



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113508136 A

(43) 申请公布日 2021.10.15

(21) 申请号 201980092818.1

(22) 申请日 2019.12.20

(30) 优先权数据

62/784,181 2018.12.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/068078 2019.12.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/132584 EN 2020.06.25

(71) 申请人 艾维迪提生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 比亚特丽丝·戴安娜·达里蒙特

文卡塔·拉马纳·多帕拉普迪

雷切尔·约翰斯

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 韦昌金

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书84页 附图20页

(54) 发明名称

抗转铁蛋白受体抗体及其用途

(57) 摘要

在某些实施方案中,本文公开了抗转铁蛋白受体抗体、抗转铁蛋白受体抗体缀合物和包含所述抗转铁蛋白受体抗体或缀合物的药物组合物。在一些实施方案中,本文还公开了利用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体递送有效负载的方法,以及使用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体进行治疗的方法。



1. 一种抗转铁蛋白受体抗体,其包含可变重链(VH)区和可变轻链(VL)区,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。

2. 根据权利要求1所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。

3. 根据权利要求1所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。

4. 根据权利要求1所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和LCDR3序列QHFWTPLTX₆,其中X₃选自N或S,X₄选自A或G,X₅选自D或E,且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、LCDR2序列AATNLAX₅和LCDR3序列QHFWTPLTX₆,其中X₅选自D或E,且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。

8. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

9. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。

11. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。

12. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

13. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且所述VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VH区与选自SEQ ID NO:13-16的序列具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%的序列同一性。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述VL区与选自SEQ ID NO:18-21的序列具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%的序列同一性。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体包括人源化抗体或其结合片段或者嵌合抗体或其结合片段。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体包括多特异性抗体或其结合片段。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体包括双特异性抗体或其结合片段。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体包括IgG-scFv、纳米抗体、BiTE、双抗体、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH3、三抗体、微型抗体、微抗体、TriBi微抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv-Fc KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂、F(ab')₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、双抗体-Fc、串联scFv-Fc或胞内抗体。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体包含IgG1框架。

21. 根据权利要求1-19中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体包含IgG2框架。

22. 根据权利要求21所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述IgG2框架是IgG2b框架。

23. 根据权利要求1-19中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体包含IgG4框架。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体进一步在Fc区中包含至少一个突变。

25. 根据权利要求24所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述至少一个突变调节效应子功能。

26. 根据权利要求24或25所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述至少一个突变减弱或消除Fc- γ 受体结合。

27. 根据权利要求24-26中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述至少一个突变位于残基位置D265、N297、K322、L328或P329处,其中所述残基位置是参考IgG1。

28. 根据权利要求24-27中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述Fc区包含两个或更多个、三个或更多个或者四个或更多个突变。

29. 根据权利要求24-28中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述Fc区包含L233和L234处的突变,其中所述残基对应于SEQ ID NO:23的位置233和234。

30. 根据权利要求24-28中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述Fc区包含D265和N297处的突变。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体包含选自SEQ ID NO:23-46的重链(HC)序列和选自SEQ ID NO:47-50的轻链(LC)序列。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体,其中所述抗转铁蛋白受体抗体与人转铁蛋白受体(TfR)特异性结合。

33. 一种抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其包含权利要求1-32的抗转铁蛋白受体抗体和有效负载。

34. 根据权利要求33所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括小分子、肽、蛋白质或多核酸分子。

35. 根据权利要求33所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括多核酸分子。

36. 根据权利要求35所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述多核酸分子包括短干扰核酸(siNA)、短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、PMO或mRNA。

37. 根据权利要求34-36中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括dsRNA。

38. 根据权利要求34-36中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括反义寡核苷酸(ASO)。

39. 根据权利要求33所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括小分子、肽或蛋白质。

40. 根据权利要求39所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括微管破坏剂、DNA修饰剂或Akt抑制剂。

41. 根据权利要求39所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括澳瑞他汀或其衍生物、尾海兔素或其衍生物或类似物、美登木素生物碱或者吡咯并苯并二氮杂萘或其衍生物。

42. 根据权利要求41所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述澳瑞他汀或其衍生物是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

43. 根据权利要求41所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述美登木素生物碱是DM1或DM4。

44. 根据权利要求41所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中吡咯并苯并二氮杂萘是吡咯并苯并二氮杂萘二聚体。

45. 根据权利要求39所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括免疫调节性药剂或免疫调节剂。

46. 根据权利要求45所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述免疫调节剂包括细胞因子。

47. 根据权利要求39所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载包括蛋白质或肽毒素或其片段。

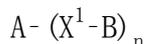
48. 根据权利要求33-47中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载通过连接体与所述抗转铁蛋白受体抗体缀合。

49. 根据权利要求33-48中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述抗转铁蛋白受体抗体进一步与两个或更多个有效负载缀合。

50. 根据权利要求33-49中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载与所述抗转铁蛋白受体抗体之比为约1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、

11:1或12:1。

51. 根据权利要求33-50中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述抗转铁蛋白缀合物包含



式(I)

其中,

A包含所述抗转铁蛋白受体抗体;

B包含所述有效负载;

X^1 由键或连接体组成;并且

n为选自1-12的平均值。

52. 根据权利要求51所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述有效负载是多核酸分子。

53. 根据权利要求52所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述多核酸分子包含过客链和指导链。

54. 根据权利要求53所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述指导链包含至少一个修饰的核苷酸间连接、至少一个反向无碱基部分、至少一个5'-乙炔基膦酸酯修饰的非天然核苷酸,或其组合。

55. 根据权利要求54所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述至少一个5'-乙炔基膦酸酯修饰的非天然核苷酸位于距所述指导链的5'末端约1、2、3、4或5个碱基处。

56. 根据权利要求51-55中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述多核酸分子进一步包含在2'位置处的糖部分的修饰。

57. 根据权利要求56所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述2'位置处的修饰选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。

58. 根据权利要求53所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述过客链包含至少6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物修饰的非天然核苷酸。

59. 根据权利要求52-58中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述过客链的长度短于所述指导链,从而在一个末端生成5'突出端、3'突出端、平端或其组合。

60. 根据权利要求52-58中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述过客链的长度等于所述指导链,从而在所述多核酸分子的每个末端生成平端。

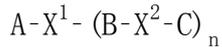
61. 根据权利要求52-60中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述过客链与A- X^1 缀合。

62. 根据权利要求61所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中A- X^1 与所述过客链的5'端缀合。

63. 根据权利要求61所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中A- X^1 与所述过客链的3'端缀合。

64. 根据权利要求33-50中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其中所述抗转铁

蛋白缀合物包含：



式 (II)

其中，

A包含所述抗转铁蛋白受体抗体；

B包含所述多核酸分子；

C由聚合物组成；

X¹由键或第一连接体组成；

X²由键或第二连接体组成；并且

n为选自1-12的平均值。

65. 根据权利要求64所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物，其中C为聚乙二醇。

66. 根据权利要求64所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物，其中所述多核酸分子包含过客链和指导链。

67. 根据权利要求66所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物，其中所述过客链与A-X¹和X²-C缀合。

68. 根据权利要求67所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物，其中A-X¹与所述过客链的5'端缀合，并且X²-C与所述过客链的3'端缀合。

69. 根据权利要求67所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物，其中X²-C与所述过客链的5'端缀合，并且A-X¹与所述过客链的3'端缀合。

70. 根据权利要求51-69中任一项所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物，其中X¹和X²各自独立地为非聚合连接体。

71. 根据权利要求64所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物，其进一步包含D。

72. 根据权利要求71所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物，其中D为内体溶解部分。

73. 一种编码权利要求1-32的抗转铁蛋白受体抗体的核酸聚合物。

74. 一种包含权利要求73的核酸聚合物的载体。

75. 一种药物组合物，其包含：

权利要求1-32的抗转铁蛋白受体抗体或权利要求33-72的抗转铁蛋白受体抗体缀合物；和

药学上可接受的赋形剂。

76. 根据权利要求75所述的药物组合物，其中所述药物组合物被配制用于全身给药。

77. 根据权利要求75或76所述的药物组合物，其中所述药物组合物被配制用于肠胃外给药。

78. 一种将有效负载递送到受试者的感兴趣的目标部位的方法，其包括：

向所述受试者施用权利要求33-72的抗转铁蛋白受体抗体缀合物或权利要求75-77的药物组合物，以将有效负载递送至感兴趣的目标部位。

79. 根据权利要求78所述的方法，其中所述感兴趣的目标部位是包含过表达的致病蛋白质的细胞。

80. 根据权利要求78所述的方法，其中所述感兴趣的目标部位是肿瘤部位。

81. 根据权利要求78所述的方法，其中所述感兴趣的目标部位是位于脑内的部位。

82. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,其包括:

向所述受试者施用权利要求33-72的抗转铁蛋白受体抗体缀合物或权利要求75-77的药物组合物,以治疗所述受试者的癌症。

83. 根据权利要求82所述的方法,其中所述癌症是实体癌。

84. 根据权利要求82所述的方法,其中所述癌症是血液系统恶性肿瘤。

85. 根据权利要求82-84中任一项所述的方法,其中所述癌症是膀胱癌、肺癌、脑癌、黑色素瘤、乳腺癌、非霍奇金淋巴瘤、宫颈癌、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、食管癌、前列腺癌、肾癌、皮肤癌、白血病、甲状腺癌、肝癌或子宫癌。

86. 根据权利要求82-85中任一项所述的方法,其中所述癌症是转移癌。

87. 根据权利要求82-85中任一项所述的方法,其中所述癌症是复发性或难治性癌症。

88. 一种治疗有需要的受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良的方法,其包括:

向所述受试者施用权利要求33-72的抗转铁蛋白受体抗体缀合物或权利要求75-77的药物组合物,其中所述多核酸分子与atrogene的靶序列杂交,并且其中所述多核酸分子介导针对atrogene的RNA干扰,从而治疗所述受试者的肌萎缩。

89. 根据权利要求88所述的方法,其中所述肌萎缩是糖尿病相关的肌萎缩或癌症恶病质相关的肌萎缩。

90. 根据权利要求88所述的方法,其中所述肌萎缩与胰岛素缺乏、慢性肾功能衰竭、充血性心力衰竭、慢性呼吸系统疾病、慢性感染、禁食、去神经支配、少肌症或1型强直性肌营养不良(DM1)相关。

91. 根据权利要求88所述的方法,其中所述强直性肌营养不良是DM1。

92. 根据权利要求88所述的方法,其中在施用抗转铁蛋白受体抗体之后,所述受试者中的网织红细胞水平没有降低。

93. 根据权利要求88所述的方法,其中抗转铁蛋白受体抗体缀合物的施用下调所述受试者的SSB siRNA或SSB mRNA水平。

94. 根据权利要求93所述的方法,其中SSB siRNA或SSB mRNA的下调发生在肌肉中。

95. 根据权利要求94所述的方法,其中所述肌肉是骨骼肌。

96. 根据权利要求94所述的方法,其中所述肌肉是心肌。

97. 根据权利要求88所述的方法,其中所述atrogene包含IGF1-Akt-FoxO途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 α -FoxO途径、TNF α -NF κ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内上调的基因。

98. 根据权利要求88所述的方法,其中所述atrogene编码E3连接酶。

99. 根据权利要求88所述的方法,其中所述atrogene编码叉头框转录因子。

100. 根据权利要求88所述的方法,其中所述atrogene包含atrogen-1基因(FBX032)、MuRF1基因(TRIM63)、FOXO1、FOXO3或MSTN。

101. 根据权利要求88所述的方法,其中所述atrogene包含DMPK。

102. 一种治疗有需要的受试者的肌营养不良的方法,其包括:

向所述受试者施用权利要求33-72的抗转铁蛋白受体抗体缀合物或权利要求75-77的药物组合物,从而治疗所述受试者的肌营养不良。

103. 根据权利要求102所述的方法,其中所述肌营养不良是杜氏肌营养不良、贝克肌营

营养不良、面肩肱型肌营养不良、先天性肌营养不良或强直性肌营养不良。

104. 根据权利要求102所述的方法,其中所述肌营养不良是杜氏肌营养不良。

105. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

106. 一种试剂盒,其包含权利要求1-32的抗转铁蛋白受体抗体、权利要求33-72的抗转铁蛋白受体抗体缀合物、权利要求73的核酸聚合物、权利要求74的载体或权利要求75-77的药物组合物。

抗转铁蛋白受体抗体及其用途

交叉引用

[0001] 本申请要求2018年12月21日提交的第62/784,181号美国临时申请的权益,该美国临时申请通过引用整体并入本文。

背景技术

[0002] 本发明属于药剂领域,具体涉及抗体。本发明提供抗转铁蛋白受体抗体以及制备和使用所述抗转铁蛋白受体抗体的方法。

[0003] 除了已知的诊断用途外,抗体已被证明可用作治疗剂。例如,近年来,免疫疗法或使用抗体用于治疗目的已被用于治疗癌症和其他病症。转铁蛋白受体是用于开发靶向癌症诊断和治疗的最广泛靶向的受体之一。这种II型跨膜糖蛋白负责细胞铁转运,并且在许多正常细胞类型的表面上以低水平发现。需要开发用于药物用途的改进的抗转铁蛋白受体抗体。

发明内容

[0004] 在某些实施方案中,本文公开了抗转铁蛋白受体抗体、抗转铁蛋白受体抗体缀合物和包含所述抗转铁蛋白受体抗体或缀合物的药物组合物。在一些实施方案中,本文还公开了利用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体递送有效负载的方法,以及使用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体进行治疗的方法。

[0005] 在某些实施方案中,本文公开了一种抗转铁蛋白受体抗体,其包含可变重链(VH)区和可变轻链(VL)区,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。在一些实施方案中,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。在一些实施方案中,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。在一些实施方案中,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。在一些实施方案中,所述VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₃选自N或S,X₄选自A或G,X₅选自D或E,且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。在一些实施方案中,所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、LCDR2序列AATNLAX₅和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₅选自D或E,且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。在一些实施方案中,所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。在一些实施方案中,所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。在一些实施方案中,所述VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。在一些实施方案中,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的

LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。在一些实施方案中,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。在一些实施方案中,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。在一些实施方案中,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且所述VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。在一些实施方案中,所述VH区与选自SEQ ID NO:13-16的序列具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,所述VL区与选自SEQ ID NO:18-21的序列具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%的序列同一性。在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包括人源化抗体或其结合片段或者嵌合抗体或其结合片段。在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包括多特异性抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体包括双特异性抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体包括IgG-scFv、纳米抗体、BiTE、双抗体、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH3、三抗体(triple body)、微型抗体、微抗体、TriBi微抗体、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv-Fc KIH、Fab-scFv-scFv-CH-CL-scFv、F(ab')₂、F(ab')₂-scFv2、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、双抗体-Fc、串联scFv-Fc或胞内抗体。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体包含IgG1框架。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体包含IgG2框架。在一些实施方案中,所述IgG2框架是IgG2b框架。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体包含IgG4框架。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体进一步在Fc区中包含至少一个突变。在一些实施方案中,所述至少一个突变调节效应子功能。在一些实施方案中,所述至少一个突变减弱或消除Fc- γ 受体结合。在一些实施方案中,所述至少一个突变位于残基位置D265、N297、K322、L328或P329处,其中所述残基位置是参考IgG1。在一些实施方案中,所述Fc区包含两个或更多个、三个或更多个或者四个或更多个突变。在一些实施方案中,所述Fc区包含L233和L234处的突变,其中所述残基对应于SEQ ID NO:23的位置233和234。在一些实施方案中,所述Fc区包含D265和N297处的突变。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体包含选自SEQ ID NO:23-46的重链(HC)序列和选自SEQ ID NO:47-50的轻链(LC)序列。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体与人转铁蛋白受体(TfR)特异性结合。

[0006] 在某些实施方案中,本文公开了一种抗转铁蛋白受体抗体缀合物,其包含本文所述的抗转铁蛋白受体抗体和有效负载。在一些实施方案中,所述有效负载包括小分子、肽、蛋白质或多核酸分子。在一些实施方案中,所述有效负载包括多核酸分子。在一些实施方案中,所述多核酸分子包括短干扰核酸(siNA)、短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、PMO或mRNA。在一些实施方案中,所述有效负载包括dsRNA。在一些实施方案中,所述有效负载包括反义寡核苷酸(ASO)。在一些实施方案中,所述有效负载包括小分子、肽或蛋白质。在一些实施方案中,所述有效负载包括微管破坏剂、DNA修饰剂或Akt抑制剂。在一些实施方案中,所述有效负载包括澳瑞他汀(auristatin)或其衍生物、尾海兔素(dolastatin)或其衍生物或类似物、美登木素生物碱

或者吡咯并苯并二氮草或其衍生物。在一些实施方案中,所述澳瑞他汀或其衍生物是单甲基澳瑞他汀E (MMAE) 或单甲基澳瑞他汀F (MMAF)。在一些实施方案中,所述美登木素生物碱是DM1或DM4。在一些实施方案中,吡咯并苯并二氮杂草是吡咯并苯并二氮杂草二聚体。在一些实施方案中,所述有效负载包括免疫调节性药剂或免疫调节剂。在一些实施方案中,所述免疫调节剂包括细胞因子。在一些实施方案中,所述有效负载包括蛋白质或肽毒素或其片段。在一些实施方案中,所述有效负载通过连接体与所述抗转铁蛋白受体抗体缀合。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体进一步与两个或更多个有效负载缀合。在一些实施方案中,所述有效负载与所述抗转铁蛋白受体抗体之比为约1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1或12:1。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白缀合物包含 $A-(X^1-B)_n$ (式(I)),其中A包含所述抗转铁蛋白抗体;B包含所述有效负载; X^1 由键或连接体组成;并且n为选自1-12的平均值。在一些实施方案中,所述有效负载是多核酸分子。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含过客链和指导链。在一些实施方案中,所述指导链包含至少一个修饰的核苷酸间连接、至少一个反向无碱基部分、至少一个5'-乙基磷酸酯修饰的非天然核苷酸,或其组合。在一些实施方案中,所述至少一个5'-乙基磷酸酯修饰的非天然核苷酸位于距所述指导链的5'末端约1、2、3、4或5个碱基处。在一些实施方案中,所述多核酸分子进一步包含在2'位置处的糖部分的修饰。在一些实施方案中,所述2'-位置处的修饰选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述过客链包含至少6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物修饰的非天然核苷酸。在一些实施方案中,所述过客链的长度短于所述指导链,从而在一个末端生成5'突出端、3'突出端、平端或其组合。在一些实施方案中,所述过客链的长度等于所述指导链,从而在所述多核酸分子的每个末端生成平端。在一些实施方案中,所述过客链与 $A-X^1$ 缀合。在一些实施方案中, $A-X^1$ 与过客链的5'端缀合。在一些实施方案中, $A-X^1$ 与过客链的3'端缀合。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白缀合物包含: $A-X^1-(B-X^2-C)_n$ (式(II)),其中A包含所述抗转铁蛋白受体抗体;B包含所述多核酸分子;C由聚合物组成; X^1 由键或第一连接体组成; X^2 由键或第二连接体组成;并且n为选自1-12的平均值。在一些实施方案中,C为聚乙二醇。在一些实施方案中,所述多核酸分子包含过客链和指导链。在一些实施方案中,所述过客链与 $A-X^1$ 和 X^2-C 缀合。在一些实施方案中, $A-X^1$ 与所述过客链的5'端缀合,并且 X^2-C 与所述过客链的3'端缀合。在一些实施方案中, X^2-C 与所述过客链的5'端缀合,并且 $A-X^1$ 与所述过客链的3'端缀合。在一些实施方案中, X^1 和 X^2 各自独立地为非聚合连接体。在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体缀合物进一步包含D。在一些实施方案中,D为内体溶解(endosomolytic)部分。

[0007] 在某些实施方案中,本文公开了一种编码本文所述的抗转铁蛋白受体抗体的核酸聚合物。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了一种载体,其包含编码本文所述的抗转铁蛋白受体抗体的核酸聚合物。

[0009] 在某些实施方案中,本文公开了一种药物组合物,其包含:本文所述的抗转铁蛋白受体抗体或本文所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物;和药学上可接受的赋形剂。在一些实

施方案中,所述药物组合物被配制用于全身给药。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于肠胃外给药。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开了一种将有效负载递送到受试者的感兴趣的目标部位的方法,其包括:向所述受试者施用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物或本文所述的药物组合物,以将有效负载递送至感兴趣的目标部位。在一些实施方案中,所述感兴趣的目标部位是包含过表达的致病蛋白质的细胞。在一些实施方案中,所述感兴趣的目标部位是肿瘤部位。在一些实施方案中,所述感兴趣的目标部位是位于脑内的部位。

[0011] 在某些实施方案中,本文公开了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,其包括:向所述受试者施用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物或本文所述的药物组合物,以治疗所述受试者的癌症。在一些实施方案中,所述癌症是实体癌。在一些实施方案中,所述癌症是血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述癌症是膀胱癌、肺癌、脑癌、黑色素瘤、乳腺癌、非霍奇金淋巴瘤、宫颈癌、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、食管癌、前列腺癌、肾癌、皮肤癌、白血病、甲状腺癌、肝癌或子宫癌。在一些实施方案中,所述癌症是转移癌。在一些实施方案中,所述癌症是复发性或难治性癌症。

[0012] 在某些实施方案中,本文公开了一种治疗有需要的受试者的肌萎缩或强直性肌营养不良的方法,其包括:向所述受试者施用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物或本文所述的药物组合物,其中所述多核酸分子与atrogene的靶序列杂交,并且其中所述多核酸分子介导针对atrogene的RNA干扰,从而治疗所述受试者的肌萎缩。在一些实施方案中,所述肌萎缩是糖尿病相关的肌萎缩或癌症恶病质相关的肌萎缩。在一些实施方案中,所述肌萎缩与胰岛素缺乏、慢性肾功能衰竭、充血性心力衰竭、慢性呼吸系统疾病、慢性感染、禁食、去神经支配、少肌症或1型强直性肌营养不良(DM1)相关。在一些实施方案中,在施用抗转铁蛋白受体抗体之后,所述受试者中的网织红细胞水平没有降低。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体缀合物的施用下调所述受试者的SSB siRNA或SSB mRNA水平。在一些实施方案中,SSB siRNA或SSB mRNA的下调发生在肌肉中。在一些实施方案中,所述肌肉是骨骼肌。在一些实施方案中,所述肌肉是心肌。

[0013] 在一些实施方案中,所述强直性肌营养不良是DM1。在一些实施方案中,所述atrogene包含IGF1-Akt-FoxO途径、糖皮质激素-GR途径、PGC1 α -FoxO途径、TNF α -NF κ B途径或肌肉生长抑制素-ActRIIb-Smad2/3途径内上调的基因。在一些实施方案中,所述atrogene编码E3连接酶。在一些实施方案中,所述atrogene编码叉头框转录因子。在一些实施方案中,所述atrogene包含atrogen-1基因(FBX032)、MuRF1基因(TRIM63)、FOXO1、FOXO3或MSTN。在一些实施方案中,所述atrogene包含DMPK。在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0014] 在某些实施方案中,本文公开了一种治疗有需要的受试者的肌营养不良的方法,其包括:向所述受试者施用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物或本文所述的药物组合物,从而治疗所述受试者的肌营养不良。在一些实施方案中,所述肌营养不良是杜氏肌营养不良、贝克肌营养不良、面肩肱型肌营养不良、先天性肌营养不良或强直性肌营养不良。在一些实施方案中,所述肌营养不良是杜氏肌营养不良。在一些实施方案中,所述受试者是人。

[0015] 在某些实施方案中,本文公开了一种试剂盒,其包含本文所述的抗转铁蛋白受体抗体、本文所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物、本文所述的核酸聚合物、本文所述的载体或

本文所述的药物组合物。

附图说明

[0016] 本公开的各个方面在所附权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本公开的原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及以下附图,将会对本公开的特征和优点获得更好的理解。本专利申请文件包含至少一张以彩色绘制的附图。在请求并支付必要的费用后,专利局将会提供具有彩图的该专利申请公布文本的副本。

[0017] 图1示出了示例性SSB过客链的结构。

[0018] 图2示出了具有19个碱基的互补性和一个3'二核苷酸突出端的示例性平端双链体的结构。对纯化的单链进行双链体化,以得到双链siRNA。

[0019] 图3A示出了TfR1.IgG2 mAb和TfR1.IgG2 mAb-SSB与重组人TfR1的体外结合。

[0020] 图3B示出了TfR1.IgG2 mAb和TfR1.IgG2 mAb-SSB与重组食蟹猴TfR1的体外结合。

[0021] 图4A示出了在用hTfR1.IgG2 mAb SSB或hTfR1.IgG2 mAb MSTN(阴性对照)缀合物处理的He192.1.7细胞中siRNA递送中的SSB mRNA水平。

[0022] 图4B示出了在用hTfR1.IgG2 mAb SSB或hTfR1.IgG2 mAb MSTN(阴性对照)缀合物处理的无限增殖化人骨骼肌细胞中siRNA递送中的SSB mRNA水平。

[0023] 图5A示出了在以30和60mg/kg (n=3)施用hTfR1.IgG2 mAb-SSB缀合物后,食蟹猴的腓肠肌中的SSB mRNA和SSB siRNA水平。

[0024] 图5B示出了在以30和60mg/kg (n=3)施用hTfR1.IgG2 mAb-SSB缀合物后,食蟹猴的四头肌中的SSB mRNA和SSB siRNA水平。

[0025] 图6示出了在以30和60mg/kg用hTfR1.IgG2 mAb-SSB缀合物给药之前和之后,食蟹猴中的相对网织红细胞水平。

[0026] 图7示出了示例性抗TfR抗体对食蟹猴CD71的结合常数。

[0027] 图8示出了示例性抗TfR抗体对人CD71的结合常数。

[0028] 图9A示出了示例性抗TfR抗体在竞争设置下与TfR的结合。

[0029] 图9B显示了图9A的测试抗TfR抗体的结合常数。

[0030] 图10A显示,示例性抗TfR抗体与TfR的结合得到保持。

[0031] 图10B显示了图10A的测试抗TfR抗体的结合常数。

[0032] 图11显示了示例性抗TfR抗体的ADCC活性。

[0033] 图12显示了抗TfR抗体不与TfR2结合。

[0034] 图13A显示了HEL92细胞中的%SSB mRNA敲减。

[0035] 图13B显示了图13A的测试抗TfR抗体的EC50。

[0036] 图14示出了示例性抗TfR抗体的ADCC活性。

[0037] 图15示出了示例性抗TfR抗体的CDC活性。

[0038] 图16显示了TfR1.mAb缀合物在原代人骨骼肌细胞(肌管)中的摄取。

[0039] 图17显示了用TfR1.hIgG2 mAb或TfR1.hIgG1 mAb变体的SSB或乱序(Scramble) siRNA缀合物处理的原代人骨骼肌细胞中的SSB mRNA水平。

[0040] 图18显示了在TfR1靶向AOC给药(第1天单剂量)前/后,食蟹猴中的绝对网织红细胞水平。

[0041] 图19显示了在单剂量的TfR1 mAb SSB缀合物 (n=3) 后21天,食蟹猴肌肉中的SSB mRNA水平。

[0042] 图20A显示了在单次6mg/kg剂量的hIgG1 TfR-Var2ii-SSB缀合物 (n=2) 后21天,食蟹猴组织中的SSB siRNA水平。

[0043] 图20B显示了在单次6mg/kg剂量的hIgG1 TfR-Var2ii-SSB缀合物 (n=2) 后21天,食蟹猴组织中的SSB mRNA水平。

具体实施方式

[0044] 转铁蛋白受体 (TfR) 包括膜糖蛋白家族,并且由基因TFRC编码。TfR通过与铁-转铁蛋白复合物相互作用促进铁进入细胞而参与铁代谢。TfR有两种亚型:转铁蛋白受体1 (TfR1或CD71) 和转铁蛋白受体2 (TfR2)。TfR1在不同细胞类型中普遍表达,而TfR2在肝细胞中特异性表达。

[0045] 在一些情况下,在各种癌症中已经注意到TfR1的异常表达。事实上,一项研究表明,TfR1的表达水平在乳腺癌细胞中升高 (Pizzamiglio等人,“Expression of iron-related proteins differentiate non-cancerous and cancerous breast tumors,”Int J Mol Sci.2017;18)。在单独的研究中,也证明TFR1在脑癌中过表达 (Rosager等人,“Transferrin receptor-land ferritin heavy and light chains in astrocytic brain tumors:Expression and prognostic value,”PLoS One 12:e0182954 (2017))。进一步的研究表明,肿瘤起始细胞中的铁摄取升高 (Rychtarcikova等人,“Tumorinitiating cells of breast and prostate origin show alterations in the expression of genes related to iron metabolism,”Oncotarget.8:6376-6398 (2017))。

[0046] 在一些实施方案中,本文公开了一种抗转铁蛋白受体抗体、抗转铁蛋白受体抗体缀合物和包含它们的药物组合物。在另外的实施方案中,本文公开了一种利用抗转铁蛋白受体抗体递送有效负载的方法,以及通过利用转铁蛋白受体的存在进行靶向递送来治疗疾病或病况的方法。

抗转铁蛋白受体抗体

[0047] 在某些实施方案中,本文公开了抗转铁蛋白受体抗体。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体与转铁蛋白受体 (TfR) 特异性结合。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体与人转铁蛋白受体 (TfR) 特异性结合。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体与转铁蛋白受体1 (TfR1) (或CD71) 特异性结合。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体与人转铁蛋白受体1 (TfR1) (或人CD71) 特异性结合。

[0048] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含可变重链 (VH) 区和可变轻链 (VL) 区,其中所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。

[0049] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体的VH区包含选自表1的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

表1.

名称	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
13E4_VH1	YTFTNYWMH	1	EINPINGRSNYAQKFQ G	2	GTRAMHY	3
13E4_VH2*	YTFTNYWMH	1	EINPINGRSNYAEKFQG	4	GTRAMHY	3
13E4_VH3	YTFTNYWMH	1	EINPIQGRSNYAEKFQG	5	GTRAMHY	3

*13E4_VH2与抗转铁蛋白受体抗体13E4_VH4具有相同的HCDR1、HCDR2和HCDR3序列。

[0050] 在一些实施方案中,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2、4或5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。在一些情况下,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。在一些情况下,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。在一些情况下,所述VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列。

[0051] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体的VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₃选自N或S,X₄选自A或G,X₅选自D或E,且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0052] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体的VL区包含选自表2的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

表2.

名称	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
13E4_VL1*	RTSENIYNNLA	6	AATNLAD	7	QHFWGTPLT	8
13E4_VL3	RTSENIYNNLA	6	AATNLAE	9	QHFWGTPLTF	10
13E4_VL4	RTSENIYSNLA	11	AGTNLAD	12	QHFWGTPLTF	10

*13E4_VL1与抗转铁蛋白受体抗体13E4_VL2具有相同的LCDR1、LCDR2和LCDR3序列。

[0053] 在一些情况下,所述VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、含有SEQ ID NO:7、9或12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₃选自N或S。

[0054] 在一些情况下,所述VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₄选自A或G,并且X₅选自D或E。

[0055] 在一些情况下,所述VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列SEQ ID NO:7、9或12和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0056] 在一些情况下,所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、LCDR2序列AATNLAX₅和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₅选自D或E,并且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0057] 在一些情况下,所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。

[0058] 在一些情况下,所述VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0059] 在一些情况下,所述VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0060] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q,并且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₃选自N或S,X₄选自A或G,X₅选自D或E,并且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0061] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q,并且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、含有SEQ ID NO:7、9或12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₃选自N或S。

[0062] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q,并且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₄选自A或G,并且X₅选自D或E。

[0063] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q,并且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列SEQ ID NO:7、9或12和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0064] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q,并且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、LCDR2序列AATNLAX₅和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₅选自D或E,并且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0065] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q,并且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。

[0066] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q,并且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0067] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有

SEQ ID NO:1的HCDR1序列;HCDR2序列EINPIX₁GRSNYAX₂KFQG,其中X₁选自N或Q,并且X₂选自Q或E;和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0068] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、含有SEQ ID NO:7、9或12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₃选自N或S。

[0069] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₄选自A或G,并且X₅选自D或E。

[0070] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列SEQ ID NO:7、9或12和LCDR3序列QHFWTPLTX₆,其中X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0071] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、LCDR2序列AATNLAX₅和LCDR3序列QHFWTPLTX₆,其中X₅选自D或E,并且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0072] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。

[0073] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0074] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:2的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0075] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、含有SEQ ID NO:7、9或12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₃选自N或S。

[0076] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₄选自A或G,并且X₅选自D或E。

[0077] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列SEQ ID NO:7、9或12和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0078] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、LCDR2序列AATNLAX5和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₅选自D或E,并且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0079] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8的LCDR3序列。

[0080] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0081] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:4的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0082] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含LCDR1序列RTSENIYX₃NLA、含有SEQ ID NO:7、9或12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₃选自N或S。

[0083] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列AX₄TNLAX₅和含有SEQ ID NO:8或10的LCDR3序列,其中X₄选自A或G,并且X₅选自D或E。

[0084] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6或11的LCDR1序列、LCDR2序列SEQ ID NO:7、9或12和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0085] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、LCDR2序列AATNLAX5和LCDR3序列QHFWGTPLTX₆,其中X₅选自D或E,并且X₆存在或不存在,如果存在,则为F。

[0086] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:7的LCDR2序列和含有

SEQ ID NO:8的LCDR3序列。

[0087] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:6的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:9的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0088] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区包含含有SEQ ID NO:1的HCDR1序列、含有SEQ ID NO:5的HCDR2序列和含有SEQ ID NO:3的HCDR3序列;并且该VL区包含含有SEQ ID NO:11的LCDR1序列、含有SEQ ID NO:12的LCDR2序列和含有SEQ ID NO:10的LCDR3序列。

[0089] 在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体包含VH区和VL区,其中该VH区的序列与SEQ ID NO:13-16具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,并且该VL区的序列与SEQ ID NO:18-21具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0090] 在一些实施方案中,所述VH区包含选自SEQ ID NO:13-16(表3)的序列,并且所述VL区包含选自SEQ ID NO:18-21(表4)的序列。表3和表4中带下划线的区域表示各自的CDR1、CDR2或CDR3序列。

表3

名称	VH 序列	SEQ ID NO:
13E4_VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGYTFTNYWMH</u> WVRQAP GQGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDT <u>SISTAYMELS</u> RLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGT <u>LVTVSS</u>	13
13E4_VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGYTFTNYWMH</u> WVRQAP GQGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDT <u>SSSTAYMELSR</u> LRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGT <u>LVTVSS</u>	14
13E4_VH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGYTFTNYWMH</u> WVRQAP GQGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDT <u>SSSTAYMELS</u> SLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGT <u>LVTVSS</u>	15
13E4_VH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <u>SCKASGYTFTNYWMH</u> WVRQAP GQGLEWMGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDT <u>SSSTAYMELS</u> SLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGT <u>LVTVSS</u>	16
13E4_VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLS <u>CKASGYTFTNYWMH</u> WVKQRP GQGLEWIGEINPINGRSNYGERFKTKATLTVDK <u>SSSTAYMQLSS</u> LTSEDSAVYYCARGTRAMHYWGQGT <u>SVTVSS</u>	17

表4

名称	VL 序列	SEQ ID NO:
13E4_VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKSP KLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYC QHFWGTPLTFGGGTKVEIK	18
13E4_VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKAP KLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYC QHFWGTPLTFGGGTKVEIK	19
13E4_VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKAP KLLIYAATNLAEAGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCQ HFWGTPLTFGGGTKVEIK	20
13E4_VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKAP KLLIYAGTNLADGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFANYYC QHFWGTPLTFGGGTKVEIK	21
13E4_VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRTSENIYNNLAWYQQKQGKSP QLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSQYSLKINSLSQSEDFGNYY	22
	CQHFWGTPLTFGAGTKLELK	

[0091] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体包含如表5所示的VH区和VL区。
表5

	13E4_VH1 (SEQ ID NO: 13)	13E4_VH2 (SEQ ID NO: 14)	13E4_VH3 (SEQ ID NO: 15)	13E4_VH4 (SEQ ID NO: 16)
13E4_VL1 (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 18
13E4_VL2 (SEQ ID NO: 19)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 19
13E4_VL3 (SEQ ID NO: 20)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 20
13E4_VL4 (SEQ ID NO: 21)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 21

[0092] 在一些实施方案中,上述抗转铁蛋白受体抗体是全长抗体。在其他实施方案中,该抗转铁蛋白受体抗体是其结合片段。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体是人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、多特异性抗体或其结合片段或者双特异性抗体或其结合片段。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体是单价Fab'、二价Fab₂、F(ab)'₃片段、单链可变片段(scFv)、bis-scFv、(scFv)₂、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定的Fv蛋白("dsFv")、单结域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科抗体或其结合片段,或其化学修饰的衍生物。

[0093] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体是多特异性抗体。在一些情况下,该多特异性抗体包含两个或更多个靶标结合部分,其中所述两个或更多个靶标结合部分中的每一个与抗原特异性结合,并且两个或更多个抗原不同。在一些情况下,该多特异性抗体包含与三种或更多种不同抗原、四种或更多种不同抗原、或五种或更多种不同抗原特异性结合的靶标结合部分。

[0094] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体是双特异性抗体。在一些情况下,该

双特异性抗体或结合片段包括Knobs-into-Holes (KiH)、不对称Re工程技术-免疫球蛋白(ART-Ig)、Triomab quadroma、双特异性单克隆抗体(BiMAb、BsmAb、BsAb、bsMab、BS-Mab或Bi-MAb)、Fc Δ Adp、XmAb、Azymetric、基于T细胞受体的抗体的双特异性接合(BEAT)、双特异性T细胞接合物(BiTE)、Biclonics、Fab-scFv-Fc、二合一/双作用Fab (Two-in-one/Dual Action Fab) (DAF)、FinomAb、scFv-Fc (Fab)-融合、Dock-aNd-Lock (DNL)、Adaptir (以前称为SCORPION)、串联双抗体(Tandem diAbody) (TandAb)、双亲和性重新靶向(Dual-affinity-ReTargeting) (DART) 或纳米抗体。

