(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118414172 A
(43)申请公布日 2024.07.30

(21)申请号 202280083977.7
(22)申请日 2022.12.20
(30)优先权数据
2030215 2021.12.22 NL
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/NL2022/050736 2022.12.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/121446 EN 2023.06.29
(71)申请人 萨普雷米科技有限公司
地址 荷兰比尔特霍芬
(72)发明人 米里亚姆·维雷娜·布伊尼
鲁本·波斯特尔 盖伊·赫尔曼斯
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
专利代理师 洪欣 伊硕
(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)
A61K 47/54(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)

权利要求书18页 说明书94页
序列表（电子公布） 附图58页

(54)发明名称

用于治疗肌肉消耗障碍的靶向皂苷-核酸缀合物

(57)摘要

本发明涉及治疗和预防肌肉消耗障碍,特别是涉及可以通过将治疗性核酸递送到肌肉细胞中来靶向的遗传因子的肌肉消耗障碍的领域。根据后一方面,本文披露了明显增强治疗性核酸向肌肉细胞的正确内部隔室诸如胞质溶胶和/或细胞核的有效递送和释放的药物组合物及其有利组分,在该隔室中该治疗性核酸可以到达并作用于其遗传靶标。如本文所披露,这种明显增强的递送和释放是通过在本文披露的包含治疗性核酸和肌肉细胞靶向配体的药物组合物中提供内体逃逸增强皂苷来实现的。正如首次在本文中证明的那样,令人意外的是,这些皂苷类型不仅似乎在完全分化的肌肉细胞中保留了其内体逃逸增强特性,而且还通过内皮胞吞转运途径,接着在肌膜处进行内吞捕获而成功到达并进入体内肌肉细胞。

CN 118414172 A

1.一种用于在治疗或预防肌肉消耗障碍中使用的药物组合物,该组合物包含共价连接的缀合物,该缀合物包含

皂苷,

核酸,和

肌肉细胞上的内吞受体的配体,

其中该皂苷是12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷。

2.根据权利要求1所述用于使用的组合物,其中该肌肉消耗障碍是肌肉细胞相关遗传性障碍,优选地是先天性肌病或肌营养不良;

优选地其中该先天性肌病选自杆状体肌病或先天性纤维型比例失调肌病,和/或其中该肌营养不良选自抗肌萎缩蛋白病、面肩肱型肌营养不良、强直性肌营养不良、埃默里-德赖弗斯肌营养不良、肢带型肌营养不良1B、先天性肌营养不良;或扩张型家族性心肌病;

最优选地其中该肌肉消耗障碍是肌肉细胞相关遗传性障碍,该肌肉细胞相关遗传性障碍是抗肌萎缩蛋白病,优选地是迪谢内肌营养不良。

3.根据权利要求1或2所述用于使用的组合物,其中该治疗或预防肌肉消耗障碍涉及反义疗法,优选地涉及外显子跳跃。

4.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该皂苷至少在非缀合状态下在该皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含醛基团。

5.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该皂苷的苷元核心结构选自以下中的任一种或多种:

皂皮酸;

丝石竹皂苷元;

2α-羟基齐墩果酸;

16α-羟基齐墩果酸;

常春藤皂苷元(23-羟基齐墩果酸);

16α,23-二羟基齐墩果酸;

原七叶皂苷元-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯;

23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯);

23-氧代-玉蕊皂苷元C-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯;

3,16,28-三羟基齐墩果烷-12-烯;

丝石竹酸;以及

其衍生物,

优选地其中该皂苷的苷元核心结构选自皂皮酸、丝石竹皂苷元及其衍生物,更优选地,该皂苷的苷元核心结构是皂皮酸。

6.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该皂苷的糖级分包含糖链,该糖链选自如下表中呈现的A组或B组中列出的糖链中的任一种:

A 组
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-
Gal-
Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-
Glc-
Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-
Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
GlcA-
Rha-(1→2)-Ara-
Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-
Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
B 组
[4,6-二-OAc-Glc-(1→3)]-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Ara/Xyl-
Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc/Gal-
Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-

Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- 其中 R 是 4E-甲氧基肉桂酸)
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-二-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 4E-甲氧基肉桂酸
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 4Z-甲氧基肉桂酸。

7.根据权利要求6所述用于使用的组合物,其中该皂苷至少是包含选自A组的第一糖链并且包含选自B组的第二糖链的双糖链皂苷;

优选地其中该第一糖链包含末端葡糖醛酸残基和/或其中该第二糖链包含至少四个呈支链构型的糖残基;

更优选地其中该第一糖链是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA和/或其中至少四个糖残基的支链第二糖链包含末端岩藻糖残基和/或末端鼠李糖残基。

8.根据权利要求7所述用于使用的组合物,其中该皂苷包含在该皂苷的苷元核心结构的C-3位置处的第一糖链和/或在该皂苷的苷元核心结构的C-28位置处的第二糖链;

优选地其中该第一糖链是在该皂苷的苷元核心结构的C-3β-OH基团处的碳水化合物取代基,和/或其中该第二糖链是在该皂苷的苷元核心结构的C-28-OH基团处的碳水化合物取代基。

9.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该缀合物包含两个或更多个该皂苷的分子、优选地2-32个该皂苷的分子、甚至更优选地4-16个该皂苷的分子、最优选地4-8个该皂苷的分子。

10.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该皂苷是以下中的任一种或多种:

a)选自列表A中的任一种或多种的皂苷:

-皂树皂苷混合物或从皂树分离的皂苷,例如Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl;

-皂苷集皂苷混合物或从皂苷集分离的皂苷;

-肥皂草皂苷混合物或从肥皂草分离的皂苷;和

-皂树树皮皂苷混合物或从皂树树皮分离的皂苷,例如Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl;或

b)包含丝石竹皂苷元苷元核心结构的皂苷,选自列表B:

SA1641、丝石竹皂苷A、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO1658和商陆皂苷元;或

c)包含皂皮酸苷元核心结构的皂苷,选自列表C:

AG1856、AG1、AG2、Agrostemmoside E、GE1741、丝石竹皂苷元1(Gyp1)、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、

SA1657、Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、SO1904、QS-7、QS-7api、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio和QS-21B-xylo;或

d)包含12,13-脱氢齐墩果烷型苷元核心结构、在该苷元的C-23位置处没有醛基团的皂苷,选自列表D:

七叶素Ia、七叶皂苷、α-常春藤皂苷、AMA-1、AMR、AS6.2、AS64R、阿萨姆皂苷F、川续断皂苷B、商陆皂苷A、灰毡毛忍冬皂苷A、NP-005236、NP-012672、报春花酸1、柴胡皂苷A、柴胡皂苷D、茶籽皂苷I和茶籽皂苷J,

优选地,该皂苷是选自列表A、B或C的皂苷、更优选地选自列表B或C的皂苷、甚至更优选地选自列表C的皂苷中的任一种或多种。

11.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该皂苷是AG1856、GE1741、从皂树分离的皂苷、Quil-A、QS-17、QS-21、QS-7、SA1641、从肥皂草分离的皂苷、Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862和SO1904中的任一种或多种;

优选地其中该皂苷是QS-21、SO1832、SO1861、SA1641和GE1741中的任一种或多种;更优选地其中该皂苷是QS-21、SO1832或SO1861;

最优选地是SO1861。

12.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该皂苷是从肥皂草分离的皂苷,优选地其中该皂苷是Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862和SO1904中的任一种或多种;

更优选地其中该皂苷是SO1832、SO1861和SO1862中的任一种或多种;

甚至更优选地其中该皂苷是SO1832或SO1861;

最优选地是SO1861。

13.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该核酸是定义为不长于150nt的核酸的寡核苷酸,优选地其中该寡核苷酸具有5-150nt、优选地8-100nt、最优选地10-50nt的大小;优选地其中该寡核苷酸是反义寡核苷酸,更优选地是突变特异性反义寡核苷酸,最优选地是被设计来诱导外显子跳跃的寡核苷酸。

14.根据权利要求13所述用于使用的组合物,其中该寡核苷酸包含以下中的任一种或由其组成:磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO)、2'-O-甲基(2′-OMe)硫代磷酸酯RNA、2′-O-甲氧基乙基(2′-O-MOE)RNA{2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)}、锁核酸或桥接核酸(LNA或BNA)、2'-O,4'-氨基乙烯桥接核酸(BNANC)、肽核酸(PNA)、2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸(FANA)、3'-氟己糖醇核酸(FHNA)、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、沉默RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、antagomir(miRNA拮抗剂)、适体RNA或适体DNA、单链RNA或单链DNA、双链RNA(dsRNA)或双链DNA;

优选地其中该寡核苷酸包含磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO)或2'-O-甲基(2′-OMe)硫代磷酸酯RNA或由其组成。

15.根据权利要求13或14所述用于使用的组合物,其中该寡核苷酸被设计来诱导人抗肌萎缩蛋白基因转录物的外显子跳跃,优选地其中该外显子跳跃涉及51号外显子跳跃或53号外显子跳跃或45号外显子跳跃;

更优选地其中该寡核苷酸是被设计来诱导该51号外显子跳跃或该53号外显子跳跃或该45号外显子跳跃的2'O-甲基-硫代磷酸酯反义寡核苷酸或磷酰二胺吗啉代寡聚物反义寡核苷酸，

甚至更优选地其中该寡核苷酸选自依特立生、曲萨珀森、戈洛迪森、维托拉生和卡西默森。

16.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物，其中该缀合物包含两个或更多个该核酸的分子，

优选地其中该两个或更多个该核酸的分子是2-16个分子，更优选地2-8个分子，可能地2、3、4、5或6个分子；

最优选地其中该两个或更多个该核酸的分子是两个或更多个寡核苷酸；可能地两个或更多个不同的寡核苷酸，其中该两个或更多个不同的寡核苷酸中的至少一个是反义寡核苷酸。

17.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物，其中该缀合物包含1-16个该皂苷的分子和1-5个该核酸的分子/1个该配体的分子。

18.根据权利要求17所述用于使用的组合物，其中该缀合物包含2-8个该皂苷的分子/1个该配体的分子；

优选地3-6个该皂苷的分子/1个该配体的分子；

更优选地4-5个该皂苷的分子/1个该配体的分子；

最优选地其中该缀合物包含平均4-4.5个该皂苷的分子/1个该配体的分子。

19.根据权利要求17或18所述用于使用的组合物，其中该缀合物包含2-5个该核酸的分子/1个该配体的分子；

优选地3-4个该核酸的分子/1个该配体的分子；

更优选地其中该缀合物包含平均4个该核酸的分子/1个该配体的分子。

20.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物，其中该配体所结合的肌肉细胞上的该内吞受体选自：转铁蛋白受体(CD71)、胰岛素样生长因子1(IGF-I)受体(IGF1R)、胰岛素样生长因子2(IGF-II)受体(IGF2R)、四次跨膜蛋白CD63；肌肉特异性激酶(MuSK)、葡萄糖转运蛋白GLUT4、阳离子非依赖性甘露糖6磷酸受体(CI-MPR)和LDL受体。

21.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物，其中该配体选自以下中的任一种或多种：

胰岛素样生长因子1(IGF-I)或其片段；

胰岛素样生长因子2(IGF-II)或其片段；

甘露糖6磷酸

转铁蛋白(Tf)，

zymozan A，和

与该内吞受体特异性结合的抗体或其结合片段，其中该内吞受体优选地选自：转铁蛋白受体(CD71)、胰岛素样生长因子1(IGF-I)受体(IGF1R)、胰岛素样生长因子2(IGF-II)受体(IGF2R)、四次跨膜蛋白CD63、肌肉特异性激酶(MuSK)、葡萄糖转运蛋白GLUT4、阳离子非依赖性甘露糖6磷酸受体(CI-MPR)和LDL受体；

优选地其中该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的抗体或其结合片段，

更优选地其中该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的单克隆抗体或Fab'片段或至少一种单结构域抗体,甚至更优选地其中该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的单克隆抗体。

22.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该缀合物内的该皂苷的共价连接是经由该皂苷所共价结合的第一接头进行的;

优选地其中该第一接头包括共价键,该共价键选自以下中的任一种或多种:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键、肟键、二硫键、硫醚键、酰胺键、肽键和酯键,优选地是腙键或缩氨基脲键;

更优选地其中该皂苷是至少在非缀合状态下在该皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含醛基团的皂苷,并且其中所述醛基团已经参与与该第一接头形成该共价键。

23.根据权利要求22所述用于使用的组合物,其中该第一接头是在酸性、还原性、酶促和/或光诱导条件下进行切割的可切割接头;

优选地其中该第一接头包括可切割键,该可切割键选自:

• 在酸性条件下进行切割的键,诸如缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,

• 易于蛋白水解,优选地通过组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,例如酰胺键或肽键;

• 还原/氧化可切割键,诸如二硫键,或硫醇交换反应敏感键,诸如硫醚键;

优选地是在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选地在pH 4.0-6.5且更优选地在pH≤5.5下进行体内切割的酸敏感性键;

更优选地是选自以下中的任一种或多种的酸敏感性键:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,甚至更优选地选自缩氨基脲键和腙键;最优选地是腙键。

24.根据权利要求22或23所述用于使用的组合物,其中该第一接头进一步包含寡聚物或聚合物结构,即树状突诸如聚酰胺基胺(PAMAM)树枝状聚合物、或聚乙二醇诸如PEG3-PEG30中的任一种;

优选地,该聚合物或寡聚物结构是PEG4-PEG12中的任一种,或G2树状突、G3树状突、G4树状突和G5树状突中的任一种,更优选地是G2树状突或G3树状突或PEG3-PEG30。

25.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该缀合物内的该核酸的共价连接是经由该核酸所共价结合的第二接头进行的;

优选地其中该第二接头包含接头3-(2-吡啶二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯(SPDP)或由其组成;

可能地其中该第二接头将该核酸共价连接到赖氨酸残基,优选地是包含在该配体中的赖氨酸残基,或者共价连接到聚糖残基,优选地是经部分修剪的聚糖。

26.根据权利要求25所述用于使用的组合物,其中该第二接头是在酸性、还原性、酶促和/或光诱导条件下进行切割的可切割接头;

优选地其中该第二接头包括可切割键,该可切割键选自:

• 在酸性条件下进行切割的键,诸如缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,

• 易于蛋白水解,优选地通过组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,例如酰胺键或肽键;

• 还原/氧化可切割键,诸如二硫键,或硫醇交换反应敏感键,诸如硫醚键;

优选地是在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选地在pH 4.0-6.5且更优选地在pH≤5.5下进行体内切割的酸敏感性键;

更优选地是选自以下中的任一种或多种的酸敏感性键:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,甚至更优选地选自缩氨基脲键和腙键;最优选地是腙键。

27.根据权利要求22-26中任一项所述用于使用的组合物,其中该第一接头和/或其中该第二接头直接地或间接地与该配体共价连接。

28.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该缀合物内的该配体的共价连接是经由该配体所共价结合的第三接头进行的;

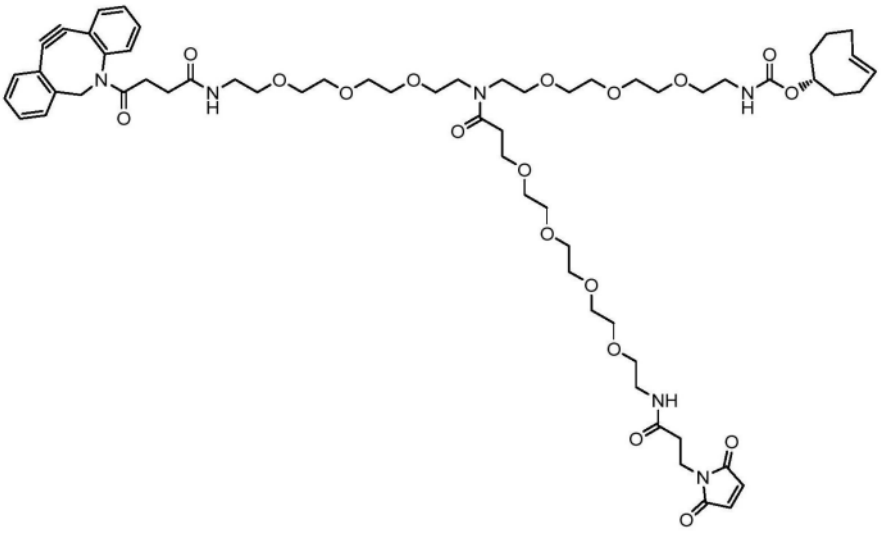
优选地其中该配体包含含有至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个赖氨酸残基的氨基酸残基链,并且其中该第三接头包括与所述至少一个半胱氨酸残基或所述至少一个赖氨酸残基形成的共价键;

更优选地其中该配体包含含有多半胱氨酸重复序列的氨基酸残基链,可能是由序列HRWCCPGCCKTF(SEQ ID NO.4)表示的四半胱氨酸重复序列,并且其中该第三接头包括与该多半胱氨酸重复序列的半胱氨酸残基中的任一个或多个的共价键;可能地其中超过一个第三接头经由该超过一个第三接头中的每一个与该配体所包含的该多半胱氨酸重复序列的单独半胱氨酸残基结合而与该配体的一个分子连接。

29.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该缀合物包含用于实现至少一个该皂苷的分子、至少一个该核酸的分子和至少一个该配体的分子之间的共价连接的中心接头,其中所述共价连接直接或分别经由该第一接头、该第二接头和/或该第三接头实现;

优选地其中该中心接头是三官能接头。

30.根据权利要求29所述用于使用的组合物,其中该中心接头是在其非缀合形式中由结构A表示的三官能接头:



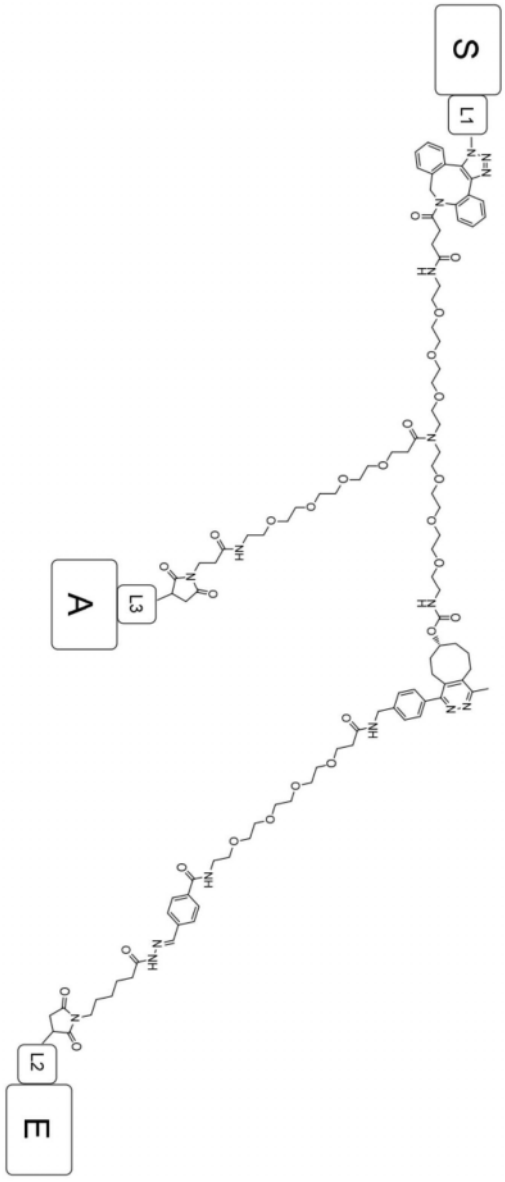
(结构A)。

31.根据权利要求29或30所述用于使用的组合物,其中对于该缀合物所包含的每一个

该配体的分子,该缀合物包含1-4个该三官能接头,更优选地1-2个三官能接头,最优选地平均1.2-1.8.个三官能接头。

32.根据权利要求29-31中任一项所述用于使用的组合物,其中该三官能接头在其缀合形式中由结构B表示:

结构 B



其中:

S是该至少一个该皂苷的分子,

L1是所述至少一个该皂苷的分子所共价结合的该第一接头,

E是至少一个该核酸的分子,

L2是所述至少一个该核酸的分子所共价结合的该第二接头,

A是该至少一个配体的分子,优选地是抗体或其结合片段,并且

L3是所述至少一个该配体的分子所共价结合的该第三接头,

其中L1、L2和L3是相同的或不同的。

33.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,其中该皂苷是或包含至少一个SO1861分子,该核酸是曲萨珀森或依特立生或戈洛迪森或维托拉生,优选地曲萨珀森或

依特立生,并且该配体是抗CD71抗体或其结合片段。

34.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,该组合物用于在向人类受试者的静脉内或皮下施用中使用。

35.根据前述权利要求中任一项所述用于使用的组合物,该组合物包含药学可接受的赋形剂和/或药学可接受的稀释剂。

36.一种用于将治疗性核酸递送到肌肉细胞中的共价连接缀合物,该缀合物包含皂苷,

核酸,和

肌肉细胞上的内吞受体的配体,

其中该皂苷是12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷,并且

其中该缀合物包含1-16个该皂苷的分子和1-5个该核酸的分子/1个该配体的分子。

37.根据权利要求36所述的缀合物,其中该缀合物包含2-8个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

优选地3-6个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

更优选地4-5个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

最优选地其中该缀合物包含平均4-4.5个该皂苷的分子/1个该配体的分子。

38.根据权利要求36或37所述的缀合物,其中该缀合物包含2-5个该核酸的分子/1个该配体的分子;

优选地3-4个该核酸的分子/1个该配体的分子;

最优选地其中该缀合物包含平均4个该核酸的分子/1个该配体的分子。

39.根据权利要求36-38中任一项所述的缀合物,其中该皂苷至少在非缀合状态下在该皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含醛基团。

40.根据权利要求36-39中任一项所述的缀合物,其中该皂苷的苷元核心结构选自以下中的任一种或多种:

皂皮酸;

丝石竹皂苷元;

2α-羟基齐墩果酸;

16α-羟基齐墩果酸;

常春藤皂苷元(23-羟基齐墩果酸);

16α,23-二羟基齐墩果酸;

原七叶皂苷元-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯;

23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯);

23-氧代-玉蕊皂苷元C-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯;

3,16,28-三羟基齐墩果烷-12-烯;

丝石竹酸;以及

其衍生物,

优选地其中该皂苷的苷元核心结构选自皂皮酸、丝石竹皂苷元及其衍生物,更优选地,该皂苷的苷元核心结构是皂皮酸。

41.根据权利要求36-40中任一项所述的缀合物,其中该皂苷的糖级分包含糖链,该糖链选自如下表中呈现的A组或B组中列出的糖链中的任一种:

A 组
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-
Gal-
Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-
Glc-
Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-
Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
GlcA-
Rha-(1→2)-Ara-
Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-
Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
B 组
[4,6-二-OAc-Glc-(1→3)]-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Ara/Xyl-
Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-

Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc/Gal-
Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- 其中 R 是 4E-甲氧基肉桂酸）
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-二-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 4E-甲氧基肉桂酸
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 4Z-甲氧基肉桂酸。

42.根据权利要求41所述的缀合物,其中该皂苷至少是包含选自A组的第一糖链并且包含选自B组的第二糖链的双糖链皂苷;

优选地其中该第一糖链包含末端葡糖醛酸残基和/或其中该第二糖链包含至少四个呈支链构型的糖残基;

更优选地其中该第一糖链是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA和/或其中至少四个糖残基的支链第二糖链包含末端岩藻糖残基和/或末端鼠李糖残基。

43.根据权利要求42所述的缀合物,其中该皂苷包含在该皂苷的苷元核心结构的C-3位置处的第一糖链和/或在该皂苷的苷元核心结构的C-28位置处的第二糖链;

优选地其中该第一糖链是在该皂苷的苷元核心结构的C-3β-OH基团处的碳水化合物取代基,和/或其中该第二糖链是在该皂苷的苷元核心结构的C-28-OH基团处的碳水化合物取

代基。

44.根据权利要求36-43中任一项所述的缀合物,其中该缀合物包含两个或更多个该皂苷的分子、优选地2-32个该皂苷的分子、甚至更优选地4-16个该皂苷的分子、最优选地4-8个该皂苷的分子。

45.根据权利要求36-44中任一项所述的缀合物,其中该皂苷是以下中的任一种或多种:

a)选自列表A中的任一种或多种的皂苷:

-皂树皂苷混合物或从皂树分离的皂苷,例如Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl;

-皂苷集皂苷混合物或从皂苷集分离的皂苷;

-肥皂草皂苷混合物或从肥皂草分离的皂苷;和

-皂树树皮皂苷混合物或从皂树树皮分离的皂苷,例如Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl;或

b)包含丝石竹皂苷元苷元核心结构的皂苷,选自列表B:

SA1641、丝石竹皂苷A、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO1658和商陆皂苷元;或

c)包含皂皮酸苷元核心结构的皂苷,选自列表C:

AG1856、AG1、AG2、Agrostemmoside E、GE1741、丝石竹皂苷元1(Gyp1)、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、SA1657、Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、SO1904、QS-7、QS-7api、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio和QS-21B-xylo;或

d)包含12,13-脱氢齐墩果烷型苷元核心结构、在该苷元的C-23位置处没有醛基团的皂苷,选自列表D:

七叶素Ia、七叶皂苷、α-常春藤皂苷、AMA-1、AMR、AS6.2、AS64R、阿萨姆皂苷F、川续断皂苷B、商陆皂苷A、灰毡毛忍冬皂苷A、NP-005236、NP-012672、报春花酸1、柴胡皂苷A、柴胡皂苷D、茶籽皂苷I和茶籽皂苷J,

优选地,该皂苷是选自列表A、B或C的皂苷、更优选地选自列表B或C的皂苷、甚至更优选地选自列表C的皂苷中的任一种或多种。

46.根据权利要求36-45中任一项所述的缀合物,其中该皂苷是AG1856、GE1741、从皂树分离的皂苷、Quil-A、QS-17、QS-21、QS-7、SA1641、从肥皂草分离的皂苷、Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862和SO1904中的任一种或多种;

优选地其中该皂苷是QS-21、SO1832、SO1861、SA1641和GE1741中的任一种或多种;更优选地其中该皂苷是QS-21、SO1832或SO1861;

最优选地是SO1861。

47.根据权利要求36-46中任一项所述的缀合物,其中该皂苷是从肥皂草分离的皂苷,优选地其中该皂苷是Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862和SO1904中的任一种或多种;

更优选地其中该皂苷是SO1832、SO1832、SO1861和SO1862中的任一种或多种;

甚至更优选地其中该皂苷是SO1832或SO1861;

最优选地是SO1861。

48.根据权利要求36-47中任一项所述的缀合物,其中该核酸是定义为不长于150nt的核酸的寡核苷酸,优选地其中该寡核苷酸具有5-150nt、优选地8-100nt、最优选地10-50nt的大小;

优选地其中该寡核苷酸是反义寡核苷酸,更优选地是突变特异性反义寡核苷酸,最优选地是被设计来诱导外显子跳跃的寡核苷酸。

49.根据权利要求48所述的缀合物,其中该寡核苷酸包含以下中的任一种或由其组成:磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO)、2'-O-甲基(2′-OMe)硫代磷酸酯RNA、2′-O-甲氧基乙基(2′-O-MOE)RNA{2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)}、锁核酸或桥接核酸(LNA或BNA)、2'-O,4'-氨基乙烯桥接核酸(BNANC)、肽核酸(PNA)、2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸(FANA)、3'-氟己糖醇核酸(FHNA)、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、沉默RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、antagomir(miRNA拮抗剂)、适体RNA或适体DNA、单链RNA或单链DNA、双链RNA(dsRNA)或双链DNA;

优选地其中该寡核苷酸包含磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO)或2'-O-甲基(2′-OMe)硫代磷酸酯RNA或由其组成。

50.根据权利要求48或49所述的缀合物,其中该寡核苷酸被设计来诱导人抗肌萎缩蛋白基因转录物的外显子跳跃,优选地其中该外显子跳跃涉及51号外显子跳跃或53号外显子跳跃或45号外显子跳跃;

更优选地其中该寡核苷酸是被设计来诱导该51号外显子跳跃或该53号外显子跳跃或该45号外显子跳跃的2'O-甲基-硫代磷酸酯反义寡核苷酸或磷酰二胺吗啉代寡聚物反义寡核苷酸,

甚至更优选地其中该寡核苷酸选自依特立生、曲萨珀森、戈洛迪森、维托拉生和卡西默森。

51.根据权利要求36-50中任一项所述的缀合物,其中该缀合物包含两个或更多个该核酸的分子,

优选地其中该两个或更多个该核酸的分子是2-16个分子,更优选地2-8个分子,可能地2、3、4、5或6个分子;

最优选地其中该两个或更多个该核酸的分子是两个或更多个寡核苷酸;可能地两个或更多个不同的寡核苷酸,其中该两个或更多个不同的寡核苷酸中的至少一个是反义寡核苷酸。

52.根据权利要求36-51中任一项所述的缀合物,其中该缀合物包含1-16个该皂苷的分子和1-5个该核酸的分子/1个该配体的分子。

53.根据权利要求52所述的缀合物,其中该缀合物包含2-8个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

优选地3-6个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

更优选地4-5个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

最优选地其中该缀合物包含平均4-4.5个该皂苷的分子/1个该配体的分子。

54.根据权利要求52或53所述的缀合物,其中该缀合物包含2-5个该核酸的分子/1个该配体的分子;

优选地3-4个该核酸的分子/1个该配体的分子;

最优选地其中该缀合物包含平均4个该核酸的分子/1个该配体的分子。

55.根据权利要求36-54中任一项所述的缀合物,其中该配体所结合的肌肉细胞上的该内吞受体选自:转铁蛋白受体(CD71)、胰岛素样生长因子1(IGF-I)受体(IGF1R)、胰岛素样生长因子2(IGF-II)受体(IGF2R)、四次跨膜蛋白CD63;肌肉特异性激酶(MuSK)、葡萄糖转运蛋白GLUT4、阳离子非依赖性甘露糖6磷酸受体(CI-MPR)。

56.根据权利要求36-55中任一项所述的缀合物,其中该配体选自以下中的任一种或多种:

胰岛素样生长因子1(IGF-I)或其片段;

胰岛素样生长因子2(IGF-II)或其片段;

甘露糖6磷酸

转铁蛋白(Tf),

zymozan A,和

与该内吞受体特异性结合的抗体或其结合片段,其中该内吞受体优选地选自:转铁蛋白受体(CD71)、胰岛素样生长因子1(IGF-I)受体(IGF1R)、胰岛素样生长因子2(IGF-II)受体(IGF2R)、四次跨膜蛋白CD63、肌肉特异性激酶(MuSK)、葡萄糖转运蛋白GLUT4、阳离子非依赖性甘露糖6磷酸受体(CI-MPR)和LDL受体;

优选地其中该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的抗体或其结合片段,

更优选地其中该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的单克隆抗体或Fab'片段或至少一种单结构域抗体,甚至更优选地其中该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的单克隆抗体。

57.根据权利要求36-56中任一项所述的缀合物,其中该缀合物内的该皂苷的共价连接是经由该皂苷所共价结合的第一接头进行的;

优选地其中该第一接头包括共价键,该共价键选自以下中的任一种或多种:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键、肟键、二硫键、硫醚键、酰胺键、肽键和酯键,优选地是腙键或缩氨基脲键;

更优选地其中该皂苷是至少在非缀合状态下在该皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含醛基团的皂苷,并且其中所述醛基团已经参与与该第一接头形成该共价键。

58.根据权利要求57所述的缀合物,其中该第一接头是在酸性、还原性、酶促和/或光诱导条件下进行切割的可切割接头;

优选地其中该第一接头包括可切割键,该可切割键选自:

• 在酸性条件下进行切割的键,诸如缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,

• 易于蛋白水解,优选地通过组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,例如酰胺键或肽键;

• 还原/氧化可切割键,诸如二硫键,或硫醇交换反应敏感键,诸如硫醚键,

优选地是在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选地在pH 4.0-6.5且更优选地在pH≤5.5下进行体内切割的酸敏感性键;

更优选地是选自以下中的任一种或多种的酸敏感性键:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,甚至更优选地选自缩氨基脲键和腙键;最优选地是腙键。

59.根据权利要求57或58所述的缀合物,其中该第一接头进一步包含寡聚物或聚合物结构,即树状突诸如聚酰胺基胺(PAMAM)树枝状聚合物、或聚乙二醇诸如PEG3-PEG30中的任一种;

优选地,该聚合物或寡聚物结构是PEG4-PEG12中的任一种,或G2树状突、G3树状突、G4树状突和G5树状突中的任一种,更优选地是G2树状突或G3树状突或PEG3-PEG30。

60.根据权利要求36-59中任一项所述的缀合物,其中该缀合物内的该核酸的共价连接是经由该核酸所共价结合的第二接头进行的;

优选地其中该第二接头包含接头3-(2-吡啶二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯(SPDP)或由其组成;

可能地其中该第二接头将该核酸共价连接到赖氨酸残基,优选地是包含在该配体中的赖氨酸残基,或者共价连接到聚糖残基,优选地是经部分修剪的聚糖。

61.根据权利要求60所述的缀合物,其中该第二接头是在酸性、还原性、酶促和/或光诱导条件下进行切割的可切割接头;

优选地其中该第二接头包括可切割键,该可切割键选自:

• 在酸性条件下进行切割的键,诸如缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,

• 易于蛋白水解,优选地通过组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,例如酰胺键或肽键;

• 还原/氧化可切割键,诸如二硫键,或硫醇交换反应敏感键,诸如硫醚键,

优选地是在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选地在pH 4.0-6.5且更优选地在pH≤5.5下进行体内切割的酸敏感性键;

更优选地是选自以下中的任一种或多种的酸敏感性键:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,甚至更优选地选自缩氨基脲键和腙键;最优选地是腙键。

62.根据权利要求57-61中任一项所述的缀合物,其中该第一接头和/或其中该第二接头直接地或间接地与该配体共价连接。

63.根据权利要求36-62中任一项所述的缀合物,其中该缀合物内的该配体的共价连接是经由该配体所共价结合的第三接头进行的;

优选地其中该配体包含含有至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个赖氨酸残基的氨基酸残基链,并且其中该第三接头包括与所述至少一个半胱氨酸残基或所述至少一个赖氨酸残基形成的共价键;

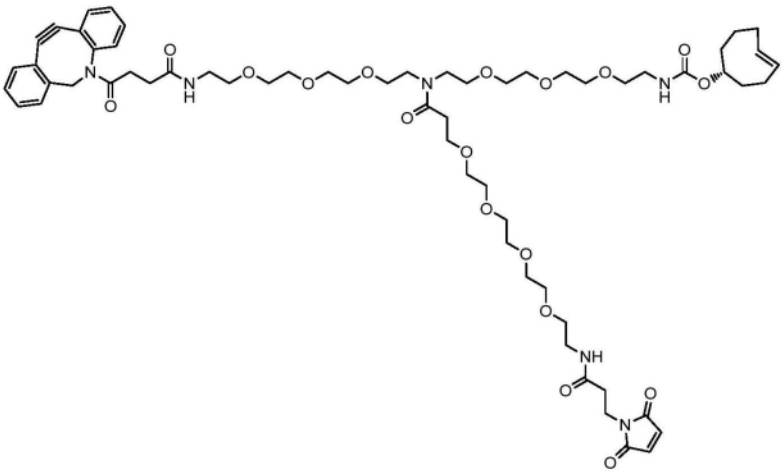
更优选地其中该配体包含含有多半胱氨酸重复序列的氨基酸残基链,可能是由序列HRWCCPGCCKTF(SEQ ID NO.4)表示的四半胱氨酸重复序列,并且其中该第三接头包括与该多半胱氨酸重复序列的半胱氨酸残基中的任一个或多个的共价键;可能地其中超过一个第三接头经由该超过一个第三接头中的每一个与该配体所包含的该多半胱氨酸重复序列的单独半胱氨酸残基结合而与该配体的一个分子连接。

64.根据权利要求36-63中任一项所述的缀合物,其中该缀合物包含用于实现至少一个

该皂苷的分子、至少一个该核酸的分子和至少一个该配体的分子之间的共价连接的中心接头,其中所述共价连接直接或分别经由该第一接头、该第二接头和/或该第三接头实现;

优选地其中该中心接头是三官能接头。

65.根据权利要求64所述的缀合物,其中该中心接头是在其非缀合形式中由结构A表示的三官能接头:

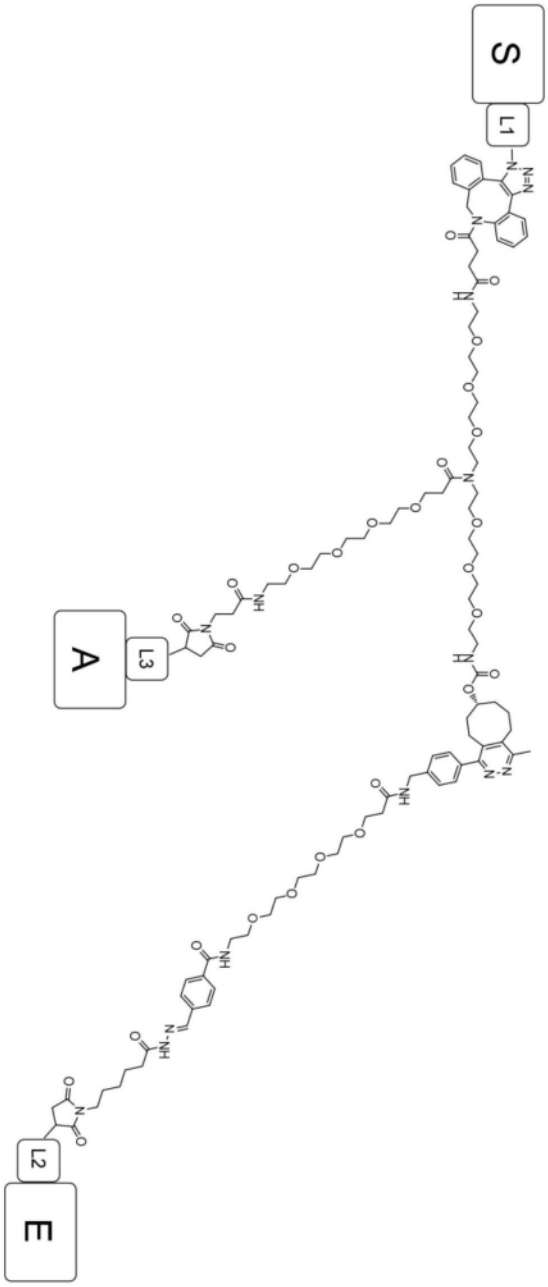


(结构A)。

66.根据权利要求64或65所述的缀合物,其中对于该缀合物所包含的每一个该配体的分子,该缀合物包含1-4个该三官能接头,更优选地1-2个三官能接头,最优选地平均1.2-1.8.个三官能接头。

67.根据权利要求64-66中任一项所述的缀合物,其中该三官能接头在其缀合形式中由结构B表示:

结构 B



其中：

S是该至少一个该皂苷的分子，

L1是所述至少一个该皂苷的分子所共价结合的该第一接头，

E是至少一个该核酸的分子，

L2是所述至少一个该核酸的分子所共价结合的该第二接头，A是该至少一个配体的分子，优选地是抗体或其结合片段，并且L3是所述至少一个该配体的分子所共价结合的该第三接头，其中L1、L2和L3是相同的或不同的。

用于治疗肌肉消耗障碍的靶向皂苷-核酸缀合物

技术领域

[0001] 本发明涉及治疗和预防肌肉消耗障碍,特别是涉及可以通过将治疗性核酸递送到肌肉细胞中来靶向的遗传因子的肌肉消耗障碍的领域。根据后一方面,本文披露了明显增强治疗性核酸向肌肉细胞的正确内部隔室诸如胞质溶胶和/或细胞核的有效递送和释放的药物组合物及其有利组分,在该隔室中该治疗性核酸可以到达并作用于其遗传靶标。如本文所披露,这种明显增强的递送和释放是通过在本文披露的包含治疗性核酸和肌肉细胞靶向配体的药物组合物中提供内体逃逸增强皂苷来实现的。正如首次在本文中证明的那样,令人意外的是,这些皂苷类型不仅似乎在完全分化的肌肉细胞中保留了其内体逃逸增强特性,而且还通过内皮胞吞转运途径,接着在肌膜处进行内吞捕获而成功到达并进入体内肌肉细胞。

背景技术

[0002] 肌肉消耗障碍是全世界人类疾病的主要病因。它们可能是由潜在的遗传条件引起的,诸如在各种类型的肌营养不良或先天性肌病中[Cardamone,2008],或者可能与老化有关,如与年龄相关的肌肉质量损失(被称为肌少症),或由创伤性肌肉损伤等引起。

[0003] 遗传性和非遗传性肌肉消耗障碍两者主要表现为横纹肌组织的衰弱或丧失,横纹肌组织是主要负责全身氧气供应、代谢平衡和运动的组织。横纹肌组织由两种类型的横纹肌细胞构建,即骨骼肌细胞和心肌细胞[Shadrin,2016]。骨骼肌占人体总质量的30％至40％,并且由于存在被称为卫星细胞(SC)的驻留肌肉干细胞,骨骼肌可以响应于运动或日常活动中发生的小肌肉撕裂而再生,卫星细胞在受伤时激活、增殖并融合以修复受损的肌肉纤维或形成新的肌肉纤维[Dumont,2016]。相比之下,心肌不具有心肌样干细胞池,具有很少或没有再生能力,损伤会导致纤维疤痕形成并最终导致泵功能受损[Uygur,2016]。

[0004] 这两种细胞类型都是终末分化的并在结构和功能上都高度专业化,并且这些特征通常与将有效载荷靶向到此类细胞的内部隔室中的难度增加有关。特别地,肌肉细胞被一种独特类型的细胞膜覆盖,该细胞膜被称为肌膜,就像神经元一样,是易兴奋的。此外,这些细胞是特别有弹性的,其特征在于收缩性、延展性和弹性,这是实现其在肌肉组织中的主要功能所需的关键特征,该主要功能是产生张力,从而产生收缩肌肉细胞的力,以便产生不同身体部位的自愿或不自愿运动。

[0005] 与此一致,尽管人们普遍认识到某些治疗性有效载荷在递送到肌肉细胞中时可以产生有益的作用,但还众所周知,靶向这些细胞已被证明是出了名地具有挑战性,如例如在WO 2021142227中认可的。对于心肌细胞而言尤其如此,其中药物的任何中靶和脱靶活性都会导致严重的安全性问题[Slordalm 2006]。已知,即使是专门针对肌肉的治疗剂全身性递送到心脏中也只具有非常有限的功效,并且甚至直接肌肉内注射到心脏中也显示出受限的心脏暴露[Ebner,2015]。

[0006] 除以上限制之外,对于患有后天性晚期或遗传性肌肉消耗障碍的个体,几乎没有可用的治疗选择和策略。实际上,对他们中的大多数人而言,没有可用的药物,姑息性治疗

往往是减轻患病个体痛苦的唯一适用解决方案。

[0007] 特别地,到目前为止,已经描述了令人难以置信的一系列肌肉细胞相关遗传障碍(有时统称为遗传性肌病),并且尽管由于发病率相对较低,其中大多数被归类为“罕见病”,但不同形式的总和使这些障碍成为一个相对常见的健康问题,影响着全球数百万患者的生活质量,产生衰弱性并发症,经常导致死亡[González-Jamett,2017]。

[0008] 肌肉细胞相关遗传障碍的一种常见分类是基于源自肌肉细胞的突变蛋白产物的位置。也就是说,先天性肌病被认为是由肌肉细胞内收缩器的遗传缺陷导致的,并通过肌肉活检上独特的静态组织化学或超微结构变化来定义。相比之下,肌营养不良被描述为肌肉膜或其支持性蛋白的疾病,并且其特征通常在于持续的肌肉退化和再生的病理学证据[Cardamone,2008]。

[0009] 简而言之,该收缩器包括由肌动蛋白和肌球蛋白组成的肌原纤维,这些肌原纤维形成彼此滑过、从而产生改变肌肉细胞形状的张力的肌丝。收缩器的功能在很大程度上依赖于其与强化的肌肉细胞骨架以及肌膜内和肌膜周围高度专业化的结构的相互作用,与人体中的大多数细胞膜不同,肌膜被一种称为糖萼的多糖材料高度包衣,该多糖材料与肌肉细胞周围的基底膜接触。这种基底膜含有许多胶原原纤维和专门的细胞外基质蛋白,诸如层粘连蛋白。基质蛋白提供了肌肉纤维可以粘附的支架。通过肌膜中的跨膜蛋白,肌肉细胞内的肌动蛋白骨架与基底膜和细胞外部连接。此类锚定的大量肌肉细胞构成肌肉组织,并且通过同步和受控的张力产生,它们可以生成显著的力。

[0010] 肌肉细胞的这种结构和功能复杂性,包括其细胞内收缩器、强化和解释肌膜的特定功能和架构的蛋白质网络及其外部的多组分支架,是大型肌肉细胞特异性蛋白质组的产物。

[0011] 此蛋白质组的很大一部分是由纯肌肉细胞特异性转录物翻译而来的大结构蛋白,这些转录物来源于经常经历广泛选择性剪接事件的往往非常大的多外显子基因[Savarese,2020]。实际上,分布在人类基因组中一些最大基因上的各种突变,特别是包括DMD、TTN、NEB、RYR1,被认为是最具特征的肌肉细胞相关遗传障碍的潜在原因。

[0012] 也许,也可以说,研究最多的遗传性肌肉细胞相关障碍是迪谢内肌营养不良(DMD),它是由编码肌营养不良蛋白的DMD基因突变引起的,该突变阻止了抗肌萎缩蛋白(Dp427m)的肌肉同种型的产生。DMD是一种特别严重的疾病,其特征在于骨骼肌逐渐萎缩,并被纤维、骨或脂肪组织替代,最终通常由于心肌或呼吸衰竭而导致死亡。DMD是隐性和X染色体连锁(X连锁)。因此,大多数患者是男性。平均而言,他们在2-3岁左右出现最早症状,在10-12岁左右依赖轮椅,并且即使在最佳护理下,也会在20岁与40岁之间死亡。不同的范围可以通过以下事实解释,即DMD不是由DMD基因中精确定义的位点特异性或单个热点突变引起的。相反,DMD与许多其他由大型多外显子基因的不同突变引起的肌肉细胞相关遗传障碍一样,可以被视为一系列障碍,其表型的严重程度取决于转录物的阅读框受到影响的程度。DMD病例通常含有移码或无义突变,导致过早截短,从而产生非功能性和不稳定的抗肌萎缩蛋白。与此相反,一种被称为贝克肌营养不良(BMD)的较轻的抗肌萎缩蛋白病是由DMD基因的框内突变(即,维持阅读框并导致产生仅内部截短的抗肌萎缩蛋白突变体蛋白的突变)引起的。

[0013] 基于大多数框外突变会导致严重DMD,而绝大多数框内突变会导致较轻BMD的观察

结果,已经测试并开发了不同的基于反义寡核苷酸(ASO)的DMD治疗剂,目的是恢复抗肌萎缩蛋白转录物的阅读框,从而产生至少部分功能性的蛋白质。这些ASO较短(20-30个核苷酸),经常是经化学修饰的核酸或核酸类似物,在pre-mRNA剪接过程中与靶外显子特异性结合,导致缺陷外显子的所谓跳跃,即阻止其包含在mRNA中。外显子跳跃ASO方法是突变特异性的,因为根据突变位置需要跳过不同的外显子。然而,某些外显子的跳跃适用于较大的患者组,包括51号外显子(14%)、45号外显子(8%)、53号外隐子(8%)和44号外显子(6%)的跳跃[Bladen,2013]。到目前为止,四种不同的吗啉代型ASO被设计为跳过51号外显子(依特立生(eteplirsen))、53号外显子(戈洛迪森(golodirsen)和维托拉生(viltolarsen))或45号外显子(卡西默森(casimersen)),它们已经在小患者队列中显示出诱导抗肌萎缩蛋白恢复的一些证据,尽管表现出某些全身性副作用,但还是获得了FDA的批准。在安慰剂对照试验中评价了另一种具有2'-O-甲基硫代磷酸酯修饰的51号外显子跳跃ASO(曲萨珀森(drisapersen)),但最终例如由于发生注射部位反应、蛋白尿以及一部分患者的血小板减少症而未获得FDA的批准[Goemans,2018]。用于诱导外显子跳跃的替代性组合物可以在WO 2018129384中找到。

[0014] DMD的其他基于核酸的方法包括尝试以高载体剂量递送微小抗肌萎缩蛋白cDNA,其临床试验正在进行中,一些已经报告了微小抗肌萎缩蛋白成功表达,但也在一部分患者中观察到严重的不良作用,包括可能由于先天免疫应答引起的短暂性肾衰竭[Mendell,2020]。可替代地,目前也在努力递送编码可以改善肌肉质量,诸如卵泡抑素[Mendell,2020]或靶向疾病机制,诸如SERCA2a[Wasala,2020]的蛋白质的基因的cDNA。进一步的考虑涉及单独使用微小RNA、miRNA模拟产物、antimiR、antagomiR和该系列,或与其他基于核酸的疗法共施用,以刺激唤醒的肌肉细胞的生长和/或再生[Aránega,2021]。例如,WO 2018080658披露了miR-128-1作为用于治疗DMD的基于LNA的ASO治疗剂。提出了又另一种替代性方法,该方法基于CRISPR/Cas9技术和被设计用于例如通过外显子缺失或废除剪接位点来恢复阅读框的向导RNA,其概念验证已在DMD细胞系和动物模型中进行了尝试[Chemello,2020;Nelson 2017]。然而,所有的基因组编辑工作仍处于临床前阶段,必须克服多重挑战才能在人类中系统性应用,包括基因组编辑组分的最佳递送。

[0015] 在DMD或BMD患者中发现了数千种不同的DMD突变[Blanden,2015]。类似的情况也存在于许多其他遗传性肌肉细胞相关障碍中,在其中鉴定到基因突变靶标。这些包括但不限于其他肌营养不良,包括面肩肱型肌营养不良(受影响基因:DUX4/双同源盒4)、1型强直性肌营养不良(DMPK)、埃默里-德赖弗斯肌营养不良(受影响基因:EMD/伊默菌素和LMNA/核纤层蛋白A/C)、肢带型肌营养不良1(受影响基因:MYOT/肌收缩蛋白、LMNA/核纤层蛋白A/C等)、先天性肌营养不良(受影响基因:LAMA2/分区蛋白或层粘连蛋白-α2链/编码胶原6A的任何COL6A基因);或扩张型家族性心肌病(受影响基因:LMNA/核纤层蛋白A/C),以及先天性肌病,尤其包括杆状体肌病(受影响基因:NEB/伴肌动蛋白、ACTA/骨骼肌α-肌动蛋白、TPM3/α-原肌球蛋白-3、TPM2/β-原肌球蛋白-2、TNNT1/肌钙蛋白T1、LMOD3/平滑肌蛋白-3、MYPN/肌钯蛋白等)或先天性纤维型比例失调肌病(受影响基因:TPM3/α-原肌球蛋白-3、CTA/骨骼肌α-肌动蛋白、RYR1/兰尼碱受体通道)、以及任何涉及例如TTN基因(肌连蛋白)中的突变的综合征。因此,由于许多不同肌肉消耗障碍背后的甚至已限定的遗传靶标的突变可变性,使用治疗性核酸,诸如ASO或antagomir[Cerro-Herreros,2020],似乎是开发治疗各种肌肉消

耗障碍的新疗法的一种合乎逻辑和实用的方法。

[0016] 然而,如以上所解释,尽管具有相当大的优点,但即使当与各种递送系统结合时,也难以有效地将这种基于核酸的治疗剂引入肌肉细胞内的适当隔室中,例如引入用于反义疗法的肌肉细胞胞质溶胶中,或从中引入用于直接基因编辑的细胞核中。肌肉细胞转染和体内的这种低效率自然导致基于核酸的治疗剂在其靶位点的浓度太低,无法实现有效和持续的结局。这进而导致需要增加施用剂量,从而导致脱靶作用。最常见的此类副作用包括补体级联的激活、凝血级联的抑制和Toll样受体介导的免疫系统刺激。这些作用自然是非常不希望的,并有可能诱导威胁患者健康或甚至生命的副作用,包括器官衰竭。此类和类似不良事件的发生导致许多基于核酸的治疗剂(如DMD外显子跳跃ASO曲萨珀森)在临床试验中失败。

[0017] 因此,强烈希望提供用于治疗肌肉细胞消耗障碍的新型基于核酸的药物配制品,该药物配制品特别地将显示出有效的核酸在体内递送到肌肉细胞中的速率。因此,需要配制品,其中治疗性核酸的作用(1)对涉及或导致肌肉细胞消耗障碍的遗传靶标高度特异,(2)足够安全,(3)有效,(4)特异性地针对肌肉细胞,对其他细胞具有很少或没有脱靶活性,(5)具有足够及时的作用模式(例如,所施用的药物应当在一定的时间范围内到达人患者中的靶向位点,并且应当在靶向位点保持一定的时间范围),和/或(6)在患者体内具有足够长的持续治疗活性,等等。

[0018] 对进入横纹肌细胞中的不同药物递送方法的全面综述可以在以下中找到:DC Ebner等人,2015,Curr Pharm Des[当代药物设计],21(10):1327-36.doi:10.2174/1381612820666140929095755,该文献提及肌肉靶向肽、微泡、纳米颗粒、基于病毒、转运蛋白和抗体的靶向技术,并且强调了细胞摄取大体上仍然是肌肉细胞中的一个主要问题的事实。关于基于转运蛋白和抗体的靶向技术,通过肌肉细胞表面上的内吞(或内化)受体的配体介导靶向来递送核酸例如在WO 2018129384或WO 2020028857中示出。

[0019] 然而,根据本发明人的知识和经验,没有一种已知的肌肉特异性递送方法实现以上概述的有益特征(1)-(6)的全部或至少相当一部分。因此,尽管进行了长期深入的研究并在该领域的几个方面分别取得了进展,但仍然迫切需要提高将基于核酸的治疗剂递送到患有肌肉消耗障碍的患者的肌肉细胞中的效率。

发明内容

[0020] 为了满足这一需求,本发明人已经开发并特此描述了新型药物组合物,这些药物组合物包含肌肉细胞靶向治疗性核酸与12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷的组合。这些特定皂苷类型在例如WO 2020126620中被表征和报告为在几种癌症细胞类型中对各种抗体-药物缀合物(ADC)具有内体逃逸增强活性。

[0021] 在肿瘤细胞的上下文中,这些皂苷进一步披露于WO 2020126626、WO 2020126620、WO 2020126627、WO 2020126064和WO 2020126609中,这些文献描述了用针对肿瘤细胞标志物的单克隆抗体的缀合物、皂苷和用于使HSP27沉默的BNA来使肿瘤模型中的HSP27基因沉默。然后,WO 2020126627、WO 2020126064、WO 2020126604、WO 2020126600和WO 2020126609描述了用针对肿瘤细胞标志物的单克隆抗体的第一缀合物和皂苷以及针对肿瘤细胞标志物的单克隆抗体的第二缀合物和用于使HSP27沉默的BNA的组合来使肿瘤模型

中的HSP27基因沉默。最后,WO 2020126609描述了用皂苷和用于使HSP27沉默的BNA的组合或用皂苷与针对肿瘤细胞标志物的单克隆抗体的缀合物和用于使HSP27沉默的BNA的组合来使肿瘤模型中的HSP27基因沉默。

[0022] 然而,终末分化的肌肉细胞,特别是心肌细胞,在代谢以及细胞膜架构和内吞活性方面与遗传上不稳定且不断分裂的肿瘤细胞有很大不同。此外,由于细胞信号传导途径的扰动和混乱的增殖活性,已知肿瘤是由可渗透和渗漏的血管形成提供的[Hanahan和Weinberg,2011],这与提供肌肉组织的健康且富含紧密连接的血管非常不同。

[0023] 尽管存在这些差异,但在将肌肉内吞受体配体缀合的ASO与12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷组合时,本发明人在体外和体内分别观察到对人和鼠DMD转录物的外显子跳跃效率的令人意外且稳健的影响。不希望受任何理论的约束,本发明人假设这些发现指示,所述特定组的内体逃逸增强皂苷不仅能够刺激治疗性核酸从肌肉细胞的内体有效地退出到适当的肌肉细胞内部隔室中(在对于治疗剂非常希望但尚未被完全理解的现象中,被称为内体逃逸),而且令人意外地,当与配体和ASO一起配制时,它们在体内成功地进行了从血液到肌肉细胞外部环境的内皮细胞胞吞转运,而没有经由内体逃逸导致含有有效载荷的货物进入内皮细胞的内部隔室中的任何明显损失。

[0024] 据本发明人所知,将皂苷与核酸组合用于治疗肌肉细胞消耗障碍的唯一实例是由Wang等人尝试[Wang,2018,Molecular Therapy:Nucleic Acids[分子疗法:核酸];Wang,2018-Drug Design,Development and Therapy[药物设计、开发和疗法]]。然而,在这些报告中,作者集中研究了非共价结合和非靶向核酸复合物与主要甾体皂苷(诸如已知的体外转染剂毛地黄皂苷)的膜穿透转染活性。然而,Wang等人研究的皂苷中没有一种是12,13-脱氢齐墩果烷型的内体逃逸增强皂苷,也没有一种复合物是经由内吞受体配体特异性靶向肌肉细胞的。因此,由Wang等人用于在其DMD模型系统中诱导外显子跳跃活性的皂苷和核酸浓度均大大超过了如在本文下文中呈现的新型组合物中对应组分的浓度。

[0025] 总之,为了解决现有技术的缺点,本文呈现了用于在治疗或预防肌肉消耗障碍,特别是肌肉细胞相关遗传性障碍中使用的新型药物组合物,以及具有共价连接的12,13-脱氢齐墩果烷型内体逃逸增强皂苷的新型肌肉特异性内吞受体靶向治疗性核酸缀合物,该缀合物用于将治疗性核酸递送到肌肉细胞中,本发明人观察到该缀合物具有在体内将治疗性核酸有效地递送到横纹肌细胞中的独特能力,这可能是通过促进特定在靶肌肉细胞中的内体逃逸来进行的,并且令人意外地还成功地进行从血液到所述细胞的内皮胞吞转运。本文呈现的发现为患有肌肉消耗障碍的患者开发了新型低治疗有效载荷且因此更安全的治疗方法。这些优点和其他优点将在下文中进一步呈现。

[0026] 本文披露了包含治疗性核酸、肌肉细胞表面内吞受体靶向配体和内吞逃逸增强皂苷的共价连接缀合物的改善的生物活性化合物和药物组合物。本文披露的缀合物具有表现出高度希望的特性的特定优点,即增强和有效地将治疗性核酸(诸如反义寡核苷酸)递送到分化的肌肉细胞,特别是横纹肌细胞,尤其包括心肌细胞中。

[0027] 本文呈现的创新概念将关于特别实施例进行描述,这些实施例应被视为描述性的并且不限于权利要求中所描述的内容。除非另外说明,否则如本文所述的这些实施例可以组合和协同操作。

[0028] 本披露的实施例的若干目标中的一个是为在向患有肌肉消耗障碍并且需要基于

核酸的治疗剂的人类患者施用此类治疗剂时遇到的非特异性问题提供解决方案。

[0029] 这些实施例的若干目标中的另一个是为特别地在诱导副作用的过量剂量下向有需要的人类患者施用时当前基于核酸的药物的安全性特征不足的问题提供解决方案。

[0030] 本发明的实施例的若干目标中的又一个是为在向有需要的人类患者施用时当前基于核酸的疗法没有达到希望的有效性的问题提供解决方案,没有达到希望的有效性是由于在向有需要的人类患者施用时不足以到达和/或进入患病的肌肉细胞中,同时对非患病细胞具有很少或没有脱靶活性。

[0031] 以上目标中的至少一个通过提供用于在治疗或预防肌肉消耗障碍中使用的药物组合物来实现,该肌肉消耗障碍特别地是肌肉细胞相关遗传性障碍,诸如先天性肌病或肌营养不良,尤其包括迪谢内肌营养不良,该组合物包含

[0032] 共价连接的缀合物,该缀合物包含

[0033] 皂苷,

[0034] 核酸,和

[0035] 肌肉细胞上的内吞受体的配体,

[0036] 其中该皂苷是内体逃逸增强12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷。

[0037] 在另一方面,以上目标中的至少一个通过提供用于将治疗性核酸递送到肌肉细胞中的共价连接缀合物来实现,该缀合物包含

[0038] 皂苷,

[0039] 核酸,和

[0040] 肌肉细胞上的内吞受体的配体,

[0041] 其中该皂苷是内体逃逸增强12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷,并且其中该缀合物包含1-16个该皂苷的分子和1-5个该核酸的分子/1个该配体的分子。

[0042] 在另一方面,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物和/或根据本披露的缀合物的另外的实施例,这些实施例进一步解决了上述目标中的一个或多个。

[0043] 在特别有利的方面,提供了本披露的不同实施例,其包括包含选自以下的有利缀合物:有利的内体逃逸增强皂苷;例如被配置来诱导肌肉细胞消耗障碍相关基因转录物的缺陷外显子的跳跃的不同治疗性核酸,诸如反义寡核苷酸;用于靶向肌肉细胞上的内吞受体的有利配体或其组合;以及用于将以上任一者连接在一起的有利共价接头,这些共价接头还可能被配置用于在人类内体中存在的条件下可切割。

[0044] 本披露的这些和其他方面在下文中详细呈现。

[0045] 定义

[0046] 术语“皂苷”具有其常规的既定含义并且在本文中是指一组两亲性糖苷,这些两亲性糖苷包含一个或多个与亲脂性苷元核心(其被称为皂苷元)组合的亲水性糖链。皂苷可以是天然存在的或合成的(即非天然存在的)。术语“皂苷”包括天然存在的皂苷、天然存在的皂苷的功能性衍生物以及通过化学和/或生物技术合成途径从头合成的皂苷。根据本发明的缀合物的皂苷具有三萜骨架,它是五环C30萜骨架,也被称为皂苷元或苷元。在本发明的缀合物中,皂苷不被认为是效应分子,也不被认为是根据本发明的缀合物中的效应子部分。因此,在包含皂苷和效应子部分的缀合物中,效应子部分是与缀合的皂苷不同的分子。在本发明的缀合物的上下文中,术语皂苷是指当存在于哺乳动物细胞(诸如人细胞)的内体和/

或溶酶体中时,对由本发明的缀合物所包含的并且与皂苷一起存在于所述内体/溶酶体中的效应子部分施加内体/溶酶体逃逸增强活性的那些皂苷。

[0047] 如本文所用,术语“皂苷衍生物”(也称为“经修饰的皂苷”)应理解为是指通过一种或多种化学修饰(诸如官能团的氧化、官能团的还原和/或与另一分子形成共价键(也称为“缀合”或“共价缀合”)衍生的对应于天然存在的皂苷的化合物(优选为当一起存在于哺乳动物细胞的内体或溶酶体中时,对治疗性分子诸如核酸的内体/溶酶体逃逸增强活性)。优选的修饰包括苷元核心的醛基团的衍生化;糖链的羧基基团的衍生化或糖链的乙酰氧基基团的衍生化。典型地,皂苷衍生物不具有天然对应物,即皂苷衍生物不是由例如植物或树木天然产生的。术语“皂苷衍生物”包括通过天然存在的皂苷的衍生化获得的衍生物,以及通过化学和/或生物技术合成途径从头合成的衍生物,该合成产生与天然存在的皂苷对应的已通过一种或多种化学修饰衍生化的化合物。本发明上下文中的皂苷衍生物应理解为皂苷功能性衍生物。皂苷衍生物上下文中的“功能性”被理解为皂苷或皂苷衍生物增强与皂苷或皂苷衍生物一起接触细胞的效应分子的内体逃逸的能力或活性。

[0048] 术语“苷元核心结构”应理解为是指皂苷的苷元核心,其不具有与其结合的碳水化合物触角或糖链(聚糖)。例如,皂皮酸是SO1861、QS-7和QS21的苷元核心结构。典型地,皂苷的聚糖是单糖或寡糖,诸如直链或支链聚糖。

[0049] 术语“糖链”具有其常规的科学含义并且是指聚糖、碳水化合物触角、单个糖部分(单糖)或包含多个糖部分(寡糖、多糖)的链中的任何。糖链可以仅由糖部分组成,或者还可以包含另外的部分,诸如以下中的任一种:4E-甲氧基肉桂酸、4Z-甲氧基肉桂酸、和5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸,例如像存在于QS-21中。

[0050] 糖链名称上下文中的术语“Api/Xyl-”或“Api-或Xyl-”具有其常规的科学含义并且此处是指包含芹菜糖(Api)部分或包含木糖(Xyl)部分的糖链。

[0051] 如本文所用,术语“核酸”和“多核苷酸”彼此同义,并且应被解释为涵盖任何由单元构成的聚合物分子,其中单元包括核碱基(或简称“碱基”,例如为经典核碱基如腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U),或任何已知的非经典、经修饰或合成的核碱基如5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、7-甲基鸟嘌呤;5,6-二氢尿嘧啶等)或其功能等效物,其使得所述聚合物分子能够在适当的杂交条件下与天然存在的核酸诸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)进行基于氢键的核碱基配对(诸如Watson-Crick碱基配对),这些天然存在的核酸应理解为由核苷酸单元构成的聚合物分子。

[0052] 因此,从化学角度来看,本定义下的术语核酸可以被解释为涵盖化学上为DNA或RNA的聚合物分子,以及作为核酸类似物的聚合物分子(也称为异种核酸(XNA)或人工核酸),其是聚合物分子,其中一个或多个(或所有)单元是经修饰的核苷酸或是核苷酸的功能等效物。核酸类似物在本领域中是众所周知的,并且由于各种特性,诸如改善的特异性和/或亲和力、对其靶标的更高结合强度和/或增加的体内稳定性,它们被广泛用于研究和医学。核酸类似物的典型实例包括但不限于锁核酸(LNA)(也称为桥接核酸(BNA))、磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO,也称为吗啉代)、肽核酸(PNA)、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、己糖醇核酸(HNA)、2’-脱氧-2’-氟阿拉伯糖核酸(FANA或FNA)、2’-脱氧-2’-氟核糖核酸(2’-FRNA或FRNA);阿卓糖醇核酸(ANA)、环己烯核酸(CeNA)等。

[0053] 根据标准,核酸的长度在本文中表示为构建核酸单链的单元数。因为每个单元正好对应于一个能够参与一个碱基配对事件的核碱基,所以无论所讨论的核酸是单链(ss)核酸还是双链(ds)核酸,长度都经常以所谓的“碱基对”或“bp”表示。在天然存在的核酸中,1bp对应于1个核苷酸,缩写为1nt。例如,由1000个核苷酸构成的单链核酸(或由两条互补链构成的双链核酸,每条互补链由1000个核苷酸构成)被描述为具有1000个碱基对或1000bp的长度,该长度也可以表示为1000nt或缩写为1kb的1千碱基。2千碱基或2kb等于2000个碱基对的长度,其等于单链RNA或DNA的2000个核苷酸。然而,为了避免混淆,鉴于如本文所定义的核酸可以包含不仅在化学上为核苷酸而且是其功能等效物的单元或由其组成,核酸的长度在本文中优选地以“bp”或“kb”表示,而不是以本领域中同样常见的指称“nt”表示。

