架序列。

[0229] 根据本公开内容可使用的转铁蛋白受体抗体的实例描述于国际申请公开WO 2016/081643中,其通过引用并入本文。该抗体的氨基酸序列在表7中提供。

[0230] 表7.已知的抗TfR1抗体的实例的重链和轻链CDR

[0231]

序列类型	Kabat	Chothia	Contact
CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 110)	GYTFTSY (SEQ ID NO: 116)	TSYWMH (SEQ ID NO: 118)
CDR-H2	EINPTNGRTNYIE KFKS (SEQ ID	NPTNGR (SEQ ID NO: 117)	WIGEINPTNGRTN (SEQ ID

[0232]

	NO: 111)		NO: 119)
CDR-H3	GTRAYHY (SEQ ID NO: 112)	GTRAYHY (SEQ ID NO: 112)	ARGTRA (SEQ ID NO: 120)
CDR-L1	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 113)	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 113)	YSNLAWY (SEQ ID NO: 121)
CDR-L2	DATNLAD (SEQ ID NO: 114)	DATNLAD (SEQ ID NO: 114)	LLVYDATNLA (SEQ ID NO: 122)
CDR-L3	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 115)	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 115)	QHFWGTPL (SEQ ID NO: 123)
鼠 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYW GQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 124)		
鼠 VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYDATNL ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 125)		
人源化 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIN PTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHY WGQGTMVTVSS (SEQ ID NO: 128)		
人源化 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 129)		
嵌合全长IgG1的HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYW GQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 132)		
嵌合全长IgG1的LC	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYDATNL ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWGTPLTFGAGTKLELKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 133)		
完全人全长IgG1的HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIN PTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHY WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134)		
完全人全长IgG1的LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPLTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV		

[0233]

	TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 135)
嵌合Fab的HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYW GQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 136)
全长人Fab的HC	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIN PTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHY WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 137)

[0234] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含与表7中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。作为替代或补充(例如,补充),本公开内容的抗TfR1抗体包含与表7中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3相同的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0235] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含CDR-L3,其与如表7中所示的CDR-L3相比包含不超过3个氨基酸变异(例如,不超过3、2或1个氨基酸变异)。在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含CDR-L3,其与如表7中所示的CDR-L3相比包含一个氨基酸变异。在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含QHFAGTPLT(SEQ ID NO:126)的CDR-L3(根据Kabat和Chothia定义系统)或QHFAGTPL(SEQ ID NO:127)的CDR-L3(根据Contact定义系统)。在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含与表7中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1和CDR-L2,并且包含QHFAGTPLT(SEQ ID NO:126)的CDR-L3(根据Kabat和Chothia定义系统)或QHFAGTPLT(SEQ ID NO:127)的CDR-L3(根据Contact定义系统)。

[0236] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含重链CDR,其共同与如表7中所示的重链CDR具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性。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CDR,其共同与如表7中所示的轻链CDR具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性。

[0237] 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:124的氨基酸序列的VH。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:125的氨基酸序列的VL。

[0238] 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:128的氨基酸序列的VH。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:129的氨基酸序列的VL。

[0239] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体包含VH,所述VH与SEQ ID NO:128中所示的VH相比包含不超过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VL,所述VL与SEQ ID NO:129中所示的VL相比包含不超过15个氨基酸变异(例如,不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0240] 在一些实施方案中,本公开内容的抗TfR1抗体是全长IgG1抗体,其可包含来自人

抗体的重恒定区和轻恒定区。在一些实施方案中,如本文中所述的任何抗TfR1抗体的重链可包含重链恒定区(CH)或其一部分(例如,CH1、CH2、CH3或其组合)。重链恒定区可具有任何合适的来源,例如人、小鼠、大鼠或兔。在一个具体实例中,重链恒定区来自人IgG例如IgG1、IgG2或IgG4(γ重链)。以下给出了人IgG1恒定区的一个实例:

[0241] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)。

[0242] 在一些实施方案中,本文中所述的任何抗TfR1抗体的轻链还可包含轻链恒定区(CL),其可以是本领域已知的任何CL。在一些实例中,CL是κ轻链。在另一些实例中,CL是λ轻链。在一些实施方案中,CL是κ轻链,以下提供了其序列:

[0243] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 83)。

[0244] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体是嵌合抗体,其包含含有SEQ ID NO:132的氨基酸序列的重链。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:133的氨基酸序列的轻链。

[0245] 在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体是包含重链的完全人抗体,所述重链包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:135的氨基酸序列的轻链。

[0246] 在一些实施方案中,抗TfR1抗体是完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段(Fab)。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1 Fab包含含有SEQ ID NO:136的氨基酸序列的重链。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的抗TfR1 Fab包含含有SEQ ID NO:133的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1 Fab包含含有SEQ ID NO:137的氨基酸序列的重链。作为替代或补充(例如,补充),本文中所述的抗TfR1 Fab包含含有SEQ ID NO:135的氨基酸序列的轻链。

[0247] 本文中所述的抗TfR1抗体可为任何抗体形式,包括但不限于完整(即,全长)抗体、其抗原结合片段(例如Fab、Fab'、F(ab')2、Fv)、单链抗体、双特异性抗体或纳米抗体。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体是scFv。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体是scFv-Fab(例如,与恒定区的一部分融合的scFv)。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体是与恒定区(例如,SEQ ID NO:81中所示的人IgG1恒定区)融合的scFv。

[0248] 在一些实施方案中,可在残基不太可能参与与靶抗原(例如,转铁蛋白受体)相互作用的位置(例如,如基于晶体结构确定的)处将保守突变引入抗体序列(例如,CDR或框架序列)中。在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入本文中所述的抗TfR1抗体的Fc区(例如,在CH2结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或(例如,和)CH3结构域(人IgG1的第341至447位残基)和/或(例如,和)铰链区中,根据Kabat编号系统

(例如,Kabat中的EU索引)编号),以改变抗体的一种或更多种功能特性,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或(例如,和)抗原依赖性细胞毒性。

[0249] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入Fc区(CH1结构域)的铰链区中,使得铰链区中的半胱氨酸残基的数目改变(例如,增加或减少),如例如美国专利No.5,677,425中所述。可改变CH1结构域的铰链区中半胱氨酸残基的数目,例如以促进轻链和重链的组装,或改变(例如,提高或降低)抗体的稳定性或促进接头缀合。

[0250] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入本文中所述的肌肉靶向抗体的Fc区(例如,在CH2结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或(例如,和)CH3结构域(人IgG1的第341至447位残基)和/或(例如,和)铰链区中,根据Kabat编号系统(例如,Kabat中的EU索引)编号),以提高或降低抗体对效应细胞表面上Fc受体(例如,激活的Fc受体)的亲和力。降低或提高抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc区中的突变以及将这样的突变引入Fc受体或其片段的技术是本领域技术人员已知的。可被进行以改变抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc受体中突变的一些实例描述于以下中:例如Smith P et al.,(2012)PNAS 109:6181-6186,美国专利No.6,737,056,以及国际公开No.WO 02/060919、WO 98/23289和WO 97/34631,其通过引用并入本文。

[0251] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以改变(例如,降低或提高)抗TfR1抗体在体内的半衰期。参见,例如国际公开No.WO 02/060919、WO 98/23289和WO 97/34631,以及美国专利No.5,869,046、6,121,022、6,277,375和6,165,745,例如将改变(例如,降低或提高)抗体在体内的半衰期的突变。

[0252] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以降低抗TfR1抗体在体内的半衰期。在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以提高抗体在体内的半衰期。在一些实施方案中,抗体可在第二恒定(CH2)结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或(例如,和)第三恒定(CH3)结构域(人IgG1的第341至447位残基)(根据Kabat中的EU索引(Kabat E Aet al.,(1991)同上)编号)中具有一个或更多个氨基酸突变(例如,替换)。在一些实施方案中,本文中所述的抗体的IgG1的恒定区包含在第252位处的甲硫氨酸(M)至酪氨酸(Y)替换,在第254位处的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)替换,以及在第256位处的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)替换,所述位置根据如Kabat中的EU索引编号。参见美国专利No.7,658,921,其通过引用并入本文。这种类型的突变体IgG(称为“YTE突变体”)已显示出与同一抗体的野生型形式相比显示半衰期提高4倍(参见Dall'Acqua W F et al.,(2006)J Biol Chem 281:23514-24)。在一些实施方案中,抗体包含IgG恒定结构域,该结构域包含在第251至257、285至290、308至314、385至389和428至436位处的氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸替换,所述位置根据如Kabat中的EU索引编号。

[0253] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸替换引入IgG恒定结构域Fc区中,以改变抗TfR1抗体的效应子功能。对其的亲和力被改变的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。这种方法在美国专利No.5,624,821和5,648,260中有更详细的描述。在一些实施方案中,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可降低循环抗体的Fc

受体结合,从而提高肿瘤定位。对于使恒定结构域缺失或失活并从而提高肿瘤定位的突变的描述,参见例如美国专利No.5,585,097和8,591,886。在一些实施方案中,可将一个或更多个氨基酸替换引入本文中所述的抗体的Fc区中,以去除Fc区上潜在的糖基化位点,这可降低Fc受体结合(参见,例如Shields R Let al.,(2001)J Biol Chem 276:6591-604)。

[0254] 在一些实施方案中,可将本文中所述的抗TfR1抗体的恒定区中的一个或更多个氨基替换为不同的氨基酸残基,使得抗体具有改变的C1q结合和/或者(例如,和)降低或消除的补体依赖性细胞毒性(complement dependent cytotoxicity,CDC)。这种方法在美国专利No.6,194,551(Idusogie et al)中有更详细的描述。在一些实施方案中,改变本文中所述的抗体的CH2结构域的N端区域中的一个或更多个氨基酸残基,从而改变抗体的固定补体的能力。这种方法在国际公开No.WO 94/29351中有进一步描述。在一些实施方案中,对本文中所述的抗体的Fc区进行修饰以提高抗体的介导抗体依赖性细胞毒性(antibody dependent cellular cytotoxicity,ADCC)的能力和/或(例如,和)提高抗体对Fcγ受体的亲和力。这种方法在国际公开No.WO 00/42072中有进一步描述。

[0255] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体的重链和/或(例如,和)轻链可变结构域序列可用于产生例如CDR接枝、嵌合、人源化或复合的人抗体或抗原结合片段,如本文中其他地方所述。如本领域普通技术人员所理解的,来源于本文中提供的任何抗体的任何变体(CDR接枝、嵌合、人源化或复合的抗体)可用于本文中所述的组合物和方法中,并将保持特异性结合转铁蛋白受体的能力,从而使得相对于其所来源的原始抗体,变体(CDR接枝、嵌合、人源化或复合的抗体)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更多的与转铁蛋白受体的结合。

[0256] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体包含赋予抗体以期望性质的突变。例如,为了避免归因于已知与天然IgG4 mAb发生的Fab-臂交换而引起的潜在并发症,本文中提供的抗体可包含稳定性'Adair'突变(Angal S.,et al.,"Asingle amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4)antibody,"Mol Immunol 30,105-108;1993),其中第228位(EU编号,根据Kabat编号为第241位残基)丝氨酸转化为脯氨酸,从而产生了IgG1样铰链序列。因此,任何抗体都可包含稳定性'Adair'突变。

[0257] 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)磷酸糖基化与抗体缀合。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、寡糖或聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子是支化的寡糖或支化的聚糖。在一些实施方案中,一个或更多个糖或碳水化合物分子包含甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡糖胺单元、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,存在约1至10、约1至5、约5至10、约1至4、约1至3或约2个糖分子。在一些实施方案中,糖基化抗体是完全或部分糖基化的。在一些实施方案中,通过化学反应或通过酶促手段使抗体糖基化。在一些实施方案中,抗体在体外或细胞内被糖基化,其可任选地缺少N-或O-糖基化途径中的酶,例如糖基转移酶。在一些实施方案中,用糖或碳水化合物分子对抗体进行官能化,如2014年5月1日公开的标题为"Modified antibody,antibody-conjugate and process

for the preparation thereof”的国际专利申请公开WO2014065661中所述。

[0258] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种抗TfR1抗体可在重链序列和/或(例如,和)轻链序列中包含信号肽(例如,N端信号肽)。在一些实施方案中,本文中所述的抗TfR1抗体包含本文中所述的VH序列和VL序列中的任一种、IgG重链序列和轻链序列中的任一种、或者F(ab')重链序列和轻链序列中的任一种,并且还包含信号肽(例如,N端信号肽)。在一些实施方案中,信号肽包含氨基酸序列MGWSCIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO:104)。

[0259] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体可具有一种或更多种翻译后修饰。在一些实施方案中,也称为焦谷氨酸形成(pyro-Glu)的N端环化可在产生期间在抗体的N端谷氨酸(Glu)和/或谷氨酰胺(Gln)残基处发生。因此,应理解指定为具有包含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,焦谷氨酸形成发生在重链序列中。在一些实施方案中,焦谷氨酸形成发生在轻链序列中。

[0260] b.其他肌肉靶向抗体

[0261] 在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是特异性结合血幼素(hemojuvelin)、小窝蛋白-3、迪谢内肌营养不良肽(Duchenne muscular dystrophy peptide)、肌球蛋白IIb或CD63的抗体。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是特异性结合肌原性前体蛋白的抗体。一些示例性的肌原性前体蛋白包括但不限于ABCG2、M-钙黏着蛋白/钙黏着蛋白-15、小窝蛋白-1、CD34、FoxK1、整联蛋白α7、整联蛋白α7β1、MYF-5、MyoD、肌细胞生成蛋白、NCAM-1/CD56、Pax3、Pax7和Pax9。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是特异性结合骨骼肌蛋白的抗体。一些示例性的骨骼肌蛋白包括但不限于α-肌聚糖蛋白(alpha-Sarcoglycan)、β-肌聚糖蛋白、钙蛋白酶抑制剂、肌酸激酶MM/CKMM、eIF5A、烯醇化酶2/神经元特异性烯醇化酶、ε-肌聚糖蛋白、FABP3/H-FABP、GDF-8/肌生成抑制蛋白、GDF-11/GDF-8、整联蛋白α7、整联蛋白α7β1、整联蛋白β1/CD29、MCAM/CD146、MyoD、肌细胞生成蛋白、肌球蛋白轻链激酶抑制剂、NCAM-1/CD56和肌钙蛋白I。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是特异性结合平滑肌蛋白的抗体。一些示例性的平滑肌蛋白包括但不限于α-平滑肌肌动蛋白、VE-钙黏着蛋白、钙调蛋白结合蛋白/CALD1、钙调理蛋白1、结蛋白(Desmin)、组胺H2 R、胃动素R/GPR38、转凝蛋白/TAGLN、和波形蛋白。然而,应理解,针对其他靶标的抗体在本公开内容的范围内,并且本文中提供的靶标的示例性列表并不意味着是限制性的。

[0262] c.抗体特征/改变

[0263] 在一些实施方案中,可在残基不太可能参与与靶抗原(例如,转铁蛋白受体)相互作用的位置(例如,如基于晶体结构确定的)处将保守突变引入抗体序列(例如,CDR或框架序列)中。在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入本文中所述的肌肉靶向抗体的Fc区(例如,在CH2结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或(例如,和)CH3结构域(人IgG1的第341至447位残基)和/或(例如,和)铰链区中,根据Kabat编号系统(例如,Kabat中的EU索引)编号),以改变抗体的一种或更多种功能特性,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或(例如,和)抗原依赖性细胞毒性。

[0264] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入Fc区(CH1结构域)的铰链区中,使得铰链区中的半胱氨酸残基的数目改变(例如,增加或减少),如例如美国专利No.5,677,425中所述。可改变CH1结构域的铰链区中半胱氨酸残基的数目,例如

以促进轻链和重链的组装,或改变(例如,提高或降低)抗体的稳定性或促进接头缀合。

[0265] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入本文中所述的肌肉靶向抗体的Fc区(例如,在CH2结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或(例如,和)CH3结构域(人IgG1的第341至447位残基)和/或(例如,和)铰链区中,根据Kabat编号系统(例如,Kabat中的EU索引)编号),以提高或降低抗体对效应细胞表面上Fc受体(例如,激活的Fc受体)的亲和力。降低或提高抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc区中突变以及将这样的突变引入Fc受体或其片段的技术是本领域技术人员已知的。可被进行以改变抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc受体中突变的一些实例描述于以下中:例如Smith P et al.,(2012)PNAS109:6181-6186,美国专利No.6,737,056,以及国际公开No.WO 02/060919、WO 98/23289和WO 97/34631,其通过引用并入本文。

[0266] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以改变(例如,降低或提高)抗体在体内的半衰期。参见例如国际公开No.WO 02/060919、WO 98/23289和WO 97/34631,以及美国专利No.5,869,046、6,121,022、6,277,375和6,165,745,例如将改变(例如,降低或提高)抗体在体内的半衰期的突变。

[0267] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以降低抗转铁蛋白受体抗体在体内的半衰期。在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以提高抗体在体内的半衰期。在一些实施方案中,抗体可在第二恒定(CH2)结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或(例如,和)第三恒定(CH3)结构域(人IgG1的第341至447位残基)(根据Kabat中的EU索引(Kabat E Aet al.,(1991)同上)编号)中具有一个或更多个氨基酸突变(例如,替换)。在一些实施方案中,本文中所述的抗体的IgG1的恒定区包含在第252位处的甲硫氨酸(M)至酪氨酸(Y)替换,在第254位处的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)替换,以及在第256位处的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)替换,所述位置根据如Kabat中的EU索引编号。参见美国专利No.7,658,921,其通过引用并入本文。这种类型的突变体IgG(称为“YTE突变体”)已显示出与同一抗体的野生型形式相比显示半衰期提高4倍(参见Dall'Acqua W F et al.,(2006)J Biol Chem 281:23514-24)。在一些实施方案中,抗体包含IgG恒定结构域,该结构域包含在第251至257、285至290、308至314、385至389和428至436位处的氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸替换,所述位置根据如Kabat中的EU索引编号。

[0268] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸替换引入IgG恒定结构域Fc区中,以改变抗转铁蛋白受体抗体的效应子功能。对其的亲和力被改变的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。这种方法在美国专利No.5,624,821和5,648,260中有更详细的描述。在一些实施方案中,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可降低循环抗体的Fc受体结合,从而提高肿瘤定位。对于使恒定结构域缺失或失活并从而提高肿瘤定位的突变的描述,参见例如美国专利No.5,585,097和8,591,886。在一些实施方案中,可将一个或更多个氨基酸替换引入本文中所述的抗体的Fc区中,以去除Fc区上潜在的糖基化位点,这可降低Fc受体结合(参见,例如Shields R L et al.,(2001)J Biol Chem 276:6591-604)。

[0269] 在一些实施方案中,可将本文中所述的肌肉靶向抗体的恒定区中的一个或更多个氨基替换为不同的氨基酸残基,使得抗体具有改变的C1q结合和/或者(例如,和)降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。这种方法在美国专利No.6,194,551(Idusogie et al)中有更详细的描述。在一些实施方案中,改变本文中所述的抗体的CH2结构域的N端区域中的一个或更多个氨基酸残基,从而改变抗体的固定补体的能力。这种方法在国际公开No.WO 94/29351中有进一步描述。在一些实施方案中,对本文中所述的抗体的Fc区进行修饰以提高抗体的介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或(例如,和)提高抗体对Fcγ受体的亲和力。这种方法在国际公开No.WO 00/42072中有进一步描述。

[0270] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体的重链和/或(例如,和)轻链可变结构域序列可用于产生例如CDR接枝、嵌合、人源化或复合的人抗体或抗原结合片段,如本文中其他地方所述。如本领域普通技术人员所理解的,来源于本文中提供的任何抗体的任何变体(CDR接枝、嵌合、人源化或复合的抗体)可用于本文中所述的组合物和方法中,并将保持特异性结合转铁蛋白受体的能力,从而使得相对于其所来源的原始抗体,变体(CDR接枝、嵌合、人源化或复合的抗体)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更多的与转铁蛋白受体的结合。

[0271] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体包含赋予抗体以期望性质的突变。例如,为了避免归因于已知与天然IgG4 mAb发生的Fab-臂交换而引起的潜在并发症,本文中提供的抗体可包含稳定性'Adair'突变(Angal S.,et al.,"A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4)antibody,"Mol Immunol 30,105-108;1993),其中第228位(EU编号,根据Kabat编号为第241位残基)丝氨酸转化为脯氨酸,从而产生了IgG1样铰链序列。因此,任何抗体都可包含稳定性'Adair'突变。

[0272] 如本文中所提供,本公开内容的抗体可任选地包含恒定区或其一部分。例如,VL结构域可在其C端末端处连接至轻链恒定结构域,如Cκ或Cλ。类似地,VH结构域或其一部分可连接至如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,以及任何同种型亚类的重链的全部或一部分。抗体可包括合适的恒定区(参见,例如,Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,No.91-3242,National Institutes of Health Publications,Bethesda,Md.(1991))。因此,在本公开内容范围内的抗体可包含与任何合适的恒定区组合的VH和VL结构域或其抗原结合部分。

[0273] ii.肌肉靶向肽

[0274] 本公开内容的一些方面提供了肌肉靶向肽作为肌肉靶向剂。已描述了与特定细胞类型结合的短肽序列(例如,长度为5至20个氨基酸的肽序列)。例如,细胞靶向肽已在以下中进行了描述:Vines e.,et al.,A."Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery"Biochim Biophys Acta 2008,1786:126-38;Jarver P.,et al.,"In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery"Trends Pharmacol Sci 2010;31:528-35;Samoylova T.I.,et al.,"Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening"Muscle Nerve 1999;22:460-6;美国专利No.6,329,501,其于2001年12月11日授权,标题为"METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE";以及Samoylov A.M.,et al.,"Recognition of cell-specific binding of phage display derived peptides using an acoustic wave

sensor."Biomol Eng 2002;18:269-72;其各自的全部内容均通过引用并入本文。通过设计肽与特定的细胞表面抗原(例如,受体)相互作用,可实现对所期望组织例如肌肉的选择性。已研究了骨骼肌靶向并且能够递送一系列分子有效载荷。这些方法可对肌肉组织具有高度选择性,而没有大的抗体或病毒颗粒的许多实际缺点。因此,在一些实施方案中,肌肉靶向剂是长度为4至50个氨基酸的肌肉靶向肽。在一些实施方案中,肌肉靶向肽的长度为4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸。可使用数种方法中的任一种(例如噬菌体展示)来产生肌肉靶向肽。

[0275] 在一些实施方案中,肌肉靶向肽可与和某些其他细胞相比在肌细胞中过表达或相对高地表达的内化细胞表面受体,例如转铁蛋白受体结合。在一些实施方案中,肌肉靶向肽可靶向转铁蛋白受体(例如,与之结合)。在一些实施方案中,靶向转铁蛋白受体的肽可包含天然存在配体(例如,转铁蛋白)的区段。在一些实施方案中,靶向转铁蛋白受体的肽如2000年11月30日提交的美国专利No.6,743,893,"RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF PEPTIDES THAT BIND THE HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR"中所述。在一些实施方案中,靶向转铁蛋白受体的肽如Kawamoto,M.et al,"A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells."BMC Cancer.2011Aug 18;11:359中所述。在一些实施方案中,靶向转铁蛋白受体的肽如2011年5月20日提交的美国专利No.8,399,653,"TRANSFERRIN/TRANSFERRIN RECEPTOR-MEDIATED SIRNADELIVERY"中所述。

[0276] 如上所讨论,已报道了肌肉靶向肽的一些实例。例如,使用呈递表面七肽的噬菌体展示文库鉴定了肌肉特异性肽。作为一个实例,具有氨基酸序列ASSLNIA(SEQ ID NO:167)的肽在体外与C2C12鼠肌管结合,并且在体内与小鼠肌肉组织结合。因此,在一些实施方案中,肌肉靶向剂包含氨基酸序列ASSLNIA(SEQ ID NO:167)。该肽在小鼠中进行静脉内注射之后展示出提高的与心脏和骨骼肌组织结合的特异性,以及降低的与肝、肾和脑的结合。使用噬菌体展示已鉴定了另外的肌肉特异性肽。例如,通过噬菌体展示文库鉴定了12个氨基酸的肽用于在DMD治疗的情况下进行肌肉靶向。参见Yoshida D.,et al.,"Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats."Int J Pharm 2002;231:177-84;其全部内容在此通过引用并入。在此,鉴定了具有序列SKTFNTHPQSTP(SEQ ID NO:168)的12个氨基酸的肽,并且该肌肉靶向肽相对于ASSLNIA(SEQ ID NO:167)肽显示出提高的与C2C12细胞的结合。

[0277] 用于鉴定相对于其他细胞类型而对肌肉(例如,骨骼肌)具有选择性的肽的另一方法包括体外选择,这已在Ghosh D.,et al.,"Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting"J Virol 2005;79:13667-72中进行了描述;其全部内容通过引用并入本文。通过将随机的12聚体(12-mer)肽噬菌体展示文库与非肌细胞类型的混合物预孵育选择出了非特异性细胞结合物。在数轮选择之后,12个氨基酸的肽TARGEHKEEELI(SEQ ID NO:169)最频繁地出现。因此,在一些实施方案中,肌肉靶向剂包含氨基酸序列TARGEHKEEELI(SEQ ID NO:169)。

[0278] 肌肉靶向剂可以是含氨基酸的分子或肽。肌肉靶向肽可对应于优先与存在于肌细

胞中的蛋白质受体结合的蛋白质序列。在一些实施方案中,肌肉靶向肽包含高倾向性的疏水性氨基酸,例如缬氨酸,使得该肽优先靶向肌细胞。在一些实施方案中,肌肉靶向肽是先前未表征或公开过的。可使用数种方法中的任一种(例如噬菌体展示肽文库、单珠单化合物肽文库或位置扫描合成肽组合文库)来构思、产生、合成和/或(例如,和)衍生这些肽。一些示例性方法已在本领域中表征并通过引用并入(Gray,B.P.and Brown,K.C.“Combinatorial Peptide Libraries:Mining for Cell-Binding Peptides”Chem Rev.2014,114:2,1020--1081.;Samoylova,T.I.and Smith,B.F.“Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening.”Muscle Nerve,1999,22:4.460-6.)。在一些实施方案中,先前已公开了肌肉靶向肽(参见,例如Writer M.J.et al.“Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic vectors incorporating novel targeting peptides selected by phage display.”J.Drug Targeting.2004;12:185;Cai,D.“BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart.”Physiol Genomics.2006,24:3,191-7.;Zhang,L.“Molecular profiling of heart endothelial cells.”Circulation,2005,112:11,1601-11.;McGuire,M.J.et al.“In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo.”J Mol Biol.2004,342:1,171-82.)。一些示例性的肌肉靶向肽包含以下组的氨基酸序列:

[0279] CQAQGQLVC (SEQ ID NO: 170), CSERSMNFC (SEQ ID NO: 171), CPKTRRVPC (SEQ ID NO: 130), WLSEAGPVVTVRALRGTGSW (SEQ ID NO: 172), ASSLNIA (SEQ ID NO: 167), CMQHSMRVC (SEQ ID NO: 173), 和 DDTRHWG (SEQ ID NO: 131)。

[0280] 在一些实施方案中,肌肉靶向肽可包含约2至25个氨基酸、约2至20个氨基酸、约2至15个氨基酸、约2至10个氨基酸或约2至5个氨基酸。肌肉靶向肽可包含天然存在的氨基酸例如半胱氨酸、丙氨酸或者非天然存在或经修饰氨基酸。非天然存在的氨基酸包括β-氨基酸、高氨基酸(homo-amino acid)、脯氨酸衍生物、3-经取代的丙氨酸衍生物、线性核心氨基酸、N-甲基氨基酸和本领域中已知的其他氨基酸。在一些实施方案中,肌肉靶向肽可以是线性的;在另一些实施方案中,肌肉靶向肽可以是环状的,例如双环的(参见,例如Silvana,M.G.et al.Mol.Therapy,2018,26:1,132--147.)。

[0281] iii.肌肉靶向受体配体

[0282] 肌肉靶向剂可以是配体,例如与受体蛋白结合的配体。肌肉靶向配体可以是蛋白质,例如与由肌细胞表达的内化细胞表面受体结合的转铁蛋白。因此,在一些实施方案中,肌肉靶向剂是与转铁蛋白受体结合的转铁蛋白或其衍生物。肌肉靶向配体可替代地是小分子,例如相对于其他细胞类型而优先靶向肌细胞的亲脂性小分子。可靶向肌细胞的一些示例性亲脂性小分子包括包含以下的化合物:胆固醇、胆固醇基、硬脂酸、棕榈酸、油酸、油烯基、亚麻烯(linolene)、亚油酸、肉豆蔻酸、甾醇类、二氢睾酮、睾酮衍生物、甘油、烷基链、三苯甲基类和烷氧基酸。

[0283] iv.肌肉靶向适配体

[0284] 肌肉靶向剂可以是适配体,例如RNA适配体,其相对于其他细胞类型而优先靶向肌细胞。在一些实施方案中,肌肉靶向适配体是先前未表征或公开过的。可使用数种方法中的

任一种(例如通过指数富集的配体的系统进化)来构思、产生、合成和/或(例如,和)衍生这些适配体。一些示例性方法已在本领域中表征并通过引用并入(Yan,A.C.and Levy,M.“Aptamers and aptamer targeted delivery”RNAbiology,2009,6:3,316-20.;Germer,K.et al.“RNAaptamers and their therapeutic and diagnostic applications.”Int.J.Biochem.Mol.Biol.2013;4:27-40.)。在一些实施方案中,先前已公开了肌肉靶向适配体(参见,例如Phillippou,S.et al.“Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers.”Mol Ther Nucleic Acids.2018,10:199-214.;Thiel,W.H.et al.“Smooth Muscle Cell-targeted RNAAptamer Inhibits Neointimal Formation.”Mol Ther.2016,24:4,779-87.)。示例性的肌肉靶向适配体包括A01B RNA适配体和RNAApt 14。在一些实施方案中,适配体是基于核酸的适配体、寡核苷酸适配体或肽适配体。在一些实施方案中,适配体可以是约5kDa至15kDa、约5kDa至10kDa、约10kDa至15kDa、约1至5Da、约1kDa至3kDa或更小。

[0285] v.其他肌肉靶向剂

[0286] 用于靶向肌细胞(例如,骨骼肌细胞)的一种策略是使用肌转运体蛋白(例如在肌膜上表达的转运体蛋白)的底物。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是对肌肉组织具有特异性的流入转运体的底物。在一些实施方案中,流入转运体对骨骼肌组织具有特异性。两类主要的转运体在骨骼肌肌膜上表达:(1)三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)结合盒(adenosine triphosphate binding cassette,ABC)超家族,其促进从骨骼肌组织流出和(2)溶质运载体(solute carrier,SLC)超家族,其可促进底物流入骨骼肌中。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是与转运体的ABC超家族或SLC超家族结合的底物。在一些实施方案中,与转运体的ABC或SLC超家族结合的底物是天然存在的底物。在一些实施方案中,与转运体的ABC或SLC超家族结合的底物是非天然存在的底物,例如,与转运体的ABC或SLC超家族结合的其合成衍生物。

[0287] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是本文中所述的靶向转运体的SLC超家族的任何肌肉靶向剂(例如,抗体、核酸、小分子、肽、适配体、脂质、糖部分)。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是转运体的SLC超家族的底物。SLC转运体是平衡型的,或者使用跨膜而产生的质子或钠离子梯度来驱动底物的转运。具有高骨骼肌表达的一些示例性SLC转运体包括但不限于SATT转运体(ASCT1;SLC1A4)、GLUT4转运体(SLC2A4)、GLUT7转运体(GLUT7;SLC2A7)、ATRC2转运体(CAT-2;SLC7A2)、LAT3转运体(KIAA0245;SLC7A6)、PHT1转运体(PTR4;SLC15A4)、OATP-J转运体(OATP5A1;SLC21A15)、OCT3转运体(EMT;SLC22A3)、OCTN2转运体(FLJ46769;SLC22A5)、ENT转运体(ENT1;SLC29A1和ENT2;SLC29A2)、PAT2转运体(SLC36A2)和SAT2转运体(KIAA1382;SLC38A2)。这些转运体可促进底物流入骨骼肌中,为肌肉靶向提供机会。

[0288] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是平衡型核苷转运体2(equilibrative nucleoside transporter 2,ENT2)转运体的底物。相对于其他转运体,ENT2在骨骼肌中具有最高的mRNA表达之一。虽然人ENT2(hENT2)在大多数身体器官例如脑、心脏、胎盘、胸腺、胰腺、前列腺和肾中表达,但其在骨骼肌中特别丰富。人ENT2根据其浓度梯度促进其底物的吸收。ENT2通过转运广泛范围的嘌呤和嘧啶核苷碱基在维持核苷稳态中发挥作用。hENT2转运体对除肌苷之外的所有核苷(腺苷、鸟苷、尿苷、胸苷和胞苷)均具有低的亲和力。因此,在

一些实施方案中,肌肉靶向剂是ENT2底物。示例性的ENT2底物包括但不限于肌苷、2',3'-二脱氧肌苷和氯法拉滨(calofarabine)。在一些实施方案中,本文中提供的任何肌肉靶向剂均与分子有效载荷(例如,寡核苷酸载荷)缔合。在一些实施方案中,肌肉靶向剂与分子有效载荷共价连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂与分子有效载荷非共价连接。

[0289] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是有机阳离子/肉碱转运体(organic cation/carnitine transporter,OCTN2)的底物,所述有机阳离子/肉碱转运体是钠离子依赖性的高亲和力肉碱转运体。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是肉碱、米屈肼(mildronate)、乙酰肉碱或与OCTN2结合的其任意衍生物。在一些实施方案中,肉碱、米屈肼、乙酰肉碱或其衍生物与分子有效载荷(例如,寡核苷酸载荷)共价连接。

[0290] 肌肉靶向剂可以是蛋白质,该蛋白质是以靶向肌细胞的至少一种可溶性形式存在的蛋白质。在一些实施方案中,肌肉靶向蛋白可以是血幼素(也称为排斥性导向分子C或血色素沉着症2型蛋白),所述血幼素是参与铁超负荷和稳态的蛋白。在一些实施方案中,血幼素可以是全长或片段,或者与功能性血幼素蛋白具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的突变体。在一些实施方案中,血幼素突变体可以是可溶性片段,可缺乏N端信号传导,和/或(例如,和)缺乏C端锚定结构域。在一些实施方案中,血幼素可以以GenBank RefSeq登录号NM_001316767.1、NM_145277.4、NM_202004.3、NM_213652.3或NM_213653.3进行注释。应理解,血幼素可以是人、非人灵长类或啮齿动物来源的。

[0291] B.分子有效载荷

[0292] 本公开内容的一些方面提供了分子有效载荷,例如,旨在靶向DUX4RNA以调节DUX4的表达或活性的寡核苷酸。在一些实施方案中,本公开内容提供了与DUX4 RNA互补的寡核苷酸,其可用于降低与面肩肱型肌营养不良(FSHD)病理学特征相关的DUX4 mRNA和/或蛋白质的水平,所述特征包括肌肉萎缩、炎症、和降低的分化潜能以及氧化应激。在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸旨在指导RNAi介导的DUX4 RNA的降解。在一些实施方案中,寡核苷酸旨在有效地接合RNA诱导的沉默复合物(RISC)以降解DUX4 RNA而且还具有降低的脱靶效应。在一些实施方案中,寡核苷酸旨在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,寡核苷酸旨在具有期望的结合亲和力特性。在一些实施方案中,寡核苷酸旨在具有期望的毒性和/或免疫原性谱。

[0293] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含具有DUX4 RNA的互补区的链。示例性的寡核苷酸在本文中进一步详细描述,然而,应理解,本文中提供的示例性寡核苷酸并不意味着是限制性的。

[0294] i.寡核苷酸

[0295] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸旨在引起RNAi介导的DUX4 mRNA的降解。在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸包含与DUX4 mRNA互补的反义链。在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸还包含形成双链寡核苷酸的有义链(例如,siRNA)。应理解,在一些实施方案中,可以通过将功能序列(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)。

[0296] 如本文所述,任何合适的寡核苷酸都可用作分子有效载荷。可用于靶向DUX4的寡

核苷酸的一些实例提供于以下中:美国专利号9,988,628,其于2017年2月2日公开,标题为“AGENTS USEFUL IN TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY”;美国专利号9,469,851,其于2014年10月30日公开,标题为“RECOMBINANT VIRUS PRODUCTS AND METHODS FOR INHIBITING EXPRESSION OF DUX4”;美国专利申请公开20120225034,其于2012年9月6日公开,标题为“AGENTS USEFUL IN TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY”;PCT专利申请公开号WO 2013/120038,其于2013年8月15日公开,标题为“MORPHOLINO TARGETING DUX4FOR TREATING FSHD”;Chen et al.,“Morpholino-mediated Knockdown of DUX4 Toward Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Therapeutics,”Molecular Therapy,2016,24:8,1405-1411.;以及Ansseau et al.,“Antisense Oligonucleotides Used to Target the DUX4 mRNA as Therapeutic Approaches in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy(FSHD),”Genes,2017,8,93;其各自的内容以其整体并入本文。在一些实施方案中,寡核苷酸是反义寡核苷酸、吗啉代、siRNA、shRNA或者与靶DUX4基因或mRNA杂交的其他寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸是siRNA寡核苷酸。

[0297] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸具有以下的所示序列之互补区:人DUX4,对应于如下的NCBI序列NM_001293798.2(SEQ ID NO:160)或NCBI序列:NM_001306068.3(SEQ ID NO:161)以及/或者(例如,以及)小鼠DUX4,对应于如下的NCBI序列NM_001081954.1(SEQ ID NO:162)。另一些非限制性的示例性人DUX4 mRNA包括NCBI序列:NM_033178,GenBank登录号FJ439133,

[0298] AF117653,HM101229,HM101230,HM101232,HM101233,HM101234,HM101235,HM101240,HM101241,HM101242,HM101243,HM101244,HM101245,HM101246,HM101247,HM101248,HM101249,HM101250,HM101251 and HM190160,HM190161,HM190162,HM190163,HM190164,HM190165,HM190166,HM190167,HM190168,HM190169,HM190170,HM190171,HM190172,HM190173,HM190174,HM190175,HM190176,HM190177,HM190178,HM190179,HM190180,HM190181,HM190182,HM190183,HM190184,HM190185,HM190186,HM190187,HM190188,HM190189,HM190190,HM190191,HM190192,HM190193,HM190194,HM190195,HM190196,

[0299] 其各自均通过引用并入本文。在一些实施方案中,寡核苷酸可具有低甲基化的紧凑的D4Z4重复之互补区,如Daxinger,et al.,“Genetic and Epigenetic Contributors to FSHD,”公开于2015年的Curr Opin Genet Dev,Lim J-W,et al.,DICER/AGO-dependent epigenetic silencing of D4Z4 repeats enhanced by exogenous siRNA suggests mechanisms and therapies for FSHD Hum Mol Genet.2015Sep 1;24(17):4817-4828,其各自的内容以其整体并入。

[0300] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有如下所示序列之互补区,所述序列是示例性人DUX4基因序列(NM_001293798.2)(SEQ ID NO:160):

[0301]

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAG
GACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTG
CTTTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCC
ATCGGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCC
AGCTGAGGCAGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGGCCCGCC
AGAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTC
CGAGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCA
GAGAGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGC
CAGGCACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAG
CGCGGCCCCCGGCGGGGGTCACCCTGCTCCCTCGTGGGTCGCCTTCGCCCACACCG
GCGCGTGGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCT
CCCACAGGGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCCGCGCTGCAGCCC
AGCCAGGCCGCGCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATT
TCGCCTACGCCGCCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCCACCCTCAGGCTCCT
CGCTGGCCTCCGCACCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGAC
GGCCTGCCGGGCCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCGCTCAAGCGGGGCCGC
AGGGCCAAGGGGTGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTG
GGGCCGGGGTCCCCAGGTCGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGC
TCCACCTCCCCAGCCCGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAG
ATGCAAGGCATCCCGGCGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTG
CACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAG
CAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACGGAGGCCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAA
GAGGCCGCCTCGCTGGAAGCACCCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGG
AGGAGCTTTAGGACGCGGGGTCTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAGAA

CTGCCATTCTTTCCTGGGCATCCCGGGGATCCCAGAGCCGGCCCAGGTACCAGCAG
ACCTGCGCGCAGTGCGCACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCT
GTGCCCTTGTTCTTCCGTGAAATTCTGGCTGAATGTCTCCCCCCACCTTCCGACGCT
GTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTACATCTCCTGGATGATTAGTTCAGAGATATA
TTAAAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCTATAG 。

[0302] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有如下所示序列之互补区,所述序列是示例性人DUX4基因序列(NM_001306068.3)(SEQ ID NO:161):

[0303]

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAG
GACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTG
CTTTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCC
ATCGGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCC
AGCTGAGGCAGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGGCCCGCC
AGAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTC
CGAGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCA
GAGAGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGC
CAGGCACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAG
CGCGGCCCCCGGCGGGGGTCACCCTGCTCCCTCGTGGGTCGCCTTCGCCCACACCG
GCGCGTGGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCT
CCCACAGGGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCCGCGCTGCAGCCC
AGCCAGGCCGCGCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATT
TCGCCTACGCCGCCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCCACCCTCAGGCTCCT
CGGTGGCCTCCGCACCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGAC
GGCCTGCCGGGCCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCGCTCAAGCGGGGCCGC
AGGGCCAAGGGGTGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTG
GGGCCGGGGTCCCCAGGTCGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGC
TCCACCTCCCCAGCCCGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAG
ATGCAAGGCATCCCGGCGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTG
CACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAG
CAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACGGAGGCCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAA
GAGGCCGCCTCGCTGGAAGCACCCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGG
AGGAGCTTTAGGACGCGGGGTTGGGACGGGGTCGGGTGGTTCGGGGCAGGGCGGT
GGCCTCTCTTTCGCGGGGAACACCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCC
GCCCCCTCCACCGGGCTGACCGGCCTGGGATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGG

TGAGAGACTCCACTCCGCGGAGAACTGCCTTTCTTTCCTGGGCATCCCGGGGATCC
CAGAGCCGGCCCAGGTACCAGCAGACCTGCGCGCAGTGCGCACCCCGGCTGACGT
GCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTTCTTCCGTGAAATTCTGGCTGA
ATGTCTCCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTACATCT
CCTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTAAAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCTATAG 。

[0304] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有如下所示序列之互补区,所述序列是示例性小鼠DUX4基因序列(SEQ ID NO:162)(NM_001081954.1):

ATGGCAGAAGCTGGCAGCCCTGTTGGTGGCAGTGGTGTGGCACGGGAATCCCGGC
GGCGCAGGAAGACGGTTTGGCAGGCCTGGCAAGAGCAGGCCCTGCTATCAACTTT
CAAGAAGAAGAGATACCTGAGCTTCAAGGAGAGGAAGGAGCTGGCCAAGCGAAT
GGGGGTCTCAGATTGCCGCATCCGCGTGTGGTTTCAGAACCGCAGGAATCGCAGT
GGAGAGGAGGGGCATGCCTCAAAGAGGTCCATCAGAGGCTCCAGGCGGCTAGCCT
CGCCACAGCTCCAGGAAGAGCTTGGATCCAGGCCACAGGGTAGAGGCATGCGCTC
ATCTGGCAGAAGGCCTCGCACTCGACTCACCTCGCTACAGCTCAGGATCCTAGGG
CAAGCCTTTGAGAGGAACCCACGACCAGGCTTTGCTACCAGGGAGGAGCTGGCGC
GTGACACAGGGTTGCCCGAGGACACGATCCACATATGGTTTCAAAACCGAAGAGC
TCGGCGGCGCCACAGGAGGGGCAGGCCCACAGCTCAAGATCAAGACTTGCTGGCG
TCACAAGGGTCGGATGGGGCCCCTGCAGGTCCGGAAGGCAGAGAGCGTGAAGGT
GCCCAGGAGAACTTGTTGCCACAGGAAGAAGCAGGAAGTACGGGCATGGATACCT