[0095] 在一些情况下,所述双特异性抗体是三官能抗体或双特异性微抗体。在一些情况下,该双特异性抗体是三官能抗体。在一些情况下,该三官能抗体是全长单克隆抗体,其包含针对两种不同抗原的结合位点。

[0096] 在一些情况下,所述双特异性抗体是双特异性微抗体。在一些情况下,该双特异性微抗体包括二价Fab₂、F(ab)₃片段、双scFv、(scFv)₂、双抗体、微抗体、三抗体、四抗体或双特异性T细胞接合物(BiTE)。在一些实施方案中,该双特异性T细胞接合物是包含两个单链可变片段(scFv)的融合蛋白,其中这两个scFv靶向两种不同抗原的表位。

[0097] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体是三特异性抗体。在一些情况下,该三特异性抗体包括F(ab)₃片段或三抗体(triobody)。在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体是如Dimas等人,“Development of a trisppecific antibody designed to simultaneously and efficiently target three different antigens on tumor cells,”Mol.Pharmaceutics,12(9):3490-3501(2015)所述的三特异性抗体。

[0098] 在一些情况下,所述抗转铁蛋白受体抗体包含Brinkmann和Kontermann,“The making of bispecific antibodies,”MABS 9(2):182-212(2017)的图2所示的抗体形式。

[0099] 在一些实施方案中,本文所述的抗转铁蛋白受体抗体包含IgG框架、IgA框架、IgE框架或IgM框架。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体包含IgG框架(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体包含IgG1框架。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体包含IgG2(例如,IgG2a或IgG2b)框架。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体包含IgG2a框架。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体包含IgG2b框架。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体包含IgG3框架。在一些情况下,该抗转铁蛋白受体抗体包含IgG4框架。

[0100] 在一些情况下,抗转铁蛋白受体抗体在框架区中,例如在CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域、铰链区或其组合中,包含一个或多个突变。在一些情况下,所述一个或多个突变是为了稳定抗体和/或延长半衰期。在一些情况下,所述一个或多个突变是为了调节Fc受体相互作用,以减少或消除Fc效应子功能,如Fc γ R、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。在另外的情况下,所述一个或多个突变是为了调节糖基化。

[0101] 在一些实施方案中,所述一个或多个突变位于Fc区中。在一些情况下,Fc区在残基位置L234、L235或其组合处包含突变。在一些情况下,所述突变包括L234和L235。在一些情况下,所述突变包括L234A和L235A。在一些情况下,所述残基位置是参考IgG1。

[0102] 在一些情况下,Fc区在残基位置L234、L235、D265、N297、K322、L328或P329或其组合处包含突变。在一些情况下,所述突变包括与残基位置K322、L328或P329处的突变组合的L234和L235。在一些情况下,Fc区包含L234、L235和K322处的突变。在一些情况下,Fc区包含

L234、L235和L328处的突变。在一些情况下，Fc区包含L234、L235和P329处的突变。在一些情况下，Fc区包含D265和N297处的突变。在一些情况下，所述残基位置是参考IgG1。

[0103] 在一些情况下，Fc区包含L234A、L235A、D265A、N297G、K322G、L328R或P329G，或其组合。在一些情况下，Fc区包含与K322G、L328R或P329G组合的L234A和L235A。在一些情况下，Fc区包含L234A、L235A和K322G。在一些情况下，Fc区包含L234A、L235A和L328R。在一些情况下，Fc区包含L234A、L235A和P329G。在一些情况下，Fc区包含D265A和N297G。在一些情况下，所述残基位置是参考IgG1。

[0104] 在一些情况下，Fc区包含残基位置L235、L236、D265、N297、K322、L328或P329处的突变，或突变的组合。在一些情况下，Fc区包含L235和L236处的突变。在一些情况下，Fc区包含与残基位置K322、L328或P329处的突变组合的L235和L236处的突变。在一些情况下，Fc区包含L235、L236和K322处的突变。在一些情况下，Fc区包含L235、L236和L328处的突变。在一些情况下，Fc区包含L235、L236和P329处的突变。在一些情况下，Fc区包含D265和N297处的突变。在一些情况下，所述残基位置是参考IgG2b。

[0105] 在一些实施方案中，Fc区包含L235A、L236A、D265A、N297G、K322G、L328R或P329G，或其组合。在一些情况下，Fc区包含L235A和L236A。在一些情况下，Fc区包含与K322G、L328R或P329G组合的L235A和L236A。在一些情况下，Fc区包含L235A、L236A和K322G。在一些情况下，Fc区包含L235A、L236A和L328R。在一些情况下，Fc区包含L235A、L236A和P329G。在一些情况下，Fc区包含D265A和N297G。在一些情况下，所述残基位置是参考IgG2b。

[0106] 在一些实施方案中，Fc区包含残基位置L233、L234、D264、N296、K321、L327或P328处的突变，其中所述残基对应于SEQ ID NO:23的位置233、234、264、296、321、327和328。在一些情况下，Fc区包含L233和L234处的突变。在一些情况下，Fc区包含与残基位置K321、L327或P328处的突变组合的L233和L234处的突变。在一些情况下，Fc区包含L233、L234和K321处的突变。在一些情况下，Fc区包含L233、L234和L327处的突变。在一些情况下，Fc区包含L233、L234和K321处的突变。在一些情况下，Fc区包含L233、L234和P328处的突变。在一些情况下，Fc区包含D264和N296处的突变。在一些情况下，考虑与IgG1、IgG2、IgG3或IgG4框架中的残基L233、L234、D264、N296、K321、L327或P328的等效位置。在一些情况下，还考虑向对应于IgG1、IgG2或IgG4框架中SEQ ID NO:23的残基L233、L234、D264、N296、K321、L327或P328的残基的突变。

[0107] 在一些实施方案中，Fc区包含L233A、L234A、D264A、N296G、K321G、L327R或P328G，其中所述残基对应于SEQ ID NO:23的位置233、234、264、296、321、327和328。在一些情况下，Fc区包含L233A和L234A。在一些情况下，Fc区包含与K321G、L327R或P328G组合的L233A和L234A。在一些情况下，Fc区包含L233A、L234A和K321G。在一些情况下，Fc区包含L233A、L234A和L327R。在一些情况下，Fc区包含L233A、L234A和K321G。在一些情况下，Fc区包含L233A、L234A和P328G。在一些情况下，Fc区包含D264A和N296G。

[0108] 在一些实施方案中，对人IgG恒定区进行修饰，以改变抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC)，例如，采用以下文献中描述的氨基酸修饰：Natsume等人，2008Cancer Res, 68 (10) :3863-72；Idusogie等人，2001J Immunol, 166 (4) :2571-5；Moore等人，2010mAbs, 2 (2) :181-189；Lazar等人，2006PNAS, 103 (11) :4005-4010，Shields等人，2001JBC, 276 (9) :6591-6604；Stavenhagen等人，2007Cancer Res, 67 (18) :8882-8890；

Stavenhagen等人,2008Advan.Enzyme Regul.,48:152-164;Alegre等人,1992J Immunol, 148:3461-3468;Reviewed in Kaneko and Niwa,2011Biodrugs,25(1):1-11。

[0109] 在一些实施方案中,本文所述的抗转铁蛋白受体抗体是全长抗体,其包含重链(HC)和轻链(LC)。在一些情况下,重链(HC)包含选自表6的序列。在一些情况下,轻链(LC)包含选自表7的序列。带下划线的区域表示各自的CDR。

表6

名称	HC 序列	SEQ ID NO:
13E4_VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSTAYME LSRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE	23

	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
13E4_VH1_a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	24
13E4_VH1_b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCGVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	25
13E4_VH1_c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	26
13E4_VH1_d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	27
13E4_VH1_e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAQKFQGRVTLTVDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS	28

	VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
13E4_VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	29
13E4_VH2_a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	30
13E4_VH2_b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCGVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	31
13E4_VH2_c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDRKVEPKSCDKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ	32

	GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
13E4_VH2_d	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	33
13E4_VH2_e	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWIGEINPINGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	34
13E4_VH3	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	35
13E4_VH3_a	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	36
13E4_VH3_b	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL</p>	37

	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCGVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
13E4_VH3_c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKARPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	38
13E4_VH3_d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	39
13E4_VH3_e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPIQGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	40
13E4_VH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATYYCARGTRAMHYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	41
13E4_VH4_a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME	42

	LSSLRSEDATATYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
13E4_VH4_b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATATYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCGVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	43
13E4_VH4_c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATATYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	44
13E4_VH4_d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATATYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	45
13E4_VH4_e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQA PGQGLEWMGEINPINGRSNYAEKFGQGRVTLTVDTSSSTAYME LSSLRSEDATATYYCARGTRAMHYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI	46
	AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	

表7

名称	LC 序列	SEQ ID NO:
13E4_VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKSPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFHWGTPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	47
13E4_VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFHWGTPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	48
13E4_VL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYNNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFHWGTPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	49
13E4_VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAGTNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFANYCQHFHWGTPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	50

[0110] 在一些实施方案中,与参考抗转铁蛋白受体抗体相比,本文所述的抗转铁蛋白受体抗体具有改善的血清半衰期。在一些情况下,改善的血清半衰期比参考抗转铁蛋白受体抗体更长至少30分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、14天、30天或更长。

抗体或其结合片段的产生

[0111] 在一些实施方案中,本文所述的多肽(例如,抗体及其结合片段)使用本领域已知的可用于多肽(例如,抗体)合成的任何方法产生,特别是通过化学合成或通过重组表达产生,并且优选地通过重组表达技术产生。

[0112] 在一些情况下,重组表达抗体或其结合片段,并且从化学合成的寡核苷酸装配编码该抗体或其结合片段的核酸(例如,如Kutmeier等人,1994,BioTechniques 17:242所述),其包括合成包含编码该抗体的序列部分的重叠寡核苷酸,退火并连接这些寡核苷酸,然后通过PCR扩增所连接的寡核苷酸。

[0113] 或者,任选地使用可与该序列的3'和5'端杂交的合成引物通过PCR扩增,或者使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针通过克隆,从合适的来源(例如,抗体cDNA文库,或从表达免疫球蛋白的任何组织或细胞生成的cDNA文库)生成编码抗体的核酸分子。

[0114] 在一些情况下,抗体或其结合片段任选地通过免疫动物如兔子以生成多克隆抗体或更优选地通过生成单克隆抗体来产生,例如,如Kohler和Milstein(1975,Nature 256:495-497)所述,或如Kozbor等人(1983,Immunology Today 4:72)或Cole等人(1985,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,pp.77-96)所述。或者,任选地通过针对结合特异性抗原的Fab片段的克隆筛查Fab表达文库(例如,如Huse等人,1989,Science 246:1275-1281所述),或者通过筛查抗体文库(参见,例如,Clackson等人,

1991, Nature 352:624; Hane等人, 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937), 来获得至少编码该抗体的Fab部分的克隆。

[0115] 在一些实施方案中, 使用针对产生“嵌合抗体”而开发的技术 (Morrison等人, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger等人, 1984, Nature 312:604-608; Takeda等人, 1985, Nature 314:452-454), 其包括将来自具有适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自具有适当生物活性的人抗体分子的基因一起剪接。嵌合抗体是其中不同部分来源于不同动物物种的分子, 例如具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些抗体, 例如人源化抗体。

[0116] 在一些实施方案中, 修改针对产生单链抗体描述的技术 (美国专利4,694,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 和Ward等人, 1989, Nature 334:544-54) 以产生单链抗体。单链抗体是通过经由氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链片段以产生单链多肽而形成的。也任选地使用在大肠杆菌中装配功能性Fv片段的技术 (Skerra等人, 1988, Science 242:1038-1041)。

[0117] 在一些实施方案中, 通过常规技术 (例如电穿孔、脂质体转染和磷酸钙沉淀) 将包含抗体的核苷酸序列的表达载体或抗体的核苷酸序列转移至宿主细胞, 然后通过常规技术培养经转染的细胞, 以产生该抗体。在特定的实施方案中, 抗体的表达由组成型、诱导型或组织特异性启动子调节。

[0118] 在一些实施方案中, 采用多种宿主表达载体系统来表达本文所述的抗体或其结合片段。此类宿主表达系统代表通过其产生抗体的编码序列并随后纯化的媒介, 但也代表当用适当的核苷酸编码序列转化或转染时原位表达抗体或其结合片段的细胞。这些包括但不限于微生物, 如用含有抗体或其结合片段编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌 (例如, 大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)); 用含有抗体或其结合片段编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母 (例如, 毕赤酵母 (*Saccharomyces Pichia*)); 用含有抗体或其结合片段编码序列的重组病毒表达载体 (例如, 杆状病毒) 感染的昆虫细胞系统; 用重组病毒表达载体 (例如, 花椰菜花叶病毒 (CaMV) 和烟草花叶病毒 (TMV)) 感染的或用含有抗体或其结合片段编码序列的重组质粒表达载体 (例如, Ti质粒) 转化的植物细胞系统; 或携带重组表达构建体的哺乳动物细胞系统 (例如, COS、CHO、BH、293、293T、3T3细胞), 该构建体含有来源于哺乳动物细胞基因组的启动子 (例如, 金属硫蛋白启动子) 或来源于哺乳动物病毒的启动子 (例如, 腺病毒晚期启动子; 痘苗病毒7.5K启动子)。

[0119] 为了长期、高产量地产生重组蛋白, 优选稳定的表达。在一些情况下, 任选地工程改造稳定地表达抗体的细胞系。宿主细胞不是使用含有病毒复制起点的表达载体, 而是用由适当的表达控制元件 (例如, 启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等) 和选择性标记控制的DNA来转化。引入外源DNA后, 然后使工程化细胞在富集培养基中生长1-2天, 然后切换至选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性, 并允许细胞将该质粒稳定整合到其染色体中并生长以形成转化灶, 继而将其克隆并扩充成细胞系。该方法可以有利地用来工程改造表达抗体或其结合片段的细胞系。

[0120] 在一些情况下, 使用许多选择系统, 包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler等人, 1977, Cell 11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Szybalska&Szybalski, 192, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202) 和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Lowy等人, 1980,

Cell122:817) 基因,它们分别在tk⁻、hgp^rt⁻或ap^rt⁻细胞中使用。另外,使用抗代谢物抗性作为选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对氨基蝶呤的抗性(Wigler等人,1980, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:357;O'Hare等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Clinical Pharmacy 12:488-505;Wu和Wu, 1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596; Mulligan,1993,Science 260:926-932;以及Morgan和Anderson,1993, Ann.Rev.Biochem.62:191-217;1993年5月,TIB TECH 11(5):155-215),和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,1984,Gene30:147)。可以使用的重组DNA技术领域中公知的方法描述于Ausubel等人(编,1993,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY;Kriegler,1990,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual, Stockton Press,NY;以及第12和13章,Dracopoli等人(编),1994,Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY.;Colberre-Garapin等人,1981,J.Mol.Biol.150:1)。

[0121] 在一些情况下,抗体的表达水平通过载体扩增而增加(有关综述,请参见 Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,Vol.3.(Academic Press,New York,1987))。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加该标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体的核苷酸序列相关联,因此抗体的产生也将增加(Crouse等人,1983,Mol.Cell Biol.3:257)。

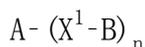
[0122] 在一些情况下,使用本领域已知的任何用于纯化或分析抗体或抗体缀合物的方法,例如,通过色谱法(例如,离子交换、亲和色谱法,特别是根据蛋白A后对特定抗原的亲合力,和大小柱色谱法)、离心、差异溶解度,或通过其他任何标准蛋白质纯化技术。示例性的色谱方法包括但不限于强阴离子交换色谱法、疏水相互作用色谱法、大小排阻色谱法和快速蛋白质液相色谱法。

抗转铁蛋白受体抗体缀合物

[0123] 在一些实施方案中,上述抗转铁蛋白受体抗体进一步与有效负载缀合。在一些情况下,有效负载包括小分子。在其他情况下,有效负载包括蛋白质或肽。在另外的情况下,有效负载包括多核酸分子。

[0124] 在一些情况下,有效负载与抗转铁蛋白受体抗体之比(药物与抗体之比或DAR比)约为1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1或16:1。

[0125] 在一些情况下,抗转铁蛋白受体抗体缀合物包含



式(I)

其中,

A包含所述抗转铁蛋白受体抗体;

B包含所述有效负载;

X1由键或连接体组成;并且

n为选自1-12的平均值。

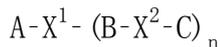
[0126] 在一些情况下,B与A(抗转铁蛋白受体抗体)的DAR比约为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些情况下,B与A的DAR比约为1。在一些情况下,B与A的DAR比约为2。在一些情况下,B与A的DAR比约为3。在一些情况下,B与A的DAR比约为4。在一些情况下,B与A的DAR比约为6。在一些情况下,B与A的DAR比约为8。在一些情况下,B与A的DAR比约为10。在一些情况下,B与A的DAR比约为12。在一些情况下,B与A的DAR比约为16。

[0127] 在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为1。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为2。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为3。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为4。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为5。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为6。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为7。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为8。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为9。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为10。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为11。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为12。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为13。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为14。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为15。在一些情况下,多核酸分子(B)与抗转铁蛋白受体抗体A的DAR比约为16。

[0128] 在一些实施方案中,B包含小分子、肽或蛋白质。

[0129] 在一些实施方案中,B包含多核酸分子。在一些情况下,该多核酸分子包含过客链和指导链。在一些情况下,该过客链与A-X¹缀合。在一些情况下,A-X¹与过客链的5'端缀合。在一些情况下,A-X¹与过客链的3'端缀合。

[0130] 在一些情况下,抗转铁蛋白受体抗体缀合物包含



式(II)

其中,

A包含所述抗转铁蛋白受体抗体;

B包含所述有效负载;

C由聚合物组成;

X¹由键或第一连接体组成;

X²由键或第二连接体组成;并且

n为选自1-12的平均值。

[0131] 在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0132] 在一些情况下,B是多核酸分子。在一些情况下,该多核酸分子包含过客链和指导链。在一些情况下,该过客链与A-X¹和X²-C缀合。在一些情况下,A-X¹与所述过客链的5'端缀合,并且X²-C与所述过客链的3'端缀合。在一些情况下,X²-C与所述过客链的5'端缀合,并且A-X¹与所述过客链的3'端缀合。

[0133] 在一些情况下, X^1 和 X^2 各自独立地为非聚合连接体。

[0134] 在一些情况下, 式(II) $A-X^1-(B-X^2-C)_n$ 的缀合物进一步包含D——内体溶解部分。
缀合化学

[0135] 在一些实施方案中, B通过化学连接过程缀合至A。在一些情况下, B通过天然连接缀合至B。在一些情况下, 该缀合如下所述: Dawson等人. “Synthesis of proteins by native chemical ligation,” *Science* 1994, 266, 776-779; Dawson等人. “Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives,” *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 4325-4329; Hackeng等人. “Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 10068-10073; 或Wu等人. “Building complex glycopeptides: Development of a cysteine-free native chemical ligation protocol,” *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 4116-4125。在一些情况下, 该缀合如美国专利8, 936, 910所述。在一些实施方案中, 该多核酸分子经由天然连接化学法位点特异性或非特异性地缀合至结合部分。

[0136] 在一些情况下, B通过利用“无痕”偶联技术 (Philochem) 的定点方法缀合至A。在一些情况下, 该“无痕”偶联技术利用结合部分上的N-末端1,2-氨基硫醇基团, 其随后与含有醛基团的多核酸分子缀合 (参见Casi等人, “Site-specific traceless coupling of potent cytotoxic drugs to recombinant antibodies for pharmacodelivery,” *JACS* 134 (13) : 5887-5892 (2012))。

[0137] 在一些情况下, B通过利用并入结合部分中的非天然氨基酸的定点方法缀合至A。在一些情况下, 该非天然氨基酸包括对乙酰基苯丙氨酸 (pAcPhe)。在一些情况下, pAcPhe的酮基团选择性地与衍生自烷氧基-胺的缀合部分偶联以形成肟键 (参见Axup等人, “Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids,” *PNAS* 109 (40) : 16101-16106 (2012))。

[0138] 在一些情况下, B通过利用酶催化过程的定点方法缀合至A。在一些情况下, 该定点方法利用SMARTag™技术 (Catalent, Inc.)。在一些情况下, SMARTag™技术包括通过甲酰甘氨酸生成酶 (FGE) 在醛标签的存在下通过氧化过程从半胱氨酸生成甲酰甘氨酸 (FGly) 残基, 随后经由肟基-Pictet-Spengler (HIPS) 连接将FGly缀合至烷基肟官能化多核酸分子 (参见Wu等人, “Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag,” *PNAS* 106 (9) : 3000-3005 (2009); Agarwal等人, “A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification,” *PNAS* 110 (1) : 46-51 (2013))。

[0139] 在一些情况下, 酶催化过程包含微生物转谷氨酰胺酶 (mTG)。在一些情况下, B利用微生物转谷氨酰胺酶催化的过程缀合至A。在一些情况下, mTG催化识别序列内谷氨酰胺的酰胺侧链与官能化多核酸分子的伯胺之间的共价键形成。在一些情况下, mTG由茂源链霉菌 (*Streptomyces mobarensis*) 产生 (参见Strop等人, “Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates,” *Chemistry and Biology* 20 (2) 161-167 (2013))。

[0140] 在一些情况下, B通过如PCT公开W02014/140317中描述的方法缀合至A, 该方法利

用序列特异性转肽酶。

[0141] 在一些情况下，B通过如美国专利公开2015/0105539和2015/0105540中描述的方法缀合至A。

有效负载

多核酸分子

[0142] 在一些实施方案中，所述有效负载是多核酸分子。在一些情况下，该多核酸分子参与基因疗法，如RNA干扰 (RNAi) 或基因沉默 (例如反义寡核苷酸) 疗法。在一些情况下，该多核酸分子调节mRNA的剪接，从而调节所编码蛋白质的后续产生。

[0143] 在一些实施方案中，所述多核酸分子包含短干扰核酸 (siNA)、短干扰RNA (siRNA)、双链RNA (dsRNA)、微RNA (miRNA) 或短发夹RNA (shRNA)。

[0144] 在其他实施方案中，所述多核酸分子包含反义寡核苷酸。

[0145] 在其他实施方案中，所述多核酸分子包含PMO。

[0146] 在另外的实施方案中，所述多核酸分子包含mRNA。

[0147] 在一些情况下，所述多核酸分子与萎缩相关基因 (也称为atrogene) 的靶序列杂交。Atrogene，或萎缩相关基因，是在萎缩的肌肉中上调或下调的基因。在一些情况下，上调的atrogene包括编码泛素连接酶、叉头框转录因子、生长因子、去泛素化酶或参与糖皮质激素诱导的萎缩的蛋白质的基因。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与泛素连接酶 (例如，E3泛素连接酶或线粒体泛素连接酶) 的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与叉头框转录因子的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与生长因子的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与去泛素化酶的靶序列杂交。

[0148] 在一些实施方案中，本文所述的多核酸分子与FBX032、TRIM63、TRAF6、FBX030、FBX040、NEDD4、TRIM32、MUL1、STUB1、FOXO1、FOXO3、MSTN、USP14、USP19、DDIT4、CTSL2、TGIF、MYOG、HDAC2、HDAC3、MT1L、MT1B或DMPK的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与FBX032、TRIM63、FOXO1、FOXO3或MSTN的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与FBX032的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与TRIM63的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与TRAF6的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与FBX030的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与FBX040的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与NEDD4的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与TRIM32的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与MUL1的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与STUB1的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与FOXO1的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与FOXO3的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与MSTN的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与USP14的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与USP19的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与DDIT4的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与CTSL2的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与TGIF的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与MYOG的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与HDAC2的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与HDAC3的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与MT1L的靶序列杂交。在一些情况下，本文所述的多核酸分子与MT1B的靶序列杂交。在一些情

况下,本文所述的多核酸分子与DMPK的靶序列杂交。

[0149] 在一些情况下,所述多核酸分子与错误剪接的mRNA的靶区域杂交,这导致不限于神经肌肉疾病、遗传病、癌症、遗传性疾病或心血管疾病的疾病或病症。在一些情况下,神经肌肉疾病或病症是杜氏肌营养不良、贝克肌营养不良、面肩肱型肌营养不良、先天性肌营养不良或强直性肌营养不良。

[0150] 在一些情况下,所述多核酸分子靶向导致杜氏肌营养不良的DMD基因中突变的外显子。在导致杜氏肌营养不良的DMD基因中突变的示例性外显子包括但不限于外显子2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77和78。

[0151] 在一些情况下,所述多核酸分子与癌基因的靶区域杂交。示例性癌基因包括但不限于Ab1、AKT-2、ALK、AML1(或RUNX1)、AR、AXL、BCL-2、3、6、BRAF、c-MYC、EGFR、ErbB-2(Her2、Neu)、Fms、FOS、GLI1、HPRT1、IL-3、INTS2、JUN、KIT、KS3、K-sam、LBC(AKAP13)、LCK、LMO1、LMO2、LYL1、MAS1、MDM2、MET、MLL(KMT2A)、MOS、MYB、MYH11/CBFB、NOTCH1(TAN1)、NTRK1(TRK)、OST(SLC51B)、PAX5、PIM1、PRAD-1、RAF、RAR/PML、HRAS、KRAS、NRAS、REL/NRG、RET、ROS、SKI、SRC、TIAM1或TSC2。在一些情况下,所述多核酸分子与KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1(β -连环蛋白)或 β -连环蛋白相关基因的靶区域杂交。

[0152] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含mRNA。在一些情况下,该mRNA编码细胞毒性蛋白质或肽。示例性细胞毒性蛋白质或肽包括细菌细胞毒素,如 α -孔形成毒素(例如,来自大肠杆菌的溶细胞素A)、 β -孔形成毒素(例如, α -溶血素、PVL-panton Valentine杀白细胞素、气单胞菌溶素、梭菌 ϵ -毒素、产气荚膜梭菌(*clostridium perfringens*)肠毒素)、二元毒素(炭疽毒素、水肿毒素、肉毒梭菌(*C.botulinum*)C2毒素、螺状梭菌(*C.spirofove*)毒素、产气荚膜梭菌(*C.perfringens*)iota毒素、艰难梭菌(*C.difficile*)细胞致死毒素(A和B))、朊病毒、副孢菌素(parasporin)、胆固醇依赖性溶细胞素(例如肺炎球菌溶血素),小孔形成毒素(例如短杆菌肽A),蓝藻毒素(cyanotoxin)(例如,微囊藻素、节球藻素)、溶血毒素、神经毒素(例如,肉毒杆菌神经毒素)、细胞毒素、霍乱毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素A、破伤风毒素或免疫毒素(伊达比星、蓖麻毒素A、CRM9、美洲商陆抗病毒蛋白、DT)。

[0153] 在一些情况下,所述mRNA编码细胞毒性肽或与免疫系统相关的肽,如细胞毒性T细胞或B细胞表位,以通过呈递此类表位与MHC I的复合物、补体系统的膜攻击复合蛋白(MAC)、穿孔素、粒酶和颗粒溶素来刺激特异性免疫应答。

[0154] 在一些情况下,所述mRNA编码凋亡触发蛋白质或肽,如凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)、细胞色素-c、胱天蛋白酶起始蛋白(CASP2、CASP8、CASP9、CASP10)、凋亡诱导因子(AIF)、p53、p73、p63、Bcl-2、Bax、粒酶B、聚ADP核糖聚合酶(PARP)和P21活化激酶2(PAK2)。

[0155] 在一些实施方案中,所述多核酸分子是核酸诱饵。在一些情况下,该核酸诱饵是蛋白质结合核酸的模拟物,例如基于RNA的蛋白质结合模拟物。示例性核酸诱饵包括反式激活区(TAR)诱饵和Rev响应元件(RRE)诱饵。

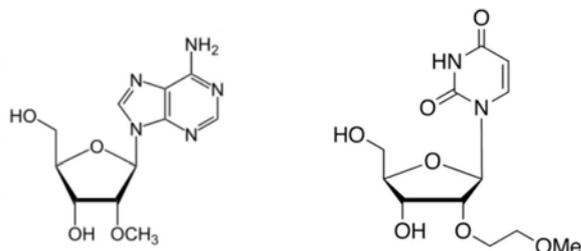
[0156] 在一些情况下,所述有效负载是适体。所述适体是与特定靶分子结合的小寡核苷酸或肽分子。示例性核酸适体包括DNA适体、RNA适体或XNA适体,它们是包含一种或多种非

天然核苷酸的RNA和/或DNA适体。示例性核酸适体包括ARC19499 (Archemix Corp.)、REG1 (Regado Biosciences) 和ARC1905 (Ophtotech)。

[0157] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含天然或合成或人工核苷酸类似物或碱基。在一些情况下,该多核酸分子包含DNA、RNA和/或核苷酸类似物的组合。在一些情况下,该合成或人工核苷酸类似物或碱基在核糖部分、磷酸部分、核苷部分或其组合中的一种或多种处包含修饰。

[0158] 在一些实施方案中,核苷酸类似物或人工核苷酸碱基包含在核糖部分的2' 羟基处具有修饰的核酸。在一些情况下,该修饰包括H、OR、R、卤素、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂或CN,其中R为烷基部分。示例性的烷基部分包括但不限于卤素、硫、硫醇、硫醚、硫酯、胺(伯、仲或叔胺)、酰胺、醚、酯、醇和氧。在一些情况下,该烷基部分进一步包含修饰。在一些情况下,该修饰包括偶氮基团、酮基团、醛基团、羧基、硝基、亚硝基、腈基团、杂环(例如,咪唑、胍基或羟基氨基)基团、异氰酸酯或氰酸酯基团,或者含硫基团(例如,亚砷、砷、硫化物或二硫化物)。在一些情况下,该烷基部分进一步包含杂取代。在一些情况下,杂环基团的碳被氮、氧或硫替代。在一些情况下,杂环取代包括但不限于吗啉代、咪唑和吡咯烷子基(pyrrolidino)。

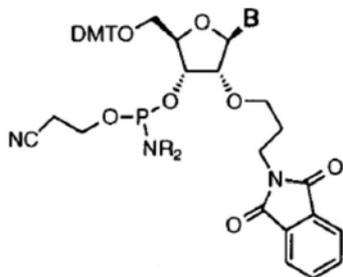
[0159] 在一些情况下,2' 羟基处的修饰是2' -O-甲基修饰或2' -O-甲氧基乙基(2' -O-MOE)修饰。在一些情况下,2' -O-甲基修饰向核糖部分的2' 羟基添加甲基,而2' -O-甲氧基乙基修饰向核糖部分的2' 羟基添加甲氧基乙基。腺苷分子的2' -O-甲基修饰和尿苷的2' -O-甲氧基乙基修饰的示例性化学结构如下所示。



2'-O-甲基-腺苷

2'-O-甲氧基乙基尿苷

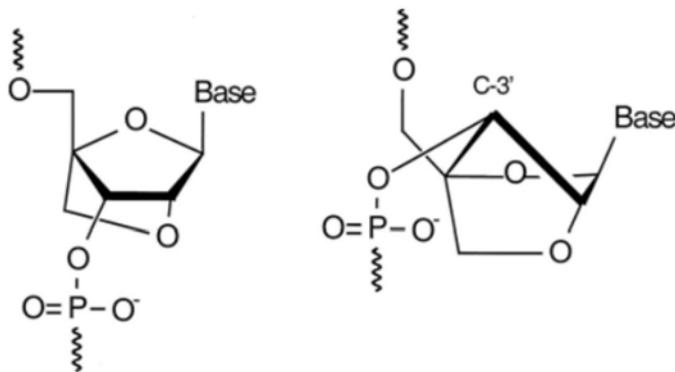
[0160] 在一些情况下,2' 羟基处的修饰是2' -O-氨基丙基修饰,其中包含丙基连接体的延伸胺基团将胺基团与2' 氧结合。在一些情况下,该修饰通过每个糖从胺基团引入一个正电荷来中和寡核苷酸分子的磷酸酯衍生的总负电荷,并且由于其两性离子性质而改善了细胞摄取性质。2' -O-氨基丙基核苷亚磷酰胺的示例性化学结构如下所示。



2'-O-氨基丙基核苷亚磷酰胺

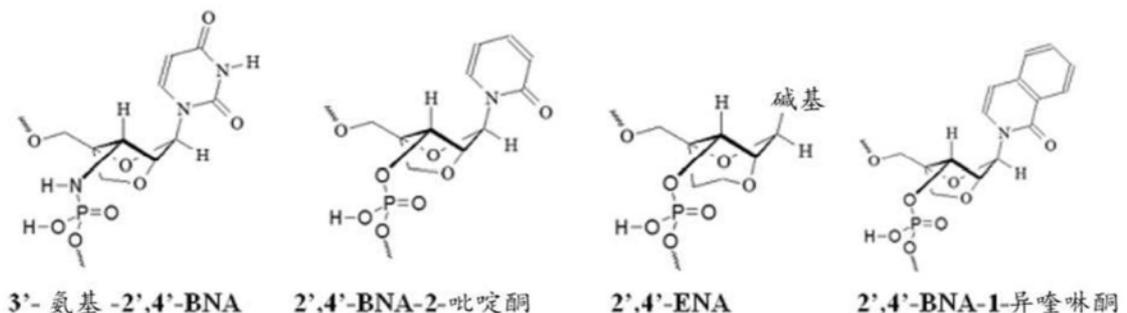
[0161] 在一些情况下,在2' 羟基处的修饰是锁定或桥接的核糖修饰(例如,锁定核酸或LNA),其中结合在2' 碳上的氧分子通过亚甲基连接至4' 碳,从而形成2' -C、4' -C-氧基-亚甲基连接的双环核糖核苷酸单体。LNA的化学结构的示例性表示如下所示。左侧所示的表示突

出了LNA单体的化学连接性。右侧所示的表示突出了LNA单体的呋喃糖环的锁定的3'-内(³E)构象。



LNA (锁定核酸)

[0162] 在一些情况下,2' 羟基处的修饰包括乙烯核酸(ENA),例如2' -4' -亚乙基桥连的核酸,其将糖构象锁定为C_{3'}-内糖折叠(puckering)构象。ENA是桥连核酸类别的修饰核酸的一部分,该修饰核酸也包含LNA。ENA和桥连核酸的示例性化学结构如下所示。

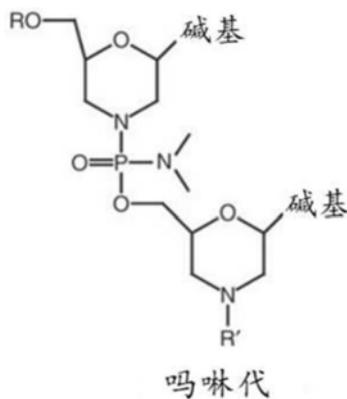


[0163] 在一些实施方案中,2' 羟基处的另外的修饰包括2' -脱氧、T-脱氧-2' -氟代、2' -O-氨基丙基(2' -O-AP)、2' -O-二甲基氨基乙基(2' -O-DMAOE)、2' -O-二甲基氨基丙基(2' -O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2' -O-DMAEOE)或2' -O-N-甲基乙酰胺基(2' -O-NMA)。

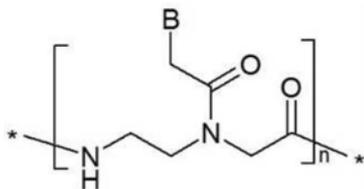
[0164] 在一些实施方案中,核苷酸类似物包含修饰的碱基,诸如但不限于5-丙炔基尿苷、5-丙炔基胞苷、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、N,N-二甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-氨基腺嘌呤、1-甲基肌苷、3-甲基尿苷、5-甲基胞苷、5-甲基尿苷和其他在5位置处具有修饰的核苷酸、5-(2-氨基)丙基尿苷、5-卤代胞苷、5-卤代尿苷、4-乙酰基胞苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、3-甲基胞苷、6-甲基尿苷、2-甲基尿苷、7-甲基尿苷、2,2-二甲基尿苷、5-甲基氨基乙基尿苷、5-甲基氧基尿苷、脱氮核苷酸如7-脱氮-腺苷、6-偶氮尿苷、6-偶氮胞苷、6-偶氮胸苷、5-甲基-2-硫尿苷、其他硫代碱基如2-硫代尿苷和4-硫代尿苷和2-硫代胞苷、二氢尿苷、假尿苷、癸苷、古嘌呤、茶基和取代的茶基、任何O-烷基化和N-烷基化嘌呤和嘧啶如N6-甲基腺苷、5-甲基羰基甲基尿苷、尿苷5-羟乙酸、吡啶-4-酮、吡啶-2-酮、苯基和修饰的苯基如氨基酚或2,4,6-三甲氧基苯、充当G夹(clamp)核苷酸的修饰的胞嘧啶、8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-取代的尿嘧啶和胸腺嘧啶、氮杂嘧啶、羧基烷基核苷酸、羧基烷基氨基烷基核苷酸以及烷基羰基烷基核苷酸。修饰的核苷酸还包括在糖部分被修饰的核苷酸,以及具有非核糖基的糖或其类似物的核苷酸。例如,在一些情况下,糖部分是或基于甘露糖、阿拉伯糖、吡喃葡萄糖、吡喃半乳糖、4'-硫代核糖和其他糖、杂环或碳环。术语核苷

酸还包含本领域已知的通用碱基。例如,通用碱基包括但不限于3-硝基吡咯、5-硝基吡咯或水粉蕈素。

[0165] 在一些实施方案中,修饰的核苷酸类似物进一步包含吗啉代、肽核酸(PNA)、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺、1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)或其组合。吗啉代或二氨基磷酸酯吗啉代寡核苷酸(PMO)包括其结构模拟天然核酸结构但偏离正常的糖和磷酸酯结构的合成分子。在一些情况下,五元核糖环被含有四个碳、一个氮和一个氧的六元吗啉代环取代。在一些情况下,核糖单体通过二氨基磷酸酯基团而不是磷酸酯基团连接。在这样的情况下,骨架改变去除所有正电荷和负电荷,使得吗啉代中性分子能够穿过细胞膜而无需借助细胞递送剂,诸如带电荷的寡核苷酸所使用的细胞递送剂。