[0054] 在如本文披露的有利实施例中,核酸不长于1kb,优选地不长于500bp,最优选地不长于250bp。

[0055] 在特别有利的实施例中,核酸是寡核苷酸(或简称为寡聚物),其被定义为不长于150bp的核酸,即根据以上提供的定义,是由不多于150个单元构成的任何聚合物分子,其中每个单元包括核碱基或其功能等效物,这使得所述寡核苷酸能够在适当的杂交条件下与DNA或RNA进行基于氢键的核碱基配对。在所述定义的范围内,将立即认识到,本文披露的寡核苷酸可以包含不仅是核苷酸而且是其合成等效物的单元或由其组成。换言之,从化学角度来看,如本文所用,术语寡核苷酸将被解释为可能包含以下或由以下组成:RNA、DNA或核酸类似物,诸如但不限于LNA(BNA)、PMO(吗啉代)、PNA、GNA、TNA、HNA、FANA、FRNA、ANA、CeNA等。

[0056] 如本文所用,术语“肌肉细胞上的内吞受体”应理解为是指表面分子、可能的受体或转运蛋白,其可从肌肉细胞肌膜的外侧或表面到达其特异性配体,并且能够经由内吞途径,例如在外部刺激(诸如配体与受体结合)下进行内化。在一些实施例中,肌肉细胞上的内吞受体通过网格蛋白介导的内吞作用而内化,但也可以通过网格蛋白非依赖性途径内化,例如像吞噬作用、大型胞饮作用、小窝和筏介导的摄取或组成性网格蛋白非依赖性内吞作用。在一些实施例中,肌肉细胞上的内吞受体包括细胞内结构域、跨膜结构域和/或(例如,和)细胞外结构域,其可以任选地进一步包括配体结合结构域。在一些实施例中,肌肉细胞上的内吞受体在配体结合之后被肌肉细胞内化。在一些实施例中,配体可以是肌肉靶向剂或肌肉靶向抗体。在一些实施例中,内化的细胞表面受体是转铁蛋白受体(CD71),或者例如属于四次跨膜蛋白家族的CD63(也称为LAMP-3)。

[0057] 术语“抗体-寡核苷酸缀合物”或“AOC”具有其常规的科学含义并且此处是指抗体(诸如IgG、Fab、scFv、免疫球蛋白、免疫球蛋白片段、一个或多个V_H结构域、单结构域抗体、V_{HH}、骆驼V_H等)和当与受试者诸如人患者的细胞接触时可以发挥治疗作用的任何多核苷酸(寡核苷酸)分子(诸如选自天然或合成的核酸串的寡核苷酸,包括DNA、经修饰的DNA、RNA、mRNA、经修饰的RNA、合成的核酸,呈现为单链分子或双链分子,诸如BNA、反义寡核苷酸(ASO,AON)、短或小干扰RNA(siRNA;沉默RNA)、反义DNA、反义RNA等)的任何缀合物。

[0058] 如本文所用,术语“抗体或其结合片段”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域或至少一个抗原决定簇,例如与抗原特异性结合的互补位的多肽。在一些实施例中,抗体是全长抗体。在一些实施例中,抗体是嵌合抗体。在一些实施例中,抗体是人源化抗体。然而,在一些实施例中,抗体是Fab片段、F(ab')片段、F(ab')2片段、Fv片段或scFv片段。在一些实

施例中,抗体是衍生自骆驼抗体的纳米抗体或衍生自鲨鱼抗体的纳米抗体。在一些实施例中,抗体是双特异抗体。在一些实施例中,抗体包含具有人类种系序列的框架。在另一个实施例中,抗体包含重链恒定结构域,其选自下组,该组由以下组成:IgG、IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG2C、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgM和IgE恒定结构域。在一些实施例中,抗体包含重(H)链可变区(在本文中缩写为VH)和/或(例如,和)轻(L)链可变区域(在本文中缩写为VL)。在一些实施例中,抗体包含恒定结构域,例如Fc区。免疫球蛋白恒定结构域是指重链或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列及其功能性变异是已知的。关于重链,在一些实施例中,本文所述的抗体的重链可以是α(a)、δ(D)、ε(e)、γ (g)或μ(m)重链。在一些实施例中,本文所述的抗体的重链可以包括人α(a)、δ(D)、ε(e)、γ (g)或μ(m)重链。在一个特别实施例中,本文所述的抗体包含人γ1CHI、CH2和/或(例如,和)CH3结构域。在一些实施例中,VH结构域的氨基酸序列包括人γ (g)重链恒定区的氨基酸序列,诸如本领域已知的任何氨基酸序列。本领域已经描述了人恒定区序列的非限制性实例,例如参见美国专利号5,693,780和Kabat E A等人,(1991)同上。在一些实施例中,VH结构域包含与本文提供的任何可变链恒定区具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,抗体是经修饰的,例如经由糖基化、磷酸化、类泛素化和/或(例如,和)甲基化进行修饰。在一些实施例中,抗体是与一种或多种糖或碳水化合物分子缀合的糖基化抗体。在一些实施例中,一种或多种糖或碳水化合物分子经由N-糖基化、O-糖基化、C-糖基化、糖基磷脂酰肌醇化(GPI锚附接)和/或(例如,和)磷酸糖基化与抗体缀合。在一些实施例中,一种或多种糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、低聚糖或聚糖。在一些实施例中,一种或多种糖或碳水化合物分子是支链寡糖或支链聚糖。在一些实施例中,一种或多种糖或碳水化合物分子包括甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡糖胺单元、N-乙酰半乳糖胺单元、半乳糖单元、岩藻糖单元或磷脂单元。在一些实施例中,抗体是包含多肽的构建体,该多肽包含与接头多肽或免疫球蛋白恒定结构域连接的一个或多个本披露的抗原结合片段。接头多肽包含通过肽键接合的两个或更多个氨基酸残基,并且用于连接一个或多个子抗原结合部分。已经报告了接头多肽的实例(参见例如Holliger,P等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院研究期刊]90:6444-6448;Poljak,R.J.等人(1994)Structure[结构]2:1121-1123)。更进一步,抗体可以是更大的免疫粘附分子的一部分,其通过抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合而形成。此类免疫粘附分子的实例包括使用链霉亲和素核心区来制备四聚体scFv分子(Kipriyanov,S.M.等人(1995)Human Antibodies and Hybridomas[人类抗体与杂交瘤]6:93-101)和使用半胱氨酸残基、标记肽和C-末端多组氨酸标签来制备二价和生物素化scFv分子(Kipriyanov,S.M.等人(1994)Mol.Immunol.[分子免疫学]31:1047-1058)。

[0059] 术语“单结构域抗体”或“sdAb”或简称“纳米抗体”具有其常规的科学含义并且此处是指由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段,除非被称为超过一个单体可变抗体结构域,例如像在二价sdAb的上下文中,其包含两个串联的此类单体变抗体结构域。二价纳米抗体是包含两种单结构域抗体的分子,其靶向存在于细胞的胞外侧的分子上的表位,诸如存在于细胞上的细胞表面分子的胞外结构域上的表位。优选地,细胞表面分子是细胞表面受体。二价纳米抗体也被称为二价单结构域抗体。优选地,两种不同的单结构域抗体直接共价结合或通过与两种不同的单结构域抗体共价结合的中间体分子共价结合。优选地,二价

纳米抗体的中间体分子具有小于10,000道尔顿、更优选地小于5000道尔顿、甚至更优选地小于2000道尔顿、最优选地小于1500道尔顿的分子量。

[0060] 如本文所用,术语“共价连接的”是指两个或更多个分子经由至少一个共价键连接在一起的特征,即直接连接,或经由共价键链连接,即经由包含至少一个或多个原子的接头连接。

[0061] 如本文所用,术语“缀合物”应解释为已经且现在共价结合的两个或更多个不同分子的组合。例如,形成如本文披露的缀合物的不同分子可以包括一种或多种皂苷或皂苷分子、一种或多种核酸或寡核苷酸分子、与肌肉细胞表面上存在的内吞受体结合的一种或多种配体,优选地其中该配体是抗体或其结合片段,诸如IgG、单克隆抗体(mAb)、VHH结构域或另一种纳米抗体类型、包含两种单结构域抗体的二价纳米抗体分子等。在一些方面,本文披露的缀合物可以通过经由一个或多个中间体分子诸如接头(例如像经由连接到中心或另一个接头)共价连接不同的分子来制备。在缀合物中,并非所有的两个或更多个(诸如三个)不同的分子都需要彼此直接共价结合。缀合物中的不同分子也可以通过两者共价结合到相同的中间体分子诸如接头来共价结合,或者各自通过共价结合到中间体分子诸如另一个接头或中心接头来共价结合,其中这两个中间体分子诸如两个(不同的)接头彼此共价结合。根据这个定义,甚至更多中间体分子(诸如接头)可以存在于缀合物中的两个不同分子之间,只要它们之间存在共价结合的原子链即可。

[0062] 如本文所用,术语“施用(administering)”或“施用(administration)”意指以生理学上和/或(例如,和)药理学上有用的方式(例如,治疗受试者的病症)向受试者提供复合物

[0063] 如本文所用,术语“大约”或“约”在应用于一个或多个所感兴趣的值时,是指与所说明的参考值类似的值。在某些实施例中,术语“大约”或“约”是指在所说明的参考值的任一方向上的(大于或小于)15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值范围,除非另外说明或以另外的方式从上下文显而易见(除了这样的数值将超过可能值的100%)。

[0064] 说明书和权利要求书中的术语第一、第二、第三等用于区分例如相似要素、组合物、组合物中的成分、或分开的方法步骤,而不一定用于描述顺序或时间次序。除非另外说明,否则术语在适当的情况下是可互换的,并且本发明的实施例可以以本文所描述或展示的顺序外的其他顺序操作。

[0065] 除非另外说明,否则如本文所述的实施例可以组合和协同操作。此外,尽管各种实施例被称为“优选的”或“例如”或“举例”或“特别地”等,但是这些实施例应被解释为可以实施本文披露的概念的示例性方式,而不是限制的。

[0066] 权利要求中使用的术语“包含”不应被解释为限于例如要素或方法步骤或其后列出的组合物的成分;它不排除其他要素或方法步骤或某一组合物中的成分。它应被解释为明确说明存在提及的所述特征、整数、(方法)步骤或组分的存在,但不排除一个或多个其他特征、整数、步骤或组分、或其组的存在或添加。因此,“包含步骤A和B的方法”的表达的范围不应限于仅由步骤A和B组成的方法,而是相对于本发明,仅列举出该方法的步骤是A和B,并且权利要求应进一步解释为包括那些方法步骤的等同物。因此,“包含组分A和B的组合物”的表达的范围不应限于仅由组分A和B组成的组合物,而是相对于本发明,仅列举出该组合

物的组分是A和B,并且权利要求应进一步解释为包括那些组分的等同物。

[0067] 另外,通过不定冠词“一个/一种”(“a”或“an”)指代要素或组分并不排除存在多于一个/一种要素或组分的可能性,除非上下文明确要求存在一个/一种并且仅一个/一种要素或组分。因此,不定冠词“一个/一种”通常意指“至少一个/一种”。

[0068] 术语“皂苷集(Saponinum album)”具有其正常含义并且此处是指Merck KGaA(达姆施塔特,德国)生产的皂苷混合物,其中含有来自满天星(Gypsophila paniculata)和Gypsophila arostii的皂苷,其含有SA1657,主要是SA1641。

[0069] 术语“皂树皂苷”具有其正常含义并且此处是指皂树的皂苷级分,因此是所有其他QS皂苷的来源,主要含有QS-18和QS-21。

[0070] “QS-21”或“QS21”具有其常规的科学含义并且此处是指QS-21A-apio(约63%)、QS-21A-xylo(约32%)、QS-21B-apio(约3.3%)和QS-21B-xylo(约1.7%)的混合物。

[0071] 同样,“QS-21A”具有其常规的科学含义并且此处是指QS-21A-apio(约65%)和QS-21A-xylo(约35%)的混合物。

[0072] 同样,“QS-21B”具有其常规的科学含义并且此处是指QS-21B-apio(约65%)和QS-21B-xylo(约35%)的混合物。

[0073] 术语“Quil-A”是指一种市售的皂树半纯化提取物并且含有数量不定的50多种不同的皂苷,其中许多在QS-7、QS-17、QS-18和QS-21的C-3β-OH基团处掺入了三萜-三糖亚结构Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-。Quil-A中发现的皂苷列于van Setten(1995),表2[Dirk C.van Setten,Gerrit van de Werken,Gijsbert Zomer和Gideon F.A.Kersten,Glycosyl Compositions and Structural Characteristics of the Potential Immuno-adjuvant Active Saponins in the Quillaja saponaria Molina Extract Quil A[皂树提取物Quil A中潜在免疫佐剂活性皂苷的糖基组成和结构特征],RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY[质谱分析快讯],第9卷,660-666(1995)]。Quil-A和皂树皂苷是来自皂树的皂苷的级分,两者都含有大量不同的皂苷,且含量大体上是重叠的。这两个级分的具体组成不同,因为这两个级分是通过不同的纯化程序获得的。

[0074] 术语“QS1861”和术语“QS1862”指的是QS-7和QS-7api。QS1861的分子量为1861道尔顿,QS1862的分子量为1862道尔顿。QS1862在以下中有描述:Fleck等人(2019)表1中,第28行[Juliane Deise Fleck,Andresa Heemann Betti,Francini Pereira da Silva,Eduardo Artur Troian,Cristina Olivaro,Fernando Ferreira and Simone Gasparin Verza,Saponins from Quillaja saponaria和Quillaja brasiliensis:Particular Chemical Characteristics and Biological Activities[特定的化学特征和生物活性],Molecules[分子]2019,24,171;doi:10.3390/molecules24010171]。所描述的结构是QS-7的api-变体QS1862。分子量为1862道尔顿,因为该质量是包括葡糖醛酸处的质子在内的形式质量。在中性pH下,分子去质子化。在负离子模式下进行质谱测量时,测量质量为1861道尔顿。

[0075] 术语“SO1861”和“SO1862”是指肥皂草(Saponaria officinalis)的相同皂苷,但是分别为去质子化形式或api形式。分子量为1862道尔顿,因为该质量是包括葡糖醛酸处的质子在内的形式质量。在中性pH下,分子去质子化。在负离子模式下使用质谱法测量质量时,测量质量为1861道尔顿。

附图说明

[0076] 图1:在来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管中使用(A)DMD-ASO,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-EMCH的共施用和(B)DMD-PMO,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-EMCH的共施用的外显子跳跃

[0077] 图2:(A)hCD71-PEG4-SPDP前体的合成,以产生(B)hCD71-DMD-ASO和(C)hCD71-DMD-PMO;(D)mCD71-SMCC的合成;(E)mCD71-M23D的合成

[0078] 图3:在来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管中使用(A)hCD71-DMD-ASO(DAR2.1),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-EMCH的共施用和(B)hCD71-DMD-PMO(DAR3.2),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-EMCH的共施用的外显子跳跃;还参见图9

[0079] 图4:在来自受DMD影响的供体(DM8036)的分化人类肌管中使用(A)hCD71-DMD-ASO,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-EMCH的共施用和(B)hCD71-DMD-PMO,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-EMCH的共施用的外显子跳跃;NB,在(A,右分图)中,0.013nM的第一个样品(星号)显示为空泳道

[0080] 图5:在分化鼠C2C12肌管中使用mCD71-M23D PMO,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用的外显子跳跃

[0081] 图6:(A-C)mCD71-SO1861的合成,产生经由链间半胱氨酸与SO1861缀合并通过如本领域已知的各种力保持在一起的完整mAb,使用(A)SO1861-EMCH或SO1861-SC-马来酰亚胺,(B)mCD71-SH中间体的生成,(C)mCD71-SO1861的合成;NB:为了使示意图清晰,图中放大了重链之间的空间;(D)IGF-1配体与SO1861-脲-NHS缀合以产生IGF-1-SO1861

[0082] 图7:在分化鼠C2C12肌管中使用(A)mCD71-SO1861(用SO1861-EMCH合成)+M23D(左分图)和mCD71-SO1861(用SO1861-SC-Mal合成)+M23D(右分图),和(B)IGF-1-SO1861+M23D(左分图)和对照(右分图)的外显子跳跃

[0083] 图8:(A-E)hCD71-DMD-ASO-SO1861和hCD71-DMD-PMO-SO1861的合成,产生经由链间半胱氨酸与SO1861缀合并通过如本领域已知的各种力保持在一起的完整mAb,分别使用(A)hCD71的链间二硫键还原,(B)hCD71-SO1861的合成,(C)hCD71-SO1861-PEG4-SPDP的合成,(D)hCD71-DMD-ASO-SO1861的合成,和(E)hCD71-DMD-PMO-SO1861的合成;(F)mCD71-M23D-SMCC的合成,和(G)mCD71-M23D-SO1861的合成,产生经由链间半胱氨酸与SO1861缀合并通过如本领域已知的各种力保持在一起的完整mAb;NB:为了使示意图清晰,图中放大了重链之间的空间

[0084] 图9:在来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管中使用(A)hCD71-DMD-ASO(DAR2.2),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用和(B)hCD71-DMD-PMO(DAR3.1),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用,和(C)hCD71-DMD-ASO-SO1861 1-组分的外显子跳跃评估

[0085] 图10:在来自受DMD影响的供体(DM8036)的分化人类肌管中使用(A)hCD71-DMD-ASO,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用和(B)hCD71-DMD-PMO,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用,和(C)hCD71-DMD-ASO-SO1861 1-组分的外显子跳跃评估

[0086] 图11:在鼠C2C12分化肌管中使用mCD71-M23D-SO1861的外显子跳跃评估

[0087] 图12:处理后第4天、第14天和第28天在小鼠的(A)腓肠肌、(B)膈膜和(C)心脏中来

自单剂量mCD71-M23D(第2组)或单剂量mCD71-M23D-SO1861(3个剂量组,第3组、第4组、第5组)和媒介物对照(第1组)的外显子跳跃分析;NB,在(A)中,第4天第4组中的样品3(星号)的PCR扩增显示空泳道,最初失败,但cDNA合成/PCR的技术重复显示全长产物,并且在此动物中没有可测量的跳跃

[0088] 图13:处理后第4天、第14天和第28天在小鼠的(A)腓肠肌、(B)膈膜和(C)心脏中来自单剂量mCD71-M23D(第2组)或单剂量mCD71-M23D-SO1861(3个剂量组,第3组、第4组、第5组)的平均外显子跳跃的密度定量(N=3/组/时间点;第4天第4组的腓肠肌除外,其中N=2);(A-C)使用ChemiDoc™XRS+系统和Image Lab™软件(伯乐公司(BioRad))对条带强度进行定量

[0089] 图14:在第4天、第14天、第28天来自使用mCD71-M23D(第2组)或单剂量mCD71-M23D-SO1861(3个剂量组:第3组、第4组、第5组)和媒介物对照组的单剂量研究的(A)血清肌酐和(B)血清ALT分析(N=3/剂量/时间点,mCD71-M23D除外,第28天,其中N=2)。

[0090] 图15:(A)本发明的可能缀合物的示意图。示出了与结合到抗体的轻链或铰链区(两种选择均示意性地示出)的四个皂苷分子'S'和与共价结合到抗体重链的恒定结构域的四个效应核酸分子'NA'共价缀合的IgG抗体。(B)本发明的缀合物的可能实施例的示意图。示出了与四个三价接头共价缀合的IgG抗体,其中每个接头与皂苷共价结合,并与核酸分子共价结合。三价接头与抗体共价结合,例如通过铰链区或通过轻链(两种选择均示出)。(C)本发明的缀合物的可能实施例的示意图。示出了与两个三价接头共价缀合的单结构域抗体,其中每个接头与皂苷共价结合,并与核酸分子共价结合。(D)本发明的缀合物的可能实施例的示意图。示出了与三价接头共价缀合的单结构域抗体,其中三价接头与皂苷共价结合,并与核酸分子共价结合。(E)本发明的缀合物的可能实施例的示意图。示出了与结合到抗体的铰链区的四个皂苷分子'S'和与经由聚糖重塑和点击化学共价结合到抗体重链的恒定结构域的四个效应核酸分子'NA'共价缀合的IgG抗体。

[0091] 图16:经由合成方案进行的DBCO-(M23D)$_2$的合成,该合成方案涉及(A)中间体3的合成(经由中间体1和2);(B)中间体4的合成;(C)中间体4与M23D-SH(还原形式)的偶联以实现中间体5的合成;以及(D)中间体3和5的偶联以产生所需的最终产物DBCO-(M23D)$_2$,即携带两个M23D PMO寡核苷酸有效载荷的支链支架。

[0092] 图17:mAb-M23D,诸如mCD71-M23D和mCD63-M23D的缀合程序的示意图。(A)经修剪和叠氮基修饰的mAb聚糖的制备。(B)经修剪和叠氮基修饰的mAb聚糖与DBCO-(M23D)$_2$之间经由应变促进的叠氮化物-炔烃点击反应进行的缀合,从而产生mAb-(M23D)$_4$。NB:为了使示意图清晰,以DAR 4示出mAb-M23D。(C)图例解释了符号表示的聚糖残基。(D)图例解释了符号表示的分子。

[0093] 图18:在分化鼠C2C12肌管中(A)mCD71-M23D,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用和(B)mCD63-M23D,没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用的23号外显子跳跃分析。

[0094] 图19:mAb-SO1861,诸如mCD63-SC-SO1861的缀合程序的示意图。mAb与还原链间二硫键上的SO1861之间的缀合,从而产生mAb-(SO1861)$_4$。NB:为了使示意图清晰,以DAR 4示出mAb-SO1861。

[0095] 图20:在分化鼠C2C12肌管中(A)mCD63-SC-SO1861+M23D和(B)mCD63-SC-SO1861+

mCD71-M23D的23号外显子跳跃分析。(C)在分化鼠C2C12肌管中单独使用M23D、mCD63-SC-SO1861或mCD71-M23D作为对照的外显子跳跃。

[0096] 图21:mAb-M23D-SO1861,诸如mCD63-M23D-SC-SO1861的缀合程序的示意图。(A)mAb与还原链间二硫键上的SO1861之间的缀合,从而产生mAb-$(SO1861)_4$,接着(B)经修剪和叠氮基修饰的mAb-$(SO1861)_4$聚糖的制备,和(C)经修剪的mAb-$(SO1861)_4$聚糖与DBCO-$(M23D)_2$之间经由应变促进的叠氮化物-炔烃点击反应进行的缀合,从而产生mAb-$(SO1861)_4$-$(M23D)_4$。NB:为了使示意图清晰,以DAR 4/4示出mAb-M23D-SO1861。关于符号表示的聚糖残基或符号表示的分子的解释,分别参见图17C和图17D。

[0097] 图22:在分化鼠C2C12肌管中使用(A)mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)或(B)mCD63-M23D-SC-SO1861的23号外显子跳跃评估。

[0098] 图23:(A-C)hAb-DMD-寡聚物,诸如hCD71-5'-SS-DMD-ASO、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1-5)和hCD63-5'-SS-DMD-ASO的缀合程序的示意图,涉及(A)在激活的赖氨酸(Lys)残基处用PEG4-SPDP进行的hAb功能化,(B)受保护的DMD-寡聚物的激活,(C)激活的DMD-寡聚物-SH与hAb-PEG4-SPDP之间的二硫键形成,和(D)图例。NB:为了使示意图清晰,以DAR 4示出hAb-DMD-寡聚物。

[0099] 图24:在来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管中(A)hCD71-5'-SS-DMD-ASO(DAR2.1),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用和(B)hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)(DAR2.2),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用的51号外显子跳跃分析。

[0100] 图25:在来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管中(A)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)(DAR2.1),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用,(B)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)(DAR3.0),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用和(C)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)(DAR2.6),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用的51号外显子跳跃分析。

[0101] 图26:在来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管中(A)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)(DAR2.3),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用和(B)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)(DAR2.1),没有(左分图)或具有(右分图)SO1861-SC-Mal的共施用的53号外显子跳跃分析。

[0102] 图27:hAb-SO1861,诸如hCD71-SC-SO1861和hCD63-SC-SO1861的缀合程序的示意图。hAb与链间二硫键上的SO1861之间的缀合,从而产生hAb-$(SO1861)_4$。NB:为了使示意图清晰,以DAR 4示出hAb-SO1861。

[0103] 图28:在来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管中(A)hCD71-5'-SS-DMD-ASO(DAR2.1),具有hCD63-SC-SO1861(DAR4.8)的共施用和(B)hCD63-5'-SS-DMD-ASO(DAR2.3),具有hCD71-SC-SO1861(DAR4.0)的共施用的51号外显子跳跃分析。

[0104] 图29:在(A)来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管和(B)来自受DMD影响的供体(KM1328)的分化人类肌管中hCD63-SC-SO1861(DAR4.8),具有hCD71-5'-SS-DMD-ASO(DAR2.1)的共施用的51号外显子跳跃分析。

[0105] 图30:(A-C)hAb-DMD-寡聚物-SO1861,诸如hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861、hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1-5)-SC-SO1861和hCD63-3'-

SS-DMD-PMO(1-4)-SC-SO1861的缀合程序的示意图。(A)hAb与链间二硫键上的SO1861之间的缀合,从而产生hAb-(SO1861)$_4$,接着在激活的赖氨酸(Lys)残基处用PEG4-SPDP进行的hAb功能化,和(B)激活的DMD-寡聚物-SH与hAb-(SO1861)$_4$-(SPDP)$_4$之间的二硫键形成,以产生hAb-(SO1861)$_4$-(DMD-寡聚物)$_4$。(C)图例。NB:为了使示意图清晰,以DAR 4/4示出hAb-DMD-寡聚物-SO1861。

[0106] 图31:在来自受DMD影响的供体(KM1328)的分化人类肌管中(A)hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861(DAR2.3/4.0)(左分图)和hCD63-5'SS-DMD-ASO-SC-SO1861(DAR2.2/4.8)(右分图),(B)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861(DAR2.4/4.0)(左分图)和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861(DAR2.7/4.8)(右分图),(C)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861(DAR3.1/4.0)(左分图)和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861(DAR2.7/4.8)(右分图),和(D)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861(DAR2.5/4.0)(左分图)和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861(DAR2.8/4.8)(右分图)的51号外显子跳跃分析。

[0107] 图32:在来自受DMD影响的供体(KM1328)的分化人类肌管中(A)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861(DAR2.0/4.0)(左分图)和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861(DAR2.4/4.8)(右分图),和(B)hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)-SC-SO1861(DAR2.0/4.0)的53号外显子跳跃分析。

具体实施方式

[0108] 本文披露了包含治疗性核酸、肌肉细胞表面内吞受体靶向配体和内吞逃逸增强皂苷的共价连接缀合物的改善的生物活性药物组合物。本文披露的缀合物具有表现出高度希望的特性的特定优点,即增强和有效地将治疗性核酸(诸如反义寡核苷酸)递送到分化的肌肉细胞,特别是横纹肌细胞,尤其包括心肌细胞中。

[0109] 本文呈现的创新概念将关于本披露的特别实施例或方面进行描述,这些实施例或方面应被视为描述性的并且不限于权利要求中所描述的内容。除非另外说明,否则如本文所述的特别方面可以组合和协同操作。虽然本发明已参考这些实施例进行了描述,但可以预期的是,在阅读说明书和研究附图后,其替换、修改、置换和等同物对于本领域普通技术人员来说将变得显而易见。本发明不以任何方式受限于所展示的实施例。可以在不偏离所附权利要求书限定的范围的情况下作出改变。

[0110] 本披露的实施例的若干目标中的一个是为在向患有肌肉消耗障碍并且需要基于核酸的治疗剂的人类患者施用此类治疗剂时遇到的非特异性问题提供解决方案。这些实施例的若干目标中的另一个是为特别地在诱导副作用的过量剂量下向有需要的人类患者施用时当前基于核酸的药物的安全性特征不足的问题提供解决方案。本发明的实施例的若干目标中的又一个是为在向有需要的人类患者施用时当前基于核酸的疗法没有达到希望的有效性的问题提供解决方案,没有达到希望的有效性是由于在向有需要的人类患者施用时不足以到达和/或进入患病的肌肉细胞中,同时对非患病细胞具有很少或没有脱靶活性。

[0111] 不希望受任何理论的约束,本文披露的新型药物组合物是基于以下观察而构思的,即对于通过内吞受体介导的内吞作用靶向到肌肉细胞中的基于核酸的治疗剂,特定组的12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷似乎表现出有效的内体逃逸增强特性。

[0112] 内吞途径很复杂,尚未完全了解。如今,据推测,内吞途径涉及由囊泡交通连接的

稳定的隔室。隔室是一种复杂的多功能膜细胞器,专门用于细胞的一组特定的基本功能。囊泡被认为是短暂的细胞器,组成更简单,并被定义为膜封闭的容器,通过从预先存在的隔室出芽来从头形成。与隔室不同,囊泡可以经历成熟,这是生理上不可逆的一系列生化变化。早期内体和晚期内体代表内吞途径中的稳定隔室,而初级内吞囊泡、吞噬体、多囊泡体(也称为内体载体囊泡)、分泌颗粒,甚至溶酶体代表囊泡。

[0113] 内吞囊泡出现在质膜上,最突出的是来自网格蛋白包被的凹坑,首先与早期内体融合,早期内体是大约pH 6.5的主要分选隔室。大部分内化的货物和膜通过回收囊泡(回收途径)回收回质膜。应降解的组分通过多囊泡体被运输到酸性晚期内体(pH低于6)。溶酶体是囊泡,可以储存成熟的溶酶体酶,并在需要时将它们递送到晚期内体隔室。由此产生的细胞器称为混合细胞器或内溶酶体。溶酶体在称为溶酶体重构的过程中从混合细胞器中出芽。晚期内体、溶酶体和混合细胞器是极动态的细胞器,通常很难区分它们。内吞分子的降解发生在内溶酶体内。

[0114] 核内体逃逸是物质从任何类型的隔室或囊泡的内腔中主动或被动地从内吞途径,优选从网格蛋白介导的内吞或再循环途径释放到胞质溶胶中。因此,内体逃逸包括但不限于从内体、内溶酶体或溶酶体释放,包括它们的中间和混合细胞器。进入胞质溶胶后,所述物质可能会移动到其他细胞单位,诸如细胞核。

[0115] 如本文呈现的数据所证明的,本披露的治疗性组合物和缀合物中包含的12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷不仅似乎刺激治疗性核酸从肌肉细胞的内体有效地退出到适当的肌肉细胞内部隔室中,而且令人意外的是,它也不干扰体内内皮细胞从血液到肌肉细胞外部环境的胞吞转运,从而允许在静脉内递送后将本披露的含有皂苷的治疗性组合物和缀合物有效地体内递送到肌肉细胞中。

[0116] 根据这些有希望的观察和发现,在第一一般方面,本发明提供了一种用于在治疗或预防肌肉消耗障碍中使用的药物组合物,该组合物包含共价连接的缀合物,该缀合物包含

[0117] 皂苷,

[0118] 核酸,和

[0119] 肌肉细胞上的内吞受体的配体,

[0120] 其中该皂苷是12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷。

[0121] 如本文所用,术语“共价连接的缀合物”在包含皂苷、核酸和肌肉细胞上的内吞受体的配体的共价连接缀合物的上下文中被解释为是指其中皂苷、核酸和配体共价结合在一起的缀合物。

[0122] 如本文所用,将从上下文中理解,形成本文披露的用于治疗性目的的组合物的一部分的核酸被选择为具有用于治疗或预防所选的肌肉消耗障碍的治疗活性。也就是说,如本文披露的缀合物中所包含的核酸将是针对一种障碍的治疗性核酸,而对于另一种病症,它可能不会引起任何益处。旨在对所选障碍进行特异性治疗的技术人员将知道如何进行有希望的治疗性核酸的选择,并且将能够基于他们对引起此类障碍的突变的了解或基于给定患者的基因突变筛查结果来决定哪种治疗性核酸应包含在如本文披露的新型缀合物中,以进行改善的治疗。

[0123] 在优选的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物,其中

该肌肉消耗障碍是肌肉细胞相关遗传性障碍,优选地是先天性肌病或肌营养不良;优选地其中该先天性肌病选自杆状体肌病或先天性纤维型比例失调肌病,和/或其中该肌营养不良选自抗肌萎缩蛋白病、面肩肱型肌营养不良、强直性肌营养不良、埃默里-德赖弗斯肌营养不良、肢带型肌营养不良1B、先天性肌营养不良;或扩张型家族性心肌病;最优选地其中该肌肉消耗障碍是肌肉细胞相关遗传性障碍,该肌肉细胞相关遗传性障碍是抗肌萎缩蛋白病,优选地是迪谢内肌营养不良。

[0124] 在一个特别有利的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物,其中该肌肉消耗障碍的治疗或预防涉及反义疗法,优选地涉及外显子跳跃。

[0125] 有趣的是,已经观察到有利的核酸递送特征可能与每一(1)个存在于缀合物中的内吞受体靶向配体分子缀合在一起的核酸和皂苷分子的数量相关。

[0126] 根据以上观察,在一个有利的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物,其中该缀合物包含1-16个该皂苷的分子和1-5个该核酸的分子/1个该配体的分子。

[0127] 在另一个有利实施例中,本文进一步披露了一种用于将治疗性核酸递送到肌肉细胞中的共价连接缀合物,该缀合物包含

[0128] 皂苷,

[0129] 核酸,和

[0130] 肌肉细胞上的内吞受体的配体,

[0131] 其中该皂苷是12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷,并且

[0132] 其中该缀合物包含1-16个该皂苷的分子和1-5个该核酸的分子/1个该配体的分子。

[0133] 在一个相关方面,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该缀合物包含2-8个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

[0134] 优选地3-6个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

[0135] 更优选地4-5个该皂苷的分子/1个该配体的分子;

[0136] 最优选地其中该缀合物包含平均4-4.5个该皂苷的分子/1个该配体的分子。

[0137] 在另一个相关方面,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该缀合物包含2-5个该核酸的分子/1个该配体的分子;

[0138] 优选地3-4个该核酸的分子/1个该配体的分子;

[0139] 更优选地其中该缀合物包含平均4个该核酸的分子/1个该配体的分子。

[0140] 典型地,适合在本文披露的缀合物中应用的皂苷是展示出内体逃逸增强活性的皂苷。如从表1中可以看出,此类皂苷具有12,13-脱氢齐墩果烷型三萜骨架,其中三萜骨架的基本结构是五环C30萜骨架(也称为皂苷元或苷元)。

[0141]

表 1.展示出（晚期）内体/溶酶体逃逸增强活性并且具有 12,13-脱氢齐墩果烷型 [4]的苷元核心的皂苷			
皂苷名称	在 C-23 位置处具有醛基团的苷元核心	C-3β-OH 基团处的碳水化合物取代基	C-28-OH 基团处的碳水化合物取代基
NP-017777	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 4E-甲氧基肉桂酸）
NP-017778	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 4Z-甲氧基肉桂酸）
NP-017774	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018110[c]、	丝石竹皂	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-二-OAc-Fuc-

[0142]

NP-017772[d]	苷元		
NP-018109	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc-（R＝4E-甲氧基肉桂酸）
NP-017888	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-017889	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-018108	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
SA1641[a]、AEX55[b]	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1658	丝石竹皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
丝石竹皂苷A[6)]	丝石竹皂苷元	Gal-(1→4)-Glc (1→4)-[Ara-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Fuc-(1→4)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→3)]-Rha-
商陆皂苷元	丝石竹皂苷元	不存在	不存在
丝石竹皂苷元1（Gyp1）	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-017674	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-0178	皂皮	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-

[0143]

10	酸		
AG1	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-003881	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
NP-017676	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
NP-017677	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
NP-017706	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017705	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-017773	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
NP-017775	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
SA1657	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
AG2	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
GE1741	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1542	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1584	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1674	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-

[0144]

SO1700[3)]	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Saponariside B[1)]	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1730[3)]	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1772[3)]	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc--
SO1832[1)]（质子化SO1831）=Saponariside A	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1861（去质子化SO1862）	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1862（质子化SO1861），也称为*Sapofectosid*[5)]	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1904[3)]	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
QS-7（也称为QS1861）	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
QS-7 api（也称为	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-

[0145]

QS1862）			
QS-17	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-18	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21 A-apio	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21 A-xylo	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21 B-apio	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21 B-xylo	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc-（R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸）
QS-21	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	在苷元的这个位置上，针对 QS-21 A-apio、A-xylo、B-apio、B-xylo 描绘的碳水化合物链的组合（还参见描绘为（方案 Q）的结构）
Agrostemmoside E（AG1856，AG2.8）[2)]	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	[4,6-二-OAc-Glc-(1→3)]-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-

[0146]

皂苷名称	在C-23位置处没有醛基团的苷元核心	C-3β-OH 基团处的碳水化合物取代基	C-28-OH 基团处的碳水化合物取代基
NP-005236	2α-羟基齐墩果酸	GlcA-	Glc/Gal-
AMA-1	16α-羟基齐墩果酸	Glc-	Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
AMR	16α-羟基齐墩果酸	Glc-	Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-
α-常春藤皂苷	常春藤皂苷元（23-羟基齐墩果酸）	Rha-(1→2)-Ara-	不存在
NP-012672	16α,23-二羟基	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-	Ara/Xyl-

[0147]

	齐墩果酸		
β-七叶素（描述为：七叶素 Ia）	原七叶皂苷元-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯	Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-	不存在
七叶皂苷	在 C-23 位置处没有醛基团的苷元核心	存在	不存在
川续断皂苷 B	在 C-23 位置处没有醛基团的苷元核心	存在	存在
商陆皂苷 A	在 C-23 位置	存在	不存在

[0148]

	处没有醛基团的苷元核心		
茶籽皂苷I	23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯)	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	不存在
茶籽皂苷J	23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯)	Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	不存在
阿萨姆皂苷F	23-氧代-玉蕊皂苷元C-21(2	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	不存在

[0149]

	-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯		
报春花酸 1	3,16,28-三羟基齐墩果烷-12-烯	Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-	不存在
AS64R	丝石竹酸	不存在	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
灰毡毛忍冬皂苷 A	在 C-23 位置处没有醛基团的苷元核心	存在	存在
柴胡皂苷 A	在 C-23 位置处没有醛基团的苷元核	存在	不存在

	心		
柴胡皂苷 D	在 C-23 位置处没有醛基团的苷元核心	存在	不存在
		C-23-OH 基团上的碳水化合物取代基	
AS6.2	丝石竹酸	Gal-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-

a、b：不同的名称是指相同结构的不同分离物

c、d：不同的名称是指相同结构的不同分离物

[0150] 1) Jia 等人, Major Triterpenoid Saponins from *Saponaria officinalis* [来自肥皂草的主要三萜皂苷], J. Nat. Prod. [天然产物杂志] 1998, 61, 11, 1368–1373, 公开日期：1998 年 9 月 19 日, https://doi.org/10.1021/np980167u

2) 在 J. Clochard 等人, A new acetylated triterpene saponin from Agrostemma githago L. modulates gene delivery efficiently and shows a high cellular tolerance [一种来自麦仙翁的新乙酰化三萜皂苷有效调节基因递送并表现出高细胞耐受性], International Journal of Pharmaceutics [国际药剂学杂志], 第 589 卷, 2020 年 11 月 15 日, 119822 的图 4 中给出了 Agrostemmoside E（也称为 AG1856 或 AG2.8）的结构。

3) 在 Moniuszko-Szajwaj 等人, Highly Polar Triterpenoid Saponins from the Roots of Saponaria officinalis L. [来自肥皂草的根部的高极性三萜皂苷], Helv. Chim. Acta [瑞士化学学报], V99, 第 347 – 354 页, 2016 (doi.org/10.1002/hlca.201500224)中给出了 SO1700、SO1730、SO1772、SO1904 的结构。

4) 参见例如：

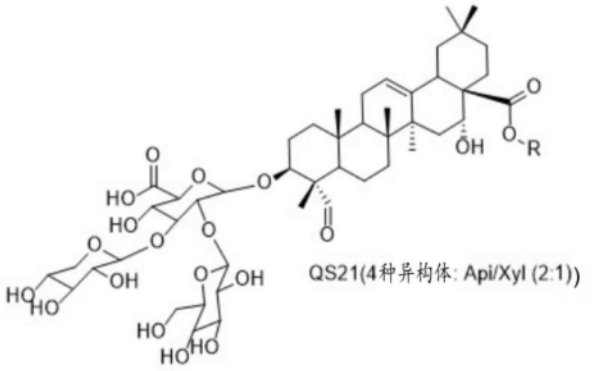
- Dr Stefan Böttger (2013)的论文：Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizität zwischen Saponinen und Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I，和
- Sama 等人, Structure-Activity Relationship of Transfection-Modulating Saponins – A Pursuit for the Optimal Gene Trafficker [转染-调控皂苷的结构-活性关系 – 寻找最佳基因载体], Planta Med. [药用植物] 第 85 卷, 第 513-518 页, 2019 (doi:10.1055/a-0863-4795)，以及
- Fuchs 等人, Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor

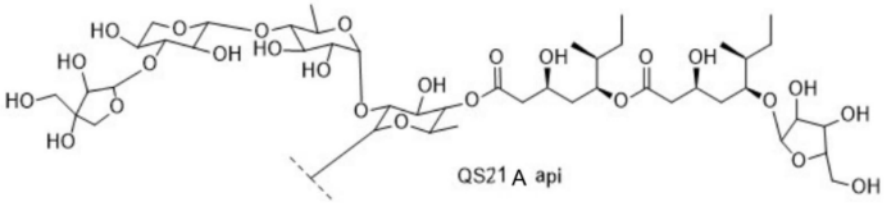
[0151]

Therapies [糖基化三萜作为靶向肿瘤疗法中的内体逃逸增强剂], Biomedicine [生物医学], 第 5 卷, 第 14 期, 2017 (doi:10.3390/biomedicines5020014)。

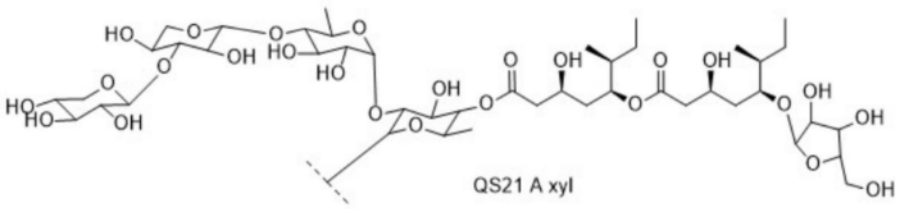
5) Sama 等人, Sapofectosid – Ensuring non-toxic and effective DNA and RNA delivery [Sapofectosid–确保无毒且有效的 DNA 和 RNA 递送], International Journal of Pharmaceutics [国际药剂学杂志], 第 534 卷, 第 1-2 期, 2017 年 12 月 20 日, 第 195-205 页(dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.016)和 Moniuszko-Szajwaj 等人, Highly Polar Triterpenoid Saponins from the Roots of Saponaria officinalis L. [来自肥皂草的根部的高极性三萜皂苷], Helv. Chim. Acta [瑞士化学学报], V99, 第 347 – 354 页, 2016 (doi.org/10.1002/hlca.201500224)。

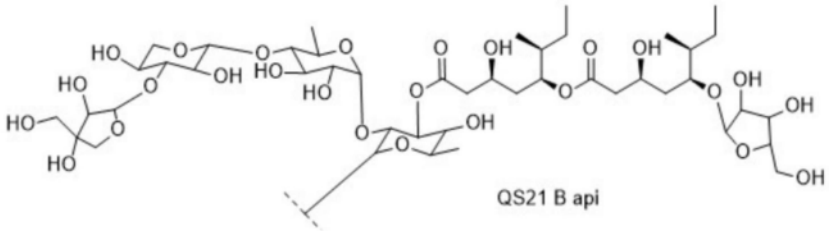
6) 参见例如:doi:10.1016/s0040-4039(01)90658-6, Tetrahedron Letters [四面体快报] 第 8 期, 第 477-482 页, 1963 和 pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gipsoside

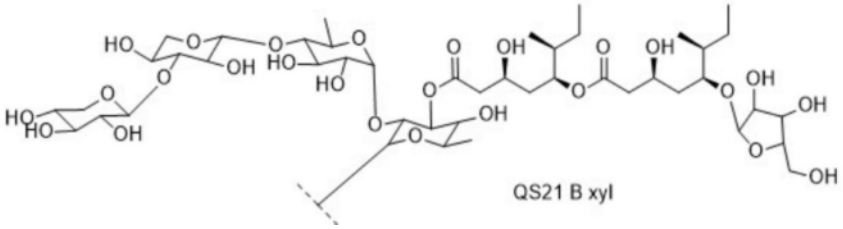




[0152]







[0153] (方案Q)

[0154] 如从表1中可以看出,许多12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含醛基团。

[0155] 不希望受任何理论的约束,观察到所述醛基团在皂苷的苷元核心结构(此处也称为‘苷元’)中的存在有利于皂苷刺激和/或强化本发明的缀合物所包含的治疗性核酸的内

体逃逸的能力。

[0156] 因此,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该皂苷包含

[0157] 在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处的醛基团,或

[0158] 在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处的共价键,该共价键共价连接缀合物中的皂苷

[0159] 优选地其中C-23位置处的共价键是在内体或溶酶体中存在的条件下进行切割的可切割键,

[0160] 更优选地,其中C-23位置处的可切割共价键适于在切割时恢复C-23位置处的醛基团;

[0161] 或者其中用于制备缀合物的皂苷至少处于非缀合状态,例如在本文披露的缀合物内共价连接之前,例如以其天然形式存在或从其来源植物材料中提取,该皂苷在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含醛基团。

[0162] 此类皂苷可以通过所述皂苷中存在的适合于本领域已知的缀合的任何官能团来与缀合物的剩余部分(所述剩余部分包括核酸和肌肉细胞上的内吞受体的配体)共价连接,或者可以通过使皂苷的苷元核心结构的C-23位置处的所述醛基团反应来共价连接,该反应导致C-23位置处的醛基团转化为C-23位置处的共价键,其中C-23位置处的所述共价键将皂苷共价连接到缀合物的剩余部分。

[0163] 不希望受任何理论的约束,已经观察到这种游离醛基团对于12,13-脱氢齐墩果烷型三萜皂苷的内体逃逸刺激特性是有益的,这可能与囊泡膜的不稳定性增强相关。

[0164] 因此,为了甚至进一步强化皂苷的内体逃逸增强特性,并因此进一步改善作为所披露的缀合物的一部分存在于内体隔室中的治疗性核酸的逃逸,可以选择C-23位置处的共价键,使得在其切割时(例如,响应于哺乳动物内体或溶酶体中存在的条件),皂苷的苷元核心结构的C-23位置处的醛基团被恢复。

[0165] 可以设计用于此醛基团恢复目的的合适的键类型的实例包括以下中的一种或多种:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、和/或肟键。如本文在以下实例中所示,如本文披露的缀合物的这种功能设计已经用皂苷成功地实现,由此天然存在于皂苷的C-23位置处的醛基团在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处转化为缩氨基脲或腙共价键并连接缀合物内的皂苷。响应于酸性条件,C-23位置处的这些键有效地从缀合物中释放皂苷,由此释放的皂苷在C-23位置处使醛基团恢复。

[0166] 与以上内容一致,当醛基团例如被附接在所述C-23位置处的包含马来酰亚胺的部分取代时,此类皂苷的内体逃逸增强特性也非常明显,该部分具有可切割的共价键,该共价键在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下被切割,其中皂苷的苷元核心结构的C-23位置处的所述醛基团在所述切割后在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下被恢复。

[0167] 在有利的实施例中,这种可切割的共价键可以选自缩氨基脲键、腙键或亚胺键。

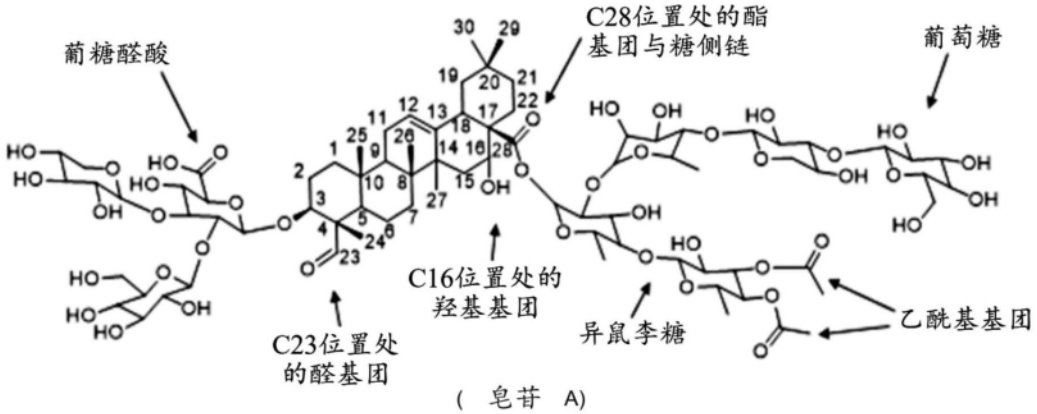
[0168] 例如,在可能的实施例中,包含马来酰亚胺的部分可以是包含4-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基)哌嗪-1-碳酰肼或由其组成的分子的一部分,该分子在形成缩氨基脲键后附接在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处(进一步称为SC-马来酰亚胺),

或者其中包含马来酰酰亚胺的部分是包含N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼或由其组成的分子的一部分,该分子在形成腙键后附接在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处(进一步称为EMCH)。

[0169] 特别适合于本发明的缀合物的在其天然或非缀合形式在C-23位置处天然包含醛基团的12,13-脱氢齐墩果烷型皂苷是苷元核心结构为皂皮酸或丝石竹皂苷元的皂苷。与此一致,已经观察到对于本发明的缀合物特别合适的皂苷是12,13-脱氢齐墩果烷型皂苷,其包含皂皮酸或丝石竹皂苷元的苷元核心结构,或者如果这些苷元核心结构的C-23醛基团用于缀合,则所述皂苷的衍生物,其中这两个苷元的C-23位置处的醛基团已经在C-23位置处转化为共价键。

[0170] 在C-23位置处具有醛基团的非缀合皂苷的实例被描述为皂苷A,并通过以下结构来说明:

[0171]



(皂苷 A)

[0172] 然而,应注意到,还观察到包含不同的12,13-脱氢齐墩果烷型苷元核心结构的皂苷表现出令人满意的内体逃逸增强特性,并且因此表1中列出的其他苷元结构对于本披露的目的也是有利的。

[0173] 因此,在另一个实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中皂苷的苷元核心结构选自以下中的任一种或多种:

[0174] 皂皮酸;

[0175] (和/或包括皂皮酸衍生物,其中皂皮酸的C-23位置处的醛基团已经在C-23位置处转化为共价键,优选地其中所述共价键是共价连接缀合物内的皂苷的键;)

[0176] 丝石竹皂苷元;

[0177] (和/或包括丝石竹皂苷元衍生物,其中丝石竹皂苷元的C-23位置处的醛基团已经在C-23位置处转化为共价键,优选地其中所述共价键是共价连接缀合物内的皂苷的键;)

[0178] 2α-羟基齐墩果酸;

[0179] 16α-羟基齐墩果酸;

[0180] 常春藤皂苷元(23-羟基齐墩果酸);

[0181] 16α,23-二羟基齐墩果酸;

[0182] 原七叶皂苷元-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯;

[0183] 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双(2-甲基丁-2-烯酸酯);

[0184] 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯;

[0185] 3,16,28-三羟基齐墩果烷-12-烯;

[0186] 丝石竹酸;以及

[0187] 其衍生物,

[0188] 优选地其中皂苷的苷元核心结构选自

[0189] 皂皮酸;

[0190] (和/或包括皂皮酸衍生物,其中皂皮酸的C-23位置处的醛基团已经在C-23位置处转化为共价键,优选地其中所述共价键是共价连接缀合物内的皂苷的键);

[0191] 丝石竹皂苷元;

[0192] (和/或丝石竹皂苷元衍生物,其中丝石竹皂苷元的C-23位置处的醛基团已经在C-23位置处转化为共价键,优选地其中所述共价键是共价连接缀合物内的皂苷的键);

[0193] 更优选地其中皂苷的苷元核心结构选自皂皮酸(和/或包括皂皮酸衍生物,其中皂皮酸的C-23位置处的醛基团已经在C-23位置处转化为共价键,优选地其中所述共价键是共价连接缀合物内的皂苷的键)。

[0194] 皂苷可以包含附接到苷元核心结构的一个或多个糖链。本披露的组合物或缀合物的优选皂苷包含附接到三萜12,13-脱氢齐墩果烷苷元核心结构的单链(即,单糖链)或两条链(即,双糖链),任选地在C-23位置处包含醛基团。

[0195] 假设糖链在内体逃逸增强特性中也发挥作用。

[0196] 与以上内容一致,在另一个实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中皂苷的糖级分包含糖链,该糖链选自如下表2中呈现的A组或B组中列出的糖链中的任一种:

[0197]

表 2. 糖链
A 组
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-Glc/Gal-(1→2)-Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-
Gal-
Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-
Glc-
Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-
Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
GlcA-
Rha-(1→2)-Ara-

[0198]

Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-
Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-
B 组
[4,6-二-OAc-Glc-(1→3)]-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
Ara/Xyl-
Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Glc/Gal-
Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-

[0199]

Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- 其中 R 是 4E-甲氧基肉桂酸)
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-二-OAc-Fuc-
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 4E-甲氧基肉桂酸
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- 其中 R 是 4Z-甲氧基肉桂酸

[0200] 在对于例如缀合选择有利的实施例中,皂苷是双糖链皂苷。

[0201] 在一个相关的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该皂苷至少是包含选自A组的第一糖链并且包含选自B组的第二糖链的双糖链皂苷;优选地其中该第一糖链包含末端葡糖醛酸残基和/或其中该第二糖链包含至少四个呈支链构型的糖残基;更优选地其中该第一糖链是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA和/或其中至少四个糖残基的支链第二糖链包含末端岩藻糖残基和/或末端鼠李糖残基。

[0202] 在本发明的缀合物的一个有利实施例中,该皂苷包含以下中的一种或两种:与苷元核心结构的C-3原子或C-28原子结合的第一糖链,优选地包含与苷元核心结构的C-3原子结合的一条糖链和与C-28原子结合的第二糖链。在这种情况下,当本发明的缀合物所包含的皂苷具有所述两种聚糖(糖链)时,第一糖链结合在皂苷的苷元核心结构的C-3位置处,并且第二糖链典型地结合在苷元核心结构的C-28位置处,尽管对于在C-23位置处缺乏醛基团的一些皂苷,第二聚糖可以结合在所述C-23位置处(参见表1)。

[0203] 因此,在另一个相关实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中皂苷包含在皂苷的苷元核心结构的C-3位置处的第一糖链和/或在皂苷的苷元核心结构的C-28位置处的第二糖链;

[0204] 优选地其中该第一糖链是在该皂苷的苷元核心结构的C-3β-OH基团处的碳水化合物取代基,和/或其中该第二糖链是在该皂苷的苷元核心结构的C-28-OH基团处的碳水化合物取代基。

[0205] 在一个特别优选的实施例中,提供了一种缀合物,其中该皂苷是12,13-脱氢齐墩

果烷型三萜皂苷,其至少在非缀合状态中在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含醛基团,并且在皂苷的苷元核心结构的C-3β-OH基团处包含选自A组的糖链作为碳水化合物取代基并且包含末端葡糖醛酸残基,该糖链优选地是Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA。

[0206] 在下一个实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该缀合物包含两个或更多个该皂苷的分子、优选地2-32个该皂苷的分子、甚至更优选地4-16个该皂苷的分子、最优选地4-8个该皂苷的分子。

[0207] 这些分子可以是相同的皂苷,或具有相同苷元核心结构和不同糖链的皂苷,或者甚至可以是不同的内体逃逸增强12,13-脱氢齐墩果烷型皂苷的混合物,例如是选自表1的不同皂苷的混合物。

[0208] 在另一个实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该皂苷是以下中的任一种或多种:

[0209] a)选自列表A中的任一种或多种的皂苷:

[0210] -皂树皂苷混合物或从皂树分离的皂苷,例如Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl;

[0211] -皂苷集皂苷混合物或从皂苷集分离的皂苷;

[0212] -肥皂草皂苷混合物或从肥皂草分离的皂苷;和

[0213] -皂树树皮皂苷混合物或从皂树树皮分离的皂苷,例如Quil-A、QS-17-api、QS-17-xyl、QS-21、QS-21A、QS-21B、QS-7-xyl;或

[0214] b)包含丝石竹皂苷元苷元核心结构的皂苷,选自列表B:

[0215] SA1641、丝石竹皂苷A、NP-017772、NP-017774、NP-017777、NP-017778、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SO1658和商陆皂苷元;或

[0216] c)包含皂皮酸苷元核心结构的皂苷,选自列表C:

[0217] AG1856、AG1、AG2、Agrostemmoside E、GE1741、丝石竹皂苷元1(Gyp1)、NP-017674、NP-017810、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017705、NP-017706、NP-017773、NP-017775、SA1657、Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862、SO1904、QS-7、QS-7api、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio和QS-21B-xylo;或

[0218] d)包含12,13-脱氢齐墩果烷型苷元核心结构、在该苷元的C-23位置处没有醛基团的皂苷,选自列表D:

[0219] 七叶素Ia、七叶皂苷、α-常春藤皂苷、AMA-1、AMR、AS6.2、AS64R、阿萨姆皂苷F、川续断皂苷B、商陆皂苷A、灰毡毛忍冬皂苷A、NP-005236、NP-012672、报春花酸1、柴胡皂苷A、柴胡皂苷D、茶籽皂苷I和茶籽皂苷J,

[0220] 优选地,该皂苷是选自列表A、B或C的皂苷、更优选地选自列表B或C的皂苷、甚至更优选地选自列表C的皂苷中的任一种或多种。

[0221] 在一个特别实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该皂苷是AG1856、GE1741、从皂树分离的皂苷、Quil-A、QS-17、QS-21、QS-7、SA1641、从肥皂草分离的皂苷、Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862和SO1904中的任一种或多种;优选地其中该皂苷是QS-21、SO1832、SO1861、SA1641和GE1741中的任一种或多种;更优选地其中

该皂苷是QS-21、SO1832或SO1861;最优选地是SO1861。

[0222] 在一个更特别的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该皂苷是从肥皂草分离的皂苷,优选地其中该皂苷是Saponarioside B、SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862和SO1904中的任一种或多种;更优选地其中该皂苷是SO1542、SO1584、SO1658、SO1674、SO1700、SO1730、SO1772、SO1832、SO1861、SO1862和SO1904中的任一种或多种;甚至更优选地其中该皂苷是SO1832、SO1861和SO1862中的任一种或多种;甚至更优选地其中该皂苷是SO1832和SO1861;最优选地是SO1861。

[0223] 在特别实施例中,可以提供用于本文披露的治疗性或预防性用途的缀合物和包含其的组合物,其中以下中的一项、两项或三项、优选地一项或两项、更优选地一项:

[0224] i.如果存在,至少一种皂苷的苷元核心结构中的醛基团已被衍生化,

[0225] ii.当存在于至少一种皂苷中时,至少一种皂苷的第一糖链中的葡糖醛酸部分的羧基基团已被衍生化,并且

[0226] iii.如果存在,至少一种皂苷的第二糖链中的至少一个乙酰氧基(Me(CO)O-)基团已被衍生化。

[0227] 在更特别的实施例中,可以提供用于本文披露的治疗性或预防性用途的缀合物和包含其的组合物,其中至少一种皂苷包含:

[0228] i.包含醛基团的苷元核心结构,该醛基团已通过以下进行衍生化:

[0229] -还原为醇;

[0230] -通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化为腙键,其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;

[0231] -通过与N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼(BMPH)反应转化为腙键,其中该BMPH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0232] -通过与N-[κ-马来酰亚胺基十一烷酸]酰肼(KMUH)反应转化为腙键,其中该KMUH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0233] ii.第一糖链,其包含羧基基团,优选葡糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已经通过与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)或N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化为酰胺键而衍生化;或

[0234] iii.第二糖链,其包含乙酰氧基基团(Me(CO)O-),该乙酰氧基基团已经通过脱乙酰转化为羟基基团(HO-)而衍生化;或

[0235] iv.i.、ii.和/或iii.的两个或三个衍生化的任何组合,优选地是i.、ii.和iii.的两个衍生化的任何组合。

[0236] 在一个特定实施例中,提供了缀合物和包含其的组合物,其中至少一个皂苷分别根据表2的A组和B组包含第一糖链和包含第二糖链,其中该第一糖链包含多于一个糖部分并且该第二糖链包含多于一个糖部分,并且其中该苷元核心结构优选地是皂皮酸或丝石竹皂苷元,更优选地皂皮酸,其中以下中的一项、两项或三项、优选地一项或两项:

[0237] i.该苷元核心结构中的醛基团已被衍生化,

[0238] ii.该第一糖链中的葡糖醛酸部分的羧基基团已被衍生化,以及

[0239] iii.该第二糖链中的至少一个乙酰氧基(Me(CO)O-)基团已被衍生化。

[0240] 一个实施例是本发明的缀合物,其中以下中的一项、两项或三项、优选地一项或两项、更优选地一项:

[0241] iv.如果存在,至少一种皂苷的苷元核心结构中的醛基团已被衍生化,

[0242] v.当存在于至少一种皂苷中时,至少一种皂苷的第一糖链中的葡糖醛酸部分的羧基基团已被衍生化,并且

[0243] 如果存在,至少一种皂苷的第二糖链中的至少一个乙酰氧基(Me(CO)O-)基团已被衍生化。

[0244] 在一个特定实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的缀合物或组合物,其中至少一个皂苷的苷元核心结构的C-23位置中的醛官能团与接头EMCH共价结合,该EMCH经由硫醚键共价结合到共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子中的巯基基团,诸如半胱氨酸的巯基基团。EMCH接头与皂苷苷元的醛基团的结合导致腙键的形成。这种腙键是内体和溶酶体内酸性条件下可切割键的典型实例。与缀合物所包含的配体或缀合物等所包含的核酸偶联的皂苷,一旦递送在暴露配体可以结合的内吞受体的靶肌肉细胞的内体或溶酶体中,就可从本发明的缀合物中释放。这样,与缀合物中的配体和核酸偶联的皂苷从细胞外转移到内体(或溶酶体)中,并且在内体(或溶酶体)中,皂苷在pH驱动的腙键切割后从缀合物的剩余部分中释放。在内体(或溶酶体)中,在将本发明的缀合物所包含的治疗性核酸递送到肌肉细胞的胞质溶胶中时,游离皂苷可以发挥其刺激活性。如以上所解释,发明人意外地意识到,皂苷以游离形式存在于内体或溶酶体中并不是皂苷介导的内体逃逸的先决条件。另外,本文披露的缀合物中包含的皂苷可以强化治疗性核酸从内体/溶酶体递送到靶向肌肉细胞的胞质溶胶中。

[0245] 本文呈现的有利组合物的开发是基于令人意外的认识,即由于在本发明的缀合物中包含了内体逃逸增强皂苷,任何核酸都可以以改善的方式有效地递送到肌肉细胞中,以帮助治疗和/或预防肌肉消耗障碍。

[0246] 与此一致,在一个有利的实施例中,核酸是治疗性核酸,其适于靶向在特定肌肉细胞相关遗传性障碍中受影响的基因内的突变转录物或基因组突变。此类潜在可靶向遗传靶标和与其相关的肌肉细胞相关遗传性障碍的列表可以例如在Cardamone M等人,2008中找到。

[0247] 在一个特别实施例中,这种遗传靶标是抗肌萎缩蛋白病诸如DMD背后的突变人抗肌萎缩蛋白,证明本文披露的组合物的潜力的概念验证实验在下文中呈现。然而,也可以靶向已知基因中的其他突变,诸如但不限于:面肩肱型肌营养不良背后的DUX4/双同源盒4、或1型强直性肌营养不良背后的DMPK、或埃默里-德赖弗斯肌营养不良背后的EMD/伊默菌素和LMNA/核纤层蛋白A/C、或肢带型肌营养不良1背后的MYOT/肌收缩蛋白、LMNA/核纤层蛋白A/C。另外的实例包括先天性肌营养不良中发生突变的LAMA2/分区蛋白或层粘连蛋白-α2链/编码胶原6A的任何COL6A基因、或扩张型家族性心肌病中的LMNA/核纤层蛋白A/C。可以被本文披露的缀合物和组合物中存在的核酸靶向的另外的突变可以在以下基因中找到,如NEB/伴肌动蛋白、ACTA/骨骼肌α-肌动蛋白、TPM3/α-原肌球蛋白-3、TPM2/β-原肌球蛋白-2、TNNT1/肌钙蛋白T1、LMOD3/平滑肌蛋白-3、MYPN/肌钯蛋白等(杆状体肌病)、或TPM3/α-原肌球蛋白-3、CTA/骨骼肌α-肌动蛋白、RYR1/兰尼碱受体通道(先天性纤维型比例失调肌病)、或有利地在TTN基因(肌连蛋白)中。

[0248] 在一个特别有利的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该核酸是定义为不长于150nt的核酸的寡核苷酸,优选地其中该寡核苷酸具有5-150nt、优选地8-100nt、最优选地10-50nt的大小。

[0249] 如本文所用,术语寡核苷酸应理解为涵盖由天然存在的核苷酸制成并且因此在化学上是寡核苷酸的寡聚物,以及包括经修饰的寡核苷酸或其类似物的寡聚物。例如,合成寡聚物可以包含例如2'修饰的核苷,其可以选自:2'-氟(2'-F)、2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)、2'-O-氨基丙基(2'O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)、锁核酸(LNA)、乙烯桥接核酸(ENA)和(S)-限制性乙基桥接核酸(cEt)等。与此一致,在一个可能的实施例中,寡核苷酸可以在结构上或功能上被定义为以下中的任一种:脱氧核糖核酸(DNA)寡聚物、核糖核酸(RNA)寡聚物、反义寡核苷酸(ASO、AON)、短干扰RNA(siRNA)、抗微小RNA(抗miRNA)、DNA适体、RNA适体、mRNA、小环DNA、肽核酸(PNA)、磷酰胺吗啉代寡聚物(PMO)、锁核酸(LNA)、桥接核酸(BNA)、2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸(FANA)、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、3'-氟己糖醇核酸(FHNA)、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、基于BNA的siRNA和基于BNA反义寡核苷酸(BNA-AON)、siRNA(诸如基于BNA的siRNA,选自经化学修饰的siRNA、代谢稳定的siRNA和经化学修饰的代谢稳定的siRNA)、或本领域已知的任何其他类别。

