

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390409 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.28

(51) Int. Cl. A61K 38/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.09

(54) МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНО-ЛИЦЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

(31) 63/055,768; 63/061,839; 63/143,828;
63/181,456

(32) 2020.07.23; 2020.08.06; 2021.01.30;
2021.04.29

(33) US

(86) PCT/US2021/040987

(87) WO 2022/020106 2022.01.27

(71) Заявитель:

ДАЙН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

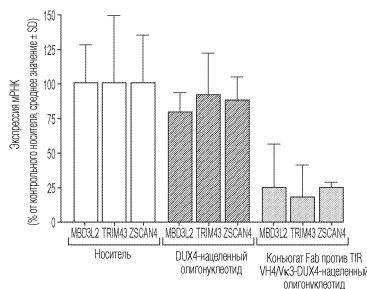
(72) Изобретатель:

Субраманиян Ромеш Р., Катанани
Мохаммед Т., Уиден Тимоти,
Дежарден Коди А., Куинн Брендан,
Наджим Джон (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Аспекты настоящего изобретения относятся к комплексам, содержащим мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором поверхности клетки на мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка ингибирует экспрессию или активность DUX4. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, таким как антисмысловой олигонуклеотид или РНКи-олигонуклеотид.



A1

202390409

202390409

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577089EA/55

МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНО-ЛИЦЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по 35 U.S.C. § 119(e) по предварительной заявке США № 63/055768, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY", поданной 23 июля 2020 года, предварительной заявке США № 63/061839, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY", поданной 6 августа 2020 года, предварительной заявке США № 63/143828, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY", поданной 30 января 2021 года, и предварительной заявке США № 63/181456, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY", поданной 29 апреля 2021 года; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к направленным комплексам для доставки молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотидов) в клетки и их применению, в частности, применению, касающемуся лечения заболевания.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ВИДЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА ПОСРЕДСТВОМ EFS-WEB

[0003] Настоящая заявка содержит список последовательностей, поданный в формате ASCII посредством EFS-WEB и включенный, таким образом, посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII копия, созданная 8 июля 2021 года, названа D082470039WO00-SEQ-DWY и имеет размер 160579 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Мышечные дистрофии (MD) являются группой заболеваний, отличающихся прогрессирующей слабостью и потерей мышечной массы. Эти заболевания вызваны мутациями в генах, кодирующих белки, необходимые для формирования здоровой мышечной ткани. Плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD) является MD с доминантным типом наследования, главным образом, поражающей мышцы лица, лопаток и плеч. Другие симптомы FSHD включают слабость мышц брюшного пресса, аномалии сетчатки, потерю слуха и боль и воспаление суставов. FSHD является наиболее распространенной из девяти типов MD, поражая взрослых и детей с частотой приблизительно 1 на 8300 людей в мире. FSHD вызвана аномальной продукцией двойного гомеобокса 4 (DUX4), белка, функция которого неизвестна. Ген *DUX4*, кодирующий белок DUX4, локализован в области повторов D4Z4 на хромосоме 4 и, как правило,

экспрессируется только во время эмбрионального развития, после чего репрессирован посредством гиперметилирования повторов D4Z4, окружающих и приводящих к компактизации гена *DUX4*. Описано два типа FSHD, тип 1 и тип 2. Тип 1, на который приходится приблизительно 95% случаев, ассоциирован с делециями повторов D4Z4 на хромосоме 4. Нестрадающие заболеванием индивидуумы, как правило, имеют более 10 повторов, расположенных в субтеломерной области хромосомы 4, в то время как наиболее распространенная форма FSHD (FSHD1) вызвана сокращением набора до менее чем 10 повторов, что ассоциировано со сниженной эпигенетической репрессии и разнообразной экспрессии *DUX4* в скелетных мышцах. Два аллельных варианта хромосомы 4q (4qA и 4qB) находятся в области, дистальной относительно D4Z4. 4qA находится в цис-положении относительно функционального консенсусного участка полиаденилирования. Сокращение аллелей 4qA является патогенным, т.к. транскрипт *DUX4* полиаденилируется и транслируется в стабильный белок. FSHD типа 2, на которую приходится приблизительно 5% случаев, ассоциирована с мутациями в гене *SMCHD1* на хромосоме 18. Помимо поддерживающей терапии и лечения, направленного на симптомы заболевания, в настоящее время недоступно эффективное терапевтическое средство для FSHD.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к комплексам, нацеленным на мышечные клетки, для доставки молекулярной нагрузки в эти клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, ингибирующей экспрессию или активность аллеля *DUX4*, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию (FSHD). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, содержат мышечно-специфические средства (например, мышечно-специфические антитела), специфически связывающиеся с рецепторами на поверхности мышечных клеток, для доставки молекулярной нагрузки в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы захватываются клетками с помощью рецептор-опосредованной интернализации, после чего молекулярная нагрузка может высвобождаться для выполнения функции внутри клеток. Например, комплексы, сконструированные для доставки олигонуклеотидов, могут высвобождать олигонуклеотиды таким образом, что олигонуклеотиды могут ингибировать экспрессию гена *DUX4* в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды высвобождаются посредством эндосомального расщепления ковалентных линкеров, соединяющих олигонуклеотиды и мышечно-специфические средства из комплексов.

[0006] Один из аспектов настоящего изобретения относится к комплексу, содержащему антитело против рецептора трансферрина (TfR), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для снижения экспрессии или активности *DUX4*, где антитело содержит:

[0007] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

- (i) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75;
- (ii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;
- (iii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;
- (iv) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;
- (v) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74;
- (vi) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75;
- (vii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74;
- (viii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78;
- (ix) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; или
- (x) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

[0008] В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, scFv, Fv и полноразмерного IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело является Fab-фрагментом.

[0009] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

- (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 101; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 90;
- (ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 97; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;
- (iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 98; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;
- (iv) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 99; и/или легкую цепь, содержащую

(vii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89;

(viii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93;

(ix) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; или

(x) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[00011] В некоторых вариантах осуществления антитело не связывается специфически с участком связывания трансферрина рецептора трансферрина, и/или где антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления антитело перекрестно реагирует с внеклеточными эпитопами двух или более из рецепторов трансферрина человека, не являющегося человеком примата и грызуна. В некоторых вариантах осуществления комплекс сконфигурирован для стимуляции опосредованной рецептором трансферрина интернализации молекулярной нагрузки в мышечную клетку.

[00012] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности в отношении РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности в отношении некодирующей области РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности в отношении 5'- или 3'-UTR РНК DUX4.

[00013] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов SEQ ID NO: 151 (GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT).

[00014] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151 (GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT).

[00015] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид дополнительно содержит смысловую цепь, гибридизующуюся с антисмысловой цепью с образованием двухцепочечной миРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления один или более модифицированных нуклеозидов являются 2'-модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является фосфоамидатным морфолиновым олигомером.

[00016] В некоторых вариантах осуществления антитело ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность валин-цитруллин.

[00017] В некоторых вариантах осуществления антитело ковалентно связано с молекулярной нагрузкой посредством конъюгации с осадком лизина или осадком цистеина антитела.

[00018] В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии или активности DUX4 включает снижение уровней РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии или активности DUX4 включает снижение уровней белка DUX4.

[00019] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения экспрессии или активности DUX4 в клетке, включающему приведение клетки в контакт с комплексом в эффективном количестве для стимуляции интернализации молекулярной нагрузки в клетку, необязательно, где клетка является мышечной клеткой.

[00020] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения индивидуума, имеющего одну или более делеций повтора D4Z4 на хромосоме 4, ассоциированного с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией, включающему введение индивидууму эффективного количества комплекса.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00021] На фиг. 1 представлена неограничивающая схема, на которой показан эффект трансфекции клеток с использованием миРНК.

[00022] На фиг. 2 представлена неограничивающая схема, на которой показана активность мышечно-специфического комплекса, содержащего миРНК.

[00023] На фиг. 3А-3В представлена неограничивающая схема, на которой показана активность мышечно-специфического комплекса, содержащего миРНК, в мышечных тканях мыши (икроножной мышце и сердце) *in vivo* относительно контролей, которым вводили носитель (N=4 мыши C57BL/6 WT).

[00024] На фиг. 4А-4Е представлена неограничивающая схема, на которой показана тканевая селективность мышечно-специфического комплекса, содержащего миРНК.