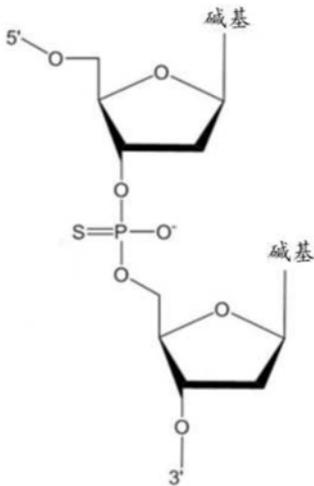
[0166] 在一些实施方案中,肽核酸(PNA)不含糖环或磷酸酯连接,并且碱基通过寡聚甘氨酸样分子连接并适当间隔,因此消除了骨架电荷。



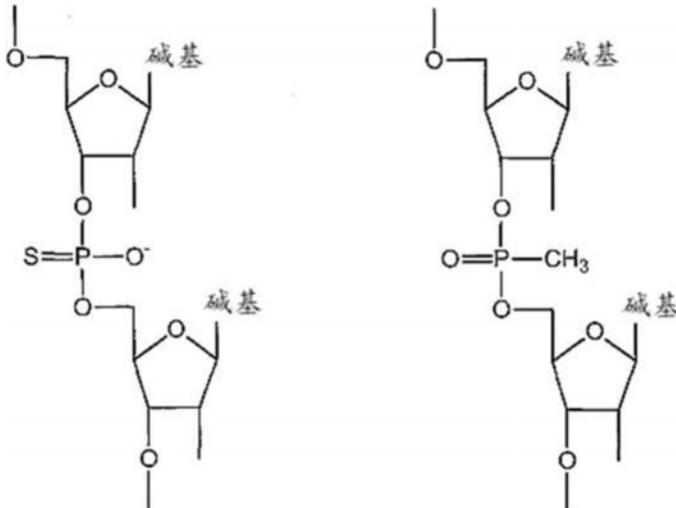
PNA

[0167] 在一些实施方案中,一个或多个修饰任选地在核苷酸间连接处发生。在一些情况下,修饰的核苷酸间连接包括但不限于硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、5'-亚烷基磷酸酯、5'-甲基磷酸酯、3'-亚烷基磷酸酯、三氟化硼、3'-5'连接或2'-5'连接的硼烷磷酸酯和硒基磷酸酯、磷酸三酯、硫羰基烷基磷酸三酯、氢磷酸酯键、烷基磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、芳基硫代磷酸酯、硒化磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒化磷酸酯、次磷酸酯、氨基磷酸酯、3'-烷基氨基磷酸酯、氨基烷基氨基磷酸酯、硫羰基氨基磷酸酯、哌嗪磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phosphoranilidate)、酮、砜、磺胺、碳酸酯、氨基甲酸酯、亚甲基胍(methylenehydrazo)、亚甲基二甲基亚胍(methylenedimethylhydrazo)、formacetal、硫代甲缩醛、肟、亚甲基亚胺、亚甲基甲基亚胺、硫代酰胺、具有核糖乙酰基的连接、氨乙基甘氨酸、甲硅烷基或硅氧烷连接、具有或不具有杂原子的烷基或环烷基连接,例如,1至10个饱和或不饱和的和/或取代的和/或含有杂原子的碳、具有吗啉代结构、酰胺、聚酰胺的连接,其中碱基直接或间接地连接到骨架的氮杂

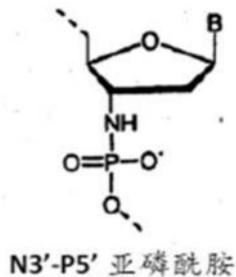
氮,及其组合。硫代磷酸酯反义寡核苷酸 (PS ASO) 是包含硫代磷酸酯连接的反义寡核苷酸。示例性的PS ASO如下所示。



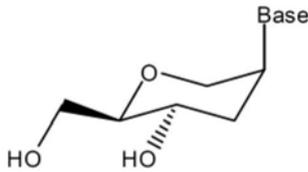
[0168] 在一些情况下,所述修饰是甲基或硫醇修饰,如甲基磷酸酯或硫醇磷酸酯修饰。示例性的硫醇磷酸酯核苷酸(左)和甲基磷酸酯核苷酸(右)如下所示。



[0169] 在一些情况下,修饰的核苷酸包括但不限于如下所示的2'-氟N3-P5'-亚磷酰胺:

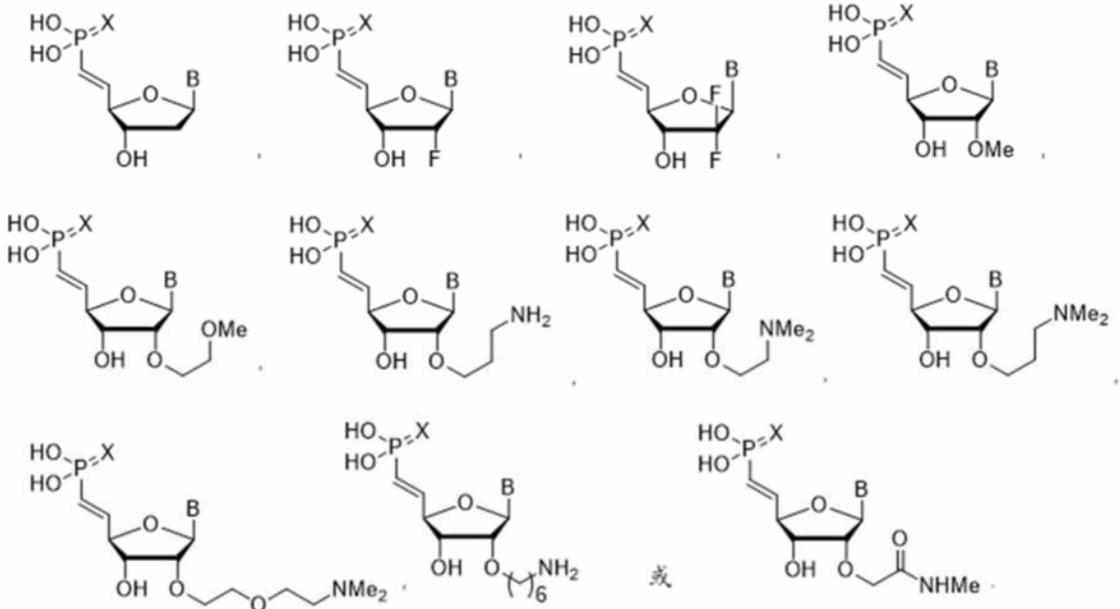


[0170] 在一些情况下,修饰的核苷酸包括但不限于己糖醇核酸(或1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)),如下所示:



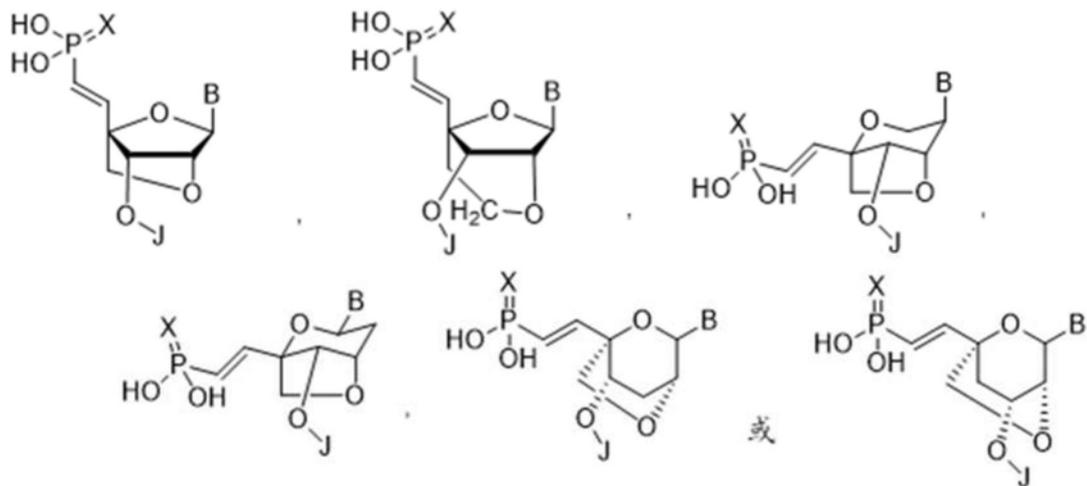
HNA

[0171] 在一些实施方案中,上述核苷酸类似物或人工核苷酸碱基包含在核糖部分的5' 羟基处具有修饰的5'-乙炔基磷酸酯修饰的核苷酸核酸。在一些实施方案中,该5'-乙炔基磷酸酯修饰的核苷酸选自以下提供的核苷酸,其中X为O或S;并且B为杂环碱基部分。



[0172] 在一些情况下,2' 羟基处的修饰是2'-O-氨基丙基修饰,其中包含丙基连接体的延伸的胺基团将胺基团与2' 氧结合。在一些情况下,这种修饰通过每个糖从胺基团引入一个正电荷来中和寡核苷酸分子的磷酸衍生的总负电荷,并且由于其两性离子性质而改善了细胞摄取性质。

[0173] 在一些情况下,5'-乙炔基磷酸酯修饰的核苷酸在锁定或桥接的核糖修饰(例如,锁定核酸或LNA)中的2' 羟基处被进一步修饰,其中结合在2' 碳上的氧分子通过亚甲基连接至4' 碳,从而形成2'-C、4'-C-氧基-亚甲基连接的双环核糖核苷酸单体。5'-乙炔基磷酸酯修饰的LNA的化学结构的示例性表示如下所示,其中X为O或S;B为杂环碱基部分;并且J为与该多核苷酸的相邻核苷酸连接的核苷酸间连接基团。



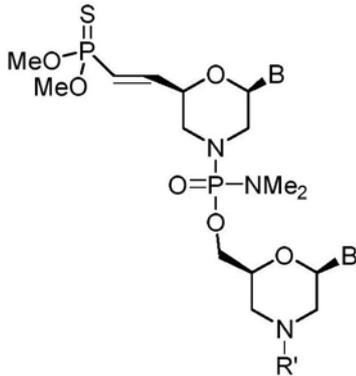
LNA (锁定核酸)

[0174] 在一些实施方案中,2' 羟基处的另外的修饰包括2' -脱氧、T-脱氧-2' -氟代、2' -0-氨基丙基(2' -0-AP)、2' -0-二甲基氨基乙基(2' -0-DMAOE)、2' -0-二甲基氨基丙基(2' -0-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2' -0-DMAEOE)或2' -0-N-甲基乙酰胺基(2' -0-NMA)。

[0175] 在一些实施方案中,核苷酸类似物包含修饰的碱基,诸如但不限于5-丙炔基尿苷、5-丙炔基胞苷、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、N,N,-二甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-氨基腺嘌呤、1-甲基肌苷、3-甲基尿苷、5-甲基胞苷、5-甲基尿苷和其他在5位置处具有修饰的核苷酸、5-(2-氨基)丙基尿苷、5-卤代胞苷、5-卤代尿苷、4-乙酰基胞苷、1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、3-甲基胞苷、6-甲基尿苷、2-甲基尿苷、7-甲基尿苷、2,2-二甲基尿苷、5-甲基氨基乙基尿苷、5-甲基氧基尿苷、脱氮核苷酸(如7-脱氮-腺苷、6-偶氮尿苷、6-偶氮胞苷或6-偶氮胸苷)、5-甲基-2-硫尿苷、其他硫代碱基(如2-硫代尿苷、4-硫代尿苷和2-硫代胞苷)、二氢尿苷、假尿苷、癸苷、古嘌呤、萘基和取代的萘基、任何O-烷基化和N-烷基化嘌呤和嘧啶(如N6-甲基腺苷、5-甲基羰基甲基尿苷、尿苷5-羟乙酸、吡啶-4-酮或吡啶-2-酮)、苯基和修饰的苯基如氨基酚或2,4,6-三甲氧基苯、充当G夹(clamp)核苷酸的修饰的胞嘧啶、8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-取代的尿嘧啶和胸腺嘧啶、氮杂嘧啶、羧基烷基核苷酸、羧基烷基氨基烷基核苷酸以及烷基羰基烷基化核苷酸。5'-乙炔基磷酸酯修饰的核苷酸还包括在糖部分被修饰的核苷酸,以及具有非核糖基的糖或其类似物的5'-乙炔基磷酸酯修饰的核苷酸。例如,在一些情况下,糖部分是或基于甘露糖、阿拉伯糖、吡喃葡萄糖、吡喃半乳糖、4'-硫代核糖和其他糖、杂环或碳环。术语核苷酸还包含本领域已知的通用碱基。例如,通用碱基包括但不限于3-硝基吡咯、5-硝基吡咯或水粉蕈素。

[0176] 在一些实施方案中,5'-乙炔基磷酸酯修饰的核苷酸类似物进一步包含吗啉代、肽核酸(PNA)、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酸酰胺或1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)。吗啉代或二氨基磷酸酯吗啉代寡核苷酸(PMO)包括其结构模拟天然核酸结构但偏离正常的糖和磷酸酯结构的合成分子。在一些情况下,五元核糖环被含有四个碳、一个氮和一个氧的六元吗啉代环取代。在一些情况下,核糖单体通过二氨基磷酸酯基团而不是磷酸酯基团连接。在这样的情况下,骨架改变去除所有正电荷和负电荷,使得吗啉代中性分子能够穿过细胞膜而无需借助细胞递送剂,诸如带电荷的寡核苷酸所使用的细胞递送剂。5'-乙炔基磷酸酯修饰的吗啉代寡核苷酸的非限制性实例如下所示,其中X为O或S;并

且B为杂环碱基部分。

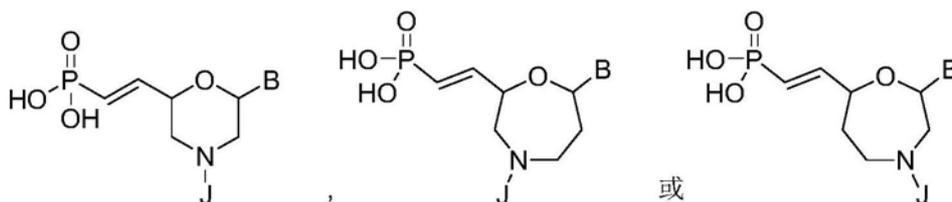


[0177] 在一些实施方案中,以上描述的5'-乙烯基膦酸酯修饰的吗啉代或PMO是包含正电荷或阳离子电荷的PMO。在一些情况下,该PMO是FM0plus (Sarepta)。FM0plus是指包含任何数目的(1-哌嗪子基)亚膦酰亚基氧基、(1-(4-(ω -胍基-链烷酰基))-哌嗪子基)亚膦酰亚基氧基连接的二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(例如,如在PCT公开W02008/036127中描述的那些)。在一些情况下,该PMO是美国专利7943762中描述的PMO。

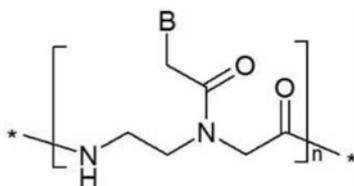
[0178] 在一些实施方案中,以上描述的吗啉代或PMO是PMO-X (Sarepta)。在一些情况下,PMO-X是指包含至少一个连接或至少一个所公开的末端修饰的二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物,如PCT公开W02011/150408和美国公开2012/0065169中描述的那些。

[0179] 在一些实施方案中,以上描述的吗啉代或PMO是如美国公开2014/0296321的表5中描述的PMO。

[0180] 5'-乙烯基膦酸酯修饰的核酸的化学结构的示例性表示如下所示,其中X为O或S;B为杂环碱基部分;并且J为核苷酸间连接。



[0181] 在一些实施方案中,肽核酸(PNA)不含糖环或磷酸酯连接,并且碱基通过寡聚甘氨酸样分子连接并适当间隔,因此消除了骨架电荷。

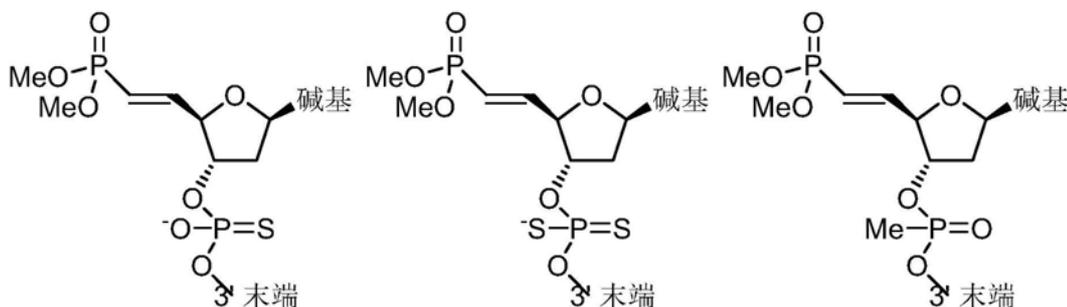


PNA

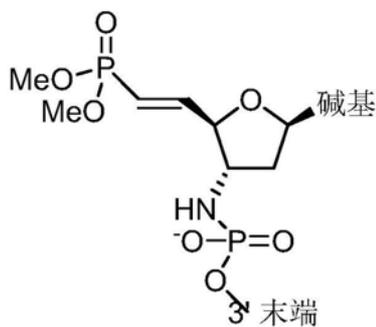
[0182] 在一些实施方案中,5'-乙烯基膦酸酯修饰的寡核苷酸的一个或多个修饰任选地在核苷酸间连接处发生。在一些情况下,修饰的核苷酸间连接包括但不限于硫代磷酸酯;二硫代磷酸酯;甲基膦酸酯;5'-亚烷基膦酸酯;5'-甲基膦酸酯;3'-亚烷基膦酸酯;三氟化硼;3'-5'连接或2'-5'连接的硼烷膦酸酯和硒基膦酸酯;磷酸三酯;硫羰基烷基磷酸三酯;氢膦酸酯键;烷基膦酸酯;烷基硫代磷酸酯;芳基硫代磷酸酯;硒化磷酸酯

(phosphoroselenoate); 二硒化磷酸酯; 次磷酸酯; 氨基磷酸酯; 3'-烷基氨基磷酸酯; 氨基烷基氨基磷酸酯; 硫羰基氨基磷酸酯; 哌嗪磷酸酯; 苯胺硫代磷酸酯 (phosphoroanilothioate); 苯胺磷酸酯 (phosphoranilidate); 酮; 砒; 磺胺; 碳酸酯; 氨基甲酸酯; 亚甲基肼 (methylenehydrazo); 亚甲基二甲基亚肼 (methylenedimethylhydrazo); formacetal; 硫代甲缩醛; 肟; 亚甲基亚胺; 亚甲基甲基亚胺; 硫代酰胺; 具有核糖乙酰基的连接; 氨乙基甘氨酸; 甲硅烷基或硅氧烷连接; 具有或不具有杂原子的烷基或环烷基连接, 例如, 1至10个饱和或不饱和的和/或取代的和/或含有杂原子的碳; 具有吗啉代结构、酰胺或聚酰胺的连接, 其中碱基直接或间接地连接到骨架的氮杂氮; 及其组合。

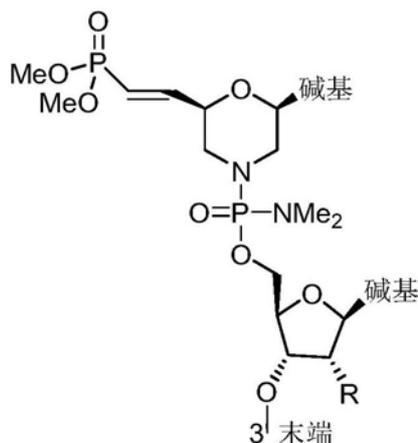
[0183] 在一些情况下, 所述修饰是甲基或硫醇修饰, 如甲基磷酸酯或硫醇磷酸酯修饰。示例性的硫醇磷酸酯核苷酸(左)、二硫代磷酸酯(中)和甲基磷酸酯核苷酸(右)如下所示。



[0184] 在一些情况下, 5'-乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸包括但不限于如下所示的亚磷酰胺:

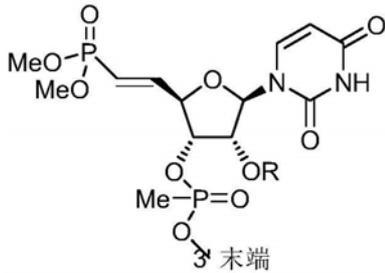


[0185] 在一些情况下, 修饰的核苷酸间连接是二氨基磷酸酯连接。与吗啉代体系的二氨基磷酸酯连接的非限制性实例如下所示。

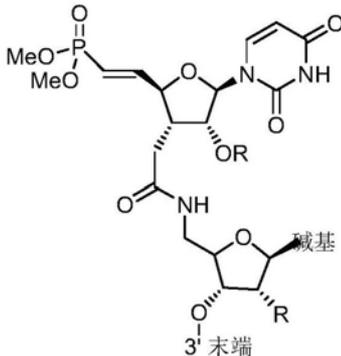


[0186] 在一些情况下, 修饰的核苷酸间连接是甲基磷酸酯连接。甲基磷酸酯连接的非限

制性实例如下所示。



[0187] 在一些情况下,修饰的核苷酸间连接是酰胺连接。酰胺连接的非限制性实例如下所示。



[0188] 在一些情况下,5'-乙烯基磷酸酯修饰的核苷酸包括但不限于以下修饰的核酸。

[0189] 在一些实施方案中,一个或多个修饰包括修饰的磷酸骨架,其中该修饰产生中性或不带电荷的骨架。在一些情况下,磷酸骨架通过烷基化来修饰,以产生不带电荷的或中性的磷酸骨架。如本文所用的,烷基化包括甲基化、乙基化和丙基化。在一些情况下,如本文在烷基化的上下文中所使用的,烷基是指含有1-6个碳原子的直链或支链饱和烃基。在一些情况下,示例性烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、己基、异己基、1,1-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基和2-乙基丁基。在一些情况下,修饰的磷酸酯是如美国专利9481905所述的磷酸基团。

[0190] 在一些实施方案中,另外的修饰的磷酸骨架包含甲基磷酸酯、乙基磷酸酯、甲基硫代磷酸酯或甲氧基磷酸酯。在一些情况下,修饰的磷酸酯是甲基磷酸酯。在一些情况下,修饰的磷酸酯是乙基磷酸酯。在一些情况下,修饰的磷酸酯是甲基硫代磷酸酯。在一些情况下,修饰的磷酸酯是甲氧基磷酸酯。

[0191] 在一些实施方案中,一个或多个修饰进一步任选地包括核糖部分、磷酸骨架和核苷的修饰,或者3'或5'末端处的核苷酸类似物的修饰。例如,3'末端任选地包含3'阳离子基团,或用3'-3'连接在3'末端处反转核苷。在另一替代方案中,3'末端任选地与氨基烷基缀合,例如3'-C5-氨基烷基dT。在另一替代方案中,3'末端任选地与脱碱基位点缀合,例如与脱嘌呤或脱嘧啶位点缀合。

[0192] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含一个或多个本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该人工核苷酸类似物包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基

(2'-O-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合。在一些情况下,该多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个人工核苷酸类似物,该人工核苷酸类似物选自2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合。在一些情况下,该多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个2'-O-甲基修饰的核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)修饰的核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25个或更多个硫醇磷酸酯核苷酸。

[0193] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含多个二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物或多个肽核酸修饰的非天然核苷酸,并且任选地包含至少一个反向脱碱基部分。在一些情况下,该多核酸分子包含至少6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18、19、20个或更多个二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物修饰的非天然核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含100%的二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物修饰的非天然核苷酸。

[0194] 在一些情况下,该多核酸分子包含至少6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个肽核酸修饰的非天然核苷酸。在一些情况下,该多核酸分子包含100%的肽核酸修饰的非天然核苷酸。

[0195] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含一个或多个核苷酸类似物,其中每个核苷酸类似物为立体化学异构形式。在这样的情况下,该多核酸分子是手性分子。在一些情况下,该核苷酸类似物包含骨架立体化学。在另外的情况下,该核苷酸类似物包括美国专利9,982,257、9,695,211或9,605,019中描述的手性类似物。

[0196] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约5%至约100%的修饰、约10%至约100%的修饰、约20%至约100%的修饰、约30%至约100%的修饰、约40%至约100%的修饰、约50%至约100%的修饰、约60%至约100%的修饰、约70%至约100%的修饰、约80%至约100%的修饰和约90%至约100%的修饰。

[0197] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约90%的修饰、约20%至约90%的修饰、约30%至约90%的修饰、约40%至约90%的修饰、约50%至约90%的修饰、约60%至约90%的修饰、约70%至约90%的修饰和约80%至约100%的修饰。

[0198] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约80%的修饰、约20%至约80%的修饰、约30%至约80%的修饰、约40%至约80%的修饰、约50%至约80%的修饰、约60%至约80%的修饰和约70%至约80%的修饰。

[0199] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约70%的修饰、约20%至约70%的修饰、约30%至约70%的修饰、约40%至约70%的修饰、约50%至约70%的修饰和约60%至约70%的修饰。

[0200] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约60%的修饰、约

20%至约60%的修饰、约30%至约60%的修饰、约40%至约60%的修饰和约50%至约60%的修饰。

[0201] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约50%的修饰、约20%至约50%的修饰、约30%至约50%的修饰和约40%至约50%的修饰。

[0202] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约40%的修饰、约20%至约40%的修饰和约30%至约40%的修饰。

[0203] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少以下之一:约10%至约30%的修饰和约20%至约30%的修饰。

[0204] 在一些情况下,所述多核酸分子包含约10%至约20%的修饰。

[0205] 在一些情况下,所述多核酸分子包含约15%至约90%、约20%至约80%、约30%至约70%或约40%至约60%的修饰。

[0206] 在另外的情况下,所述多核酸分子包含至少约15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的修饰。

[0207] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含至少约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22个或更多个修饰。

[0208] 在一些情况下,所述多核酸分子包含至少约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22个或更多个修饰的核苷酸。

[0209] 在一些情况下,约5%至约100%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的所述多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约5%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约10%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约15%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约20%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约25%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约30%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约35%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约40%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约45%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约50%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约55%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约60%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约65%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约70%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约75%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约80%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约85%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约90%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约95%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约96%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约97%的多核酸分子包含本文

所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约98%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约99%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些情况下,约100%的多核酸分子包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,该人工核苷酸类似物包括2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧-T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合。

[0210] 在一些实施方案中,所述多核酸分子包含约1至约25个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约1个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约2个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约3个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约4个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约5个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约6个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约7个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约8个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约9个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约10个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约11个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约12个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约13个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约14个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约15个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约16个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约17个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约18个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约19个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约20个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约21个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约22个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约23个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约24个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,多核酸分子包含约25个修饰,其中该修饰包含本文所述的人工核苷酸类似物。

[0211] 在一些实施方案中,多核酸分子由两个单独的多核苷酸装配而成,其中一个多核苷酸包含有义链,而第二个多核苷酸包含该多核酸分子的反义链。在其他实施方案中,有义

链经由连接体分子与反义链连接,在一些情况下,该连接体分子是多核苷酸连接体或非核苷酸连接体。

[0212] 一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链中的嘧啶核苷酸包含2'-O-甲基嘧啶核苷酸,有义链中的嘌呤核苷酸包含2'-脱氧嘌呤核苷酸。在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链中存在的嘧啶核苷酸包含2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸,并且其中有义链中存在的嘌呤核苷酸包含2'-脱氧嘌呤核苷酸。

[0213] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中嘧啶核苷酸当存在于所述反义链中时是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸,并且嘌呤核苷酸当存在于所述反义链中时是2'-O-甲基嘌呤核苷酸。

[0214] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中嘧啶核苷酸当存在于所述反义链中时是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸,并且其中嘌呤核苷酸当存在于所述反义链中时包含2'-脱氧-嘌呤核苷酸。

[0215] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链在有义链的5'端、3'端或者5'和3'两端包括末端帽部分。在其他实施方案中,该末端帽部分是反向脱氧脱碱基部分。

[0216] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中反义链在反义链的3'端包含磷酸骨架修饰。在一些情况下,该磷酸骨架修饰是硫代磷酸酯。在一些情况下,过客链比指导链包含更多的硫代磷酸酯修饰。在其他情况下,指导链比过客链包含更多的硫代磷酸酯修饰。在另外的情况下,过客链包含约2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个硫代磷酸酯修饰。在另外的情况下,指导链包含约2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个硫代磷酸酯修饰。

[0217] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中反义链在反义链的3'端包含甘油基修饰。

[0218] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链包含一个或多个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或约一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,和可选的在有义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子;并且其中反义链包含约1个至约10个或更多个,特别是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多)通用碱基修饰的核苷酸,和可选的在反义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。在其他实施方案中,有义链和/或反义链的一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个嘧啶核苷酸用2'-脱氧、2'-O-甲基和/或2'-脱氧-2'-氟代核苷酸进行化学修饰,具有或不具有一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接和/或存在于相同或不同链中的、在3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。

[0219] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中有义链包含约1个至约25个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-

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

[0220] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中反义链包含一个或多个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或约一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在有义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子;并且其中反义链包含约1个至约10个或更多个,特别是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在反义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。在其他实施方案中,有义链和/或反义链的一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个嘧啶核苷酸用2'-脱氧、2'-O-甲基和/或2'-脱氧-2'-氟核苷酸进行化学修饰,具有或不具有一个或多个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接和/或存在于相同或不同链中的、在3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。

[0221] 在一些实施方案中,多核酸分子包含有义链和反义链,其中反义链包含约1个至约25个或更多个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在有义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子;并且其中反义链包含约1个至约25个或更多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-脱氧-2'-氟代,和/或一个或多个(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)通用碱基修饰的核苷酸,以及可选的在反义链的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。在其他实施方案中,有义链和/或反义链的一个或多个,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个嘧啶核苷酸用2'-脱氧、2'-O-甲基和/或2'-脱氧-2'-氟核苷酸进行化学修饰,具有或不具有约1个至约5个,例如约1、2、3、4、5个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接和/或存在于相同或不同链中

的、在3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽分子。

[0222] 在一些实施方案中,多核酸分子是具有以下一种或多种性质的双链体多核酸分子:更高的肝细胞稳定性,降低的总电荷,减少的肝细胞摄取,或延长的药代动力学。在一些实施方案中,该双链体多核酸分子包含含有多个修饰的过客链(例如,有义链)和指导链(例如,反义链)。

[0223] 在一些实施方案中,所述双链体多核酸分子包含具有一个或多个上述修饰的指导链(例如,反义链)和具有多个二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物或多个肽核酸修饰的非天然核苷酸的过客链(例如,有义链)。

[0224] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子是化学修饰的短干扰核酸分子,其在该多核酸分子的每条链中具有约1个至约25个,例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间连接。

[0225] 在另一个实施方案中,本文所述的多核酸分子包含2'-5'核苷酸间连接。在一些情况下,该2'-5'核苷酸间连接位于一条或两条序列链的3'端、5'端或者3'和5'两端。在其他实例中,该2'-5'核苷酸间连接存在于一条或两条序列链内的各个其他位置,例如,多核酸分子的一条或两条链中的嘧啶核苷酸的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个,包括每个核苷酸间连接,包含2'-5'核苷酸间连接,或者多核酸分子的一条或两条链中的嘌呤核苷酸的约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个,包括每个核苷酸间连接,包含2'-5'核苷酸间连接。

[0226] 在一些情况下,所述多核酸分子是具有双链体、不对称双链体、发夹或不对称发夹二级结构的多核苷酸,具有自身互补的有义和反义区,其中反义区包含与单独的靶核酸分子中的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列,并且有义区具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列。在其他情况下,所述多核酸分子是环状单链多核苷酸,其具有两个或更多个环结构和包含自身互补的有义和反义区的茎,其中反义区包含与靶核酸中的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列,并且有义区具有对应于靶核酸序列或其部分的核苷酸序列,并且其中该环状多核苷酸在体内或体外加工,以生成能够介导RNAi的活性多核酸分子。在另外的情况下,所述多核酸分子还包含单链多核苷酸,其具有与靶核酸分子中的核苷酸序列或其部分互补的核苷酸序列(例如,在这样的多核酸分子不需要在多核酸分子内存在对应于靶核酸序列的核苷酸序列或其部分时),其中该单链多核苷酸进一步包含末端磷酸基团,如5'-磷酸(参见例如Martinez等人,2002,Cell.,110,563-574和Schwarz等人,2002,Molecular Cell,10,537-568)或5',3'-二磷酸。

[0227] 在一些实施方案中,多核酸分子是单链多核酸分子,其在细胞或重建的体外系统中介导RNAi活性,其中该多核酸分子包含与靶核酸序列具有互补性的单链多核苷酸,并且其中一个或多个存在于该多核酸中的嘧啶核苷酸是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸(例如,其中所有嘧啶核苷酸是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸,或者多个嘧啶核苷酸是2'-脱氧-2'-氟代嘧啶核苷酸),并且其中该多核酸中存在的任何嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸(例如,其中所有嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸,或者多个嘌呤核苷酸是2'-脱氧嘌呤核苷酸),以及任选地存在于反义序列的3'端、5'端或者3'和5'两端的末端帽修饰,该多核酸分子任选地在多核酸分子的3'端还包含约1个至约4个(例如,约1、2、3或4个)末端2'-脱氧核苷酸,其中该末端核苷酸进一步包含一个或多个(例如,1、2、3或4个)硫代磷酸酯核苷酸间连接,并且其中该多核酸分子任选地还包含末端磷酸基团,如5'末端磷酸基团。

[0228] 在一些情况下,不对称发夹是线性多核酸分子,其包含反义区、包含核苷酸或非核苷酸的环部分以及包含比反义区更少的核苷酸的有义区,使得有义区具有足够的互补核苷酸,以与反义区发生碱基配对并与环形成双链体。例如,不对称发夹多核酸分子包含长度足以在细胞或体外系统中介导RNAi的反义区(例如约19个至约22个核苷酸)和包含约4个至约8个核苷酸的环区域,以及具有约3个至约18个与反义区互补的核苷酸的有义区。在一些情况下,不对称发夹多核酸分子还包含化学修饰的5'末端磷酸基团。在另外的情况下,不对称发夹多核酸分子的环部分包含核苷酸、非核苷酸、连接体分子或缀合物分子。

[0229] 在一些实施方案中,不对称双链体是具有包含有义区和反义区的两条单独的链的多核酸分子,其中有义区包含比反义区更少的核苷酸,使得有义区具有足够的互补核苷酸,以与反义区发生碱基配对并形成双链体。例如,不对称双链多核酸分子包含长度足以在细胞或体外系统中介导RNAi的反义区(例如约19个至约22个核苷酸)和具有约3个至约18个与反义区互补的核苷酸的有义区。

[0230] 在一些情况下,与天然多核酸分子相比,本文所述的一种或多种人工核苷酸类似物对核酸酶具有抗性,该核酸酶例如是核糖核酸酶如RNA酶H、脱氧核糖核酸酶如DNA酶或者外切核酸酶如5'-3'外切核酸酶和3'-5'外切核酸酶。在一些情况下,包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸、2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺或其组合的人工核苷酸类似物对核酸酶具有抗性,该核酸酶例如是核糖核酸酶如RNA酶H、脱氧核糖核酸酶如DNA酶或者外切核酸酶如5'-3'外切核酸酶和3'-5'外切核酸酶。在一些情况下,2'-O-甲基修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-氨基丙基修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-脱氧修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,T-脱氧-2'-氟代修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,LNA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,ENA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外

切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,HNA修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,吗啉代是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,PNA修饰的多核酸分子对核酸酶具有抗性(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,甲基磷酸酯核苷酸修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,硫醇磷酸酯核苷酸修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,包含2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。在一些情况下,本文所述的5'缀合物抑制5'-3'核酸外切切割。在一些情况下,本文所述的3'缀合物抑制3'-5'核酸外切切割。

[0231] 在一些实施方案中,相对于等同的天然多核酸分子,本文所述的一种或多种人工核苷酸类似物对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。相对于等同的天然多核酸分子,包含2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰、LNA、ENA、PNA、HNA、吗啉代、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸或2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺的一种或多种人工核苷酸类似物对其mRNA靶标可具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-甲基修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-氨基丙基修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-脱氧修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,T-脱氧-2'-氟代修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,LNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,ENA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,PNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,HNA修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,吗啉代修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分

子,甲基磷酸酯核苷酸修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,硫醇磷酸酯核苷酸修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,包含2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,增加的亲和力用较低的Kd、较高的解链温度(Tm)或其组合说明。

[0232] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子是手性纯的(或立体纯的)多核酸分子,或是包含单一对映体的多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子包含L-核苷酸。在一些情况下,多核酸分子包含D-核苷酸。在一些情况下,多核酸分子组合物包含少于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的其镜像对映体。在一些情况下,多核酸分子组合物包含少于30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的外消旋混合物。在一些情况下,多核酸分子是在美国专利公开2014/194610和2015/211006以及PCT公开W02015107425中描述的多核酸分子。

[0233] 在一些实施方案中,进一步修饰本文所述的多核酸分子以包含适体缀合部分。在一些情况下,该适体缀合部分是DNA适体缀合部分。在一些情况下,该适体缀合部分是Alphamer (Centauri Therapeutics),其包含识别特定细胞表面靶标的适体部分和呈现特定表位以供连接至循环抗体的部分。在一些情况下,进一步修饰本文所述的多核酸分子以包含如美国专利8,604,184、8,591,910和7,850,975中所述的适体缀合部分。

[0234] 在另外的实施方案中,修饰本文所述的多核酸分子以增加其稳定性。在一些实施方案中,该多核酸分子为RNA(例如,sirNA)。在一些情况下,通过一个或多个上述修饰来修饰多核酸分子以增加其稳定性。在一些情况下,在2'羟基位置处修饰多核酸分子,诸如通过2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-0-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰胺基(2'-O-NMA)修饰,或者通过锁定或桥连核糖构象(例如,LNA或ENA)修饰多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子被2'-O-甲基和/或2'-O-甲氧基乙基核糖修饰。在一些情况下,多核酸分子还包含吗啉代、PNA、HNA、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸和/或2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺以增加其稳定性。在一些情况下,多核酸分子是手性纯的(或立体纯的)多核酸分子。在一些情况下,修饰手性纯的(或立体纯的)多核酸分子以增加其稳定性。为了增加递送稳定性而对RNA的合适的修饰对于技术人员将会是显而易见的。

