



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118638787 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 13

(21) 申请号 202410788002.5

(22) 申请日 2018.12.06

(30) 优先权数据

62/595,545 2017.12.06 US

62/725,883 2018.08.31 US

(62) 分案原申请数据

201880088816.0 2018.12.06

(71) 申请人 艾维迪提生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 安德鲁·约翰·吉尔

文卡塔·拉马纳·多帕拉普迪

大卫·世-豪·朱

迈克尔·卡拉米安·科克伦

迈克尔·胡德

比亚特丽丝·戴安娜·达里蒙特

罗伯·伯克 石云雨

古林·埃尔多安·莫雷柳斯

巴尔博拉·马勒科娃

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 王玉桂 武晶晶

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

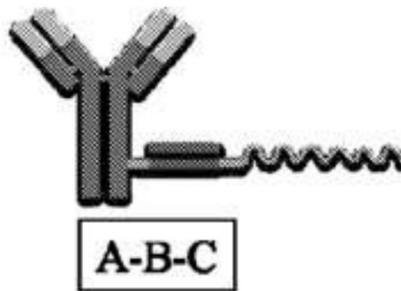
权利要求书1页 说明书140页  
序列表(电子公布) 附图64页

(54) 发明名称

治疗肌萎缩和强直性肌营养不良的组合物和方法

(57) 摘要

本文公开了治疗肌萎缩和强直性肌营养不良的组合物和方法。具体地,本文公开了多核酸分子、药物组合物和用于治疗肌萎缩或强直性肌营养不良的方法。



1. 一种多核酸分子缀合物,其包含与多核酸分子缀合的抗体或其结合片段,所述多核酸分子与atrogene的靶序列杂交;其中所述多核酸分子包含至少一个2' 修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;并且其中所述多核酸分子缀合物介导针对所述atrogene的RNA干扰,从而治疗受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良。

2. 根据权利要求1所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene包括IGF1-Akt-Fox0途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -Fox0途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内差异调节的基因。

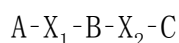
3. 根据权利要求2所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene是IGF1-Akt-Fox0途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -Fox0途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内下调的基因。

4. 根据权利要求2所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene是IGF1-Akt-Fox0途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -Fox0途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内上调的基因。

5. 根据权利要求1所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene编码E3连接酶。

6. 根据权利要求1所述的多核酸分子缀合物,其中所述抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。

7. 根据权利要求1所述的多核酸分子缀合物,其中所述多核酸分子缀合物包含式(I)的分子:



式I

其中,

A为抗体或其结合片段;

B为与atrogene的靶序列杂交的多核酸分子;

C为聚合物;且

X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>各自独立地选自键或非聚合连接体;并且

其中A和C不连接至B的同一末端。

8. 一种药物组合物,其包含:

权利要求1-7的多核酸分子缀合物;以及

药学上可接受的赋形剂。

9. 一种治疗有需要的受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良的方法,其包括:

向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1-7的多核酸分子缀合物或权利要求8的药物组合物,以治疗所述受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良。

10. 一种试剂盒,其包含权利要求1-7的多核酸分子缀合物或权利要求8的药物组合物。

## 治疗肌萎缩和强直性肌营养不良的组合物和方法

[0001] 申请是申请日为2018年12月6日、申请号为201880088816.0、发明名称为“治疗肌萎缩和强直性肌营养不良的组合物和方法”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2018年12月6日、申请号为(PCT/US2018/064359)的分案申请。

[0002] 序列表

[0003] 本申请含有序列表,该序列表已经以XML格式电子提交,并且通过引用整体并入本文。创建于2024年6月13日的所述XML副本被命名为45532-722\_7112\_SL.xml,大小为170,577个字节。

### 背景技术

[0004] 通过RNA诱导的基因沉默进行的基因抑制提供了几种控制水平:转录失活、小干扰RNA(siRNA)诱导的mRNA降解和siRNA诱导的转录弱化。在一些情况下,RNA干扰(RNAi)对多细胞分裂提供持久的影响。因此,RNAi代表了可用于药物靶标验证、基因功能分析、途径分析和疾病治疗的可行方法。

### 发明内容

[0005] 在某些实施方案中,本文公开了用于调节与肌萎缩相关的基因(或atrogene)的多核酸分子和药物组合物。在一些实施方案中,本文还描述了用本文公开的多核酸分子或多核酸分子缀合物治疗肌萎缩的方法。

[0006] 在某些实施方案中,本文公开了式(I)的分子: $A-X_1-B-X_2-C$ (式I)其中,A为结合部分;B为与atrogene的靶序列杂交的多核苷酸;C为聚合物;且 $X_1$ 和 $X_2$ 各自独立地选自键或非聚合连接体;其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;并且其中A和C不连接至B的同一末端。在一些实施方案中,所述atrogene包括IGF1-Akt-FoxO途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -FoxO途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内差异调节的(例如,上调或下调的)基因。在一些实施方案中,所述atrogene编码E3连接酶。在一些实施方案中,所述atrogene编码叉头框转录因子。在一些实施方案中,所述atrogene包括atrogen-1基因(FBXCTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG gac032)(SEQ ID NO:881)、MuRF1基因(TRIM63)、FOXO1、FOXO3或MSTN。在一些实施方案中,所述atrogen包括DMPK。在一些实施方案中,B由与atrogene的靶序列杂交的多核苷酸组成。在一些实施方案中,C由聚合物组成。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、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)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些实施方案中,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含与atrogene的靶序

列杂交的单链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核苷酸分子,其中第一多核苷酸或第二多核苷酸还与 atrogene 的靶序列杂交。在一些实施方案中,第二多核苷酸包含至少一个修饰。在一些实施方案中,第一多核苷酸和第二多核苷酸是 RNA 分子。在一些实施方案中,所述多核苷酸与 atrogene 的靶序列的至少 8 个连续碱基杂交。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含与 SEQ ID NO:190-303 和 532-642 所示的序列至少 60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 99% 互补的序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸的长度为约 8 个至约 50 个核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸的长度为约 10 个至约 30 个核苷酸。在一些实施方案中,第一多核苷酸包含与 SEQ ID NO:304-417、418-531、643-753、754-864 和 28-189 所示的序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的序列。在一些实施方案中,第二多核苷酸包含与 SEQ ID NO:304-417、418-531、643-753、754-864 和 28-189 所示的序列具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性的序列。在一些实施方案中,  $X_1$  和  $X_2$  独立地为  $C_1$ - $C_6$  烷基。在一些实施方案中,  $X_1$  和  $X_2$  独立地为同双官能连接体或异双官能连接体,任选地缀合至  $C_1$ - $C_6$  烷基。在一些实施方案中, A 为抗体或其结合片段。在一些实施方案中, A 包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价 Fab'、二价 Fab2、单链可变片段 (scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体 (sdAb) 或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些实施方案中, A 为抗运铁蛋白受体抗体或其结合片段。在一些实施方案中, C 为聚乙二醇。在一些实施方案中, A- $X_1$  缀合至 B 的 5' 端,且  $X_2$ -C 缀合至 B 的 3' 端。在一些实施方案中,  $X_2$ -C 缀合至 B 的 5' 端,且 A- $X_1$  缀合至 B 的 3' 端。在一些实施方案中, A 直接缀合至  $X_1$ 。在一些实施方案中, C 直接缀合至  $X_2$ 。在一些实施方案中, B 直接缀合至  $X_1$  和  $X_2$ 。在一些实施方案中,该分子进一步包含 D。在一些实施方案中, D 缀合至 C 或缀合至 A。在一些实施方案中, D 为内体溶解聚合物。

[0007] 在某些实施方案中,本文公开了一种多核苷酸分子缀合物,其包含与多核苷酸缀合的结合部分,所述多核苷酸与 atrogene 的靶序列杂交;其中所述多核苷酸任选地包含至少一个 2' 修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;并且其中所述多核苷酸分子缀合物介导针对所述 atrogene 的 RNA 干扰,从而治疗受试者的肌萎缩。在一些实施方案中,所述 atrogene 包括 IGF1-Akt-FoxO 途径、糖皮质激素-GR 途径、PGC1 $\alpha$ -FoxO 途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B 途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3 途径内差异调节的 (例如,上调或下调的) 基因。在一些实施方案中,所述 atrogene 编码 E3 连接酶。在一些实施方案中,所述 atrogene 编码叉头框转录因子。在一些实施方案中,所述 atrogene 包含 TGF-beta (转化生长因子-beta) 蛋白质超家族的配体。在一些实施方案中,所述 atrogene 包括 DMPK。在一些实施方案中,所述结合部分是抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述结合部分包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价 Fab'、二价 Fab2、单链可变片段 (scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体 (sdAb) 或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述结合部分是抗运铁蛋白受体抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述结合部分是胆固醇。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含与 atrogene 的靶序列杂交的单链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核苷酸分子,其中第一多核苷酸或第二多核苷酸还与 atrogene 的靶序列杂交。在一些实施方案中,第二多核苷酸包含至少一个修饰。



在一些实施方案中,第一多核苷酸和第二多核苷酸是RNA分子。在一些实施方案中,所述多核苷酸与atrogene的靶序列的至少8个连续碱基杂交。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的序列至少60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%互补的序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸的长度为约8个至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸的长度为约10个至约30个核苷酸。在一些实施方案中,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:304-417、418-531、643-753、754-864和28-189所示的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:142-255、256-369、481-591、592-702和3407-14222所示的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子缀合物任选地包含将所述结合部分连接至所述多核苷酸的连接体。在一些实施方案中,所述多核酸分子缀合物进一步包含聚合物,所述聚合物任选地通过另外的连接体间接缀合至所述多核苷酸。在一些实施方案中,所述连接体和所述另外的连接体各自独立地是键或非聚合连接体。在一些实施方案中,所述多核酸分子缀合物包含式(I)的分子: $A-X_1-B-X_2-C$ (式I),其中,A为抗体或其结合片段;B为与atrogene的靶序列杂交的多核酸;C为聚合物;且 $X_1$ 和 $X_2$ 各自独立地选自键或非聚合连接体;其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;并且其中A和C不连接至B的同一末端。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、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-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些实施方案中,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端。在一些实施方案中,所述肌萎缩是糖尿病相关的肌萎缩。在一些实施方案中,所述肌萎缩是癌症恶病质相关的肌萎缩。在一些实施方案中,所述肌萎缩与胰岛素缺乏相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与慢性肾功能衰竭相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与充血性心力衰竭相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与慢性呼吸系统疾病相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与慢性感染相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与禁食相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与去神经支配相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与少肌症、糖皮质激素治疗、中风和/或心脏病发作相关。在一些情况下,1型强直性肌营养不良(DM1)与DMPK基因3' UTR中的CTG重复序列的扩展相关。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了一种药物组合物,其包含:以上描述的分子或以上描述的多核酸分子缀合物;和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制为纳米颗粒制剂。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于肠胃外、口服、鼻内、经颊、直肠或经皮给药。

[0009] 在某些实施方案中,本文公开了一种治疗有需要的受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良的方法,其包括:向所述受试者施用治疗有效量的多核酸分子缀合物,其包含与多核苷酸缀合的结合部分,所述多核苷酸与atrogene的靶序列杂交;其中所述多核苷酸任选地包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部

分;并且其中所述多核酸分子缀合物介导针对所述atrogene的RNA干扰,从而治疗所述受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良。在一些实施方案中,所述肌萎缩是糖尿病相关的肌萎缩。在一些实施方案中,所述肌萎缩是癌症恶病质相关的肌萎缩。在一些实施方案中,所述肌萎缩与胰岛素缺乏相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与慢性肾功能衰竭相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与充血性心力衰竭相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与慢性呼吸系统疾病相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与慢性感染相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与禁食相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与去神经支配相关。在一些实施方案中,所述肌萎缩与少肌症相关。在一些实施方案中,所述强直性肌营养不良是DM1。在一些实施方案中,所述atrogene包括IGF1-Akt-FoxO途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -FoxO途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内差异调节的(例如,上调或下调的)基因。在一些实施方案中,所述atrogene编码E3连接酶。在一些实施方案中,所述atrogene编码叉头框转录因子。在一些实施方案中,所述atrogene包括atrogen-1基因(FBX032)、MuRF1基因(TRIM63)、FOXO1、FOXO3或MSTN。在一些实施方案中,所述atrogen包括DMPK。在一些实施方案中,所述多核酸分子缀合物包含式(I)的分子:A-X<sub>1</sub>-B-X<sub>2</sub>-C(式I),其中,A为结合部分;B为与atrogene的靶序列杂交的多核苷酸;C为聚合物;且X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>各自独立地选自键或非聚合连接体;其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;并且其中A和C不连接至B的同一末端。在一些实施方案中,B由与atrogene的靶序列杂交的多核苷酸组成。在一些实施方案中,C由聚合物组成。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、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)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些实施方案中,所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。在一些实施方案中,所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含与atrogene的靶序列杂交的单链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子,其中第一多核苷酸或第二多核苷酸还与atrogene的靶序列杂交。在一些实施方案中,第二多核苷酸包含至少一个修饰。在一些实施方案中,第一多核苷酸和第二多核苷酸是RNA分子。在一些实施方案中,所述多核苷酸与atrogene的靶序列的至少8个连续碱基杂交。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的序列至少60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%互补的序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸的长度为约8个至约50个核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸的长度为约10个至约30个核苷酸。在一些实施方案中,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:304-417、418-531、643-753、754-864和28-189所示的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:304-417、418-531、643-753、754-864和28-189所示的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>独立地为C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基。在一些实施方案中,X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>独立地为同双官能连接体或异双官能连接体,任选地缀合至C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基。在一些实施方案中,A为抗体或其

结合片段。在一些实施方案中,A包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。在一些实施方案中,A为抗运铁蛋白受体抗体或其结合片段。在一些实施方案中,C为聚乙二醇。在一些实施方案中,A-X<sub>1</sub>缀合至B的5'端,且X<sub>2</sub>-C缀合至B的3'端。在一些实施方案中,X<sub>2</sub>-C缀合至B的5'端,且A-X<sub>1</sub>缀合至B的3'端。在一些实施方案中,A直接缀合至X<sub>1</sub>。在一些实施方案中,C直接缀合至X<sub>2</sub>。在一些实施方案中,B直接缀合至X<sub>1</sub>和X<sub>2</sub>。在一些实施方案中,该方法进一步包含D。在一些实施方案中,D缀合至C或缀合至A。在一些实施方案中,D为内体溶解聚合物。在一些实施方案中,所述多核酸分子缀合物被配制用于肠胃外、口服、鼻内、经颊、直肠或经皮给药。在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开了包含以上描述的分子或以上描述的多核酸分子缀合物的试剂盒。

## 附图说明

[0011] 在所附权利要求书中详细阐明了本公开的各个方面。通过参考以下对利用本公开的原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及以下附图,将会对本公开的特征和优点获得更好的理解。本专利申请文件包含至少一张以彩色绘制的附图。在请求并支付必要的费用后,专利局将会提供具有彩图的该专利申请公布文本的副本。

[0012] 图1示出了胆固醇-肌肉生长抑制素siRNA缀合物的示例性结构。

[0013] 图2示出了TfR mAb- (Cys) -HPRT-PEG5k,DAR1的SAX HPLC色谱图。

[0014] 图3示出了TfR mAb- (Cys) -HPRT-PEG5k,DAR1的SEC HPLC色谱图。

[0015] 图4示出了TfR1mAb-Cys-BisMal-siRNA缀合物的DAR1和DAR2SAX HPLC色谱图的叠加。

[0016] 图5示出了TfR1mAb-Cys-BisMal-siRNA缀合物的DAR1和DAR2SEC HPLC色谱图的叠加。

[0017] 图6示出了CD71 Fab-Cys-HPRT-PEG5的SEC色谱图。

[0018] 图7示出了CD71 Fab-Cys-HPRT-PEG5的SAX色谱图。

[0019] 图8示出了C2C12成肌细胞和肌管中Murf1和atrogin-1的相对表达水平。C2C12成肌细胞和肌管如实施例4所述生成。mRNA水平如实施例4所述测定。

[0020] 图9A示出了体内研究设计,以评估示例性缀合物介导骨骼肌中肌肉生长抑制素(MSTN)的mRNA下调的能力。

[0021] 图9B显示了小鼠腓肠肌(gastroc)中小鼠MSTN的siRNA介导的mRNA敲减。

[0022] 图10A示出了体内研究设计,以评估示例性缀合物介导骨骼肌中肌肉生长抑制素(MSTN)的mRNA下调的能力。

[0023] 图10B显示了直到示例性式(I)分子给药后1008h的组织浓度-时间曲线。

[0024] 图10C显示了小鼠腓肠肌(gastroc)中小鼠MSTN的siRNA介导的mRNA敲减。

[0025] 图10D显示了小鼠腓肠肌(gastroc)中小鼠MSTN的siRNA介导的mRNA敲减后,血浆mRNA蛋白的减少。

[0026] 图10E显示了小鼠腓肠肌(gastroc)中小鼠MSTN的siRNA介导的mRNA敲减后,肌肉

大小的变化。

[0027] 图10F显示了图10E的Welch双尾非配对t检验。

[0028] 图11A示出了示例性的体内研究设计。

[0029] 图11B显示了以所示剂量单次静脉内施用示例性式(I)分子后,小鼠腓肠肌(gastroc)中siRNA的组织积累。

[0030] 图11C显示了小鼠腓肠肌(gastroc)中小鼠MSTN的siRNA介导的mRNA敲减。

[0031] 图12A示出了示例性的体内研究设计。

[0032] 图12B显示了siRNA在各种肌肉组织中的积累。

[0033] 图12C显示了小鼠腓肠肌(gastroc)和心肌中小鼠MSTN的siRNA介导的mRNA敲减。

[0034] 图12D显示了小鼠腓肠肌(gastroc)中MSTN指导链的RISC负载。

[0035] 图13A示出了示例性的体内研究设计。

[0036] 图13B显示了小鼠腓肠肌(gastroc)、四头肌、三头肌和心脏中小鼠MSTN的siRNA介导的mRNA敲减。

[0037] 图13C示出了血浆肌肉生长抑制素水平。

[0038] 图13D示出了siRNA在不同组织类型中的累积:腓肠肌、三头肌、四头肌和心脏组织。

[0039] 图13E显示了小鼠腓肠肌(gastroc)中MSTN指导链的RISC负载。

[0040] 图13F显示了肌肉面积的变化。

[0041] 图13G显示了图13F的Welch双尾非配对t检验。

[0042] 图14A示出了示例性的体内研究设计。

[0043] 图14B显示了本文所述的示例性缀合物引起的腓肠肌的HPRT mRNA表达。

[0044] 图14C显示了本文所述的示例性缀合物引起的腓肠肌的SSB mRNA表达。

[0045] 图14D显示了本文所述的示例性缀合物引起的心脏组织的HPRT mRNA表达。

[0046] 图14E显示了本文所述的示例性缀合物引起的心脏组织的SSB mRNA表达。

[0047] 图14F显示了siRNA在腓肠肌中的积累。

[0048] 图15A示出了示例性的体内研究设计。

[0049] 图15B显示了腓肠肌(gastroc)中的Atrogin-1下调。

[0050] 图15C显示了心脏组织中的Atrogin-1下调。

[0051] 图16A示出了示例性的体内研究设计。

[0052] 图16B显示了腓肠肌中的MuRF-1下调。

[0053] 图16C显示了心脏组织中的MuRF-1下调。

[0054] 图17示出了在体外转染到小鼠C2C12成肌细胞中的siRNA。评估的四种DMPK siRNA均显示DMPK mRNA敲减,而阴性对照siRNA则没有。虚线是通过非线性回归拟合的三参数曲线。

[0055] 图18A-图18F显示了体内结果,其证明在单次静脉内施用DMPK siRNA-抗体缀合物后7天,对DMPK mRNA敲减的稳定剂量响应。图18A:腓肠肌;图18B:胫骨前肌;图18C:四头肌;图18D:膈肌;图18E:心脏;图18F:肝脏。

[0056] 图19A-图19L显示了本文所述的示例性抗体-核酸缀合物。

[0057] 图19M呈现了在图19A-图19L中使用的抗体卡通。

[0058] 图20A-图20B示出了在实施例20中使用的示例性21聚体双链体。图20A显示了在5'端具有C6-NH<sub>2</sub>缀合柄且在3'端具有C6-S-NEM的siRNA过客链的代表性结构。图20B显示了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体的代表性结构。

[0059] 图21A-图21B示出了在实施例20中使用的第二示例性21聚体双链体。图21A显示了具有5'缀合手柄的siRNA过客链的代表性结构。图21B显示了具有19个碱基的互补性和一个3'二核苷酸突出端的平端双链体的代表性结构。

[0060] 图22显示了说明性的体内研究设计。

[0061] 图23示出了在以3mg/kg的单剂量静脉内递送后,由TfR1抗体siRNA缀合物介导的腓肠肌中Atrogin-1mRNA下调的时程。

[0062] 图24示出了在以3mg/kg的单剂量静脉内递送后,由TfR1抗体siRNA缀合物介导的心肌中Atrogin-1mRNA下调的时程。

[0063] 图25显示了说明性的体内研究设计。

[0064] 图26显示了在以所示剂量静脉内递送后,由TfR1抗体siRNA缀合物介导的腓肠肌中96小时的MuRF1 mRNA下调。

[0065] 图27显示了在以所示剂量静脉内递送后,由TfR1抗体siRNA缀合物介导的心肌中96小时的MuRF1 mRNA下调。

[0066] 图28显示了在不存在和存在地塞米松诱发肌萎缩的情况下,由TfR1抗体siRNA缀合物(以3mg/kg siRNA静脉内递送)介导的腓肠肌中MuRF1和Atrogin-1mRNA下调的时程。

[0067] 图29显示了在不存在和存在地塞米松诱发肌萎缩的情况下,由TfR1抗体siRNA缀合物(以3mg/kg siRNA静脉内递送)介导的心肌中MuRF1和Agtrogin1 mRNA下调的时程。

[0068] 图30显示了在不存在和存在肌萎缩的情况下,由TfR1抗体siRNA缀合物(以3mg/kg siRNA静脉内递送)介导的腓肠肌重量变化的时程。

[0069] 图31显示了在不存在和存在肌萎缩的情况下,由TfR1抗体siRNA缀合物(以3mg/kg siRNA静脉内递送)介导的腓肠肌和心肌中siRNA组织浓度的时程。

[0070] 图32显示了说明性的体内研究设计。

[0071] 图33显示了相对于组织中siRNA的测量浓度,在不存在和存在地塞米松诱发的萎缩(在第7天开始)的情况下,在TfR1抗体siRNA缀合物后10天,腓肠肌中的Atrogin-1mRNA下调。

[0072] 图34显示了在不存在(第10和13组,以及第11和14组)和存在地塞米松诱发的萎缩(第12和15组)的情况下,杂乱(scramble)对照组的腓肠肌中的相对Atrogin-1mRNA水平。

[0073] 图35显示了在不存在和存在地塞米松诱发的萎缩的情况下,在TfR1-mAb缀合物递送后,小鼠腓肠肌中Atrogin-1指导链的相对RISC负载。

[0074] 图36显示了相对于PBS对照,在不存在(实线)和存在(虚线)地塞米松诱发的萎缩(在第7天开始)的情况下,TfR1抗体siRNA缀合物递送后,腓肠肌中MSTN mRNA下调的时程。

[0075] 图37显示了在不存在和存在地塞米松诱发的萎缩的情况下,在TfR1-mAb缀合物递送后,腓肠肌中的腿部肌肉生长速率。

[0076] 图38显示了说明性的体内研究设计。

[0077] 图39A显示了4.5mg/kg (siRNA)的Atrogin-1siRNA或MuRF1siRNA的单次处理,或两种siRNA组合的单剂量处理,导致腓肠肌中每个靶标最高下调75%。

[0078] 图39B显示了直到ASC给药后37天,在整个腿中,腓肠肌中两种靶标的mRNA敲减保持在75%。

[0079] 图39C显示了肌肉面积的变化。

[0080] 图39D显示了腓肠肌重量的变化。

[0081] 图39E显示了就腿部肌肉面积而言,治疗引起的肌肉萎缩减少百分比 (percentage sparing)。统计分析使用Welch's T检验将治疗组与杂乱siRNA对照组进行了比较。

[0082] 图39F显示了就腓肠肌重量而言,治疗引起的肌肉萎缩减少百分比 (percentage sparing)。

### 具体实施方式

[0083] 肌萎缩是指诸如控制运动的骨骼肌或随意肌、心肌和平滑肌等肌肉的肌肉质量丧失或进行性弱化和退化。包括废用、饥饿、癌症、糖尿病和肾功能衰竭在内的各种病理生理状况或糖皮质激素治疗会导致肌萎缩和力量下降。肌萎缩的表型效应是由各种分子事件引起的,包括抑制肌肉蛋白质合成、增加肌肉蛋白质转换、卫星细胞分化的异常调节以及肌肉纤维类型的异常转化。

[0084] 广泛的研究已经确定,肌萎缩是由特定信号途径和转录程序控制的活跃过程。参与该过程的示例性途径包括但不限于IGF1-Akt-FoxO途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -FoxO途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径和肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径。

[0085] 在一些情况下,对调节肌萎缩的机制的治疗性处置集中在IGF1-Akt、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B和肌肉生长抑制素。虽然IGF1类似物显示出可有效治疗肌萎缩,但IGF1-Akt途径参与促进肿瘤发生和肥大阻碍了这些疗法。使用 $\beta$ -肾上腺素能激动剂调节Akt-mTOR途径也涉及类似的风险。通过使用可溶性ActRIIB或阻断ActRIIB抗体的配体抑制肌肉生长抑制素可预防和逆转骨骼肌损失,并延长荷瘤动物的生存期。然而,肌肉生长抑制素阻断的抗萎缩作用机理仍不确定,因为显性阴性ActRIIB的表达和Smad2/3的敲减都未能阻止去神经支配后的肌肉丢失 (Satori等人, "Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood", *Am J Physiol Cell Physiol* 296:C1248-C1257, 2009)。

[0086] 比较不同肌萎缩模型 (包括糖尿病、癌症恶病质、慢性肾功能衰竭、禁食和去神经支配) 中的基因表达已导致鉴定出与萎缩相关的基因,称为atrogene (Sacheck等人, "Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases", *The FASEB Journal*, 21(1): 140-155, 2007), 它们通常在萎缩的肌肉中上调或下调。在萎缩条件下强烈上调的基因包括肌肉特异性泛素蛋白 (E3) 连接酶 (例如, atrogin-1, MuRF1)、叉头框转录因子和介导应激反应的蛋白质。在一些情况下,使用传统药物难以调节许多这些效应蛋白质。

[0087] 核酸 (例如, RNAi) 疗法是具有高选择性和特异性的靶向疗法。然而, 在一些情况下, 核酸疗法也受到细胞内摄取不良、血液稳定性有限和非特异性免疫刺激的阻碍。为了解决这些问题, 探索了核酸组合物的各种修饰, 例如, 用于更好稳定和/或降低毒性的新型连接体, 用于提高靶标特异性和/或靶标递送的结合部分的优化, 以及用于提高稳定性和/或降低脱靶效应的核酸聚合物修饰。

[0088] 在一些实施方案中, 构成核酸组合物的不同组分的排列或顺序进一步影响细胞内

摄取、稳定性、毒性、功效和/或非特异性免疫刺激。例如,如果核酸组分包括结合部分、聚合物和多核酸分子(或多核苷酸),则该结合部分、聚合物和/或多核酸分子(或多核苷酸)的顺序或排列(例如,结合部分-多核酸分子-聚合物、结合部分-聚合物-多核酸分子或聚合物-结合部分-多核酸分子)进一步影响细胞内摄取、稳定性、毒性、功效和/或非特异性免疫刺激。

[0089] 在一些实施方案中,本文描述的包括用于治疗肌萎缩或强直性肌营养不良的多核酸分子和多核酸分子缀合物。在一些情况下,本文所述的多核酸分子缀合物增强细胞内摄取、稳定性和/或效能。在一些情况下,该多核酸分子缀合物包含式(I)的分子: $A-X_1-B-X_2-C$ 。在一些情况下,该多核酸分子与一个或多个atrogene的靶序列杂交。

[0090] 本文描述的其他实施方案包括治疗肌萎缩或强直性肌营养不良的方法,其包括向受试者施用本文所述的多核酸分子或多核酸分子缀合物。

[0091] Atrogene

[0092] Atrogene,或萎缩相关基因,是在萎缩的肌肉中上调或下调的基因。在一些情况下,上调的atrogene包括编码泛素连接酶、叉头框转录因子、生长因子、去泛素化酶或参与糖皮质激素诱导的萎缩的蛋白质的基因。

[0093] 泛素连接酶

[0094] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码E3泛素连接酶。示例性的E3泛素连接酶包括但不限于Atrogin-1/MAFbx、肌肉环指1(MuRF1)、TNF受体衔接蛋白6(TRAF6)、F-Box蛋白30(Fbxo30)、F-Box蛋白40(Fbxo40)、神经前体细胞表达发育下调蛋白4(Nedd4-1)和含三部分基序的蛋白32(Trim32)。示例性的线粒体泛素连接酶包括但不限于线粒体E3泛素蛋白连接酶1(Mu11)和Hsc70相互作用蛋白的羧基末端(CHIP)。

[0095] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码Atrogin-1,也称为肌萎缩F-box(MAFbx),是F-box蛋白家族的成员。Atrogin-1/MAFbx是泛素连接酶复合物SKP1-cullin-F-box(SCF)的四个亚单位之一,其促进MyoD——一种肌肉转录因子——和真核翻译起始因子3亚单位F(eIF3-f)的降解。Atrogin-1/MAFbx由FBX032编码。

[0096] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码肌肉环指1(MuRF1)。MuRF1是肌肉特异性环指蛋白的成员,并且与家族成员MuRF2和MuRF3一起在肌原纤维的M线和Z线晶格处发现。此外,一些研究表明,MuRF1与肌肉结构蛋白如肌钙蛋白I、肌球蛋白重链、肌动蛋白、肌球蛋白结合蛋白C和肌球蛋白轻链1和2相互作用和/或调节其半衰期。MuRF1由TRIM63编码。

[0097] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码TNF受体衔接蛋白6(TRAF6)(也称为白介素-1信号转导物、环指蛋白85或RNF85)。TRAF6是E3连接酶的成员,该酶介导Lys63连接的聚泛素链与靶蛋白的缀合。Lys63连接的聚泛素链通过支架蛋白p62(SQSTM1)发出自噬依赖性货物识别的信号。TRAF6由TRAF6基因编码。

[0098] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码F-Box蛋白30(Fbxo30)(也称为仅F-Box蛋白、解旋酶18;atrophy-1中的SCF复合物的肌肉泛素连接酶;或MUSA1)。Fbxo30是E3泛素连接酶的SCF复合物家族的成员。在一项研究中,提出Fbxo30被骨形态发生蛋白(BMP)途径抑制,并且在诱导萎缩的条件下被上调,随后经历自泛素化。Fbxo30由FBX030基因编码。

[0099] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码F-Box蛋白40(Fbxo40)(也称为仅F-Box蛋白40或肌肉疾病相关蛋白)。Fbxo40是E3泛素连接酶的SCF复合物家族的第二个成员,

调节合成代谢信号。在一些情况下,Fbxo40将胰岛素受体底物1(胰岛素受体介导的信号传导的下游效应物)泛素化并影响其降解。Fbxo40由FBX040基因编码。

[0100] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码神经前体细胞表达发育下调蛋白4(Nedd4-1),这是一种HECT结构域E3泛素连接酶,其已显示在废用期间在肌肉细胞中被上调。Nedd4-1由NEDD4基因编码。

[0101] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码含三部分基序蛋白32(Trim32)。Trim32是E3泛素连接酶的成员,它参与细丝如肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白、 $\alpha$ -肌动蛋白和结蛋白的降解。Trim32由TRIM32基因编码。

[0102] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码线粒体E3泛素蛋白连接酶1(Mu11)(也称为线粒体锚定蛋白连接酶、环指蛋白218、RNF218、MAPL、MULAN和GIDE)。Mu11参与线粒体网络重塑,并且在分解代谢条件下(例如,去神经支配或禁食)被FoxO转录因子家族上调,随后导致线粒体破碎和通过自噬(线粒体吞噬(mitophagy))被去除。此外,Mu11将线粒体促融合蛋白——线粒体融合蛋白2(一种参与线粒体融合的GTP酶)泛素化,导致线粒体融合蛋白2降解。Mu11由MUL1基因编码。

[0103] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码Hsc70相互作用蛋白的羧基末端(CHIP)(也称为STIP1同源物和含U-Box蛋白1、STUB1、CFF相关抗原KW-8、抗原NY-CO-7、SCAR16、SDCCAG7或UBOX1)。CHIP是一种线粒体泛素连接酶,其调节丝氨酸C(在Z线中发现的一种肌肉蛋白质)的泛素化和依赖溶酶体的降解。Z线或Z盘是相邻肌节之间形成的结构,而肌节是肌肉的基本单位。细丝蛋白结构的改变触发了共伴侣蛋白BAG3的结合,BAG3是一种包含伴侣蛋白Hsc70和HspB8与CHIP的复合物。随后CHIP对BAG3和细丝蛋白的泛素化激活了自噬系统,导致细丝蛋白C的降解。CHIP由STUB1基因编码。

[0104] 叉头框转录因子

[0105] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码叉头框转录因子。示例性的叉头框转录因子包括但不限于同种型叉头框蛋白01(Fox01)和叉头框蛋白03(Fox03)。

[0106] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码叉头框蛋白01(Fox01)(也称为横纹肌肉瘤中的叉头同源物、FKHR或FKH1)。Fox01参与通过胰岛素信号传导对糖异生和糖原分解的调节,以及通过前体脂肪细胞引发脂肪形成。Fox01由FOX01基因编码。

[0107] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码叉头框蛋白03(Fox03)(也称为横纹肌肉瘤中的叉头样1、FKHRL1或FOX03A)。FOX03被AMP激活的蛋白激酶AMPK激活,后者继而诱导atrogen-1和MuRF1的表达。Fox03由FOX03基因编码。

[0108] 生长因子

[0109] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码生长因子。示例性的生长因子包括肌肉生长抑制素。

[0110] 在一些情况下,本文所述的atrogene编码肌肉生长抑制素(Mstn),也称为生长/分化因子8(GDF-8)。肌肉生长抑制素在细胞内转化为激活物,并通过Smad(small mothers against decapentaplegic)的磷酸化/激活抑制Akt来刺激肌肉降解并抑制肌肉合成。在一些情况下,已发现肌肉生长抑制素受Akt-FoxO信号传导途径调节。在另外的情况下,肌肉生长抑制素已显示出抑制卫星细胞的分化,通过抑制Akt途径刺激肌肉降解,并通过mTOR途径抑制肌肉合成。



[0111] 去泛素化酶

[0112] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码去泛素化酶。示例性的去泛素化酶包括但不限于泛素特异性肽酶14 (USP14) 和泛素特异性肽酶19 (USP19)。在一些情况下,本文所述的atrogene编码USP14 (也称为去泛素化酶14或TGT)。在其他情况下,本文所述的atrogene编码USP19 (也称为含锌指MYND结构域蛋白9、去泛素化酶19或ZMYND9)。USP14由USP14基因编码。USP19由USP19基因编码。

[0113] 另外的Atrogene

[0114] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码发育和DNA损伤反应调节1 (Redd1), 也称为DNA损伤诱导型转录物4 (DDIT4) 和HIF-1响应蛋白RTP801。Redd1通过螯合14-3-3抑制mTOR功能并增加TSC1/2活性。此外,Redd1减少了参与肌肉蛋白质合成的4E-BP1和S6K1的磷酸化。Redd1由DDIT4基因编码。

[0115] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码组织蛋白酶L2,也称为组织蛋白酶V。组织蛋白酶L2是溶酶体半胱氨酸蛋白酶。它由CTSL2基因编码。

[0116] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码TG相互作用因子或同源框蛋白TGIF1。TG相互作用因子是一种转录因子,其调节参与胚胎发育的信号传导途径。该蛋白质由TGIF基因编码。

[0117] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码肌细胞生成蛋白,也称为生肌因子4。肌细胞生成蛋白是肌肉特异性碱性-螺旋-环-螺旋 (bHLH) 转录因子MyoD家族的成员,其参与骨骼肌发育和修复的协调。肌细胞生成蛋白由MYOG基因编码。

[0118] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码肌强直蛋白-蛋白激酶 (MT-PK), 也称为强直性肌营养不良蛋白激酶 (MDPK) 或营养不良性肌强直蛋白激酶 (DMK)。MT-PK是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,进一步与GTP酶Rho家族成员相互作用。在人类中,MT-PK由DMPK基因编码。

[0119] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码组蛋白脱乙酰酶2——组蛋白脱乙酰酶家族的成员。组蛋白脱乙酰酶2由HDAC2基因编码。

[0120] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码组蛋白脱乙酰酶3——组蛋白脱乙酰酶家族的另一成员。组蛋白脱乙酰酶3由HDAC3基因编码。

[0121] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码金属硫蛋白1L——金属硫蛋白家族的成员。金属硫蛋白 (MT) 是富含半胱氨酸的低分子量蛋白质,其能够结合重金属,从而提供针对金属毒性和/或氧化应激的保护作用。金属硫蛋白1L由MT1L基因编码。

[0122] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene编码金属硫蛋白1B——金属硫蛋白家族的第二个成员。金属硫蛋白1B由MT1B基因编码。

[0123] 在一些实施方案中,本文所述的atrogene是表14中列出的atrogene。

[0124] 多核酸分子

[0125] 在某些实施方案中,多核酸分子与萎缩相关基因 (也称为atrogene) 的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与泛素连接酶 (例如, E3泛素连接酶或线粒体泛素连接酶) 的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与叉头框转录因子的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与生长因子的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与去泛素化酶的靶序列杂交。

[0126] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子与FBX032、TRIM63、TRAF6、FBX030、FBX040、NEDD4、TRIM32、MUL1、STUB1、FOXO1、FOXO3、MSTN、USP14、USP19、DDIT4、CTSL2、TGIF、MYOG、HDAC2、HDAC3、MT1L、MT1B或DMPK的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与FBX032、TRIM63、FOXO1、FOXO3或MSTN的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与FBX032的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与TRIM63的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与TRAF6的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与FBX030的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与FBX040的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与NEDD4的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与TRIM32的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与MUL1的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与STUB1的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与FOXO1的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与FOXO3的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与MSTN的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与USP14的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与USP19的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与DDIT4的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与CTSL2的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与TGIF的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与MYOG的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与HDAC2的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与HDAC3的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与MT1L的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与MT1B的靶序列杂交。在一些情况下,本文所述的多核酸分子与DMPK的靶序列杂交。

[0127] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:28-141和370-480所示的靶序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少50%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少60%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少75%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多

核酸分子由SEQ ID NO:190-303和532-642所示的靶序列组成。

[0128] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:304-417、418-531、643-753、754-864和28-189所示的靶序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:304-417、418-531、643-753、754-864和28-189所示的靶序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含与SEQ ID NO:304-417、643-753和28-108所示的靶序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第一多核苷酸,和与SEQ ID NO:418-531、754-864和109-189所示的靶序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第二多核苷酸。

[0129] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含有义链(例如,过客链)和反义链(例如,指导链)。在一些情况下,有义链(例如,过客链)包含与SEQ ID NO:304-417、643-753和28-108所示的靶序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,反义链(例如,指导链)包含与SEQ ID NO:418-531、754-864和109-189所示的靶序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0130] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子包含RNA或DNA。在一些情况下,该多核酸分子包含RNA。在一些情况下,RNA包含短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、双链RNA(dsRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)或核内不均一RNA(hnRNA)。在一些情况下,RNA包含shRNA。在一些情况下,RNA包含miRNA。在一些情况下,RNA包含dsRNA。在一些情况下,RNA包含tRNA。在一些情况下,RNA包含rRNA。在一些情况下,RNA包含hnRNA。在一些情况下,RNA包含siRNA。在一些情况下,该多核酸分子包含siRNA。

[0131] 在一些实施方案中,所述多核酸分子的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10至约30、约15至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0132] 在一些实施方案中,所述多核酸分子的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约30个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约14个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约50个

核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约45个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约40个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约35个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约30个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约25个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约10个至约20个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约15个至约25个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约15个至约30个核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子的长度为约12个至约30个核苷酸。

[0133] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含第一多核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含第二多核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸为有义链或过客链。在一些情况下,第二多核苷酸为反义链或指导链。

[0134] 在一些实施方案中,所述多核酸分子为第一多核苷酸。在一些实施方案中,第一多核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约30、约15至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23、约19至约30、约19至约25、约19至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0135] 在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约14个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约45个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约40个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约35个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个至约20个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15个至约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15个至约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约12个至约30个核苷酸。

[0136] 在一些实施方案中,所述多核酸分子为第二多核苷酸。在一些实施方案中,第二多核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约30、约15至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0137] 在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约30个

核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约14个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约45个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约40个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约35个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约30个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个至约20个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15个至约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15个至约30个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约12个至约30个核苷酸。

[0138] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子进一步包含平端、突出端或其组合。在一些情况下,该平端为5'平端、3'平端或两者。在一些情况下,该突出端为5'突出端、3'突出端或两者。在一些情况下,该突出端包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含1、2、3、4、5或6个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含1、2、3或4个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含1个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含2个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含3个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,该突出端包含4个非碱基配对核苷酸。

[0139] 在一些实施方案中,所述多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少50%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少60%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少70%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少80%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少90%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少95%互补。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少99%互补。在一些情况下,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列100%互补。

[0140] 在一些实施方案中,所述多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有5个或更少的错配。在一些实施方案中,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有4个或更少的错配。在一些情况下,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有3个或更少的错配。在一些情况下,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有2个或更少的错配。在一些情况下,该多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有1个或更少的错配。

[0141] 在一些实施方案中,与本文所述的靶序列杂交的多核酸分子的特异性是该多核酸分子与靶序列的95%、98%、99%、99.5%或100%序列互补性。在一些情况下,该杂交是高

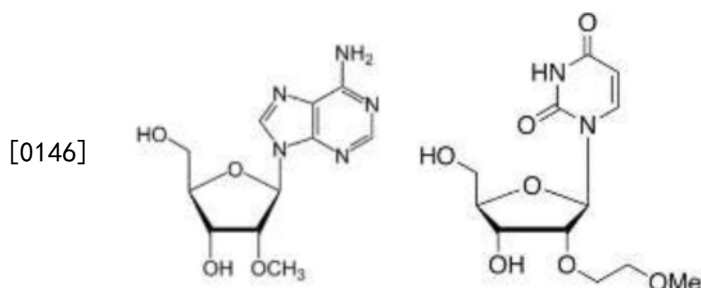
度严格的杂交条件。

[0142] 在一些实施方案中,所述多核酸分子具有降低的脱靶效应。在一些情况下,“脱靶”或“脱靶效应”是指其中针对给定靶标的多核酸聚合物通过直接或间接地与另一mRNA序列、DNA序列或者细胞蛋白质或其他部分相互作用而引起非预期效应的任何情况。在一些情况下,当由于其他转录物与多核酸分子的有义链和/或反义链之间的部分同源性或互补性而导致其他转录物同时降解时,发生“脱靶效应”。

[0143] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含天然或合成或人工核苷酸类似物或碱基。在一些情况下,该多核酸分子包含DNA、RNA和/或核苷酸类似物的组合。在一些情况下,该合成或人工核苷酸类似物或碱基在核糖部分、磷酸部分、核苷部分或其组合中的一种或多种处包含修饰。

[0144] 在一些实施方案中,核苷酸类似物或人工核苷酸碱基包含在核糖部分的2' 羟基处具有修饰的核酸。在一些情况下,该修饰包括H、OR、R、卤素、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>或CN,其中R为烷基部分。示例性的烷基部分包括但不限于卤素、硫、硫醇、硫醚、硫酯、胺(伯、仲或叔胺)、酰胺、醚、酯、醇和氧。在一些情况下,该烷基部分进一步包含修饰。在一些情况下,该修饰包括偶氮基团、酮基团、醛基团、羧基、硝基、亚硝基、腈基团、杂环(例如,咪唑、胍基或羟基氨基)基团、异氰酸酯或氰酸酯基团,或者含硫基团(例如,亚砷、砷、硫化物和二硫化物)。在一些情况下,该烷基部分进一步包含杂取代。在一些情况下,杂环基团的碳被氮、氧或硫替代。在一些情况下,杂环取代包括但不限于吗啉代、咪唑和吡咯烷子基(pyrrolidino)。

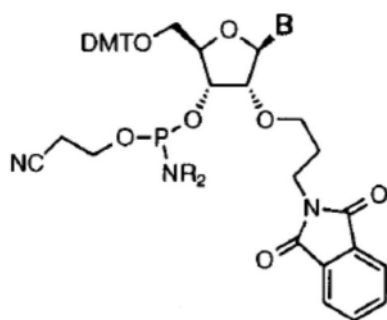
[0145] 在一些情况下,2' 羟基处的修饰是2' -O-甲基修饰或2' -O-甲氧基乙基(2' -O-MOE)修饰。在一些情况下,2' -O-甲基修饰向核糖部分的2' 羟基添加甲基,而2' -O-甲氧基乙基修饰向核糖部分的2' 羟基添加甲氧基乙基。腺苷分子的2' -O-甲基修饰和尿苷的2' -O-甲氧基乙基修饰的示例性化学结构如下所示。



[0147] 2' -O-甲基-腺苷 2' -O-甲氧基乙基尿苷

[0148] 在一些情况下,2' 羟基处的修饰是2' -O-氨基丙基修饰,其中包含丙基连接体的延伸胺基团将胺基团与2' 氧结合。在一些情况下,该修饰通过每个糖从胺基团引入一个正电荷来中和寡核苷酸分子的磷酸酯衍生的总负电荷,并且由于其两性离子性质而改善了细胞摄取性质。2' -O-氨基丙基核苷亚磷酰胺的示例性化学结构如下所示。

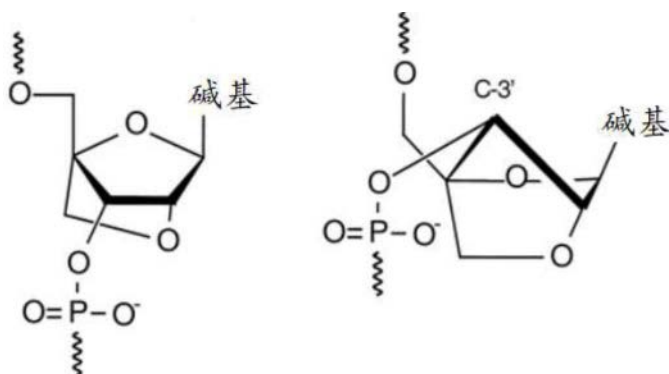
[0149]



### 2'-O-氨基丙基核苷亚磷酰胺

[0150] 在一些情况下,在2' 羟基处的修饰是锁定或桥接的核糖修饰(例如,锁定核酸或LNA),其中结合在2' 碳上的氧分子通过亚甲基连接至4' 碳,从而形成2' -C、4' -C-氧基-亚甲基连接的双环核糖核苷酸单体。LNA的化学结构的示例性表示如下所示。左侧所示的表示突出了LNA单体的化学连接性。右侧所示的表示突出了LNA单体的呋喃糖环的锁定的3'-内(<sup>3</sup>E)构象。

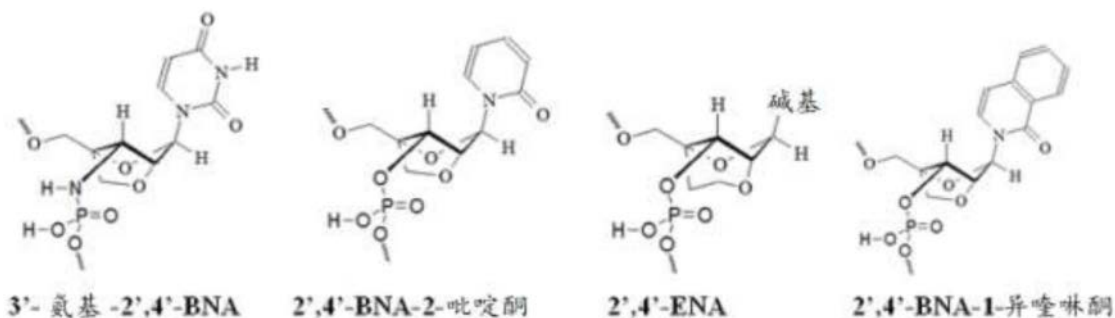
[0151]



### LNA (锁定核酸)

[0152] 在一些情况下,2' 羟基处的修饰包括乙烯核酸(ENA),例如2' -4' -亚乙基桥连的核酸,其将糖构象锁定为C<sub>3'</sub>-内糖折叠(puckering)构象。ENA是桥连核酸类别的修饰核酸的一部分,该修饰核酸也包含LNA。ENA和桥连核酸的示例性化学结构如下所示。

[0153]



3'-氨基-2',4'-BNA

2',4'-BNA-2-吡啶酮

2',4'-ENA

2',4'-BNA-1-异噻唑酮

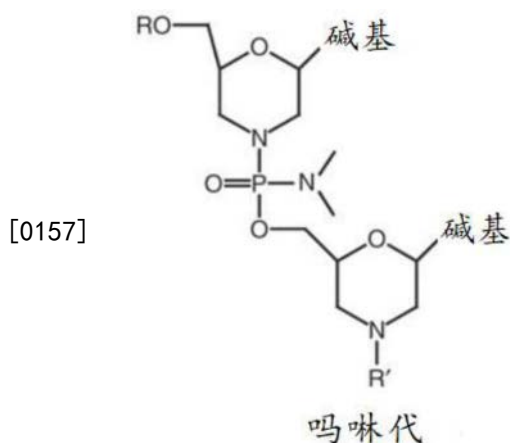
[0154] 在一些实施方案中,2' 羟基处的另外的修饰包括2' -脱氧、2' -脱氧-2' -氟代、2' -O-氨基丙基(2' -O-AP)、2' -O-二甲基氨基乙基(2' -O-DMAOE)、2' -O-二甲基氨基丙基(2' -O-DMAP)、2' -O-二甲基氨基乙氧基乙基(2' -O-DMAEOE)或2' -O-N-甲基乙酰胺基(2' -O-NMA)。

[0155] 在一些实施方案中,核苷酸类似物包含修饰的碱基,诸如但不限于5-丙炔基尿苷、5-丙炔基胞苷、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、N,N,-二甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-氨基腺嘌呤、1-甲基肌苷、3-甲基尿苷、5-甲基胞苷、5-甲基尿苷和其他在5位置



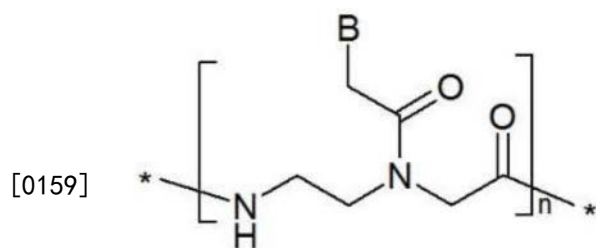
处具有修饰的核苷酸、5-(2-氨基)丙基尿苷、5-卤代胞苷、5-卤代尿苷、4-乙酰基胞苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、3-甲基胞苷、6-甲基尿苷、2-甲基尿苷、7-甲基尿苷、2,2-二甲基尿苷、5-甲基氨基乙基尿苷、5-甲基氧基尿苷、脱氮核苷酸如7-脱氮-腺苷、6-偶氮尿苷、6-偶氮胞苷、6-偶氮胸苷、5-甲基-2-硫尿苷、其他硫代碱基如2-硫代尿苷和4-硫代尿苷和2-硫代胞苷、二氢尿苷、假尿苷、癸苷、古嘌呤、萘基和取代的萘基、任何O-烷基化和N-烷基化嘌呤和嘧啶如N6-甲基腺苷、5-甲基羰基甲基尿苷、尿苷5-羧乙酸、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基和修饰的苯基如氨基酚或2,4,6-三甲氧基苯、充当G夹(clamp)核苷酸的修饰的胞嘧啶、8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-取代的尿嘧啶和胸腺嘧啶、氮杂嘧啶、羧基烷基核苷酸、羧基烷基氨基烷基核苷酸以及烷基羰基烷基化核苷酸。修饰的核苷酸还包括在糖部分被修饰的核苷酸,以及具有非核糖基的糖或其类似物的核苷酸。例如,在一些情况下,糖部分是或基于甘露糖、阿拉伯糖、吡喃葡萄糖、吡喃半乳糖、4'-硫代核糖和其他糖、杂环或碳环。术语核苷酸还包含本领域已知的通用碱基。例如,通用碱基包括但不限于3-硝基吡咯、5-硝基吡咯或水粉草素。

[0156] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸类似物进一步包含吗啉代、肽核酸(PNA)、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酸酰胺、1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)或其组合。吗啉代或二氨基磷酸酯吗啉代寡核苷酸(PMO)包括其结构模拟天然核酸结构但偏离正常的糖和磷酸酯结构的合成分子。在一些情况下,五元核糖环被含有四个碳、一个氮和一个氧的六元吗啉代环取代。在一些情况下,核糖单体通过二氨基磷酸酯基团而不是磷酸酯基团连接。在这样的情况下,骨架改变去除所有正电荷和负电荷,使得吗啉代中性分子能够穿过细胞膜而无需借助细胞递送剂,诸如带电荷的寡核苷酸所使用的细胞递送剂。



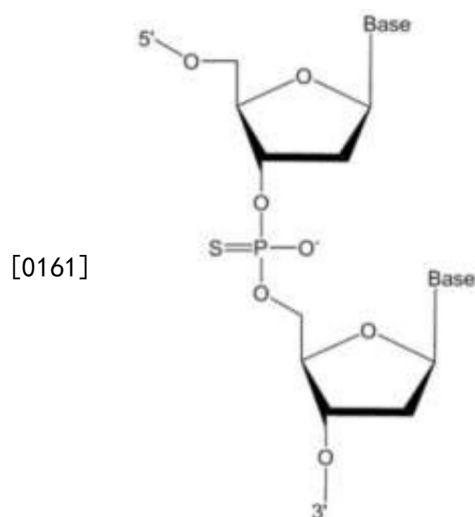
[0158] 在一些实施方案中,肽核酸(PNA)不含糖环或磷酸酯连接,并且碱基通过寡聚甘氨酸样分子连接并适当间隔,因此消除了骨架电荷。



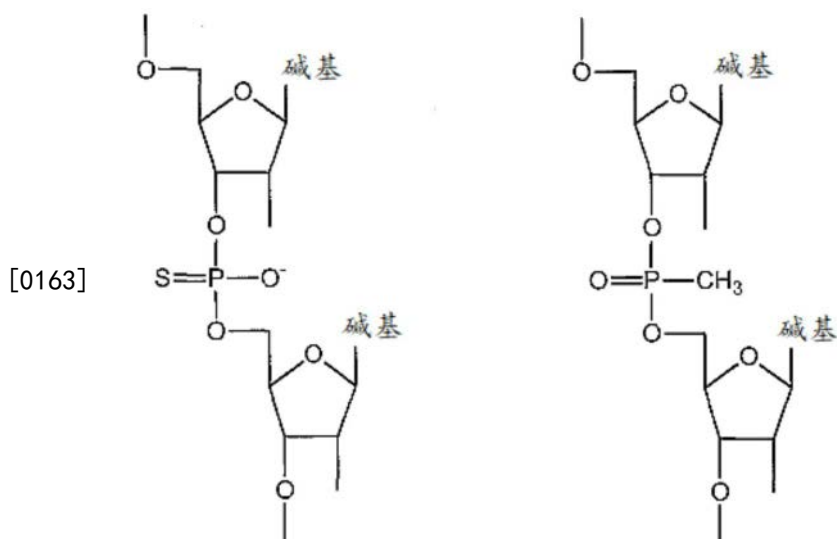


### PNA

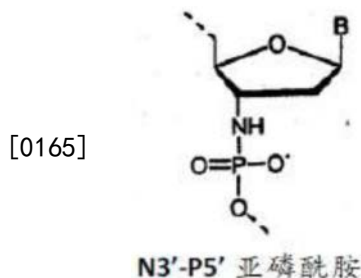
[0160] 在一些实施方案中,一个或多个修饰任选地在核苷酸间连接处发生。在一些情况下,修饰的核苷酸间连接包括但不限于硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、5'-亚烷基膦酸酯、5'-甲基膦酸酯、3'-亚烷基膦酸酯、三氟化硼、3'-5' 连接或2'-5' 连接的硼烷磷酸酯和硒基磷酸酯、磷酸三酯、硫羰基烷基磷酸三酯、氢膦酸酯键、烷基膦酸酯、烷基硫代磷酸酯、芳基硫代磷酸酯、硒化磷酸酯 (phosphoroselenoate)、二硒化磷酸酯、次膦酸酯、氨基磷酸酯、3'-烷基氨基磷酸酯、氨基烷基氨基磷酸酯、硫羰基氨基磷酸酯、哌嗪磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯 (phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯 (phosphoranilidate)、酮、砒、磺胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、亚甲基肼 (methylenehydrazo)、亚甲基二甲基亚肼 (methylenedimethylhydrazo)、formacetal、硫代甲缩醛、肟、亚甲基亚胺、亚甲基甲基亚胺、硫代酰胺、具有核糖乙酰基的连接、氨乙基甘氨酸、甲硅烷基或硅氧烷连接、具有或不具有杂原子的烷基或环烷基连接,例如,1至10个饱和或不饱和的和/或取代的和/或含有杂原子的碳、具有吗啉代结构、酰胺、聚酰胺的连接,其中碱基直接或间接地连接到骨架的氮杂氮,及其组合。硫代磷酸酯反义寡核苷酸 (PS ASO) 是包含硫代磷酸酯连接的反义寡核苷酸。示例性的PS ASO如下所示。



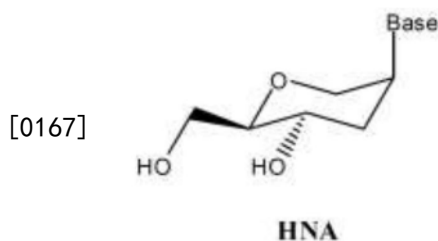
[0162] 在一些情况下,所述修饰是甲基或硫醇修饰,如甲基膦酸酯或硫醇膦酸酯修饰。示例性的硫醇膦酸酯核苷酸(左)和甲基膦酸酯核苷酸(右)如下所示。



[0164] 在一些情况下,修饰的核苷酸包括但不限于如下所示的2'-氟N3-P5'-亚磷酸胺:



[0166] 在一些情况下,修饰的核苷酸包括但不限于己糖醇核酸(或1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)),如下所示:



[0168] 在一些实施方案中,一个或多个修饰进一步任选地包括核糖部分、磷酸骨架和核苷的修饰,或者3'或5'末端处的核苷酸类似物的修饰。例如,3'末端任选地包含3'阳离子基团,或用3'-3'连接在3'末端处反转核苷。在另一替代方案中,3'末端任选地与氨基烷基缀合,例如3'-C5-氨基烷基dT。在另一替代方案中,3'末端任选地与脱碱基位点缀合,例如与脱嘌呤或脱嘧啶位点缀合。在一些情况下,5'末端与氨基烷基缀合,例如与5'-O-烷基氨基取代基缀合。在一些情况下,5'末端与脱碱基位点缀合,例如与脱嘌呤或脱嘧啶位点缀合。

[0169] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含一个或多个本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该人工核苷酸类似物包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、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、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2'-氟代N3-

P5'-亚磷酰胺或其组合。在一些情况下,该多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个人工核苷酸类似物,该人工核苷酸类似物选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、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、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合。在一些情况下,该多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个2'-O-甲基修饰的核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)修饰的核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个硫醇膦酸酯核苷酸。

[0170] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约5%至约100%的修饰、约10%至约100%的修饰、约20%至约100%的修饰、约30%至约100%的修饰、约40%至约100%的修饰、约50%至约100%的修饰、约60%至约100%的修饰、约70%至约100%的修饰、约80%至约100%的修饰和约90%至约100%的修饰。

[0171] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约90%的修饰、约20%至约90%的修饰、约30%至约90%的修饰、约40%至约90%的修饰、约50%至约90%的修饰、约60%至约90%的修饰、约70%至约90%的修饰和约80%至约100%的修饰。

[0172] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约80%的修饰、约20%至约80%的修饰、约30%至约80%的修饰、约40%至约80%的修饰、约50%至约80%的修饰、约60%至约80%的修饰和约70%至约80%的修饰。

[0173] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约70%的修饰、约20%至约70%的修饰、约30%至约70%的修饰、约40%至约70%的修饰、约50%至约70%的修饰和约60%至约70%的修饰。

[0174] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约60%的修饰、约20%至约60%的修饰、约30%至约60%的修饰、约40%至约60%的修饰和约50%至约60%的修饰。

[0175] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约50%的修饰、约20%至约50%的修饰、约30%至约50%的修饰和约40%至约50%的修饰。

[0176] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约40%的修饰、约20%至约40%的修饰和约30%至约40%的修饰。

[0177] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约30%的修饰和约20%至约30%的修饰。

[0178] 在一些情况下,所述多核酸分子包含约10%至约20%的修饰。

[0179] 在一些情况下,所述多核酸分子包含约15%至约90%、约20%至约80%、约30%至约70%或约40%至约60%的修饰。

[0180] 在另外的情况下,所述多核酸分子包含至少约15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的修饰。

[0181] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含至少约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约

8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22个或更多个修饰。

[0182] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22个或更多个修饰的核苷酸。

[0183] 在一些情况下,约5%至约100%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约10%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约15%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约20%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约25%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约30%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约35%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约40%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约45%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约50%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约55%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约60%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约65%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约70%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约75%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约80%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约85%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约90%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约95%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约96%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约97%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约98%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约99%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约100%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该人工核苷酸类似物包括2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、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、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合。

[0184] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含约1至约25个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约1个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约2个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约3个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包

含约4个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约5个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约6个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约7个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约8个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约9个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约10个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约11个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约12个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约13个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约14个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约15个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约16个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约17个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约18个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约19个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约20个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约21个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约22个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约23个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约24个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该多核酸分子包含约25个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。

[0185] 在一些实施方案中,多核酸分子由两个单独的多核苷酸装配而成,其中一个多核苷酸包含有义链,而第二个多核苷酸包含该多核酸分子的反义链。在其他实施方案中,有义链经由连接体分子与反义链连接,在一些情况下,该连接体分子是多核苷酸连接体或非核苷酸连接体。

[0186] 一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链中的嘧啶核苷酸包含2'-O-甲基嘧啶核苷酸,有义链中的嘌呤核苷酸包含2'-脱氧嘌呤核苷酸。在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链中存在的嘧啶核苷酸包含2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸,并且其中有义链中存在的嘌呤核苷酸包含2'-脱氧嘌呤核苷酸。

[0187] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中嘧啶核苷酸当存在于所述反义链中时是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸,并且嘌呤核苷酸当存在于所述反义链中时是2'-O-甲基嘌呤核苷酸。

[0188] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中嘧啶核苷酸当存在于所述反义链中时是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸,并且其中嘌呤核苷酸当存在于所述反义链中时包含2'-脱氧-嘌呤核苷酸。

[0189] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链在有义链的5'

端、3' 端或者5' 和3' 两端包括末端帽部分。在其他实施方案中,该末端帽部分是反向脱氧脱碱基部分。

[0190] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中反义链在反义链的3' 端包含磷酸骨架修饰。在一些情况下,该磷酸骨架修饰是硫代磷酸酯。

[0191] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中反义链在反义链的3' 端包含甘油基修饰。

[0192] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链包含一个或多个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-0-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或约一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,和可选的在有义链的3' 端、5' 端或者3' 和5' 两端的末端帽分子;并且其中反义链包含约1个至约10个或更多个,特别是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-0-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,和可选的在反义链的3' 端、5' 端或者3' 和5' 两端的末端帽分子。在其他实施方案中,有义链和/或反义链的一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个嘧啶核苷酸用2'-脱氧、2'-0-甲基和/或2'-脱氧-2'-氟代核苷酸进行化学修饰,具有或不具有一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接和/或存在于相同或不同链中的、在3' 端、5' 端或者3' 和5' 两端的末端帽分子。

[0193] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链包含约1个至约25个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-0-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在有义链的3' 端、5' 端或者3' 和5' 两端的末端帽分子;并且其中反义链包含约1个至约25个或更多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-0-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在反义链的3' 端、5' 端或者3' 和5' 两端的末端帽分子。在其他实施方案中,有义链和/或反义链的一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个嘧啶核苷酸用2'-脱氧、2'-0-甲基和/或2'-脱氧-2'-氟代核苷酸进行化学修饰,具有或不具有约1个至约25个或更多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接和/或存在于相同或不同链中的、在3' 端、5' 端或者3' 和5' 两端的末端帽分子。

[0194] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中反义链包含一个或多个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或约一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-0-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个

或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在有义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子;并且其中反义链包含约1个至约10个或更多个,特别是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在反义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。在其他实施方案中,有义链和/或反义链的一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个嘧啶核苷酸用2'-脱氧、2'-O-甲基和/或2'-脱氧-2'-氟核苷酸进行化学修饰,具有或不具有一个或多个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接和/或存在于相同或不同链中的、在3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。

[0195] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中反义链包含约1个至约25个或更多个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在有义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子;并且其中反义链包含约1个至约25个或更多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在反义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。在其他实施方案中,有义链和/或反义链的一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个嘧啶核苷酸用2'-脱氧、2'-O-甲基和/或2'-脱氧-2'-氟核苷酸进行化学修饰,具有或不具有约1个至约5个,例如约1、2、3、4、5个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接和/或存在于相同或不同链中的、在3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。

[0196] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子是化学修饰的短干扰核酸分子,其在该多核酸分子的每条链中具有约1个至约25个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0197] 在另一个实施方案中,本文所述的多核酸分子包含2'-5'核苷酸间连接。在一些情况下,该2'-5'核苷酸间连接位于一条或两条序列链的3'端、5'端或者3'和5'两端。在其他实例中,该2'-5'核苷酸间连接存在于一条或两条序列链内的各个其他位置,例如,多核酸分子的一条或两条链中的嘧啶核苷酸的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个,包括每个核苷酸间连接,包含2'-5'核苷酸间连接,或者多核酸分子的一条或两条链中的嘌呤核苷酸的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个,包括每个核苷酸间连接,包含2'-5'核苷酸间连接。

