(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118662652 A
(43)申请公布日 2024.09.20

(21)申请号 202311783365.1
(22)申请日 2017.03.31
(30)优先权数据
62/316,919 2016.04.01 US
(62)分案原申请数据
201780034491.3 2017.03.31
(71)申请人 艾维迪提生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 安德鲁·约翰·吉尔
文卡塔·拉马纳·多帕拉普迪
大卫·世-豪·朱
迈克尔·卡拉米安·科克伦
雷切尔·伊丽莎白·约翰斯
帕拉尼·巴卢 罗伯·伯克
比亚特丽丝·戴安娜·达里蒙特
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 刘晓杰 武晶晶
(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2017.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/712(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61K 47/60(2017.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

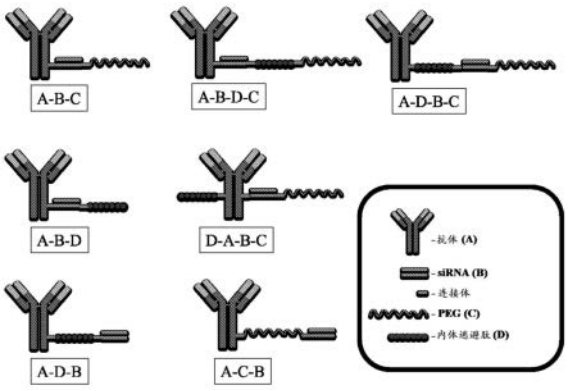
权利要求书1页 说明书234页
序列表（电子公布） 附图124页

(54)发明名称

核酸-多肽组合物及其用途

(57)摘要

本文涉及一种核酸-多肽组合物及其用途。具体地,本文公开了包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的组合物和药物制剂。本文还描述了包括利用组合物或药物制剂治疗癌症的方法,所述组合物或药物制剂包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分。



CN 118662652 A

1.一种式(I)的分子:

$A-X_1-B-X_2-C$式(I)

其中,

A为抗体或其抗原结合片段;

B由双链多核苷酸组成,所述双链多核苷酸由过客链和指导链组成;

C为聚合物;

X_1为键或第一非聚合物连接体;以及

X_2为键或第二非聚合物连接体;

其中所述双链多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;并且

其中A和C不在相同末端与B连接。

2.如权利要求1所述的分子,其中所述至少一个2'修饰的核苷酸包括2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基、2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。

3.如权利要求1所述的分子,其中所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。

4.如权利要求1所述的分子,其中所述至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。

5.如权利要求1所述的分子,其中所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端。

6.如权利要求1所述的分子,其中所述过客链和指导链包含至少一个修饰。

7.如权利要求1所述的分子,其中所述过客链和所述指导链为RNA分子。

8.如权利要求1所述的分子,其中所述过客链包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

9.如权利要求1所述的分子,其中所述指导链包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

10.如权利要求1所述的分子,其中X_1和X_2独立地为键。

核酸-多肽组合物及其用途

[0001] 本申请是申请日为2017年03月31日、申请号为201780034491.3、发明名称为“核酸-多肽组合物及其用途”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2017年03月31日、申请号为PCT/US2017/025608)的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求于2016年4月1日提交的美国临时申请号62/316,919的权益,该申请通过引用并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本发明含有以XML文件格式电子提交的序列表,并通过引用以其全文并入于此。所述XML副本创建于2023年5月5日,命名为45532-707_7111_SL.xml且大小为12,585,013字节。

背景技术

[0006] 通过RNA诱导的基因沉默进行的基因抑制提供了几种控制水平:转录失活、小干扰RNA(siRNA)诱导的mRNA降解和siRNA诱导的转录弱化。在一些情况下,RNA干扰(RNAi)对多细胞分裂提供持久的影响。因此,RNAi代表了用于药物靶标验证、基因功能分析、途径分析和疾病疗法的可行方法。

发明内容

[0007] 在某些实施方案中,本文公开了包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的组合物和药物制剂。在一些实施方案中,本文还描述了包括利用组合物或药物制剂用于治疗疾病或病况(例如,癌症)的方法,所述组合物或药物制剂包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了式(I)的分子:

[0009] A-X-B-Y-C

[0010] 式I

[0011] 其中,

[0012] A为结合部分;

[0013] B为多核苷酸;

[0014] C为聚合物;

[0015] X为键或第一连接体;以及

[0016] Y为键或第二连接体;并且

[0017] 其中所述多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。

[0018] 在一些实施方案中,所述至少一个2’修饰的核苷酸包括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-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些实施方案中,所述至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端。

[0019] 在一些实施方案中,所述多核苷酸包含单链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含两条或多条链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸包含至少一种修饰。

[0020] 在一些实施方案中,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为RNA分子。在一些实施方案中,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为siRNA分子。

[0021] 在一些实施方案中,所述第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述第一多核苷酸由选自SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117的序列组成。

[0022] 在一些实施方案中,所述第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸由选自SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117的序列组成。

[0023] 在一些实施方案中,X和Y独立地为键或非聚合物连接体基团。在一些实施方案中,X为键。在一些实施方案中,X为C_1-C_6烷基基团。在一些实施方案中,Y为C_1-C_6烷基基团。在一些实施方案中,X为同双官能连接体或异双官能连接体,任选地与C_1-C_6烷基基团缀合。在一些实施方案中,Y为同双官能连接体或异双官能连接体。

[0024] 在一些实施方案中,所述结合部分为抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其结合片段为抗EGFR抗体或其结合片段。

[0025] 在一些实施方案中,C为聚乙二醇。在一些实施方案中,C具有约5000Da的分子量。

[0026] 在一些实施方案中,A-X与B的5'端缀合,并且Y-C与B的3'端缀合。在一些实施方案中,Y-C与B的5'端缀合,并且A-X与B的3'端缀合。在一些实施方案中,A-X、Y-C或其组合与核苷酸间连接基团缀合。

[0027] 在一些实施方案中,所述分子进一步包含D。在一些实施方案中,D与C或A缀合。

[0028] 在一些实施方案中,D根据式(II)与式(I)的分子缀合:

[0029] $(A\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_n)\text{-}L\text{-}D$

[0030] 式II

[0031] 其中,

[0032] A为结合部分;

[0033] B为多核苷酸;

[0034] C为聚合物;

[0035] X为键或第一连接体;

[0036] Y为键或第二连接体;

[0037] L为键或第三连接体;

[0038] D为内体溶解(endosomolytic)部分;以及

[0039] n为0与1之间的整数;并且

[0040] 其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;并且D缀合在A、B或C上的任何地方。

[0041] 在一些实施方案中,D为INF7或蜂毒肽。

[0042] 在一些实施方案中,D为内体溶解聚合物。

[0043] 在一些实施方案中,L为C_1-C_6烷基基团。在一些实施方案中,L为同双官能连接体或异双官能连接体。

[0044] 在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少第二结合部分A。在一些实施方案中,所述至少第二结合部分A与A、B或C缀合。在一些实施方案中,所述至少第二结合部分A为胆固醇。

[0045] 在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少另外的多核苷酸B。在一些实施方案中,所述至少另外的多核苷酸B与A、B或C缀合。

[0046] 在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少另外的聚合物C。在一些实施方案中,所述至少另外的聚合物C与A、B或C缀合。

[0047] 在某些实施方案中,本文公开了式(I)的分子:A-X-B-Y-C(式I),其中A为抗体或其结合片段;B为多核苷酸;C为聚合物;X为键或第一非聚合物连接体;以及Y为键或第二连接体;其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;并且其中A和C不在相同末端连接至B。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括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-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些实施方案中,所述至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含单链。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸包含至少一种修饰。在一些实施方案中,所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为RNA分子。在一些实施方案中,所述第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,Y为非聚合物连接体基团。在一些实施方案

中,X为键。在一些实施方案中,X为C_1-C_6烷基基团。在一些实施方案中,Y为C_1-C_6烷基基团。在一些实施方案中,X为同双官能连接体或异双官能连接体,任选地与C_1-C_6烷基基团缀合。在一些实施方案中,Y为同双官能连接体或异双官能连接体。在一些实施方案中,所述抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。在一些实施方案中,C为聚乙二醇。在一些实施方案中,C具有约1000Da、2000Da或5000Da的分子量。在一些实施方案中,A-X与B的5'端缀合,并且Y-C与B的3'端缀合。在一些实施方案中,Y-C与B的5'端缀合,并且A-X与B的3'端缀合。在一些实施方案中,所述分子进一步包含D。在一些实施方案中,D与C或A缀合。在一些实施方案中,D根据式(II)与式(I)的分子缀合:(A-X-B-Y-C_c)-L-D(式II),其中A为抗体或其结合片段;B为多核苷酸;C为聚合物;X为键或第一非聚合物连接体;Y为键或第二连接体;L为键或第三连接体;D为内体溶解部分;以及n为0与1之间的整数;其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;其中A和C不在相同末端连接至B;并且其中D缀合在A或C上的任何地方或者B的末端。在一些实施方案中,D为INF7或蜂毒肽。在一些实施方案中,D为内体溶解聚合物。在一些实施方案中,L为C_1-C_6烷基基团。在一些实施方案中,L为同双官能连接体或异双官能连接体。在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少第二结合部分。在一些实施方案中,所述至少第二结合部分与A、B或C缀合。在一些实施方案中,所述至少第二结合部分为胆固醇。在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少另外的多核苷酸B。在一些实施方案中,所述至少另外的多核苷酸B与A、B或C缀合。在一些实施方案中,所述分子进一步包含至少另外的聚合物C。在一些实施方案中,所述至少另外的聚合物C与A、B或C缀合。

[0048] 在某些实施方案中,本文公开了包含上述分子和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制为纳米颗粒制剂。在一些实施方案中,所述药物组合物被配制用于肠胃外、口服、鼻内、经颊、直肠或经皮给药。

[0049] 在某些实施方案中,本文公开了治疗有需要的患者中的疾病或病症的方法,包括向所述患者施用包含上述分子的组合物。在一些实施方案中,所述疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,所述癌症为实体瘤。在一些实施方案中,所述癌症为恶性血液病。在一些实施方案中,所述癌症包括KRAS相关癌症、EGFR相关癌症、AR相关癌症、β-连环蛋白相关癌症、PIK3C相关癌症或MYC相关癌症。在一些实施方案中,所述癌症包括膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、多形性成胶质细胞瘤、头颈癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或甲状腺癌。在一些实施方案中,所述癌症包括急性髓样白血病、CLL、DLBCL或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,所述方法为免疫肿瘤学疗法。

[0050] 在某些实施方案中,本文公开了抑制患者原代细胞中的靶基因表达的方法,包括将上述分子施用于所述原代细胞。在一些实施方案中,所述方法为体内方法。在一些实施方案中,所述患者为人类。

[0051] 在某些实施方案中,本文公开了包含上述分子的免疫肿瘤学疗法,用于治疗有需要的患者中的疾病或病症。

[0052] 在某些实施方案中,本文公开了包含上述分子的药剂盒。

附图说明

[0053] 本公开内容的各个方面在随附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本公开内容原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将会获得对本公开内容的特征和优点的更好理解,在这些附图中:

[0054] 图1A-图1C图示了本文所述分子的图示。

[0055] 图2图示了胆固醇缀合物过客链的结构。

[0056] 图3示出了本文所述的INF7肽序列(SEQ ID NO:2055)。

[0057] 图4示出了本文所述的蜂毒肽肽序列(SEQ ID NO:2060)。

[0058] 图5图示了EGFR抗体-PEG20kDa-EGFR的分析性HPLC。

[0059] 图6图示了EGFR抗体-PEG20kDa-EGFR缀合物的SDS-PAGE分析。

[0060] 图7图示了EGFR抗体-PEG10kDa-EGFR siRNA的分析性色谱图。

[0061] 图8示出了EGFR抗体-PEG5kDa-EGFR siRNA的分析性色谱图。

[0062] 图9示出了EGFR抗体-PEG10kDa-EGFR siRNA和EGFR抗体-PEG5kDa-EGFR siRNA缀合物的SDS PAGE分析。

[0063] 图10示出了siRNA负载为1、2和3的EGFR抗体-PEG1kDa-EGFR siRNA缀合物的叠加。

[0064] 图11示出了EGFR抗体-KRAS-PEG5kDa的HPLC色谱图。

[0065] 图12示出了帕尼单抗-KRAS-PEG5kDa的HPLC色谱图。

[0066] 图13示出了EGFR抗体-S-S-siRNA-PEG5kDa(DAR=1)的HPLC色谱图。

[0067] 图14示出了EGFR抗体-PEG24-蜂毒肽(负载=~1)的HPLC色谱图。

[0068] 图15图示了EGFR抗体-蜂毒肽(n=~1)的HPLC色谱图。

[0069] 图16图示了EGFR抗体-蜂毒肽(n=1)的质谱。

[0070] 图17示出了EGFR抗体-PEG1kDa-INF7(肽负载=~1)的HIC色谱图。

[0071] 图18示出了EGFR抗体-INF7(肽负载=~1)的HPLC色谱图。

[0072] 图19示出了INF7-PEG1kDa-(EGFR抗体-KRAS-PEG5kDa)。

[0073] 图20图示了蜂毒肽-PEG1kDa-(EGFR抗体-KRAS-PEG5kDa)。

[0074] 图21图示了直到给药后96h的血浆浓度-时间曲线,其中siRNA浓度表示为注射剂量的百分比(%ID)。

[0075] 图22示出了直到给药后96h的血浆浓度-时间曲线,其中siRNA浓度表示为注射剂量的百分比(%ID)。

[0076] 图23示出了直到给药后96h的血浆浓度-时间曲线,其中siRNA浓度表示为注射剂量的百分比(%ID)。

[0077] 图24图示了直到给药后96h的血浆浓度-时间曲线,其中siRNA浓度表示为注射剂量的百分比(%ID)。

[0078] 图25图示了直到给药后24h的血浆浓度-时间曲线,其中siRNA浓度表示为注射剂量的百分比(%ID)。

[0079] 图26A和图26B图示了小鼠的肿瘤或正常肝中的组织浓度-时间曲线。图26A示出了在小鼠模型的皮下胁腹H358肿瘤中测量的直到给药后168h的组织浓度-时间曲线。图26B示出了在小鼠正常肝中测量的直到给药后168h的组织浓度-时间曲线。

[0080] 图27示出了在小鼠的皮下胁腹H358肿瘤和正常肝中测量的直到给药后168h的组

织浓度-时间曲线。

[0081] 图28图示了在小鼠的皮下胁腹H358肿瘤和正常肝中测量的直到给药后168h的组织浓度-时间曲线。

[0082] 图29图示了在小鼠的皮下胁腹H358肿瘤和正常肝中测量的直到给药后168h的组织浓度-时间曲线。

[0083] 图30示出了在小鼠的皮下胁腹H358肿瘤和正常肝中测量的直到给药后168h的组织浓度-时间曲线。

[0084] 图31A和图31B图示了人皮下胁腹H358肿瘤中的人KRAS(图31A)或正常小鼠肝中的小鼠KRAS(图31B)的siRNA介导的mRNA敲低。

[0085] 图32图示了人皮下胁腹H358肿瘤中的人EGFR的siRNA介导的mRNA敲低。

[0086] 图33图示了人皮下胁腹H358肿瘤中的人KRAS的siRNA介导的mRNA敲低。

[0087] 图34图示了人皮下胁腹H358肿瘤中的人EGFR的siRNA介导的mRNA敲低。

[0088] 图35示出了小鼠肝中的小鼠KRAS的siRNA介导的mRNA敲低。

[0089] 图36图示了直到给药后96h的血浆浓度-时间曲线,其中siRNA浓度表示为注射剂量的百分比(%ID)。

[0090] 图37图示了在野生型CD-1小鼠的肝、肾和肺中测量的直到给药后144h的组织浓度-时间曲线。

[0091] 图38A和图38B图示了在人皮下胁腹H358肿瘤中测量的胆固醇-KRAS混合胆固醇-INF7肽(图38A)或胆固醇-蜂毒肽(图38B)的直到给药后144h的组织浓度-时间曲线。

[0092] 图39A和图39B图示了在小鼠肝中测量的胆固醇-KRAS混合胆固醇-INF7肽(图39A)或胆固醇-蜂毒肽(图39B)的直到给药后144h的组织浓度-时间曲线。

[0093] 图40A和图40B图示了在小鼠肾中测量的胆固醇-KRAS混合胆固醇-INF7肽(图40A)或胆固醇-蜂毒肽(图40B)的直到给药后144h的组织浓度-时间曲线。

[0094] 图41A和图41B图示了在小鼠肺中测量的胆固醇-KRAS混合胆固醇-INF7肽(图41A)或胆固醇-蜂毒肽(图41B)的直到给药后144h的组织浓度-时间曲线。

[0095] 图42图示了小鼠肝中的小鼠KRAS的siRNA介导的mRNA敲低。

[0096] 图43A和图43B图示了在人皮下胁腹H358肿瘤(图43A)或小鼠肝(图43B)中测量的直到给药后96h的组织浓度-时间曲线。

[0097] 图44A和图44B示出了在小鼠肾(图44A)或小鼠肺(图44B)中测量的直到给药后96h的组织浓度-时间曲线。

[0098] 图45示出了人皮下胁腹H358肿瘤中的小鼠KRAS的siRNA介导的mRNA敲低。

[0099] 图46示出了在人皮下胁腹H358肿瘤以及小鼠肝、肾和肺中测量的给药后96h的siRNA组织浓度。

[0100] 图47A和图47B示出了人皮下胁腹H358肿瘤中的EGFR(图47A)或KRAS(图47B)的siRNA介导的mRNA敲低。

[0101] 图48示出了Hep3B原位肝肿瘤中的人CTNNB1的siRNA介导的mRNA敲低。

[0102] 图49示出了来自具有Hep3B原位肝肿瘤的小鼠的血清中的人甲胎蛋白。

[0103] 图50A示出了LNCaP肿瘤中的人EGFR的siRNA介导的mRNA敲低。

[0104] 图50B示出了给药后96小时肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0105] 图51A图示了第96小时LNCaP肿瘤中的人EGFR的siRNA介导的mRNA敲低。

[0106] 图51B示出了给药后96小时肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0107] 图52示出了本文所述的示例性分子的血浆siRNA浓度。

[0108] 图53A图示了本文所述的示例性分子在HCC827肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0109] 图53B示出了本文所述的示例性分子的EGFR mRNA表达水平。

[0110] 图54图示了生成式(I)包括的分子的示例性A和B。

[0111] 图55图示了本文所述的示例性分子的EGFR mRNA表达水平。

[0112] 图56A图示了本文所述的示例性分子在HCC827肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0113] 图56B示出了本文所述的示例性分子的EGFR mRNA表达水平。

[0114] 图57A-图57B图示了本文所述的示例性分子在肝脏(图57A)和肿瘤(图57B)中的siRNA浓度。

[0115] 图57C示出了本文所述的示例性分子的KRAS mRNA表达水平。

[0116] 图58A图示了本文所述的示例性分子的血浆siRNA浓度。

[0117] 图58B示出了本文所述的示例性分子的血浆抗体浓度。

[0118] 图59A图示了本文所述的示例性分子在肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0119] 图59B示出了本文所述的示例性分子在Hep3B肿瘤中的mRNA表达水平。

[0120] 图60示出了本文所述的示例性分子在肝中的CTNNB1 mRNA表达水平。

[0121] 图61示出了本文所述的示例性分子在肝中的KRAS mRNA表达水平。

[0122] 图62图示了本文所述的示例性分子的血浆siRNA或单克隆抗体(mAb)浓度。

[0123] 图63A图示了本文所述的示例性分子在肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0124] 图63B示出了本文所述的示例性分子在LNCaP肿瘤中的EGFRmRNA表达水平。

[0125] 图64A-图64E图示了本文所述示例性分子在心脏中的HPRTmRNA表达水平(图64A)、在胃肠组织中的HPRT mRNA表达水平(图64B)、在肝中的HPRT mRNA表达水平(图64C)、在肺中的HPRTmRNA表达水平(图64D)和在组织中的siRNA浓度(图64E)。

[0126] 图65A-图65E图示了本文所述示例性分子在心脏中的mRNA表达水平(图65A)、在胃肠组织中的mRNA表达水平(图65B)、在肝中的mRNA表达水平(图65C)、在肺中的mRNA表达水平(图65D)和在组织中的siRNA浓度(图65E)。

[0127] 图66A-图66D图示了心脏中的siRNA浓度(图66A)、心脏中的mRNA表达水平(图66B)、胃肠组织中的mRNA表达水平(图66C)和肌肉中的siRNA浓度(图66D)。

[0128] 图67A图示了本文所述的示例性分子的mRNA表达水平。

[0129] 图67B示出了本文所述的示例性分子在肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0130] 图68A-图68B图示了激活原代小鼠B细胞的抗B细胞抗体-siRNA缀合物。图68A图示了抗B细胞Fab-siRNA缀合物。图68B示出了抗B细胞单克隆抗体-siRNA缀合物。

[0131] 图69A图示了本文所述的示例性分子的血浆siRNA浓度。

[0132] 图69B示出了本文所述的示例性分子在5mg/kg剂量下在血浆中的抗体扎芦木单抗(zalutumumab)浓度。

[0133] 图70A示出了本文所述的示例性分子的mRNA表达水平。

[0134] 图70B示出了本文所述的示例性分子在肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0135] 图70C示出了本文所述的示例性分子的血浆siRNA浓度。

[0136] 图71A图示了本文所述的示例性分子在LNCaP肿瘤中的siRNA浓度。

[0137] 图71B-图71C图示了本文所述的示例性分子在LNCaP肿瘤中的EGFR mRNA表达水平。

[0138] 图72A图示了本文所述的示例性分子在组织中的siRNA浓度。

[0139] 图72B示出了本文所述的示例性分子在治疗后96h在HCC827肿瘤中的mRNA表达水平。

[0140] 图73A图示了本文所述的示例性分子在0.5mg/kg剂量下在血浆中的siRNA浓度。

[0141] 图73B示出了本文所述的示例性分子在5mg/kg剂量下在血浆中的抗体扎芦木单抗浓度。

[0142] 图74图示了含有不同连接体的式(I)包括的示例性分子的血浆清除率。

[0143] 图75A图示了本文所述的示例性分子在0.5mg/kg剂量下在HCC827肿瘤中的mRNA表达水平。

[0144] 图75B-图75D图示了肿瘤(图75B)、肝(图75C)和血浆(图75D)中的siRNA浓度。

[0145] 图76A-图76D图示了靶向HPRT的本文所述的示例性分子的mRNA表达水平。图76A示出了心脏中的mRNA表达水平。图76B示出了肌肉中的mRNA表达水平。图76C示出了肝中的mRNA表达水平。图76D示出了肺中的mRNA表达水平。

[0146] 图77A-图77D图示了式(I)包括的示例性分子在肌肉(图77A)、心脏(图77B)、肝(图77C)和肺(图77D)中的siRNA浓度。

[0147] 图78A-图78D图示了式(I)包括的示例性分子在治疗后96h在心脏(图78A)、胃肠组织(图78B)、肝(图78C)和肺(图78D)中的mRNA表达水平。

[0148] 图79图示了式(I)包括的示例性分子的血浆siRNA浓度。

[0149] 图80A示出了式(I)包括的示例性分子在治疗后96h在LNCaP肿瘤中的mRNA表达水平。

[0150] 图80B示出了式(I)包括的示例性分子在LNCaP肿瘤、肝、肾、肺和脾组织样品中的siRNA浓度。

[0151] 图81A示出了式(I)包括的示例性分子在治疗后96h在HCC827肿瘤中的mRNA表达水平。

[0152] 图81B图示了式(I)包括的示例性分子在肿瘤、肝、肾、肺和脾组织样品中的siRNA浓度。

[0153] 图82图示了式(I)包括的示例性分子的血浆siRNA浓度。

[0154] 图83图示了式(I)包括的示例性分子的血浆siRNA浓度。

[0155] 图84图示了式(I)包括的示例性分子在治疗后96h在HCC827肿瘤中的mRNA表达水平。

[0156] 图85图示了给药后96小时HCC827肿瘤或肝组织中的siRNA浓度。

[0157] 图86图示了式(I)包括的示例性分子在治疗后48h在小鼠脾脏B细胞中的相对mRNA表达水平。每个示例性分子进一步用数字表示。

[0158] 图87图示了式(I)包括的示例性分子(或ASC)在小鼠血浆中的稳定性。

具体实施方式

[0159] 核酸(例如,RNAi)疗法是具有高选择性和特异性的靶向疗法。然而,在一些情况下,核酸疗法也受到细胞内摄取不良、血液稳定性有限和非特异性免疫刺激的阻碍。为了解决这些问题,探索了核酸组合物的各种修饰,诸如,用于更好稳定和/或降低毒性的新型连接体、用于增加靶特异性和/或靶递送的结合部分的优化、以及用于增加稳定性和/或降低脱靶效应的核酸聚合物修饰。

[0160] 在一些实施方案中,构成核酸组合物的不同组分的排列或顺序进一步影响细胞内摄取、稳定性、毒性、功效和/或非特异性免疫刺激。例如,如果核酸组分包括结合部分、聚合物和多核酸分子(或多核苷酸),则结合部分、聚合物和/或多核酸分子(或多核苷酸)的顺序或排列(例如,结合部分-多核酸分子-聚合物、结合部分-聚合物-多核酸分子或聚合物-结合部分-多核酸分子)进一步影响细胞内摄取、稳定性、毒性、功效和/或非特异性免疫刺激。

[0161] 在一些实施方案中,本文所述的分子包括核酸组分的排列影响细胞内摄取、稳定性、毒性、功效和/或非特异性免疫刺激的那些分子。在一些情况下,该分子包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分。在一些实施方案中,该分子包括根据式(I):A-X-B-Y-C的分子;其中A为结合部分,B为多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,Y为键或第二连接体。在一些情况下,所述多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。在一些情况下,式(I)的分子还包含D,即内体溶解部分。

[0162] 在一些实施方案中,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的如本文所述排列的分子增强细胞内摄取、稳定性和/或功效。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的如本文所述排列的分子降低毒性和/或非特异性免疫刺激。在一些情况下,该分子包括根据式(I):A-X-B-Y-C的分子;其中A为结合部分,B为多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,Y为键或第二连接体。在一些情况下,所述多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。在一些情况下,式(I)的分子还包含D,即内体溶解部分。

[0163] 在一些实施方案中,本文所述的分子进一步用于治疗疾病或病症。在一些情况下,用于治疗疾病或病症的分子为根据式(I):A-X-B-Y-C的分子;其中A为结合部分,B为多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,Y为键或第二连接体。在一些情况下,所述多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。在一些情况下,式(I)的分子还包含D,即内体溶解部分。

[0164] 在一些实施方案中,本文所述的分子还用于抑制靶基因在有需要的患者的原代细胞中的表达。在这样的情况下,用于此类用途的分子为根据式(I):A-X-B-Y-C的分子;其中A为结合部分,B为多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,Y为键或第二连接体。在一些情况下,所述多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。在一些情况下,式(I)的分子还包含D,即内体溶解部分。

[0165] 在一些实施方案中,本文所述的分子另外用作免疫肿瘤学疗法,用于治疗疾病或病症。在一些情况下,该分子为根据式(I):A-X-B-Y-C的分子;其中A为结合部分,B为多核苷酸,C为聚合物,X为键或第一连接体,Y为键或第二连接体。在一些情况下,所述多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。在一些情况下,式(I)的分子还包含D,即内体溶解部分。

[0166] 在另外的实施方案中,本文所述包括药剂盒,其包含一种或多种本文所述的分子。

[0167] 治疗性分子平台

[0168] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分。在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)包括根据式(I)的分子:

[0169] A-X-B-Y-C

[0170] 式I

[0171] 其中,

[0172] A为结合部分;

[0173] B为多核苷酸;

[0174] C为聚合物;

[0175] X为键或第一连接体;以及

[0176] Y为键或第二连接体;并且

[0177] 其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。

[0178] 在一些情况下,式(I)的分子还包含D,即内体溶解部分。

[0179] 在一些实施方案中,至少一个A和/或至少一个C与B的5'末端、B的3'末端、B上的内部位点或其任意组合缀合。在一些情况下,至少一个A缀合在B的一个末端,而至少一个C缀合在B的相对末端。在一些情况下,至少一个A缀合在B的一个末端,而至少一个C缀合在B上的内部位点。

[0180] 在一些情况下,A和C不在相同末端与B缀合或连接。在一些情况下,A在B的第一末端与B连接或缀合。在一些情况下,C在B的第二末端与B连接或缀合,并且B的第二末端与第一末端不同。在一些情况下,A在B的5'末端与B连接或缀合,并且C在B的3'末端与B连接或缀合。在其他情况下,A在B的3'末端与B连接或缀合,并且C在B的5'末端与B连接或缀合。

[0181] 在一些实施方案中,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚合物。在一些情况下,A和C不在相同末端与B缀合或连接。在一些情况下,A在B的第一末端与B连接或缀合。在一些情况下,C在B的第二末端与B连接或缀合,并且B的第二末端与第一末端不同。在一些情况下,A在B的5'末端与B连接或缀合,并且C在B的3'末端与B连接或缀合。在其他情况下,A在B的3'末端与B连接或缀合,并且C在B的5'末端与B连接或缀合。在一些情况下,连接A与B的X为键或非聚合物连接体。在一些情况下,X为非肽连接体(或不包含氨基酸残基的连接体)。在一些情况下,连接B与C的Y为键或第二连接体。在一些情况下,X将A与B的5'末端连接,并且Y将C与B的3'末端连接。在其他情况下,X将A与B的3'末端连接,并且Y将C与B的5'末端连接。

[0182] 在一些实施方案中,X-B与A的N-末端、C-末端、恒定区、铰链区或Fc区缀合或连接。在一些情况下,X-B与A的N-末端缀合或连接。在一些情况下,X-B与A的C-末端缀合或连接。在一些情况下,X-B与A的铰链区缀合或连接。在一些情况下,X-B与A的恒定区缀合或连接。在一些情况下,X-B与A的Fc区缀合或连接。

[0183] 在一些情况下,至少一个B和/或至少一个C以及任选的至少一个D与第一个A缀合。在一些情况下,至少一个B在末端(例如,5'末端或3'末端)与第一个A缀合或经由内部位点与第一个A缀合。在一些情况下,至少一个C与第一个A直接缀合或经由两个或更多个B间接

缀合。如果间接经由两个或更多个B缀合,则两个或更多个C缀合在B上与第一个A相同的末端、与第一个A相对的末端或在内部位点独立缀合。在一些情况下,至少一个另外的A进一步与第一个A、B或C缀合。在另外的情况下,至少一个D任选地直接或间接与第一个A、至少一个B或至少一个C缀合。如果直接与第一个A缀合,则至少一个D也任选地与至少一个B缀合以形成A-D-B缀合物,或者任选地与至少一个B和至少一个C缀合以形成A-D-B-C缀合物。在一些情况下,至少一个另外的A与第一个A不同。

[0184] 在一些情况下,两个或更多个B和/或两个或更多个C与第一个A缀合。在一些情况下,两个或更多个B在末端(例如,5'末端或3'末端)与第一个A缀合或经由内部位点与第一个A缀合。在一些情况下,两个或更多个C与第一个A直接缀合或者经由两个或更多个B间接缀合。如果间接经由两个或更多个B缀合,则两个或更多个C缀合在B上与第一个A相同的末端、与第一个A相对的末端或在内部位点独立缀合。在一些情况下,至少一个另外的A进一步与第一个A、两个或更多个B或者两个或更多个C缀合。在另外的情况下,至少一个D任选地直接或间接与第一个A、两个或更多个B或者两个或更多个C缀合。如果间接地与第一个A缀合,则至少一个D与第一个A通过两个或更多个B缀合、通过两个或更多个C缀合、通过B-C取向缀合以形成A-B-C-D型缀合物、或者通过C-B取向缀合以形成A-C-B-D型缀合物。在一些情况下,至少一个另外的A与第一个A不同。在一些情况下,两个或更多个B不同。在其他情况下,两个或更多个B相同。在一些情况下,两个或更多个C不同。在其他情况下,两个或更多个C相同。在另外的情况下,两个或更多个D不同。在另外的情况下,两个或更多个D相同。

[0185] 在其他情况下,两个或更多个B和/或两个或更多个D、任选的两个或更多个C与第一个A缀合。在一些情况下,两个或更多个B在末端(例如,5'末端或3'末端)与第一个A缀合或经由内部位点与第一个A缀合。在一些情况下,两个或更多个D与第一个A直接缀合或者经由两个或更多个B间接缀合。如果间接经由两个或更多个B缀合,则两个或更多个D缀合在B上与第一个A相同的末端、与第一个A相对的末端或在内部位点独立缀合。在一些情况下,至少一个另外的A进一步与第一个A、两个或更多个B或者两个或更多个D缀合。在另外的情况下,两个或更多个C任选地直接或间接与第一个A、两个或更多个B或者两个或更多个D缀合。在一些情况下,至少一个另外的A与第一个A不同。在一些情况下,两个或更多个B不同。在其他情况下,两个或更多个B相同。在一些情况下,两个或更多个C不同。在其他情况下,两个或更多个C相同。在另外的情况下,两个或更多个D不同。在另外的情况下,两个或更多个D相同。

[0186] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(II)的分子:

[0187] $(A\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_C)\text{-}L\text{-}D$

[0188] 式II

[0189] 其中,

[0190] A为结合部分;

[0191] B为多核苷酸;

[0192] C为聚合物;

[0193] X为键或第一连接体;

[0194] Y为键或第二连接体;

[0195] L为键或第三连接体;

[0196] D为内体溶解部分;以及

[0197] c为0与1之间的整数;并且

[0198] 其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;并且D缀合在A、B或C上的任何地方。

[0199] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(III)的分子:

[0200] A_a-X-B_b-Y-C_c-L-D_n

[0201] 式III

[0202] 其中,

[0203] A为结合部分;

[0204] B为多核苷酸;

[0205] C为聚合物;

[0206] D为内体溶解部分;

[0207] X为键或第一连接体;

[0208] Y为键或第二连接体;

[0209] L为键或第三连接体;

[0210] a和b独立地为1-3之间的整数;

[0211] c为0与3之间的整数;以及

[0212] n为0与10之间的整数;并且

[0213] 其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;A缀合在B、C或D上的任何地方;B缀合在A、C或D上的任何地方;C缀合在A、B或D上的任何地方;并且D缀合在A、B或C上的任何地方。

[0214] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(IIIa)的分子:A-X-B-L-D-Y-C。

[0215] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(IIIb)的分子:A_a-X-B_b-L-D_n。

[0216] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(IV)的分子:

[0217] A-X-$(B_b$-Y-C_c-L-$D_n)_m$

[0218] 其中,

[0219] A为结合部分;

[0220] B为多核苷酸;

[0221] C为聚合物;

[0222] D为内体溶解部分;

[0223] X为键或第一连接体;

[0224] Y为键或第二连接体;

[0225] L为键或第三连接体;

[0226] a和b独立地为1-3之间的整数;

[0227] c为0与3之间的整数;

[0228] n为0与10之间的整数;以及

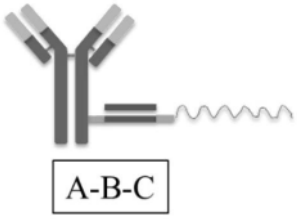
[0229] m为1-3之间的整数;并且

[0230] 其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;C缀合在B或D上的任何地方;并且D缀合在B或C上的任何地方。

[0231] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)包括根据式(IVa)的分子:$A\text{-}X\text{-}(B_b\text{-}L\text{-}D_n\text{-}Y\text{-}C_c)_m$。

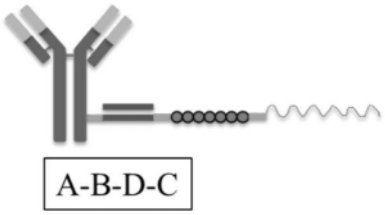
[0232] 在一些实施方案中,本文所述的分子(例如,治疗性分子)为如图1所示的分子。在一些情况下,本文所述的分子(例如,治疗性分子)为如图1A所示的分子。在一些情况下,本文所述的分子(例如,治疗性分子)为如图1B所示的分子。在另外的情况下,本文所述的分子(例如,治疗性分子)为如图1C所示的分子。

[0233] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)为如图所示的分子:



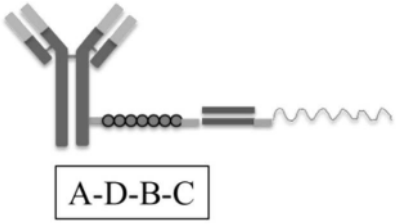
。

[0234] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)为如图所示的分子:



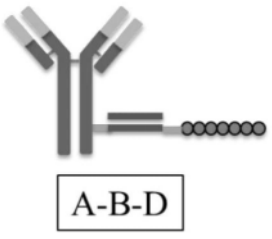
。

[0235] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)为如图所示的分子:



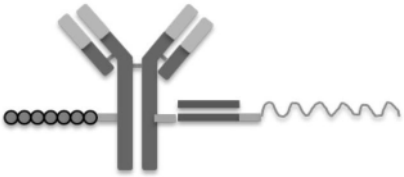
。

[0236] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)为如图所示的分子:



。

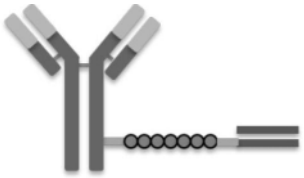
[0237] 在一些实施方案中,分子(例如,治疗性分子)为如图所示的分子:



D-A-B-C

。

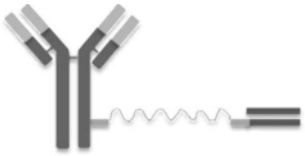
[0238] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



A-D-B

。

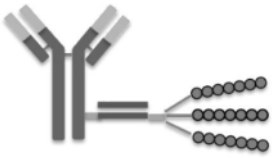
[0239] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



A-C-B

。

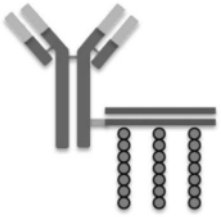
[0240] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



$A\text{-}B\text{-}(D)_n$

。

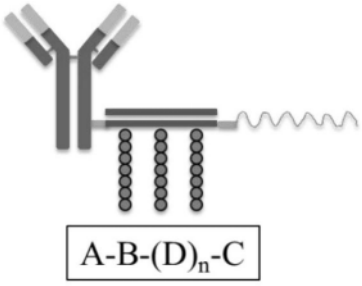
[0241] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



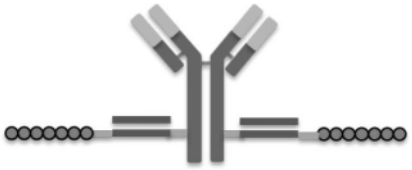
$A\text{-}B\text{-}(D)_n$

。

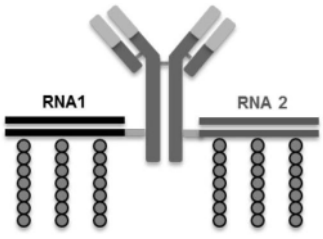
[0242] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



[0243] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：

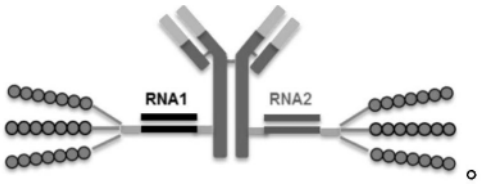


[0244] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：

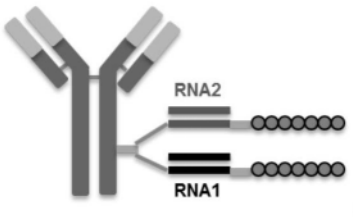


[0245] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：

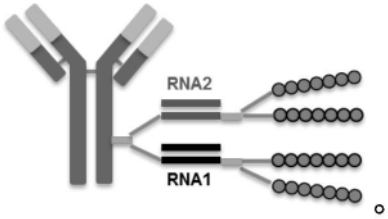
[0246] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



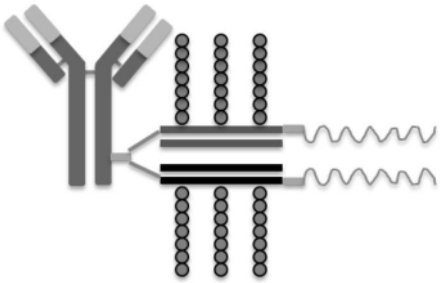
[0247] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



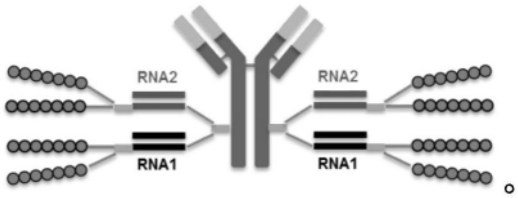
[0248] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



[0249] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



[0250] 在一些实施方案中，分子（例如，治疗性分子）为如图所示的分子：



[0251] 如上所示的 仅用于表示目的，并且包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。

[0252] 多核酸分子靶标

[0253] 在一些实施方案中，多核酸分子B是与癌基因上的靶区域杂交的多核酸分子(或多核苷酸)。在一些情况下，癌基因进一步分类为几个类别：生长因子或促分裂原、受体酪氨酸激酶、细胞质酪氨酸激酶、细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶、调节性GTP酶和转录因子。示例性的生长因子包括c-Sis。示例性的受体酪氨酸激酶包括表皮生长因子受体(EGFR)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)和HER2/neu。示例性的细胞质酪氨酸激酶包括Src酪氨酸激酶家族、Syk-ZAP-70酪氨酸激酶家族、BTK酪氨酸激酶家族和CML中的Abl基因。示例性的细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶包括Raf激酶和细胞周期蛋白依赖性激酶。示例性的调节性GTP酶包括Ras蛋白质家族，诸如KRAS。示例性的转录因子包括MYC基因。在一些情况下，本文所述的癌基因包括选自以下的癌基因：生长因子或促分裂原、受体酪氨酸激酶、细胞质酪氨酸激酶、细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶、调节性GTP酶和转录因子。在一些实施方案中，多核酸分子是与癌基因的靶区域杂交的多核酸分子，该癌基因选自生长因子或促分裂原、受体酪氨酸激酶、细胞质酪氨酸激酶、细胞质丝氨酸/苏氨酸激酶、调节性GTP酶和转录因子。

[0254] 在一些情况下，本文所述的癌基因包括Abl、AKT-2、ALK、AML1(或RUNX1)、AR、AXL、BCL-2、BCL-3、BCL-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。在一些实施方案中,多核酸分子是与Abl、AKT-2、ALK、AML1(或RUNX1)、AR、AXL、BCL-2、BCL-3、BCL-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的靶区域杂交的多核酸分子。

[0255] 在一些实施方案中,本文所述的癌基因包括KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1(β-连环蛋白)或β-连环蛋白相关基因。在一些实施方案中,多核酸分子B是与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的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与KRAS的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与EGFR的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与AR的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与CNNTB1(β-连环蛋白)的靶区域杂交的多核酸分子。在一些实施方案中,多核酸分子B是与CNNTB1(β-连环蛋白)相关基因的靶区域杂交的多核酸分子。在一些情况下,β-连环蛋白相关基因包括PIK3CA、PIK3CB和Myc。在一些情况下,多核酸分子B是与HPRT1的靶区域杂交的多核酸分子。

[0256] 靶向Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物(KRAS)的多核酸分子

[0257] Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物(也称为GTP酶KRas、V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物或KRAS)参与调节细胞分裂。K-Ras蛋白是属于Ras超家族的GTP酶。在一些情况下,K-Ras调节细胞周期进程,以及在不同环境触发(例如,细胞应激、紫外线、热休克或电离辐射)下诱导生长停滞、细胞凋亡和复制衰老。在一些情况下,野生型KRAS基因已显示在不同类型的癌症的肿瘤进展期间经常丢失,同时KRAS基因的突变与癌症发展有关。在一些情况下,KRAS扩增也涉及癌症发展(参见例如,Valtorta等人"KRAS gene amplification incolorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy,"Int.J.Cancer 133:1259-1266(2013))。在这样的情况下,癌症属于难治性癌症,其中患者已经获得对特定抑制剂或抑制剂类别的耐药性。

[0258] 在一些实施方案中,KRAS基因是野生型或包含突变。在一些情况下,KRAS mRNA是野生型或包含突变。在一些情况下,多核酸分子是与野生型KRASDNA或RNA的靶区域杂交的多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子是与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的KRASDNA或RNA的靶区域杂交的多核酸分子。

[0259] 在一些实施方案中,KRASDNA或RNA包含一种或多种突变。在一些实施方案中,KRASDNA或RNA在外显子1中的密码子12或13处包含一种或多种突变。在一些情况下,KRASDNA或RNA在密码子61、63、117、119或146处包含一种或多种突变。在一些情况下,KRASDNA或RNA在对应于KRAS多肽的氨基酸残基12、13、18、19、20、22、24、26、36、59、61、63、64、68、110、116、117、119、146、147、158、164、176或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些实施方案中,KRASDNA或RNA在对应于选自KRAS多肽的G12V、G12D、G12C、G12A、G12S、G12F、G13C、G13D、G13V、A18D、L19F、T20R、Q22K、I24N、N26K、I36L、I36M、A59G、A59E、Q61K、Q61H、Q61L、Q61R、E63K、Y64D、Y64N、R68S、P110S、K117N、C118S、A146T、A146P、A146V、K147N、

T158A、R164Q、K176Q或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变。

[0260] 在一些实施方案中,多核酸分子与包含一种或多种突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子1中的密码子12或13处包含一种或多种突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在密码子61、63、117、119或146处包含一种或多种突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于KRAS多肽的氨基酸残基12、13、18、19、20、22、24、26、36、59、61、63、64、68、110、116、117、119、146、147、158、164、176或其组合的位置处包含一种或多种突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含对应于选自KRAS多肽的G12V、G12D、G12C、G12A、G12S、G12F、G13C、G13D、G13V、A18D、L19F、T20R、Q22K、I24N、N26K、I36L、I36M、A59G、A59E、Q61K、Q61H、Q61L、Q61R、E63K、Y64D、Y64N、R68S、P110S、K117N、C118S、A146T、A146P、A146V、K147N、T158A、R164Q、K176Q或其组合的氨基酸残基的一种或多种突变的KRASDNA或RNA的靶区域杂交。

[0261] 靶向表皮生长因子受体(EGFR)的多核酸分子

[0262] 表皮生长因子受体(EGFR、ErbB-1或HER1)是跨膜酪氨酸激酶受体和ErbB受体家族的成员,其还包括HER2/c-neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)和Her4(ErbB-4)。在一些情况下,EGFR突变驱动RAS/RAF/MAPK、PI3K/AKT和/或JAK/STAT途径的下游激活,导致有丝分裂、细胞增殖和抑制细胞凋亡。此外,野生型EGFR基因的扩增已经涉及癌症如成胶质细胞瘤和非小细胞肺癌的发展(Talasila,等人,“EGFR Wild-type Amplification and Activation Promote Invasion andDevelopment of Glioblastoma Independent of Angiogenesis,”ActaNeuropathol.125(5):683-698(2013);Bell等人,“Epidermal Growth FactorReceptor Mutations and Gene Amplification in Non-Small-Cell Lung Cancer:Molecular Analysis of the IDEAL/INTACT Gefitinib Trials,”J.ClinicalOncology 23(31):8081-8092(2005))。

[0263] 在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA是野生型EGFR或包含突变的EGFR。在一些情况下,EGFR是野生型EGFR。在一些情况下,EGFR DNA或RNA包含突变。在一些情况下,多核酸分子与野生型EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,多核酸分子与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0264] 在一些情况下,EGFR DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一种或多种突变。在一些情况下,一个或多个外显子包括外显子18、外显子19、外显子20、外显子21或外显子22。在一些情况下,EGFR DNA或RNA在外显子18、外显子19、外显子20、外显子21、外显子22或其组合中包含一种或多种突变。

[0265] 在一些情况下,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基34、38、45、62、63、77、78、108、114、120、140、148、149、160、177、178、189、191、198、220、222、223、229、237、240、244、252、254、255、256、263、270、273、276、282、288、289、301、303、304、309、314、326、331、354、363、373、337、380、384、393、427、428、437、441、447、465、475、515、526、527、531、536、541、546、571、588、589、596、596、598、602、614、620、628、636、641、645、651、671、689、694、700、709、712、714、715、716、719、720、721、731、733、739-744、742、746-750、746-752、746、747、747-749、747-751、747-753、751、752、754、752-759、750、761-762、761、763、765、767-768、767-769、768、769、769-770、770-771、772、773-774、773、774、774-775、776、779、

783、784、786、790、792、794、798、803、805、807、810、826、827、831、832、833、835、837、838、839、842、843、847、850、851、853、854、856、858、861、863、894、917、967、1006、1019、1042、1100、1129、1141、1153、1164、1167或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基747、761、790、854、858或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基761、790、858或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基747的位置处包含突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基761的位置处包含突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基790的位置处包含突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基854的位置处包含突变。在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA在对应于EGFR多肽的氨基酸残基858的位置处包含突变。

[0266] 在一些实施方案中,EGFR DNA或RNA包含选自EGFR多肽的T34M、L38V、E45Q、L62R、G63R、G63K、S77F、F78L、R108K、R108G、E114K、A120P、L140V、V148M、R149W、E160K、S177P、M178I、K189T、D191N、S198R、S220P、R222L、R222C、S223Y、S229C、A237Y、C240Y、R244G、R252C、R252P、F254I、R255(无义突变)、D256Y、T263P、Y270C、T273A、Q276(无义)、E282K、G288(移码)、A289D、A289V、A289T、A289N、A289D、V301(缺失)、D303H、H304Y、R309Q、D314N、C326R、G331R、T354M、T363I、P373Q、R337S、S380(移码)、T384S、D393Y、R427L、G428S、S437Y、V441I、S447Y、G465R、I475V、C515S、C526S、R527L、R531(无义)、V536M、L541I、P546Q、C571S、G588S、P589L、P596L、P596S、P596R、P596L、G598V、G598A、E602G、G614D、C620Y、C620W、C628Y、C628F、C636Y、T638M、P641H、S645C、V651M、R671C、V689M、P694S、N700D、E709A、E709K、E709Q、E709K、F712L、K714N、I715S、K716R、G719A、G719C、G719D、G719S、S720C、S720F、G721V、W731Stop、P733L、K739-I744(插入)、V742I、V742A、E746-A750(缺失)、E746K、L747S、L747-E749(缺失)、L747-T751(缺失)、L747-P753(缺失)、G746-S752(缺失)、T751I、S752Y、K754(缺失)、S752-I759(缺失)、A750P、D761-E762(例如,残基EAFQ插入(SEQ ID NO:2110))、D761N、D761Y、A763V、V765A、A767-S768(例如,残基TLA插入)、A767-V769(例如,残基ASV插入)、S768I、S768T、V769L、V769M、V769-D770(例如,残基Y插入)、770-771(例如,残基GL插入)、770-771(例如,残基G插入)、770-771(例如,残基CV插入)、770-771(例如,残基SVD插入)、P772R、773-774(例如,残基NPH插入)、H773R、H773L、V774M、774-775(例如,残基HV插入)、R776H、R776C、G779F、T783A、T784F、T854A、V786L、T790M、L792P、P794H、L798F、R803W、H805R、D807H、G810S、N826S、Y827(无义)、R831H、R832C、R832H、L833F、L833V、H835L、D837V、L838M、L838P、A839V、N842H、V843L、T847K、T847I、H850N、V851A、I853T、F856L、L858R、L858M、L861Q、L861R、G863D、Q894L、G917A、E967A、D1006Y、P1019L、S1042N、R1100S、H1129Y、T1141S、S1153I、Q1164R、L1167M或其组合的一种或多种突变。

[0267] 在一些情况下,多核酸分子与包含一种或多种突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子18、外显子19、外显子20、外显子21、外显子22或其组合中包含一种或多种突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0268] 在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基34、38、45、62、63、77、78、108、114、120、140、148、149、160、177、178、189、191、198、220、222、223、229、237、240、244、252、254、255、256、263、270、273、276、282、288、289、301、303、304、309、314、326、

331、354、363、373、337、380、384、393、427、428、437、441、447、465、475、515、526、527、531、536、541、546、571、588、589、596、596、598、602、614、620、628、636、641、645、651、671、689、694、700、709、712、714、715、716、719、720、721、731、733、739-744、742、746-750、746-752、746、747、747-749、747-751、747-753、751、752、754、752-759、750、761-762、761、763、765、767-768、767-769、768、769、769-770、770-771、772、773-774、773、774、774-775、776、779、783、784、786、790、792、794、798、803、805、807、810、826、827、831、832、833、835、837、838、839、842、843、847、850、851、853、854、856、858、861、863、894、917、967、1006、1019、1042、1100、1129、1141、1153、1164、1167或其组合的位置处包含一种或多种突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基747、761、790、854、858或其组合的位置处包含一种或多种突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基761、790、858或其组合的位置处包含一种或多种突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基747的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基761的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基790的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基854的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于EGFR多肽的氨基酸残基858的位置处包含突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0269] 在一些实施方案中,多核酸分子与包含选自EGFR多肽的T34M、L38V、E45Q、L62R、G63R、G63K、S77F、F78L、R108K、R108G、E114K、A120P、L140V、V148M、R149W、E160K、S177P、M178I、K189T、D191N、S198R、S220P、R222L、R222C、S223Y、S229C、A237Y、C240Y、R244G、R252C、R252P、F254I、R255(无义突变)、D256Y、T263P、Y270C、T273A、Q276(无义)、E282K、G288(移码)、A289D、A289V、A289T、A289N、A289D、V301(缺失)、D303H、H304Y、R309Q、D314N、C326R、G331R、T354M、T363I、P373Q、R337S、S380(移码)、T384S、D393Y、R427L、G428S、S437Y、V441I、S447Y、G465R、I475V、C515S、C526S、R527L、R531(无义)、V536M、L541I、P546Q、C571S、G588S、P589L、P596L、P596S、P596R、P596L、G598V、G598A、E602G、G614D、C620Y、C620W、C628Y、C628F、C636Y、T638M、P641H、S645C、V651M、R671C、V689M、P694S、N700D、E709A、E709K、E709Q、E709K、F712L、K714N、I715S、K716R、G719A、G719C、G719D、G719S、S720C、S720F、G721V、W731Stop、P733L、K739-I744(插入)、V742I、V742A、E746-A750(缺失)、E746K、L747S、L747-E749(缺失)、L747-T751(缺失)、L747-P753(缺失)、G746-S752(缺失)、T751I、S752Y、K754(缺失)、S752-I759(缺失)、A750P、D761-E762(例如,残基EAFQ插入(SEQ ID NO:2110))、D761N、D761Y、A763V、V765A、A767-S768(例如,残基TLA插入)、A767-V769(例如,残基ASV插入)、S768I、S768T、V769L、V769M、V769-D770(例如,残基Y插入)、770-771(例如,残基GL插入)、770-771(例如,残基G插入)、770-771(例如,残基CV插入)、770-771(例如,残基SVD插入)、P772R、773-774(例如,残基NPH插入)、H773R、H773L、V774M、774-775(例如,残基HV插入)、R776H、R776C、G779F、T783A、T784F、T854A、V786L、T790M、L792P、P794H、L798F、R803W、H805R、D807H、G810S、N826S、Y827(无义)、R831H、R832C、R832H、L833F、L833V、H835L、D837V、L838M、L838P、A839V、N842H、V843L、T847K、T847I、H850N、V851A、I853T、F856L、

L858R、L858M、L861Q、L861R、G863D、Q894L、G917A、E967A、D1006Y、P1019L、S1042N、R1100S、H1129Y、T1141S、S1153I、Q1164R、L1167M或其组合的一种或多种突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含选自EGFR多肽的L747S、D761Y、T790M、T854A、L858R或其组合的一种或多种突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含选自EGFR多肽的D761Y、T790M、L858R或其组合的一种或多种突变的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含EGFR多肽的突变L747S的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含EGFR多肽的突变D761Y的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含EGFR多肽的突变T790M的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含EGFR多肽的突变T854A的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含EGFR多肽的突变L858R的EGFR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0270] 靶向雄激素受体(AR)的多核酸分子

[0271] 雄激素受体(AR)(也称为NR3C4,核受体亚家族3,组C,基因4)属于核受体超家族的类固醇激素组及其相关成员:雌激素受体(ER)、糖皮质激素受体(GR)、孕酮受体(PR)和盐皮质激素受体(MR)。雄激素或类固醇激素通过雄激素受体调节蛋白质合成和组织重塑。AR蛋白是配体诱导的锌指转录因子,其调节靶基因表达。AR基因中突变的存在已经在几种类型的癌症(例如,前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌或食管癌)中得以观察,并且在一些情况下,已经与转移性进展相联系。

[0272] 在一些实施方案中,AR DNA或RNA是野生型的或者包含一种或多种突变和/或剪接变体。在一些情况下,AR DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些情况下,AR DNA或RNA包含选自包括但不限于AR1/2/2b、ARV2、ARV3、ARV4、AR1/2/3/2b、ARV5、ARV6、ARV7、ARV9、ARV10、ARV11、ARV12、ARV13、ARV14、ARV15、ARV16和ARV(v567es)的AR剪接变体的一种或多种剪接变体。在一些情况下,多核酸分子与包含突变(例如,置换、缺失或添加)或剪接变体的AR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0273] 在一些实施方案中,AR DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些实施方案中,AR DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一种或多种突变。在一些情况下,一个或多个外显子包括外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7或外显子8。在一些实施方案中,AR DNA或RNA在外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8或其组合中包含一种或多种突变。在一些情况下,AR DNA或RNA在对应于AR多肽的氨基酸残基2、14、16、29、45、54、57、64、106、112、176、180、184、194、198、204、214、221、222、233、243、252、255、266、269、287、288、334、335、340、363、368、369、390、403、443、491、505、513、524、524、528、533、547、548、564、567、568、574、547、559、568、571、573、575、576、577、578、579、580、581、582、585、586、587、596、597、599、601、604、607、608、609、610、611、615、616、617、619、622、629、630、638、645、647、653、662、664、670、671、672、674、677、681、682、683、684、687、688、689、690、695、700、701、702、703、705、706、707、708、710、711、712、715、717、720、721、722、723、724、725、726、727、728、730、732、733、737、739、741、742、743、744、745、746、748、749、750、751、752、754、755、756、757、758、759、762、763、764、765、766、767、768、771、772、774、777、779、786、795、780、782、784、787、788、790、791、793、794、798、802、803、804、806、807、812、813、814、819、820、821、824、827、828、830、831、834、840、841、

842、846、854、855、856、863、864、866、869、870、871、874、875、877、879、880、881、886、888、889、891、892、895、896、897、898、902、903、904、907、909、910、911、913、916、919或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些实施方案中,AR DNA或RNA在对应于选自AR多肽的E2K、P14Q、K16N、V29M、S45T、L54S、L57Q、Q64R、Y106C、Q112H、S176S、K180R、L184P、Q194R、E198G、G204S、G214R、K221N、N222D、D233K、S243L、A252V、L255P、M266T、P269S、A287D、E288K、S334P、S335T、P340L、Y363N、L368V、A369P、P390R、P390S、P390L、A403V、Q443R、G491S、G505D、P513S、G524D、G524S、D528G、P533S、L547F、P548S、D564Y、S567F、G568W、L574P、L547F、C559Y、G568W、G568V、Y571C、Y571H、A573D、T575A、C576R、C576F、G577R、S578T、C579Y、C579F、K580R、V581F、F582Y、F582S、R585K、A586V、A587S、A596T、A596S、S597G、S597I、N599Y、C601F、D604Y、R607Q、R608K、K609N、D610T、C611Y、R615H、R615P、R615G、R616C、L616R、L616P、R617P、C619Y、A622V、R629W、R629Q、K630T、L638M、A645D、S647N、E653K、S662(无义)、I664N、Q670L、Q670R、P671H、I672T、L674P、L677P、E681L、P682T、G683A、V684I、V684A、A687V、G688Q、H689P、D690V、D695N、D695V、D695H、L700M、L701P、L701I、H701H、S702A、S703G、N705S、N705Y、E706(无义)、L707R、G708A、R710T、Q711E、L712F、V715M、K717Q、K720E、A721T、L722F、P723S、G724S、G724D、G724N、F725L、R726L、N727K、L728S、L728I、V730M、D732N、D732Y、D732E、Q733H、I737T、Y739D、W741R、M742V、M742I、G743R、G743V、L744F、M745T、V746M、A748D、A748V、A748T、M749V、M749I、G750S、G750D、W751R、R752Q、F754V、F754L、T755A、N756S、N756D、V757A、N758T、S759F、S759P、L762F、Y763H、Y763C、F764L、A765T、A765V、P766A、P766S、D767E、L768P、L768M、N771H、E772G、E772A、R774H、R774C、K777T、R779W、R786Q、G795V、M780I、S782N、C784Y、M787V、R788S、L790F、S791P、E793D、F794S、Q798E、Q802R、G803L、F804L、C806Y、M807V、M807R、M807I、L812P、F813V、S814N、N819Q、G820A、L821V、Q824L、Q824R、F827L、F827V、D828H、L830V、L830P、R831Q、R831L、Y834C、R840C、R840H、I841S、I842T、R846G、R854K、R855C、R855H、F856L、L863R、D864N、D864E、D864G、V866L、V866M、V866E、I869M、A870G、A870V、R871G、H874Y、H874R、Q875K、T877S、T877A、D879T、D879G、L880Q、L881V、M886V、S888L、V889M、F891L、P892L、M895T、A896T、E897D、I898T、Q902R、V903M、P904S、P904H、L907F、G909R、G909E、K910R、V911L、P913S、F916L、Q919R或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变。

[0274] 在一些实施方案中,多核酸分子与包含一种或多种突变的ARDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与一种或多种AR剪接变体杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含一种或多种包括但不限于AR1/2/2b、ARV2、ARV3、ARV4、AR1/2/3/2b、ARV5、ARV6、ARV7、ARV9、ARV10、ARV11、ARV12、ARV13、ARV14、ARV15、ARV16和ARV(v567es)的AR剪接变体的AR DNA或RNA杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子1、外显子2、外显子3、外显子4、外显子5、外显子6、外显子7、外显子8或其组合中包含一种或多种突变的AR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于AR多肽的氨基酸残基2、14、16、29、45、54、57、64、106、112、176、180、184、194、198、204、214、221、222、233、243、252、255、266、269、287、288、334、335、340、363、368、369、390、403、443、491、505、513、524、524、528、533、547、548、564、567、568、574、547、559、568、571、573、575、576、577、578、579、580、581、582、585、586、587、596、597、599、601、604、607、608、609、610、611、615、616、617、619、622、629、630、638、645、647、653、662、664、670、671、672、674、677、681、682、683、684、687、

688、689、690、695、700、701、702、703、705、706、707、708、710、711、712、715、717、720、721、722、723、724、725、726、727、728、730、732、733、737、739、741、742、743、744、745、746、748、749、750、751、752、754、755、756、757、758、759、762、763、764、765、766、767、768、771、772、774、777、779、786、795、780、782、784、787、788、790、791、793、794、798、802、803、804、806、807、812、813、814、819、820、821、824、827、828、830、831、834、840、841、842、846、854、855、856、863、864、866、869、870、871、874、875、877、879、880、881、886、888、889、891、892、895、896、897、898、902、903、904、907、909、910、911、913、916、919或其组合的位置处包含一种或多种突变的AR DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含选自AR多肽的E2K、P14Q、K16N、V29M、S45T、L54S、L57Q、Q64R、Y106C、Q112H、S176S、K180R、L184P、Q194R、E198G、G204S、G214R、K221N、N222D、D233K、S243L、A252V、L255P、M266T、P269S、A287D、E288K、S334P、S335T、P340L、Y363N、L368V、A369P、P390R、P390S、P390L、A403V、Q443R、G491S、G505D、P513S、G524D、G524S、D528G、P533S、L547F、P548S、D564Y、S567F、G568W、L574P、L547F、C559Y、G568W、G568V、Y571C、Y571H、A573D、T575A、C576R、C576F、G577R、S578T、C579Y、C579F、K580R、V581F、F582Y、F582S、R585K、A586V、A587S、A596T、A596S、S597G、S597I、N599Y、C601F、D604Y、R607Q、R608K、K609N、D610T、C611Y、R615H、R615P、R615G、R616C、L616R、L616P、R617P、C619Y、A622V、R629W、R629Q、K630T、L638M、A645D、S647N、E653K、S662(无义)、I664N、Q670L、Q670R、P671H、I672T、L674P、L677P、E681L、P682T、G683A、V684I、V684A、A687V、G688Q、H689P、D690V、D695N、D695V、D695H、L700M、L701P、L701I、H701H、S702A、S703G、N705S、N705Y、E706(无义)、L707R、G708A、R710T、Q711E、L712F、V715M、K717Q、K720E、A721T、L722F、P723S、G724S、G724D、G724N、F725L、R726L、N727K、L728S、L728I、V730M、D732N、D732Y、D732E、Q733H、I737T、Y739D、W741R、M742V、M742I、G743R、G743V、L744F、M745T、V746M、A748D、A748V、A748T、M749V、M749I、G750S、G750D、W751R、R752Q、F754V、F754L、T755A、N756S、N756D、V757A、N758T、S759F、S759P、L762F、Y763H、Y763C、F764L、A765T、A765V、P766A、P766S、D767E、L768P、L768M、N771H、E772G、E772A、R774H、R774C、K777T、R779W、R786Q、G795V、M780I、S782N、C784Y、M787V、R788S、L790F、S791P、E793D、F794S、Q798E、Q802R、G803L、F804L、C806Y、M807V、M807R、M807I、L812P、F813V、S814N、N819Q、G820A、L821V、Q824L、Q824R、F827L、F827V、D828H、L830V、L830P、R831Q、R831L、Y834C、R840C、R840H、I841S、I842T、R846G、R854K、R855C、R855H、F856L、L863R、D864N、D864E、D864G、V866L、V866M、V866E、I869M、A870G、A870V、R871G、H874Y、H874R、Q875K、T877S、T877A、D879T、D879G、L880Q、L881V、M886V、S888L、V889M、F891L、P892L、M895T、A896T、E897D、I898T、Q902R、V903M、P904S、P904H、L907F、G909R、G909E、K910R、V911L、P913S、F916L、Q919R或其组合的一种或多种突变的AR DNA或RNA的靶区域杂交。

[0275] 靶向β-连环蛋白和β-连环蛋白相关基因的多核酸分子

[0276] 连环蛋白β-1(也称为CTNNB1、β-连环蛋白或beta-连环蛋白)是连环蛋白家族的成员。在人类中,其由CTNNB1基因编码,并以其双重功能——细胞间粘附和基因转录而闻名。β-连环蛋白是基于钙粘着蛋白的粘附连接的整体结构组分,并调节细胞生长和细胞之间的粘附并锚定肌动蛋白细胞骨架。在一些情况下,β-连环蛋白负责传递接触抑制信号,该信号在上皮片完成时引起细胞停止分裂。β-连环蛋白也是Wnt信号传导途径的关键核效应物。在

一些情况下,β-连环蛋白的结构和信号传导性质的不平衡导致疾病以及与恶性肿瘤如癌症相关的生长失调。例如,β-连环蛋白的过表达已经与癌症如胃癌相联系(Suriano,等人,“Beta-catenin(CTNNB1)gene amplification:a new mechanism of proteinoverexpression in cancer,”Genes Chromosomes Cancer 42(3):238-246(2005))。在一些情况下,CTNNB1基因中的突变已经与癌症发展(例如,结肠癌、黑素瘤、肝细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、成神经管细胞瘤、毛母质瘤或前列腺癌)相联系,并且在一些情况下,与转移性进展相联系。在其他情况下,CTNNB1基因中的突变导致β-连环蛋白在没有任何外部刺激的情况下易位至细胞核,并持续驱动其靶基因的转录。在一些情况下,β-连环蛋白将受影响细胞先前的上皮表型改变成侵袭性的间充质样类型的潜力有助于转移形成。

[0277] 在一些实施方案中,CTNNB1基因是野生型CTNNB1或者包含一种或多种突变的CTNNB1。在一些情况下,CTNNB1是野生型CTNNB1。在一些情况下,CTNNB1是包含一种或多种突变的CTNNB1。在一些情况下,多核酸分子是与野生型CTNNB1的靶区域杂交的多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子是与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的CTNNB1的靶区域杂交的多核酸分子。

[0278] 在一些实施方案中,CTNNB1 DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些实施方案中,CTNNB1 DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一种或多种突变。在一些情况下,一个或多个外显子包括外显子3。在一些情况下,CTNNB1 DNA或RNA在密码子32、33、34、37、41、45、183、245、287或其组合中包含一种或多种突变。在一些情况下,CTNNB1DNA或RNA在对应于CTNNB1多肽的氨基酸残基25、31、32、33、34、35、36、37、41、45、140、162、170、199、213、215、257、303、322、334、354、367、373、383、387、402、426、453、474、486、515、517、535、553、555、582、587、619、623、641、646、688、703、710、712、714、724、738、777或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些情况下,CTNNB1 DNA或RNA在对应于选自CTNNB1多肽的W25(无义突变)、L31M、D32A、D32N、D32Y、D32G、D32H、S33C、S33Y、S33F、S33P、G34R、G34E、G34V、I35S、H36Y、S37F、S37P、S37C、S37A、T41N、T41A、T41I、S45Y、S45F、S45C、I140T、D162E、K170M、V199I、C213F、A215T、T257I、I303M、Q322K、E334K、K354T、G367V、P373S、W383G、N387K、L402F、N426D、R453L、R453Q、R474(无义突变)、R486C、R515Q、L517F、R535(无义突变)、R535Q、M553V、G555A、R582Q、R587Q、C619Y、Q623E、T641(移码)、S646F、M688T、Q703H、R710H、D712N、P714R、Y724H、E738K、F777S或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变。

[0279] 在一些实施方案中,多核酸分子与包含一种或多种突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子3内包含一种或多种突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在密码子32、33、34、37、41、45、183、245、287或其组合处包含一种或多种突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于CTNNB1多肽的氨基酸残基25、31、32、33、34、35、36、37、41、45、140、162、170、199、213、215、257、303、322、334、354、367、373、383、387、402、426、453、474、486、515、517、535、553、555、582、587、619、623、641、646、688、703、710、712、714、724、738、777或其组合的位置处包含一种或多种突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,多核酸分子与包含选自CTNNB1多肽的W25(无义突变)、L31M、D32A、D32N、D32Y、D32G、D32H、S33C、S33Y、S33F、S33P、G34R、G34E、G34V、I35S、H36Y、S37F、S37P、S37C、S37A、T41N、T41A、T41I、S45Y、S45F、S45C、I140T、D162E、K170M、V199I、C213F、A215T、T257I、

I303M、Q322K、E334K、K354T、G367V、P373S、W383G、N387K、L402F、N426D、R453L、R453Q、R474(无义突变)、R486C、R515Q、L517F、R535(无义突变)、R535Q、M553V、G555A、R582Q、R587Q、C619Y、Q623E、T641(移码)、S646F、M688T、Q703H、R710H、D712N、P714R、Y724H、E738K、F777S或其组合的一种或多种突变的CTNNB1 DNA或RNA的靶区域杂交。

[0280] 在一些实施方案中,β-连环蛋白相关基因进一步包括PIK3CA、PIK3CB和MYC。在一些实施方案中,β-连环蛋白相关基因进一步包括PIK3CA DNA或RNA。PIK3CA(磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶,催化亚基α或p110α蛋白)是I类PI 3-激酶催化亚基,其使用ATP使磷脂酰肌醇磷酸化。在一些实施方案中,PIK3CA基因是野生型PIK3CA或者包含一种或多种突变的PIK3CA。在一些情况下,PIK3CA DNA或RNA是野生型PIK3CA。在一些情况下,PIK3CA DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些情况下,多核酸分子与野生型PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,多核酸分子与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。

[0281] 在一些实施方案中,PIK3CA DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些实施方案中,PIK3CA DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一种或多种突变。在一些情况下,PIK3CA DNA或RNA在外显子9和/或20内包含一种或多种突变。在一些情况下,PIK3CA DNA或RNA在对应于PIK3CA多肽的氨基酸残基1、4、10-16、11-18、11、12、38、39、65、72、75、79、81、83、88、90、93、102、103、103-104、103-106、104、105-108、106、106-107、106-108、107、108、109-112、110、111、113、115、137、170、258、272、279、320、328、335、342、344、345、350、357、359、363、364、365、366、378、398、401、417、420、447-455、449、449-457、451、453、454、455、455-460、463-465、471、495、522、538、539、542、545、546、547、576、604、614、617、629、643、663、682、725、726、777、791、818、866、901、909、939、951、958、970、971、975、992、1004、1007、1016、1017、1021、1025、1029、1037、1040、1043、1044、1045、1047、1048、1049、1052、1065、1069或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些实施方案中,PIK3CADNA或RNA在对应于选自PIK3CA多肽的M1V、R4(无义突变)、L10-M16(缺失)、W11-P18(缺失)、W11L、G12D、R38L、R38H、R38C、R38S、E39K、E39G、E65K、S72G、Q75E、R79M、E81K、E81(缺失)、F83Y、R88Q、C90Y、C90G、R93Q、R93W、I102(缺失)、E103G、E103-P104(缺失)、E103-G106(缺失)、P104L、V105-R108(缺失)、G106V、G106-N107(缺失)、G106-R108(缺失)、G106R、N107S、R108L、R108H、E109-I112(缺失)、E110(缺失)、K111E、K111R、K111N、K111(缺失)、L113(缺失)、R115L、Q137L、N170S、D258N、Y272(无义突变)、L279I、G320V、W328S、R335G、T342S、V344G、V344M、V344A、N345K、N345I、N345T、D350N、D350G、R357Q、G359R、G363A、G364R、E365K、E365V、P366R、C378R、C378Y、R398H、R401Q、E417K、C420R、C420G、P447-L455(缺失)、P449L、P449-N457(缺失)、G451R、G451V、E453K、E453Q、E453D、D454Y、L455(移码插入)、L455-G460(缺失)、G463-N465(缺失)、P471L、P471A、H495L、H495Y、E522A、D538N、P539R、E542K、E542V、E542G、E542Q、E542A、E545K、E545A、E545G、E545Q、E545D、Q546K、Q546R、Q546P、E547D、S576Y、C604R、F614I、A617W、S629C、Q643H、I663S、Q682(缺失)、D725N、W726K、R777M、E791Q、R818C、L866W、C901F、F909L、D939G、R951C、Q958R、E970K、C971R、R975S、R992P、M1004I、G1007R、F1016C、D1017H、Y1021H、Y1021C、T1025A、T1025S、D1029H、E1037K、M1040V、M1043V、M1043I、N1044K、N1044Y、D1045V、H1047R、H1047L、H1047Y、H1047Q、H1048R、G1049R、T1052K、H1065L、1069W(无终止突变)或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变。

[0282] 在一些实施方案中,多核酸分子与包含一种或多种突变的PIK3CADNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子内包含一种或多种突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子9或外显子20内包含一种或多种突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于PIK3CA多肽的氨基酸残基1、4、10-16、11-18、11、12、38、39、65、72、75、79、81、83、88、90、93、102、103、103-104、103-106、104、105-108、106、106-107、106-108、107、108、109-112、110、111、113、115、137、170、258、272、279、320、328、335、342、344、345、350、357、359、363、364、365、366、378、398、401、417、420、447-455、449、449-457、451、453、454、455、455-460、463-465、471、495、522、538、539、542、545、546、547、576、604、614、617、629、643、663、682、725、726、777、791、818、866、901、909、939、951、958、970、971、975、992、1004、1007、1016、1017、1021、1025、1029、1037、1040、1043、1044、1045、1047、1048、1049、1052、1065、1069或其组合的位置处包含一种或多种突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子是与在对应于选自PIK3CB多肽的M1V、R4(无义突变)、L10-M16(缺失)、W11-P18(缺失)、W11L、G12D、R38L、R38H、R38C、R38S、E39K、E39G、E65K、S72G、Q75E、R79M、E81K、E81(缺失)、F83Y、R88Q、C90Y、C90G、R93Q、R93W、I102(缺失)、E103G、E103-P104(缺失)、E103-G106(缺失)、P104L、V105-R108(缺失)、G106V、G106-N107(缺失)、G106-R108(缺失)、G106R、N107S、R108L、R108H、E109-I112(缺失)、E110(缺失)、K111E、K111R、K111N、K111(缺失)、L113(缺失)、R115L、Q137L、N170S、D258N、Y272(无义突变)、L279I、G320V、W328S、R335G、T342S、V344G、V344M、V344A、N345K、N345I、N345T、D350N、D350G、R357Q、G359R、G363A、G364R、E365K、E365V、P366R、C378R、C378Y、R398H、R401Q、E417K、C420R、C420G、P447-L455(缺失)、P449L、P449-N457(缺失)、G451R、G451V、E453K、E453Q、E453D、D454Y、L455(移码插入)、L455-G460(缺失)、G463-N465(缺失)、P471L、P471A、H495L、H495Y、E522A、D538N、P539R、E542K、E542V、E542G、E542Q、E542A、E545K、E545A、E545G、E545Q、E545D、Q546K、Q546R、Q546P、E547D、S576Y、C604R、F614I、A617W、S629C、Q643H、I663S、Q682(缺失)、D725N、W726K、R777M、E791Q、R818C、L866W、C901F、F909L、D939G、R951C、Q958R、E970K、C971R、R975S、R992P、M1004I、G1007R、F1016C、D1017H、Y1021H、Y1021C、T1025A、T1025S、D1029H、E1037K、M1040V、M1043V、M1043I、N1044K、N1044Y、D1045V、H1047R、H1047L、H1047Y、H1047Q、H1048R、G1049R、T1052K、H1065L、1069W(无终止突变)或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变的PIK3CA DNA或RNA的靶区域杂交的多核酸分子。

[0283] 在一些实施方案中,β-连环蛋白相关基因进一步包括PIK3CB。在一些实施方案中,PIK3CB基因是野生型的或者包含一种或多种突变。在一些情况下,PIK3CB DNA或RNA是野生型PIK3CB DNA或RNA。在一些情况下,PIK3CB DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些情况下,多核酸分子与野生型PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,多核酸分子与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的PIK3CBDNA或RNA的靶区域杂交。

[0284] 在一些实施方案中,PIK3CB DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些实施方案中,PIK3CB DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一种或多种突变。在一些情况下,PIK3CB DNA或RNA在对应于PIK3CB多肽的氨基酸残基18、19、21、28、50、61、68、103、135、140、167、252、270、290、301、304、321、369、417、442、470、497、507、512、540、551、552、554、562、567、593、595、619、628、668、768、805、824、830、887、967、992、1005、1020、1036、1046、1047、1048、

1049、1051、1055、1067或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些情况下,PIK3CB DNA或RNA在对应于选自PIK3CB多肽的W18(无义突变)、A19V、D21H、G28S、A50P、K61T、M68I、R103K、H135N、L140S、S167C、G252W、R270W、K290N、E301V、I304R、R321Q、V369I、T417M、N442K、E470K、E497D、P507S、I512M、E540(无义突变)、C551R、E552K、E554K、R562(无义突变)、E567D、A593V、L595P、V619A、R628(无义突变)、R668W、L768F、K805E、D824E、A830T、E887(无义突变)、V967A、I992T、A1005V、D1020H、E1036K、D1046N、E1047K、A1048V、L1049R、E1051K、T1055A、D1067V、D1067A或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变。

[0285] 在一些实施方案中,多核酸分子与包含一种或多种突变的PIK3CBDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子内包含一种或多种突变的PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于PIK3CB多肽的氨基酸残基18、19、21、28、50、61、68、103、135、140、167、252、270、290、301、304、321、369、417、442、470、497、507、512、540、551、552、554、562、567、593、595、619、628、668、768、805、824、830、887、967、992、1005、1020、1036、1046、1047、1048、1049、1051、1055、1067或其组合的位置处包含一种或多种突变的PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于选自PIK3CB多肽的W18(无义突变)、A19V、D21H、G28S、A50P、K61T、M68I、R103K、H135N、L140S、S167C、G252W、R270W、K290N、E301V、I304R、R321Q、V369I、T417M、N442K、E470K、E497D、P507S、I512M、E540(无义突变)、C551R、E552K、E554K、R562(无义突变)、E567D、A593V、L595P、V619A、R628(无义突变)、R668W、L768F、K805E、D824E、A830T、E887(无义突变)、V967A、I992T、A1005V、D1020H、E1036K、D1046N、E1047K、A1048V、L1049R、E1051K、T1055A、D1067V、D1067A或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变的PIK3CB DNA或RNA的靶区域杂交。

[0286] 在一些实施方案中,β-连环蛋白相关基因进一步包括MYC。在一些实施方案中,MYC基因是野生型MYC或者包含一种或多种突变的MYC。在一些情况下,MYC是野生型MYC DNA或RNA。在一些情况下,MYC DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些情况下,多核酸分子与野生型MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些情况下,多核酸分子是与包含突变(例如,置换、缺失或添加)的MYC DNA或RNA的靶区域杂交的多核酸分子。

[0287] 在一些实施方案中,MYC DNA或RNA包含一种或多种突变。在一些实施方案中,MYC DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一种或多种突变。在一些情况下,MYC DNA或RNA在外显子2或外显子3内包含一种或多种突变。在一些情况下,MYC DNA或RNA在对应于氨基酸残基2、7、17、20、32、44、58、59、76、115、138、141、145、146、169、175、188、200、202、203、248、251、298、321、340、369、373、374、389、395、404、419、431、439或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些实施方案中,MYC DNA或RNA在对应于选自MYC多肽的P2L、F7L、D17N、Q20E、Y32N、A44V、A44T、T58I、P59L、A76V、F115L、F138S、A141S、V145I、S146L、S169C、S175N、C188F、N200S、S202N、S203T、T248S、D251E、S298Y、Q321E、V340D、V369D、T373K、H374R、F389L、Q395H、K404N、L419M、E431K、R439Q或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变。

[0288] 在一些实施方案中,多核酸分子与包含一种或多种突变的MYCDNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子内包含一种或多种突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子2或外显子3内包含一种或多种

突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于MYC多肽的氨基酸残基2、7、17、20、32、44、58、59、76、115、138、141、145、146、169、175、188、200、202、203、248、251、298、321、340、369、373、374、389、395、404、419、431、439或其组合的位置处包含一种或多种突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于选自MYC多肽的P2L、F7L、D17N、Q20E、Y32N、A44V、A44T、T58I、P59L、A76V、F115L、F138S、A141S、V145I、S146L、S169C、S175N、C188F、N200S、S202N、S203T、T248S、D251E、S298Y、Q321E、V340D、V369D、T373K、H374R、F389L、Q395H、K404N、L419M、E431K、R439Q或其组合的氨基酸残基的位置处包含一种或多种突变的MYC DNA或RNA的靶区域杂交。靶向次黄嘌呤转磷酸核糖基酶1(HPRT1)的多核酸分子

[0289] 次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT)是一种转移酶,其催化次黄嘌呤转化为肌苷一磷酸和鸟嘌呤转化为鸟苷一磷酸。HGPRT由次黄嘌呤转磷酸核糖基酶1(HPRT1)基因编码。

[0290] 在一些实施方案中,HPRT1 DNA或RNA是野生型的或者包含一种或多种突变。在一些情况下,HPRT1 DNA或RNA在一个或多个外显子内包含一种或多种突变。在一些情况下,一个或多个外显子包括外显子2、外显子3、外显子4、外显子6、外显子8或外显子9。在一些情况下,HPRT1 DNA或RNA在对应于HPRT1多肽的氨基酸残基35、48、56、74、87、129、154、162、195、200、210或其组合的位置处包含一种或多种突变。在一些实施方案中,多核酸分子与包含选自HPRT1多肽的V35M、R48H、E56D、F74L、R87I、N129(剪接位点突变)、N154H、S162(剪接位点突变)、Y195C、Y195N、R200M、E210K或其组合的一种或多种突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。

[0291] 在一些实施方案中,多核酸分子与包含一种或多种突变的HPRT1DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在外显子2、外显子3、外显子4、外显子6、外显子8或外显子9中包含一种或多种突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与在对应于HPRT1多肽的氨基酸残基35、48、56、74、87、129、154、162、195、200、210或其组合的位置处包含一种或多种突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与包含选自HPRT1多肽的V35M、R48H、E56D、F74L、R87I、N129(剪接位点突变)、N154H、S162(剪接位点突变)、Y195C、Y195N、R200M、E210K或其组合的一种或多种突变的HPRT1 DNA或RNA的靶区域杂交。

[0292] 多核酸分子序列

[0293] 在一些实施方案中,多核酸分子包含与表1、表4、表7、表8或表10中所示的靶序列杂交的序列。在一些情况下,多核酸分子为B。在一些情况下,多核酸分子包含与表1中所示的靶序列(KRAS靶序列)杂交的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与表4中所示的靶序列(EGFR靶序列)杂交的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与表7中所示的靶序列(AR靶序列)杂交的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与表8中所示的靶序列(β-连环蛋白靶序列)杂交的序列。在另外的情况下,多核酸分子包含与表10中所示的靶序列(PIK3CA和PIK3CB靶序列)杂交的序列。

[0294] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表2或表3中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少50%、55%、

60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少50％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少60％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少70％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少75％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少80％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少85％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少90％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少95％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少96％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少97％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少98％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少99％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子由SEQ ID NO:16-75组成。

[0295] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的第一多核苷酸以及与SEQ ID NO:16-75具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的第二多核苷酸。

[0296] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表5或表6中列出的序列具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少50％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少60％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少70％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少75％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少80％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少85％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少90％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少95％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少96％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少97％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少98％序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核

酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子由SEQ ID NO:452-1955组成。

[0297] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与SEQ ID NO:452-1955具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第一多核苷酸以及与SEQ ID NO:452-1955具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第二多核苷酸。

[0298] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表7中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少50%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少60%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少75%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子由SEQ ID NO:1956-1962组成。

[0299] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含和与SEQ ID NO:1956-1962具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列互补的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1956-1962具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第一多核苷酸以及和与SEQ ID NO:1956-1962具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列互补的第二多核苷酸。

[0300] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表9中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少50%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少60%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少75%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子由SEQ ID NO:1967-2002组成。

[0301] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与SEQ ID NO:1967-2002具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第一多核苷酸以及与SEQ ID NO:1967-2002具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第二多核苷酸。

[0302] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表11中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少50%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少60%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少75%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID

NO:2013-2032具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子由SEQ ID NO:2013-2032组成。

[0303] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2013-2032具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第一多核苷酸以及与SEQ ID NO:2013-2032具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的第二多核苷酸。

[0304] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含与表12中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0305] 在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少50%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少60%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少70%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少75%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少85%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少95%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少96%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少97%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少98%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少99%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子由SEQID NO:2082-2109或2117组成。

[0306] 在一些实施方案中,多核酸分子B包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少50%、55%、60%、

65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的序列。在一些情况下,多核酸分子包含与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的第一多核苷酸以及与SEQ ID NO:2082-2109或2117具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的第二多核苷酸。

[0307] 多核酸分子

[0308] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子包括RNA或DNA。在一些情况下,多核酸分子包括RNA。在一些情况下,RNA包括短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、双链RNA(dsRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)或核内不均一RNA(hnRNA)。在一些情况下,RNA包括shRNA。在一些情况下,RNA包括miRNA。在一些情况下,RNA包括dsRNA。在一些情况下,RNA包括tRNA。在一些情况下,RNA包括rRNA。在一些情况下,RNA包括hnRNA。在一些情况下,RNA包括siRNA。在一些情况下,多核酸分子包括siRNA。在一些情况下,B包括siRNA。

[0309] 在一些实施方案中,多核酸分子的长度为约10至约50个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10至约30、约15至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0310] 在一些实施方案中,多核酸分子的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约30个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约14个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10至约50个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10至约45个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10至约40个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10至约35个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10至约30个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10至约25个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约10至约20个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约15至约25个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约15至约30个核苷酸。在一些情况下,多核酸分子的长度为约12至约30个核苷酸。

[0311] 在一些实施方案中,多核酸分子包含第一多核苷酸。在一些情况下,多核酸分子包含第二多核苷酸。在一些情况下,多核酸分子包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸为有义链或过客链。在一些情况下,第二多核苷酸为反义链或指导链。

[0312] 在一些实施方案中,多核酸分子为第一多核苷酸。在一些实施方案中,第一多核苷酸的长度为约10至约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约30、约15

至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0313] 在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约14个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约50个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约45个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约40个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约35个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约10至约20个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15至约25个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约15至约30个核苷酸。在一些情况下,第一多核苷酸的长度为约12至约30个核苷酸。

[0314] 在一些实施方案中,多核酸分子为第二多核苷酸。在一些实施方案中,第二多核苷酸的长度为约10至约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约30、约15至约30、约18至约25、约18至约24、约19至约23或约20至约22个核苷酸。

[0315] 在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约45个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约40个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约35个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约30个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约20个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约19个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约18个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约17个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约16个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约14个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约13个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约12个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约11个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约50个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约45个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约40个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约35个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约30个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约10至约20个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15至约25个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约15至约30个核苷酸。在一些情况下,第二多核苷酸的长度为约12至约30个

核苷酸。

[0316] 在一些实施方案中,多核酸分子包含第一多核苷酸和第二多核苷酸。在一些情况下,多核酸分子进一步包含钝末端、突出端或其组合。在一些情况下,钝末端为5’平末端、3’平末端或两者。在一些情况下,突出端为5’突出端、3’突出端或两者。在一些情况下,突出端包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,突出端包含1、2、3、4、5或6个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,突出端包含1、2、3或4个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,突出端包含1个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,突出端包含2个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,突出端包含3个非碱基配对核苷酸。在一些情况下,突出端包含4个非碱基配对核苷酸。

[0317] 在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少50%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少60%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少70%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少80%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少90%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少95%互补。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列至少99%互补。在一些情况下,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列100%互补。

[0318] 在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有5个或更少的错配。在一些实施方案中,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列具有4个或更少的错配。在一些情况下,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列可具有3个或更少的错配。在一些情况下,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列可具有2个或更少的错配。在一些情况下,多核酸分子的序列与本文所述的靶序列可具有1个或更少的错配。

[0319] 在一些实施方案中,与本文所述的靶序列杂交的多核酸分子的特异性是多核酸分子与靶序列的95%、98%、99%、99.5%或100%序列互补性。在一些情况下,杂交是高度严格的杂交情况。

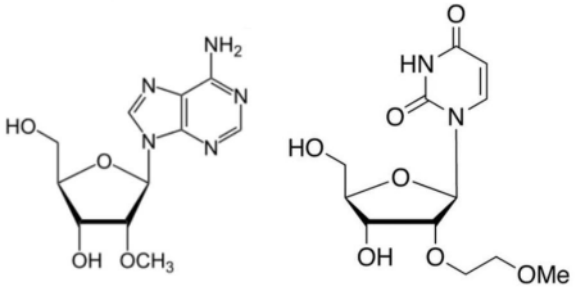
[0320] 在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少8个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少9个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少10个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少11个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少12个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少13个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少14个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少15个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少16个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少17个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少18个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少19个连续碱基杂交。在一些实施方案中,多核酸分子与本文所述靶序列的至少20个连续碱基杂交。

[0321] 在一些实施方案中,多核酸分子具有降低的脱靶效应。在一些情况下,“脱靶”或“脱靶效应”是指其中针对给定靶标的多核酸聚合物通过直接或间接与另一mRNA序列、DNA序列或者细胞蛋白质或其他部分相互作用而引起非预期效应的任何情况。在一些情况下,当由于其他转录物与多核酸分子的有义链和/或反义链之间的部分同源性或互补性而导致其他转录物同时降解时,发生“脱靶效应”。

[0322] 在一些实施方案中,多核酸分子包含天然、合成或人工核苷酸类似物或碱基。在一些情况下,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,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。

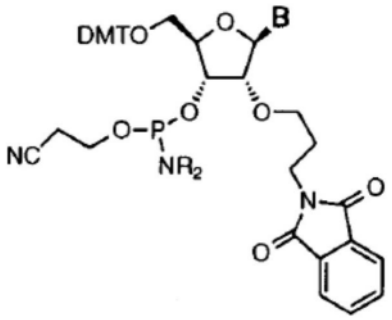
[0323] 在一些实施方案中,上述核苷酸类似物或人工核苷酸碱基包括在核糖部分的2’羟基基团处具有修饰的核酸。在一些情况下,修饰包括H、OR、R、卤素、SH、SR、NH2、NHR、NR2或CN,其中R为烷基部分。示例性的烷基部分包括但不限于卤素、硫、硫醇、硫醚、硫酯、胺(伯、仲或叔)、酰胺、醚、酯、醇和氧。在一些情况下,烷基部分进一步包含修饰。在一些情况下,修饰包括偶氮基团、酮基团、醛基团、羧基基团、硝基基团、亚硝基基团、腈基团、杂环(例如,咪唑、肼基或羟基氨基)基团、异氰酸酯或氰酸酯基团、或者含硫基团(例如,亚砜、砜、硫化物或二硫化物)。在一些情况下,烷基部分进一步包含杂取代。在一些情况下,杂环基团的碳被氮、氧或硫取代。在一些情况下,杂环取代包括但不限于吗啉代、咪唑和吡咯烷代。

[0324] 在一些情况下,2’羟基基团的修饰是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’羟基基团添加甲基基团,而2’O-甲氧基乙基修饰向核糖部分的2’羟基基团添加甲氧基乙基基团。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。

[0325] 

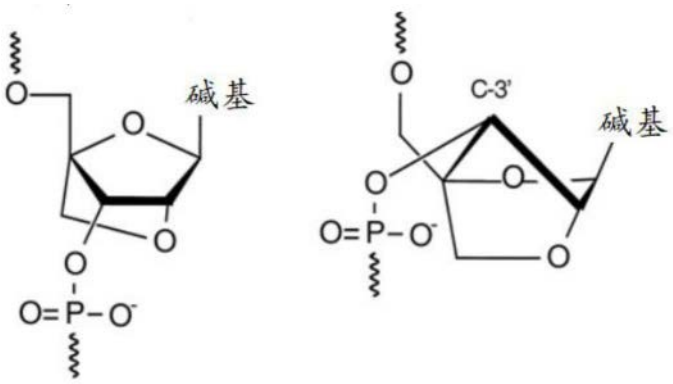
[0326] 2’-O-甲基-腺苷2’-O-甲氧基乙基尿苷

[0327] 在一些情况下,2’羟基基团处的修饰是2’-O-氨基丙基修饰,其中包含丙基连接体的延伸胺基基团将胺基基团与2’氧结合。在一些情况下,该修饰通过从每个糖的胺基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整体负电荷,从而由于其两性离子性质来改善细胞摄取性质。2’-O-氨基丙基核苷亚磷酰胺的示例性化学结构如下所示。

[0328] 

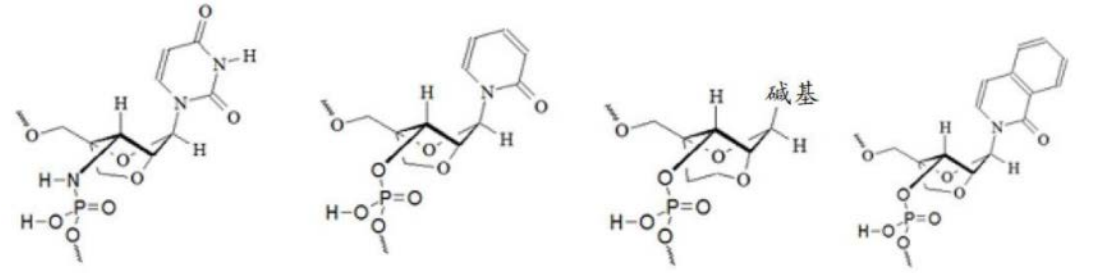
[0329] 2'-O-氨基丙基核苷亚磷酰胺

[0330] 在一些情况下,2'羟基基团处的修饰是锁定或桥接的核糖修饰(例如,锁定核酸或LNA),其中在2'碳处结合的氧分子通过亚甲基基团与4'碳连接,从而形成2′-C,4′-C-氧-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(^{3}E)构象。

[0331] 

[0332] LNA(锁定核酸)

[0333] 在一些情况下,2'羟基基团处的修饰包括乙烯核酸(ENA),诸如2'-4'-乙烯桥连核酸,其将糖构象锁定为C_3'-内糖折叠(puckering)构象。ENA是修饰核酸的桥接核酸种类的一部分,该修饰核酸也包含LNA。ENA和桥接核酸的示例性化学结构如下所示。

[0334] 

3'-氨基-2',4'-BNA 2',4'-BNA-2-吡啶酮 2',4'-ENA 2',4'-BNA-1-异喹啉酮

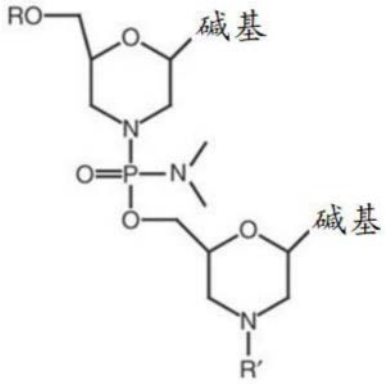
[0335] 在一些实施方案中,2'羟基基团处另外的修饰包括2'-脱氧、T-脱氧-2'-氟代、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)。

[0336] 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(诸如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(诸如2-硫尿苷、4-硫尿苷和2-硫胞苷)、二氢尿苷、假尿苷、辫苷、古嘌苷、萘基和取代萘基基团、任何O-烷基化和N-烷基化嘌呤和嘧啶(诸如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)、苯基和修饰苯基基团诸如氨基酚或2,4,6-三甲氧基苯、充当G夹(clamp)核苷酸的修饰胞嘧啶、8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤、5-取代尿嘧啶和胸腺嘧啶、氮杂嘧啶、羧基羟烷基核苷酸、羧烷基氨基烷基核苷酸以及烷基羰基烷基化核苷酸。修饰的核苷酸还包括相对于糖部分被修饰的那些核苷酸,以及具有非核糖基的糖或其类似物的核苷酸。例如,糖部分在一些情况下是或基于甘露糖、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-硝基吲哚或水粉蕈素。

[0337] 在一些实施方案中,核苷酸类似物进一步包括吗啉代、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'-亚磷酰胺或1',5'-失水己糖醇核酸(UNA)。吗啉代或磷酰二胺吗啉代寡核苷酸(PMO)包括合成分子,其结构模拟天然核酸结构但偏离正常的糖和磷酸酯结构。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不借助细胞递送剂,诸如带电荷的寡核苷酸所使用的细胞递送剂。

[0338]



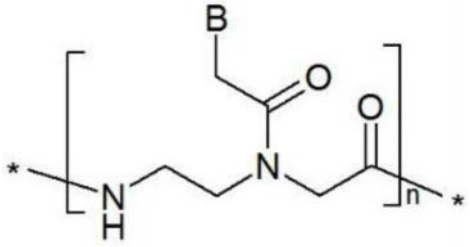
吗啉代

[0339] 在一些实施方案中,上述吗啉代或PMO是包含正电荷或阳离子电荷的PMO。在一些情况下,PMO是PMOplus(Sarepta)。PMOplus是指包含任何数目的(1-哌嗪基)氧亚膦基氧基、(1-(4-(ω-胍基-烷酰基))-哌嗪基)氧亚膦基氧基键的二氨基磷酸吗啉代寡聚体(例如,如PCT公开号WO2008/036127中描述的那些)。在一些情况下,PMO是美国专利号7943762中描述的PMO。

[0340] 在一些实施方案中,上述吗啉代或PMO是PMO-X(Sarepta)。在一些情况下,PMO-X是指包含至少一个键或至少一个公开的末端修饰的二氨基磷酸吗啉代寡聚体,诸如PCT公开号WO2011/150408和美国公开号2012/0065169中公开的那些。

[0341] 在一些实施方案中,上述吗啉代或PMO是如美国公开号2014/0296321的表5中描述的PMO。

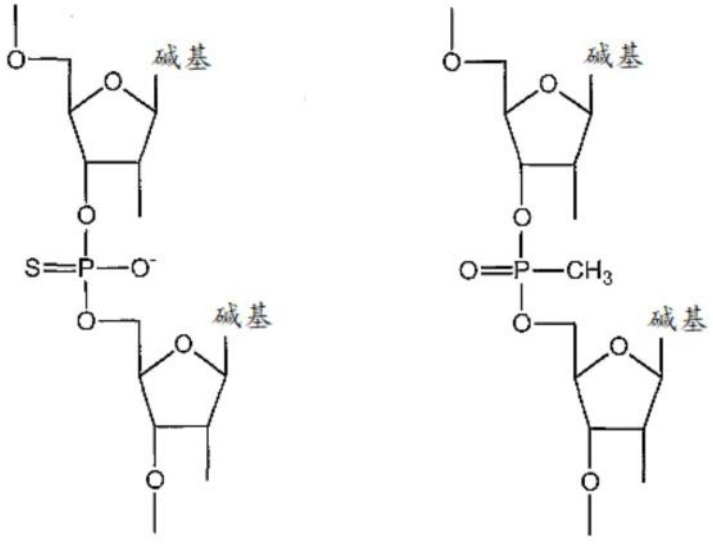
[0342] 在一些实施方案中,肽核酸(PNA)不含糖环或磷酸酯键,并且碱基通过寡聚甘氨酸样分子连接并适当间隔,因此消除了骨架电荷。

[0343] 

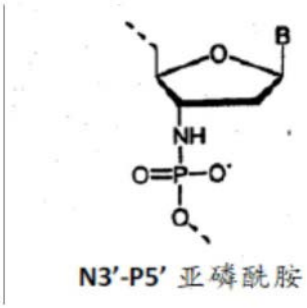
PNA

[0344] 在一些实施方案中,一种或多种修饰任选地在核苷酸间键处发生。在一些情况下,修饰的核苷酸间键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'键或2'-5'键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;次膦酸酯;氨基磷酸酯;3'-烷基氨基磷酸酯;氨基烷基氨基磷酸酯;硫羰基氨基磷酸酯;哌嗪磷酸酯;苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate);苯胺磷酸酯(phosphoranilidate);酮;砜;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;具有核糖乙酰基基团的键;氨乙基甘氨酸;甲硅烷基或硅氧烷键;具有或不具有杂原子的烷基或环烷基键,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、酰胺或聚酰胺的键,其中碱基直接或间接连接到骨架的氮杂氮;及其组合。

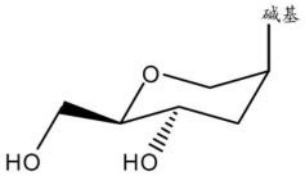
[0345] 在一些情况下,修饰是甲基或硫醇修饰,诸如甲基磷酸酯或硫醇磷酸酯修饰。示例性的硫醇磷酸酯核苷酸(左)和甲基磷酸酯核苷酸(右)如下所示。

[0346] 

[0347] 在一些情况下,修饰的核苷酸包括但不限于2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺,如下所示:

[0348] 

[0349] 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:

[0350] 

HNA

[0351] 在一些实施方案中,一种或多种修饰包括修饰的磷酸骨架,其中修饰产生中性或不带电荷的骨架。在一些情况下,通过烷基化修饰磷酸酯骨架以产生不带电荷或中性的磷酸骨架。如本文所用,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使用的烷基基团是指含有1至6个碳原子的直链或支链饱和烃基团。在一些情况下,示例性的烷基基团包括但不限于甲基、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-乙基丁基基团。在一些情况下,修饰的磷酸酯是如美国专利号9481905中描述的磷酸酯基团。

[0352] 在一些实施方案中,另外修饰的磷酸骨架包括甲基磷酸酯、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。

[0353] 在一些实施方案中,一种或多种修饰进一步任选地包括核糖部分、磷酸主链和核苷的修饰,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,或反转具有3'-3'键的3'末端的核苷。在另一替代方案中,3'末端任选地与氨基烷基基团缀合,例如与3'C5-氨基烷基dT缀合。在另一替代方案中,3'末端任选地与脱碱基位点缀合,例如与脱嘌呤或脱嘧啶位点缀合。在一些情况下,5'末端与氨基烷基基团缀合,例如与5'-O-烷基氨基取代基缀合。在一些情况下,5'末端与脱碱基位点缀合,例如与脱嘌呤或脱嘧啶位点缀合。

[0354] 在一些实施方案中,多核酸分子包含本文所述的一种或多种人工核苷酸类似物。在一些情况下,多核酸分子包含本文所述的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、20、25种或更多种人工核苷酸类似物。在一些实施方案中,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-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修

饰、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,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种或更多种人工核苷酸类似物,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-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-甲基乙酰氨基(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,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种或更多种2'-O-甲基修饰的核苷酸。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种或更多种2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)修饰的核苷酸。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种或更多种硫醇磷酸酯核苷酸。

[0355] 在一些实施方案中,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种或更多种修饰。在一些情况下,多核酸分子为SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117的多核酸分子。

[0356] 在一些情况下,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种或更多种修饰的核苷酸。在一些情况下,多核酸分子为SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117的多核酸分子。

[0357] 在一些情况下,多核酸分子包含以下至少一种:约5%至约100%修饰、约10%至约100%修饰、约20%至约100%修饰、约30%至约100%修饰、约40%至约100%修饰、约50%至约100%修饰、约60%至约100%修饰、约70%至约100%修饰、约80%至约100%修饰以及约90%至约100%修饰。在一些情况下,多核酸分子为SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117的多核酸分子。

[0358] 在一些情况下,约5%至约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SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117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5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的SEQ ID NO:16-45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5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的SEQ ID NO:452-1203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5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的SEQ ID NO:1956-1962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5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、

55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％的SEQ ID NO:1967-2002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5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％的SEQ ID NO:2013-2032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5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％的SEQ ID NO:2082-2109或2117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,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-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰、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。

[0359] 在一些情况下,包含人工核苷酸类似物的多核酸分子包括SEQ ID NO:46-75。在一些情况下,包含人工核苷酸类似物的多核酸分子包括SEQ ID NO:1204-1955。在一些情况下,包含人工核苷酸类似物的多核酸分子包括SEQ ID NO:1967-2002。在一些情况下,包含人工核苷酸类似物的多核酸分子包括SEQ ID NO:2013-2032。在一些情况下,包含人工核苷酸类似物的多核酸分子包括SEQ ID NO:2082-2109或2117。

[0360] 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-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰、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'-亚磷酰胺或其组合的人工核苷酸类似物对核酸酶具有抗性,该核酸酶例如核糖核酸酶如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-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)修饰的多核酸分子是核酸酶抗性的(例如,RNA酶H、DNA酶、5'-3'外切核酸酶或3'-5'外切核酸酶抗性)。

在一些情况下,2'-O-N-甲基乙酰氨基(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)。吗啉代可以是核酸酶抗性的(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。

[0361] 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-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰、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-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)修饰的多核酸分子对其mRNA靶标具有增加的结合亲和力。在一些情况下,相对于等同的天然多核酸分子,2'-O-N-甲基乙酰氨基(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,较低的Kd、较高的熔融温度(Tm)或其组合说明增加的亲和力。

[0362] 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号2014/194610和2015/211006;以及PCT公开号WO2015107425中描述的多核酸分子。

[0363] 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,适体缀合部分是DNA适体-缀合部分。在一些情况下,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递特定表位用于连接循环抗体的部分。在一些情况下,进一步修饰本文所述的多核酸分子以包含适体-缀合部分,如美国专利号8,604,184、8,591,910和7,850,975中所述。

[0364] 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,多核酸分子为RNA(例如,siRNA),修饰多核酸分子以增加其稳定性。在一些情况下,通过上述一种或多种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-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰,或者通过锁定或桥接核糖构象(例如,LNA或ENA)修饰多核酸分子。在一些情况下,多核酸分子被2'-O-甲基和/或2'-O-甲氧基乙基核糖修饰。在一些情况下,多核酸分子还包含吗啉代、PNA、HNA、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸和/或2'-氟代N3-P5'-亚磷酰胺以增加其稳定性。在一些情况下,多核酸分子是手性纯的(或立体纯的)多核酸分子。在一些情况下,修饰手性纯的(或立体纯的)多核酸分子以增加其稳定性。为了增加递送的稳定性对RNA的合适修饰对于技术人员将会是显而易见的。

[0365] 在一些实施方案中,本文所述的多核酸分子具有RNAi活性,其调节由上述基因编码的RNA的表达。在一些情况下,本文所述的多核酸分子是下调基因表达的双链siRNA分子,其中双链siRNA分子的一条链包含与基因的核苷酸序列或者由基因或其部分编码的RNA互补的核苷酸序列,并且其中双链siRNA分子的第二条链包含与基因的核苷酸序列或者由基因或其部分编码的RNA基本相似的核苷酸序列。在一些情况下,本文所述的多核酸分子是下调基因表达的双链siRNA分子,其中siRNA分子的每条链包含约15至25、18至24或19至约23

个核苷酸,其中每条链包含与另一条链的核苷酸互补的至少约14、17或19个核苷酸。在一些情况下,本文所述的多核酸分子是下调基因表达的双链siRNA分子,其中siRNA分子的每条链包含约19至约23个核苷酸,其中每条链包含与另一条链的核苷酸互补的至少约19个核苷酸。在一些情况下,基因为KRAS、EGFR、AR、HPRT1、CNNTB1(β-连环蛋白)或β-连环蛋白相关基因。

[0366] 在一些实施方案中,使用本领域已知的程序使用化学合成和/或酶促连接反应构建本文所述的多核酸分子。例如,使用天然存在的核苷酸或各种修饰的核苷酸化学合成多核酸分子,该修饰的核苷酸被设计用于增加分子的生物稳定性或者增加多核酸分子与靶核酸之间形成的双链体的物理稳定性。示例性方法包括在美国专利号5,142,047;5,185,444;5,889,136;6,008,400;和6,111,086;PCT公开号WO2009099942;或者欧洲公开号1579015中描述的那些。另外的示例性方法包括在Griffey等人,“2'-O-aminopropyl ribonucleotides:a zwitterionic modification thatenhances the exonuclease resistance and biological activity of antisenseoligonucleotides,”J.Med.Chem.39(26):5100-5109(1997));Obika,等人″Synthesis of 2′-O,4′-C-methyleneuridine and-cytidine.Novel bicyclicnucleosides having a fixed C3,-endo sugar puckering″.Tetrahedron Letters38(50):8735(1997);Koizumi,M.″ENA oligonucleotides as therapeutics″.Current opinion in molecular therapeutics 8(2):144-149(2006);以及Abramova等人,“Novel oligonucleotide analogues based on morpholinonucleoside subunits-antisense technologies:new chemical possibilities,”Indian Journal of Chemistry 48B:1721-1726(2009)中描述的那些。或者,使用表达载体在生物学上产生多核酸分子,其中多核酸分子已经以反义方向(即,从插入的多核酸分子转录的RNA将会是感兴趣的靶多核酸分子的反义方向)亚克隆到表达载体中。

[0367] 缀合化学

[0368] 在一些实施方案中,多核酸分子与结合部分缀合。在一些情况下,结合部分包括氨基酸、肽、多肽、蛋白质、抗体、抗原、毒素、激素、脂质、核苷酸、核苷、糖、碳水化合物、聚合物如聚乙二醇和聚丙二醇、以及所有这些物质类别的类似物或衍生物。结合部分的其他实例还包括类固醇如胆固醇、磷脂、二酰基甘油和三酰基甘油、脂肪酸、烃(例如,饱和、不饱和或含有取代基)、酶底物、生物素、洋地黄毒苷和多糖。在一些情况下,结合部分为抗体或其结合片段。在一些情况下,多核酸分子进一步与聚合物和任选的内体溶解部分缀合。

[0369] 在一些实施方案中,多核酸分子通过化学连接过程与结合部分缀合。在一些情况下,多核酸分子通过天然连接与结合部分缀合。在一些情况下,缀合如下所述:Dawson,等人“Synthesis of proteins by nativechemical ligation,”Science 1994,266,776-779;Dawson,等人“Modulationof Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives,”J.Am.Chem.Soc.1997,119,4325-4329;Hackeng,等人“Protein synthesisby native chemical ligation:Expanded scope by using straightforwardmethodology.,”Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1999,96,10068-10073;或Wu,等人“Building complex glycopeptides:Development of a cysteine-free nativechemical ligation protocol,”Angew.Chem.Int.Ed.2006,45,4116-4125。在一些

情况下,缀合如美国专利号8,936,910中所述。在一些实施方案中,多核酸分子经由天然连接化学位点特异性或非特异性地与结合部分缀合。

[0370] 在一些情况下,多核酸分子通过利用“无痕”偶联技术(Philochem)的定点方法与结合部分缀合。在一些情况下,“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,”JACS134(13):5887-5892(2012))。

[0371] 在一些情况下,多核酸分子通过利用掺入结合部分的非天然氨基酸的定点方法与结合部分缀合。在一些情况下,非天然氨基酸包含对乙酰基苯丙氨酸(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 aminoacids,”PNAS109(40):16101-16106(2012))。

[0372] 在一些情况下,多核酸分子通过利用酶催化过程的定点方法与结合部分缀合。在一些情况下,定点方法利用SMARTag™技术(Redwood)。在一些情况下,SMARTag™技术包括通过甲酰甘氨酸生成酶(FGE)在醛标记存在下通过氧化过程从半胱氨酸生成甲酰甘氨酸(FGly)残基,随后经由肼基-Pictet-Spengler(HIPS)连接将FGly与烷基肼官能化多核酸分子缀合(参见Wu等人,“Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag,”PNAS106(9):3000-3005(2009);Agarwal,等人,“A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification,”PNAS110(1):46-51(2013))。

[0373] 在一些情况下,酶催化过程包含微生物转谷氨酰胺酶(mTG)。

[0374] 在一些情况下,多核酸分子利用微生物转谷氨酰胺催化过程与结合部分缀合。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 drugconjugates,”Chemistry and Biology 20(2)161-167(2013))。

[0375] 在一些情况下,多核酸分子通过如PCT公开号WO2014/140317中描述的方法与结合部分缀合,该方法利用序列特异性转肽酶。

[0376] 在一些情况下,多核酸分子通过如美国专利公开号2015/0105539和2015/0105540中描述的方法与结合部分缀合。

[0377] 结合部分

[0378] 在一些实施方案中,结合部分A为多肽。在一些情况下,多肽为抗体或其片段。在一些情况下,片段为结合片段。在一些情况下,抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab’、二价Fab_2、$F(ab)'_3$片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定Fv蛋白(dsFv)、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或者其化学修饰的衍生物。

[0379] 在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,A为人源化抗体或其结合片

段、鼠抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab_2、$F(ab')_3$片段、单链可变片段(scFv)、双scFv、$(scFv)_2$、双抗体、微抗体、纳米抗体、三抗体、四抗体、二硫键稳定Fv蛋白("dsFv")、单域抗体(sdAb)、Ig NAR、骆驼科抗体或其结合片段、双特异性抗体或其结合片段、或者其化学修饰的衍生物。在一些情况下,A为人源化抗体或其结合片段。在一些情况下,A为鼠抗体或其结合片段。在一些情况下,A为嵌合抗体或其结合片段。在一些情况下,A为单克隆抗体或其结合片段。在一些情况下,A为单价Fab'。在一些情况下,A为二价Fab_2。在一些情况下,A为单链可变片段(scFv)。

[0380] 在一些实施方案中,结合部分A为双特异性抗体或其结合片段。在一些情况下,双特异性抗体为三官能抗体或双特异性微抗体。在一些情况下,双特异性抗体为三官能抗体。在一些情况下,三官能抗体为全长单克隆抗体,其包含针对两种不同抗原的结合位点。示例性的三官能抗体包括卡妥索单抗(其靶向EpCAM和CD3;Fresenius Biotech/TrionPharma)、ertumaxomab(靶向HER2/neu/CD3;Fresenius Biotech/TrionPharma)、lymphomun FBTA05(靶向CD20/CD3;Fresenius Biotech/TrionPharma)、RG7221(RO5520985;靶向Angiopoietin 2/VEGF;Roche)、RG7597(靶向Her1/Her3;Genentech/Roche)、MM141(靶向IGF1R/Her3;Merrimack)、ABT122(靶向TNFα/IL17;Abbvie)、ABT981(靶向IL1α/IL1β;Abbott)、LY3164530(靶向Her1/cMET;Eli Lilly)和TRBS07(Ektomab;靶向GD2/CD3;Trion Research Gmbh)。另外的示例性三官能抗体包括来自F-star Biotechnology Ltd的mAb^2。在一些情况下,A为双特异性三官能抗体。在一些实施方案中,A为选自以下的双特异性三官能抗体:卡妥索单抗(其靶向EpCAM和CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、ertumaxomab(靶向HER2/neu/CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、lymphomun FBTA05(靶向CD20/CD3;Fresenius Biotech/Trion Pharma)、RG7221(RO5520985;靶向Angiopoietin 2/VEGF;Roche)、RG7597(靶向Her1/Her3;Genentech/Roche)、MM141(靶向IGF1R/Her3;Merrimack)、ABT122(靶向TNFα/IL17;Abbvie)、ABT981(靶向IL1α/IL1β;Abbott)、LY3164530(靶向Her1/cMET;Eli Lilly)、TRBS07(Ektomab;靶向GD2/CD3;Trion Research Gmbh)和来自F-star Biotechnology Ltd的mAb^2。

[0381] 在一些情况下,双特异性抗体为双特异性微抗体。在一些情况下,双特异性微抗体包括二价Fab_2、$F(ab')_3$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,双特异性T细胞接合物为包含两个单链可变片段(scFv)的融合蛋白,其中两个scFv靶向两种不同抗原的表位。示例性的双特异性微抗体包括但不限于DART(双亲和力重新靶向平台;MacroGenics)、博纳吐单抗(MT103或AMG103;其靶向CD19/CD3;Micromet)、MT111(靶向CEA/CD3;Micromet/Amegen)、MT112(BAY2010112;靶向PSMA/CD3;Micromet/Bayer)、MT110(AMG 110;靶向EPCAM/CD3;Amgen/Micromet)、MGD006(靶向CD123/CD3;MacroGenics)、MGD007(靶向GPA33/CD3;MacroGenics)、BI1034020(靶向β-淀粉状蛋白上的两种不同表位;Ablynx)、ALX0761(靶向IL17A/IL17F;Ablynx)、TF2(靶向CEA/hepten;Immunomedics)、IL-17/IL-34二Ab(BMS)、AFM13(靶向CD30/CD16;Affimed)、AFM11(靶向CD19/CD3;Affimed)和域抗体(dAb,来自Domantis/GSK)。

[0382] 在一些实施方案中,结合部分A为双特异性微抗体。在一些情况下,A为双特异性Fab2。在一些情况下,A为双特异性$F(ab')_3$片段。在一些情况下,A为双特异性双scFv。在一些情况下,A为双特异性$(scFv)_2$。在一些实施方案中,A为双特异性双抗体。在一些实施方案

中,A为双特异性微抗体。在一些实施方案中,A为双特异性三抗体。在其他实施方案中,A为双特异性四抗体。在其他实施方案中,A为双特异性T细胞接合物(BiTE)。在另外的实施方案中,A为选自以下的双特异性微抗体:DART(双亲和力重新靶向平台;MacroGenics)、博纳吐单抗(MT103或AMG103;其靶向CD19/CD3;Micromet)、MT111(靶向CEA/CD3;Micromet/Amegen)、MT112(BAY2010112;靶向PSMA/CD3;Micromet/Bayer)、MT110(AMG 110;靶向EPCAM/CD3;Amgen/Micromet)、MGD006(靶向CD123/CD3;MacroGenics)、MGD007(靶向GPA33/CD3;MacroGenics)、BI1034020(靶向β-淀粉状蛋白上的两种不同表位;Ablynx)、ALX0761(靶向IL17A/IL17F;Ablynx)、TF2(靶向CEA/hepten;Immunomedics)、IL-17/IL-34二Ab(BMS)、AFM13(靶向CD30/CD16;Affimed)、AFM11(靶向CD19/CD3;Affimed)和域抗体(dAb,来自Domantis/GSK)。

[0383] 在一些实施方案中,结合部分A为三特异性抗体。在一些情况下,三特异性抗体包括F(ab)'$_3$片段或三抗体。在一些情况下,A为三特异性F(ab)'3片段。在一些情况下,A为三抗体。在一些实施方案中,A为三特异性抗体,如Dimas,等人,"Development of a trispecific antibodydesigned to simultaneously and efficiently target three different antigens ontumor cells,"Mol.Pharmaceutics,12(9):3490-3501(2015)中所述。

[0384] 在一些实施方案中,结合部分A为识别细胞表面蛋白的抗体或其结合片段。在一些情况下,细胞表面蛋白是由癌细胞表达的抗原。示例性的癌抗原包括但不限于甲胎蛋白、ASLG659、B7-H3、BAFF-R、短小蛋白聚糖、CA125(MUC16)、CA15-3、CA19-9、癌胚抗原(CEA)、CA242、CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生生长因子)、CTLA-4、CXCR5、E16(LAT1、SLC7A5)、FcRH2(IFGP4、IRTA4、SPAP1A(包含磷酸酶锚定蛋白1a的SH2域)、SPAP1B、SPAP1C)、表皮生长因子、ETBR、Fc受体样蛋白1(FCRH1)、GEDA、HLA-DOB(MHC II类分子的β亚基(Ia抗原)、人绒毛膜促性腺激素、ICOS、IL-2受体、IL20Rα、免疫球蛋白超家族受体易位相关2(IRTA2)、L6、路易斯Y、路易斯X、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE 4、MART1、间皮素、MDP、MPF(SMR、MSLN)、MCP1(CCL2)、巨噬细胞抑制因子(MIF)、MPG、MSG783、粘蛋白、MUC1-KLH、Napi3b(SLC34A2)、柄蛋白-4、Neu癌基因产物、NCA、胎盘碱性磷酸酶、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、前列腺酸性磷酸酶、PSCA hlg、p97、嘌呤受体P2X配体门控离子通道5(P2X5)、LY64(淋巴细胞抗原64(RP105)、gp100、P21、前列腺的六跨膜上皮抗原(STEAP1)、STEAP2、Sema 5b、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B,瞬时受体电位阳离子通道,亚家族M,成员4)等。

[0385] 在一些情况下,细胞表面蛋白包括分化簇(CD)细胞表面标志物。示例性的CD细胞表面标志物包括但不限于CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L(L-选择蛋白)、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD79(例如,CD79a、CD79b)、CD90、CD95(Fas)、CD103、CD104、CD125(IL5RA)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD152(CTLA-4)、CD221、CD274、CD279(PD-1)、

CD319(SLAMF7)、CD326(EpCAM)等。

[0386] 在一些情况下,结合部分A为识别癌抗原的抗体或其结合片段。在一些情况下,结合部分A为识别甲胎蛋白、ASLG659、B7-H3、BAFF-R、短小蛋白聚糖、CA125(MUC16)、CA15-3、CA19-9、癌胚抗原(CEA)、CA242、CRIPTO(CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生生长因子)、CTLA-4、CXCR5、E16(LAT1、SLC7A5)、FcRH2(IFGP4、IRTA4、SPAP1A(包含磷酸酶锚定蛋白1a的SH2域)、SPAP1B、SPAP1C)、表皮生长因子、ETBR、Fc受体样蛋白1(FCRH1)、GEDA、HLA-DOB(MHC II类分子的β亚基(Ia抗原)、人绒毛膜促性腺激素、ICOS、IL-2受体、IL20Rα、免疫球蛋白超家族受体易位相关2(IRTA2)、L6、路易斯Y、路易斯X、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE 4、MART1、间皮素、MCP1(CCL2)、MDP、巨噬细胞抑制因子(MIF)、MPF(SMR、MSLN)、MPG、MSG783、粘蛋白、MUC1-KLH、Napi3b(SLC34A2)、柄蛋白-4、Neu癌基因产物、NCA、胎盘碱性磷酸酶、前列腺特异性膜抗原(PMSA)、前列腺酸性磷酸酶、PSCA hlg、p97、嘌呤受体P2X配体门控离子通道5(P2X5)、LY64(淋巴细胞抗原64(RP105)、gp100、P21、前列腺的六跨膜上皮抗原(STEAP1)、STEAP2、Sema 5b、肿瘤相关糖蛋白72(TAG-72)、TrpM4(BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B,瞬时受体电位阳离子通道,亚家族M,成员4)或其组合的抗体或其结合片段。

[0387] 在一些情况下,结合部分A为识别CD细胞表面标志物的抗体或其结合片段。在一些情况下,结合部分A为识别CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD45RA、CD45RB、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L(L-选择蛋白)、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD79(例如,CD79a、CD79b)、CD90、CD95(Fas)、CD103、CD104、CD125(IL5RA)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD152(CTLA-4)、CD221、CD274、CD279(PD-1)、CD319(SLAMF7)、CD326(EpCAM)或其组合的抗体或其结合片段。

[0388] 在一些实施方案中,抗体或其结合片段包括扎芦木单抗(HuMax-EFGr,Genmab)、阿巴伏单抗(Menarini)、abituzumab(Merck)、adecatumumab(MT201)、培化阿珠单抗、阿仑珠单抗(Campath®,MabCampath或Campath-1H;Leukosite)、AlloMune(BioTransplant)、amatuximab(Morphotek,Inc.)、抗VEGF(Genetech)、马安莫单抗、阿泊珠单抗(hu1D10)、ascrinvacumab(Pfizer Inc.)、atezolizumab(MPDL3280A;Genentech/Roche)、B43.13(OvaRex,AltaRex Corporation)、巴利昔单抗(Simulect®,Novartis)、贝利木单抗(Benlysta®,GlaxoSmithKline)、贝伐珠单抗(Avastin®,Genentech)、博纳吐单抗(Blincyto,AMG103;Amgen)、BEC2(ImGlone Systems Inc.)、carlumab(Janssen Biotech)、卡妥索单抗(Removab,Trion Pharma)、CEAcide(Immunomedics)、西妥昔单抗(Erbitux®,ImClone)、泊西他珠单抗(VB6-845)、西妥木单抗(IMC-A12,ImClone Systems Inc.)、可那木单抗(AMG 655,Amgen)、达西珠单抗(SGN-40,huS2C6;Seattle Genetics,Inc.)、达雷木单抗(Darzalex®,Janssen Biotech)、地莫单抗、drozitumab(Genentech)、durvalumab(MedImmune)、dusigitumab(MedImmune)、依决洛单抗(MAb17-1A,Panorex,Glaxo Wellcome)、依洛珠单抗(Empliciti™,Bristol-Myers Squibb)、emibetuzumab(Eli

Lilly)、enavatuzumab(Facet Biotech Corp.)、enfortumab vedotin(Seattle Genetics, Inc.)、enoblituzumab(MGA271,MacroGenics,Inc.)、ensituxumab(Neogenix Oncology, Inc.)、依帕珠单抗(LymphoCide,Immunomedics,Inc.)、厄马索单抗(Rexomun®,Trion Pharma)、伊瑞西珠(Abegrin,MedImmune)、法利珠单抗(MORAb-003,Morphotek,Inc)、FBTA05(Lymphomun,Trion Pharma)、ficlatuzumab(AVEO Pharmaceuticals)、芬妥木单抗(CP-751871,Pfizer)、flanvotumab(ImClone Systems)、夫苏木单抗(GC1008,Aanofi-Aventis)、futuximab、glaximab、ganitumab(Amgen)、吉瑞昔单抗(Rencarex®,Wilex AG)、IMAB362(Claudiximab,Ganymed Pharmaceuticals AG)、imalumab(Baxalta)、IMC-1C11(ImClone Systems)、IMC-C225(Imclone Systems Inc.)、imgatuzumab(Genentech/Roche)、英妥木单抗(Centocor,Inc.)、易普利姆玛(Yervoy®,Bristol-Myers Squibb)、伊妥木单抗(Medarex,Inc.)、isatuximab(SAR650984,Sanofi-Aventis)、拉贝珠单抗(CEA-CIDE,Immunomedics)、来沙木单抗(ETR2-ST01,Cambridge Antibody Technology)、林妥珠单抗(SGN-33,Seattle Genetics)、鲁卡木单抗(Novartis)、鲁昔单抗、马帕木单抗(HGS-ETR1,Human Genome Sciences)、马妥珠单抗(EMD72000,Merck)、米拉珠单抗(hLL1, Immunomedics,Inc.)、米妥莫单抗(BEC-2,ImClone Systems)、narnatumab(ImClone Systems)、奈昔木单抗(Portrazza™,Eli Lilly)、nesvacumab(Regeneron Pharmaceuticals)、尼妥珠单抗(h-R3、BIOMAb EGFR、TheraCIM、Theraloc或CIMAher; Biotech Pharmaceutical Co.)、纳武单抗(Opdivo®,Bristol-Myers Squibb)、obinutuzumab(Gazyva或Gazyvaro;Hoffmann-La Roche)、ocaratuzumab(AME-133v, LY2469298;Mentrik Biotech,LLC)、奥法木单抗(Arzerra®,Genmab)、onartuzumab (Genentech)、Ontuxizumab(Morphotek,Inc.)、奥戈伏单抗(OvaRex®,AltaRex Corp.)、otlertuzumab(Emergent BioSolutions)、帕尼单抗(ABX-EGF,Amgen)、pankomab (Glycotope GMBH)、parsatuzumab(Genentech)、patritumab、派姆单抗(Keytruda®, Merck)、pemtumomab(Theragyn,Antisoma)、帕妥珠单抗(Perjeta,Genentech)、pidilizumab(CT-011,Medivation)、polatuzumab vedotin(Genentech/Roche)、普立木单抗、雷妥莫单抗(Vaxira®,Recombio)、雷莫芦单抗(Cyramza®,ImClone Systems Inc.)、利妥昔单抗(Rituxan®,Genentech)、罗妥木单抗(Schering-Plough)、Seribantumab(Sanofi/Merrimack Pharmaceuticals,Inc.)、西罗珠单抗、司妥昔单抗(Sylvant™,Janssen Biotech)、Smart MI95(Protein DesignLabs,Inc.)、Smart ID10 (Protein Design Labs,Inc.)、tabalumab(LY2127399,Eli Lilly)、帕他莫单抗、替妥莫单抗、替妥木单抗(Roche)、tetulomab、TGN1412(CD28-SuperMAB或TAB08)、替加珠单抗(CD-1008,Daiichi Sankyo)、托西莫单抗、曲妥珠单抗(Herceptin®)、曲美木单抗(CP-672, 206;Pfizer)、西莫白介素单抗(EMD Pharmaceuticals)、ublituximab、urelumab(BMS-663513,Bristol-Myers Squibb)、伏洛昔单抗(M200,Biogen Idec)、zatuximab等。

[0389] 在一些实施方案中,结合部分A包括扎芦木单抗(HuMax-EFGr,Genmab)、阿巴伏单抗(Menarini)、abituzumab(Merck)、adecatumumab(MT201)、培化阿珠单抗、阿仑珠单抗(