[0235] 在一些情况下,通用碱基是指几乎没有区别地与每个天然DNA/RNA碱基形成碱基对的核苷酸碱基类似物。通用碱基的非限制性实例包括C-苯基、C-萘基和其他芳族衍生物、肌苷、唑类羧酰胺和硝基唑衍生物,如3-硝基吡咯、4-硝基吡咯、5-硝基吡咯和6-硝基吡咯,如本领域已知的(参见例如Loakes,2001,Nucleic Acids Research,29,2437-2447)。

小分子、蛋白质和肽

[0236] 在一些实施方案中,所述有效负载是小分子。在一些情况下,该小分子是细胞毒性有效负载。示例性的细胞毒性有效负载包括但不限于微管破坏剂、DNA修饰剂或Akt抑制剂。

[0237] 在一些实施方案中,所述有效负载包括微管破坏剂。示例性微管破坏剂包括但不限于2-甲氧基雌二醇、澳瑞他汀、查耳酮、秋水仙碱、考布他汀、念珠藻素(cryptophycin)、dictyostatin、盘皮海绵内酯(discodermolide)、dolastain、软珊瑚醇(eleutherobin)、埃

坡霉素 (epothilone)、软海绵素 (halichondrin)、laulimalide、美登木素 (maytansine)、noscainoid、紫杉醇、peloruside、phomopsin、鬼臼毒素、根霉素 (rhizoxin)、海绵抑制素、紫杉烷、微管溶素 (tubulysin)、长春花生物碱、长春瑞滨或其衍生物或类似物。

[0238] 在一些实施方案中,所述微管溶素是微管溶素类似物或衍生物,例如在美国专利 8580820 和 8980833 以及美国公开 20130217638、20130224228 和 201400363454 中所描述的。

[0239] 在一些实施方案中,所述美登木素是美登木素生物碱 (maytansinoid)。在一些实施方案中,该美登木素生物碱是 DM1、DM4 或安丝菌素。在一些实施方案中,该美登木素生物碱是 DM1。在一些实施方案中,该美登木素生物碱是 DM4。在一些实施方案中,该美登木素生物碱是安丝菌素。在一些实施方案中,该美登木素生物碱是美登木素生物碱衍生物或类似物,例如美国专利 5208020、5416064、7276497 和 6716821 或美国公开 2013029900 和 US20130323268 中所描述的。

[0240] 在一些实施方案中,所述有效负载是尾海兔素,或其衍生物或类似物。在一些实施方案中,该尾海兔素是尾海兔素 10 或尾海兔素 15,或其衍生物或类似物。在一些实施方案中,该尾海兔素 10 类似物是澳瑞他汀、索利多丁 (soblidotin)、symplostatin 1 或 symplostatin 3。在一些实施方案中,该尾海兔素 15 类似物是西马多汀或他西多汀。

[0241] 在一些实施方案中,所述尾海兔素 10 类似物是澳瑞他汀或澳瑞他汀衍生物。在一些实施方案中,该澳瑞他汀或澳瑞他汀衍生物是澳瑞他汀 E (AE)、澳瑞他汀 F (AF)、澳瑞他汀 E5-苯甲酰基戊酸酯 (AEVB)、单甲基澳瑞他汀 E (MMAE)、单甲基澳瑞他汀 F (MMAF) 或单甲基澳瑞他汀 D (MMAD)、澳瑞他汀 PE 或澳瑞他汀 PYE。在一些实施方案中,该澳瑞他汀衍生物是单甲基澳瑞他汀 E (MMAE)。在一些实施方案中,该澳瑞他汀衍生物是单甲基澳瑞他汀 F (MMAF)。在一些实施方案中,该澳瑞他汀是澳瑞他汀衍生物或类似物,例如在美国专利 6884869、7659241、7498298、7964566、7750116、8288352、8703714 和 887177 中所描述的。

[0242] 在一些实施方案中,所述有效负载包括 DNA 修饰剂。在一些实施方案中,该 DNA 修饰剂包括 DNA 切割剂、DNA 嵌入剂、DNA 转录抑制剂或 DNA 交联剂。在一些情况下,该 DNA 切割剂包括博来霉素 A2、加利车霉素 (calicheamicin) 或其衍生物或类似物。在一些情况下,该 DNA 嵌入剂包括多柔比星、表柔比星、PNU-159682、多卡米星 (duocarmycin)、吡咯并苯并二氮杂萘、寡霉素 C、柔红霉素、戊柔比星、拓扑替康或其衍生物或类似物。在一些情况下,该 DNA 转录抑制剂包括放线菌素。在一些情况下,该 DNA 交联剂包括丝裂霉素 C。

[0243] 在一些实施方案中,所述 DNA 修饰剂包括安吡啶、蒽环霉素、喜树碱、多柔比星、多卡米星、烯二炔、依托泊苷、吡啶并苯并二氮杂萘、纺锤菌素 (netropsin)、替尼泊苷或其衍生物或类似物。

[0244] 在一些实施方案中,所述蒽环霉素是多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、丝裂霉素-C、更生霉素、光神霉素、奈莫柔比星、匹克生琼 (pixantrone)、沙柔比星 (sabarubicin) 或戊柔比星。

[0245] 在一些实施方案中,所述喜树碱的类似物是拓扑替康、伊立替康、silatecan、可司替康 (cositecan)、依沙替康 (exatecan)、勒托替康 (lurtotecan)、吉马替康 (gimatecan)、贝洛替康 (belotecan)、芦比替康 (rubitecan) 或 SN-38。

[0246] 在一些实施方案中,所述多卡米星是多卡米星 A、多卡米星 B1、多卡米星 B2、多卡米星 C1、多卡米星 C2、多卡米星 D、多卡米星 SA 或 CC-1065。在一些实施方案中,所述烯二炔是加

利车霉素、埃斯波霉素或dynemicin A。

[0247] 在一些实施方案中,所述吡咯并苯并二氮杂萘是安曲霉素、abbeymycin、chicamycin、DC-81、甲基氨基霉素(mazethramycin)、新茵霉素A、新茵霉素B、porothramycin、prothracarcin、西班米星(sibanomicin)(DC-102)、西伯里亚霉素(sibiromycin)或托马霉素(tomaymycin)。在一些实施方案中,该吡咯并苯并二氮杂萘是托马霉素衍生物,例如美国专利8404678和8163736中所描述的。在一些实施方案中,该吡咯并苯并二氮杂萘如美国专利8426402、8802667、8809320、6562806、6608192、7704924、7067511、US7612062、7244724、7528126、7049311、8633185、8501934和8697688以及美国公开US20140294868所述。

[0248] 在一些实施方案中,所述吡咯并苯并二氮杂萘是吡咯并苯并二氮杂萘二聚体。在一些实施方案中,该PBD二聚体是对称二聚体。对称PBD二聚体的实例包括但不限于SJG-136(SG-2000)、ZC-423(SG2285)、SJG-720、SJG-738、ZC-207(SG2202)和DSB-120(表2)。在一些实施方案中,该PBD二聚体是不对称的二聚体。不对称PBD二聚体的实例包括但不限于SJG-136衍生物,例如美国专利8697688和9242013以及美国公开20140286970中所描述的。

[0249] 在一些实施方案中,所述有效负载包括Akt抑制剂。在一些情况下,该Akt抑制剂包括ipatasertib(GDC-0068)或其衍生物。

[0250] 在一些实施方案中,所述有效负载包括聚合酶抑制剂,包括但不限于聚合酶II抑制剂,如 α -鹅膏蕈碱和聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂。示例性的PARP抑制剂包括但不限于Iniparib(BSI201)、Talazoparib(BMN-673)、奥拉帕尼(Olaparib)(AZD-2281)、奥拉帕尼、卢卡帕尼(Rucaparib)(AG014699、PF-01367338)、维利帕尼(Veliparib)(ABT-888)、CEP 9722、MK4827、BGB-290或3-氨基苯甲酰胺。

[0251] 在一些实施方案中,所述有效负载是成像剂。在一些情况下,所述有效负载包括“不透射线”的标记,例如使用X射线可视化的标记。不透射线的材料是本领域技术人员公知的。示例性的不透射线的材料包括碘化物、溴化物或钡盐。另外的不透射线的材料包括但不限于有机铋衍生物{参见,例如,美国专利5,939,045}、不透射线的聚氨酯(参见,例如,美国专利5,346,981)、有机铋复合物(参见,例如,美国专利5,256,334)、不透射线的钡聚合物复合物(参见,例如,美国专利4,866,132)等。

[0252] 在一些情况下,所述有效负载包括可检测的标记,例如,用于免疫缀合物,包括可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电、光学或化学手段检测的任何组合物。有用的标记包括磁珠(例如,DYNABEADS™)、荧光染料(例如,异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等)、放射性标记(例如, ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和ELISA中常用的其他酶)和比色标记,如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)珠子、纳米颗粒、量子点等。

[0253] 在一些实施方案中,合适的放射性标记包括但不限于 ^{99}Tc 、 ^{203}Pb 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{111}In 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{97}Ru 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{52}Fe 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 ^{51}Cr 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{77}As 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{169}Er 、 ^{121}Sn 、 ^{127}Te 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{161}Tb 、 ^{109}Pd 、 ^{165}Dy 、 ^{149}Pm 、 ^{151}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{157}Gd 、 ^{159}Gd 、 ^{166}Ho 、 ^{172}Tm 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{177}Lu 、 ^{105}Rh 和 ^{111}Ag 。

[0254] 在一些情况下,所述有效负载包括增强电离辐射(例如,如可能由 ^{60}Co 或X射线源产生的)对细胞的细胞毒性作用的放射增敏剂。许多放射增敏剂是已知的,包括但不限于苯并

卟啉生物化合物(参见,例如,美国专利5,945,439)、1,2,4-苯并三嗪氧化物(参见,例如,美国专利5,849,738)、含有某些二胺的化合物(例如,参见,美国专利5,700,825)、BCNT(参见例如美国专利5,872,107)、放射增敏硝基苯甲酸酰胺衍生物(参见,例如,美国专利4,474,814)、各种杂环衍生物(参见,例如,美国专利5,064,849)、铂络合物(参见,例如,美国专利4,921,963)等。

[0255] 在一些情况下,所述有效负载包括 α 发射体,即发射 α 粒子的放射性同位素。 α -发射体最近已被证明在治疗癌症方面是有效的(参见,例如,McDevitt等人(2001) *Science* 294:1537-1540;Ballangrud等人(2001) *Cancer Res.* 61:2008-2014;Borchardt等人(2003) *Cancer Res.* 63:5084-50)。合适的 α 发射体包括但不限于 ^{213}Bi 、 ^{211}At 等。

[0256] 在一些情况下,所述有效负载包括免疫调节剂。有用的免疫调节剂包括阻断激素对肿瘤的作用的抗激素和抑制细胞因子产生、下调自身抗原表达或掩盖MHC抗原的免疫抑制剂。代表性的抗激素包括抗雌激素,包括,例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制性4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、酮昔芬(keoxifene)、LY 117018、奥那司酮(onapstone)和托瑞米芬;和抗雄激素,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;和抗肾上腺药物。说明性的免疫抑制剂包括但不限于2-氨基-6-芳基--取代的嘧啶、硫唑嘌呤、环磷酰胺、溴隐亭、达那唑、氨苯砜、戊二醛、MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体、环孢菌素A、诸如糖皮质激素等类固醇、链激酶或雷帕霉素。

[0257] 在一些实施方案中,所述有效负载包括蛋白质或肽毒素或其片段。示例性的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A片段、白喉毒素的非结合性活性片段、外毒素A(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A链、相思豆毒蛋白(abrin)A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 α -帚曲霉素(sarcin)、某些油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、某些石竹素(*Dianthin*)蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAP、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝裂菌褶素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯(tricothecene)。

[0258] 在一些情况下,所述有效负载是免疫调节剂。示例性免疫调节剂包括但不限于gancyclovier、依那西普、他克莫司、西罗莫司、伏环孢素(voclosporin)、环孢菌素、雷帕霉素、环磷酰胺、硫唑嘌呤、霉酚酸酯、甲氨蝶呤、糖皮质激素及其类似物、黄嘌呤、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、肿瘤坏死因子(TNF)(例如TNF α)、白介素(例如,白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18和IL-21)、集落刺激因子(例如,粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF))、干扰素(例如,干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ)、被称为“S1因子”的干细胞生长因子、促红细胞生成素和血小板生成素,或其组合。

[0259] 在一些情况下,所述有效负载包括细胞因子。在一些实施方案中,该细胞因子包括IL-2、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、干扰素(例如,IFN α 、IFN β)或TNF α 。

聚合物

[0260] 在一些实施方案中,本文所述的抗转铁蛋白受体抗体缀合物进一步包含聚合物(聚合物部分C)。在一些情况下,该聚合物是天然或合成聚合物,其由支链或非支链单体的

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

[0261] 在一些情况下,C为PEG部分。在一些情况下,该PEG部分在多核酸分子的5'末端缀合,而结合部分在多核酸分子的3'末端缀合。在一些情况下,该PEG部分在多核酸分子的3'末端缀合,而结合部分在多核酸分子的5'末端缀合。在一些情况下,该PEG部分缀合至多核酸分子的内部位点。在一些情况下,该PEG部分、结合部分或其组合缀合至多核酸分子的内部位点。在一些情况下,该缀合是直接缀合。在一些情况下,该缀合经由天然连接进行。

[0262] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如,PEG)是多分散或单分散化合物。在一些情况下,多分散材料包含不同分子量的材料的分散分布,其特征在于平均重量(重均)大小和分散性。在一些情况下,单分散PEG包含一种大小的分子。在一些实施方案中,C为多分散或单分散的聚环氧烷(例如,PEG),并且指示的分子量表示聚环氧烷(例如,PEG)分子的分子量的平均值。

[0263] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如,PEG)的分子量为约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da。

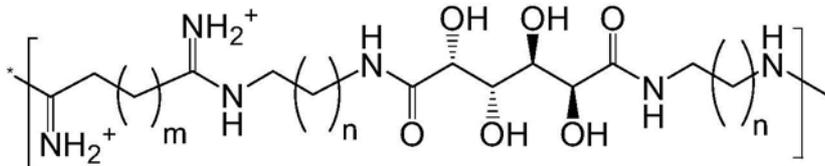
[0264] 在一些实施方案中,C为聚环氧烷(例如,PEG),并且具有约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da的分子量。在一些实施方案中,C为PEG,并且具有约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000或100,000Da的分子量。在一些情况下,C的分子量为约200Da。在一些情况下,C的分子量为约300Da。在一些情况下,C的分子量为约400Da。在一些情况下,C的分子量为约500Da。在一些情况下,C的分子量为约600Da。在一些情况下,C的分子量为约700Da。在一些情况下,C的分子量为约800Da。在一些情况下,C的分子量为约900Da。在一些情况下,C的分子量为约1000Da。在一些情况下,C的分子量为约1100Da。在一些情况下,C的分子量为约1200Da。在一些情况下,C的分子量为约1300Da。在一些情况下,C的分子量为约1400Da。在一些情况下,C的分子量为约1450Da。在一些情况下,

C的分子量为约1500Da。在一些情况下,C的分子量为约1600Da。在一些情况下,C的分子量为约1700Da。在一些情况下,C的分子量为约1800Da。在一些情况下,C的分子量为约1900Da。在一些情况下,C的分子量为约2000Da。在一些情况下,C的分子量为约2100Da。在一些情况下,C的分子量为约2200Da。在一些情况下,C的分子量为约2300Da。在一些情况下,C的分子量为约2400Da。在一些情况下,C的分子量为约2500Da。在一些情况下,C的分子量为约2600Da。在一些情况下,C的分子量为约2700Da。在一些情况下,C的分子量为约2800Da。在一些情况下,C的分子量为约2900Da。在一些情况下,C的分子量为约3000Da。在一些情况下,C的分子量为约3250Da。在一些情况下,C的分子量为约3350Da。在一些情况下,C的分子量为约3500Da。在一些情况下,C的分子量为约3750Da。在一些情况下,C的分子量为约4000Da。在一些情况下,C的分子量为约4250Da。在一些情况下,C的分子量为约4500Da。在一些情况下,C的分子量为约4600Da。在一些情况下,C的分子量为约4750Da。在一些情况下,C的分子量为约5000Da。在一些情况下,C的分子量为约5500Da。在一些情况下,C的分子量为约6000Da。在一些情况下,C的分子量为约6500Da。在一些情况下,C的分子量为约7000Da。在一些情况下,C的分子量为约7500Da。在一些情况下,C的分子量为约8000Da。在一些情况下,C的分子量为约10,000Da。在一些情况下,C的分子量为约12,000Da。在一些情况下,C的分子量为约20,000Da。在一些情况下,C的分子量为约35,000Da。在一些情况下,C的分子量为约40,000Da。在一些情况下,C的分子量为约50,000Da。在一些情况下,C的分子量为约60,000Da。在一些情况下,C的分子量为约100,000Da。

[0265] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如PEG)是离散的PEG,其中该离散的PEG是包含超过一个重复环氧乙烷单元的聚合PEG。在一些情况下,离散的PEG(dPEG)包含2至60、2至50或2至48个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、35、40、42、48、50个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约2个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约3个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约4个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约5个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约6个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约7个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约8个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约9个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约10个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约11个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约12个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约13个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约14个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约15个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约16个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约17个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约18个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约19个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约20个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约22个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约24个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约26个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约28个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约30个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约35个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情

况下,dPEG包含约40个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约42个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约48个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约50个或更多个重复环氧乙烷单元。在一些情况下,以逐步的方式由纯的(例如,约95%、98%、99%或99.5%)起始材料将dPEG合成为单分子量化合物。在一些情况下,dPEG具有特定的分子量,而不是平均分子量。在一些情况下,本文所述的dPEG是来自Quanta Biodesign,LMD的dPEG。

[0266] 在一些实施方案中,聚合物部分C包含基于阳离子粘酸的聚合物(cMAP)。在一些情况下,cMAP包含至少一个重复亚单位的一个或多个亚单位,并且该亚单位结构表示为式(III):



式 III

[0267] 其中m在每次出现时独立地为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,优选4-6或5;并且n在每次出现时独立地为1、2、3、4或5。在一些实施方案中,m和n为例如约10。

[0268] 在一些情况下,cMAP进一步缀合至PEG部分,生成cMAP-PEG共聚物、mPEG-cMAP-PEG_m三嵌段聚合物或cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。在一些情况下,PEG部分的范围为约500Da至约50,000Da。在一些情况下,PEG部分的范围为约500Da至约1000Da、大于1000Da至约5000Da、大于5000Da至约10,000Da、大于10,000至约25,000Da、大于25,000Da至约50,000Da,或这些范围中的两个或更多个的任意组合。

[0269] 在一些情况下,C是cMAP-PEG共聚物、mPEG-cMAP-PEG_m三嵌段聚合物或cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。在一些情况下,C是cMAP-PEG共聚物。在其他情况下,C是mPEG-cMAP-PEG_m三嵌段聚合物。在另外的情况下,C是cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。

内体溶解部分

[0270] 在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体缀合物进一步包含另外的缀合部分。在一些情况下,该另外的缀合部分是内体溶解部分。在一些情况下,该内体溶解部分是细胞区室释放组分,诸如能够从本领域已知的任何细胞区室释放的化合物,该细胞区室例如是内体、溶酶体、内质网(ER)、高尔基体、微管、过氧化物酶体或细胞内的其他囊泡体。在一些情况下,该内体溶解部分包含内体溶解多肽、内体溶解聚合物、内体溶解脂质或内体溶解小分子。在一些情况下,该内体溶解部分包含内体溶解多肽。在其他情况下,该内体溶解部分包含内体溶解聚合物。

内体溶解多肽

[0271] 在一些实施方案中,所述抗转铁蛋白受体抗体缀合物进一步与内体溶解多肽缀合。在一些实施方案中,式(I) —A-(X¹-B)_n或式(II) —A-X¹-(B-X²-C)_n的缀合物进一步与内体溶解多肽缀合。在一些情况下,该内体溶解多肽是pH依赖性膜活性肽。在一些情况下,该内体溶解多肽是两亲性多肽。在另外的情况下,该内体溶解多肽是拟肽。在一些情况下,该内体溶解多肽包含INF、蜂毒肽、meucin或其各自的衍生物。在一些情况下,该内体溶解多肽包含INF或其衍生物。在其他情况下,该内体溶解多肽包含蜂毒肽或其衍生物。在另

外的情况下,该内体溶解多肽包含meucin或其衍生物。

[0272] 在一些情况下,INF7为24个残基的多肽,其序列包含CGIFGEIEELIEEGLLENLIDWGNA (SEQ ID NO:51) 或GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC (SEQ ID NO:52)。在一些情况下,INF7或其衍生物包含以下序列:GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYGS GSCG (SEQ ID NO:53)、GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG- (PEG) 6-NH₂ (SEQ ID NO:54) 或GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYGS GSC-K (GalNAc) 2 (SEQ ID NO:55)。

[0273] 在一些情况下,蜂毒肽是26个残基的多肽,其序列包含CLIGAILKVLATGLPTLISWIKNKRKQ (SEQ ID NO:56) 或GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (SEQ ID NO:57)。在一些情况下,蜂毒肽包含如美国专利8,501,930中描述的多肽序列。

[0274] 在一些情况下,meucin是来源于蝎子条斑钳蝎 (*Mesobuthus eupeus*) 的毒腺的抗微生物肽 (AMP)。在一些情况下,meucin包括meucin-13和meucin-18,meucin-13的序列包含IFGAIAGLLKNIF-NH₂ (SEQ ID NO:58),meucin-18的序列包含FFGHLFKLATKIIPSLFQ (SEQ ID NO:59)。

[0275] 在一些情况下,内体溶解多肽包括其序列与INF7或其衍生物、蜂毒肽或其衍生物或者meucin或其衍生物具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括INF7或其衍生物、蜂毒肽或其衍生物或者meucin或其衍生物。

[0276] 在一些情况下,内体溶解部分包含如表8所示的序列。

表8

名称	来源	氨基酸序列	SEQ ID NO:	类型
Pep-1	来自猿猴病毒 40 大抗原的 NLS 和 HIV 的逆转录酶	KETWWETWWTEWSQPKKKRK V	60	一级两亲性
pVEC	VE-钙粘着蛋白	LLIILRRRRIRKQAHASK	61	一级两亲性
VT5	合成肽	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKG DPKPD	62	β -折叠两亲性
C105Y	1-抗胰蛋白酶	CSIPPEVKFNKPFVYLI	63	-
穿膜肽	甘丙肽和肥大脱粒肽	GWTLNSAGYLLGKINLKALAA LAKKIL	64	一级两亲性
TP10	甘丙肽和肥大脱粒肽	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	65	一级两亲性
MPG	来自 HIV gp41 和 SV40 T 抗原的 NLS 的融合序列的疏水结构域	GALFLGFLGAAGSTMGA	66	β -折叠两亲性
gH625	I 型 HSV 的糖蛋白 gH	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	67	二级两亲性 α -螺旋
CADY	PPTG1 肽	GLWRALWRLLRSLWRLWRA	68	二级两亲性 α -螺旋
GALA	合成肽	WEAALAEALAEALAEHLAEAL AEALEALAA	69	二级两亲性 α -螺旋
INF	流感 HA2 融合肽	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWY GC	70	二级两亲性 α -螺旋/ pH 依赖性膜活性肽
HA2E5-TAT	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚单位	GLFGAIAEAGFIENGWEGMIDGWY G	71	二级两亲性 α -螺旋/ pH 依赖性膜活性肽

HA2-penetratin	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚单位	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKIWFQNRMMKW KK-amide	72	pH 依赖性膜活性肽
HA-K4	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚单位	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG-SS KKKK	73	pH 依赖性膜活性肽
HA2E4	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚单位	GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGG YC	74	pH 依赖性膜活性肽
H5WYG	HA2 类似物	GLFHAIHFIHGGWH GLIHGWYG	75	pH 依赖性膜活性肽
GALA-IN F3- (PEG)6-N H	INF3 融合肽	GLFEAIEGFIENGWEGLAEALAE ALEALAA- (PEG)6-NH ₂	76	pH 依赖性膜活性肽
CM18-TA T11	抗菌肽-A-蜂毒肽 ₂₋₁₂ (CM ₁₈) 融合肽	KWKLFFKKIGAVLKVLTG-YGR KKRRQRRR	77	pH 依赖性膜活性肽

[0277] 在一些情况下,内体溶解部分包含Bak BH3多肽,后者通过拮抗抑制剂靶标如Bcl-2和/或Bcl-x_L诱导凋亡。在一些情况下,内体溶解部分包含Albarran等人,“Efficient intracellular delivery of a pro-apoptotic peptide with a pH-responsive carrier,”*Reactive&Functional Polymers* 71:261-265 (2011) 描述的Bak BH3多肽。

[0278] 在一些情况下,内体溶解部分包含PCT公开W02013/166155或W02015/069587中描述的多肽(例如,细胞穿透多肽)。

内体溶解聚合物

[0279] 在一些实施方案中,式(I)——A-(X¹-B)_n或式(II)——A-X¹-(B-X²-C)_n的缀合物进一步与内体溶解聚合物缀合。如本文所用的,内体溶解聚合物包括直链、支链的网络、星形、梳形或梯形聚合物。在一些情况下,内体溶解聚合物是包含两种或更多种不同类型的单体的均聚物或共聚物。在一些情况下,内体溶解聚合物是聚阳离子聚合物。在其他情况下,内体溶解聚合物是聚阴离子聚合物。

[0280] 在一些情况下,聚阳离子聚合物包含带正电荷、为电荷中性或带负电荷的单体单元,并且净电荷为正。在其他情况下,聚阳离子聚合物包含含有两个或更多个正电荷的非聚合分子。示例性阳离子聚合物包括但不限于聚(L-赖氨酸)(PLL)、聚(L-精氨酸)(PLA)、聚乙烯亚胺(PEI)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸](PAGA)、甲基丙烯酸2-(二甲基氨基)乙酯(DMAEMA)或甲基丙烯酸N,N-二乙基氨基乙酯(DEAEMA)。

[0281] 在一些情况下,聚阴离子聚合物包含带正电荷、为电荷中性或带负电荷的单体单元,并且净电荷为负。在其他情况下,聚阴离子聚合物包含含有两个或更多个负电荷的非聚合分子。示例性的阴离子聚合物包括聚(丙烯酸烷基酯)(例如,聚(丙烯酸丙酯)(PAA))或聚(N-异丙基丙烯酰胺)(NIPAM)。另外的实例包括PP75——在Khormae等人,“Edosomolytic anionic polymer for the cytoplasmic delivery of siRNAs in localized in vivo applications,”*Advanced Functional Materials* 23:565-574 (2013) 中描述的L-苯丙氨酸-聚(L-赖氨酸异邻苯二甲酰胺)聚合物。

[0282] 在一些实施方案中,本文所述的内体溶解聚合物是pH响应性内体溶解聚合物。pH响应性聚合物包括根据环境的pH而增大(溶胀)或塌缩的聚合物。聚丙烯酸和壳聚糖是pH响

应性聚合物的实例。

[0283] 在一些情况下,本文描述的内体溶解部分是膜破坏性聚合物。在一些情况下,该膜破坏性聚合物包括阳离子聚合物、中性或疏水性聚合物或阴离子聚合物。在一些情况下,该膜破坏性聚合物是亲水性聚合物。

[0284] 在一些情况下,本文描述的内体溶解部分是pH响应性膜破坏性聚合物。示例性的pH响应性膜破坏性聚合物包括聚(烷基丙烯酸)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(NIPAM)共聚物、琥珀酰化聚(缩水甘油)和聚(β -苹果酸)聚合物。

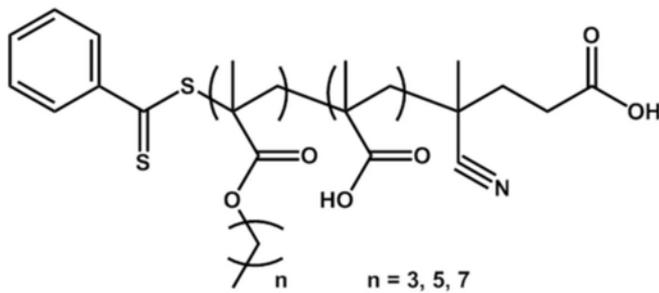
[0285] 在一些情况下,聚(烷基丙烯酸)包括聚(丙基丙烯酸)(polyPAA)、聚(甲基丙烯酸)(PMAA)、聚(乙基丙烯酸)(PEAA)和聚(丙基丙烯酸)(PPAA)。在一些情况下,聚(烷基丙烯酸)包括Jones等人,Biochemistry Journal 372:65-75(2003)中描述的聚(烷基丙烯酸)。

[0286] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括聚(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)。(参见Bulmus等人,Journal of Controlled Release 93:105-120(2003);和Yessine等人,Biochimica et Biophysica Acta 1613:28-38(2003))。

[0287] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括聚(苯乙烯-马来酸酐)交替聚合物。(参见Henry等人,Biomacromolecules 7:2407-2414(2006))。

[0288] 一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物,如聚(MAA-共-PDSA)、聚(EAA-共-PDSA)、聚(PAA-共-PDSA)、聚(MAA-共-BA-共-PDSA)、聚(EAA-共-BA-共-PDSA)或聚(PAA-共-BA-共-PDSA)聚合物。(参见El-Sayed等人,“Rational design of composition and activity correlations for pH-responsive and glutathione-reactive polymer therapeutics,”Journal of Controlled Release 104:417-427(2005);或Flanary等人,“Antigen delivery with poly(propylacrylic acid) conjugation enhanced MHC-I presentation and T-cell activation,”Bioconjugate Chem.20:241-248(2009))。

[0289] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括包含以下基本结构的溶解性聚合物:



[0290] 在一些情况下,本文所述的内体溶解部分进一步缀合至另外的缀合物,例如聚合物(例如,PEG)或修饰的聚合物(例如,胆固醇修饰的聚合物)。

[0291] 在一些情况下,所述另外的缀合物包括去污剂(例如,Triton X-100)。在一些情况下,本文所述的内体溶解部分包含与去污剂(例如,Triton X-100)缀合的聚合物(例如,聚(酰胺基胺))。在一些情况下,本文所述的内体溶解部分包含聚(酰胺基胺)-Triton X-100缀合物(Duncan等人,“A polymer-Triton X-100 conjugate capable of pH-dependent red blood cell lysis: a model system illustrating the possibility of drug

delivery within acidic intracellular compartments,”Journal of Drug Targeting 2:341-347(1994)。

内体溶解脂质

[0292] 在一些实施方案中,所述内体溶解部分是脂质(例如,促融合脂质)。在一些实施方案中,式(I)—— $A-(X^1-B)_n$ 或式(II)—— $A-X^1-(B-X^2-C)_n$ 的缀合物进一步与内体溶解脂质(例如,促融合脂质)缀合。示例性促融合脂质包括1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七碳-6,9,28,31-四烯-19-醇(Di-Lin)、N-甲基(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)甲胺(DLin-k-DMA)和N-甲基-2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊环-4-基)乙胺(XTC)。

[0293] 在一些情况下,内体溶解部分是PCT公开W009/126,933中描述的脂质(例如,促融合脂质)。

内体溶解小分子

[0294] 在一些实施方案中,所述内体溶解部分是小分子。在一些实施方案中,式(I)—— $A-(X^1-B)_n$ 或式(II)—— $A-X^1-(B-X^2-C)_n$ 的分子进一步与内体溶解小分子缀合。适合作为内体溶解部分的示例性小分子包括但不限于奎宁、氯喹、羟基氯喹、氨基氯喹(carnoquine)、阿莫吡喹、伯氨喹、甲氟喹、nivaquine、卤泛群、醌亚胺或其组合。在一些情况下,喹啉内体溶解部分包括但不限于7-氯-4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉(氯喹);7-氯-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉(羟基氯喹);7-氟-4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉;4-(4-二乙基氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-二乙基-氨基-1-甲基丁基-氨基)喹啉;7-氯-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉(脱甲基氯喹);7-氟-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(4-二乙基-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-二乙基-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;磷酸羟基氯喹;7-氯-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-1)-氨基-1-丁基氨基)喹啉(脱甲基羟基氯喹);7-氟-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;8-[(4-氨基戊基)氨基-6-甲氧基喹啉二盐酸盐];1-乙酰基-1,2,3,4-四

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

[0295] 在一些实施方案中,所述内体溶解部分是尼日利亚菌素或其缀合物,例如叶酸-尼日利亚菌素酯缀合物、叶酸-尼日利亚菌素酰胺缀合物或叶酸-尼日利亚菌素氨基甲酸酯缀合物。在一些情况下,该内体溶解部分是Rangasamy等人,“New mechanism for release of endosomal contents:osmotic lysis via nigericin-mediated K^+/H^+ exchange,” Bioconjugate Chem.29:1047-1059 (2018)中描述的尼日利亚菌素。

连接体

[0296] 在一些实施方案中,本文所述的连接体是可切割连接体或不可切割连接体。在一些情况下,该连接体是可切割连接体。在其他情况下,该连接体是不可切割连接体。

[0297] 在一些情况下,所述连接体是非聚合连接体。非聚合连接体是指不含通过聚合过程生成的单体重复单元的连接体。示例性的非聚合连接体包括但不限于 C_1 - C_6 烷基(例如, C_5 、 C_4 、 C_3 、 C_2 或 C_1 烷基)、同双官能交联体、异双官能交联体、肽连接体、无痕连接体、自牺牲(self-immolative)连接体、基于马来酰亚胺的连接体或其组合。在一些情况下,该非聚合连接体包含 C_1 - C_6 烷基(例如, C_5 、 C_4 、 C_3 、 C_2 或 C_1 烷基)、同双官能交联体、异双官能交联体、肽连接体、无痕连接体、自牺牲连接体、基于马来酰亚胺的连接体或其组合。在另外的情况下,该非聚合连接体不包含超过两个相同类型的连接体,例如,超过两个同双官能交联体,或超过两个肽连接体。在其他情况下,该非聚合连接体任选地包含一个或多个反应性官能团。

[0298] 在一些情况下,该非聚合连接体不包含以上描述的聚合物。在一些情况下,该非聚合连接体不包含由聚合物部分C所包含的聚合物。在一些情况下,该非聚合连接体不包含聚环氧烷(例如PEG)。在一些情况下,该非聚合连接体不包含PEG。

[0299] 在一些情况下,所述连接体包括同双官能连接体。示例性的同双官能连接体包括但不限于Lomant试剂二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3'3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯)(DTSSP)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二亚胺代己二酸二甲酯(DMA)、庚二亚氨酸二甲酯(DMP)、辛二亚氨酸二甲酯(DMS)、3,3'-二硫代二丙亚氨酸二甲酯(DTBP)、1,4-二-(3'-(2'-吡啶基二硫代)丙酰胺基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB),例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基砜(DFDNPS)、双-[β -(4-叠氮基水杨酰胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3'-二甲基联苯胺、联苯胺、 α,α' -对二氨基二苯基、二碘-对

二甲苯磺酸、N,N'-亚乙基-双(碘乙酰胺)或N,N'-六亚甲基-双(碘乙酰胺)。

[0300] 在一些实施方案中,所述连接体包括异双官能连接体。示例性的异双官能连接体包括但不限于胺反应性和巯基交联体,如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫代)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α -甲基- α -(2-吡啶基二硫代)-甲苯甲酰胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBs)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBs)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(sIAB)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBs)、琥珀酰亚胺基6-((碘乙酰基)氨基)己酸酯(sIAX)、琥珀酰亚胺基6-[6-(((碘乙酰基)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-甲酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-(((4-(碘乙酰基)氨基)甲基)环己烷-1-羰基)氨基)己酸酯(sIACX)、对硝基苯基碘乙酸酯(NPIA),羰基反应性和巯基反应性交联剂,如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼(PDPH),胺反应性和光反应性交联体,如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氨基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氨基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氨基水杨酰胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氨基水杨酰胺基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氨基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氨基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氨基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4'-叠氨基-2'-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氨基-2-硝基苯甲酰基氧基琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间叠氨基-邻硝基苯甲酰胺基)-乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氨基苯基)1,3'-二硫代丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氨基苯基)-1,3'-二硫代丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(对叠氨基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氨基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氨基-4-甲基香豆素3-乙酰胺(磺基-sAMCA)、对硝基苯基重氨基丙酮酸(pNPDP)、对硝基苯基-2-重氨基-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP),巯基反应性和光反应性交联体,如1-(对叠氨基水杨酰胺基)-4-(碘乙酰胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(对叠氨基水杨酰胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙酰胺(APDP)、苯甲酮-4-碘乙酰胺,苯甲酮-4-马来酰亚胺羰基反应性和光反应性交联体,如对叠氨基苯甲酰基酰肼(ABH),羧酸反应性和光反应性交联体,如4-(对叠氨基水杨酰胺基)丁胺(AsBA),以及精氨酸反应性和光反应性交联体,如对叠氨基苯基乙二醛(APG)。

[0301] 在一些情况下,该连接体包含反应性官能团。在一些情况下,所述反应性官能团包括对存在于结合部分上的亲电子基团具有反应性的亲核基团。示例性的亲电子基团包括羰

基——如醛、酮、羧酸、酯、酰胺、烯酮、酰基卤或酸酐。在一些实施方案中,所述反应性官能团是醛。示例性的亲核基团包括酰肼、肟、氨基、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳基酰肼。

[0302] 在一些实施方案中,所述连接体包含马来酰亚胺基团。在一些情况下,该马来酰亚胺基团也被称为马来酰亚胺间隔基。在一些情况下,该马来酰亚胺基团进一步包含己酸,从而形成马来酰亚胺基己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体包含马来酰亚胺基己酰基(mc)。在一些情况下,该连接体是马来酰亚胺基己酰基(mc)。在其他情况下,该马来酰亚胺基团包括以上描述的马来酰亚胺基甲基,如琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。