[0250] 从功能的角度来看,在有利的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该寡核苷酸是反义寡核苷酸,更优选地是突变特异性反义寡核苷酸,最优选地是被设计来诱导外显子跳跃的寡核苷酸。

[0251] 在一个相关实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该寡核苷酸包含以下中的任一种或由其组成:磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO)、2'-O-甲基(2′-OMe)硫代磷酸酯RNA、2′-O-甲氧基乙基(2′-O-MOE)RNA{2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)}、锁核酸或桥接核酸(LNA或BNA)、2'-O,4'-氨基乙烯桥接核酸(BNANC)、肽核酸(PNA)、2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸(FANA)、3'-氟己糖醇核酸(FHNA)、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、沉默RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、antagomir(miRNA拮抗剂)、适体RNA或适体DNA、单链RNA或单链DNA、双链RNA(dsRNA)或双链DNA;

[0252] 在特别优选的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该寡核苷酸包含磷酰二胺吗啉代寡聚物(PMO)或2'-O-甲基(2′-OMe)硫代磷酸酯RNA或由其组成。

[0253] 在一个特别且对于DMD有利的特别实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中寡核苷酸被设计来诱导人抗肌萎缩蛋白基因转录物的外显子跳跃,优选地其中该外显子跳跃涉及51号外显子跳跃或53号外显子跳跃或45号外显子跳跃,优选地其中寡核苷酸是被设计来诱导51号外显子跳跃或53号外显子跳跃或45号外显子跳跃的2'O-甲基-硫代磷酸酯反义寡核苷酸或磷酰二胺吗啉代寡聚物反义寡核苷酸。

[0254] 在与前一个实施例一致的非常特别的实施例中,该寡核苷酸选自依特立生、曲萨珀森、戈洛迪森、维托拉生和卡西默森。

[0255] 在一个有利实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该缀合物包含两个或更多个该核酸的分子。两种或更多种治疗性核酸的此类治疗性组合是本领域已知的,并且用于肌肉消耗障碍,例如,提出了一种基于两种AON的用于肌生成抑制蛋白和抗肌萎缩蛋白中的双外显子跳跃的组合方法来管理迪谢内肌营养不良[Kemaladewi等人,2011]。

[0256] 在另一个有利实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中优选地其中两个或更多个该核酸的分子是2-16个分子,更优选地2-8个分子,可能地2、3、4、5或6个分子。

[0257] 与临床实践一致,在一个优选实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中两个或更多个该核酸的分子是两个或更多个寡核苷酸;可能地两个或更多个不同的寡核苷酸,其中该两个或更多个不同的寡核苷酸中的至少一个是反义寡核苷酸。

[0258] 关于与肌肉细胞上的内吞受体的配体有关的特别实施例,应注意,在肌肉细胞的表面上表达的内吞受体是已知的,并且其中一些如转铁蛋白受体(CD71)或肌肉特异性激酶(MuSK)描述于WO 2018129384或WO 2020028857中。合适受体的另外实例可以包括肌肉跨膜转运蛋白,例如GLUT4或ENT2(与许多其他受体一起描述于Ebner,2015中)或例如四次跨膜蛋白CD63[Baik,2021]。实际上,到目前为止,已经对肌肉细胞表面上存在的许多内吞受体进行了表征,其中转铁蛋白受体(CD71)和可能的胰岛素样生长因子1(IGF-I)受体(IGF1R)是研究最多的受体。这些受体的配体可以选自天然配体,诸如作为CD71的天然配体的转铁蛋白(Tf),或作为LDL受体的配体的LDL。可替代地,它们可以是非天然存在的配体,诸如各种类型的抗体或其结合片段,或者可替代地可以是合成配体,如与内吞甘露糖受体结合的zymozan A,或天然存在的配体的合成片段,诸如作为GF1R的配体的IGF-I的片段或作为CI-MPR(也称为IGF2R)的配体的IGF-II的片段。

[0259] 在一个优选实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中配体所结合的肌肉细胞上的内吞受体选自:转铁蛋白受体(CD71)、胰岛素样生长因子1(IGF-I)受体(IGF1R)、四次跨膜蛋白CD63;肌肉特异性激酶(MuSK)、葡萄糖转运蛋白GLUT4、阳离子非依赖性甘露糖6磷酸受体(CI-MPR)和LDL受体。

[0260] 在另一个优选实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该配体选自以下中的任一种:

[0261] 胰岛素样生长因子1(IGF-I)或其片段;

[0262] 胰岛素样生长因子2(IGF-II)或其片段

[0263] 甘露糖6磷酸

[0264] 转铁蛋白(Tf),

[0265] zymozan A,和

[0266] 与该内吞受体特异性结合的抗体或其结合片段,其中该内吞受体优选地选自:转铁蛋白受体(CD71)、胰岛素样生长因子1(IGF-I)受体(IGF1R)、四次跨膜蛋白CD63、肌肉特异性激酶(MuSK)、葡萄糖转运蛋白GLUT4、阳离子非依赖性甘露糖6磷酸受体(CI-MPR)和LDL受体;

[0267] 优选地其中该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的抗体或其结合片段,

[0268] 在一个相关的特别有利的实施例中,该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的单克隆抗体或Fab'片段或至少一种单结构域抗体,甚至更优选地其中该配体是与转铁蛋白受体特异性结合的单克隆抗体。

[0269] 在另一个有利实施例中,配体是单克隆抗体,诸如人源化或人单克隆抗体、IgG、包含以下或由以下组成的分子:单结构域抗体、至少一个VHH结构域、优选地骆驼VH、可变重链新抗原受体(VNAR)结构域、Fab、scFv、Fv、dAb、F(ab)2和Fcab片段。

[0270] 在一个特定实施例中,提供了本发明的缀合物,前提是肌肉细胞上的内吞受体的配体不是CD71或MuSK的配体,优选地前提是该配体不是CD71结合抗体或其CD71结合片段,或者不是MuSK结合抗体或其MuSK结合片段。

[0271] 如以上所解释,在另外的有利实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中缀合物内的皂苷的共价连接是经由皂苷所共价结合的第一接头进行的;优选地其中该第一接头包括共价键,该共价键选自以下中的任一种或多种:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键、肟键、二硫键、硫醚键、酰胺键、肽键和酯键,优选地选自以下中的任一种或多种:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、二硫键、硫醚键、酰胺键、肽键和酯键,更优选地腙键或缩氨基脲键;甚至更优选地其中该皂苷包含

[0272] 在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处的醛基团,或

[0273] 在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处的共价键,该共价键经由第一接头共价连接第一缀合物内的皂苷并作为第一接头的一部分被包含在内,优选地其中C-23位置处的共价键是在内体或溶酶体中存在的条件下进行切割的可切割键,更优选地,其中C-23位置处的可切割共价键适于在切割后恢复C-23位置处的醛基团;

[0274] 或者其中用于制备缀合物的皂苷是至少在非缀合状态下在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含醛基团的皂苷,并且其中在制备缀合物后,所述醛基团已经参与与第一接头形成共价键。

[0275] 因此,在一个相关的有利实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该第一接头是在酸性、还原性、酶促和/或光诱导条件下进行切割的可切割接头;

[0276] 优选地其中该第一接头包括可切割键,该可切割键选自:

[0277] • 在酸性条件下进行切割的键,诸如缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,

[0278] • 易于蛋白水解,优选地通过组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,例如酰胺键或肽键;

[0279] • 还原/氧化可切割键,诸如二硫键,或硫醇交换反应敏感键,诸如硫醚键;

[0280] 更优选地其中该第一接头包括可切割键,该可切割键选自:

[0281] • 在酸性条件下进行切割的键,诸如缩氨基脲键,或腙键,和/或

[0282] • 易于蛋白水解,例如通过组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,和/或

[0283] • 易于在还原条件下进行切割的键,诸如二硫键。

[0284] 优选地,这种键是在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选地在pH 4.0-6.5且更优选地在pH≤5.5下进行体内切割的酸敏感性键;

[0285] 在有利实施例中,酸敏感性键选自以下中的任一种或多种:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,甚至更优选地选自缩氨基脲键和腙键;最优选地是腙键。

[0286] 在某些实施例中,当皂苷通过皂苷的苷元核心结构的C-23位置处的共价键(优选地是酸敏感性键)缀合时,C-23位置处的所述共价键被选择为使得或适于在切割(例如,在酸性条件下)后恢复C-23位置处的醛基团是有利的。有利地,这种共价键可以选自以下中的任一种或多种:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键和/或肟键,优选地是缩氨基脲键或腙键。

[0287] 优选的是,当缀合物存在于细胞的内体和溶酶体外部时,诸如在缀合物通过结合与内吞受体接合之后在细胞外部或在内吞囊泡中时,这种可切割键不易被切割或仅在较小程度上易被切割。优选地,在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选地pH≤6.5、优选地pH≤6、更优选地pH≤5.5,该键在体内有效地被切割。

[0288] 例如,与缀合物在内吞缀合物的靶细胞的内体或溶酶体中时键的切割易感性相比,缀合物存在于人类受试者的循环中和/或存在于人类受试者的细胞外器官中时可切割键优选地更不易被切割。因此,优选的是在存在于人细胞的内体和/或溶酶体中,优选地pH≤6.5、优选地pH≤6、更优选地pH≤5.5的酸性条件下进行体内切割的可切割键(即,酸敏感性键)更优选地是选自缩氨基脲键和腙键的键;最优选地是腙键。当皂苷从缀合物的剩余部分上切割下时,皂苷将其内体逃逸增强活性临时施加到与皂苷一起存在于内体中的另外分子,诸如本披露的缀合物中的核酸或寡核苷酸。

[0289] 在苷元的C-23位置处包含醛基团的皂苷是特别优选的,因为这些皂苷对核酸诸如寡核苷酸具有有效的内体逃逸增强活性。因此,对于缀合物优选的皂苷是在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下在皂苷的苷元核心结构的C-23位置处包含或形成醛基团的那些皂苷。

[0290] 例如,当以上所述的B组和C组的皂苷通过经由涉及醛基团的接头化学共价结合在缀合物中(例如,形成腙键或缩氨基脲键)时,优选当缀合物被内吞并且皂苷通过可切割键的切割从缀合物的剩余部分上切割下时,醛基团在内体或溶酶体中重新形成(即,恢复)。适用于此目的的此类皂苷的实例列于表1中,并且是例如上文所概述的A-C组,特别是B组和C组中的皂苷。

[0291] 为了构建复杂的共价缀合物,例如为了包括更大或固定数量的配体诸如抗体,或多个核酸分子,或尤其是皂苷分子,可以采用包括寡聚物或聚合物结构的分子支架。其优点之一是支架可以被设计成使得它包含限定数量的分子,例如皂苷。例如,支架可以正好包含一个皂苷分子,但也可以包含几个(例如,两个、三个或四个)皂苷或大量(例如,10个、20个或100个)相对恒定和限定数量的皂苷。可能的这种寡聚物/聚合物结构将由以下制成:聚(胺),例如聚乙烯亚胺和聚(酰胺基胺),或可替代地聚乙二醇、聚(酯),诸如聚(丙交酯)、聚(内酰胺)、聚丙交酯-共-乙交酯共聚物、聚(糊精),或肽或蛋白质,或天然和/或人工聚氨基酸,例如聚赖氨酸、DNA聚合物诸如包含2-100个核苷酸的DNA、稳定的RNA聚合物或PNA(肽核酸)聚合物(例如,包含2-200个核苷酸,表现为直链、支链或环状聚合物)、寡聚物、树枝状聚合物、树状突(例如,G2、G3、G4或G5树状突中的任一种,分别用于最大共价结合4、8、16或32个皂苷部分)、树状突化聚合物、树状突化寡聚物或这些结构的纯的或混合的组装体。优选

地,此类支架可以由寡聚物/聚合物结构制成,诸如树枝状聚合物、树状突、树状突化聚合物、树状突化寡聚物、DNA例如2-200个核酸、聚乙二醇、低聚乙二醇(OEG),诸如OEG_3、OEG_4和OEG_5。

[0292] 因此,在一个有利实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中第一接头进一步包含寡聚物或聚合物结构,即树状突诸如聚酰胺基胺(PAMAM)树枝状聚合物、或聚乙二醇诸如PEG3-PEG30中的任一种;优选地,该聚合物或寡聚物结构是PEG4-PEG12中的任一种,或G2树状突、G3树状突、G4树状突和G5树状突中的任一种,更优选地是G2树状突或G3树状突或PEG3-PEG30。

[0293] 此类寡聚物/聚合物支架形成结构有利地缺乏固有生物活性。典型地,支架由惰性分子制成,以避免造成潜在的健康风险。由待掺入本文呈现肌肉靶向缀合物的特别实施例中的所选皂苷的数量驱动,可以适当地选择寡聚物/聚合物结构的类型和大小或长度。也就是说,作为缀合物的一部分,与配体和核酸偶联的皂苷的数量可以决定合适的寡聚物或聚合物结构的选择,该寡聚物或聚合物结构携带足够数量的结合位点用于偶联所需数量的皂苷,从而提供共价皂苷结合结构。例如,OEG的长度或树状突分子或聚赖氨酸分子的大小决定了可以共价连接到潜在地作为第一接头的一部分包含在缀合物内的此类寡聚物或聚合物结构的皂苷的最大数量。

[0294] 在有利实施例中,这种包含支架的缀合物将包含限定数量或范围的与其共价连接的皂苷,而不是其随机数量。这对于与获得上市许可相关的药物开发尤其有利。在这方面限定的数量意味着缀合物优选包含先前限定数量的皂苷。例如,这是通过设计包含寡聚物/聚合物结构的支架来实现的,该结构具有一定数量的可能用于与一个或多个皂苷接合的基团。在理想环境下,这些基团中的每一个都将与皂苷分子接合,从而产生包含限定数量的皂苷的缀合物。设想提供一组标准支架,包括例如两个、四个、八个、十六个、三十二个、六十四个等。

[0295] 在本发明的缀合物的一个实施例中,可以提供支架,其中皂苷分子的数量将被定义为一个范围,例如,对于非理想结合环境,其中并非所有存在于这种寡聚物/聚合物中的基团都与皂苷分子接合。例如,此类范围可以是每个支架2-4个皂苷分子、每个支架3-6个皂苷分子、每个支架4-8个皂苷分子、每个支架6-8个皂苷分子、每个支架6-12个皂苷分子等等。

[0296] 在一些实施例中,包含与寡聚物或聚合物分子结合的多个皂苷的这种第一接头可以充当多个皂苷部分的载体(支持物、支架),这些皂苷部分可以与配体和核酸结合,从而形成本文披露的肌肉细胞靶向治疗偶联物的某些实施例。在一个有利实施例中,这种装载有皂苷分子的包含寡聚物或聚合物分子的接头可以经由优选可切割的键附接到肌肉细胞靶向缀合物的剩余部分。

[0297] 在另一个有利实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中缀合物内的核酸的共价连接是经由核酸所共价结合的第二接头进行的;优选地其中该第二接头包含接头3-(2-吡啶二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯(SPDP)或由其组成;可能地其中该第二接头将该核酸共价连接到赖氨酸残基,优选地是包含在该配体中的赖氨酸残基,或者共价连接到聚糖残基,优选地是经部分修剪的聚糖。

[0298] 与皂苷缀合类似,一个或多个核酸分子(例如,寡核苷酸分子,并且特别是双链寡

核苷酸分子如siRNA)经由可切割键结合在缀合物中也是有利的,其中可切割键在例如酸性、还原性、酶促和/或光诱导条件下进行切割。在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下进行切割的可切割键是优选的。

[0299] 与以上内容一致,在一个相关且有利的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该第二接头是在酸性、还原性、酶促和/或光诱导条件下进行切割的可切割接头;

[0300] 优选地其中该第二接头包括可切割键,该可切割键选自:

[0301] • 在酸性条件下进行切割的键,诸如缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,

[0302] • 易于蛋白水解,优选地通过组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,例如酰胺键或肽键;

[0303] • 还原/氧化可切割键,诸如二硫键,或硫醇交换反应敏感键,诸如硫醚键;

[0304] 更优选地其中该第一接头包括可切割键,该可切割键选自:

[0305] • 在酸性条件下进行切割的键,诸如缩氨基脲键,或腙键,和/或

[0306] • 易于蛋白水解,例如通过组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,和/或

[0307] • 易于在还原条件下进行切割的键,诸如二硫键。

[0308] 有利地,该键是酸敏感性的,即在人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选地pH≤6.5、优选地pH≤6、更优选地pH≤5.5的酸性条件下进行体内切割,更优选地是选自以下中的任一种或多种的酸敏感性键:缩氨基脲键、腙键、亚胺键、包括1,3-二噁烷键的缩醛键、缩酮键、酯键和/或肟键,甚至更优选地选自缩氨基脲键和腙键;最优选地是腙键。

[0309] 优选的是,当缀合物存在于细胞的内体和溶酶体外部时,诸如在缀合物通过配体与其肌肉细胞上的靶内吞受体结合而与内吞受体接合之后在细胞外部或在内吞囊泡中时,这种可切割键不易被切割或仅在较小程度上易被切割。例如,与缀合物在靶细胞(在本文中是肌肉细胞)的内体或溶酶体中时键的切割易感性相比,缀合物存在于人类受试者的循环中和/或存在于人类受试者的细胞外器官中时可切割键优选地更不易被切割。

[0310] 在一个特别实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中第一接头和/或其中第二接头直接地或间接地与配体共价连接。

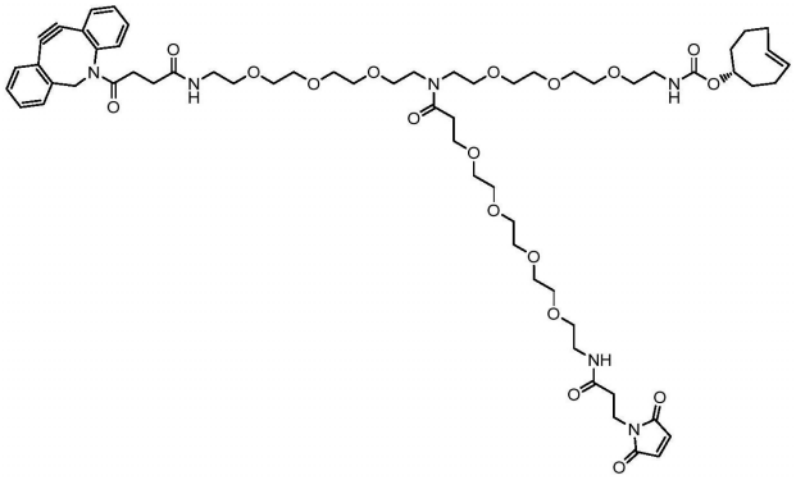
[0311] 在另一个且有利的实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中缀合物内的配体的共价连接是经由配体所共价结合的第三接头进行的;优选地其中该配体包含含有至少一个半胱氨酸残基和/或至少一个赖氨酸残基的氨基酸残基链,并且其中该第三接头包括与所述至少一个半胱氨酸残基或所述至少一个赖氨酸残基形成的共价键;更优选地其中该配体包含含有多半胱氨酸重复序列的氨基酸残基链,可能是由序列HRWCCPGCCKTF(SEQ ID NO.4)表示的四半胱氨酸重复序列,并且其中该第三接头包括与该多半胱氨酸重复序列的半胱氨酸残基中的任一个或多个的共价键;可能地其中超过一个第三接头经由该超过一个第三接头中的每一个与该配体所包含的该多半胱氨酸重复序列的单独半胱氨酸残基结合而与该配体的一个分子连接。

[0312] 在另一个可能实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中缀合物包含用于实现至少一个该皂苷的分子、至少一个该核酸

的分子和至少一个该配体的分子之间的共价连接的中心接头,其中所述共价连接直接或分别经由第一接头、第二接头和/或第三接头实现;优选地其中该中心接头是三官能接头。

[0313] 例如,在一个相关实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该中心接头是在其非缀合形式中由结构A表示的三官能接头:

[0314]

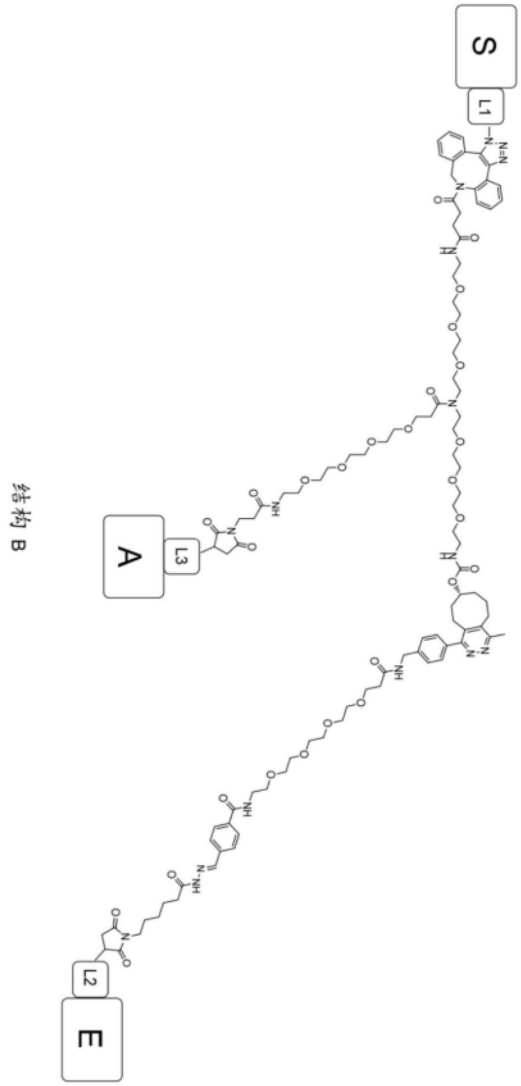


(结构 A)

[0315] 在与以上所述相关的一个可能实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中对于该缀合物所包含的每一个该配体的分子,该缀合物包含1-4个三官能接头,更优选地1-2个三官能接头,最优选地平均1.2-1.8.个三官能接头。

[0316] 在另一个相关实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该三官能接头在其缀合形式中由结构B表示:

[0317] 结构 B



[0318] 其中：

[0319] S是该至少一个该皂苷的分子,优选地选自A、B或C组,

[0320] L1是所述至少一个该皂苷的分子所共价结合的该第一接头,

[0321] E是至少一个该核酸的分子,

[0322] L2是所述至少一个该核酸的分子所共价结合的该第二接头,

[0323] A是该至少一个该配体的分子,优选地是抗体或其结合片段,可能地是一种或多种单结构域抗体,并且

[0324] L3是所述至少一个该配体的分子所共价结合的该第三接头,

[0325] 其中L1、L2和L3是相同的或不同的。

[0326] 在特别实施例中,L1可以任选地包含如以上针对某些实施例所述的寡聚物或聚合物结构,该结构优选地包含PEG,更优选地选自PEG3-PEG30,或G2、G3或G4树状突。

[0327] 在一个特别实施例中,提供了一种缀合物,其中至少一个皂苷经由硫醚键共价结合到至少一个配体(优选地是抗体或其结合片段)之一中和/或至少一个核酸(优选地是ASO)之一中的巯基基团上,共价结合优选地经由N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH),该N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼与皂苷的苷元核心结构的C-23位置中的醛基团共价结合并且与配体中的巯基基团诸如半胱氨酸的巯基基团共价结合。

[0328] 在另一个特别实施例中,提供了一种缀合物,其中至少一个皂苷是双糖链三萜皂苷或其衍生物,该双糖链三萜皂苷或其衍生物属于在C-23位置中任选地具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且在结合于该皂苷的苷元核心结构的C_3β-OH基团处的第一糖链中包含葡糖醛酸单元,其中该皂苷经由该第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团,优选地经由接头,共价结合到该配体和/或该至少一个核酸分子的氨基酸残基,其中该氨基酸残基优选地选自半胱氨酸和赖氨酸。

[0329] 本发明的治疗性肌肉细胞靶向缀合物的可能实施例的不同示意图在图15及其图例中示出和描述。

[0330] 如以上所解释,可以设想本文披露的肌肉细胞靶向缀合物的不同示例性实施例,由此设想皂苷和/或核酸(优选地是寡核苷酸)与配体和/或寡聚物或聚合物结构(进一步称为支架)的不同缀合模式。与以上解释的实施例一致,这种缀合可以经由缀合物所包含的至少两种类型的分子的直接共价键合进行,或者经由接头诸如以上所述的第一接头、第二接头和/或第三接头进行。接头可以用于建立缀合物所包含的至少一个分子或至少一种类型的分子与缀合物的剩余部分的共价键合,或者为此目的可以使用更多的接头。在一个特别实施例中,缀合物所包含的每个不同分子(即,不同分子是皂苷、核酸和配体)可以通过各自的接头(即,分别为第一、第二或第三接头)共价结合到缀合物的剩余部分,例如通过结合到共同的支架。如以上所解释,在可能的实施例中,接头可以在哺乳动物(例如,人类)内体/溶酶体中存在的条件下是稳定的,或者在所述条件下是不稳定的(即,可切割的),后者意味着这些接头响应于所述条件而切割,从而从缀合物的剩余部分中释放经由这种可切割接头共价连接的分子。

[0331] 以上描述了共价连接缀合物内的皂苷的第一可切割接头的许多实例,包括在皂苷苷元核心的C-23位置处经由酸敏感性键结合到皂苷的第一可切割接头的更详细描述的实施例,这些酸敏感性键优选地通过使这种皂苷的苷元核心的C-23位置处的醛基团反应而建立并且被配置来在哺乳动物(例如,人类)内体/溶酶体中存在的酸性条件下恢复所述基团。

[0332] 可替代地,当受体内化速率不是限制性因素时,在其他可能的实施例中,共价连接本发明的缀合物内的皂苷的第一接头可以是稳定接头,其例如可以经由葡糖醛酸基团,优选地并且如果存在,经由与结合在皂苷的苷元核心结构的C3β-OH基团处的第一糖链中的葡糖醛酸单元反应来连接到皂苷。作为这种反应的结果,可以在结合在皂苷的苷元核心结构的C3β-OH基团处的第一糖链上产生包含稳定(即,不可切割)键的第一稳定接头,该第一稳定接头将缀合物内的皂苷共价连接到例如配体(例如,免疫球蛋白像mAb、sdAb、VHH等)或支架。与此一致,一个可能的实施例是如所提供的缀合物,其中该皂苷属于在皂苷的苷元核心结构的C_3β-OH基团处的第一糖链中包含葡糖醛酸单元的皂苷,其中该葡糖醛酸单元已经反应以优选地经由在结合在皂苷的苷元核心结构的C3β-OH基团处的第一糖链上产生的酰胺键将接头更优选地与配体中存在的胺基团(诸如赖氨酸的胺基团或蛋白质配体诸如免疫球蛋白的N末端)或支架共价结合。葡糖醛酸功能是特别有利的,因为它可以经由直接共价键或经由接头反应以建立皂苷与本发明的缀合物的配体或支架的共价连接,其中该接头是稳定接头,但也可以被设计为可切割接头。

[0333] 第一可切割接头与第一稳定接头之间的选择完全取决于技术人员,并且可以例如根据配体的选择和缀合物所包含的任何不同分子的所需释放速率来进行。经由第一可切割

接头或第一稳定接头缀合的皂苷可以是本发明的缀合物的任何实施例的一部分,例如其中核酸(例如,寡核苷酸,优选地PMO或ASO)经由第二可切割接头或第二稳定接头连接的实施例。以上提供了稳定的和可切割的第二接头的实例,并且两者均非常有可能用于本发明的缀合物内的核酸的缀合。它们之间的选择将在很大程度上取决于所使用的核酸类型和预期的疗法。例如,稳定接头可以非常容易地用于缀合治疗性核酸的仅一条链,该治疗性核酸将被设计为在细胞中以单链形式起作用。可以选择此类治疗性核酸的两条链,以便响应于内体/溶酶体中存在的条件而解离,从而从缀合物中释放治疗性链以通过本文所述的内体逃逸增强皂苷的存在而增强的方式进入胞质溶胶。对于双链核酸,在一些实施例中,第二可切割接头可能是有利的,并且可以被认为与配体缀合或与支架缀合。

[0334] 在另一个特别实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该皂苷是或包含至少一个SO1861分子,该核酸是曲萨珀森或依特立生,并且该配体是抗CD71抗体或其结合片段。

[0335] 在另一个实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物,该组合物用于在向人类受试者的静脉内或皮下施用中使用。

[0336] 在又另一个实施例中,提供了用于本文披露的治疗性或预防性用途的组合物或根据本披露的缀合物,其中该组合物包含药学可接受的赋形剂和/或药学可接受的稀释剂。

[0337] 在一个特定方面,提供了用作药物的根据本披露的组合物或缀合物。

[0338] 实例

[0339] 材料:

[0340] SO1861由法国中草药公司(Extrasynthese,France)和/或德国分析发现有限公司(Analyticon Discovery GmbH,Germany)从肥皂草获得的原植物提取物中分离和纯化。

[0341] 具有序列5'-UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU-3'[SEQ ID NO:1]的反义寡核苷酸和具有相同序列和硫醇修饰的ASO(分别为DMD-ASO和5'-硫醇-DMD-ASO)是定制的并且购自Hanugen Therapeutics私人有限公司。具有序列5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3'的PMO(DMD-PMO或DMD-PMO(1))[SEQ ID NO:2]和具有相同序列和二硫酰胺修饰的PMO(5'-二硫酰胺-DMD-PMO或5'-二硫酰胺-DMD-PMO(1))是定制的并且购自Gene Tools有限责任公司。具有序列5'-CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG-3'(DMD-PMO(1))[SEQ ID NO:2]和在3'上的二硫酰胺修饰的PMO(3'-二硫酰胺-DMD-PMO(1))是定制的并且购自Gene Tools公司。具有序列5'-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT-3'(M23D)[SEQ ID NO:3]的PMO和具有相同序列和二硫酰胺修饰的PMO(3'-二硫酰胺-M23D)是定制的并且购自Gene Tools有限责任公司。具有序列5'-GTGTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG-3'(DMD-PMO(2))[SEQ ID NO:16]和在3'上的二硫酰胺修饰的PMO(3'-二硫酰胺-DMD-PMO(2))是定制的并且购自Gene Tools公司。具有序列5'-GGCAGTTTCCTTAGTAACCACAGGTTGTGT-3'(DMD-PMO(3))[SEQ ID NO:17]和在3'上的二硫酰胺修饰的PMO(3'-二硫酰胺-DMD-PMO(3))是定制的并且购自Gene Tools公司。具有序列5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'(DMD-PMO(4))[SEQ ID NO:18]和在3'上的二硫酰胺修饰的PMO(3'-二硫酰胺-DMD-PMO(4))是定制的并且购自Gene Tools公司。具有序列5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'(DMD-PMO(5))[SEQ ID NO:19]和在3'上的二硫酰胺修饰的PMO(3'-二硫酰胺-DMD-PMO(5))是定制的并且购自Gene Tools公司。

[0342] 靶向人CD71(hCD71)的抗CD71抗体(克隆OKT9)和靶向鼠(mCD71)的抗CD71抗体(克

隆R17 217.1.3)均购自BioXCell公司。靶向人CD63(hCD63)的抗CD63抗体(克隆H5C6)和靶向鼠(mCD63)的抗CD63抗体(克隆NVG-2)均购自BioLegend公司。IGF-1配体购自派普泰克公司(PeproTech)。

[0343] 使用三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP,98%,西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB,埃尔曼试剂,99%,西格玛奥德里奇公司)、Zeba™旋转脱盐柱(2mL,赛默飞世尔公司(Thermo-Fisher))、NuPAGE™4%-12%Bis-Tris蛋白质凝胶(赛默飞世尔公司)、NuPAGE™MESSDS运行缓冲液(赛默飞世尔公司)、Novex™Sharp预染色蛋白质标准物(赛默飞世尔公司)、PageBlue™蛋白质染色溶液(赛默飞世尔公司)、Pierce™BCA蛋白质测定试剂盒(赛默飞世尔公司)、N-乙基马来酰亚胺(NEM,98%,西格玛奥德里奇公司)、1,4-二硫苏糖醇(DTT,98%,西格玛奥德里奇公司)、Sephadex G25(GE医疗公司(GE Healthcare))、Sephadex G50 M(GE医疗公司)、Superdex 200P(GE医疗公司)、异丙醇(IPA,99.6%,VWR)、三(羟甲基)氨基乙烷(Tris,99%,西格玛奥德里奇公司)、三(羟甲基)氨基乙烷盐酸盐(Tris.HCL,西格玛奥德里奇公司)、L-组氨酸(99%,西格玛奥德里奇公司)、D-(+)-海藻糖脱水物(99%,西格玛奥德里奇公司)、聚乙二醇山梨醇单月桂酸酯(TWEEN20,西格玛奥德里奇公司)、杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS,赛默飞世尔公司)、盐酸胍(99%,西格玛奥德里奇公司)、乙二胺四乙酸二钠盐二水合物(EDTA-Na_2,99%,西格玛奥德里奇公司)、无菌过滤器0.2μm和0.45μm(赛多利斯公司(Sartorius))、Vivaspin T4和T15浓缩器(赛多利斯公司)、Superdex 200PG(GE医疗公司)、四(乙二醇)、二甲基亚砜(DMSO,99%,西格玛奥德里奇公司)、N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺三氟乙酸盐(AEM,98%,西格玛奥德里奇公司)、L-半胱氨酸(98.5%,西格玛奥德里奇公司)、新取自实验室超纯水系统(MilliQ,默克公司(Merck))的去离子水(DI)、镍-次氮基三乙酸琼脂糖(Ni-NTA琼脂糖,Protino公司)、甘氨酸(99.5%,VWR)、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(埃尔曼试剂,DTNB,98%,西格玛奥德里奇公司)、S-乙酰巯基丁二酸酐荧光素(SAMSA试剂,英杰公司(Invitrogen))、碳酸氢钠(99.7%,西格玛奥德里奇公司)、碳酸钠(99.9%,西格玛奥德里奇公司)、具有Sephadex G-25树脂的PD MiniTrap脱盐柱(GE医疗公司)、PD10 G25脱盐柱(GE医疗公司)、0.5、2、5和10mL的Zeba旋转脱盐柱(赛默飞世尔公司)、Vivaspin离心过滤器T4 10kDa MWCO、T4 100kDa MWCO和T15(赛多利斯公司)、Biosep s3000aSEC柱(飞诺美公司(Phenomenex))、Vivacell超滤单元10和30kDa MWCO(赛多利斯公司)、Nalgene Rapid-Flow过滤器(赛默飞世尔公司)、二氯甲烷(西格玛奥德里奇公司)、甲醇(西格玛奥德里奇公司)、二乙醚(西格玛奥德里奇公司)、乙腈(西格玛奥德里奇公司)、2-吡啶硫酮(西格玛奥德里奇公司)、山羊抗人IgG-HRP(Southern Biotech公司)、山羊抗人Kappa-HRP(Southern Biotech公司)、Tris浓缩物(赛默飞世尔公司)、MOPS运行缓冲液(20x,赛默飞世尔公司)、LDS样品缓冲液(4x,赛默飞世尔公司)、TBS封闭缓冲液(赛默飞世尔公司)、Tris(三(羟甲基)氨基乙烷,默克公司)、Tris HCl(西格玛奥德里奇公司)、Minisart RC15 0.2μm过滤器(赛多利斯公司)、Minisart 0.45μm过滤器(赛多利斯公司)、PD Minitrap G25(思拓凡公司(Cytiva))、TNBS(2,4,6-三硝基苯磺酸,西格玛奥德里奇公司)、十二烷基硫酸钠(SDS,西格玛奥德里奇公司)、SMCC(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环已烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯,赛默飞世尔公司)、THPP(三(羟丙基)膦,西格玛奥德里奇公司)、DBCO-NHS(CAS1353016-71-3,BroadPharm公司)、PEG4-SPDP(2-吡啶基二硫醇-四氧杂十四烷-N-羟基琥珀酰亚胺,赛默飞

世尔公司)、Novex™TBE-Urea凝胶15%(赛默飞世尔公司)、TBE缓冲液(ris-Borat-EDTA,赛默飞世尔公司)、GlyCLICK™(10mg)叠氮化物激活试剂盒(Genovis公司)和固定GlycINATOR™柱(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒(Genovis公司)。

[0344] 与hCD71缀合物相关的材料

[0345]

描述	供应商
hCD71 人抗 CD71 抗体	BioXcell
SO1861-SC-马来酰亚胺	Symeres 公司
DMD-PMO(1)-5'-SS-酰胺（5'-DMD-PMO(1)）	Gene Tools 公司
DMD-PMO(1)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(1)）	Gene Tools 公司
DMD-PMO(2)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(2)）	Gene Tools 公司
DMD-PMO(3)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(3)）	Gene Tools 公司
DMD-PMO(4)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(4)）	Gene Tools 公司
DMD-PMO(5)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(5)）	Gene Tools 公司
DMD-ASO-硫醇（5'-DMD-ASO）	Hanugen Therapeutics 私人有限公司
山羊抗人 IgG–HRP	Southern Biotech 公司
山羊抗人 Kappa–HRP	Southern Biotech 公司
缀合缓冲液（TBS pH 7.5）	Fleet Bioprocessing 有限公司
杜氏 PBS pH 7.5	Fleet Bioprocessing 有限公司
SEC 分析缓冲液（DPBS:IPA 85:15）	Fleet Bioprocessing 有限公司
6 M 盐酸胍	Fleet Bioprocessing 有限公司
0.5 M NaOH	Fleet Bioprocessing 有限公司
PBS-T（杜氏 PBS pH 7.5 和 Tween-20）	Fleet Bioprocessing 有限公司
MOPS 运行缓冲液（20X）	Fleet Bioprocessing 有限公司
LDS 样品缓冲液（4X）	赛默公司
NuPAGE 转移缓冲液（10X）	Fleet Bioprocessing 有限公司
TBS 封闭缓冲液	赛默公司
TCEP	赛默公司
THPP	西格玛公司
DTT	西格玛公司
PEG4-SPDP	赛默公司
NEM	西格玛公司
甘氨酸	VWR

[0346]

DMSO	西格玛公司
埃尔曼试剂	赛默公司
0.2 μm Minisart 过滤器	赛多利斯公司
0.45 μm Minisart 过滤器	赛多利斯公司
0.2 μm Spin X 过滤器	康宁公司（Corning）
Zeba 2ml 7K MWCO	赛默公司
Zeba 10ml 40K MWCO	赛默公司
PD10 G25 Sephadex	思拓凡公司
2.6 × 30cm Sephadex G25	Fleet Bioprocessing 有限公司
2.6 × 40cm Superdex 200	Fleet Bioprocessing 有限公司
2.6 × 60cm Superdex 200	Fleet Bioprocessing 有限公司
Vivaspin 20（10K MWCO）	赛多利斯公司
Vivaspin T15（10K MWCO）	赛多利斯公司
Vivacell 100（10K MWCO）	赛多利斯公司
Novex 蛋白质标准物阶梯	生命技术公司（Life Technologies）
4%-12% Bis-Tris 凝胶	赛默公司
硝化纤维素膜	赛默公司
PageBlue 蛋白质染色剂	赛默公司
Ultra TMB 印迹溶液	赛默公司
BCA 测定试剂盒	赛默公司
2 mg/ml BGG 标准物	赛默公司
Biosep s3000 aSEC 柱	飞诺美公司

[0347] 与hCD63缀合物相关的材料

[0348]

描述	**供应商**
hCD63 人抗 CD63 抗体	Biolegend 公司
SO1861-SC-马来酰亚胺	Symeres 公司
DMD-PMO(1)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(1)）	Gene Tools 公司
DMD-PMO(2)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(2)）	Gene Tools 公司
DMD-PMO(3)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(3)）	Gene Tools 公司
DMD-PMO(4)-SS-酰胺（3'-DMD-PMO(4)）	Gene Tools 公司
DMD-ASO-硫醇（5'-DMD-ASO）	Hanugen Therapeutics 私人有限公司

[0349]

山羊抗人 IgG–HRP	Southern Biotech 公司
山羊抗人 Kappa–HRP	Southern Biotech 公司
缀合缓冲液（TBS pH 7.5）	Fleet Bioprocessing 有限公司
上样缓冲液（杜氏 PBS pH 7.5）	Fleet Bioprocessing 有限公司
SEC 分析缓冲液（DPBS:IPA 85:15）	Fleet Bioprocessing 有限公司
6 M 盐酸胍	Fleet Bioprocessing 有限公司
PBS-T	Fleet Bioprocessing 有限公司
MOPS 运行缓冲液（20X）	Fleet Bioprocessing 有限公司
LDS 样品缓冲液（4X）	赛默公司
转移缓冲液（1X）	Fleet Bioprocessing 有限公司
TBS 封闭缓冲液	赛默公司
TCEP	赛默公司
THPP	西格玛公司
DTT	西格玛公司
PEG4-SPDP	赛默公司
NEM	西格玛公司
甘氨酸	VWR
DMSO	赛默公司 西格玛公司
埃尔曼试剂	赛默公司
0.2 μm Minisart 过滤器	赛多利斯公司
0.2 μm Spin 过滤器	密理博公司（Millipore）
Zeba 2ml 7K MWCO	赛默公司
PD10 G25 Sephadex	思拓凡公司
2.6 × 30 cm Sephadex G25	Fleet Bioprocessing 有限公司
2.6 × 40 cm Superdex 200	Fleet Bioprocessing 有限公司
2.6 × 60 cm Superdex 200	Fleet Bioprocessing 有限公司
Vivaspin 20（10K MWCO）	赛多利斯公司
Vivaspin T15（10K MWCO）	赛多利斯公司
Novex 蛋白质标准物阶梯	生命技术公司（Life Technologies）
4%-12% Bis-Tris 凝胶	赛默公司
硝化纤维素膜	赛默公司

[0350]

PageBlue 蛋白质染色剂	赛默公司
Ultra TMB 印迹溶液	赛默公司
BCA 测定试剂盒	赛默公司
2 mg/ml BGG 标准物	赛默公司
Biosep s3000 aSEC 柱	飞诺美公司

[0351] 缩写

[0352] Ab 抗体

[0353] Ac 乙酰基

[0354] AON 反义寡核苷酸

[0355] ASO 反义寡核苷酸

[0356] BCA 二辛可宁酸

[0357] BGG 牛丙种球蛋白

[0358] aSEC 分析尺寸排阻色谱法

[0359] DAR 药物-抗体比

[0360] DBCO 二苯并环辛炔

[0361] DBCO-NHS 二苯并环辛炔-N-羟基琥珀酰亚胺酯

[0362] DCM 二氯甲烷

[0363] DIPEA N,N-二异丙基乙胺

[0364] DMEM 杜氏改良Eagle培养基

[0365] DMF N,N-二甲基甲酰胺

[0366] DMSO 二甲基亚砜

[0367] DPBS 杜氏磷酸盐缓冲盐水

[0368] DTME 二硫代双马来酰亚胺乙烷

[0369] DTNB 5,5′-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)

[0370] DTT 二硫代苏糖醇

[0371] EDTA 乙二胺四乙酸

[0372] EDCI.HCl 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐

[0373] EMCH.TFA N-(ε-马来酰亚胺基己酸)酰肼,三氟乙酸盐

[0374] Equiv. 当量

[0375] EtBr 溴化乙锭

[0376] FBS 胎牛血清

[0377] GalT 半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶

[0378] HATU 1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐

[0379] HRP 辣根过氧化物酶

[0380] IPA 异丙醇

[0381] LC-MS 液相色谱法-质谱法

[0382] LDS 十二烷基硫酸锂

[0383] LRMS 低分辨质谱法

[0384] NEM N-乙基马来酰亚胺

[0385] NHS N-羟基琥珀酰亚胺酯

[0386] mAb 单克隆抗体

[0387] min 分钟

[0388] MOPS 3-(吗啉-4-基)丙烷-1-磺酸

[0389] MPLC 中压液相色谱法

[0390] MWCO 截留分子量

[0391] NMM 4-甲基吗啉

[0392] PBS 磷酸盐缓冲盐水

[0393] PBS-T 磷酸盐缓冲盐水和Tween-20

[0394] PEG4-SPDP 2-吡啶基二硫醇-四氧杂十四烷-N-羟基琥珀酰亚胺

[0395] PMO 磷酰二胺吗啉代寡聚物

[0396] PDT 2-吡啶硫酮

[0397] rpm 转/分钟

[0398] RT 室温

[0399] r.t. 保留时间

[0400] SDS 十二烷基硫酸钠

[0401] SEC 尺寸排阻色谱法

[0402] SMCC 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯

[0403] TBEU (三-(羟甲基)-氨基甲烷)-硼酸盐-EDTA-脲

[0404] TBS Tris缓冲盐水

[0405] TCEP 三(2-羧基乙基)膦盐酸盐

[0406] TCO4-NHS 反式环辛烯-N-羟基琥珀酰亚胺

[0407] Temp 温度

[0408] TFA 三氟乙酸

[0409] THPP 三(羟丙基)膦

[0410] TMB 3,3',5,5'-四甲基联苯胺

[0411] TNBS 2,4,6-三硝基苯磺酸

[0412] Tris 三(羟甲基)氨基乙烷

[0413] UDP-GalNAz 尿苷二磷酸-N-叠氮基乙酰半乳糖胺

[0414] 方法(如在实例1-6中进行):

[0415] SO1861-马来酰亚胺、SO1861-NHS合成

[0416] SO1861是来自肥皂草(法国中草药公司和/或德国分析发现有限公司),并由Symeres公司(NL)根据本领域已知的方法偶联到对应的手柄。

[0417] SO1861与抗体和蛋白质的缀合

[0418] 由Fleet Bioprocessing公司(UK)进行IGF-1-SO1861、mCD71-SO1861和hCD71-SO1861的定制生产。

[0419] 5'-二硫酰胺-DMD-PMO、5'-硫醇-DMD-ASO和3'-二硫酰胺-M23D与抗体的缀合

[0420] 由Fleet Bioprocessing公司(UK)进行mCD71-M23D、mCD71-M23D-SO1861以及hCD71-DMD-ASO、hCD71-DMD-PMO、hCD71-DMD-ASO-SO1861和hCD71-DMD-PMO-SO1861的定制生产。

[0421] 分析和制备方法

[0422] LC-MS方法1

[0423] 设备:Waters IClass;二元泵:UPIBSM,SM:具有SO的UPISMFTN;UPCMA,PDA:UPPDATC,210-320nm,SQD:ACQ-SQD2 ESI,质量范围取决于产物的分子量:

[0424] 1500-2400或2000-3000范围内的阴或阴/阳;ELSD:气体压力40psi,漂移管temp:50℃;柱:Acquity C18,50×2.1mm,1.7μm温度:60℃,流速:0.6mL/min,取决于产物的极性的线性梯度:

[0425] $^{A}t_{0}$=2% A,$t_{5.0min}$=50% A,$t_{6.0min}$=98% A

[0426] $^{B}t_{0}$=2% A,$t_{5.0min}$=98% A,$t_{6.0min}$=98% A

[0427] 后运行时间:1.0min,洗脱剂A:乙腈,洗脱剂B:在水中的10mM碳酸氢铵(pH=9.5)。

[0428] LC-MS方法2

[0429] 设备:Waters IClass;二元泵:UPIBSM,SM:具有SO的UPISMFTN;UPCMA,PDA:UPPDATC,210-320nm,SQD:ACQ-SQD2 ESI,质量范围取决于产物的分子量:阳/阴100-800或阴2000-3000;ELSD:气体压力40psi,漂移管temp:50℃;柱:Waters XSelect™ CSH C18,50×2.1mm,2.5μm,温度:25℃,流速:0.5mL/min,梯度:t_{0min}=5% A,$t_{2.0min}$=98% A,$t_{2.7min}$=98% A,后运行时间:0.3min,洗脱剂A:乙腈,洗脱剂B:在水中的10mM碳酸氢铵(pH=9.5)。

[0430] LC-MS方法3

[0431] 设备:Waters IClass;二元泵:UPIBSM,SM:具有SO的UPISMFTN;UPCMA,PDA:UPPDATC,210-320nm,SQD:ACQ-SQD2 ESI,质量范围取决于产物的分子量阳/阴105-800、500-1200或1500-2500;ELSD:气体压力40psi,漂移管temp:50℃;柱:Waters XSelect™ CSH C18,50×2.1mm,2.5μm,温度:40℃,流速:0.5mL/min,梯度:t_{0min}=5% A,$t_{2.0min}$=98% A,$t_{2.7min}$=98% A,后运行时间:0.3min,洗脱剂A:在乙腈中的0.1%甲酸,洗脱剂B:在水中的0.1%甲酸。

[0432] LC-MS方法4

[0433] 设备:Waters IClass;二元泵:UPIBSM,SM:具有SO的UPISMFTN;UPCMA,PDA:UPPDATC,210-320nm,SQD:ACQ-SQD2 ESI,质量范围取决于产物的分子量:阳/阴100-800或阴2000-3000;ELSD:气体压力40psi,漂移管temp:50℃柱:沃特世Acquity Shield RP18,50×2.1mm,1.7μm温度:25℃,流速:0.5mL/min,梯度:t_{0min}=5% A,$t_{2.0min}$=98% A,$t_{2.7min}$=98% A,后运行时间:0.3min,洗脱剂A:乙腈,洗脱剂B:在水中的10mM碳酸氢铵(pH=9.5)。

[0434] 制备型MP-LC方法1

[0435] 仪器类型:Reveleris™制备型MPLC;柱:Waters XSelect™ CSH C18(145×25mm,10μm);流速:40mL/min;柱温:室温;洗脱剂A:在水中的10mM碳酸氢铵(pH=9.0);洗脱剂B:99%乙腈+在水中的1%10mM碳酸氢铵;梯度:

[0436] $^{A}t_{0min}$=5% B,t_{1min}=5% B,t_{2min}=10% B,t_{17min}=50% B,t_{18min}=100% B,t_{23min}=100% B

[0437] $^{A}t_{0min}$=5% B,t_{1min}=5% B,t_{2min}=20% B,t_{17min}=60% B,t_{18min}=100% B,t_{23min}

＝100％ B;检测UV:210、235、254nm和ELSD。

[0438] 制备型MP-LC方法2

[0439] 仪器类型:Reveleris™制备型MPLC;柱:Phenomenex LUNA C18(3)(150×25mm,10μm);流速:40mL/min;柱温:室温;洗脱剂A:在水中的0.1％(v/v)甲酸,洗脱剂B:在乙腈中的0.1％(v/v)甲酸;梯度:

[0440] $^{A}t_{0min}$＝5％ B,t_{1min}＝5％ B,t_{2min}＝20％ B,t_{17min}＝60％ B,t_{18min}＝100％ B,t_{23min}＝100％ B

[0441] $^{B}t_{0min}$＝2％ B,t_{1min}＝2％ B,t_{2min}＝2％ B,t_{17min}＝30％ B,t_{18min}＝100％ B,t_{23min}＝100％ B

[0442] $^{C}t_{0min}$＝5％ B,t_{1min}＝5％ B,t_{2min}＝10％ B,t_{17min}＝50％ B,t_{18min}＝100％ B,t_{23min}＝100％ B

[0443] $^{D}t_{0min}$＝5％ B,t_{1min}＝5％ B,t_{2min}＝5％ B,t_{17min}＝40％ B,t_{18min}＝100％ B,t_{23min}＝100％ B;检测UV:210、235、254nm和ELSD。

[0444] 制备型LC-MS方法3

[0445] MS仪器类型:Agilent Technologies G6130B Quadrupole;HPLC仪器类型:Agilent Technologies 1290制备型LC;柱:Waters XSelect™ CSH(C18,150×19mm,10μm);流速:25ml/min;柱温:室温;洗脱剂A:100％乙腈;洗脱剂B:在水中的10mM碳酸氢铵,pH＝9.0;梯度:

[0446] $^{A}t_{0}$＝20％ A,$t_{2.5min}$＝20％ A,t_{11min}＝60％ A,t_{13min}＝100％ A,t_{17min}＝100％ A

[0447] $^{B}t_{0}$＝5％ A,$t_{2.5min}$＝5％ A,t_{11min}＝40％ A,t_{13min}＝100％ A,t_{17min}＝100％ A;检测:DAD(210nm);检测:MSD(ESI pos/neg)质量范围:100-800;基于DAD的级分收集。

[0448] 制备型LC-MS方法4

[0449] MS仪器类型:Agilent Technologies G6130B Quadrupole;HPLC仪器类型:Agilent Technologies 1290制备型LC;柱:Waters XBridge Protein(C4,150×19mm,10μm);流速:25ml/min;柱温:室温;洗脱剂A:100％乙腈;洗脱剂B:在水中的10mM碳酸氢铵,pH＝9.0;梯度:

[0450] $^{A}t_{0}$＝2％ A,$t_{2.5min}$＝2％ A,t_{11min}＝30％ A,t_{13min}＝100％ A,t_{17min}＝100％ A

[0451] $^{B}t_{0}$＝10％ A,$t_{2.5min}$＝10％ A,t_{11min}＝50％ A,t_{13min}＝100％ A,t_{17min}＝100％ A

[0452] $^{C}t_{0}$＝5％ A,$t_{2.5min}$＝5％ A,t_{11min}＝40％ A,t_{13min}＝100％ A,t_{17min}＝100％ A;检测:DAD(210nm);检测:MSD(ESI pos/neg)质量范围:100-800;基于DAD的级分收集

[0453] 快速色谱法

[0454] Grace Reveleris X2™ C-815Flash;溶剂递送系统:具有自动启动功能的3活塞泵,4个独立通道,一次运行最多4种溶剂,当溶剂耗尽时自动切换管路;最大泵流速250mL/min;最大压力50巴(725psi);检测:UV 200-400nm,多达4个UV信号的组合和整个UV范围的扫描,ELSD;柱尺寸:在仪器上为4-330g,鲁尔型,750g至3000g,带可选支架。

[0455] UV-vis分光光度法

[0456] 使用Thermo Nanodrop 2000光谱仪或Perkin Elmer Lambda 365分光光度计和以下质量消光系数(EC)值确定浓度:

[0457] 对于SAMSA-荧光素,使用实验确定的摩尔ε495＝58,700M-1cm-1和Rz280:495＝

0.428。

[0458] M23D-SS-酰胺;质量EC265＝259,210M-1cm-1

[0459] 埃尔曼试剂(TNB);摩尔EC412＝14,150M-1cm-1

[0460] DMD-PMO;摩尔EC265＝318,050 135,027M-1cm-1

[0461] DMD-ASO;摩尔EC265＝310,000 252,512M-1cm-1

[0462] 2-吡啶硫酮(PDT);摩尔ε363＝8,080M-1cm-1

[0463] TNBS测定

[0464] 使用DPBS pH 7.5新制备甘氨酸标准物(0、2.5、5、10、15和20μg/ml)。通过将TNBS(40μl)和DPBS pH 7.5(9.96ml)合并来制备TNBS测定试剂。使用DI水制备10％w/v SDS。对于测定,将60μl的每个样品(一式一份)和标准物(一式三份)铺板。向每个孔中添加TNBS试剂(60μl),并且将板在37℃和600rpm下进行摇床孵育3小时。之后,添加50μl的10％ SDS和25μl的1M HCl,并在340nm处分析板。通过缀合物的赖氨酸浓度相对于未修饰蛋白质的耗竭来确定SO1861-脲-NHS掺入。

[0465] SEC

[0466] 使用Akta纯化器10系统和Biosep SEC-s3000柱通过SEC分析缀合物,用DPBS:IPA(85:15)洗脱。缀合物纯度通过缀合物峰相对于杂质/聚集体形式的积分来确定。

[0467] SDS-PAGE和蛋白质印迹

[0468] 使用4％-12％bis-tris凝胶和MOPS作为运行缓冲液(200V,约40分钟),在热变性非还原和还原条件下,通过SDS-PAGE针对蛋白阶梯分析天然蛋白和缀合物。将样品制备成0.5mg/ml,包含LDS样品缓冲液和作为稀释剂的MOPS运行缓冲液。对于还原样品,添加DTT至最终浓度为50mM。样品在90℃-95℃下热处理2分钟,并向每个孔中添加5μg(10μl)。蛋白阶梯(10μl)未经预处理即被加载。用1×LDS样品缓冲液(10μl)填充空列。凝胶运行之后,用DI水(100ml)伴随振荡(15分钟,200rpm)洗涤三次。通过将凝胶与PAGEBlue蛋白染色剂(30ml)进行摇床孵育(60分钟,200rpm)来进行考马斯染色。除去过量的染色溶液,用DI水(100ml)漂洗两次,并用DI水(100ml)脱色(60分钟,200rpm)。使用ImageJ(ImageJ(Rasband,W.S.,ImageJ,美国国立卫生研究院(U.S.National Institutes of Health),贝塞斯达,马里兰州,美国)和MyCurveFit(蛋白质阶梯的点对点相关性)对所得凝胶进行成像和处理。

[0469] 蛋白质印迹

[0470] 使用新制备的转移缓冲液,使用X-Cell印迹模块,在以下设置((-)BP-BP-FP-Gel-NC-BP-BP-BP(+))和条件(30V,60分钟)下,将凝胶从SDS-PAGE转移到硝化纤维素膜上。BP-印迹垫;FP-过滤垫;NC-硝化纤维素膜。在此之后,用PBS-T(100ml)在振荡(5分钟,200rpm)下将NC洗涤三次,用封闭缓冲液(50ml)在振荡(30分钟,200rpm)下封闭非特异性位点,然后用在封闭缓冲液中稀释的山羊抗人Kappa-HRP(1:2000)和山羊抗人IgG-HRP(1:2000)(50ml)的组合在振荡(30分钟,200rpm)下标记活性位点。在此之后,用PBS-T(100ml)在振荡(5分钟,200rpm)下将NC洗涤一次,并用新制备的、新过滤的CN/DAB底物(25ml)检测复合抗体。目视观察显色,并且在2分钟之后通过用水洗涤NC停止显色,并拍摄所得的印迹。

[0471] TBEU-PAGE

[0472] 在热变性非还原条件下,使用15％ TBE-脲凝胶和TBE作为运行缓冲液(180V,约60分钟),通过TBE-脲PAGE针对寡聚物阶梯分析寡核苷酸缀合物和寡核苷酸标准物。分别将样

品制备至0.5mg/ml并将标准物制备至50至5μg/ml,均包含TBE脲样品缓冲液和作为稀释剂的纯化H_2O。将样品和标准物在70℃下热处理3分钟,并向每个孔中添加10μl,相当于每个泳道5μg的蛋白质和缀合物样品以及0.5/0.2/0.1/0.5μg(DMD-ASO)或0.2/0.1/0.05μg(DMD-PMO)。在TE pH 7.5(2μl)中重构至0.1μg/条带/ml的寡聚物阶梯未经预处理即被加载。在凝胶运行之后,用新制备的溴化乙锭溶液(1μg/ml)在振荡(40分钟,200rpm)下将其染色。所得凝胶通过UV落射照明(254nm)进行可视化,使用ImageJ进行成像和处理(Rasband,W.S.,ImageJ,美国国立卫生研究院(U.S.National Institutes of Health),贝塞斯达,马里兰州,美国)。

[0473] mCD71-M23D

[0474] 将mCD71的等分试样(42.9mg,4.20ml)缓冲液交换到DPBS pH 7.5中并归一化至2.5mg/ml。向mCD71的等分试样(34.4mg,0.23μmol,2.53mg/ml)中添加新制备的SMCC溶液的等分试样(2.0mg/ml,3.53摩尔当量,0.81μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育60分钟。在孵育之后,通过添加新制备的甘氨酸溶液的等分试样(2.0mg/ml,约20摩尔当量,4.05μmol)来使反应淬灭,将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育>15分钟。将缀合物通过Superdex 200柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱并通过UV-vis分析,以得到纯化的mCD71-SMCC(31.7mg,产率:96%,0.942mg/ml,SMCC与mCD71的比率=2.1)。

[0475] 单独地,向使用TBS pH 7.5重构的M23D-SS-酰胺的等分试样(17.2mg,1.99μmol,10.0mg/ml)中添加新制备的THPP溶液的等分试样(50mg/ml,10摩尔当量,19.9μmol,82.8μl),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃下孵育60分钟。在孵育之后,将寡聚物通过PD10 Sephadex G25M柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,以得到M23D-SH(14.8mg,产率:86%,硫醇与M23D的比率=0.98)。

[0476] 向mCD71-SMCC的等分试样(31.7mg,0.21μmol,0.942mg/ml)中添加M23D-SH的等分试样(4.122mg/ml,4.0摩尔当量,0.85μmol,1.771ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育。在大约72小时之后,将缀合物混合物浓缩并通过Superdex 200PG柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的mCD71-M23D缀合物。通过BCA比色测定对等分试样进行分析,并为缀合物指定新的EC值,然后浓缩并归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成用于表征的等分试样和用于产物测试的等分试样。结果是mCD71-M23D缀合物(总产量=25.7mg,73%,M23D与mCD71的比率=1.2)。

[0477] mCD71-SO1861

[0478] 为了生成mCD71-SO1861,已经使用SO1861-SC-马来酰亚胺或SO1861-EMCH来生成两种不同的mCD71-SO1861缀合物。该程序是针对mCD71与SO1861-EMCH之间的缀合描述的示例性程序。

[0479] 将等分试样mCD71(55.1mg,0.37μmol,8.10mg/ml,6.80ml)用DPBS pH 7.5归一化至5mg/ml,然后添加30μl/ml(330μl)预混合的Tris/Tris.HCl/EDTA浓缩物,该浓缩物包含以1:1:1v/v合并的Tris浓缩物(127mg/ml,1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml、3.95M)和EDTA.2Na.$2H_2O$浓缩物(95mg/ml,0.26M),以得到50mM TBS、2.5mM EDTA缓冲液pH约7.5。向mCD71(50mg,0.33μmol,5.044mg/ml)中添加新制备的TCEP溶液的等分试样(2.00mg/ml,2.74摩尔当量,0.912μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育210分钟。在孵育之后(在添加SO1861-EMCH之前),将mCD71-SH分配用于多个缀合,并且取出1.0mg

(0.201ml)等分式样并使用Zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化到TBS pH 7.5中。此等分试样通过UV-vis分析和Ellman测定(3.248mg/ml,硫醇与mCD71的比率＝3.97)进行表征。向mCD71-SH的等分式样(42mg,0.28μmol,4.978mg/ml)中添加新制备的SO1861-EMCH溶液的等分式样(2.0mg/ml,8摩尔当量,2.24μmol,2.32ml),将混合物短暂涡旋,然后在20℃下孵育120分钟。除缀合反应外,将脱盐mCD71-SH的两个等分式样(0.25mg,0.077ml,1.67nmol)与NEM(8.00当量,134nmol,6.7μl的0.25mg/ml溶液)或TBS pH 7.5缓冲液(6.7μl)在20℃下反应120分钟,分别作为阳性和阴性对照。在孵育之后,取出大约0.4mg mCD71-SO8161混合物的等分式样,使用Zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化到TBS pH 7.5中,并通过Ellman测定以及阳性对照和阴性对照表征,以获得SO1861掺入。向mCD71-SO1861主体混合物中添加新制备的NEM溶液的等分式样(5摩尔当量,1.40μmol,70.1μl的2.5mg/ml溶液)以淬灭反应。将缀合物通过Superdex 200柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的mCD71-SO1861缀合物。将产物浓缩,然后归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成等分式样以进行表征、产物测试和进一步缀合。结果是mCD71-SO1861缀合物(总产量＝37.3mg,89％,SO1861与mCD71的比率＝3.8)。

[0480] IGF-1-SO1861

[0481] 将IGF-1(4mg)溶解在DPBS pH 7.5(1.60ml)中。向IGF-1(3.88mg,0.51μmol,4.821mg/ml)中添加新制备的SO1861-脲-NHS溶液的等分式样(2.0mg/ml,5摩尔当量,2.53μmol,3.80ml),将混合物短暂涡旋,然后在20℃下孵育60分钟。在缀合之后,添加新制备的甘氨酸溶液的等分式样(25当量,13μmol,95μl的10mg/ml溶液),然后将缀合物通过Zeba 10ml 7K MWCO旋转脱盐柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的IGF-1-SO1861缀合物。通过BCA比色测定对等分试样进行分析以确定新的EC值,然后通过离心过滤(3,000g,20℃,10分钟间隔)浓缩,归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,并分配成等分试样,以进行表征和定制测试。结果是IGF-1-SO1861缀合物(总产量＝2.83mg,73％,SO1861与IGF-1的比率＝2.7)。

[0482] mCD71-M23D-SO1861

[0483] 向具有DAR3.8的mCD71-SO1861的等分试样(20mg,0.126μmol,2.53mg/ml)中添加新制备的SMCC溶液的等分试样(2.0mg/ml,3.53摩尔当量,0.447μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育60分钟。在孵育之后,通过添加新制备的甘氨酸溶液的等分试样(2.0mg/ml,约20摩尔当量,2.5μmol)来使反应淬灭,将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育>15分钟。将缀合物通过Superdex200柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱并通过UV-vis分析,以得到纯化的mCD71-SO1861-SMCC(18.6mg,产率:93％,0.942mg/ml,SMCC与mCD71的比率＝2.6)。

[0484] 单独地,向使用TBS pH 7.5重构的M23D-SS-酰胺的等分试样(17.2mg,1.99μmol,10.0mg/ml)中添加新制备的THPP溶液的等分试样(50mg/ml,10摩尔当量,19.9μmol,82.8μl),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃下孵育60分钟。在孵育之后,将寡聚物通过PD10 Sephadex G25M柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,以得到M23D-SH(14.8mg,产率:86％,硫醇与M23D的比率＝0.98)。

[0485] 向mCD71-SO1861-SMCC的等分试样(17.2mg,0.11μmol,0.95mg/ml)中添加M23D-SH的等分试样(4.1mg/ml,4.0摩尔当量,0.44μmol,0.86ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育。在大约72小时之后,将缀合物混合物浓缩并通过Superdex 200PG柱纯化,

用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的mCD71-SO1861-M23D缀合物。通过BCA比色测定对等分试样进行分析,并为缀合物指定新的EC值,然后浓缩并归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成用于表征的等分试样和用于产物测试的等分试样。结果是mCD71-SO1861-M23D缀合物(总产量=15.2mg,79%,M23D与mCD71-SO1861的比率=1.6)。

[0486] hCD71-DMD-ASO

[0487] 将hCD71的等分试样(60mg,4.20ml)缓冲液交换到DPBS pH 7.5中并归一化至2.5mg/ml。向hCD71的等分试样(58mg,0.38μmol,2.53mg/ml)中添加新制备的PEG4-SPDP溶液的等分试样(10mg/ml,10摩尔当量,3.8μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育60分钟。在孵育之后,通过添加新制备的甘氨酸溶液的等分试样(2.0mg/ml,50摩尔当量,19μmol)来使反应淬灭,将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育>15分钟。将缀合物通过Zeba 40K旋转脱盐柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱并通过UV-vis分析,以得到纯化的hCD71-PEG4-SPDP(51.3mg,产率:88%,0.95mg/ml,PEG4-SPDP与hCD71的比率=4.5)。