[0305] CGAGCCCTAGCGACTTGCCCTCCTTCTGCGGAGAGTCCCAGCCTTTCCAAGTGGCA
CAGCCCCGTGGAGCAGGCCAACAAGAGGCCCCCACTCGAGCAGGCAACGCAGGC
TCTCTGGAACCCCTCCTTGATCAGCTGCTGGATGAAGTCCAAGTAGAAGAGCCTGC
TCCAGCCCCTCTGAATTTGGATGGAGACCCTGGTGGCAGGGTGCATGAAGGTTCCC
AGGAGAGCTTTTGGCCACAGGAAGAAGCAGGAAGTACAGGCATGGATACTTCTAG
CCCCAGCGACTCAAACTCCTTCTGCAGAGAGTCCCAGCCTTCCCAAGTGGCACAGC
CCTGTGGAGCGGGCCAAGAAGATGCCCGCACTCAAGCAGACAGCACAGGCCCTCT
GGAACTCCTCCTCCTTGATCAACTGCTGGACGAAGTCCAAAAGGAAGAGCATGTG
CCAGTCCCACTGGATTGGGGTAGAAATCCTGGCAGCAGGGAGCATGAAGGTTCCC
AGGACAGCTTACTGCCCCTGGAGGAAGCAGTAAATTCGGGCATGGATACCTCGAT
CCCTAGCATCTGGCCAACCTTCTGCAGAGAATCCCAGCCTCCCCAAGTGGCACAGC
CCTCTGGACCAGGCCAAGCACAGGCCCCCACTCAAGGTGGGAACACGGACCCCCT
GGAGCTCTTCCTCTATCAACTGTTGGATGAAGTCCAAGTAGAAGAGCATGCTCCAG
CCCCTCTGAATTGGGATGTAGATCCTGGTGGCAGGGTGCATGAAGGTTCGTGGGA
GAGCTTTTGGCCACAGGAAGAAGCAGGAAGTACAGGCCTGGATACTTCAAGCCCC
AGCGACTCAAACTCCTTCTTCAGAGAGTCCAAGCCTTCCCAAGTGGCACAGCGCC
GTGGAGCGGGCCAAGAAGATGCCCGCACTCAAGCAGACAGCACAGGCCCTCTGG
AACTCCTCCTCTTTGATCAACTGCTGGACGAAGTCCAAAAGGAAGAGCATGTGCC
AGCCCCACTGGATTGGGGTAGAAATCCTGGCAGCATGGAGCATGAAGGTTCCCAG

[0306] GACAGCTTACTGCCCCTGGAGGAAGCAGCAAATTCGGGCAGGGATACCTCGATCC
CTAGCATCTGGCCAGCCTTCTGCAGAAAATCCCAGCCTCCCCAAGTGGCACAGCCC
TCTGGACCAGGCCAAGCACAGGCCCCCATTCAAGGTGGGAACACGGACCCCCTGG
AGCTCTTCCTTGATCAACTGCTGACCGAAGTCCAACTTGAGGAGCAGGGGCCTGCC
CCTGTGAATGTGGAGGAAACATGGGAGCAAATGGACACAACACCTATCTGCCTCT
CACTTCAGAAGAATATCAGACTCTTCTAGATATGCTCTGA 。

[0307] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有多种物种的DUX4基因序列之互补区,所述多种物种例如选自人、小鼠和非人物种。在一些实施方案中,非人物种是食蟹猴。

[0308] ii.寡核苷酸尺寸/序列

[0309] 寡核苷酸可具有多种不同的长度,例如这取决于形式。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75或更多个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为8至50个核苷酸、长度为8至40个核苷酸、长度为8至32个核苷酸、长度为10至15个核苷酸、长度为10至20个核苷酸、长度为15至25个核苷酸、长度为21至23个核苷酸,等。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为8至32个核苷酸、15至29个核苷酸、15至27个核苷酸、15至20个核苷酸、20至25个核苷酸、21至27个核苷酸、23至27个核苷酸、25至30个核苷酸或25至32个核苷酸。

[0310] 在一些实施方案中,当寡核苷酸的互补核酸序列与靶分子(例如,mRNA)的结合干扰靶标(例如,mRNA)的正常功能从而导致丧失活性(例如,抑制翻译)或表达(例如,降解靶mRNA),并且具有足够程度的互补性以避免在以下条件下该序列与非靶标序列的非特异性结合时,出于本公开内容的目的,寡核苷酸的互补核酸序列与靶核酸可特异性地杂交或对靶核酸具有特异性:在其中期望避免非特异性结合的条件下,例如在体内测定或治疗性处理的情况下的生理条件下,以及在体外测定的情况下的生理条件下,在其中合适的严格条件下进行测定的条件下。因此,在一些实施方案中,寡核苷酸可与靶核酸的连续核苷酸至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。在一些实施方案中,互补核苷酸序列不需要与其所靶向的100%互补来与靶核酸可特异性地杂交或对靶核酸具有特异性。在一些实施方案中,寡核苷酸包含一个或更多个相对于靶核酸错配的核碱基。在一些实施方案中,与靶标相关的活性因这样的错配而降低,但与非靶标相关的活性降低的量更大(即,对靶核酸的选择性提高并且脱靶效应降低)。在一些实施方案中,靶核酸是前mRNA分子或mRNA分子。

[0311] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含靶核酸之互补区,所述互补区的长度在8至15、8至30、8至40、或10至50、或5至50、或5至40个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸包含靶核酸之互补区,所述互补区的长度在8至32、15至29、15至27、21至27、23至27个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸包含靶核酸之互补区,所述互补区的长度在15至29、15至27、15至20、20至25、21至27、23至27、25至27或25至32个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸与靶核酸的互补区的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个核苷酸。在一些实施方案中,互补区与靶核酸的至少8个连续核苷酸互补。在一些实施方案中,互补区与靶核酸的至少12个连续核苷酸互补。在一些实施方案中,互补区与靶核酸的至少16个连续核苷酸互补。在一些实施方案中,与靶核酸的连续核苷酸部分相比,寡核苷酸可包含1、2或3个碱基错配。在一些实施方案中,寡核苷酸在15个碱基上可具有至多3个错配,或在10个碱基上具有至多2个错配。

[0312] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含含有SEQ ID NO:236至266中任一者的序列的至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含含有SEQ ID NO:236至266中任一者的序列。在一些实施方案中,寡核苷酸包含与SEQ ID NO:236至266中任一者的至少12个或至少15个连续核苷酸共有至少70%、75%、80%、85%、

90％、95％或97％序列同一性的序列。

[0313] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含与SEQ ID NO:174至235中任一者所示靶序列的互补区。在一些实施方案中,寡核苷酸包含与SEQ ID NO:174至235中任一者所示靶序列的至少12个或至少15个连续核苷酸具有至少70％、75％、80％、85％、90％、95％、97％、99％或100％互补的互补区。在一些实施方案中,互补区的长度为至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少19或至少20个核苷酸。在一些实施方案中,互补区的长度为8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸。在一些实施方案中,互补区的长度在8至20、10至20或15至20个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,互补区与其靶序列的全部或部分完全互补。在一些实施方案中,互补区包含1、2、3个或更多个错配。

[0314] 在一些实施方案中,寡核苷酸与本文中提供的任一种寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸)的靶序列互补(例如,至少85％、至少90％、至少95％或100％互补)。在一些实施方案中,寡核苷酸与本文中提供的任一种寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸)的靶序列互补(例如,至少85％、至少90％、至少95％或100％互补)。在一些实施方案中,这样的靶序列与表8中所列寡核苷酸100％互补。在一些实施方案中,这样的靶序列与表9中所列寡核苷酸100％互补。在一些实施方案中,寡核苷酸与本文中提供的任一种寡核苷酸(例如,包含SEQ ID NO:236至266中任一者的寡核苷酸)的靶序列互补(例如,至少85％、至少90％、至少95％或100％互补)。在一些实施方案中,寡核苷酸与本文中提供的任一种寡核苷酸(例如,包含SEQ ID NO:248、251至253和262中任一者的寡核苷酸)的靶序列互补(例如,至少85％、至少90％、至少95％或100％互补)。在一些实施方案中,这样的靶序列与本文中所述寡核苷酸(例如,包含SEQ ID NO:236至266中任一者的寡核苷酸)100％互补。在一些实施方案中,这样的靶序列与本文中所述寡核苷酸(例如,包含SEQ ID NO:248、251至253和262中任一者的寡核苷酸)100％互补。

[0315] 在一些实施方案中,应理解,核碱基尿嘧啶在C5位置处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胸腺嘧啶核苷。

[0316] 在一些实施方案中,本文中提供的任一种寡核苷酸中的一个或更多个胸腺嘧啶碱基(T)可独立地且任选地为尿嘧啶碱基(U),以及/或者任何一个或更多个U可独立地且任选地为T。在一些实施方案中,表8中所列任一种寡核苷酸中的一个或更多个胸腺嘧啶碱基(T)可独立地且任选地是尿嘧啶碱基(U),以及/或者任何一个或更多个U可独立地且任选地是T。在一些实施方案中,表9中所列任一种寡核苷酸中的一个或更多个胸腺嘧啶碱基(T)可独立地且任选地是尿嘧啶碱基(U),以及/或者任何一个或更多个U可独立地且任选地是T。

[0317] b.寡核苷酸修饰:

[0318] 本文中所述的寡核苷酸可被修饰,例如,包含经修饰糖部分、经修饰核苷间键联、经修饰核苷酸或核苷和/或者(例如,和)其组合。另外,在一些实施方案中,寡核苷酸可表现出以下特性中的一种或更多种:不介导选择性剪接;不是免疫刺激性的;具有核酸酶抗性;与未经修饰寡核苷酸相比具有提高的细胞摄取;对细胞或哺乳动物无毒;提高了在细胞中内部排出内体;使TLR刺激最小化;或避免模式识别受体。本文中所述的寡核苷酸的任何经修饰的化学组成(chemistry)或形式可彼此组合。例如,同一寡核苷酸内可包含一种、两种、

三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0319] 在一些实施方案中,可使用某些核苷酸或核苷修饰,所述核苷酸或核苷修饰使并入它们的寡核苷酸比天然寡脱氧核苷酸或寡核糖核苷酸分子对核酸酶消化更具抗性;这些经修饰寡核苷酸比未经修饰寡核苷酸完整存活更长的时间。经修饰寡核苷酸的一些具体实例包括含有经修饰的主链(backbone)的那些,例如经修饰核苷间键联,例如硫代磷酸酯键联、磷酸三酯键联、甲基膦酸酯键联、短链烷基键联或环烷基糖间键联或者短链杂原子键联或杂环糖间键联。因此,本公开内容的寡核苷酸可例如通过并入修饰例如核苷酸或核苷修饰而稳定化以抵抗溶核降解。

[0320] 在一些实施方案中,寡核苷酸的长度可以是多至50个或多至100个核苷酸,其中寡核苷酸的2至10、2至15、2至16、2至17、2至18、2至19、2至20、2至25、2至30、2至40、2至45或更多个核苷酸或核苷是经修饰核苷酸/核苷。寡核苷酸的长度可以是8至30个核苷酸,其中寡核苷酸的2至10、2至15、2至16、2至17、2至18、2至19、2至20、2至25、2至30个核苷酸或核苷是经修饰核苷酸/核苷。寡核苷酸的长度可以是8至15个核苷酸,其中寡核苷酸的2至4、2至5、2至6、2至7、2至8、2至9、2至10、2至11、2至12、2至13、2至14个核苷酸或核苷是经修饰核苷酸/核苷。任选地,寡核苷酸可具有除1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个经修饰核苷酸/核苷之外的每个核苷酸或核苷。寡核苷酸修饰在本文中进一步描述。

[0321] c.经修饰核苷

[0322] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含在糖的2'位置处经修饰的至少一个核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个2'-经修饰核苷。在一些实施方案中,寡核苷酸中的所有核苷均是2'-经修饰核苷。

[0323] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含一个或更多个非双环2'-经修饰核苷,例如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-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷。

[0324] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含一个或更多个2'-氟(2'-F)修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含至少两个2'-氟(2'-F)修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含至少四个2'-氟(2'-F)修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含至少六个2'-氟(2'-F)修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含一个或更多个2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷。

[0325] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含一个或更多个2'-4'双环核苷,其中核糖环包含连接环中的两个原子的桥联部分,例如,通过亚甲基(LNA)桥联、亚乙基(ENA)桥联或(S)-约束性乙基(cEt)桥联将2'-O原子与4'-C原子连接。LNA的一些实例描述于国际专利申请公开WO/2008/043753中,其于2008年4月17日公开,并且标题为"RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9",其内容通过引用整体并入本文。ENA的一些实例在以下中提供:国际专利公开No.WO 2005/042777,其于2005年5月12日公开,并且标题为"APP/ENA Antisense";Morita et al.,Nucleic Acid Res.,增刊1:241-242,2001;Surono et al.,Hum.Gene Ther.,15:749-757,2004;Koizumi,Curr.Opin.Mol.Ther.,8:144-149,2006以及Horie et al.,Nucleic Acids Symp.Ser(Oxf),49:171-172,2005;其公开内容通

过引用整体并入本文。cEt的一些实例在以下中提供:美国专利7,101,993、7,399,845和7,569,686,其各自通过引用整体并入本文。

[0326] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含在以下美国专利或专利申请公开之一中公开的经修饰核苷:美国专利7,399,845,其于2008年7月15日授权,并且标题为“6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,741,457,其于2010年6月22日授权,并且标题为“6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利8,022,193,其于2011年9月20日授权,并且标题为“6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,569,686,其于2009年8月4日授权,并且标题为“Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,335,765,其于2008年2月26日授权,并且标题为“Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues”;美国专利7,314,923,其于2008年1月1日授权,并且标题为“Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues”;美国专利7,816,333,其于2010年10月19日授权,并且标题为“Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same”和美国公开号2011/0009471,现在为美国专利8,957,201,其于2015年2月17日授权,并且标题为“Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same”,其各自的全部内容出于所有目的通过引用并入本文。

[0327] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含至少一个经修饰核苷,其导致所述寡核苷酸与不具有至少一个经修饰核苷的寡核苷酸相比,Tm提高1℃、2℃、3℃、4℃或5℃。寡核苷酸可具有多个经修饰核苷,其导致所述寡核苷酸与不具有经修饰核苷的寡核苷酸相比,Tm总体提高2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃或更高。

[0328] 寡核苷酸可包含不同种类的核苷的混合物。例如,寡核苷酸可包含2’-脱氧核糖核苷或核糖核苷和2’-氟修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含脱氧核糖核苷或核糖核苷和2’-O-Me修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含2’-氟修饰核苷和2’-O-甲基修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含桥联的核苷和2’-氟或2’-O-甲基修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-O-MOE)和2’-4’双环核苷(例如,LNA、ENA、cEt)的混合物。寡核苷酸可包含2’-氟修饰核苷和2’-O-Me修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含2’-4’双环核苷和2’-MOE、2’-氟或2’-O-Me修饰核苷的混合物。寡核苷酸可包含非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE、2’-氟或2’-O-Me)和2’-4’双环核苷(例如,LNA、ENA、cEt)的混合物。

[0329] 寡核苷酸可包含不同种类的替代核苷。例如,寡核苷酸可包含替代的2’-脱氧核糖核苷或核糖核苷和2’-氟修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的脱氧核糖核苷或核糖核苷和2’-O-Me修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的2’-氟修饰核苷和2’-O-Me修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的桥联核苷和2’-氟或2’-O-甲基修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-O-MOE)和2’-4’双环核苷(例如,LNA、ENA、cEt)。寡核苷酸可包含替代的2’-4’双环核苷和2’-MOE、2’-氟或2’-O-Me修饰核苷。寡核苷酸可包含替代的非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE、2’-氟或2’-O-Me)和2’-4’双环核苷(例如,LNA、ENA、cEt)。

[0330] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含5’-乙烯基膦酸酯修饰、一个或更多个无碱基残基和/或一个或更多个倒置无碱基残基。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是包含有义链和反义链的siRNA寡核苷酸,其中反义链或有义链包含5’-乙烯基膦酸

酯(例如,5'-(E)-乙烯基膦酸酯修饰)。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是包含有义链和反义链的siRNA寡核苷酸,其中反义链包含5'-乙烯基膦酸酯(例如,5'-(E)-乙烯基膦酸酯)修饰)。

[0331] d.核苷间键联/骨架

[0332] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含硫代磷酸酯键联或其他经修饰核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸在至少两个核苷之间包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸在所有核苷之间均包含硫代磷酸酯核苷间键联。例如,在一些实施方案中,寡核苷酸在核苷酸序列的5'或3'末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联处包含经修饰核苷间键联。

[0333] 可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基膦酸酯和包含3'亚烷基膦酸酯的其他烷基膦酸酯、以及手性膦酸酯、次膦酸酯、包含3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键联的硼烷磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物、以及其中相邻的核苷单元对连接在3'-5'到5'-3'或2'-5'到5'-2'的具有相反极性的那些;参见美国专利no.

[0334] 3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0335] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有杂原子主链,例如亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链;酰胺主链(参见De Mesmaeker et al.Ace.Chem.Res.1995,28:366-374);吗啉代主链(参见Summerton and Weller,美国专利No.5,034,506);或肽核酸(peptide nucleic acid,PNA)主链(其中寡核苷酸的磷酸二酯主链被聚酰胺主链替代,核苷酸与聚酰胺主链的氮杂氮原子直接或间接结合,参见Nielsen et al.,Science 1991,254,1497)。

[0336] e.立体特异性寡核苷酸

[0337] 在一些实施方案中,寡核苷酸的核苷酸间磷原子是手性的,并且基于手性磷原子的构型调节寡核苷酸的特性。在一些实施方案中,可使用适当方法以立体控制的方式合成P-手性寡核苷酸类似物(例如,如Oka N,Wada T.Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms.Chem Soc Rev.2011Dec;40(12):5829-43中所述)。在一些实施方案中,提供含有硫代磷酸酯的寡核苷酸,其包含通过基本上所有的Sp或基本上所有的Rp硫代磷酸酯糖间键联连接在一起的核苷单元。在一些实施方案中,具有基本上手性纯糖间键联的这样的硫代磷酸酯寡核苷酸通过酶或化学合成来制备,如例如于1996年12月12日授权的美国专利5,587,261中所述,其内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸提供了靶核酸的选择性切割模式。例如,在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸在核酸的互补序列内提供了单个位点切割,如例如美国专利申请公开20170037399 A1中所述,其于2017年2月2日公开,标题为"CHIRAL DESIGN",其内容通过引用整体并入本文。

[0338] f.吗啉代

[0339] 在一些实施方案中,寡核苷酸可以是基于吗啉代的化合物。基于吗啉代的寡聚化

合物描述于Dwaine A.Braasch and David R.Corey,Biochemistry,2002,41(14),4503-4510);Genesis,第30卷,第3期,2001;Heasman,J.,Dev.Biol.,2002,243,209-214;Nasevicius et al.,Nat.Genet.,2000,26,216-220;Lacerra et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,2000,97,9591-9596;和1991年7月23日授权的美国专利No.5,034,506。在一些实施方案中,基于吗啉代的寡聚化合物是磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)(例如,如Iverson,Curr.Opin.Mol.Ther.,3:235-238,2001;和Wang et al.,J.Gene Med.,12:354-364,2010中所述;其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0340] h.间隔聚体

[0341] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是间隔聚体。间隔聚体寡核苷酸通常具有式5'-X-Y-Z-3',其中X和Z作为围绕间隔区Y的侧翼区。在一些实施方案中,式5'-X-Y-Z-3'的侧翼区X也称为X区、侧翼序列X、5'翼区X或5'翼区段。在一些实施方案中,式5'-X-Y-Z-3'的侧翼区Z也称为Z区、侧翼序列Z、3'翼区Z或3'翼区段。在一些实施方案中,式5'-X-Y-Z-3'的间隔区Y也称为Y区、Y区段或间隔区段Y。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,并且5'翼区X或3'翼区Z均不包含任何2'-脱氧核糖核苷。

[0342] 在一些实施方案中,Y区是核苷酸的连续延伸,例如,6个或更多个DNA核苷酸的区域,其能够募集RNA酶(例如RNA酶H)。在一些实施方案中,间隔聚体与靶核酸结合,在该点处RNA酶被募集并随后可切割靶核酸。在一些实施方案中,Y区5'和3'二者的侧翼是包含高亲和力经修饰核苷,例如1至6个高亲和力经修饰核苷的X和Z区。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,侧翼序列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。侧翼序列X和Z可具有相似长度或不同长度。在一些实施方案中,间隔区段Y可以是长度为5至20个核苷酸、5至15十二个核苷酸或6至10个核苷酸的核苷酸序列。

[0343] 在一些实施方案中,除DNA核苷酸之外,间隔聚体寡核苷酸的间隔区可包含已知可被接受用于高效的RNA酶H作用的经修饰核苷酸,例如C4'-取代的核苷酸、非环核苷酸和阿拉伯糖(arabino)构型的核苷酸。在一些实施方案中,间隔区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一个或更多个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,间隔区和两个侧翼区在至少两个、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核苷间键联(例如,硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联)。

[0344] 可使用适当的方法产生间隔聚体。教导制备间隔聚体的代表性美国专利、美国专利出版物和PCT出版物包括但不限于:

[0345] 美国专利No.5,013,830;5,149,797;5,220,007;5,256,775;5,366,878;5,403,711;5,491,133;5,565,350;5,623,065;5,652,355;5,652,356;5,700,922;5,898,031;7,015,315;7,101,993;7,399,845;7,432,250;7,569,686;7,683,036;7,750,131;8,580,756;9,045,754;9,428,534;9,695,418;10,017,764;10,260,069;9,428,534;8,580,756;

[0346] 美国专利公开No.US20050074801、US20090221685、US20090286969、US20100197762和US20110112170;PCT公开No.WO2004069991、WO2005023825、WO2008049085和WO2009090182;以及EP专利No.EP2,149,605,其各自通过引用整体并入本文。

[0347] 在一些实施方案中,间隔聚体的长度是10至40个核苷。例如,间隔聚体的长度可以是10至40、10至35、10至30、10至25、10至20、10至15、15至40、15至35、15至30、15至25、15至20、20至40、20至35、20至30、20至25、25至40、25至35、25至30、30至40、30至35或35至40个核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的长度是10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个核苷。

[0348] 在一些实施方案中,间隔聚体中的间隔区Y的长度是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的长度是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。

[0349] 在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)独立地为1至20个核苷长。例如,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的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,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的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,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)具有相同的长度。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)具有不同的长度。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)比间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)长。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)比间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)短。

[0350] 在一些实施方案中,间隔聚体包含以下的5'-X-Y-Z-3':

[0351] 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-

18-2,2-18-1,1-17-3,3-17-1,2-17-2,1-16-4,4-16-1,2-16-3,3-16-2,1-15-5,2-15-4,4-15-2,3-15-3,1-14-6,6-14-1,2-14-5,5-14-2,3-14-4,4-14-3,1-13-7,7-13-1,2-13-6,6-13-2,3-13-5,5-13-3,4-13-4,1-12-8,8-12-1,2-12-7,7-12-2,3-12-6,6-12-3,4-12-5,5-12-4,2-11-8,8-11-2,3-11-7,7-11-3,4-11-6,6-1 1-4,5-11-5,1-20-1,1-19-2,2-19-1,1-18-3,3-18-1,2-18-2,1-17-4,4-17-1,2-17-3,3-17-2,1-16-5,2-16-4,4-16-2,3-16-3,1-15-6,6-15-1,2-15-5,5-15-2,3-15-4,4-15-3,1-14-7,7-14-1,2-14-6,6-14-2,3-14-5,5-14-3,4-14-4,1-13-8,8-13-1,2-13-7,7-13-2,3-13-6,6-13-3,4-13-5,5-13-4,2-12-8,8-12-2,3-12-7,7-12-3,4-12-6,6-12-4,5-12-5,3-11-8,8-11-3,4-11-7,7-11-4,5-11-6,6-11-5,1-21-1,1-20-2,2-20-1,1-20-3,3-19-1,2-19-2,1-18-4,4-18-1,2-18-3,3-18-2,1-17-5,2-17-4,4-17-2,3-17-3,1-16-6,6-16-1,2-16-5,5-16-2,3-16-4,4-16-3,1-15-7,7-15-1,2-15-6,6-15-2,3-15-5,5-15-3,4-15-4,1-14-8,8-14-1,2-14-7,7-14-2,3-14-6,6-14-3,4-14-5,5-14-4,2-13-8,8-13-2,3-13-7,7-13-3,4-13-6,6-13-4,5-13-5,1-12-10,10-12-1,2-12-9,9-12-2,3-12-8,8-12-3,4-12-7,7-12-4,5-12-6,6-12-5,4-1 1-8,8-1 1-4,5-11-7,7-11-5,6-1 1-6,1-22-1,1-21-2,2-21-1,1-21-3,3-20-1,2-20-2,1-19-4,4-19-1,2-19-3,3-19-2,1-18-5,2-18-4,4-18-2,3-18-3,1-17-6,6-17-1,2-17-5,5-17-2,3-17-4,4-17-3,1-16-7,7-16-1,2-16-6,6-16-2,3-16-5,5-16-3,4-16-4,1-15-8,8-15-1,2-15-7,7-15-2,3-15-6,6-15-3,4-15-5,5-15-4,2-14-8,8-14-2,3-14-7,7-14-3,4-14-6,6-14-4,5-14-5,3-13-8,8-13-3,4-13-7,7-13-4,5-13-6,6-13-5,4-12-8,8-12-4,5-12-7,7-12-5,6-12-6,5-11-8,8-11-5,6-11-7,或7-11-6

[0352] 数字表示5'-X-Y-Z-3'间隔聚体中X、Y和Z区中的核苷的数目。

[0353] 在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)或间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的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-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA))。

[0354] 在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)中的一个或更多个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)中的每个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的一个或更多个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的每个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)中的一个或更多个核苷是高亲和力经修饰核苷,并且间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的一个或更多个核苷是高亲和力经修饰核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)中的每个核苷是高亲和力经修饰核苷,并且间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中的每个核苷是高亲和力经修饰核苷。

[0355] 在一些实施方案中,间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)包含与间隔聚体的

3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)相同的高亲和力核苷。例如,间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)和间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)可包含一个或更多个非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me)。在另一个实例中,间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)和间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)可包含一个或更多个2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt)。在一些实施方案中,间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)和间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)中的每个核苷是非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me)。在一些实施方案中,间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)和间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)中的每个核苷是2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt)。

[0356] 在一些实施方案中,间隔聚体包含5’-X-Y-Z-3’构型,其中X和Z的长度独立地为1至7个(例如,1、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和Z中的每个核苷是非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me),并且Y中的每个核苷是2’-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔聚体包含5’-X-Y-Z-3’构型,其中X和Z的长度独立地为1至7个(例如,1、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和Z中的每个核苷是2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt),并且Y中的每个核苷是2’-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)包含与间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)不同的高亲和力核苷。例如,间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)可包含一个或更多个非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me),并且间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)可包含一个或更多个2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt)。在另一个实例中,间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)可包含一个或更多个非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me),并且间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)可包含一个或更多个2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt)。

[0357] 在一些实施方案中,间隔聚体包含5’-X-Y-Z-3’构型,其中X和Z的长度独立地为1至7个(例如,1、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中的每个核苷是非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me),Z中的每个核苷是2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt),并且Y中的每个核苷是2’-脱氧核糖核苷。在一些实施方案中,间隔聚体包含5’-X-Y-Z-3’构型,其中X和Z的长度独立地为1至7个(例如,1、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中的每个核苷是2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt),Z中的每个核苷是非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me),并且Y中的每个核苷是2’-脱氧核糖核苷。

[0358] 在一些实施方案中,间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)包含一个或更多个非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me)和一个或更多个2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt)。在一些实施方案中,间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)包含一个或更多个非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me)和一个或更多个2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt)。在一些实施方案中,间隔聚体的5’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的X)和间隔聚体的3’翼区(5’-X-Y-Z-3’式中的Z)二者均包含一个或更多个非双环2’-经修饰核苷(例如,2’-MOE或2’-O-Me)和一个或更多个2’-4’双环核苷(例如,LNA或cEt)。

[0359] 在一些实施方案中,间隔聚体包含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,间隔聚体包含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,间隔聚体包含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中第1、2、3、4、5、6或7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)中的至少一个位置但不是全部(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。

[0360] 在间隔聚体的5'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的X)和/或间隔聚体的3'翼区(5'-X-Y-Z-3'式中的Z)中具有非双环2'-经修饰核苷(例如,2'-MOE或2'-O-Me)和2'-4'双环核苷(例如,LNA或cEt)的混合物的间隔聚体构型的一些非限制性实例包括:

[0361] BBB-(D)n-BBBAA;KKK-(D)n-KKKAA;LLL-(D)n-LLLAA;BBB-(D)n-BBBEE;KKK-(D)n-KKKEE;LLL-(D)n-LLLEE;BBB-(D)n-BBBAA;KKK-(D)n-KKKAA;LLL-(D)n-LLLAA;BBB-(D)n-BBBEE;KKK-(D)n-KKKEE;LLL-(D)n-LLLEE;BBB-(D)n-BBBAAA;KKK-(D)n-KKKAAA;LLL-(D)n-LLLAAA;BBB-(D)n-BBBEEE;KKK-(D)n-KKKEEE;LLL-(D)n-LLLEEE;BBB-(D)n-BBBAAA;KKK-(D)n-KKKAAA;LLL-(D)n-LLLAAA;BBB-(D)n-BBBEEE;KKK-(D)n-KKKEEE;LLL-(D)n-LLLEEE;BABA-(D)n-ABAB;KAKA-(D)n-AKAK;LALA-(D)n-ALAL;BEBE-(D)n-EBEB;KEKE-(D)n-EKEK;LELE-(D)n-ELEL;BABA-(D)n-ABAB;KAKA-(D)n-AKAK;LALA-(D)n-ALAL;BEBE-(D)n-EBEB;KEKE-(D)n-EKEK;LELE-(D)n-ELEL;ABAB-(D)n-ABAB;AKAK-(D)n-AKAK;ALAL-(D)n-ALAL;EBEB-(D)n-EBEB;EKEK-(D)n-EKEK;ELEL-(D)n-ELEL;ABAB-(D)n-ABAB;AKAK-(D)n-AKAK;ALAL-(D)n-ALAL;EBEB-(D)n-EBEB;EKEK-(D)n-EKEK;ELEL-(D)n-ELEL;AABB-(D)n-BBAA;BBAA-(D)n-AABB;AAKK-(D)n-KKAA;AALL-(D)n-LLAA;EEBB-(D)n-BBEE;EEKK-(D)n-KKEE;EELL-(D)n-LLEE;AABB-(D)n-BBAA;AAKK-(D)n-KKAA;AALL-(D)n-LLAA;EEBB-(D)n-BBEE;EEKK-(D)n-KKEE;EELL-(D)n-LLEE;BBB-(D)n-BBA;KKK-(D)n-KKA;LLL-(D)n-LLA;BBB-(D)n-BBE;KKK-(D)n-KKE;LLL-(D)n-LLE;BBB-(D)n-BBA;KKK-(D)n-KKA;LLL-(D)n-LLA;BBB-(D)n-BBE;KKK-(D)n-KKE;LLL-(D)n-LLE;BBB-(D)n-BBA;KKK-(D)n-KKA;LLL-(D)n-LLA;BBB-(D)n-BBE;KKK-(D)n-KKE;LLL-(D)n-LLE;ABBB-(D)n-BBBA;AKKK-(D)n-KKKA;ALLL-(D)n-LLLA;EBBB-(D)n-BBBE;EKKK-(D)n-KKKE;ELLL-(D)n-LLLE;ABBB-(D)n-BBBA;AKKK-(D)n-KKKA;ALLL-(D)n-LLLA;EBBB-(D)n-BBBE;EKKK-(D)n-KKKE;ELLL-(D)n-LLLE;ABBB-(D)n-BBBAA;AKKK-(D)n-KKKAA;ALLL-(D)n-LLLAA;EBBB-(D)n-BBBEE;EKKK-(D)n-KKKEE;ELLL-(D)n-LLLEE;ABBB-(D)n-BBBAA;AKKK-(D)n-KKKAA;ALLL-(D)n-LLLAA;EBBB-(D)n-BBBEE;EKKK-(D)n-KKKEE;ELLL-(D)n-LLLEE;AABBB-(D)n-BBB;AAKKK-(D)n-KKK;AALLL-(D)n-LLL;EEBBB-(D)n-BBB;EEKKK-(D)n-KKK;EELLL-(D)n-LLL;AABBB-(D)n-BBB;AAKKK-(D)n-KKK;AALLL-(D)n-LLL;EEBBB-(D)n-BBB;EEKKK-(D)n-KKK;EELLL-(D)n-LLL;AABBB-(D)n-BBBA;

AAKKK-(D)n-KKKA;AALLL-(D)n-LLLA;EEBBB-(D)n-BBBE;EEKKK-(D)n-KKKE;EELLL-(D)n-LLLE;AABBB-(D)n-BBBA;AAKKK-(D)n-KKKA;AALLL-(D)n-LLLA;EEBBB-(D)n-BBBE;EEKKK-(D)n-KKKE;EELLL-(D)n-LLLE;ABBAABB-(D)n-BB;AKKAAKK-(D)n-KK;ALLAALLL-(D)n-LL;EBBEEBB-(D)n-BB;EKKEEKK-(D)n-KK;ELLEELL-(D)n-LL;ABBAABB-(D)n-BB;AKKAAKK-(D)n-KK;ALLAALL-(D)n-LL;EBBEEBB-(D)n-BB;EKKEEKK-(D)n-KK;ELLEELL-(D)n-LL;ABBABB-(D)n-BBB;AKKAKK-(D)n-KKK;ALLALLL-(D)n-LLL;EBBEBB-(D)n-BBB;EKKEKK-(D)n-KKK;ELLELL-(D)n-LLL;ABBABB-(D)n-BBB;AKKAKK-(D)n-KKK;ALLALL-(D)n-LLL;EBBEBB-(D)n-BBB;EKKEKK-(D)n-KKK;ELLELL-(D)n-LLL;EEEK-(D)n-EEEEEEEE;EEK-(D)n-EEEEEEEEE;EK-(D)n-EEEEEEEEEE;EK-(D)n-EEEKK;K-(D)n-EEEKEKE;K-(D)n-EEEKEKEE;K-(D)n-EEKEK;EK-(D)n-EEEEKEKE;EK-(D)n-EEEKEK;EEK-(D)n-KEEKE;EK-(D)n-EEKEK;EK-(D)n-KEEK;EEK-(D)n-EEEKEK;EK-(D)n-KEEEKEE;EK-(D)n-EEKEKE;EK-(D)n-EEEKEKE;和EK-(D)n-EEEEKEK。

[0362] “A”核苷酸包含2’-经修饰核苷;“B”表示2’-4’双环核苷;“K”表示约束性乙基核苷(cEt);“L”表示LNA核苷;以及“E”表示2’-MOE修饰的核糖核苷;“D”表示2’-脱氧核糖核苷;“n”表示间隔区段(5’-X-Y-Z-3’构型中的Y)的长度并且是1至20的整数。

[0363] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种间隔聚体在X、Y和Z区的每一个中包含一个或更多个经修饰核苷键联(例如,硫代磷酸酯键联)。在一些实施方案中,本文中所述的任一种间隔聚体中的每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,X、Y和Z区各自独立地包含硫代磷酸酯键联和磷酸二酯键联的混合物。在一些实施方案中,间隔区Y中的每个核苷间键联是硫代磷酸酯键联,5’翼区X包含硫代磷酸酯键联和磷酸二酯键联的混合物,并且3’翼区Z包含硫代磷酸酯键联和磷酸二酯键联的混合物。

[0364] i.RNA干扰(RNAi)

[0365] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸是小干扰RNA(small interfering RNA,siRNA),其也称为短干扰RNA或沉默RNA。siRNA是一类双链RNA分子,通常长度为约20至25个碱基对,其通过细胞中的RNA干扰(RNAi)途径靶向核酸(例如,mRNA)用于降解。siRNA分子的特异性可通过分子反义链与其靶RNA的结合来确定。有效的siRNA分子的长度通常少于30至35个碱基对,以防止通过干扰素应答触发细胞中的非特异性RNA干扰途径,尽管更长的siRNA也可能是有效的。在一些实施方案中,siRNA分子的长度为7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,35,40,45,50或更多个碱基对。在一些实施方案中,siRNA分子的长度为8至30个碱基对、长度为10至15个碱基对、长度为10至20个碱基对、长度为15至25个碱基对、长度为19至21个碱基对、长度为21至23个碱基对。在一些实施方案中,siRNA分子的长度为8至32个碱基对、长度为8至29个碱基对、长度为8至27个碱基对、长度为15至32个碱基对、长度为15至29个碱基对、长度为15至27个碱基对、长度为21至31个碱基对、长度为21至29个碱基对、长度为21至27个碱基对、长度为21至23个碱基对、长度为23至32个碱基对、长度为23至29个碱基对,或长度为23至27个碱基对。

[0366] 在选择适当的靶RNA序列之后,可使用适当的方法设计和制备包含与全部或部分靶序列互补的核苷酸序列(即反义序列)的siRNA分子(参见,例如PCT公开号WO 2004/016735;以及美国专利公开No.2004/0077574和2008/0081791)。

[0367] siRNA分子可以是双链的(即,包含反义链和互补有义链的dsRNA分子)或单链的(即,仅包含反义链的ssRNA分子)。siRNA分子可包含具有自身互补的有义链和反义链的双

链体(duplex)、非对称双链体、发夹或非对称发夹二级结构。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是包含反义链和有义链的siRNA。

[0368] 在一些实施方案中,siRNA分子的反义链的长度为7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,35,40,45,50个或更多个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为8至50个核苷酸、长度为8至40个核苷酸、长度为8至30个核苷酸、长度为10至15个核苷酸、长度为10至20个核苷酸、长度为15至25个核苷酸、长度为19至21个核苷酸、长度为21至23个核苷酸。在一些实施方案中,反义链的长度为8至32个核苷酸、长度为8至29个核苷酸、长度为8至27个核苷酸、长度为15至32个核苷酸、长度为15至29个核苷酸、长度为15至27个核苷酸、长度为21至31个核苷酸、长度为21至29个核苷酸、长度为21至27个核苷酸、长度为21至23个核苷酸、长度为23至32个核苷酸、长度为23至29个核苷酸或长度为23至27个核苷酸。

[0369] 在一些实施方案中,siRNA分子的有义链的长度为7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,35,40,45,50个或更多个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为8至50个核苷酸、长度为8至40个核苷酸、长度为8至30个核苷酸、长度为10至15个核苷酸、长度为10至20个核苷酸、长度为15至25个核苷酸、长度为19至21个核苷酸、长度为21至23个核苷酸。在一些实施方案中,有义链的长度为8至32个核苷酸、长度为8至29个核苷酸、长度为8至27个核苷酸、长度为15至32个核苷酸、长度为15至29个核苷酸、长度为15至27个核苷酸、长度为21至31个核苷酸、长度为21至29个核苷酸、长度为21至27个核苷酸、长度为21至23个核苷酸、长度为23至32个核苷酸、长度为23至29个核苷酸或长度为23至27个核苷酸。

[0370] 在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含DUX4mRNA中的靶区域之互补区。在一些实施方案中,互补区为与DUX4mRNA中的靶区域至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。在一些实施方案中,靶区域是DUX4 mRNA中的连续核苷酸的区域。在一些实施方案中,互补核苷酸序列不需要与其靶标的核苷酸序列100%互补来与靶RNA序列可特异性地杂交或对靶RNA序列具有特异性。

[0371] 在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含DUX4mRNA序列之互补区,并且该互补区的长度在8至15、8至30、8至40、或10至50、或5至50、或5至40个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,互补区的长度为5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,67,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,或50个核苷酸。在一些实施方案中,互补区与DUX4 mRNA序列的至少6个、至少7个、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、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少21个、至少22个、至少23个、至少24个、至少25个或更多个连续核苷酸互补。在一些实施方案中,与DUX4 mRNA序列的互补部分相比,互补区包含含有不超过1、2、3、4或5个碱基错配的核苷酸序列。在一些实施方案中,互补区包含在15个碱基上具有至多3个错配或在10个碱基上具有至多2个错配的核苷酸序列。

[0372] 在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含与SEQ ID NO:174至235中任一者所示的靶RNA序列互补(例如,至少85%、至少90%、至少95%或100%互补)的

核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含与SEQ ID NO:186、189至191和200中任一者所示靶RNA序列互补(例如,至少85%、至少90%、至少95%或100%互补)的核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA分子包含长度为18至25个核苷酸的反义链,并且包含SEQ ID NO:174至235中任一者所示靶RNA序列的至少15个核苷酸(例如,至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸或至少19个核苷酸)之互补区。在一些实施方案中,siRNA分子包含长度为18至25个核苷酸的反义链,并且包含SEQ ID NO:186、189至191和200中任一者所示靶RNA序列的至少15个核苷酸(例如,至少15个核苷酸、至少16个核苷酸、至少17个核苷酸、至少18个核苷酸或至少19个核苷酸)之互补区。

[0373] 在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含与SEQ ID NO:236至266中任一者中所示寡核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA分子包含反义链,所述反义链包含与SEQ ID NO:248、251至253和262中任一者中所示寡核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的核苷酸序列。在一些实施方案中,siRNA分子包含长度为18至25个核苷酸的反义链,并且包含SEQ ID NO:236至266中任一者中所示寡核苷酸的至少6个、至少7个、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、至少16个、至少17个、至少18个或至少19个连续核苷酸。在一些实施方案中,siRNA分子包含长度为18至25个核苷酸的反义链,并且包含SEQ ID NO:248、251至253和262中任一者中所示寡核苷酸的至少6个、至少7个、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、至少16个、至少17个、至少18个或至少19个连续核苷酸。

[0374] 双链siRNA可包含相同长度或不同长度的有义和反义RNA链。双链siRNA分子也可由单个寡核苷酸组装成茎-环结构,其中siRNA分子的自身互补有义和反义区通过以下连接:基于核酸或基于非核酸的接头,以及环状单链RNA,其具有两个或更多个环结构和包含自身互补有义链和反义链的茎,其中环状RNA可在体内或体外加工以产生能够介导RNAi的活性siRNA分子。因此,本文中也考虑了小发夹RNA(small hairpin RNA,shRNA)分子。除了通常由间隔区或环序列隔开的反向互补(有义)序列之外,这些分子还包含特定的反义序列。间隔区或环的切割提供了单链RNA分子及其反向互补物,使得它们可进行退火以形成dsRNA分子(任选地,具有可导致从任一或两条链的3'末端和/或(例如,和)5'末端添加或去除一个、两个、三个或更多个核苷酸的另外的加工步骤)。间隔区可具有足够的长度以允许反义和有义序列在切割间隔区(和任选地,可导致从任一或两条链的3'末端和/或(例如,和)5'末端添加或去除一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸的后续加工步骤)之前进行退火并形成双链结构(或茎)。间隔区序列可以是位于两个互补核苷酸序列区域之间的不相关核苷酸序列,当退火成双链核酸时其包含shRNA。

[0375] siRNA分子的总长度可根据所设计siRNA分子的类型在约14至约100个核苷酸内变化。通常来说,这些核苷酸中的约14至约50个与RNA靶序列互补,即构成siRNA分子的特异性反义序列。例如,当siRNA是双链或单链siRNA时,长度可在约14至约50个核苷酸内变化,而当siRNA是shRNA或环状分子时,长度可在约40个核苷酸至约100个核苷酸内变化。

[0376] siRNA分子可在分子的一个末端处包含3'突出端。另一末端可以是平末端或也具有突出端(5'或3')。当siRNA分子在分子两个末端处均包含突出端时,突出端的长度可以相同或不同。在一个实施方案中,本公开内容的siRNA分子在分子的两个末端上均包含约1至

约3个(例如,1个、2个、3个)核苷酸的3’突出端。在一些实施方案中,siRNA分子在有义链上包含约1至约3个核苷酸的3’突出端。在一些实施方案中,siRNA分子在反义链上包含约1至约3个(例如,1个、2个、3个)核苷酸的3’突出端。在一些实施方案中,siRNA分子在有义链和反义链二者上均包含约1至约3个(例如,1个、2个、3个)核苷酸的3’突出端。

[0377] 在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个经修饰核苷酸和/或(例如,和)一个或更多个经修饰核苷间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷酸是经修饰糖部分(例如,2’经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2’经修饰核苷酸,例如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-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)。在一些实施方案中,siRNA分子的每个核苷酸均是经修饰核苷酸(例如,2’-经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2’-O-甲基修饰的核苷酸。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2’-F修饰的核苷酸。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2’-O-甲基和2’-F修饰的核苷酸。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个经修饰核苷(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个经修饰核苷以及/或者(例如,以及)一个或更多个经修饰核苷间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷是经修饰糖部分(例如2’经修饰核苷)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2’经修饰核苷,例如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-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)。在一些实施方案中,siRNA分子的每个核苷是经修饰核苷酸(例如,2’-经修饰核苷)。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2’-O-甲基修饰的核苷。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2’-F修饰的核苷。在一些实施方案中,siRNA分子包含一个或更多个2’-O-甲基和2’-F修饰的核苷。

[0378] 在一些实施方案中,siRNA分子包含硫代磷酸酯或其他经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含硫代磷酸酯或其他经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含至少两个核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含至少两个核苷之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含至少两个核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含所有核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含所有核苷之间的硫代磷酸酯核苷间键联。例如,在一些实施方案中,siRNA分子在siRNA分子的5’或3’末端处的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联包含经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,siRNA分子包含所有核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联。例如,在一些实施方案中,siRNA分子在siRNA分子的5’或3’末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷酸间键联处包含经修饰的核苷酸间键联。例如,在一些实施方案中,siRNA分子在siRNA分子的5’或3’末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联处包含经修饰的核苷酸间键联。

[0379] 在一些实施方案中,经修饰的核苷酸间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,经修饰核苷间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基膦酸酯和包含3'亚烷基膦酸酯的其他烷基膦酸酯、以及手性膦酸酯、次膦酸酯、包含3'-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键联的硼烷磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物、以及其中相邻的核苷单元对连接在3'-5'到5'-3'或2'-5'到5'-2'的具有相反极性的那些;参见