[0303] 在一些情况下,所述马来酰亚胺基团是自稳定马来酰亚胺。在一些情况下,该自稳定马来酰亚胺利用二氨基丙酸(DPR)掺入与马来酰亚胺相邻的碱性氨基,以提供硫代琥珀酰亚胺环水解的分子内催化,从而避免马来酰亚胺通过逆Michael反应经历消除反应。在一些情况下,该自稳定马来酰亚胺是Lyon等人,“Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates,” Nat. Biotechnol. 32 (10) :1059-1062 (2014) 描述的马来酰亚胺基团。在一些情况下,该连接体包含自稳定马来酰亚胺。在一些情况下,该连接体是自稳定马来酰亚胺。

[0304] 在一些实施方案中,所述连接体包含肽部分。在一些情况下,该肽部分包含至少2、3、4、5或6个或更多个氨基酸残基。在一些情况下,该肽部分包含至多2、3、4、5、6、7或8个或更多个氨基酸残基。在一些情况下,该肽部分包含约2个、约3个、约4个、约5个或约6个氨基酸残基。在一些情况下,该肽部分是可切割的肽部分(例如,酶促或化学地)。在一些情况下,该肽部分是不可切割的肽部分。在一些情况下,该肽部分包含Val-Cit(缬氨酸-瓜氨酸)、Gly-Gly-Phe-Gly、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly。在一些情况下,所述连接体包含肽部分,诸如:Val-Cit(缬氨酸-瓜氨酸)、Gly-Gly-Phe-Gly、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly。在一些情况下,所述连接体包含Val-Cit。在一些情况下,所述连接体是Val-Cit。

[0305] 在一些实施方案中,所述连接体包含苯甲酸基团或其衍生物。在一些情况下,该苯甲酸基团或其衍生物包含对氨基苯甲酸(PABA)。在一些情况下,该苯甲酸基团或其衍生物包含 γ -氨基丁酸(GABA)。

[0306] 在一些实施方案中,所述连接体包含任意组合的马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团中的一种或多种。在一些实施方案中,所述连接体包含马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团的组合。在一些情况下,该马来酰亚胺基团是马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,该肽基团是val-cit。在一些情况下,该苯甲酸基团是PABA。在一些情况下,所述连接体包含mc-val-cit基团。在一些情况下,所述连接体包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下,所述连接体包含mc-val-cit-PABA基团。

[0307] 在一些实施方案中,所述连接体是自牺牲连接体或自消除连接体。在一些情况下,所述连接体是自牺牲连接体。在其他情况下,所述连接体是自消除连接体(例如,环化自消除连接体)。在一些情况下,所述连接体包括美国专利9,089,614或PCT公开W02015038426中

描述的连接体。

[0308] 在一些实施方案中,所述连接体是树枝型连接体。在一些情况下,该树枝型连接体包含支化的多官能连接体部分。在一些情况下,该树枝型连接体用来增加多核苷酸B与结合部分A的摩尔比。在一些情况下,该树枝型连接体包含PAMAM树枝状高分子。

[0309] 在一些实施方案中,所述连接体是无痕连接体或者在切割后不会给结合部分A、多核苷酸B、聚合物C或内体溶解部分D留下连接体部分(例如,原子或连接体基团)的连接体。示例性的无痕连接体包括但不限于锆连接体、硅连接体、硫连接体、硒连接体、氮连接体、磷连接体、硼连接体、铬连接体或苯肼连接体。在一些情况下,所述连接体是如Hejesen等人,“A traceless aryl-triazene linker for DNA-directed chemistry,”*Org Biomol Chem* 11 (15):2493-2497 (2013) 描述的无痕芳基-三氮烯连接体。在一些情况下,所述连接体是Blaney等人,“Traceless solid-phase organic synthesis,”*Chem.Rev.*102:2607-2024 (2002) 描述的无痕连接体。在一些情况下,连接体是美国专利6,821,783中描述的无痕连接体。

[0310] 在一些情况下,所述连接体是以下文献中描述的连接体:美国专利6,884,869;7,498,298;8,288,352;8,609,105;或8,697,688;美国专利公开2014/0127239;2013/028919;2014/286970;2013/0309256;2015/037360;或2014/0294851;或者PCT公开W02015057699;W02014080251;W02014197854;W02014145090;或W02014177042。

[0311] 在一些实施方案中, X^1 和 X^2 各自独立地为键或非聚合连接体。在一些情况下, X^1 和 X^2 各自独立地为键。在一些情况下, X^1 和 X^2 各自独立地为非聚合连接体。

[0312] 在一些情况下, X^1 为键或非聚合连接体。在一些情况下, X^1 为键。在一些情况下, X^1 为非聚合连接体。在一些情况下,该连接体为 C_1 - C_6 烷基。在一些情况下, X^1 为 C_1 - C_6 烷基,例如, C_5 、 C_4 、 C_3 、 C_2 或 C_1 烷基。在一些情况下,该 C_1 - C_6 烷基是未取代的 C_1 - C_6 烷基。如在连接体的语境中,特别是在 X^1 的语境中所使用的,烷基意指含有最多六个碳原子的饱和直链或支链烃基团。在一些情况下, X^1 包括以上所述的同双官能连接体或异双官能连接体。在一些情况下, X^1 包括异双官能连接体。在一些情况下, X^1 包括sMCC。在其他情况下, X^1 包括任选地缀合至 C_1 - C_6 烷基的异双官能连接体。在其他情况下, X^1 包括任选地缀合至 C_1 - C_6 烷基的sMCC。在另外的情况下, X^1 不包括上文描述的同双官能连接体或异双官能连接体。

[0313] 在一些情况下, X^2 为键或连接体。在一些情况下, X^2 为键。在其他情况下, X^2 为连接体。在一些情况下, X^2 为非聚合连接体。在一些实施方案中, X^2 为 C_1 - C_6 烷基。在一些情况下, X^2 为以上所述的同双官能连接体或异双官能连接体。在一些情况下, X^2 为以上所述的同双官能连接体。在一些情况下, X^2 为以上所述的异双官能连接体。在一些情况下, X^2 包含马来酰亚胺基团,诸如上述马来酰亚胺基己酰基(mc)或自稳定的马来酰亚胺基团。在一些情况下, X^2 包含肽部分,如Val-Cit。在一些情况下, X^2 包含苯甲酸基团,如PABA。在另外的情况下, X^2 包含马来酰亚胺基团、肽部分和/或苯甲酸基团的组合。在另外的情况下, X^2 包含mc基团。在另外的情况下, X^2 包含mc-val-cit基团。在另外的情况下, X^2 包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下, X^2 包含mc-val-cit-PABA基团。

使用方法

[0314] 在一些实施方案中,本文描述了使用本文所述的抗转铁蛋白受体抗体将有效负载递送至感兴趣的目标部位的方法。在一些情况下,感兴趣的目标部位是过表达与疾病或病

况相关的致病蛋白质的细胞。在一些情况下,感兴趣的目标部位是包含错误加工的mRNA的细胞,该错误加工的mRNA编码非功能性蛋白质或导致疾病或病况的蛋白质表达降低。在一些情况下,感兴趣的目标部位是肿瘤部位。在其他情况下,感兴趣的目标部位是位于脑内的部位。

[0315] 在一些实施方案中,本文描述了一种治疗以过表达蛋白质为特征的疾病或病症的方法。在一些情况下,该疾病或病症是肌萎缩。在一些情况下,该疾病或病症是强直性肌营养不良。

[0316] 在一实施方案中,肌萎缩是指肌力的显著损失。肌力的显著损失是指相对于对照受试者中的相同肌肉组织,受试者中患病、受伤或废用的肌肉组织的力量降低。在一个实施方案中,肌力的显著损失是力量相对于对照受试者中的相同肌肉组织降低至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或更高。在另一个实施方案中,肌力的显著损失是指相对于在不使用一段时间之前同一受试者中相同肌肉组织的肌力,废用肌肉组织的力量降低。在一个实施方案中,肌力的显著损失是相对于在不使用一段时间之前同一受试者中相同肌肉组织的肌力降低至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或更多。

[0317] 在另一个实施方案中,肌萎缩是指肌肉质量的显著损失。肌肉质量的显著损失是指相对于对照受试者中的相同肌肉组织,受试者中患病、受伤或废用的肌肉组织的肌肉体积减少。在一个实施方案中,肌肉体积的显著损失为相对于对照受试者中的相同肌肉组织至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或更多。在另一个实施方案中,肌肉质量的显著损失是指相对于在不使用一段时间之前同一受试者中相同肌肉组织的肌肉体积,废用的肌肉组织的肌肉体积减少。在一个实施方案中,肌肉组织的显著损失是相对于在不使用一段时间之前同一受试者中相同肌肉组织的肌肉体积至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或更多。任选地,例如通过磁共振成像(例如,通过肌肉体积/横截面积(CSA)MRI方法),通过评估肌肉的横截面积来测量肌肉体积。

[0318] 在一些实施方案中,所述肌萎缩包括恶病质、去神经支配、肌病、运动神经元疾病、糖尿病、慢性阻塞性肺病、肝病、充血性心力衰竭、慢性肾功能衰竭、慢性感染、脓毒症、禁食、少肌症、糖皮质激素相关的肌萎缩或废用相关的肌萎缩,或与以上所述相关。

[0319] 恶病质是由潜在疾病引起的后天性、加速的肌肉损失。在一些情况下,恶病质是指无法通过营养逆转的体重减轻,并且通常与诸如癌症、COPD、AIDS、心力衰竭等潜在疾病相关。当在患有晚期癌症的患者中观察到恶病质时,将其称为“癌症恶病质”。癌症恶病质影响大多数晚期癌症患者,并与治疗耐受性、对治疗的反应、生活质量和生存时间的降低有关。在一些情况下,癌症恶病质被定义为一种多因素综合征,其特征是骨骼肌质量持续减少、脂肪量减少或不减少、常规营养支持不能完全逆转以及导致进行性功能损害。在一些情况下,骨骼肌损失似乎是癌症恶病质中最重要的事件。此外,癌症恶病质的分类表明,诊断标准不仅考虑体重减轻是恶病质过程的信号事件,而且还应考虑患者的初始储备,如低BMI或低水平的肌肉健壮程度。

[0320] 去神经支配是对周围运动神经元的损伤,器官与中枢神经系统之间的神经纤维的部分或完全中断,导致神经传导中断和运动神经元冲动,继而阻止骨骼肌的收缩。由于整个

运动神经元单元的丧失,这种神经功能的丧失是局部的或普遍的。骨骼肌无法收缩导致肌萎缩。在一些情况下,去神经支配与退行性、代谢性或炎性神经病(例如,格林-巴利综合征、周围神经病或暴露于环境毒素或药物)相关或作为其结果。在另外的情况下,去神经支配与身体损伤如外科手术有关。

[0321] 肌病是一个笼统的术语,其描述肌肉的疾病。在一些情况下,肌病包括肌强直;先天性肌病,如线形体肌病、多/小核肌病和肌管(中央核)肌病;线粒体肌病;家族性周期性麻痹;炎性肌病;代谢性肌病,例如,由糖原或脂质贮积病引起的;皮炎;多肌炎;包涵体肌炎;骨化性肌炎;横纹肌溶解;和肌红蛋白尿。在一些情况下,肌病是由肌肉营养不良综合征引起的,如杜氏、贝克氏、强直性、面肩肱型、Emery-Dreifuss、眼咽、肩胛肱型、肢带型、福山、先天性肌营养不良或遗传性远端肌病。在一些情况下,肌病是由强直性肌营养不良引起的(例如,1型强直性肌营养不良或DM1)。在一些情况下,肌病是由DM1引起的。

[0322] 运动神经元疾病(MND)包括影响运动神经元的神经系统疾病,运动神经元是控制机体随意肌的细胞。示例性运动神经元疾病包括但不限于成年运动神经元疾病、婴儿脊髓性肌萎缩症、肌萎缩侧索硬化、青少年脊髓性肌萎缩、伴有多灶性传导阻滞的自身免疫性运动神经病、中风或脊髓损伤引起的瘫痪,或骨骼由于创伤而无法固定。

[0323] 糖尿病(diabetes mellitus,DM)包括1型糖尿病、2型糖尿病、3型糖尿病、4型糖尿病、双重糖尿病、潜伏性自身免疫性糖尿病(LAD)、妊娠糖尿病、新生儿糖尿病(NDM)、青年成熟期发作糖尿病(MODY)、Wolfram综合征、Alström综合征、糖尿病前期或尿崩症。2型糖尿病,也称为非胰岛素依赖型糖尿病,是最常见的糖尿病类型,占有糖尿病病例的95%。在一些情况下,2型糖尿病是由多种因素引起的,包括由于胰岛β细胞功能异常导致的胰岛素抵抗,继而导致高血糖水平。在一些情况下,胰高血糖素水平升高会刺激肝脏产生异常量的不需要的葡萄糖,从而导致高血糖水平。1型糖尿病,也称为胰岛素依赖型糖尿病,占有糖尿病病例的5%至10%。1型糖尿病是一种自身免疫疾病,其中T细胞攻击并破坏胰腺中产生胰岛素的β细胞。在一些实施方案中,1型糖尿病是由遗传和环境因素引起的。4型糖尿病是一种类型的糖尿病,可影响约20%的65岁以上糖尿病患者。在一些实施方案中,4型糖尿病的特征在于年龄相关的胰岛素抵抗。将3型糖尿病用作阿尔茨海默病的术语,其导致大脑中的胰岛素抵抗。

[0324] 慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种类型的阻塞性肺疾病,其特征在于长期呼吸问题和气流不良。慢性支气管炎和肺气肿是COPD的两种不同类型。

[0325] 肝病(或肝脏疾病)包括纤维化、硬化、肝炎、酒精性肝病、肝脂肪变性、遗传性疾病或原发性肝癌。

[0326] 充血性心力衰竭是指心脏无法将足够的血液和氧泵送到人体组织的情况。

[0327] 慢性肾功能衰竭或慢性肾脏疾病是以肾脏功能随时间逐渐丧失为特征的病况。

[0328] 在一些实施方案中,诸如AIDS等慢性感染进一步导致肌萎缩。

[0329] 脓毒症是对导致组织损伤、器官衰竭和/或死亡的感染的免疫应答。

[0330] 禁食是一段时期内对某些或全部食物、饮料或两者的戒断或减少。

[0331] 少肌症是正常衰老过程中肌萎缩的持续过程,其特征是在数月和数年的时间内,肌肉质量和肌力逐渐丧失。常规衰老过程在本文中是指不受促进骨骼肌神经变性的病症和疾病的存在影响或加速的衰老过程。

[0332] 在一些情况下,采用糖皮质激素的治疗进一步导致肌萎缩。示例性的糖皮质激素包括但不限于皮质醇、地塞米松、倍他米松、泼尼松、甲泼尼龙和泼尼松龙。

[0333] 当肢体被固定(例如,由于肢体或关节骨折或骨科手术,如髌部或膝盖置换手术)时,导致与废用相关的肌萎缩。如本文所用的,“固定”或“固定的”是指肢体、肌肉、骨骼、肌腱、关节或任何其他身体部位在长时间段内(例如2天、3天、4天、5天、6天、一周、两周或更长时间)受到部分或完全限制运动。在一些情况下,固定时间时包括运动不受约束的短暂时间或情况,例如洗澡,更换外部设备或调整外部设备。肢体固定可选地通过各种外部设备进行,包括但不限于支具、吊索、石膏、绷带和夹板(其中的任一个可选地由硬或软材料组成,包括但不限于布、纱布、玻璃纤维、塑料、石膏或金属)以及任何内部设备,包括手术植入的夹板、板、支具等。在肢体固定的情况下,运动受限涉及单个关节或多个关节(例如,简单关节,如肩关节或髌关节,复合关节,如桡腕关节)和复杂关节如膝关节),包括但不限于以下一种或多种:手的关节、肩关节、肘关节、腕关节、辅助关节、胸锁关节、椎骨关节、颞下颌关节、骶髂关节、髌关节、膝关节和足关节)、单个肌腱或韧带或多个肌腱或韧带(例如,包括但不限于以下一种或多种:前交叉韧带、后交叉韧带、肩袖肌腱、肘和膝关节侧副韧带、手的屈肌腱、脚踝的侧韧带以及颌骨或颞下颌关节的肌腱和韧带)、单个骨骼或多个骨骼(例如,包括但不限于以下一种或多种:颅骨、下颌骨、锁骨、肋骨、桡骨、尺骨、humorous、盆骨、骶骨、股骨、髌骨、趾骨、腕骨、掌骨、跗骨、跖骨、腓骨、胫骨、肩胛骨和椎骨)、一条或多条肌肉(例如,包括但不限于以下一种或多种:背阔肌、斜方肌、三角肌、胸肌、二头肌、三头肌、外斜肌、腹肌、臀大肌、腓绳肌、四头肌、腓肠肌和膈肌);单肢或多肢(一个或多个手臂和腿),或整个骨骼肌系统或其部分(例如,在全身石膏或人字形石膏的情况下)。

[0334] 强直性肌营养不良是一种多系统神经肌肉疾病,其包括两种主要类型:1型强直性肌营养不良(DM1)和2型强直性肌营养不良(DM2)。DM1是由基因DM蛋白激酶(DMPK)中显性遗传的“CTG”重复扩充引起的,当其被转录为mRNA时,形成与盲肌(Muscleblind)样(MBNL)家族蛋白质以高亲和力结合的发夹。MBNL蛋白参与转录后剪接和多腺苷酸化位点调节,并且MBNL蛋白功能的丧失导致核病灶的下游积累和错误剪接事件的增加,随后导致肌强直和其他临床症状。

[0335] 在一些实施方案中,本文描述了一种治疗以错误剪接的mRNA为特征的疾病或病症的方法。在一些实施方案中,本文所述的抗转铁蛋白受体抗体将多核酸分子递送至错误剪接的mRNA转录物的位点,以诱导外显子跳跃或外显子包含。

[0336] 在一些情况下,由不正确剪接或部分剪接的mRNA引起的疾病或病症包括但不限于神经肌肉疾病、遗传病、癌症、遗传性疾病或心血管疾病。

[0337] 在一些情况下,遗传性疾病或病症包括常染色体显性病症、常染色体隐性病症、X连锁显性病症、X连锁隐性病症、Y连锁病症、线粒体疾病或多因素或多基因病症。

[0338] 在一些情况下,诸如高胆固醇血症的心血管疾病由不正确剪接或部分剪接的mRNA引起。在高胆固醇血症中,已经显示低密度脂蛋白受体(LDLR)的外显子12中的单核苷酸多态性促进外显子跳跃。

[0339] 在一些情况下,不正确剪接或部分剪接的mRNA会导致癌症。例如,不正确剪接或部分剪接的mRNA影响与癌症有关的细胞过程,包括但不限于增殖、运动性和药物反应。在一些情况下是实体癌或血液系统癌症。在一些情况下,该癌症是膀胱癌、肺癌、脑癌、黑素瘤、乳

腺癌、非霍奇金淋巴瘤、宫颈癌、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌、食管癌、前列腺癌、肾癌、皮肤癌、白血病、甲状腺癌、肝癌或子宫癌。

[0340] 在一些情况下,不正确剪接或部分剪接的mRNA会导致神经肌肉疾病或病症。示例性的神经肌肉疾病包括肌营养不良,如杜氏肌营养不良、贝克肌营养不良、面肩肱型肌营养不良、先天性肌营养不良或强直性肌营养不良。在一些情况下,肌营养不良是遗传性的。在一些情况下,肌营养不良是由自发突变引起的。贝克肌营养不良和杜氏肌营养不良已被证明与DMD基因的突变有关,该基因编码肌养蛋白。面肩肱型肌营养不良已被证明与双同源框4 (DUX4) 基因的突变有关。

[0341] 在一些情况下,不正确剪接或部分剪接的mRNA会导致杜氏肌营养不良。杜氏肌营养不良导致严重的肌无力,并且由DMD基因的突变引起,其阻止了功能性肌养蛋白的产生。在一些情况下,杜氏肌营养不良是DMD基因中的外显子突变的结果。在一些情况下,杜氏肌营养不良是DMD基因中外显子1、2、3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78和79中的至少一个的突变的结果。在一些情况下,杜氏肌营养不良是DMD基因中外显子3、4、5、6、7、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62和63中的至少一个的突变的结果。在一些情况下,杜氏肌营养不良是DMD基因中外显子8、23、35、43、44、45、50、51、52、53和55中的至少一个的突变的结果。在一些情况下,多个外显子发生突变。例如,外显子48-50的突变在杜氏肌营养不良患者中是常见的。在一些情况下,杜氏肌营养不良是外显子51突变的结果。在一些情况下,杜氏肌营养不良是外显子23突变的结果。在一些情况下,突变涉及一个或多个外显子的缺失。在一些情况下,突变涉及一个或多个外显子的复制。在一些情况下,突变涉及外显子中的点突变。例如,已经显示一些患者在DMD基因的外显子51中具有无义点突变。

药物制剂

[0342] 在一些实施方案中,本文所述的药物制剂通过多种给药途径施用于受试者,所述途径包括但不限于肠胃外(例如,静脉内、皮下、肌肉内)、口服、鼻内、颊部、直肠或透皮给药途径。在一些情况下,本文所述的药物组合物被配制用于肠胃外(例如,静脉内、皮下、肌肉内、动脉内、腹膜内、鞘内、脑内、脑室内或颅内)给药。在其他情况下,本文所述的药物组合物被配制用于口服给药。在另外其他的情况下,本文所述的药物组合物被配制用于鼻内给药。

[0343] 在一些实施方案中,所述药物制剂包括但不限于水性液体分散体、自乳化分散体、固溶体、脂质体分散体、气雾剂、固体剂型、粉末、立即释放制剂、控制释放制剂、速熔制剂、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲释放制剂、多颗粒制剂(例如纳米颗粒制剂)以及立即释放和控制释放混合型制剂。

[0344] 在一些情况下,所述药物制剂包括多颗粒制剂。在一些情况下,所述药物制剂包括纳米颗粒制剂。在一些情况下,纳米颗粒包含cMAP、环糊精或脂质。在一些情况下,纳米颗粒包括固体脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、自乳化纳米颗粒、脂质体、微乳液或胶束溶液。其他示例性的纳米颗粒包括但不限于顺磁性纳米颗粒、超顺磁性纳米颗粒、金属纳米颗粒、富

钠和三羟甲基氨基甲烷;和缓冲液,如柠檬酸盐/右旋糖、碳酸氢钠和氯化铵。这类酸、碱和缓冲液以使组合物的pH保持在可接受范围内所需的量包含在内。

[0352] 在一些情况下,所述药物制剂以使组合物的重量摩尔渗透压浓度处于可接受范围内所需的量包含一种或多种盐。这类盐包括具有钠、钾或铵阳离子和氯离子、柠檬酸根、抗坏血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根或亚硫酸氢根阴离子的盐;合适的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠和硫酸铵。

治疗方案

[0353] 在一些实施方案中,施用本文所述的药物组合物以用于治疗应用。在一些实施方案中,该药物组合物每天施用一次、每天施用两次、每天施用三次或更频繁。该药物组合物每天、每隔一天、隔日、每周五天、每周一次、每隔一周、每月两周、每月三周、每月一次、每月两次、每月三次或更频繁地施用。该药物组合物施用至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、2年、3年或更长时间。

[0354] 在一些实施方案中,一种或多种药物组合物同时、依次或间隔一段时间施用。在一些实施方案中,一种或多种药物组合物同时施用。在一些情况下,一种或多种药物组合物依次施用。在另外的情况下,一种或多种药物组合物间隔一段时间施用(例如,第一药物组合物的第一次施用在第一天,然后在施用至少第二药物组合物之前间隔至少1、2、3、4、5天或更多天)。

[0355] 在一些实施方案中,两种或更多种不同的药物组合物共同施用。在一些情况下,两种或更多种不同的药物组合物同时共同施用。在一些情况下,两种或更多种不同的药物组合物依次共同施用,而在施用之间没有时间间隔。在其他情况下,两种或更多种不同的药物组合物依次共同施用,在施用之间间隔约0.5小时、1小时、2小时、3小时、12小时、1天、2天或更久。

[0356] 在患者的状态确实得到改善的情况下,根据医生的裁量,继续进行组合物的施用;或者,所施用的组合物的剂量暂时减少或暂时停止某段时间长度(即“休药期”)。在一些情况下,休药期的长度为2天至1年不等,仅举例来说,包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。在休药期期间的剂量减少是10%-100%,仅举例来说,包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0357] 一旦患者的状况已发生改善,如有必要,施用维持剂量。随后,根据症状,可将给药剂量或频率或这两者降低至改善的疾病、病症或病况得以保持的水平。

[0358] 在一些实施方案中,对应于此量的给定药剂的量根据诸如具体化合物、疾病的严重程度、需要治疗的受试者或宿主的特性(例如体重)等因素而变化,不过仍根据该病例的具体情况以本领域已知的方式进行常规确定,所述情况包括例如所施用的具体药剂、给药途径和所治疗的受试者或宿主。在一些情况下,所需剂量方便地以单剂量或分剂量呈现,所述分剂量同时(或在短时间段内)或以适当的间隔施用,例如每天两次、三次、四次或更多次亚剂量。

[0359] 前述范围仅是建议性的,因为关于个体治疗方案的变量数目很大,并且偏离这些推荐值的相当大的偏差也并不罕见。这样的剂量根据许多变量而改变,这些变量不限于所

使用的化合物的活性、所治疗的疾病或病况、给药模式、受试个体的需求、所治疗的疾病或病况的严重程度,以及从业医生的判断。

[0360] 在一些实施方案中,此类治疗方案的毒性和治疗效果通过标准药理学程序在细胞培养物或实验动物中确定,包括但不限于LD50(群体中50%致死的剂量)和ED50(群体中50%治疗有效的剂量)的确定。毒性作用与治疗效果之间的剂量比为治疗指数,并且将其表示为LD50与ED50之间的比值。表现出高治疗指数的化合物是优选的。从细胞培养试验和动物研究获得的数据用于制定在人体中使用的剂量范围。此类化合物的剂量优选地处于包括ED50且具有最小毒性的循环浓度的范围内。该剂量在该范围内变化,这取决于所使用的剂型和所采用的给药途径。

试剂盒/制品

[0361] 在某些实施方案中,本文公开了与本文所述的一种或多种组合物和方法一起使用的试剂盒和制品。这样的试剂盒包括载具、包装或容器,该容器被区室化为容纳一个或多个容器如小瓶、管等,每个容器包含在本文描述的方法中使用的一个单独元件。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器和试管。在一个实施方案中,该容器由多种材料如玻璃或塑料形成。

[0362] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶子、管、袋、容器、瓶子,和任何适于选定制剂和预期给药和治疗模式的包装材料。

[0363] 例如,所述容器包含本文所述的抗转铁蛋白受体抗体和可选的一种或多种靶核酸分子。这样的试剂盒任选地包含关于其在本文所述方法中的使用的标识性描述或标签或说明书。

[0364] 试剂盒一般包括列出了内容物的标签和/或使用说明书,以及带有使用说明的包装插页。一般还包括一套说明书。

[0365] 在一个实施方案中,标签位于容器上或与容器相关联。在一个实施方案中,当构成标签的字母、数字或其他字符附着、模制或蚀刻在容器本身上时,标签处于容器上;当标签存在于也容纳容器的接纳器或载具内(例如作为包装插页)时,标签与容器相关联。在一个实施方案中,标签用来指示内容物将用于特定的治疗性应用。标签还指示内容物的使用说明,例如在本文所述方法中的使用说明。

[0366] 在某些实施方案中,所述药物组合物呈现于包装或分配器装置中,该包装或分配器装置包含一种或多种含有本文提供的化合物的单位剂型。例如,该包装包含金属或塑料箔,如泡罩包装。在一个实施方案中,该包装或分配器装置附有给药说明书。在一个实施方案中,该包装或分配器还附有监管药物生产、使用或销售的政府机构所规定的形式的、与容器相关联的告知书,该告知书反映出该机构批准该药物形式用于人类或兽医给药。例如,这样的告知书是由美国食品药品监督管理局对处方药批准的标签或批准的产品插页。在一个实施方案中,还制备含有在相容药物载体中配制的本文提供的化合物的组合物,将其置于适当的容器中,并且标示出用于治疗所示的病况。

某些术语

[0367] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均与所请求保护的主体所属领域的技术人员所一般了解的含义相同。应当理解,前面的一般性描述和下面的详细描述仅是示例性的和说明性的,并不是对所请求保护的主体任何主题的限制。在本申请中,除非另

有特别说明,否则单数形式的使用包括复数形式。必须指出,除非上下文另有明确说明,否则本说明书和所附的权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数形式的指示物。在本申请中,除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括”以及其他形式如“包含”、“含有”和“具有”的使用不是限制性的。

[0368] 如本文所用的,范围和量可以被表示为“约”特定值或范围。“约”还包括确切的量。因此,“约5 μ L”表示“约5 μ L”,并且还表示“5 μ L”。通常,术语“约”包括预期在实验误差内的量。

[0369] 本文所用的章节标题仅用于组织编排的目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0370] “抗体”和“免疫球蛋白”(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。这些术语作为同义词使用。在一些情况下,免疫球蛋白的抗原特异性是已知的。

[0371] 术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且涵盖完全组装的抗体、可以结合抗原的抗体片段(例如Fab、F(ab')₂、Fv、单链抗体、双抗体(diabody)、抗体嵌合体、杂合抗体、双特异抗体、人源化抗体等)和包含前述的重组肽。

[0372] 如本文所用的术语“单克隆抗体”和“mAb”是指从基本上均质的抗体群体中获得的抗体,即,除了可能少量存在的可能天然发生的突变外,构成该群体的各个抗体是相同的。

[0373] “天然抗体”和“天然免疫球蛋白”通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每条轻链通过一个共价二硫键连接到重链上,而二硫键的数目随着不同免疫球蛋白同种型的重链而有所不同。每条重链和轻链也具有规律间隔的链内二硫键。每条重链在一个末端具有可变域(V_H),随后是多个恒定域。每条轻链在一个末端具有可变域(V_L)且在另一末端具有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一个恒定域对齐,而轻链可变域与重链的可变域对齐。特定氨基酸残基被认为形成轻链和重链可变域之间的界面。

[0374] 术语“可变”是指在抗体之间,可变域的某些部分在序列上广泛不同的事实。可变区赋予抗原结合特异性。然而,可变性并非均匀地分布在抗体的整个可变域中。其集中在轻链和重链可变域中被称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段中。可变域的更高度保守的部分被称为框架(FR)区。天然重链和轻链的可变域各包含四个FR区,其主要采取 β 折叠片构型,通过三个CDR连接,它们形成连接 β 折叠片结构的环,并且在一些情况下形成 β 折叠片结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区近距离地保持在一起,并与来自另一条链的CDR一起有助于形成抗体的抗原结合位点(参见,Kabat等人(1991)NIH PubL.No.91-3242,Vol.I,第647-669页)。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出多种效应物功能,如Fc受体(FcR)结合、抗体参与抗体依赖性细胞毒性、补体依赖性细胞毒性的引发和肥大细胞的脱粒。

[0375] 当在本文中使用时,术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即,轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3),以及重链可变域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institute of Health,Bethesda,Md.),和/或来自“高变环”的那些残基(即,轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3),以及重链可变域中的残基(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Clothia和Lesk,(1987)J.Mol.Biol.,196:901-917)。“框

架”或“FR”残基是除本文中所认为的高变区残基之外的那些可变域残基。

[0376] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab₂、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(Zapata等(1995) *Protein Eng.* 10:1057-1062);单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体经木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段(被称为“Fab”片段,其各带有一个抗原结合位点),以及残余的“Fc”片段,其名称反映出它容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点,并且依然能够交联抗原。

[0377] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。这个区域由紧密、非共价缔合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。正是以这种构型,每个可变域的三个CDR相互作用,以限定出V_H-V_L二聚体表面上的抗原结合位点。这六个CDR共同地为抗体赋予了抗原结合特异性。然而,甚至单一可变域(或者半个Fv,其只包含三个对抗原具有特异性的CDR)也具有识别并结合抗原的能力,虽然亲和力低于完整的结合位点。

[0378] Fab片段也含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(C_{H1})。Fab片段与Fab'片段的不同在于,在重链C_{H1}域的羧基末端添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在此是指其中恒定域的半胱氨酸残基带有游离巯基的Fab'。Fab'片段通过还原F(ab')₂片段的重链二硫键而产生。抗体片段的其他化学偶合也是已知的。

[0379] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的轻链,基于其恒定域的氨基酸序列,可以归为两种截然不同的类型(称为κ(kappa)和λ(lambda))之一。

[0380] 根据其重链恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以归为不同的类别。存在五大类人免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG、IgM和IgY,并且其中若干个可被进一步分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定域分别被称为α、δ、ε、γ和μ。不同类别免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是公知的。不同的同种型具有不同的效应物功能。例如,人IgG1和IgG3同种型具有ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)活性。

[0381] 在一些情况下,抗体的CDR根据以下方式来确定:(i) Kabat编号系统(Kabat等人(197) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391,和Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*第五版,U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242);或(ii) Chothia编号方案,其在本文中将被称为“Chothia CDR”(参见,例如,Chothia和Lesk,1987, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917;Al-Lazikani等人,1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948;Chothia等人,1992, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817;Tramontano A等人,1990, *J. Mol. Biol.* 215(1):175-82;和美国专利7,709,226);或(iii) ImMunoGeneTics (IMGT)编号系统,例如,如下所述:Lefranc, M.-P., 1999, *The Immunologist*, 7:132-136和Lefranc, M.-P.等人,1999, *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212(“IMGT CDR”);或(iv) MacCallum等人,1996, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745。另见,例如,Martin, A., “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,”于 *Antibody Engineering*, Kontermann和Diibel编著,第31章, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001)。

[0382] 对Kabat编号系统而言,抗体重链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置31至35处——任选地可在35之后包括一个或两个额外的氨基酸(在Kabat编号方案中称为35A和

35B) (CDR1)、氨基酸位置50至65处 (CDR2) 和氨基酸位置95至102处 (CDR3)。使用Kabat编号系统, 抗体轻链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置24至34处 (CDR1)、氨基酸位置50至56处 (CDR2) 和氨基酸位置89至97处 (CDR3)。如本领域技术人员公知的, 使用Kabat编号系统, 由于FR和/或CDR的缩短或延长, 抗体可变域的实际线性氨基酸序列可以包含更少或额外的氨基酸, 因此, 氨基酸的Kabat编号不一定与其线性氨基酸编号相同。

[0383] 对Chotia编号系统而言, 抗体重链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置26至31处——任选地可在31之后包括一个或两个额外的氨基酸(在Chotia编号方案中称为31A和31B) (CDR1)、氨基酸位置52至56处 (CDR2) 和氨基酸位置95至102处 (CDR3)。使用Chotia编号系统, 抗体轻链分子内的CDR通常存在于氨基酸位置24至34处 (CDR1)、氨基酸位置50至56处 (CDR2) 和氨基酸位置89至97处 (CDR3)。如本领域技术人员公知的, 使用Chotia编号系统, 由于FR和/或CDR的缩短或延长, 抗体可变域的实际线性氨基酸序列可以包含更少或额外的氨基酸, 因此, 氨基酸的Chotia编号不一定与其线性氨基酸编号相同。

[0384] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分源自特定来源或物种, 而重链和/或轻链的其余部分源自不同来源或物种的抗体。

[0385] 术语“人源化抗体”是指其中框架或CDR已被修饰以包含与亲本免疫球蛋白相比具有不同特异性的免疫球蛋白CDR的抗体。

[0386] 如本文所用的, 术语“个体”、“受试者”和“患者”是指任何哺乳动物。在一些实施方案中, 该哺乳动物是人。在一些实施方案中, 该哺乳动物是非人哺乳动物。这些术语都不需要或局限于以卫生保健工作者(例如, 医生、注册护士、从业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作人员)的监护(例如, 持续的或间歇的)为特征的情形。

实施例

[0387] 提供这些实施例仅仅是为了说明性目的, 而并非限制本文提供的权利要求书的范围。

实施例1: 人源化抗TfR抗体的产生和表征

[0388] 将编码示例性抗TfR抗体的核酸稳定转染到CHOK1SV GSK0细胞中, 为每个产品创建3个稳定池。从转染后第8天起监测稳定池的细胞生长和蛋白A滴度。一旦培养物在70%活力下达到 0.6×10^6 个细胞/mL的阈值, 即对稳定池进行传代。当细胞的活力超过97%时, 使用测试池中最高产量的池以 0.2×10^6 个细胞/mL为每个产品接种600mL补料分批过度生长培养物(FOG)。FOG培养物在第4天和第8天补料, 并在第11天通过离心收获并过滤除菌。在AKTA纯化器上串联使用3x5ml MabSelectSuRE柱(以10mL/min运行), 通过蛋白A纯化来纯化无菌细胞培养上清液。柱子用50mM磷酸钠、250mM氯化钠(pH 7.0)平衡, 用50mM磷酸钠和1M氯化钠(pH 7.0)洗涤, 并用10mM甲酸钠(pH 3.5)洗脱。通过用2x PBS以1:2稀释来中和洗脱的级分, 然后使用稀释的NaOH将pH调节至7.4。

[0389] 通过SE-HPLC和SDS-PAGE分析抗体。使用Zorbax GF-2509.4mm ID x 25cm柱(Agilent), 通过SE-HPLC分析重复样品。将80 μ l等份的1mg/ml样品注射并在50mM磷酸钠、150mM氯化钠、500mM L-精氨酸(pH6.0)中以1ml/min运行15分钟。所有变体均显示<16.89%的小峰, 保留时间约为7.66分钟, 与可溶性聚集体一致。使用Empower v3软件分析可溶性聚集体水平。

[0390] 表9示出了测试的抗TfR抗体的构建体设计和HPLC分析。

抗体名称	HC 名称	LC 名称	保留时间 (Min)	%单体
13E4-变体2i	13E_VH2_a	13E4_VL1	8.315	95.44
13E4-变体2ii	13E_VH2_b	13E4_VL1	8.326	95.86
13E4-变体2iii	13E_VH2_c	13E4_VL1	8.324	95.85
13E4-变体9i	13E_VH1_a	13E4_VL3	8.337	94.40
13E4-变体9ii	13E_VH1_b	13E4_VL3	8.347	94.62
13E4-变体9iii	13E_VH1_c	13E4_VL3	8.324	96.28
13E4-变体15i	13E_VH3_a	13E4_VL4	8.311	83.11
13E4-变体15ii	13E_VH3_b	13E4_VL4	8.316	87.39
13E4-变体15iii	13E_VH3_c	13E4_VL4	8.311	88.50