[0488] 单独地,向使用TBS pH 7.5重构的DMD-ASO-SH的等分试样(14.4mg,2μmol,10.0mg/ml)中添加新制备的THPP溶液的等分试样(50mg/ml,10摩尔当量,20μmol,82.8μl),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃下孵育60分钟。在孵育之后,将寡聚物通过PD10 Sephadex G25M柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,以得到还原的DMD-ASO-SH(13.2mg,产率:92%,硫醇与DMD-ASO的比率=0.91)。

[0489] 向hCD71-PEG4-SPDP的等分试样(25mg,0.16μmol,0.95mg/ml)中添加DMD-ASO-SH的等分试样(4mg/ml,4.0摩尔当量,0.65μmol,1.17ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育。通过PDT置换测量反应进展。在16小时之后,将缀合物混合物浓缩并通过Superdex 200PG柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的hCD71-DMD-ASO缀合物。通过BCA比色测定对等分试样进行分析,并为缀合物指定新的EC值,然后浓缩并归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成用于表征的等分试样和用于产物测试的等分试样。结果是hCD71-DMD-ASO缀合物(总产量=23.1mg,82%,DMD-ASO与hCD71的比率=3.5)。在第二合成中,用与所述相同的方法合成hCD71-DMD-ASO缀合物,并且DMD-ASO与hCD71的比率=2.1。

[0490] hCD71-DMD-PMO

[0491] 将hCD71的等分试样(60mg,4.20ml)缓冲液交换到DPBS pH 7.5中并归一化至2.5mg/ml。向hCD71的等分试样(58mg,0.38μmol,2.53mg/ml)中添加新制备的PEG4-SPDP溶液的等分试样(10mg/ml,10摩尔当量,3.8μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育60分钟。在孵育之后,通过添加新制备的甘氨酸溶液的等分试样(2.0mg/ml,50摩尔当量,19μmol)来使反应淬灭,将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育>15分钟。将缀合物通过Zeba 40K旋转脱盐柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱并通过UV-vis分析,以得到纯化的hCD71-PEG4-SPDP(51.3mg,产率:88%,0.95mg/ml,PEG4-SPDP与hCD71的比率=4.1)。

[0492] 单独地,向使用TBS pH 7.5重构的DMD-PMO-SS-酰胺的等分试样(20.2mg,2μmol,10.0mg/ml)中添加新制备的THPP溶液的等分试样(50mg/ml,10摩尔当量,20μmol,82.8μl),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃下孵育60分钟。在孵育之后,将寡聚物通过PD10 Sephadex G25M柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,以得到DMD-PMO-SH(16.4mg,产率:81%,硫醇与DMD-PMO的比率=0.97)。

[0493] 向hCD71-PEG4-SPDP的等分试样(25mg,0.16μmol,0.95mg/ml)中添加DMD-PMO-SH

的等分试样(4.1mg/ml,4.0摩尔当量,0.65μmol,1.59ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育。通过PDT置换测量反应进展。在大约16小时之后,将缀合物混合物浓缩并通过Superdex 200PG柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的hCD71-DMD-PMO缀合物。通过BCA比色测定对等分试样进行分析,并为缀合物指定新的EC值,然后浓缩并归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成用于表征的等分试样和用于产物测试的等分试样。结果是hCD71-DMD-PMO缀合物(总产量=28.2mg,92%,DMD-PMO与hCD71的比率=3.9)。在第二合成中,用相同的方法合成hCD71-DMD-PMO缀合物,并且DMD-PMO与hCD71的比率=3.2。

[0494] hCD71-SO1861

[0495] 使用Zeba旋转脱盐柱用TBS pH 7.5洗脱对所提供的hCD71(55.1mg,0.37μmol,8.10mg/ml,6.80ml)进行缓冲液交换,并归一化至3mg/ml。向hCD71(50mg,0.33μmol,5.044mg/ml)中添加新制备的TCEP溶液的等分试样(2.00mg/ml,3摩尔当量,1μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育210分钟。在孵育之后(在添加SO1861-SC-马来酰亚胺之前),取出1.0mg(0.201ml)的hCD71溶液的等分式样,并使用Zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化到TBS pH 7.5中。此等分试样通过UV-vis分析和Ellman测定(2.23mg/ml,硫醇与hCD71的比率=4.35)进行表征。向主体hCD71-SH的等分式样(42mg,0.28μmol,4.978mg/ml)中添加新制备的SO1861-SC-马来酰亚胺溶液的等分式样(2.0mg/ml,8摩尔当量,2.24μmol,2.32ml),将混合物短暂涡旋,然后在20℃下孵育120分钟。除缀合反应外,将脱盐hCD71-SH的两个等分式样(0.25mg,0.077ml,1.67nmol)与NEM(8.00当量,13.4nmol,6.7μl的0.25mg/ml溶液)或TBS pH 7.5缓冲液(6.7μl)在20℃下反应120分钟,分别作为阳性和阴性对照。在孵育之后,取出大约0.4mg hCD71-SO8161混合物的等分式样,使用Zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化到TBS pH 7.5中,并通过Ellman测定以及阳性对照和阴性对照表征,以获得SO1861掺入。向hCD71-SO1861主体混合物中添加新制备的NEM溶液的等分式样(5摩尔当量,1.4μmol的2.5mg/ml溶液)以淬灭反应。将缀合物通过Zeba 40K MWCO旋转脱盐柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,得到纯化的hCD71-SO1861缀合物。通过BCA比色测定分析产物的等分式样,以确定新的EC280值。然后将产物归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成等分式样以进行表征、产物测试和进一步缀合。结果是hCD71-SO1861缀合物(总产量=37.8mg,89%,SO1861与hCD71的比率=4.2)。

[0496] hCD71-DMD-PMO-SO1861

[0497] 向在DPBS pH 7.5中的具有DAR 4.2的hCD71-SO1861的等分试样(20mg,0.128μmol,2.53mg/ml)中添加新制备的PEG4-SPDP溶液的等分试样(10mg/ml,10摩尔当量,1.28μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育60分钟。在孵育之后,通过添加新制备的甘氨酸溶液的等分试样(2.0mg/ml,50摩尔当量,6.4μmol)来使反应淬灭,将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育>15分钟。将缀合物通过Zeba 40K旋转脱盐柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱并通过UV-vis分析,以得到纯化的hCD71-SO1861-PEG4-SPDP(17.2mg,产率:84%,0.93mg/ml,PEG4-SPDP与hCD71的比率=3.7)。

[0498] 单独地,向使用TBS pH 7.5重构的DMD-PMO-SS-酰胺的等分试样(20.2mg,2μmol,10.0mg/ml)中添加新制备的THPP溶液的等分试样(50mg/ml,10摩尔当量,20μmol,82.8μl),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃下孵育60分钟。在孵育之后,将寡聚物通过PD10 Sephadex G25M柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,以得到DMD-PMO-SH(16.4mg,产率:81%,硫醇与

DMD-PMO的比率＝0.97)。

[0499] 向hCD71-SO1861-PEG4-SPDP的等分试样(15mg,95nmol,0.98mg/ml)中添加DMD-PMO-SH的等分试样(4mg/ml,4.0摩尔当量,0.38μmol,0.95ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育。在72小时之后,将缀合物混合物浓缩并通过Superdex 200PG柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的hCD71-DMD-PMO-SO1861缀合物。通过BCA比色测定对等分试样进行分析,并为缀合物指定新的EC值,然后浓缩并归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成用于表征的等分试样和用于产物测试的等分试样。结果是hCD71-DMD-PMO-SO1861缀合物(总产量＝11.8mg,49％,DMD-PMO与hCD71-SO1861的比率＝2.6)。

[0500] hCD71-DMD-ASO-SO1861

[0501] 向在DPBS pH 7.5中的具有DAR 4.2的hCD71-SO1861的等分试样(20mg,0.128μmol,2.53mg/ml)中添加新制备的PEG4-SPDP溶液的等分试样(10mg/ml,10摩尔当量,1.28μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育60分钟。在孵育之后,通过添加新制备的甘氨酸溶液的等分试样(2.0mg/ml,50摩尔当量,6.4μmol)来使反应淬灭,将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育>15分钟。将缀合物通过Zeba 40K旋转脱盐柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱并通过UV-vis分析,以得到纯化的hCD71-SO1861-PEG4-SPDP(17.2mg,产率:84％,0.93mg/ml,PEG4-SPDP与hCD71的比率＝3.7)。

[0502] 单独地,向使用TBS pH 7.5重构的DMD-ASO-SH的等分试样(14.4mg,2μmol,10.0mg/ml)中添加新制备的THPP溶液的等分试样(50mg/ml,10摩尔当量,20μmol,82.8μl),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃下孵育60分钟。在孵育之后,将寡聚物通过PD10 Sephadex G25M柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,以得到还原的DMD-ASO-SH(13.2mg,产率:92％,硫醇与DMD-ASO的比率＝0.91)。

[0503] 向hCD71-SO1861-PEG4-SPDP的等分试样(15mg,95nmol,0.98mg/ml)中添加DMD-ASO-SH的等分试样(4mg/ml,4.0摩尔当量,0.38μmol,0.68ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育。在72小时之后,将缀合物混合物浓缩并通过Superdex 200PG柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的hCD71-DMD-ASO-SO1861缀合物。通过BCA比色测定对等分试样进行分析,并为缀合物指定新的EC值,然后浓缩并归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成用于表征的等分试样和用于产物测试的等分试样。结果是hCD71-DMD-ASO-SO1861缀合物(总产量＝14.3mg,84％,DMD-ASO与hCD71-SO1861的比率＝2.1)。

[0504] 细胞培养(人类)

[0505] 将来自非DMD供体(KM155)的人永生成肌细胞和来自受DMD影响的供体(DM8036)的成肌细胞在骨骼肌细胞生长培养基(PromoCell,德国)中培养,该培养基根据制造商的说明书具有补充包,进一步补充有15％胎牛血清(Gibco公司,英国)和0.5％庆大霉素(西格玛奥德里奇公司,美国)。为了分化,将细胞接种在0.5％明胶包被的表面上,并且在约70％-80％汇合度下,用补充有2％ FBS(Gibco公司)、2％GlutaMAX和1％葡萄糖(西格玛奥德里奇公司)和0.5％庆大霉素的DMEM(Gibco公司)替换增殖培养基。在分化至少3天至最多5天(基于分化的肌管的存在)之后开始处理。

[0506] 细胞培养和体外实验(鼠)

[0507] 将鼠成肌细胞系C2C12维持在10％ FBSDMEM培养基+Pen/Strep中,并在24孔板中以240,000个细胞/孔(cpw)或在96孔板(wp)中以40,000cpw在维持培养基(在DMEM培养基中

的10％ FBS+Pen/Strep)进行铺板,并在37℃和5％ CO_2下孵育。在接种之后24小时,将细胞切换到分化培养基(在DMEM中的2％马血清)中并孵育3天,然后更新培养基。再过24小时之后,再次更新培养基,并且添加化合物并孵育48小时。然后更新分化培养基(不含化合物),并且将细胞再孵育24小时。在处理后总计72小时,收获24-wp中的细胞进行外显子跳跃分析,并在96-wp上评估细胞活力。

[0508] 外显子跳跃分析和定量(人类)

[0509] 用TRIsure分离试剂(Bioline公司)和氯仿提取分离RNA;如本领域技术人员所知,进行RNA从水相的异丙醇沉淀。对于cDNA合成,使用1000ng的总RNA并在适量的不含RNase的水中稀释,以得到8μl RNA稀释液。引发预混物含有1μl dNTP混合物(各10mM)和1μl特异性反向引物(对于KM155,h53R 5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'[SEQ ID NO:5];对于DM8036,h55R5'-ATCCTGTAGGACATTGGCAGTT-3'[SEQ ID NO:6])。将此混合物在70℃下加热5min,然后在冰上冷却至少1min。制备含有0.5μl rRNasin(普洛麦格公司(Promega))、4.0μl RT缓冲液、1.0μl Tetro RT(Bioline公司)和4.5μl不含RNase的水的反应混合物,并将其添加到冷却的混合物中,每个反应产生20μl的总体积。RT-PCR在42℃下运行60min,然后在85℃下运行5min,并在冰上冷却。对于跳跃分析,遵循巢式PCR方法。为此,在第一PCR中,将3μl cDNA添加到2.5μl 10x SuperTaq PCR缓冲液、0.5μl dNTP混合物(各10mM)、0.125μl Taq DNA聚合酶TAQ-RO(5U/μl;罗氏公司(Roche))、16.875μl不含RNase的水和1μl(10pmol/μl)靶向外显子侧翼的每种引物的混合物中:对于KM155,h48F 5'-AAAAGACCTTGGGCAGCTTG-3'[SEQ ID NO:7]和h53R 5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'[SEQ ID NO:5];对于DM8036,h47F2 5'-TGAAACTGGAGGACCCGTG-3'[SEQ ID NO:8]和h54R5'-CCAAGAGGCATTGATATTCTC-3'[SEQ ID NO:9]。将这些样品经受PCR运行,在94℃下5min,然后在94℃下40sec、在60℃下40sec、在72℃下180sec进行25个循环,之后在72℃下进行7min。对于第二PCR,将1.5μl PCR1样品添加到5μl 10x SuperTaq PCR缓冲液、1μl dNTP混合物(各10mM)、0.25μl Taq DNA聚合酶TAQ-RO(5U/μl;罗氏公司)、38.25μl不含RNase的水和2μl(10pmol/μl)靶向外显子侧翼的每种引物的混合物中:对于KM155,h49F 5'-CCAGCCACTCAGCCAGTG-3'[SEQ ID NO:10]和h52R2 5'-TTCTTCCAACTGGGGACGC-3'[SEQ ID NO:11];对于DM8036,h47F5'-CCCATAAGCCCAGAAGAGC-3'[SEQ ID NO:12]和h53R 5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'[SEQ ID NO:13]。将这些样品经受PCR运行,在94℃下5min,然后在94℃下40sec、在60℃下40sec、在72℃下60sec进行32个循环,之后在72℃下进行7min。根据制造商的说明书,使用超灵敏NGS试剂盒(安捷伦公司(Agilent))用Femto Pulse系统对外显子跳跃水平进行定量。可替代地,使用具有DNA1000芯片的生物分析仪2100(芯片实验室;安捷伦公司)分析特异性PCR片段,或在120V下运行的2％琼脂糖凝胶上分离。对凝胶进行成像并使用ImageJ定量条带强度。预期的非跳跃产物分别具有408bp(KM155)和475bp(DM8036)的大小,并且跳跃产物分别具有175bp(KM155)或242bp(DM8036)的大小。

[0510] 外显子跳跃分析和定量(鼠体外和体内)

[0511] 为了分析鼠细胞系的跳跃,收获细胞并根据制造商的说明书使用0.5ml TRIzol™试剂(赛默飞世尔公司)对每个样品分离RNA。为了分析组织,首先将30-50mg冷冻组织切成小块,并且根据制造商的说明书使用TRIzol™试剂(赛默飞世尔公司)和TissueLyser LT(凯杰公司(Qiagen))分离mRNA。对于每个样品的cDNA合成,向5.0μl中的0.5μg RNA中添加10.0

μl ddH_2O、4.0μl 5x iScript™反应混合物和1.0μliScript™逆转录酶(伯乐公司),以产生20.0μl的总体积/反应。RT-PCR在25℃下运行5min,在46℃下运行60min,并且在95℃下运行2min。对于跳跃分析,根据制造商的说明书使用SapphireAmp™ Fast PCR主混合物(宝生物工程株式会社(TakaraBio))。为此,将9.7μl不含RNAse的水、12.5μl的2x主混合物、0.4μl的10μM FW引物5'-ACCCAGTCTACCACCCTATC-3'[SEQ ID NO:14]和0.4μl的10μM RV引物5'-CTCTTTATCTTCTGCCCACCTT-3'[SEQ ID NO:15]添加到PCR管中,混合,之后添加2μl cDNA(50ng)以产生25μl的总体积。将这些样品经受PCR运行,在94℃下1min,在98℃下5sec、在55℃下5sec、在72℃下5sec进行35个循环,接着在72℃下进行1min。将样品与2μl 6x上样缓冲液混合,然后将16μl加载到2%琼脂糖凝胶上,并在80V下运行60-90min。对凝胶进行成像并且用ChemiDoc™XRS+系统和Image Lab™软件(伯乐公司)定量条带强度。对应地,预期的非跳跃产物具有788bp的大小,并且跳跃产物具有575bp的大小。

[0512] 细胞活力(鼠体外)

[0513] 在处理之后,根据制造商的说明书(普洛麦格公司),用CellTiter-Glo®2.0测定确定细胞活力。在SpectraMax ID5板读取器(分子仪器公司(Molecular Devices))上测量发光信号。为了定量,将'仅培养基'孔的背景信号从所有其他孔中减去,然后通过将经处理的孔的背景校正信号除以未处理的孔的背景校正信号(x 100)计算经处理/未处理细胞的细胞活力百分比。

[0514] 体内研究

[0515] 向每组9只雄性CD-1小鼠(给药时年龄为6-7周)静脉内(iv)给予表A2中列出的化合物或媒介物的单次注射。在第2组和第3组中,将剂量归一化以获得类似的PMO剂量,从而进行功效比较。在治疗时间段期间,定期对动物称重(在给药前一天,并且在给药后每周两次),并记录任何临床观察结果。分别在第4天、第14天和第28天,每组处死3只小鼠,并且收获末期出血和来自不同组织和器官的样品进行分析。制备血清并分析ALT(AU480,贝克曼库尔特公司(Beckman-Coulter))和肌酐水平(比色法,贝克曼库尔特公司)。将组织保存在RNALater中,并快速冷冻直至进行分析。在心脏、膈膜和腓肠肌样品中,确定抗肌萎缩蛋白跳跃水平。

[0516] 表A2:给药组的体内功效和耐受性

[0517]

组	化合物名称	动物#	总化合物	总剂量中的相对
			[mg/kg]	PMO 量[mg/kg]

[0518]

1	媒介物 (PBS)	9	0.0	N/A
2	mCD71-M23D (DAR1.2)	9	44.0	2.80
3	mCD71-M23D-SO1861 (DAR1.6)	9	36.6	2.91
4	mCD71-M23D-SO1861 (DAR1.6)	9	5.2	0.42
5	mCD71-M23D-SO1861 (DAR1.6)	9	1.8	0.15

[0519] 结果(实例1-6)

[0520] 实例1.DMD-PMO+SO1861和DMD-ASO+SO1861

[0521] 在衍生自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管中评估DMD-ASO(诱导人抗肌萎缩蛋白的51号外显子跳跃并且具有与曲萨珀森相同的序列和化学修饰的2'O-甲基-硫代磷酸酯反义寡核苷酸)和DMD-PMO(诱导人抗肌萎缩蛋白的51号外显子跳跃并且具有与依特立生相同的序列但没有5'-修饰的磷酰二胺吗啉代寡聚物反义寡核苷酸)与内体逃逸增强剂SO1861-EMCH(4μM)的组合的外显子跳跃活性。意外地,这揭示了在72小时之后仅与SO1861组合时51号外显子的外显子跳跃强烈增强(表A3):虽然单独的暴露于20μM DMD-ASO没有显示出跳跃活性,但是0.08μM DMD-ASO+SO1861-EMCH已经揭示了40%的外显子跳跃,从而指示改善系数超过250倍(图1A)。同样地,暴露于20μM DMD-PMO产生4%跳跃,而1.25μMDMD-ASO+SO1861-EMCH已经实现了5%跳跃且在20μM下实现34%跳跃,从而指示在非靶向SO1861-EMCH的情况下对非靶向寡聚物的效力增加了16倍(图1B)。

[0522] 总而言之,SO1861-EMCH的共施用强烈增强了DMD-ASO和DMD-PMO的中靶递送,并且在与不存在SO1861-EMCH的条件相比低一到两个数量级的暴露浓度下诱导明显的51号外显子跳跃。

[0523] 表A3:人类肌管(KM155)中在具有和没有SO1861-EMCH共施用的情况下MD寡聚物的跳跃功效

[0524]

%外显子跳跃		DMD 寡聚物浓度				
		20 μM	5 μM	1.25 μM	0.31 μM	0.08 μM

[0525]

(芯片实验室或 Femto 分析)						
DMD-ASO	芯片实验室	1%	1%	0%	0%	0%
DMD-ASO + SO1861-EMCH	芯片实验室	52%	61%	67%	53%	40%
DMD-PMO	Femto	4%	0%	0%	0%	0%
DMD-PMO + SO1861-EMCH	Femto	34%	19%	5%	0%	0%

[0526] 实例2.hCD71-DMD-ASO+SO1861-EMCH或hCD71-DMD-PMO+SO1861-EMCH或mCD71-M23D+SO1861-EMCH

[0527] 如图2B和图2C所示,分别将DMD-ASO-SH和DMD-PMO-SH与PEG4-SPDP修饰的人抗CD71单克隆抗体(hCD71-PEG4-SPDP,图2A)缀合以产生:hCD71-DMD-ASO(DAR2.1)和hCD71-DMD-PMO(DAR3.2)。在来自非DMD供体(KM155)和受DMD影响的供体(DM8036)的分化人类肌管上在没有4μMSO1861-EMCH或与其组合的情况下针对增强的细胞质DMD寡聚物递送和增强的抗肌萎缩蛋白51号外显子跳跃测试所得的化合物。这揭示了与4μM SO1861-EMCH组合时在处理72小时之后在与单独的hCD71-DMD-ASO和单独的hCD71-DMD-PMO相比明显更低的浓度下51号外显子的增强外显子跳跃(表A4和A5):hCD71-DMD-ASO在2181nM下在KM155中产生低跳跃(3%)(图3A,左分图),这与非靶向DMD-ASO相比有所改善(表A3),而hCD71-DMD-ASO+SO1861已经在18.2-109nM下在KM155中将跳跃进一步增加至18%-24%(图3A,右分图)。同样地,hCD71-DMD-PMO在2022nM下在KM155中没有产生跳跃(0%)(图3B,左分图),而在添加SO1861-EMCH的情况下,外显子跳跃在2.8-16.9nM hCD71-DMD-PMO的浓度下是可见的(图

3B,右分图)。更重要地,在来自受DMD影响的供体(DM8036)的分化肌管中,在363nM hCD71-DMD-ASO下仅观察到17%的51号外显子跳跃(图4A,左分图),而意外地,0.50nM hCD71-DMD-ASO+4μMSO1861-EMCH的720倍更低浓度已经产生了相当的跳跃(15%)。在hCD71-DMD-ASO的仅18.2-109nM暴露浓度下,跳跃效率明显地增加至高达64%-68%(图4A,右分图)。同样地,仍然在DM8036肌管中,单独的hCD71-DMD-PMO在337nM下达到21%跳跃(图4B,左分图),而0.08-0.47nM hCD71-DMD-PMO+4μM SO1861-EMCH的暴露浓度已经产生了明显可测量的跳跃(7%-13%),其在101nM下增加至高达33%(图4B,右分图),实现了一到两个数量级的提高。

[0528] 综合考虑,这表明SO1861-EMCH与靶向寡核苷酸hCD71-DMD-ASO和hCD71-DMD-PMO的共施用明显改善了中靶细胞质递送,尤其是在相关细胞系统,诸如来自受DMD影响的供体的分化肌管中。

[0529] 表A4:人类肌管中抗CD71缀合的DMD寡聚物的跳跃功效(DMD-ASO-缀合物的最高浓度,DMD-PMO-缀合物的最低浓度)

[0530]

%外显子跳跃 (Femto 分析)	[nM 缀合物]						
	2181/ 2022	363/ 337	61/ 56	10.1/ 9.4	1.68/1.5 6	0.28/ 0.26	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.1)(KM155)	3	0	0	0	0	0	% DMD 51 号外显子跳跃
hCD71-DMD-PMO (DAR3.2)(KM155)	0	0	0	0	0	0	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.1)(DM8036)	24	17	0	0	0	0	
hCD71-DMD-PMO (DAR3.2)(DM8036)	45	21	0	0	0	0	

[0531] 表A5:人类肌管中抗CD71缀合的DMD寡聚物与SO1861-EMCH共施用的跳跃功效(DMD-ASO-缀合物的最高浓度,DMD-PMO-缀合物的最低浓度)

[0532]

%外显子跳跃 (Femto 分析)	[nM 缀合物]						
	109/ 101	18.2/16. 9	3.0/2.8	0.50/0.4 7	0.084/ 0.078	0.014/0. 013	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.1) + SO1861-EMCH (KM155)	18	24	0	0	0	0	% DMD 51 号外显子跳跃
hCD71-DMD-PMO (DAR3.2) + SO1861-EMCH (KM155)	0	3	2	0	0	0	
hCD71-DMD-ASO (DAR2.1) +	64	68	62	15	1	0	

[0533]

SO1861-EMCH（DM8036）						
hCD71-DMD-PMO（DAR3.2）+ SO1861-EMCH（DM8036）	33	34	15	13	7	0

[0534] 接下来,将M23D-SS-酰胺(诱导小鼠抗肌萎缩蛋白的23号外显子跳跃的磷酰二胺吗啉代寡聚物反义寡核苷酸)与靶向用SMCC接头修饰的鼠CD71(mCD71-SMCC,图2D)的抗CD71单克隆抗体缀合,以产生mCD71-M23D(DAR1.2)(图2E)。在分化C2C12肌管上测试mCD71-M23D+8μM SO1861-SC-Mal的共施用,并且这揭示了在与SO1861-SC-Mal组合时在低了至少一个数量级的mCD71-M23D浓度下外显子跳跃强烈地增强(清晰条带,直至27nM,图5,右分图),而单独的mCD71-M23D在高达433nM的所有测试浓度下都没有显示出活性(图5,左分图)。

[0535] 这表明,SO1861化合物的共施用在物种间是广泛适用的,有效地增加具有不同靶向序列(不同外显子、不同序列)的靶向PMO的效力。

[0536] 实例3.mCD71-SO1861+M23D或IGF-1-SO1861+M23D

[0537] 分别将SO1861-EMCH或SO1861-SC-马来酰亚胺(图6A)与靶向鼠CD71的TCEP处理的抗CD71单克隆抗体(mCD71-SH,图6B)缀合,以产生mCD71-SO1861(DAR3.8)的两种不同缀合物(图6C)。将浓度范围为0-720nM的每种缀合物与500nM固定浓度的M23D共施用于C2C12分化肌管。这揭示了mCD71-SO1861(SO1861-EMCH)+500nM M23D(在710nM下12%跳跃,在142nM下8%跳跃)(图7A,左分图)和mCD71-SO1861(SO1861-SC-Mal)+500nM M23D(在710nM下19%跳跃,在142nM下10%跳跃)的组合在23号外显子跳跃中具有类似强烈增强的M23D功效,而单独的500nM M23D(0nM缀合物)仅显示出5%跳跃(图7A,右分图)。此数据表明,添加mCD71-SO1861-Mal缀合物(与缀合和接头无关)明显增加了M23D介导的中靶作用,即外显子跳跃。

[0538] 接下来,将IGF-1配体经由赖氨酸与SO1861-脲-NHS缀合以产生:IGF-1-SO1861(DAR2.7),如图6D所示。在C2C12分化肌管上在与500nM M23D的共施用中测试浓度范围为0-3333nM的IGF-1-SO1861。这揭示了IGF-1-SO1861+500nM M23D(在3333nM下19%跳跃,在667nM下11%跳跃,在133nM下8%跳跃)组合的增强M23D细胞质递送,即抗肌萎缩蛋白23号外显子跳跃(图7B)。

[0539] 综合考虑,这些数据表明抗体和非抗体配体缀合的,即靶向的SO1861在共施用环境中在肌肉细胞中导致明显的效力增强,即PMO有效载荷的中靶递送。

[0540] 实例4.hCD71-DMD-ASO-SO1861或hCD71-DMD-PMO-SO1861

[0541] 将SO1861-SC-Mal经由半胱氨酸与靶向人CD71的TCEP处理的抗CD71单克隆抗体(hCD71-SH,图8A)缀合(图8B)并将PEG4-SPDP与赖氨酸缀合,以产生hCD71-SO1861-PEG4-SPDP(图8C),将DMD-ASO-SH或DMD-PMO-SH与其缀合以产生:hCD71-DMD-ASO-SO1861(DAR2.1/4.2)(图8D)和hCD71-DMD-PMO-SO1861(DAR2.6/4.2)(图8E);还将DMD-ASO-SH或DMD-PMO-SH(如先前在图2B和图2C中所述)与靶向人CD71的抗CD71单克隆抗体(hCD71)缀合,以产生hCD71-DMD-ASO(DAR2.2)和hCD71-DMD-PMO(DAR3.1)。在非DMD受体(KM155)和受DMD影响的供体(DM8036)的分化人类肌管上测试缀合物,包括对照。如所预期的,这些处理

揭示了在剂量后72小时在0.084nM-651nM hCD71-DMD-ASO(图9A,左分图;表A6)和0.078nM-610nM hCD71-DMD-PMO(图9B,左分图;表A6)的浓度范围内KM155肌管中没有或有仅非常微小的外显子跳跃,范围为0-2.4%。然而,在将4μM SO1861-SC-Mal与hCD71-DMD-ASO(图9A,右分图;表A7)或hCD71-DMD-PMO(图9B,右分图:表A7)共施用时,在分化人类肌管中观察到强烈增强的外显子跳跃:在大约0.5nM下,分别对于hCD71-DMD-ASO和hCD71-DMD-PMO已经观察到0-5%和0-4%的外显子跳跃。与不添加SO1861-SC-Mal的条件相比,在109nM hCD71-DMD-ASO和102nM hCD71-DMD-PMO下,这分别增加到29%-40%和4%-5%,构成了几个数量级的效力提高。

[0542] 最引人注目的是,与掺入ASO和与hCD71缀合的SO1861两者的缀合物hCD71-DMD-ASO-SO1861一起孵育,在10.0nM缀合物下已经揭示了51号外显子跳跃(8.5%-8.6%)并在361nM下增加至高达36%-53%,因此与没有SO1861的条件相比构成了明显的效力提高,并且与共施用的SO1861-SC-Mal相比,效力提高的数量级相同(图9C;表A8)。

[0543] 更相关的是,在来自受DMD影响的供体的分化肌管中,在剂量后72小时用靶向缀合物hCD71-DMD-ASO和hCD71-DMD-PMO进行的处理再次揭示分别在651nM hCD71-DMD-ASO(图9A,左分图;表A7)和610nM hCD71-DMD-PMO(图9B,左分图;表A7)下最大7%-11%的跳跃。然而,引人注目的是,在将4μMSO1861-SC-Mal与hCD71-DMD-ASO或hCD71-DMD-PMO共施用时,在来自受DMD影响的供体的分化人类肌管中观察到强烈增强的外显子跳跃:在109nM hCD71-DMD-ASO+SO1861-SC-Mal下为92%-96%跳跃(图10A,右分图),在102nM hCD71-DMD-PMO+SO1861-SC-Mal下为37%-57%跳跃(图10B,右分图)。低至至少0.50nM hCD71-DMD-ASO时,甚至在0.013nM下作用仍然是可测量的,对于hCD71-DMD-PMO+SO1861-SC-Mal观察到跳跃。再次,最引人注目的是,与掺入ASO和与hCD71缀合的SO1861的缀合物hCD71-DMD-ASO-SO1861一起孵育,在361nM下揭示了强烈增强的51号外显子跳跃(94%-96%)并在10.0nM缀合物下仍然为30%-40%(图9C;表A8),因此与没有SO1861的条件相比构成了明显的效力提高,并且与共施用的SO1861-SC-Mal相比,效力提高的数量级相同。

[0544] 表A6:人类肌管中抗CD71缀合的DMD寡聚物的跳跃功效(DMD-ASO-缀合物的最高浓度,DMD-PMO-缀合物的最低浓度)

[0545]

外显子跳跃% ImageJ 和 Femto 分析		[nM 缀合物] 651/610	109/102	18.1/16.9	3.0/2.8	0.50/0.47	0.084/0.078	
hCD71-DMD-ASO（DAR2.2）（KM155）	ImageJ	1.9	0.0	0.5	1.0	1.1	1.5	% DMD 51 号外显子跳跃
	Femto	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-PMO（DAR3.1）（KM155）	ImageJ	0.3	1.4	2.4	2.0	1.8	2.0	
	Femto	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-ASO（DAR2.2）（DM8036）	ImageJ	6.9	1.6	1.4	1.0	1.3	1.4	
	Femto	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-PMO（DAR3.1）（DM8036）	ImageJ	7.3	3.5	3.2	2.8	3.3	2.2	
	Femto	7.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

[0546] 表A7:人类肌管中抗CD71缀合的DMD寡聚物与SO1861-SC-Mal共施用的跳跃功效(DMD-ASO的最高浓度,DMD-PMO的最低浓度)

[0547]

外显子跳跃% ImageJ 和 Femto 分析		[nM 缀合物] 109/102	18.1/16.9	3.0/2.8	0.50/0.47	0.084/0.078	0.014/0.013	
hCD71-DMD-ASO（DAR2.2）+ SO1861-SC-Mal（KM155）	ImageJ	28.8	29.4	13.9	5.1	3.0	3.0	% DMD 51 号外显子跳跃
	Femto	40.3	38.4	13.5	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-PMO（DAR3.1）+ SO1861-SC-Mal（KM155）	ImageJ	4.6	5.2	5.2	4.1	2.8	1.9	
	Femto	3.9	4.4	2.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-ASO（DAR2.2）+ SO1861-SC-Mal（DM8036）	ImageJ	92.2	56.6	34.1	7.0	2.2	0.0	
	Femto	96.1	88.0	53.8	7.4	0.0	0.0	
hCD71-DMD-PMO（DAR3.1）+ SO1861-SC-Mal（DM8036）	ImageJ	37.1	38.3	34.7	28.9	25.2	6.1	
	Femto	57.2	65.0	55.8	46.5	40.9	9.9	

[0548] 表A8:人类肌管中hCD71-DMD-ASO-SO1861的跳跃功效

[0549]

外显子跳跃% ImageJ 和 Femto 分析		[nM 缀合物] 361	60.1	10.0	1.7	0.28	0.046	
hCD71-DMD-ASO-SO1861（DAR2.1/4.2）（KM155）	ImageJ	35.5	31.6	8.5	2.0	1.3	0.2	% DMD 51 号外显子跳跃
	Femto	52.8	43.4	8.6	0.0	0.0	0.0	
hCD71-DMD-ASO-SO1861（DAR2.1/4.2）（DM8036）	ImageJ	94.4	78.3	29.7	4.2	2.0	1.2	
	Femto	96.1	93.5	40.2	0.0	0.0	0.0	

[0550] 实例5.mCD71-M23D-SO1861(体外)

[0551] 将SO1861-EMCH经由半胱氨酸与靶向鼠CD71(mCD71)的抗CD71单克隆抗体缀合,并且将M23D-硫醇经由赖氨酸与该单克隆抗体缀合,以产生:mCD71-M23D-SO1861(DAR1.6/3.8)(图8F、图8G)和mCD71-M23D(DAR1.2)(图2D),并且在分化鼠C2C12肌管上针对抗肌萎缩蛋白23号外显子跳跃进行测试。如通过CTG测定所确定的,处理不影响细胞活力,但揭示了在336nM(40％跳跃)、84nM(28％跳跃)、21nM(21％跳跃)、5nM(12％跳跃)、1nM(6％跳跃)下增强的23号外显子跳跃(图11),而如先前所示,在针对mCD71-M23D测试的任何浓度下都没有观察到明显的跳跃(图5,左分图)。

[0552] 这些数据表明mCD71-M23D-SO1861使M23D在肌管中的中靶递送提高了至少一到两个数量级。

[0553] 实例6.mCD71-M23D-SO1861(体内功效)

[0554] CD-1雄性小鼠接受mCD71-M23D-SO1861(DAR1.6/3.8)(图8C,图8D)或mCD71-M23D(DAR1.2)(图2D)的单次注射,归一化至外显子跳跃活性化合物M23D的类似标称剂量(分别为2.91和2.80mg/kg)。另外,还包括具有较低剂量mCD71-M23D-SO1861的2个剂量组以及媒介物对照组。

[0555] 如图12(A-C)和图13所示,接受mCD71-M23D(2.80mg/kg PMO;第2组)的动物在任何测试组织或任何时间点(第4天、第14天和第28天)均未显示出23号外显子跳跃。然而,重要的是,在用mCD71-M23D-SO1861(2.91mg/kg PMO,第3组)给药的组中,在所有动物和所有测试的肌肉组织中观察到明显跳跃:在第4天,在腓肠肌中为8.8％跳跃,在隔膜中为6.4％,甚至在心肌中为17.1％;在第14天,跳跃在腓肠肌中增加至19.3％,在隔膜中增加至10.2％,并且在心肌中增加至18.4％。单次施用的作用是持久的,因为即使在第28天,在仅施用2.91mg/kg绝对PMO有效载荷的情况下,在腓肠肌中测量到8.5％跳跃,在膈膜中测量到9.0％跳跃,并且在心肌中测量到7.6％跳跃(所有％都是每个组织n＝2/3的平均值,平均值的+/-标准误差)。值得注意的是,对于中剂量,甚至低剂量在几个组织和时间点中观察到低水平跳跃,并且引人注目的是,在第14天,对于仅含有0.42mg/kg绝对PMO有效载荷的中剂量,在心肌中观察到3.8％的跳跃。

[0556] 此数据表明,含有靶向配体、寡核苷酸有效载荷和最重要地SO1861的缀合物是高效的,并且2.91mg/kg的DMD靶向PMO的单剂量已经可以在不同的骨骼中实现实质性的外显子跳跃,但最重要的是,在心肌中也可以实现,而没有SO1861的缀合物在相当剂量下不能实现任何跳跃。即使是仅含有0.42mg/kg绝对PMO有效载荷的剂量,也可能产生可测量的跳跃。

此数据支持在体内野生型内容物中效力增加至少一到两个数量级。

[0557] mCD71-M23D-SO1861在CD-1小鼠中的体内耐受性

[0558] 如图8C和图8D中所述产生缀合物mCD71-M23D-SO1861和mCD71-M23D,并如表A2中详述进行给药。在研究过程期间,mCD71-M23D-SO1861缀合物在所有剂量下都具有良好的耐受性,并且未显示出治疗特定的不良反应发现或任何指示缀合物不耐受的特定临床观察。然而,(第2组中剩下六只中的)一只用mCD71-M23D处理的动物在第11天被发现死亡,也导致在第28天三只小鼠中的一只的生物标志物数据缺失。在第14天处死时,第2组中(三只中的)两只给药mCD71-M23D的小鼠中出现肾脏异常和血清肌酐升高(图14A),而重要的是,在给药mCD71-M23D-SO1861的组中未观察到异常。显而易见的是,肾脏生物标志物ALT没有明显或持久的变化,在最高mCD71-M23D-SO1861剂量中(第3组),分别在161U/L下有一个结果并且在30和34U/L下有两个结果,导致N=3的这一小组出现高度变化(图14B)。值得注意的是,在14天和28天之后,所有给药组(尤其是对于mCD71-M23D-SO1861)中的ALT水平与媒介物对照(第1组)是相当的。总而言之,mCD71-M23D-SO1861在所有测试剂量下都具有良好的耐受性。综合考虑,这些数据表明,mCD71-M23D-SO1861缀合物非常有效,而且在本研究中也具有良好的耐受性,并且显示出比mCD71-M23D更有利的耐受性谱。

[0559] 方法(如在实例7-9中进行):

[0560] SO1861

[0561] SO1861是来自肥皂草(法国中草药公司),并由Symeres公司(NL)根据本领域已知的方法偶联到对应的手柄。

[0562] DBCO-$(M23D)_2$的合成

[0563] 由Symeres公司(NL)进行DBCO-$(M23D)_2$合成。

[0564] SO1861与抗体的缀合

[0565] 由Abzena公司(UK)进行mCD63-SO1861的定制缀合物生产。

[0566] DBCO-$(M23D)_2$与抗体的缀合

[0567] 由Abzena公司(UK)进行mCD71-M23D和mCD63-M23D的定制缀合物生产。

[0568] DBCO-$(M23D)_2$与SO1861-抗体的缀合

[0569] 由Abzena公司(UK)进行mCD63-M23D-SC-SO1861的定制缀合物生产。

[0570] 3'-二硫酰胺-M23D与SO1861-抗体的缀合

[0571] 由Fleet Bioprocessing公司(UK)进行mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)的定制缀合物生产。

[0572] 分析和制备方法

[0573] 分析方法

[0574] SEC方法1

[0575] 用于反应分析的设备:分析SEC仪器DIONEX Ultimate 3000UPLC(DIONEX 6);柱:Waters Protein BEH SEC柱,200 Å,1.7μm,4.6mm X 150mm;流动相:缓冲液A(0.2M磷酸钾缓冲液,pH 6.8,0.2M KCl,在超纯水中的15%异丙醇);方法:等度缓冲液A,10min;流速:0.35ml/min;运行时间:10min;检测UV:214nm、248nm、260nm和280nm;柱温箱:30℃;自动采样器:环境;进样量:10μL;样品制备:通过用DPBS将样品稀释至1.0mg/ml来分析最终样品。

[0576] LC-MS方法1

[0577] 质谱法(LC-MS)仪器:XEVO-G2XS TOF;柱:Agilent Poroshell 300SB-C3 guard,5μm RP柱;流动相:缓冲液A(水,0.1%甲酸),缓冲液B(MeCN,0.1%甲酸);液相方法:0-2.0min,10% B 2.0-7.0min,10%-80% B 7.0-8.0min,100% B 8.0-8.01min,10% B 8.01-10.0min,10% B;MS方法:毛细管电压:3.0kV,锥孔电压:120V,锥孔温度:140℃,脱溶剂温度:450℃;流速:0.4ml/min:运行时间:10min:检测:TIC;柱温箱:60℃;自动采样器:环境;进样量:10μL;样品制备:a.通过在DPBS中将样品稀释至0.05mg/ml来分析最终样品、中间体和反应混合物。

[0578] LC-MS方法2

[0579] 仪器:Agilent 1260Infinity II,1260G7112B Bin.Pump,1260G7167A Multisampler,1290MCT G7116B Column Comp.1260G7115A DAD(210、220和210-320nm),PDA(210-320nm),G6130B MSD(ESI pos/neg)质量范围90-1500,柱:XSelect CSH C18(30x 2.1mm 3.5μm),流速:1ml/min,柱温:40℃,洗脱剂A:在水中的0.1%甲酸,洗脱剂B:在乙腈中的0.1%甲酸,梯度:t_{0min}=5% B,$t_{1.6min}$=98% B,t_{3min}=98%B,后运行:1.3min。

[0580] LC-MS方法3

[0581] 仪器:Agilent 1260Infinity II,1260G7112B Bin.Pump,1260G7167A Multisampler,1260MCT G7116A Column Comp.1260G7115A DAD(210、220和210-320nm),PDA(210-320nm),G6130B MSD(ESI pos/neg)质量范围90-1500,柱:XSelect CSH C18(30x 2.1mm 3.5μm),流速:1ml/min,柱温:25℃,洗脱剂A:在水中的10mM碳酸氢铵(pH 9.5),洗脱剂B:乙腈,梯度:t_{0min}=5% B,$t_{1.6min}$=98% B,t_{3min}=98%B,后运行:1.2min。

[0582] LC-MS方法4

[0583] 仪器:Agilent 1260Infinity II,1260G7112B Bin.Pump,1260G7167A Multisampler,1290MCT G7116B Column Comp.1260G7115A DAD(210-320nm、210和220nm),PDA(210-320nm),G6130B MSD(ESI pos/neg)质量范围90-1500,柱:Waters C4BEH(50x 2.1mm 3.5μm),流速:1ml/min;柱温:40℃,洗脱剂A:在水中的0.1%甲酸,洗脱剂B:在乙腈中的0.1%甲酸,梯度:

[0584] $^{A}t_{0min}$=5% B,$t_{2.5min}$=98% B,t_{4min}=98% B

[0585] $^{B}t_{0min}$=5% B,$t_{0.05min}$=5% B,t_{5min}=98% B,t_{6min}=98% B

[0586] 后运行:1.5min。

[0587] 制备型方法

[0588] 制备型MP-LC方法1

[0589] 仪器类型:Buchi Reveleris™制备型MPLC;柱:Waters XSelect™ CSH C18(145×25mm,10μm);流速:40ml/min;柱温:室温;洗脱剂A:在水中的10mM碳酸氢铵(pH=9.0);洗脱剂B:99%乙腈+在水中的1%10mM碳酸氢铵;梯度:t_{0min}=50% B,t_{4min}=50% B,t_{16min}=100% B,t_{21min}=100% B;检测UV:220、254、270nm;基于UV的级分收集。

[0590] 制备型MP-LC方法2

[0591] 仪器类型:Buchi Reveleris™制备型MPLC;柱:Phenomenex LUNA C18(3)(150×25mm,10μm);流速:40ml/min;柱温:室温;洗脱剂A:在水中的0.1%(v/v)甲酸,洗脱剂B:在乙腈中的0.1%(v/v)甲酸;梯度:t_{0min}=5% B,t_{1min}=5% B,t_{2min}=20% B,t_{17min}=60% B,t_{18min}=100% B,t_{23min}=100% B;检测UV:220、240、280nm;基于UV的级分收集。

[0592] 制备型LC-MS方法

[0593] MS仪器类型:Agilent Technologies G6120AA Quadrupole;HPLC仪器类型:Agilent Technologies 1200制备型LC;柱:Waters XBridge Protein(C4,150x 19mm,10μ);流速:25ml/min;柱温:室温;洗脱剂A:在水中的0.1%甲酸;洗脱剂B:100%乙腈;梯度:t_0=10% A,$t_{2.5min}$=10% A,t_{11min}=50% A,t_{13min}=100% A,t_{17min}=100% A;检测:DAD(220-320nm);检测:MSD(ESI pos/neg)质量范围:100-1000;基于DAD的级分收集。

[0594] 快速色谱法

[0595] Grace Reveleris X2™ C-815Flash;溶剂递送系统:具有自动启动功能的3活塞泵,4个独立通道,一次运行最多4种溶剂,当溶剂耗尽时自动切换管路;最大泵流速250ml/min;最大压力50巴(725psi);检测:UV 200-400nm,多达4个UV信号的组合和整个UV范围的扫描,ELSD;柱尺寸:在仪器上为4-330g,鲁尔型,750g至3000g,带可选支架。

[0596] mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)

[0597] 向具有DAR4.5的mCD71-EMCH-SO1861的等分试样(20mg,0.126μmol,2.53mg/ml)中添加新制备的SMCC溶液的等分试样(2.0mg/ml,7摩尔当量,0.886μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育60分钟。在孵育之后,通过添加新制备的甘氨酸溶液的等分试样(2.0mg/ml,约20摩尔当量,2.5μmol)来使反应淬灭,将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育>15分钟。将缀合物通过Superdex200柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱并通过UV-vis分析,以得到纯化的mCD71-SO1861-SMCC(18.6mg,产率:93%,0.942mg/ml,SMCC与mCD71的比率=3.9)。

[0598] 单独地,向使用TBS pH 7.5重构的M23D-SS-酰胺的等分试样(17.2mg,1.99μmol,10.0mg/ml)中添加新制备的THPP溶液的等分试样(50mg/ml,5摩尔当量,10μmol,41μl),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃下孵育60分钟。在孵育之后,将寡聚物通过PD10 Sephadex G25M柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,以得到M23D-SH(14.8mg,产率:86%,硫醇与M23D的比率=0.98)。

[0599] 向mCD71-SO1861-SMCC的等分试样(17.2mg,0.11μmol,0.95mg/ml)中添加M23D-SH的等分试样(4.1mg/ml,8摩尔当量,0.88μmol,1.72ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育。在大约72小时之后,将缀合物混合物浓缩并通过Superdex 200PG柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,以得到纯化的mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)缀合物。通过BCA比色测定对等分试样进行分析,并为缀合物指定新的EC值,然后浓缩并归一化至2.5mg/ml,通过0.2μm过滤,然后分配成用于表征的等分试样和用于产物测试的等分试样。结果是mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)缀合物(总产量=15.1mg,79%,M23D与mCD71-SO1861的比率=2.1)。

[0600] DBCO-$(M23D)_2$合成

[0601] 中间体1(N-[2-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.$0^{4,9}$]十六烷-1(12),4(9),5,7,13,15-己烯-10-炔-2-基}-N-(2-{[(叔丁氧基)羰基]氨基}乙基)-4-氧代丁酰胺基)乙基]氨基甲酸叔丁酯)

[0602] 向DBCO-酸(50.0mg,0.164mmol)在DMF(1.00ml)中的溶液中添加DIPEA(34.0μL,0.195mmol)和HATU(62.3mg,0.164mmol),并将混合物搅拌15min。接下来,添加(氮杂二基双(乙烷-2,1-二基))二氨基甲酸二叔丁酯(59.6mg,0.197mmol),并将反应混合物在室温下搅拌。在30min之后,将反应混合物添加到水(10.0ml)中。将所得的致密悬浮液离心(5000RPM,

3min),得到顶部有固体的澄清溶液。用移液管除去溶液,并将固体溶解在乙腈(10.0ml)中。将所得的溶液在真空中浓缩。将残余物通过快速色谱法(DCM-甲醇/DCM(1/9,v/v)梯度100:0升至0:50)纯化,以得到呈无色凝固油状物的标题化合物(90.0mg,93%)。基于LC-MS的纯度为100%。

[0603] LRMS(m/z):591$[M+H]^{1+}$

[0604] LC-MS r.t.(min):2.12[1]

[0605] 中间体2(N,N-双(2-氨基乙基)-4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六烷-1(12),4(9),5,7,13,-15-已烯-10-炔-2-基}-4-氧代丁酰胺二氟乙酸酯)

[0606] 将N-[2-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六烷-1(12),4(9),5,7,13,15-已烯-10-炔-2-基}-N-(2-{[(叔丁氧基)羰基]氨基}乙基)-4-氧代丁酰胺基)乙基]氨基甲酸叔丁酯(90.0mg,0.152mol)溶解在DCM(2.00ml)中并冷却至0℃。接下来,添加TFA(2.00ml,26.0mmol),并将反应混合物在0℃下搅拌40min。使反应混合物在10min内达到室温。接下来,将反应混合物冷却至0℃并用甲苯(5ml)稀释。将所得的溶液在真空中浓缩并与DCM(2x5ml)共蒸发,以得到呈淡粉色油状物的粗标题化合物,该标题化合物直接用于下一步骤。基于LC-MS的纯度为88%。

[0607] LRMS(m/z):196$[M+2]^{2+}$,391$[M+1]^{1+}$

[0608] LC-MS r.t.(min):1.17(LC-MS方法2)

[0609] 中间体3(N-[2-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六烷-1(12),4(9),5,-7,13,15-已烯-10-炔-2-基}-N-[2-({[(1S,4E)-环辛-4-烯-1-基氧基]羰基}氨基)乙基]-4-氧代丁酰胺基)乙基]氨基甲酸(1S,4E)-环辛-4-烯-1-基酯)

[0610] 向粗N,N-双(2-氨基乙基)-4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六烷-1(12),4(9),-5,7,13,15-已烯-10-炔-2-基}-4-氧代丁酰胺二氟乙酸酯(0.152mmol)在DMF(1.00ml)和DIPEA(200μL,1.15mmol)中的溶液中添加TCO4-NHS碳酸酯(102mg,0.380mmol),并将混合物在室温下搅拌。在30min之后,对反应混合物进行制备型MP-LC(制备型MP-LC方法1)。将对应于产物的级分立即合并在一起,冷冻并冻干过夜,以得到呈淡棕色油状物的标题化合物(90.0mg,85%)。基于LC-MS的纯度为99%。

[0611] LRMS(m/z):696$[M+1]^{1+}$

[0612] LC-MS r.t.(min):2.35(LC-MS方法3)

[0613] 中间体4 2-[4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基]-N-[2-(吡啶-2-基连硫基)乙基]乙酰胺

[0614] 向甲基四嗪-NHS酯(50.0mg,0.153mmol)在DMF(800μL)中的溶液中添加2-(2-吡啶基连硫基)乙胺盐酸盐(40.8mg,0.183mmol)和DIPEA(53.0μL,0.306mmol)。将所得的混合物在室温下搅拌。在两小时之后,对反应混合物进行制备型MP-LC(制备型MP-LC方法2)。将对应于产物的级分立即合并在一起,冷冻并冻干过夜,以得到呈粉色固体的标题化合物(53.6mg,88%)。基于LC-MS的纯度为100%。

[0615] LRMS(m/z):399$[M+1]^{1+}$

[0616] LC-MS r.t.(min):1.87(LC-MS方法3)

[0617] 中间体5:M23D-mTz

[0618] 向M23D-DSA(294mg,34.0μmol)在水(15.0ml)中溶液中添加DTT(100mg,648μmol)。

将反应混合物在室温下搅拌。在两小时之后,将反应混合物分成六等份并倒入乙腈(6x 45ml)中。将所得的悬浮液振荡并静置30min。接下来,将悬浮液离心(7830RPM,20min)。倾析溶液并将残余物用乙腈(每个小瓶20ml)处理。将所得的悬浮液离心(7830RPM,3min)。将残余物溶解在水(总计10.0ml)中并将溶液合并。接下来,添加2-[4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基]-N-[2-(吡啶-2-基连硫基)乙基]乙酰胺(54.2mg,136μmol)在乙腈(4.00ml)中的溶液。将反应混合物在室温下搅拌。在两小时之后,将反应混合物等分并倒入乙腈(6x 45ml)中。将所得的悬浮液振荡并离心(7830RPM,3min)。倾析溶液并将残余物溶解在水/乙腈(6x 2ml,1/1,v/v)中。将所得的溶液倒入乙腈(6x 20ml)中。接下来,将悬浮液离心(7830RPM,3min)。倾析溶液,并且将残余物溶解在水/乙腈(总计15ml,1/1,v/v)中并冻干过夜,以得到呈粉色固体的标题化合物(340mg,定量)。基于LC-MS的纯度为99%。

[0619] LRMS(m/z):1468[M+6]$^{6+}$,1259[M+7]$^{7+}$,1102[M+8]$^{8+}$,979[M+9]$^{9+}$,881[M+10]$^{10+}$

[0620] LC-MS r.t.(min):1.75(LC-MS方法4A)

[0621] DBCO-(M23D)$_2$

[0622] 向M23D-mTz(16.4mg,1.86μmol)在水(1.00ml)和乙腈(0.400ml)中的溶液中添加N-[2-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六烷-1(12),4(9),5,7,13,15-己烯-10-炔-2-基}-N-[2-({[(1S,4E)-环辛-4-烯-1-基氧基]羰基}氨基)乙基]-4-氧代丁酰胺基)乙基]氨基甲酸(1S,4E)-环辛-4-烯-1-基酯(0.67mg,0.964μmol)在乙腈(675μl)中的储备溶液,并且将反应混合物在室温下搅拌。在每次添加之后,用LC-MS^{3A}监测反应进展。以这种方式,获得了向标题产物的完全转化。储备溶液的添加如下;400μl,在10min之后-100μl,在10min之后-100μl,在10min之后-25μl,在10min之后-25μl,在10min之后-25μl。接下来,对反应混合物进行制备型LC-MS。将对应于产物的级分立即合并在一起,冷冻并冻干过夜,以得到呈白色固体的标题化合物(10.5mg,62%)。基于LC-MS的纯度为100%(宽峰)。

[0623] LRMS(m/z):1142[M+16]$^{16+}$,1075[M+17]$^{17+}$,1015[M+18]$^{18+}$,包括已知片段的多个m/z值

[0624] LC-MS r.t.(min):2.84(LC-MS方法4B)

[0625] 鼠抗CD63(mCD63)mAb与DBCO-(M23D)$_2$的缀合

[0626] 1.mCD63的制备

[0627] 使用Vivaspin(50kDa MWCO)将mCD63缓冲液交换到TBS中至10.0mg/ml的最终浓度。

[0628] 2.抗体-Fc结构域上碳水化合物的修饰

[0629] 根据供应商的指示平衡并制备固定化的GlycINATOR™柱(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)。然后将样品加载在柱上,将培养基重悬浮,并且将混合物在RT下孵育并混合1h。然后将柱离心并洗脱样品。

[0630] 根据供应商的指示用TBS重构UDP-GalNAz(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)并与GalT(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)一起转移到合并的洗脱物中。将混合物在30℃下在黑暗中孵育过夜。之后,将反应物加载到预处理的脱盐柱上(根据供应商的指示)并离心,以收集含有叠氮基修饰的mAb的流通液。将其在4C下储存在黑暗中,直至随后用于缀合。

[0631] 3.与DBCO-(M23D)$_2$的缀合

[0632] 使用Vivaspin(50kDa MWCO)将mCD63缓冲液交换到DPBS中至10.0mg/ml的最终浓度,将DBCO-(M23D)$_2$(5.0equi.,1mM在DPBS中,pH 7.4)添加到mAb溶液中。将反应混合物在37℃下孵育24h,然后通过制备型SEC(HiLoad 26/600Superdex 200pg,DPBS)直接纯化。通过SEC-UV(DAR确定)对缀合物进行表征。使用上述Vivaspin将合并的级分浓缩至>10.0mg/ml的最终浓度,在0.22μm过滤单元上无菌过滤,并在4℃下储存,直至进一步使用。

[0633]

测试	结果
SEC(%单体)	98.4
LC-MS(MW)	N/A
HIC(平均DAR)	N/A
LC-MS(平均DAR)	N/A
UV(平均DAR)	3.42
内毒素(EU/mg)	0.517
体积(ml)	5.0
浓度(mg/ml)	12.24
量(mg)	61.2
产率(%)	76.5

[0634] 鼠抗CD63(mCD63)mAb与SO1861的缀合

[0635] 1.mCD63的制备

[0636] 使用Vivaspin(50kDa MWCO)将mCD63缓冲液交换到DPBS+5mM EDTA,pH 7.4中至8.0mg/ml的最终浓度。

[0637] 2.mCD63的缀合

[0638] 将mCD63在37℃下预孵育约15分钟,接着添加TCEP(3.8equi.)。将反应混合物稀释至6.5mg/ml,然后在37℃下孵育1h。通过变性LC-MS监测mCD63的还原。将反应平衡至22℃,并添加SO1861(8.0equi.)。经由变性LC-MS进行反应监测,并且当反应完成时,用DTT(100equi.)将反应淬灭。

[0639] 3.mCD63缀合物的纯化

[0640] 使用DPBS通过P2脱盐柱直接纯化反应混合物。通过SEC和变性LC-MS(DAR确定,最终消光系数)对缀合物进行表征,然后使用Vivaspin(50kDa MWCO)浓缩至高于10mg/ml,在0.22μm过滤单元上无菌过滤,并在+4℃下储存,直至进一步使用。

[0641]

测试	结果
SEC (%单体)	100
LC-MS (MW)	符合结构

[0642]

HIC（平均DAR）	N/A
LC-MS（平均DAR）	4.08
UV（平均DAR）	N/A
内毒素（EU/mg）	0.629
体积（ml）	1.65
浓度（mg/ml）	10.0
量（mg）	16.5
产率（%）	74.0

[0643] 鼠抗CD63(mCD63)mAb-SO1861与DBCO-(M23D)$_2$的缀合

[0644] 1.mCD63的制备

[0645] 使用Vivaspin(50kDa MWCO)将mCD63-SO1861缀合物缓冲液交换到TBS中至10.0mg/ml的最终浓度。

[0646] 2.抗体-Fc结构域上碳水化合物的修饰

[0647] 根据供应商的指示平衡并制备固定化的GlycINATOR™柱(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)。然后将样品加载在柱上,将培养基重悬浮,并且将混合物在RT下孵育并混合1h。然后将柱离心并洗脱样品。

[0648] 根据供应商的指示用TBS重构UDP-GalNAz(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)并与GalT(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)一起转移到合并的洗脱物中。将混合物在30℃下在黑暗中孵育过夜。之后,将反应物加载到预处理的脱盐柱上(根据供应商的指示)并离心,以收集含有叠氮基修饰的mCD63的流通液。将其在4C下储存在黑暗中,直至随后用于缀合。

[0649] 步骤3.与DBCO-(M23D)$_2$的缀合

[0650] 使用Vivaspin(50kDa MWCO)将mCD63缓冲液交换到DPBS中至10.0mg/ml的最终浓度。将DBCO-(M23D)$_2$(5.0equi.,1mM在DPBS中,pH 7.4)添加到mCD63溶液中,并且将反应混合物在37℃下孵育24h,然后通过制备型SEC(HiLoad 26/600Superdex 200pg,DPBS)直接纯化。通过SEC-UV(DAR确定)对缀合物进行表征。使用上述Vivaspin将合并的级分浓缩至>10.0mg/ml的最终浓度,在0.22μm过滤单元上无菌过滤,并在4℃下储存,直至进一步使用。

[0651]

测试	结果
SEC(%单体)	98.6
LC-MS(MW)	符合SO1861的结构
HIC(平均DAR)	N/A
LC-MS(平均DAR)	4.08(SO1861)
UV(平均DAR)	3.62(M23D)
内毒素(EU/mg)	0.430
体积(ml)	3.5
浓度(mg/ml)	10.87
量(mg)	38.12
产率(%)	76.2

[0652] 鼠抗CD71(mCD71)mAb与DBCO-(M23D)$_2$的缀合

[0653] 1.mCD71的制备使用Vivaspin(50kDa MWCO)将mCD71缓冲液交换到TBS中至10.0mg/ml的最终浓度。

[0654] 2.抗体-Fc结构域上碳水化合物的修饰

[0655] 根据供应商的指示平衡并制备固定化的GlycINATOR™柱(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)。然后将样品加载在柱上,将培养基重悬浮,并且将混合物在RT下孵育并混合1h。然后将柱离心并洗脱样品。

[0656] 根据供应商的指示用TBS重构UDP-GalNAz(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)并与GalT(来自GlyCLICK™叠氮化物激活试剂盒,Genovis公司)一起转移到合并的洗脱物中。将混合物在30℃下在黑暗中孵育过夜。之后,将反应物加载到预处理的脱盐柱上(根据供应商的说明书)并离心,以收集含有叠氮基修饰的mCD71的流通液。将其在4℃下储存在黑暗中,直至随后用于缀合。

[0657] 3.与DBCO-(M23D)$_2$的缀合

[0658] 使用Vivaspin(50kDa MWCO)将mCD71缓冲液交换到DPBS中至10.0mg/ml的最终浓度。将DBCO-(M23D)$_2$(5.0equi.,1mM在DPBS中,pH 7.4)添加到mCD71溶液中,并且将反应混合物在37℃下孵育24h,然后通过制备型SEC(HiLoad 26/600Superdex 200pg,DPBS)直接纯化。通过SEC-UV(DAR确定)对缀合物进行表征。使用上述Vivaspin将合并的级分浓缩至>10.0mg/ml的最终浓度,在0.22μm过滤单元上无菌过滤,并在4℃下储存,直至进一步使用。

[0659]

测试	结果
SEC(%单体)	99.8
LC-MS(MW)	N/A
HIC(平均DAR)	N/A
LC-MS(平均DAR)	N/A
UV(平均DAR)	3.49
内毒素(EU/mg)	1.418
体积(ml)	4.6
浓度(mg/ml)	10.76
量(mg)	49.54
产率(%)	69.7

[0660] 细胞培养和体外实验(鼠)

[0661] 将鼠成肌细胞系C2C12维持在10% FBSDMEM培养基+Pen/Strep中,并在24孔板中以240,000个细胞或180,000个细胞/孔(cpw)或在96孔板(wp)中以40,000或30,000cpw在维持培养基(在DMEM培养基中的10% FBS+Pen/Strep)进行铺板,并在37℃和5% CO_2下孵育。在接种之后24小时,将细胞切换到分化培养基(在DMEM中的2%马血清)中并孵育3天,然后更新培养基。再过24小时之后,再次更新培养基,并且添加化合物并孵育48或72小时。在处理后总计48或72小时,收获24-wp中的细胞进行外显子跳跃分析,并在96-wp上评估细胞活力。

[0662] 外显子跳跃分析和定量(鼠体外)

[0663] 在方法(如在实例1-6中进行)中如上所述进行。

[0664] 细胞活力(鼠体外)

[0665] 在方法(如在实例1-6中进行)中如上所述进行。

[0666] 结果(实例7-9)

[0667] 实例7.mCD71-M23D+SO1861-SC-Mal或mCD63-M23D+SO1861-SC-Mal(体外)

[0668] 如图16中所示产生DBCO-$(M23D)_2$,一种携带两个M23D(诱导小鼠抗肌萎缩蛋白的23号外显子跳跃的磷酰二胺吗啉代寡聚物反义寡核苷酸)寡核苷酸有效载荷的支链支架。将DBCO-$(M23D)_2$与靶向小鼠CD71的抗CD71单克隆抗体或靶向鼠CD63的抗CD63单克隆抗体缀合,以分别产生mCD71-M23D(DAR 3.5)和mCD63-M23D(DAR 3.4)(关于缀合程序,参见图17)。将mCD71-M23D缀合物或mCD63-M23D缀合物与8μM固定浓度的内体逃逸增强剂SO1861-SC-Mal共施用,并在处理48h后测试分化C2C12鼠肌管上的抗肌萎缩蛋白23号外显子跳跃。8μMSO1861-SC-Mal的共施用揭示了mCD71-M23D(透明条带,直至0.2nM,提高至少三个数量级)(图18A,右分图)和mCD63-M23D(透明条带,直至6.0nM,提高两个数量级)(图18B,右分图)两者均具有强烈的23号外显子跳跃增强。单独的mCD71-M23D在高达758nM的所有测试浓度下均未显示出活性(图18A,左分图),并且单独的mCD63-M23D在755nM下仅显示出2%的跳跃(图18B,左分图)。处理不影响细胞活力,如用CTG测定所确定的。这些数据表明SO1861-SC-Mal的共施用使M23D在肌管中的CD71和CD63靶向递送提高了至少两到三个数量级。

[0669] 实例8.mCD63-SC-SO1861+M23D或mCD71-M23D(体外)

[0670] 将SO1861-SC-Mal与靶向鼠CD63的抗CD63单克隆抗体缀合,以产生mCD63-SC-SO1861(DAR 4.1)(关于缀合程序,参见图19)。将mCD63-SC-SO1861与500nM固定浓度的M23D(诱导小鼠抗肌萎缩蛋白的23号外显子跳跃的磷酰二胺吗啉代寡聚物反义寡核苷酸)共施用于分化C2C12鼠肌管。这揭示了mCD63-SC-SO1861增强23号外显子跳跃,在处理48h之后,在662nM下为28%跳跃并且在1.6nM下为2%跳跃(图20A),而单独的500nM M23D没有显示出外显子跳跃活性(图20C)。这些数据证明了mCD63-SC-SO1861诱导M23D的增强中靶细胞质递送,从而诱导增强的23号外显子跳跃。