[0198] 在一些实施方案中,多核酸分子是单链多核酸分子,其在细胞或重建的体外系统中介导RNAi活性,其中该多核酸分子包含与靶核酸序列具有互补性的单链多核苷酸,并且其中一个或多个存在于该多核酸中的嘧啶核苷酸是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸(例如,其中所有嘧啶核苷酸是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸,或者多个嘧啶核苷酸是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸),并且其中该多核酸中存在的任何嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸(例如,其中所有嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸,或者多个嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸),



以及任选地存在于反义序列的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽修饰,该多核酸分子任选地也在多核酸分子的3'端还包含约1个至约4个(例如,约1、2、3或4个)末端2'-脱氧核苷酸,其中该末端核苷酸进一步包含一个或多个(例如,1、2、3或4个)硫代磷酸酯核苷酸间连接,并且其中该多核酸分子任选地还包含末端磷酸基团,例如5'末端磷酸基团。

[0199] 在一些情况下,与天然多核酸分子相比,本文所述的一种或多种人工核苷酸类似物对核酸酶具有抗性,该核酸酶例如是核糖核酸酶如RNA酶H、脱氧核糖核酸酶如DNA酶或者外切核酸酶如5'-3'外切核酸酶和3'-5'外切核酸酶。在一些情况下,包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、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、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合的人工核苷酸类似物对核酸酶具有抗性,该核酸酶例如是核糖核酸酶如RNA酶H、脱氧核糖核酸酶如DNA酶或者外切核酸酶如5'-3'外切核酸酶和3'-5'外切核酸酶。在一些情况下,2'-O-甲基修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-氨基丙基修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-脱氧修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-脱氧-2'-氟代修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,LNA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,ENA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,HNA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,吗啉代是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,PNA修饰的多核酸分子对核酸酶具有抗性(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,甲基膦酸酯核苷酸修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,硫醇膦酸酯核苷酸修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,包含2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺的多核酸



分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3' 外切核酸酶或3'-5' 外切核酸酶抗性)。在一些情况下,本文所述的5' 缀合物抑制5'-3' 核酸外切切割。在一些情况下,本文所述的3' 缀合物抑制3'-5' 核酸外切切割。

[0200] 在一些实施方案中,相对于等同的天然多核酸分子,本文所述的一种或多种人工核苷酸类似物对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。相对于等同的天然多核酸分子,包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、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、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸或2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺的一种或多种人工核苷酸类似物对其mRNA靶标可具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-甲基修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-氨基丙基修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-脱氧修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-脱氧-2'-氟代修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,LNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,ENA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,PNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,HNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,吗啉代修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,甲基磷酸酯核苷酸修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,硫醇磷酸酯核苷酸修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,包含2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,增加的亲和力用较低的Kd、较高的解链温度(Tm)或其组合说明。

[0201] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子是手性纯的(或立体纯的)多核酸分子,或是包含单一对映体的多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子包含L-核苷酸。在一些情况下,多核酸分子包含D-核苷酸。在一些情况下,多核酸分子组合物包含少于30%、25%、

20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的其镜像对映体。在一些情况下,多核酸分子组合物包含少于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的外消旋混合物。在一些情况下,多核酸分子是在美国专利公开2014/194610和2015/211006以及PCT公开W02015107425中描述的多核酸分子。

[0202] 在一些实施方案中,进一步修饰本文所述的多核酸分子以包含适体缀合部分。在一些情况下,该适体缀合部分是DNA适体缀合部分。在一些情况下,该适体缀合部分是Alphamer (Centauri Therapeutics),其包含识别特定细胞表面靶标的适体部分和呈现特定表位以供连接至循环抗体的部分。在一些情况下,进一步修饰本文所述的多核酸分子以包含如美国专利8,604,184、8,591,910和7,850,975中所述的适体缀合部分。

[0203] 在另外的实施方案中,修饰本文所述的多核酸分子以增加其稳定性。在一些实施方案中,该多核酸分子为RNA(例如,siRNA)。在一些情况下,通过一个或多个上述修饰来修饰多核酸分子以增加其稳定性。在一些情况下,在2' 羟基位置处修饰多核酸分子,诸如通过2' -O-甲基、2' -O-甲氧基乙基(2' -O-MOE)、2' -O-氨基丙基、2' -脱氧、2' -脱氧-2' -氟代、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,或者通过锁定或桥连核糖构象(例如,LNA或ENA)修饰多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子被2' -O-甲基和/或2' -O-甲氧基乙基核糖修饰。在一些情况下,多核酸分子还包含吗啉代、PNA、HNA、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸和/或2' -氟代N3-P5' -亚磷酰胺以增加其稳定性。在一些情况下,多核酸分子是手性纯的(或立体纯的)多核酸分子。在一些情况下,修饰手性纯的(或立体纯的)多核酸分子以增加其稳定性。为了增加递送稳定性而对RNA的合适的修饰对于技术人员将会是显而易见的。

[0204] 在一些情况下,所述多核酸分子是包含自身互补的有义和反义区的双链多核苷酸分子,其中反义区包含与靶核酸分子中的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列,并且有义区具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列。在一些情况下,所述多核酸分子由两个单独的多核苷酸装配而成,其中一条链是有义链,而另一条链是反义链,其中反义链和有义链是自身互补的(例如,每条链包含与另一条链中的核苷酸序列互补的核苷酸序列;例如其中反义链和有义链形成双链体或双链结构,例如其中双链区域为约19、20、21、22、23个或更多个碱基对);反义链包含与靶核酸分子中的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列,并且有义链包含对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列。或者,所述多核酸分子由单个寡核苷酸装配而成,其中该多核酸分子的自身互补的有义和反义区通过基于核酸或非基于核酸的连接体连接。

[0205] 在一些情况下,所述多核酸分子是具有双链体、不对称双链体、发夹或不对称发夹二级结构的多核苷酸,具有自身互补的有义和反义区,其中反义区包含与单独的靶核酸分子中的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列,并且有义区具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列。在其他情况下,所述多核酸分子是环状单链多核苷酸,其具有两个或更多个环结构和包含自身互补的有义和反义区的茎,其中反义区包含与靶核酸中的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列,并且有义区具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列,并且其中该环状多核苷酸在体内或体外加工,以生成能够介导RNAi的活性多核酸分子。在另外的情况下,所述多核酸分子还包含单链多核苷酸,其具有与靶核酸分子中的核苷酸序

列或其部分互补的核苷酸序列(例如,在这样的多核酸分子不需要在多核酸分子内存在对应于靶核酸序列的核苷酸序列或其部分时),其中该单链多核苷酸进一步包含末端磷酸基团,如5'-磷酸(参见例如Martinez等人,2002,Cell.,110,563-574和Schwarz等人,2002,Molecular Cell,10,537-568)或5',3'-二磷酸。

[0206] 在一些情况下,不对称发夹是线性多核酸分子,其包含反义区、包含核苷酸或非核苷酸的环部分以及包含比反义区更少的核苷酸的有义区,使得有义区具有足够的互补核苷酸,以与反义区发生碱基配对并与环形成双链体。例如,不对称发夹多核酸分子包含长度足以在细胞或体外系统中介导RNAi的反义区(例如约19个至约22个核苷酸)和包含约4个至约8个核苷酸的环区域,以及具有约3个至约18个与反义区互补的核苷酸的有义区。在一些情况下,不对称发夹多核酸分子还包含化学修饰的5'末端磷酸基团。在另外的情况下,不对称发夹多核酸分子的环部分包含核苷酸、非核苷酸、连接体分子或缀合物分子。

[0207] 在一些实施方案中,不对称双链体是具有包含有义区和反义区的两条单独的链的多核酸分子,其中有义区包含比反义区更少的核苷酸,使得有义区具有足够的互补核苷酸,以与反义区发生碱基配对并形成双链体。例如,不对称双链多核酸分子包含长度足以在细胞或体外系统中介导RNAi的反义区(例如约19个至约22个核苷酸)和具有约3个至约18个与反义区互补的核苷酸的有义区。

[0208] 在一些情况下,通用碱基是指几乎没有区别地与每个天然DNA/RNA碱基形成碱基对的核苷酸碱基类似物。通用碱基的非限制性实例包括C-苯基、C-萘基和其他芳族衍生物、肌苷、唑类羧酰胺和硝基唑衍生物,如3-硝基吡咯、4-硝基吡咯、5-硝基吡咯和6-硝基吡咯,如本领域已知的(参见例如Loakes,2001,Nucleic Acids Research,29,2437-2447)。

[0209] 多核酸分子合成

[0210] 在一些实施方案中,使用本领域已知的程序,使用化学合成和/或酶促连接反应构建本文所述的多核酸分子。例如,使用天然存在的核苷酸或各种修饰的核苷酸以化学方式合成多核酸分子,该修饰的核苷酸被设计用于增加分子的生物稳定性或者增加多核酸分子与靶核酸之间形成的双链体的物理稳定性。示例性方法包括在美国专利5,142,047、5,185,444、5,889,136、6,008,400和6,111,086、PCT公开W02009099942或欧洲公开1579015中描述的那些方法。另外的示例性方法包括在以下文献中描述的那些方法:Griffey等人,"2'-O-aminopropyl ribonucleotides:a zwitterionic modification that enhances the exonuclease resistance and biological activity of antisense oligonucleotides,"J.Med.Chem.39(26):5100-5109(1997);Obika等人"Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and-cytidine.Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3,-endo sugar puckering".Tetrahedron Letters 38(50):8735(1997);Koizumi,M."ENA oligonucleotides as therapeutics".Current opinion in molecular therapeutics8(2):144-149(2006);和Abramova等人,"Novel oligonucleotide analogues based on morpholino nucleoside subunits-antisense technologies:new chemical possibilities,"Indian Journal of Chemistry 48B:1721-1726(2009)。或者,使用表达载体以生物学方式产生多核酸分子,其中多核酸分子已经以反义方向(即,从插入的多核酸分子转录的RNA将会与感兴趣的靶多核酸分子呈反义方向)亚克隆到该表达载体中。

[0211] 在一些实施方案中,通过串联合成方法合成多核酸分子,其中两条链被合成为由可切割连接体隔开的单个连续寡核苷酸片段或链,随后将其切割以提供单独的片段或链,它们杂交并允许纯化双链体。

[0212] 在一些情况下,多核酸分子还由两个不同的核酸链或片段装配而成,其中一个片段包括有义区,而第二个片段包括该分子的反义区。

[0213] 用于并入例如糖、碱基和磷酸修饰的其他修饰方法包括:Eckstein等人,国际公开PCT No.WO 92/07065;Perrault等人Nature,1990,344,565-568;Pieken等人Science,1991,253,314-317;Usman和Cedergren,Trends in Biochem.Sci.,1992,17,334-339;Usman等人,国际公开PCT No.WO 93/15187;Sproat,美国专利5,334,711和Beigelman等人,1995,J.Biol.Chem.,270,25702;Beigelman等人,国际PCT公开No.WO 97/26270;Beigelman等人,美国专利5,716,824;Usman等人,美国专利5,627,053;Woolf等人,国际PCT公开No.WO 98/13526;Thompson等人,1998年4月20日提交的U.S.Ser.No.60/082,404;Karpeisky等人,1998,Tetrahedron Lett.,39,1131;Earnshaw和Gait,1998,Biopolymers (Nucleic Acid Sciences),48,39-55;Verma和Eckstein,1998,Annu.Rev.Biochem.,67,99-134;和Burlina等人,1997,Bioorg.Med.Chem.,5,1999-2010。这些出版物描述了确定糖、碱基和/或磷酸修饰等掺入核酸分子中的位置而无需调节催化的一般方法和策略。

[0214] 在一些情况下,虽然采用硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和/或5'-甲基磷酸酯连接对多核酸分子核苷酸间连接的化学修饰改善了稳定性,但过度修饰有时会引起毒性或活性降低。因此,当设计核酸分子时,在一些情况下,这些核苷酸间连接的量被最小化。在这样的情况下,这些连接的浓度的降低导致这些分子的毒性降低、功效提高以及更高的特异性。

[0215] 多核酸分子缀合物

[0216] 在一些实施方案中,多核酸分子进一步缀合至多肽A以供递送至目标部位。在一些情况下,多核酸分子缀合至多肽A和可选的聚合部分。

[0217] 在一些情况下,至少一个多肽A缀合到至少一个B。在一些情况下,至少一个多肽A缀合到至少一个B以形成A-B缀合物。在一些实施方案中,至少一个A缀合至B的5'末端、B的3'末端、B上的内部位点或其任意组合。在一些情况下,至少一个多肽A缀合到至少两个B。在一些情况下,至少一个多肽A缀合到至少2、3、4、5、6、7、8个或更多个B。

[0218] 在一些实施方案中,至少一个多肽A在至少一个B的一个末端缀合,而至少一个C在所述至少一个B的相对末端缀合,以形成A-B-C缀合物。在一些情况下,至少一个多肽A在至少一个B的一个末端缀合,而至少一个C在所述至少一个B上的内部位点缀合。在一些情况下,至少一个多肽A直接缀合到至少一个C。在一些情况下,至少一个B通过至少一个C间接缀合到至少一个多肽A,以形成A-C-B缀合物。

[0219] 在一些情况下,至少一个B和/或至少一个C以及可选的至少一个D缀合到至少一个多肽A。在一些情况下,至少一个B在末端(例如,5'末端或3'末端)缀合到至少一个多肽A,或者通过内部位点缀合到至少一个多肽A。在一些情况下,至少一个C直接缀合到至少一个多肽A,或者通过至少一个B间接地缀合到至少一个多肽A。如果通过至少一个B间接缀合,则至少一个C与至少一个多肽A在相同的末端缀合在B上、与至少一个多肽A在相对的末端缀合,或者独立地在内部位点缀合。在一些情况下,至少一个另外的多肽A进一步缀合到至少一个多肽A、B或C。在另外的情况下,至少一个D任选地直接或间接地缀合到至少一个多肽A、至少

一个B或至少一个C。如果直接缀合到至少一个多肽A,则至少一个D也任选地缀合到至少一个B,以形成A-D-B缀合物,或者任选地缀合到至少一个B和至少一个C,以形成A-D-B-C缀合物。在一些情况下,至少一个D直接缀合到至少一个多肽A,并间接缀合到至少一个B和至少一个C,以形成D-A-B-C缀合物。如果间接缀合到至少一个多肽A,则至少一个D还任选地缀合到至少一个B,以形成A-B-D缀合物,或者任选地缀合到至少一个B和至少一个C,以形成A-B-D-C缀合物。在一些情况下,至少一个另外的D进一步缀合到至少一个多肽A、B或C。

[0220] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19A所示的构建体。

[0221] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19B所示的构建体。

[0222] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19C所示的构建体。

[0223] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19D所示的构建体。

[0224] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19E所示的构建体。

[0225] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19F所示的构建体。

[0226] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19G所示的构建体。

[0227] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19H所示的构建体。

[0228] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19I所示的构建体。

[0229] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19J所示的构建体。

[0230] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19K所示的构建体。

[0231] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合物包含如图19L所示的构建体。

[0232] 如图19M所示的抗体卡通仅用于表示目的,并且包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab<sub>2</sub>、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。

[0233] 结合部分

[0234] 在一些实施方案中,结合部分A是多肽。在一些情况下,该多肽是抗体或其片段。在一些情况下,该片段是结合片段。在一些情况下,该抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab<sub>2</sub>、F(ab)'<sub>3</sub>片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、(scFv)<sub>2</sub>、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定的Fv蛋白(dsFv)、单结构域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段,或者它们的化学修饰的衍生物。

[0235] 在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,A为人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab<sub>2</sub>、F(ab)'<sub>3</sub>片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、(scFv)<sub>2</sub>、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定的Fv蛋白("dsFv")、单结构域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段,或者它们的化学修饰的衍生物。在一些情况下,A为人源化抗体或其结合片段。在一些情况下,A为鼠抗体或其结合片段。在一些情况下,A为嵌合抗体或其结合片段。在一些情况下,A为单克隆抗体或其结合片段。在一些情况下,A为单价Fab'。在一些情况下,A为二价Fab<sub>2</sub>。在一些情况下,A为单链可变片段(scFv)。

[0236] 在一些实施方案中,结合部分A是双特异性抗体或其结合片段。在一些情况下,该双特异性抗体是三官能抗体或双特异性微抗体。在一些情况下,该双特异性抗体是三官能抗体。在一些情况下,该三官能抗体是全长单克隆抗体,其包含针对两种不同抗原的结合位

点。

[0237] 在一些情况下,所述双特异性抗体是双特异性微抗体。在一些情况下,该双特异性微抗体包括二价Fab<sub>2</sub>、F(ab)'<sub>3</sub>片段、双scFv、(scFv)<sub>2</sub>、双抗体、微抗体、三抗体、四抗体或双特异性T细胞接合物(BiTE)。在一些实施方案中,该双特异性T细胞接合物是包含两个单链可变片段(scFv)的融合蛋白,其中这两个scFv靶向两种不同抗原的表位。

[0238] 在一些实施方案中,结合部分A是双特异性微抗体。在一些情况下,A为双特异性Fab<sub>2</sub>。在一些情况下,A为双特异性F(ab)'<sub>3</sub>片段。在一些情况下,A为双特异性双scFv。在一些情况下,A为双特异性(scFv)<sub>2</sub>。在一些实施方案中,A为双特异性双抗体。在一些实施方案中,A为双特异性微抗体。在一些实施方案中,A为双特异性三抗体。在其他实施方案中,A为双特异性四抗体。在其他实施方案中,A为双特异性T细胞接合物(BiTE)。

[0239] 在一些实施方案中,结合部分A是三特异性抗体。在一些情况下,该三特异性抗体包括F(ab)'<sub>3</sub>片段或三抗体。在一些情况下,A为三特异性F(ab)'<sub>3</sub>片段。在一些情况下,A为三抗体。在一些实施方案中,A为三特异性抗体,如Dimas等人,“Development of a trispecific antibody designed to simultaneously and efficiently target three different antigens on tumor cells,”Mol.Pharmaceutics,12(9):3490-3501(2015)所述。

[0240] 在一些实施方案中,结合部分A是识别细胞表面蛋白质的抗体或其结合片段。在一些情况下,结合部分A是识别肌细胞上的细胞表面蛋白质的抗体或其结合片段。In some cases,the binding moiety A is an antibody or binding fragment thereof that recognizes a cell surface protein on a skeletal muscle cell.

[0241] 在一些实施方案中,示例性抗体包括但不限于抗肌球蛋白抗体、抗运铁蛋白抗体和识别肌肉特异性激酶(MuSK)的抗体。在一些情况下,该抗体是抗运铁蛋白(抗CD71)抗体。

[0242] 在一些实施方案中,结合部分A非特异性地缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A经由赖氨酸残基或半胱氨酸残基以非位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A经由赖氨酸残基以非位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A经由半胱氨酸残基以非位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。

[0243] 在一些实施方案中,结合部分A以位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过赖氨酸残基、半胱氨酸残基、在5'末端、3'末端、非天然氨基酸或者酶修饰或酶催化的残基经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过赖氨酸残基经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过半胱氨酸残基经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A在5'末端经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A在3'末端经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过非天然氨基酸经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。在一些情况下,结合部分A通过酶修饰或酶催化的残基经由位点特异性方式缀合至多核酸分子(B)。

[0244] 在一些实施方案中,一个或多个多核酸分子(B)缀合至结合部分A。在一些情况下,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个或更多个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约1个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约2个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约3个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一

些情况下,约4个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约5个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约6个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约7个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约8个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约9个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约10个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约11个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约12个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约13个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约14个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约15个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,约16个多核酸分子缀合至一个结合部分A。在一些情况下,所述一个或多个多核酸分子是相同的。在其他情况下,所述一个或多个多核酸分子是不同的。

[0245] 在一些实施方案中,缀合至结合部分A的多核酸分子(B)的数目形成比值。在一些情况下,该比值被称为DAR(药物-抗体)比,其中如本文提及的药物为多核酸分子(B)。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约1或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约2或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约3或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约4或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约5或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约6或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约7或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约8或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约9或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约10或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约11或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约12或更大。

[0246] 在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约1。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约2。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约3。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约4。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约5。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约6。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约7。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约8。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约9。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约10。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约11。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约12。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约13。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约14。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约15。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为约16。

[0247] 在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为1。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为2。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为4。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为6。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为8。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比为

12。

[0248] 在一些情况下,与包含不含结合部分A的多核酸分子(B)的缀合物相比,包含多核酸分子(B)和结合部分A的缀合物具有改善的活性。在一些情况下,改善的活性导致增强的生物学相关功能,例如,改善的稳定性、亲和力、结合、功能活性和在治疗或预防疾病状态中的功效。在一些情况下,该疾病状态是基因的一个或多个突变外显子的结果。在一些情况下,与包含不含结合部分A的多核酸分子(B)的缀合物相比,包含多核酸分子(B)和结合部分A的缀合物导致一个或多个突变外显子的外显子跳读增加。在一些情况下,与包含不含结合部分A的多核酸分子(B)的缀合物相比,在包含多核酸分子(B)和结合部分A的缀合物中,外显子跳读增加至少或大约5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或超过95%。

[0249] 在一些实施方案中,使用本领域已知的常规技术进一步修饰抗体或其结合片段,例如,通过单独或组合地使用氨基酸缺失、插入、置换、添加和/或通过重组和/或本领域已知的其他任何修饰(例如,翻译后和化学修饰,如糖基化和磷酸化)。在一些情况下,该修饰进一步包括用于调节与Fc受体的相互作用的修饰。在一些情况下,所述一个或多个修饰包括例如国际公开W097/34631中描述的那些修饰,该文献公开了参与Fc域与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基。在抗体或其结合片段的氨基酸序列的核酸序列中引入此类修饰的方法是本领域技术人员公知的。

[0250] 在一些情况下,抗体结合片段进一步包括其衍生物,并且包括含有至少一个CDR的多肽序列。

[0251] 在一些情况下,如本文所用的术语“单链”意指双特异性单链构建体的第一和第二结构域共价连接,优选地为单个核酸分子可编码的共线氨基酸序列的形式。

[0252] 在一些情况下,双特异性单链抗体构建体涉及包含两个抗体衍生的结合域的构建体。在这样的实施方案中,双特异性单链抗体构建体是串联双scFv或双抗体。在一些情况下,scFv含有通过连接体肽连接的VH和VL域。在一些情况下,连接体的长度和序列足以确保第一和第二结构域中的每一个可以彼此独立地保留其差异结合特异性。

[0253] 在一些实施方案中,与本文所用的结合或相互作用定义至少两个抗原相互作用位点彼此的结合/相互作用。在一些情况下,抗原相互作用位点定义多肽的基序,其显示出与特定抗原或特定抗原组的特异性相互作用的能力。在一些情况下,结合/相互作用也被理解为定义特异性识别。在这样的情况下,特异性识别是指抗体或其结合片段能够与每个靶分子的至少两个氨基酸特异性地相互作用和/或结合。例如,特异性识别涉及抗体分子的特异性,或其辨别靶分子的特定区域的能力。在另外的情况下,抗原相互作用位点与其特定抗原的特异性相互作用导致信号起始,例如,由于诱导抗原构象的改变、抗原的寡聚化等。在进一步的实施方案中,结合的实例是“匙-锁原理”的特异性。因此,在一些情况下,抗原相互作用位点和抗原的氨基酸序列中的特定基序由于其一级、二级或三级结构以及所述结构的二级修饰而彼此结合。在这样的情况下,抗原相互作用位点与其特定抗原的特异性相互作用也导致位点与抗原的简单结合。

[0254] 在一些情况下,特异性相互作用进一步指抗体或其结合片段的交叉反应性降低或脱靶效应降低。例如,与感兴趣的多肽/蛋白质结合但不与或基本上不与其他任何多肽结合的抗体或其结合片段被认为对感兴趣的多肽/蛋白质具有特异性。抗原相互作用位点与特



定抗原的特异性相互作用的实例包括配体对其受体的特异性,例如抗原决定簇(表位)与抗体的抗原结合位点的相互作用。

[0255] 另外的结合部分

[0256] 在一些实施方案中,所述结合部分是血浆蛋白质。在一些情况下,该血浆蛋白质包括白蛋白。在一些情况下,结合部分A是白蛋白。在一些情况下,白蛋白通过本文所述的一种或多种缀合化学法缀合至多核酸分子。在一些情况下,白蛋白通过天然连接化学法缀合至多核酸分子。在一些情况下,白蛋白通过赖氨酸缀合而缀合至多核酸分子。

[0257] 在一些情况下,所述结合部分是类固醇。示例性的类固醇包括胆固醇、磷脂、二酰基甘油和三酰基甘油、脂肪酸,饱和的、不饱和的、包含取代的烃,或其组合。在一些情况下,该类固醇是胆固醇。在一些情况下,该结合部分是胆固醇。在一些情况下,胆固醇通过本文所述的一种或多种缀合化学法缀合至多核酸分子。在一些情况下,胆固醇通过天然连接化学法缀合至多核酸分子。在一些情况下,胆固醇通过赖氨酸缀合而缀合至多核酸分子。

[0258] 在一些情况下,所述结合部分是聚合物,包括但不限于与细胞上的特定表面标志物结合的多核酸分子适体。在这种情况下,该结合部分是这样的多核酸,其不与靶基因或mRNA杂交,而是类似于与细胞表面标志物的其特定表位结合的抗体,能够选择性地与细胞表面标志物结合。

[0259] 在一些情况下,所述结合部分是肽。在一些情况下,该肽具有约1至约3kDa。在一些情况下,该肽具有约1.2至约2.8kDa、约1.5至约2.5kDa或约1.5至约2kDa。在一些情况下,该肽是双环肽。在一些情况下,该双环肽是受约束的双环肽。在一些情况下,该结合部分是双环肽(例如,来自Bicycle Therapeutics的双环化合物)。

[0260] 在另外的情况下,所述结合部分是小分子。在一些情况下,该小分子是募集抗体的小分子。在一些情况下,该募集抗体的小分子包含靶标结合末端和抗体结合末端,其中靶标结合末端能够识别细胞表面受体并与之相互作用。例如,在一些情况下,包含谷氨酸脲化化合物的靶标结合末端使得能够与PSMA相互作用,从而增强与表达PSMA的细胞的抗体相互作用。在一些情况下,结合部分是Zhang等人,“A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules,”*J Am Chem Soc.*132(36):12711-12716(2010);或McEnaney等人,“Antibody-recruiting molecules:an emerging paradigm for engaging immune function in treating human disease,”*ACS Chem Biol.*7(7):1139-1151(2012)中描述的小分子。

[0261] 抗体或其结合片段的产生

[0262] 在一些实施方案中,使用本领域已知可用于合成多肽(例如,抗体)的任何方法产生本文所述的多肽(例如,抗体及其结合片段),特别是通过化学合成或通过重组表达,并且优选地通过重组表达技术产生。

[0263] 在一些情况下,重组地表达抗体或其结合片段,并且由化学合成的寡核苷酸装配编码该抗体或其结合片段的核酸(例如,如Kutmeier等人,1994,*BioTechniques* 17:242所述),该方法包括合成含有编码抗体的序列部分的重叠寡核苷酸,退火并连接这些寡核苷酸,然后通过PCR扩增所连接的寡核苷酸。

[0264] 或者,任选地通过使用可与序列的3'和5'端杂交的合成引物的PCR扩增,或者通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针的克隆,从合适的来源(例如,抗体cDNA文

库,或由表达免疫球蛋白的任何组织或细胞生成的cDNA文库)生成编码抗体的核酸分子。

[0265] 在一些情况下,任选地通过对动物如兔进行免疫来生成多克隆抗体,或者更优选地,通过生成单克隆抗体,来生成抗体或其结合片段,例如,如Kohler和Milstein(1975, *Nature* 256:495-497)所述,或者如Kozbor等人(1983, *Immunology Today* 4:72)或Cole等人(1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)所述。或者,任选地通过针对结合特定抗原的Fab片段的克隆筛选Fab表达文库(例如,如Huse等人,1989, *Science* 246:1275-1281所述),或通过筛选抗体文库(参见,例如,Clackson等人,1991, *Nature* 352:624; Hane等人,1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937),来获得至少编码抗体的Fab部分的克隆。

[0266] 在一些实施方案中,使用被开发用于通过将来自具有适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自具有适当生物活性的人抗体分子的基因剪接而产生“嵌合抗体”的技术(Morrison等人,1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger等人,1984, *Nature* 312:604-608; Takeda等人,1985, *Nature* 314:452-454)。嵌合抗体是其中不同部分来源于不同动物物种的分子,例如具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体,例如人源化抗体。

[0267] 在一些实施方案中,针对产生单链抗体所描述的技术(美国专利4,694,778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston等人,1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; 和Ward等人,1989, *Nature* 334:544-54)适于产生单链抗体。通过经由氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链片段产生单链多肽来形成单链抗体。还任选地使用在大肠杆菌(*E. coli*)中装配功能性Fv片段的技术(Skerra等人,1988, *Science* 242:1038-1041)。

[0268] 在一些实施方案中,通过常规技术(例如,电穿孔、脂质体转染和磷酸钙沉淀)将包含抗体的核苷酸序列的表达载体或抗体的核苷酸序列转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生抗体。在具体实施方案中,抗体的表达受组成型、诱导型或组织特异性启动子调节。

[0269] 在一些实施方案中,利用多种宿主表达载体系统表达本文所述的抗体或其结合片段。此类宿主表达系统代表通过其产生抗体的编码序列并随后进行纯化的载体,而且也代表当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时原位表达抗体或其结合片段的细胞。这些包括但不限于用含有抗体或其结合片段编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的微生物如细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*));用含有抗体或其结合片段编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母(*Saccharomyces Pichia*));用含有抗体或其结合片段编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒(CaMV)和烟草花叶病毒(TMV))感染或用含有抗体或其结合片段编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或者带有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、BH、293、293T、3T3细胞),所述重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。

[0270] 对于重组蛋白的长期高产量生产,优选稳定表达。在一些情况下,任选地对稳定表达抗体的细胞系进行工程化。不使用含有病毒复制起点的表达载体,而是用通过适当的表

达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和选择性标记控制的DNA转化宿主细胞。在引入外源DNA后,使工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后切换到选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并允许细胞将质粒稳定整合到其染色体中,并生长形成灶点(foci),然后将该灶点克隆并扩充成细胞系。该方法可有利地用来对表达抗体或其结合片段的细胞系进行工程化。

[0271] 在一些情况下,使用多种选择系统,包括但不限于分别在tk<sup>-</sup>、hgp<sup>rt</sup>-或ap<sup>rt</sup>-细胞中使用的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,1977,Cell 11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(Szybalska&Szybalski,192,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202)和腺嘌呤转磷酸核糖基酶(Lowy等人,1980,Cell 22:817)基因。此外,使用抗代谢物抗性作为选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对氨甲蝶呤的抗性(Wigler等人,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:357;O'Hare等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷类G-418的抗性(Clinical Pharmacy 12:488-505;Wu和Wu,1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596;Mulligan,1993,Science 260:926-932;以及Morgan和Anderson,1993,Ann.Rev.Biochem.62:191-217;May,1993,TIB TECH 11(5):155-215);以及hygro,赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,1984,Gene 30:147)。重组DNA技术领域中公知的可使用的方法描述于Ausubel等人(编著),1993,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY;Kriegler,1990,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY;以及第12和13章,Dracopoli等人(编著),1994,Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY.;Colberre-Garapin等人,1981,J.Mol.Biol.150:1。

[0272] 在一些情况下,通过载体扩增来增加抗体的表达水平(综述参见Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷(Academic Press,New York,1987))。当表达抗体的载体系统中的标记可扩增时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体的核苷酸序列相关,因此抗体的产生也将增加(Crouse等人,1983,Mol.Cell Biol.3:257)。

[0273] 在一些情况下,使用本领域已知的用于纯化或分析抗体或抗体缀合物的任何方法,例如,通过色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和色谱法,特别是针对蛋白A后的特定抗原的亲和色谱法,以及大小柱色谱法)、离心、差异溶解度,或通过用于纯化蛋白质的其他任何标准技术。示例性的色谱方法包括但不限于强阴离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法、大小排阻色谱法和快速蛋白质液相色谱法。

#### [0274] 缀合化学

[0275] 在一些实施方案中,多核酸分子缀合至结合部分。在一些情况下,该结合部分包括氨基酸、肽、多肽、蛋白质、抗体、抗原、毒素、激素、脂质、核苷酸、核苷、糖、碳水化合物、聚合物如聚乙二醇和聚丙二醇,以及所有这些物质类别的类似物或衍生物。结合部分的其他实例还包括类固醇如胆固醇、磷脂、二酰基甘油和三酰基甘油、脂肪酸、烃(例如,饱和的、不饱和的或含有取代基)、酶底物、生物素、洋地黄毒苷和多糖。在一些情况下,该结合部分是抗体或其结合片段。在一些情况下,多核酸分子进一步缀合至聚合物和可选的内体溶解部分。

[0276] 在一些实施方案中,所述多核酸分子通过化学连接过程缀合至结合部分。在一些情况下,该多核酸分子通过天然连接缀合至结合部分。在一些情况下,该缀合如下所述:Dawson等人,“Synthesis of proteins by native chemical ligation,”*Science* 1994, 266,776-779;Dawson等人,“Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives,”*J.Am.Chem.Soc.*1997,119,4325-4329;Hackeng等人,“Protein synthesis by native chemical ligation:Expanded scope by using straightforward methodology.,”*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1999,96,10068-10073;或Wu等人,“Building complex glycopeptides:Development of acysteine-free native chemical ligation protocol,”*Angew.Chem.Int.Ed.*2006,45,4116-4125。在一些情况下,该缀合如美国专利8,936,910所述。在一些实施方案中,该多核酸分子经由天然连接化学法位点特异性或非特异性地缀合至结合部分。

[0277] 在一些情况下,所述多核酸分子通过利用“无痕”偶联技术(Philochem)的定点方法缀合至结合部分。在一些情况下,该“无痕”偶联技术利用结合部分上的N-末端1,2-氨基硫醇基团,其随后与含有醛基团的多核酸分子缀合(参见Casi等人,“Site-specific traceless coupling of potent cytotoxic drugs to recombinant antibodies for pharmacodelivery,”*JACS*134(13):5887-5892(2012))。

[0278] 在一些情况下,所述多核酸分子通过利用并入结合部分中的非天然氨基酸的定点方法缀合至结合部分。在一些情况下,该非天然氨基酸包括对乙酰基苯丙氨酸(pAcPhe)。在一些情况下,pAcPhe的酮基团选择性地与衍生自烷氧基-胺的缀合部分偶联以形成肟键(参见Axup等人,“Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids,”*PNAS*109(40):16101-16106(2012))。

[0279] 在一些情况下,所述多核酸分子通过利用酶催化过程的定点方法缀合至结合部分。在一些情况下,该定点方法利用SMARTag<sup>TM</sup>技术(Catalent, Inc.)。在一些情况下,SMARTag<sup>TM</sup>技术包括通过甲酰甘氨酸生成酶(FGE)在醛标签的存在下通过氧化过程从半胱氨酸生成甲酰甘氨酸(FGly)残基,随后经由肟基-Pictet-Spengler(HIPS)连接将FGly缀合至烷基肟官能化多核酸分子(参见Wu等人,“Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag,”*PNAS*106(9):3000-3005(2009);Agarwal等人,“A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification,”*PNAS*110(1):46-51(2013))。

[0280] 在一些情况下,酶催化过程包含微生物转谷氨酰胺酶(mTG)。在一些情况下,所述多核酸分子利用微生物转谷氨酰胺酶催化的过程缀合至结合部分。在一些情况下,mTG催化识别序列内谷氨酰胺的酰胺侧链与官能化多核酸分子的伯胺之间的共价键形成。在一些情况下,mTG由茂源链霉菌(*Streptomyces mobarensis*)产生(参见Strop等人,“Location matters:site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates,”*Chemistry and Biology* 20(2)161-167(2013))。

[0281] 在一些情况下,所述多核酸分子通过如PCT公开W02014/140317中描述的方法缀合至结合部分,该方法利用序列特异性转肽酶。

[0282] 在一些情况下,所述多核酸分子通过如美国专利公开2015/0105539和2015/0105540中描述的方法缀合至结合部分。

[0283] 聚合物缀合部分

[0284] 在一些实施方案中,聚合物部分C进一步缀合至本文所述的多核酸分子、本文所述的结合部分或其组合。在一些情况下,聚合物部分C缀合至多核酸分子。在一些情况下,聚合物部分C缀合至结合部分。在其他情况下,聚合物部分C缀合至多核酸分子结合部分分子。在另外的情况下,聚合物部分C如上文所述缀合。

[0285] 在一些情况下,聚合物部分C是天然或合成聚合物,其由支链或非支链单体的长链和/或二维或三维的单体交联网络组成。在一些情况下,聚合物部分C包括多糖、木质素、橡胶或聚环氧烷(例如,聚乙二醇)。在一些情况下,至少一个聚合物部分C包括但不限于 $\alpha$ -、 $\omega$ -二羟基聚乙二醇、可生物降解的基于内酯的聚合物,例如聚丙烯酸、聚乳酸(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚丙烯、聚苯乙烯、聚烯烃、聚酰胺、聚氰基丙烯酸酯、聚酰亚胺、聚对苯二甲酸乙二醇酯(也称为聚(对苯二甲酸乙二酯)、PET、PETG或PETE)、聚丁二醇(PDG)或聚氨酯及其混合物。如本文所用的,混合物是指在同一化合物内以及在嵌段共聚物中使用不同聚合物。在一些情况下,嵌段共聚物是其中至少一部分聚合物由另一聚合物的单体构成的聚合物。在一些情况下,聚合物部分C包括聚环氧烷。在一些情况下,聚合物部分C包括PEG。在一些情况下,聚合物部分C包括聚乙烯酰亚胺(PEI)或羟乙基淀粉(HES)。

[0286] 在一些情况下,C为PEG部分。在一些情况下,该PEG部分在多核酸分子的5'末端缀合,而结合部分在多核酸分子的3'末端缀合。在一些情况下,该PEG部分在多核酸分子的3'末端缀合,而结合部分在多核酸分子的5'末端缀合。在一些情况下,该PEG部分缀合至多核酸分子的内部位点。在一些情况下,该PEG部分、结合部分或其组合缀合至多核酸分子的内部位点。在一些情况下,该缀合是直接缀合。在一些情况下,该缀合经由天然连接进行。

[0287] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如,PEG)是多分散或单分散化合物。在一些情况下,多分散材料包含不同分子量的材料的分散分布,其特征不在于平均重量(重均)大小和分散性。在一些情况下,单分散PEG包含一种大小的分子。在一些实施方案中,C为多分散或单分散的聚环氧烷(例如,PEG),并且指示的分子量表示聚环氧烷(例如,PEG)分子的分子量的平均值。

[0288] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如,PEG)的分子量为约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da。

[0289] 在一些实施方案中,C为聚环氧烷(例如,PEG),并且具有约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da的分子量。在一些实施方案中,C为PEG,并且具有约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da的分子量。在一些情

况下,C的分子量为约200Da。在一些情况下,C的分子量为约300Da。在一些情况下,C的分子量为约400Da。在一些情况下,C的分子量为约500Da。在一些情况下,C的分子量为约600Da。在一些情况下,C的分子量为约700Da。在一些情况下,C的分子量为约800Da。在一些情况下,C的分子量为约900Da。在一些情况下,C的分子量为约1000Da。在一些情况下,C的分子量为约1100Da。在一些情况下,C的分子量为约1200Da。在一些情况下,C的分子量为约1300Da。在一些情况下,C的分子量为约1400Da。在一些情况下,C的分子量为约1450Da。在一些情况下,C的分子量为约1500Da。在一些情况下,C的分子量为约1600Da。在一些情况下,C的分子量为约1700Da。在一些情况下,C的分子量为约1800Da。在一些情况下,C的分子量为约1900Da。在一些情况下,C的分子量为约2000Da。在一些情况下,C的分子量为约2100Da。在一些情况下,C的分子量为约2200Da。在一些情况下,C的分子量为约2300Da。在一些情况下,C的分子量为约2400Da。在一些情况下,C的分子量为约2500Da。在一些情况下,C的分子量为约2600Da。在一些情况下,C的分子量为约2700Da。在一些情况下,C的分子量为约2800Da。在一些情况下,C的分子量为约2900Da。在一些情况下,C的分子量为约3000Da。在一些情况下,C的分子量为约3250Da。在一些情况下,C的分子量为约3350Da。在一些情况下,C的分子量为约3500Da。在一些情况下,C的分子量为约3750Da。在一些情况下,C的分子量为约4000Da。在一些情况下,C的分子量为约4250Da。在一些情况下,C的分子量为约4500Da。在一些情况下,C的分子量为约4600Da。在一些情况下,C的分子量为约4750Da。在一些情况下,C的分子量为约5000Da。在一些情况下,C的分子量为约5500Da。在一些情况下,C的分子量为约6000Da。在一些情况下,C的分子量为约6500Da。在一些情况下,C的分子量为约7000Da。在一些情况下,C的分子量为约7500Da。在一些情况下,C的分子量为约8000Da。在一些情况下,C的分子量为约10,000Da。在一些情况下,C的分子量为约12,000Da。在一些情况下,C的分子量为约20,000Da。在一些情况下,C的分子量为约35,000Da。在一些情况下,C的分子量为约40,000Da。在一些情况下,C的分子量为约50,000Da。在一些情况下,C的分子量为约60,000Da。在一些情况下,C的分子量为约100,000Da。

[0290] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如,PEG)包含离散环氧乙烷单元(例如4至约48个环氧乙烷单元)。在一些情况下,包含离散环氧乙烷单元的聚环氧烷是直链。在其他情况下,包含离散环氧乙烷单元的聚环氧烷是支链。

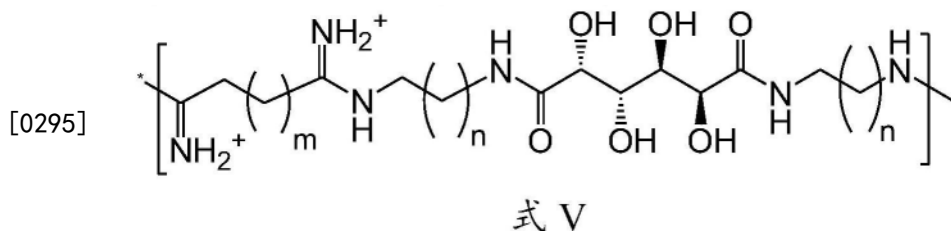
[0291] 在一些情况下,聚合物部分C是包含离散环氧乙烷单元的聚环氧烷(例如,PEG)。在一些情况下,聚合物部分C包含约4至约48个环氧乙烷单元。在一些情况下,聚合物部分C包含约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47或约48个环氧乙烷单元。

[0292] 在一些情况下,聚合物部分C是离散的PEG,其包含,例如,约4至约48个环氧乙烷单元。在一些情况下,聚合物部分C是离散的PEG,其包含,例如,约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39、约40、约41、约42、约43、约44、约45、约46、约47或约48个环氧乙烷单元。在一些情况下,聚合物部分C是离散的PEG,其包含,例如,约4个环氧乙烷单元。在一些情况下,聚合物部分C是离散

[illegible]

[0293] 在一些情况下,聚合物部分C是dPEG® (Quanta Biodesign Ltd)。

[0294] 在一些实施方案中,聚合物部分C包含基于阳离子粘酸的聚合物(cMAP)。在一些情况下,cMAP包含至少一个重复亚单位的一个或多个亚单位,并且该亚单位结构表示为式(V):



[0296] 其中m在每次出现时独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选4-6或5;并且n在每次出现时独立地为1、2、3、4或5。在一些实施方案中,m和n为例如约10。

[0297] 在一些情况下,cMAP进一步缀合至PEG部分,生成cMAP-PEG共聚物、mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物或cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。在一些情况下,PEG部分的范围为约500Da至约50,000Da。在一些情况下,PEG部分的范围为约500Da至约1000Da、大于1000Da至约5000Da、大于5000Da至约10,000Da、大于10,000至约25,000Da、大于25,000Da至约50,000Da,或这些范围中的两个或更多个的任意组合。

[0298] 在一些情况下,聚合物部分C是cMAP-PEG共聚物、mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物或cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。在一些情况下,聚合物部分C是cMAP-PEG共聚物。在其他情况下,聚合物部分C是mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物。在另外的情况下,聚合物部分C是cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。

[0299] 在一些实施方案中,聚合物部分C如上文所述缀合至多核酸分子、结合部分和可选的内体溶解部分。

[0300] 内体溶解部分

[0301] 在一些实施方案中,式(I) —A-X<sub>1</sub>-B-X<sub>2</sub>-C—的分子进一步包含另外的缀合部分。在一些情况下,该另外的缀合部分是内体溶解部分。在一些情况下,该内体溶解部分是细胞区室释放组分,诸如能够从本领域已知的任何细胞区室释放的化合物,该细胞区室例如是内体、溶酶体、内质网(ER)、高尔基体、微管、过氧化物酶体或细胞内的其他囊泡体。在一些情况下,该内体溶解部分包含内体溶解多肽、内体溶解聚合物、内体溶解脂质或内体溶解小分子。在一些情况下,该内体溶解部分包含内体溶解多肽。在其他情况下,该内体溶解部分包含内体溶解聚合物。

[0302] 内体溶解多肽

[0303] 在一些实施方案中,式(I) —A-X<sub>1</sub>-B-X<sub>2</sub>-C—的分子进一步与内体溶解多肽缀合。在一些情况下,该内体溶解多肽是pH依赖性膜活性肽。在一些情况下,该内体溶解多肽是两亲性多肽。在另外的情况下,该内体溶解多肽是拟肽。在一些情况下,该内体溶解多肽包含INF、蜂毒肽、meucicn或其各自的衍生物。在一些情况下,该内体溶解多肽包含INF或其衍生物。在其他情况下,该内体溶解多肽包含蜂毒肽或其衍生物。在另外的情况下,该内体溶解多肽包含meucicn或其衍生物。

[0304] 在一些情况下,INF7为24个残基的多肽,其序列包含CGIFGEIEELIEEGLNLDWGNA (SEQ ID NO:1) 或GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC (SEQ ID NO:2)。在一些情况下,INF7或其衍



生物包含以下序列:GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYGS GSCG (SEQ ID NO:3)、GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG-(PEG)6-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:4)或GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG-SGSC-K(GalNAc)<sub>2</sub>(SEQ ID NO:5)。

[0305] 在一些情况下,蜂毒肽是26个残基的多肽,其序列包含CLIGAILKVLATGLPTLISWIKNKRKQ(SEQ ID NO:6)或GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ(SEQ ID NO:7)。在一些情况下,蜂毒肽包含如美国专利8,501,930中描述的多肽序列。

[0306] 在一些情况下,meucin是来源于蝎子条斑钳蝎(*Mesobuthus eupeus*)的毒腺的抗微生物肽(AMP)。在一些情况下,meucin包括meucin-13和meucin-18,meucin-13的序列包含IFGAIAGLLKNIF-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:8),meucin-18的序列包含FFGHLFKLATKIIPSLFQ(SEQ ID NO:9)。

[0307] 在一些情况下,内体溶解多肽包括其序列与INF7或其衍生物、蜂毒肽或其衍生物或者meucin或其衍生物具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括INF7或其衍生物、蜂毒肽或其衍生物或者meucin或其衍生物。

[0308] 在一些情况下,内体溶解部分是INF7或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1-5具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:1具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:2-5具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:1。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2-5。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:1组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2-5组成。

[0309] 在一些情况下,内体溶解部分是蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:6或7具有至少至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:6具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:7具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:6。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:7。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:6组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:7组成。

[0310] 在一些情况下,内体溶解部分是meucin或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:8或9具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:8具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含与SEQ ID NO:9具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:8。在一些情

况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:9。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:8组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:9组成。

[0311] 在一些情况下,内体溶解部分包含如表1所示的序列。

[0312]

名称	来源	氨基酸序列	SEQ ID NO:	类型
Pep-1	来自猿猴病毒 40 大抗原的 NLS 和 HIV 的逆转录酶	KETWWETWWTEWSQPKKKRK V	10	一级两亲性
pVEC	VE-钙粘着蛋白	LLIILRRRRIRKQAHASHK	11	一级两亲性
VT5	合成肽	DPKGD PKGVTVTVTVTVTGKG DPKPD	12	$\beta$ -折叠两亲性
C105Y	1-抗胰蛋白酶	CSIPPEVKFNKPFVYLI	13	-
穿膜肽	甘丙肽和肥大脱粒肽	GWTLSAGYLLGKINLKALAA LAKKIL	14	一级两亲性
TP10	甘丙肽和肥大脱粒肽	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	15	一级两亲性
MPG	来自 HIV gp41 和 SV40 T 抗原的 NLS 的融合序列的疏水结构域	GALFLGFLGAAGSTMGA	16	$\beta$ -折叠两亲性
gH625	I 型 HSV 的糖蛋白 gH	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	17	二级两亲性 $\alpha$ -螺旋
CADY	PPTG1 肽	GLWRALWRLLRSLWRLWRA	18	二级两亲性 $\alpha$ -螺旋
GALA	合成肽	WEAALAEALAEALAEHLAEAL AEALAEALAA	19	二级两亲性 $\alpha$ -螺旋
INF	流感 HA2 融合肽	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWY GC	20	二级两亲性 $\alpha$ -

[0313]

				螺旋/ pH 依赖性膜 活性肽
HA2E5- TAT	流感病毒 X31 株融 合肽的流感 HA2 亚 单位	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWY G	21	二级 两亲性 $\alpha$ - 螺旋/ pH 依赖性膜 活性肽
HA2- penetratin	流感病毒 X31 株融 合肽的流感 HA2 亚 单位	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQI KIWFQNRRMKW KK-amide	22	pH 依赖性 膜活性肽
HA-K4	流感病毒 X31 株融 合肽的流感 HA2 亚 单位	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG- SSKKKK	23	pH 依赖性 膜活性肽
HA2E4	流感病毒 X31 株融 合肽的流感 HA2 亚 单位	GLFEAIAAGFIENGWEGMIDGGG YC	24	pH 依赖性 膜活性肽
H5WYG	HA2 类似物	GLFHAIAGFIENGWEGMIDGGH GLIHGWYG	25	pH 依赖性 膜活性肽
GALA- INF3- (PEG)6- NH	INF3 融合肽	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAE ALEALAA- (PEG)6-NH <sub>2</sub>	26	pH 依赖性 膜活性肽
CM18- TAT11	抗菌肽-A-蜂毒肽 <sub>2-12</sub> (CM <sub>18</sub> ) 融合肽	KWKLFKKIGAVLKVLTTG- YGRKKRRQRRR	27	pH 依赖性 膜活性肽

[0314] 在一些情况下,内体溶解部分包含Bak BH3多肽,后者通过拮抗抑制剂靶标如Bcl-2和/或Bcl-x<sub>L</sub>诱导凋亡。在一些情况下,内体溶解部分包含Albarran等人,“Efficient intracellular delivery of a pro-apoptotic peptide with a pH-responsive carrier,”*Reactive&Functional Polymers* 71:261-265(2011)描述的Bak BH3多肽。

[0315] 在一些情况下,内体溶解部分包含PCT公开W02013/166155或W02015/069587中描述的多肽(例如,细胞穿透多肽)。

[0316] 内体溶解脂质

[0317] 在一些实施方案中,所述内体溶解部分是脂质(例如,促融合脂质)。在一些实施方案中,式(I)——A-X<sub>1</sub>-B-X<sub>2</sub>-C——的分子进一步与内体溶解脂质(例如,促融合脂质)缀合。示例性促融合脂质包括1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-醇(Di-Lin)、N-甲基(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)甲胺(DLink-DMA)和N-甲基-2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙胺(XTC)。

[0318] 在一些情况下,内体溶解部分是PCT公开W009/126,933中描述的脂质(例如,促融合脂质)。

[0319] 内体溶解小分子

[0320] 在一些实施方案中,所述内体溶解部分是小分子。在一些实施方案中,式(I)——A-X<sub>1</sub>-B-X<sub>2</sub>-C——的分子进一步与内体溶解小分子缀合。适合作为内体溶解部分的示例性小分子包括但不限于奎宁、氯喹、羟基氯喹、氨酚喹(carnoquine)、阿莫吡喹、伯氨喹、甲氟喹、

nivaquine、卤泛群、醌亚胺或其组合。在一些情况下,喹啉内体溶解部分包括但不限于7-氯-4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉(氯喹);7-氯-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉(羟基氯喹);7-氟-4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉;4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-二乙基-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉(脱甲基氯喹);7-氟-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(4-二乙基-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-二乙基-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-二乙基-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(4-乙基-(2-羟基-乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基-)喹啉;7-羟基-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;磷酸羟基氯喹;7-氯-4-(4-乙基-(2-羟基乙基-1)-氨基-1-丁基氨基)喹啉(脱甲基羟基氯喹);7-氟-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;8-[(4-氨基戊基)氨基-6-甲氧基喹啉二盐酸盐;1-乙酰基-1,2,3,4-四氢喹啉;8-[(4-氨基戊基)氨基]-6-甲氧基喹啉二盐酸盐;1-丁酰基-1,2,3,4-四氢喹啉;3-氯-4-(4-羟基- $\alpha,\alpha'$ -双(2-甲基-1-吡咯烷基)-2,5-二甲苯氨基喹啉,4-[(4-二乙基-氨基)-1-甲基丁基-氨基]-6-甲氧基喹啉;3-氟-4-(4-羟基- $\alpha,\alpha'$ -双(2-甲基-1-吡咯烷基)-2,5-二甲苯氨基喹啉,4-[(4-二乙基氨基)-1-甲基丁基-氨基]-6-甲氧基喹啉;4-(4-羟基- $\alpha,\alpha'$ -双(2-甲基-1-吡咯烷基)-2,5-二甲苯氨基喹啉;4-[(4-二乙基氨基)-1-甲基丁基-氨基]-6-甲氧基喹啉;3,4-二氢-1-(2H)-喹啉羧基醛;1,1'-五亚甲基二喹啉鎓二碘化物;8-羟基喹啉硫酸盐及其氨基、醛、羧基、羟基、卤素、酮基、巯基和乙烯基衍生物或类似物。在一些情况下,内体溶解部分是 Naisbitt 等人(1997, J Pharmacol Exp Therapy 280:884-893) 和美国专利 5,736,557 中描述的小分子。

#### [0321] 连接体

[0322] 在一些实施方案中,本文所述的连接体是可切割连接体或不可切割连接体。在一些情况下,该连接体是可切割连接体。在其他情况下,该连接体是不可切割连接体。

[0323] 在一些情况下,所述连接体是非聚合连接体。非聚合连接体是指不含通过聚合过程生成的单体重复单元的连接体。示例性的非聚合连接体包括但不限于 $C_1$ - $C_6$ 烷基(例如, $C_5$ 、 $C_4$ 、 $C_3$ 、 $C_2$ 或 $C_1$ 烷基)、同双官能交联体、异双官能交联体、肽连接体、无痕连接体、自牺牲(self-immolative)连接体、基于马来酰亚胺的连接体或其组合。在一些情况下,该非聚合

连接体包含C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基(例如,C<sub>5</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>或C<sub>1</sub>烷基)、同双官能交联体、异双官能交联体、肽连接体、无痕连接体、自牺牲连接体、基于马来酰亚胺的连接体或其组合。在另外的情况下,该非聚合连接体不包含超过两个相同类型的连接体,例如,超过两个同双官能交联体,或超过两个肽连接体。在其他情况下,该非聚合连接体任选地包含一个或多个反应性官能团。

[0324] 在一些情况下,该非聚合连接体不包含以上描述的聚合物。在一些情况下,该非聚合连接体不包含由聚合物部分C所包含的聚合物。在一些情况下,该非聚合连接体不包含聚环氧烷(例如PEG)。在一些情况下,该非聚合连接体不包含PEG。

[0325] 在一些情况下,所述连接体包括同双官能连接体。示例性的同双官能连接体包括但不限于Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3',3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)乙二醇酯(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二甲基己二酰亚胺酯(DMA)、二甲基庚二酰亚胺酯(DMP)、二甲基辛二酰亚胺酯(DMS)、二甲基-3,3'-二硫代双丙酰亚胺酯(DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB)如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨基氨基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α'-对二氨基联苯、二碘-对二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。

[0326] 在一些实施方案中,所述连接体包括异双官能连接体。示例性的异双官能连接体包括但不限于胺反应性和巯基交联体,诸如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫代)甲苯酰胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBs)、间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBs)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBs)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((磺基琥珀酰亚胺)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((磺基琥珀酰亚胺)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-(((4-磺基琥珀酰亚胺)氨基)甲基)环己烷-1-羰基(氨基)己酸酯(sIACX)、对-硝基苯基碘乙酸酯(NPIA);羰基反应性和巯基反应性交联体,诸如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰肼(PDPH);胺反应性和光反应性交联体,诸如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺

基-(4-叠氮基水杨基酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(*p*-叠氮基水杨基酰胺基)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氮基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间-叠氮基-邻-硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(*p*-叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺(磺基-sAMCA)、*p*-硝基苯基重氮基丙酮酸酯(*p*NPDP)、*p*-硝基苯基-2-重氮基-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP);巯基反应性和光反应性交联体,诸如1-(*p*-叠氮基水杨基酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(*p*-叠氮基水杨基酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙酰胺、二苯甲酮-4-马来酰亚胺;羰基反应性和光反应性交联体,诸如*p*-叠氮基苯甲酰基肼(ABH);羧酸酯反应性和光反应性交联体,诸如4-(*p*-叠氮基水杨基酰胺基)丁胺(AsBA);以及精氨酸反应性和光反应性交联体,诸如*p*-叠氮基苯基乙二醛(APG)。

[0327] 在一些情况下,所述连接体包含反应性官能团。在一些情况下,该反应性官能团包含对结合部分上存在的亲电子基团具有反应性的亲核基团。示例性的亲电子基团包括羰基,如醛、酮、羧酸、酯、酰胺、烯酮、酰卤或酸酐。在一些实施方案中,该反应性官能团是醛。示例性的亲核基团包括肼、肟、氨基、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳基肼。

[0328] 在一些实施方案中,所述连接体包含马来酰亚胺基团。在一些情况下,马来酰亚胺基团也被称为马来酰亚胺间隔基。在一些情况下,该马来酰亚胺基团进一步包含己酸,形成马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体包含马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体是马来酰亚胺己酰基(mc)。在其他情况下,该马来酰亚胺基团包括马来酰亚胺甲基,例如如上所述的琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。

[0329] 在一些实施方案中,所述马来酰亚胺基团是自稳定的马来酰亚胺。在一些情况下,自稳定的马来酰亚胺利用二氨基丙酸(DPR)并入邻近马来酰亚胺的碱性氨基,以提供硫代琥珀酰亚胺环水解的分子内催化,从而阻止马来酰亚胺发生通过逆迈克尔反应的消除反应。在一些情况下,自稳定的马来酰亚胺是Lyon等人,“Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,”*Nat. Biotechnol.* 32(10):1059-1062 (2014) 描述的马来酰亚胺基团。在一些情况下,所述连接体包含自稳定的马来酰亚胺。在一些情况下,所述连接体是自稳定的马来酰亚胺。

[0330] 在一些实施方案中,所述连接体包含肽部分。在一些情况下,该肽部分包含至少2、3、4、5或6个或更多个氨基酸残基。在一些情况下,该肽部分包含至多2、3、4、5、6、7或8个或更多个氨基酸残基。在一些情况下,该肽部分包含约2个、约3个、约4个、约5个或约6个氨基酸残基。在一些情况下,该肽部分是可切割的肽部分(例如,酶促或化学地)。在一些情况下,

该肽部分是不可切割的肽部分。在一些情况下,该肽部分包含Val-Cit(缬氨酸-瓜氨酸)、Gly-Gly-Phe-Gly(SEQ ID NO:865)、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:866)或Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:867)。在一些情况下,所述连接体包含肽部分,诸如:Val-Cit(缬氨酸-瓜氨酸)、Gly-Gly-Phe-Gly(SEQ ID NO:865)、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:866)或Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:867)。在一些情况下,所述连接体包含Val-Cit。在一些情况下,所述连接体是Val-Cit。

[0331] 在一些实施方案中,所述连接体包含苯甲酸基团或其衍生物。在一些情况下,该苯甲酸基团或其衍生物包含对氨基苯甲酸(PABA)。在一些情况下,该苯甲酸基团或其衍生物包含 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)。

[0332] 在一些实施方案中,所述连接体包含任意组合的马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团中的一种或多种。在一些实施方案中,所述连接体包含马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团的组合。在一些情况下,该马来酰亚胺基团是马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,该肽基团是val-cit。在一些情况下,该苯甲酸基团是PABA。在一些情况下,所述连接体包含mc-val-cit基团。在一些情况下,所述连接体包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下,所述连接体包含mc-val-cit-PABA基团。

[0333] 在一些实施方案中,所述连接体是自牺牲连接体或自消除连接体。在一些情况下,所述连接体是自牺牲连接体。在其他情况下,所述连接体是自消除连接体(例如,环化自消除连接体)。在一些情况下,所述连接体包括美国专利9,089,614或PCT公开W02015038426中描述的连接体。

[0334] 在一些实施方案中,所述连接体是树枝型连接体。在一些情况下,该树枝型连接体包含支化的多官能连接体部分。在一些情况下,该树枝型连接体用来增加多核苷酸B与结合部分A的摩尔比。在一些情况下,该树枝型连接体包含PAMAM树枝状高分子。

[0335] 在一些实施方案中,所述连接体是无痕连接体或者在切割后不会给结合部分A、多核苷酸B、聚合物C或内体溶解部分D留下连接体部分(例如,原子或连接体基团)的连接体。示例性的无痕连接体包括但不限于锗连接体、硅连接体、硫连接体、硒连接体、氮连接体、磷连接体、硼连接体、铬连接体或苯肼连接体。在一些情况下,所述连接体是如Hejesen等人,“A traceless aryl-triazene linker for DNA-directed chemistry,”Org Biomol Chem 11(15):2493-2497(2013)描述的无痕芳基-三氮烯连接体。在一些情况下,所述连接体是Blaney等人,“Traceless solid-phase organic synthesis,”Chem.Rev.102:2607-2024(2002)描述的无痕连接体。在一些情况下,连接体是美国专利6,821,783中描述的无痕连接体。

[0336] 在一些情况下,所述连接体是以下文献中描述的连接体:美国专利6,884,869;7,498,298;8,288,352;8,609,105;或8,697,688;美国专利公开2014/0127239;2013/028919;2014/286970;2013/0309256;2015/037360;或2014/0294851;或者PCT公开W02015057699;W02014080251;W02014197854;W02014145090;或W02014177042。

[0337] 在一些实施方案中, $X_1$ 和 $X_2$ 各自独立地为键或非聚合连接体。在一些情况下, $X_1$ 和 $X_2$ 各自独立地为键。在一些情况下, $X_1$ 和 $X_2$ 各自独立地为非聚合连接体。

[0338] 在一些情况下,  $X_1$  为键或非聚合连接体。在一些情况下,  $X_1$  为键。在一些情况下,  $X_1$  为非聚合连接体。在一些情况下, 该连接体为  $C_1$ - $C_6$  烷基。在一些情况下,  $X_1$  为  $C_1$ - $C_6$  烷基, 例如,  $C_5$ 、 $C_4$ 、 $C_3$ 、 $C_2$  或  $C_1$  烷基。在一些情况下, 该  $C_1$ - $C_6$  烷基是未取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基。如在连接体的语境中, 特别是在  $X_1$  的语境中所使用的, 烷基意指含有最多六个碳原子的饱和直链或支链烃基团。在一些情况下,  $X_1$  包括以上所述的同双官能连接体或异双官能连接体。在一些情况下,  $X_1$  包括异双官能连接体。在一些情况下,  $X_1$  包括 sMCC。在其他情况下,  $X_1$  包括任选地缀合至  $C_1$ - $C_6$  烷基的异双官能连接体。在其他情况下,  $X_1$  包括任选地缀合至  $C_1$ - $C_6$  烷基的 sMCC。在另外的情况下,  $X_1$  不包括上文描述的同双官能连接体或异双官能连接体。

[0339] 在一些情况下,  $X_2$  为键或连接体。在一些情况下,  $X_2$  为键。在其他情况下,  $X_2$  为连接体。在一些情况下,  $X_2$  为非聚合连接体。在一些实施方案中,  $X_2$  为  $C_1$ - $C_6$  烷基。在一些情况下,  $X_2$  为以上所述的同双官能连接体或异双官能连接体。在一些情况下,  $X_2$  为以上所述的同双官能连接体。在一些情况下,  $X_2$  为以上所述的异双官能连接体。在一些情况下,  $X_2$  包含马来酰亚胺基团, 诸如上述马来酰亚胺基己酰基 (mc) 或自稳定的马来酰亚胺基团。在一些情况下,  $X_2$  包含肽部分, 如 Val-Cit。在一些情况下,  $X_2$  包含苯甲酸基团, 如 PABA。在另外的情况下,  $X_2$  包含马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团的组合。在另外的情况下,  $X_2$  包含 mc 基团。在另外的情况下,  $X_2$  包含 mc-val-cit 基团。在另外的情况下,  $X_2$  包含 val-cit-PABA 基团。在另外的情况下,  $X_2$  包含 mc-val-cit-PABA 基团。

#### [0340] 使用方法

[0341] 肌萎缩是指肌肉质量损失和/或肌肉的进行性弱化和退化。在一些情况下, 由于蛋白质降解率高、蛋白质合成率低或两者兼而有之, 发生肌肉质量损失和/或肌肉的进行性弱化和退化。在一些情况下, 肌肉蛋白质的高降解率是由于肌肉蛋白质的分解代谢 (即, 为了使用氨基酸作为糖异生的底物而导致的肌肉蛋白质的分解) 引起的。

[0342] 在一实施方案中, 肌萎缩是指肌力的显著损失。肌力的显著损失是指相对于对照受试者中的相同肌肉组织, 受试者中病病、受伤或废用的肌肉组织的力量降低。在一个实施方案中, 肌力的显著损失是力量相对于对照受试者中的相同肌肉组织降低至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50% 或更高。在另一个实施方案中, 肌力的显著损失是指相对于在不使用一段时间之前同一受试者中相同肌肉组织的肌力, 废用肌肉组织的力量降低。在一个实施方案中, 肌力的显著损失是相对于在不使用一段时间之前同一受试者中相同肌肉组织的肌力降低至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50% 或更多。

[0343] 在另一个实施方案中, 肌萎缩是指肌肉质量的显著损失。肌肉质量的显著损失是指相对于对照受试者中的相同肌肉组织, 受试者中病变、受伤或废用的肌肉组织的肌肉体积减少。在一个实施方案中, 肌肉体积的显著损失为相对于对照受试者中的相同肌肉组织至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50% 或更多。在另一个实施方案中, 肌肉质量的显著损失是指相对于在不使用一段时间之前同一受试者中相同肌肉组织的肌肉体积, 废用的肌肉组织的肌肉体积减少。在一个实施方案中, 肌肉组织的显著损失是相对于在不使用一段时间之前同一受试者中相同肌肉组织的肌肉体积至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50% 或更多。任选地, 例如通过磁共振成像 (例如, 通过肌肉体积/横截面积 (CSA))