[0391] 表征了九种示例性人源化抗TfR抗体和亲本嵌合抗体的结合动力学。使用以蛋白A包被以供mAb捕获的GLM传感器芯片,在BioRad ProteOn XPR36光学生物传感器上进行研究。运行缓冲液包括10mM HEPES,150mM NaCl,pH 7.4,含有0.05%吐温-20和0.2mg/ml BSA。在25摄氏度下收集数据。所有mAb都根据提供的储备浓度在运行缓冲液中稀释至2ug/ml。然后在蛋白A表面上各自捕获40秒。

[0392] 将hTfR (100ug) 溶解在300uL水中以产生4.3uM的储备浓度。将hTfR稀释至43nM作为最高浓度,并在3倍稀释系列中进行测试。hTfR以200ul/min注射2分钟,随后是一小时的解离阶段。

[0393] 通过从内点参考表面中减去数据来处理响应数据,并且使用缓冲液注射进行双重参考。

[0394] 表10示出了在25°C下测定的结合常数。

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (μM)
13E4_WT 第 1	1.0608(2)*e6	3.7(2)e-7	0.35(1)
13E4_WT 第 2	9.03(1)e5	1.50(2)e-6	1.66(1)
13E4_WT 第 3	8.402(9)e5	1.18(2)e-6	1.40(1)
(n=3)	9[1]**e5	1.0[6]e-6	1.1[7]
13E4_变体 2-i	9.132(1)e5	3.9(2)e-7	0.43(1)
13E4_变体 2-ii	8.801(1)e5	4.3(2)e-7	0.49(1)
13E4_变体 2-iii	8.623(1)e5	8.2(2)e-7	0.95(1)
13E4_变体 9-i	8.427(2)e5	1.02(2)e-6	1.21(2)
13E4_变体 9-ii	7.843(2)e5	1.81(3)e-6	2.31(1)
13E4_变体 9-iii	7.913(8)e5	4.17(2)e-6	5.27(1)
13E4_变体 15-i	7.205(7)e5	6.13(2)e-6	8.51(1)
13E4_变体 15-ii	6.966(8)e5	9.14(3)e-6	13.1(1)
13E4_变体 15-iii	6.947(9)e5	6.94(3)e-6	9.99(1)

*圆括号中的数字代表基于数据集拟合的最后报告数字的标准误差。

**方括号中的数字代表基于重复数据集的实验标准偏差。

例如,9[1]e5代表 $(9 \pm 1) e5$ 。

实施例2

[0395] 使用hIgG2 TfR1嵌合抗体siRNA (SSB) 缀合物进行的体内基因下调

[0396] 将针对hTfR1的小鼠IgG2抗体的CDR亚克隆到人IgG2背景中,并转染到CHO-K1SP细胞中,序列参见实施例4。选择、扩增稳定的细胞池,并使用Wave Bioreactor (GE Healthcare),在37°C和5%CO₂下,将其接种在细胞袋(cellbags) (GE Healthcare)中的Dynamis培养基(GIBCO)中。从第4天开始,每两天以最终培养物体积(25升)的8%补料,共培养14天。收集培养上清液,深度过滤,并使用Monofinity A Resin (GenScript)以30ml/min的流速进行纯化。将洗脱蛋白质的缓冲液更换为PBS,通过还原和非还原条件下的SDS-PAGE和SEC-HPLC分析纯化的蛋白质的分子量和纯度。最终的蛋白质纯度>98%。

[0397] 使用双马来酰亚胺 (BisMal) 连接体将TfR1-IgG2 mAb嵌合体与SSB siRNA缀合

[0398] 对于本实验中使用的缀合物,使用SSB siRNA双链体。21聚体SSB指导/反义链的序列是(5'到3')UUACAUUAAGUCUGUUGUUU。单链使用标准亚磷酸胺化学在固相上完全组装,并使用HPLC纯化。使用RNAi领域中充分描述的碱基、糖和磷酸修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。siRNA过客链在5'端含有C6-NH₂缀合柄,参见图1。siRNA双链体被设计为具有19个碱基的互补性和一个3'二核苷酸突出端的平端双链体。缀合柄通过末端碱基上的磷酸二酯连接到siRNA过客链,参见图2。

[0399] 步骤1:用TCEP还原抗体

[0400] 用含有1mM DTPA的25mM硼酸盐缓冲液(pH 8)对抗体进行缓冲液交换,并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液中加入在相同硼酸盐缓冲液中的4当量TCEP,并在37°C下孵育2小时。在室温(RT)下,将所得反应混合物与BisMal-siRNA(1.25当量)在pH 6.0的10mM乙酸盐

缓冲液中的溶液合并,并在4℃下保持过夜。通过分析型SAX柱色谱法对反应混合物的分析显示了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。将反应混合物用10EQ的N-乙基马来酰亚胺(在DMSO中为10mg/mL)处理,以对任何剩余的游离半胱氨酸残基进行加帽。

[0401] 步骤2:纯化

[0402] 使用阴离子交换色谱(SAX)方法-1,通过AKTA Pure FPLC纯化粗反应混合物。分离含有DAR1抗体-siRNA缀合物的级分,浓缩,并用pH 7.4PBS进行缓冲液交换。

[0403] 阴离子交换色谱方法(SAX)-1。

[0404] 柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13µm

[0405] 溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0406] 梯度:

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

[0407] 强阴离子交换色谱(SAX)方法-2

[0408] 柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X 250mm

[0409] 溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:0.75ml/min

[0410] 梯度:

a) 时间	%A	%B
b) .0	90	10
c) 3.00	90	10
d) 11.00	40	60
e) 14.00	40	60
f) 15.00	20	80
g) 16.00	90	10
h) 20.00	90	10

[0411] 使用SAX方法-2(表11),通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

缀合物	SAX保留时间(min)	%纯度(根据峰面积)
TfR-SSB DAR 1	9.41	99

[0412] 本实施例中使用的缀合物的分析数据表:以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)和通

过色谱峰面积确定的百分纯度。

[0413] hTfR1-IgG2 mAb siRNA DAR1缀合物的体外活性

[0414] 使用ELISA测定评估hTfR1-IgG2 mAb siRNA缀合物结合人和食蟹猴TfR1的能力。半孔高结合96孔板 (Costar#3690) 用重组人转铁蛋白受体蛋白 (Sino Biological 11020-H07H) 或重组食蟹猴转铁蛋白受体蛋白 (Sino Biological 90253-C07H) 在PBS (Gibco 14190) 中以1ng/ μ L包被,并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。用100 μ L Tris缓冲盐水+吐温 (20x TBST, Cell Signaling 9997S) 洗板四次。将100 μ L Superblock (ThermoFisher PI-37535) 添加到每个孔中,并在室温下孵育1小时。在加入样品之前重复洗涤步骤。以高达10nM的浓度添加样品,50 μ L/孔。将板在室温下再孵育一小时并重复洗涤步骤。第二抗体 (过氧化物酶 AffiniPure山羊抗人IgG, Fc γ 片段特异性, Jackson Immunoresearch, 109-035-098) 在 Superblock中以1:5000稀释,并以50 μ L/孔添加。将板在室温下孵育1小时并再洗涤一次。通过添加50 μ L 1-StepTM Ultra TMB-ELISA (ThermoFisher, 34028), 孵育5分钟,并加入25 μ L 2N硫酸终止溶液 (R&D Systems DY994) 终止反应,来测量结合。在450nm处测量吸光度,减去参考波长570nm。使用具有希尔斜率 (Hill Slope) 的GraphPad Prism特异性结合来确定结合常数。

[0415] 非缀合的和缀合的hTfR1.IgG2 mAb抗体以相似的亲和力结合重组人和食蟹猴TfR1 (图3A-图3B)。

[0416] 在HEL92.1.7和人骨骼肌细胞中监测TfR1.IgG2 mAb-SSB缀合物下调SSB表达的能力。HEL92.1.7细胞 (ATCC®TIB-180TM) 在含有10%胎牛血清 (Nucleus Biologics FBS1824) 的RPMI 1640中培养。将细胞稀释至100,000/mL,并将100 μ L添加到板的每个孔中。将抗体缀合物稀释至最大浓度为100nM。将20 μ L缀合物或作为阴性对照的PBS加入96孔板的孔中,将处理过的细胞置于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下72小时。

[0417] 将无限增殖化的人骨骼肌细胞 (Institute of Myology, Paris) 接种在24孔胶原蛋白板 (Thermo Fisher A1142802) 上的500 μ L骨骼肌细胞生长培养基 (PromoCell C-23260) 中,并在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂中孵育直至成肌细胞变成汇合。此时通过在500 μ L分化培养基 (补充有10ug/ml胰岛素和50 μ g/ml庆大霉素的DMEM (Gibco 10566-016)) 中孵育4天来诱导向肌管的分化。更新培养基并加入在PBS中稀释的50 μ L TfR1.IgG2 mAb-SSB缀合物。将处理过的细胞孵育72小时。对于任一细胞类型的收获和分析,从孔中移除培养基并添加150 μ L Trizol (Ambion15596018)。在分析前将板在-80 $^{\circ}$ C下冷冻过夜或更长时间。使用Direct-zol 96RNA试剂盒按照制造商的说明分离RNA,并通过光谱法进行定量。使用High Capacity cDNA试剂盒 (Thermo Fisher#4368813) 根据制造商的说明逆转录RNA (100-200ng)。使用适当设计的引物和探针,使用TaqManq PCR量化mRNA水平。PPIB (管家基因) 用作内部RNA加载对照。%mRNA使用 $\Delta\Delta$ Ct法来计算,PBS处理的细胞被设置为100%表达。在这些实验中,TfR1.IgG2 mAb-SSB缀合物将SSB下调高达60%,而SSB在用TfR1.IgG2 mAb-MSTN缀合物 (阴性对照) 处理的细胞中最多下调25% (图4A-图4B)。

[0418] hTfR1-IgG2 mAb SSB siRNA缀合物在食蟹猴中的活性和安全性

[0419] 在食蟹猴中评估了hIgG2 TfR1.mAb-siSSB缀合物的PK、PD和安全性特征。动物为雄性,2-3岁,体重2-3kg。通过30分钟 (+/-3分钟) 静脉内 (IV) 输注向动物给予30mg/kg或60mg/kg (mAb浓度) 的缀合物或PBS。如表12中所概述的,在不同时间,分别从受约束的、有意

识的动物的外周静脉或被镇静的动物的腓肠肌和四头肌收集血液样本和肌肉活检物。

[0420] 表12:用hTfR1.IgG2 mAb siRNA缀合物处理的食蟹猴的取样时间表。

时间点 (研究周)	血液学	血清化学	PK	肌肉活检 ^c
适应	1x	1x	-	1x (腓肠肌)
(第-2周)				
适应 (第-1周)	1x	1x	-	1x (腓肠肌)
给药 第1天	1x	1x	3x (5', 4h)	-
第2天	1x	1x	1x	-
第3天			1x	-
第4天	1x	1x	1x	-
第8天	1x	1x	1x	-
第15天	1x	1x	1x	-
第22天	1x	1x	1x	1x (腓肠肌)
第29天	1x	1x	1x	2x (腓肠肌, 四头肌)

[0421] hIgG2 TfR1.mAb-siSSB缀合物的血浆浓度使用茎-环qPCR测定来确定。简言之,将血浆样品直接在TE缓冲液+0.1%v/v Triton X-100中稀释。通过将siRNA掺加到来自未处理的动物的血浆中并然后用TE缓冲液+0.1%v/v Triton X-100进行系列稀释来产生标准曲线。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems),用25nM序列特异性茎-环RT引物对siRNA的反义链进行逆转录。来自RT步骤的cDNA用于使用TaqMan Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)用1.5 μ M正向引物、0.75 μ M反向引物和0.2 μ M探针进行实时PCR。SSB siRNA反义链以及用来对其进行测量的所有引物和探针的序列在表13中示出。在QuantStudio 7Flex Real-Time PCR(Life Technologies)中使用标准循环条件进行定量PCR反应。使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

表13. 茎-环qPCR测定中使用的所有siRNA反义链、引物和探针的序列。

目标	名称	序列(5' - 3')
SSB	反义(指导)	UUACAUUAAAGUCUGUUGUUU
SSB	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC AAACAAC
SSB	正向	GGCGGCTTACATTAAAGTCTGT
SSB	反向	AGTGCAGGGTCCGAG
SSB	探针	(6FAM)-TGGATACGACAAACAA-(NFQ-MGB)

[0422] 缀合物的清除率和半衰期显示在表14中。这些缀合物的PK性质类似于在小鼠中测试的小鼠抗转铁蛋白mAb缀合物。

表14:在食蟹猴(n=3)中通过30分钟输注以30和60mg/kg给药后,hTfR1.IgG2 mAb-SSB缀合物的PK参数估计。

AOC	剂量 (mg/kg)	AUC _{0-29d}	剂量	CL	CL	alpha t _{1/2}	beta t _{1/2}
		(mg/mL)*min	mg/kg	mL/min/kg	uL/min/kg	h	h
hTfR1.IgG2 mAb-SSB (DAR1)	3	82.89	3	0.036	36	12.9	230
hTfR1.IgG2 mAb-SSB (DAR1)	6	155.2	6	0.039	39	13.8	269

[0423] 为了评估肌肉中的siRNA浓度和缀合物的活性,根据表12中所示的时间表获得肌肉活检物(腓肠肌和四头肌)。肌肉活检物通过6mm冲头获取,称重,并在液氮中速冻。将冷冻的组织样品在1ml冷TRIZOL(供应商)中均质化。为了确定mRNA敲减,使用Direct-zol 96RNA试剂盒按照制造商的说明从组织中提取总RNA,并通过光谱法进行定量。使用High Capacity cDNA试剂盒(Thermo Fisher#4368813)根据制造商的说明逆转录RNA(100-200ng)。使用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR量化SSB mRNA水平。PPIB(管家基因)用作内部RNA加载对照。%mRNA使用 $\Delta\Delta Ct$ 法来计算,相同动物治疗前的SSB mRNA水平或用PBS处理的动物中的SSB水平被设置为100%表达。

[0424] 使用茎-环qPCR测定来确定组织siRNA浓度的定量。简言之,使用基于TissueLyser II板的匀浆器(Qiagen)在500uL Trizol中对15-50mg组织片进行均质化,然后在TE缓冲液+0.1%v/v Triton X-100中稀释。标准曲线是通过将siRNA掺加到来自未治疗动物的均质化组织中,然后用TE缓冲液+0.1%v/v Triton X-100连续稀释而生成的。siRNA的反义链使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)和25nM序列特异性茎-环RT引物进行逆转录。来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,其中使用TaqMan Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)和1.5 μ M正向引物、0.75 μ M反向引物和0.2 μ M探针。SSB siRNA反义链以及用于对其进行测量的所有引物和探针的序列都显示在表13中。在QuantStudio 7Flex实时PCR系统(Life Technologies)中使用标准循环条件进行定量PCR反应。使用由标准曲线推导出的线性方程将Ct值转换为血浆或组织浓度。

[0425] 用缀合物治疗食蟹猴导致腓肠肌中的SSB mRNA下调最高达62%,四头肌中的SSB mRNA下调最高达75%(图5A和图5B)。这些组织中的siRNA浓度是剂量依赖性的,对于30mg/kg和60mg/kg剂量,分别为0.6-1.9nM和2.0-6.5nM。当在给药后21或28天探测时,缀合物的活性和组织中的siRNA浓度是相似的。这些结果表明,所选的TfR1抗体可以有效地将siRNA递送到灵长类动物的肌肉组织中,并且转铁蛋白受体靶向AOC的活性在物种之间翻译。

[0426] 为了监测所选抗hTfR1抗体在灵长类动物中的安全性,根据表x中所示的时间表分析血液学和临床化学。除了网织红细胞的剂量依赖性但短暂的消耗(图6)外,直到给药后28天,没有观察到对任何血液学或临床化学参数有治疗相关的影响。观察到的网织红细胞的短暂下调已被描述为TfR1抗体的副作用。具有完整效应子功能或补体结合能力的鼠TfR1抗体已被证明会严重消耗表达TfR的网织红细胞(Daniels-Wells等人,“Transferrin receptor 1:a target for antibody-mediated cancer therapy,”*Immunotherapy* 8(9):991-994(2016))。由于在灵长类动物中,表达高TfR1水平的网织红细胞的比率很低,因此网织红细胞的消耗只是短暂的,而且不如啮齿类动物中明显。重要的是,其他人的研究表明,通过消除抗体的ADCC/CDC活性的突变可以成功地抑制这种活性(WO 2014/189973 A2)。

实施例3

[0427] 人/食蟹猴交叉反应性抗TfR1抗体的生成、表征和人源化

[0428] 使用本领域中充分描述的现代计算机抗体人源化和去免疫程序,设计了在实施例1中的NHP研究中测试的嵌合抗转铁蛋白1mAb的16种变体,这些变体的序列参见表XYZ。作为设计的一部分,通过鉴别高风险翻译后修饰(PTM)对可制备性进行了评估,并在可行的情况下,通过氨基酸置换去除它们作为人源化活动的一部分。还进行了免疫原性风险评估,以鉴定并在可行的情况下去除高风险表位。还将突变引入变体的Fc结构域中以去除效应子功能(ADCC和CDC)。然后使用本领域充分描述的技术,在哺乳动物细胞培养物中表达这16种变体,并使用基于蛋白A树脂的亲色谱法进行纯化。然后对mAb变体进行充分表征,并如下所述制备siRNA缀合物。

[0429] 人和食蟹猴TfR1 ELISA测定

[0430] 这些测定的目标是验证16种变异人抗TfR1抗体与人和食蟹猴TfR1均结合。人或食蟹猴转铁蛋白受体ELISA测定方案描述如下:

[0431] 半孔高结合96孔板(Costar#3690)用重组人转铁蛋白受体蛋白(Sino Biological 11020-H07H)或重组食蟹猴转铁蛋白受体蛋白(Sino Biological 90253-C07H)在PBS(Gibco 14190)中以1ng/ μ L包被,并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。用100 μ L Tris缓冲盐水+吐温(20x TBST,Cell Signaling 9997S)洗板四次。将100 μ L Superblock(ThermoFisher PI-37535)添加到每个孔中,并在室温下孵育1小时。在加入样品之前重复洗涤步骤。以高达10nM的浓度添加样品,50 μ L/孔。将板在室温下再孵育一小时并重复洗涤步骤。第二抗体(过氧化物酶AffiniPure山羊抗人IgG,Fc γ 片段特异性,Jackson Immunoresearch,109-035-098)在Superblock中以1:5000稀释,并以50 μ L/孔添加。将板在室温下孵育1小时并再洗涤一次。通过添加50 μ L 1-StepTM Ultra TMB-ELISA(ThermoFisher,34028),孵育5分钟,并加入25 μ L 2N硫酸终止溶液(R&D Systems DY994)终止反应,来测量结合。在450nm处测量吸光度,减去参考波长570nm。使用具有希尔斜率(Hill Slope)的GraphPad Prism特异性结合来确定结合常数。

[0432] 图7和图8分别示出了与食蟹猴CD71和人CD71的结合结果。

[0433] Tf-TfR阻断性ELISA测定

[0434] 该测定的目标是验证TfR抗体在全转铁蛋白的存在下与TfR结合。

[0435] 使用50倍摩尔过量的EZ-Link No weigh NHS-Biotin(Thermo Scientific A39256),按照制造商的说明对抗体进行生物素化。半孔高结合96孔板(Costar#3690)在4 $^{\circ}$ C下用500ng/mL纯化的人全转铁蛋白(R&D Systems 2914-HT)在PBS中包被过夜。为了比较,将板直接用hTfR包被。用100 μ L Tris缓冲盐水+吐温(20x TBST,Cell Signaling9997S)洗板四次。将100 μ L Superblock(ThermoFisher PI-37535)添加到每个孔中,并在室温下孵育1小时。在将hTfR(25 μ l中200ng/mL)添加到转铁蛋白板或将Superblock添加到hTfR板之前,重复洗涤步骤,并孵育30分钟。将生物素化的抗体稀释至20nM以获得高浓度,并以3倍系列稀释添加到板中。将25 μ l/孔添加到板中已有的25 μ l中。将板孵育1小时,并重复洗涤步骤。按照包装插页上推荐的稀释度添加链霉亲和素-HRP(R&D Systems DY998),并进行最后的洗涤步骤。通过添加50 μ L 1-StepTM Ultra TMB-ELISA(ThermoFisher,34028),孵育5分钟,并加入25 μ L 2N硫酸终止溶液(R&D Systems DY994)终止反应,来测量结合。在450nm处测量吸光度,减去参考波长570nm。使用具有希尔斜率(Hill Slope)的GraphPad Prism特异性结

合来确定结合常数。相对于已知与转铁蛋白具有重叠表位的市售抗体 (AF2474, R&D Systems), 考虑在存在与不存在转铁蛋白的情况下抗体结合常数的变化。参见图9A-图9B。

[0436] HFE-TfR结合ELISA测定

[0437] 该测定的目标是验证当TfR与HFE结合时TfR抗体保持结合。

[0438] 该测定按照与存在转铁蛋白时的TfR结合相同的方法进行, 其中转铁蛋白被替换为辅因子HFE (遗传性血色病蛋白, mybiosource.com, MBS953891)。参见图10A-图10B。

[0439] Fc γ RIIIA (CD16a) ELISA

[0440] 该测定的目标是通过测量与Fc γ RIIIA (CD16a) 基因型V158的结合来确定抗体的ADCC活性的潜力。半孔高结合96孔板 (Costar#3690) 用重组CD16a蛋白 (Sino Biological 10389-H27H1) 在PBS (Gibco 14190) 中以2ng/ μ L包被, 并在4°C下孵育过夜。用100 μ L Tris缓冲盐水+吐温 (20x TBST, Cell Signaling 9997S) 洗板四次。将100 μ L Superblock (ThermoFisher PI-37535) 添加到每个孔中, 并在室温下孵育1小时。在加入样品之前重复洗涤步骤。以高达1 μ M的浓度添加样品, 50 μ L/孔。将板在室温下再孵育一小时并重复洗涤步骤。第二抗体 (过氧化物酶AffiniPure山羊抗人IgG, Fc γ 片段特异性, Jackson Immunoresearch, 109-035-098) 在Superblock中以1:5000稀释, 并以50 μ L/孔添加。将板在室温下孵育1小时并再洗涤一次。通过添加50 μ L 1-StepTM Ultra TMB-ELISA (ThermoFisher, 34028), 孵育5分钟, 并加入25 μ L 2N硫酸终止溶液 (R&D Systems DY994) 终止反应, 来测量结合。在450nm处测量吸光度, 减去参考波长570nm。使用具有希尔斜率 (Hill Slope) 的GraphPad Prism特异性结合来确定结合常数。参见图11。

[0441] 在HEL92.1.7细胞中的体外效力测定

[0442] 该测定的目标是证明TfR mRNA缀合物能够递送siRNA和基因特异性下调。mAb变体与活性siRNA (SSB) 或乱序对照 (Scr) 缀合。HEL92.1.7细胞系 (ATCC®TIB-180TM) 在含有10%胎牛血清 (Nucleus Biologics FBS1824) 的RPMI1640 (Gibco A10491) 中培养。将抗体-siRNA缀合物稀释至100nM的最大剂量。将20 μ L缀合物加入96孔板的孔中。将20 μ L PBS添加到一些孔中作为额外的阴性对照。将细胞稀释至100,000/mL, 并向板的每个孔中加入100 μ L。将细胞置于37°C和5%CO₂下72小时。从孔中除去培养基并加入150 μ L Trizol (Ambion 15596018)。在分析前将板在-80°C下冷冻过夜或更长时间。使用Direct-zol 96RNA分离试剂盒 (Zymo Research R2056) 按照制造商的说明分离RNA。使用High Capacity cDNA试剂盒 (Applied biosystems 4368814), 根据制造商的说明逆转录RNA, 并使用Taqman Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems 4444558) 以及SSB和PPIB Taqman探针组 (ThermoFisher Hs04187362_g1和Hs00168719_m1) 进行qPCR。%mRNA使用 $\Delta\Delta$ Ct法来计算, PBS处理的细胞被设置为100%表达。

[0443] 如实施例2所述制备并表征含有活性siRNA (SSB) 或非活性或乱序siRNA (Scr) 的DAR1缀合物。对于这些缀合物, SSB siRNA含有在核糖2' 羟基上的过客链的位置11处缀合的Cy5荧光标签。这在固相合成过程中引入, 不抑制指导链的活性, 但允许进行摄取测定。缀合物的纯度通过分析型HPLC使用阴离子交换色谱法-2进行评估, 色谱保留时间和纯度在以下表15中描述。

表15

缀合物	SAX保留时间 (min)	%纯度 (根据峰面积)
-----	---------------	-------------

hIgG1 TfrVar2i-SSB DAR 1	9.106	98.2
hIgG1 Tfr-Var2i-Scr DAR 1	8.905	98.0
hIgG1 Tfr-Var2ii-SSB DAR 1	9.059	98.3
hIgG1 Tfr-Var2ii-Scr DAR 1	8.863	98.4
hIgG1 Tfr-Var2iii-SSB DAR 1	9.069	98.2
hIgG1 Tfr-Var2iii-Scr DAR 1	8.871	98.5
hIgG1 Tfr-Var9i-SSB DAR 1	9.066	98.4
hIgG1 Tfr-Var9i-Scr DAR 1	8.867	98.5
hIgG1 Tfr-Var9ii-SSB DAR 1	9.048	98.6
hIgG1 Tfr-Var9ii-Scr DAR 1	8.855	98.8
hIgG1 Tfr-Var9iii-SSB DAR 1	9.069	98.6
hIgG1 Tfr-Var9iii-Scr DAR 1	8.862	99.0
hIgG1 Tfr-Var15i-SSB DAR 1	9.097	98.8
hIgG1 Tfr-Var15i-Scr DAR 1	8.892	98.6
hIgG1 Tfr-Var15ii-SSB DAR 1	9.082	98.2
hIgG1 Tfr-Var15ii-Scr DAR 1	8.882	98.8
hIgG1 Tfr-Var15iii-SSB DAR 1	9.078	98.3
hIgG1 Tfr-Var15iii-Scr DAR 1	8.877	98.6
hIgG1 Tfr-WT-SSB DAR 1	9.045	98.6
hIgG1 Tfr-WT-ScrDAR 1	8.847	98.9

[0444] 本实施例中使用的缀合物的分析数据表:以分钟为单位的HPLC保留时间(RT)和通过色谱峰面积确定的百分纯度。

[0445] PBMC中由Tfr1抗体和抗体siRNA缀合物(ASC)介导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)

[0446] 在小鼠和非人灵长类动物(NHP)中的研究表明,具有效应子功能和/或补体结合能力的结合鼠/食蟹猴Tfr的抗体选择性地消耗表达Tfr的网织红细胞。为了确定变体是否具有效应子功能,使用来自健康人类供体的外周血单核细胞(PBMC)作为效应细胞进行ADCC测定。

[0447] 材料:

[0448] 来自BUYPBMC.COM的PBMC(批号2010113378)具有强ADCC活性。

[0449] 靶细胞:HEL-92.1.7(ATCC,#TIB-180);HEL(#JCRB0062)

[0450] 细胞毒性LDH试剂盒,Pierce(ThermoFisher),#88953

[0451] 含有10%热灭活FBS(56°C下30分钟)和2%L-谷氨酰胺的含血清组织培养基(完全培养基)RPMI 1640(Life Technologies)

[0452] hIgG1 mAb变体

[0453] 程序:

[0454] 在37°C水浴中轻轻搅拌解冻PBMC细胞。解冻后,在30秒内逐滴向小瓶中加入1mL温培养基,从而让细胞适应环境的变化。将细胞缓慢添加到含有9mL温培养基的15或50mL锥形管中。用1mL含有细胞的培养基冲洗原始小瓶,以回收可能粘附在侧壁上的细胞;将冲洗介质添加到锥形管中。通过以350x g离心8-12分钟使细胞沉淀。丢弃上清液。通过轻轻敲击

(避免过度的剪切力)重新悬浮细胞沉淀物。通过向锥形管中加入10mL温培养基,再次冲洗细胞。通过以350x g离心8-12分钟使细胞沉淀。丢弃第二次洗涤的上清液。通过轻轻敲击(避免过度的剪切力)重新悬浮细胞沉淀物。根据需要在10mL温培养基中重新悬浮细胞。在37°C下在T75中孵育过夜以使细胞适应。

[0455] 收获靶细胞HEL-92,并用冷测定介质洗涤2x;确保高活力。在冰上在96孔圆底板中,以 4×10^4 /孔,在冷50 μ l (8×10^5)测定介质(含有1%BSA和100单位/mL青霉素和链霉素的RPMI-1640)中接种靶细胞。如下表所示,将测试和对照抗体/ASC(10 μ l)的稀释液(6x,从10 μ g/ml开始)添加到含有靶细胞的板中,然后在冰上孵育30分钟以进行调理。将10 μ l培养基添加到对照孔中以保持体积。

[0456] 对照:

[0457] -背景低对照:靶细胞自发LDH释放对照校正靶细胞的自发释放(低对照)。添加与实验孔中使用的相同数目的靶细胞。用培养基将最终体积调整为100 μ L/孔。

[0458] -阳性高对照:在计算中需要靶细胞最大LDH释放对照来确定100%的LDH释放。添加与实验孔中使用的相同数目的靶细胞。最终体积必须为100 μ L/孔(步骤5添加10 μ L的10X裂解缓冲液)。

[0459] -不依赖抗体的细胞毒性(AICC)在含有靶细胞和效应细胞而没有添加抗体的孔中进行测量。

[0460] 以下两个对照用于监测测定条件,ADCC计算不需要。

[0461] -效应细胞自发LDH释放对照校正效应细胞的自发LDH释放。添加与实验孔中使用的不同数目的靶细胞。用培养基将最终体积调整为100 μ L/孔。

[0462] -需要培养基背景对照来校正由可能存在于含血清培养基中的LDH活性引起的影响。将100 μ L培养基添加到一式三份的孔(无细胞)中。

[0463] 在冰上孵育30分钟后,将在50 μ l温测定介质(含有1%BSA和100单位/mL青霉素和链霉素的RPMI-1640)中的 8×10^5 PBMC效应细胞添加到每个孔中,以产生20:1的效应细胞:靶细胞比,将板在37°C下再孵育4小时。

[0464] 在收获上清液前45分钟,将10 μ L裂解缓冲液(10X)添加到靶细胞最大LDH释放对照(阳性对照)和体积校正对照中。将10 μ L的PBS添加到带有细胞、样品和其他对照的背景低对照中。孵育后对板进行离心(350g,10min)。将50 μ l上清液转移到96孔透明平板上,并向每个样品孔中加入50 μ L反应混合物,通过轻轻敲击进行混合。将板在室温下避光孵育30分钟。向每个样品孔中加入50 μ L终止溶液,并通过轻轻敲击进行混合。测量490nm和680nm处的吸光度。为了确定LDH活性,从490nm吸光度值中减去680nm吸光度值(来自仪器的背景信号)。

[0465] 比ADCC活性如下计算:

[0466] $\%ADCC = 100 \times ((A_{490}(\text{样品}) - A_{490}(\text{AICC})) / (A_{490}(\text{高对照}) - A_{490}(\text{低对照})))$

[0467] 结果示于图14中。

[0468] 兔血清中由TfR1抗体和抗体siRNA缀合物(ASC)介导的补体依赖性细胞毒性(ADCC)

[0469] 材料:

[0470] 兔补体,冻干的。用冰冷的蒸馏水重建。轻轻搅拌以确保所有冻干的材料都溶解。重建后一小时内使用。始终将重建的材料放在冰上。如果在1/2稀释时没有完全活性,则丢

弃等分试样。

[0471] 靶细胞:HEL-92.1.7 (ATCC,#TIB-180)

[0472] 活力405/452可固色染料

[0473] 含有10%热灭活FBS (56℃下30分钟) 和2%L-谷氨酰胺的含血清组织培养基(完全培养基) RPMI 1640 (Life Technologies)

[0474] hIgG1变体

[0475] 程序:

[0476] 收获HEL92.1.7靶细胞,并用冷测定介质洗涤两次。在96孔圆底板中,以 5×10^4 /孔,在冷50 μ l (8×10^5) 测定介质(含有1%BSA和100单位/mL青霉素和链霉素的RPMI-1640)中接种细胞。将测试和对照抗体(25 μ l)的稀释液(5x,从100ug/ml开始,最终50ug/ml)添加到含有25 μ l靶细胞的板中,然后在冰上孵育30分钟以进行调理。

[0477] 对照:

[0478] -背景低对照:靶细胞自发LDH释放对照校正靶细胞的自发释放(低对照)。添加与实验孔中使用的相同数目的靶细胞。用培养基将最终体积调整为100 μ L/孔。

[0479] -不依赖抗体的细胞毒性(AICC)在含有靶标和CDC而没有添加抗体的孔中进行测量。

[0480] 孵育30分钟后,向每个孔中加入50 μ l补体,培养基和低对照(使用50 μ l培养基)除外,并将板在37℃下再孵育60分钟。在孵育结束时对板进行离心(350g,10min)。添加稀释的活力405/452染料(在100 μ L染色缓冲液中的0.5 μ L染料)。板在室温下避光放置15分钟。洗涤并固定细胞。进行流动分析以测量死细胞。

[0481] 经CDC活性如下计算:

[0482] %CDC=样品中的%死细胞-细胞中的%死细胞

[0483] 结果在图15中示出。

[0484] 人抗TfR1 IgG1 siRNA缀合物(ASC)向人骨骼肌管中的体外摄取

[0485] 为了监测ASC向肌细胞中的摄取,将原代人类骨骼肌成肌细胞(Thermo Fisher Scientific A11440)接种在24孔胶原蛋白板(Thermo Fisher A1142802)中补充有10%FBS (Nucleus Biologics FBS1824)和1x ITS(Thermo Fisher Scientific 41400045)的1mL DMEM(ATCC 30-2002)中。将细胞在37℃下在5%CO₂中孵育,直到成肌细胞变成汇合。此时,通过在补充有2%马血清(ATCC 30-2040)和1x ITS(Thermo Fisher Scientific 41400045)的1000 μ l 1mL DMEM(ATCC 30-2002)中孵育2天来诱导向肌管的分化。将培养基更换为500 μ l分化培养基,并加入在PBS中稀释的50 μ l TfR1.IgG2 mAb-SSB(Cy5)缀合物至终浓度为1和10nM。将细胞在5%CO₂中于37℃孵育24小时,然后用500 μ l PBS洗涤3次,并使用冻融循环在150 μ l T-PER裂解缓冲液(Thermo Fisher Scientific 78510)中裂解。用75 μ l无核酸酶水稀释75 μ l裂解的细胞,并使用TECAN读板仪测定荧光(Ex 635nm-Em 675nm)。结果以相对于输入的细胞中的荧光来呈现(图16)。

[0486] 人骨骼肌管中由人抗TfR1 IgG1 siRNA缀合物(ASC)介导的体外基因下调

[0487] 为了监测TfR1.mAb-SSB缀合物下调SSB mRNA水平的能力,将原代人骨骼肌成肌细胞(Thermo Fisher Scientific A11440)接种在24孔胶原蛋白板(Thermo Fisher A1142802)中补充有10%FBS(Nucleus Biologics FBS1824)和1x ITS(Thermo Fisher

Scientific 41400045)的1mL DMEM(ATCC 30-2002)中。将细胞在37℃下在5%CO₂中孵育,直到成肌细胞变成汇合。此时,通过在补充有2%马血清(ATCC 30-2040)和1x ITS(Thermo Fisher Scientific 41400045)的1000μl 1mL DMEM(ATCC 30-2002)中孵育2天来诱导向肌管的分化。更新培养基,并加入在PBS中稀释的100ul TfR1.IgG2 mAb-SSB缀合物。将处理过的细胞孵育72小时。为了收获,从孔中移除培养基并添加150uL Trizol(Ambion 15596018)。在分析前将板在-80℃下冷冻过夜或更长时间。使用Direct-zol 96RNA试剂盒按照制造商的说明分离RNA,并通过光谱法进行定量。使用High Capacity cDNA试剂盒(Thermo Fisher#4368813)根据制造商的说明逆转录RNA(100-200ng)。使用适当设计的引物和探针,使用TaqManq PCR量化mRNA水平。PIIB(管家基因)用作内部RNA加载对照。%mRNA使用ΔΔCt法来计算,PBS处理的细胞被设置为100%表达。所有测试的SSB siRNA缀合物都将SSB下调了50%,具有相似的效力(图17)。

实施例4

[0488] hTfR1重链:461aa

[0489] NruI-Kozak序列--人工信号肽-hTfR1 mAb HC可变区-人IgG2恒定区(P01859)--终止密码子—PmlI

[0490] MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWKQRPGQGLEWIGE
INPINGRSNYGERFKTKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAMHYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPL
APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFNGTQTYTCNVDHK
PSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDISEVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

[0491] hTfR1轻链:233aa

[0492] AscI-Kozak序列—人工信号肽-hTfR1 mAb LC可变区-人Ig kappa恒定区(P01834)—终止密码子—FseI

[0493] MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRTSENIYNNLAWYQQKQKSPQLLVYA
ATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGNYYCQHFHWGTPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

实施例5:食蟹猴研究中示例性抗TfR抗体的SSB siRNA敲减

[0494] 测试用示例性抗TfR抗体对食蟹猴的治疗,以确定腓肠肌中SSB mRNA下调的百分比。测试30mg/kg、10mg/kg和3mg/kg的剂量。在给药后21和/或28天探测抗体缀合物的活性。灵长类动物的安全性也通过血液学和临床化学分析进行监测。

实施例6:hIgG1 TfR-Var2ii和hIgG1 TfR-Var9ii的SSB缀合物不影响食蟹猴中的绝对网织红细胞水平

[0495] hIgG1 TfR-Var2ii和hIgG1 TfR-Var9ii是靶向hTfR1的人源化IgG1抗体,其在IgG1重链的铰链区中包含突变,旨在去除效应子功能(LALA+L328R)。与嵌合hIgG2 TfR1抗体相反,hIgG1 TfR-Var2ii和hIgG1 TfR-Var9ii的SSB缀合物在食蟹猴中给药后不降低网织红细胞水平。该结果与其他人的研究一致,这些研究证明,通过消除抗体的ADCC/CDC活性