[0671] 接下来,将mCD63-SC-SO1861(图19)与80nM固定浓度的mCD71-M23D(图17)共施用。用单独的80nM mCD71-M23D处理没有显示出外显子跳跃(图20C)。mCD63-SC-SO1861与80nM mCD71-M23D共施用揭示了mCD63-SC-SO1861增强23号外显子跳跃,在处理48h之后,在662nM下为10%跳跃并且在5.3nM下仍然为4%跳跃(图20B)。

[0672] 综合考虑,这些数据表明配体1缀合的SO1861(即,靶向SO1861)与配体2缀合的PMO有效载荷(即,靶向M23D)组合导致明显的效力增强(靶向2-组分系统的实例)。

[0673] 实例9.mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)或mCD63-M23D-SC-SO1861(体外)

[0674] 将SO1861-EMCH和M23D-硫醇两者与靶向鼠CD71的抗CD71单克隆抗体缀合,以产生mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)(DAR 2.1/4.5)(缀合程序先前在图8F、8G中描述)。将SO1861-SC-Mal和DBCO-$(M23D)_2$两者与靶向鼠CD63的抗CD63单克隆抗体缀合,以产生mCD63-M23D-SC-SO1861(DAR 3.6/4.1)(缀合程序先前在图21中描述)。用这些缀合物处理分化C2C12鼠肌管揭示了mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)在1200nM(65%跳跃)、240nM(27%跳跃)、48nM(17%跳跃)、9.6nM(6%跳跃)和1.9nM(7%跳跃)下增强23号外显子跳跃,持续72h(图22A)。对于mCD63-M23D-SC-SO1861,在1200nM(53%跳跃)、240nM(22%跳跃)和48nM(11%跳跃)下观察到增强的23号外显子跳跃(图22B)。处理不影响细胞活力,如用CTG测定所确定的。这些

数据表明mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)和mCD63-M23D-SC-SO1861使M23D在肌管中的中靶递送提高了至少一到三个数量级(靶向1-组分系统的实例)。

[0675] 方法(实例10-12)

[0676] SO1861-SC-马来酰亚胺

[0677] SO1861是来自肥皂草(法国中草药公司),并由Symeres公司(NL)根据本领域已知的方法偶联到对应的手柄。

[0678] SO1861与抗体的缀合

[0679] 由Fleet Bioprocessing公司(UK)进行hCD71-SC-SO1861和hCD63-SC-SO1861的定制缀合物生产。

[0680] 5'-硫醇-DMD-ASO、5'-二硫酰胺-DMD-PMO(1)和3'-二硫酰胺-DMD-PMO(1、2、3、4和5)与抗体的缀合

[0681] 由Fleet Bioprocessing公司(UK)进行hCD71-5'-SS-DMD-ASO、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)和hCD63-5'-SS-DMD-ASO的定制缀合物生产。

[0682] 5'-硫醇-DMD-ASO和3'-二硫酰胺-DMD-PMO(1、2、3、4和5)与SO1861-抗体的缀合

[0683] 由Fleet Bioprocessing公司(UK)进行hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)-SC-SO1861、hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861、hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861、hCD63-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861、hCD63-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861的定制缀合物生产。

[0684] 分析和制备方法

[0685] 经由UV-vis分光光度法、BCA比色测定、分析SEC、SDS-PAGE、蛋白质印迹和脲-PAGE凝胶电泳对缀合物进行表征。在与SO1861-SC-马来酰亚胺缀合之前,经由UV-vis分光光度法和Ellman测定分析还原的mAb-SH(hCD71-SH或hCD63-SH)。

[0686] UV-vis分光光度法

[0687] 使用Thermo Nanodrop 2000光谱仪或Perkin Elmer Lambda 365分光光度计和以下质量消光系数(EC)值确定浓度:

[0688] 对于SAMSA-荧光素,使用实验确定的摩尔ε495＝58,700M-1cm-1和Rz280:495＝0.428。

[0689] 埃尔曼试剂(TNB);摩尔ε412＝14,150M-1cm-1

[0690] 2-吡啶硫酮(PDT);摩尔ε363＝8,080M-1cm-1

[0691] 另外,使用文献ε^{265}值,通过UV-vis分光光度法和BCA比色测定确定DMD寡核苷酸掺入:

[0692] DMD-PMO(1);摩尔ε363＝318,050(mg/ml)-1cm-1

[0693] DMD-PMO(2);摩尔ε363＝318,120(mg/ml)-1cm-1

[0694] DMD-PMO(3);摩尔ε363＝308,180(mg/ml)-1cm-1

[0695] DMD-PMO(4);摩尔ε363＝247,710(mg/ml)-1cm-1

[0696] DMD-PMO(5);摩尔ε363＝207,890(mg/ml)-1cm-1

[0697] DMD-ASO;摩尔ε363＝310,00(mg/ml)-1cm-1

[0698] SEC

[0699] 使用Akta纯化器10系统和Biosep SEC-s3000柱通过SEC分析缀合物,用DPBS:IPA(85:15)洗脱。缀合物纯度通过缀合物峰相对于杂质/聚集体形式的积分来确定。

[0700] SDS-PAGE

[0701] 使用4%-12%bis-tris凝胶和MOPS作为运行缓冲液(200V,约40分钟),在热变性非还原和还原条件下,通过SDS-PAGE针对蛋白阶梯分析天然蛋白和缀合物。将样品制备成0.5mg/ml,包含LDS样品缓冲液和作为稀释剂的MOPS运行缓冲液。对于还原样品,添加DTT至最终浓度为50mM。样品在90℃-95℃下热处理15分钟,并向每个孔中添加2.5μg(5μL)。蛋白阶梯(10μL)未经预处理即被加载。用1×LDS样品缓冲液(10μL)填充空列。凝胶运行之后,用DI水(100ml)伴随振荡(15分钟,200rpm)洗涤三次。通过将凝胶与PAGEBlue蛋白染色剂(30ml)进行摇床孵育(60分钟,200rpm)来进行考马斯染色。除去过量的染色溶液,用DI水(100ml)漂洗两次,并用DI水(100ml)脱色(60分钟,200rpm)。使用ImageJ(ImageJ(Rasband,W.S.,ImageJ,美国国立卫生研究院(U.S.National Institutes of Health),贝塞斯达,马里兰州,美国)和MyCurveFit(蛋白质阶梯的点对点相关性)对所得凝胶进行成像和处理。

[0702] 蛋白质印迹

[0703] 使用新制备的转移缓冲液,使用X-Cell印迹模块,在以下设置((-)BP-BP-FP-Gel-NC-BP-BP-BP(+))和条件(30V,60分钟)下,将凝胶从SDS-PAGE转移到硝化纤维素膜上。BP-印迹垫;FP-过滤垫;NC-硝化纤维素膜。之后,用PBS-T(100ml)在振荡(5分钟,200rpm)下将NC洗涤三次,用封闭缓冲液(50ml)在振荡(30分钟,200rpm)下封闭非特异性位点,然后用在封闭缓冲液中稀释的山羊抗人Kappa-HRP(1:2000)和山羊抗人IgG-HRP(1:2000)(50ml)的组合在振荡(30分钟,200rpm)下标记活性位点。在此之后,用PBS-T(100ml)在振荡(5分钟,200rpm)下将NC洗涤一次,并用Ultra TMB-印迹溶液(25ml)检测复合抗体。目视观察显色,并且通过用水洗涤NC停止显色,并拍摄所得的印迹。

[0704] 脲-PAGE凝胶电泳

[0705] 缀合物的这种表征是在变性非还原条件下用EtBr或SYBR Green染色进行的,与寡核苷酸标准物和寡核苷酸标准物阶梯进行比较(报告残留的'游离'寡核苷酸)。

[0706] hAb-SC-SO1861

[0707] hAb-SO1861,诸如hCD71-SC-SO1861和hCD63-SC-SO1861的缀合的一般描述在以下示出。括号和斜体中给出的数量以hCD71-SC-SO1861为例示出。

[0708] 将hAb的等分试样缓冲液交换到TBS pH 7.5中并归一化至5mg/ml。在轻微旋转下向hAb的等分试样(95.8mg,6.39×10^{-4}mmol,4.94mg/ml)中添加在TBS pH 7.5(1mg/ml)中新制备的TCEP的等分式样(3.18equiv.,2.03×10^{-3}mmol,0.58mg,0.582ml)。将混合物用辊混合在20℃下孵育210分钟。在孵育之后,取出1.0mg反应混合物的等分试样(0.203ml),并通过Zeba 7K旋转脱盐柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,并通过UV-vis和Ellman测定进行表征(3.407mg/ml,SH与hAb的比率＝4.8)。在轻微旋转下向主体反应物中添加在TBS pH 7.5(2mg/ml)中新制备的SO1861-SC-马来酰亚胺的等分式样(6mol equiv.,3.79×10^{-3}mmol,8.3mg,4.14ml),将混合物短暂涡旋,然后在20℃下孵育120分钟。分配2×0.25mg的脱盐

hAb-SH(1.67×10^{-6}mmol,0.073ml)并与NEM(8mol equiv.,1.34×10^{-5}mmol,6.7μl,0.25mg/ml)或TBS pH 7.5(6.7μl)反应,然后孵育并进行主体缀合,分别作为阳性和阴性反应对照。在孵育之后,取出0.5mg hAb-SC-SO1861混合物的等分式样(大约0.100ml),通过Zeba 7K旋转脱盐柱纯化,用TBS pH 7.5洗脱,并通过Ellman测定以及阳性对照和阴性对照表征,以获得SO1861掺入。在反应之后,向hAb-SC-SO1861主体混合物中添加新制备的NEM溶液的等分式样(5mol equiv.,3.16×10^{-3}mmol,158μl的2.5mg/ml溶液)以淬灭反应。通过使用经消毒的2.6×40cm Superdex 200柱纯化淬灭的反应混合物,用DPBS pH 7.5洗脱。收集纯化的hAb-SC-SO1861并通过UV-vis分光光度法进行分析。然后使用Vivaspin 20离心过滤器将其浓缩至>2.5mg/ml,归一化至2.5mg/ml,并在层流下过滤至0.2μm。将产物分配成等分试样,以进行产物测试、表征和进一步的缀合工作。结果是:

[0709] hCD71-SC-SO1861(总产量=78.4mg,82%,SO1861与hCD71的比率=4.0)

[0710] hCD63-SC-SO1861缀合物(总产量=58.8mg,SO1861与hCD63的比率=4.8)。

[0711] hAb-DMD-寡核苷酸

[0712] hAb靶向的DMD寡核苷酸,诸如hCD71-5'-SS-DMD-ASO、hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1-5)和hCD63-5'-SS-DMD-ASO的缀合的一般描述在以下示出。括号和斜体中给出的数量以hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)为例示出。

[0713] 将hAb的等分试样缓冲液交换到DPBS pH 7.5中并归一化至2.5mg/ml。向hAb的等分试样(hCD71,20.0mg,1.33×10-4mmol,2.5mg/ml)中添加新制备的PEG4-SPDP溶液的等分试样(10.0mg/ml,10.0摩尔当量,1.33×10-3mmol,0.075ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育60分钟。在孵育之后,通过添加新制备的甘氨酸溶液的等分试样(10mg/ml,50摩尔当量,6.65×10-3mmol,8.1μl)来使反应淬灭,将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育>15分钟。将缀合物纯化(使用Zeba 40K旋转脱盐柱,用TBS pH 7.5洗脱,过滤至0.45μm),然后通过UV-vis分析以得到纯化的hAb-SPDP(hCD71-SPDP,21.2mg,2.04mg/ml,SPDP与hCD71的比率=3.9)。立即使用hAb-SPDP。

[0714] 单独地,使用TBS pH 7.5重构所需的DMD寡核苷酸(DMD-PMO(1)-5'-酰胺,20.2mg,1.99×10-3mmol,10.00mg/ml),合并成单个等分式样并通过UV-vis分析,以确定ε_{280}、ε_{260}及其比率$\varepsilon_{260}/\varepsilon_{280}$。向其中添加新制备的THPP溶液的等分式样(50mg/ml,10摩尔当量,1.99×10-2mmol,83μl),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃下孵育60分钟。在孵育之后,使用PD10 Sephadex G25柱将寡核苷酸纯化,用TBS pH 7.5洗脱,以得到还原的DMD寡核苷酸-SH(DMD-PMO(1)-5'-SH,16.4mg,81%,硫醇与DMD-PMO(1)的比率=1.02)。

[0715] 向hAb-SPDP的等分试样(hCD71-SPDP,10.2mg,6.79×10-5mmol,2.04mg/ml)中添加寡核苷酸-SH的等分试样(DMD-PMO(1)-SH,2.73mg/ml,8.0摩尔当量,5.43×10-4mmol,2.01ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃下孵育过夜。在大约16小时之后,通过UV-vis分析缀合物混合物,以确定通过PDT置换的掺入,然后使用经消毒的2.6×60cm Superdex 200PG柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱。通过UV-vis和BCA比色测定分析缀合物并分配新的ε_{280}。将材料浓缩(使用Vivacell 100(30K MWCO),至可获得的最大浓度),然后分配成等分式样以进行产物测试和表征。结果是hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)缀合物(总产率=65%;DMD-PMO(1)与hCD71的比率=2.2),作为实例。其他结果是:

[0716] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)(总产率=58%,DMD-PMO(1)与hCD71的比率=2.1)

[0717] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)(总产率=70%,DMD-PMO(2)与hCD71的比率=3.0)

[0718] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)(总产率=65%,DMD-PMO(3)与hCD71的比率=2.6)

[0719] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)(总产率=68%,DMD-PMO(4)与hCD71的比率=2.3)

[0720] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)(总产率=67%,DMD-PMO(5)与hCD71的比率=2.1)

[0721] hCD71-5'-SS-DMD-ASO(总产率=76%,DMD-ASO与hCD71的比率=2.1)

[0722] hCD63-5'-SS-DMD-ASO(总产率=60%,DMD-ASO与hCD63的比率=2.3)

[0723] hAb-DMD-寡核苷酸-SC-SO1861

[0724] hAb-DMD-寡聚物-SC-SO1861,诸如hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861、hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1-5)-SC-SO1861和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1-5)-SC-SO1861的缀合的一般描述在以下示出。

[0725] 将hAb-SC-SO1861(DAR4)经由靶向DAR值为4的赖氨酸残基与一系列DMD寡核苷酸缀合。进行hAb-SC-SO1861的主体激活,并且将所得的SPDP中间体分成等分试样,以与每种寡核苷酸缀合。一开始,对大约100mg规模的hAb进行PEG4-SPDP功能化,然后使用经消毒的5×50cm Superdex 200柱通过凝胶过滤进行纯化,并通过UV-vis进行表征以获得hAb-SPDP。在进行DMD寡核苷酸的偶联之前,通过用例如THPP处理来激活每种寡核苷酸,然后通过UV-vis和Ellman测定进行分析来确定硫醇的存在。

[0726] 使hAb-SPDP的每个等分式样与8equiv.的相应寡核苷酸(即,2equiv./hAb-SPDP;每1mg hAb-SPDP需要0.37-0.54mg的寡核苷酸-SH)经由不稳定的二硫键进行反应以得到hAb-寡核苷酸。通过PDT置换(通过UV-vis测量)来估计寡核苷酸掺入。使用专用的2.6×40cm Superdex 200柱通过凝胶过滤纯化缀合物,用杜氏PBS pH 7.5进行洗脱。通过BCA比色测定和UV-vis光谱法分析纯化的缀合物以确定hAb浓度,然后进行浓缩和归一化,之后进行末端过滤和层流下的分配。保留每种的小等分试样(例如,0.25mg),以用于经由经由aSEC、SDS-PAGE、蛋白质印迹和脲PAGE电泳进行表征。结果是:

[0727] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861(总产率=67%,SO1861与hCD71的比率=4.0,DMD-PMO(1)与hCD71的比率=2.4)

[0728] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861(总产率=57%,SO1861与hCD71的比率=4.0,DMD-PMO(2)与hCD71的比率=3.1)

[0729] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861(总产率=61%,SO1861与hCD71的比率=4.0,DMD-PMO(3)与hCD71的比率=2.5)

[0730] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861(总产率=61%,SO1861与hCD71的比率=4.0,DMD-PMO(4)与hCD71的比率=2.0)

[0731] hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)-SC-SO1861(总产率=54%,SO1861与hCD71的比率=4.0,DMD-PMO(5)与hCD71的比率=2.0)

[0732] hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861(总产率=62%,SO1861与hCD71的比率=4.0,DMD-ASO与hCD71的比率=2.3)

[0733] hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861(总产率=69%,SO1861与hCD63的比率=4.8,DMD-PMO(1)与hCD63的比率=2.7)

[0734] hCD63-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861(总产率=59%,SO1861与hCD63的比率=4.8,DMD-PMO(2)与hCD63的比率=2.7)

[0735] hCD63-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861(总产率＝67％,SO1861与hCD63的比率＝4.8,DMD-PMO(3)与hCD63的比率＝2.8)

[0736] hCD63-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861(总产率＝58％,SO1861与hCD63的比率＝4.8,DMD-PMO(4)与hCD63的比率＝2.4)

[0737] hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861(总产率＝51％,SO1861与hCD63的比率＝4.8,DMD-ASO与hCD63的比率＝2.2)

[0738] 细胞培养(人类)

[0739] 在方法(如在实例1-6中进行)中如上所述培养来自非DMD供体(KM155)的人永生成肌细胞。

[0740] 在自制生长培养基中培养来自受DMD影响的供体(KM1328)的人永生成肌细胞,该生长培养基含有80ml 199培养基(赛默飞世尔科技公司)和320ml DMEM(赛默飞世尔科技公司),补充有20％胎牛血清(Gibco公司,英国)、50μg/ml庆大霉素(赛默飞世尔科技公司)、25μg/ml胎球蛋白(赛默飞世尔科技公司)、5ng/ml人表皮生长因子(赛默飞世尔科技公司)、0.5ng/ml基础成纤维细胞生长因子(赛默飞世尔科技公司)、5μg/ml胰岛素(西格玛公司)和0.2μg/ml地塞米松(西格玛公司)。为了进行分化,将细胞接种在基质胶包被的表面上,该表面通过在37℃下用0.1mg Corning™ Matrigel™基底膜基质(康宁公司)/ml DMEM(Gibco公司)孵育60min来制备。在100％汇合度下,用补充有2％胎牛血清(Gibco公司)、10μg/ml胰岛素(西格玛公司)和50μg/ml庆大霉素(赛默飞世尔科技公司)的DMEM(Gibco公司)替换生长培养基。在分化至少3天至最多5天(基于分化的肌管的存在)之后开始处理。

[0741] 外显子跳跃分析和定量(人类)

[0742] 用TRIsure分离试剂(Bioline公司)和氯仿提取分离RNA;如本领域技术人员所知,进行RNA从水相的异丙醇沉淀。对于cDNA合成,使用1000ng的总RNA并在适量的不含RNase的水中稀释,以得到8μl RNA稀释液。

[0743] 对于KM155肌管中的51号外显子和53号外显子跳跃分析,引发预混合物含有1μl dNTP混合物(各10mM)和1μl特异性反向引物(对于KM155,51号外显子:h53R 5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'[SEQ ID NO:5];53号外显子:h55R5'-ATCCTGTAGGACATTGGCAGTT-3[SEQ ID NO:6]。将此混合物在70℃下加热5min,然后在冰上冷却至少1min。制备含有0.5μl rRNasin(普洛麦格公司)、4.0μl 5x RT缓冲液(普洛麦格公司)、1.0μl M-MLV RT(普洛麦格公司)和4.5μl不含RNase的水的反应混合物,并将其添加到冷却的混合物中,每个反应产生20μl的总体积。RT-PCR在42℃下运行60min,然后在85℃下运行5min,并在冰上冷却。对于跳跃分析,遵循巢式PCR方法。为此,在第一PCR中,将3μl cDNA添加到2.5μl 10xSuperTaq PCR缓冲液、0.5μl dNTP混合物(各10mM)、0.125μl Taq DNA聚合酶TAQ-RO(5U/μl;罗氏公司)、16.875μl不含RNase的水和1μl(10pmol/μl)靶向外显子侧翼的每种引物的混合物中。使用以下引物:对于KM155,51号外显子:h48F5'-AAAAGACCTTGGGCAGCTTG-3'[SEQ ID NO:7]和h53R 5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'[SEQ ID NO:5];53号外显子:h50F5'-AGGAAGTTAGAAGATCTGAGC-3'[SEQ ID NO:20]和h55R5'-ATCCTGTAGGACATTGGCAGTT-3'[SEQ ID NO:6]。将这些样品经受PCR运行,在94℃下5min,然后在94℃下40sec、在60℃下40sec、在72℃下180sec进行25个循环,之后在72℃下进行7min。对于第二PCR,将1.5μl PCR1样品添加到5μl 10x SuperTaq PCR缓冲液、1μl dNTP混

合物(各10mM)、0.25μl Taq DNA聚合酶TAQ-RO(5U/μl;罗氏公司)、38.25μl不含RNase的水和2μl(10pmol/μl)靶向外显子侧翼的每种引物的混合物中。使用以下引物:对于KM155,51号外显子:h49F5'-CCAGCCACTCAGCCAGTG-3'[SEQ ID NO:10]和h52R2 5'-TTCTTCCAACTGGGGACGC-3'[SEQ ID NO:11],53号外显子:h52F5'-CCCCAGTTGGAAGAACTCATT-3'[SEQ ID NO:21]和h54R5'-CCAAGAGGCATTGATATTCTC-3'[SEQ ID NO:9]。将这些样品经受PCR运行,在94℃下5min,然后在94℃下40sec、在60℃下40sec、在72℃下60sec进行32个循环,之后在72℃下进行7min。根据制造商的说明书,使用超灵敏NGS试剂盒(安捷伦公司)使用Femto Pulse系统对外显子跳跃水平进行定量。可替代地,使用具有DNA1000芯片的生物分析仪2100(芯片实验室;安捷伦公司)分析特异性PCR片段。对于51号外显子跳跃,预期的非跳跃产物具有408bp的大小(KM155)并且跳跃产物具有175bp的大小(KM155)。对于53号外显子跳跃,预期的非跳跃产物具有438bp的大小(KM155)并且跳跃产物具有226bp的大小(KM155)。

[0744] 对于KM1328肌管中的51号外显子和53号外显子跳跃分析,引发预混合物含有1μl dNTP混合物(各10mM)和1μl特异性反向引物(对于KM1328,51和53号外显子:h57R 5'-TCTGAACTGCTGGAAAGTCG-3'[SEQ ID NO:22])。将此混合物在70℃下加热5min,然后在冰上冷却至少1min。制备含有0.5μl rRNasin(普洛麦格公司)、4.0μl 5x RT缓冲液(普洛麦格公司)、1.0μl M-MLV RT(普洛麦格公司)和4.5μl不含RNase的水的反应混合物,并将其添加到冷却的混合物中,每个反应产生20μl的总体积。RT-PCR在42℃下运行60min,然后在70℃下运行10min,并在冰上冷却。对于跳跃分析,遵循巢式PCR方法。为此,在第一PCR中,将3μl cDNA添加到2.5μl 10x SuperTaq PCR缓冲液、0.5μl dNTP混合物(各10mM)、0.125μl Taq DNA聚合酶TAQ-RO(5U/μl;罗氏公司)、16.875μl不含RNase的水和1μl(10pmol/μl)靶向外显子侧翼的每种引物的混合物中。使用以下引物:对于KM1328,51号外显子和53号外显子:h48F 5'-AAAAGACCTTGGGCAGCTTG-3'[SEQ ID NO:7]和h57R5'-TCTGAACTGCTGGAAAGTCG-3'[SEQ ID NO:22]。将这些样品经受PCR运行,在94℃下5min,然后在94℃下40sec、在60℃下40sec、在72℃下180sec进行25个循环,之后在72℃下进行7min。对于第二PCR,将1.5μl PCR1样品添加到5μl 10x SuperTaq PCR缓冲液、1μl dNTP混合物(各10mM)、0.25μl Taq DNA聚合酶TAQ-RO(5U/μl;罗氏公司)、38.25μl不含RNase的水和2μl(10pmol/μl)靶向外显子侧翼的每种引物的混合物中。使用以下引物:对于KM1328,51和53号外显子:h49F2 5'-AAACTGAAATAGCAGTTCAAGC-3'[SEQ ID NO:23]和h54R5'-CCAAGAGGCATTGATATTCTC-3'[SEQ ID NO:9]。将这些样品经受PCR运行,在94℃下5min,然后在94℃下40sec、在60℃下40sec、在72℃下90sec进行32个循环,之后在72℃下进行7min。通过使用具有DNA1000芯片的生物分析仪2100(芯片实验室;安捷伦公司)分析特异性PCR片段来定量外显子跳跃水平。对于51号外显子跳跃,预期的非跳跃产物具有793bp的大小(KM1328)并且跳跃产物具有560bp的大小(KM1328)。对于53号外显子跳跃,预期的非跳跃产物具有793bp的大小(KM1328)并且跳跃产物具有581bp的大小(KM1328)。

[0745] 结果(实例10-12)

[0746] 实例10.hCD71-5'-SS-DMD-ASO+SO1861-SC-Mal或hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)+SO1861-SC-Mal或hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1、2、3、4或5)+SO1861-SC-Mal(体外)

[0747] 通过5'上的二硫键形成将DMD-ASO-SH(诱导人抗肌萎缩蛋白的51号外显子跳跃并

且具有与曲萨珀森相同的序列和化学修饰的2'O-甲基-硫代磷酸酯反义寡核苷酸的激活形式)或DMD-PMO(1)-SH(诱导人抗肌萎缩蛋白的51号外显子跳跃并且具有与依特立生相同的序列但没有5'-修饰的磷酰二胺吗啉代寡聚物[PMO]反义寡核苷酸的激活形式)与靶向人CD71的抗CD71单克隆抗体缀合,以分别产生hCD71-5'-SS-DMD-ASO(DAR2.1)和hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)(DAR2.2)(关于缀合程序,参见图23A-D)。在来自非DMD供体(KM155)的分化人类肌管上在没有4μM的内体逃逸增强剂SO1861-SC-Mal或与其组合的情况下针对抗肌萎缩蛋白51号外显子跳跃测试所得的化合物。这揭示了在处理72小时之后与4μMSO1861-SC-Mal组合强烈增强了51号外显子的跳跃:虽然单独的hCD71-5'-SS-DMD-ASO在600nM下产生低51号外显子跳跃(2.6%)(图24A,左分图;表A9),但是0.46-100nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO+SO1861-SC-Mal已经揭示了13.4%-43.6%的51号外显子跳跃(图24A,右分图;表A10)。同样地,虽然暴露于hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)在16.6-600nM下产生非常微小的51号外显子跳跃(0.4%-1.1%)(图24B,左分图;表A9),但是51号外显子跳跃在2.78-100nM hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)+SO1861-SC-Mal的低6倍的暴露浓度下增加至10.4%-12.5%(图24B,右分图;表A10),从而构成与没有SO1861-SC-Mal的条件相比明显的效力提高。因此,SO1861-SC-Mal与hCD71-5'-SS-DMD-ASO和hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)(即,与5'上的hCD71缀合的靶向DMD寡核苷酸)的共施用改善中靶递送并诱导明显的51号外显子跳跃。

[0748] 接下来,在人类肌管上针对51号外显子跳跃活性测试与3'上的抗hCD71缀合的靶向DMD-PMO。通过3'上的二硫键形成将DMD-PMO(1)-SH、DMD-PMO(2)-SH(诱导人抗肌萎缩蛋白的51号外显子跳跃的PMO反义寡核苷酸的激活形式,如Echigoya等人(2017)中所述)或DMD-PMO(3)-SH(诱导人抗肌萎缩蛋白的51号外显子跳跃的PMO反义寡核苷酸的激活形式,如Echigoya等人(2017)中所述)与靶向人CD71的抗CD71单克隆抗体缀合,以分别产生hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)(DAR2.1)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)(DAR3.0)和hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)(DAR2.6)(关于缀合程序,参见图23A-D)。在来自非DMD供体(KM155)的分化人类肌管上在没有4μM SO1861-SC-Mal或与其组合的情况下针对抗肌萎缩蛋白51号外显子跳跃测试所得的化合物。如针对hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)所示,这揭示了在处理72小时之后hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)与4μM SO1861-SC-Mal组合增强51号外显子跳跃:虽然暴露于单独的hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)在0.077-600nM下产生非常微小的51号外显子跳跃(0.4%-2.2%)(图25A,左分图;表A9),但是51号外显子跳跃在2.78-100nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)+SO1861-SC-Mal的暴露浓度下增加至8.2%-9.7%(图25A,右分图;表A10)。更引人注目的是,在hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)与4μM SO1861-SC-Mal组合的情况下,51号外显子跳跃强烈地增强:暴露于hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)+SO1861-SC-Mal已经揭示了在0.013nM缀合物下的51号外显子跳跃(7.8%),该跳跃在2.78-100nM缀合物下增加至高达75.6%-80.4%(图25B,右分图;表A10),但是暴露于单独的hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)在600nM缀合物下仅产生5.7%的51号外显子跳跃(图25B,左分图;表A9),从而构成了与没有SO1861-SC-Mal的条件相比四个数量级的提高。暴露于hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)与4μM SO1861-SC-Mal的组合也产生强烈增强的51号外显子跳跃:hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)+SO1861-SC-Mal已经揭示了在0.077nM缀合物下的51号外显子跳跃(9.6%),该跳跃在2.78-100nM下增加至高达28.3%-29.2%(图25C,右分图;表A10),但是暴露于单独的hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)在所有测试浓度(高达600nM)下没有产生51号外显子跳跃(0.0%)(图25C,左分图;表A9)。因此,

SO1861-SC-Mal与hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)和hCD71-3'-DMD-PMO(3)(即,与3'上的hCD71缀合的靶向DMD寡核苷酸)的共施用改善中靶递送并诱导明显的51号外显子跳跃。

[0749] 还在人类肌管上测试了诱导人抗肌萎缩蛋白的53号外显子跳跃的靶向DMD-PMO。通过3'上的二硫键形成将DMD-PMO(4)-SH(诱导人抗肌萎缩蛋白的53号外显子跳跃并且具有与戈洛迪森相同的序列和化学修饰的PMO反义寡核苷酸的激活形式)或DMD-PMO(5)-SH(诱导人抗肌萎缩蛋白的53号外显子跳跃并且具有与维托拉生相同的序列和化学修饰的PMO反义寡核苷酸的激活形式)与靶向人CD71的抗CD71单克隆抗体缀合,以分别产生hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)(DAR2.3)和hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)(DAR2.1)(关于缀合程序,参见图23A-D)。在来自非DMD供体(KM155)的分化人类肌管上在没有4μM SO1861-SC-Mal或与其组合的情况下针对抗肌萎缩蛋白53号外显子跳跃测试所得的化合物。这揭示了在处理72小时之后仅在与SO1861-SC-Mal组合时增强53号外显子跳跃:虽然暴露于单独的600nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)仅产生0.4%的53号外显子跳跃(图26A,左分图;表A9),但是2.78nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)+SO1861-SC-Mal已经产生5.4%的53号外显子跳跃(图26A,右分图;表A10)。同样地,虽然暴露于单独的600nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)产生0.3%的53号外显子跳跃(图26B,左分图;表A9),但是2.78nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)+SO1861-SC-Mal(图26B,右分图;表A10)产生6.0%的53号外显子跳跃,该跳跃在100nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)下增加至高达8.4%,从而实现了一到两个数量级的提高。这些数据表明,SO1861-SC-Mal与hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)和hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)(即,与3'上的hCD71缀合的靶向DMD寡核苷酸)的共施用增强其中靶递送并诱导53号外显子跳跃。

[0750] 综合考虑,这些数据表明,SO1861-SC-Mal的共施用广泛适用于在人类肌管中有效增加具有不同靶向序列(不同外显子、不同序列)的hCD71靶向DMD寡核苷酸和缀合方法(在5'或3'末端上)的效力。

[0751] 表A9:人类肌管中抗CD71缀合的DMD寡核苷酸的跳跃功效

[0752]

%外显子跳跃（Femto 或芯片实验室分析）		[nM 缀合物] 600	100	16.6	2.78	0.46	0.077	
hCD71-5'-SS-DMD-ASO（DAR2.1）（KM155）	Femto	2.6	0.4	0.3	0.5	1.5	0.4	% DMD 51 号外显子跳跃
hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)（DAR2.2）（KM155）	Femto	0.5	0.4	1.1	0.3	0.3	0.3	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)（DAR2.1）（KM155）	Femto	2.2	0.4	0.5	0.4	1.6	0.5	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)（DAR3.0）（KM155）	Femto	5.7	1.3	2.6	0.3	0.4	0.5	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)（DAR2.6）（KM155）	芯片实验室	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)（DAR2.3）（KM155）	Femto	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	% DMD 53 号外显子跳跃
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)（DAR2.1）（KM155）	Femto	0.3	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	

[0753] 表A10:人类肌管中抗CD71缀合的DMD寡核苷酸与SO1861-SC-Ma1共施用的跳跃功效

[0754]

%外显子跳跃（Femto 或芯片实验室分析）		[nM 缀合物] 100	16.6	2.78	0.46	0.077	0.013	
hCD71-5'-SS-DMD-ASO（DAR2.1）+ SO1861-SC-Mal（KM155）	Femto	43.6	63.8	21.9	13.4	0.0	0.0	% DMD 51 号外

[0755]

hCD71-5'-SS-DMD-PMO(1)（DAR2.2）+SO1861-SC-Mal（KM155）	Femto	10.4	12.5	12.3	5.3	1.8	1.0	显子跳跃
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)（DAR2.1）+SO1861-SC-Mal（KM155）	Femto	9.5	9.7	8.2	5.4	2.2	0.7	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)（DAR3.0）+SO1861-SC-Mal（KM155）	Femto	79.1	80.4	75.6	50.7	23.4	7.8	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)（DAR2.6）+SO1861-SC-Mal（KM155）	芯片实验室	29.2	29.1	28.3	14.6	9.6	1.0	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)（DAR2.3）+SO1861-SC-Mal（KM155）	Femto	4.4	5.0	5.4	1.3	0.6	0.1	% DMD 53 号外显子跳跃
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)+SO1861-SC-Mal（DAR2.1）（KM155）	Femto	8.4	5.4	6.0	2.1	1.8	0.0	

[0756] 实例11.hCD71-5'-SS-DMD-ASO+hCD63-SC-SO1861或hCD63-5'-SS-DMD-ASO+hCD71-SC-SO1861(体外)

[0757] 将DMD-ASO-SH与靶向人CD71的抗CD71单克隆抗体或靶向人CD63的抗CD63单克隆抗体缀合,以分别产生hCD71-5'-SS-DMD-ASO(DAR2.1)和hCD63-5'-SS-DMD-ASO(DAR2.3)(关于缀合程序,参见图23A-D)。将SO1861-SC-Mal与靶向人CD71的抗CD71单克隆抗体或靶向人CD63的抗CD63单克隆抗体缀合,以分别产生hCD71-SC-SO1861(DAR 4.0)和hCD63-SC-SO1861(DAR 4.8)(关于缀合程序,参见图27)。将hCD71-5'-SS-DMD-ASO和hCD63-5'-SS-DMD-PMO分别与100nM固定浓度的hCD63-SC-SO1861或hCD71-SC-SO1861共施用于来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管。引人注目的是,hCD71-5'-SS-DMD-ASO与100nM hCD63-SC-SO1861的共施用揭示了增强的51号外显子跳跃,在0.46nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO下已经具有28.7%的外显子跳跃,该跳跃在16.6-100nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO下增加至高达50.0%-68.1%的外显子跳跃(图28A;表A11)。hCD63-5'-SS-DMD-ASO与100nM hCD71-SC-SO1861的共施用揭示了增强的51号外显子跳跃,在16.6nM下具有29.2%的外显子跳跃(图28B;表A11)。这些数据表明,hCD63-SC-SO1861和hCD71-SC-SO1861诱导hCD71或hCD63靶向的DMD-ASO的增强中靶细胞质递送,从而诱导增强的51号外显子跳跃。

[0758] 接下来,切换滴定的缀合物和以固定浓度共施用的缀合物。将来自非DMD(健康)供体(KM155)的分化人类肌管用hCD63-SC-SO1861与55.6nM固定浓度的hCD71-5'-SS-DMD-ASO组合处理。这揭示了增强的51号外显子跳跃,在16.6nM hCD63-SC-SO1861下为72.6%外显子跳跃,在2.78nM下为53.1%外显子跳跃,并且在0.46nM下仍然为21.0%外显子跳跃(图29A;表A12)。更引人注目的是且相关地,在来自受DMD影响的供体(KM1328)的分化肌管中,hCD63-SC-SO1861与55.6nM固定浓度的hCD71-5'-SS-DMD-ASO的共施用在0.46nM hCD63-

SC-SO1861下已经产生53.8%的跳跃,该跳跃在16.6nM hCD63-SC-SO1861下增加至高达93.4%跳跃并且在600nM下增加至高达97.0%跳跃(图29B,表A12)。

[0759] 综合考虑,这些数据表明,配体1缀合的寡核苷酸有效载荷(即,hCD71或hCD63靶向的DMD-ASO)与配体2缀合的SO1861(即,hCD71或hCD63靶向的SO1861)组合或反之亦然(即,配体2缀合的寡核苷酸有效载荷与配体1缀合的SO1861组合)在人类肌管中并且特别地在疾病相关细胞系统诸如来自受DMD影响的供体的分化肌管(2-靶标、2-组分系统的实例)中导致明显的效力增强。

[0760] 表A11:人类肌管中抗CD71缀合的DMD寡核苷酸与hCD61-SC-SO1861和抗CD63缀合的DMD寡核苷酸与hCD71-SC-SO1861共施用的跳跃功效

[0761]

%外显子跳跃（Femto 分析）	**[nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO 或 hCD63-5'-SS-DMD-ASO]**						
	100	**16.6**	**2.78**	**0.46**	**0.077**	**0.013**	
hCD71-5'-SS-DMD-ASO（DAR2.1）+ 100 nM hCD63-SC-SO1861（DAR4.8）（KM155）	50.0	68.1	29.8	28.7	0.0	0.0	% DMD 51 号外显子跳跃
hCD63-5'-SS-DMD-ASO（DAR2.3）+ 100 nM hCD71-SC-SO1861（DAR4.0）	6.9	29.2	0.0	0.6	0.0	0.0	

[0762]

（KM155）							

[0763] 表A12:人类肌管中抗CD61-SC-SO1861与抗CD71缀合的DMD寡聚物共施用的跳跃功效

[0764]

%外显子跳跃（Femto 或芯片实验室分析）		**[nM hCD63-SC-SO1861]**						
		600	**100**	**16.6**	**2.78**	**0.46**	**0.077**	
hCD63-SC-SO1861（DAR4.8）+ 55.6 nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO（DAR2.1）（KM155）	Femto	61.3	58.9	72.6	53.1	21.0	0.7	% DMD 51 号外显子跳跃
hCD63-SC-SO1861（DAR4.8）+ 55.6 nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO（DAR2.1）（KM1328）	芯片实验室	97.0	95.5	93.4	89.3	53.8	0.7	

[0765] 实例12.hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861或hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861或hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1、2、3、4或5)-SC-SO1861或hCD63-DMD-PMO(1、2、3或4)-SC-SO1861(体外)

[0766] 将SO1861-SC-Mal与靶向人CD71(hCD71)的抗CD71单克隆抗体或靶向人CD63(hCD63)的抗CD63单克隆抗体缀合,并且然后通过5'上的二硫键形成与DMD-ASO-SH缀合,以分别产生:hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861(DAR2.3/4.0)和hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861(DAR2.2/4.8)(关于缀合程序,参见图30A-C)。引人注目的是,用这些缀合物处理来

自受DMD影响的供体(KM1328)的分化人类肌管揭示了极其增强的51号外显子跳跃:hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861在600nM缀合物下显示出99.6%跳跃,在100nM下显示出96.3%跳跃,在16.6nM下显示出64.7%跳跃,并且在2.78nM下仍然显示出79.2%跳跃(图31A,左分图;表A13)。外显子跳跃在低至至少0.46nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861下仍然是可测量的。同样地,hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861在100-600nM缀合物下显示出100.0%外显子跳跃,在16.6nM下显示出74.6%跳跃,并且在2.78nM下仍然显示出62.4%跳跃(图31A,右分图;表A13)。这些数据表明,与掺入DMD-ASO和与hCD71或hCD63缀合的SO1861-SC-Mal的缀合物一起孵育构成了在来自受DMD影响的供体的人类肌管中实现的最大抗肌萎缩蛋白51号外显子跳跃百分比的明显提高。

[0767] 接下来,在来自受DMD影响的供体(KM1328)的人类肌管中针对抗肌萎缩蛋白51号外显子跳跃测试掺入DMD-PMO(1、2或3)和与hCD71或hCD63缀合的SO1861-SC-Mal的缀合物。将SO1861-SC-Mal与靶向人CD71的抗CD71单克隆抗体或靶向人CD63的抗CD63单克隆抗体缀合,并且然后通过3'上的二硫键形成与DMD-PMO(1)-SH、DMD-PMO(2)-SH或DMD-PMO(3)-SH缀合,以产生:hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861(DAR2.4/4.0)、hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861(DAR2.7/4.8)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861(DAR3.1/4.0)、hCD63-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861(DAR2.7/4.8)、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861(DAR2.5/4.0)和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861(DAR2.8/4.8)(关于缀合程序,参见图30A-C)。用这些缀合物进行处理全部揭示了来自受DMD影响的供体(KM1328)的人类肌管中极其增强的51号外显子跳跃(表A13):在600nMhCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861下为75.8%外显子跳跃(图31B,左分图),在600nM hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861下为96.5%外显子跳跃(图31B,右分图)。51号外显子跳跃在2.78nM hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861下仍然为76.9%,并且作用在低至至少0.46nM hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861下仍然是可测量的。甚至更引人注目的是,hCD63-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861揭示了在2.78-600nM下100.0%的外显子跳跃,并且在0.46nM下仍然为53.6%跳跃(图31C,右分图)。同样地,hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861揭示了强烈增强的51号外显子跳跃,在600nM下为100.0%外显子跳跃,在100nM下为97.6%跳跃,在16.6nM下为92.1%跳跃,在2.78nM下为76.3%跳跃,并且在0.46nM下仍然为28.3%跳跃(图31C,左分图)。最后,hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861也显示出强烈增强的51号外显子跳跃,在600nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861下为86.7%跳跃(图31D,左分图),并且在2.78-600nM hCD63-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861下为89.6%-98.2%外显子跳跃(图31D,右分图)。明显的51号外显子跳跃在低至至少0.46nM(20.0%)hCD63-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861下是可测量的。综合考虑,这些数据表明,与掺入DMD-PMO和与hCD71或hCD63缀合的SO1861-SC-Mal两者的缀合物一起孵育构成了在来自受DMD影响的供体的人类肌管中实现的最大51号外显子跳跃百分比的明显提高,DMD-PMO具有不同的靶向序列。

[0768] 另外,在来自受DMD影响的供体(KM1328)的人类肌管中针对抗肌萎缩蛋白53号外显子跳跃测试掺入DMD-PMO(4或5)和与hCD71或hCD63缀合的SO1861-SC-Mal的缀合物。将SO1861-SC-Mal与靶向人CD71的抗CD71单克隆抗体或靶向人CD63的抗CD63单克隆抗体缀合,并且然后通过3'上的二硫键形成与DMD-PMO(4)-SH或DMD-PMO(5)-SH缀合,以产生:

hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861(DAR2.0/4.0)、hCD63-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861(DAR2.4/4.8)和hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)-SC-SO1861(DAR2.0/4.0)(关于缀合程序,参见图30A-C)。用这些缀合物进行处理全部揭示了来自受DMD影响的供体(KM1328)的人类肌管中极其增强的53号外显子跳跃(表A13):在600nM hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861下为93.6%跳跃(图32A,左分图),在600nM hCD63-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861下为98.0%跳跃(图32A,右分图)。53号外显子跳跃在2.78nM hCD63-3'-SS-DMD-PMO(4)-SO1861下仍然为90.6%,并且作用在低至至少0.46nM hCD63-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861下仍然是可测量的。同样地,hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)-SC-SO1861揭示了在600nM下94.4%的外显子跳跃,并且在2.78nM下仍然为19.1%跳跃(图32B)。这些数据表明,与掺入DMD-PMO和与hCD71或hCD63缀合的SO1861-SC-Mal两者的缀合物一起孵育在DMD-PMO的不同靶向序列的情况下构成了在来自受DMD影响的供体的人类肌管中实现的最大53号外显子跳跃百分比的明显提高。

[0769] 总而言之,掺入DMD寡核苷酸和与hCD71或hCD63缀合的SO1861-SC-Mal的缀合物在不同寡核苷酸靶向系列(不同外显子、不同序列)的情况下在相关细胞系统诸如来自受DMD影响的供体的分化肌管(靶向1-组分系统的实例)中导致明显的效力增强。

[0770] 表A13:人类肌管中hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861、hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861、hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1-5)-SC-SO1861和hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1-5)-SC-SO1861的跳跃功效

[0771]

%外显子跳跃（芯片实验室分析）	[nM 缀合物] 600	100	16.6	2.78	0.46	0.077	
hCD71-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861（DAR2.3/4.0）（KM1328）	99.6	96.3	64.7	79.2	3.7	0.8	% DMD 51 号外显子跳跃
hCD63-5'-SS-DMD-ASO-SC-SO1861（DAR2.2/4.8）（KM1328）	100.0	100.0	74.6	62.4	2.0	0.7	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861（DAR2.4/4.0）（KM1328）	75.8	43.4	20.1	4.7	1.5	0.9	
hCD63-3'-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861（DAR2.7/4.8）（KM1328）	96.5	93.5	89.5	76.9	8.6	0.7	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861（DAR3.1/4.0）（KM1328）	100.0	97.6	92.1	76.3	28.3	0.5	
hCD63-3'-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861（DAR2.7/4.8）（KM1328）	100.0	100.0	100.0	100.0	53.6	0.6	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861（DAR2.5/4.0）（KM1328）	86.7	71.0	54.3	18.7	7.3	0.8	
hCD63-3'-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861（DAR2.8/4.8）（KM1328）	98.2	96.4	95.3	89.6	20.0	0.7	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861（DAR2.0/4.0）（KM1328）	93.6	59.6	42.8	9.5	6.4	0.8	% DMD 53 号外显子跳跃
hCD63-3'-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861（DAR2.4/4.8）（KM1328）	98.0	97.4	96.6	90.6	6.6	0.7	
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)-SC-SO1861（DAR2.0/4.0）（KM1328）	94.4	63.7	31.2	19.1	4.8	0.5	

[0772] 参考文献

[0773] Cardamone M,et al.,2008-Cardamone M;Darras BT;Ryan MM,2008,'Inherited myopathies and muscular dystrophies',Seminars in Neurology,vol.28,pp.250-259,http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1062269

[0774] Shadrin et al,2016-Striated muscle function,regeneration,and repair,Cell Mol Life Sci.2016 November;73(22):4175-4202.doi:10.1007/s00018-016-2285-z.

[0775] Dumont NA,Wang YX,Rudnicki MA.Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function.Development.2015;142(9):1572-1581,doi:10.1242/dev.114223

[0776] Uygur and Lee,Mechanisms of Cardiac Regeneration.Dev Cell.2016 Feb 22;Volume 36(4):pp.362-374,doi:10.1016/j.devcel.2016.01.018

[0777] SlørdalL,Spigset O.Heart failure induced by non-cardiac drugs,Drug Saf 2006;Volume 29(7):pp.567-86,doi:10.2165/00002018-200629070-00003

[0778] Ebner et al.,Strategies for Skeletal Muscle Targeting in Drug

Discovery,Curren tPharmaceutical Design 2015,Volume 21(10),pp.1327-1336,DOI:10.2174/1381612820666140929095755

[0779] González-Jamett et al.,Hereditary Myopathies,2018,DOI:10.5772/intechopen.76076,www.intechopen.com/chapters/60283

[0780] Savarese et al.,Is Gene-Size an Issue for the Diagnosis of Skeletal Muscle Disorders?,2020,Volume 7(3),pp.203-216,DOI:10.3233/JND-190459

[0781] Duan et al.,Duchenne muscular dystrophy,Nat Rev Dis Primers,2021 Feb 18;Volume 7(1):13,doi:10.1038/s41572-021-00248-3

[0782] Bladen,C.L.et al.,The TREAT-NMD Duchenne muscular dystrophy registries:conception,design,and utilization by industry and academia.Hum.Mutat.34,1449-1457(2013),DOI:10.1002/humu.22390.

[0783] Goemans,N.et al.,A randomized placebo-controlled phase 3 trial of an antisense oligonucleotide,drisapersen,in Duchenne muscular dystrophy.Neuromuscul.Disord.Volume 28(1),pp.4-15(2018),doi:10.1016/j.nmd.2017.10.004.

[0784] Mendell,J.R.et al.,Assessment of systemic delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in children with duchenne muscular dystrophy:a nonrandomized controlled trial.JAMA Neurol.Volume 77(9),pp.1122-1131(2020),doi:10.1001/jamaneurol.2020.1484.

[0785] Mendell,J.R.et al,A phase I/IIa follistatin gene therapy trial for Becker muscular dystrophy,Mol.Ther.Volume 23(1),pp.192-201(2015),doi:10.1038/mt.2014.200.

[0786] Wasala,N.B.et al.,Single SERCA2a therapy ameliorated dilated cardiomyopathy for 18 months in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy,Mol.Ther.Volume 28(3),pp.845-854(2020),doi:10.1016/j.ymthe.2019.12.011

[0787] Aránega,et al.,Review MiRNAs and Muscle Regeneration:Therapeutic Targets inDuchenne Muscular Dystrophy,Int J Mol Sci.(2021 Apr),Volume 22(8):4236,doi:10.3390/ijms22084236

[0788] Chemello,et al.,Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing,J.Clin.Invest.Volume 130(6),pp.2766-2776(2020),doi:10.1172/JCI136873

[0789] Nelson,et al.,Genome engineering:a new approach to gene therapy forneuromuscular disorders,Nat.Rev.Neurol.Volume 13(11),pp.647-661(2017),doi:10.1038/nrneurol.2017.126

[0790] Cerro-Herreros et al.,Therapeutic Potential of AntagomiR-23b for Treating MyotonicDystrophy,Mol Ther Nucleic Acids,2020 Sep 4;Volume 21,pp.837-849,doi.org/10.1016/j.omtn.2020.07.021

[0791] Bladen,C.L.et al.,The TREAT-NMD DMD global database:analysis of more than7000 Duchenne muscular dystrophy mutations.Hum.Mutat.Volume 36(4),pp.395-402(2015),doi:10.1002/humu.22758

[0792] Hanahan and Weinberg,Hallmarks of cancer:the next generation,Cell

(2011,Mar 4);Volume 144(5),pp.646-674,doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

[0793] Wang et al.,Saponins as Natural Adjuvant for Antisense Morpholino OligonucleotidesDelivery In Vitro and in mdx Mice,Molecular Therapy:Nucleic Acids,2018,Volume 11,pp.192-202,doi:10.1016/j.omtn.2018.02.004

[0794] Wang et al.,Saponins enhance exon skipping of 2′-O-methyl phosphorothioateoligonucleotide in vitro and in vivo,Drug Design,Development and Therapy Volume 12:pp.3705-3715(2018),DOI:10.2147/DDDT.S179008

[0795] Kemaladewi et al,Dual exon skipping in myostatin and dystrophin for Duchennemuscular dystrophy,BMC Medical Genomics,Volume 4,36(2011),DOI:10.1186/1755-8794-4-36

[0796] Baik et al,Cell type-selective targeted delivery of a recombinant lysosomal enzymefor enzyme therapies,Molecular Therapy,Volume 29(12),pp.3512-3524(2021),DOI:10.1016/j.ymthe.2021.08.020

[0797] Echigoya et al.,Quantitative antisense screening and optimization for exon 51skipping in Duchenne muscular dystrophy,Molecular Therapy,Volume 25(11),pp.2561-2572(2017),DOI:10.1016/j.ymthe.2017.07.014

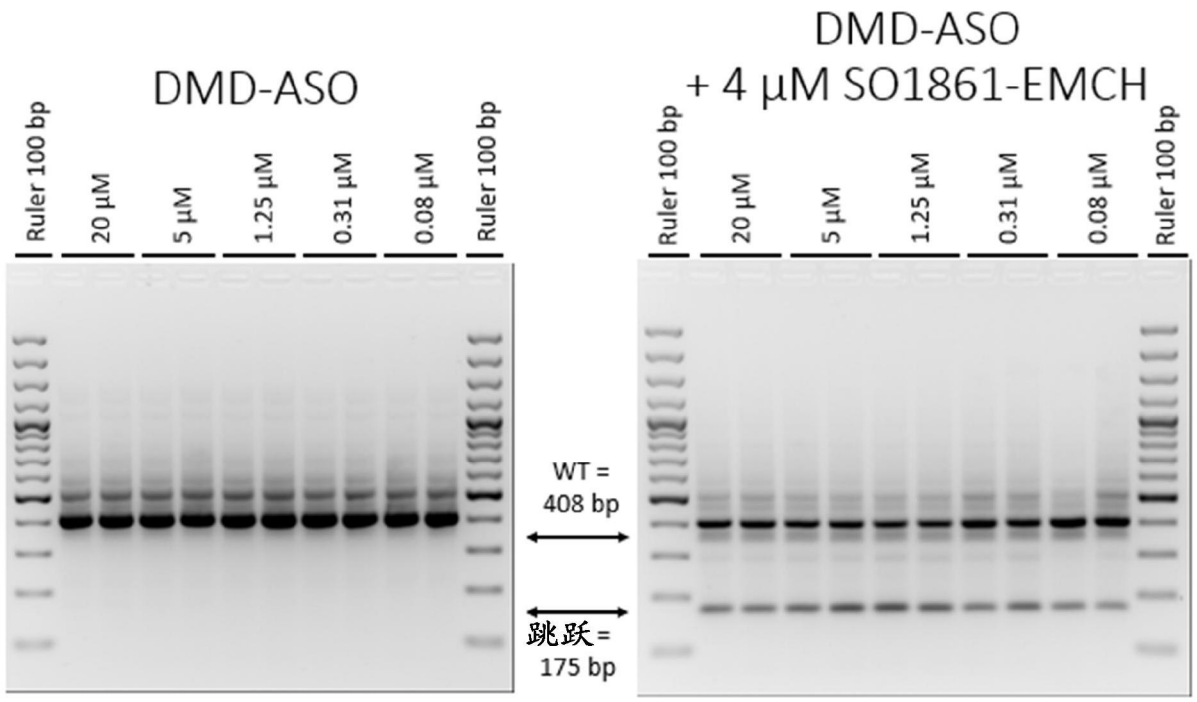

DMD-ASO
Ruler 100 bp
20 µM
5 µM
1.25 µM
0.31 µM
0.08 µM
Ruler 100 bp
WT = 408 bp
跳跃 = 175 bp
DMD-ASO
+ 4 µM SO1861-EMCH
Ruler 100 bp
20 µM
5 µM
1.25 µM
0.31 µM
0.08 µM
Ruler 100 bp

图1A

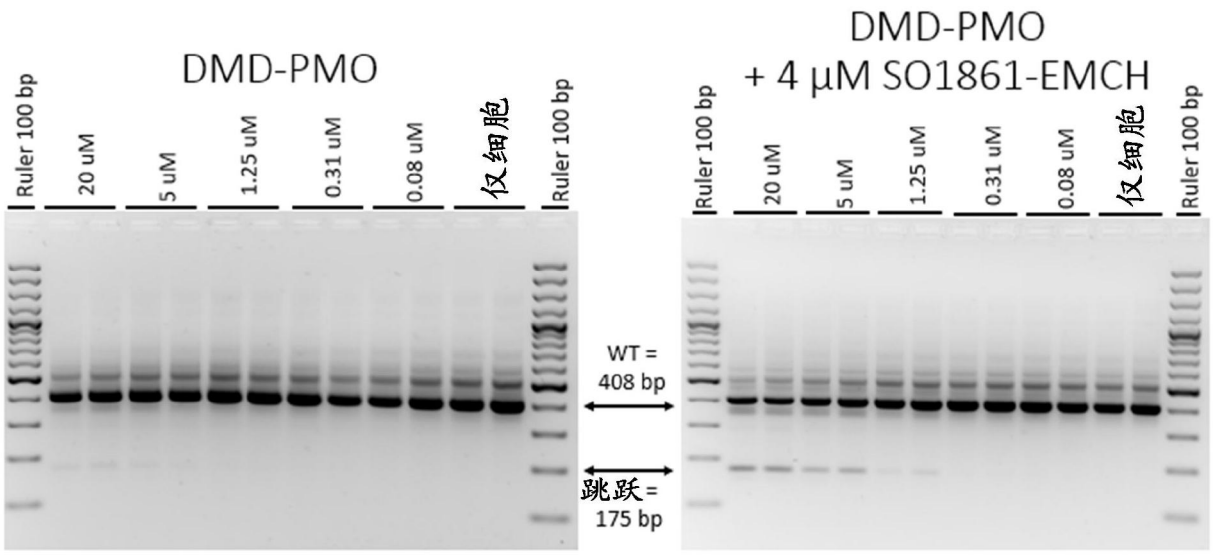

DMD-PMO
Ruler 100 bp
20 uM
5 uM
1.25 uM
0.31 uM
0.08 uM
仅细胞
Ruler 100 bp
WT = 408 bp
跳跃 = 175 bp
DMD-PMO
+ 4 µM SO1861-EMCH
Ruler 100 bp
20 uM
5 uM
1.25 uM
0.31 uM
0.08 uM
仅细胞
Ruler 100 bp