Campath®,MabCampath或Campath-1H;Leukosite)、AlloMune(BioTransplant)、amatuximab(Morphotek,Inc.)、抗VEGF(Genetech)、马安莫单抗、阿泊珠单抗(hu1D10)、ascrinvacumab(Pfizer Inc.)、atezolizumab(MPDL3280A;Genentech/Roche)、B43.13(OvaRex,AltaRex Corporation)、巴利昔单抗(Simulect®,Novartis)、贝利木单抗(Benlysta®,GlaxoSmithKline)、贝伐珠单抗(Avastin®,Genentech)、博纳吐单抗(Blincyto,AMG103;Amgen)、BEC2(ImGlone Systems Inc.)、carlumab(Janssen Biotech)、卡妥索单抗(Removab,Trion Pharma)、CEAcide(Immunomedics)、西妥昔单抗(Erbitux®,ImClone)、泊西他珠单抗(VB6-845)、西妥木单抗(IMC-A12,ImClone Systems Inc.)、可那木单抗(AMG 655,Amgen)、达西珠单抗(SGN-40,huS2C6;Seattle Genetics,Inc.)、达雷木单抗(Darzalex®,Janssen Biotech)、地莫单抗、drozitumab(Genentech)、durvalumab(MedImmune)、dusigitumab(MedImmune)、依决洛单抗(MAb17-1A,Panorex,Glaxo Wellcome)、依洛珠单抗(Empliciti™,Bristol-Myers Squibb)、emibetuzumab(Eli Lilly)、enavatuzumab(Facet Biotech Corp.)、enfortumab vedotin(Seattle Genetics,Inc.)、enoblituzumab(MGA271,MacroGenics,Inc.)、ensituxumab(Neogenix Oncology,Inc.)、依帕珠单抗(LymphoCide,Immunomedics,Inc.)、厄马索单抗(Rexomun®,Trion Pharma)、伊瑞西珠(Abegrin,MedImmune)、法利珠单抗(MORAb-003,Morphotek,Inc)、FBTA05(Lymphomun,Trion Pharma)、ficlatuzumab(AVEO Pharmaceuticals)、芬妥木单抗(CP-751871,Pfizer)、flanvotumab(ImClone Systems)、夫苏木单抗(GC1008,Aanofi-Aventis)、futuximab、glaximab、ganitumab(Amgen)、吉瑞昔单抗(Rencarex®,Wilex AG)、IMAB362(Claudiximab,Ganymed Pharmaceuticals AG)、imalumab(Baxalta)、IMC-1C11(ImClone Systems)、IMC-C225(Imclone Systems Inc.)、imgatuzumab(Genentech/Roche)、英妥木单抗(Centocor,Inc.)、易普利姆玛(Yervoy®,Bristol-Myers Squibb)、伊妥木单抗(Medarex,Inc.)、isatuximab(SAR650984,Sanofi-Aventis)、拉贝珠单抗(CEA-CIDE,Immunomedics)、来沙木单抗(ETR2-ST01,Cambridge Antibody Technology)、林妥珠单抗(SGN-33,Seattle Genetics)、鲁卡木单抗(Novartis)、鲁昔单抗、马帕木单抗(HGS-ETR1,Human Genome Sciences)、马妥珠单抗(EMD72000,Merck)、米拉珠单抗(hLL1,Immunomedics,Inc.)、米妥莫单抗(BEC-2,ImClone Systems)、narnatumab(ImClone Systems)、奈昔木单抗(Portrazza™,Eli Lilly)、nesvacumab(Regeneron Pharmaceuticals)、尼妥珠单抗(h-R3、BIOMAb EGFR、TheraCIM、Theraloc或CIMAher;Biotech Pharmaceutical Co.)、纳武单抗(Opdivo®,Bristol-Myers Squibb)、obinutuzumab(Gazyva或Gazyvaro;Hoffmann-La Roche)、ocaratuzumab(AME-133v,LY2469298;Mentrik Biotech,LLC)、奥法木单抗(Arzerra®,Genmab)、onartuzumab(Genentech)、Ontuxizumab(Morphotek,Inc.)、奥戈伏单抗(OvaRex®,AltaRex Corp.)、otlertuzumab(Emergent BioSolutions)、帕尼单抗(ABX-EGF,Amgen)、pankomab(Glycotope GMBH)、parsatuzumab(Genentech)、patritumab、派姆单抗(Keytruda®,Merck)、pemtumomab(Theragyn,Antisoma)、帕妥珠单抗(Perjeta,Genentech)、

pidilizumab(CT-011,Medivation)、polatuzumab vedotin(Genentech/Roche)、普立木单抗、雷妥莫单抗(Vaxira®,Recombio)、雷莫芦单抗(Cyramza®,ImClone Systems Inc.)、利妥昔单抗(Rituxan®,Genentech)、罗妥木单抗(Schering-Plough)、Seribantumab(Sanofi/Merrimack Pharmaceuticals,Inc.)、西罗珠单抗、司妥昔单抗(Sylvant™,Janssen Biotech)、Smart MI95(Protein Design Labs,Inc.)、Smart ID10(Protein Design Labs,Inc.)、tabalumab(LY2127399,Eli Lilly)、帕他莫单抗、替妥莫单抗、替妥木单抗(Roche)、tetulomab、TGN1412(CD28-SuperMAB或TAB08)、替加珠单抗(CD-1008,Daiichi Sankyo)、托西莫单抗、曲妥珠单抗(Herceptin®)、曲美木单抗(CP-672,206;Pfizer)、西莫白介素单抗(EMD Pharmaceuticals)、ublituximab、urelumab(BMS-663513,Bristol-Myers Squibb)、伏洛昔单抗(M200,Biogen Idec)或zatuximab。在一些实施方案中,结合部分A为扎芦木单抗(HuMax-EFGr,来自Genmab)。

[0390] 在一些实施方案中,结合部分A根据式(I)与多核酸分子(B)和聚合物(C)缀合,并且根据本文所述的式(II)与任选的内体溶解部分(D)缀合。在一些情况下,多核酸分子包含与表2、表3、表5、表6、表7、表9或表11中列出的序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,多核酸分子包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些情况下,多核酸分子包含选自EQ ID NO 16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117的序列。在一些情况下,聚合物C包括聚亚烷基氧化物(例如,聚乙二醇)。在一些实施方案中,内体溶解部分D包括INF7或蜂毒肽,或者它们各自的衍生物。

[0391] 在一些实施方案中,结合部分A与多核酸分子(B)和聚合物(C)以及任选的内体溶解部分(D)缀合,如图1所示。在一些情况下,结合部分A为抗体或其结合片段。

[0392] 在一些实施方案中,结合部分A非特异性地与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A经由赖氨酸残基或半胱氨酸残基以非位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A经由赖氨酸残基以非位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A经由半胱氨酸残基以非位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A为抗体或其结合片段。

[0393] 在一些实施方案中,结合部分A以位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A通过赖氨酸残基、半胱氨酸残基、在5'末端、3'末端、非天然氨基酸或者酶修饰或酶催化的残基经由位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A通过赖氨酸残基经由位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A通过半胱氨酸残基经由位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A通过在5'末端经由位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A通过在3'末端经由位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A通过非天然氨基酸经由位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A通过酶修饰或酶催化的残基经由位点特异性方式与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A为抗体或其结合片段。

[0394] 在一些实施方案中,结合部分A的一个或多个区域(例如,抗体或其结合片段)与多核酸分子(B)缀合。在一些情况下,结合部分A的一个或多个区域包含结合部分A的N-末端、C-末端、恒定区、铰链区或Fc区。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的N-末端(例如,抗体或其结合片段的N-末端)缀合。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的C-末端(例如,抗体或其结合片段的C-末端)缀合。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的恒定区(例如,抗体或其结合片段的恒定区)缀合。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的铰链区(例如,抗体或其结合片段的铰链区)缀合。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的Fc区(例如,抗体或其结合片段的Fc区)缀合。

[0395] 在一些实施方案中,一个或多个多核酸分子(B)与结合部分A缀合。在一些情况下,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个或更多个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约1个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约2个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约3个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约4个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约5个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约6个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约7个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约8个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约9个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约10个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约11个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约12个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约13个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约14个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约15个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,约16个多核酸分子与一个结合部分A缀合。在一些情况下,一个或多个多核酸分子相同。在其他情况下,一个或多个多核酸分子不同。在一些情况下,结合部分A为抗体或其结合片段。

[0396] 在一些实施方案中,与结合部分A(例如,抗体或其结合片段)缀合的多核酸分子(B)的数目形成比率。在一些情况下,该比率被称为DAR(药物-抗体)比率,其中如本文提及的药物为多核酸分子(B)。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约1或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约2或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约3或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约4或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约5或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约6或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约7或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约8或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约9或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约10或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约11或更大。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约12或更大。

[0397] 在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A(例如,抗体或其结合片段)的DAR比率为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约1。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约2。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约3。在一些情况下,多核酸分子(B)与

结合部分A的DAR比率为约4。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约5。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约6。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约7。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约8。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约9。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约10。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约11。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约12。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约13。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约14。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约15。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为约16。

[0398] 在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为1。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为2。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为4。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为6。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为8。在一些情况下,多核酸分子(B)与结合部分A的DAR比率为12。

[0399] 在一些实施方案中,使用本领域已知的常规技术进一步修饰抗体或其结合片段,例如,通过单独或组合地使用氨基酸缺失、插入、置换、添加和/或通过重组和/或本领域已知的任何其他修饰(例如,翻译后和化学修饰,诸如糖基化和磷酸化)。在一些情况下,修饰进一步包括用于调节与Fc受体的相互作用的修饰。在一些情况下,一种或多种修饰包括例如国际公开号WO97/34631中描述的那些,该文献公开了参与Fc结构域与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基。在抗体或其结合片段的氨基酸序列中的核酸序列中引入此类修饰的方法是本领域技术人员公知的。

[0400] 在一些情况下,抗体结合片段进一步包括其衍生物,并包括含有至少一个CDR的多肽序列。

[0401] 在一些情况下,如本文所用的术语“单链”意指双特异性单链构建体的第一和第二结构域共价连接,优选处于单个核酸分子可编码的共线氨基酸序列的形式。

[0402] 在一些情况下,双特异性单链抗体构建体涉及包含两个抗体衍生结合域的构建体。在这样的实施方案中,双特异性单链抗体构建体是串联双scFv或双抗体。在一些情况下,scFv含有通过连接体肽连接的VH和VL结构域。在一些情况下,连接体的长度和序列足以确保第一和第二结构域中的每一个可以彼此独立地保持其差异结合特异性。

[0403] 在一些实施方案中,与本文所用的结合或相互作用定义至少两个抗原相互作用位点彼此的结合/相互作用。在一些情况下,抗原相互作用位点定义多肽的基序,其显示与特定抗原或特定抗原组的特异性相互作用的能力。在一些情况下,结合/相互作用也被理解为定义特异性识别。在这样的情况下,特异性识别是指抗体或其结合片段能够与每个靶分子的至少两个氨基酸特异性地相互作用和/或结合。例如,特异性识别涉及抗体分子的特异性,或其辨别靶分子的特定区域的能力。在另外的情况下,抗原相互作用位点与其特定抗原的特异性相互作用导致信号起始,例如,由于诱导抗原的构象改变、抗原的寡聚化等。在进一步的实施方案中,结合的实例是“匙-锁原理”的特异性。因此,在一些情况下,抗原相互作用位点和抗原的氨基酸序列中的特定基序由于其一级、二级或三级结构以及所述结构的二

级修饰而彼此结合。在这样的情况下,抗原相互作用位点与其特定抗原的特异性相互作用也导致位点与抗原的简单结合。

[0404] 在一些情况下,特异性相互作用进一步指抗体或其结合片段的交叉反应性降低或脱靶效应降低。例如,与感兴趣的多肽/蛋白质结合但不与或基本上不与任何其他多肽结合的抗体或其结合片段被认为对感兴趣的多肽/蛋白质具有特异性。抗原相互作用位点与特定抗原的特异性相互作用的实例包括配体对其受体的特异性,例如抗原决定簇(表位)与抗体的抗原结合位点的相互作用。

[0405] 另外的结合部分

[0406] 在一些实施方案中,结合部分为血浆蛋白质。在一些情况下,血浆蛋白质包括白蛋白。在一些情况下,结合部分A为白蛋白。在一些情况下,白蛋白通过一种或多种本文所述的缀合化学与多核酸分子缀合。在一些情况下,白蛋白通过天然连接化学与多核酸分子缀合。在一些情况下,白蛋白通过赖氨酸缀合与多核酸分子缀合。

[0407] 在一些情况下,结合部分为类固醇。示例性的类固醇包括胆固醇、磷脂、二酰基甘油和三酰基甘油、脂肪酸、饱和、不饱和、包含取代基的烃或其组合。在一些情况下,类固醇为胆固醇。在一些情况下,结合部分为胆固醇。在一些情况下,胆固醇通过一种或多种本文所述的缀合化学与多核酸分子缀合。在一些情况下,胆固醇通过天然连接化学与多核酸分子缀合。在一些情况下,胆固醇通过赖氨酸缀合与多核酸分子缀合。

[0408] 在一些情况下,结合部分为聚合物,包括但不限于与细胞上的特定表面标志物结合的多核酸分子适体。在这种情况下,结合部分为多核酸,其不与靶基因或mRNA杂交,而是能够选择性地与细胞表面标志物结合,类似于抗体与其细胞表面标志物的特定表位结合。

[0409] 在一些情况下,结合部分为肽。在一些情况下,肽包含约1至约3kDa。在一些情况下,肽包含约1.2至约2.8kDa、约1.5至约2.5kDa、或约1.5至约2kDa。在一些情况下,肽为双环肽。在一些情况下,双环肽为约束双环肽。在一些情况下,结合部分为双环肽(例如,来自BicycleTherapeutics的双环)。

[0410] 在另外的情况下,结合部分为小分子。在一些情况下,小分子为招募抗体的小分子。在一些情况下,招募抗体的小分子包含靶标结合末端和抗体结合末端,其中靶标结合末端能够识别细胞表面受体并与其相互作用。例如,在一些情况下,包含谷氨酸脲化合物的靶标结合末端能够与PSMA相互作用,从而增强抗体与表达PSMA的细胞(例如,癌细胞)的相互作用。在一些情况下,结合部分是Zhang等人,“A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules,”J Am Chem Soc.132(36):12711-12716(2010);或McEnaney,等人,“Antibody-recruiting molecules:an emerging paradigmfor engaging immune function in treating human disease,”ACS Chem Biol.7(7):1139-1151(2012)中描述的小分子。

[0411] 抗体或其结合片段的产生

[0412] 在一些实施方案中,使用本领域已知的用于合成多肽(例如,抗体)任何方法产生本文所述的多肽(例如,抗体及其结合片段),特别是通过化学合成或通过重组表达,并且优选通过重组表达技术产生。

[0413] 在一些情况下,重组地表达抗体或其结合片段,并且编码抗体或其结合片段的核酸由化学合成的寡核苷酸组装(例如,如Kutmeier等人,1994,BioTechniques 17:242中所

述),该方法包括合成含有编码抗体的序列部分的重叠寡核苷酸,退火并连接那些寡核苷酸,然后通过PCR扩增连接的寡核苷酸。

[0414] 或者,任选地通过使用可与序列的3′和5′端杂交的合成引物的PCR扩增或者通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针的克隆从合适的来源(例如,抗体cDNA文库,或由表达免疫球蛋白的任何组织或细胞生成的cDNA文库)生成编码抗体的核酸分子。

[0415] 在一些情况下,任选地通过使动物(诸如兔)免疫来生成多克隆抗体,或者更优选地通过生成单克隆抗体以生成抗体或其结合片段,例如,如Kohler和Milstein(1975,Nature 256:495-497)所述,或者如Kozbor等人(1983,Immunology Today 4:72)或Cole等人(1985in MonoclonalAntibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,77-96页)所述。或者,任选地通过筛选Fab表达文库(例如,如Huse等人,1989,Science246:1275-1281中所述)的结合特定抗原的Fab片段的克隆或通过筛选抗体文库(参见例如,Clackson等人,1991,Nature 352:624;Hane等人,1997Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:4937)获得编码至少抗体的Fab部分的克隆。

[0416] 在一些实施方案中,使用被开发用于通过将来自具有适当抗原特异性的小鼠抗体分子的基因与来自具有适当生物活性的人抗体分子的基因剪接而产生“嵌合抗体”的技术(Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.81:851-855;Neuberger等人,1984,Nature 312:604-608;Takeda等人,1985,Nature 314:452-454)。嵌合抗体是其中不同部分衍生自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。

[0417] 在一些实施方案中,针对产生单链抗体所描述的技术(美国专利号4,694,778;Bird,1988,Science 242:423-42;Huston等人,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;以及Ward等人,1989,Nature 334:544-54)适于产生单链抗体。通过经由氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链片段产生单链多肽来形成单链抗体。还任选地使用用于在大肠杆菌(E.coli)中组装功能性Fv片段的技术(Skerra等人,1988,Science 242:1038-1041)。

[0418] 在一些实施方案中,通过常规技术(例如,电穿孔、脂质体转染和磷酸钙沉淀)将包含抗体的核苷酸序列的表达载体或抗体的核苷酸序列转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染的细胞以产生抗体。在具体实施方案中,抗体的表达受组成型、诱导型或组织特异性启动子调节。

[0419] 在一些实施方案中,利用各种宿主表达载体系统表达本文所述的抗体或其结合片段。此类宿主表达系统代表通过其产生抗体的编码序列并随后纯化的载体,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。这些包括但不限于用含有抗体或其结合片段编码序列重组噬菌体DNA、质粒DNA或者的粘粒DNA表达载体转化的微生物如细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(B.subtilis));用含有抗体或其结合片段编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母(Saccharomyces Pichia));用含有抗体或其结合片段编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒(CaMV)和烟草花叶病毒(TMV))感染或用含有抗体或其结合片段编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或者含有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS、CHO、BH、293、293T、3T3细胞),所述重组表达构建体含有源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属

硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)。

[0420] 对于重组蛋白的长期高产量生产,优选稳定表达。在一些情况下,任选地对稳定表达抗体的细胞系进行工程化。不使用含有病毒复制起点的表达载体,而是用通过适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多聚腺苷酸化位点等)和选择性标记控制的DNA转化宿主细胞。在引入外源DNA后,随后允许工程细胞在富集培养基中生长1-2天,然后切换到选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并允许细胞将质粒稳定整合到其染色体中并生长形成焦点(focus),然后将该焦点克隆并扩增到细胞系中。该方法可有利地用于对表达抗体或其结合片段的细胞系进行工程化。

[0421] 在一些情况下,使用多种选择系统,包括但不限于分别用于tk-、hgprt-或aprt-细胞的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,1977,Cell11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(Szybalska&Szybalski,192,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202)和腺嘌呤转磷酸核糖基酶(Lowy等人,1980,Cell 22:817)基因。此外,使用抗代谢物抗性作为选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler等人,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:357;O'Hare等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan&Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072);neo,其赋予对氨基糖苷类G-418的抗性(ClinicalPharmacy 12:488-505;Wu和Wu,1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596;Mulligan,1993,Science260:926-932;以及Morgan和Anderson,1993,Ann.Rev.Biochem.62:191-217;May,1993,TIB TECH 11(5):155-215);以及hygro,赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,1984,Gene 30:147)。可使用的重组DNA技术领域中公知的方法描述于Ausubel等人(编著),1993,Current Protocols inMolecular Biology,John Wiley&Sons,NY;Kriegler,1990,Gene Transferand Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY;以及第12和13章,Dracopoli等人(编著),1994,Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY.;Colberre-Garapin等人,1981,J.Mol.Biol.150:1。

[0422] 在一些情况下,通过载体扩增来增加抗体的表达水平(综述参见Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification forthe expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷(Academic Press,New York,1987))。当表达抗体的载体系统中的标记可扩增时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体的核苷酸序列相关,因此抗体的产生也将增加(Crouse等人,1983,Mol.Cell Biol.3:257)。

[0423] 在一些情况下,使用本领域已知的用于纯化抗体的任何方法,例如,通过色谱法(例如,离子交换色谱、亲和色谱,特别是针对蛋白A后的特定抗原的亲和色谱、以及尺寸柱色谱)、离心、差异溶解度、或通过纯化蛋白质的任何其他标准技术。

[0424] 聚合物缀合部分

[0425] 在一些实施方案中,聚合物部分C进一步与本文所述的多核酸分子、本文所述的结合部分或其组合缀合。在一些情况下,聚合物部分C与多核酸分子缀合。在一些情况下,聚合物部分C与结合部分缀合。在其他情况下,聚合物部分C与多核酸分子-结合部分分子缀合。在另外的情况下,聚合物部分C如图1所示并且如在治疗性分子平台部分中的讨论而缀合。

[0426] 在一些情况下,聚合物部分C是天然或合成聚合物,由支链或非支链单体的长链和/或二维或三维的单体交联网络组成。在一些情况下,聚合物部分C包括多糖、木质素、橡胶或聚亚烷基氧化物(例如,聚乙二醇)。在一些情况下,至少一种聚合物部分C包括但不限于α-二羟基聚乙二醇、ω-二羟基聚乙二醇、可生物降解的内酯基聚合物,例如聚丙烯酸、聚乳酸(PLA)、聚(羟基乙酸)(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(PTG)或聚氨酯及其混合物。如本文所用,混合物是指在相同化合物内以及在嵌段共聚物中使用不同聚合物。在一些情况下,嵌段共聚物是其中至少一部分聚合物由另一聚合物的单体构成的聚合物。在一些情况下,聚合物部分C包括聚环氧烷。在一些情况下,聚合物部分C包括PEG。在一些情况下,聚合物部分C包括聚乙烯亚胺(PEI)或羟乙基淀粉(HES)。

[0427] 在一些情况下,C为PEG部分。在一些情况下,PEG部分缀合在多核酸分子的5'末端,而结合部分缀合在多核酸分子的3'末端。在一些情况下,PEG部分缀合在多核酸分子的3'末端,而结合部分缀合在多核酸分子的5'末端。在一些情况下,PEG部分与多核酸分子的内部位点缀合。在一些情况下,PEG部分、结合部分或其组合与多核酸分子的内部位点缀合。在一些情况下,缀合是直接缀合。在一些情况下,缀合经由天然连接。

[0428] 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。

[0429] 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。

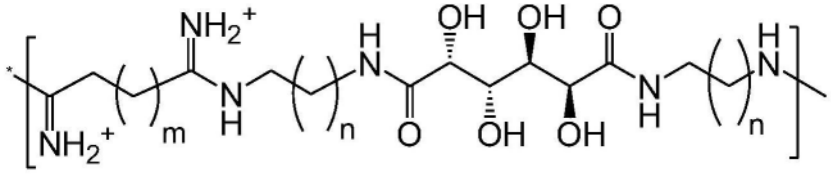
[0430] 在一些实施方案中,C为聚环氧烷(例如,PEG),并且具有约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3250、3350、3500、3750、4000、4250、4500、4600、4750、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、10,000、12,000、20,000、35,000、40,000、50,000、60,000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。

[0431] 在一些实施方案中,聚环氧烷(例如,PEG)是离散PEG,其中离散PEG是包含多于一个重复的环氧乙烷单元的聚合物PEG。在一些情况下,离散PEG(dPEG)包含2至60、2至50或2至48个重复的环氧乙烷单元。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个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约2个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约3个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约4个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约5个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约6个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约7个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约8个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约9个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约10个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约11个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约12个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约13个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约14个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约15个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约16个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约17个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约18个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约19个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约20个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约22个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约24个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约26个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约28个或更多个

重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约30个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约35个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约40个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约42个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约48个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG包含约50个或更多个重复的环氧乙烷单元。在一些情况下,dPEG以逐步方式由纯(例如,约95%、98%、99%或99.5%)起始材料合成为单一分子量化合物。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。

[0432] 在一些实施方案中,聚合物部分C包括阳离子粘酸基聚合物(cMAP)。在一些情况下,cMPA包含至少一个重复亚基的一个或多个亚基,并且该亚基结构表示为式(III):

[0433] 

式 III

[0434] 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。

[0435] 在一些情况下,cMAP进一步与PEG部分缀合,产生cMAP-PEG共聚物、mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物或cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。在一些情况下,PEG部分的范围为约500Da至约50,000Da。在一些情况下,PEG部分的范围为约500Da至约1000Da、大于1000Da至约5000Da、大于5000Da至约10,000Da、大于10,000至约25,000Da、大于25,000Da至约50,000Da,或这些范围中的两种或更多种的任意组合。

[0436] 在一些情况下,聚合物部分C为cMAP-PEG共聚物、mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物或cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。在一些情况下,聚合物部分C为cMAP-PEG共聚物。在其他情况下,聚合物部分C为mPEG-cMAP-PEGm三嵌段聚合物。在另外的情况下,聚合物部分C为cMAP-PEG-cMAP三嵌段聚合物。

[0437] 在一些实施方案中,聚合物部分C与多核酸分子、结合部分和任选的内体溶解部分缀合,如图1所示。

[0438] 内体溶解部分

[0439] 在一些实施方案中,式(I)的分子:A-X-B-Y-C进一步包含另外的缀合部分。在一些情况下,另外的缀合部分是内体溶解部分。在一些情况下,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,该细胞区室诸如内体、溶酶体、内质网(ER)、高尔基体、微管、过氧化物酶体或其他细胞内的泡囊体。在一些情况下,内体溶解部分包括内体溶解多肽、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,内体溶解部分包括内体溶解多肽。在其他情况下,内体溶解部分包括内体溶解聚合物。

[0440] 内体溶解多肽

[0441] 在一些实施方案中,式(I)的分子:A-X-B-Y-C进一步与内体溶解多肽缀合。在一些情况下,内体溶解多肽为pH依赖性膜活性肽。在一些情况下,内体溶解多肽为两亲性多肽。

在另外的情况下,内体溶解多肽为肽模拟物。在一些情况下,内体溶解多肽包括INF、蜂毒肽、meucin或其各自的衍生物。在一些情况下,内体溶解多肽包括INF或其衍生物。在其他情况下,内体溶解多肽包括蜂毒肽或其衍生物。在另外的情况下,内体溶解多肽包括meucin或其衍生物。

[0442] 在一些情况下,INF7为24残基多肽,序列包括CGIFGEIEELIEEGLENLIDWGNA(SEQ ID NO:2055)或GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC(SEQ ID NO:2056)。在一些情况下,INF7或其衍生物包括以下序列:GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYGSGSCG(SEQ ID NO:2057)、GLFEAIEGFIENGWEGMIDG WYG-(PEG)6-NH2(SEQ ID NO:2058)或GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG-SGSC-K(GalNAc)2(SEQ ID NO:2059)。

[0443] 在一些情况下,蜂毒肽为26残基多肽,序列包括CLIGAILKVLATGLPTLISWIKNKRKQ(SEQ ID NO:2060)或GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ(SEQ ID NO:2061)。在一些情况下,蜂毒肽包括如美国专利号8,501,930中描述的多肽序列。

[0444] 在一些情况下,meucin是衍生自蝎子条斑钳蝎(Mesobuthus eupeus)的毒腺的抗微生物肽(AMP)。在一些情况下,meucin包括meucin-13,序列包括IFGAIAGLLKNIF-NH_2(SEQ ID NO:2062),以及meucin-18,序列包括FFGHLFKLATKIIPSLFQ(SEQ ID NO:2063)。

[0445] 在一些情况下,内体溶解多肽包括序列与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。

[0446] 在一些情况下,内体溶解部分为INF7或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2055-2059具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2055具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2056-2059具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2055。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2056-2059。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2055组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2056-2059组成。

[0447] 在一些情况下,内体溶解部分为蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2060或2061具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2060具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2061具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2060。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2061。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2060组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2061组成。

[0448] 在一些情况下,内体溶解部分为meucin或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分

包括与SEQ ID NO:2062或2063具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2062具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2063具有至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2062。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2063。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2062组成。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2063组成。

[0449] 在一些情况下,内体溶解部分包含如表62中所示的序列。

[0450] 表62.

[0451]

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	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	2064	一级两亲性
pVEC	VE-钙粘着蛋白	LLIILRRRRIRKQAHAHSK	2065	一级两亲性
VT5	合成肽	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	2066	β-折叠两亲性
C105Y	1-抗胰蛋白酶	CSIPPEVKFNKPFVYLI	2067	-
穿膜肽	甘丙肽和肥大脱粒肽	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	2068	一级两亲性
TP10	甘丙肽和肥大脱粒肽	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	2069	一级两亲性
MPG	来自HIV gp41的融合序列和SV40 T抗原的NLS的疏水结构域	GALFLGFLGAAGSTMGA	2070	β-折叠两亲性
gH625	I型HSV的糖蛋白gH	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	2071	二级两亲性α-螺旋

[0452]

CADY	PPTG1 肽	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA	2072	二级两亲性 α-螺旋
GALA	合成肽	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA	2073	二级两亲性 α-螺旋
INF	流感 HA2 融合肽	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC	2074	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 亚基	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	2075	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 亚基	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGRQIKIWFQNRRMKWKK-amide	2076	pH 依赖性膜活性肽
HA-K4	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚基	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG-SSKKKK	2077	pH 依赖性膜活性肽
HA2E4	流感病毒 X31 株融合肽的流感 HA2 亚基	GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGYC	2078	pH 依赖性膜活性肽
H5WYG	HA2 类似物	GLFHAIAHFIHGGWHGLIHGWYG	2079	pH 依赖性膜活性肽
GALA-INF3-(PEG)6-NH	INF3 融合肽	GLFEAIEGFIENGWEGLAEALAEALEALAA-(PEG)6-NH2	2080	pH 依赖性膜活性肽
CM18-TAT11	抗菌肽-A-蜂毒肽 2-12（CM_{18}）融合肽	KWKLFKKIGAVLKVLTTG-YGRKKRRQRRR	2081	pH 依赖性膜活性肽

[0453] 在一些情况下,内体溶解部分包括Bak BH3多肽,其通过拮抗抑制剂靶标如Bcl-2和/或Bcl-x_L诱导细胞凋亡。在一些情况下,内体溶解部分包括Albarran,等人,"Efficient intracellular delivery of a pro-apoptoticpeptide with a pH-responsive carrier,"Reactive&Functional Polymers 71:261-265(2011)中描述的Bak BH3多肽。

[0454] 在一些情况下,内体溶解部分包括PCT公开号WO2013/166155或WO2015/069587中描述的多肽(例如,细胞穿透多肽)。

[0455] 内体溶解聚合物

[0456] 在一些实施方案中,式(I)的分子:A-X-B-Y-C进一步与内体溶解聚合物缀合。如本文所用,内体溶解聚合物包括线性、支化网络、星形、梳形或梯形类型的聚合物。在一些情况下,内体溶解聚合物是包含两种或以上不同类型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。

[0457] 在一些情况下,聚阳离子聚合物包含带正电荷、电荷中性或带负电荷的单体单元,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。示例性的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-(二甲氨基)乙酯(DMAEMA)或甲基丙烯酸N,N-二乙氨基乙酯(DEAEMA)。

[0458] 在一些情况下,聚阴离子聚合物包含带正电荷、电荷中性或带负电荷的单体单元,

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p(烷基丙烯酸酯)(例如,聚(丙基丙烯酸)(PPAA))或聚(N-异丙基丙烯酰胺)(NIPAM)。另外的实例包括PP75,一种L-苯丙氨酸-聚(L-赖氨酸异邻苯二甲酰胺)聚合物,描述于Khormaee,等人,"Edosomolytic anionicpolymer for the cytoplasmic delivery of siRNAs in localized in vivoapplications,"Advanced Functional Materials 23:565-574(2013)。

[0459] 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而大小增加(膨胀)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。

[0460] 在一些情况下,本文所述的内体溶解部分是膜破坏性聚合物。在一些情况下,膜破坏性聚合物包括阳离子聚合物、中性或疏水聚合物、或者阴离子聚合物。在一些情况下,膜破坏性聚合物是亲水性聚合物。

[0461] 在一些情况下,本文所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p(烷基丙烯酸)、聚(N-异丙基丙烯酰胺)(NIPAM)共聚物、琥珀酰化p(缩水甘油)和p(β-苹果酸)聚合物。

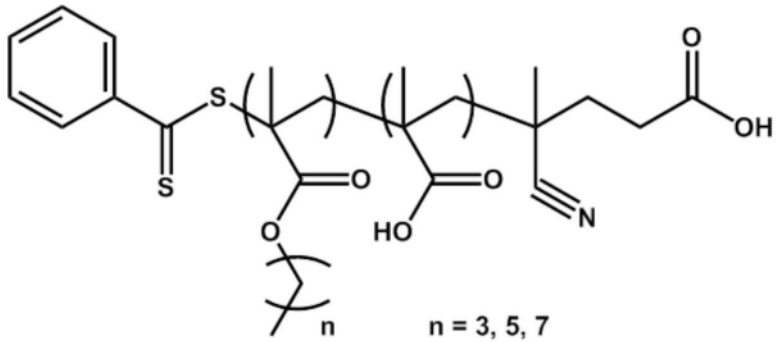
[0462] 在一些情况下,p(烷基丙烯酸)包括聚(丙基丙烯酸)(聚PAA)、聚(甲基丙烯酸)(PMAA)、聚(乙基丙烯酸)(PEAA)和聚(丙基丙烯酸)(PPAA)。在一些情况下,p(烷基丙烯酸)包括Jones,等人,BiochemistryJournal 372:65-75(2003)中描述的p(烷基丙烯酸)。

[0463] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括p(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))。

[0464] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括p(苯乙烯-alt-马来酸酐)(参见Henry,等人,Biomacromolecules 7:2407-2414(2006))。

[0465] 在一些实施方案中,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,诸如聚(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 designof 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-1presentation and T-cell activation,"Bioconjugate Chem.20:241-248(2009))。

[0466] 在一些实施方案中,pH响应性膜破坏性聚合物包括溶解聚合物,其包括以下基础结构:

[0467] 

[0468] 在一些情况下,本文所述的内体溶解部分进一步与另外的缀合物缀合,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)。

[0469] 在一些情况下,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括与去污剂(例如,Triton X-100)缀合的聚合物(例如,聚(酰氨基胺))。在一些情况下,本文所述的内体溶解部分包括聚(酰氨基胺)-Triton X-100缀合物(Duncan,等人,“Apolymer-Triton X-100conjugate capable of pH-dependent red blood cell lysis:a model system illustrating the possibility of drug delivery within acidicintracellular compartments,”Journal of Drug Targeting 2:341-347(1994))。

[0470] 内体溶解脂质

[0471] 在一些实施方案中,内体溶解部分为脂质(例如,融合脂质)。在一些实施方案中,式(I)的分子:A-X-B-Y-C进一步与内体溶解脂质(例如,融合脂质)缀合。示例性的融合脂质包括1,2-二油酰基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱(POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-醇(Di-Lin)、N-甲基(2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)-1,3-二氧杂环戊烷-4-基)甲胺(DLin-k-DMA)和N-甲基-2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)-1,3-二氧杂环戊烷-4-基)乙胺(XTC)。

[0472] 在一些情况下,内体溶解部分是PCT公开号WO09/126,933中描述的脂质(例如,融合脂质)。

[0473] 内体溶解小分子

[0474] 在一些实施方案中,内体溶解部分为小分子。在一些实施方案中,式(I)的分子:A-X-B-Y-C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、羟氯喹、阿莫地喹(carnoquine)、阿莫吡喹、伯氨喹、甲氟喹、硫酸氯喹、卤泛曲林、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(去甲氯喹);7-氟-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉);4-(4-二乙基-氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-4-二乙基-氨基-1-丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-丁基氨基)喹啉;7-氯-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(1-羧基-

4-二乙基-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-羟基-4-(1-羧基-4-二乙基氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;7-氟-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;4-(4-乙基-(2-羟基-乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基-)喹啉;7-羟基-4-(4-乙基-(2-羟基乙基)-氨基-1-甲基丁基氨基)喹啉;磷酸羟氯喹;7-氯-4-(4-乙基-(2-羟基乙基-1)-氨基-1-丁基氨基)喹啉(去甲羟氯喹);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-甲氧基二盐酸喹啉;1-乙酰基-1,2,3,4-四氢喹啉;8-[(4-氨基戊基)氨基]-6-甲氧基喹啉二盐酸盐;1-丁酰基-1,2,3,4-四氢喹啉;3-氯-4-(4-羟基-α,α′-双(2-甲基-1-吡咯烷基)-2,5-二甲代苯氨基喹啉;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)-2,5-二甲代苯氨基喹啉;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)-2,5-二甲代苯氨基喹啉;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′-五亚甲基二喹啉二碘化物(1,1′-pentamethylene diquinoleinium diiodide);8-羟基喹啉硫酸酯,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)和美国专利号5,736,557中描述的小分子。

[0475] 式(I)分子-内体溶解部分缀合物

[0476] 在一些实施方案中,一个或多个内体溶解部分与包含至少一个结合部分、至少一个多核苷酸、至少一个聚合物或其任意组合的分子缀合。在一些情况下,内体溶解部分根据式(II)缀合:

[0477] $(A-X-B-Y-C_c)-L-D$

[0478] 式II

[0479] 其中,

[0480] A为结合部分;

[0481] B为多核苷酸;

[0482] C为聚合物;

[0483] X为键或第一连接体;

[0484] Y为键或第二连接体;

[0485] L为键或第三连接体;

[0486] D为内体溶解部分;以及

[0487] c为0与1之间的整数;并且

[0488] 其中多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少

一个反向脱碱基部分;并且D缀合在A、B或C上的任何地方。

[0489] 在一些实施方案中,A和C不在相同末端与B连接。

[0490] 在一些实施方案中,至少一个2'修饰的核苷酸包括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-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些情况下,至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,多核苷酸包含第一多核苷酸和与第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一种修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或非聚合物连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0491] 在一些情况下,内体溶解部分包括多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解多肽。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物。在其他情况下,内体溶解部分为内体溶解脂质。在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解小分子。

[0492] 在一些情况下,内体溶解部分为INF7或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2055具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2055。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2055组成。

[0493] 在一些情况下,内体溶解部分为蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2060具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2060。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2060组成。

[0494] 在一些情况下,内体溶解部分为如表62中所示的序列。

[0495] 在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,内体溶解部分包括p(烷基丙烯酸)聚合物、p(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、p(苯乙烯-alt-马来酸酐)聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0496] 在一些实施方案中,内体溶解部分缀合物根据式(IIa):

[0497] $D\text{-}L\text{-}A\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_c$

[0498] 式IIa

[0499] 其中,

[0500] A为结合部分;

[0501] B为多核苷酸;

[0502] C为聚合物;

[0503] X为键或第一连接体;

[0504] Y为键或第二连接体;

[0505] L为键或第三连接体;

[0506] D为内体溶解部分;以及

[0507] c为整数1;并且

[0508] 其中多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。

[0509] 在一些实施方案中,A和C不在相同末端与B连接。

[0510] 在一些实施方案中,至少一个2'修饰的核苷酸包括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-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些情况下,至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,多核苷酸包含第一多核苷酸和与第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一种修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或非聚合物连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0511] 在一些情况下,内体溶解部分包括多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解多肽。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物。在其他情况下,内体溶解部分为内体溶解脂质。在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解小分子。

[0512] 在一些情况下,内体溶解部分为INF7或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2055具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2055。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2055组成。

[0513] 在一些情况下,内体溶解部分为蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2060具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2060。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2060组成。

[0514] 在一些情况下,内体溶解部分为如表62中所示的序列。

[0515] 在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,内体溶解部分包括p(烷基丙烯酸)聚合物、p(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、p(苯乙烯-alt-马来酸酐)聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0516] 在一些情况下,内体溶解部分缀合物根据式(IIb):

[0517] A-X-B-L-D

[0518] 式IIb

[0519] 其中,

[0520] A为结合部分;

[0521] B为多核苷酸;

[0522] X为键或第一连接体;

[0523] L为键或第三连接体;以及

[0524] D为内体溶解部分;并且

[0525] 其中多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。

[0526] 在一些实施方案中,A和C不在相同末端与B连接。

[0527] 在一些实施方案中,至少一个2'修饰的核苷酸包括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-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些情况下,至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,多核苷酸包含第一多核苷酸和与第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一种修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X和L独立地为键或非聚合物连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0528] 在一些情况下,内体溶解部分包括多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解多肽。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物。在其他情况下,内体溶解部分为内体溶解脂质。在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解小分子。

[0529] 在一些情况下,内体溶解部分为INF7或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2055具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2055。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2055组成。

[0530] 在一些情况下,内体溶解部分为蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2060具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2060。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2060组成。

[0531] 在一些情况下,内体溶解部分为如表62中所示的序列。

[0532] 在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,内体溶解部分包括p(烷基丙烯酸)聚合物、p(丙烯酸丁酯-共-甲基丙

烯酸)聚合物、p(苯乙烯-alt-马来酸酐)聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0533] 在一些情况下,内体溶解部分缀合物根据式(IIc):

[0534] $A-X-B-Y-C_c-L-D$

[0535] 式IIc

[0536] 其中,

[0537] A为结合部分;

[0538] B为多核苷酸;

[0539] C为聚合物;

[0540] X为键或第一连接体;

[0541] Y为键或第二连接体;

[0542] L为键或第三连接体;

[0543] D为内体溶解部分;以及

[0544] c为整数1;并且

[0545] 其中多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。

[0546] 在一些实施方案中,A和C不在相同末端与B连接。

[0547] 在一些实施方案中,至少一个2'修饰的核苷酸包括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-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些情况下,至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,多核苷酸包含第一多核苷酸和与第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一种修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或非聚合物连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0548] 在一些情况下,内体溶解部分包括多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解多肽。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物。在其他情况下,内体溶解部分为内体溶解脂质。在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解小分子。

[0549] 在一些情况下,内体溶解部分为INF7或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2055具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2055。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2055组成。

[0550] 在一些情况下,内体溶解部分为蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2060具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、

95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2060。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2060组成。

[0551] 在一些情况下,内体溶解部分为如表62中所示的序列。

[0552] 在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,内体溶解部分包括p(烷基丙烯酸)聚合物、p(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、p(苯乙烯-alt-马来酸酐)聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0553] 在一些情况下,内体溶解部分缀合物根据式(IId):

[0554] $A\text{-}L\text{-}D\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_c$

[0555] 式IId

[0556] 其中,

[0557] A为结合部分;

[0558] B为多核苷酸;

[0559] C为聚合物;

[0560] X为键或第一连接体;

[0561] Y为键或第二连接体;

[0562] L为键或第三连接体;

[0563] D为内体溶解部分;以及

[0564] c为整数1;并且

[0565] 其中多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分。

[0566] 在一些实施方案中,A和C不在相同末端与B连接。

[0567] 在一些实施方案中,至少一个2’修饰的核苷酸包括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-甲基乙酰氨基(2’-O-NMA)修饰的核苷酸。在一些情况下,至少一个2’修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。在一些情况下,至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,多核苷酸包含第一多核苷酸和与第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子。在一些情况下,第二多核苷酸包含至少一种修饰。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为RNA分子。在一些情况下,第一多核苷酸和第二多核苷酸为siRNA分子。在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或非聚合物连接体基团。在一些情况下,A为抗体或其结合片段。在一些情况下,抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab’、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。在一些情况下,C为聚乙二醇。

[0568] 在一些情况下,内体溶解部分包括多肽、聚合物、脂质或小分子。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解多肽。在一些情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物。在其他情况下,内体溶解部分为内体溶解脂质。在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解小分子。

[0569] 在一些情况下,内体溶解部分为INF7或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2055具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2055。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2055组成。

[0570] 在一些情况下,内体溶解部分为蜂毒肽或其衍生物。在一些情况下,内体溶解部分包括与SEQ ID NO:2060具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的多肽。在一些情况下,内体溶解部分包含SEQ ID NO:2060。在一些情况下,内体溶解部分由SEQ ID NO:2060组成。

[0571] 在一些情况下,内体溶解部分为如表62中所示的序列。

[0572] 在另外的情况下,内体溶解部分为内体溶解聚合物,例如pH响应性内体溶解聚合物、膜破坏性聚合物、聚阳离子聚合物、聚阴离子聚合物、pH响应性膜破坏性聚合物或其组合。在另外的情况下,内体溶解部分包括p(烷基丙烯酸)聚合物、p(丙烯酸丁酯-共-甲基丙烯酸)聚合物、p(苯乙烯-alt-马来酸酐)聚合物、吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物、聚合物-PEG缀合物、聚合物-去污剂缀合物或其组合。

[0573] 连接体

[0574] 在一些实施方案中,本文所述的连接体是可切割的连接体或不可切割的连接体。在一些情况下,连接体是可切割的连接体。在一些情况下,连接体是酸可切割的连接体。在一些情况下,连接体是不可切割的连接体。在一些情况下,连接体包括C_1-C_6烷基基团(例如,C_5、C_4、C_3、C_2或C_1烷基基团)。在一些情况下,连接体包括同双官能连接体、异双官能连接体等。在一些情况下,连接体是无痕连接体(或零长度连接体)。在一些情况下,连接体是非聚合物连接体。在一些情况下,连接体是非肽连接体或不含氨基酸残基的连接体。

[0575] 在一些情况下,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's试剂二硫双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)DSP、3′3′-二硫双(磺基琥珀酰亚胺基丙酸酯(DTSSP)、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)、双(磺基琥珀酰亚胺基)辛二酸酯(BS)、二琥珀酰亚胺基酒石酸酯(DST)、二磺基琥珀酰亚胺基酒石酸酯(磺基DST)、双(琥珀酰亚胺基琥珀酸酯)乙二醇酯(EGS)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯(DSG)、N,N′-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)、二甲基己二酰亚胺酯(DMA)、二甲基庚二酰亚胺酯(DMP)、二甲基辛二酰亚胺酯(DMS)、二甲基-3,3′-二硫双丙酰亚胺酯(DTBP)、1,4-二-3′-(2′-吡啶基二硫)丙酰氨基)丁烷(DPDPB)、双马来酰亚胺己烷(BMH)、含芳基卤的化合物(DFDNB)如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯、4,4′-二氟-3,3′-二硝基苯基砜(DFDNPS)、双-[β-(4-叠氮基水杨基氨基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二缩水甘油醚、己二酸二酰肼、碳酰肼、邻甲苯胺、3,3′-二甲基联苯胺、联苯胺、α,α′-对二氨基联苯、二碘-对二甲苯磺酸、N,N′-乙烯-双(碘乙酰胺)或N,N′-环己烷-双(碘乙酰胺)。

[0576] 在一些实施方案中,连接体包括同异官能连接体。示例性的异双官能连接体包括但不限于胺反应性和巯基交联体,诸如N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(sPDP)、长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性长链N-琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀酰亚胺基氧羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫)甲苯(sMPT)、磺基琥珀酰亚胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫)甲苯酰氨基]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-羧酸酯(sMCC)、磺基琥珀酰

亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(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)琥珀酰亚胺酯(GMBs)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰基氧)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-(((碘磺基琥珀酰亚胺)氨基)己酰基)氨基]己酸酯(sIAXX)、琥珀酰亚胺基4-(((碘磺基琥珀酰亚胺)氨基)甲基)环己烷-1-羧酸酯(sIAC)、琥珀酰亚胺基6-((((4-碘磺基琥珀酰亚胺)氨基)甲基)环己烷-1-羰基)氨基)己酸酯(sIACX)、对-硝基苯基碘乙酸酯(NPIA);羰基反应性和巯基反应性交联体,诸如4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-酰肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫)丙酰基酰肼(PDPH);胺反应性和光反应性交联体,诸如N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(NHs-AsA)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基水杨酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基水杨基酰氨基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(ρ-叠氮基水杨基酰氨基)乙基-1,3′-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羟基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(HsAB)、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀酰亚胺基-6-(4′-叠氮基-2′-硝基苯基氨基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀酰亚胺基-6-(4′-叠氮基-2′-硝基苯基氨基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰基氧琥珀酰亚胺(ANB-NOs)、磺基琥珀酰亚胺基-2-(间-叠氮基-邻-硝基苯甲酰氨基)-乙基-1,3′-二硫丙酸酯(sAND)、N-琥珀酰亚胺基-4(4-叠氮基苯基)1,3′-二硫丙酸酯(sADP)、N-磺基琥珀酰亚胺基(4-叠氮基苯基)-1,3′-二硫丙酸酯(磺基-sADP)、磺基琥珀酰亚胺基4-(ρ-叠氮基苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基琥珀酰亚胺基2-(7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酰胺)乙基-1,3′-二硫丙酸酯(sAED)、磺基琥珀酰亚胺基7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸酯(磺基-sAMCA)、ρ-硝基苯基重氮基丙酮酸酯(ρNPDP)、ρ-硝基苯基-2-重氮基-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP);巯基反应性和光反应性交联体,诸如1-(ρ-叠氮基水杨基酰氨基)-4-(碘乙酰氨基)丁烷(AsIB)、N-[4-(ρ-叠氮基水杨基酰氨基)丁基]-3′-(2′-吡啶基二硫)丙酰胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙酰胺、二苯甲酮-4-马来酰亚胺;羰基反应性和光反应性交联体,诸如ρ-叠氮基苯甲酰基酰肼(ABH);羧酸酯反应性和光反应性交联体,诸如4-(ρ-叠氮基水杨基酰氨基)丁胺(AsBA);以及精氨酸反应性和光反应性交联体,诸如ρ-叠氮基苯基乙二醛(APG)。

[0577] 在一些情况下,连接体包含反应性官能团。在一些情况下,反应性官能团包含亲核基团,其对结合部分上存在的亲电子基团具有反应性。示例性的亲电子基团包括羰基,诸如醛、酮、羧酸、酯、酰胺、烯酮、酰卤或酸酐。在一些实施方案中,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、肼羧酸酯和芳基肼。

[0578] 在一些实施方案中,连接体包含马来酰亚胺基团。在一些情况下,马来酰亚胺基团也称为马来酰亚胺间隔基。在一些情况下,马来酰亚胺基团进一步包含己酸,形成马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,连接体包含马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,连接体是马来酰亚胺己酰基(mc)。在其他情况下,马来酰亚胺基团包括马来酰亚胺甲基基团,例如如上所述的琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(sMCC)或磺基琥珀酰

亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-sMCC)。

[0579] 在一些实施方案中,马来酰亚胺基团是自稳定马来酰亚胺。在一些情况下,自稳定马来酰亚胺利用二氨基丙酸(DPR)引入邻近马来酰亚胺的碱性氨基团,以提供硫琥珀酰亚胺环水解的分子内催化,从而消除马来酰亚胺进行通过逆迈克尔反应的消除反应。在一些情况下,自稳定马来酰亚胺是Lyon,等人,"Self-hydrolyzing maleimides improve thestability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," Nat.Biotechnol.32(10):1059-1062(2014)中描述的马来酰亚胺基团。在一些情况下,连接体包含自稳定马来酰亚胺。在一些情况下,连接体是自稳定马来酰亚胺。

[0580] 在一些实施方案中,连接体包含肽部分。在一些情况下,肽部分包含至少2、3、4、5、6、7、8个或更多个氨基酸残基。在一些情况下,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,肽部分是不可切割的肽部分。在一些情况下,肽部分包括Val-Cit(缬氨酸-瓜氨酸)、Gly-Gly-Phe-Gly(SEQ ID NO:2111)、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:2112)或Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:2113)。在一些情况下,连接体包含肽部分,诸如:Val-Cit(缬氨酸-瓜氨酸)、Gly-Gly-Phe-Gly(SEQ ID NO:2111)、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(SEQID NO:2112)或Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:2113)。在一些情况下,连接体包含Val-Cit。在一些情况下,连接体是Val-Cit。

[0581] 在一些实施方案中,连接体包含苯甲酸基团或其衍生物。在一些情况下,苯甲酸基团或其衍生物包括对氨基苯甲酸(PABA)。在一些情况下,苯甲酸基团或其衍生物包括γ-氨基丁酸(GABA)。

[0582] 在一些实施方案中,连接体包含任何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,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,马来酰亚胺基团是马来酰亚胺己酰基(mc)。在一些情况下,肽基团是val-cit。在一些情况下,苯甲酸基团是PABA。在一些情况下,连接体包含mc-val-cit基团。在一些情况下,连接体包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下,连接体包含mc-val-cit-PABA基团。

[0583] 在一些实施方案中,连接体是自牺牲(self-immolative)连接体或自消除连接体。在一些情况下,连接体是自牺牲连接体。在其他情况下,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,连接体包括美国专利号9,089,614或PCT公开号WO2015038426中描述的连接体。

[0584] 在一些实施方案中,连接体是树枝型连接体。在一些情况下,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,树枝型连接体用于增加多核苷酸B与结合部分A的摩尔比。在一些情况下,树枝型连接体包含PAMAM树枝状高分子。

[0585] 在一些实施方案中,连接体是无痕连接体或者其中切割后不会给结合部分A、多核苷酸B、聚合物C或内体溶解部分D留下连接体部分(例如,原子或连接体基团)的连接体。示例性的无痕连接体包括但不限于锗连接体、硅连接体、硫连接体、硒连接体、氮连接体、磷连接体、硼连接体、铬连接体或苯肼连接体。在一些情况下,连接体是无痕的芳基-三氮烯连接体,如Hejesen,等人,"A traceless aryl-triazene linker forDNA-directed

chemistry,"Org Biomol Chem 11(15):2493-2497(2013)中所述。在一些情况下,连接体是Blaney,等人,"Traceless solid-phase organicsynthesis,"Chem.Rev.102:2607-2024(2002)中描述的无痕连接体。在一些情况下,连接体是美国专利号6,821,783中描述的无痕连接体。

[0586] 在一些情况下,连接体包含在连接体与缀合部分(例如,本文所述的A、B、C或D)之间的键合位点处发挥立体位阻的官能团。在一些情况下,立体位阻是二硫键周围的立体位阻。表现出立体位阻的示例性连接体包括异双官能连接体,诸如上述的异双官能连接体。在一些情况下,表现出立体位阻的连接体包括SMCC和SPDB。

[0587] 在一些情况下,连接体是酸可切割的连接体。在一些情况下,酸可切割的连接体包含腙键,其易于水解切割。在一些情况下,酸可切割的连接体包含硫代马来酰胺酸连接体。在一些情况下,酸可切割的连接体是如Castaneda,等人,"Acid-cleavable thiomaleamic acid linker forhomogeneous antibody-drug conjugation,"Chem.Commun.49:8187-8189(2013)中描述的硫代马来酰胺酸连接体。

[0588] 在一些情况下,连接体是美国专利号6,884,869;7,498,298;8,288,352;8,609,105;或8,697,688;美国专利公开号2014/0127239;2013/028919;2014/286970;2013/0309256;2015/037360;或2014/0294851;或者PCT公开号WO2015057699;WO2014080251;WO2014197854;WO2014145090;或WO2014177042中描述的连接体。

[0589] 在一些实施方案中,X、Y和L独立地为键或连接体。在一些情况下,X、Y和L独立地为键。在一些情况下,X、Y和L独立地为连接体。

[0590] 在一些情况下,X为键或连接体。在一些情况下,X为键。在一些情况下,X为连接体。在一些情况下,连接体为C_1-C_6烷基基团。在一些情况下,X为C_1-C_6烷基基团,例如,C_5、C_4、C_3、C_2或C_1烷基基团。在一些情况下,C_1-C_6烷基基团是未取代的C_1-C_6烷基基团。如在连接体的上下文中所使用的,特别是在X的上下文中,烷基意指含有最多六个碳原子的饱和直链或支链烃基。在一些情况下,X是非聚合物连接体。在一些情况下,X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包括异双官能连接体。在一些情况下,X包括sMCC。在其他情况下,X包括任选地与C_1-C_6烷基基团缀合的异双官能连接体。在其他情况下,X包括任选地与C_1-C_6烷基基团缀合的sMCC。在另外的情况下,X不包括以上所述的同双官能连接体或异双官能连接体。

[0591] 在一些情况下,Y为键或连接体。在一些情况下,Y为键。在其他情况下,Y为连接体。在一些实施方案中,Y为C_1-C_6烷基基团。在一些情况下,Y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,Y为以上所述的同双官能连接体。在一些情况下,Y为以上所述的异双官能连接体。在一些情况下,Y包含马来酰亚胺基团,诸如上述马来酰亚胺己酰基(mc)或自稳定马来酰亚胺基团。在一些情况下,Y包含肽部分,诸如Val-Cit。在一些情况下,Y包含苯甲酸基团,诸如PABA。在另外的情况下,Y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,Y包含mc基团。在另外的情况下,Y包含mc-val-cit基团。在另外的情况下,Y包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下,Y包含mc-val-cit-PABA基团。

[0592] 在一些情况下,L为键或连接体。在一些情况下,L为键。在其他情况下,L为连接体。在一些实施方案中,L为C_1-C_6烷基基团。在一些情况下,L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,L为以上所述的同双官能连接体。在一些情况下,L为以上所

述的异双官能连接体。在一些情况下,L包含马来酰亚胺基团,诸如上述马来酰亚胺己酰基(mc)或自稳定马来酰亚胺基团。在一些情况下,L包含肽部分,诸如Val-Cit。在一些情况下,L包含苯甲酸基团,诸如PABA。在另外的情况下,L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,L包含mc基团。在另外的情况下,L包含mc-val-cit基团。在另外的情况下,L包含val-cit-PABA基团。在另外的情况下,L包含mc-val-cit-PABA基团。

[0593] 使用方法

[0594] 在一些实施方案中,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗疾病或病症。在一些情况下,该疾病或病症为癌症。在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用作治疗疾病或病症的免疫疗法。在一些情况下,免疫疗法为免疫肿瘤学疗法。

[0595] 癌症

[0596] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用于治疗癌症。在一些情况下,癌症为实体瘤。在一些情况下,癌症为恶性血液病。在一些情况下,癌症为复发性或难治性癌症,或者转移性癌症。在一些情况下,实体瘤为复发性或难治性实体瘤,或者转移性实体瘤。在一些情况下,恶性血液病为复发性或难治性恶性血液病,或者转移性恶性血液病。

[0597] 在一些实施方案中,癌症为实体瘤。示例性的实体瘤包括但不限于肛门癌、阑尾癌、胆道癌(即胆管癌)、膀胱癌、脑肿瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、未知原发癌(CUP)、食管癌、眼癌、输卵管癌、胃肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺疾病、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、直肠癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌或外阴癌。

[0598] 在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗实体瘤。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗肛门癌、阑尾癌、胆道癌(即胆管癌)、膀胱癌、脑肿瘤、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、未知原发癌(CUP)、食管癌、眼癌、输卵管癌、胃肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、成神经管细胞瘤、黑素瘤、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁腺疾病、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、直肠癌、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌或外阴癌。在一些情况下,实体瘤为复发性或难治性实体瘤,或者转移性实体瘤。

[0599] 在一些情况下,癌症为恶性血液病。在一些情况下,恶性血液病为白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤。在一些情况下,恶性血液病包括慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、高风险CLL、非CLL/SLL淋巴瘤、幼淋巴细胞白血病(PLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高级别B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、成免疫细胞性大细胞淋巴瘤、前体B成淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞性骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿。

[0600] 在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗恶性血液病。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤或

霍奇金淋巴瘤。在一些情况下,恶性血液病包括慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、高风险CLL、非CLL/SLL淋巴瘤、幼淋巴细胞白血病(PLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高级别B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤(PMBL)、成免疫细胞性大细胞淋巴瘤、前体B成淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤或淋巴瘤样肉芽肿。在一些情况下,恶性血液病为复发性或难治性恶性血液病,或者转移性恶性血液病。

[0601] 在一些情况下,癌症为KRAS相关癌症、EGFR相关癌症、AR相关癌症、HPRT1相关癌症或β-连环蛋白相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗KRAS相关癌症、EGFR相关癌症、AR相关癌症、HPRT1相关癌症或β-连环蛋白相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗KRAS相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗EGFR相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗AR相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗HPRT1相关癌症。在一些情况下,包含与多核酸分子和聚合物缀合的结合部分的本文所述的组合物或药物制剂用于治疗β-连环蛋白相关癌症。在一些情况下,癌症为实体瘤。在一些情况下,癌症为恶性血液病。在一些情况下,实体瘤为复发性或难治性实体瘤,或者转移性实体瘤。在一些情况下,恶性血液病为复发性或难治性恶性血液病,或者转移性恶性血液病。在一些情况下,癌症包括膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、多形性成胶质细胞瘤、头颈癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、急性髓样白血病、CLL、DLBCL或多发性骨髓瘤。在一些情况下,β-连环蛋白相关癌症进一步还包括PIK3C相关癌症和/或MYC相关癌症。

[0602] 免疫疗法

[0603] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用作治疗疾病或病症的免疫疗法。在一些情况下,免疫疗法为免疫肿瘤学疗法。在一些情况下,免疫-肿瘤学疗法分类为主动、被动或组合(主动和被动)方法。例如,在主动免疫肿瘤学疗法方法中,肿瘤相关抗原(TAA)被呈递给免疫系统以触发对呈递这些TAA的癌细胞的攻击。在一些情况下,主动免疫肿瘤学疗法方法包括肿瘤靶向和/或免疫靶向剂(例如,检查点抑制剂如单克隆抗体)和/或疫苗,诸如原位疫苗接种和/或基于细胞或基于非细胞(例如,基于树突细胞、基于肿瘤细胞、抗原、抗独特型、DNA或基于载体)的疫苗。在一些情况下,基于细胞的疫苗是使用从患者自身的免疫系统获得的活化免疫细胞产生的疫苗,其随后由患者自身的癌症激活。在一些情况下,主动免疫肿瘤学疗法进一步细分为非特异性主动免疫疗法和特异性主动免疫疗法。在一些情况下,非特异性主动免疫疗法利用细胞因子和/或其他细胞信号传导组分来诱导一般免疫系统应答。在一些情况下,特异性主动免疫疗法利用特异性TAA来引发免疫应答。

[0604] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用作治疗疾病或病症(例如,癌

症)的主动免疫肿瘤学疗法。在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂包含肿瘤靶向剂。在一些情况下,肿瘤靶向剂包含在结合部分A中。在其他情况下,肿瘤靶向剂是与式(I)分子组合使用的另外的试剂。在一些情况下,肿瘤靶向剂是肿瘤定向的多肽(例如,肿瘤定向的抗体)。在一些情况下,肿瘤靶向剂是肿瘤定向的抗体,其通过诸如直接杀伤(例如,信号传导诱导的细胞凋亡)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)等机制发挥其抗肿瘤活性。在另外的情况下,肿瘤靶向剂引发适应性免疫应答,诱导抗肿瘤T细胞。

[0605] 在一些实施方案中,结合部分A是肿瘤定向的多肽(例如,肿瘤定向的抗体)。在一些情况下,结合部分A是肿瘤定向的抗体,其通过诸如直接杀伤(例如,信号传导诱导的细胞凋亡)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)等机制发挥其抗肿瘤活性。在另外的情况下,结合部分A引发适应性免疫应答,诱导抗肿瘤T细胞。

[0606] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂包含免疫靶向剂。在一些情况下,免疫靶向剂包含在结合部分A中。在其他情况下,免疫靶向剂是与式(I)分子组合使用的另外的试剂。在一些情况下,免疫靶向剂包括细胞因子、检查点抑制剂或其组合。

[0607] 在一些实施方案中,免疫靶向剂是检查点抑制剂。在一些情况下,免疫检查点分子是存在于CD4和/或CD8 T细胞的细胞表面上的分子。示例性的免疫检查点分子包括但不限于程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、B7H1、B7H4、OX-40、CD137、CD40、2B4、IDO1、IDO2、VISTA、CD27、CD28、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、CD80、CD86、PDL2、B7H3、HVEM、BTLA、KIR、GAL9、TIM3、A2aR、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷酯酰丝氨酸)、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、HAVCR2、CD276、VTCN1、CD70和CD160。

[0608] 在一些情况下,免疫检查点抑制剂是指调节或抑制免疫检查点分子活性的任何分子。在一些情况下,免疫检查点抑制剂包括抗体、抗体衍生物(例如,Fab片段、scFv、微抗体、双抗体)、反义寡核苷酸、siRNA、适体或肽。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂为程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137,CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷酯酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1或其任意组合的抑制剂。

[0609] 在一些实施方案中,示例性的检查点抑制剂包括:

[0610] PD-L1抑制剂,诸如Genentech的MPDL3280A(RG7446)、来自BioXcell的抗小鼠PD-L1抗体克隆10F.9G2(目录号BE0101)、来自Bristol-Meyer's Squibb的抗PD-L1单克隆抗体MDX-1105(BMS-936559)和BMS-935559、MSB0010718C、小鼠抗PD-L1克隆29E.2A3、和AstraZeneca的MEDI4736;

[0611] PD-L2抑制剂,诸如GlaxoSmithKline的AMP-224(Amplimmune)和rHIgM12B7;

[0612] PD-1抑制剂,诸如来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆J43(目录号BE0033-2)、来自BioXcell的抗小鼠PD-1抗体克隆RMP1-14(目录号BE0146)、小鼠抗PD-1抗体克隆EH12、Merck的MK-3475抗小鼠PD-1抗体(Keytruda、派姆单抗、lambrolizumab)、AnaptysBio的称为ANB011的抗PD-1抗体、抗体MDX-1 106(ONO-4538)、Bristol-Myers Squibb的人IgG4单克

隆抗体纳武单抗(Opdivo®,BMS-936558,MDX1106)、AstraZeneca的AMP-514和AMP-224、和来自CureTechLtd的Pidilizumab(CT-011);

[0613] CTLA-4抑制剂,诸如Bristol Meyers Squibb的抗CTLA-4抗体易普利姆玛(也称为Yervoy®,MDX-010、BMS-734016和MDX-101)、抗CTLA4抗体、来自Millipore的克隆9H10、Pfizer的tremelimumab(CP-675,206,ticilimumab)、和来自Abcam的抗CTLA4抗体克隆BNI3;

[0614] LAG3抑制剂,诸如来自eBioscience的抗Lag-3抗体克隆eBioC9B7W(C9B7W)、来自LifeSpan Biosciences的抗Lag3抗体LS-B2237、来自Immutep的IMP321(ImmuFact)、抗Lag3抗体BMS-986016、和LAG-3嵌合抗体A9H12;

[0615] B7-H3抑制剂,诸如MGA271;

[0616] KIR抑制剂,诸如Lirilumab(IPH2101);

[0617] CD137(41BB)抑制剂,诸如urelumab(BMS-663513,Bristol-MyersSquibb)、PF-05082566(抗-4-1BB,PF-2566,Pfizer)或XmAb-5592(Xencor);

[0618] PS抑制剂,诸如Bavituximab;

[0619] 以及诸如对TIM3、CD52、CD30、CD20、CD33、CD27、OX40(CD134)、GITR、ICOS、BTLA(CD272)、CD160、2B4、LAIR1、TIGHT、LIGHT、DR3、CD226、CD2或SLAM的抗体或其片段(如单克隆抗体、人、人源化或嵌合抗体)、RNAi分子或小分子等抑制剂。

[0620] 在一些实施方案中,包含免疫检查点抑制剂的结合部分A用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,结合部分A为包含免疫检查点抑制剂的双特异性抗体或其结合片段。在一些情况下,包含程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137,CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷酯酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1或其任意组合的抑制剂的结合部分A用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0621] 在一些实施方案中,式(I)的分子与免疫检查点抑制剂的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,免疫检查点抑制剂包括程序性死亡配体1(PD-L1,也称为B7-H1、CD274)、程序性死亡1(PD-1)、CTLA-4、PD-L2(B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137,CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO(具有胶原结构的巨噬细胞受体)、PS(磷酯酰丝氨酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1或其任意组合的抑制剂。在一些情况下,式(I)的分子与易普利姆玛、tremelimumab、纳武单抗、pemrolizumab、pidilizumab、MPDL3280A、MEDI4736、MSB0010718C、MK-3475或BMS-936559组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0622] 在一些实施方案中,免疫靶向剂是细胞因子。在一些情况下,细胞因子进一步被分组为趋化因子、干扰素、白介素和肿瘤坏死因子。在一些实施方案中,趋化因子发挥化学引诱物的作用引导细胞迁移,并且分为四个亚家族:CXC、CC、CX3C和XC。示例性的趋化因子包括来自以下的趋化因子:CC亚家族:CCL1、CCL2(MCP-1)、CCL3、CCL4、CCL5(RANTES)、CCL6、

CCL7、CCL8、CCL9(或CCL10)、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27和CCL28;CXC亚家族:CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16和CXCL17;XC亚家族:XCL1和CL2;以及CX3C亚家族CX3CL1。

[0623] 干扰素(IFN)包括I型干扰素(例如,IFN-α、IFN-β、IFN-ε、IFN-κ和IFN-ω)、II型干扰素(例如,IFN-γ)和III型干扰素。在一些实施方案中,IFN-α进一步分为约13种亚型,其包括IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNA8、IFNA10、IFNA13、IFNA14、IFNA16、IFNA17和IFNA21。

[0624] 白介素由白细胞或白血球表达,促进T淋巴细胞和B淋巴细胞以及造血细胞的发育和分化。示例性的白介素包括IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8(CXCL8)、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-35和IL-36。

[0625] 肿瘤坏死因子(TNF)是一组调节细胞凋亡的细胞因子。在一些情况下,TNF家族内约有19个成员,包括但不限于TNFα、淋巴毒素-α(LT-α)、淋巴毒素-β(LT-β)、T细胞抗原gp39(CD40L)、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L和TNF相关凋亡诱导配体(TRAIL)。

[0626] 在一些实施方案中,式(I)的分子与细胞因子的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与趋化因子的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与干扰素的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与白介素的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与肿瘤坏死因子的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与IL-1β、IL-2、IL-7、IL-8、IL-15、MCP-1(CCL2)、MIP-1α、RANTES、MCP-3、MIP5、CCL19、CCL21、CXCL2、CXCL9、CXCL10或CXCL11的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0627] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂包含疫苗。在一些情况下,疫苗为原位疫苗接种。在一些情况下,疫苗为基于细胞的疫苗。在一些情况下,疫苗为基于非细胞的疫苗。在一些情况下,式(I)的分子与基于树突细胞的疫苗的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与基于肿瘤细胞的疫苗的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与抗原疫苗的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与抗独特型疫苗的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与DNA疫苗的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,式(I)的分子与基于载体的疫苗的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0628] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂用作治疗疾病或病症(例如,癌症)的被动免疫肿瘤学疗法。在一些情况下,被动方法利用过继免疫系统组分如外源产生的T细胞、自然杀伤(NK)T细胞和/或嵌合抗原受体(CAR)T细胞来攻击癌细胞。

[0629] 在一些实施方案中,式(I)的分子与基于T细胞的治疗剂的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,基于T细胞的治疗剂是识别上述CD细胞表面标志物中的一种或多种的活化T细胞剂。在一些情况下,基于T细胞的治疗剂包括识别CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD27、CD28、CD80、CD134、CD137、CD152、CD154、CD160、CD200R、CD223、CD226、CD244、CD258、CD267、CD272、CD274、CD278、CD279或CD357中的一种或多种的活化T细胞剂。在一些

情况下,式(I)的分子与识别CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD27、CD28、CD80、CD134、CD137、CD152、CD154、CD160、CD200R、CD223、CD226、CD244、CD258、CD267、CD272、CD274、CD278、CD279或CD357中的一种或多种的活化T细胞剂的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0630] 在一些实施方案中,式(I)的分子与基于自然杀伤(NK)T细胞的治疗剂的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,基于NK的治疗剂是识别上述CD细胞表面标志物中的一种或多种的活化NK剂。在一些情况下,基于NK的治疗剂是识别CD2、CD11a、CD11b、CD16、CD56、CD58、CD62L、CD85j、CD158a/b、CD158c、CD158e/f/k、CD158h/j、CD159a、CD162、CD226、CD314、CD335、CD337、CD244或CD319中的一种或多种的活化NK剂。在一些情况下,式(I)的分子与识别CD2、CD11a、CD11b、CD16、CD56、CD58、CD62L、CD85j、CD158a/b、CD158c、CD158e/f/k、CD158h/j、CD159a、CD162、CD226、CD314、CD335、CD337、CD244或CD319中的一种或多种的活化NK剂的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0631] 在一些实施方案中,式(I)的分子与基于CAR-T细胞的治疗剂的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。

[0632] 在一些实施方案中,式(I)的分子与使内体膜不稳定(或破坏内体-溶酶体膜运输)的另外的药剂的组合用于治疗疾病或病症(例如,癌症)。在一些情况下,另外的药剂包括抗有丝分裂剂。示例性的抗有丝分裂剂包括但不限于紫杉烷类,诸如紫杉醇和多西他赛;长春花生物碱,诸如长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨;卡巴他赛;秋水仙碱;艾日布林;雌莫司汀;依托泊苷;伊沙匹隆;鬼臼毒素;替尼泊苷;或灰黄霉素。在一些情况下,另外的药剂包括紫杉醇、多西他赛、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、卡巴他赛、秋水仙碱、艾日布林、雌莫司汀、依托泊苷、伊沙匹隆、鬼臼毒素、替尼泊苷或灰黄霉素。在一些情况下,另外的药剂包括泰素(taxol)。在一些情况下,另外的药剂包括紫杉醇。在一些情况下,另外的药剂包括依托泊苷。在其他情况下,另外的药剂包括维生素K3。

[0633] 在一些实施方案中,本文所述的组合物或药物制剂在治疗疾病或病症(例如,癌症)中用作组合方法(包括主动和被动方法)。

[0634] 药物制剂

[0635] 在一些实施方案中,本文所述的药物制剂通过多种给药途径施用于受试者,该给药途径包括但不限于肠胃外(例如,静脉内、皮下、肌内)、口服、鼻内、经颊,直肠或经皮给药途径。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、肌内)施用。在其他情况下,本文所述的药物组合物被配制用于口服施用。在其他情况下,本文所述的药物组合物被配制用于鼻内施用。

[0636] 在一些实施方案中,药物制剂包括但不限于水性液体分散体、自乳化分散体、固体溶液、脂质体分散体、气溶胶、固体剂型、粉末、速释制剂、控释制剂、快速熔化制剂、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放制剂、缓释制剂、脉冲释放制剂、多颗粒制剂(例如,纳米颗粒制剂)、以及混合的速释和控释制剂。

[0637] 在一些情况下,药物制剂包括多颗粒制剂。在一些情况下,药物制剂包括纳米颗粒制剂。在一些情况下,纳米颗粒包括cMAP、环糊精或脂质。在一些情况下,纳米颗粒包括固体脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、自乳化纳米颗粒、脂质体、微乳液或胶束溶液。另外的示例性纳米颗粒包括但不限于顺磁性纳米颗粒、超顺磁性纳米颗粒、金属纳米颗粒、富勒烯样材料、无机纳米管、树枝状高分子(诸如具有共价连接的金属螯合物)、纳米纤维、纳米角、纳米

洋葱、纳米棒、纳米绳和量子点。在一些情况下、纳米颗粒是金属纳米颗粒,例如钪、钛、钒、铬、锰、铁、钴、镍、铜、锌、钇、锆、铌、钼、钌、铑、钯、银、镉、铪、钽、钨、铼、锇、铱、铂、金、钆、铝、镓、铟、锡、铊、铅、铋、镁、钙、锶、钡、锂、钠、钾、硼、硅、磷、锗、砷、锑及其组合、合金或氧化物的纳米颗粒。

[0638] 在一些情况下,纳米颗粒包含核或者核和壳,如在核-壳纳米颗粒中。

[0639] 在一些情况下,纳米颗粒进一步涂覆有用于连接功能元件的分子(例如,与本文所述的多核酸分子或结合部分中的一种或多种)。在一些情况下,涂层包含硫酸软骨素、硫酸葡聚糖、羧甲基葡聚糖、藻酸、果胶、角叉菜胶、岩藻多糖、琼脂胶、紫菜聚糖、刺梧桐胶、结冷胶、黄原胶、透明质酸、葡糖胺、半乳糖胺、几丁质(或壳聚糖)、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、溶菌酶、细胞色素C、核糖核酸酶、胰蛋白酶原、胰凝乳蛋白酶原、α-胰凝乳蛋白酶、聚赖氨酸、聚精氨酸、组蛋白、鱼精蛋白、卵清蛋白、糊精或环糊精。在一些情况下,纳米颗粒包括石墨烯涂覆的纳米颗粒。

[0640] 在一些情况下,纳米颗粒具有至少一个小于约500nm、400nm、300nm、200nm或100nm的尺寸。

[0641] 在一些情况下,纳米颗粒制剂包含顺磁性纳米颗粒、超顺磁性纳米颗粒、金属纳米颗粒、富勒烯样材料、无机纳米管、树枝状高分子(诸如具有共价连接的金属螯合物)、纳米纤维、纳米角、纳米洋葱、纳米棒、纳米绳或量子点。在一些情况下,本文所述的多核酸分子或结合部分直接或间接缀合至纳米颗粒。在一些情况下,本文所述的至少1、5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100个或更多个多核酸分子或结合部分直接或间接缀合至纳米颗粒。

[0642] 在一些实施方案中,药物制剂包含基于与本文公开的组合物的相容性以及期望剂型的释放性质选择的载体或载体材料。示例性的载体材料包括例如粘合剂、悬浮剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、润湿剂、稀释剂等。药学上相容的载体材料包括但不限于阿拉伯树胶、明胶、胶体二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糖糊精、甘油、硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、胆固醇、胆固醇酯、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、牛磺胆酸、磷脂酰胆碱、氯化钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、纤维素和纤维素缀合物、糖硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉等。参见例如,Remington:The Scienceand Practice of Pharmacy,第十九版(Easton,Pa.:Mack PublishingCompany,1995);Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania 1975;Liberman,H.A.和Lachman,L.编著,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;以及Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第七版.(Lippincott Williams&Wilkins1999)。

[0643] 在一些情况下,药物制剂进一步包含pH调节剂或缓冲剂,其包括酸如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和三羟甲基氨基甲烷;和缓冲液如柠檬酸盐/右旋糖、碳酸氢钠和氯化铵。这样的酸、碱和缓冲剂以将组合物的pH维持在可接受范围内所需的量包含在内。

[0644] 在一些情况下,药物制剂包含使组合物的重量摩尔渗透压浓度处于可接受范围内所需的量的一种或多种盐。这样的盐包括具有钠、钾或铵阳离子以及氯离子、柠檬酸根、抗坏血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氢根、硫酸根、硫代硫酸根或亚硫酸氢根阴离子的那些盐;

合适的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠和硫酸铵。

[0645] 在一些情况下,药物制剂进一步包含用于稳定化合物的稀释剂,因为它们可以提供更稳定的环境。利用溶解在缓冲溶液中的盐(其也可提供pH控制或维持)作为本领域的稀释剂,包括但不限于磷酸盐缓冲盐水溶液。在一些情况下,稀释剂增加组合物的体积以便于压缩或者产生用于均匀混合胶囊填充物的足够体积。这样的化合物可包括例如乳糖、淀粉、甘露醇、山梨糖醇、右旋糖、微晶纤维素如Avicel®;磷酸氢钙、二水磷酸二钙;磷酸三钙、磷酸钙;无水乳糖、喷雾干燥乳糖;预胶化淀粉、可压缩糖,如Di-Pac®(Amstar);甘露醇、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯、蔗糖基稀释剂、糖果店的糖;一元硫酸钙一水合物、硫酸钙二水合物;乳酸钙三水合物、葡萄糖结合剂(dextrate);水解谷物固体、直链淀粉;粉状纤维素、碳酸钙;甘氨酸、高岭土;甘露醇、氯化钠;肌醇、膨润土等。

[0646] 在一些情况下,药物制剂包含崩解剂或崩解物以便于物质的分解或崩解。术语“崩解”包括当与胃肠液接触时剂型的溶解和分散。崩解剂的实例包括淀粉,例如天然淀粉如玉米淀粉或马铃薯淀粉、预胶化淀粉如National 1551或Amijel®、或羟基乙酸淀粉钠如Promogel®或Explotab®、纤维素如木制品、甲基结晶纤维素如Avicel®、Avicel® PH101、Avicel®PH102、Avicel®PH105、Elcema®P100、Emcocel®、Vivacel®、MingTia®和Solka-Floc®、甲基纤维素、交联羧甲基纤维素、或交联纤维素如交联羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol®)、交联羧甲基纤维素或交联的交联羧甲基纤维素、交联淀粉如羟基乙酸淀粉钠、交联聚合物如聚乙烯聚吡咯烷酮、交联聚乙烯吡咯烷酮、藻酸盐如藻酸或藻酸的盐如藻酸钠、粘土如Veegum® HV(硅酸镁铝)、树胶如琼脂、瓜尔胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶或黄蓍胶、羟基乙酸淀粉钠、膨润土、天然海绵、表面活性剂、树脂如阳离子交换树脂、柑橘浆、十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠组合淀粉等。

[0647] 在一些情况下,药物制剂包含填充剂,诸如乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉末、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预胶化淀粉、蔗糖、木糖醇、乳糖醇、甘露醇、山梨糖醇、氯化钠、聚乙二醇等。

[0648] 润滑剂和助流剂也任选地包含在本文所述的药物制剂中,用于预防、减少或抑制材料的粘附或摩擦。示例性的润滑剂包括例如硬脂酸、氢氧化钙、滑石、硬脂酰富马酸钠、烃如矿物油、或氢化植物油如氢化大豆油(Sterotex®)、高级脂肪酸及其碱金属和碱土金属盐如铝、钙、镁、锌、硬脂酸、硬脂酸钠、甘油、滑石、蜡、Stearowet®、硼酸、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、聚乙二醇(例如,PEG-4000)或甲氧基聚乙二醇如Carbowax™、油酸钠、苯甲酸钠、山嵛酸甘油酯、聚乙二醇、十二烷基硫酸镁或十二烷基硫酸钠、胶体二氧化硅如Syloid™、Cab-O-Sil®、淀粉如玉米淀粉、硅油、表面活性剂等。

[0649] 增塑剂包括用于软化微胶囊化材料或膜涂层以使其更不易碎的化合物。合适的增塑剂包括例如聚乙二醇如PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350和PEG 800、硬脂酸、丙二醇、油酸、三乙基纤维素和三醋精。增塑剂也可用作分散剂或润湿剂。

[0650] 增溶剂包括诸如三醋精、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、维生素E TPGS、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷

酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、正丁醇、异丙醇、胆固醇、胆汁盐、聚乙二醇200-600、四氢呋喃聚乙二醇醚(glycofurol)、二乙二醇单乙基醚(transcutol)、丙二醇、二甲基异山梨醇等化合物。

[0651] 稳定剂包括诸如任何抗氧化剂、缓冲剂、酸、防腐剂等化合物。

[0652] 悬浮剂包括诸如聚乙烯吡咯烷酮如聚乙烯吡咯烷酮K12、聚乙烯吡咯烷酮K17、聚乙烯吡咯烷酮K25或聚乙烯吡咯烷酮K30、乙烯基吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物(S630)、聚乙二醇(例如,聚乙二醇可具有约300至约6000、或约3350至约4000、或约7000至约5400的分子量)、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯、聚山梨醇酯-80、羟乙基纤维素、藻酸钠、树胶如黄蓍胶和阿拉伯树胶、瓜尔胶、黄原胶包括黄原树胶、糖、纤维素如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚山梨醇酯-80、藻酸钠、聚乙氧基化失水山梨糖醇单月桂酸酯、聚乙氧基化失水山梨糖醇单月桂酸酯、聚维酮等化合物。

[0653] 表面活性剂包括诸如十二烷基硫酸钠、多库酯钠、吐温60或80、三醋精、维生素E TPGS、失水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯、polaxomer、胆汁盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物如Pluronic® (BASF)等化合物。另外的表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油,例如聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油;以及聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚,例如辛苯昔醇(octoxynol)10、辛苯昔醇40。有时,包含表面活性剂以增强物理稳定性或用于其他目的。

[0654] 粘度增强剂包括例如甲基纤维素、黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、卡波姆、聚乙烯醇、藻酸盐、阿拉伯树胶、壳聚糖及其组合。

[0655] 润湿剂包括诸如油酸、单硬脂酸甘油酯、失水山梨醇单油酸酯、失水山梨醇单月桂酸酯、油酸三乙醇胺、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯、多库酯钠、油酸钠、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、三醋精、吐温80、维生素E TPGS、铵盐等化合物。

[0656] 治疗方案

[0657] 在一些实施方案中,施用本文所述的药物组合物用于治疗应用。在一些实施方案中,药物组合物的施用每天一次、每天两次、每天三次或更多。药物组合物的施用每日一次、每天一次、每隔一天、每周五天、每周一次、每隔一周、每月两周、每月三周、每月一次、每月两次、每月三次或更多。药物组合物施用至少1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、2年、3年或更久。

[0658] 在一些实施方案中,一种或多种药物组合物同时、顺序地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顺序地施用。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)。

[0659] 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顺序地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

物组合物顺序地共同施用,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。

[0660] 在患者的状况确实得到改善的情况下,根据医生的判断,继续给予组合物的施用;或者,将所施用的组合物的剂量暂时减少或暂时暂停某一时间长度(即“休药期”)。在一些情况下,休药期的长度在2天与1年之间不等,仅举例而言,包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。休药期期间的剂量减少为10%-100%,仅举例而言,包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0661] 一旦患者的病况出现改善,如有必要,施用维持剂量。随后,根据症状的变化,任选地将给药剂量或频率或两者降低至该改善的疾病、病症或病况得以保持的水平。

[0662] 在一些实施方案中,对应于这样的量的给定药剂的量根据诸如具体化合物、疾病严重性、需要治疗的受试者或宿主的身份(例如,体重)等因素而变化,然而其仍根据与该病例有关的具体情况以本领域已知的方式常规地确定,该具体情况包括例如所施用的具体药剂、给药途径以及所治疗的受试者或宿主。在一些情况下,所需的剂量方便地以单剂量或以分开的剂量呈现,该分开的剂量同时(或在短时间段内)施用或以适当的间隔施用,例如每天2、3、4个或更多个亚剂量。

[0663] 前述范围仅为提示性的,因为关于个体治疗方案的变量的数量巨大,并且相距这些推荐值的大量偏差并不罕见。这样的剂量根据多个变量而改变,该变量不限于所用化合物的活性、待治疗的疾病或病况、给药模式、受试个体的需求、所治疗的疾病或病况的严重性以及从业者的判断。

[0664] 在一些实施方案中,此类治疗方案的毒性和治疗功效通过在细胞培养物或实验动物中的标准药学程序来确定,包括但不限于LD50(对50%的群体致死的剂量)和ED50(在50%的群体中在治疗上有效的剂量)的确定。毒性效果与治疗效果之间的剂量比为治疗指数,并且将其表示为LD50与ED50之间的比值。优选表现出高治疗指数的化合物。使用从细胞培养测定和动物研究获得的数据来配制用于人的剂量范围。此类化合物的剂量优选在包含ED50且具有最小毒性的循环浓度范围内。取决于所用的剂型和所用的给药途径,剂量在该范围内变化。

[0665] 药剂盒/制品

[0666] 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药剂盒和制品。这样的药剂盒包括载具、包装或被区室化为接纳一个或多个容器如小瓶、管等的容器,每个容器包含将在本文所述的方法中使用的一个单独要素。合适的容器包括例如,瓶、小瓶、注射器和试管。在一个实施方案中,容器由诸如玻璃或塑料等各种材料形成。

[0667] 本文提供的制品含有包装材料。药物包装材料的实例包括但不限于泡罩包装、瓶、管、袋、容器、瓶和适于所选制剂以及预期的给药和治疗方式的任何包装材料。

[0668] 例如,容器包含式(I)的分子:A-X-B-Y-C,任选地与本文公开的内体溶解部分D缀合。这样的药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。

[0669] 药剂盒通常包括列出内容物的标签和/或使用说明,以及具有使用说明的包装插页。通常也将会包括一组说明。

[0670] 在一些实施方案中,标签处于容器上或与容器相关联。在一个实施方案中,当构成标签的字母、数字或其他字符附着、模制或蚀刻在容器本身上时,标签处于容器上;当标签存在于也容纳容器的接纳器或载具内(例如作为包装插页)时,标签与容器相关联。在一个实施方案中,使用标签来指示内容物将用于具体治疗应用。标签也指示关于内容物诸如在本文所述方法中的使用的指导。

[0671] 在某些实施方案中,药物组合物存在于含有一个或多个单位剂型的分配器装置中,该单位剂型含有本文提供的化合物。例如,该包装包含金属或塑料箔,诸如泡罩包装。在一个实施方案中,该包装或分配器装置伴随有给药说明。在一个实施方案中,该包装或分配器也伴随有由监管药物的制造、使用或销售的政府机构所规定形式的、与容器相关联的公告,该公告反映出该机构批准该药物形式用于人类或兽医给药。这样的公告例如为由美国食品和药品管理局批准用于处方药物的标记或已批准的产品插页。在一个实施方案中,还制备含有在相容性药物载体中配制的本文提供的化合物的组合物,将该组合物置于适当容器中,并标出用于治疗所示出的病况。

[0672] 某些术语

[0673] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与所请求保护的主题所属领域的技术人员所一般理解的相同的含义。应当理解,上述的一般描述和下列详细描述均仅为示例性和说明性的,并非限制任何所请求保护的主题。在本申请中,除非另有特殊声明,否则单数的使用包含复数。必须指出,在本说明书和随附权利要求书中使用时,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物。在本申请中,除非另有声明,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”的使用是非限制性的。

[0674] 如本文所用,范围和量可表示为“约”特定值或范围。约还包括准确量。因此,“约5μL”意指“约5μL”,并且还指“5μL”。通常,术语“约”包括预期在实验误差内的量。

[0675] 本文使用的章节标题仅用于组织的目的,而不应理解为限制所描述的主题。

[0676] 如本文所用,术语“个体”、“受试者”和“患者”意指任何哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物为人类。在一些实施方案中,哺乳动物为非人类。这些术语均不要求或不限于以医疗保健工作者(例如,医生、注册护士、执业护士、医师助理、护理员或临终关怀工作者)的监督(例如,持续或间歇性)为特征的情况。

[0677] 本发明提供了包括但不限于以下实施方式:

[0678] 1.一种式(I)的分子:

[0679] A-X-B-Y-C

[0680] 式I

[0681] 其中,

[0682] A为抗体或其结合片段;

[0683] B为多核苷酸;

[0684] C为聚合物;

[0685] X为键或第一非聚合物连接体;以及

[0686] Y为键或第二连接体;

[0687] 其中所述多核苷酸包含至少一个2'修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;并且

[0688] 其中A和C不在相同末端与B连接。

[0689] 2.如实施方式1所述的分子,其中所述至少一个2'修饰的核苷酸包括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-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)修饰的核苷酸。

[0690] 3.如实施方式1或2所述的分子,其中所述至少一个2'修饰的核苷酸包括锁定核酸(LNA)或乙烯核酸(ENA)。

[0691] 4.如实施方式1-3中任一项所述的分子,其中所述至少一个修饰的核苷酸间键包括硫代磷酸酯键或二硫代磷酸酯键。

[0692] 5.如实施方式1所述的分子,其中所述至少一个反向脱碱基部分在至少一个末端。

[0693] 6.如实施方式1-5中任一项所述的分子,其中所述多核苷酸包含单链。

[0694] 7.如实施方式1-5中任一项所述的分子,其中多核苷酸包含第一多核苷酸和与所述第一多核苷酸杂交的第二多核苷酸,以形成双链多核酸分子。

[0695] 8.如实施方式7所述的分子,其中所述第二多核苷酸包含至少一种修饰。

[0696] 9.如实施方式1-8中任一项所述的分子,其中所述第一多核苷酸和所述第二多核苷酸为RNA分子。

[0697] 10.如实施方式1-9中任一项所述的分子,其中所述第一多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0698] 11.如实施方式1-10中任一项所述的分子,其中所述第二多核苷酸包含与SEQ ID NO:16-75、452-1955、1956-1962、1967-2002、2013-2032、2082-2109或2117具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0699] 12.如实施方式1-11中任一项所述的分子,其中Y为非聚合物连接体基团。

[0700] 13.如实施方式1-12中任一项所述的分子,其中X为键。

[0701] 14.如实施方式1-12中任一项所述的分子,其中X为C_1-C_6烷基基团。

[0702] 15.如实施方式1-14中任一项所述的分子,其中Y为C_1-C_6烷基基团。

[0703] 16.如实施方式1-14中任一项所述的分子,其中X为同双官能连接体或异双官能连接体,任选地与C_1-C_6烷基基团缀合。

[0704] 17.如实施方式1-14中任一项所述的分子,其中Y为同双官能连接体或异双官能连接体。

[0705] 18.如实施方式1-17中任一项所述的分子,其中所述抗体或其结合片段包括人源化抗体或其结合片段、嵌合抗体或其结合片段、单克隆抗体或其结合片段、单价Fab'、二价Fab2、单链可变片段(scFv)、双抗体、微抗体、纳米抗体、单域抗体(sdAb)、或者骆驼科动物抗体或其结合片段。

[0706] 19.如实施方式1-18中任一项所述的分子,其中C为聚乙二醇。

[0707] 20.如实施方式1-19中任一项所述的分子,其中C具有约1000Da、2000Da或5000Da

的分子量。

[0708] 21.如实施方式1-20中任一项所述的分子,其中A-X与B的5’端缀合,并且Y-C与B的3’端缀合。

[0709] 22.如实施方式1-20中任一项所述的分子,其中Y-C与B的5’端缀合,并且A-X与B的3’端缀合。

[0710] 23.如实施方式1-22中任一项所述的分子,进一步包含D。

[0711] 24.如实施方式23所述的分子,其中D与C或A缀合。

[0712] 25.如实施方式23或24所述的分子,其中D根据式(II)与式(I)的分子缀合:

[0713] $(A\text{-}X\text{-}B\text{-}Y\text{-}C_c)\text{-}L\text{-}D$

[0714] 式II

[0715] 其中,

[0716] A为抗体或其结合片段;

[0717] B为多核苷酸;

[0718] C为聚合物;

[0719] X为键或第一非聚合物连接体;

[0720] Y为键或第二连接体;

[0721] L为键或第三连接体;

[0722] D为内体溶解部分;以及

[0723] c为0与1之间的整数;

[0724] 其中所述多核苷酸包含至少一个2’修饰的核苷酸、至少一个修饰的核苷酸间键或至少一个反向脱碱基部分;

[0725] 其中A和C不在相同末端与B连接;并且

[0726] 其中D缀合在A或C上的任何地方或者B的末端。

[0727] 26.如实施方式23-25中任一项所述的分子,其中D为INF7或蜂毒肽。

[0728] 27.如实施方式23-25中任一项所述的分子,其中D为内体溶解聚合物。

[0729] 28.如实施方式25所述的分子,其中L为C_1-C_6烷基基团。

[0730] 29.如实施方式25所述的分子,其中L为同双官能连接体或异双官能连接体。

[0731] 30.如实施方式1-29中任一项所述的分子,进一步包含至少第二结合部分。

[0732] 31.如实施方式30所述的分子,其中所述至少第二结合部分与A、B或C缀合。

[0733] 32.如实施方式30或31所述的分子,其中所述至少第二结合部分为胆固醇。

[0734] 33.如实施方式1-32中任一项所述的分子,进一步包含至少另外的多核苷酸B。

[0735] 34.如实施方式33所述的分子,其中所述至少另外的多核苷酸B与A、B或C缀合。

[0736] 35.如实施方式1-34中任一项所述的分子,进一步包含至少另外的聚合物C。

[0737] 36.如实施方式35所述的分子,其中所述至少另外的聚合物C与A、B或C缀合。

[0738] 37.一种药物组合物,包含:

[0739] 实施方式1-36所述的分子;以及

[0740] 药学上可接受的赋形剂。

[0741] 38.如实施方式37所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制为纳米颗粒制剂。

[0742] 39.如实施方式37或38所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制用于肠胃外、口服、鼻内、经颊、直肠或经皮给药。

[0743] 40.一种治疗有需要的患者中的疾病或病症的方法,包括向所述患者施用包含实施方式1-36所述的分子的组合物。

[0744] 41.如实施方式40所述的方法,其中所述疾病或病症为癌症。

[0745] 42.如实施方式41所述的方法,其中所述癌症为实体瘤。

[0746] 43.如实施方式41所述的方法,其中所述癌症为恶性血液病。

[0747] 44.如实施方式40-43中任一项所述的方法,其中所述癌症包括KRAS相关癌症、EGFR相关癌症、AR相关癌症、β-连环蛋白相关癌症、PIK3C相关癌症或MYC相关癌症。

[0748] 45.如实施方式40-44中任一项所述的方法,其中所述癌症包括膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、多形性成胶质细胞瘤、头颈癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或甲状腺癌。

[0749] 46.如实施方式40-44中任一项所述的方法,其中所述癌症包括急性髓样白血病、CLL、DLBCL或多发性骨髓瘤。

[0750] 47.如实施方式40所述的方法,其中所述方法为免疫肿瘤学疗法。

[0751] 48.一种抑制患者原代细胞中的靶基因表达的方法,包括将实施方式1-36所述的分子施用于所述原代细胞。

[0752] 49.如实施方式48所述的方法,其中所述方法为体内方法。

[0753] 50.如实施方式40-49中任一项所述的方法,其中所述患者为人类。

[0754] 51.一种包含实施方式1-36所述的分子的免疫肿瘤学疗法,用于治疗有需要的患者中的疾病或病症。

[0755] 实施例

[0756] 这些实施例仅提供用于说明目的,并不限制本文提供的权利要求的范围。

[0757] 实施例1.序列

[0758] 表1、4、7、8和10示出了本文所述的靶序列。表2、3、5、6、9、11和12示出了本文所述的多核酸分子序列。

[0759] 表1.KRAS靶序列

[0760]

Id #	NM_033360.2 中的序列位置	NM_033360.2 中的靶位点	SEQ ID NO:
182	182-200	AAAUGACUGAAUAUAAACUUGUG	1
183	183-201	AAUGACUGAAUAUAAACUUGUGG	2
197	197-215	AACUUGUGGUAGUUGGAGCUGGU	3
224	224-242	UAGGCAAGAGUGCCUUGACGAUA	4
226	226-244	GGCAAGAGUGCCUUGACGAUACA	5
227	227-245	GCAAGAGUGCCUUGACGAUACAG	6
228	228-246	CAAGAGUGCCUUGACGAUACAGC	7
232	232-250	AGUGCCUUGACGAUACAGCUAAU	8
233	233-251	GUGCCUUGACGAUACAGCUAAUU	9
236	236-254	CCUUGACGAUACAGCUAAUUCAG	10

[0761]

237	237-255	CUUGACGAUACAGCUAAUUCAGA	11
245	245-263	UACAGCUAAUUCAGAAUCAUUUU	12
266	266-284	UUGUGGACGAAUAUGAUCCAACA	13
269	269-287	UGGACGAAUAUGAUCCAACAAUA	14
270	270-288	GGACGAAUAUGAUCCAACAAUAG	15

[0762] 表2.KRAS siRNA序列

[0763]

Id #	NM_033360.2 中的序列位置	有义链序列(5′-3′)	SEQ ID NO:	反义链序列(5′-3′)	SEQ ID NO:
182	182-200	AUGACUGAAUAUAAACUUGTT	16	CAAGUUUAUAUUCAGUCAUTT	17
183	183-201	UGACUGAAUAUAAACUUGUTT	18	ACAAGUUUAUAUUCAGUCATT	19
197	197-215	CUUGUGGUAGUUGGAGCUGTT	20	CAGCUCCAACUACCACAAGTT	21
224	224-242	GGCAAGAGUGCCUUGACGATT	22	UCGUCAAGGCACUCUUGCCTT	23
226	226-244	CAAGAGUGCCUUGACGAUATT	24	UAUCGUCAAGGCACUCUUGTT	25
227	227-245	AAGAGUGCCUUGACGAUACTT	26	GUAUCGUCAAGGCACUCUUTT	27
228	228-246	AGAGUGCCUUGACGAUACATT	28	UGUAUCGUCAAGGCACUCUTT	29
232	232-250	UGCCUUGACGAUACAGCUATT	30	UAGCUGUAUCGUCAAGGCATT	31
233	233-251	GCCUUGACGAUACAGCUAATT	32	UUAGCUGUAUCGUCAAGGCTT	33
236	236-254	UUGACGAUACAGCUAAUUCTT	34	GAAUUAGCUGUAUCGUCAATT	35
237	237-255	UGACGAUACAGCUAAUUCATT	36	UGAAUUAGCUGUAUCGUCATT	37
245	245-263	CAGCUAAUUCAGAAUCAUUTT	38	AAUGAUUCUGAAUUAGCUGTT	39
266	266-284	GUGGACGAAUAUGAUCCAATT	40	UUGGAUCAUAUUCGUCCACTT	41
269	269-287	GACGAAUAUGAUCCAACAATT	42	UUGUUGGAUCAUAUUCGUCTT	43

[0764]

270	270-288	ACGAAUAUGAUCCAACAAUTT	44	AUUGUUGGAUCAUAUUCGUTT	45

[0765] 表3.具有化学修饰的KRAS siRNA序列

[0766]

Id #	NM_033360.2 中的序列位置	具有化学修饰的 siRNA 序列的有义链序列(5′-3′)	SEQ ID NO:	具有化学修饰的 siRNA 序列的反义链序列(5′-3′)	SEQ ID NO:
182	182-200	auGfaCfuGfaAfuAfuAfaAfcUfuGfdTsdT	46	CfAfaGfuUfuAfuAfuUfcAfgUfcAfudTsdT	47
183	183-201	ugAfcUfgAfaUfaUfaAfaCfuUfgUfdTsdT	48	AfCfaAfgUfuUfaUfaUfuCfaGfuCfadTsdT	49
197	197-215	cuUfgUfgGfuAfgUfuGfgAfgCfuGfdTsdT	50	CfAfgCfuCfcAfaCfuAfcCfaCfaAfgdTsdT	51
224	224-242	ggCfaAfgAfgUfgCfcUfuGfaCfgAfdTsdT	52	UfCfgUfcAfaGfgCfaCfuCfuUfgCfcdTsdT	53
226	226-244	caAfgAfgUfgCfcUfuGfaCfgAfuAfdTsdT	54	UfAfuCfgUfcAfaGfgCfaCfuCfuUfgdTsdT	55
227	227-245	aaGfaGfuGfcCfuUfgAfcGfaUfaCfdTsdT	56	GfUfaUfcGfuCfaAfgGfcAfcUfcUfudTsdT	57
228	228-246	agAfgUfgCfcUfuGfaCfgAfuAfcAfdTsdT	58	UfGfuAfuCfgUfcAfaGfgCfaCfuCfudTsdT	59
232	232-250	ugCfcUfuGfaCfgAfuAfcAfgCfuAfdTsdT	60	UfAfgCfuGfuAfuCfgUfcAfaGfgCfadTsdT	61
233	233-251	gcCfuUfgAfcGfaUfaCfaGfcUfaAfdTsdT	62	UfUfaGfcUfgUfaUfcGfuCfaAfgGfcdTsdT	63
236	236-254	uuGfaCfgAfuAfcAfgCfuAfaUfuCfdTsdT	64	GfAfaUfuAfgCfuGfuAfuCfgUfcAfadTsdT	65
237	237-255	ugAfcGfaUfaCfaGfcUfaAfuUfcAfdTsdT	66	UfGfaAfuUfaGfcUfgUfaUfcGfuCfadTsdT	67
245	245-263	caGfcUfaAfuUfcAfgAfaUfcAfuUfdTsdT	68	AfAfuGfaUfuCfuGfaAfuUfaGfcUfgdTsdT	69
266	266-284	guGfgAfcGfaAfuAfuGfaUfcCfaAfdTsdT	70	UfUfgGfaUfcAfuAfuUfcGfuCfcAfcdTsdT	71
269	269-287	gaCfgAfaUfaUfgAfuCfcAfaCfaAfdTsdT	72	UfUfgUfuGfgAfuCfaUfaUfuCfgUfcdTsdT	73
270	270-288	acGfaAfuAfuGfaUfcCfaAfcAfuAfdTsdT	74	AfUfuGfuUfgGfaUfcAfuAfuUfcGfudTsdT	75

[0767]

[0768] 具有化学修饰信息的siRNA序列小写(n)＝2'-O-Me;Nf＝2'-F;dT＝脱氧-T残基;s＝硫代磷酸酯骨架修饰;iB＝反向脱碱基

[0769] 表4.EGFR靶序列

[0770]

hs Id #	NM_005228.3 中的 19mer 位置	NM_005228.3 中的总 23mer 靶位点的序列	SEQ ID NO:
68	68-86	GGCGGCCGGAGUCCCGAGCUAGC	76
71	71-89	GGCCGGAGUCCCGAGCUAGCCCC	77
72	72-90	GCCGGAGUCCCGAGCUAGCCCCG	78
73	73-91	CCGGAGUCCCGAGCUAGCCCCGG	79
74	74-92	CGGAGUCCCGAGCUAGCCCCGGC	80
75	75-93	GGAGUCCCGAGCUAGCCCCGGCG	81
76	76-94	GAGUCCCGAGCUAGCCCCGGCGG	82
78	78-96	GUCCCGAGCUAGCCCCGGCGGCC	83
114	114-132	CCGGACGACAGGCCACCUCGUCG	84
115	115-133	CGGACGACAGGCCACCUCGUCGG	85
116	116-134	GGACGACAGGCCACCUCGUCGGC	86
117	117-135	GACGACAGGCCACCUCGUCGGCG	87
118	118-136	ACGACAGGCCACCUCGUCGGCGU	88
120	120-138	GACAGGCCACCUCGUCGGCGUCC	89
121	121-139	ACAGGCCACCUCGUCGGCGUCCG	90
122	122-140	CAGGCCACCUCGUCGGCGUCCGC	91
123	123-141	AGGCCACCUCGUCGGCGUCCGCC	92
124	124-142	GGCCACCUCGUCGGCGUCCGCCC	93
125	125-143	GCCACCUCGUCGGCGUCCGCCCG	94
126	126-144	CCACCUCGUCGGCGUCCGCCCGA	95
127	127-145	CACCUCGUCGGCGUCCGCCCGAG	96
128	128-146	ACCUCGUCGGCGUCCGCCCGAGU	97
129	129-147	CCUCGUCGGCGUCCGCCCGAGUC	98
130	130-148	CUCGUCGGCGUCCGCCCGAGUCC	99
131	131-149	UCGUCGGCGUCCGCCCGAGUCCC	100
132	132-150	CGUCGGCGUCCGCCCGAGUCCCC	101
135	135-153	CGGCGUCCGCCCGAGUCCCCGCC	102
136	136-154	GGCGUCCGCCCGAGUCCCCGCCU	103
141	141-159	CCGCCCGAGUCCCCGCCUCGCCG	104

[0771]

164	164-182	CCAACGCCACAACCACCGCGCAC	105
165	165-183	CAACGCCACAACCACCGCGCACG	106
166	166-184	AACGCCACAACCACCGCGCACGG	107
168	168-186	CGCCACAACCACCGCGCACGGCC	108
169	169-187	GCCACAACCACCGCGCACGGCCC	109
170	170-188	CCACAACCACCGCGCACGGCCCC	110
247	247-265	CGAUGCGACCCUCCGGGACGGCC	111
248	248-266	GAUGCGACCCUCCGGGACGGCCG	112
249	249-267	AUGCGACCCUCCGGGACGGCCGG	113
251	251-269	GCGACCCUCCGGGACGGCCGGGG	114
252	252-270	CGACCCUCCGGGACGGCCGGGGC	115
254	254-272	ACCCUCCGGGACGGCCGGGGCAG	116
329	329-347	AAAGAAAGUUUGCCAAGGCACGA	117
330	330-348	AAGAAAGUUUGCCAAGGCACGAG	118
332	332-350	GAAAGUUUGCCAAGGCACGAGUA	119
333	333-351	AAAGUUUGCCAAGGCACGAGUAA	120
334	334-352	AAGUUUGCCAAGGCACGAGUAAC	121
335	335-353	AGUUUGCCAAGGCACGAGUAACA	122
336	336-354	GUUUGCCAAGGCACGAGUAACAA	123
337	337-355	UUUGCCAAGGCACGAGUAACAAG	124
338	338-356	UUGCCAAGGCACGAGUAACAAGC	125
361	361-379	UCACGCAGUUGGGCACUUUUGAA	126
362	362-380	CACGCAGUUGGGCACUUUUGAAG	127
363	363-381	ACGCAGUUGGGCACUUUUGAAGA	128
364	364-382	CGCAGUUGGGCACUUUUGAAGAU	129
365	365-383	GCAGUUGGGCACUUUUGAAGAUC	130
366	366-384	CAGUUGGGCACUUUUGAAGAUCA	131
367	367-385	AGUUGGGCACUUUUGAAGAUCAU	132
368	368-386	GUUGGGCACUUUUGAAGAUCAUU	133
369	369-387	UUGGGCACUUUUGAAGAUCAUUU	134
377	377-395	UUUUGAAGAUCAUUUUCUCAGCC	135
379	379-397	UUGAAGAUCAUUUUCUCAGCCUC	136
380	380-398	UGAAGAUCAUUUUCUCAGCCUCC	137
385	385-403	AUCAUUUUCUCAGCCUCCAGAGG	138
394	394-412	UCAGCCUCCAGAGGAUGUUCAAU	139
396	396-414	AGCCUCCAGAGGAUGUUCAAUAA	140
397	397-415	GCCUCCAGAGGAUGUUCAAUAAC	141
401	401-419	CCAGAGGAUGUUCAAUAACUGUG	142

[0772]

403	403-421	AGAGGAUGUUCAAUAACUGUGAG	143
407	407-425	GAUGUUCAAUAACUGUGAGGUGG	144
409	409-427	UGUUCAAUAACUGUGAGGUGGUC	145
410	410-428	GUUCAAUAACUGUGAGGUGGUCC	146
411	411-429	UUCAAUAACUGUGAGGUGGUCCU	147
412	412-430	UCAAUAACUGUGAGGUGGUCCUU	148
413	413-431	CAAUAACUGUGAGGUGGUCCUUG	149
414	414-432	AAUAACUGUGAGGUGGUCCUUGG	150
416	416-434	UAACUGUGAGGUGGUCCUUGGGA	151
418	418-436	ACUGUGAGGUGGUCCUUGGGAAU	152
419	419-437	CUGUGAGGUGGUCCUUGGGAAUU	153
425	425-443	GGUGGUCCUUGGGAAUUUGGAAA	154
431	431-449	CCUUGGGAAUUUGGAAAUUACCU	155
432	432-450	CUUGGGAAUUUGGAAAUUACCUA	156
433	433-451	UUGGGAAUUUGGAAAUUACCUAU	157
434	434-452	UGGGAAUUUGGAAAUUACCUAUG	158
458	458-476	GCAGAGGAAUUAUGAUCUUUCCU	159
459	459-477	CAGAGGAAUUAUGAUCUUUCCUU	160
463	463-481	GGAAUUAUGAUCUUUCCUUCUUA	161
464	464-482	GAAUUAUGAUCUUUCCUUCUUAA	162
466	466-484	AUUAUGAUCUUUCCUUCUUAAAG	163
468	468-486	UAUGAUCUUUCCUUCUUAAAGAC	164
471	471-489	GAUCUUUCCUUCUUAAAGACCAU	165
476	476-494	UUCCUUCUUAAAGACCAUCCAGG	166
477	477-495	UCCUUCUUAAAGACCAUCCAGGA	167
479	479-497	CUUCUUAAAGACCAUCCAGGAGG	168
481	481-499	UCUUAAAGACCAUCCAGGAGGUG	169
482	482-500	CUUAAAGACCAUCCAGGAGGUGG	170
492	492-510	AUCCAGGAGGUGGCUGGUUAUGU	171
493	493-511	UCCAGGAGGUGGCUGGUUAUGUC	172
494	494-512	CCAGGAGGUGGCUGGUUAUGUCC	173
495	495-513	CAGGAGGUGGCUGGUUAUGUCCU	174
496	496-514	AGGAGGUGGCUGGUUAUGUCCUC	175
497	497-515	GGAGGUGGCUGGUUAUGUCCUCA	176
499	499-517	AGGUGGCUGGUUAUGUCCUCAUU	177
520	520-538	UUGCCCUCAACACAGUGGAGCGA	178
542	542-560	AAUUCCUUUGGAAAACCUGCAGA	179
543	543-561	AUUCCUUUGGAAAACCUGCAGAU	180

[0773]

550	550-568	UGGAAAACCUGCAGAUCAUCAGA	181
551	551-569	GGAAAACCUGCAGAUCAUCAGAG	182
553	553-571	AAAACCUGCAGAUCAUCAGAGGA	183
556	556-574	ACCUGCAGAUCAUCAGAGGAAAU	184
586	586-604	ACGAAAAUUCCUAUGCCUUAGCA	185
587	587-605	CGAAAAUUCCUAUGCCUUAGCAG	186
589	589-607	AAAAUUCCUAUGCCUUAGCAGUC	187
592	592-610	AUUCCUAUGCCUUAGCAGUCUUA	188
593	593-611	UUCCUAUGCCUUAGCAGUCUUAU	189
594	594-612	UCCUAUGCCUUAGCAGUCUUAUC	190
596	596-614	CUAUGCCUUAGCAGUCUUAUCUA	191
597	597-615	UAUGCCUUAGCAGUCUUAUCUAA	192
598	598-616	AUGCCUUAGCAGUCUUAUCUAAC	193
599	599-617	UGCCUUAGCAGUCUUAUCUAACU	194
600	600-618	GCCUUAGCAGUCUUAUCUAACUA	195
601	601-619	CCUUAGCAGUCUUAUCUAACUAU	196
602	602-620	CUUAGCAGUCUUAUCUAACUAUG	197
603	603-621	UUAGCAGUCUUAUCUAACUAUGA	198
604	604-622	UAGCAGUCUUAUCUAACUAUGAU	199
605	605-623	AGCAGUCUUAUCUAACUAUGAUG	200
608	608-626	AGUCUUAUCUAACUAUGAUGCAA	201
609	609-627	GUCUUAUCUAACUAUGAUGCAAA	202
610	610-628	UCUUAUCUAACUAUGAUGCAAAU	203
611	611-629	CUUAUCUAACUAUGAUGCAAAUA	204
612	612-630	UUAUCUAACUAUGAUGCAAAUAA	205
613	613-631	UAUCUAACUAUGAUGCAAAUAAA	206
614	614-632	AUCUAACUAUGAUGCAAAUAAAA	207
616	616-634	CUAACUAUGAUGCAAAUAAAACC	208
622	622-640	AUGAUGCAAAUAAAACCGGACUG	209
623	623-641	UGAUGCAAAUAAAACCGGACUGA	210
624	624-642	GAUGCAAAUAAAACCGGACUGAA	211
626	626-644	UGCAAAUAAAACCGGACUGAAGG	212
627	627-645	GCAAAUAAAACCGGACUGAAGGA	213
628	628-646	CAAAUAAAACCGGACUGAAGGAG	214
630	630-648	AAUAAAACCGGACUGAAGGAGCU	215
631	631-649	AUAAAACCGGACUGAAGGAGCUG	216
632	632-650	UAAAACCGGACUGAAGGAGCUGC	217
633	633-651	AAAACCGGACUGAAGGAGCUGCC	218

[0774]

644	644-662	GAAGGAGCUGCCCAUGAGAAAUU	219
665	665-683	UUUACAGGAAAUCCUGCAUGGCG	220
668	668-686	ACAGGAAAUCCUGCAUGGCGCCG	221
669	669-687	CAGGAAAUCCUGCAUGGCGCCGU	222
670	670-688	AGGAAAUCCUGCAUGGCGCCGUG	223
671	671-689	GGAAAUCCUGCAUGGCGCCGUGC	224
672	672-690	GAAAUCCUGCAUGGCGCCGUGCG	225
674	674-692	AAUCCUGCAUGGCGCCGUGCGGU	226
676	676-694	UCCUGCAUGGCGCCGUGCGGUUC	227
677	677-695	CCUGCAUGGCGCCGUGCGGUUCA	228
678	678-696	CUGCAUGGCGCCGUGCGGUUCAG	229
680	680-698	GCAUGGCGCCGUGCGGUUCAGCA	230
681	681-699	CAUGGCGCCGUGCGGUUCAGCAA	231
682	682-700	AUGGCGCCGUGCGGUUCAGCAAC	232
683	683-701	UGGCGCCGUGCGGUUCAGCAACA	233
684	684-702	GGCGCCGUGCGGUUCAGCAACAA	234
685	685-703	GCGCCGUGCGGUUCAGCAACAAC	235
686	686-704	CGCCGUGCGGUUCAGCAACAACC	236
688	688-706	CCGUGCGGUUCAGCAACAACCCU	237
690	690-708	GUGCGGUUCAGCAACAACCCUGC	238
692	692-710	GCGGUUCAGCAACAACCCUGCCC	239
698	698-716	CAGCAACAACCCUGCCCUGUGCA	240
700	700-718	GCAACAACCCUGCCCUGUGCAAC	241
719	719-737	CAACGUGGAGAGCAUCCAGUGGC	242
720	720-738	AACGUGGAGAGCAUCCAGUGGCG	243
721	721-739	ACGUGGAGAGCAUCCAGUGGCGG	244
724	724-742	UGGAGAGCAUCCAGUGGCGGGAC	245
725	725-743	GGAGAGCAUCCAGUGGCGGGACA	246
726	726-744	GAGAGCAUCCAGUGGCGGGACAU	247
733	733-751	UCCAGUGGCGGGACAUAGUCAGC	248
734	734-752	CCAGUGGCGGGACAUAGUCAGCA	249
736	736-754	AGUGGCGGGACAUAGUCAGCAGU	250
737	737-755	GUGGCGGGACAUAGUCAGCAGUG	251
763	763-781	UUCUCAGCAACAUGUCGAUGGAC	252
765	765-783	CUCAGCAACAUGUCGAUGGACUU	253
766	766-784	UCAGCAACAUGUCGAUGGACUUC	254
767	767-785	CAGCAACAUGUCGAUGGACUUCC	255
769	769-787	GCAACAUGUCGAUGGACUUCCAG	256

[0775]

770	770-788	CAACAUGUCGAUGGACUUCCAGA	257
771	771-789	AACAUGUCGAUGGACUUCCAGAA	258
772	772-790	ACAUGUCGAUGGACUUCCAGAAC	259
775	775-793	UGUCGAUGGACUUCCAGAACCAC	260
789	789-807	CAGAACCACCUGGGCAGCUGCCA	261
798	798-816	CUGGGCAGCUGCCAAAAGUGUGA	262
800	800-818	GGGCAGCUGCCAAAAGUGUGAUC	263
805	805-823	GCUGCCAAAAGUGUGAUCCAAGC	264
806	806-824	CUGCCAAAAGUGUGAUCCAAGCU	265
807	807-825	UGCCAAAAGUGUGAUCCAAGCUG	266
810	810-828	CAAAAGUGUGAUCCAAGCUGUCC	267
814	814-832	AGUGUGAUCCAAGCUGUCCCAAU	268
815	815-833	GUGUGAUCCAAGCUGUCCCAAUG	269
817	817-835	GUGAUCCAAGCUGUCCCAAUGGG	270
818	818-836	UGAUCCAAGCUGUCCCAAUGGGA	271
819	819-837	GAUCCAAGCUGUCCCAAUGGGAG	272
820	820-838	AUCCAAGCUGUCCCAAUGGGAGC	273
821	821-839	UCCAAGCUGUCCCAAUGGGAGCU	274
823	823-841	CAAGCUGUCCCAAUGGGAGCUGC	275
826	826-844	GCUGUCCCAAUGGGAGCUGCUGG	276
847	847-865	GGGGUGCAGGAGAGGAGAACUGC	277
871	871-889	AGAAACUGACCAAAAUCAUCUGU	278
872	872-890	GAAACUGACCAAAAUCAUCUGUG	279
873	873-891	AAACUGACCAAAAUCAUCUGUGC	280
877	877-895	UGACCAAAAUCAUCUGUGCCCAG	281
878	878-896	GACCAAAAUCAUCUGUGCCCAGC	282
881	881-899	CAAAAUCAUCUGUGCCCAGCAGU	283
890	890-908	CUGUGCCCAGCAGUGCUCCGGGC	284
892	892-910	GUGCCCAGCAGUGCUCCGGGCGC	285
929	929-947	CCCCAGUGACUGCUGCCACAACC	286
930	930-948	CCCAGUGACUGCUGCCACAACCA	287
979	979-997	GGGAGAGCGACUGCCUGGUCUGC	288
980	980-998	GGAGAGCGACUGCCUGGUCUGCC	289
981	981-999	GAGAGCGACUGCCUGGUCUGCCG	290
982	982-1000	AGAGCGACUGCCUGGUCUGCCGC	291
983	983-1001	GAGCGACUGCCUGGUCUGCCGCA	292
984	984-1002	AGCGACUGCCUGGUCUGCCGCAA	293
989	989-1007	CUGCCUGGUCUGCCGCAAAUUCC	294

[0776]

990	990-1008	UGCCUGGUCUGCCGCAAAUUCCG	295
991	991-1009	GCCUGGUCUGCCGCAAAUUCCGA	296
992	992-1010	CCUGGUCUGCCGCAAAUUCCGAG	297
994	994-1012	UGGUCUGCCGCAAAUUCCGAGAC	298
995	995-1013	GGUCUGCCGCAAAUUCCGAGACG	299
996	996-1014	GUCUGCCGCAAAUUCCGAGACGA	300
997	997-1015	UCUGCCGCAAAUUCCGAGACGAA	301
999	999-1017	UGCCGCAAAUUCCGAGACGAAGC	302
1004	1004-1022	CAAAUUCCGAGACGAAGCCACGU	303
1005	1005-1023	AAAUUCCGAGACGAAGCCACGUG	304
1006	1006-1024	AAUUCCGAGACGAAGCCACGUGC	305
1007	1007-1025	AUUCCGAGACGAAGCCACGUGCA	306
1008	1008-1026	UUCCGAGACGAAGCCACGUGCAA	307
1010	1010-1028	CCGAGACGAAGCCACGUGCAAGG	308
1013	1013-1031	AGACGAAGCCACGUGCAAGGACA	309
1014	1014-1032	GACGAAGCCACGUGCAAGGACAC	310
1015	1015-1033	ACGAAGCCACGUGCAAGGACACC	311
1016	1016-1034	CGAAGCCACGUGCAAGGACACCU	312
1040	1040-1058	CCCCCCACUCAUGCUCUACAACC	313
1042	1042-1060	CCCCACUCAUGCUCUACAACCCC	314
1044	1044-1062	CCACUCAUGCUCUACAACCCCAC	315
1047	1047-1065	CUCAUGCUCUACAACCCCACCAC	316
1071	1071-1089	UACCAGAUGGAUGUGAACCCCGA	317
1073	1073-1091	CCAGAUGGAUGUGAACCCCGAGG	318
1074	1074-1092	CAGAUGGAUGUGAACCCCGAGGG	319
1075	1075-1093	AGAUGGAUGUGAACCCCGAGGGC	320
1077	1077-1095	AUGGAUGUGAACCCCGAGGGCAA	321
1078	1078-1096	UGGAUGUGAACCCCGAGGGCAAA	322
1080	1080-1098	GAUGUGAACCCCGAGGGCAAAUA	323
1084	1084-1102	UGAACCCCGAGGGCAAAUACAGC	324
1085	1085-1103	GAACCCCGAGGGCAAAUACAGCU	325
1087	1087-1105	ACCCCGAGGGCAAAUACAGCUUU	326
1088	1088-1106	CCCCGAGGGCAAAUACAGCUUUG	327
1089	1089-1107	CCCGAGGGCAAAUACAGCUUUGG	328
1096	1096-1114	GCAAAUACAGCUUUGGUGCCACC	329
1097	1097-1115	CAAAUACAGCUUUGGUGCCACCU	330
1098	1098-1116	AAAUACAGCUUUGGUGCCACCUG	331
1104	1104-1122	AGCUUUGGUGCCACCUGCGUGAA	332

[0777]

1106	1106-1124	CUUUGGUGCCACCUGCGUGAAGA	333
1112	1112-1130	UGCCACCUGCGUGAAGAAGUGUC	334
1116	1116-1134	ACCUGCGUGAAGAAGUGUCCCCG	335
1117	1117-1135	CCUGCGUGAAGAAGUGUCCCCGU	336
1118	1118-1136	CUGCGUGAAGAAGUGUCCCCGUA	337
1119	1119-1137	UGCGUGAAGAAGUGUCCCCGUAA	338
1120	1120-1138	GCGUGAAGAAGUGUCCCCGUAAU	339
1121	1121-1139	CGUGAAGAAGUGUCCCCGUAAUU	340
1122	1122-1140	GUGAAGAAGUGUCCCCGUAAUUA	341
1123	1123-1141	UGAAGAAGUGUCCCCGUAAUUAU	342
1124	1124-1142	GAAGAAGUGUCCCCGUAAUUAUG	343
1125	1125-1143	AAGAAGUGUCCCCGUAAUUAUGU	344
1126	1126-1144	AGAAGUGUCCCCGUAAUUAUGUG	345
1127	1127-1145	GAAGUGUCCCCGUAAUUAUGUGG	346
1128	1128-1146	AAGUGUCCCCGUAAUUAUGUGGU	347
1129	1129-1147	AGUGUCCCCGUAAUUAUGUGGUG	348
1130	1130-1148	GUGUCCCCGUAAUUAUGUGGUGA	349
1132	1132-1150	GUCCCCGUAAUUAUGUGGUGACA	350
1134	1134-1152	CCCCGUAAUUAUGUGGUGACAGA	351
1136	1136-1154	CCGUAAUUAUGUGGUGACAGAUC	352
1137	1137-1155	CGUAAUUAUGUGGUGACAGAUCA	353
1138	1138-1156	GUAAUUAUGUGGUGACAGAUCAC	354
1139	1139-1157	UAAUUAUGUGGUGACAGAUCACG	355
1140	1140-1158	AAUUAUGUGGUGACAGAUCACGG	356
1142	1142-1160	UUAUGUGGUGACAGAUCACGGCU	357
1145	1145-1163	UGUGGUGACAGAUCACGGCUCGU	358
1147	1147-1165	UGGUGACAGAUCACGGCUCGUGC	359
1148	1148-1166	GGUGACAGAUCACGGCUCGUGCG	360
1149	1149-1167	GUGACAGAUCACGGCUCGUGCGU	361
1150	1150-1168	UGACAGAUCACGGCUCGUGCGUC	362
1151	1151-1169	GACAGAUCACGGCUCGUGCGUCC	363
1152	1152-1170	ACAGAUCACGGCUCGUGCGUCCG	364
1153	1153-1171	CAGAUCACGGCUCGUGCGUCCGA	365
1154	1154-1172	AGAUCACGGCUCGUGCGUCCGAG	366
1155	1155-1173	GAUCACGGCUCGUGCGUCCGAGC	367
1156	1156-1174	AUCACGGCUCGUGCGUCCGAGCC	368
1157	1157-1175	UCACGGCUCGUGCGUCCGAGCCU	369
1160	1160-1178	CGGCUCGUGCGUCCGAGCCUGUG	370

[0778]

1200	1200-1218	AUGGAGGAAGACGGCGUCCGCAA	371
1201	1201-1219	UGGAGGAAGACGGCGUCCGCAAG	372
1203	1203-1221	GAGGAAGACGGCGUCCGCAAGUG	373
1204	1204-1222	AGGAAGACGGCGUCCGCAAGUGU	374
1205	1205-1223	GGAAGACGGCGUCCGCAAGUGUA	375
1207	1207-1225	AAGACGGCGUCCGCAAGUGUAAG	376
1208	1208-1226	AGACGGCGUCCGCAAGUGUAAGA	377
1211	1211-1229	CGGCGUCCGCAAGUGUAAGAAGU	378
1212	1212-1230	GGCGUCCGCAAGUGUAAGAAGUG	379
1213	1213-1231	GCGUCCGCAAGUGUAAGAAGUGC	380
1214	1214-1232	CGUCCGCAAGUGUAAGAAGUGCG	381
1215	1215-1233	GUCCGCAAGUGUAAGAAGUGCGA	382
1216	1216-1234	UCCGCAAGUGUAAGAAGUGCGAA	383
1217	1217-1235	CCGCAAGUGUAAGAAGUGCGAAG	384
1219	1219-1237	GCAAGUGUAAGAAGUGCGAAGGG	385
1220	1220-1238	CAAGUGUAAGAAGUGCGAAGGGC	386
1221	1221-1239	AAGUGUAAGAAGUGCGAAGGGCC	387
1222	1222-1240	AGUGUAAGAAGUGCGAAGGGCCU	388
1223	1223-1241	GUGUAAGAAGUGCGAAGGGCCUU	389
1224	1224-1242	UGUAAGAAGUGCGAAGGGCCUUG	390
1225	1225-1243	GUAAGAAGUGCGAAGGGCCUUGC	391
1226	1226-1244	UAAGAAGUGCGAAGGGCCUUGCC	392
1229	1229-1247	GAAGUGCGAAGGGCCUUGCCGCA	393
1230	1230-1248	AAGUGCGAAGGGCCUUGCCGCAA	394
1231	1231-1249	AGUGCGAAGGGCCUUGCCGCAAA	395
1232	1232-1250	GUGCGAAGGGCCUUGCCGCAAAG	396
1233	1233-1251	UGCGAAGGGCCUUGCCGCAAAGU	397
1235	1235-1253	CGAAGGGCCUUGCCGCAAAGUGU	398
1236	1236-1254	GAAGGGCCUUGCCGCAAAGUGUG	399
1237	1237-1255	AAGGGCCUUGCCGCAAAGUGUGU	400
1238	1238-1256	AGGGCCUUGCCGCAAAGUGUGUA	401
1239	1239-1257	GGGCCUUGCCGCAAAGUGUGUAA	402
1241	1241-1259	GCCUUGCCGCAAAGUGUGUAACG	403
1261	1261-1279	ACGGAAUAGGUAUUGGUGAAUUU	404
1262	1262-1280	CGGAAUAGGUAUUGGUGAAUUUA	405
1263	1263-1281	GGAAUAGGUAUUGGUGAAUUUAA	406
1264	1264-1282	GAAUAGGUAUUGGUGAAUUUAAA	407
1266	1266-1284	AUAGGUAUUGGUGAAUUUAAAGA	408

[0779]

1267	1267-1285	UAGGUAUUGGUGAAUUUAAAGAC	409
1289	1289-1307	CUCACUCUCCAUAAAUGCUACGA	410
1313	1313-1331	UAUUAAACACUUCAAAAACUGCA	411
1320	1320-1338	CACUUCAAAAACUGCACCUCCAU	412
1321	1321-1339	ACUUCAAAAACUGCACCUCCAUC	413
1322	1322-1340	CUUCAAAAACUGCACCUCCAUCA	414
1323	1323-1341	UUCAAAAACUGCACCUCCAUCAG	415
1324	1324-1342	UCAAAAACUGCACCUCCAUCAGU	416
1328	1328-1346	AAACUGCACCUCCAUCAGUGGCG	417
1332	1332-1350	UGCACCUCCAUCAGUGGCGAUCU	418
1333	1333-1351	GCACCUCCAUCAGUGGCGAUCUC	419
1335	1335-1353	ACCUCCAUCAGUGGCGAUCUCCA	420
1338	1338-1356	UCCAUCAGUGGCGAUCUCCACAU	421
1344	1344-1362	AGUGGCGAUCUCCACAUCCUGCC	422
1345	1345-1363	GUGGCGAUCUCCACAUCCUGCCG	423
1346	1346-1364	UGGCGAUCUCCACAUCCUGCCGG	424
1347	1347-1365	GGCGAUCUCCACAUCCUGCCGGU	425
1348	1348-1366	GCGAUCUCCACAUCCUGCCGGUG	426
1353	1353-1371	CUCCACAUCCUGCCGGUGGCAUU	427
1354	1354-1372	UCCACAUCCUGCCGGUGGCAUUU	428
1355	1355-1373	CCACAUCCUGCCGGUGGCAUUUA	429
1357	1357-1375	ACAUCCUGCCGGUGGCAUUUAGG	430
1360	1360-1378	UCCUGCCGGUGGCAUUUAGGGGU	431
1361	1361-1379	CCUGCCGGUGGCAUUUAGGGGUG	432
1362	1362-1380	CUGCCGGUGGCAUUUAGGGGUGA	433
1363	1363-1381	UGCCGGUGGCAUUUAGGGGUGAC	434
1366	1366-1384	CGGUGGCAUUUAGGGGUGACUCC	435
1369	1369-1387	UGGCAUUUAGGGGUGACUCCUUC	436
1370	1370-1388	GGCAUUUAGGGGUGACUCCUUCA	437
1371	1371-1389	GCAUUUAGGGGUGACUCCUUCAC	438
1372	1372-1390	CAUUUAGGGGUGACUCCUUCACA	439
1373	1373-1391	AUUUAGGGGUGACUCCUUCACAC	440
1374	1374-1392	UUUAGGGGUGACUCCUUCACACA	441
1404	1404-1422	CCUCUGGAUCCACAGGAACUGGA	442
1408	1408-1426	UGGAUCCACAGGAACUGGAUAUU	443
1409	1409-1427	GGAUCCACAGGAACUGGAUAUUC	444
1411	1411-1429	AUCCACAGGAACUGGAUAUUCUG	445
1412	1412-1430	UCCACAGGAACUGGAUAUUCUGA	446