的突变可以成功地抑制TfR1靶向抗体对未成熟网织红细胞的消耗(WO 2014/189973 A2)。

[0496] 方法:

[0497] 食蟹猴(雄性;2-3岁;体重2-3kg)在第一天通过30分钟(+/-3分钟)静脉内(IV)输注给药。如图18所示,在给药后的不同时间点从受约束的、有意识的动物的外周静脉收集血液样本。

实施例7:hIgG1 TfR-Var2ii Ab和hIgG1 TfR-Var9ii Ab的SSB缀合物下调食蟹猴肌肉中的SSB RNA水平

[0498] 与给药前的SSB mRNA水平相比,单剂量1或6mg/kg(siRNA)的hIgG1 TfR-Var2ii或hIgG1 TfR-Var9ii SSB缀合物在给药后21天将腓肠肌和四头肌中的SSB mRNA水平下调了最高72%(图19)。人源化抗体的活性类似于亲本嵌合IgG2 TfR1抗体的活性。以60mg/kg(这等于6mg/kg AOC剂量)给药的未缀合的TfR-Var2ii Ab未显示出SSB的显著下调。

[0499] 方法:

[0500] 食蟹猴(雄性;2-3岁;体重2-3kg)在第一天通过30分钟(+/-3分钟)静脉内(IV)输注给药。肌肉活检物(腓肠肌和股四头肌)在给药后第-10天和第+21天通过6mm冲头从镇静的动物获取,称重,并在液氮中速冻。将冷冻的组织样品在1ml冷TRIZOL(Thermo Fisher#15596026)中均质化。为了确定mRNA敲减,使用Direct-zol 96RNA试剂盒按照制造商的说明从组织中提取总RNA,并通过光谱法进行定量。使用High Capacity cDNA试剂盒(Thermo Fisher#4368813)根据制造商的说明逆转录RNA(100-200ng)。使用适当设计的引物和探针,使用TaqMan qPCR量化SSB mRNA水平。PPIB(管家基因)用作内部RNA加载对照。%mRNA使用 $\Delta\Delta Ct$ 法来计算,相同动物治疗前的SSB mRNA水平或用PBS处理的动物中的SSB水平被设置为100%表达。

实施例8:AOC介导的SSB敲减是肌肉特异性的,但siRNA递送不是

[0501] 在单次6mg/kg剂量的hIgG1 TfR-Var2ii-SSB后21天,大多数组织表现出10-100nM的SSB siRNA浓度。最高siRNA水平出现在肝脏和肾上腺中(≥ 1000 nM);在脑中最低(2nM)。骨骼肌中的siRNA浓度为3-20nM。尽管siRNA暴露相对较低,但只有骨骼肌和心脏表现出>50%的SSB mRNA水平降低。该结果表明,TfR1靶向抗体递送寡核苷酸有效负载是肌肉特异性的,并由细胞特异性运输途径而非siRNA暴露来驱动。

[0502] 方法:

[0503] 食蟹猴(雄性;2-3岁;体重2-3kg)在第一天通过30分钟(+/-3分钟)静脉内(IV)输注给药。在给药后第21天,通过6mm冲头从镇静的动物获取肌肉活检物(腓肠肌和股四头肌)。所有其他组织样品均在死后30分钟内收集。如上所述处理组织样品并测定SSB mRNA水平(图20B)。如方法部分所述,使用茎-环qPCR测定来确定组织SSB siRNA浓度(图20A)。使用序列特异性茎-环RT引物,采用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒对siRNA的反义链进行逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用由标准曲线得出的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0504] 虽然本文已经示出并描述了本公开的优选实施方案,但对于本领域技术人员明显的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本公开内容的前提下,本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应当理解,在实施本公开时可以采用本文所述本公开的实施方案的各种替代方案。旨在以所附权利要求书限定本公开的范围,并且由此涵盖这些权

利要求范围内的方法和结构及其等同物。

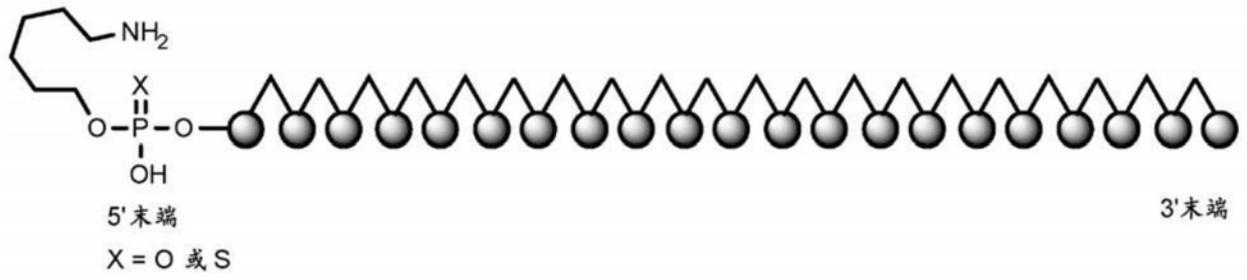


图1

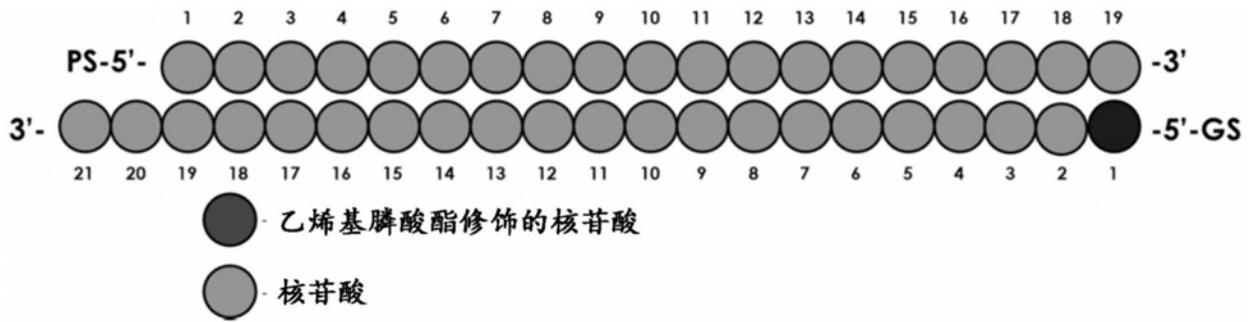
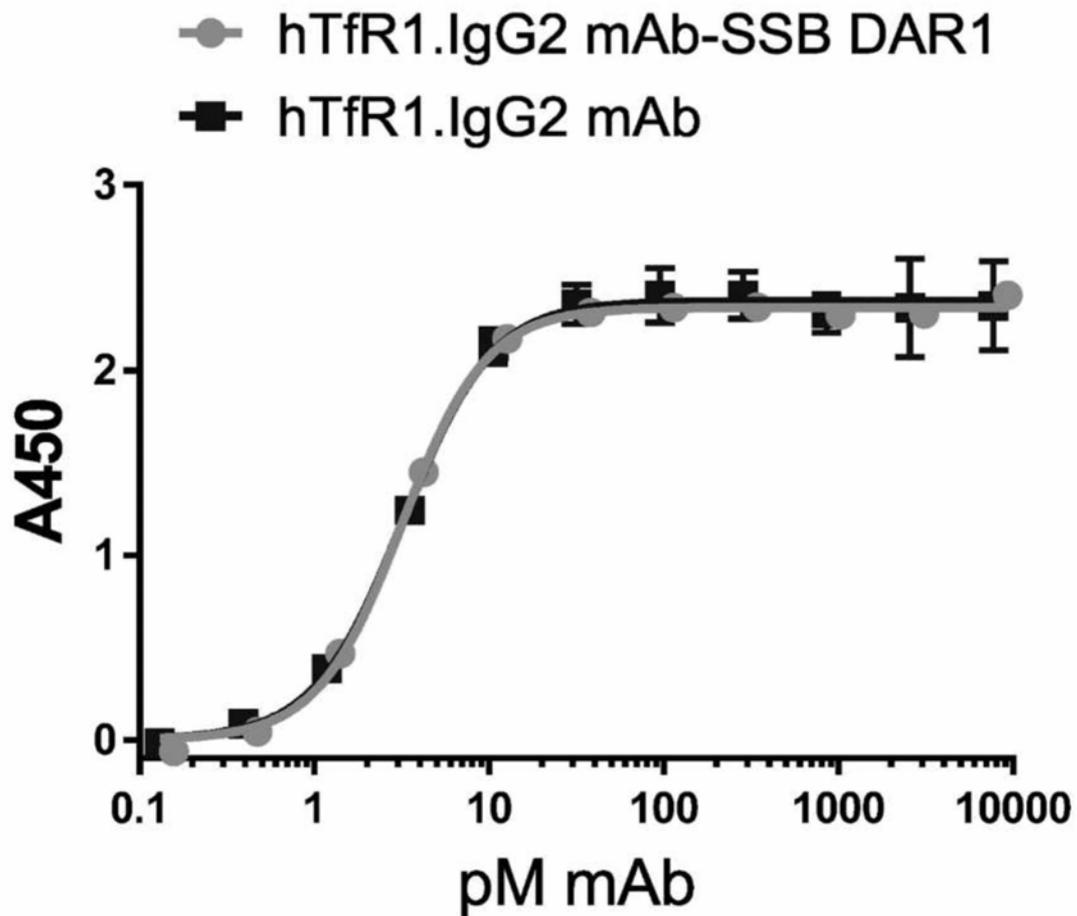


图2

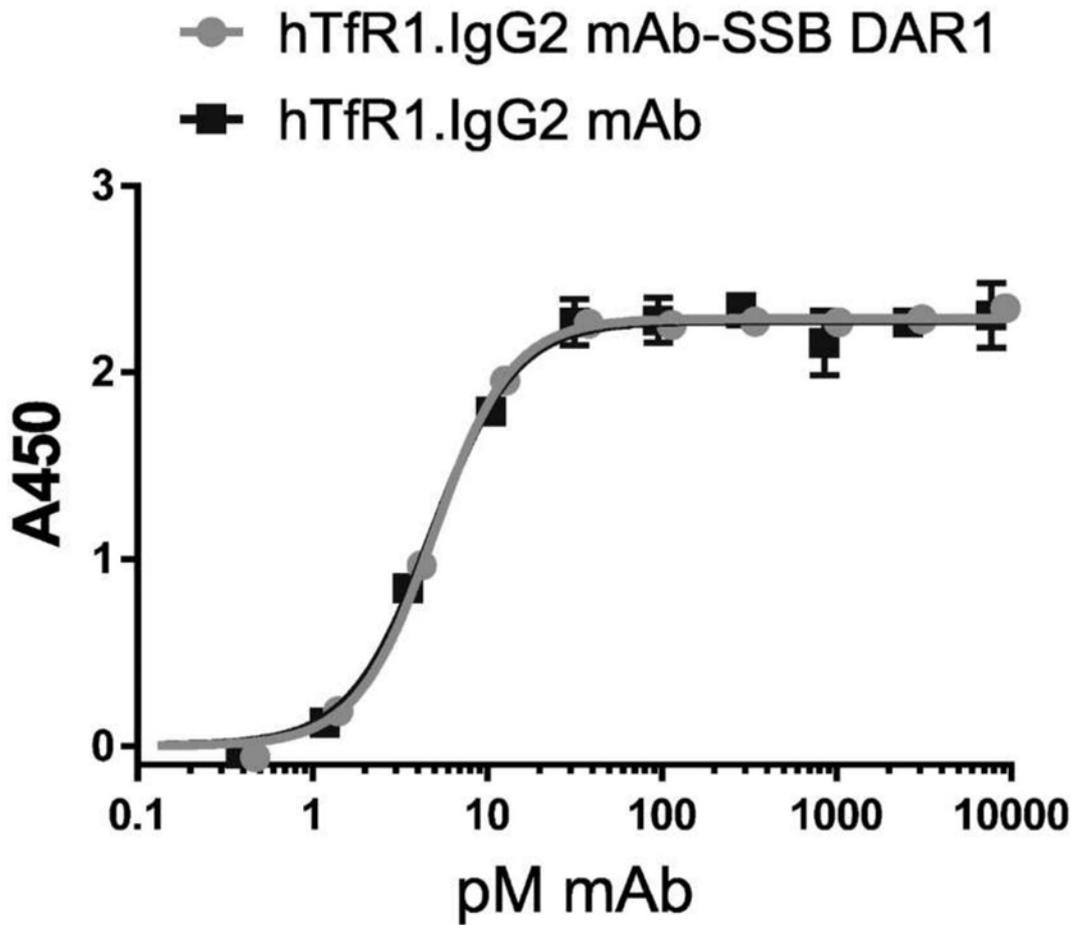
人TfR1



	hTfR1.IgG2 mAb-SSB DAR1	hTfR1.IgG2 mAb
采用希尔斜率的特异性结合		
最佳拟合值		
Bmax	2.339	2.371
h	1.794	1.717
Kd	3.179	3.224

图3A

食蟹猴 CD71



	hTfR1.IgG2 mAb-SSB DAR1	hTfR1.IgG2 mAb
采用希尔斜率的特异性结合		
最佳拟合值		
Bmax	2.283	2.273
h	1.959	1.86
Kd	4.994	4.872

图3B

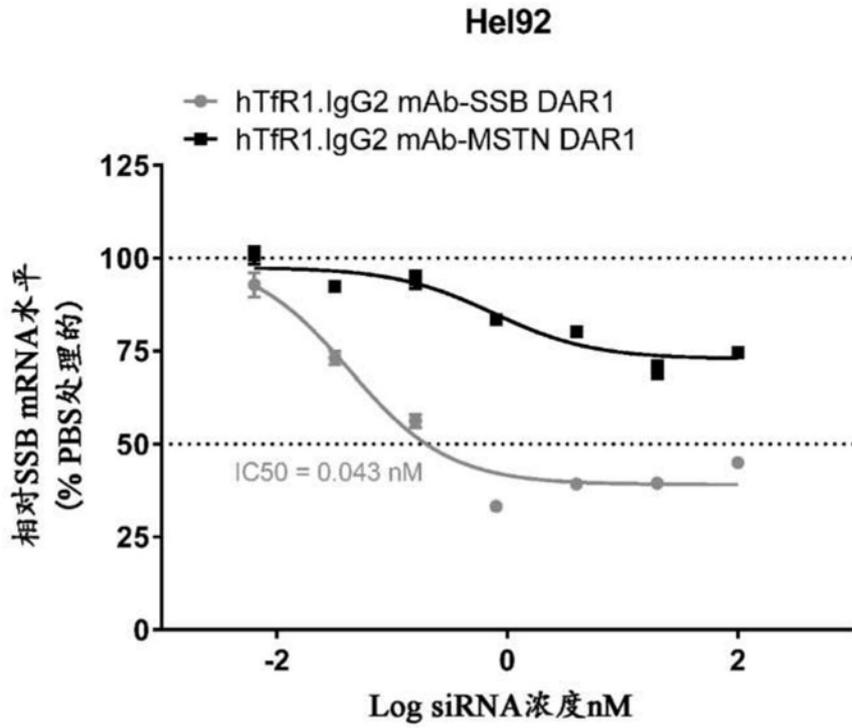


图4A

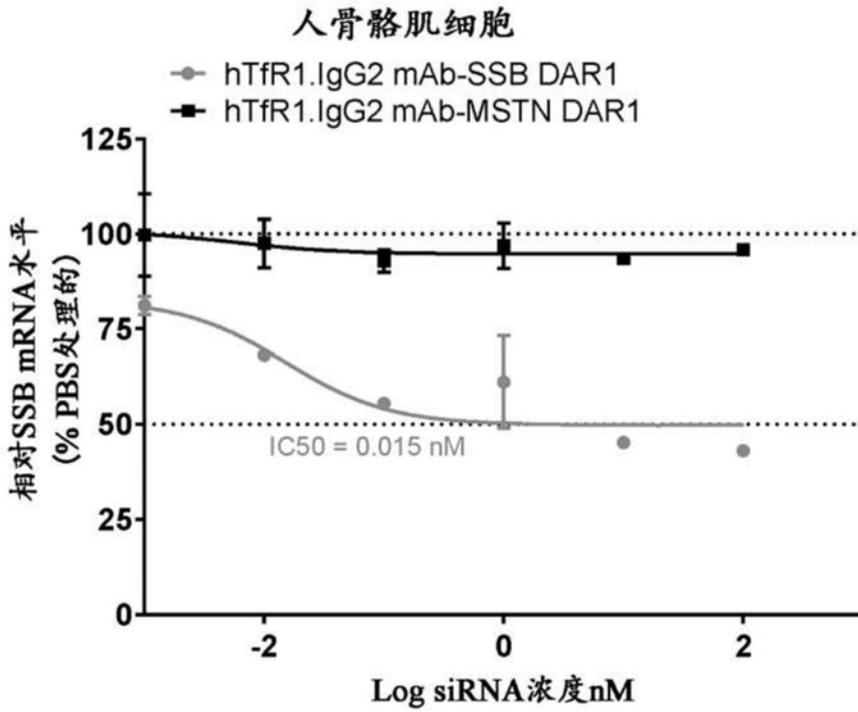


图4B

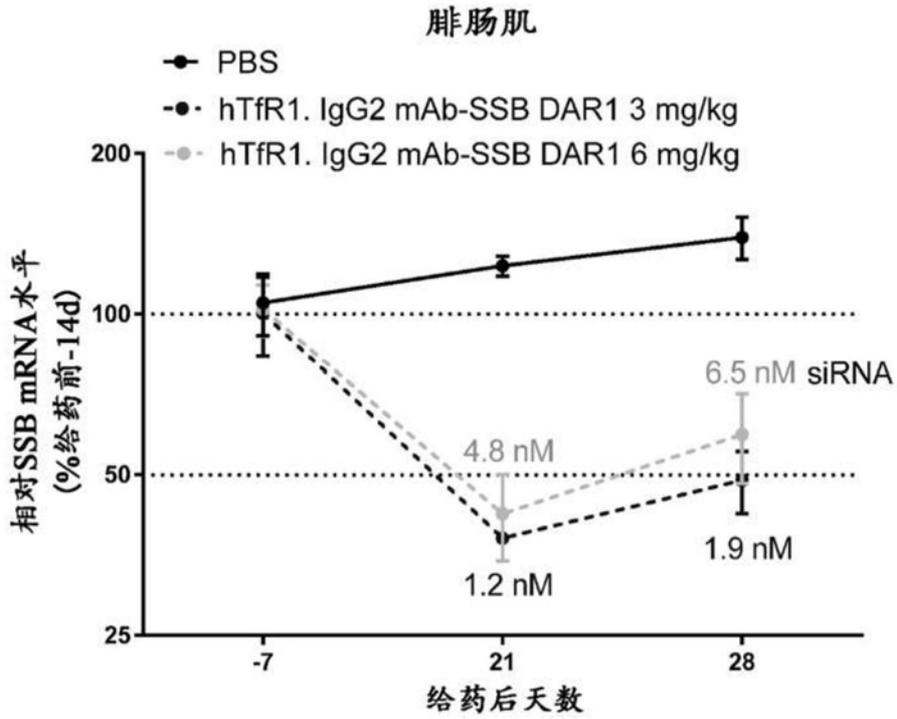


图5A

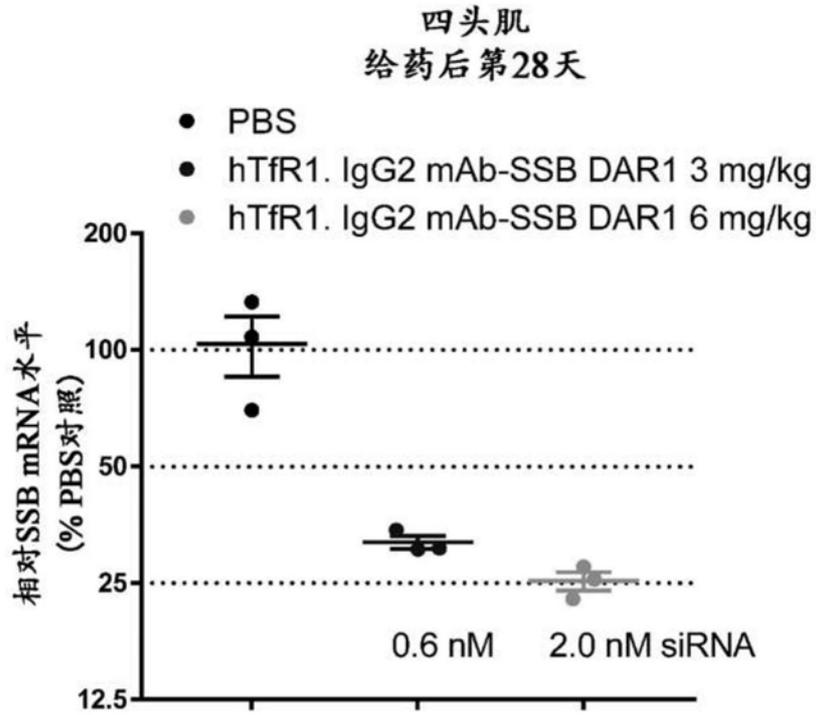


图5B

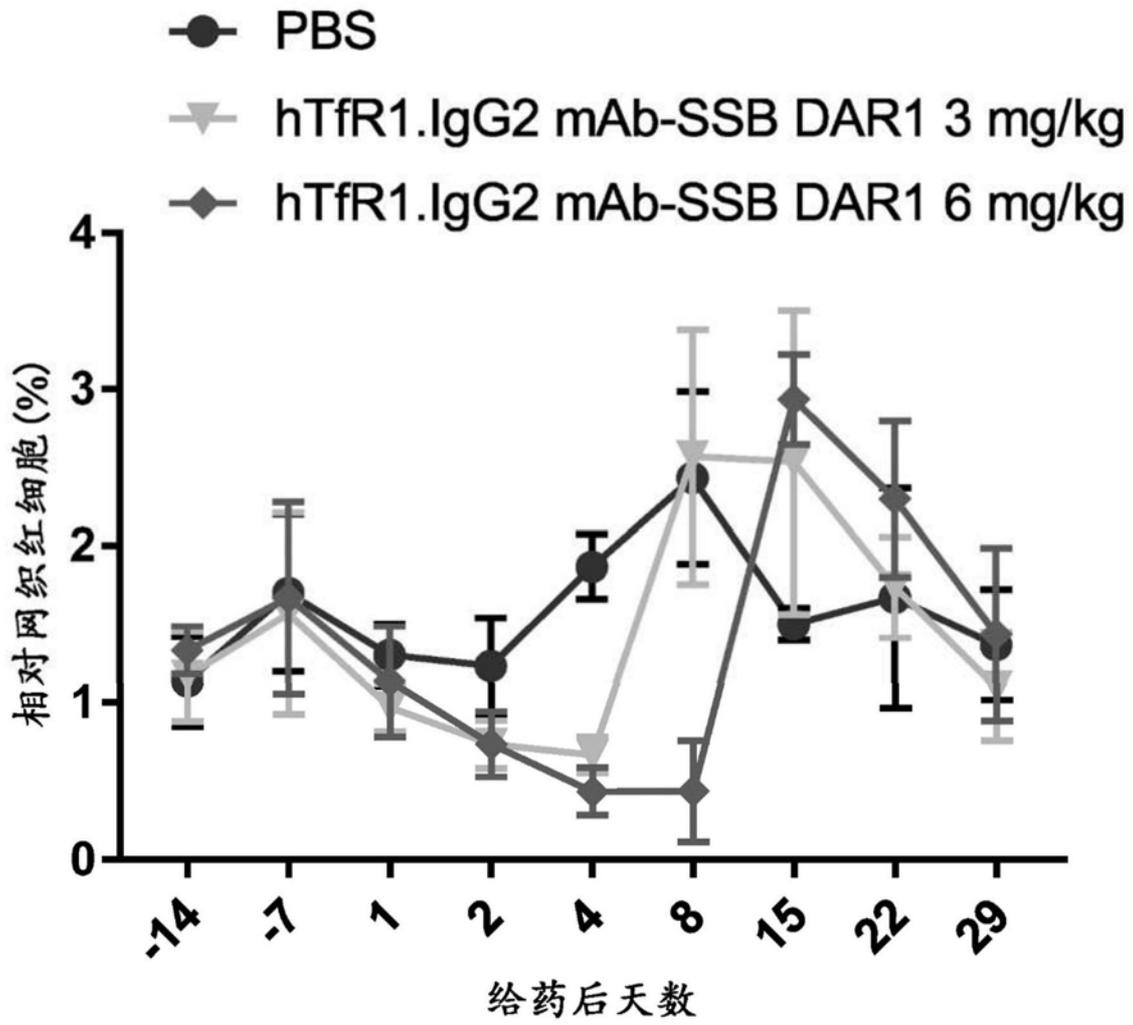
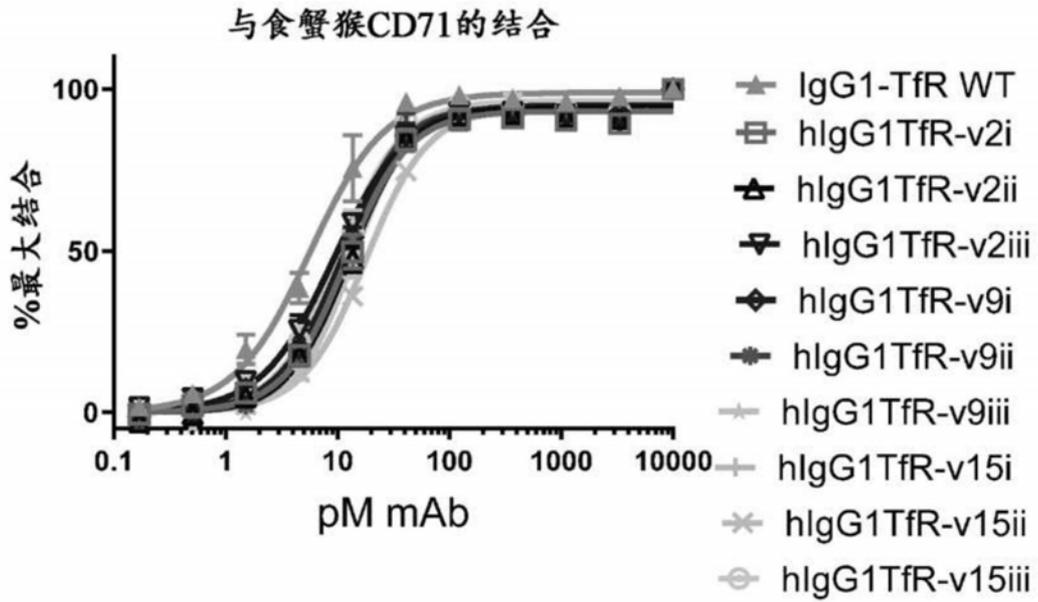
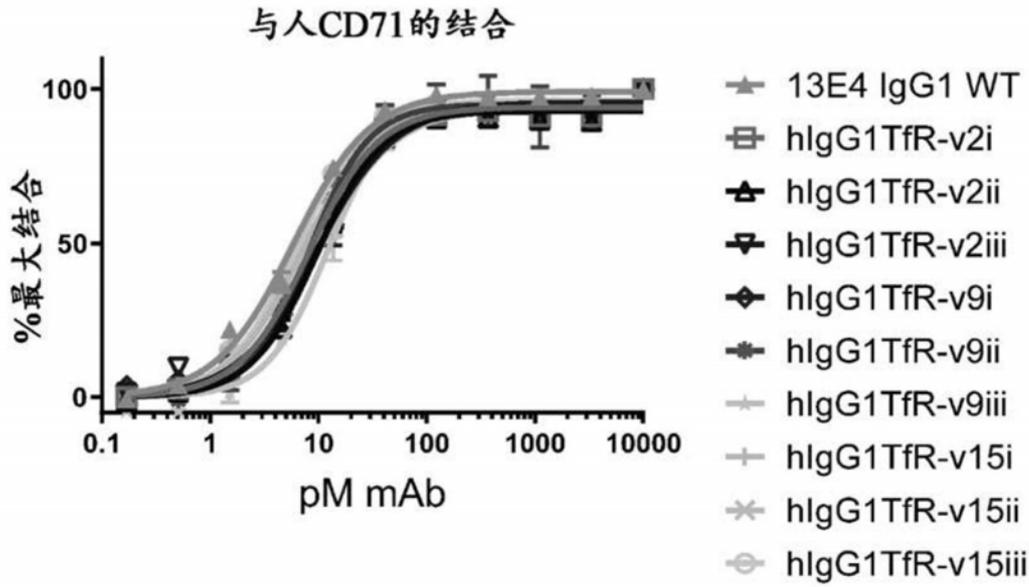


图6



	IgG1-TfR WT	hlgG1TfR-v2i	hlgG1TfR-v2ii	hlgG1TfR-v2iii	hlgG1TfR-v9i
Bmax	99.11	93.14	94.21	94.32	94.96
h	1.339	1.559	1.58	1.349	1.513
Kd	5.819	11.95	12.72	9.2	11.01
	hlgG1TfR-v9ii	hlgG1TfR-v9iii	hlgG1TfR-v15i	hlgG1TfR-v15ii	hlgG1TfR-v15iii
Bmax	94.32	94.02	94.21	94.39	96.37
h	1.743	1.736	1.551	1.535	1.539
Kd	11.37	13.69	12.46	17.95	10.31

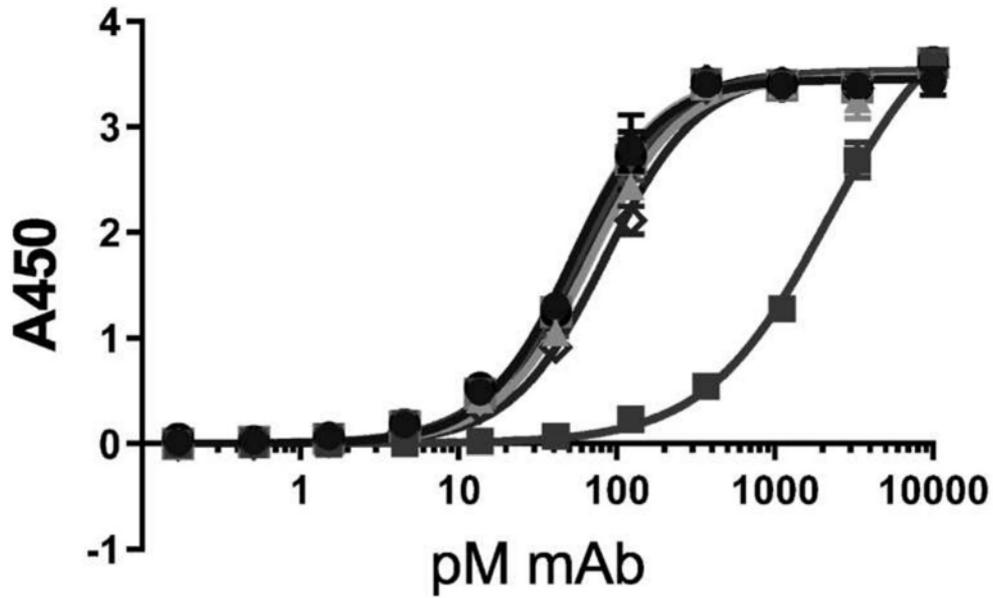
图7



	IgG1-TfR WT	hlgG1TfR-v2i	hlgG1TfR-v2ii	hlgG1TfR-v2iii	hlgG1TfR-v9i
Bmax	98.26	94.18	92.89	95.01	95.74
h	1.181	1.352	1.434	1.202	1.223
Kd	6.196	8.175	9.643	9.578	9.729
	hlgG1TfR-v9ii	hlgG1TfR-v9iii	hlgG1TfR-v15i	hlgG1TfR-v15ii	hlgG1TfR-v15iii
	95.16	93.76	95.31	93.7	96.48
	1.571	1.56	1.291	1.252	1.351
	8.235	11.97	7.127	9.874	6.295

图8

Tf+TfR 结合



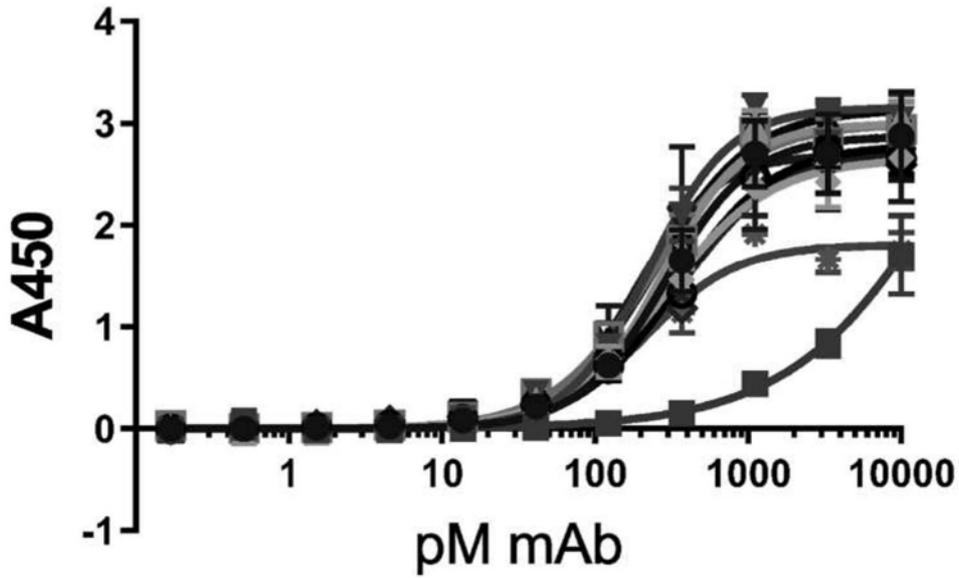
- IgG1 TfR WT
- 阻断 AF2474
- ▲ hlgG1TfR-v2i
- ▼ hlgG1TfR-v2ii
- ◆ hlgG1TfR-v2iii
- ⊖ hlgG1TfR-v9i
- ⊞ hlgG1TfR-v9ii
- ▲ hlgG1TfR-v9iii
- ▼ hlgG1TfR-v15i
- ◆ hlgG1TfR-v15ii
- ⊞ hlgG1TfR-v15iii

图9A

	IgG1 TfR WT	阻断 AF2474	hlgG1TfR-v2i	hlgG1TfR-v2ii	hlgG1TfR-v2iii	hlgG1TfR-v9i
Bmax	3.452	4.258	3.477	3.533	3.474	3.528
h	1.575	1.117	1.487	1.447	1.614	1.451
Kd	51.79	2181	67.76	57.8	52.17	55.95
Kd(Tf+TfR)/Kd(TfR)	3.1	51.8	2.8	2.5	2.1	2.2
	hlgG1TfR-v9ii	hlgG1TfR-v9iii	hlgG1TfR-v15i	hlgG1TfR-v15ii	hlgG1TfR-v15iii	
Bmax	3.509	3.527	3.473	3.523	3.5	
h	1.481	1.491	1.562	1.456	1.516	
Kd	56.99	54.62	61.87	84.94	60.39	
Kd(Tf+TfR)/Kd(TfR)	2.6	2.5	2.9	2.5	2.4	

图9B

HFE+TfR 结合



- IgG1 TfR WT
- 阻断 AF2474
- ★ hlgG1TfR-v2i
- ▼ hlgG1TfR-v2ii
- ◆ hlgG1TfR-v15ii
- ◆ hlgG1TfR-v2iii
- ⊖ hlgG1TfR-v9i
- ⊖ hlgG1TfR-v9ii
- ▲ hlgG1TfR-v9iii
- ▼ hlgG1TfR-v15i
- ◆ hlgG1TfR-v15iii

图10A

HFE+TfR	IgG1 TfR WT	阻断 AF2474	hlgG1TfR-v2i	hlgG1TfR-v2ii	hlgG1TfR-v2iii	hlgG1TfR-v9i
Bmax	2.875	5.703	2.999	3.155	2.658	2.789
h	1.544	0.8004	1.627	1.642	1.261	1.368
Kd	286.4	28940	273.2	227	289.2	340.9
Kd(HFE+TfR)/Kd(TfR)	16.9	687.7	11.1	9.9	11.9	13.6
	hlgG1TfR-v9ii	hlgG1TfR-v9iii	hlgG1TfR-v15i	hlgG1TfR-v15ii	hlgG1TfR-v15iii	
Bmax	2.996	3.136	2.699	2.79	1.811	
h	1.357	1.38	1.653	1.285	1.452	
Kd	229.2	248.2	182.3	346.4	213.5	
Kd(HFE+TfR)/Kd(TfR)	10.4	11.4	8.5	10.2	8.5	