MRI方法),通过评估肌肉的横截面积来测量肌肉体积。

[0344] 强直性肌营养不良是一种多系统性神经肌肉疾病,包括两种主要类型:1型强直性肌营养不良(DM1)和2型强直性肌营养不良(DM2)。DM1是由基因DM蛋白激酶(DMPK)中的一个显性遗传的“CTG”重复扩展引起的,当其转录为mRNA时,会形成发夹,这些发夹以高亲和力与盲肌样(MBNL)家族的蛋白质结合。MBNL蛋白参与转录后剪接和多腺苷酸位点调节,而MBNL蛋白功能的丧失导致核灶的下游积累并增加错误剪接事件,继而导致肌强直和其他临床症状。

[0345] 在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子或本文所述的多核酸分子缀合物。在一些情况下,该肌萎缩是由恶病质(例如,癌症恶病质)、去神经支配、肌病、运动神经元疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺病、肝病、充血性心力衰竭、慢性肾功能衰竭、慢性感染、脓毒症、禁食、少肌症、糖皮质激素诱发的萎缩、废用或太空飞行引起和/或与之相关。在一些情况下,强直性营养不良是DM1。

[0346] 恶病质

[0347] 恶病质是由潜在疾病引起的后天性、加速的肌肉损失。在一些情况下,恶病质是指无法通过营养逆转的体重减轻,并且通常与诸如癌症、COPD、AIDS、心力衰竭等潜在疾病相关。当在患有晚期癌症的患者中观察到恶病质时,将其称为“癌症恶病质”。癌症恶病质影响大多数晚期癌症患者,并与治疗耐受性、对治疗的反应、生活质量和生存时间的降低有关。在一些情况下,癌症恶病质被定义为一种多因素综合征,其特征是骨骼肌质量持续减少、脂肪量减少或不减少、常规营养支持不能完全逆转以及导致进行性功能损害。在一些情况下,骨骼肌损失似乎是癌症恶病质中最重要的事件。此外,癌症恶病质的分类表明,诊断标准不仅考虑体重减轻是恶病质过程的信号事件,而且还应考虑患者的初始储备,如低BMI或低水平的肌肉健壮程度。

[0348] 在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者中与恶病质相关的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子或本文所述的多核酸分子缀合物。在另外的实施方案中,本文描述了治疗受试者中与癌症恶病质相关的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子或本文所述的多核酸分子缀合物。

[0349] 去神经支配

[0350] 去神经支配是对周围运动神经元的损伤,器官与中枢神经系统之间的神经纤维的部分或完全中断,导致神经传导中断和运动神经元冲动,继而阻止骨骼肌的收缩。由于整个运动神经元单元的丧失,这种神经功能的丧失是局部的或普遍的。骨骼肌无法收缩导致肌萎缩。在一些情况下,去神经支配与退行性、代谢性或炎性神经病(例如,格林-巴利综合征、周围神经病或暴露于环境毒素或药物)相关或作为其结果。在另外的情况下,去神经支配与身体损伤如外科手术有关。

[0351] 在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者中与去神经支配相关或由去神经支配引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与去神经支配相关或由去神经支配引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0352] 肌病

[0353] 肌病是一个笼统的术语,其描述肌肉的疾病。在一些情况下,肌病包括肌强直;先天性肌病,如线形体肌病、多/小核肌病和肌管(中央核)肌病;线粒体肌病;家族性周期性麻痹;炎性肌病;代谢性肌病,例如,由糖原或脂质贮积病引起的;皮炎;多肌炎;包涵体肌炎;骨化性肌炎;横纹肌溶解;和肌红蛋白尿。在一些情况下,肌病是由肌肉营养不良综合征引起的,如杜氏、贝氏、强直性、面肩肱型、Emery-Dreifuss、眼咽、肩胛肱型、肢带型、福山、先天性肌营养不良或遗传性远端肌病。在一些情况下,肌病是由强直性肌营养不良引起的(例如,1型强直性肌营养不良或DM1)。在一些情况下,肌病是由DM1引起的。

[0354] 在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者中与肌病相关的或由肌病引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与肌病相关或由其引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0355] 运动神经元疾病

[0356] 运动神经元疾病(MND)包括影响运动神经元的神经系统疾病,运动神经元是控制机体随意肌的细胞。示例性运动神经元疾病包括但不限于成年运动神经元疾病、婴儿脊髓性肌萎缩症、肌萎缩侧索硬化、青少年脊髓性肌萎缩、伴有多灶性传导阻滞的自身免疫性运动神经病、中风或脊髓损伤引起的瘫痪,或骨骼由于创伤而无法固定。

[0357] 在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者中与运动神经元疾病相关或由其引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与运动神经元疾病相关或由其引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0358] 糖尿病

[0359] 糖尿病(diabetes mellitus,DM)包括1型糖尿病、2型糖尿病、3型糖尿病、4型糖尿病、双重糖尿病、潜伏性自身免疫性糖尿病(LAD)、妊娠糖尿病、新生儿糖尿病(NDM)、青年成熟期发作糖尿病(MODY)、Wolfram综合征、Alström综合征、糖尿病前期或尿崩症。2型糖尿病,也称为非胰岛素依赖型糖尿病,是最常见的糖尿病类型,占有糖尿病病例的95%。在一些情况下,2型糖尿病是由多种因素引起的,包括由于胰岛 $\beta$ 细胞功能异常导致的胰岛素抵抗,继而导致高血糖水平。在一些情况下,胰高血糖素水平升高会刺激肝脏产生异常量的不需要的葡萄糖,从而导致高血糖水平。

[0360] 1型糖尿病,也称为胰岛素依赖型糖尿病,约占所有糖尿病病例的5%至10%。1型糖尿病是一种自身免疫疾病,其中T细胞攻击并破坏胰腺中产生胰岛素的 $\beta$ 细胞。在一些实施方案中,1型糖尿病是由遗传和环境因素引起的。

[0361] 4型糖尿病是最近发现的一种糖尿病,可影响约20%的65岁以上糖尿病患者。在一些实施方案中,4型糖尿病的特征在于年龄相关的胰岛素抵抗。

[0362] 在一些实施方案中,将3型糖尿病用作阿尔茨海默病的术语,其导致大脑中的胰岛素抵抗。

[0363] 在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者中糖尿病相关的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子或本文所述的多核酸分子缀合物。在另外的实施方案中,本文描述了治疗受试者中与癌症糖尿病相关的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子或本文所述的多核酸分子缀合物。

[0364] 慢性阻塞性肺疾病

[0365] 慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种类型的阻塞性肺疾病,其特征在于长期呼吸问题和气流不良。慢性支气管炎和肺气肿是COPD的两种不同类型。在一些情况下,本文描述了治疗受试者中与COPD(例如,慢性支气管炎或肺气肿)相关的或由COPD引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与COPD相关的或由COPD(例如,慢性支气管炎或肺气肿)引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0366] 肝病

[0367] 肝病(或肝脏疾病)包括纤维化、硬化、肝炎、酒精性肝病、肝脂肪变性、遗传性疾病或原发性肝癌。在一些情况下,本文描述了治疗受试者中与肝病相关或由肝病引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与肝病相关或由肝病引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0368] 充血性心力衰竭

[0369] 充血性心力衰竭是指心脏无法将足够的血液和氧泵送到人体组织的情况。在一些情况下,本文描述了治疗受试者中与充血性心力衰竭相关或由充血性心力衰竭引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与充血性心力衰竭相关或由充血性心力衰竭引起的肌萎缩的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0370] 慢性肾功能衰竭

[0371] 慢性肾功能衰竭或慢性肾脏疾病是以肾脏功能随时间逐渐丧失为特征的病况。在一些情况下,本文描述了治疗受试者中与慢性肾功能衰竭相关或由慢性肾功能衰竭引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与慢性肾功能衰竭相关或由慢性肾功能衰竭引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0372] 慢性感染

[0373] 在一些实施方案中,诸如AIDS等慢性感染进一步导致肌萎缩。在一些情况下,本文描述了治疗受试者中与慢性感染(例如,AIDS)相关或由其引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与慢性感染(例如,AIDS)相关或由其引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0374] 脓毒症

[0375] 脓毒症是对导致组织损伤、器官衰竭和/或死亡的感染的免疫应答。在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者中与脓毒症相关或由脓毒症引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了一种治疗受试者中与脓毒症相关或由脓毒症引起的肌萎缩的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

[0376] 禁食

[0377] 禁食是一段时期内对某些或全部食物、饮料或两者的戒断或减少。在一些实施方

案中,本文描述了治疗受试者中与禁食相关或由禁食引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了一种治疗受试者中与禁食相关或由禁食引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

#### [0378] 少肌症

[0379] 少肌症是正常衰老过程中肌萎缩的持续过程,其特征在在于在数月和数年的时间内,肌肉质量和肌力逐渐丧失。常规衰老过程在本文中是指不受促进骨骼肌神经变性的病症和疾病的存在影响或加速的衰老过程。

[0380] 在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者中与少肌症相关或由少肌症引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与少肌症相关或由少肌症引起的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

#### [0381] 糖皮质激素相关的肌萎缩

[0382] 在一些实施方案中,采用糖皮质激素的治疗进一步导致肌萎缩。示例性的糖皮质激素包括但不限于皮质醇、地塞米松、倍他米松、泼尼松、甲泼尼龙和泼尼松龙。

[0383] 在一些实施方案中,本文描述了治疗受试者中与糖皮质激素相关的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了治疗受试者中与糖皮质激素相关的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

#### [0384] 废用相关的肌萎缩

[0385] 当肢体被固定(例如,由于肢体或关节骨折或骨科手术,如髌部或膝盖置换手术)时,导致与废用相关的肌萎缩。如本文所用的,“固定”或“固定的”是指肢体、肌肉、骨骼、肌腱、关节或任何其他身体部位在长时间段内(例如2天、3天、4天、5天、6天、一周、两周或更长时间)受到部分或完全限制运动。在一些情况下,固定时间时包括运动不受约束的短暂时间或情况,例如洗澡,更换外部设备或调整外部设备。肢体固定可选地通过各种外部设备进行,包括但不限于支具、吊索、石膏、绷带和夹板(其中的任一个可选地由硬或软材料组成,包括但不限于布、纱布、玻璃纤维、塑料、石膏或金属)以及任何内部设备,包括手术植入的夹板、板、支具等。在肢体固定的情况下,运动受限涉及单个关节或多个关节(例如,简单关节,如肩关节或髋关节,复合关节,如桡腕关节)和复杂关节如膝关节),包括但不限于以下一种或多种:手的关节、肩关节、肘关节、腕关节、辅助关节、胸锁关节、椎骨关节、颞下颌关节、髋关节、髌关节、膝关节和足关节)、单个肌腱或韧带或多个肌腱或韧带(例如,包括但不限于以下一种或多种:前交叉韧带、后交叉韧带、肩袖肌腱、肘和膝关节侧副韧带、手的屈肌腱、脚踝的侧韧带以及颌骨或颞下颌关节的肌腱和韧带)、单个骨骼或多个骨骼(例如,包括但不限于以下一种或多种:颅骨、下颌骨、锁骨、肋骨、桡骨、尺骨、humorous、盆骨、髌骨、股骨、髌骨、趾骨、腕骨、掌骨、跗骨、跖骨、腓骨、胫骨、肩胛骨和椎骨)、一条或多条肌肉(例如,包括但不限于以下一种或多种:背阔肌、斜方肌、三角肌、胸肌、二头肌、三头肌、外斜肌、腹肌、臀大肌、腓绳肌、四头肌、腓肠肌和膈肌);单肢或多肢(一个或多个手臂和腿),或整个骨骼肌系统或其部分(例如,在全身石膏或人字形石膏的情况下)。

[0386] 在一些实施方案中,本文描述了一种治疗受试者中与废用相关的肌萎缩的方法,

其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子。在其他实施方案中,本文描述了一种治疗受试者中与废用相关的肌萎缩的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的多核酸分子缀合物。

**[0387] 药物制剂**

**[0388]** 在一些实施方案中,本文所述的药物制剂通过多种给药途径施用于受试者,该给药途径包括但不限于肠胃外(例如,静脉内、皮下、肌肉内)、口服、鼻内、经颊、直肠或透皮给药途径。在一些情况下,本文所述的药物组合物被配制用于肠胃外(例如,静脉内、皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、鞘内、大脑内、脑室内或颅内)给药。在其他情况下,本文所述的药物组合物被配制用于口服给药。在其他情况下,本文所述的药物组合物被配制用于鼻内给药。

**[0389]** 在一些实施方案中,所述药物制剂包括但不限于水性液体分散体、自乳化分散体、固溶体、脂质体分散体、气雾剂、固体剂型、粉末、立即释放制剂、控制释放制剂、快速熔化解剂、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂、多颗粒制剂(例如,纳米颗粒制剂)以及立即和控制释放混合型制剂。

**[0390]** 在一些情况下,所述药物制剂包括多颗粒制剂。在一些情况下,所述药物制剂包括纳米颗粒制剂。在一些情况下,纳米颗粒包含cMAP、环糊精或脂质。在一些情况下,纳米颗粒包括固体脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、自乳化纳米颗粒、脂质体、微乳液或胶束溶液。另外的示例性纳米颗粒包括但不限于顺磁性纳米颗粒、超顺磁性纳米颗粒、金属纳米颗粒、富勒烯样材料、无机纳米管、树枝状高分子(诸如具有共价连接的金属螯合物)、纳米纤维、纳米角、纳米洋葱、纳米棒、纳米绳和量子点。在一些情况下,纳米颗粒是金属纳米颗粒,例如钪、钛、钒、铬、锰、铁、钴、镍、铜、锌、钇、锆、铌、钼、钽、铈、钡、银、镉、钨、铼、铱、铊、金、钽、铝、镓、铟、锡、铊、铅、铋、镁、钙、锶、钡、锂、钠、钾、硼、硅、磷、锗、砷、锑及其组合、合金或氧化物的纳米颗粒。

**[0391]** 在一些情况下,纳米颗粒包含核或者核和壳,如在核-壳纳米颗粒中。

**[0392]** 在一些情况下,纳米颗粒进一步涂覆有用于附接功能元件的分子(例如,与本文所述的多核酸分子或结合部分中的一种或多种)。在一些情况下,涂层包含硫酸软骨素、硫酸葡聚糖、羧甲基葡聚糖、藻酸、果胶、角叉菜聚糖、岩藻多糖、琼脂胶、紫菜聚糖、刺梧桐胶、结冷胶、黄原胶、透明质酸、葡糖胺、半乳糖胺、壳多糖(或壳聚糖)、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、溶菌酶、细胞色素C、核糖核酸酶、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶、聚赖氨酸、聚精氨酸、组蛋白、鱼精蛋白、卵清蛋白、糊精或环糊精。在一些情况下,纳米颗粒包括石墨烯涂覆的纳米颗粒。

**[0393]** 在一些情况下,纳米颗粒具有小于约500nm、400nm、300nm、200nm或100nm的至少一个维度。

**[0394]** 在一些情况下,纳米颗粒制剂包含顺磁性纳米颗粒、超顺磁性纳米颗粒、金属纳米颗粒、富勒烯样材料、无机纳米管、树枝状高分子(诸如具有共价连接的金属螯合物)、纳米纤维、纳米角、纳米洋葱、纳米棒、纳米绳或量子点。在一些情况下,本文所述的多核酸分子或结合部分直接或间接地缀合至纳米颗粒。在一些情况下,至少1、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100个或更多个本文所述的多核酸分子或结合部分直接或间接地缀合至纳米颗粒。

**[0395]** 在一些实施方案中,所述药物制剂包含递送载体,例如重组载体,将多核酸分子递

送到细胞中。在一些情况下,该重组载体是DNA质粒。在其他情况下,该重组载体是病毒载体。示例性的病毒载体包括衍生自腺相关病毒、逆转录病毒、腺病毒或甲病毒的载体。在一些情况下,能够表达多核酸分子的重组载体在靶细胞中提供稳定的表达。在另外的情况下,使用提供多核酸分子的瞬时表达的病毒载体。

[0396] 在一些实施方案中,所述药物制剂包含基于与本文公开的组合物相容性以及所需剂型的释放谱性质而选择的载体或载体材料。示例性的载体材料包括,例如,粘合剂、悬浮剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、润湿剂、稀释剂等。药学上相容的载体材料包括但不限于阿拉伯胶、明胶、胶体二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糖糊精、甘油、硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、胆固醇、胆固醇酯、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、牛磺胆酸、磷脂酰胆碱、氯化钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、纤维素和纤维素缀合物、糖硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉等。参见,例如,Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第十九版(Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. 和 Lachman, L. 编著, Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; 以及 Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第七版 (Lippincott Williams & Wilkins 1999)。

[0397] 在一些情况下,所述药物制剂进一步包含pH调节剂或缓冲剂,其包括酸,如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱,如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和三羟甲基氨基甲烷;和缓冲液,如柠檬酸盐/右旋糖、碳酸氢钠和氯化铵。这样的酸、碱和缓冲液以将组合物的pH维持在可接受范围内所需的量包含在内。

[0398] 在一些情况下,所述药物制剂包含使组合物的重量摩尔渗透压浓度处于可接受范围内所需的量的一种或多种盐。这样的盐包括具有钠、钾或铵阳离子以及氯离子、柠檬酸根、抗坏血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根或亚硫酸氢根阴离子的那些盐;合适的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠和硫酸铵。

[0399] 在一些情况下,所述药物制剂进一步包含用来稳定化合物的稀释剂,因为它们提供更稳定的环境。本领域中利用溶解在缓冲溶液(其也提供pH控制或维持)中的盐作为稀释剂,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液。在某些情况下,稀释剂增加组合物的体积,以便于压缩或者产生用于均匀掺合以供胶囊填充的足够体积。这类化合物包括例如乳糖、淀粉、甘露醇、山梨醇、右旋糖、微晶纤维素如 **Avicel®**; 磷酸氢钙、磷酸二钙二水合物; 磷酸三钙、磷酸钙; 无水乳糖、喷雾干燥的乳糖; 预胶化淀粉、可压缩糖,如 **Di-Pac®** (Amstar); 甘露醇、羟丙基甲基纤维素、乙酸硬脂酸羟丙基甲基纤维素、基于蔗糖的稀释剂、糖果糖; 一碱式硫酸钙一水合物、硫酸钙二水合物; 乳酸钙三水合物、葡萄糖结合剂(dextrate); 水解谷物固体、直链淀粉; 粉状纤维素、碳酸钙; 甘氨酸、高岭土; 甘露醇、氯化钠; 肌醇、膨润土等。

[0400] 在一些情况下,所述药物制剂包含崩解剂以便于物质的分解或崩解。术语“崩解”包括当与胃肠液接触时剂型的溶解和分散。崩解剂的实例包括淀粉,例如天然淀粉如玉米淀粉或马铃薯淀粉,预胶化淀粉如National 1551或 **Amijel®**, 或羟基乙酸淀粉钠如 **Promogel®** 或 **Explotab®**, 纤维素如木制品,甲基结晶纤维素,例如 **Avicel®**、**Avicel®**

PH101、Avicel<sup>®</sup>PH102、Avicel<sup>®</sup>PH105、Elcema<sup>®</sup>P100、Emcocel<sup>®</sup>、Vivacel<sup>®</sup>、Ming Tia<sup>®</sup>和Solka-Floc<sup>®</sup>，甲基纤维素，交联羧甲基纤维素，或交联纤维素如交联羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol<sup>®</sup>)、交联羧甲基纤维素或交联的交联羧甲基纤维素，交联淀粉如羟基乙酸淀粉钠，交联聚合物如聚维酮、交联聚乙烯吡咯烷酮，藻酸盐如藻酸或藻酸的盐如藻酸钠，粘土如Veegum<sup>®</sup>HV(硅酸镁铝)，树胶如琼脂、瓜尔胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶或黄蓍胶，羟基乙酸淀粉钠，膨润土，天然海绵，表面活性剂，树脂如阳离子交换树脂，柑橘浆，十二烷基硫酸钠，十二烷基硫酸钠与淀粉的组合，等等。

[0401] 在一些情况下，所述药物制剂包含填充剂，如乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉末、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预胶化淀粉、蔗糖、木糖醇、乳糖醇、甘露醇、山梨醇、氯化钠、聚乙二醇等。

[0402] 润滑剂和助流剂也任选地包含在本文所述的药物制剂中，用于预防、减少或抑制材料的粘附或摩擦。示例性的润滑剂包括例如硬脂酸，氢氧化钙，滑石，硬脂酰富马酸钠，烃如矿物油，或氢化植物油如氢化大豆油(Sterotex<sup>®</sup>)，高级脂肪酸及其碱金属和碱土金属盐，如铝、钙、镁、锌盐，硬脂酸，硬脂酸钠，甘油，滑石，蜡，Stearowet<sup>®</sup>，硼酸，苯甲酸钠，乙酸钠，氯化钠，亮氨酸，聚乙二醇(例如，PEG-4000)或甲氧基聚乙二醇如Carbowax<sup>™</sup>，油酸钠，苯甲酸钠，山萘酸甘油酯，聚乙二醇，十二烷基硫酸镁或十二烷基硫酸钠，胶体二氧化硅如Syloid<sup>™</sup>，Cab-O-Sil<sup>®</sup>，淀粉如玉米淀粉，硅油，表面活性剂，等等。

[0403] 增塑剂包括用来软化微胶囊化材料或膜涂层以使其更不易碎的化合物。合适的增塑剂包括例如聚乙二醇如PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350和PEG 800、硬脂酸、丙二醇、油酸、三乙基纤维素和三醋精。增塑剂也用作分散剂或润湿剂。

[0404] 增溶剂包括诸如三醋精、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、维生素E TPGS、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、正丁醇、异丙醇、胆固醇、胆汁盐、聚乙二醇200-600、四氢呋喃聚乙二醇醚(glycofurol)、二乙二醇单乙基醚(transcutol)、丙二醇和二甲基异山梨醇等化合物。

[0405] 稳定剂包括诸如任何抗氧化剂、缓冲液、酸、防腐剂等化合物。

[0406] 悬浮剂包括诸如聚乙烯吡咯烷酮如聚乙烯吡咯烷酮K12、聚乙烯吡咯烷酮K17、聚乙烯吡咯烷酮K25或聚乙烯吡咯烷酮K30、乙烯基吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物(S630)、聚乙二醇(例如，聚乙二醇具有约300至约6000，或约3350至约4000，或约7000至约5400的分子量)、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙酸硬脂酸羟甲基纤维素、聚山梨醇酯-80、羟乙基纤维素、藻酸钠、树胶如黄蓍胶和阿拉伯胶、瓜尔胶、黄原胶(包括黄原树胶)、糖、纤维素如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚山梨醇酯-80、藻酸钠、聚乙氧基化失水山梨醇单月桂酸酯、聚乙氧基化失水山梨醇单月桂酸酯、聚维酮等化合物。

[0407] 表面活性剂包括诸如十二烷基硫酸钠、多库酯钠、吐温60或80、三醋精、维生素E TPGS、失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆

(polaxomer)、胆汁盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物如Pluronic® (BASF) 等化合物。另外的表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油,例如聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油;以及聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚,例如辛苯昔醇(octoxynol) 10、辛苯昔醇40。有时,包含表面活性剂以增强物理稳定性或用于其他目的。

[0408] 粘度增强剂包括例如甲基纤维素、黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙酸硬脂酸羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、卡波姆、聚乙烯醇、藻酸盐、阿拉伯胶、壳聚糖及其组合。

[0409] 润湿剂包括诸如油酸、单硬脂酸甘油酯、失水山梨醇单油酸酯、失水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯、多库酯钠、油酸钠、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、三醋精、吐温80、维生素E TP GS、铵盐等化合物。

[0410] 治疗方案

[0411] 在一些实施方案中,施用本文所述的药物组合物用于治疗应用。在一些实施方案中,该药物组合物每天一次、每天两次、每天三次或更多次施用。该药物组合物每日、每天一次、每隔一天、每周五天、每周一次、每隔一周、每月两周、每月三周、每月一次、每月两次、每月三次或更多次施用。该药物组合物施用至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、2年、3年或更久。

[0412] 在一些实施方案中,一种或多种药物组合物同时、依次或间隔一段时间施用。在一些实施方案中,一种或多种药物组合物同时施用。在一些情况下,一种或多种药物组合物依次施用。在另外的情况下,一种或多种药物组合物间隔一段时间施用(例如,第一药物组合物的第一次施用在第一天,然后在施用至少第二药物组合物之前间隔至少1、2、3、4、5天或更多天)。

[0413] 在一些实施方案中,两种或更多种不同的药物组合物共同施用。在一些情况下,两种或更多种不同的药物组合物同时共同施用。在一些情况下,两种或更多种不同的药物组合物依次共同施用,而在施用之间没有时间间隔。在其他情况下,两种或更多种不同的药物组合物依次共同施用,在施用之间间隔约0.5小时、1小时、2小时、3小时、12小时、1天、2天或更久。

[0414] 在患者的状况确实得到改善的情况下,根据医生的判断,继续给予组合物的施用;或者,将所施用的组合物的剂量暂时减少或暂时暂停某一时间长度(即“休药期”)。在一些情况下,休药期的长度在2天与1年之间不等,仅举例而言,包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。休药期期间的剂量减少为10%-100%,仅举例而言,包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0415] 一旦患者的病况出现改善,如有必要,施用维持剂量。随后,可根据症状的变化,任选地将给药剂量或频率或两者降低至该疾病、病症或病况的改善得以保持的水平。

[0416] 在一些实施方案中,对应于这样的量的给定药剂的量根据诸如具体化合物、疾病严重程度、需要治疗的受试者或宿主的特征(例如,体重)等因素而变化,然而其仍然根据与该实例有关的具体情况以本领域已知的方式常规地确定,该具体情况包括例如所施用的具



体药剂、给药途径以及所治疗的受试者或宿主。在一些情况下,所需的剂量方便地以单剂量或以分剂量呈现,该分剂量同时(或在短时间段内)施用或以适当的间隔施用,例如每天2、3、4个或更多个亚剂量。

[0417] 前述范围仅为提示性的,因为关于个体治疗方案的变量的数量巨大,并且相距这些推荐值的相当大的偏差并不罕见。这样的剂量根据多个变量而改变,这些变量不限于所用化合物的活性、待治疗的疾病或病况、给药方式、受试个体的需求、所治疗的疾病或病况的严重程度以及执业医师的判断。

[0418] 在一些实施方案中,此类治疗方案的毒性和治疗功效通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序来确定,包括但不限于LD50(对群体的50%致死的剂量)和ED50(对群体的50%在治疗上有效的剂量)的确定。毒性效果与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且表示为LD50与ED50之比。优选表现出高治疗指数的化合物。使用从细胞培养试验和动物研究获得的数据来制定用于人类的剂量范围。此类化合物的剂量优选处于包含ED50且具有最小毒性的循环浓度范围内。根据所用的剂型和所用的给药途径,剂量在该范围内变化。

[0419] 试剂盒/制品

[0420] 在某些实施方案中,本文公开了与本文所述的一种或多种组合物和方法一起使用的试剂盒和制品。这样的试剂盒包括载具、包装或被区室化为接纳一个或多个容器如小瓶、管等的容器,每个容器包含将在本文所述的方法中使用的一个单独要素。合适的容器包括,例如,瓶、小瓶、注射器和试管。在一个实施方案中,容器由诸如玻璃或塑料等各种材料形成。

[0421] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶、管、袋、容器、瓶以及适于所选制剂及预期的给药和治疗方式的任何包装材料。

[0422] 例如,所述容器包含本文所述的靶核酸分子。这样的试剂盒任选地包含关于其在本文所述方法中的使用的标识性描述或标签或说明。

[0423] 试剂盒通常包括列出内容物的标签和/或使用说明书,以及具有使用说明的包装插页。通常也将会包括一套说明书。

[0424] 在一个实施方案中,标签处于容器上或与容器相关联。在一个实施方案中,当构成标签的字母、数字或其他字符附着、模制或蚀刻在容器本身上时,标签处于容器上;当标签存在于也容纳容器的接纳器或载具内(例如作为包装插页)时,标签与容器相关联。在一个实施方案中,标签用来指示内容物将用于具体治疗应用。标签也指示关于内容物诸如在本文所述方法中的使用的指导。

[0425] 在某些实施方案中,药物组合物在含有一个或多个单位剂型的包装或分配器装置中提供,该单位剂型含有本文提供的化合物。例如,该包装包含金属或塑料箔,如泡罩包装。在一个实施方案中,该包装或分配器装置伴随有给药说明书。在一个实施方案中,该包装或分配器还伴随有由监管药物制造、使用或销售的政府机构所规定形式的、与容器相关联的公告,该公告反映出该机构已批准该药物形式用于人类或兽医给药。这样的公告例如是由美国食品和药品管理局批准用于处方药的标记或已批准的产品插页。在一个实施方案中,还制备含有在相容性药物载体中配制的本文提供的化合物的组合物,将该组合物置于适当的容器中,并标出用于治疗所指示的病况。

[0426] 某些术语

[0427] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与所请求保护的主体所属领域的技术人员所一般理解的含义相同的含义。应当理解,前面的一般描述和以下详细描述均仅为示例性和说明性的,并非限制任何所请求保护的主体。在本申请中,除非另有具体说明,否则单数的使用包括复数。必须指出,如在本说明书和所附权利要求书中使用的,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物。在本申请中,除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括”以及其他形式如“包含”、“含有”和“具有”的使用是非限制性的。

[0428] 如本文所用的,范围和量可表示为“约”特定值或范围。“约”还包括准确量。因此,“约5 $\mu$ L”意指“约5 $\mu$ L”,并且还指“5 $\mu$ L”。通常,术语“约”包括预期在实验误差内的量。

[0429] 本文使用的章节标题仅用于组织结构的目的,而不应理解为限制所描述的主题。

[0430] 如本文所用的,术语“个体”、“受试者”和“患者”意指任何哺乳动物。在一些实施方案中,该哺乳动物为人。在一些实施方案中,该哺乳动物为非人类。这些术语均不要求或不限于以医疗保健工作者(例如,医生、注册护士、执业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作者)的监督(例如,持续或间歇性)为特征的情况。

[0431] 术语“治疗有效量”是指足以在哺乳动物受试者中提供所需治疗效果的多核酸分子缀合物的量。在一些情况下,该量是向患者(如人)的单次或多次给药剂量,以用于对病症进行治疗、预防、预防其发作、治愈、延迟、降低其严重程度、减轻病症的至少一种症状或病症的复发,或延长患者的生存期,超出在没有这种治疗的情况下所预期的生存期。自然地,用于提供治疗有效量的特定多核酸分子缀合物的剂量水平根据损伤的类型,受试者的年龄、体重、性别、医疗状况,病况的严重程度,给药途径,和所用的特定抑制剂而不同。在一些情况下,如本文所述,最初从细胞培养和动物模型中估计多核酸分子缀合物的治疗有效量。例如,在细胞培养方法中确定的IC<sub>50</sub>值任选地用作动物模型的起点,而在动物模型中确定的IC<sub>50</sub>值任选地用于在人类中寻找治疗有效剂量。

[0432] 骨骼肌,或随意肌,通常被腱固定到骨,并且通常用来实现骨骼运动如运动或保持姿势。尽管通常以无意识反射的方式维持对骨骼肌的某些控制(例如姿势肌或膈肌),但是骨骼肌对有意识的控制作出反应。在诸如食管、胃、肠、子宫、尿道和血管等器官和结构的壁中发现了平滑肌或不随意肌。

[0433] 骨骼肌进一步分为两大类:I型(或“慢肌”)和II型(或“快肌”)。I型肌纤维具有密集的毛细血管,并富含线粒体和肌红蛋白,这使I型肌肉组织具有特征性的红色。在一些情况下,I型肌纤维携带更多的氧气,并使用脂肪或碳水化合物作为燃料来维持有氧运动。I型肌纤维可长时间收缩,但力度很小。II型肌纤维进一步细分为三种主要的亚型(IIa、IIx和IIb),它们在收缩速度和产生的力上各不相同。II型肌纤维快速而有力地收缩,但很快疲劳,因此在肌肉收缩变得疼痛之前仅产生短暂的厌氧爆发活动。

[0434] 与骨骼肌不同,平滑肌不受意识控制。

[0435] 心肌也是不随意肌,但在结构上更类似于骨骼肌,并且仅在心脏中发现。心肌和骨骼肌是横纹肌的,因为它们含有被包装为成束的高度规则的排列的肌节。相反,平滑肌细胞的肌原纤维没有以肌节排列,因此没有横纹。

[0436] 肌细胞包括任何对肌肉组织有贡献的细胞。示例性的肌细胞包括成肌细胞、卫星细胞、肌管和肌原纤维组织。

[0437] 如本文所用的,肌力与横截面积(CSA)成比例,而肌肉速度与肌纤维长度成比例。因此,比较各种肌肉之间的横截面积和肌纤维能够提供肌萎缩的指征。测量肌肉力量和肌肉重量的各种方法在本领域中是已知的,例如,参见,Hazel M. Clarkson, "Musculoskeletal assessment: Joint range of motion and manual muscle strength" Lippincott Williams&Wilkins, 2000年出版。通过计算机轴向断层扫描和超声检查评估从选定的肌肉组织产生断层图像是测量肌肉质量的另外的方法。

[0438] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[0439] 1. 一种多核酸分子缀合物,其包含与多核酸分子缀合的抗体或其结合片段,所述多核酸分子与atrogene的靶序列杂交;其中所述多核酸分子包含至少一个2' 修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分;并且其中所述多核酸分子缀合物介导针对所述atrogene的RNA干扰,从而治疗受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良。

[0440] 2. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene包括IGF1-Akt-Fox0途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -Fox0途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内差异调节的基因。

[0441] 3. 根据实施方式2所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene是IGF1-Akt-Fox0途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -Fox0途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内下调的基因。

[0442] 4. 根据实施方式2所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene是IGF1-Akt-Fox0途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 $\alpha$ -Fox0途径、TNF $\alpha$ -NF $\kappa$ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内上调的基因。

[0443] 5. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene编码E3连接酶。

[0444] 6. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene编码叉头框转录因子。

[0445] 7. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogene包括atrogen-1基因(FBX032)、MuRF1基因(TRIM63)、FOX01、FOX03或MSTN。

[0446] 8. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述atrogen包括DMPK。

[0447] 9. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单结构域抗体(sdAb)或者骆驼科抗体或其结合片段。

[0448] 10. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述抗体或其结合片段是抗运铁蛋白受体抗体或其结合片段。

[0449] 11. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述多核酸分子包含有义链和反义链,并且其中所述有义链和反义链各自独立地包含至少一个2' 修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间连接或至少一个反向脱碱基部分。

[0450] 12. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述多核苷酸与atrogene的靶序列的至少8个连续碱基杂交。

[0451] 13. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述靶序列与SEQ ID NO: 28-141、370-480或703-3406所示的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%的序列同一性。

[0452] 14. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述多核苷酸的长度为约8个至约50个核苷酸,或长度为约10个至约30个核苷酸。

[0453] 15. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述有义链包含与SEQ ID NO: 142-255、481-591、3407-6110或8815-11518所示的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0454] 16. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述反义链包含与SEQ ID NO: 256-369、592-702、6111-8814或11519-14222所示的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0455] 17. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述多核酸分子缀合物包含将所述结合部分连接至所述多核苷酸的连接体。

[0456] 18. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述多核酸分子缀合物进一步包含聚合物,所述聚合物任选地通过另外的连接体间接缀合至所述多核苷酸。

[0457] 19. 根据实施方式17或18所述的多核酸分子缀合物,其中所述连接体和所述另外的连接体各自独立地是非聚合连接体。

[0458] 20. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述多核酸分子缀合物包含式(I)的分子:

[0459]  $A-X_1-B-X_2-C$

[0460] 式I

[0461] 其中,

[0462] A为抗体或其结合片段;

[0463] B为与atrogene的靶序列杂交的多核酸分子;

[0464] C为聚合物;且

[0465]  $X_1$ 和 $X_2$ 各自独立地选自键或非聚合连接体;并且

[0466] 其中A和C不连接至B的同一末端。

[0467] 21. 根据实施方式20所述的多核酸分子缀合物,其中C为聚乙二醇(PEG)。

[0468] 22. 根据实施方式20所述的多核酸分子缀合物,其中 $A-X_1$ 缀合至B的5'端,且 $X_2-C$ 缀合至B的3'端。

[0469] 23. 根据实施方式20所述的多核酸分子缀合物,其中 $X_2-C$ 缀合至B的5'端,且 $A-X_1$ 缀合至B的3'端。

[0470] 24. 根据实施方式20所述的多核酸分子缀合物,其中B包含有义链和反义链。

[0471] 25. 根据实施方式24所述的多核酸分子缀合物,其中A和C各自连接至所述有义链的不同末端。

[0472] 26. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述至少一个2'修饰的核苷酸包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、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)、T-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)修饰的核苷酸。

[0473] 27. 根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述至少一个2'修饰的核苷酸

包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。

[0474] 28.根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述至少一个修饰的核苷酸间连接包括硫代磷酸酯连接或二硫代磷酸酯连接。

[0475] 29.根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端。

[0476] 30.根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述肌萎缩是糖尿病相关的肌萎缩或癌症恶病质相关的肌萎缩。

[0477] 31.根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述肌萎缩与胰岛素缺乏相关、与慢性肾功能衰竭相关、与充血性心力衰竭相关、与慢性呼吸系统疾病相关、与慢性感染相关、与禁食相关、与去神经支配相关、与少肌症相关或与糖皮质激素治疗相关。

[0478] 32.根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述肌萎缩与1型强直性肌营养不良(DM1)相关。

[0479] 33.根据实施方式1所述的多核酸分子缀合物,其中所述强直性肌营养不良为DM1。

[0480] 34.一种药物组合物,其包含:

[0481] 实施方式1-33的多核酸分子缀合物;以及

[0482] 药学上可接受的赋形剂。

[0483] 35.根据实施方式34所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制为纳米颗粒制剂。

[0484] 36.根据实施方式34所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于肠胃外、口服、鼻内、经颊、直肠或经皮给药。

[0485] 37.一种治疗有需要的受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良的方法,其包括:

[0486] 向所述受试者施用治疗有效量的实施方式1-33的多核酸分子缀合物或实施方式34-36的药物组合物,以治疗所述受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良。

[0487] 38.根据实施方式37所述的方法,其中所述受试者是人。

[0488] 一种试剂盒,其包含实施方式1-33的多核酸分子缀合物或实施方式34-36的药物组合物。

#### [0489] 实施例

[0490] 提供这些实施例仅仅是为了说明目的,并非限制本文提供的权利要求的范围。

[0491] 实施例1.siRNA序列和合成

[0492] 所有siRNA单链均使用标准亚磷酸胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。所有siRNA过客链都在链的每一端含有不同形式的缀合柄,即C6-NH<sub>2</sub>和/或C6-SH。一个或多个缀合柄通过反向脱碱基磷酸二酯或硫代磷酸酯连接至siRNA过客链。以下是在体内实验中使用的格式的代表性结构。



[0494] 在过客链的5'端具有C6-NH<sub>2</sub>缀合柄且在3'端具有C6-SH的siRNA的代表性结构。

[0495]

[0496] 在5'端具有C6-NH<sub>2</sub>缀合柄且在3'端具有C6-S-PEG的siRNA过客链的代表性结构。

[0497]

[0498] 在5'端具有C6-NH<sub>2</sub>缀合柄且在3'端具有C6-S-NEM的siRNA过客链的代表性结构。

[0499]



[0500] 在5'端具有C6-N-SMCC缀合柄且在3'端具有C6-S-NEM的siRNA过客链的代表性结构。

[0501]



[0502] 在5'端具有PEG且在3'端具有C6-SH的siRNA过客链的代表性结构。

[0503]

[0504] 在5'端具有C6-S-NEM且在3'端具有C6-NH<sub>2</sub>缀合柄的siRNA过客链的代表性结构。

[0505] 胆固醇-肌肉生长抑制素siRNA缀合物

[0506] 指导/反义链的序列与对于MSTN的小鼠mRNA转录物开始于碱基位置1169的基因序列互补(UUAUUAUAUUGUGUUCUUGCCUU; SEQ ID NO:868)。使用碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有如以下图1所

述缀合的5'胆固醇。

[0507] 实施例2.通用实验方案和材料

[0508] 动物

[0509] 所有动物研究均按照机构动物管理和使用委员会 (IACUC) 的方案在Explora BioLabs进行,遵守USDA动物福利法案中概述的规定以及“实验动物管理和使用指南 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)” (国家研究委员会 (National Research Council) 出版物,第8版,2011年修订)。所有小鼠均获自Charles River Laboratories或Harlan Laboratories。

[0510] 通过静脉内 (iv) 注射向野生型CD-1小鼠 (4-6周龄) 给予指定的ASC (或抗体-核酸缀合物) 和剂量。

[0511] 抗运铁蛋白受体抗体

[0512] 抗小鼠运铁蛋白受体抗体或CD71 mAb是结合小鼠CD71或小鼠运铁蛋白受体1 (mTfR1) 的大鼠IgG2a亚类单克隆抗体。该抗体由BioXcell生产,并且可商购获得 (目录号BE0175)。

[0513] IgG2a同种型对照抗体

[0514] 大鼠IgG2a同种型对照抗体购自BioXcell (克隆2A3,目录号BE0089),该抗体对三硝基苯酚具有特异性,并且在小鼠中没有任何已知抗原。

[0515] 抗EGFR抗体

[0516] 抗EGFR抗体是针对人表皮生长因子受体 (EGFR) 的完全人IgG1 $\kappa$ 单克隆抗体。其在中国仓鼠卵巢细胞系DJT33中产生,该细胞系是通过用携带来源于产生人抗EGFR抗体的杂交瘤细胞系 (2F8) 的抗体基因的GS载体转染而从CHO细胞系CHO-K1SV衍生的。抗EGFR抗体的制备使用标准哺乳动物细胞培养和纯化技术。

[0517] 不含聚糖的抗EGFR抗体的理论分子量 (MW) 为146.6kDa。如通过质谱法确定的,该抗体的主要糖基化同种型的实验MW为149kDa。使用还原条件SDS-PAGE,发现轻链的MW约为25kDa,重链的MW约为50kDa。重链通过两个链间二硫键彼此连接,并且一条轻链通过单个链间二硫键连接至每条重链。轻链具有两个链内二硫键,而重链具有四个链内二硫键。该抗体在重链的Asn305处被聚糖进行N-连接的糖基化,该聚糖由N-乙酰基-葡萄糖胺、甘露糖、岩藻糖和半乳糖组成。存在的主要聚糖是含有零个或一个末端半乳糖残基的岩藻糖基化双触角结构。

[0518] 已经使用成像毛细管IEF、琼脂糖IEF和分析型阳离子交换HPLC研究了IgG1 $\kappa$ 抗体的带电荷的同种型模式。发现了多个带电荷的同种型,其中主要的同种型的等电点约为8.7。

[0519] 抗EGFR抗体的主要作用机制是对A431癌细胞中EGF诱导的EGFR磷酸化进行浓度依赖性抑制。另外,在临床前细胞体外研究中已经观察到在低抗体浓度下诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

[0520] siRNA效力和功效的体外评价

[0521] C2C12成肌细胞 (ATCC) 在补充有10% v/v FBS的DMEM中生长。为了进行转染,将细胞以10,000个细胞/孔的密度接种在24孔板中,并在24小时内转染。通过在被有2% v/v马血清的DMEM中孵育汇合的C2C12成肌细胞培养物3-4天来生成C2C12肌管。在分化期间和之后,



每天更换培养基。预分化的原代人骨骼肌细胞从ThermoFisher获得,并根据制造商的建议将其接种于含2% v/v马血清的DMEM中。使人SJCRH30横纹肌肉瘤成肌细胞(ATCC)在补充有10% v/v热灭活胎牛血清、4.5mg/mL葡萄糖、4mM L-谷氨酰胺、10mM HEPES和1mM丙酮酸钠的DMEM中生长。为了进行转染,将细胞以10,000-20,000个细胞/孔的密度接种在24孔板中,并在24小时内转染。使用RNAiMax (ThermoFisher),根据制造商的建议,用各种浓度的siRNA (0.0001-100nM; 10倍稀释) 转染所有细胞。将转染的细胞在5% CO<sub>2</sub>中于37°C下孵育2天,然后用PBS洗涤,并在300ul TRIzol (ThermoFisher) 中收获,并保存在-80°C。使用ZYMO 96孔RNA试剂盒(ThermoFisher) 制备RNA,并使用可商购获得的TaqMan探针(FifeTechnology) 通过RT-qPCR对相对RNA表达水平进行定量。使用 $\Delta\Delta CT$ 方法分析相对于Ppib表达归一化的表达数据,并以相对于模拟转染的细胞的%KD呈现。使用3参数剂量响应抑制函数(GraphPad Prism 7.02) 通过非线性回归分析数据。在这些实验条件下,所有敲减结果均显示观察到的最大KD。

[0522] 肌肉生长抑制素ELISA

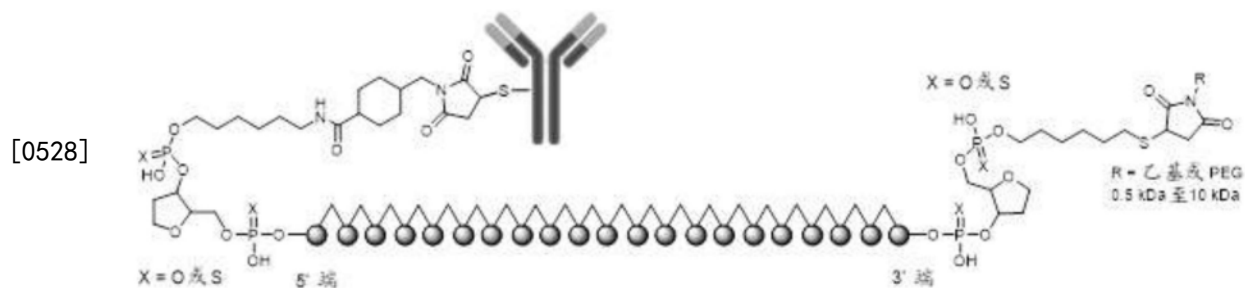
[0523] 使用来自R&D Systems的GDF-8 (Myostatin) Quantikine ELISA Immunoassay (货号DGDF80),根据制造商的说明,对血浆中的肌肉生长抑制素蛋白进行定量。

[0524] RISC加载测定

[0525] RISC从组织裂解物中的特异性免疫沉淀和免疫沉淀物中小RNA的定量通过茎-环PCR来确定,其采用Pei等人Quantitative evaluation of siRNA delivery in vivo. RNA (2010), 16:2553-2563所述的测定的改进。

[0526] 实施例3. 缀合物合成

[0527] 以下结构示出了本文所述的示例性A-X<sub>1</sub>-B-X<sub>2</sub>-Y (式I) 架构。



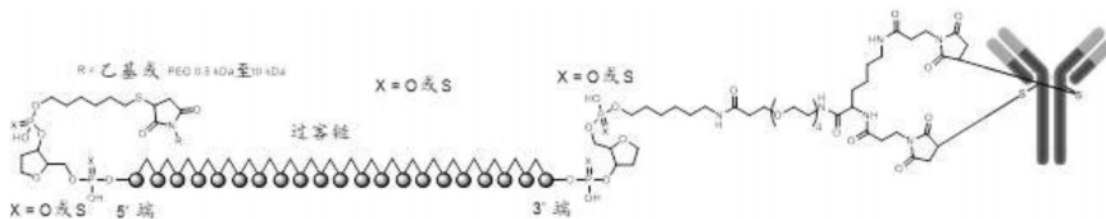
[0529] 架构-1: 抗体-Cys-SMCC-5'-过客链。该缀合物通过与过客链5'端马来酰亚胺(SMCC)的抗体链间半胱氨酸缀合而生成。



[0531] 架构-2: 抗体-Cys-SMCC-3'-过客链。该缀合物通过与过客链3'端马来酰亚胺(SMCC)的抗体链间半胱氨酸缀合而生成。

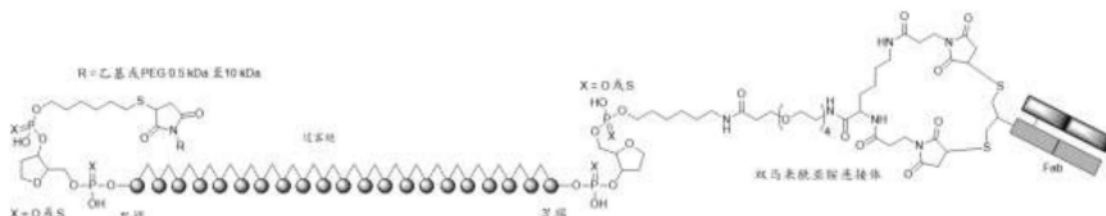


[0532]



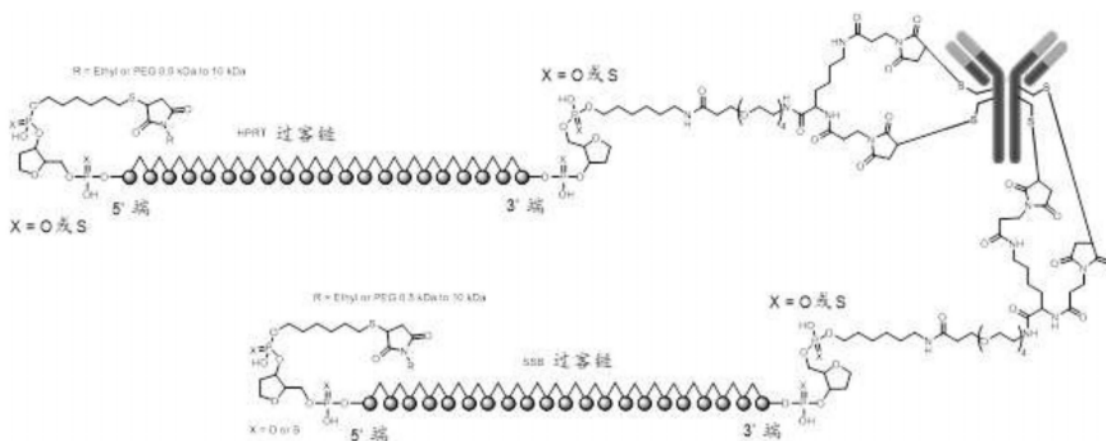
[0533] 架构-3: 抗体-Cys-bisMal-3'-过客链。该缀合物通过与过客链3'端双马来酰亚胺(bisMal)连接体的抗体链间半胱氨酸缀合而生成。

[0534]



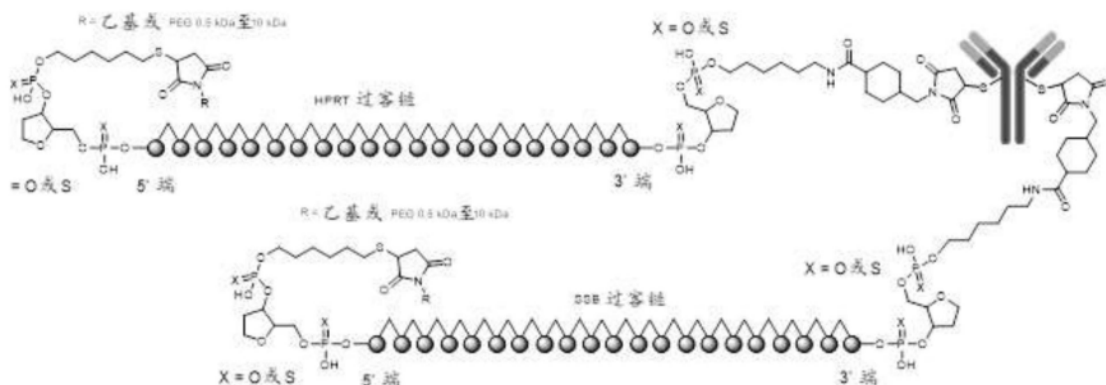
[0535] 架构-4: Fab-Cys-bisMal-3' 过客链的模型结构。该缀合物通过与过客链3'端双马来酰亚胺(bisMal)连接体的Fab链间半胱氨酸缀合而生成。

[0536]



[0537] 架构-5: 抗体siRNA缀合物的模型结构, 其中两个不同的siRNA与一个抗体分子连接。该缀合物通过将SSB和HPRT siRNA的混合物缀合至每个siRNA过客链3'端的双马来酰亚胺(bisMal)连接体与还原的mAb链间半胱氨酸而生成。

[0538]



[0539] 架构-6: 抗体siRNA缀合物的模型结构, 连接有两个不同的siRNA。该缀合物通过将SSB和HPRT siRNA的混合物缀合至每个siRNA过客链3'端的马来酰亚胺(SMCC)连接体与还原的mAb链间半胱氨酸而生成。

[0540] 实施例3.1使用SMCC连接体的抗体siRNA缀合物合成



[0541] 合成方案-1:通过抗体半胱氨酸缀合的抗体-Cys-SMCC-siRNA-PEG缀合物

[0542] 步骤1:用TCEP进行的抗体链间二硫化物还原

[0543] 用25mM硼酸盐缓冲液 (pH 8) 对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在水中的2当量TCEP,并在室温下旋转2小时。将所得反应混合物用含有5mM EDTA的pH 7.4PBS进行缓冲液交换,并在室温下添加至SMCC-C6-siRNA或SMCC-C6-siRNA-C6-NHCO-PEG-XkDa (2当量) (X=0.5kDa至10kDa) 在含有5mM EDTA的pH 7.4PBS中的溶液中,并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[0544] 步骤2:纯化

[0545] 使用如实施例3.4所述的阴离子交换色谱方法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR>2抗体-siRNA-PEG缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

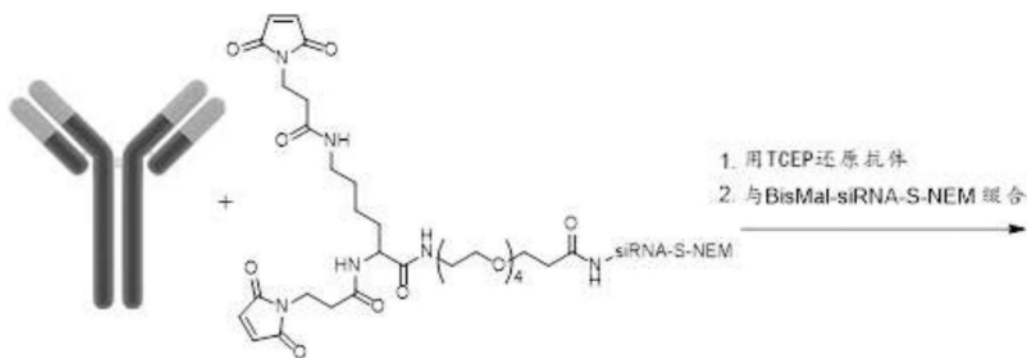
[0546] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0547] 通过SEC、SAX色谱法和SDS-PAGE来表征所分离的缀合物。使用阴离子交换色谱方法-2或阴离子交换色谱方法-3,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。两种方法均描述于实施例3.4中。所分离的DAR1缀合物在分析型SAX方法中通常在 $9.0 \pm 0.3$ min处洗脱,并且纯度大于90%。典型的DAR>2半胱氨酸缀合物含有超过85%的DAR2和少于15%的DAR3。

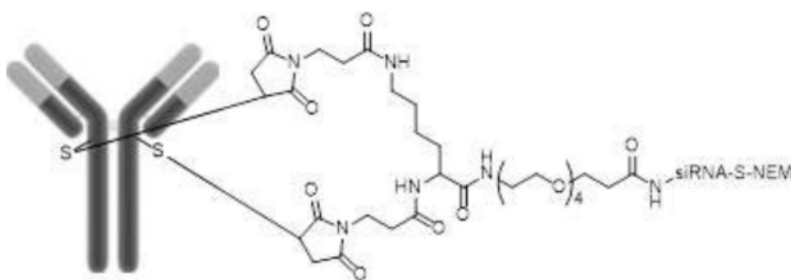
[0548] 图2示出了TfR mAb- (Cys) -HPRT-PEG5k, DAR1的SAX HPLC色谱图。

[0549] 图3示出了TfR mAb- (Cys) -HPRT-PEG5k, DAR1的SEC HPLC色谱图。

[0550] 实施例3.2.使用双马来酰亚胺 (BisMal) 连接体的抗体siRNA缀合物合成



[0551]



[0552] 合成方案-2:抗体-Cys-BisMal-siRNA-PEG缀合物

[0553] 步骤1:用TCEP还原抗体

[0554] 用25mM硼酸盐缓冲液 (pH 8) 对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液中加入在水中的2当量TCEP,并在室温下旋转2小时。将所得反应混合物用含有5mM EDTA的pH 7.4PBS进行交换,并在室温下添加至BisMal-C6-siRNA-C6-S-NEM(2当量)在含有5mM EDTA的pH 7.4PBS中的溶液中,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[0555] 步骤2:纯化

[0556] 使用阴离子交换色谱方法-1,通过AKTA explorer FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

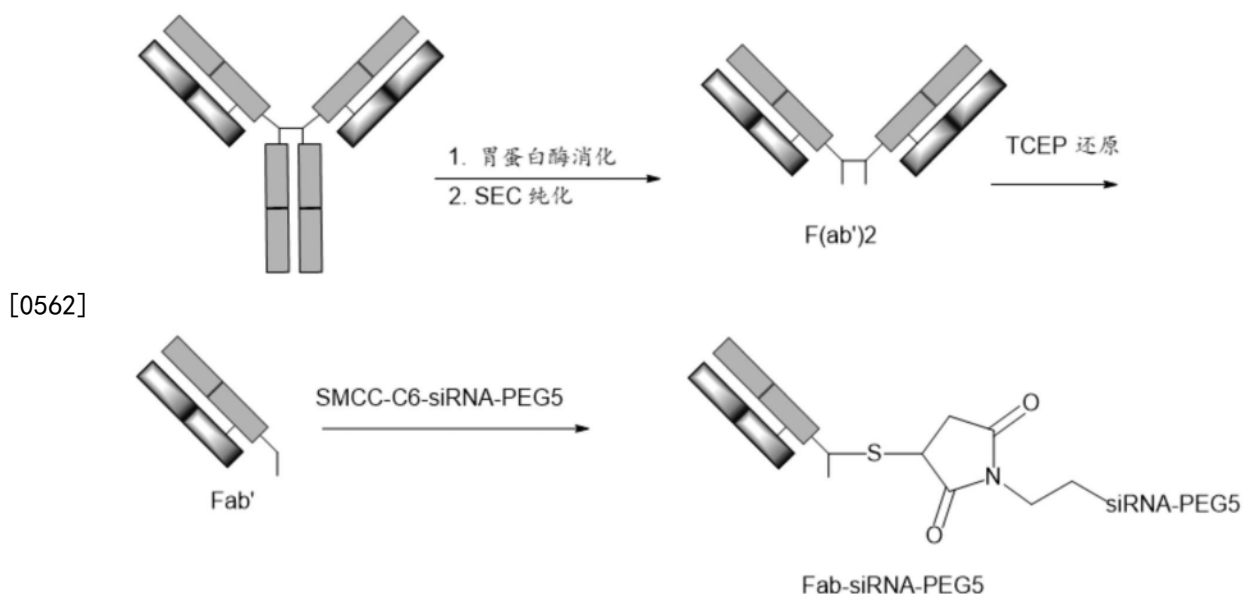
[0557] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0558] 通过质谱法或SDS-PAGE来表征所分离的缀合物。使用阴离子交换色谱方法-2或3以及大小排阻色谱方法-1,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[0559] 图4示出了TfR1mAb-Cys-BisMal-siRNA缀合物的DAR1和DAR2SAX HPLC色谱图的叠加。

[0560] 图5示出了TfR1mAb-Cys-BisMal-siRNA缀合物的DAR1和DAR2SEC HPLC色谱图的叠加。

[0561] 实施例3.3.从mAb生成Fab' 并与siRNA缀合



[0563] 方案-3: Fab-siRNA缀合物生成

[0564] 步骤1: 用胃蛋白酶消化抗体

[0565] 将抗体用pH 4.0的20mM乙酸钠/乙酸缓冲液进行缓冲液交换, 并使其浓度达到5mg/ml。添加固定化的胃蛋白酶(Thermo Scientific, 产品编号20343), 并在37℃下孵育3小时。使用30kDa MWC0 Amicon旋转过滤器和pH 7.4PBS来过滤反应混合物。收集保留物, 并使用大小排阻色谱法进行纯化以分离F(ab')<sub>2</sub>。然后用10当量的TCEP对收集的F(ab')<sub>2</sub>进行还原, 并在室温下于pH 7.4PBS中与SMCC-C6-siRNA-PEG5缀合。通过SAX色谱法对反应混合物的分析显示了Fab-siRNA缀合物以及未反应的Fab和siRNA-PEG。

[0566] 步骤2: 纯化

[0567] 使用阴离子交换色谱方法-1, 通过AKTA explorer FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2 Fab-siRNA缀合物的级分, 浓缩, 并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[0568] 步骤-3: 经纯化的缀合物的分析

[0569] 使用阴离子交换色谱方法-2或3以及SEC方法-1, 通过分析型HPLC评估所分离的缀合物的表征和纯度。

[0570] 图6示出了CD71 Fab-Cys-HPRT-PEG5的SEC色谱图。

[0571] 图7示出了CD71 Fab-Cys-HPRT-PEG5的SAX色谱图。

[0572] 实施例3.4. 纯化和分析方法

[0573] 阴离子交换色谱方法(SAX)-1.

[0574] 1. 柱: Tosoh Bioscience, TSKGel SuperQ-5PW, 21.5mm ID X 15cm, 13um

[0575] 2. 溶剂A: 20mM TRIS缓冲液, pH 8.0; 溶剂B: 20mM TRIS, 1.5M NaCl, pH 8.0; 流速: 6.0ml/min

[0576] 3. 梯度:

	a. %A	%B	柱体积
	b. 100	0	1.00
	c. 60	40	18.00
[0577]	d. 40	60	2.00
	e. 40	60	5.00
	f. 0	100	2.00
	g. 100	0	2.00

[0578] 阴离子交换色谱 (SAX) 方法-2

[0579] 1.柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X 250mm

[0580] 2.溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[0581] 3.梯度:

	a. 时间	%A	%B
	b. 0.0	90	10
	c. 3.00	90	10
[0582]	d. 11.00	40	60
	e. 13.00	40	60
	f. 15.00	90	10
	g. 20.00	90	10

[0583] 阴离子交换色谱 (SAX) 方法-3

[0584] 1.柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LCTM,4X 250mm

[0585] 2.溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl

[0586] 3.流速:0.75ml/min

[0587] 4.梯度:

	a. 时间	%A	%B
	b. 0.0	90	10
	c. 3.00	90	10
[0588]	d. 11.00	40	60
	e. 23.00	40	60
	f. 25.00	90	10
	g. 30.00	90	10

[0589] 大小排阻色谱 (SEC) 方法-1

[0590] 1.柱:TOSOH Biosciences,TSKgelG3000SW XL,7.8X 300mm,5 $\mu$ M

[0591] 2.流动相:150mM磷酸盐缓冲液

[0592] 3.流速:1.0ml/min,15min

[0593] 实施例4.体外筛选:Atrogin-1

[0594] 鉴定siRNA对小鼠和人/NHP atrogin-1的调节

[0595] 进行的生物信息学筛选鉴定出56种siRNA (19聚体),它们与小鼠atrogin-1 (Fbxo32;NM\_026346.3) 特异性结合。另外,还鉴定出靶向小鼠atrogin-1和人atrogin-1 (FBX032;NM\_058229.3) 的6种siRNA。针对特异性靶向人/NHP atrogin-1 (FBX032;NM\_058229.3) 的siRNA (19聚体) 的筛选产生52个候选物 (表2A-表2B)。所有选出的siRNA靶位点均不携带SNP (位置2-18)。

[0596] 表2A和表2B示出了用于调节小鼠和人/NHP atrogin-1的已鉴定的siRNA候选物。

[0597] 表2A.