[00025] На фиг. 5 представлена неограничивающая схема, на которой показаны уровни экспрессии DUX4 в трех DUX4-экспрессирующих линиях клеток (линиях клеток A549, U-2 OS и HepG2) и иммортализованных миобластов скелетных мышц (SkMC).

[00026] На фиг. 6 представлена неограничивающая схема, на которой показана способность версии антисмыслового олигонуклеотида в виде фосфоамидатного морфолинового олигомера (PMO), нацеленного на DUX4 (FM10 PMO), снижать уровни экспрессии генов ниже DUX4 (ZSCAN4, MBD3L2, TRIM43).

[00027] На фиг. 7 представлена неограничивающая схема, на которой показана способность мышечно-специфического комплекса (антитело против TfR-FM10), содержащего Fab против TfR1 (RI7 217), конъюгированного с антисмысловым олигонуклеотидом FM10, снижать уровни экспрессии нижележащих генов DUX4 (ZSCAN4, MBD3L2, TRIM43) в клетках U-2 OS человека относительно "голового" антисмыслового олигонуклеотида FM10.

[00028] На фиг. 8 показана стабильность в сыворотке линкера, используемого для связывания антитела против TfR1 и молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотида) в различных видах с течением времени после внутривенного введения.

[00029] На фиг. 9A-9F показано связывание гуманизированных Fab против TfR с TfR1 человека (hTfR1) или TfR1 яванского макака (cTfR1), что измеряют посредством ELISA. На фиг. 9A показано связывание гуманизированных вариантов 3M12 с hTfR1. На фиг. 9B показано связывание гуманизированных вариантов 3M12 с cTfR1. На фиг. 9C показано связывание гуманизированных вариантов 3A4 с hTfR1. На фиг. 9D показано связывание гуманизированных вариантов 3A4 с cTfR1. На фиг. 9E показано связывание гуманизированных вариантов 5H12 с hTfR1. На фиг. 9F показано связывание гуманизированных вариантов 5H12 с hTfR1.

[00030] На фиг. 10 показан количественный клеточный захват конъюгатов Fab против TfR в клетки рабдомиосаркомы (RD). Молекулярной нагрузкой в тестируемых конъюгатах являются DMPK-нацеленные олигонуклеотиды, и захват конъюгатов облегчается указанными Fab против TfR. В этот анализ также включены конъюгаты, имеющие Fab отрицательного контроля (против TfR мыши) или Fab положительного контроля (против TfR1 человека). Клетки инкубировали с указанным конъюгатом в концентрации 100 нМ в течение 4 часов. Клеточный захват измеряли по средней флуоресценции Cypher5e.

[00031] На фиг. 11A-11F показано связывание олигонуклеотид-конъюгированными или неконъюгированными гуманизированными Fab против TfR с TfR1 человека (hTfR1) и яванского макака TfR1 (cTfR1), что измеряют посредством ELISA. На фиг. 11A показано связывание гуманизированных вариантов 3M12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 11B показано связывание гуманизированных вариантов 3M12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с cTfR1. На фиг. 11C показано связывание гуманизированных вариантов 3A4 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 11D показано связывание гуманизированных вариантов 3A4 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с cTfR1. На фиг. 11E показано связывание гуманизированных вариантов 5H12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 11F показано связывание гуманизированных вариантов 5H12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с cTfR1. Также показаны соответствующие значения EC₅₀.

[00032] На фиг. 12 показана экспрессия DMPK в клетках RD, обработанных различными концентрациями конъюгатов, содержащих указанные гуманизированные антитела против TfR, конъюгированные с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом ASO300. Продолжительность обработки составляла 3 дня. ASO300, доставляемый с использованием средств для трансфекции, использовали в качестве контроля.

[00033] На фиг. 13A-13B показана экспрессия транскриптов MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4 в мышечных трубочках, полученных из пациентов с FSHD, обработанных "голым"

FM10 (фиг. 13A) или FM10, конъюгированным с антителом против TfR1 (фиг. 13B) в диапазоне концентраций.

[00034] На фиг. 14 показаны измерения ELISA связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с рекомбинантным белком TfR1 человека (круги), яванского макака (квадраты), мышь (обращенные вверх треугольники) или крысы (обращенные вниз треугольники) в диапазоне концентраций от 230 пМ до 500 нМ Fab. Результаты измерения свидетельствуют о том, что Fab против TfR реагирует с TfR1 человека и яванского макака. Не наблюдали связывания с рекомбинантным TfR1 мыши или крысы. Данные приведены в виде относительных единиц флуоресценции, нормализованных по исходному уровню.

[00035] На фиг. 15 показаны результаты тестирования ELISA аффинности Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с рекомбинантным TfR1 или TfR2 человека в диапазоне концентраций от 230 пМ до 500 нМ Fab. Данные приведены в виде относительных единиц флуоресценции, нормализованных по исходному уровню. Результаты свидетельствуют о том, что Fab не связывается с рекомбинантным TfR2 человека.

[00036] На фиг. 16 показана стабильность в сыворотке линкера, используемого для связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с контрольным бессмысленным олигонуклеотидом за 72 часа инкубации в PBS или в сыворотке крысы, мыши, яванского макака или человека.

[00037] На фиг. 17 показано, что конъюгаты, содержащие Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3, конъюгированный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (SEQ ID NO: 151), ингибировали транскриптом DUX4 в C6 (AB1080) immortalized клетках FSHD1, на что указывает сниженная экспрессия мРНК MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4. Конъюгаты демонстрировали лучшую активность относительно неконъюгированного DUX4-нацеленного олигонуклеотида в ингибировании транскриптома DUX4.

[00038] На фиг. 18A-18B показаны кривые доза-эффект для нокдауна генов. На фиг. 18A показан нокдаун MBD3L2 в C6 (AB1080) immortalized клетках FSHD1, обработанных конъюгатами, содержащими Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3, конъюгированный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (SEQ ID NO: 151). На фиг. 18B показан нокдаун MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4 в мышечных трубчатках пациентов с FSHD, обработанных конъюгатами, содержащими Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3, конъюгированный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (SEQ ID NO: 151). Фиг. 18B включает данные о MBD3L2, показанные на фиг. 18A.

[00039] На фиг. 19 показаны уровни DUX4-нацеленного олигонуклеотида (SEQ ID NO: 151) в плазме не являющегося человеком примата с течением времени после введения 30 мг/кг неконъюгированного ("голого") олигонуклеотида или 3, 10 или 30 мг/кг эквивалента олигонуклеотида из конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 3M12 VH4/Vk3, ковалентно связанный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом ("конъюгат Fab-олигонуклеотид").

[00040] На фиг. 20 показаны уровни DUX4-нацеленного олигонуклеотида (SEQ ID NO: 151) в ткани, измеренные в образцах мышечной ткани не являющегося человеком

примата через две недели после введения 30 мг/кг неконъюгированного ("голого") олигонуклеотида или 3, 10 или 30 мг/кг эквивалента олигонуклеотида из конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 3M12 VH4/Vk3, ковалентно связанный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом ("конъюгат Fab-олигонуклеотид").

[00041] На фиг. 21 показаны уровни DUX4-нацеленного олигонуклеотида (SEQ ID NO: 151) в ткани, измеренные в образцах мышечной ткани не являющегося человеком примата, собранных посредством биопсии через неделю после введения (левые 5 столбиков) или посредством некропсии через две недели после введения (правые 5 столбиков) 30 мг/кг неконъюгированного олигонуклеотида ("олигонуклеотида") или 3, 10 или 30 мг/кг эквивалента олигонуклеотида из конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 3M12 VH4/Vk3, ковалентно связанные с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом ("конъюгат").

