



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118662653 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202410663435.8

(22) 申请日 2019.08.02

(30) 优先权数据

62/713,959 2018.08.02 US

(62) 分案原申请数据

201980064590.5 2019.08.02

(71) 申请人 达因疗法公司

地址 美国

(72) 发明人 罗梅什·R·苏布拉马尼亚

穆罕默德·T·卡塔纳尼

蒂莫西·威登

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

专利代理人 张福誉 韩晓帆

(51) Int. Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书64页

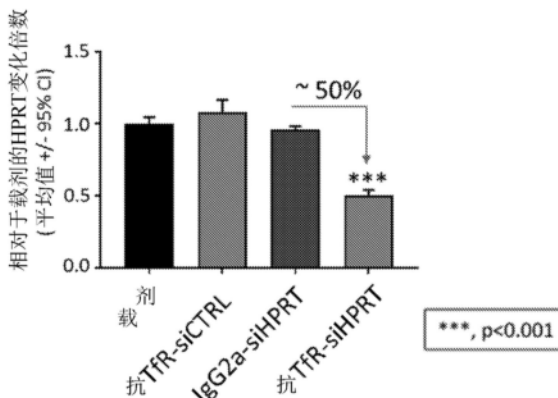
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

肌肉靶向复合物及其用于治疗蓬佩病的用途

(57) 摘要

本申请涉及肌肉靶向复合物及其用于治疗蓬佩病的用途。本公开内容的一些方面涉及包含与分子载荷共价连接的肌肉靶向剂的复合物。在一些实施方案中,所述肌肉靶向剂与肌细胞上的内化细胞表面受体特异性结合。在一些实施方案中,所述分子载荷降低细胞中的糖原水平。



1. 复合物,其包含与分子载荷共价连接的肌肉靶向剂,所述分子载荷配置成用于降低肌细胞中的糖原水平,其中所述肌肉靶向剂与肌细胞上的内化细胞表面受体特异性结合。
2. 权利要求1所述的复合物,其中所述肌肉靶向剂是肌肉靶向抗体。
3. 权利要求2所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体与转铁蛋白受体的胞外表位特异性结合。
4. 权利要求3所述的复合物,其中所述转铁蛋白受体的所述胞外表位包含所述转铁蛋白受体的顶端结构域的表位。
5. 权利要求3或4所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体与SEQ ID NO:1至3的C89至F760范围内的序列的表位特异性结合。
6. 权利要求3至5中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体与所述转铁蛋白受体之结合的平衡解离常数(Kd)为 10^{-11} M至 10^{-6} M。
7. 权利要求3至6中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体与表1中列出的抗体竞争与转铁蛋白受体表位的特异性结合。
8. 权利要求7所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体以小于或等于 10^{-6} M的Kd竞争与转铁蛋白受体表位的特异性结合。
9. 权利要求8所述的复合物,其中所述Kd为 10^{-11} M至 10^{-6} M。
10. 权利要求3至9中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体不与所述转铁蛋白受体的转铁蛋白结合位点特异性结合,和/或其中所述肌肉靶向抗体不抑制转铁蛋白与所述转铁蛋白受体的结合。
11. 权利要求3至10中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体与人、非人灵长类和啮齿动物转铁蛋白受体中两种或更多种的胞外表位交叉反应。
12. 权利要求3至11中任一项所述的复合物,其中所述复合物配置成促进转铁蛋白受体介导的所述分子载荷内化到肌细胞中。
13. 权利要求2至12中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体是嵌合抗体,任选地其中所述嵌合抗体是人源化单克隆抗体。
14. 权利要求2至13中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体为ScFv、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段或Fv片段的形式。
15. 权利要求1至14中任一项所述的复合物,其中所述分子载荷是寡核苷酸。
16. 权利要求15所述的复合物,其中所述寡核苷酸促进在成熟GAAmRNA中包含外显子2。
17. 权利要求15所述的复合物,其中所述寡核苷酸抑制GYS1的表达。
18. 权利要求1至14中任一项所述的复合物,其中所述分子载荷是多肽。
19. 权利要求17所述的复合物,其中所述多肽是重组野生型酸性 α 葡糖苷酶(GAA)。
20. 权利要求15至17中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含至少一个经修饰核苷酸间键联。
21. 权利要求20所述的复合物,其中所述至少一个经修饰核苷酸间键联是硫代磷酸酯键联。
22. 权利要求21所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含处于Rp立体化学构象和/或Sp立体化学构象的硫代磷酸酯键联。
23. 权利要求22所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含全部处于Rp立体化学构象或全

部处于Sp立体化学构象的硫代磷酸酯键联。

24. 权利要求15至17或20至23中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含一个或更多个经修饰核苷酸。

25. 权利要求24所述的复合物,其中所述一个或更多个经修饰核苷酸是2'-经修饰核苷酸。

26. 权利要求15或20至25中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸是指导细胞中RNA酶H介导的GYS1 mRNA转录物之切割的间隔聚体寡核苷酸。

27. 权利要求26所述的复合物,其中所述间隔聚体寡核苷酸包含5至15个脱氧核糖核苷酸的中央部分,所述中央部分的侧翼是2至8个经修饰核苷酸的翼。

28. 权利要求27所述的复合物,其中所述翼的所述经修饰核苷酸是2'-经修饰核苷酸。

29. 权利要求15或20至25中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸是混合聚体寡核苷酸。

30. 权利要求29所述的复合物,其中所述混合聚体寡核苷酸促进剪接介导的在c.-32-13T>G (IVS1)GAA变体中包含外显子2。

31. 权利要求29或30所述的复合物,其中所述混合聚体寡核苷酸包含两个或更多个不同的2' 经修饰核苷酸。

32. 权利要求15或20至25中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸是促进RNAi介导的所述GYS1 mRNA转录物之切割的RNAi寡核苷酸。

33. 权利要求32所述的复合物,其中所述RNAi寡核苷酸是长度为19至25个核苷酸的双链寡核苷酸。

34. 权利要求32或33所述的复合物,其中所述RNAi寡核苷酸包含至少一个2' 经修饰核苷酸。

35. 权利要求25、28、31或34中任一项所述的复合物,其中每个2' 经修饰核苷酸选自: 2'-O-甲基、2'-氟(2'-F)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)和2',4'-桥连核苷酸。

36. 权利要求24所述的复合物,其中所述一个或更多个经修饰核苷酸是桥连核苷酸。

37. 权利要求25、28、31或34中任一项所述的复合物,其中至少一个2' 经修饰核苷酸是2',4'-桥连核苷酸,其选自:2',4'-约束性2'-O-乙基(cEt)和锁核酸(LNA)核苷酸。

38. 权利要求15或20至25中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸包含用于基因组编辑核酸酶的指导序列。

39. 权利要求15、16或20至25中任一项所述的复合物,其中所述寡核苷酸是亚磷酸二酰胺吗啉代寡聚物。

40. 权利要求1至39中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向剂通过可切割接头与所述分子载荷共价连接。

41. 权利要求40所述的复合物,其中所述可切割接头选自:蛋白酶敏感性接头、pH敏感性接头和谷胱甘肽敏感性接头。

42. 权利要求41所述的复合物,其中所述可切割接头是蛋白酶敏感性接头。

43. 权利要求42所述的复合物,其中所述蛋白酶敏感性接头包含可被溶酶体蛋白酶和/或内体蛋白酶切割的序列。

44. 权利要求42所述的复合物,其中所述蛋白酶敏感性接头包含缬氨酸-瓜氨酸二肽序

列。

45. 权利要求47所述的复合物,其中所述接头是在4至6的pH下被切割的pH敏感性接头。

46. 权利要求1至49中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向剂通过不可切割接头与所述分子载荷共价连接。

47. 权利要求46所述的复合物,其中所述不可切割接头是烷烃接头。

48. 权利要求2至47中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体包含与所述寡核苷酸共价连接的非天然氨基酸。

49. 权利要求2至48中任一项所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体通过与所述抗体的赖氨酸残基或半胱氨酸残基的缀合与所述寡核苷酸共价连接。

50. 权利要求49所述的复合物,其中所述寡核苷酸通过含马来酰亚胺接头与所述抗体的半胱氨酸缀合,任选地其中所述含马来酰亚胺接头包含马来酰亚胺基己酰基或马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸酯基团。

51. 权利要求2至50所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体是包含至少一个糖部分的糖基化抗体,所述寡核苷酸与所述糖部分共价连接。

52. 权利要求51所述的复合物,其中所述糖部分是支链的甘露糖。

53. 权利要求51或52所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体是包含1至4个糖部分的糖基化抗体,每个所述糖部分与单独的寡核苷酸共价连接。

54. 权利要求51所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体是完全糖基化抗体。

55. 权利要求51所述的复合物,其中所述肌肉靶向抗体是部分糖基化抗体。

56. 权利要求55所述的复合物,其中所述部分糖基化抗体是通过化学或酶促方式产生的。

57. 权利要求55所述的复合物,其中所述部分糖基化抗体是在细胞中产生的,所述细胞缺乏N-或O-糖基化途径中的酶。

58. 将分子载荷递送至表达转铁蛋白受体之细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与权利要求1至57中任一项所述的复合物接触。

59. 降低具有与蓬佩病(PD)相关的突变GAA等位基因的肌细胞中糖原水平的方法,所述方法包括使所述细胞与有效促进分子载荷内化至所述细胞之量的权利要求1至57中任一项所述复合物接触。

60. 权利要求59所述的方法,其中所述细胞是体外的。

61. 权利要求59所述的方法,其中所述细胞在对象中。

62. 权利要求61所述的方法,其中所述对象是人。

63. 权利要求61所述的方法,其中所述突变GAA等位基因包含c. -32-13T>G (IVS1)GAA变体。

64. 治疗具有与蓬佩病相关的突变GAA等位基因的对象的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的权利要求1至57中任一项所述的复合物。

65. 权利要求64所述的方法,其中所述突变GAA等位基因包含c. -32-13T>G (IVS1)GAA变体。

肌肉靶向复合物及其用于治疗蓬佩病的用途

[0001] 本申请是申请号为201980064590.5的发明名称为“肌肉靶向复合物及其用于治疗蓬佩病的用途”的中国专利申请的分案申请,原申请是2019年08月02日提交的PCT国际申请PCT/US2019/044960于2021年03月30日进入中国国家阶段的申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2018年8月2日提交的标题为“MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING POMPE DISEASE”的美国临时申请No.62/713,959的申请日权益,其内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0004] 本申请涉及用于向细胞递送分子载荷(molecular payload)(例如,寡核苷酸)的靶向复合物及其用途,特别是涉及疾病治疗的用途。

[0005] 序列表的引用

[0006] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表以2019年7月31日创建的大小为65KB的名为D082470003W000-SEQ.txt的文件提供。序列表的电子格式中的信息通过引用整体并入本文。

背景技术

[0007] 溶酶体贮积病是由溶酶体水解酶或跨膜蛋白的缺陷引起的一组遗传性疾病。这些疾病通常以进行性的多种未消化底物的积累和细胞运输途径的失调为特征。蓬佩病(pompe disease,PD)是一种常染色体隐性遗传的溶酶体贮积病,特征在于肌细胞中糖原的积累,其导致进行性肌肉无力、肌张力降低(张力减退)、心脏增大和呼吸困难。在严重的情况下症状通常在出生时就存在,尽管发作可能在整个生命中发生,并且蓬佩病在美国影响约40,000人中的1人。蓬佩病是由GAA基因中的突变引起的,该基因编码酶酸性 α -葡糖苷酶。GAA酶在溶酶体中将糖原分解成葡萄糖。GAA基因中的某些突变导致酶活性降低,从而导致溶酶体中糖原的毒性积累。在一个实例中,c.-32-13T>G(IVS1)GAA变体在前mRNA剪接过程中促进外显子2跳读,并且是儿童/成人疾病形式的最常见变体。糖原由多种酶合成,包括糖原合酶1(由GYS1基因编码)。糖原积累对肌细胞特别有毒,导致PD的进行性肌肉无力症状。用于PD的当前治疗涉及酶替代治疗,其涉及施用重组的野生型人GAA蛋白。

发明内容

[0008] 根据一些方面,本公开内容提供了靶向肌细胞以用于将分子载荷递送至那些细胞的复合物。在一些实施方案中,本文提供的复合物特别可用于递送寡核苷酸,所述寡核苷酸纠正对象(例如在编码溶酶体酶酸性 α -葡糖苷酶(GAA)的基因中具有c.-32-13T>G(IVS1)变体的对象)的细胞中的异常剪接。在一些实施方案中,本文提供的复合物还特别可用于递送分子载荷,其抑制糖原合成途径中的酶(例如GYS1)的表达从而降低糖原合成,例如在患有或怀疑患有蓬佩病的对象中。在一些实施方案中,本文提供的复合物特别可用于将递送野

生型GAA蛋白或编码该蛋白质的多核苷酸的分子载荷递送至对象,例如递送至患有或怀疑患有蓬佩病的对象。在一些实施方案中,可施用(例如同时施用)两种或更多种复合物以治疗患有或怀疑患有蓬佩病的对象。因此,在一些实施方案中,本文中提供的复合物包含与肌细胞表面上的受体特异性结合的肌肉靶向剂(例如,肌肉靶向抗体),以用于将分子载荷递送至肌细胞。在一些实施方案中,复合物通过受体介导的内化被摄取到细胞中,然后分子载荷可被释放以在细胞内部执行功能。例如,经工程化以递送寡核苷酸的复合物可释放寡核苷酸,使得寡核苷酸可纠正剪接变体(例如纠正GAA中的外显子2跳读)或抑制基因表达(例如肌细胞中GYS1的表达)。在一些实施方案中,经工程化以递送野生型GAA蛋白的复合物可释放野生型GAA蛋白或编码野生型GAA蛋白的重组核酸,以提高细胞GAA活性。在一些实施方案中,通过连接复合物的寡核苷酸和肌肉靶向剂的共价接头的内体切割而释放寡核苷酸。

[0009] 本公开内容的一些方面包括复合物,所述复合物包含与分子载荷共价连接的肌肉靶向剂,所述分子载荷配置成用于降低肌细胞中的糖原水平,其中肌肉靶向剂与肌细胞上的内化细胞表面受体特异性结合。

[0010] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是肌肉靶向抗体。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是与转铁蛋白受体的胞外表位(例如,转铁蛋白受体的顶端结构域(apical domain)的表位)特异性结合的抗体。肌肉靶向抗体可与SEQ ID NO:1至3的C89至F760范围内的序列的表位特异性结合。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体与转铁蛋白受体之结合的平衡解离常数(Kd)为 10^{-11} M至 10^{-6} M。

[0011] 在一些实施方案中,复合物的肌肉靶向抗体与表1中列出的抗体竞争与转铁蛋白受体表位的特异性结合(例如以小于或等于 10^{-6} M,例如 10^{-11} M至 10^{-6} M的Kd竞争与转铁蛋白受体表位的特异性结合)。

[0012] 在一些实施方案中,复合物的肌肉靶向抗体不与转铁蛋白受体的转铁蛋白结合位点特异性结合,和/或不抑制转铁蛋白与转铁蛋白受体的结合。在一些实施方案中,复合物的肌肉靶向抗体与人、非人灵长类和啮齿动物转铁蛋白受体中两种或更多种的胞外表位交叉反应。在一些实施方案中,复合物的肌肉靶向抗体配置成促进转铁蛋白受体介导的分子载荷内化到肌细胞中。

[0013] 肌肉靶向抗体(例如,肌肉靶向抗体是与转铁蛋白受体的胞外表位特异性结合的抗体)是嵌合抗体,其中任选地嵌合抗体是人源化单克隆抗体。肌肉靶向抗体可以是ScFv、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段或Fv片段的形式。

[0014] 在一些实施方案中,复合物的分子载荷是寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸促进在成熟GAAMRNA中包含外显子2。在一些实施方案中,寡核苷酸抑制GYS1的表达。

[0015] 本公开内容的寡核苷酸可包含至少一个经修饰核苷酸间键联(internucleotide linkage)(例如硫代磷酸酯键联)。在一些实施方案中,寡核苷酸包含处于Rp立体化学构象和Sp立体化学构象的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,寡核苷酸包含全部处于Rp立体化学构象的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中,寡核苷酸包含全部处于Sp立体化学构象的硫代磷酸酯键联。

[0016] 本公开内容的寡核苷酸可包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,2'-经修饰核苷酸)。在一些实施方案中,经修饰核苷酸是2'-O-甲基、2'-氟(2'-F)、2'-O-甲氧基乙基(2'-MOE)或2',4'-桥连核苷酸(2',4'-bridged nucleotide)。在一些实施方案中,经修饰核苷

酸是桥连核苷酸(例如,选自:2',4'-约束性2'-O-乙基(cEt)和锁核酸(locked nucleic acid,LNA)核苷酸)。

[0017] 在一些实施方案中,寡核苷酸是指导细胞中RNA酶H介导的GYS1mRNA转录物之切割的间隔聚体(gapmer)寡核苷酸。间隔聚体寡核苷酸可包含5至15个脱氧核糖核苷酸的中央部分,所述中央部分的侧翼是2至8个经修饰核苷酸(例如,2'-经修饰核苷酸)的翼。

[0018] 在一些实施方案中,寡核苷酸是混合聚体(mixmer)寡核苷酸。在一些实施方案中,混合聚体寡核苷酸促进剪接介导的在c.-32-13T>G(IVS1)GAA变体中包含外显子2。混合聚体寡核苷酸可包含两个或更多个不同的2'-经修饰核苷酸。

[0019] 在一些实施方案中,寡核苷酸是促进RNAi介导的GYS1 mRNA转录物之切割的RNAi寡核苷酸。RNAi寡核苷酸可以是长度为19至25个核苷酸的双链寡核苷酸。在一些实施方案中,RNAi寡核苷酸包含至少一个2'-经修饰核苷酸。

[0020] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含用于基因组编辑核酸酶的指导序列。

[0021] 在一些实施方案中,寡核苷酸是亚磷酸二酰胺吗啉代寡聚物(phosphorodiamidite morpholino oligomer,PMO)。

[0022] 在另一些实施方案中,分子载荷是多肽。在一些实施方案中,分子载荷是重组野生型酸性 α 葡萄糖苷酶(GAA)多肽。

[0023] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂通过可切割接头(例如蛋白酶敏感性接头、pH敏感性接头和谷胱甘肽敏感性接头)与分子载荷共价连接。蛋白酶敏感性接头可包含可被溶酶体蛋白酶和/或内体蛋白酶切割的序列。在一些实施方案中,蛋白酶敏感性接头包含缬氨酸-瓜氨酸二肽序列。pH敏感性接头可在4至6的pH下被切割。

[0024] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂通过不可切割接头(例如,烷烃接头)与分子载荷共价连接。

[0025] 在一些实施方案中,肌肉靶向抗体包含可与寡核苷酸共价连接的非天然氨基酸。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体通过与抗体的赖氨酸残基或半胱氨酸残基的缀合与寡核苷酸共价连接。在一些实施方案中,寡核苷酸通过含马来酰亚胺接头与抗体的半胱氨酸缀合,任选地其中含马来酰亚胺接头包含马来酰亚胺基己酰基或马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸酯基团。

[0026] 在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是包含至少一个糖部分的糖基化抗体,寡核苷酸与所述糖部分共价连接。在一些实施方案中,糖基化抗体包含至少一个糖部分,所述至少一个糖部分是支链的甘露糖。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是包含1至4个糖部分的糖基化抗体,每个糖部分与单独的寡核苷酸共价连接。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是完全糖基化抗体或部分糖基化抗体。部分糖基化抗体可通过化学或酶促方式产生。在一些实施方案中,部分糖基化抗体是在细胞中产生的,所述细胞缺乏N-或O-糖基化途径中的酶。

[0027] 本公开内容的一些方面包括将分子载荷递送至表达转铁蛋白受体之细胞的方法,所述方法包括使细胞与复合物接触,所述复合物包含与配置成用于降低肌细胞中糖原水平的分子载荷共价连接的肌肉靶向剂。

[0028] 本公开内容的一些方面包括降低具有与蓬佩病(PD)相关的突变GAA等位基因的肌细胞中糖原水平的方法,所述方法包括使细胞与有效促进分子载荷内化至细胞之量的复合物接触,所述复合物包含与配置成用于降低肌细胞中糖原水平的分子载荷共价连接的肌肉

靶向剂。在一些实施方案中,细胞是体外的。在一些实施方案中,细胞在对象中。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,突变GAA等位基因包含c.-32-13T>G(IVS1)GAA变体。

[0029] 本公开内容的一些方面包括治疗具有与蓬佩病相关的突变GAA等位基因的对象的方法,所述方法包括向对象施用有效量的复合物,所述复合物包含与配置成用于降低肌细胞中糖原水平的分子载荷共价连接的肌肉靶向剂。在一些实施方案中,突变GAA等位基因包含c.-32-13T>G(IVS1)GAA变体。

附图说明

[0030] 图1描绘了非限制性示意图,其示出了用siRNA转染细胞的效果。

[0031] 图2描绘了非限制性示意图,其示出了包含siRNA的肌肉靶向复合物的活性。

[0032] 图3A至3B描绘了非限制性示意图,其示出了相对于对照实验,体内小鼠肌肉组织(腓肠肌和心脏)中包含siRNA的肌肉靶向复合物的活性。(N=4只C57B1/6WT小鼠)

[0033] 图4A至4E描绘了非限制性示意图,其示出了包含siRNA的肌肉靶向复合物的组织选择性。

具体实施方式

[0034] 本公开内容的一些方面涉及这样的认识:尽管某些分子载荷(例如,寡核苷酸、肽、小分子)可能在肌细胞中具有有益作用,但是已证明有效地靶向这样的细胞具有挑战。如本文中所述,本公开内容提供了包含与分子载荷共价连接的肌肉靶向剂的复合物,以克服这样的挑战。在一些实施方案中,所述复合物对于递送抑制肌细胞中靶基因的表达或活性的分子载荷特别有用,例如在患有或怀疑患有罕见肌肉疾病的对象中。例如,在一些实施方案中,提供了用于治疗患有蓬佩病的对象的复合物,其中所述对象具有至少一个促进GAAmRNA的外显子2的跳读的突变GAA等位基因。因此,在一些实施方案中,复合物包含能够纠正GAA的这种异常剪接的寡核苷酸。然而,在一些实施方案中,提供了用于递送野生型GAA蛋白或编码该蛋白的合成核酸的复合物。在另一些实施方案中,提供了用于下调GYS1以治疗患有蓬佩病的对象的复合物。

[0035] 而且,在一些实施方案中,本文中提供的复合物可包含分子载荷,例如能够将核酸可编程核酸酶(例如,Cas9)靶向至GAA内的疾病相关突变(例如,降低GAA催化活性的突变或改变mRNA剪接的突变)处或附近的序列的指导分子(例如,指导RNA)。在一些实施方案中,这样的核酸可编程核酸酶(例如包含Cas9蛋白的碱基编辑器)可用于纠正PD相关的GAA等位基因中的一个或更多个突变。

[0036] 下面提供了本公开内容的其他方面,包括对定义的术语的描述。

[0037] I. 定义

[0038] 施用:如本文所用,术语“施用”(“administering”或“administration”)意指以生理和/或药理学上可用的方式向对象提供复合物(例如,以治疗对象中的病症)。

[0039] 大约:如本文所用,术语“大约”或“约”,如应用于一个或更多个目标值时,是指类似于陈述的参考值的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指落入陈述的参考值的任一方向上(大于或小于)15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或更小以内的值的范围,除非另有说明或在其他情况下从上下文中可以明显

看出(除非这样的数字超过可能值的100%)。

[0040] 抗体:如本文所用,术语“抗体”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域或至少一个抗原决定簇(例如与抗原特异性结合的互补位)的多肽。在一些实施方案中,抗体是全长抗体。在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。然而,在一些实施方案中,抗体是Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段或scFv片段。在一些实施方案中,抗体是源自骆驼科抗体的纳米抗体或源自鲨鱼抗体的纳米抗体。在一些实施方案中,抗体是双抗体。在一些实施方案中,抗体包含具有人种系序列的框架。在另一个实施方案中,抗体包含选自IgG、IgG1、IgG2、IgG2A、IgG2B、IgG2C、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgM和IgE恒定结构域的重链恒定结构域。在一些实施方案中,抗体包含重(H)链可变区(在本文中简称为VH)和/或轻(L)链可变区(在本文中简称为VL)。在一些实施方案中,抗体包含恒定结构域,例如Fc区。免疫球蛋白恒定结构域是指重链或轻链恒定结构域。人IgG重链和轻链恒定结构域氨基酸序列及其功能变异是已知的。关于重链,在一些实施方案中,本文所述的抗体的重链可以是alpha(α)、delta(Δ)、epsilon(ϵ)、gamma(γ)或mu(μ)重链。在一些实施方案中,本文所述的抗体的重链可包含人alpha(α)、delta(Δ)、epsilon(ϵ)、gamma(γ)或mu(μ)重链。在一个特定的实施方案中,本文所述的抗体包含人 γ 1CH1、CH2和/或CH3结构域。在一些实施方案中,VH结构域的氨基酸序列包含人gamma(γ)重链恒定区的氨基酸序列,例如本领域已知的任何。人恒定区序列的非限制性实例已在本领域中描述,例如,参见美国专利No.5,693,780和Kabat E Aet al.,(1991)同上。在一些实施方案中,VH结构域包含与本文中提供的任何可变链恒定区具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,对抗体进行修饰,例如,通过糖基化、磷酸化、SUMO化(sumoylation)和/或甲基化进行修饰。在一些实施方案中,抗体是与一个或多个糖或碳水化合物分子缀合的糖基化抗体。在一些实施方案中,一个或多个糖或碳水化合物分子通过N-糖基化、O-糖基化、C-糖基化、糖基磷脂酰肌醇化(GPI锚定附着)和/或磷酸糖基化(phosphoglycosylation)与抗体缀合。在一些实施方案中,一个或多个糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、寡糖或聚糖。在一些实施方案中,一个或多个糖或碳水化合物分子是支链的寡糖或支链的聚糖。在一些实施方案中,一个或多个糖或碳水化合物分子包含甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡萄糖胺单元、N-乙酰半乳糖胺单元、半乳糖单元、岩藻糖单元或磷脂单元。在一些实施方案中,抗体是包含多肽的构建体,所述多肽包含与接头多肽或免疫球蛋白恒定结构域连接的一个或多个本公开内容的抗原结合片段。接头多肽包含通过肽键连接的两个或多个氨基酸残基,并且用于连接一个或多个抗原结合部分。接头多肽的实例已有报道(参见,例如,Holliger,P.,et al.(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448;Poljak,R.J.,et al.(1994) Structure 2:1121-1123)。另外,抗体可以是更大的免疫黏附分子的一部分,免疫黏附分子通过抗体或抗体部分与一个或多个其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合而形成。这样的免疫黏附分子的实例包括使用链霉亲和素核芯区域来制备四聚体scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1995) Human Antibodies and Hybridomas6:93-101),以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov,S.M.,et al.(1994) Mol.Immunol.31:1047-1058)。

[0041] CDR:如本文所用,术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。重链和轻链的每

个可变区中有三个CDR,对于每个可变区分别称为CDR1、CDR2和CDR3。如本文所用,术语“CDR组”是指出现在单个可变区内的能够结合抗原的三个CDR的组。这些CDR的确切边界已根据不同的系统进行了不同的定义。Kabat描述的系统(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991))不仅提供了适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,而且还提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可以被称为Kabat CDR。CDR的子部分可以被指定为L1、L2和L3或H1、H2和H3,其中“L”和“H”分别指定轻链和重链区域。这些区域可以称为Chothia CDR,其具有与Kabat CDR重叠的边界。Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995))和MacCallum (J Mol Biol 262 (5):732-45 (1996))已经描述了定义与Kabat CDR重叠的CDR的其他边界。另一些CDR边界定义可能并不严格遵循上述系统之一,但仍与Kabat CDR重叠,尽管可以根据预测或者根据特定残基或残基的组或甚至整个CDR不会显著影响抗原结合的实验发现来缩短或延长它们。尽管优选的实施方案使用Kabat或Chothia定义的CDR,但是本文中使用的的方法可利用根据这些系统中的任何一个定义的CDR。