[0780]

1419	1419-1437	GAACUGGAUAUUCUGAAAACCGU	447
1426	1426-1444	AUAUUCUGAAAACCGUAAAGGAA	448
1427	1427-1445	UAUUCUGAAAACCGUAAAGGAAA	449
1430	1430-1448	UCUGAAAACCGUAAAGGAAAUCA	450
1431	1431-1449	CUGAAAACCGUAAAGGAAAUCAC	451

[0781] 表5.EGFR siRNA序列

[0782]

hs Id #	NM_005228.3 中的序列位置	有义链序列 (5′-3′)	SEQ ID NO:	反义链序列 (5′-3′)	SEQ ID NO:
68	68-86	CGGCCGGAGUCCCGAGCUATT	452	UAGCUCGGGACUCCGGCCGTT	453
71	71-89	CCGGAGUCCCGAGCUAGCCTT	454	GGCUAGCUCGGGACUCCGGTT	455
72	72-90	CGGAGUCCCGAGCUAGCCCTT	456	GGGCUAGCUCGGGACUCCGTT	457
73	73-91	GGAGUCCCGAGCUAGCCCCTT	458	GGGGCUAGCUCGGGACUCCTT	459
74	74-92	GAGUCCCGAGCUAGCCCCGTT	460	CGGGGCUAGCUCGGGACUCTT	461
75	75-93	AGUCCCGAGCUAGCCCCGGTT	462	CCGGGGCUAGCUCGGGACUTT	463
76	76-94	GUCCCGAGCUAGCCCCGGCTT	464	GCCGGGGCUAGCUCGGGACTT	465
78	78-96	CCCGAGCUAGCCCCGGCGGTT	466	CCGCCGGGGCUAGCUCGGGTT	467
114	114-132	GGACGACAGGCCACCUCGUTT	468	ACGAGGUGGCCUGUCGUCCTT	469
115	115-133	GACGACAGGCCACCUCGUCTT	470	GACGAGGUGGCCUGUCGUCTT	471
116	116-134	ACGACAGGCCACCUCGUCGTT	472	CGACGAGGUGGCCUGUCGUTT	473
117	117-135	CGACAGGCCACCUCGUCGGTT	474	CCGACGAGGUGGCCUGUCGTT	475
118	118-136	GACAGGCCACCUCGUCGGCTT	476	GCCGACGAGGUGGCCUGUCTT	477
120	120-138	CAGGCCACCUCGUCGG	478	ACGCCGACGAGGUGGCC	479

[0783]

		CGUTT		UGTT	
121	121-139	AGGCCACCUCGUCGGCGUCTT	480	GACGCCGACGAGGUGGCCUTT	481
122	122-140	GGCCACCUCGUCGGCGUCCTT	482	GGACGCCGACGAGGUGGCCTT	483
123	123-141	GCCACCUCGUCGGCGUCCGTT	484	CGGACGCCGACGAGGUGGCTT	485
124	124-142	CCACCUCGUCGGCGUCCGCTT	486	GCGGACGCCGACGAGGUGGTT	487
125	125-143	CACCUCGUCGGCGUCCGCCTT	488	GGCGGACGCCGACGAGGUGTT	489
126	126-144	ACCUCGUCGGCGUCCGCCCTT	490	GGGCGGACGCCGACGAGGUTT	491
127	127-145	CCUCGUCGGCGUCCGCCCGTT	492	CGGGCGGACGCCGACGAGGTT	493
128	128-146	CUCGUCGGCGUCCGCCCGATT	494	UCGGGCGGACGCCGACGAGTT	495
129	129-147	UCGUCGGCGUCCGCCCGAGTT	496	CUCGGGCGGACGCCGACGATT	497
130	130-148	CGUCGGCGUCCGCCCGAGUTT	498	ACUCGGGCGGACGCCGACGTT	499
131	131-149	GUCGGCGUCCGCCCGAGUCTT	500	GACUCGGGCGGACGCCGACTT	501
132	132-150	UCGGCGUCCGCCCGAGUCCTT	502	GGACUCGGGCGGACGCCGATT	503
135	135-153	GCGUCCGCCCGAGUCCCCGTT	504	CGGGGACUCGGGCGGACGCTT	505
136	136-154	CGUCCGCCCGAGUCCCCGCTT	506	GCGGGGACUCGGGCGGACGTT	507
141	141-159	GCCCGAGUCCCCGCCUCGCTT	508	GCGAGGCGGGGACUCGGGCTT	509
164	164-182	AACGCCACAACCACCGCGCTT	510	GCGCGGUGGUUGUGGCGUUTT	511
165	165-183	ACGCCACAACCACCGCGCATT	512	UGCGCGGUGGUUGUGGCGUTT	513
166	166-184	CGCCACAACCACCGCGCACTT	514	GUGCGCGGUGGUUGUGGCGTT	515
168	168-186	CCACAACCACCGCGCA	516	CCGUGCGCGGUGGUUG	517

[0784]

		CGGTT		UGGTT	
169	169-187	CACAACCACCGCGCACGGCTT	518	GCCGUGCGCGGUGGUUGUGTT	519
170	170-188	ACAACCACCGCGCACGGCCTT	520	GGCCGUGCGCGGUGGUUGUTT	521
247	247-265	AUGCGACCCUCCGGGACGGTT	522	CCGUCCCGGAGGGUCGCAUTT	523
248	248-266	UGCGACCCUCCGGGACGGCTT	524	GCCGUCCCGGAGGGUCGCATT	525
249	249-267	GCGACCCUCCGGGACGGCCTT	526	GGCCGUCCCGGAGGGUCGCTT	527
251	251-269	GACCCUCCGGGACGGCCGGTT	528	CCGGCCGUCCCGGAGGGUCTT	529
252	252-270	ACCCUCCGGGACGGCCGGGTT	530	CCCGGCCGUCCCGGAGGGUTT	531
254	254-272	CCUCCGGGACGGCCGGGGCTT	532	GCCCCGGCCGUCCCGGAGGTT	533
329	329-347	AGAAAGUUUGCCAAGGCACTT	534	GUGCCUUGGCAAACUUUCUTT	535
330	330-348	GAAAGUUUGCCAAGGCACGTT	536	CGUGCCUUGGCAAACUUUCTT	537
332	332-350	AAGUUUGCCAAGGCACGAGTT	538	CUCGUGCCUUGGCAAACUUTT	539
333	333-351	AGUUUGCCAAGGCACGAGUTT	540	ACUCGUGCCUUGGCAAACUTT	541
334	334-352	GUUUGCCAAGGCACGAGUATT	542	UACUCGUGCCUUGGCAAACTT	543
335	335-353	UUUGCCAAGGCACGAGUAATT	544	UUACUCGUGCCUUGGCAAATT	545
336	336-354	UUGCCAAGGCACGAGUAACTT	546	GUUACUCGUGCCUUGGCAATT	547
337	337-355	UGCCAAGGCACGAGUAACATT	548	UGUUACUCGUGCCUUGGCATT	549
338	338-356	GCCAAGGCACGAGUAACAATT	550	UUGUUACUCGUGCCUUGGCTT	551
361	361-379	ACGCAGUUGGGCACUUUUGTT	552	CAAAAGUGCCCAACUGCGUTT	553
362	362-380	CGCAGUUGGGCACUU	554	UCAAAAGUGCCCAACUG	555

[0785]

		UUGATT		CGTT	
363	363-381	GCAGUUGGGCACUUUUGAATT	556	UUCAAAAGUGCCCAACUGCTT	557
364	364-382	CAGUUGGGCACUUUUGAAGTT	558	CUUCAAAAGUGCCCAACUGTT	559
365	365-383	AGUUGGGCACUUUUGAAGATT	560	UCUUCAAAAGUGCCCAACUTT	561
366	366-384	GUUGGGCACUUUUGAAGAUTT	562	AUCUUCAAAAGUGCCCAACTT	563
367	367-385	UUGGGCACUUUUGAAGAUCTT	564	GAUCUUCAAAAGUGCCCAATT	565
368	368-386	UGGGCACUUUUGAAGAUCATT	566	UGAUCUUCAAAAGUGCCCATT	567
369	369-387	GGGCACUUUUGAAGAUCAUTT	568	AUGAUCUUCAAAAGUGCCCTT	569
377	377-395	UUGAAGAUCAUUUUCUCAGTT	570	CUGAGAAAAUGAUCUUCAATT	571
379	379-397	GAAGAUCAUUUUCUCAGCCTT	572	GGCUGAGAAAAUGAUCUUCTT	573
380	380-398	AAGAUCAUUUUCUCAGCCUTT	574	AGGCUGAGAAAAUGAUCUUTT	575
385	385-403	CAUUUUCUCAGCCUCCAGATT	576	UCUGGAGGCUGAGAAAAUGTT	577
394	394-412	AGCCUCCAGAGGAUGUUCATT	578	UGAACAUCCUCUGGAGGCUTT	579
396	396-414	CCUCCAGAGGAUGUUCAAUTT	580	AUUGAACAUCCUCUGGAGGTT	581
397	397-415	CUCCAGAGGAUGUUCAAUATT	582	UAUUGAACAUCCUCUGGAGTT	583
401	401-419	AGAGGAUGUUCAAUAACUGTT	584	CAGUUAUUGAACAUCCUCUTT	585
403	403-421	AGGAUGUUCAAUAACUGUGTT	586	CACAGUUAUUGAACAUCCUTT	587
407	407-425	UGUUCAAUAACUGUGAGGUTT	588	ACCUCACAGUUAUUGAACATT	589
409	409-427	UUCAAUAACUGUGAGGUGGTT	590	CCACCUCACAGUUAUUGAATT	591
410	410-428	UCAAUAACUGUGAGG	592	ACCACCUCACAGUUAUU	593

[0786]

		UGGUTT		GATT	
411	411-429	CAAUAACUGUGAGGUGGUCTT	594	GACCACCUCACAGUUAUUGTT	595
412	412-430	AAUAACUGUGAGGUGGUCCTT	596	GGACCACCUCACAGUUAUUTT	597
413	413-431	AUAACUGUGAGGUGGUCCUTT	598	AGGACCACCUCACAGUUAUTT	599
414	414-432	UAACUGUGAGGUGGUCCUUTT	600	AAGGACCACCUCACAGUUATT	601
416	416-434	ACUGUGAGGUGGUCCUUGGTT	602	CCAAGGACCACCUCACAGUTT	603
418	418-436	UGUGAGGUGGUCCUUGGGATT	604	UCCCAAGGACCACCUCACATT	605
419	419-437	GUGAGGUGGUCCUUGGGAATT	606	UUCCCAAGGACCACCUCACTT	607
425	425-443	UGGUCCUUGGGAAUUGGATT	608	UCCAAAUUCCCAAGGACCATT	609
431	431-449	UUGGGAAUUUGGAAAUUACTT	610	GUAAUUUCCAAAUUCCCAATT	611
432	432-450	UGGGAAUUUGGAAAUUACCTT	612	GGUAAUUUCCAAAUUCCCATT	613
433	433-451	GGGAAUUUGGAAAUUACCUTT	614	AGGUAAUUUCCAAAUUCCCTT	615
434	434-452	GGAAUUUGGAAAUUACCUATT	616	UAGGUAAUUUCCAAAUUCCTT	617
458	458-476	AGAGGAAUUAUGAUCUUUCTT	618	GAAAGAUCAUAAUUCCUCUTT	619
459	459-477	GAGGAAUUAUGAUCUUUCCTT	620	GGAAAGAUCAUAAUUCCUCTT	621
463	463-481	AAUUAUGAUCUUUCCUUCUTT	622	AGAAGGAAAGAUCAUAAUUTT	623
464	464-482	AUUAUGAUCUUUCCUUCUUTT	624	AAGAAGGAAAGAUCAUAAUTT	625
466	466-484	UAUGAUCUUUCCUUCUUAATT	626	UUAAGAAGGAAAGAUCAUATT	627
468	468-486	UGAUCUUUCCUUCUUAAAGTT	628	CUUUAAGAAGGAAAGAUCATT	629
471	471-489	UCUUUCCUUCUUAAA	630	GGUCUUUAAGAAGGAA	631

[0787]

		GACCTT		AGATT	
476	476-494	CCUUCUUAAAGACCA UCCATT	632	UGGAUGGUCUUUAAGA AGGTT	633
477	477-495	CUUCUUAAAGACCAU CCAGTT	634	CUGGAUGGUCUUUAAG AAGTT	635
479	479-497	UCUUAAAGACCAUCC AGGATT	636	UCCUGGAUGGUCUUUA AGATT	637
481	481-499	UUAAAGACCAUCCAG GAGGTT	638	CCUCCUGGAUGGUCUUU AATT	639
482	482-500	UAAAGACCAUCCAGG AGGUTT	640	ACCUCCUGGAUGGUCUU UATT	641
492	492-510	CCAGGAGGUGGCUGG UUAUTT	642	AUAACCAGCCACCUCCU GGTT	643
493	493-511	CAGGAGGUGGCUGGU UAUGTT	644	CAUAACCAGCCACCUCC UGTT	645
494	494-512	AGGAGGUGGCUGGUU AUGUTT	646	ACAUAACCAGCCACCUC CUTT	647
495	495-513	GGAGGUGGCUGGUUA UGUCTT	648	GACAUAACCAGCCACCU CCTT	649
496	496-514	GAGGUGGCUGGUUAU GUCCTT	650	GGACAUAACCAGCCACC UCTT	651
497	497-515	AGGUGGCUGGUUAUG UCCUTT	652	AGGACAUAACCAGCCAC CUTT	653
499	499-517	GUGGCUGGUUAUGUC CUCATT	654	UGAGGACAUAACCAGCC ACTT	655
520	520-538	GCCCUCAACACAGUGG AGCTT	656	GCUCCACUGUGUUGAG GGCTT	657
542	542-560	UUCCUUUGGAAAACC UGCATT	658	UGCAGGUUUUCCAAAG GAATT	659
543	543-561	UCCUUUGGAAAACCU GCAGTT	660	CUGCAGGUUUUCCAAA GGATT	661
550	550-568	GAAAACCUGCAGAUC AUCATT	662	UGAUGAUCUGCAGGUU UUCTT	663
551	551-569	AAAACCUGCAGAUCA UCAGTT	664	CUGAUGAUCUGCAGGU UUUTT	665
553	553-571	AACCUGCAGAUCAUC AGAGTT	666	CUCUGAUGAUCUGCAG GUUTT	667
556	556-574	CUGCAGAUCAUCAGA	668	UUCCUCUGAUGAUCUGC	669

[0788]

		GGAATT		AGTT	
586	586-604	GAAAAUUCCUAUGCCUUAGTT	670	CUAAGGCAUAGGAAUUUCTT	671
587	587-605	AAAAUUCCUAUGCCUUAGCTT	672	GCUAAGGCAUAGGAAUUUTT	673
589	589-607	AAUUCCUAUGCCUUAGCAGTT	674	CUGCUAAGGCAUAGGAAUUTT	675
592	592-610	UCCUAUGCCUUAGCAGUCUTT	676	AGACUGCUAAGGCAUAGGATT	677
593	593-611	CCUAUGCCUUAGCAGUCUUTT	678	AAGACUGCUAAGGCAUAGGTT	679
594	594-612	CUAUGCCUUAGCAGUCUUATT	680	UAAGACUGCUAAGGCAUAGTT	681
596	596-614	AUGCCUUAGCAGUCUUAUCTT	682	GAUAAGACUGCUAAGGCAUTT	683
597	597-615	UGCCUUAGCAGUCUUAUCUTT	684	AGAUAAGACUGCUAAGGCATT	685
598	598-616	GCCUUAGCAGUCUUAUCUATT	686	UAGAUAAGACUGCUAAGGCTT	687
599	599-617	CCUUAGCAGUCUUAUCUAATT	688	UUAGAUAAGACUGCUAAGGTT	689
600	600-618	CUUAGCAGUCUUAUCUAACTT	690	GUUAGAUAAGACUGCUAAGTT	691
601	601-619	UUAGCAGUCUUAUCUAACUTT	692	AGUUAGAUAAGACUGCUAATT	693
602	602-620	UAGCAGUCUUAUCUAACUATT	694	UAGUUAGAUAAGACUGCUATT	695
603	603-621	AGCAGUCUUAUCUAACUAUTT	696	AUAGUUAGAUAAGACUGCUTT	697
604	604-622	GCAGUCUUAUCUAACUAUGTT	698	CAUAGUUAGAUAAGACUGCTT	699
605	605-623	CAGUCUUAUCUAACUAUGATT	700	UCAUAGUUAGAUAAGACUGTT	701
608	608-626	UCUUAUCUAACUAUGAUGCTT	702	GCAUCAUAGUUAGAUAAGATT	703
609	609-627	CUUAUCUAACUAUGAUGCATT	704	UGCAUCAUAGUUAGAUAAGTT	705
610	610-628	UUAUCUAACUAUGAU	706	UUGCAUCAUAGUUAGA	707

[0789]

		GCAATT		UAATT	
611	611-629	UAUCUAACUAUGAUG CAAATT	708	UUUGCAUCAUAGUUAG AUATT	709
612	612-630	AUCUAACUAUGAUGC AAAUTT	710	AUUUGCAUCAUAGUUA GAUTT	711
613	613-631	UCUAACUAUGAUGCA AAUATT	712	UAUUUGCAUCAUAGUU AGATT	713
614	614-632	CUAACUAUGAUGCAA AUAATT	714	UUAUUUGCAUCAUAGU UAGTT	715
616	616-634	AACUAUGAUGCAAAU AAAATT	716	UUUUAUUUGCAUCAUA GUUTT	717
622	622-640	GAUGCAAAUAAAACC GGACTT	718	GUCCGGUUUUAUUUGC AUCTT	719
623	623-641	AUGCAAAUAAAACCG GACUTT	720	AGUCCGGUUUUAUUUG CAUTT	721
624	624-642	UGCAAAUAAAACCGG ACUGTT	722	CAGUCCGGUUUUAUUU GCATT	723
626	626-644	CAAAUAAAACCGGAC UGAATT	724	UUCAGUCCGGUUUUAU UUGTT	725
627	627-645	AAAUAAAACCGGACU GAAGTT	726	CUUCAGUCCGGUUUUA UUUTT	727
628	628-646	AAUAAAACCGGACUG AAGGTT	728	CCUUCAGUCCGGUUUUA UUTT	729
630	630-648	UAAAACCGGACUGAA GGAGTT	730	CUCCUUCAGUCCGGUUU UATT	731
631	631-649	AAAACCGGACUGAAG GAGCTT	732	GCUCCUUCAGUCCGGUU UUTT	733
632	632-650	AAACCGGACUGAAGG AGCUTT	734	AGCUCCUUCAGUCCGGU UUTT	735
633	633-651	AACCGGACUGAAGGA GCUGTT	736	CAGCUCCUUCAGUCCGG UUTT	737
644	644-662	AGGAGCUGCCCAUGA GAAATT	738	UUUCUCAUGGGCAGCUC CUTT	739
665	665-683	UACAGGAAAUCCUGC AUGGTT	740	CCAUGCAGGAUUUCCUG UATT	741
668	668-686	AGGAAAUCCUGCAUG GCGCTT	742	GCGCCAUGCAGGAUUUC CUTT	743
669	669-687	GGAAAUCCUGCAUGG	744	GGCGCCAUGCAGGAUU	745

[0790]

		CGCCTT		UCCTT	
670	670-688	GAAAUCCUGCAUGGCGCCGTT	746	CGGCGCCAUGCAGGAUUUCTT	747
671	671-689	AAAUCCUGCAUGGCGCCGUTT	748	ACGGCGCCAUGCAGGAUUUTT	749
672	672-690	AAUCCUGCAUGGCGCCGUGTT	750	CACGGCGCCAUGCAGGAUUTT	751
674	674-692	UCCUGCAUGGCGCCGUGCGTT	752	CGCACGGCGCCAUGCAGGATT	753
676	676-694	CUGCAUGGCGCCGUGCGGUTT	754	ACCGCACGGCGCCAUGCAGTT	755
677	677-695	UGCAUGGCGCCGUGCGGUUTT	756	AACCGCACGGCGCCAUGCATT	757
678	678-696	GCAUGGCGCCGUGCGGUUCTT	758	GAACCGCACGGCGCCAUGCTT	759
680	680-698	AUGGCGCCGUGCGGUUCAGTT	760	CUGAACCGCACGGCGCCAUTT	761
681	681-699	UGGCGCCGUGCGGUUCAGCTT	762	GCUGAACCGCACGGCGCCATT	763
682	682-700	GGCGCCGUGCGGUUCAGCATT	764	UGCUGAACCGCACGGCGCCTT	765
683	683-701	GCGCCGUGCGGUUCAGCAATT	766	UUGCUGAACCGCACGGCGCTT	767
684	684-702	CGCCGUGCGGUUCAGCAACTT	768	GUUGCUGAACCGCACGGCGTT	769
685	685-703	GCCGUGCGGUUCAGCAACATT	770	UGUUGCUGAACCGCACGGCTT	771
686	686-704	CCGUGCGGUUCAGCAACAATT	772	UUGUUGCUGAACCGCACGGTT	773
688	688-706	GUGCGGUUCAGCAACAACCTT	774	GGUUGUUGCUGAACCGCACTT	775
690	690-708	GCGGUUCAGCAACAACCCUTT	776	AGGGUUGUUGCUGAACCGCTT	777
692	692-710	GGUUCAGCAACAACCCUGCTT	778	GCAGGGUUGUUGCUGAACCTT	779
698	698-716	GCAACAACCCUGCCCUGUGTT	780	CACAGGGCAGGGUUGUUGCTT	781
700	700-718	AACAACCCUGCCCUGU	782	UGCACAGGGCAGGGUU	783

[0791]

		GCATT		GUUTT	
719	719-737	ACGUGGAGAGCAUCCAGUGTT	784	CACUGGAUGCUCUCCACGUTT	785
720	720-738	CGUGGAGAGCAUCCAGUGGTT	786	CCACUGGAUGCUCUCCACGTT	787
721	721-739	GUGGAGAGCAUCCAGUGGCTT	788	GCCACUGGAUGCUCUCCACTT	789
724	724-742	GAGAGCAUCCAGUGGCGGGTT	790	CCCGCCACUGGAUGCUCUCTT	791
725	725-743	AGAGCAUCCAGUGGCGGGATT	792	UCCCGCCACUGGAUGCUCUTT	793
726	726-744	GAGCAUCCAGUGGCGGGACTT	794	GUCCCGCCACUGGAUGCUCTT	795
733	733-751	CAGUGGCGGGACAUAGUCATT	796	UGACUAUGUCCCGCCACUGTT	797
734	734-752	AGUGGCGGGACAUAGUCAGTT	798	CUGACUAUGUCCCGCCACUTT	799
736	736-754	UGGCGGGACAUAGUCAGCATT	800	UGCUGACUAUGUCCCGCCATT	801
737	737-755	GGCGGGACAUAGUCAGCAGTT	802	CUGCUGACUAUGUCCCGCCTT	803
763	763-781	CUCAGCAACAUGUCGAUGGTT	804	CCAUCGACAUGUUGCUGAGTT	805
765	765-783	CAGCAACAUGUCGAUGGACTT	806	GUCCAUCGACAUGUUGCUGTT	807
766	766-784	AGCAACAUGUCGAUGGACUTT	808	AGUCCAUCGACAUGUUGCUTT	809
767	767-785	GCAACAUGUCGAUGGACUUTT	810	AAGUCCAUCGACAUGUUGCTT	811
769	769-787	AACAUGUCGAUGGACUUCCTT	812	GGAAGUCCAUCGACAUGUUTT	813
770	770-788	ACAUGUCGAUGGACUUCCATT	814	UGGAAGUCCAUCGACAUGUTT	815
771	771-789	CAUGUCGAUGGACUUCCAGTT	816	CUGGAAGUCCAUCGACAUGTT	817
772	772-790	AUGUCGAUGGACUUCCAGATT	818	UCUGGAAGUCCAUCGACAUTT	819
775	775-793	UCGAUGGACUUCCAG	820	GGUUCUGGAAGUCCAU	821

[0792]

		AACCTT		CGATT	
789	789-807	GAACCACCUGGGCAGC UGCTT	822	GCAGCUGCCCAGGUGGU UCTT	823
798	798-816	GGGCAGCUGCCAAAA GUGUTT	824	ACACUUUUGGCAGCUGC CCTT	825
800	800-818	GCAGCUGCCAAAAGU GUGATT	826	UCACACUUUUGGCAGCU GCTT	827
805	805-823	UGCCAAAAGUGUGAU CCAATT	828	UUGGAUCACACUUUUG GCATT	829
806	806-824	GCCAAAAGUGUGAUC CAAGTT	830	CUUGGAUCACACUUUU GGCTT	831
807	807-825	CCAAAAGUGUGAUCC AAGCTT	832	GCUUGGAUCACACUUU UGGTT	833
810	810-828	AAAGUGUGAUCCAAG CUGUTT	834	ACAGCUUGGAUCACACU UUTT	835
814	814-832	UGUGAUCCAAGCUGU CCCATT	836	UGGGACAGCUUGGAUC ACATT	837
815	815-833	GUGAUCCAAGCUGUC CCAATT	838	UUGGGACAGCUUGGAU CACTT	839
817	817-835	GAUCCAAGCUGUCCCA AUGTT	840	CAUUGGGACAGCUUGG AUCTT	841
818	818-836	AUCCAAGCUGUCCCAA UGGTT	842	CCAUUGGGACAGCUUG GAUTT	843
819	819-837	UCCAAGCUGUCCCAAU GGGTT	844	CCCAUUGGGACAGCUUG GATT	845
820	820-838	CCAAGCUGUCCCAAUG GGATT	846	UCCCAUUGGGACAGCUU GGTT	847
821	821-839	CAAGCUGUCCCAAUG GGAGTT	848	CUCCCAUUGGGACAGCU UGTT	849
823	823-841	AGCUGUCCCAAUGGG AGCUTT	850	AGCUCCCAUUGGGACAG CUTT	851
826	826-844	UGUCCCAAUGGGAGC UGCUTT	852	AGCAGCUCCCAUUGGGA CATT	853
847	847-865	GGUGCAGGAGAGGAG AACUTT	854	AGUUCUCCUCUCCUGCA CCTT	855
871	871-889	AAACUGACCAAAAUC AUCUTT	856	AGAUGAUUUUGGUCAG UUUTT	857
872	872-890	AACUGACCAAAAUCA	858	CAGAUGAUUUUGGUCA	859

[0793]

		UCUGTT		GUUTT	
873	873-891	ACUGACCAAAAUCAU CUGUTT	860	ACAGAUGAUUUUGGUC AGUTT	861
877	877-895	ACCAAAAUCAUCUGU GCCCTT	862	GGGCACAGAUGAUUUU GGUTT	863
878	878-896	CCAAAAUCAUCUGUG CCCATT	864	UGGGCACAGAUGAUUU UGGTT	865
881	881-899	AAAUCAUCUGUGCCC AGCATT	866	UGCUGGGCACAGAUGA UUUTT	867
890	890-908	GUGCCCAGCAGUGCUC CGGTT	868	CCGGAGCACUGCUGGGC ACTT	869
892	892-910	GCCCAGCAGUGCUCCG GGCTT	870	GCCCGGAGCACUGCUGG GCTT	871
929	929-947	CCAGUGACUGCUGCCA CAATT	872	UUGUGGCAGCAGUCAC UGGTT	873
930	930-948	CAGUGACUGCUGCCAC AACTT	874	GUUGUGGCAGCAGUCA CUGTT	875
979	979-997	GAGAGCGACUGCCUG GUCUTT	876	AGACCAGGCAGUCGCUC UCTT	877
980	980-998	AGAGCGACUGCCUGG UCUGTT	878	CAGACCAGGCAGUCGCU CUTT	879
981	981-999	GAGCGACUGCCUGGU CUGCTT	880	GCAGACCAGGCAGUCGC UCTT	881
982	982-1000	AGCGACUGCCUGGUC UGCCTT	882	GGCAGACCAGGCAGUCG CUTT	883
983	983-1001	GCGACUGCCUGGUCU GCCGTT	884	CGGCAGACCAGGCAGUC GCTT	885
984	984-1002	CGACUGCCUGGUCUGC CGCTT	886	GCGGCAGACCAGGCAGU CGTT	887
989	989-1007	GCCUGGUCUGCCGCAA AUUTT	888	AAUUUGCGGCAGACCA GGCTT	889
990	990-1008	CCUGGUCUGCCGCAAA UUCTT	890	GAAUUUGCGGCAGACC AGGTT	891
991	991-1009	CUGGUCUGCCGCAAA UUCCTT	892	GGAAUUUGCGGCAGAC CAGTT	893
992	992-1010	UGGUCUGCCGCAAAU UCCGTT	894	CGGAAUUUGCGGCAGA CCATT	895
994	994-1012	GUCUGCCGCAAAUUCC	896	CUCGGAAUUUGCGGCA	897

[0794]

		GAGTT		GACTT	
995	995-1013	UCUGCCGCAAAUUCCG AGATT	898	UCUCGGAAUUUGCGGC AGATT	899
996	996-1014	CUGCCGCAAAUUCCGA GACTT	900	GUCUCGGAAUUUGCGG CAGTT	901
997	997-1015	UGCCGCAAAUUCCGA GACGTT	902	CGUCUCGGAAUUUGCG GCATT	903
999	999-1017	CCGCAAAUUCCGAGAC GAATT	904	UUCGUCUCGGAAUUUG CGGTT	905
1004	1004-1022	AAUUCCGAGACGAAG CCACTT	906	GUGGCUUCGUCUCGGA AUUTT	907
1005	1005-1023	AUUCCGAGACGAAGC CACGTT	908	CGUGGCUUCGUCUCGGA AUTT	909
1006	1006-1024	UUCCGAGACGAAGCC ACGUTT	910	ACGUGGCUUCGUCUCGG AATT	911
1007	1007-1025	UCCGAGACGAAGCCAC GUGTT	912	CACGUGGCUUCGUCUCG GATT	913
1008	1008-1026	CCGAGACGAAGCCACG UGCTT	914	GCACGUGGCUUCGUCUC GGTT	915
1010	1010-1028	GAGACGAAGCCACGU GCAATT	916	UUGCACGUGGCUUCGUC UCTT	917
1013	1013-1031	ACGAAGCCACGUGCA AGGATT	918	UCCUUGCACGUGGCUUC GUTT	919
1014	1014-1032	CGAAGCCACGUGCAA GGACTT	920	GUCCUUGCACGUGGCUU CGTT	921
1015	1015-1033	GAAGCCACGUGCAAG GACATT	922	UGUCCUUGCACGUGGCU UCTT	923
1016	1016-1034	AAGCCACGUGCAAGG ACACTT	924	GUGUCCUUGCACGUGGC UUTT	925
1040	1040-1058	CCCCACUCAUGCUCUA CAATT	926	UUGUAGAGCAUGAGUG GGGTT	927
1042	1042-1060	CCACUCAUGCUCUACA ACCTT	928	GGUUGUAGAGCAUGAG UGGTT	929
1044	1044-1062	ACUCAUGCUCUACAAC CCCTT	930	GGGGUUGUAGAGCAUG AGUTT	931
1047	1047-1065	CAUGCUCUACAACCCC ACCTT	932	GGUGGGGUUGUAGAGC AUGTT	933
1071	1071-1089	CCAGAUGGAUGUGAA	934	GGGGUUCACAUCCAUCU	935

[0795]

		CCCCTT		GGTT	
1073	1073-1091	AGAUGGAUGUGAACCCCGATT	936	UCGGGGUUCACAUCCAUCUTT	937
1074	1074-1092	GAUGGAUGUGAACCCCGAGTT	938	CUCGGGGUUCACAUCCAUCTT	939
1075	1075-1093	AUGGAUGUGAACCCCGAGGTT	940	CCUCGGGGUUCACAUCCAUTT	941
1077	1077-1095	GGAUGUGAACCCCGAGGGCTT	942	GCCCUCGGGGUUCACAUCCTT	943
1078	1078-1096	GAUGUGAACCCCGAGGGCATT	944	UGCCCUCGGGGUUCACAUCTT	945
1080	1080-1098	UGUGAACCCCGAGGGCAAATT	946	UUUGCCCUCGGGGUUCACATT	947
1084	1084-1102	AACCCCGAGGGCAAAUACATT	948	UGUAUUUGCCCUCGGGGUUTT	949
1085	1085-1103	ACCCCGAGGGCAAAUACAGTT	950	CUGUAUUUGCCCUCGGGGUTT	951
1087	1087-1105	CCCGAGGGCAAAUACAGCUTT	952	AGCUGUAUUUGCCCUCGGGTT	953
1088	1088-1106	CCGAGGGCAAAUACAGCUUTT	954	AAGCUGUAUUUGCCCUCGGTT	955
1089	1089-1107	CGAGGGCAAAUACAGCUUUTT	956	AAAGCUGUAUUUGCCCUCGTT	957
1096	1096-1114	AAAUACAGCUUUGGUGCCATT	958	UGGCACCAAAGCUGUAUUUTT	959
1097	1097-1115	AAUACAGCUUUGGUGCCACTT	960	GUGGCACCAAAGCUGUAUUTT	961
1098	1098-1116	AUACAGCUUUGGUGCCACCTT	962	GGUGGCACCAAAGCUGUAUTT	963
1104	1104-1122	CUUUGGUGCCACCUGCGUGTT	964	CACGCAGGUGGCACCAAAGTT	965
1106	1106-1124	UUGGUGCCACCUGCGUGAATT	966	UUCACGCAGGUGGCACCAATT	967
1112	1112-1130	CCACCUGCGUGAAGAAGUGTT	968	CACUUCUUCACGCAGGUGGTT	969
1116	1116-1134	CUGCGUGAAGAAGUGUCCCTT	970	GGGACACUUCUUCACGCAGTT	971
1117	1117-1135	UGCGUGAAGAAGUGU	972	GGGGACACUUCUUCACG	973

[0796]

		CCCCTT		CATT	
1118	1118-1136	GCGUGAAGAAGUGUCCCGTT	974	CGGGGACACUUCUUCACGCTT	975
1119	1119-1137	CGUGAAGAAGUGUCCCCGUTT	976	ACGGGGACACUUCUUCACGTT	977
1120	1120-1138	GUGAAGAAGUGUCCCCGUATT	978	UACGGGGACACUUCUUCACTT	979
1121	1121-1139	UGAAGAAGUGUCCCCGUAATT	980	UUACGGGGACACUUCUUCATT	981
1122	1122-1140	GAAGAAGUGUCCCCGUAAUTT	982	AUUACGGGGACACUUCUUCTT	983
1123	1123-1141	AAGAAGUGUCCCCGUAAUUTT	984	AAUUACGGGGACACUUCUUTT	985
1124	1124-1142	AGAAGUGUCCCCGUAAUUATT	986	UAAUUACGGGGACACUUCUTT	987
1125	1125-1143	GAAGUGUCCCCGUAAUUAUTT	988	AUAAUUACGGGGACACUUCTT	989
1126	1126-1144	AAGUGUCCCCGUAAUUAUGTT	990	CAUAAUUACGGGGACACUUTT	991
1127	1127-1145	AGUGUCCCCGUAAUUAUGUTT	992	ACAUAAUUACGGGGACACUTT	993
1128	1128-1146	GUGUCCCCGUAAUUAUGUGTT	994	CACAUAAUUACGGGGACACTT	995
1129	1129-1147	UGUCCCCGUAAUUAUGUGGTT	996	CCACAUAAUUACGGGGACATT	997
1130	1130-1148	GUCCCCGUAAUUAUGUGGUTT	998	ACCACAUAAUUACGGGGACTT	999
1132	1132-1150	CCCCGUAAUUAUGUGGUGATT	1000	UCACCACAUAAUUACGGGGTT	1001
1134	1134-1152	CCGUAAUUAUGUGGUGACATT	1002	UGUCACCACAUAAUUACGGTT	1003
1136	1136-1154	GUAAUUAUGUGGUGACAGATT	1004	UCUGUCACCACAUAAUUACTT	1005
1137	1137-1155	UAAUUAUGUGGUGACAGAUTT	1006	AUCUGUCACCACAUAAUUATT	1007
1138	1138-1156	AAUUAUGUGGUGACAGAUCTT	1008	GAUCUGUCACCACAUAAUUTT	1009
1139	1139-1157	AUUAUGUGGUGACAG	1010	UGAUCUGUCACCACAUA	1011

[0797]

		AUCATT		AUTT	
1140	1140-1158	UUAUGUGGUGACAGA UCACTT	1012	GUGAUCUGUCACCACAU AATT	1013
1142	1142-1160	AUGUGGUGACAGAUC ACGGTT	1014	CCGUGAUCUGUCACCAC AUTT	1015
1145	1145-1163	UGGUGACAGAUCACG GCUCTT	1016	GAGCCGUGAUCUGUCAC CATT	1017
1147	1147-1165	GUGACAGAUCACGGC UCGUTT	1018	ACGAGCCGUGAUCUGUC ACTT	1019
1148	1148-1166	UGACAGAUCACGGCU CGUGTT	1020	CACGAGCCGUGAUCUGU CATT	1021
1149	1149-1167	GACAGAUCACGGCUC GUGCTT	1022	GCACGAGCCGUGAUCUG UCTT	1023
1150	1150-1168	ACAGAUCACGGCUCG UGCGTT	1024	CGCACGAGCCGUGAUCU GUTT	1025
1151	1151-1169	CAGAUCACGGCUCGU GCGUTT	1026	ACGCACGAGCCGUGAUC UGTT	1027
1152	1152-1170	AGAUCACGGCUCGUG CGUCTT	1028	GACGCACGAGCCGUGAU CUTT	1029
1153	1153-1171	GAUCACGGCUCGUGC GUCCTT	1030	GGACGCACGAGCCGUGA UCTT	1031
1154	1154-1172	AUCACGGCUCGUGCG UCCGTT	1032	CGGACGCACGAGCCGUG AUTT	1033
1155	1155-1173	UCACGGCUCGUGCGUC CGATT	1034	UCGGACGCACGAGCCGU GATT	1035
1156	1156-1174	CACGGCUCGUGCGUCC GAGTT	1036	CUCGGACGCACGAGCCG UGTT	1037
1157	1157-1175	ACGGCUCGUGCGUCCG AGCTT	1038	GCUCGGACGCACGAGCC GUTT	1039
1160	1160-1178	GCUCGUGCGUCCGAGC CUGTT	1040	CAGGCUCGGACGCACGA GCTT	1041
1200	1200-1218	GGAGGAAGACGGCGU CCGCTT	1042	GCGGACGCCGUCUUCCU CCTT	1043
1201	1201-1219	GAGGAAGACGGCGUC CGCATT	1044	UGCGGACGCCGUCUUCC UCTT	1045
1203	1203-1221	GGAAGACGGCGUCCG CAAGTT	1046	CUUGCGGACGCCGUCUU CCTT	1047
1204	1204-1222	GAAGACGGCGUCCGC	1048	ACUUGCGGACGCCGUCU	1049

[0798]

		AAGUTT		UCTT	
1205	1205-1223	AAGACGGCGUCCGCAAGUGTT	1050	CACUUGCGGACGCCGUCUUTT	1051
1207	1207-1225	GACGGCGUCCGCAAGUGUATT	1052	UACACUUGCGGACGCCGUCTT	1053
1208	1208-1226	ACGGCGUCCGCAAGUGUAATT	1054	UUACACUUGCGGACGCCGUTT	1055
1211	1211-1229	GCGUCCGCAAGUGUAAGAATT	1056	UUCUUACACUUGCGGACGCTT	1057
1212	1212-1230	CGUCCGCAAGUGUAAGAAGTT	1058	CUUCUUACACUUGCGGACGTT	1059
1213	1213-1231	GUCCGCAAGUGUAAGAAGUTT	1060	ACUUCUUACACUUGCGGACTT	1061
1214	1214-1232	UCCGCAAGUGUAAGAAGUGTT	1062	CACUUCUUACACUUGCGGATT	1063
1215	1215-1233	CCGCAAGUGUAAGAAGUGCTT	1064	GCACUUCUUACACUUGCGGTT	1065
1216	1216-1234	CGCAAGUGUAAGAAGUGCGTT	1066	CGCACUUCUUACACUUGCGTT	1067
1217	1217-1235	GCAAGUGUAAGAAGUGCGATT	1068	UCGCACUUCUUACACUUGCTT	1069
1219	1219-1237	AAGUGUAAGAAGUGCGAAGTT	1070	CUUCGCACUUCUUACACUUTT	1071
1220	1220-1238	AGUGUAAGAAGUGCGAAGGTT	1072	CCUUCGCACUUCUUACACUTT	1073
1221	1221-1239	GUGUAAGAAGUGCGAAGGGTT	1074	CCCUUCGCACUUCUUACACTT	1075
1222	1222-1240	UGUAAGAAGUGCGAAGGGCTT	1076	GCCCUUCGCACUUCUUACATT	1077
1223	1223-1241	GUAAGAAGUGCGAAGGGCCTT	1078	GGCCCUUCGCACUUCUUACTT	1079
1224	1224-1242	UAAGAAGUGCGAAGGGCCUTT	1080	AGGCCCUUCGCACUUCUUATT	1081
1225	1225-1243	AAGAAGUGCGAAGGGCCUUTT	1082	AAGGCCCUUCGCACUUCUUTT	1083
1226	1226-1244	AGAAGUGCGAAGGGCCUUGTT	1084	CAAGGCCCUUCGCACUUCUTT	1085
1229	1229-1247	AGUGCGAAGGGCCUU	1086	CGGCAAGGCCCUUCGCA	1087

[0799]

		GCCGTT		CUTT	
1230	1230-1248	GUGCGAAGGGCCUUGCCGCTT	1088	GCGGCAAGGCCCUUCGCACTT	1089
1231	1231-1249	UGCGAAGGGCCUUGCCGCATT	1090	UGCGGCAAGGCCCUUCGCATT	1091
1232	1232-1250	GCGAAGGGCCUUGCCGCAATT	1092	UUGCGGCAAGGCCCUUCGCTT	1093
1233	1233-1251	CGAAGGGCCUUGCCGCAAATT	1094	UUUGCGGCAAGGCCCUUCGTT	1095
1235	1235-1253	AAGGGCCUUGCCGCAAAGUTT	1096	ACUUUGCGGCAAGGCCCUUTT	1097
1236	1236-1254	AGGGCCUUGCCGCAAAGUGTT	1098	CACUUUGCGGCAAGGCCCUTT	1099
1237	1237-1255	GGGCCUUGCCGCAAAGUGUTT	1100	ACACUUUGCGGCAAGGCCCTT	1101
1238	1238-1256	GGCCUUGCCGCAAAGUGUGTT	1102	CACACUUUGCGGCAAGGCCTT	1103
1239	1239-1257	GCCUUGCCGCAAAGUGUGUTT	1104	ACACACUUUGCGGCAAGGCTT	1105
1241	1241-1259	CUUGCCGCAAAGUGUGUAATT	1106	UUACACACUUUGCGGCAAGTT	1107
1261	1261-1279	GGAAUAGGUAUUGGUGAAUTT	1108	AUUCACCAAUACCUAUUCCTT	1109
1262	1262-1280	GAAUAGGUAUUGGUGAAUUTT	1110	AAUUCACCAAUACCUAUUCTT	1111
1263	1263-1281	AAUAGGUAUUGGUGAAUUUTT	1112	AAAUUCACCAAUACCUAUUTT	1113
1264	1264-1282	AUAGGUAUUGGUGAAUUUATT	1114	UAAAUUCACCAAUACCUAUTT	1115
1266	1266-1284	AGGUAUUGGUGAAUUUAAATT	1116	UUUAAAUUCACCAAUACCUTT	1117
1267	1267-1285	GGUAUUGGUGAAUUUAAAGTT	1118	CUUUAAAUUCACCAAUACCTT	1119
1289	1289-1307	CACUCUCCAUAAAUGCUACTT	1120	GUAGCAUUUAUGGAGAGUGTT	1121
1313	1313-1331	UUAAACACUUCAAAAACUGTT	1122	CAGUUUUUGAAGUGUUUAATT	1123
1320	1320-1338	CUUCAAAAACUGCACC	1124	GGAGGUGCAGUUUUUG	1125

[0800]

		UCCTT		AAGTT	
1321	1321-1339	UUCAAAAACUGCACC UCCATT	1126	UGGAGGUGCAGUUUUU GAATT	1127
1322	1322-1340	UCAAAAACUGCACCUC CAUTT	1128	AUGGAGGUGCAGUUUU UGATT	1129
1323	1323-1341	CAAAAACUGCACCUCC AUCTT	1130	GAUGGAGGUGCAGUUU UUGTT	1131
1324	1324-1342	AAAAACUGCACCUCCA UCATT	1132	UGAUGGAGGUGCAGUU UUUTT	1133
1328	1328-1346	ACUGCACCUCCAUCAG UGGTT	1134	CCACUGAUGGAGGUGC AGUTT	1135
1332	1332-1350	CACCUCCAUCAGUGGC GAUTT	1136	AUCGCCACUGAUGGAG GUGTT	1137
1333	1333-1351	ACCUCCAUCAGUGGCG AUCTT	1138	GAUCGCCACUGAUGGA GGUTT	1139
1335	1335-1353	CUCCAUCAGUGGCGA UCUCTT	1140	GAGAUCGCCACUGAUG GAGTT	1141
1338	1338-1356	CAUCAGUGGCGAUCU CCACTT	1142	GUGGAGAUCGCCACUG AUGTT	1143
1344	1344-1362	UGGCGAUCUCCACAUC CUGTT	1144	CAGGAUGUGGAGAUCG CCATT	1145
1345	1345-1363	GGCGAUCUCCACAUCC UGCTT	1146	GCAGGAUGUGGAGAUC GCCTT	1147
1346	1346-1364	GCGAUCUCCACAUCCU GCCTT	1148	GGCAGGAUGUGGAGAU CGCTT	1149
1347	1347-1365	CGAUCUCCACAUCCUG CCGTT	1150	CGGCAGGAUGUGGAGA UCGTT	1151
1348	1348-1366	GAUCUCCACAUCCUGC CGGTT	1152	CCGGCAGGAUGUGGAG AUCTT	1153
1353	1353-1371	CCACAUCCUGCCGGUG GCATT	1154	UGCCACCGGCAGGAUGU GGTT	1155
1354	1354-1372	CACAUCCUGCCGGUGG CAUTT	1156	AUGCCACCGGCAGGAUG UGTT	1157
1355	1355-1373	ACAUCCUGCCGGUGGC AUUTT	1158	AAUGCCACCGGCAGGAU GUTT	1159
1357	1357-1375	AUCCUGCCGGUGGCA UUUATT	1160	UAAAUGCCACCGGCAGG AUTT	1161
1360	1360-1378	CUGCCGGUGGCAUUU	1162	CCCUAAAUGCCACCGGC	1163

[0801]

		AGGGTT		AGTT	
1361	1361-1379	UGCCGGUGGCAUUUAGGGGTT	1164	CCCCUAAAUGCCACCGGCATT	1165
1362	1362-1380	GCCGGUGGCAUUUAGGGGUTT	1166	ACCCCUAAAUGCCACCGGCTT	1167
1363	1363-1381	CCGGUGGCAUUUAGGGGUGTT	1168	CACCCCUAAAUGCCACCGGTT	1169
1366	1366-1384	GUGGCAUUUAGGGGUGACUTT	1170	AGUCACCCCUAAAUGCCACTT	1171
1369	1369-1387	GCAUUUAGGGGUGACUCCUTT	1172	AGGAGUCACCCCUAAAUGCTT	1173
1370	1370-1388	CAUUUAGGGGUGACUCCUUTT	1174	AAGGAGUCACCCCUAAAUGTT	1175
1371	1371-1389	AUUUAGGGGUGACUCCUUCTT	1176	GAAGGAGUCACCCCUAAAUTT	1177
1372	1372-1390	UUUAGGGGUGACUCCUUCATT	1178	UGAAGGAGUCACCCCUAAATT	1179
1373	1373-1391	UUAGGGGUGACUCCUUCACTT	1180	GUGAAGGAGUCACCCCUAATT	1181
1374	1374-1392	UAGGGGUGACUCCUUCACATT	1182	UGUGAAGGAGUCACCCCUATT	1183
1404	1404-1422	UCUGGAUCCACAGGAACUGTT	1184	CAGUUCCUGUGGAUCCAGATT	1185
1408	1408-1426	GAUCCACAGGAACUGGAUATT	1186	UAUCCAGUUCCUGUGGAUCTT	1187
1409	1409-1427	AUCCACAGGAACUGGAUAUTT	1188	AUAUCCAGUUCCUGUGGAUTT	1189
1411	1411-1429	CCACAGGAACUGGAUAUUCTT	1190	GAAUAUCCAGUUCCUGUGGTT	1191
1412	1412-1430	CACAGGAACUGGAUAUUCUTT	1192	AGAAUAUCCAGUUCCUGUGTT	1193
1419	1419-1437	ACUGGAUAUUCUGAAAACCTT	1194	GGUUUUCAGAAUAUCCAGUTT	1195
1426	1426-1444	AUUCUGAAAACCGUAAAGGTT	1196	CCUUUACGGUUUUCAGAAUTT	1197
1427	1427-1445	UUCUGAAAACCGUAAAGGATT	1198	UCCUUUACGGUUUUCAGAATT	1199
1430	1430-1448	UGAAAACCGUAAAGG	1200	AUUUCCUUUACGGUUU	1201

[0802]

		AAAUTT		UCATT	
1431	1431-1449	GAAAACCGUAAAGGAAAUCTT	1202	GAUUUCCUUUACGGUUUUCTT	1203

[0803] 表6.具有化学修饰的EGFR siRNA序列

[0804]

hs Id #	NM_005228.3 中的序列位置	有义链序列 (5′-3′)	SEQ ID NO:	反义链序列 (5′-3′)	SEQ ID NO:
68	68-86	cgGfcCfgGfaGfuCfcCfgAfgCfuAfdTsdT	1204	UfAfgCfuCfgGfgAfcUfcCfgGfcCfgdTsdT	1205
71	71-89	ccGfgAfgUfcCfcGfaGfcUfaGfcCfdTsdT	1206	GfGfcUfaGfcUfcGfgGfaCfuCfcGfgdTsdT	1207
72	72-90	cgGfaGfuCfcCfgAfgCfuAfgCfcCfdTsdT	1208	GfGfgCfuAfgCfuCfgGfgAfcUfcCfgdTsdT	1209
73	73-91	ggAfgUfcCfcGfaGfcUfaGfcCfcCfdTsdT	1210	GfGfgGfcUfaGfcUfcGfgGfaCfuCfcdTsdT	1211
74	74-92	gaGfuCfcCfgAfgCfuAfgCfcCfcGfdTsdT	1212	CfGfgGfgCfuAfgCfuCfgGfgAfcUfcdTsdT	1213
75	75-93	agUfcCfcGfaGfcUfaGfcCfcCfgGfdTsdT	1214	CfCfgGfgGfcUfaGfcUfcGfgGfaCfudTsdT	1215
76	76-94	guCfcCfgAfgCfuAfgCfcCfcGfgCfdTsdT	1216	GfCfcGfgGfgCfuAfgCfuCfgGfgAfcdTsdT	1217
78	78-96	ccCfgAfgCfuAfgCfcCfcGfgCfgGfdTsdT	1218	CfCfgCfcGfgGfgCfuAfgCfuCfgGfgdTsdT	1219
114	114-132	ggAfcGfaCfaGfgCfcAfcCfuCfgUfdTsdT	1220	AfCfgAfgGfuGfgCfcUfgUfcGfuCfcdTsdT	1221
115	115-133	gaCfgAfcAfgGfcCfaCfcUfcGfuCfdTsdT	1222	GfAfcGfaGfgUfgGfcCfuGfuCfgUfcdTsdT	1223
116	116-134	acGfaCfaGfgCfcAfcCfuCfgUfcGfdTsdT	1224	CfGfaCfgAfgGfuGfgCfcUfgUfcGfudTsdT	1225
117	117-135	cgAfcAfgGfcCfaCfcUfcGfuCfgGfdTsdT	1226	CfCfgAfcGfaGfgUfgGfcCfuGfuCfgdTsdT	1227
118	118-136	gaCfaGfgCfcAfcCfuCfgUfcGfgCfdTsdT	1228	GfCfcGfaCfgAfgGfuGfgCfcUfgUfcdTsdT	1229
120	120-138	caGfgCfcAfcCfuCfgUfcGfgCfgUfdTsdT	1230	AfCfgCfcGfaCfgAfgGfuGfgCfcUfgdTsdT	1231
121	121-139	agGfcCfaCfcUfcGfuCfgGfcGfuCfdTsdT	1232	GfAfcGfcCfgAfcGfaGfgUfgGfcCfudTsdT	1233

[0805]

122	122-140	ggCfcAfcCfuCfgUfcGfgCfgUfcCfdTsdT	1234	GfGfaCfgCfcGfaCfgAfgGfuGfgCfcdTsdT	1235
123	123-141	gcCfaCfcUfcGfuCfgGfcGfuCfcGfdTsdT	1236	CfGfgAfcGfcCfgAfcGfaGfgUfgGfcdTsdT	1237
124	124-142	ccAfcCfuCfgUfcGfgCfgUfcCfgCfdTsdT	1238	GfCfgGfaCfgCfcGfaCfgAfgGfuGfgdTsdT	1239
125	125-143	caCfcUfcGfuCfgGfcGfuCfcGfcCfdTsdT	1240	GfGfcGfgAfcGfcCfgAfcGfaGfgUfgdTsdT	1241
126	126-144	acCfuCfgUfcGfgCfgUfcCfgCfcCfdTsdT	1242	GfGfgCfgGfaCfgCfcGfaCfgAfgGfudTsdT	1243
127	127-145	ccUfcGfuCfgGfcGfuCfcGfcCfcGfdTsdT	1244	CfGfgGfcGfgAfcGfcCfgAfcGfaGfgdTsdT	1245
128	128-146	cuCfgUfcGfgCfgUfcCfgCfcCfgAfdTsdT	1246	UfCfgGfgCfgGfaCfgCfcGfaCfgAfgdTsdT	1247
129	129-147	ucGfuCfgGfcGfuCfcGfcCfcGfaGfdTsdT	1248	CfUfcGfgGfcGfgAfcGfcCfgAfcGfadTsdT	1249
130	130-148	cgUfcGfgCfgUfcCfgCfcCfgAfgUfdTsdT	1250	AfCfuCfgGfgCfgGfaCfgCfcGfaCfgdTsdT	1251
131	131-149	guCfgGfcGfuCfcGfcCfcGfaGfuCfdTsdT	1252	GfAfcUfcGfgGfcGfgAfcGfcCfgAfcdTsdT	1253
132	132-150	ucGfgCfgUfcCfgCfcCfgAfgUfcCfdTsdT	1254	GfGfaCfuCfgGfgCfgGfaCfgCfcGfadTsdT	1255
135	135-153	gcGfuCfcGfcCfcGfaGfuCfcCfcGfdTsdT	1256	CfGfgGfgAfcUfcGfgGfcGfgAfcGfcdTsdT	1257
136	136-154	cgUfcCfgCfcCfgAfgUfcCfcCfgCfdTsdT	1258	GfCfgGfgGfaCfuCfgGfgCfgGfaCfgdTsdT	1259
141	141-159	gcCfcGfaGfuCfcCfcGfcCfuCfgCfdTsdT	1260	GfCfgAfgGfcGfgGfgAfcUfcGfgGfcdTsdT	1261
164	164-182	aaCfgCfcAfcAfaCfcAfcCfgCfgCfdTsdT	1262	GfCfgCfgGfuGfgUfuGfuGfgCfgUfudTsdT	1263
165	165-183	acGfcCfaCfaAfcCfaCfcGfcGfcAfdTsdT	1264	UfGfcGfcGfgUfgGfuUfgUfgGfcGfudTsdT	1265
166	166-184	cgCfcAfcAfaCfcAfcCfgCfgCfaCfdTsdT	1266	GfUfgCfgCfgGfuGfgUfuGfuGfgCfgdTsdT	1267
168	168-186	ccAfcAfaCfcAfcCfgCfgCfaCfgGfdTsdT	1268	CfCfgUfgCfgCfgGfuGfgUfuGfuGfgdTsdT	1269
169	169-187	caCfaAfcCfaCfcGfcGfcAfcGfgCfdTsdT	1270	GfCfcGfuGfcGfcGfgUfgGfuUfgUfgdTsdT	1271

[0806]

170	170-188	acAfaCfcAfcCfgCfgCfaCfgGfcCfdTsdT	1272	GfGfcCfgUfgCfgCfgGfuGfgUfuGfudTsdT	1273
247	247-265	auGfcGfaCfcCfuCfcGfgGfaCfgGfdTsdT	1274	CfCfgUfcCfcGfgAfgGfgUfcGfcAfudTsdT	1275
248	248-266	ugCfgAfcCfcUfcCfgGfgAfcGfgCfdTsdT	1276	GfCfcGfuCfcCfgGfaGfgGfuCfgCfadTsdT	1277
249	249-267	gcGfaCfcCfuCfcGfgGfaCfgGfcCfdTsdT	1278	GfGfcCfgUfcCfcGfgAfgGfgUfcGfcdTsdT	1279
251	251-269	gaCfcCfuCfcGfgGfaCfgGfcCfgGfdTsdT	1280	CfCfgGfcCfgUfcCfcGfgAfgGfgUfcdTsdT	1281
252	252-270	acCfcUfcCfgGfgAfcGfgCfcGfgGfdTsdT	1282	CfCfcGfgCfcGfuCfcCfgGfaGfgGfudTsdT	1283
254	254-272	ccUfcCfgGfgAfcGfgCfcGfgGfgCfdTsdT	1284	GfCfcCfcGfgCfcGfuCfcCfgGfaGfgdTsdT	1285
329	329-347	agAfaAfgUfuUfgCfcAfaGfgCfaCfdTsdT	1286	GfUfgCfcUfuGfgCfaAfaCfuUfuCfudTsdT	1287
330	330-348	gaAfaGfuUfuGfcCfaAfgGfcAfcGfdTsdT	1288	CfGfuGfcCfuUfgGfcAfaAfcUfuUfcdTsdT	1289
332	332-350	aaGfuUfuGfcCfaAfgGfcAfcGfaGfdTsdT	1290	CfUfcGfuGfcCfuUfgGfcAfaAfcUfudTsdT	1291
333	333-351	agUfuUfgCfcAfaGfgCfaCfgAfgUfdTsdT	1292	AfCfuCfgUfgCfcUfuGfgCfaAfaCfudTsdT	1293
334	334-352	guUfuGfcCfaAfgGfcAfcGfaGfuAfdTsdT	1294	UfAfcUfcGfuGfcCfuUfgGfcAfaAfcdTsdT	1295
335	335-353	uuUfgCfcAfaGfgCfaCfgAfgUfaAfdTsdT	1296	UfUfaCfuCfgUfgCfcUfuGfgCfaAfadTsdT	1297
336	336-354	uuGfcCfaAfgGfcAfcGfaGfuAfaCfdTsdT	1298	GfUfuAfcUfcGfuGfcCfuUfgGfcAfadTsdT	1299
337	337-355	ugCfcAfaGfgCfaCfgAfgUfaAfcAfdTsdT	1300	UfGfuUfaCfuCfgUfgCfcUfuGfgCfadTsdT	1301
338	338-356	gcCfaAfgGfcAfcGfaGfuAfaCfaAfdTsdT	1302	UfUfgUfuAfcUfcGfuGfcCfuUfgGfcdTsdT	1303
361	361-379	acGfcAfgUfuGfgGfcAfcUfuUfuGfdTsdT	1304	CfAfaAfaGfuGfcCfcAfaCfuGfcGfudTsdT	1305
362	362-380	cgCfaGfuUfgGfgCfaCfuUfuUfgAfdTsdT	1306	UfCfaAfaAfgUfgCfcCfaAfcUfgCfgdTsdT	1307
363	363-381	gcAfgUfuGfgGfcAfcUfuUfuGfaAfdTsdT	1308	UfUfcAfaAfaGfuGfcCfcAfaCfuGfcdTsdT	1309

[0807]

364	364-382	caGfuUfgGfgCfaCfuUfuUfgAfaGfdTsdT	1310	CfUfuCfaAfaAfgUfgCfcCfaAfcUfgdTsdT	1311
365	365-383	agUfuGfgGfcAfcUfuUfuGfaAfgAfdTsdT	1312	UfCfuUfcAfaAfaGfuGfcCfcAfaCfudTsdT	1313
366	366-384	guUfgGfgCfaCfuUfuUfgAfaGfaUfdTsdT	1314	AfUfcUfuCfaAfaAfgUfgCfcCfaAfcdTsdT	1315
367	367-385	uuGfgGfcAfcUfuUfuGfaAfgAfuCfdTsdT	1316	GfAfuCfuUfcAfaAfaGfuGfcCfcAfadTsdT	1317
368	368-386	ugGfgCfaCfuUfuUfgAfaGfaUfcAfdTsdT	1318	UfGfaUfcUfuCfaAfaAfgUfgCfcCfadTsdT	1319
369	369-387	ggGfcAfcUfuUfuGfaAfgAfuCfaUfdTsdT	1320	AfUfgAfuCfuUfcAfaAfaGfuGfcCfcdTsdT	1321
377	377-395	uuGfaAfgAfuCfaUfuUfuCfuCfaGfdTsdT	1322	CfUfgAfgAfaAfaUfgAfuCfuUfcAfadTsdT	1323
379	379-397	gaAfgAfuCfaUfuUfuCfuCfaGfcCfdTsdT	1324	GfGfcUfgAfgAfaAfaUfgAfuCfuUfcdTsdT	1325
380	380-398	aaGfaUfcAfuUfuUfcUfcAfgCfcUfdTsdT	1326	AfGfgCfuGfaGfaAfaAfuGfaUfcUfudTsdT	1327
385	385-403	caUfuUfuCfuCfaGfcCfuCfcAfgAfdTsdT	1328	UfCfuGfgAfgGfcUfgAfgAfaAfaUfgdTsdT	1329
394	394-412	agCfcUfcCfaGfaGfgAfuGfuUfcAfdTsdT	1330	UfGfaAfcAfuCfcUfcUfgGfaGfgCfudTsdT	1331
396	396-414	ccUfcCfaGfaGfgAfuGfuUfcAfaUfdTsdT	1332	AfUfuGfaAfcAfuCfcUfcUfgGfaGfgdTsdT	1333
397	397-415	cuCfcAfgAfgGfaUfgUfuCfaAfuAfdTsdT	1334	UfAfuUfgAfaCfaUfcCfuCfuGfgAfgdTsdT	1335
401	401-419	agAfgGfaUfgUfuCfaAfuAfaCfuGfdTsdT	1336	CfAfgUfuAfuUfgAfaCfaUfcCfuCfudTsdT	1337
403	403-421	agGfaUfgUfuCfaAfuAfaCfuGfuGfdTsdT	1338	CfAfcAfgUfuAfuUfgAfaCfaUfcCfudTsdT	1339
407	407-425	ugUfuCfaAfuAfaCfuGfuGfaGfgUfdTsdT	1340	AfCfcUfcAfcAfgUfuAfuUfgAfaCfadTsdT	1341
409	409-427	uuCfaAfuAfaCfuGfuGfaGfgUfgGfdTsdT	1342	CfCfaCfcUfcAfcAfgUfuAfuUfgAfadTsdT	1343
410	410-428	ucAfaUfaAfcUfgUfgAfgGfuGfgUfdTsdT	1344	AfCfcAfcCfuCfaCfaGfuUfaUfuGfadTsdT	1345
411	411-429	caAfuAfaCfuGfuGfaGfgUfgGfuCfdTsdT	1346	GfAfcCfaCfcUfcAfcAfgUfuAfuUfgdTsdT	1347

[0808]

412	412-430	aaUfaAfcUfgUfgAfgGfuGfgUfcCfdTsdT	1348	GfGfaCfcAfcCfuCfaCfaGfuUfaUfudTsdT	1349
413	413-431	auAfaCfuGfuGfaGfgUfgGfuCfcUfdTsdT	1350	AfGfgAfcCfaCfcUfcAfcAfgUfuAfudTsdT	1351
414	414-432	uaAfcUfgUfgAfgGfuGfgUfcCfuUfdTsdT	1352	AfAfgGfaCfcAfcCfuCfaCfaGfuUfadTsdT	1353
416	416-434	acUfgUfgAfgGfuGfgUfcCfuUfgGfdTsdT	1354	CfCfaAfgGfaCfcAfcCfuCfaCfaGfudTsdT	1355
418	418-436	ugUfgAfgGfuGfgUfcCfuUfgGfgAfdTsdT	1356	UfCfcCfaAfgGfaCfcAfcCfuCfaCfadTsdT	1357
419	419-437	guGfaGfgUfgGfuCfcUfuGfgGfaAfdTsdT	1358	UfUfcCfcAfaGfgAfcCfaCfcUfcAfcdTsdT	1359
425	425-443	ugGfuCfcUfuGfgGfaAfuUfuGfgAfdTsdT	1360	UfCfcAfaAfuUfcCfcAfaGfgAfcCfadTsdT	1361
431	431-449	uuGfgGfaAfuUfuGfgAfaAfuUfaCfdTsdT	1362	GfUfaAfuUfuCfcAfaAfuUfcCfcAfadTsdT	1363
432	432-450	ugGfgAfaUfuUfgGfaAfaUfuAfcCfdTsdT	1364	GfGfuAfaUfuUfcCfaAfaUfuCfcCfadTsdT	1365
433	433-451	ggGfaAfuUfuGfgAfaAfuUfaCfcUfdTsdT	1366	AfGfgUfaAfuUfuCfcAfaAfuUfcCfcdTsdT	1367
434	434-452	ggAfaUfuUfgGfaAfaUfuAfcCfuAfdTsdT	1368	UfAfgGfuAfaUfuUfcCfaAfaUfuCfcdTsdT	1369
458	458-476	agAfgGfaAfuUfaUfgAfuCfuUfuCfdTsdT	1370	GfAfaAfgAfuCfaUfaAfuUfcCfuCfudTsdT	1371
459	459-477	gaGfgAfaUfuAfuGfaUfcUfuUfcCfdTsdT	1372	GfGfaAfaGfaUfcAfuAfaUfuCfcUfcdTsdT	1373
463	463-481	aaUfuAfuGfaUfcUfuUfcCfuUfcUfdTsdT	1374	AfGfaAfgGfaAfaGfaUfcAfuAfaUfudTsdT	1375
464	464-482	auUfaUfgAfuCfuUfuCfcUfuCfuUfdTsdT	1376	AfAfgAfaGfgAfaAfgAfuCfaUfaAfudTsdT	1377
466	466-484	uaUfgAfuCfuUfuCfcUfuCfuUfaAfdTsdT	1378	UfUfaAfgAfaGfgAfaAfgAfuCfaUfadTsdT	1379
468	468-486	ugAfuCfuUfuCfcUfuCfuUfaAfaGfdTsdT	1380	CfUfuUfaAfgAfaGfgAfaAfgAfuCfadTsdT	1381
471	471-489	ucUfuUfcCfuUfcUfuAfaAfgAfcCfdTsdT	1382	GfGfuCfuUfuAfaGfaAfgGfaAfaGfadTsdT	1383
476	476-494	ccUfuCfuUfaAfaGfaCfcAfuCfcAfdTsdT	1384	UfGfgAfuGfgUfcUfuUfaAfgAfaGfgdTsdT	1385

[0809]

477	477-495	cuUfcUfuAfaAfgAfcCfaUfcCfaGfdTsdT	1386	CfUfgGfaUfgGfuCfuUfuAfaGfaAfgdTsdT	1387
479	479-497	ucUfuAfaAfgAfcCfaUfcCfaGfgAfdTsdT	1388	UfCfcUfgGfaUfgGfuCfuUfuAfaGfadTsdT	1389
481	481-499	uuAfaAfgAfcCfaUfcCfaGfgAfgGfdTsdT	1390	CfCfuCfcUfgGfaUfgGfuCfuUfuAfadTsdT	1391
482	482-500	uaAfaGfaCfcAfuCfcAfgGfaGfgUfdTsdT	1392	AfCfcUfcCfuGfgAfuGfgUfcUfuUfadTsdT	1393
492	492-510	ccAfgGfaGfgUfgGfcUfgGfuUfaUfdTsdT	1394	AfUfaAfcCfaGfcCfaCfcUfcCfuGfgdTsdT	1395
493	493-511	caGfgAfgGfuGfgCfuGfgUfuAfuGfdTsdT	1396	CfAfuAfaCfcAfgCfcAfcCfuCfcUfgdTsdT	1397
494	494-512	agGfaGfgUfgGfcUfgGfuUfaUfgUfdTsdT	1398	AfCfaUfaAfcCfaGfcCfaCfcUfcCfudTsdT	1399
495	495-513	ggAfgGfuGfgCfuGfgUfuAfuGfuCfdTsdT	1400	GfAfcAfuAfaCfcAfgCfcAfcCfuCfcdTsdT	1401
496	496-514	gaGfgUfgGfcUfgGfuUfaUfgUfcCfdTsdT	1402	GfGfaCfaUfaAfcCfaGfcCfaCfcUfcdTsdT	1403
497	497-515	agGfuGfgCfuGfgUfuAfuGfuCfcUfdTsdT	1404	AfGfgAfcAfuAfaCfcAfgCfcAfcCfudTsdT	1405
499	499-517	guGfgCfuGfgUfuAfuGfuCfcUfcAfdTsdT	1406	UfGfaGfgAfcAfuAfaCfcAfgCfcAfcdTsdT	1407
520	520-538	gcCfcUfcAfaCfaCfaGfuGfgAfgCfdTsdT	1408	GfCfuCfcAfcUfgUfgUfuGfaGfgGfcdTsdT	1409
542	542-560	uuCfcUfuUfgGfaAfaAfcCfuGfcAfdTsdT	1410	UfGfcAfgGfuUfuUfcCfaAfaGfgAfadTsdT	1411
543	543-561	ucCfuUfuGfgAfaAfaCfcUfgCfaGfdTsdT	1412	CfUfgCfaGfgUfuUfuCfcAfaAfgGfadTsdT	1413
550	550-568	gaAfaAfcCfuGfcAfgAfuCfaUfcAfdTsdT	1414	UfGfaUfgAfuCfuGfcAfgGfuUfuUfcdTsdT	1415
551	551-569	aaAfaCfcUfgCfaGfaUfcAfuCfaGfdTsdT	1416	CfUfgAfuGfaUfcUfgCfaGfgUfuUfudTsdT	1417
553	553-571	aaCfcUfgCfaGfaUfcAfuCfaGfaGfdTsdT	1418	CfUfcUfgAfuGfaUfcUfgCfaGfgUfudTsdT	1419
556	556-574	cuGfcAfgAfuCfaUfcAfgAfgGfaAfdTsdT	1420	UfUfcCfuCfuGfaUfgAfuCfuGfcAfgdTsdT	1421
586	586-604	gaAfaAfuUfcCfuAfuGfcCfuUfaGfdTsdT	1422	CfUfaAfgGfcAfuAfgGfaAfuUfuUfcdTsdT	1423

[0810]

587	587-605	aaAfaUfuCfcUfaUfgCfcUfuAfgCfdTsdT	1424	GfCfuAfaGfgCfaUfaGfgAfaUfuUfudTsdT	1425
589	589-607	aaUfuCfcUfaUfgCfcUfuAfgCfaGfdTsdT	1426	CfUfgCfuAfaGfgCfaUfaGfgAfaUfudTsdT	1427
592	592-610	ucCfuAfuGfcCfuUfaGfcAfgUfcUfdTsdT	1428	AfGfaCfuGfcUfaAfgGfcAfuAfgGfadTsdT	1429
593	593-611	ccUfaUfgCfcUfuAfgCfaGfuCfuUfdTsdT	1430	AfAfgAfcUfgCfuAfaGfgCfaUfaGfgdTsdT	1431
594	594-612	cuAfuGfcCfuUfaGfcAfgUfcUfuAfdTsdT	1432	UfAfaGfaCfuGfcUfaAfgGfcAfuAfgdTsdT	1433
596	596-614	auGfcCfuUfaGfcAfgUfcUfuAfuCfdTsdT	1434	GfAfuAfaGfaCfuGfcUfaAfgGfcAfudTsdT	1435
597	597-615	ugCfcUfuAfgCfaGfuCfuUfaUfcUfdTsdT	1436	AfGfaUfaAfgAfcUfgCfuAfaGfgCfadTsdT	1437
598	598-616	gcCfuUfaGfcAfgUfcUfuAfuCfuAfdTsdT	1438	UfAfgAfuAfaGfaCfuGfcUfaAfgGfcdTsdT	1439
599	599-617	ccUfuAfgCfaGfuCfuUfaUfcUfaAfdTsdT	1440	UfUfaGfaUfaAfgAfcUfgCfuAfaGfgdTsdT	1441
600	600-618	cuUfaGfcAfgUfcUfuAfuCfuAfaCfdTsdT	1442	GfUfuAfgAfuAfaGfaCfuGfcUfaAfgdTsdT	1443
601	601-619	uuAfgCfaGfuCfuUfaUfcUfaAfcUfdTsdT	1444	AfGfuUfaGfaUfaAfgAfcUfgCfuAfadTsdT	1445
602	602-620	uaGfcAfgUfcUfuAfuCfuAfaCfuAfdTsdT	1446	UfAfgUfuAfgAfuAfaGfaCfuGfcUfadTsdT	1447
603	603-621	agCfaGfuCfuUfaUfcUfaAfcUfaUfdTsdT	1448	AfUfaGfuUfaGfaUfaAfgAfcUfgCfudTsdT	1449
604	604-622	gcAfgUfcUfuAfuCfuAfaCfuAfuGfdTsdT	1450	CfAfuAfgUfuAfgAfuAfaGfaCfuGfcdTsdT	1451
605	605-623	caGfuCfuUfaUfcUfaAfcUfaUfgAfdTsdT	1452	UfCfaUfaGfuUfaGfaUfaAfgAfcUfgdTsdT	1453
608	608-626	ucUfuAfuCfuAfaCfuAfuGfaUfgCfdTsdT	1454	GfCfaUfcAfuAfgUfuAfgAfuAfaGfadTsdT	1455
609	609-627	cuUfaUfcUfaAfcUfaUfgAfuGfcAfdTsdT	1456	UfGfcAfuCfaUfaGfuUfaGfaUfaAfgdTsdT	1457
610	610-628	uuAfuCfuAfaCfuAfuGfaUfgCfaAfdTsdT	1458	UfUfgCfaUfcAfuAfgUfuAfgAfuAfadTsdT	1459
611	611-629	uaUfcUfaAfcUfaUfgAfuGfcAfaAfdTsdT	1460	UfUfuGfcAfuCfaUfaGfuUfaGfaUfadTsdT	1461

[0811]

612	612-630	auCfuAfaCfuAfuGfaUfgCfaAfaUfdTsdT	1462	AfUfuUfgCfaUfcAfuAfgUfuAfgAfudTsdT	1463
613	613-631	ucUfaAfcUfaUfgAfuGfcAfaAfuAfdTsdT	1464	UfAfuUfuGfcAfuCfaUfaGfuUfaGfadTsdT	1465
614	614-632	cuAfaCfuAfuGfaUfgCfaAfaUfaAfdTsdT	1466	UfUfaUfuUfgCfaUfcAfuAfgUfuAfgdTsdT	1467
616	616-634	aaCfuAfuGfaUfgCfaAfaUfaAfaAfdTsdT	1468	UfUfuUfaUfuUfgCfaUfcAfuAfgUfudTsdT	1469
622	622-640	gaUfgCfaAfaUfaAfaAfcCfgGfaCfdTsdT	1470	GfUfcCfgGfuUfuUfaUfuUfgCfaUfcdTsdT	1471
623	623-641	auGfcAfaAfuAfaAfaCfcGfgAfcUfdTsdT	1472	AfGfuCfcGfgUfuUfuAfuUfuGfcAfudTsdT	1473
624	624-642	ugCfaAfaUfaAfaAfcCfgGfaCfuGfdTsdT	1474	CfAfgUfcCfgGfuUfuUfaUfuUfgCfadTsdT	1475
626	626-644	caAfaUfaAfaAfcCfgGfaCfuGfaAfdTsdT	1476	UfUfcAfgUfcCfgGfuUfuUfaUfuUfgdTsdT	1477
627	627-645	aaAfuAfaAfaCfcGfgAfcUfgAfaGfdTsdT	1478	CfUfuCfaGfuCfcGfgUfuUfuAfuUfudTsdT	1479
628	628-646	aaUfaAfaAfcCfgGfaCfuGfaAfgGfdTsdT	1480	CfCfuUfcAfgUfcCfgGfuUfuUfaUfudTsdT	1481
630	630-648	uaAfaAfcCfgGfaCfuGfaAfgGfaGfdTsdT	1482	CfUfcCfuUfcAfgUfcCfgGfuUfuUfadTsdT	1483
631	631-649	aaAfaCfcGfgAfcUfgAfaGfgAfgCfdTsdT	1484	GfCfuCfcUfuCfaGfuCfcGfgUfuUfudTsdT	1485
632	632-650	aaAfcCfgGfaCfuGfaAfgGfaGfcUfdTsdT	1486	AfGfcUfcCfuUfcAfgUfcCfgGfuUfudTsdT	1487
633	633-651	aaCfcGfgAfcUfgAfaGfgAfgCfuGfdTsdT	1488	CfAfgCfuCfcUfuCfaGfuCfcGfgUfudTsdT	1489
644	644-662	agGfaGfcUfgCfcCfaUfgAfgAfaAfdTsdT	1490	UfUfuCfuCfaUfgGfgCfaGfcUfcCfudTsdT	1491
665	665-683	uaCfaGfgAfaAfuCfcUfgCfaUfgGfdTsdT	1492	CfCfaUfgCfaGfgAfuUfuCfcUfgUfadTsdT	1493
668	668-686	agGfaAfaUfcCfuGfcAfuGfgCfgCfdTsdT	1494	GfCfgCfcAfuGfcAfgGfaUfuUfcCfudTsdT	1495
669	669-687	ggAfaAfuCfcUfgCfaUfgGfcGfcCfdTsdT	1496	GfGfcGfcCfaUfgCfaGfgAfuUfuCfcdTsdT	1497
670	670-688	gaAfaUfcCfuGfcAfuGfgCfgCfcGfdTsdT	1498	CfGfgCfgCfcAfuGfcAfgGfaUfuUfcdTsdT	1499

[0812]

671	671-689	aaAfuCfcUfgCfaUfgGfcGfcCfgUfdTsdT	1500	AfCfgGfcGfcCfaUfgCfaGfgAfuUfudTsdT	1501
672	672-690	aaUfcCfuGfcAfuGfgCfgCfcGfuGfdTsdT	1502	CfAfcGfgCfgCfcAfuGfcAfgGfaUfudTsdT	1503
674	674-692	ucCfuGfcAfuGfgCfgCfcGfuGfcGfdTsdT	1504	CfGfcAfcGfgCfgCfcAfuGfcAfgGfadTsdT	1505
676	676-694	cuGfcAfuGfgCfgCfcGfuGfcGfgUfdTsdT	1506	AfCfcGfcAfcGfgCfgCfcAfuGfcAfgdTsdT	1507
677	677-695	ugCfaUfgGfcGfcCfgUfgCfgGfuUfdTsdT	1508	AfAfcCfgCfaCfgGfcGfcCfaUfgCfadTsdT	1509
678	678-696	gcAfuGfgCfgCfcGfuGfcGfgUfuCfdTsdT	1510	GfAfaCfcGfcAfcGfgCfgCfcAfuGfcdTsdT	1511
680	680-698	auGfgCfgCfcGfuGfcGfgUfuCfaGfdTsdT	1512	CfUfgAfaCfcGfcAfcGfgCfgCfcAfudTsdT	1513
681	681-699	ugGfcGfcCfgUfgCfgGfuUfcAfgCfdTsdT	1514	GfCfuGfaAfcCfgCfaCfgGfcGfcCfadTsdT	1515
682	682-700	ggCfgCfcGfuGfcGfgUfuCfaGfcAfdTsdT	1516	UfGfcUfgAfaCfcGfcAfcGfgCfgCfcdTsdT	1517
683	683-701	gcGfcCfgUfgCfgGfuUfcAfgCfaAfdTsdT	1518	UfUfgCfuGfaAfcCfgCfaCfgGfcGfcdTsdT	1519
684	684-702	cgCfcGfuGfcGfgUfuCfaGfcAfaCfdTsdT	1520	GfUfuGfcUfgAfaCfcGfcAfcGfgCfgdTsdT	1521
685	685-703	gcCfgUfgCfgGfuUfcAfgCfaAfcAfdTsdT	1522	UfGfuUfgCfuGfaAfcCfgCfaCfgGfcdTsdT	1523
686	686-704	ccGfuGfcGfgUfuCfaGfcAfaCfaAfdTsdT	1524	UfUfgUfuGfcUfgAfaCfcGfcAfcGfgdTsdT	1525
688	688-706	guGfcGfgUfuCfaGfcAfaCfaAfcCfdTsdT	1526	GfGfuUfgUfuGfcUfgAfaCfcGfcAfcdTsdT	1527
690	690-708	gcGfgUfuCfaGfcAfaCfaAfcCfcUfdTsdT	1528	AfGfgGfuUfgUfuGfcUfgAfaCfcGfcdTsdT	1529
692	692-710	ggUfuCfaGfcAfaCfaAfcCfcUfgCfdTsdT	1530	GfCfaGfgGfuUfgUfuGfcUfgAfaCfcdTsdT	1531
698	698-716	gcAfaCfaAfcCfcUfgCfcCfuGfuGfdTsdT	1532	CfAfcAfgGfgCfaGfgGfuUfgUfuGfcdTsdT	1533
700	700-718	aaCfaAfcCfcUfgCfcCfuGfuGfcAfdTsdT	1534	UfGfcAfcAfgGfgCfaGfgGfuUfgUfudTsdT	1535
719	719-737	acGfuGfgAfgAfgCfaUfcCfaGfuGfdTsdT	1536	CfAfcUfgGfaUfgCfuCfuCfcAfcGfudTsdT	1537

[0813]

720	720-738	cgUfgGfaGfaGfcAfuCfcAfgUfgGfdTsdT	1538	CfCfaCfuGfgAfuGfcUfcUfcCfaCfgdTsdT	1539
721	721-739	guGfgAfgAfgCfaUfcCfaGfuGfgCfdTsdT	1540	GfCfcAfcUfgGfaUfgCfuCfuCfcAfcdTsdT	1541
724	724-742	gaGfaGfcAfuCfcAfgUfgGfcGfgGfdTsdT	1542	CfCfcGfcCfaCfuGfgAfuGfcUfcUfcdTsdT	1543
725	725-743	agAfgCfaUfcCfaGfuGfgCfgGfgAfdTsdT	1544	UfCfcCfgCfcAfcUfgGfaUfgCfuCfudTsdT	1545
726	726-744	gaGfcAfuCfcAfgUfgGfcGfgGfaCfdTsdT	1546	GfUfcCfcGfcCfaCfuGfgAfuGfcUfcdTsdT	1547
733	733-751	caGfuGfgCfgGfgAfcAfuAfgUfcAfdTsdT	1548	UfGfaCfuAfuGfuCfcCfgCfcAfcUfgdTsdT	1549
734	734-752	agUfgGfcGfgGfaCfaUfaGfuCfaGfdTsdT	1550	CfUfgAfcUfaUfgUfcCfcGfcCfaCfudTsdT	1551
736	736-754	ugGfcGfgGfaCfaUfaGfuCfaGfcAfdTsdT	1552	UfGfcUfgAfcUfaUfgUfcCfcGfcCfadTsdT	1553
737	737-755	ggCfgGfgAfcAfuAfgUfcAfgCfaGfdTsdT	1554	CfUfgCfuGfaCfuAfuGfuCfcCfgCfcdTsdT	1555
763	763-781	cuCfaGfcAfaCfaUfgUfcGfaUfgGfdTsdT	1556	CfCfaUfcGfaCfaUfgUfuGfcUfgAfgdTsdT	1557
765	765-783	caGfcAfaCfaUfgUfcGfaUfgGfaCfdTsdT	1558	GfUfcCfaUfcGfaCfaUfgUfuGfcUfgdTsdT	1559
766	766-784	agCfaAfcAfuGfuCfgAfuGfgAfcUfdTsdT	1560	AfGfuCfcAfuCfgAfcAfuGfuUfgCfudTsdT	1561
767	767-785	gcAfaCfaUfgUfcGfaUfgGfaCfuUfdTsdT	1562	AfAfgUfcCfaUfcGfaCfaUfgUfuGfcdTsdT	1563
769	769-787	aaCfaUfgUfcGfaUfgGfaCfuUfcCfdTsdT	1564	GfGfaAfgUfcCfaUfcGfaCfaUfgUfudTsdT	1565
770	770-788	acAfuGfuCfgAfuGfgAfcUfuCfcAfdTsdT	1566	UfGfgAfaGfuCfcAfuCfgAfcAfuGfudTsdT	1567
771	771-789	caUfgUfcGfaUfgGfaCfuUfcCfaGfdTsdT	1568	CfUfgGfaAfgUfcCfaUfcGfaCfaUfgdTsdT	1569
772	772-790	auGfuCfgAfuGfgAfcUfuCfcAfgAfdTsdT	1570	UfCfuGfgAfaGfuCfcAfuCfgAfcAfudTsdT	1571
775	775-793	ucGfaUfgGfaCfuUfcCfaGfaAfcCfdTsdT	1572	GfGfuUfcUfgGfaAfgUfcCfaUfcGfadTsdT	1573
789	789-807	gaAfcCfaCfcUfgGfgCfaGfcUfgCfdTsdT	1574	GfCfaGfcUfgCfcCfaGfgUfgGfuUfcdTsdT	1575

[0814]

798	798-816	ggGfcAfgCfuGfcCfaAfaAfgUfgUfdTsdT	1576	AfCfaCfuUfuUfgGfcAfgCfuGfcCfcdTsdT	1577
800	800-818	gcAfgCfuGfcCfaAfaAfgUfgUfgAfdTsdT	1578	UfCfaCfaCfuUfuUfgGfcAfgCfuGfcdTsdT	1579
805	805-823	ugCfcAfaAfaGfuGfuGfaUfcCfaAfdTsdT	1580	UfUfgGfaUfcAfcAfcUfuUfuGfgCfadTsdT	1581
806	806-824	gcCfaAfaAfgUfgUfgAfuCfcAfaGfdTsdT	1582	CfUfuGfgAfuCfaCfaCfuUfuUfgGfcdTsdT	1583
807	807-825	ccAfaAfaGfuGfuGfaUfcCfaAfgCfdTsdT	1584	GfCfuUfgGfaUfcAfcAfcUfuUfuGfgdTsdT	1585
810	810-828	aaAfgUfgUfgAfuCfcAfaGfcUfgUfdTsdT	1586	AfCfaGfcUfuGfgAfuCfaCfaCfuUfudTsdT	1587
814	814-832	ugUfgAfuCfcAfaGfcUfgUfcCfcAfdTsdT	1588	UfGfgGfaCfaGfcUfuGfgAfuCfaCfadTsdT	1589
815	815-833	guGfaUfcCfaAfgCfuGfuCfcCfaAfdTsdT	1590	UfUfgGfgAfcAfgCfuUfgGfaUfcAfcdTsdT	1591
817	817-835	gaUfcCfaAfgCfuGfuCfcCfaAfuGfdTsdT	1592	CfAfuUfgGfgAfcAfgCfuUfgGfaUfcdTsdT	1593
818	818-836	auCfcAfaGfcUfgUfcCfcAfaUfgGfdTsdT	1594	CfCfaUfuGfgGfaCfaGfcUfuGfgAfudTsdT	1595
819	819-837	ucCfaAfgCfuGfuCfcCfaAfuGfgGfdTsdT	1596	CfCfcAfuUfgGfgAfcAfgCfuUfgGfadTsdT	1597
820	820-838	ccAfaGfcUfgUfcCfcAfaUfgGfgAfdTsdT	1598	UfCfcCfaUfuGfgGfaCfaGfcUfuGfgdTsdT	1599
821	821-839	caAfgCfuGfuCfcCfaAfuGfgGfaGfdTsdT	1600	CfUfcCfcAfuUfgGfgAfcAfgCfuUfgdTsdT	1601
823	823-841	agCfuGfuCfcCfaAfuGfgGfaGfcUfdTsdT	1602	AfGfcUfcCfcAfuUfgGfgAfcAfgCfudTsdT	1603
826	826-844	ugUfcCfcAfaUfgGfgAfgCfuGfcUfdTsdT	1604	AfGfcAfgCfuCfcCfaUfuGfgGfaCfadTsdT	1605
847	847-865	ggUfgCfaGfgAfgAfgGfaGfaAfcUfdTsdT	1606	AfGfuUfcUfcCfuCfuCfcUfgCfaCfcdTsdT	1607
871	871-889	aaAfcUfgAfcCfaAfaAfuCfaUfcUfdTsdT	1608	AfGfaUfgAfuUfuUfgGfuCfaGfuUfudTsdT	1609
872	872-890	aaCfuGfaCfcAfaAfaUfcAfuCfuGfdTsdT	1610	CfAfgAfuGfaUfuUfuGfgUfcAfgUfudTsdT	1611
873	873-891	acUfgAfcCfaAfaAfuCfaUfcUfgUfdTsdT	1612	AfCfaGfaUfgAfuUfuUfgGfuCfaGfudTsdT	1613

[0815]

877	877-895	acCfaAfaAfuCfaUfcUfgUfgCfcCfdTsdT	1614	GfGfgCfaCfaGfaUfgAfuUfuUfgGfudTsdT	1615
878	878-896	ccAfaAfaUfcAfuCfuGfuGfcCfcAfdTsdT	1616	UfGfgGfcAfcAfgAfuGfaUfuUfuGfgdTsdT	1617
881	881-899	aaAfuCfaUfcUfgUfgCfcCfaGfcAfdTsdT	1618	UfGfcUfgGfgCfaCfaGfaUfgAfuUfudTsdT	1619
890	890-908	guGfcCfcAfgCfaGfuGfcUfcCfgGfdTsdT	1620	CfCfgGfaGfcAfcUfgCfuGfgGfcAfcdTsdT	1621
892	892-910	gcCfcAfgCfaGfuGfcUfcCfgGfgCfdTsdT	1622	GfCfcCfgGfaGfcAfcUfgCfuGfgGfcdTsdT	1623
929	929-947	ccAfgUfgAfcUfgCfuGfcCfaCfaAfdTsdT	1624	UfUfgUfgGfcAfgCfaGfuCfaCfuGfgdTsdT	1625
930	930-948	caGfuGfaCfuGfcUfgCfcAfcAfaCfdTsdT	1626	GfUfuGfuGfgCfaGfcAfgUfcAfcUfgdTsdT	1627
979	979-997	gaGfaGfcGfaCfuGfcCfuGfgUfcUfdTsdT	1628	AfGfaCfcAfgGfcAfgUfcGfcUfcUfcdTsdT	1629
980	980-998	agAfgCfgAfcUfgCfcUfgGfuCfuGfdTsdT	1630	CfAfgAfcCfaGfgCfaGfuCfgCfuCfudTsdT	1631
981	981-999	gaGfcGfaCfuGfcCfuGfgUfcUfgCfdTsdT	1632	GfCfaGfaCfcAfgGfcAfgUfcGfcUfcdTsdT	1633
982	982-1000	agCfgAfcUfgCfcUfgGfuCfuGfcCfdTsdT	1634	GfGfcAfgAfcCfaGfgCfaGfuCfgCfudTsdT	1635
983	983-1001	gcGfaCfuGfcCfuGfgUfcUfgCfcGfdTsdT	1636	CfGfgCfaGfaCfcAfgGfcAfgUfcGfcdTsdT	1637
984	984-1002	cgAfcUfgCfcUfgGfuCfuGfcCfgCfdTsdT	1638	GfCfgGfcAfgAfcCfaGfgCfaGfuCfgdTsdT	1639
989	989-1007	gcCfuGfgUfcUfgCfcGfcAfaAfuUfdTsdT	1640	AfAfuUfuGfcGfgCfaGfaCfcAfgGfcdTsdT	1641
990	990-1008	ccUfgGfuCfuGfcCfgCfaAfaUfuCfdTsdT	1642	GfAfaUfuUfgCfgGfcAfgAfcCfaGfgdTsdT	1643
991	991-1009	cuGfgUfcUfgCfcGfcAfaAfuUfcCfdTsdT	1644	GfGfaAfuUfuGfcGfgCfaGfaCfcAfgdTsdT	1645
992	992-1010	ugGfuCfuGfcCfgCfaAfaUfuCfcGfdTsdT	1646	CfGfgAfaUfuUfgCfgGfcAfgAfcCfadTsdT	1647
994	994-1012	guCfuGfcCfgCfaAfaUfuCfcGfaGfdTsdT	1648	CfUfcGfgAfaUfuUfgCfgGfcAfgAfcdTsdT	1649
995	995-1013	ucUfgCfcGfcAfaAfuUfcCfgAfgAfdTsdT	1650	UfCfuCfgGfaAfuUfuGfcGfgCfaGfadTsdT	1651

[0816]

996	996-1014	cuGfcCfgCfaAfaUfuCfcGfaGfaCfdTsdT	1652	GfUfcUfcGfgAfaUfuUfgCfgGfcAfgdTsdT	1653
997	997-1015	ugCfcGfcAfaAfuUfcCfgAfgAfcGfdTsdT	1654	CfGfuCfuCfgGfaAfuUfuGfcGfgCfadTsdT	1655
999	999-1017	ccGfcAfaAfuUfcCfgAfgAfcGfaAfdTsdT	1656	UfUfcGfuCfuCfgGfaAfuUfuGfcGfgdTsdT	1657
1004	1004-1022	aaUfuCfcGfaGfaCfgAfaGfcCfaCfdTsdT	1658	GfUfgGfcUfuCfgUfcUfcGfgAfaUfudTsdT	1659
1005	1005-1023	auUfcCfgAfgAfcGfaAfgCfcAfcGfdTsdT	1660	CfGfuGfgCfuUfcGfuCfuCfgGfaAfudTsdT	1661
1006	1006-1024	uuCfcGfaGfaCfgAfaGfcCfaCfgUfdTsdT	1662	AfCfgUfgGfcUfuCfgUfcUfcGfgAfadTsdT	1663
1007	1007-1025	ucCfgAfgAfcGfaAfgCfcAfcGfuGfdTsdT	1664	CfAfcGfuGfgCfuUfcGfuCfuCfgGfadTsdT	1665
1008	1008-1026	ccGfaGfaCfgAfaGfcCfaCfgUfgCfdTsdT	1666	GfCfaCfgUfgGfcUfuCfgUfcUfcGfgdTsdT	1667
1010	1010-1028	gaGfaCfgAfaGfcCfaCfgUfgCfaAfdTsdT	1668	UfUfgCfaCfgUfgGfcUfuCfgUfcUfcdTsdT	1669
1013	1013-1031	acGfaAfgCfcAfcGfuGfcAfaGfgAfdTsdT	1670	UfCfcUfuGfcAfcGfuGfgCfuUfcGfudTsdT	1671
1014	1014-1032	cgAfaGfcCfaCfgUfgCfaAfgGfaCfdTsdT	1672	GfUfcCfuUfgCfaCfgUfgGfcUfuCfgdTsdT	1673
1015	1015-1033	gaAfgCfcAfcGfuGfcAfaGfgAfcAfdTsdT	1674	UfGfuCfcUfuGfcAfcGfuGfgCfuUfcdTsdT	1675
1016	1016-1034	aaGfcCfaCfgUfgCfaAfgGfaCfaCfdTsdT	1676	GfUfgUfcCfuUfgCfaCfgUfgGfcUfudTsdT	1677
1040	1040-1058	ccCfcAfcUfcAfuGfcUfcUfaCfaAfdTsdT	1678	UfUfgUfaGfaGfcAfuGfaGfuGfgGfgdTsdT	1679
1042	1042-1060	ccAfcUfcAfuGfcUfcUfaCfaAfcCfdTsdT	1680	GfGfuUfgUfaGfaGfcAfuGfaGfuGfgdTsdT	1681
1044	1044-1062	acUfcAfuGfcUfcUfaCfaAfcCfcCfdTsdT	1682	GfGfgGfuUfgUfaGfaGfcAfuGfaGfudTsdT	1683
1047	1047-1065	caUfgCfuCfuAfcAfaCfcCfcAfcCfdTsdT	1684	GfGfuGfgGfgUfuGfuAfgAfgCfaUfgdTsdT	1685
1071	1071-1089	ccAfgAfuGfgAfuGfuGfaAfcCfcCfdTsdT	1686	GfGfgGfuUfcAfcAfuCfcAfuCfuGfgdTsdT	1687
1073	1073-1091	agAfuGfgAfuGfuGfaAfcCfcCfgAfdTsdT	1688	UfCfgGfgGfuUfcAfcAfuCfcAfuCfudTsdT	1689

[0817]

1074	1074-1092	gaUfgGfaUfgUfgAfaCfcCfcGfaGfdTsdT	1690	CfUfcGfgGfgUfuCfaCfaUfcCfaUfcdTsdT	1691
1075	1075-1093	auGfgAfuGfuGfaAfcCfcCfgAfgGfdTsdT	1692	CfCfuCfgGfgGfuUfcAfcAfuCfcAfudTsdT	1693
1077	1077-1095	ggAfuGfuGfaAfcCfcCfgAfgGfgCfdTsdT	1694	GfCfcCfuCfgGfgGfuUfcAfcAfuCfcdTsdT	1695
1078	1078-1096	gaUfgUfgAfaCfcCfcGfaGfgGfcAfdTsdT	1696	UfGfcCfcUfcGfgGfgUfuCfaCfaUfcdTsdT	1697
1080	1080-1098	ugUfgAfaCfcCfcGfaGfgGfcAfaAfdTsdT	1698	UfUfuGfcCfcUfcGfgGfgUfuCfaCfadTsdT	1699
1084	1084-1102	aaCfcCfcGfaGfgGfcAfaAfuAfcAfdTsdT	1700	UfGfuAfuUfuGfcCfcUfcGfgGfgUfudTsdT	1701
1085	1085-1103	acCfcCfgAfgGfgCfaAfaUfaCfaGfdTsdT	1702	CfUfgUfaUfuUfgCfcCfuCfgGfgGfudTsdT	1703
1087	1087-1105	ccCfgAfgGfgCfaAfaUfaCfaGfcUfdTsdT	1704	AfGfcUfgUfaUfuUfgCfcCfuCfgGfgdTsdT	1705
1088	1088-1106	ccGfaGfgGfcAfaAfuAfcAfgCfuUfdTsdT	1706	AfAfgCfuGfuAfuUfuGfcCfcUfcGfgdTsdT	1707
1089	1089-1107	cgAfgGfgCfaAfaUfaCfaGfcUfuUfdTsdT	1708	AfAfaGfcUfgUfaUfuUfgCfcCfuCfgdTsdT	1709
1096	1096-1114	aaAfuAfcAfgCfuUfuGfgUfgCfcAfdTsdT	1710	UfGfgCfaCfcAfaAfgCfuGfuAfuUfudTsdT	1711
1097	1097-1115	aaUfaCfaGfcUfuUfgGfuGfcCfaCfdTsdT	1712	GfUfgGfcAfcCfaAfaGfcUfgUfaUfudTsdT	1713
1098	1098-1116	auAfcAfgCfuUfuGfgUfgCfcAfcCfdTsdT	1714	GfGfuGfgCfaCfcAfaAfgCfuGfuAfudTsdT	1715
1104	1104-1122	cuUfuGfgUfgCfcAfcCfuGfcGfuGfdTsdT	1716	CfAfcGfcAfgGfuGfgCfaCfcAfaAfgdTsdT	1717
1106	1106-1124	uuGfgUfgCfcAfcCfuGfcGfuGfaAfdTsdT	1718	UfUfcAfcGfcAfgGfuGfgCfaCfcAfadTsdT	1719
1112	1112-1130	ccAfcCfuGfcGfuGfaAfgAfaGfuGfdTsdT	1720	CfAfcUfuCfuUfcAfcGfcAfgGfuGfgdTsdT	1721
1116	1116-1134	cuGfcGfuGfaAfgAfaGfuGfuCfcCfdTsdT	1722	GfGfgAfcAfcUfuCfuUfcAfcGfcAfgdTsdT	1723
1117	1117-1135	ugCfgUfgAfaGfaAfgUfgUfcCfcCfdTsdT	1724	GfGfgGfaCfaCfuUfcUfuCfaCfgCfadTsdT	1725
1118	1118-1136	gcGfuGfaAfgAfaGfuGfuCfcCfcGfdTsdT	1726	CfGfgGfgAfcAfcUfuCfuUfcAfcGfcdTsdT	1727

[0818]

1119	1119-1137	cgUfgAfaGfaAfgUfgUfcCfcCfgUfdTsdT	1728	AfCfgGfgGfaCfaCfuUfcUfuCfaCfgdTsdT	1729
1120	1120-1138	guGfaAfgAfaGfuGfuCfcCfcGfuAfdTsdT	1730	UfAfcGfgGfgAfcAfcUfuCfuUfcAfcdTsdT	1731
1121	1121-1139	ugAfaGfaAfgUfgUfcCfcCfgUfaAfdTsdT	1732	UfUfaCfgGfgGfaCfaCfuUfcUfuCfadTsdT	1733
1122	1122-1140	gaAfgAfaGfuGfuCfcCfcGfuAfaUfdTsdT	1734	AfUfuAfcGfgGfgAfcAfcUfuCfuUfcdTsdT	1735
1123	1123-1141	aaGfaAfgUfgUfcCfcCfgUfaAfuUfdTsdT	1736	AfAfuUfaCfgGfgGfaCfaCfuUfcUfudTsdT	1737
1124	1124-1142	agAfaGfuGfuCfcCfcGfuAfaUfuAfdTsdT	1738	UfAfaUfuAfcGfgGfgAfcAfcUfuCfudTsdT	1739
1125	1125-1143	gaAfgUfgUfcCfcCfgUfaAfuUfaUfdTsdT	1740	AfUfaAfuUfaCfgGfgGfaCfaCfuUfcdTsdT	1741
1126	1126-1144	aaGfuGfuCfcCfcGfuAfaUfuAfuGfdTsdT	1742	CfAfuAfaUfuAfcGfgGfgAfcAfcUfudTsdT	1743
1127	1127-1145	agUfgUfcCfcCfgUfaAfuUfaUfgUfdTsdT	1744	AfCfaUfaAfuUfaCfgGfgGfaCfaCfudTsdT	1745
1128	1128-1146	guGfuCfcCfcGfuAfaUfuAfuGfuGfdTsdT	1746	CfAfcAfuAfaUfuAfcGfgGfgAfcAfcdTsdT	1747
1129	1129-1147	ugUfcCfcCfgUfaAfuUfaUfgUfgGfdTsdT	1748	CfCfaCfaUfaAfuUfaCfgGfgGfaCfadTsdT	1749
1130	1130-1148	guCfcCfcGfuAfaUfuAfuGfuGfgUfdTsdT	1750	AfCfcAfcAfuAfaUfuAfcGfgGfgAfcdTsdT	1751
1132	1132-1150	ccCfcGfuAfaUfuAfuGfuGfgUfgAfdTsdT	1752	UfCfaCfcAfcAfuAfaUfuAfcGfgGfgdTsdT	1753
1134	1134-1152	ccGfuAfaUfuAfuGfuGfgUfgAfcAfdTsdT	1754	UfGfuCfaCfcAfcAfuAfaUfuAfcGfgdTsdT	1755
1136	1136-1154	guAfaUfuAfuGfuGfgUfgAfcAfgAfdTsdT	1756	UfCfuGfuCfaCfcAfcAfuAfaUfuAfcdTsdT	1757
1137	1137-1155	uaAfuUfaUfgUfgGfuGfaCfaGfaUfdTsdT	1758	AfUfcUfgUfcAfcCfaCfaUfaAfuUfadTsdT	1759
1138	1138-1156	aaUfuAfuGfuGfgUfgAfcAfgAfuCfdTsdT	1760	GfAfuCfuGfuCfaCfcAfcAfuAfaUfudTsdT	1761
1139	1139-1157	auUfaUfgUfgGfuGfaCfaGfaUfcAfdTsdT	1762	UfGfaUfcUfgUfcAfcCfaCfaUfaAfudTsdT	1763
1140	1140-1158	uuAfuGfuGfgUfgAfcAfgAfuCfaCfdTsdT	1764	GfUfgAfuCfuGfuCfaCfcAfcAfuAfadTsdT	1765

[0819]

1142	1142-1160	auGfuGfgUfgAfcAfgAfuCfaCfgGfdTsdT	1766	CfCfgUfgAfuCfuGfuCfaCfcAfcAfudTsdT	1767
1145	1145-1163	ugGfuGfaCfaGfaUfcAfcGfgCfuCfdTsdT	1768	GfAfgCfcGfuGfaUfcUfgUfcAfcCfadTsdT	1769
1147	1147-1165	guGfaCfaGfaUfcAfcGfgCfuCfgUfdTsdT	1770	AfCfgAfgCfcGfuGfaUfcUfgUfcAfcdTsdT	1771
1148	1148-1166	ugAfcAfgAfuCfaCfgGfcUfcGfuGfdTsdT	1772	CfAfcGfaGfcCfgUfgAfuCfuGfuCfadTsdT	1773
1149	1149-1167	gaCfaGfaUfcAfcGfgCfuCfgUfgCfdTsdT	1774	GfCfaCfgAfgCfcGfuGfaUfcUfgUfcdTsdT	1775
1150	1150-1168	acAfgAfuCfaCfgGfcUfcGfuGfcGfdTsdT	1776	CfGfcAfcGfaGfcCfgUfgAfuCfuGfudTsdT	1777
1151	1151-1169	caGfaUfcAfcGfgCfuCfgUfgCfgUfdTsdT	1778	AfCfgCfaCfgAfgCfcGfuGfaUfcUfgdTsdT	1779
1152	1152-1170	agAfuCfaCfgGfcUfcGfuGfcGfuCfdTsdT	1780	GfAfcGfcAfcGfaGfcCfgUfgAfuCfudTsdT	1781
1153	1153-1171	gaUfcAfcGfgCfuCfgUfgCfgUfcCfdTsdT	1782	GfGfaCfgCfaCfgAfgCfcGfuGfaUfcdTsdT	1783
1154	1154-1172	auCfaCfgGfcUfcGfuGfcGfuCfcGfdTsdT	1784	CfGfgAfcGfcAfcGfaGfcCfgUfgAfudTsdT	1785
1155	1155-1173	ucAfcGfgCfuCfgUfgCfgUfcCfgAfdTsdT	1786	UfCfgGfaCfgCfaCfgAfgCfcGfuGfadTsdT	1787
1156	1156-1174	caCfgGfcUfcGfuGfcGfuCfcGfaGfdTsdT	1788	CfUfcGfgAfcGfcAfcGfaGfcCfgUfgdTsdT	1789
1157	1157-1175	acGfgCfuCfgUfgCfgUfcCfgAfgCfdTsdT	1790	GfCfuCfgGfaCfgCfaCfgAfgCfcGfudTsdT	1791
1160	1160-1178	gcUfcGfuGfcGfuCfcGfaGfcCfuGfdTsdT	1792	CfAfgGfcUfcGfgAfcGfcAfcGfaGfcdTsdT	1793
1200	1200-1218	ggAfgGfaAfgAfcGfgCfgUfcCfgCfdTsdT	1794	GfCfgGfaCfgCfcGfuCfuUfcCfuCfcdTsdT	1795
1201	1201-1219	gaGfgAfaGfaCfgGfcGfuCfcGfcAfdTsdT	1796	UfGfcGfgAfcGfcCfgUfcUfuCfcUfcdTsdT	1797
1203	1203-1221	ggAfaGfaCfgGfcGfuCfcGfcAfaGfdTsdT	1798	CfUfuGfcGfgAfcGfcCfgUfcUfuCfcdTsdT	1799
1204	1204-1222	gaAfgAfcGfgCfgUfcCfgCfaAfgUfdTsdT	1800	AfCfuUfgCfgGfaCfgCfcGfuCfuUfcdTsdT	1801
1205	1205-1223	aaGfaCfgGfcGfuCfcGfcAfaGfuGfdTsdT	1802	CfAfcUfuGfcGfgAfcGfcCfgUfcUfudTsdT	1803

[0820]

1207	1207-1225	gaCfgGfcGfuCfcGfcAfaGfuGfuAfdTsdT	1804	UfAfcAfcUfuGfcGfgAfcGfcCfgUfcdTsdT	1805
1208	1208-1226	acGfgCfgUfcCfgCfaAfgUfgUfaAfdTsdT	1806	UfUfaCfaCfuUfgCfgGfaCfgCfcGfudTsdT	1807
1211	1211-1229	gcGfuCfcGfcAfaGfuGfuAfaGfaAfdTsdT	1808	UfUfcUfuAfcAfcUfuGfcGfgAfcGfcdTsdT	1809
1212	1212-1230	cgUfcCfgCfaAfgUfgUfaAfgAfaGfdTsdT	1810	CfUfuCfuUfaCfaCfuUfgCfgGfaCfgdTsdT	1811
1213	1213-1231	guCfcGfcAfaGfuGfuAfaGfaAfgUfdTsdT	1812	AfCfuUfcUfuAfcAfcUfuGfcGfgAfcdTsdT	1813
1214	1214-1232	ucCfgCfaAfgUfgUfaAfgAfaGfuGfdTsdT	1814	CfAfcUfuCfuUfaCfaCfuUfgCfgGfadTsdT	1815
1215	1215-1233	ccGfcAfaGfuGfuAfaGfaAfgUfgCfdTsdT	1816	GfCfaCfuUfcUfuAfcAfcUfuGfcGfgdTsdT	1817
1216	1216-1234	cgCfaAfgUfgUfaAfgAfaGfuGfcGfdTsdT	1818	CfGfcAfcUfuCfuUfaCfaCfuUfgCfgdTsdT	1819
1217	1217-1235	gcAfaGfuGfuAfaGfaAfgUfgCfgAfdTsdT	1820	UfCfgCfaCfuUfcUfuAfcAfcUfuGfcdTsdT	1821
1219	1219-1237	aaGfuGfuAfaGfaAfgUfgCfgAfaGfdTsdT	1822	CfUfuCfgCfaCfuUfcUfuAfcAfcUfudTsdT	1823
1220	1220-1238	agUfgUfaAfgAfaGfuGfcGfaAfgGfdTsdT	1824	CfCfuUfcGfcAfcUfuCfuUfaCfaCfudTsdT	1825
1221	1221-1239	guGfuAfaGfaAfgUfgCfgAfaGfgGfdTsdT	1826	CfCfcUfuCfgCfaCfuUfcUfuAfcAfcdTsdT	1827
1222	1222-1240	ugUfaAfgAfaGfuGfcGfaAfgGfgCfdTsdT	1828	GfCfcCfuUfcGfcAfcUfuCfuUfaCfadTsdT	1829
1223	1223-1241	guAfaGfaAfgUfgCfgAfaGfgGfcCfdTsdT	1830	GfGfcCfcUfuCfgCfaCfuUfcUfuAfcdTsdT	1831
1224	1224-1242	uaAfgAfaGfuGfcGfaAfgGfgCfcUfdTsdT	1832	AfGfgCfcCfuUfcGfcAfcUfuCfuUfadTsdT	1833
1225	1225-1243	aaGfaAfgUfgCfgAfaGfgGfcCfuUfdTsdT	1834	AfAfgGfcCfcUfuCfgCfaCfuUfcUfudTsdT	1835
1226	1226-1244	agAfaGfuGfcGfaAfgGfgCfcUfuGfdTsdT	1836	CfAfaGfgCfcCfuUfcGfcAfcUfuCfudTsdT	1837
1229	1229-1247	agUfgCfgAfaGfgGfcCfuUfgCfcGfdTsdT	1838	CfGfgCfaAfgGfcCfcUfuCfgCfaCfudTsdT	1839
1230	1230-1248	guGfcGfaAfgGfgCfcUfuGfcCfgCfdTsdT	1840	GfCfgGfcAfaGfgCfcCfuUfcGfcAfcdTsdT	1841

[0821]

1231	1231-1249	ugCfgAfaGfgGfcCfuUfgCfcGfcAfdTsdT	1842	UfGfcGfgCfaAfgGfcCfcUfuCfgCfadTsdT	1843
1232	1232-1250	gcGfaAfgGfgCfcUfuGfcCfgCfaAfdTsdT	1844	UfUfgCfgGfcAfaGfgCfcCfuUfcGfcdTsdT	1845
1233	1233-1251	cgAfaGfgGfcCfuUfgCfcGfcAfaAfdTsdT	1846	UfUfuGfcGfgCfaAfgGfcCfcUfuCfgdTsdT	1847
1235	1235-1253	aaGfgGfcCfuUfgCfcGfcAfaAfgUfdTsdT	1848	AfCfuUfuGfcGfgCfaAfgGfcCfcUfudTsdT	1849
1236	1236-1254	agGfgCfcUfuGfcCfgCfaAfaGfuGfdTsdT	1850	CfAfcUfuUfgCfgGfcAfaGfgCfcCfudTsdT	1851
1237	1237-1255	ggGfcCfuUfgCfcGfcAfaAfgUfgUfdTsdT	1852	AfCfaCfuUfuGfcGfgCfaAfgGfcCfcdTsdT	1853
1238	1238-1256	ggCfcUfuGfcCfgCfaAfaGfuGfuGfdTsdT	1854	CfAfcAfcUfuUfgCfgGfcAfaGfgCfcdTsdT	1855
1239	1239-1257	gcCfuUfgCfcGfcAfaAfgUfgUfgUfdTsdT	1856	AfCfaCfaCfuUfuGfcGfgCfaAfgGfcdTsdT	1857
1241	1241-1259	cuUfgCfcGfcAfaAfgUfgUfgUfaAfdTsdT	1858	UfUfaCfaCfaCfuUfuGfcGfgCfaAfgdTsdT	1859
1261	1261-1279	ggAfaUfaGfgUfaUfuGfgUfgAfaUfdTsdT	1860	AfUfuCfaCfcAfaUfaCfcUfaUfuCfcdTsdT	1861
1262	1262-1280	gaAfuAfgGfuAfuUfgGfuGfaAfuUfdTsdT	1862	AfAfuUfcAfcCfaAfuAfcCfuAfuUfcdTsdT	1863
1263	1263-1281	aaUfaGfgUfaUfuGfgUfgAfaUfuUfdTsdT	1864	AfAfaUfuCfaCfcAfaUfaCfcUfaUfudTsdT	1865
1264	1264-1282	auAfgGfuAfuUfgGfuGfaAfuUfuAfdTsdT	1866	UfAfaAfuUfcAfcCfaAfuAfcCfuAfudTsdT	1867
1266	1266-1284	agGfuAfuUfgGfuGfaAfuUfuAfaAfdTsdT	1868	UfUfuAfaAfuUfcAfcCfaAfuAfcCfudTsdT	1869
1267	1267-1285	ggUfaUfuGfgUfgAfaUfuUfaAfaGfdTsdT	1870	CfUfuUfaAfaUfuCfaCfcAfaUfaCfcdTsdT	1871
1289	1289-1307	caCfuCfuCfcAfuAfaAfuGfcUfaCfdTsdT	1872	GfUfaGfcAfuUfuAfuGfgAfgAfgUfgdTsdT	1873
1313	1313-1331	uuAfaAfcAfcUfuCfaAfaAfaCfuGfdTsdT	1874	CfAfgUfuUfuUfgAfaGfuGfuUfuAfadTsdT	1875
1320	1320-1338	cuUfcAfaAfaAfcUfgCfaCfcUfcCfdTsdT	1876	GfGfaGfgUfgCfaGfuUfuUfuGfaAfgdTsdT	1877
1321	1321-1339	uuCfaAfaAfaCfuGfcAfcCfuCfcAfdTsdT	1878	UfGfgAfgGfuGfcAfgUfuUfuUfgAfadTsdT	1879

[0822]

1322	1322-1340	ucAfaAfaAfcUfgCfaCfcUfcCfaUfdTsdT	1880	AfUfgGfaGfgUfgCfaGfuUfuUfuGfadTsdT	1881
1323	1323-1341	caAfaAfaCfuGfcAfcCfuCfcAfuCfdTsdT	1882	GfAfuGfgAfgGfuGfcAfgUfuUfuUfgdTsdT	1883
1324	1324-1342	aaAfaAfcUfgCfaCfcUfcCfaUfcAfdTsdT	1884	UfGfaUfgGfaGfgUfgCfaGfuUfuUfudTsdT	1885
1328	1328-1346	acUfgCfaCfcUfcCfaUfcAfgUfgGfdTsdT	1886	CfCfaCfuGfaUfgGfaGfgUfgCfaGfudTsdT	1887
1332	1332-1350	caCfcUfcCfaUfcAfgUfgGfcGfaUfdTsdT	1888	AfUfcGfcCfaCfuGfaUfgGfaGfgUfgdTsdT	1889
1333	1333-1351	acCfuCfcAfuCfaGfuGfgCfgAfuCfdTsdT	1890	GfAfuCfgCfcAfcUfgAfuGfgAfgGfudTsdT	1891
1335	1335-1353	cuCfcAfuCfaGfuGfgCfgAfuCfuCfdTsdT	1892	GfAfgAfuCfgCfcAfcUfgAfuGfgAfgdTsdT	1893
1338	1338-1356	caUfcAfgUfgGfcGfaUfcUfcCfaCfdTsdT	1894	GfUfgGfaGfaUfcGfcCfaCfuGfaUfgdTsdT	1895
1344	1344-1362	ugGfcGfaUfcUfcCfaCfaUfcCfuGfdTsdT	1896	CfAfgGfaUfgUfgGfaGfaUfcGfcCfadTsdT	1897
1345	1345-1363	ggCfgAfuCfuCfcAfcAfuCfcUfgCfdTsdT	1898	GfCfaGfgAfuGfuGfgAfgAfuCfgCfcdTsdT	1899
1346	1346-1364	gcGfaUfcUfcCfaCfaUfcCfuGfcCfdTsdT	1900	GfGfcAfgGfaUfgUfgGfaGfaUfcGfcdTsdT	1901
1347	1347-1365	cgAfuCfuCfcAfcAfuCfcUfgCfcGfdTsdT	1902	CfGfgCfaGfgAfuGfuGfgAfgAfuCfgdTsdT	1903
1348	1348-1366	gaUfcUfcCfaCfaUfcCfuGfcCfgGfdTsdT	1904	CfCfgGfcAfgGfaUfgUfgGfaGfaUfcdTsdT	1905
1353	1353-1371	ccAfcAfuCfcUfgCfcGfgUfgGfcAfdTsdT	1906	UfGfcCfaCfcGfgCfaGfgAfuGfuGfgdTsdT	1907
1354	1354-1372	caCfaUfcCfuGfcCfgGfuGfgCfaUfdTsdT	1908	AfUfgCfcAfcCfgGfcAfgGfaUfgUfgdTsdT	1909
1355	1355-1373	acAfuCfcUfgCfcGfgUfgGfcAfuUfdTsdT	1910	AfAfuGfcCfaCfcGfgCfaGfgAfuGfudTsdT	1911
1357	1357-1375	auCfcUfgCfcGfgUfgGfcAfuUfuAfdTsdT	1912	UfAfaAfuGfcCfaCfcGfgCfaGfgAfudTsdT	1913
1360	1360-1378	cuGfcCfgGfuGfgCfaUfuUfaGfgGfdTsdT	1914	CfCfcUfaAfaUfgCfcAfcCfgGfcAfgdTsdT	1915
1361	1361-1379	ugCfcGfgUfgGfcAfuUfuAfgGfgGfdTsdT	1916	CfCfcCfuAfaAfuGfcCfaCfcGfgCfadTsdT	1917

[0823]

1362	1362-1380	gcCfgGfuGfgCfaUfuUfaGfgGfgUfdTsdT	1918	AfCfcCfcUfaAfaUfgCfcAfcCfgGfcdTsdT	1919
1363	1363-1381	ccGfgUfgGfcAfuUfuAfgGfgGfuGfdTsdT	1920	CfAfcCfcCfuAfaAfuGfcCfaCfcGfgdTsdT	1921
1366	1366-1384	guGfgCfaUfuUfaGfgGfgUfgAfcUfdTsdT	1922	AfGfuCfaCfcCfcUfaAfaUfgCfcAfcdTsdT	1923
1369	1369-1387	gcAfuUfuAfgGfgGfuGfaCfuCfcUfdTsdT	1924	AfGfgAfgUfcAfcCfcCfuAfaAfuGfcdTsdT	1925
1370	1370-1388	caUfuUfaGfgGfgUfgAfcUfcCfuUfdTsdT	1926	AfAfgGfaGfuCfaCfcCfcUfaAfaUfgdTsdT	1927
1371	1371-1389	auUfuAfgGfgGfuGfaCfuCfcUfuCfdTsdT	1928	GfAfaGfgAfgUfcAfcCfcCfuAfaAfudTsdT	1929
1372	1372-1390	uuUfaGfgGfgUfgAfcUfcCfuUfcAfdTsdT	1930	UfGfaAfgGfaGfuCfaCfcCfcUfaAfadTsdT	1931
1373	1373-1391	uuAfgGfgGfuGfaCfuCfcUfuCfaCfdTsdT	1932	GfUfgAfaGfgAfgUfcAfcCfcCfuAfadTsdT	1933
1374	1374-1392	uaGfgGfgUfgAfcUfcCfuUfcAfcAfdTsdT	1934	UfGfuGfaAfgGfaGfuCfaCfcCfcUfadTsdT	1935
1404	1404-1422	ucUfgGfaUfcCfaCfaGfgAfaCfuGfdTsdT	1936	CfAfgUfuCfcUfgUfgGfaUfcCfaGfadTsdT	1937
1408	1408-1426	gaUfcCfaCfaGfgAfaCfuGfgAfuAfdTsdT	1938	UfAfuCfcAfgUfuCfcUfgUfgGfaUfcdTsdT	1939
1409	1409-1427	auCfcAfcAfgGfaAfcUfgGfaUfaUfdTsdT	1940	AfUfaUfcCfaGfuUfcCfuGfuGfgAfudTsdT	1941
1411	1411-1429	ccAfcAfgGfaAfcUfgGfaUfaUfuCfdTsdT	1942	GfAfaUfaUfcCfaGfuUfcCfuGfuGfgdTsdT	1943
1412	1412-1430	caCfaGfgAfaCfuGfgAfuAfuUfcUfdTsdT	1944	AfGfaAfuAfuCfcAfgUfuCfcUfgUfgdTsdT	1945
1419	1419-1437	acUfgGfaUfaUfuCfuGfaAfaAfcCfdTsdT	1946	GfGfuUfuUfcAfgAfaUfaUfcCfaGfudTsdT	1947
1426	1426-1444	auUfcUfgAfaAfaCfcGfuAfaAfgGfdTsdT	1948	CfCfuUfuAfcGfgUfuUfuCfaGfaAfudTsdT	1949
1427	1427-1445	uuCfuGfaAfaAfcCfgUfaAfaGfgAfdTsdT	1950	UfCfcUfuUfaCfgGfuUfuUfcAfgAfadTsdT	1951
1430	1430-1448	ugAfaAfaCfcGfuAfaAfgGfaAfaUfdTsdT	1952	AfUfuUfcCfuUfuAfcGfgUfuUfuCfadTsdT	1953
1431	1431-1449	gaAfaAfcCfgUfaAfaGfgAfaAfuCfdTsdT	1954	GfAfuUfuCfcUfuUfaCfgGfuUfuUfcdTsdT	1955

[0824] 具有化学修饰信息的siRNA序列

[0825] 小写(n)＝2'-O-Me;Nf＝2'-F;dT＝脱氧-T残基;

[0826] s＝硫代磷酸酯骨架修饰;iB＝反向脱碱基

[0827] 表7.AR靶序列

[0828]

ID	代码	靶序列	SEQ ID NO:	NM_000044.3	外显子	物种
XD-01817K1	**17**	**CAAAGGUUCUCUGCUAGACGACA**	**1956**	**1987-2005**	**1**	**h**
XD-01827K1	**27**	**UCUGGGUGUCACUAUGGAGCUCU**	**1957**	**2819-2837**	**2**	**h**
XD-01828K1	**28**	**CUGGGUGUCACUAUGGAGCUCUC**	**1958**	**2820-2838**	**2**	**h**
XD-01829K1	**29**	**GGGUGUCACUAUGGAGCUCUCAC**	**1959**	**2822-2840**	**2**	**h**
XD-01821K1	21	UACUACAACUUUCCACUGGCUCU	1960	2207-2225	1	h
XD-01825K1	25	AAGCUUCUGGGUGUCACUAUGGA	1961	2814-2832	2	h,m
XD-01826K1	26	CUUCUGGGUGUCACUAUGGAGCU	1962	2817-2835	2	h

[0829] 表8.β-连环蛋白靶序列

[0830]

R#	通用名	基因	靶序列			
R-1146	1797mfm	CTNNB1	CUGUUGGAUUGAUUCGAAAUU	SEQ ID NO: 1963	UUUCGAAUCAAUCCAACAGUU	SEQ ID NO: 1964
R-1147	1870mfm	CTNNB1	ACGACUAGUUCAGUUGCUUUU	SEQ ID NO: 1965	AAGCAACUGAACUAGUCGUUU	SEQ ID NO: 1966

[0831] 表9.β-连环蛋白和β-连环蛋白相关的siRNA序列

[0832]

R#	通用名	基因	有义链序列(5′-3′) 过客链(PS)2	SEQ ID NO:	反义链序列(5′-3′) 指导链(GS)3	SEQ ID NO:
R-	1797mfm	CTNNB	iBcsuGfuUfgGfaUfuGf	1967	usUfsusCfgAfaUfcAfaUfc	1968

[0833]

1146		1	aUfuCfgAfaAfusuiB		CfaAfcAfgusu	
R-1147	1870mfm	CTNNB1	iBascGfaCfuAfgUfuCfaGfuUfgCfuUfusuiB	1969	asAfsgsCfaAfcUfgAfaCfuAfgUfcGfuusu	1970
R-1150	PA1746	1746	GCUCAAAGCAAUUUCUACAdTsdT	1971	UGUAGAAAUUGCUUUGAGCdTsdT	1972
R-1151	PA2328	2328	GGAUGAAACACAAAAGGUAdTsdT	1973	UACCUUUUGUGUUUCAUCCdTsdT	1974
R-1152	PA2522	2522	UGUCAGAGUUACUGUUUCAdTsdT	1975	UGAAACAGUAACUCUGACAdTsdT	1976
R-1153	PA3484	3484	AGCAAGAACAGAAAUAAAAdTsdT	1977	UUUUAUUUCUGUUCUUGCUdTsdT	1978
R-1154	PA5018	5018	CUAGUUCAUUUCAAAAUUAdTsdT	1979	UAAUUUUGAAAUGAACUAGdTsdT	1980
R-1155	PB183	183	CAAGUUCACAAUUACCCAAdTsdT	1981	UUGGGUAAUUGUGAACUUGdTsdT	1982
R-1156	PB272	272	GCUUGAAGAUGAAACACGAdTsdT	1983	UCGUGUUUCAUCUUCAAGCdTsdT	1984
R-1157	PB862	862	AGAUCAAGAAAAUGUAUGAdTsdT	1985	UCAUACAUUUUCUUGAUCUdTsdT	1986
R-1158	PB948	948	CCAAAGAAAACACGAAUUAdTsdT	1987	UAAUUCGUGUUUUCUUUGGdTsdT	1988
R-1159	PB1520	1520	CUUCGAUAAGAUUAUUGAAdTsdT	1989	UUCAAUAAUCUUAUCGAAGdTsdT	1990
R-1160	Myc953U	953	AGGAACUAUGACCUCGACUdTsdT	1991	AGUCGAGGUCAUAGUUCCUdTsdT	1992
R-1161	Myc622U	622	ACGACGAGACCUUCAUCAAdTsdT	1993	UUGAUGAAGGUCUCGUCGUdTsdT	1994
R-1162	Myc1370U	1370	AAGAUGAGGAAGAAAUCGAdTsdT	1995	UCGAUUUCUUCCUCAUCUUdTsdT	1996
R-1163	Myc1364U	1364	AGGAAGAAAUCGAUGUUGUdTsdT	1997	ACAACAUCGAUUUCUUCCUdTsdT	1998
R-1164	Myc1711U	1711	AGCUUUUUUGCCCUGCGUGdTsdT	1999	CACGCAGGGCAAAAAAGCUdTsdT	2000
R-1165	Myc1769U	1769	AGGUAGUUAUCCUUAAAAAdTsdT	2001	UUUUUAAGGAUAACUACCUdTsdT	2002

[0834] 具有化学修饰信息的siRNA序列小写(n)＝2'-O-Me;Nf＝2'-F;dT＝脱氧-T残基;s＝硫代磷酸酯骨架修饰;iB＝反向脱碱基

[0835] 表10.PIK3CA*和PIK3CB*靶序列

[0836]

基因符号	基因ID	名称	靶序列(97-mer)	SEQ ID NO:
PIK3CA	5290	PIK3CA_1746	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGCTCAAAGCAATTTCTACATAGTGAAGCCACAGATGTATGTAGAAATTGCTTTGAGCTGTTGCCTACTGCCTCGGA	2003
PIK3CA	5290	PIK3CA_2328	TGCTGTTGACAGTGAGCGAAAGGATGAAACACAAAAGGTATAGTGAAGCCACAGATGTATACCTTTTGTGTTTCATCCTTCTGCCTACTGCCTCGGA	2004
PIK3CA	5290	PIK3CA_2522	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCATGTCAGAGTTACTGTTTCATAGTGAAGCCACAGATGTATGAAACAGTAACTCTGACATGATGCCTACTGCCTCGGA	2005
PIK3CA	5290	PIK3CA_3555	TGCTGTTGACAGTGAGCGCAACTAGTTCATTTCAAAATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATTTTGAAATGAACTAGTTTTGCCTACTGCCTCGGA	2006
PIK3CA	5290	PIK3CA_3484	TGCTGTTGACAGTGAGCGCACAGCAAGAACAGAAATAAAATAGTGAAGCCACAGATGTATTTTATTTCTGTTCTTGCTGTATGCCTACTGCCTCGGA	2007
PIK3CB	5291	PIK3CB_862	TGCTGTTGACAGTGAGCGACAAGATCAAGAAAATGTATGATAGTGAAGCCACAGATGTATCATACATTTTCTTGATCTTGCTGCCTACTGCCTCGGA	2008
PIK3CB	5291	PIK3CB_183	TGCTGTTGACAGTGAGCGCAGCAAGTTCACAATTACCCAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGGGTAATTGTGAACTTGCTTTGCCTACTGCCTCGGA	2009
PIK3CB	5291	PIK3CB_1520	TGCTGTTGACAGTGAGCGCCCCTTCGATAAGATTATTGAATAGTGAAGCCACAGATGTATTCAATAATCTTATCGAAGGGATGCCTACTGCCTCGGA	2010
PIK3CB	5291	PIK3CB_272	TGCTGTTGACAGTGAGCGAGAGCTTGAAGATGAAACACGATAGTGAAGCCACAGATGTATCGTGTTTCATCTTCAAGCTCCTGCCTACTGCCTCGGA	2011
PIK3CB	5291	PIK3CB_948	TGCTGTTGACAGTGAGCGACACCAAAGAAAACACGAATTATAGTGAAGCCACAGATGTATAATTCGTGTTTTCTTTGGTGGTGCCTACTGCCTCGGA	2012

[0837] *物种是智人。

[0838] 表11.PIK3CA和PIK3CB siRNA序列

[0839]

基因符号	基因ID	名称	siRNA 指导	SEQ ID NO:	siRNA 过客	SEQ ID NO:
PIK3CA	5290	PIK3CA_1746	UGUAGAAAUUGCUUUGAGCUGU	2013	AGCUCAAAGCAAUUUCUACAUA	2014
PIK3CA	5290	PIK3CA_2328	UACCUUUUGUGUUUCAUCCUUC	2015	AGGAUGAAACACAAAAGGUAUA	2016
PIK3CA	5290	PIK3CA_2522	UGAAACAGUAACUCUGACAUGA	2017	AUGUCAGAGUUACUGUUUCAUA	2018
PIK3CA	5290	PIK3CA_3555	UAAUUUUGAAAUGAACUAGUUU	2019	ACUAGUUCAUUUCAAAAUUAUA	2020
PIK3CA	5290	PIK3CA_3484	UUUUAUUUCUGUUCUUGCUGUA	2021	CAGCAAGAACAGAAAUAAAAUA	2022
PIK3CB	5291	PIK3CB_862	UCAUACAUUUUCUUGAUCUUGC	2023	AAGAUCAAGAAAAUGUAUGAUA	2024
PIK3CB	5291	PIK3CB_183	UUGGGUAAUUGUGAACUUGCUU	2025	GCAAGUUCACAAUUACCCAAUA	2026
PIK3CB	5291	PIK3CB_1520	UUCAAUAAUCUUAUCGAAGGGA	2027	CCUUCGAUAAGAUUAUUGAAUA	2028
PIK3CB	5291	PIK3CB_272	UCGUGUUUCAUCUUCAAGCUCC	2029	AGCUUGAAGAUGAAACACGAUA	2030
PIK3CB	5291	PIK3CB_948	UAAUUCGUGUUUUCUUUGGUGG	2031	ACCAAAGAAAACACGAAUUAUA	2032

[0840] 表12.其他多核酸分子序列

[0841]

	碱基起始位置	指导链	SEQ ID NO:	过客链	SEQ ID NO:
EGFR R1246	333	ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU	2082	AGUUUGCCAAGGCACGAGUUU	2083
EGFR R1195	333	ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU	2084	AGUUUGCCAAGGCACGAGUUU	2085
EGFR R1449	333	ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU	2086	AGUUUGCCAAGGCACGAGUUU	2087
KRAS R1450	237	UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU	2088	TGACGAUACAGCUAAUUCAUU	2089
KRAS	237	UGAAUUAGCUGUAUC	2090	UGACGAUACAGCUAAUU	2091

[0842]

R1443		GUCAUU		CAUU	
KRAS R1194	237	UGAAUUAGCUGUAUC GUCAUU	2092	UGACGAUACAGCUAAUU CAUU	2093
CTNNB 1 R1442	1248	UAAGUAUAGGUCCUC AUUAUU	2094	UAAUGAGGACCUAUACU UAUU	2095
CTNNB 1 R1404	1797	TUUCGAAUCAAUCCAA CAGUU	2096	CUGUUGGAUUGAUUCGA AAUU	2097
CTNNB 1 R1441	1797	UUUCGAAUCAAUCCA ACAGUU	2098	CUGUUGGAUUGAUUCGA AAUU	2099
CTNNB 1 R1523	1797	UUUCGAAUCAAUCCA ACAGUU	2100	CUGUUGGAUUGAUUCGA AAUU	2101
HPRT R1492	425	AUAAAAUCUACAGUC AUAGUU	2102	CUAUGACUGUAGAUUUU AUUU	2103
HPRT R1526	425	UUAAAAUCUACAGUC AUAGUU	2104	CUAUGACUGUAGAUUUU AAUU	2105
HPRT R1527	425	UUAAAAUCUACAGUC AUAGUU	2106	CUAUGACUGUAGAUUUU AAUU	2107
AR R1245	2822	GAGAGCUCCAUAGUG ACACUU	2108	GUGUCACUAUGGAGCUC UCUU	2109

[0843] 实施例2.一般实验方案

[0844] 用于siRNA定量的茎-环qPCR测定

[0845] 将血浆样品直接稀释在TE缓冲液中。使用FastPrep-24组织匀浆器(MP Biomedicals)将50mg组织块在1mL Trizol中匀浆,然后在TE缓冲液中稀释。通过将siRNA掺入来自未处理动物的血浆或匀浆组织中并然后用TE缓冲液连续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引物将siRNA的反义链逆转录。将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,该实时PCR使用TaqMan Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)用1.5μM的正向引物、0.75μM反向引物和0.2μM探针进行。KRASsiRNA反义链和EGFR 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在表13中示出。在ViiA 7实时PCR系统(Life Technologies)中使用标准循环条件进行定量PCR反应。使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[0846] 表13.用于茎-环qPCR测定的所有siRNA反义链、引物和探针的序列。

[0847]

靶标	名称	序列(5'－3')	SEQ ID NO:
KRAS	反义链	UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU	2033
KRAS	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGG ATACGACAATGACG	2034
KRAS	正向引物	GGCGGCTGAATTAGCTGTATCGT	2035
KRAS	反向引物	AGTGCAGGGTCCGAG	2036
KRAS	探针	(6FAM)-TGGATACGACAATGAC-(NFQ-MGB)	2037
靶标	**名称**	**序列(5'－3')**	
EGFR	反义链	ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU	2038
EGFR	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGG ATACGACAAAGTTTG	2039
EGFR	正向引物	GGCGGCACTCGTGCCTTGGCA	2040
EGFR	反向引物	AGTGCAGGGTCCGAG	2041
EGFR	探针	(6FAM)-TGGATACGACAAAGTT-(NFQ-MGB)	2042

[0848] 用于确定mRNA敲低的比较qPCR测定

[0849] 如上所述将组织样品在Trizol中匀浆。使用RNeasy RNA分离96孔板(Qiagen)来分离总RNA,然后用高容量RNA将500ng RNA逆转录至cDNA试剂盒(ThermoFisher)。通过用ViiA 7实时PCR系统进行的TaqMan qPCR分析来定量KRAS、EGFR、CTNNB1和PPIB mRNA。用于KRAS的TaqMan引物和探针由Avidity设计和验证,并在表14中示出。用于EGFR和CTNNB1的TaqMan引物和探针作为预先验证的基因表达测定从Applied Biosystems购得。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,其中用于PPIB的所有TaqMan引物和探针都作为预先验证的基因表达测定从Applied Biosystems购得。通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因(KRAS、CTNNB1或EGFR)Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。

[0850] 表14.用于使用比较qPCR测定的KRAS mRNA检测的引物和探针的序列。

[0851]

靶标	物种	名称	序列(5’－3’)	SEQ ID NO:
KRAS	小鼠	正向引物	CGCCTTGACGATACAGCTAAT	2043
KRAS	小鼠	反向引物	TGTTTCCTGTAGGAGTCCTCTAT	2044
KRAS	小鼠	探针	(6FAM)-TCACTTTGT(Zen)GGATGAGTATGACCCTACG-(IABkFQ)	2114
靶标	物种	名称	序列(5’－3’)	
KRAS	人	正向引物	GTGCCTTGACGATACAGCTAAT	2046
KRAS	人	反向引物	CCAAGAGACAGGTTTCTCCATC	2047
KRAS	人	探针	(6FAM)-CCAACAATA(Zen)GAGGATTCCTACAGGAAGCA-(IABkFQ)	2115

[0852] 动物

[0853] 所有动物研究都按照Explora BioLabs的实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)的规程进行,遵守美国农业部动物福利法案(USDA Animal Welfare Act)中规定的法规以及“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”(NationalResearch Council出版,第8版,2011年修订)。所有小鼠都获自CharlesRiver Laboratories或Harlan Laboratories。

[0854] H358、HCC827和Hep-3B2 1-7皮下胁腹肿瘤模型

[0855] 对于H358皮下胁腹肿瘤模型,接种肿瘤细胞并根据以下方法确立肿瘤。在细胞注射前一天通过耳部标签识别雌性NCr nu/nu小鼠。在接种之前将小鼠称重。H358细胞用10％FBS/RPMI介质培养并用0.05％胰蛋白酶和Cell Stripper(MediaTech)收获。将具有基质胶(1:1)的0.05ml Hank’s平衡盐溶液(HBSS)中的500万个H358细胞皮下(SC)注射到每只小鼠的右上腹侧。通过使用数显卡尺的肿瘤体积测量来监测肿瘤生长,在接种后第7天开始,随后每周进行2次,直到平均直流体积到达大于100mm^3且小于等于300mm^3。一旦肿瘤被分期至期望的体积(平均100mm^3至300mm^3),将动物随机化并剔除具有非常大或小肿瘤的小鼠。将小鼠划分成所需的组别并通过肿瘤体积进行随机化。然后如单独的实验中所述地处理小鼠。

[0856] 对于Hep3B正位肝脏肿瘤模型,接种肿瘤细胞并根据以下方法确立肿瘤。在前一天通过耳部标签识别雌性NCr nu/nu小鼠,用异氟烷将小鼠麻醉。然后将小鼠置于水循环加热垫上的仰卧位置以维持体温。将会在胸骨下方形成小的横切口以暴露肝脏。使用28号针将癌细胞缓慢注射至肝脏的左上叶中。将细胞以30度角注射至肝脏中,使得可以通过肝囊看到透明的细胞泡。通过在冷PBS悬浮(0.1-5x10^6个细胞)并与稀释的基质胶(在PBS中稀释30倍)来制备Hep 3B2.1 7细胞。接种30-50ul细胞/基质胶。注射后,将一小块无菌纱布置于注射部位上,并施加轻微压力1分钟以防止出血。然后用6-0丝线闭合腹部。在肿瘤细胞植入后,将动物保持在温笼中,观察1-2小时,然后在从麻醉中完全恢复后返回动物室。在肿瘤植入后7-10天,将动物随机化、划分成所需的组别,然后如在单独的实验中所述地进行处理。

[0857] LNCap皮下胁腹肿瘤模型

[0858] 使LNCaP细胞(ATCC® CRL-1740™)在补充有非必需氨基酸和丙酮酸钠的RPMI+10％FBS中生长至约80％融合。将细胞与基质胶1:1混合,并将5-7*10^6个细胞皮下注射至雄性SCID小鼠(6-8周)中。肿瘤通常在3-5周内发育至100-350mm^3的大小。将携带该范围内的肿瘤的动物随机化并通过尾静脉中注射来用ASC处理。对于PD研究,在注射后96小时处死动物并收获器官片段、称重并在液氮中冷冻。对于RNA分离,将器官样品在Trizol中匀浆,并使用Qiagen RNeasy 96Plus试剂盒按照制造商的说明制备RNA。用光谱法确定RNA浓度。通过逆转录将RNA转化为cDNA,并使用ΔΔCT方法和经验证的Taqman测定(Thermofisher)通过qPCR将特异性靶标的表达定量。将样品相对于PPIB的表达水平归一化。

[0859] 胆固醇siRNA缀合物合成

[0860] 使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。缀合至过客链的胆固醇的结构在图2中示出。表15示出了KRAS siRNA序列、EGFR siRNA序列和CTNNB1 siRNA序列。

[0861] 表15.