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00042] Аспекты настоящего изобретения относятся к пониманию того, что, хотя некоторая молекулярная нагрузка (например, олигонуклеотиды, пептиды, низкомолекулярные соединения) может иметь положительный эффект в мышечных клетках, эффективное направленное воздействие на такие клетки оказалось затруднительным. Как представлено в настоящем описании, настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим мышечно-специфические средства, ковалентно связанные с молекулярной нагрузкой, для преодоления таких затруднений. В некоторых вариантах осуществления комплексы особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, ингибирующей экспрессию или активность генов-мишеней в мышечных клетках, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают имеющего редкое мышечное заболевание. Например, некоторых варианты осуществления настоящего изобретения относятся к комплексам для таргетинга DUX4 для лечения индивидуумов с FSHD. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, содержат олигонуклеотиды, ингибирующие экспрессию DUX4 у индивидуума, имеющего одну или более делеций повторов D4Z4 на хромосоме 4. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, содержат молекулярную нагрузку, такую как гидовые молекулы (например, гидовая РНК), способные к таргетингу программируемых нуклеиновыми кислотами нуклеаз (например, Cas9) к гену DUX4 для инактивации гена в мышечных клетках, например, посредством удаления части гена DUX4 или встраивания инактивирующей мутации или стоп-кодона в ген DUX4. В некоторых вариантах осуществления такие программируемые нуклеиновыми кислотами нуклеазы можно использовать для инактивации DUX4, аномально экспрессирующегося в мышечных клетках.

[00043] Дополнительные аспекты изобретения, включая описание определенных терминов, приведены ниже.

I. Определения

[00044] **Введение:** В рамках изобретения термин "введение" означает предоставление комплекса индивидууму таким образом, что это можно использовать физиологически и/или фармакологически (например, для лечения состояния у индивидуума).

[00045] **Приблизительно:** В рамках изобретения термин "приблизительно" в отношении одного или более интересующих значений относится к значению, схожему с указанным референсным значением. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, попадающих в 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любом направлении (более чем или менее чем) от указанного референсного значения, если не указано иначе или иное не очевидно из контекста (за исключением того случая, когда такое количество будет превышать 100% возможного значения).

[00046] **Антитело:** В рамках изобретения термин "антитело" относится к полипептиду, включающему по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина или по меньшей мере одну антигенную детерминанту, например, паратоп, специфически связывающийся с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело является полноразмерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным антителом. Однако в некоторых вариантах осуществления антитело является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')₂-фрагментом, Fv-фрагментом или scFv-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело является нанотелом, полученным из антитела Верблюдовых, или нанотелом, полученным из антитела акулы. В некоторых вариантах осуществления антитело является диателом. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит каркас, имеющий последовательность зародышевой линии человека. В другом варианте осуществления антитело содержит константный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из константных доменов IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM и IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (H) (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как VH), и/или (например, и) переменную область легкой цепи (L) (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как VL). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен, например, Fc-область. Термин "константный домен иммуноглобулина" относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Известны аминокислотные последовательности константного домена тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека и их функциональные варианты. Что касается тяжелой цепи, в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, представленная в настоящем описании, может являться тяжелой цепью альфа (α), дельта (Δ), эпсилон (ε), гамма (γ) или мю (μ). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, представленная в настоящем описании, может включать тяжелую цепь альфа (α), дельта (Δ), эпсилон (ε), гамма (γ) или мю (μ) человека. В конкретном варианте осуществления антитело, представленное в настоящем описании, содержит домен CH1,

CH₂ и/или (например, и) CH₃ гамма 1 человека. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) человека, такую как любая известная в этой области. Неограничивающие примеры последовательностей константной области человека описаны в этой области, например, см. патент США № 5693780 и Kabat E A et al., (1991) выше. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или по меньшей мере 99% идентичной любой из константных областей вариабельной цепи, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело является модифицированным, например, модифицированным посредством гликозилирования, фосфорилирования, сумоилирования и/или (например, и) метилирования. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным антителом, конъюгированным с одной или более молекулами сахара или углевода. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахара или углевода конъюгированы с антителом посредством N-гликозилирования, O-гликозилирования, C-гликозилирования, глипирования (присоединения GPI-якоря) и/или (например, и) фосфогликозилирования. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахара или углевода представляют собой моносахариды, дисахариды, олигосахариды или гликаны. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахара или углевода представляет собой разветвленный олигосахарид или разветвленный гликан. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахара или углевода включает маннозное звено, глюкозное звено, звено N-ацетилглюкозамина, звено N-ацетилгалактозамина, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления антитело является конструкцией, содержащей полипептид, содержащий один или более антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, соединенных с линкерным полипептидом или константным доменом иммуноглобулина. Линкерные полипептиды содержат два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями, и их используют для соединения одной или более антигенсвязывающих частей. Описаны примеры линкерных полипептидов (см., например, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123). Кроме того, антитело может являться частью более крупной молекулы иммуноадгезии, образованной посредством ковалентного или нековалентного связи антитела или части антитела с одним или более другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) *Human antibodies and Hybridomas* 6:93-101) и использование остатка цистеина, пептида-маркера и C-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058).

[00047] **CDR:** В рамках изобретения термин "CDR" относится к определяющей комплементарности области в переменных последовательностях антитела. Типичная молекула антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), как правило, участвующие в связывании антигена. Области VH и VL можно дополнительно разделять на области гиперпеременности, также известные как "определяющие комплементарность области" ("CDR"), чередующиеся с областями, являющимися более консервативными, известные как "каркасные области" ("FR"). Каждая VH и VL, как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Протяженность каркасной области и CDR можно точно определить с использованием методологии, известной в этой области, например, с помощью определения по Kabat, определения IMGT, определения по Chothia, определения AbM и/или (например, и) определения по системе Contact, все из которых хорошо известны в этой области. См., например, 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; IMGT®, The International ImMunoGeneTics Information system® <http://www.imgt.org>, Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999); Ruiz, M. et al., *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); Lefranc, M.-P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); Lefranc, M.-P., *Nucleic Acids Res.*, 31:307-310 (2003); Lefranc, M.-P. et al., *In Silico Biol.*, 5, 0006 (2004) [Epub], 5:45-60 (2005); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 33:D593-597 (2005); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 37:D1006-1012 (2009); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 43:D413-422 (2015); 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; и Almagro, J. *Mol. Recognit.* 17:132-143 (2004). Также см. hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs. В рамках изобретения термин "CDR" может относиться к CDR, определенной любым известным в этой области способом. Два антитела, имеющие одинаковую CDR, означает, что два антитела имеют одинаковую аминокислотную последовательность этой CDR, что определяют одним и тем же способом, например, с помощью определения IMGT.

[00048] Существует три CDR в каждой из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, обозначаемые как CDR1, CDR2 и CDR3, для каждой из переменных областей. В рамках изобретения термин "набор CDR" относится к группе из трех CDR, встречающихся в одной переменной области, способной связывать антиген. Точные границы этих CDR определяют по-разному в разных системах. Система, описанная Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) и (1991)), не только представляет собой систему однозначной нумерации остатков, которую можно использовать в отношении любой переменной области антитела, но также позволяет определять точные границы остатков и, таким образом, три CDR. Эти CDR можно обозначать как CDR Kabat. Подчасти CDR можно обозначать как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" означают области легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти области можно обозначать как CDR Chothia, имеющие

границы, перекрывающиеся с CDR Kabat. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR Kabat, описаны Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) и MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Другие определения границ CDR могут не следовать строго одной из указанных выше систем, но все равно будут перекрываться с CDR Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете прогнозирования или экспериментальных данных о том, что конкретные остатки, или группы остатков, или даже целые CDR не влияют значимо на связывание антигена. В способах, используемых в настоящем описании, можно использовать CDR, определенные по любой из этих систем. Примеры систем определения CDR приведены в таблице 1.

Таблица 1. Определения CDR

	IMGT¹	Kabat²	Chothia³
CDR-H1	27-38	31-35	26-32
CDR-H2	56-65	50-65	53-55
CDR-H3	105-116/117	95-102	96-101
CDR-L1	27-38	24-34	26-32
CDR-L2	56-65	50-56	50-52
CDR-L3	105-116/117	89-97	91-96

¹IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, imgt.org, Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res., 27:209-212 (1999)

²Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242

³Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))

[00049] **Антитело с пересаженным CDR:** Термин "антитело с пересаженным CDR" относится к антителам, содержащим последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида, но в которых последовательности одной или более из областей CDR VH и/или (например, и) VL заменяют последовательностями CDR другого биологического вида, таким как антитела, имеющие вариабельные области тяжелой и легкой цепей мыши, в которых одну или более CDR мыши (например, CDR3) заменяют последовательностями CDR человека.

[00050] **Химерное антитело:** Термин "химерное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида и последовательности константной области другого биологического вида, таким как антитела, имеющие вариабельные области тяжелой и легкой цепи мыши, соединенные с константными областями человека.