[0042] CDR接枝抗体 (CDR-grafted antibody):术语“CDR接枝抗体”是指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列但是其中VH和/或VL的一个或更多个CDR区的序列被来自另一物种的CDR序列替代的抗体,例如具有鼠重链和轻链可变区并且其中一个或更多个鼠CDR (例如CDR3)已被人CDR序列替代的抗体。

[0043] 嵌合抗体:术语“嵌合抗体”是指包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列和来自另一物种的恒定区序列的抗体,例如具有与人恒定区连接的鼠重链和轻链可变区的抗体。

[0044] 互补:如本文所用,术语“互补”是指在两个核苷酸或两组核苷酸之间精确配对的能力。特别地,互补是表征氢键配对引起两个核苷酸或两组核苷酸之间结合的程度术语。例如,如果寡核苷酸的一个位置处的碱基能够与靶核酸(例如,mRNA)的相应位置处的碱基进行氢键合,则认为在该位置处碱基彼此互补。碱基配对可包括规范的沃森-克里克碱基配对和非沃森-克里克碱基配对(例如,Wobble碱基配对和Hoogsteen碱基配对)二者。例如,在一些实施方案中,对于互补碱基配对,腺苷型碱基(A)与胸苷型碱基(T)或尿嘧啶型碱基(U)互补,胞嘧啶型碱基(C)与鸟苷型碱基(G)互补,并且通用碱基如3-硝基吡咯或5-硝基咪唑可与任何A、C、U或T杂交并被认为是互补的。肌苷(I)在本领域中也被认为是通用碱基,并且被认为与任何A、C、U或T互补。

[0045] 保守氨基酸替换:如本文所用,“保守氨基酸替换”是指不改变进行氨基酸替换的蛋白质的相对电荷或尺寸特征的氨基酸替换。可以根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备变体,所述方法例如可以在汇编这样的方法的参考文献中找到:例如Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012, 或Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York。氨基酸的保守替换包括在以下组内的氨基酸之间进行的替换:(a)M、I、L、V; (b)F、Y、W; (c)K、R、H; (d)A、G; (e)S、T; (f)Q、N; 和(g)E、D。

[0046] 共价连接:如本文所用,术语“共价连接”是指两个或更多个分子通过至少一个共价键连接在一起的特征。在一些实施方案中,两个分子可以通过充当分子之间的接头的单

键例如二硫键或二硫桥共价连接在一起。然而,在一些实施方案中,两个或更多个分子可以通过充当接头的分子共价连接在一起,该接头通过多个共价键将两个或更多个分子连接在一起。在一些实施方案中,接头可以是可切割接头。然而,在一些实施方案中,接头可以是不可切割接头。

[0047] 交叉反应性:如本文所用以及在靶向剂(例如,抗体)的情况下,术语“交叉反应性”是指物质能够以相似亲和力或亲合力与相似类型或类别的超过一种抗原(例如,多个同源物、旁系同源物或直系同源物的抗原)特异性结合的性质。例如,在一些实施方案中,对相似类型或类别的人和/或非人灵长类抗原(例如人转铁蛋白受体和非人灵长类转移受体)具有交叉反应性的抗体能够以相似亲和力或亲合力与人抗原和非人灵长类抗原结合。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的人抗原和啮齿动物抗原具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的啮齿动物抗原和非人灵长类抗原具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体对相似类型或类别的人抗原、非人灵长类抗原和啮齿动物抗原具有交叉反应性。

[0048] 框架:如本文所用,术语“框架”或“框架序列”是指可变区减去CDR的剩余序列。由于CDR序列的确切定义可通过不同的系统确定,因此框架序列的含义相应地具有不同解释。六个CDR(轻链的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3和重链的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)也将轻链和重链上的框架区分为每条链上的四个子区域(FR1、FR2、FR3和FR4),其中CDR1位于FR1和FR2之间,CDR2位于FR2和FR3之间,并且CDR3位于FR3和FR4之间。在未将特定子区域指定为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下,其他人提到的框架区代表单个天然免疫球蛋白链的可变区内的组合的FR。如本文所使用的,FR代表四个子区域之一,并且FRs代表构成框架区的四个子区域中的两个或更多个。人重链和轻链受体序列是本领域已知的。在一个实施方案中,本领域已知的受体序列可用于本文中公开的抗体中。

[0049] GAA:如本文所用,术语“GAA”是指编码酸性 α -葡糖苷酶的基因,酸性 α -葡糖苷酶是分解溶酶体中的糖原的蛋白质。在一些实施方案中,GAA可以是人基因(基因ID:2548)、非人灵长类基因(例如,基因ID:712054,基因ID:454940)或啮齿动物基因(例如,基因ID:14387,基因ID:367562)。在人中,突变GAA蛋白的表达导致蓬佩病。另外,已经表征了编码不同蛋白质同工型的多种转录物变体(例如,如以下GenBank RefSeq登录号进行注释:NM_000152.4、NM_001079803.2和NM_001079804.2)。

[0050] GAA等位基因:如本文所用,术语“GAA等位基因”是指GAA基因的替代形式(例如,野生型或突变形式)中的任一种。在一些实施方案中,GAA等位基因可编码保留其正常和典型功能的野生型酸性 α -葡糖苷酶。在一些实施方案中,GAA等位基因可包含一个或更多个与蓬佩病相关的突变,例如如以下中公开的:Moravej, et al. “A New Mutation Causing Severe Infantile-Onset Pompe Disease Responsive to Enzyme Replacement Therapy,” *Iran J Med Sci*, 2018; 以及 van der Wal E., et al. “GAA Deficiency in Pompe Disease Is Alleviated by Exon Inclusion in iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells” *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Jun 16; 7:101-115; 其各自的整个内容通过引用并入本文。

[0051] GYS1:如本文所用,术语“GYS1”是指编码糖原合酶的基因,糖原合酶在糖原的合成中发挥作用。在一些实施方案中,GYS1可以是人基因(基因ID:2997)、非人灵长类基因(例如,基因ID:574233,基因ID:456196)或啮齿动物基因(例如,基因ID:14936,基因ID:

690987)。在人中,突变GYS1蛋白的表达导致糖原合成降低。另外,已经表征了编码不同蛋白质同工型的多种人转录物变体(例如,如以下GenBank RefSeq登录号进行注释:NM_001161587.1和NM_002103.4)。

[0052] 人抗体:如本文所用,术语“人抗体”旨在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本公开内容的人抗体可包含不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中,特别是在CDR3中。然而,如本文所用,术语“人抗体”不意图包括其中源自另一哺乳动物物种(例如小鼠)种系的CDR序列已接枝到人框架序列上的抗体。

[0053] 人源化抗体:术语“人源化抗体”是指包含来自非人物种(例如,小鼠)的重链和轻链可变区序列但是其中VH和/或VL序列的至少一部分已被改变为更加“人样”(即,更类似于人种系可变序列)的抗体。一种类型的人源化抗体是CDR接枝抗体,其中人CDR序列被引入非人VH和VL序列中以替代相应的非人CDR序列。在一个实施方案中,提供了人源化抗转铁蛋白受体抗体和抗原结合部分。这样的抗体可以通过使用传统的杂交瘤技术获得鼠抗转铁蛋白受体单克隆抗体随后使用体外基因工程化进行人源化来产生,例如在Kasalian等人的PCT公开No.WO 2005/123126 A2中公开的那些。

[0054] 内化细胞表面受体:如本文所用,术语“内化细胞表面受体”是指在外部刺激(例如配体与受体结合)下被细胞内化的细胞表面受体。在一些实施方案中,内化细胞表面受体通过内吞作用内化。在一些实施方案中,内化细胞表面受体通过网格蛋白介导的内吞作用内化。然而,在一些实施方案中,内化细胞表面受体通过不依赖于网格蛋白的途径内化,例如如吞噬作用、巨胞饮作用、小窝和筏介导的摄取或组成型网格蛋白非依赖性内吞作用。在一些实施方案中,内化细胞表面受体包含胞内结构域、跨膜结构域和/或胞外结构域,其可任选地还包含配体结合结构域。在一些实施方案中,细胞表面受体在配体结合后被细胞内化。在一些实施方案中,配体可以是肌肉靶向剂或肌肉靶向抗体。在一些实施方案中,内化细胞表面受体是转铁蛋白受体。

[0055] 分离的抗体:本文所用的“分离的抗体”旨在指代基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合转铁蛋白受体的分离的抗体基本上不含特异性结合转铁蛋白受体以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合转铁蛋白受体复合物的分离的抗体可能与其他抗原(例如来自其他物种的转铁蛋白受体分子)具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0056] Kabat编号:术语“Kabat编号”、“Kabat定义”和“Kabat标记”在本文可互换使用。在本领域中公认的这些术语是指对抗体或其抗原结合部分的重链和轻链可变区中的比其他氨基酸残基更加可变(即高变)的氨基酸残基进行编号的系统(Kabat et al. (1971) Ann.NY Acad,Sci.190:382-391以及,Kabat,E.A.,et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。对于重链可变区,CDR1的高变区为第31至35位氨基酸,CDR2的高变区为第50至65位氨基酸,并且CDR3的高变区为第95至102位氨基酸。对于轻链可变区,CDR1的高变区为第24至34位氨基酸,CDR2的高变区为第50至56位氨基酸,并且CDR3的高变区为第89至97位氨基酸。

[0057] 分子载荷:如本文所用,术语“分子载荷”是指发挥调节生物学结局作用的分子或

物质。在一些实施方案中,分子载荷与肌肉靶向剂连接或以其他方式缔合。在一些实施方案中,分子载荷是小分子、蛋白质、肽、核酸或寡核苷酸。在一些实施方案中,分子载荷发挥调节DNA序列的转录、调节蛋白质的表达或调节蛋白质的活性的作用。在一些实施方案中,分子载荷是寡核苷酸,其包含具有与靶基因互补的区域的链。

[0058] 肌肉靶向剂:如本文所用,术语“肌肉靶向剂”是指与肌细胞上表达的抗原特异性结合的分子。肌细胞内或上的抗原可以是膜蛋白,例如整合膜蛋白或外周膜蛋白。通常来说,肌肉靶向剂与肌细胞上的抗原特异性结合,这有助于将肌肉靶向剂(和任何缔合的分子载荷)内化到肌细胞中。在一些实施方案中,肌肉靶向剂与肌肉上的内化细胞表面受体特异性结合,并且能够通过受体介导的内化而内化到肌细胞中。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是小分子、蛋白质、肽、核酸(例如,适配体)、或抗体。在一些实施方案中,肌肉靶向剂与分子载荷连接。

[0059] 肌肉靶向抗体:如本文所用,术语“肌肉靶向抗体”是指为与存在于肌细胞内或上的抗原特异性结合的抗体的肌肉靶向剂。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体与肌细胞上的抗原特异性结合,这有助于将肌肉靶向抗体(和任何缔合的分子载荷)内化到肌细胞中。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体与存在于肌细胞上的内化细胞表面受体特异性结合。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是与转铁蛋白受体特异性结合的抗体。

[0060] 寡核苷酸:如本文所用,术语“寡核苷酸”是指长度高至200个核苷酸的寡聚核酸化合物。寡核苷酸的实例包括但不限于RNAi寡核苷酸(例如,siRNA、shRNA)、微RNA、间隔聚体、混合聚体、亚磷酸二酰胺吗啉代、肽核酸、适配体、指导核酸(例如,Cas9指导RNA)等。寡核苷酸可以是单链或双链。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或更多个经修饰核苷酸(例如,2'-O-甲基糖修饰、嘌呤或嘧啶修饰)。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或更多个经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸可包含一个或更多个硫代磷酸酯键联,其可以处于Rp或Sp立体化学构象。

[0061] 蓬佩病(PD):如本文所用,术语“蓬佩病(PD)”是指与以下相关的遗传疾病,其以肌肉无力、呼吸困难、张力减退以及在极端情况下心脏增大导致心力衰竭为特征。根据症状出现的时间,已经描述了三类PD。经典婴儿发病PD在出生后的几个月内开始,患者出现肌肉无力、张力减退、肝增大和心脏缺陷。如果不进行治疗,经典婴儿PD通常会导致在生命的第一年内死亡。非经典婴幼儿PD通常在约1岁表现,并且以运动技能延迟和进行性肌肉无力为特征。这种无力导致严重的呼吸问题,并且大多数患有非经典婴儿PD的患者在儿童早期死亡。晚发型PD可能直到儿童后期、青春期或成年期才表现,并且通常比婴儿PD轻。大多数患有晚发型PD的患者会出现进行性肌肉无力,这可能导致呼吸问题和呼吸衰竭。蓬佩病(PD)与OMIM Entry#232300相关。蓬佩病、该疾病的遗传学基础和相关症状已在本领域进行了描述(参见,例如Lim,et al.,“Pompe disease:from pathophysiology to therapy and back again”*Frontiers in Aging:Neuroscience*. (2014);以及Ferreira,et al.“Lysosomal storage diseases”*Transl Sci Rare Dis*. (2017),5:1-71)。

[0062] 重组抗体:如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,例如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(在本公开内容中更详细地描述),从重组、组合人抗体文库分离的抗体(Hoogenboom H.R., (1997) *TIB Tech*.15:62-70;Azzazy H.,and Highsmith W.E., (2002) *Clin.Biochem*.35:425-445;

Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), 从人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如,小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor, L.D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295; Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370), 或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,对这样的重组人抗体进行体外诱变(或当使用人Ig序列转基因的动物时,进行体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列,尽管其源自人种系VH和VL序列并与之相关,但可能不是体内人抗体种系库中天然存在的。本公开内容的一个实施方案提供了能够结合人转铁蛋白受体的完全人抗体,其可使用本领域公知的技术产生,例如但不限于使用人Ig噬菌体文库,例如Jermutus等人的PCT公开No. WO 2005/007699 A2中公开的那些。

[0063] 互补区:如本文所用,术语“互补区”是指与例如靶核酸的同源核苷酸序列充分互补的例如寡核苷酸的核苷酸序列,使得两个核苷酸序列能够在生理条件下(例如,在细胞中)彼此退火。在一些实施方案中,互补区与靶核酸的同源核苷酸序列完全互补。然而,在一些实施方案中,互补区与靶核酸的同源核苷酸序列部分互补(例如,至少80%、90%、95%或99%互补)。在一些实施方案中,与靶核酸的同源核苷酸序列相比,互补区包含1、2、3或4个错配。

[0064] 特异性结合:如本文所用,术语“特异性结合”是指分子以一定程度的亲和力或亲合力与结合伴侣结合的能力,该亲和力或亲合力使得分子能够用于在结合测定或其他结合环境中将结合伴侣与合适的对照区分开。关于抗体,术语“特异性结合”是指与合适的一种或更多种参考抗原相比,抗体以一定程度的亲和力或亲合力与特异性抗原结合的能力,该亲和力或亲合力使得抗体能够用于将特异性抗原与其他抗原区分开,例如至允许通过与如本文中所述的抗原结合而优先靶向某些细胞(例如肌细胞)的程度。在一些实施方案中,如果抗体与靶标结合的 K_D 为至少约 $10^{-4}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $10^{-13}M$ 或更小,则抗体与靶标特异性结合。在一些实施方案中,抗体与转铁蛋白受体(例如,转铁蛋白受体的顶端结构域的表位)特异性结合。

[0065] 对象:如本文所用,术语“对象”是指哺乳动物。在一些实施方案中,对象是非人灵长类或啮齿动物。在一些实施方案中,对象是人。在一些实施方案中,对象是患者,例如患有或怀疑患有疾病的人患者。在一些实施方案中,对象是患有或怀疑患有蓬佩病(PD)的人患者。在一些实施方案中,对象是具有一个或更多个与PD相关的突变GAA等位基因的人患者。

[0066] 转铁蛋白受体:如本文所用,术语“转铁蛋白受体”(也称为TFRC、CD71、p90或TFR1)是指结合转铁蛋白以促进通过内吞作用摄取铁的内化细胞表面受体。在一些实施方案中,转铁蛋白受体可以是人来源的(NCBI基因ID 7037)、非人灵长类来源的(例如NCBI基因ID 711568或NCBI基因ID 102136007)或啮齿动物来源的(例如NCBI基因ID 22042)。另外,已经表征了编码受体的不同同工型的多种人转录物变体(例如,如以下GenBank RefSeq登录号注释的:NP_001121620.1、NP_003225.2、NP_001300894.1和NP_001300895.1)。

[0067] II. 复合物

[0068] 本文中提供了包含与分子载荷共价连接的靶向剂(例如,抗体)的复合物。在一些实施方案中,复合物包含与寡核苷酸共价连接的肌肉靶向抗体。复合物可包含特异性结合单个抗原位点或结合可存在于相同或不同抗原上的至少两个抗原位点的抗体。

[0069] 复合物可用于调节至少一种基因、蛋白质和/或核酸的活性或功能。在一些实施方案中,与复合物一起存在的分子载荷负责基因、蛋白质和/或核酸的调节。分子载荷可以是能够调节细胞中基因、蛋白质和/或核酸的活性或功能的小分子、蛋白质、核酸、寡核苷酸或任何分子实体。在一些实施方案中,分子载荷是靶向与PD相关的突变GAA等位基因的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子载荷是靶向GYS1的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子载荷包含或编码GAA蛋白。

[0070] 在一些实施方案中,复合物包含与分子载荷(例如靶向与PD相关的GAA等位基因的反义寡核苷酸)共价连接的肌肉靶向剂,例如抗转铁蛋白受体抗体。

[0071] A. 肌肉靶向剂

[0072] 本公开内容的一些方面提供了肌肉靶向剂,例如用于将分子载荷递送至肌细胞。在一些实施方案中,这样的肌肉靶向剂能够例如通过与肌细胞上的抗原特异性结合而与肌细胞结合,并且将缔合的分子载荷递送至肌细胞。在一些实施方案中,分子载荷与肌肉靶向剂结合(例如,共价结合),并且在肌肉靶向剂与肌细胞上的抗原结合后内化到肌细胞中,例如通过内吞作用。应当理解,根据本公开内容可以使用多种类型的肌肉靶向剂。例如,肌肉靶向剂可包含核酸(例如,DNA或RNA)、肽(例如,抗体)、脂质(例如,微泡(microvesicle))或糖部分(例如,多糖),或者由其组成。示例性的肌肉靶向剂在本文中进一步详细描述,然而,应当理解,本文中提供的示例性肌肉靶向剂并不意味着是限制性的。

[0073] 本公开内容的一些方面提供了与肌肉(例如骨骼肌、平滑肌或心肌)上的抗原特异性结合的肌肉靶向剂。在一些实施方案中,本文中提供的任何肌肉靶向剂均与骨骼肌细胞、平滑肌细胞和/或心肌细胞上的抗原结合(例如,特异性结合)。

[0074] 通过与肌肉特异性细胞表面识别元件(例如,细胞膜蛋白)相互作用,可实现组织定位和选择性摄取到肌细胞中二者。在一些实施方案中,作为肌肉摄取转运体之底物的分子可用于将分子载荷递送到肌肉组织中。与肌肉表面识别元件结合之后是胞吞作用,其可允许甚至大分子(例如,抗体)进入肌细胞。作为另一个实例,与转铁蛋白或抗转铁蛋白受体抗体缀合的分子载荷可通过与转铁蛋白受体结合而被肌细胞摄取,然后可例如通过网格蛋白介导的内吞作用内吞。

[0075] 肌肉靶向剂的使用可用于将分子载荷(例如,寡核苷酸)集中在肌肉中,同时降低与其他组织中的作用相关的毒性。在一些实施方案中,与对象内的另一种细胞类型相比,肌肉靶向剂将结合的分子载荷集中在肌细胞中。在一些实施方案中,肌肉靶向剂将结合的分子载荷以比非肌细胞(例如,肝、神经元、血液或脂肪细胞)中的量高至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍的量集中在肌细胞(例如骨骼肌、平滑肌或心肌细胞)中。在一些实施方案中,当分子载荷在与肌肉靶向剂结合时递送至对象时,其在对象中的毒性降低至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或95%。

[0076] 在一些实施方案中,为了实现肌肉选择性,可能需要肌肉识别元件(例如,肌细胞抗原)。作为一个实例,肌肉靶向剂可以是为肌肉特异性摄取转运体之底物的小分子。作为

另一个实例,肌肉靶向剂可以是通过转运体介导的内吞作用进入肌细胞的抗体。作为另一个实例,肌肉靶向剂可以是与肌细胞上的细胞表面受体结合的配体。应当理解,尽管基于转运体的方法为细胞进入提供了直接途径,但是基于受体的靶向可能涉及刺激的胞吞作用以达到期望的作用部位。

[0077] i. 肌肉靶向抗体

[0078] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是抗体。通常来说,抗体对其靶抗原的高特异性提供了用于选择性靶向肌细胞(例如骨骼肌、平滑肌和/或心肌细胞)的潜力。这种特异性也可以限制脱靶毒性。能够靶向肌细胞表面抗原的抗体的实例已经报道并且在本公开内容的范围内。例如,靶向肌细胞表面的抗体在以下中有描述:Arahata K., et al. "Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide" *Nature* 1988;333:861-3; Song K.S., et al. "Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins" *J Biol Chem* 1996;271:15160-5; 以及 Weisbart R.H. et al., "Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of a monoclonal antibody that binds myosin IIb" *Mol Immunol.* 2003 Mar, 39(13):78309; 其每一个的全部内容均通过引用并入本文。

[0079] a. 抗转铁蛋白受体抗体

[0080] 本公开内容的一些方面是基于这样的认识:与转铁蛋白受体结合的物质(例如抗转铁蛋白受体抗体)能够靶向肌细胞。转铁蛋白受体是内化细胞表面受体,其通过细胞膜转运转铁蛋白并参与胞内铁水平的调节和稳态。本公开内容的一些方面提供了能够与转铁蛋白受体结合的转铁蛋白受体结合蛋白。因此,本公开内容的方面提供了与转铁蛋白受体结合的结合蛋白(例如,抗体)。在一些实施方案中,与转铁蛋白受体结合的结合蛋白与任何结合的分子载荷一起被内化到肌细胞中。如本文所用,与转铁蛋白受体结合的抗体可以称为抗转铁蛋白受体抗体。与转铁蛋白受体结合(例如,特异性结合)的抗体可以在与转铁蛋白受体结合后例如通过受体介导的内吞作用而被内化到细胞中。

[0081] 应当理解,可使用数种已知的方法(例如使用噬菌体展示的文库设计)来产生、合成和/或衍生抗转铁蛋白受体抗体。示例性方法已经在本领域中表征并且通过引用并入(Díez, P. et al. "High-throughput phage-display screening in array format", *Enzyme and microbial technology*, 2015, 79, 34-41.; Christoph M.H. and Stanley, J.R. "Antibody Phage Display: Technique and Applications" *J Invest Dermatol.* 2014, 134:2.; Engleman, Edgar (Ed.) "Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies." 1985, Springer)。在另一些实施方案中,抗转铁蛋白抗体先前已被表征或公开。与转铁蛋白受体特异性结合的抗体是本领域中已知的(参见,例如1979年12月4日提交的美国专利No. 4,364,934, "Monoclonal antibody to a human early thymocyte antigen and methods for preparing same"; 2006年6月14日提交的美国专利No. 8,409,573, "Anti-CD71 monoclonal antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells"; 2014年5月20日提交的美国专利No. 9,708,406, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"; 2014年12月19日提交的US 9,611,323, "Low affinity blood

brain barrier receptor antibodies and uses therefor”;2014年12月24日提交的WO 2015/098989,“Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier”;Schneider C.et al.“Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9.”J Biol Chem.1982,257:14,8516-8522.;Lee et al.“Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse”2000,J Pharmacol.Exp.Ther.,292:1048-1052)。

[0082] 任何合适的抗转铁蛋白受体抗体都可用于本文公开的复合物中。表1中列出了抗转铁蛋白受体抗体的实例,包括相关参考文献和结合表位。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体包含本文中提供的任何抗转铁蛋白受体抗体(例如表1列出的抗转铁蛋白受体抗体)的互补决定区(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)。

[0083] 表1-抗转铁蛋白受体抗体克隆的列表,包括相关参考文献和结合表位信息。

[0084]

抗体克隆名称	参考文献	表位/注释
OKT9	1979 年 12 月 4 日提交的美国专利 No. 4,364,934, 标题为“MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME” Schneider C. et al. “Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9.” J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.	TfR 的顶端结构域 (人 TfR 序列 XM_052730.3 的第 305 至 366 位残基, 可在 GenBank 获得)
(来自 JCR) 克隆 M11 克隆 M23 克隆 M27 克隆 B84	<ul style="list-style-type: none"> 2014 年 12 月 24 日提交的 WO 2015/098989, “Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier” 2014 年 12 月 24 日提交的美国专利 No. 9,994,641, “Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier” 	顶端结构域 (TfR 的第 230 至 244 位和第 326 至 347 位残基) 和蛋白酶样结构域 (第 461 至 473 位残基)
(来自 Genentech) 7A4、8A2、 15D2、10D11、 7B10、15G11、 16G5、13C3、 16G4、16F6、 7G7、4C2、1B12	<ul style="list-style-type: none"> 2016 年 5 月 26 日提交的 WO 2016/081643, 标题为“ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE” 2014 年 5 月 20 日提交的美国专利 No. 9,708,406, “Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use” 	顶端结构域和非顶端区

[0085]

和 13D4		
(来 自 Armagen) 8D3	<ul style="list-style-type: none"> • Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse" 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052. • 2008年9月11日提交的美国专利申请 2010/077498, 标题为"COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE" 	
OX26	<ul style="list-style-type: none"> • Haobam, B. et al. 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806-21. 	
DF1513	<ul style="list-style-type: none"> • Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. Plant J 48:757-70 (2006) . 	
1A1B2、66IG10、 MEM-189 、 JF0956、29806、 1A1B2 、 TFRC/1818 、 1E6、66Ig10、 TFRC/1059 、 Q1/71、23D10、 13E4 、 TFRC/1149 、 ER-MP21 、 YTA74.4 、 BU54、2B6、RI7 217	<ul style="list-style-type: none"> • 市售抗转铁蛋白受体抗体。 	Novus Biologicals 8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120

[0086]	(来自 INSERM) BA120g	<ul style="list-style-type: none"> 2005年6月15日提交的美国专利申请 2011/0311544A1, 标题为“ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS” 	不与 OKT9 竞争
	LUCA31	<ul style="list-style-type: none"> 2004年6月7日提交的美国专利 No. 7,572,895, 标题为“TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES” 	“LUCA31 表位”
	(Salk Institute) B3/25 T58/30	Trowbridge, I.S. et al. “Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells.” Nature, 1981, volume 294, pages 171-173	
	R17 217.1.3、5E9C11、OKT9 (BE0023 克隆)	<ul style="list-style-type: none"> 市售抗转铁蛋白受体抗体 	BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B West Lebanon, NH 03784-1671 USA
	BK19.9、B3/25、T56/14 和 T58/1	<ul style="list-style-type: none"> Gatter, K.C. et al. “Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance.” J Clin Pathol. 1983 May;36(5):539-45. 	