[0862]

siRNA	链	序列(5'-3')	所观察到的MW	SEQ ID NO:
KRAS	过客链	胆固醇-iBusgAfcGfaUfaCfaGfcUfaAfuUfcAfusuiB	7813.6	2049
KRAS	指导链	UfsGfsasAfuUfaGfcUfgUfaUfcGfuCfausu	6874.6	2050
EGFR	过客链	胆固醇-iBasgUfuUfgCfcAfaGfgCfaCfgAfgUfusuiB	7884.6	2051
EGFR	指导链	asCfsusCfgUfgCfcUfuGfgCfaAfaCfuusu	6860.6	2052
CTNNB1	过客链	胆固醇-iBcsuGfuUfgGfaUfuGfaUfuCfgAfaAfusuiB	7847.5	2053
CTNNB1	指导链	usUfsusCfgAfaUfcAfaUfcCfaAfcAfgusu	6852.6	2054

[0863] siRNA化学修饰包括:

[0864] • 大写(N)=2'-OH(核糖);

[0865] • 小写(n)=2'-O-Me(甲基);

[0866] • dN=2'-H(脱氧);

[0867] • Nf=2'-F(氟代);

[0868] • s=硫代磷酸酯骨架修饰;

[0869] • iB=反向脱碱基

[0870] 肽合成

[0871] 使用标准Fmoc化学法将在固相上合成肽。两种肽都具有在N-末端的半胱氨酸,并通过HPLC纯化经切割的肽并通过质谱法确认。INF7肽如图3所示(SEQ ID NO:2055)。蜂毒肽如图4所示(SEQ ID NO:2060)。

[0872] 抗EGFR抗体

[0873] 抗EGFR抗体是针对人表皮生长因子受体(EGFR)的完全人IgG1κ单克隆抗体。其产生于中国仓鼠卵巢细胞系DJT33中,该细胞系DJT33是通过用携带衍生产生自人抗EGFR抗体的杂交瘤细胞系(2F8)的抗体基因的GS载体转染而从CHO细胞系CHO-K1SV衍生的。使用标准

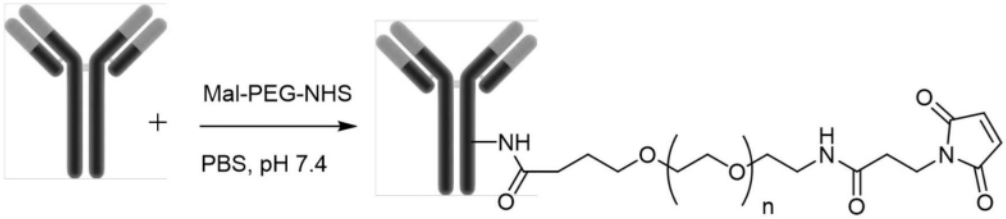
哺乳动物细胞培养和纯化技术制备抗EGFR抗体。

[0874] 没有聚糖的抗EGFR抗体的理论分子量(MW)是146.6kDa。如通过质谱法确定的,抗体的主要糖基化同种型的实验MW为149kDa。在还原条件下使用SDS-PAGE,发现轻链的MW为约25kDa,重链的MW为约50kDa。重链通过两个链间二硫键彼此连接,并且一个轻链通过单个链间二硫键附接至每个重链。轻链具有两个链内二硫键,重链具有四个链内二硫键。该抗体在重链的Asn305处被N-连接糖基化,其中聚糖由N-乙酰基-葡糖胺、甘露糖、岩藻糖和半乳糖组成。存在的主要聚糖是含有零个或一个末端半乳糖残基的岩藻糖基化双触角结构。

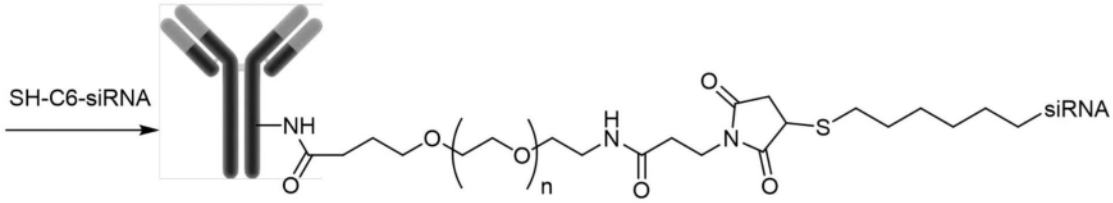
[0875] 已经使用成像毛细管IEF、琼脂糖IEF和分析型阳离子交换HPLC研究了IgG1κ抗体的带电荷的同种型模式。发现了多个带电荷的同种型,其中主要的同种型具有约8.7的等电点。

[0876] 抗EGFR抗体的主要作用机制是对A431癌细胞中EGF诱导的EGFR磷酸化的浓度依赖性抑制。另外,在临床前细胞体外研究中已经观察到在低抗体浓度下诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0877] 实施例3:抗体-PEG-EGFR缀合物和抗体-EGFR缀合物的合成、纯化和分析



[0878]



[0879] 缀合方案-1

[0880] 步骤1:抗体与马来酰亚胺-PEG-NHS缀合,随后与SH-EGFR缀合

[0881] 将抗-EGFR抗体(EGFR-Ab)与1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)交换并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液添加2个当量的SMCC连接体或马来酰亚胺-PEGxkDa-NHS(x=1、5、10、20)并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS通过旋转过滤来去除未反应的马来酰亚胺-PEG。收集抗体-PEG-Mal缀合物并将其转移到反应容器中。在室温下将SH-C6-EGFR(2个当量)添加至在PBS中的抗体-PEG-马来酰亚胺并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱来分析反应混合物,并且可以看到缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[0882] 步骤2:纯化

[0883] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有抗体-PEG-EGFR缀合物的级分集中、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。基于siRNA负载分离了具有SMCC连接体、PEG1kDa、PEG5kDa和PEG10kDa的抗体siRNA缀合物。具有PEG20kDa的缀合物的分离较差。

[0884] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0885] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2或阴离子交换色谱法-3,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。使用这些方法制得的所有缀合物的实例在表16中描述。

[0886] 表16.AXCYB缀合物列表

[0887]

缀合物	采用阴离子交换色谱法-2 的 HPLC 保留时间（分钟）		
	DAR=1	DAR = 2	DAR = >2
EGFR-Ab-EGFR	9.0	9.9	10.4
EGFR-Ab-PEG1kDa-EGFR	9.2	10.0	10.6
EGFR-Ab-PEG5kDa-EGFR	8.7	9.3	ND
EGFR-Ab-PEG10kDa-EGFR	8.6	8.8 至 10；DAR 2-3 的混合物	
EGFR-Ab-PEG20kDa-EGFR	8.6；DAR 1-3 的混合物		
Holo-抗 B 细胞 Ab-PEG20kDa-EGFR	9.2		9.5

[0888] 阴离子交换色谱法-1

[0889] 1.柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[0890] 2.溶剂A:20mM TRIS缓冲液,pH 8.0;溶剂B:20mM TRIS,1.5M NaCl,pH 8.0;流速:6.0ml/min

[0891] 3.梯度:

[0892]

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

[0893] 阴离子交换色谱法-2

[0894] 1.柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X 250mm

[0895] 2.溶剂A:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇;溶剂B:80%10mM TRIS pH 8,20%乙醇,1.5M NaCl;流速:1.0ml/min

[0896] 3.梯度:

	a.	时间	%A %B
	b.	0.0	90 10
	c.	3.00	90 10
[0897]	d.	11.00	40 60
	e.	13.00	40 60
	f.	15.00	90 10
	g.	20.00	90 10

[0898] 阴离子交换色谱法-3

[0899] 1.柱:Thermo Scientific,ProPacTM SAX-10,Bio LCTM,4X 250mm

[0900] 2.溶剂A:80％10mM TRIS pH 8,20％乙醇;溶剂B:80％10mM TRIS pH 8,20％乙醇,1.5M NaCl

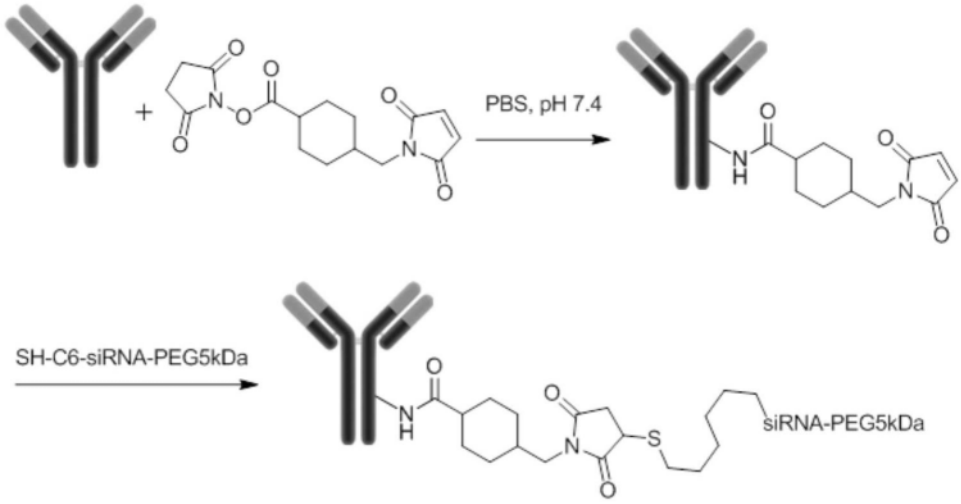
[0901] 3.流速:0.75ml/min

[0902] 4.梯度:

	a.	时间	%A %B
	b.	0.0	90 10
	c.	3.00	90 10
[0903]	d.	11.00	40 60
	e.	23.00	40 60
	f.	25.00	90 10
	g.	30.00	90 10

[0904] EGFR抗体-PEG20kDa-EGFR的分析数据在图5和图6中示出。图5示出了EGFR抗体-PEG20kDa-EGFR的分析型HPLC。图6示出了EGFR抗体-PEG20kDa-EGFR缀合物的SDS-PAGE分析。EGFR抗体-PEG10kDa-EGFR的分析型色谱图在图7中示出。EGFR抗体-PEG5kDa-EGFR的分析数据在图8和图9中示出。图8示出了EGFR抗体-PEG5kDa-EGFR的分析型色谱图。图9示出了EGFR抗体-PEG10kDa-EGFR缀合物和EGFR抗体-PEG5kDa-EGFR缀合物的SDS-PAGE分析。具有不同siRNA负载的EGFR抗体-PEG1kDa-EGFR缀合物的分析数据在图10中示出。

[0905] 实施例4:抗体-siRNA-PEG缀合物的合成、纯化和分析

[0906] 

[0907] 缀合方案-2

[0908] 步骤1:抗体与SMCC连接体缀合,随后与SH-KRAS-PEG5kDa缀合

[0909] 将抗-EGFR抗体与1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)交换并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液添加2个当量的SMCC连接体(琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液通过旋转过滤来去除未反应的SMCC连接体。收集保留物,并在室温下添加2个当量的SH-C6-KRAS-PEG5kDa并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱来分析反应混合物,并且可以观察到缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[0910] 步骤2:纯化

[0911] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有抗体-KRAS-PEG缀合物的级分集中、浓缩并与pH7.4的PBS进行缓冲液交换。

[0912] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0913] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-3,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度(如实施例1中所述)。使用实施例4和实施例5中所描述的方法制得的缀合物的实例在表17中示出。

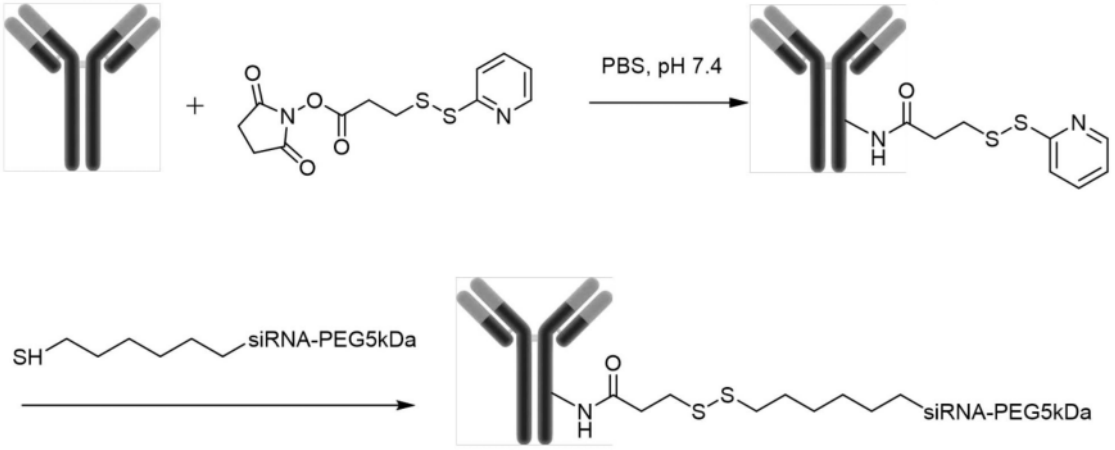
[0914] 表17.A-X-B-Y-C缀合物列表

[0915]

缀合物	采用阴离子交换色谱法-3 的 HPLC 保留时间(分钟)		
	DAR=1	DAR = 2	DAR = >2
EGFR-Ab-KRAS-PEG5kDa	9.2		
EGFR-Ab-S-S-KRAS-PEG5kDa	9.0		
Holo-抗 B 细胞 Ab-KRAS-PEG5kDa	9.2	9.7	10.1
帕尼单抗-KRAS-PEG5kDa	9.2	9.7	10.2

[0916] EGFR抗体-KRAS-PEG5kDa的HPLC色谱图在图11中示出。帕尼单抗-KRAS-PEG5kDa的HPLC色谱图如图12所示。

[0917] 实施例5:抗体-S-S-siRNA-PEG缀合物的合成、纯化和分析



[0918] 缀合方案-3

[0919] 步骤1:抗体与SPDP连接体缀合,随后与SH-siRNA-PEG5kDa缀合

[0920] 将抗-EGFR抗体与1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)交换并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液添加2个当量的SPDP连接体(琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液通过旋转过滤来去除未反应的SPDP连接体。收集保留物,并在室温下添加2个当量的SH-C6-siRNA-PEG5kDa并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱来分析反应混合物,并且可以看到缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[0921] 步骤2:纯化

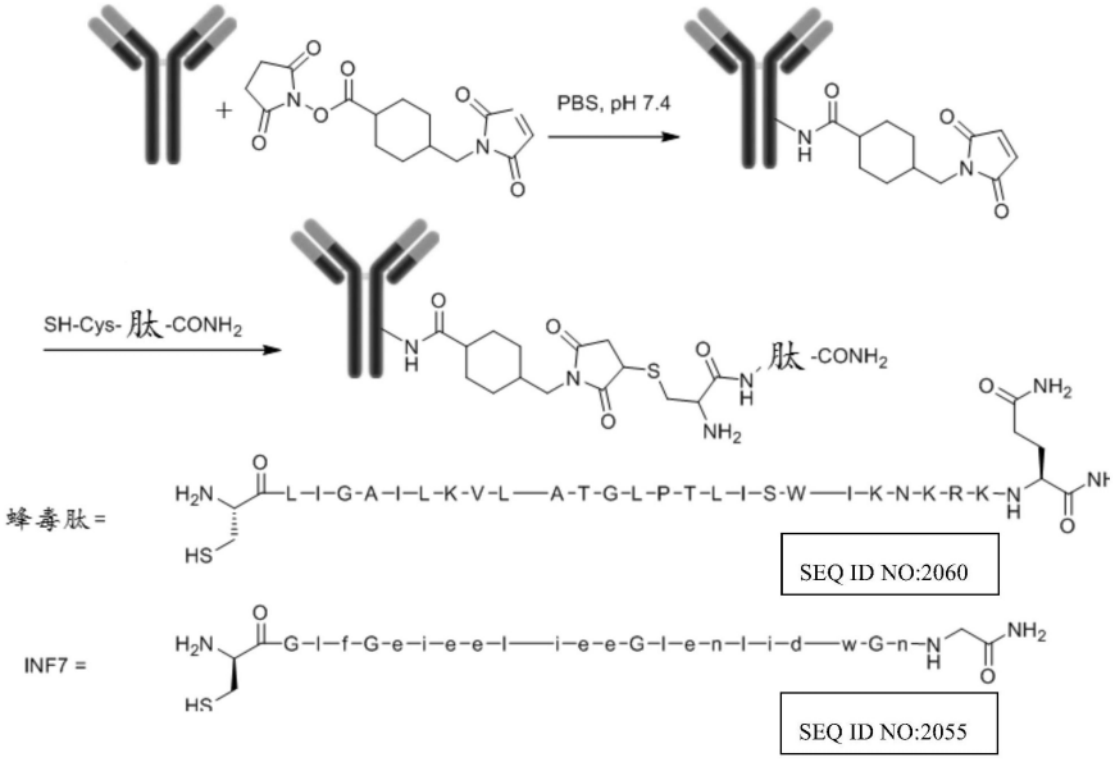
[0922] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有抗体-PEG-siRNA缀合物的级分集中、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。

[0923] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0924] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。EGFR抗体-S-S-siRNA-PEG5kDa(DAR=1)的HPLC色谱图如图13所示。

[0925] 实施例6:抗体-SMCC-内体逃避肽缀合物的合成、纯化和分析

[0926]



[0927] 缀合方案-4

[0928] 步骤1:抗体与SMCC连接体或马来酰亚胺-PEG-NHS缀合,随后与SH-Cys-肽-$CONH_2$缀合

[0929] 将抗-EGFR抗体与1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)交换并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液添加3个当量的SMCC连接体(琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)或马来酰亚胺-PEG1kDa-NHS并在室温下旋转1.5小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液(对于蜂毒肽缀合物,25mM MES pH=6.1)通过旋转过滤来去除未反应的SMCC连接体或PEG连接体。收集保留物,并在室温下添加3个当量的SH-Cys-肽-$CONH_2$并旋转过夜。然后通过HIC色谱或阳离子交换色谱将反应混合物纯化,以分离抗EGFR抗体-肽或抗EGFR抗体-PEG1k-肽。

[0930] 步骤2:纯化

[0931] 使用疏水相互作用色谱(HIC)法-1或阳离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有抗体-肽缀合物的级分集中、浓缩并与pH 7.4的PBS(对于蜂毒肽,10mM乙酸盐pH=6.0)进行缓冲液交换。

[0932] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0933] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用HIC法-2或阳离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估纯度和肽负载。使用实施例6的方法制得的所有缀合物的实例在表18和表19中描述。

[0934] 表18.AXYD缀合物列表

[0935]

缀合物	采用 HIC 法-2 的 HPLC 保留时间(分钟)		
	DAR=1	DAR = 2	DAR = >2
EGFR-Ab-INF7	7.7	9.3	11.2
EGFR-Ab-PEG24-INF7	8.4	12.2	15.2

[0936] 表19.AXYD缀合物列表

[0937]

缀合物	采用阳离子交换色谱法-2 的 HPLC 保留时间(分钟)		
	DAR=1	DAR = >1	DAR = >2
EGFR-Ab-蜂毒肽	40.9	54.8	
EGFR-Ab-PEG1kDa-蜂毒肽	48.	53.4	55.8

[0938] 阳离子交换色谱法-1

[0939] 1.柱:GE Healthcare HiPrep SP HP 16/10

[0940] 2.溶剂A:50mM MES pH＝6.0;溶剂B:50mM MES+0.5M NaCl pH＝6.0;流速:2.0ml/min

[0941] 3.梯度:

[0942]

a.	%A	%B	柱体积
b.	100	0	0.1
c.	100	0	冲洗循环 12ml
d.	100	0	2.5
e.	0	100	15
f.	0	100	5

[0943]

g.	100	0	0.5
h.	100	0	5

[0944] 阳离子交换色谱法-2

[0945] 1.柱:Thermo Scientific,MAbPac™ SCX-10,Bio LC™,4X 250mm(产品编号074625)

[0946] 2.溶剂A:20mM MES pH＝5.5;溶剂B:20mM MES+0.3M NaCl pH＝5.5;流速:0.5ml/min

[0947] 3.梯度:

	a.	时间	%A %B
	b.	0.0	100 0
	c.	5	100 0
[0948]	d.	50	0 100
	e.	80	0 100
	f.	85	100 0
	g.	90	100 0

[0949] 疏水相互作用色谱法-1(HIC法-1)

[0950] 1.柱:GE Healthcare Butyl Sepharose High Performance(17-5432-02)200ml

[0951] 2.溶剂A:50mM磷酸钠+0.8M硫酸铵(pH＝7.0);溶剂B:80％50mM磷酸钠(pH＝7.0),20％IPA;流速:3.0ml/min

[0952] 3.梯度:

	a.	%A	%B	柱体积
	b.	100	0	0.1
[0953]	c.	0	100	3
	d.	0	100	1.35
	e.	100	0	0.1
[0954]	f.	100	0	0.5

[0955] 疏水相互作用色谱法-2(HIC法-2)

[0956] 1.柱:Tosoh Bioscience TSKgel Butyl-NPR 4.6mm ID x 10cm 2.5μm

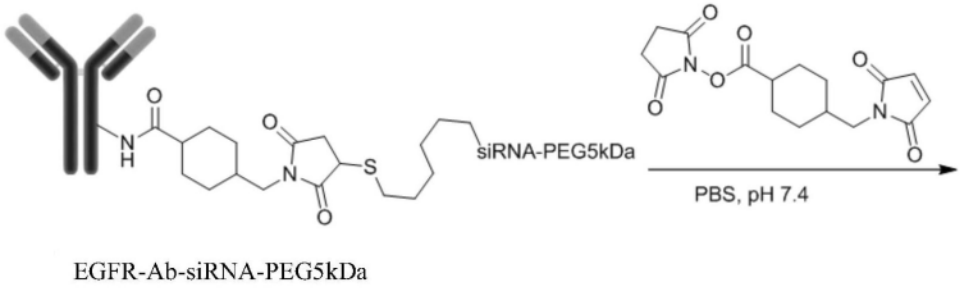
[0957] 2.溶剂A:100mM磷酸钠+1.8M硫酸铵(pH＝7.0);溶剂B:80％100mM磷酸钠(pH＝7.0),20％IPA;流速:0.5ml/min

[0958] 3.梯度:

	a.	时间	%A	%B
	b.	0	100	0
[0959]	c.	3	50	50
	d.	21	0	100
	e.	23	0	100
	f.	25	100	0

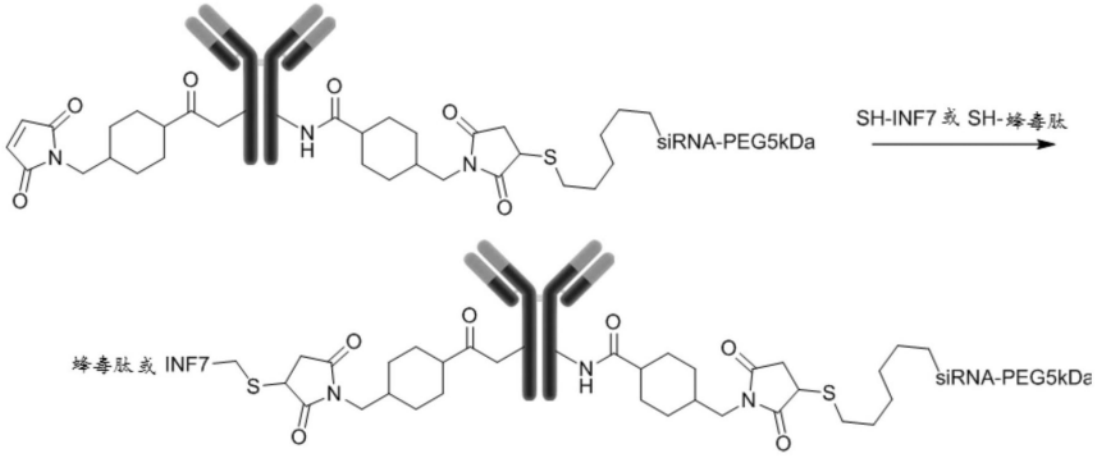
[0960] 图14图示了EGFR抗体-PEG24-蜂毒肽(负载＝约1)的HPLC色谱。图15图示了EGFR抗体-蜂毒肽(n＝约1)的HPLC色谱。图16示出了EGFR抗体-蜂毒肽(n＝1)的质谱。图17示出了EGFR抗体-PEG1kDa-INF7(肽负载＝约1)的HIC色谱。图18示出了EGFR抗体-INF7(肽负载＝约1)的HPLC色谱。

[0961] 实施例7:EEP-抗体-siRNA-PEG缀合物的合成、纯化和分析



EGFR-Ab-siRNA-PEG5kDa

[0962]



[0963] 缀合方案-5

[0964] 步骤1:缀合PEG24连接体,随后将SH-Cys-肽-$CONH_2$缀合至EGFR-Ab-siRNA-PEG

[0965] 将siRNA负载为1的EGFR-Ab-siRNA-PEG缀合物与在pH7.4的PBS中的4个当量的PEG1k连接体(琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯)缀合并在室温下旋转1.5小时。使用50kDaMWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液通过旋转过滤来去除未反应的PEG1k连接体。收集保留物,并在室温下添加4个当量的SH-Cys-肽-$CONH_2$并旋转过夜。

[0966] 步骤2:纯化

[0967] 然后通过使用pH 7.4的PBS缓冲液和50kDa Amicon旋转过滤器重复旋转过滤来纯化反应混合物,直至如通过HPLC监测的,未反应的肽已被去除。产物含有具有缀合至抗体骨架的0、1、2、3或更多个肽的缀合物的混合物。

[0968] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0969] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用HIC法-2或阳离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度和肽负载。使用实施例7中所描述的方法制得的缀合物的实例在表20中示出。

[0970] 表20.(A-X-B-Y-Cn)-L-D缀合物列表

[0971]

缀合物	采用阳离子交换色谱法-2 的 HPLC 保留时间(分)			
	DAR=0	DAR=1	DAR=2	DAR =3
(EGFR-Ab-siRNA-PEG5kDa)-PEG1k-INF7	24	38	27	9
(EGFR-Ab-siRNA-PEG5kDa)-PEG1k-蜂毒肽	24	11.79 (宽峰)		

[0972] 图19示出了INF7-PEG1kDa-(EGFR抗体-KRAS-PEG5kDa)。图20示出了蜂毒肽-PEG1kDa-(EGFR抗体-KRAS-PEG5kDa)。

[0973] 实施例8:EGFR抗体-siRNA-PEG缀合物(PK-055)的体内药代动力学研究

[0974] 通过siRNA缀合物的静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-150mm^3的皮下胁腹H358肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=3),而相同小鼠的对照组(n=4)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。接受EGFR抗体-siRNA-PEG缀合物的处理组的剂量为0.5mg/kg(基于siRNA的重量),而接受胆固醇-siRNA缀合物的组的剂量为15mg/kg。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。通过穿刺眶后丛在给药后2、15或60分钟收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24、96或168h通过CO_2窒息将小鼠处死。表21描述了更详细的研究设计并且提供了缀合物合成和表征的交叉参考。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。收集50mg肿瘤、肝、肾和肺的小片并在液氮中快速冷冻。如实施例2-7中所述地进行mRNA敲低分析和mRNA定量。

[0975] 表21.EGFR抗体-siRNA-PEG缀合物(PK-055)的研究设计以及对所测试的缀合物的合成和表征的交叉参考。

[0976]

组别	试验品	N	siRNA剂量(mg/kg)	siRNA:EGFR-Ab之比(mol/mol)	蜂毒肽:siRNA之比(mol/mol)	ROA	剂量方案	存活流血(min)	最终流血(h)	收获时间(h)	对合成和表征的交叉参考
4	EGFR-Ab-PEG10k-EGFR	3	0.5	1.4	-	IV	t=0	2	24	24	实施例3
5		3	0.5	1.4	-	IV	t=0	15	96	96	
6		3	0.5	1.4	-	IV	t=0	60	168	168	
7	EGFR-Ab-PEG5k-EGFR	3	0.5	1.25	-	IV	t=0	2	24	24	实施例3
8		3	0.5	1.25	-	IV	t=0	15	96	96	
9		3	0.5	1.25	-	IV	t=0	60	168	168	
10	EGFR-Ab-PEG1k-EGFR	3	0.5	1.25	-	IV	t=0	2	24	24	实施例3
11		3	0.5	1.25	-	IV	t=0	15	96	96	
12		3	0.5	1.25	-	IV	t=0	60	168	168	
13	EGFR-Ab-EGFR	3	0.5	1.3	-	IV	t=0	2	24	24	实施例3
14		3	0.5	1.3	-	IV	t=0	15	96	96	
15		3	0.5	1.3	-	IV	t=0	60	168	168	
16	EGFR-Ab-KRAS-PEG5k(每个EGFR-Ab n=2个siRNA)	3	0.5	2.6	-	IV	t=0	2	24	24	实施例4
17		3	0.5	2.6	-	IV	t=0	15	96	96	
18		3	0.5	2.6	-	IV	t=0	60	168	168	
19	EGFR-Ab-KRAS-PEG5k(每个EGFR-Ab n=1个siRNA)	3	0.5	1.0	-	IV	t=0	2	24	24	实施例4
20		3	0.5	1.0	-	IV	t=0	15	96	96	
21		3	0.5	1.0	-	IV	t=0	60	168	168	
22	EGFR-Ab-KRAS-PEG5k(n=1)+EGFR-Ab-蜂毒肽	3	0.5	1.0	1:1	IV	t=0	2	24	24	实施例4和6
23		3	0.5	1.0	1:1	IV	t=0	15	96	96	
24		3	0.5	1.0	1:1	IV	t=0	60	168	168	
25	胆固醇-EGFR-333mfm	3	15	-	-	IV	t=0	2	24	24	一般实验(实施例2)
26		3	15	-	-	IV	t=0	15	96	96	
27		3	15	-	-	IV	t=0	60	168	168	
28	胆固醇-KRAS-237ffm	3	15	-	-	IV	t=0	2	24	24	一般实验(实施例2)
29		3	15	-	-	IV	t=0	15	96	96	
30		3	15	-	-	IV	t=0	60	168	168	

[0977]

31	载体	4	-	-	-	IV	t=0	-	-	24	
32		4	-	-	-	IV	t=0	-	-	96	
33		4	-	-	-	IV	t=0	-	-	168	

[0978] 使用各种分子量的PEG连接体和小分子连接体将EGFR siRNA附接到EGFR抗体(EGFR-Ab),并评估PK以确定连接体分子量对mAb-siRNA缀合物在血浆中的行为的影响。如

图21所示,除了10kDa PEG导致更快的siRNA清除(即,在后续时间血浆浓度更低)之外,PEG连接体的分子量对血浆PK没有大的影响。还探索了siRNA和PEG相对于EGFR-Ab的取向。如图22所示,在EGFR-Ab与PEG5k之间具有siRNA(EGFR抗体-KRAS-PEG5k)所导致的血浆浓度比其中PEG5k处于EGFR-Ab与siRNA之间的替代缀合物(EGFR抗体-PEG5K-EGFR)所导致的显著更高。在一些情况下,在这些缀合物上使用两种不同的siRNA没有影响血浆动力学。

[0979] 还研究了EGFR-Ab上的药物负载,其中每个EGFR-Ab n=1个siRNA和n=2个siRNA。如图23所示,每个EGFR-Ab只有一个siRNA导致更高的血浆浓度,而每个EGFR-Ab n=2个siRNA的更高负载导致从血浆中更快清除。评估了添加内体逃避肽(蜂毒肽)的影响。将EGFR抗体-KRAS-PEG5k和EGFR抗体-蜂毒肽在溶液中混合在一起并共同注射。如图24所示,EGFR抗体-蜂毒肽的存在增加了EGFR抗体-KRAS-PEG5k在后续时间从血浆中的清除。

[0980] 接下来,在通过尾静脉注射在静脉内施用之后,将胆固醇-siRNA缀合物的血浆PK与mAb-siRNA缀合物相比较。如图25所示,相比于mAb-siRNA缀合物,胆固醇-siRNA缀合物更快地从血浆中清除。如PK曲线所示,缀合物上具有EGFR或KRAS siRNA不影响血浆动力学。

[0981] 除了血浆PK分析之外,在给药后的不同时间确定了组织中的siRNA浓度,以确定组织PK。组织浓度被测量为pmol/g,随后通过假设组织密度等于1g/mL,将其转换成pmol/mL。在图26中,浓度1nM=1nmol/L=1pmol/mL=1pmol/g组织。如图26A所示,对于几乎所有的缀合物,单次静脉内给药的0.5mg/kg EGFR抗体-siRNA导致在给药后24h时,肿瘤中的siRNA浓度为约100nM。在这些EGFR抗体-连接体-siRNA缀合物的情况下,EGFR-Ab与EGFR siRNA之间的连接体的分子量似乎不会改变这些缀合物在皮下胁腹H358肿瘤中的PK。如图26B中所示,在单次静脉内给药0.5mg/kg EGFR抗体-siRNA后的给药后24h时,肝脏中siRNA的浓度为约100nM,与肿瘤中所见类似。在给药后24h时,只有小分子连接体产生的肝脏中siRNA浓度是关于更长PEG连接体所见的约一半。对于这些EGFR抗体-连接体-siRNA缀合物,肿瘤和肝脏组织中的siRNA浓度都随时间降低。

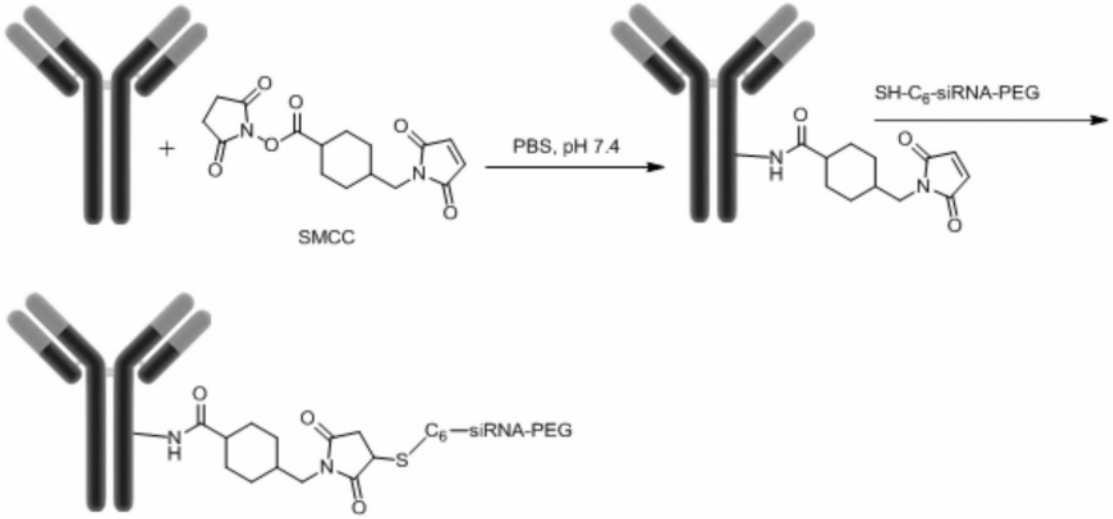
[0982] 还相对于组织PK曲线探索了siRNA和PEG相对于EGFR-Ab的取向。如图27所示,在单次静脉内给药0.5mg/kg后,EGFR抗体-KRAS-PEG5k缀合物和EGFR抗体-PEG5k-EGFR缀合物都向肿瘤和肝脏中递送约100nM siRNA。然而,EGFR抗体-KRAS-PEG5k将肿瘤中的siRNA浓度保持在约100nM,直到给药后168h,而其他三个曲线的浓度随时间下降。接下来,评估了组织PK与药物负载的关系。如图28所示,相比于向肝脏中,每个EGFR-Ab n=1个siRNA向肿瘤中递送了更高量的siRNA。然而,将siRNA负载增加到每个EGFR-Ab n=2个siRNA增加了递送至肝脏的siRNA量并降低了递送至肿瘤的siRNA量。另外,将EGFR抗体-蜂毒肽与一些制剂混合以便引入内体逃避功能。如图29所示,将EGFR抗体-蜂毒肽与EGFR抗体-siRNA的混合和共施用对组织PK没有大的影响。蜂毒肽的添加降低了siRNA在肿瘤中的摄取并增加了siRNA在肝脏中的摄取。

[0983] 还评估了胆固醇-siRNA缀合物(采用EGFR siRNA和KRASsiRNA二者)在肝脏和皮下胁腹H358肿瘤中的组织PK曲线。如图30中所示,在单次静脉内给药15mg/kg后,两种胆固醇-siRNA缀合物都向肝脏中递送了约5μM浓度的siRNA。在肝脏中,在1周的时间范围内,胆固醇-KRAS似乎比胆固醇-EGFR略微更快地被清除。两种不同的胆固醇-siRNA缀合物进一步显示了在肿瘤中的不同PK曲线。两种胆固醇缀合物向肿瘤中递送的siRNA比向肝脏中递送的少,但相比于胆固醇-KRAS缀合物,胆固醇-EGFR向肿瘤中递送更多siRNA。两种胆固醇-

siRNA缀合物都随时间以相似的斜率从肿瘤中清除。

[0984] 在PK分析后进行了PD分析。如图31A所示,在单次静脉内给药15mg/kg后,胆固醇-KRAS缀合物在肿瘤中仅产生了KRAS靶基因的边缘(约25%)mRNA敲低。然而,如图31B所示,相同15mg/kg剂量的胆固醇-KRAS能够在小鼠肝脏中产生大于50%的mRNA敲低。如图32所示,胆固醇-EGFR缀合物能够在肿瘤中产生大于50%的mRNA敲低。在一些情况下,在肿瘤中通过胆固醇-EGFR相比于通过胆固醇-KRAS的更高敲低是由于对于在肿瘤中所观察到的siRNA浓度,胆固醇-EGFR比胆固醇-KRAS更高(图30)。最后,如图33和图34所示,大多数EGFR抗体-siRNA缀合物在单次静脉内给药后在肿瘤中导致约25-50%EGFR mRNA或KRAS mRNA敲低,但所用的剂量(0.5mg/kg)远低于胆固醇-siRNA缀合物。

[0985] 实施例9:其他抗体-siRNA缀合物的合成、纯化和分析

[0986] 

[0987] 方案-6:通过SMCC连接体的抗体赖氨酸缀合得到的抗体-lys-siRNA-PEG缀合物

[0988] 步骤1:抗体与SMCC连接体缀合,随后与SH-siRNA缀合

[0989] 将抗体与1X磷酸盐缓冲液(pH 7.4)进行缓冲液交换并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液添加溶于DMSO中的2个当量的SMCC连接体并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS通过旋转过滤来去除未反应的SMCC连接体。将抗体-马来酰亚胺缀合物收集到反应容器中,并在室温下向具有5mM EDTA的pH 7.4的PBS中添加SH-C6-siRNA或SH-C6-siRNA-C6-NHCO-PEG-XkDa(2个当量)(X=0.5kDa至10kDa)。通过分析型SAX柱色谱法-2对反应混合物的分析示出了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[0990] 步骤2:纯化

[0991] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA-PEG缀合物和DAR>2抗体-siRNA-PEG缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。

[0992] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[0993] 通过SAX色谱法、SEC色谱法和SDS-PAGE分析来表征所分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。所有DAR1缀合物通常在9.0±0.4分洗脱,而DAR2缀合物和DAR3缀合物通常在9.7±0.2分洗脱。纯化后典型的DAR1缀合物的纯度大于90%,而典型的DAR>2赖氨酸缀合物含有70-80%DAR2和20-30%DAR3。

[0994]

[0995] 方案-7:通过抗体半胱氨酸缀合得到的抗体-Cys-siRNA-PEG缀合物

[0996] 步骤1:用TCEP进行抗体链间二硫化物还原

[0997] 将抗体与硼砂缓冲液(pH 8)进行缓冲液交换并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液添加在水中的2个当量的TCEP连接体并在室温下旋转2小时。将所得的反应混合物与含有5mM EDTA的pH 7.4的PBS进行缓冲液交换,并在室温下添加至SMCC-C6-siRNA或SMCC-C6-siRNA-C6-NHCO-PEG-XkDa(2个当量)(X=0.5kDa至10kDa)在含有5mMEDTA的pH 7.4的PBS中的溶液并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱对反应混合物的分析示出了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[0998] 步骤2:纯化

[0999] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-PEG-siRNA缀合物和DAR>2抗体-PEG-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。

[1000] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1001] 通过SEC、SAX色谱和SDS-PAGE来表征所分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2或阴离子交换色谱法-3,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。所分离的DAR1缀合物在分析型SAX法-2中通常在9.0+0.3min洗脱,并且纯度大于90%。典型的DAR>2半胱氨酸缀合物含有超过85%的DAR2和少于15%的DAR3。

[1002]

[1003] 方案-8:通过抗体链间半胱氨酸缀合得到的抗体siRNA缀合物

[1004] 步骤1:用TCEP进行抗体链间二硫化物还原

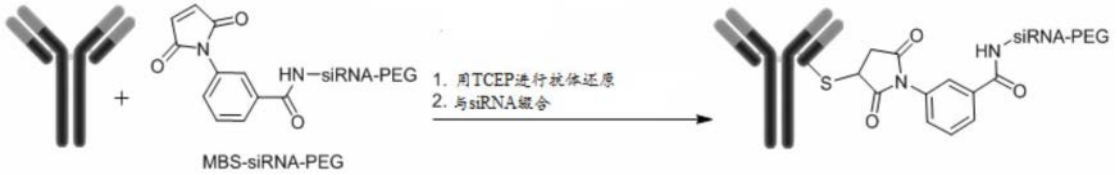
[1005] 将抗体与硼砂缓冲液(pH 8)进行缓冲液交换并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液添加在水中的2个当量的TCEP连接体并在室温下旋转2小时。将所得的反应混合物与含有5mM EDTA的pH 7.4的PBS进行缓冲液交换,并在室温下添加至CBTF-C6-siRNA-C6-NHCO-PEG-5kDa(2个当量)在含有5mM EDTA的pH 7.4的PBS中的溶液并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱对反应混合物的分析示出了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[1006] 步骤2:纯化

[1007] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA缀合物和DAR≥2抗体-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。典型的DAR>2半胱氨酸缀合物含有超过85%的DAR2和少于15%的DAR3或更高。

[1008] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1009] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2或阴离子交换色谱法-3,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1010] 

[1011] 方案-9:通过抗体链间半胱氨酸缀合得到的抗体siRNA缀合物

[1012] 步骤1:用TCEP进行抗体还原

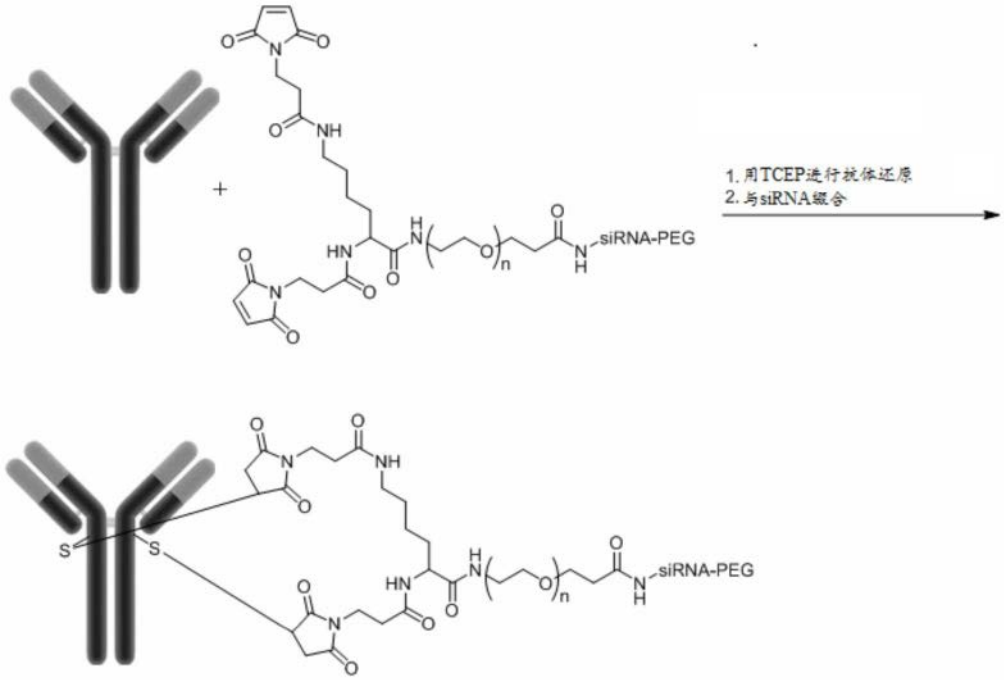
[1013] 将抗体与硼砂缓冲液(pH 8)进行缓冲液交换并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液添加在水中的2个当量的TCEP连接体并在室温下旋转2小时。将所得的反应混合物与含有5mM EDTA的pH 7.4的PBS进行交换,并在室温下添加至MBS-C6-siRNA-C6-NHCO-PEG-5kDa(2个当量)在含有5mM EDTA的pH 7.4的PBS中的溶液并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱对反应混合物的分析示出了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[1014] 步骤2:纯化

[1015] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA缀合物和DAR>2抗体-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。典型的DAR>2半胱氨酸缀合物含有超过85%的DAR2和少于15%的DAR3或更高的DAR。

[1016] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1017] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2或阴离子交换色谱法-3,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1018] 

[1019] 方案-10:通过抗体链间半胱氨酸缀合得到的抗体siRNA缀合物

[1020] 步骤1:用TCEP进行抗体还原

[1021] 将抗体与硼砂缓冲液(pH 8)进行缓冲液交换并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液添

加在水中的2个当量的TCEP连接体并在室温下旋转2小时。将所得的反应混合物与含有5mM EDTA的pH 7.4的PBS进行交换,并在室温下添加至MBS-C6-siRNA-C6-NHCO-PEG-5kDa(2个当量)在含有5mM EDTA的pH 7.4的PBS中的溶液并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱对反应混合物的分析示出了抗体siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

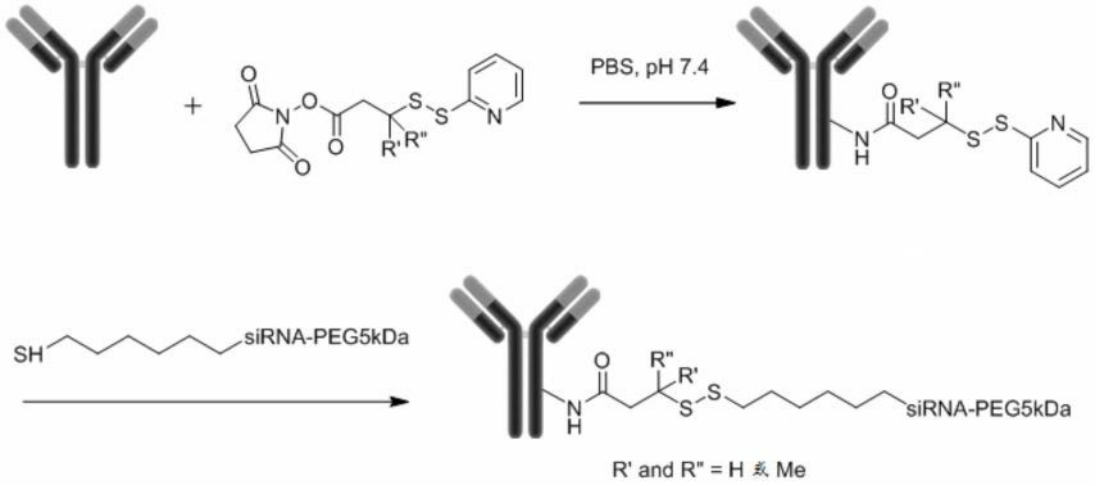
[1022] 步骤2:纯化

[1023] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA缀合物和DAR>2抗体-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。典型的DAR>2半胱氨酸缀合物含有超过85%的DAR2和少于15%的DAR3或更高的DAR。

[1024] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1025] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2或阴离子交换色谱法-3,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1026]



[1027] 方案-11:抗体-赖氨酸-S-S-siRNA-PEG缀合物的合成

[1028] 步骤1:抗体与SPDP连接体缀合,随后与SH-siRNA-PEG5kDa缀合

[1029] 将抗体与pH 7.4的1X PBS进行缓冲液交换并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液添加2个当量的SPDP连接体[琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯]或其甲基化形式并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS缓冲液通过旋转过滤来去除未反应的SPDP连接体。收集保留物,并在室温下添加在pH 7.4的PBS中的2个当量的SH-C6-siRNA-PEG5kDa并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱来分析反应混合物,并且可以看到缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

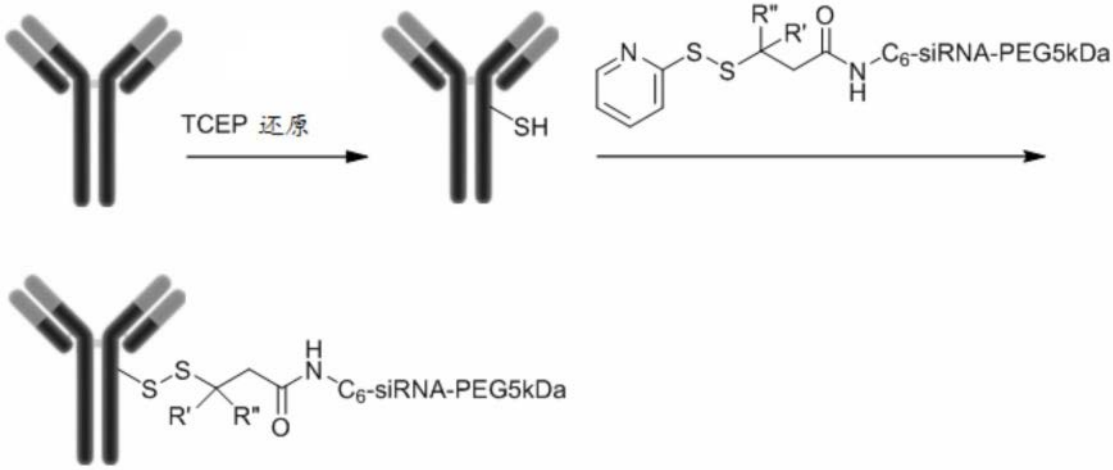
[1030] 步骤2:纯化

[1031] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA缀合物和DAR>2抗体-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。典型的DAR>2赖氨酸缀合物含有70%至80%的DAR2和20%至30%的DAR3或更高的DAR。

[1032] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1033] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1034]



[1035] 方案-12:抗体-半胱氨酸-S-S-siRNA-PEG缀合物的合成

[1036] 步骤1:抗体还原以及与吡啶基二硫代-siRNA-PEG5kDa缀合

[1037] 将抗体与pH 8.0的硼砂缓冲液进行缓冲液交换并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液添加1.5个当量的TCEP,并将反应混合物在室温下旋转1小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器通过旋转过滤来去除未反应的TCEP,并与pH 7.4的PBS缓冲液进行缓冲液交换。收集保留物,并在室温下添加在pH 7.4的PBS中的2个当量的吡啶基二硫代-C6-siRNA-PEG5kDa并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱来分析反应混合物,并且可以看到缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

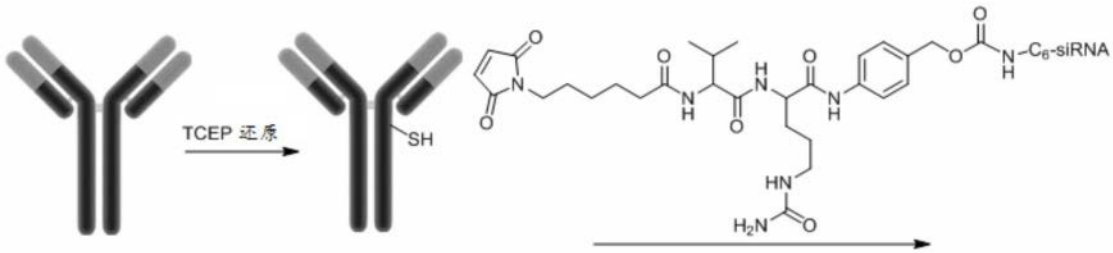
[1038] 步骤2:纯化

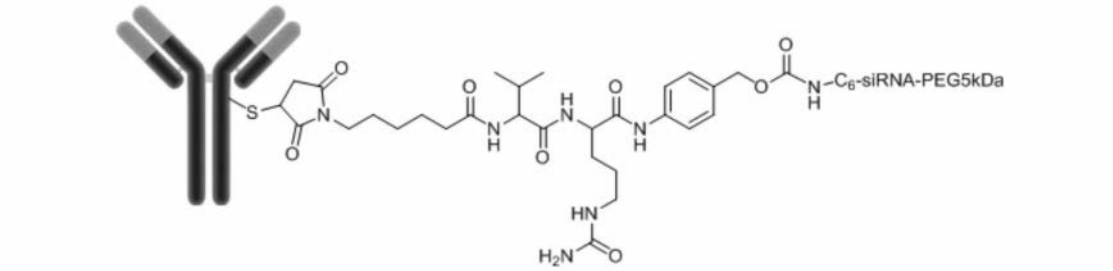
[1039] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA缀合物和DAR>2抗体-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。

[1040] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1041] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。典型的DAR>2半胱氨酸缀合物含有90％的DAR2和10％的DAR3或更高的DAR。

[1042]





[1043] 方案-13:抗体-半胱氨酸-ECL-siRNA-PEG缀合物的合成

[1044] 步骤1:抗体还原和与马来酰亚胺-ECL-siRNA-PEG5kDa缀合

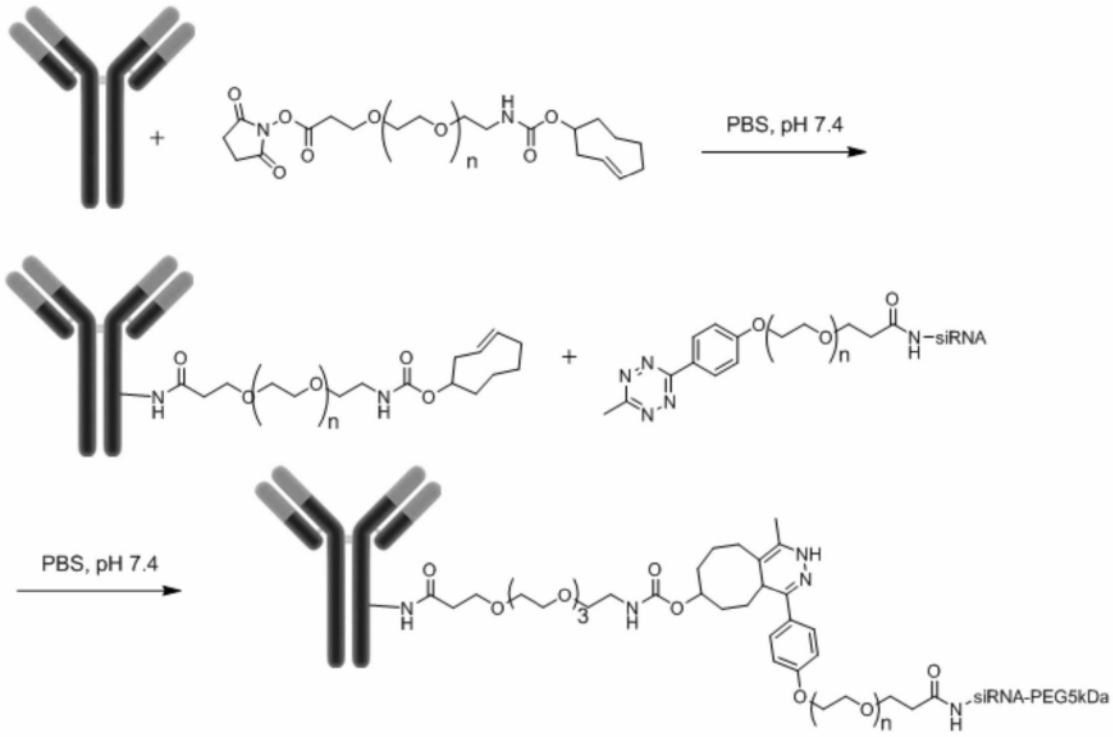
[1045] 将抗体与pH 8.0的硼砂缓冲液进行缓冲液交换并使其浓度达到10mg/ml。向该溶液添加1.5个当量的TCEP(三(2-羧乙基)膦盐酸盐)试剂并在室温下旋转1小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和具有5mM EDTA的pH 7.4的PBS缓冲液通过旋转过滤来去除未反应的TCEP。收集保留物,并在室温下添加在pH 7.4的PBS中的1.5个当量的马来酰亚胺-ECL-C6-siRNA-PEG5kDa并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱来分析反应混合物,并且可以看到缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

[1046] 步骤2:纯化

[1047] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA缀合物和DAR>2抗体-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。

[1048] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1049] 通过质谱或SDS-PAGE来表征分离的缀合物。使用阴离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。典型的DAR>2赖氨酸缀合物含有70％至80％的DAR2和20％至30％的DAR3或更高的DAR。

[1050] 

[1051] 方案-14:用TCO/四嗪连接体进行的抗体赖氨酸缀合

[1052] 步骤1:抗体与NHS-PEG4-TCO缀合,随后与甲基四嗪-PEG4-siRNA-PEG5kDa缀合

[1053] 将抗体与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换并使其浓度达到5mg/ml。向该溶液添加2个当量的NHS-PEG4-TCO连接体并在室温下旋转4小时。使用50kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS通过旋转过滤来去除未反应的连接体。收集保留物,并在室温下添加在pH 7.4的PBS中的2个当量的甲基四嗪-PEG4-siRNA-PEG5kDa并旋转过夜。通过分析型SAX柱色谱来分析反应混合物,并且观察到抗体-siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

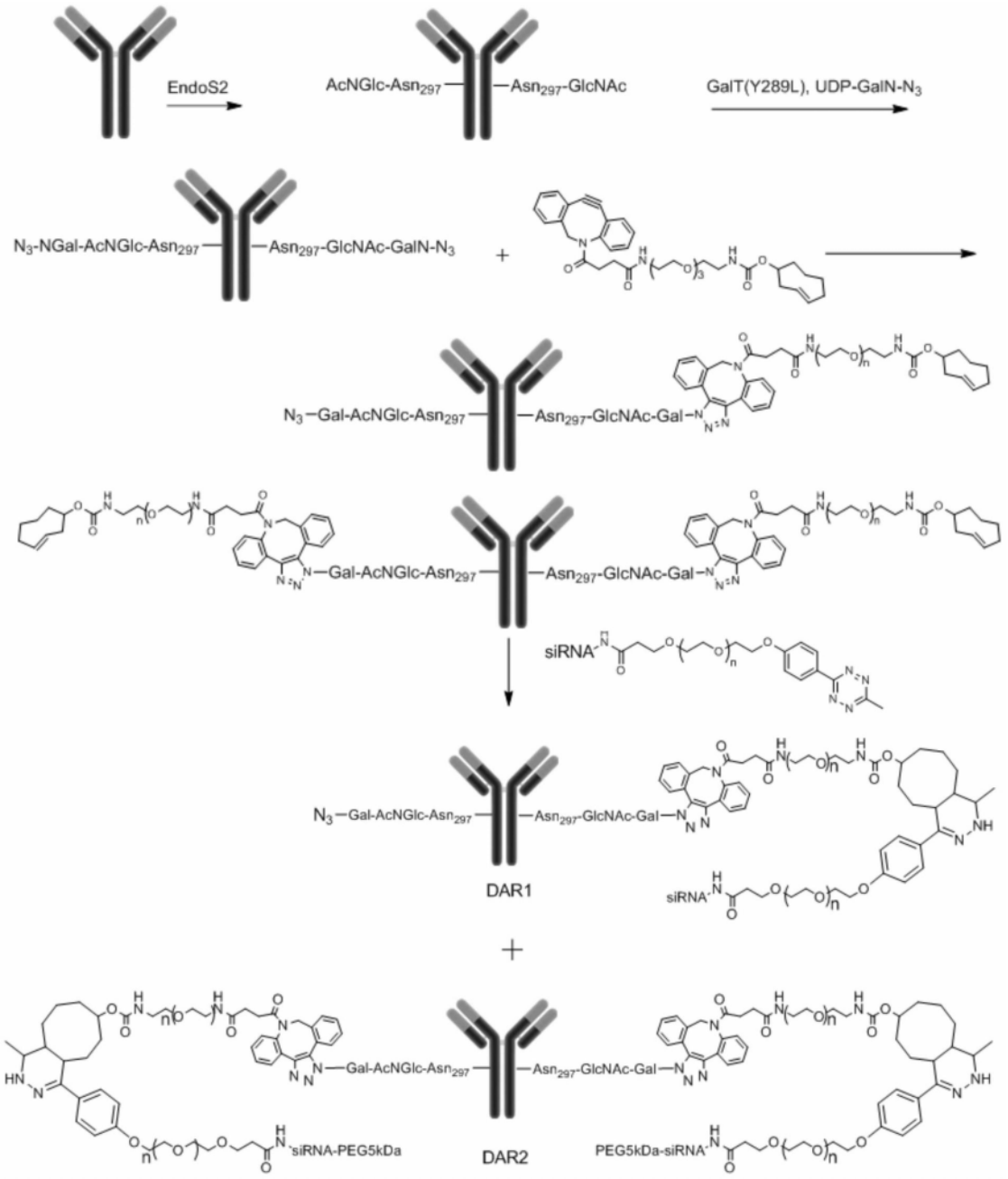
[1054] 步骤2:纯化

[1055] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA缀合物和DAR>2抗体-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。典型的DAR>2赖氨酸缀合物含有70%-80%的DAR2和20%-30%的DAR3或更高的DAR。

[1056] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1057] 通过质谱或SDS-PAGE来表征所分离的缀合物的特性和纯度。使用阴离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1058]



[1059] 方案-15:抗体聚糖处的位点特异性缀合

[1060] 步骤1:抗体聚糖修饰和Gal-N_3添加

[1061] 将抗体与pH 6.0的50mM磷酸钠缓冲液进行缓冲液交换并在37℃下用EndoS2处理16小时。将反应混合物缓冲液交换至TBS缓冲液(20mM Tris,0.9%NaCl,pH 7.4)中,并添加

UDP-GalNAz,随后添加$MnCl_2$和在50mM Tris,5mM EDTA(pH 8)中的Gal-T(Y289L)。最终溶液所含的浓度为0.4mg/mL抗体、10mM $MnCl_2$、1mM UDP-GalNAz和0.2mg/mL Gal-T(Y289L)并在30℃下温育过夜。

[1062] 步骤2:DIBO-PEG-TCO与叠氮物修饰的抗体缀合

[1063] 将来自步骤1的反应混合物与PBS进行缓冲液交换,并添加2个当量的DIBO-PEG4-TCO连接体并在室温下旋转6小时。使用50kDaMWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS通过旋转过滤来去除未反应的连接体。收集保留物并将其用于步骤3。

[1064] 步骤3:甲基四嗪-siRNA与TCO标记的抗体缀合

[1065] 将在pH 7.4的PBS中的2个当量的甲基四嗪-PEG4-siRNA-PEG5kDa添加至来自步骤2的保留物并在室温下旋转1小时。通过分析型SAX柱色谱来分析反应混合物,并且观察到抗体-siRNA缀合物以及未反应的抗体和siRNA。

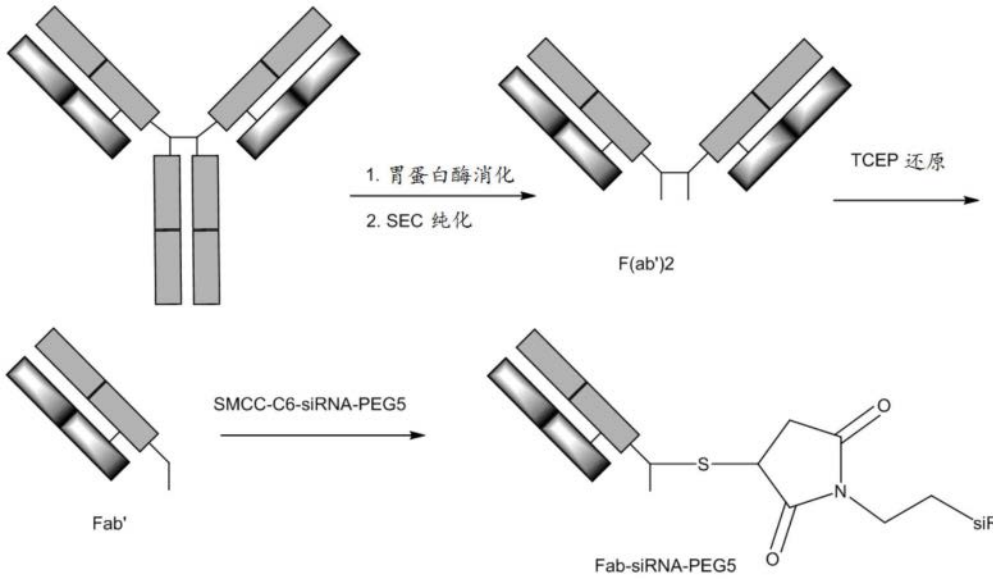
[1066] 步骤4:纯化

[1067] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1抗体-siRNA缀合物和DAR>2抗体-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。典型的DAR>2赖氨酸缀合物含有70%-80%的DAR2和20%-30%的DAR3或更高的DAR。

[1068] 步骤-5:经纯化的缀合物的分析

[1069] 通过质谱或SDS-PAGE来表征所分离的缀合物的特性和纯度。使用阴离子交换色谱法-2,通过分析型HPLC评估缀合物的纯度。

[1070]



[1071] 方案-16:Fab-siRNA缀合物生成

[1072] 步骤1:用胃蛋白酶进行抗体消化

[1073] 将抗体与pH 4.0的20mM乙酸钠/乙酸缓冲液进行缓冲液交换并使其浓度达到5mg/ml。添加固定的胃蛋白酶(Thermo Scientific,产品编号20343)并在37℃下温育3小时。使用30kDa MWCO Amicon旋转过滤器和pH 7.4的PBS来过滤反应混合物。收集保留物,并使用尺寸排阻色谱进行纯化以分离F(ab')2。然后通过10个当量的TCEP将收集的F(ab')2还原,并在室温下于pH 7.4的PBS中与SMCC-C6-siRNA-PEG5缀合。在SAX柱色谱上对反应混合物的分析示出了Fab-siRNA缀合物以及未反应的Fab和siRNA-PEG。

[1074] 步骤2:纯化

[1075] 使用阴离子交换色谱法-1,通过AKTA explorer FPLC来纯化粗制反应混合物。将含有DAR1 Fab-siRNA缀合物和DAR2 Fab-siRNA缀合物的级分分离、浓缩并与pH 7.4的PBS进行缓冲液交换。

[1076] 步骤-3:经纯化的缀合物的分析

[1077] 使用阴离子交换色谱法-2,通过SDS-PAGE和分析型HPLC评估所分离的缀合物的特性和纯度。

[1078] 纯化和分析方法

[1079] 阴离子交换色谱法-1。

[1080] 柱:Tosoh Bioscience,TSKGel SuperQ-5PW,21.5mm ID X 15cm,13um

[1081] 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

[1082] 梯度:

a.	%A	%B	柱体积
b.	100	0	1.00
c.	60	40	18.00
[1083] d.	40	60	2.00
e.	40	60	5.00
f.	0	100	2.00
g.	100	0	2.00

[1084] 阴离子交换色谱法-2

[1085] 柱:Thermo Scientific,ProPac™ SAX-10,Bio LC™,4X250mm

[1086] 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:1.0ml/min

[1087] 梯度:

a.	时间	%A	%B
b.	0.0	90	10
c.	3.00	90	10
[1088] d.	11.00	40	60
e.	13.00	40	60
f.	15.00	90	10
g.	20.00	90	10

[1089] 阴离子交换色谱法-3

[1090] 柱:Thermo Scientific,ProPacTM SAX-10,Bio LCTM,4X250mm

[1091] 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

[1092] 流速:0.75ml/min

[1093] 梯度:

[1094]

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

[1095] 尺寸排阻色谱法-1

[1096] 柱:TOSOH Biosciences,TSKgelG3000SW XL,7.8X 300mm,5μM

[1097] 流动相:150mM磷酸盐缓冲液

[1098] 流速:1.0ml/min,持续20min

[1099] siRNA合成

[1100] 使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。

[1101] 每个siRNA过客链含有两个缀合柄C6-NH_2和C6-SH,链的每端各一个。在5’端具有C6-NH_2柄的过客链含有在其3’端的C6-SH,而在3’端具有C6-NH_2柄的链含有在其5’端的C6-SH。两个缀合柄都通过反向脱碱基磷酸二酯或硫代磷酸酯连接至siRNA过客链。

[1102] siRNA的代表性结构具有在过客链的5’端的C6-NH_2缀合柄和其3’端的C6-SH。

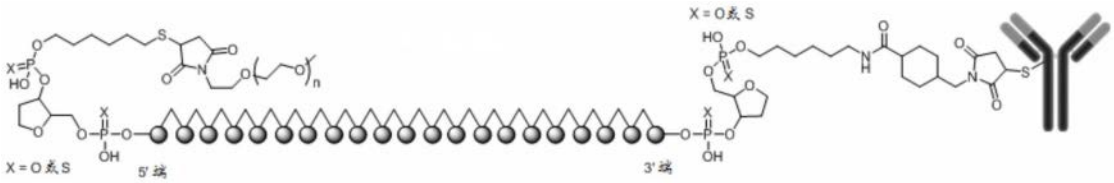
[1103]

[1104] 实施例10-41中所述的ASC架构

[1105] ASC架构-1:抗体-Lys-SMCC-S-3’-过客链。该缀合物通过抗体赖氨酸-SMCC缀合至过客链3’端处的巯基而生成。

[1106]

[1107] ASC架构-2:抗体-Cys-SMCC-S-3’-过客链。该缀合物通过抗体链间半胱氨酸缀合至过客链3’端处的SMCC而生成。

[1108] 

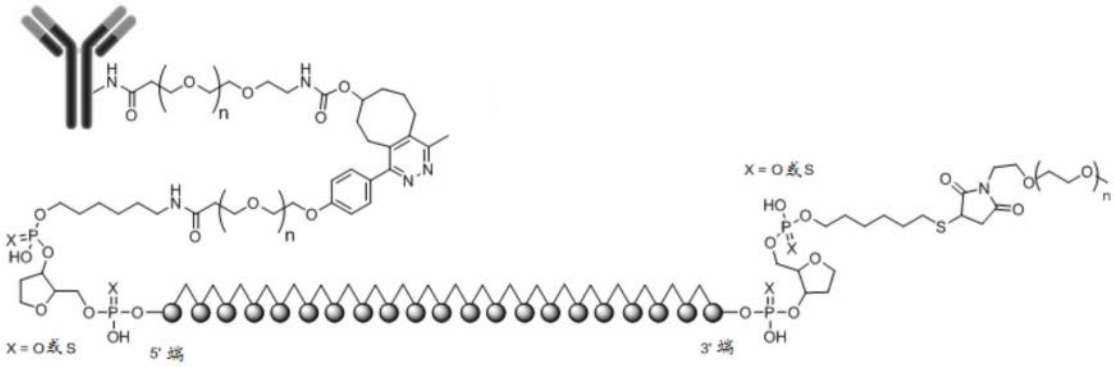
[1109] ASC架构-3:抗体-Lys-SMCC-S-5’-过客链。该缀合物通过抗体赖氨酸-SMCC缀合至过客链5’端处的C6-巯基而生成。

[1110]

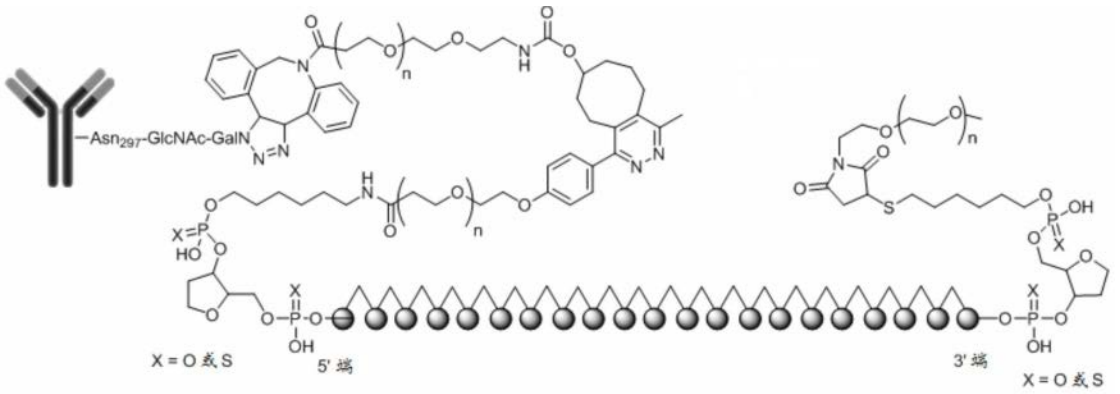
[1111] ASC架构-4:抗体-Cys-SMCC-S-5’-过客链。该缀合物通过抗体链间半胱氨酸缀合至过客链5’端处的SMCC而生成。

[1112]

[1113] ASC架构-5:抗体-Lys-PEG-5’-过客链。该缀合物通过抗体PEG-TCO缀合至过客链5’端处的四嗪而生成。

[1114] 

[1115] ASC架构-6:抗体-Lys-PEG-5’-过客链。该缀合物通过抗体PEG-TCO缀合至过客链5’端处的四嗪而生成。

[1116] 

[1117] ASC架构-7:在5’端没有反向脱碱基的抗体-Cys-PEG-5’-过客链。该缀合物使用与构架-2类似的程序生成。抗体直接缀合至过客链5’端的糖上的胺。

[1118]

[1119] 扎芦木单抗(EGFR-Ab)

[1120] 扎芦木单抗是针对人表皮生长因子受体(EGFR)的完全人IgG1κ单克隆抗体。其产生于中国仓鼠卵巢细胞系DJT33中,该细胞系DJT33通过用携带抗体基因(该抗体基因衍生自产生人抗EGFR抗体的杂交瘤细胞系(2F8))的GS载体转染而从CHO细胞系CHO-K1SV衍生。使用标准哺乳动物细胞培养和纯化技术制备扎芦木单抗。

[1121] 没有聚糖的扎芦木单抗的理论分子量(MW)是146.6kDa。如通过质谱法确定的,抗体的主要糖基化同种型的实验MW为149kDa。在还原条件下使用SDS-PAGE,发现轻链的MW为约25kDa,重链的MW为约50kDa。重链通过两个链间二硫键彼此连接,并且一个轻链通过单个链间二硫键附接至每个重链。轻链具有两个链内二硫键,重链具有四个链内二硫键。该抗体在重链的Asn305处被N-连接糖基化,其中聚糖由N-乙酰基-葡糖胺、甘露糖、岩藻糖和半乳糖组成。存在的主要聚糖是含有零个或一个末端半乳糖残基的岩藻糖基化双触角结构。已经使用成像毛细管IEF、琼脂糖IEF和分析型阳离子交换HPLC研究了IgG1κ抗体的带电荷的同种型模式。发现了多个带电荷的同种型,其中主要的同种型具有约8.7的等电点。

[1122] 扎芦木单抗的主要作用机制是对A431癌细胞中EGF诱导的EGFR磷酸化的浓度依赖性抑制。另外,在临床前细胞体外研究中已经观察到在低抗体浓度下诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[1123] 帕尼单抗(EGFR2-Ab)

[1124] 帕尼单抗是对表皮生长因子受体(EGFR)特异的临床批准的、完全人IgG2亚类单克隆抗体。帕尼单抗具有两条γ重链和两条κ轻链。糖基化帕尼单抗的总分子量约为147kDa。帕尼单抗表达为糖蛋白,具有位于重链上的单个共有N-连接的糖基化位点。帕尼单抗从中国仓鼠卵巢(CHO)细胞产生,并通过一系列色谱步骤、病毒灭活步骤、病毒过滤步骤和超滤/渗滤步骤纯化。

[1125] 帕尼单抗用作EGFR的配体结合位点处的竞争性拮抗剂,以抑制由EGF和转化生长因子α(该受体的天然配体)介导的结合和信号传导。使用BIAcore方法在重组EGFR中确定帕

尼单抗与EGFR结合的亲和力为3.5和5.7x10^{-12}M。对EGF结合的抑制在A431细胞中显示,A431细胞是一种表达EGFR的人表皮癌细胞系。在A431细胞中,EGFR的细胞内酸化、磷酸化和内化被帕尼单抗以剂量依赖性的方式阻断。还显示帕尼单抗在相同细胞系中体外和体内抑制细胞生长。

[1126] Herceptin(EGFR3-Ab)

[1127] Herceptin是对表皮生长因子受体2(EGFR2)特异的临床批准的、人源化IgG1亚类单克隆抗体。Herceptin具有人Fcγ1同种型以及κ轻链。

[1128] PSMA-Ab

[1129] PSMA-Ab是对前列腺特异性膜抗原(PSMA)特异的人源化IgG1亚类单克隆抗体。

[1130] ASGR1-Ab

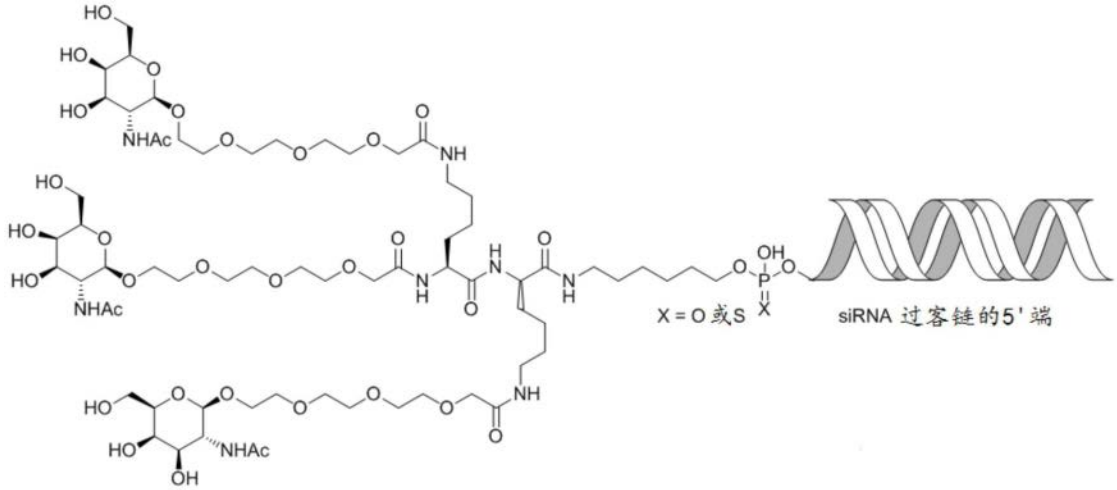
[1131] ASGR mAb-Sino103是结合小鼠脱唾液酸糖蛋白受体1(ASGPR1)的兔IgG单克隆抗体。其由Sino Biologicals Inc.(分类号50083-R103)供应。

[1132] ASGR2-Ab

[1133] ASGR mAb-R&D是结合小鼠脱唾液酸糖蛋白受体1(ASGPR1)的鼠IgG$_{2A}$亚类单克隆抗体。其通过蛋白A或蛋白G从杂交瘤培养物上清液种纯化,并由R&D Systems(分类号MAB2755)供应。

[1134] siRNA-TriGalNAc缀合物

[1135] 使用Lys-Lys二肽合成siRNA triGalNAc缀合物。将受保护的triGalNAc与二肽PEG连接体偶联并纯化。在去除triGalNAc-二肽上的羧酸保护基团后,将其缀合至siRNA过客链的5'端。

[1136] 

[1137] 实施例10:2016-PK-163-LNCap

[1138] siRNA设计和合成

[1139] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH$_2$和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连

接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1140] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1141] ASC合成和表征

[1142] 将第3-4组中使用的AXBYC缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。AXB缀合物和AXCYB缀合物如实施例9中所述制备。

[1143] 体内研究设计

[1144] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-350mm^3的皮下胁腹LNCaP肿瘤的雌性SCID SHO小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。处理组1-6依照如下的研究设计以1.0mg/kg或0.5mg/kg(基于siRNA的重量)给药。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。表22描述了更详细的研究设计。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1145] 表22

[1146]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	PSMA-Ab(Cys)-EGFR (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	PSMA-Ab(Cys)-EGFR (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
4	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
5	PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
6	PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
7	PSMA-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
8	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数: 40						

[1147] 具有 LNCaP 肿瘤的 SCID SHO 小鼠

[1148] 在体内小鼠肿瘤模型中探索了siRNA和PEG相对于PSMA-Ab的取向。如图50A所示，在PSMA-Ab与PEG5k之间具有siRNA(PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k或AXBYC形式)在肿瘤中所导致的EGFR mRNA敲低的水平比其中PEG5k处于PSMA-Ab与siRNA之间的替代缀合物(PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR或AXCYB形式)所导致的更高。相对于没有PEG5K的缀合物(PSMA-Ab(Cys)-EGFR或AXB形式)，该方法(AXBYC)还在肿瘤中导致更高水平的EGFR mRNA敲低。

[1149] 还相对于组织PK曲线探索了siRNA和PEG相对于PSMA-Ab的取向。组织浓度被测量为pmol/g，随后通过假设组织密度等于1g/mL，将其转换成pmol/mL(浓度1nM＝1nmol/L＝1pmol/mL＝1pmol/g组织)。如图50B所示，在PSMA-Ab与PEG5k之间具有siRNA(AXBYC)所导致的递送至肿瘤的siRNA水平比其中PEG5k处于PSMA-Ab与siRNA之间的替代缀合物(AXCYB)所导致的更高。相对于没有PEG5K的缀合物(AXB)，该方法(AXBYC)还导致递送至肿瘤的EGFR siRNA水平更高。

[1150] 在小鼠LNCaP皮下异种移植模型中，已经证明，相对于AXCYB形式和AXB形式，抗体siRNA缀合物的AXBYC形式导致肿瘤组织中更高水平的siRNA积累和更大幅度的EGFR mRNA敲低。LNCap肿瘤表达人PSMA，从而导致在静脉内施用后PSMA靶向的siRNA缀合物的肿瘤组织特异性积累、受体介导摄取和siRNA促进靶基因的敲低。

[1151] 实施例11:2016-PK-202-LNCap

[1152] siRNA设计和合成

[1153] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体，其带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上，并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄，即，在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链，化学结构参见实施例9。

[1154] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5’至3’)为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性，并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上，并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄，即，在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链，化学结构参见实施例9。

[1155] ASC合成和表征

[1156] 将第3-5和7组中使用的AXBYC缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n＝1)，如实施例9中所述。AXB缀合物(第1-2组)和AXCYB缀合物(第6组)如实施例9中所述制备。

[1157] 体内研究设计

[1158] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-350mm^3的皮下胁腹LNCaP肿瘤的雌性SCID SHO小鼠组(n＝5)，而相同小鼠的对照组(n＝5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。处理组1-6依照如下的研究设计以1.0mg/kg或0.5mg/kg(基于siRNA的重量)给药。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。在给药后

96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。表23描述了更详细的研究设计。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1159] 表23

[1160]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	PSMA-Ab(Cys)-EGFR (n=1)	5	1	IV	5.0	1	96
2	PSMA-Ab(Cys)-EGFR (n=1)	5	0.5	IV	5.0	1	96
3	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	5.0	1	96
4	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	5.0	1	96
5	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	5.0	1	96
6	PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR (n=1)	5	0.5	IV	5.0	1	96
7	PSMA-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	5.0	1	96
8	PBS 对照	5	-	IV	5.0	1	96
	动物总数: 40	具有 LNCaP 肿瘤的 SCID SHO 小鼠					

[1161] 还在体内小鼠肿瘤模型中探索了siRNA和PEG相对于PSMA-Ab的取向。如图51A所示,在PSMA-Ab与PEG5k之间具有siRNA(PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k或AXBYC形式)在肿瘤中所导致的EGFR mRNA敲低的水平比其中PEG5k处于PSMA-Ab与siRNA之间的替代缀合物(PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR或AXCYB形式)所导致的更高。相对于没有PEG5K的缀合物(PSMA-Ab(Cys)-EGFR或AXB形式),该方法(AXBYC)还在肿瘤中导致更高水平的EGFR mRNA敲低。

[1162] 还相对于组织PK曲线探索了siRNA和PEG相对于PSMA-Ab的取向。组织浓度被测量为pmol/g,随后通过假设组织密度等于1g/mL,将其转换成pmol/mL(浓度1nM=1nmol/L=1pmol/mL=1pmol/g组织)。如图51B所示,在PSMA-Ab与PEG5k之间具有siRNA(PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k或AXBYC)所导致的递送至肿瘤的siRNA水平比其中PEG5k处于PSMA-Ab与siRNA之间的替代缀合物(PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR或AXCYB)所导致的更高。相对于没有PEG5K的缀合物(PSMA-Ab(Cys)-EGFR或AXB),该方法(AXBYC)还导致递送至肿瘤的EGFR siRNA水平更高。

[1163] 在小鼠LNCaP皮下异种移植模型中,已经证明,相对于AXCYB形式和AXB形式,抗体siRNA缀合物的AXBYC形式导致肿瘤组织中更高水平的siRNA积累和更大幅度的EGFR mRNA敲低。LNCap肿瘤表达人PSMA,从而导致在静脉内施用后PSMA靶向的siRNA缀合物的肿瘤组织特异性积累、受体介导摄取和siRNA促进靶基因的敲低。

[1164] 实施例12:2016-PK-219-WT

[1165] siRNA设计和合成

[1166] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1167] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1168] ASC合成和表征

[1169] 将第4-6组中使用的AXBYC缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。AXB缀合物(第1-3组)和AXCYB缀合物(第7-9组)以及BYC缀合物(第10-12组)如实施例9中所述制备。

[1170] 体内研究设计

[1171] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4)。处理组接受0.5mg/kg(基于siRNA的重量),向所有组施用5.0mL/kg的剂量体积。表24示出了更详细的研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后5、30和180分钟收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24、96或168h通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1172] 表24

[1173]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量编号	给药方案	存活流血(min)	最终流血(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR (n=1)	4	0.5	IV	1	t=0	5	24
2		4	0.5	IV	1	t=0	30	96
3		4	0.5	IV	1	t=0	180	168
4	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	1	t=0	5	24
5		4	0.5	IV	1	t=0	30	96
6		4	0.5	IV	1	t=0	180	168
7	EGFR-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR (n=1)	4	0.5	IV	1	t=0	5	24
8		4	0.5	IV	1	t=0	30	96
9		4	0.5	IV	1	t=0	180	168
10	单独的 EGFR(即 EGFR-PEG5k)	4	0.5	IV	1	t=0	5	24
11		4	0.5	IV	1	t=0	30	96
12		4	0.5	IV	1	t=0	180	168
	动物总数: 48	WT 小鼠 CD-1						

[1174] 在该体内PK实验中,探索了siRNA和PEG相对于EGFR-Ab的取向以确定血浆中mAb-siRNA缀合物的行为。如图52所示,所有mAb-siRNA缀合物(AXB、AXBYC和AXCYB形式)都具有相若的PK,其中在168小时(7天)后约10%的siRNA保留在体循环中,相比之下,siRNA-PEG5K(BYC形式)快速从血浆中清除。

[1175] 相对于快速从血浆中清除的siRNA-PEG缀合物(BYC),抗体siRNA缀合物的AXBYC形式具有改善的PK性质。

[1176] 实施例13:2016-PK-199-HCC827

[1177] siRNA设计和合成

[1178] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。

[1179] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。将用于活性EGFR siRNA双链体的相同碱基、糖和磷酸盐修饰用于阴性对照siRNA。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。

[1180] ASC合成和表征

[1181] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1182] 体内研究设计

[1183] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^{3}的皮下(SC)胁腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n＝5),而相同小鼠的对照组(n＝5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。处理组1-3和4-6依照如下的研究设计以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg(基于siRNA的重量)给药。如实施例9所述,第1-3组含有相同靶向抗体,第4-6组具有另一不同EGFR靶向抗体,剩余的缀合物组分(连接体、siRNA和PEG)是相同的。第7组接受具有阴性对照siRNA序列(乱序的)的抗体缀合物,作为第1组的对照。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。表25描述了更详细的研究设计。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1184] 表25

[1185]

组别	测试品	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	剂量体积 (mL/kg)	剂量编号	收获时间 (h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
4	EGFR2-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
5	EGFR2-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
6	EGFR2-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
7	EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
8	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数:	**40**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠				

[1186] 在以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg单次静脉内注射后确定了肿瘤和肝脏中96小时的siRNA浓度。组织浓度被测量为pmol/g,随后通过假设组织密度等于1g/mL,将其转换成pmol/mL。在图53A中,浓度1nM＝1nmol/L＝1pmol/mL＝1pmol/g组织。如图53A所示,两种抗体缀合物都能够向肿瘤中递送更高水平(相对于向肝脏中)的siRNA,并且观察到剂量响应。在所有测试的剂量下,相对于EGFR2抗体,EGFR抗体缀合物能够向肿瘤组织递送更多siRNA。参见图53B。两种缀合物都能够在施用后96小时产生EGFR基因特异性mRNA敲低。含有乱序的siRNA和PBS载体对照的对照缀合物未产生显著的EGFR基因特异性mRNA敲低。

[1187] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物(cargo)的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,

证明了利用与设计用于下调EGFR mRNA的siRNA缀合的两种不同EGFR抗体进行靶向的2种缀合物的肿瘤特异性积累。HCC827肿瘤表达高水平的人EGFR,而两种缀合物都具有用以靶向siRNA的人特异性EGFR抗体,从而导致缀合物的肿瘤组织特异性积累。受体介导摄取导致靶基因的siRNA介导的敲低。

[1188] 实施例14:2016-PK-236-HCC827

[1189] siRNA设计和合成

[1190] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1191] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1192] ASC合成和表征

[1193] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1194] 体内研究设计

[1195] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)胁腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组6(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。依照如下的研究设计为处理组1-3以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg(基于siRNA的重量)给药,第4和5组以1.0mg/kg给药。如实施例9所述,第1-3组含有相同的靶向抗体,第4组具有不同的EGFR靶向抗体,但剩余的缀合物组分(连接体、siRNA和PEG)是相同的。第6组接受具有阴性对照siRNA序列(乱序的)的抗体缀合物,作为第5组的对照。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。表26描述了更详细的研究设计。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。

[1196] 表26

[1197]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	EGFR3-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	EGFR3-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	EGFR3-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
4	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
5	EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
6	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数: **30**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠					

[1198]

[1199] 在该体内PD实验中,证明了用EGFR抗体靶向剂的第三实例(EGFR3)施用后96小时的剂量依赖性EGFR基因特异性mRNA敲低。含有乱序的siRNA和PBS载体对照的对照缀合物未产生显著的EGFR基因特异性mRNA敲低。

[1200] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明了使用第三EGFR抗体靶向配体对EGFR mRNA的肿瘤特异性下调。HCC827肿瘤表达人EGFR,而两种缀合物都具有用以靶向siRNA的人特异性EGFR抗体(EGFR和EGFR3),从而导致缀合物的肿瘤组织特异性积累。受体介导摄取导致靶基因的siRNA介导的敲低。

[1201] 实施例15:2016-PK-234-HCC827

[1202] siRNA设计和合成

[1203] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列(5'至3')为TCUCGUGCCUUGGCAAACUUU(SEQ ID NO:2117),并且其被设计成与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1204] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1205] ASC合成和表征

[1206] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1207] 体内研究设计

[1208] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)胁腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组10(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。处理组1-3、4-6和7-9依照如下的研究设计以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg(基于siRNA的重量)给药。如实施例9所述,第1-3组含有相同靶向抗体(EGFR3),第4-9组具有另一不同EGFR靶向抗体,但剩余的缀合物组分(连接体、siRNA和PEG)是相同的。第7-9组接受具有阴性对照siRNA序列(乱序的)的抗体缀合物,作为第1-6组的对照。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。表27描述了更详细的研究设计。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1209] 表27

[1210]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	EGFR3-Ab(Cys)-N3'-EGFR-5'S-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	EGFR3-Ab(Cys)-N3'-EGFR-5'S-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	EGFR3-Ab(Cys)-N3'-EGFR-5'S-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
4	EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
5	EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
6	EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
7	EGFR-Ab(Cys)-N5'-乱序-3'S-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
8	EGFR-Ab(Cys)-N5'-乱序-3'S-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
9	EGFR-Ab(Cys)-N5'-乱序-3'S-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
10	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
动物总数:	**50**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠					

[1211] 在以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg单次静脉内注射后确定了肿瘤和肝脏中96小时的siRNA浓度。组织浓度被测量为pmol/g,随后通过假设组织密度等于1g/mL,将其转换成pmol/mL。在图56A中,浓度1nM＝1nmol/L＝1pmol/mL＝1pmol/g组织。如图56A所示,两种抗体缀合物都能够向肿瘤中递送更高水平(相对于向肝脏中)的siRNA,并且观察到剂量响应。相对于乱序的和载体对照,两种缀合物都能够在施用后96小时产生EGFR基因特异性mRNA敲低。参见图56B。

[1212] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明了利用与设计用于下调EGFR mRNA的siRNA缀合的两种不同EGFR抗体进行靶向的2种缀合物的肿瘤特异性积累。HCC827肿瘤表达高水平的人EGFR,而两种缀合物都具有用以靶向siRNA的人特异性EGFR抗体,从而导致缀合物的肿瘤组织特异性积累。受体介导摄取导致靶基因的siRNA介导的敲低。

[1213] 实施例16:2016-PK-237-HCC827

[1214] siRNA设计和合成

[1215] KRAS:设计了针对人KRAS的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与KRAS的人mRNA转录物上从碱基位置237起始的基因序

列(UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU;SEQ ID NO:2088)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,在3'端是C6-SH,其通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。此外,过客链的5'端去除了反向脱碱基,并且采用类似于架构2的程序将抗体直接缀合至T碱基上的过客链5'端的糖上的胺,参见实施例9。

[1216] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1217] ASC合成和表征

[1218] 将第1-3组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-7的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1219] 将第4-6组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1220] 体内研究设计

[1221] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)肋腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组7(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。处理组1-3、4-6依照如下的研究设计以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg(基于siRNA的重量)给药。如实施例9中所述,第1-6组含有相同的靶向抗体(EGFR),但第1-3组具有设计用于下调KRAS的siRNA而第4-6组具有设计用于下调EGFR的siRNA。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。表28描述了更详细的研究设计。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如方法部分中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。使用ELISA测定来确定缀合物的抗体组分的血浆浓度。

[1222] 表28

[1223]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	存活流血(min)	最终流血(h)	收获时间(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-KRAS-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	72	72
2	EGFR-Ab(Cys)-KRAS-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	3	96	96
3	EGFR-Ab(Cys)-KRAS-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	24	168	168
4	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	72	72
5	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	3	96	96
6	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	24	168	168
7	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	-	-	96

动物总数:	**3 5**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠

[1224] 在以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg单次静脉内注射后确定了肿瘤和肝脏中96小时的siRNA浓度。组织浓度被测量为pmol/g,随后通过假设组织密度等于1g/mL,将其转换成pmol/mL。在图57A和图57B中,浓度1nM＝1nmol/L＝1pmol/mL＝1pmol/g组织。如图57A和图57B所示,两种抗体缀合物都能够向肿瘤中递送更高水平(相对于向肝脏中)的siRNA。相对于含有设计用于下调EGFR的siRNA的缀合物或PBS载体对照,含有设计用于下调KRAS的siRNA的缀合物能够在施用后96小时实现KRAS基因特异性mRNA敲低(图57C)。两种抗体缀合物构建物具有类似的PK性质(参见图58A和图58B),表明在抗体的5'指导链上使用替代的缀合策略对该生物参数没有影响。

[1225] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明了与设计用于下调KRAS mRNA的siRNA缀合的EGFR抗体的肿瘤特异性积累和siRNA介导的mRNA敲低。HCC827肿瘤表达高水平的人EGFR,而缀合物具有用以靶向siRNA的人特异性EGFR抗体,从而导致缀合物的肿瘤组织特异性积累。受体介导摄取导致KRAS基因的siRNA介导的敲低。

[1226] 实施例17:2016-PK-187-Hep3B

[1227] siRNA设计和合成

[1228] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通

过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1229] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1230] ASC合成和表征

[1231] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1232] 体内研究设计

[1233] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)胁腹Hep-3B2 1-7肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组5(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。依照如下的研究设计为处理组1-3以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg(基于siRNA的重量)给药,第4组(乱序对照)以1.0mg/kg给药。第4组接受具有阴性对照siRNA序列(乱序的)的抗体缀合物,作为第1组的对照。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。表29描述了更详细的研究设计。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1234] 表29

[1235]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
4	EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
5	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
动物总数:	**25**	具有 Hep3B 肿瘤的 nu/nu 小鼠					

[1236] 在以1.0mg/kg、0.5mg/kg或0.25mg/kg单次静脉内注射后确定了肿瘤和肝脏中96小时的siRNA浓度。组织浓度被测量为pmol/g,随后通过假设组织密度等于1g/mL,将其转换

成pmol/mL。在图59A中,浓度1nM＝1nmol/L＝1pmol/mL＝1pmol/g组织。如图59A所示,抗体缀合物能够将siRNA递送至肿瘤。相对于含有阴性对照siRNA序列的缀合物或PBS载体对照,该缀合物能够在施用后96小时实现EGFR基因特异性mRNA敲低(图59B)。

[1237] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明了与设计用于下调EGFR mRNA的siRNA缀合的EGFR抗体的肿瘤特异性积累和siRNA介导的mRNA敲低。Hep-3B2 1-7肿瘤细胞表达人EGFR,而缀合物具有用以靶向siRNA的人特异性EGFR抗体,从而导致缀合物的肿瘤组织特异性积累。受体介导摄取导致EGFR基因的siRNA介导的敲低。

[1238] 实施例18:2016-PK-257-WT

[1239] siRNA设计和合成

[1240] R1442:N5-CTNNB1-3'S

[1241] CTNNB1:设计了针对人CTNNB1的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与CTNNB1的人mRNA转录物上从碱基位置1248起始的基因序列(UAAUGAGGACCUAUACUUAUU;SEQ ID NO:2095)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1242] ASC合成和表征

[1243] 将抗体缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n＝1),如实施例9中所述。tri-GalNAc-CTNNB1缀合物如实施例9中所述制备。

[1244] 体内研究设计

[1245] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠的第1-3组(n＝4),靶向GalNAc的对照通过皮下注射给药。处理组1-3接受2.0mg/kg、1.0mg/kg或0.5mg/kg(基于siRNA的重量)的剂量,并且靶向GalNAc的对照缀合物以2mg/kg给药。所有组都被施用5.0mL/kg的剂量体积。表30示出了更详细的研究设计。收集50mg的肝脏小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。

[1246] 表30

[1247]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	ASGR1-Ab(Lys)-CTNNB1-	4	2	IV	**5.0**	1	96

[1248]

	PEG5k (n=1)						
2	ASGR1-Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
3	ASGR1-Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	96
4	3GalNAc-CTNNB1 对照	5	2	**s.c.**	**5.0**	1	96
5	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
				动物总数:	**22**	WT 小鼠(CD-1)	

[1249] 在施用后96小时确定CTNNB1基因敲低。如图60所示,GalNac缀合的siRNA能够在单次皮下注射后实现基因特异性敲低,如本领域其他人员已充分描述的。与ASGR抗体缀合的相同siRNA还能够实现CTNNB1基因特异性下调和剂量依赖性的方式。

[1250] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明向肝脏递送了与设计用于下调CTNNB1 mRNA的siRNA缀合的ASGR抗体。小鼠肝细胞表达脱唾液酸糖蛋白受体(ASGR),而缀合物具有靶向siRNA的小鼠特异性ASGR抗体,从而导致肝脏中CTNNB1的siRNA介导的敲低。

[1251] 实施例19:2016-PK-253-WT

[1252] siRNA设计和合成

[1253] KRAS:设计了针对人KRAS的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与KRAS的人mRNA转录物上从碱基位置237起始的基因序列(UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU;SEQ ID NO:2088)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1254] ASC合成和表征

[1255] 将抗体缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n=1),如实施例9中所述。tri-GalNAc-CTNNB1缀合物如实施例9中所述制备。

[1256] 体内研究设计

[1257] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠的第1-3组(n=4),靶向GalNAc的对照通过皮下注射给药。处理组1-3接受2.0mg/kg、1.0mg/kg或0.5mg/kg(基于siRNA的重量)的剂量,并且靶向GalNAc的对照缀合物以2mg/kg给药。所有组都被施用5.0mL/kg的剂量体积。表31示出了更详细的研究设计。收集50mg的肝脏小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。

[1258] 表31

[1259]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	ASGR2-Ab(Lys)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	2	IV	**5.0**	1	96
2	ASGR2-Ab(Lys)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
3	ASGR2-Ab(Lys)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	96
4	3GalNAc-KRAS 对照	5	2	**s.c.**	**5.0**	1	96
5	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数:	**22**			WT 小鼠(CD-1)		

[1260] 在施用后96小时确定KRAS基因敲低。如图61所示,GalNac缀合的siRNA能够在单次皮下注射后实现基因特异性敲低,如本领域其他人员已充分描述的。与ASGR抗体缀合的相同siRNA还能够实现KRAS基因特异性下调和剂量依赖性的方式。

[1261] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明向肝脏递送了与设计用于下调KRASmRNA的siRNA缀合的ASGR抗体。小鼠肝细胞表达脱唾液酸糖蛋白受体(ASGR),而缀合物具有靶向siRNA的小鼠特异性ASGR抗体,从而导致肝脏中KRAS的siRNA介导的敲低。

[1262] 实施例20:2016-PK-129-WT-血浆

[1263] siRNA设计和合成

[1264] KRAS:设计了针对人KRAS的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与KRAS的人mRNA转录物上从碱基位置237起始的基因序列(UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU;SEQ ID NO:2088)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1265] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1266] ASC合成和表征

[1267] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1268] 体内研究设计

[1269] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n＝3)。处理组接受0.5mg/kg(基于siRNA的重量),向所有组施用5.0mL/kg的剂量体积。表32示出了更详细的研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后5、30和180分钟收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24、96或168h通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。使用ELISA测定来确定抗体的血浆浓度。

[1270] 表32

[1271]

组别	测试品	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	剂量体积 (mL/kg)	剂量编号	存活流血 (min)	最终流血 (h)
1	EGFR2-Ab(Lys)-KRAS-PEG5k (N=1)	3	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
2		3	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
3		3	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
4	PSMA-Ab(Lys)-EGFR-PEG5k (N=1)	3	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
5		3	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
6		3	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
	动物总数:	**18**	WT 小鼠 CD-1					

[1272] 在该体内PK实验中,探索了两种不同缀合物的血浆清除率。如图62所示,当比较siRNA(KRAS与EGFR)或抗体(EGFR2与PSMA)的血浆水平时,两种mAb-siRNA缀合物具有相若的血浆PK。

[1273] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明具有不同抗体靶向配体和不同siRNA货物的两种不同缀合物具有相若的血浆PK性质。

[1274] 实施例21:2016-PK-123-LNCaP

[1275] siRNA设计和合成

[1276] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1277] ASC合成和表征

[1278] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n＝1)或DAR2(n＝2),如实施

例9中所述。

[1279] 体内研究设计

[1280] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-350mm^{3}的皮下胁腹LNCaP肿瘤的雌性SCID SHO小鼠组(n＝5),而相同小鼠的对照组(n＝5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。依照表33中的研究设计为处理组给药。所有组(处理组和对照组)都被施用5.71mL/kg的剂量体积。在给药后72小时通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1281] 表33

[1282]

组别	测试品	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	剂量体积 (mL/kg)	剂量编号	收获时间 (h)
1	PSMA-Ab(Lys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	2	IV	**5.71**	1	72
2		5	1	IV	**5.71**	1	72
3		5	0.5	IV	**5.71**	1	72
4	PSMA-Ab(Lys)-EGFR-PEG5k (n=2)	5	4	IV	**5.71**	1	72
5		5	2	IV	**5.71**	1	72
6		5	1	IV	**5.71**	1	72
7	PSMA-Ab(Lys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	2	IV	**5.71**	1	72
8	单独的 EGFR siRNA	5	2	IV	**5.71**	1	72
9	载体	5	-	IV	**5.71**	1	72
	动物总数:	**45**	具有 LNCaP 肿瘤的 SCID SHO 小鼠				

[1283] 在单次静脉内注射后确定了肿瘤和肝脏中72小时的siRNA浓度,参见图63A。如图63A所示,药物抗体比为1(n＝1)的抗体缀合物能够以剂量依赖性的方式向肿瘤递送siRNA,在肿瘤中递送的siRNA水平高于在肝脏中测得的水平,并且相对于乱序对照和PBS对照产生了EGFR基因特异性mRNA敲低。这与药物抗体比为2(n＝2)的抗体缀合物形成对比,该抗体缀合物在相同剂量下在肿瘤中获得了较低浓度的siRNA,肝脏浓度和肿瘤浓度在相同量级,并且EGFR敲低水平较低。未缀合的siRNA具有较差的肿瘤和肝脏积累,并且没有可测量的EGFR mRNA敲低。图63B图示了LNCaP肿瘤中EGFR mRNA的相对百分比。

[1284] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的

一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明相对于DAR2缀合物和未缀合的siRNA,DAR1缀合物能够获得更高的siRNA肿瘤浓度。此外,相对于DAR2缀合物和未缀合的siRNA,DAR1缀合物能够获得更高水平的siRNA介导的EGFR敲低。

[1285] 实施例22:2016-PK-258-WT

[1286] siRNA设计和合成

[1287] HPRT:设计了针对人HPRT的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列为AUAAAAUCUACAGUCAUAGUU(SEQ ID NO:2102),并且其被设计成与HPRT的人mRNA转录物上从碱基位置425起始的基因序列互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1288] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。将用于活性EGFR siRNA双链体的相同碱基、糖和磷酸盐修饰用于阴性对照siRNA。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1289] ASC合成和表征

[1290] 将第1-3和7-9组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第4-6组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1291] 体内研究设计

[1292] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4),而相同小鼠的对照组(n=4)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表34示出了更详细的研究设计。收集50mg的组织小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1293] 表34

[1294]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	抗 B 细胞 Ab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96

[1295]

2	抗 B 细胞 Ab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
3	抗 B 细胞 Ab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
4	抗 B 细胞 Ab(Lys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
5	抗 B 细胞 Ab(Lys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
6	抗 B 细胞 Ab(Lys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
7	抗 B 细胞 Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
8	抗 B 细胞 Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
9	抗 B 细胞 Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
10	PBS 对照	4	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数:	**77**	WT 小鼠(CD-1)				

[1296] 如图64A-图64C所示,在单次静脉内施用ASC后,测量到在心肌、腓肠肌骨骼肌和肝脏中HPRT的剂量依赖性敲低。在肺组织中没有可测量的HPRT敲低(图64D)。此外,观察到该siRNA在全部四种组织区室中的剂量依赖性积累(图64E)。赖氨酸缀合物与半胱氨酸缀合物之间的生物活性(KD和组织浓度)没有显著差异。

[1297] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明抗B细胞抗体可用于使siRNA靶向心肌、腓肠肌骨骼肌和肝脏并且获得报道基因HPRT的基因特异性下调。当使用赖氨酸或半胱氨酸缀合策略来附接抗体时,ASC构建体的生物活性没有可测量的差异。

[1298] 实施例23:2016-PK-254-WT

[1299] siRNA设计和合成

[1300] HPRT:设计了针对人HPRT的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列为AUAAAAUCUACAGUCAUAGUU(SEQ ID NO:2102),并且其被设计成与HPRT的人mRNA转录物上从碱基位置425起始的基因序列互补。使用在RNAi领域中充分描述的碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化

学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1301] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5’至3’)为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。将用于活性EGFR siRNA双链体的相同碱基、糖和磷酸盐修饰用于阴性对照siRNA。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1302] ASC合成和表征

[1303] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1304] 体内研究设计

[1305] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表35示出了更详细的研究设计。收集50mg的组织小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1306] 表35

[1307]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	抗 B 细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	10	IV	**5.1**	1	96
2	抗 B 细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.1**	1	96
3	抗 B 细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.1**	1	96
4	抗 B 细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	4	10	IV	**5.1**	1	96
5	抗 B 细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.1**	1	96
6	抗 B 细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.1**	1	96
7	PBS 对照	5	-	IV	**5.1**	1	96
	动物总数:	**29**	WT 小鼠(CD-1)				

[1308] 如图65A-图65C所示,在单次静脉内施用含有抗B细胞Fab靶向配体的ASC后,测量到在心肌、腓肠肌骨骼肌和肝脏中HPRT的剂量依赖性敲低。在肺组织中没有可测量的HPRT敲低(图65D)。此外,观察到该siRNA在全部四种组织区室中的剂量依赖性积累(图65E)。

[1309] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物(cargo)的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明抗B细胞Fab可用于使siRNA靶向心肌、腓肠肌骨骼肌和肝脏并且获得报道基因HPRT的基因特异性下调。

[1310] 实施例24:2016-PK-245-WT

[1311] siRNA设计和合成

[1312] CTNNB1:设计了针对人CTNNB1的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列为TUUCGAAUCAAUCCAACAGUU(SEQ ID NO:2096),被设计成靶向CTNNB1的人mRNA转录物上从碱基位置1797起始的基因序列。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1313] ASC合成和表征

[1314] 将第3-4组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第1-2组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1315] 体内研究设计

[1316] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组

(n＝4),而相同小鼠的对照组(n＝5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表36示出了更详细的研究设计。收集50mg的组织小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1317] 表36

[1318]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	抗 B 细胞 Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
2	抗 B 细胞 Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
3	抗 B 细胞 Ab(Cys)-CTNNB1-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
4	抗 B 细胞 Ab(Cys)-CTNNB1-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
5	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
动物总数:	**21**	WT 小鼠(CD-1)					

[1319] 如图66A和图66B所示,在单次静脉内施用含有抗B细胞抗体(抗B细胞-Ab)靶向配体的ASC后,引起了心肌中的HPRT敲低和剂量依赖性组织siRNA积累。如图66C和图66D所示,在单次静脉内施用含有抗B细胞抗体靶向配体的ASC后,引起了腓肠肌骨骼肌中的HPRT敲低和剂量依赖性组织siRNA积累。赖氨酸缀合物与半胱氨酸缀合物之间的生物活性(KD和组织浓度)没有显著差异。

[1320] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明抗B细胞抗体可用于使siRNA靶向心肌和腓肠肌骨骼肌并且获得CTNNB1 mRNA的基因特异性下调。

[1321] 实施例25:2016-PK-160-LNCaP

[1322] siRNA设计和合成

[1323] AR:设计了针对人AR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与AR的人mRNA转录物上从碱基位置2822起始的基因序列(指导链序列:GAGAGCUCCAUAGUGACACUU;SEQ ID NO:2108)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,

即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1324] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1325] ASC合成和表征

[1326] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1327] 体内研究设计

[1328] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-350mm^3的皮下胁腹LNCaP肿瘤的雌性SCID SHO小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。下表描述了研究设计。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1329] 表37

[1330]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	ANT4044(Lys)-AR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	ANT4044(Lys)-AR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	ANT4044(Lys)-AR-PE5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
4	ANT4044(Lys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
5	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数: 30	具有 LNCaP 肿瘤的阉割 SCID SHO 小鼠					

[1331] 如图67A所示,在单次静脉内施用含有PSMA抗体靶向配体和设计用于下调AR的siRNA的ASC之后,相对于乱序对照,在所有测试剂量下都引发了LNCaP肿瘤组织中的AR下调。如图67B所示,在肿瘤组织中存在可测量的siRNA积累,并且其中siRNA的水平高于在肝脏组织中测得的水平。

[1332] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明向

LNCaP前列腺肿瘤递送了与设计用于下调AR mRNA的siRNA缀合的PSMA抗体。LNCaP细胞在细胞表面上表达人PSMA,该缀合物具有人特异性PSMA抗体,该抗体结合抗原并允许siRNA的内化,从而导致肿瘤组织中AR的siRNA介导的敲低。

[1333] 实施例26:在B细胞中的体外摄取和敲低

[1334] siRNA设计和合成

[1335] HPRT:设计了针对人HPRT的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列为AUAAAAUCUACAGUCAUAGUU(SEQ ID NO:2102),并且其被设计成与HPRT的人mRNA转录物上从碱基位置425起始的基因序列互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1336] ASC合成和表征

[1337] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1338] 体外研究设计

[1339] 收获小鼠脾脏并将其保持于在冰上的具有100u/ml青霉素和链霉素的PBS中。用干净的载玻片将脾脏粉碎、切成小块、用18G针匀浆并过滤(70um尼龙膜)。采用来自Milteny biotec的死细胞去除试剂盒(分类号130-090101),根据制造商的说明来去除死细胞。为了分离小鼠B细胞,依照制造商的说明来使用B细胞分离试剂盒Milteny biotec(分类号130-090-862)。简言之,用每个小鼠脾脏200μl MACS缓冲液将活脾细胞悬浮。采用与抗生物素磁性微珠偶联的针对CD43(Ly48)、CD4和Ter-119的生物素缀合单克隆抗体耗尽非B细胞。从一个小鼠脾脏可以获得3000万个活B细胞。为激活分离的小鼠B细胞(在具有100u/ml青霉素和链霉素的10%FBS RPMI-1640中2x10^6个/ml),添加10μg/ml LPS、5μg/ml抗IgM、1μg/ml抗CD40、0.05μg/ml IL-4和0.05μg/ml INFγ的混合物。在激活四小时后,向24孔板(0.5ml介质)或12孔板(1ml介质)中的每个孔10^6个细胞添加ASC(1pM至10nM)。在ASC治疗48小时后,收获细胞,并分析所分离的RNA的mRNA敲低。

[1340] 表38

[1341]

组别	测试品
1	抗B细胞Ab(Cys)-HPRT-PEG5k(n=1)
2	抗B细胞Ab(Cys)-乱序-PEG5k(n=1)
3	抗B细胞Fab(Cys)-HPRT-PEG5k(n=1)
4	抗B细胞Fab(Cys)-乱序-PEG5k(n=1)
5	抗B细胞Ab
6	载体对照

[1342] 在该体外实验中,在激活的原代小鼠B细胞中,测量到抗B细胞抗体ASC和Fab ASC递送设计用于下调次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)的siRNA的能力。如图68A所示,Fab缀合物能够相对于载体对照或乱序对照下调HPRT。如图68B所示,抗体缀合物能够相对于抗体对照、载体对照或乱序对照下调HPRT。

[1343] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明向激活的小鼠B细胞递送了与设计用于下调HPRT mRNA的siRNA缀合的小鼠抗B细胞抗体或抗B细胞Fab。激活的小鼠B细胞通过识别抗B细胞抗体的表面受体识别和内化抗体-siRNA缀合物,从而导致HPRT的siRNA介导的敲低。

[1344] 实施例27:2016-PK-249-WT

[1345] siRNA设计和合成

[1346] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1347] KRAS:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与KRAS的人mRNA转录物上从碱基位置237起始的基因序列(UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU;SEQ ID NO:2088)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1348] ASC合成和表征

[1349] 将第1-2组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第3-4组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR2(n=2),如实施例9中所述。将第5-6组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-5的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第7-8组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-5的DAR2(n=2),如实施例9中所述。将第9-10组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-6的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第11-12组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-6的DAR2(n=2),如实施例9中所述。

[1350] 体内研究设计

[1351] 通过siRNA缀合物(第1-12组)或单独的抗体(第13-14组)的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4)。表39示出了研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后0.25小时和3小时收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24小时和72小时通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。使用ELISA测定来确定抗体的血浆浓度。

[1352] 表39

[1353]

Gr	测试品	N	siRNA剂量 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	剂量编号	存活流血 (h)	最终流血 (h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	4	0.5	**5.0**	1	0.25	24
2	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	4	0.5	**5.0**	1	3	72
3	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=2)	4	0.5	**5.0**	1	0.25	24
4	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=2)	4	0.5	**5.0**	1	3	72
5	EGFR-Ab(Lys-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	**5.0**	1	0.25	24
6	EGFR-Ab(Lys-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	**5.0**	1	3	72
7	EGFR-Ab(Lys-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=2)	4	0.5	**5.0**	1	0.25	24
8	EGFR-Ab(Lys-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=2)	4	0.5	**5.0**	1	3	72
9	EGFR-Ab(Asn297-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.125	**5.0**	1	0.25	24
10	EGFR-Ab(Asn297-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.125	**5.0**	1	3	72
11	EGFR-Ab(Asn297-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=2)	4	0.125	**5.0**	1	0.25	24
12	EGFR-Ab(Asn297-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=2)	4	0.125	**5.0**	1	3	72
13	EGFR-Ab	4	0.5	**5.0**	1	0.25	24
14	EGFR-Ab	4	0.5	**5.0**	1	3	72
	动物总数: 56	WT 小鼠 CD-1					

[1354]

[1355] 在该体内PK研究中,证明了位点特异性缀合的实用性。如图69A所示,DAR1(n=1)测试品(第9组)与两个对照(第1组和第5组)具有相若的siRNA血浆清除曲线,其中在168小时后,血浆中剩余约10%siRNA。相对于DAR1缀合物,所有DAR2(n=2)缀合物具有快得多的siRNA血浆清除率。如图69B所示,DAR1(n=1)测试品(第9组)与两个对照(第1组和第5组)具有相若的EGFR-Ab血浆清除曲线。相对于DAR1缀合物,所有DAR2(n=2)缀合物具有快得多的抗体血浆清除率。

[1356] 在以上的实施例中,展示了使用赖氨酸和半胱氨酸缀合策略将siRNA附接至抗体。在本实施例中,证明了位点特异性缀合策略的实用性,并且证明该缀合物与非特异性缀合策略具有相若的PK性质。

[1357] 实施例28:2016-PK-180-HCC827

[1358] siRNA设计和合成

[1359] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序

列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1360] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1361] ASC合成和表征

[1362] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1363] 体内研究设计

[1364] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)胁腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表40描述了研究设计。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆和组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度和组织浓度。

[1365] 表40

[1366]

Gr	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
4	EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
5	EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
6	EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
7	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
8	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
9	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
10	EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
11	EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
12	EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
15	EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
16	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数:	**80**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠				

[1367] 在该体内PK研究中,测试了将抗体与siRNA之间的SMCC连接体替换为酶促可切割的连接体,以及在siRNA与PEG之间引入可切割的二硫化物连接体,或其组合。如图70A所示,所有连接体组合都能够在HCC827肿瘤细胞中实现相对于乱序对照的EGFR mRNA敲低。如图70B所示,所有连接体组合都在肿瘤和肝脏中产生了相若的siRNA组织积累。如图70C所示,所有缀合物都能够在血浆中维持高水平的siRNA,其中在168小时后,血浆中剩余约10%。

[1368] 在本AXBYC实施例中,证明不同的连接体组合("X"和/或"Y")可用于将siRNA缀合至抗体和PEG。

[1369] 实施例29:2016-PK-162-LNCaP

[1370] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1371] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):

3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5’至3’)为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1372] ASC合成和表征

[1373] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1374] 体内研究设计

[1375] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-350mm^3的皮下胁腹LNCaP肿瘤的雌性SCID SHO小鼠组1-7(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。下表描述了研究设计。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1376] 表41

[1377]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	PSMA-Ab(Lys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	5.0	1	96
2	PSMA-Ab(Lys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	5.0	1	96
3	PSMA-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	5.0	1	96
4	PSMA-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	5.0	1	96
5	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)新鲜	5	1	IV	5.0	1	96

[1378]

6	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)冷冻	5	1	IV	5.0	1	96
7	PSMA-Ab(Cys)- 乱 序 -PEG5k (n=1)	5	1	IV	5.0	1	96
8	PBS 对照	5	-	IV	5.0	1	96
动物总数:		40	具有 LNCaP 肿瘤的 SCID SHO 小鼠				