[00051] **Комплементарный:** В рамках изобретения термин "комплементарный" относится к возможности точного спаривания между двумя нуклеотидами или двумя наборами нуклеотидов. В частности, "комплементарный" представляет собой термин, характеризующий степень спаривания водородных связей, приводящую к связыванию между двумя нуклеотидами или двумя наборами нуклеотидов. Например, если основание в

одном положении олигонуклеотида может связываться посредством водородных связей с основанием в соответствующем положении нуклеиновой кислоты-мишени (например, мРНК), основания считают комплементарными друг другу в этом положении. Спаривание оснований может включать каноническое уотсон-криковское спаривание и не-уотсон-криковское спаривание (например, неоднозначное спаривание оснований и хугстиновское спаривание оснований). Например, в некоторых вариантах осуществления в случае комплементарного спаривания оснований основания типа аденозина (А) являются комплементарными основаниям типа тимидина (Т) или основаниям типа урацила (U), основания типа цитозина (С) являются комплементарными основаниям типа гуанозина (G), и универсальные основания, такие как 3-нитропиррол или 5-нитроиндол, могут гибридизоваться, и их считают комплементарными любому из А, С, U или Т. В этой области инозин (I) также считают универсальным основанием, и его считают комплементарным любому из А, С, U или Т.

[00052] **Консервативная аминокислотная замена:** В рамках изобретения термин "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислоты, не изменяющей относительные характеристики заряда или размера белка, в котором сделана замена аминокислоты. Варианты можно получать способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в этой области, такими как обнаруживаемые в источниках, в которых скомпилированы такие способы, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012, или *Current Protocols in Molecular biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, сделанные среди аминокислот в следующих группах: (a) М, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

[00053] **Ковалентно связанный:** В рамках изобретения термин "ковалентно связанный" относится к характеристике двух или более молекулы, соединенных с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления две молекулы могут являться ковалентно связанными посредством одинарной связи, например, дисульфидной связи или дисульфидного мостика, служащей в качестве линкера между молекулами. Однако в некоторых вариантах осуществления две или более молекулы могут являться ковалентно связанными с помощью молекулы, служащей в качестве линкера, соединяющего две или более молекул через множество ковалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер может являться расщепляемым линкером. Однако в некоторых вариантах осуществления линкер может являться нерасщепляемым линкером.

[00054] **Перекрестно реактивный:** В рамках изобретения и в отношении направляющего средства (например, антитела) термин "перекрестно реактивный" относится к свойству средства быть способным специфически связываться с более чем одним антигеном схожего типа или класса (например, антигенами многочисленных гомологов, паралогов или ортологов) со схожей аффинностью или авидностью. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, перекрестно реактивное в отношении

антигенов человека и не являющегося человеком примата схожего типа или класса (например, рецептор трансферрина человека и рецептор трансферрина не являющегося человеком примата), может связываться с антигеном человека и антигенами не являющегося человеком примата со схожей аффинностью или авидностью. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена человека и антигена грызуна схожего типа или класса. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена грызуна и антигена не являющегося человеком примата схожего типа или класса. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена человека, антигена не являющегося человеком примата и антигена грызуна схожего типа или класса.

[00055] **DUX4:** В рамках изобретения термин "DUX4" относится к гену, кодирующему двойной гомеобокс 4, белок, как правило, экспрессирующийся во время эмбрионального развития и яичках взрослых самцов. В некоторых вариантах осуществления DUX4 может являться геном человека (Gene ID: 100288687), не являющегося человеком примата (например, Gene ID: 750891, Gene ID: 100405864) или грызуна (например, Gene ID: 306226). У людей экспрессия гена DUX4 вне эмбрионального развития и яичек ассоциирована с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией. Кроме того, охарактеризовано множество вариантов транскриптов человека (например, как аннотировано в GenBank RefSeq под регистрационными номерами: NM_001293798.2, NM_001306068.2, NM_001363820.1), кодирующих разные изоформы белка.

[00056] **Плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD):** В рамках изобретения термин "плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD)" относится к генетическому заболеванию, вызванному мутациями в гене DUX4 или гене SMCHD1, отличающемуся потерей мышечной массы и мышечной атрофией, главным образом, в мышцах лица, лопаток и плеч. Описано два типа заболевания, тип 1 и тип 2. Тип 1 ассоциирован с делециями в областях повторов D4Z4 на аллельном варианте 4qA на хромосоме 4, содержащих ген DUX4. Тип 2 ассоциирован с мутациями в гене SMCHD1. Тип 1 и тип 2 FSHD отличаются аномальной продукцией белка DUX4 после эмбрионального развития вне яичек. Плече-лопаточно-лицевая дистрофия, генетическая основа заболевания и соответствующие симптомы описаны в этой области (см., например, Campbell, A.E., et al., "Faciocapulothumeral dystrophy: Activating an early embryonic transcriptional program in human skeletal muscle" Human Mol Genet. (2018); и Tawil, R. "Faciocapulothumeral muscular dystrophy" Handbook Clin. Neurol. (2018), 148: 541-548). Тип 1 FSHD приведен в базе данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) как запись № 158900. Тип 2 FSHD приведен в базе данных OMIM как запись № 158901.

[00057] **Каркас:** В рамках изобретения термин "каркас" или "каркасная последовательность" относится к остальным последовательностям вариативной области без CDR. Т.к. точное определение последовательности CDR можно осуществлять с помощью различных систем, значение термина "каркасная последовательность",

соответственно, является предметом разной интерпретации. Шесть CDR (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 легкой цепи и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 тяжелой цепи) также разделяют каркасные области легкой цепи и тяжелой цепи на четыре подобласти (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, где CDR1 расположена между FR1 и FR2, CDR2 - между FR2 и FR3, и CDR3 - между FR3 и FR4. Без определения конкретных подобластей как FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасная область, как указано другими, представляет собой комбинированные FR в вариабельной области одной, природной цепи иммуноглобулина. В рамках изобретения FR представляет собой одну из четырех подобластей, и FR представляют собой две или более из четырех подобластей, составляющих каркасную область. В этой области известны акцепторные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи человека. В одном из вариантов осуществления акцепторные последовательности, известные в этой области, можно использовать в антителах, представленных в настоящем описании.

[00058] **Антитело человека:** В рамках изобретения термин "антитело человека" предназначен для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, неcodируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, встраиваемые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако, в рамках изобретения термин "антитело человека" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, пересаживают на каркасные последовательности человека.

[00059] **Гуманизированное антитело:** Термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи не являющихся человеком видов (например, мыши), но в которых по меньшей мере часть последовательности VH и/или (например, и) VL изменена в направлении более "человекоподобной", т.е. более похожей на последовательности вариабельной области зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизированного антитела является антитело с пересаженными CDR, в котором последовательности CDR человека встраивают в не принадлежащие человеку последовательности VH и VL для замены соответствующих не принадлежащих человеку последовательностей CDR. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к гуманизированным антителам против рецептора трансферрина и их антигенсвязывающим частям. Такие антитела можно получать посредством получения моноклональных антител мыши против рецептора трансферрина с использованием общепринятой гибридомной технологии с последующей гуманизацией с использованием генетической инженерии *in vitro*, например, как описано в публикации PCT № WO 2005/123126 A2 Kasaian et al.

[00060] **Интернализирующийся рецептор поверхности клетки:** В рамках изобретения термин "интернализирующийся рецептор поверхности клетки" относится к

рецептору поверхности клетки, интернализуемому клетками, например, после внешней стимуляции, например, связывания лиганда с рецептором. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза. Однако, в некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством клатрин-независимого пути, такого как, например, фагоцитоз, макропиноцитоз, кавеола- и рафт-опосредованный захват или конститутивный клатрин-независимый эндоцитоз. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен, и/или (например, и) внеклеточный домен, который, необязательно, дополнительно может содержать лиганд-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления рецептор поверхности клетки интернализуется клеткой после связывания лиганда. В некоторых вариантах осуществления лиганд может являться мышечно-специфическим средством или мышечно-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки является рецептором трансферрина.

[00061] **Выделенное антитело:** В рамках изобретения термин "выделенное антитело" предназначен для обозначения антитела, по существу, не содержащего другие антитела, имеющие другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с рецептором трансферрина, по существу, не содержит антитела, специфически связывающиеся с иными антигенами, чем рецептор трансферрина). Однако, выделенное антитело, специфически связывающееся с комплексом рецептора трансферрина, может иметь перекрестную реактивность в отношении других антигенов, таких как молекулы рецептора трансферрина, другого биологического вида. Кроме того, выделенное антитело может, по существу, не содержать другой клеточный материал и/или (например, и) химические вещества.