[0380] 美国专利no.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0381] 本文中所述的siRNA分子的任何经修饰化学组成或形式可彼此组合。例如,同一siRNA分子内可包含一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0382] 在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个经修饰核苷酸和/或(例如,和)一个或更多个经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷酸包含经修饰糖部分(例如,2'经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个2'经修饰核苷酸,例如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-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)。在一些实施方案中,反义链的每个核苷酸均是经修饰核苷酸(例如,2'-经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个2'-O-甲基修饰的核苷酸。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个2'-F修饰的核苷酸。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个2'-O-甲基和2'-F修饰的核苷酸。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个经修饰核苷(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个经修饰核苷以及/或者(例如,以及)一个或更多个经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷包含经修饰糖部分(例如2'经修饰核苷)。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个2'经修饰核苷,例如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-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)。在一些实施方案中,反义链的每个核苷是经修饰核苷(例如,2'-经修饰核苷)。在一些实施方案中,本文中所述的反义链包含一个或更多个2'-F修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的反义链包含至少两个2'-F修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的反义链包含至少四个2'-F修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的反义链包含至少六个2'-氟(2'-F)修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的反义链包含一个或更多个2'-O-甲基修饰的核苷。在一些实施方案中,反义链包含一个或更多个2'-O-甲基和2'-F修饰的核苷。

[0383] 在一些实施方案中,反义链包含硫代磷酸酯或其他经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,反义链包含硫代磷酸酯或其他经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,反

义链包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链包含硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,反义链包含至少两个核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链包含至少两个核苷之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链包含至少两个核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,反义链包含所有核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链包含所有核苷之间的硫代磷酸核苷间键联。例如,在一些实施方案中,反义链在siRNA分子的5’或3’末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联处包含经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,反义链3’末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链包含所有核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联。例如,在一些实施方案中,反义链在siRNA分子的5’或3’末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷酸间键联处包含经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,反义链3’末端处的两个核苷酸间键联是硫代磷酸酯核苷酸间键联。例如,在一些实施方案中,反义链在siRNA分子的5’或3’末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联处包含经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,反义链3’末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0384] 在一些实施方案中,经修饰的核苷酸间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,经修饰的核苷间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基膦酸酯和包含3’亚烷基膦酸酯的其他烷基膦酸酯、以及手性膦酸酯、次膦酸酯、包含3’-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3’-5’键联的硼烷磷酸酯、这些的2’-5’连接类似物、以及其中相邻的核苷单元对连接在3’-5’到5’-3’或2’-5’到5’-2’的具有相反极性的那些;参见

[0385] 美国专利no.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0386] 本文中所述的反义链的任何经修饰化学组成或形式可彼此组合。例如,同一反义链内可包含一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0387] 在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个经修饰核苷酸和/或(例如,和)一个或更多个经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷酸包含经修饰糖部分(例如,2’经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个2’经修饰核苷酸,例如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-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)。在一些实施方案中,有义链的每个核苷酸均是经修饰核苷酸(例如,2’-经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个经修饰的核苷(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个经修饰核苷酸以及/或者(例如,以及)一个或更多个经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,经修饰核苷包含经修饰糖部分(例如2’经修饰核苷)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个2’经修饰核苷,例如

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-二甲基氨基乙氧基乙基(2’-O-DMAEOE)或2’-O-N-甲基乙酰胺基(2’-O-NMA)。在一些实施方案中,有义链的每个核苷是经修饰核苷(例如,2’-经修饰核苷)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个磷酸二酰胺吗啉代。在一些实施方案中,有义链是磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(PMO)。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个2’-O-甲基修饰的核苷酸。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个2’-F修饰的核苷酸。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个2’-O-甲基和2’-F修饰的核苷酸。

[0388] 在一些实施方案中,本文中所述的有义链包含一个或更多个2’-F修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的有义链包含至少两个2’-F修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的有义链包含至少四个2’-F修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的有义链包含至少六个2’-F修饰的核苷。在一些实施方案中,本文中所述的有义链包含一个或更多个2’-O-甲基修饰的核苷。在一些实施方案中,有义链包含一个或更多个2’-O-甲基和2’-F修饰的核苷。

[0389] 在一些实施方案中,有义链包含硫代磷酸酯或其他经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,有义链包含硫代磷酸酯或其他经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,有义链包含至少两个核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含至少两个核苷之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含至少两个核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联。在一些实施方案中,有义链包含所有核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含所有核苷之间的硫代磷酸酯核苷间键联。例如,在一些实施方案中,有义链在有义链5’或3’末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联处包含经修饰的核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含所有核苷酸之间的硫代磷酸酯核苷酸间键联。例如,在一些实施方案中,有义链在有义链5’或3’末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷酸间键联处包含经修饰的核苷酸间键联。例如,在一些实施方案中,有义链在有义链5’或3’末端的第一、第二和/或(例如,和)第三核苷间键联处包含经修饰的核苷酸间键联。在一些实施方案中,有义链包含磷酸二酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链不包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,经修饰的核苷酸间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,经修饰的核苷间键联是含磷的键联。在一些实施方案中,可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基膦酸酯和包含3’亚烷基膦酸酯的其他烷基膦酸酯、以及手性膦酸酯、次膦酸酯、包含3’-氨基磷酰胺酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3’-5’键联的硼烷磷酸酯、这些的2’-5’连接类似物、以及其中相邻的核苷单元对连接在3’-5’到5’-3’或2’-5’到5’-2’的具有相反极性的那些;参见美国专利

[0390] 3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0391] 本文中所述的有义链的任何经修饰化学组成或形式可彼此组合。例如,同一有义链内可包含一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0392] 在一些实施方案中,siRNA分子的反义链或有义链包含增强或降低RNA诱导沉默复合物(RISC)负载的修饰。在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含增强RISC负载的修饰。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链包含降低RISC负载并降低脱靶效应的修饰。在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)修饰。在切割位点处添加2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)基团通过促进经修饰链的定向RNA诱导沉默复合物(RISC)负载改善了siRNA的特异性和沉默活性二者,如Song et al.,(2017)Mol Ther Nucleic Acids 9:242-250中所述,其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含提高RISC负载的2'-OMe-二硫代磷酸酯修饰,如Wu et al.,(2014)Nat Commun5:3459中所述,其通过引用整体并入本文。

[0393] 在一些实施方案中,siRNA分子的有义链包含5'-吗啉代,其降低有义链的RISC负载并改善反义链选择和RNAi活性,如Kumar et al.,(2019)Chem Commun(Camb)55(35):5139-5142中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链是用合成的RNA样高亲和力核苷酸类似物锁核酸(LNA)来修饰的,其降低有义链的RISC负载并进一步增强反义链并入到RISC中,如Elman et al.,(2005)Nucleic Acids Res.33(1):439-447中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链包含5'解锁核酸(unlocked nucleic acid,UNA)修饰,其降低有义链的RISC负载并改善反义链的沉默效力,如Snead et al.,(2013)Mol Ther Nucleic Acids 2(7):e103中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链包含5-硝基吲哚修饰,其降低有义链的RNAi效力并降低脱靶效应,如Zhang et al.,(2012)Chembiochem 13(13):1940-1945中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,有义链包含2'-O'甲基(2'-O-Me)修饰,其降低有义链的RISC负载和脱靶效应,如Zheng et al.,FASEB(2013)27(10):4017-4026中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的有义链被吗啉代、2'-MOE或2'-O-Me残基完全替换并且不被RISC识别,如Kole et al.,(2012)Nature reviews.Drug Discovery11(2):125-140中所述,该文献通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,siRNA分子的反义链包含2'-MOE修饰并且有义链包含2'-O-Me修饰(参见例如,Song et al.,(2017)Mol Ther Nucleic Acids 9:242-250)。在一些实施方案中,至少一个(例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个)siRNA分子与肌肉靶向剂(例如,共价)连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可包含以下或者由以下组成:核酸(例如,DNA或RNA)、肽(例如,抗体)、脂质(例如,微囊泡)或糖部分(例如,多糖)。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是抗体。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是抗转铁蛋白受体抗体(例如,表2至7中提供的任一种抗TfR1抗体)。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子有义链的5'末端连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子有义链的5'末端共价连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子有义链的3'末端连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子有义链的3'末端共价连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的有义链内部连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的有义链内部共价连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的反义链的5'末端连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的反义链的5'末端共价连接。在一些实施方

案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的反义链的3’末端连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的反义链的3’末端共价连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的反义链内部连接。在一些实施方案中,肌肉靶向剂可与siRNA分子的反义链内部共价连接。

[0394] 本文中所述siRNA的一些非限制性实例在表8中提供。

[0395] 表8.siRNA的非限制性实例††

[0396]

siRNA编号	靶标起始位置^	靶序列	有义链 (5’-3’)	SEQ ID NO	反义链 (5’-3’)	SEQ ID NO
1	192	GATTTGGTTTCAGAATGAGA (SEQ ID NO: 174)	未经修饰：GAUUUGGUUUCAGAAUGAGAA	205	未经修饰：UUCUCAUUCUGAAACCAAAUCUG	236
			经修饰 (MS3-205): mG*mA*mUmUfUmGmGmUfUfUfCmAmGfAmAmUmGmAfGmAmA		经修饰 (MAS3-236): fU*fU*mCmUmCmAmUmUmCmUmGmAmAfAmCmCmAmAmAmUmC*mU*mG	
2	192	GATTTGGTTTCAGAATGAGA (SEQ ID NO: 174)	未经修饰：GAUUUGGUUUCAGAAUGAGAA	205	未经修饰：UUCUCAUUCUGAAACCAAAUCUG	236
			经修饰 (MS4-205): mG*mA*mUmUmUmGfGmUfUfUfCmAmGmAmAmUmGmAmGmAmA		经修饰 (MAS4-236): fU*fU*mCmUmCfAmUfUfCmUmGmAmAfAmCfCmAmAmAmUmC*mU*mG	
3	192	GATTTGGTTTCAGAATG	未经修饰：GAUUUGGUUUCAGA	205	未经修饰：UUCUCAUUCUGAAACC	236

[0397]

		AGA (SEQ ID NO: 174)	AUGAGAA 经修饰 (MS6-205): mG*mA*mUmUmUmGfGmUfUfUfCmAmGmAmAfUmGmAfGmAmA		AAAUCUG 经修饰 (MAS4-236): fU*fU*mCmUmCfAmUfUfCmUmGmAmAfAmCfCmAmAmAmUmC*mU*mG	
4	192	GATTTGGTTTCAGAATGAGA (SEQ ID NO: 174)	未经修饰：GAUUUGGUUUCAGAAUGAGAA 经修饰 (MS5-205): mG*mA*mUmUmUmGfGmUfUfUfCmAmGmAmAfUfGmAmGmAmA	205	未经修饰：UUCUCAUUCUGAAACCAAAUCUG 经修饰 (MAS2-236): fU*fU*mCmUmCfAmUmUmCmUmGmAmAfAmCfCmAmAmAmUmC*mU*mG	236
5	192	GATTTGGTTTCAGAATGAGA (SEQ ID NO: 174)	未经修饰：GAUUUGGUUUCAGAAUGAGAA 经修饰 (MS4-205): mG*mA*mUmUmUmGfGmUfUfUfCmAmGmAmAmUmGmAmGmAmA	205	未经修饰：UUCUCAUUCUGAAACCAAAUCUG 经修饰 (MAS2-236): fU*fU*mCmUmCfAmUmUmCmUmGmAmAfAmCfCmAmAmAmUmC*mU*mG	236
6	192	GATTTGGTTTCAGAATGAGA (SEQ ID NO: 174)	未经修饰：GAUUUGGUUUCAGAAUGAGAA 经修饰 (MS1-205): mG*mA*fUmUfUmGfGmUfUmUfCmAfGmAfAmUfGmAfGmAfA	205	未经修饰：UUCUCAUUCUGAAACCAAAUCUG 经修饰 (MAS1-236): fU*fU*mCfUmCfAmUfUmCfUmGfAmAfAmCfCmAfAmAfUmC*fU*mG	236
7	337	TTTGAGAAGGATCGCTTTCC (SEQ ID NO: 175)	未经修饰：UUUGAGAAGGAUCGCUUUCCA 经修饰 (MS3-206): mU*mU*mUmGfAmGmAmAfGfGfAmUmCfGmCmUmUmUfCmCmA	206	未经修饰：UGGAAAGCGAUCCUUCUCAAAGG 经修饰 (MAS3-237): fU*fG*mGmAmAmAmGmCmGmAmUmCmCfUmUmCmUmCmAmAmA*mG*mG	237
8	337	TTTGAGAAGGATCGCTTTCC (SEQ ID NO: 175)	未经修饰：UUUGAGAAGGAUCGCUUUCCA 经修饰 (MS4-206): mU*mU*mUmGmAmGfAmAfGfGfAmUmCmGmCmUmUmUmCmCmA	206	未经修饰：UGGAAAGCGAUCCUUCUCAAAGG 经修饰 (MAS4-237): fU*fG*mGmAmAfAmGfCfGmAmUmCmCfUmUfCmUmCmAmAmA*mG*mG	237
9	337	TTTGAGAAGGATCGCTTTCC (SEQ ID NO: 175)	未经修饰：UUUGAGAAGGAUCGCUUUCCA 经修饰 (MS6-206): mU*mU*mUmGmAmGfAmAfGfGfAmUmCmGmCfUmUmUfCmCmA	206	未经修饰：UGGAAAGCGAUCCUUCUCAAAGG 经修饰 (MAS4-237): fU*fG*mGmAmAfAmGfCfGmAmUmCmCfUmUfCmUmCmAmAmA*mG*mG	237
10	337	TTTGAGAAGGATCGCTTTCC (SEQ ID NO: 175)	未经修饰：UUUGAGAAGGAUCGCUUUCCA 经修饰 (MS5-206): mU*mU*mUmGmAmGfAmAfGfGfAmUmCmGmCfUfUmUmCmCmA	206	未经修饰：UGGAAAGCGAUCCUUCUCAAAGG 经修饰 (MAS2-237): fU*fG*mGmAmAfAmGmCmGmAmUmCmCfUmUfCmUmCmAmAmA*mG*mG	237
11	337	TTTGAGAAGGATCGCTTTCC (SEQ ID	未经修饰：UUUGAGAAGGAUCGCUUUCCA	206	未经修饰：UGGAAAGCGAUCCUUCUCAAAGG	237

[0398]

		NO: 175)	经修饰 (MS4-206): mU*mU*mUmGmAmGfAmAfGfGfAmUmCmGmCmUmUmUmCmCmA		经修饰 (MAS2-237): fU*fG*mGmAmAfAmGmCmGmAmUmCmCfUmUfCmUmCmAmAmA*mG*mG	
12	337	TTTGAGAAGGATCGCTTTCC (SEQ ID NO: 175)	未经修饰 : UUUGAGAAGGAUCGCUUUCCA 经修饰 (MS1-206): mU*mU*fUmGfAmGfAmAfGmGfAmUfCmGfCmUfUmUfCmCfA	206	未经修饰 : UGGAAAGCGAUCCUUCUCAAAGG 经修饰 (MAS1-237): fU*fG*mGfAmAfAmGfCmGfAmUfCmCfUmUfCmUfCmAfAmA*fG*mG	237
13	1234	CTCAGCGAGGAAGAATACCG (SEQ ID NO: 176)	未经修饰 : CUCAGCGAGGAAGAAUACCGA 经修饰 (MS3-207): mC*mU*mCmAfGmCmGmAfGfGfAmAmGfAmAmUmAmCfCmGmA	207	未经修饰 : UCGGUAUUCUUCCUCGCUGAGGG 经修饰 (MAS3-238): fU*fC*mGmGmUmAmUmUmCmUmUmCmCfUmCmGmCmUmGmAmG*mG*mG	238
14	1234	CTCAGCGAGGAAGAATACCG (SEQ ID NO: 176)	未经修饰 : CUCAGCGAGGAAGAAUACCGA 经修饰 (MS4-207): mC*mU*mCmAmGmCfGmAfGfGfAmAmGmAmAmUmAmCmCmGmA	207	未经修饰 : UCGGUAUUCUUCCUCGCUGAGGG 经修饰 (MAS4-238): fU*fC*mGmGmUfAmUfUfCmUmUmCmCfUmCfGmCmUmGmAmG*mG*mG	238
15	1234	CTCAGCGAGGAAGAATACCG (SEQ ID NO: 176)	未经修饰 : CUCAGCGAGGAAGAAUACCGA 经修饰 (MS6-207): mC*mU*mCmAmGmCfGmAfGfGfAmAmGmAmAfUmAmCfCmGmA	207	未经修饰 : UCGGUAUUCUUCCUCGCUGAGGG 经修饰 (MAS 4-238): fU*fC*mGmGmUfAmUfUfCmUmUmCmCfUmCfGmCmUmGmAmG*mG*mG	238
16	1234	CTCAGCGAGGAAGAATACCG (SEQ ID NO: 176)	未经修饰 : CUCAGCGAGGAAGAAUACCGA 经修饰 (MS5-207): mC*mU*mCmAmGmCfGmAfGfGfAmAmGmAmAfUfAmCmCmGmA	207	未经修饰 : UCGGUAUUCUUCCUCGCUGAGGG 经修饰 (MAS2-238): fU*fC*mGmGmUfAmUmUmCmUmUmCmCfUmCfGmCmUmGmAmG*mG*mG	238
17	1234	CTCAGCGAGGAAGAATACCG (SEQ ID NO: 176)	未经修饰 : CUCAGCGAGGAAGAAUACCGA 经修饰 (MS4-207): mC*mU*mCmAmGmCfGmAfGfGfAmAmGmAmAmUmAmCmCmGmA	207	未经修饰 : UCGGUAUUCUUCCUCGCUGAGGG 经修饰 (MAS2-238): fU*fC*mGmGmUfAmUmUmCmUmUmCmCfUmCfGmCmUmGmAmG*mG*mG	238
18	1234	CTCAGCGAGGAAGAATACCG (SEQ ID NO: 176)	未经修饰 : CUCAGCGAGGAAGAAUACCGA 经修饰 (MS1-207): mC*mU*fCmAfGmCfGmAfGmGfAmAfGmAfAmUfAmCfCmGfA	207	未经修饰 : UCGGUAUUCUUCCUCGCUGAGGG 经修饰 (MAS1-238): fU*fC*mGfGmUfAmUfUmCfUmUfCmCfUmCfGmCfUmGfAmG*fG*mG	238
19	1568	TGCCCTTGTTCTTCCGTGAA (SEQ ID NO: 177)	未经修饰 : UGCCCUUGUUCUUCCGUGAAA 经修饰 (MS3-208):	208	未经修饰 : UUUCACGGAAGAACAAGGGCACA 经修饰 (MAS3-239):	239

[0399]

			mU*mG*mCmCfCmUmUmGfUfUfCmUmUfCmCmGmUmGfAmAmA		fU*fU*mUmCmAmCmGmGmAmAmGmAmAfCmAmAmGmGmGmCmA*mC*mA	
20	1568	TGCCCTTGTTCTTCCGTGAA (SEQ ID NO: 177)	未经修饰：UGCCCUUGUUCUUCCGUGAAA 经修饰 (MS4-208): mU*mG*mCmCmCmUfUmGfUfUfCmUmUmCmCmGmUmGmAmAmA	208	未经修饰：UUUCACGGAAGAACAAGGGCACA 经修饰 (MAS4-239): fU*fU*mUmCmAfCmGfGfAmAmGmAmAfCmAfAmGmGmGmCmA*mC*mA	239
21	1568	TGCCCTTGTTCTTCCGTGAA (SEQ ID NO: 177)	未经修饰：UGCCCUUGUUCUUCCGUGAAA 经修饰 (MS6-208): mU*mG*mCmCmCmUfUmGfUfUfCmUmUmCmCfGmUmGfAmAmA	208	未经修饰：UUUCACGGAAGAACAAGGGCACA 经修饰 (MAS4-239): fU*fU*mUmCmAfCmGfGfAmAmGmAmAfCmAfAmGmGmGmCmA*mC*mA	239
22	1568	TGCCCTTGTTCTTCCGTGAA (SEQ ID NO: 177)	未经修饰：UGCCCUUGUUCUUCCGUGAAA 经修饰 (MS5-208): mU*mG*mCmCmCmUfUmGfUfUfCmUmUmCmCfGfUmGmAmAmA	208	未经修饰：UUUCACGGAAGAACAAGGGCACA 经修饰 (MAS2-239): fU*fU*mUmCmAfCmGmGmAmAmGmAmAfCmAfAmGmGmGmCmA*mC*mA	239
23	1568	TGCCCTTGTTCTTCCGTGAA (SEQ ID NO: 177)	未经修饰：UGCCCUUGUUCUUCCGUGAAA 经修饰 (MS4-208): mU*mG*mCmCmCmUfUmGfUfUfCmUmUmCmCmGmUmGmAmAmA	208	未经修饰：UUUCACGGAAGAACAAGGGCACA 经修饰 (MAS2-239): fU*fU*mUmCmAfCmGmGmAmAmGmAmAfCmAfAmGmGmGmCmA*mC*mA	239
24	1568	TGCCCTTGTTCTTCCGTGAA (SEQ ID NO: 177)	未经修饰：UGCCCUUGUUCUUCCGUGAAA 经修饰 (MS2-208): mU*mG*mCmCfCmUfUmGfUfUfCmUmUmCmCfGmUmGmAmAmA	208	未经修饰：UUUCACGGAAGAACAAGGGCACA 经修饰 (MAS4-239): fU*fU*mUmCmAfCmGfGfAmAmGmAmAfCmAfAmGmGmGmCmA*mC*mA	239
25	1654	TCCTGGATGATTAGTTCAGA (SEQ ID NO: 178)	未经修饰：UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAA 经修饰 (MS3-209): mU*mC*mCmUfGmGmAmUfGfAfUmUmAfGmUmUmCmAfGmAmA	209	未经修饰：UUCUGAACUAAUCAUCCAGGAGA 经修饰 (MAS3-240): fU*fU*mCmUmGmAmAmCmUmAmAmUmCfAmUmCmCmAmGmGmA*mG*mA	240
26	1654	TCCTGGATGATTAGTTCAGA (SEQ ID NO: 178)	未经修饰：UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAA 经修饰 (MS4-209): mU*mC*mCmUmGmGfAmUfGfAfUmUmAmGmUmUmCmAmGmAmA	209	未经修饰：UUCUGAACUAAUCAUCCAGGAGA 经修饰 (MAS4-240): fU*fU*mCmUmGfAmAfCfUmAmAmUmCfAmUfCmCmAmGmGmA*mG*mA	240
27	1654	TCCTGGATGATTAGTTCAGA (SEQ ID NO: 178)	未经修饰：UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAA 经修饰 (MS6-209): mU*mC*mCmUmGmGf	209	未经修饰：UUCUGAACUAAUCAUCCAGGAGA 经修饰 (MAS4-240): fU*fU*mCmUmGfAmAfCf	240

[0400]

			AmUfGfAfUmUmAmGmUfUmCmAfGmAmA		UmAmAmUmCfAmUfCmCmAmGmGmA*mG*mA	
28	1654	TCCTGGATGATTAGTTCAGA (SEQ ID NO: 178)	未经修饰：UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAA 经修饰 (MS5-209): mU*mC*mCmUmGmGfAmUfGfAfUmUmAmGmUfUfCmAmGmAmA	209	未经修饰：UUCUGAACUAAUCAUCCAGGAGA 经修饰 (MAS2-240): fU*fU*mCmUmGfAmAmCmUmAmAmUmCfAmUfCmCmAmGmGmA*mG*mA	240
29	1654	TCCTGGATGATTAGTTCAGA (SEQ ID NO: 178)	未经修饰：UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAA 经修饰 (MS4-209): mU*mC*mCmUmGmGfAmUfGfAfUmUmAmGmUmUmCmAmGmAmA	209	未经修饰：UUCUGAACUAAUCAUCCAGGAGA 经修饰 (MAS2-240): fU*fU*mCmUmGfAmAmCmUmAmAmUmCfAmUfCmCmAmGmGmA*mG*mA	240
30	1654	TCCTGGATGATTAGTTCAGA (SEQ ID NO: 178)	未经修饰：UCCUGGAUGAUUAGUUCAGAA 经修饰 (MS2-209): mU*mC*mCmUfGmGfAmUfGfAfUmUmAmGmUfUmCmAmGmAmA	209	未经修饰：UUCUGAACUAAUCAUCCAGGAGA 经修饰 (MAS4-240): fU*fU*mCmUmGfAmAfCfUmAmAmUmCfAmUfCmCmAmGmGmA*mG*mA	240
31	1624	GTCTAGGCAAACCTGGATTA (SEQ ID NO: 179)	未经修饰：GUCUAGGCAAACCUGGAUUAA 经修饰 (MS3-210): mG*mU*mCmUfAmGmGmCfAfAfAmCmCfUmGmGmAmUfUmAmA	210	未经修饰：UUAAUCCAGGUUUGCCUAGACAG 经修饰 (MAS3-241): fU*fU*mAmAmUmCmCmAmGmGmUmUmUfGmCmCmUmAmGmAmC*mA*mG	241
32	1624	GTCTAGGCAAACCTGGATTA (SEQ ID NO: 179)	未经修饰：GUCUAGGCAAACCUGGAUUAA 经修饰 (MS4-210): mG*mU*mCmUmAmGfGmCfAfAfAmCmCmUmGmGmAmUmUmAmA	210	未经修饰：UUAAUCCAGGUUUGCCUAGACAG 经修饰 (MAS4-241): fU*fU*mAmAmUfCmCfAfGmGmUmUmUfGmCfCmUmAmGmAmC*mA*mG	241
33	1624	GTCTAGGCAAACCTGGATTA (SEQ ID NO: 179)	未经修饰：GUCUAGGCAAACCUGGAUUAA 经修饰 (MS6-210): mG*mU*mCmUmAmGfGmCfAfAfAmCmCmUmGfGmAmUfUmAmA	210	未经修饰：UUAAUCCAGGUUUGCCUAGACAG 经修饰 (MAS4-241): fU*fU*mAmAmUfCmCfAfGmGmUmUmUfGmCfCmUmAmGmAmC*mA*mG	241
34	1624	GTCTAGGCAAACCTGGATTA (SEQ ID NO: 179)	未经修饰：GUCUAGGCAAACCUGGAUUAA Modified (MS5-210): mG*mU*mCmUmAmGfGmCfAfAfAmCmCmUmGfGfAmUmUmAmA	210	未经修饰：UUAAUCCAGGUUUGCCUAGACAG Modified (MAS2-241): fU*fU*mAmAmUfCmCmAmGmGmUmUmUfGmCfCmUmAmGmAmC*mA*mG	241
35	1624	GTCTAGGCAAACCTGGATTA (SEQ ID NO: 179)	未经修饰：GUCUAGGCAAACCUGGAUUAA 经修饰 (MS4-210): mG*mU*mCmUmAmGfGmCfAfAfAmCmCmUm	210	未经修饰：UUAAUCCAGGUUUGCCUAGACAG 经修饰 (MAS2-241): fU*fU*mAmAmUfCmCmAmGmGmUmUmUfGmCf	241

[0401]

			GmGmAmUmUmAmA		CmUmAmGmAmC*mA*mG	
36	1624	GTCTAGGCAAACCTGGATTA (SEQ ID NO: 179)	未经修饰：GUCUAGGCAAACCUGGAUUAA 经修饰 (MS2-210): mG*mU*mCmUfAmGfGmCfAfAfAmCmCmUmGfGmAmUmUmAmA	210	未经修饰：UUAAUCCAGGUUUGCCUAGACAG 经修饰 (MAS4-241): fU*fU*mAmAmUfCmCfAfGmGmUmUmUfGmCfCmUmAmGmAmC*mA*mG	241
37	1619	ACGCTGTCTAGGCAAACCTG (SEQ ID NO: 180)	未经修饰：ACGCUGUCUAGGCAAACCUGA 经修饰 (MS3-211): mA*mC*mGmCfUmGmUmCfUfAfGmGmCfAmAmAmCmCfUmGmA	211	未经修饰：UCAGGUUUGCCUAGACAGCGUCG 经修饰 (MAS3-242): fU*fC*mAmGmGmUmUmUmGmCmCmUmAfGmAmCmAmGmCmGmU*mC*mG	242
38	1619	ACGCTGTCTAGGCAAACCTG (SEQ ID NO: 180)	未经修饰：ACGCUGUCUAGGCAAACCUGA 经修饰 (MS4-211): mA*mC*mGmCmUmGfUmCfUfAfGmGmCmAmAmAmCmCmUmGmA	211	未经修饰：UCAGGUUUGCCUAGACAGCGUCG 经修饰 (MAS4-242): fU*fC*mAmGmGfUmUfUfGmCmCmUmAfGmAfCmAmGmCmGmU*mC*mG	242
39	1619	ACGCTGTCTAGGCAAACCTG (SEQ ID NO: 180)	未经修饰：ACGCUGUCUAGGCAAACCUGA 经修饰 (MS6-211): mA*mC*mGmCmUmGfUmCfUfAfGmGmCmAmAfAmCmCfUmGmA	211	未经修饰：UCAGGUUUGCCUAGACAGCGUCG 经修饰 (MAS4-242): fU*fC*mAmGmGfUmUfUfGmCmCmUmAfGmAfCmAmGmCmGmU*mC*mG	242
40	1619	ACGCTGTCTAGGCAAACCTG (SEQ ID NO: 180)	未经修饰：ACGCUGUCUAGGCAAACCUGA 经修饰 (MS5-211): mA*mC*mGmCmUmGfUmCfUfAfGmGmCmAmAfAfCmCmUmGmA	211	未经修饰：UCAGGUUUGCCUAGACAGCGUCG 经修饰 (MAS2-242): fU*fC*mAmGmGfUmUmUmGmCmCmUmAfGmAfCmAmGmCmGmU*mC*mG	242
41	1619	ACGCTGTCTAGGCAAACCTG (SEQ ID NO: 180)	未经修饰：ACGCUGUCUAGGCAAACCUGA 经修饰 (MS4-211): mA*mC*mGmCmUmGfUmCfUfAfGmGmCmAmAmAmCmCmUmGmA	211	未经修饰：UCAGGUUUGCCUAGACAGCGUCG 经修饰 (MAS2-242): fU*fC*mAmGmGfUmUmUmGmCmCmUmAfGmAfCmAmGmCmGmU*mC*mG	242
42	1619	ACGCTGTCTAGGCAAACCTG (SEQ ID NO: 180)	未经修饰：ACGCUGUCUAGGCAAACCUGA 经修饰 (MS2-211): mA*mC*mGmCfUmGfUmCfUfAfGmGmCmAmAfAmCmCmUmGmA	211	未经修饰：UCAGGUUUGCCUAGACAGCGUCG 经修饰 (MAS4-242): fU*fC*mAmGmGfUmUfUfGmCmCmUmAfGmAfCmAmGmCmGmU*mC*mG	242
43	1651	ATCTCCTGGATGATTAGTTC (SEQ ID NO: 181)	未经修饰：AUCUCCUGGAUGAUUAGUUCA 经修饰 (MS3-212): mA*mU*mCmUfCmCmUmGfGfAfUmGmAfUmUmAmGmUfUmCmA	212	未经修饰：UGAACUAAUCAUCCAGGAGAUGU 经修饰 (MAS3-243): fU*fG*mAmAmCmUmAmAmUmCmAmUmCfCmAmGmGmAmGmAmU*mG*m	243

[0402]

					U	
44	1651	ATCTCCTGGATGATTAGTTC (SEQ ID NO: 181)	未经修饰：AUCUCCUGGAUGAUUAGUUCA 经修饰 (MS4-212): mA*mU*mCmUmCmCfUmGfGfAfUmGmAmUmUmAmGmUmUmCmA	212	未经修饰：UGAACUAAUCAUCCAGGAGAUGU 经修饰 (MAS4-243): fU*fG*mAmAmCfUmAfAfUmCmAmUmCfCmAfGmGmAmGmAmU*mG*mU	243
45	1651	ATCTCCTGGATGATTAGTTC (SEQ ID NO: 181)	未经修饰：AUCUCCUGGAUGAUUAGUUCA 经修饰 (MS6-212): mA*mU*mCmUmCmCfUmGfGfAfUmGmAmUmUfAmGmUfUmCmA	212	未经修饰：UGAACUAAUCAUCCAGGAGAUGU 经修饰 (MAS4-243): fU*fG*mAmAmCfUmAfAfUmCmAmUmCfCmAfGmGmAmGmAmU*mG*mU	243
46	1651	ATCTCCTGGATGATTAGTTC (SEQ ID NO: 181)	未经修饰：AUCUCCUGGAUGAUUAGUUCA 经修饰 (MS5-212): mA*mU*mCmUmCmCfUmGfGfAfUmGmAmUmUfAfGmUmUmCmA	212	未经修饰：UGAACUAAUCAUCCAGGAGAUGU 经修饰 (MAS2-243): fU*fG*mAmAmCfUmAmAmUmCmAmUmCfCmAfGmGmAmGmAmU*mG*mU	243
47	1651	ATCTCCTGGATGATTAGTTC (SEQ ID NO: 181)	未经修饰：AUCUCCUGGAUGAUUAGUUCA 经修饰 (MS4-212): mA*mU*mCmUmCmCfUmGfGfAfUmGmAmUmUmAmGmUmUmCmA	212	未经修饰：UGAACUAAUCAUCCAGGAGAUGU 经修饰 (MAS2-243): fU*fG*mAmAmCfUmAmAmUmCmAmUmCfCmAfGmGmAmGmAmU*mG*mU	243
48	1651	ATCTCCTGGATGATTAGTTC (SEQ ID NO: 181)	未经修饰：AUCUCCUGGAUGAUUAGUUCA 经修饰 (MS2-212): mA*mU*mCmUfCmCfUmGfGfAfUmGmAmUmUfAmGmUmUmCmA	212	未经修饰：UGAACUAAUCAUCCAGGAGAUGU 经修饰 (MAS4-243): fU*fG*mAmAmCfUmAfAfUmCmAmUmCfCmAfGmGmAmGmAmU*mG*mU	243
49	1565	CTGTGCCCTTGTTCTTCCGT (SEQ ID NO: 182)	未经修饰：CUGUGCCCUUGUUCUUCCGUA 经修饰 (MS3-213): mC*mU*mGmUfGmCmCmCfUfUfGmUmUfCmUmUmCmCfGmUmA	213	未经修饰：UACGGAAGAACAAGGGCACAGAG 经修饰 (MAS3-244): fU*fA*mCmGmGmAmAmGmAmAmCmAmAfGmGmGmCmAmCmAmG*mA*mG	244
50	1565	CTGTGCCCTTGTTCTTCCGT (SEQ ID NO: 182)	未经修饰：CUGUGCCCUUGUUCUUCCGUA 经修饰 (MS4-213): mC*mU*mGmUmGmCfCmCfUfUfGmUmUmCmUmUmCmCmGmUmA	213	未经修饰：UACGGAAGAACAAGGGCACAGAG 经修饰 (MAS4-244): fU*fA*mCmGmGfAmAfGfAmAmCmAmAfGmGfGmCmAmCmAmG*mA*mG	244
51	1565	CTGTGCCCTTGTTCTTCCGT (SEQ ID NO: 182)	未经修饰：CUGUGCCCUUGUUCUUCCGUA 经修饰 (MS6-213): mC*mU*mGmUmGmCfCmCfUfUfGmUmUmCmUfUmCmCfGmUmA	213	未经修饰：UACGGAAGAACAAGGGCACAGAG 经修饰 (MAS4-244): fU*fA*mCmGmGfAmAfGfAmAmCmAmAfGmGfGmCmAmCmAmG*mA*mG	244
52	1565	CTGTGCCCT	未经修饰：	213	未经修饰：	244

[0403]

		TGTTCTTCCGT (SEQ ID NO: 182)	CUGUGCCCUUGUUCUUCCGUA 经修饰 (MS5-213): mC*mU*mGmUmGmCfCmCfUfUfGmUmUmCmUfUfCmCmGmUmA		UACGGAAGAACAAGGGCACAGAG 经修饰 (MAS2-244): fU*fA*mCmGmGfAmAmGmAmAmCmAmAfGmGfGmCmAmCmAmG*mA*mG	
53	1565	CTGTGCCCTTGTTCTTCCGT (SEQ ID NO: 182)	未经修饰：CUGUGCCCUUGUUCUUCCGUA 经修饰 (MS4-213): mC*mU*mGmUmGmCfCmCfUfUfGmUmUmCmUmUmCmCmGmUmA	213	未经修饰：UACGGAAGAACAAGGGCACAGAG 经修饰 (MAS2-244): fU*fA*mCmGmGfAmAmGmAmAmCmAmAfGmGfGmCmAmCmAmG*mA*mG	244
54	1565	CTGTGCCCTTGTTCTTCCGT (SEQ ID NO: 182)	未经修饰：CUGUGCCCUUGUUCUUCCGUA 经修饰 (MS2-213): mC*mU*mGmUfGmCfCmCfUfUfGmUmUmCmUfUmCmCmGmUmA	213	未经修饰：UACGGAAGAACAAGGGCACAGAG 经修饰 (MAS4-244): fU*fA*mCmGmGfAmAfGfAmAmCmAmAfGmGfGmCmAmCmAmG*mA*mG	244
55	1656	CTGGATGATTAGTTCAGAGA (SEQ ID NO: 183)	未经修饰：CUGGAUGAUUAGUUCAGAGAA 经修饰 (MS3-214): mC*mU*mGmGfAmUmGmAfUfUfAmGmUfUmCmAmGmAfGmAmA	214	未经修饰：UUCUCUGAACUAAUCAUCCAGGA 经修饰 (MAS3-245): fU*fU*mCmUmCmUmGmAmAmCmUmAmAfUmCmAmUmCmCmAmG*mG*mA	245
56	1656	CTGGATGATTAGTTCAGAGA (SEQ ID NO: 183)	未经修饰：CUGGAUGAUUAGUUCAGAGAA 经修饰 (MS4-214): mC*mU*mGmGmAmUfGmAfUfUfAmGmUmUmCmAmGmAmGmAmA	214	未经修饰：UUCUCUGAACUAAUCAUCCAGGA 经修饰 (MAS4-245): fU*fU*mCmUmCfUmGfAfAmCmUmAmAfUmCfAmUmCmCmAmG*mG*mA	245
57	1656	CTGGATGATTAGTTCAGAGA (SEQ ID NO: 183)	未经修饰：CUGGAUGAUUAGUUCAGAGAA 经修饰 (MS6-214): mC*mU*mGmGmAmUfGmAfUfUfAmGmUmUmCfAmGmAfGmAmA	214	未经修饰：UUCUCUGAACUAAUCAUCCAGGA 经修饰 (MAS4-245): fU*fU*mCmUmCfUmGfAfAmCmUmAmAfUmCfAmUmCmCmAmG*mG*mA	245
58	1656	CTGGATGATTAGTTCAGAGA (SEQ ID NO: 183)	未经修饰：CUGGAUGAUUAGUUCAGAGAA 经修饰 (MS5-214): mC*mU*mGmGmAmUfGmAfUfUfAmGmUmUmCfAfGmAmGmAmA	214	未经修饰：UUCUCUGAACUAAUCAUCCAGGA 经修饰 (MAS2-245): fU*fU*mCmUmCfUmGmAmAmCmUmAmAfUmCfAmUmCmCmAmG*mG*mA	245
59	1656	CTGGATGATTAGTTCAGAGA (SEQ ID NO: 183)	未经修饰：CUGGAUGAUUAGUUCAGAGAA 经修饰 (MS4-214): mC*mU*mGmGmAmUfGmAfUfUfAmGmUmUmCmAmGmAmGmAmA	214	未经修饰：UUCUCUGAACUAAUCAUCCAGGA 经修饰 (MAS2-245): fU*fU*mCmUmCfUmGmAmAmCmUmAmAfUmCfAmUmCmCmAmG*mG*mA	245
60	1656	CTGGATGAT	未经修饰：	214	未经修饰：	245

[0404]

		TAGTTCAGAGA (SEQ ID NO: 183)	CUGGAUGAUUAGUUCAGAGAA 经修饰 (MS2-214): mC*mU*mGmGfAmUfGmAfUfUfAmGmUmUmCfAmGmAmGmAmA		UUCUCUGAACUAAUCAUCCAGGA 经修饰 (MAS4-245): fU*fU*mCmUmCfUmGfAfAmCmUmAmAfUmCfAmUmCmCmAmG*mG*mA	
61	1570	CCCTTGTTCTTCCGTGAAAT (SEQ ID NO: 184)	未经修饰：CCCUUGUUCUUCCGUGAAAUA 经修饰 (MS3-215): mC*mC*mCmUfUmGmUmUfCfUfUmCmCfGmUmGmAmAfAmUmA	215	未经修饰：UAUUUCACGGAAGAACAAGGGCA 经修饰 (MAS3-246): fU*fA*mUmUmUmCmAmCmGmGmAmAmGfAmAmCmAmAmGmGmG*mC*mA	246
62	1570	CCCTTGTTCTTCCGTGAAAT (SEQ ID NO: 184)	未经修饰：CCCUUGUUCUUCCGUGAAAUA 经修饰 (MS4-215): mC*mC*mCmUmUmGfUmUfCfUfUmCmCmGmUmGmAmAmAmUmA	215	未经修饰：UAUUUCACGGAAGAACAAGGGCA 经修饰 (MAS4-246): fU*fA*mUmUmUfCmAfCfGmGmAmAmGfAmAfCmAmAmGmGmG*mC*mA	246
63	1570	CCCTTGTTCTTCCGTGAAAT (SEQ ID NO: 184)	未经修饰：CCCUUGUUCUUCCGUGAAAUA 经修饰 (MS6-215): mC*mC*mCmUmUmGfUmUfCfUfUmCmCmGmUfGmAmAfAmUmA	215	未经修饰：UAUUUCACGGAAGAACAAGGGCA 经修饰 (MAS4-246): fU*fA*mUmUmUfCmAfCfGmGmAmAmGfAmAfCmAmAmGmGmG*mC*mA	246
64	1570	CCCTTGTTCTTCCGTGAAAT (SEQ ID NO: 184)	未经修饰：CCCUUGUUCUUCCGUGAAAUA 经修饰 (MS5-215): mC*mC*mCmUmUmGfUmUfCfUfUmCmCmGmUfGfAmAmAmUmA	215	未经修饰：UAUUUCACGGAAGAACAAGGGCA 经修饰 (MAS2-246): fU*fA*mUmUmUfCmAmCmGmGmAmAmGfAmAfCmAmAmGmGmG*mC*mA	246
65	1570	CCCTTGTTCTTCCGTGAAAT (SEQ ID NO: 184)	未经修饰：CCCUUGUUCUUCCGUGAAAUA 经修饰 (MS4-215): mC*mC*mCmUmUmGfUmUfCfUfUmCmCmGmUmGmAmAmAmUmA	215	未经修饰：UAUUUCACGGAAGAACAAGGGCA 经修饰 (MAS2-246): fU*fA*mUmUmUfCmAmCmGmGmAmAmGfAmAfCmAmAmGmGmG*mC*mA	246
66	1570	CCCTTGTTCTTCCGTGAAAT (SEQ ID NO: 184)	未经修饰：CCCUUGUUCUUCCGUGAAAUA 经修饰 (MS2-215) mC*mC*mCmUfUmGfUmUfCfUfUmCmCmGmUfGmAmAmAmUmA	215	未经修饰：UAUUUCACGGAAGAACAAGGGCA 经修饰 (MAS4-246): fU*fA*mUmUmUfCmAfCfGmGmAmAmGfAmAfCmAmAmGmGmG*mC*mA	246
67	1629	GGCAAACCTGGATTAGAGTT (SEQ ID NO: 185)	未经修饰：GGCAAACCUGGAUUAGAGUUA 经修饰 (MS3-216): mG*mG*mCmAfAmAmCmCfUfGfGmAmUfUmAmGmAmGfUmUmA	216	未经修饰：UAACUCUAAUCCAGGUUUGCCUA 经修饰 (MAS3-247): fU*fA*mAmCmUmCmUmAmAmUmCmCmAfGmGmUmUmUmGmCmC*mU*mA	247
68	1629	GGCAAACCTGGATTAG	未经修饰：GGCAAACCUGGAUU	216	未经修饰：UAACUCUAAUCCAGGU	247

[0405]