[0598]

NM_026346.3 中的 19 聚体 位置	外显子#	小鼠	小鼠 x 人	NM_026346.3 中的总 23 聚体靶位点的序列	SEQ ID NO:
7	1	X		GGGCAGCGGCCCGGGAUAAAUAC	190
8	1	X		GGCAGCGGCCCGGGAUAAAUACU	191
499	2/3	X		AACCAAAACUCAGUACUCCAUC	192
553	3/4	X		UACGAAGGAGCGCCAUGGAUACU	193
590	4	X	X	GCUUUAACAGACUGGACUUCUC	194
631	4	X		CAGAAGAUUCAACUACGUAGUAA	195
694	5	X		GAGUGGCAUCGCCCCAAAAGACU	196
772	6	X		AAGACUUAUACGGGAACUUCUCC	197
1178	8	X		AAGCUUGUACGAUGUUACCCAAG	198
1179	8	X		AGCUUGUACGAUGUUACCCAAGA	199
1256	8/9	X	X	UGGAAGGGCACUGACCAUCCGUG	200
1258	8/9	X	X	GAAGGGCACUGACCAUCCGUGCA	201
1260	9	X	X	AGGGCACUGACCAUCCGUGCACG	202
1323	9	X		AAGACUUUAUCAAUUUGUUAAG	203
1401	9	X		GGGAGUCGGGACACUUCAUUUGU	204
1459	9	X		CGGGGGAUACGUCAUUGAGGAGA	205
1504	9	X		UUGCCGAUGGAAAUUACAAAUG	206
1880	9	X	X	CCACACAAUGGUCUACCUCUAAA	207

[0599]

1884	9	X	X	ACAAUGGUCUACCUCUAAAAGCA	208
2455	9	X		CUGAUAGAUGUGUUCGUCUAAA	209
2570	9	X		AUCUCAGGGCUUAAGGAGUUAU	210
2572	9	X		CUCAGGGCUUAAGGAGUUAUUC	211
2936	9	X		CUGAUUUGCAGGGUCUACAUCU	212
3006	9	X		CUGGUGGCCAAAUAAGUUGAAU	213
3007	9	X		UGGUGGCCAAAUAAGUUGAAU	214
3115	9	X		GAGAUUACAAACAUUGUAAACAG	215
3668	9	X		CAGCGCAAAACUAGUUAGCCAGU	216
3676	9	X		AACUAGUUAGCCAGUCUUACAGA	217
3715	9	X		AAGUCAUAUAGCAUCCAUAACAC	218
3800	9	X		UAGUAGGUGCUUGCAGGUUCUCC	219
3845	9	X		AUGGUAUGUGACACAACCGAAGA	220
3856	9	X		CACAACCGAAGAAUCGUUUGACG	221
4026	9	X		GGCAAGCAAGAUACCCAUAUUAG	222
4095	9	X		AGCUCUUAGGACAUUAAUAGUCU	223
4139	9	X		UGCAGGACUCCCAGACUAAAAC	224
4183	9	X		CCCAGAACUGCUAGUACAAAAGC	225
4203	9	X		AGCAAGAGGGGUGUGGCUAUAGA	226
4208	9	X		GAGGGGUGUGGCUAUAGAAGUUG	227
4548	9	X		GACCAUGUCGCUACUACCAUUGC	228
4554	9	X		GUCGCUACUACCAUUGCUUCAAG	229
4563	9	X		ACCAUUGCUUCAAGUGGGUAUCU	230
4567	9	X		UUGCUUCAAGUGGGUAUCUCAGU	231
4673	9	X		CUGGUUAGUGAUGAUCAACUUCA	232
4858	9	X		UGCCGCUUCAUACGGGAGAAAAA	233
4970	9	X		UCGGCUUCAACGCAUUGUUUAUU	234
5022	9	X		CUGCCUGGUUAUAAAGCAAUAC	235
5235	9	X		ACCUGUUAGUGCUUAAACAGACU	236
5237	9	X		CUGUUAGUGCUUAAACAGACUCA	237
5279	9	X		GGGGCAAACGCAGGGGUGUUACU	238
5292	9	X		GGGUGUUACUCUUUGAUUAUCA	239
5443	9	X		AUCCAGACUUUAGACCAAAAGG	240
5640	9	X		UUGUGGACGUGUGUAAAUAUCAUG	241
6000	9	X		UUCAUUGACCAACCAGUCUUAAG	242
6105	9	X		UGCCGCAACCUCCTAAGUCAUAU	243
6530	9	X		GAGUAUAGACAUGCGUGUUAACU	244



[0600]

6537	9	X		GACAUGCGUGUUAACUAUGCACA	245
6608	9	X		UUGGUUCCAUCUUUAUACCAAAU	246
6668	9	X		GUGUCUAAGCUUAGAAGCUUUA	247
6720	9	X		UGGGUUGAACACUUUAACUAAAC	248
6797	9	X		AUCUGAAUCCUGUAUAACUUAUU	249
6799	9	X		CUGAAUCCUGUAUAACUUAUUUG	250
6803	9	X		AUCCUGUAUAACUUAUUUGCACA	251
NM_058229.3 中的 19 聚体 位置		入+NHP		NM_058229.3 中的 23 聚体靶位点的序列	
586		x		UUCCAGAAGAUUUAACUACGUGG	252
589		x		CAGAAGAUUUAACUACGUGGUCC	253
1068		x		AGCGGCAGAUCCGCAAACGAUUA	254
1071		x		GGCAGAUCCGCAAACGAUUAUUU	255
1073		x		CAGAUCCGCAAACGAUUAUUUCU	256
1075		x		GAUCCGCAAACGAUUAUUUCUGU	257
1076		x		AUCCGCAAACGAUUAUUUCUGUC	258
1077		x		UCCGCAAACGAUUAUUUCUGUCA	259
1079		x		CGCAAACGAUUAUUUCUGUCAGA	260
1083		x		AACGAUUAUUUCUGUCAGACAAA	261
1127		x		AUGUAUUUCAAAACUUGUCCGAUG	262
1142		x		GUCCGAUGUUACCCAAGGAAAGA	263
1164		x		AGCAGUAUGGAGAUACCCUUCAG	264
1228		x		CCAUCCGUGCACUGCCAAUAACC	265
1254		x		AGAGCUGCUCGCUUUCACUUUCA	266
1361		x		UGGGAAUAUGGCAUUUGGACACU	267
1492		x		UGUGAACUUCUCACUAGAAUUGG	268
1500		x		UCUCACUAGAAUUGGUAUGGAAA	269
1563		x		CAGCAAGACUAUAAGGGCAAUAA	270
1566		x		CAAGACUAUAAGGGCAAUAAUUC	271
1635		x		UCUUAUAGUUCCCUAGGAAGAAA	272
1679		x		AUAGGACGCUUUGUUUACAAUGU	273
2487		x		UUUUCUUUAGGUCCAACAUCAAA	274
2488		x		UUUCUUUAGGUCCAACAUCAAAA	275
2582		x		AGGAGAGGUACCACAAGUUCAUC	276
2661		x		GAGGCAAUAUCAGCAGGUAACU	277
2663		x		GGCAAUAUCAGCAGGUAACUGU	278

[0601]

2790		x		UUUCCUACAACAAUGUACAUAUA	279
2999		x		AAGAGACAAGCUAUGAUACAACA	280
3875		x		GAAAUCAACCUUUAUGGUUCUCU	281
4036		x		GUGCCACGUGGUAUCUGUUAAGU	282
4039		x		CCACGUGGUAUCUGUUAAGUAUG	283
4059		x		AUGGCCAGAGCCUCACAUAUAAG	284
4062		x		GCCAGAGCCUCACAUAUAAGUGA	285
4065		x		AGAGCCUCACAUAUAAGUGAAGA	286
4117		x		AUAAUAGUCUAUAGAAUUUCUAU	287
4444		x		GCCUAGAGUCUCUUGAGAGUAAA	288
4653		x		GAAAGCAUCCCCAAUGUAUCAGU	289
4665		x		AAUGUAUCAGUUGUGAGAUGAUU	290
4787		x		CUACUAGCACUUGGGCAGUAAGG	291
5162		x		UUAACUAAACUCUAUCAUCAUUU	292
5261		x		CUGGCCUAAAAUCCUAUUAGUGC	293
5270		x		AAUCCUAUUAGUGCUUAAACAGA	294
5272		x		UCCUAUUAGUGCUUAAACAGACC	295
5338		x		UUUGAUUAUCUUGGGUCCUUGA	296
5737		x		UGGCUGUUAACGUUCCAUAUUA	297
5739		x		GCUGUUAACGUUCCAUAUUAAG	298
6019		x		CUCAGAGGUACAUAUUAAUCCAUC	299
6059		x		CAGGACCAGCUAUGAGAUUCAGU	300
6140		x		GGGGGAUUAUCCAUGAGGCAGC	301
6431		x		GGCUCCAAGCUGUAUUCUAUACU	302
6720		x		UUUGUACCAGACGGUGGCAUAUU	303

[0602] 表2B.

[0603]

NM_026346.3 中的19聚体 位置	外显 子#	有义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO:	反义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO:
7	1	GCAGCGGCCCGGGAU AAAU	304	AUUUAUCCCGGGCCG CUGC	418
8	1	CAGCGGCCCGGGUA AAUA	305	UAUUUAUCCCGGGCC GCUG	419
499	2/3	CCAAAACUCAGUACU UCCA	306	UGGAAGUACUGAGUU UUGG	420

[0604]

553	3/4	CGAAGGAGCGCCAUG GAUA	307	UAUCCAUGGCGCUCC UUCG	421
590	4	UUUCAACAGACUGGA CUUC	308	GAAGUCCAGUCUGUU GAAA	422
631	4	GAAGAUUCAACUACG UAGU	309	ACUACGUAGUUGAAU CUUC	423
694	5	GUGGCAUCGCCCAA AGAA	310	UUCUUUUGGGCGAUG CCAC	424
772	6	GACUUAUACGGGAAC UUCU	311	AGAAGUUCCCGUAUA AGUC	425
1178	8	GCUUGUACGAUGUUA CCCA	312	UGGGUAACAUCGUAC AAGC	426
1179	8	CUUGUACGAUGUUA CCAA	313	UUGGGUAACAUCGUA CAAG	427
1256	8/9	GAAGGGCACUGACCA UCCG	314	CGGAUGGUCAGUGCC CUUC	428
1258	8/9	AGGGCACUGACCAUC CGUG	315	CACGGAUGGUCAGUG CCCU	429
1260	9	GGCACUGACCAUCCG UGCA	316	UGCACGGAUGGUCAG UGCC	430
1323	9	GACUUUAUCAAUUUG UUCA	317	UGAACAAAUUGAUAA AGUC	431
1401	9	GAGUCGGGACACUUC AUUU	318	AAAUGAAGUGUCCCG ACUC	432
1459	9	GGGGAUACGUCAUUG AGGA	319	UCCUCAUGACGUUAU CCCC	433
1504	9	GCCGAUGGAAAUUUA CAAA	320	UUUGUAAAUUCCAUA CGGC	434
1880	9	ACACAAUGGUCUACC UCUA	321	UAGAGGUAGACCAUU GUGU	435
1884	9	AAUGGUCUACCUCUA AAAG	322	CUUUUAGAGGUAGAC CAUU	436
2455	9	GAUAGAUGUGUUCGU CUUA	323	UAAGACGAACACAUC UAUC	437
2570	9	CUCAGGGCUUAAGGA GUUA	324	UAACUCCUUAAGCCC UGAG	438
2572	9	CAGGGCUUAAGGAGU UAAU	325	AUUAACUCCUUAAGC CCUG	439

[0605]

2936	9	GAUUUGCAGGGUCUU ACAU	326	AUGUAAGACCCUGCA AAUC	440
3006	9	GGUGGCCAAAUAAG UUGA	327	UCAACUAAAUUUGGC CACC	441
3007	9	GUGGCCAAAUAAGU UGAA	328	UUCAACUAAAUUUGG CCAC	442
3115	9	GAUUACAAACAUUGU AACA	329	UGUUACAAUGUUUGU AAUC	443
3668	9	GCGCAAAACUAGUUA GCCA	330	UGGCUAACUAGUUUU GCGC	444
3676	9	CUAGUUAGCCAGUCU UACA	331	UGUAAGACUGGCUAA CUAG	445
3715	9	GUCAUAUAGCAUCCA UACA	332	UGUAUGGAUGCUAUA UGAC	446
3800	9	GUAGGUGCUUGCAGG UUCU	333	AGAACCUGCAAGCAC CUAC	447
3845	9	GGUAUGUGACACAAC CGAA	334	UUCGGUUGUGUCACA UACC	448
3856	9	CAACCGAAGAAUCGU UUGA	335	UCAAACGAUUCUUCG GUUG	449
4026	9	CAAGCAAGAUACCCA UAUU	336	AAUAUGGGUAUCUUG CUUG	450
4095	9	CUCUUAGGACAUUAA UAGU	337	ACUAUUA AUGUCCUA AGAG	451
4139	9	CAGGACUCCCAGACU UAAA	338	UUUAAGUCUGGGAGU CCUG	452
4183	9	CAGAACUGCUAGUAC AAAA	339	UUUUGUACUAGCAGU UCUG	453
4203	9	CAAGAGGGGUGUGGC UAUA	340	UAUAGCCACACCCCU CUUG	454
4208	9	GGGGUGUGGCUAUAG AAGU	341	ACUUCUAUAGCCACA CCCC	455
4548	9	CCAUGUCGCUACUAC CAUU	342	AAUGGUAGUAGCGAC AUGG	456
4554	9	CGCUACUACCAUUGC UUCA	343	UGAAGCAAUGGUAGU AGCG	457
4563	9	CAUUGCUUCAAGUGG GUAU	344	AUACCCACUUGAAGC AAUG	458

[0606]

4567	9	GCUUCAAGUGGGUAU CUCA	345	UGAGAUACCCACUUG AAGC	459
4673	9	GGUUAGUGAUGAUCA ACUU	346	AAGUUGAUCAUCACU AACC	460
4858	9	CCGCUUCAUACGGGA GAAA	347	UUUCUCCCGUAUGAA GCGG	461
4970	9	GGCUUCAACGCAUUG UUUA	348	UAAACAAUGCGUUGA AGCC	462
5022	9	GCCUGGUUAUAAAGC AAUA	349	UAUUGCUUUAUAACC AGGC	463
5235	9	CUGUUAGUGCUUAAA CAGA	350	UCUGUUUAAGCACUA ACAG	464
5237	9	GUUAGUGCUUAAACA GACU	351	AGUCUGUUUAAGCAC UAAC	465
5279	9	GGCAAACGCAGGGGU GUUA	352	UAACACCCUGCGUU UGCC	466
5292	9	GUGUUACUCUUUGAU AUAU	353	AUAUAUCAAAGAGUA ACAC	467
5443	9	CCCAGACUUUAGACC AAAA	354	UUUUGGUCUAAAGUC UGGG	468
5640	9	GUGGACGUGUGUAAA UUCA	355	UGAAUUUACACACGU CCAC	469
6000	9	CAUUGACCAACCAGU CUUA	356	UAAGACUGGUUGGUC AAUG	470
6105	9	CCGCAACCUCCCAAGU CAU	357	AUGACUUGGGAGGUU GCGG	471
6530	9	GUAUAGACAUGCGUG UUAA	358	UUAACACGCAUGUCU AUAC	472
6537	9	CAUGCGUGUUAACUA UGCA	359	UGCAUAGUUAACACG CAUG	473
6608	9	GGUCCAUCUUUAUA CCAA	360	UUGGUAUAAAGAUGG AACC	474
6668	9	GUCUAAGCUUAGAAG CUUU	361	AAAGCUUCUAAGCUU AGAC	475
6720	9	GGUUGAACACUUUAA CUAA	362	UUAGUUAAAGUGUUC AACC	476
6797	9	CUGAAUCCUGUAUAA CUUA	363	UAAGUUUAUACAGGAU UCAG	477

[0607]

6799	9	GAAUCCUGUAUAACU UAUU	364	AAUAAGUUAUACAGG AUUC	478
6803	9	CCUGUAUAACUUAUU UGCA	365	UGCAAAUAAGUUAUA CAGG	479
NM_0582 29.3 中的 19 聚体位 置		有义链序列 (5'-3')		反义链序列 (5'-3')	
586		CCAGAAGAUUUAACU ACGU	366	ACGUAGUAAAUCUU CUGG	480
589		GAAGAUUUAACUACG UGGU	367	ACCACGUAGUAAAU CUUC	481
1068		CGGCAGAUCCGCAAA CGAU	368	AUCGUUUGCGGAUCU GCCG	482
1071		CAGAUCCGCAAACGA UUA	369	UUAUUCGUUUGCGGA UCUG	483
1073		GAUCCGCAAACGAUU AAUU	370	AAUUAUUCGUUUGCG GAUC	484
1075		UCCGCAAACGAUUA UUCU	371	AGAAUUAUUCGUUUG CGGA	485
1076		CCGCAAACGAUUAU UCUG	372	CAGAAUUAUUCGUUU GCGG	486
1077		CGCAAACGAUUAUU CUGU	373	ACAGAAUUAUUCGUU UGCG	487
1079		CAAACGAUUAUUCU GUCA	374	UGACAGAAUUAUUCG UUUG	488
1083		CGAUUAUUCUGUCA GACA	375	UGUCUGACAGAAUUA AUCG	489
1127		GUAUUUCAAAACUUGU CCGA	376	UCGGACAAGUUUGAA AUAC	490
1142		CCGAUGUUACCCAAG GAAA	377	UUUCCUUGGGUAACA UCGG	491
1164		CAGUAUGGAGAUACC CUUC	378	GAAGGGUAUCUCCAU ACUG	492
1228		AUCCGUGCACUGCCA AUAA	379	UUAUUGGCAGUGCAC GGAU	493
1254		AGCUGCUCCGUUUCA CUUU	380	AAAGUGAAACGGAGC AGCU	494

[0608]

1361		GGAAUAUGGCAUUUG GACA	381	UGUCCAAAUGCCAUA UUCC	495
1492		UGAACUUCUCACUAG AAUU	382	AAUUCUAGUGAGAAG UUCA	496
1500		UCACUAGAAUUGGUA UGGA	383	UCCAUACCAAUUCUA GUGA	497
1563		GCAAGACUAUAAGGG CAAU	384	AUUGCCCUUAUAGUC UUGC	498
1566		AGACUAUAAGGGCAA UAAU	385	AUUAUUGCCCUUAUA GUCU	499
1635		UUAUAGUUCCCUAGG AAGA	386	UCUUCCUAGGGAACU AUA	500
1679		AGGACGCUUUGUUUA CAAU	387	AUUGUAAACAAAGCG UCCU	501
2487		UUCUUUAGGUCCAAC AUCA	388	UGAUGUUGGACCUA AGAA	502
2488		UCUUUAGGUCCAACA UCAA	389	UUGAUGUUGGACCUA AAGA	503
2582		GAGAGGUACCACAAG UUCA	390	UGAACUUGUGGUACC UCUC	504
2661		GGCAAUAUCAGCAG GUAA	391	UUACCUGCUGAUUU UGCC	505
2663		CAAUAUCAGCAGGU AACU	392	AGUUACCUGCUGAU UUUG	506
2790		UCCUACAACAAUGUA CAUA	393	UAUGUACAUGUUGU AGGA	507
2999		GAGACAAGCUAUGAU ACAA	394	UUGUAUCAUAGCUUG UCUC	508
3875		AAUCAACCUUUAUGG UUCU	395	AGAACCAUAAAGGU GAUU	509
4036		GCCACGUGGUAUCUG UUAA	396	UUAACAGAUACCACG UGGC	510
4039		ACGUGGUAUCUGUUA AGUA	397	UACUUAACAGAUACC ACGU	511
4059		GGCCAGAGCCUCACA UAUA	398	UAUAUGUGAGGCUCU GGCC	512
4062		CAGAGCCUCACAUAU AAGU	399	ACUUAUAUGUGAGGC UCUG	513

[0609]

4065		AGCCUCACAUAUAAG UGAA	400	UUCACUUAUAUGUGA GGCU	514
4117		AAUAGUCUAUAGAAU UUCU	401	AGAAAUUCUAUAGAC UAUU	515
4444		CUAGAGUCUCUUGAG AGUA	402	UACUCUCAAGAGACU CUAG	516
4653		AAGCAUCCCCAAUGU AUCA	403	UGAUACAUUGGGGAU GCUU	517
4665		UGUAUCAGUUGUGAG AUGA	404	UCAUCUCACAACUGA UACA	518
4787		ACUAGCACUUGGGCA GUAA	405	UUACUGCCCAAGUGC UAGU	519
5162		AACUAAACUCUAUCA UCAU	406	AUGAUGAUAGAGUUU AGUU	520
5261		GGCCUAAAAUCCUAU UAGU	407	ACUAAUAGGAUUUUA GGCC	521
5270		UCCUAUUAGUGCUUA AACA	408	UGUUUAAGCACUAU AGGA	522
5272		CUAUUAGUGCUUAAA CAGA	409	UCUGUUUAAGCACUA AUAG	523
5338		UGAUUAUUCUUGGGU CCUU	410	AAGGACCCAAGAUU AUAU	524
5737		GCUGUUAACGUUUC AUUU	411	AAAUGGAAACGUUAA CAGC	525
5739		UGUUAACGUUCCAU UUCA	412	UGAAAUGGAAACGUU AACA	526
6019		CAGAGGUACAUUUA UCCA	413	UGGAUUAAAUGUACC UCUG	527
6059		GGACCAGCUAUGAGA UUCA	414	UGAAUCUCAUAGCUG GUCC	528
6140		GGGAUUAUCCAUGA GGCA	415	UGCCUCAUGGAAUAA UCCC	529
6431		CUCCAAGCUGUAUUC UAUA	416	UAUAGAAUACAGCUU GGAG	530
6720		UGUACCAGACGGUGG CAUA	417	UAUGCCACCGUCUGG UACA	531

[0610] 在转染的小鼠C2C12成肌细胞、小鼠C2C12肌管、原代人骨骼肌细胞的预分化肌管和人SJCRH30横纹肌肉瘤成肌细胞中评价选出的atrogen-1siRNA。

[0611] 从62种鉴定的靶向小鼠atrogen-1的siRNA和52种靶向人atrogen-1的siRNA中, 分别选择30和20种siRNA进行合成和功能分析。在转染的小鼠C2C12成肌细胞、小鼠C2C12肌管、原代人骨骼肌细胞的预分化肌管和人SJCRH30横纹肌肉瘤成肌细胞中分析这些siRNA的



活性。

[0612] 在小鼠C2C12肌管中(10nM),没有一种靶向小鼠atrogen-1的受测siRNA表现出显著的活性,但是在C2C12成肌细胞中,有3种siRNA使小鼠atrogen-1mRNA下调了>75%(表3)。相反,靶向Murfl的siRNA仅在C2C12肌管中表达(图8),在C2C12肌管中有活性,证明了siRNA可以被转染到C2C12肌管中。为了确定atrogen-1是否可以在C2C12成肌细胞和肌管中选择性剪接,通过RT-qPCR对atrogen-1mRNA中的各个位置进行了探测,但产生了类似的结果。在靶向人atrogen-1的20种受测siRNA中,只有4种产生了>75%的KD。对于小鼠和人atrogen-1,活性siRNA都位于编码区内或附近。靶向小鼠atrogen-1的siRNA之一(1179)与人atrogen-1有强烈的交叉反应性。尽管该siRNA在小鼠C2C12肌管中未能显示出显著的活性,但它有效下调了人原代骨骼肌细胞肌管中的人atrogen-1。所有有效的siRNA均以亚纳摩尔效力下调其各自的靶标。

[0613] 表3示出了选出的atrogen-1siRNA在转染的小鼠C2C12成肌细胞、小鼠C2C12肌管、原代人骨骼肌细胞的预分化肌管和人SJCRH30横纹肌肉瘤成肌细胞中的活性。关于实验程序,参见实施例2。

[0614]

mu atrogen-1 NM_026346.3 ID#	muC2C12 肌管 %KD (10 nM)	muC2C12 成肌细胞 %KD	muC2C12 成肌细胞 IC50(nM)	huSkMC 肌管%KD	huSkMC 肌管 IC50(nM)	huSJCRH30 成肌细 胞%KD	huSJCRH30 成肌细 胞 IC50 (nM)
8	无 KD	无 KD					
499	8.5	34.4					

[0615]

553	9.7	10.6					
590	10.1	30.5	0.628	62.8			
631	14.4	83.7	0.159	81.5	0.129	54.5	0.614
694	10.2	50.5	1.228	72.4	0.011	64.6	0.004
772	8.8	64.7	0.872				0.084
1179	7.2	76.6	0.160	88.5	0.010	86.0	0.015
1256	2.7	32.5					
1260	无 KD	13.6					
1459	16.1	60.8	0.258	24.4	1.714		
1504	12.8	76.8	0.092	29.1	0.433	17.3	0.423
1880	14.3	58.6	0.192	66.5			
1884	7.7	54.6	0.135	54.8			0.002
2572	13.7	61.5	0.928	16.0	2.664	18.4	0.027
3007	14.4	32.7					
3668	1.4	6.9					
3715	0.7	17.2					
3856	无 KD	5.9					
4139	2.7	10.5					
4567	12.8	56.1	1.589	0.0		37.2	1.028
4673	11.6	34.9					
4970	15.6	35.7					
5292	20.3	49.6	0.106	19.3	0.441	11.2	0.02
5640	13.6	40.4					
6000	19.7	21.2					
6530	3.5	无 KD					
6608	7.4	无 KD					
6720	17.5	无 KD					
6799	15.4	无 KD					
hu atrogin-1 NM_058229.3 ID#	muC2C12 肌管 %KD(10 nM)	muC2C12 成肌细胞 %KD	muC2C12 成肌细胞 IC50(nM)	huSkMC 肌管%KD	huSkMC 肌管 IC50(nM)	huSJCRH30 成肌细胞 %KD	huSJCRH30 成肌细胞 IC50 (nM)
586		66.1	0.326	89.9	0.008	90.6	0.011

[0616]	1071		0.0	无 KD	55.9			
	1077		14.4	1.774	93.9	0.009	93.9	0.016
	1083		无 KD	无 KD	92.8	0.047	92.2	0.056
	1361		无 KD		80.1	0.003	81.4	0.118
	1566				49.9			
	1679		15.1	1.471	55.8			
	2582				46.2			
	2663		无 KD	无 KD	64.2			
	2999		无 KD	无 KD	55.0			
	4036		无 KD	0.200	64.7			
	4059				3.2			
	4117		24.2	1.541	68.0			
	5162				15.7			
	5261				44.4			
	5272				47.4			
	5737		无 KD	无 KD	60.8			
	6019				44.4			
	6059		无 KD	无 KD	57.6			
	6431		无 KD	无 KD	65.0			

[0617] 实施例5. 体外筛选:MuRF-1

[0618] 靶向小鼠Murf1 (Trim63) 和/或人/NHP MuRF1 (TRIM63) 的siRNA的鉴定

[0619] 进行了生物信息学筛选,并鉴定出51种与小鼠Murf1序列特异性结合的siRNA (19聚体),这些序列显示出超过3个从小鼠Murf2 (Trim55;NM\_001039048.2) 或Murf3 (Trim54) 的序列衍生。另外,还鉴定出靶向小鼠Murf1和人MuRF1 (TRIM63;NM\_032588.3) 的9种siRNA。针对特异性靶向人和NHP MuRF1 (MuRF1;NM\_032588.3) 的siRNA (19聚体) 的筛选产生52个候选物 (表4A-表4B)。所有选出的siRNA靶位点均不携带SNP (位置2-18)。

[0620] 表4A和表4B示出了用于调节小鼠和人/NHP MuRF1的已鉴定的siRNA候选物。

[0621] 表4A

[0622]

NM_00103904 8.2 中的 19 聚 体位置	外显子 #	小鼠	小鼠 X 入	NM_001039048.2 中的总 23 聚体靶位 点的序列	SEQ ID NO:
33	1	x		GAGGAUCCGAGUGGGUUUGGAGA	532
82	1	x		CGAGACAGUCGCAUUUCAAGCA	533
109	1	x		GGAUUUAUAAAUCUAGCCUGAUUC	534
130	1	x		UCCUGAUGGAAACGCUAUGGAGA	535
264	2	x		AGGCUGCGAAUCCCUACUGGACC	536
318	2	x		GUCGUUUCGUGGCCCCUCGUGC	537
328	2	x		UUGCCCCUCGUGCCGCCAUGAAG	538
329	2	x		UGCCCCUCGUGCCGCCAUGAAGU	539
330	2	x		GCCCCUCGUGCCGCCAUGAAGUG	540
337	2	x		GUGCCGCCAUGAAGUGAUGG	541
346	2	x		UGAAGUGAUGGACCGGCACG	542
423	2/3	x	X	AGCAGGAGUGCUCCAGUCGGCCC	543
457	3	x		CAGCCACCCGAUGUGCAAGGAAC	544
460	3	x		CCACCCGAUGUGCAAGGAACACG	545
495	3	x	X	UCAACAUCUACUGUCUCACGUGU	546
497	3	x		AACAUCUACUGUCUCACGUGUGA	547
499	3	x	X	CAUCUACUGUCUCACGUGUGAGG	548
500	3	x	X	AUCUACUGUCUCACGUGUGAGGU	549
502	3	x	X	CUACUGUCUCACGUGUGAGGUGC	550
505	3	x	X	CUGUCUCACGUGUGAGGUGCCUA	551
507	3	x		GUCUCACGUGUGAGGUGCCUACU	552
511	3	x		CACGUGUGAGGUGCCUACUUGCU	553
538	3	x		GUGCAAGGUGUUUGGGGCUCACC	554
609	4	x		CUGAGCUGAGUAACUGCAUCUCC	555
616	4	x		GAGUAACUGCAUCUCCAUGCUGG	556
646	4	x		CAACGACCGAGUGCAGACGAUCA	557
651	4	x		ACCGAGUGCAGACGAUCAUCUCU	558
787	5	x	X	GCUGCAGCGGAUCACGCAGGAGC	559
790	5	x		GCAGCGGAUCACGCAGGAGCAGG	560

[0623]

911	5	x		GAGCCCGGAGGGGCUACCUUCCU	561
1012	7	x		UGAGAACAUGGACUACUUUACUC	562
1016	7	x		AACAUGGACUACUUUACUCUGGA	563
1018	7	x		CAUGGACUACUUUACUCUGGACU	564
1022	7	x		GACUACUUUACUCUGGACUUAGA	565
1130	8	x		GAGGAAGAGGGCGUGACCACAGA	566
1266	9	x		UACAAUAGGGAAGUGUGUCUUCU	567
1351	9	x		ACACAAUUGGAAAUGUAUCCAAA	568
1364	9	x		UGUAUCCAAAACGUCACAGGACA	569
1366	9	x		UAUCCAAAACGUCACAGGACACU	570
1369	9	x		CCAAAACGUCACAGGACACUUUU	571
1380	9	x		CAGGACACUUUUCUACGUUGGUG	572
1386	9	x		ACUUUUCUACGUUGGUGCGAAAU	573
1387	9	x		CUUUUCUACGUUGGUGCGAAAUG	574
1390	9	x		UUCUACGUUGGUGCGAAAUGAAA	575
1391	9	x		UCUACGUUGGUGCGAAAUGAAAU	576
1393	9	x		UACGUUGGUGCGAAAUGAAAUAU	577
1397	9	x		UUGGUGCGAAAUGAAAUAUUUUG	578
1454	9	x	X	UAUAUGUAUGCCAAUUUGGUGCU	579
1458	9	x	X	UGUAUGCCAAUUUGGUGCUUUUU	580
1460	9	x		UAUGCCAAUUUGGUGCUUUUUGU	581
1462	9	x		UGCCAAUUUGGUGCUUUUUGUAC	582
1466	9	x		AAUUUGGUGCUUUUUGUACGAGA	583
1478	9	x		UUUGUACGAGAACUUUUGUAUGA	584
1480	9	x		UGUACGAGAACUUUUGUAUGAUC	585
1481	9	x		GUACGAGAACUUUUGUAUGAUCA	586
1483	9	x		ACGAGAACUUUUGUAUGAUCACG	587
1520	9	x		GACUGGCGAUUGUCACAAAGUGG	588
1658	9	x		GGAUAGGACUGAAUUUGUGUUAU	589
1660	9	x		AUAGGACUGAAUUUGUGUUAUAU	590
NM_032588. 3 中的 19 聚 体位置		入 + NHP		NM_032588.3 中的总 23 聚体靶位点的 序列	

[0624]

28		X		GGAAGCCAACAGGAUCCGACCCG	591
75		X		CCCAGGUCUACUUAGAGCAAAGU	592
77		X		CAGGUCUACUUAGAGCAAAGUUA	593
153		X		AGUCGAGCCUGAUCCAGGAUGGG	594
239		X		CCAGUGGUCAUCUUGCCGUGCCA	595
245		X		GUCAUCUUGCCGUGCCAGCACAA	596
248		X		AUCUUGCCGUGCCAGCACAAACCU	597
249		X		UCUUGCCGUGCCAGCACAAACCUG	598
259		X		CCAGCACAAACCUGUGCCGGAAGU	599
339		X		UGUCCAUGUCUGGAGGCCGUUUC	600
367		X		CCCCACCUGCCGCCACGAGGUGA	601
368		X		CCCACCUGCCGCCACGAGGUGAU	602
370		X		CACCUGCCGCCACGAGGUGAUCA	603
371		X		ACCUGCCGCCACGAGGUGAUCAU	604
372		X		CCUGCCGCCACGAGGUGAUCAUG	605
373		X		CUGCCGCCACGAGGUGAUCAUGG	606
374		X		UGCCGCCACGAGGUGAUCAUGGA	607
375		X		GCCGCCACGAGGUGAUCAUGGAU	608
379		X		CCACGAGGUGAUCAUGGAUCGUC	609
380		X		CACGAGGUGAUCAUGGAUCGUCA	610
381		X		ACGAGGUGAUCAUGGAUCGUCAC	611
384		X		AGGUGAUCAUGGAUCGUCACGGA	612
385		X		GGUGAUCAUGGAUCGUCACGGAG	613
386		X		GUGAUCAUGGAUCGUCACGGAGU	614
387		X		UGAUCAUGGAUCGUCACGGAGUG	615
451		X		CAUCUACAAACAGGAGUGCUGCA	616
458		X		AAACAGGAGUGCUGCCAGUCGGCC	617
459		X		AACAGGAGUGCUGCCAGUCGGCCG	618
461		X		CAGGAGUGCUGCCAGUCGGCCGCU	619
491		X		GGCAGUCACCCCAUGUGCAAGGA	620
499		X		CCCAUGUGCAAGGAGCACGAAG	621
503		X		AUGUGCAAGGAGCACGAAGAUGA	622
531		X		UCAACAUCUACUGUCUCACGUGU	623

[0625]

535		X		CAUCUACUGUCUCACGUGUGAGG	624
539		X		UACUGUCUCACGUGUGAGGUGCC	625
564		X		CCUGCUCCAUGUGCAAGGUGUUU	626
568		X		CUCCAUGUGCAAGGUGUUUGGGA	627
610		X		GGCCCCAUUGCAGAGUGUCUCC	628
612		X		CCCCAUUGCAGAGUGUCUCCAG	629
645		X		CUGAACUGAAUAACUGUAUCUCC	630
647		X		GAACUGAAUAACUGUAUCUCCAU	631
670		X		GCUGGUGGCGGGGAAUGACCGUG	632
671		X		CUGGUGGCGGGGAAUGACCGUGU	633
672		X		UGGUGGCGGGGAAUGACCGUGUG	634
673		X		GGUGGCGGGGAAUGACCGUGUGC	635
812		X		AAAAGUGAGUUGCUGCAGCGGAU	636
860		X		AGCUUCAUCGAGGCCCUCAUCCA	637
968		X		CUCUUGACUGCCAAGCAACUCAU	638
970		X		CUUGACUGCCAAGCAACUCAUCA	639
977		X		GCCAAGCAACUCAUCAAAGCAU	640
979		X		CAAGCAACUCAUCAAAGCAUUG	641
980		X		AAGCAACUCAUCAAAGCAUUGU	642

[0626] 表4B

[0627]

NM_00103904 8.2 中的 19 聚 体位置	外显子 #	有义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO:	反义链序列 (5'-3')	SEQ ID NO:
33	1	GGAUCCGAGUGGGUUU GGA	643	UCCAAACCCACUCGGA UCC	754
82	1	AGACAGUCGCAUUUCA AAG	644	CUUUGAAAUGCGACUG UCU	755
109	1	AUUAUAAAUCUAGCCU GAU	645	AUCAGGCUAGAUUUUAU AAU	756
130	1	CUGAUGGAAACGCUAU GGA	646	UCCAUAGCGUUUCCAU CAG	757
264	2	GCUGCGAAUCCCUACU GGA	647	UCCAGUAGGGAUUCGC AGC	758

[0628]

318	2	CGUUUCCGUUGCCCCU CGU	648	ACGAGGGGCAACGGAA ACG	759
328	2	GCCCCUCGUGCCGCCA UGA	649	UCAUGGCGGCACGAGG GGC	760
329	2	CCCCUCGUGCCGCCAU GAA	650	UUCAUGGCGGCACGAG GGG	761
330	2	CCCUCGUGCCGCCAUG AAG	651	CUUCAUGGCGGCACGA GGG	762
337	2	GCCGCCAUGAAGUGAU CAU	652	AUGAUCACUUAUGGC GGC	763
346	2	AAGUGAUAUGGACCG GCA	653	UGCCGGUCCAUGAUA CUU	764
423	2 月 3 日	CAGGAGUGCUCACAGUC GGC	654	GCCGACUGGAGCACUC CUG	765
457	3	GCCACCCGAUGUGCAA GGA	655	UCCUUGCACAUCGGGU GGC	766
460	3	ACCCGAUGUGCAAGGA ACA	656	UGUCCUUGCACAUCG GGU	767
495	3	AACAUCUACUGUCUCA CGU	657	ACGUGAGACAGUAGAU GUU	768
497	3	CAUCUACUGUCUCACG UGU	658	ACACGUGAGACAGUAG AUG	769
499	3	UCUACUGUCUCACGUG UGA	659	UCACACGUGAGACAGU AGA	770
500	3	CUACUGUCUCACGUGU GAG	660	CUCACACGUGAGACAG UAG	771
502	3	ACUGUCUCACGUGUGA GGU	661	ACCUCACACGUGAGAC AGU	772
505	3	GUCUCACGUGUGAGGU GCC	662	GGCACCUCACACGUGA GAC	773
507	3	CUCACGUGUGAGGUGC CUA	663	UAGGCACCUCACACGU GAG	774
511	3	CGUGUGAGGUGCCUAC UUG	664	CAAGUAGGCACCUCAC ACG	775
538	3	GCAAGGUGUUUGGGGC UCA	665	UGAGCCCCAAACACCU UGC	776



[0629]

609	4	GAGCUGAGUACUGCA UCU	666	AGAUGCAGUUACUCAG CUC	777
616	4	GUAACUGCAUCUCCA GCU	667	AGCAUGGAGAUGCAGU UAC	778
646	4	ACGACCGAGUGCAGAC GAU	668	AUCGUCUGCACUCGGU CGU	779
651	4	CGAGUGCAGACGAUCA UCU	669	AGAUGAUCGUCUGCAC UCG	780
787	5	UGCAGCGGAUCACGCA GGA	670	UCCUGCGUGAUCCGCU GCA	781
790	5	AGCGGAUCACGCAGGA GCA	671	UGCUCUGCGUGAUCC GCU	782
911	5	GCCCGGAGGGGCUACC UUC	672	GAAGGUAGCCCCUCCG GGC	783
1012	7	AGAACAUGGACUACUU UAC	673	GUAAAGUAGUCCAUGU UCU	784
1016	7	CAUGGACUACUUUACU CUG	674	CAGAGUAAAGUAGUCC AUG	785
1018	7	UGGACUACUUUACUCU GGA	675	UCCAGAGUAAAGUAGU CCA	786
1022	7	CUACUUUACUCUGGAC UUA	676	UAAGUCCAGAGUAAAG UAG	787
1130	8	GGAAGAGGGCGUGACC ACA	677	UGUGGUCACGCCCUCU UCC	788
1266	9	CAAUAGGGAAGUGUG UCUU	678	AAGACACACUUCCCUA UUG	789
1351	9	ACAAUUGGAAAUGUA UCCA	679	UGGAUACAUUCCAAU UGU	790
1364	9	UAUCCAAAACGUCACA GGA	680	UCCUGUGACGUUUUGG AUA	791
1366	9	UCCAAAACGUCACAGG ACA	681	UGUCCUGUGACGUUUU GGA	792
1369	9	AAAACGUCACAGGACA CUU	682	AAGUGUCCUGUGACGU UUU	793
1380	9	GGACACUUUUCUACGU UGG	683	CCAACGUAGAAAAGUG UCC	794
1386	9	UUUUCUACGUUGGUGC GAA	684	UUCGCACCAACGUAGA AAA	795

[0630]

1387	9	UUUCUACGUUGGUGCG AAA	685	UUUCGCACCAACGUAG AAA	796
1390	9	CUACGUUGGUGCGAAA UGA	686	UCAUUUCGCACCAACG UAG	797
1391	9	UACGUUGGUGCGAAAU GAA	687	UUCAUUUCGCACCAAC GUA	798
1393	9	CGUUGGUGCGAAAUGA AAU	688	AUUUCAUUUCGCACCA ACG	799
1397	9	GGUGCGAAAUGAAAU AUUU	689	AAAUUUUCAUUUCGC ACC	800
1454	9	UAUGUAUGCCAAUUUG GUG	690	CACCAAAUUGGCAUAC AUA	801
1458	9	UAUGCCAAUUUGGUGC UUU	691	AAAGCACCAAAUUGGC AUA	802
1460	9	UGCCAAUUUGGUGCUU UUU	692	AAAAAGCACCAAAUUG GCA	803
1462	9	CCAAUUUGGUGCUUUU UGU	693	ACAAAAAGCACCAAAU UGG	804
1466	9	UUUGGUGCUUUUUGU ACGA	694	UCGUACAAAAAGCACC AAA	805
1478	9	UGUACGAGAACUUUUG UAU	695	AUACAAAAGUUCUCGU ACA	806
1480	9	UACGAGAACUUUUGUA UGA	696	UCAUACAAAAGUUCUC GUA	807
1481	9	ACGAGAACUUUUGUAU GAU	697	AUCAUACAAAAGUUCU CGU	808
1483	9	GAGAACUUUUGUAUG AUCA	698	UGAUCAUACAAAAGUU CUC	809
1520	9	CUGGCGAUUGUCACAA AGU	699	ACUUUGUGACAAUCGC CAG	810
1658	9	AUAGGACUGAAUUUG UGUU	700	AACACAAAUUCAGUCC UAU	811
1660	9	AGGACUGAAUUUGUG UUAU	701	AUAACACAAAUUCAGU CCU	812
NM_0325 88.3 中的 19 聚体位 置		有义链序列 (5'-3')		反义链序列 (5'-3')	

[0631]

28		AAGCCAACAGGAUCCG ACC	702	GGUCGGAUCCUGUUGG CUU	813
75		CAGGUCUACUUAGAGC AAA	703	UUUGCUCUAAGUAGAC CUG	814
77		GGUCUACUUAGAGCAA AGU	704	ACUUUGCUCUAAGUAG ACC	815
153		UCGAGCCUGAUCCAGG AUG	705	CAUCCUGGAUCAGGCU CGA	816
239		AGUGGUCAUCUUGCCG UGC	706	GCACGGCAAGAUGACC ACU	817
245		CAUCUUGCCGUGCCAG CAC	707	GUGCUGGCACGGCAAG AUG	818
248		CUUGCCGUGCCAGCAC AAC	708	GUUGUGCUGGCACGGC AAG	819
249		UUGCCGUGCCAGCACA ACC	709	GGUUGUGCUGGCACGG CAA	820
259		AGCACAACCUGUGCCG GAA	710	UUCCGGCACAGGUUGU GCU	821
339		UCCAUGUCUGGAGGCC GUU	711	AACGGCCUCCAGACAU GGA	822
367		CCACCUGCCGCCACGA GGU	712	ACCUCGUGGCGGCAGG UGG	823
368		CACCUGCCGCCACGAG GUG	713	CACCUCGUGGCGGCAG GUG	824
370		CCUGCCGCCACGAGGU GAU	714	AUACCUCGUGGCGGC AGG	825
371		CUGCCGCCACGAGGUG AUC	715	GAUACCUCGUGGCGG CAG	826
372		UGCCGCCACGAGGUGA UCA	716	UGAUCACCUCGUGGCG GCA	827
373		GCCGCCACGAGGUGAU CAU	717	AUGAUCACCUCGUGGC GGC	828
374		CCGCCACGAGGUGAUC AUG	718	CAUGAUCACCUCGUGG CGG	829
375		CGCCACGAGGUGAUCA UGG	719	CCAUGAUCACCUCGUG GCG	830
379		ACGAGGUGAUGGAUGA UCG	720	CGAUCCAUGAUCACCU CGU	831

[0632]

380		CGAGGUGAUCAUGGAU CGU	721	ACGAUCCAUGAUCACC UCG	832
381		GAGGUGAUCAUGGAUC GUC	722	GACGAUCCAUGAUCAC CUC	833
384		GUGAUCAUGGAUCGUC ACG	723	CGUGACGAUCCAUGAU CAC	834
385		UGAUCAUGGAUCGUCA CGG	724	CCGUGACGAUCCAUGA UCA	835
386		GAUCAUGGAUCGUCAC GGA	725	UCCGUGACGAUCCAUG AUC	836
387		AUCAUGGAUCGUCACG GAG	726	CUCCGUGACGAUCCA GAU	837
451		UCUACAAACAGGAGUG CUC	727	GAGCACUCCUGUUUGU AGA	838
458		ACAGGAGUGCUCCAGU CGG	728	CCGACUGGAGCACUCC UGU	839
459		CAGGAGUGCUCCAGUC GGC	729	GCCGACUGGAGCACUC CUG	840
461		GGAGUGCUCCAGUCGG CCG	730	CGGCCGACUGGAGCAC UCC	841
491		CAGUCACCCCAUGUGC AAG	731	CUUGCACAUGGGGUGA CUG	842
499		CCAUGUGCAAGGAGCA CGA	732	UCGUGCUCCUUGCACA UGG	843
503		GUGCAAGGAGCACGAA GAU	733	AUCUUCGUGCUCCUUG CAC	844
531		AACAUCUACUGUCUCA CGU	734	ACGUGAGACAGUAGAU GUU	845
535		UCUACUGUCUCACGUG UGA	735	UCACACGUGAGACAGU AGA	846
539		CUGUCUCACGUGUGAG GUG	736	CACCUCACACGUGAGA CAG	847
564		UGCUGCAUGUGCAAGG UGU	737	ACACCUUGCACAUGGA GCA	848
568		CCAUGUGCAAGGUGUU UGG	738	CCAAACACCUUGCACA UGG	849
610		CCCCAUUGCAGAGUGU CUU	739	AAGACACUCUGCAAUG GGG	850

[0633]

612		CCAUUGCAGAGUGUCU UCC	740	GGAAGACACUCUGCAA UGG	851
645		GAACUGAAUAACUGUA UCU	741	AGAUACAGUUAUUCAG UUC	852
647		ACUGAAUAACUGUAUC UCC	742	GGAGAUACAGUUAUUC AGU	853
670		UGGUGGCGGGGAAUG ACCG	743	CGGUCAUUCCTCCGCA CCA	854
671		GGUGGCGGGGAAUGAC CGU	744	ACGGUCAUUCCTCCGCC ACC	855
672		GUGGCGGGGAAUGACC GUG	745	CACGGUCAUUCCTCCGC CAC	856
673		UGGCGGGGAAUGACCG UGU	746	ACACGGUCAUUCCTCCG CCA	857
812		AAGUGAGUUGCUGCAG CGG	747	CCGCUGCAGCAACUCA CUU	858
860		CUUCAUCGAGGCCUC AUC	748	GAUGAGGGCCUCGAUG AAG	859
968		CUUGACUGCCAAGCAA CUC	749	GAGUUGCUCUUGGCAGUC AAG	860
970		UGACUGCCAAGCAACU CAU	750	AUGAGUUGCUCUUGGCAG UCA	861
977		CAAGCAACUCAUAAA AGC	751	GCUUUUGAUGAGUUGC UUG	862
979		AGCAACUCAUAAAAG CAU	752	AUGCUUUUGAUGAGU UGCU	863
980		GCAACUCAUAAAAGC AUU	753	AAUGCUUUUGAUGAG UUGC	864

[0634] 选出的MuRF1 siRNA在经转染的小鼠C2C12肌管和原代人骨骼肌细胞的预分化肌管中的活性

[0635] 从60种鉴定的靶向小鼠Murf1的siRNA和25种靶向人MuRF1的siRNA中,分别选择35和25种siRNA进行合成。在转染的小鼠C2C12肌管和预分化的原代人骨骼肌细胞中分析这些siRNA的活性(表5)。在靶向小鼠MurF1的siRNA中,有14种在C2C12肌管中表现出>70%的Murf1敲减,但<20%的Murf2和Murf3敲减。这14种siRNA中至少有6种与人MuRF1交叉反应。在靶向人MuRF1的受测siRNA中,有8种在原代人骨骼肌细胞的预分化肌管中表现出>70%的MuRF1敲减,但<20%的MuRF2和MuRF3敲减。这8种siRNA中只有1种显示出与小鼠Muf1的显著交叉反应。所有有效的siRNA均以亚纳摩尔效力下调其各自的靶标。

[0636] 表5示出了选出的MuRF1 siRNA在经转染的小鼠C2C12肌管和原代人骨骼肌细胞的预分化肌管中的活性。如实施例5所述,使细胞生长并转染,并分离和分析RNA。

[0637]

NM_026346.3 中的 19 聚体位置	muC2C12 肌管 mMuRF1 KD(%)	muC2C12 肌管 mMuRF2 KD(%)	muC2C12 肌管 mMuRF3 KD(%)	muC2C12 肌管 mMuRF1 IC50(nM)	huSkMC 肌管 hMuRF1 KD(%)	huSkMC 肌管 hMuRF2 KD(%)	huSkMC 肌管 hMuRF3 KD(%)	huSkMC 肌管 hMuRF1 IC50(nM)
33	24.3	0.0	5.5					
109	73.4	0.0	6.0	0.073				
130	45.8	10.4	16.0					
264	79.6	3.7	22.0	0.172	80.9	5.6	0.0	0.018
337	42.9	10.4	7.9					
423	65.9	15.5	8.9	0.288	64.5			
460	56.4	16.6	17.8					
495	70.7	9.6	31.9	0.495	76.1	49.0	4.4	0.105
499	73.8	12.7	7.0	0.116	76.0	11.3	24.0	0.150
500	69.0	20.7	11.5	0.167	92.5	23.3	50.0	
538	48.6	10.7	16.5					
651	78.3	5.8	0.0	0.082	53.9	0.0	4.2	0.150
787	26.0	13.5	7.9					
911	43.5	0.0	10.0					
1012	74.1	0.0	27.5	0.014	83.1	6.6	0.0	0.019
1018	72.6	12.3	6.3	0.121				
1022	70.9	26.5	22.9	0.042				
1130	60.6	22.0	16.3	0.206				
1266	73.5	27.1	19.6	0.007	83.8	7.5	42.3	0.184
1351	77.5	44.2	0.0	0.008	79.0	6.6	52.4	0.509
1364	71.6	0.8	2.8	0.012	27.9			
1387	79.1	9.5	14.9	0.007	66.7	15.0	13.3	0.059

[0638]

1390	73.6	33.1	10.0	0.012				
1393	75.2	28.4	4.5	0.044	73.3	34.0	12.1	0.141
1397	78.8	5.2	16.4	0.008	74.9	23.0	12.3	0.009
1454	73.8	6.5	8.7	0.019	68.2	7.0	1.7	0.004
1458	73.1	0.0	6.4	0.016	85.8	13.7	42.7	0.008
1462	69.9	17.2	19.8	0.017	63.8	3.8	0.0	0.005
1466	75.0	17.8	19.1	0.012	68.4	6.2	0.0	0.045
1480	71.1	11.9	6.9	0.022				
1481	65.8	12.2	0.4	0.266				
1483	74.6	1.1	4.0	0.030				
1520	72.8	1.6	8.8	0.012	30.6			
1658	73.7	21.6	9.8	0.028	26.0	15.6	6.6	0.005
1660	76.2	0.0	0.0	0.017				
NM_032588.3 中的 19 聚体位置	muC2C12 肌管 mMuRF1 KD(%)	muC2C12 肌管 mMuRF2 KD(%)	muC2C12 肌管 mMuRF3 KD(%)	muC2C12 肌管 mMuRF1 IC50(nM)	huSkMC 肌管 hMuRF1 KD(%)	huSkMC 肌管 hMuRF2 KD(%)	huSkMC 肌管 hMuRF3 KD(%)	huSkMC 肌管 hMuRF1 IC50(nM)
75	25.8				69.6	0.0	0.0	
77	14.5	17.4	13.8		83.7	7.1	13.9	0.152
245	60.3			0.905	70.9	33.1	14.3	
259	49.7			2.759	75.1	84.5	71.1	0.053
339					52.7	1.2	14.3	
367					0.0	0.0	0.0	
370	8.8			0.033	21.2	25.0	4.1	
373					64.6	21.8	14.1	
374	33.7	7.0	14.8	0.659	89.7	10.0	19.7	0.110
380	19.5			0.013	70.6	8.5	0.4	
386					69.9	19.9	16.4	0.002
459	66.7			0.148	78.1	25.2	7.1	
491					57.1	16.3	1.3	
503	56.4			0.101	52.0	89.9	86.1	
535	70.8	32.4	13.4	0.074	82.1	24.0	9.5	0.008
564	8.2			0.002	72.4	26.1	0.6	
610	6.5	18.7	17.0		89.6	9.4	15.2	0.107
645	46.2	13.9	2.3	3.475	85.2	0.0	0.0	0.007
647	77.5	20.1	0.0	0.211	94.6	4.4	19.4	0.006
673					35.5	13.4	4.5	

[0639]	860					77.1	22.5	0.0	
	970	8.8	29.3	10.6		84.9	12.9	7.3	0.056
	977	19.9	5.9	0.0	2.838	93.6	51.0	12.6	0.117
	979					87.4	29.6	17.4	0.058
	980	0.0	36.0	2.1		93.6	4.7	20.5	0.118

[0640] 实施例6.2017-PK-279-WT-CD71 vs IgG2A同种型、HPRT vs MSTN siRNA的设计和合成

[0641] MSTN:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU(SEQ ID NO:686)。使用碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。

[0642] HPRT:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU(SEQ ID NO:869)。使用碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在3'端的C6-NH<sub>2</sub>和在5'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。

[0643] 阴性对照siRNA序列(杂乱):使用所公开的(Burke等人(2014) Pharm. Res., 31(12):3445-60)具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:870)。在阴性对照siRNA中使用用于活性MSTN siRNA双链体的相同的碱、糖和磷酸修饰。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。

[0644] ASC合成和表征

[0645] 如实施例3所述制备、纯化并表征CD71 mAb-siRNA DAR1缀合物。所有缀合物均通过半胱氨酸缀合、SMCC连接体和PEG连接在巯基上,对于MSTN和杂乱siRNA使用架构1,对于HPRT siRNA使用架构2,参见实施例3。如表6中所述对缀合物进行色谱表征。

[0646] 表6.以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)



组	缀合物	RT, SAX 方法-2	RT, SEC 方法-1
1-4	TfR-mAb-HPRT-PEG5k; DAR1	8.8	7.1
5-8	IgG2a-mAb-HPRT-PEG5k; DAR1	8.9	7.7
9-12	TfR-mAb-MSTN-PEG5k; DAR1	8.7	7.2
13-16	IgG2a-mAb-MSTN-PEG5k; DAR1	8.9	7.7
17-20	TfR-mAb-scrambled-PEG5k; DAR1	8.4	7.2

[0648] 体内研究设计

[0649] 在野生型CD-1小鼠中,在体内评估了缀合物介导骨骼肌中肌生成抑制蛋白(MSTN)的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,参见图9A。96小时后,收获腓肠肌(gastroc)组织,并在液氮中骤冻。使用比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta Ct$ ),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta Ct$ )将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0650] 结果

[0651] 对于给药后96小时收获的腓肠肌,在3mg/kg siRNA的单次静脉内剂量后观察到大于90%的最大MSTN mRNA下调,见图9B。另外,还观察到剂量响应(剂量范围:0.3至3.0mg/kg siRNA),并且对照组没有观察到显著的mRNA下调。

[0652] 结论

[0653] 在腓肠肌中,已经证明了ASC能够下调肌肉特定基因。ASC由与设计用于下调MSTN mRNA的siRNA缀合的抗运铁蛋白抗体制成。小鼠腓肠肌表达运铁蛋白受体,并且该缀合物具有小鼠特异性抗运铁蛋白抗体以靶向siRNA,导致该缀合物在腓肠肌中积累。受体介导的摄取导致siRNA介导的MSTN mRNA敲减。

[0654] 实施例7.用于表型siRNA设计和合成的2017-PK-289-WT-CD71 mAb MSTN时程

[0655] MSTN:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU(SEQ ID NO:868)。使用碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0656] 阴性对照siRNA序列(杂乱):使用所公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链

的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:870)。在阴性对照siRNA中使用用于活性MSTN siRNA双链体的相同的碱、糖和磷酸修饰。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0657] ASC合成和表征

[0658] 如实施例3所述制备并表征CD71 mAb-siRNA DAR1缀合物。所有缀合物均使用架构1通过半胱氨酸缀合、SMCC连接体和巯基制备,并且用NEM封端。如表7中所述对缀合物进行色谱表征。

[0659] 表7.以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)

组	缀合物	RT, SAX 方法 -2	RT, SEC 方法-1
[0660] 1-4、13 和 14	TfR-mAb-MSTN-NEM ; DAR1	8.7	10.0
5-8	TfR-mAb-scrambled-NEM; DAR1	8.9	10.0

[0661] 体内研究设计

[0662] 在野生型CD-1小鼠中,在体内评估了缀合物介导骨骼肌中肌生成抑制蛋白(MSTN)的mRNA下调的能力。以图10A所示的剂量,通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量。也如图10A所示取得血浆和组织样品。收获肌肉组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta$ Ct),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta$ Ct)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0663] 使用ELISA确定血浆肌肉生长抑制素水平,完整的实验细节参见实施例2。确定腿部肌肉面积的变化:将待测的腿剃毛,并使用不褪色的墨水画线以标记出测量区域。将小鼠约束在锥形约束装置中,并用手握住右腿。使用数字卡尺在矢状面上进行一次测量,并在冠状面上进行另一次测量。每周重复该程序两次。

[0664] 结果

[0665] 在单次静脉内施用抗体siRNA缀合物后,肌肉组织中积累的siRNA的可定量水平,参见图10B。在单次静脉内施用3mg/kg siRNA后,在腓肠肌观察到稳定的MSTN mRNA下调,这导致血浆中MSTN蛋白质水平降低,参见图10C和图10D。约90%的最大mRNA下调在给药后7-

14天观察到。给药后6周,腓肠肌具有约75%的mRNA下调,这对应于与PBS或抗运铁蛋白抗体缀合的杂乱对照相比血浆蛋白质水平降低约50%。MSTN的下调导致肌肉大小在统计学上显著的增加,参见图10E和图10F。

[0666] 结论

[0667] 在该实施例中,证明了在单剂量的抗运铁蛋白抗体靶向的siRNA缀合物后,siRNA在各种肌肉组织中的积累。在腓肠肌中,观察到显著且持久的siRNA介导的MSTN mRNA下调。小鼠腓肠肌表达运铁蛋白受体,并且该缀合物具有小鼠特异性抗运铁蛋白抗体以靶向siRNA,导致该缀合物在腓肠肌中积累。受体介导的摄取导致siRNA介导的MSTN基因敲减。

[0668] 实施例8:2017-PK-299-WT-MSTN Zalu vs TfR、mAb vs Fab、DAR1vs DAR2 siRNA的设计和合成

[0669] MSTN:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUUUUGUUCUUUGCCUU(SEQ ID NO:868)。使用碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0670] MSTN\*:MSTN:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUUUUGUUCUUUGCCUU(SEQ ID NO:868)。使用碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。

[0671] ASC合成和表征

[0672] 如实施例3所述制备并表征CD71 mAb-siRNA DAR1和DAR2缀合物。第1-8组和第17-20组是使用架构3通过半胱氨酸缀合和BisMa1连接体制成的。第9-16组使用架构1通过半胱氨酸缀合、SMCC连接体和游离巯基制备,并且用NEM PEG封端。如表8中所述对缀合物进行色谱表征。

[0673] 表8.以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)

组	缀合物	RT, SAX	RT, SEC
		方法-2	方法-1
1-4	TfR-Fab-MSTN; DAR1	8.7	10.0

[0675]	<b>5-8</b>	EGFR-Fab-MSTN; DAR1	8.9	10.0
	<b>9-12</b>	TfR-mAb-MSTN-NEM; DAR1	9.5	7.9
	<b>13-16</b>	TfR-mAb-MSTN-nEM; DAR2	10.3	8.1
	<b>17-18</b>	EGFR-mAb-MSTN; DAR1	9.3	NT
	<b>19-20</b>	EGFR-mAb-MSTN; DAR2	10.2	NT

#### [0676] 体内研究设计

[0677] 在野生型CD-1小鼠中,在体内评估了缀合物介导骨骼肌中肌生成抑制蛋白(MSTN)的mRNA下调的能力。以图11A所示的剂量,通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量。也如图11A所示取得血浆和组织样品。收获腓肠肌(gastroc)组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta Ct$ ),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta Ct$ )将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

#### [0678] 结果

[0679] 在单次静脉内施用抗体和Fab siRNA缀合物后,肌肉组织中积累的siRNA的可定量水平,参见图11B。当抗运铁蛋白抗体缀合物作为DAR1或DAR2或作为Fab DAR1缀合物施用时,在腓肠肌中观察到稳定的MSTN mRNA下调,参见图11C。

#### [0680] 结论

[0681] 在该实施例中,证明了在单剂量的抗运铁蛋白抗体和Fab靶向的siRNA缀合物后,siRNA在腓肠肌组织中的积累。在腓肠肌中,除了DAR1 Fab缀合物外,使用DAR1和DAR2抗体缀合物也观察到siRNA介导的MSTN mRNA下调。小鼠腓肠肌表达运铁蛋白受体,并且该缀合物具有小鼠特异性抗运铁蛋白抗体或Fab以靶向siRNA,导致该缀合物在腓肠肌中积累。受体介导的摄取导致siRNA介导的MSTN基因敲减。实施例9:2017-PK-303-WT-剂量响应MSTN mAb vs Fab vs Chol siRNA的设计和合成

[0682] MSTN:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU(SEQ ID NO:868)。使用碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0683] MSTN\*:MSTN:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU(SEQ ID NO:868)。

使用碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。

[0684] 阴性对照siRNA序列(杂乱):使用所公开的(Burke等人(2014) Pharm. Res., 31 (12):3445-60)具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:870)。在阴性对照siRNA中使用用于活性MSTN siRNA双链体的相同的碱、糖和磷酸修饰。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0685] ASC合成和表征

[0686] 如实施例3所述制备并表征CD71 mAb-siRNA DAR1和DAR2缀合物。第5-12组是使用架构3通过半胱氨酸缀合、BisMal连接体制成的。第13-16组使用架构1通过半胱氨酸缀合、SMCC连接体、游离巯基制备,并且用NEM封端。第17-20组使用架构3通过半胱氨酸缀合、BisMal连接体、游离巯基制备,并且用NEM封端。如表9中所述对缀合物进行色谱表征。

[0687] 表9.以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)

组	缀合物	RT, SAX	RT, SEC
		方法-2	方法-1
[0688]	5-8 TfR-Fab-MSTN*; DAR1	8.7	10.0
	9-12 TfR-mAb-MSTN*; DAR1	9.3	7.8
	13-16 TfR-mAb-MSTN; DAR1	9.5	7.9
	17-20 TfR-mAb-scramble; DAR1	9.1	7.3

[0689] 体内研究设计

[0690] 在野生型CD-1小鼠中,在体内评估了缀合物介导骨骼肌中肌生成抑制蛋白(MSTN)的mRNA下调的能力。以图12A所示的剂量,通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量。也如图12A所示取得组织样品。收获腓肠肌(gastroc)组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta$ Ct),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta$ Ct)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0691] 如实施例2所述确定细胞内RISC加载。

**[0692] 结果**

[0693] 在单次静脉内施用抗体和Fab siRNA缀合物后,腓肠肌和心肌组织中积累的siRNA的可定量水平,参见图12B。当用抗运铁蛋白受体抗体或Fab靶向ASC时,在腓肠肌中观察到稳定的MSTN mRNA下调,参见图12B和图12C。将更高浓度的siRNA递送至心脏组织,但这并未导致稳定的肌肉生长抑制素mRNA下调,参见图12B。与胆固醇siRNA缀合物相比,需要低得多的剂量的ASC才能实现等效的mRNA下调。MSTN siRNA指导链的RISC负载量与mRNA的下调相关,参见图12D。

**[0694] 结论**

[0695] 在该实施例中,证明了在单剂量的抗运铁蛋白抗体和Fab靶向的siRNA缀合物后,siRNA在腓肠肌组织中的积累。在腓肠肌中,使用DAR1抗运铁蛋白抗体或Fab缀合物观察到siRNA介导的MSTN mRNA下调。小鼠腓肠肌表达运铁蛋白受体,并且该缀合物具有小鼠特异性抗运铁蛋白抗体或Fab以靶向有效负载,导致该缀合物在腓肠肌中积累并且负载到RISC复合物中。受体介导的摄取导致siRNA介导的MSTN mRNA下调。

**[0696] 实施例10:2017-PK-304-WT-PK带MSTN表型mAb vs Chol siRNA的设计和合成**

[0697] MSTN:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UUAUUAUUUGUUCUUUGCCUU (SEQ ID NO:868)。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0698] 阴性对照siRNA序列(杂乱):使用所公开的(Burke等人(2014) Pharm. Res., 31(12):3445-60)具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU (SEQ ID NO:870)。在阴性对照siRNA中使用用于活性MSTN siRNA双链体的相同的碱、糖和磷酸修饰。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

**[0699] ASC合成和表征**

[0700] 如实施例3所述制备并表征CD71 mAb-siRNA DAR1和DAR2缀合物。第5-12组使用架构1通过半胱氨酸缀合、SMCC连接体、游离巯基制备,并且用NEM封端。第13-16组使用架构3通过半胱氨酸缀合、BisMal连接体、游离巯基制备,并且用NEM封端。如表10中所述对缀合物进行色谱表征。

**[0701] 表10.以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)**

[0702]

组	缀合物	RT,	RT, SEC
---	-----	-----	---------

		<b>SAX 方法 -2</b>	<b>方法-1</b>
[0703]	5-8	TfR-mAb-MSTN; DAR1	9.5
	9-12	TfR-mAb-MSTN; DAR2	10.3
	13-16	TfR-mAb-scramble; DAR1	9.1

[0704] 体内研究设计

[0705] 在野生型CD-1小鼠中,在体内评估了缀合物介导骨骼肌中肌生成抑制蛋白(MSTN)的mRNA下调的能力。以图13A所示的剂量,通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量。也如图13A所示取得组织样品。收获腓肠肌(gastroc)组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta Ct$ ),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta Ct$ )将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0706] 如实施例2所述确定细胞内RISC加载。如实施例2所述,通过ELISA测定血浆MSTN蛋白水平。

[0707] 确定腿部肌肉面积的变化:将待测的腿剃毛,并使用不褪色的墨水画线以标记出测量区域。将小鼠约束在小decapicone袋中。使用数字卡尺在矢状面上进行一次测量,并在冠状面上进行另一次测量。每周重复该程序两次。

[0708] 结果

[0709] 在以3mg/kg单次静脉内施用抗体siRNA缀合物后,腓肠肌、三头肌、四头肌(Quad)和心脏组织中积累的siRNA的可定量水平,参见图13D。使用DAR1和DAR2缀合物,在腓肠肌、四头肌和三头肌中观察到MSTN mRNA下调,但在心脏组织中未观察到,参见图13B。如通过EFISA测量的,MSTN mRNA下调导致MSTN蛋白的血浆浓度降低,参见图13C。MSTN siRNA指导链的RISC负载量与mRNA的下调相关,参见图13E。MSTN的下调导致肌肉大小在统计学上显著的增加,参见图13F和图13G。

[0710] 结论

[0711] 在该实施例中,证明了在单剂量的抗运铁蛋白抗体siRNA缀合物DAR1和DAR2后,siRNA在腓肠肌、四头肌和三头肌组织中的积累。在所有三种组织中,使用DAR1和DAR2抗运铁蛋白抗体缀合物观察到可测量的siRNA介导的MSTN mRNA下调。mRNA下调与血浆MSTN蛋白水平降低和siRNA指导链的RISC负载相关。所有三种肌肉组织都表达运铁蛋白受体,并且该缀合物具有小鼠特异性抗运铁蛋白抗体以靶向siRNA,导致该缀合物在肌肉中积累。受体介导的摄取导致siRNA介导的MSTN基因敲减。

[0712] 实施例11:2017-PK-355-WT多siRNA给药siRNA的设计和合成

[0713] HPRT:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3' 二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5' 至3')为UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU (SEQ ID NO:869)。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。

[0714] SSB:针对小鼠MSTN设计了具有19个碱基的互补性和3' 二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5' 至3')为UUACAUAUAAAGUCUGUUGUUU (SEQ ID NO:871)。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。

[0715] ASC合成和表征

[0716] 如实施例3所述制备并表征CD71 mAb-siRNA缀合物。

[0717] 第1-4组和第5-8组使用架构3,通过半胱氨酸缀合、BisMal连接体、在过客链上无3' 缀合柄来制成。第13-16组通过半胱氨酸缀合、BisMal连接体、在过客链上没有3' 缀合柄制成,但是DAR2缀合物由HPRT和SSB siRNA的混合物使用架构4制成。如表11中所述对缀合物进行色谱表征。

[0718] 表11.以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)

[0719]	缀合物	RT, SAX 方法-2	RT, SEC 方法-1
	TfR-mAb-HPRT; DAR1	9.0	12.5 (0.5 ml 流速, 25 min 运行)
	TfR-mAb-SSB; DAR1	9.4	无数据
	TfR-mAb-HPRT/SSB (1:1) DAR2	10.09	无数据

[0720] 体内研究设计

[0721] 在野生型CD-1小鼠中,在体内评估了缀合物介导骨骼肌中两种持家基因(HPRT和SSB)的mRNA下调的能力。以图14A所示的剂量,通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量。也如图14A所示取得组织样品。收获腓肠肌(gastroc)组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta Ct$ ),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta Ct$ )将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值



转化为血浆浓度或组织浓度。

[0722] 如实施例2所述进行RISC加载测定。

[0723] 结果

[0724] 以所示剂量单次静脉内施用抗体siRNA缀合物后,在腓肠肌和心脏组织中观察到mRNA下调,参见图14B-图14D。共同施用两种靶向两种不同基因(HPRT和SSB)的ASC的混合物,导致这两种靶标在腓肠肌和心脏组织中的有效mRNA下调。此外,使用两种不同siRNA(HPRT和SSB)的1:1混合物合成的DAR2缀合物的施用也导致这两种靶标在腓肠肌和心脏组织中的有效mRNA下调。所有递送途径都导致在腓肠肌组织中积累可测量的量的siRNA,参见图14F。

[0725] 结论

[0726] 在该实施例中,证明了在单剂量的抗运铁蛋白抗体siRNA缀合物后,siRNA在腓肠肌和心肌组织中的积累。通过共同施用由相同的抗运铁蛋白抗体产生但与两种不同siRNA(HPRT和SSB)缀合的两种ASC,下调了两种基因。另外,使用两种不同siRNA(HPRT和SSB)的1:1混合物合成的抗运铁蛋白mAb DAR2缀合物下调了两种基因。在一些情况下,同时下调超过一种基因可用于肌萎缩。

[0727] 实施例12:Atrogin-1siRNA在体内的2017-PK-380-WT活性(剂量响应)siRNA设计和合成

[0728] Atrogin-1siRNA:针对Atrogin-1设计了4种不同的具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体,关于序列的详细信息,请参见实施例4。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有四种siRNA使用相同的设计。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0729] ASC合成和表征

[0730] 如实施例3所述制备并表征CD71 mAb-siRNA缀合物。

[0731] 第1-16组使用架构3通过半胱氨酸缀合、BisMal连接体、游离巯基制备,并且用NEM封端。如表12中所述对缀合物进行色谱表征。

[0732] 表12.以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)

组	缀合物	RT, SAX 方法 -2	RT, SEC 方法-1
1-4	mTfR1(Cys)-BisMal-N-mAtrogin#1179; DAR1	9.2	7.7
[0733] 5-8	mTfR1(Cys)-BisMal-N-mAtrogin#1504; DAR1	9.3	7.8
9-12	mTfR1(Cys)-BisMal-N-mAtrogin#631; DAR1	9.3	7.8
13-16	mTfR1(Cys)-BisMal-N-mAtrogin#586; DAR1	9.2	7.8

[0734] 体内研究设计

[0735] 在野生型CD-1小鼠中,在体内评估了缀合物介导骨骼肌中Atrogin-1的mRNA下调的能力。以图15A所示的剂量,通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量。如图15A所示取得组织样品。收获腓肠肌(gastroc)组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta Ct$ ),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta Ct$ )将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0736] 结果

[0737] 以所示剂量单次静脉内施用抗体siRNA缀合物后,在腓肠肌中观察到至多80%的atrogin-1mRNA下调,而在心脏组织中观察到至多50%的atrogin-1mRNA下调,参见图15B和图15C。

[0738] 结论

[0739] 如该实施例所示,抗体siRNA缀合物在肌肉和心脏中差异性下调Atrogin-1。

[0740] 实施例13:MuRF1 siRNA在体内的2017-PK-383-WT活性(剂量响应)siRNA设计和合成

[0741] MuRF1 siRNA:针对Atrogin-1设计了4种不同的具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体,关于序列的详细信息,请参见实施例5。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有四种siRNA使用相同的设计。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0742] ASC合成和表征

[0743] 如实施例3所述制备并表征CD71 mAb-siRNA缀合物。

[0744] 第1-16组使用架构3通过半胱氨酸缀合、BisMal连接体、游离巯基制备,并且用NEM封端。如表13中所述对缀合物进行色谱表征。

[0745] 表13.以分钟为单位的HPLC保留时间 (RT)

组	缀合物	RT, SAX 方 法-2	RT, SEC 方 法-1
1-4	mTfR1(Cys)-BisMal-N-MuRF#651-S-NEM; DAR1	9.2	7.8
[0746] 5-8	mTfR1(Cys)-BisMal-N-MuRF#1387-S-NEM; DAR1	9.3	7.8
9-13	mTfR1(Cys)-BisMal-N-MuRF#1454-S-NEM; DAR1	9.1	7.8
14-18	mTfR1(Cys)-BisMal-N-MuRF#1660-S-NEM; DAR1	9.1	7.8

[0747] 体内研究设计

[0748] 在野生型CD-1小鼠中,在体内评估了缀合物介导骨骼肌和心肌中MuRF-1的mRNA下调的能力。以图16A所示的剂量,通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量。如图16A所示取得组织样品。收获腓肠肌(gastroc)组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta Ct$ ),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta Ct$ )将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0749] 结果

[0750] 以所示剂量单次静脉内施用抗体siRNA缀合物后,腓肠肌肉中的MuRF1 mRNA下调至最多70%,而在心脏组织中下调至最多50%,参见图16B和图16C。

[0751] 结论

[0752] 如该实施例所示,抗体siRNA缀合物在肌肉和心脏中差异性下调MuRF1。

[0753] 实施例14.