[0087] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是抗转铁蛋白受体抗体。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体与具有如本文公开的氨基酸序列的转铁蛋白蛋白质特异性结合。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体可与转铁蛋白受体的任何胞外表位或开始暴露于抗体的表位(包括顶端结构域、转铁蛋白结合结构域和蛋白酶样结构域)特异性结合。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体与人或非人灵长类转铁蛋白受体的氨基酸片段(如SEQ ID No.1至3中提供的)在氨基酸C89至F760的范围内结合。在一些实施方案中,转铁蛋白受体抗体以至少约 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、 10^{-13} M或更小的结合亲和力特异性结合。本文使用的抗转铁蛋白受体抗体可以能够与其他抗转铁蛋白受体抗体(例如OKT9、8D3)竞争结合,后者抗体以 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M或更小与转铁蛋白受体结合。

[0088] 对应于NCBI序列NP_003225.2(转铁蛋白受体蛋白1同工型1,智人)的示例性人转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

[0089] MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLA VDEEENADNNT
KANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPG
EDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVEN
QFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVA YSKAATVT
GKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKF
PIVNAELSSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFNGM
EGDCPSDWKTDSTCRMVTSSEKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQ
RDAWGPGA AAKSGVGTALLLKL A QMFSDMVLK DGFQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATE
WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQ
DSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELN
KVARAAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLN QYRADIKEMGLSLQW
LYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPF RH
VFWGSGSHTLPALLENLKL RKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDI
DNEF (SEQ ID NO: 1).

[0090] 对应于NCBI序列NP_001244232.1 (转铁蛋白受体蛋白1,食蟹猴)的示例性非人灵长类转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

[0091] MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLG VDEEENTDNNTKPNGT
KPKRCGGNICYGTIAV IIFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPA
APRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFREFK
LSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVA YSKAATVTGKLVH
ANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFP IVKAD
LSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFNGMEGDCPS
DWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAW
GPGA AKSSVGTALLLKL A QMFSDMVLK DGFQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLEGY
LSSLHLKAFTYINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWA
SKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKVAR
AAAEVAGQFVIKLT HDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLN QYRADVKEMGLSLQWL YSA
RGDFFRATSRLTTDFR NAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPF RHVFWG
SGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
(SEQ ID NO: 2)

[0092] 对应于NCBI序列XP_005545315.1 (转铁蛋白受体蛋白1,食蟹猴)的示例性非人灵长类转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDEEENTDNNKANGT
 KPKRCGGNICYGTIAVIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPA
 APRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFREFK
 LSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVH
 ANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKAD
 LSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPS
 DWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAW
 [0093] GPGAAKSSVGTALLLKL A QMFSDMVLDKGFQPSRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEGY
 LSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWA
 SKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKVAR
 AAAEVAGQFVIKLTHTDELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYSA
 RGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFMKKNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPF RHVFWG
 SGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 3).

[0094] 对应于NCBI序列NP_001344227.1 (转铁蛋白受体蛋白1,小家鼠 (mus musculus))
 的示例性鼠转铁蛋白受体氨基酸序列如下:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLA ADEEENADNNMKASV
 RKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMMSGYLG YCKRVEQKEECVKLAETEETDKSETMETE
 DVPTSSRLYWADLK TLLSEKLN SIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIENQFH
 EFKFSK VWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVSGKLV
 HANFGTKKDFEELS YSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKFPVVE
 ADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGKMEGS
 CPARWNIDSSCKLELSQ NQNVLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEDRYVVVGAQRDA
 [0095] LGAGVAAKSSVGTGLLLKL A QVFSDMISKDGF RPSRSIIFASWTAGDFGAVGATEWLEG
 YLSSLHLKAFTYINLDKVV LGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLYRDSN
 WISKVEKLSFDNAA YPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQLNQM
 VRTAAEVAGQLIKLTHDVELNLDYEMYN SKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQWLYS
 ARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNR FVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPFRHIFWG
 SGSHTLSALVENLKL RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNEF
 (SEQ ID NO: 4)

[0096] 在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体与如下的受体氨基酸片段结合:

FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGKLVHANFGTKKDFE
 DLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAEL SFFGHAHLG
 TGDYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCR
 MVTSESKNVLT VSNVLKE (SEQ ID NO: 5)

[0097] 并且不抑制转铁蛋白受体与转铁蛋白和/或人血色素沉着蛋白(也称为HFE)之间的结合相互作用。

[0098] 可使用适当的方法来获得和/或产生抗体、抗体片段或抗原结合剂,例如,通过使用重组DNA方案。在一些实施方案中,也可通过杂交瘤的产生来产生抗体(参见,例如, Kohler, G and Milstein, C. “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity” *Nature*, 1975, 256:495-497)。目的抗原可以以任何形式或实体(例如重组或天然形式或实体)用作免疫原。使用标准方法(例如ELISA筛选)筛选杂交瘤,以发现至少一种产生靶向特定抗原之抗体的杂交瘤。也可通过筛选表达抗体的蛋白质表达文库(例如噬菌体展示文库)来产生抗体。在一些实施方案中,也可使用噬菌体展示文库设计(参见,例如,1991年3月1日提交的美国专利No 5,223,409, “Directed evolution of novel binding proteins”; 1992年4月10日提交的WO 1992/18619, “Heterodimeric receptor libraries using phagemids”; 1991年5月1日提交的WO 1991/17271, “Recombinant library screening methods”; 1992年5月15日提交的WO 1992/20791, “Methods for producing members of specific binding pairs”; 1992年2月28日提交的WO 1992/15679, “Improved epitope displaying phage”)。在一些实施方案中,目的抗原可用于对非人动物,例如啮齿动物或山羊进行免疫接种。在一些实施方案中,然后从非人动物获得抗体,并且可任选地使用多种方法(例如使用重组DNA技术)对其进行修饰。抗体产生和方法的其他实例是本领域已知的(参见,例如Harlow et al. “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.)。

[0099] 在一些实施方案中,对抗体进行修饰,例如,通过糖基化、磷酸化、SUMO化和/或甲基化进行修饰。在一些实施方案中,抗体是与一个或多个糖或碳水化合物分子缀合的糖基化抗体。在一些实施方案中,一个或多个糖或碳水化合物分子通过N-糖基化、O-糖基化、C-糖基化、糖基磷脂酰肌醇化(GPI锚定附着)和/或磷酸糖基化与抗体缀合。在一些实施方案中,一个或多个糖或碳水化合物分子是单糖、二糖、寡糖或聚糖。在一些实施方案中,一个或多个糖或碳水化合物分子是支链的寡糖或支链的聚糖。在一些实施方案中,一个或多个糖或碳水化合物分子包含甘露糖单元、葡萄糖单元、N-乙酰葡萄糖胺单元、N-乙酰半乳糖胺单元、半乳糖单元、岩藻糖单元或磷脂单元。在一些实施方案中,存在约1至10、约1至5、约5至10、约1至4、约1至3或约2个糖分子。在一些实施方案中,糖基化抗体是完全或部分糖基化的。在一些实施方案中,通过化学反应或通过酶促手段使抗体糖基化。在一些实施方案中,抗体在体外或细胞内被糖基化,其可任选地缺少N-或O-糖基化途径中的酶,例如糖基转移酶。在一些实施方案中,用糖或碳水化合物分子对抗体进行官能化,如2014年5月1日公开的标题为“Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof”的国际专利申请公开W02014065661中所述。

[0100] 本公开内容的一些方面提供了与转铁蛋白受体(例如,转铁蛋白受体的胞外部分)结合的蛋白质。在一些实施方案中,本文中提供的转铁蛋白受体抗体与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)特异性结合。转铁蛋白受体是内化细胞表面受体,其通过细胞膜来转运转铁蛋白并参与细胞内铁水平的调节和稳态。在一些实施方案中,本文中提供的转铁蛋白受体抗体与来自人、非人灵长类、小鼠、大鼠等的转铁蛋白受体特异性结合。在一些实施方案中,本文中提供的转铁蛋白受体抗体与人转铁蛋白受体结合。在一些实施方案中,本文中提供的转铁蛋白受体抗体与人转铁蛋白受体特异性结合。在一些实施方案中,本文中提供的转铁蛋白受体抗体与人转铁蛋白受体的顶端结构域结合。在一些实施方案中,本文中

提供的转铁蛋白受体抗体与人转铁蛋白受体的顶端结构域特异性结合。

[0101] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体的一个或更多个CDR-H(例如,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)氨基酸序列。在一些实施方案中,转铁蛋白受体抗体包含为选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体提供的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。在一些实施方案中,转铁蛋白受体抗体包含为选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体提供的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,转铁蛋白受体抗体包含为选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体提供的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。本公开内容还包含编码包含为选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体提供的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2或CDR-L3的分子的任何核酸序列。在一些实施方案中,抗体重链和轻链CDR3结构域可能在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中发挥特别重要的作用。因此,本公开内容的抗转铁蛋白受体抗体可至少包含选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体的重链和/或轻链CDR3。

[0102] 在一些实例中,本公开内容的任何抗转铁蛋白受体抗体均具有与选自表1的一种抗转铁蛋白受体抗体的任何CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和/或CDR-L3序列基本上相似的一个或更多个CDR(例如CDR-H或CDR-L)。在一些实施方案中,本文所述的抗体的一个或更多个CDR沿着VH(例如CDR-H1、CDR-H2或CDR-H3)和/或VL(例如CDR-L1、CDR-L2或CDR-L3)区的位置可改变一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸位置,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,基本上维持了其来源原始抗体之结合的例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。例如,在一些实施方案中,限定本文所述的任何抗体的CDR的位置可通过将CDR的N端和/或C端边界相对于本文所述的任一种抗体的CDR位置移动一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸来改变,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,基本上维持了其来源原始抗体之结合的例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。在另一个实施方案中,本文所述的抗体的一个或更多个CDR沿着VH(例如,CDR-H1、CDR-H2或CDR-H3)和/或VL(例如,CDR-L1、CDR-L2或CDR-L3)的长度可改变(例如变得更短或更长)一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,基本上维持了其来源原始抗体之结合的例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。

[0103] 因此,在一些实施方案中,本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3可比本文所述的一个或更多个CDR(例如选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的CDR)短一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,相对于其所来源原始抗体的结合,基本上维持了例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。在一些实施方案中,本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3可比本文所述的一个或更多个CDR(例如选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的CDR)长一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,相对于其所来源原始抗体的结合,基本上维持了例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。在一些实施方案中,与本文所述的一个或更多个CDR(例如选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的CDR)相比,本文所述的CDR-L1、CDR-L2、

CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3的氨基部分可延长一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,相对于其所来源原始抗体的结合,基本上维持了例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。在一些实施方案中,与本文所述的一个或更多个CDR(例如选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的CDR)相比,本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3的羧基部分可延长一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,相对于其所来源原始抗体的结合,基本上维持了例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。在一些实施方案中,与本文所述的一个或更多个CDR(例如选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的CDR)相比,本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3的氨基部分可缩短一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,相对于其所来源原始抗体的结合,基本上维持了例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。在一些实施方案中,与本文所述的一个或更多个CDR(例如选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的CDR)相比,本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和/或CDR-H3的羧基部分可缩短一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,相对于其所来源原始抗体的结合,基本上维持了例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。可使用任何方法来确定是否维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合,例如使用本领域描述的结合测定和条件。

[0104] 在一些实例中,本公开内容的任何抗转铁蛋白受体抗体均具有与选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体基本上相似的一个或更多个CDR(例如CDR-H或CDR-L)序列。例如,抗体可包含选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的一个或更多个CDR序列,其与本文中提供的任一个CDR(例如选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的CDR)的相应CDR区相比包含多至5、4、3、2或1个氨基酸残基变异,只要维持了与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)的免疫特异性结合(例如,相对于其所来源原始抗体的结合,基本上维持了例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%)即可。在一些实施方案中,本文中提供的任何CDR中的任何氨基酸变异均可以是保守变异。保守变异可在残基不太可能参与与转铁蛋白受体蛋白(例如人转铁蛋白受体蛋白)相互作用的位置(例如如基于晶体结构确定的)处引入CDR中。本公开内容的一些方面提供了转铁蛋白受体抗体,其包含本文中提供的的一个或更多个重链可变(VH)和/或轻链可变(VL)结构域。在一些实施方案中,本文中提供的任何VH结构域均包含本文中提供的的一个或更多个CDR-H序列(例如,CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3),例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体中提供的任何CDR-H序列。在一些实施方案中,本文中提供的任何VL结构域均包含本文中提供的的一个或更多个CDR-L序列(例如,CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体中提供的任何CDR-L序列。

[0105] 在一些实施方案中,本公开内容的抗转铁蛋白受体抗体包括包含任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的重链可变结构域和/或轻链可变结构域的任何抗体。在一些实施方案中,本公开内容的抗转铁蛋白受体抗体包括包含任何

抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的重链可变和轻链可变的任何抗体。

[0106] 本公开内容的一些方面提供了抗转铁蛋白受体抗体,其具有与本文所述的那些中的任何同源的重链可变(VH)和/或轻链可变(VL)结构域氨基酸序列。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体包含与任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的重链可变序列和/或轻链可变序列具有至少75%(例如,80%、85%、90%、95%、98%或99%)同一性的重链可变序列或轻链可变序列。在一些实施方案中,同源重链可变和/或轻链可变氨基酸序列在本文中提供的任何CDR序列内均不变化。例如,在一些实施方案中,序列变异的程度(例如75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)可发生在本文中提供的不包括任何CDR序列的重链可变和/或轻链可变序列中。在一些实施方案中,本文中提供的任何抗转铁蛋白受体抗体包含重链可变序列和轻链可变序列,其包含与任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的框架区序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的框架区序列。

[0107] 在一些实施方案中,与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)特异性结合的抗转铁蛋白受体抗体包含轻链可变VL结构域,所述轻链可变VL结构域包含选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体的任何CDR-L结构域(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),或本文中提供的CDR-L结构域变体。在一些实施方案中,与转铁蛋白受体(例如,人转铁蛋白受体)特异性结合的抗转铁蛋白受体抗体包含轻链可变VL结构域,所述轻链可变VL结构域包含任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体包含轻链可变(VL)区序列,所述轻链可变(VL)区序列包含任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的轻链可变区序列的一个、两个、三个或四个框架区。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体包含轻链可变区序列的一个、两个、三个或四个框架区,其与任何转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)轻链可变区序列的一个、两个、三个或四个框架区具有至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一性。在一些实施方案中,源自所述氨基酸序列的轻链可变框架区由所述氨基酸序列组成,但是存在多至10个氨基酸替换、缺失和/或插入,优选多至10个氨基酸替换。在一些实施方案中,源自所述氨基酸序列的轻链可变框架区由所述氨基酸序列组成,其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基替换存在于相应的非人灵长类或人轻链可变框架区的类似位置的氨基酸。

[0108] 在一些实施方案中,与转铁蛋白受体特异性结合的抗转铁蛋白受体抗体包含任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,抗体还包含源自人或灵长类的VL的一个、两个、三个或全部四个VL框架区。被选择用于本文所述的轻链CDR序列的抗体的灵长类或人轻链框架区可与非人亲本抗体的轻链框架区具有例如至少70%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少99%)同一性。所选择的灵长类或人抗体在其轻链互补决定区中的氨基酸编号可与本文中提供的任何抗体(例如选自表1的任何抗转铁蛋白受体抗体)的轻链互补决定区中的氨基酸编号相同或基本上相同。在一些实施方案中,灵长类或人轻链框架区氨基酸残基来自天然灵长类或人抗体轻链框架区,其与任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的轻链框架区具有至少75%同一性,至少80%同一性,至少85%同一

性,至少90%同一性,至少95%同一性,至少98%同一性,至少99%(或更多)同一性。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体还包含源自人轻链可变 κ 亚家族的一个、两个、三个或全部四个VL框架区。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体还包含源自人轻链可变 λ 亚家族的一个、两个、三个或全部四个VL框架区。

[0109] 在一些实施方案中,本文中提供的任何抗转铁蛋白受体抗体包含轻链可变结构域,其还包含轻链恒定区。在一些实施方案中,轻链恒定区是 κ 或 λ 轻链恒定区。在一些实施方案中, κ 或 λ 轻链恒定区来自哺乳动物,例如来自人、猴、大鼠或小鼠。在一些实施方案中,轻链恒定区是人 κ 轻链恒定区。在一些实施方案中,轻链恒定区是人 λ 轻链恒定区。应当理解,本文中提供的任何轻链恒定区均可以是本文中提供的任何轻链恒定区的变体。在一些实施方案中,轻链恒定区包含与任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的任何轻链恒定区具有至少75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0110] 在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体是任何抗转铁蛋白受体抗体,例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体。

[0111] 在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体包含VL结构域,所述VL结构域包含任何抗转铁蛋白受体抗体(例如选自表1的任一种抗转铁蛋白受体抗体)的氨基酸序列,并且其中恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子或人IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子的恒定区的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗转铁蛋白受体抗体包含任何VL结构域或VL结构域变体,以及任何VH结构域或VH结构域变体,其中VL和VH结构域或其变体来自同一抗体克隆,并且其中恒定区包含IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子或者免疫球蛋白分子的任何类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类(例如,IgG2a和IgG2b)的恒定区的氨基酸序列。人恒定区的非限制性实例在本领域中描述,例如参见上文Kabat E Aet al.,(1991)。

[0112] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体可以以相对高的亲和力与靶抗原(例如,转铁蛋白受体)结合,例如 K_D 小于 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 或更小。例如,抗转铁蛋白受体抗体可以以5pM至500nM、例如50pM至100nM、例如500pM至50nM的亲和力与转铁蛋白受体蛋白(例如,人转铁蛋白受体)结合。本公开内容还包括与本文所述的任何抗体竞争与转铁蛋白受体蛋白(例如,人转铁蛋白受体)的结合并且亲和力为50nM或更小(例如,20nM或更小、10nM或更小、500pM或更小、50pM或更小或者5pM或更小)的抗体。可使用任何合适的方法来测试抗转铁蛋白受体抗体的亲和力和结合动力学,所述方法包括但不限于生物传感器技术(例如,OCTET或BIAcore)。

[0113] 在一些实施方案中,本公开内容的抗体可以以相对高的亲和力与靶抗原(例如,转铁蛋白受体)结合,例如 K_D 小于 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 或更小。例如,抗转铁蛋白受体抗体可以以5pM至500nM、例如50pM至100nM、例如500pM至50nM的亲和力与转铁蛋白受体蛋白(例如,人转铁蛋白受体)结合。本公开内容还包括与本文所述的任何抗体竞争与转铁蛋白受体蛋白(例如,人转铁蛋白受体)的结合并且亲和力为50nM或更小(例如,20nM或更小、10nM或更小、500pM或更小、50pM或更小或者5pM或更小)的抗体。可使用任何合适的方法来测试抗转铁蛋白受体抗体的亲和力和结合动力学,所述方法包括但不限于生物传感器技术(例如,OCTET或BIAcore)。

[0114] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是转铁蛋白受体抗体(例如,如国际申请公开WO 2016/081643中所述的抗体及其变体,通过引用并入本文)。

[0115] 在表1.1中提供了根据不同定义系统的抗体的重链和轻链CDR。已经描述了不同的定义系统,例如Kabat定义、Chothia定义和/或contact定义。参见例如(例如Kabat,E.A.,et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242, Chothia et al., (1989) Nature 342:877; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948; 以及Almagro, J. Mol. Recognit. 17:132-143 (2004)。还参见hgmp.mrc.ac.uk和bioinf.org.uk/abs)。

[0116] 表1.1小鼠转铁蛋白受体抗体的重链和轻链CDR

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 17)	GYTFTSY (SEQ ID NO: 23)	TSYWMH (SEQ ID NO: 25)
CDR-H2	EINPTNGRTNYIEKFKS (SEQ ID NO: 18)	NPTNGR (SEQ ID NO: 24)	WIGEINPTNGRTN (SEQ ID NO: 26)
CDR-H3	GTRAYHY (SEQ ID NO: 19)	GTRAYHY (SEQ ID NO: 19)	ARGTRA (SEQ ID NO: 27)
CDR-L1	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 20)	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 20)	YSNLAWY (SEQ ID NO: 28)
CDR-L2	DATNLAD (SEQ ID NO: 21)	DATNLAD (SEQ ID NO: 21)	LLVYDATNLA (SEQ ID NO: 29)
CDR-L3	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 22)	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 22)	QHFWGTPL (SEQ ID NO: 30)

[0117] 还提供了重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域序列:

[0118] VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGR

[0119] TNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVS
S (SEQ ID NO: 33)

[0120] VL

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLVSNLAWYQQKQKSPQLLVYDATNLADGV

[0122] PSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYQCQHFHWGTPFTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 34)

[0123] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含与表1.1中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含与表1.1中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3相同的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0124] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,与表1.1中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相比,其共同包含不超过5个氨基酸变异(例如,不超过5、4、3、2或1个氨基酸变异)。“共同”意指所有三个重链CDR中的氨基酸变异的总数均在限定的范围内。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体可包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,与表1.1中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3相比,其共同包含不超过5个氨基酸变异(例如,不超过5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0125] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,其中至少一个与表1.1中所示的对应重链CDR相比包含不超过3个氨基酸变异(例如,不超过3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体可包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中至少一个与表1.1中所示的对应轻链CDR相比包含不超过3个氨基酸变异(例如,不超过3、2或1个氨基酸变异)。

[0126] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含CDR-L3,其与表1.1中所示的CDR-L3相比包含不超过3个氨基酸变异(例如,不超过3、2或1个氨基酸变异)。在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含CDR-L3,其与表1.1中所示的CDR-L3相比包含1个氨基酸变异。在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含QHFAGTPLT (SEQ ID NO:31,根据Kabat和Chothia定义系统)或QHFAGTPL (SEQ ID NO:32,根据Contact定义系统)的CDR-L3。在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含与表1.1中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1和CDR-L2,并且包含QHFAGTPLT (SEQ ID NO:31,根据Kabat和Chothia定义系统)或QHFAGTPL (SEQ ID NO:32,根据Contact定义系统)的CDR-L3。

[0127] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含重链CDR,其共同与表1.1中所示的重链CDR具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含轻链CDR,其共同与表1.1中所示的轻链CDR具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性。

[0128] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL。

[0129] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含VH,所述VH与SEQ ID NO:33中所示的VH相比包含不超过20个氨基酸变异(例如不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含VL,所述VL与SEQ ID NO:34中所示的VL相比包含不超过15个氨基酸变异(例如不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0130] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:33中所示的VH具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%或98%) 同一性的氨基酸序列。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:34中所示的VL具有至少80% (例如,80%、85%、90%、95%或98%) 同一性的氨基酸序列。

[0131] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是人源化抗体 (例如,抗体的人源化变体)。在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含与表1.1中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且包含人源化重链可变区和/或人源化轻链可变区。

[0132] 人源化抗体是人免疫球蛋白 (接受体抗体),其中来自接受体的互补决定区 (CDR) 的残基被来自具有期望特异性、亲和力和容量 (capacity) 的非人物种 (供体抗体) 例如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基替代。在一些实施方案中,人免疫球蛋白的Fv框架区 (FR) 残基被相应的非人残基替代。此外,人源化抗体可包含在接受体抗体或者导入的CDR或框架序列中均未发现但被包含在内以进一步完善和优化抗体性能的残基。通常来说,人源化抗体将包含至少一个并且通常两个可变结构域的基本上全部,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区或结构域 (Fc) (通常是人免疫球蛋白的那些) 的至少一部分。抗体可具有如WO 99/58572中所述修饰的Fc区。人源化抗体的另一些形式具有相对于原始抗体改变的一个或更多个CDR (一个、两个、三个、四个、五个、六个),其也称为源自来自原始抗体的一个或更多个CDR的一个或更多个CDR。人源化抗体还可能涉及亲和力成熟。

[0133] 在一些实施方案中,通过将CDR (例如,如表1.1中所示) 接枝到IGKV1-NL1*01和IGHV1-3*01人可变结构域中来实现人源化。在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是人源化变体,其与SEQ ID NO:34中所示的VL相比在第9、13、17、18、40、45和70位处包含一个或更多个氨基酸替换,和/或与SEQ ID NO:33中所示的VH相比在第1、5、7、11、12、20、38、40、44、66、75、81、83、87和108位处包含一个或更多个氨基酸替换。在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是人源化变体,其与SEQ ID NO:34中所示的VL相比在全部的第9、13、17、18、40、45和70位处包含氨基酸替换,和/或与SEQ ID NO:33中所示的VH相比在全部的第1、5、7、11、12、20、38、40、44、66、75、81、83、87和108位处包含氨基酸替换。

[0134] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是人源化抗体,并且包含如SEQ ID NO:34中所示的VL的第43和48位处的残基。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是人源化抗体,并且包含如SEQ ID NO:33中所示的VH的第48、67、69、71和73位处的残基。

[0135] 提供了可根据本公开内容使用的示例性人源化抗体的VH和VL氨基酸序列:

[0136] 人源化VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIPTNGR

[0137] TNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGMVTV
SS (SEQ ID NO: 35)

[0138] 人源化VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLDGV

[0139] PSRFSGSGSGTDYSLKINSLSQSEDFGTYCYCQHFHWGTPLETFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 36)

[0140] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VL。

[0141] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含VH,所述VH与SEQ ID NO:35中所示的VH相比包含不超过20个氨基酸变异(例如不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含VL,所述VL与SEQ ID NO:36中所示的VL相比包含不超过15个氨基酸变异(例如不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0142] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含VH,所述VH包含与SEQ ID NO:35中所示的VH具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的氨基酸序列。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含VL,所述VL包含与SEQ ID NO:36中所示的VL具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的氨基酸序列。

[0143] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是人源化变体,其与SEQ ID NO:34中所示的VL相比在第43和48位中的一个或多个处包含氨基酸替换,和/或与SEQ ID NO:33中所示的VH相比在第48、67、69、71和73位中的一个或多个处包含氨基酸替换。在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是人源化变体,其与SEQ ID NO:34中所示的VL相比包含S43A和/或V48L突变,和/或与SEQ ID NO:33中所示的VH相比包含A67V、L69I、V71R和K73T突变中的一个或多个。

[0144] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是人源化变体,其与SEQ ID NO:34中所示的VL相比在第9、13、17、18、40、43、48、45和70位中的一个或多个处包含氨基酸替换,和/或与SEQ ID NO:33中所示的VH相比在第1、5、7、11、12、20、38、40、44、48、66、67、69、71、73、75、81、83、87和108位中的一个或多个处包含氨基酸替换。

[0145] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体是嵌合抗体,其可包含来自人抗体的重恒定区和轻恒定区。嵌合抗体是指具有来自第一物种的可变区或可变区的一部分以及来自第二物种的恒定区的抗体。通常来说,在这些嵌合抗体中,轻链和重链二者的可变区模拟源自一种哺乳动物(例如,非人哺乳动物,例如小鼠、兔和大鼠)的抗体的可变区,而恒定部分与源自另一种哺乳动物(例如人)的抗体中的序列同源。在一些实施方案中,可在可变区和/或恒定区中进行氨基酸修饰。

[0146] 在一些实施方案中,本文所述的转铁蛋白受体抗体是嵌合抗体,其可包含来自人抗体的重恒定区和轻恒定区。嵌合抗体是指具有来自第一物种的可变区或可变区的一部分以及来自第二物种的恒定区的抗体。通常来说,在这些嵌合抗体中,轻链和重链二者的可变区模拟源自一种哺乳动物(例如,非人哺乳动物,例如小鼠、兔和大鼠)的抗体的可变区,而恒定部分与源自另一种哺乳动物(例如人)的抗体中的序列同源。在一些实施方案中,可在可变区和/或恒定区中进行氨基酸修饰。