		AGTT (SEQ ID NO: 185)	AGAGUUA 经修饰 (MS4-216): mG*mG*mCmAmAmAf CmCfUfGfGmAmUmU mAmGmAmGmUmUmA		UUGCCUA 经修饰 (MAS4-247): fU*fA*mAmCmUfCmUfAf AmUmCmCmAfGmGfUm UmUmGmCmC*mU*mA	
69	1629	GGCAAACC TGGATTAG AGTT (SEQ ID NO: 185)	未经修饰：GGCAAACCUGGAUU AGAGUUA 经修饰 (MS6-216): mG*mG*mCmAmAmAf CmCfUfGfGmAmUmU mAfGmAmGfUmUmA	216	未经修饰：UAACUCUAAUCCAGGU UUGCCUA 经修饰 (MAS4-247): fU*fA*mAmCmUfCmUfAf AmUmCmCmAfGmGfUm UmUmGmCmC*mU*mA	247
70	1629	GGCAAACC TGGATTAG AGTT (SEQ ID NO: 185)	未经修饰：GGCAAACCUGGAUU AGAGUUA 经修饰 (MS5-216): mG*mG*mCmAmAmAf CmCfUfGfGmAmUmU mAfGfAmGmUmUmA	216	未经修饰：UAACUCUAAUCCAGGU UUGCCUA 经修饰 (MAS2-247): fU*fA*mAmCmUfCmUm AmAmUmCmCmAfGmGf UmUmUmGmCmC*mU*m A	247
71	1629	GGCAAACC TGGATTAG AGTT (SEQ ID NO: 185)	未经修饰：GGCAAACCUGGAUU AGAGUUA 经修饰 (MS4-216): mG*mG*mCmAmAmAf CmCfUfGfGmAmUmU mAmGmAmGmUmUmA	216	未经修饰：UAACUCUAAUCCAGGU UUGCCUA 经修饰 (MAS2-247): fU*fA*mAmCmUfCmUm AmAmUmCmCmAfGmGf UmUmUmGmCmC*mU*m A	247
72	1629	GGCAAACC TGGATTAG AGTT (SEQ ID NO: 185)	未经修饰：GGCAAACCUGGAUU AGAGUUA 经修饰 (MS2-216): mG*mG*mCmAfAmAfC mCfUfGfGmAmUmUm AfGmAmGmUmUmA	216	未经修饰：UAACUCUAAUCCAGGU UUGCCUA 经修饰 (MAS4-247): fU*fA*mAmCmUfCmUfAf AmUmCmCmAfGmGfUm UmUmGmCmC*mU*mA	247
73	1627	TAGGCAAA CCTGGATTA GAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰：UAGGCAAACCUGGA UUAGAGA 经修饰 : (MS3-217) mU*mA*mGmGfCmAm AmAfCfCfUmGmGfAm UmUmAmGfAmGmA	217	未经修饰：UCUCUAAUCCAGGUUU GCCUAGA 经修饰 (MAS3-248): fU*fC*mUmCmUmAmAm UmCmCmAmGmGfUmUm UmGmCmCmUmA*mG*m A	248
74	1627	TAGGCAAA CCTGGATTA GAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰：UAGGCAAACCUGGA UUAGAGA 经修饰 (MS4-217): mU*mA*mGmGmCmAf AmAfCfCfUmGmGmA mUmUmAmGmAmGmA	217	未经修饰：UCUCUAAUCCAGGUUU GCCUAGA 经修饰 (MAS4-248): fU*fC*mUmCmUfAmAfUf CmCmAmGmGfUmUfUm GmCmCmUmA*mG*mA	248
75	1627	TAGGCAAA CCTGGATTA GAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰：UAGGCAAACCUGGA UUAGAGA 经修饰 (MS6-217): mU*mA*mGmGmCmAf AmAfCfCfUmGmGmA mUfUmAmGfAmGmA	217	未经修饰：UCUCUAAUCCAGGUUU GCCUAGA 经修饰 (MAS4-248): fU*fC*mUmCmUfAmAfUf CmCmAmGmGfUmUfUm GmCmCmUmA*mG*mA	248
76	1627	TAGGCAAA CCTGGATTA GAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰：UAGGCAAACCUGGA UUAGAGA 经修饰 (MS5-217):	217	未经修饰：UCUCUAAUCCAGGUUU GCCUAGA 经修饰 (MAS2-248):	248

[0406]

			mU*mA*mGmGmCmAf AmAfCfCfUmGmGmA mUfUfAmGmAmGmA		fU*fC*mUmCmUfAmAm UmCmCmAmGmGfUmUf UmGmCmCmUmA*mG*m A	
77	1627	TAGGCAAA CCTGGATTA GAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰 : UAGGCAAACCUGGA UUAGAGA 经修饰 (MS4-217): mU*mA*mGmGmCmAf AmAfCfCfUmGmGmA mUmUmAmGmAmGmA	217	未经修饰 : UCUCUAAUCCAGGUUU GCCUAGA 经修饰 (MAS2-248): fU*fC*mUmCmUfAmAm UmCmCmAmGmGfUmUf UmGmCmCmUmA*mG*m A	248
78	1627	TAGGCAAA CCTGGATTA GAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰 : UAGGCAAACCUGGA UUAGAGA 经修饰 (MS2-217): mU*mA*mGmGfCmAf AmAfCfCfUmGmGmA mUfUmAmGmAmGmA	217	未经修饰 : UCUCUAAUCCAGGUUU GCCUAGA 经修饰 (MAS4-248): fU*fC*mUmCmUfAmAfUf CmCmAmGmGfUmUfUm GmCmCmUmA*mG*mA	248
79	1628	AGGCAAAC CTGGATTAG AGT (SEQ ID NO: 187)	未经修饰 : AGGCAAACCUGGAU UAGAGUA 经修饰 (MS3-218): mA*mG*mGmCfAmAm AmCfCfUfGmGmAfUm UmAmGmAfGmUmA	218	未经修饰 : UACUCUAAUCCAGGUU UGCCUAG 经修饰 (MAS3-249): fU*fA*mCmUmCmUmAm AmUmCmCmAmGfGmUm UmUmGmCmCmU*mA*m G	249
80	1628	AGGCAAAC CTGGATTAG AGT (SEQ ID NO: 187)	未经修饰 : AGGCAAACCUGGAU UAGAGUA 经修饰 (MS4-218): mA*mG*mGmCmAmAf AmCfCfUfGmGmAmU mUmAmGmAmGmUmA	218	未经修饰 : UACUCUAAUCCAGGUU UGCCUAG 经修饰 (MAS4-249): fU*fA*mCmUmCfUmAfAf UmCmCmAmGfGmUfUm UmGmCmCmU*mA*mG	249
81	1628	AGGCAAAC CTGGATTAG AGT (SEQ ID NO: 187)	未经修饰 : AGGCAAACCUGGAU UAGAGUA 经修饰 (MS6-218): mA*mG*mGmCmAmAf AmCfCfUfGmGmAmU mUfAmGmAfGmUmA	218	未经修饰 : UACUCUAAUCCAGGUU UGCCUAG 经修饰 (MAS4-249): fU*fA*mCmUmCfUmAfAf UmCmCmAmGfGmUfUm UmGmCmCmU*mA*mG	249
82	1628	AGGCAAAC CTGGATTAG AGT (SEQ ID NO: 187)	未经修饰 : AGGCAAACCUGGAU UAGAGUA 经修饰 (MS5-218): mA*mG*mGmCmAmAf AmCfCfUfGmGmAmU mUfAfGmAmGmUmA	218	未经修饰 : UACUCUAAUCCAGGUU UGCCUAG 经修饰 (MAS2-249): fU*fA*mCmUmCfUmAm AmUmCmCmAmGfGmUf UmUmGmCmCmU*mA*m G	249
83	1628	AGGCAAAC CTGGATTAG AGT (SEQ ID NO: 187)	未经修饰 : AGGCAAACCUGGAU UAGAGUA 经修饰 (MS4-218): mA*mG*mGmCmAmAf AmCfCfUfGmGmAmU mUmAmGmAmGmUmA	218	未经修饰 : UACUCUAAUCCAGGUU UGCCUAG 经修饰 (MAS2-249): fU*fA*mCmUmCfUmAm AmUmCmCmAmGfGmUf UmUmGmCmCmU*mA*m G	249
84	1628	AGGCAAAC CTGGATTAG AGT (SEQ ID NO: 187)	未经修饰 : AGGCAAACCUGGAU UAGAGUA 经修饰 (MS2-218):	218	未经修饰 : UACUCUAAUCCAGGUU UGCCUAG 经修饰 (MAS4-249):	249

[0407]

			mA*mG*mGmCfAmAfAmCfCfUfGmGmAmUmUfAmGmAmGmUmA		fU*fA*mCmUmCfUmAfAfUmCmCmAmGfGmUfUmUmGmCmCmU*mA*mG	
85	1634	ACCTGGATTAGAGTTACATC (SEQ ID NO: 188)	未经修饰：ACCUGGAUUAGAGUUACAUCA 经修饰 (MS3-219): mA*mC*mCmUfGmGmAmUfUfAfGmAmGfUmUmAmCmAfUmCmA	219	未经修饰：UGAUGUAACUCUAAUCCAGGUUU 经修饰 (MAS3-250): fU*fG*mAmUmGmUmAmAmCmUmCmUmAfAmUmCmCmAmGmGmU*mU*mU	250
86	1634	ACCTGGATTAGAGTTACATC (SEQ ID NO: 188)	未经修饰：ACCUGGAUUAGAGUUACAUCA 经修饰 (MS4-219): mA*mC*mCmUmGmGfAmUfUfAfGmAmGmUmUmAmCmAmUmCmA	219	未经修饰：UGAUGUAACUCUAAUCCAGGUUU 经修饰 (MAS4-250): fU*fG*mAmUmGfUmAfAfCmUmCmUmAfAmUfCmCmAmGmGmU*mU*mU	250
87	1634	ACCTGGATTAGAGTTACATC (SEQ ID NO: 188)	未经修饰：ACCUGGAUUAGAGUUACAUCA 经修饰 (MS6-219): mA*mC*mCmUmGmGfAmUfUfAfGmAmGmUmUfAmCmAfUmCmA	219	未经修饰：UGAUGUAACUCUAAUCCAGGUUU 经修饰 (MAS4-250): fU*fG*mAmUmGfUmAfAfCmUmCmUmAfAmUfCmCmAmGmGmU*mU*mU	250
88	1634	ACCTGGATTAGAGTTACATC (SEQ ID NO: 188)	未经修饰：ACCUGGAUUAGAGUUACAUCA 经修饰 (MS5-219): mA*mC*mCmUmGmGfAmUfUfAfGmAmGmUmUfAfCmAmUmCmA	219	未经修饰：UGAUGUAACUCUAAUCCAGGUUU 经修饰 (MAS2-250): fU*fG*mAmUmGfUmAmAmCmUmCmUmAfAmUfCmCmAmGmGmU*mU*mU	250
89	1634	ACCTGGATTAGAGTTACATC (SEQ ID NO: 188)	未经修饰：ACCUGGAUUAGAGUUACAUCA 经修饰 (MS4-219): mA*mC*mCmUmGmGfAmUfUfAfGmAmGmUmUmAmCmAmUmCmA	219	未经修饰：UGAUGUAACUCUAAUCCAGGUUU 经修饰 (MAS2-250): fU*fG*mAmUmGfUmAmAmCmUmCmUmAfAmUfCmCmAmGmGmU*mU*mU	250
90	1634	ACCTGGATTAGAGTTACATC (SEQ ID NO: 188)	未经修饰：ACCUGGAUUAGAGUUACAUCA 经修饰 (MS2-219): mA*mC*mCmUfGmGfAmUfUfAfGmAmGmUmUfAmCmAmUmCmA	219	未经修饰：UGAUGUAACUCUAAUCCAGGUUU 经修饰 (MAS4-250): fU*fG*mAmUmGfUmAfAfCmUmCmUmAfAmUfCmCmAmGmGmU*mU*mU	250
91	1659	GATGATTAGTTCAGAGATAT (SEQ ID NO: 189)	未经修饰：GAUGAUUAGUUCAGAGAUAUA 经修饰 (MS3-220): mG*mA*mUmGfAmUmUmAfGfUfUmCmAfGmAmGmAmUfAmUmA	220	未经修饰：UAUAUCUCUGAACUAAUCAUCCA 经修饰 (MAS3-251): fU*fA*mUmAmUmCmUmCmUmGmAmAmCfUmAmAmUmCmAmUmC*mC*mA	251
92	1659	GATGATTAGTTCAGAGATAT (SEQ ID NO: 189)	未经修饰：GAUGAUUAGUUCAGAGAUAUA 经修饰 (MS4-220): mG*mA*mUmGmAmUf	220	未经修饰：UAUAUCUCUGAACUAAUCAUCCA 经修饰 (MAS4-251): fU*fA*mUmAmUfCmUfCf	251

[0408]

			UmAfGfUfUmCmAmG mAmGmAmUmAmUmA		UmGmAmAmCfUmAfAm UmCmAmUmC*mC*mA	
93	1659	GATGATTA GTTCAGAG ATAT (SEQ ID NO: 189)	未经修饰：GAUGAUUAGUUCAGAGAUAUA 经修饰 (MS6-220): mG*mA*mUmGmAmUf UmAfGfUfUmCmAmG mAfGmAmUfAmUmA	220	未经修饰：UAUAUCUCUGAACUAAUCAUCCA 经修饰 (MAS4-251): fU*fA*mUmAmUfCmUfCf UmGmAmAmCfUmAfAm UmCmAmUmC*mC*mA	251
94	1659	GATGATTA GTTCAGAG ATAT (SEQ ID NO: 189)	未经修饰：GAUGAUUAGUUCAGAGAUAUA 经修饰 (MS5-220): mG*mA*mUmGmAmUf UmAfGfUfUmCmAmG mAfGfAmUmAmUmA	220	未经修饰：UAUAUCUCUGAACUAAUCAUCCA 经修饰 (MAS2-251): fU*fA*mUmAmUfCmUm CmUmGmAmAmCfUmAf AmUmCmAmUmC*mC*m A	251
95	1659	GATGATTA GTTCAGAG ATAT (SEQ ID NO: 189)	未经修饰：GAUGAUUAGUUCAGAGAUAUA 经修饰 (MS4-220): mG*mA*mUmGmAmUf UmAfGfUfUmCmAmG mAmGmAmUmAmUmA	220	未经修饰：UAUAUCUCUGAACUAAUCAUCCA 经修饰 (MAS2-251): fU*fA*mUmAmUfCmUm CmUmGmAmAmCfUmAf AmUmCmAmUmC*mC*m A	251
96	1659	GATGATTA GTTCAGAG ATAT (SEQ ID NO: 189)	未经修饰：GAUGAUUAGUUCAGAGAUAUA 经修饰 (MS2-220): mG*mA*mUmGfAmUf UmAfGfUfUmCmAmG mAfGmAmUmAmUmA	220	未经修饰：UAUAUCUCUGAACUAAUCAUCCA 经修饰 (MAS4-251): fU*fA*mUmAmUfCmUfCf UmGmAmAmCfUmAfAm UmCmAmUmC*mC*mA	251
97	1641	TTAGAGTTA CATCTCCTG GA (SEQ ID NO: 190)	未经修饰：UUAGAGUUACAUCUCCUGGAA 经修饰 (MS3-221): mU*mU*mAmGfAmGm UmUfAfCfAmUmCfUm CmCmUmGfGmAmA	221	未经修饰：UUCCAGGAGAUGUAACUCUAAUC 经修饰 (MAS3-252): fU*fU*mCmCmAmGmGm AmGmAmUmGmUfAmA mCmUmCmUmAmA*mU* mC	252
98	1641	TTAGAGTTA CATCTCCTG GA (SEQ ID NO: 190)	未经修饰：UUAGAGUUACAUCUCCUGGAA 经修饰 (MS4-221): mU*mU*mAmGmAmGf UmUfAfCfAmUmCmU mCmCmUmGmGmAmA	221	未经修饰：UUCCAGGAGAUGUAACUCUAAUC 经修饰 (MAS4-252): fU*fU*mCmCmAfGmGfAf GmAmUmGmUfAmAfCm UmCmUmAmA*mU*mC	252
99	1641	TTAGAGTTA CATCTCCTG GA (SEQ ID NO: 190)	未经修饰：UUAGAGUUACAUCUCCUGGAA 经修饰 (MS6-221): mU*mU*mAmGmAmGf UmUfAfCfAmUmCmU mCfCmUmGfGmAmA	221	未经修饰：UUCCAGGAGAUGUAACUCUAAUC 经修饰 (MAS4-252): fU*fU*mCmCmAfGmGfAf GmAmUmGmUfAmAfCm UmCmUmAmA*mU*mC	252
100	1641	TTAGAGTTA CATCTCCTG GA (SEQ ID NO: 190)	未经修饰：UUAGAGUUACAUCUCCUGGAA 经修饰 (MS5-221): mU*mU*mAmGmAmGf UmUfAfCfAmUmCmU mCfCfUmGmGmAmA	221	未经修饰：UUCCAGGAGAUGUAACUCUAAUC 经修饰 (MAS2-252): fU*fU*mCmCmAfGmGm AmGmAmUmGmUfAmAf CmUmCmUmAmA*mU*m	252

[0409]

					C	
101	1641	TTAGAGTTACATCTCCTGGA (SEQ ID NO: 190)	未经修饰：UUAGAGUUACAUCUCCUGGAA 经修饰 (MS4-221): mU*mU*mAmGmAmGfUmUfAfCfAmUmCmUmCmCmUmGmGmAmA	221	未经修饰：UUCCAGGAGAUGUAACUCUAAUC 经修饰 (MAS2-252): fU*fU*mCmCmAfGmGmAmGmAmUmGmUfAmAfCmUmCmUmAmA*mU*mC	252
102	1641	TTAGAGTTACATCTCCTGGA (SEQ ID NO: 190)	未经修饰：UUAGAGUUACAUCUCCUGGAA 经修饰 (MS2-221): mU*mU*mAmGfAmGfUmUfAfCfAmUmCmUmCfCmUmGmGmAmA	221	未经修饰：UUCCAGGAGAUGUAACUCUAAUC 经修饰 (MAS4-252): fU*fU*mCmCmAfGmGfAfGmAmUmGmUfAmAfCmUmCmUmAmA*mU*mC	252
103	1631	CAAACCTGGATTAGAGTTAC (SEQ ID NO: 191)	未经修饰：CAAACCUGGAUUAGAGUUACA 经修饰 (MS3-222): mC*mA*mAmAfCmCmUmGfGfAfUmUmAfGmAmGmUmUfAmCmA	222	未经修饰：UGUAACUCUAAUCCAGGUUUGCC 经修饰 (MAS3-253): fU*fG*mUmAmAmCmUmCmUmAmAmUmCfCmAmGmGmUmUmUmG*mC*mC	253
104	1631	CAAACCTGGATTAGAGTTAC (SEQ ID NO: 191)	未经修饰：CAAACCUGGAUUAGAGUUACA 经修饰 (MS4-222): mC*mA*mAmAmCmCfUmGfGfAfUmUmAmGmAmGmUmUmAmCmA	222	未经修饰：UGUAACUCUAAUCCAGGUUUGCC 经修饰 (MAS4-253): fU*fG*mUmAmAfCmUfCfUmAmAmUmCfCmAfGmGmUmUmUmG*mC*mC	253
105	1631	CAAACCTGGATTAGAGTTAC (SEQ ID NO: 191)	未经修饰：CAAACCUGGAUUAGAGUUACA 经修饰 (MS6-222): mC*mA*mAmAmCmCfUmGfGfAfUmUmAmGmAfGmUmUfAmCmA	222	未经修饰：UGUAACUCUAAUCCAGGUUUGCC 经修饰 (MAS4-253): fU*fG*mUmAmAfCmUfCfUmAmAmUmCfCmAfGmGmUmUmUmG*mC*mC	253
106	1631	CAAACCTGGATTAGAGTTAC (SEQ ID NO: 191)	未经修饰：CAAACCUGGAUUAGAGUUACA 经修饰 (MS5-222): mC*mA*mAmAmCmCfUmGfGfAfUmUmAmGmAfGfUmUmAmCmA	222	未经修饰：UGUAACUCUAAUCCAGGUUUGCC 经修饰 (MAS2-253): fU*fG*mUmAmAfCmUmCmUmAmAmUmCfCmAfGmGmUmUmUmG*mC*mC	253
107	1631	CAAACCTGGATTAGAGTTAC (SEQ ID NO: 191)	未经修饰：CAAACCUGGAUUAGAGUUACA 经修饰 (MS4-222): mC*mA*mAmAmCmCfUmGfGfAfUmUmAmGmAmGmUmUmAmCmA	222	未经修饰：UGUAACUCUAAUCCAGGUUUGCC 经修饰 (MAS2-253): fU*fG*mUmAmAfCmUmCmUmAmAmUmCfCmAfGmGmUmUmUmG*mC*mC	253
108	1631	CAAACCTGGATTAGAGTTAC (SEQ ID NO: 191)	未经修饰：CAAACCUGGAUUAGAGUUACA 经修饰 (MS2-222): mC*mA*mAmAfCmCfUmGfGfAfUmUmAmGmAfGmUmUmAmCmA	222	未经修饰：UGUAACUCUAAUCCAGGUUUGCC 经修饰 (MAS4-253): fU*fG*mUmAmAfCmUfCfUmAmAmUmCfCmAfGmGmUmUmUmG*mC*mC	253

[0410]

109	1571	CCTTGTTCTTCCGTGAAATT (SEQ ID NO: 192)	未经修饰：CCUUGUUCUUCCGUGAAAUUA 经修饰 (MS3-223): mC*mC*mUmUfGmUmUmCfUfUfCmCmGfUmGmAmAmAfUmUmA	223	未经修饰：UAAUUUCACGGAAGAACAAGGGC 经修饰 (MAS3-254): fU*fA*mAmUmUmUmCmAmCmGmGmAmAfGmAmAmCmAmAmGmG*mG*mC	254
110	1571	CCTTGTTCTTCCGTGAAATT (SEQ ID NO: 192)	未经修饰：CCUUGUUCUUCCGUGAAAUUA 经修饰 (MS4-223): mC*mC*mUmUmGmUfUmCfUfUfCmCmGmUmGmAmAmAmUmUmA	223	未经修饰：UAAUUUCACGGAAGAACAAGGGC 经修饰 (MAS4-254): fU*fA*mAmUmUfUmCfAfCmGmGmAmAfGmAfAmCmAmAmGmG*mG*mC	254
111	1571	CCTTGTTCTTCCGTGAAATT (SEQ ID NO: 192)	未经修饰：CCUUGUUCUUCCGUGAAAUUA 经修饰 (MS6-223): mC*mC*mUmUmGmUfUmCfUfUfCmCmGmUmGfAmAmAfUmUmA	223	未经修饰：UAAUUUCACGGAAGAACAAGGGC 经修饰 (MAS4-254): fU*fA*mAmUmUfUmCfAfCmGmGmAmAfGmAfAmCmAmAmGmG*mG*mC	254
112	1571	CCTTGTTCTTCCGTGAAATT (SEQ ID NO: 192)	未经修饰：CCUUGUUCUUCCGUGAAAUUA 经修饰 (MS5-223): mC*mC*mUmUmGmUfUmCfUfUfCmCmGmUmGfAfAmAmUmUmA	223	未经修饰：UAAUUUCACGGAAGAACAAGGGC 经修饰 (MAS2-254): fU*fA*mAmUmUfUmCmAmCmGmGmAmAfGmAfAmCmAmAmGmG*mG*mC	254
113	1571	CCTTGTTCTTCCGTGAAATT (SEQ ID NO: 192)	未经修饰：CCUUGUUCUUCCGUGAAAUUA 经修饰 (MS4-223): mC*mC*mUmUmGmUfUmCfUfUfCmCmGmUmGmAmAmAmUmUmA	223	未经修饰：UAAUUUCACGGAAGAACAAGGGC 经修饰 (MAS2-254): fU*fA*mAmUmUfUmCmAmCmGmGmAmAfGmAfAmCmAmAmGmG*mG*mC	254
114	1571	CCTTGTTCTTCCGTGAAATT (SEQ ID NO: 192)	未经修饰：CCUUGUUCUUCCGUGAAAUUA 经修饰 (MS2-223): mC*mC*mUmUfGmUfUmCfUfUfCmCmGmUmGfAmAmAmUmUmA	223	未经修饰：UAAUUUCACGGAAGAACAAGGGC 经修饰 (MAS4-254): fU*fA*mAmUmUfUmCfAfCmGmGmAmAfGmAfAmCmAmAmGmG*mG*mC	254
115	1648	TACATCTCCTGGATGATTAG (SEQ ID NO: 193)	未经修饰：UACAUCUCCUGGAUGAUUAGA 经修饰 (MS3-224): mU*mA*mCmAfUmCmUmCfCfUfGmGmAfUmGmAmUmUfAmGmA	224	未经修饰：UCUAAUCAUCCAGGAGAUGUAAC 经修饰 (MAS3-255): fU*fC*mUmAmAmUmCmAmUmCmCmAmGfGmAmGmAmUmGmUmA*mA*mC	255
116	1648	TACATCTCCTGGATGATTAG (SEQ ID NO: 193)	未经修饰：UACAUCUCCUGGAUGAUUAGA 经修饰 (MS4-224): mU*mA*mCmAmUmCfUmCfCfUfGmGmAmUmGmAmUmUmAmGmA	224	未经修饰：UCUAAUCAUCCAGGAGAUGUAAC 经修饰 (MAS4-255): fU*fC*mUmAmAfUmCfAfUmCmCmAmGfGmAfGmAmUmGmUmA*mA*mC	255
117	1648	TACATCTCC	未经修饰：	224	未经修饰：	255

[0411]

		TGGATGATTAG (SEQ ID NO: 193)	UACAUCUCCUGGAUGAUUAGA 经修饰 (MS6-224): mU*mA*mCmAmUmCfUmCfCfUfGmGmAmUmGfAmUmUfAmGmA		UCUAAUCAUCCAGGAGAUGUAAC 经修饰 (MAS4-255): fU*fC*mUmAmAfUmCfAfUmCmCmAmGfGmAfGmAmUmGmUmA*mA*mC	
118	1648	TACATCTCCTGGATGATTAG (SEQ ID NO: 193)	未经修饰：UACAUCUCCUGGAUGAUUAGA 经修饰 (MS5-224): mU*mA*mCmAmUmCfUmCfCfUfGmGmAmUmGfAfUmUmAmGmA	224	未经修饰：UCUAAUCAUCCAGGAGAUGUAAC 经修饰 (MAS2-255): fU*fC*mUmAmAfUmCmAmUmCmCmAmGfGmAfGmAmUmGmUmA*mA*mC	255
119	1648	TACATCTCCTGGATGATTAG (SEQ ID NO: 193)	未经修饰：UACAUCUCCUGGAUGAUUAGA 经修饰 (MS4-224): mU*mA*mCmAmUmCfUmCfCfUfGmGmAmUmGmAmUmUmAmGmA	224	未经修饰：UCUAAUCAUCCAGGAGAUGUAAC 经修饰 (MAS2-255): fU*fC*mUmAmAfUmCmAmUmCmCmAmGfGmAfGmAmUmGmUmA*mA*mC	255
120	1648	TACATCTCCTGGATGATTAG (SEQ ID NO: 193)	未经修饰：UACAUCUCCUGGAUGAUUAGA 经修饰 (MS2-224): mU*mA*mCmAfUmCfUmCfCfUfGmGmAmUmGfAmUmUmAmGmA	224	未经修饰：UCUAAUCAUCCAGGAGAUGUAAC 经修饰 (MAS4-255): fU*fC*mUmAmAfUmCfAfUmCmCmAmGfGmAfGmAmUmGmUmA*mA*mC	255
121	1503	TACCAGCAGACCTGCGCGCA (SEQ ID NO: 194)	未经修饰：UACCAGCAGACCUGCGCGCAA 经修饰 (MS3-225): mU*mA*mCmCfAmGmCmAfGfAfCmCmUfGmCmGmCmGfCmAmA	225	未经修饰：UUGCGCGCAGGUCUGCUGGUACC 经修饰 (MAS3-256): fU*fU*mGmCmGmCmGmCmAmGmGmUmCfUmGmCmUmGmGmUmA*mC*mC	256
122	1503	TACCAGCAGACCTGCGCGCA (SEQ ID NO: 194)	未经修饰：UACCAGCAGACCUGCGCGCAA 经修饰 (MS4-225): mU*mA*mCmCmAmGfCmAfGfAfCmCmUmGmCmGmCmGmCmAmA	225	未经修饰：UUGCGCGCAGGUCUGCUGGUACC 经修饰 (MAS4-256): fU*fU*mGmCmGfCmGfCfAmGmGmUmCfUmGfCmUmGmGmUmA*mC*mC	256
123	1503	TACCAGCAGACCTGCGCGCA (SEQ ID NO: 194)	未经修饰：UACCAGCAGACCUGCGCGCAA 经修饰 (MS6-225): mU*mA*mCmCmAmGfCmAfGfAfCmCmUmGmCfGmCmGfCmAmA	225	未经修饰：UUGCGCGCAGGUCUGCUGGUACC 经修饰 (MAS4-256): fU*fU*mGmCmGfCmGfCfAmGmGmUmCfUmGfCmUmGmGmUmA*mC*mC	256
124	1503	TACCAGCAGACCTGCGCGCA (SEQ ID NO: 194)	未经修饰：UACCAGCAGACCUGCGCGCAA 经修饰 (MS5-225): mU*mA*mCmCmAmGfCmAfGfAfCmCmUmGmCfGfCmGmCmAmA	225	未经修饰：UUGCGCGCAGGUCUGCUGGUACC 经修饰 (MAS2-256): fU*fU*mGmCmGfCmGmCmAmGmGmUmCfUmGfCmUmGmGmUmA*mC*mC	256
125	1503	TACCAGCAGACCTGCGCGCA (SEQ	未经修饰：UACCAGCAGACCUGCGCGCAA	225	未经修饰：UUGCGCGCAGGUCUGCUGGUACC	256

[0412]

		ID NO: 194)	经修饰 (MS4-225): mU*mA*mCmCmAmGfCmAfGfAfCmCmUmGmCmGmCmGmCmAmA		经修饰 (MAS2-256): fU*fU*mGmCmGfCmGmCmAmGmGmUmCfUmGfCmUmGmGmUmA*mC*mC	
126	1503	TACCAGCAGACCTGCGCGCA (SEQ ID NO: 194)	未经修饰 : UACCAGCAGACCUGCGCGCAA 经修饰 (MS2-225): mU*mA*mCmCfAmGfCmAfGfAfCmCmUmGmCfGmCmGmCmAmA	225	未经修饰 : UUGCGCGCAGGUCUGCUGGUACC 经修饰 (MAS4-256): fU*fU*mGmCmGfCmGfCfAmGmGmUmCfUmGfCmUmGmGmUmA*mC*mC	256
127	1643	AGAGTTACATCTCCTGGATG (SEQ ID NO: 195)	未经修饰 : AGAGUUACAUCUCCUGGAUGA 经修饰 (MS3-226): mA*mG*mAmGfUmUmAmCfAfUfCmUmCfCmUmGmGmAfUmGmA	226	未经修饰 : UCAUCCAGGAGAUGUAACUCUAA 经修饰 (MAS3-257): fU*fC*mAmUmCmCmAmGmGmAmGmAmUfGmUmAmAmCmUmCmU*mA*mA	257
128	1643	AGAGTTACATCTCCTGGATG (SEQ ID NO: 195)	未经修饰 : AGAGUUACAUCUCCUGGAUGA 经修饰 (MS4-226): mA*mG*mAmGmUmUfAmCfAfUfCmUmCmCmUmGmGmAmUmGmA	226	未经修饰 : UCAUCCAGGAGAUGUAACUCUAA 经修饰 (MAS4-257): fU*fC*mAmUmCfCmAfGfGmAmGmAmUfGmUfAmAmCmUmCmU*mA*mA	257
129	1643	AGAGTTACATCTCCTGGATG (SEQ ID NO: 195)	未经修饰 : AGAGUUACAUCUCCUGGAUGA 经修饰 (MS6-226): mA*mG*mAmGmUmUfAmCfAfUfCmUmCmCmUfGmGmAfUmGmA	226	未经修饰 : UCAUCCAGGAGAUGUAACUCUAA 经修饰 (MAS4-257): fU*fC*mAmUmCfCmAfGfGmAmGmAmUfGmUfAmAmCmUmCmU*mA*mA	257
130	1643	AGAGTTACATCTCCTGGATG (SEQ ID NO: 195)	未经修饰 : AGAGUUACAUCUCCUGGAUGA 经修饰 (MS5-226): mA*mG*mAmGmUmUfAmCfAfUfCmUmCmCmUfGfGmAmUmGmA	226	未经修饰 : UCAUCCAGGAGAUGUAACUCUAA 经修饰 (MAS2-257): fU*fC*mAmUmCfCmAmGmGmAmGmAmUfGmUfAmAmCmUmCmU*mA*mA	257
131	1643	AGAGTTACATCTCCTGGATG (SEQ ID NO: 195)	未经修饰 : AGAGUUACAUCUCCUGGAUGA 经修饰 (MS4-226): mA*mG*mAmGmUmUfAmCfAfUfCmUmCmCmUmGmGmAmUmGmA	226	未经修饰 : UCAUCCAGGAGAUGUAACUCUAA 经修饰 (MAS2-257): fU*fC*mAmUmCfCmAmGmGmAmGmAmUfGmUfAmAmCmUmCmU*mA*mA	257
132	1643	AGAGTTACATCTCCTGGATG (SEQ ID NO: 195)	未经修饰 : AGAGUUACAUCUCCUGGAUGA 经修饰 (MS2-226): mA*mG*mAmGfUmUfAmCfAfUfCmUmCmCmUfGmGmAmUmGmA	226	未经修饰 : UCAUCCAGGAGAUGUAACUCUAA 经修饰 (MAS4-257): fU*fC*mAmUmCfCmAfGfGmAmGmAmUfGmUfAmAmCmUmCmU*mA*mA	257
133	1635	CCTGGATTAGAGTTACATCT (SEQ ID NO: 196)	未经修饰 : CCUGGAUUAGAGUUACAUCUA 经修饰 (MS3-227): mC*mC*mUmGfGmAmUmUfAfGfAmGmUfUmAmCmAmUfCmUmA	227	未经修饰 : UAGAUGUAACUCUAAUCCAGGUU 经修饰 (MAS3-258): fU*fA*mGmAmUmGmUmAmAmCmUmCmUfAmAmUmCmCmAmGmG*mU*m	258

[0413]

					U	
134	1650	CATCTCCTGGATGATTAGTT (SEQ ID NO: 197)	未经修饰：CAUCUCCUGGAUGAUUAGUUA 经修饰 (MS3-228): mC*mA*mUmCfUmCmCmUfGfGfAmUmGfAmUmUmAmGfUmUmA	228	未经修饰：UAACUAAUCAUCCAGGAGAUGUA 经修饰 (MAS3-259): fU*fA*mAmCmUmAmAmUmCmAmUmCmCfAmGmGmAmGmAmUmG*mU*mA	259
135	1638	GGATTAGAGTTACATCTCCT (SEQ ID NO: 198)	未经修饰：GGAUUAGAGUUACAUCUCCUA 经修饰 (MS3-229): mG*mG*mAmUfUmAmGmAfGfUfUmAmCfAmUmCmUmCfCmUmA	229	未经修饰：UAGGAGAUGUAACUCUAAUCCAG 经修饰 (MAS3-260): fU*fA*mGmGmAmGmAmUmGmUmAmAmCfUmCmUmAmAmUmCmC*mA*mG	260
136	1566	TGTGCCCTTGTTCTTCCGTG (SEQ ID NO: 199)	未经修饰：UGUGCCCUUGUUCUUCCGUGA 经修饰 (MS3-230): mU*mG*mUmGfCmCmCmUfUfGfUmUmCfUmUmCmCmGfUmGmA	230	未经修饰：UCACGGAAGAACAAGGGCACAGA 经修饰 (MAS3-261): fU*fC*mAmCmGmGmAmAmGmAmAmCmAfAmGmGmGmCmAmCmA*mG*mA	261
137	1576	TTCTTCCGTGAAATTCTGGC (SEQ ID NO: 200)	未经修饰：UUCUUCCGUGAAAUUCUGGCA 经修饰 (MS3-231): mU*mU*mCmUfUmCmCmGfUfGfAmAmAfUmUmCmUmGfGmCmA	231	未经修饰：UGCCAGAAUUUCACGGAAGAACA 经修饰 (MAS3-262): fU*fG*mCmCmAmGmAmAmUmUmUmCmAfCmGmGmAmAmGmAmA*mC*mA	262
138	1621	GCTGTCTAGGCAAACCTGGA (SEQ ID NO: 201)	未经修饰：GCUGUCUAGGCAAACCUGGAA 经修饰 (MS3-232): mG*mC*mUmGfUmCmUmAfGfGfCmAmAfAmCmCmUmGfGmAmA	232	未经修饰：UUCCAGGUUUGCCUAGACAGCGU 经修饰 (MAS3-263): fU*fU*mCmCmAmGmGmUmUmUmGmCmCfUmAmGmAmCmAmGmC*mG*mU	263
139	1649	ACATCTCCTGGATGATTAGT (SEQ ID NO: 202)	未经修饰：ACAUCUCCUGGAUGAUUAGUA 经修饰 (MS3-233): mA*mC*mAmUfCmUmCmCfUfGfGmAmUfGmAmUmUmAfGmUmA	233	未经修饰：UACUAAUCAUCCAGGAGAUGUAA 经修饰 (MAS3-264): fU*fA*mCmUmAmAmUmCmAmUmCmCmAfGmGmAmGmAmAmUmGmU*mA*mA	264
140	1639	GATTAGAGTTACATCTCCTG (SEQ ID NO: 203)	未经修饰：GAUUAGAGUUACAUCUCCUGA 经修饰 (MS3-234): mG*mA*mUmUfAmGmAmGfUfUfAmCmAfUmCmUmCmCfUmGmA	234	未经修饰：UCAGGAGAUGUAACUCUAAUCCA 经修饰 (MAS3-265): fU*fC*mAmGmGmAmGmAmUmGmUmAmAfCmUmCmUmAmAmUmC*mC*mA	265
141	1588	ATTCTGGCTGAATGTCTCCC (SEQ ID NO: 204)	未经修饰：AUUCUGGCUGAAUGUCUCCCA 经修饰 (MS3-235):	235	未经修饰：UGGGAGACAUUCAGCCAGAAUUU 经修饰 (MAS3-266):	266

[0414]

			mA*mU*mUmCfUmGmGmCfUfGfAmAmUfGmUmCmUmCfCmCmA		fU*fG*mGmGmAmGmAmCmAmUmUmCmAfGmCmCmAmGmAmAmU*mU*mU	

[0415] “m”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“f”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;以及在两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0416] †表8中提供的任一种寡核苷酸和/或靶序列中的每个尿嘧啶碱基(U)可独立地和任选地被胸腺嘧啶碱基(T)替换,以及/或者每个T可独立地和任选地被U替换。表8中所列靶序列包含T,但是考虑了本文中所述的寡核苷酸与RNA和/或DNA的结合。

[0417] ^靶序列起始位置在NM_001306068.3(SEQ ID NO:161)中

[0418] ‡表8中提供的siRNA寡核苷酸可具有不同的修饰模式,所述siRNA寡核苷酸具有如SEQ ID NO所示的相同核碱基序列的有义链和反义链。经修饰的有义链和反义链分别由“MS#”或“MAS#”表示。表8中提供的siRNA寡核苷酸包含没有5’-(E)-乙烯基膦酸酯修饰的反义链。然而,包含具有5’-(E)-乙烯基膦酸酯修饰的反义链的siRNA寡核苷酸也是预期的,并且在本文中由在MAS#前带有“VP”的相同MAS#(即VP-MAS#)表示。表8中提供的siRNA寡核苷酸可以在有义链的5’或3’核苷处与式$NH_2-(CH_2)_6-$的化合物缀合。

[0419] 表9.另外的siRNA的非限制性实例††

[0420]

siRNA编号	靶标起始位置^	靶序列	有义链 (5’-3’)	SEQ ID NO	反义链 (5’-3’)	SEQ ID NO
142	1659	GATGATTAGTTCAGAGATAT (SEQ ID NO: 189)	未经修饰:GAUGAUUAGUUCAGAGAUAUA 经修饰 (MS7-220): mG*mA*mUmGmAmUfUmAfGfUfUmCmAmGmAmGmAmUmA*mU*mA	220	未经修饰:UAUAUCUCUGAACUAAUCAUCCA 经修饰 (VP-MAS6-251): VP-mU*fA*mUmAmUfCmUfCfUmGmAmAmCfUmAfAmUmCmAmUmC*mC*mA	251
143	1641	TTAGAGTTACATCTCCTGGA (SEQ ID NO: 190)	未经修饰:UUAGAGUUACAUCUCCUGGAA 经修饰 (MS8-221): mU*mU*mAmGfAmGmUmUfAfCfAmUmCfUmCmCmUmGfG*mA*mA	221	未经修饰:UUCCAGGAGAUGUAACUCUAAUC 经修饰 (VP-MAS7-252): VP-mU*fU*mCmCmAmGmGmAmGmAmUmGmUfAmAmCmUmCmUmAmA*mU*mC	252
144	1631	CAAACCTGGATTAGAGTTAC (SEQ ID NO: 191)	未经修饰:CAAACCUGGAUUAGAGUUACA 经修饰 (MS7-222): mC*mA*mAmAmCmCfUmGfGfAfUmUmAmG	222	未经修饰:UGUAACUCUAAUCCAGGUUUGCC 经修饰 (VP-MAS6-253): VP-mU*fG*mUmAmAfCmUf	253

[0421]

			mAmGmUmUmA*mC*mA		CfUmAmAmUmCfCmAfGmGmUmUmUmG*mC*mC	
145	1576	TTCTTCCGTGAAATTCTGGC (SEQ ID NO: 200)	未经修饰：UUCUUCCGUGAAAUUCUGGCA 经修饰 (MS8-231): mU*mU*mCmUfUmCmCmGfUfGfAmAmAfUmUmCmUmGfG*mC*mA	231	未经修饰：UGCCAGAAUUUCACGGAAGAACA 经修饰 (VP-MAS7-262): VP-mU*fG*mCmCmAmGmAmAmUmUmUmCmAfCmGmGmAmAmGmAmA*mC*mA	262
146	1627	TAGGCAAACCTGGATTAGAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰：UAGGCAAACCUGGAUUAGAGA 经修饰 (MS9-217): mU*mA*mGmGfCmAfAmAfCfCfUmGmGmAmUfUmAmGmA*mG*mA	217	未经修饰：UCUCUAAUCCAGGUUUGCCUAGA 经修饰 (VP-MAS6-248): VP-mU*fC*mUmCmUfAmAfUfCmCmAmGmGfUmUfUmGmCmCmUmA*mG*mA	248
147	1627	TAGGCAAACCTGGATTAGAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰：UAGGCAAACCUGGAUUAGAGA 经修饰 (MS7-217): mU*mA*mGmGmCmAfAmAfCfCfUmGmGmAmUmUmAmGmA*mG*mA	217	未经修饰：UCUCUAAUCCAGGUUUGCCUAGA 经修饰 (VP-MAS6-248): VP-mU*fC*mUmCmUfAmAfUfCmCmAmGmGfUmUfUmGmCmCmUmA*mG*mA	248
148	1627	TAGGCAAACCTGGATTAGAG (SEQ ID NO: 186)	未经修饰：UAGGCAAACCUGGAUUAGAGA 经修饰 (MS7-217): mU*mA*mGmGmCmAfAmAfCfCfUmGmGmAmUmUmAmGmA*mG*mA	217	未经修饰：UCUCUAAUCCAGGUUUGCCUAGA 经修饰 (VP-MAS5-248): VP-mU*fC*mUmCmUfAmAmUmCmCmAmGmGfUmUfUmGmCmCmUmA*mG*mA	248

[0422] “m”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“f”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;以及在两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。“VP”表示5’-(E)-乙烯基膦酸酯。

[0423] 表9中提供的任一种寡核苷酸和/或靶序列中的每个尿嘧啶碱基(U)可独立地和任选地被胸腺嘧啶碱基(T)替换,以及/或者每个T可独立地和任选地被U替换。表9中所列靶序列包含T,但是考虑了本文中所述的寡核苷酸与RNA和/或DNA的结合。

[0424] 靶序列起始位置在NM_001306068.3(SEQ ID NO:161)中表9中提供的siRNA寡核苷酸可具有不同的修饰模式,所述siRNA寡核苷酸具有如SEQ ID NO所示的相同核碱基序列的有义链和反义链。经修饰的有义链和反义链分别由“MS#”或“MAS#”表示。表9中提供的

siRNA寡核苷酸包含这样的反义链:其包含由MAS#前的“VP”(即VP-MAS#)表示的5’-(E)-乙烯基膦酸酯修饰。也考虑了包含没有5’-(E)-乙烯基膦酸酯修饰的反义链的siRNA寡核苷酸,并且在本文中由没有“VP”的相同的MAS#表示。表9中提供的siRNA寡核苷酸可以在有义链的5’或3’(例如,5’)核苷处与式NH_2-$(CH_2)_6$-的化合物缀合。

[0425] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含长度为18至25个核苷(例如,18、19、20、21、22、23、24或25个核苷)的反义链,并且包含与SEQ ID NO:174至235中任一者所示靶序列的互补区,其中互补区的长度为至少16个核苷酸(例如,16、17、18或19个核苷酸)。在一些实施方案中,反义链的长度为23个核苷酸,并且包含与SEQ ID NO:174至235中任一者所示靶序列的互补区,其中互补区的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中,互补区与其靶序列的全部或部分完全互补。在一些实施方案中,互补区包含1、2、3或更多个错配。

[0426] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链,所述反义链包含SEQ ID NO:236至266中任一者的核苷酸序列的至少15个连续核苷(例如,至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或至少20个)。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸还包含有义链,所述有义链包含SEQ ID NO:205至235中任一者的核苷酸序列的至少15个连续核苷(例如,至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或至少20个)。