[0754] 表14示出了调节肌萎缩的示例性siRNA(或atrogene)靶标。在一些情况下,多核酸分子与表14中所述的atrogene的靶区域杂交。

功能	基因	名称
蛋白质降解	FBXO32	Atrogin-1
	Trim63	MuRF1
	TRAF6	TNF 受体相关因子 6
	USP14	泛素特异性蛋白酶 14
	CTSL2	组织蛋白酶 L2
转录	Foxo1	叉头框 O1
	Foxo3	叉头框 O3
	TGIF	TG 相互作用因子
	MYOG	肌细胞生成蛋白
	HDAC2	组蛋白脱乙酰酶 2
	HDAC3	组蛋白脱乙酰酶 3
应激响应	MT1L	金属硫蛋白 1L
	MT1B	金属硫蛋白 1B

[0755] 实施例15:序列

[0757] 在一个DMPK转录物变体 (NM\_001288766) 内生成23聚体靶序列。通过每次将转录物的长度向下移动一个碱基而生成该转录物变体的一组23聚体靶序列,并且可以使用相同的程序为其他DMPK转录物变体生成相似的一组靶序列。可以用于靶向DMPK转录物中的这些位点的一种常见siRNA结构是19聚体完全互补双链体,其在每条链的3'端具有2个突出端(未碱基配对)核苷酸。因此,向19聚体添加两个2核苷酸突出端导致总共23个针对靶位点的碱基。由于突出端可以由反映靶转录物或其他核苷酸的序列的序列(例如非相关的二核苷酸序列,如“UU”)组成,因此19聚体完全互补序列可以用来描述针对每个23聚体靶位点的siRNA。

[0758] 对于靶向DMPK转录物内每个位点的siRNA双链体生成19聚体有义和反义序列的第一集合。DMPK转录物变体NM\_001288766已用于说明,但可以通过遍历其他DMPK转录物变体来生成一组相似的siRNA双链体。当siRNA的反义链负载到Ago2中时,第一个碱基在Ago2结合口袋内缔合,而其他碱基(从反义链的位置2开始)则显示出互补的mRNA结合。由于“U”是用于结合Ago2的热力学上优选的第一个碱基,并且不结合靶mRNA,因此所有反义序列都可以将“U”置换到第一个碱基,而不影响靶标互补性和特异性。相应地,有义链19聚体的最后一个碱基(位置19)被切换为“A”,以确保与反义链的第一位置处“U”的碱基配对。

[0759] 19聚体有义序列的第二集合类似于靶向DMPK转录物的19聚体有义序列的第一集合,不同之处在于19聚体有义链的最后一个位置被碱基“A”置换。

[0760] 19聚体反义序列的第二集合类似于靶向DMPK转录物的19聚体反义序列的第一集

合,不同之处在于19聚体反义链的第一个位置被碱基“U”置换。

[0761] 实施例16:针对体外活性初步筛选一组选出的DMPK siRNA

[0762] 使用旨在选择具有最高概率中靶活性和最低概率脱靶活性的序列的生物信息学分析,将DMPK siRNA的第二集合缩小为81个siRNA序列(SEQ ID NO:28-189)的列表。用于选择活性和特异性siRNA的生物信息学方法已在RNAi领域中充分描述,并且本领域技术人员能够针对任何其他DMPK转录物变体生成相似的DMPK siRNA序列表。使用寡核苷酸合成文献中描述的标准固相合成方法,以小规模合成了81个序列的组中的DMPK siRNA。已知未经修饰的和经过化学修饰的siRNA均可在体外转染后产生有效的敲减。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来合成DMPK siRNA序列,以优化双链体的效力并降低免疫原性。使用两种人细胞系评估DMPK siRNA的体外活性:第一种是SJCRH30人横纹肌肉瘤细胞系(ATCC®CRL-2061™);第二种是源自1型强直性营养不良(DM1)患者的无限增殖化人骨骼肌成肌细胞。对于DMPK siRNA文库的初步筛选,将每个DMPK siRNA以1nM和0.01nM终浓度转染至SJCRH30细胞中,以及以10nM和1nM终浓度转染至DM1成肌细胞中。用转染试剂Lipofectamine RNAiMAX(Life Technologies),按照制造商的“正向转染”说明,配制siRNA。转染前24小时将细胞一式三份接种至96孔组织培养板上,对于SJCRH30为每孔8500个细胞,对于DM1成肌细胞为每孔4000个细胞。在转染后48h(SJCRH30)或72h(DM1成肌细胞),用PBS洗涤细胞,并用TRIZOL®试剂(Life Technologies)收获。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μl RNA逆转录为cDNA。使用TaqMan®Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems),用DMPK特异性和PPIB特异性TaqMan人基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。在每个样品内将DMPK值相对于PPIB基因表达进行归一化。HPRT下调的定量使用标准 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来进行。所有实验均一式三份进行,表15A和表15B呈现了三次重复的平均值。

[0763] 表15A

[0764]

ID # <sup>1</sup>	有义链序列 (5'-3') 过客链 (PS)	SEQ ID NO:	反义链序列 (5'-3') 指导链 (GS)	SEQ ID NO:
385	GCUUAAGGAGGUCCGACUA	28	UAGUCGGACCUCUUAAGC	109
443	GGGGCGUUCAGCGAGGUAA	29	UUACCUCGCUGAACGCCCC	110
444	GGGCGUUCAGCGAGGUAGA	30	UCUACCUCGCUGAACGCC	111
445	GGCGUUCAGCGAGGUAGCA	31	UGCUACCUCGCUGAACGCC	112
533	AGGGGCGAGGUGUCGUGCA	32	UGCACGACACCUCGCCCCU	113
534	GGGGCGAGGUGUCGUGCUA	33	UAGCACGACACCUCGCCCC	114
535	GGGCGAGGUGUCGUGCUUA	34	UAAGCACGACACCUCGCC	115
539	GAGGUGUCGUGCUUCCGUA	35	UACGGAAGCACGACACCUC	116
540	AGGUGUCGUGCUUCCGUGA	36	UCACGGAAGCACGACACCU	117
541	GGUGUCGUGCUUCCGUGAA	37	UUCACGGAAGCACGACACC	118
543	UGUCGUGCUUCCGUGAGGA	38	UCCUCACGGAAGCACGACA	119
544	GUCGUGCUUCCGUGAGGAA	39	UUCCUCACGGAAGCACGAC	120
576	UGAAUGGGGACCGGCGGUA	40	UACCGCCGGUCCCCAUUCA	121
577	GAAUGGGGACCGGCGGUGA	41	UCACCGCCGGUCCCCAUUC	122
581	GGGGACCGGCGGUGGAUCA	42	UGAUCCACCGCCGGUCCCC	123
583	GGACCGGCGGUGGAUCACA	43	UGUGAUCCACCGCCGGUCC	124
584	GACCGGCGGUGGAUCACGA	44	UCGUGAUCCACCGCCGGUC	125
690	AGUUUGGGGAGCGGAUUCA	45	UGAAUCCGCUCCCCAAACU	126
716	AUGGCGCGCUUCUACCUGA	46	UCAGGUAGAAGCGCGCCA	127
717	UGGCGCGCUUCUACCUGGA	47	UCCAGGUAGAAGCGCGCCA	128
785	AGGGACAUAACCCGACA	48	UGUCGGGUUUGAUGUCCU	129
786	GGGACAUAACCCGACAA	49	UUGUCGGGUUUGAUGUCCC	130
789	ACAUAACCCGACAACAA	50	UUGUUGUCGGGUUUGAUGU	131
1026	GGCAGACGCCCUUCUACGA	51	UCGUAGAAGGGCGUCUGCC	132
1027	GCAGACGCCCUUCUACGCA	52	UGCGUAGAAGGGCGUCUGC	133
1028	CAGACGCCCUUCUACGCGA	53	UCGCGUAGAAGGGCGUCUG	134
1029	AGACGCCCUUCUACGCGGA	54	UCCGCGUAGAAGGGCGUCU	135
1037	UUCUACGCGGAUCCACGA	55	UCGUGGAAUCCGCGUAGAA	136
1039	CUACGCGGAUCCACGGCA	56	UGCCGUGGAAUCCGCGUAG	137
1041	ACGCGGAUCCACGGCGGA	57	UCCGCCGUGGAAUCCGCGU	138
1043	GCGGAUCCACGGCGGAGA	58	UCUCCGCCGUGGAAUCCGC	139
1044	CGGAUCCACGGCGGAGAA	59	UUCUCCGCCGUGGAAUCCG	140
1047	AUCCACGGCGGAGACCUA	60	UAGGUCUCCGCCGUGGAAU	141
1071	AGAUCGUCCACUACAAGGA	61	UCCUUGUAGUGGACGAUCU	142

[0765]

1073	AUCGUCCACUACAAGGAGA	62	UCUCCUUGUAGUGGACGAU	143
1262	CCUUUACACCGGAUUUCA	63	UGAAAUCCGGUGUAAAGGG	144
1263	CCUUUACACCGGAUUUCGA	64	UCGAAAUCCGGUGUAAAGG	145
1264	CUUUACACCGGAUUUCGAA	65	UUCGAAAUCCGGUGUAAAG	146
1265	UUUACACCGGAUUUCGAAA	66	UUUCGAAAUCCGGUGUAAA	147
1267	UACACCGGAUUUCGAAGGA	67	UCCUUCGAAAUCCGGUGUA	148
1268	ACACCGGAUUUCGAAGGUA	68	UACCUUCGAAAUCCGGUGU	149
1269	CACCGGAUUUCGAAGGUGA	69	UCACCUUCGAAAUCCGGUG	150
1274	GAUUUCGAAGGUGCCACCA	70	UGGUGGCACCUUCGAAAUC	151
1276	UUUCGAAGGUGCCACCGAA	71	UUCGGUGGCACCUUCGAAA	152
1283	GGUGCCACCGACACAUGCA	72	UGCAUGUGUCGGUGGCACC	153
1297	AUGCAACUUCGACUUGGUA	73	UACCAAGUCGAAGUUGCAU	154
1342	ACUGUCGGACAUUCGGGAA	74	UUCCCGAAUGUCCGACAGU	155
1343	CUGUCGGACAUUCGGGAAA	75	UUUCCCGAAUGUCCGACAG	156
1344	UGUCGGACAUUCGGGAAGA	76	UCUUCCCGAAUGUCCGACA	157
1346	UCGGACAUUCGGGAAGGUA	77	UACCUUCCCGAAUGUCCGA	158
1825	UGCUCUGUUCGCCGUUGA	78	UCAACGGCGAACAGGAGCA	159
1886	CCACGCCGGCCAACUCACA	79	UGUGAGUUGGCCGGCGUGG	160
1890	GCCGGCCAACUCACCGCAA	80	UUGCGGUGAGUUGGCCGGC	161
1898	ACUCACCGCAGUCUGGCGA	81	UCGCCAGACUGCGGUGAGU	162
1945	CCCUAGAACUGUCUUCGAA	82	UUCGAAGACAGUUCUAGGG	163
1960	CGACUCCGGGGCCCCGUUA	83	UAACGGGGCCCCGGAGUCG	164
2126	GCCGGCGAACGGGGCUCGA	84	UCGAGCCCCGUUCGCCGGC	165
2127	CCGGCGAACGGGGCUCGAA	85	UUCGAGCCCCGUUCGCCGG	166
2149	UCCUUGUAGCCGGGAUGA	86	UCAUUCCCGGCUACAAGGA	167
2150	CCUUGUAGCCGGGAUGCA	87	UGCAUUCCCGGCUACAAGG	168
2268	CCCUGACGUGGAUGGGCAA	88	UUGCCCAUCCACGUCAGGG	169
2272	GACGUGGAUGGGCAAACUA	89	UAGUUUGCCCAUCCACGUC	170
2528	GCUUCGGCGGUUUGGAUAA	90	UUAUCCAAACCGCCGAAGC	171
2529	CUUCGGCGGUUUGGAUAUA	91	UAUAUCCAAACCGCCGAAG	172
2530	UUCGGCGGUUUGGAUAUUA	92	UAAUAUCCAAACCGCCGAA	173
2531	UCGGCGGUUUGGAUAUUUA	93	UAAAUAUCCAAACCGCCGA	174
2532	CGGCGGUUUGGAUAUUUAA	94	UUAAAUAUCCAAACCGCCG	175
2554	CCUCGUCCUCCGACUCGCA	95	UGCGAGUCGGAGGACGAGG	176
2558	GUCCUCCGACUCGCUGACA	96	UGUCAGCGAGUCGGAGGAC	177
2600	CAAUCCACGUUUUGGAUGA	97	UCAUCCAAAACGUGGAUUG	178
2628	CCGACAUUCCUCGGUAUUA	98	UAAUACCGAGGAAUGUCGG	179
2629	CGACAUUCCUCGGUAUUUA	99	UAAAUACCGAGGAAUGUCG	180

[0766]

2631	ACAUUCCUCGGUAUUUAUA	100	UAUAAAUACCGAGGAAUGU	181
2636	CCUCGGUAUUUAUUGUCUA	101	UAGACAAUAAAUACCGAGG	182
2639	CGGUAUUUAUUGUCUGUCA	102	UGACAGACAAUAAAUACCG	183
2675	CCCCGACCCUCGCGAAUAA	103	UUAUUCGCGAGGGUCGGGG	184
2676	CCCACCCUCGCGAAUAAA	104	UUUAUUCGCGAGGGUCGGG	185
2679	GACCCUCGCGAAUAAAAGA	105	UCUUUUAUUCGCGAGGGUC	186
2680	ACCCUCGCGAAUAAAAGGA	106	UCCUUUUAUUCGCGAGGGU	187
2681	CCCUCGCGAAUAAAAGGCA	107	UGCCUUUUAUUCGCGAGGG	188
2682	CCUCGCGAAUAAAAGGCCA	108	UGGCCUUUUAUUCGCGAGG	189
Neg. Control	n/a	n/a	n/a	n/a

[0767] <sup>1</sup>NM\_001288766.1中的19聚体位置

[0768] 表15B

[0769]

ID # <sup>1</sup>	qPCR <sup>2</sup>	qPCR <sup>3</sup>	qPCR <sup>4</sup>	qPCR <sup>5</sup>	ID # <sup>1</sup>	qPCR <sup>2</sup>	qPCR <sup>3</sup>	qPCR <sup>4</sup>	qPCR <sup>5</sup>
385	150.8	153.8	64.1	142.5	1269	42.6	49.1	42.4	96.7
443	112.7	95.8	56.7	127.8	1274	63.6	55.4	78.0	98.5
444	76.5	66.2	36.7	113.6	1276	52.2	36.9	35.2	82.5
445	61.4	107.7	29.4	110.8	1283	35.2	62.8	56.6	95.9
533	168.8	119.8	85.7	118.1	1297	20.3	55.7	32.2	91.0
534	91.4	44.8	26.7	94.2	1342	44.6	46.7	41.5	94.5
535	101.0	65.9	33.1	109.9	1343	65.8	80.0	56.1	119.2
539	81.7	70.2	34.1	102.4	1344	30.9	63.7	51.7	116.7
540	68.3	56.8	40.0	114.6	1346	133.8	102.9	98.0	104.0
541	112.1	107.3	73.8	120.6	1825	54.1	69.2	28.6	86.7
543	42.6	59.9	41.9	117.8	1886	786.9	282.0	130.5	98.4
544	42.4	107.5	66.9	154.7	1890	28.8	30.3	51.5	94.4
576	107.4	119.0	85.0	127.5	1898	125.5	57.5	67.7	97.6
577	101.6	90.1	72.1	106.6	1945	23.5	22.6	21.8	57.6
581	199.3	97.7	69.9	103.5	1960	28.4	33.7	35.7	87.9
583	66.6	77.5	66.4	100.3	2126	147.9	87.2	86.8	98.1
584	26.3	37.3	31.0	88.3	2127	46.5	51.9	52.7	96.2
690	163.6	84.1	58.0	92.7	2149	44.7	41.5	62.0	99.6
716	29.0	39.6	29.4	86.0	2150	110.4	89.1	63.4	114.1
717	44.4	45.7	52.8	102.5	2268	53.5	48.6	60.8	113.1
785	79.9	93.2	71.3	101.0	2272	56.5	54.7	46.9	92.5
786	85.5	63.8	54.3	92.2	2528	32.5	32.8	32.7	76.9



[0770]

789	45.4	51.3	43.8	96.9	2529	19.6	25.8	21.4	59.5
1026	55.6	77.3	32.0	110.4	2530	29.5	25.9	32.8	68.1
1027	98.9	94.7	35.2	108.3	2531	22.2	31.6	25.4	64.3
1028	132.1	104.9	27.3	87.3	2532	44.4	35.6	29.2	74.0
1029	62.2	95.5	45.9	94.2	2554	13.7	22.6	26.8	60.9
1037	68.2	80.2	65.3	97.0	2558	54.6	47.4	28.0	72.0
1039	42.3	79.3	53.6	97.0	2600	205.4	209.6	n.d.	n.d.
1041	67.2	64.4	73.2	98.6	2628	12.6	28.5	20.1	56.2
1043	342.8	86.6	61.5	96.5	2629	12.8	39.5	20.6	63.8
1044	109.5	84.8	42.7	94.0	2631	97.4	68.6	39.7	104.4
1047	101.3	72.1	35.2	90.7	2636	62.0	68.6	16.8	58.7
1071	88.5	99.6	91.6	101.3	2639	33.2	46.1	22.2	81.0
1073	134.3	63.0	36.3	93.6	2675	57.7	82.5	n.d.	n.d.
1262	36.5	59.6	27.3	117.5	2676	31.1	53.0	n.d.	n.d.
1263	47.6	79.7	33.9	104.3	2679	44.7	75.7	n.d.	n.d.
1264	64.2	54.5	43.7	95.4	2680	89.2	61.5	n.d.	n.d.
1265	19.8	57.6	30.9	91.6	2681	19.0	28.6	n.d.	n.d.
1267	61.3	85.9	73.4	97.1	2682	98.2	61.8	n.d.	n.d.
1268	32.0	28.3	38.0	92.3	Neg. Control	101.2	100.6	101.1	106.4

[0771] <sup>2</sup>DM1成肌细胞;10nM; %DMPK mRNA[0772] <sup>3</sup>DM1成肌细胞;1nM; %DMPK mRNA[0773] <sup>4</sup>SJCRH30;1nM; %DMPK mRNA[0774] <sup>5</sup>SJCRH30;0.01nM; %DMPK mRNA

[0775] 实施例17:一组选出的DMPK siRNA的体外剂量响应曲线

[0776] 为了进一步验证DMPK siRNA的活性,选择了许多在初始筛选中显示出最佳活性的序列,以便以剂量响应形式进行后续评价。再次,使用两种人细胞系评估DMPK siRNA的体外活性:第一种是SJCRH30人横纹肌肉瘤细胞系;第二种是源自1型强直性营养不良(DM1)患者的无限增殖化人骨骼肌成肌细胞。选出的siRNA以100、10、1、0.1、0.01、0.001和0.0001nM终浓度以10倍剂量响应转染,或以50、5.55556、0.617284、0.068587、0.007621、0.000847和0.000094nM最终浓度以9倍剂量响应转染。用转染试剂Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies),按照制造商的“正向转染”说明,配制siRNA。转染前24小时将细胞一式三份接种至96孔组织培养板上,对于SJCRH30为每孔8500个细胞,对于DM1成肌细胞为每孔4000个细胞。在转染后48h(SJCRH30)或72h(DM1成肌细胞),用PBS洗涤细胞,并用TRIZOL®试剂(Life Technologies)收获。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μl RNA逆转录为cDNA。使用TaqMan®Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems),用DMPK特异性和PP1B特异性TaqMan人基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。在每个样品内将DMPK值相对于PP1B基因表达进行归一化。HPRT下调的定量使用标准 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来进行。所有实验均一式三份进行,

表16A-B、17A-B和18A-B呈现了三次重复的平均值以及通过非线性回归将曲线拟合到剂量响应数据而确定的计算出的IC<sub>50</sub>值。

[0777] 表16A

ID # <sup>1</sup>	有义链序列 (5'-3') 过客链 (PS)	SEQ ID NO:	反义链序列 (5'-3') 指导链 (GS)	SEQ ID NO:
535	GGGCGAGGUGUCGUGCUUA	34	UAAGCACGACACCUCGCCC	115
584	GACCGGCGGUGGAUCACGA	44	UCGUGAUCCACCGCCGGUC	125
716	AUGGCGCGCUUCUACCUGA	46	UCAGGUAGAAGCGCGCCA	127
1028	CAGACGCCCUUCUACGCGA	53	UCGCGUAGAAGGGCGUCUG	134
1276	UUUCGAAGGUGCCACCGAA	71	UUCGGUGGCACCUUCGAAA	152
1825	UGCUCUGUUCGCCGUUGA	78	UCAACGGCGAACAGGAGCA	159
1945	CCCUAGAACUGUCUUCGAA	82	UUCGAAGACAGUUCUAGGG	163
2529	CUUCGGCGGUUUGGAUUA	91	UAUAUCCAAACCGCCGAAG	172
2558	GUCCUCCGACUCGCUGACA	96	UGUCAGCGAGUCGGAGGAC	177
2628	CCGACAUUCCUCGUUAUA	98	UAAUACCGAGGAAUGUCGG	179
2636	CCUCGUUAUUUAUUGUCUA	101	UAGACAAUAAAUACCGAGG	182

[0779] <sup>1</sup>NM\_001288766.1中的19聚体位置

[0780] 表16B

ID # <sup>1</sup>	qPCR <sup>2</sup>	qPCR <sup>3</sup>	qPCR <sup>4</sup>	qPCR <sup>5</sup>	qPCR <sup>6</sup>	qPCR <sup>7</sup>	qPCR <sup>8</sup>	IC50 (nM)
535	111.9	105.4	106.3	82.4	36.7	29.5	35.7	0.165
584	90.5	90.2	84.7	67.8	38.0	25.8	28.3	0.190
716	88.9	85.2	81.9	62.0	32.6	19.3	20.3	0.181
1028	88.5	81.8	83.0	61.3	32.7	27.3	31.5	0.127
1276	87.0	85.0	84.0	66.1	40.5	34.0	36.4	0.150
1825	85.1	85.9	83.7	69.1	36.2	25.2	25.0	0.259
1945	85.0	81.7	74.4	44.9	22.9	17.7	17.2	0.070
2529	83.3	81.8	75.3	50.6	24.6	17.5	17.7	0.103
2558	84.3	81.1	74.3	45.4	23.4	13.3	11.8	0.088
2628	85.3	84.0	79.5	59.8	30.3	23.5	25.1	0.140
2636	86.3	86.9	74.3	44.0	19.8	12.4	13.0	0.070

[0783] <sup>2</sup>SJCRH30;0.0001nM;%DMPK mRNA <sup>3</sup>SJCRH30;0.001nM;%DMPK mRNA <sup>4</sup>SJCRH30;0.01nM;%DMPK mRNA <sup>5</sup>SJCRH30;0.1nM;%DMPK mRNA <sup>6</sup>SJCRH30;1nM;%DMPK mRNA <sup>7</sup>SJCRH30;10nM;%DMPK mRNA <sup>8</sup>SJCRH30;100nM;%DMPK mRNA表17A

ID # <sup>1</sup>	有义链序列 (5'-3') 过客链 (PS)	SEQ ID NO:	反义链序列 (5'-3') 指导链 (GS)	SEQ ID NO:
2600	CAAUCCACGUUUUGGAUGA	97	UCAUCCAAAACGUGGAUUG	178
2636	CCUCGUAUUUAUUGUCUA	101	UAGACAAUAAAUACCGAGG	182
2675	CCCCGACCCUCGCGAAUAA	103	UUAUUCGCGAGGGUCGGGG	184
2676	CCCGACCCUCGCGAAUAAA	104	UUUAUUCGCGAGGGUCGGG	185
2679	GACCCUCGCGAAUAAAAGA	105	UCUUUUUAUUCGCGAGGGUC	186
2680	ACCCUCGCGAAUAAAAGGA	106	UCCUUUUUAUUCGCGAGGGU	187
2681	CCCUCGCGAAUAAAAGGCA	107	UGCCUUUUUAUUCGCGAGGG	188
2682	CCUCGCGAAUAAAAGGCCA	108	UGGCCUUUUUAUUCGCGAGG	189

[0785] <sup>1</sup>NM\_001288766.1中的19聚体位置

[0786] 表17B

ID # <sup>1</sup>	qPCR <sup>2</sup>	qPCR <sup>3</sup>	qPCR <sup>4</sup>	qPCR <sup>5</sup>	qPCR <sup>6</sup>	qPCR <sup>7</sup>	IC50 (nM)
2600	107.5	107.6	108.1	106.3	103.1	72.7	31.31
2636	81.1	81.1	74.0	47.2	25.7	11.5	0.073

2675	88.1	88.3	84.3	64.6	38.1	20.7	0.151
2676	88.9	78.9	84.4	72.7	44.9	35.6	0.204
2679	84.0	87.3	82.7	53.3	31.4	13.5	0.091
2680	87.4	85.3	85.1	68.5	44.5	39.6	0.110
2681	87.0	85.4	77.6	49.6	26.5	16.0	0.061
2682	82.4	83.9	77.1	50.8	27.3	31.1	0.047

[0789] <sup>2</sup>SJCRH30;0.000094nM;%DMPK mRNA <sup>3</sup>SJCRH30;0.000847nM;%DMPK mRNA <sup>4</sup>SJCRH30;0.007621nM;%DMPK mRNA <sup>5</sup>SJCRH30;0.068587nM;%DMPK mRNA <sup>6</sup>SJCRH30;0.617284nM;%DMPK mRNA <sup>7</sup>SJCRH30;5.55556nM;%DMPK mRNA表18A

ID # <sup>1</sup>	有义链序列 (5'-3') 过客链 (PS)	SEQ ID NO:	反义链序列 (5'-3') 指导链 (GS)	SEQ ID NO:
584	GACCGGCGGUGGAUCACGA	44	UCGUGAUCCACCGCCGGUC	125
716	AUGGCGCGCUUCUACCUGA	46	UCAGGUAGAAGCGCGCCA	127
1265	UUUACACCGGAUUUCGAAA	66	UUUCGAAAUCCGGUGUAAA	147
1297	AUGCAACUUCGACUUGGUA	73	UACCAAGUCGAAGUUGCAU	154
1945	CCCUAGAACUGUCUUCGAA	82	UUCGAAGACAGUUCUAGGG	163
1960	CGACUCCGGGGCCCCGUUA	83	UAACGGGGCCCCGGAGUCG	164
2529	CUUCGGCGGUUUGGAUAUA	91	UAUAUCCAAACCGCCGAAG	172
2530	UUCGGCGGUUUGGAUAUUA	92	UAAUAUCCAAACCGCCGAA	173
2531	UCGGCGGUUUGGAUAUUUA	93	UAAUAUCCAAACCGCCGA	174
2554	CCUCGUCCUCCGACUCGCA	95	UGCGAGUCGGAGGACGAGG	176
2628	CCGACAUUCCUCGGUAUUA	98	UAAUACCGAGGAAUGUCGG	179
2629	CGACAUUCCUCGGUAUUUA	99	UAAUACCGAGGAAUGUCG	180
2681	CCCUCGCGAAUAAAAGGCA	107	UGCCUUUUUAUUCGCGAGGG	188

[0791] <sup>1</sup>NM\_001288766.1中的19聚体位置

[0792] 表18B

	ID # <sup>1</sup>	qPCR <sup>2</sup>	qPCR <sup>3</sup>	qPCR <sup>4</sup>	qPCR <sup>5</sup>	qPCR <sup>6</sup>	qPCR <sup>7</sup>	IC50 (nM)
[0793]	584	90.8	77.0	97.7	71.9	45.0	29.7	0.228
	716	96.5	82.5	77.0	64.6	43.3	33.9	0.080
	1265	68.5	80.9	68.0	57.1	37.5	25.7	0.146
[0794]	1297	71.4	67.2	69.4	53.5	40.5	25.4	0.171
	1945	71.8	62.3	41.7	29.8	22.4	15.3	0.006
	1960	63.0	65.4	62.1	45.8	31.1	28.3	0.068
	2529	63.5	58.7	49.2	31.1	22.9	21.9	0.017
	2530	69.3	66.7	53.1	43.2	38.8	24.5	0.016
	2531	69.9	72.4	57.3	40.2	35.4	25.6	0.018
	2554	68.2	70.1	51.2	43.0	32.1	17.3	0.043
	2628	69.7	67.9	62.5	38.4	31.6	17.1	0.042
	2629	72.1	65.6	69.0	42.1	34.4	13.7	0.078
	2681	82.4	91.5	87.6	55.5	29.3	19.6	0.084

[0795] <sup>2</sup>DM1成肌细胞;0.000094nM; %DMPK mRNA

[0796] <sup>3</sup>DM1成肌细胞;0.000847nM; %DMPK mRNA

[0797] <sup>4</sup>DM1成肌细胞;0.007621nM; %DMPK mRNA

[0798] <sup>5</sup>DM1成肌细胞;0.068587nM; %DMPK mRNA

[0799] <sup>6</sup>DM1成肌细胞;0.617284nM; %DMPK mRNA

[0800] <sup>7</sup>DM1成肌细胞;5.55556nM; %DMPK mRNA

[0801] 实施例18:在小鼠中确定物种交叉反应性的体外实验

[0802] 将选出的siRNA以100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001nM的终浓度转染到C2C12小鼠肌肉成肌细胞(ATCC®CRL-1772™)中。用转染试剂Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies),按照制造商的“正向转染”说明,配制siRNA。转染前24小时将细胞一式三份接种至96孔组织培养板上,对于C2C12接种为每孔4000个细胞。转染后48小时,用PBS洗涤细胞,并用TRIzol®试剂(Life Technologies)收获。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μl RNA逆转录为cDNA。使用TaqMan®Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems),用DMPK特异性和PPIB特异性TaqMan小鼠基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。在每个样品内将DMPK值相对于PPIB基因表达进行归一化。HPRT下调的定量使用标准 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来进行。所有实验均一式三份进行,结果显示于图17中。已显示四种DMPK siRNA(图17图例中指示的数字对应于表15A中列出的ID#)与小鼠DMPK mRNA有效交叉反应,从而在小鼠C2C12成肌细胞细胞系中产生稳定的mRNA敲减。两种siRNA(ID#535和1028)的效力稍差,仅产生最大mRNA敲减的约70%。两种siRNA(ID#2628和2636)更有效,并产生最大mRNA敲减的约90%。

[0803] 实施例19:在小鼠中确定物种交叉反应性的体内实验

[0804] 动物

[0805] 所有动物研究均按照机构动物管理和使用委员会(IACUC)的方案在Explora

BioLabs进行,遵守USDA动物福利法案中概述的规定以及“实验动物管理和使用指南 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)” (国家研究委员会 (National Research Council) 出版物,第8版,2011年修订)。所有小鼠均获自Charles River Laboratories或Harlan Laboratories。

#### [0806] 缀合物制备

[0807] 体内研究总共使用了五种siRNA:四种显示与小鼠在体外交叉反应的DMPK siRNA (图17),和一种具有杂乱序列的siRNA,其不产生DMPK敲减,并且可以用作阴性对照。使用寡核苷酸合成文献中描述的标准固相合成方法合成所有siRNA。使用标准方法通过HPLC纯化单链,然后将纯单链以等摩尔比混合,以产生纯双链体。所有siRNA均被合成为在过客(有义)链5'端具有一个己胺连接体,其可以用作与抗体连接的缀合柄。siRNA使用RNAi领域中充分描述的最佳碱基、糖和磷酸修饰来合成,以最大化双链体的效力、最大化代谢稳定性和最小化免疫原性。

[0808] 抗小鼠运铁蛋白受体 (TfR1,也称为CD71) 单克隆抗体 (mAb) 是以高亲和力结合小鼠CD71蛋白的大鼠IgG2a亚类单克隆抗体。该CD71抗体由BioXcell生产,并且可商购获得(目录号BE0175)。使用得自BioXcell的CD71 mAb和相应的DMPK或杂乱siRNA合成抗体-siRNA缀合物。如前所述,使用双马来酰亚胺-TFP酯连接体,通过半胱氨酸缀合至抗体和胺缀合至siRNA(通过己胺)合成所有缀合物。如前所述,通过强阳离子交换(SAX)仅分离药物-抗体比(DAR)等于1(即1个siRNA/mAb的摩尔比)的缀合物,来纯化所有缀合物。通过在PBS中稀释配制所有抗体-siRNA缀合物以供体内给药。

#### [0809] 体内给药和分析

[0810] 通过以5mL/kg的给药体积单次静脉内团注到尾静脉,将纯化的DAR1抗体-siRNA缀合物以0.1、0.3、1和3mg/kg(基于siRNA的重量)给予雌性野生型CD-1小鼠(4-6周龄)组(n=4)。将单次模拟剂量的PBS媒介物以匹配的剂量体积注射到雌性野生型CD-1小鼠(也是4-6周龄)的对照组(n=5)。给药后7天通过CO<sub>2</sub>窒息处死小鼠,并从每只小鼠中收获20-30mg多种组织(腓肠肌、胫骨前肌、四头肌、膈肌、心脏和肝脏)片,并在液氮中骤冻。加入TRIzol®试剂(Life Technologies),然后使用TissueLyser II(Qiagen)将每个组织片均质化。使用Direct-zol-96RNA试剂盒(Zymo Research),按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA Reverse Transcription试剂盒(Applied Biosystems),按照制造商的说明将10μl RNA逆转录为cDNA。使用TaqMan® Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems),用DMPK特异性和PPIB特异性TaqMan小鼠基因表达探针(Thermo Fisher)通过qPCR评价cDNA样品。在每个样品内将DMPK值相对于PPIB基因表达进行归一化。通过将治疗的动物与PBS对照组进行比较,使用标准 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对DMPK下调进行定量。体内DMPK mRNA敲减结果显示在图18A-图18F中。所有四种DMPK siRNA(图18A-图18F图例中所示的数字对应于表15A中列出的ID#)均显示以剂量依赖性方式有效降低所分析的所有骨骼肌(腓肠肌、胫骨前肌、四头肌和膈肌)中DMPK mRNA的水平。在最高剂量(3mg/kg)下,最具活性的siRNA在所有骨骼肌中达到大于75%的DMPK mRNA敲减。在小鼠骨骼肌中观察到的体内DMPK敲减(图18A-图18F)与在小鼠C2C12成肌细胞细胞系中观察到的体外DMPK敲减(图17)密切相关,siRNA ID#2628和2636显示出高于siRNA ID#535和1028的mRNA敲减水平。除了骨骼肌中的DMPK mRNA敲减外,在小鼠心肌(心脏)中也观察到了强活性(大于50%的mRNA敲减)。最终,

在小鼠肝脏中观察到了较差的活性(低于50%的mRNA敲减)。这些结果证明,有可能在多个小鼠肌肉群(包括骨骼肌和心肌)中实现稳定的DMPK mRNA敲减,同时将诸如肝脏等脱靶组织中的敲减降至最低。

[0811] 实施例20:siRNA合成

[0812] 所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并使用HPLC纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。所有siRNA过客链都在5'端含有C6-NH<sub>2</sub>缀合柄,参见图20A-图21B。对于具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体,缀合柄通过反向脱碱基磷酸二酯连接到siRNA过客链,结构见图20A-图20B。对于具有19个碱基的互补性和一个3'二核苷酸的平端21聚体双链体,缀合柄通过末端碱基上的磷酸二酯连接到siRNA过客链,结构见图21A-图21B。

[0813] 对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。

[0814] 实施例21:2017-PK-401-C57BL6:各种Atrogin-1siRNA的体内运铁蛋白mAb缀合物递送

[0815] 对于第1-4组,参见图22中的研究设计,设计了21聚体Atrogin-1指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UCUACGUAGUUGAAUCUUCUU(SEQ ID NO:872)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0816] 使用双马来酰亚胺(BisMal)连接体的抗体siRNA缀合物合成

[0817] 步骤1:用TCEP还原抗体

[0818] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37℃下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在pH 6.0的10mM乙酸盐缓冲液中的溶液合并,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[0819] 步骤2:纯化

[0820] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法-1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[0821] 阴离子交换色谱方法(SAX)-1.

[0822] 柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13μm

[0823] 溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0824] 梯度:

	a. %A	%B	柱体积
	b. 100	0	1
	c. 81	19	0.5
[0825]	d. 50	50	13
	e. 40	60	0.5
	f. 0	100	0.5
	g. 100	0	2

[0826] 阴离子交换色谱 (SAX) 方法-2

[0827] 柱: Thermo Scientific, ProPac™ SAX-10, Bio LC™, 4X 250mm

[0828] 溶剂A: 80% 10mM TRIS pH 8, 20% 乙醇; 溶剂B: 80% 10mM TRIS pH 8, 20% 乙醇, 1.5M NaCl; 流速: 0.75ml/min

[0829] 梯度:

	a. 时间	%A	%B
	b. 0.0	90	10
	c. 3.00	90	10
[0830]	d. 11.00	40	60
	e. 14.00	40	60
	f. 15.00	20	80
	g. 16.00	90	10
	h. 20.00	90	10

[0831] 步骤-3: 经纯化的缀合物的分析

[0832] 使用阴离子交换色谱方法-2, 通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。对于缀合物 mTfR1-mAb-Atrogin-1 (DAR1), SAX保留时间为9.1min, %纯度 (以色谱峰面积计) 为99。

[0833] 体内研究设计

[0834] 在体内实验 (C57BL6小鼠) 中, 评估了缀合物介导骨骼肌中Atrogin-1的mRNA下调的能力。通过静脉内 (iv) 注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量, 参见图22。所示时间点后, 收获腓肠肌 (gastroc) 和心肌组织, 并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA, 进行逆转录, 并采用适当设计的引物和探针, 使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB (持家基因) 作为内部RNA加样对照, 通过比较Ct方法计算结果, 其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值 ( $\Delta$  Ct), 然后通过取二次差值 ( $\Delta \Delta$  Ct) 将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0835] 结果

[0836] 当与靶向运铁蛋白受体的抗TfR mAb缀合时, Atrogin-1 siRNA指导链能够介导腓肠肌和心肌中靶基因的下调, 参见图23和图24。

**[0837] 结论**

**[0838]** 在该实施例中,证明了TfR1-siAtrogin-1缀合物在体内递送后介导腓肠肌和心肌中靶基因的特异性下调。ASC由抗运铁蛋白抗体制成,小鼠腓肠肌和心肌表达运铁蛋白受体,并且该缀合物具有小鼠特异性抗运铁蛋白抗体以靶向siRNA,导致该缀合物在腓肠肌和心肌中积累。受体介导的摄取导致siRNA介导的靶mRNA敲减。

**[0839]** 实施例22:2017-PK-413-C57BL6:各种MuRF1序列的体内运铁蛋白mAb缀合物递送

**[0840]** 对于第1-2组,参见图25中的研究设计,设计了21聚体MuRF1 (2089) 指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUUCGCACCAACGUAGAAAUU (SEQ ID NO:873)。使用标准亚磷酸胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

**[0841]** 对于第3-6组,参见图G中的研究设计,设计了21聚体MuRF1 (2265) 指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UCGUGAGACAGUAGAUGUUUU (SEQ ID NO:874)。使用标准亚磷酸胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。

**[0842]** 对于第7-10组,参见图G中的研究设计,设计了21聚体MuRF1 (2266) 指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UCACACGUGAGACAGUAGAUU (SEQ ID NO:875)。使用标准亚磷酸胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。

**[0843]** 对于第11-14组,参见图G中的研究设计,设计了21聚体MuRF1 (2267) 指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUCACACGUGAGACAGUAGUU (SEQ ID NO:876)。使用标准亚磷酸胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。

**[0844]** 对于第15-18组,参见图G中的研究设计,设计了21聚体MuRF1 (2268) 指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UAAUAUUUCAUUCGCACCUU (SEQ ID NO:877)。使用标准亚磷酸胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。

**[0845]** 对于第19-22组,参见图G中的研究设计,设计了21聚体MuRF1 (2269) 指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UAAGCACCAAAUUGGCAUAUU (SEQ ID NO:878)。使用标准亚磷酸胺化



学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有一个缀合柄,即5'端的C6-NH<sub>2</sub>,它通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。

[0846] 使用双马来酰亚胺(BisMal)连接体的抗体siRNA缀合物合成

[0847] 步骤1:用TCEP还原抗体

[0848] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37℃下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在pH 6.0的10mM乙酸盐缓冲液中的溶液合并,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[0849] 步骤2:纯化

[0850] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法-1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[0851] 阴离子交换色谱方法(SAX) -1.

[0852] 柱:Tosoh Bioscience, TSKGel SuperQ-5PW, 21.5mm ID X 15cm, 13μm

[0853] 溶剂A:20mM TRIS缓冲液, pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS, 1.5M NaCl, pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0854] 梯度:

	a. %A	%B	柱体积
	b. 100	0	1
	c. 81	19	0.5
[0855]	d. 50	50	13
	e. 40	60	0.5
	f. 0	100	0.5
	g. 100	0	2

[0856] 阴离子交换色谱(SAX)方法-2

[0857] 柱:Thermo Scientific, ProPac<sup>TM</sup> SAX-10, Bio LC<sup>TM</sup>, 4X 250mm

[0858] 溶剂A:80%10mM TRIS pH 8, 20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8, 20%乙醇, 1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[0859] 梯度:

	a. 时间	%A	%B
	b. 0.0	90	10
	c. 3.00	90	10
[0860]	d. 11.00	40	60
	e. 14.00	40	60
	f. 15.00	20	80
	g. 16.00	90	10
	h. 20.00	90	10

[0861] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0862] 使用阴离子交换色谱方法-2(表19),通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[0863] 表19.

	缀合物	SAX 保留时间(min)	%纯度(根据峰面积)
	mTfR1-mAb-MuRF1(R2089)(DAR1)	9.3	99
	mTfR1-mAb-MuRF1(R2265)(DAR1)	9.1	95
[0864]	mTfR1-mAb-MuRF1(R2266)(DAR1)	9.1	98
	mTfR1-mAb-MuRF1(R2267)(DAR1)	9.1	98
	mTfR1-mAb-MuRF1(R2268)(DAR1)	9.1	97
	mTfR1-mAb-MuRF1(R2269)(DAR1)	9.2	97

[0865] 体内研究设计

[0866] 在体内实验(C57BL6小鼠)中,评估了缀合物介导肌肉(腓肠肌和心肌)中MuRF1的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,参见图25。96小时后,收获腓肠肌(gastroc)和心肌组织,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta Ct$ ),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta Ct$ )将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0867] 结果

[0868] 当与靶向运铁蛋白受体的抗TfR1 mAb缀合时,MuRF1 siRNA指导链能够介导腓肠肌和心肌中靶基因的下调,参见图26和图27。

[0869] 结论

[0870] 在该实施例中,证明了TfR1-MuRF1缀合物在体内递送后介导腓肠肌和心肌中靶基因的特异性下调。ASC由抗运铁蛋白1抗体制成,小鼠腓肠肌和心肌表达运铁蛋白受体1,并且该缀合物具有小鼠特异性抗运铁蛋白抗体以靶向siRNA,导致该缀合物在腓肠肌中积累。

受体介导的摄取导致siRNA介导的靶mRNA敲减。

[0871] 实施例23:2017-PK-412-C57BL6:用Atrogin-1和MuRF1 Tfr1-mAb缀合物预防地塞米松诱导的肌萎缩

[0872] 对于该实验,使用三种不同的siRNA:

[0873] (1):设计了21聚体Atrogin-1指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UCUACGUAGUUGAAUCUUCUU(SEQ ID NO:872)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0874] (2):设计了21聚体MuRF1指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUUCGCACCAACGUAGAAAUU(SEQ ID NO:873)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0875] (3):阴性对照siRNA序列(杂乱):使用所公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体双链体。指导/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:870)。在阴性对照siRNA中使用用于活性MSTN siRNA双链体的相同的碱、糖和磷酸修饰。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0876] 使用双马来酰亚胺(BisMal)连接体的抗体siRNA缀合物合成

[0877] 步骤1:用TCEP还原抗体

[0878] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37°C下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在pH 6.0的10mM乙酸盐缓冲液中的溶液合并,并在4°C下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[0879] 步骤2:纯化

[0880] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法-1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[0881] 阴离子交换色谱方法(SAX)-1.

[0882] 柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[0883] 溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0884] 梯度:

	a. %A	%B	柱体积
	b. 100	0	1
	c. 81	19	0.5
[0885]	d. 50	50	13
	e. 40	60	0.5
	f. 0	100	0.5
	g. 100	0	2

[0886] 阴离子交换色谱(SAX)方法-2

[0887] 柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X 250mm

[0888] 溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[0889] 梯度:

	a. 时间	%A	%B
	b. 0.0	90	10
	c. 3.00	90	10
[0890]	d. 11.00	40	60
	e. 14.00	40	60
	f. 15.00	20	80
	g. 16.00	90	10
[0891]	h. 20.00	90	10

[0892] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0893] 使用阴离子交换色谱方法-2(表20),通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[0894] 表20.

[0895]	缀合物	SAX保留时间 (min)	%纯度 (根据峰面积)
	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1)	9.3	97
	mTfR1-MuRF1 (DAR1)	9.5	98
	mTfR1-SC (DAR1)	9.0	99

[0896] 体内研究设计

[0897] 在体内实验(C57BL6小鼠)中,在存在和不存在肌萎缩的情况下,评估了缀合物介导肌肉(腓肠肌)中MuRF1和Atrogin-1的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,参见表21。缀合物递送后7天,对于第2-4、9-11和16-18

组,通过腹膜内注射(10mg/kg)地塞米松21天,通过每日给药诱发肌萎缩。对于对照组5-7、12-14和19-21(不诱发肌萎缩),通过每天腹膜内注射施用PBS。在诱发肌萎缩之前,在第7天收获第1、8、15和22组,以建立mRNA表达和肌肉重量的基线测量。在所示的时间点,收获腓肠肌(gastroc)和心肌组织,称重,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta Ct$ ),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta Ct$ )将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0898] 使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0899] 表21.

[0900]

动物和组信息			Dex/PBS 给药				化合物信息		
组	测试物	N	ROA	剂量体积 (mL/kg)	剂量数	剂量时间表	siRNA 剂量 (mg/kg)	剂量数	收获时间 (d)
1	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1)	5	-	-	-	-	3	1	7
2	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	10
3	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	17
4	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	28
5	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1), PBS	5	IP	6.25	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	10
6	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1), PBS	5	IP	6.25	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	17
7	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1), PBS	5	IP	6.25	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	28
8	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1) + mTfR1-MuRF1 (DAR1)	5	-	-	-	-	3+3	1	7
9	mTfR1-Atrogin-1 (DAR1) + mTfR1-MuRF1	5	IP	6.25	每天; 21	ASC 后 192h	3+3	1	10

[0901]

	(DAR1), +DEX (10 mg/kg)				天				
10	mTfR1-Atrogin- 1 (DAR1) + mTfR1-MuRF1 (DAR1), +DEX (10 mg/kg)	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3+3	1	17
11	mTfR1-Atrogin- 1 (DAR1) + mTfR1-MuRF1 (DAR1), +DEX (10 mg/kg)	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3+3	1	28
12	mTfR1-Atrogin- 1 (DAR1) + mTfR1-MuRF1 (DAR1), +PBS	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3+3	1	10
13	mTfR1-Atrogin- 1 (DAR1) + mTfR1-MuRF1 (DAR1), +PBS	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3+3	1	17
14	mTfR1-Atrogin- 1 (DAR1) + mTfR1-MuRF1 (DAR1), +PBS	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3+3	1	28
15	mTfR1-SC (DAR1)	5	-	-	-	-	3	1	7
16	mTfR1-SC (DAR1), +DEX (10 mg/kg)	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	10
17	mTfR1-SC (DAR1), +DEX (10 mg/kg)	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	17
18	mTfR1-SC (DAR1), +DEX (10 mg/kg)	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	28
19	mTfR1-SC (DAR1), PBS	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	10
20	mTfR1-SC (DAR1), PBS	5	IP	<b>6.25</b>	每天; 21 天	ASC 后 192h	3	1	17
21	mTfR1-SC	5	IP	<b>6.25</b>	每	ASC	3	1	28

[0902]	(DAR1), PBS				天; 21 天	后 192h			
	22	PBS 对照	5	-	-	-	-	1	7

[0903] 结果

[0904] 数据总结在图28至图31中。当使用TfR1 mAb缀合物递送时,Atrogin-1和MuRF1 siRNA的共同递送有效地下调了正常和萎缩肌肉中的Atrogin-1和MuRF1 mRNA表达。萎缩的诱导瞬时诱导Atrogin-1和MuRF1表达约4倍。在正常和萎缩的腓肠肌中,单剂量的mTfR1-Atrogin-1+TfR1.mAb-siMuRF1 (3mg/kg,各自和混合剂量)使Atrogin-1和MuRF1 mRNA水平降低>70%。MuRF1和Atrogin-1mRNA的下调使腓肠肌重量增加5-10%,并使DEX诱发的腓肠肌重量减轻减少50%。单独Atrogin-1下调对腓肠肌重量变化没有显著影响。在没有肌萎缩的情况下,用Atrogin-1/MuRF1 siRNA治疗诱导肌肉肥大。

[0905] 结论

[0906] 在该实施例中,证明了当使用TfR1 mAb缀合物递送时,Atrogin-1和MuRF1 siRNA的共同递送有效地下调了正常和萎缩腓肠肌中的Atrogin-1和MuRF1 mRNA表达。缀合物对心肌几乎没有影响,其中Atrogin-1的下调可能是有害的。MuRF1和Atrogin-1mRNA的下调使腓肠肌重量增加5-10%,并使DEX诱发的腓肠肌重量减轻减少50%。单独Atrogin-1下调对腓肠肌重量变化没有显著影响。ASC由抗运铁蛋白抗体制成,小鼠腓肠肌表达运铁蛋白受体,并且该缀合物具有小鼠特异性抗运铁蛋白抗体以靶向siRNA,导致该缀合物在腓肠肌中积累。受体介导的摄取导致siRNA介导的靶mRNA敲减。

[0907] 实施例24:2017-PK-435-C57BL6:用于Atrogin-1的运铁蛋白mAb缀合物递送的体内剂量响应实验

[0908] 对于第1-12组,参见图32中的研究设计,设计了21聚体Atrogin-1指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UCGUAGUAAAUCUUCUGGUU (SEQ ID NO:879)。使用标准亚磷酸胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图A所述的双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0909] 对于第13-18组,参见图32中的研究设计,使用了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体阴性对照siRNA序列(杂乱)(由Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60发表)。指导/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU (SEQ ID NO:870)。在阴性对照siRNA中使用用于活性MSTN siRNA双链体的相同的碱、糖和磷酸修饰。所有siRNA单链均使用标准亚磷酸胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0910] 使用双马来酰亚胺(BisMal)连接体的抗体siRNA缀合物合成

[0911] 步骤1:用TCEP还原抗体



[0912] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37℃下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在pH 6.0的10mM乙酸盐缓冲液中的溶液合并,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[0913] 步骤2:纯化

[0914] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法-1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[0915] 阴离子交换色谱方法(SAX) -1.

[0916] 柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[0917] 溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0918] 梯度:

	a. %A	%B	柱体积
	b. 100	0	1
	c. 81	19	0.5
[0919]	d. 50	50	13
	e. 40	60	0.5
	f. 0	100	0.5
	g. 100	0	2

[0920] 阴离子交换色谱(SAX)方法-2

[0921] 柱:Thermo Scientific,ProPac<sup>TM</sup> SAX-10,Bio LC<sup>TM</sup>,4X 250mm

[0922] 溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[0923] 梯度:

	a. 时间	%A	%B
	b. 0.0	90	10
	c. 3.00	90	10
[0924]	d. 11.00	40	60
	e. 14.00	40	60
	f. 15.00	20	80
	g. 16.00	90	10
[0925]	h. 20.00	90	10

[0926] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0927] 使用阴离子交换色谱方法-2(表22),通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[0928] 表22.

缀合物	SAX保留时间 (min)	%纯度(根据峰面积)
TfR1-Atrogin-1DAR1	9.2	99
TfR1-Scramble DAR1	8.9	93

[0930] 体内研究设计

[0931] 在体内实验(C57BL6小鼠)中,在存在和不存在肌萎缩的情况下,评估了缀合物介导肌肉(腓肠肌)中Atrogin-1的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,参见图32。缀合物递送后7天,对于第3、6、9、12和15组,通过腹膜内注射(10mg/kg)地塞米松3天,通过每日给药诱发肌萎缩。对于对照组2、5、8、11和14(不诱发肌萎缩),通过每天腹膜内注射施用PBS。在诱发肌萎缩之前,在第7天收获第1、4、7、10和13组,以建立mRNA表达和肌肉重量的基线测量。在萎缩诱发后三天(或缀合物递送后10天),收获腓肠肌(gastroc),称重,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta$ Ct),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta$ Ct)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0932] 使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0933] 结果

[0934] 数据总结在图33至图35中。当与靶向运铁蛋白受体的抗TfR mAb缀合时,Atrogin-1siRNA指导链能够介导腓肠肌中靶基因的下调,参见图33。将剂量从3mg/kg增加到9mg/kg使萎缩诱导的Atrogin-1mRNA水平减少了2-3倍。siRNA可获得的最大KD为80%,需要40nM的组织浓度才能在萎缩肌肉中达到最大KD。这突显了缀合物递送方法能够通过增加剂量来改变疾病诱导的Atrogin-1的mRNA表达水平(见图34)。图35突显了mRNA下调由Atrogin-1指导链的RISC负载介导,并且是浓度依赖性的。

[0935] 结论

[0936] 在该实施例中,证明了TfR1-Atrogin-1缀合物在体内递送后,以剂量依赖性方式介导腓肠肌中靶基因的特异性下调。萎缩诱发后,缀合物能够在较高剂量下介导疾病诱导的Atrogin-1的mRNA表达水平。Atrogin-1指导链的较高RISC负载与mRNA下调的增加相关。

[0937] 实施例25:2017-PK-381-C57BL6:肌肉生长抑制素(MSTN)下调减少地塞米松治疗的小鼠中的肌肉损失

[0938] 对于第1-12组,参见表24中的研究设计,设计了21聚体Atrogin-1指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UCGUAGUAAAUCUUCUGGUU(SEQ ID NO:879)。使用标准亚磷酸胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双

链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0939] 对于第13-18组,参见表24中的研究设计,使用了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体阴性对照siRNA序列(杂乱)(由Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60发表)。指导/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:870)。在阴性对照siRNA中使用用于活性MSTN siRNA双链体的相同的碱、糖和磷酸修饰。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0940] 使用双马来酰亚胺(BisMal)连接体的抗体siRNA缀合物合成

[0941] 步骤1:用TCEP还原抗体

[0942] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37°C下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在pH 6.0的10mM乙酸盐缓冲液中的溶液合并,并在4°C下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[0943] 步骤2:纯化

[0944] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法-1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[0945] 阴离子交换色谱方法(SAX)-1.

[0946] 柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[0947] 溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0948] 梯度:

a. %A	%B	柱体积
b. 100	0	1
c. 81	19	0.5
[0949] d. 50	50	13
e. 40	60	0.5
f. 0	100	0.5
g. 100	0	2

[0950] 阴离子交换色谱(SAX)方法-2

[0951] 柱:Thermo Scientific,ProPac<sup>TM</sup> SAX-10,Bio LC<sup>TM</sup>,4X 250mm

[0952] 溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,

1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[0953] 梯度:

	a. 时间	%A	%B
	b. 0.0	90	10
	c. 3.00	90	10
[0954]	d. 11.00	40	60
	e. 14.00	40	60
	f. 15.00	20	80
	g. 16.00	90	10
	h. 20.00	90	10

[0955] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0956] 使用阴离子交换色谱方法-2(表23),通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[0957] 表23.

[0958]	缀合物	SAX 保留时间(min)	%纯度(根据峰面积)
	mTfR1-MSTN (DAR1)	9.2	98
[0959]	mTfR1-SC (DAR1)	8.9	98

[0960] 体内研究设计

[0961] 在体内实验(C57BL6小鼠)中,在存在和不存在肌萎缩的情况下,评估了缀合物介导肌肉(腓肠肌)中MSTN的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,参见表24。缀合物递送后7天,对于第2、3、4、9、10和11组,通过腹膜内注射(10mg/kg)地塞米松13天,通过每日给药诱发肌萎缩。对于对照组5、6、7、12、13和14(不诱发肌萎缩),通过每天腹膜内注射施用PBS。在诱发肌萎缩之前,在第7天收获第1和8组,以建立mRNA表达和肌肉重量的基线测量。在萎缩诱发后3、7和14天(或缀合物递送后10、14和21天),收获腓肠肌(gastroc),称重,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta$ Ct),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta$ Ct)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[0962] 使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0963] 表24

[0964]

动物和组信息			Dex/PBS 给药				化合物信息		
组	测试物	N	ROA	剂量体 积 (mL/kg)	剂量 数	剂量时 间表	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	收获时 间 (d)
1	mTfR1- MSTN (DAR1)	5	-	-	-	-	3	IV	7

[0965]

2	mTfR1-MSTN (DAR1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	10
3	mTfR1-MSTN (DAR=1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	14
4	mTfR1-MSTN (DAR=1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	21
5	mTfR1-MSTN (DAR1), PBS	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	10
6	mTfR1-MSTN (DAR1), PBS	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	14
7	mTfR1-MSTN (DAR1), PBS	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	21
8	mTfR1-SC (DAR1)	5	-	-	-	-	3	IV	7
9	mTfR1-SC (DAR1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	10
10	mTfR1-SC (DAR1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	14
11	mTfR1-SC (DAR1), +DEX (10mg/kg)	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	21
12	mTfR1-SC (DAR1), PBS	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	10
13	mTfR1-SC	5	IP	6.25	每天;	ASC 后	3	IV	14

[0966]		(DAR1), PBS				13 天	192h			
	14	mTfR1- SC (DAR1), PBS	5	IP	6.25	每天; 13 天	ASC 后 192h	3	IV	21
	15	PBS 对 照	5	-	-	-	-	-	IV	7

[0967] 结果

[0968] 数据总结在图36和图37中。在存在和不存在地塞米松诱发的萎缩的情况下,当与靶向运铁蛋白受体的抗TfR mAb缀合时,MSTN siRNA指导链能够介导腓肠肌中靶基因的下调,参见图36。单次3mg/kg siRNA将MSTN mRNA水平下调了>75%。在地塞米松诱发的萎缩的存在下,MSTN下调增加了肌肉质量并减轻了Dex诱导的肌肉损失,参见图37。

[0969] 结论

[0970] 在该实施例中,证明了TfR1-MSTN缀合物在体内递送后介导腓肠肌中靶基因的特异性下调。在萎缩诱发后,缀合物能够增加肌肉质量并减轻Dex诱导的肌肉损失。

[0971] 实施例26:2017-PK-496-C57BL6:Atrogin-1和MuRF1下调减少小鼠坐骨神经去神经支配时的腿部肌肉损失

[0972] 对于第1-4组,参见图38中的研究设计,设计了21聚体Atrogin-1指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUUGGUAACAUCGUACAAGUU(SEQ ID NO:880)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0973] 对于第5-6组,参见图V中的研究设计,设计了21聚体MuRF1指导链。指导/反义链的序列(5'至3')为UUUCGCACCAACGUAGAAAUU(SEQ ID NO:873)。使用标准亚磷酰胺化学法在固相上组装指导链和完全互补的RNA过客链,并通过HPLC进行纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。对纯化的单链进行双链体化,以得到图20B所述的双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0974] 对于第7-12组,如上所述设计Atrogin-1和MuRF1。与TfR1 mAb缀合后,并且在在纯化和分离单个DAR1物质后,混合并共同施用。

[0975] 对于第13组,参见图38中的研究设计,使用了具有19个碱基的互补性和3'二核苷酸突出端的21聚体阴性对照siRNA序列(杂乱)(由Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60发表)。指导/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:870)。在阴性对照siRNA中使用用于活性MSTN siRNA双链体的相同的碱、糖和磷酸修饰。所有siRNA单链均使用标准亚磷酰胺化学在固相上完全组装,并通过HPLC纯化。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH<sub>2</sub>和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链。由

于游离巯基没有用于缀合,因此用N-乙基马来酰亚胺进行fffu封端。

[0976] 使用双马来酰亚胺 (BisMal) 连接体的抗体siRNA缀合物合成

[0977] 步骤1:用TCEP还原抗体

[0978] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液 (pH 8) 对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37℃下孵育2小时。在室温下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在pH 6.0的10mM乙酸盐缓冲液中的溶液合并,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺 (在DMSO中为10mg/mL) 处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[0979] 步骤2:纯化

[0980] 使用阴离子交换色谱 (SAX) 方法-1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1和DAR2抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[0981] 阴离子交换色谱方法 (SAX) -1.