图10B

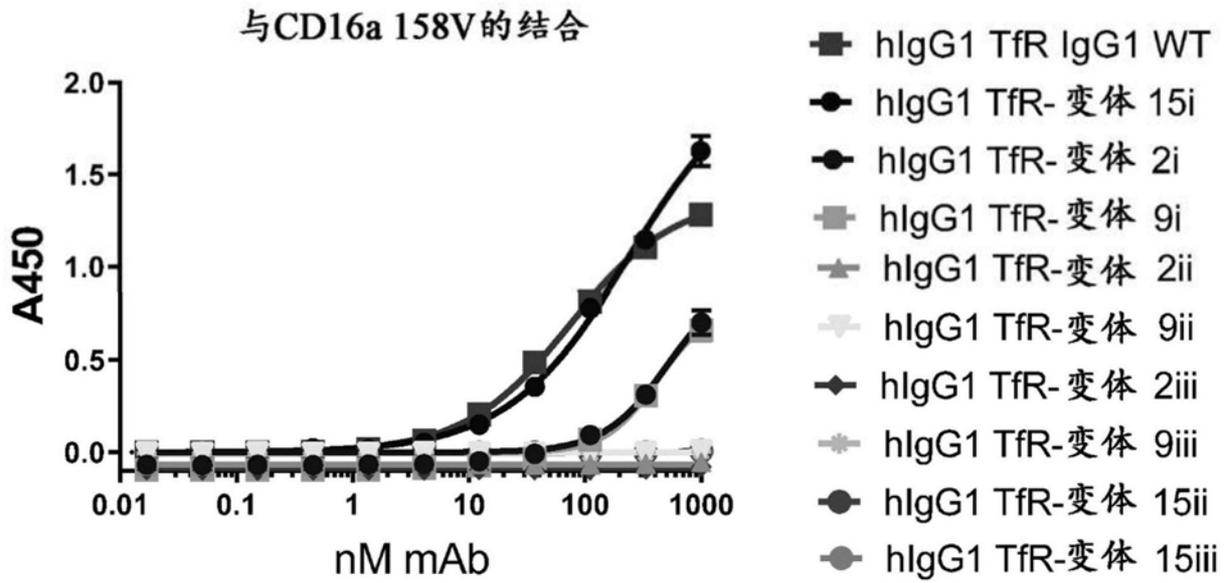


图11

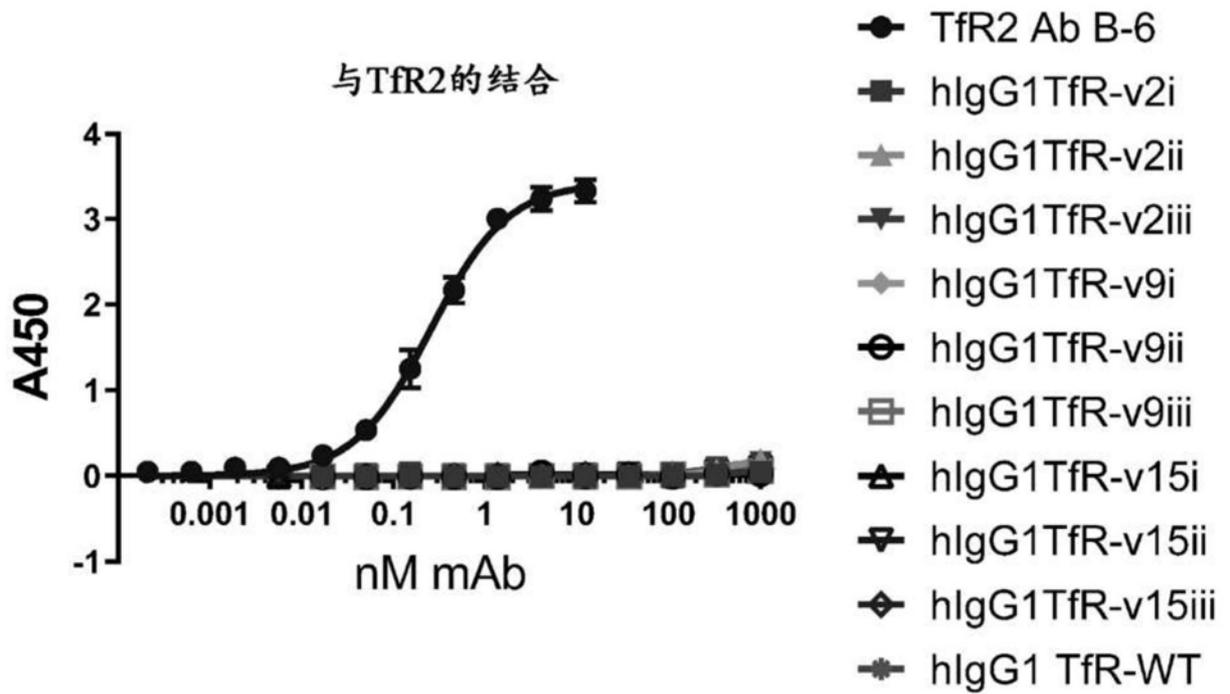


图12

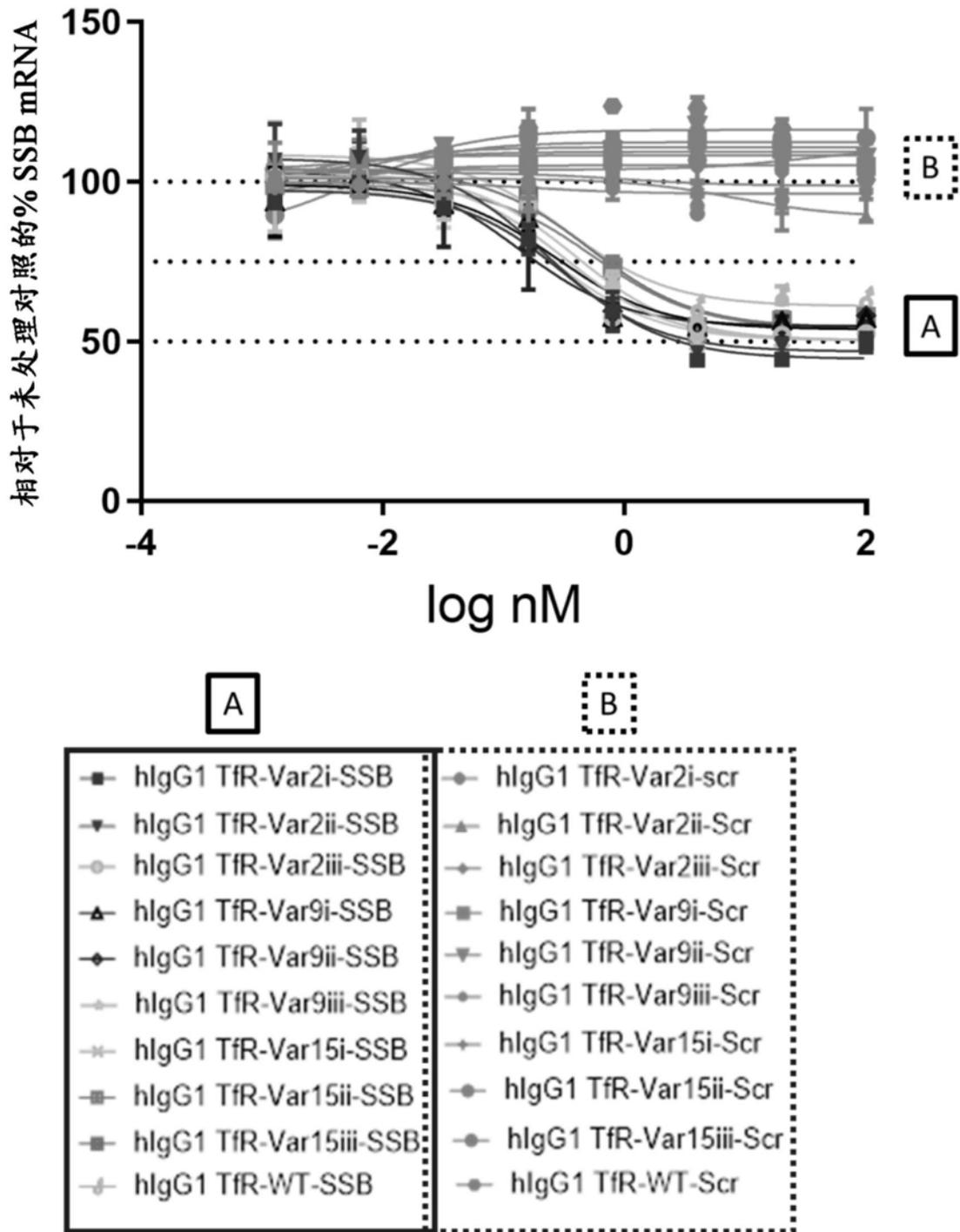


图13A

	hlgG1 TfR-Var2i-SSB	hlgG1 TfR-Var2ii-SSB	hlgG1 TfR-Var2iii-SSB	hlgG1 TfR-Var9i-SSB	hlgG1 TfR-Var9ii-SSB
底	97.38	107.3	102.3	99.1	103.2
顶	44.58	46.89	50.43	53.83	54.82
LogEC50	-0.4851	-0.6479	-0.5046	-0.5777	-0.8734
EC50 (nM)	0.3273	0.225	0.3129	0.2644	0.1338
跨度	-52.8	-60.46	-51.83	-45.26	-48.37
Emax (%KD)	55.42	53.11	49.57	46.17	45.18

	hlgG1 TfR-Var9iii-SSB	hlgG1 TfR-Var15i-SSB	hlgG1 TfR-Var15ii-SSB	hlgG1 TfR-Var15iii-SSB	hlgG1 TfR-WT Chim-SSB
底	98.01	103	99.32	104	108.4
顶	50.34	50.4	53.94	54.36	61.06
LogEC50	-0.5671	-0.4047	-0.2551	-0.289	-0.4791
EC50 (nM)	0.2709	0.3938	0.5557	0.514	0.3318
跨度	-47.67	-52.59	-45.37	-49.62	-47.38
Emax (%KD)	49.66	49.6	46.06	45.64	38.94

图13B

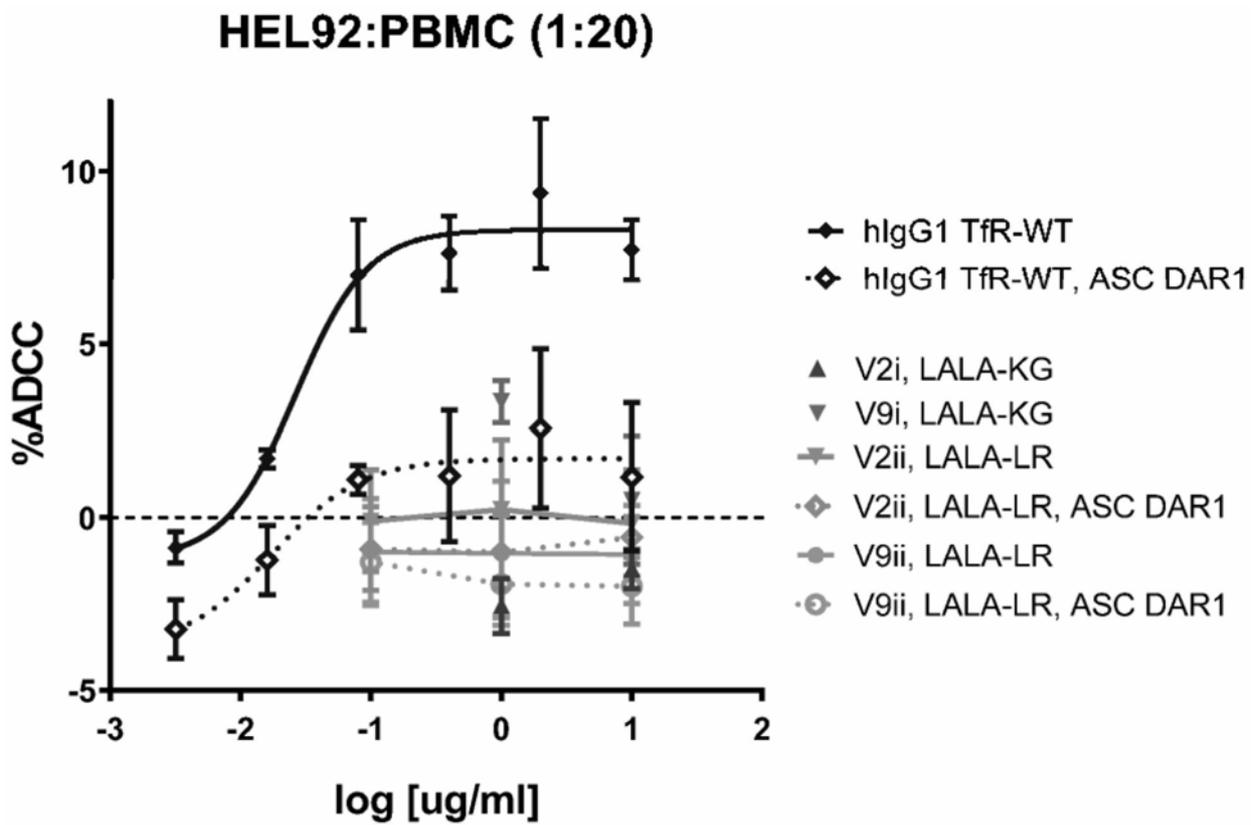


图14

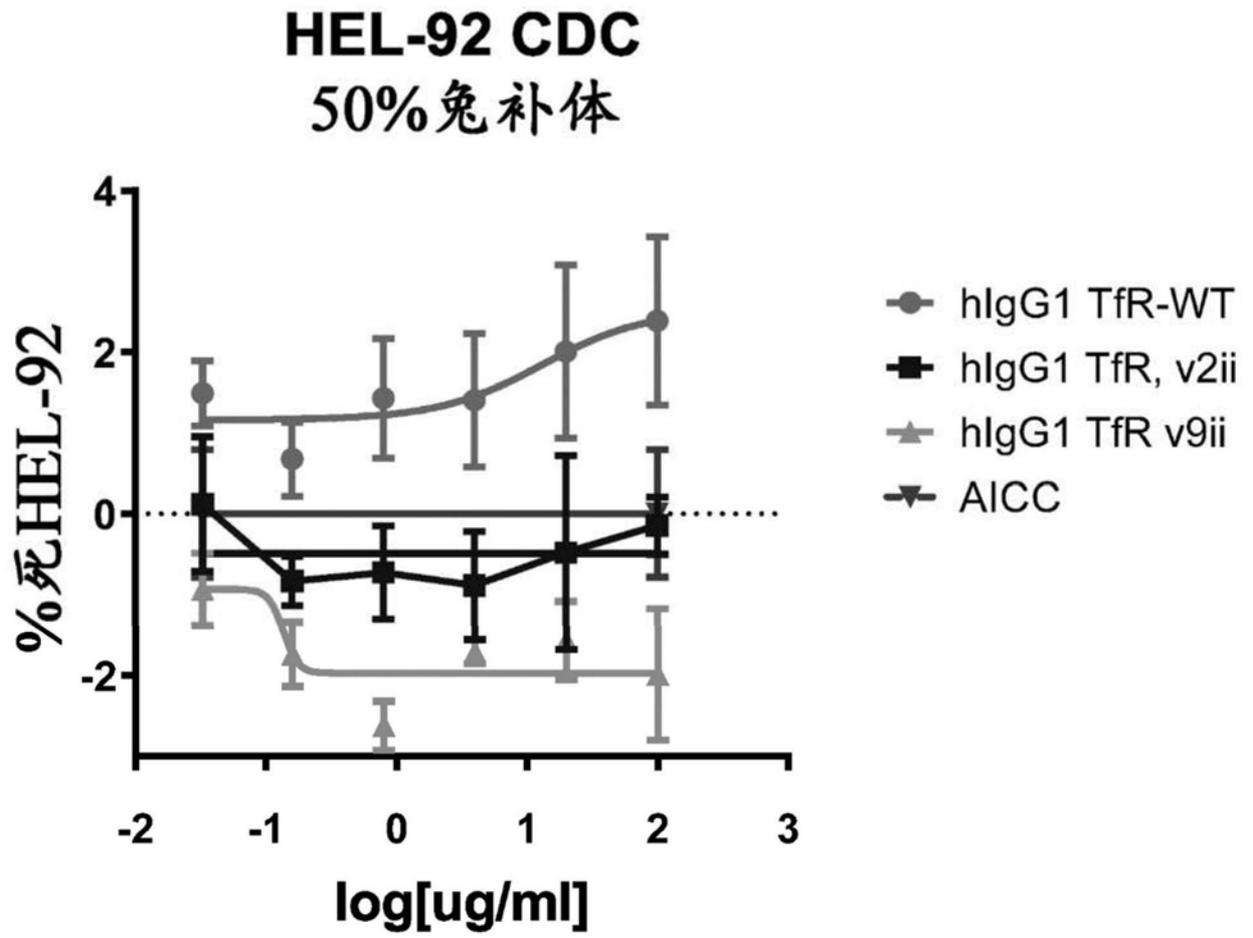


图15

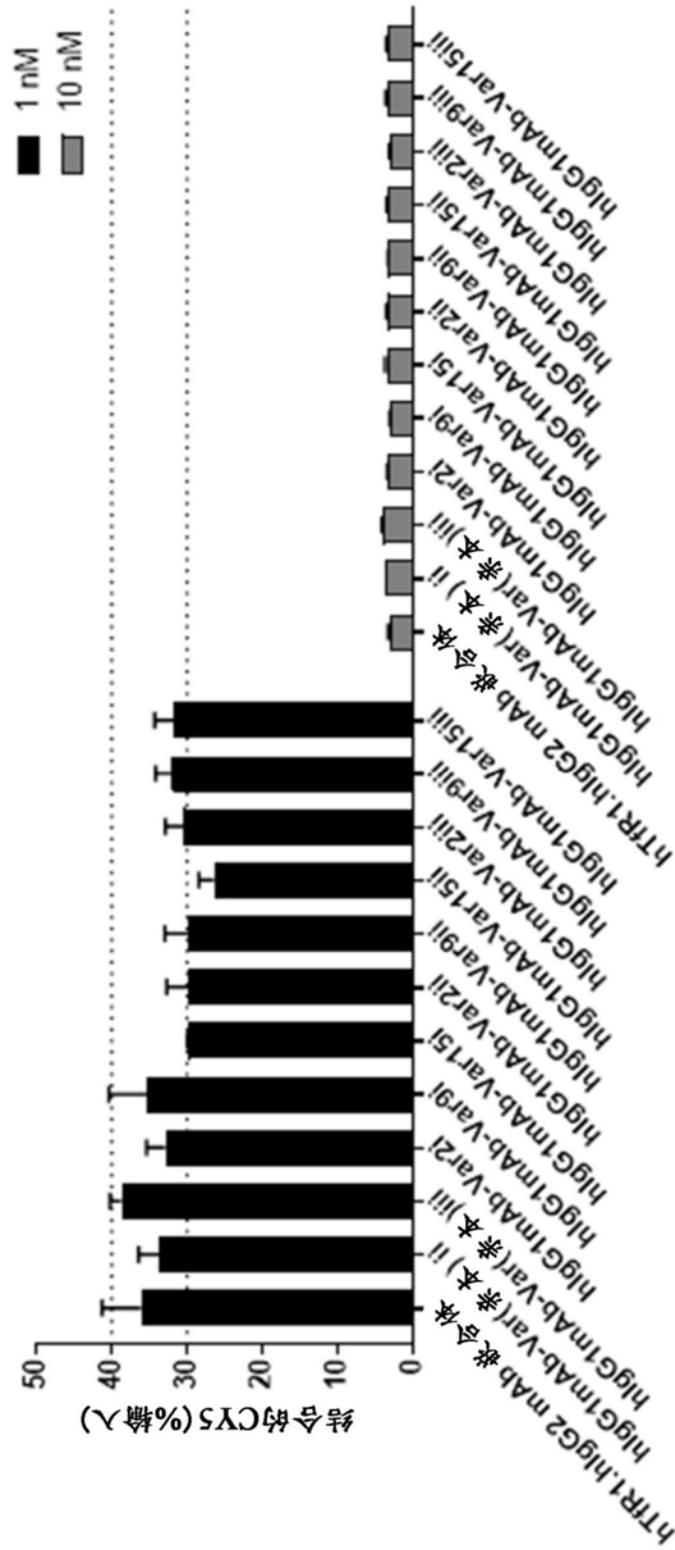
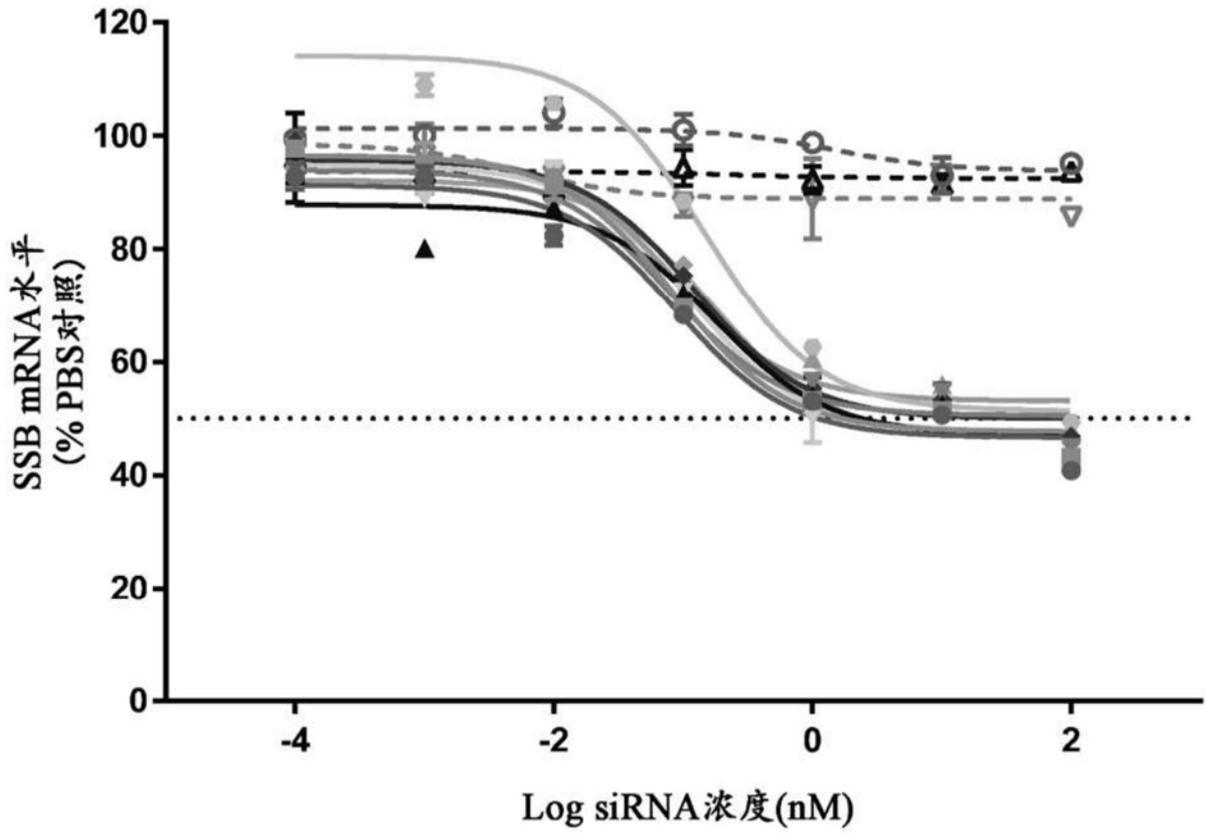


图16



- TfR1.hlgG2 mAb-SSB DAR 1
- TfR1.hlgG1mAb-Var(亲本)ii-SSB DAR 1
- TfR1.hlgG1mAb-Var(亲本)iii-SSB DAR 1
- ▲ TfR1.hlgG1mAb-Var2ii-SSB DAR 1
- △ TfR1.hlgG1mAb-Var2iii-SSB DAR 1
- ▽ TfR1.hlgG1mAb-Var9ii-SSB DAR 1
- ▽ TfR1.hlgG1mAb-Var9iii-SSB DAR 1
- ◆ TfR1.hlgG1mAb-Var15ii-SSB DAR 1
- ◆ TfR1.hlgG1mAb-Var15iii-SSB DAR 1
- TfR1.hlgG2 mAb-乱序DAR 1
- ▲ TfR1.hlgG1mAb-Var2ii-乱序DAR 1
- ▽ TfR1.hlgG1mAb-Var9ii-乱序DAR 1

图17

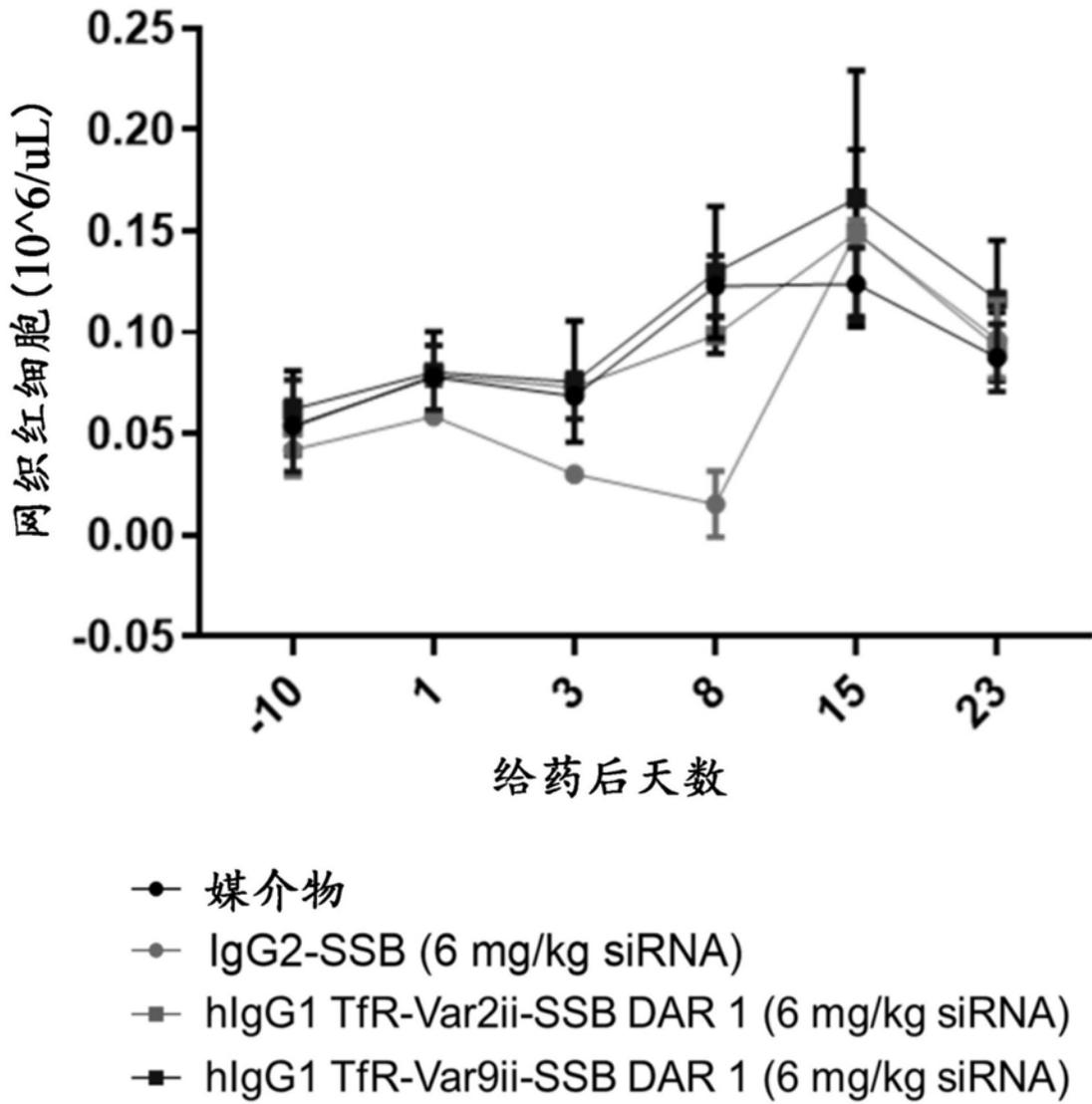


图18

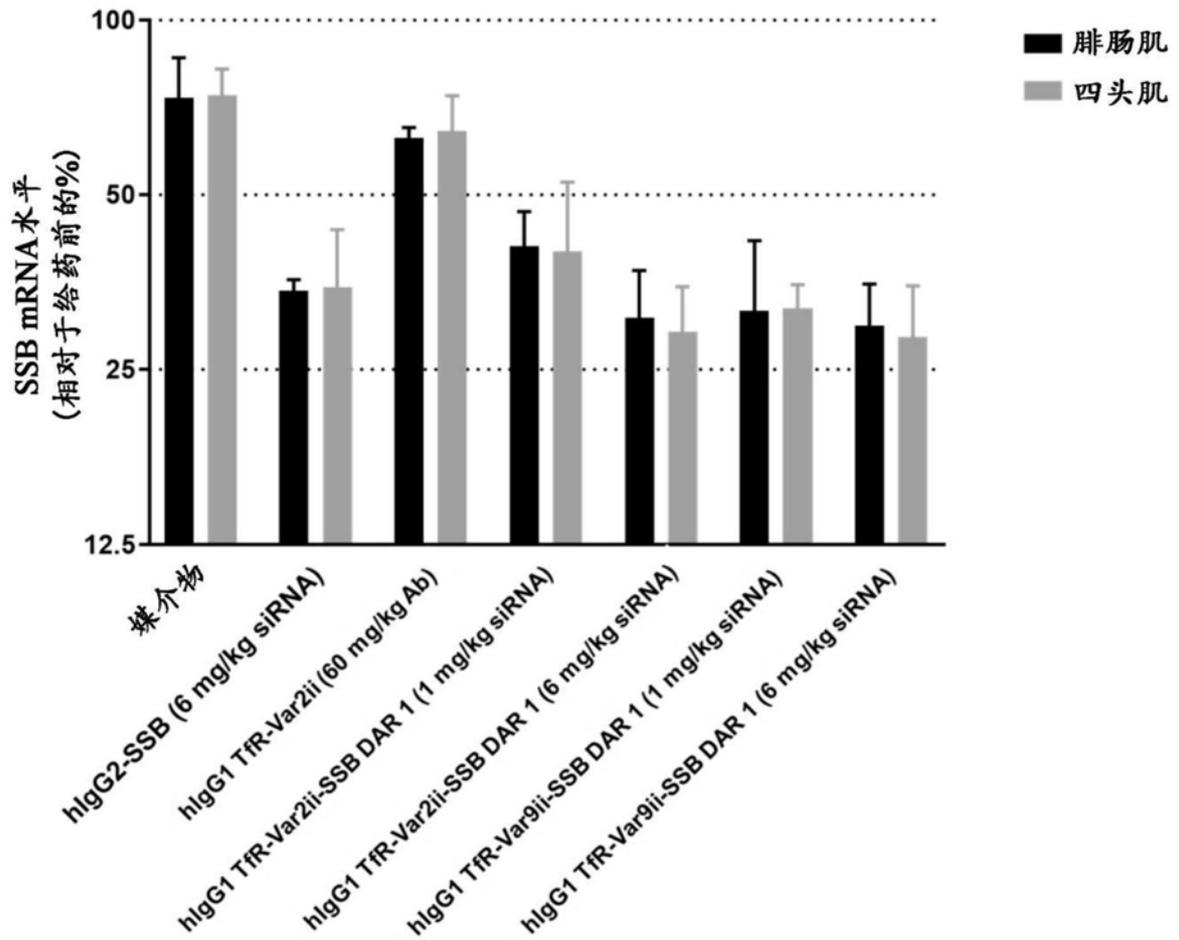


图19

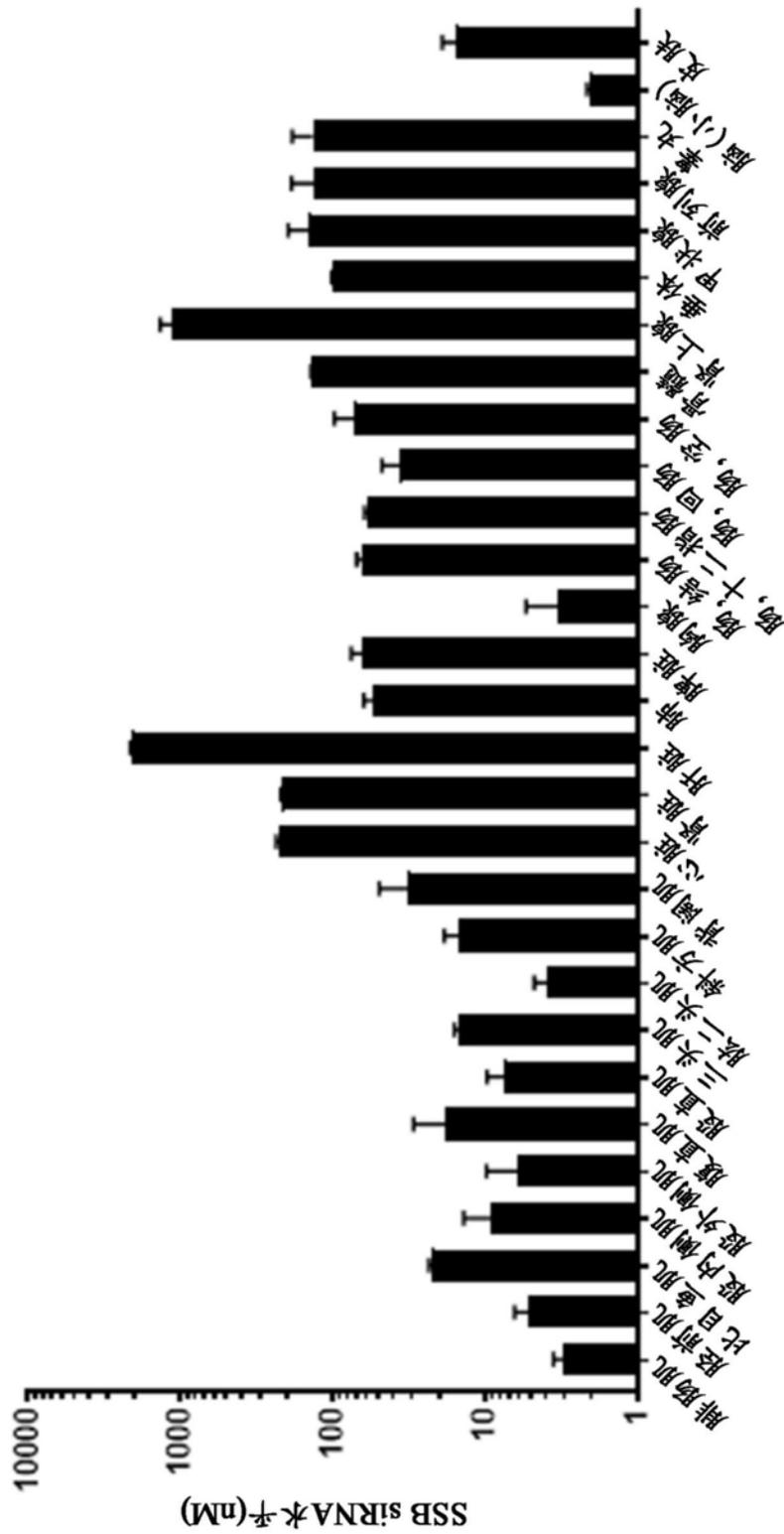


图20A

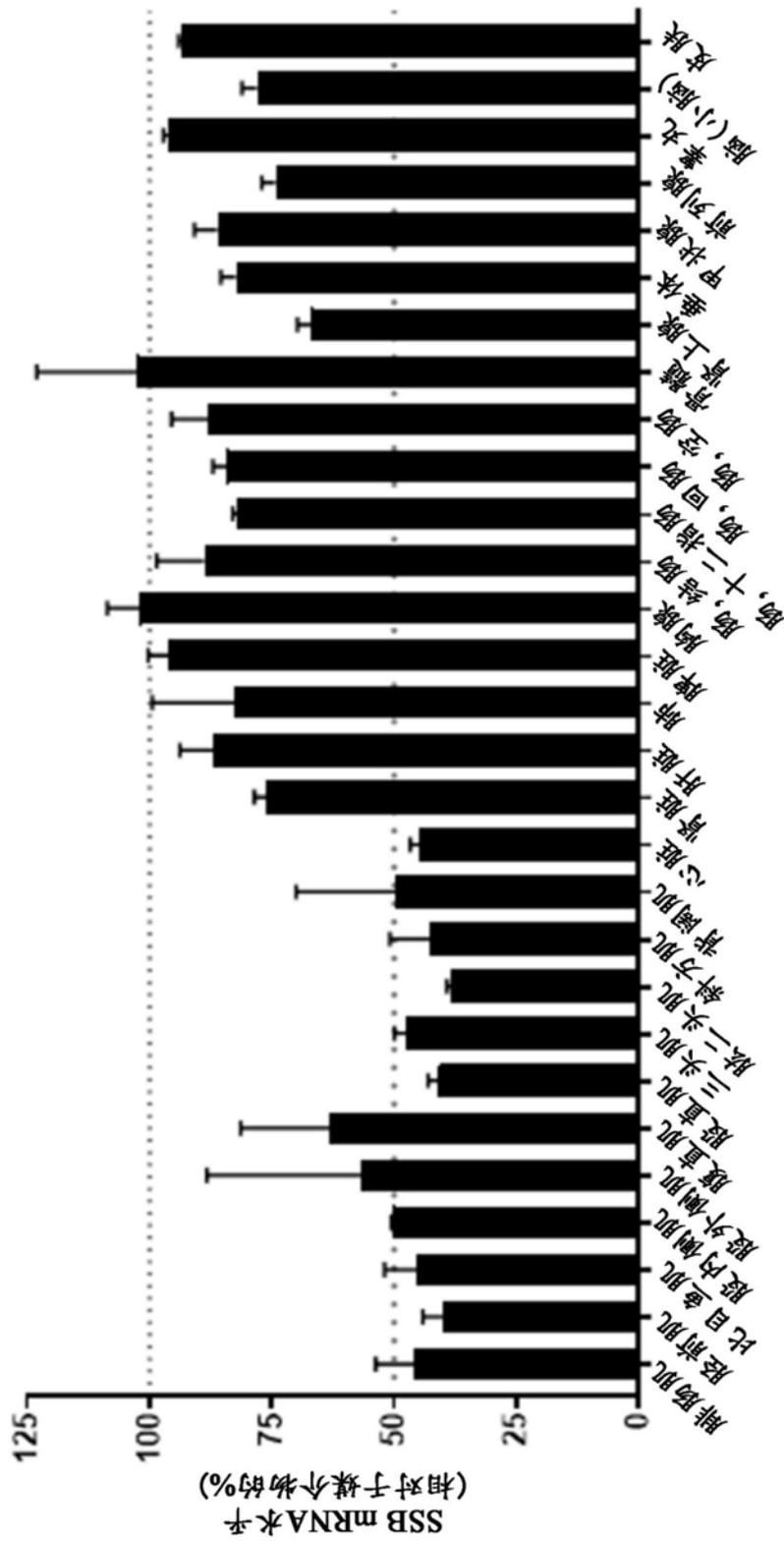


图20B