[0427] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链,所述反义链包含SEQ ID NO:236至266中任一者的核苷酸序列。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸还包含有义链,所述有义链包含SEQ ID NO:205至235中任一者的核苷酸序列。

[0428] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是包含反义链和有义链的双链寡核苷酸(例如,siRNA),所述反义链包含SEQ ID NO:236至266中任一者的核苷酸序列,所述有义链与反义链杂交并包含SEQ ID NO:205至235中任一者的核苷酸序列,其中所述反义链和/或(例如,和)包含一个或更多个经修饰核苷(例如,2’-经修饰核苷)。在一些实施方案中,一个或更多个经修饰核苷选自2’-O-Me和2’-F修饰的核苷。

[0429] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是包含反义链和有义链的双链寡核苷酸(例如,siRNA),所述反义链包含SEQ ID NO:236至266中任一者的核苷酸序列,所述有义链与反义链杂交并且包含SEQ ID NO:205至235中任一者的核苷酸序列,其中反义链中的每个核苷和/或(例如,和)有义链中的每个核苷是选自以下的2’-经修饰核苷:2’-O-Me和2’-F修饰的核苷。

[0430] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是包含反义链和有义链的双链寡核苷酸(例如,siRNA),所述反义链包含SEQ ID NO:236至266中任一者的核苷酸序列,所述有义链与反义链杂交并且包含SEQ ID NO:205至235中任一者的核苷酸序列,其中反义链中的每个核苷和有义链中的每个核苷是选自以下的2’-经修饰核苷:2’-O-Me和2’-F修饰的核苷,并且其中反义链和/或(例如,和)有义链各自包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链不包含任何硫代磷酸酯核苷间键联(有义链中所有的核苷间键联都是磷酸二酯核苷间键联),并且反义链包含1、2或3个硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含2个硫代磷酸酯核苷间键联,并且反义链包含4个硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含4个硫代磷酸酯核苷间键联,并且反义链包含4个硫代磷酸酯核苷间键联。

[0431] 在一些实施方案中,反义链包含2个硫代磷酸酯核苷间键联,任选地,其中反义链

3’末端的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联,并且反义链中的其余核苷间键联是磷酸二酯核苷间键联。在一些实施方案中,反义链包含4个硫代磷酸酯核苷间键联,任选地,其中反义链3’末端处的两个核苷间键联和5’末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联,并且反义链中的其余核苷间键联是磷酸二酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含2个硫代磷酸酯核苷间键联,任选地,其中有义链5’末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联,并且有义链中的其余核苷间键联是磷酸二酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链包含4个硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,有义链5’末端处的两个核苷间键联和3’末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联,并且有义链中的其余核苷间键联是磷酸二酯核苷间键联。

[0432] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MAS1”):

[0433] fN*fN*mNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmN*fN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,反义链MAS1-236、MAS1-237和MAS1-238包含这种结构。

[0434] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MAS2”):

[0435] fN*fN*mNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,

[0436] 其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,反义链MAS2-236,MAS2-237,MAS2-238,

[0437] MAS2-239,MAS2-240,MAS2-241,MAS2-242,MAS2-243,MAS2-244,MAS2-245,MAS2-246,MAS2-247,MAS2-248,MAS2-249,MAS2-250,MAS2-251,MAS2-252,MAS2-253,MAS2-254,MAS2-255,MAS2-256,和MAS2-257

[0438] 包含这种结构。

[0439] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MAS3”):

[0440] fN*fN*mNmNmNmNmNmNmNmNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,

[0441] 其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,反义链

[0442] MAS3-236,MAS3-237,MAS3-238,MAS3-239,MAS3-240,MAS3-241,MAS3-242,MAS3-243,MAS3-244,MAS3-245,MAS3-246,MAS3-247,MAS3-248,MAS3-249,MAS3-250,MAS3-251,MAS3-252,MAS3-253,MAS3-254,MAS3-255,MAS3-256,MAS3-257,MAS3-258,MAS3-259,MAS3-260,MAS3-261,MAS3-262,MAS3-263,MAS3-264,MAS3-265,和MAS3-266

[0443] 包含这种结构。

[0444] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MAS4”):

[0445] fN*fN*mNmNmNINmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-

甲基(2'-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2'-氟(2'-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;以及两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,反义链

[0446] MAS4-236,MAS4-237,MAS4-238,MAS4-239,MAS4-240,MAS4-241,MAS4-242,MAS4-243,MAS4-244,MAS4-245,MAS4-246,MAS4-247,MAS4-248,MAS4-249,MAS4-250,MAS4-251,MAS4-252,MAS4-253,MAS4-254,MAS4-255,MAS4-256,和MAS4-257

[0447] 包含这种结构。

[0448] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链包含结构(5'至3',在本文中称为“MAS5”):

[0449] mN*fN*mNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2'-氟(2'-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0450] 在一些实施方案中,MAS5结构还包含5'乙烯基膦酸酯(例如,5'-(E)-乙烯基膦酸酯)修饰(5'至3',在本文中称为“VP-MAS5”):

[0451] VP-mN*fN*mNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2'-氟(2'-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联;并且VP表示5'-(E)-乙烯基膦酸酯。例如,在表9中,反义链VP-MAS5-248包含这种结构。

[0452] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链包含结构(5'至3',在本文中称为“MAS6”):

[0453] mN*fN*mNmNmNfNmNININmNmNmNmNINmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2'-氟(2'-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0454] 在一些实施方案中,MAS6结构还包含5'乙烯基膦酸酯(例如,5'-(E)-乙烯基膦酸酯)修饰(5'至3',在本文中称为“VP-MAS6”):

[0455] VP-mN*fN*mNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2'-氟(2'-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联;并且VP表示5'-(E)-乙烯基膦酸酯。例如,在表9中,反义链VP-MAS6-251、VP-MAS6-253和VP-MAS6-248包含这种结构。

[0456] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链包含结构(5'至3',在本文中称为“MAS7”):

[0457] mN*fN*mNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2'-氟(2'-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0458] 在一些实施方案中,MAS7结构还包含5'乙烯基膦酸酯(例如,5'-(E)-乙烯基膦酸酯)修饰(5'至3',在本文中称为“VP-MAS7”):

[0459] VP-mN*fN*mNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2'-氟(2'-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联;并且VP表示5'-(E)-乙烯基膦酸酯。例如,在表9中,反义链VP-MAS7-252和VP-MAS7-262包含这种结构。

[0460] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS1”):

[0461] mN*mN*fNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,有义链MS1-205、MS1-206和MS1-207包含这种结构。

[0462] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS2”):

[0463] mN*mN*mNmNfNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNmNmNmNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,有义链

[0464] MS2-208,MS2-209,MS2-210,MS2-211,MS2-212,MS2-213,MS2-214,MS2-215,MS2-216,MS2-217,MS2-218,MS2-219,MS2-220,MS2-221,MS2-222,MS2-223,MS2-224,MS2-225,和MS2-226

[0465] 包含这种结构。

[0466] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS3”):

[0467] mN*mN*mNmNfNmNmNmNfNfNfNmNmNfNmNmNmNmNfNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,有义链

[0468] MS3-205,MS3-206,MS3-207,MS3-208,MS3-209,MS3-210,MS3-211,MS3-212,MS3-213,MS3-214,MS3-215,MS3-216,MS3-217,MS3-218,MS3-219,MS3-220,MS3-221,MS3-222,MS3-223,MS3-224,MS3-225,MS3-226,MS3-227,MS3-228,MS3-229,MS3-230,MS3-231,MS3-232,MS3-233,MS3-234,和MS3-235包含这种结构。

[0469] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS4”):

[0470] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,有义链

[0471] MS4-205,MS4-206,MS4-207,MS4-208,MS4-209,MS4-210,MS4-211,MS4-212,MS4-213,MS4-214,MS4-215,MS4-216,MS4-217,MS4-218,MS4-219,MS4-220,MS4-221,MS4-222,MS4-223,MS4-224,MS4-225,和MS4-226包含这种结构。

[0472] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS5”):

[0473] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNfNmNmNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,有义链

[0474] MS5-205,MS5-206,MS5-207,MS5-208,MS5-209,MS5-210,MS5-211,MS5-212,MS5-213,MS5-214,MS5-215,MS5-216,MS5-217,MS5-218,MS5-219,MS5-220,MS5-221,MS5-222,

MS5-223,MS5-224,MS5-225,和MS5-226包含这种结构。

[0475] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS6”):

[0476] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNmNmNfNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表8中,有义链

[0477] MS6-205,MS6-206,MS6-207,MS6-208,MS6-209,MS6-210,MS6-211,MS6-212,MS6-213,MS6-214,MS6-215,MS6-216,MS6-217,MS6-218,MS6-219,MS6-220,MS6-221,MS6-222,MS6-223,MS6-224,MS6-225,和MS6-226包含这种结构。

[0478] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS7”):

[0479] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表9中,有义链MS7-220、MS7-222和MS7-217包含这种结构。

[0480] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS8”):

[0481] mN*mN*mNmNfNmNmNmNfNfNfNmNmNfNmNmNmNmNfN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表9中,有义链MS8-221和MS8-231包含这种结构。

[0482] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链包含结构(5’至3’,在本文中称为“MS9”):

[0483] mN*mN*mNmNfNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。例如,在表9中,有义链MS9-217包含这种结构。

[0484] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链选自表8中所列SEQ ID NO:236至266的经修饰形式(例如,MAS1至MAS4)。例如,在一些实施方案中,反义链选自:

[0485] MAS1-236,MAS1-237,MAS1-238,MAS2-236,MAS2-237,MAS2-238,MAS2-239,MAS2-240,MAS2-241,MAS2-242,MAS2-243,MAS2-244,MAS2-245,MAS2-246,MAS2-247,MAS2-248,MAS2-249,MAS2-250,MAS2-251,MAS2-252,MAS2-253,MAS2-254,MAS2-255,MAS2-256,MAS2-257,MAS3-236,MAS3-237,MAS3-238,MAS3-239,MAS3-240,MAS3-241,MAS3-242,MAS3-243,MAS3-244,MAS3-245,MAS3-246,MAS3-247,MAS3-248,MAS3-249,MAS3-250,MAS3-251,MAS3-252,MAS3-253,MAS3-254,MAS3-255,MAS3-256,MAS3-257,MAS3-258,MAS3-259,MAS3-260,MAS3-261,MAS3-262,MAS3-263,MAS3-264,MAS3-265,MAS3-266,MAS4-236,MAS4-237,MAS4-238,MAS4-239,MAS4-240,MAS4-241,MAS4-242,MAS4-243,MAS4-244,MAS4-245,MAS4-246,MAS4-247,MAS4-248,MAS4-249,MAS4-250,MAS4-251,MAS4-252,MAS4-253,MAS4-254,MAS4-255,MAS4-256,和MAS4-257。

[0486] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链选自表8中所列SEQ ID NO:236至266的经修饰形式(例如,MAS5至MAS7)。在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的反义链选自表9中所列SEQ ID NO:251、253、262、248和252的经修饰形式(例如,MAS5、MAS6、MAS7、VP-MAS5、VP-MAS6和VP-MAS7)。例如,在一些实施方案中,反义链选自VP-MAS6-251,VP-MAS7-252,VP-MAS6-253,VP-MAS7-262,VP-MAS6-248和VP-MAS5-248。

[0487] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链选自表8中所列SEQ ID NO:205至235的经修饰形式(例如,MS1至MS6)。例如,在一些实施方案中,有义链选自:

[0488] MS1-205,MS1-206,MS1-207,MS2-208,MS2-209,MS2-210,MS2-211,MS2-212,MS2-213,MS2-214,MS2-215,MS2-216,MS2-217,MS2-218,MS2-219,MS2-220,MS2-221,MS2-222,MS2-223,MS2-224,MS2-225,MS2-226,MS3-205,MS3-206,MS3-207,MS3-208,MS3-209,MS3-210,MS3-211,MS3-212,MS3-213,MS3-214,MS3-215,MS3-216,MS3-217,MS3-218,MS3-219,MS3-220,MS3-221,MS3-222,MS3-223,MS3-224,MS3-225,MS3-226,MS3-227,MS3-228,MS3-229,MS3-230,MS3-231,MS3-232,MS3-233,MS3-234,MS3-235,MS4-205,MS4-206,MS4-207,MS4-208,MS4-209,MS4-210,MS4-211,MS4-212,MS4-213,MS4-214,MS4-215,MS4-216,MS4-217,MS4-218,MS4-219,MS4-220,MS4-221,MS4-222,MS4-223,MS4-224,MS4-225,MS4-226,MS5-205,MS5-206,MS5-207,MS5-208,MS5-209,MS5-210,MS5-211,MS5-212,MS5-213,MS5-214,MS5-215,MS5-216,MS5-217,MS5-218,MS5-219,MS5-220,MS5-221,MS5-222,MS5-223,MS5-224,MS5-225,MS5-226,MS6-205,MS6-206,MS6-207,MS6-208,MS6-209,MS6-210,MS6-211,MS6-212,MS6-213,MS6-214,MS6-215,MS6-216,MS6-217,MS6-218,MS6-219,MS6-220,MS6-221,MS6-222,MS6-223,MS6-224,MS6-225,和MS6-226。

[0489] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链选自表8中所列SEQ ID NO:205至235的经修饰形式(例如,MS7至MS9)。在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸的有义链选自表9中所列SEQ ID NO:220、222、231、217和221的经修饰形式(例如,MS7至MS9)。例如,在一些实施方案中,有义链选自MS7-220、MS8-221、MS7-222、MS8-231、MS9-217和MS7-217。

[0490] 在一些实施方案中,本文中所述寡核苷酸可包含反义链和有义链,所述反义链包含本文中所述的任一种反义链结构(例如,MAS1至MAS4,与其核碱基序列无关),并且所述有义链包含本文中所述的任一种有义链结构(例如,MS1至MS6,与其核碱基序列无关)。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸可包含反义链和有义链,所述反义链包含本文中所述的任一种反义链结构(例如,MAS5、MAS6、MAS7、VP-MAS5、VP-MAS6和VP-MAS7,与其核碱基序列无关),并且有义链包含本文中所述的任一种有义链结构(例如,MS7至MS9,与其核碱基序列无关)。

[0491] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5'至3',MAS3):

[0492] fN*fN*mNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5'至3',MS3):mN*mN*mNmNfNmNmNmNfNfNfNmNmNfNmNmNmNmNfNmNmN,其中"mN"表示2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷;"fN"表示2'-氟(2'-F)修饰的核苷;"*"表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在"*"表示磷酸二酯核苷间键联。

[0493] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5'至3',MAS4):

[0494] fN*fN*mNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’;MS4):

[0495] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;以及两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0496] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS4):

[0497] fN*fN*mNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS6):

[0498] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNmNmNfNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0499] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS2):

[0500] fN*fN*mNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS5):

[0501] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNfNmNmNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0502] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS2):

[0503] fN*fN*mNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS4):

[0504] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0505] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS1):

[0506] fN*fN*mNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmN*fN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’;MS1):

[0507] mN*mN*fNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfNmNfN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0508] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS4):

[0509] fN*fN*mNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’;MS2):

[0510] mN*mN*mNmNfNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNmNmNmNmNmN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键

联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0511] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS5):

[0512] mN*fN*mNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS7):

[0513] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0514] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS6):

[0515] mN*fN*mNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS7):

[0516] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0517] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS 7):

[0518] mN*fN*mNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS8):

[0519] mN*mN*mNmNfNmNmNmNfNfNfNmNmNfNmNmNmNmNfN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0520] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,MAS6):

[0521] mN*fN*mNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS9):

[0522] mN*mN*mNmNfNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,VP-MAS5):

[0523] VP-mN*fN*mNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS7):

[0524] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmN mNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0525] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,VP-MAS6):

[0526] VP-mN*fN*mNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS7):

[0527] mN*mN*mNmNmNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0528] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,VP-MAS7):

[0529] v_P-mN*fN*mNmNmNmNmNmNmNmNmNmNmNfNmNmNmNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS8):

[0530] mN*mN*mNmNfNmNmNmNfNfNfNmNmNfNmNmNmNmNfN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。

[0531] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸包含反义链和有义链,所述反义链包含结构(5’至3’,VP-MAS6):

[0532] VP-mN*fN*mNmNmNfNmNfNfNmNmNmNmNfNmNfNmNmNmNmNmN*mN*mN,所述有义链包含结构(5’至3’,MS9):

[0533] mN*mN*mNmNfNmNfNmNfNfNfNmNmNmNmNfNmNmNmN*mN*mN,其中“mN”表示2’-O-甲基(2’-O-Me)修饰的核苷;“fN”表示2’-氟(2’-F)修饰的核苷;“*”表示硫代磷酸酯核苷间键联;并且两个核苷之间不存在“*”表示磷酸二酯核苷间键联。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是选自表8中所列siRNA的siRNA。在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸是选自表9中所列siRNA的siRNA。

[0534] 在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,选自表8中siRNA的siRNA)可以呈盐形式,例如,作为钠盐、钾盐、镁盐。在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,选自表9中siRNA的siRNA)可以呈盐形式,例如,作为钠盐、钾盐、镁盐。

[0535] 在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸)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,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸)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,磷酸二酯键联存在于间隔基与寡核苷酸的5’或3’核苷之间。在一些实施方案中,本文中所述的任何寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸)的5’或3’核苷(例如,末端核苷)与间隔基缀合,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)R^A-,-C(=O)R^A-,-NR^AC(=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。在一些实施方案中,本文中所述的任何寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸)的5’或3’核苷(例如,末端核苷)与间隔基缀合,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)R^A-,-C(=O)R^A-,-NR^AC(=O)O-,-NR^AC(=O)N(R^A)-,-OC(=O)-,-OC(=O)O-,-OC(=O)N(R^A)-,-S

$(O)_2NR^A-$,$-NR^AS(O)_2-$、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。

[0536] 在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸,有义链或反义链)的5'或3'核苷与式$-NH_2-(CH_2)_n-$化合物缀合,其中n是1至12的整数。在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸,有义链或反义链)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。在一些具体实施方案中,n是6。在一些实施方案中,在式$NH_2-(CH_2)_n-$化合物与寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸,有义链或反义链)的5'或3'核苷之间存在磷酸二酯键联,其中n是1至12的整数。在一些实施方案中,n是6、7、8、9、10、11或12。在一些具体实施方案中,n是6。

[0537] 在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸)的有义链的5'核苷与式$-NH_2-(CH_2)_n-$化合物缀合,其中n是1至12的整数(例如,6)。

[0538] 在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸)的有义链的5'核苷与式$-NH_2-(CH_2)_n-$化合物缀合,其中n是1至12的整数(例如,6)。

[0539] 在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸)的有义链的3'核苷与式$-NH_2-(CH_2)_n-$化合物缀合,其中n是1至12的整数(例如,6)。

[0540] 在一些实施方案中,本文中所述任一种寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸)的有义链的3'核苷与式$-NH_2-(CH_2)_n-$化合物缀合,其中n是1至12的整数(例如,6)。

[0541] 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(例如,有义链或反义链的5'磷酸)之间的反应与寡核苷酸缀合。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(例如,表8中所列寡核苷酸)有义链的5'磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。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(例如,表9中所列寡核苷酸)有义链的5'磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。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(例如,表8中所列寡核苷酸)反义链的5'磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。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(例如,表9中所列寡核苷酸)反义链的5'磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。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3'磷酸(例如有义链或反义链的3'磷酸)之间的反应与寡核苷酸缀合。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(例如,表8中所列寡核苷酸)有义链的3'磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。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(例如,表9中所列寡核苷酸)有义链的3'磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。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(例如,表8中所列寡核苷酸)反义链的3'磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。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(例如,表9中所列寡核苷酸)反义链的3'磷酸之间的反应与寡核苷酸缀合。在一些实施方案中,寡核苷酸通过例如胺基与靶向剂缀合,所述靶向剂例如肌肉靶向剂,例如抗TfR1抗体。

[0542] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸(例如,表8或表9中所列siRNA分子)具有降低的脱靶效应,例如与其他已知的DUX4靶向siRNA相比而言。

[0543] C.接头

[0544] 本文中所述的复合物通常包含共价连接本文中所述的任一种抗TfR1抗体与分子有效载荷的接头。接头包含至少一个共价键。在一些实施方案中,接头可以是共价连接抗TfR1抗体与分子有效载荷的单键,例如二硫键或二硫桥。然而,在一些实施方案中,接头可通过多个共价键共价连接本文中所述的任一种抗TfR1抗体与分子有效载荷。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。接头通常在体外和体内是稳定的,并且在某些细胞环境中可以是稳定的。另外,通常来说接头不负面影响抗TfR1抗体或分子有效载荷的功能特性。接头合成的一些实例和方法是本领域中已知的(参见,例如Kline,T.et al.“Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates.”Pharmaceutical Research,2015,32:11,3480-3493.;Jain,N.et al.“Current ADC Linker Chemistry”Pharm Res.2015,32:11,3526--3540.;McCombs,J.R.and Owen,S.C.“Antibody Drug Conjugates:Design and Selection of Linker,Payload and Conjugation Chemistry”AAPS J.2015,17:2,339-351.)。

[0545] 接头通常将包含允许与抗TfR1抗体和分子有效载荷二者连接的两种不同的反应性物质。在一些实施方案中,两种不同的反应性物质可以是亲核体和/或亲电体。在一些实施方案中,接头包含两种不同的亲电体或亲核体,其对两种不同的亲核体或亲电体具有特异性。在一些实施方案中,接头通过与抗TfR1抗体的赖氨酸残基或半胱氨酸残基缀合而与抗TfR1抗体共价连接。在一些实施方案中,接头通过含马来酰亚胺的接头与抗TfR1抗体的半胱氨酸残基共价连接,其中任选地,含马来酰亚胺的接头包含马来酰亚胺基己酰基或马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸根基团。在一些实施方案中,接头通过3-芳基丙腈官能团与抗TfR1抗体的半胱氨酸残基或巯基官能化的分子有效载荷共价连接。在一些实施方案中,接头与抗TfR1抗体的赖氨酸残基共价连接。在一些实施方案中,接头通过酰胺键、氨基甲酸酯键、酰肼、三唑、硫醚和/或二硫键与抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷独立地共价连接。

[0546] i.可切割接头

[0547] 可切割接头可以是蛋白酶敏感性接头、pH敏感性接头或谷胱甘肽敏感性接头。这些接头通常仅在胞内可切割,并且优选在胞外环境,例如肌细胞的胞外中稳定。

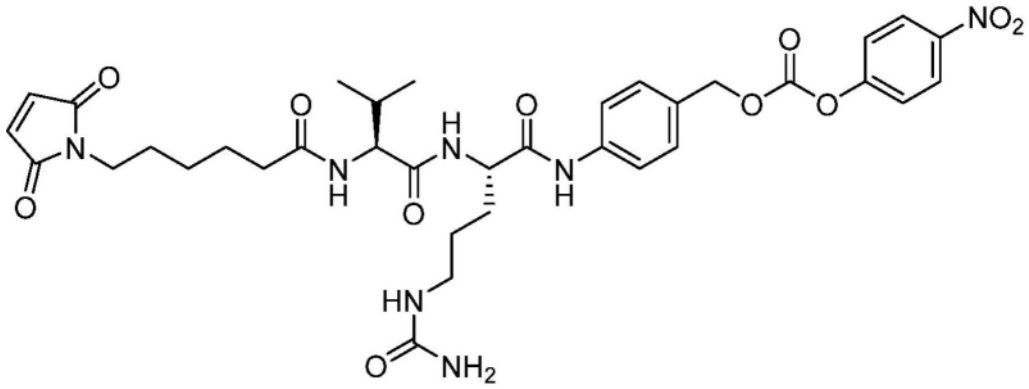
[0548] 蛋白酶敏感性接头可通过蛋白酶酶活性切割。这些接头通常包含肽序列,并且长度可以是2至10个氨基酸、约2至5个氨基酸、约5至10个氨基酸、约10个氨基酸、约5个氨基酸、约3个氨基酸或约2个氨基酸。在一些实施方案中,肽序列可包含天然存在的氨基酸(例如半胱氨酸、丙氨酸)或者非天然存在的或经修饰的氨基酸。非天然存在的氨基酸包括β-氨基酸、高氨基酸、脯氨酸衍生物、3-经取代的丙氨酸衍生物、线性核心氨基酸、N-甲基氨基酸和本领域已知的其他氨基酸。在一些实施方案中,蛋白酶敏感性接头包含缬氨酸-瓜氨酸或丙氨酸-瓜氨酸序列。在一些实施方案中,蛋白酶敏感性接头可被溶酶体蛋白酶(例如组织蛋白酶B(cathepsin B))和/或(例如,和)内体蛋白酶切割。

[0549] pH敏感性接头是在高或低pH环境中容易降解的共价键联。在一些实施方案中,pH敏感性接头可在4至6范围的pH下被切割。在一些实施方案中,pH敏感性接头包含腙或环缩醛。在一些实施方案中,pH敏感性接头在内体或溶酶体内被切割。

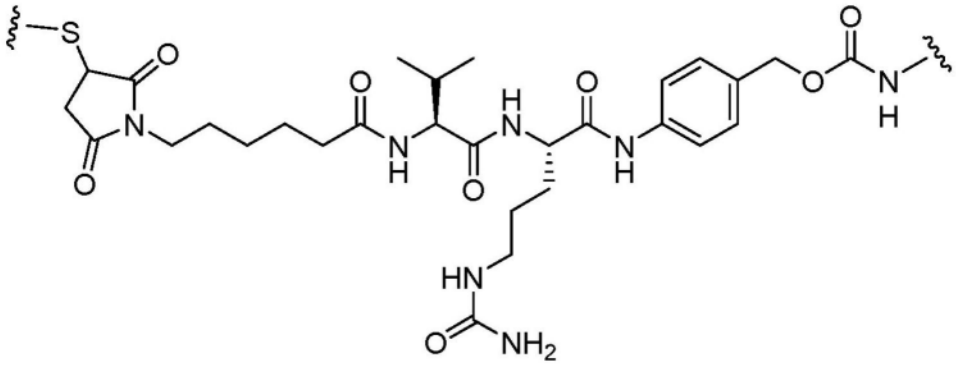
[0550] 在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性接头包含二硫化物部分。在一些实施方案中,

谷胱甘肽敏感性接头通过与细胞内的谷胱甘肽物质进行二硫化物交换反应来切割。在一些实施方案中,二硫化物部分还包含至少一种氨基酸,例如半胱氨酸残基。

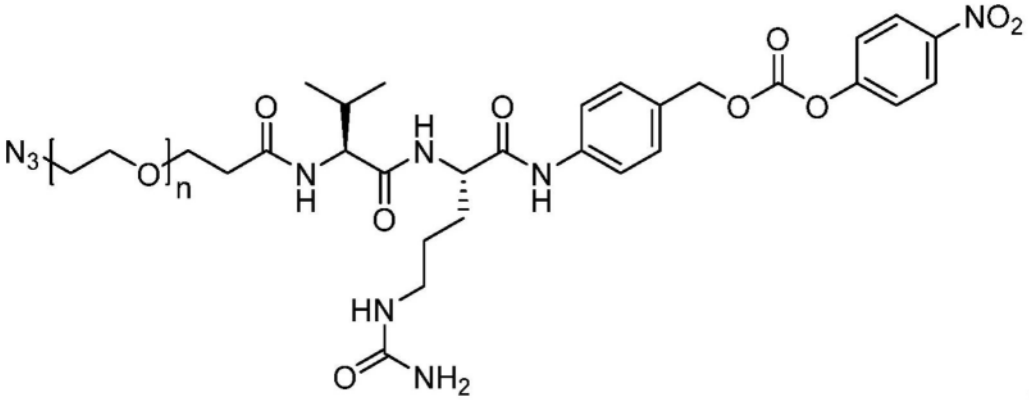
[0551] 在一些实施方案中,接头包含缬氨酸-瓜氨酸序列(例如,如美国专利6,214,345中所述,其通过引用并入本文)。在一些实施方案中,在缀合之前,接头包含以下结构:

[0552] 

[0553] 在一些实施方案中,在缀合之后,接头包含以下结构:

[0554] 

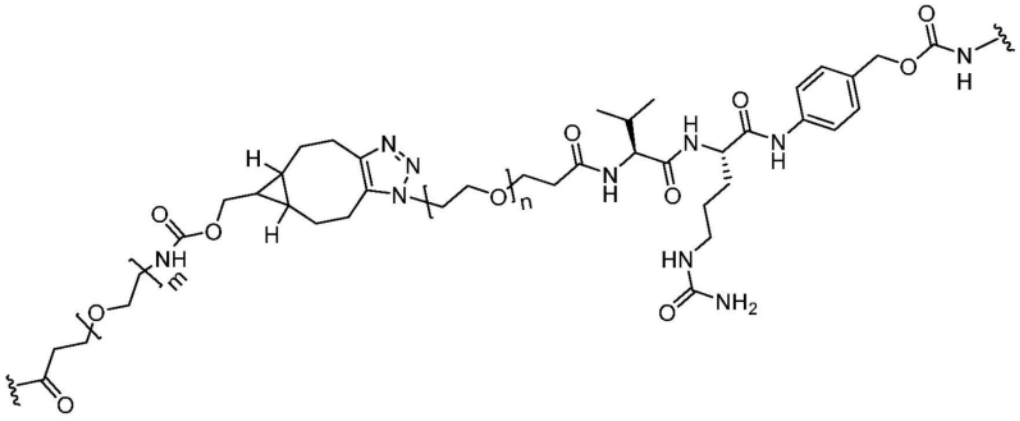
[0555] 在一些实施方案中,在缀合之前,接头包含式(A)结构:

[0556] 

(A)

[0557] 其中n是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3。

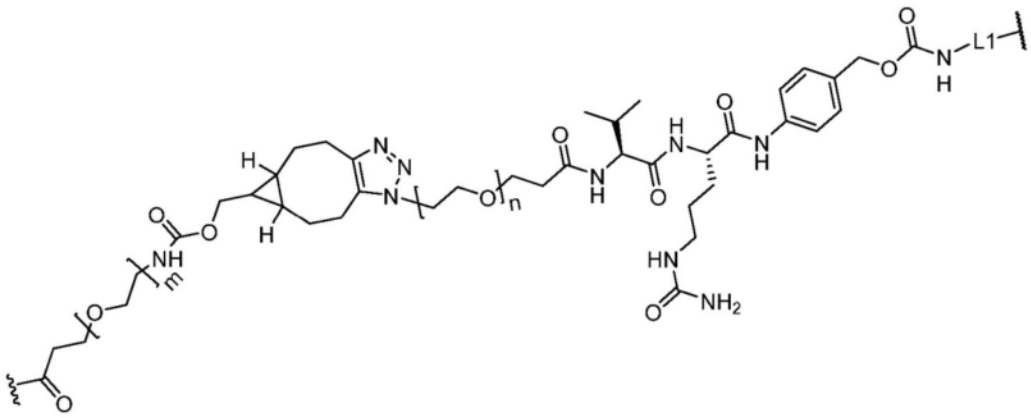
[0558] 在一些实施方案中,接头包含式(H)结构:

[0559] 

(H)，

[0560] 其中n是0至10的任意数字，其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中，n是3和/或(例如，和)m是4。

[0561] 在一些实施方案中，接头包含式(I)结构：

[0562] 

(I)，

[0563] 其中n是0至10的任意数字，其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中，n是3和/或(例如，和)m是4。

[0564] ii.不可切割接头

[0565] 在一些实施方案中，可使用不可切割接头。通常来说，不可切割接头在细胞或生理环境中不容易被降解。在一些实施方案中，不可切割接头包含任选经取代的烷基，其中所述取代可包括卤素、羟基、氧物质和其他常见的取代。在一些实施方案中，接头可包含任选经取代的烷基、任选经取代的亚烷基、任选经取代的亚芳基、亚杂芳基、包含至少一种非天然氨基酸的肽序列、截短的聚糖、不能被酶降解的一种或更多种糖、叠氮化物、炔-叠氮化物、包含LPXT序列的肽序列、硫醚、生物素、联苯、聚乙二醇或等同化合物的重复单元、酸性酯、酰胺、磺酰胺和/或烷氧基-胺接头。在一些实施方案中，分选酶介导的连接可用于共价连接包含LPXT序列的抗TfR1抗体与包含$(G)_n$序列的分子有效载荷(参见，例如Proft T.Sortase-mediated protein ligation:an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization.Biotechnol Lett.2010,32(1):1-10.)。

[0566] 在一些实施方案中，接头可包含经取代的亚烷基、任选经取代的亚烯基、任选经取代的亚炔基、任选经取代的亚环烷基、任选经取代的亚环烯基、任选经取代的亚芳基、还包含至少一个选自N、O和S的杂原子的任选经取代的亚杂芳基；还包含至少一个选自N、O和S的杂原子的任选经取代的亚杂环基；亚氨基、任选经取代的氮物质、任选经取代的氧物质O、任

选经取代的硫物质或聚(环氧烷烃),例如聚环氧乙烷或聚环氧丙烷。在一些实施方案中,接头可以是不可切割的N-γ-马来酰亚胺基丁酰基-氧基琥珀酰亚胺酯(N-gamma-maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester,GMBS)接头。

[0567] iii.接头缀合

[0568] 在一些实施方案中,接头通过磷酸酯、硫醚、醚、碳-碳、氨基甲酸酯、或酰胺键与抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷共价连接。在一些实施方案中,接头通过磷酸酯或硫代磷酸酯基团例如寡核苷酸主链的末端磷酸酯与寡核苷酸共价连接。在一些实施方案中,接头通过抗TfR1抗体上存在的赖氨酸或半胱氨酸残基与该抗TfR1抗体共价连接。

[0569] 在一些实施方案中,接头或其一部分通过叠氮化物和炔烃之间的环加成反应与抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷共价连接以形成三唑,其中叠氮化物或炔烃可位于抗TfR1抗体、分子有效载荷或接头上。在一些实施方案中,炔烃可以是环炔烃,例如环辛炔。在一些实施方案中,炔烃可以是双环壬炔(也称为双环[6.1.0]壬炔或BCN)或经取代的双环壬炔。在一些实施方案中,环辛烷如国际专利申请公开WO2011136645中所述,其于2011年11月3日公开,标题为"Fused Cyclooctyne Compounds And Their Use In Metal-free Click Reactions"。在一些实施方案中,叠氮化物可以是包含叠氮化物的糖或碳水化合物分子。在一些实施方案中,叠氮化物可以是6-叠氮基-6-脱氧半乳糖或6-叠氮基-N-乙酰半乳糖胺。在一些实施方案中,包含叠氮化物的糖或碳水化合物分子如国际专利申请公开WO2016170186中所述,其于2016年10月27日公开,标题为"Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From Aβ(1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase"。在一些实施方案中,在叠氮化物和炔烃之间进行环加成反应以形成三唑,其中叠氮化物或炔烃可位于抗TfR1抗体、分子有效载荷或接头上,如以下中所述:国际专利申请公开WO2014065661,其于2014年5月1日公开,标题为"Modified antibody,antibody-conjugate and process for the preparation thereof";或国际专利申请公开WO2016170186,其于2016年10月27日公开,标题为"Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From Aβ(1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase"。

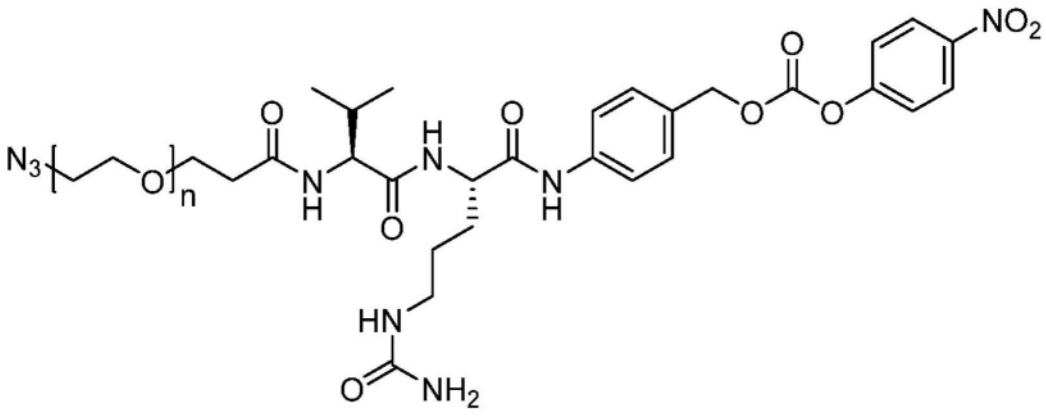
[0570] 在一些实施方案中,接头包含间隔基,例如聚乙二醇间隔基或酰基/胺甲酰基磺酰胺间隔基,例如HydraSpace™间隔基。在一些实施方案中,间隔基如Verkade,J.M.M.et al.,"A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability,Stability,and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates",Antibodies,2018,7,12中所述。

[0571] 在一些实施方案中,接头通过亲二烯体和二烯/杂二烯之间的第尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder reaction)与抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷共价连接,其中亲二烯体或二烯/杂二烯可位于抗TfR1抗体、分子有效载荷或接头上。在一些实施方案中,接头通过其他周环反应(pericyclic reaction)例如烯反应与抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷共价连接。在一些实施方案中,接头通过酰胺、硫代酰胺或磺酰胺键合反应与抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷共价连接。在一些实施方案中,接头通过缩合反应与抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷共价连接,以形成存在于接头和抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷之间的肟、腙或氨基脲基团。

[0572] 在一些实施方案中,接头通过亲核体(例如胺或羟基)和亲电体(例如羧酸、碳酸或醛)之间的共轭加成反应与抗TfR1抗体和/或(例如,和)分子有效载荷共价连接。在一些实施方案中,在进行接头和抗TfR1抗体或分子有效载荷之间的反应之前,亲核体可存在于接头上并且亲电体可存在于抗TfR1抗体或分子有效载荷上。在一些实施方案中,在进行接头和抗TfR1抗体或分子有效载荷之间的反应之前,亲电体可存在于接头上并且亲核体可存在于抗TfR1抗体或分子有效载荷上。在一些实施方案中,亲电体可以是叠氮化物、五氟苯基、硅中心、羰基、羧酸、酸酐、异氰酸酯、硫代异氰酸酯、琥珀酰亚胺酯、磺基琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺、烷基卤化物、烷基假卤化物、环氧化物、环硫化物、氮丙啶、芳基、活化的磷中心和/或活化的硫中心。在一些实施方案中,亲核体可以是任选经取代的烯烃、任选经取代的炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂环基、羟基、氨基、烷基氨基、苯胺基和/或硫醇基。

[0573] 在一些实施方案中,接头包含与反应性化学部分(例如,用于点击化学的叠氮化物部分或BCN部分)共价连接的缬氨酸-瓜氨酸序列。在一些实施方案中,包含与反应性化学部分(例如,用于点击化学的叠氮化物部分)共价连接的缬氨酸-瓜氨酸序列的接头包含式(A)结构:

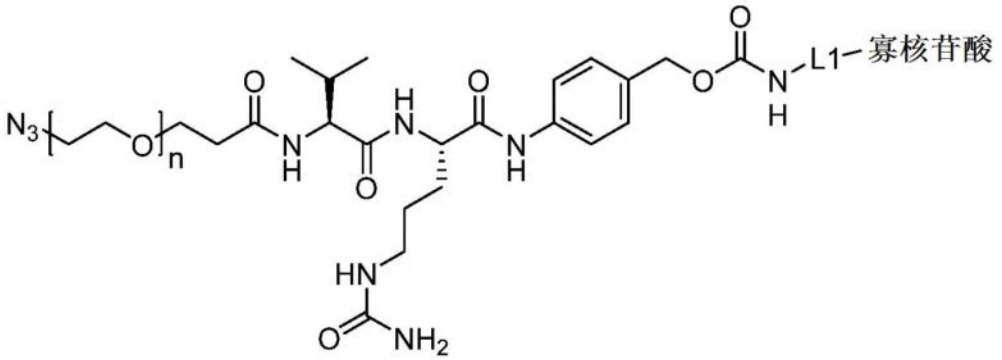
[0574]



(A)

[0575] 其中n是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3。

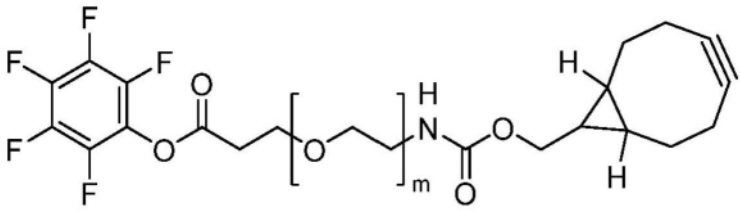
[0576] 在一些实施方案中,包含式(A)结构的接头(例如,任选地通过另外的化学部分)与分子有效载荷(例如,寡核苷酸)共价连接。在一些实施方案中,分子有效载荷是双链siRNA寡核苷酸,并且包含式(A)结构的接头(例如,任选地通过另外的化学部分)与siRNA寡核苷酸的有义链(例如,在5’末端处)共价连接。在一些实施方案中,分子有效载荷是双链siRNA寡核苷酸,并且包含式(A)结构的接头(例如,任选地通过另外的化学部分)与siRNA寡核苷酸的有义链(例如,在3’末端处)共价连接。在一些实施方案中,包含式(A)结构的接头与寡核苷酸共价连接,例如通过与胺-L1-寡核苷酸形成氨基甲酸酯键的亲核取代而共价连接,从而产生包含式(B)结构的化合物:

[0577] 

(B)

[0578] 其中n是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3。在一些实施方案中,包含式(B)结构的化合物的寡核苷酸包含siRNA寡核苷酸的有义链。在一些实施方案中,反义链与siRNA寡核苷酸的有义链退火(例如,在25℃至105℃的退火温度下)。在一些实施方案中,退火步骤在以下的退火温度下进行:25℃至150℃(例如,25℃至150℃、25℃至100℃、25℃至75℃、25℃至50℃、25℃至40℃、25℃至30℃、30℃至150℃、30℃至100℃、30℃至75℃、30℃至50℃、30℃至40℃、75℃至150℃、75℃至125℃、或75℃至100℃)。在一些实施方案中,退火步骤在100℃的退火温度下进行。例如,退火反应混合物可以在100℃下孵育(例如,3、4、5、6、7、8、9、10分钟或更长),并允许在室温下冷却以使有义链和反义链退火。在一些实施方案中,退火步骤在20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃的退火温度下进行。在一些实施方案中,退火步骤在30℃的退火温度下进行。例如,退火反应混合物可以在30℃下孵育(例如,1至24小时,例如1至24小时、5至20小时、5至15小时、5至10小时、1至5小时、10至24小时、10至20小时、10至15小时、15至24小时、15至20小时或20至24小时,或过夜)以使有义链和反义链退火。在一些实施方案中,包含式(B)结构的化合物的寡核苷酸包含siRNA寡核苷酸,该寡核苷酸包含有义链和反义链,其中有义链的5'末端与L1共价连接。在一些实施方案中,式(B)寡核苷酸包含含有有义链和反义链的siRNA寡核苷酸,其中有义链的3'末端与L1共价连接。

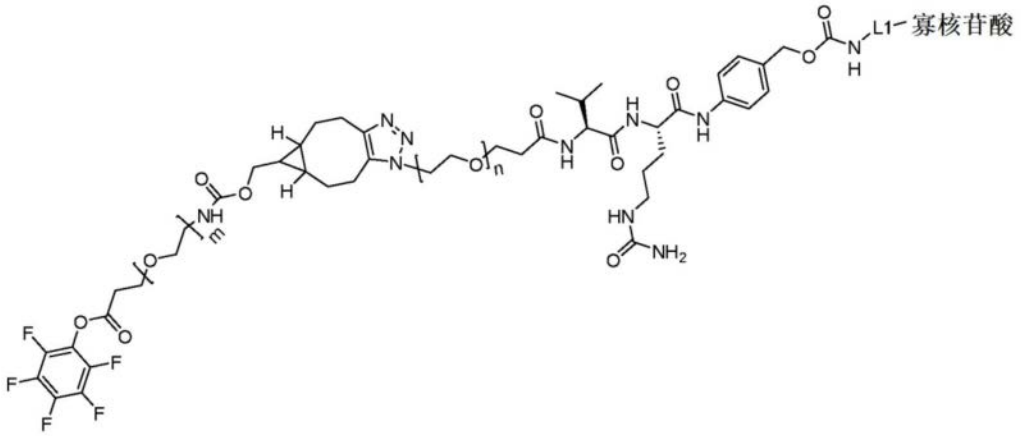
[0579] 在一些实施方案中,式(B)化合物通过三唑与另外的部分进一步共价连接,其中三唑通过双环壬炔上提供的炔烃与式(A)或式(B)的叠氮化物之间的点击反应形成。在一些实施方案中,包含双环壬炔的化合物包含式(C)结构:

[0580] 

(C)

[0581] 其中m是0至10的任何数字。在一些实施方案中,m是4。在一些实施方案中,在包含式(B)结构的化合物与包含式(C)结构的化合物之间的点击反应中,式(C)化合物是摩尔过量的(例如,(C)与(B)的摩尔比为3:1或4:1)。在一些实施方案中,在包含式(B)结构的化合物与包含式(C)结构的化合物之间的点击反应中,式(B)化合物是摩尔过量的(例如,(C)与(B)的摩尔比为0.9:1或0.85:1)。