[0147] 在一些实施方案中,本文所述的任何转铁蛋白受体抗体的重链可包含重链恒定区(CH)或其一部分(例如,CH1、CH2、CH3或其组合)。重链恒定区可具有任何合适的来源,例如

人、小鼠、大鼠或兔。在一个特定的实例中,重链恒定区是来自人IgG例如IgG1、IgG2或IgG4的(γ 重链)。下面给出了示例性人IgG1恒定区:

[0148] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37)

[0149] 在一些实施方案中,本文所述的任何转铁蛋白受体抗体的轻链可还包含轻链恒定区(CL),其可以是本领域已知的任何CL。在一些实例中,CL是 κ 轻链。在另一些实例中,CL是 λ 轻链。在一些实施方案中,CL是 κ 轻链,其序列提供如下:

[0150] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 38)

[0151] 其他抗体重链和轻链恒定区是本领域公知的,例如在IMGT数据库(www.imgt.org)或www.vbase2.org/vbstat.php.中提供的那些,二者都通过引用并入本文。

[0152] 下面提供了所述的转铁蛋白受体抗体的示例性重链和轻链氨基酸序列:

[0153] 重链(VH+人IgG1恒定区)

[0154] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSTVVSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

[0155] 轻链(VL+ κ 轻链)

[0156] QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSTVVSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 40)

[0157] 重链(人源化VH+人IgG1恒定区)

[0158] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGR
 TNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGMVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

[0159] 轻链(人源化VL+κ轻链)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGV
 PSRFGSGSGTDYSLKINSLQSEDFGTYQCQHFHWGTPLTFGAGTKLELKASTKGPSVFPL
 [0160] APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 42)

[0161] 在一些实施方案中,本文所述的转铁蛋白受体抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:39具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的氨基酸序列。作为替代或补充,本文所述的转铁蛋白受体抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:40具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的转铁蛋白受体抗体包含含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链。作为替代或补充,本文所述的转铁蛋白受体抗体包含含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链。

[0162] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含重链,所述重链与SEQ ID NO:39中所示的重链相比包含不超过20个氨基酸变异(例如不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含轻链,所述轻链与SEQ ID NO:40中所示的轻链相比包含不超过15个氨基酸变异(例如不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0163] 在一些实施方案中,本文所述的转铁蛋白受体抗体包含重链,所述重链包含与SEQ ID NO:41具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的氨基酸序列。作为替代或补充,本文所述的转铁蛋白受体抗体包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:42具有至少80%(例如,80%、85%、90%、95%或98%)同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的转铁蛋白受体抗体包含含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链。作为替代或补充,本文所述的转铁蛋白受体抗体包含含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链。

[0164] 在一些实施方案中,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含重链,所述重链与SEQ ID NO:39中所示的人源化抗体的重链相比包含不超过20个氨基酸变异(例如不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。作为替代或补充,本公开内容的转铁蛋白受体抗体包含轻链,所述轻链与SEQ ID NO:40中所示的人源化抗体的轻链相比包含不超过15个氨基酸变异(例如不超过20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸变异)。

[0165] 在一些实施方案中,转铁蛋白受体抗体是完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段

(FAB)。完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段可通过常规方法制备。例如,F(ab')₂片段可通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生,并且Fab片段可通过还原F(ab')₂片段的二硫键而产生。下面提供了本文所述的转铁蛋白受体抗体的示例性FAB氨基酸序列:

[0166] 重链FAB(VH+人IgG1恒定区的一部分)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVS

[0167] SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTTCP (SEQ ID
NO: 43)

[0168] 重链FAB(人源化VH+人IgG1恒定区的一部分)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGMVTV

[0169] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTTCP (SEQ ID
NO: 44)

[0170] 本文所述的转铁蛋白受体抗体可以是任何抗体形式,包括但不限于完整(即全长)抗体、其抗原结合片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链抗体、双特异性抗体或纳米抗体。在一些实施方案中,本文所述的转铁蛋白受体抗体是scFv。在一些实施方案中,本文所述的转铁蛋白受体抗体是scFv-Fab(例如,与恒定区的一部分融合的scFv)。在一些实施方案中,本文所述的转铁蛋白受体抗体是与恒定区(例如,SEQ ID NO:39中所示的人IgG1恒定区)融合的scFv。

[0171] b. 其他肌肉靶向抗体

[0172] 在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是特异性结合血幼素(hemojuvelin)、小窝蛋白-3、迪谢内肌营养不良肽、肌球蛋白Iib或CD63的抗体。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是特异性结合肌原性前体蛋白的抗体。示例性的肌原性前体蛋白包括但不限于ABCG2、M-钙黏着蛋白/钙黏着蛋白-15、小窝蛋白-1、CD34、FoxK1、整联蛋白 α 7、整联蛋白 α 7 β 1、MYF-5、MyoD、肌细胞生成蛋白、NCAM-1/CD56、Pax3、Pax7和Pax9。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是特异性结合骨骼肌蛋白的抗体。示例性的骨骼肌蛋白包括但不限于 α -肌聚糖蛋白(alpha-Sarcoglycan)、 β -肌聚糖蛋白、钙蛋白酶抑制剂、肌酸激酶MM/CKMM、eIF5A、烯醇化酶2/神经元特异性烯醇化酶、 ϵ -肌聚糖蛋白、FABP3/H-FABP、GDF-8/肌生成抑制蛋白、GDF-11/GDF-8、整联蛋白 α 7、整联蛋白 α 7 β 1、整联蛋白 β 1/CD29、MCAM/CD146、MyoD、肌细胞生成蛋白、肌球蛋白轻链激酶抑制剂、NCAM-1/CD56和肌钙蛋白I。在一些实施方案中,肌肉靶向抗体是特异性结合平滑肌蛋白的抗体。示例性的平滑肌蛋白包括但不限于 α -平滑肌肌动蛋白、VE-钙黏着蛋白、钙调蛋白结合蛋白/CALD1、钙调蛋白1、结蛋白(Desmin)、组胺H2 R、胃动素R/GPR38、转凝蛋白/TAGLN、和波形蛋白。然而,应当理解,针对其他靶标的抗体在本公开内容的范围内,并且本文中提供的靶标的示例性列表并不意图是限制性的。

[0173] c. 抗体功能/改变

[0174] 在一些实施方案中,可在残基不太可能参与与靶抗原(例如,转铁蛋白受体)相互作用的位置(例如,如基于晶体结构确定的)处将保守突变引入抗体序列(例如,CDR或框架

序列)中。在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入本文所述的肌肉靶向抗体的Fc区(例如,在CH2结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或CH3结构域(人IgG1的第341至447位残基)和/或铰链区中,根据Kabat编号系统(例如,Kabat中的EU索引)编号),以改变抗体的一种或更多种功能特性,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。

[0175] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入Fc区(CH1结构域)的铰链区中,使得铰链区中的半胱氨酸残基的数目改变(例如,增加或减少),如例如美国专利No.5,677,425中所述。可改变CH1结构域的铰链区中半胱氨酸残基的数目,例如以促进轻链和重链的组装,或改变(例如,提高或降低)抗体的稳定性或促进接头缀合。

[0176] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸替换)引入本文所述的肌肉靶向抗体的Fc区(例如,在CH2结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或CH3结构域(人IgG1的第341至447位残基)和/或铰链区中,根据Kabat编号系统(例如,Kabat中的EU索引)编号),以提高或降低抗体对效应细胞表面上Fc受体(例如,激活的Fc受体)的亲和力。降低或提高抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc区中的突变以及将这样的突变引入Fc受体或其片段的技术是本领域技术人员已知的。可进行以改变抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc受体中的突变的实例描述于以下中:例如Smith P et al., (2012) PNAS109:6181-6186,美国专利No.6,737,056,以及国际公开No.WO 02/060919、WO 98/23289、和WO97/34631,其通过引用并入本文。

[0177] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以改变(例如,降低或提高)体内抗体的半衰期。参见例如国际公开No.WO 02/060919、WO 98/23289和WO 97/34631,以及美国专利No.5,869,046、6,121,022、6,277,375和6,165,745,例如将改变(例如,降低或提高)体内抗体的半衰期的突变。

[0178] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以降低体内抗转铁蛋白受体抗体的半衰期。在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸突变(即,替换、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选地,Fc或铰链-Fc结构域片段)中以提高体内抗体的半衰期。在一些实施方案中,抗体可在第二恒定(CH2)结构域(人IgG1的第231至340位残基)和/或第三恒定(CH3)结构域(人IgG1的第341至447位残基)(根据Kabat中的EU索引(Kabat E Aet al., (1991)同上)编号)中具有一个或更多个氨基酸突变(例如,替换)。在一些实施方案中,本文所述的抗体的IgG1的恒定区包含在第252位处的甲硫氨酸(M)至酪氨酸(Y)替换,在第254位处的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)替换,以及在第256位处的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)替换,所述位置根据Kabat中的EU索引编号。参见美国专利No.7,658,921,其通过引用并入本文。这种类型的突变IgG(称为“YTE突变型”)已显示出与同一抗体的野生型形式相比半衰期提高4倍(参见Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281:23514-24)。在一些实施方案中,抗体包含IgG恒定结构域,该结构域包含在第251至257、285至290、308至314、385至389和428至436位处的氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸替换,所述位置根据Kabat中的EU索引编号。

[0179] 在一些实施方案中,将一个、两个或更多个氨基酸替换引入IgG恒定结构域Fc区

中,以改变抗转铁蛋白受体抗体的一种或更多种效应子功能。改变亲和力的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。该方法在美国专利No.5,624,821和5,648,260中有更详细的描述。在一些实施方案中,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可降低循环抗体的Fc受体结合,从而提高肿瘤定位。对于使恒定结构域缺失或失活并且从而提高肿瘤定位的突变的描述,参见例如美国专利No.5,585,097和8,591,886。在一些实施方案中,可将一个或多个氨基酸替换引入本文所述的抗体的Fc区中,以去除Fc区上潜在的糖基化位点,这可降低Fc受体结合(参见,例如Shields R Let al.,(2001)J Biol Chem 276:6591-604)。

[0180] 在一些实施方案中,可将本文所述的肌肉靶向抗体的恒定区中的一个或多个氨基酸替换为不同的氨基酸残基,使得抗体具有改变的C1q结合和/或者降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。这种方法在美国专利No.6,194,551(Idusogie等人)中有更详细的描述。在一些实施方案中,改变本文所述的抗体的CH2结构域的N端区域中的一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。这种方法在国际公开No.WO 94/29351中有进一步描述。在一些实施方案中,对本文所述的抗体的Fc区进行修饰以提高抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或提高抗体对Fc γ 受体的亲和力。这种方法在国际公开No.WO 00/42072中有进一步描述。

[0181] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体的重链和/或轻链可变结构域序列可用于产生例如CDR接枝、嵌合、人源化或复合的人抗体或抗原结合片段,如本文其他地方所述。如本领域普通技术人员所理解的,源自本文中提供的任何抗体的任何变体(CDR接枝、嵌合、人源化或复合的抗体)可用于本文所述的组合物和方法中,并将保持特异性结合转铁蛋白受体的能力,从而使得相对于其所来源原始抗体,变体(CDR接枝、嵌合、人源化或复合的抗体)具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更多的与转铁蛋白受体的结合。

[0182] 在一些实施方案中,本文中提供的抗体包含赋予抗体以期望性质的突变。例如,为了避免归因于已知与天然IgG4 mAb发生的Fab臂交换而引起的潜在并发症,本文中提供的抗体可包含稳定性‘Adair’突变(Angal S.,et al.,“A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human(IgG4) antibody,”Mol Immunol 30,105-108;1993),其中第228位(EU编号,根据Kabat编号为第241位残基)丝氨酸转化为脯氨酸,产生了IgG1样铰链序列。因此,任何抗体都可包含稳定性‘Adair’突变。

[0183] 如本文所提供,本公开内容的抗体可任选地包含恒定区或其一部分。例如,VL结构域可在其C端连接至轻链恒定结构域,如C κ 或C λ 。类似地,VH结构域或其一部分可连接至重链的全部或一部分,所述重链例如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,以及任何同种型亚类。抗体可包括合适的恒定区(参见,例如,Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,No.91-3242,National Institutes of Health Publications,Bethesda,Md.(1991))。因此,在本公开内容范围内的抗体可包含与任何合适的恒定区组合的VH和VL结构域或其抗原结合部分。

[0184] ii.肌肉靶向肽

[0185] 本公开内容的一些方面提供了肌肉靶向肽作为肌肉靶向剂。已描述了与特定细胞类型结合的短肽序列(例如,长度为5至20个氨基酸的肽序列)。例如,细胞靶向肽已在以下

中进行了描述:Vines e., et al., A. "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery" *Biochim Biophys Acta* 2008, 1786:126-38; Jarver P., et al., "In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery" *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31:528-35; Samoylova T.I., et al., "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening" *Muscle Nerve* 1999; 22:460-6; 美国专利No. 6, 329, 501, 其于2001年12月11日授权, 标题为 "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE"; 以及 Samoylov A.M., et al., "Recognition of cell-specific binding of phage display derived peptides using an acoustic wave sensor." *Biomol Eng* 2002; 18:269-72; 其各自的全部内容均通过引用并入本文。通过设计肽与特定的细胞表面抗原(例如, 受体)相互作用, 可实现对所期望组织例如肌肉的选择性。已研究了骨骼肌靶向并且能够递送一系列分子载荷。这些方法可对肌肉组织具有高度选择性, 而没有大的抗体或病毒颗粒的许多实际缺点。因此, 在一些实施方案中, 肌肉靶向剂是长度为4至50个氨基酸的肌肉靶向肽。在一些实施方案中, 肌肉靶向肽的长度为4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个氨基酸。可使用数种方法中的任一种(例如噬菌体展示)来产生肌肉靶向肽。

[0186] 在一些实施方案中, 肌肉靶向肽可与和某些其他细胞相比在肌细胞中过表达或相对高地表达的内化细胞表面受体, 例如转铁蛋白受体结合。在一些实施方案中, 肌肉靶向肽可靶向(例如, 与之结合)转铁蛋白受体。在一些实施方案中, 靶向转铁蛋白受体的肽可包含天然配体(例如转铁蛋白)的片段。在一些实施方案中, 靶向转铁蛋白受体的肽如2000年11月30日提交的美国专利No. 6, 743, 893, "RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF PEPTIDES THAT BIND THE HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR" 中所述。在一些实施方案中, 靶向转铁蛋白受体的肽如 Kawamoto, M. et al., "A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells." *BMC Cancer*. 2011 Aug 18; 11:359 中所述。在一些实施方案中, 靶向转铁蛋白受体的肽如2011年5月20日提交的美国专利No. 8, 399, 653, "TRANSFERRIN/TRANSFERRIN RECEPTOR-MEDIATED SIRMEDIATION" 中所述。

[0187] 如上所述, 已报道了肌肉靶向肽的一些实例。例如, 使用呈递表面七肽的噬菌体展示文库鉴定了肌肉特异性肽。作为一个实例, 具有氨基酸序列ASSLNIA (SEQ ID NO:6) 的肽在体外与C2C12鼠肌管结合, 并且在体内与小鼠肌肉组织结合。因此, 在一些实施方案中, 肌肉靶向剂包含氨基酸序列ASSLNIA (SEQ ID NO:6)。该肽在小鼠中进行静脉内注射之后展示出提高了与心脏和骨骼肌组织结合的特异性, 以及降低了与肝、肾和脑的结合。使用噬菌体展示已鉴定了另外的肌肉特异性肽。例如, 通过噬菌体展示文库鉴定了12个氨基酸肽用于在DMD治疗的情况下进行肌肉靶向。参见 Yoshida D., et al., "Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats." *Int J Pharm* 2002; 231:177-84; 其全部内容在此通过引用并入。在此, 鉴定了具有序列SKTFNTHPQSTP (SEQ ID NO:7) 的12个氨基酸肽, 并且该肌肉靶向肽相对于ASSLNIA (SEQ ID NO:6) 肽显示出提高了与C2C12细胞的结合。

[0188] 用于鉴定相对于其他细胞类型对肌肉(例如, 骨骼肌)具有选择性的肽的另一方法

包括体外选择,这已在Ghosh D., et al., “Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting” *J Virol* 2005;79:13667-72中进行了描述;其全部内容通过引用并入本文。通过将随机的12聚体(12-mer)肽噬菌体展示文库与非肌细胞类型的混合物预孵育选择出了非特异性细胞结合物。在数轮选择之后,12个氨基酸肽TARGEHKEEELI (SEQ ID NO:8) 最频繁地出现。因此,在一些实施方案中,肌肉靶向剂包含氨基酸序列TARGEHKEEELI (SEQ ID NO:8)。

[0189] 肌肉靶向剂可以是含氨基酸的分子或肽。肌肉靶向肽可对应于优先与肌细胞中发现的蛋白质受体结合的蛋白质序列。在一些实施方案中,肌肉靶向肽包含高倾向性的疏水性氨基酸,例如缬氨酸,使得该肽优先靶向肌细胞。在一些实施方案中,先前未表征或公开过肌肉靶向肽。可使用数种方法中的任一种(例如噬菌体展示肽文库、单珠单化合物肽文库或位置扫描合成肽组合文库)来构思、产生、合成和/或衍生这些肽。示例性方法已在本领域中表征并通过引用并入(Gray, B.P. and Brown, K.C. “Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides” *Chem Rev.* 2014, 114:2, 1020-1081.; Samoylova, T.I. and Smith, B.F. “Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening.” *Muscle Nerve*, 1999, 22:4, 460-6.)。在一些实施方案中,先前已公开了肌肉靶向肽(参见,例如Writer M.J. et al. “Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic vectors incorporating novel targeting peptides selected by phage display.” *J. Drug Targeting*. 2004; 12:185; Cai, D. “BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart.” *Physiol Genomics*. 2006, 24:3, 191-7.; Zhang, L. “Molecular profiling of heart endothelial cells.” *Circulation*, 2005, 112:11, 1601-11.; McGuire, M.J. et al. “In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo.” *J Mol Biol*. 2004, 342:1, 171-82.)。示例性的肌肉靶向肽包含以下组的氨基酸序列:CQAQQQLVC (SEQ ID NO:9)、CSERSMNFC (SEQ ID NO:10)、CPKTRRVPC (SEQ ID NO:11)、WLSEAGPVVTVRALRGTGSW (SEQ ID NO:12)、ASSLNIA (SEQ ID NO:6)、CMQHSMRVC (SEQ ID NO:13) 和DDTRHWG (SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,肌肉靶向肽可包含约2至25个氨基酸、约2至20个氨基酸、约2至15个氨基酸、约2至10个氨基酸或约2至5个氨基酸。肌肉靶向肽可包含天然氨基酸例如半胱氨酸、丙氨酸或者非天然或经修饰氨基酸。非天然氨基酸包括 β -氨基酸、高氨基酸(homo-amino acid)、脯氨酸衍生物、3-经取代的丙氨酸衍生物、线性核心氨基酸、N-甲基氨基酸和本领域中已知的其他。在一些实施方案中,肌肉靶向肽可以是线性的;在另一些实施方案中,肌肉靶向肽可以是环状的,例如双环的(参见,例如Silvana, M.G. et al. *Mol. Therapy*, 2018, 26:1, 132-147.)。

[0190] iii. 肌肉靶向受体配体

[0191] 肌肉靶向剂可以是配体,例如与受体蛋白结合的配体。肌肉靶向配体可以是蛋白质,例如与由肌细胞表达的内化细胞表面受体结合的转铁蛋白。因此,在一些实施方案中,肌肉靶向剂是转铁蛋白或其与转铁蛋白受体结合的衍生物。肌肉靶向配体可替代地是小分子,例如相对于其他细胞类型优先靶向肌细胞的亲脂性小分子。可靶向肌细胞的一些示例性亲脂性小分子包括包含以下的化合物:胆固醇、胆固醇基、硬脂酸、棕榈酸、油酸、油烯基、亚麻烯(linolene)、亚油酸、肉豆蔻酸、甾醇类、二氢睾酮、睾酮衍生物、甘油、烷基链、三苯

甲基类和烷氧基酸。

[0192] iv. 肌肉靶向适配体

[0193] 肌肉靶向剂可以是适配体,例如RNA适配体,其相对于其他细胞类型优先靶向肌细胞。在一些实施方案中,先前未表征或公开过肌肉靶向适配体。可使用数种方法中的任一种(例如通过指数富集的配体的系统进化)来构思、产生、合成和/或衍生这些适配体。示例性方法已在本领域中表征并通过引用并入(Yan, A.C. and Levy, M. "Aptamers and aptamer targeted delivery" RNA biology, 2009, 6:3, 316-20.; Germer, K. et al. "RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications." Int. J. Biochem. Mol. Biol. 2013; 4:27-40.)。在一些实施方案中,先前已公开了肌肉靶向适配体(参见,例如Phillippou, S. et al. "Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers." Mol Ther Nucleic Acids. 2018, 10:199-214.; Thiel, W.H. et al. "Smooth Muscle Cell-targeted RNA Aptamer Inhibits Neointimal Formation." Mol Ther. 2016, 24:4, 779-87.)。示例性的肌肉靶向适配体包括A01B RNA适配体和RNA Apt 14。在一些实施方案中,适配体是基于核酸的适配体、寡核苷酸适配体或肽适配体。在一些实施方案中,适配体可以是约5kDa至15kDa、约5kDa至10kDa、约10kDa至15kDa、约1至5Da、约1kDa至3kDa或更小。

[0194] v. 其他肌肉靶向剂

[0195] 用于靶向肌细胞(例如,骨骼肌细胞)的一种策略是使用肌转运体蛋白(例如在肌膜上表达的转运体蛋白)的底物。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是对肌肉组织具有特异性的流入转运体的底物。在一些实施方案中,流入转运体对骨骼肌组织具有特异性。两类主要的转运体在骨骼肌肌膜上表达:(1)三磷酸腺苷(ATP)结合盒(ABC)超家族,其促进从骨骼肌组织流出和(2)溶质运载体(SLC)超家族,其可促进底物流入骨骼肌中。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是与转运体的ABC超家族或SLC超家族结合的底物。在一些实施方案中,与转运体的ABC或SLC超家族结合的底物是天然底物。在一些实施方案中,与转运体的ABC或SLC超家族结合的底物是非天然底物,例如,其与转运体的ABC或SLC超家族结合的合成衍生物。

[0196] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是转运体的SLC超家族的底物。SLC转运体是平衡型的,或者使用跨膜产生的质子或钠离子梯度来驱动底物的转运。具有高骨骼肌表达的示例性SLC转运体包括但不限于SATT转运体(ASCT1; SLC1A4)、GLUT4转运体(SLC2A4)、GLUT7转运体(GLUT7; SLC2A7)、ATRC2转运体(CAT-2; SLC7A2)、LAT3转运体(KIAA0245; SLC7A6)、PHT1转运体(PTR4; SLC15A4)、OATP-J转运体(OATP5A1; SLC21A15)、OCT3转运体(EMT; SLC22A3)、OCTN2转运体(FLJ46769; SLC22A5)、ENT转运体(ENT1; SLC29A1和ENT2; SLC29A2)、PAT2转运体(SLC36A2)和SAT2转运体(KIAA1382; SLC38A2)。这些转运体可促进底物流入骨骼肌中,为肌肉靶向提供机会。

[0197] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是平衡型核苷转运体2(equilibrative nucleoside transporter 2, ENT2)转运体的底物。相对于其他转运体,ENT2在骨骼肌中具有最高的mRNA表达之一。虽然人ENT2(hENT2)在大多数身体器官例如脑、心脏、胎盘、胸腺、胰腺、前列腺和肾中表达,但其在骨骼肌中特别丰富。人ENT2根据其浓度梯度促进其底物的吸收。ENT2通过转运广泛的嘌呤和嘧啶核苷碱基在维持核苷稳态中发挥作用。hENT2转运体对除肌苷之外的所有核苷(腺苷、鸟苷、尿苷、胸苷和胞苷)均具有低的亲和力。因此,在一些

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

[0198] 在一些实施方案中,肌肉靶向剂是有机阳离子/肉碱转运体(OCTN2)的底物,所述有机阳离子/肉碱转运体是钠离子依赖性的高亲和力肉碱转运体。在一些实施方案中,肌肉靶向剂是肉碱、米屈肼(mildronate)、乙酰肉碱或其与OCTN2结合的任意衍生物。在一些实施方案中,肉碱、米屈肼、乙酰肉碱或其衍生物与分子载荷(例如,寡核苷酸载荷)共价连接。

[0199] 肌肉靶向剂可以是蛋白质,该蛋白质是以靶向肌细胞的至少一种可溶性形式存在的蛋白质。在一些实施方案中,肌肉靶向蛋白可以是血幼素(也称为排斥性导向分子C或血色素沉着症2型蛋白),所述血幼素是参与铁超负荷和稳态的蛋白。在一些实施方案中,血幼素可以是全长或片段,或者与功能性血幼素蛋白具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的突变体。在一些实施方案中,血幼素突变体可以是可溶性片段,可缺乏N端信号传导,和/或缺乏C端锚定结构域。在一些实施方案中,血幼素可以以GenBank RefSeq登录号NM_001316767.1、NM_145277.4、NM_202004.3、NM_213652.3或NM_213653.3进行注释。应理解,血幼素可以是人、非人灵长类或啮齿动物来源的。

[0200] B. 分子载荷

[0201] 本公开内容的一些方面提供了分子载荷,例如,用于调节生物学结局,例如,DNA序列的转录、蛋白质的表达或蛋白质的活性。在一些实施方案中,分子载荷与肌肉靶向剂连接或以其他方式相关联。在一些实施方案中,这样的分子载荷能够靶向肌细胞,例如在通过相关肌肉靶向剂递送至肌细胞之后通过与肌细胞中的核酸或蛋白质特异性结合。应理解,根据本公开内容可使用多种类型的肌肉靶向剂。例如,分子载荷可包含以下或由以下组成:寡核苷酸(例如,反义寡核苷酸)、肽(例如,结合肌细胞中与疾病相关的核酸或蛋白质的肽)、蛋白质(例如,结合肌细胞中与疾病相关的核酸或蛋白质的蛋白质)或小分子(例如,调节肌细胞中与疾病相关的核酸或蛋白质之功能的小分子)。在一些实施方案中,分子载荷是包含具有与突变GAA等位基因互补的区域的链的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子载荷是包含具有与GYS1互补的区域的链的寡核苷酸。在一些实施方案中,分子载荷包含或编码野生型GAA蛋白。本文中进一步详细描述了示例性分子载荷,然而,应理解,本文中提供的示例性分子载荷并不意味着是限制性的。

[0202] i. 寡核苷酸

[0203] 如本文中所述,任何合适的寡核苷酸均可用作分子载荷。在一些实施方案中,寡核苷酸可被设计为引起mRNA的降解(例如,寡核苷酸可以是引起降解的间隔聚体、siRNA、核酶或适配体)。在一些实施方案中,寡核苷酸可被设计为阻断mRNA的翻译(例如,寡核苷酸可以是阻断翻译的混合聚体、siRNA或适配体)。在一些实施方案中,寡核苷酸可被设计为引起mRNA的降解和阻断翻译。在一些实施方案中,寡核苷酸可以是用于指导酶(例如,基因编辑酶)活性的指导核酸(例如,指导RNA)。本文中提供了寡核苷酸的另一一些实例。应理解,在一些实施方案中,通过将功能序列(例如,反义链序列)从一种格式并入另一种格式,一种格式的寡核苷酸(例如,反义寡核苷酸)可适当地适应于另一种格式(例如,siRNA寡核苷酸)。