图1B

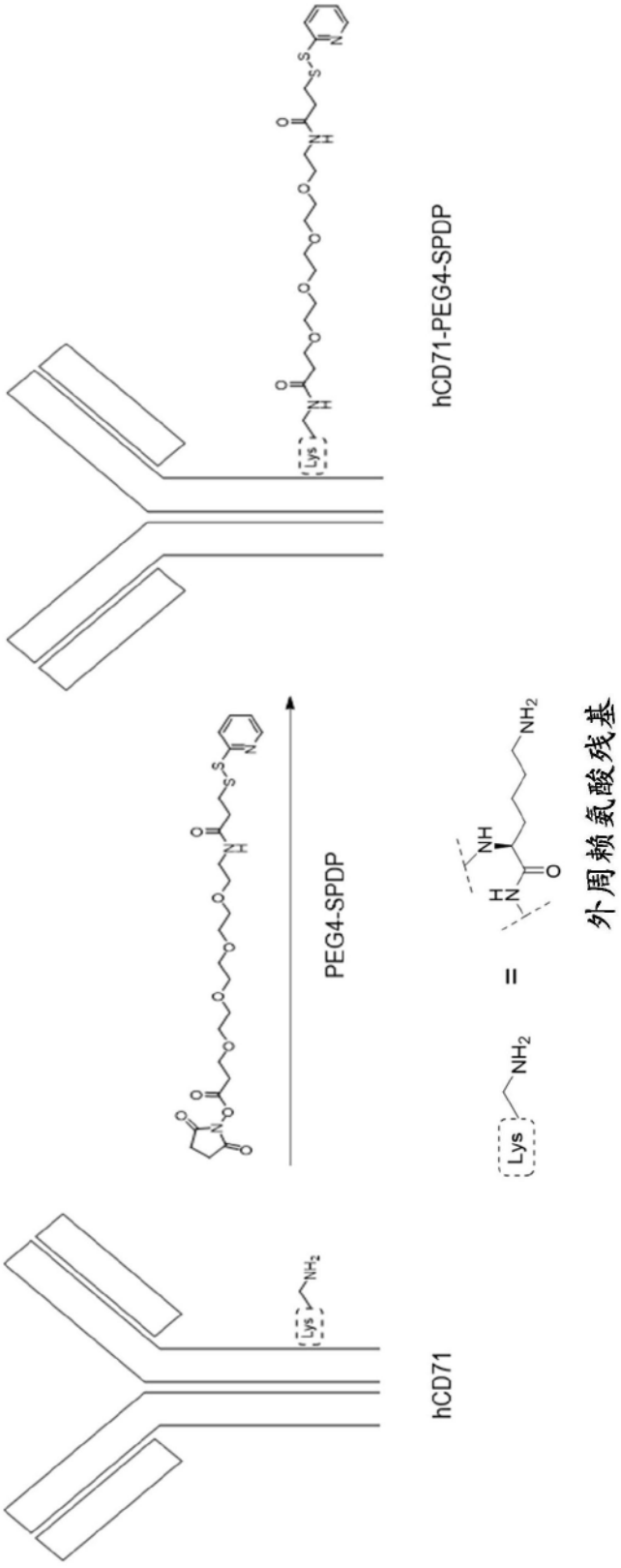


图2A

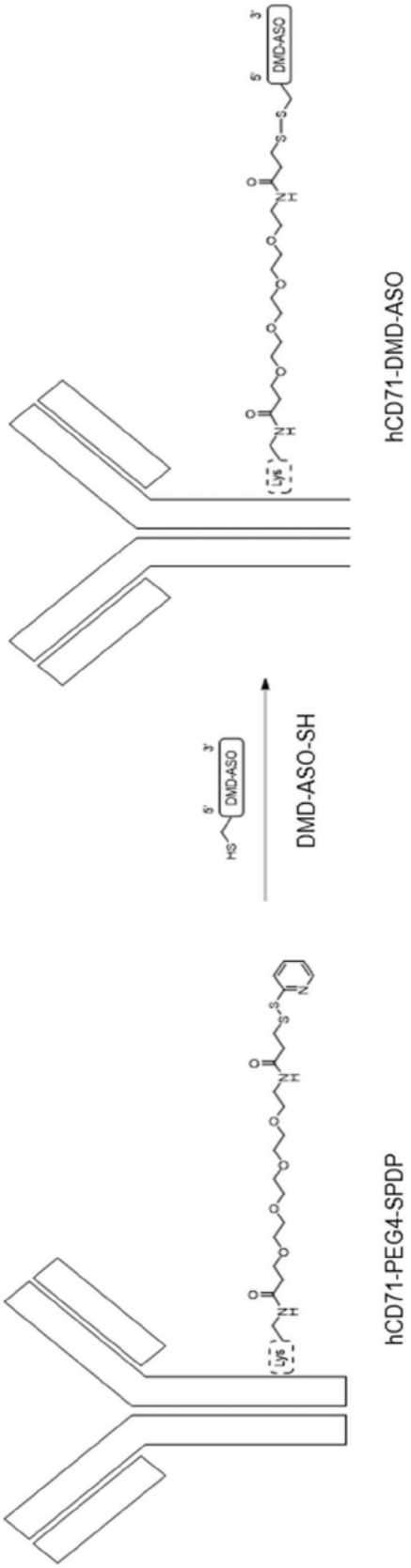


图2B

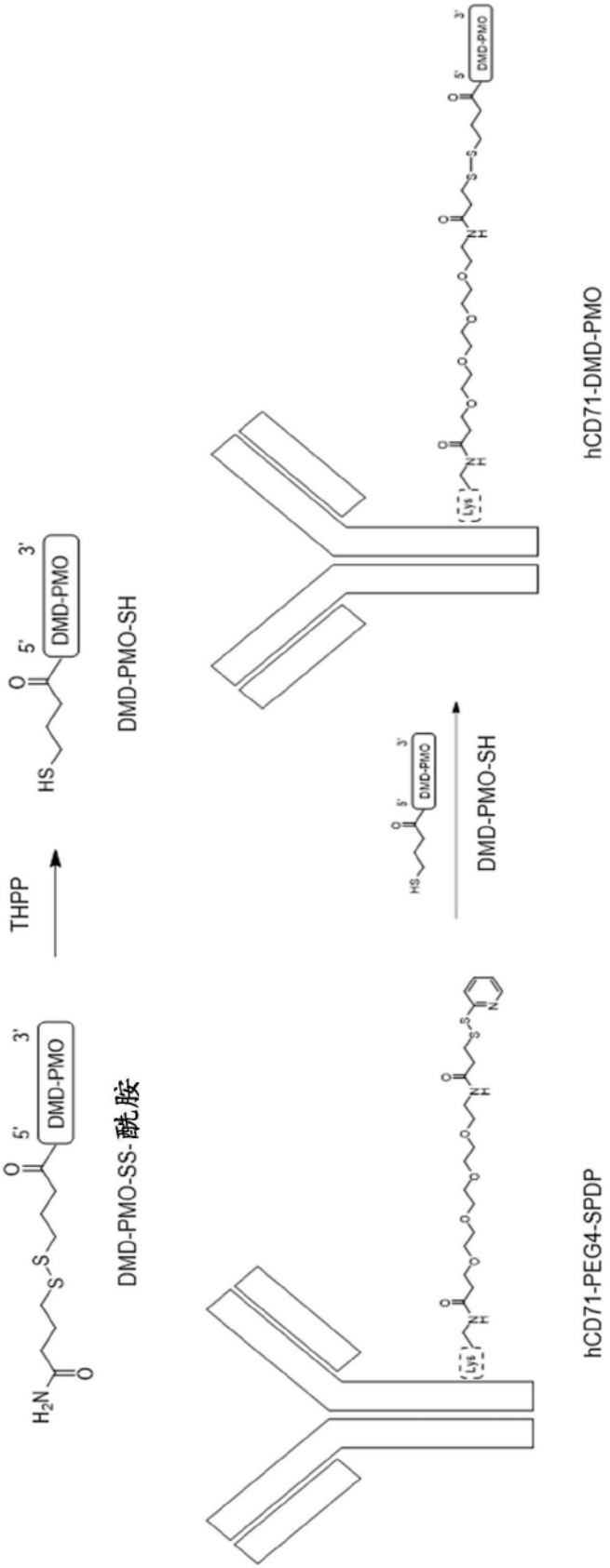

DMD-PMO-SS-酰胺
THPP
DMD-PMO-SH
hCD71-PEG4-SPDP
DMD-PMO-SH
hCD71-DMD-PMO

图2C

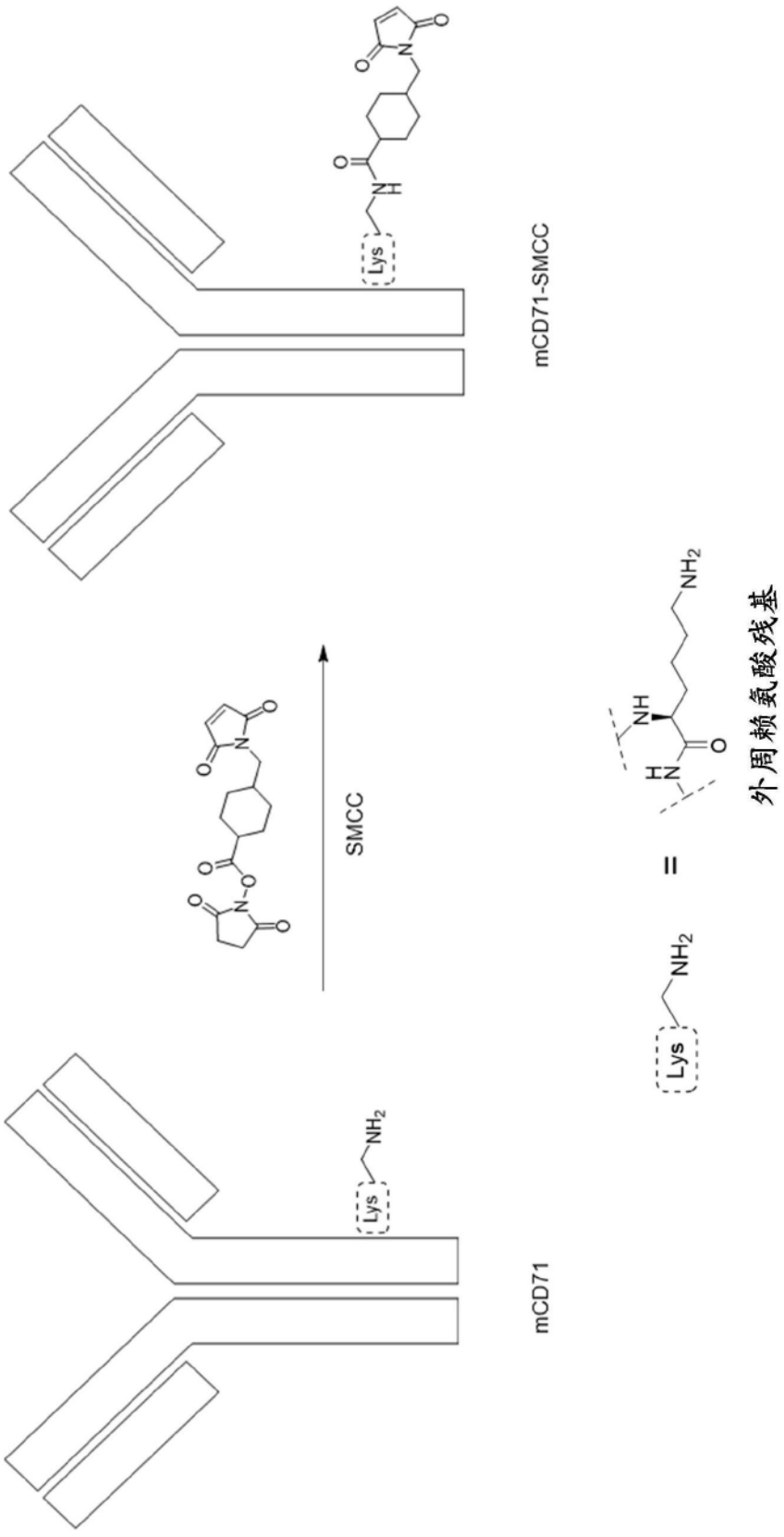


图2D

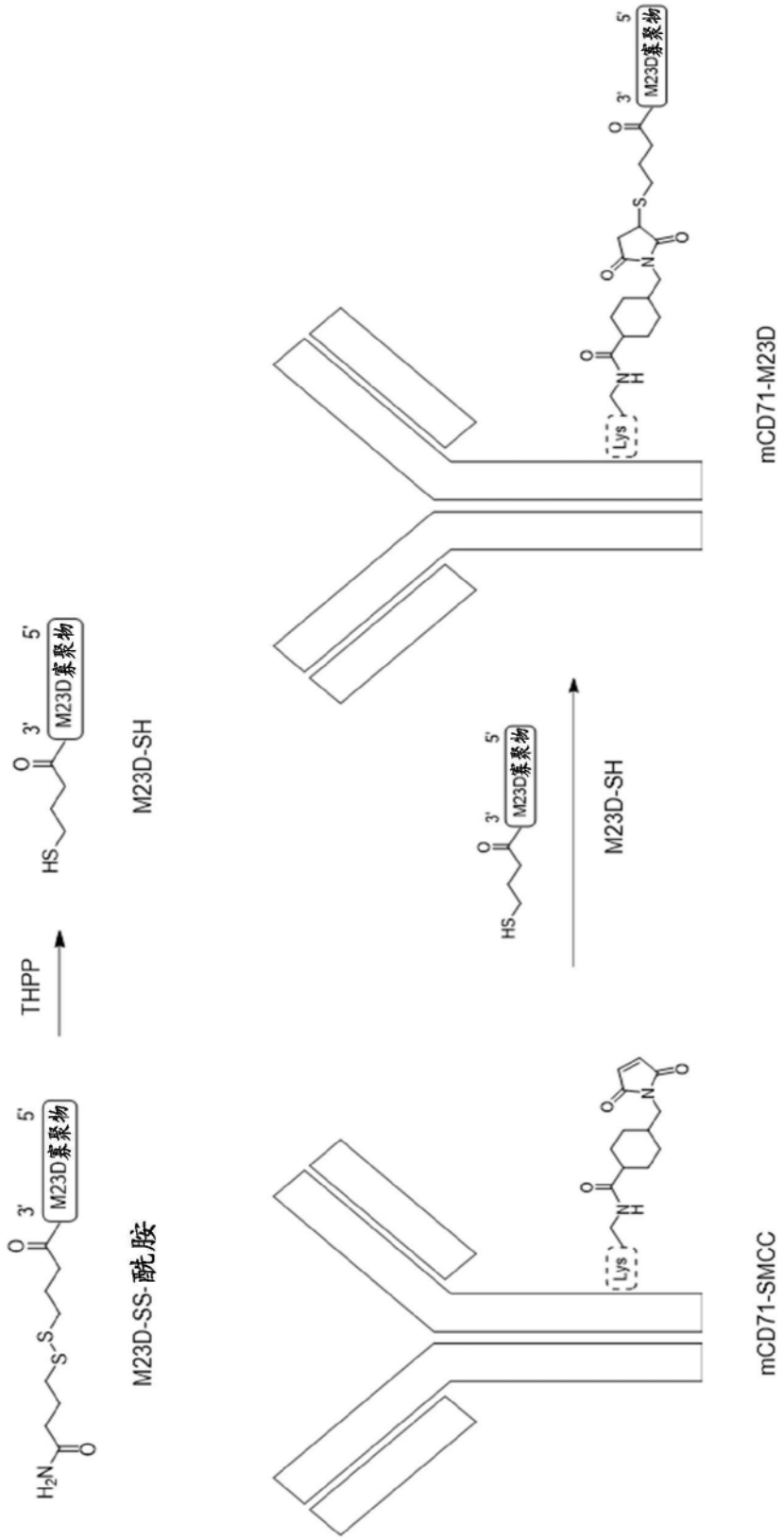

M23D-SS-酰胺
THPP
M23D-SH
M23D-SH
mCD71-SMCC
mCD71-M23D
M23D寡聚物
5'
3'
HS
Lys
H2N

图2E

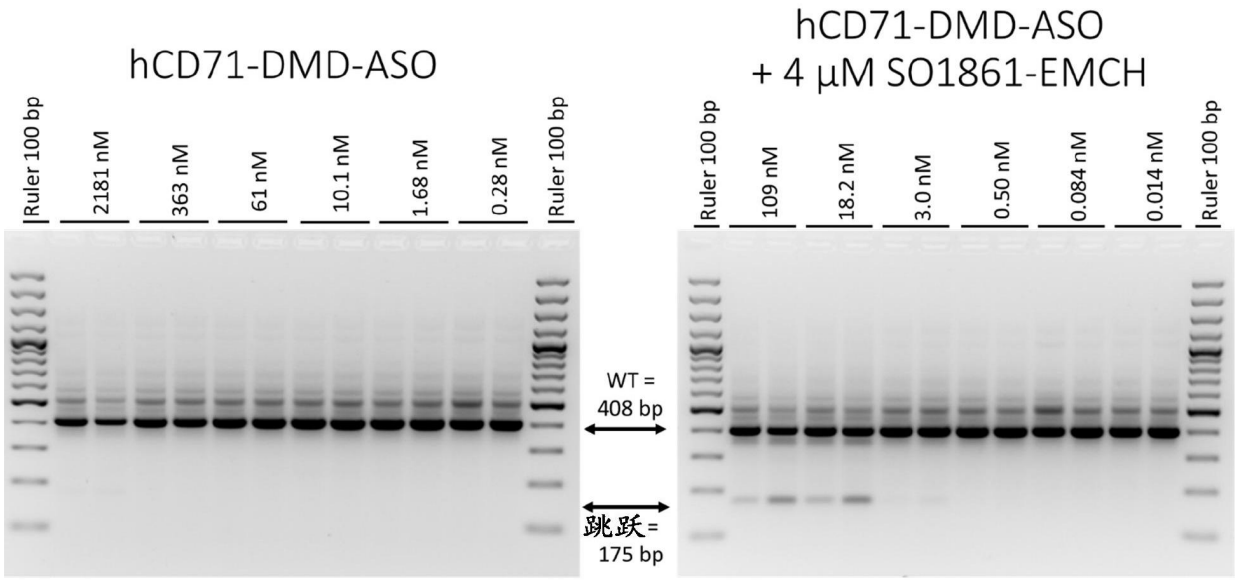

hCD71-DMD-ASO
Ruler 100 bp
2181 nM
363 nM
61 nM
10.1 nM
1.68 nM
0.28 nM
Ruler 100 bp
hCD71-DMD-ASO
+ 4 μM SO1861-EMCH
Ruler 100 bp
109 nM
18.2 nM
3.0 nM
0.50 nM
0.084 nM
0.014 nM
Ruler 100 bp
WT =
408 bp
跳跃=
175 bp

图3A

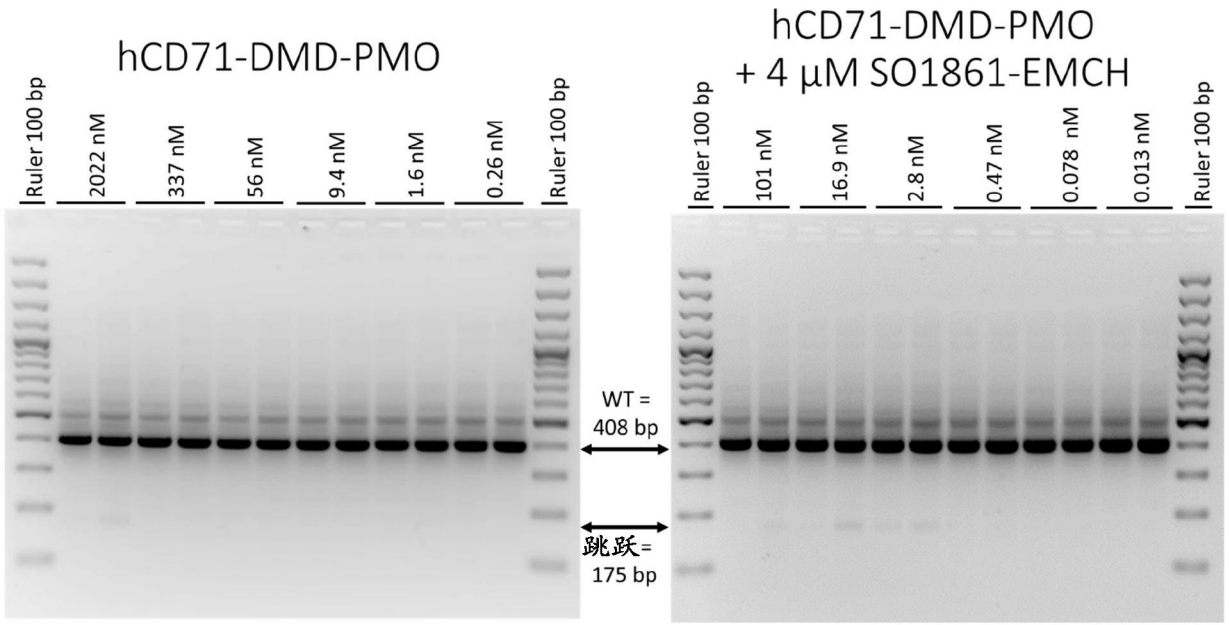

hCD71-DMD-PMO
Ruler 100 bp
2022 nM
337 nM
56 nM
9.4 nM
1.6 nM
0.26 nM
Ruler 100 bp
hCD71-DMD-PMO
+ 4 μM SO1861-EMCH
Ruler 100 bp
101 nM
16.9 nM
2.8 nM
0.47 nM
0.078 nM
0.013 nM
Ruler 100 bp
WT =
408 bp
跳跃=
175 bp

图3B

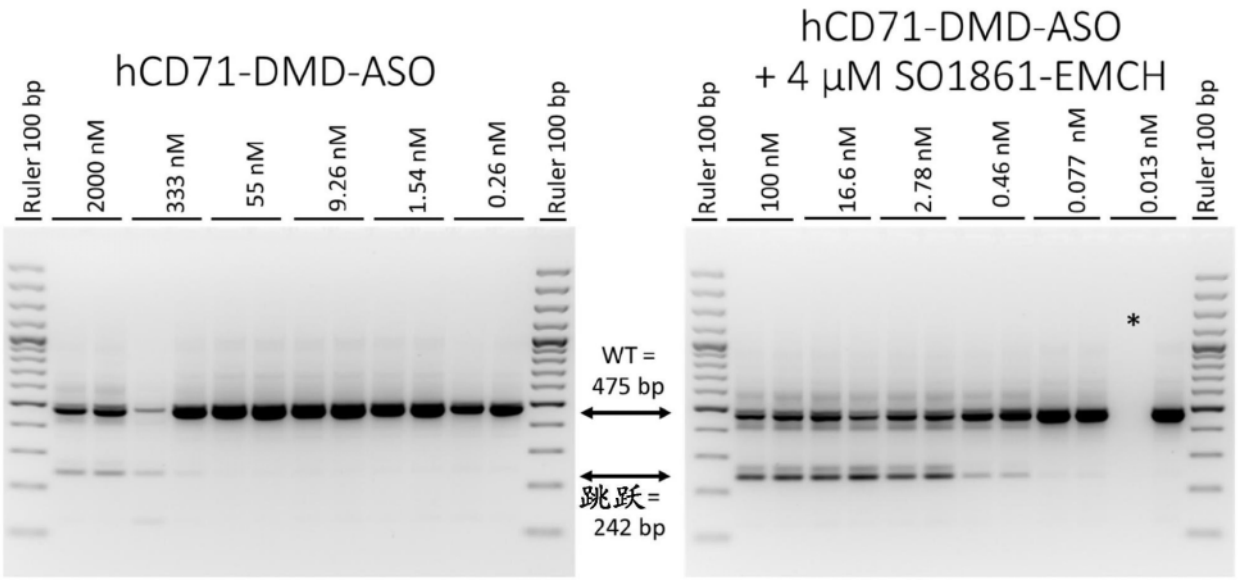

hCD71-DMD-ASO
Ruler 100 bp
2000 nM
333 nM
55 nM
9.26 nM
1.54 nM
0.26 nM
Ruler 100 bp
WT = 475 bp
跳跃 = 242 bp
hCD71-DMD-ASO + 4 μM SO1861-EMCH
Ruler 100 bp
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
Ruler 100 bp
*

图4A

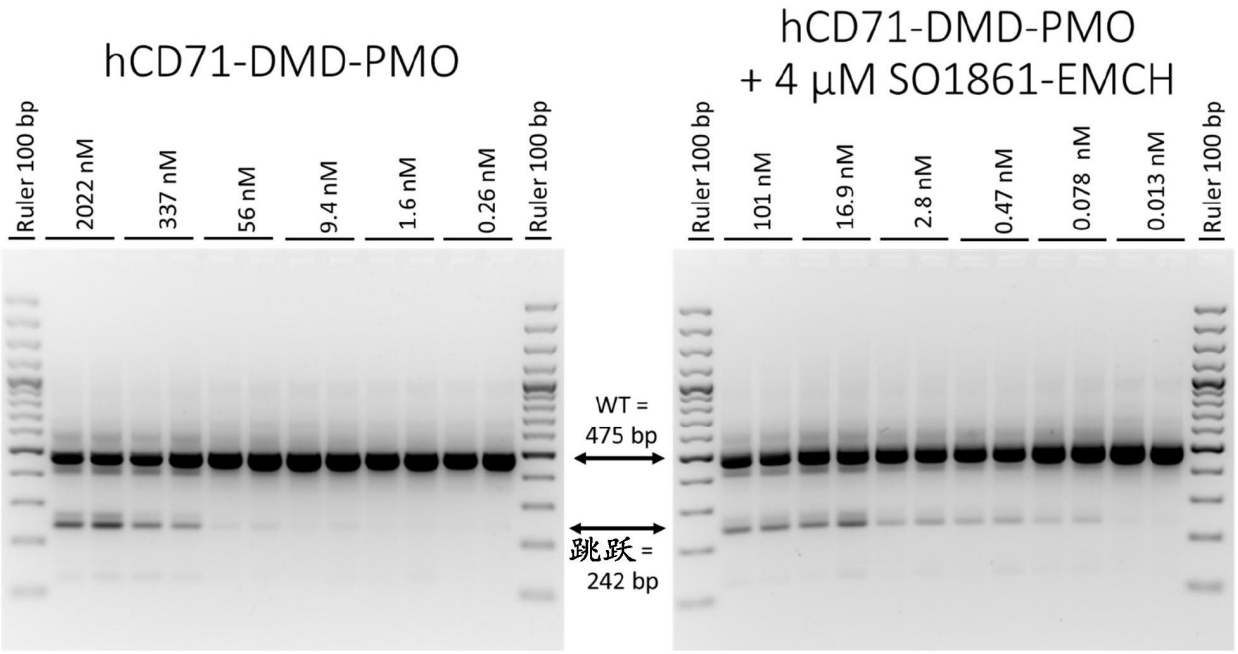

hCD71-DMD-PMO
Ruler 100 bp
2022 nM
337 nM
56 nM
9.4 nM
1.6 nM
0.26 nM
Ruler 100 bp
WT = 475 bp
跳跃 = 242 bp
hCD71-DMD-PMO + 4 μM SO1861-EMCH
Ruler 100 bp
101 nM
16.9 nM
2.8 nM
0.47 nM
0.078 nM
0.013 nM
Ruler 100 bp

图4B

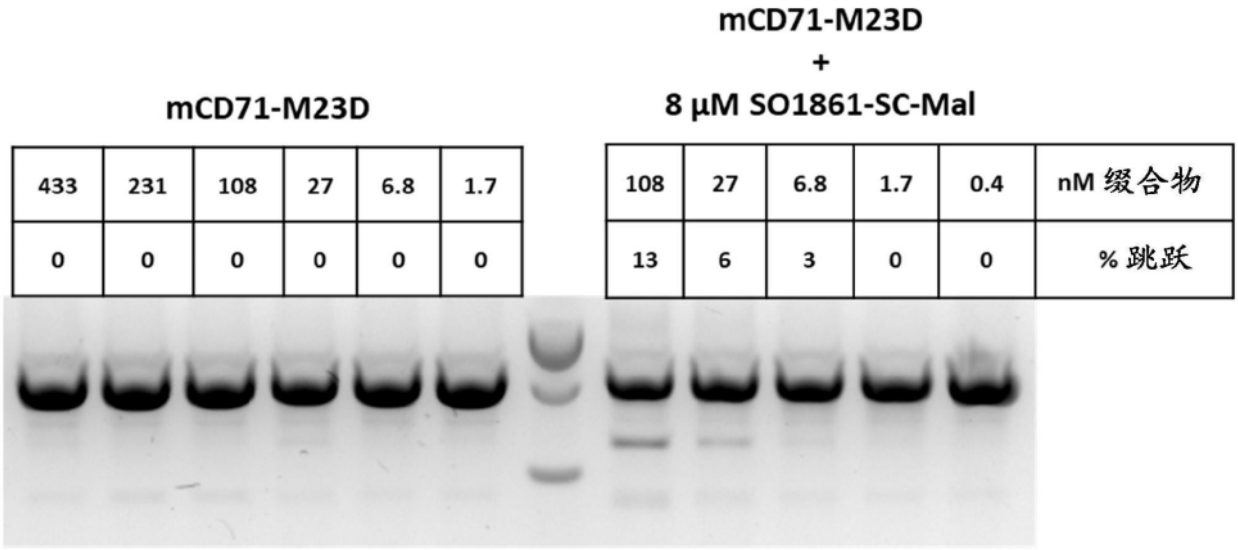

mCD71-M23D
mCD71-M23D
+
8 μM SO1861-SC-Mal
433 231 108 27 6.8 1.7
0 0 0 0 0 0
108 27 6.8 1.7 0.4 nM 缀合物
13 6 3 0 0 % 跳跃

图5

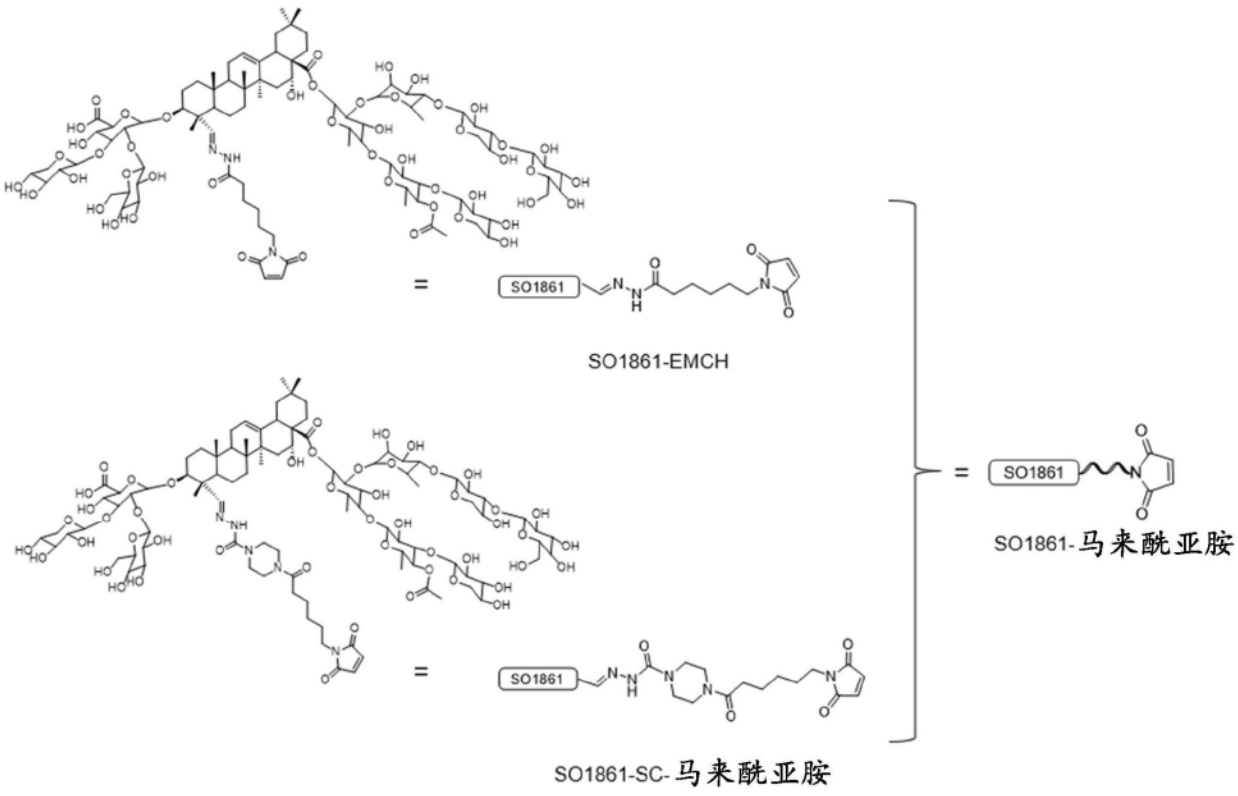

SO1861
SO1861-EMCH
SO1861
SO1861-SC-马来酰亚胺
SO1861
SO1861-马来酰亚胺

图6A

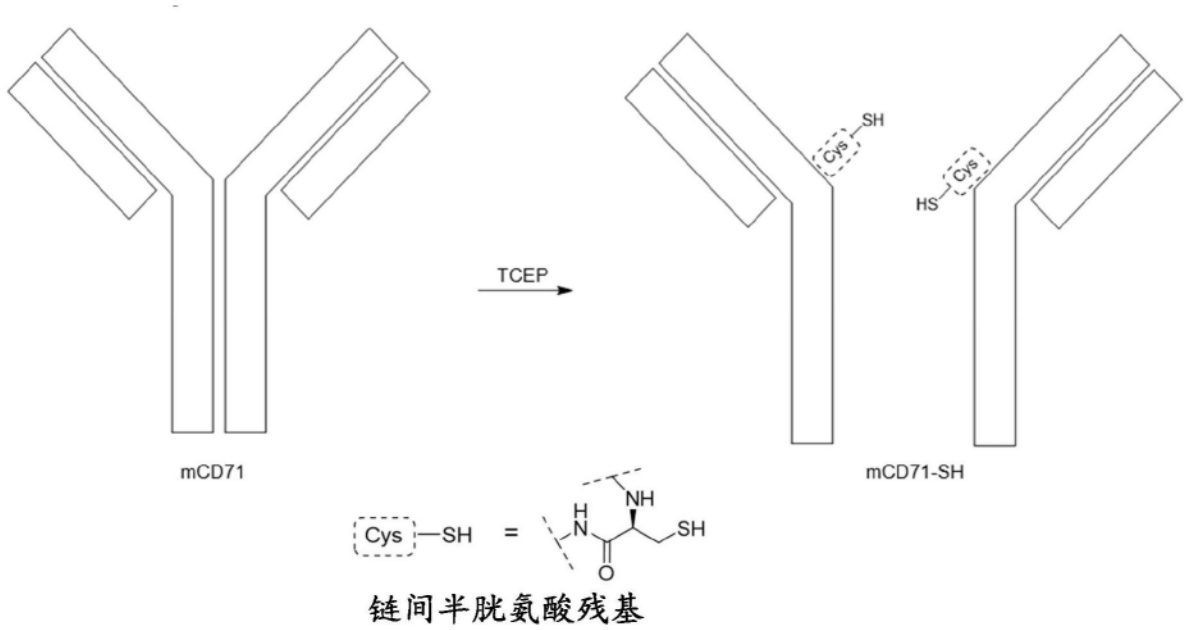

TCEP
mCD71
mCD71-SH
Cys—SH =
链间半胱氨酸残基

图6B

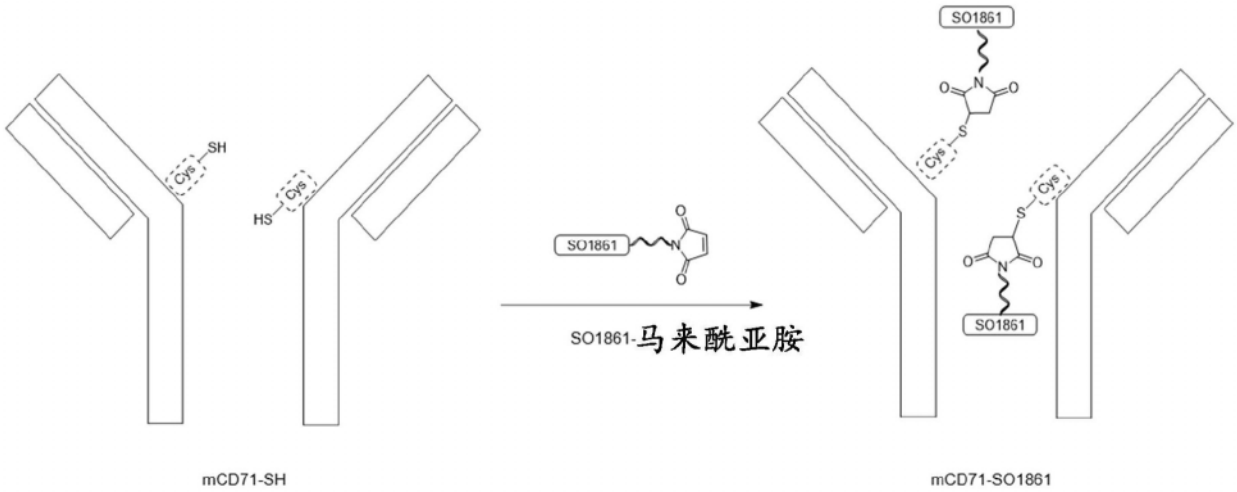

SO1861
SO1861-马来酰亚胺
mCD71-SH
mCD71-SO1861

图6C

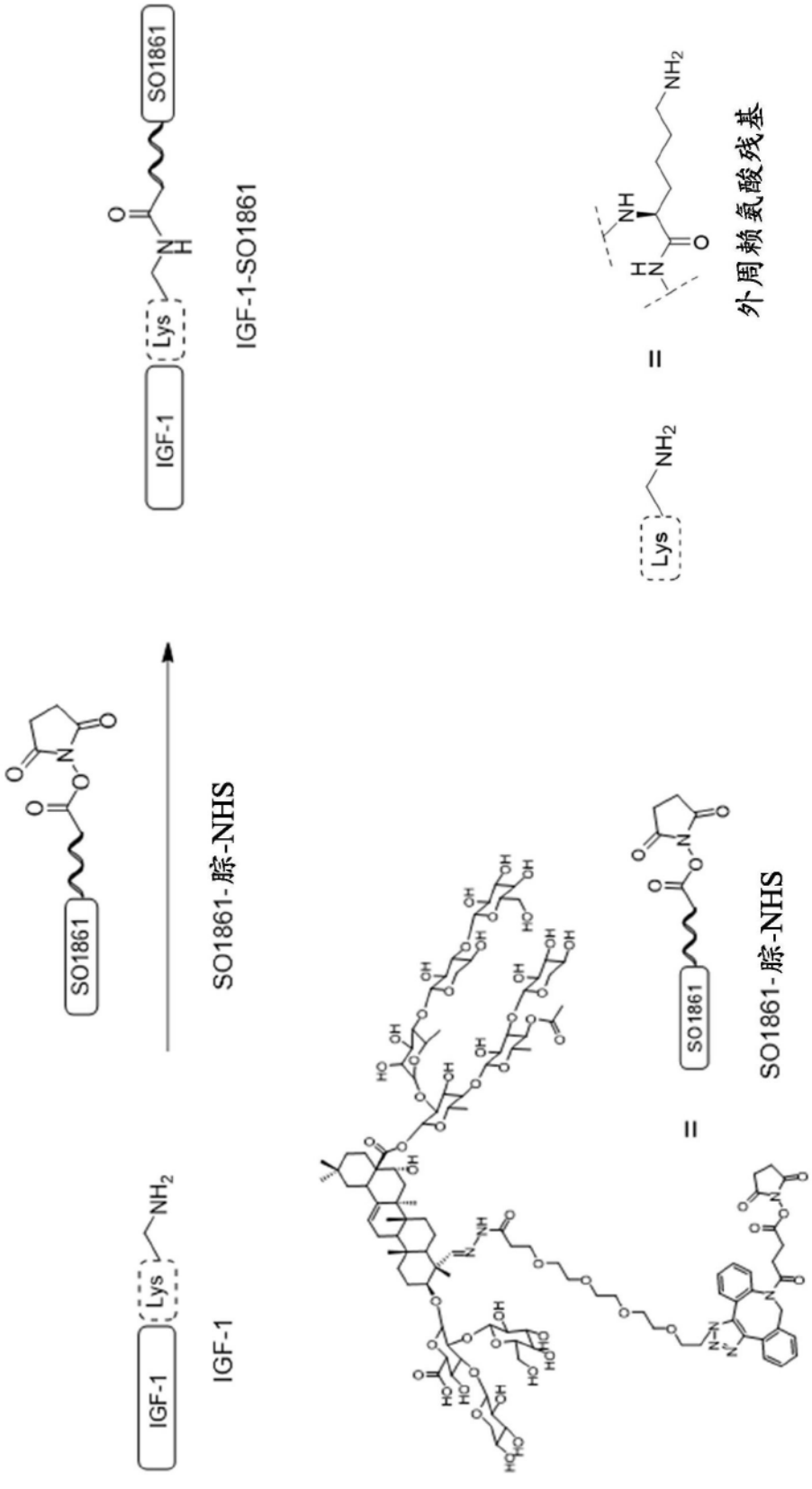


图6D

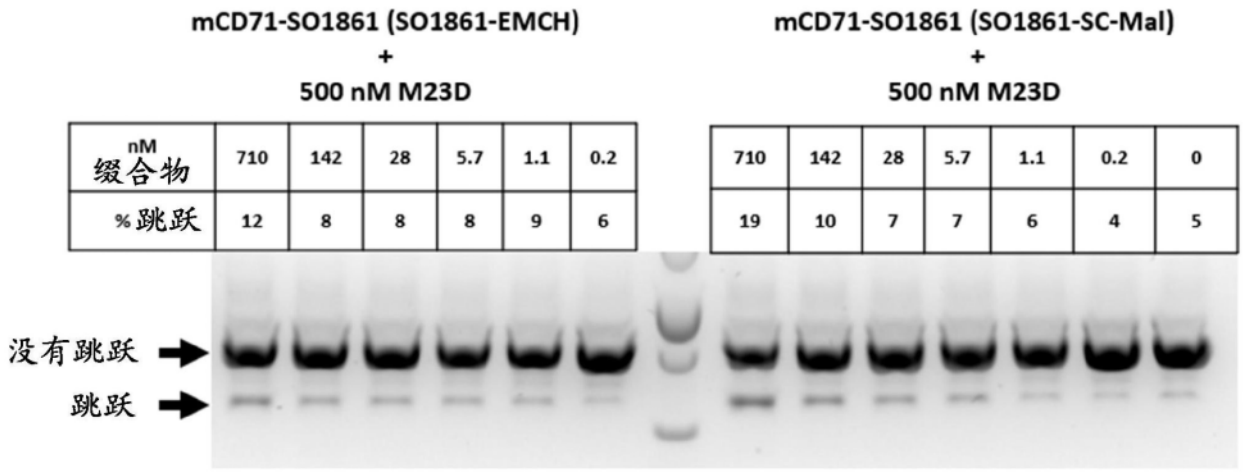

mCD71-SO1861 (SO1861-EMCH)
+
500 nM M23D
mCD71-SO1861 (SO1861-SC-Mal)
+
500 nM M23D
nM 缀合物
710 142 28 5.7 1.1 0.2
% 跳跃
12 8 8 8 9 6
710 142 28 5.7 1.1 0.2 0
19 10 7 7 6 4 5
没有跳跃
跳跃

图7A

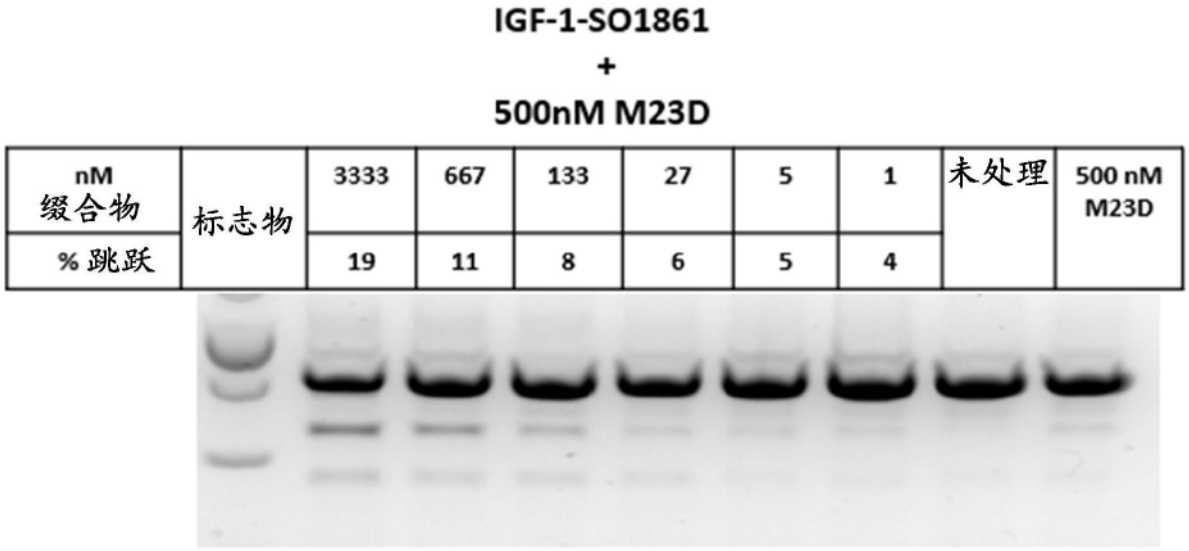

IGF-1-SO1861
+
500nM M23D
nM 缀合物
标志物
3333 667 133 27 5 1
未处理
500 nM M23D
% 跳跃
19 11 8 6 5 4

图7B

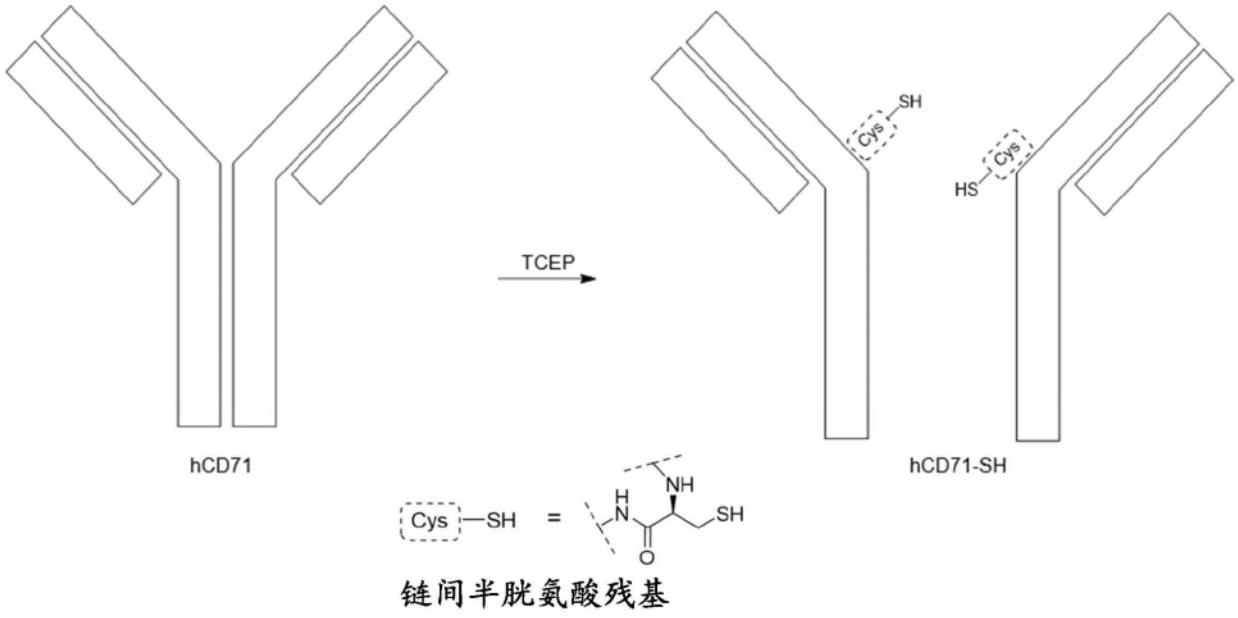

TCEP
hCD71
hCD71-SH
Cys—SH =
链间半胱氨酸残基

图8A

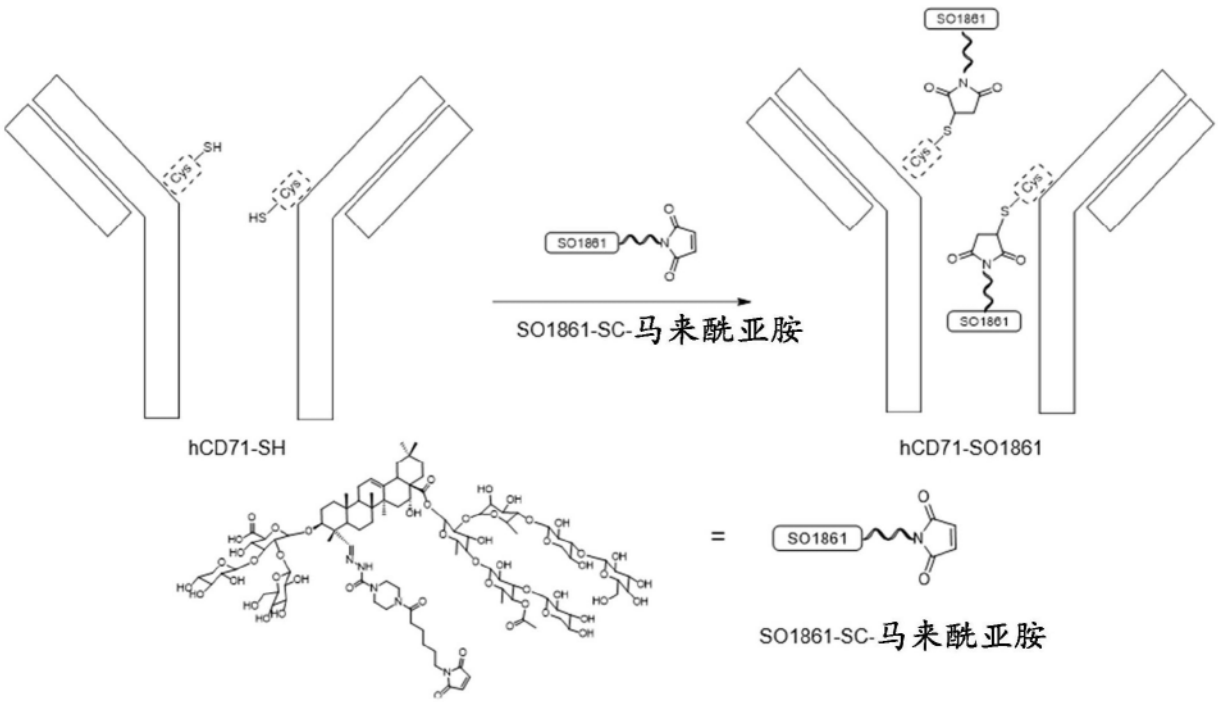

SO1861
SO1861-SC-马来酰亚胺
hCD71-SH
hCD71-SO1861
=
SO1861-SC-马来酰亚胺

图8B

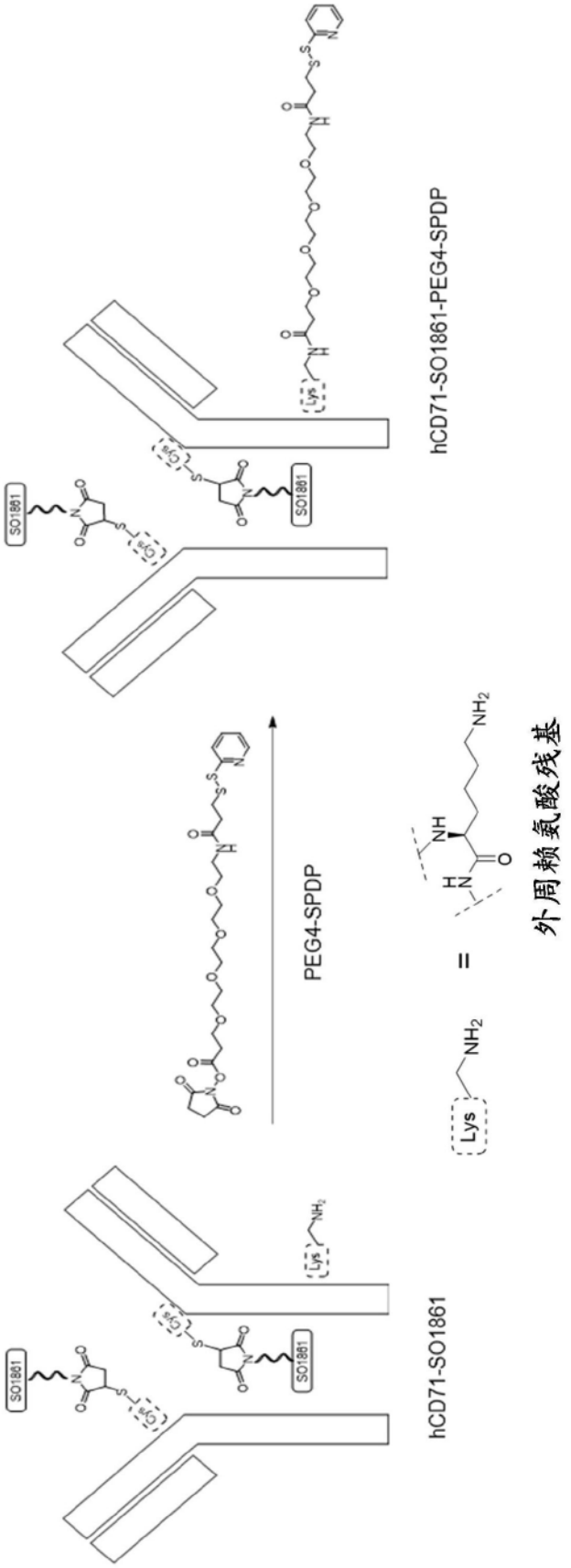

hCD71-SO1861-PEG4-SPDP
hCD71-SO1861
PEG4-SPDP
外周赖氨酸残基
SO1861
Lys
NH2

图8C

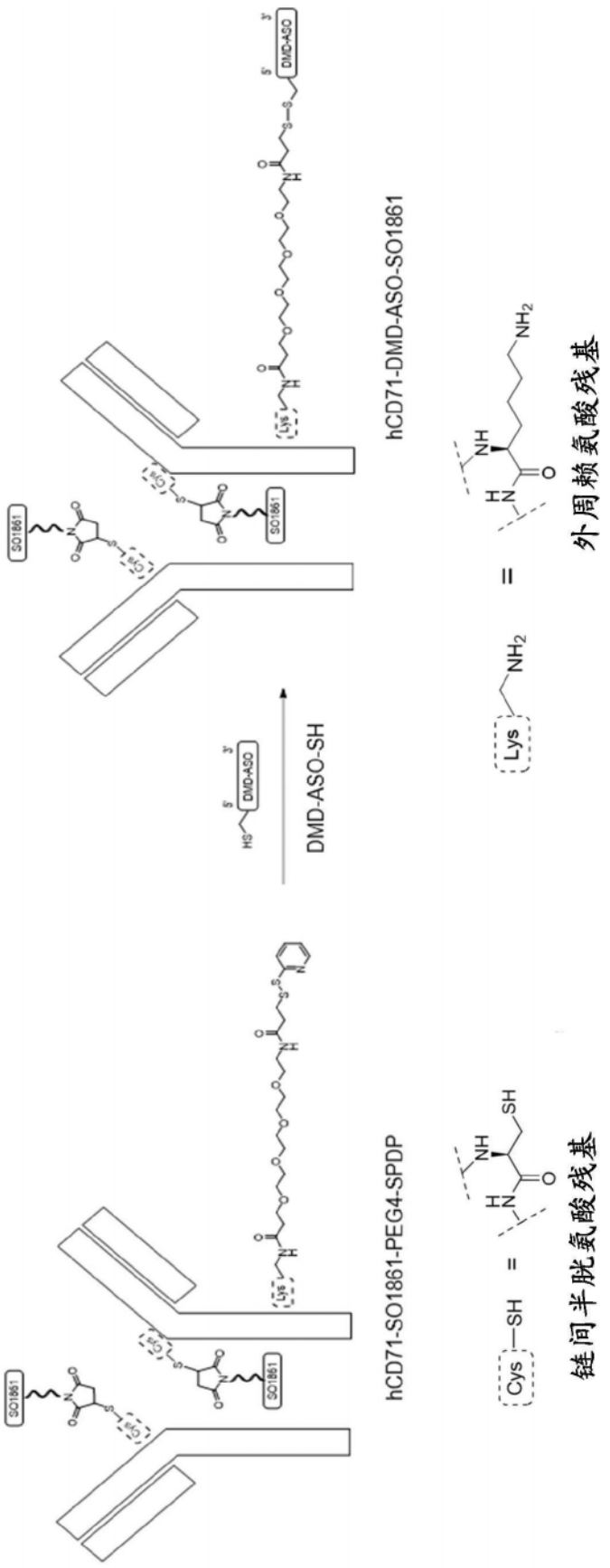

hCD71-DMD-ASO-SO1861
hCD71-SO1861-PEG4-SPDP
DMD-ASO-SH
DMD-ASO
SO1861
Lys
Cys
外周赖氨酸残基
链间半胱氨酸残基

图8D

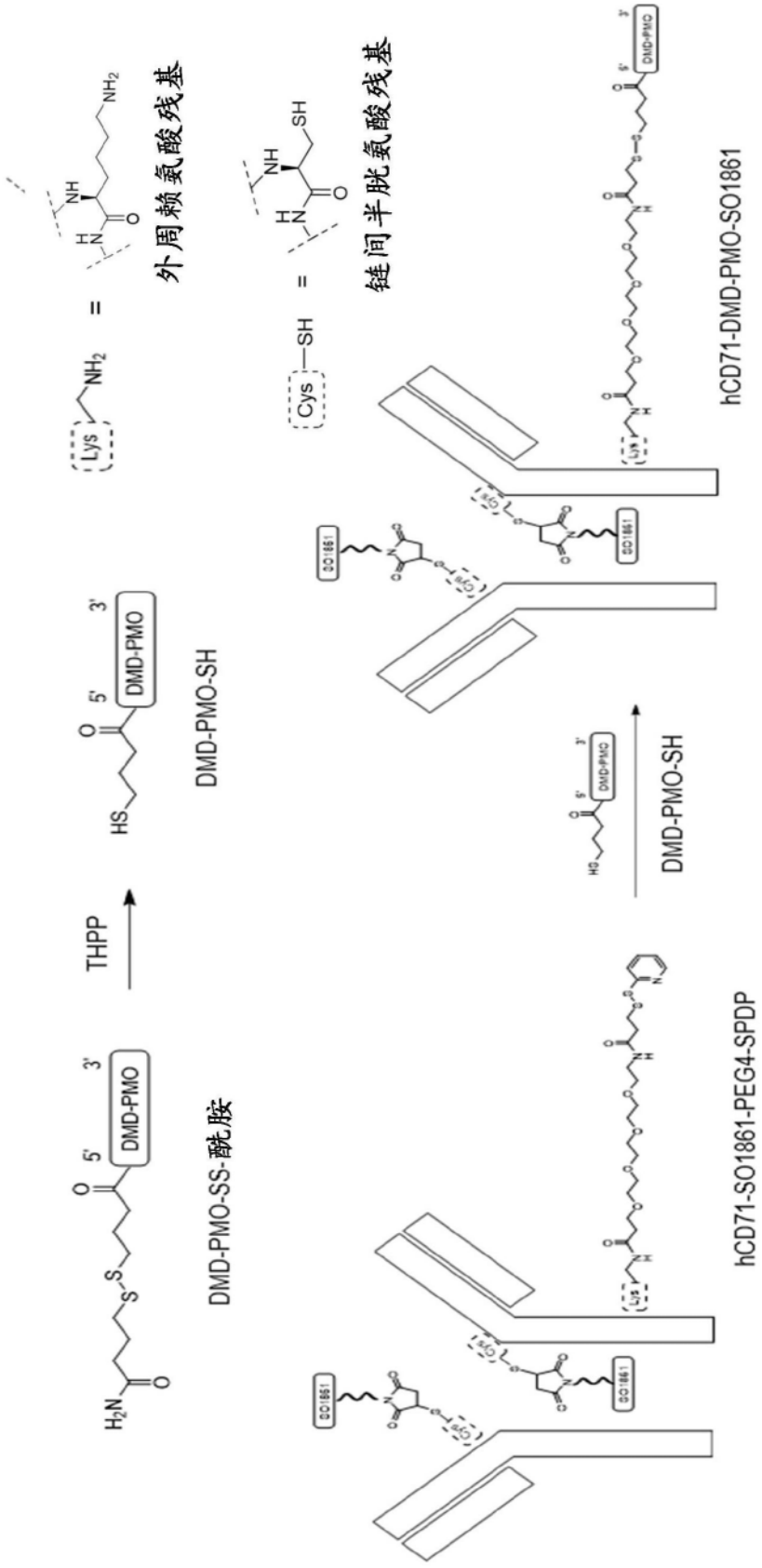

外周赖氨酸残基
链间半胱氨酸残基
DMD-PMO-SS-酰胺
THPP
DMD-PMO-SH
hCD71-DMD-PMO-SO1861
hCD71-SO1861-PEG4-SPDP

图8E

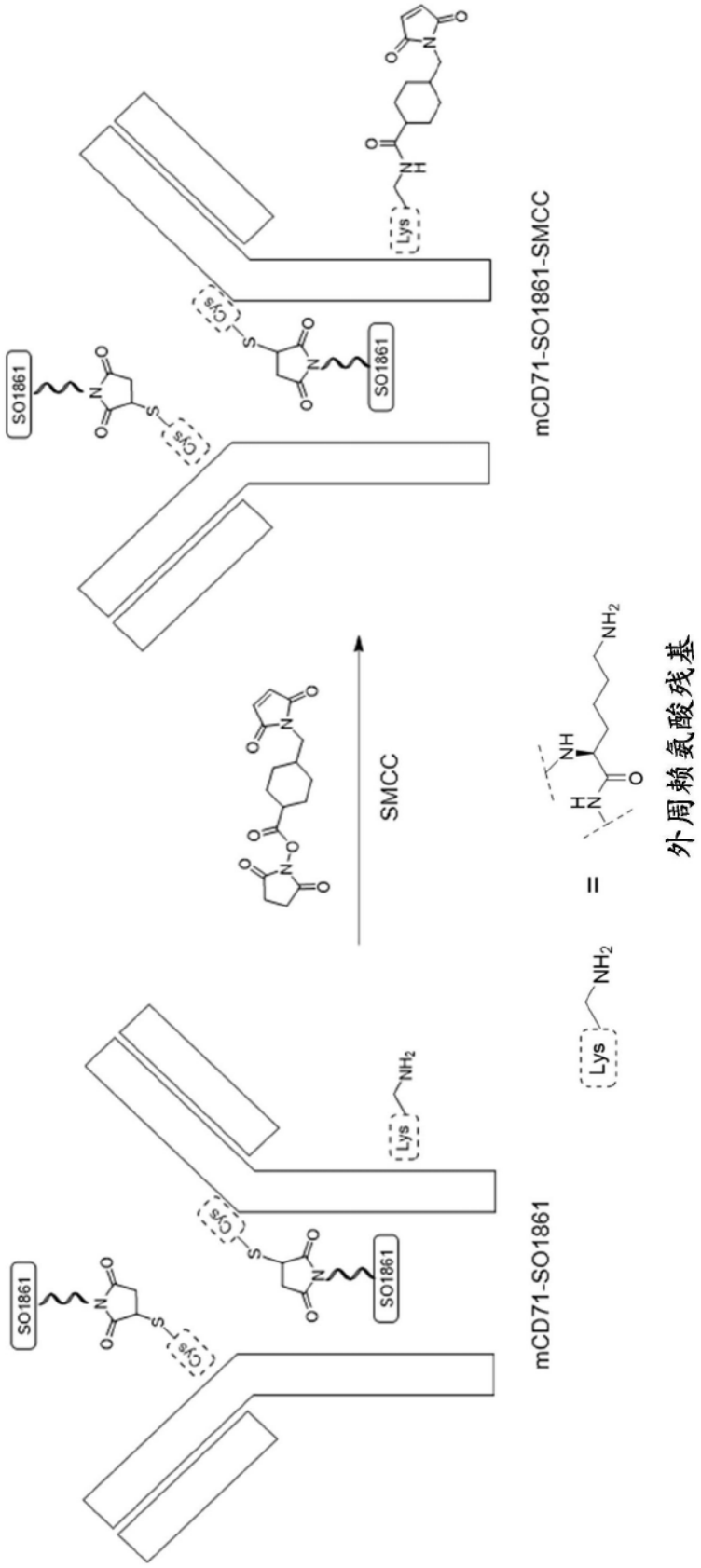

mCD71-SO1861-SMCC
mCD71-SO1861
SMCC
SO1861
Cys
Lys
NH2
外周赖氨酸残基

图8F

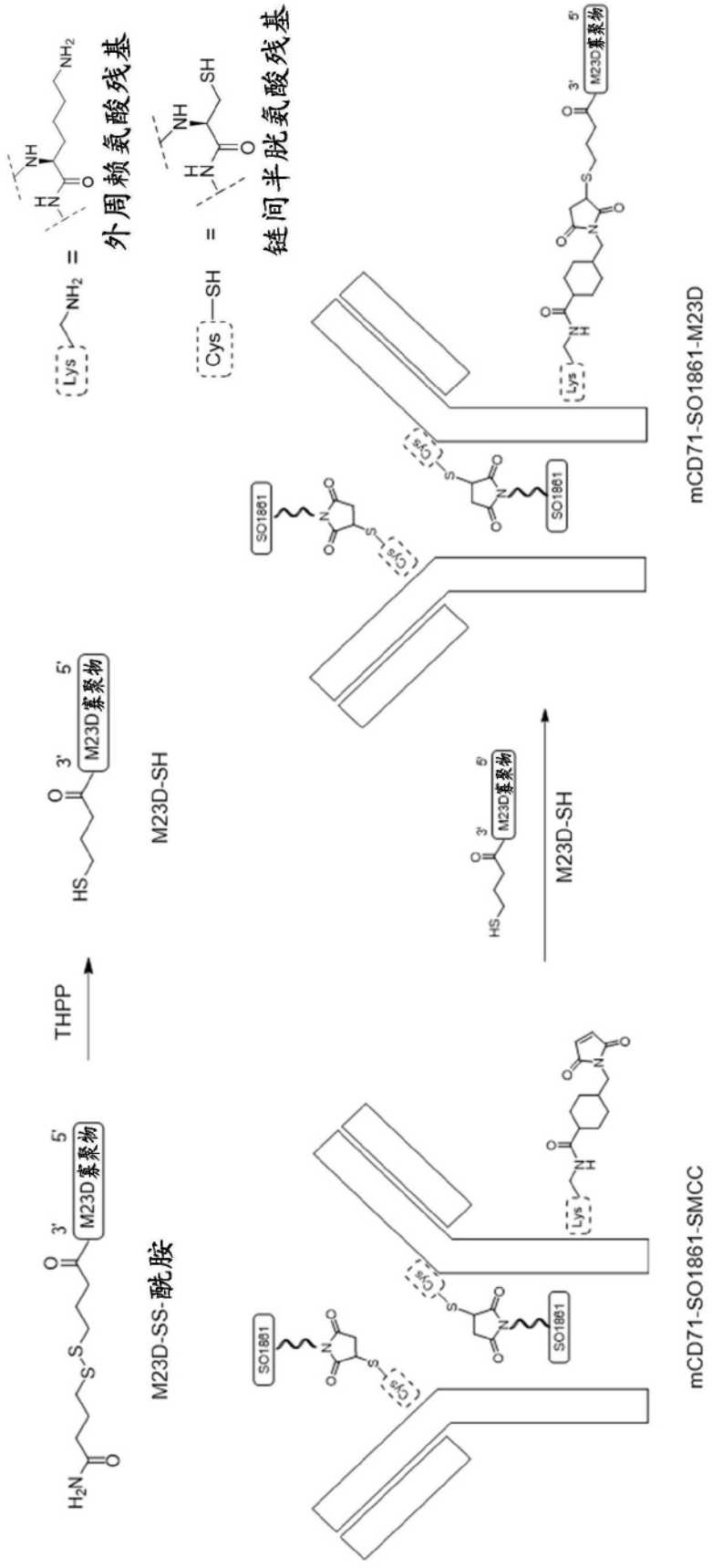

外周赖氨酸残基
链间半胱氨酸残基
M23D-SS-酰胺
THPP
M23D-SH
mCD71-SO1861-SMCC
mCD71-SO1861-M23D

图8G

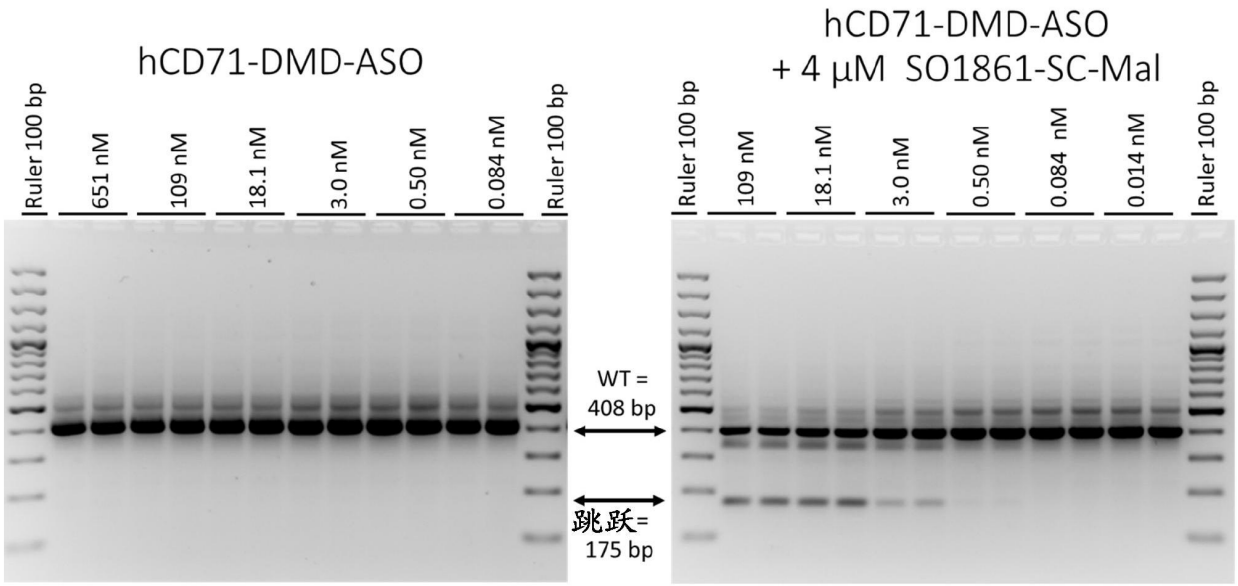

hCD71-DMD-ASO
Ruler 100 bp
651 nM
109 nM
18.1 nM
3.0 nM
0.50 nM
0.084 nM
Ruler 100 bp
hCD71-DMD-ASO
+ 4 µM SO1861-SC-Mal
Ruler 100 bp
109 nM
18.1 nM
3.0 nM
0.50 nM
0.084 nM
0.014 nM
Ruler 100 bp
WT =
408 bp
跳跃=
175 bp

图9A

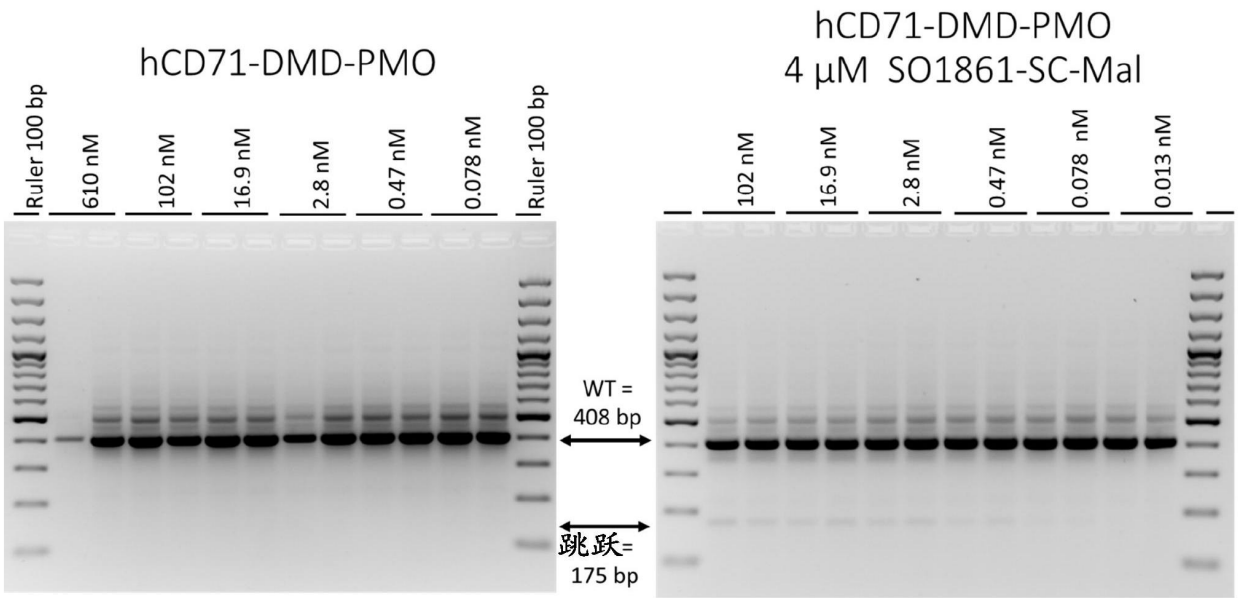

hCD71-DMD-PMO
Ruler 100 bp
610 nM
102 nM
16.9 nM
2.8 nM
0.47 nM
0.078 nM
Ruler 100 bp
hCD71-DMD-PMO
4 µM SO1861-SC-Mal
102 nM
16.9 nM
2.8 nM
0.47 nM
0.078 nM
0.013 nM
WT =
408 bp
跳跃=
175 bp