[0582] 在一些实施方案中,结构(B)的化合物的叠氮化物通过与结构(C)的化合物的炔烃的点击反应形成三唑,从而形成包含式(D)结构的化合物:

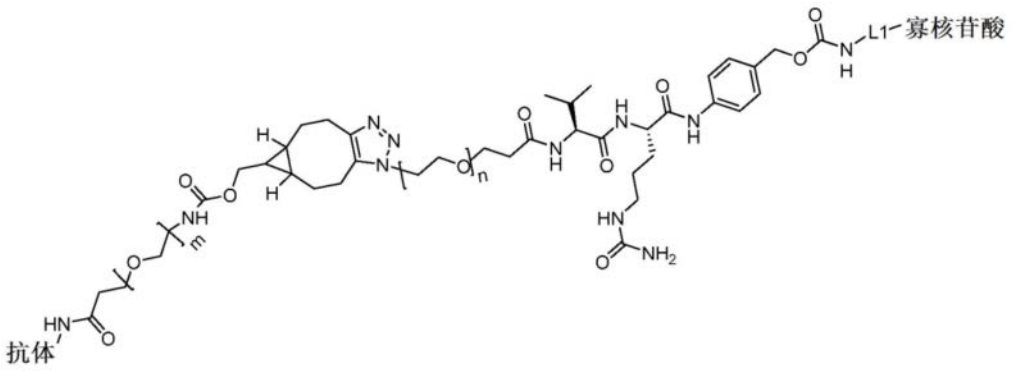
[0583] 

(D)，

[0584] 其中n是0至10的任意数字，并且其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中，n是3并且m是4。在一些实施方案中，式(D)寡核苷酸包含含有有义链和反义链的siRNA寡核苷酸，其中有义链的5’末端与L1共价连接。在一些实施方案中，式(D)寡核苷酸包含含有有义链和反义链的siRNA寡核苷酸，其中有义链的3’末端与L1共价连接。在一些实施方案中，包含式(D)结构的化合物在与抗TfR1抗体的赖氨酸进一步共价连接之前被分离。在一些实施方案中，当包含式(D)结构的化合物在与抗TfR1抗体的赖氨酸进一步共价连接之前被分离时，在包含式(B)结构的化合物与包含式(C)结构的化合物之间的点击反应中，包含式(C)结构的化合物与包含式(B)结构的化合物之间的摩尔比大于1，例如3:1或4:1。

[0585] 在一些实施方案中，包含式(D)结构的化合物在与抗TfR1抗体的赖氨酸进一步共价连接之前不被分离。在一些实施方案中，当包含式(D)结构的化合物在与抗TfR1抗体的赖氨酸进一步共价连接之前不被分离时，在包含式(B)结构的化合物与包含式(C)结构的化合物之间的点击反应中，包含式(C)结构的化合物与包含式(B)结构的化合物之间的摩尔比小于1，例如0.9:1或0.85:1。

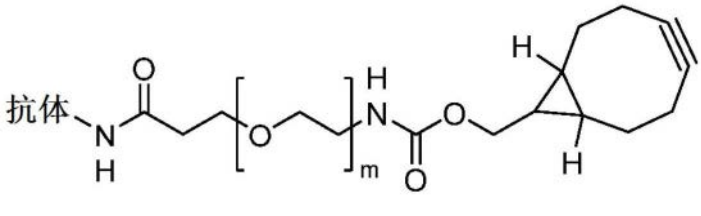
[0586] 在一些实施方案中，结构(D)化合物与抗TfR1抗体的赖氨酸进一步共价连接，从而形成包含式(E)结构的复合物：

[0587] 

(E)，

[0588] 其中n是0至10的任意数字，其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中，n是3和/或(例如，和)m是4。应理解，在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺例如赖氨酸ε胺的反应产生的。在一些实施方案中，式(E)寡核苷酸包含含有有义链和反义链的siRNA寡核苷酸，其中有义链的5’末端与L1共价连接。在一些实施方案中，式(E)寡核苷酸包含含有有义链和反义链的siRNA寡核苷酸，其中有义链的3’末端与L1共价连接。

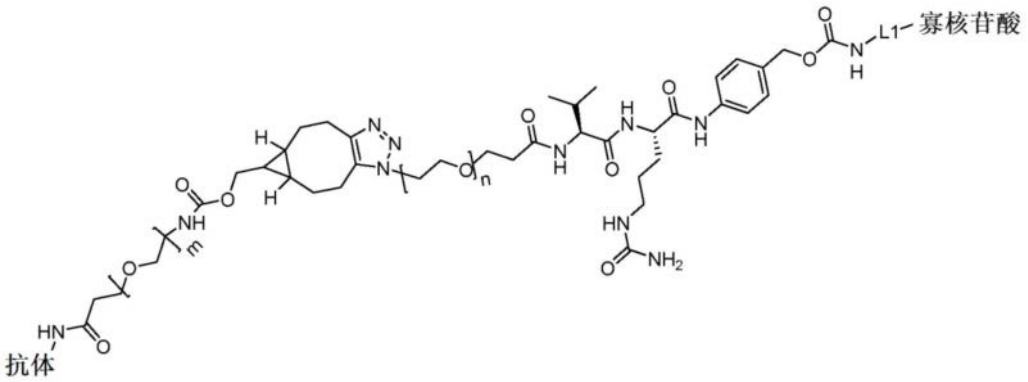
[0589] 在一些实施方案中,式(C)化合物与抗TfR1抗体的赖氨酸进一步共价连接,从而形成包含式(F)结构的化合物:

[0590] 

(F)

[0591] 其中m是0至15(例如4)。应理解,在式(F)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。

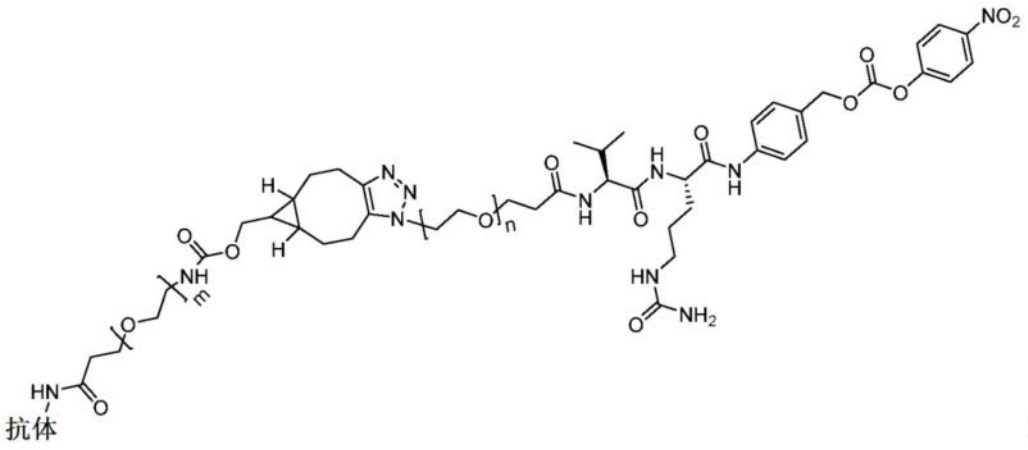
[0592] 在一些实施方案中,结构(B)化合物的叠氮化物通过与结构(F)化合物的炔烃的点击反应形成三唑,从而形成包含式(E)结构的复合物:

[0593] 

(E),

[0594] 其中n是0至10的任意数字,其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3和/或(例如,和)m是4。应理解,式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,式(E)寡核苷酸包含含有有义链和反义链的siRNA寡核苷酸,其中有义链的5'末端与L1共价连接。在一些实施方案中,式(E)寡核苷酸包含含有有义链和反义链的siRNA寡核苷酸,其中有义链的3'末端与L1共价连接。

[0595] 在一些实施方案中,结构(A)化合物的叠氮化物通过与结构(F)化合物的炔烃的点击反应形成三唑,从而形成包含式(G)结构的化合物:

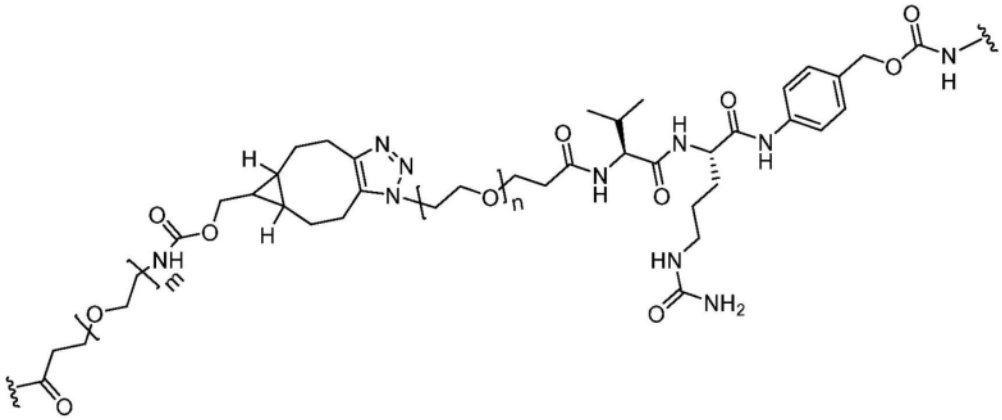
[0596] 

(G),

[0597] 其中n是0至10的任意数字,其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3和/或(例如,和)m是4。在一些实施方案中,寡核苷酸与包含式(G)结构的化合物共价连接,

从而形成包含式(E)结构的复合物。应理解,式(G)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。

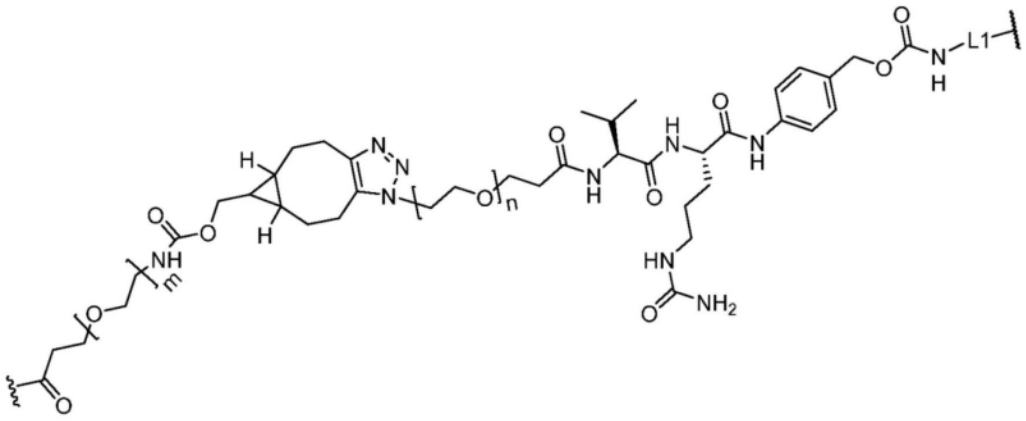
[0598] 在一些实施方案中,在本文中所述的任一复合物中,抗TfR1抗体通过抗TfR1抗体的赖氨酸经由包含式(H)结构的接头与分子有效载荷(例如,寡核苷酸)共价连接:

[0599] 

(H),

[0600] 其中n是0至10的任意数字,其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3和/或(例如,和)m是4。

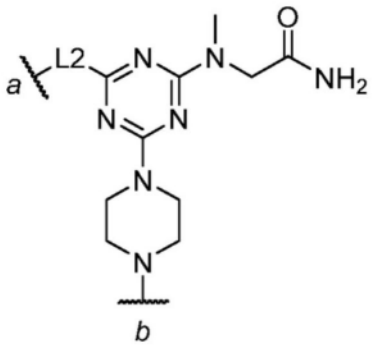
[0601] 在一些实施方案中,在本文中所述的任一复合物中,抗TfR1抗体通过抗TfR1抗体的赖氨酸经由包含式(I)结构的接头与分子有效载荷(例如,寡核苷酸)共价连接:

[0602] 

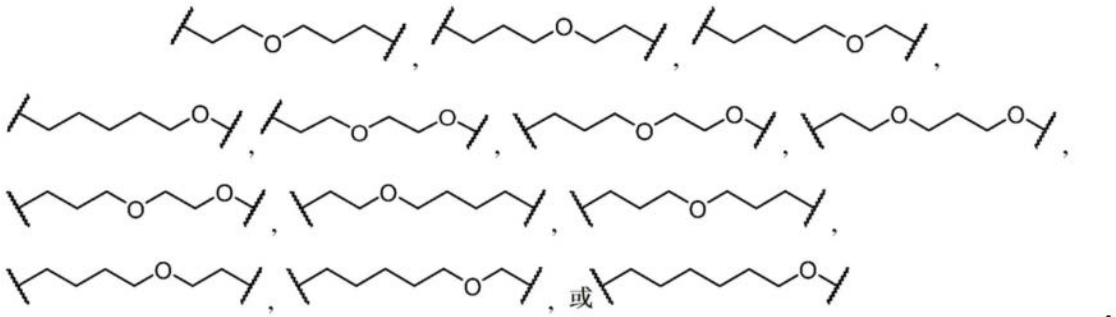
(I),

[0603] 其中n是0至10的任意数字,其中m是0至10的任意数字。在一些实施方案中,n是3和/或(例如,和)m是4。

[0604] 在一些实施方案中,在式(B)、(D)、(E)和(I)中,L1是间隔基,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)R^A-,-C(=O)R^A-,-NR^AC(=O)O-,-NR^AC(=O)N(R^A)-,-OC(=O)-,-OC(=O)O-,-OC(=O)N(R^A)-,-$S(O)_2NR^A$-,-$NR^AS(O)_2$-或其组合,其中每个R^A独立地是氢或者经取代或未经取代的烷基。在一些实施方案中,L1是

[0605] 

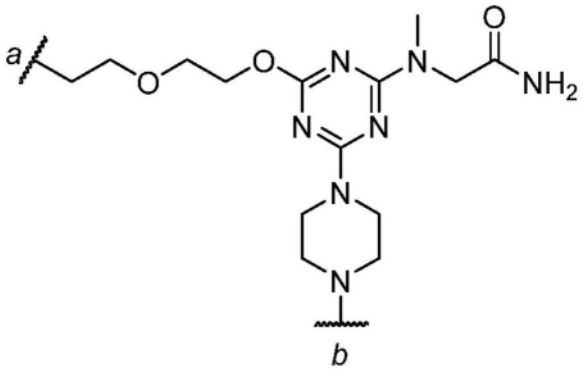
[0606] 其中L2是

[0607] 

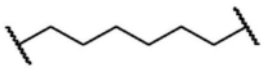
;

[0608] 其中a标记与式(B)、(D)、(E)和(I)的氨基甲酸酯部分直接连接的位点;以及b标记与寡核苷酸共价连接(直接或通过另外的化学部分进行连接)的位点。

[0609] 在一些实施方案中,L1是:

[0610] 

[0611] 其中a标记与式(B)、(D)、(E)和(I)的氨基甲酸酯部分直接连接的位点;以及b标记与寡核苷酸共价连接(直接或通过另外的化学部分进行连接)的位点。

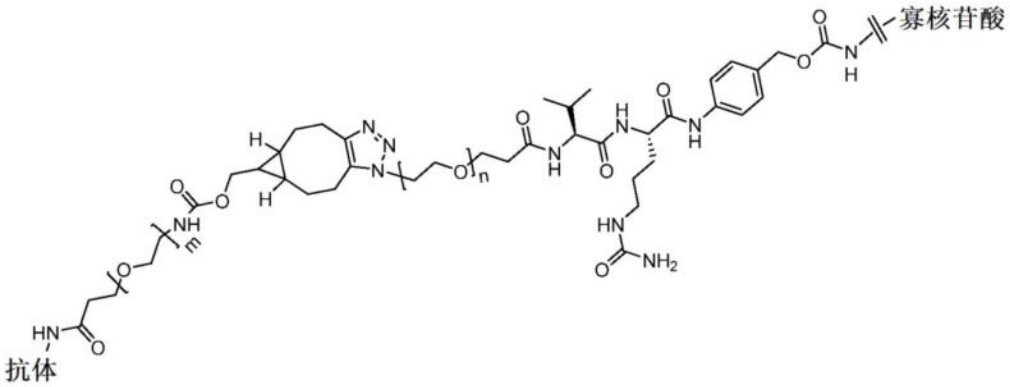
[0612] 在一些实施方案中,L1是  。

[0613] 在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的5’磷酸连接。在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的5’磷酸的键联在L1与寡核苷酸之间形成磷酸二酯键。

[0614] 在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的3’磷酸连接。在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的3’磷酸的键联在L1与寡核苷酸之间形成磷酸二酯键。

[0615] 在一些实施方案中,L1是任选的(例如,不是必要存在的)。

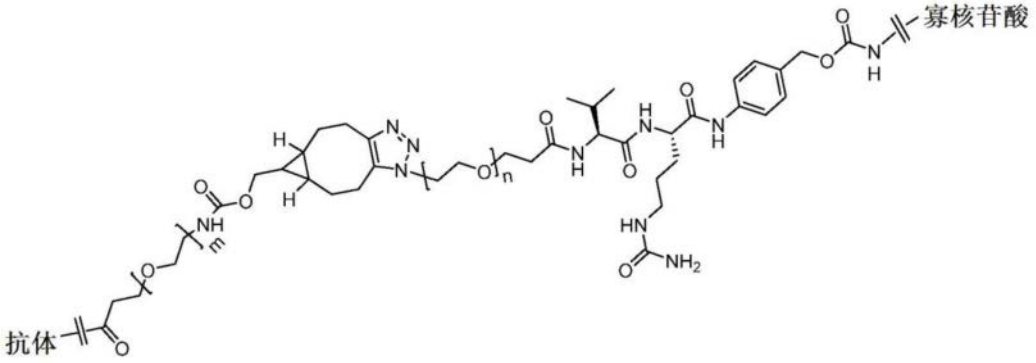
[0616] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种复合物具有式(J)结构:

[0617] 

(J)，

[0618] 其中n是0至15(例如,3)并且m是0至15(例如,4)。应理解,式(J)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。

[0619] 在一些实施方案中,本文中所述的任一种复合物具有式(K)结构:

[0620] 

(K)，

[0621] 其中n是0至15(例如,3)并且m是0至15(例如,4)。

[0622] 在一些实施方案中,在与化合物(例如,式(A)或式(G)化合物)连接之前,寡核苷酸经修饰以包含胺基,所述胺基在5'末端、3'末端或内部(例如,作为胺官能化的核碱基)。

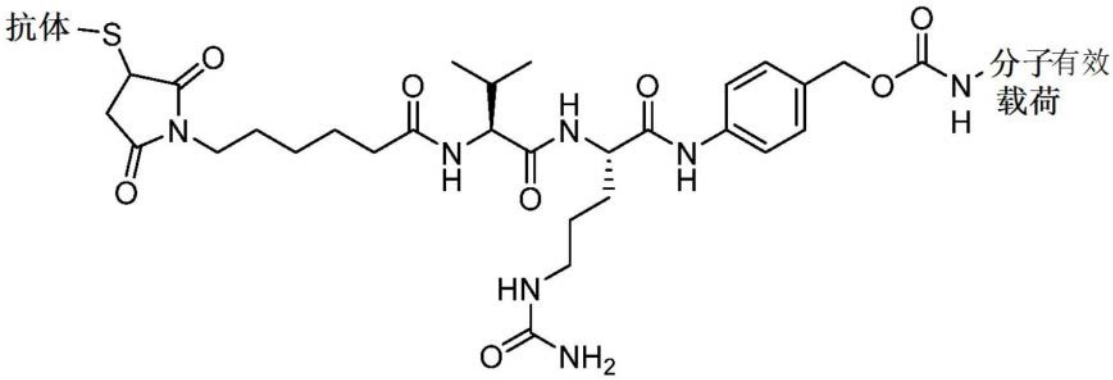
[0623] 尽管在抗TfR1抗体和寡核苷酸分子有效载荷的上下文中描述了接头缀合,但应理解,预期在其他肌肉靶向剂(例如,其他肌肉靶向抗体)和/或其他分子有效载荷上使用这样的接头缀合。

[0624] D.抗体-分子有效载荷复合物的一些实例

[0625] 本文中还提供了包含与本文中所述的任何分子有效载荷(例如,寡核苷酸)共价连接的任一种本文中所述的抗TfR1抗体的复合物的一些非限制性实例。在一些实施方案中,抗TfR1抗体(例如,表2至7中提供的任一种抗TfR1抗体)通过接头与分子有效载荷(例如,包含SEQ ID NO:174至266中任一者的核苷酸序列的至少12个(例如,至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个或至少19个)连续核苷酸的寡核苷酸)共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体(例如,表2至7中提供的任一种抗TfR1抗体)通过接头与分子有效载荷(例如,寡核苷酸,例如表8中提供的寡核苷酸)共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体(例如,表2至7中提供的任一种抗TfR1抗体)通过接头与分子有效载荷(例如,寡核苷酸,例如表9中提供的寡核苷酸)共价连接。可使用本文中所述的任何接头。在一些实施方案中,如果分子有效载荷是寡核苷酸,则接头与有义链和反义链的5'末端、3'末端或内部连接。在一些实施方案中,分子有效载荷是siRNA,接头与有义链的5'末端连接。在一些实施方案中,分子有效载荷是siRNA,接头与有义链的3'末端连接。在一些实施方案中,接

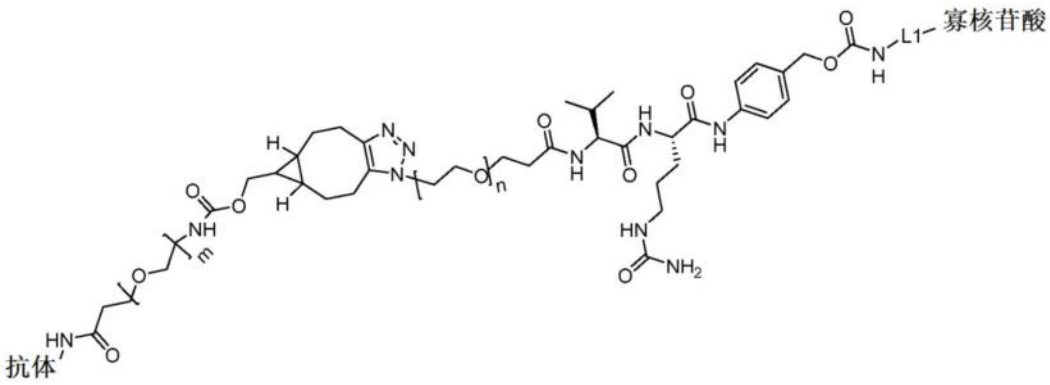
头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗TfR1抗体中的半胱氨酸)与抗TfR1抗体连接。在一些实施方案中,接头(例如,包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头)通过胺基(例如,通过抗体中的赖氨酸)与抗体(例如,本文中所述的抗TfR1抗体)连接。在一些实施方案中,分子有效载荷是寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸)。在一些实施方案中,分子有效载荷是寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸)。在一些实施方案中,分子有效载荷是siRNA的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是siRNA的反义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含有义链和反义链的siRNA。

[0626] 以下提供了复合物的结构的一个实例,所述复合物包含通过接头与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体:

[0627] 

[0628] 其中接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体连接。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含SEQ ID NO:174至266中任一者的核苷酸序列的至少12个(例如,至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个或至少19个)连续核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含SEQ ID NO:174至266中任一者的核苷酸序列的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0629] 以下提供了复合物的结构的另一个实例,所述复合物包含通过接头与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体:

[0630] 

(E)

[0631] 其中n是0至10的数字,其中m是0至10的数字,其中接头通过胺基(例如,在赖氨酸残基上)与抗体连接,和/或(例如,和)其中接头与有义链或反义链(例如,在5’末端、3’末端或内部)连接。在一些实施方案中,接头与有义链的5’末端连接。在一些实施方案中,接头与有义链的3’末端连接。在一些实施方案中,接头通过赖氨酸与抗体连接,接头在5’末端与寡核苷酸连接,n是3并且m是4。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含SEQ ID NO:174至266中任一者的核苷酸序列的至少12个(例如,至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个或至少19个)核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含SEQ ID NO:174至266中任一者的核苷酸序列的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,L1是本文中所述的任一种间隔基。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。

[0632] 应理解,抗体可与具有不同化学计量的分子有效载荷连接,该特性可被称为药物抗体比(drug to antibody ratio,DAR),其中“药物”是分子有效载荷。在一些实施方案中,一个分子有效载荷与一个抗体连接(DAR=1)。在一些实施方案中,两个分子有效载荷与一个抗体连接(DAR=2)。在一些实施方案中,三个分子有效载荷与一个抗体连接(DAR=3)。在一些实施方案中,四个分子有效载荷与一个抗体连接(DAR=4)。在一些实施方案中,提供了不同复合物的混合物,各复合物具有不同的DAR。在一些实施方案中,这样的混合物中的复合物的平均DAR可在1至3、1至4、1至5或更大的范围内。可通过将分子有效载荷缀合至抗体上的不同位点和/或(例如,和)通过将多聚体缀合至抗体上的一个或更多个位点来提高DAR。例如,可通过将单个分子有效载荷缀合至抗体上的两个不同位点或通过将二聚体分子有效载荷缀合至抗体的单个位点来实现DAR为2。

[0633] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的本文中所述的抗TfR1抗体(例如,表2至7中提供的抗体)。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过接头(例如,包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头)与分子有效载荷共价连接的本文中所述的抗TfR1抗体(例如,表2至7中提供的抗体)。在一些实施方案中,接头(例如,包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头)通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体(例如,本文中所述的抗TfR1抗体)连接。在一些实施方案中,接头(例如,包含缬氨酸-瓜氨酸序列的接头)通过胺基(例如,通过抗体中的赖氨酸)与抗体(例如,本文中所述的抗TfR1抗体)连接。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含SEQ ID NO:174至266中任一者的核苷酸序列的至少12个(例如,至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个或至少19个)核苷酸的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含SEQ ID NO:174至266中任一者的核苷酸序列的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具

有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0634] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含表2中所列任一种抗体中的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0635] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含VH和VL,所述VH含有SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:72的氨基酸序列,所述VL含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0636] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含VH和VL,所述VH含有SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:76的氨基酸序列,所述VL含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0637] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含VH和VL,所述VH含有SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:76的氨基酸序列,所述VL含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个

连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0638] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含VH和VL,所述VH含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列,所述VL含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0639] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含VH和VL,所述VH含有SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:79的氨基酸序列,所述VL含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0640] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含VH和VL,所述VH含有SEQ ID NO:154的氨基酸序列,所述VL含有SEQ ID NO:155的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0641] 在一些实施方案中,分子有效载荷是寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸)。在一些实施方案中,分子有效载荷是寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸)。

[0642] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中的靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0643] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:91的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0644] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:91的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0645] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:92或SEQ ID NO:94的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0646] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核

苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0647] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0648] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和VL,所述重链包含SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:99的氨基酸序列,所述VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0649] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:100或SEQ ID NO:101的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0650] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:100或SEQ ID NO:101的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施

方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

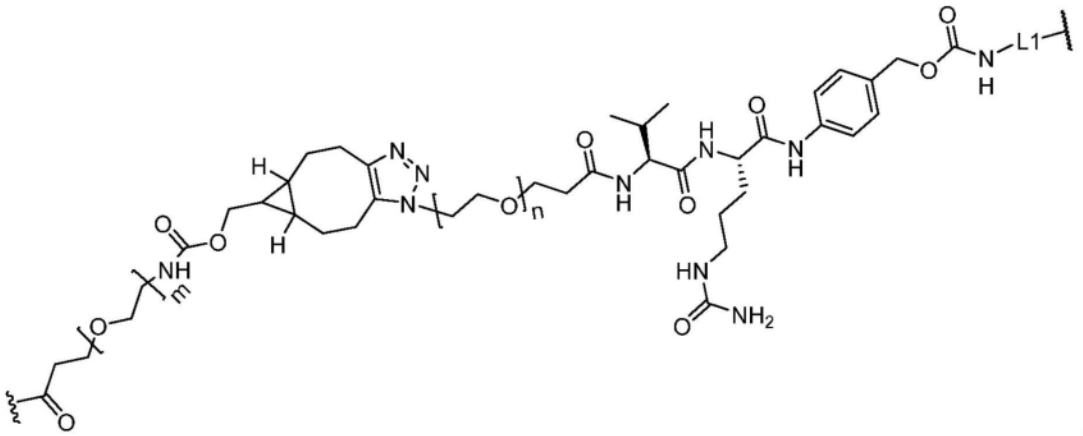
[0651] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中的靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0652] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:102或SEQ ID NO:103的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0653] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与分子有效载荷共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:158或SEQ ID NO:159的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表8中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表8中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。在一些实施方案中,分子有效载荷是包含反义链的寡核苷酸,所述反义链包含针对DUX4 mRNA中靶序列(例如,表9中所列靶序列)的具有至少16个核苷酸的互补区,任选地,其中反义链包含表9中所列任一种反义序列的至少16个连续核苷酸,任选地,其中寡核苷酸还包含与反义链杂交的有义链。

[0654] 在一些实施方案中,分子有效载荷是寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸)。在一些实施方案中,分子有效载荷是寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸)。

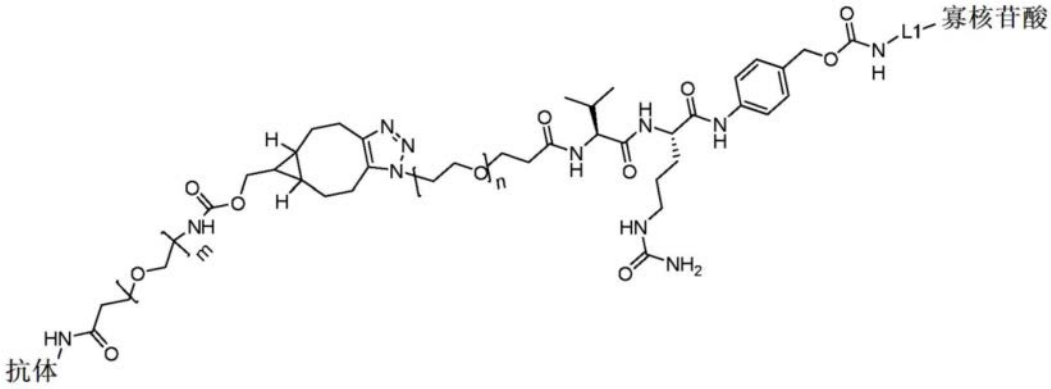
[0655] 在本文中所述的任何示例性复合物中,在一些实施方案中,抗TfR1抗体通过包含式(I)结构的接头与分子有效载荷共价连接:

[0656] 

(I)

[0657] 其中n是3,m是4。

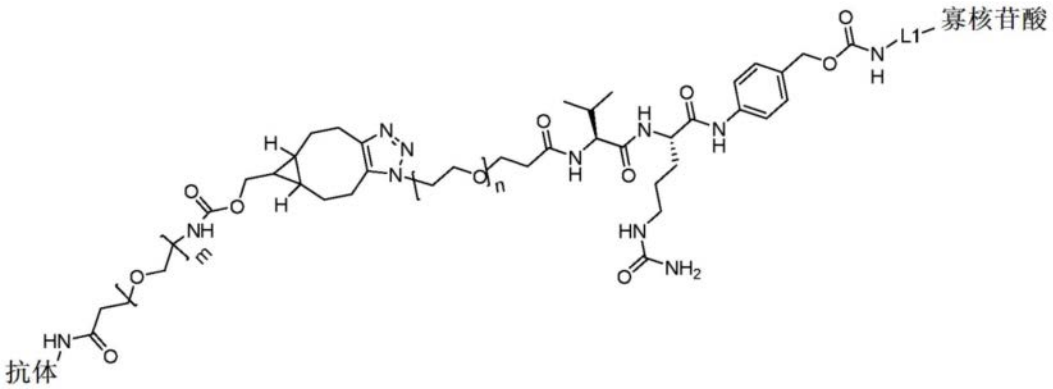
[0658] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含抗TfR1抗体,所述抗TfR1抗体通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述的寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接,其中抗TfR1抗体包含表2中所列任一种抗体中的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中该复合物具有式(E)结构:

[0659] 

(E)

[0660] 其中n是3,并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3’末端共价连接。

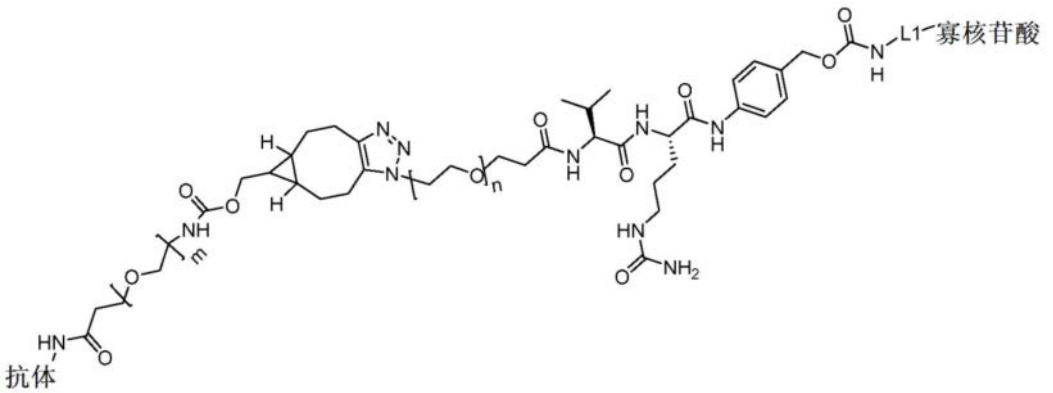
[0661] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含表2中所列任一种抗体的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中该复合物具有式(E)结构:

[0662] 

(E)

[0663] 其中n是3,并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端或3’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3’末端共价连接。

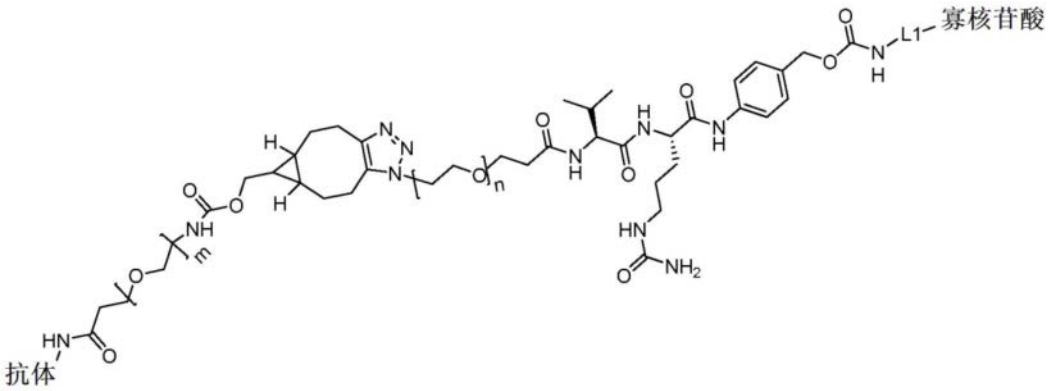
[0664] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含表3中所列任一种抗体的VH和VL,其中该复合物具有式(E)结构:

[0665] 

(E)

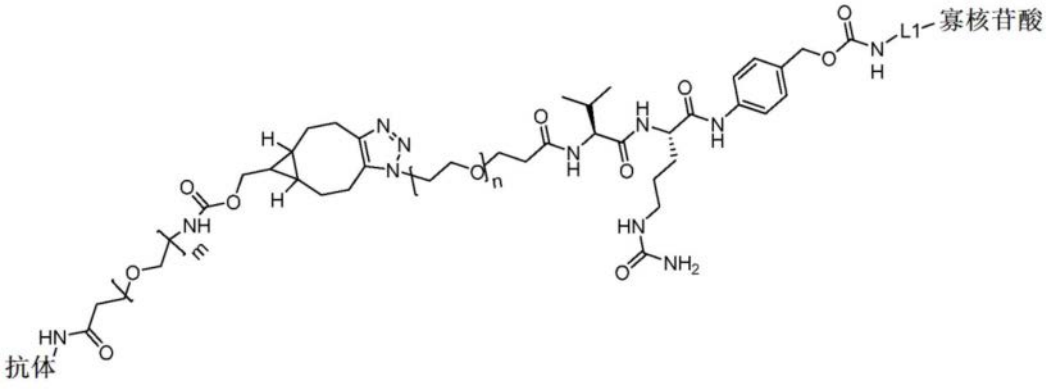
[0666] 其中n是3,并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3’末端共价连接。

[0667] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含表3中所列任一种抗体的VH和VL,其中该复合物具有式(E)结构:

[0668] 

(E)

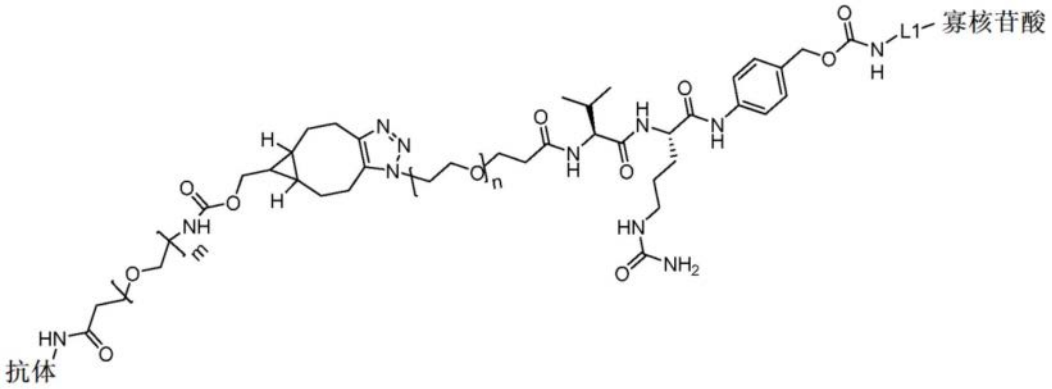
[0669] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端或3’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3’末端共价连接。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述的寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含表4中所列任一种抗体的重链和轻链,其中该复合物具有式(E)结构:

[0670] 

(E)

[0671] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3’末端共价连接。

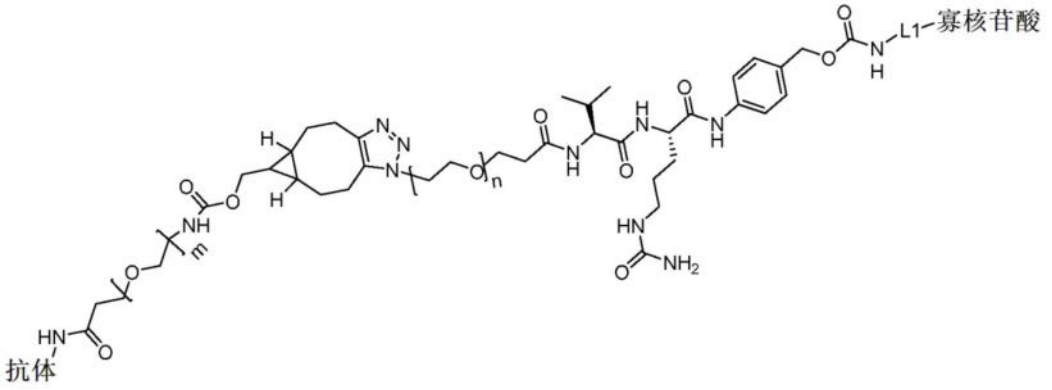
[0672] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接的抗TfR1抗体,其中所述抗TfR1抗体包含表4中所列任一种抗体的重链和轻链,其中所述复合物具有式(E)结构:

[0673] 

(E)

[0674] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端或3’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3’末端共价连接。

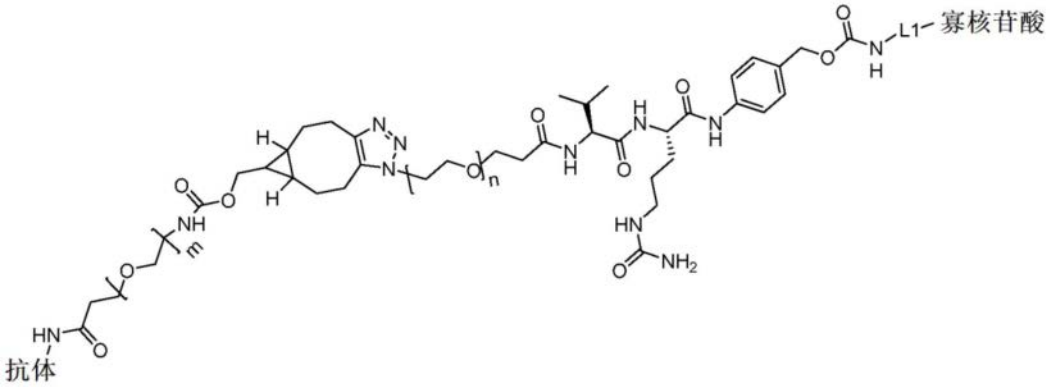
[0675] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含作为通过抗TfR1 Fab中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接的Fab的抗TfR1抗体,其中抗TfR1 Fab包含表5中所列任一种抗体的重链和轻链,其中该复合物具有式(E)结构:

[0676] 

(E)

[0677] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3’末端共价连接。

[0678] 在一些实施方案中,本文中所述复合物包含作为通过抗TfR1 Fab中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接的Fab的抗TfR1抗体,其中抗TfR1 Fab包含表5中所列任一种抗体的重链和轻链,其中该复合物具有式(E)结构:

[0679] 

(E)

[0680] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端或3’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5’末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3’末端共价连接。

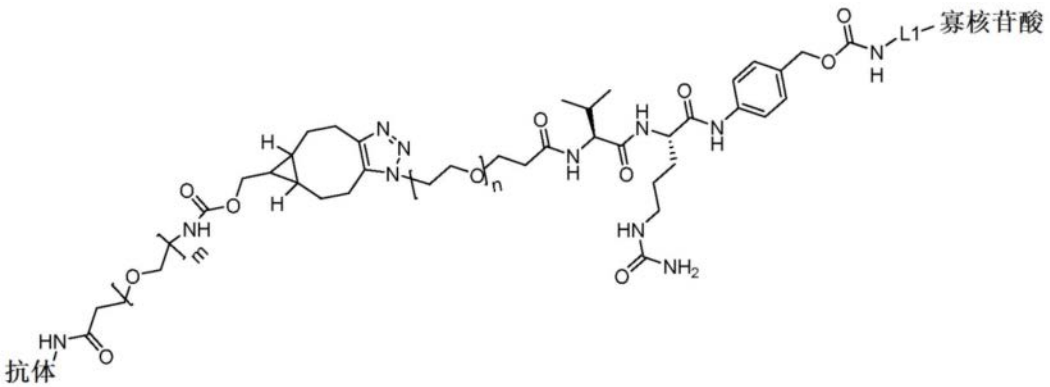
[0681] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述的寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3’或5’末端共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含:

[0682] (i)含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;

[0683] (ii)含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;或者

[0684] (ii)含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-L3,

[0685] 其中该复合物具有式(E)结构:

[0686] 

(E)

[0687] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗

TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3'末端共价连接。

[0688] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3'或5'末端共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含:

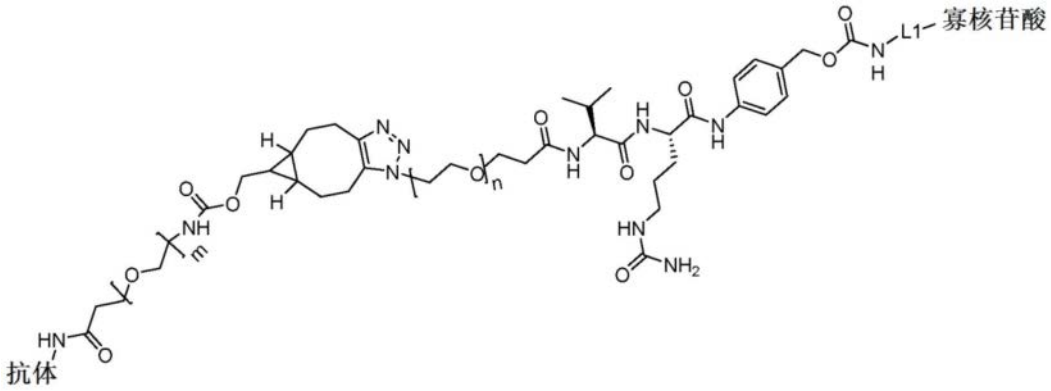
[0689] (i)含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;

[0690] (ii)含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;或者

[0691] (ii)含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-L3,

[0692] 其中该复合物具有式(E)结构:

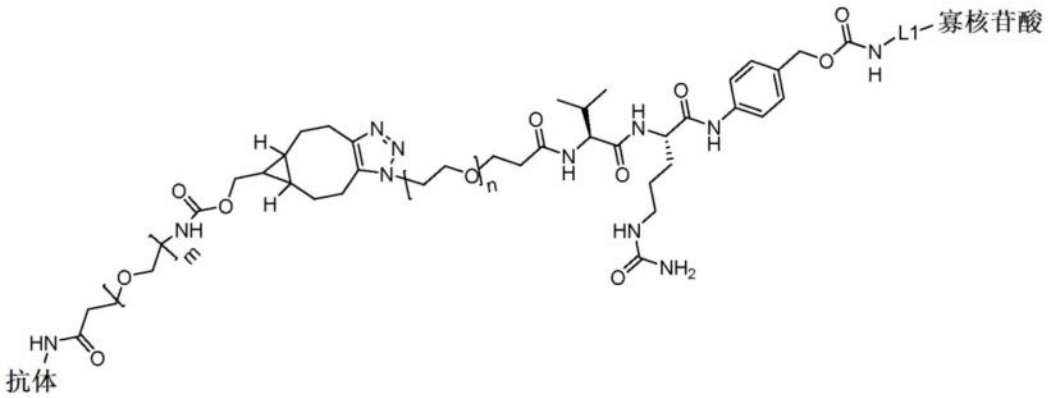
[0693]



(E)

[0694] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端或3'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3'末端共价连接。

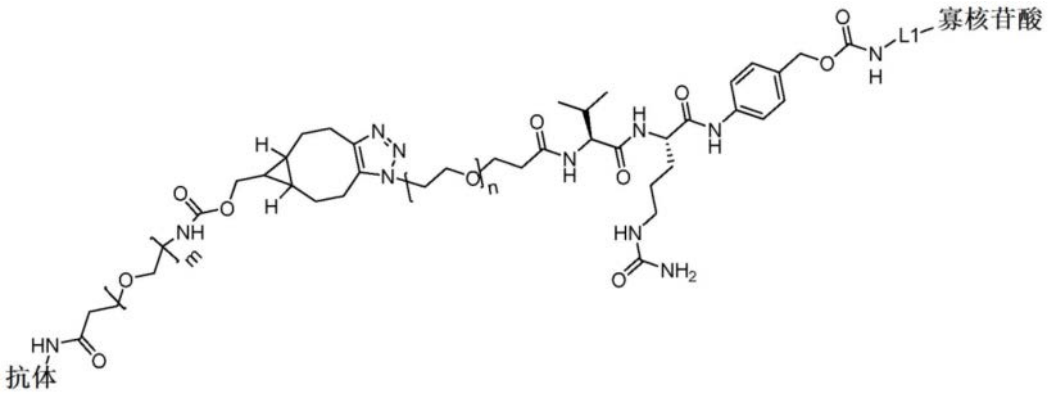
[0695] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3'或5'末端共价连接的抗TfR1抗体,其中所述抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL,其中该复合物具有式(E)结构:

[0696] 

(E)

[0697] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3'末端共价连接。

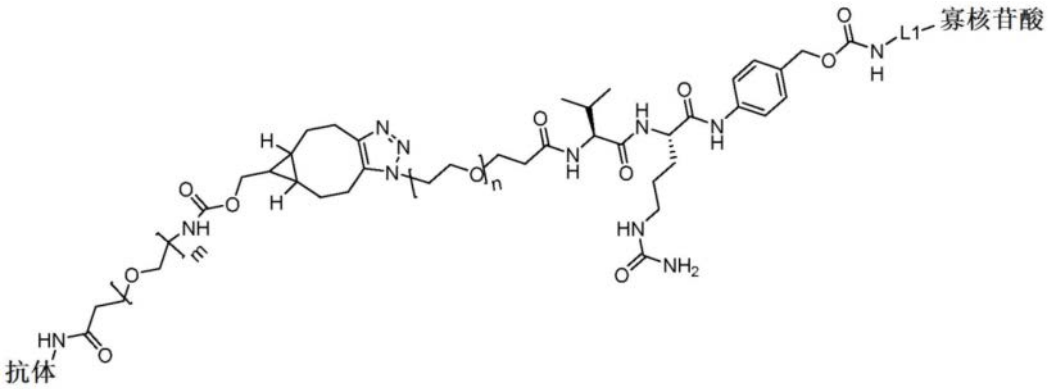
[0698] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过抗TfR1抗体中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3'或5'末端共价连接的抗TfR1抗体,其中抗TfR1抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的VL,其中该复合物具有式(E)结构:

[0699] 

(E)

[0700] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端或3'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3'末端共价连接。

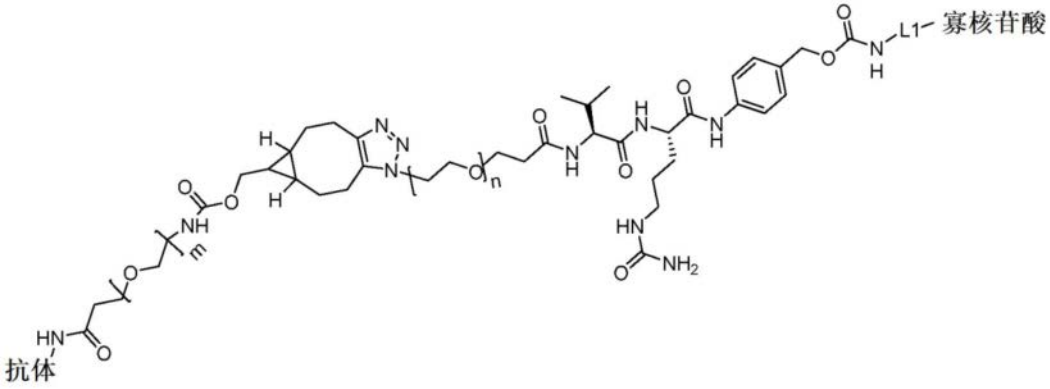
[0701] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含作为通过抗TfR1 Fab中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表8中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3'或5'末端共价连接的Fab的抗TfR1抗体,其中抗TfR1 Fab包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,其中该复合物具有式(E)结构:

[0702] 

(E)

[0703] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3'末端共价连接。

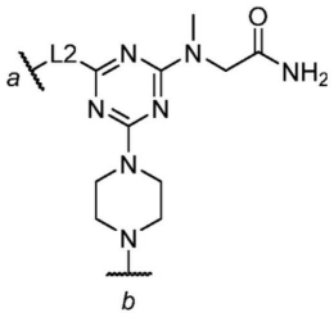
[0704] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含作为通过抗TfR1 Fab中的赖氨酸与本文中所述寡核苷酸(例如,表9中所列寡核苷酸的有义链或反义链)的3'或5'末端共价连接的Fab的抗TfR1抗体,其中抗TfR1 Fab包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列,其中该复合物具有式(E)结构:

[0705] 

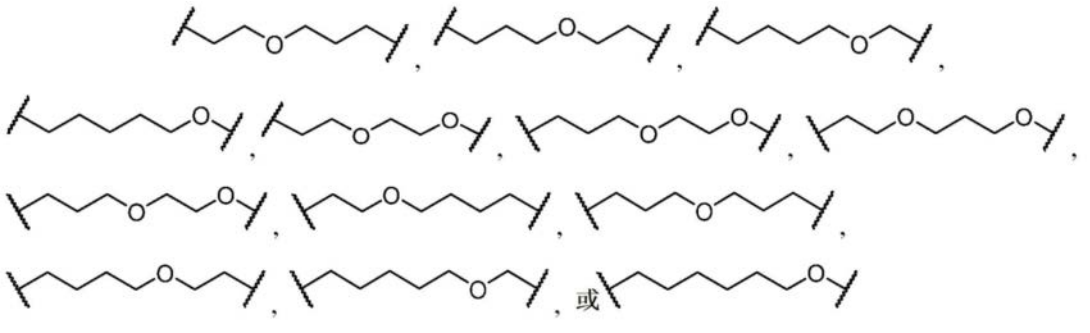
(E)

[0706] 其中n是3并且m是4。应理解,在式(E)中示出的与抗TfR1抗体相邻的酰胺是由与抗TfR1抗体的胺(例如赖氨酸ε胺)的反应产生的。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端或3'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。在一些实施方案中,抗TfR1抗体与本文中所述寡核苷酸的有义链的3'末端共价连接。

[0707] 在一些实施方案中,在本文中所述复合物的任何一个实例中,L1是:

[0708] 

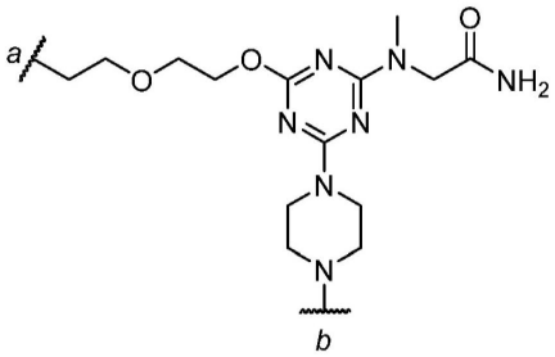
[0709] 其中L2是

[0710] 

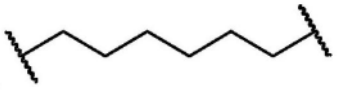
;

[0711] 其中a标记与式(B)、(D)、(E)和(I)的氨基甲酸酯部分直接连接的位点;并且b标记与寡核苷酸共价连接(直接或通过另外的化学部分进行连接)的位点。

[0712] 在一些实施方案中,L1是:

[0713] 

[0714] 其中a标记与式(B)、(D)、(E)和(I)的氨基甲酸酯部分直接连接的位点;并且b标记与寡核苷酸共价连接(直接或通过另外的化学部分进行连接)的位点。

[0715] 在一些实施方案中,L1是  。

[0716] 在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的5'磷酸连接。在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的5'磷酸的键联在L1与寡核苷酸之间形成磷酸二酯键。

[0717] 在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的3'磷酸连接。在一些实施方案中,L1与寡核苷酸的3'磷酸的键联在L1与寡核苷酸之间形成磷酸二酯键。

[0718] 在一些实施方案中,L1是任选的(例如,不需要存在)。

[0719] III.制剂

[0720] 本文中提供的复合物可以以任何合适的方式配制。通常来说,本文中提供的复合物以适用于药物用途的方式配制。例如,可使用使降解最小化、促进递送和/或(例如,和)摄取或者为制剂中的复合物提供另外的有益特性的制剂将复合物递送至对象。在一些实施方案中,本文中提供了包含复合物和可药用载体的组合物。可适当地配制这样的组合物使得当施用于对象时,无论是施用至靶细胞的直接环境中或全身性施用,足够量的复合物都能进入靶肌细胞。在一些实施方案中,复合物被配制在缓冲溶液例如磷酸缓冲盐水溶液、脂质体、胶束结构和衣壳中。

[0721] 应理解,在一些实施方案中,组合物可分别包含本文中提供的复合物的一种或更多种组分(例如,肌肉靶向剂、接头、分子有效载荷或它们中任一者的前体分子)。

[0722] 在一些实施方案中,复合物被配制在水或水溶液(例如,用pH调节的水)中。在一些实施方案中,复合物被配制在碱性缓冲水溶液(例如,PBS)中。在一些实施方案中,本文中公

开的制剂包含赋形剂。在一些实施方案中,赋形剂赋予组合物以改善的稳定性、改善的吸收、改善的溶解性和/或(例如,和)活性成分的治疗性增强。在一些实施方案中,赋形剂是缓冲剂(例如,柠檬酸钠、磷酸钠、tris碱或氢氧化钠)或载剂(例如,缓冲溶液、矿脂(petrolatum)、二甲基亚砜或矿物油)。

[0723] 在一些实施方案中,将复合物或其组分(例如,寡核苷酸或抗体)冻干用于延长其保质期,并随后在使用(例如,施用于对象)之前制成溶液。因此,包含本文中所述的复合物或其组分的组合物中的赋形剂可以是冻干保护剂(例如,甘露醇、乳糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮)或崩解温度调节剂(例如,右旋糖酐、ficoll或明胶)。

[0724] 在一些实施方案中,药物组合物被配制成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的。

[0725] 适用于可注射使用的药物组合物包含无菌水溶液(在具有水溶性时)或分散体,以及用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),及其合适的混合物。在一些实施方案中,制剂在组合物中包含等张剂,例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨醇,以及氯化钠。无菌可注射溶液可通过将所需量的复合物与以上列举的成分之一或组合(根据需要)一起并入选定的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。

[0726] 在一些实施方案中,组合物可包含至少约0.1%的复合物或其组分,或者更多,尽管活性成分的百分比可以为总组合物的重量或体积的约1%至约80%或更多。本领域技术人员将考虑制备这样的药物制剂的因素例如溶解性、生物利用度、生物学半衰期、施用途径、产品保质期以及其他药理学考虑因素,并且因此多种剂量和治疗方案可以是期望的。

[0727] IV.使用/治疗方法

[0728] 包含与本文中所述的分子有效载荷共价连接的肌肉靶向剂的复合物在治疗FSHD中是有效的。在一些实施方案中,复合物在治疗1型FSHD中是有效的。在一些实施方案中,复合物在治疗2型FSHD中是有效的。在一些实施方案中,FSHD与4号染色体上的包含DUX4基因的D4Z4重复区域中的缺失相关。在一些实施方案中,FSHD与SMCHD1基因中的突变相关。在一些实施方案中,FSHD与DNMT3B基因中的突变相关。在一些实施方案中,FSHD与LRIF1基因中的突变相关。在一些实施方案中,对象可以是人对象、非人灵长类对象、啮齿动物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,对象在胎儿发育和睾丸之外具有升高的DUX4基因表达。在一些实施方案中,对象患有1型或2型的面肩肱型肌营养不良。在一些实施方案中,患有FSHD的对象在SMCHD1基因中具有突变。在一些实施方案中,患有FSHD的对象在DNMT3B基因中具有突变。在一些实施方案中,患有FSHD的对象在LRIF1基因中具有突变。在一些实施方案中,患有FSHD的对象在4号染色体上在D4Z4重复区域中具有缺失突变。

[0729] 本公开内容的一个方面包括涉及向对象施用有效量的本文中所述的复合物的方法。在一些实施方案中,可向有治疗需要的对象施用有效量的包含含有与分子有效载荷共价连接的肌肉靶向剂的复合物的药物组合物。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,所述途径可包括静脉内施用,例如作为推注(bolus)或通过在一段时间内的连续输注。在一些实施方案中,可通过肌内、腹膜内、脑脊髓

内、皮下、关节内、滑膜内或鞘内途径进行静脉内施用。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,可将水性或液体形式雾化或冻干。在一些实施方案中,雾化或冻干形式可用水溶液或液体溶液重构。

[0730] 用于静脉内施用的组合物可包含多种载体,例如植物油、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、豆蔻酸异丙酯、乙醇以及多元醇(甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)。对于静脉内注射,水溶性抗体可通过滴注方法施用,通过该方法输注包含抗体和生理学上可接受的赋形剂的药物制剂。生理学上可接受的赋形剂可包括,例如5%右旋糖、0.9%盐水、林格溶液(Ringer's solution)或其他合适的赋形剂。可将肌内制剂,例如抗体的合适可溶性盐形式的无菌制剂溶解在药用赋形剂例如注射用水、0.9%盐水或5%葡萄糖溶液中并施用。

[0731] 在一些实施方案中,包含含有与分子有效载荷共价连接的肌肉靶向剂的复合物的药物组合物通过位点特异性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、直接注射或直接应用。

[0732] 在一些实施方案中,包含含有与分子有效载荷共价连接的肌肉靶向剂的复合物的药物组合物以赋予对象治疗作用的有效浓度施用。如本领域技术人员所公认的,有效量根据疾病的严重程度、所治疗对象的独特特征(例如,年龄、身体状况、健康或体重)、治疗的持续时间、任何同时治疗的性质、施用途径和相关因素而变化。这些相关因素是本领域技术人员已知的,并且仅通过常规实验即可解决。在一些实施方案中,有效浓度是被认为对患者安全的最大剂量。在一些实施方案中,有效浓度将是提供最大效力的最低的可能浓度。

[0733] 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。

[0734] 通常来说,对于本文中所述的任何复合物的施用,根据上述因素,例如安全性或效力,初始候选剂量可为约1至100mg/kg或更高。在一些实施方案中,将施用一次治疗。在一些实施方案中,将每天、每两周、每周、每两个月、每月或以提供最大效力的同时使对对象的安全风险最小化的任何时间间隔施用治疗。通常来说,可在整个治疗过程中监测效力和治疗以及安全风险。

[0735] 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,可通过评价与FSHD相关的症状(包括主要在面部、肩肱和上臂肌肉中的肌肉量减少和肌肉萎缩)的观察结果来评估治疗的效力。

[0736] 在一些实施方案中,将包含含有与分子有效载荷共价连接的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物以相对于对照(例如治疗之前基因表达的基线水平)足以抑制至少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。

[0737] 在一些实施方案中,向对象单次给药或施用包含含有与分子有效载荷共价连接的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1至5天、1至10天、5至15天、10至20天、15至30天、20至40天、25至50天或更多天。在一些实施方案中,向对象单次给药或施用包含含有与分子有效载荷共价连接的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周。在一些实施方案中,向对象单次给药或施用包含含有与分子有效载荷共价连

接的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1、2、3、4、5或6个月。

[0738] 在一些实施方案中,药物组合物可包含多于一种包含与分子有效载荷共价连接的肌肉靶向剂的复合物。在一些实施方案中,药物组合物还可包含用于治疗对象(例如,患有FSHD的人对象)的任何其他合适的治疗剂。在一些实施方案中,其他治疗剂可增强或补充本文中所述复合物的效力。在一些实施方案中,与本文中所述复合物相比,其他治疗剂可发挥治疗不同的症状或疾病的功能。

[0739] 实施例

[0740] 实施例1:用所转染的反义寡核苷酸靶向基因表达

[0741] 在体外测试了靶向次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthine phosphoribosyltransferase,HPRT)的siRNA其降低永生化细胞系中HPRT表达水平的能力。简言之,用使用lipofectamine 2000配制的对照siRNA(siCTRL;100nM)或靶向HPRT的siRNA(siHPRT;100nM)转染Hepa1-6细胞。转染之后48小时评价HPRT表达水平。还进行了对照实验,其中将载剂(磷酸缓冲盐水)递送至培养中的Hepa 1-6细胞并将细胞维持48小时。如图1中所示,发现与对照相比,HPRT siRNA使HPRT表达水平降低约90%。表10提供了所使用的siRNA的序列。HPRT表达水平由HPRT mRNA表达水平来表示。

[0742] 表10.siHPRT和siCTRL的序列

[0743]

	序列	SEQ ID NO:
siHPRT有义链	5'-UcCuAuGaCuGuAgAuUuUaU-$(CH_2)_6NH_2$-3′	163
siHPRT反义链	5'-aUaAaAuCuAcAgUcAuAgGasAsu-3′	164
siCTRL有义链	5'-UgUaAuAaCcAuAuCuAcCuU-$(CH_2)_6NH_2$-3′	165
siCTRL反义链	5'-aAgGuAgAuAuGgUuAuUaCasAsa-3′	166

[0744] *小写字母-2'O-Me核糖核苷;大写字母-2'氟核糖核苷;s-硫代磷酸酯键联

[0745] 实施例2:用肌肉靶向复合物靶向HPRT

[0746] 产生了肌肉靶向复合物,其包含通过不可切割的N-γ-马来酰亚胺基丁酰基-氧基琥珀酰亚胺酯(GMBS)接头与抗转铁蛋白受体抗体DTX-A-002共价连接的在实施例1中使用的HPRT siRNA(siHPRT)。DTX-A-002是RI7217抗TfR1 Fab。

[0747] 简言之,将GMBS接头溶解在无水DMSO中,并通过在水性条件下形成酰胺键来与siHPRT有义链的3'末端偶联。通过Kaiser测试验证反应的完成。通过凝胶渗透色谱去除过量的接头和有机溶剂。然后使用迈克尔加成反应将纯化的siHPRT的马来酰亚胺官能化有义链与DTX-A-002抗体偶联。

[0748] 然后对抗体偶联反应的产物进行疏水相互作用色谱(hydrophobic interaction chromatography,HIC-HPLC)纯化。对包含与DTX-A-002抗体共价连接的一个或两个siHPRT分子的抗TfR1-siHPRT复合物进行纯化。密度测定法确定了,经纯化的复合物样品的平均siHPRT与抗体之比为1.46。SDS-PAGE分析表明,>90%的经纯化的复合物样品包含与一个或两个siHPRT分子连接的DTX-A-002。

[0749] 使用与上述相同的方法,产生了对照IgG2a-siHPRT复合物,其包含通过GMBS接头与IgG2a(Fab)抗体(DTX-A-003)共价连接的在实施例1中使用的HPRT siRNA(siHPRT)。密度测定法确定了,DTX-C-001(IgG2a-siHPRT复合物)的平均siHPRT与抗体之比为1.46,并且

SDS-PAGE表明,>90％的经纯化的对照复合物样品包含与一个或两个siHPRT分子连接的DTX-A-003。

[0750] 然后测试抗TfR1-siHPRT复合物的细胞内化和对细胞内HPRT的抑制。在载剂(磷酸缓冲盐水)、IgG2a-siHPRT(100nM)、抗TfR1-siCTRL(100nM)或抗TfR1-siHPRT(100nM)的存在下将具有相对高的转铁蛋白受体表达水平的Hepa 1-6细胞孵育72小时。在72小时孵育之后,分离细胞并测定HPRT的表达水平(图2)。相对于用载剂对照处理的细胞以及用IgG2a-siHPRT复合物处理的那些细胞,用抗TfR1-siHPRT处理的细胞表现出HPRT表达降低了约50％。同时,用IgG2a-siHPRT或抗TfR1-siCTRL处理之细胞的HPRT表达水平与载剂对照相当(HPRT表达未降低)。这些数据表明抗TfR1-siHPRT的抗转铁蛋白受体抗体能够使复合物进行细胞内化,从而使siHPRT抑制HPRT的表达。HPRT表达水平由HPRT mRNA表达水平来表示。

[0751] 实施例3:用肌肉靶向复合物靶向小鼠肌肉组织中的HPRT

[0752] 测试了实施例2中所述的肌肉靶向复合物抗TfR1-siHPRT对小鼠组织中HPRT的抑制。用单剂量的载剂对照(磷酸缓冲盐水)、siHPRT(2mg/kg siRNA)、IgG2a-siHPRT(2mg/kg siRNA,对应于9mg/kg抗体复合物)或抗TfR1-siHPRT(2mg/kg siRNA,对应于9mg/kg抗体复合物)静脉内注射C57BL/6野生型小鼠。每个实验条件在四只单独的C57BL/6野生型小鼠中重复。在注射之后3天时期之后,使小鼠安乐死并分割成分离的组织类型。随后测定单独的组织样品的HPRT表达水平(图3A至3B和4A至4E)。

[0753] 相对于用siHPRT对照处理的小鼠,用抗TfR1-siHPRT复合物处理的小鼠表现出腓肠肌(31％降低;$p<0.05$)和心脏(30％降低;$p<0.05$)中的HPRT表达降低(图3A至3B)。同时,对于所有测定的肌肉组织类型,用IgG2a-siHPRT复合物处理的小鼠的HPRT表达水平与siHPRT对照相当(HPRT表达几乎没有或没有降低)。

[0754] 用抗TfR1-siHPRT复合物处理的小鼠显示出在非肌肉组织例如脑、肝、肺、肾和脾组织中HPRT表达没有变化(图4A至4E)。

[0755] 这些数据表明,在体内小鼠模型中抗TfR1-siHPRT复合物的抗转铁蛋白受体抗体能够使复合物细胞内化至肌肉特异性组织中,从而允许siHPRT抑制HPRT的表达。这些数据还表明本公开内容的抗TfR1-寡核苷酸复合物能够特异性地靶向肌肉组织。HPRT mRNA的减少表明HPRT的抑制。

[0756] 实施例4:DUX4靶向的siRNA缀合物在FSHD患者肌管中的活性

[0757] 在AB1080永生化的FSHD患者来源肌管中测试了缀合物的活性,所述缀合物包含与DUX4靶向siRNA共价连接的抗TfR1 Fab 3M12VH4/Vκ3。在缀合物中,抗TfR1 Fab通过接头与每个siRNA有义链的3'末端共价连接,并且对应的反义链与有义链退火。测试的siRNA是siRNA-A(具有与SEQ ID NO 174互补的区域)、siRNA-B(具有与SEQ ID NO:175互补的区域)、或siRNA-C(具有与SEQ ID NO:176互补的区域)。

[0758] 用浓度等同于1pM、1nM或100nM siRNA的siRNA缀合物处理AB1080(C6)永生化的FSHD患者来源肌管持续10天。用TaqMan Fast Advanced Cells-to-Ct试剂盒(Thermo Fisher Scientific)从细胞中获得cDNA,并通过qPCR用特异性TaqMan测定(Thermo Fisher Scientific)分析三种DUX4转录组标志物MBD3L2(Hs00544743_m1)、TRIM43(Hs00299174_m1)、ZSCAN4(Hs00537549_m1)和RPL13A(Hs04194366_g1)的水平。在QuantStudio 7仪器(Thermo Fisher Scientific)上进行用于确定循环阈值(cycle threshold,Ct)的两步法

扩增反应和荧光测量。使用三种DUX4转录组标志物(MBD3L2、TRIM43和ZSCAN4)计算FSHD1细胞中的FSHD综合评分,其中ΔCt＝(3种DUX4标志物的平均Ct)-(RPL13A的平均Ct),ΔΔCt＝ΔCt(经处理)-ΔCt(载剂),FSHD综合＝2-ΔΔCT*100(%)(参见图5)。结果显示出,siRNA缀合物在FSHD患者来源肌管中实现了测试的DUX4转录组标志物的减少,并且用等同于100nM siRNA的缀合物的处理实现了测试的DUX4转录组标志物中约50%的减少。

[0759] 实施例4的siRNA和抗体缀合方案

[0760] 以下方案用于制备实施例4中测试的siRNA缀合物。产生了包含与抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3共价连接的siRNA-A、siRNA-B、siRNA-C的缀合物。缀合物可通过以下所示的反应来产生。

[0761] 材料:

[0762] 叠氮化物-PEG3-vc-PABC-PFP接头:MW＝773.79

[0763] 叠氮基-PEG8-PFP酯接头:MW＝633.6

[0764] BCN-PEG4-PFP接头:MW＝607.6

[0765] 抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3:MW＝47968

[0766] siRNA-A、siRNA-B和siRNA-C

[0767] 将抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3缓冲液交换到pH 8.0的50mM EPPS中,并浓缩至约10mg/ml的浓度。

[0768] 将每种测试的siRNA的有义链溶解在水中至50mg/ml的浓度(用UV吸光度确认浓度)。将4×叠氮化物-接头(20mg/ml,在DMA中)、50×三丁胺(4.2M)和70% DMA添加到有义链溶液中,并在室温下孵育过夜,以产生叠氮基-有义链中间体。在孵育之后,向反应混合物添加1/10体积的3M NaCl和3体积的冷异丙醇(isopropanol alcohol,IPA)。将反应混合物置于-80℃的冷冻箱中30分钟,然后以4500rpm旋转25分钟。将包含叠氮基-有义链中间体的沉淀用70%乙醇洗涤两次(在洗涤期间用移液管吸头吸起沉淀),将其溶解在PBS中至约40mg/ml的最终浓度(用UV吸光度确定浓度)。

[0769] 为了产生叠氮化物-siRNA双链体中间体,将每种测试的siRNA的反义链溶解在PBS中至50mg/ml的浓度(用UV吸光度确认浓度)。将叠氮化物-有义链中间体和对应的反义链以1:1的比例混合。对于退火,将300至500ml水在玻璃烧杯中加热至沸腾并将包含叠氮化物-有义链中间体和反义链混合物的管置于沸水浴中5分钟,并在水浴中静置,直至其在工作台上冷却至室温。用UPLC SEC柱测量各siRNA的退火效率。

[0770] 为了产生BCN-叠氮化物-siRNA双联体中间体,将在30mM MES,pH 5.0中的叠氮化物-siRNA双联体中间体溶液缓慢添加到在冰上的相同体积的DMA中。然后将4×BCN-PEG4-PFP接头(20mg/ml,在DMA中)缓慢添加到叠氮化物-siRNA双链体中间体/DMA混合物中,并在室温下孵育3至3.5小时以产生BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体。或者,在该步骤中可使用3×BCN-PEG4-PFP接头(20mg/ml,在DMA中)。使用UPLC C18柱来检查反应的完成。

[0771] 然后在与抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3进行缀合反应之前纯化粗反应混合物。为了分离BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体,将1/10体积的3M NaCl和3体积的冷IPA添加到反应混合物中,并置于-80℃冰箱中30分钟,随后以4500rpm旋转25分钟。将包含BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体的沉淀用70%乙醇洗涤两次(在洗涤过程中用移液管吸头提起沉淀),溶解在20mM MES、pH 5.0中至约20mg/ml的浓度(通过UV吸收确认浓度)。

[0772] 或者,可将粗制反应混合物在没有任何纯化的情况下立即进行缀合反应。在这种情况下,建立了40％ DMA,BCN-PEG4-PFP接头和pH5.0的25mM MES中的2至3mM叠氮化物-siRNA双链体中间体溶液的反应混合物,并在30℃水浴中孵育3至4小时,以产生BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体。叠氮化物-siRNA双链体与BCN-PEG4-PFP接头之间的摩尔比为1:0.85。

[0773] 最后,将抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3与1×(靶向DAR1)BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体混合,并在室温下孵育过夜,以产生抗TfR1Fab-siRNA缀合物。

[0774] 也可以使用替代的缀合方法。将抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3经缓冲液交换到50mM EPPS pH 8.0中,并浓缩至约10mg/ml的浓度。将每种测试的siRNA的有义链溶解于水中至浓度为100mg/ml(用UV吸光度确认浓度)。将4×叠氮化物-接头(20mg/ml,在DMA中)、100×三丁胺(4.2M)和70％ DMA添加到有义链溶液中,并在室温下孵育过夜,以产生叠氮基-有义链中间体。在孵育之后,将1/10体积的3M NaCl和5体积的冷异丙醇(IPA)添加到反应混合物中。将反应混合物置于-80℃的冷冻箱中持续30分钟,随后以4500rpm旋转25分钟。将包含叠氮基-有义链中间体的沉淀用80％乙醇洗涤两次,溶解于水中至约40mg/ml的最终浓度(用UV吸光度确认浓度)。

[0775] 为了产生叠氮化物-siRNA双链体中间体,将每个测试的siRNA的反义链溶解在水中至50mg/ml的浓度。将叠氮化物-有义链中间体和对应的反义链以1:1的比例混合,并在30℃水浴中孵育多于4小时以进行退火。

[0776] 为了产生BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体,建立了40％ DMA、4摩尔过量的BCN-PEG4-PFP接头和pH 5.0的25mM MES中的2至3mM叠氮化物-siRNA双链体中间体溶液的反应混合物,并在30℃水浴中孵育2至3小时,以产生BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体。或者,在该步骤中可使用3×BCN-PEG4-PFP接头(20mg/ml,在DMA中)。使用UPLC C18柱来检查反应的完成。

[0777] 然后在与抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3进行缀合反应之前纯化粗反应混合物。为了分离BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体,将1/10体积的3M NaCl和3体积的冷IPA添加到反应混合物中,并将其置于-80℃冷冻箱中30分钟,随后以4500rpm旋转25分钟。将包含BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体的沉淀用80％乙醇洗涤两次,溶解在水中至浓度为约20mg/ml。

[0778] 或者,可将粗制反应混合物在没有任何纯化的情况下立即进行缀合反应。在这种情况下,建立了40％ DMA,摩尔过量的BCN-PEG4-PFP接头和pH5.0的25mM MES中的2至3mM叠氮化物-siRNA双链体中间体溶液的反应混合物,并在30℃水浴中孵育3至4小时,以产生BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体。叠氮化物-siRNA双链体与BCN-PEG4-PFP接头之间的摩尔比为1:0.85。

[0779] 最后,将在50mM EPPS、pH8.5中的5至10mg/ml的抗TfR1 Fab 3M12VH4/Vκ3与1×(靶向DAR1)的BCN-叠氮化物-siRNA双链体中间体混合,并在室温下孵育过夜,以产生抗TfR1 Fab-siRNA缀合物。

[0780] 也可使用替代的缀合方法,并用于制备以下实施例5至7中测试的siRNA缀合物。在替代方法中,将PBS中的抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3(5至6mg/ml)、1×BCN(DMA中20mg/ml,32.9mM)和10％ DMA混合,并在室温下孵育至少5小时,以产生抗TfR1 Fab 3M12VH4/Vκ3-BCN中间体。然后使用TFF来纯化抗体-BCN中间体,并将其经缓冲液交换到pH 8.0的50mM

EPPS中。

[0781] 如上所述产生叠氮化物-siRNA双链体中间体。

[0782] 将抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3-BCN中间体(在EPPS中的浓度为6至7mg/ml,pH 8.0)与1.0摩尔过量的叠氮化物-siRNA双链体中间体混合,并在室温下孵育过夜,以产生抗TfR1 Fab-siRNA缀合物。

[0783] 通过TSKgel superQ-5PW柱的纯化:

[0784] 使用以下方法对使用两步法反应或一步法反应所产生的抗TfR1Fab-siRNA缀合物进行纯化。

[0785] 用5倍柱体积(column volume,cv)的pH 8.0的10mM Tris来稀释pH 8.0的50mM EPPS中的粗制缀合反应产物。将样品以0.5ml/分钟装载到1ml TSKgel superQ-5PW柱上,每ml树脂少于10mg缀合物。用缓冲液A(20mM Tris,pH8.0)以1ml/分钟洗涤该柱5至6cv。然后用15至20cv的包含79%缓冲液A(20mM Tris,pH8.0)和21%缓冲液B(20mM Tris,pH8.0+1.5M NaCl)的洗脱缓冲液以1ml/分钟洗脱缀合物。然后将洗脱的缀合物经缓冲液交换到PBS中,并浓缩至>5mg/ml的浓度。

[0786] 在替代的纯化方法中,用1体积的10mM pH 8.0的Tris稀释粗制缀合反应产物,并将其装载到5ml TSKgel superQ-5PW柱上。用15%缓冲液B(缓冲液B:pH 8.0的20mM Tris+1.5M NaCl;缓冲液A:pH 8.0的20mM Tris))至40%缓冲液B的梯度以1.5ml/分钟经过25个柱体积(CV)对柱进行洗脱。收集DAR 1缀合物级分,将将其经缓冲液交换到PBS中并浓缩至>5mg/ml的浓度。

[0787] 实施例5:靶向DUX4的siRNA的体外活性

[0788] 在两种siRNA浓度(0.2nM和20nM)下,测试了48种DUX4靶向siRNA其在FSHD患者来源C6肌管中敲低DUX4转录组的活性。测试的siRNA是siRNA 49、50、53、54、136、19、114、137、138、32、35、33、36、73、74、77、76、75、78、83、68、103、104、107、106、105、108、85、86、89、88、87、90、133、135、140、97、128、132、134、47、91、92、95、94、93和96。将靶向外显子1的siRNA siRNA 7用作阳性对照。siRNA编号对应于表8中的siRNA编号。在图6中示出了使用FSHD患者来源的C6肌管中三种DUX4转录组标志物MBD3L2、TRIM43和ZSCAN4的平均mRNA水平而计算的综合评分。

[0789] 结果显示出,与阳性对照相比,大多数测试的siRNA在FSHD患者来源的C6肌管中实现了测试的DUX4转录组标志物的相当水平的敲低。与阳性对照相比,一些siRNA具有更显著的敲低。

[0790] 另外,也在Hepa1-6细胞中以20nM的浓度测试了48种siRNA中的16种(siRNA 136、137、74、77、78、104、107、106、86、89、133、97、128、92、95和94)。设计DualGlo报道质粒以用于筛选siRNA。该质粒在报道物荧光素酶的3'-UTR中包含人DUX4 mRNA的编码序列。用DualGlo报道质粒和20nM的16种DUX靶向siRNA转染Hepa1-6细胞。将siRNA7也用作Hepa1-6细胞中的阳性对照。在转染之后,将细胞维持1天。在表10中示出了16种siRNA中每一种的DUX4敲低活性,以及以上在FSHD患者来源的C6肌管中测试的相同的16种siRNA的DUX4转录组敲低活性。

[0791] 结果显示出,与阳性对照相比,测试的siRNA实现了相当水平或更显著水平的Hepa1-6细胞中的DUX4敲低和FSHD患者来源的C6肌管中的DUX4转录组敲低,表明在多个体

外FSHD模型中的稳健效力。

[0792] 还使用16种所测试siRNA与阳性对照在一定浓度范围(2pM至40nM)下人MBD3L2、TRIM43和ZSCAN4标志物的平均mRNA水平计算的综合评分产生了剂量响应曲线,并且其显示出DUX4转录组标志物的敲低(参见图7A至7C)。

[0793] 表10.DUX-4靶向的siRNA的体外活性

[0794]

	Hepa1-6 (20 nM)		FSHD C6 (20 nM)	
	DUX4 (% 对照)		FSHD 综合 (% 对照)	
siRNA	平均值	SD	平均值	SD
7	8.0	1.3	29.0	17.6
136	15.0	2.8	28.5	18.7
137	6.5	1.2	26.3	21.9
74	13.0	1.6	6.8	5.9
77	10.8	0.7	4.5	3.1
78	12.8	2.3	6.5	0.6
104	10.8	0.2	9.3	9.1
107	8.8	1.7	7.3	13.3
106	10.6	1.5	24.8	38.3
86	9.6	1.4	26.0	38.7
89	8.4	1.2	10.0	5.0
133	10.8	2.0	27.0	34.0
97	7.3	1.1	8.8	12.3
128	15.8	2.5	30.5	18.0
92	6.7	0.3	10.5	4.0
95	5.7	0.6	9.0	7.8
94	6.4	0.8	3.8	0.6

[0795] 实施例5:在FSHD患者肌管中靶向DUX4的siRNA复合物的活性

[0796] 在AB1080永生化的FSHD患者来源的肌管中测试了七种复合物的活性,所述复合物包含通过接头与DUX4靶向siRNA共价连接的抗TfR1 Fab3M12 VH4/Vκ3。对于每种siRNA复合物,测试了两种形式,一种形式其中抗TfR1 Fab与siRNA有义链的3’末端共价连接,以及另一种形式其中抗TfR1 Fab与每个siRNA有义链的5’末端共价连接。测试的siRNA是siRNA142至148。siRNA编号对应于表9中的siRNA编号。将靶向外显子1的siRNA用作阳性对照。

[0797] 用等同于10nM、100nM或1000nM浓度的siRNA复合物处理AB1080(C6)永生化的FSHD患者来源的肌管10天。用TaqMan Fast Advanced Cells-to-Ct试剂盒(Thermo Fisher Scientific)从细胞中获得cDNA,并通过qPCR用特异性TaqMan测定(Thermo Fisher

Scientific)分析三种DUX4转录组标志物MBD3L2(Hs00544743_m1)、TRIM43(Hs00299174_m1)、ZSCAN4(Hs00537549_m1)和RPL13A(Hs04194366_g1)的水平。在QuantStudio 7仪器(Thermo Fisher Scientific)上进行用于确定循环阈值(Ct)的两步法扩增反应和荧光测量。在图8中示出了使用FSHD患者来源的C6肌管中三种DUX4转录组标志物MBD3L2、TRIM43和ZSCAN4的平均mRNA水平而计算的综合评分。

[0798] 结果显示出,与阳性对照相比,测试的siRNA在FSHD患者来源的C6肌管中实现了测试的DUX4转录组标志物的显著水平的敲低。

[0799] 实施例6:在FSHD患者来源的原代细胞中靶向DUX4的siRNA复合物的活性

[0800] 在FSHD1原代细胞(MB010、MB015、MB016、MB018和MB020)中测试了复合物的活性,所述复合物包含与DUX4靶向siRNA共价连接的抗TfR1 Fab 3M12 VH4/Vκ3。在该复合物中,抗TfR1 Fab通过接头与每个siRNA的有义链的5'末端共价连接,并且对应的反义链与有义链进行退火。测试的siRNA是siRNA145。siRNA编号对应于表9中的siRNA编号。用浓度等同于100nM siRNA的siRNA复合物处理原代细胞7天。用TaqMan Fast Advanced Cells-to-Ct试剂盒(Thermo Fisher Scientific)从细胞中获得cDNA,并通过qPCR用特异性TaqMan测定(Thermo Fisher Scientific)分析三种DUX4转录组标志物MBD3L2(Hs00544743_m1)、TRIM43(Hs00299174_m1)、ZSCAN4(Hs00537549_m1)和RPL13A(Hs04194366_g1)的水平。在QuantStudio 7仪器(Thermo Fisher Scientific)上进行用于确定循环阈值(Ct)的两步法扩增反应和荧光测量。

[0801] 结果(参见表11)显示出,siRNA在FSHD患者来源的原代细胞中实现了测试的DUX4转录组标志物的显著降低。

[0802] 表11

[0803]

FSHD细胞	DUX4转录组学 (%对照)	
	平均值	SD
MB010	60.3	20.7
MB015	33.7	12.0
MB016	37.6	10.9
MB018	34.5	13.4
MB020	2.7	1.2

[0804] 实施例7:小鼠肌肉组织中靶向DUX4的siRNA复合物的活性

[0805] 在八至九周龄的hTfR1/FLExDUX4/ACTA小鼠中测试了复合物的活性,所述复合物包含通过接头与靶向DUX4的siRNA共价连接的抗TfR1Fab 3M12 VH4/Vκ3。对于每种siRNA复合物,测试了两种形式,一种形式其中抗TfR1 Fab与siRNA有义链的3'末端共价连接,以及一种形式其中抗TfR1 Fab与每个siRNA有义链的5'末端共价连接。测试的siRNA是siRNA145、siRNA148、siRNA144、siRNA143和siRNA142。siRNA编号对应于表9中的siRNA编号。

[0806] 向hTfR1/FLExDUX4/ACTA小鼠静脉内注射单剂量的载剂对照(磷酸缓冲盐水)或浓度等同于10mg/kg siRNA的siRNA复合物。每个实验条件在三到十五只单独的hTfR1/FLExDUX4/ACTA小鼠中重复。注射之后二十八天之后,对小鼠进行安乐死。收集腓肠肌和四头肌,并在RNAlater™稳定溶液(Thermo Fisher Scientific)中快速冷冻。用Maxwell® RSC miRNA组织试剂盒(Promega)从腓肠肌和股四头肌中分离总miRNA,并进行实时定量RT-PCR。

[0807] 通过qPCR用特异性TaqMan测定(Thermo Fisher Scientific)分析三种鼠下游DUX4转录组标志物Wfdc3(Mm01243777_m1)、Sord(Mm00455377_g1)、Serpinb6c(Mm00655242_m1)和Rpl37A(Mm00782745_s1)。在QuantStudio 7仪器(Thermo Fisher Scientific)上进行用于确定循环阈值(Ct)的两步法扩增反应和荧光测量。使用三种DUX4转录组标志物(Wfdc3、Sord、Serpinb6c)计算FSHD综合评分,其中ΔCt=(3种DUX4标志物的平均Ct)-(Rpl37A的平均Ct),ΔΔCt=ΔCt(经处理)-ΔCt(载剂),FSHD综合=2-ΔΔCt*100(%)(参见表12,图9A和9B)。

[0808] 结果显示出,许多siRNA复合物在hTfR1/FLExDUX4/ACTA小鼠的腓肠肌和四头肌中实现了测试的DUX4小鼠转录组标志物的显著降低。

[0809] 表12

[0810]

抗TfR1-siRNA	DUX4转录组敲低(%对照)(几何平均值)	
	四头肌	腓肠肌
siRNA 145-5'	85	73
siRNA 145-3'	87	81
siRNA 148-5'	63	78
siRNA 148-3'	71	62
siRNA 144-5'	67	77
siRNA 144-3'	71	60
siRNA 143-5'	21	41
siRNA 143-3'	0	0
siRNA 142-5'	67	84
siRNA 142-3'	59	36

[0811] 另外的实施方案

[0812] 1.复合物,其包含与靶向双同源框4(DUX4)RNA的寡核苷酸共价连接的肌肉靶向剂,其中所述寡核苷酸包含长度为18至25个核苷酸的反义链,并且包含SEQ ID NO:174至235中所示的靶序列之互补区,并且其中所述互补区的长度为至少16个连续的核苷。

[0813] 2.实施方案1所述的复合物,其中所述肌肉靶向剂是抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体。

[0814] 3.实施方案1或实施方案2所述的复合物,其中所述寡核苷酸是RNAi寡核苷酸。

[0815] 4.实施方案1或实施方案2所述的复合物,其中所述反义链包含SEQ ID NO:236至266中任一者的核苷酸序列。

[0816] 5.实施方案1至4中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸还包含有义链,所述有义链包含与反义链互补的至少18个连续的核苷。

[0817] 6.实施方案5所述的复合物,其中所述有义链包含SEQ ID NO:205至235中任一者的核苷酸序列。

[0818] 7.实施方案1至6中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含一个或更多个经修饰核苷。

[0819] 8.实施方案7所述的复合物,其中所述一个或更多个经修饰核苷是2'经修饰核苷酸,任选地,其中所述一个或更多个2'经修饰核苷选自: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-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA))。

[0820] 9.实施方案8所述的复合物,其中每个2'经修饰核苷酸是2'-O-甲基(2'-O-Me)或2'-氟(2'-F)。

[0821] 10.实施方案1至9中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联。

[0822] 11.实施方案10所述的复合物,其中所述一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联存在于寡核苷酸的反义链上。