[1379] 在该体内PK研究中,将二硫化物(SS)、酶促可切割连接体(ECL)或SMCC连接体用在抗体与siRNA之间。如slide 42上的图片1所示,当使用可切割二硫化物连接体来代替ECL或SMCC连接体时,siRNA的肿瘤组织积累降低。如slide 42上的图片2所示,ECL连接体策略在LNCaP肿瘤细胞中产生了相对于乱序对照的EGFR mRNA敲低。然而,SS连接体没有在LNCaP肿瘤细胞中产生相对于乱序对照的EGFRmRNA敲低。除了这些连接体实验之外,检查了ASC在-80℃储存的可行性。将5mg/ml抗体浓度的制剂在液氮中快速冷冻,在于-80℃下储存30天后在室温下解冻,并在施用前稀释至所需的给药浓度。如slide42上的图片3所示,在-80℃下储存并在施用前解冻的构建体保留了其在LNCaP肿瘤细胞中产生相对于乱序对照的EGFR mRNA敲低的能力。

[1380] 在本AXBYC实施例中,证明ECL连接体(“X”)可用于将抗体缀合至siRNA,并且ASC可以在-80℃下储存1个月并在施用之前解冻。

[1381] 实施例30:2016-PK-181-HCC827

[1382] siRNA设计和合成

[1383] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用在RNAi领域中充分描述的碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1384] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5’至3’)为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1385] ASC合成和表征

[1386] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1387] 体内研究设计

[1388] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)胁腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表42描述了研究设计。在给药后96小时通过CO_2室

息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如方法部分中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为组织浓度。

[1389] 表42

[1390]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	EGFR-Ab(Cys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
4	EGFR-Ab(Cys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
6	EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
7	EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
8	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数:	**80**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠				

[1391] 在该体内PK研究中,将二硫化物或SMCC连接体用在抗体与siRNA之间。如图72A所示,当使用可切割二硫化物连接体来代替更稳定的SMCC连接体时,siRNA的肿瘤组织积累降低。如图72B所示,两种连接体策略都能够在HCC827肿瘤细胞中产生相对于乱序对照的EGFR mRNA敲低。

[1392] 在本AXBYC实施例中,展示了可切割二硫化物连接体(“X”)在抗体与siRNA之间的使用。

[1393] 实施例31:2016-PK-220-WT

[1394] siRNA设计和合成

[1395] KRAS:设计了针对人KRAS的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与KRAS的人mRNA转录物上从碱基位置237起始的基因序列(指导链序列:UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU;SEQ ID NO:2088)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1396] ASC合成和表征

[1397] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1398] 体内研究设计

[1399] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组

(n＝4)。处理组接受0.5mg/kg(基于siRNA的重量),向所有组施用5.0mL/kg的剂量体积。表43示出了更详细的研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后5、30和180分钟收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24、96或168小时通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。使用ELISA测定来确定抗体的血浆浓度。

[1400] 表43

[1401]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	存活流血(min)	最终流血(h)
1	EGFR-Ab(Lys)-SPDP-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
2		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
3		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
4	EGFR-Ab(Cys)-SPDP-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
5		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
6		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
7	EGFR-Ab(Cys)-SMPT-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
8		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
9		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
10	EGFR-Ab(Cys)-SS(甲基)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
11		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
12		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
13	EGFR-Ab(Cys)-SS(二甲基)-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
14		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
15		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
	动物总数:	**60**	WT 小鼠 CD-1					

[1402]

[1403] 在该体内PK研究中,探索了具有不同空间位阻程度的不同二硫化物连接体,以便理解二硫化物切割的速率对ASC血浆PK有何种影响。如图73A所示,通过改变二硫化物连接体的空间位阻程度调节了siRNA从血浆中的清除。图73B图示了抗体扎芦木单抗从血浆中的清除。

[1404] 在本实施例中,展示了采用一系列不同AXBYC缀合物的生物活性,其中一系列不同二硫化物连接体(“X”)可用于将siRNA缀合至抗体。

[1405] 实施例32:2016-PK-256-WT

[1406] siRNA设计和合成

[1407] KRAS:设计了针对人KRAS的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3’二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与KRAS的人mRNA转录物上从碱基位置237起始的基因序

列(指导链序列:UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU;SEQ ID NO:2088)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1408] ASC合成和表征

[1409] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1410] 体内研究设计

[1411] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4)。处理组接受0.5mg/kg(基于siRNA的重量),向所有组施用5.0mL/kg的剂量体积。表44示出了更详细的研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后0.25小时、3小时和24小时收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后72、96或168h通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。使用ELISA测定来确定抗体的血浆浓度。

[1412] 表44

[1413]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	存活流血(h)	最终流血(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-SMCC-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	72
2	EGFR-Ab(Cys)-SMCC-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	3	96
3	EGFR-Ab(Cys)-SMCC-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	24	168
4	EGFR-Ab(Cys)-CBTF-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	72
5	EGFR-Ab(Cys)-CBTF-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	3	96
6	EGFR-Ab(Cys)-CBTF-KRAS-	4	0.5	IV	**5.0**	1	24	168

[1414]

	PEG5k (n=1)							
7	EGFR-Ab(Cys)-MBS-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	72
8	EGFR-Ab(Cys)-MBS-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	3	96
9	EGFR-Ab(Cys)-MBS-KRAS-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	24	168
	动物总数:	**60**	WT 小鼠 CD-1					

[1415] 在该体内PK研究中,测试了在抗体与siRNA之间的一系列不同连接体,以确定对血浆清除率的影响。如slide 45上的图片所示,所有缀合物都能够在血浆中维持高水平的siRNA,其中在168小时后,血浆中剩余超过10%。

[1416] 在本实施例中,展示了采用一系列不同AXBYC缀合物的生物活性,其中一系列不同连接体("Y")可用于将siRNA缀合至抗体,同时保持相对于针对未缀合siRNA在历史上观察到的血浆动力学改善的血浆动力学。

[1417] 实施例33:2016-PK-237-HCC827

[1418] siRNA设计和合成

[1419] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(指导链序列:ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。

[1420] 制备了含有呈两种不同取向(S5'-EGFR-3'N和N5'-EGFR-3'S)的两个缀合柄(C6-NH_2和C6-SH)的两种不同的过客链。在N5'-EGFR-3'S过客链中,两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。在S5'-EGFR-3'N过客链中,两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1421] ASC合成和表征

[1422] 将第1-3组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第4-6组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-2的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1423] 体内研究设计

[1424] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)胁腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表45描述了研究设计。在给药后72小时、96小时和168小时通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqManqPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织和血浆siRNA的定量。使用

TaqManMicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1425] 表45

[1426]

Gr	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	存活流血(min)	最终流血(h)	收获时间(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-S5'-EGFR-3'N-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	72	72
2	EGFR-Ab(Cys)-S5'-EGFR-3'N-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	3	96	96
3	EGFR-Ab(Cys)-S5'-EGFR-3'N-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	24	168	168
4	EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	72	72
5	EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	3	96	96
6	EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	24	168	168
7	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	-	-	96
	动物总数:	**65**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠						

[1427]

[1428] 在该体内PK研究中,评估了抗体和PEG向siRNA上的缀合位点的取向变化(5'或3')的生物学结果。此外,评估了使用赖氨酸或半胱氨酸将连接体附接至抗体的生物学结果。如图75A所示,siRNA的两种取向产生了相若的EGFR肿瘤敲低。如图75B和图75C所示,两种取向都在肿瘤和肝脏中产生了相若的siRNA组织积累。如图75D所示,两种取向都产生了相若的血浆清除动力学。

[1429] 如图54所示突显的,利用具有能够在一系列不同组织靶标中实现体内生物活性的一系列不同抗体和siRNA货物的A-X-B-Y-C缀合物证明了生物活性。在本实施例中,证明抗体可以缀合至siRNA的过客链的5'端和3'端,同时保持EGFR siRNA的生物活性和组织分布。

[1430] 实施例34:2016-PK-259-WT

[1431] siRNA设计和合成

[1432] HPRT:设计了针对人HPRT的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与HPRT的人mRNA转录物上从碱基位置425起始的基因序列(指导链序列:UUAAAAUCUACAGUCAUAGUU;SEQ ID NO:2104)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。制备了含有呈两种不同取向(S5'-HPRT-3'N和N5'-HPRT-3'S)的两个缀合柄(C6-NH_2和C6-SH)的两种不同的过客

链。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1433] ASC合成和表征

[1434] 将第1-3组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第4-6组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-2的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第7-9组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第10-12组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-3的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1435] 体内研究设计

[1436] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表46示出了更详细的研究设计。收集50mg的组织小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1437] 表46

[1438]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
2	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
3	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
4	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N3'-HPRT-5'S-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
5	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N3'-HPRT-5'S-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
6	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N3'-HPRT-5'S-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
7	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-PEG5k (n=1)	4	2	IV	**5.0**	1	96
8	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-PEG5k (n=1)	4	0.75	IV	**5.0**	1	96
9	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-PEG5k (n=1)	4	0.25	IV	**5.0**	1	96
10	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)	4	2	IV	**5.0**	1	96
11	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)	4	0.75	IV	**5.0**	1	96
12	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)	4	0.25	IV	**5.0**	1	96
13	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
		动物总数:	**53**	WT 小鼠(CD-1)			

[1439] 在体内PK研究中,评估了抗体和PEG向siRNA上的缀合位点的取向变化(5'或3')的生物学结果。此外,评估了使用赖氨酸或半胱氨酸将连接体附接至抗体的生物学结果。如图76A-图76D所示,制备抗体缀合物的所有组合在所测量的四种组织区室中产生了相若的HPRT敲低。如图77A-图77D所示,制备抗体缀合物的所有组合在所测量的不同组织区室中产生了相若的siRNA组织积累。

[1440] 在本实施例中,证明针对siRNA和抗体的许多不同缀合策略可用于A-X-B-Y-C形式,同时保持HPRT siRNA的生物活性和组织分布。

[1441] 实施例35:2016-PK-267-WT

[1442] siRNA设计和合成

[1443] CTNNB1:设计了针对人CTNNB1的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与CTNNB1的人mRNA转录物上从碱基位置1797起始的基因序列(指导链序列:UUUCGAAUCAAUCCAACAGUU;SEQ ID NO:2098)。使用碱、糖和磷酸盐

修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。

[1444] 制备了含有呈两种不同取向(S5'-CTNNB1-3'N和N5'-CTNNB1-3'S)的两个缀合柄(C6-NH_2和C6-SH)的两种不同的过客链。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1445] ASC合成和表征

[1446] 将第1-3组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第4-6组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-3的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第7-9组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-2的DAR1(n=1),如实施例9中所述。将第10-12组的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1447] 体内研究设计

[1448] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表47示出了更详细的研究设计。收集50mg的组织小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。

[1449] 表47

[1450]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
2	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
3	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
4	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
5	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
6	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
7	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N3'-CTNNB1-5'S-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
8	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N3'-CTNNB1-5'S-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
9	抗 B 细胞 Ab(Cys)-N3'-CTNNB1-5'S-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
10	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S3'-CTNNB1-5'N-PEG5k (n=1)	4	3	IV	**5.0**	1	96
11	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S3'-CTNNB1-5'N-PEG5k (n=1)	4	1	IV	**5.0**	1	96
12	抗 B 细胞 Ab(Lys)-S3'-CTNNB1-5'N-PEG5k (n=1)	4	0.3	IV	**5.0**	1	96
13	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
动物总数:		**53**	WT 小鼠(CD-1)				

[1451] 在该体内PK研究中,评估了抗体和PEG向siRNA上的缀合位点的取向变化(5'或3')的生物学结果和使用赖氨酸或半胱氨酸将连接体附接至抗体的生物学结果。如图78A-图78D所示,制备抗体缀合物的所有组合在所测量的四种组织区室中产生了相若的CTNNB1敲低。

[1452] 在本实施例中,证明针对siRNA和抗体的许多不同缀合策略可用于A-X-B-Y-C形式,同时保持CTNNB1 siRNA的生物活性。

[1453] 实施例36:2016-PK-188-PK

[1454] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核

苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1455] ASC合成和表征

[1456] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1457] 体内研究设计

[1458] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4)。处理组接受0.5mg/kg(基于siRNA的重量),向所有组施用5.0mL/kg的剂量体积。表48示出了更详细的研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后5、30和180分钟收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24、96或168h通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1459] 表48

[1460]

Gr	测试品	N	ROA	剂量体积 (mL/kg)	剂量编号	存活流血 (min)	最终流血 (h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	4	IV	**5.0**	1	5	24
2		4	IV	**5.0**	1	30	96
3		4	IV	**5.0**	1	180	168
4	EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)	4	IV	**5.0**	1	5	24
5		4	IV	**5.0**	1	30	96
6		4	IV	**5.0**	1	180	168
7	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	4	IV	**5.0**	1	5	24
8		4	IV	**5.0**	1	30	96
9		4	IV	**5.0**	1	180	168
10	EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	4	IV	**5.0**	1	5	24
11		4	IV	**5.0**	1	30	96
12		4	IV	**5.0**	1	180	168
	动物总数:	**48**	WT 小鼠 CD-1				

[1461] 如图79所示,具有不同的可切割连接体配置的所有ASC都获得了相当的血浆PK曲线,其中在施用后168小时,剩余约10%的siRNA。

[1462] 在本实施例中,展示了采用一系列A-X-B-Y-C缀合物的生物活性,其中使用许多不同连接体策略(组分X和Y)将PEG和抗体缀合至siRNA过客链。

[1463] 实施例37:2016-PK-201-LNCaP

[1464] siRNA设计和合成

[1465] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1466] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1467] ASC合成和表征

[1468] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1469] 体内研究设计

[1470] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-350mm^3的皮下胁腹LNCaP肿瘤的雌性SCID SHO小鼠组1-7(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表49描述了研究设计。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1471] 表49

[1472]

组别	测试品	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	剂量体积 (mL/kg)	剂量编号	收获时间 (h)
1	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-ECL-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
4	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-ECL-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
5	PSAM-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
6	PSAM-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
7	PSMA-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
8	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
动物总数: 40	具有 LNCaP 肿瘤的 SCID SHO 小鼠						

[1473] 如图80A所示,多种不同连接体被用在siRNA与PEG之间,在静脉内施用单个剂量的siRNA之后,可以获得相对于阴性对照siRNA序列或PBS对照的可测量的肿瘤组织EGFR下调。此外,如图80B所示,不同的连接体配置导致的肿瘤siRNA积累的水平高于在其他组织样品(肝脏、脾脏、肺脏和肾脏)中测得的水平。

[1474] 在本实施例中,展示了采用一系列A-X-B-Y-C缀合物的生物活性,其中使用许多不同连接体策略(组分Y)将PEG缀合至siRNA过客链。

[1475] 实施例38:2016-PK-198-HCC827

[1476] siRNA设计和合成

[1477] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1478] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列

(5’至3’)为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5’端的C6-NH_2和在3’端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1479] ASC合成和表征

[1480] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1481] 体内研究设计

[1482] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)胁腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组1-15(n=5),而相同小鼠的对照组16(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表50描述了研究设计。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1483] 表50

[1484]

组别	测试品	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	剂量体积 (mL/kg)	剂量编号	收获时间 (h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG2k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG2k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
3	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG2k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96

[1485]

4	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{48}$ (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
5	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{48}$ (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
6	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{48}$ (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
7	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{24}$ (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
8	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{24}$ (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
9	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{24}$ (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
10	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{12}$ (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
11	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{12}$ (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
12	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG$_{12}$ (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
13	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
14	PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
15	EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
16	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数:	**80**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠				

[1486] 如图81A所示,相对于阴性对照siRNA序列(乱序)和PBS对照,具有线性PEG长度的不同配置的所有ASC在HCC827肿瘤细胞中获得了剂量依赖性EGFR mRNA敲低。如图81B所示,具有线性PEG长度的不同配置的所有ASC都获得了相当的剂量依赖性siRNA肿瘤组织积累。此外,相对肿瘤,肝脏、肺脏、肾脏和脾脏的积累较低。

[1487] 在本实施例中,展示了采用一系列A-X-B-Y-C缀合物的生物活性,其中使用了许多不同PEG(组分C)长度。

[1488] 实施例39:2016-PK-194-WT

[1489] siRNA设计和合成

[1490] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连

接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1491] ASC合成和表征

[1492] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1493] 体内研究设计

[1494] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4)。处理组接受0.5mg/kg(基于siRNA的重量),向所有组施用5.0mL/kg的剂量体积。表51示出了更详细的研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后5、30和180分钟收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24、96或168h通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1495] 表51

[1496]

组别	测试品	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	剂量体积 (mL/kg)	剂量编号	存活流血 (min)	最终流血 (h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG2k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
2		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
3		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
4	EGFR-Ab(Cys)-EGFR -$dPEG_{48}$ (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
5		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
6		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
7	EGFR-Ab(Cys)-EGFR -$dPEG_{24}$ (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
8		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
9		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
10	EGFR-Ab(Cys)-EGFR -$dPEG_{12}$ (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
11		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
12		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
动物总数:		**48**	WT 小鼠 CD-1					

[1497] 如slide 54所示,具有不同的线性PEG长度的所有ASC都获得了相当的血浆PK曲线,其中在施用后168小时,剩余约10%的siRNA。

[1498] 在本实施例中,展示了采用一系列A-X-B-Y-C缀合物的相当的血浆PK性质,其中使用了许多不同PEG(组分C)长度。

[1499] 实施例40:2016-PK-195-WT

[1500] siRNA设计和合成

[1501] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链

体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1502] ASC合成和表征

[1503] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1504] 体内研究设计

[1505] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=4)。处理组接受0.5mg/kg(基于siRNA的重量),向所有组施用5.0mL/kg的剂量体积。表52示出了更详细的研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后5、30和180分钟收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24、96或168h通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定血浆siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1506] 表52

[1507]

Gr	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	存活流血(min)	最终流血(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
2		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
3		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
4	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-$(dPEG24)_3$ (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
5		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
6		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
7	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-$(dPEG12)_3$	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24

[1508]

8	(n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
9		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
10	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-$(dPEG4)_3$ (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	5	24
11		4	0.5	IV	**5.0**	1	30	96
12		4	0.5	IV	**5.0**	1	180	168
动物总数:	**48**	WT 小鼠 CD-1						

[1509] 如图83所示,具有不同的PEG配置(长度和分支)的所有ASC都获得了相当的血浆PK曲线,其中在施用后168小时,剩余约10%的siRNA。

[1510] 在本实施例中,展示了采用一系列A-X-B-Y-C缀合物的相当的血浆PK性质,其中使用了许多不同PEG(组分C)长度和分支。

[1511] 实施例41:2016-PK-236-HCC827

[1512] siRNA设计和合成

[1513] EFGR:设计了针对人EGFR的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核

苷酸突出端。指导链/反义链的序列与EGFR的人mRNA转录物上从碱基位置333起始的基因序列(ACUCGUGCCUUGGCAAACUUU;SEQ ID NO:2082)互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过硫代磷酸酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1514] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。使用碱、糖和磷酸盐修饰来降低免疫原性,并且这些修饰与活性siRNA中所使用的那些相若。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1515] ASC合成和表征

[1516] 将所有缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1517] 体内研究设计

[1518] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理携带体积为100-300mm^3的皮下(SC)肋腹HCC827肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组1-12(n=5),而相同小鼠的对照组13(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。表53描述了研究设计。在给药后96小时通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤和肝脏的小片并在液氮中快速冷冻。使用如实施例2中所述的比较qPCR测定来确定靶组织中的mRNA敲低。从组织中提取总RNA,将其逆转录,并使用TaqMan qPCR采用适当设计的引物和探针将mRNA水平定量。将PPIB(持家基因)用作内部RNA负载对照,通过比较Ct方法计算结果,其中计算靶基因Ct值与PPIB Ct值(ΔCt)之间的差值,然后通过获取第二差值(ΔΔCt)将其进一步相对于PBS对照组归一化。使用如实施例2中所述的茎-环qPCR测定来确定组织siRNA的定量。使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒采用序列特异性茎-环RT引物将siRNA的反义链逆转录。然后将来自RT步骤的cDNA用于实时PCR,并使用来源于标准曲线的线性方程将Ct值转化为血浆浓度或组织浓度。

[1519] 表53

[1520]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	收获时间(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
2	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96

[1521]

3	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
4	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
5	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
6	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
7	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
8	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1)	5	0.5	IV	**5.0**	1	96
9	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1)	5	0.25	IV	**5.0**	1	96
10	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG4)3 (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
11	EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
12	EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)	5	1	IV	**5.0**	1	96
13	PBS 对照	5	-	IV	**5.0**	1	96
	动物总数: **65**	具有 HCC827 肿瘤的 nu/nu 小鼠					

[1522] 如图84中所示,在1mg/kg剂量下,具有不同PEG配置(长度和分支)的所有ASC获得的在HCC827肿瘤细胞中的EGFR mRNA敲低与具有线性PEG5K的构建体相当。以剂量响应的方式测试的那些构建体显示出剂量依赖性的EGFR mRNA敲低。如图85中所示,在1mg/kg剂量下,线性PEG长度和PEG分支具有不同变化的所有ASC获得的siRNA肿瘤细胞积累与具有线性PEG5K的构建体相当。除了相对于肿瘤较低的肝脏积累之外,以剂量响应的方式测试的那些构建体显示出剂量依赖性的siRNA肿瘤组织积累。

[1523] 在本实施例中,展示了采用一系列A-X-B-Y-C缀合物的生物活性,其中使用了许多不同PEG(组分C)长度和分支。

[1524] 实施例42:采用具有PEG聚合物的ASC的体外敲低

[1525] siRNA设计和合成

[1526] HPRT:设计了针对人HPRT的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列为AUAAAAUCUACAGUCAUAGUU(SEQ ID NO:2082),并且其被设计成与HPRT的人mRNA转录物上从碱基位置425起始的基因序列互补。使用碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-硫代磷酸酯连接体连接至siRNA过客链。C6-NH_2和C6-SH通过磷酸二酯连接,化学结构参见实施例9。

[1527] 阴性对照siRNA序列(乱序):使用公开的(Burke等人(2014)Pharm.Res.,31(12):3445-60)带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端的21mer。指导链/反义链的序列(5'至3')为UAUCGACGUGUCCAGCUAGUU(SEQ ID NO:2116)。将用于活性EGFR siRNA双链体的相同碱基、糖和磷酸盐修饰用于阴性对照siRNA。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1528] ASC合成和表征

[1529] 将第1-3组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n=1),如实施例9中

所述。将第4-6组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中所述。

[1530] 体外研究设计

[1531] 收获小鼠脾脏并将其保持于在冰上的具有100u/ml青霉素和链霉素的PBS中。用干净的载玻片将脾脏粉碎、切成小块、用18G针匀浆并过滤(70um尼龙膜)。采用来自Milteny biotec的死细胞去除试剂盒(分类号130-090101),根据制造商的说明来去除死细胞。为了分离小鼠B细胞,依照制造商的说明来使用B细胞分离试剂盒Milteny biotec(分类号130-090-862)。简言之,用每个小鼠脾脏200μl MACS缓冲液将活脾细胞悬浮。采用与抗生物素磁性微珠偶联的针对CD43(Ly48)、CD4和Ter-119的生物素缀合单克隆抗体耗尽非B细胞。从一个小鼠脾脏可以获得3000万个活B细胞。为激活分离的小鼠B细胞(在具有100u/ml青霉素和链霉素的10%FBS RPMI-1640中$2x10^6$个/ml),添加10μg/mlLPS、5μg/ml抗IgM、1μg/ml抗CD40、0.05μg/ml IL-4和0.05μg/ml INFγ的混合物。在激活四小时后,向24孔板(0.5ml介质)或12孔板(1ml介质)中的每个孔10^6个细胞添加ASC(1pM至10nM)。在ASC治疗48小时后,收获细胞,并分析所分离的RNA的mRNA敲低。研究设计参见表54。

[1532] 表54

[1533]

组别	测试品
1	抗B细胞Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-pOEGMA8K
2	抗B细胞Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-pHPMA5K
3	抗B细胞Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-pHPMA10K
4	抗B细胞Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-pMAA10K
5	抗B细胞Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5K
6	抗B细胞Ab(Cys)-N5'-乱序-3'S-PEG5K

[1534] 在该体外实验中,在激活的原代小鼠B细胞中,测量抗B细胞抗体ASC利用一系列替代的PEG聚合物递送设计用于下调次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)的siRNA的能力。如图86所示,具有替代PEG的系列ASC能够相对于乱序对照下调HPRT。

[1535] 在本实施例中,展示了采用一系列A-X-B-Y-C缀合物的生物活性,其中使用了许多替代PEG(组分C)的聚合物。

[1536] 实施例43:PK-236-WT

[1537] siRNA设计和合成

[1538] KRAS:设计了针对人KRAS的21mer双链体,其带有具有互补性的19个碱基和3'二核苷酸突出端。指导链/反义链的序列与KRAS的人mRNA转录物上从碱基位置237起始的基因序列(指导链序列:UGAAUUAGCUGUAUCGUCAUU;SEQ ID NO:2088)互补。使用在RNAi领域中充分描述的碱、糖和磷酸盐修饰来优化双链体的效力并降低免疫原性。使用亚磷酰胺化学法将所有siRNA单链完全组装在固相上,并通过HPLC纯化。过客链上的位置11处的碱基附接有Cy5荧光标记物,如实施例9中所述。将经纯化的单链双链体化以获得双链siRNA。过客链含有两个缀合柄,即,在5'端的C6-NH_2和在3'端的C6-SH。两个缀合柄都通过磷酸二酯-反向脱碱基-磷酸二酯连接体连接至siRNA过客链,化学结构参见实施例9。

[1539] ASC合成和表征

[1540] 将第1-3组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n=1),如实施例9中

所述。将第4-6组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-4的DAR1(n＝1),但在过客链的3'端上没有PEG。在缀合之间,使用N-乙基马来酰亚胺将3'巯基封端。将第7-9组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n＝1),如实施例9中所述。将第10-12组中的缀合物制备和纯化为采用ASC架构-1的DAR1(n＝1),但在过客链的5'端上没有PEG。

[1541] 体内研究设计

[1542] 通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n＝4)。处理组接受0.5mg/kg(基于siRNA的重量),向所有组施用5.0mL/kg的剂量体积。表55示出了更详细的研究设计。通过穿刺眶后丛在给药后0.25小时、1小时和4小时收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在给药后24、48或72h通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。

[1543] 血浆样品(K2 EDTA)在收获后4小时内处理。用匹配的小鼠血浆(Bioreclamation)稀释血浆样品(2-400倍),并使用TECAN InfiniteM200 Pro(激发635nm;发射675nm)光谱地定量这些血浆样品中的CY5-siRNA浓度。为了释放可能淬灭CY5荧光的大分子相互作用,在定量之前将所有样品在含有0.01％吐温20和100ug/ml肝素的水中稀释2倍。为了确定这些血浆样品中完整ASC的量,将血浆样品用小鼠血浆稀释至2-50nM CY5-siRNA,并与装载有150nM纯化EGFR-Fc蛋白(SinoBiological)的蛋白G Dynabead(Thermofisher)一起温育。将这些结合反应在室温下温育1小时。用含有0.01％吐温20和0.05％BSA的PBS将珠子洗涤两次,之后通过在0.1M柠檬酸(pH 2.7)中温育来洗脱与EGFR结合的ASC。如上所述通过荧光确定包含在输出、未结合级分、洗涤液和珠子洗脱液中CY5-siRNA的量。

[1544] 表55

[1545]

Gr	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量体积(mL/kg)	剂量编号	存活流血(h)	最终流血(h)
1	EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	24
2	EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	1	48
3	EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	4	72
4	EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S--NEM (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	24
5	EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S--NEM (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	1	48
6	EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S--NEM (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	4	72
7	EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'N-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	24
8	EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'N-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	1	48
9	EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'N-PEG5k (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	4	72
10	EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'NH_2 (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	0.25	24
11	EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'NH_2 (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	1	48
12	EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'NH_2 (n=1)	4	0.5	IV	**5.0**	1	4	72
	动物总数:	**96**	WT 小鼠 CD-1					

[1546] 在该体内PK研究中,将两种AXBYC缀合物(半胱氨酸和赖氨酸与EGFR-Ab缀合)的体内血浆稳定性与两种AXB缀合物相比较。如图87所示,使用两种方法确定siRNA的浓度。直接测量血浆的荧光,使用标准曲线确定siRNA浓度。或者,可使用用EGFR修饰的磁珠来结合抗体缀合物,然后测量样品的荧光并使用标准曲线确定siRNA浓度。将所有数据绘制为注射剂量的百分比。在AXBYC缀合物的两个实例(半胱氨酸和赖氨酸与EGFR-Ab缀合)中,观察到相对于相应AXB缀合物的改善的血浆PK。

[1547] 在本实施例中,展示了Cys AXBYC缀合物和Lys AXBYC缀合物的体内血浆PK与匹配的对照AXB缀合物的比较。

[1548] 实施例44:胆固醇-KRAS缀合物(PD-058)的体内药效学研究

[1549] 通过胆固醇-siRNA缀合物的三次静脉内(i.v.)尾静脉注射(相隔48h)处理携带肝内Hep 3B肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受三次PBS静脉内注射作为按照相同给药方案的载体对照。接受胆固醇-KRAS的处理组以10mg/kg、4mg/

kg或2mg/kg给药。所有组(处理组和对照组)都被施用6.25mL/kg的剂量体积。表56描述了更详细的研究设计并且给出了缀合物合成和表征的交叉参考。在最终给药后72h通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg的荷瘤肝脏小片并在液氮中快速冷冻。如实施例2-7中所述地进行mRNA敲低分析和mRNA定量。

[1550] 表56.胆固醇-KRAS缀合物(PD-058)的研究设计以及所测试的缀合物的合成和表征的交叉参考。

[1551]

组别	测试品	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	剂量编号	合成和表征的交叉引用
1	胆固醇-KRAS	5	10	iv	3	一般实验(实施例 2)
2	胆固醇-KRAS	5	4	iv	3	一般实验(实施例 2)
3	胆固醇-KRAS	5	2	iv	3	一般实验(实施例 2)
4	载体(PBS)	5		iv	3	

[1552] 在3剂量研究中评估了胆固醇-KRAS缀合物的mRNA敲低和剂量响应。如图35所示,在小鼠肝脏组织内,对于小鼠KRAS mRNA敲低,存在清除的剂量响应。在该3剂量形式中,最低剂量2mg/kg导致45%的小鼠mRNA敲低,而最高剂量10mg/kg导致65%的小鼠mRNA敲低。然而,在收获时,小鼠肝脏中的人肿瘤细胞不足以用于检测来自KRAS的信号(可能是由于模型开发问题,似乎接种的人细胞不足以产生快速生长的肿瘤)。因此,无法测量肿瘤中的敲低。

[1553] 实施例45:胆固醇-siRNA缀合物(PK-063)的体内药代动力学研究

[1554] 通过胆固醇-siRNA缀合物的一次或两次静脉内(i.v.)尾静脉注射来处理野生型雌性CD-1小鼠组(n=3)。处理组接受10mg/kg的胆固醇-KRAS(基于siRNA的重量),2剂量组在第一剂量后48h接受第二剂量。所有组都被施用6.25mL/kg的剂量体积。表57示出了更详细的研究设计并且给出了缀合物合成和表征的交叉参考。通过穿刺眶后丛在最终给药后2、15、60或120分钟收集非末端血样品并将其离心以产生用于PK分析的血浆。在最终给药后4、24、96或144h通过CO_2窒息将小鼠处死。通过心脏穿刺收集末端血液样品并将其处理以产生用于PK分析的血浆。收集50mg肿瘤、肝、肾和肺的小片并在液氮中快速冷冻。如实施例2-7中所述地进行mRNA敲低分析和mRNA定量。

[1555] 表57.胆固醇-siRNA缀合物(PK-063)的研究设计以及所测试的缀合物的合成和表征的交叉参考。

[1556]

组别	测试品	N	siRNA 剂量 (mg/kg)	ROA	剂量编号	存活流血 (min)	最终流血 (h)	收获时间 (h)	合成和表征的交叉引用
1	胆固醇-KRAS	3	10	IV	1	2	4	4	一般实验(实施例 2)
2		3	10	IV	1	15	24	24	
3		3	10	IV	1	60	96	96	
4		3	10	IV	1	120	144	144	
5	胆固醇-KRAS	3	10	IV	2	2	4	4	一般实验(实施例 2)
6		3	10	IV	2	15	24	24	
7		3	10	IV	2	60	96	96	
8		3	10	IV	2	120	144	144	

[1557] 评估了相比于2剂量形式,单剂量形式中的胆固醇-siRNA的药代动力学行为。如图36所示,第一剂量和之后48h的第二剂量的血浆PK曲线近乎相同。从血浆中清除的机制未从第一剂量饱和,并且第二剂量表现相似。类似地评估了3种主要组织(肝脏、肾脏和肺)的组织PK。如图37所示,胆固醇-KRAS以最高浓度递送至肝脏,而肾脏和肺具有比肝脏低约10倍的siRNA浓度。对于全部三种组织,第二剂量后的siRNA浓度高于第一剂量后的siRNA浓度,证明当胆固醇-siRNA的剂量相隔48h时,存在siRNA在组织中的积累。

[1558] 胆固醇-siRNA缀合物(PK-067)的体内研究。通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射处理携带体积为100-150mm^3的皮下胁腹H358肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=3),而相同小鼠的对照组(n=4)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。接受胆固醇-siRNA缀合物的处理组以5mg/kg(基于siRNA的重量)给药。一些处理组还接受具有指定的肽:siRNA摩尔比的胆固醇-肽缀合物,其中所有胆固醇-siRNA缀合物和胆固醇-肽缀合物在溶液中混合在一起并共同注射。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。表58示出了更详细的研究设计并且给出了缀合物合成和表征的交叉参考。在给药后24、72或144h通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤、肝、肾和肺的小片并在液氮中快速冷冻。如实施例2-7中所述地进行mRNA敲低分析和mRNA定量。

[1559] 表58.胆固醇-siRNA缀合物(PK-067)的研究设计以及缀合物合成和表征的交叉参考

[1560]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	mol EEP/mol siRNA之比	ROA	剂量编号	收获时间(h)	合成和表征的交叉引用
1	胆固醇-KRAS	3	5	-	IV	1	24	一般实验(实施例2)
2		3	5	-	IV	1	72	
3		3	5	-	IV	1	144	

[1561]

4	胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽	3	5	1	IV	1	24	一般实验(实施例2)
5		3	5	1	IV	1	72	
6		3	5	1	IV	1	144	
7	胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽	3	5	3	IV	1	24	一般实验(实施例2)
8		3	5	3	IV	1	72	
9		3	5	3	IV	1	144	
10	胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽	3	5	10	IV	1	24	一般实验(实施例2)
11		3	5	10	IV	1	72	
12		3	5	10	IV	1	144	
13	胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7	3	5	1	IV	1	24	一般实验(实施例2)
14		3	5	1	IV	1	72	
15		3	5	1	IV	1	144	
16	胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7	3	5	3	IV	1	24	一般实验(实施例2)
17		3	5	3	IV	1	72	
18		3	5	3	IV	1	144	
19	胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7	3	5	10	IV	1	24	一般实验(实施例2)
20		3	5	10	IV	1	72	
21		3	5	10	IV	1	144	
22	载体(PBS)	4	-	-	IV	1	24	一般实验(实施例2)
23		4	-	-	IV	1	72	
24		4	-	-	IV	1	144	
	动物总数:	**75**	具有H358肿瘤的nu/nu小鼠					

[1562] 将内体溶解部分(EEP)如INF7和蜂毒肽与胆固醇缀合,与胆固醇-siRNA混合,然后共同注射到小鼠中,以证明由于改善的内体逃逸导致的siRNA效力增加。首先评估了添加EEP对各种组织中siRNA浓度的影响。如图38A所示,具有任何EEP:siRNA摩尔比的胆固醇-INF7的添加都不影响siRNA肿瘤PK。然而,如图38B所示,添加1:1比例的胆固醇-蜂毒肽不影响肿瘤PK,但添加3:1EEP:siRNA比例的胆固醇-蜂毒肽减少了肿瘤中siRNA的量。如图39所示,胆固醇-INF7和胆固醇-蜂毒肽都没有对肝脏PK有很大影响。类似地,如图40和图41所示,胆固醇-INF7和胆固醇-蜂毒肽对肾脏和肺中的PK曲线也没有很大影响。最后,评估了胆固醇-EEP缀合物对mRNA KD的影响,并且如图42所示,单独的胆固醇-KRAS的敲低的基线水平为约50%。由于改善的内体逃逸,添加1:1胆固醇-蜂毒肽或3:1胆固醇-INF7改善了每个时间点的敲低。

[1563] 胆固醇-siRNA缀合物(PK-076)的体内研究。通过siRNA缀合物的三次间隔48h的静脉内(i.v.)尾静脉注射处理携带体积为100-150mm^3的皮下胁腹H358肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受三次PBS静脉内注射作为按照相同给药方案的载体对照。接受胆固醇-siRNA缀合物的处理组以5mg/kg(基于siRNA的重量)给药。一些处理组还接受具有指定的肽:siRNA摩尔比的胆固醇-肽缀合物,其中所有胆固醇-siRNA缀合物和胆固醇-肽缀合物在溶液中混合在一起并共同注射。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。表59描述了更详细的研究设计并且给出了缀合物合成和表征的交叉参考。在给药后24或96h通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤、肝、肾和肺的小片并在

液氮中快速冷冻。如实施例2-7中所述地进行mRNA敲低分析和mRNA定量。

[1564] 表59.胆固醇-siRNA缀合物(PK-076)的研究设计以及所测试的缀合物的合成和表征的交叉参考。

[1565]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	EEP/siRNA之比(mol/mol)	ROA	剂量编号	收获时间(h)	合成和表征的交叉引用
1	胆固醇-KRAS	5	5	-	IV	3	24	一般实验(实施例2)
2		5	5	-	IV	3	96	
3	胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(1:1)	5	5	1	IV	3	24	一般实验(实施例2)
4		5	5	1	IV	3	96	
5	胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (3:1)	5	5	3	IV	3	24	一般实验(实施例2)
6		5	5	3	IV	3	96	
7	载体	5	-	-	IV	3	24	
8		5	-	-	IV	3	96	

[1566] 以三剂量研究跟进在利用胆固醇-siRNA和胆固醇-EEP的单剂量研究中所观察的活性。针对INF7选择3:1比例的EEP:siRNA,而针对蜂毒肽选择1:1比例。如图43和图44所示,在三个剂量后,胆固醇-EEP或胆固醇-siRNA的添加对组织PK似乎没有很大影响。对于敲低,图45示出,胆固醇-蜂毒肽的添加明显地改善了给药后24h的肿瘤敲低。还示出,胆固醇-蜂毒肽改善了给药后96h的肿瘤敲低。

[1567] 胆固醇-siRNA缀合物(PK-079)的体内研究。通过siRNA缀合物的一次静脉内(i.v.)尾静脉注射处理携带体积为100-150mm^3的皮下胁腹H358肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=5),而相同小鼠的对照组(n=5)接受一次PBS静脉内注射作为载体对照。接受EGFR抗体-siRNA-PEG缀合物的处理组的剂量为0.5mg/kg(基于siRNA的重量),并且还接受EGFR抗体-蜂毒肽的组别的EGFR-Ab剂量在EGFR抗体-siRNA与EGFR抗体-蜂毒肽之间匹配。所有组(处理组和对照组)都被施用5mL/kg的剂量体积。表60描述了更详细的研究设计并且给出了缀合物合成和表征的交叉参考。在给药后96h通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg肿瘤、肝、肾和肺的小片并在液氮中快速冷冻。如实施例2-7中所述地进行mRNA敲低分析和mRNA定量。

[1568] 表60.胆固醇-siRNA缀合物(PK-079)的研究设计以及所测试的缀合物的合成和表征的交叉参考。

[1569]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	siRNA:EGFR-Ab之比(mol/mol)	蜂毒肽:siRNA之比(mol/mol)	ROA	剂量编号	收获时间(h)	合成和表征的交叉引用
1	EGFR-Ab-PEG5k-EGFR	5	0.5	1	-	IV	1	96	实施例4
2	EGFR-Ab-PEG5k-EGFR+EGFR-Ab-蜂毒肽	5	0.5	1	1:1	IV	1	96	实施例3和6
3	EGFR-Ab-KRAS-PEG5k+EGFR-Ab-蜂毒肽	5	0.5	1	1:1	IV	1	96	实施例3和6
4	单独的EGFR抗体	5	-	-	-	IV	1	96	一般实验(实施例2)
5	载体	5	-	-	-	IV	1	96	

[1570]

[1571] 评估了EGFR抗体-siRNA缀合物将siRNA递送至肿瘤和产生肿瘤中的mRNA敲低的PK/PD关系的再现性。如图46所示,对于两种缀合物配置,单次静脉内剂量的0.5mg/kg EGFR抗体-siRNA缀合物都再次能够将约100nM浓度的siRNA递送至肿瘤中。EGFR抗体-蜂毒肽的添加似乎并未影响组织PK。在所分析的四种组织中,肿瘤具有最高的浓度,肝脏具有第二高的浓度,而肾脏和肺显示出较低的siRNA摄取。如图47所示,向肿瘤中较强的siRNA递送再次转化为肿瘤中EGFR或KRAS的约50%敲低。与PBS对照一样,作为对照组运行的游离EGFR-Ab未显示出mRNA敲低。

[1572] 胆固醇-siRNA缀合物(PD-077)的体内研究。通过胆固醇-siRNA缀合物的九次静脉内(i.v.)或皮下(s.c.)注射(TIW)处理携带肝内Hep3B肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠组(n=11),而相同小鼠的对照组(n=11)接受九次PBS静脉内尾静脉注射作为载体对照(同样TIW给药)。接受胆固醇-CTNNB1的处理组以5mg/kg给药。所有组(处理组和对照组)都被施用6.25mL/kg的剂量体积。表61描述了更详细的研究设计并且给出了缀合物合成和表征的交叉参考。通过穿刺眶后丛每周一次收集非末端血样品并对其进行处理以产生用于甲胎蛋白(AFP)测量的血清。在最终给药后24h通过CO_2窒息将小鼠处死。收集50mg的荷瘤肝脏小片并在液氮中快速冷冻。如上所述进行mRNA敲低分析。使用人甲胎蛋白DuoSet ELISA试剂盒(R&D Systems),根据制造商的说明将AFP定量。

[1573] 表61.胆固醇-siRNA缀合物(PK-077)的研究设计以及所测试的缀合物的合成和表征的交叉参考。

[1574]

组别	测试品	N	siRNA剂量(mg/kg)	ROA	剂量编号	存活流血	最终流血(h)	合成和表征的交叉引用
5	胆固醇-CTNNB1	11	5	IV	9	每周	24	一般实验(实施例2)
8	胆固醇-CTNNB1	11	5	SC	9	每周	24	一般实验(实施例2)
11	载体	11		IV	9	每周	24	
动物总数:		33						

[1575] 由于更早的研究证明单剂量的胆固醇-siRNA可能在正常肝脏中产生敲低,因此假设也可以在原位肝脏肿瘤中实现敲低。为小鼠接种肝内Hep3B肿瘤,允许其在接种后生长一周,然后为这些小鼠施用5mg/kg剂量的胆固醇-CTNNB1(静脉内或皮下),每周三次,持续三周(共九个剂量)。如图48所示,在最终给药后24小时的收获时间点,皮下给药的胆固醇-CTNNB1能够产生>50%的mRNA敲低。相比之下,静脉内给药的胆固醇-CTNNB1 siRNA在这个时间点似乎没有显示出任何mRNA敲低(尽管一些小鼠没有任何可测量的人CTNNB1信号,但很难确定信号损失是与敲低相关还是与低肿瘤负荷有关)。还已知人Hep3B细胞分泌人甲胎蛋白(AFP),并且已知分泌的AFP的量与Hep3B细胞的数目相关。因此,血清中AFP的浓度被视为小鼠中肿瘤负荷的标志物,并且AFP随时间的增加与肿瘤生长相关。如图49所示,皮下给药的胆固醇-CTNNB1显著降低了这些小鼠中的AFP水平,这提供了CTNNB1mRNA敲低导致肿瘤生长抑制的证据。

[1576] 实施例46.肝脏PK/PD研究

[1577] 将会为雌性野生型CD-1小鼠给予5mg/kg(基于siRNA的重量)的胆固醇-siRNA-EEP缀合物。在这些研究中,所使用的siRNA将会针对小鼠因子VII(FVII),使得FVII敲低可以通过测量血浆中的FVII蛋白水平来确定。将会使用多种EEP(内体溶解部分)来确定展示出最佳内体逃逸的肽序列,从而导致相对于对照的FVII靶基因的最佳敲低。

[1578] 实施例47.肿瘤PK/PD研究

[1579] 将会为携带皮下胁腹H358肿瘤的雌性NCr nu/nu小鼠给予0.5mg/kg(基于siRNA)的EGFR抗体-siRNA-EEP缀合物。将会使用多种EEP(内体溶解部分)来确定展示出最佳内体逃逸的肽序列,从而导致相对于对照的靶基因的最佳敲低。

[1580] 实施例48.ABC缀合物与纳米颗粒的制剂

[1581] 使用环糊精聚合物(10kDa)和过量的未缀合siRNA(ED 40-60nm,PDI 0.1-0.2)将示例性ABC缀合物包装到自组装纳米颗粒中。在这些颗粒中,示例性ABC缀合物保持其与抗体靶标相互作用的能力。通过包装siRNA的修饰来调节颗粒在体内循环中的稳定性和靶标结合能力。

[1582] 纳米颗粒制剂

[1583] 制备最终siRNA浓度为1.6mg/mL的纳米颗粒。首先将含有比例为1:20的CY5-siRNA的siRNA在水中稀释至2x终浓度。将环糊精聚合物(CDP)稀释至2倍最终浓度,以在中性pH下在10mM磷酸盐缓冲液中获得3:1的氮磷比(N:P)。将CDP快速添加至siRNA并通过移液进一步混合。在给药或分析之前将颗粒温育至少15分钟。

[1584] 体外EGFR结合

[1585] 将含有各种量的示例性ABC缀合物的纳米颗粒在胎牛血清中稀释到10nM最终浓度,并在室温下与负载有150nM纯化的EGFR-Fc蛋白(Sino Biological)的蛋白G Dynabead(Thermofisher)温育1小时。用含有0.01%吐温20和0.05%BSA的PBS洗涤珠子两次,然后用含有0.01%吐温20和100ug/ml肝素的水破坏珠子结合的纳米颗粒。使用TECAN Infinite M200 Pro(激发635nm;发射675nm)通过荧光确定输入、未结合的级分、洗涤液和珠子洗脱液中包含的CY5-siRNA的量。

[1586] CY5-ASC血浆定量

[1587] 如实施例43所示进行小鼠血浆中纳米颗粒的定量。通过使用肝素来与CDP与siRNA之间的静电相互作用竞争而释放结合至EGFR珠子的CY5-siRNA。

[1588] 虽然本文已经示出和描述了本公开内容的优选实施方案,但是对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅以举例的方式提供。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员现在将会想到许多变化、改变和替换。应当理解,可以在实践本公开内容时采用本文所述的本公开内容的实施方案的各种替代方案。旨在用以下权利要求限定本公开内容的范围,并且由此覆盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物。

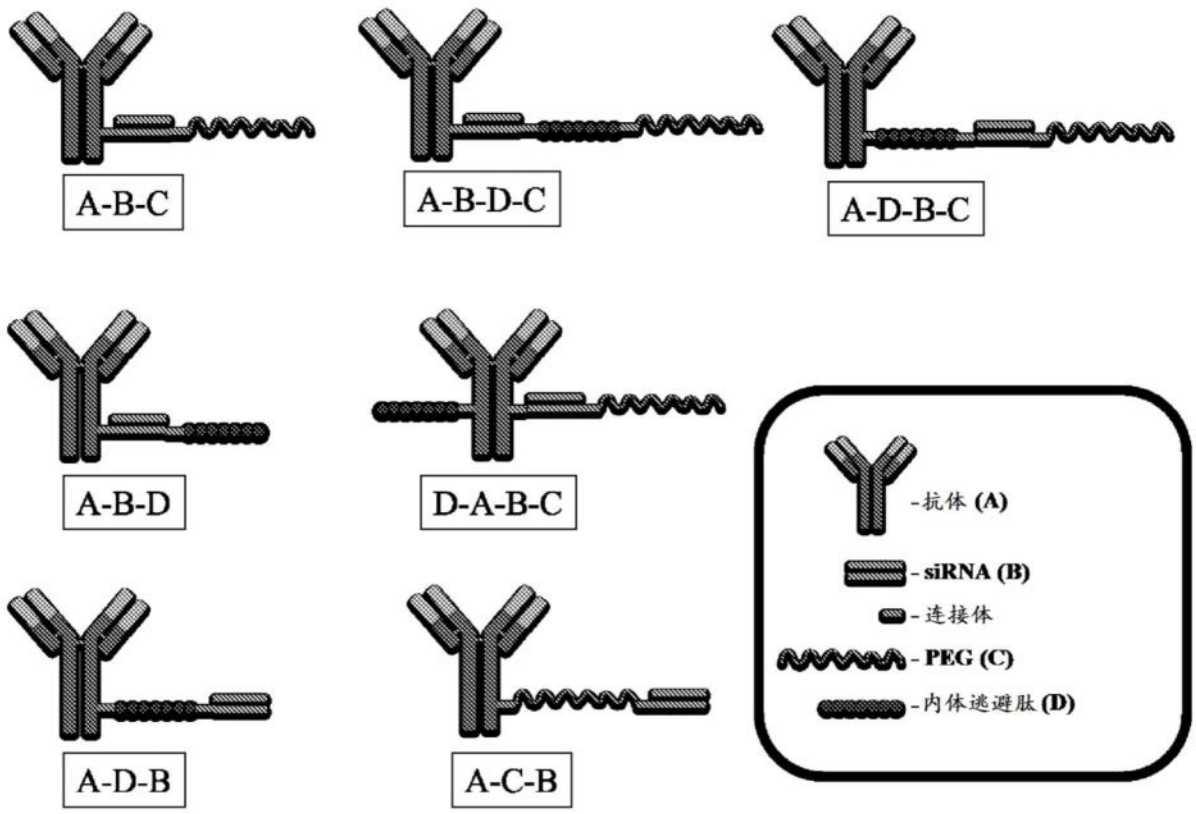


图1A

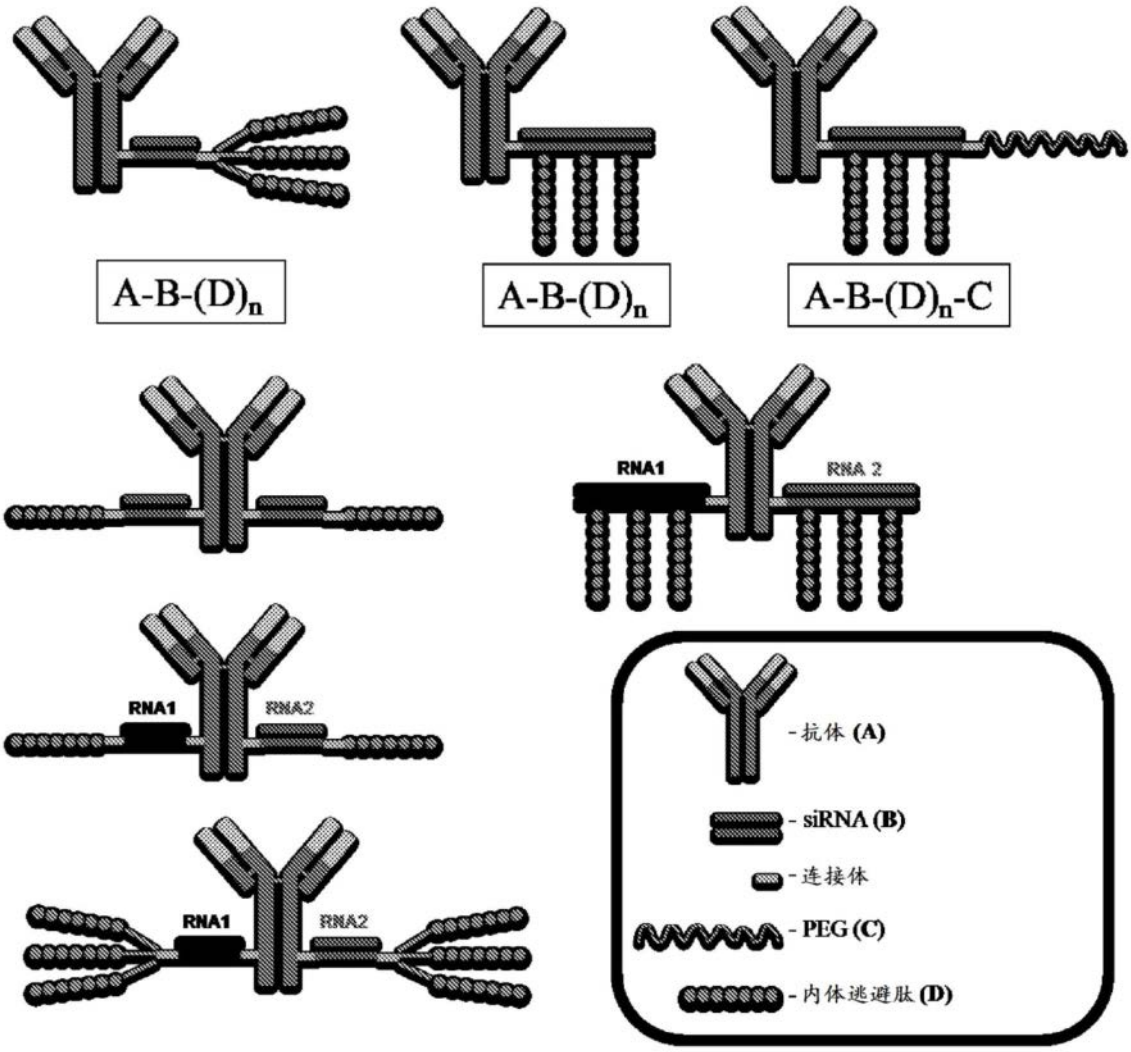

A-B-(D)n
A-B-(D)n
A-B-(D)n-C
RNA1
RNA 2
RNA1
RNA2
RNA1
RNA2
-抗体 (A)
- siRNA (B)
-连接体
- PEG (C)
-内体逃避肽 (D)

图1B

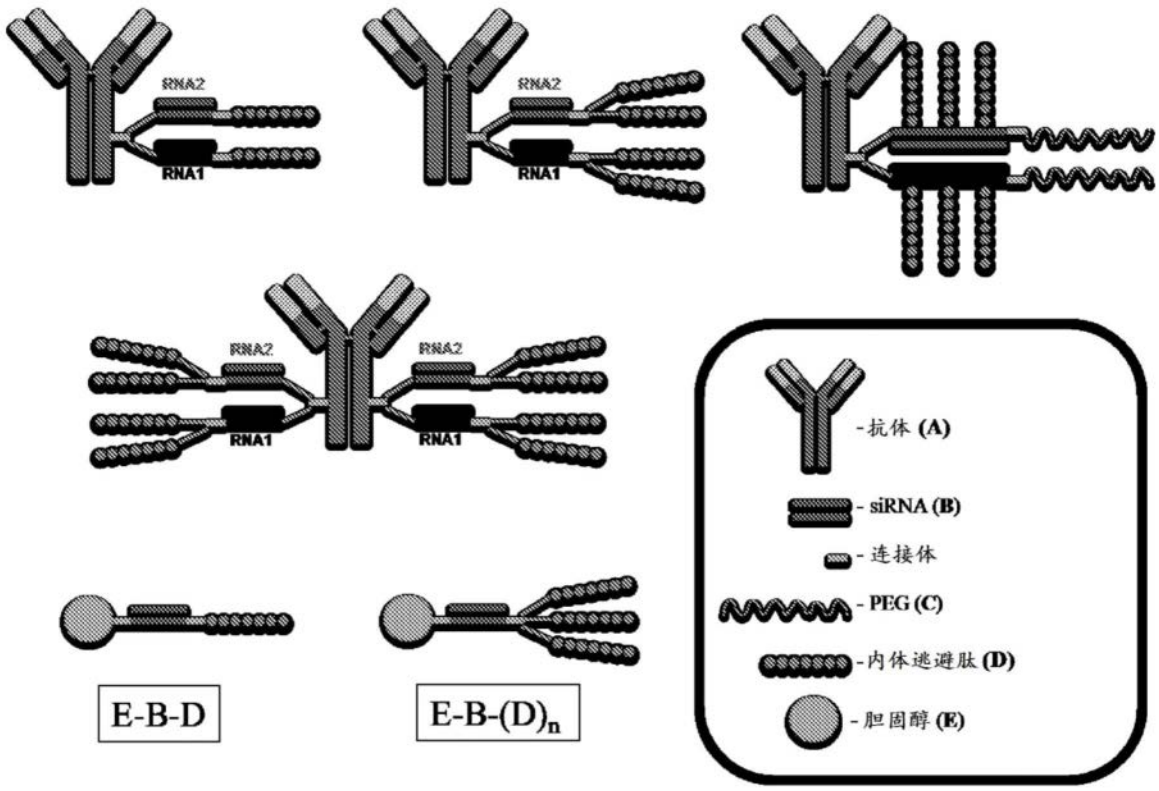


图1C

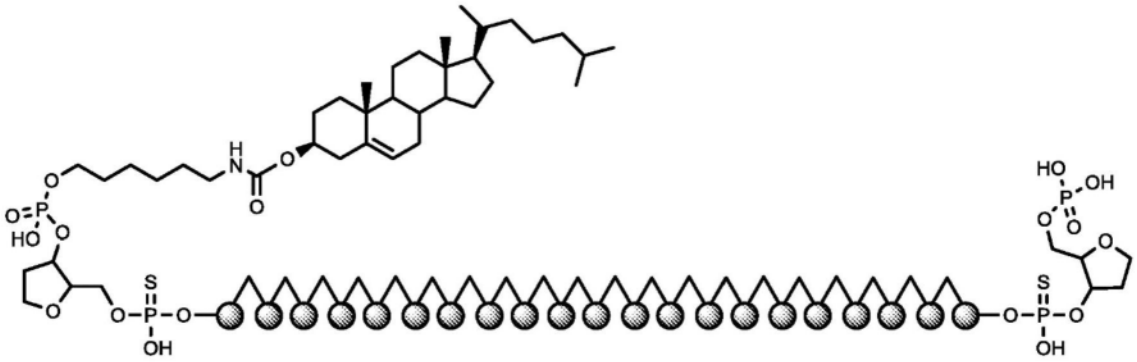
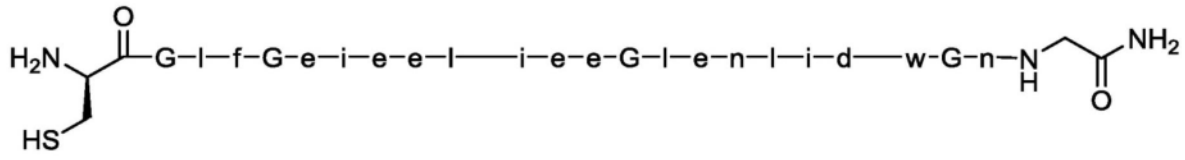
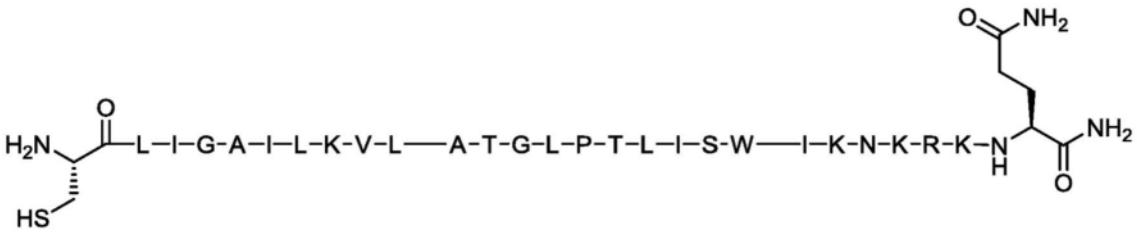


图2



(SEQ ID NO: 2055)

图3



(SEQ ID NO: 2060)

图4

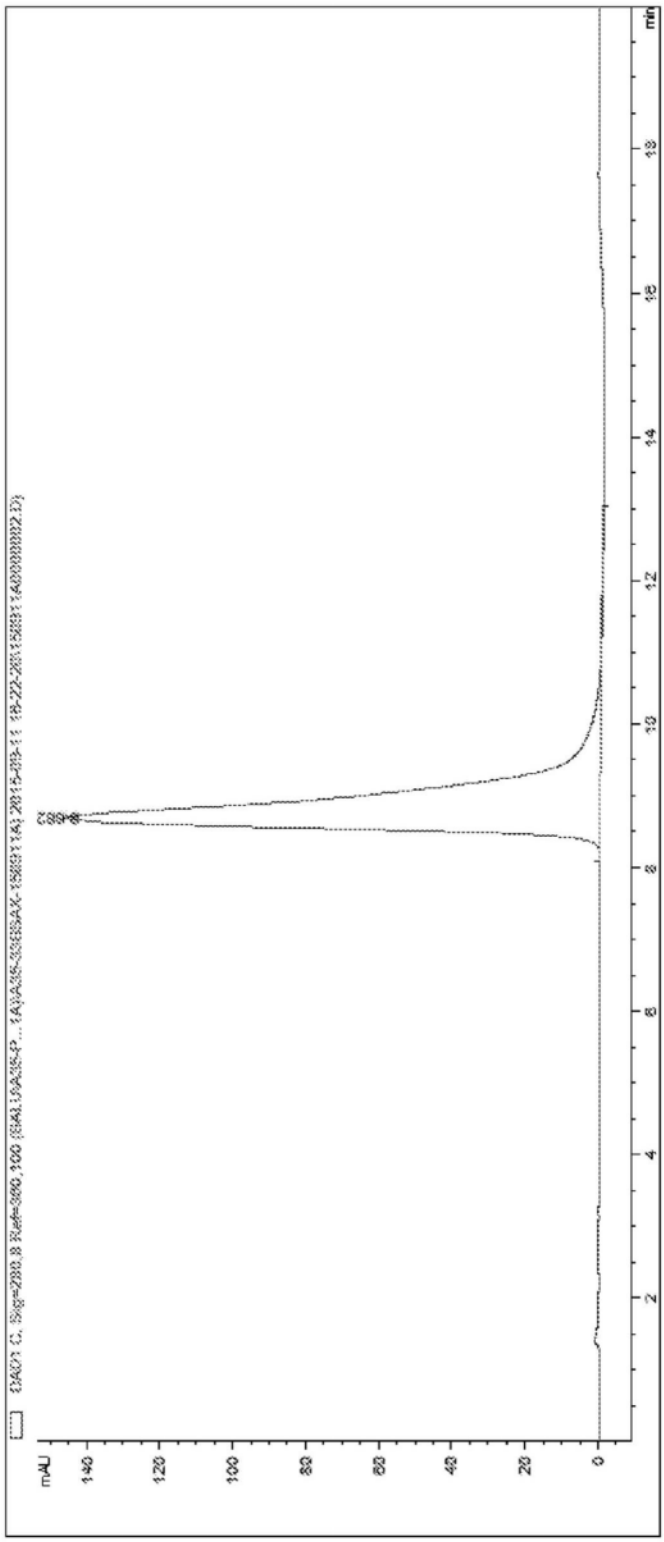


图5

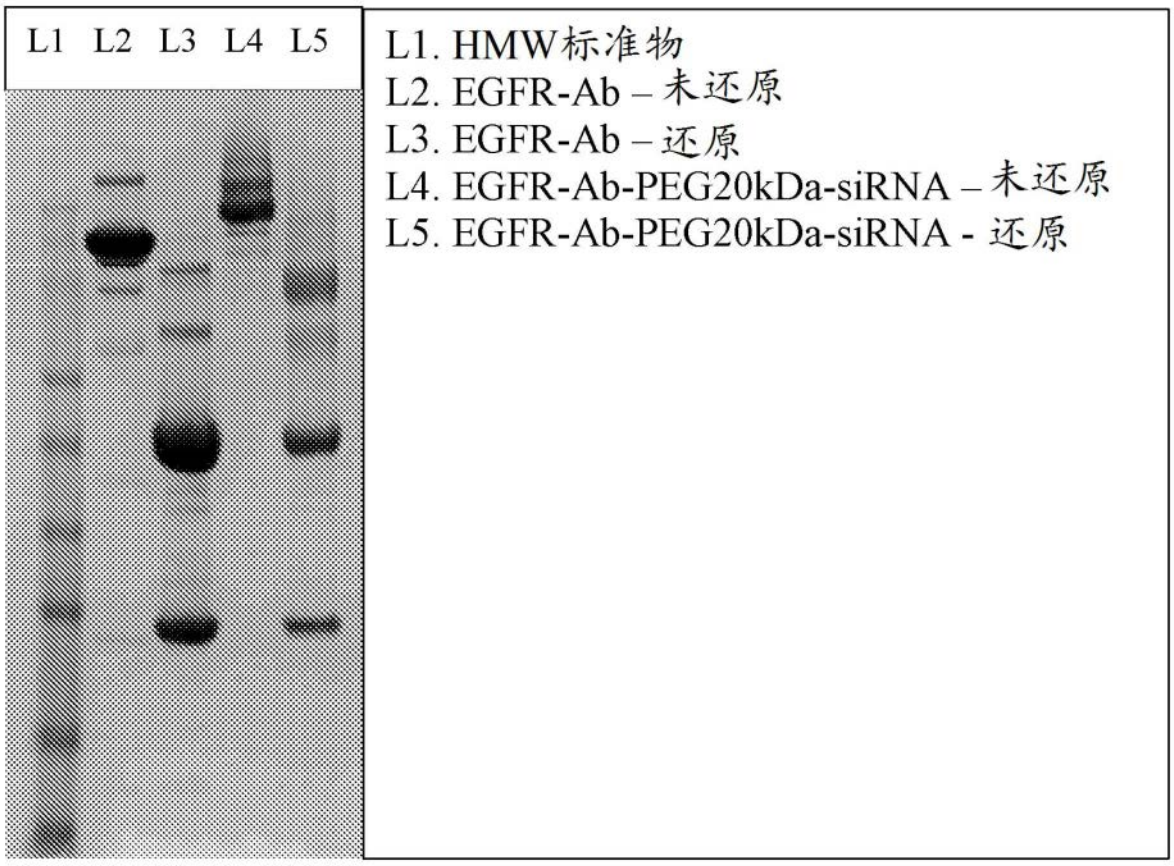

L1 L2 L3 L4 L5
L1. HMW标准物
L2. EGFR-Ab – 未还原
L3. EGFR-Ab – 还原
L4. EGFR-Ab-PEG20kDa-siRNA – 未还原
L5. EGFR-Ab-PEG20kDa-siRNA - 还原

图6

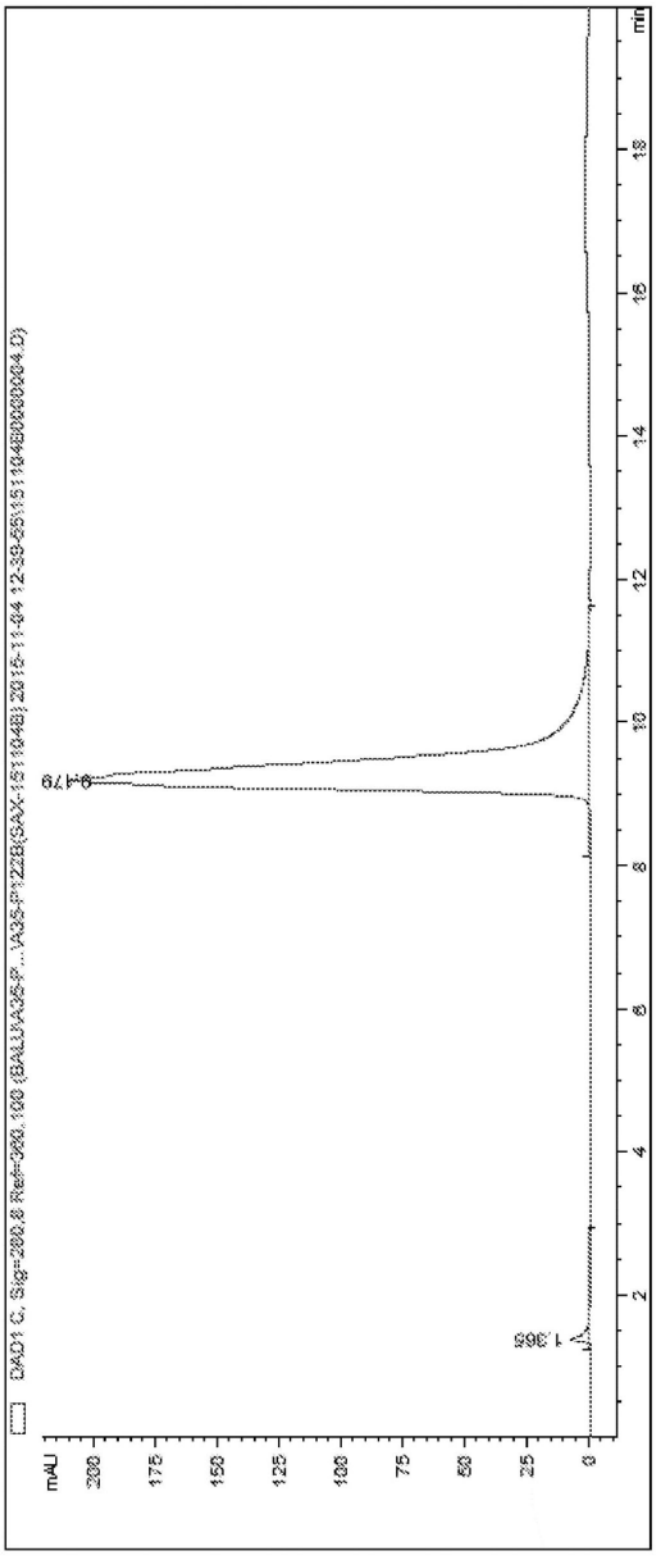

DAD1 C, Sig=280,8 Ref=360,100 (BALUVA25-P...\A35-P1228(SAX-151104B) 2015-11-04 12-39-55\151104B0000004.D)
mAU
min
9.179
1.365

图7

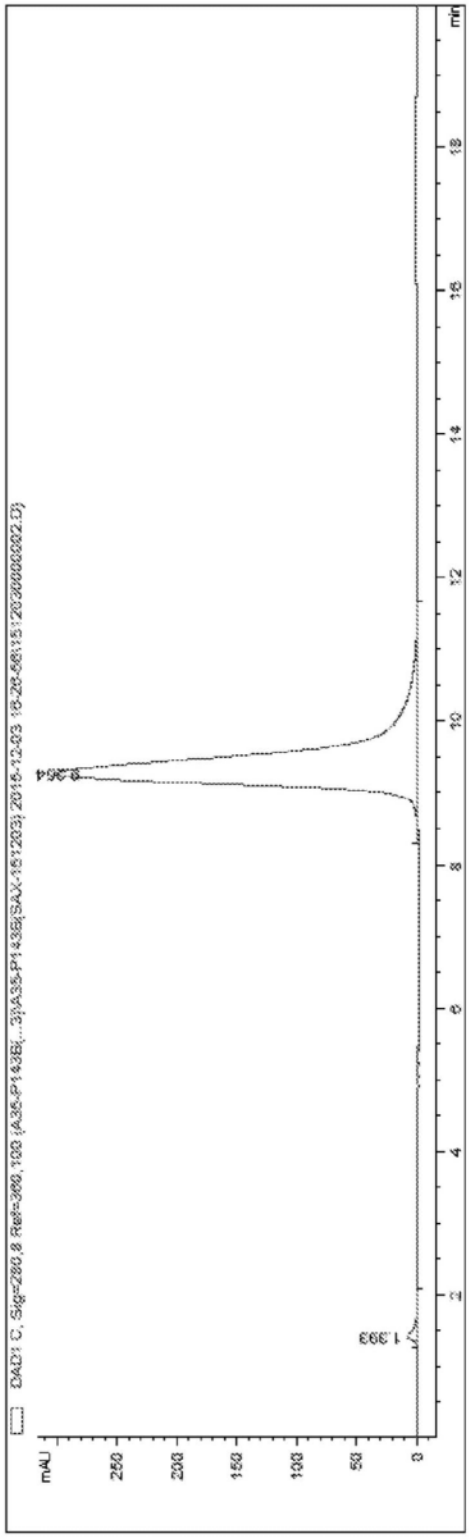


图8

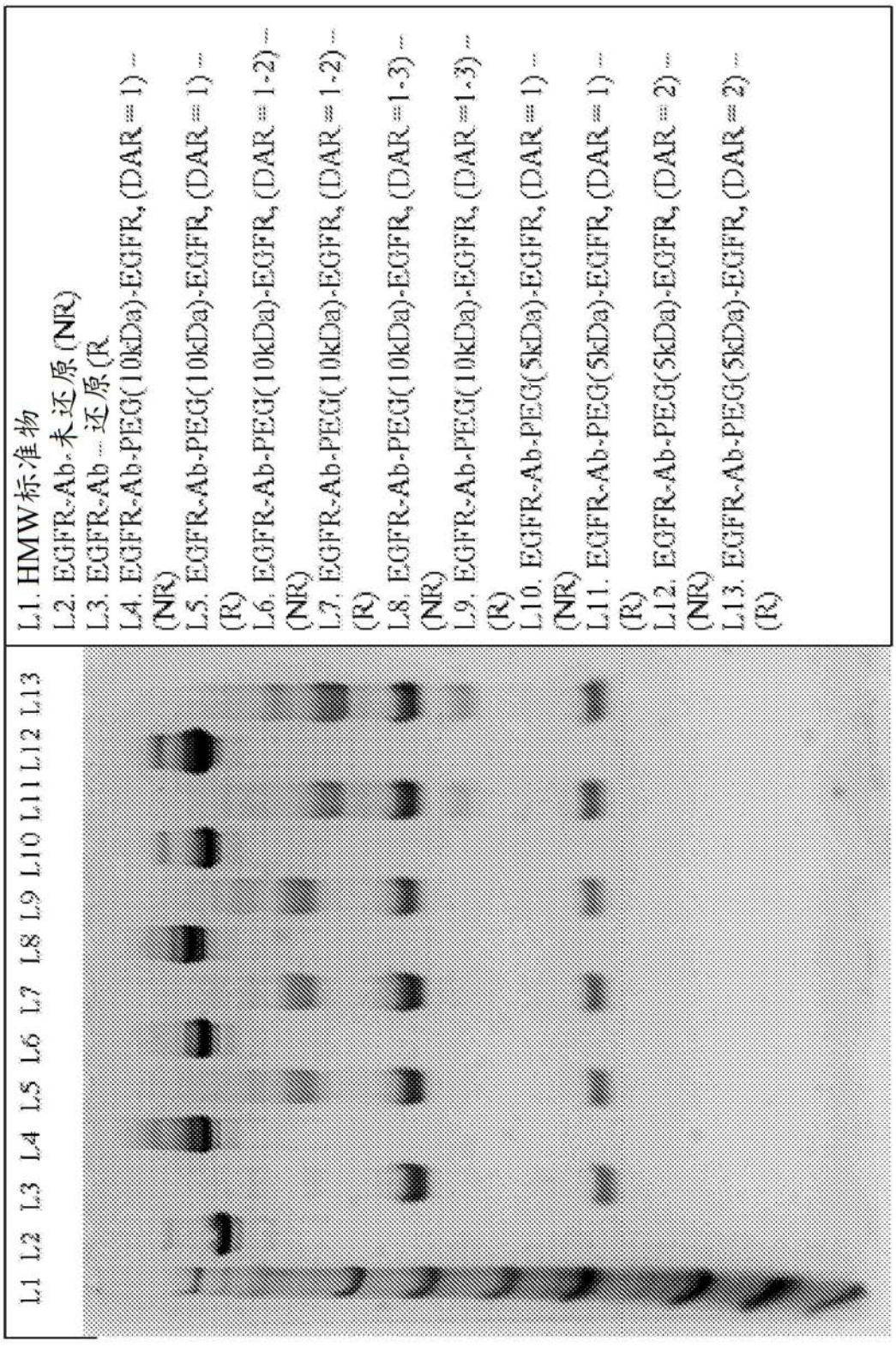

L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L10 L11 L12 L13
L1. HMW标准物
L2. EGFR-Ab-未还原(NR)
L3. EGFR-Ab—还原(R
L4. EGFR-Ab-PEG(10kDa)-EGFR, (DAR = 1) --
(NR)
L5. EGFR-Ab-PEG(10kDa)-EGFR, (DAR = 1) --
(R)
L6. EGFR-Ab-PEG(10kDa)-EGFR, (DAR = 1-2) --
(NR)
L7. EGFR-Ab-PEG(10kDa)-EGFR, (DAR = 1-2) --
(R)
L8. EGFR-Ab-PEG(10kDa)-EGFR, (DAR =1-3) --
(NR)
L9. EGFR-Ab-PEG(10kDa)-EGFR, (DAR =1-3) --
(R)
L10. EGFR-Ab-PEG(5kDa)-EGFR, (DAR = 1) --
(NR)
L11. EGFR-Ab-PEG(5kDa)-EGFR, (DAR = 1) --
(R)
L12. EGFR-Ab-PEG(5kDa)-EGFR, (DAR = 2) --
(NR)
L13. EGFR-Ab-PEG(5kDa)-EGFR, (DAR = 2) --
(R)

图9

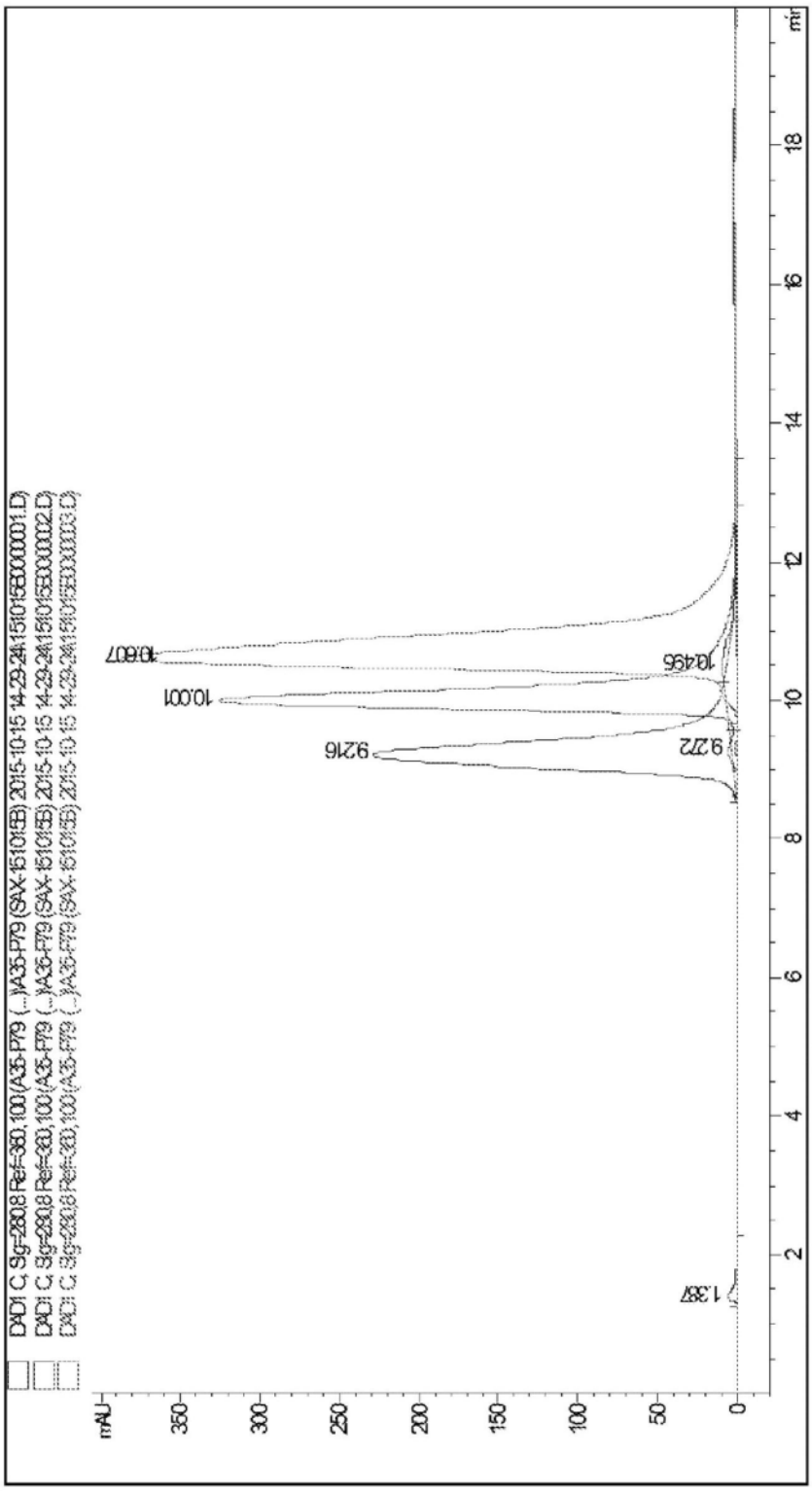

DAD1 C, Sig=280,8 Ref=360,100 (A35-P79 (...)A35-P79 (SAX-151015B) 2015-10-15 14-29-24\151015B0000001.D)
DAD1 C, Sig=280,8 Ref=360,100 (A35-P79 (...)A35-P79 (SAX-151015B) 2015-10-15 14-29-24\151015B0000002.D)
DAD1 C, Sig=280,8 Ref=360,100 (A35-P79 (...)A35-P79 (SAX-151015B) 2015-10-15 14-29-24\151015B0000003.D)
mAU
350
300
250
200
150
100
50
0
min
2
4
6
8
10
12
14
16
18
1.357
9.216
9.272
10.001
10.496
10.607

图10

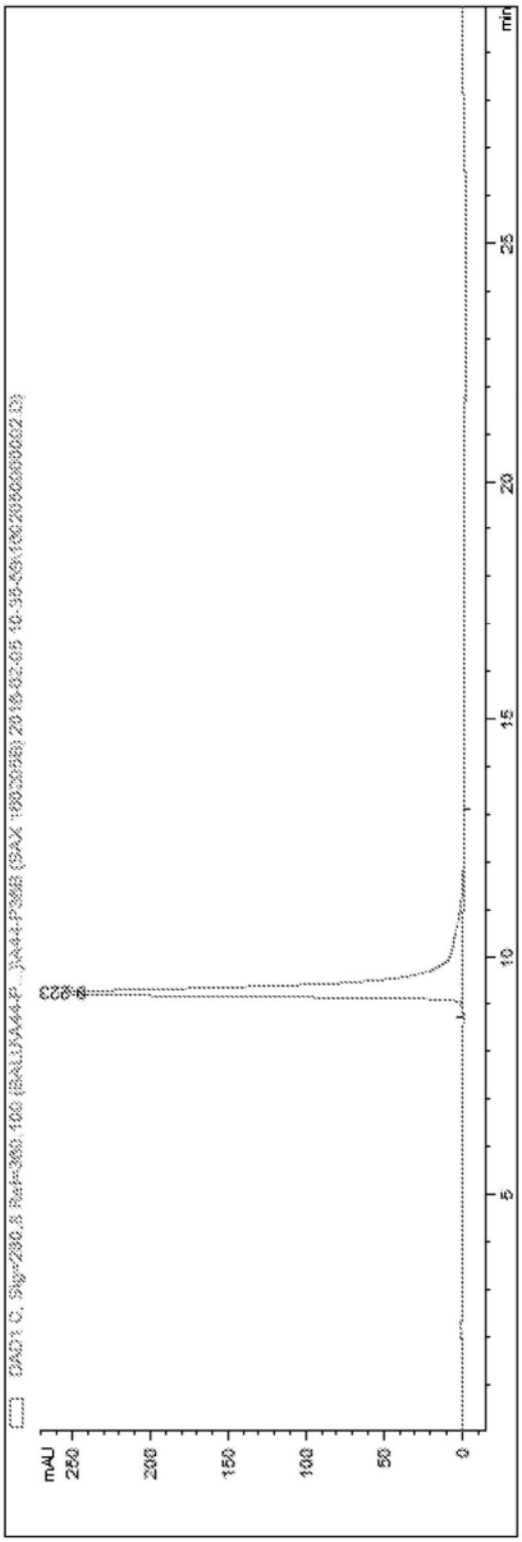


图11

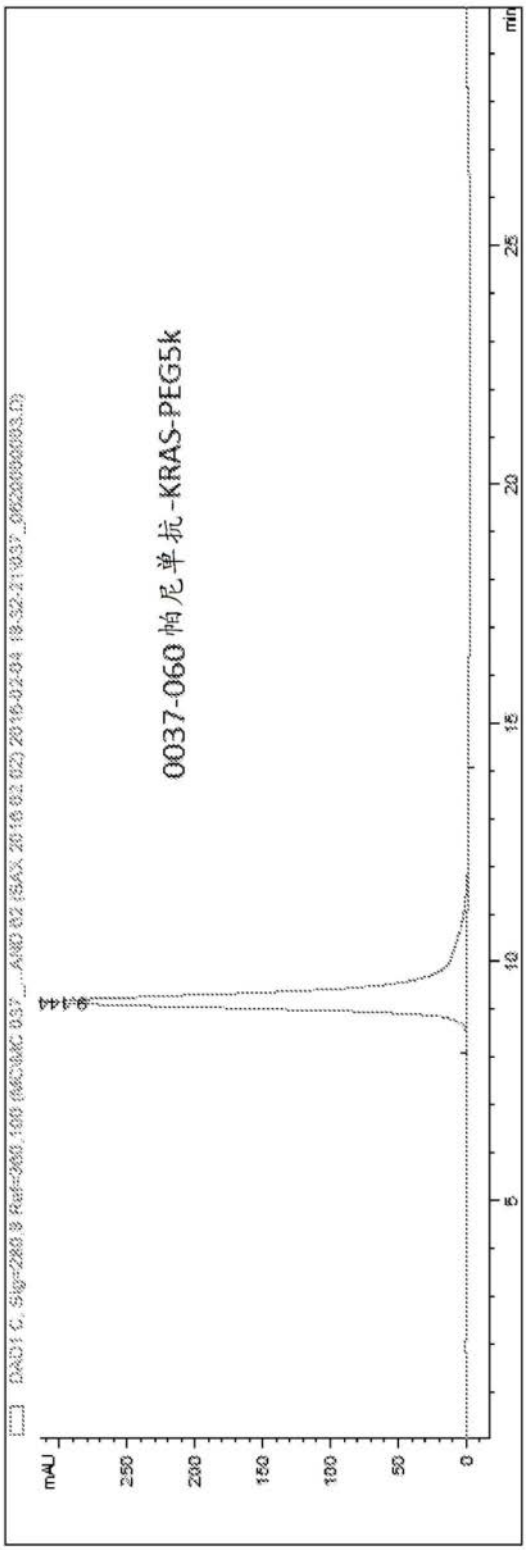

0037-060 帕尼单抗-KRAS-PEG5k
mAU
250
200
150
100
50
0
5
10
15
20
25
min

图12

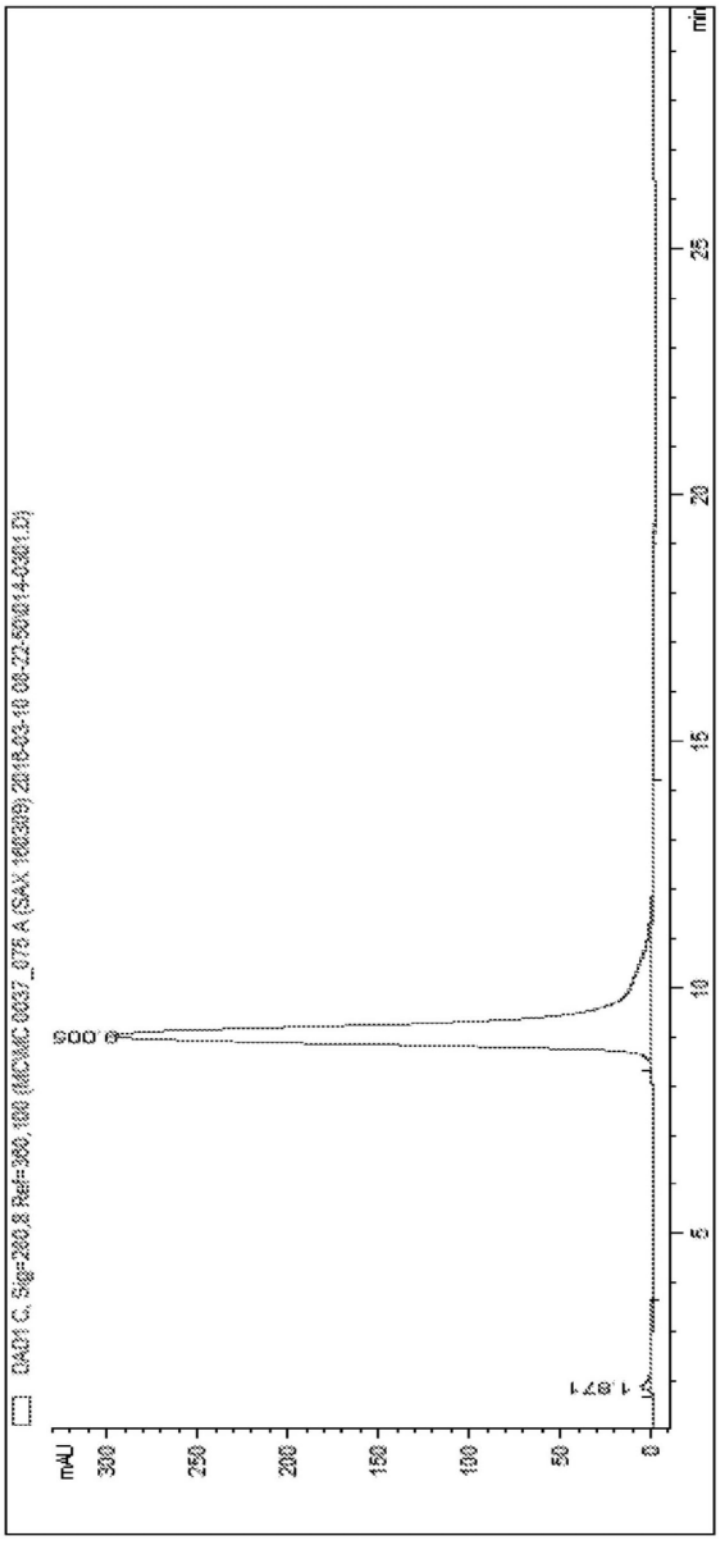

DAD1 C, Sig=280,8 Ref=360,100 (MCMC 0037_076 A (SAX 160309) 2018-03-10 08-22-50\014-0301.D)
mAU
300
250
200
150
100
50
0
min
5
10
15
20
25
1.897
9.005

图13

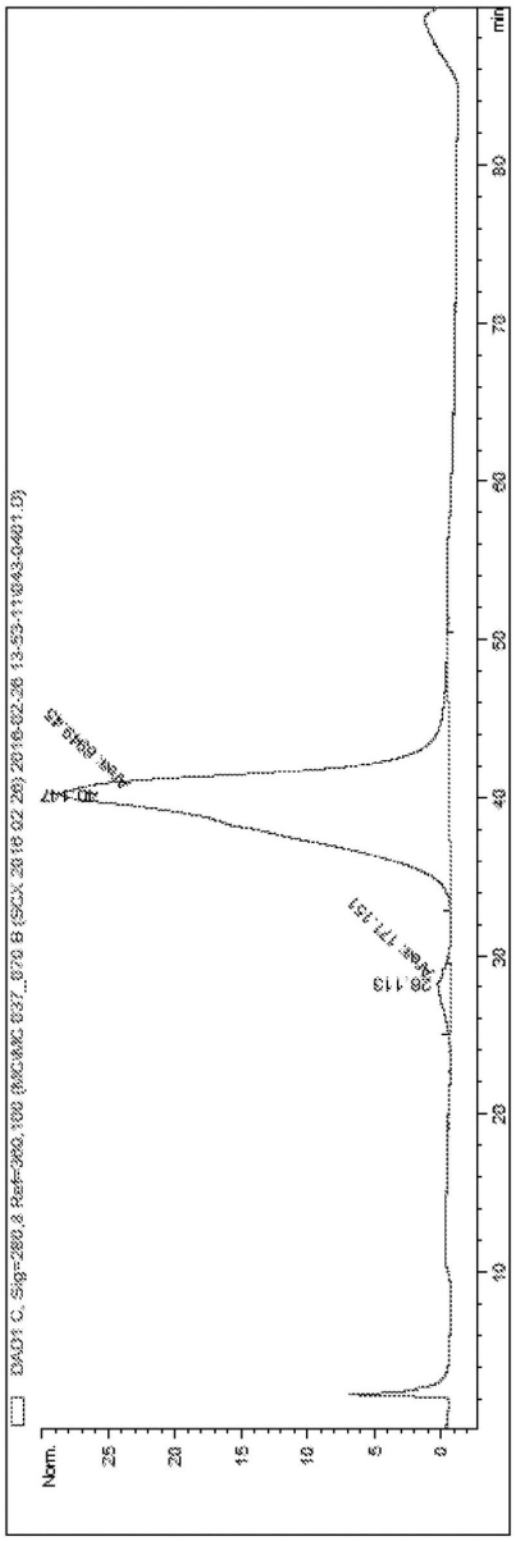

DAD1 C, Sig=280,8 Ref=360,100 (MCMC 037_070 B (SCX 2016-02-26) 2016-02-26 13-53-11\043-0401.D)
Area: 6919.45
28.147
Area: 171.151
28.113
Norm.
min

图14

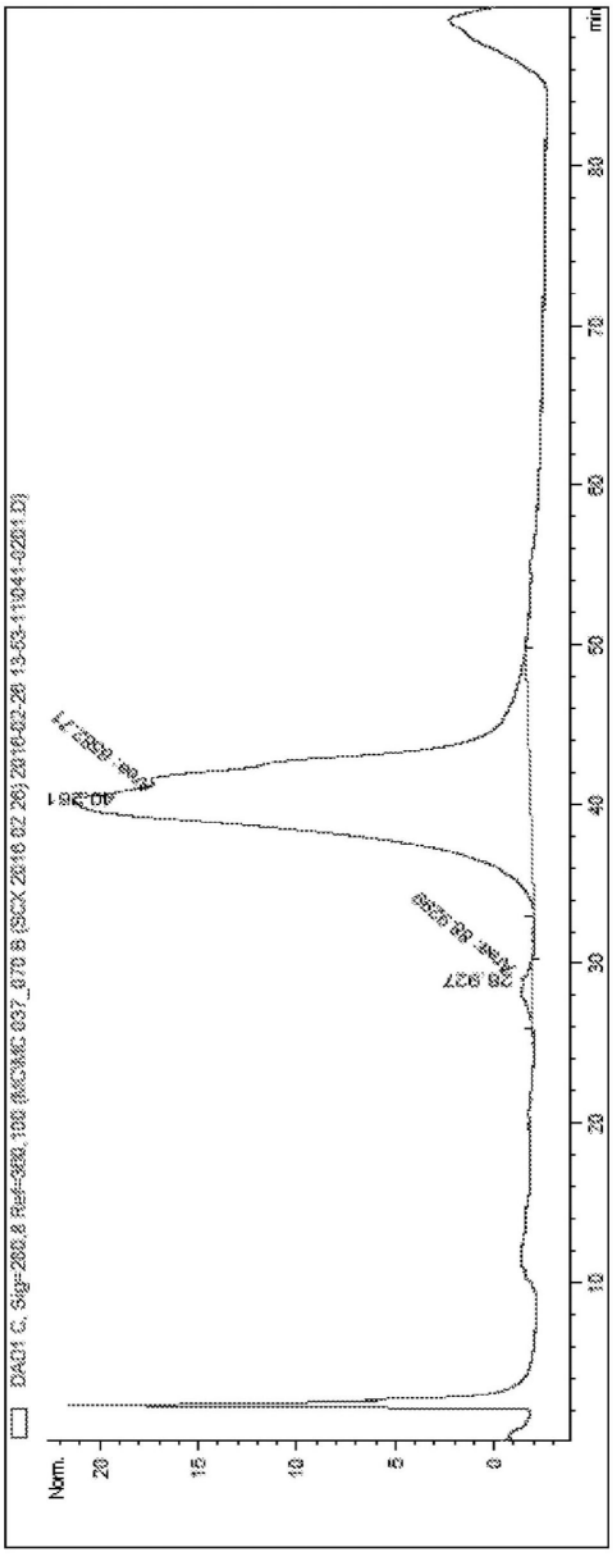


图15

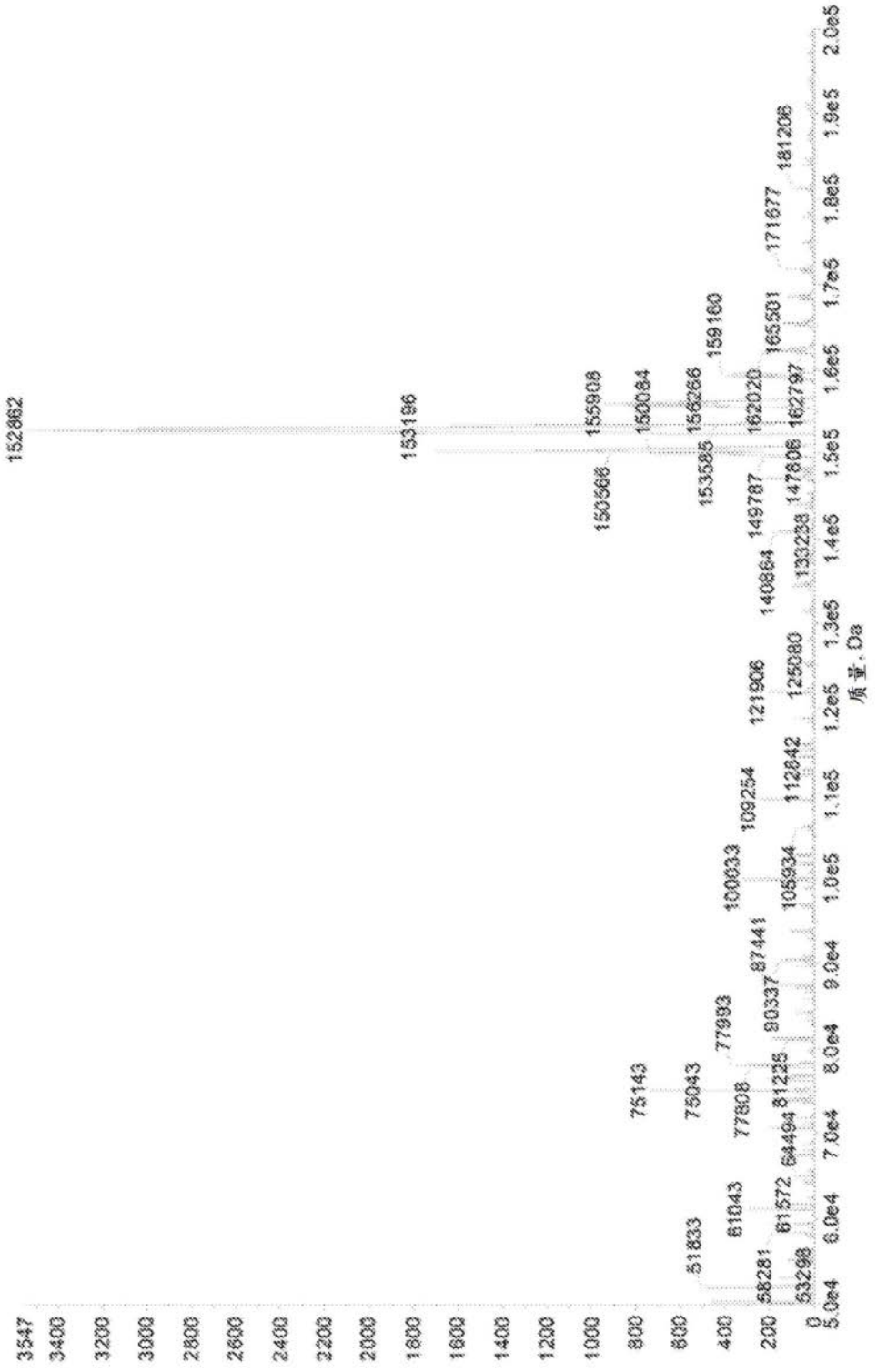

152862
153196
155908
150084
156266
159160
171677
181206
165501
162797
162020
153585
150560
147808
149787
140864
133238
125080
121906
112842
109254
105934
100033
87441
80337
81225
77808
77993
75043
75143
64494
61572
61043
58281
53298
51833
质量,Da

图16

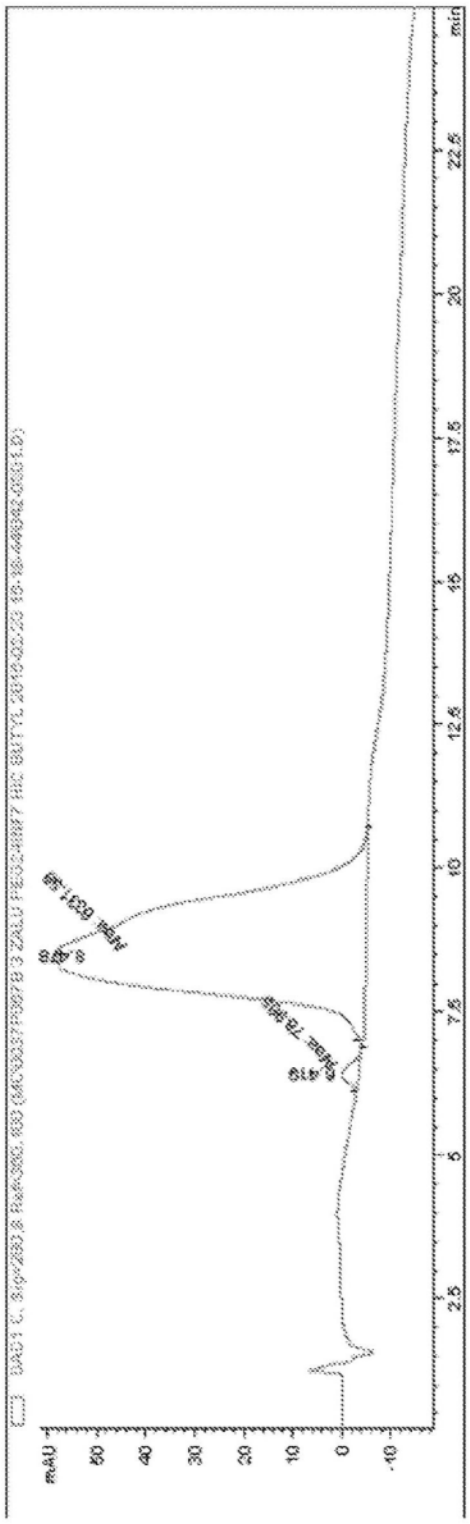


图17

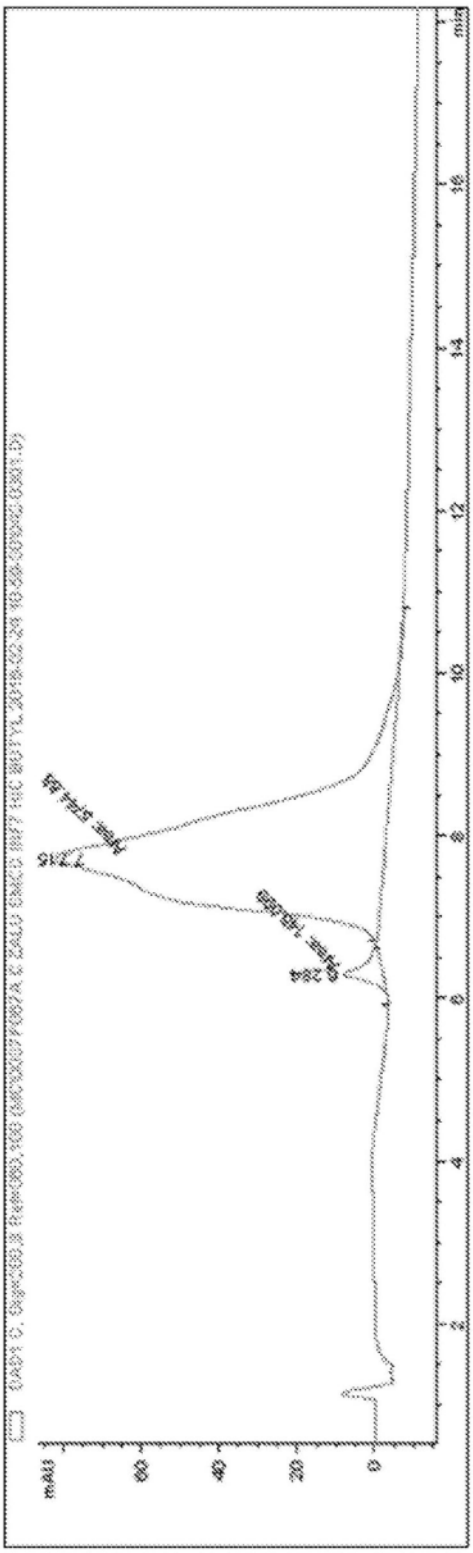


图18

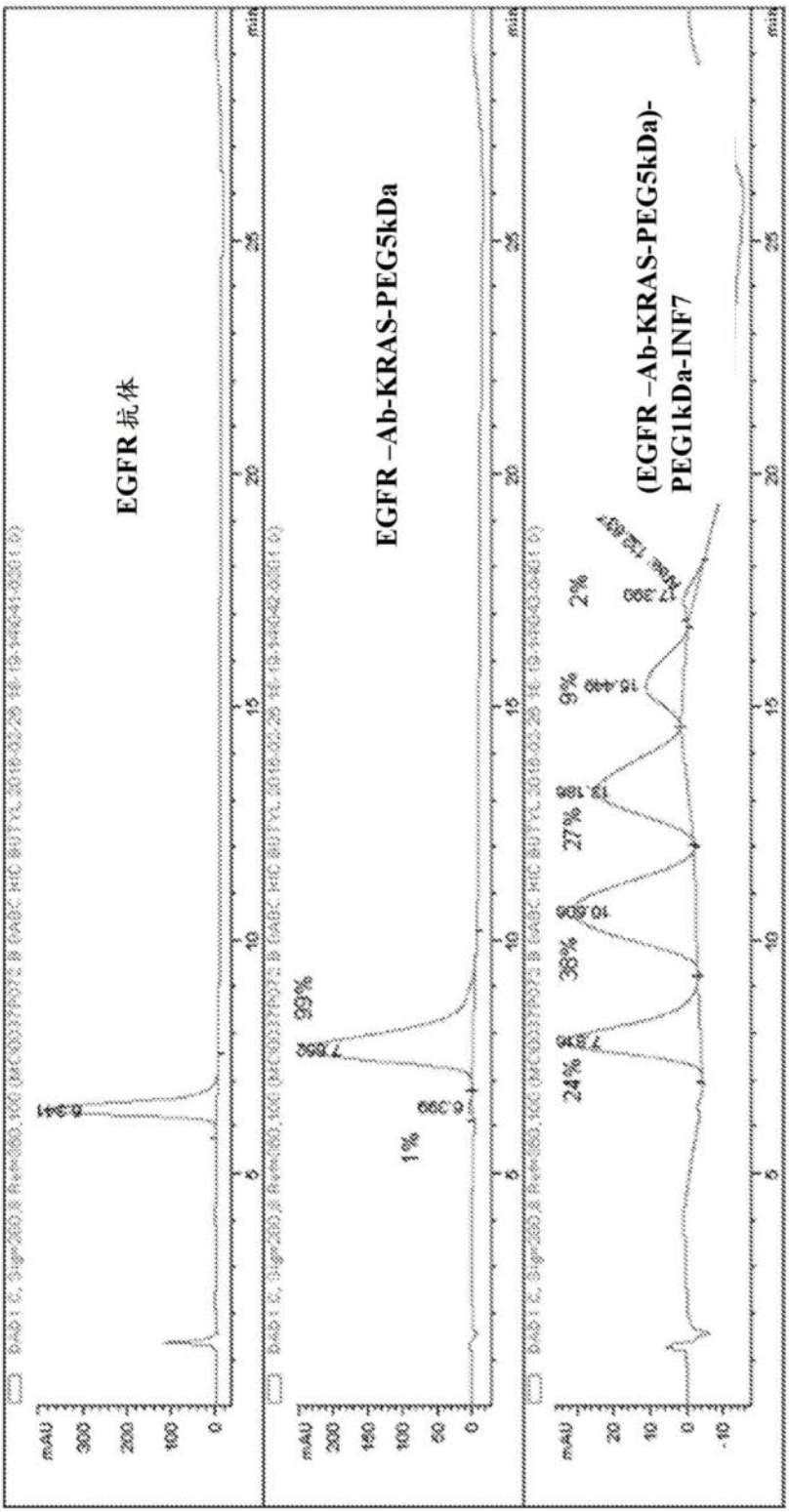

EGFR 抗体
EGFR –Ab-KRAS-PEG5kDa
(EGFR –Ab-KRAS-PEG5kDa)-PEG1kDa-INF7
mAU
min
99%
1%
24%
38%
27%
9%
2%

图19

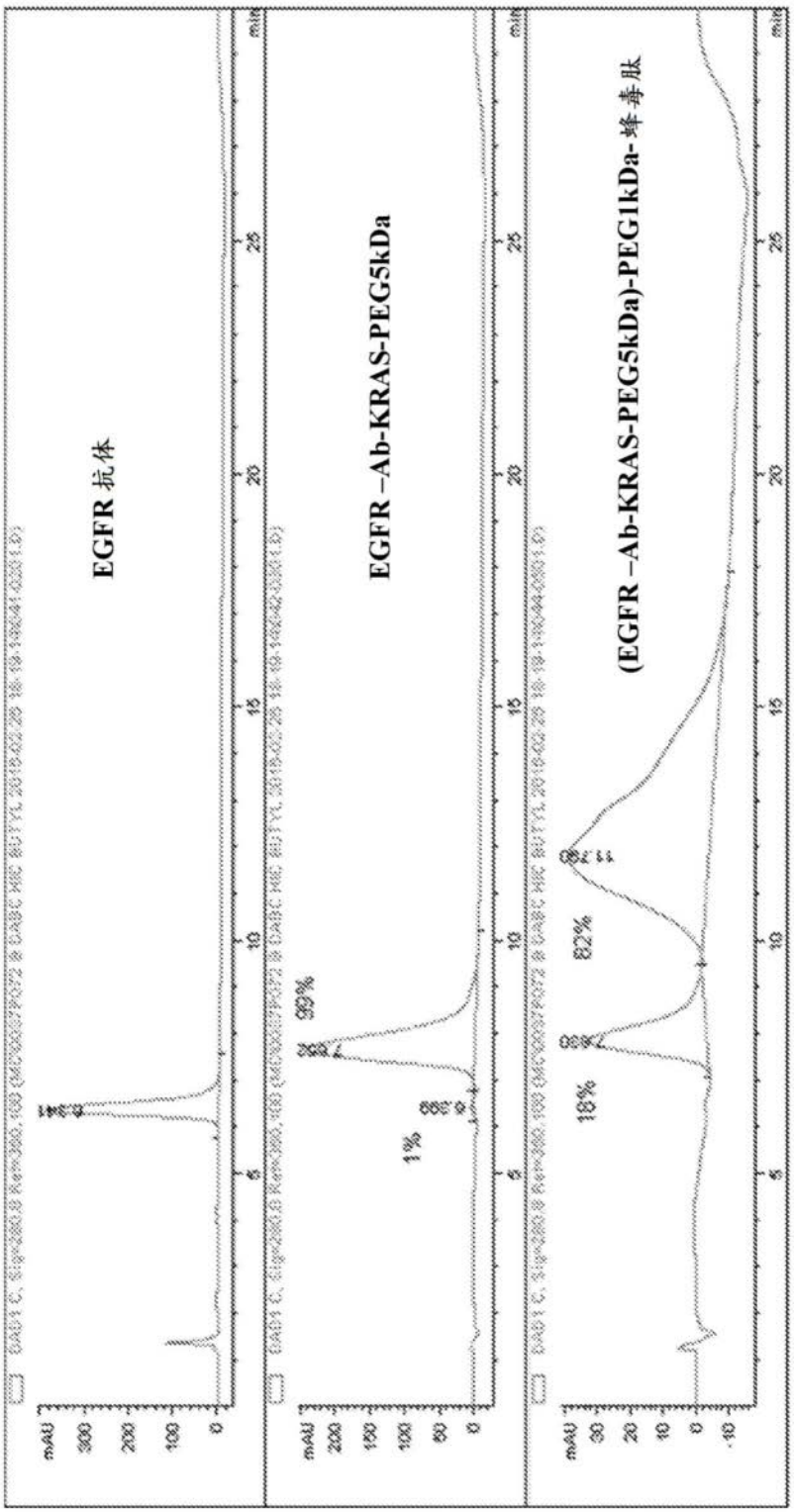

EGFR 抗体
EGFR –Ab-KRAS-PEG5kDa
(EGFR –Ab-KRAS-PEG5kDa)-PEG1kDa-蜂毒肽
99%
1%
82%
18%
mAU
min

图20

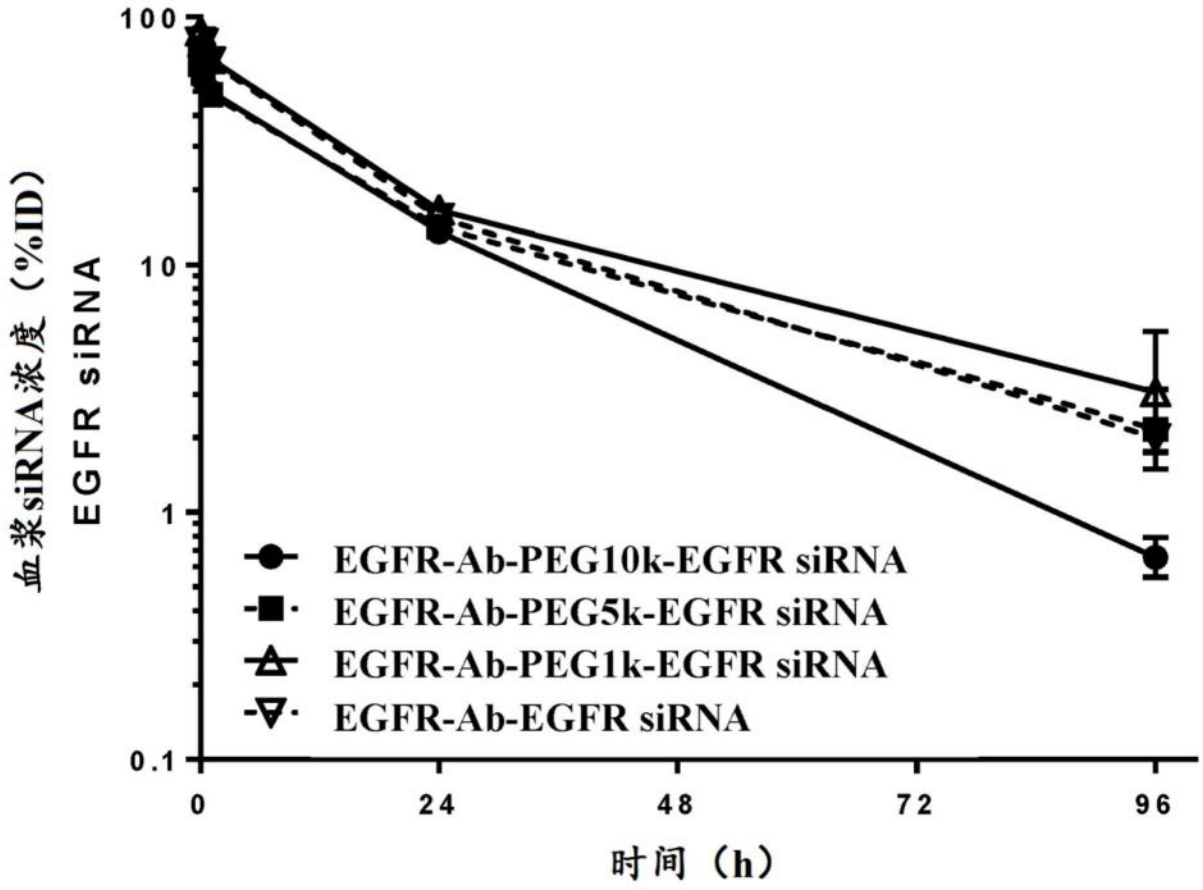

100
10
1
0.1
血浆siRNA浓度（%ID）
EGFR siRNA
EGFR-Ab-PEG10k-EGFR siRNA
EGFR-Ab-PEG5k-EGFR siRNA
EGFR-Ab-PEG1k-EGFR siRNA
EGFR-Ab-EGFR siRNA
0
24
48
72
96
时间（h）

图21

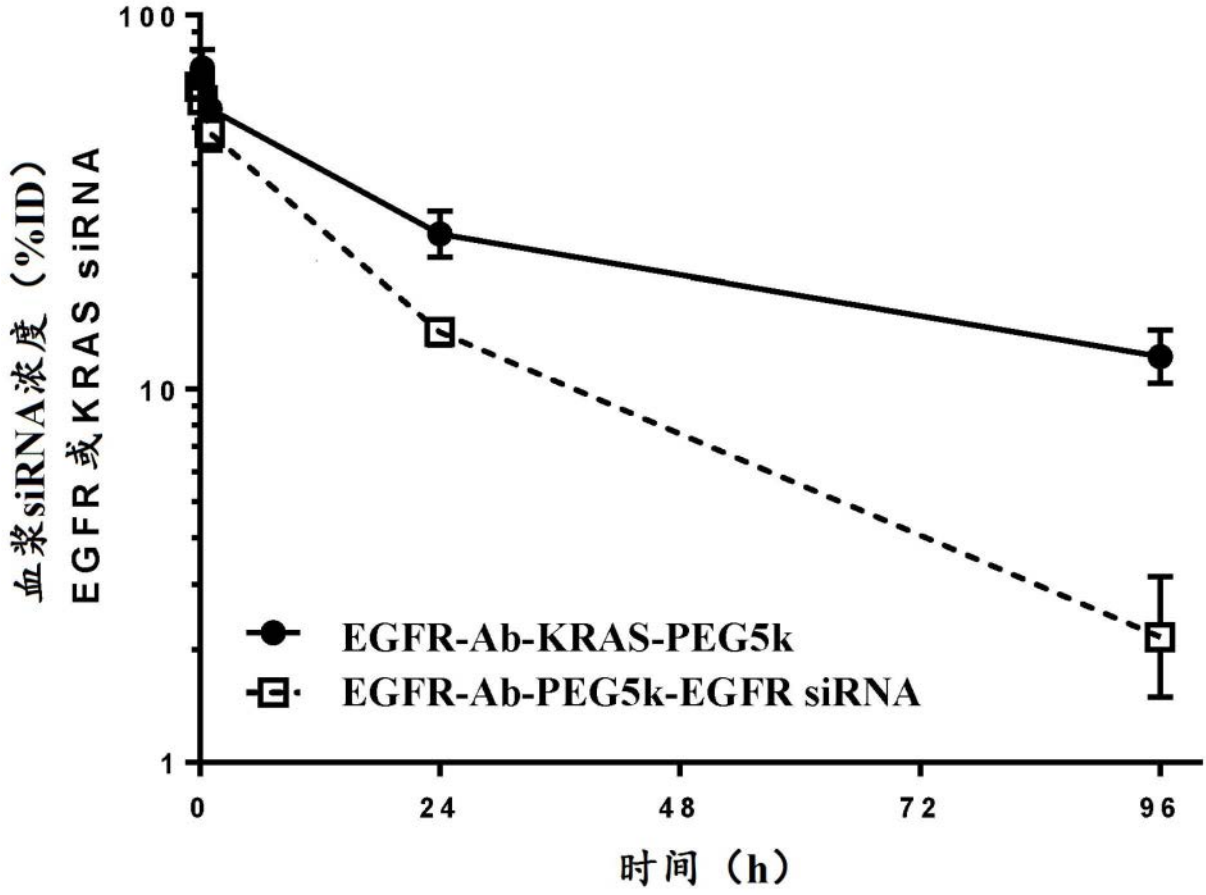

100
10
1
血浆siRNA浓度（%ID）
EGFR或KRAS siRNA
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k
EGFR-Ab-PEG5k-EGFR siRNA
0
24
48
72
96
时间（h）

图22

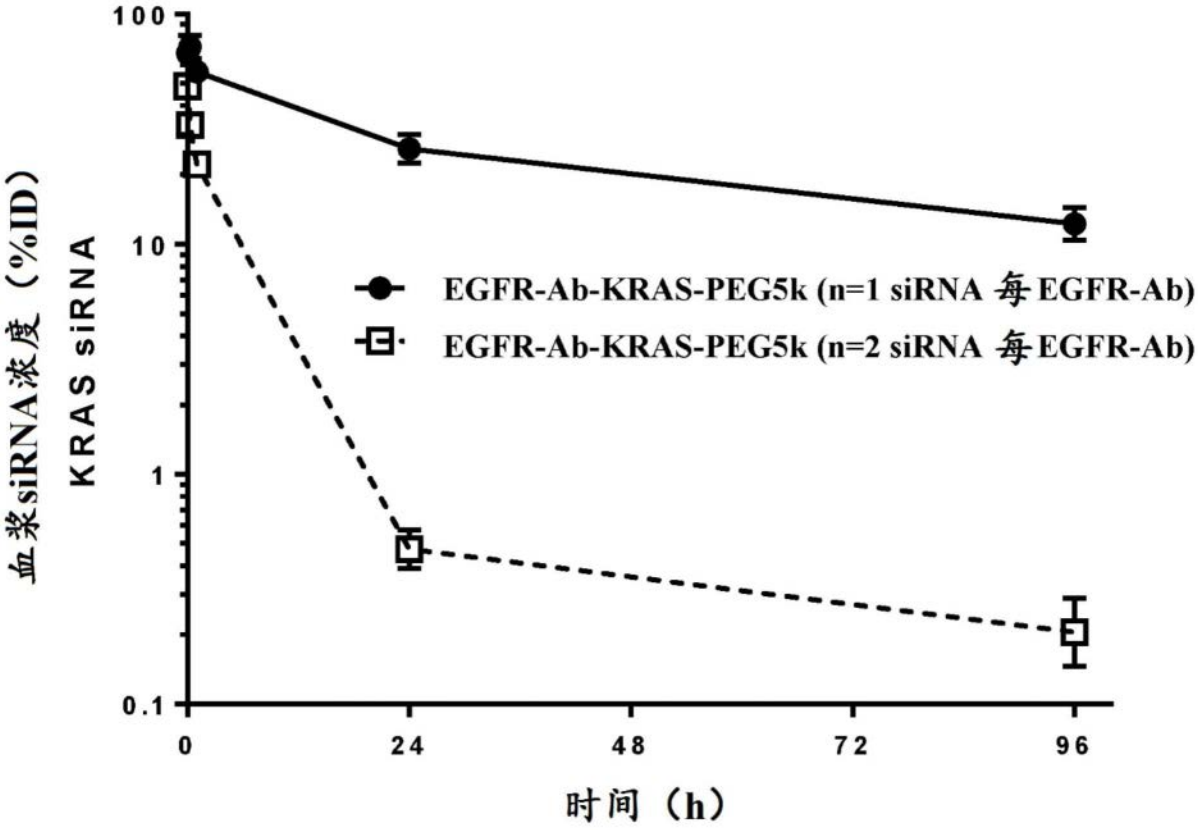

100
10
1
0.1
血浆siRNA浓度（%ID）
KRAS siRNA
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1 siRNA 每 EGFR-Ab)
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=2 siRNA 每 EGFR-Ab)
0
24
48
72
96
时间（h）

图23

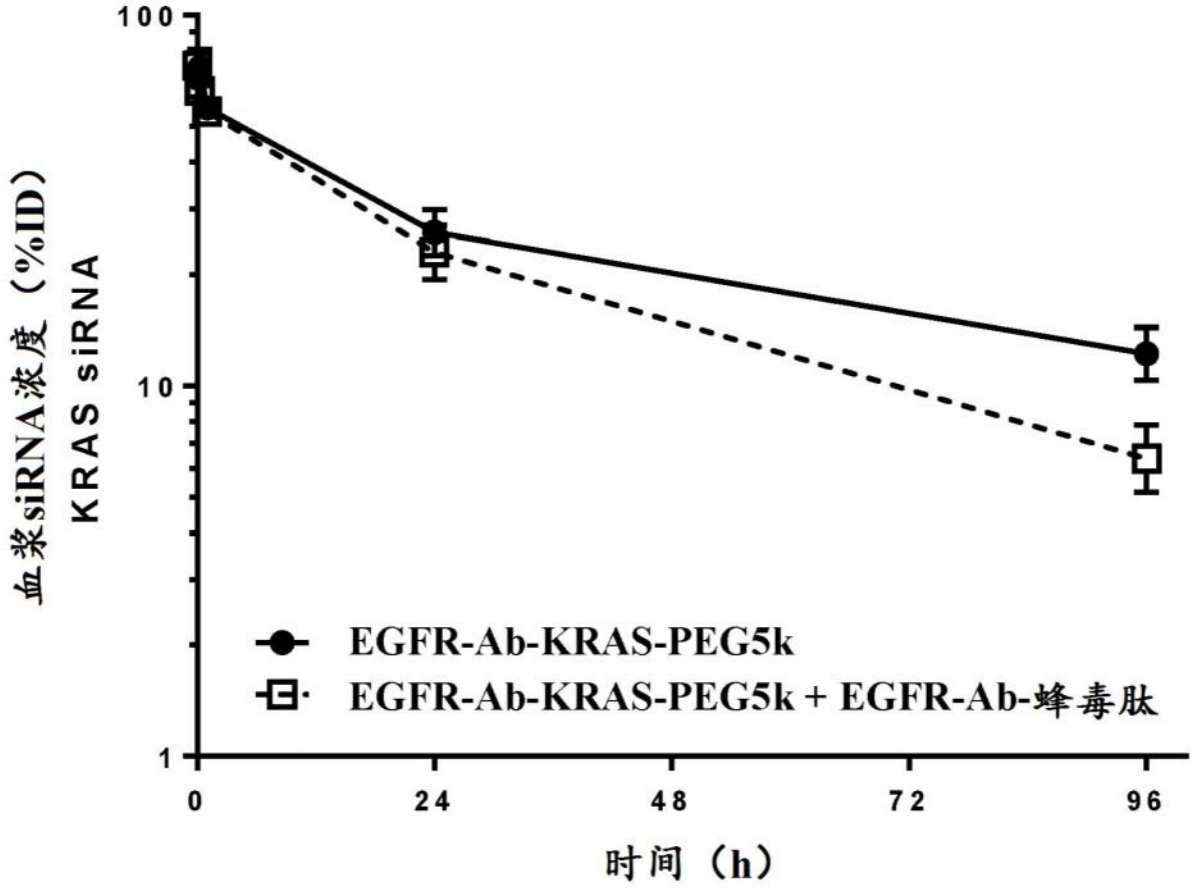

100
10
1
血浆siRNA浓度（%ID）
KRAS siRNA
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k + EGFR-Ab-蜂毒肽
0
24
48
72
96
时间（h）

图24

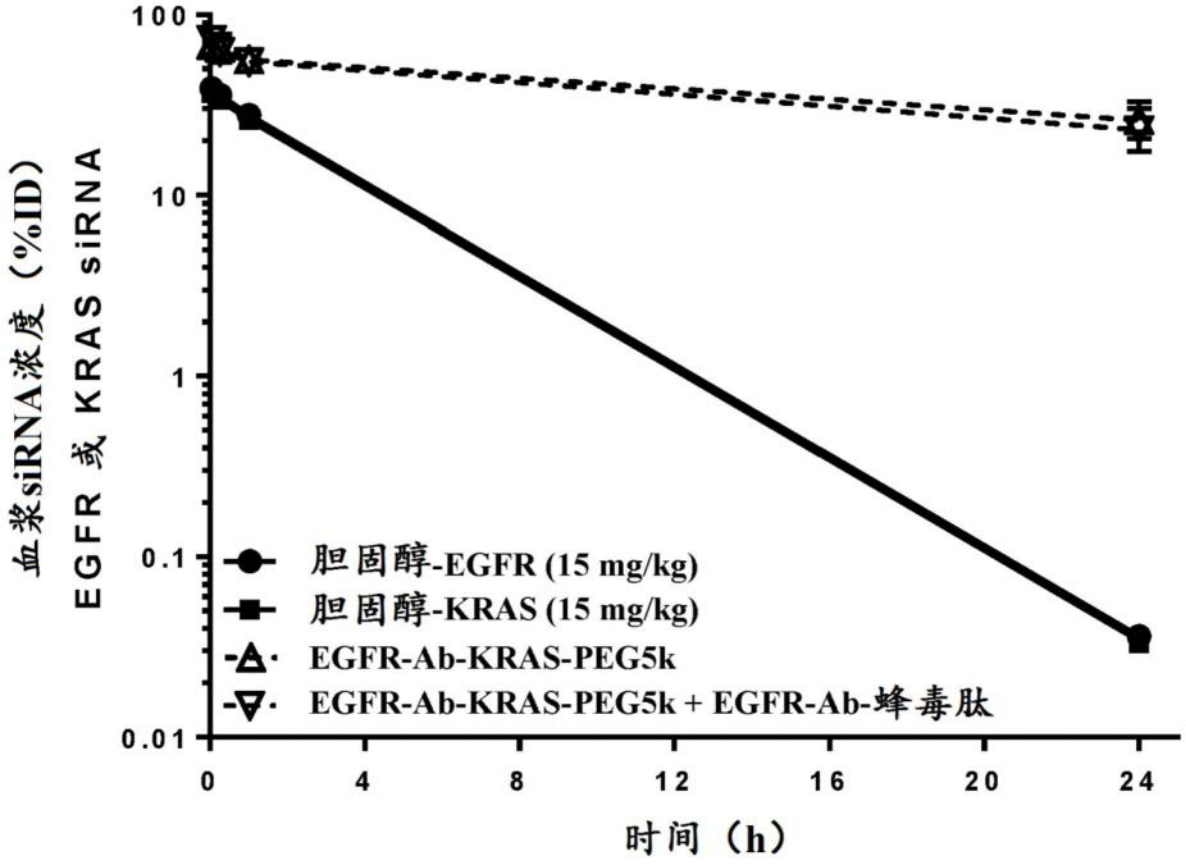

血浆siRNA浓度（%ID）
EGFR 或 KRAS siRNA
100
10
1
0.1
0.01
0
4
8
12
16
20
24
时间（h）
胆固醇-EGFR (15 mg/kg)
胆固醇-KRAS (15 mg/kg)
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k + EGFR-Ab-蜂毒肽