[0204] 在一些实施方案中,寡核苷酸介导在PD相关GAA等位基因中包含外显子2,如van der Wal, et al., “GAA Deficiency in Pompe Disease is Alleviated by Exon Inclusion in iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells,” *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Jun 16; 7:101-115中所述,其内容通过引用并入本文。因此,在一些实施方案中,寡核苷酸可具有与PD相关GAA等位基因互补的区域。

[0205] 在一些实施方案中,将寡核苷酸(例如RNAi或反义寡核苷酸)用于抑制肌细胞中野生型GYS1的表达,如例如以下中报道的:Clayton, et al., “Antisense Oligonucleotide-mediated Suppression of Muscle Glycogen Synthase 1 Synthesis as an Approach for Substrate Reduction Therapy of Pompe Disease,” 在2017年在 *Mol Ther Nucleic Acids* 中公开,或2017年6月29日公开的标题为“INHIBITING OR DOWNREGULATING GLYCOGEN SYNTHASE BY CREATING PREMATURE STOP CODONS USING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES”的美国专利公开号2017182189,其内容通过引用并入本文。因此,在一些实施方案中,寡核苷酸可具有反义链,该反义链具有与如下的人GYS1序列(对应于RefSeq号NM_002103.4)和/或小鼠GYS1序列(对应于RefSeq号NM_030678.3 (SEQ ID NO:15))的序列互补的区域。

[0206] 人GYS1 (NM_002103.4) :

```
TCCTGGCGGCTGCGAGGTTTCACTGCAGGGGCGCCAGTGGGCTCAGTGACGCTGCG
GCCTCCTTCTGCCTAGGTCCCAACGCTTCGGGGCAGGGGTGCGGTCTTGCAATAGGA
AGCCGAGCGTCTTGCAAGCTTCCCGTCGGGCACCAGCTACTCGGCCCCGCACCCTAC
CTGGTGCATTCCCTAGACACCTCCGGGGTCCCTACCTGGAGATCCCCGGAGCCCCC
```

[0207] TTCCTGCGCCAGCCATGCCTTTAAACCGCACTTTGTCCATGTCCTCACTGCCAGGAC
TGGAGGACTGGGAGGATGAATTCGACCTGGAGAACGCAGTGCTCTTCGAAGTGGCC
TGGGAGGTGGCTAACAAGGTGGGTGGCATCTACACGGTGCTGCAGACGAAGGCGA
AGGTGACAGGGGACGAATGGGGCGACA ACTACTTCCTGGTGGGGCCGTACACGGA
GCAGGGCGTGAGGACCCAGGTGGA ACTGCTGGAGGCCCCACCCCGGCCCTGAAG

[0208]

AGGACACTGGATTCCATGAACAGCAAGGGCTGCAAGGTGTATTTTCGGGCGCTGGCT
GATCGAGGGAGGCCCTCTGGTGGTGTCTCCTGGACGTGGGTGCCTCAGCTTGGGCC
TGGAGCGCTGGAAGGGAGAGCTCTGGGATACCTGCAACATCGGAGTGCCGTGGTAC
GACCGCGAGGCCAACGACGCTGTCTCTTTGGCTTTCTGACCACCTGGTTCCTGGGT
GAGTTCCTGGCACAGAGTGAGGAGAAGCCACATGTGGTTGCTCACTTCCATGAGTG
GTTGGCAGGCGTTGGACTCTGCCTGTGTCTGCGCCGGCGACTGCCTGTAGCAACCAT
CTTACCACCCATGCCACGCTGCTGGGGCGCTACCTGTGTGCCGGTGCCGTGGACTT
CTACAACAACCTGGAGAACTTCAACGTGGACAAGGAAGCAGGGGAGAGGCAGATC
TACCACCGATACTGCATGGAAAGGGCGGCAGCCACTGCGCTCACGTCTTCACTAC
TGTGTCCCAGATCACCGCCATCGAGGCACAGCACTTGCTCAAGAGGAAACCAGATA
TTGTGACCCCAATGGGCTGAATGTGAAGAAGTTTTCTGCCATGCATGAGTTCAGA
ACCTCCATGCTCAGAGCAAGGCTCGAATCCAGGAGTTTGTGCGGGGCCATTTTTATG
GGCATCTGGACTTCAACTTGGACAAGACCTTATACTTCTTTATCGCCGGCCGCTATG
AGTTCTCCAACAAGGGTGTGACGTCTTCTGGAGGCATTGGCTCGGCTCAACTATC
TGCTCAGAGTGAACGGCAGCGAGCAGACAGTGGTTGCCTTCTTCATCATGCCAGCG
CGGACCAACAATTTCAACGTGGAAACCCTCAAAGGCCAAGCTGTGCGCAAACAGCT
TTGGGACACGGCCAACACGGTGAAGGAAAAGTTCGGGAGGAAGCTTTATGAATCCT
TACTGGTTGGGAGCCTTCCCGACATGAACAAGATGCTGGATAAGGAAGACTTCACT
ATGATGAAGAGAGCCATCTTTGCAACGCAGCGGCAGTCTTCCCCCTGTGTGCACC
CACAATATGCTGGATGACTCCTCAGACCCCATCCTGACCACCATCCGCCGAATCGGC
CTCTTCAATAGCAGTGCCGACAGGGTGAAGGTGATTTCCACCCGGAGTTCCTCTCC
TCCACAAGCCCCCTGCTCCCTGTGGACTATGAGGAGTTTGTCCGTGGCTGTCACCTT
GGAGTCTTCCCCCTCCTACTATGAGCCTTGGGGCTACACACCCGGCTGAGTGCACGGT
ATGGGAATCCCCAGTATCTCCACCAATCTCTCCGGCTTCGGCTGCTTCATGGAGGAA
CACATCGCAGACCCCTCAGCTTACGGTATCTACATTCTTGACCGCGGTTCCGCAGC
CTGGATGATTCTGCTCGCAGCTCACCTCCTCCTCTACAGTTTCTGTCAGCAGAGC
CGGCGGCAGCGTATCATCCAGCGGAACCGCACGGAGCGCCTCTCCGACCTTCTGGA
CTGGAAATACCTAGGCCGGTACTATATGTCTGCGCGCCACATGGCGCTGTCCAAGG
CCTTCCAGAGCACTTACCTACGAGCCCAACGAGGCGGATGCGGCCAGGGGTAC
CGTACCCACGGCCAGCCTCGGTGCCACCGTCGCCCTCGCTGTCACGACACTCCAGC
CCGCACCAGAGTGAGGACGAGGAGGATCCCCGGAACGGGCCGCTGGAGGAAGACG
GCGAGCGCTACGATGAGGACGAGGAGGCCGCAAGGACCGGCGCAACATCCGTGC

ACCAGAGTGGCCGCGCCGAGCGTCCTGCACCTCCTCCACCAGCGGCAGCAAGCGCA
 ACTCTGTGGACACGGCCACCTCCAGCTCACTCAGCACCCCGAGCGAGCCCCTCAGC
 CCCACCAGCTCCCTGGGCGAGGAGCGTAACTAAGTCCGCCCCACCACACTCCCCGC
 CTGTCCTGCCTCTCTGCTCCAGAGAGAGGATGCAGAGGGGTGCTGCTCCTAAACCCC
 CGCTCCAGATCTGCACTGGGTGTGGCCCCGCAGTGCCCCCACCAGTCCGCCAAAC
 ACTCCACCCCCTCCAGCTCCAGTTTCCAAGTTCCTGCACTCCAGAATCCACAAAGCC
 GTGCCTTTCTCTGGCTCCAGAATATGCATAATCAGCGCCCTGGAGTCCCCTGGGCCT
 GGACCGCTTCCCAGAGGCCAGGAATCTGCCATTACTCTGCGGTGGTGCCAGAGGTT
 TTAGGAAACCTGGCATGGTGCTTTCAGGTCTGGGGCTTTTAGAGCCCCCGTGTGGC
 TTACAAATTCTACAGCATAACAGAGCAGGCCACGCTCAGGCCCGGCATGCGGGCCAC
 CAAGTTCTGGAAACCACGTGGTGTCCCTGCGAATGGGGCGATCAAGTCCAGAGCCG
 GGGCACTTTCAGAGTTTGAAGGTAAGTGAAGAGCAGATGGTCTCCTCATTTCAACTCCA
 GAAGTGGGGCTCTGGGAGGGATGTTCTAGCCCTCCCTGGCATGTCAGAGCCAGGCT
 CTGCCTGGAGGATCCCTCCATCCGGCTCCTGTGCATCCCTACACTTTGGCCAAGCAA
 GAGGTGGTAGAACCCTTGGCTGCTCATTCTTCTGGAGGACACACAGTCTCAGTCC
 AGATGCCTTCTGTCTTTCTGGCCCTTTCTGGACCAGATCCTACTCTTCTTTCTAAA
 TCTGAGATCTCCCTCCAGGGAATCCGCCTGCAGAGGACAGAGCTGGCTGTCTTCCCC
 CACCCCTAACCTGGCTTATTCCCAACTGCTCTGCCCACTGTGAAACCACTAGGTTCT
 AGGTCCTGGCTTCTAGATCTGGAACCTTACCACGTTACTGCATACTGATCCCTTTCC
 CATGATCCAGAACTGAGGTCACTGGGTCTAGAAACCCCCACATTTACCTCGAGGCTC
 TTCCATCCCCAAACTGTGCCCTGCCTTCAGCTTTGGTGAAAGGGAGGGCCCTCATG
 TGTGCTGTGCTGTGTCTGCACCGCTTGGTTTGCAGTTGAGAGGGGAGGGCAGGAGG
 GGTGTGATTGGAGTGTGTCCGGAGATGAGATGAAAAAATACATCTATATTTAAGA
 ATCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 15)

[0209]

[0210] 小鼠GYS1 (NM_030678.3) :

ACTGCAGCTGCCCCGCCGATTCAAGTGTCTCAGCTCACCTACCTGAGTCGGAGCGCT
 CTGGGGCGGGGGTGCGGTCGTGCAATAGGAAGCGGAGCGCCTTGCAAGCTTCCCCT
 GGGACACCCGCTAACTCTACCGGTCACCAAGTCTGCTGCGTTCCCAGCCGATCTCTC
 TGGTTTCCAGTTTTGGTGCTCGAAGTCCCCTGCCCGCAGTAGCCATGCCTCTCAGCC
 GCAGTCTCTGTGTCTCGCTTCCAGGATTGGAAGACTGGGAGGATGAATTCGACC
 CCGAGAACGCAGTGCTTTTCGAGGTGGCCTGGGAGGTGGCCAACAAGGTGGGTGGC
 ATCTACACTGTGCTGCAGACGAAGGCGAAGGTGACAGGGGATGAATGGGGTGACA

[0211]

[0212]

ACTACTATCTGGTGGGACCATACACGGAGCAGGGTGTGAGGACGCAGGTAGAGCTC
CTGGAGCCCCAACTCCGGAAGTGAAGAGGACTTTGGATTCCATGAACAGCAAGGG
TTGTAAGGTGTATTTTGGGCGTTGGCTGATCGAGGGGGGACCCCTAGTGGTGCTCCT
GGATGTAGGAGCCTCAGCTTGGGCCCTGGAGCGCTGGAAGGGTGAGCTTTGGGACA
CCTGCAACATCGGGGTACCCTGGTACGACCGCGAGGCCAATGACGCTGTCCTGTTC
GGCTTCCCTACACCTGGTTCCCTGGGTGAGTTCCTGGCCAGAACGAAGAGAAGCC
GTATGTGGTTGCCCACTTCCACGAATGGTTGGCTGGCGTTGGTCTGTGTCTGTGCCG
TGCCCGCGCTTGCCGGTGGCAACCATCTTCACTCATGCCACGCTGCTGGGGCG
CTACCTGTGTGCTGGCGCTGTGGACTTCTACAACAACCTGGAGAATTTCAATGTAGA
CAAGGAAGCAGGAGAGAGGCAGATCTATACCGGTAAGTGCATGGAGCGTGCAGCA
GCTCACTGTGCCATGTCTTCACTACCGTATCCAGATCACCGCAATCGAGGCTCAA
CACCTCCTTAAGAGAAAACCAGATATTGTGACCCCAACGGGCTGAATGTGAAGAA
GTTCTCTGCTATGCACGAATTCCAGAACCTTCATGCTCAGAGCAAAGCACGAATCCA
GGAATTTGTGCGTGGCCATTTTTATGGGCACCTGGACTTCAACCTAGACAAGACTTT
GTATTTCTTTATCGCTGGCCGCTATGAGTTTTCCAACAAGGGAGCTGATGTGTTCC
GGAGGCATTGGCCCGGCTCAACTATCTGCTCAGAGTGAATGGCAGTGAGCAAACAG
TTGTCGCATTCTTCATCATGCCGGCCCGGACCAATAATTTCAACGTGGAAACCCTGA
AGGGCCAAGCCGTGCGCAAACAACCTATGGGACACAGCCAATACAGTCAAGGAGAA
ATTTGGGAGGAAGCTCTACGAATCCCTTTTGTAGTGGGGAGCCTCCCGGACATGAACA
AGATGCTGGACAAGGAGGACTTCACTATGATGAAGAGAGCCATCTTTGCCACTCAG
CGGCAGTCTTTCCACCAGTGTGCACCCACAACATGCTGGACGACTCCTCAGACCCC
ATCTTGACCACCATCCGCCGAATTGGCCTTTTCAACAGCAGTGCCGACCGTGTGAAG
GTGATTTTTACACCAGAATTCCTTTCTTCCACAAGCCCTCTCCTCCCGTGGATTATG
AGGAATTTGTCCGCGGCTGTCACCTTGGGGTCTTCCCCTCCTACTATGAGCCCTGGG
GCTACACACCAGCGGAGTGCATGCTGATGGGCATCCCAGCATCTCCACCAACCTCT
CCGGCTTTGGCTGCTTTATGGAGGAACACATCGCAGATCCCTCAGCTTACGGCATT
ACATTCTGGATCGGAGGTTCCGCAGCCTGGATGATTCATGCTCACAGCTCACCTCCT
TCCTGTACAGCTTCTGCCAGCAGAGCCGGCGACAGCGCATCATCCAGCGGAACCGC
ACAGAACGGTTGTCGGACTTGCTAGATTGGAAGTACCTGGGCCGGTACTACATGTC
TGCGCGCCACATGGCTCTGGCCAAGGCCTTTCCAGACCACTTACCTATGAACCCCA
TGAGGTAGATGCGACCCAGGGGTACCGGTACCCACGACCAGCCTCCGTCCCGCGGT
CGCCCTCACTGTCTCGACACTCCAGCCCACACCAGAGTGAGGATGAGGAAGAGCCA

CGGGATGGACCCCTGGGGGAAGACAGTGAGCGTTATGATGAGGAAGAGGAGGCTG
CCAAGGACCGCCGCAACATCCGGGCACCTGAGTGGCCACGCAGGGCCTCCTGTTCC
TCCTCCACAGGTGGCAGCAAGAGAAGCAACTCGGTGGACACTGGGCCCTCCAGCTC
ACTCAGCACACCCACTGAGCCCCTGAGTCCTACCAGTTCCTGGGTGAGGAGCGCA
ACTAAGCTCCCACCCCCATCCCATTCCCTGCCTGTCCAGTGCTCCTCTCGCAGAGGG
CCTATGCAGATGGGAGGGTGCCTGAACCCCACTCCAGACTCTTGAGTGGGACCCCT
ACCCAGTGTGGTCCATAGCCTAACCTCTGTTTCAGACACTCCAGCCCTTGAGCTCCA
ATCTTGGAGTTCCCGCACTCCACGCCGCGTGCCTTTCTTGGATTGCAGGATGCATT
CTTTGTGCACTGATCTGGAGTCTCCAGGCTTAGACTGGGTCCCAGAGGCCAGGCATC
TGCCATTGTTTTTCAATGCCAGAGGTTTTAGGACACCTGGTTTATTGGCTTCCAGGCT
GTGGCTTCTTCGTTTGATCCTATAATCATAACAGAGTATGCTTTGCTCAGGCCTGCCTC
TGGGACCACCTCATGTTGGATTCTGTGTGGCTTCCCGAATCAGCCAAGTTCAGAGTT
AGGACATTTACAGGGATTAACATAATTGAAAATCAGCCTGCAAGGTAGCTCAGTAGC
[0213] TCTGTGCACAGATTGCTTGTCTAGCATGCCCGAAGCCCTGGGATCTAACTCTAGAAC
CTCATAAACCTGGTGCGGTGATACACATCTGTAATCCCAGCACTCGGTAGGTAGAG
GTAGACGGATCAAGAGTTAAAGGCCATCATCCTCTGCTACATAGGGAGTTCAAGGC
CAAACCTGGGCAACATGAGACACTGTCTCAAAGCAAAGTAAAGGTGGTGAATGCT
CACGGTCCTCCATTTCAACCCACGACTGCGATGCTGGGACATGCTGCAAGGTTGGCC
TCCCTGGGTGTGTTCTTCAAAGGAGCATGCGGAGTTGGACCAGACACCTTTCTGCCT
TTTTTCTGGACCAGACCTTCTTTTCTTGGTCCAGTGTCCCCTCTAGGGAATGCCTCC
ATTGAGGGCAGAATGTCTGTCAACCCACAAGTGCTCAGCCCCTGTGAAACCACT
GGGTTCTGGGTCCCAGTGGCTGAATCAGGAGTCTTTTGTCACTGTGCTGCACCCCGG
TCCCCTTCTGATACAAAACCGAGCCCACCGGCTTCTTGAAGCCCCACATGTACCT
CGAGGCCTTTCTGCCTGCAAGCTTCAGTGAATGGGCGGGCCCCTCCTCACGTGTGCT
GTGTCTGGCCCAGTGCCTTTGGTTTGCATTTGGGAGGGGGAGGGCAGAAGGTGTGT
GATTGGAGTGTGTCTAGAGATGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAATACACCTGTATTTAAG
AATGCC (SEQ ID NO: 16)

[0214] a. 寡核苷酸大小/序列

[0215] 寡核苷酸可具有多种不同的长度,例如,取决于格式。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75或更多个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸的长度为8至50个核苷酸、长度为8至40个核苷酸、长度为8至30个核苷酸、长度为10至15个核苷酸、长度为10至20个核苷酸、长度为15至25个核苷酸、长度为21至23个核苷酸,等。

[0216] 在一些实施方案中,当寡核苷酸的互补核酸序列与靶分子(例如,mRNA)的结合干扰靶标(例如,mRNA)的正常功能导致缺乏活性(例如,抑制翻译)或表达(例如,降解靶mRNA),并且具有足够程度的互补性以避免在以下情况下的序列与非靶标的非特异性结合时,出于本公开内容的目的,寡核苷酸的互补核酸序列可与靶核酸特异性杂交或对靶核酸具有特异性:在其中期望避免非特异性结合的条件下,例如在生理条件下在体内测定或治

疗性处理的情况下,以及在体外测定的情况下,在其中在合适的严格条件下进行测定的条件下。因此,在一些实施方案中,寡核苷酸可与靶核酸的连续核苷酸至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补。在一些实施方案中,互补核苷酸序列不需要与其所靶向的100%互补来特异性地杂交或对靶核酸具有特异性。

[0217] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含与靶核酸互补的区域,所述区域的长度为8至15、8至30、8至40或10至50、或5至50或5至40个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸与靶核酸的互补区的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个核苷酸。在一些实施方案中,互补区与靶核酸的至少8个连续核苷酸互补。在一些实施方案中,与靶核酸的连续核苷酸部分相比,寡核苷酸可包含1、2或3个碱基错配。在一些实施方案中,寡核苷酸在15个碱基上可具有多至3个错配,或在10个碱基上具有多至2个错配。

[0218] b. 寡核苷酸修饰:

[0219] 本文中所述的寡核苷酸可被修饰,例如,包含经修饰糖部分、经修饰核苷间键联、经修饰核苷酸和/或其组合。另外,在一些实施方案中,寡核苷酸可表现出一种或更多种以下特性:不介导选择性剪接;不是免疫刺激性的;具有核酸酶抗性;与未经修饰寡核苷酸相比具有提高的细胞摄取;对细胞或哺乳动物无毒;提高了在细胞中内部排出内体;使TLR刺激最小化;或避免模式识别受体。本文中所述寡核苷酸的任何经修饰化学或格式可彼此组合。例如,同一寡核苷酸内可包括一种、两种、三种、四种、五种或更多种不同类型的修饰。

[0220] 在一些实施方案中,可使用某些核苷酸修饰,所述核苷酸修饰使并入它们的寡核苷酸比天然寡脱氧核苷酸或寡核糖核苷酸分子对核酸酶消化更具抗性;这些经修饰寡核苷酸比未经修饰寡核苷酸完整存活更长的时间。经修饰寡核苷酸的一些具体实例包括含有经修饰主链(backbone)的那些,例如经修饰核苷间键联,例如硫代磷酸酯键联、磷酸三酯键联、甲基膦酸酯键联、短链烷基键联或环烷基糖间键联或短链杂原子键联或杂环糖间键联。因此,本公开内容的寡核苷酸可例如通过并入修饰例如核苷酸修饰而稳定化以抵抗溶核降解。

[0221] 在一些实施方案中,寡核苷酸的长度可以是多至50个或多至100个核苷酸,其中寡核苷酸的2至10、2至15、2至16、2至17、2至18、2至19、2至20、2至25、2至30、2至40、2至45或更多个核苷酸是经修饰核苷酸。寡核苷酸的长度可以是8至30个核苷酸,其中寡核苷酸的2至10、2至15、2至16、2至17、2至18、2至19、2至20、2至25、2至30个核苷酸是经修饰核苷酸。寡核苷酸的长度可以是8至15个核苷酸,其中寡核苷酸的2至4、2至5、2至6、2至7、2至8、2至9、2至10、2至11、2至12、2至13、2至14个核苷酸是经修饰核苷酸。任选地,寡核苷酸可具有除1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个经修饰核苷酸之外的每个核苷酸。寡核苷酸修饰在本文中进一步描述。

[0222] c. 经修饰核苷酸

[0223] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含2'-经修饰核苷酸,例如2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O--N-甲基乙酰胺基(2'-O--NMA)。

[0224] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含至少一个2'-O-甲基-修饰的核苷酸,并且在一些实施方案中,所有核苷酸均包含2'-O-甲基修饰。在一些实施方案中,寡核苷酸包含经修饰核苷酸,其中核糖环包含连接环中的两个原子例如连接2'-O原子与4'-C原子的桥部分。在一些实施方案中,寡核苷酸是“锁定的”,例如包含其中核糖环被连接2'-O原子和4'-C原子的亚甲基桥“锁定”的经修饰核苷酸。LNA的一些实例描述于国际专利申请公开W0/2008/043753中,其于2008年4月17日公开,并且标题为“RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9”,其内容通过引用整体并入本文。

[0225] 可用于本文中公开的寡核苷酸的其他修饰包括亚乙基桥联核酸(ENA)。ENA包括但不限于2'-O、4'-C-亚乙基桥联核酸。ENA的一些实例在以下中提供:国际专利公开No.WO 2005/042777,其于2005年5月12日公开,并且标题为“APP/ENA Antisense”;Morita et al.,Nucleic Acid Res.,Suppl 1:241-242,2001;Suroño et al.,Hum.Gene Ther.,15:749-757,2004;Koizumi,Curr.Opin.Mol.Ther.,8:144-149,2006和Horie et al.,Nucleic Acids Symp.Ser(Oxf),49:171-172,2005;其公开内容通过引用整体并入本文。

[0226] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含桥联核苷酸,例如锁核酸(locked nucleic acid,LNA)核苷酸、约束性乙基(constrained ethyl,cEt)核苷酸或亚乙基桥联核酸(ENA)核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸包含在以下美国专利或专利申请公开之一中公开的经修饰核苷酸:美国专利7,399,845,其于2008年7月15日授权,并且标题为“6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,741,457,其于2010年6月22日授权,并且标题为“6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利8,022,193,其于2011年9月20日授权,并且标题为“6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,569,686,其于2009年8月4日授权,并且标题为“Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs”;美国专利7,335,765,其于2008年2月26日授权,并且标题为“Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues”;美国专利7,314,923,其于2008年1月1日授权,并且标题为“Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues”;美国专利7,816,333,其于2010年10月19日授权,并且标题为“Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same”和美国公开号2011/0009471,现在为美国专利8,957,201,其于2015年2月17日授权,并且标题为“Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same”,其各自的全部内容出于所有目的通过引用并入本文。

[0227] 在一些实施方案中,寡核苷酸包含在糖的2'位被修饰的至少一个核苷酸,优选2'-O-烷基、2'-O-烷基-0-烷基或2'-氟修饰的核苷酸。在另一些优选实施方案中,RNA修饰包括在RNA的3'末端的嘧啶、无碱基残基或倒置碱基的核糖上的2'-氟、2'-氨基和2'-O-甲基修饰。

[0228] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有至少一个经修饰核苷酸,其导致与不具有至少一个经修饰核苷酸的寡核苷酸相比,寡核苷酸的 T_m 提高1°C、2°C、3°C、4°C或5°C。寡核苷酸可具有多个经修饰核苷酸,其导致与不具有经修饰核苷酸的寡核苷酸相比,寡核苷酸的 T_m 总体提高2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、40°C、45°C或更高。

[0229] 寡核苷酸可包含不同种类的替代核苷酸。例如,寡核苷酸可包含替代脱氧核糖核

苷酸或核糖核苷酸和2'-氟-脱氧核糖核苷酸。寡核苷酸可包含替代脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸和2'-O-甲基核苷酸。寡核苷酸可包含替代2'-氟核苷酸和2'-O-甲基核苷酸。寡核苷酸可包含替代桥联核苷酸和2'-氟或2'-O-甲基核苷酸。

[0230] d. 核苷酸间键联/主链

[0231] 在一些实施方案中,寡核苷酸可包含硫代磷酸酯键联或其他经修饰核苷酸间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸在至少两个核苷酸之间包含硫代磷酸酯核苷间键联。在一些实施方案中,寡核苷酸在所有核苷酸之间包含硫代磷酸酯核苷间键联。例如,在一些实施方案中,寡核苷酸在核苷酸序列的5'或3'末端的第一、第二和/或第三核苷酸间键联处包含经修饰核苷酸间键联。

[0232] 可使用的含磷的键联包括但不限于:硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基膦酸酯和包含3'亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯的其他烷基膦酸酯、次膦酸酯、包含3'氨基磷酸酯和氨基烷基磷酰胺酯的磷酰胺酯、硫羰基磷酰胺酯、硫羰基烷基膦酸酯、硫羰基烷基磷酸三酯和具有正常3'-5'键联的硼烷磷酸酯、这些的2'-5'连接类似物、以及具有倒置极性的那些,其中相邻的核苷单元对连接3'-5'与5'-3'或2'-5'与5'-2';参见美国专利no.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;和5,625,050。

[0233] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有杂原子主链,例如亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链;酰胺主链(参见De Mesmaeker et al. *Ace. Chem. Res.* 1995, 28:366-374);吗啉代主链(参见Summerton and Weller, 美国专利No.5,034,506);或肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)主链(其中寡核苷酸的磷酸二酯主链被聚酰胺主链替换,核苷酸与聚酰胺主链的氮杂氮原子直接或间接结合,参见Nielsen et al., *Science* 1991, 254, 1497)。