[0982] 柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[0983] 溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0984] 梯度:

a. %A	%B	柱体积
b. 100	0	1
c. 81	19	0.5
[0985] d. 50	50	13
e. 40	60	0.5
f. 0	100	0.5
g. 100	0	2

[0986] 阴离子交换色谱 (SAX) 方法-2

[0987] 柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X 250mm

[0988] 溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[0989] 梯度:

a. 时间	%A	%B
[0990] b. 0.0	90	10
c. 3.00	90	10



	d.	11.00	40	60
	e.	14.00	40	60
[0991]	f.	15.00	20	80
	g.	16.00	90	10
	h.	20.00	90	10

[0992] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0993] 使用阴离子交换色谱方法-2(表25),通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[0994] 表25

[0995]

缀合物	SAX保留时间 (min)	%纯度(根据峰面积)
TfR1-Atrogin-1DAR1	9.2	95
TfR1-MuRF1 DAR1	9.3	92
mTfR1-SC (DAR1)	8.9	76

[0996] 体内研究设计

[0997] 在体内实验(C57BL6小鼠)中,在存在和不存在坐骨神经去神经支配的情况下,评估了缀合物介导肌肉(腓肠肌)中MuRF1和Atrogin-1的mRNA下调的能力。通过静脉内(iv)注射向小鼠给予PBS媒介物对照和所示的ASC和剂量,参见图38。缀合物递送后7天,对于第2-4、6-8、10-12和14-16组,坐骨神经去神经支配诱发腿部肌萎缩。对照组1、5、9、13和17均未诱发去神经支配。

[0998] 对于在第7天的去神经支配程序,将小鼠麻醉(5%异氟烷)并施用0.1mg/kg丁丙诺啡的皮下剂量。从坐骨切迹到膝盖将右背骨盆区域剃毛。该区域用交替的酒精和聚维酮碘消毒。通过触摸和从坐骨切迹向膝盖切开约1cm的切口来识别坐骨切迹。股二头肌裂开以暴露坐骨神经,并通过烧灼两端除去约1cm的区片。然后缝合肌肉和皮肤以闭合切口。然后每天检查手术肢体,以观察手术伤口的情况并观察动物的整体健康状况。

[0999] 对于第4、8、12和16组,确定腿部肌肉面积的变化:将待测的腿剃毛,并使用不褪色的墨水画线以标记出测量区域。将小鼠约束在锥形约束装置中,并用手握住右腿。使用数字卡尺在矢状面上进行一次测量,并在冠状面上进行另一次测量。每周重复该程序两次。对于所有组,在所示的时间点,收获腓肠肌(gastroc)和心肌组织,称重,并在液氮中骤冻。使用如方法部分所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲减。从组织中提取总RNA,进行逆转录,并采用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR对mRNA水平进行定量。使用PPIB(持家基因)作为内部RNA加样对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值之间的差值( $\Delta$ Ct),然后通过取二次差值( $\Delta \Delta$ Ct)将其进一步相对于PBS对照组进行归一化。

[1000] 使用如方法部分所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1001] 图39A显示了4.5mg/kg (siRNA)的Atrogin-1siRNA或MuRF1siRNA的单次处理,或两

种siRNA组合的单剂量处理,导致腓肠肌中每个靶标最高下调75%。

[1002] 图39B显示了直到ASC给药后37天,在整个腿中,腓肠肌中两种靶标的mRNA敲减保持在75%。

[1003] 在去神经支配的腿中,Atrogin1 mRNA敲减在去神经支配后3天得以维持,但到去神经支配后10天降低到20%,在去神经后30天降低到0%。去神经支配后3天,去神经支配的腿中的MuRF1 mRNA敲减增强至80-85%,但到去神经支配后10天降低至50%,到去神经支配后30天降低至40% (图39C)。

[1004] 当使用两种siRNA的组合进行处理时,每个靶标的mRNA敲减不受另一个靶标的敲减的影响 (图39D)。

[1005] 基于腿部肌肉面积的测量,siRNA介导的MuRF1下调以及MuRF1和Atrogin-1的组合将去神经支配诱发的肌肉萎缩减少至多30%。与用MuRF1和Atrogin-1的组合进行治疗相比,单独用MuRF1 siRNA治疗显示出相似的反应。单独Atrogin-1下调对腿部肌肉面积没有显著影响。统计分析使用Welch's T检验将治疗组与杂乱siRNA对照组进行了比较。参见图39E。

[1006] 基于腓肠肌重量,仅MuRF1显示出统计学上显著的与杂乱siRNA对照组的差异。与通过测量腿部肌肉面积获得的结果相似,MuRF1的下调显示了去神经支配诱发的肌肉萎缩至多减少35%。这些结果与小鼠中的MuRF1敲除的作用一致 (Bodine等人,Science 291, 2001)。参见图39F。

[1007] 尽管已经在本文中示出并描述了本公开的优选实施方案,但是对于本领域技术人员明显的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本公开内容的情况下,本领域技术人员现将会想到许多变化、改变和替代。应当理解,在本公开的实践中可以采用本文所述的本公开的实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本公开的范围,由此涵盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物。

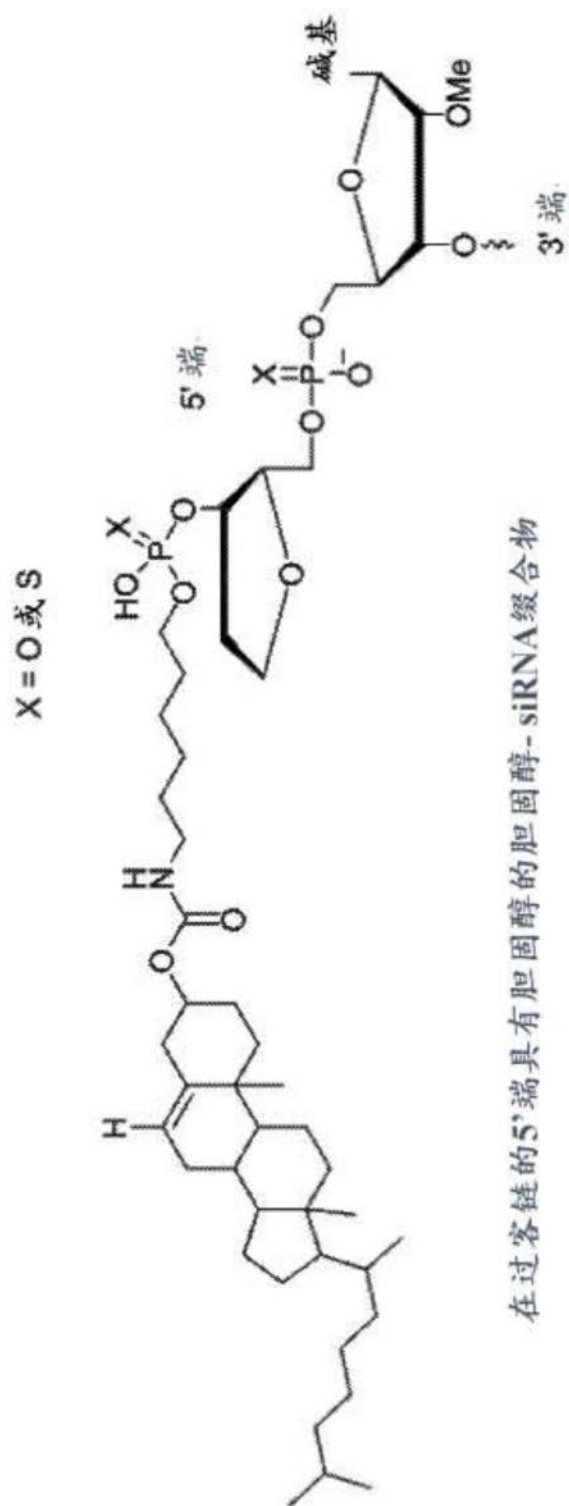


图1

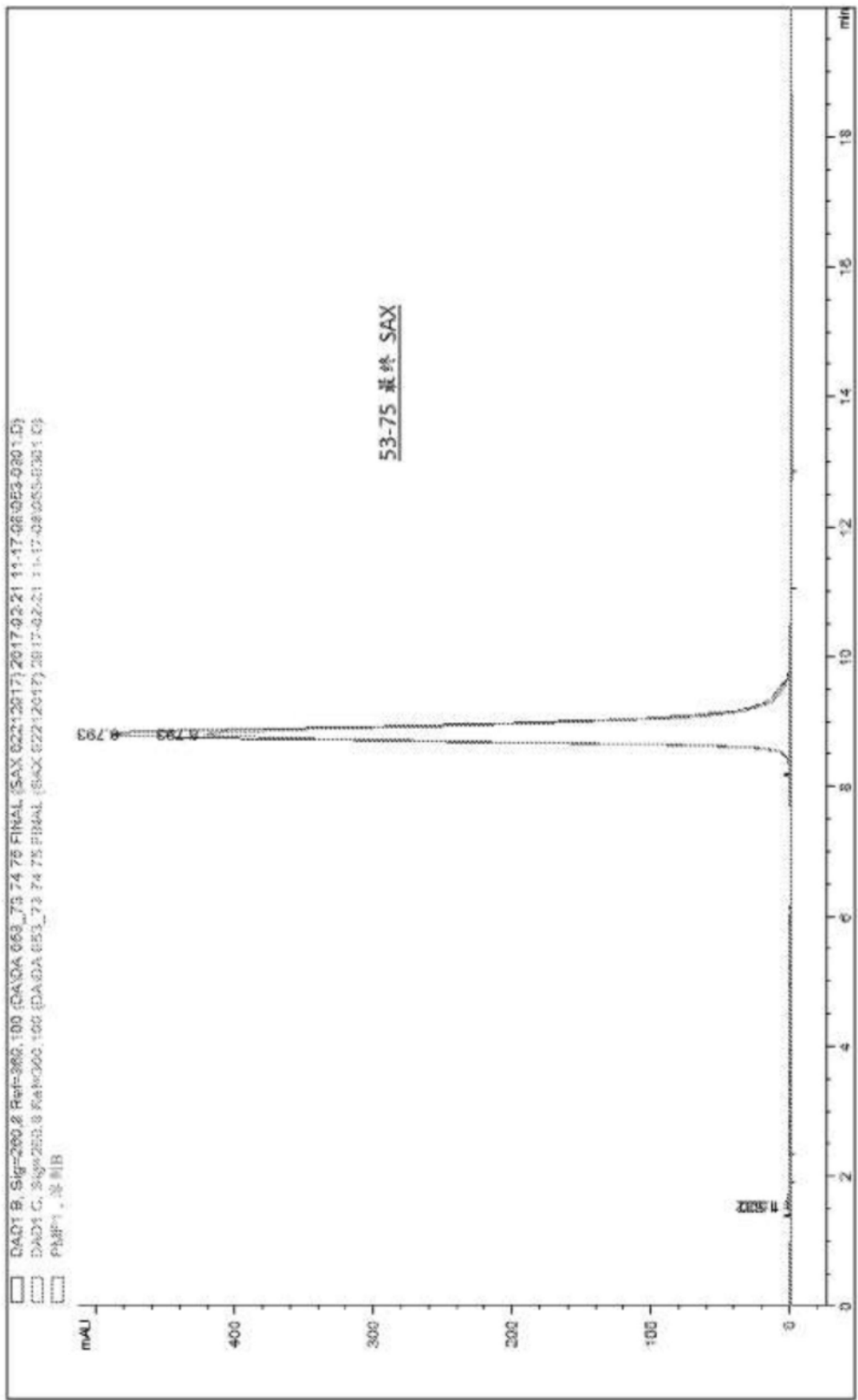


图2

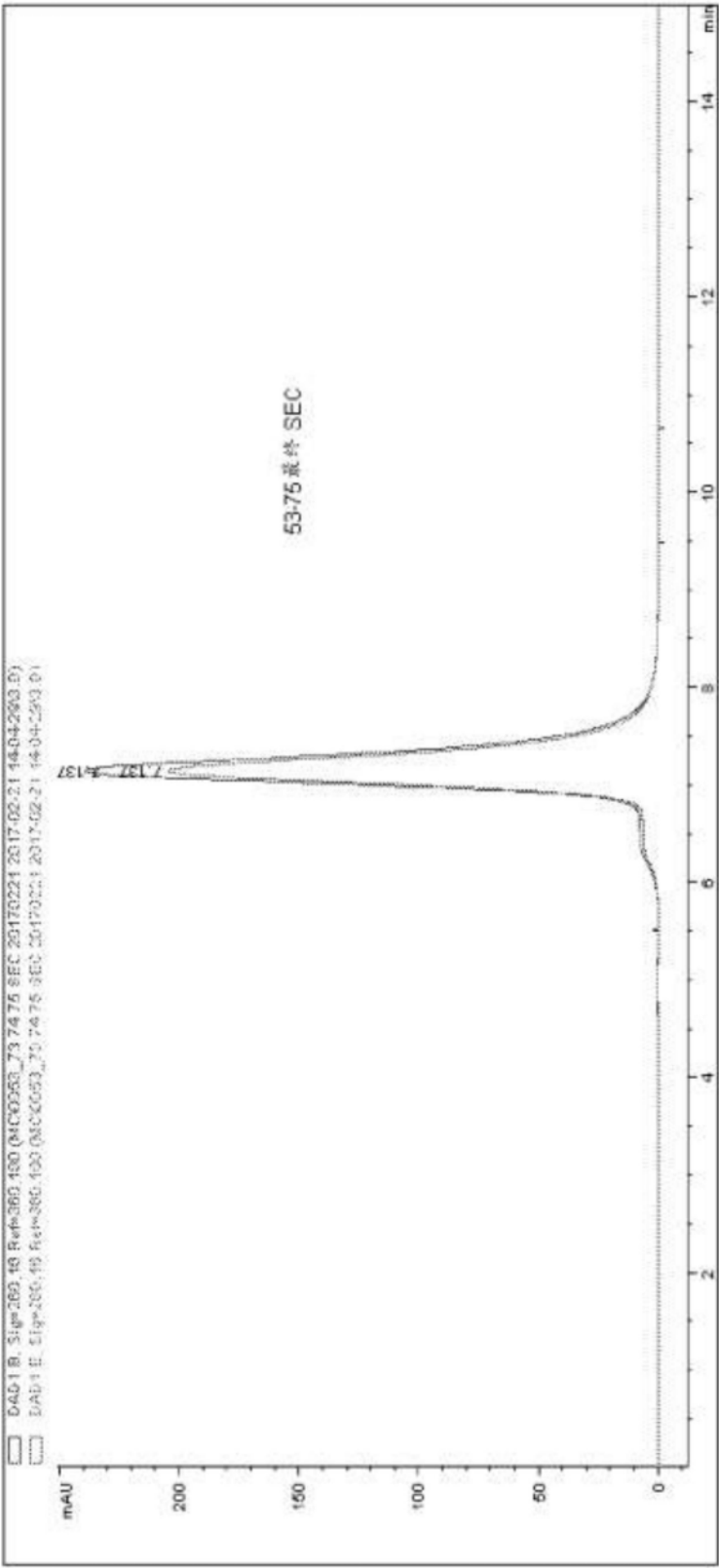


图3

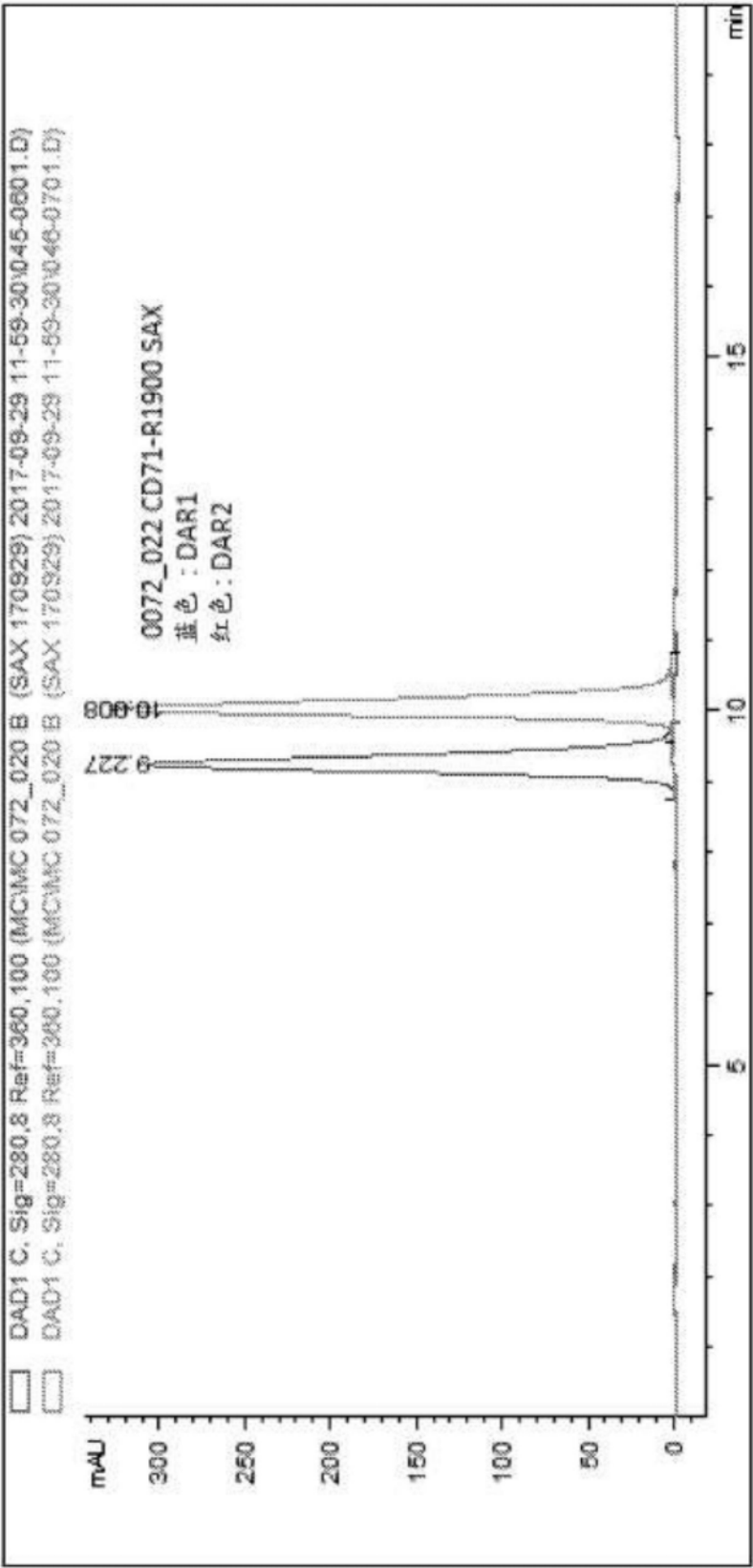


图4

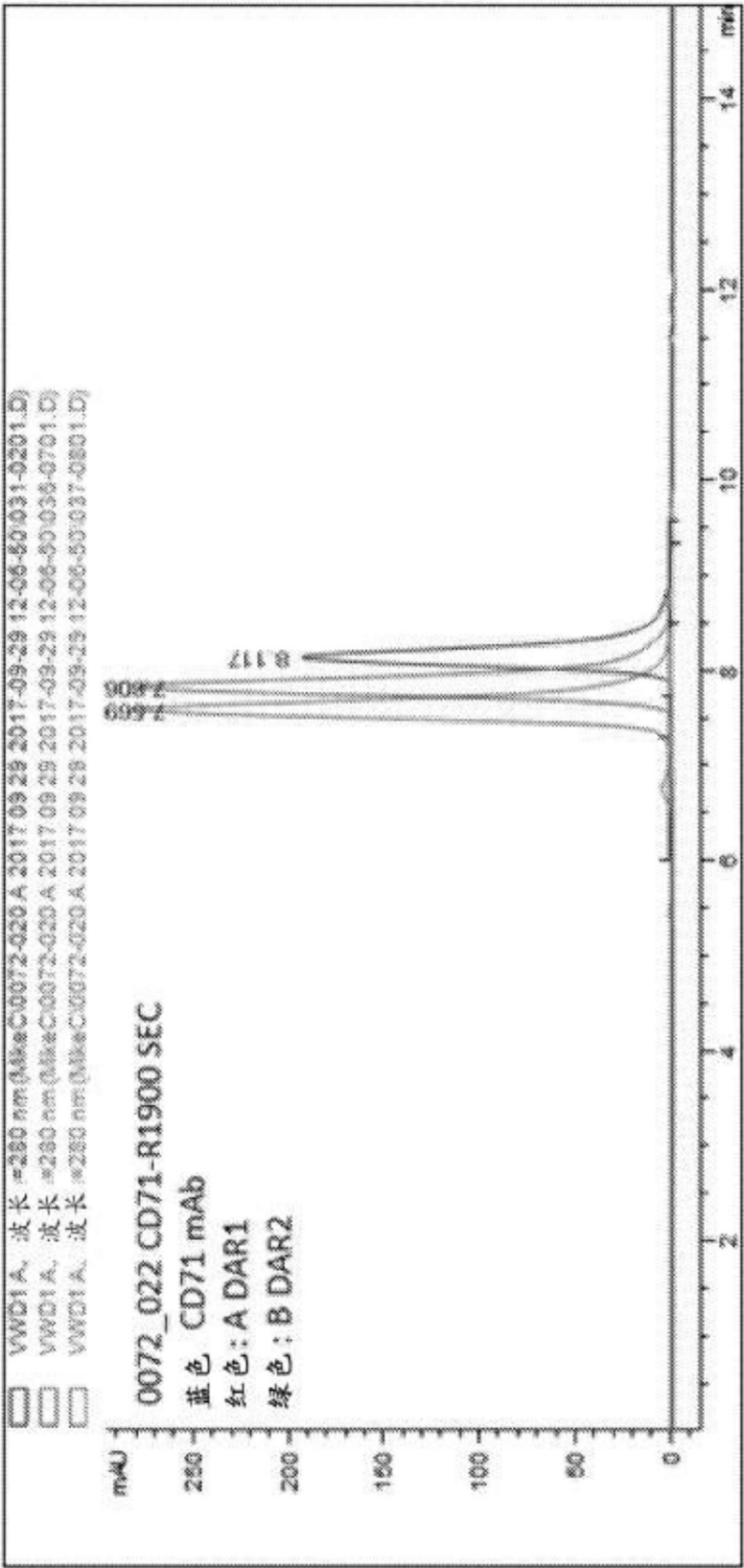


图5

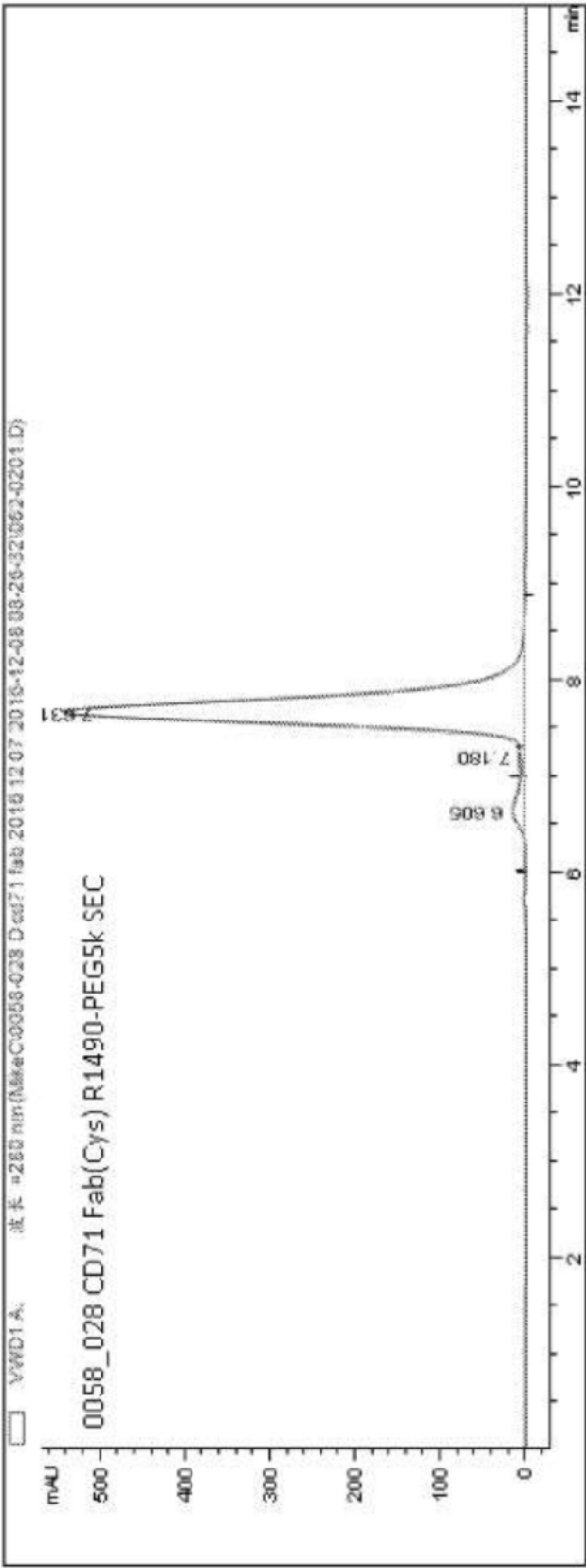


图6



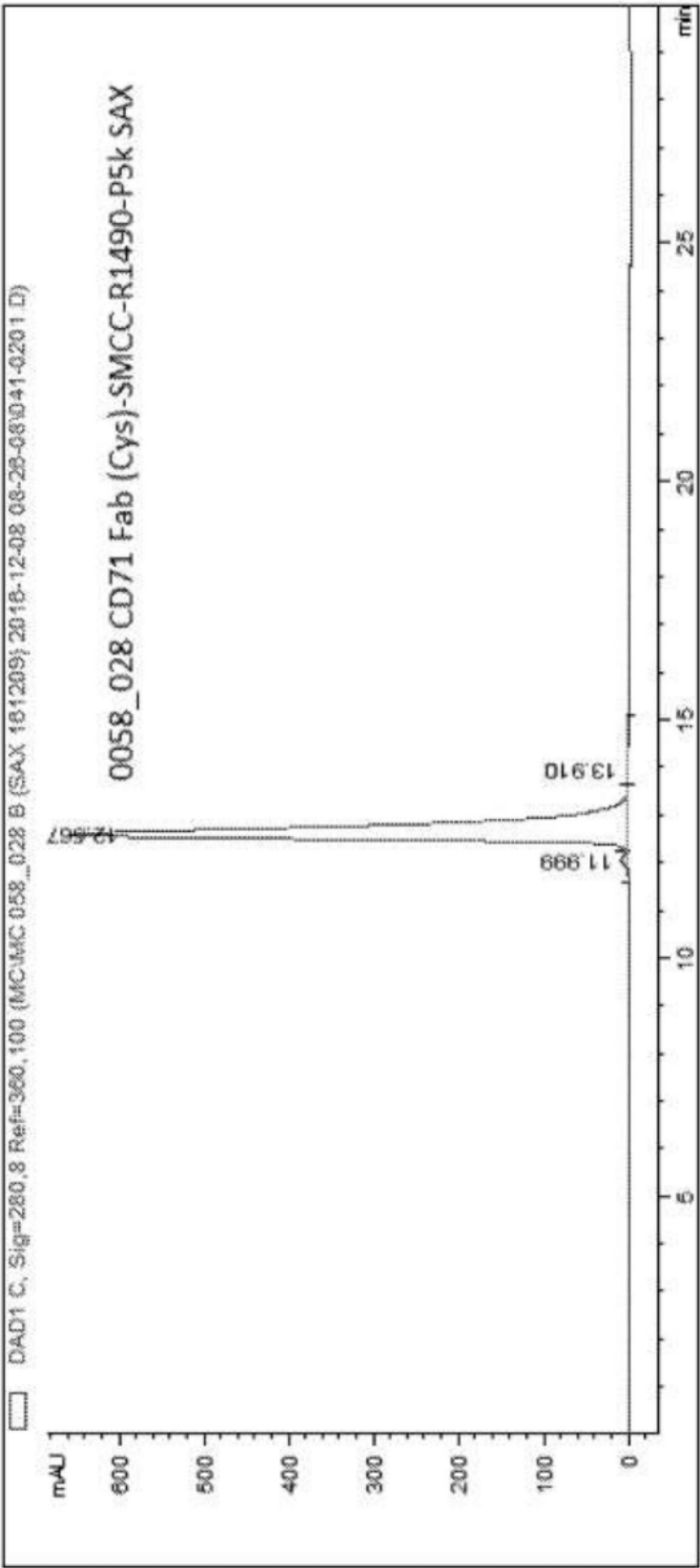


图7

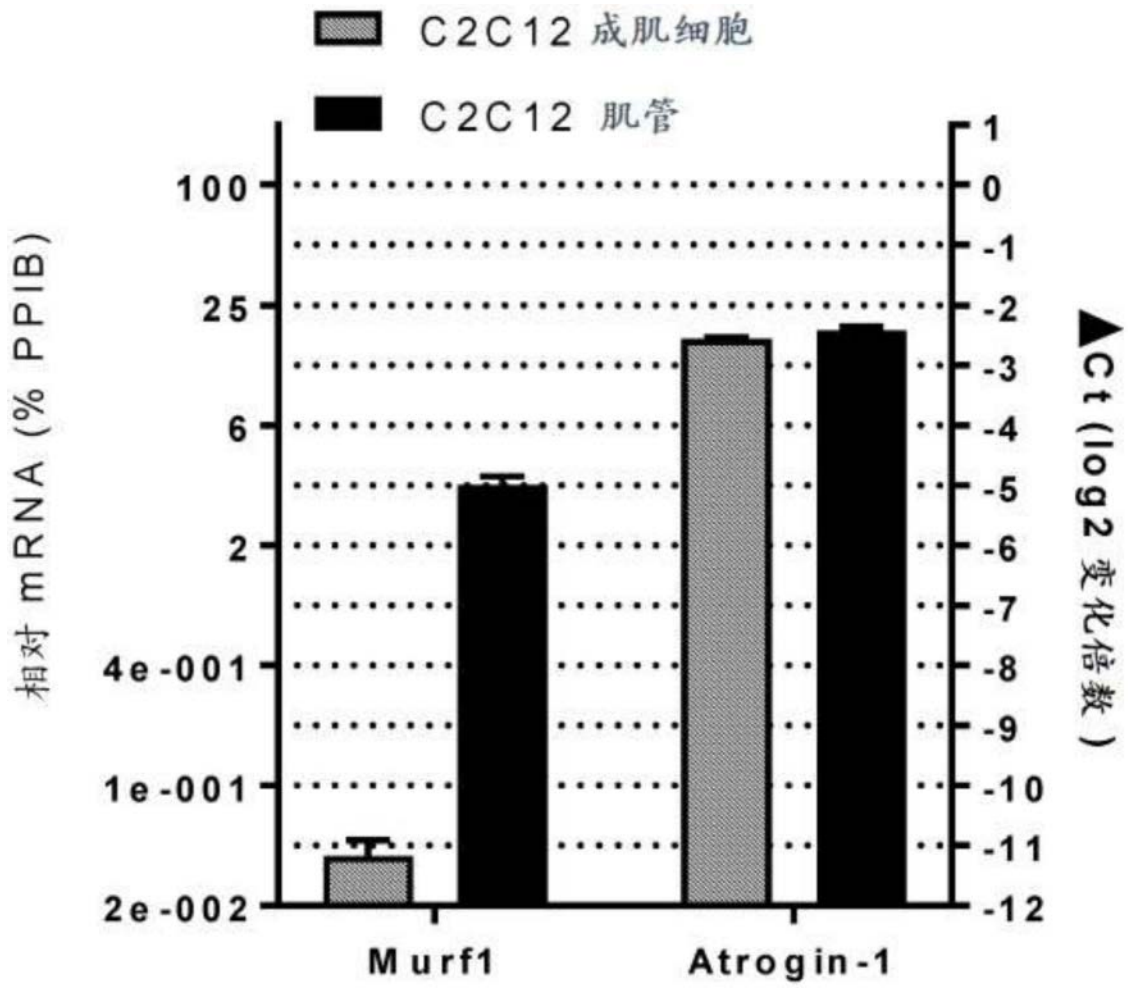


图8

组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	剂量 体积 (mL/kg)	剂量 数	收获 时间 (h)
1	TfR-mAb-HPRT-PEG5k (n=1)	4	3	5.0	1	96
2	TfR-mAb-HPRT-PEG5k (n=1)	4	1	5.0	1	96
3	TfR-mAb-HPRT-PEG5k (n=1)	4	0.3	5.0	1	96
4	TfR-mAb-HPRT-PEG5k (n=1)	4	0.1	5.0	1	96
5	IgG2a-mAb-HPRT-PEG5k (n=1)	4	3	5.0	1	96
6	IgG2a-mAb-HPRT-PEG5k (n=1)	4	1	5.0	1	96
7	IgG2a-mAb-HPRT-PEG5k (n=1)	4	0.3	5.0	1	96
8	IgG2a-mAb-HPRT-PEG5k (n=1)	4	0.1	5.0	1	96
9	TfR-mAb-MSTN-PEG5k (n=1)	4	3	5.0	1	96
10	TfR-mAb-MSTN-PEG5k (n=1)	4	1	5.0	1	96
11	TfR-mAb-MSTN-PEG5k (n=1)	4	0.3	5.0	1	96
12	TfR-mAb-MSTN-PEG5k (n=1)	4	0.1	5.0	1	96
13	IgG2a-mAb-MSTN-PEG5k (n=1)	4	3	5.0	1	96
14	IgG2a-mAb-MSTN-PEG5k (n=1)	4	1	5.0	1	96
15	IgG2a-mAb-MSTN-PEG5k (n=1)	4	0.3	5.0	1	96
16	IgG2a-mAb-MSTN-PEG5k (n=1)	4	0.1	5.0	1	96
17	TfR-mAb-scramble-PEG5k (n=1)	4	3	5.0	1	96
18	TfR-mAb-scramble-PEG5k (n=1)	4	1	5.0	1	96
19	TfR-mAb-scramble-PEG5k (n=1)	4	0.3	5.0	1	96
20	TfR-mAb-scramble-PEG5k (n=1)=1)	4	0.1	5.0	1	96
21	PBS 对照	5	-	5.0	1	96

85 WT 小鼠 (CD-1)

图9A

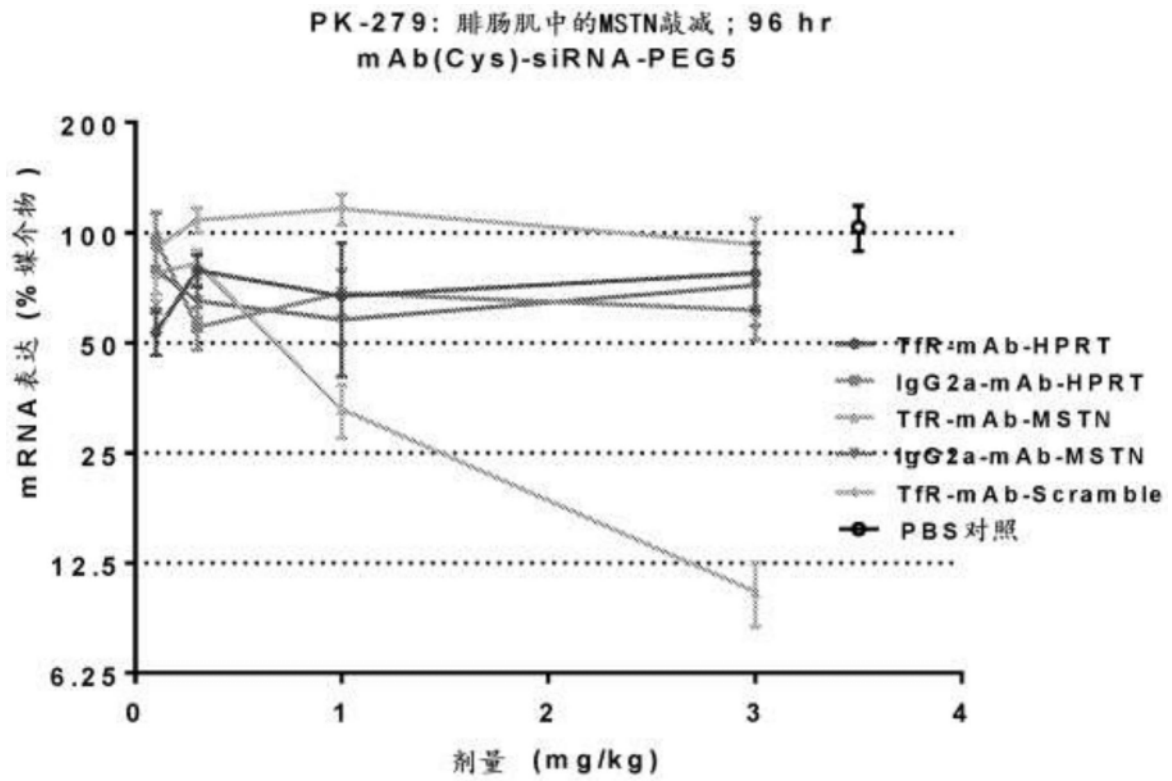


图9B

组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	剂量 数	存活 出血 (h)	终末 出血 (h)	收获 时间 (h)
1	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	3	1	0.25	24	24
2	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	3	1	1	96	96
3	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	3	1	2	168	168
4	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	3	1	4	336	336
5	TfR-mAb-scramble (n=1)	4	3	1	0.25	24	24
6	TfR-mAb-scramble (n=1)	4	3	1	1	96	96
7	TfR-mAb-scramble (n=1)	4	3	1	2	168	168
8	TfR-mAb-scramble (n=1)	4	3	1	4	336	336
9	PBS 对照	4	-	1	-	-	24
10	PBS 对照	4	-	1	-	-	96
11	PBS 对照	4	-	1	-	-	168
12	PBS 对照	4	-	1	-	-	336
13	TfR-mAb-MSTN (n=1)	5	3	1	504	840	840
14	TfR-mAb-MSTN (n=1)	5	3	1	672	1,008	1,008
15	PBS 对照	5	-	1	504	840	840
16	PBS 对照	5	-	1	672	1,008	1,008

图10A

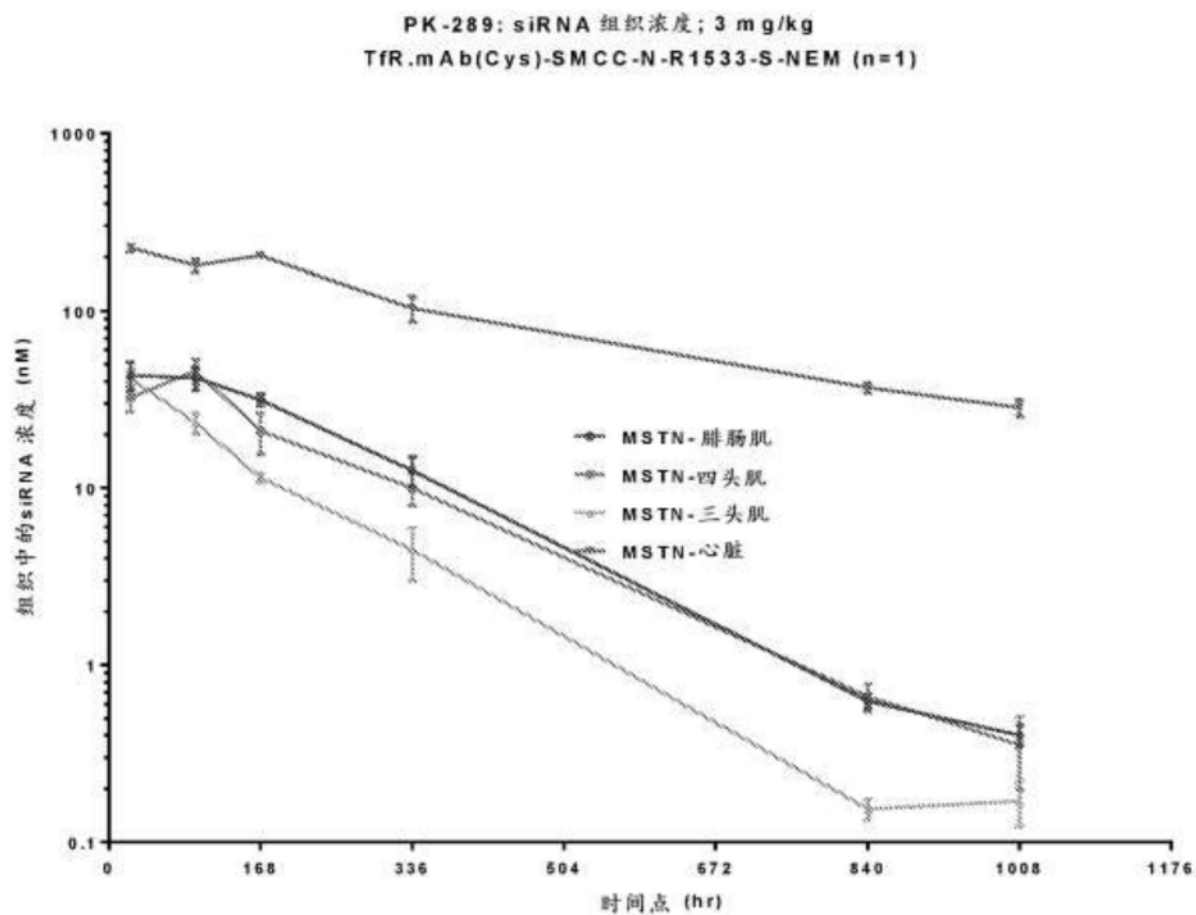


图10B

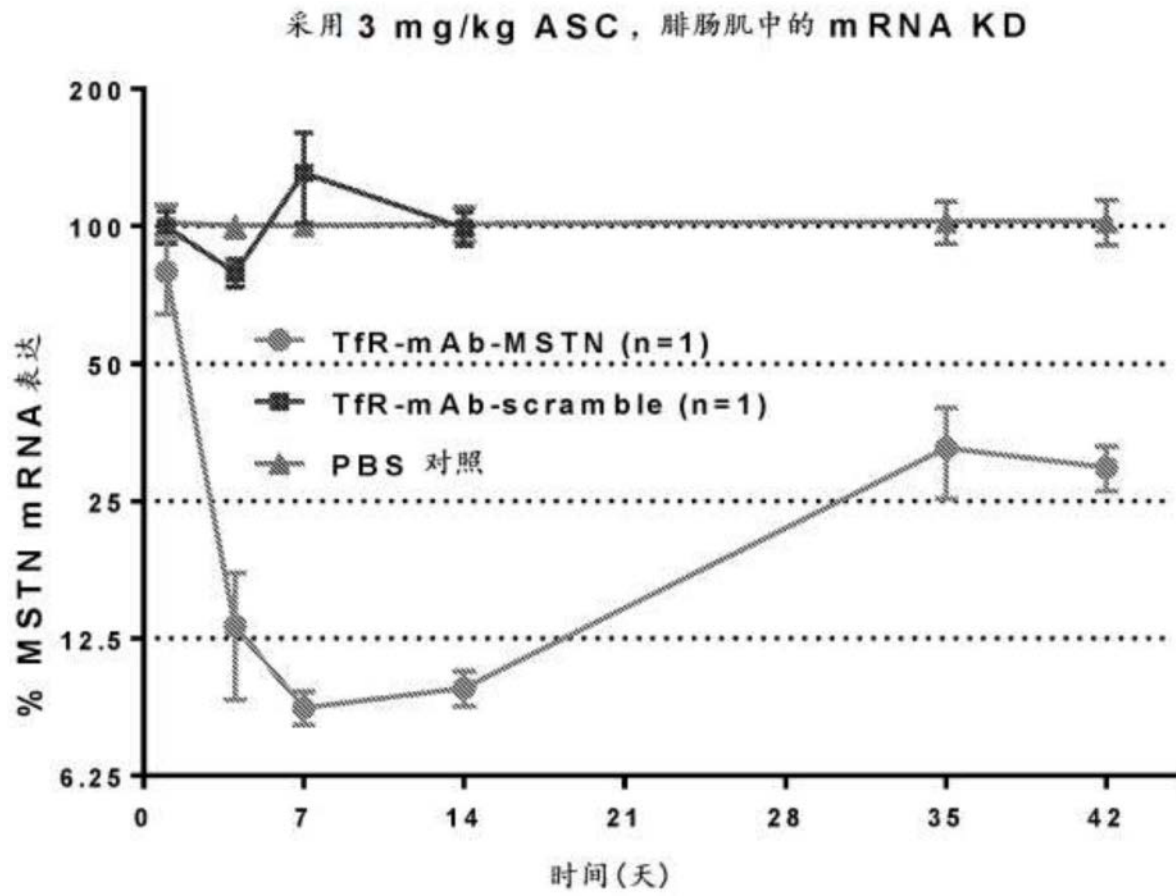


图10C



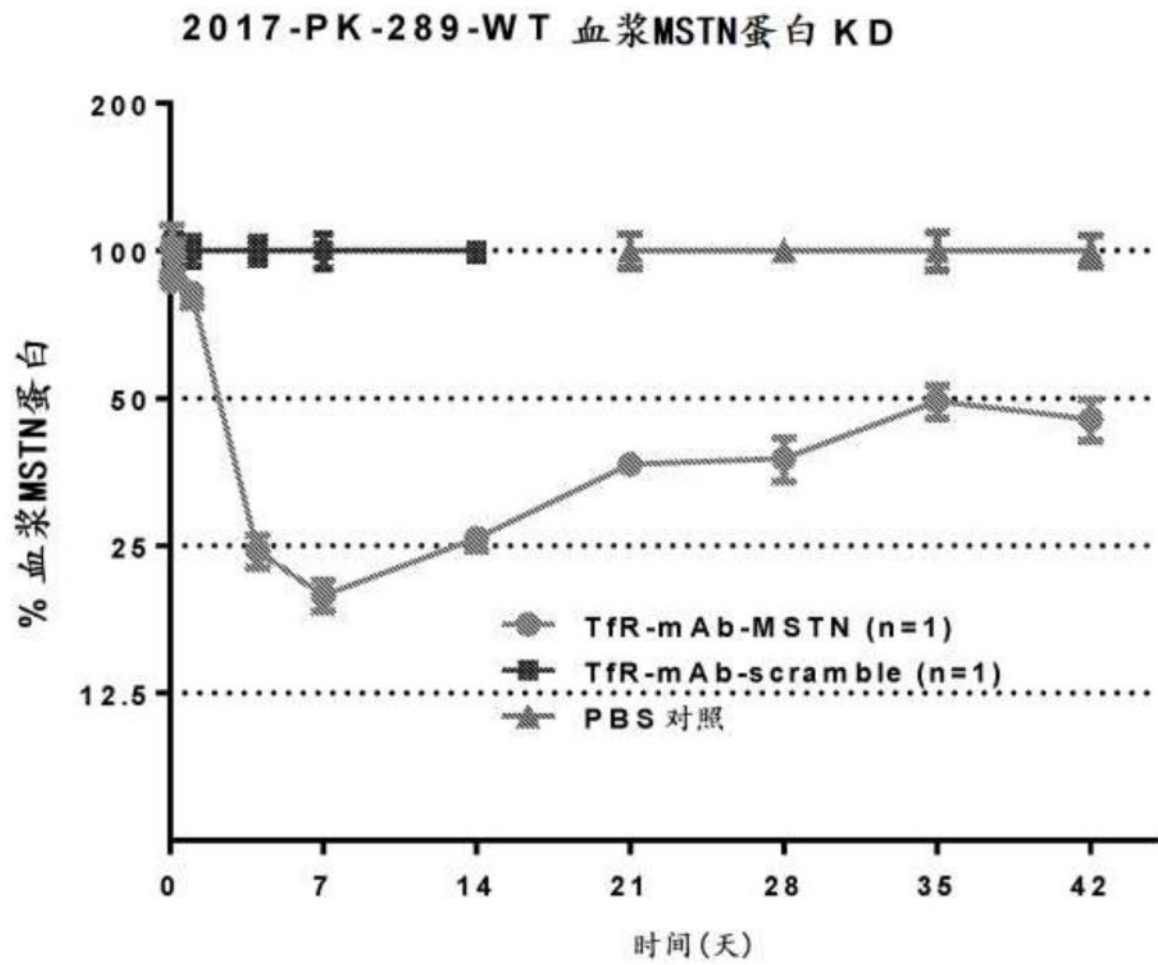


图10D



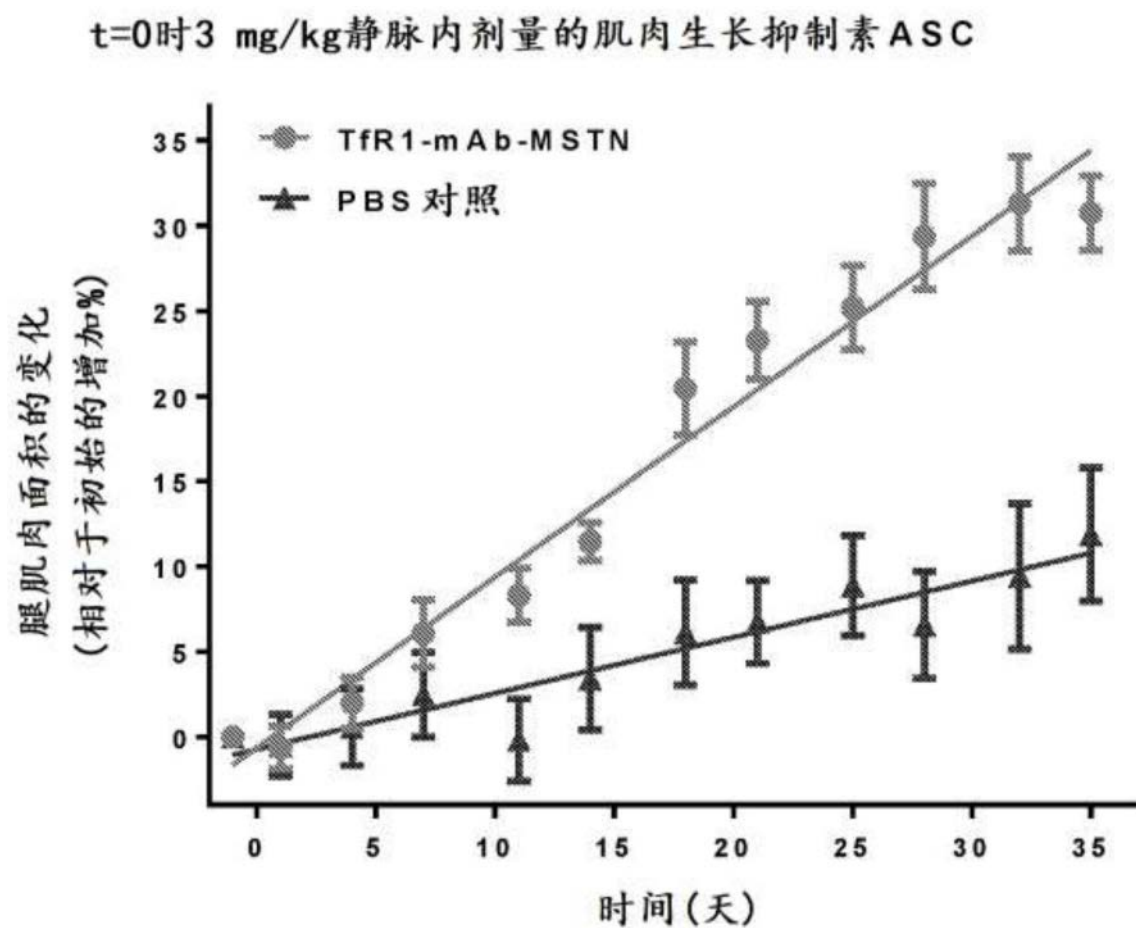


图10E

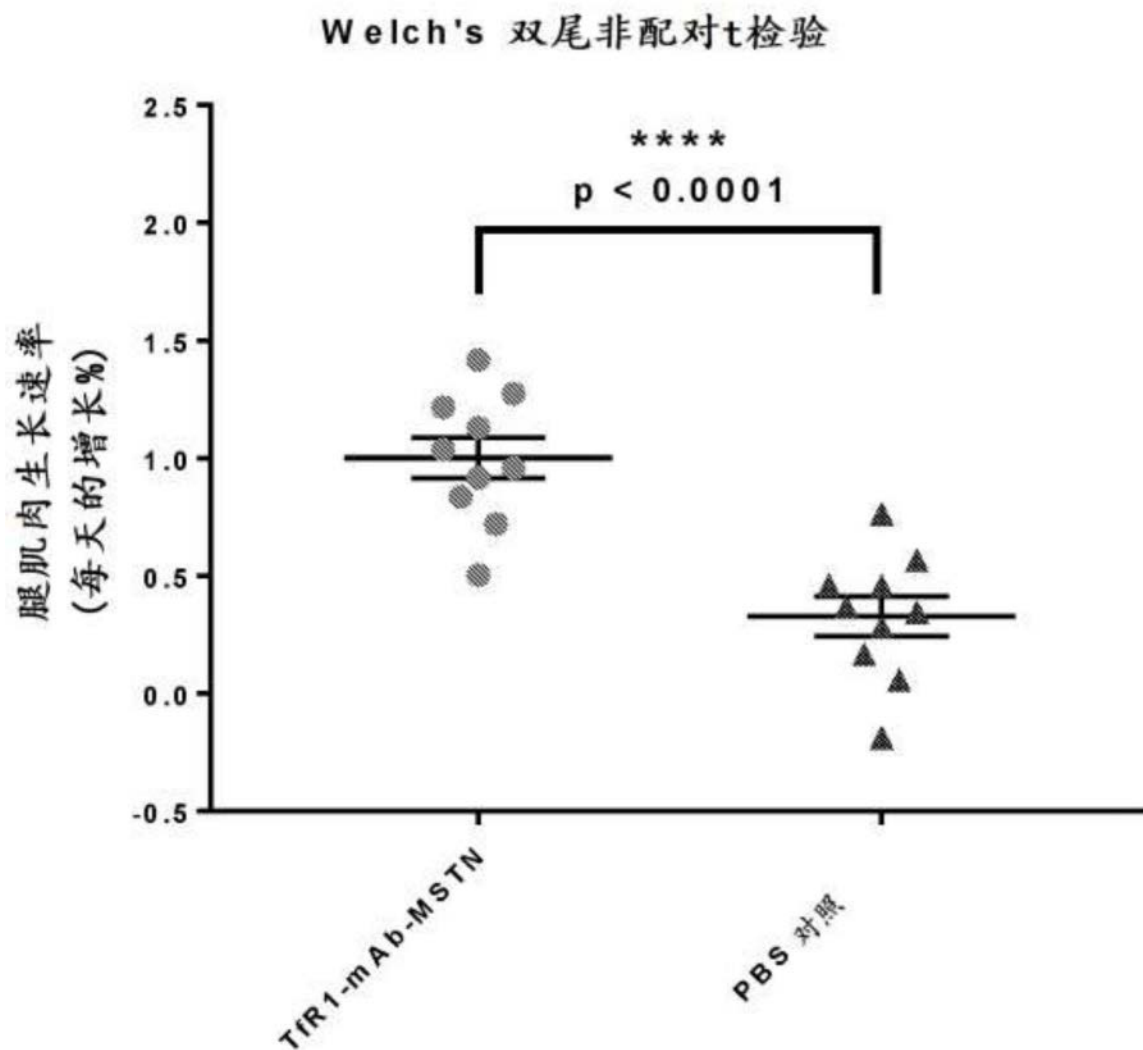


图10F

组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	剂量 体积 (mL/kg)	剂量 数	剂量 时间表	收获 时间 (h)
1	TfR-Fab-MSTN* (n=1)	4	6	5.0	1	t=0	96
2	TfR-Fab-MSTN* (n=1)	4	2	5.0	1	t=0	96
3	TfR-Fab-MSTN* (n=1)	4	0.6	5.0	1	t=0	96
4	TfR-Fab-MSTN* (n=1)	4	0.2	5.0	1	t=0	96
5	EGFR-Fab-MSTN* (n=1)	4	6	5.0	1	t=0	96
6	EGFR-Fab-MSTN* (n=1)	4	2	5.0	1	t=0	96
7	EGFR-Fab-MSTN* (n=1)	4	0.6	5.0	1	t=0	96
8	EGFR-Fab-MSTN* (n=1)	4	0.2	5.0	1	t=0	96
9	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	3	5.0	1	t=0	96
10	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	1	5.0	1	t=0	96
11	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	0.3	5.0	1	t=0	96
12	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	0.1	5.0	1	t=0	96
13	TfR-mAb-MSTN (n=2)	4	6	5.0	1	t=0	96
14	TfR-mAb-MSTN (n=2)	4	2	5.0	1	t=0	96
15	TfR-mAb-MSTN (n=2)	4	0.6	5.0	1	t=0	96
16	TfR-mAb-MSTN (n=2)	4	0.2	5.0	1	t=0	96
17	EGFR-mAb-MSTN* (n=1)	4	2.6	5.0	1	t=0	96
18	EGFR-mAb-MSTN* (n=1)	4	1	5.0	1	t=0	96
19	EGFR-mAb-MSTN* (n=2)	4	3	5.0	1	t=0	96
20	EGFR-mAb-MSTN* (n=2)	4	1	5.0	1	t=0	96
21	PBS 对照	5	-	5.0	1	t=0	96

85 WT小鼠 (CD-1)

图11A

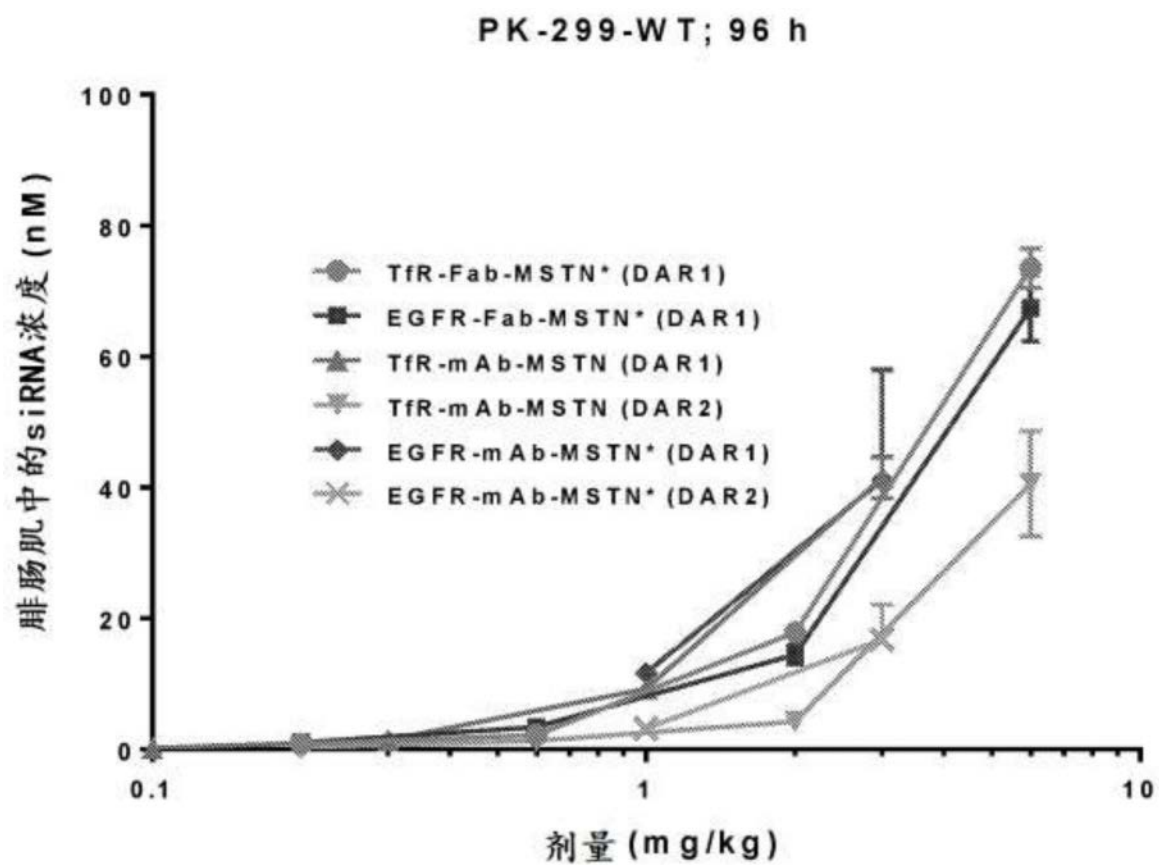


图11B

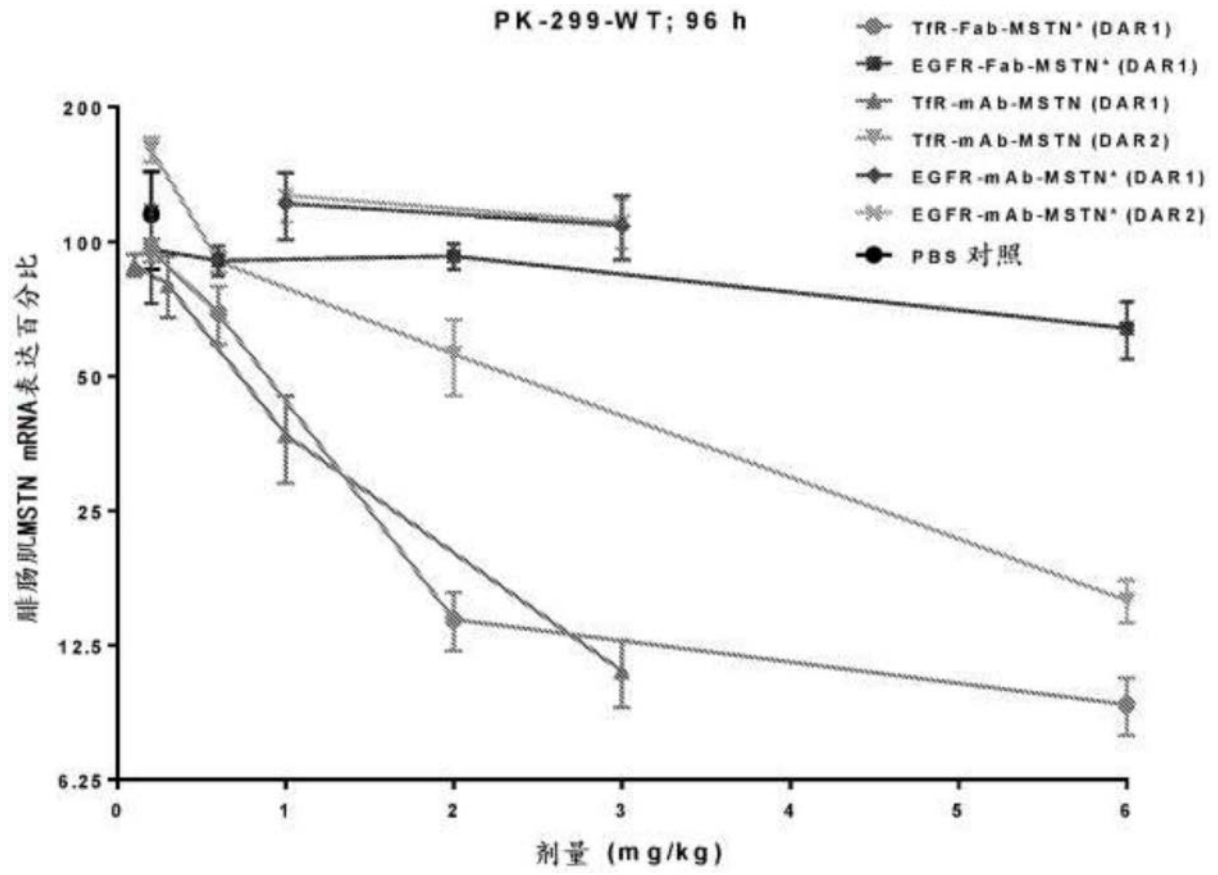


图11C



组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	剂量 体积 (mL/kg)	剂量 时间表	收获 时间 (h)
1	胆固醇-MSTN 对照	4	60	5.0	t=0	96
2	胆固醇-MSTN 对照	4	20	5.0	t=0	96
3	胆固醇-MSTN 对照	4	6	5.0	t=0	96
4	胆固醇-MSTN 对照	4	2	5.0	t=0	96
5	TfR-Fab-MSTN* (n=1)	4	6	5.0	t=0	96
6	TfR-Fab-MSTN* (n=1)	4	2	5.0	t=0	96
7	TfR-Fab-MSTN* (n=1)	4	0.6	5.0	t=0	96
8	TfR-Fab-MSTN* (n=1)	4	0.2	5.0	t=0	96
9	TfR-mAb-MSTN* (n=1)	4	3	5.0	t=0	96
10	TfR-mAb-MSTN* (n=1)	4	1	5.0	t=0	96
11	TfR-mAb-MSTN* (n=1)	4	0.3	5.0	t=0	96
12	TfR-mAb-MSTN* (n=1)	4	0.1	5.0	t=0	96
13	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	3	5.0	t=0	96
14	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	1	5.0	t=0	96
15	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	0.3	5.0	t=0	96
16	TfR-mAb-MSTN (n=1)	4	0.1	5.0	t=0	96
17	TfR-mAb-scramble (n=1)	4	3	5.0	t=0	96
18	TfR-mAb-scramble (n=1)	4	1	5.0	t=0	96
19	TfR-mAb-scramble (n=1)	4	0.3	5.0	t=0	96
20	TfR-mAb-scramble (n=1)	4	0.1	5.0	t=0	96
21	PBS 对照	5	-	5.0	t=0	96