[00062] **Нумерация по Kabat:** Термины "нумерация по Kabat", "определения по Kabat" и "мечение по Kabat" в настоящем описании используют взаимозаменяемо. Эти термины, известные в этой области, относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, являющихся более переменными (т.е. гиперпеременными), чем другие аминокислотные остатки в переменных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части (Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 и, 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). В случае переменной области тяжелой цепи гиперпеременная область занимает положения аминокислот 31-35 в случае CDR1, положения аминокислот 50-65 в случае CDR2 и положения аминокислот 95-102 в случае CDR3. В случае переменной области легкой цепи гиперпеременная область занимает положения аминокислот 24-34 в случае CDR1, положения аминокислот 50-56 в случае CDR2 и положения аминокислот 89-97 в случае CDR3.

[00063] **Молекулярная нагрузка:** В рамках изобретения термин "молекулярная нагрузка" относится к молекуле, функционирующей, модулируя биологический исход. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка связана или иначе ассоциирована с мышечно-специфическим средством. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является низкомолекулярным соединением, белком, пептидом, нуклеиновой кислотой или олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка функционирует, модулируя транскрипцию последовательности ДНК, модулируя экспрессию белка или модулируя активность белка. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим цепь, имеющую область комплементарности гену-мишени.

[00064] **Мышечно-специфическое средство:** В рамках изобретения термин "мышечно-специфическое средство" относится к молекуле, специфически связывающейся с антигеном, экспрессирующимся на мышечных клетках. Антиген в мышечных клетках или на них может являться мембранным белком, например, интегральным мембранным белком или периферическим мембранным белком. Как правило, мышечно-специфическое средство специфически связывается с антигеном на мышечных клетках, облегчающим интернализацию мышечно-специфического средства (и любой ассоциированной молекулярной нагрузкой) в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором поверхности клетки на мышцах и может интернализироваться в мышечные клетки через рецептор-опосредованную интернализацию. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является низкомолекулярным соединением, белком, пептидом, нуклеиновой кислотой (например, аптамером) или антителом. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство связано с молекулярной нагрузкой.

[00065] **Мышечно-специфическое антитело:** В рамках изобретения термин "мышечно-специфическое антитело" относится к мышечно-специфическому средству, являющемуся антителом, специфически связывающимся с антигеном, обнаруживаемым в мышечных клетках или на них. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело специфически связывается с антигеном на мышечных клетках, облегчающим интернализацию мышечно-специфического антитела (и любой ассоциированной молекулярной нагрузки) в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело специфически связывается с интернализирующимся рецептором поверхности клетки, присутствующим на мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с рецептором трансферрина.

[00066] **Олигонуклеотид:** В рамках изобретения термин "олигонуклеотид" относится к олигомерному соединению нуклеиновой кислотой длиной до 200 нуклеотидов. Неограничивающие примеры олигонуклеотидов включают олигонуклеотиды РНКи (например, миРНК, shRNA), микроРНК, гэпмеры, миксмеры, фосфородиамидатные

морфолиносоединения, пептид-нуклеиновые кислоты, аптамеры, гидовые нуклеиновые кислоты (например, гидовую РНК Cas9) и т.д. Олигонуклеотиды могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать один или более модифицированных нуклеотидов или нуклеозидов (например, модификации 2'-О-метил-сахара, модификации пурина или пиримидина). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать одну или более модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать одну или более фосфотиоатных связей, которые могут находиться в стереохимической конформации Rp или Sp.

[00067] **Рекомбинантное антитело:** В рамках изобретения термин "рекомбинантное антитело человека" предназначен для включения всех антител человека, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, с использованием которого трансфицируют клетку-хозяина (что более подробно описано в настоящем описании), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (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), антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., и Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, включающими сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хоть и получены и относятся к последовательностям VH и VL зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*. Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к полностью человеческим антителам человека, способным связываться с рецептором трансферрина человека, которые можно получать способами, хорошо известными в этой области, в качестве неограничивающих примеров, такими как, использование фаговых библиотек Ig человека, таких как описываемые в публикации PCT № WO 2005/007699 A2 Jermutus et al.

[00068] **Область комплементарности:** В рамках изобретения термин "область комплементарности" относится к нуклеотидной последовательности, например, олигонуклеотида, достаточно комплементарной когнатной нуклеотидной последовательности, например, целевой нуклеиновой кислоты, таким образом, что две нуклеотидные последовательности могут отжигаться друг с другом в физиологических условиях (например, в клетке). В некоторых вариантах осуществления область комплементарности полностью комплементарна когнатной нуклеотидной последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Однако, в некоторых вариантах осуществления область комплементарности частично комплементарна когнатной нуклеотидной последовательности целевой нуклеиновой кислоте (например, по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 99% комплементарности). В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит 1, 2, 3 или 4 неправильных спариваний по сравнению с когнатной нуклеотидной последовательностью целевой нуклеиновой кислоты.

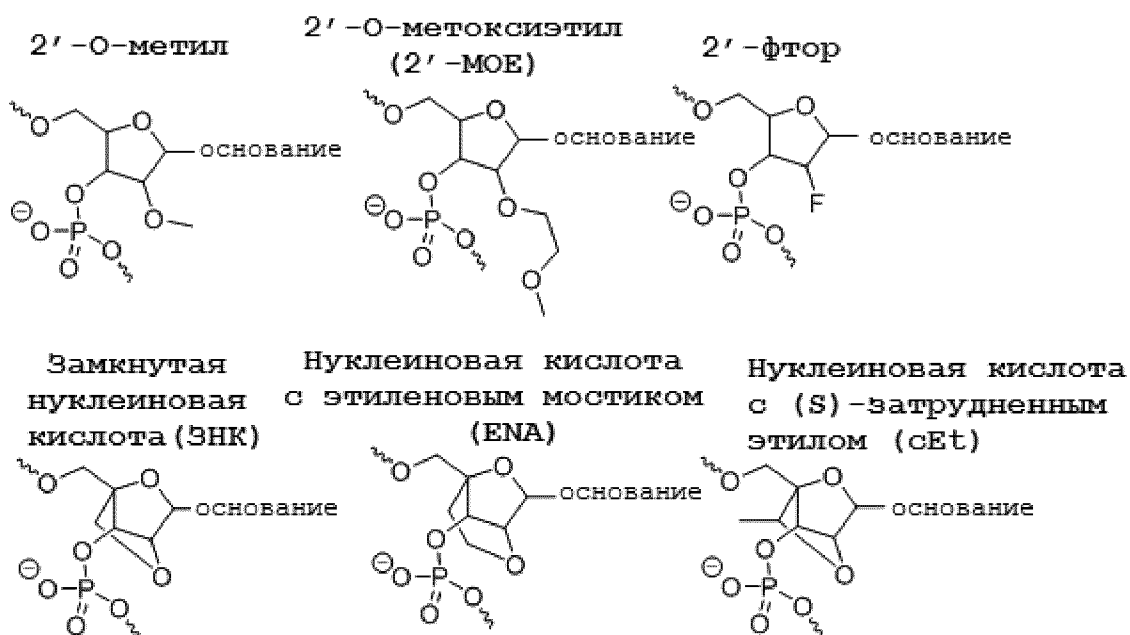
[00069] **Специфически связывается:** В рамках изобретения термин "специфически связывается" относится к способности молекулы связываться с партнером по связыванию со степенью аффинности или авидности, позволяющей использовать молекулу для различения партнера по связыванию и соответствующего контроля в анализе связывания или другом контексте связывания. В отношении антитела термин "специфически связывается" относится к способности антитела связываться со специфическим антигеном со степенью аффинности или авидности по сравнению с соответствующим референсным антигеном или антигенами, что позволяет использовать антитело для различения специфического антигена от других, например, в степени, делающей возможной преференциальный таргетинг к некоторым клеткам, например, мышечным клеткам, через связывание с антигеном, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с мишенью, если антитело имеет K_D для связывания мишени по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с рецептором трансферрина, например, эпитопом апикального домена рецептора трансферрина.