[0234] e. 立体特异性寡核苷酸

[0235] 在一些实施方案中,寡核苷酸的核苷酸间磷原子是手性的,并且基于手性磷原子的构型调节寡核苷酸的特性。在一些实施方案中,可使用适当方法来以立体控制的方式合成P-手性寡核苷酸类似物(例如,如Oka N, Wada T, *Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms. Chem Soc Rev.* 2011Dec; 40(12):5829-43中所述)。在一些实施方案中,提供了含硫代磷酸酯的寡核苷酸,其包含通过基本上所有的Sp或基本上所有的Rp硫代磷酸酯糖间键联接在一起的核苷单元。在一些实施方案中,具有基本上手性纯糖间键联的这样的硫代磷酸酯寡核苷酸通过酶或化学合成制备,如例如于1996年12月12日授权的美国专利5,587,261中所述,其内容通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸提供了靶核酸的选择性切割模式。例如,在一些实施方案中,手性控制的寡核苷酸在核酸的互补序列内提供了单个位点切割,如例如美国专利申请公开20170037399A1中所述,其于2017年2月2日公开,标题为“CHIRAL DESIGN”,其内容通过引用整体并入本文。

[0236] f. 吗啉代

[0237] 在一些实施方案中,寡核苷酸可以是基于吗啉代的化合物。基于吗啉代的寡聚化合物描述于Dwayne A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-

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

[0238] g. 肽核酸(PNA)

[0239] 在一些实施方案中,寡核苷酸的核苷酸单元的糖和核苷间键联(主链)二者均被新的基团替换。在一些实施方案中,维持碱基单元用于与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物(已显示具有优异的杂交特性的寡核苷酸模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖-主链被含酰胺的主链(例如,氨基乙基甘氨酸主链)替换。核碱基被保留并且与主链酰胺部分的氮杂氮原子直接或间接结合。报道制备PNA化合物的代表性出版物包括但不限于美国专利no. 5,539,082; 5,714,331; 和5,719,262,其各自通过引用并入本文。PNA化合物的进一步教导可在Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500中发现。

[0240] h. 间隔聚体

[0241] 在一些实施方案中,寡核苷酸是间隔聚体。间隔聚体寡核苷酸通常具有式5'-X-Y-Z-3', 其中X和Z作为围绕间隔区Y的侧翼区。在一些实施方案中,Y区域是核苷酸的连续延伸,例如,至少6个DNA核苷酸的区域,其能够募集RNA酶(例如RNA酶H)。在一些实施方案中,间隔聚体与靶核酸结合,在该点处RNA酶被募集并随后可切割靶核酸。在一些实施方案中,Y区5'和3'二者的侧翼是包含高亲和力经修饰核苷酸,例如1至6个经修饰核苷酸的X和Z区。经修饰核苷酸的一些实例包括但不限于2' MOE或2' OMe或锁核酸碱基(LNA)。在一些实施方案中,侧翼序列X和Z的长度可以是1至20个核苷酸、1至8个核苷酸或1至5个核苷酸。侧翼序列X和Z可具有相似长度或不同长度。在一些实施方案中,间隔区段Y可以是5至20个核苷酸的核苷酸序列,长度尺寸为12个核苷酸或6至10个核苷酸。

[0242] 在一些实施方案中,除DNA核苷酸之外,间隔聚体寡核苷酸的间隔区可包含已知可被接受用于高效的RNA酶H作用的经修饰核苷酸,例如C4'-取代的核苷酸、无环核苷酸和阿拉伯糖(arabino)构型的核苷酸。在一些实施方案中,间隔区包含一个或更多个未经修饰间核苷。在一些实施方案中,一个或两个侧翼区在至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个核苷酸之间各自独立地包含一个或更多个硫代磷酸酯核苷间键联(例如,硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联)。在一些实施方案中,间隔区和两个侧翼区在至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个核苷酸之间各自独立地包含经修饰核苷间键联(例如,硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联)。

[0243] 可使用适当的方法产生间隔聚体。教导制备间隔聚体的代表性美国专利、美国专利出版物和PCT出版物包括但不限于美国专利No. 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; 5,700,922; 5,898,031; 7,432,250; 和7,683,036; 美国专利公开No. US20090286969、US20100197762和US20110112170; 以及PCT公开No. W02008049085和W02009090182,其各自

通过引用整体并入本文。

[0244] i. 混合聚体

[0245] 在一些实施方案中,本文中所述的寡核苷酸可以是混合聚体或者包含混合聚体序列模式。通常来说,混合聚体是包含天然和非天然核苷酸二者的寡核苷酸或者通常以替代模式包含两种不同类型的非天然核苷酸的寡核苷酸。混合聚体通常比未经修饰寡核苷酸具有更高的结合亲和力,并且可用于特异性结合靶分子,例如,来阻断靶分子上的结合位点。通常来说,混合聚体不向靶分子募集RNA酶并且因此不促进靶分子的切割。已描述了不能募集RNA酶H的这样的寡核苷酸,例如,参见W02007/112754或W02007/112753。

[0246] 在一些实施方案中,混合聚体包含重复模式的核苷酸类似物和天然核苷酸、或一种类型的核苷酸类似物和第二种类型的核苷酸类似物,或者由其组成。然而,混合聚体不需要包含重复模式,并且可替代地包含经修饰核苷酸和天然核苷酸的任何排列,或一种经修饰核苷酸和第二种经修饰核苷酸的任何排列。重复模式可以是例如每第二个或每第三个核苷酸是经修饰核苷酸(例如LNA),并且剩余核苷酸是天然核苷酸(例如DNA)或是2' 经取代的核苷酸类似物,例如2' MOE或2' 氟类似物,或者本文中所述的任何其他经修饰核苷酸。公认的是,经修饰核苷酸的重复模式,例如LNA单元,可在固定位置例如在5' 或3' 端与经修饰核苷酸组合。

[0247] 在一些实施方案中,混合聚体不包含多于5个、多于4个、多于3个或多于2个连续的天然核苷酸(例如DNA核苷酸)的区域。在一些实施方案中,混合聚体包含至少一个由至少两个连续经修饰核苷酸,例如至少两个连续的LNA组成的区域。在一些实施方案中,混合聚体包含至少一个由至少三个连续经修饰核苷酸单元,例如至少三个连续的LNA组成的区域。

[0248] 在一些实施方案中,混合聚体不包含多于7个、多于6个、多于5个、多于4个、多于3个或多于2个连续的核苷酸类似物例如LNA的区域。在一些实施方案中,LNA单元可被其他核苷酸类似物例如本文中提及的那些替换。

[0249] 混合聚体可被设计为包含亲和力增强的经修饰核苷酸(例如在非限制性实例中LNA核苷酸和2' -O-甲基核苷酸)的混合物。在一些实施方案中,混合聚体在至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个核苷酸之间包含经修饰核苷间键联(例如,硫代磷酸酯核苷间键联或其他键联)。

[0250] 可使用任何合适的方法产生混合聚体。教导制备混合聚体的代表性美国专利、美国专利出版物和PCT出版物包括美国专利公开No. US20060128646、US20090209748、US20090298916、US20110077288和US20120322851以及美国专利No. 7687617。

[0251] 在一些实施方案中,混合聚体包含一个或多个吗啉代核苷酸。例如,在一些实施方案中,混合聚体可包含与一个或多个其他核苷酸(例如,DNA、RNA核苷酸)或经修饰核苷酸(例如,LNA、2' -O-甲基核苷酸)混合(例如,以交替方式混合)的吗啉代核苷酸。

[0252] 在一些实施方案中,混合聚体可用于剪接校正或外显子跳读,例如,如以下中报道的:Touznik A., et al., LNA/DNA mixmer-based antisense oligonucleotides correct alternative splicing of the SMN2 gene and restore SMN protein expression in type 1 SMA fibroblasts *Scientific Reports*, volume 7, Article number: 3672 (2017), Chen S. et al., Synthesis of a Morpholino Nucleic Acid (MNA) - Uridine

Phosphoramidite, and Exon Skipping Using MNA/2'-O-Methyl Mixmer Antisense Oligonucleotide, *Molecules* 2016, 21, 1582, 其各自的内容通过引用并入本文。

[0253] j. RNA干扰 (RNAi)

[0254] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸可以是小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA, 也称为短干扰RNA或沉默RNA) 的形式。siRNA是一类双链RNA分子,通常长度为约20至25个碱基对,其通过细胞中的RNA干扰 (RNAi) 途径靶向核酸(例如, mRNA) 用于降解。siRNA分子的特异性可通过分子反义链与其靶RNA的结合来确定。尽管更长的siRNA也可能是有效的,但有效的siRNA分子的长度通常少于30至35个碱基对,以防止通过干扰素应答触发细胞中的非特异性RNA干扰途径。

[0255] 在选择适当的靶RNA序列之后,可使用适当的方法设计和制备包含与全部或部分靶序列互补的核苷酸序列(即反义序列)的siRNA分子(参见,例如PCT公开号WO 2004/016735;以及美国专利公开No. 2004/0077574和2008/0081791)。

[0256] siRNA分子可以是双链的(即,包含反义链和互补有义链的dsRNA分子)或单链的(即,仅包含反义链的ssRNA分子)。siRNA分子可包含具有自身互补的有义链和反义链的双链体(duplex)、不对称双链体、发夹或不对称发夹二级结构。

[0257] 双链siRNA可包含相同长度或不同长度的RNA链。双链siRNA分子也可由单个寡核苷酸组装成茎-环结构,其中siRNA分子的自身互补有义和反义区通过以下连接:一个或更多个基于核酸或基于非核酸的接头,以及环状单链RNA,其具有两个或更多个环结构和包含自身互补有义链和反义链的茎,其中环状RNA可在体内或体外加工以产生能够介导RNAi的活性siRNA分子。因此,本文中考虑了小发夹RNA (small hairpin RNA, shRNA) 分子。除通常由间隔区或环序列隔开的反向互补(有义)序列之外,这些分子还包含特定的反义序列。间隔区或环的切割提供了单链RNA分子及其反向互补物,使得它们可进行退火以形成dsRNA分子(任选地,具有可导致从任一或两条链的3'末端和/或5'末端添加或删除一个、两个、三个或更多个核苷酸的另外的加工步骤)。间隔区可具有足够的长度以允许反义和有义序列在切割间隔区(和任选地,可导致从任一或两条链的3'末端和/或5'末端添加或删除一个、两个、三个、四个或更多个核苷酸的后续加工步骤)之前进行退火并形成双链结构(或茎)。间隔区序列可以是位于两个互补核苷酸序列区域之间的不相关核苷酸序列,当退火成双链核酸时其包含shRNA。

[0258] siRNA分子的总长度可根据所设计siRNA分子的类型从约14至约100个核苷酸变化。通常来说,这些核苷酸中的约14至约50个与RNA靶序列互补,即构成siRNA分子的特异性反义序列。例如,当siRNA是双链siRNA或单链siRNA时,长度可从约14至约50个核苷酸变化,而当siRNA是shRNA或环状分子时,长度可从约40个核苷酸至约100个核苷酸变化。

[0259] siRNA分子可在分子的一个末端包含3'突出端,另一末端可以是平末端或也具有突出端(5'或3')。当siRNA分子在分子的两个末端均包含突出端时,突出端的长度可相同或不同。在一个实施方案中,本公开内容的siRNA分子在分子的两个末端包含约1至约3个核苷酸的3'突出端。

[0260] k. 微RNA (miRNA)

[0261] 在一些实施方案中,寡核苷酸可以是微RNA (miRNA)。微RNA(称为“miRNA”)是小的非编码RNA,属于通过与靶RNA转录物上的互补位点结合来控制基因表达的一类调节分子。

通常来说,miRNA由大的RNA前体(称为初级miRNA(pri-miRNA))产生,所述RNA前体在细胞核中加工成约70个核苷酸前体miRNA,前体miRNA折叠成不完美的茎-环结构。这些前体miRNA通常在胞质内经历另外的加工步骤,在此长度为18至25个核苷酸的成熟miRNA被RNA酶III酶Dicer从前体miRNA发夹的一侧切离。

[0262] 本文中使用的miRNA包括初级miRNA、前体miRNA、成熟miRNA或保留成熟miRNA的生物学活性的其变体的片段。在一个实施方案中,miRNA的尺寸范围可以是21个核苷酸至170个核苷酸。在一个实施方案中,miRNA的尺寸范围是长度为70至170个核苷酸。在另一个实施方案中,可使用长度为21至25个核苷酸的成熟miRNA。

[0263] 1. 适配体

[0264] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸可以是适配体的形式。通常来说,在分子载荷的情况下,适配体是与靶标(例如细胞中的小分子、蛋白质、核酸)特异性结合的任何核酸。在一些实施方案中,适配体是DNA适配体或RNA适配体。在一些实施方案中,核酸适配体是单链DNA或RNA(ssDNA或ssRNA)。应理解,单链核酸适配体可形成螺旋和/或环结构。形成核酸适配体的核酸可包含天然核苷酸、经修饰核苷酸、具有插入在一个或多个核苷酸之间的烃接头(例如,亚烷基)或聚醚接头(例如,PEG接头)的天然核苷酸、具有插入在一个或多个核苷酸之间的烃或PEG接头的经修饰核苷酸,或其组合。描述适配体和制备适配体的方法的示例性出版物和专利包括,例如,Lorsch and Szostak,1996;Jayasena,1999;美国专利No.5,270,163;5,567,588;5,650,275;5,670,637;5,683,867;5,696,249;5,789,157;5,843,653;5,864,026;5,989,823;6,569,630;8,318,438和PCT申请WO 99/31275,其各自通过引用并入本文。

[0265] m. 核酶

[0266] 在一些实施方案中,本文中提供的寡核苷酸可以是核酶的形式。核酶(核糖核酸酶)是能够进行特定的生化反应,类似于蛋白质酶作用的分子,通常是RNA分子。核酶是具有催化活性,包括在与其杂交的RNA分子(例如,mRNA、含RNA的底物、lncRNA和核酶本身)中的特定磷酸二酯键联处进行切割的能力的分子。

[0267] 核酶可采用数种物理结构之一,其中之一被称为“锤头状的”。锤头状核酶由包含9个保守碱基的催化核心、双链茎和环结构(茎-环II)以及与靶RNA侧翼区催化核心互补的两个区域构成。通过形成双链茎I和III,侧翼区能够使核酶与靶RNA特异性结合。通过3',5'-磷酸二酯至2',3'-环状磷酸二酯的酯交换反应,在特定核糖核苷酸三联体旁以顺式(即,切割包含锤头状基序的同一RNA分子)或以反式(切割除包含核酶的RNA底物之外的RNA底物)发生切割。不希望受理论束缚,认为这种催化活性需要在核酶的催化区域中存在特定的、高度保守的序列。

[0268] 核酶结构中的修饰还包括用非核苷酸分子替换或替代分子的多个非核心部分。例如,Benseler et al. (J. Am. Chem. Soc. (1993) 115:8483-8484) 公开了锤头状样分子,其中茎II的两个碱基对和环II的所有四个核苷酸被基于六乙二醇、丙二醇、双(三乙二醇)磷酸酯、三(丙二醇)二磷酸酯或双(丙二醇)磷酸酯的非核苷酸接头替换。Ma et al. (Biochem. (1993) 32:1751-1758;Nucleic Acids Res. (1993) 21:2585-2589) 用非核苷酸的乙二醇相关的接头替换了TAR核酶发夹的六个核苷酸环。Thomson et al. (Nucleic Acids Res. (1993) 21:5600-5603) 用长度为13、17和19个原子的线性非核苷酸接头替换了环II。

[0269] 核酶寡核苷酸可使用公知的方法(参见,例如,PCT公开W09118624;W09413688;W09201806;和WO 92/07065;以及美国专利5436143和5650502)制备,或者可从商业来源(例如,USBiochemicals)购买,而且如果需要的话,可并入核苷酸类似物来提高寡核苷酸对细胞中通过核酸酶降解的抗性。可以以任何已知的方式,例如通过使用例如由Applied Biosystems, Inc.或Milligen产生的市售合成仪来合成核酶。也可通过常规手段在重组载体中产生核酶。参见Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(现行版)。核酶RNA序列可常规地合成,例如通过使用RNA聚合酶例如T7或SP6。

[0270] n. 指导核酸(guide nucleic acid)

[0271] 在一些实施方案中,寡核苷酸是指导核酸,例如,指导RNA(gRNA)分子。通常来说,指导RNA是由以下构成的短的合成RNA:(1)与核酸可编程DNA结合蛋白(napDNAbp)(例如,Cas9)结合的支架序列,和(2)核苷酸间隔区部分,其定义了与gRNA结合的DNA靶序列(例如,基因组DNA靶标),以将核酸可编程DNA结合蛋白引至接近DNA靶序列。在一些实施方案中,napDNAbp是与一种或更多种RNA形成复合物(例如,结合或缔合)的核酸可编程蛋白,所述RNA将核酸可编程蛋白靶向靶DNA序列(例如,靶基因组DNA序列)。在一些实施方案中,当与RNA复合时,核酸可编程核酸酶可被称为核酸酶:RNA复合物。指导RNA可作为两种或更多种RNA的复合体,或者作为单个RNA分子存在。

[0272] 作为单个RNA分子存在的指导RNA(gRNA)可被称为单指导RNA(single-guide RNA, sgRNA),尽管gRNA也被用于指代作为单个分子或者作为两种或更多种分子的复合物存在的指导RNA。通常来说,作为单个RNA种类存在的gRNA包含两个结构域:(1)与靶核酸享有同源性的结构域(即,指导Cas9复合物与靶标的结合);以及(2)结合Cas9蛋白的结构域。在一些实施方案中,结构域(2)对应于被称为tracrRNA的序列,并且包含茎-环结构。在一些实施方案中,结构域(2)与如Jinek et al., Science 337:816-821(2012)(其全部内容通过引用并入本文)中提供的tracrRNA相同或同源。

[0273] 在一些实施方案中,gRNA包含结构域(1)和(2)中的两个或更多个,并且可被称为扩增gRNA(extended gRNA)。例如,如本文中所述,扩增gRNA将结合两个或更多个Cas9蛋白并且在两个或更多个不同的区域结合靶核酸。gRNA包含与靶位点互补的核苷酸序列,其介导核酸酶/RNA复合物与所述靶位点的结合,提供核酸酶:RNA复合物的序列特异性。在一些实施方案中,RNA可编程核酸酶是(CRISPR相关系统)Cas9核酸内切酶,例如来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9(Csn1)(参见,例如,“Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*.” Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najjar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001); “CRISPR RNAmaturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.” Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011); 和 “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.” Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012), 其各自的全部内容通过引用并入本文。

[0274] o. 多聚体

[0275] 在一些实施方案中,分子载荷可包含通过接头连接的2个或更多个寡核苷酸的多聚体(例如,串联体)。在一些实施方案中,以这种方式,复合物/缀合物的寡核苷酸负载可提高超过靶向剂上的可用连接位点(例如,抗体上的可用硫醇位点),或者以其他方式调节以实现特定的载荷负载量。多聚体中的寡核苷酸可相同或不同(例如,靶向不同基因或同一基因上的不同位点或者其产物)。

[0276] 在一些实施方案中,多聚体包含通过可切割接头连接在一起的2个或更多个寡核苷酸。然而,在一些实施方案中,多聚体包含通过不可切割接头连接在一起的2个或更多个寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个连接在一起的寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体包含2至5、2至10或4至20个连接在一起的寡核苷酸。

[0277] 在一些实施方案中,多聚体包含2个或更多个首尾相连(以线性排列)的寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体包含2个或更多个通过基于寡核苷酸的接头(例如,聚-dT接头,一种无碱基接头)首尾相连的寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体包含一个寡核苷酸的5'末端,其与另一个寡核苷酸的3'末端连接。在一些实施方案中,多聚体包含一个寡核苷酸的3'末端,其与另一个寡核苷酸的3'末端连接。在一些实施方案中,多聚体包含一个寡核苷酸的5'末端,其与另一个寡核苷酸的5'末端连接。尽管如此,在一些实施方案中,多聚体可包含分支结构,所述分支结构包含通过分支接头连接在一起的多个寡核苷酸。

[0278] 可用于本文中提供的复合物中的多聚体的另一些实例在以下中公开:例如,美国专利申请号2015/0315588A1,标题为Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkers,其于2015年11月5日公开;美国专利申请号2015/0247141A1,标题为Multimeric Oligonucleotide Compounds,其于2015年9月3日公开;美国专利申请号US2011/0158937A1,标题为Immunostimulatory Oligonucleotide Multimers,其于2011年6月30日公开;和美国专利号5,693,773,标题为Triplex-Forming Antisense Oligonucleotides Having Abasic Linkers Targeting Nucleic Acids Comprising Mixed Sequences Of Purines And Pyrimidines,其于1997年12月2日授权,其各自的内容通过引用整体并入本文。

[0279] ii. 小分子:

[0280] 如本文所述,任何合适的小分子都可以用作分子载荷。在一些实施方案中,小分子是1-脱氧野尻霉素(DNJ)衍生物,例如N-丁基-DNJ、N-甲基-DNJ或N-环丙基甲基-DNJ,如2016年2月25日公开的标题为“METHOD FOR TREATMENT OF POMPE DISEASE USING 1-DEOXYNOJIRIMYCIN DERIVATIVES”的美国专利申请公开号20160051528中所述。在一些实施方案中,小分子DNJ衍生物用作分子伴侣以提高GAA的活性。在一些实施方案中,使用非抑制性酸性 α 葡糖苷酶伴侣ML247小分子,如在以下中:Marugan, et al., “Discovery, SAR, and Biological Evaluation of a Non-Inhibitory Chaperone for Acid Alpha Glucosidase,” 2011年12月在来自NIH的调查报告(Probe Reports from NIH Molecular Libraries)中公开。例如,小分子分子伴侣ML247用于提高PD相关GAA等位基因或野生型GAA等位基因的活性。上面列出的这些出版物各自的内容以其整体并入本文。

[0281] iii. 肽/蛋白质

[0282] 如本文中所述,任何合适的肽或蛋白质均可用作分子载荷。在一些实施方案中,蛋

白质是酶(例如酸性 α -葡糖苷酶,例如由GAA基因编码)。在一些实施方案中,分子载荷是蛋白质或酶,例如酸性 α -葡糖苷酶或野生型GAA蛋白或其活性片段,如在以下中:美国专利申请公开号20160346363,其于2016年12月1日公开,标题为“METHODS AND ORAL FORMULATIONS FOR ENZYME REPLACEMENT THERAPY OF HUMAN LYSOSOMAL AND METABOLIC DISEASES”,美国专利申请公开号20160279254,其于2016年9月29日公开,标题为“METHODS AND MATERIALS FOR TREATMENT OF POMPE’ SDISEASE”,或美国专利申请公开号20130243746,其于2013年9月19日公开,标题为“METHODS AND MATERIALS FOR TREATMENT OF POMPE’ SDISEASE”。在一些实施方案中,酸性 α -葡糖苷酶或野生型GAA蛋白提高对象中的GAA活性。在一些实施方案中,酸性 α -葡糖苷酶或野生型GAA蛋白由GAA基因编码。

[0283] 对应于NCBI序列XP_005257251.1(溶酶体 α -葡萄糖苷酶同工型X1)的示例性人野生型GAA蛋白序列如下:

```

MGVRHPPCSHRLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQG
ASRPGRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQ
GAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETEN
RLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNNTVA
PLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPF
YLALEDGGSAGHVLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYL
DVVGYPFMPYWGLGFHLCRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR
RDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITN
[0284] ETGQPLIGKVWPGSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRG
SEDGCPNNELENPPYVPGVVGGLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIAASHRAL
VKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGAD
VCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRY
ALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKA
EVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRA

GYIIPLQGPGLTTTESRQPMALAVALTGGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFL
ARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDIC
VSLLMGEQFLVSWC

```

[0285] iv. 核酸构建体

[0286] 如本文中所述,任何合适的基因表达构建体均可用作分子载荷。在一些实施方案中,基因表达构建体可以是载体或cDNA片段。在一些实施方案中,基因表达构建体可以是信使RNA(messenger RNA,mRNA)。在一些实施方案中,本文中使用的mRNA可以是经修饰mRNA,例如,如美国专利8,710,200中所述,其于2014年4月24日授权,标题为“Engineered nucleic acids encoding a modified erythropoietin and their expression”。在一些实施方案中,mRNA可包含5' 甲基帽。在一些实施方案中,mRNA可包含聚A尾,任选长度多至160个核苷酸。在一些实施方案中,基因表达构建体可在肌细胞的细胞核内表达,例如过表达。在一些实施方案中,基因表达构建体编码包含至少一个锌指的蛋白质。在一些实施方案中,基因表达构建体编码野生型GAA蛋白。在一些实施方案中,基因表达构建体编码基因编

辑酶。可用作分子载荷的核酸构建体的另一些实例在以下中提供：国际专利申请公开 W02017152149A1, 其于2017年9月19日公开, 标题为“Closed-Ended Linear Duplex Dna For Non-Viral Gene Transfer”; 美国专利8,853,377B2, 其于2014年10月7日授权, 标题为“mRNA For Use In Treatment Of Human Genetic Diseases”; 以及美国专利US8822663B2, 其于2014年9月2日授权, Engineered Nucleic Acids And Methods Of Use Thereof”, 其各自的内容通过引用整体并入本文。

[0287] C. 接头

[0288] 本文中所述的复合物通常包含连接肌肉靶向剂与分子载荷的接头。接头包含至少一个共价键。在一些实施方案中, 接头可以是连接肌肉靶向剂与分子载荷的单键, 例如二硫键或二硫桥。然而, 在一些实施方案中, 接头可通过多个共价键连接肌肉靶向剂与分子载荷。在一些实施方案中, 接头可以是可切割接头。然而, 在一些实施方案中, 接头可以是不可切割接头。接头通常在体外和体内是稳定的, 并且在某些细胞环境中可以是稳定的。另外, 通常来说接头不负面影响肌肉靶向剂或分子载荷的功能特性。接头合成的实例和方法是本领域中已知的(参见, 例如Kline, T. et al. “Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates.” *Pharmaceutical Research*, 2015, 32:11, 3480-3493.; Jain, N. et al. “Current ADC Linker Chemistry” *Pharm Res.* 2015, 32:11, 3526-3540.; McCombs, J.R. and Owen, S.C. “Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry” *AAPS J.* 2015, 17:2, 339-351.)。

[0289] 接头的前体通常将包含允许与肌肉靶向剂和分子载荷二者连接的两种不同的反应性物质。在一些实施方案中, 两种不同的反应性物质可以是亲核体和/或亲电体。在一些实施方案中, 接头通过与肌肉靶向剂的赖氨酸残基或半胱氨酸残基缀合而与肌肉靶向剂连接。在一些实施方案中, 接头通过含马来酰亚胺接头与肌肉靶向剂的半胱氨酸残基连接, 其中任选地, 含马来酰亚胺接头包含马来酰亚胺己酰基或马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸酯基团。在一些实施方案中, 接头通过3-芳基丙腈官能团与肌肉靶向剂的半胱氨酸残基或巯基官能化的分子载荷连接。在一些实施方案中, 接头通过酰胺键、酰肼、三唑、硫醚或二硫键与肌肉靶向剂和/或分子载荷连接。