图25

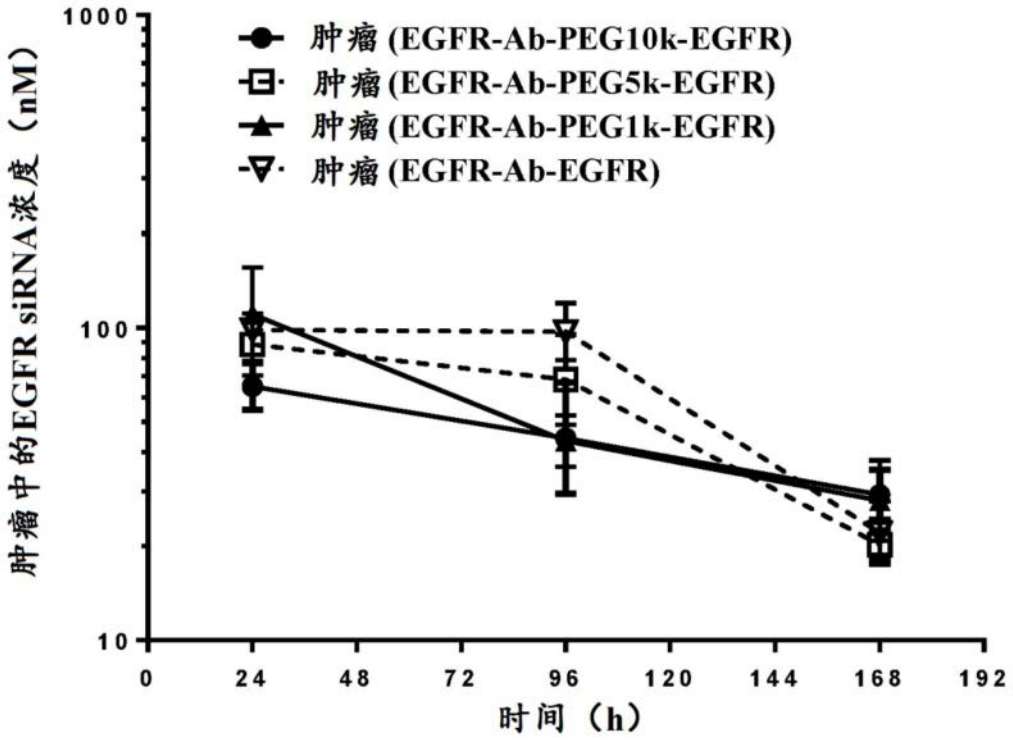

肿瘤 (EGFR-Ab-PEG10k-EGFR)
肿瘤 (EGFR-Ab-PEG5k-EGFR)
肿瘤 (EGFR-Ab-PEG1k-EGFR)
肿瘤 (EGFR-Ab-EGFR)
肿瘤中的EGFR siRNA浓度（nM）
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
144
168
192
时间（h）

图26A

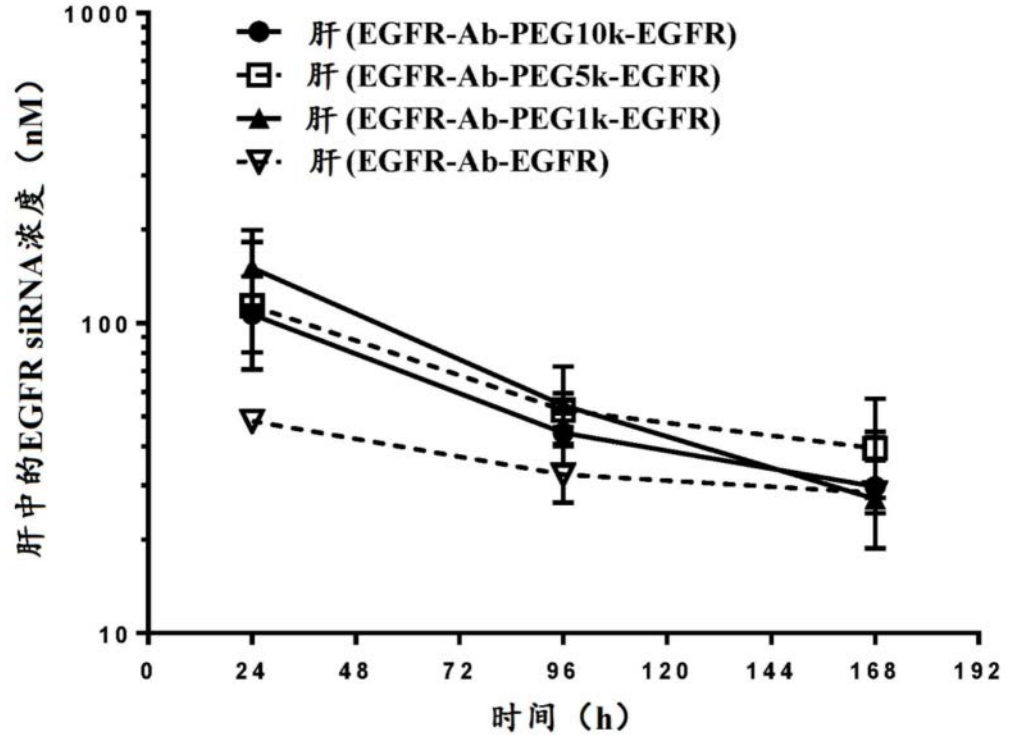

肝 (EGFR-Ab-PEG10k-EGFR)
肝 (EGFR-Ab-PEG5k-EGFR)
肝 (EGFR-Ab-PEG1k-EGFR)
肝 (EGFR-Ab-EGFR)
肝中的EGFR siRNA浓度（nM）
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
144
168
192
时间（h）

图26B

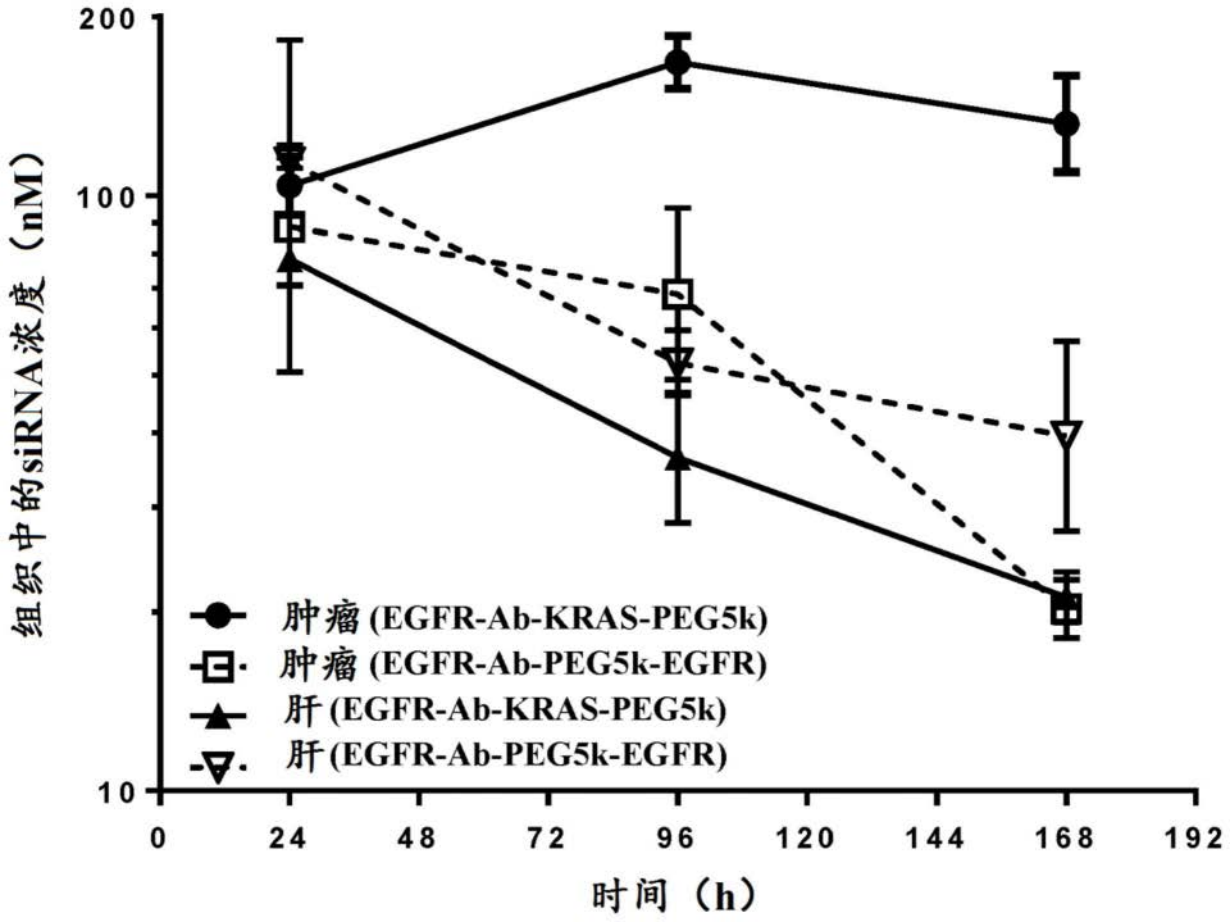

200
100
10
组织中的siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
192
时间（h）
肿瘤 (EGFR-Ab-KRAS-PEG5k)
肿瘤 (EGFR-Ab-PEG5k-EGFR)
肝 (EGFR-Ab-KRAS-PEG5k)
肝 (EGFR-Ab-PEG5k-EGFR)

图27

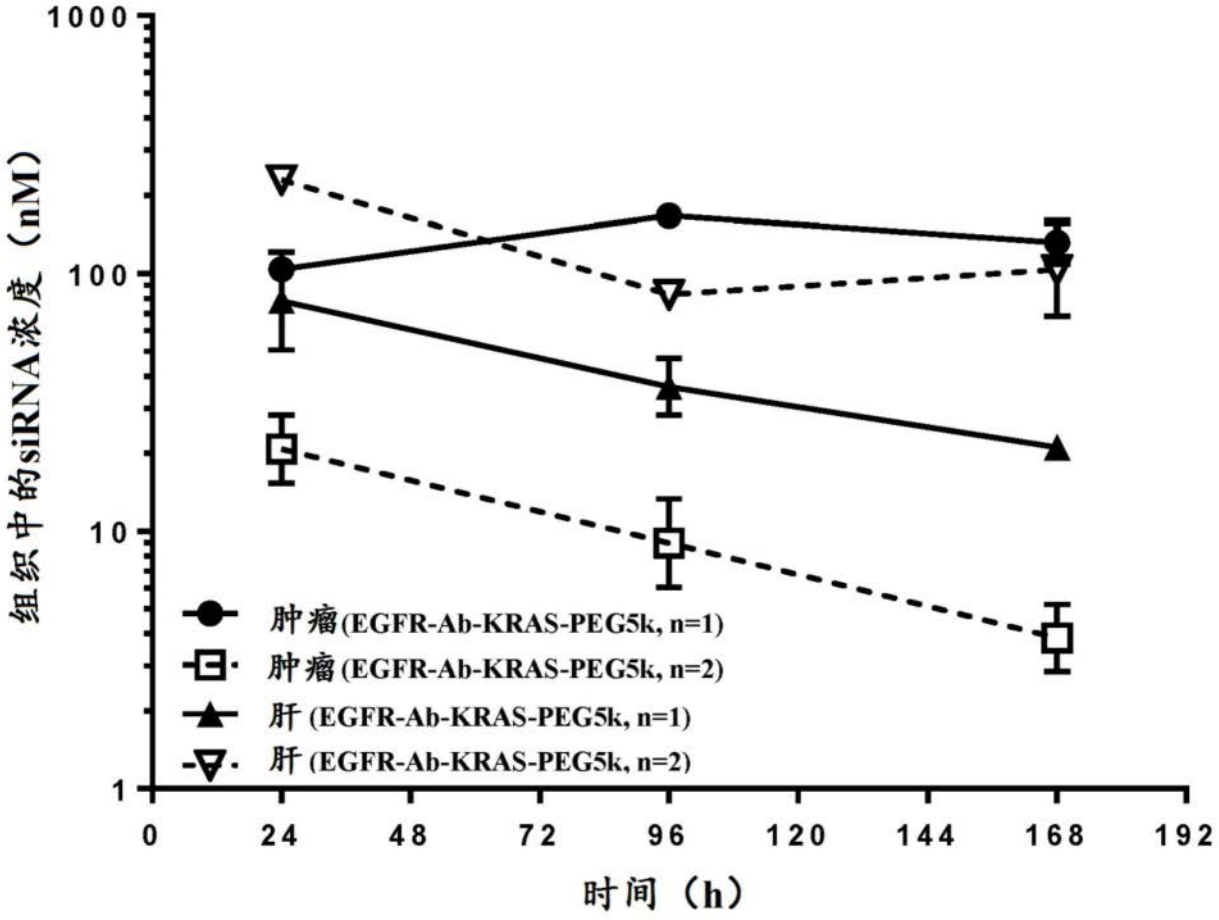

1000
100
10
1
组织中的siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
192
时间（h）
肿瘤(EGFR-Ab-KRAS-PEG5k, n=1)
肿瘤(EGFR-Ab-KRAS-PEG5k, n=2)
肝(EGFR-Ab-KRAS-PEG5k, n=1)
肝(EGFR-Ab-KRAS-PEG5k, n=2)

图28

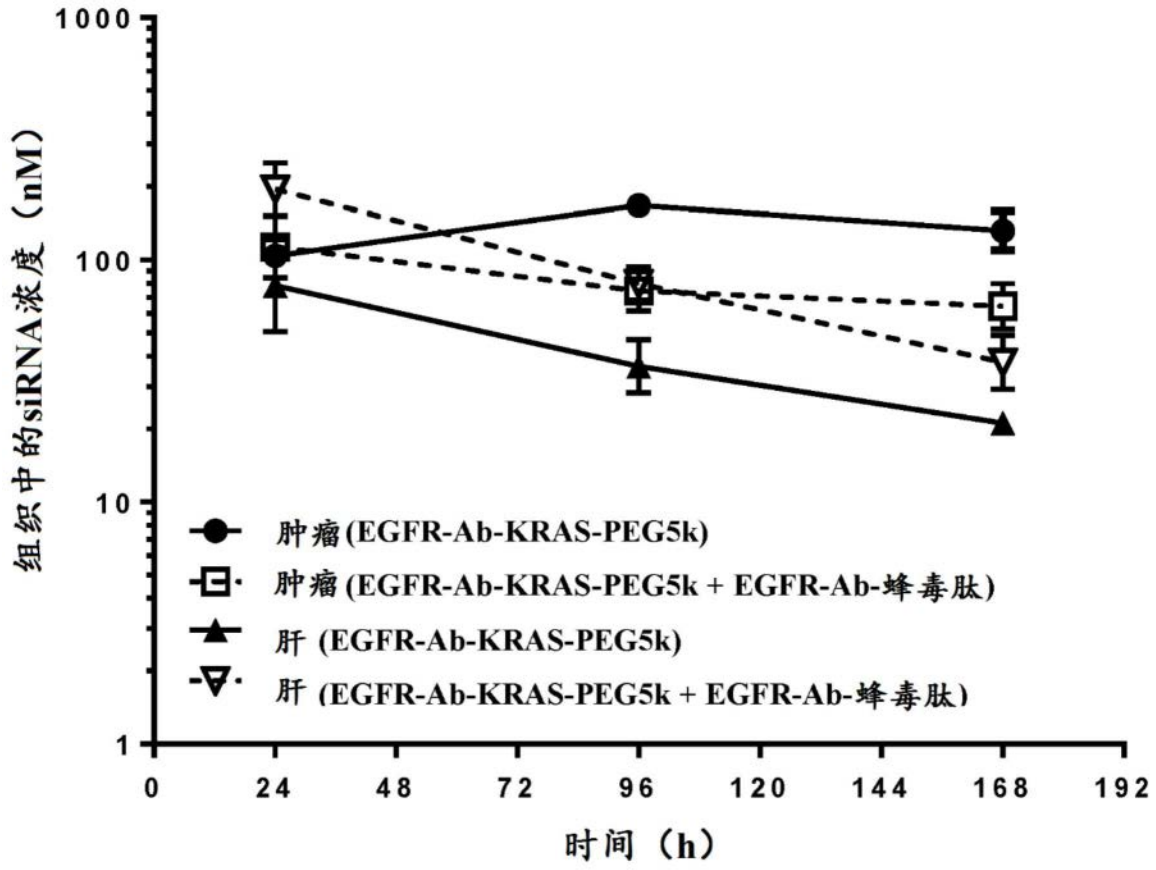

1000
100
10
1
组织中的siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
192
时间（h）
肿瘤(EGFR-Ab-KRAS-PEG5k)
肿瘤(EGFR-Ab-KRAS-PEG5k + EGFR-Ab-蜂毒肽)
肝 (EGFR-Ab-KRAS-PEG5k)
肝 (EGFR-Ab-KRAS-PEG5k + EGFR-Ab-蜂毒肽)

图29

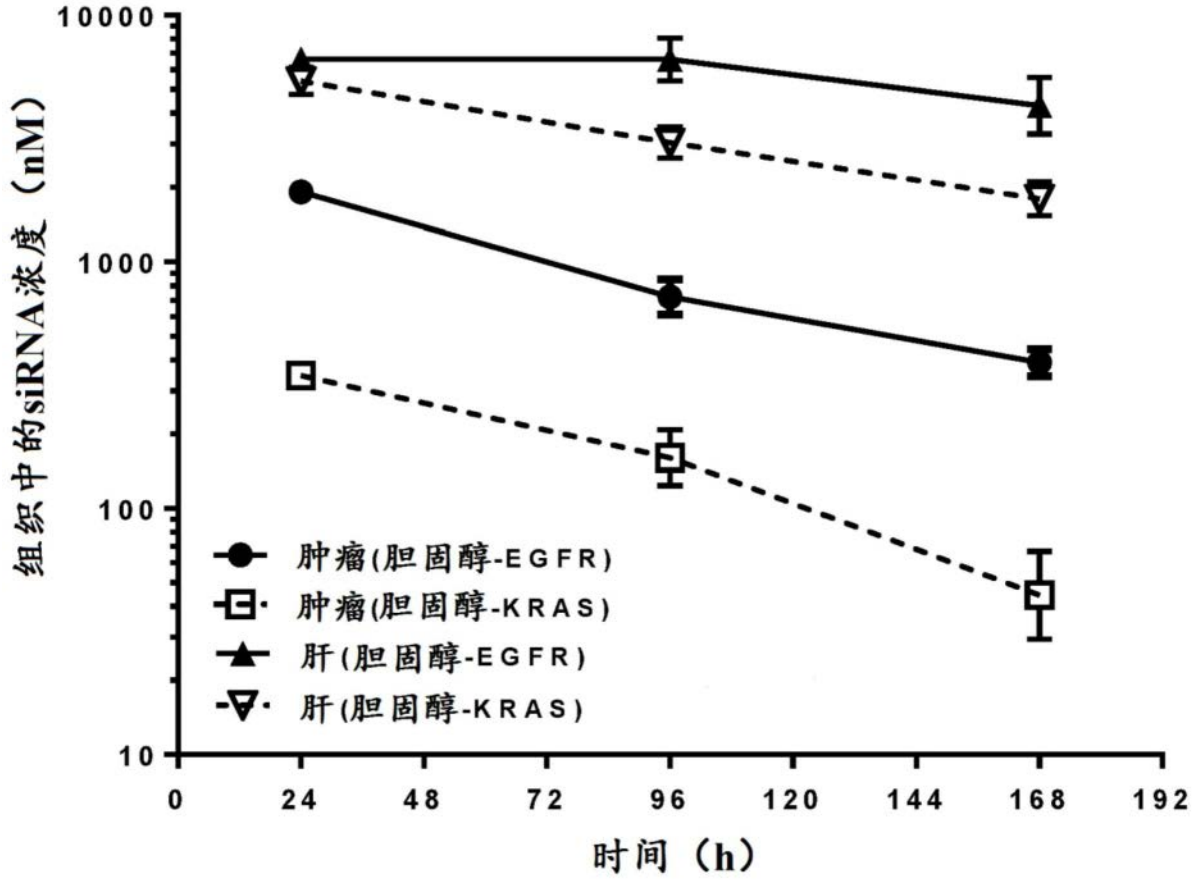

10000
1000
100
10
组织中的siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
192
时间（h）
肿瘤(胆固醇-EGFR)
肿瘤(胆固醇-KRAS)
肝(胆固醇-EGFR)
肝(胆固醇-KRAS)

图30

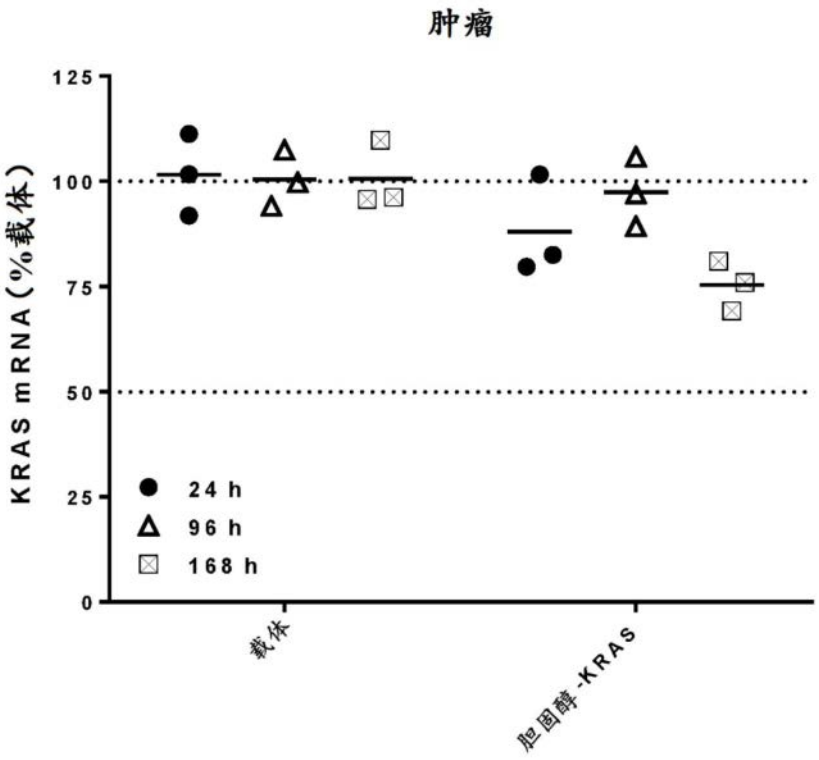

肿瘤
KRAS mRNA(%载体)
125
100
75
50
25
0
24 h
96 h
168 h
载体
胆固醇-KRAS

图31A

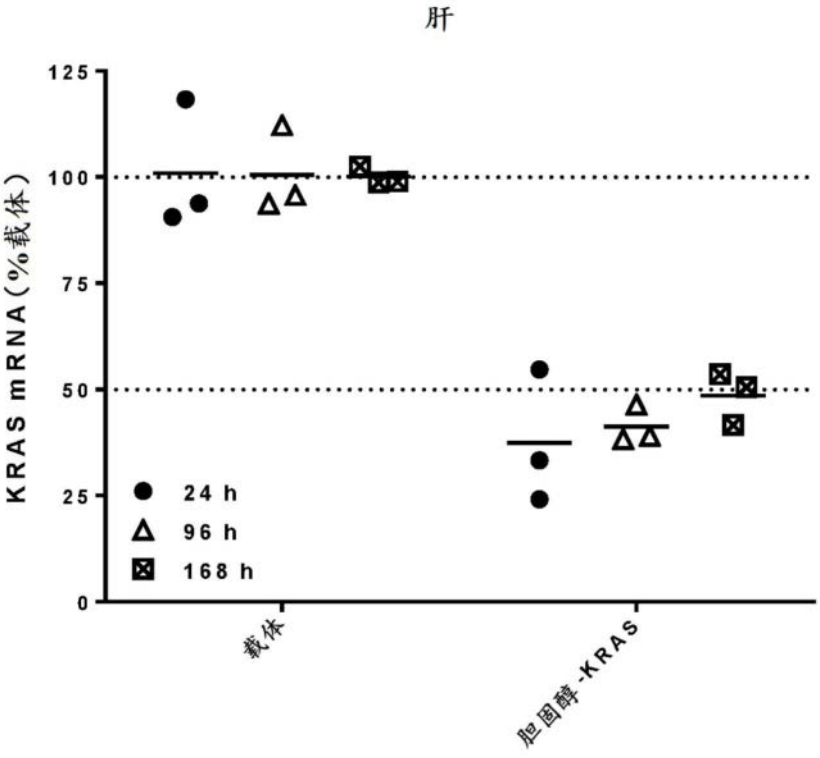

肝
KRAS mRNA(%载体)
125
100
75
50
25
0
24 h
96 h
168 h
载体
胆固醇-KRAS

图31B

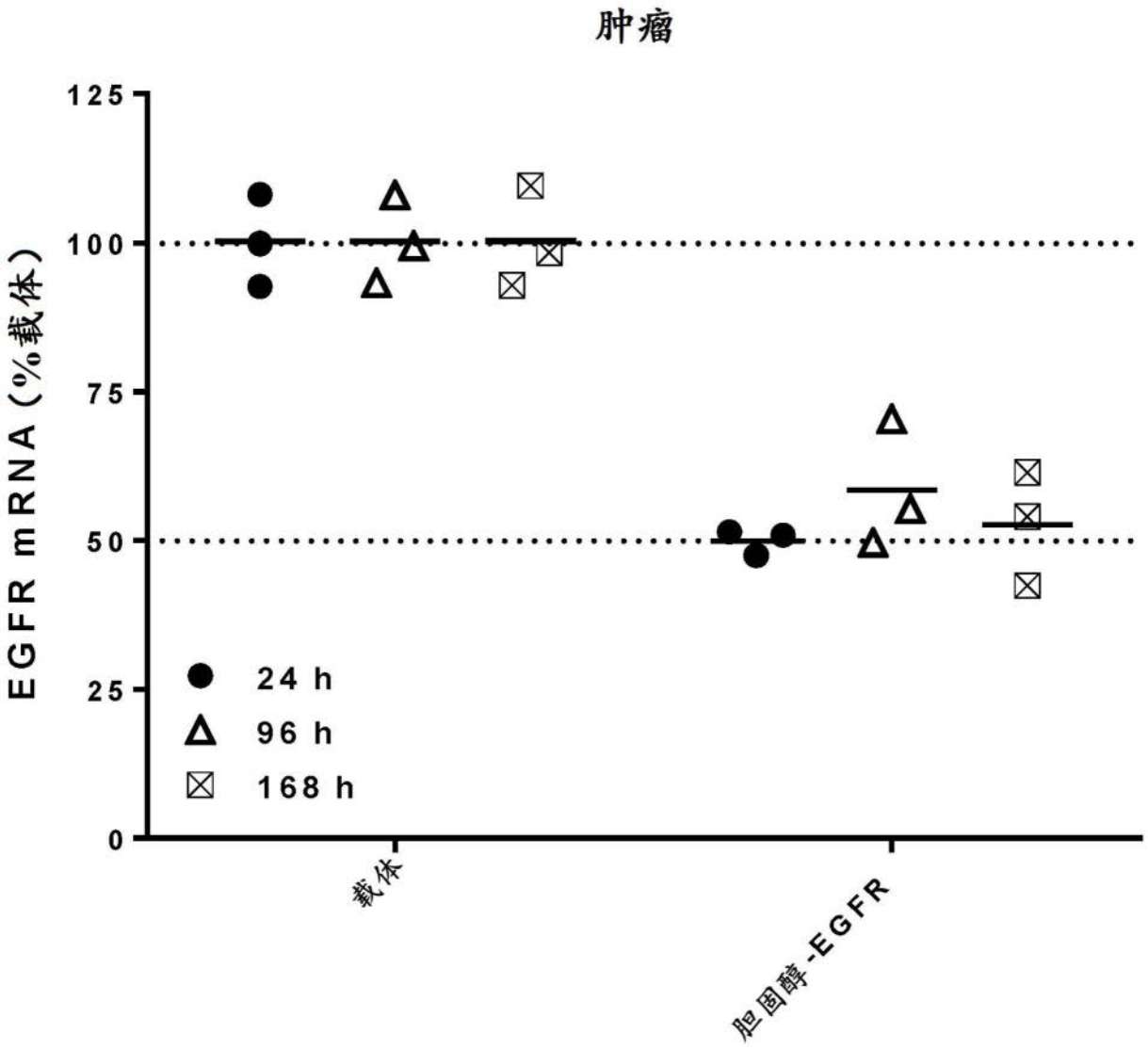


图32

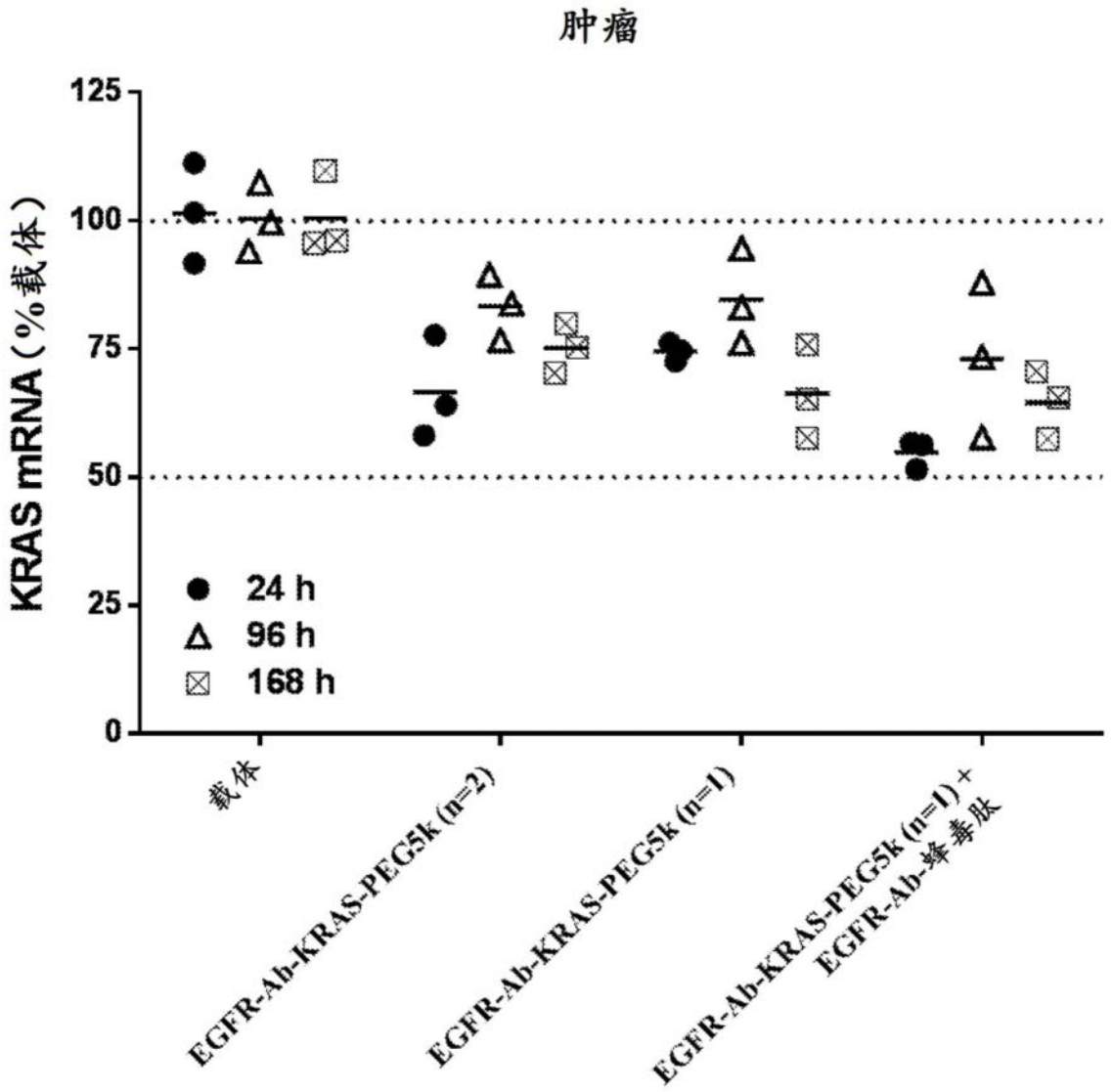

肿瘤
KRAS mRNA（%载体）
125
100
75
50
25
0
24 h
96 h
168 h
载体
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=2)
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1) + EGFR-Ab-蜂毒肽

图33

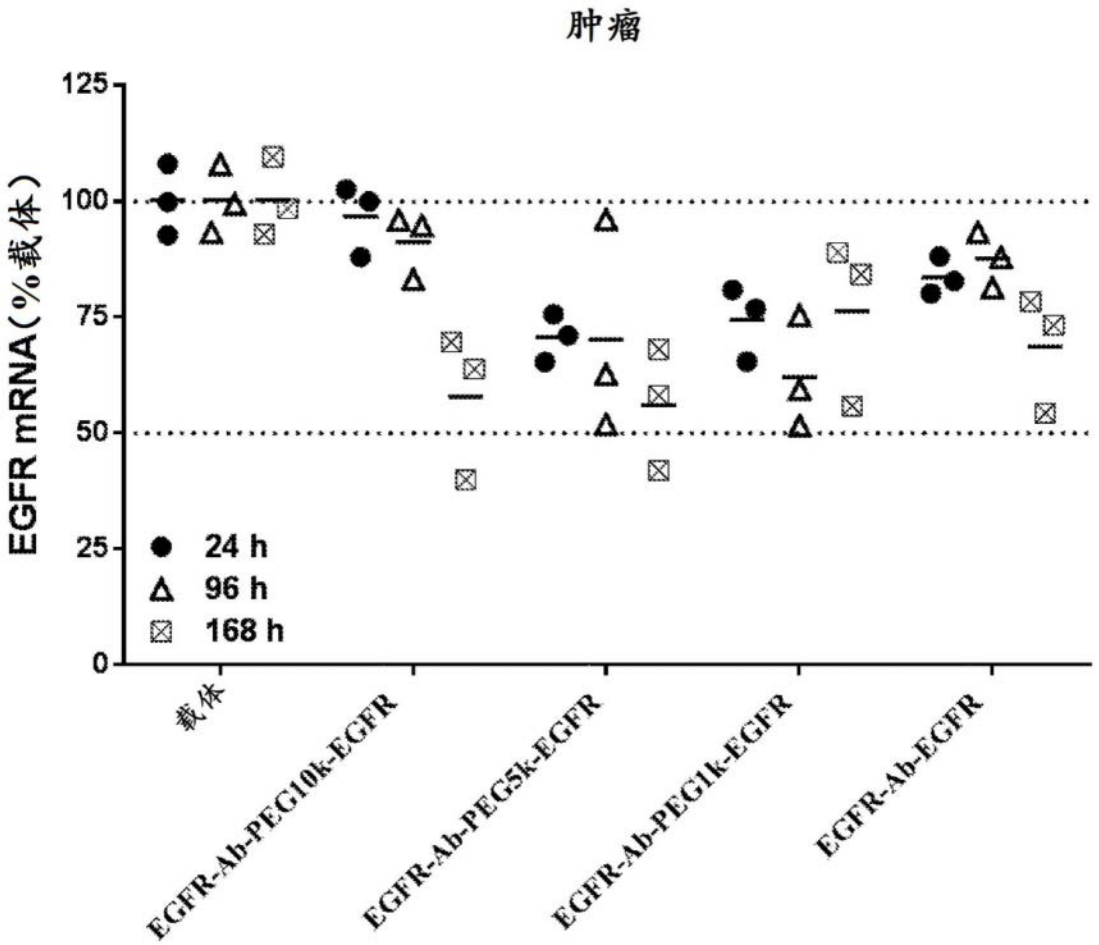

肿瘤
EGFR mRNA(%载体)
125
100
75
50
25
0
24 h
96 h
168 h
载体
EGFR-Ab-PEG10k-EGFR
EGFR-Ab-PEG5k-EGFR
EGFR-Ab-PEG1k-EGFR
EGFR-Ab-EGFR

图34

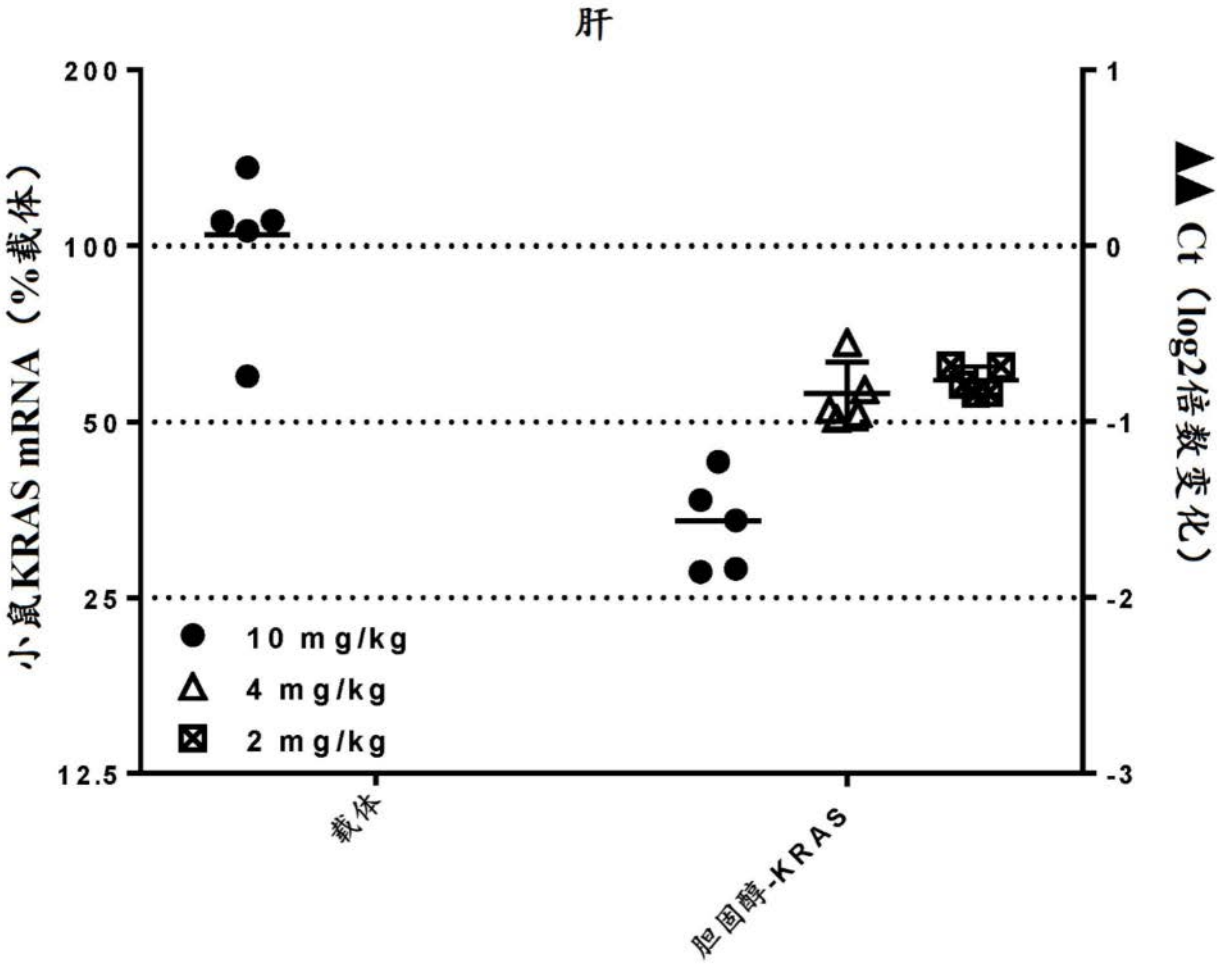

肝
小鼠KRAS mRNA（%载体）
▲▲ Ct（log2倍数变化）
200
100
50
25
12.5
1
0
-1
-2
-3
10 mg/kg
4 mg/kg
2 mg/kg
载体
胆固醇-KRAS

图35

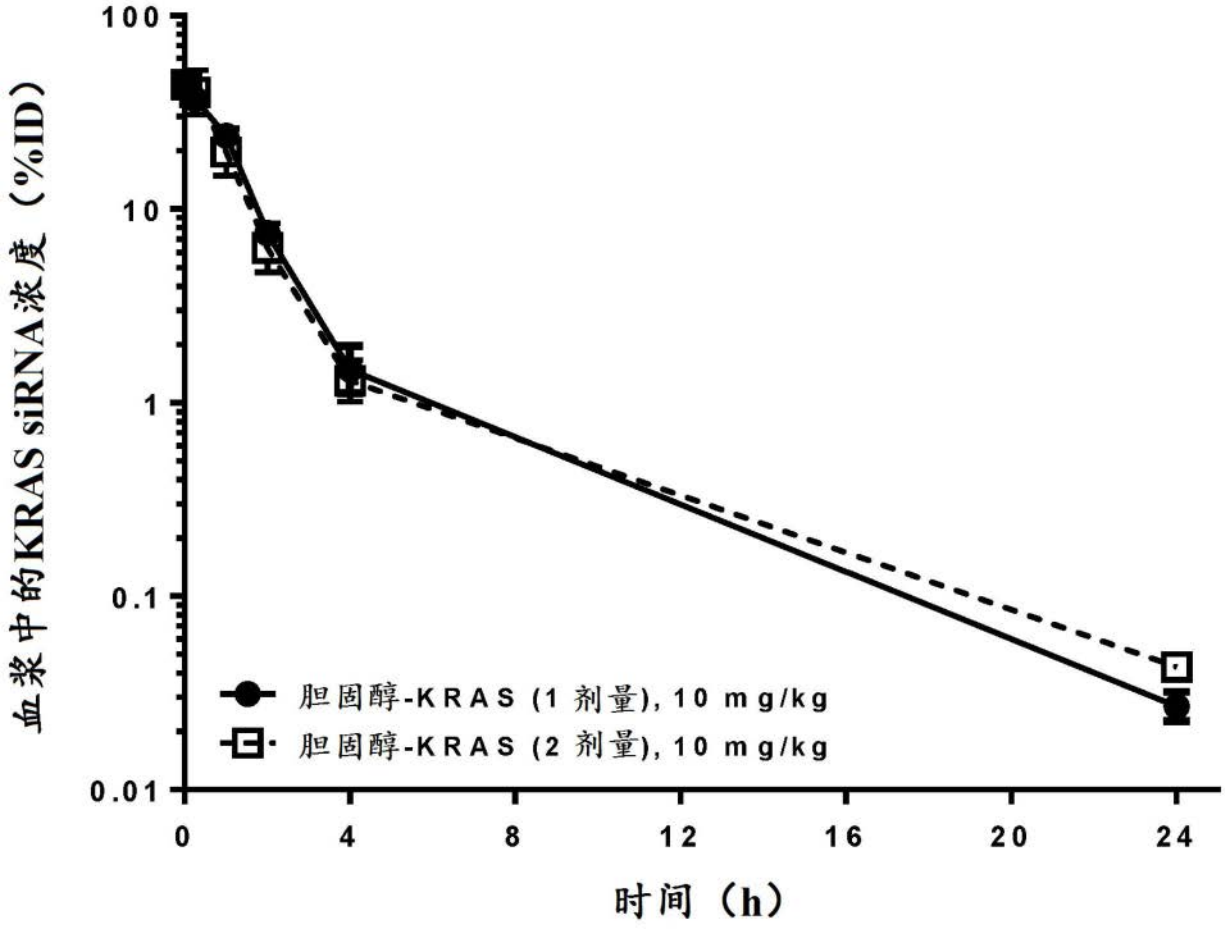

100
10
1
0.1
0.01
血浆中的KRAS siRNA浓度（%ID）
0
4
8
12
16
20
24
时间（h）
胆固醇-KRAS (1 剂量), 10 mg/kg
胆固醇-KRAS (2 剂量), 10 mg/kg

图36

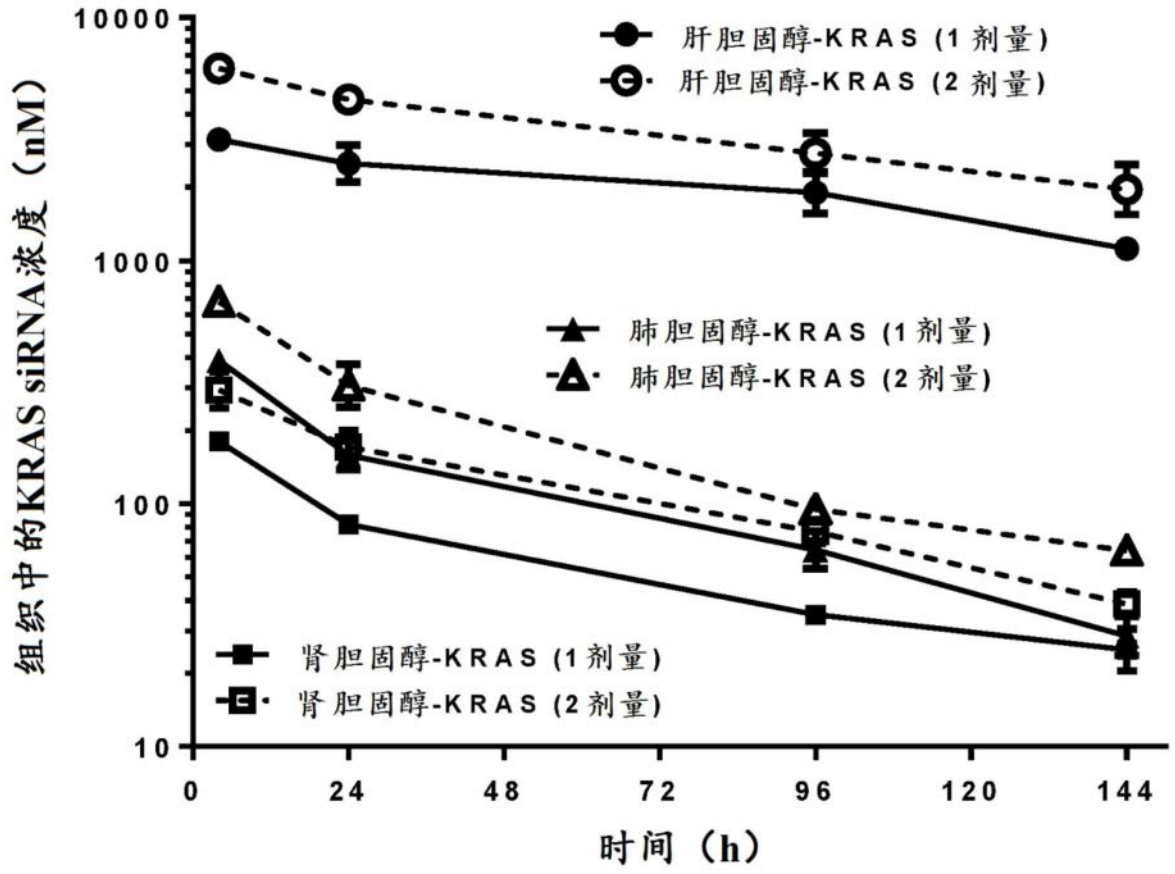

10000
1000
100
10
组织中的KRAS siRNA浓度（nM）
肝胆固醇-KRAS (1 剂量)
肝胆固醇-KRAS (2 剂量)
肺胆固醇-KRAS (1 剂量)
肺胆固醇-KRAS (2 剂量)
肾胆固醇-KRAS (1 剂量)
肾胆固醇-KRAS (2 剂量)
0
24
48
72
96
120
144
时间（h）

图37

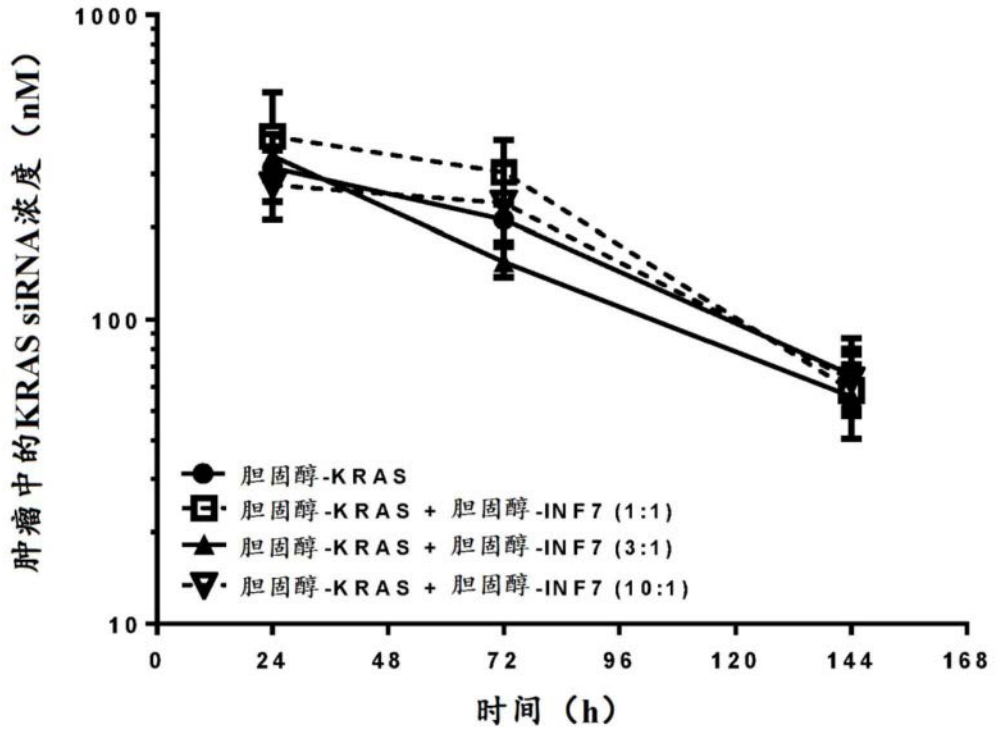

1000
100
10
肿瘤中的KRAS siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (3:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (10:1)

图38A

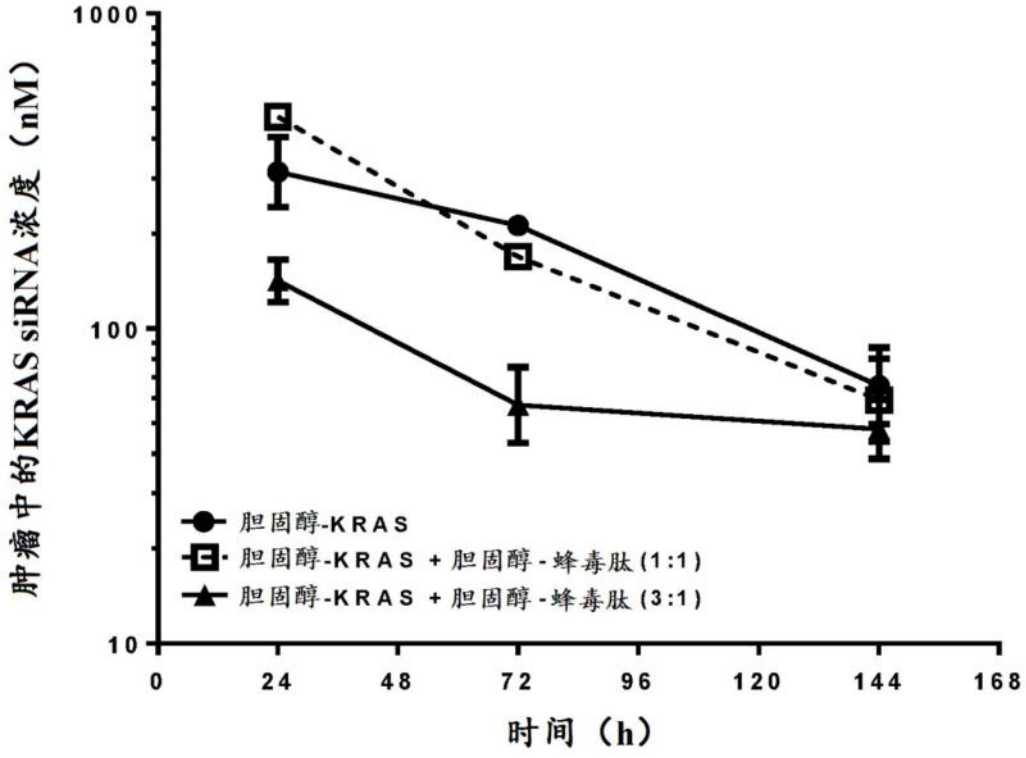

1000
100
10
肿瘤中的KRAS siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(3:1)

图38B

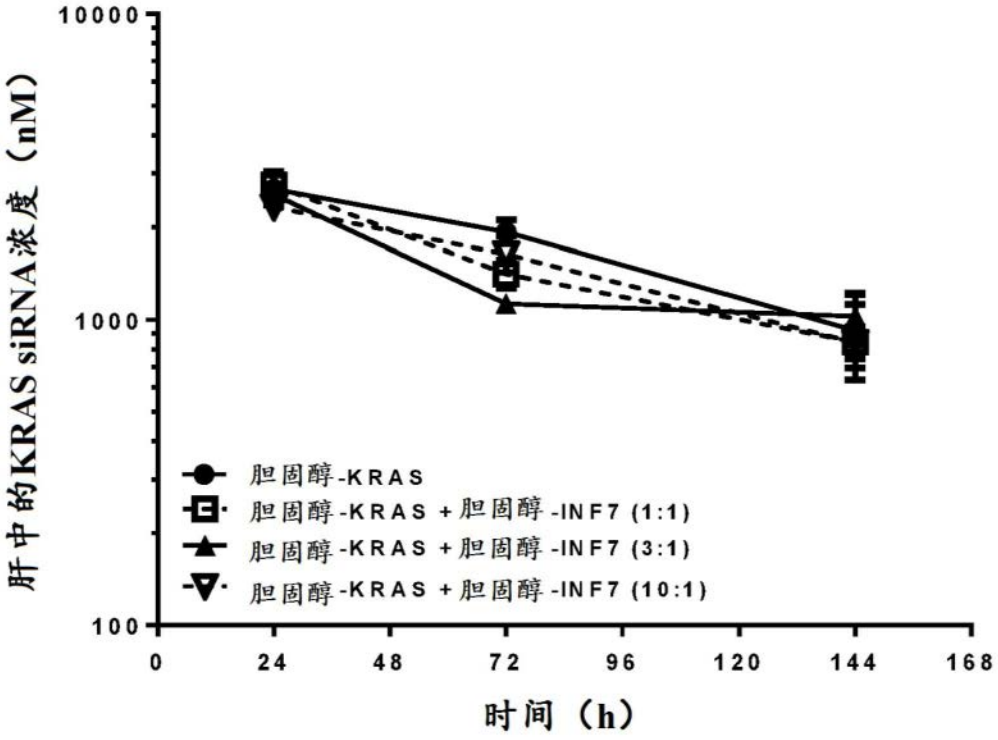

10000
1000
100
肝中的KRAS siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (3:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (10:1)

图39A

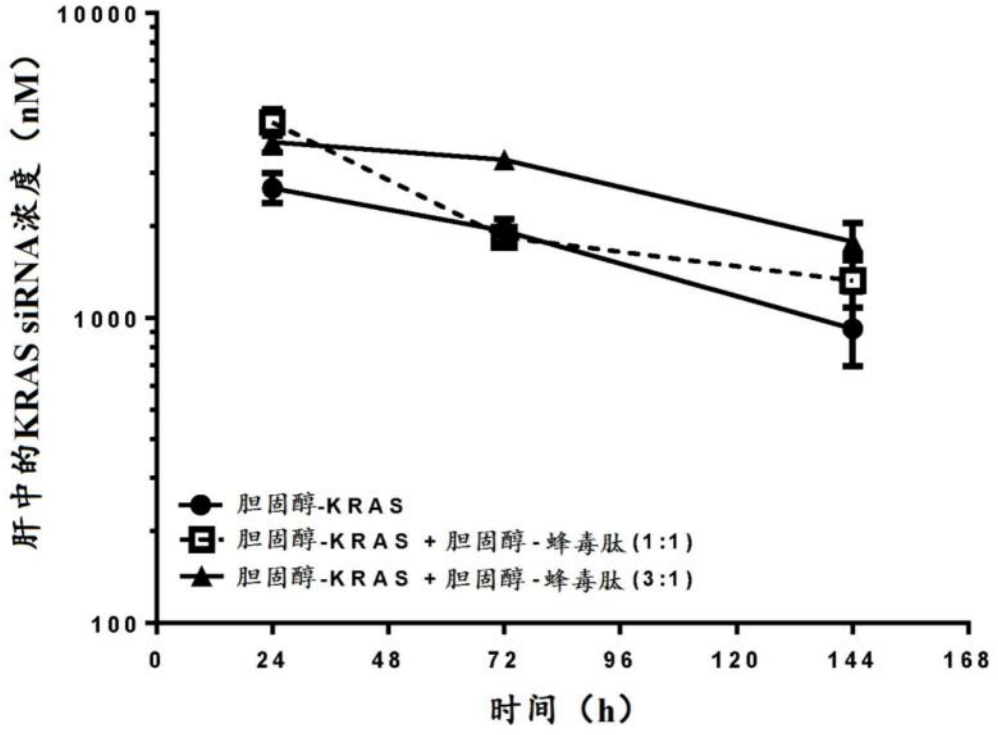

10000
1000
100
肝中的KRAS siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(3:1)

图39B

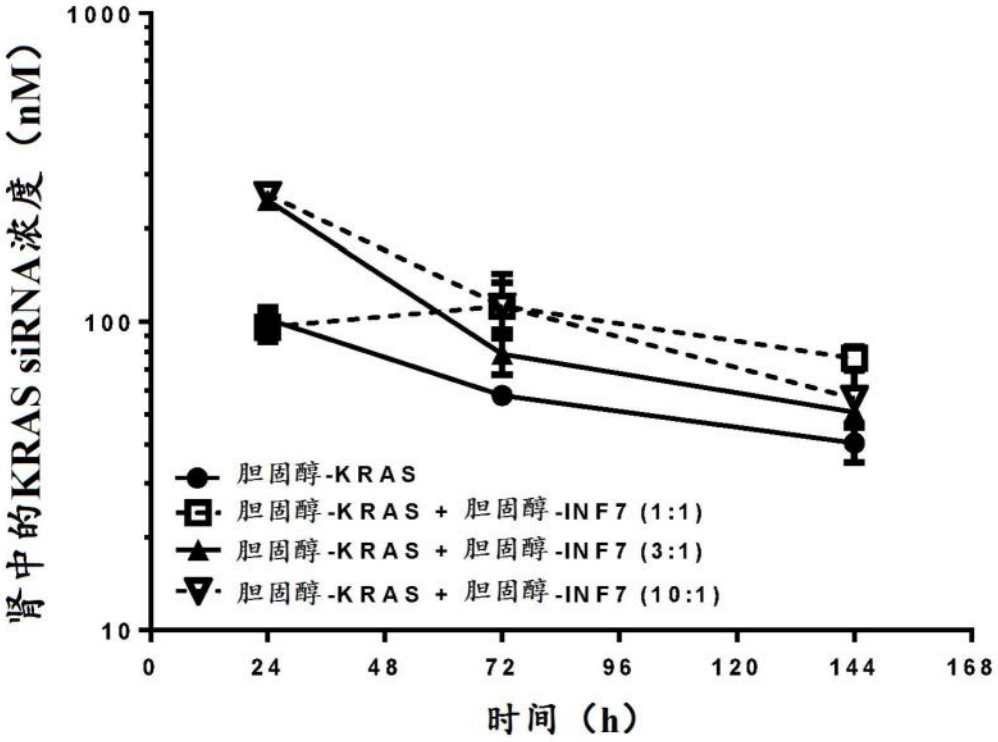

肾中的KRAS siRNA浓度（nM）
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (3:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (10:1)

图40A

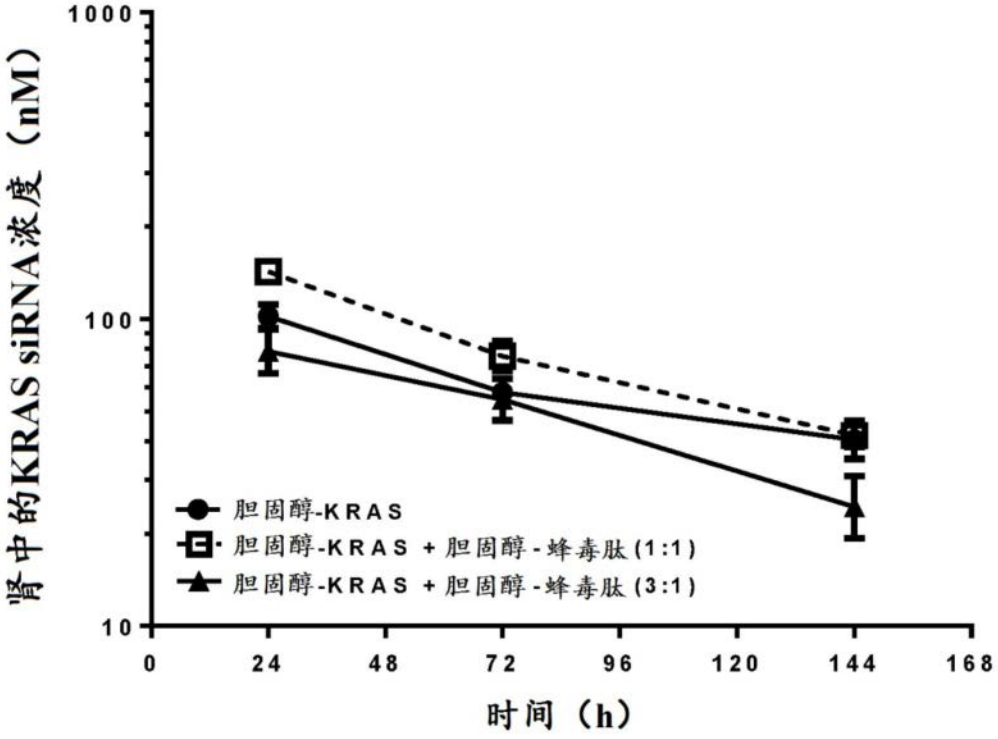

肾中的KRAS siRNA浓度（nM）
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(3:1)

图40B

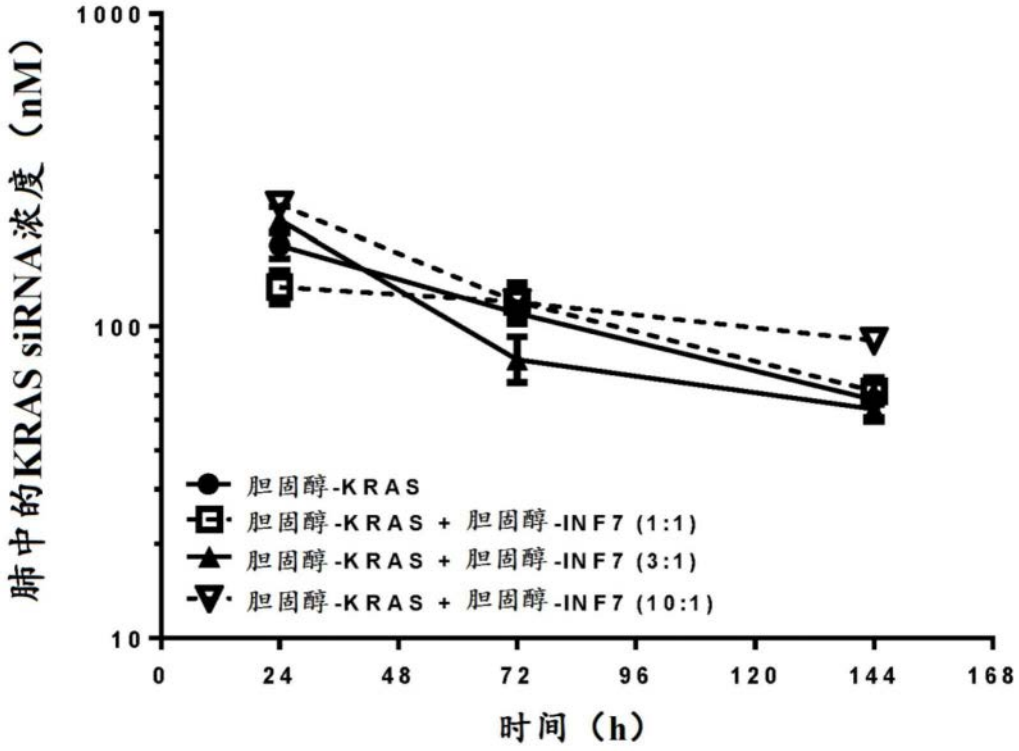

1000
100
10
肺中的KRAS siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (3:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (10:1)

图41A

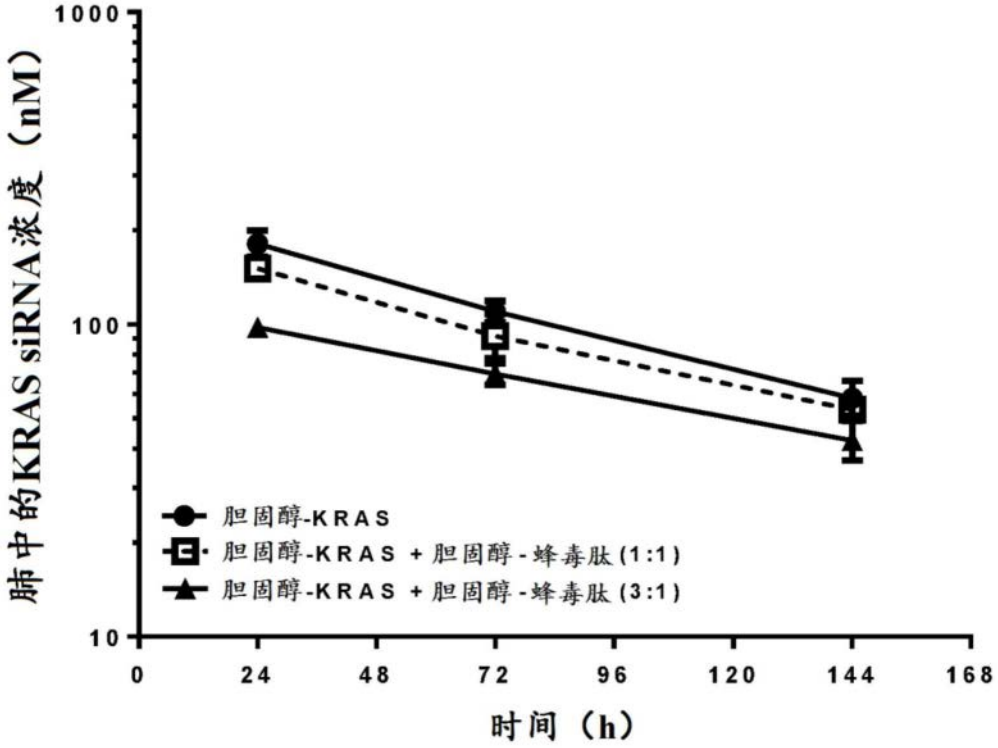

1000
100
10
肺中的KRAS siRNA浓度（nM）
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(3:1)

图41B

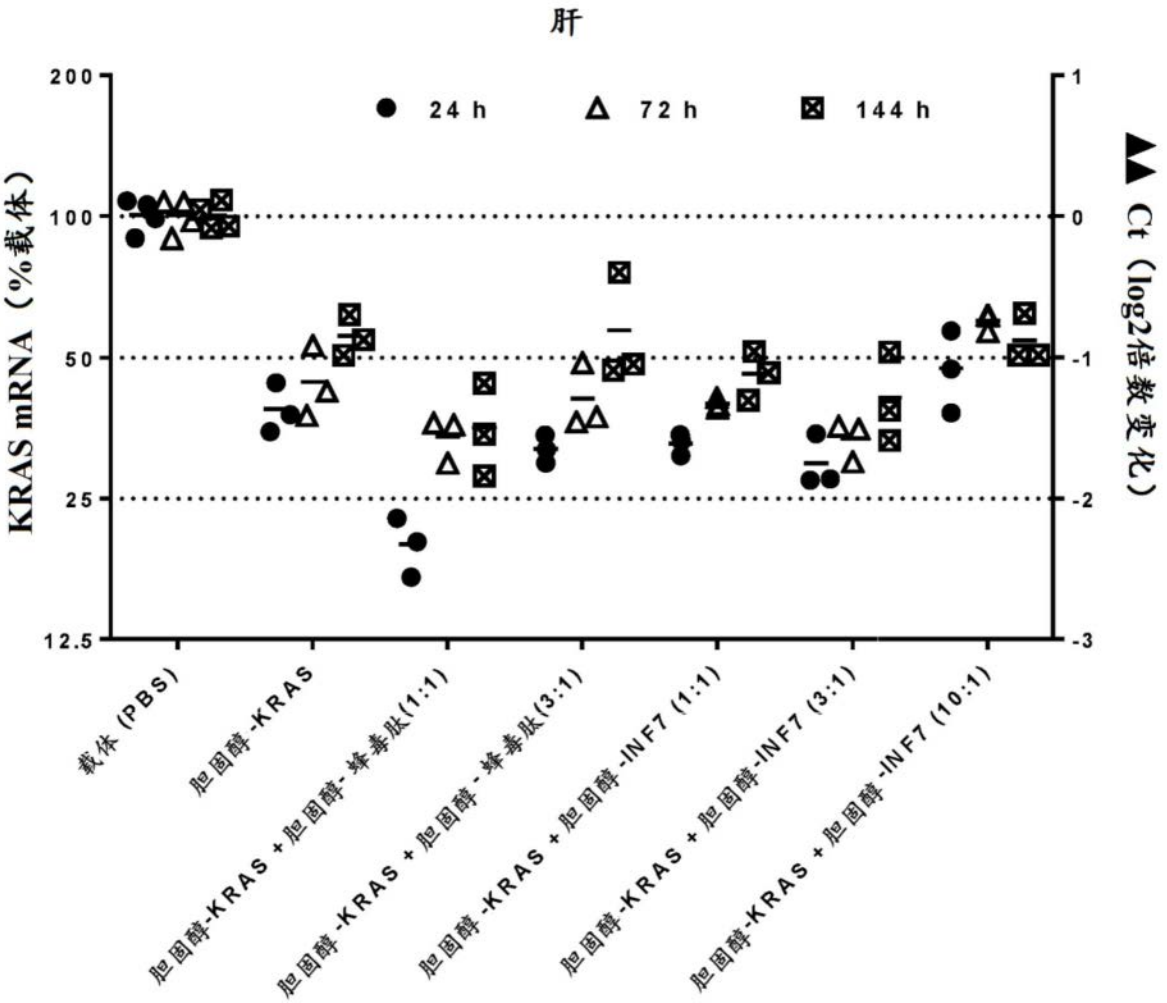

肝
24 h
72 h
144 h
KRAS mRNA（%载体）
ΔΔ Ct（log2倍数变化）
200
100
50
25
12.5
1
0
-1
-2
-3
载体 (PBS)
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇- 蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇 - 蜂毒肽(3:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇 -INF7 (1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (3:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (10:1)

图42

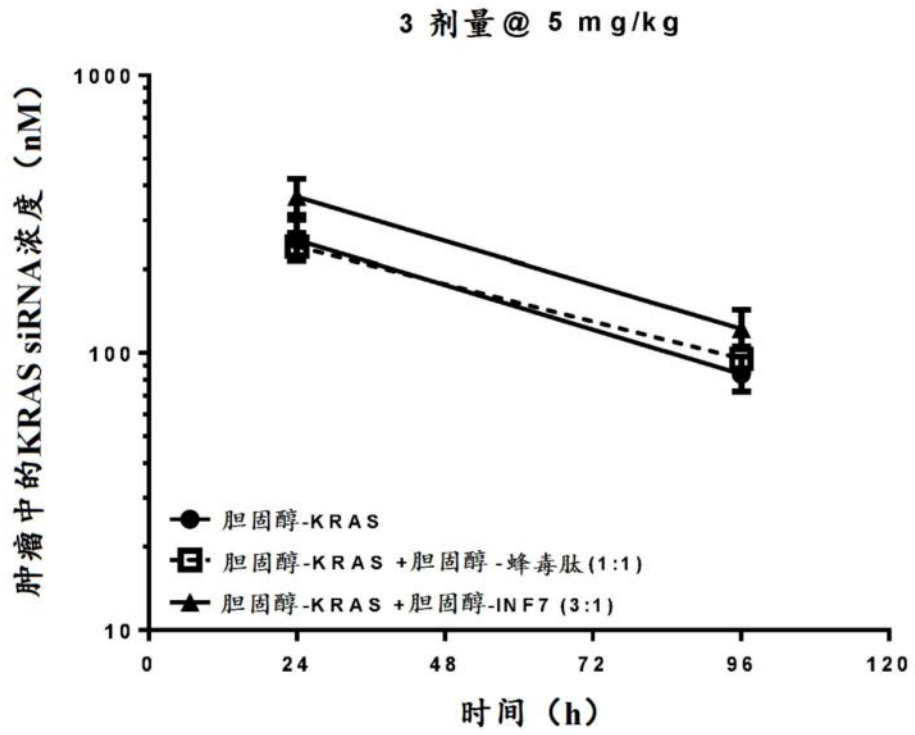

3 剂量@ 5 mg/kg
肿瘤中的KRAS siRNA浓度（nM）
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS +胆固醇-蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS +胆固醇-INF7 (3:1)

图43A

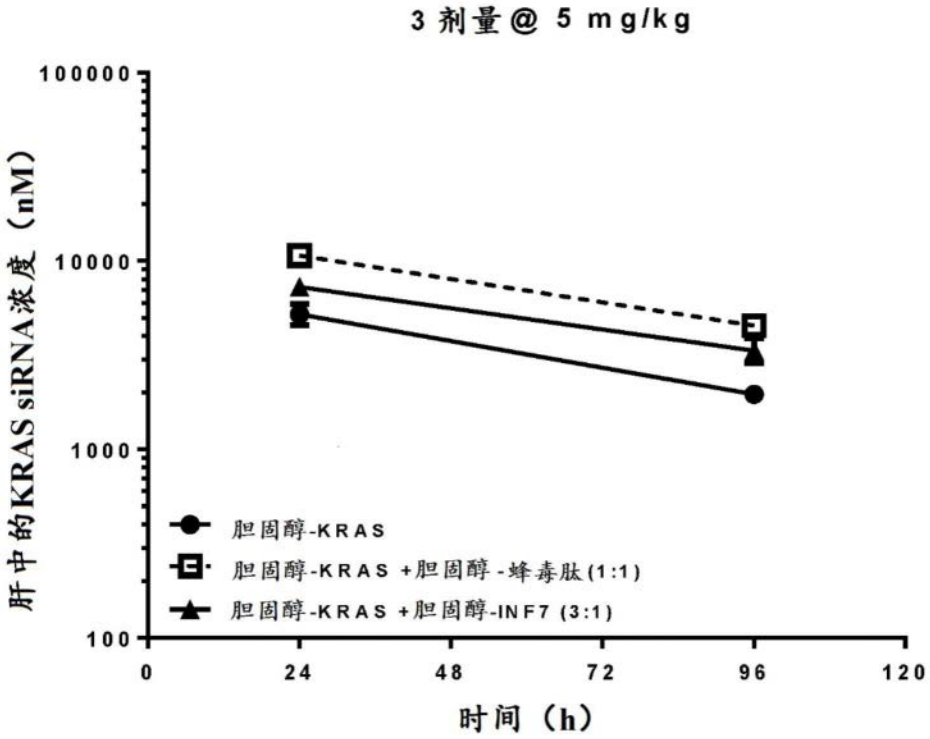

3 剂量@ 5 mg/kg
肝中的KRAS siRNA浓度（nM）
100000
10000
1000
100
0
24
48
72
96
120
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS +胆固醇-蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS +胆固醇-INF7 (3:1)

图43B

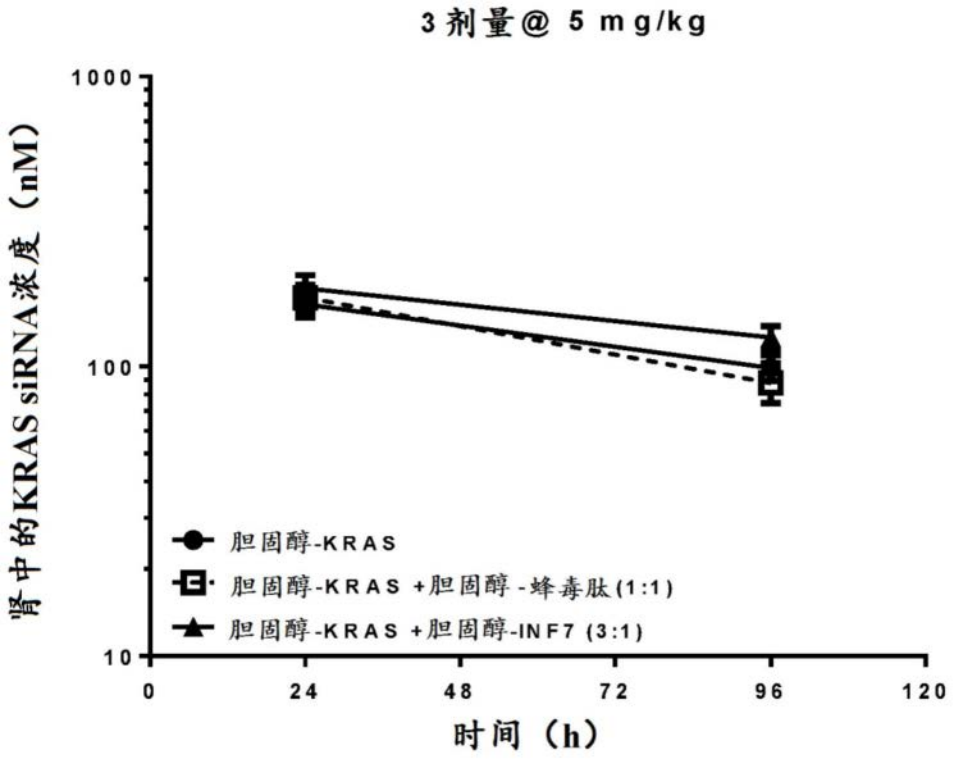

3 剂量@ 5 mg/kg
肾中的KRAS siRNA浓度（nM）
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS +胆固醇 -蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS +胆固醇-INF7 (3:1)

图44A

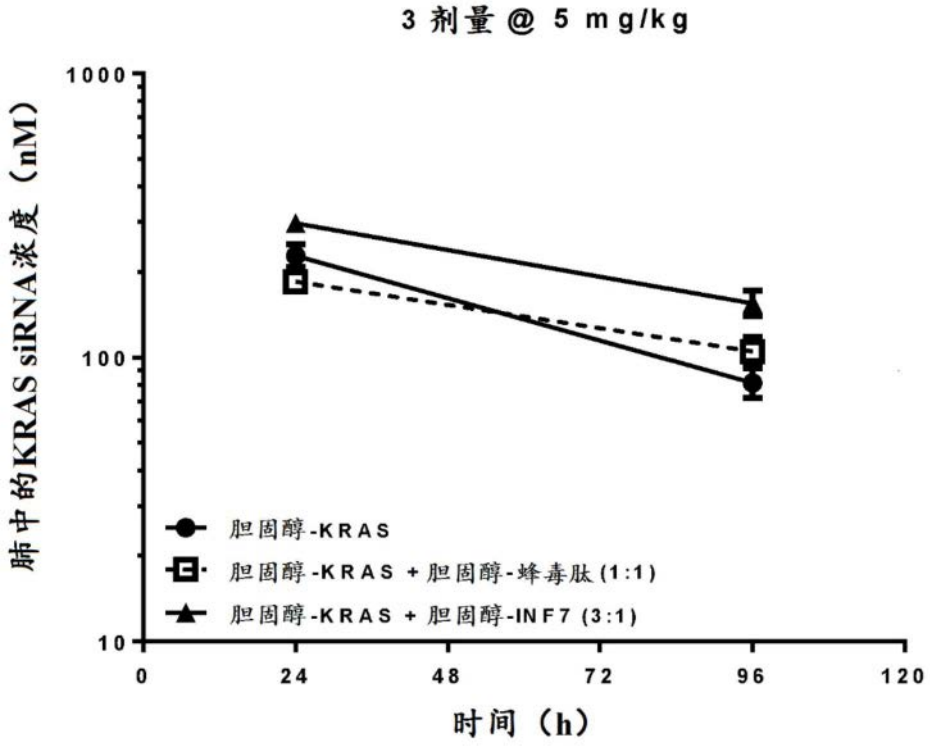

3 剂量 @ 5 mg/kg
肺中的KRAS siRNA浓度（nM）
1000
100
10
0
24
48
72
96
120
时间（h）
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS + 胆固醇-蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS + 胆固醇-INF7 (3:1)

图44B

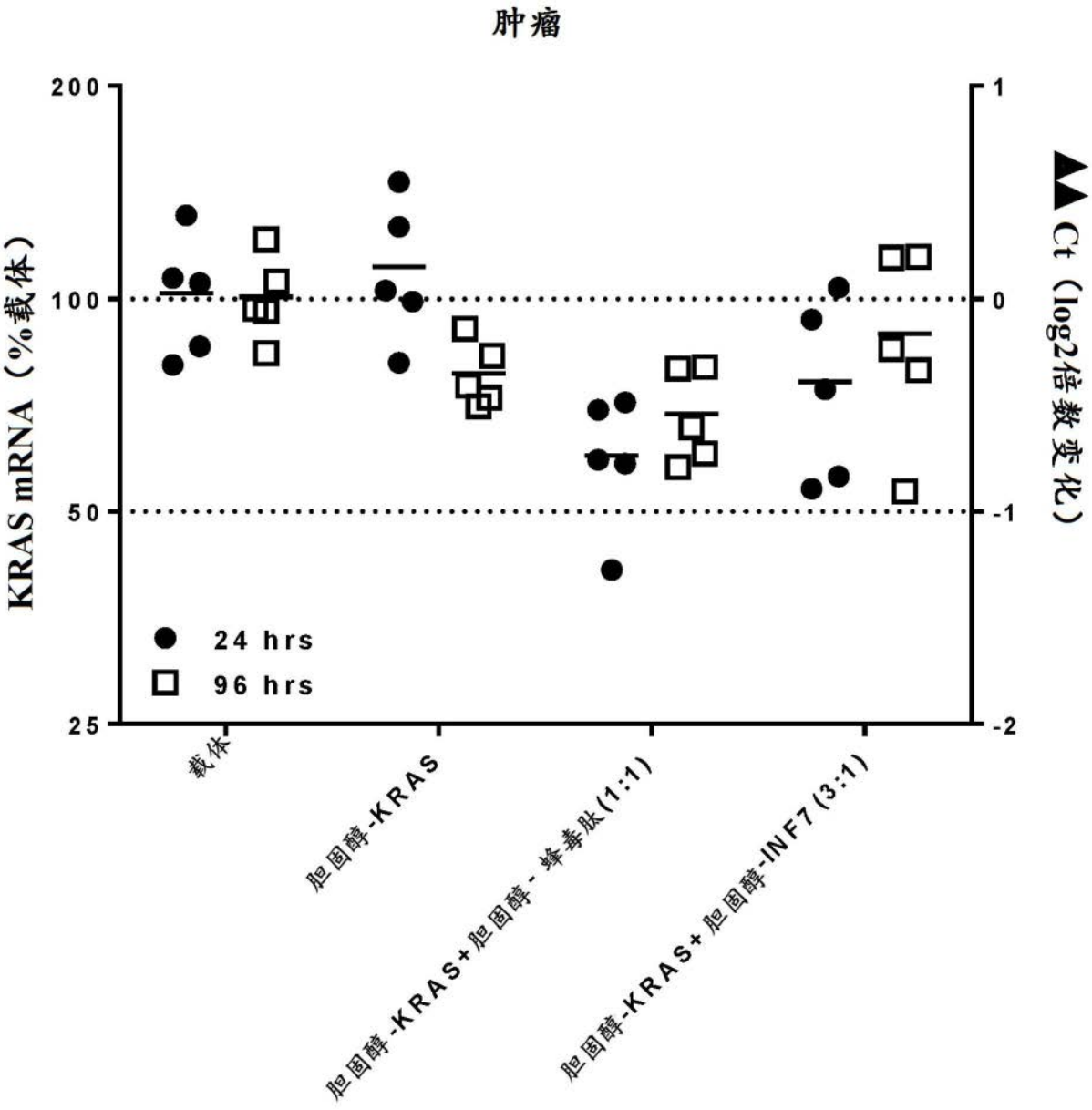

肿瘤
KRAS mRNA（%载体）
200
100
50
25
1
0
-1
-2
ΔΔ Ct（log2倍数变化）
24 hrs
96 hrs
载体
胆固醇-KRAS
胆固醇-KRAS+胆固醇-蜂毒肽(1:1)
胆固醇-KRAS+胆固醇-INF7(3:1)

图45

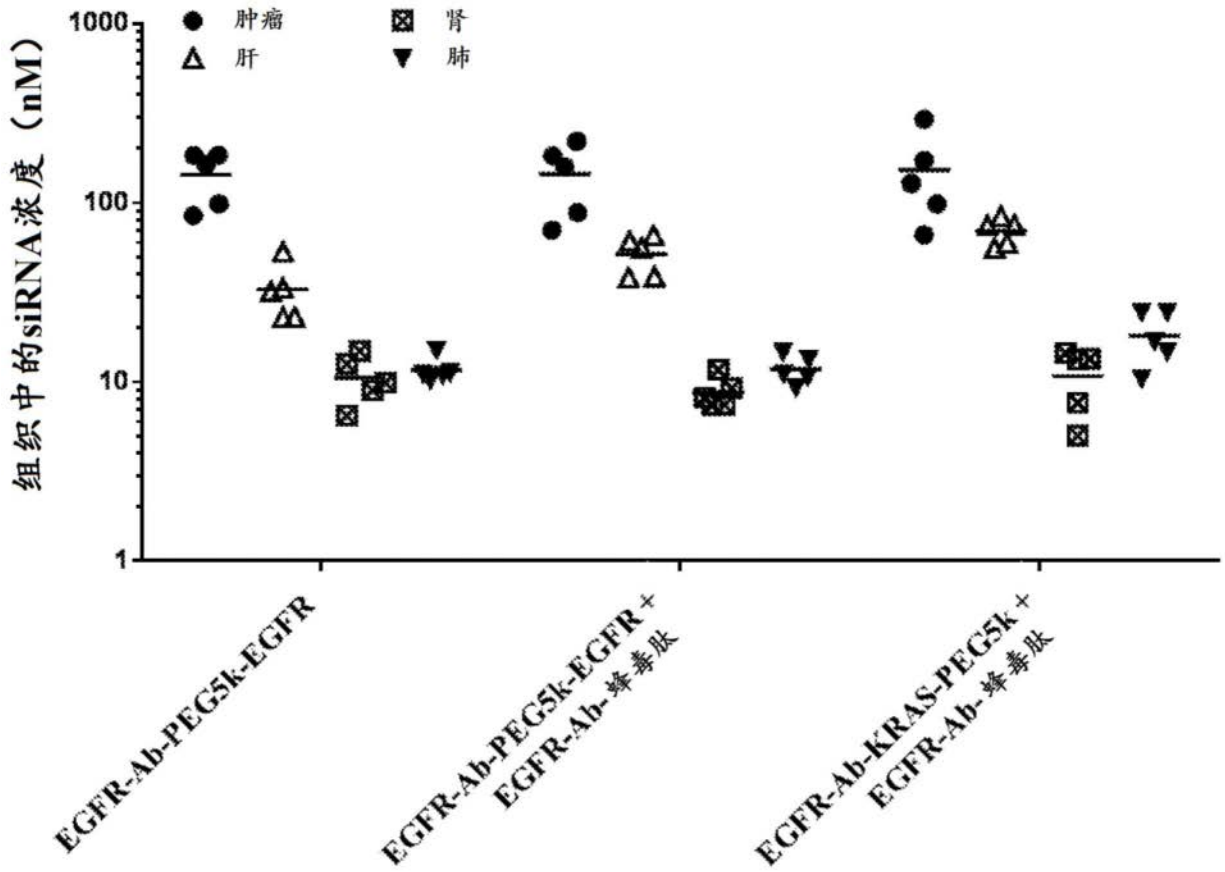

1000
100
10
1
组织中的siRNA浓度（nM）
肿瘤
肝
肾
肺
EGFR-Ab-PEG5k-EGFR
EGFR-Ab-PEG5k-EGFR+
EGFR-Ab-蜂毒肽
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k+
EGFR-Ab-蜂毒肽

图46

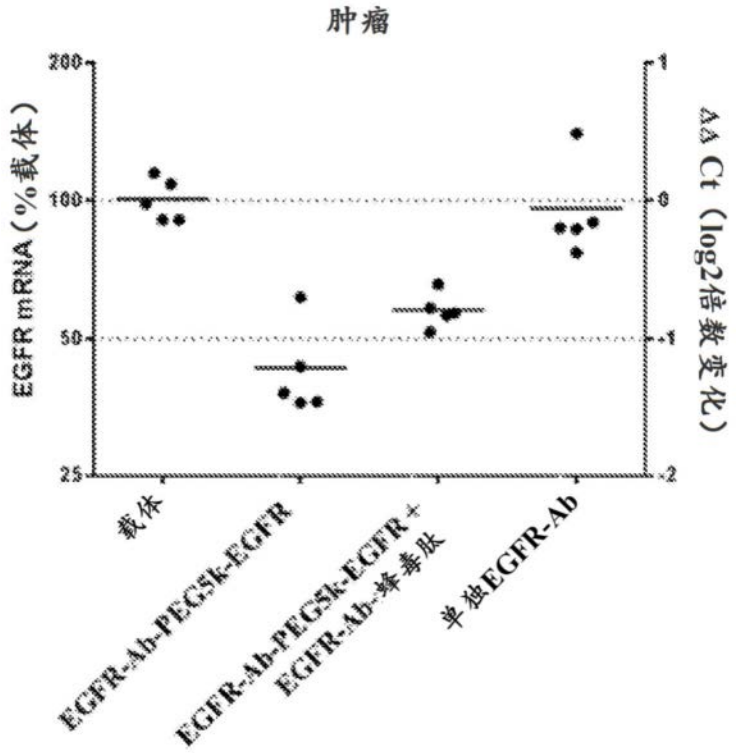

肿瘤
EGFR mRNA（%载体）
ΔΔ Ct（log2倍数变化）
200
100
50
25
1
0
-1
-2
载体
EGFR-Ab-PEGSk-EGFR
EGFR-Ab-PEGSk-EGFR+
EGFR-Ab-烯毒肽
单独EGFR-Ab

图47A

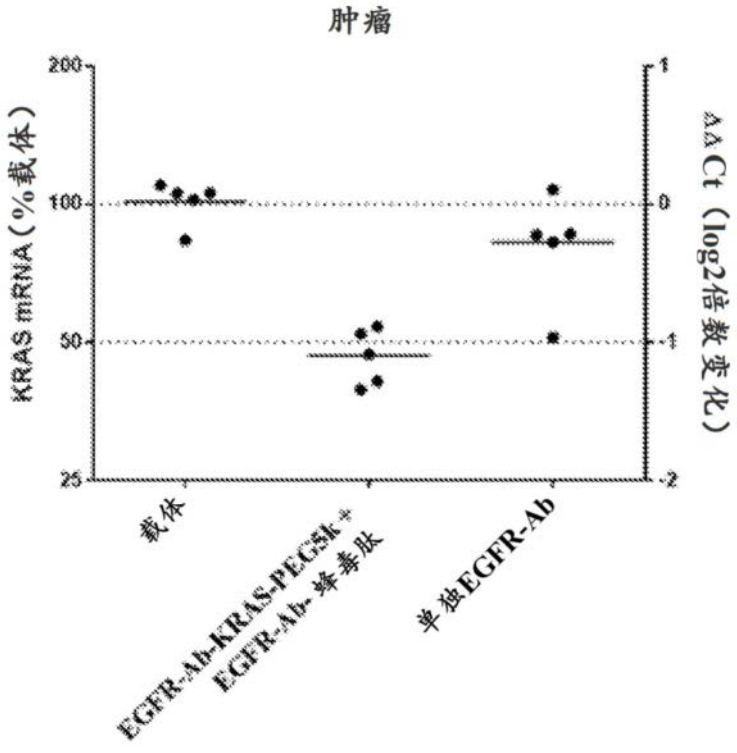

肿瘤
KRAS mRNA（%载体）
ΔΔ Ct（log2倍数变化）
200
100
50
25
1
0
-1
-2
载体
EGFR-Ab-KRAS-PEGSk+
EGFR-Ab-烯毒肽
单独EGFR-Ab

图47B

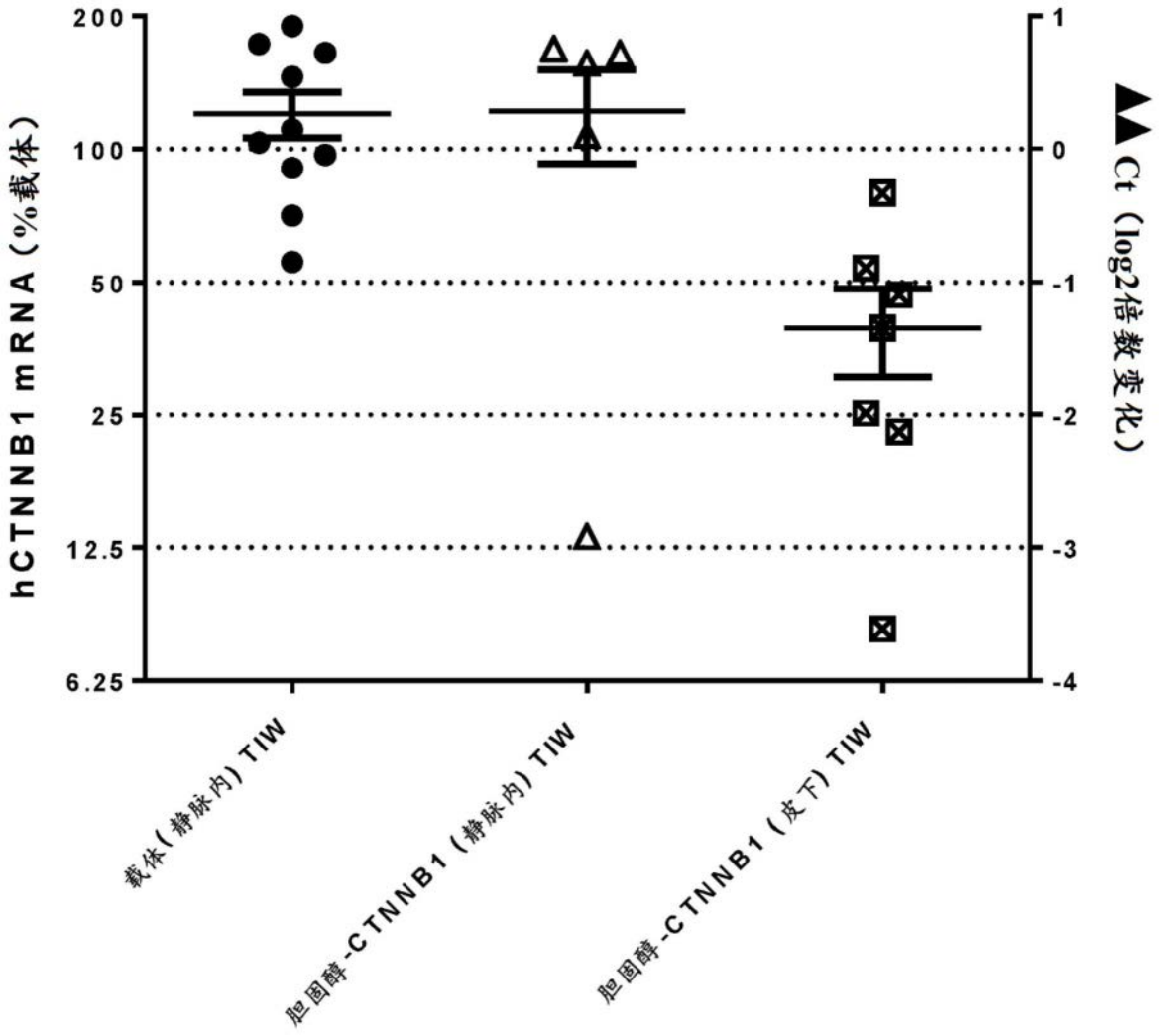

hCTNNB1 mRNA（%载体）
200
100
50
25
12.5
6.25
1
0
-1
-2
-3
-4
▲▲ Ct（log2倍数变化）
载体（静脉内）TIW
胆固醇-CTNNB1（静脉内）TIW
胆固醇-CTNNB1（皮下）TIW

图48

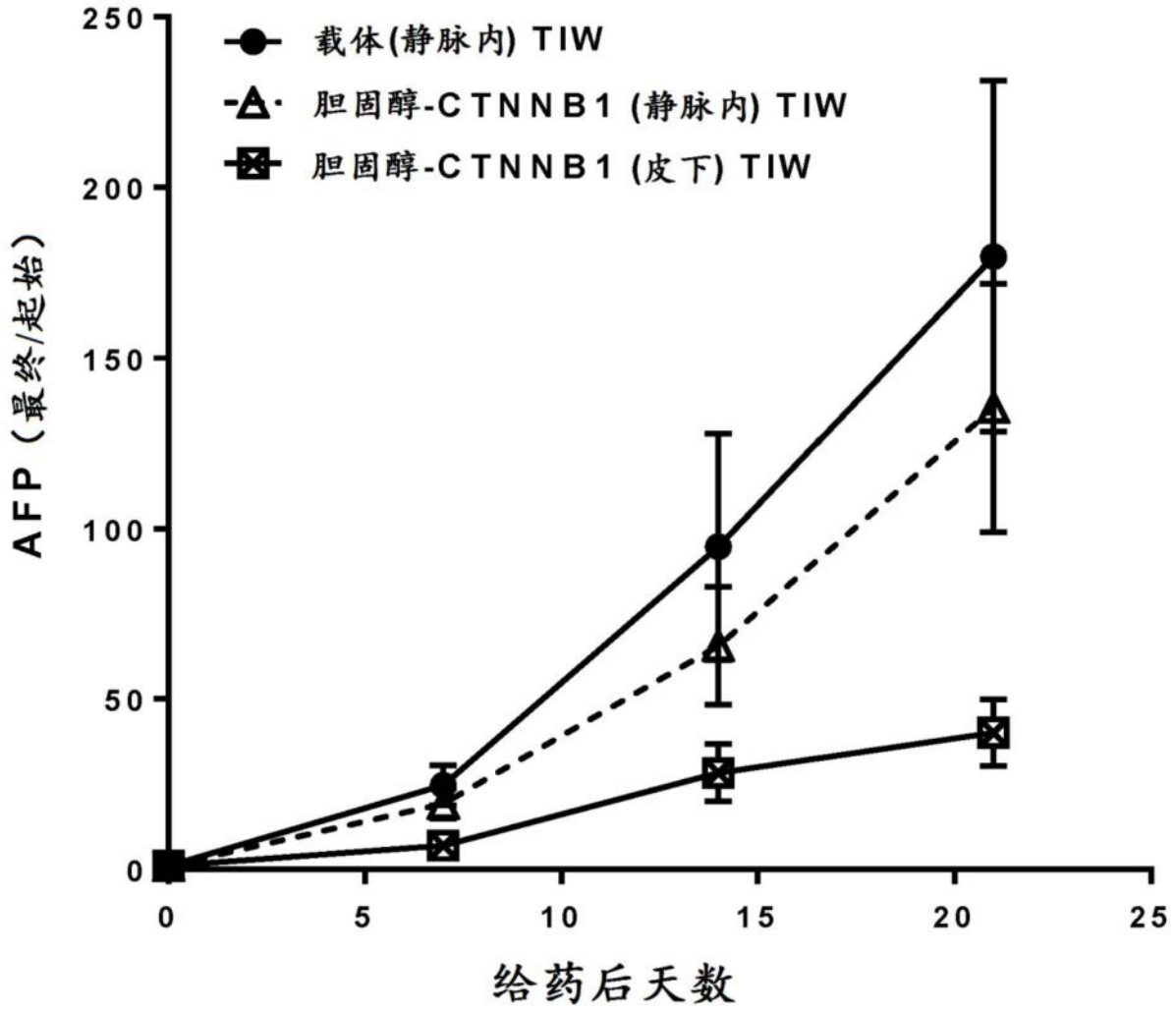

载体(静脉内) TIW
胆固醇-CTNNB1 (静脉内) TIW
胆固醇-CTNNB1 (皮下) TIW
AFP（最终/起始）
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
20
25
给药后天数

图49

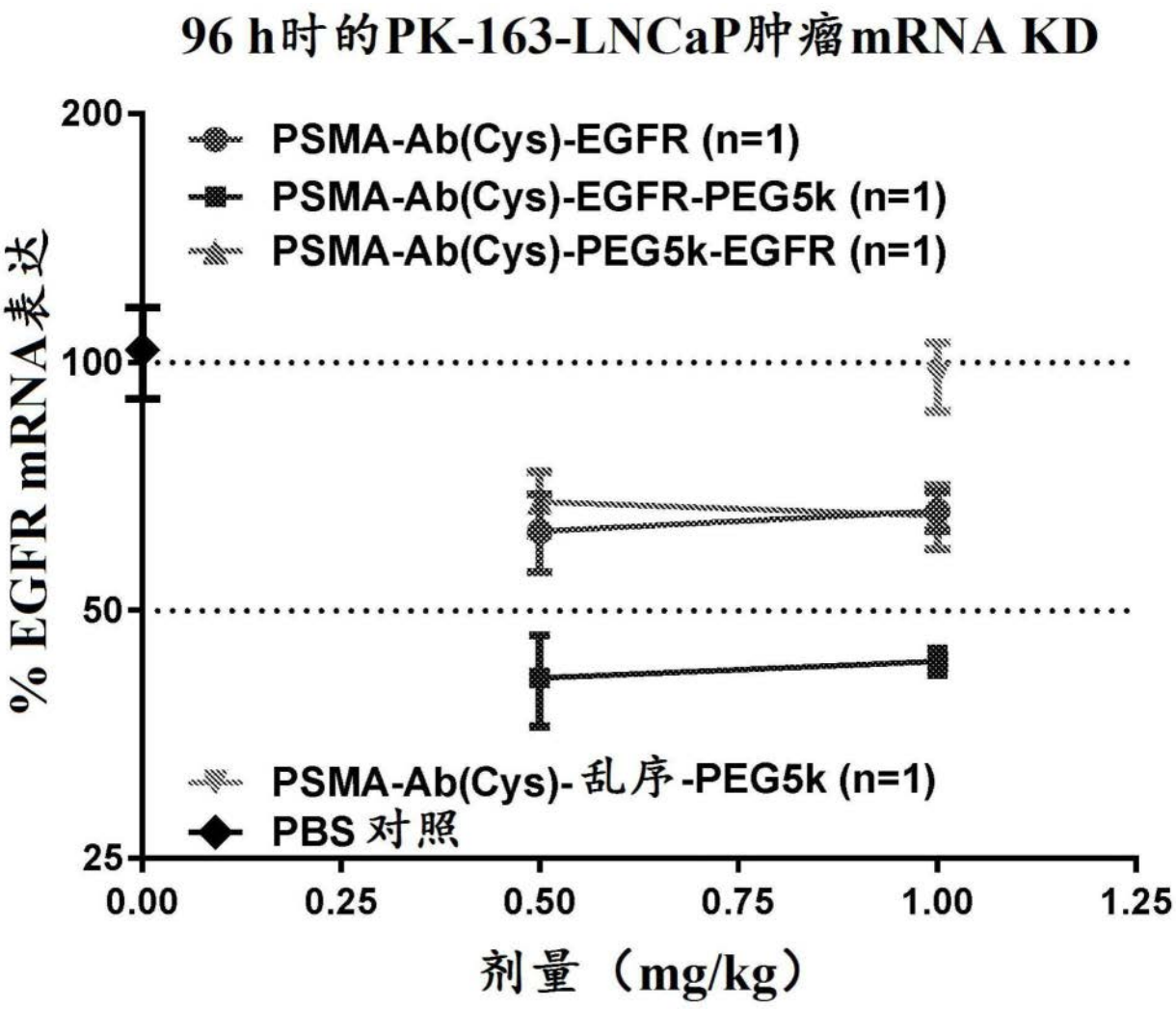

96 h时的PK-163-LNCaP肿瘤mRNA KD
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
PSMA-Ab(Cys)-EGFR (n=1)
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR (n=1)
PSMA-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
剂量（mg/kg）

图50A

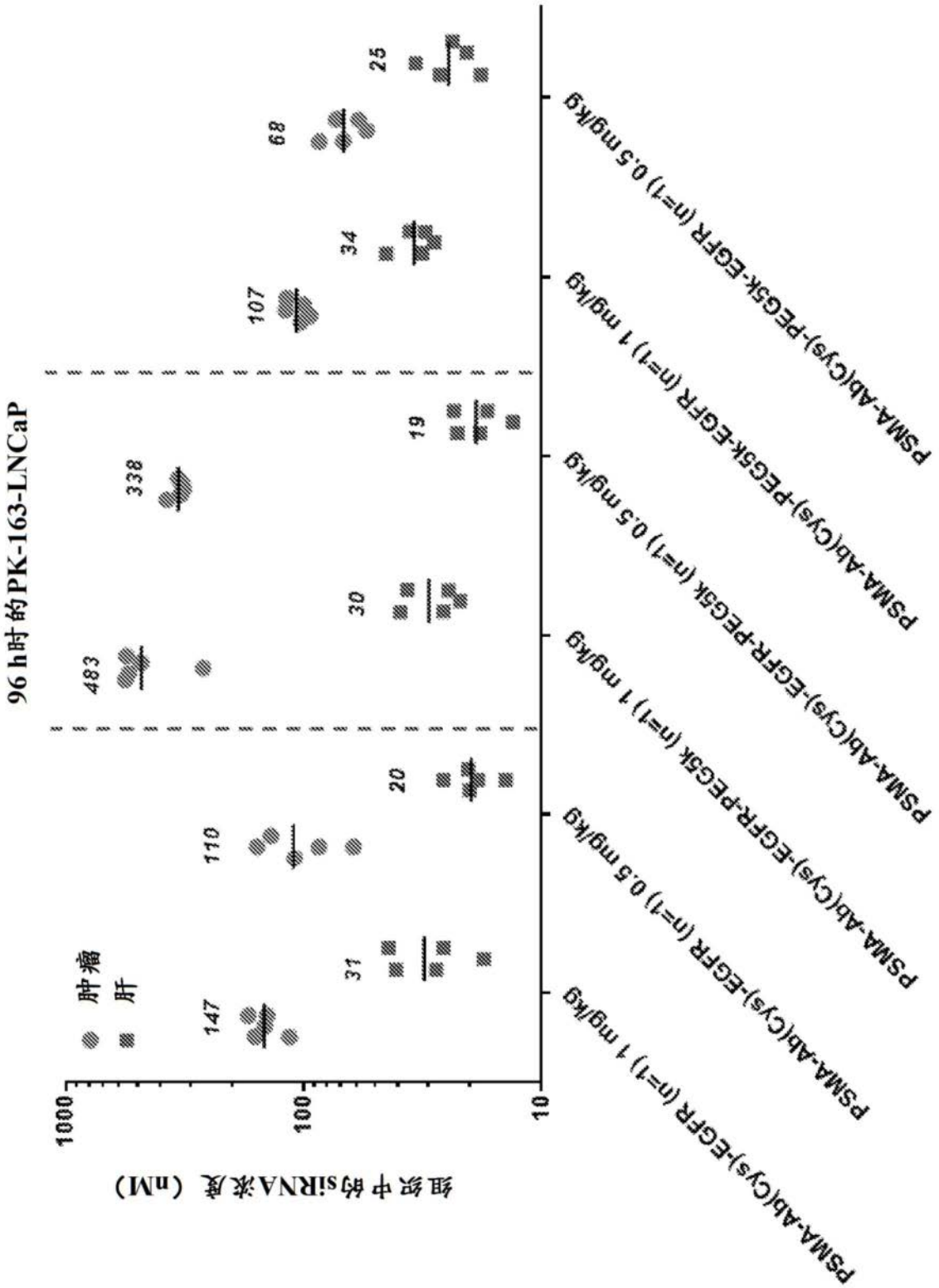

96 h时的PK-163-LNCaP
组织中的siRNA浓度 (nM)
1000
100
10
肿瘤
肝
147
110
31
483
338
20
30
19
107
68
34
25
PSMA-Ab(Cys)-EGFR (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR (n=1) 0.5 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR (n=1) 0.5 mg/kg

图50B

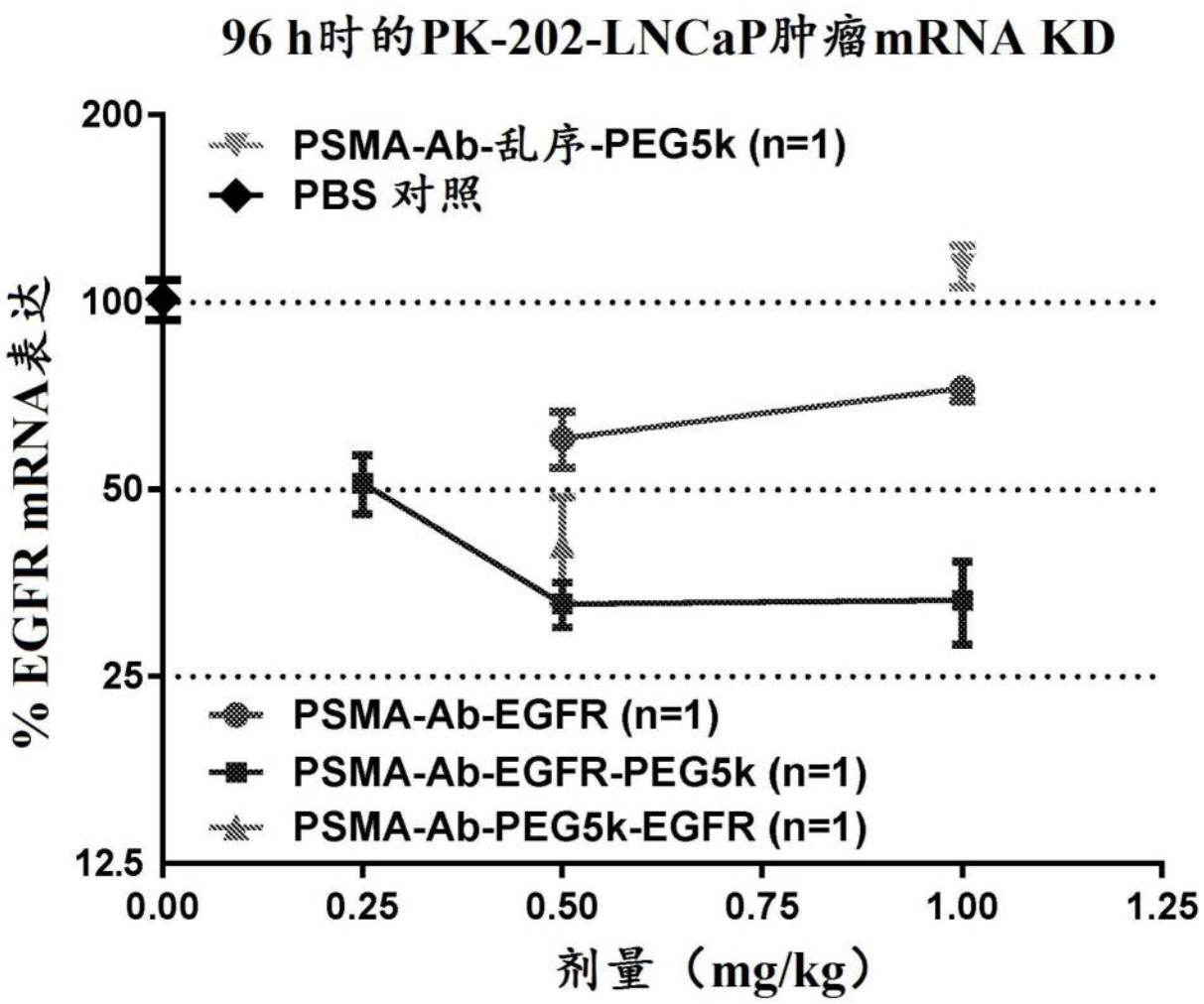

96 h时的PK-202-LNCaP肿瘤mRNA KD
PSMA-Ab-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照
PSMA-Ab-EGFR (n=1)
PSMA-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)
PSMA-Ab-PEG5k-EGFR (n=1)
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
剂量（mg/kg）

图51A

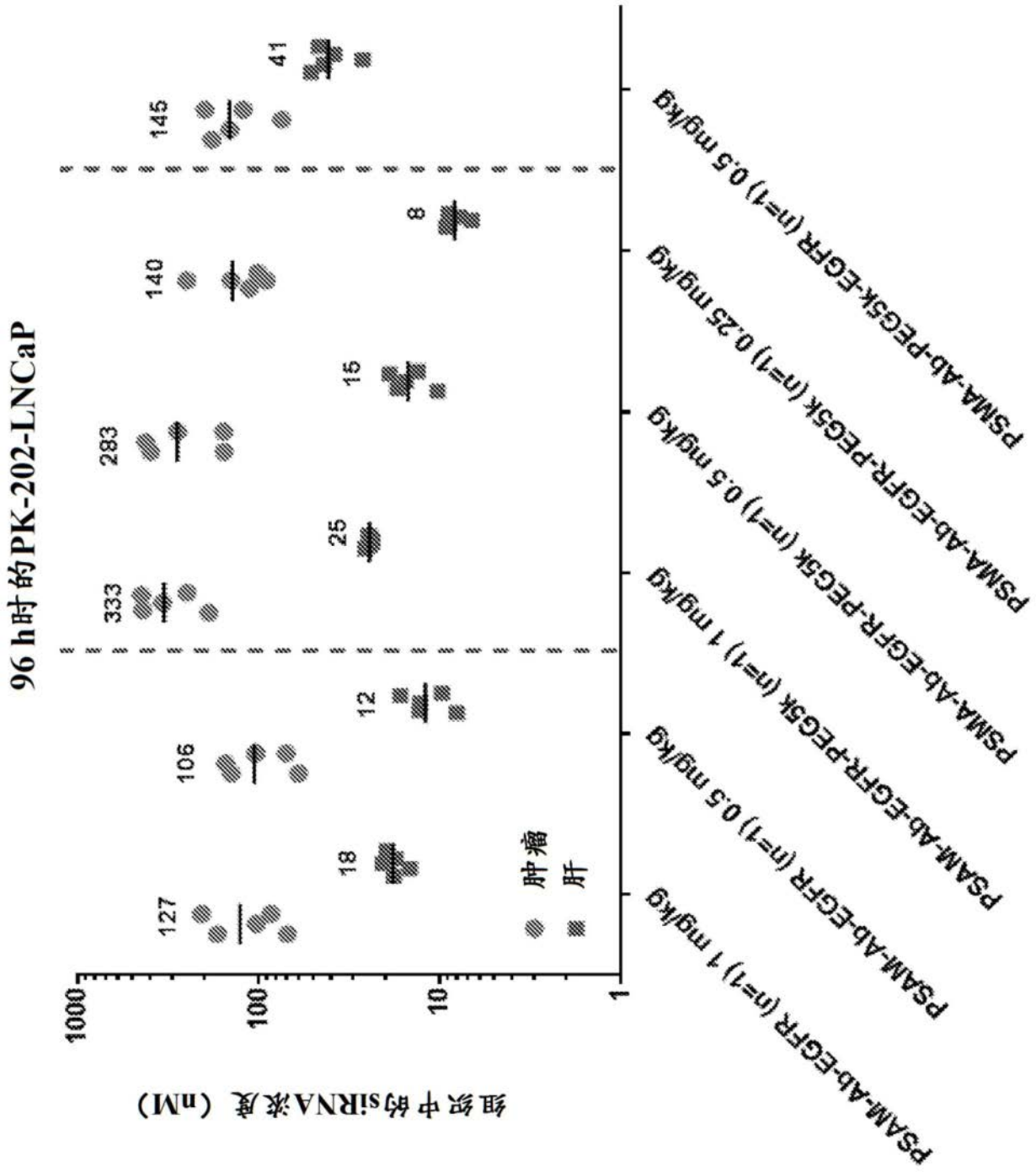

96 h时的PK-202-LNCaP
组织中的siRNA浓度 (nM)
1000
100
10
1
肿瘤
肝
127
18
106
12
333
25
283
15
140
8
145
41
PSAM-Ab-EGFR (n=1) 1 mg/kg
PSAM-Ab-EGFR (n=1) 0.5 mg/kg
PSAM-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
PSMA-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg
PSMA-Ab-PEG5k-EGFR (n=1) 0.5 mg/kg

图51B

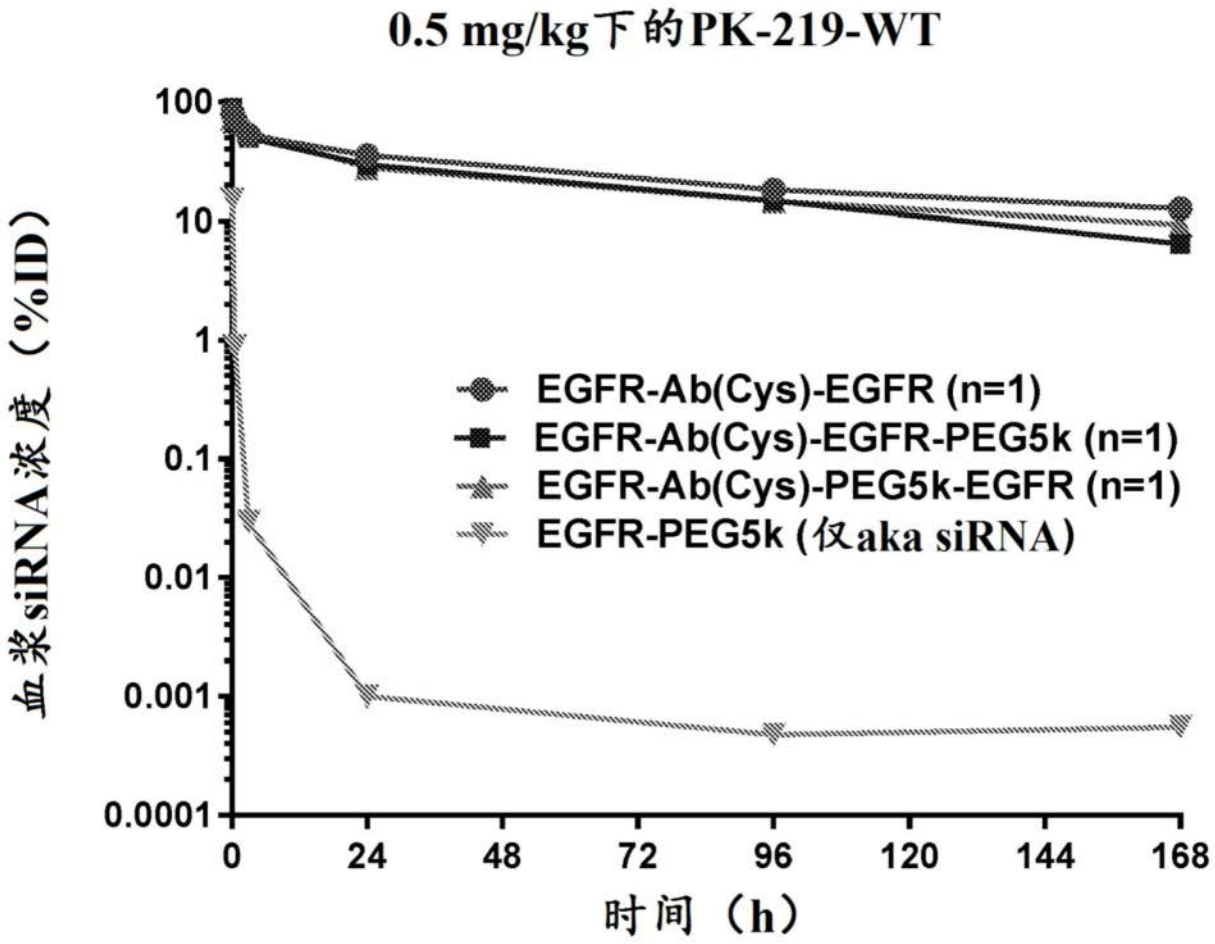

0.5 mg/kg下的PK-219-WT
血浆siRNA浓度（%ID）
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
EGFR-Ab(Cys)-EGFR (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-PEG5k-EGFR (n=1)
EGFR-PEG5k (仅aka siRNA)

图52

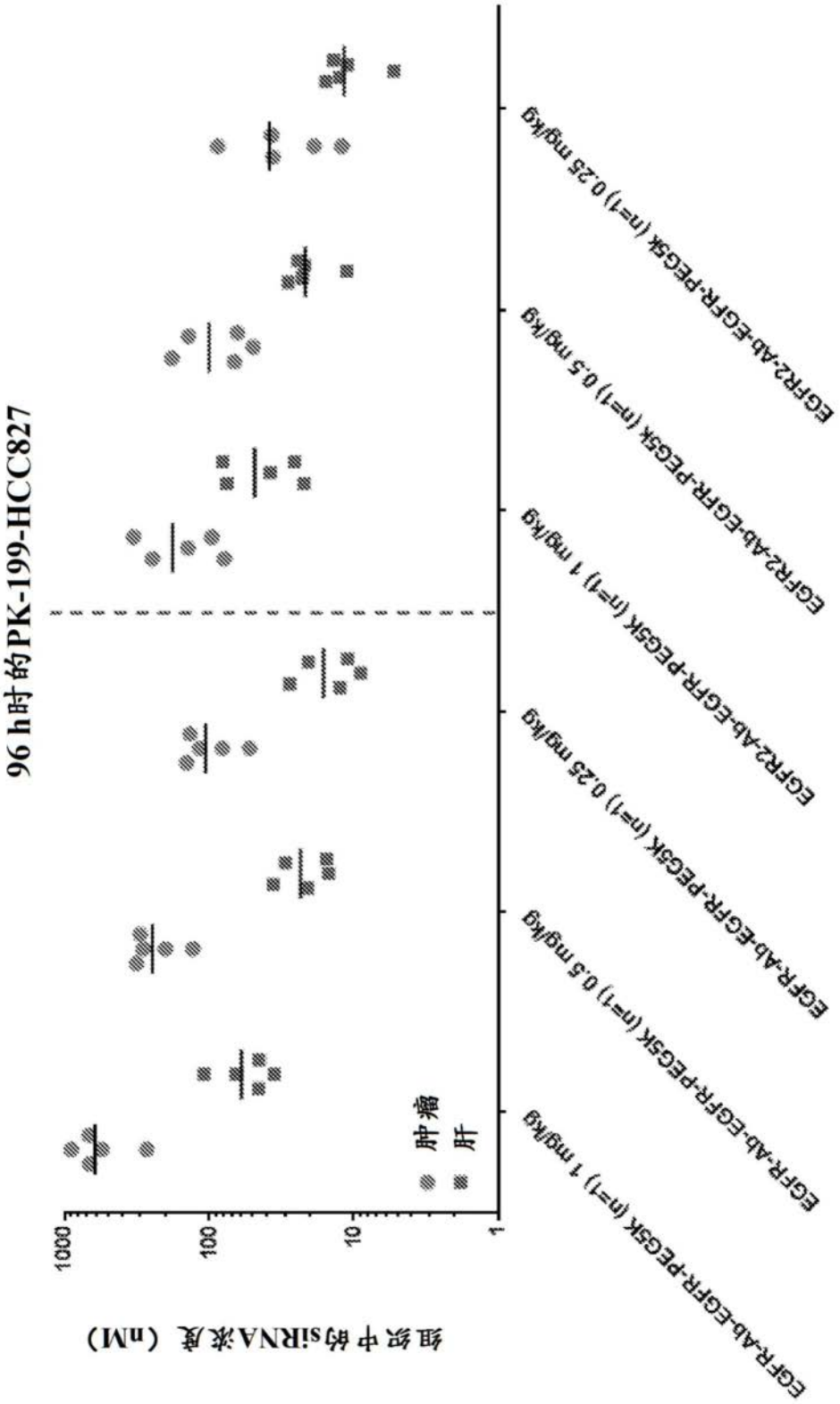

96 h时的PK-199-HCC827
组织中的siRNA浓度 (nM)
1000
100
10
1
肿瘤
肝
EGFR-Ab-EGFR-PEG5K (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab-EGFR-PEG5K (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab-EGFR-PEG5K (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR2-Ab-EGFR-PEG5K (n=1) 1 mg/kg
EGFR2-Ab-EGFR-PEG5K (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR2-Ab-EGFR-PEG5K (n=1) 0.25 mg/kg

图53A

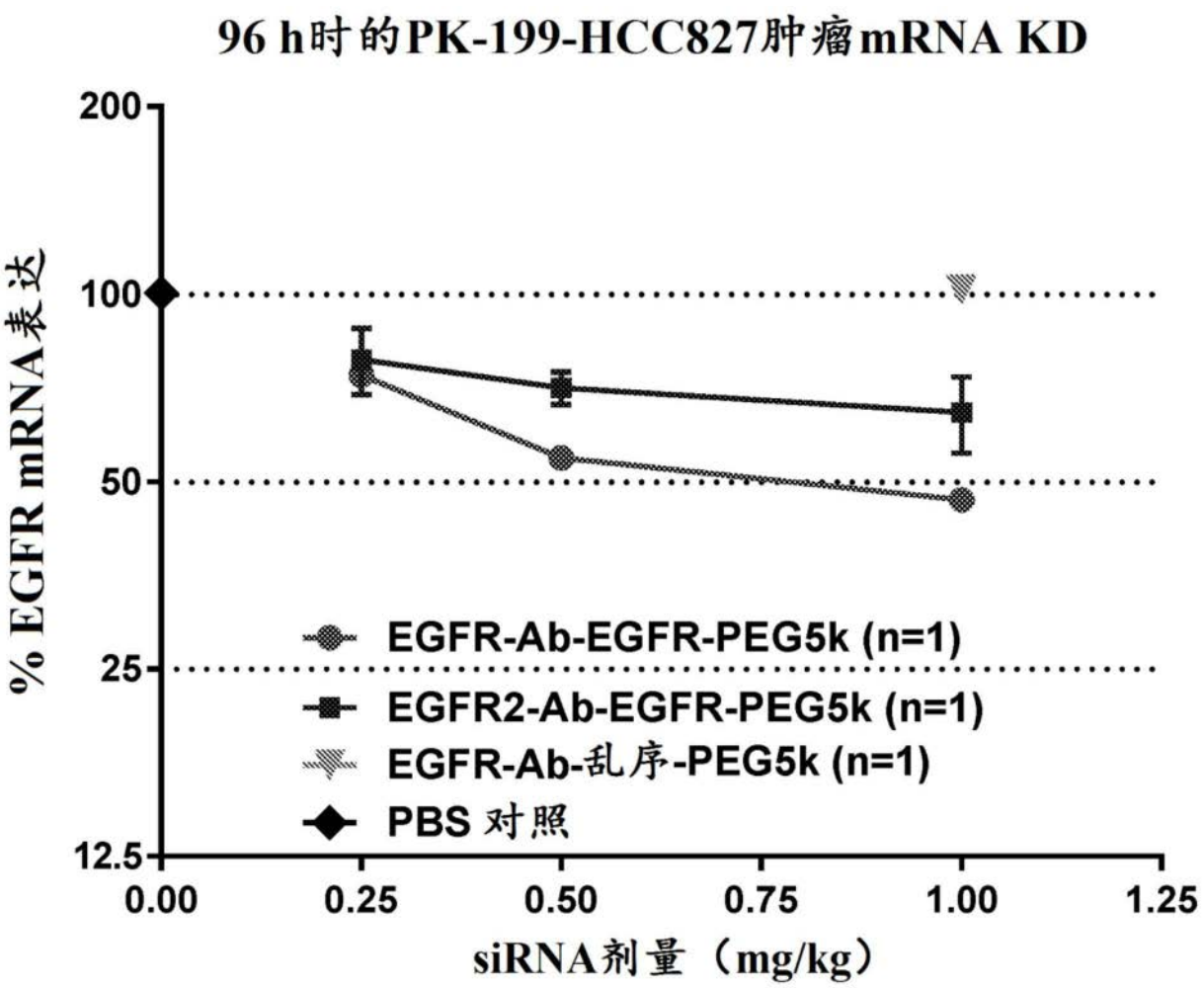

96 h时的PK-199-HCC827肿瘤mRNA KD
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
siRNA剂量（mg/kg）
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR2-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图53B

mAb	mAb 靶标	体外 KD	siRNA 靶标				
			KRAS	EGFR	CTNNB1	AR	HPRT
Zalutumumab*	人EGFR		√ PK-237-HCC827	√ PK/PD, PK-199-HCC827 和 PK239-HCC827			
帕尼单抗*	人EGFR		√ PK-129-WT	√ PK/PD, PK-199-HCC827			
赫赛汀	人EGFR			√ PK/PD, PK-234-HCC827 和 PK-236			
ANT4044*	人PSMA			√ PK-129-WT, PK-123-LNCaP		√ PK-160-LNCaP	
mASGR*	小鼠ASGR		√ PK-253-WT		√ PK-257-WT		
CD71* (Fab)	小鼠运铁蛋白	√ B细胞			√ PK-245-WT		√ PK-258-WT, PK-254-WT

√ - 体外测试
√ - 体内测试

图54

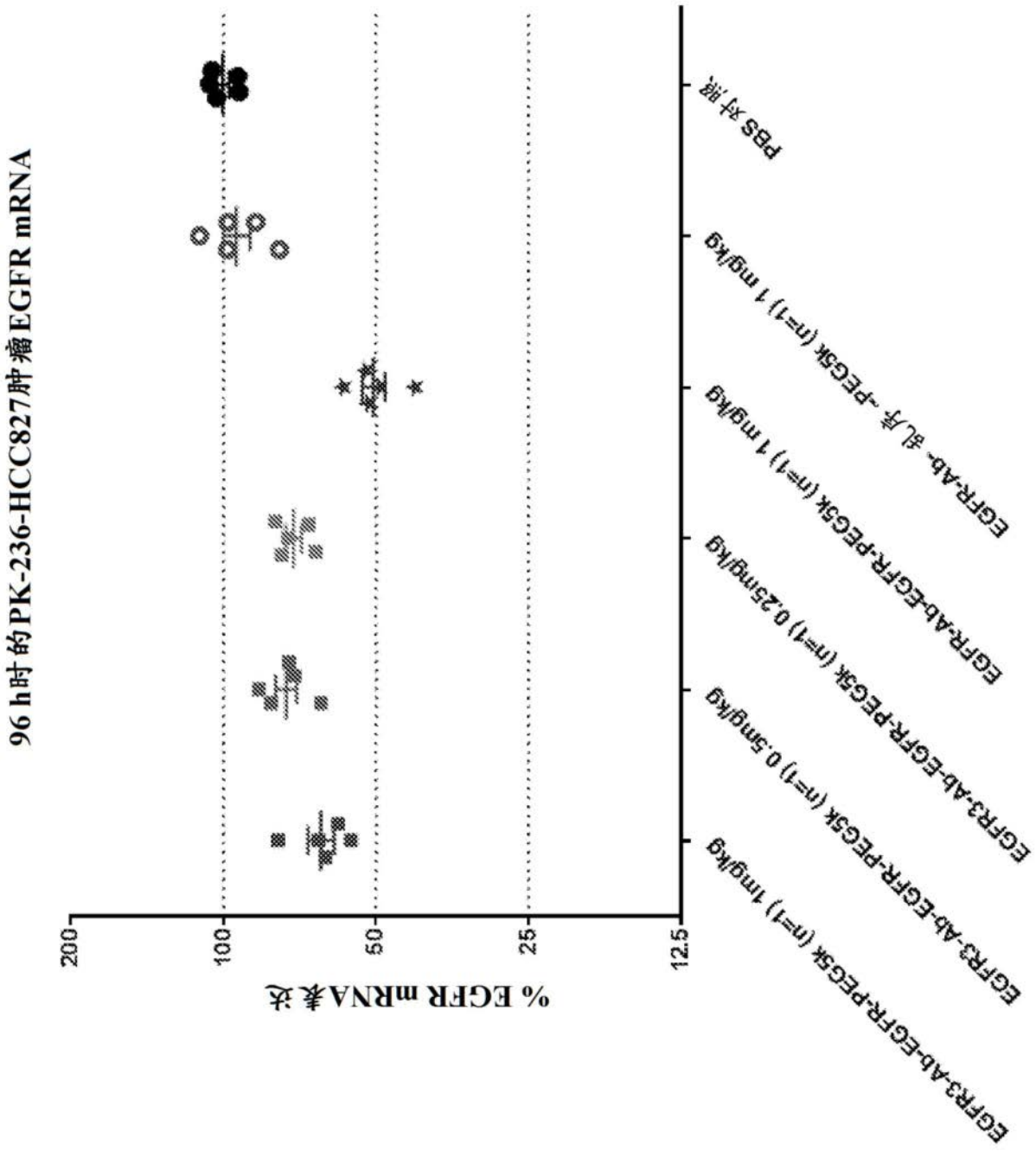

96 h时的PK-236-HCC827肿瘤EGFR mRNA
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
PBS对照
EGFR-Ab-抗体-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR3-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25mg/kg
EGFR3-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5mg/kg
EGFR3-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 1mg/kg