[00070] **Индивидуум:** В рамках изобретения термин "индивидуум" относится к млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой не являющегося человеком примата или грызуна. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом, например, пациентом-человеком, имеющим или, как предполагают, имеющим заболевание. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом-человеком, имеющим или, как предполагают, имеющим FSHD.

[00071] **Рецептор трансферрина:** В рамках изобретения термин "рецептор трансферрина" (также известный как TFRC, CD71, p90, TFR или TFR1) относится к интернализирующемуся рецептору поверхности клетки, связывающемуся с трансферрином, для облегчения захвата железа посредством эндоцитоза. В некоторых вариантах

осуществления рецептор трансферрина может принадлежать человеку (NCBI Gene ID 7037), не являющемуся человеком примату (например, NCBI Gene ID 711568 или NCBI Gene ID 102136007) или грызуну (например, NCBI Gene ID 22042). Кроме того, охарактеризовано множество вариантов транскриптов человека, кодирующих разные изоформы рецептора (например, как аннотировано под регистрационными номерами GenBank RefSeq: NP_001121620.1, NP_003225.2, NP_001300894.1 и NP_001300895.1).

[00072] **2'-модифицированный нуклеозид**: В рамках изобретения термины "2'-модифицированный нуклеозид" и "2'-модифицированный рибонуклеозид" используют взаимозаменяемо, и они относятся к нуклеозиду, имеющему остаток сахара, модифицированный по 2'-положению. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом, где 2'- и 4'-положения сахара соединены мостиком (например, с помощью метилена, этилена или (S)-затрудненного этила). В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом, например, где 2'-положение остатка сахара является замещенным. Неограничивающие примеры 2'-модифицированных нуклеозидов включают: 2'-дезокси-, 2'-фтор- (2'-F), 2'-О-метил- (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил- (2'-MOE), 2'-О-аминопропил- (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил- (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил- (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил- (2'-O-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидонуклеозид (2'-O-NMA), замкнутую нуклеиновую кислоту (ЗНК, нуклеиновую кислоту с метиленовым мостиком), нуклеиновую кислоту с этиленовым мостиком (ЕНА) и нуклеиновую кислоту с (S)-затрудненным этилом (сEt). В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированные нуклеозиды, представленные в настоящем описании, являются высокоаффинными модифицированными нуклеотидами, и олигонуклеотиды, содержащие 2'-модифицированные нуклеотиды, имеют повышенную аффинность к последовательностям-мишеням относительно немодифицированного олигонуклеотида. Примеры структур 2'-модифицированных нуклеозидов приведены ниже:



II. Комплексы

[00073] Настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим направляющее средство, например антитело, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит мышечно-специфическое антитело, ковалентно связанное с олигонуклеотидом. Комплекс может содержать антитело, специфически связывающееся с одним участком антигена, или связывающимся с по меньшей мере двумя участками антигена, которые могут существовать на одном или разных антигенах.

[00074] Комплекс можно использовать для модуляции активности или функции по меньшей мере одного гена, белка и/или (например, и) нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка, находящаяся в комплексе, отвечает за модуляцию гена, белка и/или (например, и) нуклеиновых кислот. Молекулярная нагрузка может являться низкомолекулярным соединением, белком, нуклеиновой кислотой, олигонуклеотидом или любой молекулой, способной модулировать активность или функцию гена, белка и/или (например, и) нуклеиновой кислоты в клетке. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, нацеленным DUX4 в мышечных клетках.

[00075] В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит мышечно-специфическое средство, например, антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, например, антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на DUX4.

A. Мышечно-специфические средства

[00076] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим средствам, например, для доставки молекулярной нагрузки в мышечную клетку. В некоторых вариантах осуществления такие мышечно-специфические средства могут связываться с мышечной клеткой, например, посредством специфического связывания с антигеном на мышечной клетке и доставки связанной молекулярной нагрузки в мышечную клетку. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка связана (например, ковалентно связана) с мышечно-специфическим средством и интернализуется в мышечную клетку после связывания мышечно-специфического средства с антигеном на мышечной клетке, например, посредством эндоцитоза. Следует понимать, что по изобретению можно использовать различные типы мышечно-специфических средств. Например, мышечно-специфическое средство может содержать или состоять из нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), пептида (например, антитела), липида (например, микровезикулы) или остатка сахара (например, полисахарида). Примеры мышечно-специфических средств подробно описаны в настоящем описании, однако, следует понимать, что примеры мышечно-специфических средств, представленных в настоящем описании, не являются ограничивающими.

[00077] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим средствам, специфически связывающимся с антигеном на мышце, такой

как скелетная мышца, гладкая мышца или сердечная мышца. В некоторых вариантах осуществления любые из мышечно-специфических средств, представленных в настоящем описании, связываются (например, специфически связываются) с антигеном на скелетно-мышечной клетке, гладкомышечной клетке и/или (например, и) кардиомиоците.

[00078] С помощью взаимодействия с мышечно-специфическими элементами распознавания поверхности клетки (например, белками клеточной мембраны) можно достигать тканевой локализации и селективного захвата мышечными клетками. В некоторых вариантах осуществления молекулы, являющиеся субстратами для транспортеров мышечного захвата, можно использовать для доставки молекулярной нагрузки в мышечную ткань. Связывание с элементами распознавания поверхности мышечной клетки с последующим эндоцитозом может позволять даже крупным молекулам, таким как антитела, проникать в мышечные клетки. В качестве другого примера, молекулярная нагрузка, конъюгированная с трансферрином или антителами против рецептора трансферрина, может захватываться мышечными клетками посредством связывания с рецептором трансферрина, который затем может подвергаться эндоцитозу, например, посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза.

[00079] Мышечно-специфические средства можно использовать для концентрирования молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотида) в мышце при снижении токсичности, ассоциированной с эффектами в других тканях. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство концентрирует связанную молекулярную нагрузку в мышечных клетках по сравнению с другим типом клеток в организме индивидуума. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство концентрирует связанную молекулярную нагрузку в мышечных клетках (например, скелетно-мышечных клетках, гладкомышечных клетках или кардиомиоцитах) в количестве, составляющем по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше, чем количество в неммышечных клетках (например, клетках печени, нервных клетках, клетках крови или жировых клетках). В некоторых вариантах осуществления токсичность молекулярной нагрузки у индивидуума снижают по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95% при введении индивидууму в связанном с мышечно-специфическим средством виде.

[00080] В некоторых вариантах осуществления для достижения селективности в отношении мышечных клеток может потребоваться мышечный элемент распознавания (например, антиген мышечной клетки). В качестве одного из примеров, мышечно-специфическое средство может являться низкомолекулярным соединением, являющимся субстратом для транспортера мышечно-специфического захвата. В качестве другого примера, мышечно-специфическое средство может являться антителом, проникающим в мышечную клетку посредством транспортер-опосредованного эндоцитоза. В качестве другого примера, мышечно-специфическое средство может являться лигандом, связывающимся с рецептором поверхности клетки на мышечной клетке. Следует понимать,

что, хотя подходы на основе транспортеров представляют собой прямой путь проникновения в клетку, таргетинг на основе рецепторов может включать стимулированный эндоцитоз для достижения желаемого места действия.

i. Мышечно-специфические антитела

[00081] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом. Как правило, высокая специфичность антител к их антигену-мишени обеспечивает потенциал селективного таргетинга мышечных клеток (например, скелетно-мышечных клеток, гладкомышечных клеток и/или (например, и) кардиомиоцитов). Эта специфичность также может ограничивать нецелевую токсичность. Примеры антител, способных к таргетингу поверхностного антигена мышечных клеток, описаны и входят в объем настоящего изобретения. Например, антитела, нацеленные на поверхность мышечных клеток, описаны в 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; и Weisbart R.H. et al., "Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of monoclonal antibody that binds myosin IIb" *Mol Immunol.* 2003 Mar, 39(13):78309; полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

а. Антитела против рецептора трансферрина

[00082] Некоторые аспекты настоящего изобретения основаны на понимании того, что средства, связывающиеся с рецептором трансферрина, например, антитела против рецептора трансферрина, способны к таргетингу мышечных клеток. Рецепторы трансферрина являются интернализирующимися рецепторами поверхности клетки, транспортирующими трансферрин через клеточную мембрану и участвующими в регуляции и гомеостазе внутриклеточных уровней железа. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к белкам, связывающимся с рецептором трансферрина, способными связываться с рецептором трансферрина. Таким образом, аспекты настоящего изобретения относятся к связывающим белкам (например, антителам), связывающимся с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки, связывающиеся с рецептором трансферрина, интернализуются вместе с любой связанной молекулярной нагрузкой в мышечную клетку. В рамках изобретения антитело, связывающееся с рецептором трансферрина, можно взаимозаменяемо обозначать как антитело против рецептора трансферрина или антитело против TfR. Антитела, связывающиеся, например, специфически связывающиеся, с рецептором трансферрина, могут интернализоваться в клетку, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, после связывания с рецептором трансферрина.