**85** WT 小鼠 (CD-1)

图12A

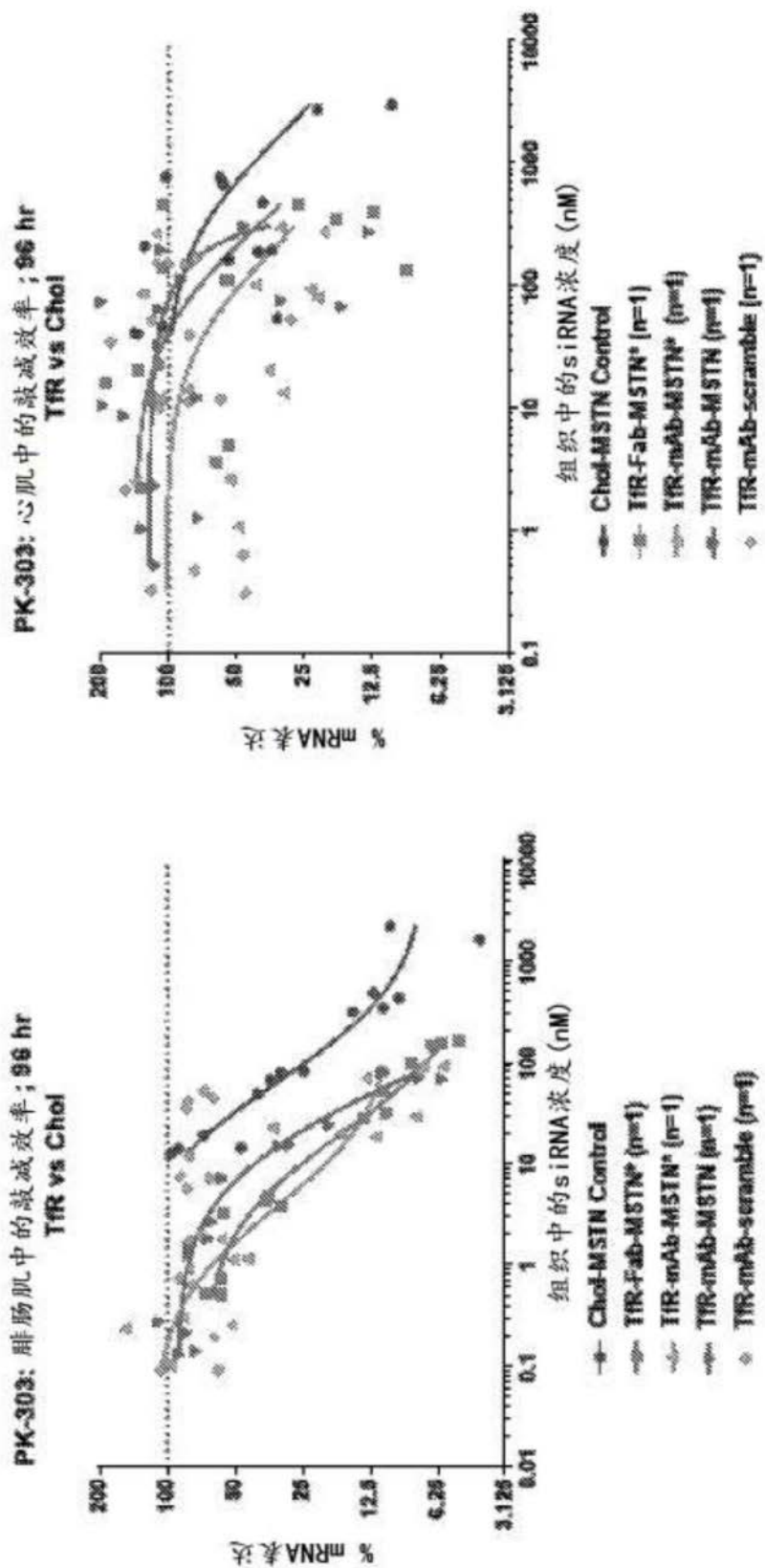


图12B

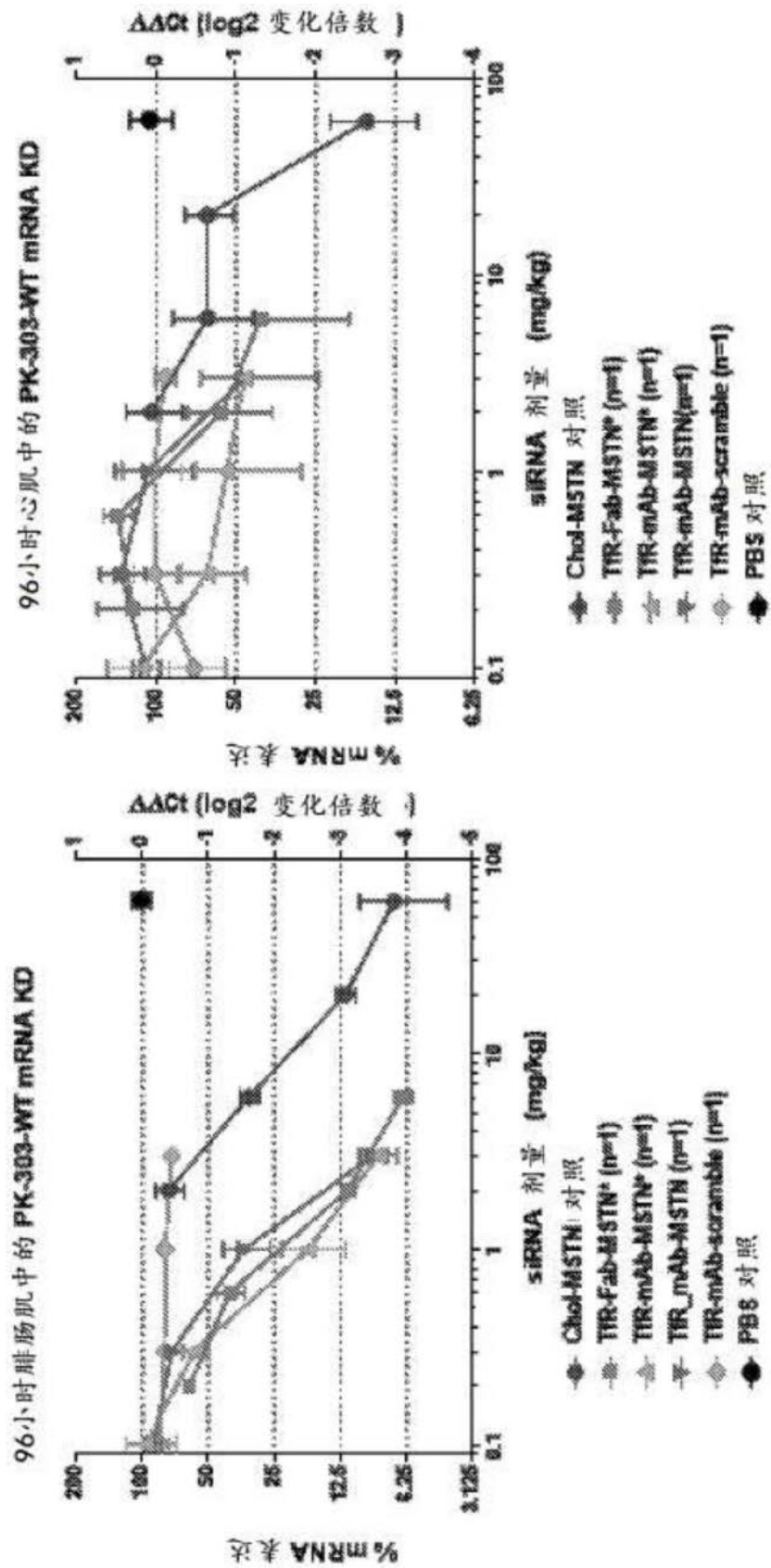


图12C



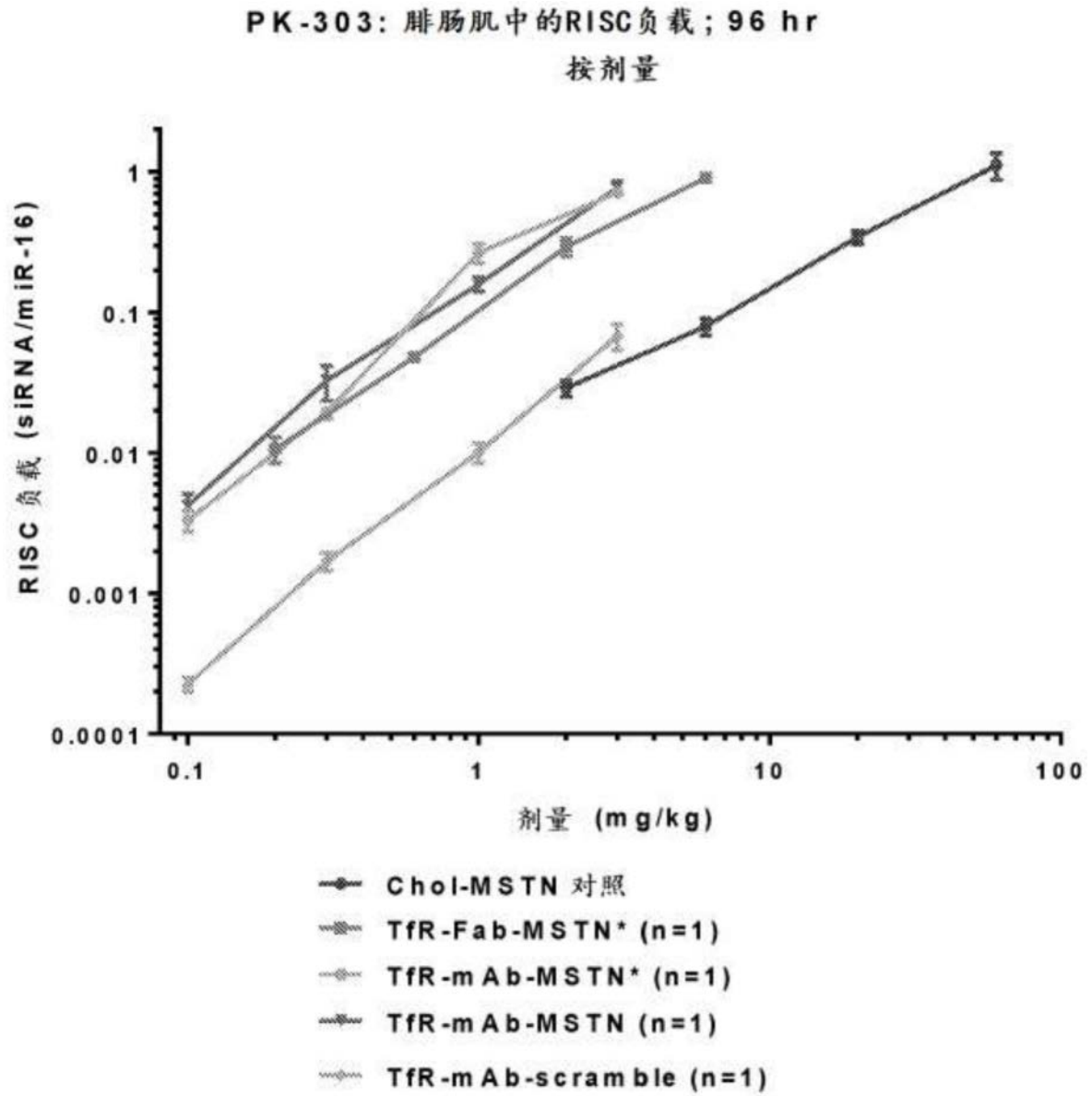


图12D

组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	存活 出血 (天)	终末 出血 (天)	收获 时间 (天)
1	胆固醇-MSTN	5	50	7	14	14
2	胆固醇-MSTN	5	50	21	28	28
3	胆固醇-MSTN	5	50	35	42	42
4	胆固醇-MSTN	5	50	49	56	56
5	TfR-mAb-MSTN (n=1)	5	3	7	14	14
6	TfR-mAb-MSTN (n=1)	5	3	21	28	28
7	TfR-mAb-MSTN (n=1)	5	3	35	42	42
8	TfR-mAb-MSTN (n=1)	5	3	49	56	56
9	TfR-mAb-MSTN (n=2)	5	3	7	14	14
10	TfR-mAb-MSTN (n=2)	5	3	21	28	28
11	TfR-mAb-MSTN (n=2)	5	3	35	42	42
12	TfR-mAb-MSTN (n=2)	5	3	49	56	56
13	TfR-mAb-scramble (n=1)	5	3	7	14	14
14	TfR-mAb-scramble (n=1)	5	3	21	28	28
15	TfR-mAb-scramble (n=1)	5	3	35	42	42
16	TfR-mAb-scramble (n=1)	5	3	49	56	56
17	PBS 对照	5	-	7	14	14
18	PBS 对照	5	-	21	28	28
19	PBS 对照	5	-	35	42	42
20	PBS 对照	5	-	49	56	56

图13A

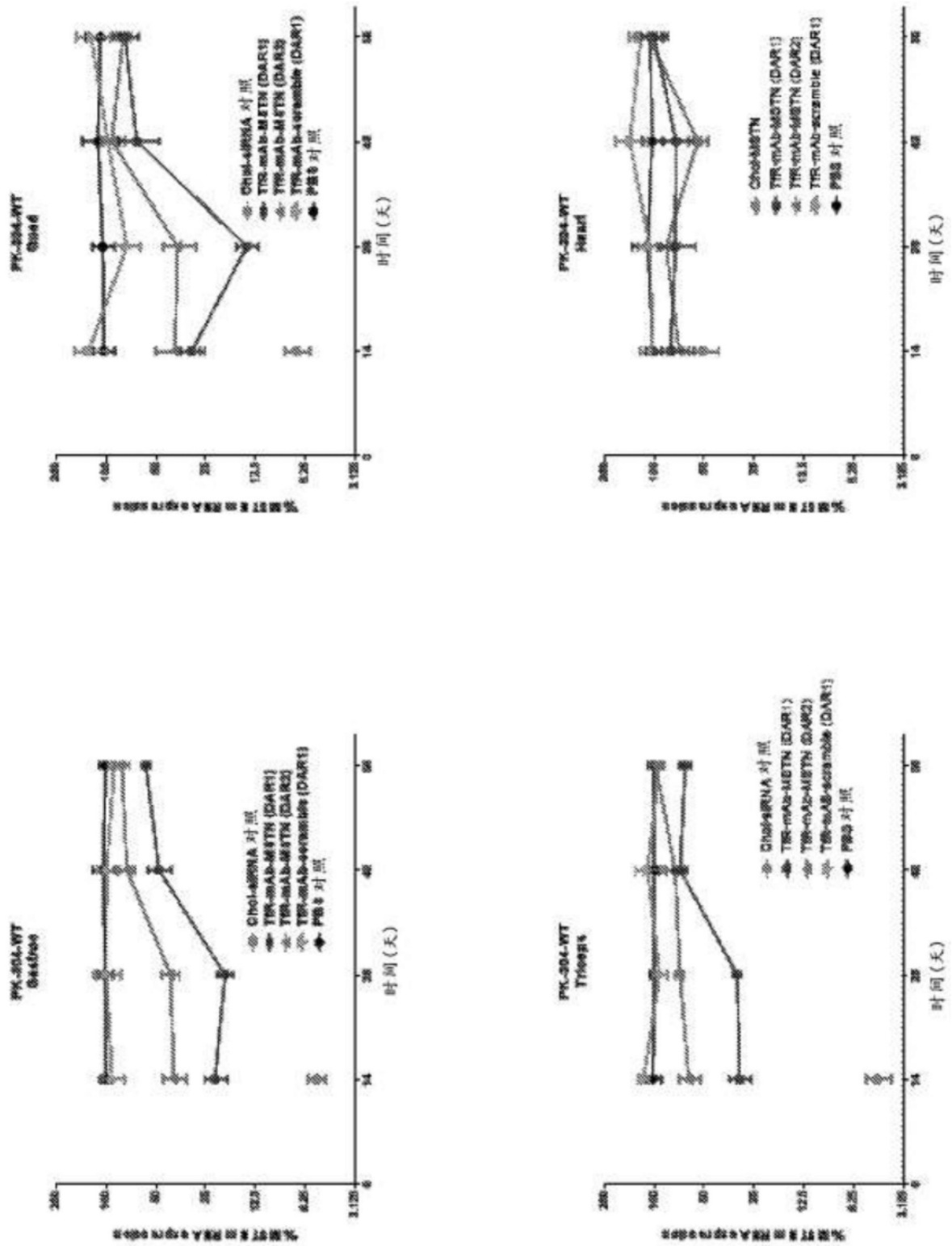


图13B

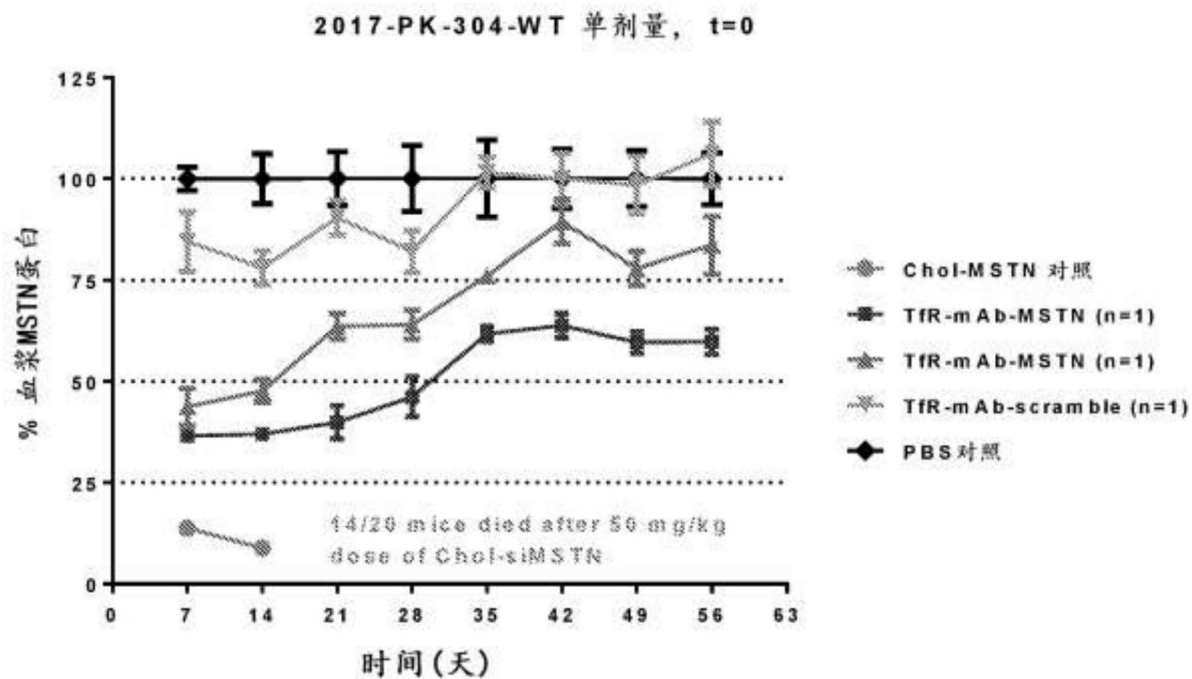


图13C

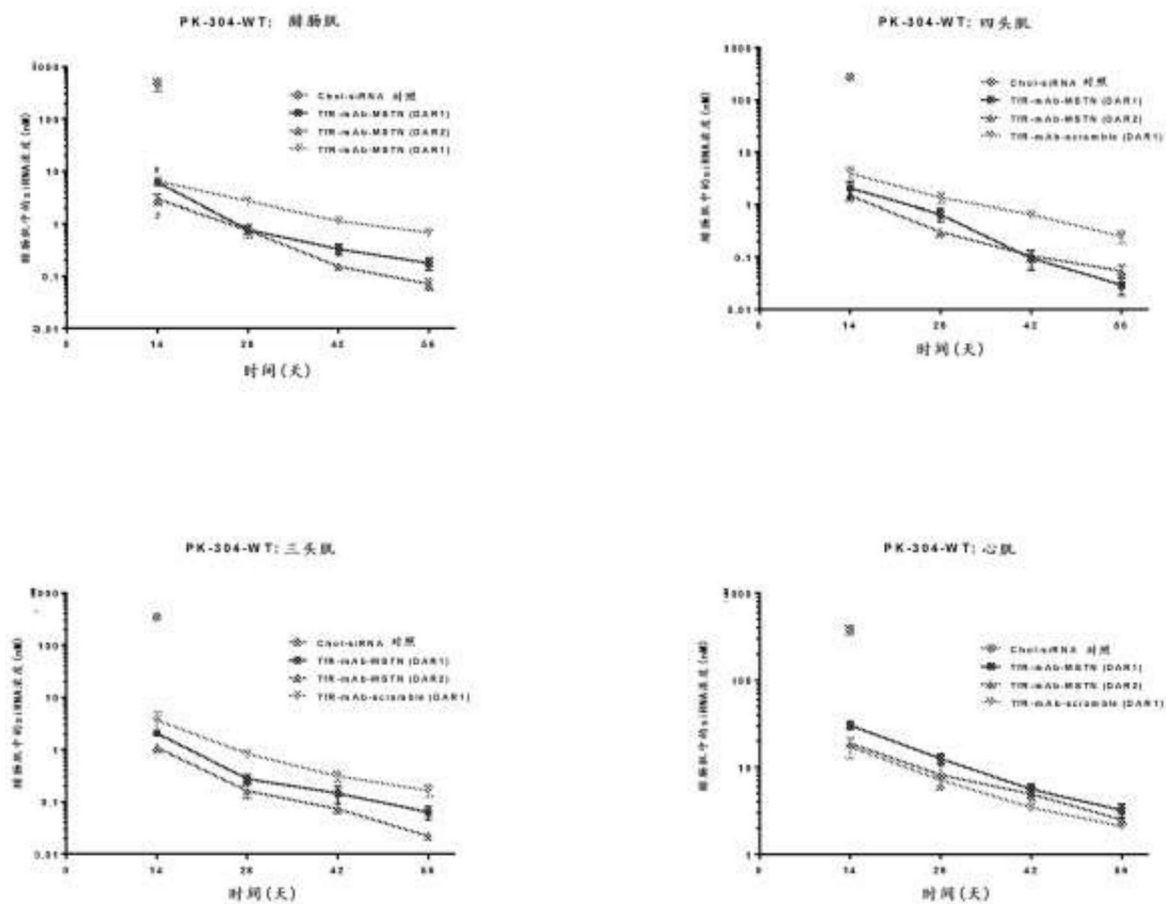


图13D

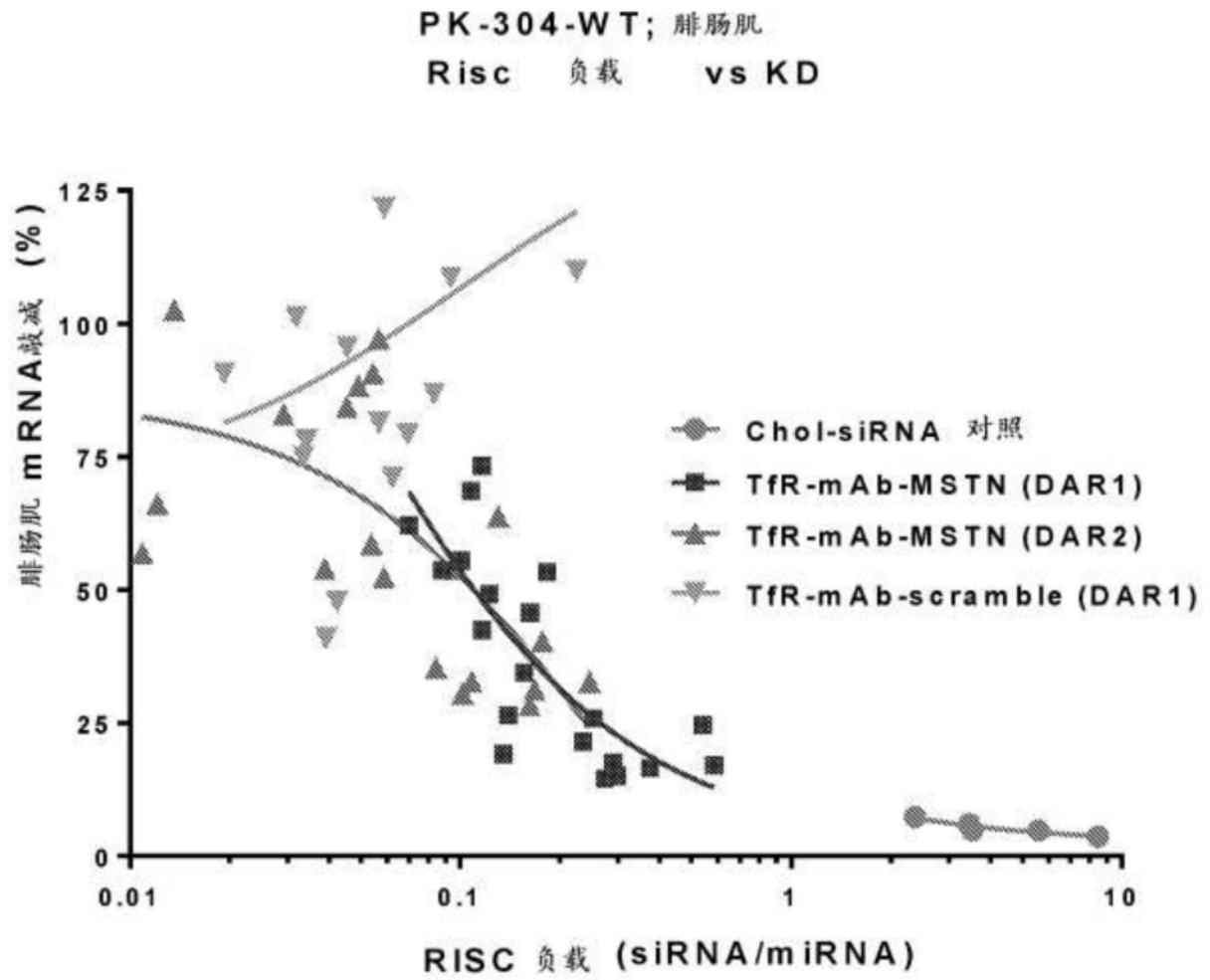


图13E

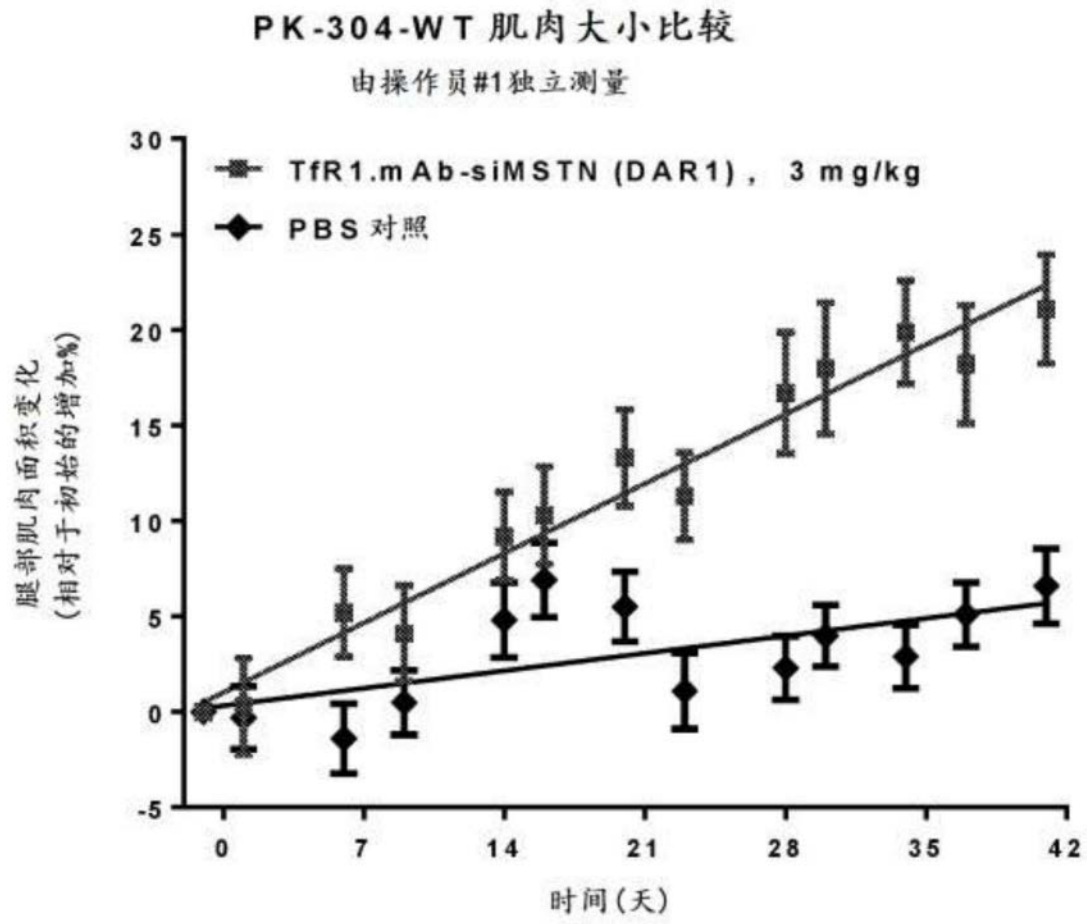


图13F

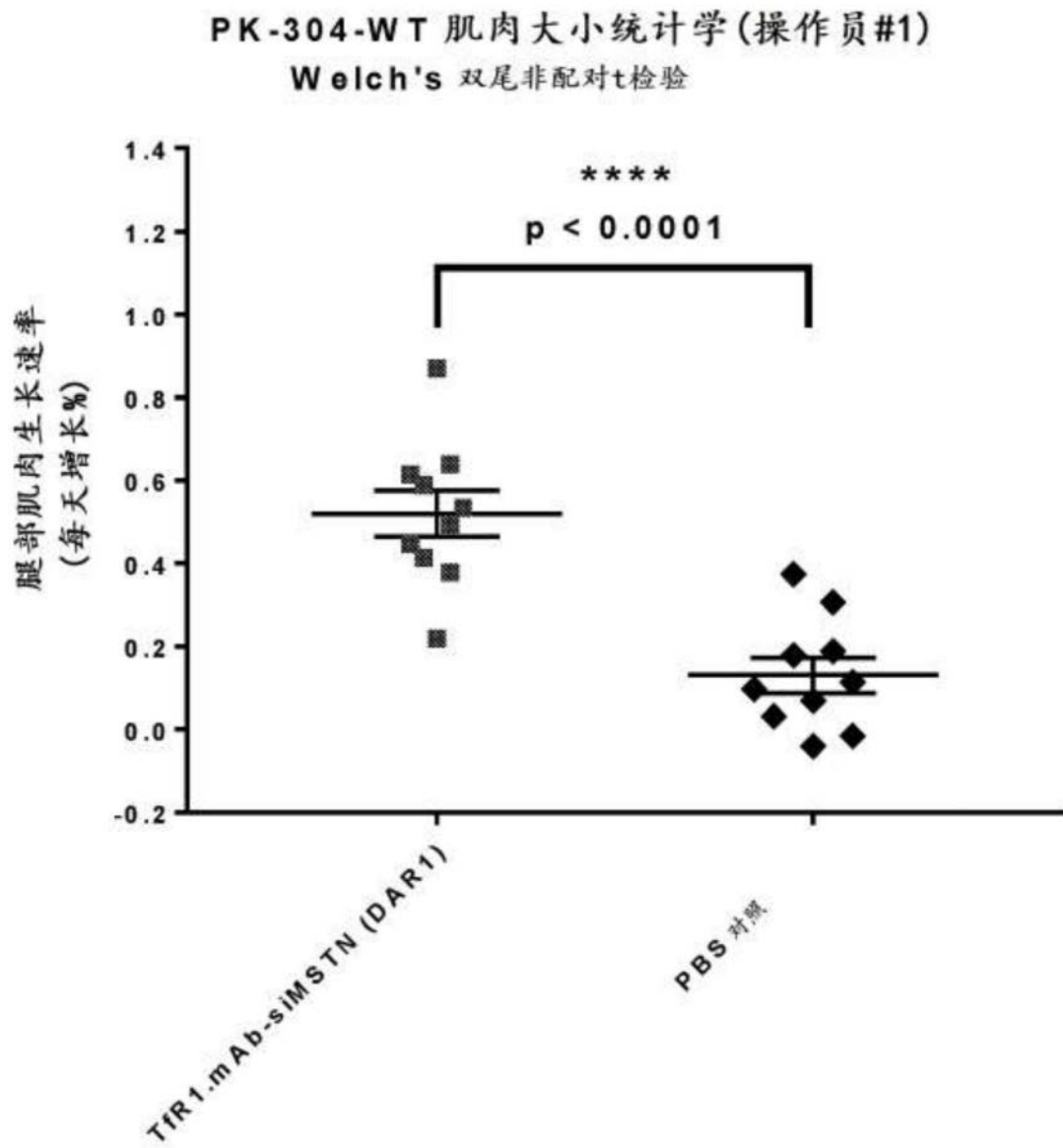


图13G



组	测试物	N	每个 siRNA 剂量 (mg/kg)	siRNA 混合物 (mg/kg)	收获 时间 (h)	最终 siRNA 剂量 (mg/kg)
1	TfR-mAb-HPRT(n=1)	4	3		96	3
2	TfR-mAb-HPRT(n=1)	4	1		96	1
3	TfR-mAb-HPRT(n=1)	4	0.3		96	0.3
4	TfR-mAb-HPRT(n=1)	4	0.1		96	0.1
5	TfR-mAb-SSB (n=1)	4	3		96	3
6	TfR-mAb-SSB (n=1)	4	1		96	1
7	m TfR-mAb-SSB (n=1)	4	0.3		96	0.3
8	TfR-mAb-SSB (n=1)	4	0.1		96	0.1
9	TfR-mAb-HPRT (n=1) + TfR-mAb-SSB (n=1)	4	3		96	6
10	TfR-mAb-HPRT (n=1) + TfR-mAb-SSB (n=1)	4	1		96	2
11	TfR-mAb-HPRT (n=1) + TfR-mAb-SSB (n=1)	4	0.3		96	0.6
12	TfR-mAb-HPRT (n=1) + TfR-mAb-SSB (n=1)	4	0.1		96	0.2
13	TfR-mAb- HPRT/SSB(1:1) (n=2)	4		3	96	6
14	TfR-mAb- HPRT/SSB(1:1) (n=2)	4		1	96	2
15	TfR-mAb- HPRT/SSB(1:1) (n=2)	4		0.3	96	0.6
16	TfR-mAb- HPRT/SSB(1:1) (n=2)	4		0.1	96	0.2
	PBS 对照	5	-		96	

图14A



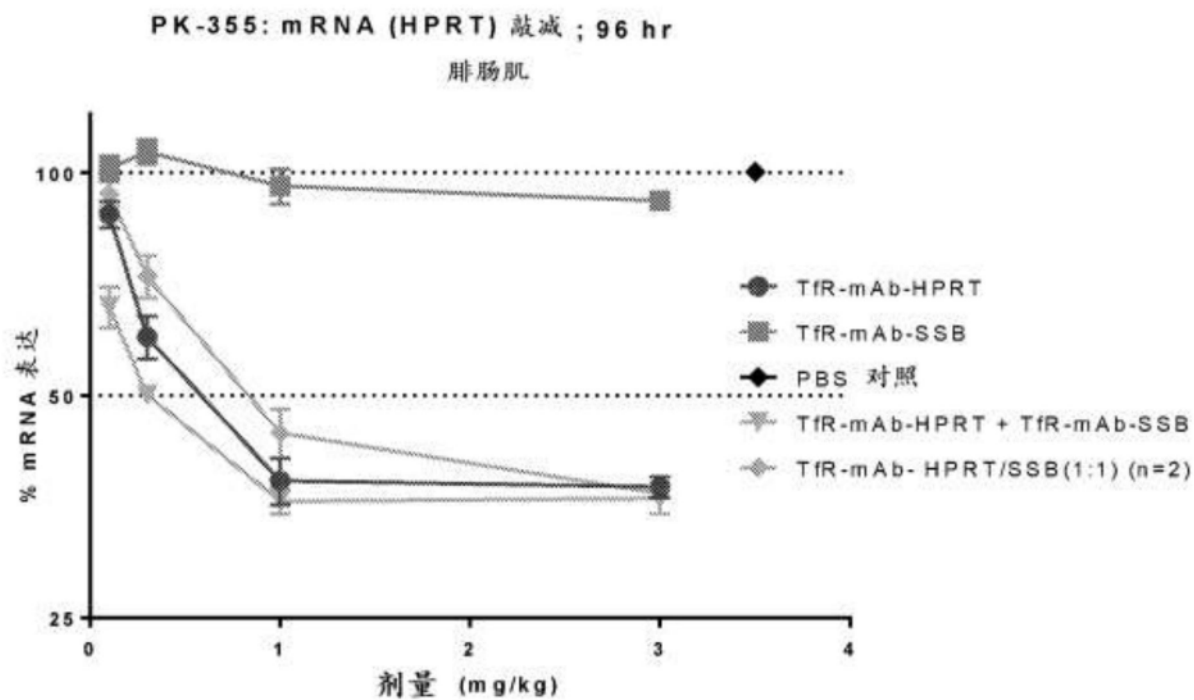


图14B

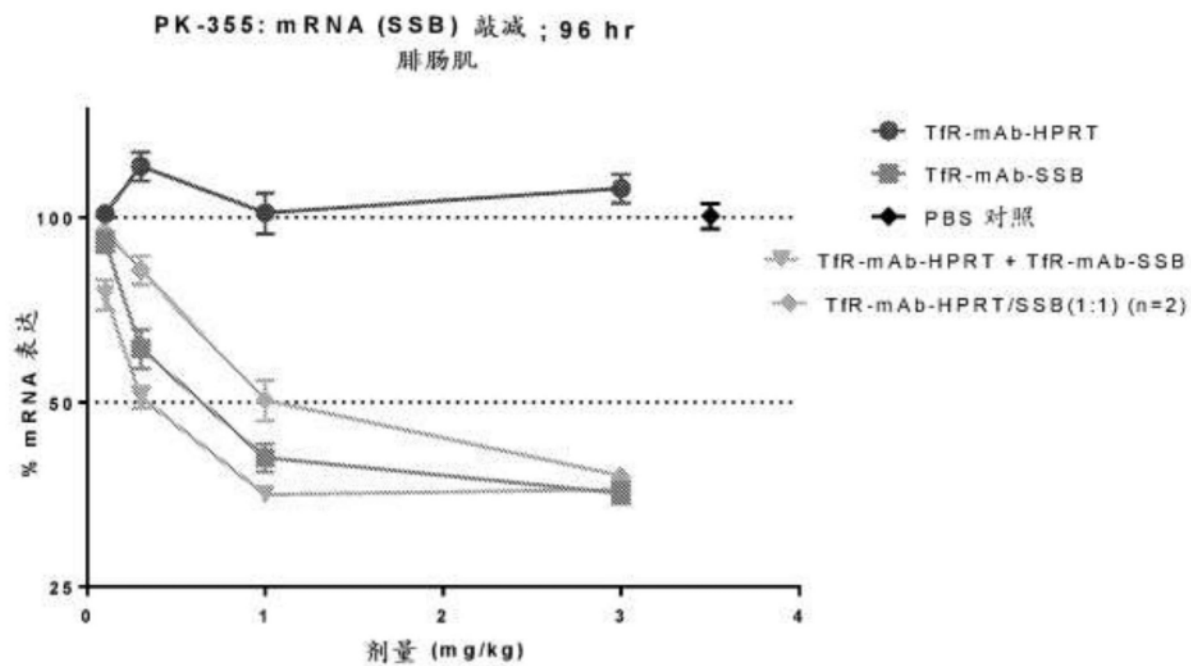


图14C

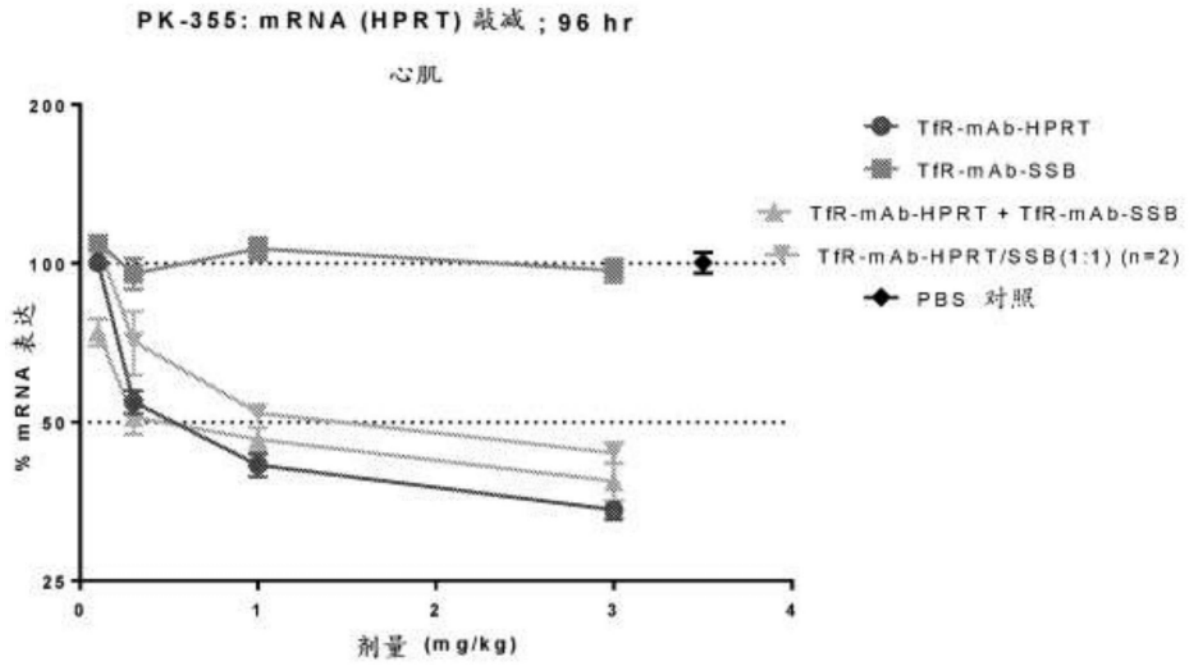


图14D

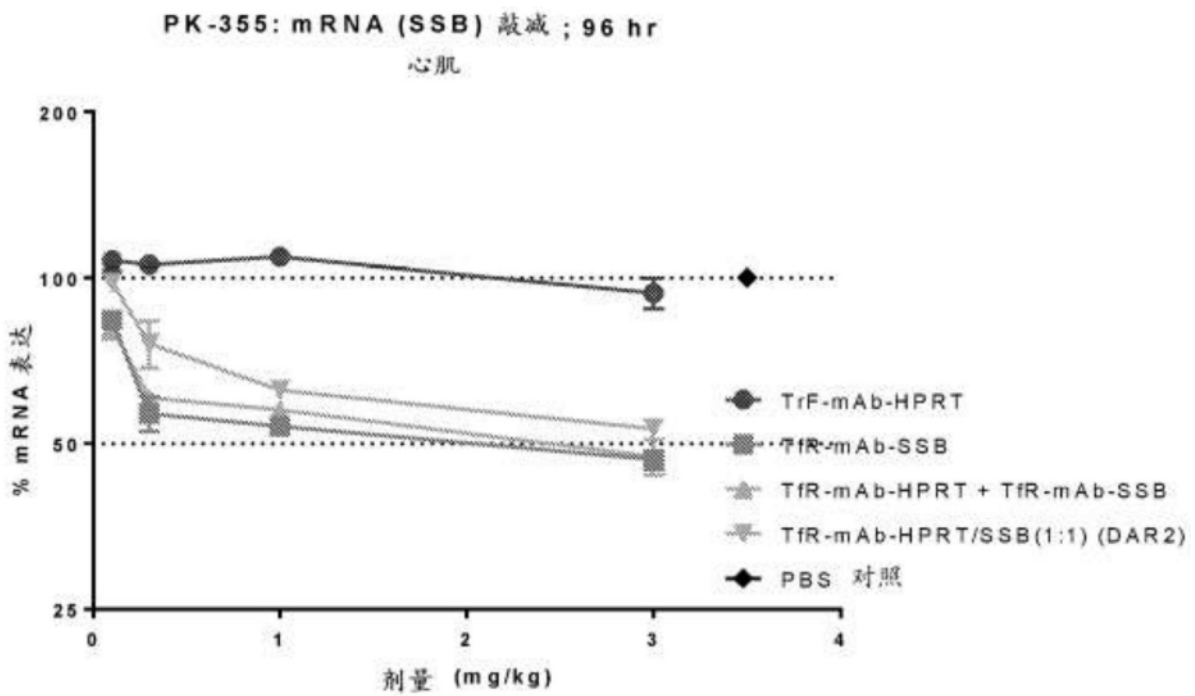


图14E

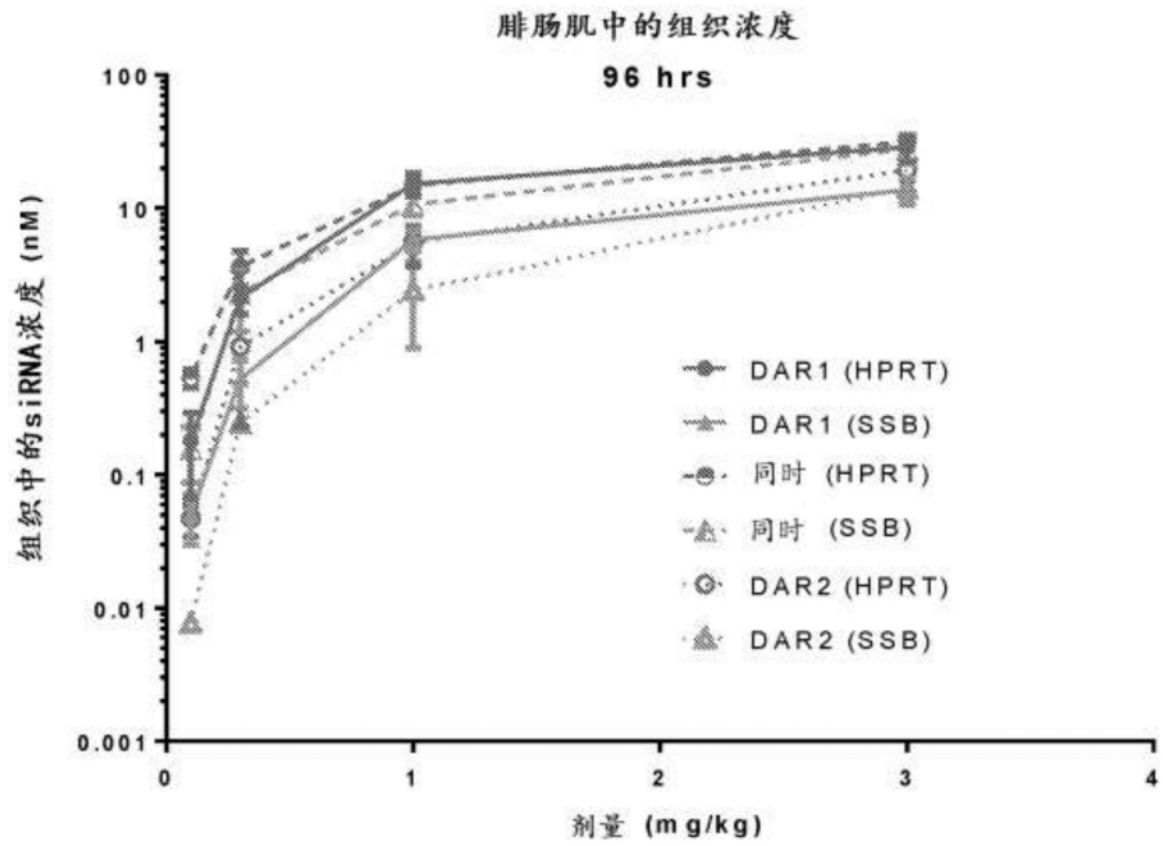


图14F

组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	收获 时间 (h)
1	TfR-mAb-mAtrogin#1179(n=1)	4	3	96
2	TfR-mAb-mAtrogin#1179(n=1)	4	1	96
3	TfR-mAb-mAtrogin#1179(n=1)	4	0.3	96
4	TfR-mAb-mAtrogin#1179(n=1)	4	0.1	96
5	TfR-mAb-mAtrogin#1504 (n=1)	4	3	96
6	TfR-mAb-mAtrogin#1504 (n=1)	4	1	96
7	TfR-mAb-mAtrogin#1504 (n=1)	4	0.3	96
8	TfR-mAb-mAtrogin#1504 (n=1)	4	0.1	96
9	TfR-mAb-m/hAtrogin#631 (n=1)	4	3	96
10	TfR-mAb-m/hAtrogin#631 (n=1)	4	1	96
11	TfR-mAb-m/hAtrogin#631 (n=1)	4	0.3	96
12	TfR-mAb-m/hAtrogin#631 (n=1)	4	0.1	96
13	TfR-mAb-m/hAtrogin#586 (n=1)	4	3	96
14	TfR-mAb-m/hAtrogin#586 (n=1)	4	1	96
15	TfR-mAb-m/hAtrogin#586 (n=1)	4	0.3	96
16	TfR-mAb-m/hAtrogin#586 (n=1)	4	0.1	96
17	PBS 对照	5	-	96

图15A

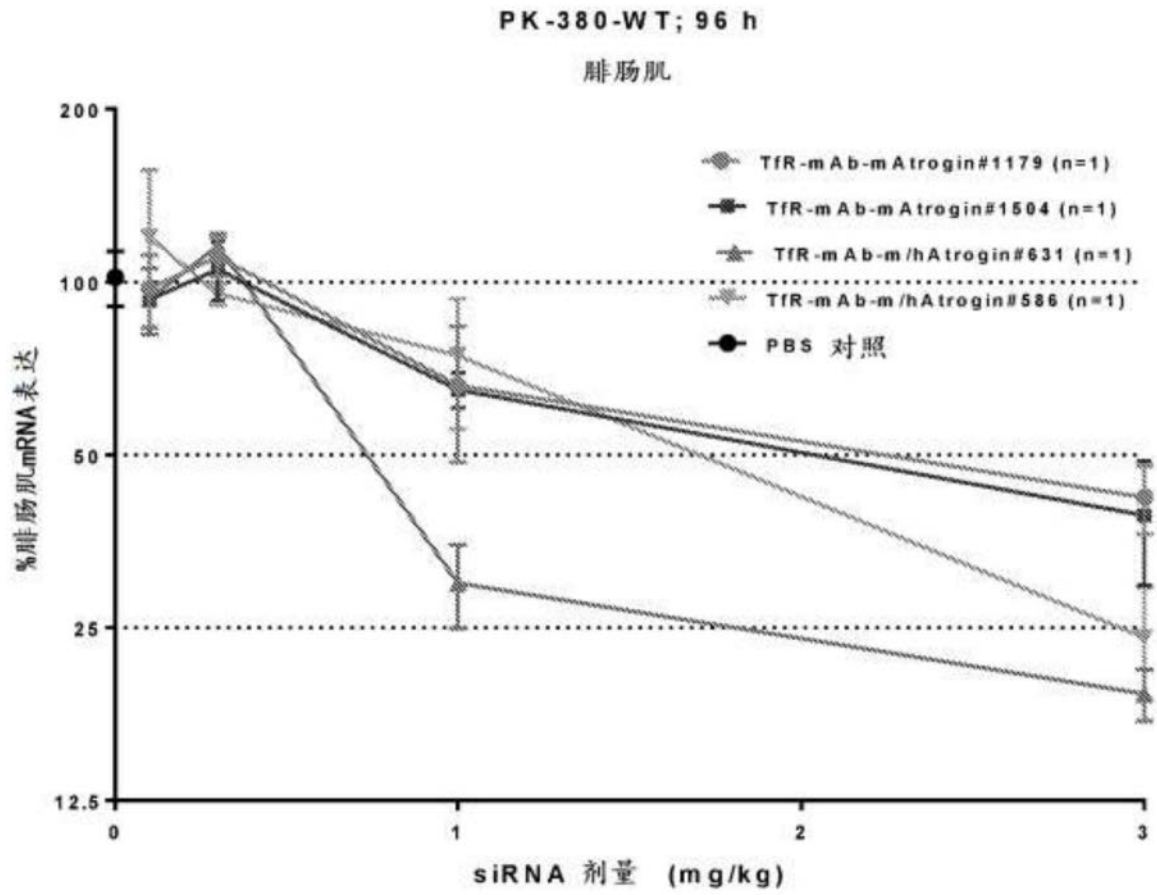


图15B

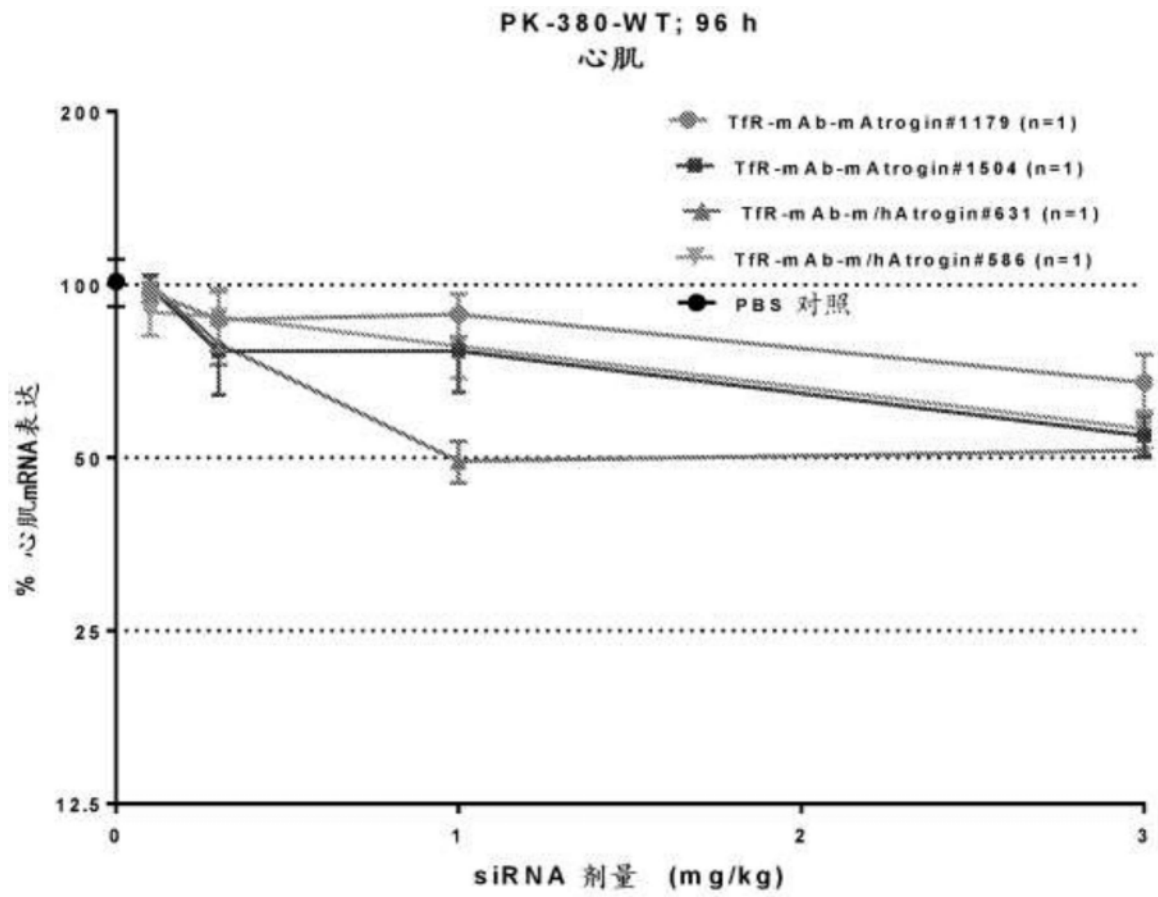


图15C

组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	收获 时间 (h)
1	TfR-mAb-MuRF1#651(n=1)	4	3	96
2	TfR-mAb-MuRF1#651(n=1)	4	1	96
3	TfR-mAb-MuRF1#651(n=1)	4	0.3	96
4	TfR-mAb-MuRF1#651(n=1)	4	0.1	96
5	TfR-mAb-MuRF1#1387 (n=1)	4	3	96
6	TfR-mAb-MuRF1#1387 (n=1)	4	1	96
7	TfR-mAb-MuRF1#1387 (n=1)	4	0.3	96
8	TfR-mAb-MuRF1#1387 (n=1)	4	0.1	96
9	TfR-mAb-MuRF1#1454 (n=1)	4	3	96
10	TfR-mAb-MuRF1#1454 (n=1)	4	1	96
11	TfR-mAb-MuRF1#1454 (n=1)	4	0.3	96
12	TfR-mAb-MuRF1#1454 (n=1)	4	0.1	96
13	TfR-mAb-MuRF1#1660 (n=1)	4	3	96
14	TfR-mAb-MuRF1#1660 (n=1)	4	1	96
15	TfR-mAb-MuRF1#1660 (n=1)	4	0.3	96
16	TfR-mAb-MuRF1#1660 (n=1)	4	0.1	96
17	PBS 对照	5	-	96