图55

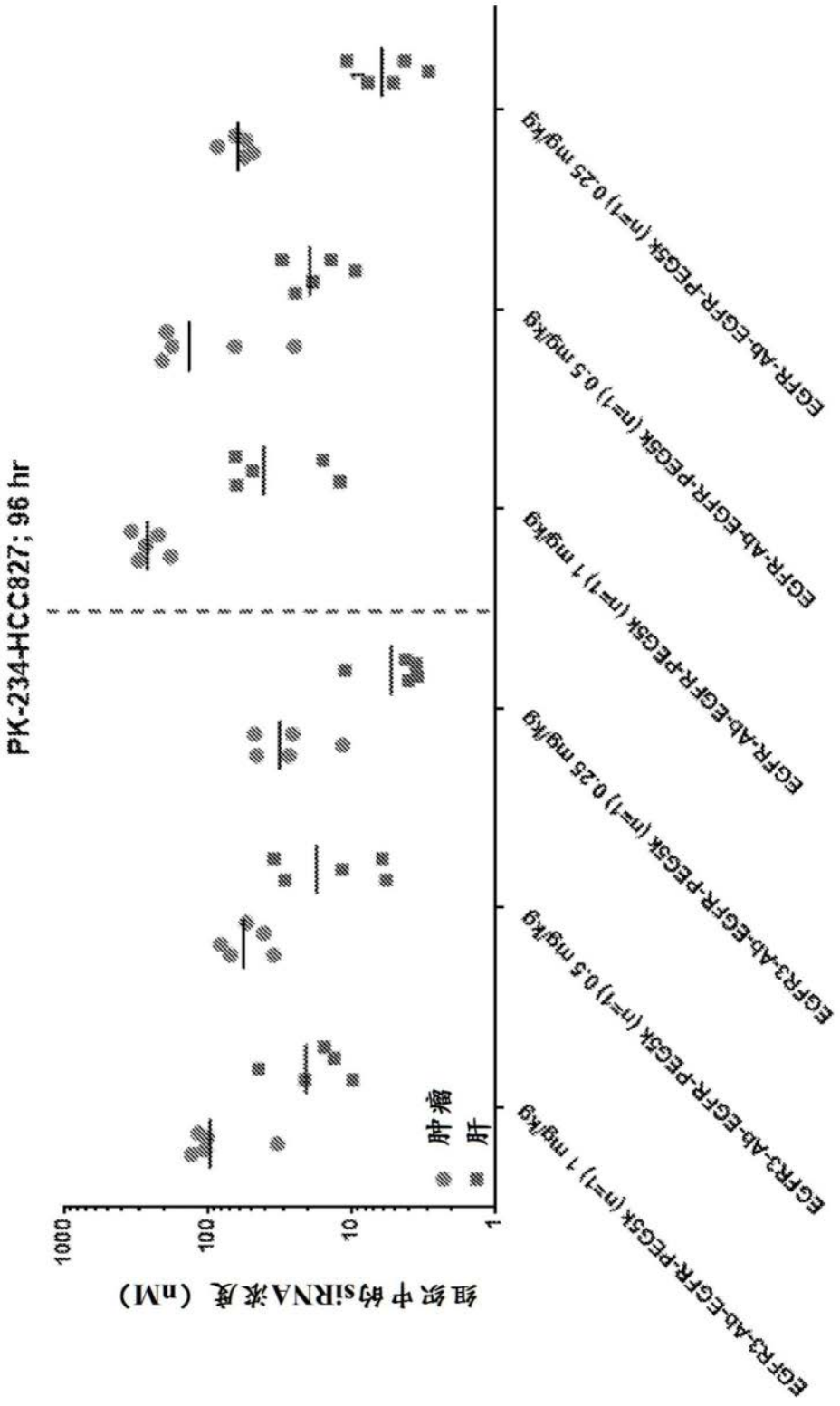

PK-234-HCC827; 96 hr
组织中的siRNA浓度 (nM)
1000
100
10
1
肿瘤
肝
EGFR3-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR3-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR3-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg

图56A

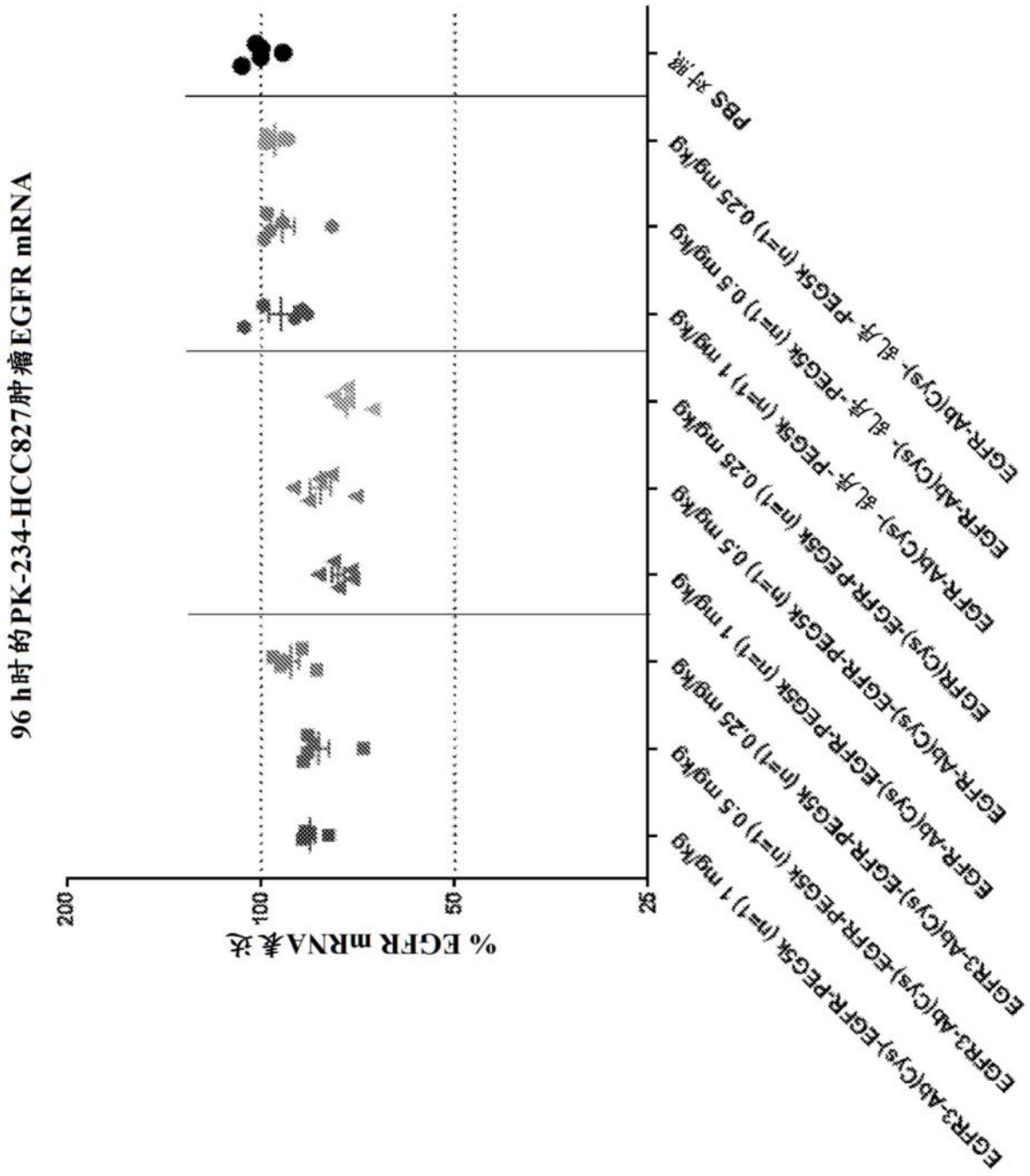

96 h时的PK-234-HCC827肿瘤EGFR mRNA
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
PBS 对照
EGFR-Ab(Cys)- 扣环 -PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)- 扣环 -PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)- 扣环 -PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR3-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR3-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR3-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg

图56B

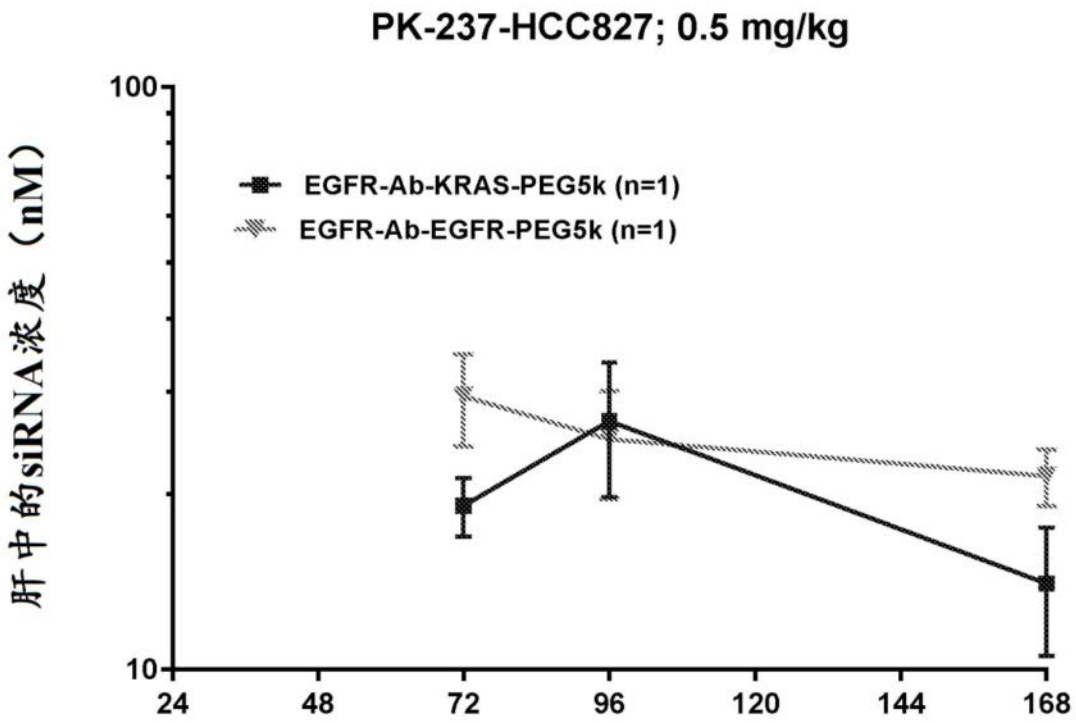

PK-237-HCC827; 0.5 mg/kg
肝中的siRNA浓度（nM）
100
10
24
48
72
96
120
144
168
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)

图57A

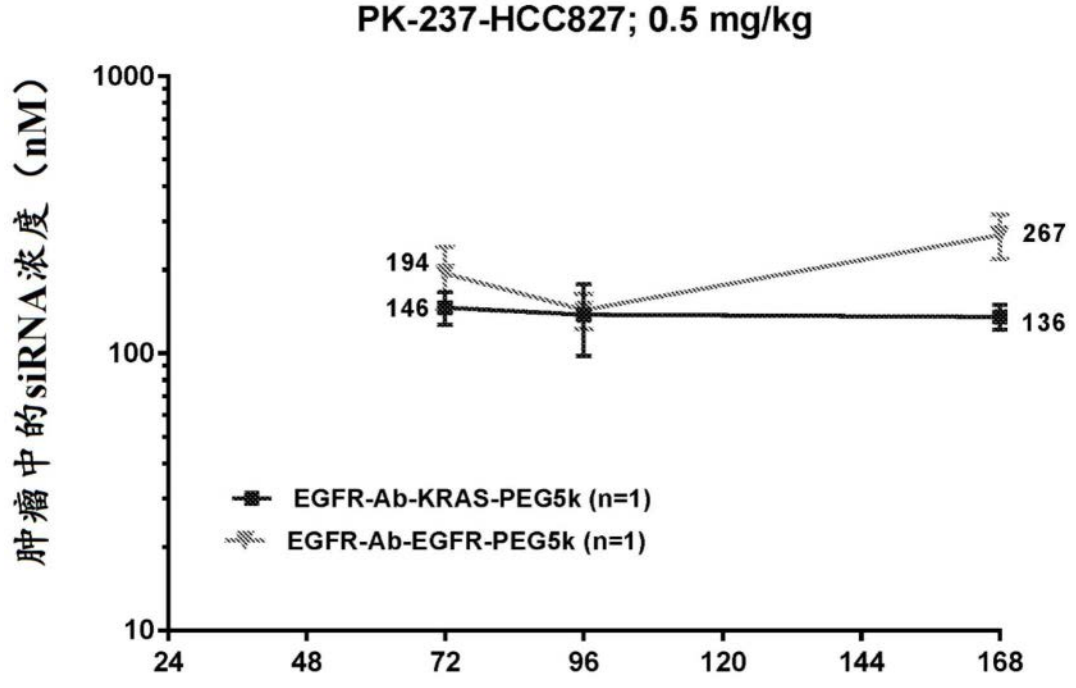

PK-237-HCC827; 0.5 mg/kg
肿瘤中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
24
48
72
96
120
144
168
194
146
267
136
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)

图57B

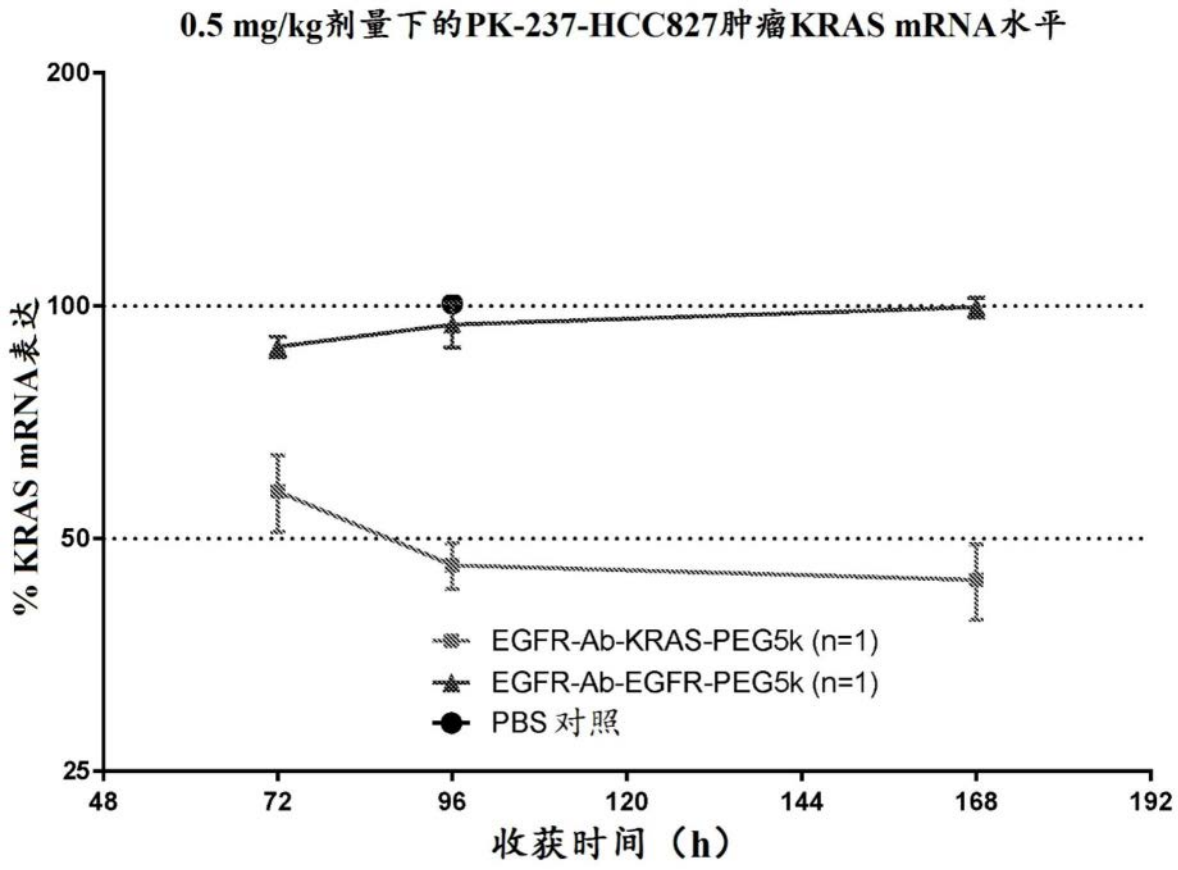

0.5 mg/kg剂量下的PK-237-HCC827肿瘤KRAS mRNA水平
% KRAS mRNA表达
200
100
50
25
48
72
96
120
144
168
192
收获时间（h）
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图57C

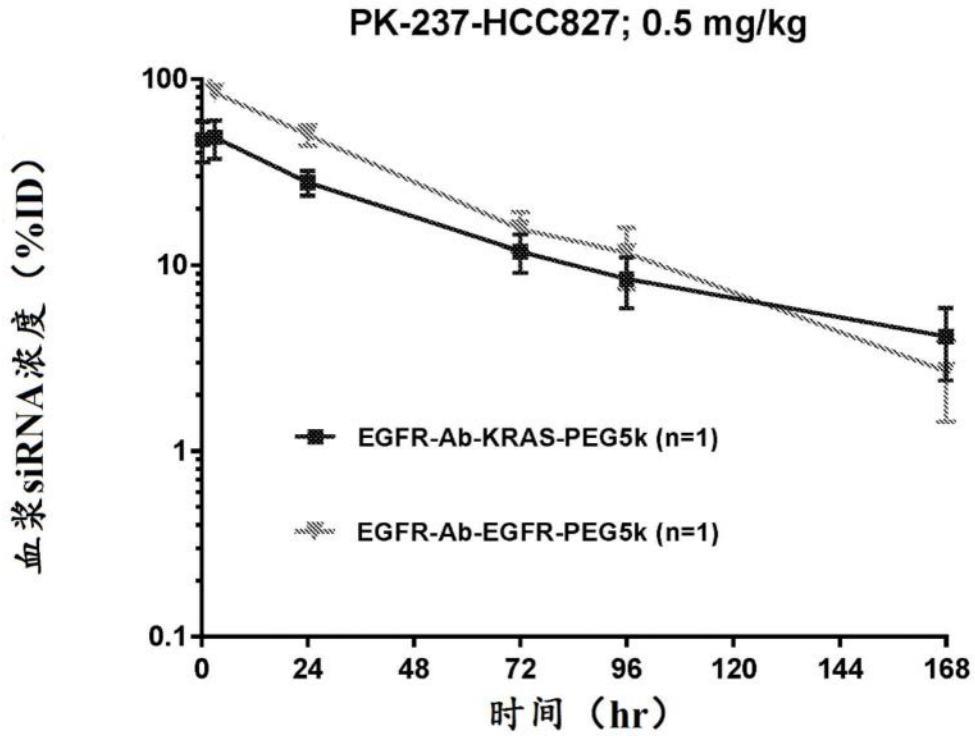

PK-237-HCC827; 0.5 mg/kg
血浆siRNA浓度（%ID）
100
10
1
0.1
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（hr）
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)

图58A

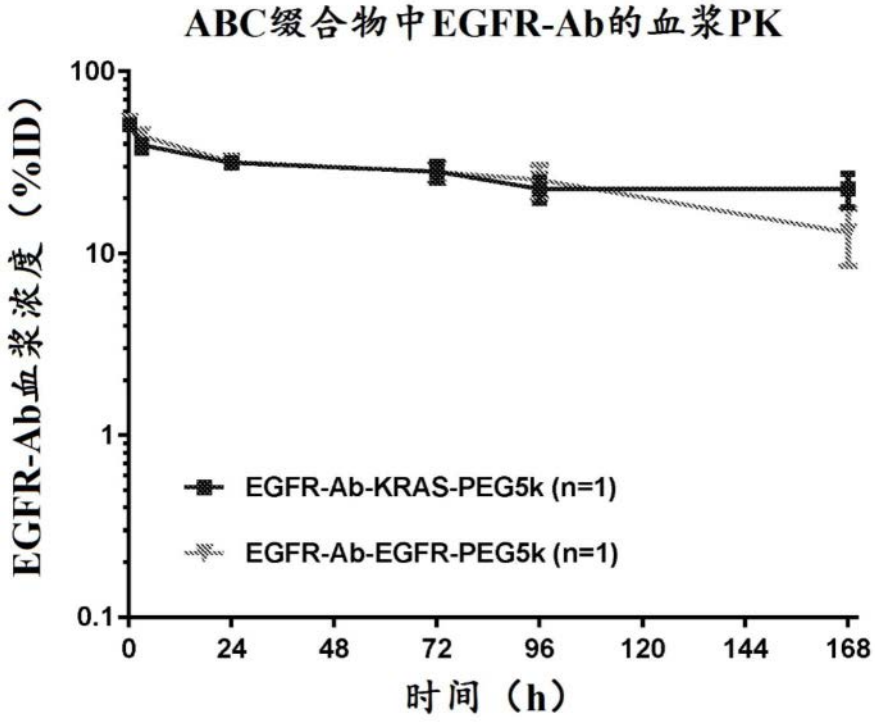

ABC缀合物中EGFR-Ab的血浆PK
EGFR-Ab血浆浓度（%ID）
100
10
1
0.1
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
EGFR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)

图58B

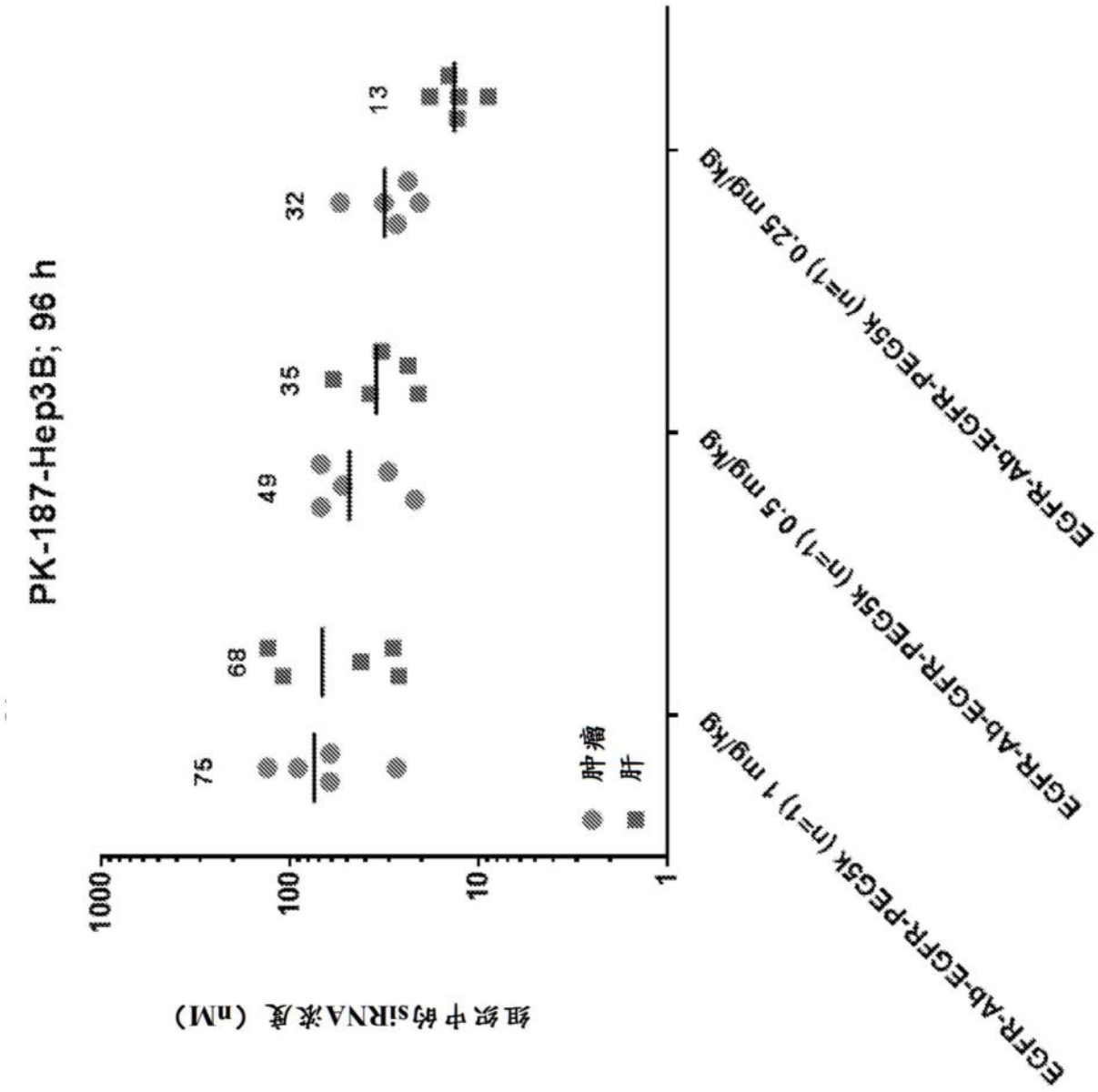

PK-187-Hep3B; 96 h
组织中的siRNA浓度 (nM)
1000
100
10
1
肿瘤
肝
75
68
49
35
32
13
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg

图59A

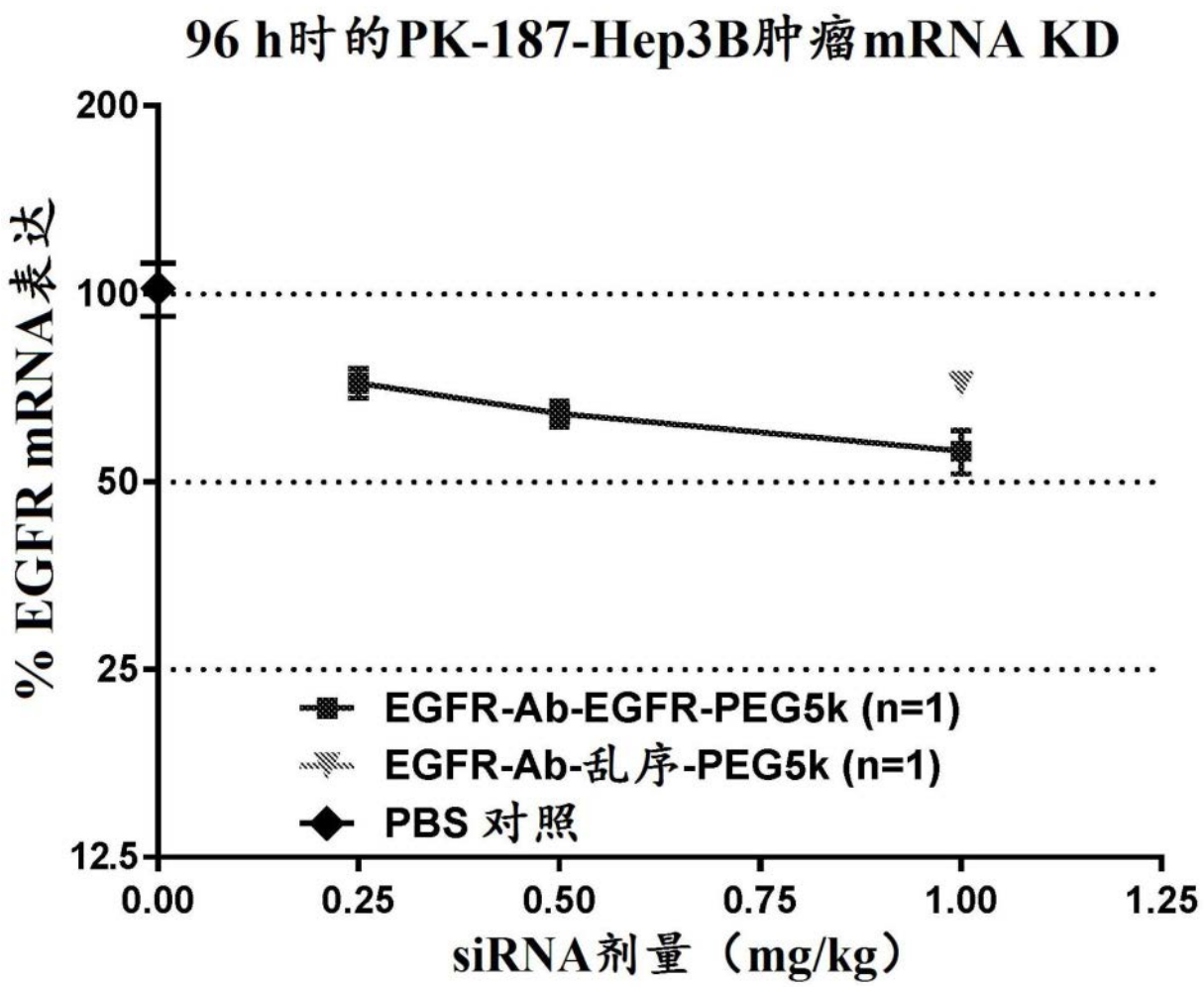

96 h时的PK-187-Hep3B肿瘤mRNA KD
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
siRNA剂量（mg/kg）
EGFR-Ab-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图59B

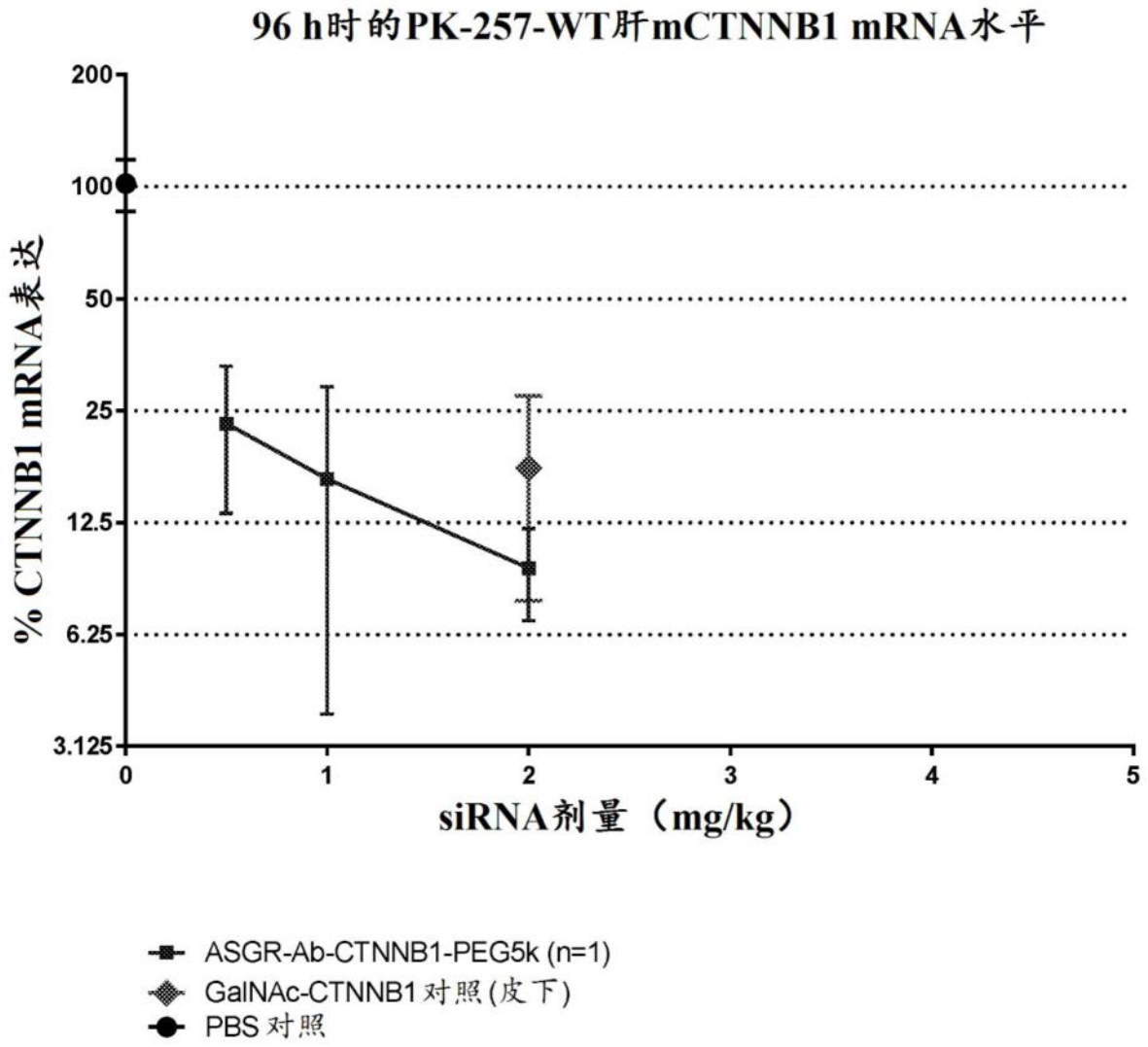

96 h时的PK-257-WT肝mCTNNB1 mRNA水平
% CTNNB1 mRNA表达
200
100
50
25
12.5
6.25
3.125
0
1
2
3
4
5
siRNA剂量（mg/kg）
ASGR-Ab-CTNNB1-PEG5k (n=1)
GalNAc-CTNNB1对照(皮下)
PBS对照

图60

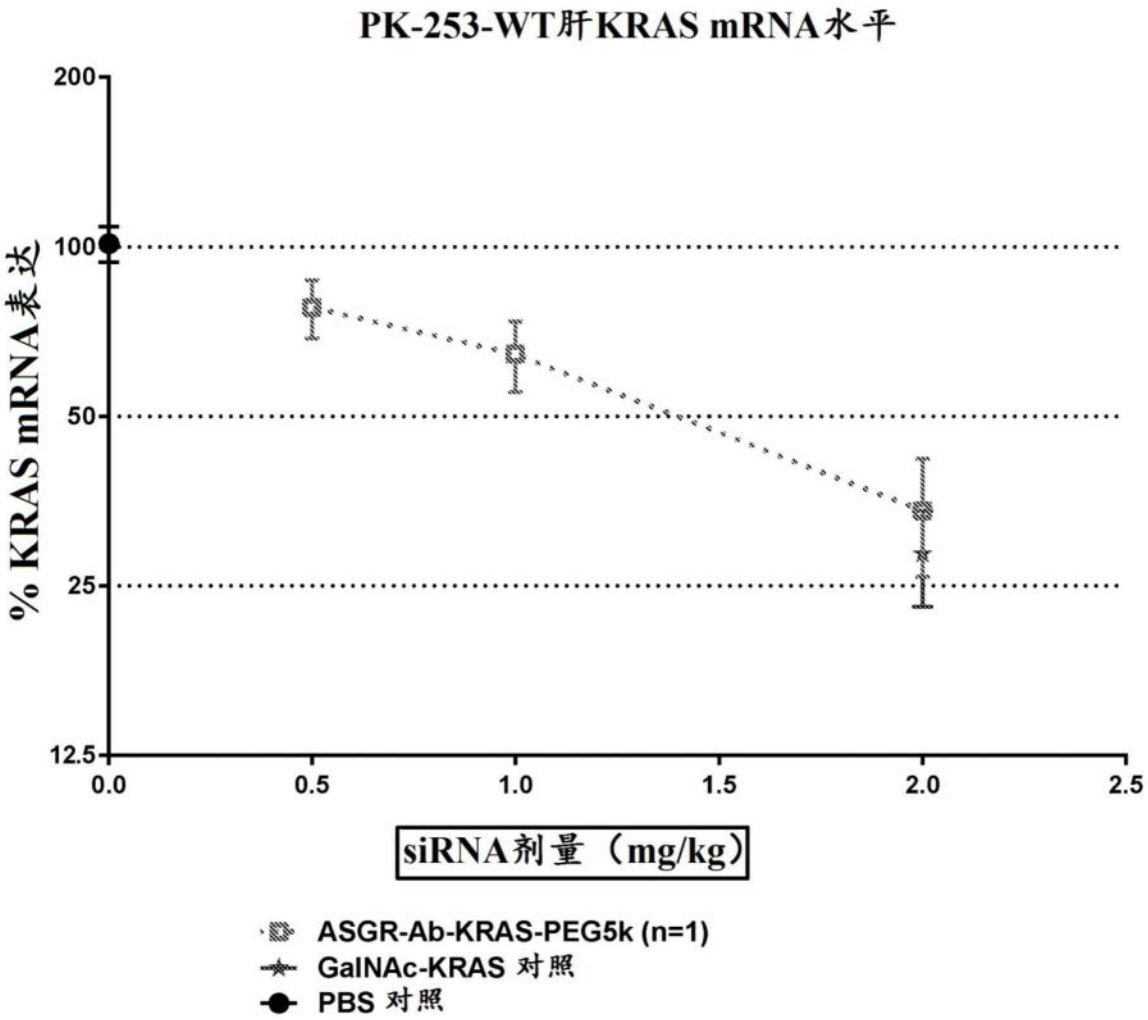

PK-253-WT肝KRAS mRNA水平
% KRAS mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
siRNA剂量（mg/kg）
ASGR-Ab-KRAS-PEG5k (n=1)
GalNAc-KRAS 对照
PBS 对照

图61

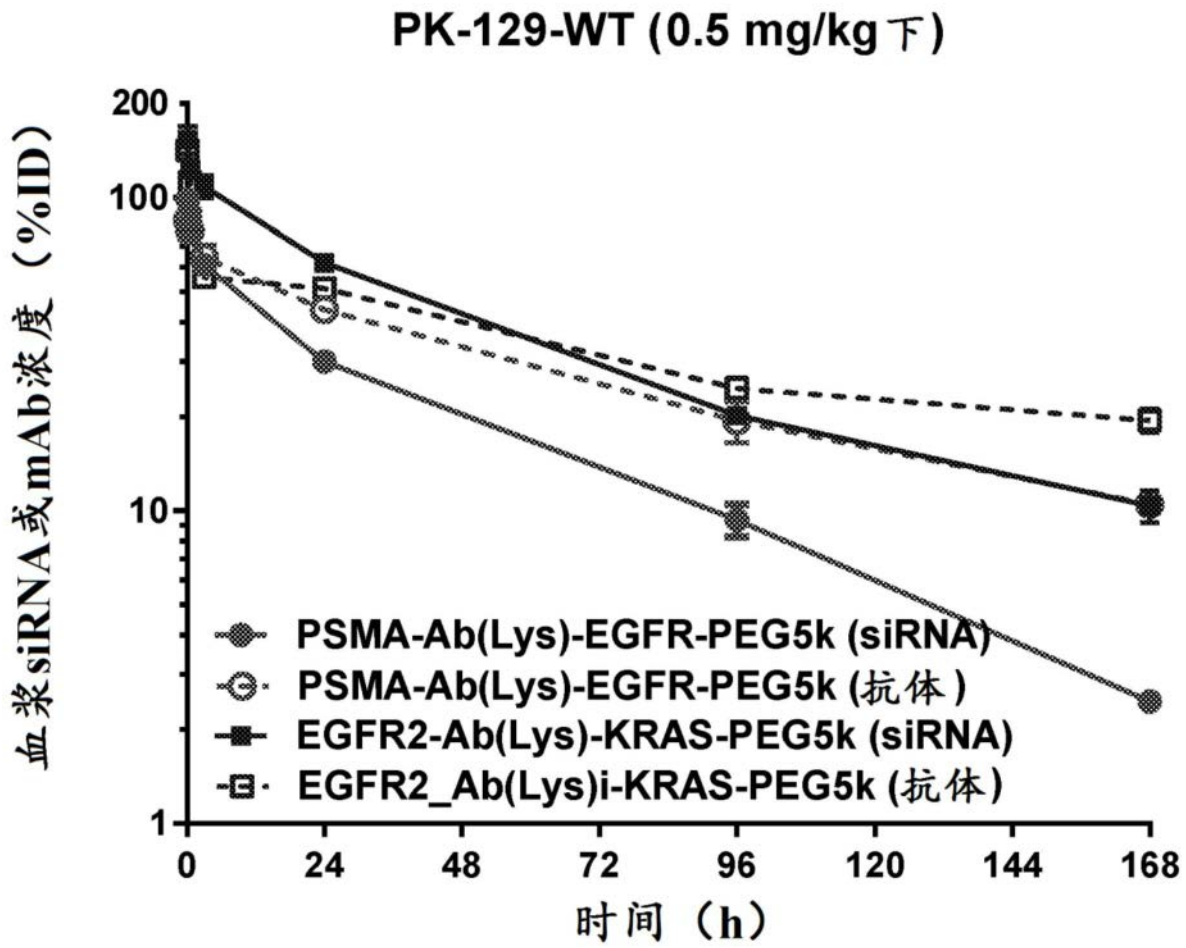

PK-129-WT (0.5 mg/kg下)
血浆siRNA或mAb浓度（%ID）
200
100
10
1
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
PSMA-Ab(Lys)-EGFR-PEG5k (siRNA)
PSMA-Ab(Lys)-EGFR-PEG5k (抗体)
EGFR2-Ab(Lys)-KRAS-PEG5k (siRNA)
EGFR2_Ab(Lys)i-KRAS-PEG5k (抗体)

图62

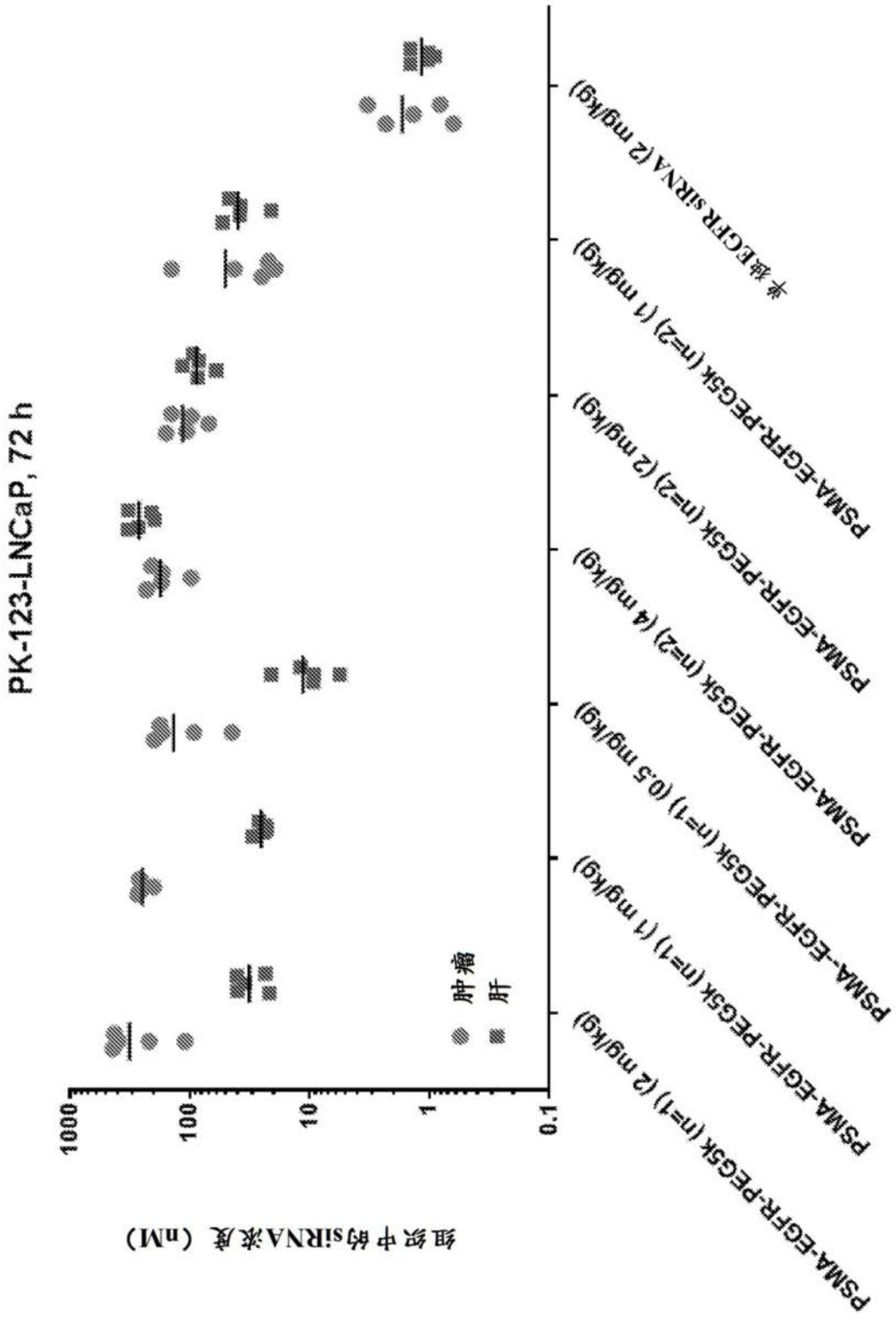

PK-123-LNCaP, 72 h
组织中的siRNA浓度 (nM)
1000
100
10
1
0.1
肿瘤
肝
PSMA-EGFR-PEG5k (n=1) (2 mg/kg)
PSMA-EGFR-PEG5k (n=1) (1 mg/kg)
PSMA-EGFR-PEG5k (n=1) (0.5 mg/kg)
PSMA-EGFR-PEG5k (n=2) (4 mg/kg)
PSMA-EGFR-PEG5k (n=2) (2 mg/kg)
PSMA-EGFR-PEG5k (n=2) (1 mg/kg)
单独EGFR siRNA (2 mg/kg)

图63A

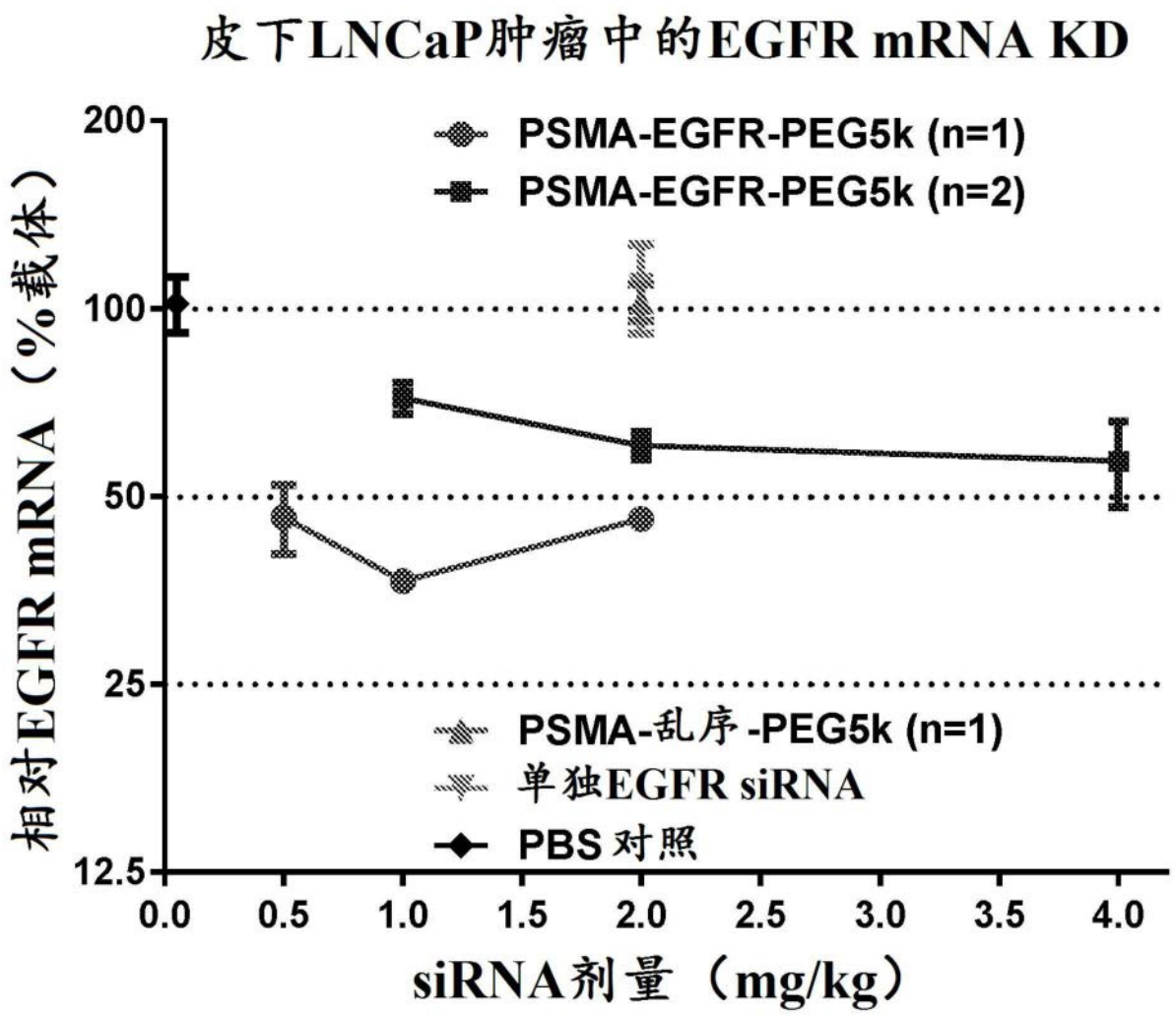

皮下LNCaP肿瘤中的EGFR mRNA KD
PSMA-EGFR-PEG5k (n=1)
PSMA-EGFR-PEG5k (n=2)
PSMA-乱序-PEG5k (n=1)
单独EGFR siRNA
PBS 对照
相对EGFR mRNA（%载体）
200
100
50
25
12.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
siRNA剂量（mg/kg）

图63B

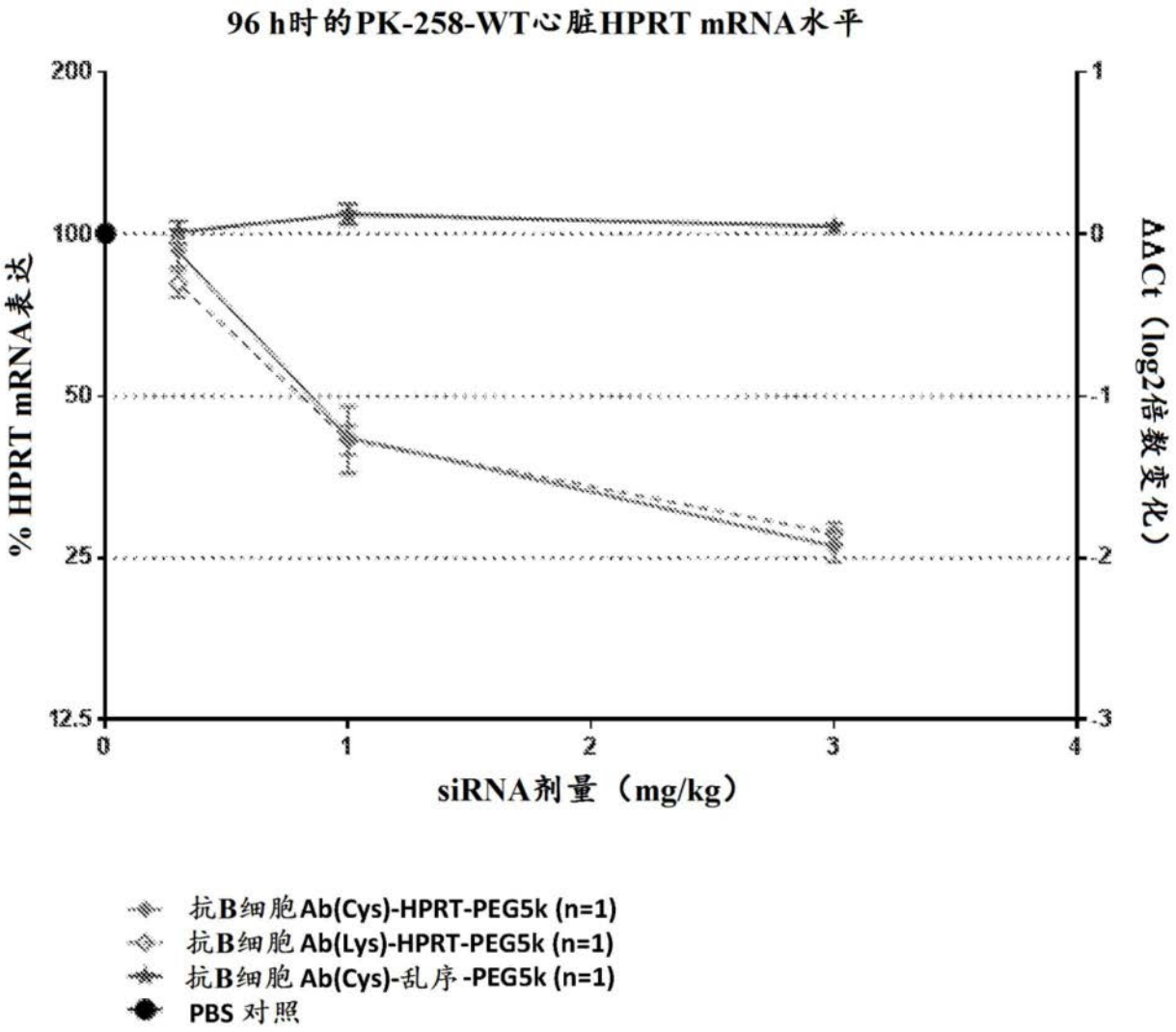

96 h时的PK-258-WT心脏HPRT mRNA水平
% HPRT mRNA表达
ΔΔCt（log2倍数变化）
siRNA剂量（mg/kg）
200
100
50
25
12.5
1
0
-1
-2
-3
0
1
2
3
4
抗B细胞Ab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-乱序 -PEG5k (n=1)
PBS 对照

图64A

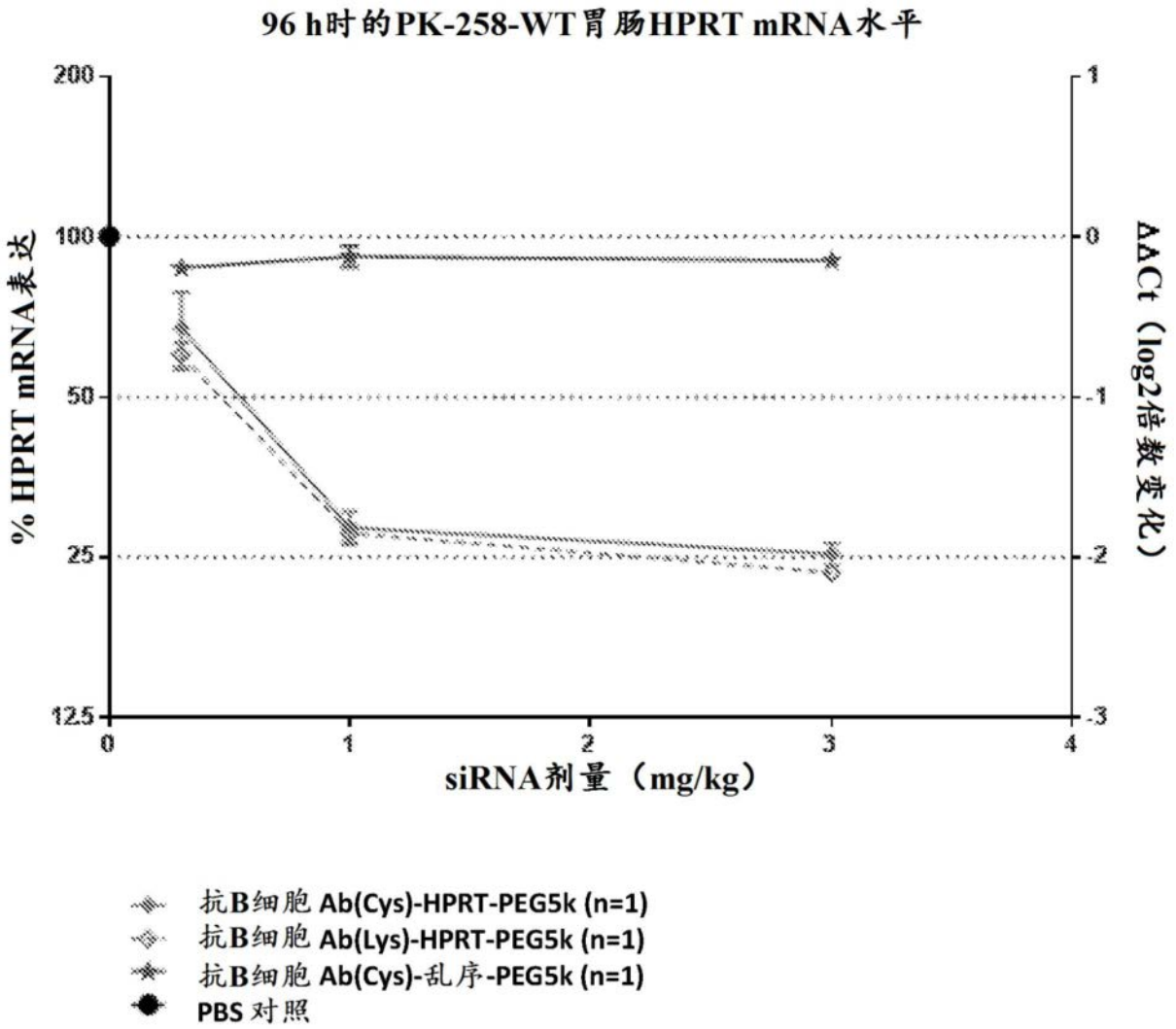

96 h时的PK-258-WT胃肠HPRT mRNA水平
% HPRT mRNA表达
ΔΔCt（log2倍数变化）
siRNA剂量（mg/kg）
200
100
50
25
125
1
0
-1
-2
-3
0
1
2
3
4
抗B细胞 Ab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图64B

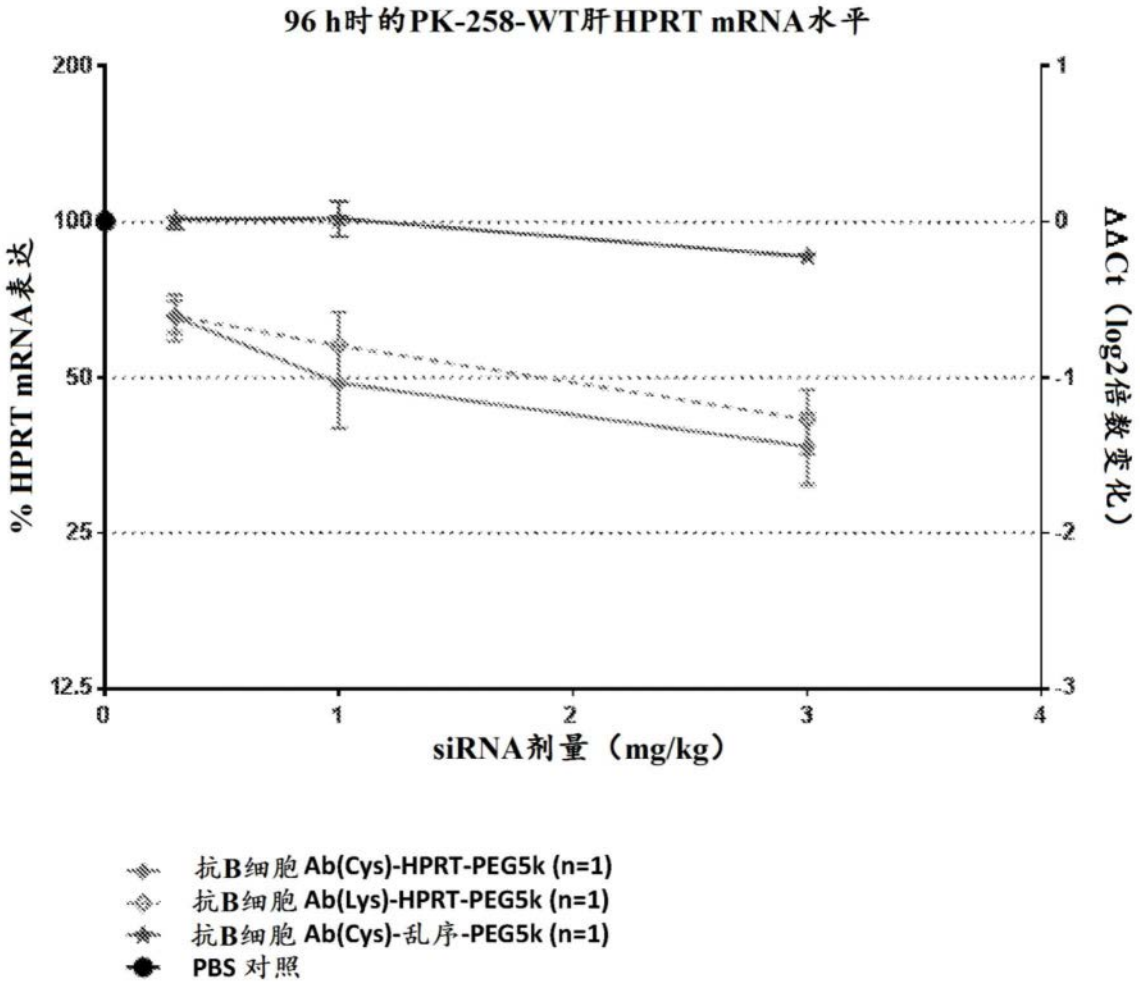

96 h时的PK-258-WT肝HPRT mRNA水平
% HPRT mRNA表达
ΔΔCt（log2倍数变化）
siRNA剂量（mg/kg）
200
100
50
25
12.5
1
0
-1
-2
-3
0
1
2
3
4
抗B细胞 Ab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图64C

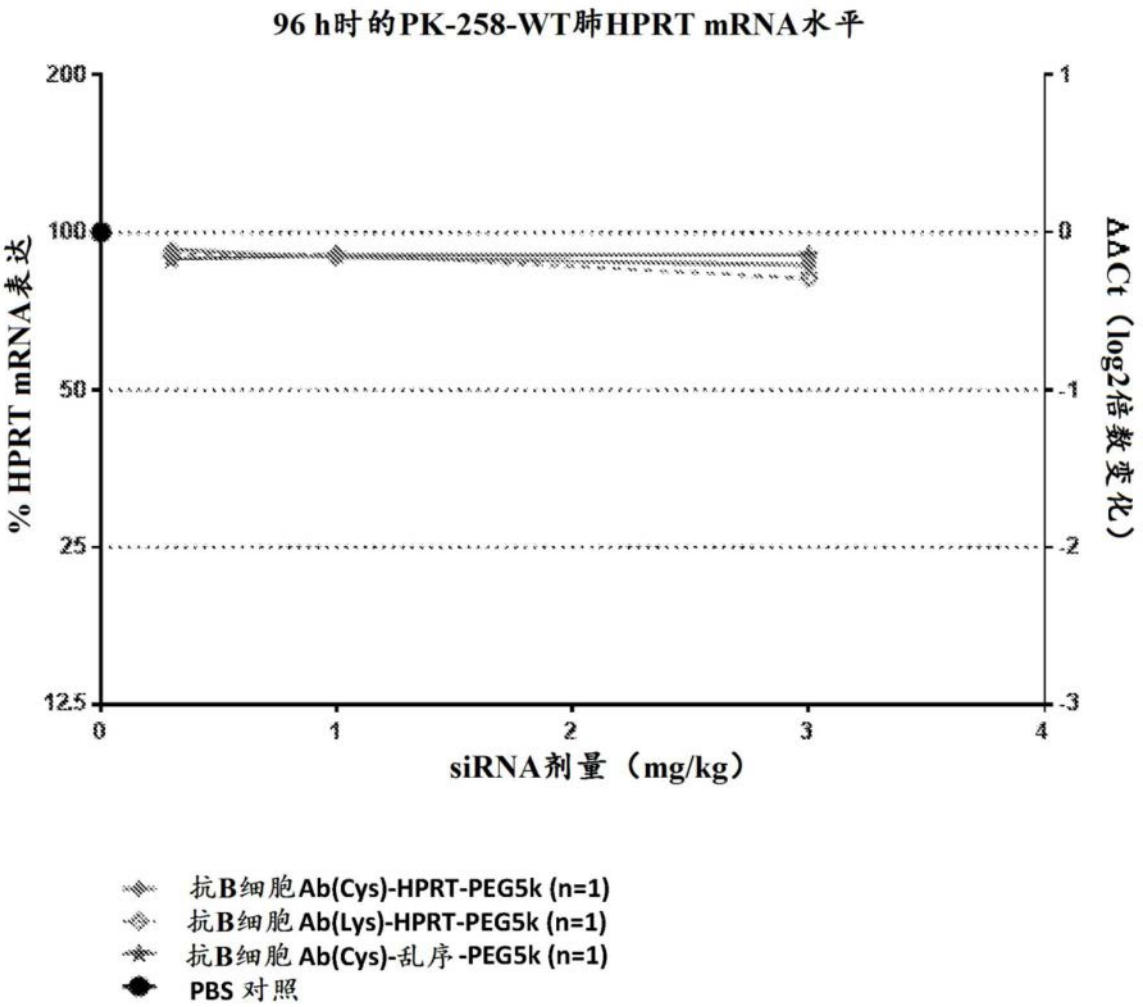

96 h时的PK-258-WT肺HPRT mRNA水平
% HPRT mRNA表达
ΔΔCt（log2倍数变化）
siRNA剂量（mg/kg）
200
100
50
25
12.5
1
0
-1
-2
-3
0
1
2
3
4
抗B细胞Ab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-乱序 -PEG5k (n=1)
PBS 对照

图64D

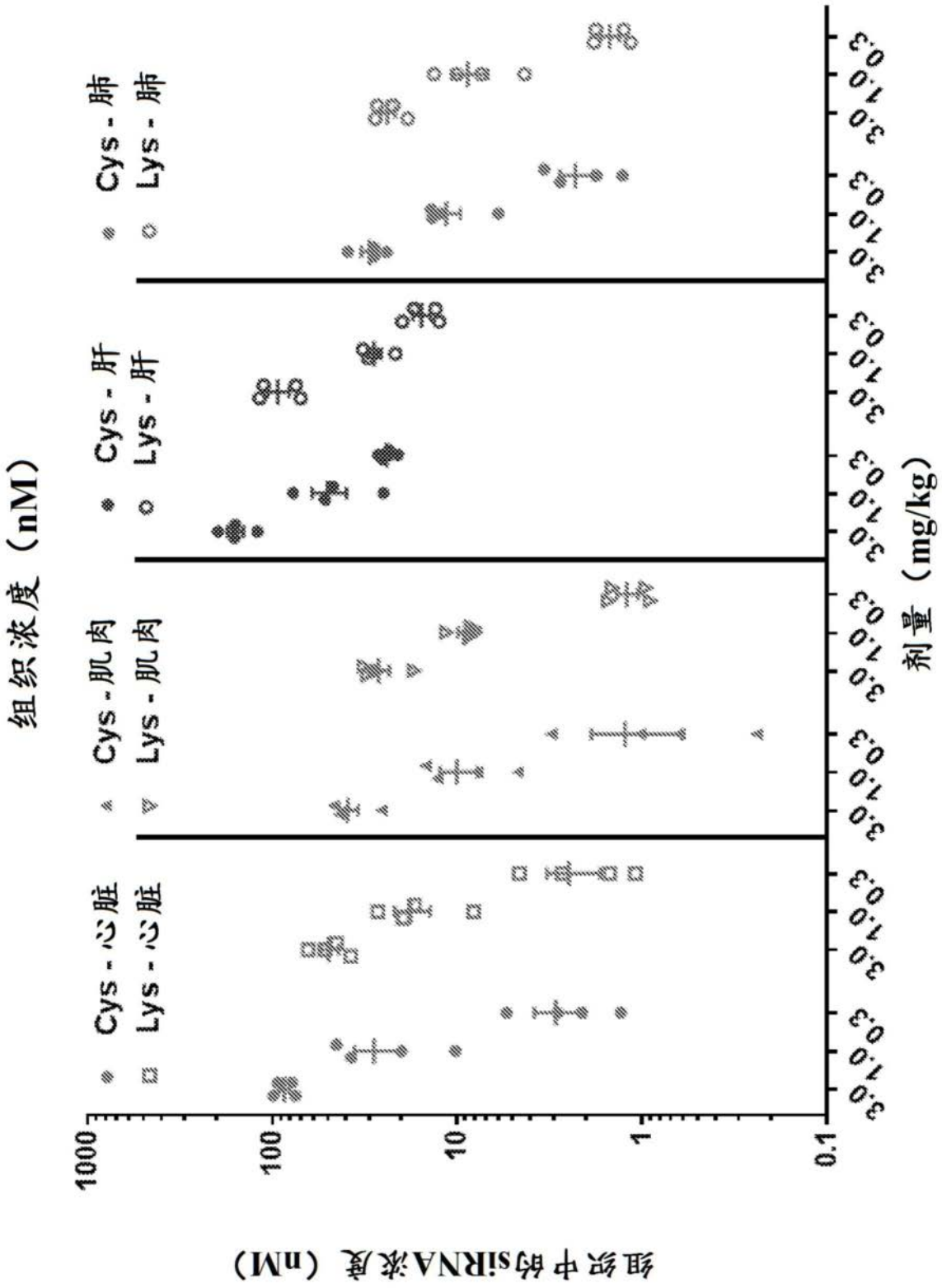

组织浓度（nM）
1000
100
10
1
0.1
Cys - 心脏
Lys - 心脏
Cys - 肌肉
Lys - 肌肉
Cys - 肝
Lys - 肝
Cys - 肺
Lys - 肺
3.0
1.0
0.3
剂量（mg/kg）
组织中的siRNA浓度（nM）

图64E

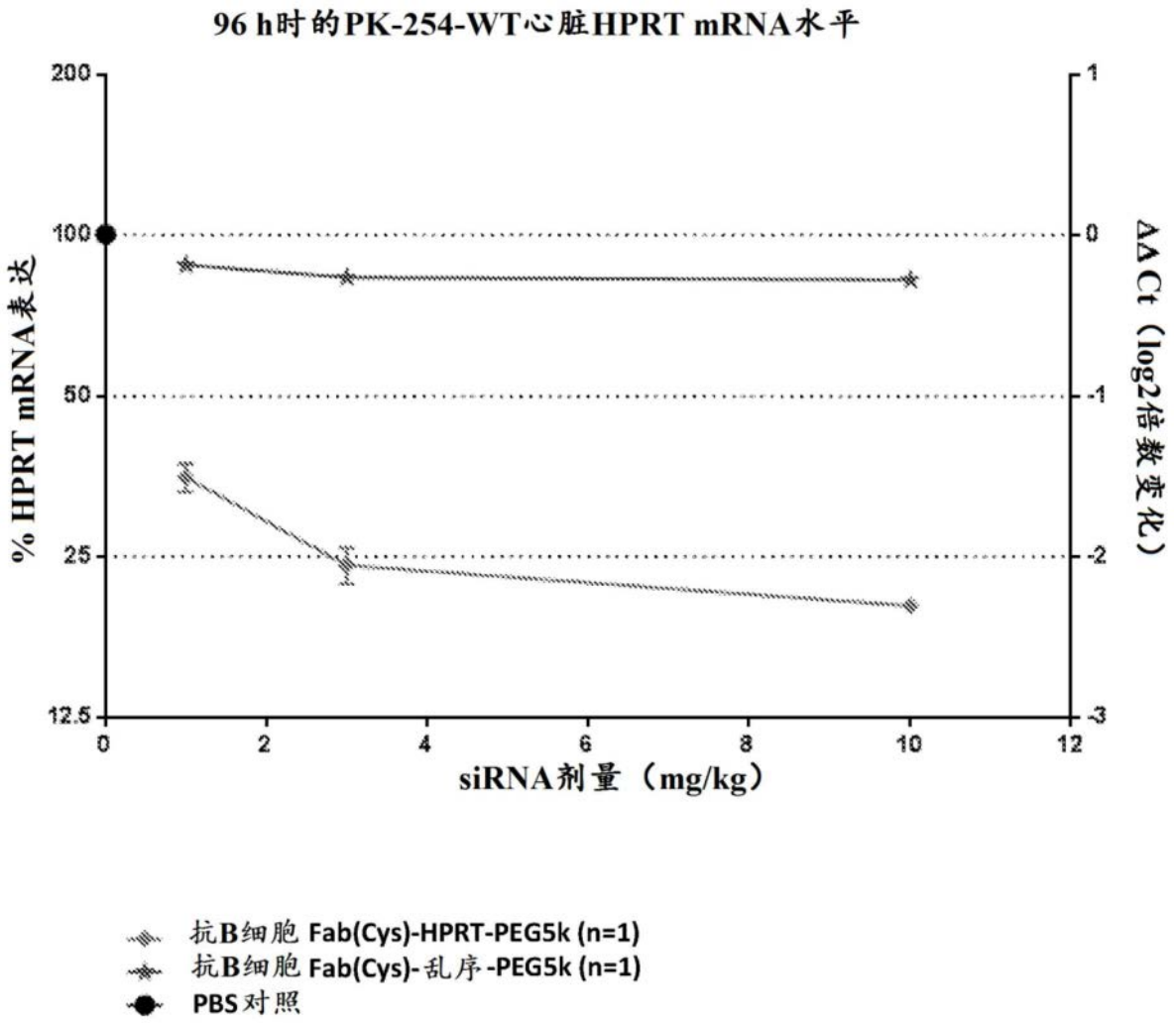

96 h时的PK-254-WT心脏HPRT mRNA水平
% HPRT mRNA表达
ΔΔ Ct（log2倍数变化）
siRNA剂量（mg/kg）
200
100
50
25
12.5
1
0
-1
-2
-3
0
2
4
6
8
10
12
抗B细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS对照

图65A

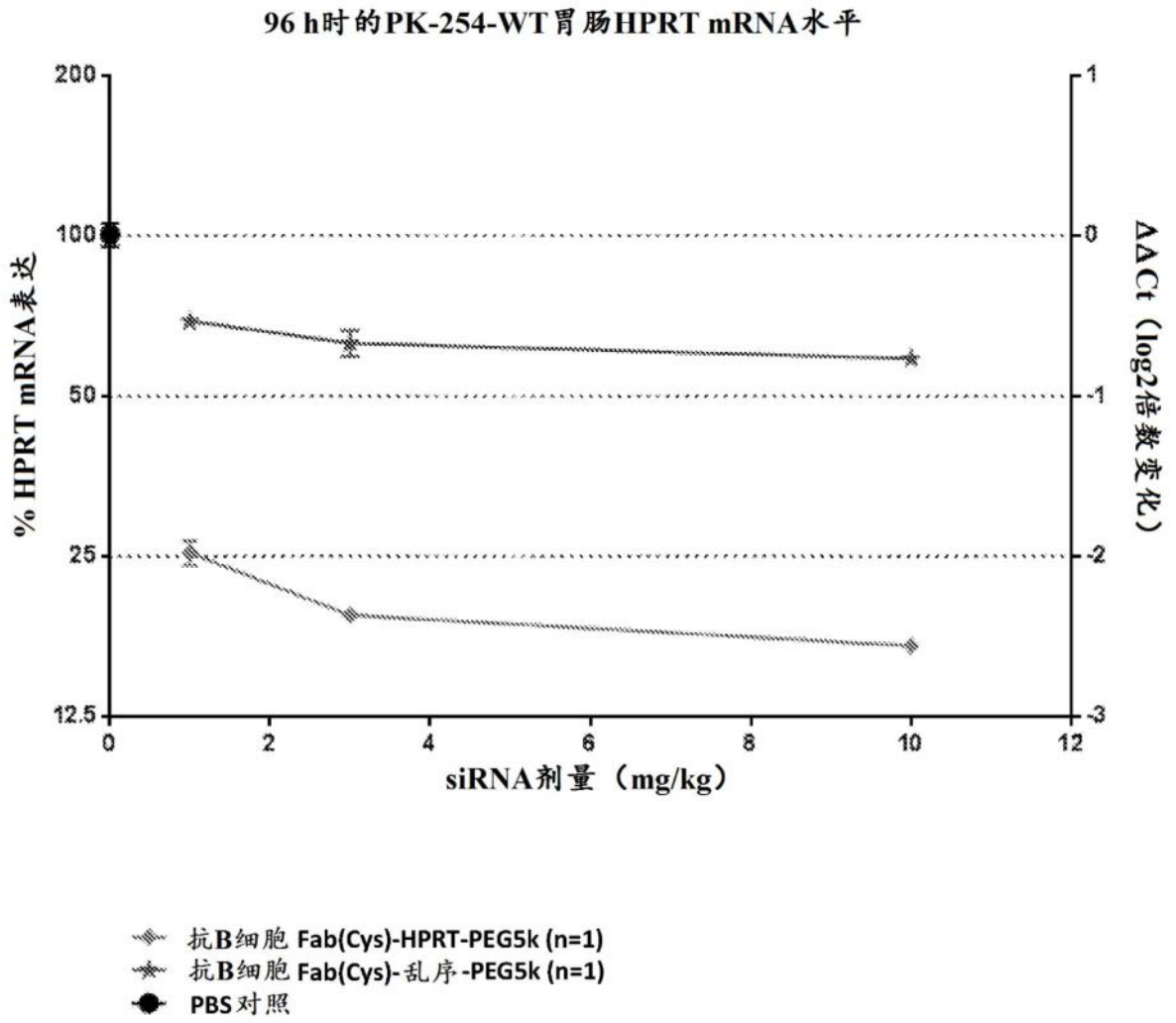

96 h时的PK-254-WT胃肠HPRT mRNA水平
% HPRT mRNA表达
ΔΔCt（log2倍数变化）
siRNA剂量（mg/kg）
200
100
50
25
12.5
1
0
-1
-2
-3
0
2
4
6
8
10
12
抗B细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS对照

图65B

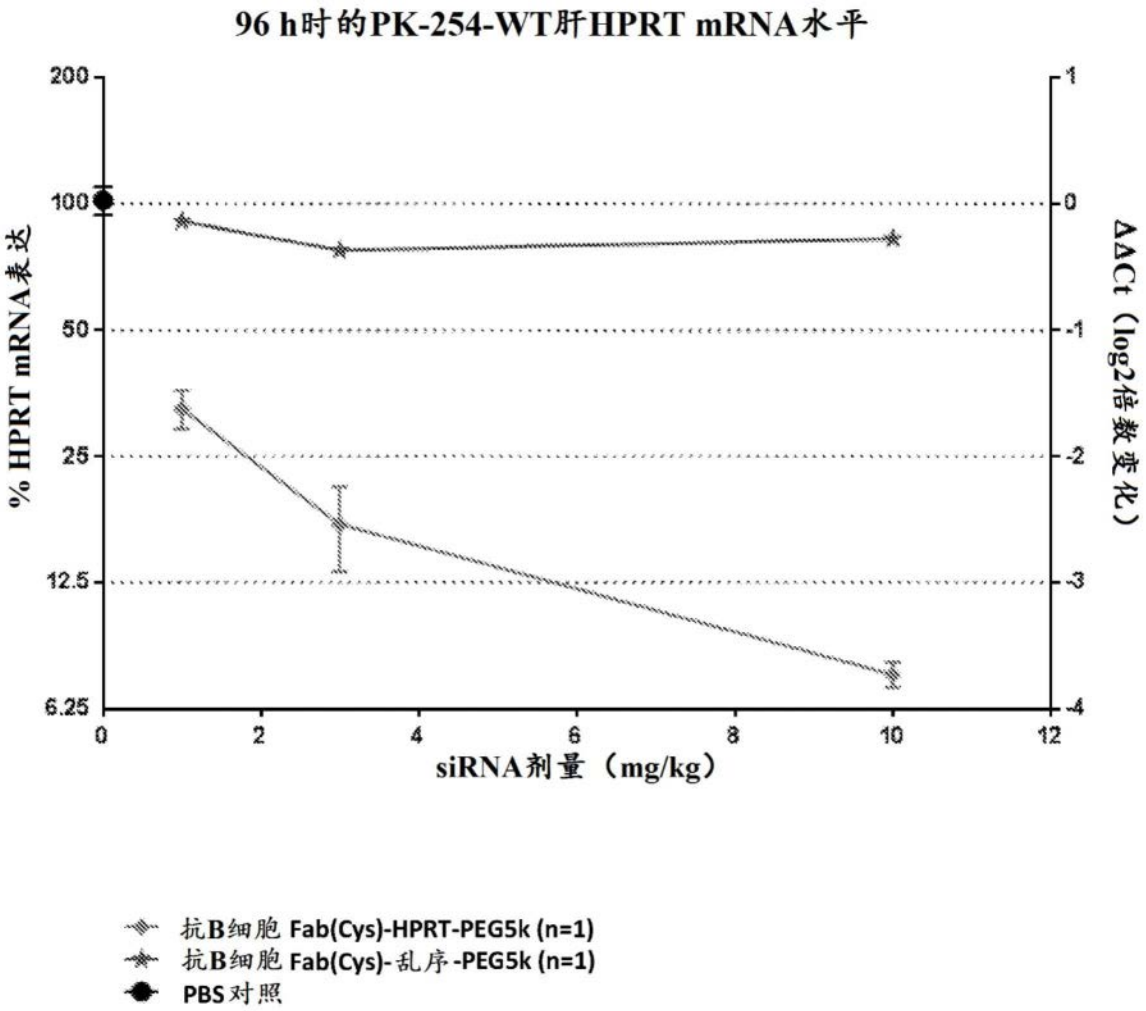

96 h时的PK-254-WT肝HPRT mRNA水平
% HPRT mRNA表达
ΔΔCt（log2倍数变化）
siRNA剂量（mg/kg）
200
100
50
25
12.5
6.25
1
0
-1
-2
-3
-4
0
2
4
6
8
10
12
抗B细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS对照

图65C

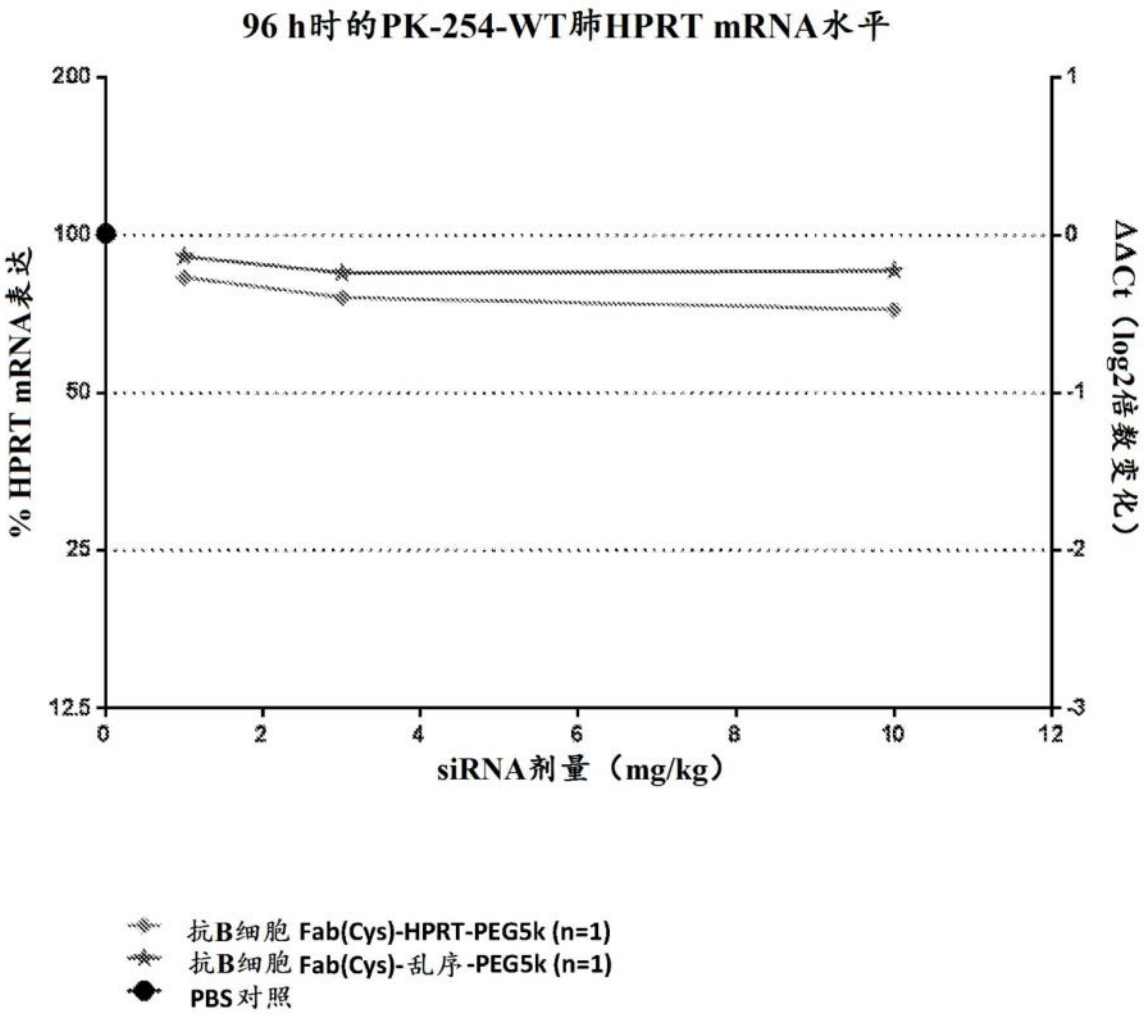

96 h时的PK-254-WT肺HPRT mRNA水平
% HPRT mRNA表达
ΔΔCt（log2倍数变化）
siRNA剂量（mg/kg）
200
100
50
25
12.5
1
0
-1
-2
-3
0
2
4
6
8
10
12
抗B细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS对照

图65D

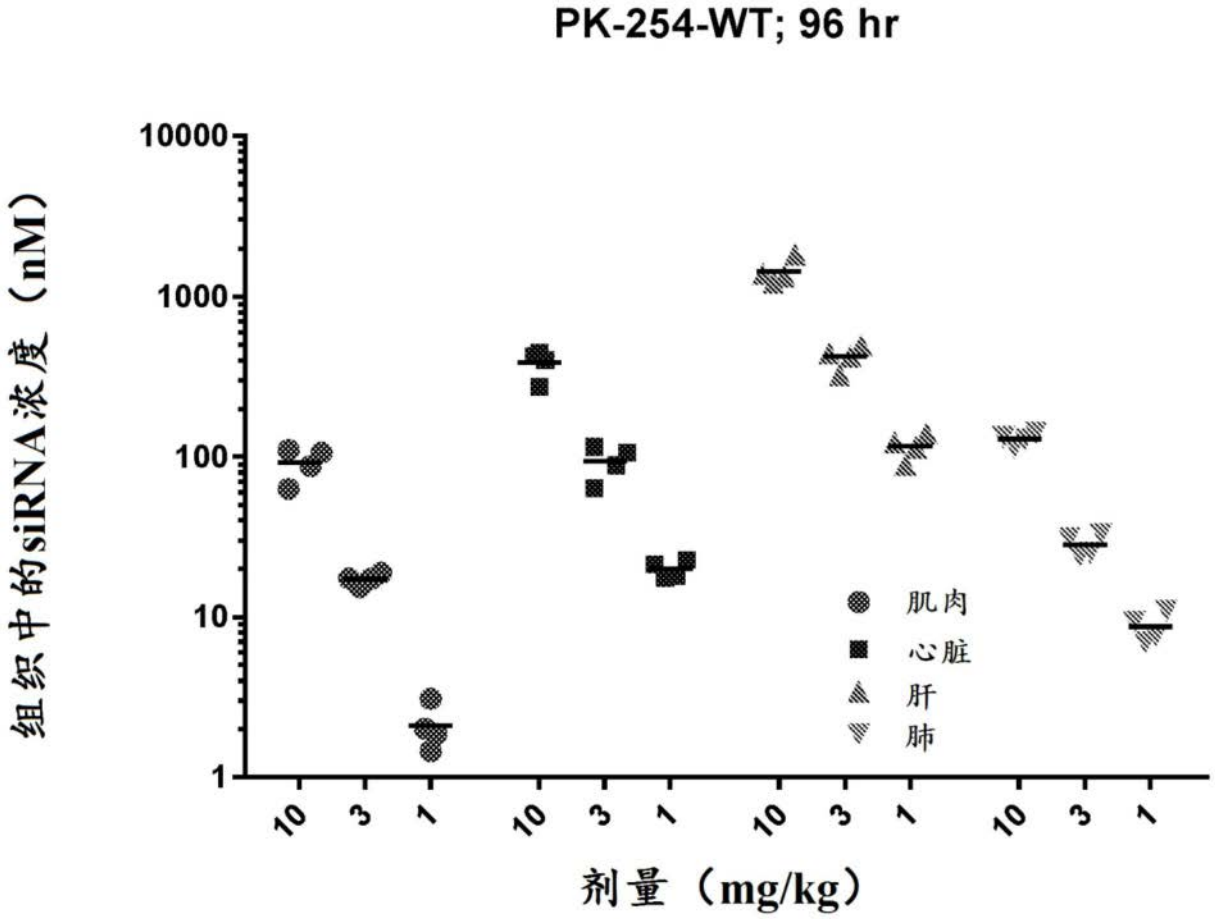

PK-254-WT; 96 hr
组织中的siRNA浓度（nM）
10000
1000
100
10
1
肌肉
心脏
肝
肺
10
3
1
剂量（mg/kg）

图65E

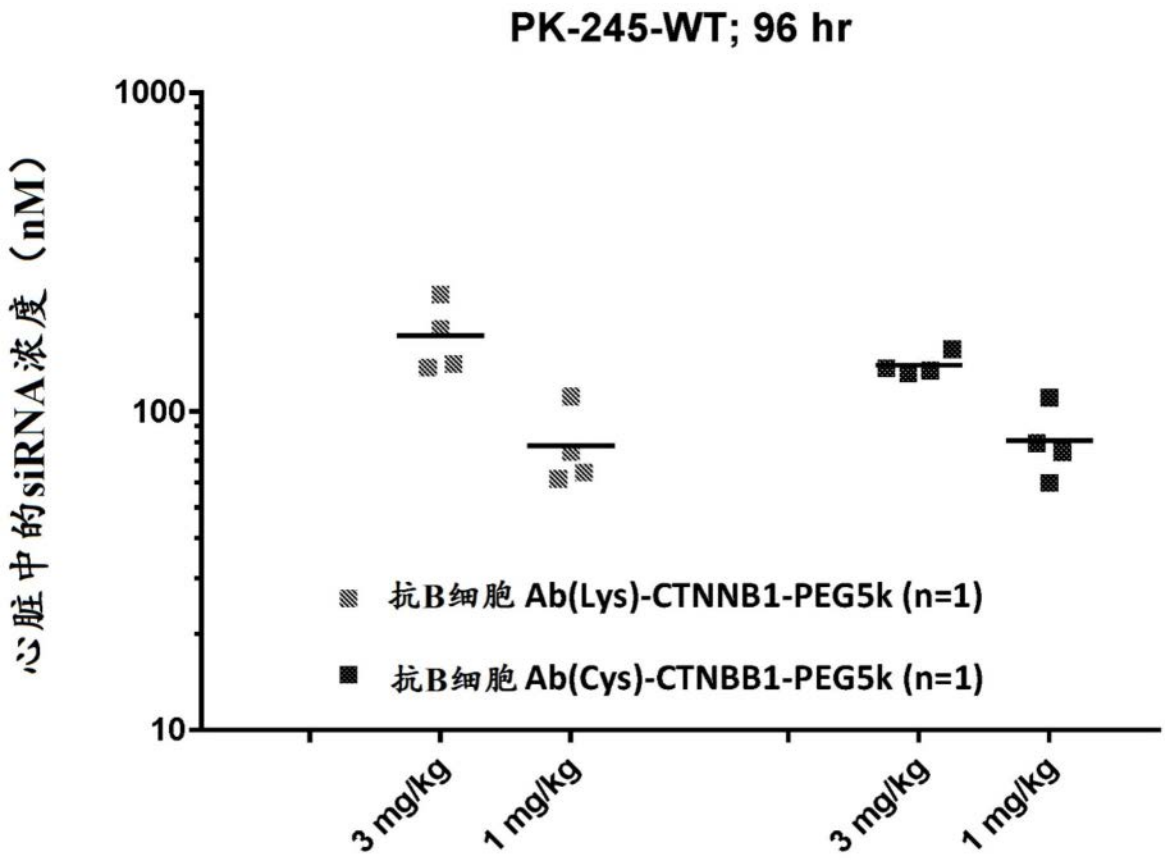

PK-245-WT; 96 hr
心脏中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
抗B细胞 Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-CTNBB1-PEG5k (n=1)
3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
1 mg/kg

图66A

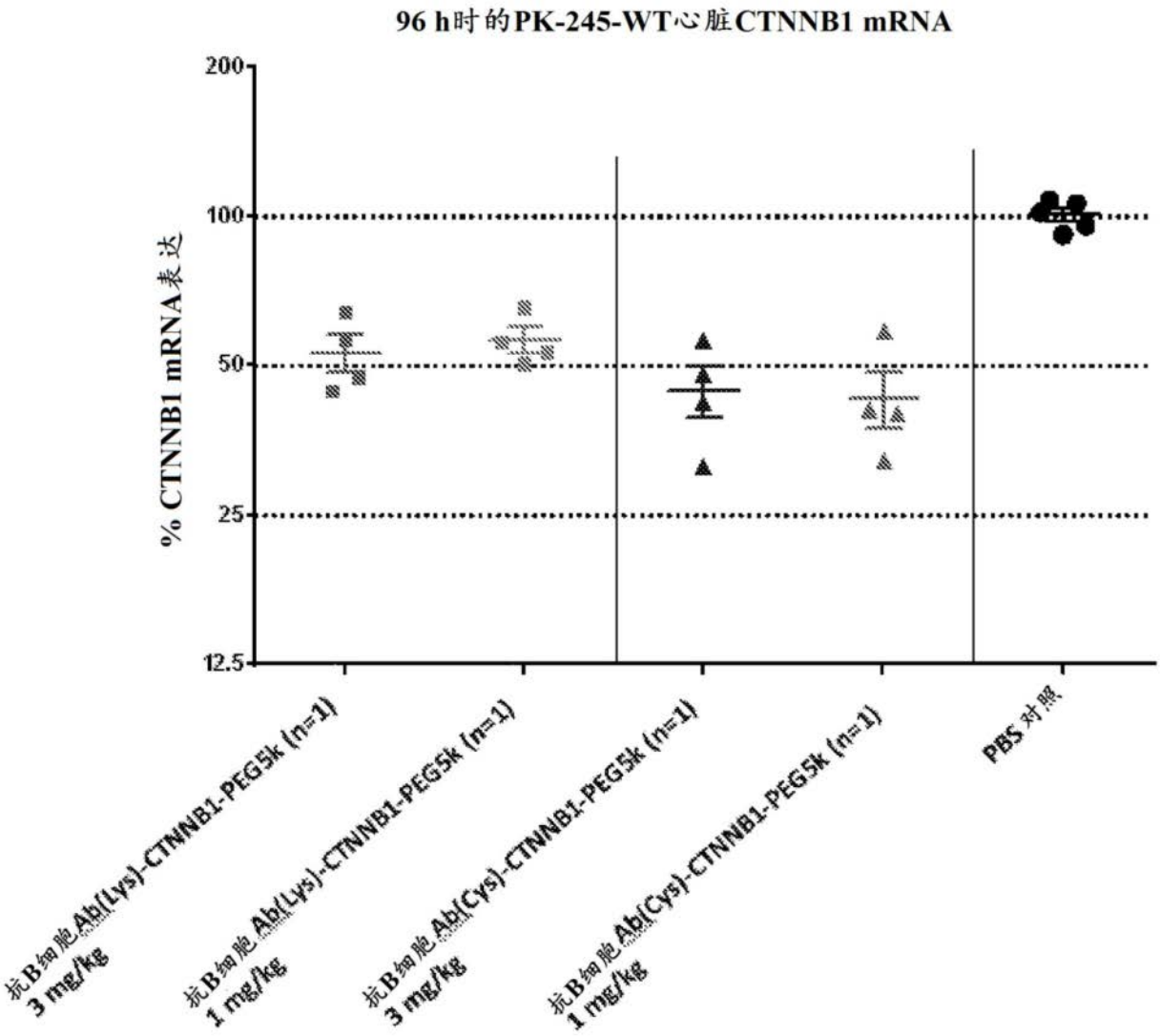

96 h时的PK-245-WT心脏CTNNB1 mRNA
% CTNNB1 mRNA表达
200
100
50
25
12.5
抗B细胞Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1) 3 mg/kg
抗B细胞Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
抗B细胞Ab(Cys)-CTNNB1-PEG5k (n=1) 3 mg/kg
抗B细胞Ab(Cys)-CTNNB1-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PBS对照

图66B

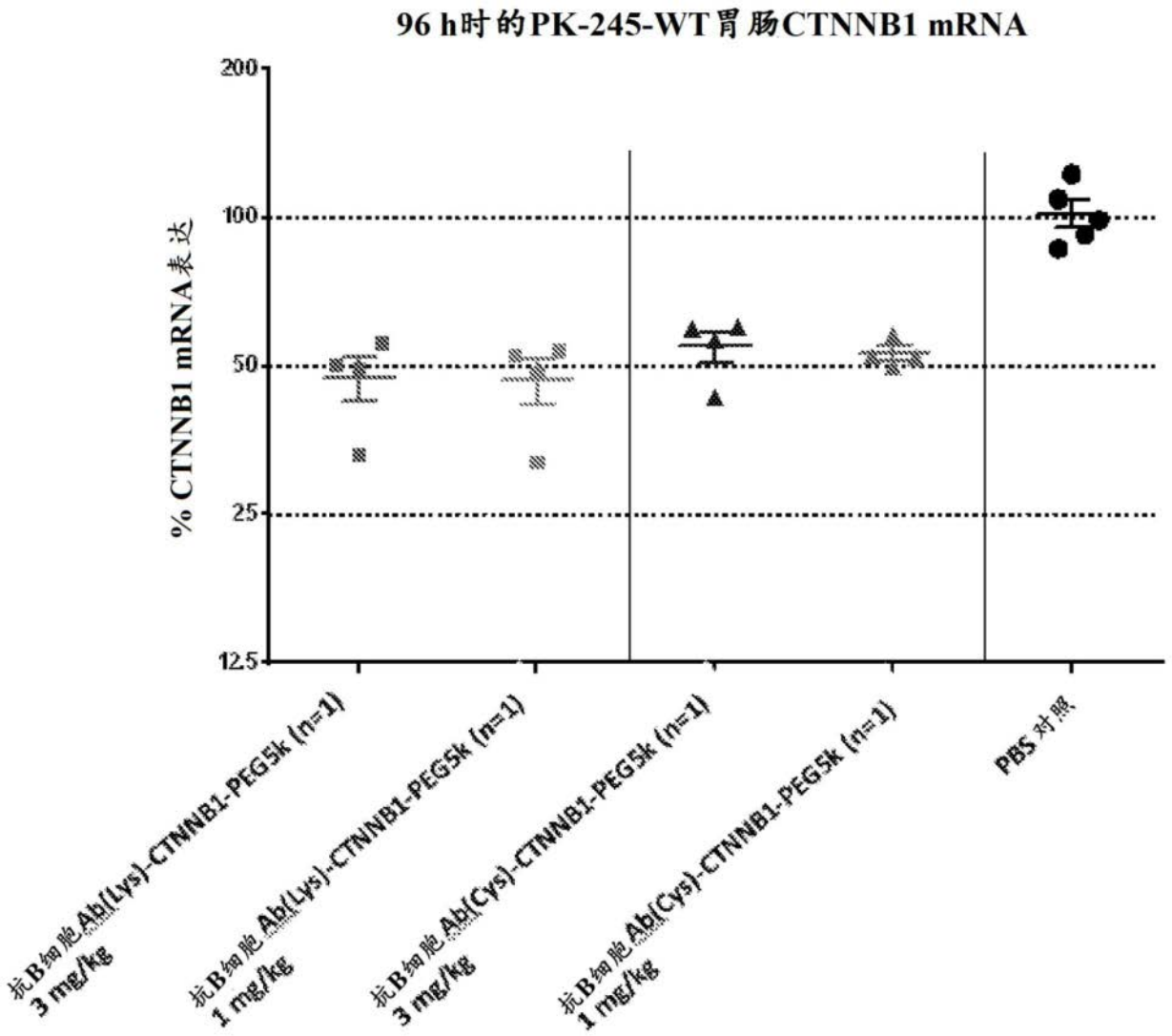

96 h时的PK-245-WT胃肠CTNNB1 mRNA
% CTNNB1 mRNA表达
200
100
50
25
12.5
抗B细胞Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1) 3 mg/kg
抗B细胞Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
抗B细胞Ab(Cys)-CTNNB1-PEG5k (n=1) 3 mg/kg
抗B细胞Ab(Cys)-CTNNB1-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PBS对照

图66C

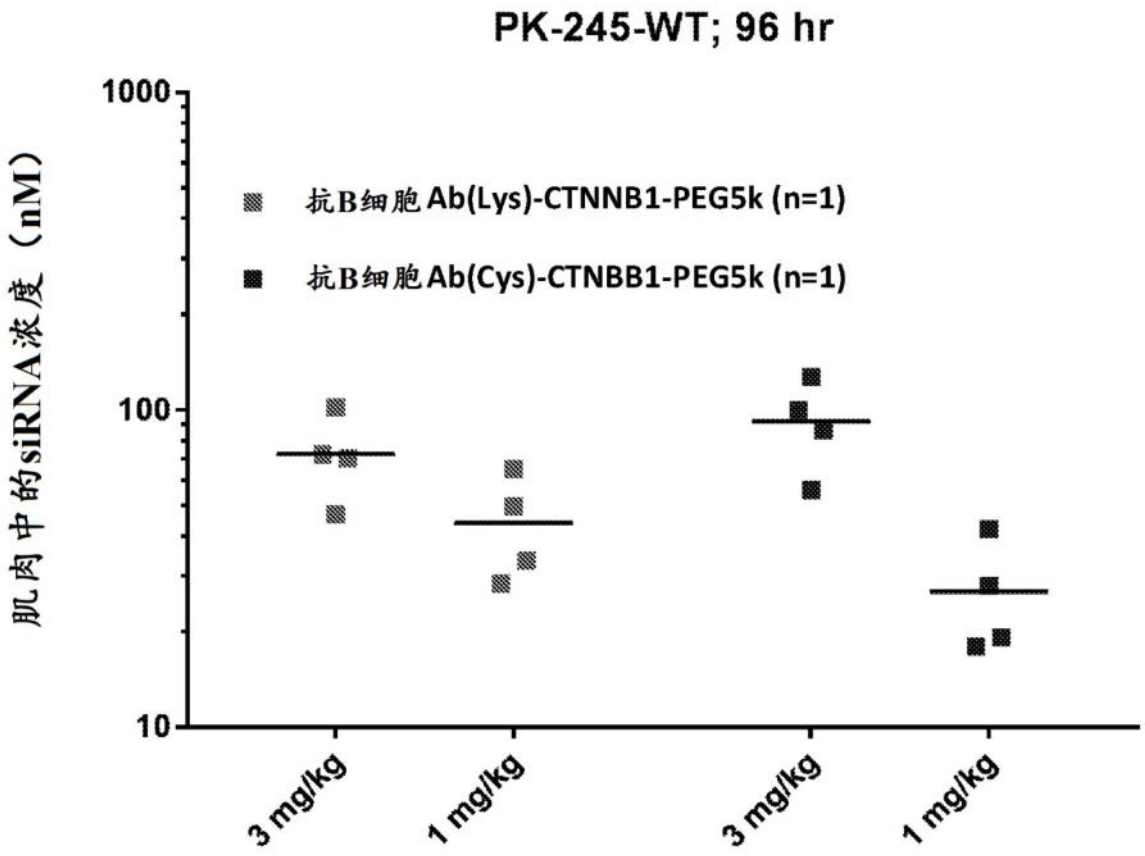

PK-245-WT; 96 hr
肌肉中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
抗B细胞Ab(Lys)-CTNNB1-PEG5k (n=1)
抗B细胞Ab(Cys)-CTNBB1-PEG5k (n=1)
3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
1 mg/kg

图66D

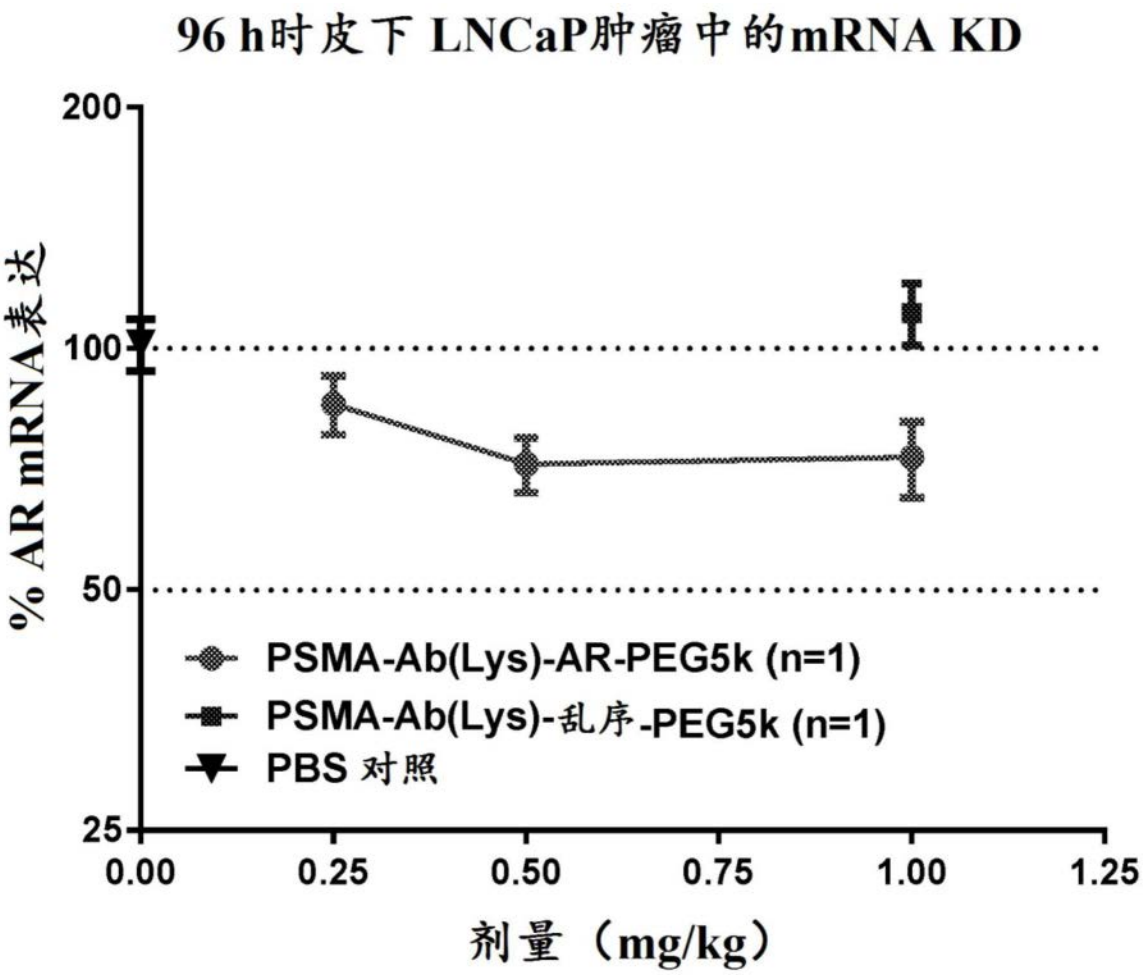

96 h时皮下 LNCaP肿瘤中的mRNA KD
% AR mRNA表达
200
100
50
25
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
剂量（mg/kg）
PSMA-Ab(Lys)-AR-PEG5k (n=1)
PSMA-Ab(Lys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图67A

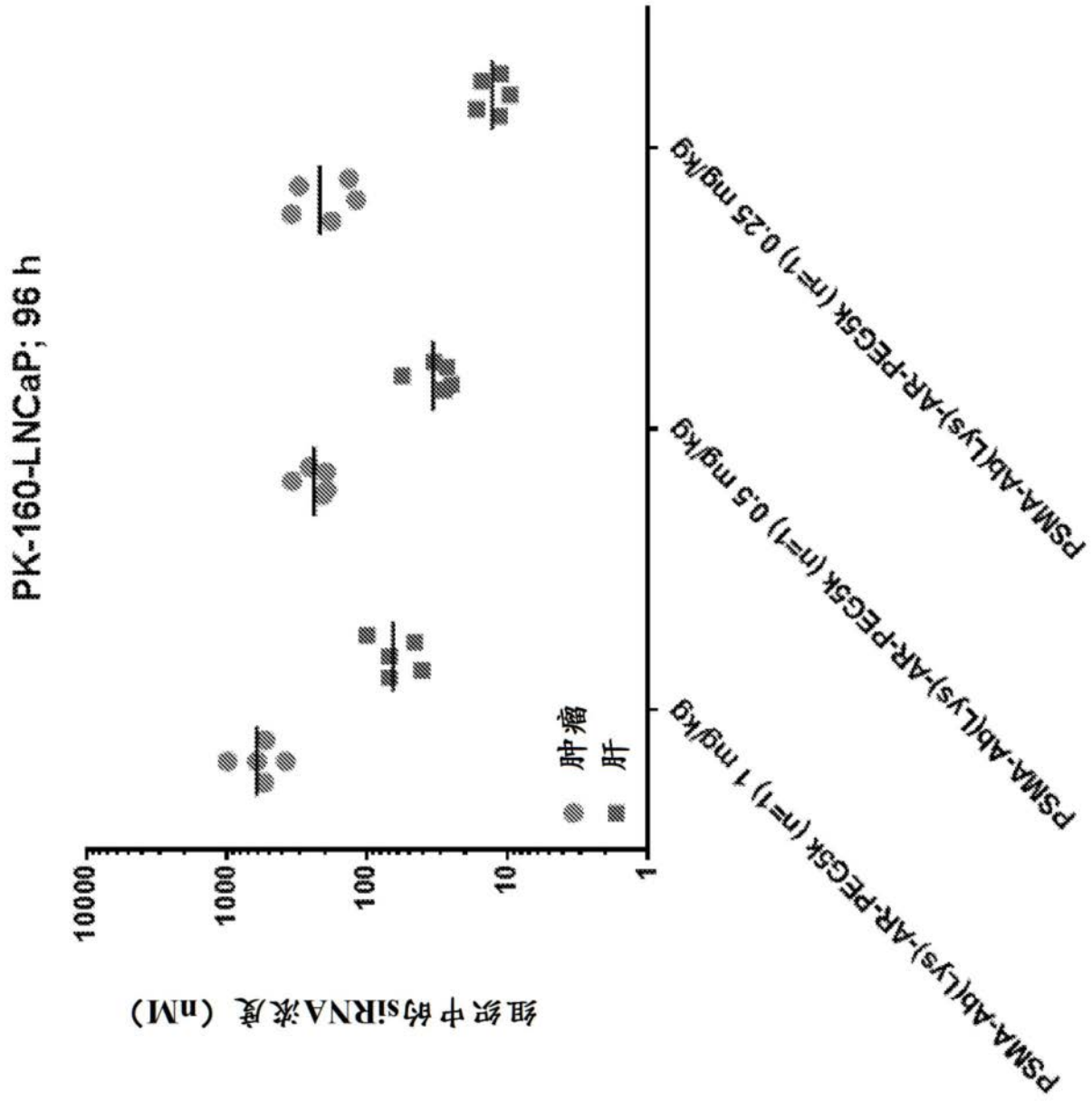

PK-160-LNCaP; 96 h
组织中的siRNA浓度 (nM)
10000
1000
100
10
1
肿瘤
肝
PSMA-Ab(Lys)-AR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Lys)-AR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
PSMA-Ab(Lys)-AR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg

图67B

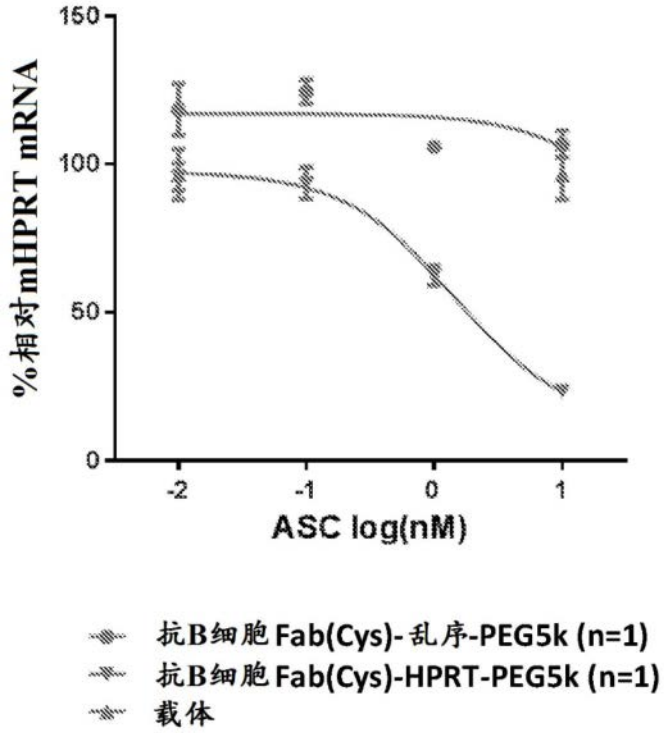

150
100
50
0
%相对mHPRT mRNA
-2
-1
0
1
ASC log(nM)
抗B细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
载体

图68A

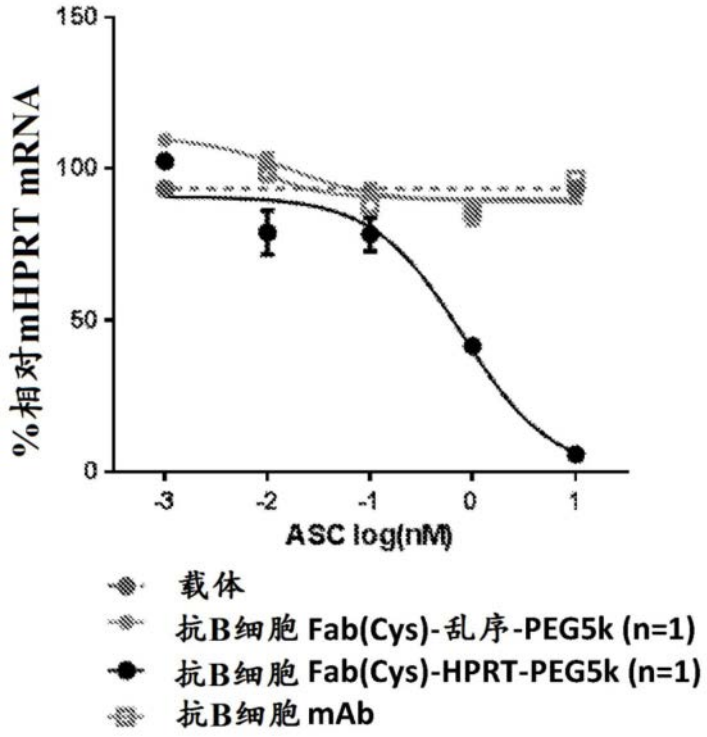

150
100
50
0
%相对mHPRT mRNA
-3
-2
-1
0
1
ASC log(nM)
载体
抗B细胞 Fab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Fab(Cys)-HPRT-PEG5k (n=1)
抗B细胞 mAb

图68B

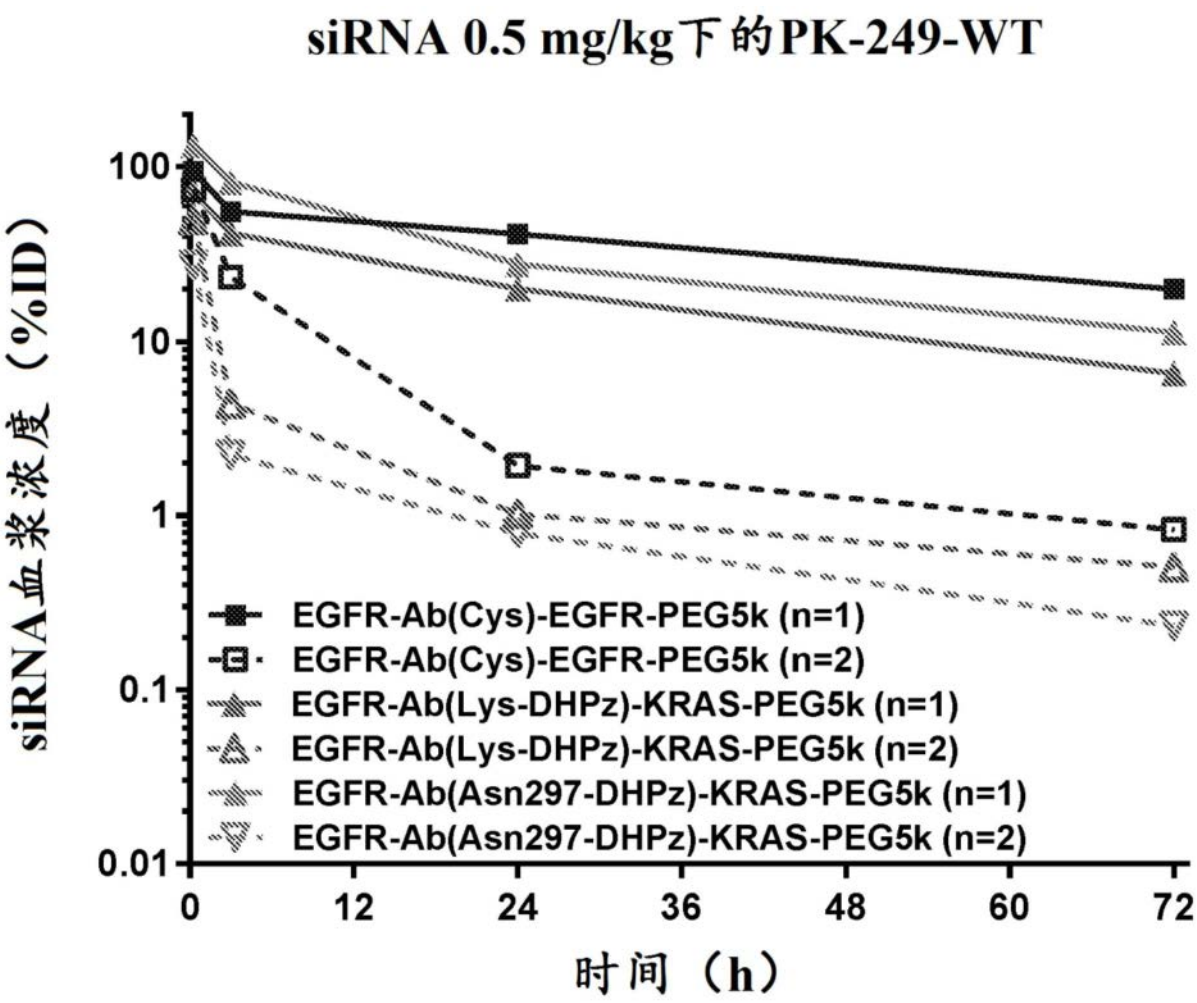

siRNA 0.5 mg/kg下的PK-249-WT
siRNA血浆浓度（%ID）
100
10
1
0.1
0.01
0
12
24
36
48
60
72
时间（h）
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=2)
EGFR-Ab(Lys-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Lys-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=2)
EGFR-Ab(Asn297-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Asn297-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=2)

图69A

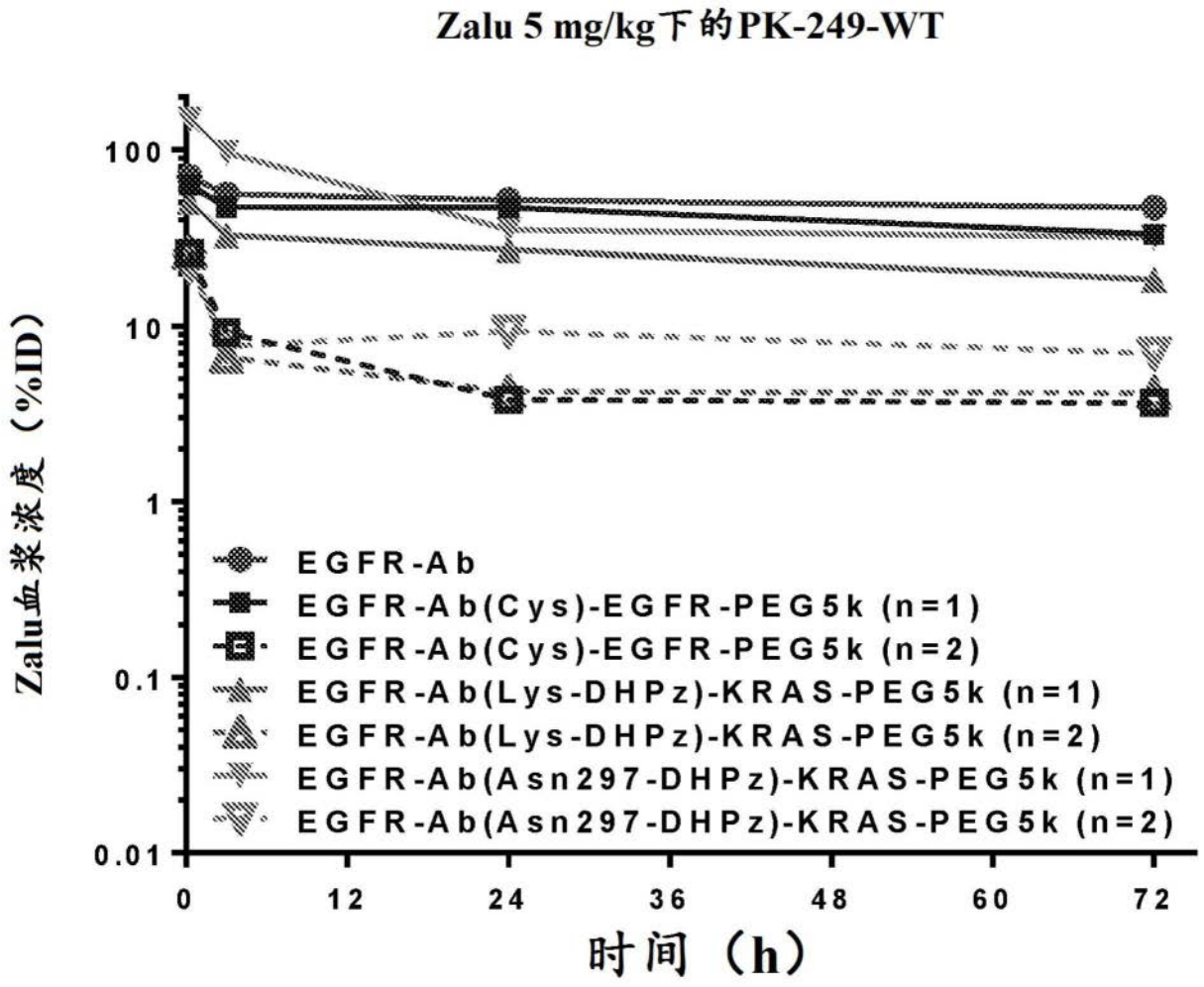

Zalu 5 mg/kg下的PK-249-WT
Zalu血浆浓度（%ID）
100
10
1
0.1
0.01
0
12
24
36
48
60
72
时间（h）
EGFR-Ab
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=2)
EGFR-Ab(Lys-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Lys-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=2)
EGFR-Ab(Asn297-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Asn297-DHPz)-KRAS-PEG5k (n=2)

图69B

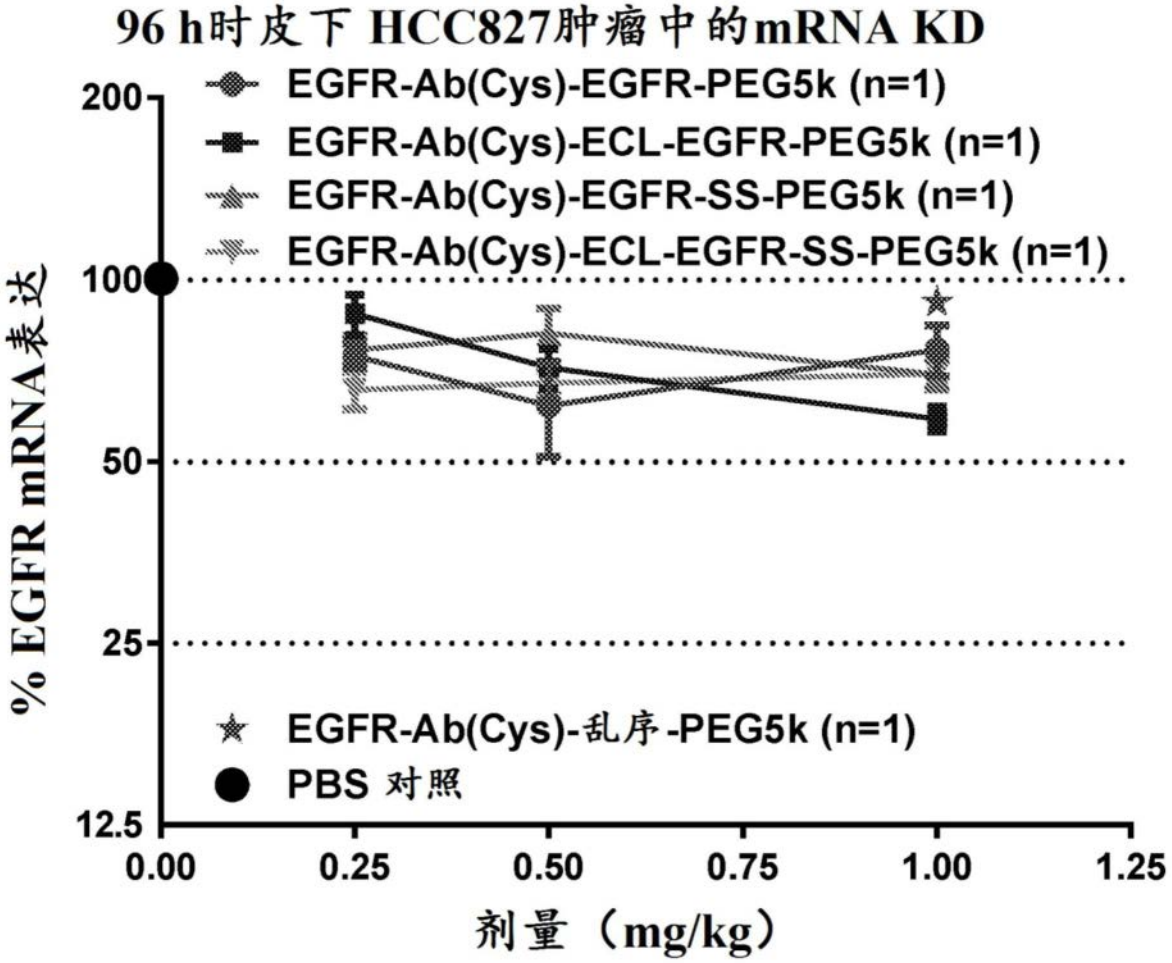

96 h时皮下 HCC827肿瘤中的mRNA KD
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
剂量（mg/kg）

图70A

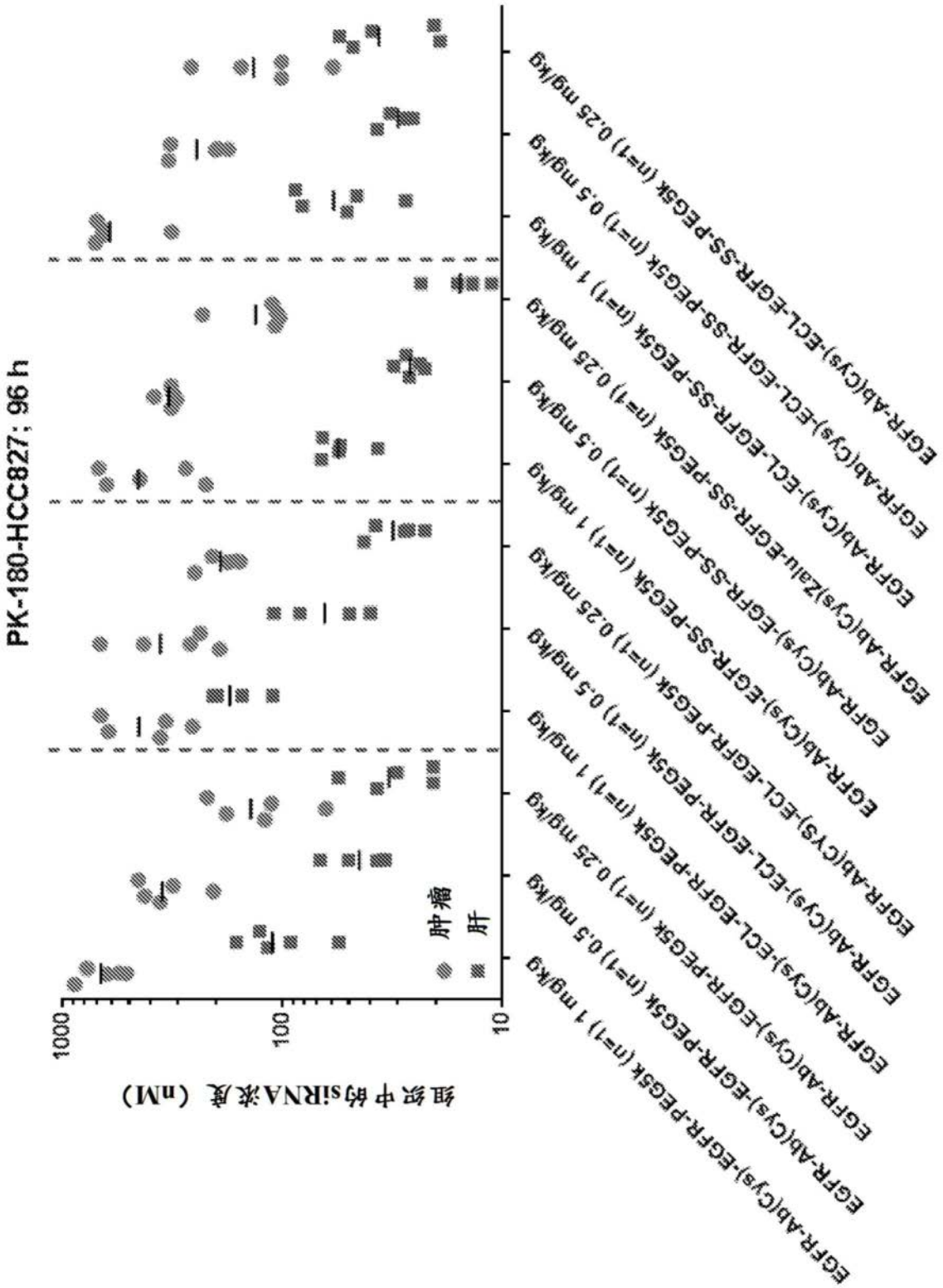

PK-180-HCC827; 96 h
组织中的siRNA浓度 (nM)
1000
100
10
肿瘤
肝
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)Zalu-EGFR-SS-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1) 0.25 mg/kg