[00083] Следует понимать, что антитела против рецептора трансферрина можно получать, синтезировать и/или (например, и) дериватизировать с использованием нескольких известных способов, например, дизайна библиотек с использованием фагового

дисплея. Примеры способов охарактеризованы в этой области и включены посредством ссылок (Díez, P. et al. "High-throughput phage-display screening in array format", *Enzyme and microbial technology*, 2015, 79, 34-41.; Hammers et al., "Antibody Phage Display: Technique and Applications" *J Invest Dermatol.* 2014, 134:2.; Engleman, Edgar (Ed.) "Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies". 1985, Springer). В других вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина охарактеризовано или описано ранее. В этой области известны антитела, специфически связывающиеся с рецептором трансферрина (см., например, патент США № 4364934, поданный 12/4/1979, "Monoclonal antibody to human early thymocyte antigen and methods for preparing same"; патент США № 8409573, поданный 6/14/2006, "Anti-CD71 monoclonal antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells"; патент США № 9708406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"; патент США № 9611323, поданный 12/19/2014, "Low affinity blood brain barrier receptor antibodies and uses therefor"; WO 2015/098989, поданный 12/24/2014, "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).

[00084] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к новым антителам против TfR для применения в качестве мышечно-специфических средств (например, в мышечно-специфических комплексах). В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с рецептором трансферрина с высокой специфичностью и аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, специфически связывается с любым внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина или эпитопом, становящимся экспонированным для антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, специфически связываются с рецептором трансферрина человека, не являющихся человеком приматов, мыши, крысы и т.д. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с аминокислотным сегментом рецептора трансферрина человека или не являющегося человеком примата, приведенным в SEQ ID NO: 105-108. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с аминокислотным сегментом, соответствующим аминокислотам 90-96 рецептора трансферрина человека, приведенным в SEQ ID NO: 105, не являющимся апикальным доменом рецептора трансферрина.

[00085] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина человека, соответствующей последовательности NCBI NP_003225.2 (изоформа 1 белка рецептора трансферрина 1, *Homo sapiens*) является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLA VDEEENADNNTK
 ANVT KPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGE
 DFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTG TIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSV IIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 NAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFP PSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGD
 CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGV IKG FVEPDHYVVVGAQRDA
 WGPGAAKSGVGTALLKLAQMFSDMV LKDG FQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLEG
 YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNW
 ASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR
 AAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSAR
 GDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPF RHVFWGS
 GSHTLPALLENLKLRLKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 105).

[00086] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI NP_001244232.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca mulatta*) является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLG VDEEENTDNNTK
 PNGTKPKRCGGNICYGTIAV IIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDF TSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSV IIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFP SQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGV IKG FVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPAAKSSVGTALLKLAQMFSDMV LKDG FQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLT HDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPF RHVFW
 GSGSHTLSALLESKLRLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 106)

[00087] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI XP_005545315.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca fascicularis*) является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLG VDEEENTDNNTK
 ANGTPKPKRCGGNICYGTIAV IIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDF TSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSV IIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV

KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLT VSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD
AWGPGA AKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDG FQPSRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE
GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
ARGDFFRATSRLTTDFRNAEK RDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPF RHVFW
GSGSHTLSALLESKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
(SEQ ID NO: 107).

[00088] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина мыши, соответствующей последовательности NCBI NP_001344227.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Mus musculus*) является следующим:

MMDQARS AFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLAAD EEEENADNNM
KASVRKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLG YCKRVEQKEECVKLAETEETDKSET
METEDVPTSSRLYWADLKTLLSEKLSNIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIE
NQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVS
GKL VHANFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKF
PVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGK
MEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVLKLVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGA
QRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFSDMISKDGF RPSRSIIFASWTAGDFGAVGATE
WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLTGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLY
RDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQ
LNQMVRTAAEVAGQLIKLTHTDELNLDYEMYSKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQ
WLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNR FVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPFRHI
FWGSGSHTLSALVENLKL RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNE
F (SEQ ID NO: 108)

[00089] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина связывается со следующим аминокислотным сегментом рецептора: FVKIQVKDS AQNSV IVDKNGRLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGKL VHANFGTKKDFE
DLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLG
TGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCR
MVTSESKNVKLT VSNVLKE (SEQ ID NO: 109) и не ингибирует связывающие взаимодействия между рецептором трансферрина и трансферрином и/или (например, и) белок гемохроматоза человека (также известный как HFE). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, не связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 109.

[00090] Для получения антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих средств можно использовать соответствующие способы, например, способы рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления антитело также можно получать, получая гибридомы (см., например, Kohler, G and Milstein, C. "Continuous cultures

of fused cells secreting antibody of predefined specificity" *Nature*, 1975, 256: 495-497). Интересующий антиген можно использовать в качестве иммуногена в любой форме, например, рекомбинантной или природной форме. Гибридомы подвергают скринингу стандартными способами, например, скринингу посредством ELISA, для обнаружения по меньшей мере одной гибридомы, продуцирующей антитело, нацеленное на конкретный антиген. Антитела также можно получать посредством скрининга экспрессирующих библиотек белков, экспрессирующих антитела, например, библиотеки фагового дисплея. В некоторых вариантах осуществления дисплея также можно использовать дизайн библиотек фагового, (см., например, патент США № 5223409, поданный 3/1/1991, "Directed evolution of novel binding proteins"; WO 1992/18619, поданный 4/10/1992, "Heterodimeric receptor libraries using phagemids"; WO 1991/17271, поданный 5/1/1991, "Recombinant library screening methods"; WO 1992/20791, поданный 5/15/1992, "Methods for producing members of specific binding pairs"; WO 1992/15679, поданный 2/28/1992, и "Improved epitope displaying phage"). В некоторых вариантах осуществления интересующий антиген можно использовать для иммунизации не принадлежащего человеку животного, например, грызуна или козы. В некоторых вариантах осуществления затем антитело получают из не принадлежащего человеку животного, и его, необязательно, можно модифицировать с использованием ряда способов, например, способов рекомбинантной ДНК. В этой области известны дополнительные примеры получения антител и способов (см., например, Harlow et al. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

[00091] В некоторых вариантах осуществления антитело является модифицированным, например, модифицированным посредством гликозилирования, фосфорилирования, сумоилирования, и/или (например, и) метилирования. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным антителом, конъюгированным с одной или более молекулами сахаров или углеводов. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов конъюгированы с антителом посредством N-гликозилирования, O-гликозилирования, C-гликозилирования, глипирования (присоединения GPI-якоря) и/или (например, и) фосфогликозилирования. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов представляют собой моносахариды, дисахариды, олигосахариды или гликаны. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов является разветвленным олигосахаридом или разветвленным гликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов включают маннозное звено, глюкозное звено, звено N-ацетилглюкозамина, звено N-ацетилгалактозамина, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления есть приблизительно 1-10, приблизительно 1-5, приблизительно 5-10, приблизительно 1-4, приблизительно 1-3 или приблизительно 2 молекул сахара. В некоторых вариантах осуществления гликозилированное антитело является полностью или частично гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным в результате химических реакций или ферментативными способами. В

некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным *in vitro* или внутри клетки, которая, необязательно, может иметь дефицит фермента пути N- или O-гликозилирования, например, гликозилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления антитело является функционализированным с использованием молекул сахаров или углеводов, как описано в международной публикации патентной заявки WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года, названной, "*Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof*".

[00092] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR по настоящему изобретению содержит домен VL и/или (например, и) домен VH любого из антител против TfR, выбранных из таблицы 2, и содержит константную область, содержащую аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b). Неограничивающие примеры константных областей человека описаны в этой области, например, см. Kabat E A et al., (1991), выше.