[0290] i. 可切割接头

[0291] 可切割接头可以是蛋白酶敏感性接头、pH敏感性接头或谷胱甘肽敏感性接头。这些接头通常仅在胞内可切割, 并且优选在胞外环境, 例如肌细胞胞外中稳定。

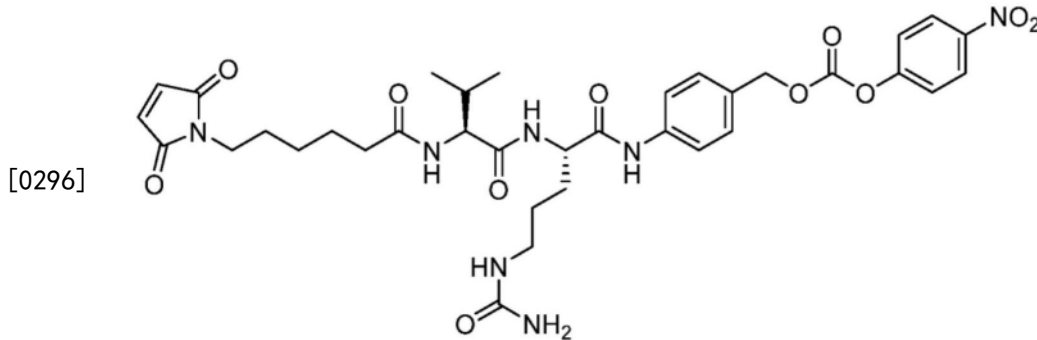
[0292] 蛋白酶敏感性接头可通过蛋白酶活性切割。这些接头通常包含肽序列, 并且长度可为2至10个氨基酸、约2至5个氨基酸、约5至10个氨基酸、约10个氨基酸、约5个氨基酸、约3个氨基酸或约2个氨基酸。在一些实施方案中, 肽序列可包含天然氨基酸例如半胱氨酸、丙氨酸或者非天然或经修饰氨基酸。非天然氨基酸包括 β -氨基酸、高氨基酸、脯氨酸衍生物、3-经取代的丙氨酸衍生物、线性核心氨基酸、N-甲基氨基酸和本领域已知的其他氨基酸。在一些实施方案中, 蛋白酶敏感性接头包含缬氨酸-瓜氨酸或丙氨酸-瓜氨酸二肽序列。在一些实施方案中, 蛋白酶敏感性接头可被溶酶体蛋白酶(例如组织蛋白酶B (cathepsin B))和/或内体蛋白酶切割。

[0293] pH敏感性接头是在高或低pH环境中容易降解的共价键联。在一些实施方案中, pH敏感性接头可在4至6的pH下被切割。在一些实施方案中, pH敏感性接头包含脘或环缩醛。在

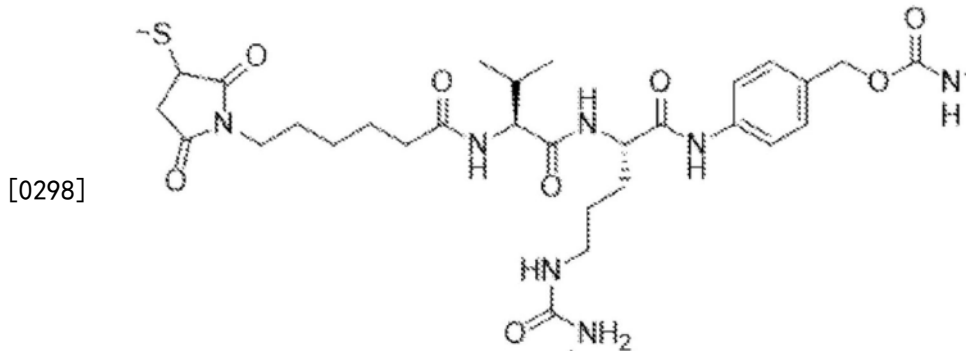
一些实施方案中,pH敏感性接头在内体或溶酶体内被切割。

[0294] 在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性接头包含二硫化物部分。在一些实施方案中,谷胱甘肽敏感性接头通过与细胞内的谷胱甘肽物质进行二硫化物交换反应来切割。在一些实施方案中,二硫化物部分还包含至少一种氨基酸,例如半胱氨酸残基。

[0295] 在一些实施方案中,接头是Val-cit接头(例如,如美国专利6,214,345中所述,其通过引用并入本文)。在一些实施方案中,在缀合之前,val-cit接头具有以下结构:



[0297] 在一些实施方案中,在缀合之后,val-cit接头具有以下结构:



[0299] ii. 不可切割接头

[0300] 在一些实施方案中,可使用不可切割接头。通常来说,不可切割接头在细胞或生理环境中不容易被降解。在一些实施方案中,不可切割接头包含任选经取代的烷基,其中所述取代可包括卤素、羟基、氧物质和其他常见的取代。在一些实施方案中,接头可包含任选经取代的烷基、任选经取代的亚烷基、任选经取代的亚芳基、杂亚芳基、包含至少一种非天然氨基酸的肽序列、截短的聚糖、不能被酶降解的一种或更多种糖、叠氮化物、炔-叠氮化物、包含LPXT序列的肽序列、硫醚、生物素、联苯、聚乙二醇或等同化合物的重复单元、酸酯、酰胺、磺酰胺和/或烷氧基-胺接头。在一些实施方案中,分选酶介导的连接将用于共价连接包含LPXT序列的肌肉靶向剂与包含(G)_n序列的分子载荷(参见,例如Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. *Biotechnol Lett.* 2010, 32(1):1-10.)。

[0301] 在一些实施方案中,接头可包含经取代的亚烷基、任选经取代的亚烯基、任选经取代的亚炔基、任选经取代的亚环烷基、任选经取代的亚环烯基、任选经取代的亚芳基、还包含至少一个选自N、O和S的杂原子的任选经取代的杂亚芳基;还包含至少一个选自N、O和S的杂原子的任选经取代的亚杂环基;亚氨基、任选经取代的氮物质、任选经取代的氧物质O、任选经取代的硫物质或聚(环氧烷烃),例如聚环氧乙烷或聚环氧丙烷。

[0302] iii. 接头缀合

[0303] 在一些实施方案中,接头通过磷酸酯、硫醚、醚、碳-碳键或酰胺键与肌肉靶向剂和/或分子载荷连接。在一些实施方案中,接头通过磷酸酯或硫代磷酸酯基团例如寡核苷酸主链的末端磷酸酯与寡核苷酸连接。在一些实施方案中,接头通过肌肉靶向剂(例如,抗体)上存在的赖氨酸或半胱氨酸残基与该肌肉靶向剂连接。

[0304] 在一些实施方案中,接头通过叠氮化物和炔烃之间的环加成反应与肌肉靶向剂和/或分子载荷连接以形成三唑,其中叠氮化物和炔烃可位于肌肉靶向剂、分子载荷或接头上。在一些实施方案中,炔烃可以是环炔烃,例如环辛炔。在一些实施方案中,炔烃可以是双环壬炔(也称为双环[6.1.0]壬炔或BCN)或经取代的双环壬炔。在一些实施方案中,环辛炔如国际专利申请公开W02011136645中所述,其于2011年11月3日公开,标题为“Fused Cyclooctyne Compounds And Their Use In Metal-free Click Reactions”。在一些实施方案中,叠氮化物可以是包含叠氮化物的糖或碳水化合物分子。在一些实施方案中,叠氮化物可以是6-叠氮基-6-脱氧半乳糖或6-叠氮基-N-乙酰半乳糖胺。在一些实施方案中,包含叠氮化物的糖或碳水化合物分子如国际专利申请公开W02016170186中所述,其于2016年10月27日公开,标题为“Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A β (1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase”。在一些实施方案中,在叠氮化物和炔烃之间进行环加成反应以形成三唑,其中叠氮化物和炔烃可位于肌肉靶向剂、分子载荷或接头上,如国际专利申请公开W02014065661,其于2014年5月1日公开,标题为“Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof”;或国际专利申请公开W02016170186,其于2016年10月27日公开,标题为“Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A β (1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase”中所述。

[0305] 在一些实施方案中,接头还包含间隔区,例如聚乙二醇间隔区或酰基/胺甲酰基磺酰胺间隔区,例如HydraSpaceTM间隔区。在一些实施方案中,间隔区如Verkade, J.M.M. et al., “A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Stability, and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates”, *Antibodies*, 2018, 7, 12中所述。

[0306] 在一些实施方案中,接头通过亲二烯体和二烯/杂二烯之间的第尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder reaction)与肌肉靶向剂和/或分子载荷连接,其中亲二烯体和二烯/杂二烯可位于肌肉靶向剂、分子载荷或接头上。在一些实施方案中,接头通过其他周环反应(pericyclic reaction),例如烯反应与肌肉靶向剂和/或分子载荷连接。在一些实施方案中,接头通过酰胺、硫代酰胺或磺酰胺键合反应与肌肉靶向剂和/或分子载荷连接。在一些实施方案中,接头通过缩合反应与肌肉靶向剂和/或分子载荷连接,以形成存在于接头和肌肉靶向剂和/或分子载荷之间的脞、脞或氨基脞基团。

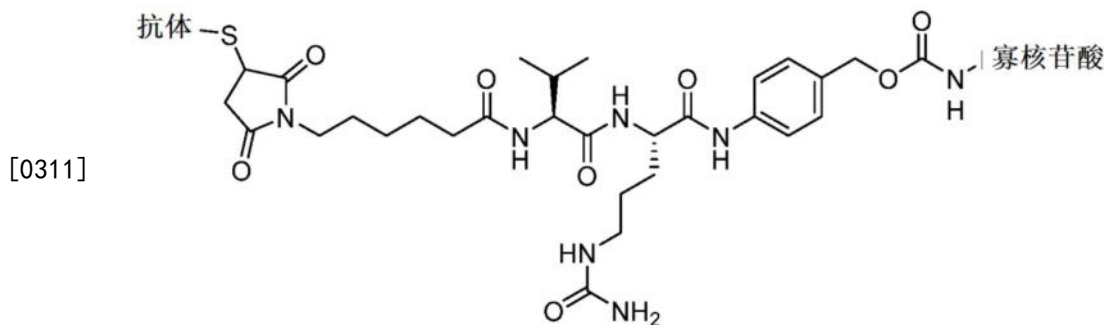
[0307] 在一些实施方案中,接头通过亲核体(例如胺或羟基)和亲电体(例如羧酸或醛)之间的共轭加成反应与肌肉靶向剂和/或分子载荷连接。在一些实施方案中,在进行接头和肌肉靶向剂或分子载荷之间的反应之前,亲核体可存在于接头上并且亲电体可存在于肌肉靶向剂或分子载荷上。在一些实施方案中,在进行接头和肌肉靶向剂或分子载荷之间的反应

之前,亲电体可存在于接头上并且亲核体可存在于肌肉靶向剂或分子载荷上。在一些实施方案中,亲电体可以是叠氮化物、硅中心、羰基、羧酸、酸酐、异氰酸酯、硫代异氰酸酯、琥珀酰亚胺酯、磺基琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺、烷基卤化物、烷基假卤化物、环氧化物、环硫化物、氮丙啶、芳基、活化的磷中心和/或活化的硫中心。在一些实施方案中,亲核体可以是任选经取代的烯烃、任选经取代的炔烃、任选经取代的芳基、任选经取代的杂环基、羟基、氨基、烷基氨基、苯胺基或硫醇基。

[0308] D. 抗体-分子载荷复合物的一些实例

[0309] 本公开内容的另一些方面提供了包含与本文中所述的任何分子载荷(例如,寡核苷酸)共价连接的任一种本文中所述的肌肉靶向剂(例如,转铁蛋白受体抗体)的复合物。在一些实施方案中,肌肉靶向剂(例如,转铁蛋白受体抗体)通过接头与分子载荷(例如,寡核苷酸)共价连接。可使用本文中所述的任何接头。在一些实施方案中,接头与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接。在一些实施方案中,接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体连接。

[0310] 以下提供了复合物的示例性结构,其包含通过Val-cit接头与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体:



[0312] 其中接头与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接,并且其中接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体连接。

[0313] 应理解,抗体可与具有不同化学计量的寡核苷酸连接,该特性可被称为药物抗体比(drug to antibody ratio,DAR),其中“药物”是寡核苷酸。在一些实施方案中,一个寡核苷酸与一个抗体连接(DAR=1)。在一些实施方案中,两个寡核苷酸与一个抗体连接(DAR=2)。在一些实施方案中,三个寡核苷酸与一个抗体连接(DAR=3)。在一些实施方案中,四个寡核苷酸与一个抗体连接(DAR=4)。在一些实施方案中,提供了不同复合物的混合物,每种复合物具有不同的DAR。在一些实施方案中,这样的混合物中的复合物的平均DAR可在1至3、1至4、1至5或更大的范围内。可通过将寡核苷酸缀合至抗体上的不同位点和/或通过多聚体缀合至抗体上的一个或更多个位点来提高DAR。例如,可通过将单个寡核苷酸缀合至抗体上的两个不同位点或通过二聚体寡核苷酸缀合至抗体的单个位点来实现DAR为2。

[0314] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体(例如,如本文中所述的抗体或其任意变体)。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过接头(例如,Val-cit接头)与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体(例如,如本文中所述的抗体或其任意变体)。在一些实施方案中,接头(例如,Val-cit接头)与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接。在一些实施方案中,接头(例如,Val-cit接头)通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体(例如,如本文中所述的抗体或其任意变

体)连接。

[0315] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含与表1.1所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;以及与表1.1所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3相同的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0316] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VL。

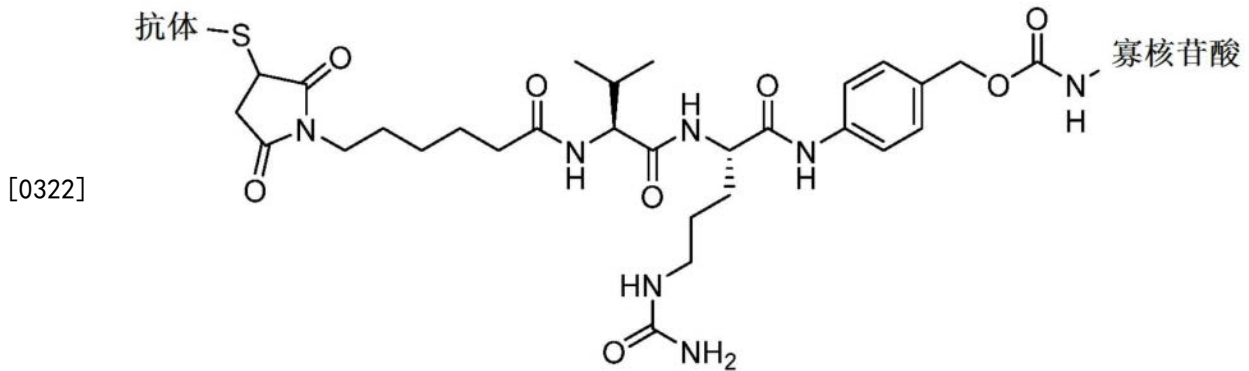
[0317] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链。

[0318] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过接头(例如,Val-cit接头)与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含与表1.1中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;以及与表1.1中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3相同的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0319] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过接头(例如,Val-cit接头)与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过接头(例如,Val-cit接头)与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VL。

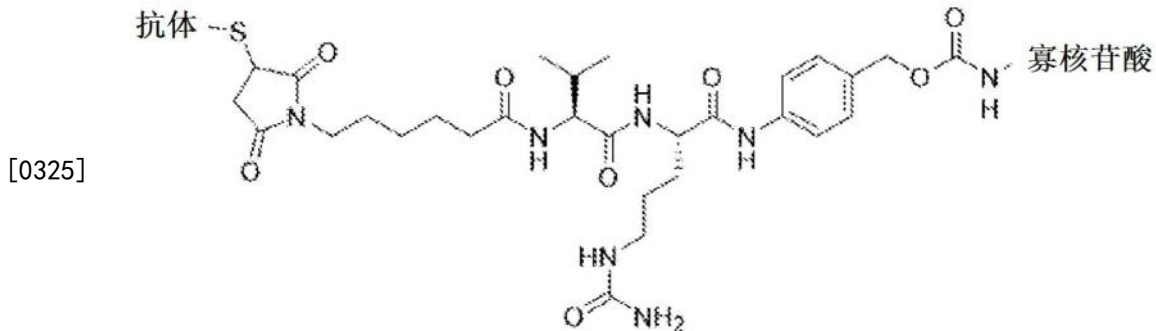
[0320] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过接头(例如,Val-cit接头)与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过接头(例如,Val-cit接头)与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链。

[0321] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过Val-cit接头与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含与表1.1中所示的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3相同的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;以及与表1.1中所示的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3相同的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,并且其中所述复合物包含以下结构:



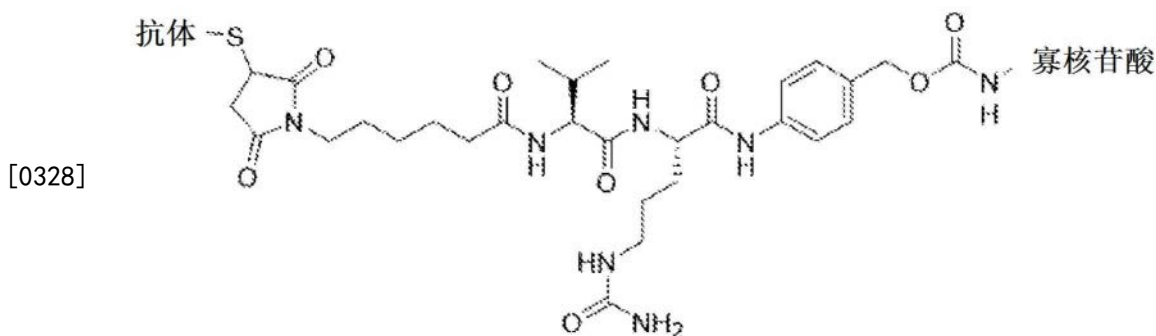
[0323] 其中接头Val-cit接头与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接,并且其中Val-cit接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体(例如,如本文中所述的抗体或其任意变体)连接。

[0324] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过Val-cit接头与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VL,并且其中所述复合物包含以下结构:



[0326] 其中接头Val-cit接头与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接,并且其中Val-cit接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体(例如,如本文中所述的抗体或其任意变体)连接。

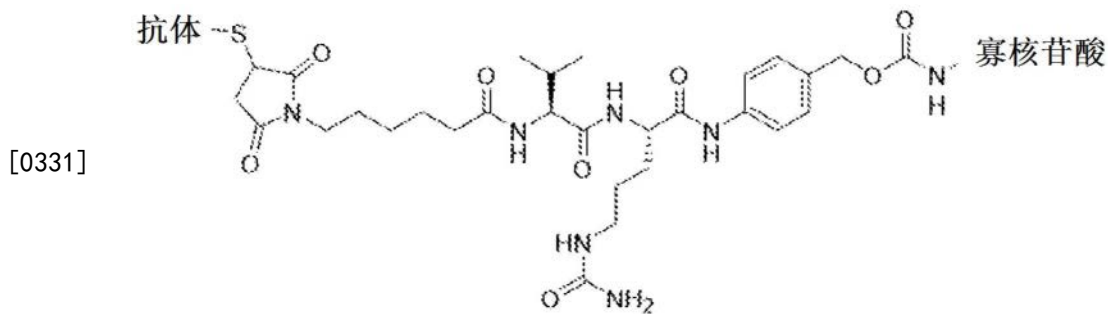
[0327] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过Val-cit接头与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VL,并且其中所述复合物包含以下结构:



[0329] 其中接头Val-cit接头与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接,并且其中Val-cit接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体(例如,如本文中所述的抗体或其任意变体)连接。

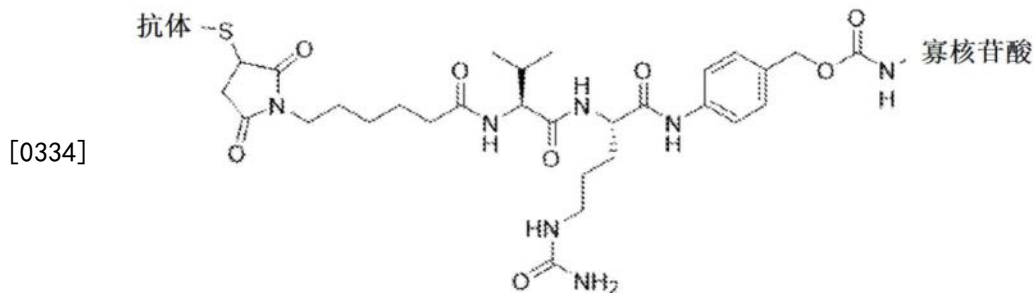
[0330] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过Val-cit接头与寡核苷酸共价

连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的轻链,并且其中所述复合物包含以下结构:



[0332] 其中接头Val-cit接头与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接,并且其中Val-cit接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体(例如,如本文中所述的抗体或其任意变体)连接。

[0333] 在一些实施方案中,本文中所述的复合物包含通过Val-cit接头与寡核苷酸共价连接的转铁蛋白受体抗体,其中所述转铁蛋白受体抗体包含具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链,并且其中所述复合物包含以下结构:



[0335] 其中接头Val-cit接头与寡核苷酸的5'末端、3'末端或内部连接,并且其中Val-cit接头通过硫醇反应性键联(例如,通过抗体中的半胱氨酸)与抗体(例如,如本文中所述的抗体或其任意变体)连接。

[0336] III. 制剂

[0337] 本文中提供的复合物可以以任何合适的方式配制。通常来说,本文中提供的复合物以适用于药物用途的方式配制。例如,可使用使降解最小化、促进递送和/或摄取或者为制剂中的复合物提供另一种有益特性的制剂将复合物递送至对象。在一些实施方案中,本文中提供了包含复合物和可药用载体的组合物。可适当地配制这样的组合物使得当施用于对象时,无论是施用至靶细胞的直接环境中或全身性施用,足够量的复合物都能进入靶肌细胞。在一些实施方案中,复合物被配制在缓冲溶液例如磷酸盐缓冲盐水溶液、脂质体、胶束结构和衣壳中。

[0338] 应理解,在一些实施方案中,组合物可分别包含本文中提供的复合物的一种或更多种组分(例如,肌肉靶向剂、接头、分子载荷或它们中任一者的前体分子)。

[0339] 在一些实施方案中,复合物被配制在水或水溶液(例如,用pH调节的水)中。在一些实施方案中,复合物被配制在碱性缓冲水溶液(例如,PBS)中。在一些实施方案中,本文中公开的制剂包含赋形剂。在一些实施方案中,赋形剂赋予组合物以改善的稳定性、改善的吸收、改善的溶解性和/或活性成分的治疗性增强。在一些实施方案中,赋形剂是缓冲剂(例

如,柠檬酸钠、磷酸钠、tris碱或氢氧化钠)或载剂(例如,缓冲溶液、矿脂(petrolatum)、二甲基亚砷或矿物质油)。

[0340] 在一些实施方案中,将复合物或其组分(例如,寡核苷酸或抗体)冻干用于延长其保质期,并随后在使用(例如,施用于对象)之前制成溶液。因此,包含本文中所述的复合物或其组分的组合物中的赋形剂可以是冻干保护剂(例如,甘露醇、乳糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮)或崩解温度调节剂(例如,右旋糖酐、ficoll或明胶)。

[0341] 在一些实施方案中,药物组合物被配制成与其预期施用途径相容。施用途径的一些实例包括肠胃外施用,例如静脉内、皮内、皮下施用。通常来说,施用途径是静脉内或皮下的。

[0342] 适用于可注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在具有水溶性时)或分散体,以及用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等),及其合适的混合物。在一些实施方案中,组合物中的制剂包含等张剂,例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨醇以及氯化钠。无菌可注射溶液可通过将所需量的复合物与以上列举的成分之一或组合(根据需要)一起并入选定的溶剂中,然后过滤灭菌来制备。

[0343] 在一些实施方案中,组合物可包含至少约0.1%的复合物或其组分,或者更多,尽管一种或更多种活性成分的百分比可为总组合物的重量或体积的约1%至约80%或更多。本领域技术人员将考虑制备这样的药物制剂的因素例如溶解性、生物利用度、生物学半衰期、施用途径、产品保质期以及其他药理学考虑因素,并且因此多种剂量和治疗方案可以是期望的。

[0344] IV. 使用/治疗方法

[0345] 如本文所述的包含与分子载荷共价的肌肉靶向剂的复合物在治疗蓬佩病中有效。在一些实施方案中,蓬佩病与包含与PD相关的突变的GAA等位基因相关。

[0346] 在一些实施方案中,对象可以是人对象、非人灵长类对象、啮齿动物对象或任何合适的哺乳动物对象。在一些实施方案中,对象可患有强直性肌营养不良。在一些实施方案中,对象在溶酶体中具有糖原的毒性积累。在一些实施方案中,患有蓬佩病的对象当前正在接受或之前已经接受过酶替代治疗。

[0347] 本公开内容的一个方面包括涉及向对象施用有效量的本文中所述的复合物的方法。在一些实施方案中,可向有治疗需要的对象施用有效量的包含含有与分子载荷共价的肌肉靶向剂的复合物的药物组合物。在一些实施方案中,可通过合适的途径施用包含如本文中所述的复合物的药物组合物,所述途径可包括静脉内施用,例如作为推注(bolus)或通过一段时间内的连续输注。在一些实施方案中,可通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内或鞘内途径进行静脉内施用。在一些实施方案中,药物组合物可以是固体形式、水性形式或液体形式。在一些实施方案中,可将水性或液体形式雾化或冻干。在一些实施方案中,雾化或冻干形式可用水溶液或液体溶液重构。

[0348] 用于静脉内施用的组合物可包含多种载体,例如植物油、二甲基乳酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、豆蔻酸异丙酯、乙醇以及多元醇(甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)。对于静脉内注射,水溶性抗体可通过滴注方法施用,通过该方法输注包含抗体和生理学上可接受的赋形剂的药物制剂。生理学上可接受的赋形剂可包括,例如5%右旋糖、0.9%盐

水、林格液 (Ringer's solution) 或其他合适的赋形剂。可将肌肉制剂, 例如抗体的合适可溶性盐形式的无菌制剂溶解在药用赋形剂例如注射用水、0.9% 盐水或5% 葡萄糖溶液中并施用。

[0349] 在一些实施方案中, 包含含有与分子载荷共价的肌肉靶向剂的复合物的药物组合物通过位点特异性或局部递送技术施用。这些技术的一些实例包括复合物的可植入储库源、局部递送导管、位点特异性载体、直接注射或直接应用。

[0350] 在一些实施方案中, 包含含有与分子载荷共价的肌肉靶向剂的复合物的药物组合物以赋予对象治疗作用的有效浓度施用。如本领域技术人员所公认的, 有效量根据疾病的严重程度、所治疗对象的独特特征 (例如年龄、身体状况、健康或体重)、治疗的持续时间、任何同时治疗的性质、施用途径和相关因素而变化。这些相关因素是本领域技术人员已知的, 并且仅通过常规实验即可解决。在一些实施方案中, 有效浓度是被认为对患者安全的最大剂量。在一些实施方案中, 有效浓度将是提供最大效力的最低的可能浓度。

[0351] 经验考虑因素 (例如复合物在对象中的半衰期) 通常将有助于确定用于治疗的药物组合物的浓度。施用频率可凭经验确定和调整以使治疗效力最大化。

[0352] 通常来说, 对于本文中所述的任何复合物的施用, 根据上述因素, 例如安全性或效力, 初始候选剂量可为约1至100mg/kg或更高。在一些实施方案中, 将施用一次治疗。在一些实施方案中, 将每天、每两周、每周、每两个月、每月或以提供最大效力的同时使对对象的安全风险最小化的任何时间间隔施用治疗。通常来说, 可在整个治疗过程中监测效力和治疗以及安全风险。

[0353] 可使用任何合适的方法评估治疗的效力。在一些实施方案中, 可通过对与蓬佩病相关的症状 (包括进行性肌肉无力和呼吸问题) 的观察进行评价, 来评估治疗的效力。

[0354] 在一些实施方案中, 将包含含有与分子载荷共价的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物以相对于对照 (例如治疗之前基因表达的基线水平) 足以抑制至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的靶基因活性或表达的有效浓度施用于对象。