图70B

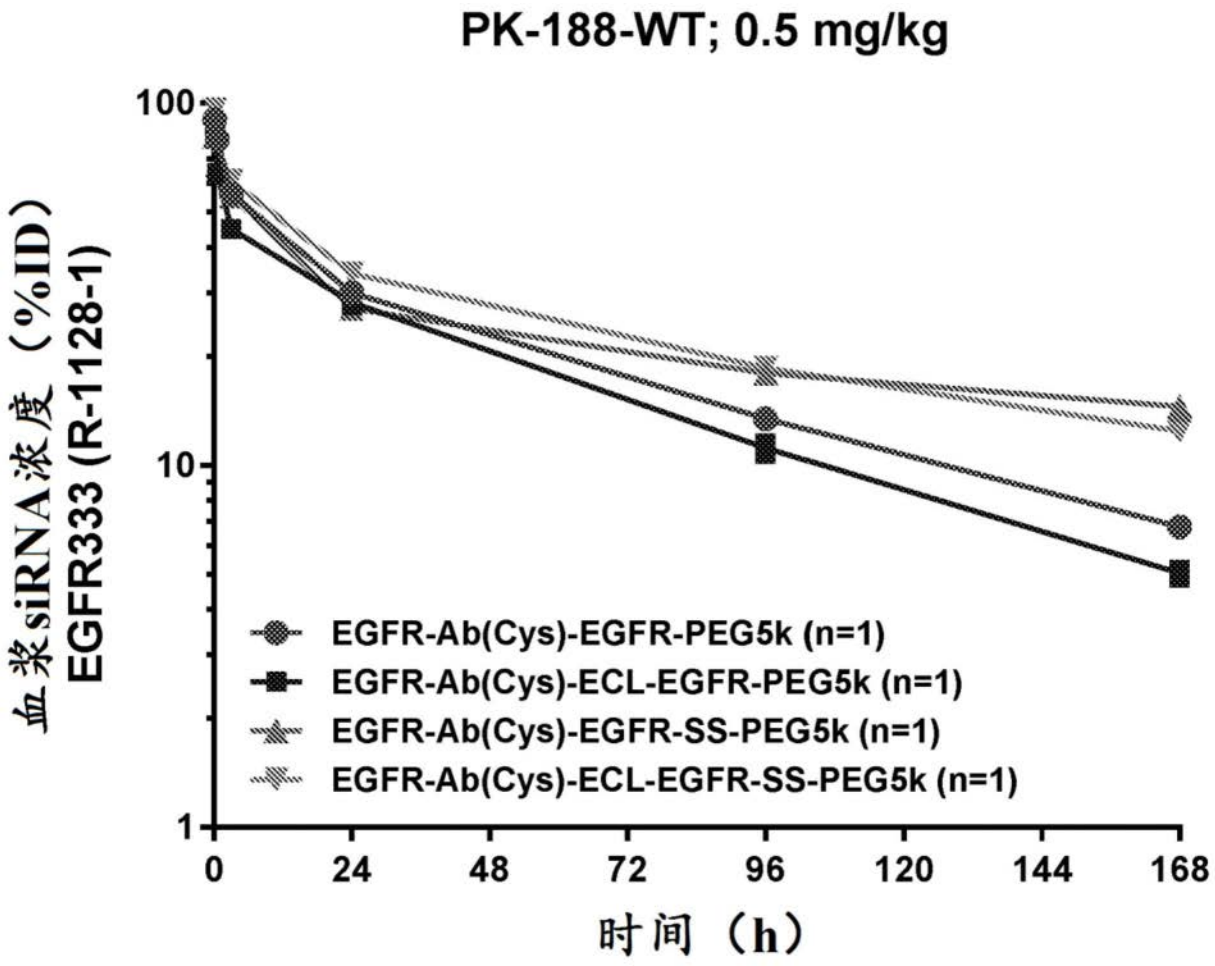

PK-188-WT; 0.5 mg/kg
血浆siRNA浓度（%ID）
EGFR333 (R-1128-1)
100
10
1
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1)

图70C

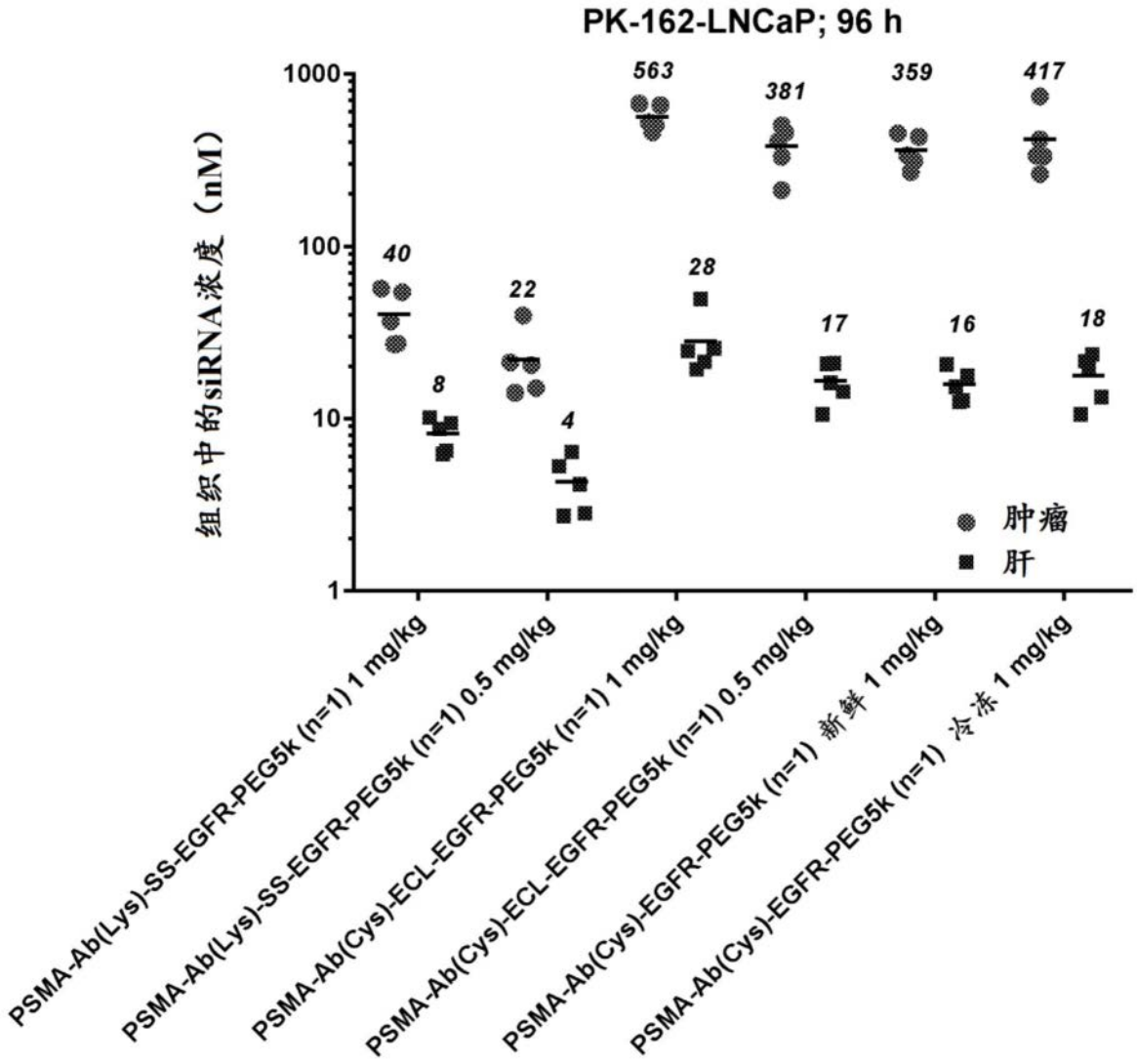

PK-162-LNCaP; 96 h
组织中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
1
563
381
359
417
40
8
22
4
28
17
16
18
肿瘤
肝
PSMA-Ab(Lys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Lys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 新鲜 1 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 冷冻 1 mg/kg

图71A

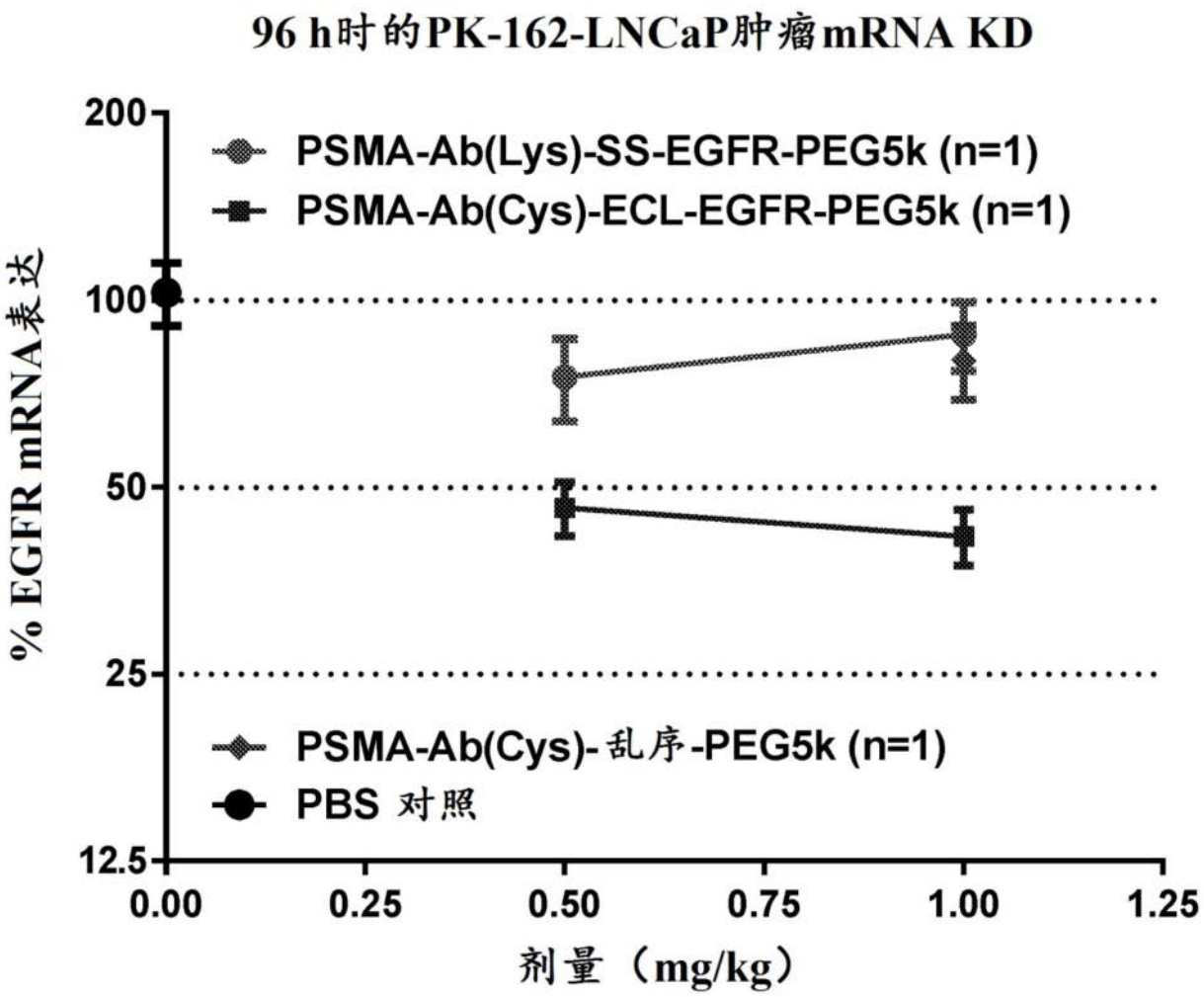

96 h时的PK-162-LNCaP肿瘤mRNA KD
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
PSMA-Ab(Lys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1)
PSMA-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)
PSMA-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
剂量（mg/kg）

图71B

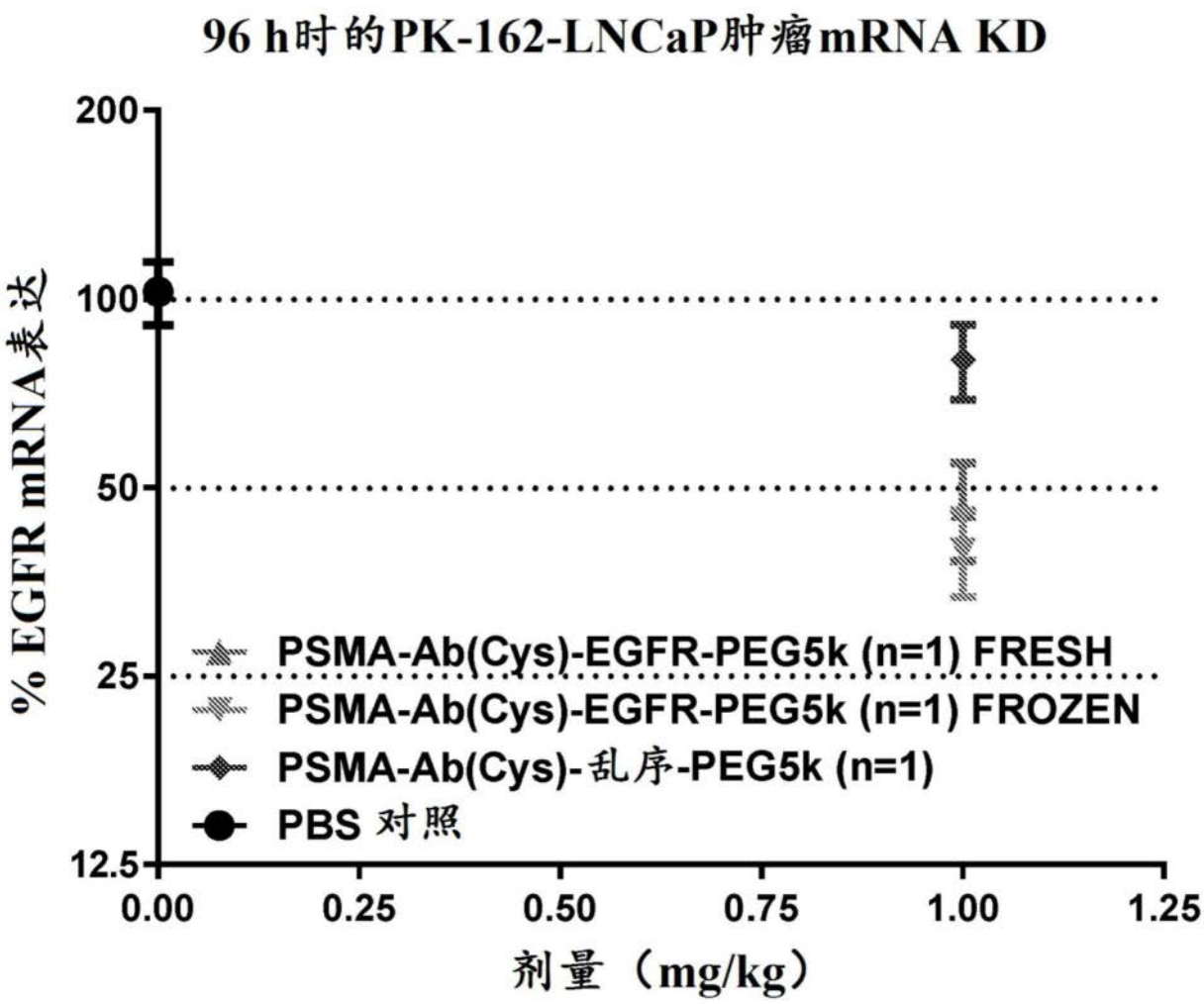

96 h时的PK-162-LNCaP肿瘤mRNA KD
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
剂量（mg/kg）
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) FRESH
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) FROZEN
PSMA-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图71C

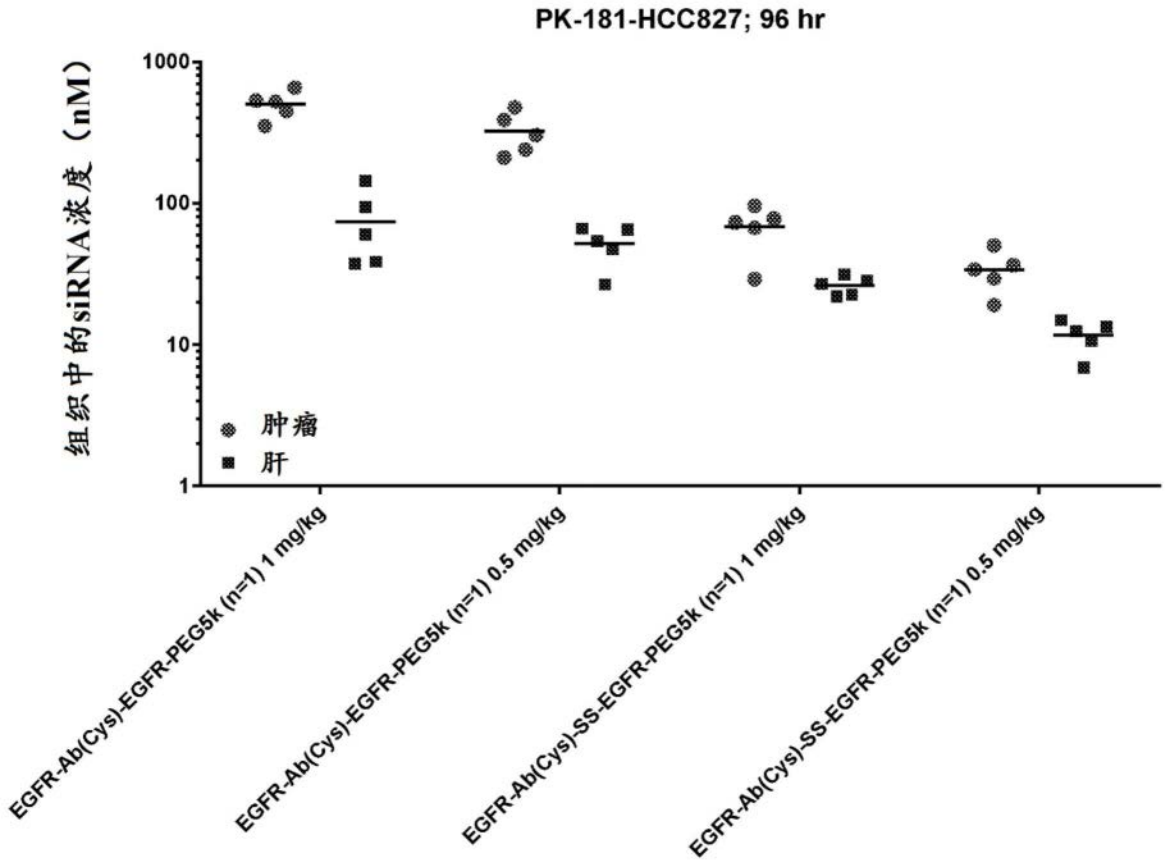

PK-181-HCC827; 96 hr
组织中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
1
肿瘤
肝
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg

图72A

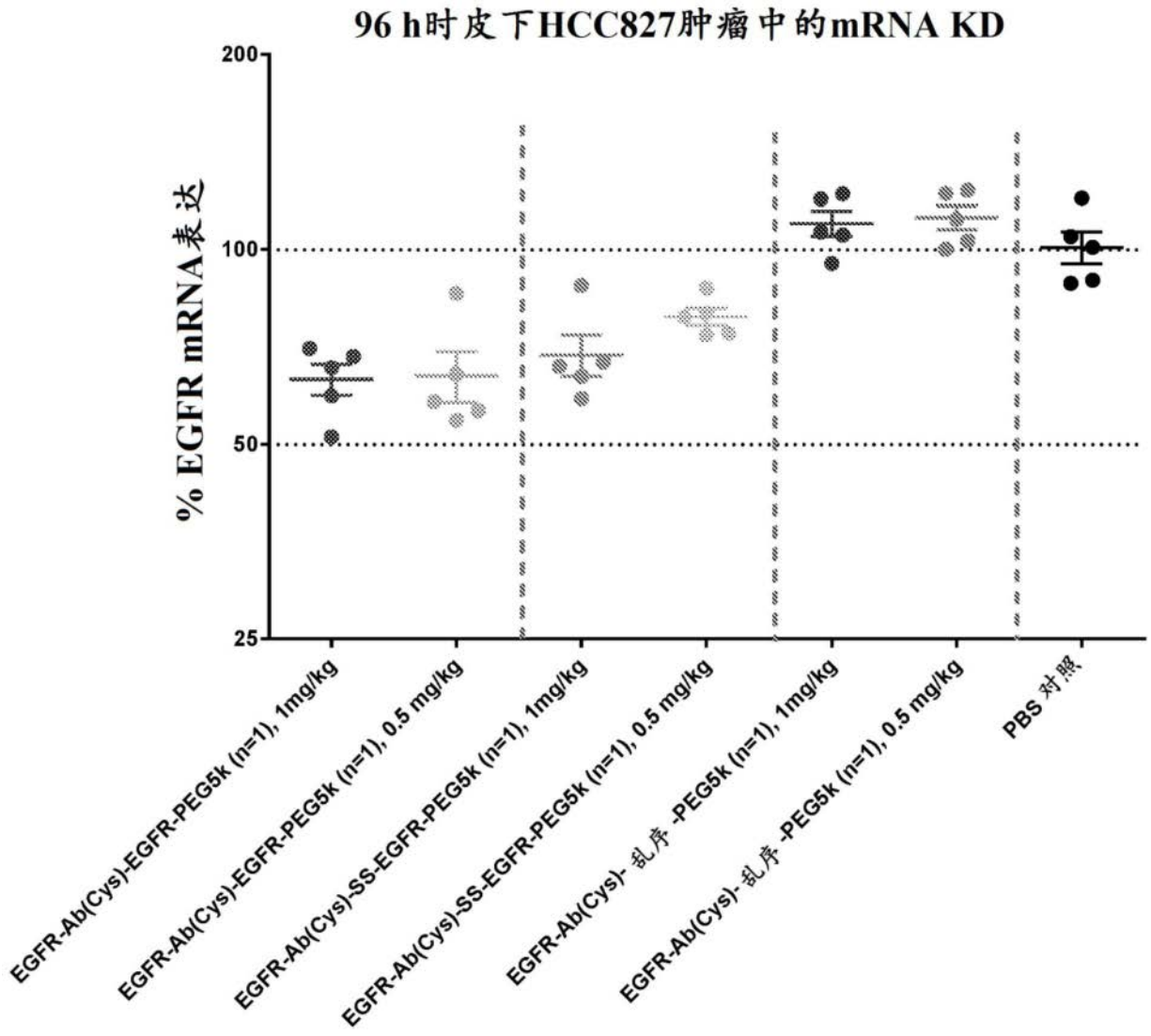

96 h时皮下HCC827肿瘤中的mRNA KD
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1), 1mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1), 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1), 1mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-SS-EGFR-PEG5k (n=1), 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)- 乱序 -PEG5k (n=1), 1mg/kg
EGFR-Ab(Cys)- 乱序 -PEG5k (n=1), 0.5 mg/kg
PBS 对照

图72B

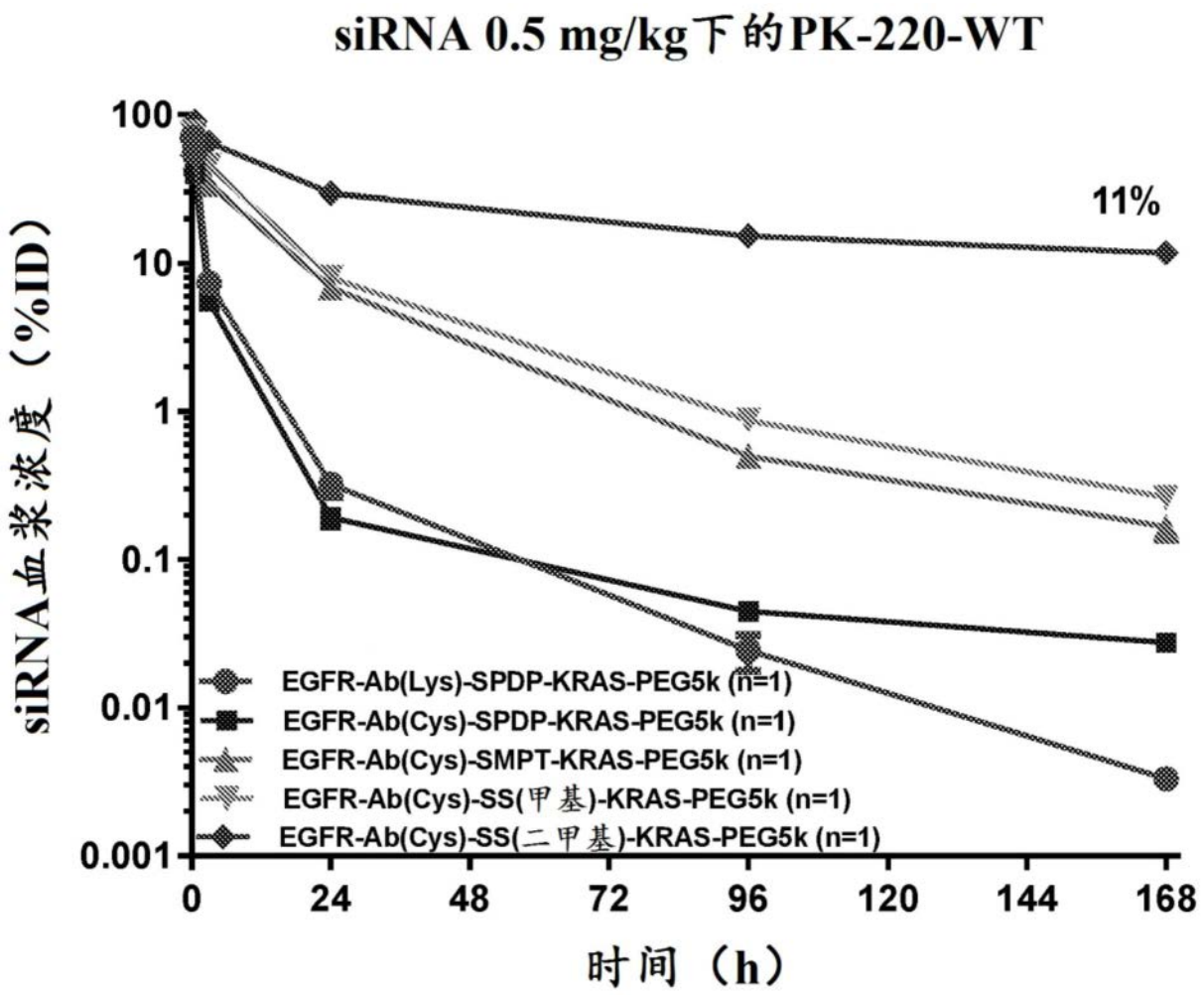

siRNA 0.5 mg/kg下的PK-220-WT
siRNA血浆浓度（%ID）
100
10
1
0.1
0.01
0.001
11%
EGFR-Ab(Lys)-SPDP-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-SPDP-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-SMPT-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-SS(甲基)-KRAS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-SS(二甲基)-KRAS-PEG5k (n=1)
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）

图73A

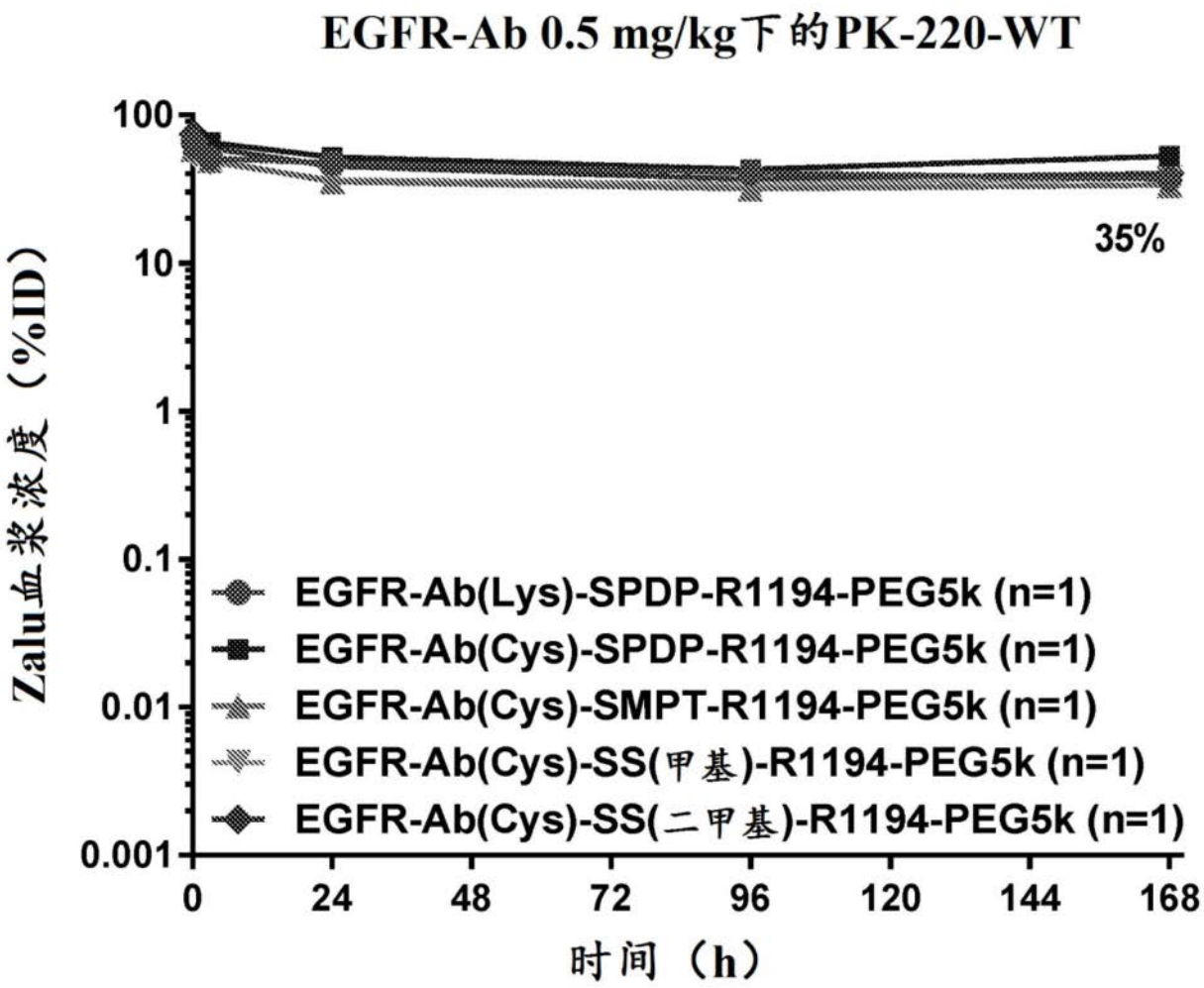

EGFR-Ab 0.5 mg/kg下的PK-220-WT
Zalu血浆浓度（%ID）
100
10
1
0.1
0.01
0.001
35%
EGFR-Ab(Lys)-SPDP-R1194-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-SPDP-R1194-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-SMPT-R1194-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-SS(甲基)-R1194-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-SS(二甲基)-R1194-PEG5k (n=1)
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）

图73B

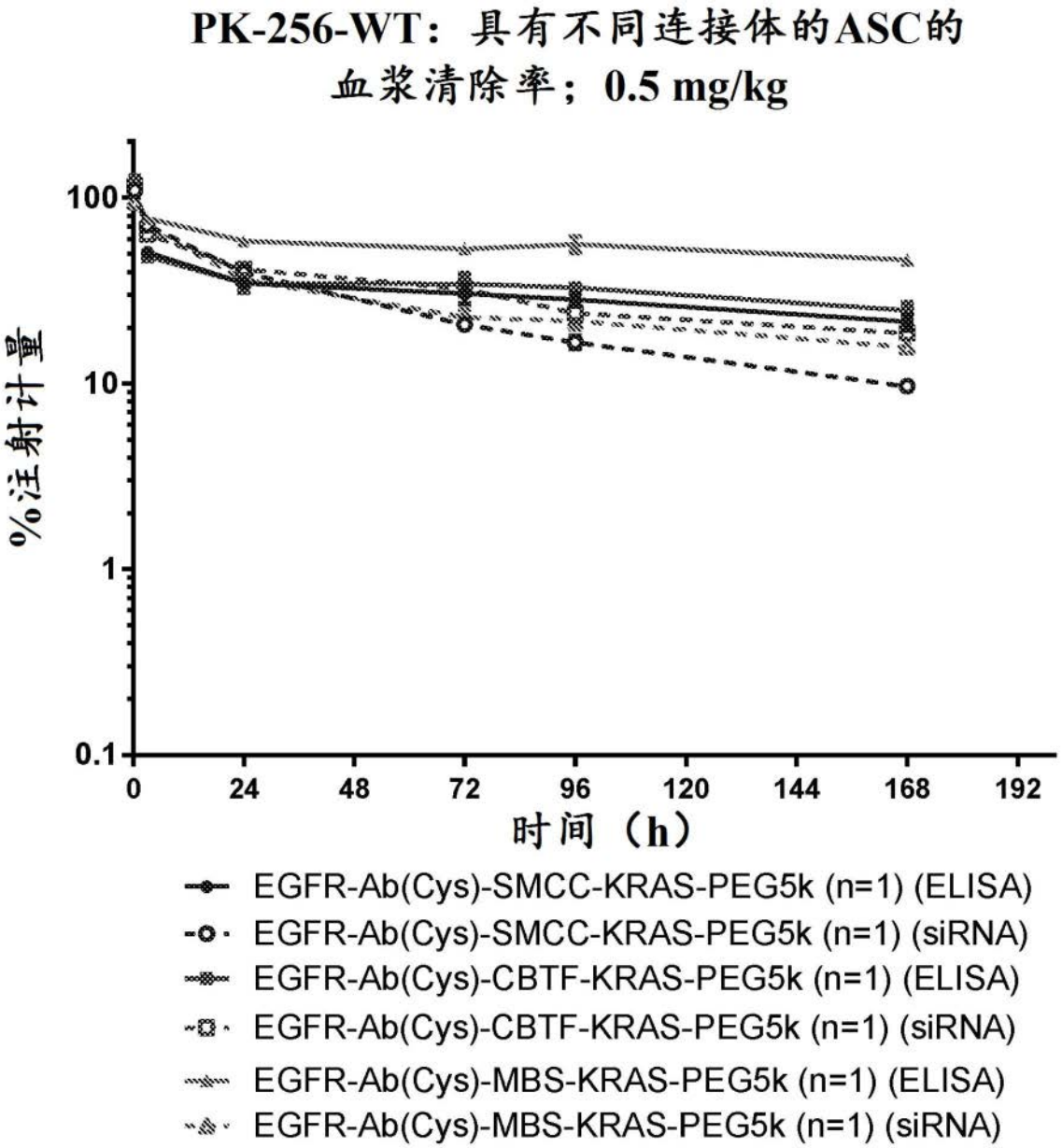

PK-256-WT：具有不同连接体的ASC的
血浆清除率；0.5 mg/kg
%注射计量
100
10
1
0.1
0
24
48
72
96
120
144
168
192
时间（h）
EGFR-Ab(Cys)-SMCC-KRAS-PEG5k (n=1) (ELISA)
EGFR-Ab(Cys)-SMCC-KRAS-PEG5k (n=1) (siRNA)
EGFR-Ab(Cys)-CBTF-KRAS-PEG5k (n=1) (ELISA)
EGFR-Ab(Cys)-CBTF-KRAS-PEG5k (n=1) (siRNA)
EGFR-Ab(Cys)-MBS-KRAS-PEG5k (n=1) (ELISA)
EGFR-Ab(Cys)-MBS-KRAS-PEG5k (n=1) (siRNA)

图74

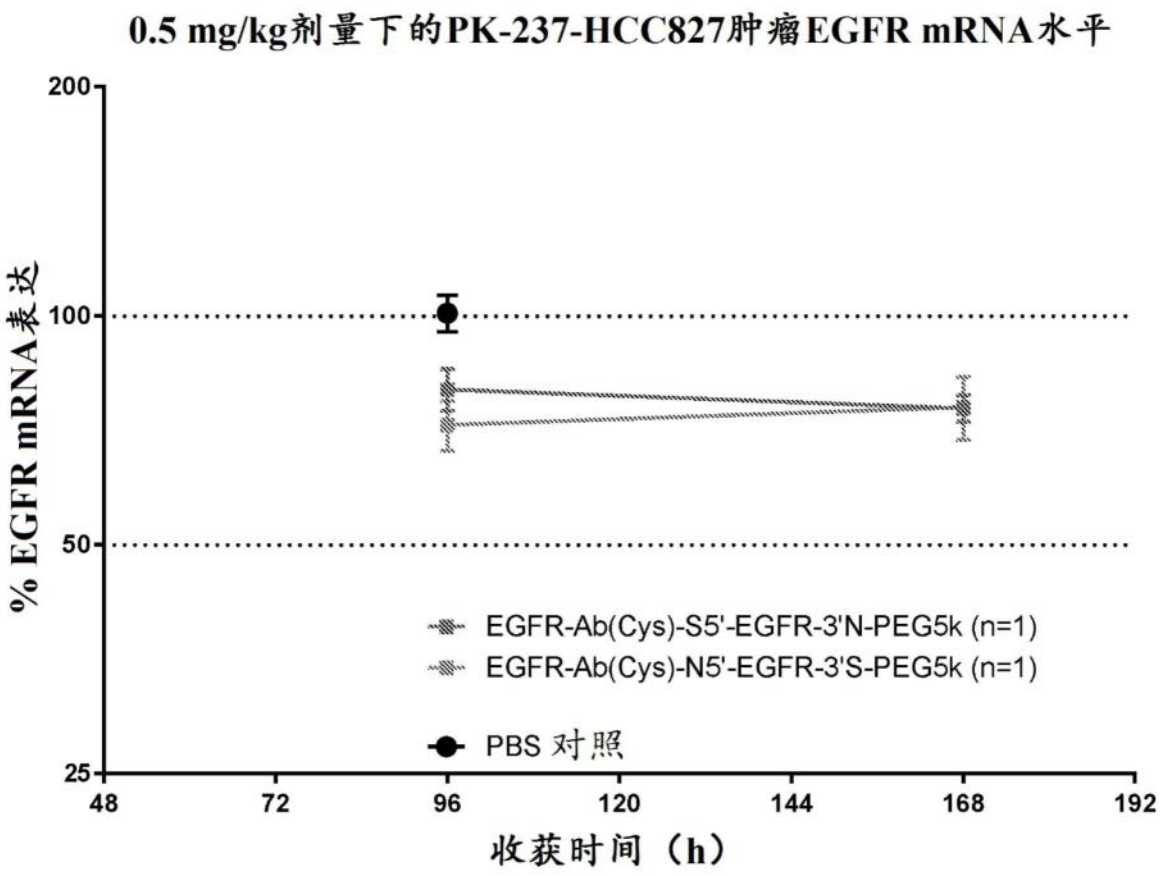

0.5 mg/kg剂量下的PK-237-HCC827肿瘤EGFR mRNA水平
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
48
72
96
120
144
168
192
收获时间（h）
EGFR-Ab(Cys)-S5'-EGFR-3'N-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图75A

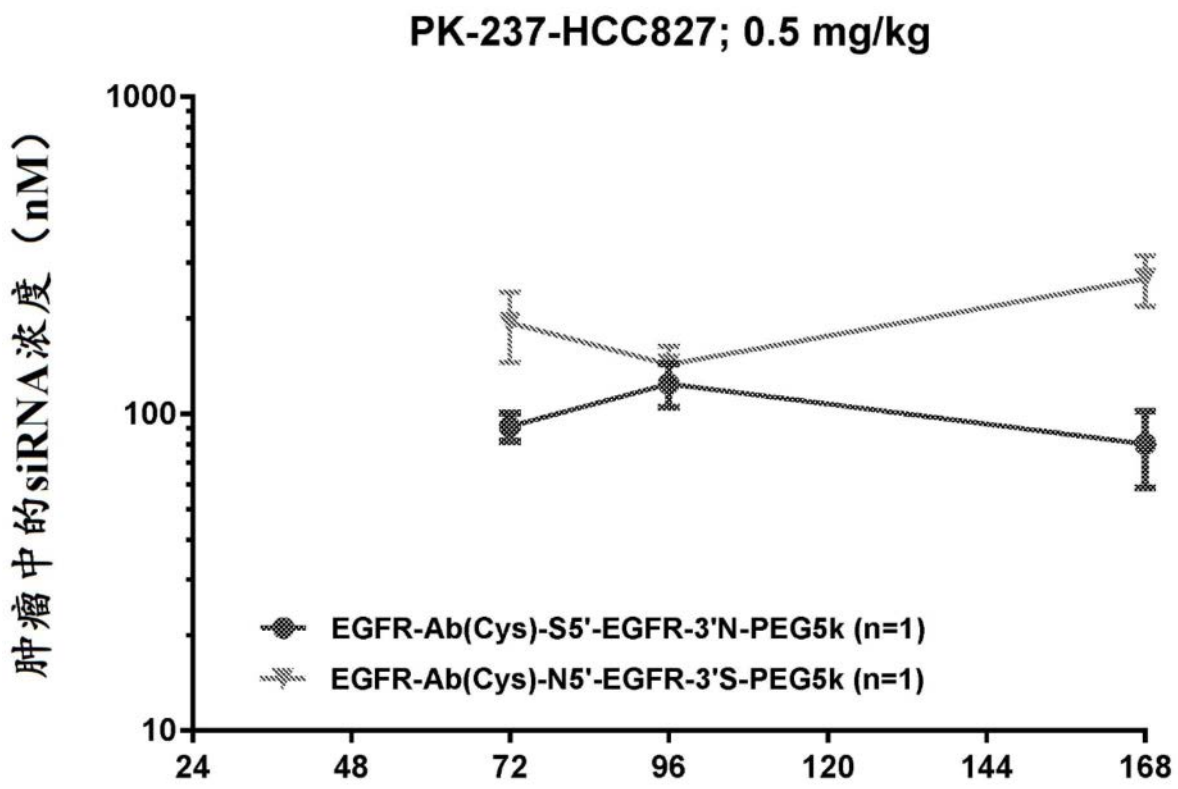

PK-237-HCC827; 0.5 mg/kg
肿瘤中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
24
48
72
96
120
144
168
EGFR-Ab(Cys)-S5'-EGFR-3'N-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)

图75B

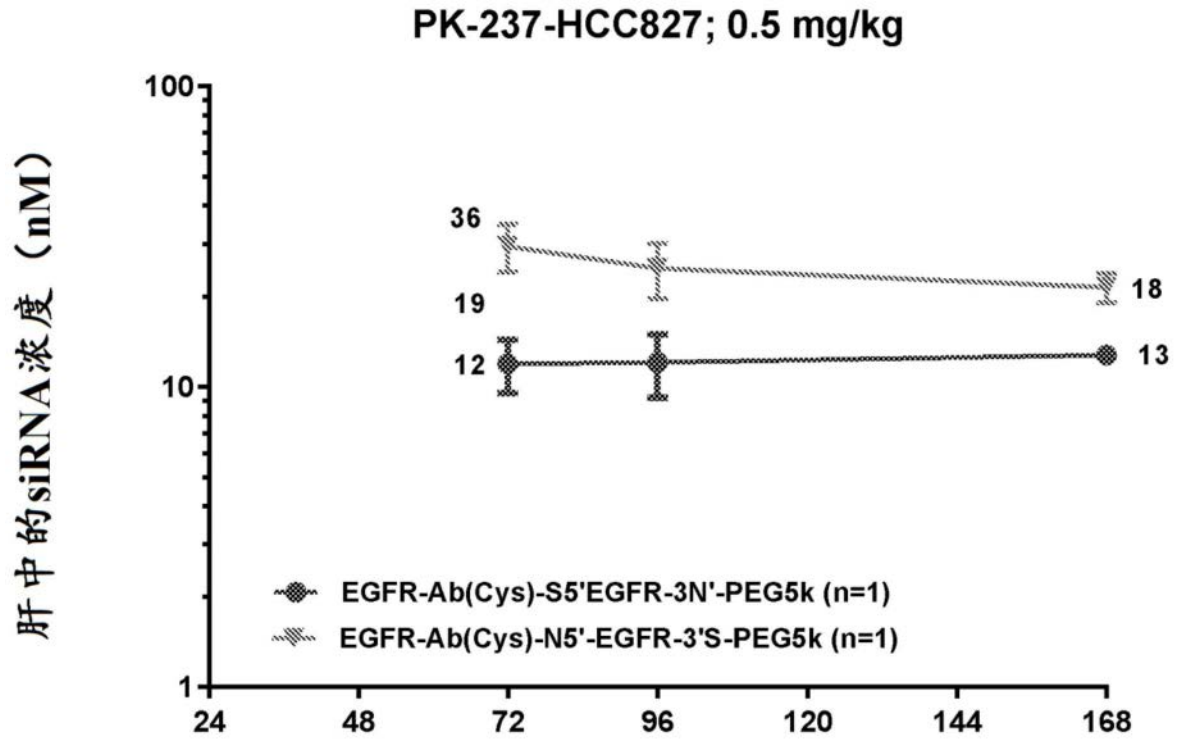

PK-237-HCC827; 0.5 mg/kg
肝中的siRNA浓度（nM）
100
10
1
24
48
72
96
120
144
168
36
19
12
18
13
EGFR-Ab(Cys)-S5'EGFR-3N'-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)

图75C

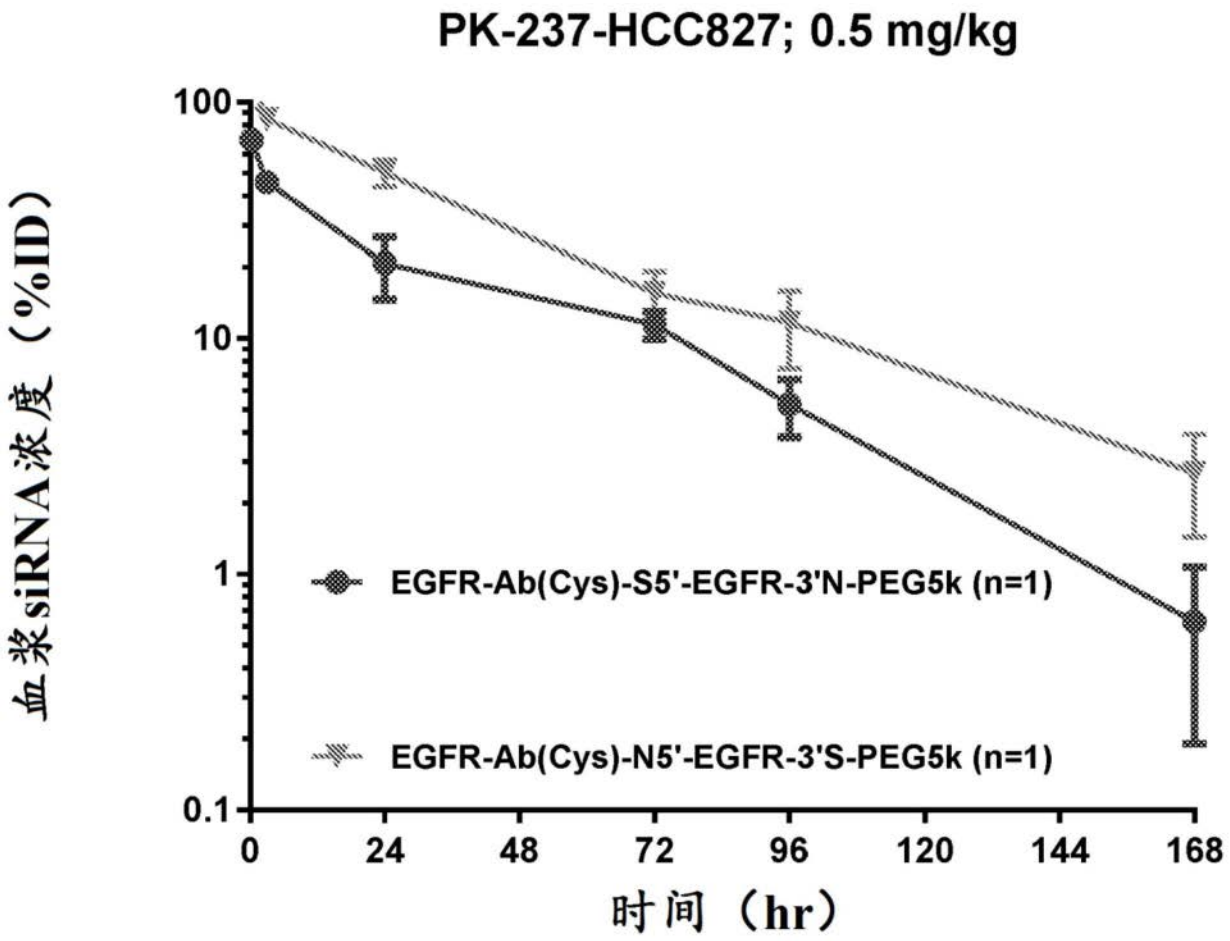

PK-237-HCC827; 0.5 mg/kg
血浆siRNA浓度（%ID）
100
10
1
0.1
EGFR-Ab(Cys)-S5'-EGFR-3'N-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-N5'-EGFR-3'S-PEG5k (n=1)
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（hr）

图75D

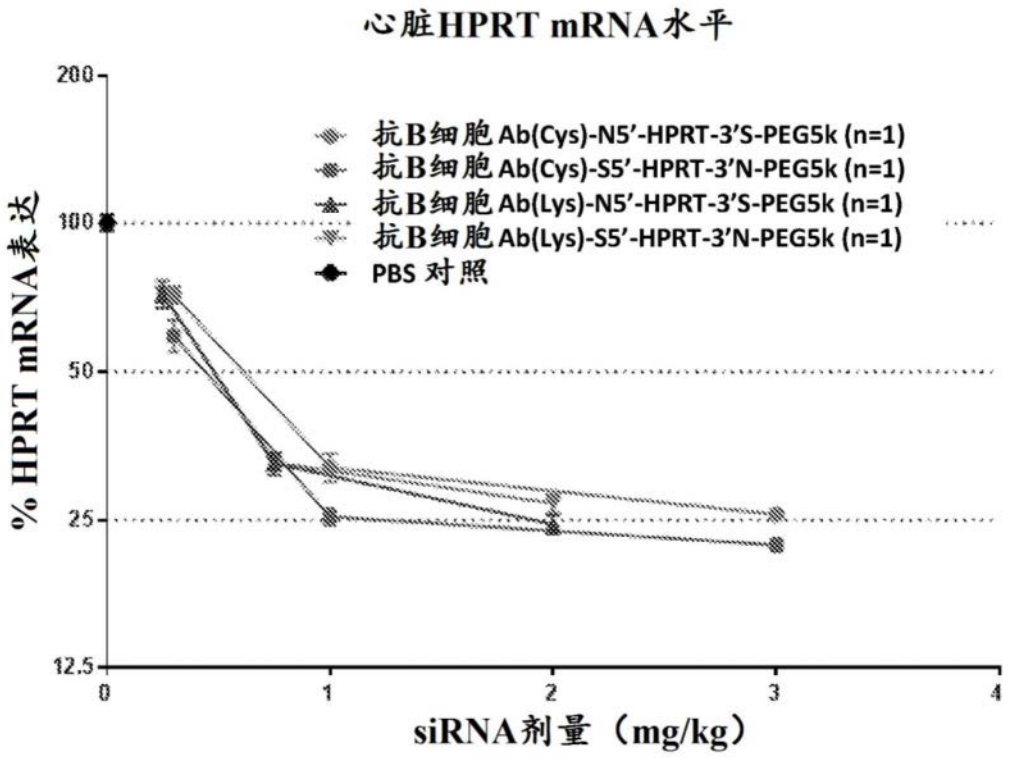

心脏HPRT mRNA水平
抗B细胞 Ab(Cys)-N5′-HPRT-3′S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-S5′-HPRT-3′N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-N5′-HPRT-3′S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5′-HPRT-3′N-PEG5k (n=1)
PBS 对照
% HPRT mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0
1
2
3
4
siRNA剂量（mg/kg）

图76A

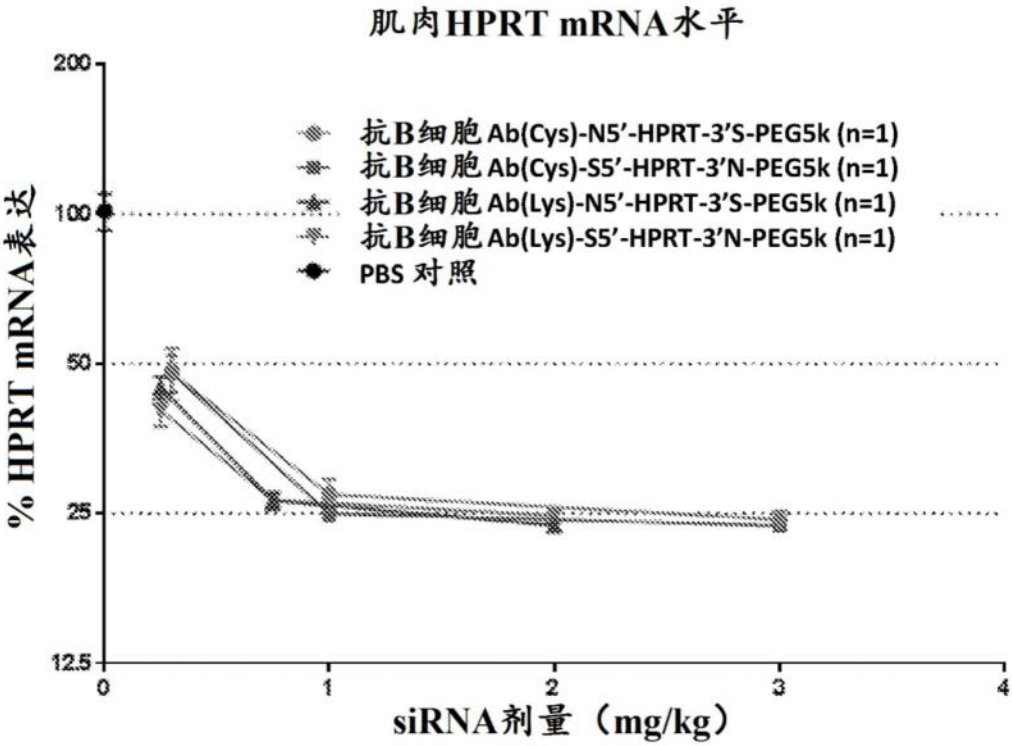

肌肉HPRT mRNA水平
抗B细胞 Ab(Cys)-N5′-HPRT-3′S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-S5′-HPRT-3′N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-N5′-HPRT-3′S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5′-HPRT-3′N-PEG5k (n=1)
PBS 对照
% HPRT mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0
1
2
3
4
siRNA剂量（mg/kg）

图76B

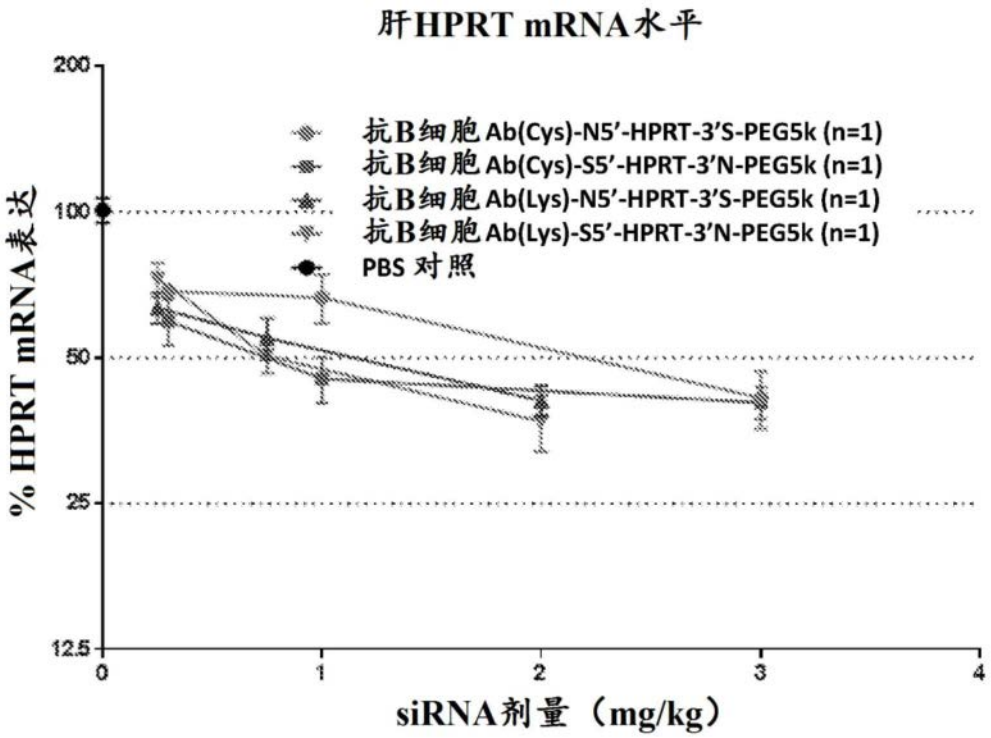

肝HPRT mRNA水平
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)
PBS 对照
% HPRT mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0
1
2
3
4
siRNA剂量（mg/kg）

图76C

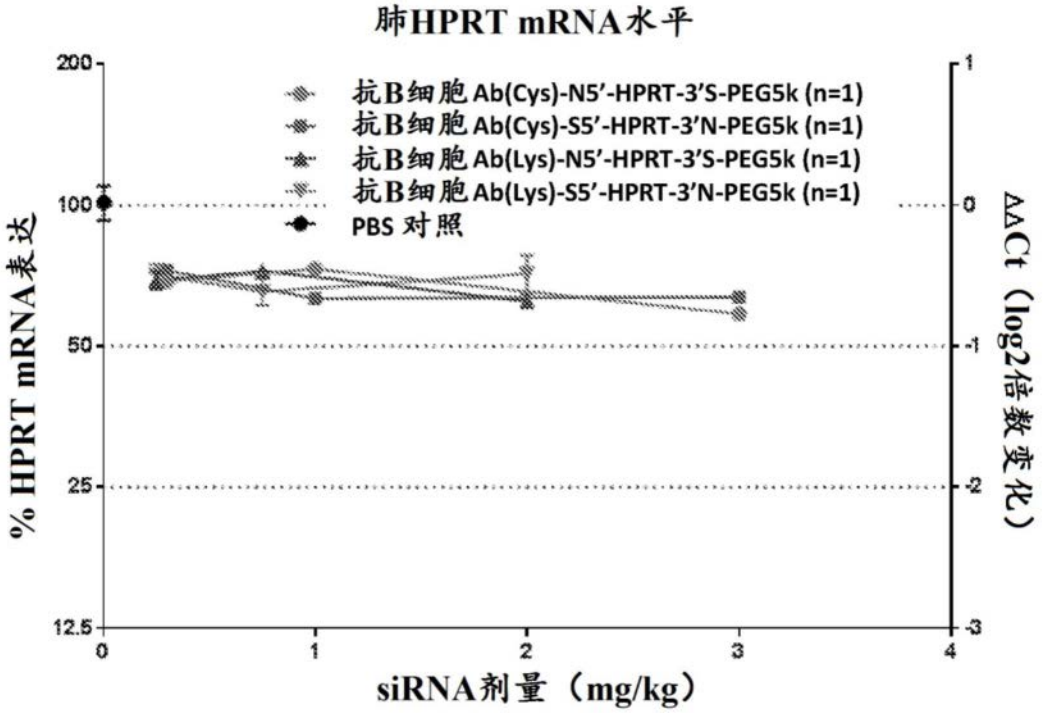

肺HPRT mRNA水平
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)
PBS 对照
% HPRT mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0
1
2
3
4
ΔΔCt（log2倍数变化）
1
0
-1
-2
-3
siRNA剂量（mg/kg）

图76D

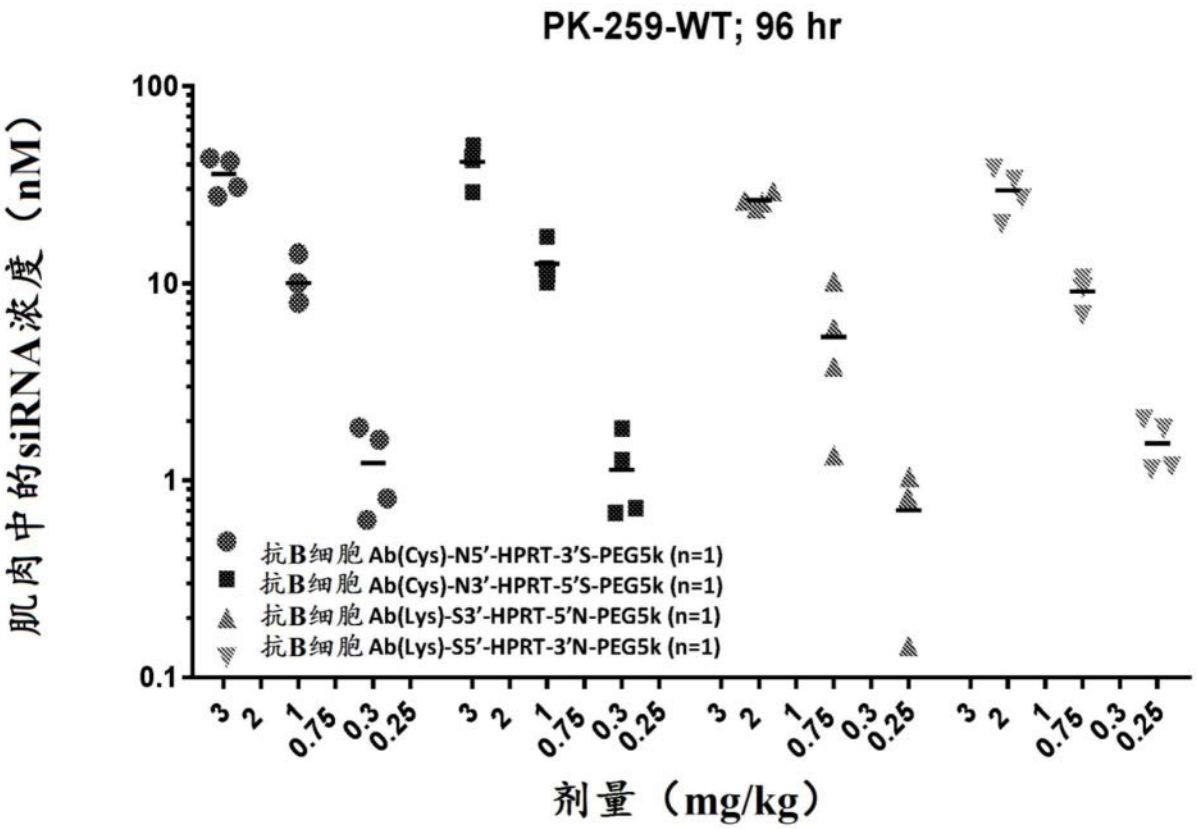

PK-259-WT; 96 hr
肌肉中的siRNA浓度（nM）
100
10
1
0.1
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-N3'-HPRT-5'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)
3 2 1 0.75 0.3 0.25
剂量（mg/kg）

图77A

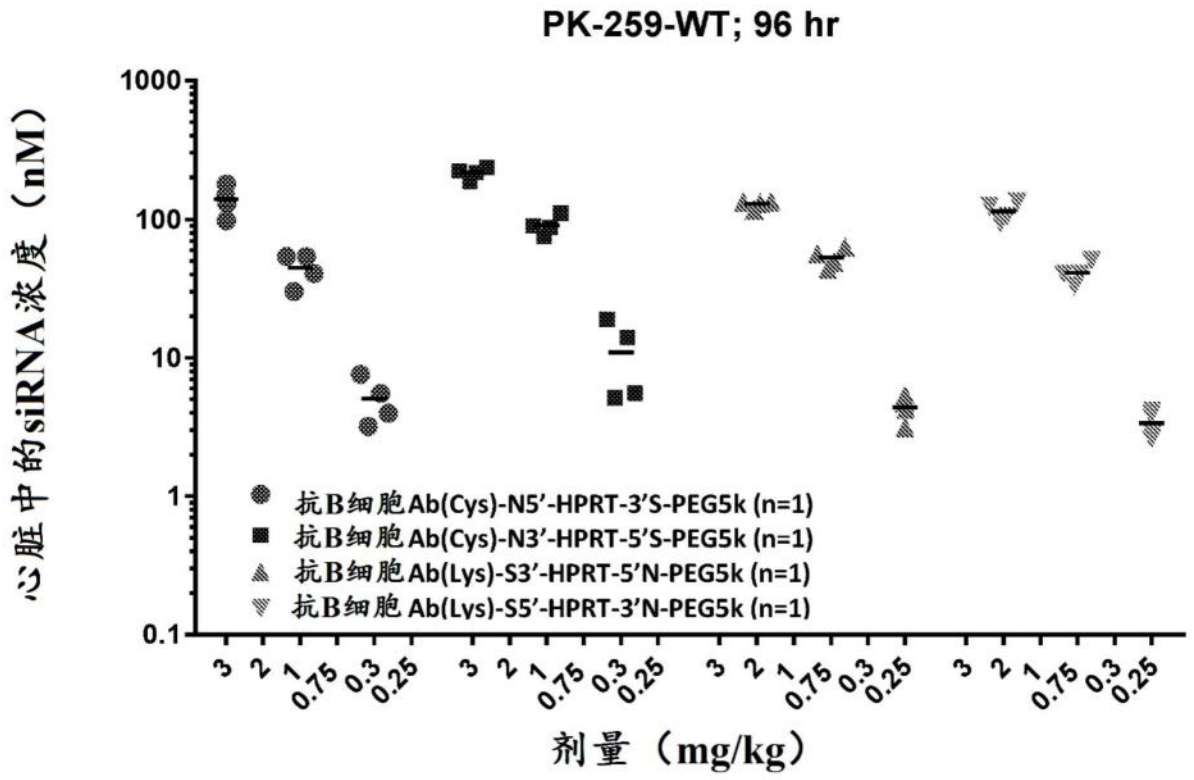

PK-259-WT; 96 hr
心脏中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
1
0.1
抗B细胞Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞Ab(Cys)-N3'-HPRT-5'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-PEG5k (n=1)
抗B细胞Ab(Lys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)
3 2 1 0.75 0.3 0.25
剂量（mg/kg）

图77B

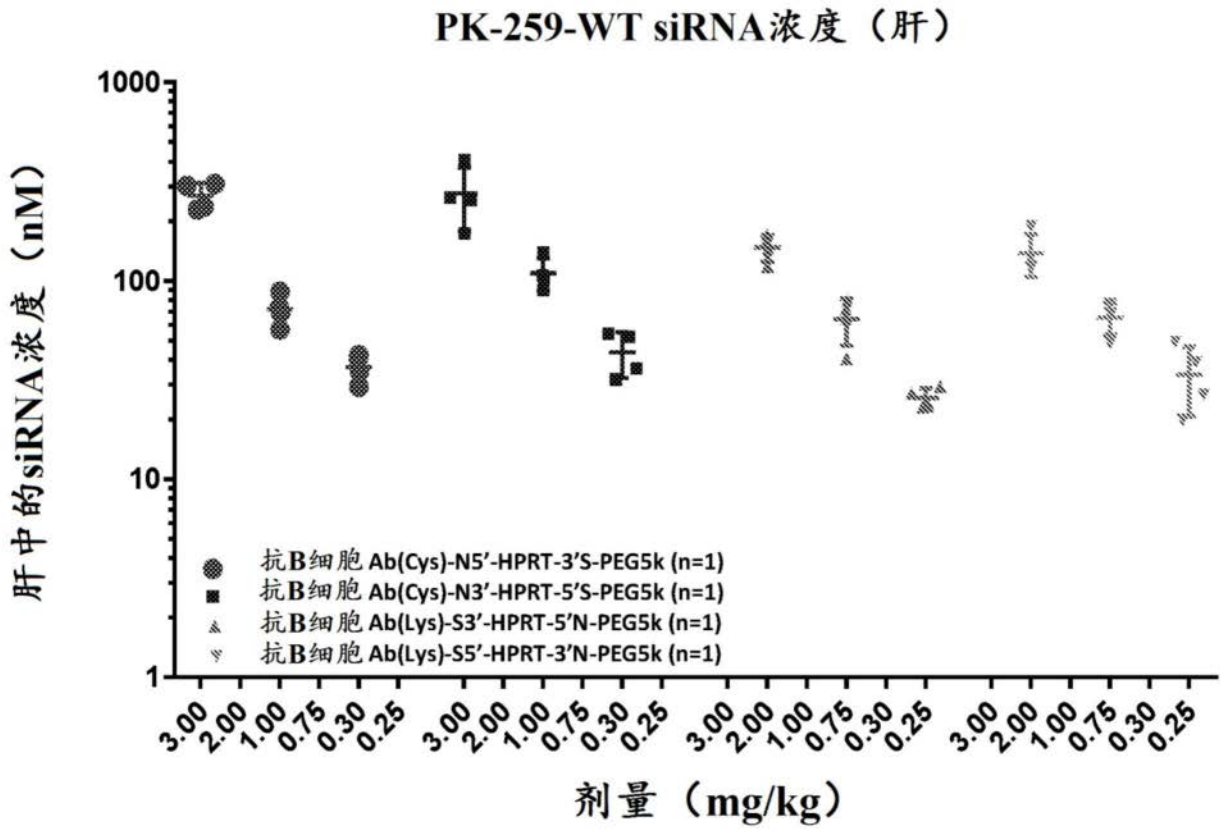

PK-259-WT siRNA浓度（肝）
肝中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
1
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-N3'-HPRT-5'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5'-HPRT-3'N-PEG5k (n=1)
3.00 2.00 1.00 0.75 0.30 0.25
剂量（mg/kg）

图77C

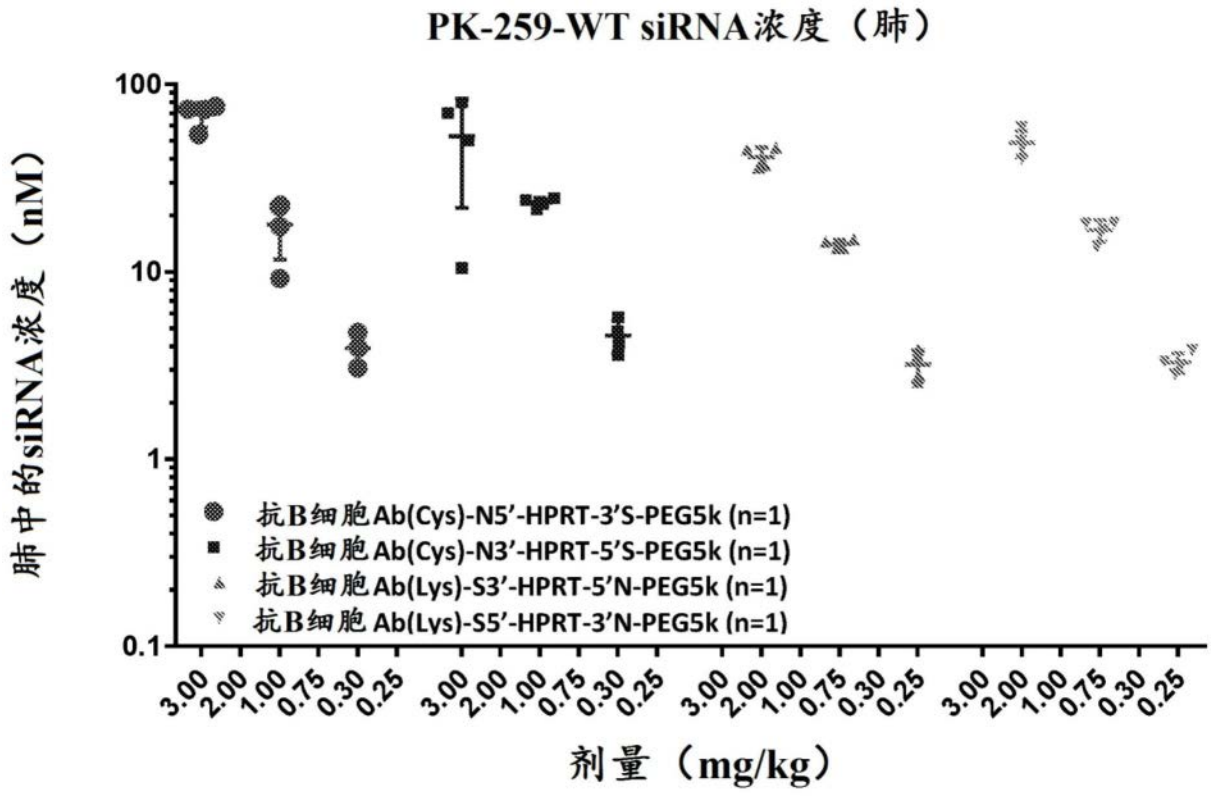

PK-259-WT siRNA浓度（肺）
肺中的siRNA浓度（nM）
100
10
1
0.1
抗B细胞Ab(Cys)-N5′-HPRT-3′S-PEG5k (n=1)
抗B细胞Ab(Cys)-N3′-HPRT-5′S-PEG5k (n=1)
抗B细胞Ab(Lys)-S3′-HPRT-5′N-PEG5k (n=1)
抗B细胞Ab(Lys)-S5′-HPRT-3′N-PEG5k (n=1)
3.00 2.00 1.00 0.75 0.30 0.25
剂量（mg/kg）

图77D

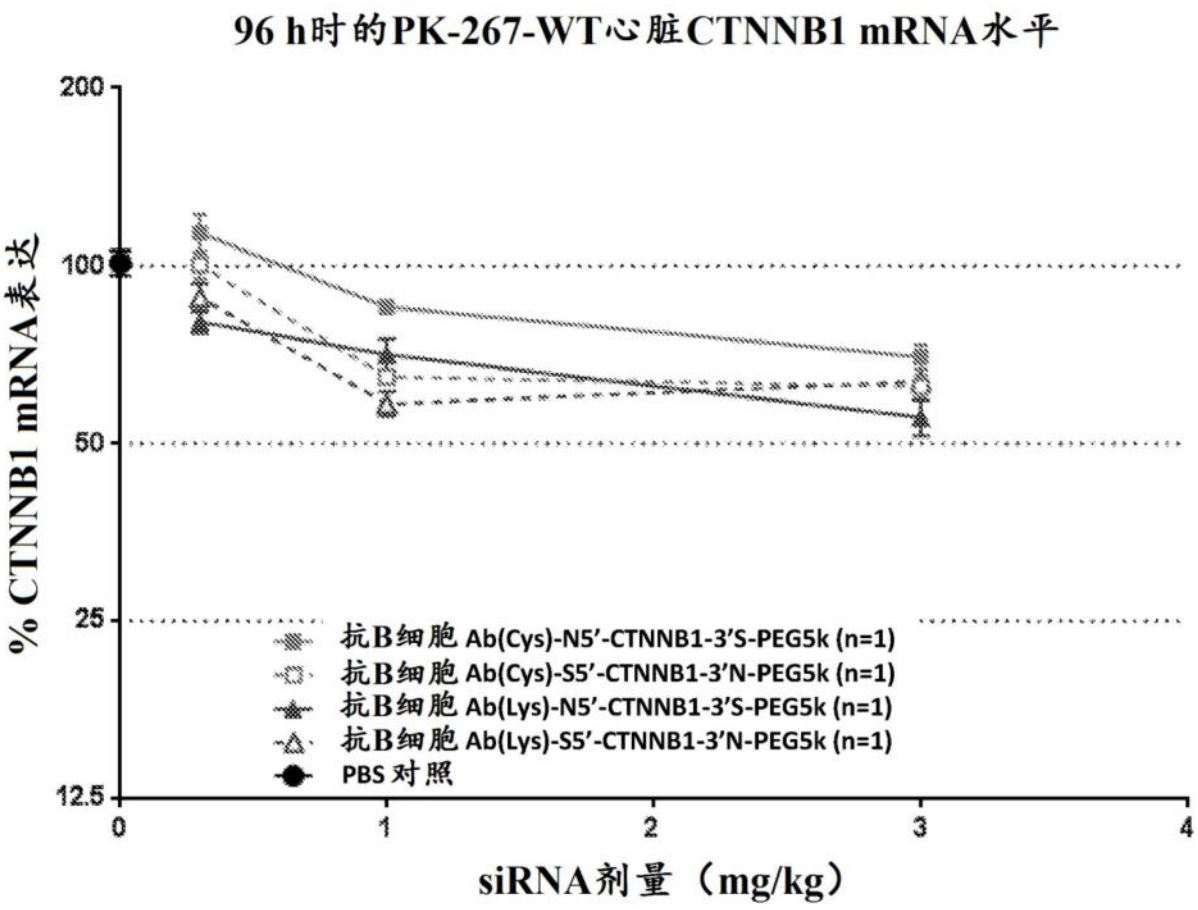

96 h时的PK-267-WT心脏CTNNB1 mRNA水平
% CTNNB1 mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0
1
2
3
4
siRNA剂量（mg/kg）
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图78A

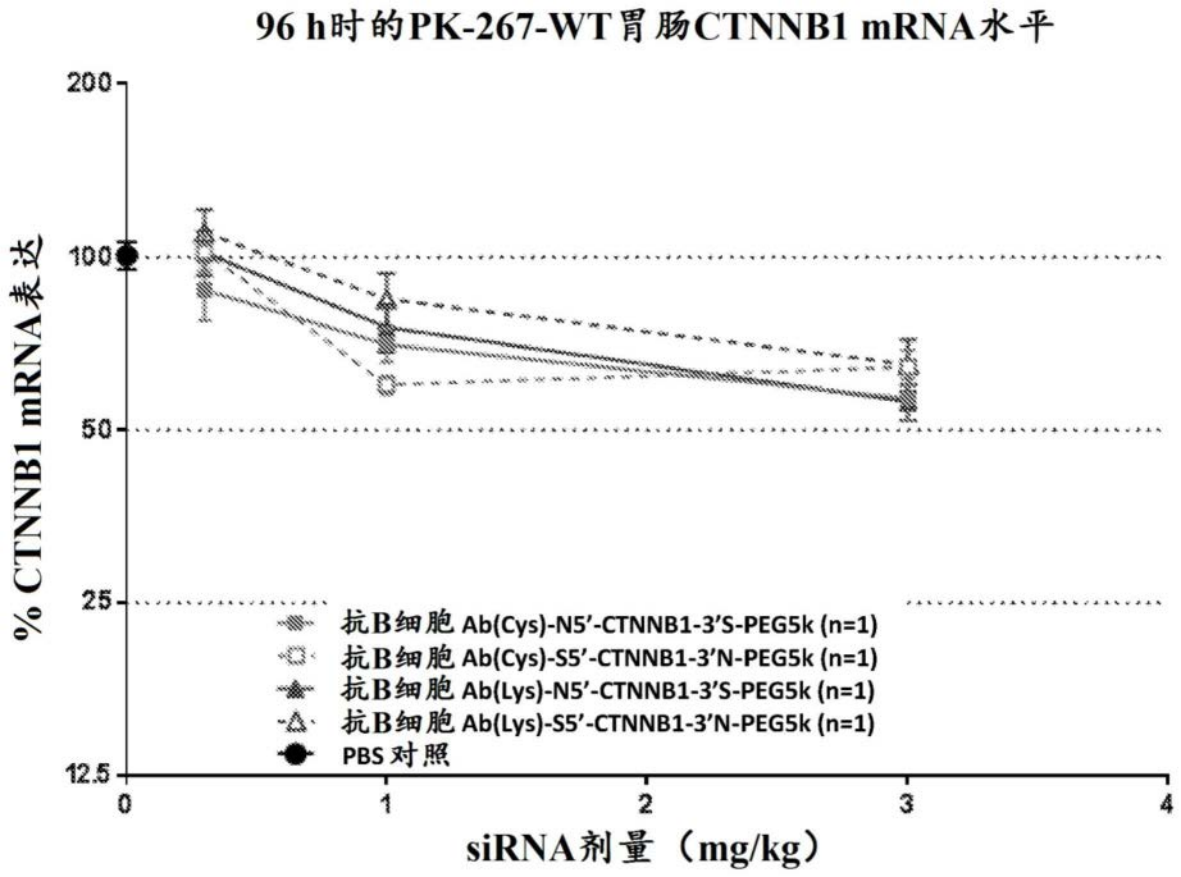

96 h时的PK-267-WT胃肠CTNNB1 mRNA水平
% CTNNB1 mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0
1
2
3
4
siRNA剂量（mg/kg）
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图78B

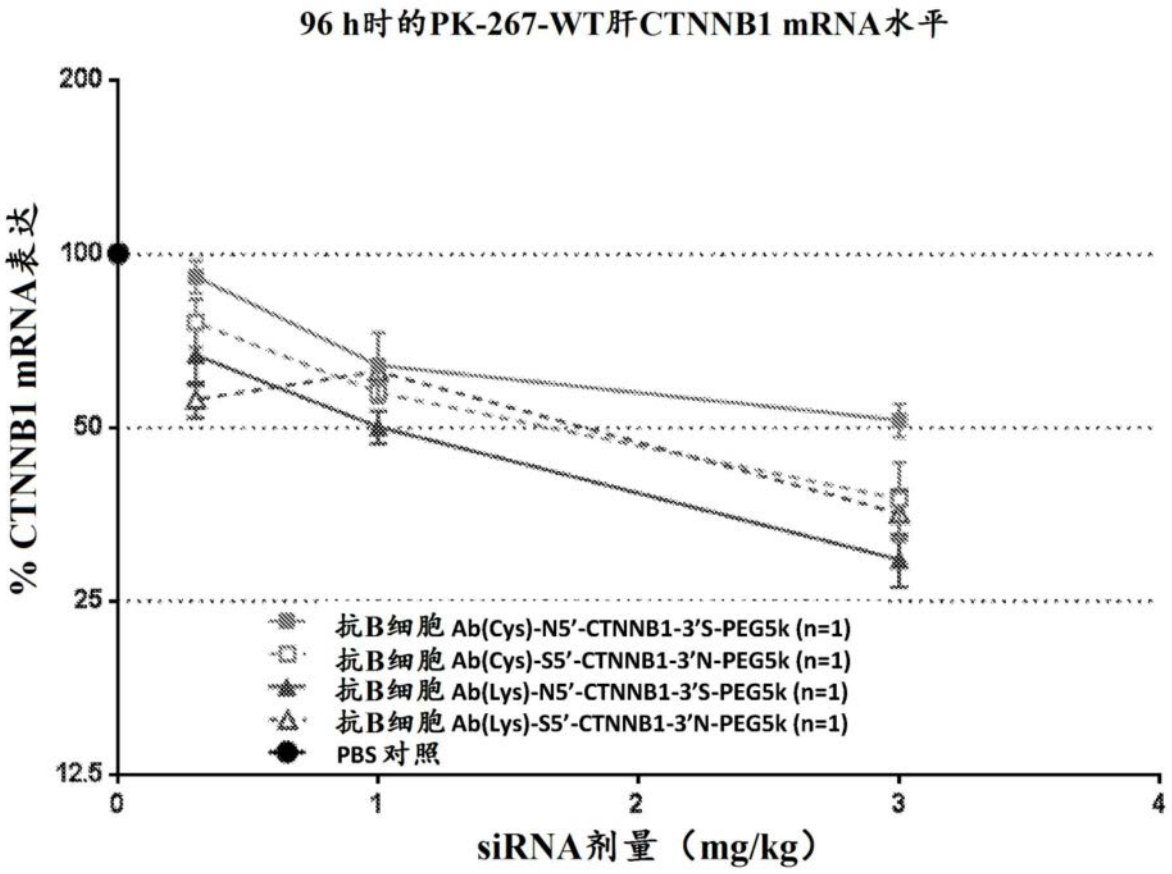

96 h时的PK-267-WT肝CTNNB1 mRNA水平
% CTNNB1 mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0
1
2
3
4
siRNA剂量（mg/kg）
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-N5'-CTNNB1-3'S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5'-CTNNB1-3'N-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图78C

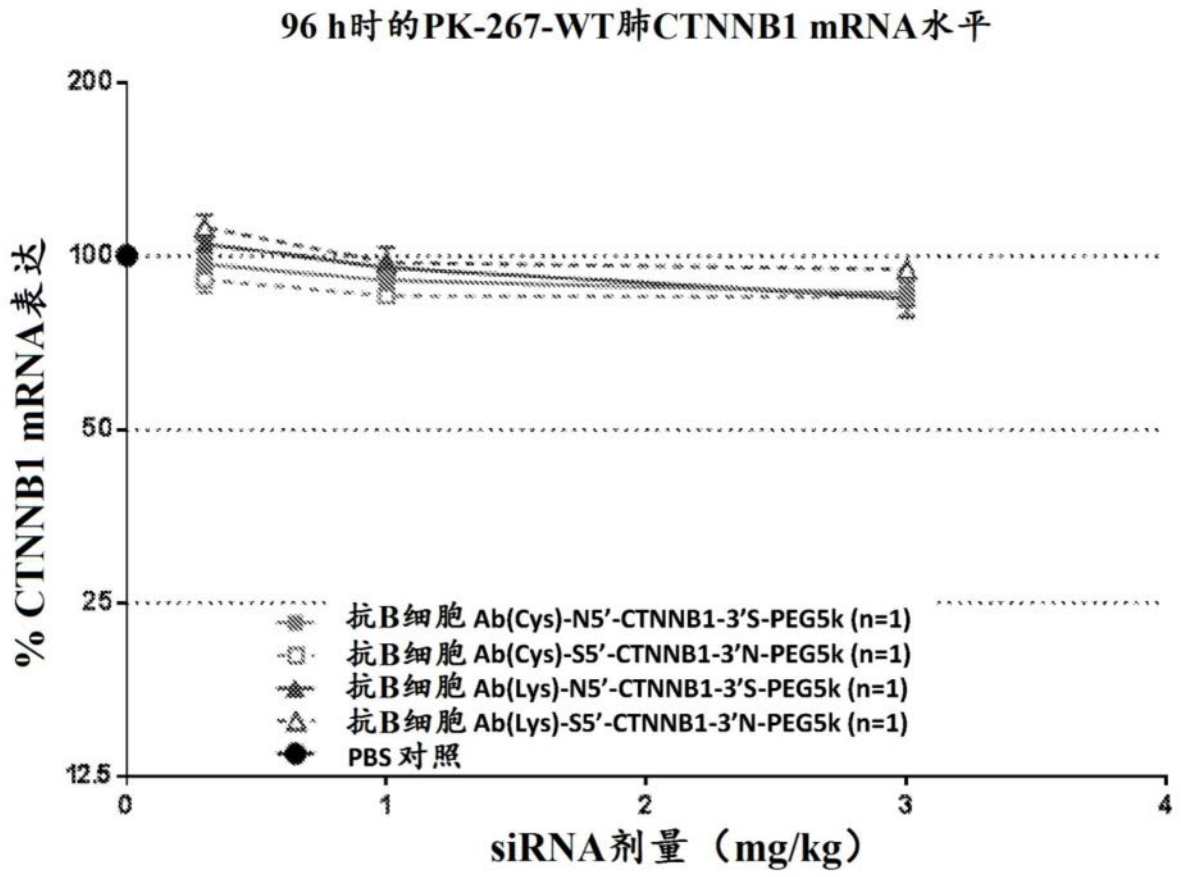

96 h时的PK-267-WT肺CTNNB1 mRNA水平
% CTNNB1 mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0
1
2
3
4
siRNA剂量（mg/kg）
抗B细胞 Ab(Cys)-N5′-CTNNB1-3′S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Cys)-S5′-CTNNB1-3′N-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-N5′-CTNNB1-3′S-PEG5k (n=1)
抗B细胞 Ab(Lys)-S5′-CTNNB1-3′N-PEG5k (n=1)
PBS 对照

图78D

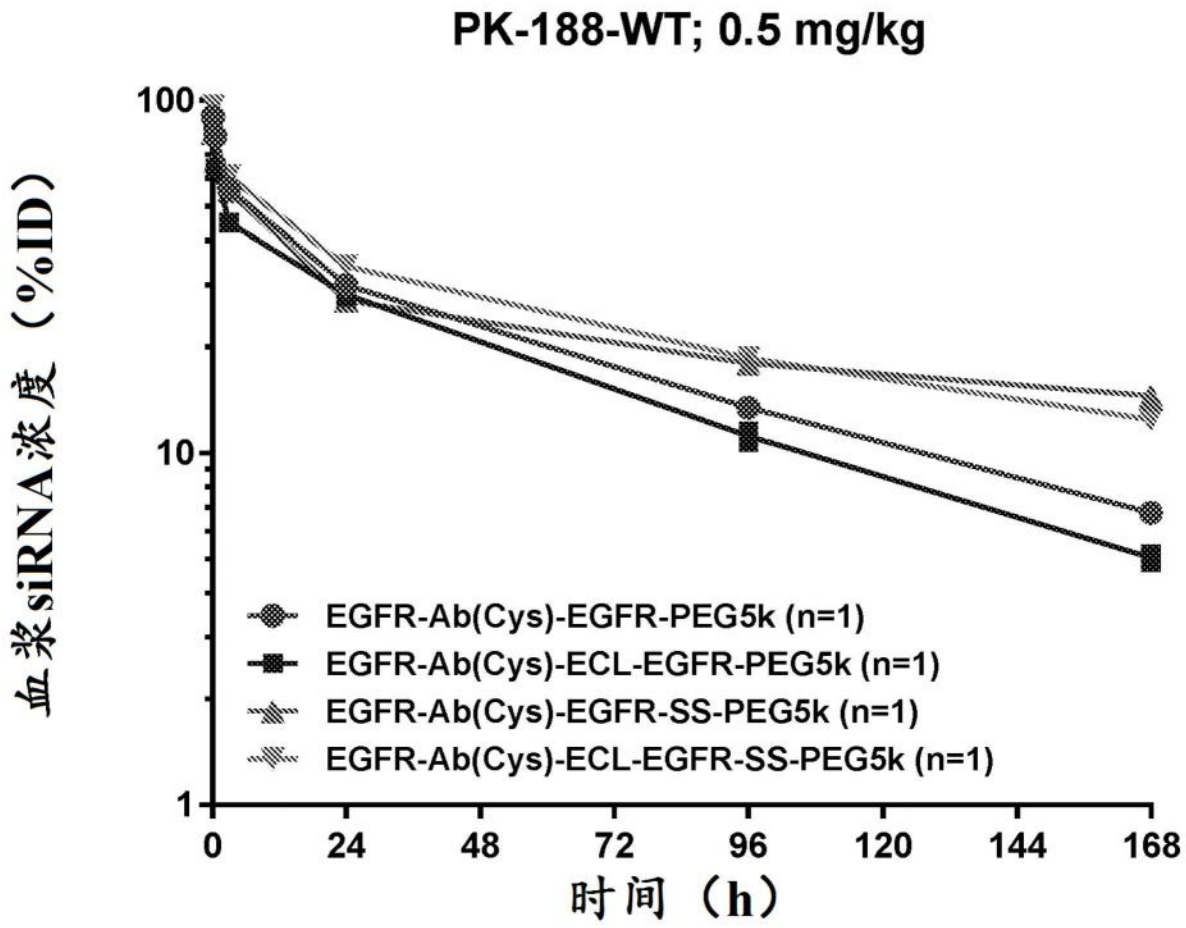

PK-188-WT; 0.5 mg/kg
血浆siRNA浓度（%ID）
100
10
1
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-ECL-EGFR-SS-PEG5k (n=1)

图79

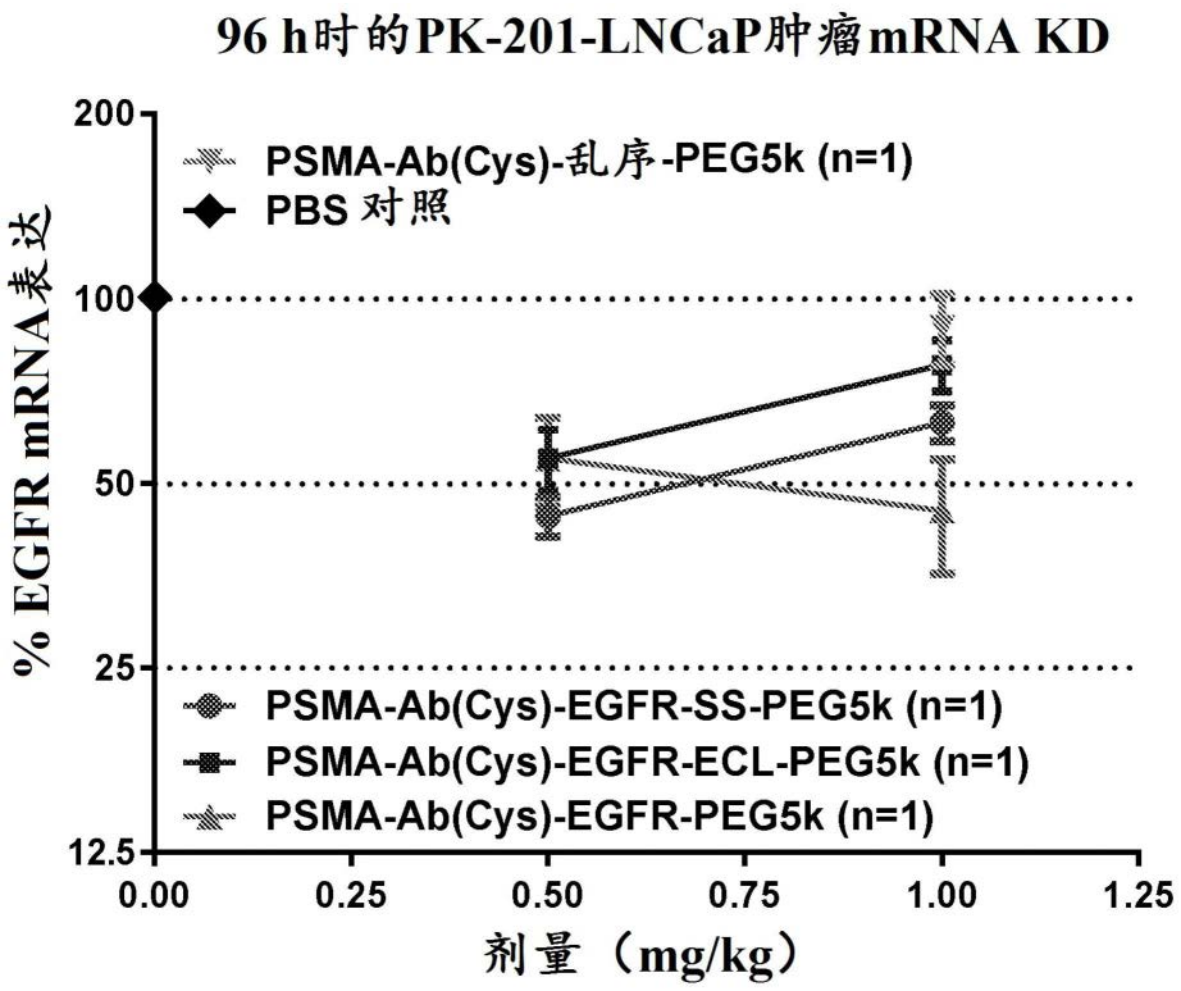

96 h时的PK-201-LNCaP肿瘤mRNA KD
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
PSMA-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1)
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-ECL-PEG5k (n=1)
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
剂量（mg/kg）

图80A

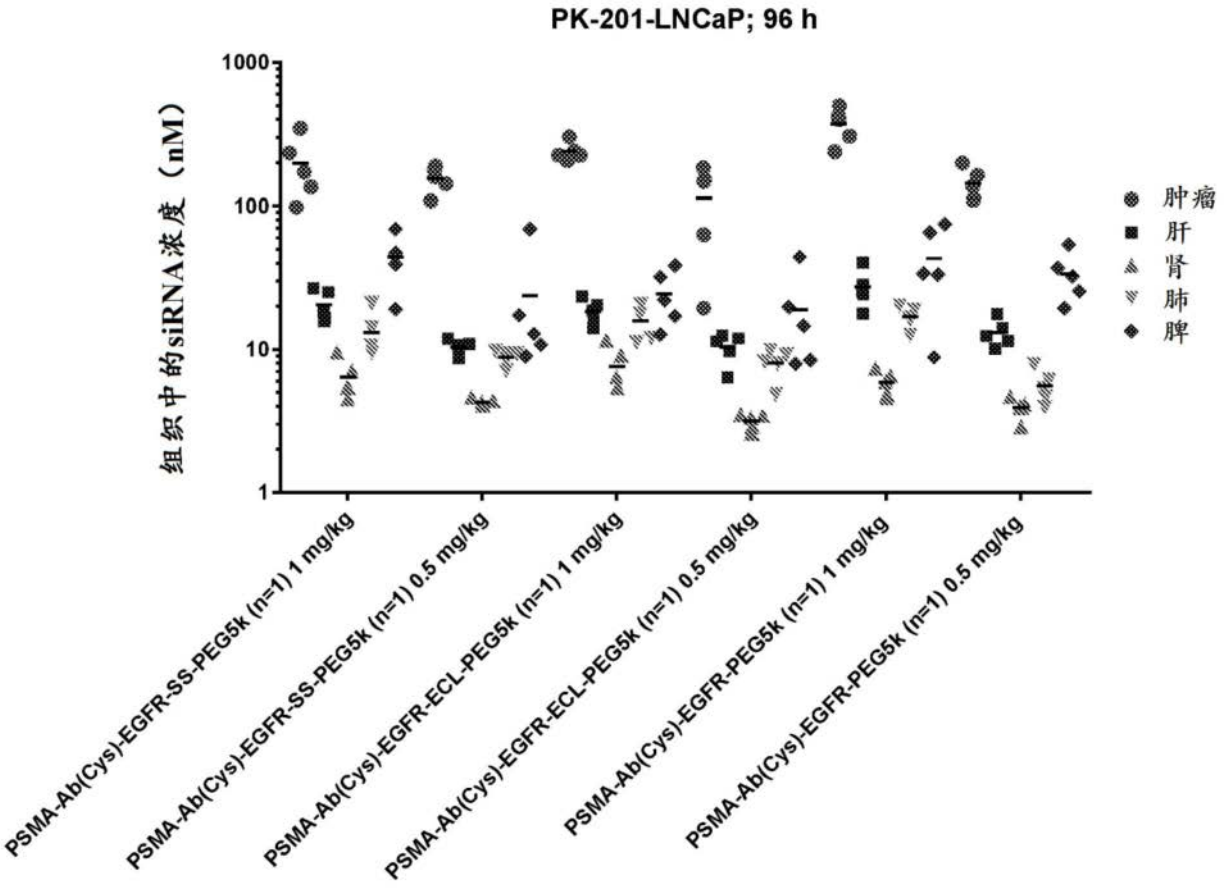

PK-201-LNCaP; 96 h
组织中的siRNA浓度（nM）
1000
100
10
1
肿瘤
肝
肾
肺
脾
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-SS-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-ECL-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-ECL-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 0.5 mg/kg

图80B

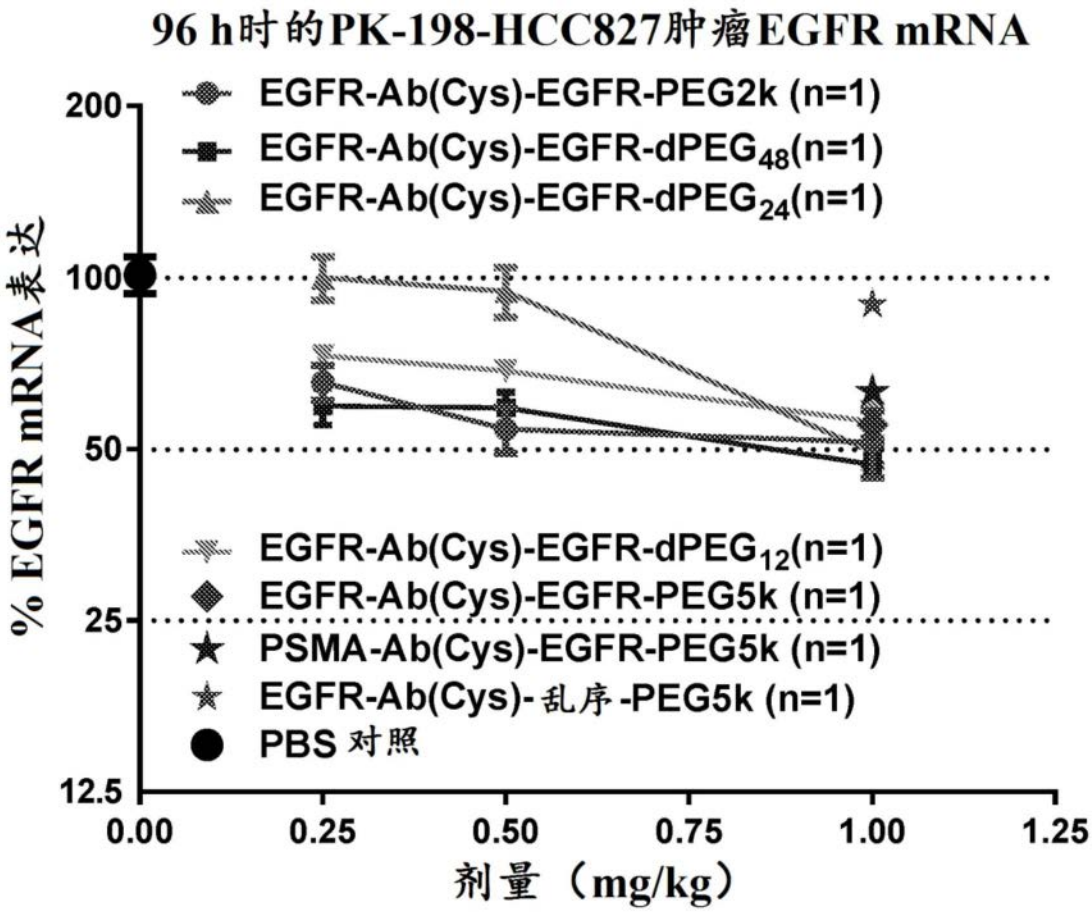

96 h时的PK-198-HCC827肿瘤EGFR mRNA
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG2k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG48(n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG24(n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG12(n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-乱序-PEG5k (n=1)
PBS 对照
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
剂量（mg/kg）

图81A

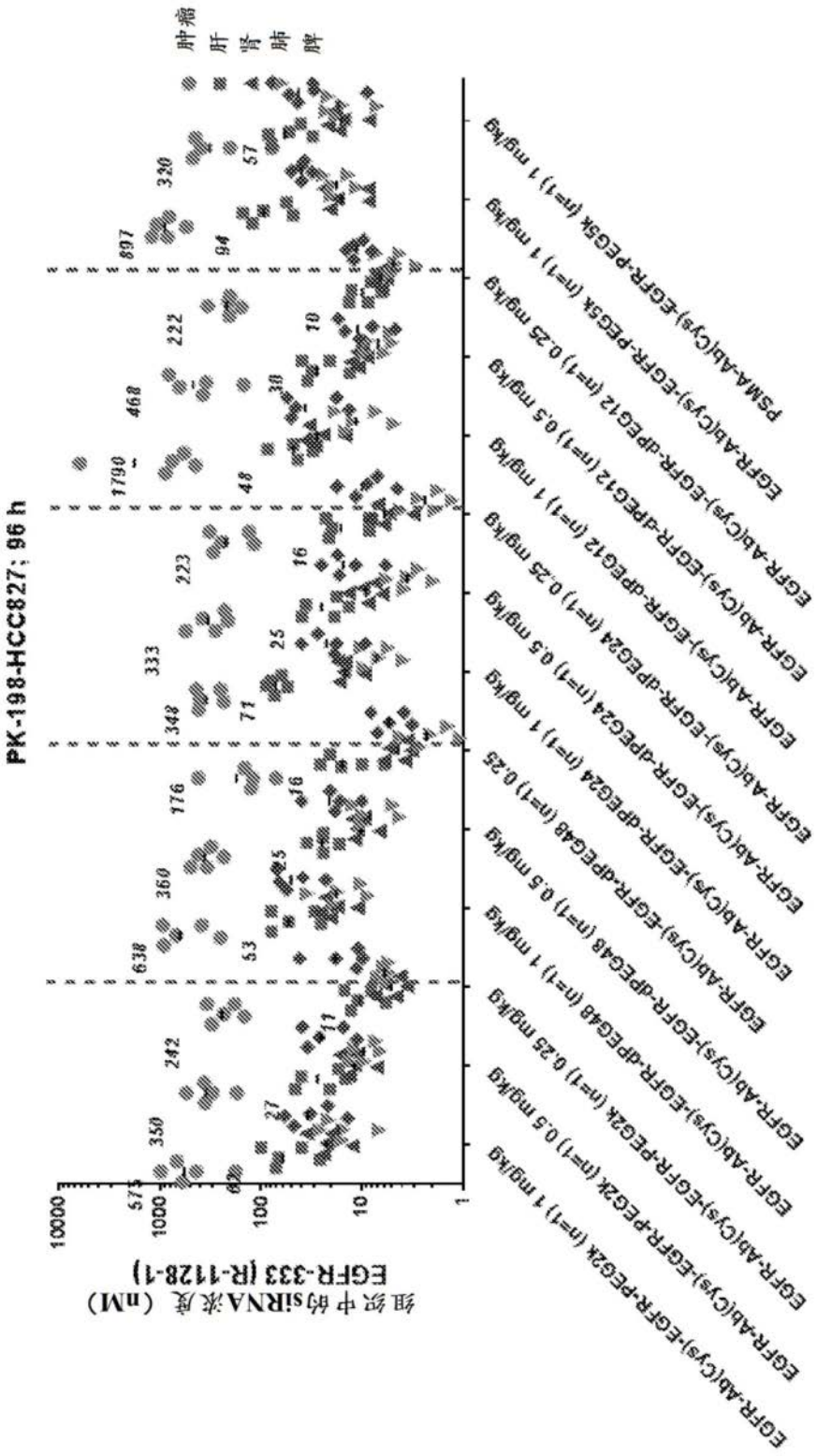

PK-198-HCC827; 96 h
EGFR-333 (R-1128-1)
组织中的siRNA浓度 (nM)
10000
1000
100
10
1
肿瘤
肝
肾
肺
脾
PSMA-Ab(Cys)-EGFR-pEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-pEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG12 (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG12 (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG12 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG24 (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG24 (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG24 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG48 (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG48 (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dpEG48 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-pEG2k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-pEG2k (n=1) 1 mg/kg

图81B

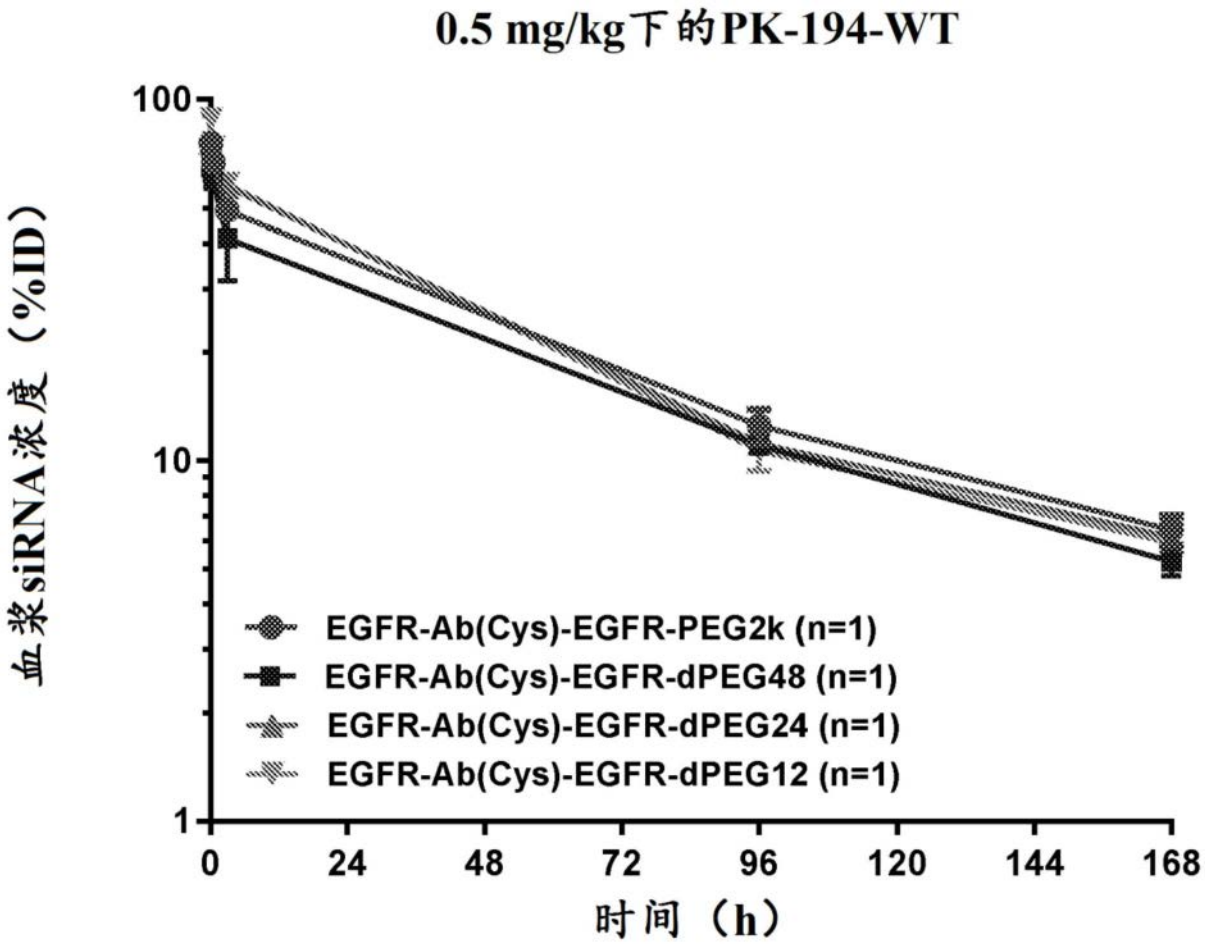

0.5 mg/kg下的PK-194-WT
血浆siRNA浓度（%ID）
100
10
1
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG2k (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG48 (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG24 (n=1)
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-dPEG12 (n=1)

图82

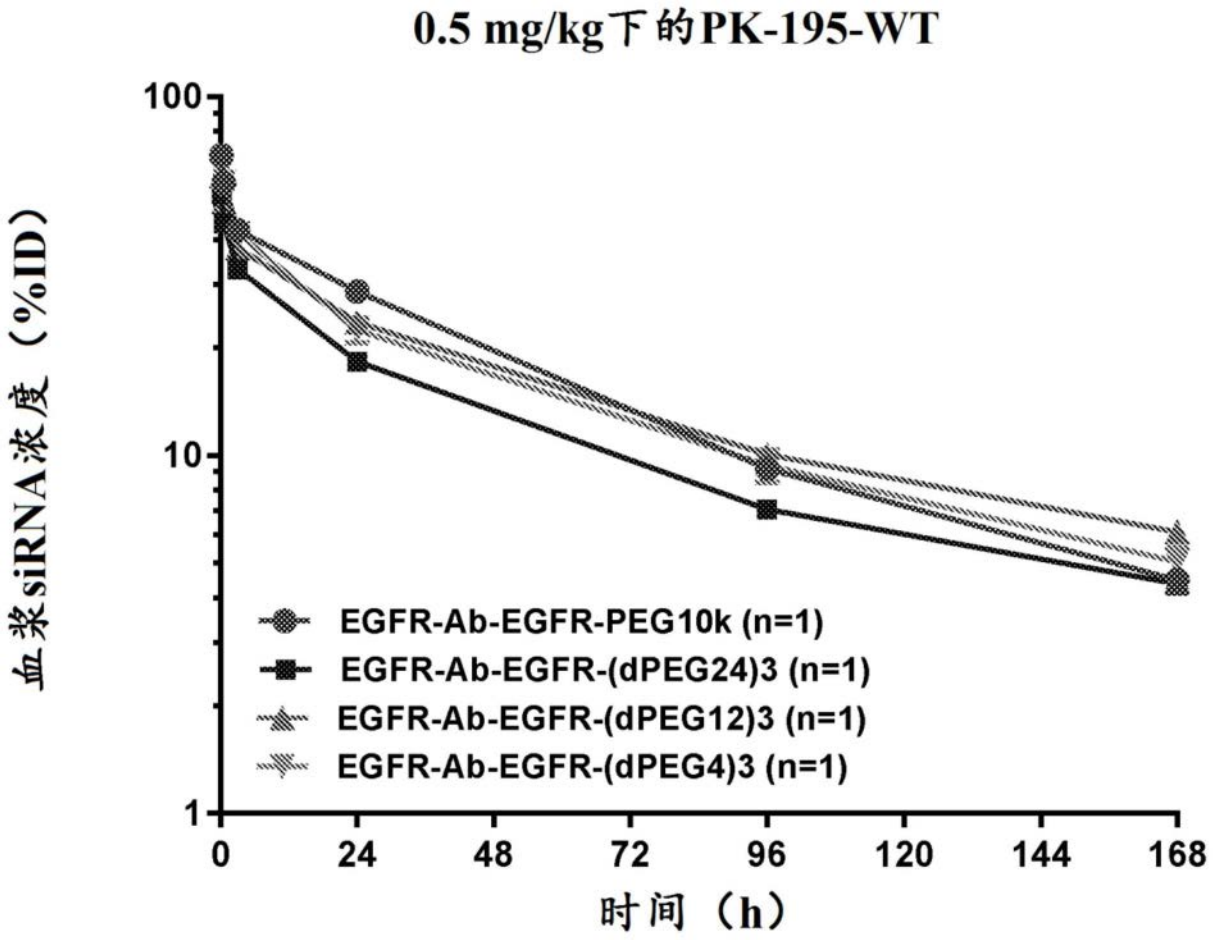

0.5 mg/kg下的PK-195-WT
血浆siRNA浓度（%ID）
100
10
1
0
24
48
72
96
120
144
168
时间（h）
EGFR-Ab-EGFR-PEG10k (n=1)
EGFR-Ab-EGFR-(dPEG24)3 (n=1)
EGFR-Ab-EGFR-(dPEG12)3 (n=1)
EGFR-Ab-EGFR-(dPEG4)3 (n=1)

图83

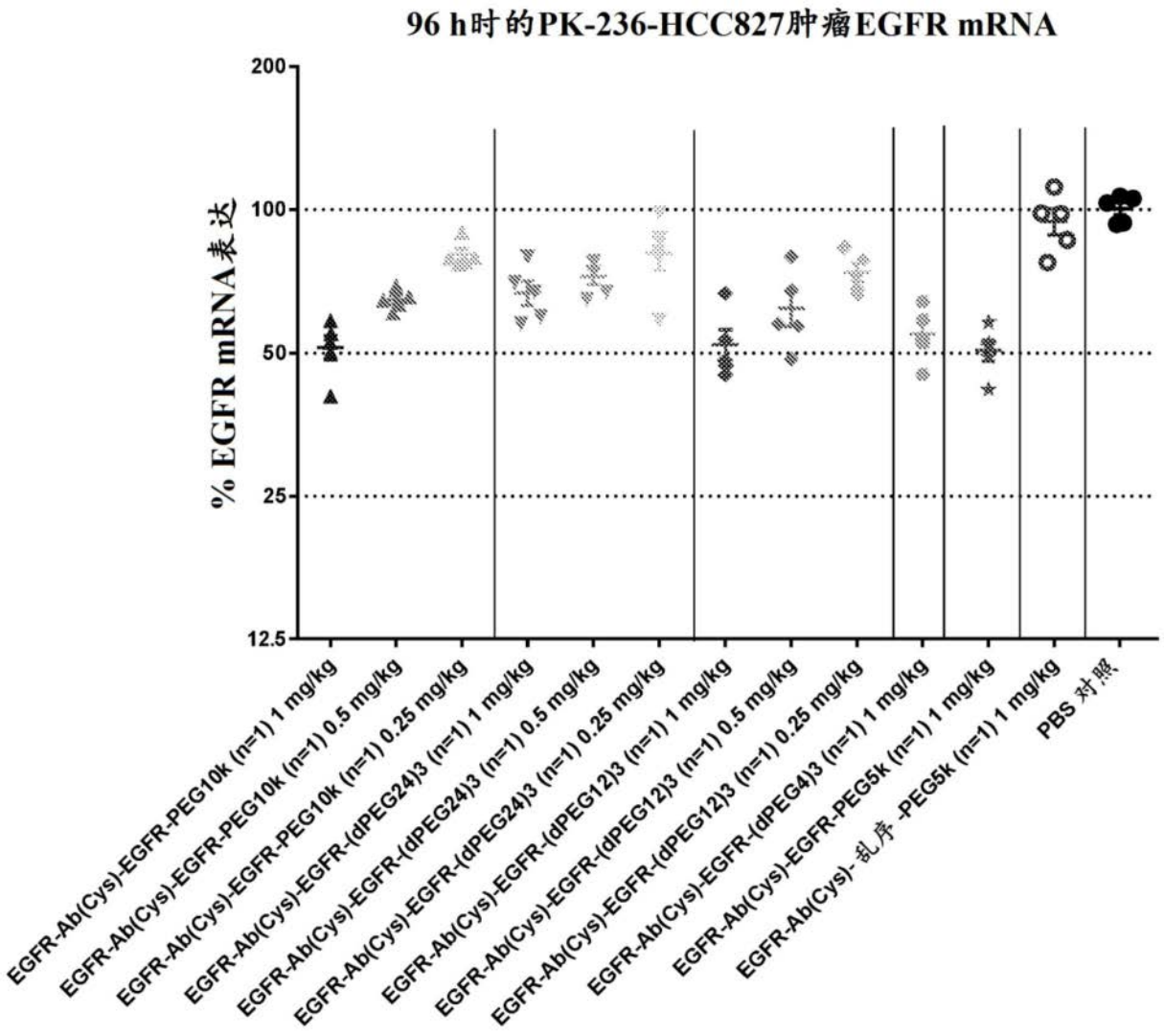

96 h时的PK-236-HCC827肿瘤EGFR mRNA
% EGFR mRNA表达
200
100
50
25
12.5
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG4)3 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-乱序 -PEG5k (n=1) 1 mg/kg
PBS 对照

图84

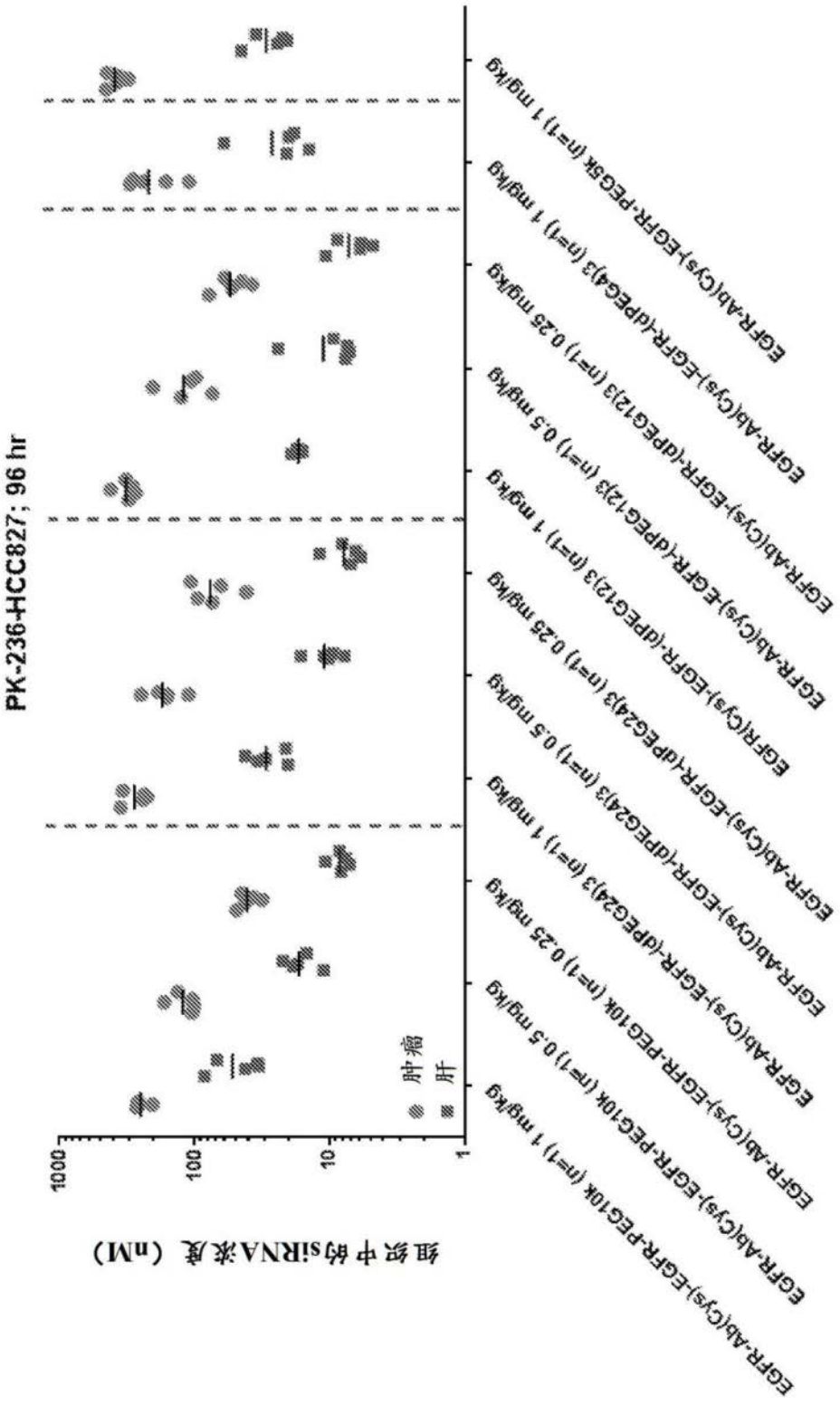

PK-236-HCC827; 96 hr
组织中的siRNA浓度 (nM)
1000
100
10
1
肿瘤
肝
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG10k (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG24)3 (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1) 0.5 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG12)3 (n=1) 0.25 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-(dPEG4)3 (n=1) 1 mg/kg
EGFR-Ab(Cys)-EGFR-PEG5k (n=1) 1 mg/kg

图85

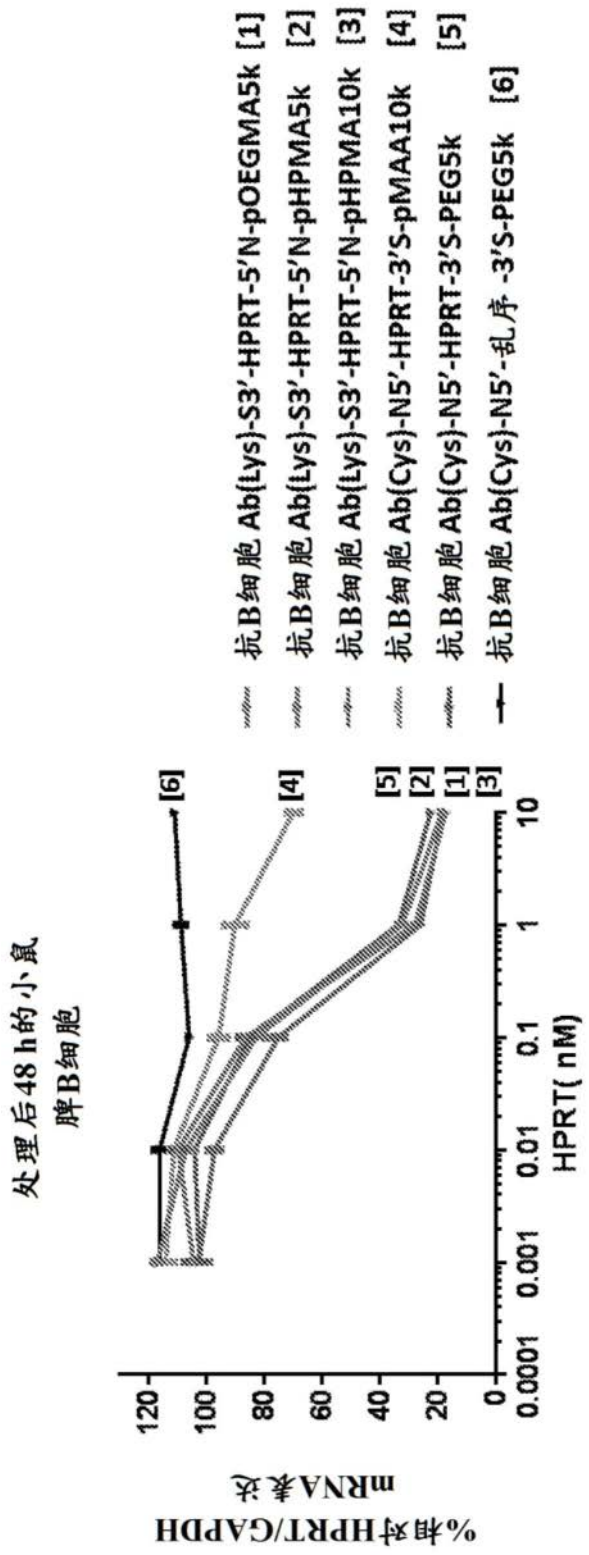

处理后48 h的小鼠
脾B细胞
%相对HPRT/GAPDH
mRNA表达
120
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
HPRT(nM)
[6]
[4]
[5]
[2]
[1]
[3]
抗B细胞 Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-pOEGMA5k [1]
抗B细胞 Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-pHPMA5k [2]
抗B细胞 Ab(Lys)-S3'-HPRT-5'N-pHPMA10k [3]
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-pMAA10k [4]
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-HPRT-3'S-PEG5k [5]
抗B细胞 Ab(Cys)-N5'-乱序 -3'S-PEG5k [6]

图86

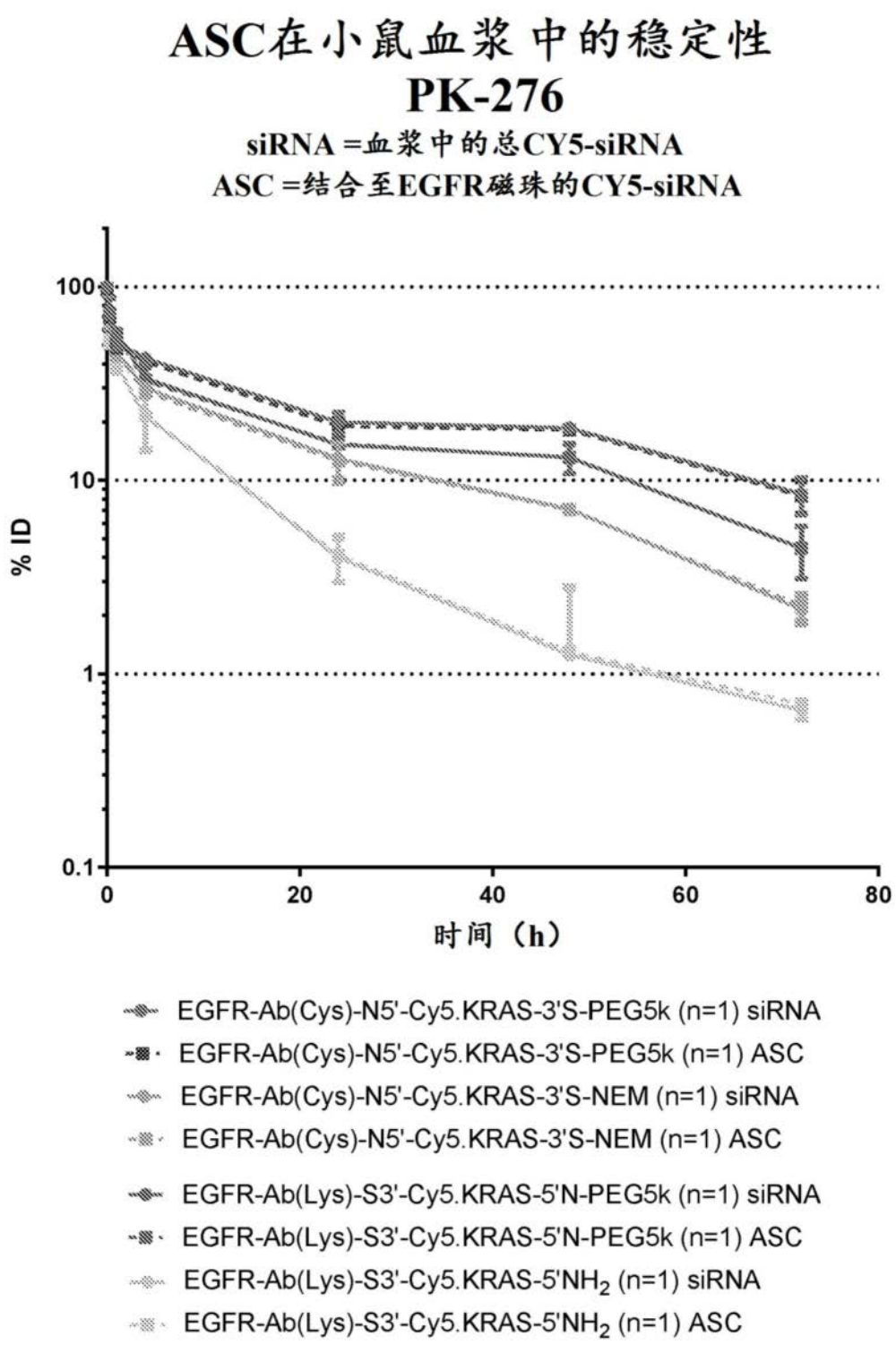

ASC在小鼠血浆中的稳定性
PK-276
siRNA =血浆中的总CY5-siRNA
ASC =结合至EGFR磁珠的CY5-siRNA
100
10
1
0.1
% ID
0
20
40
60
80
时间（h）
EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S-PEG5k (n=1) siRNA
EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S-PEG5k (n=1) ASC
EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S-NEM (n=1) siRNA
EGFR-Ab(Cys)-N5'-Cy5.KRAS-3'S-NEM (n=1) ASC
EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'N-PEG5k (n=1) siRNA
EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'N-PEG5k (n=1) ASC
EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'NH2 (n=1) siRNA
EGFR-Ab(Lys)-S3'-Cy5.KRAS-5'NH2 (n=1) ASC

图87