[0823] 12.实施方案11所述的复合物,其中所述反义链3'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0824] 13.实施方案11或实施方案12所述的复合物,其中所述反义链5'末端处的两个核苷间键联是硫代磷酸酯核苷间键联。

[0825] 14.实施方案1至13中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸的一个或更多个胞苷是2'经修饰的5-甲基胞苷,任选地,其中所述2'经修饰的5-甲基胞苷是2'-O-Me修饰的5-甲基胞苷或2'-F修饰的5-甲基胞苷。

[0826] 15.实施方案1至14中任一项所述的复合物,其中所述反义链选自表8中列出的SEQ ID NO:236至266的经修饰形式(例如,MAS1至MAS4)。

[0827] 16.实施方案5至15中任一项所述的复合物,其中所述有义链选自表8中列出的SEQ ID NO:205至235的经修饰形式(例如,MS1至MS6)。

[0828] 17.实施方案1至16所述的复合物,其中所述寡核苷酸是选自表8中列出的siRNA的siRNA分子。

[0829] 18.实施方案2至17中任一项所述的复合物,其中所述抗TfR1抗体包含表2中列出的任何抗TfR1抗体的重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)、重链互补决定区3(CDR-H3)、轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)、轻链互补决定区3(CDR-L3)。

[0830] 19.实施方案2至17中任一项所述的复合物,其中所述抗TfR1抗体包含表3中列出的任何抗TfR1抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。

[0831] 20.实施方案2至17中任一项所述的复合物,其中所述抗TfR1抗体是Fab,任选地,其中所述Fab包含表5中列出的任何抗TfR1 Fab的重链和轻链。

[0832] 21.实施方案2至20中任一项所述的复合物,其中所述抗TfR1抗体包含:

[0833] (i)含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;

[0834] (ii)含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR-L3;或者

[0835] (ii)含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的CDR-H1,含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的CDR-H2,含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的CDR-H3,含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的CDR-L1,含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的CDR-L2,和含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR-L3。

[0836] 22.实施方案21所述的复合物,其中所述抗TfR1抗体包含VH和VL,所述VH包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列,所述VL包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0837] 23.实施方案22所述的复合物,其中所述抗TfR1抗体是Fab,并且包含含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的轻链。

[0838] 24.实施方案1至23中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向剂和反义寡核苷酸通过接头共价连接,任选地,其中所述接头包含缬氨酸-瓜氨酸序列。

[0839] 25.降低肌细胞中DUX4表达的方法,所述方法包括使肌细胞与有效量的实施方案1至25中任一项所述的复合物接触,以促进寡核苷酸内化到肌细胞。

[0840] 26.实施方案25所述的方法,其中降低DUX4表达包括降低DUX4蛋白和/或mRNA水平。

[0841] 27.治疗面肩肱型肌营养不良(FSHD)的方法,所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的实施方案1至24中任一项所述的复合物。

[0842] 28.实施方案27所述的方法,其中所述对象具有DUX4蛋白的异常产生。

[0843] 29.寡核苷酸,其包含选自表8中列出的siRNA寡核苷酸的siRNA寡核苷酸。

[0844] 30.产生包含与寡核苷酸共价连接的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体的复合物的方法,所述方法包括:

[0845] (i)获得包含式(B)结构的化合物,其中所述寡核苷酸包含siRNA寡核苷酸的有义链,任选地,其中所述siRNA寡核苷酸靶向DUX4 RNA;

[0846] (ii)使所述siRNA寡核苷酸的反义链与所述有义链退火;

[0847] (iii)使所述包含式(B)结构的化合物与包含式(C)结构的化合物反应,以获得包含式(D)结构的化合物;以及

[0848] (iv)使抗TfR1抗体与带有肌肉靶向剂的所述包含式(D)结构的化合物共价连接,以获得包含式(E)结构的化合物。

[0849] 31.实施方案30所述的方法,其中步骤(ii)的退火在30℃下进行。

[0850] 32.实施方案30或实施方案31所述的方法,其还包括在步骤(iii)之后和在步骤(iv)之前分离包含式(D)结构的化合物。

[0851] 33.实施方案30或实施方案31所述的方法,其中所述包含式(D)结构的化合物在步

骤(iv)之前不被分离。

[0852] 34.产生包含与寡核苷酸共价连接的抗转铁蛋白受体1(TfR1)抗体的复合物的方法,所述方法包括:

[0853] (i)获得包含式(B)结构的化合物,其中所述寡核苷酸包含siRNA寡核苷酸的有义链,任选地,其中所述siRNA寡核苷酸靶向DUX4 RNA;

[0854] (ii)使siRNA寡核苷酸的反义链与有义链退火;

[0855] (iii)使抗TfR1抗体与包含式(C)结构的化合物共价连接,以获得包含式(F)结构的化合物;以及

[0856] (iv)使所述包含式(F)结构的化合物与所述包含式(B)结构的化合物反应,以获得包含式(E)结构的化合物。

[0857] 35.实施方案30至34中任一项所述的方法,其中所述反义链的长度为18至25个核苷酸,并且包含SEQ ID NO:189、191、200、186、190、174至185、187、188、192至199和201至235中所示的靶序列之互补区,并且其中所述互补区的长度为至少16个连续的核苷。

[0858] 36.实施方案30至35中任一项所述的方法,其中所述抗TfR1抗体包含表2中列出的任何抗TfR1抗体的重链互补决定区1(CDR-H1)、重链互补决定区2(CDR-H2)、重链互补决定区3(CDR-H3)、轻链互补决定区1(CDR-L1)、轻链互补决定区2(CDR-L2)、轻链互补决定区3(CDR-L3)。

[0859] 37.实施方案30至36中任一项所述的方法,其中所述抗TfR1抗体与靶向DUX4 RNA的siRNA寡核苷酸的有义链的5'末端共价连接。

[0860] 等同方案和术语

[0861] 本文中举例说明性地描述的公开内容可在不存在本文中未具体公开的任何一个或更多个要素、一个或更多个限制的情况下适当地实践。因此,例如,在本文中的每种情况下,术语"包含/包括"、"基本上由.....组成"和"由.....组成"中的任一个可用其他两个术语中的任一个替换。已采用的术语和表达作为描述而非限制的术语使用,并且使用这样的术语和表达不旨在排除所示出和所描述的特征的任何等同形式或其一部分,而是应认识到,在所公开内容的范围内可进行多种修改。因此,应理解,尽管已通过一些优选的实施方案、任选的特征具体公开了本公开内容,但是本领域技术人员可获取本文中所公开概念的修改和变化,并且这样的修改和变化被认为是在本公开内容的范围内。

[0862] 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。

[0863] 应理解,在一些实施方案中,在描述寡核苷酸或其他核酸的结构时可参考序列表中所示的序列。在这样的实施方案中,实际的寡核苷酸或其他核酸与指定序列相比可具有一个或更多个替代核苷酸或核苷(例如,DNA核苷的RNA对应物或RNA核苷的DNA对应物)和/或者(例如,和)一个或更多个经修饰核苷酸/核苷和/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。

[0864] 除非在本文中另外指明或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(尤其是在所附权利要求的上下文中)使用没有数量词修饰的名词将被解释为一个/种或更多

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

[0865] 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方案对于本领域普通技术人员可变得明显。

[0866] 本发明人预期技术人员在适当时采用这样的变化方案,并且本发明人希望以除本文中具体描述的之外的方式实践本发明。因此,如适用法律所允许的,本发明包括在此所附权利要求中记载的主题的所有修改方案和等同方案。此外,除非在本文中另外指明或在其他情况下与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖其所有可能变化方案中的上述要素的任何组合。本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文中所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案旨在由所附权利要求书涵盖。

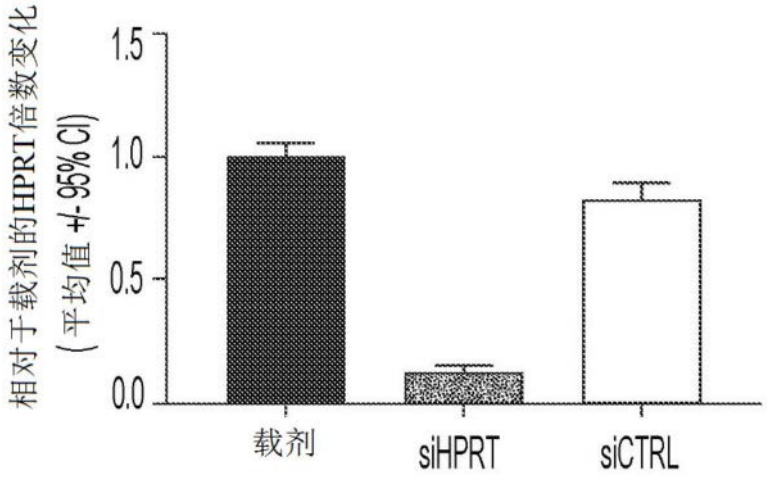

相对于载剂的HPRT倍数变化
(平均值 +/- 95% CI)
1.5
1.0
0.5
0.0
载剂
siHPRT
siCTRL

图1

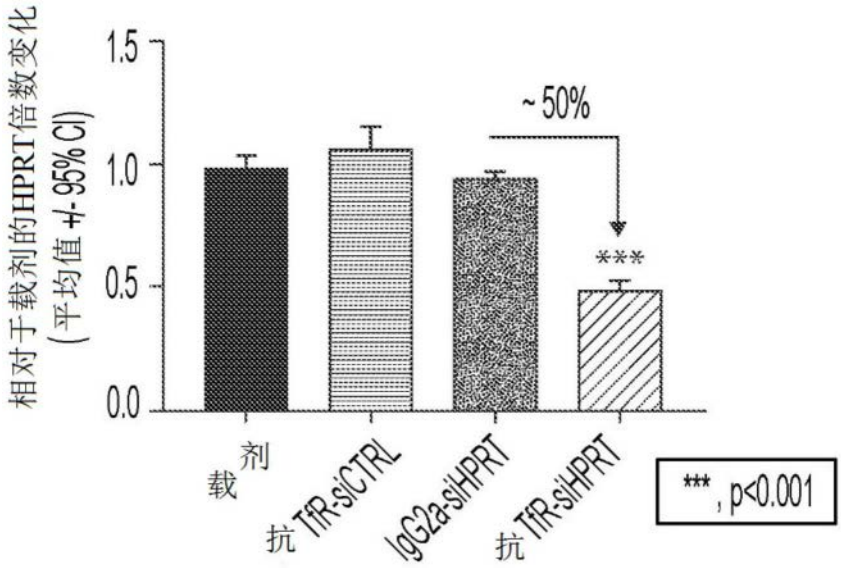

相对于载剂的HPRT倍数变化
(平均值 +/- 95% CI)
1.5
1.0
0.5
0.0
~ 50%
***
载剂
抗 TfR-siCTRL
IgG2a-siHPRT
抗 TfR-siHPRT
***, p<0.001

图2

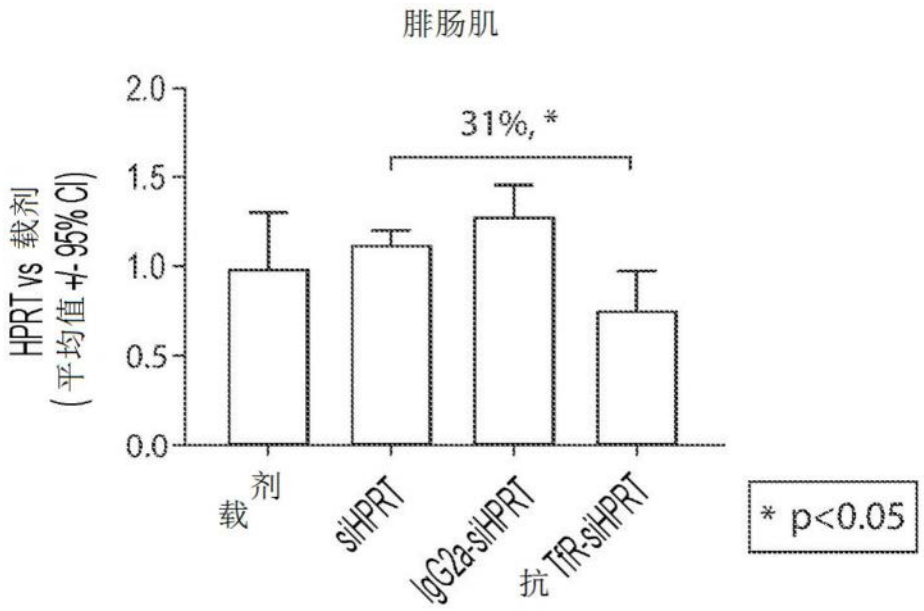

腓肠肌
HPRT vs 载剂
(平均值 +/- 95% CI)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
31%, *
载剂
siHPRT
IgG2a-siHPRT
抗 TfR-siHPRT
* p<0.05

图3A

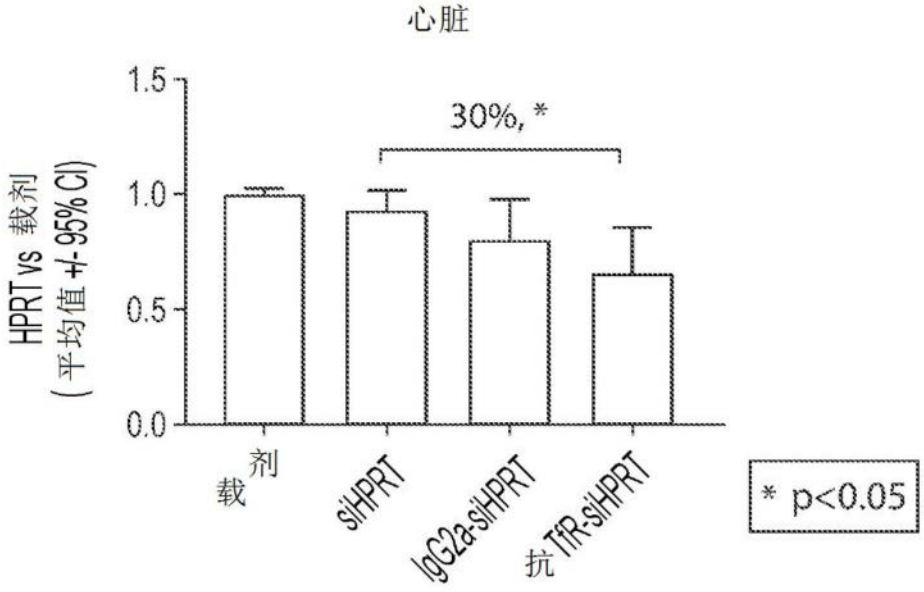

心脏
HPRT vs 载剂
(平均值 +/- 95% CI)
1.5
1.0
0.5
0.0
30%, *
载剂
siHPRT
IgG2a-siHPRT
抗 TfR-siHPRT
* p<0.05

图3B

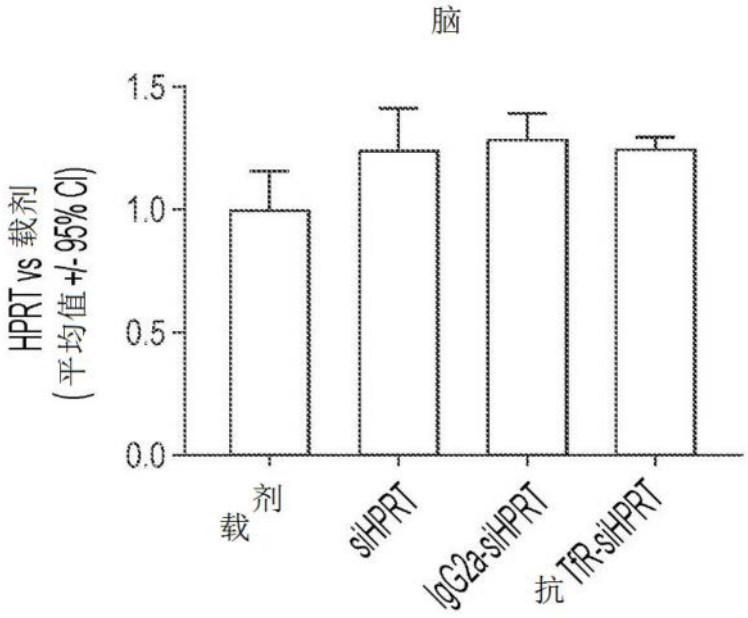

脑
HPRT vs 载剂
(平均值+/- 95% CI)
1.5
1.0
0.5
0.0
载剂
siHPRT
IgG2a-siHPRT
抗TfR-siHPRT

图4A

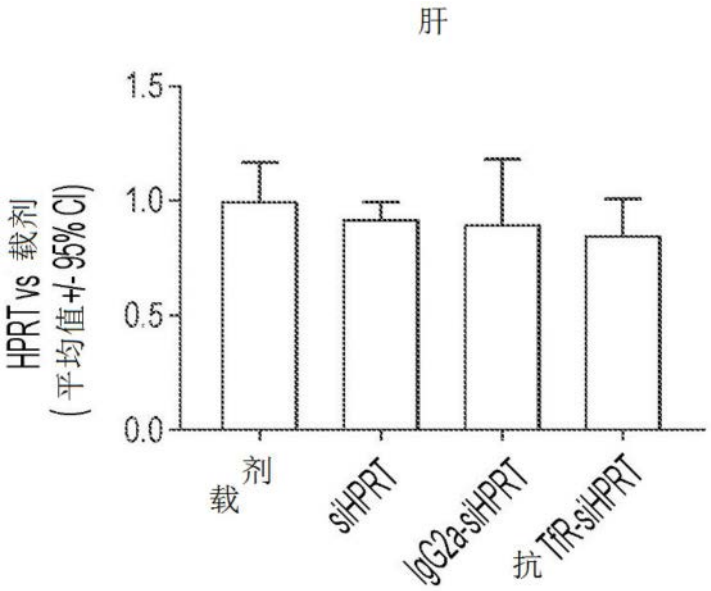

肝
HPRT vs 载剂
(平均值+/- 95% CI)
1.5
1.0
0.5
0.0
载剂
siHPRT
IgG2a-siHPRT
抗TfR-siHPRT

图4B

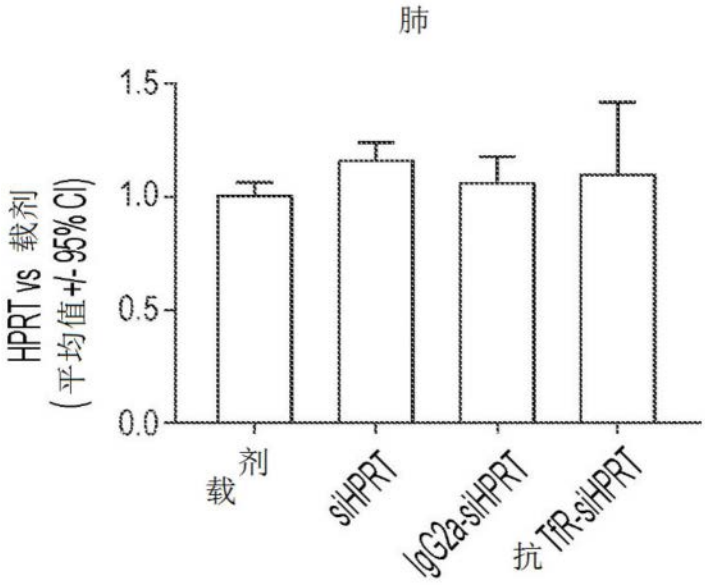

肺
HPRT vs 载剂
(平均值+/- 95% CI)
1.5
1.0
0.5
0.0
载剂
siHPRT
IgG2a-siHPRT
抗TfR-siHPRT

图4C

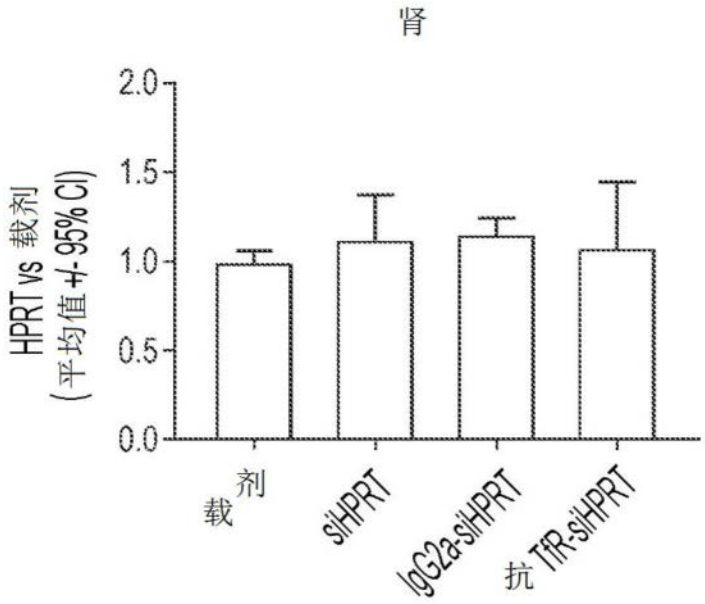

肾
HPRT vs 载剂
(平均值+/- 95% CI)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
载剂
siHPRT
IgG2a-siHPRT
抗TfR-siHPRT

图4D

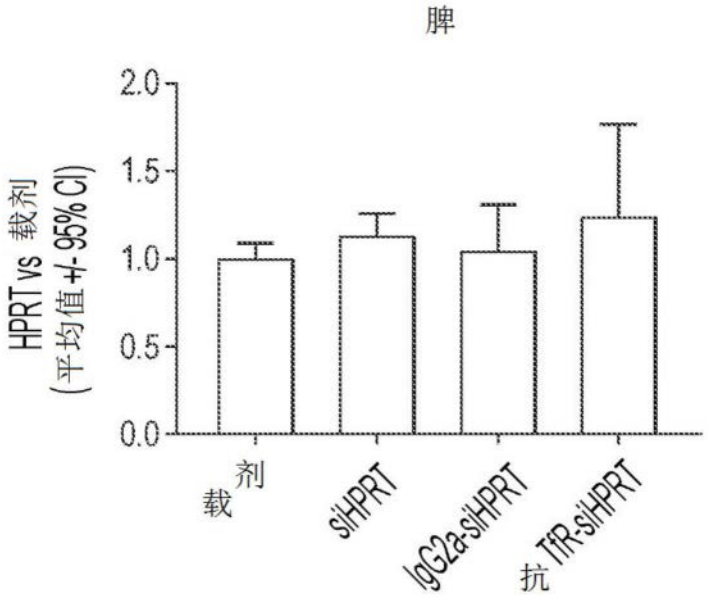

脾
HPRT vs 载剂
(平均值+/- 95% CI)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
载剂
siHPRT
IgG2a-siHPRT
抗TfR-siHPRT

图4E

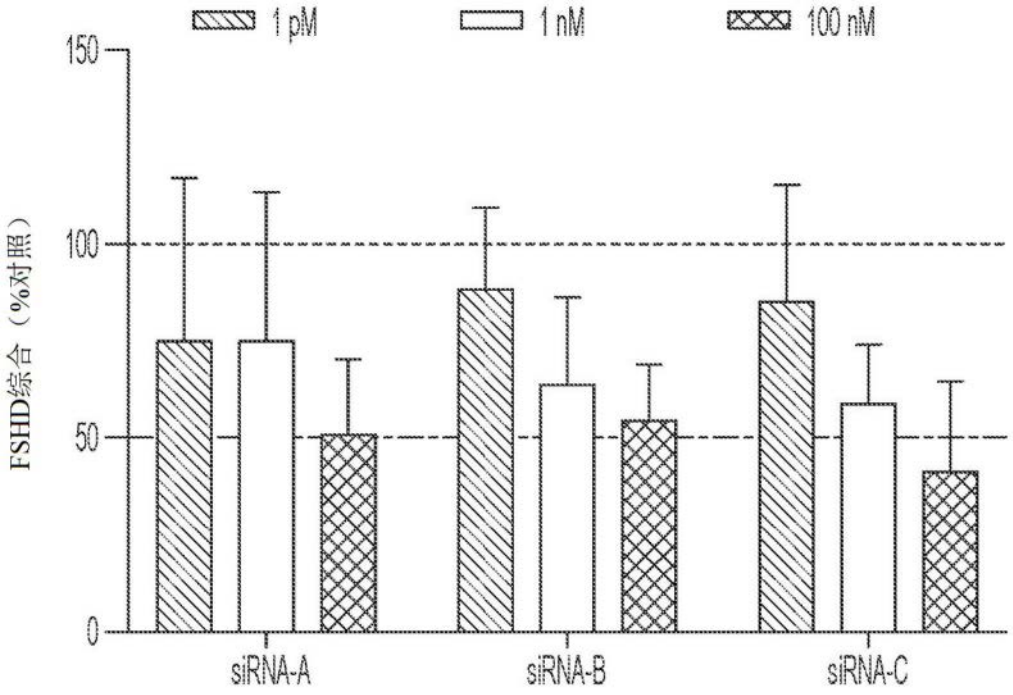

1 pM
1 nM
100 nM
FSHD综合（%对照）
150
100
50
0
siRNA-A
siRNA-B
siRNA-C

图5

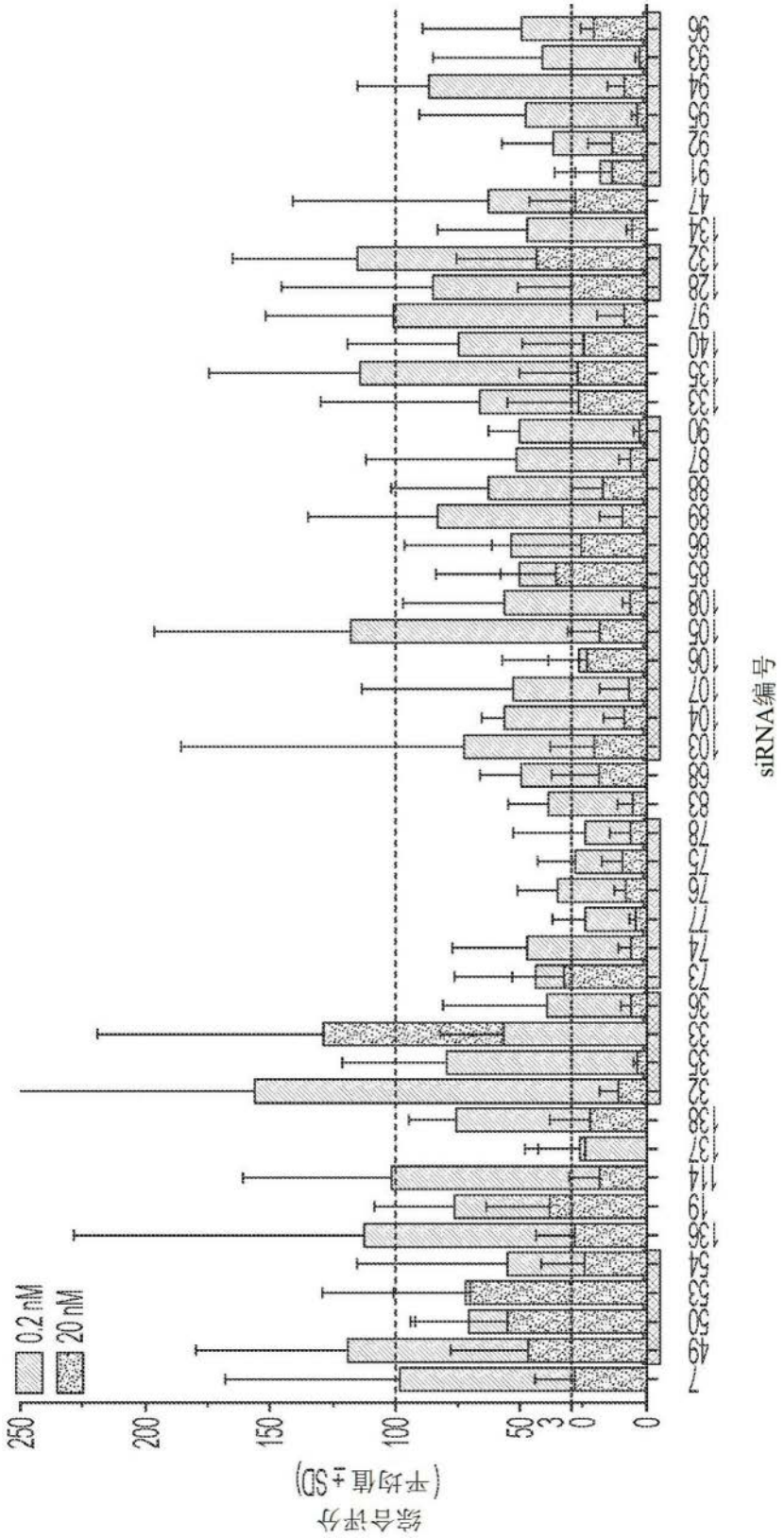


图6

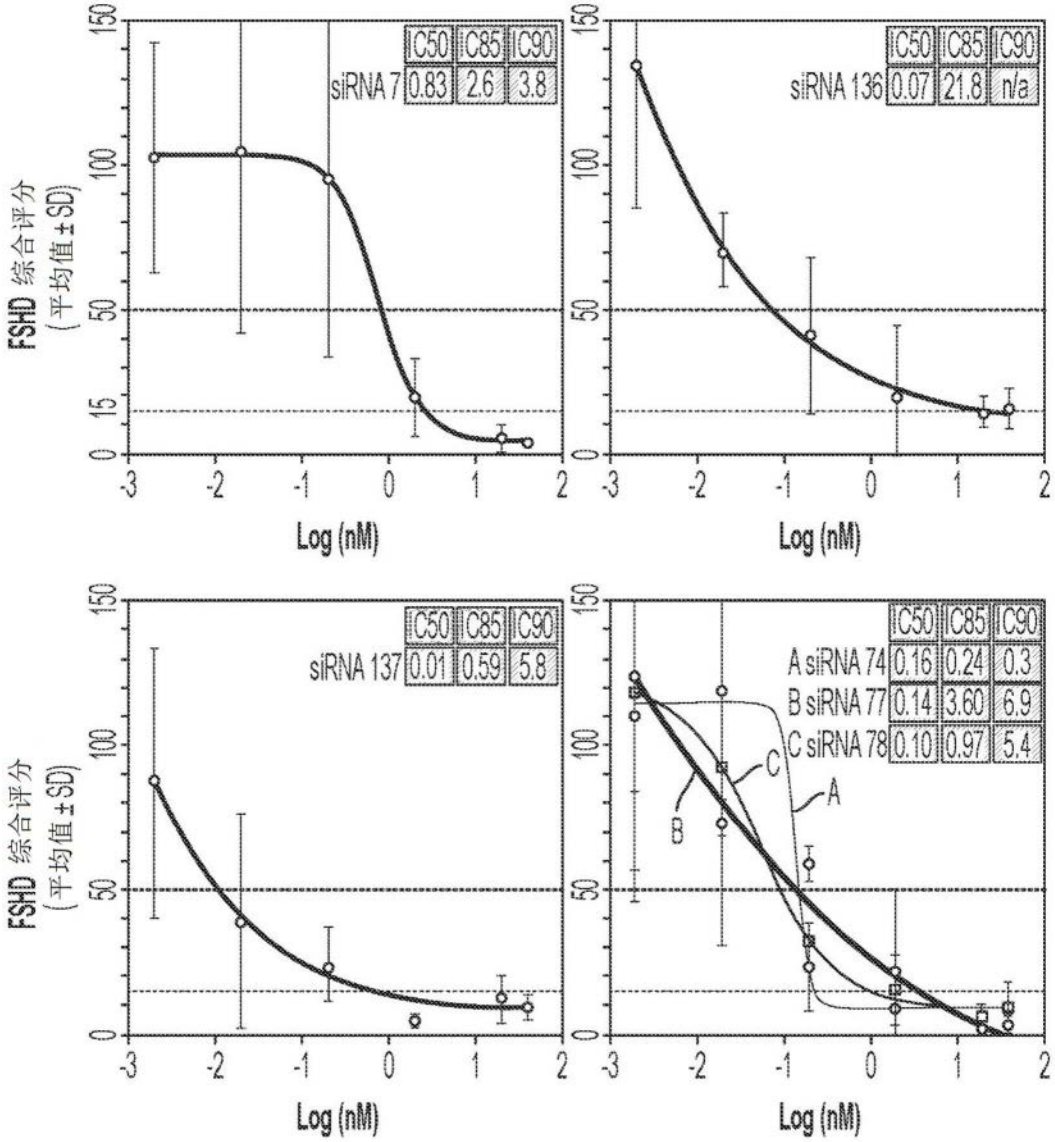

FSHD 综合评分
(平均值±SD)
Log (nM)
siRNA 7
IC50 IC85 IC90
0.83 2.6 3.8
siRNA 136
IC50 IC85 IC90
0.07 21.8 n/a
siRNA 137
IC50 IC85 IC90
0.01 0.59 5.8
A siRNA 74 0.16 0.24 0.3
B siRNA 77 0.14 3.60 6.9
C siRNA 78 0.10 0.97 5.4
A
B
C

图7A

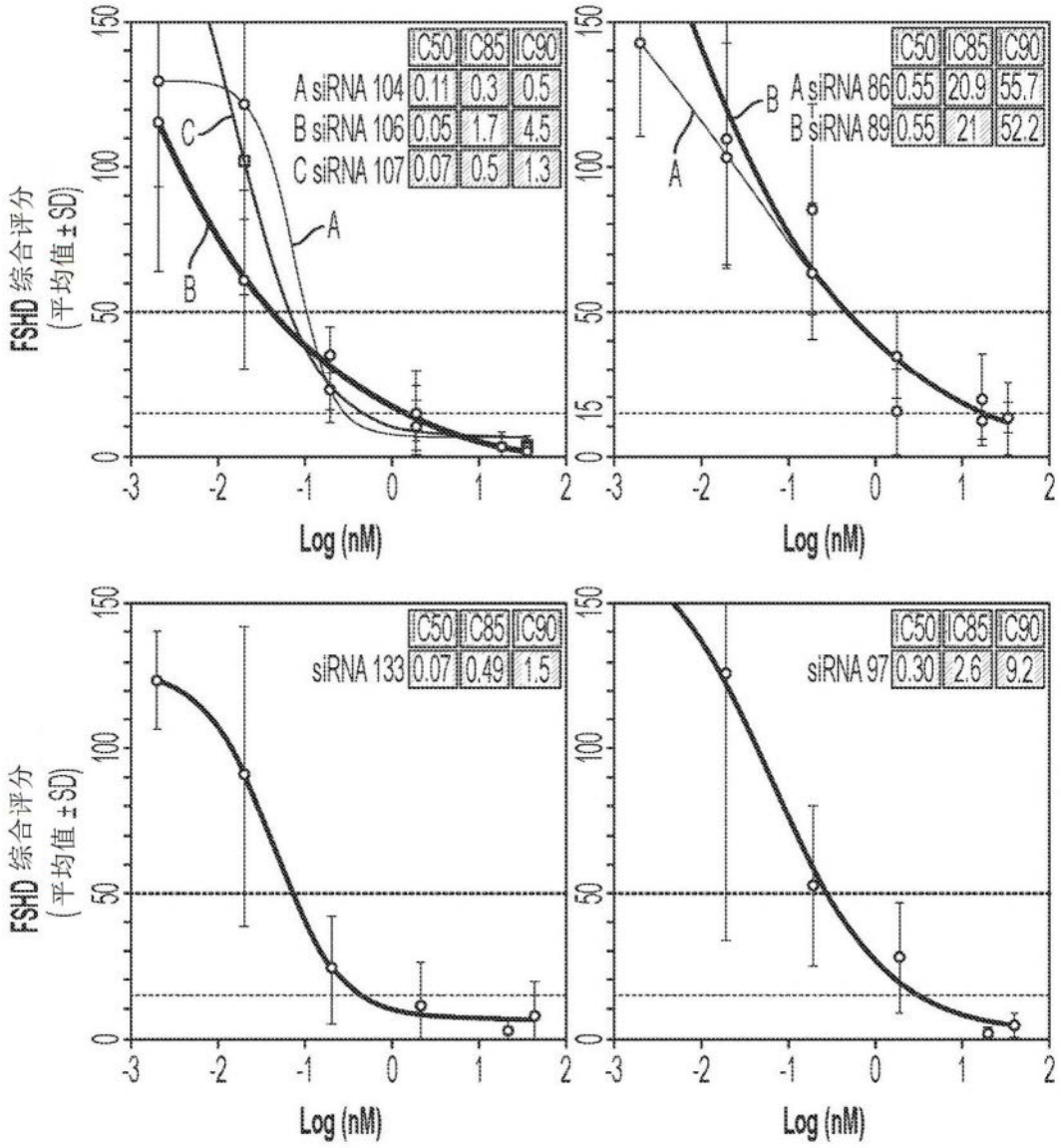

FSHD 综合评分
(平均值 ± SD)
Log (nM)
C50 C85 C90
A siRNA 104 0.11 0.3 0.5
B siRNA 106 0.05 1.7 4.5
C siRNA 107 0.07 0.5 1.3
A siRNA 86 0.55 20.9 55.7
B siRNA 89 0.55 21 52.2
siRNA 133 0.07 0.49 1.5
siRNA 97 0.30 2.6 9.2
A
B
C

图7B

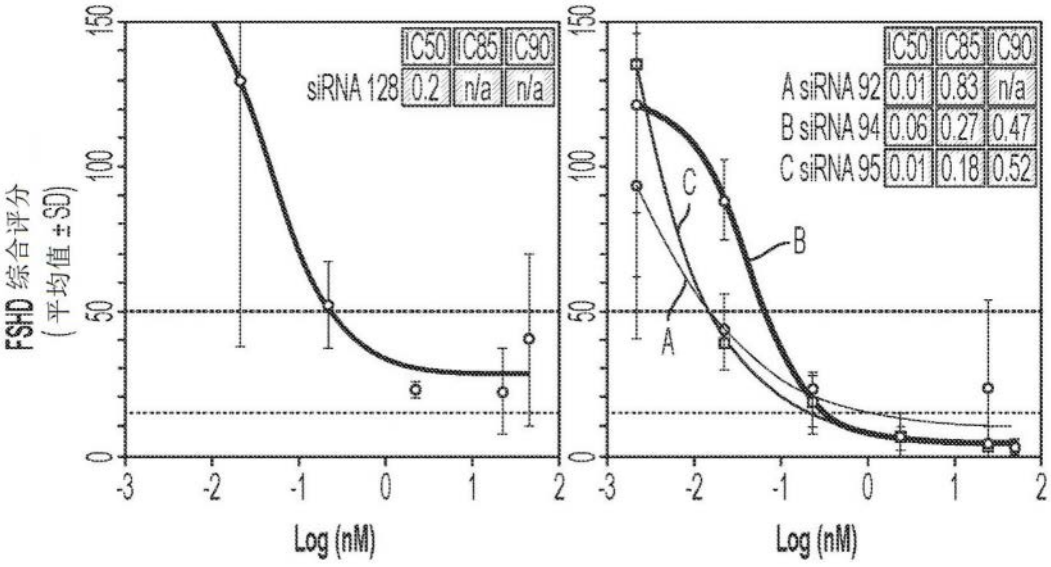

FSHD 综合评分
（平均值 ± SD）
Log (nM)
Log (nM)
IC50 IC85 IC90
siRNA 128 0.2 n/a n/a
A siRNA 92 0.01 0.83 n/a
B siRNA 94 0.06 0.27 0.47
C siRNA 95 0.01 0.18 0.52
A
B
C

图7C

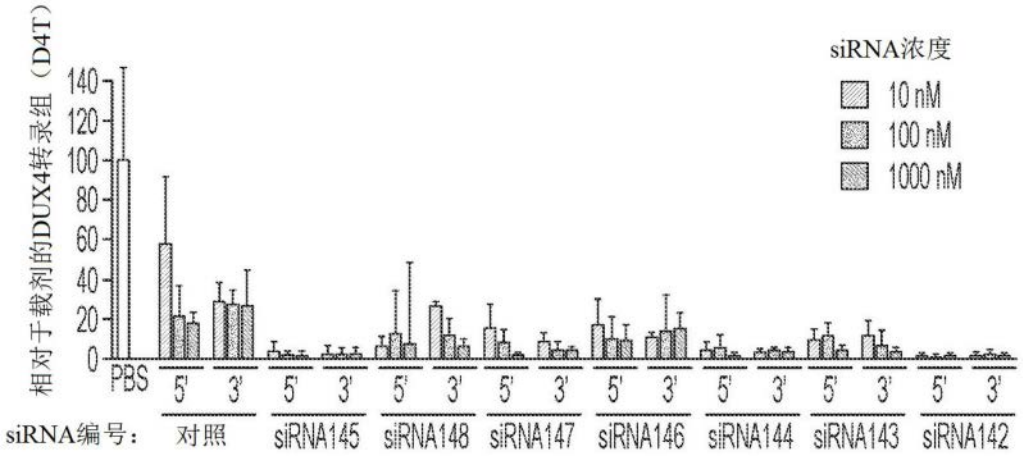

相对于载剂的DUX4转录组（D4T）
siRNA浓度
10 nM
100 nM
1000 nM
PBS
siRNA编号：
对照
siRNA145
siRNA148
siRNA147
siRNA146
siRNA144
siRNA143
siRNA142

图8

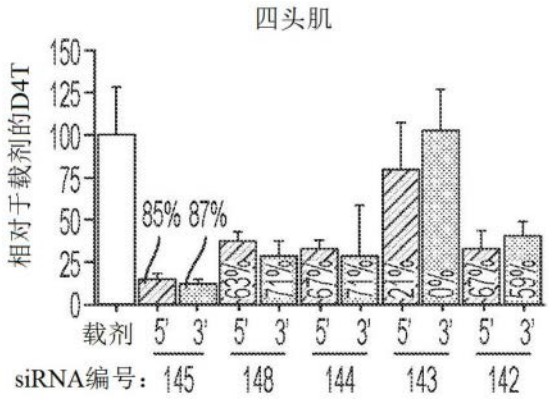

四头肌
相对于载剂的D4T
85% 87%
63%
71%
67%
71%
21%
0%
67%
59%
载剂
siRNA编号：
145
148
144
143
142

图9A

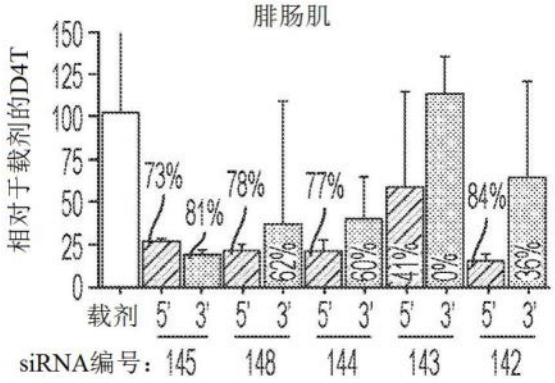

腓肠肌
相对于载剂的D4T
150
125
100
75
50
25
0
73%
81%
78%
62%
77%
60%
41%
0%
84%
36%
载剂 5' 3' 5' 3' 5' 3' 5' 3' 5' 3'
siRNA编号：145 148 144 143 142

图9B

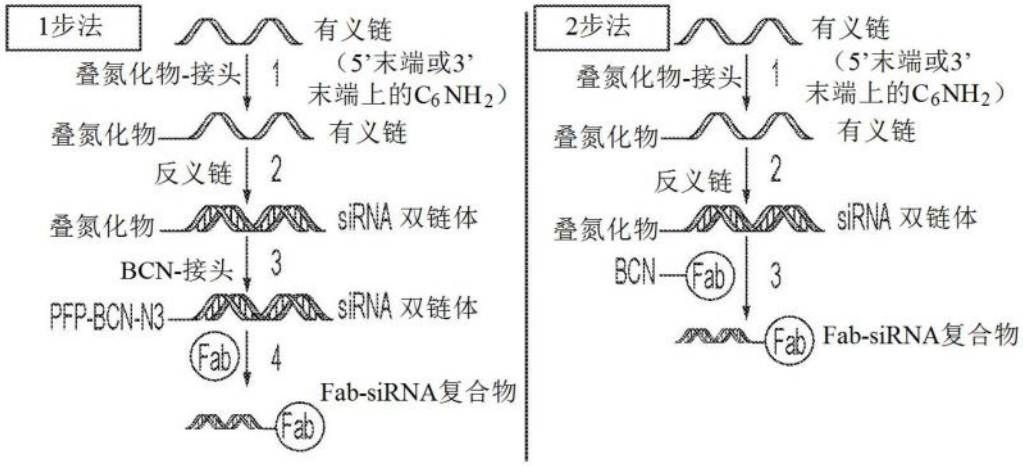

1步法
有义链
叠氮化物-接头 1
（5'末端或3'末端上的C_6NH_2）
叠氮化物
有义链
反义链 2
叠氮化物
siRNA 双链体
BCN-接头 3
PFP-BCN-N3
siRNA 双链体
Fab 4
Fab-siRNA复合物
Fab
2步法
有义链
叠氮化物-接头 1
（5'末端或3'末端上的C_6NH_2）
叠氮化物
有义链
反义链 2
叠氮化物
siRNA 双链体
BCN
Fab 3
Fab
Fab-siRNA复合物

图10