[0355] 在一些实施方案中, 向对象单次给药或施用包含含有与分子载荷共价的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1至5天、1至10天、5至15天、10至20天、15至30天、20至40天、25至50天或更多天。在一些实施方案中, 向对象单次给药或施用包含含有与分子载荷共价的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周。在一些实施方案中, 向对象单次给药或施用包含含有与分子载荷共价的肌肉靶向剂的本文中所述的复合物的药物组合物足以抑制靶基因的活性或表达持续至少1、2、3、4、5或6个月。

[0356] 在一些实施方案中, 药物组合物可包含多于一种包含与分子载荷共价的肌肉靶向剂的复合物。在一些实施方案中, 药物组合物还可包含用于治疗对象 (例如, 患有蓬佩病的人对象) 的任何其他合适的治疗剂。在一些实施方案中, 其他治疗剂可增强或补充本文中所述复合物的效力。在一些实施方案中, 其他治疗剂可发挥功能来治疗不同于本文中所述复合物的症状或疾病。

[0357] 实施例

[0358] 实施例1: 用经转染的反义寡核苷酸靶向HPRT

[0359] 在体外测试了靶向次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase, HPRT) siRNA降低永生化细胞系中HPRT表达水平的能力。简言之,用lipofectamine 2000配制的对照siRNA (siCTRL;100nM) 或靶向HPRT的siRNA (siHPRT; 100nM) 转染Hepa 1-6细胞。转染48小时之后评价HPRT表达水平。还进行了对照实验,其中将载剂(磷酸盐缓冲盐水)递送至培养中的Hepa 1-6细胞并将细胞维持48小时。如图1中所示,发现与对照相比,HPRT siRNA使HPRT表达水平降低约90%。

[0360] 表2. siHPRT和siCTRL的序列

[0361]

	序列
siHPRT有义链	5'-UcCuAuGaCuGuAgAuUuUaU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'
siHPRT反义链	5'-paUaAaAuCuAcAgUcAuAgGasAsu-3'
siCTRL有义链	5'-UgUaAuAaCcAuAuCuAcCuU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'
siCTRL反义链	5'-aAgGuAgAuAuGgUuAuUaCasAsa-3'

[0362] *小写字母-2' Ome核糖;大与字母-2' 氟核糖;p-磷酸酯键联;s-硫代磷酸酯键联

[0363] 实施例2:用肌肉靶向复合物靶向HPRT

[0364] 产生了肌肉靶向复合物,其包含通过不可切割的N-γ-马来酰亚胺基丁酰基-氧基琥珀酰亚胺酯(GMBS)接头与DTX-A-002(抗转铁蛋白受体抗体)共价连接的实施例1中使用的HPRT siRNA (siHPRT)。

[0365] 简言之,将GMBS接头溶解在干燥的DMSO中,并通过在水性条件下形成酰胺键来与siHPRT有义链的3'末端偶联。通过Kaiser测试验证反应的完成。通过凝胶渗透色谱法除去过量的接头和有机溶剂。然后使用迈克尔加成反应将经纯化的siHPRT的马来酰亚胺官能化有义链与DTX-A-002抗体偶联。

[0366] 然后对抗体偶联反应的产物进行疏水相互作用色谱法(HIC-HPLC)。纯化包含与DTX-A-002抗体共价连接的一个或两个siHPRT分子的抗TfR-siHPRT复合物。密度测定法证实,经纯化的复合物样品的平均siHPRT与抗体之比为1.46。SDS-PAGE分析表明,>90%的经纯化的复合物样品包含与一个或两个siHPRT分子连接的DTX-A-002。

[0367] 使用与上述相同的方法,产生了对照IgG2a-siHPRT复合物,其包含通过GMBS接头与IgG2a (Fab) 抗体 (DTX-A-003) 共价连接的实施例1中使用的HPRT siRNA (siHPRT)。密度测定法证实,DTX-C-001的平均siHPRT与抗体之比为1.46,并且SDS-PAGE表明,>90%经纯化的对照复合物样品包含与一个或两个siHPRT分子连接的DTX-A-003。

[0368] 然后测试抗TfR-siHPRT复合物的细胞内化和对细胞内HPRT的抑制。在载剂(磷酸盐缓冲盐水)、IgG2a-siHPRT (100nM)、抗TfR-siCTRL (100nM) 或抗TfR-siHPRT (100nM) 的存在下将具有相对高的转铁蛋白受体表达水平的Hepa 1-6细胞孵育72小时。孵育72小时之后,分离细胞并测定HPRT的表达水平(图2)。相对于用载剂对照处理的细胞,用抗TfR-siHPRT处理的细胞表现出HPRT表达降低了约50%。同时,用IgG2a-siHPRT或抗TfR-siCTRL处理之细胞的HPRT表达水平与载剂对照相当(HPRT表达未降低)。这些数据表明抗TfR-siHPRT的抗转铁蛋白受体抗体能够使复合物进行细胞内化,从而使siHPRT抑制HPRT的表达。

[0369] 实施例3:用肌肉靶向复合物靶向小鼠肌肉组织中的HPRT

[0370] 测试了实施例2中所述的肌肉靶向复合物抗TfR-siHPRT对小鼠组织中HPRT的抑

制。用单剂量的载剂对照(磷酸盐缓冲盐水)、siHPRT(2mg/kg RNA)、IgG2a-siHPRT(2mg/kg RNA,相当于9mg/kg抗体复合物)或抗TfR-siHPRT(2mg/kg RNA,相当于9mg/kg抗体复合物)静脉内注射C57BL/6野生型小鼠。每个实验条件在四只单独的C57BL/6野生型小鼠中重复。在注射之后3天时期之后,使小鼠安乐死并分割为分离的组织类型。随后测定单独的组织样品的HPRT表达水平(图3A至3B和4A至4E)。

[0371] 相对于用siHPRT对照处理的小鼠,用抗TfR-siHPRT复合物处理的小鼠表现出腓肠肌(31%降低; $p<0.05$)和心脏(30%降低; $p<0.05$)中的HPRT表达降低(图3A至3B)。同时,对于所有测定的肌肉组织类型,用IgG2a-siHPRT复合物处理的小鼠的HPRT表达水平与siHPRT对照相当(HPRT表达几乎没有或没有降低)。

[0372] 用抗TfR-siHPRT复合物处理的小鼠显示出在非肌肉组织例如脑、肝、肺、肾和脾组织中HPRT表达没有变化(图4A至4E)。

[0373] 这些数据表明,在体内小鼠模型中抗TfR-siHPRT复合物的抗转铁蛋白受体抗体能够使复合物细胞内化至肌肉特异性组织中,从而允许siHPRT抑制HPRT的表达。这些数据还表明本公开内容的抗TfR-寡核苷酸复合物能够特异性地靶向肌肉组织。

[0374] 实施例4:用肌肉靶向复合物靶向GYS1

[0375] 产生了肌肉靶向复合物,其包含通过组织蛋白酶可切割接头与抗转铁蛋白受体抗体DTX-A-002(RI7 217(Fab))共价连接的靶向GYS1的突变等位基因的反义寡核苷酸(GYS1 ASO)。

[0376] 简言之,使用酰胺偶联反应将马来酰亚胺基己酰基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸-对氨基苄醇对硝基苯基碳酸酯(MC-Val-Cit-PABC-PNP)接头分子与 $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-GYS1 ASO}$ 偶联。通过凝胶渗透色谱法除去过量的接头和有机溶剂。然后将经纯化的Val-Cit-接头-GYS1 ASO与巯基反应性抗转铁蛋白受体抗体(DTX-A-002)偶联。

[0377] 然后对抗体偶联反应的产物进行疏水相互作用色谱法(HIC-HPLC)以纯化肌肉靶向复合物。经纯化的复合物的密度测定法和SDS-PAGE分析分别允许确定ASO与抗体的平均比和总纯度。

[0378] 使用与上述相同的方法,产生了对照复合物,其包含通过Val-Cit接头与IgG2a(Fab)抗体共价连接的GYS1 ASO。

[0379] 然后测试包含与GYS1 ASO共价连接的DTX-A-002的纯化的肌肉靶向复合物的细胞内化和对GYS1的抑制。在载剂对照(盐水)、肌肉靶向复合物(100nM)或对照复合物(100nM)的存在下,将具有相对高的转铁蛋白受体表达水平的疾病相关的肌细胞孵育72小时。孵育72小时之后,分离细胞并测定GYS1的表达水平。

[0380] 实施例5:用肌肉靶向复合物靶向GAA

[0381] 产生了肌肉靶向复合物,其包含通过组织蛋白酶可切割接头与抗转铁蛋白受体抗体DTX-A-002(RI7 217(Fab))共价连接的靶向GAA的突变等位基因的反义寡核苷酸(GAAASO)。GAAASO是寡核苷酸,其靶向GAA以促进GAAmRNA转录物包含外显子2。

[0382] 简言之,使用酰胺偶联反应将马来酰亚胺基己酰基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸-对氨基苄醇对硝基苯基碳酸酯(MC-Val-Cit-PABC-PNP)接头分子与 $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-GAAASO}$ 偶联。通过凝胶渗透色谱法除去过量的接头和有机溶剂。然后将经纯化的Val-Cit-接头-GAAASO与巯基反应性抗转铁蛋白受体抗体(DTX-A-002)偶联。

[0383] 然后对抗体偶联反应的产物进行疏水相互作用色谱法 (HIC-HPLC) 以纯化肌肉靶向复合物。经纯化的复合物的密度测定法和 SDS-PAGE 分析分别允许确定 ASO 与抗体的平均比和总纯度。

[0384] 使用与上述相同的方法, 产生了对照复合物, 其包含通过 Val-Cit 接头与 IgG2a (Fab) 抗体共价连接的 GAAASO。

[0385] 然后测试包含与 GAAASO 共价连接的 DTX-A-002 的纯化的肌肉靶向复合物的细胞内化和在成熟 GAAmRNA 转录物中包含外显子 2。在载剂对照 (盐水)、肌肉靶向复合物 (100nM) 或对照复合物 (100nM) 的存在下, 将具有相对高的转铁蛋白受体表达水平的疾病相关的肌细胞孵育 72 小时。孵育 72 小时之后, 分离细胞并测定包含外显子 2 的 GAAmRNA 的表达水平。

[0386] 等同方案和术语

[0387] 本文中举例说明性地描述的公开内容可在不存在本文中未具体公开的任何一个或更多个要素、一个或更多个限制的情况下适当地实践。因此, 例如, 在本文中的每种情况下, 术语“包含/包括”、“基本上由……组成”和“由……组成”中的任一个可用其他两个术语中的任一个替换。已采用的术语和表达作为描述而非限制的术语使用, 并且使用这样的术语和表达不旨在排除所示出和所描述的特征的任何等同形式或其一部分, 而是应认识到, 在所公开内容的范围内可能进行多种修改。因此, 应理解, 尽管已通过一些优选的实施方案、任选的特征具体公开了本公开内容, 但是本领域技术人员可获取本文中所公开概念的修改和变化, 并且这样的修改和变化被认为是在本公开内容的范围内。

[0388] 另外, 在根据马库什组 (Markush group) 或其他替代组描述本公开内容的特征或方面的情况下, 本领域技术人员将认识到, 本公开内容也因此以马库什组或其他组的任何个体成员或成员亚组的方式描述。

[0389] 应理解, 在一些实施方案中, 在描述寡核苷酸或其他核酸的结构时可参考序列表中所示的序列。在这样的实施方案中, 实际的寡核苷酸或其他核酸与指定序列相比可具有一个或更多个替代核苷酸 (例如, DNA 核苷酸的 RNA 对应物或 RNA 核苷酸的 DNA 对应物) 和/或者一个或更多个经修饰核苷酸和/或者一个或更多个经修饰核苷酸间键联和/或者一个或更多个其他修饰, 同时保留与指定序列基本相同或相似的互补特性。

[0390] 除非在本文中另外指明或与上下文明显矛盾, 否则在描述本发明的上下文中 (尤其是在所附权利要求的上下文中) 使用没有数量词修饰的名词将被解释为一个/种或更多个/种。除非另有说明, 否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”将被解释为开放式术语 (即, 意指“包括但不限于”)。除非本文中另外指明, 否则本文中值范围的记载仅旨在用作分别指代落入该范围内的每个单独值的速记方法, 并且每个单独值均被并入说明书中, 如同其在本文中被单独记载一样。除非在本文中另外指明或在其他情况下与上下文明显矛盾, 否则本文中所述的所有方法均可以以任何合适的顺序进行。除非另有说明, 否则本文中提供的任何和所有实例或示例性语言 (如“例如”) 的使用仅仅旨在更好地说明本发明, 并且不对本发明的范围构成限制。说明书中的语言均不应被解释为表示对本发明的实践必要的任何未要求保护的要素。

[0391] 本文中描述了本发明的一些实施方案。在阅读前述说明之后, 那些实施实施方案的变化方案对于本领域普通技术人员可变得明显。

[0392] 本发明人预期技术人员在适当时采用这样的变化方案, 并且本发明人希望以除本

文中具体描述的之外的方式实践本发明。因此,如适用法律所允许的,本发明包括在此所附权利要求中记载的主题的所有修改方案和等同方案。此外,除非在本文中另外指明或在其他情况下与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖其所有可能变化方案中的上述要素的任何组合。本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文中所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。这样的等同方案旨在由所附权利要求书涵盖。

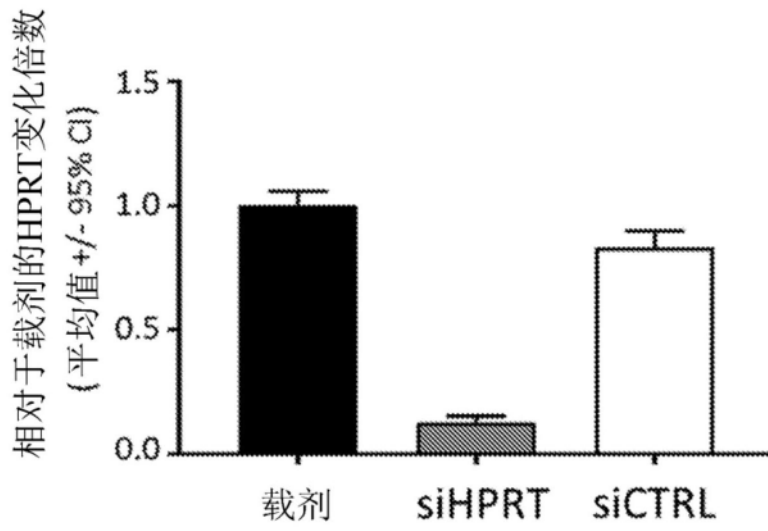


图1

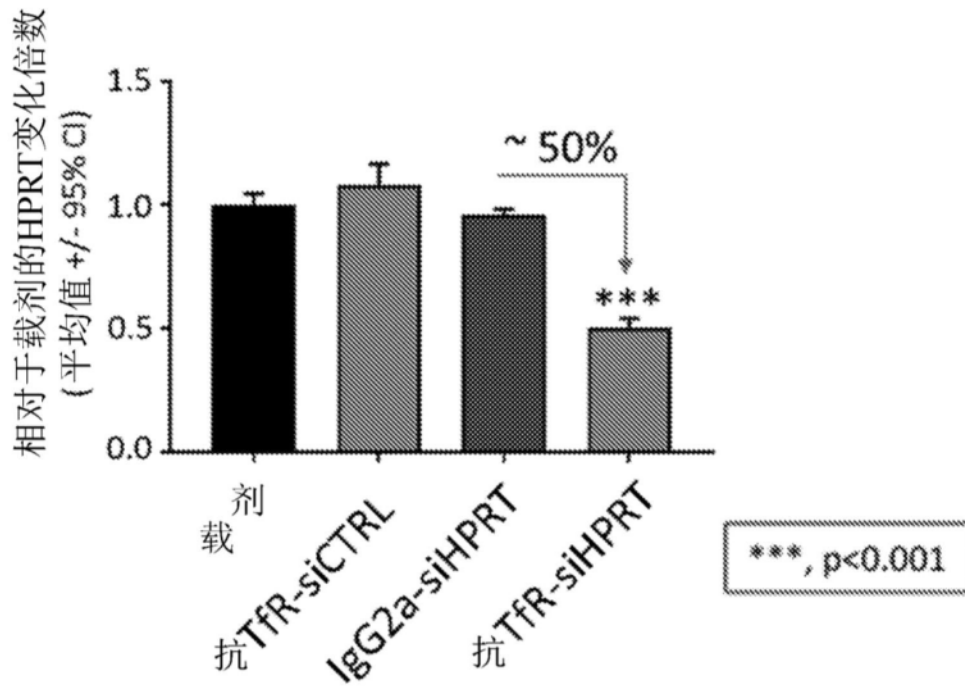


图2

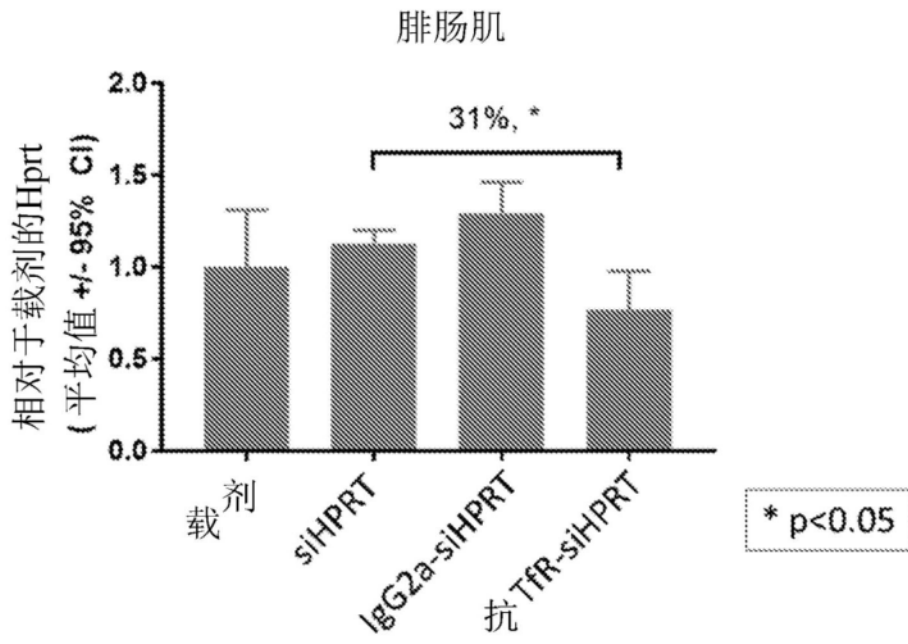


图3A

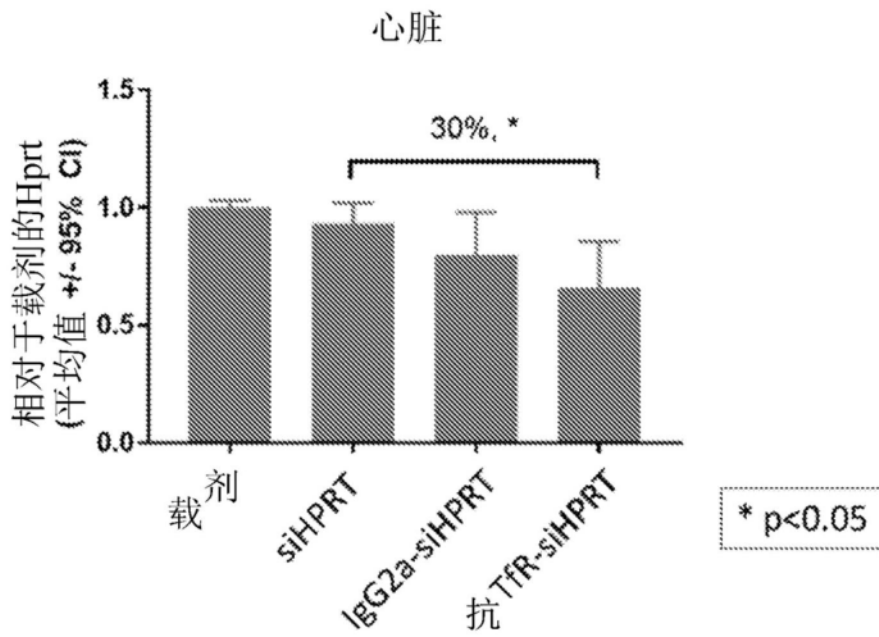


图3B

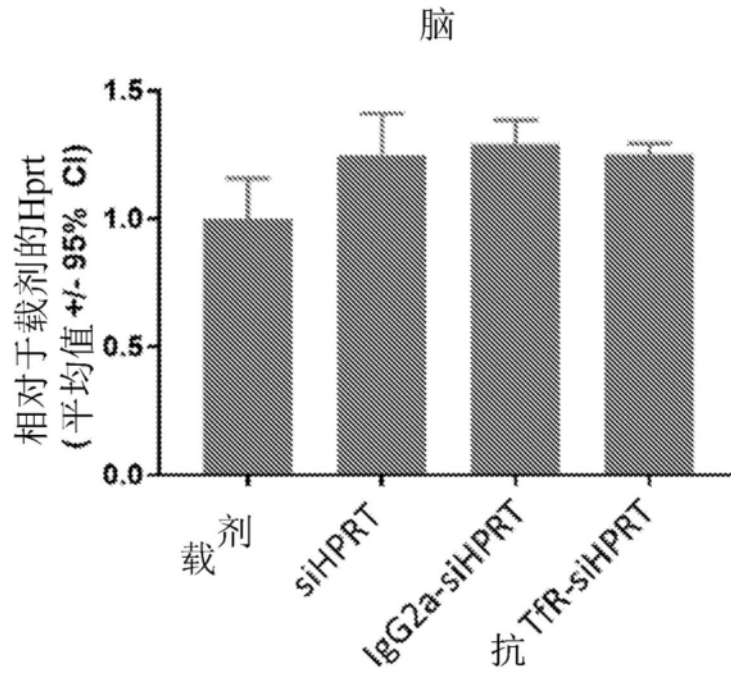


图4A

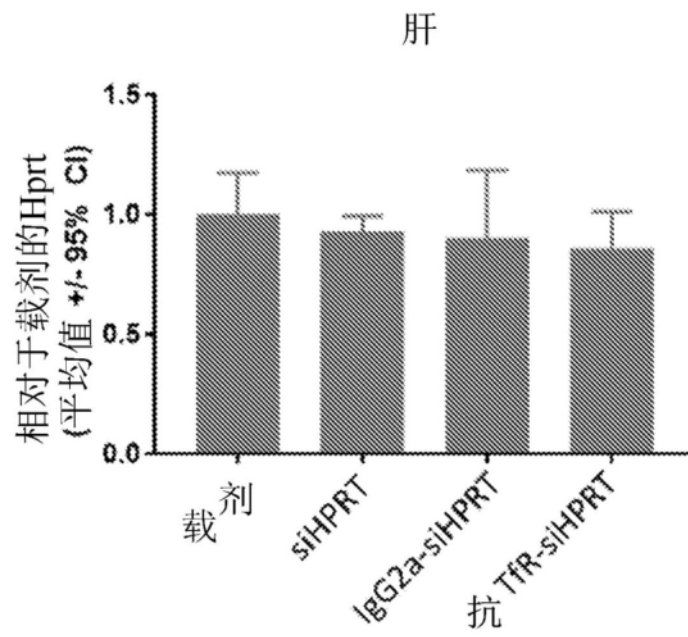


图4B

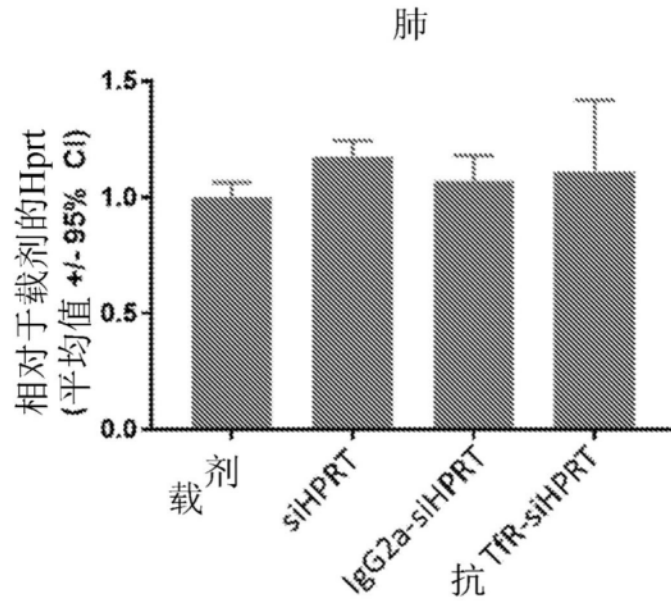


图4C

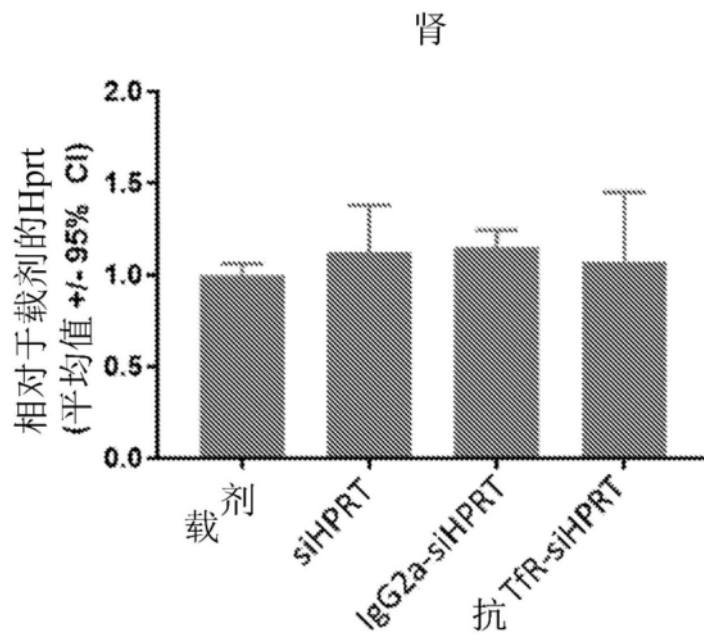


图4D

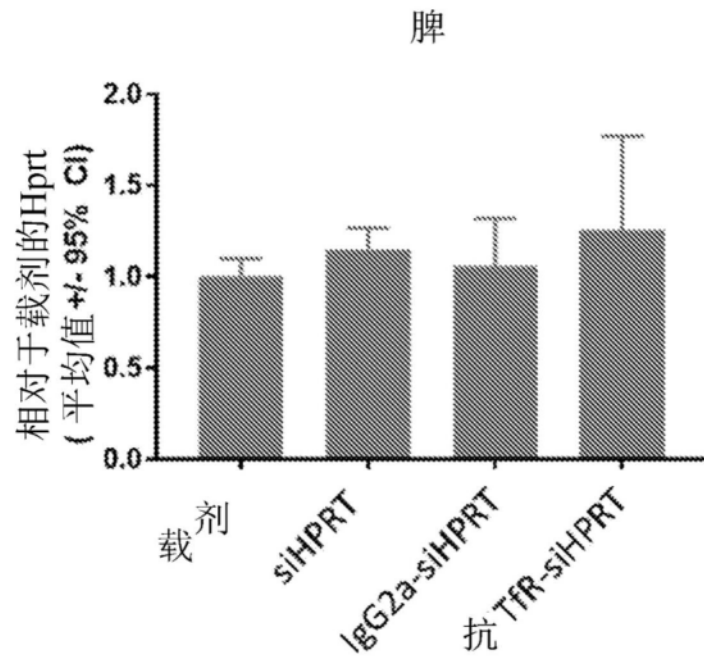


图4E