图16A

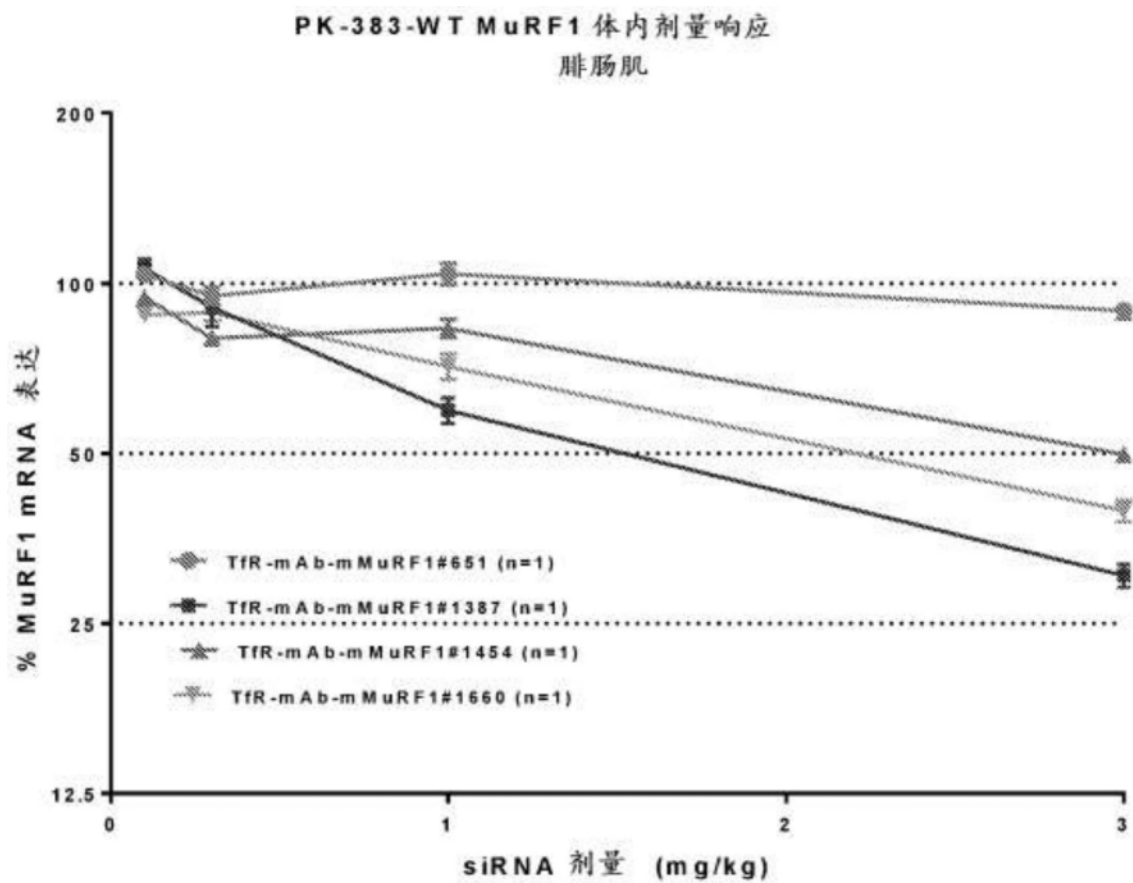


图16B



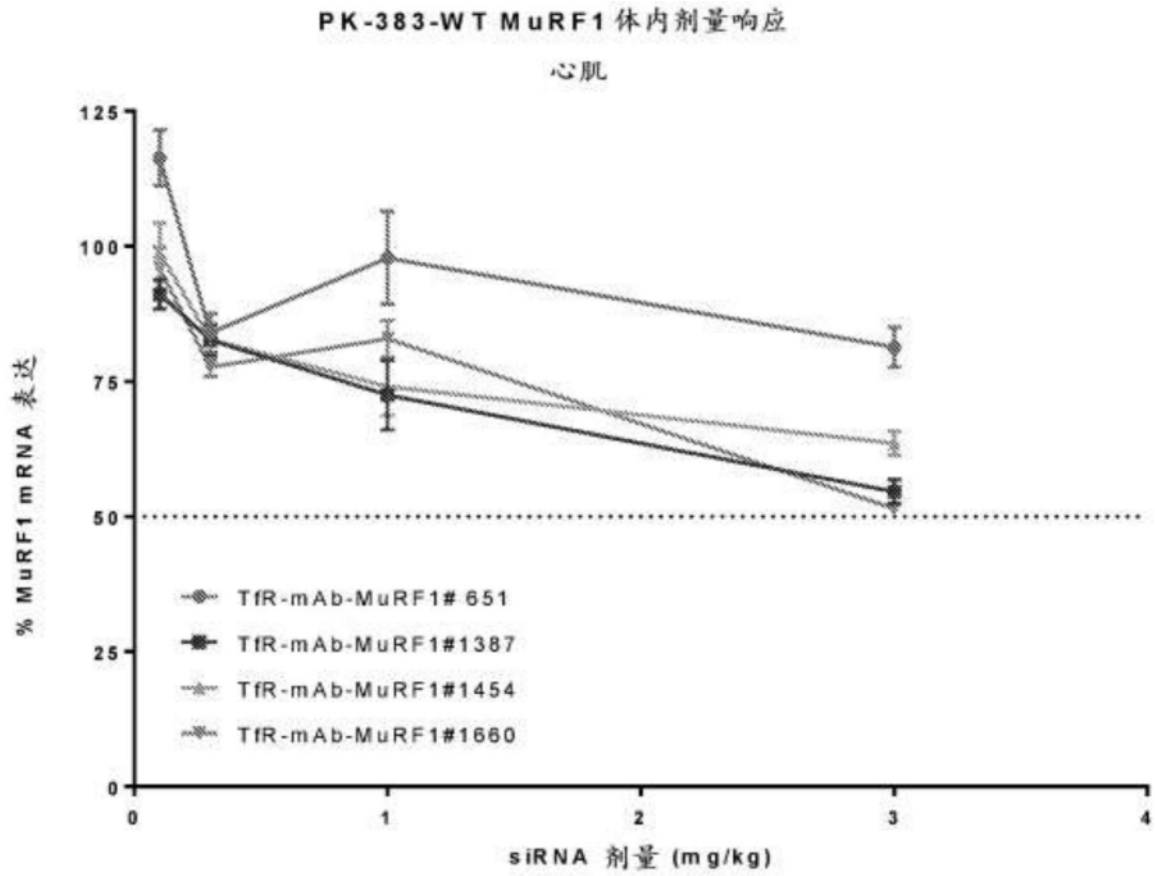


图16C

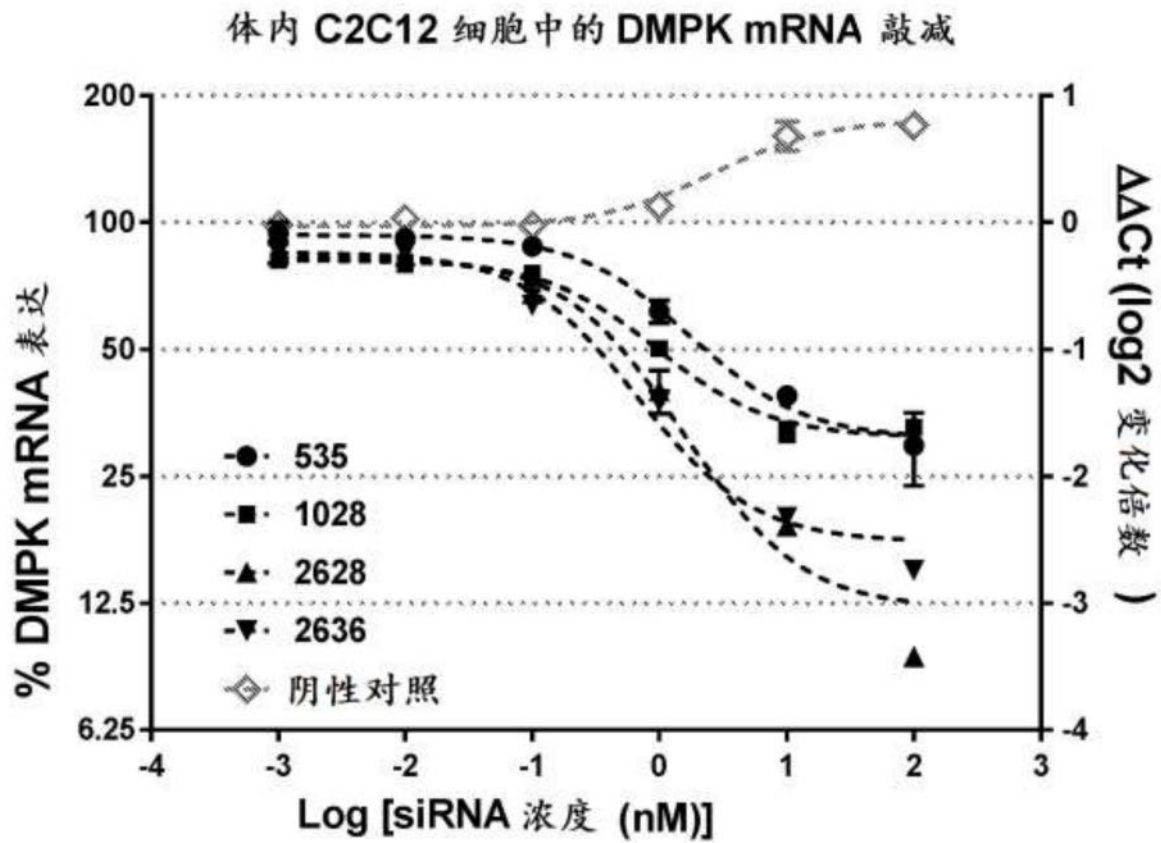


图17

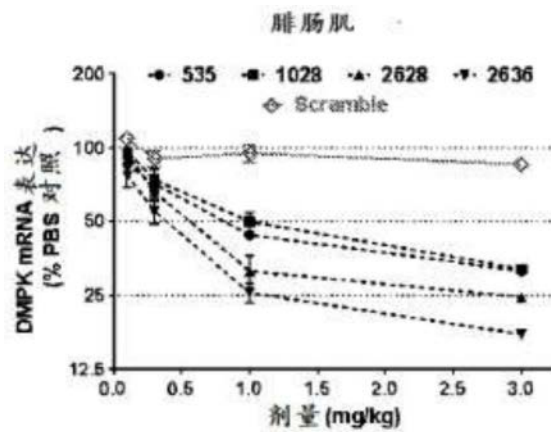


图18A

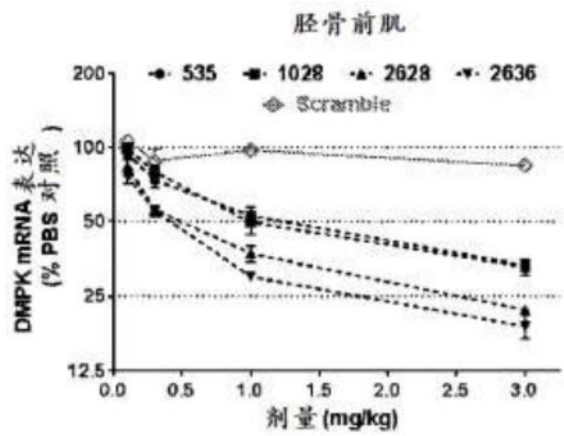


图18B

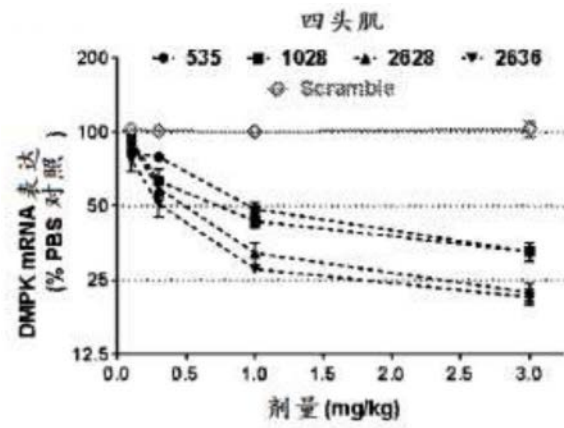


图18C

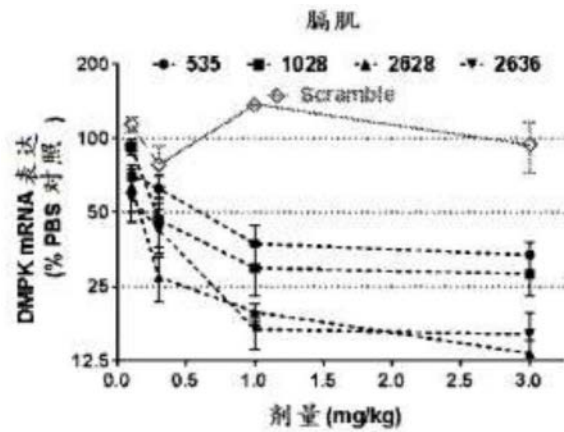


图18D

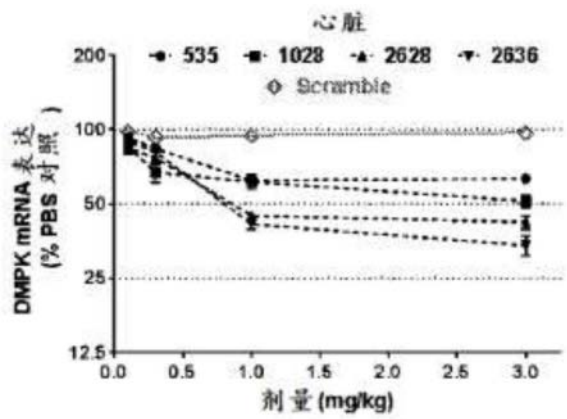


图18E

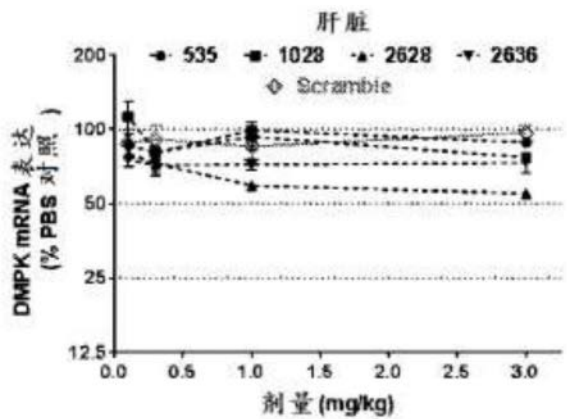


图18F

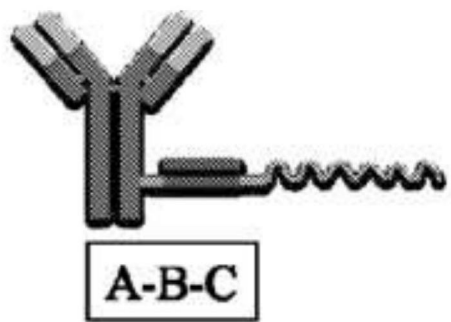


图19A

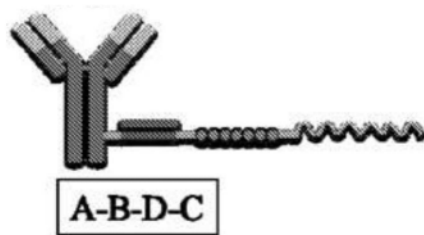


图19B

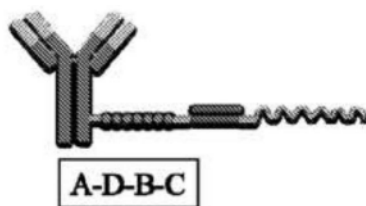


图19C

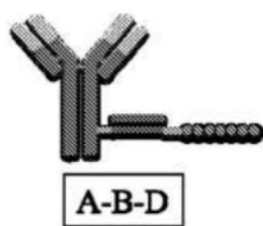


图19D

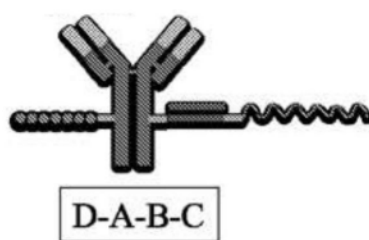


图19E

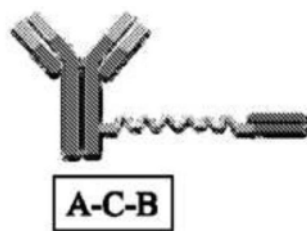


图19F

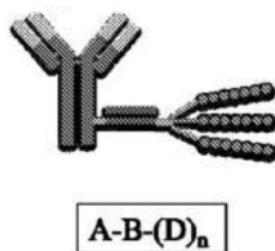


图19G

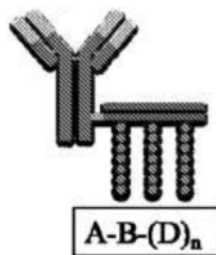


图19H

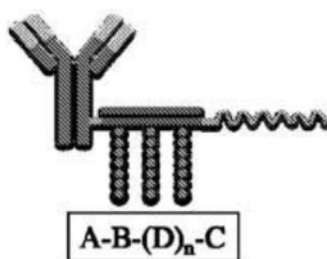


图19I



图19J

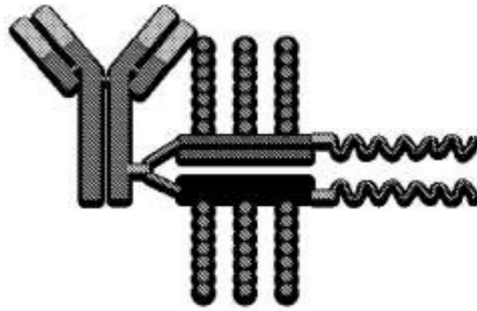


图19K

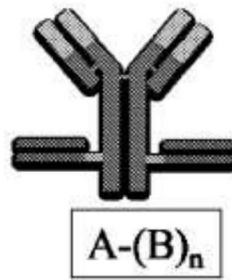


图19L



图19M



图20A

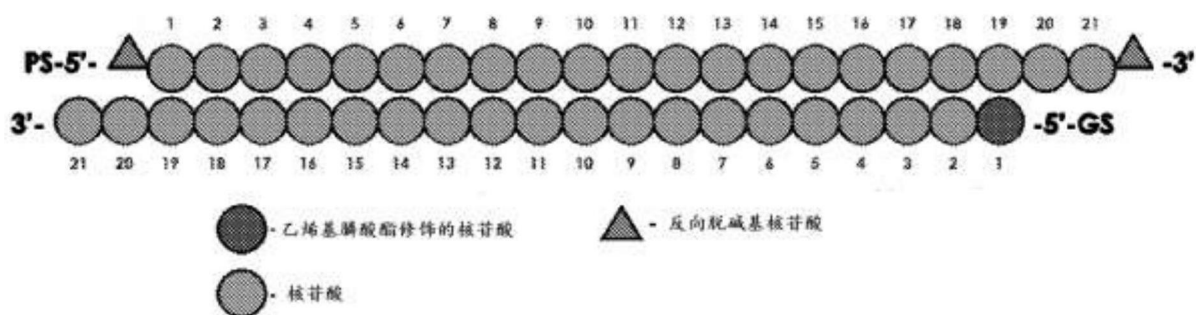


图20B

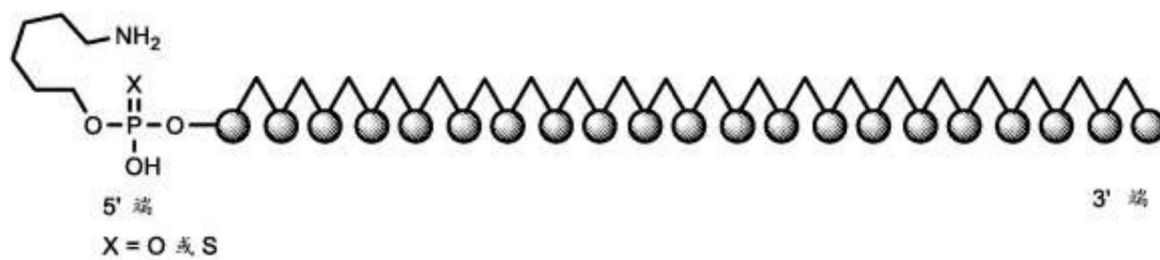


图21A

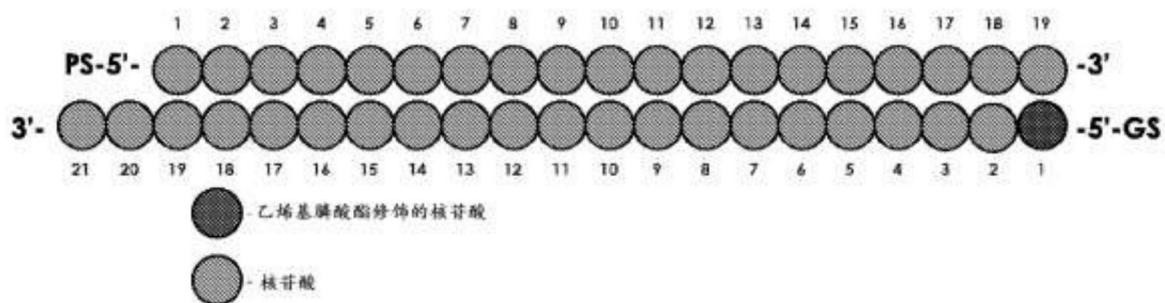


图21B



组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	剂量 体积 (mL/kg)	收获 时间 (h)
1	mTfR1-mAb- Atrogin-1 (DAR1)	4	3	5.0	96
2	mTfR1-mAb- Atrogin-1 (DAR1)	4	3	5.0	7 天
3	mTfR1-mAb- Atrogin-1 (DAR1)	4	3	5.0	14 天
4	mTfR1-mAb- Atrogin-1 (DAR1)	4	3	5.0	21 天
5	PBS 对照	4	-	5.0	96
6	PBS 对照	4	-	5.0	7 天
7	PBS 对照	4	-	5.0	14 天
8	PBS 对照	4	-	5.0	21 天

图22

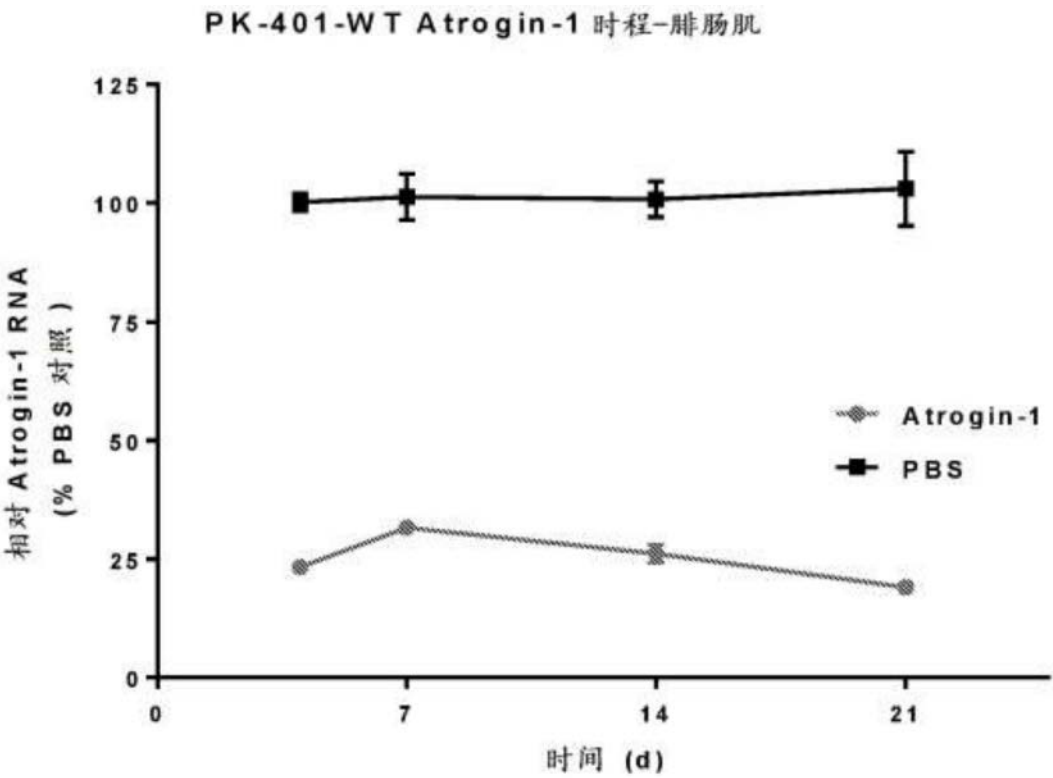


图23

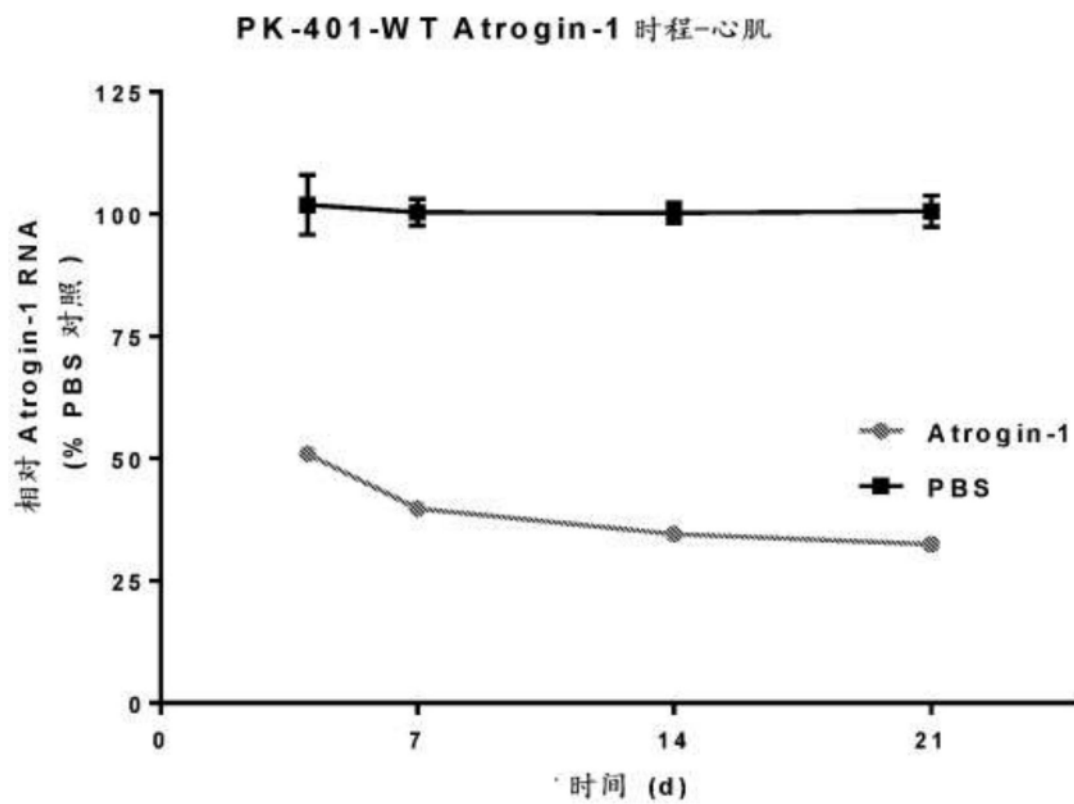


图24

组	测试物	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	剂量 体积 (mL/kg)	收获 时间 (h)
1	mTfR1-mAb-MuRF1(R2089) (DAR1)	4	3	5.0	96
2	mTfR1-mAb-MuRF1(R2089) (DAR1)	4	1	5.0	96
3	mTfR1-mAb-MuRF1(R2265) (DAR1)	4	3	5.0	96
4	mTfR1-mAb-MuRF1(R2265) (DAR1)	4	1	5.0	96
5	mTfR1-mAb-MuRF1(R2265) (DAR1)	4	0.3	5.0	96
6	mTfR1-mAb-MuRF1(R2265) (DAR1)	4	0.1	5.0	96
7	mTfR1-mAb-MuRF1(R2266) (DAR1)	4	3	5.0	96
8	mTfR1-mAb-MuRF1(R2266) (DAR1)	4	1	5.0	96
9	mTfR1-mAb-MuRF1(R2266) (DAR1)	4	0.3	5.0	96
10	mTfR1-mAb-MuRF1(R2266) (DAR1)	4	0.1	5.0	96
11	mTfR1-mAb-MuRF1(R2267) (DAR1)	4	3	5.0	96
12	mTfR1-mAb-MuRF1(R2267) (DAR1)	4	1	5.0	96
13	mTfR1-mAb-MuRF1(R2267) (DAR1)	4	0.3	5.0	96
14	mTfR1-mAb-MuRF1(R2267) (DAR1)	4	0.1	5.0	96
15	mTfR1-mAb-MuRF1(R2268) (DAR1)	4	3	5.0	96
16	mTfR1-mAb-MuRF1(R2268) (DAR1)	4	1	5.0	96
27	mTfR1-mAb-MuRF1(R2268) (DAR1)	4	0.3	5.0	96
18	mTfR1-mAb-MuRF1(R2268) (DAR1)	4	0.1	5.0	96
19	mTfR1-mAb-MuRF1(R2269) (DAR1)	4	3	5.0	96
20	mTfR1-mAb-MuRF1(R2269) (DAR1)	4	1	5.0	96
21	mTfR1-mAb-MuRF1(R2269) (DAR1)	4	0.3	5.0	96
22	mTfR1-mAb-MuRF1(R2269) (DAR1)	4	0.1	5.0	96
23	PBS 对照	5	-	5.0	96

图25

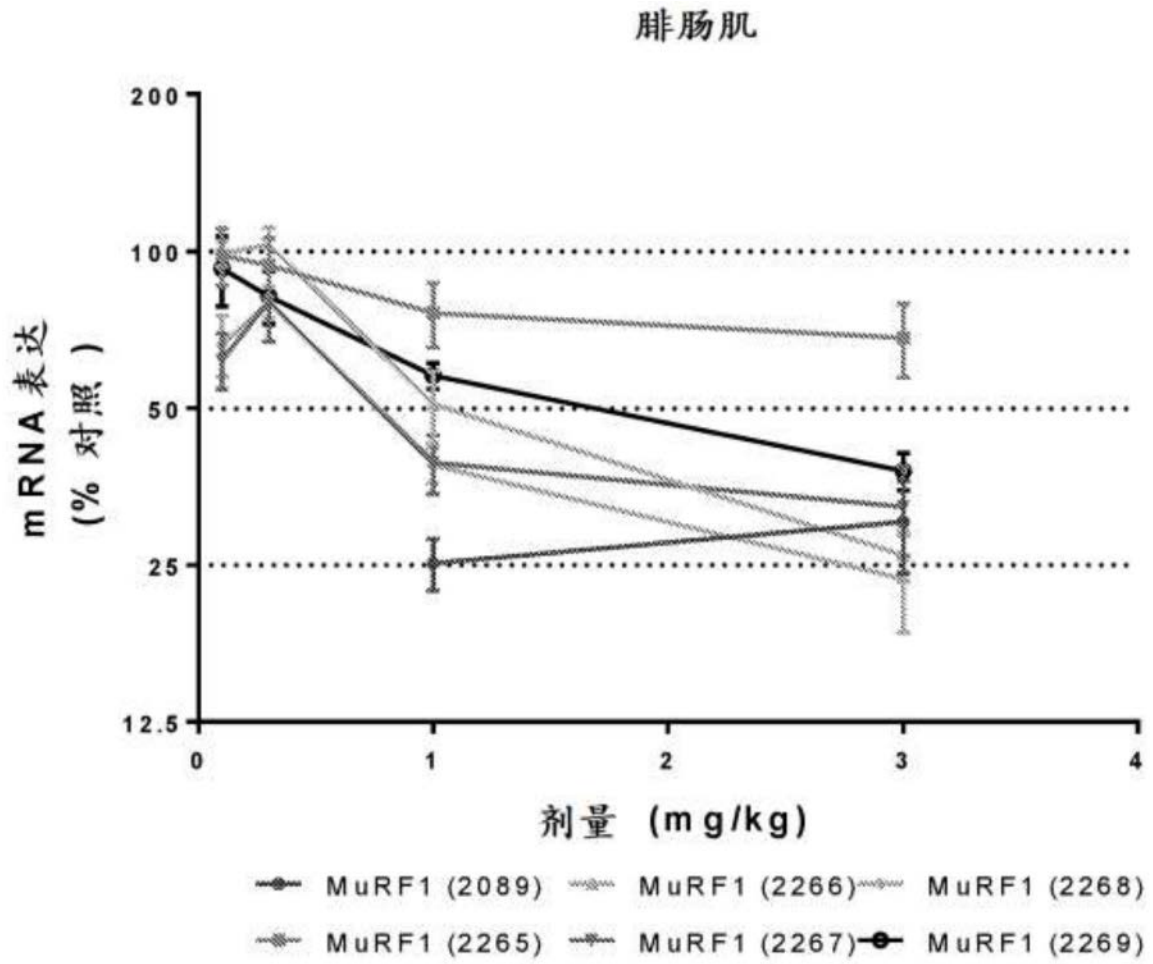


图26

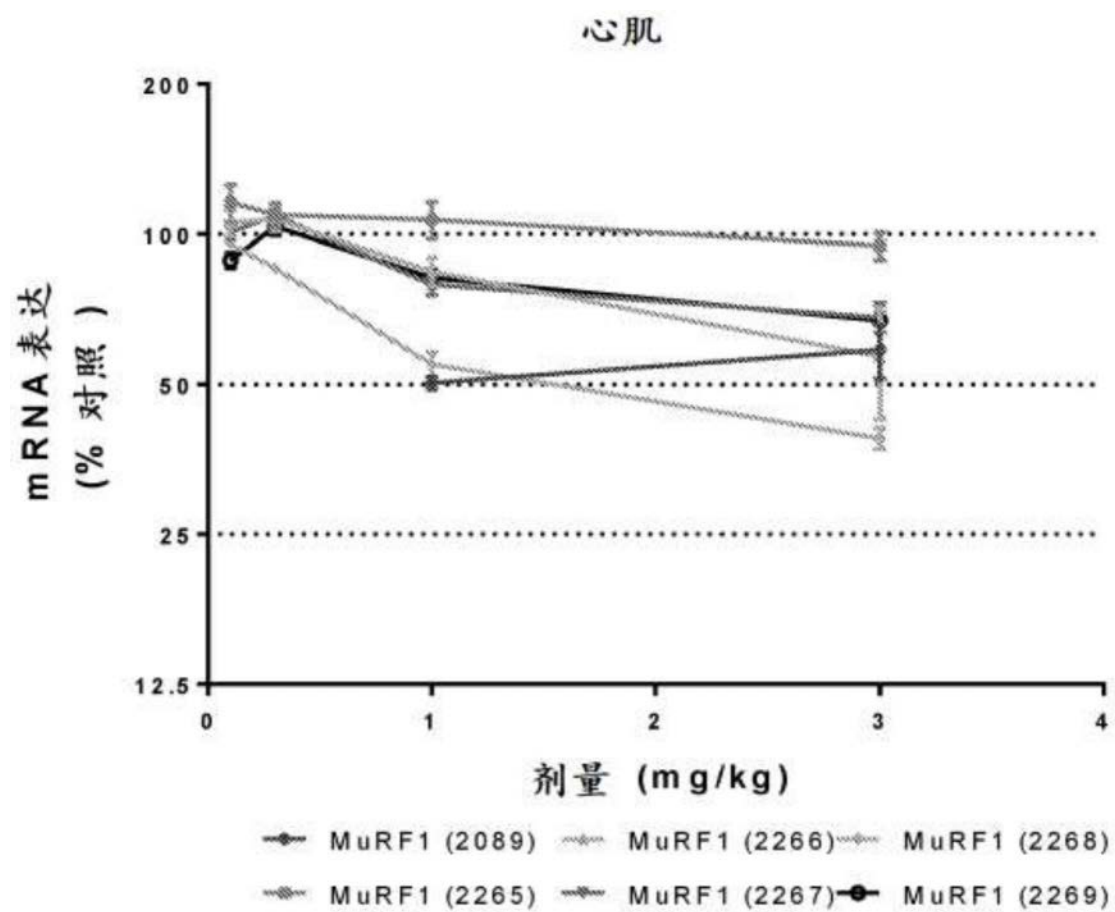


图27

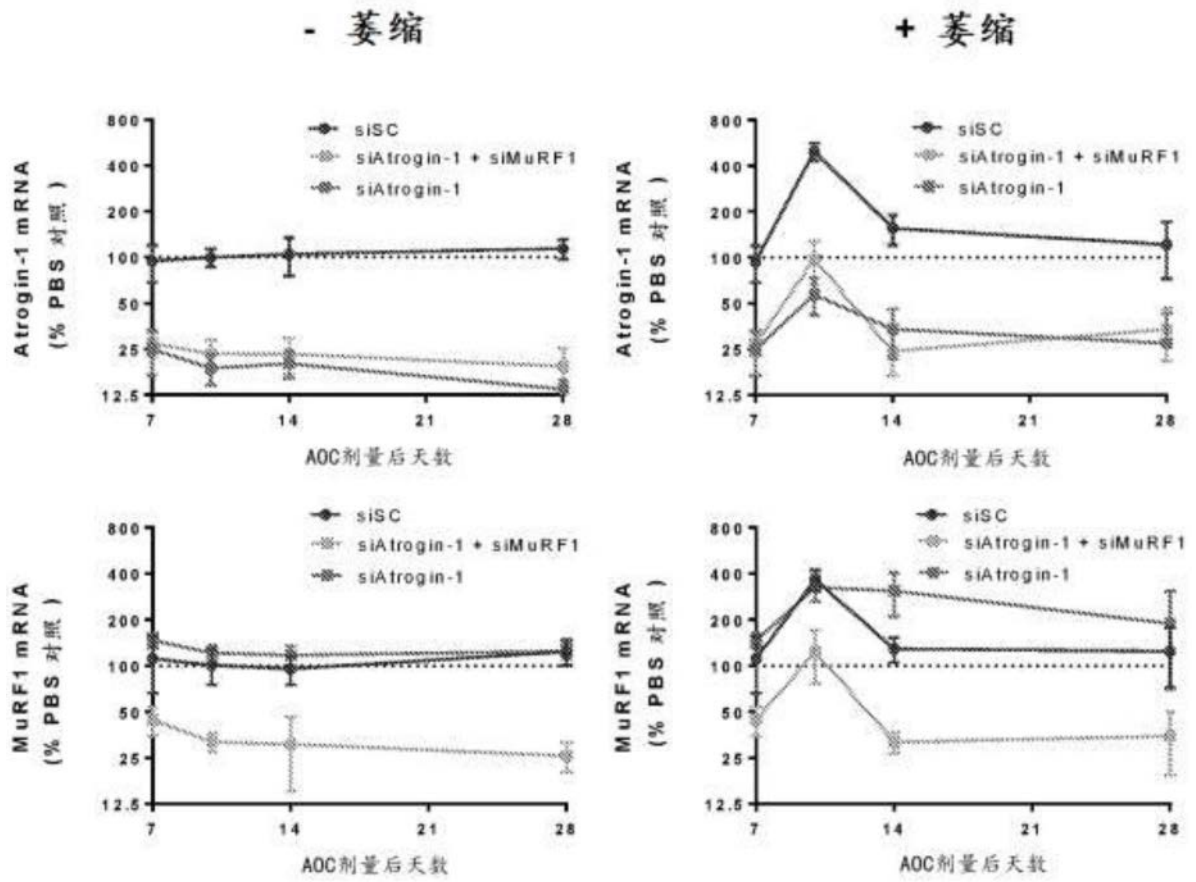


图28



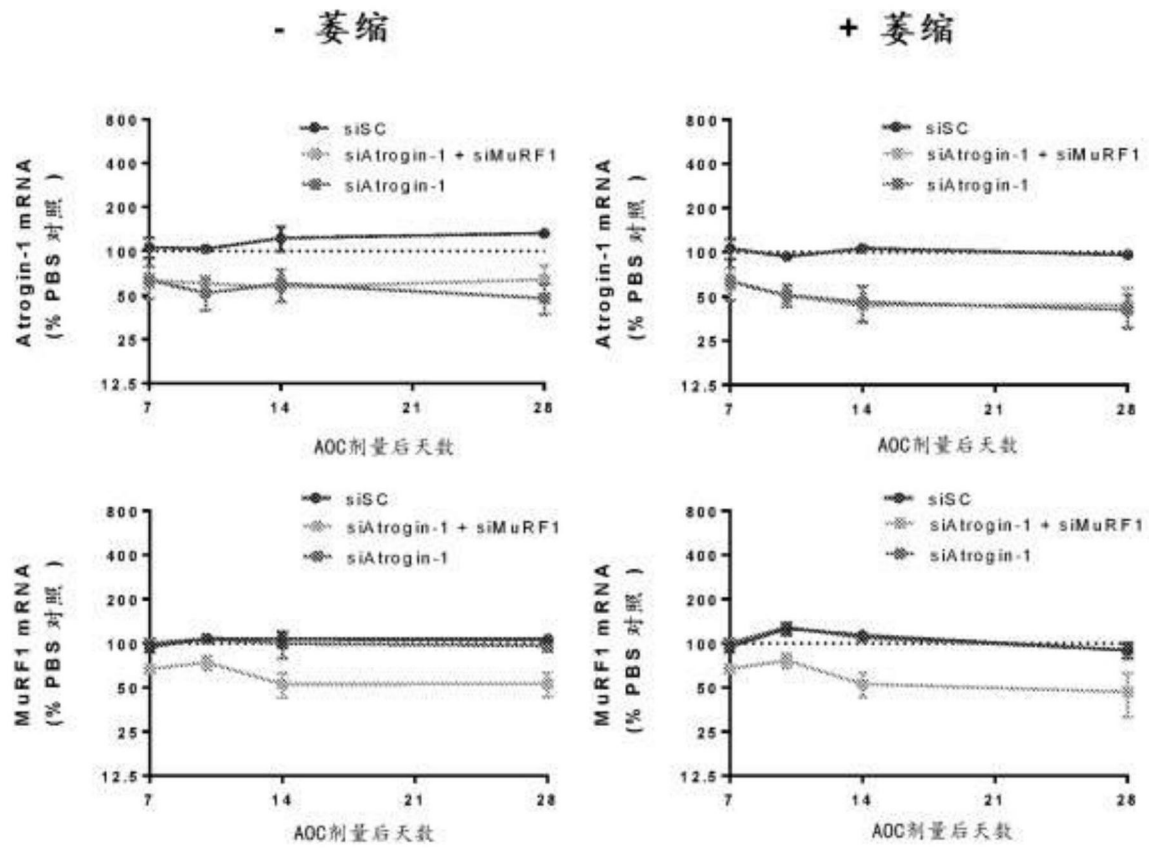


图29

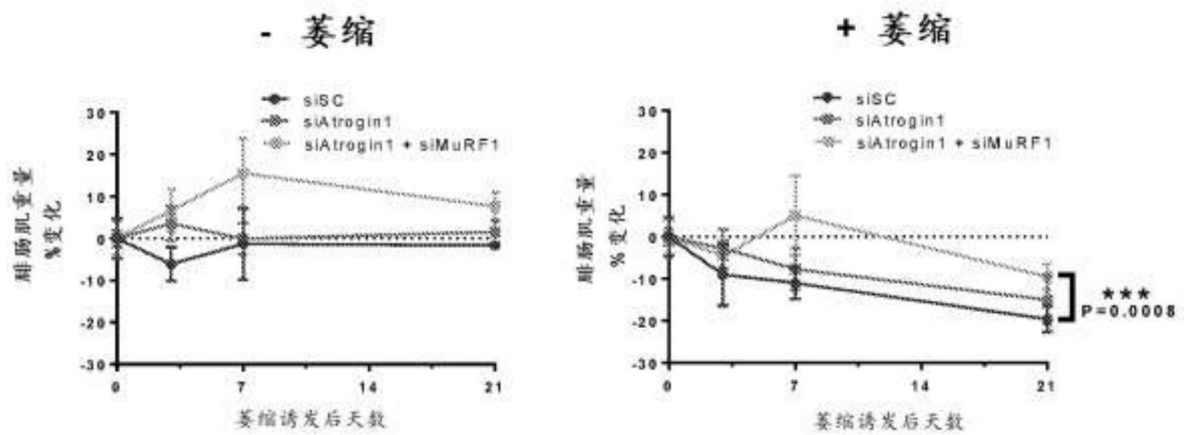


图30

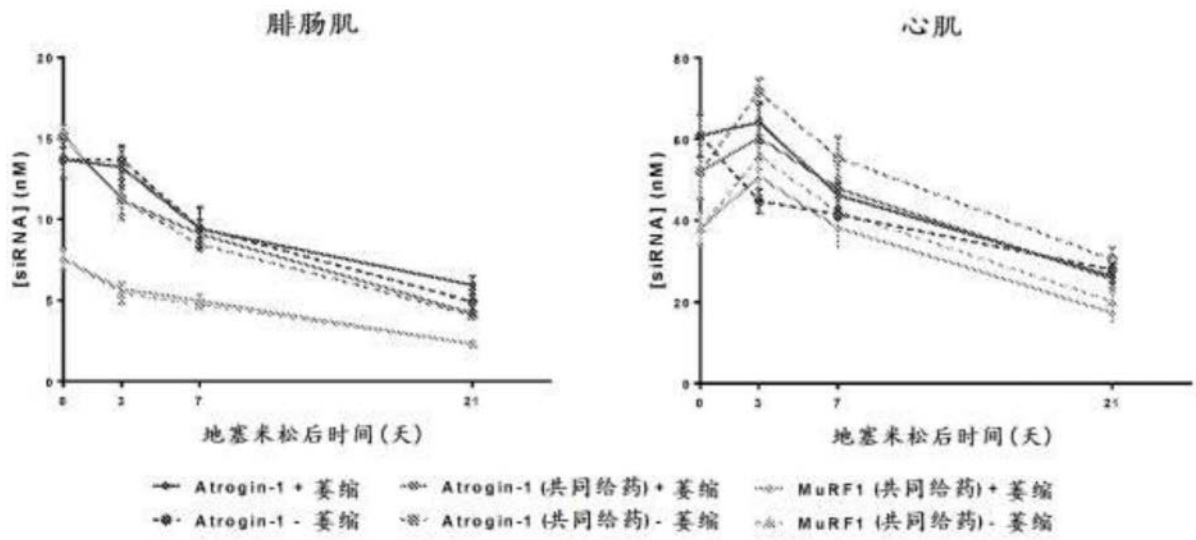


图31



组	ASC	萎缩	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	siRNA: mAb 比 (mol/mol)	剂量 体积 (mL/kg)	剂量 数	收获时间 (地塞米 松后天数)
1	TfR1-Atrogin-1 DAR1		4	9	1.0	5.0	1	0
2	TfR1-Atrogin-1 DAR1	+ PBS	4	9	1.0	5.0	1	3
3	TfR1-Atrogin-1 DAR1	+ Dex	4	9	1.0	5.0	1	3
4	TfR1-Atrogin-1 DAR1		4	3	1.0	5.0	1	0
5	TfR1-Atrogin-1 DAR1	+ PBS	4	3	1.0	5.0	1	3
6	TfR1-Atrogin-1 DAR1	+ Dex	4	3	1.0	5.0	1	3
7	TfR1-Atrogin-1 DAR1		4	1	1.0	5.0	1	0
8	TfR1-Atrogin-1 DAR1	+ PBS	4	1	1.0	5.0	1	3
9	TfR1-Atrogin-1 DAR1	+ Dex	4	1	1.0	5.0	1	3
10	TfR1-Scramble DAR1		4	9	1.0	5.0	1	0
11	TfR1-Scramble DAR1	+ PBS	4	9	1.0	5.0	1	3
12	TfR1-Scramble DAR1	+ Dex	4	9	1.0	5.0	1	3
13	TfR1-Scramble DAR1		4	3	1.0	5.0	1	0
14	TfR1-Scramble DAR1	+ PBS	4	3	1.0	5.0	1	3
15	TfR1-Scramble DAR1	+ Dex	4	3	1.0	5.0	1	3
16	PBS 对照		5	-	-	5.0	1	0

图32

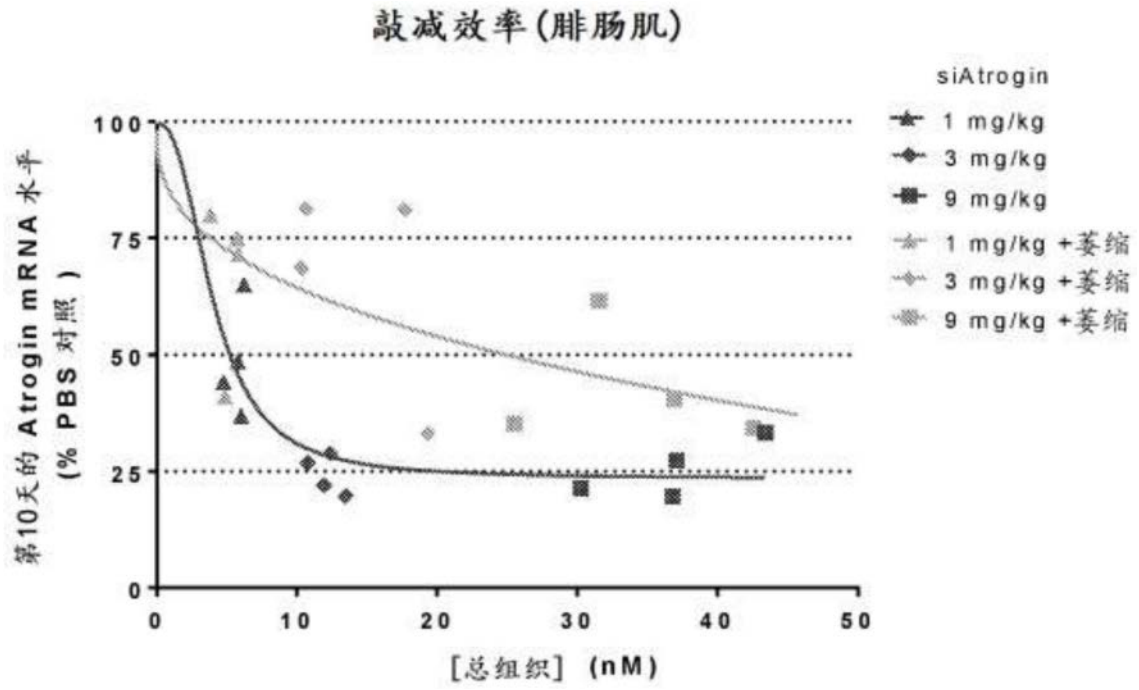


图33

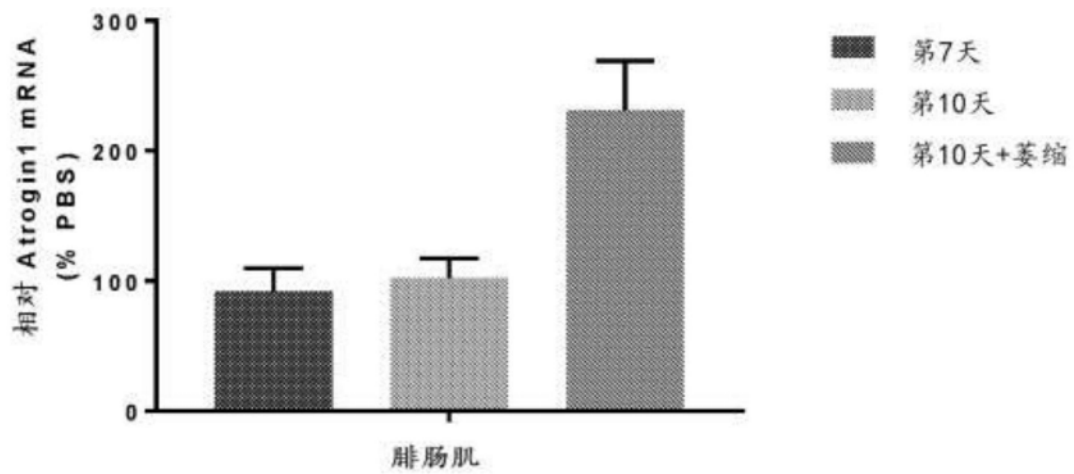


图34

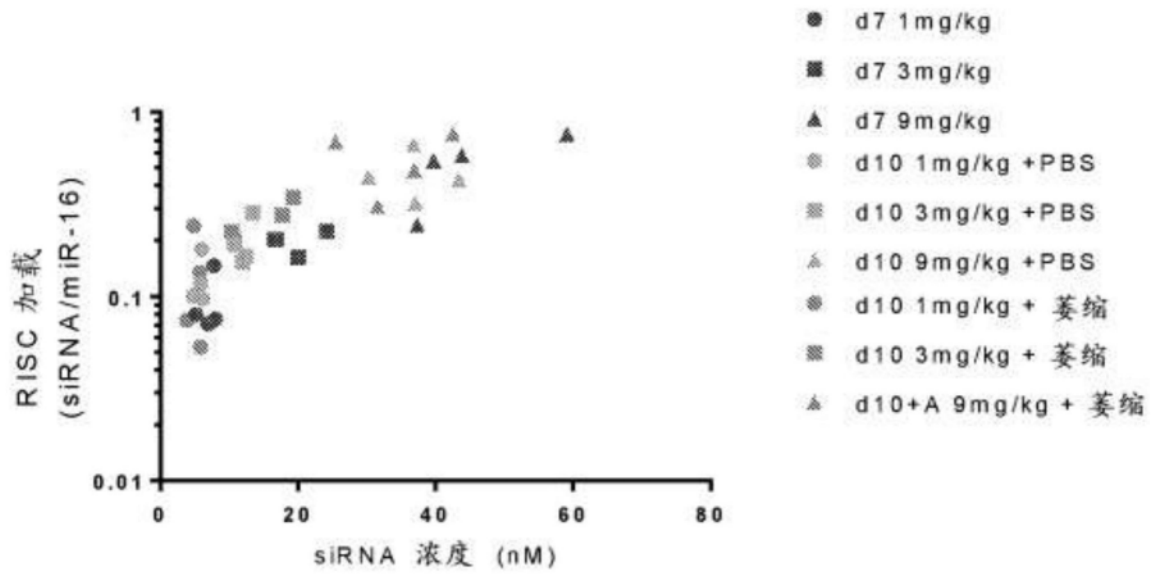


图35

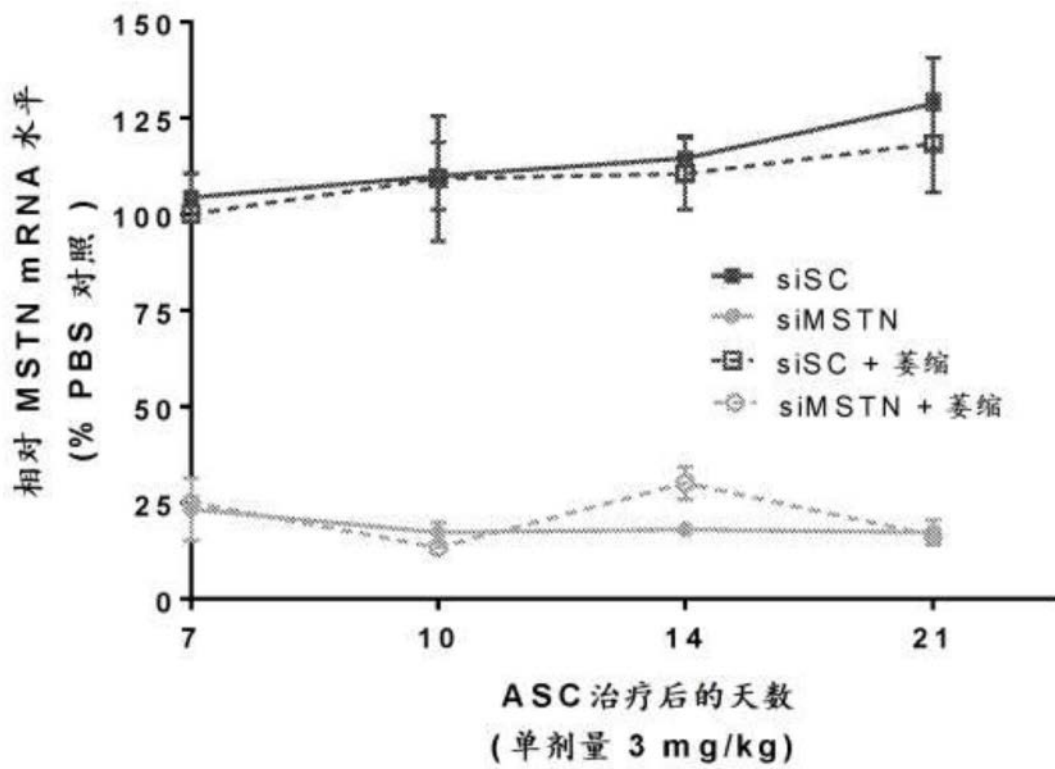


图36

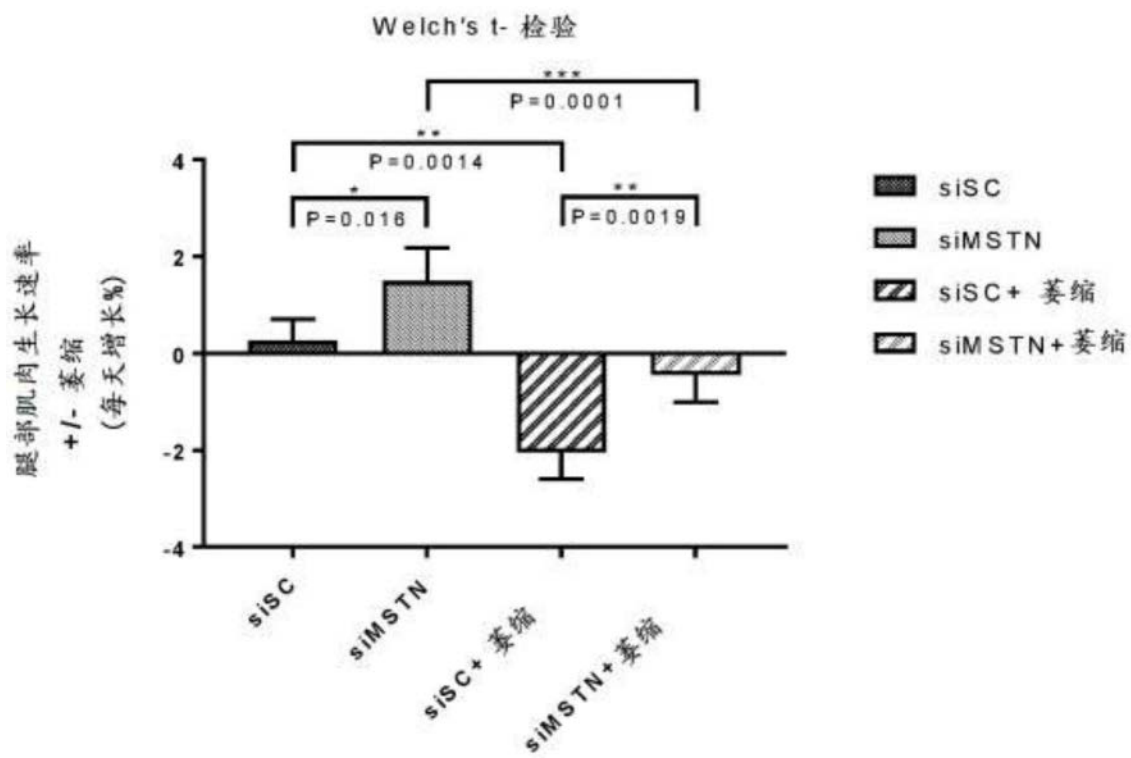


图37

组	ASC	N	总 siRNA 剂量 (mg/kg)	剂量 体积 (mL/kg)	收获时 间 (ASC 后天数)	收获时 间 (DEN 后天数)
1	TfR1-Atrogin-1 DAR1	4	4.5	5.0	7	0
2	TfR1-Atrogin-1 DAR1	4	4.5	5.0	10	3
3	TfR1-Atrogin-1 DAR1	4	4.5	5.0	17	10
4	TfR1-Atrogin-1 DAR1	8	4.5	5.0	28	21
5	TfR1-MuRF1 DAR1	4	4.5	5.0	7	0
6	TfR1-MuRF1 DAR1	4	4.5	5.0	10	3
7	TfR1-MuRF1 DAR1	4	4.5	5.0	17	10
8	TfR1-MuRF1 DAR1	8	4.5	5.0	28	21
9	TfR1-Atrogin-1 + TfR1-MuRF1 DAR1	4	9	5.0	7	0
10	TfR1-Atrogin-1 + TfR1-MuRF1 DAR1	4	9	5.0	10	3
11	TfR1-Atrogin-1 + TfR1-MuRF1 DAR1	4	9	5.0	17	10
12	TfR1-Atrogin-1 + TfR1-MuRF1 DAR1	8	9	5.0	28	21
13	TfR1-SC DAR1	4	4.5	5.0	7	0
14	TfR1-SC DAR1	4	4.5	5.0	10	3
15	TfR1-SC DAR1	4	4.5	5.0	17	10
16	TfR1-SC DAR1	8	4.5	5.0	28	21
17	PBS 对照	5	-	5.0	7	0

图38

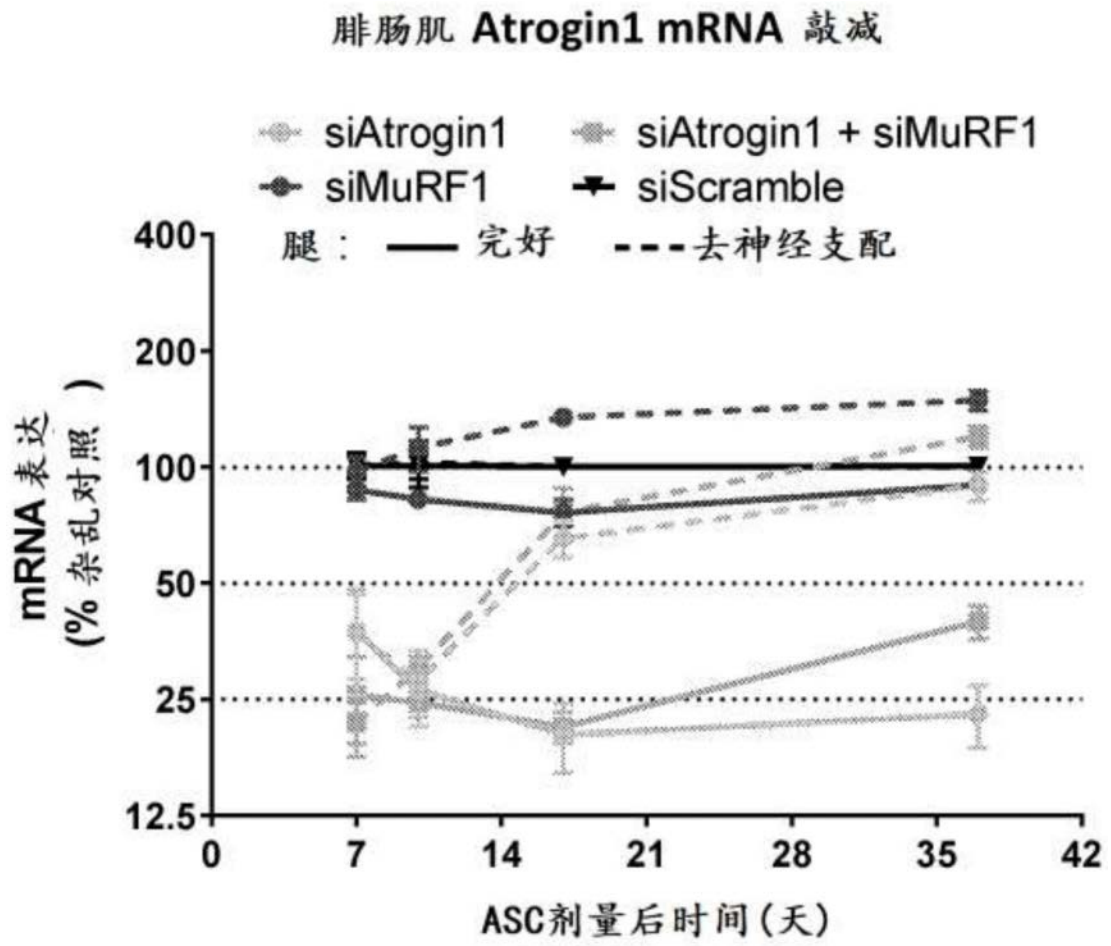


图39A



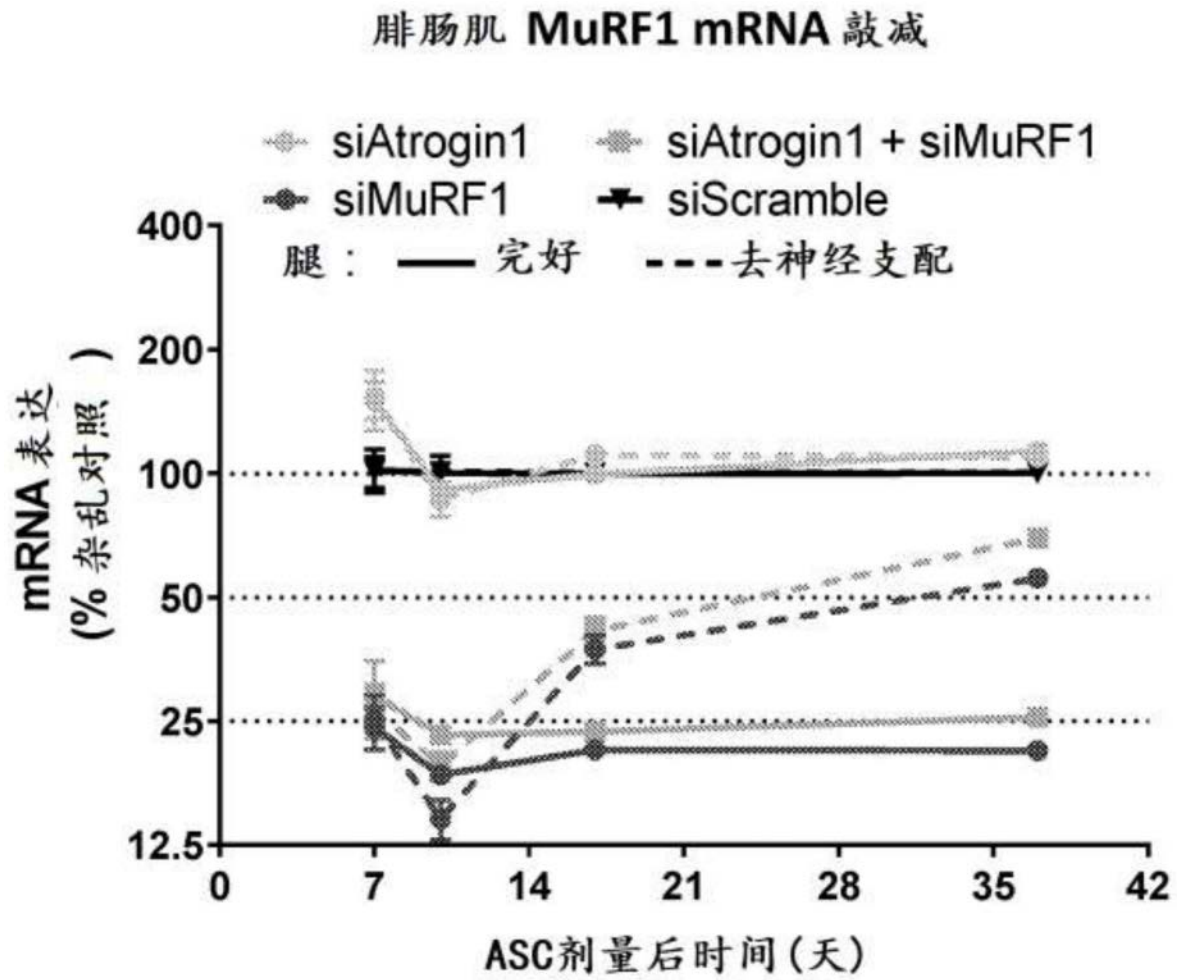


图39B

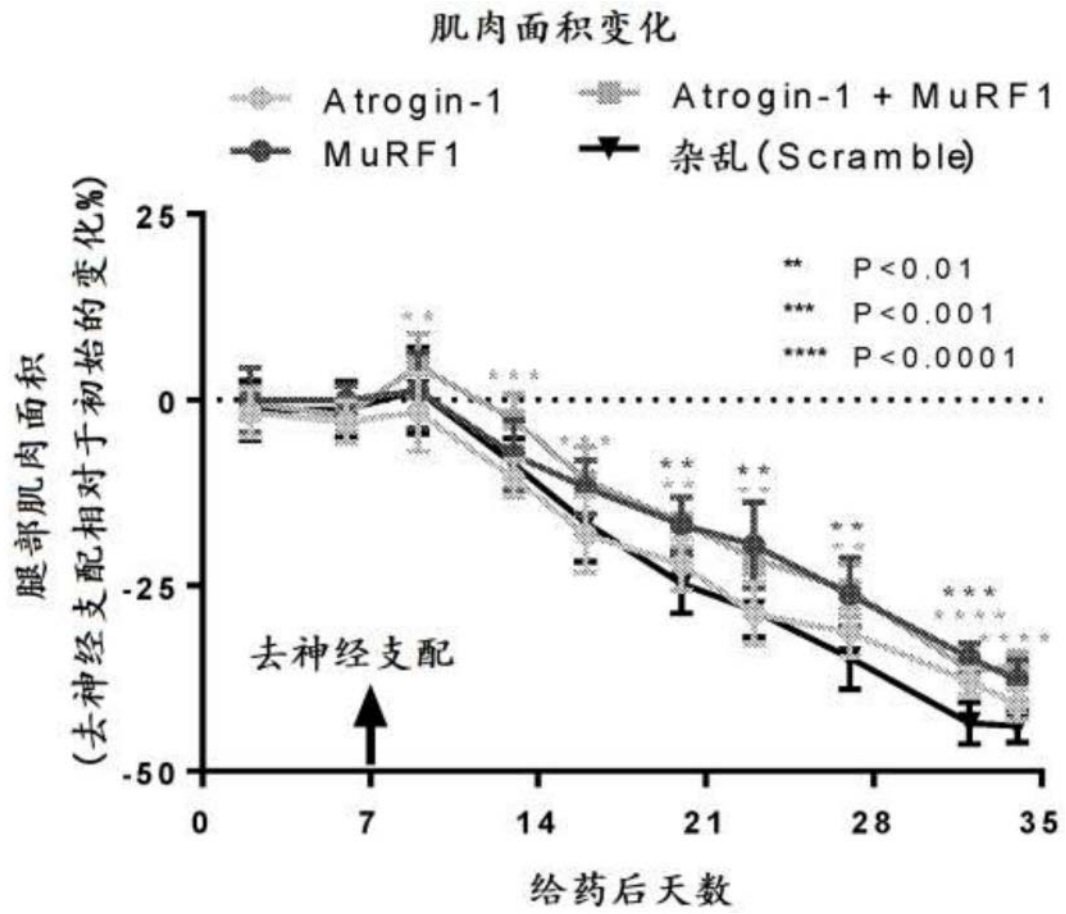


图39C



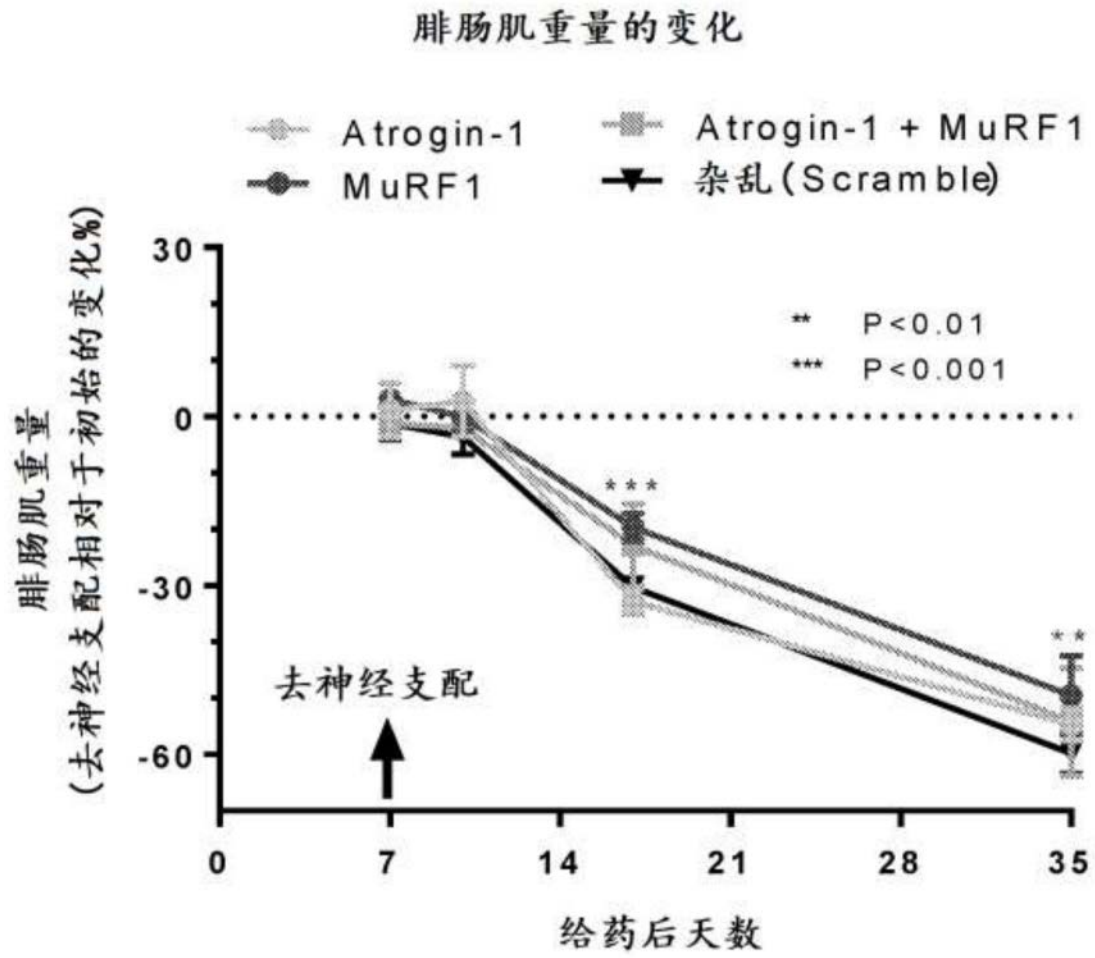


图39D

治疗引起的肌肉萎缩减少百分比  
(腿部肌肉面积)

给药后天数	去神经支配 后天数	MuRF1	Atrogin-1 + MuRF1
16	9	29.0	34.7
20	13	32.0	33.4
23	16	31.0	24.5
27	20	24.5	26.3
32	25	20.2	16.2
34	27	14.2	18.2

图39E

治疗引起的肌肉萎缩减少百分比  
(腓肠肌重量)

给药后天数	去神经支配 后天数	MuRF1
17	10	35.2
35	28	17.1

图39F