图9B

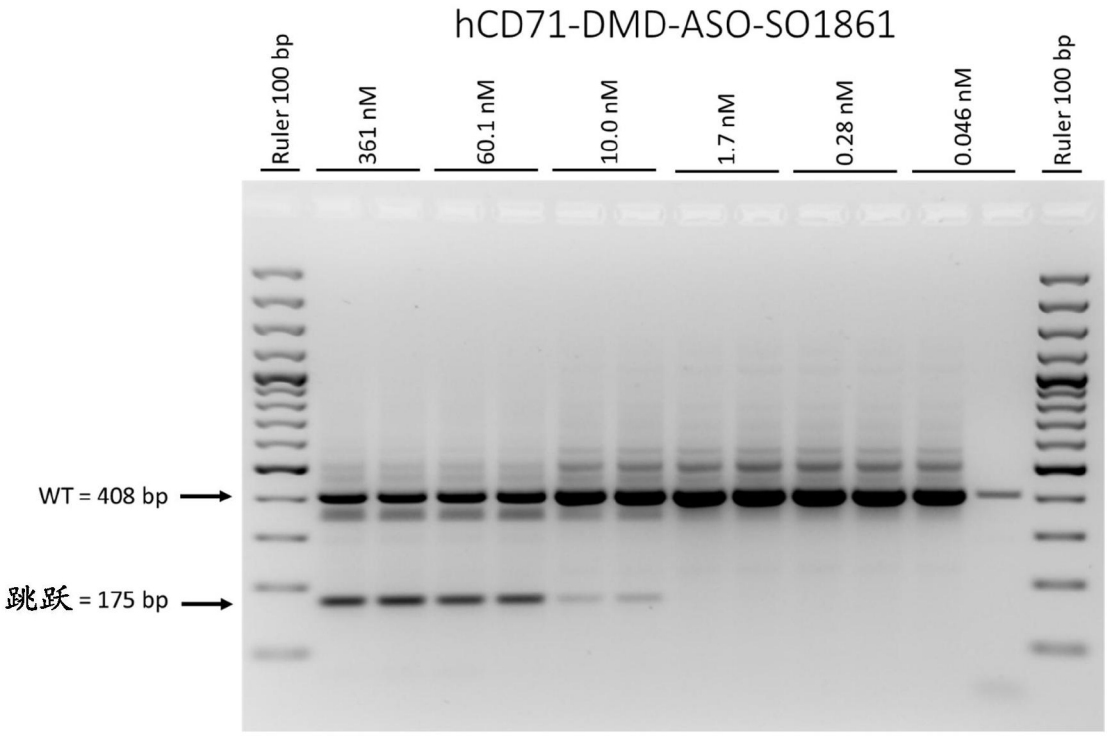

hCD71-DMD-ASO-SO1861
Ruler 100 bp
361 nM
60.1 nM
10.0 nM
1.7 nM
0.28 nM
0.046 nM
Ruler 100 bp
WT = 408 bp
跳跃 = 175 bp

图9C

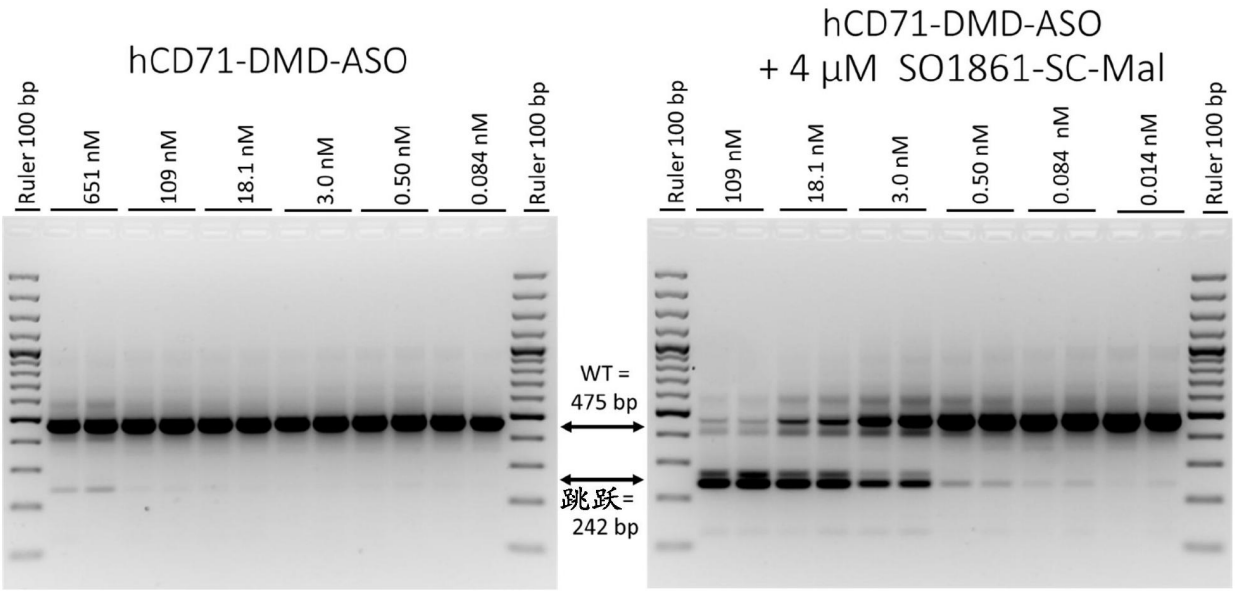

hCD71-DMD-ASO
Ruler 100 bp
651 nM
109 nM
18.1 nM
3.0 nM
0.50 nM
0.084 nM
Ruler 100 bp
hCD71-DMD-ASO
+ 4 μM SO1861-SC-Mal
Ruler 100 bp
109 nM
18.1 nM
3.0 nM
0.50 nM
0.084 nM
0.014 nM
Ruler 100 bp
WT = 475 bp
跳跃= 242 bp

图10A

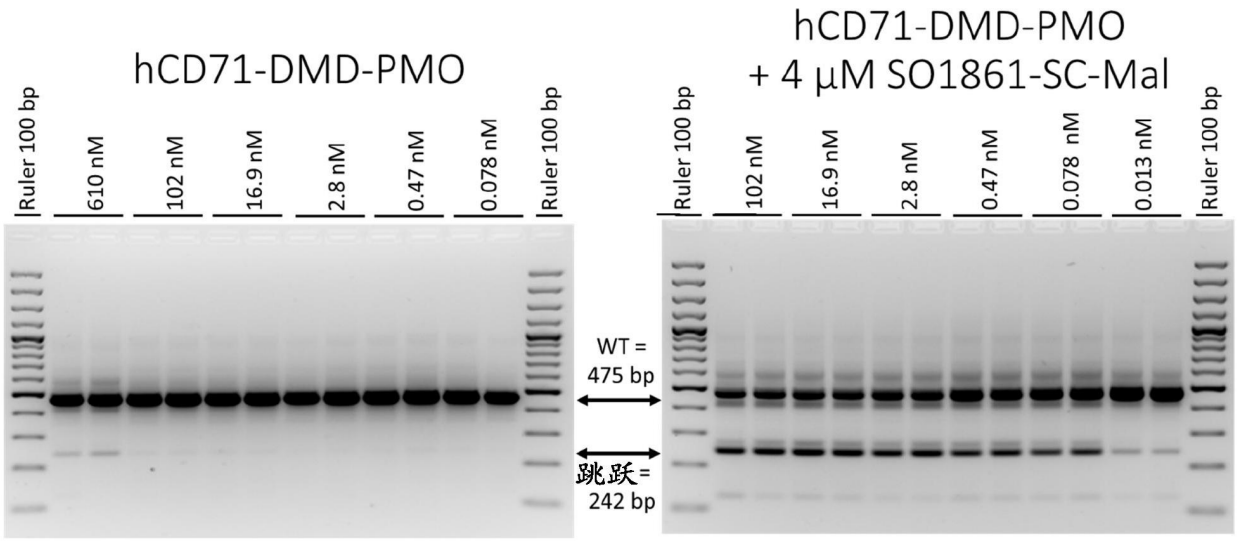

hCD71-DMD-PMO
Ruler 100 bp
610 nM
102 nM
16.9 nM
2.8 nM
0.47 nM
0.078 nM
Ruler 100 bp
hCD71-DMD-PMO
+ 4 µM SO1861-SC-Mal
Ruler 100 bp
102 nM
16.9 nM
2.8 nM
0.47 nM
0.078 nM
0.013 nM
Ruler 100 bp
WT =
475 bp
跳跃=
242 bp

图10B

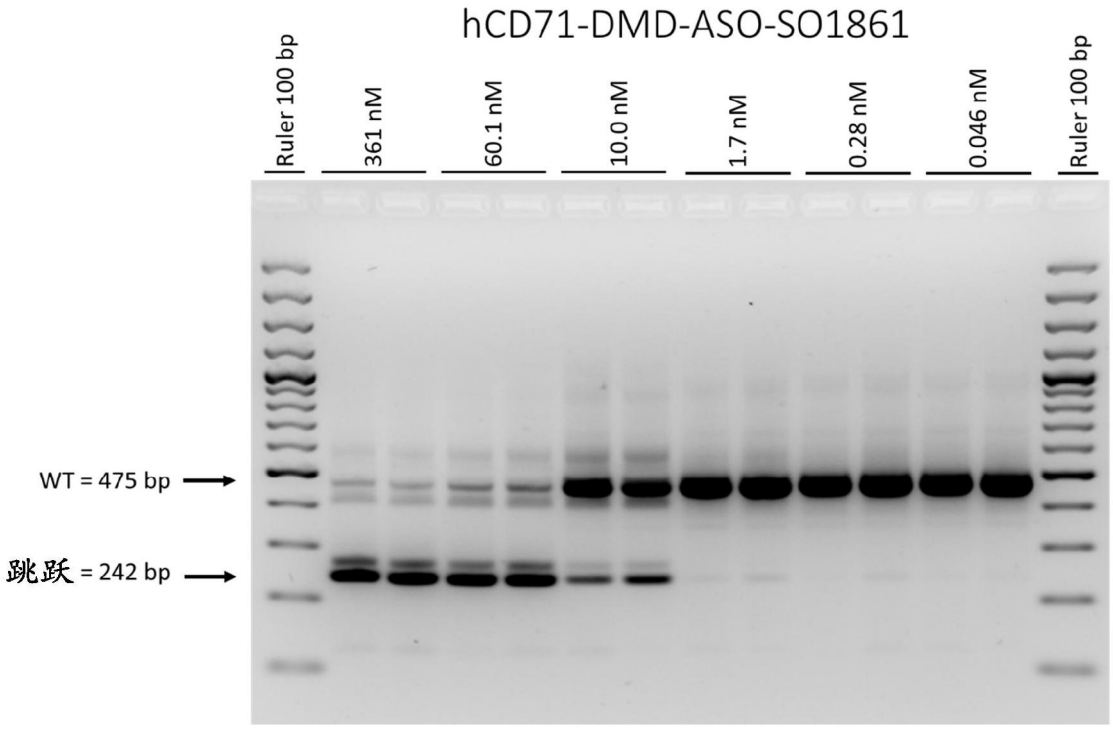

hCD71-DMD-ASO-SO1861
Ruler 100 bp
361 nM
60.1 nM
10.0 nM
1.7 nM
0.28 nM
0.046 nM
Ruler 100 bp
WT = 475 bp
跳跃 = 242 bp

图10C

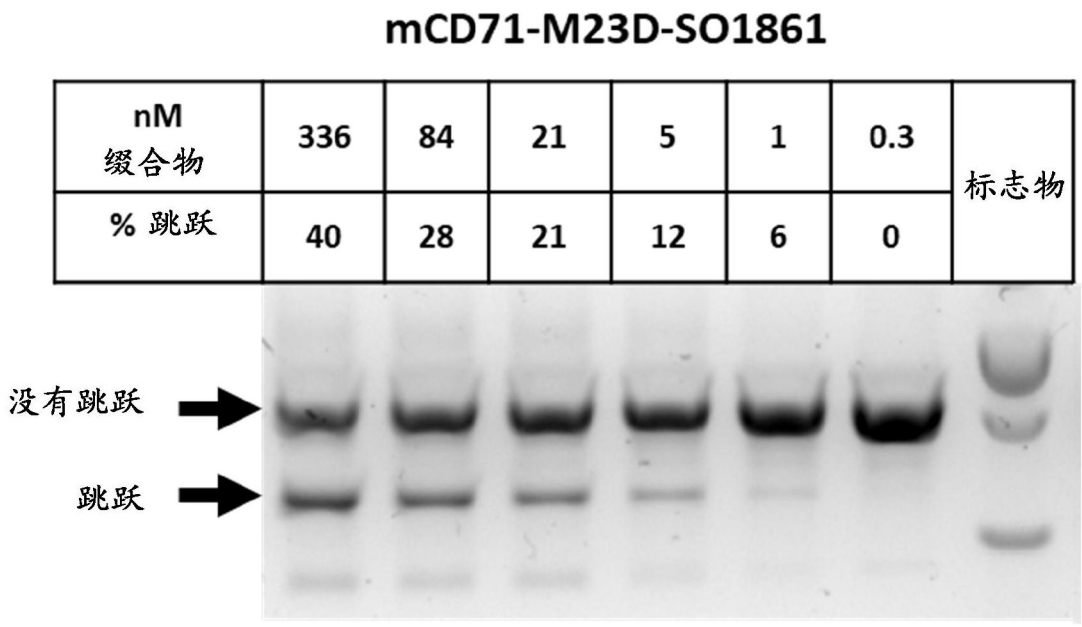

mCD71-M23D-SO1861
nM
缀合物
336
84
21
5
1
0.3
标志物
% 跳跃
40
28
21
12
6
0
没有跳跃
跳跃

图11

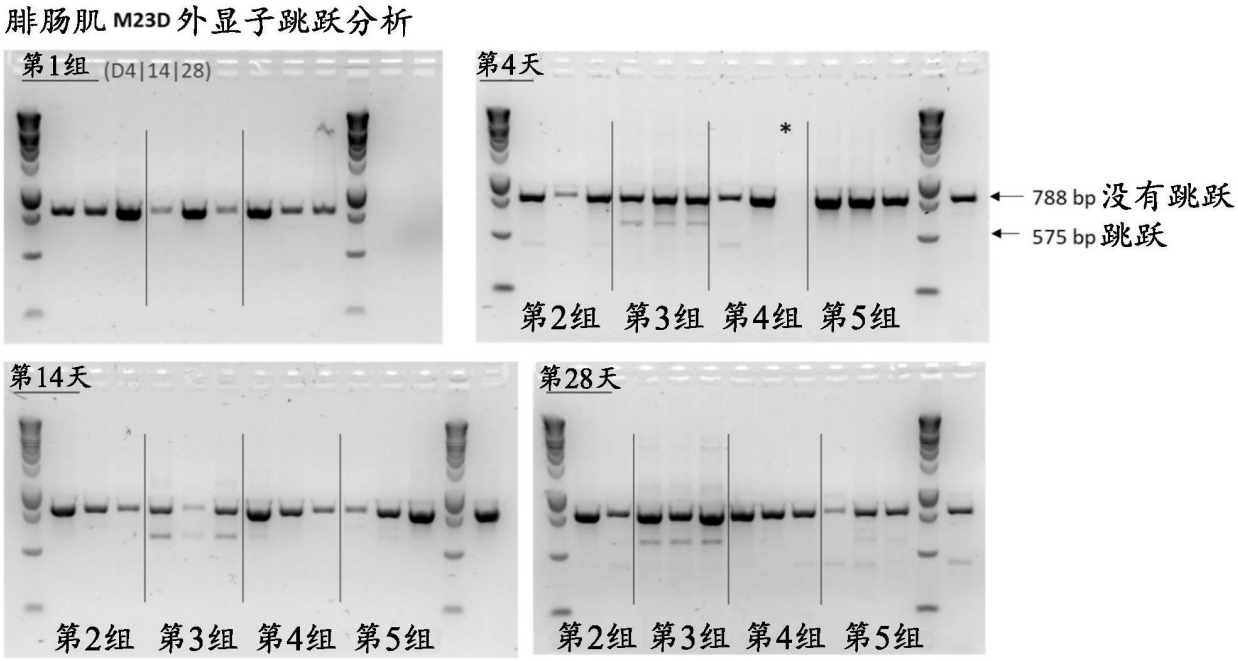

腓肠肌 M23D 外显子跳跃分析
第1组 (D4|14|28)
第4天
788 bp 没有跳跃
575 bp 跳跃
第2组 第3组 第4组 第5组
第14天
第2组 第3组 第4组 第5组
第28天
第2组 第3组 第4组 第5组

图12A

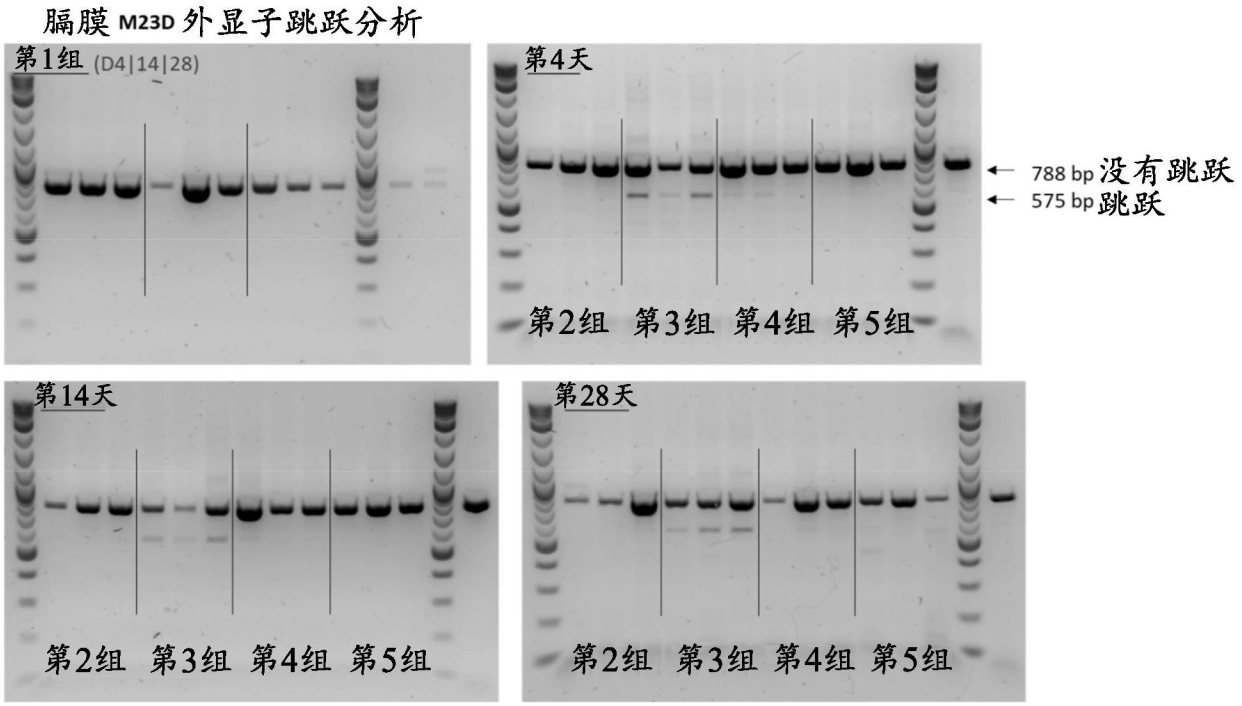

膈膜 M23D 外显子跳跃分析
第1组 (D4|14|28)
第4天
788 bp 没有跳跃
575 bp 跳跃
第2组 第3组 第4组 第5组
第14天
第2组 第3组 第4组 第5组
第28天
第2组 第3组 第4组 第5组

图12B

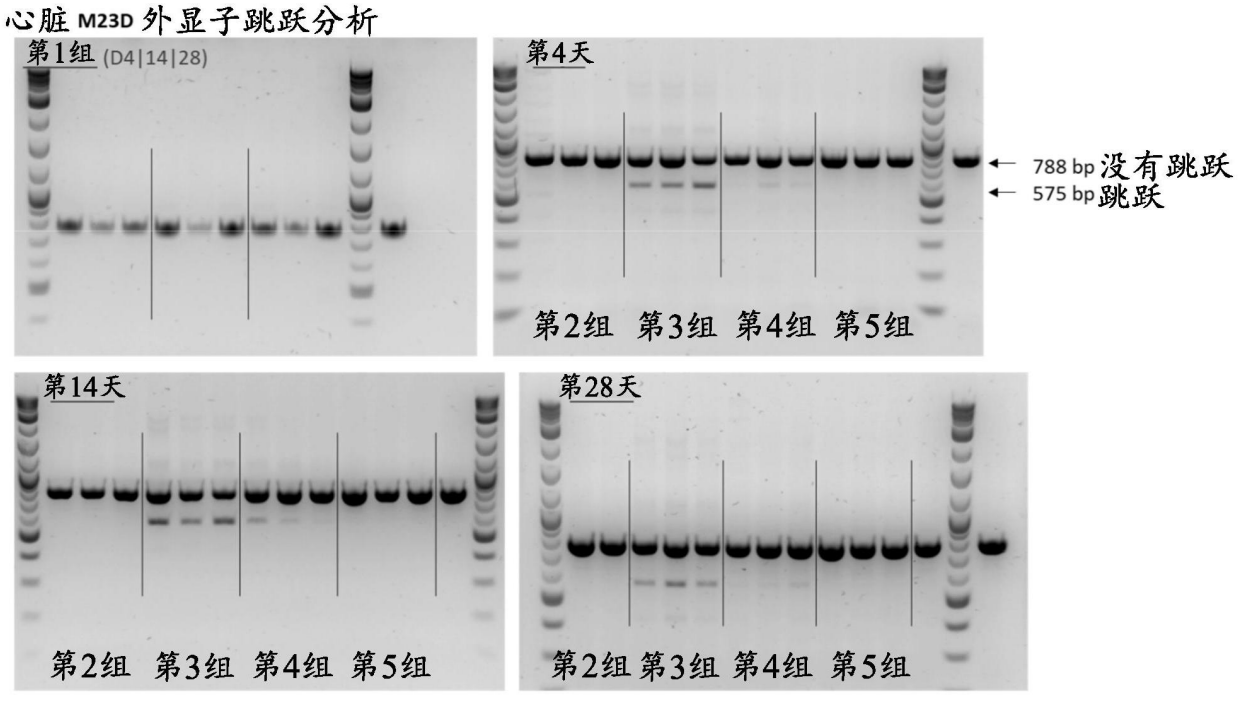

心脏 M23D 外显子跳跃分析
第1组 (D4|14|28)
第4天
788 bp 没有跳跃
575 bp 跳跃
第2组 第3组 第4组 第5组
第14天
第2组 第3组 第4组 第5组
第28天
第2组 第3组 第4组 第5组

图12C

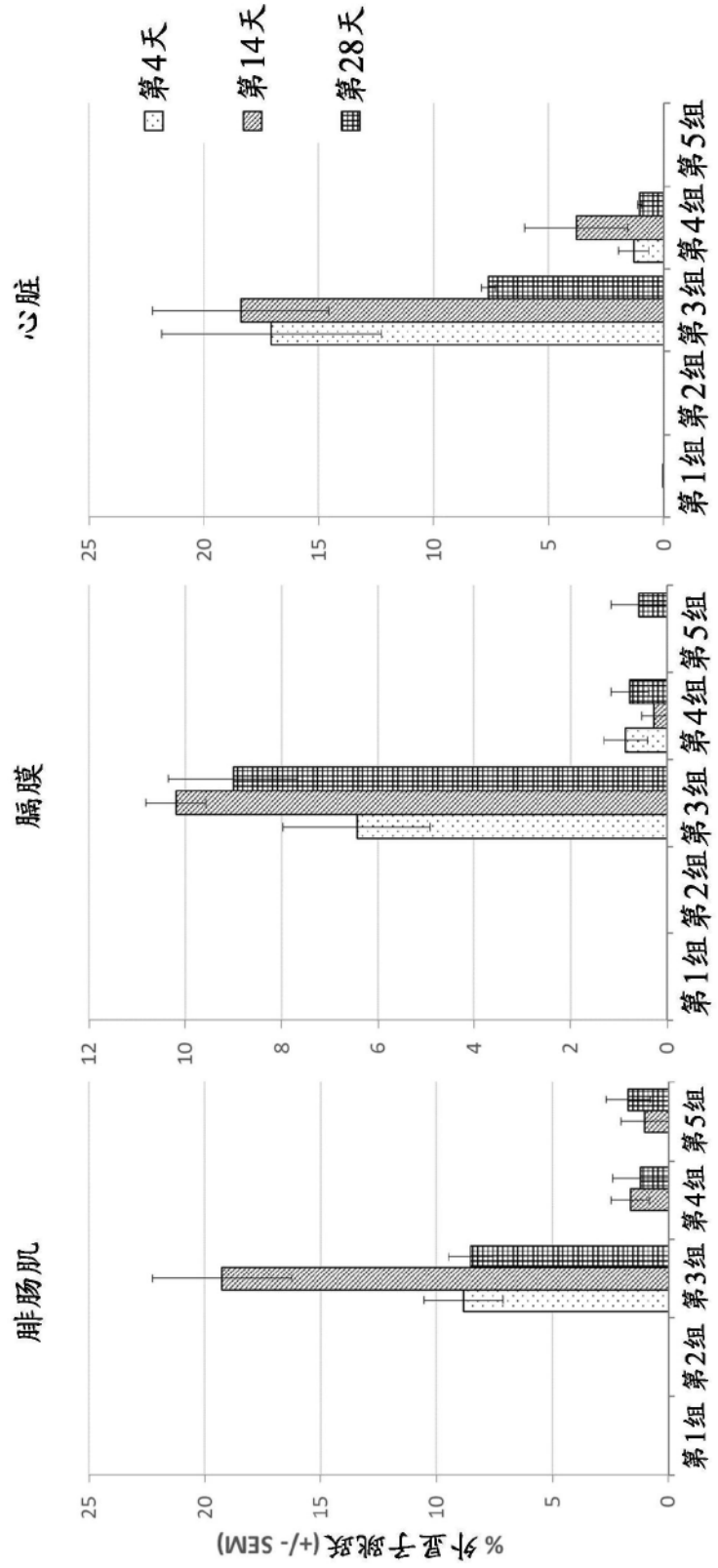

第4天
第14天
第28天
心脏
膈膜
腓肠肌
第1组 第2组 第3组 第4组 第5组
% 外层干跳跃 (+/- SEM)
0
5
10
15
20
25
2
4
6
8
12

图13

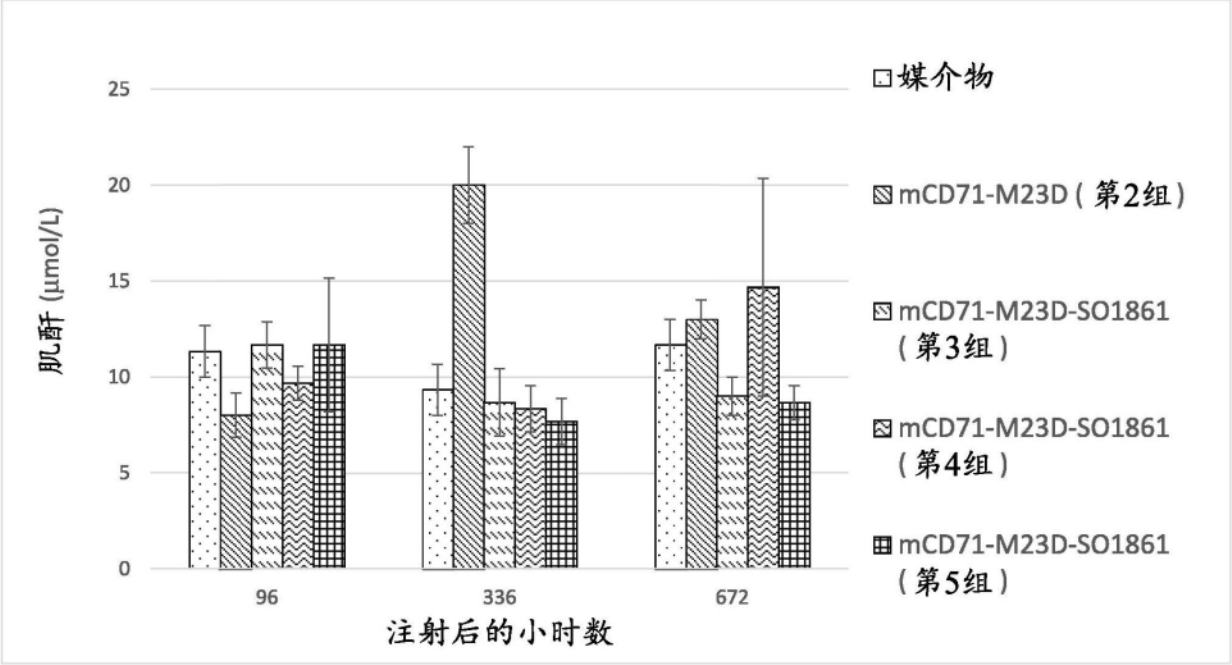

肌酐 (μmol/L)
25
20
15
10
5
0
96
336
672
注射后的小时数
媒介物
mCD71-M23D（第2组）
mCD71-M23D-SO1861（第3组）
mCD71-M23D-SO1861（第4组）
mCD71-M23D-SO1861（第5组）

图14A

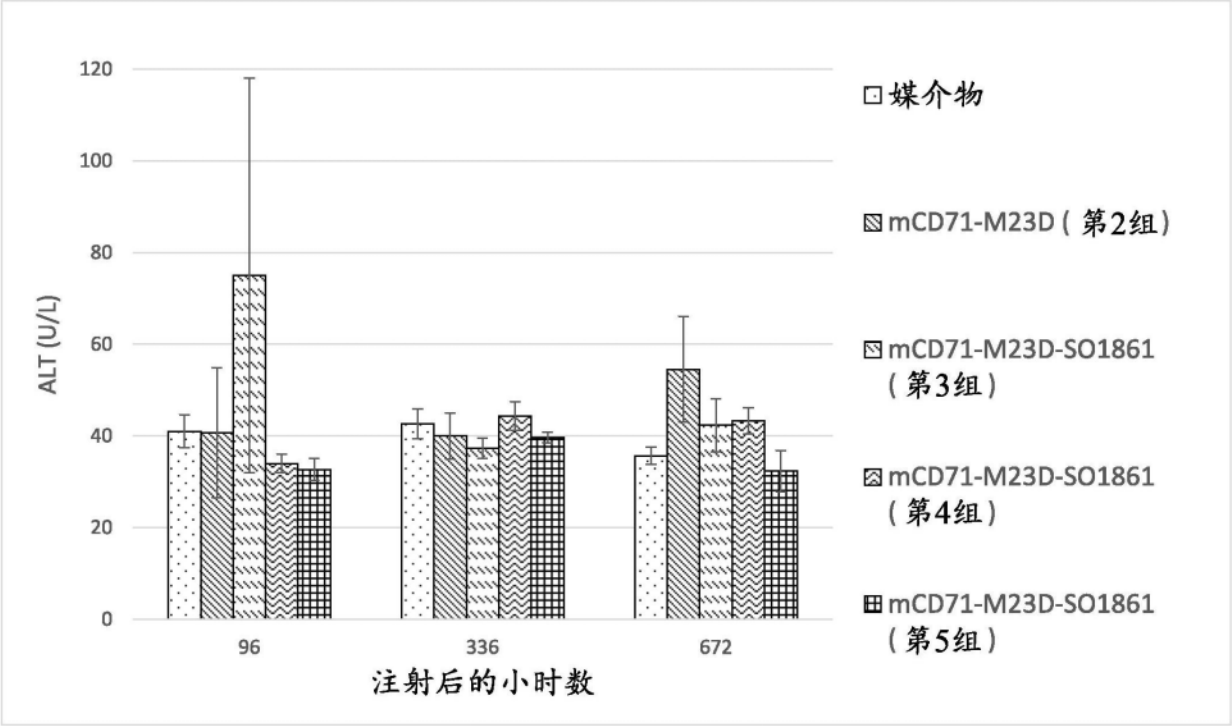

ALT (U/L)
120
100
80
60
40
20
0
96
336
672
注射后的小时数
媒介物
mCD71-M23D（第2组）
mCD71-M23D-SO1861（第3组）
mCD71-M23D-SO1861（第4组）
mCD71-M23D-SO1861（第5组）

图14B

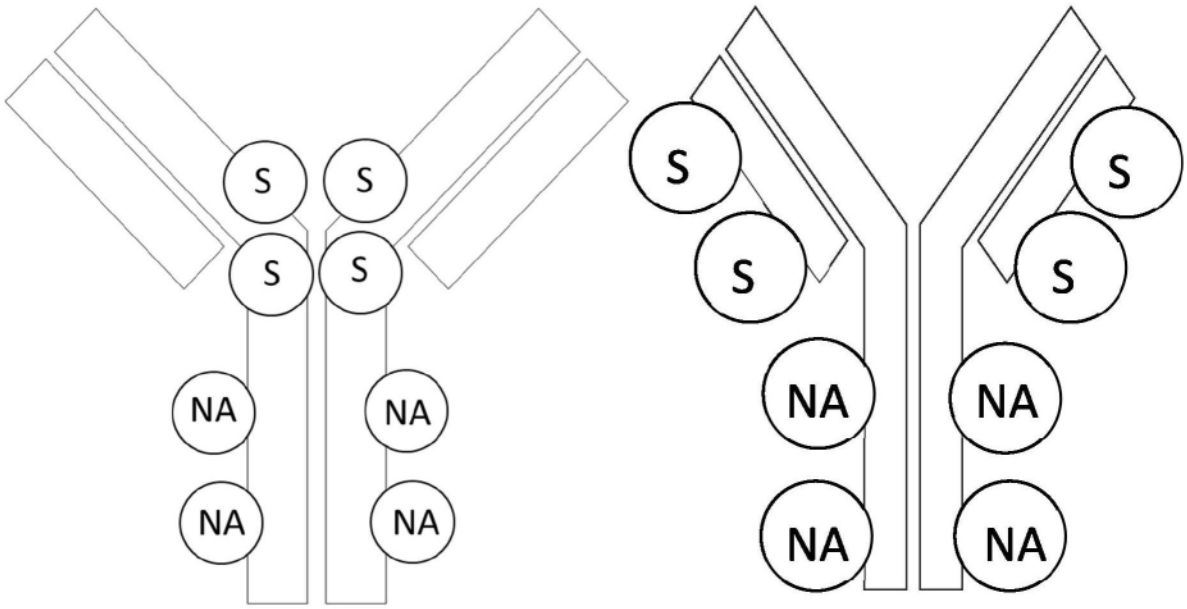


图15A

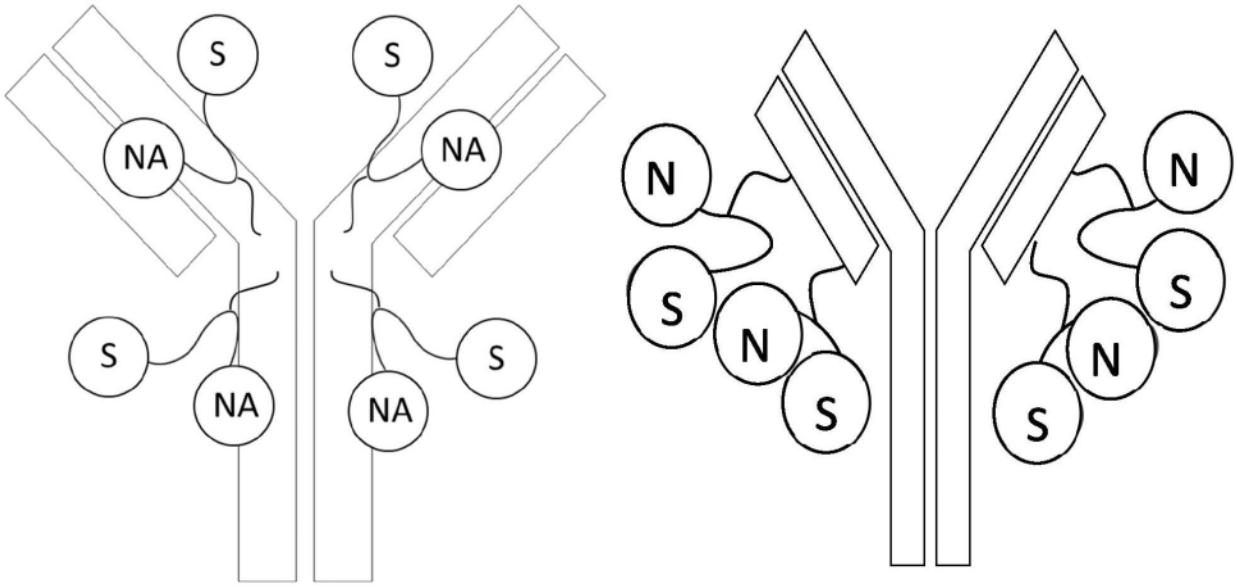


图15B

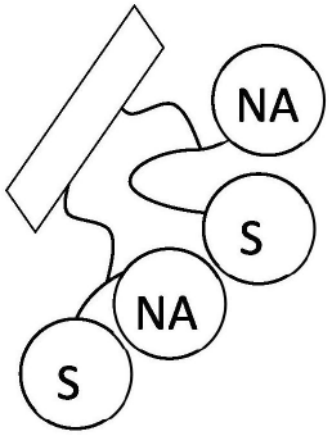


图15C

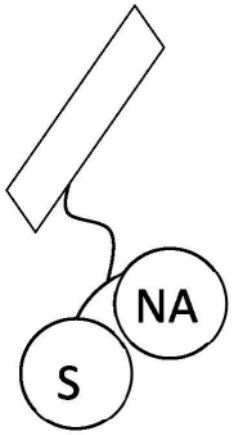


图15D

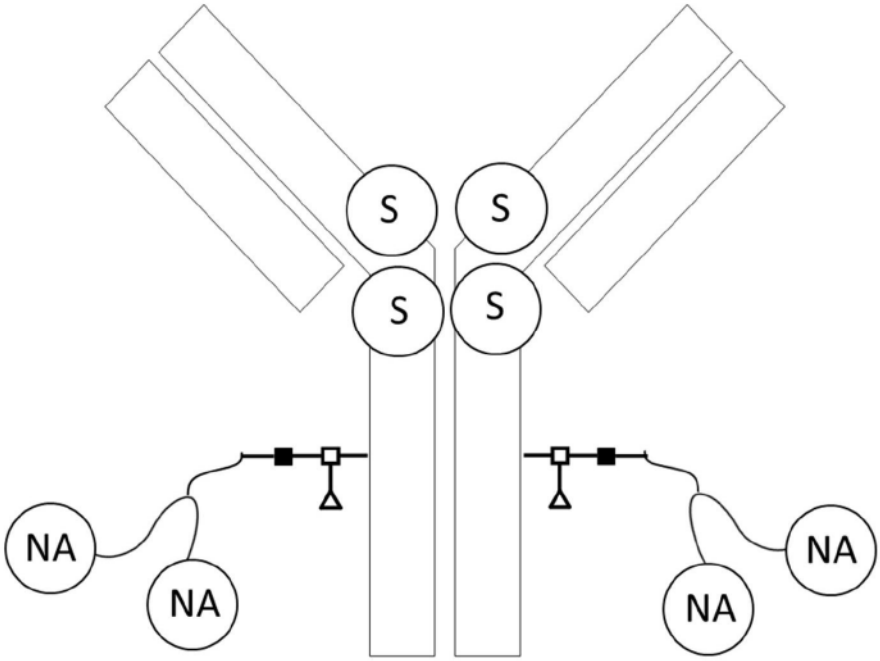


图15E

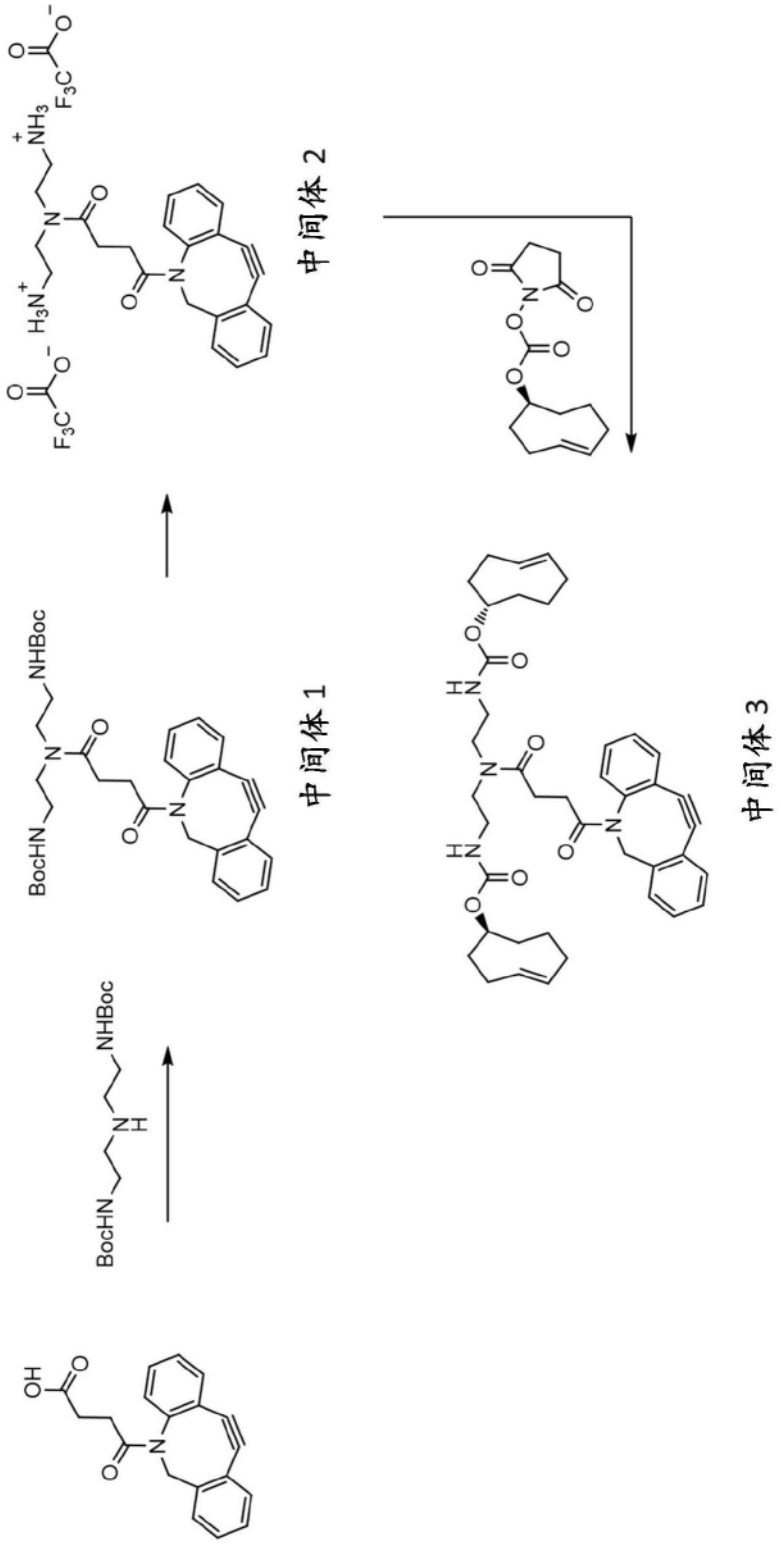


图16A

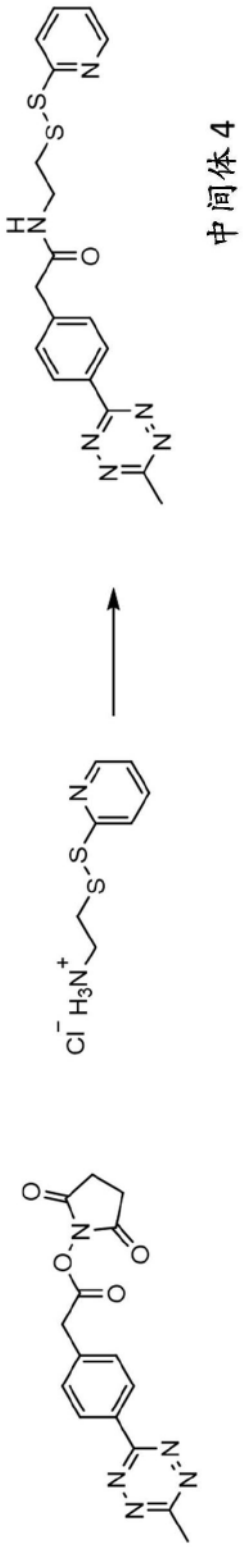


图16B

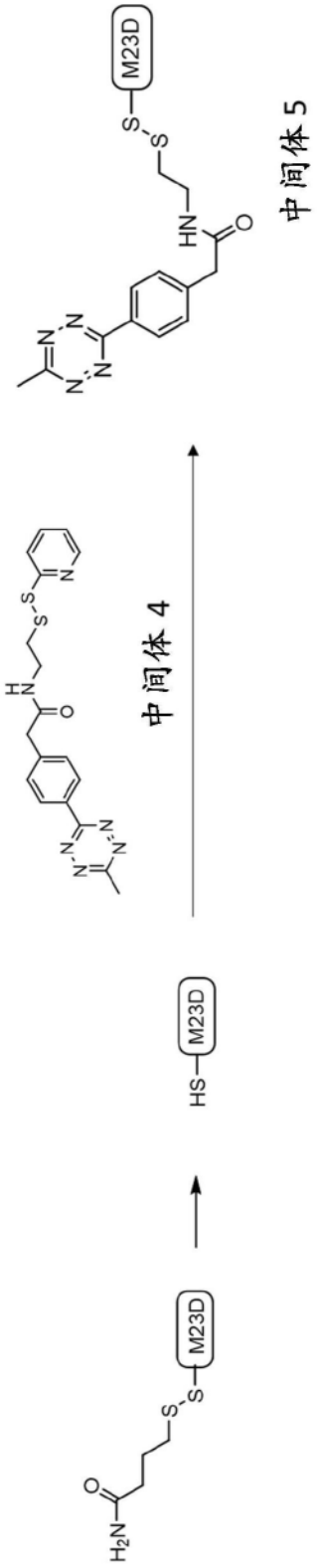


图16C

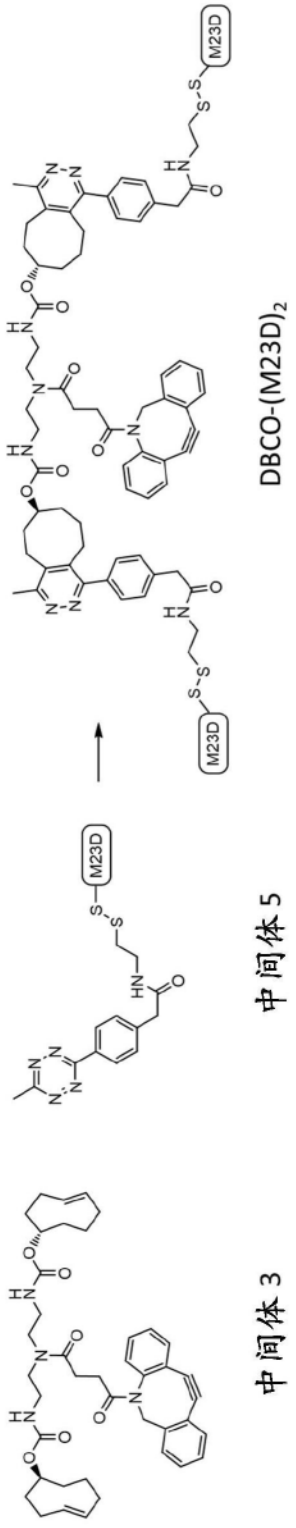


图16D

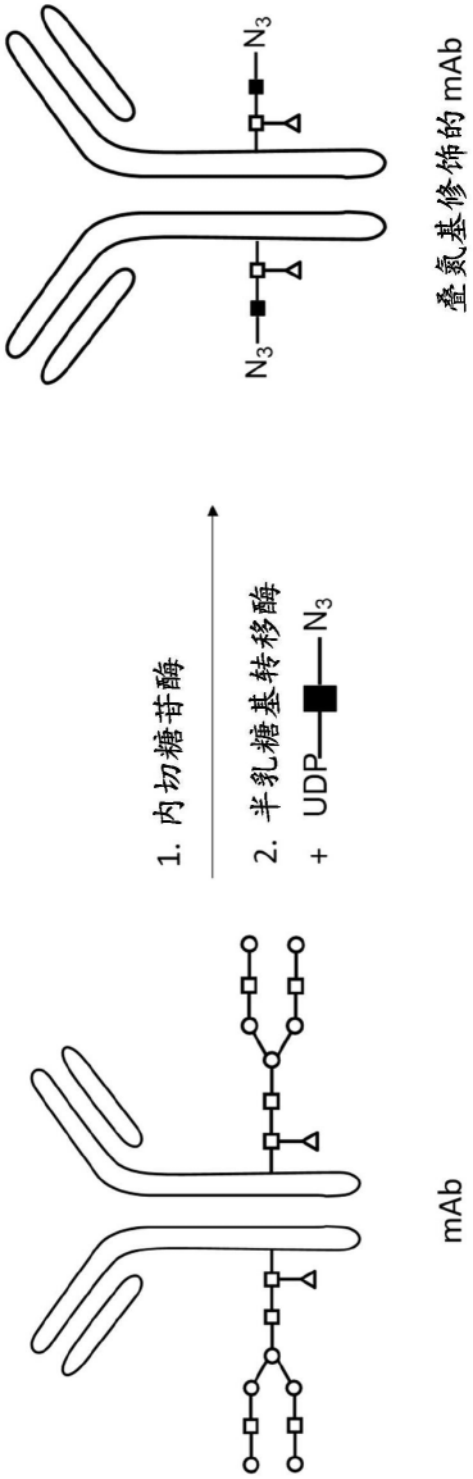


图17A

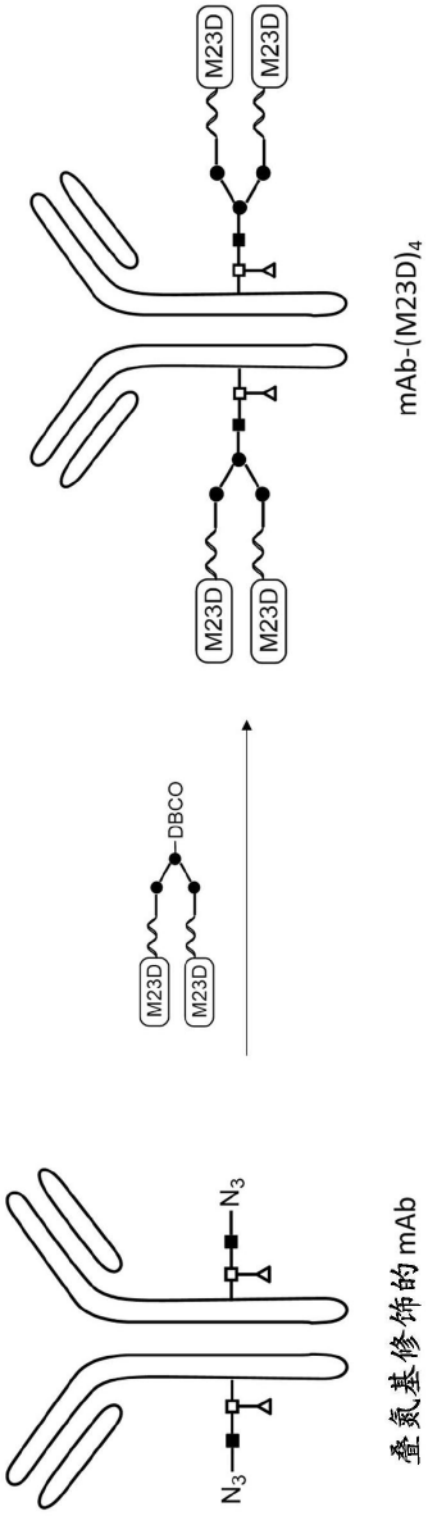


图17B

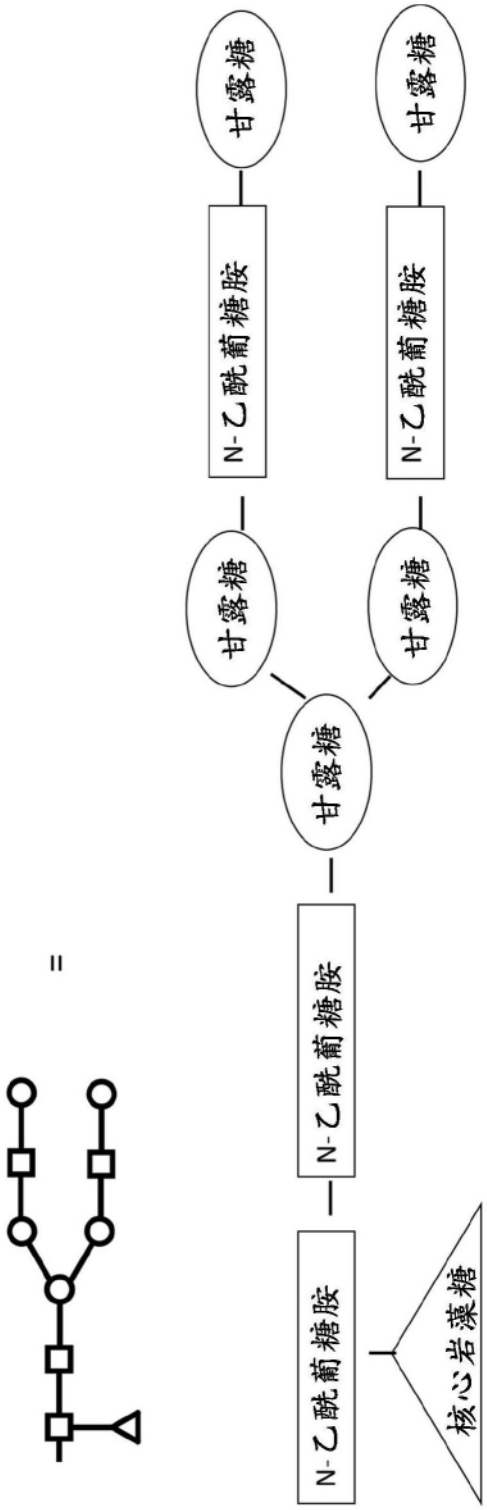


图17C

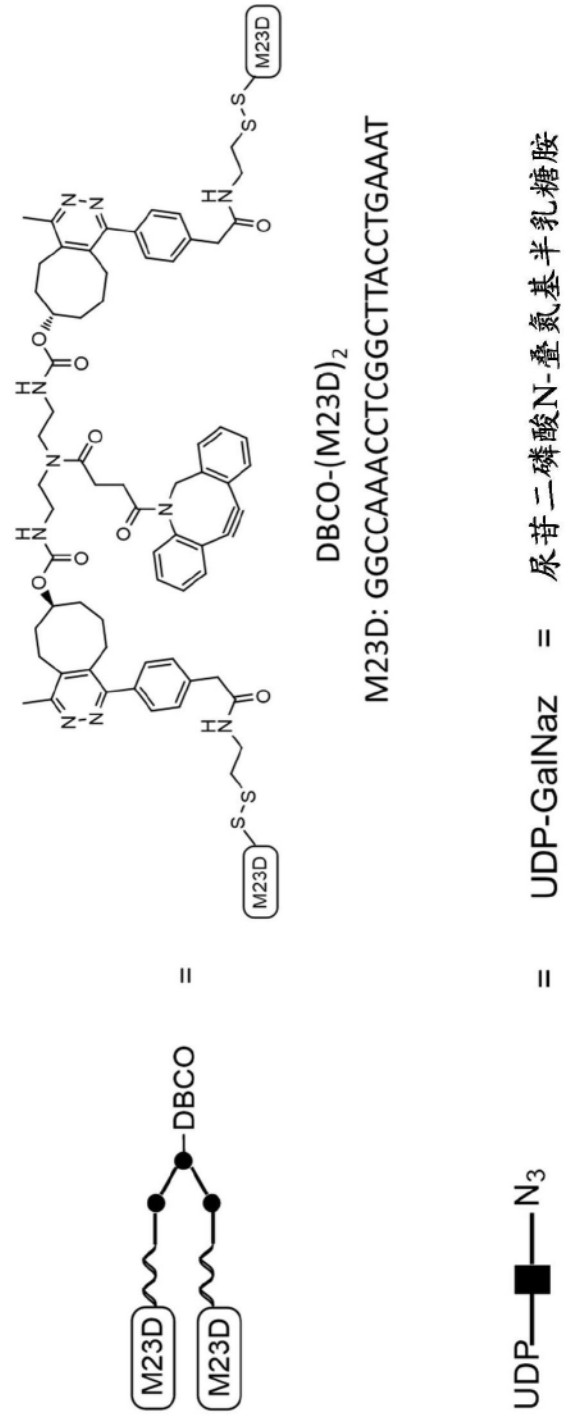

M23D
DBCO-(M23D)2
M23D: GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT
=
=
UDP-GalNaz = 尿苷二磷酸N-叠氮基半乳糖胺
DBCO
M23D
M23D
UDP
N3

图17D

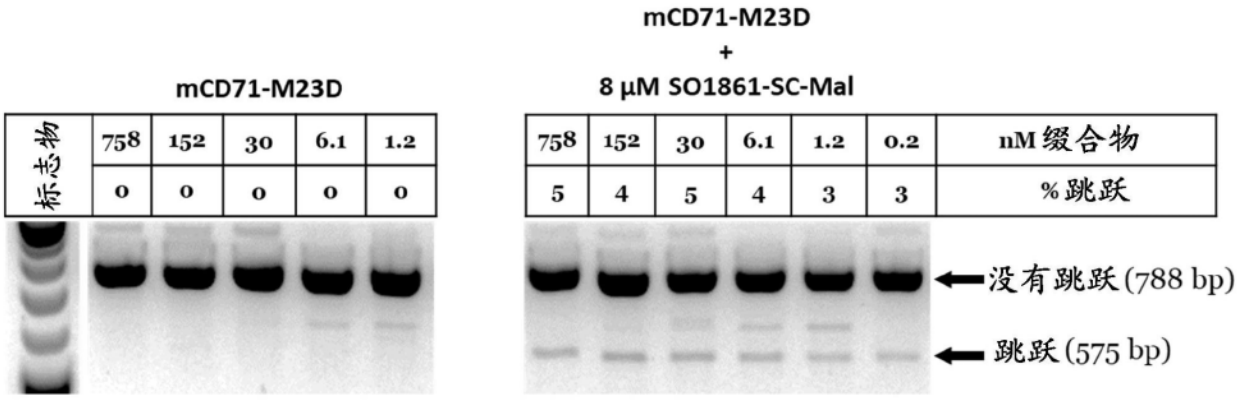

mCD71-M23D
标志物 758 152 30 6.1 1.2
0 0 0 0 0
mCD71-M23D
+
8 μM SO1861-SC-Mal
758 152 30 6.1 1.2 0.2 nM缀合物
5 4 5 4 3 3 %跳跃
没有跳跃(788 bp)
跳跃(575 bp)

图18A

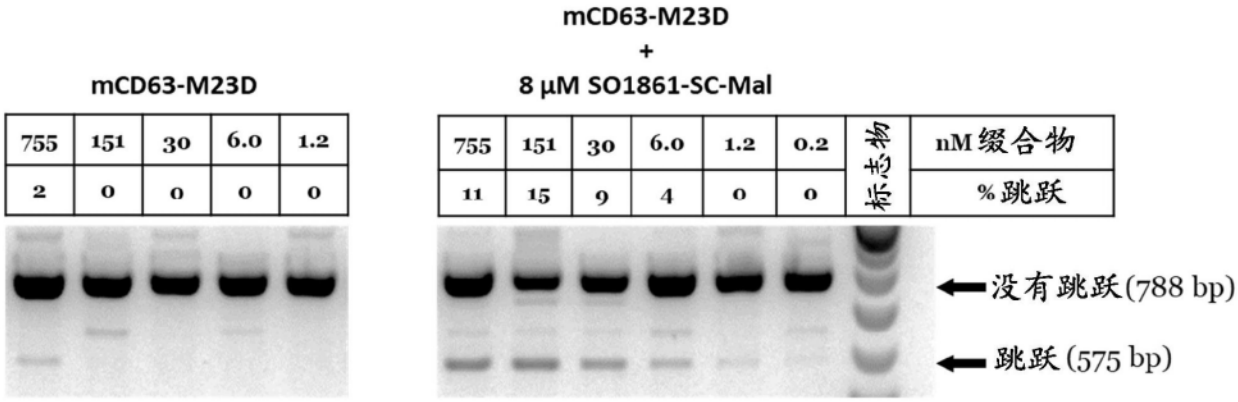

mCD63-M23D
755 151 30 6.0 1.2
2 0 0 0 0
mCD63-M23D
+
8 μM SO1861-SC-Mal
755 151 30 6.0 1.2 0.2 标志物 nM缀合物
11 15 9 4 0 0 %跳跃
没有跳跃(788 bp)
跳跃(575 bp)

图18B

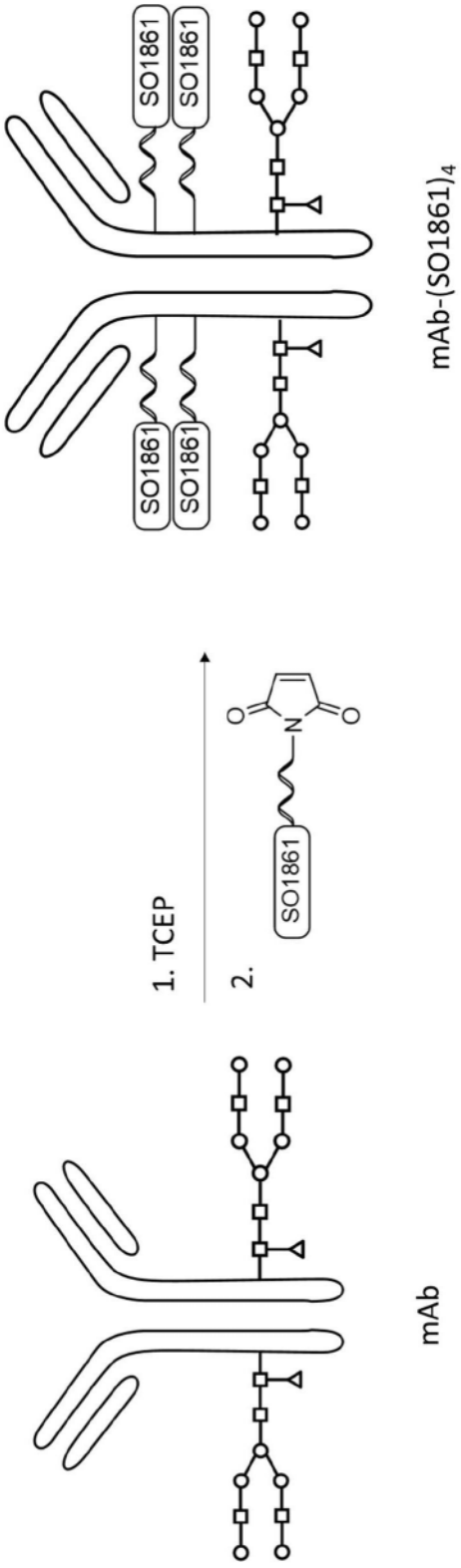


图19

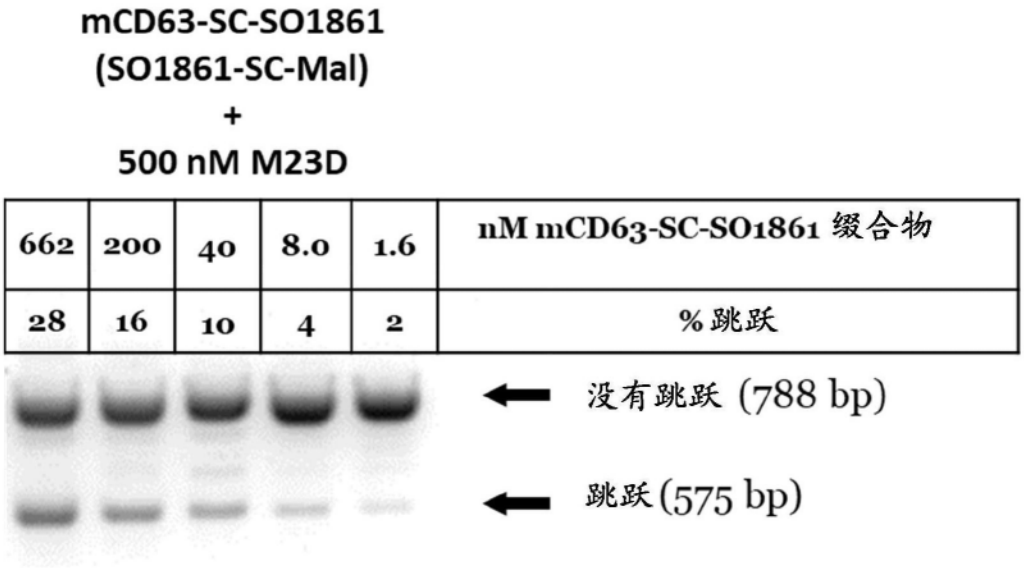

mCD63-SC-SO1861
(SO1861-SC-Mal)
+
500 nM M23D
662 200 40 8.0 1.6 nM mCD63-SC-SO1861 缀合物
28 16 10 4 2 % 跳跃
没有跳跃 (788 bp)
跳跃 (575 bp)

图20A

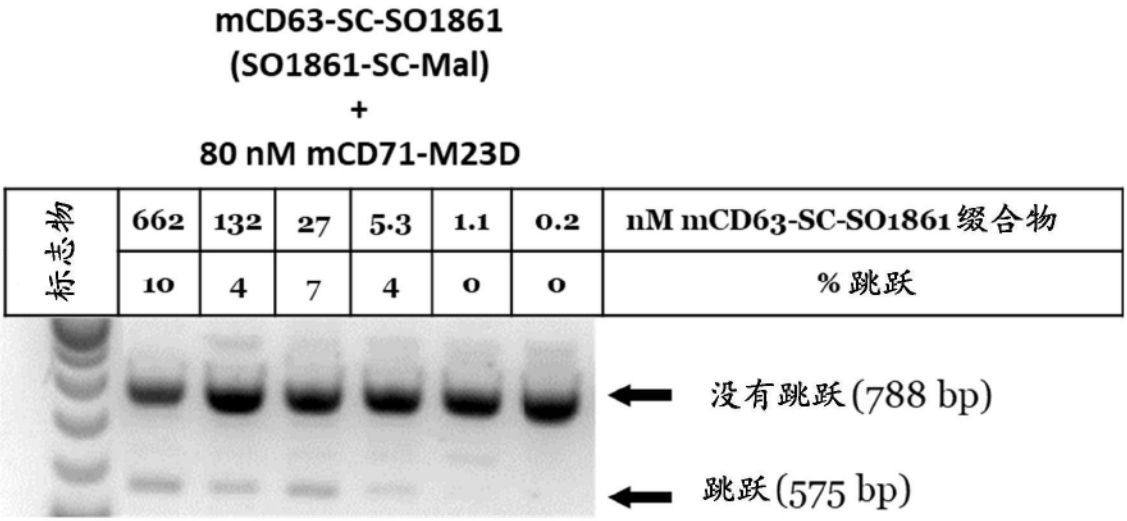

mCD63-SC-SO1861
(SO1861-SC-Mal)
+
80 nM mCD71-M23D
标志物
662 132 27 5.3 1.1 0.2 nM mCD63-SC-SO1861缀合物
10 4 7 4 0 0 % 跳跃
没有跳跃(788 bp)
跳跃(575 bp)

图20B

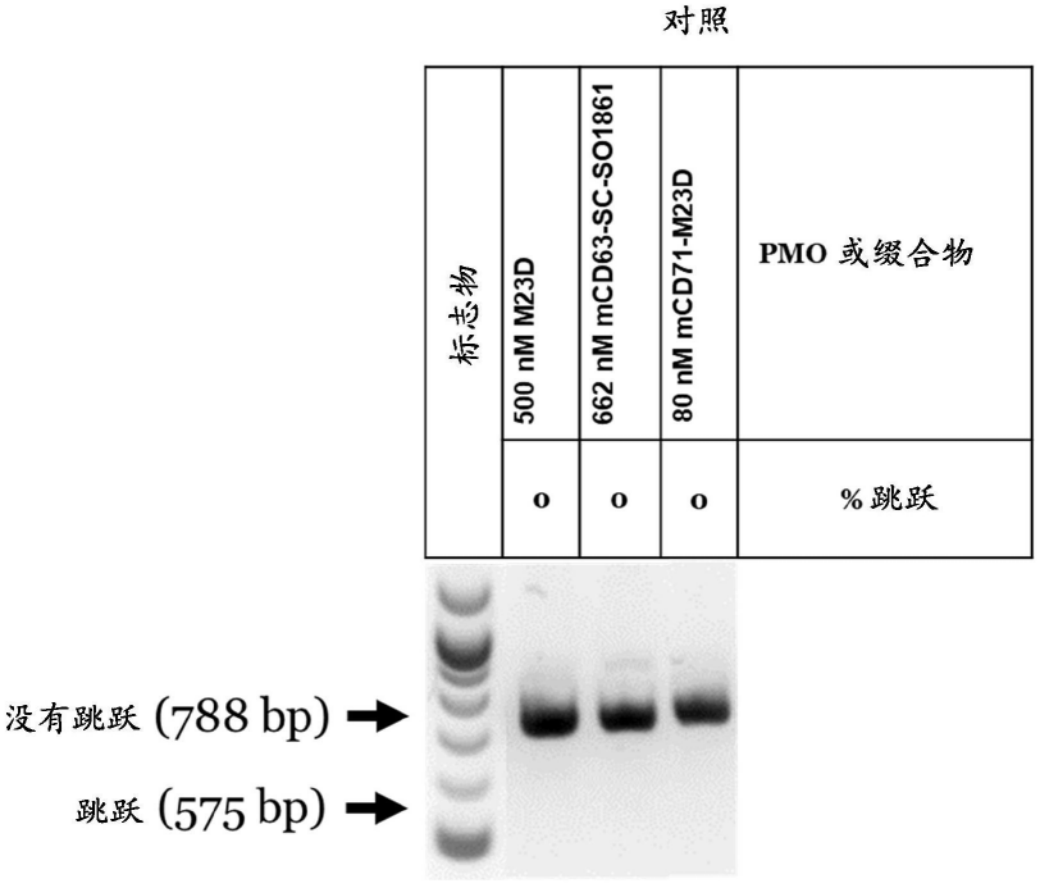

对照
标志物
500 nM M23D
662 nM mCD63-SC-SO1861
80 nM mCD71-M23D
PMO 或缀合物
o
o
o
% 跳跃
没有跳跃 (788 bp)
跳跃 (575 bp)

图20C

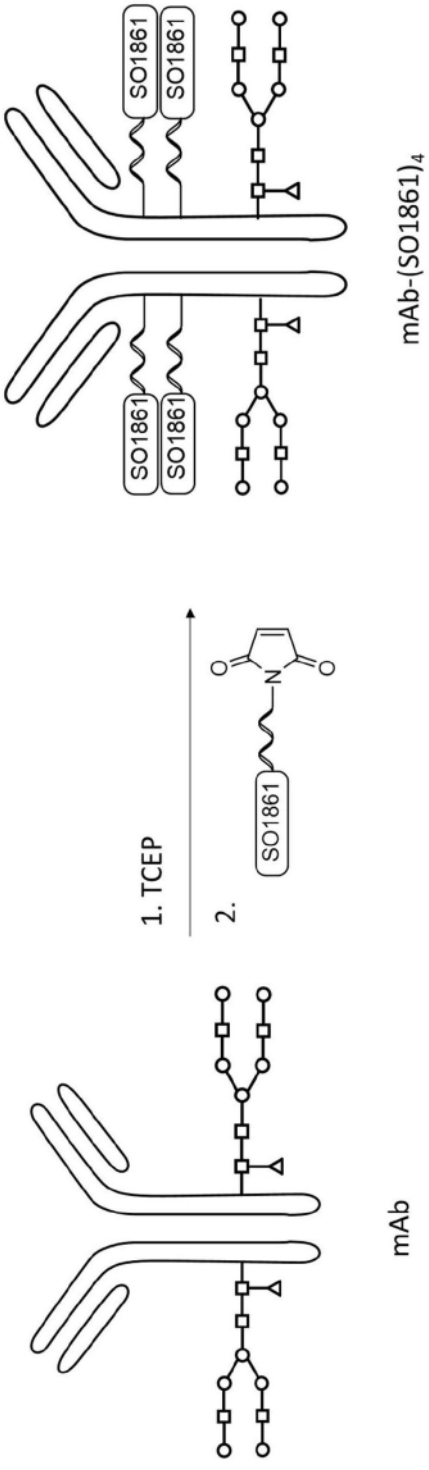


图21A

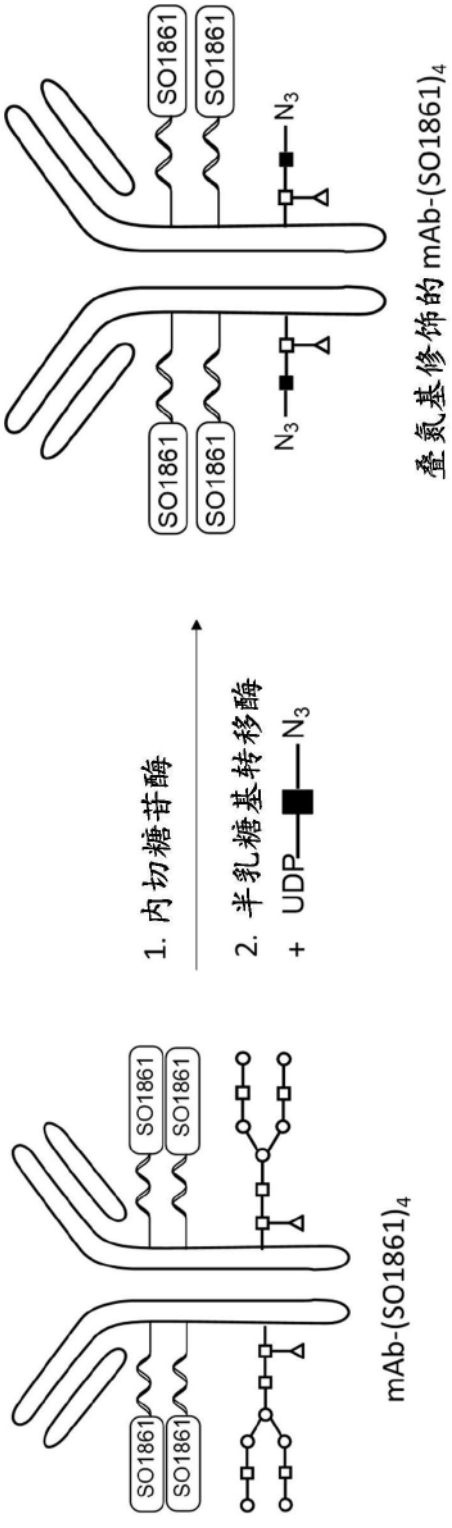

SO1861
SO1861
N3
SO1861
SO1861
N3
叠氮基修饰的 mAb-(SO1861)4
1. 内切糖苷酶
2. 半乳糖基转移酶
+ UDP—N3
SO1861
SO1861
SO1861
SO1861
mAb-(SO1861)4

图21B

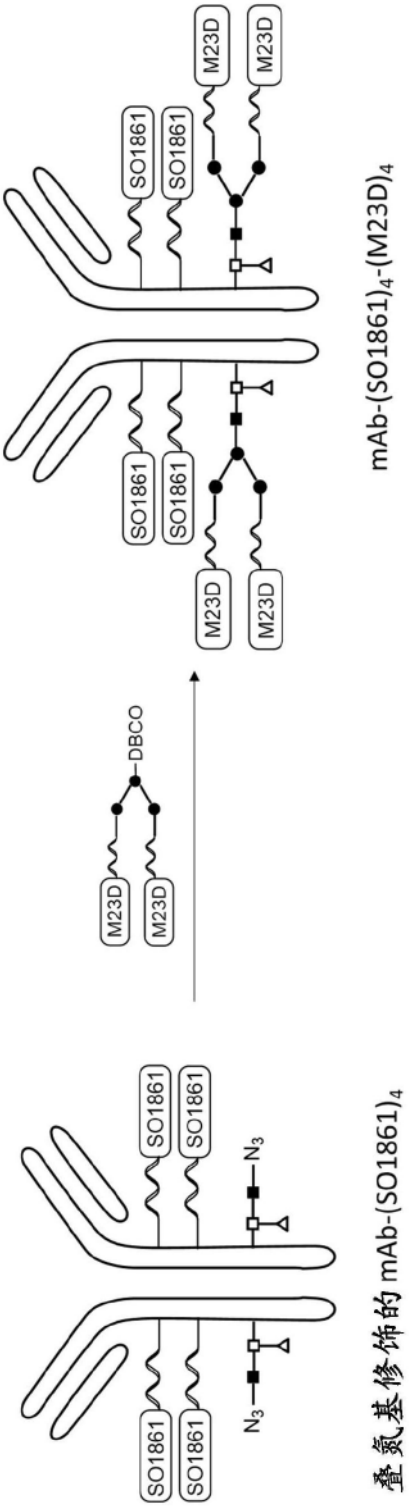

叠氮基修饰的 mAb-(SO1861)4
SO1861
SO1861
N3
N3
SO1861
SO1861
DBCO
M23D
M23D
mAb-(SO1861)4-(M23D)4
SO1861
SO1861
SO1861
SO1861
M23D
M23D
M23D
M23D

图21C

mCD71-M23D-EMCH-SO1861(2)
(SO1861-EMCH)

nM 缀合物	标志物	1200	240	48	9.6	1.9	0.38
% 跳跃		65	27	17	6	7	0

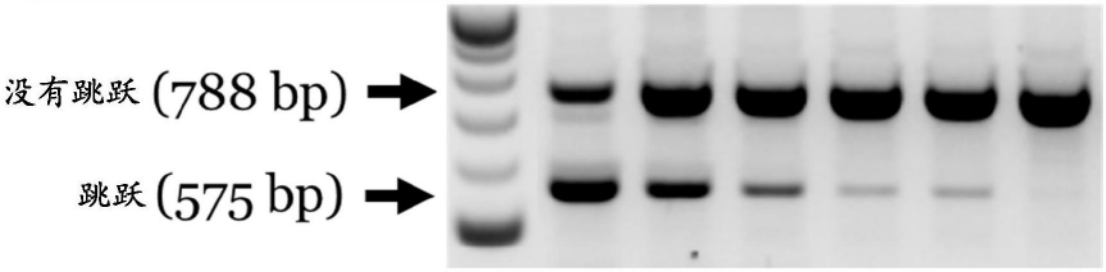


图22A

mCD63-M23D-SC-SO1861
(SO1861-SC-Mal)

nM 缀合物	标志物	1200	240	48	9.6	1.9	0.38
% 跳跃		53	22	11	0	0	0

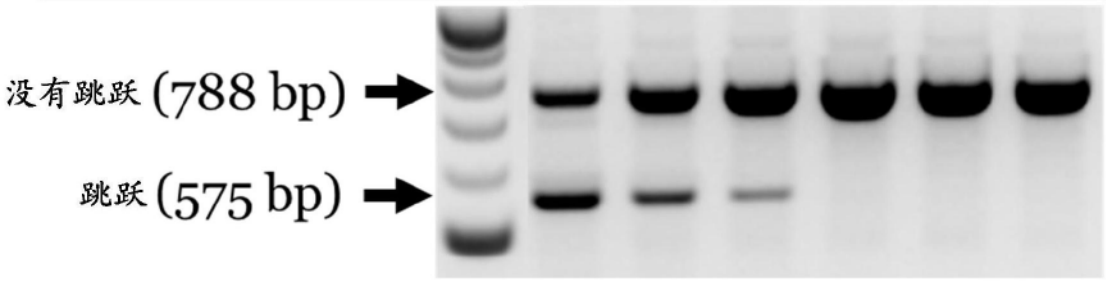


图22B

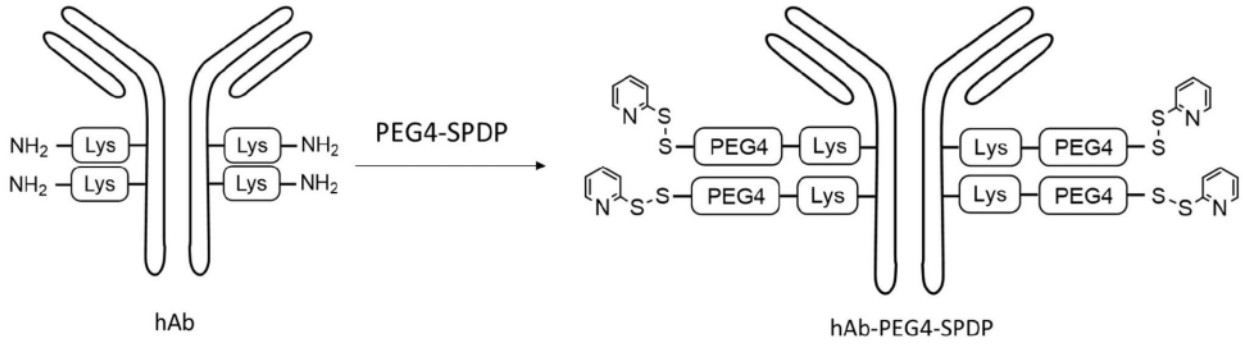


图23A

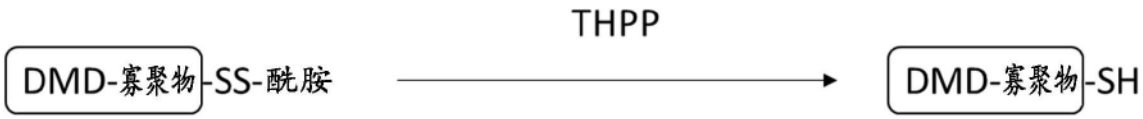

THPP
DMD-寡聚物-SS-酰胺
DMD-寡聚物-SH

图23B

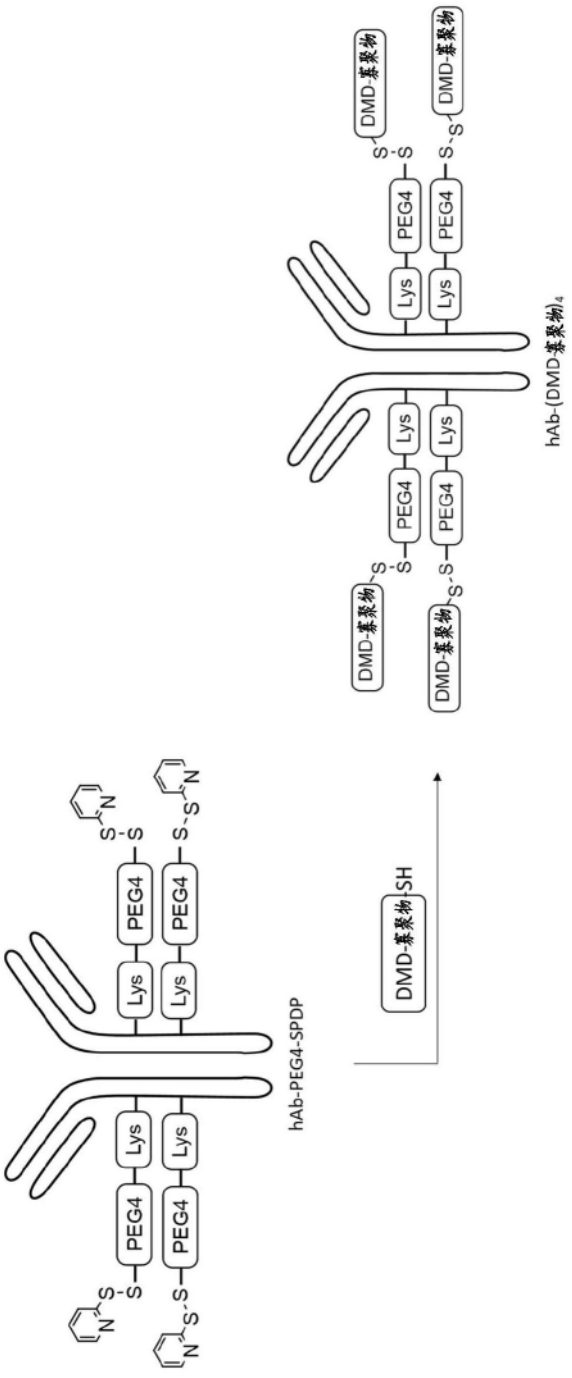
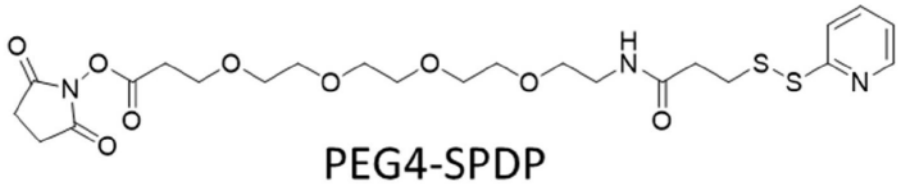
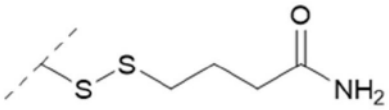

DMD-寡聚物
PEG4
Lys
hAb-(DMD-寡聚物)4
hAb-PEG4-SPDP
DMD-寡聚物-SH

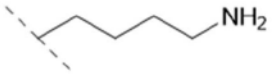
图23C



PEG4-SPDP



-SS-酰胺



Lys

hAb = hCD71 或 hCD63

DMD-寡聚物1 - 7:

寡聚物 1 = 5′-SS-DMD-PMO(1)

寡聚物 2 = 3′-SS-DMD-PMO(1)

寡聚物 3 = 3′-SS-DMD-PMO(2)

寡聚物 4 = 3′-SS-DMD-PMO(3)

寡聚物 5 = 3′-SS-DMD-PMO(4)

寡聚物 6 = 3′-SS-DMD-PMO(5)

寡聚物 7 = 5′-SS-DMD-ASO

图23D

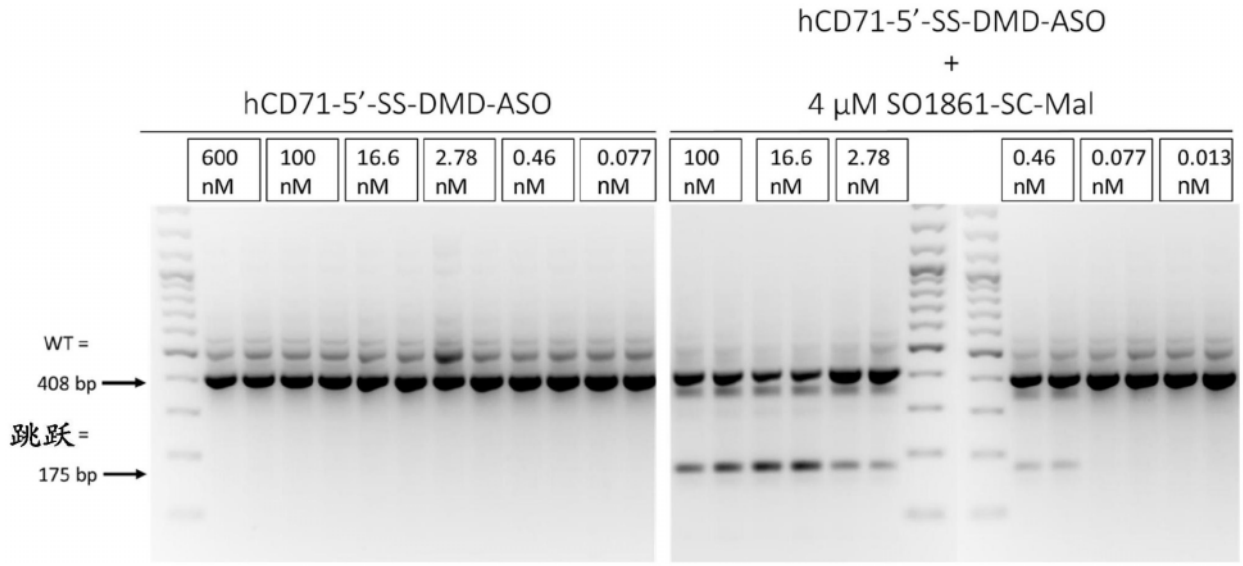

hCD71-5′-SS-DMD-ASO
hCD71-5′-SS-DMD-ASO
+
4 μM SO1861-SC-Mal
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT =
408 bp
跳跃 =
175 bp

图24A

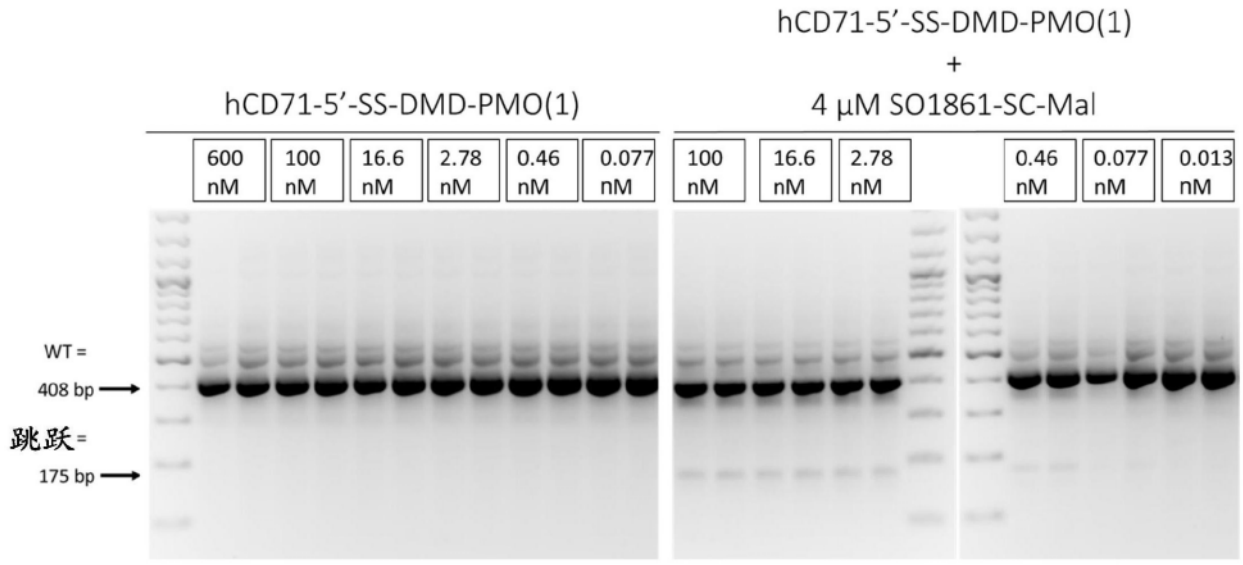

hCD71-5′-SS-DMD-PMO(1)
hCD71-5′-SS-DMD-PMO(1)
+
4 μM SO1861-SC-Mal
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT =
408 bp
跳跃 =
175 bp

图24B

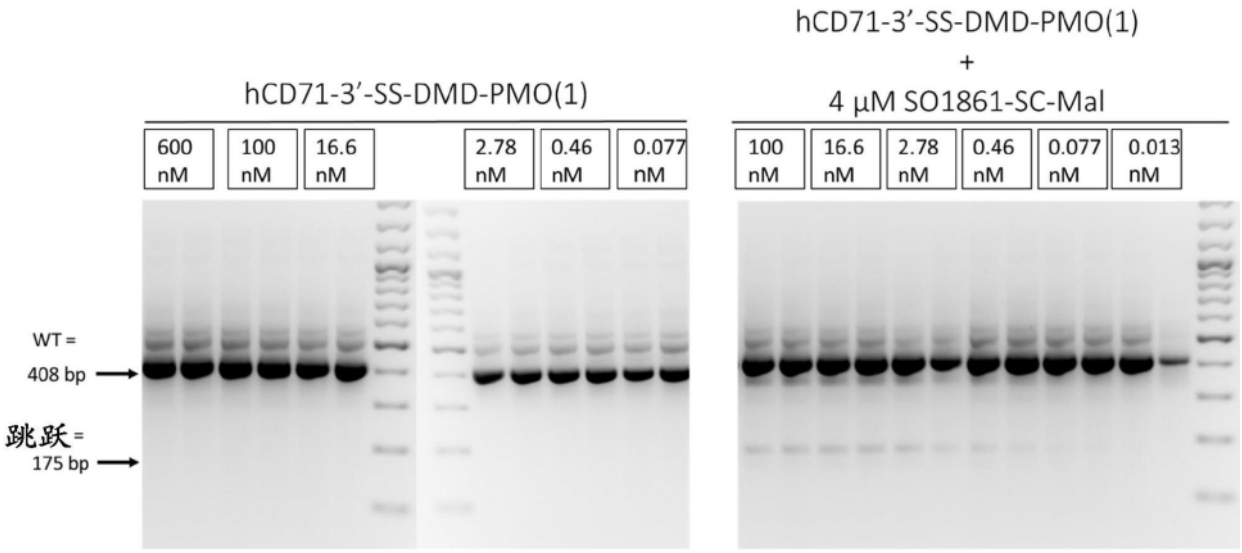

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(1)
hCD71-3′-SS-DMD-PMO(1)
+
4 μM SO1861-SC-Mal
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT =
408 bp
跳跃 =
175 bp

图25A

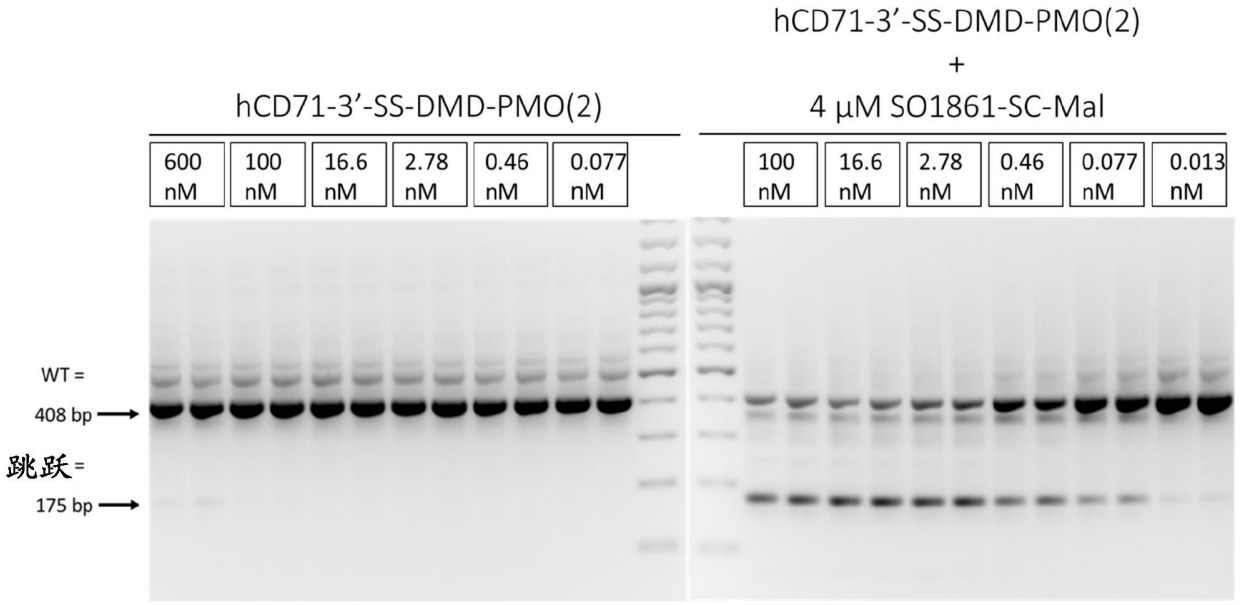

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(2)
hCD71-3′-SS-DMD-PMO(2)
+
4 μM SO1861-SC-Mal
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT =
408 bp
跳跃 =
175 bp

图25B

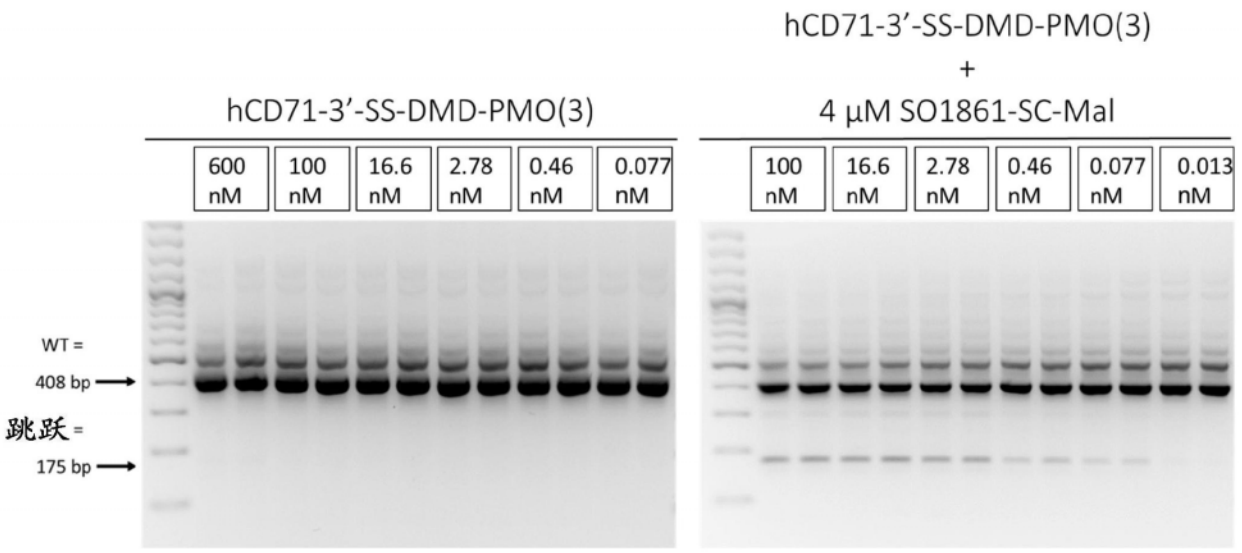

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(3)
hCD71-3′-SS-DMD-PMO(3)
+
4 μM SO1861-SC-Mal
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT =
408 bp
跳跃 =
175 bp

图25C

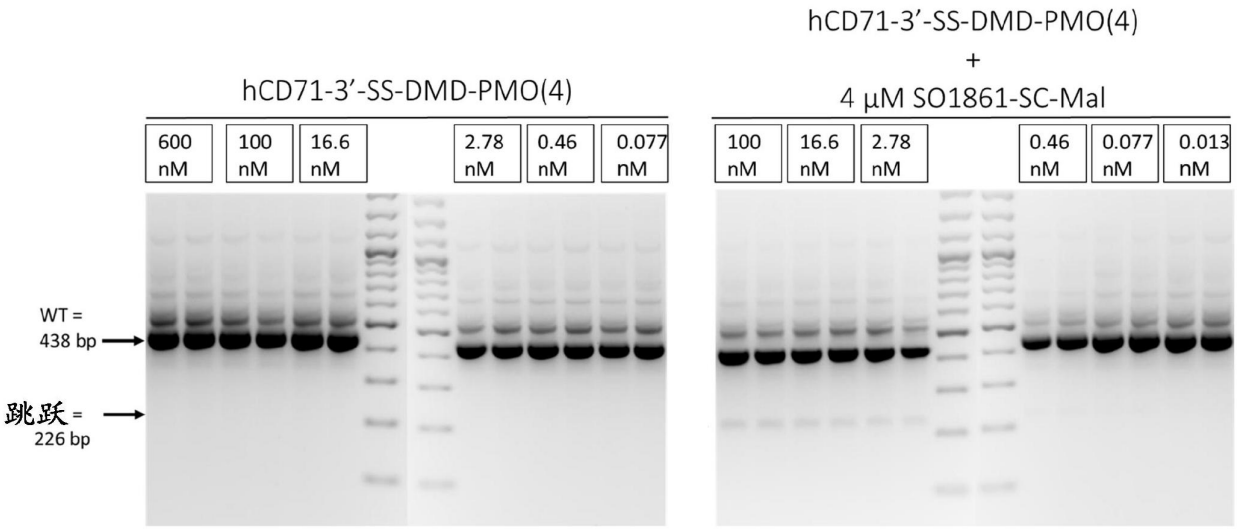

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(4)
hCD71-3′-SS-DMD-PMO(4)
+
4 μM SO1861-SC-Mal
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT =
438 bp
跳跃 =
226 bp

图26A

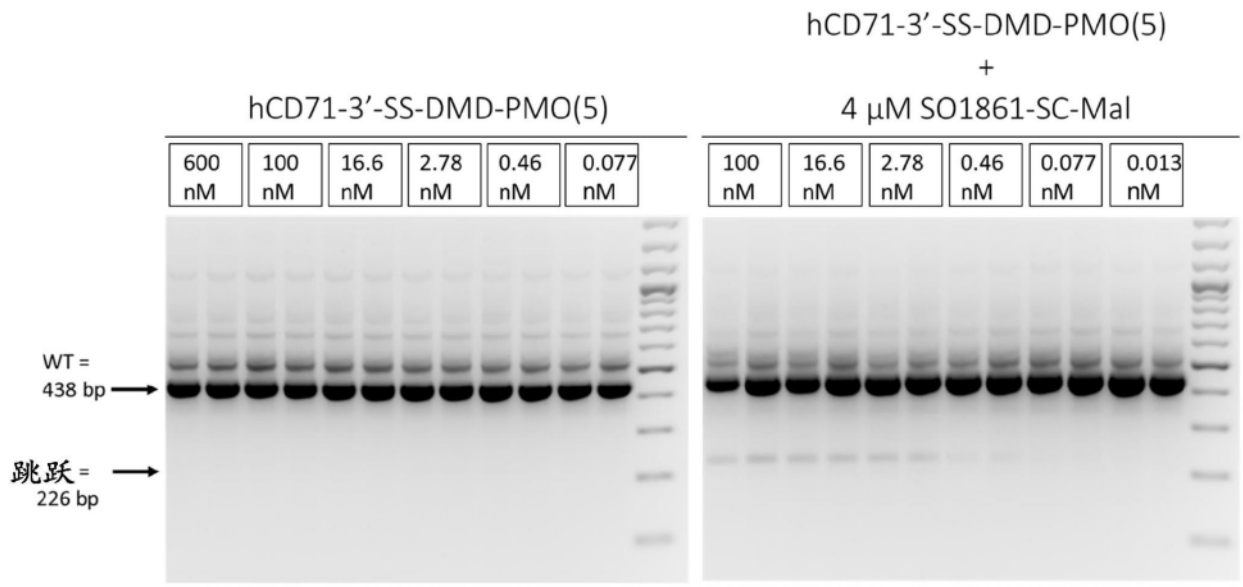

hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)
hCD71-3'-SS-DMD-PMO(5)
+
4 μM SO1861-SC-Mal
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT = 438 bp
跳跃 = 226 bp

图26B

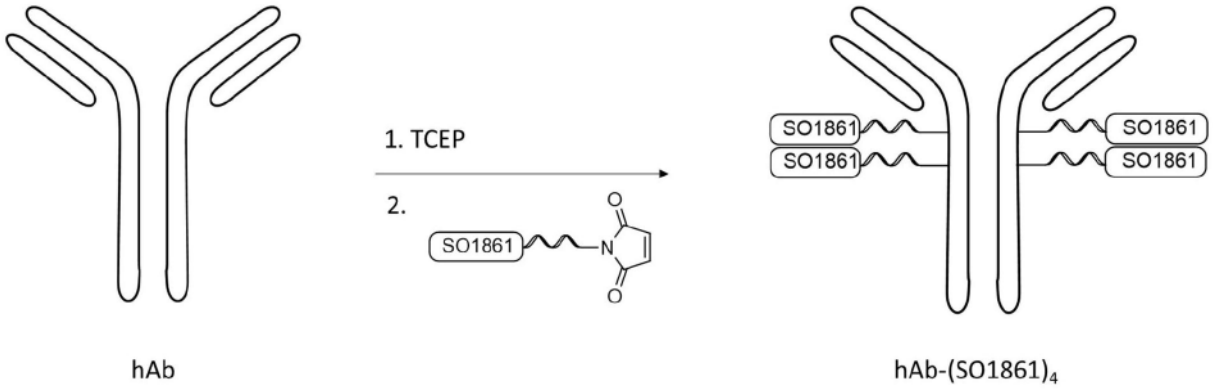

1. TCEP
2.
SO1861
hAb
SO1861
SO1861
SO1861
SO1861
hAb-(SO1861)4

图27

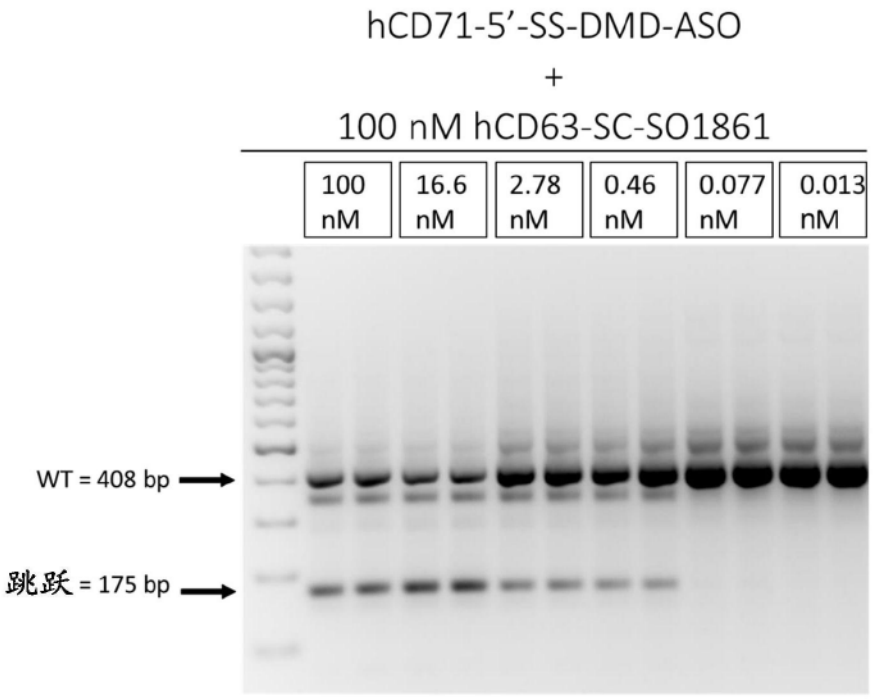

hCD71-5′-SS-DMD-ASO
+
100 nM hCD63-SC-SO1861
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT = 408 bp
跳跃 = 175 bp

图28A

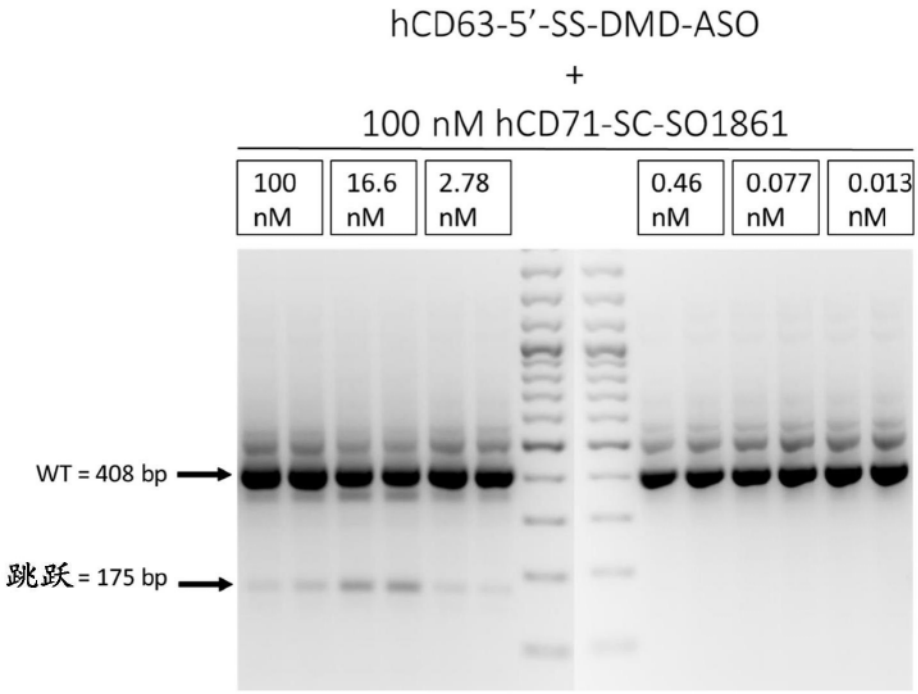

hCD63-5′-SS-DMD-ASO
+
100 nM hCD71-SC-SO1861
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
0.013 nM
WT = 408 bp
跳跃 = 175 bp

图28B

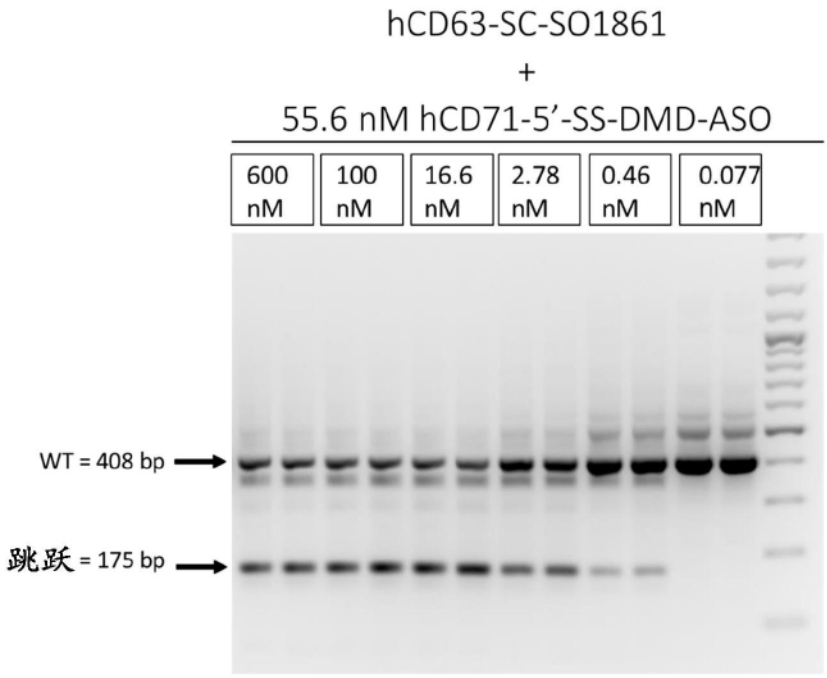

hCD63-SC-SO1861
+
55.6 nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
WT = 408 bp
跳跃 = 175 bp

图29A

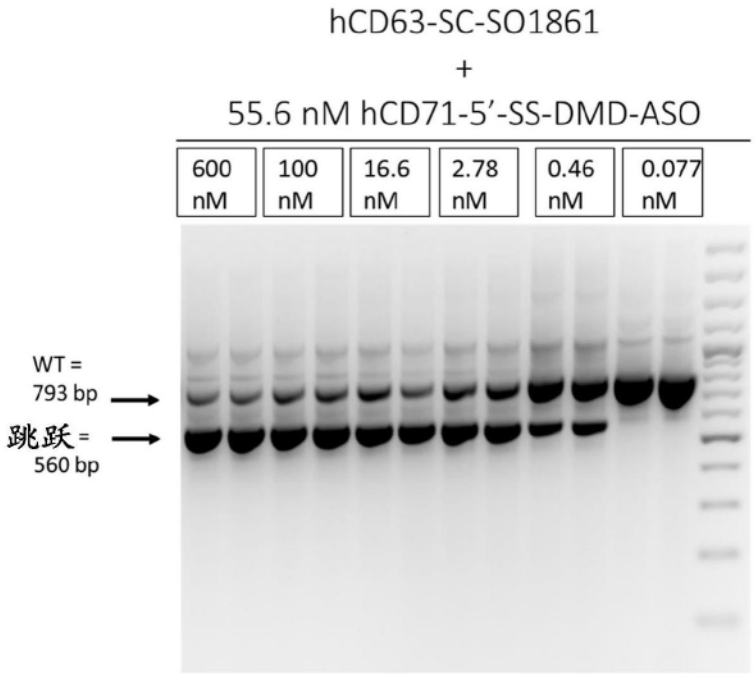

hCD63-SC-SO1861
+
55.6 nM hCD71-5'-SS-DMD-ASO
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
WT = 793 bp
跳跃 = 560 bp

图29B

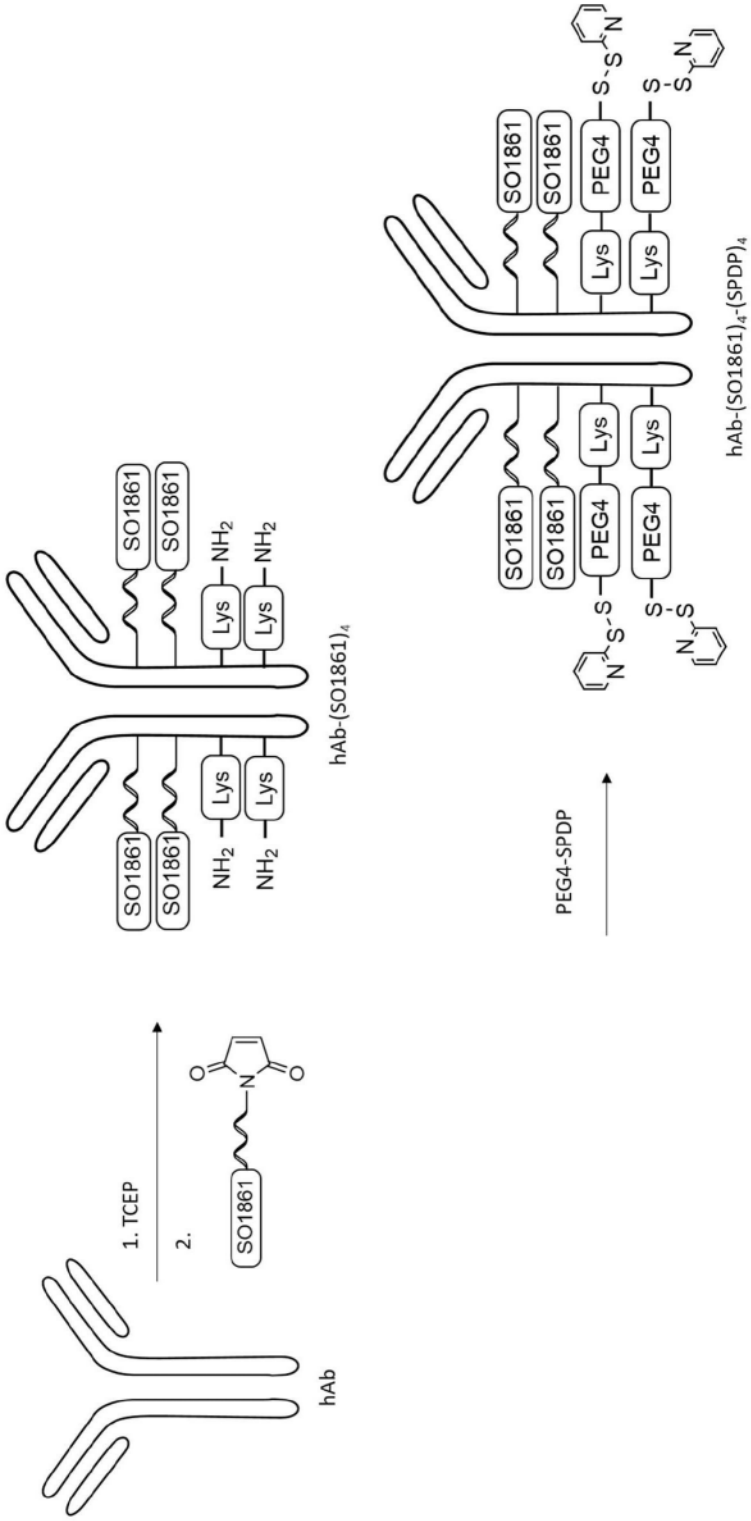

hAb
1. TCEP
2.
SO1861
hAb-(SO1861)4
PEG4-SPDP
hAb-(SO1861)4-(SPDP)4
Lys
PEG4
NH2

图30A

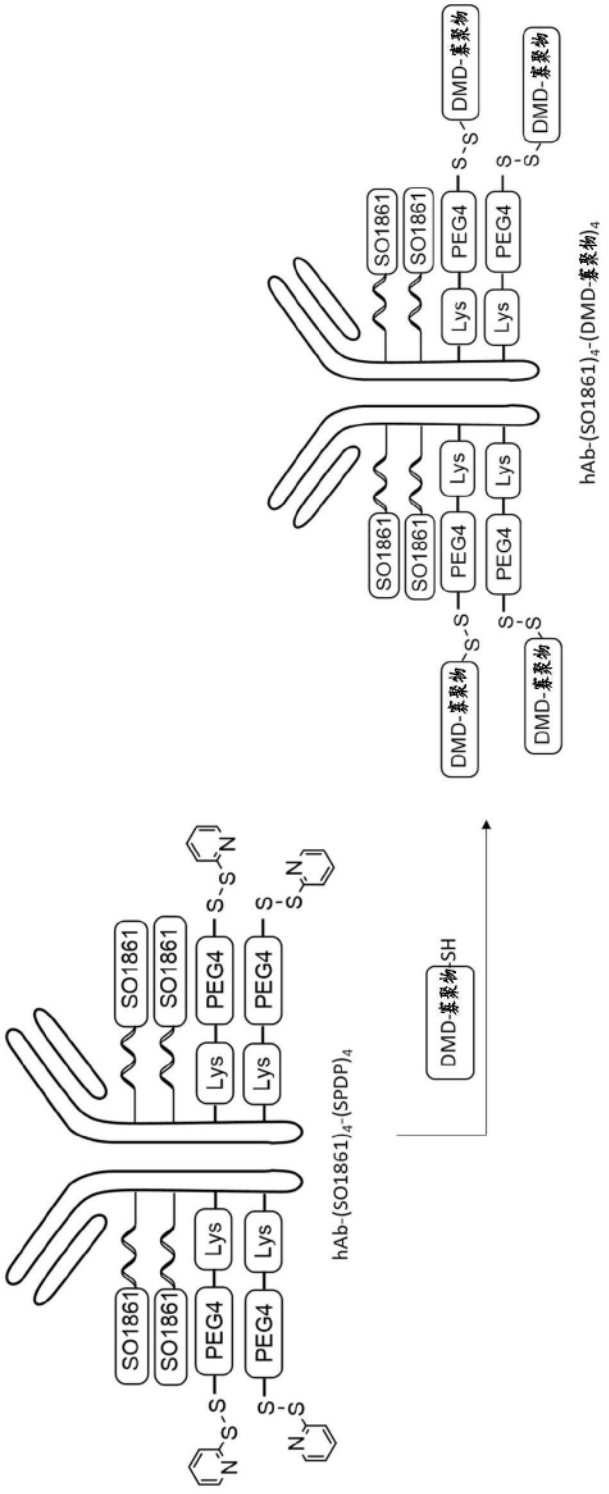
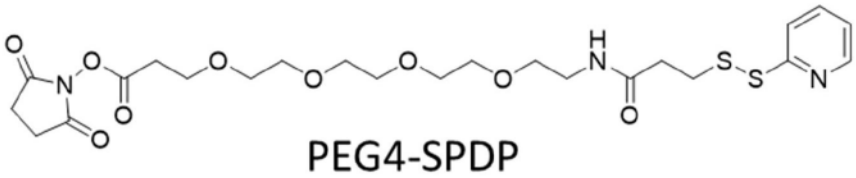
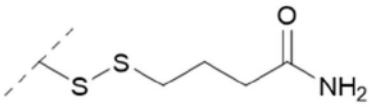

hAb-(SO1861)4-(SPDP)4
SO1861
PEG4
Lys
DMD-寡聚物-SH
hAb-(SO1861)4-(DMD-寡聚物)4
DMD-寡聚物

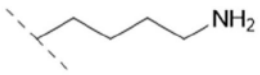
图30B



PEG4-SPDP



-SS-酰胺



Lys

hAb = hCD71 或 hCD63

DMD-寡聚物1 - 7:

寡聚物1 = 5′-SS-DMD-PMO(1)

寡聚物2 = 3′-SS-DMD-PMO(1)

寡聚物3 = 3′-SS-DMD-PMO(2)

寡聚物4 = 3′-SS-DMD-PMO(3)

寡聚物5 = 3′-SS-DMD-PMO(4)

寡聚物6 = 3′-SS-DMD-PMO(5)

寡聚物7 = 5′-SS-DMD-ASO

图30C

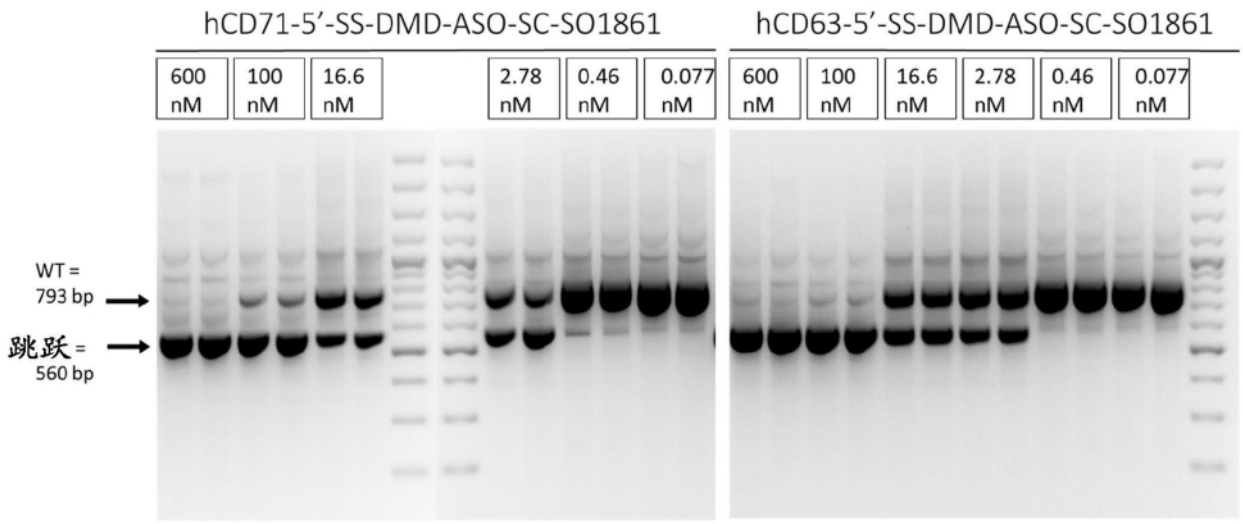

hCD71-5′-SS-DMD-ASO-SC-SO1861
hCD63-5′-SS-DMD-ASO-SC-SO1861
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
WT = 793 bp
跳跃 = 560 bp

图31A

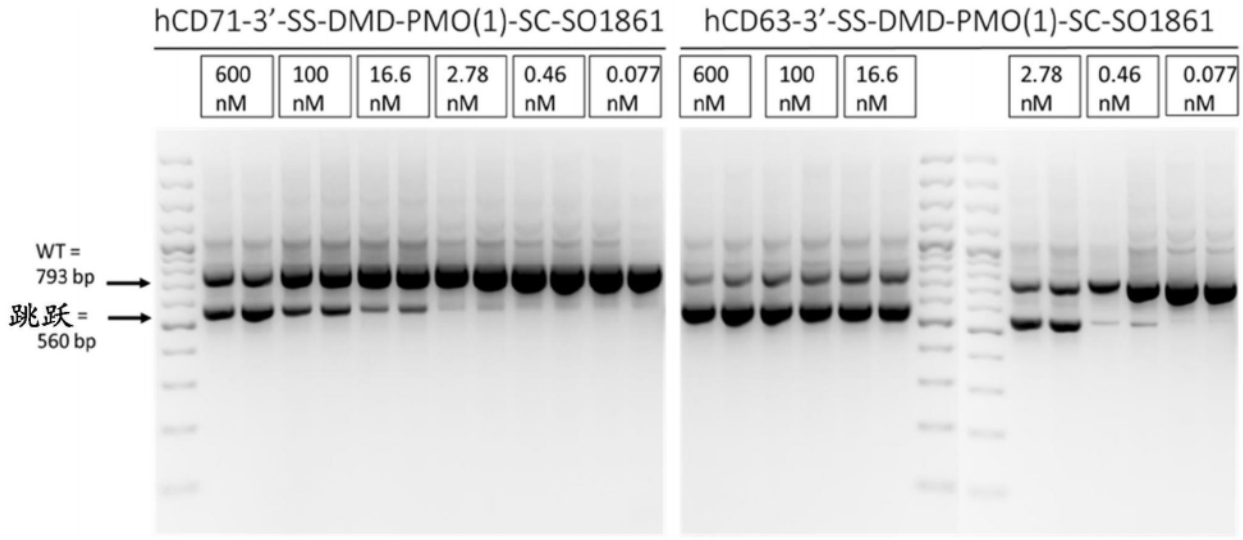

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861
hCD63-3′-SS-DMD-PMO(1)-SC-SO1861
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
WT = 793 bp
跳跃 = 560 bp

图31B

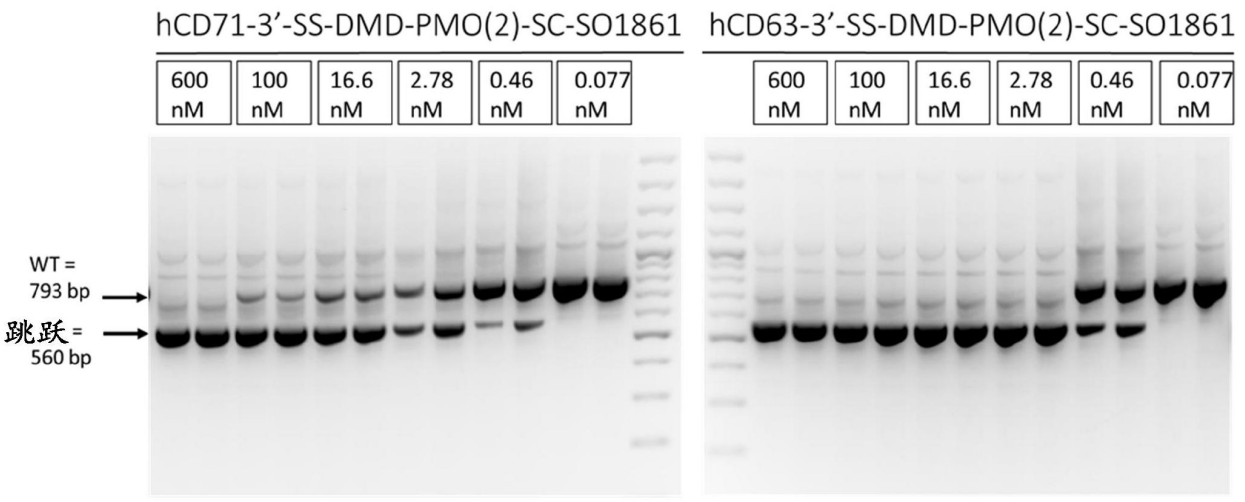

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861
hCD63-3′-SS-DMD-PMO(2)-SC-SO1861
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
WT = 793 bp
跳跃 = 560 bp

图31C

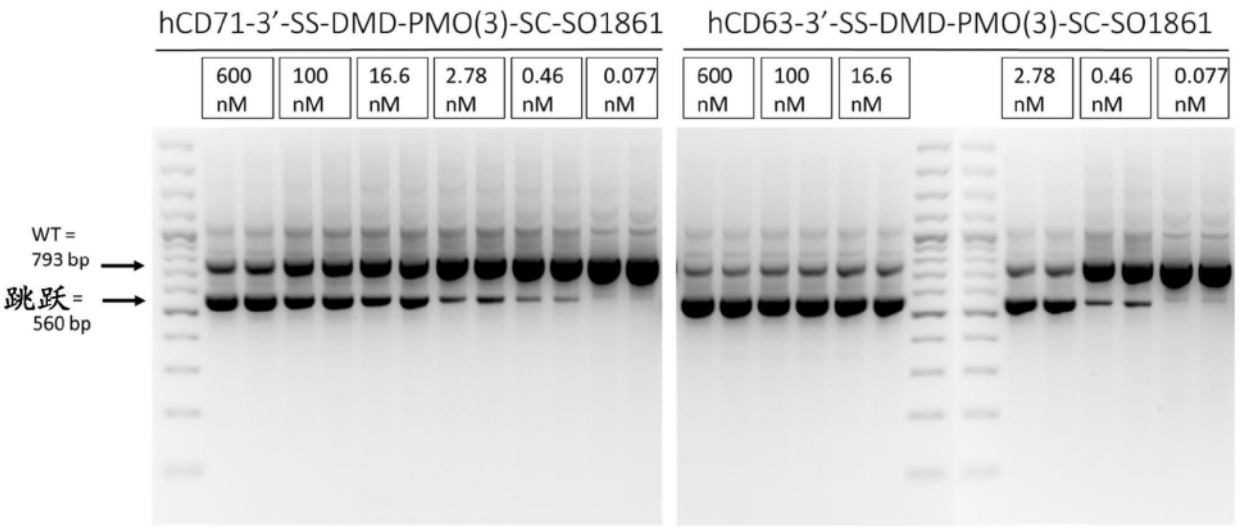

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861
hCD63-3′-SS-DMD-PMO(3)-SC-SO1861
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
WT = 793 bp
跳跃 = 560 bp

图31D

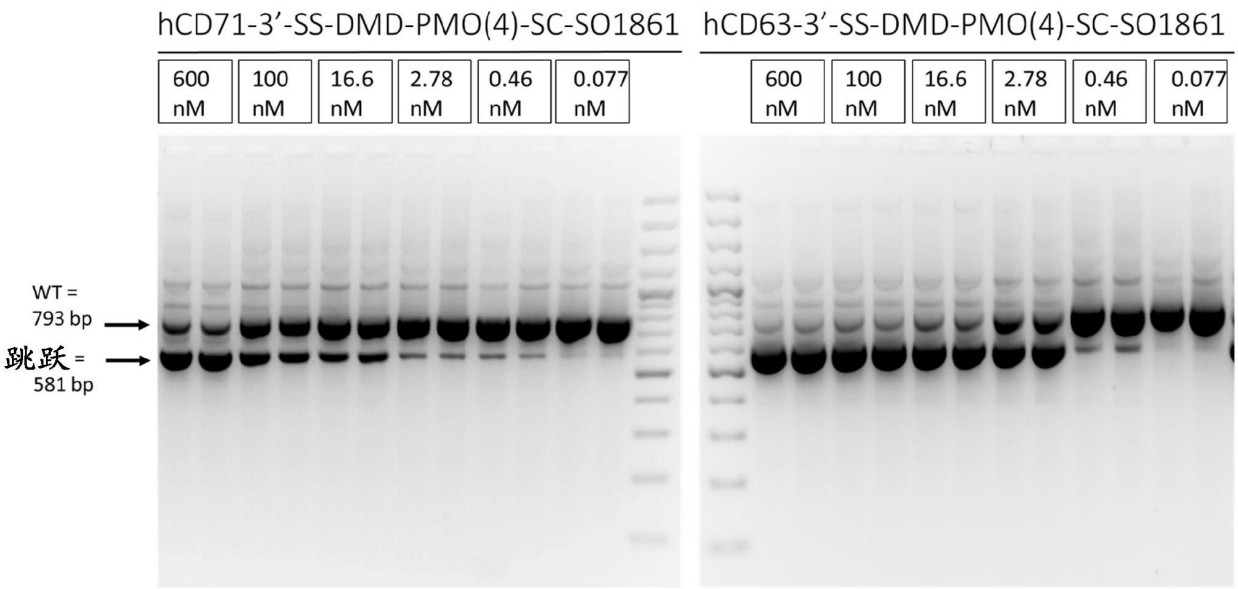

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
hCD63-3′-SS-DMD-PMO(4)-SC-SO1861
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
WT = 793 bp
跳跃 = 581 bp

图32A

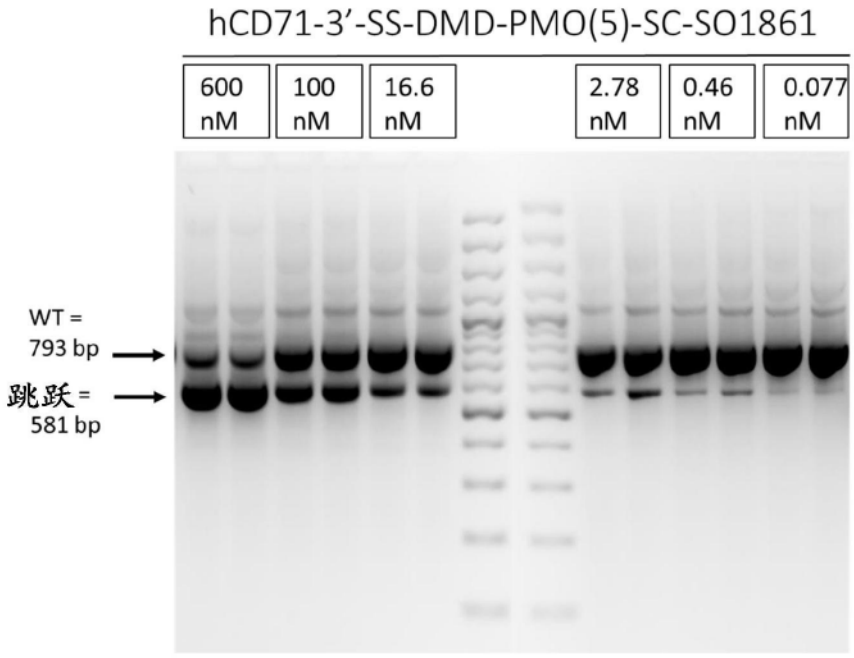

hCD71-3′-SS-DMD-PMO(5)-SC-SO1861
600 nM
100 nM
16.6 nM
2.78 nM
0.46 nM
0.077 nM
WT = 793 bp
跳跃 = 581 bp

图32B