[00093] В некоторых вариантах осуществления средства, связывающиеся с рецептором трансферрина, например, антитела против TfR, способны к таргетингу мышечной клетки и/или (например, и) опосредуют транспорт средства через гематоэнцефалитический барьер. Рецепторы трансферрина являются интернализирующимися рецепторами поверхности клетки, транспортирующими трансферрин через клеточную мембрану и участвующие в регуляции и гомеостазе внутриклеточных уровней железа. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к белкам, связывающимся с рецептором трансферрина, способным связываться с рецептором трансферрина. Антитела, связывающиеся, например, специфически связывающиеся, с рецептором трансферрина могут интернализироваться в клетку, например, с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза, после связывания с рецептором трансферрина.

[00094] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, связывающимся с рецептором трансферрина с высокой специфичностью и аффинностью. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, специфически связывается с любым внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина или эпитопом, становящимся экспонированным для антитела. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR, представленные в настоящем описании, специфически связываются с рецептором трансферрина человека, не являющихся человеком приматов, мыши, крысы и т.д. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с аминокислотным сегментом рецептора трансферрина человека или не являющегося человеком примата, приведенного в SEQ ID NO: 105-108. В некоторых

вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с аминокислотным сегментом, соответствующим аминокислотам 90-96 рецептора трансферрина человека, приведенного в SEQ ID NO: 105, неявляющимся апиальным доменом рецептора трансферрина. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с TfR1, но не связываются с TfR2.

[00095] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR специфически связывается с TfR1 (например, TfR1 человека или не являющегося человеком примата) с аффинностью связывания (например, на что указывает K_d) по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с TfR1 с KD в субнанолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, селективно связываются с рецептором трансферрина 1 (TfR1), но не связываются с рецептором трансферрина 2 (TfR2). В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с TfR1 человека и TfR1 яванского макака (например, с K_d 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее), но не связываются с TfR1 мыши. Аффинность и кинетику связывания антитела против TfR можно тестировать любым подходящим способом, включая, в качестве неограничивающих примеров, биосенсорную технологию (например, OCTET или BIACORE). В некоторых вариантах осуществления связывание любого из антител против TfR, представленных в настоящем описании, не конкурирует со связыванием трансферрина с TfR1 или не ингибирует его. В некоторых вариантах осуществления связывание любого из антител против TfR, представленных в настоящем описании, конкурирует со связыванием HFE-бета-2-микроглобулина с TfR1 или не ингибирует его.

[00096] Антитела против TfR, представленные в настоящем описании, являются гуманизированными антителами. Аминокислотные последовательности CDR и вариабельной области моноклонального антитела мыши против TfR, из которого получены гуманизированные антитела против TfR, представленные в настоящем описании, приведены в таблице 2.

Таблица 2. Моноклональные антитела мыши против TfR

Ab	Система	IMGT	Kabat	Chothia
3-A4	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPENGDT (SEQ ID NO: 2)	WIDPENGDT EYASK FQD (SEQ ID NO: 8)	ENG (SEQ ID NO: 13)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)

	CDR-L1	KSLHLSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLHLSNGYTYL F (SEQ ID NO: 10)	SKSLHLSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQG LEWIGWIDPENGDTHEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLHLSNGYTYLFWFLQRPQG SPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3- A4 N54 T*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPETGDT (SEQ ID NO: 19)	WIDPETGDTEYASKF QD (SEQ ID NO: 20)	ETG (SEQ ID NO: 21)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLHLSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLHLSNGYTYL F (SEQ ID NO: 10)	SKSLHLSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQG LEWIGWIDPETGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 22)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLHLSNGYTYLFWFLQRPQG SPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3- A4 N54 S*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPESGDT (SEQ ID NO: 23)	WIDPESGDTEYASKF QD (SEQ ID NO: 24)	ESG (SEQ ID NO: 25)

	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLHLSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLHLSNGYTYL F (SEQ ID NO: 10)	SKSLHLSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQG LEWIGWIDPESGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 26)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLHLSNGYTYLFWFLQRPQG SPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3- M12	CDR-H1	GYSITSGYY (SEQ ID NO: 27)	SGYYWN (SEQ ID NO: 33)	GYSITSGY (SEQ ID NO: 38)
	CDR-H2	ITFDGAN (SEQ ID NO: 28)	YITFDGANNYNPSLK N (SEQ ID NO: 34)	FDG (SEQ ID NO: 39)
	CDR-H3	TRSSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 29)	SSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 35)	SYDYDVLD (SEQ ID NO: 40)
	CDR-L1	QDISNF (SEQ ID NO: 30)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO: 36)	SQDISNF (SEQ ID NO: 41)
	CDR-L2	YTS (SEQ ID NO: 31)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 37)	YTS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	GHTLPY (SEQ ID NO: 42)
	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKL EWMGYITFDGANNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSVTTEDTA TYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 43)		
	VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWYQQRPDGTVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTVSNLEQEDIATYFCQQGHT LPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 44)		
5- H12	CDR-H1	GYSFTDYC (SEQ ID NO: 45)	DYCIN (SEQ ID NO: 51)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)

	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERF KG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGM DY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFM H (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYCINWVNQRPGQGLE WIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSA VYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 61)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQ PPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQ SSEDPWTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33 Y*	CDR-H1	GYSFTDYY (SEQ ID NO: 63)	DYYIN (SEQ ID NO: 64)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERF KG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGM DY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFM H (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYINWVNQRPGQGLE WIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSA VYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 65)		

	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQ PPKLLIFRASNLSESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQ SSEDPWTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5- H12 C33 D*	CDR-H1	GYSFTDYD (SEQ ID NO: 66)	DYDIN (SEQ ID NO: 67)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERF KG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGM DY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFM H (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYDINWVNQRPGQGLE WIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSA VYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 68)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQ PPKLLIFRASNLSESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQ SSEDPWTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		

**положения мутаций соответствуют нумерации по Kabat соответствующих последовательностей VH, содержащих мутации*

[00097] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR по изобретению является гуманизированным вариантом любого из антител против TfR, приведенных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR по изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в любом из антител против TfR, приведенных в таблице 2, и содержит гуманизированную вариабельную область тяжелой цепи и/или (например, и) гуманизированную вариабельную область легкой цепи.

[00098] Гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентным антителом), в котором остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменяют остатками из CDR не являющихся человеком видов (донорного антитела), таких как мышь, крыса или кролик, имеющими желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых вариантах осуществления остатки

каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, не содержащиеся ни в реципиентном антителе, ни в импортированной CDR или каркасных последовательностях, но включенные для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик антитела. В основном, гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все из областей CDR соответствуют CDR из не принадлежащего человеку иммуноглобулина, и все или по существу все из областей FR являются областями из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. В оптимальном варианте гуманизированное антитело также будет содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Антитела могут иметь Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененные относительно исходного антитела, которые также обозначают как одну или более CDR, полученных из одной или более CDR из исходного антитела. Гуманизированные антитела также могут включать созревание аффинности.

[00099] Известны гуманизированные антитела и способы их получения, например, как описано в Almagro et al., *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); патенты США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005); Padlan et al., *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005); Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005); и Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000), содержание всех из которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Каркасные области человека, которые можно использовать, для гуманизации описаны, например, в Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993); Almagro et al., *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008); Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997); и Rosok et al., *J Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996), содержание всех из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

[000100] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую одно или более изменений аминокислот (например, в каркасной области VH) по сравнению с любой из VH, приведенных в таблице 2, и/или (например, и) гуманизированную VL, содержащую одно или более изменений аминокислот (например, в каркасной области VL) по сравнению с любой из VL, приведенных в таблице 2.

[000101] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с

VH любого из антител против TfR, приведенных в таблице 2 (например, любой из SEQ ID NO: 17, 22, 26, 43, 61, 65 и 68). Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VL, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL любого из антител против TfR, приведенных в таблице 2 (например, любой из SEQ ID NO: 18, 44 и 62).

[000102] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH любого из антител против TfR, приведенных в таблице 2 (например, любой из SEQ ID NO: 17, 22, 26, 43, 61, 65 и 68). Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), в некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL любого из антител против TfR, приведенных в таблице 2 (например, любой из SEQ ID NO: 18, 44 и 62).

[000103] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (по системе определения IMGT), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 23 (по системе определения IMGT), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (по системе определения IMGT), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 26. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (по системе определения IMGT), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (по системе определения IMGT), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (по системе определения IMGT), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 18.

[000104] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (по системе определения IMGT), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19 или SEQ

ID NO: 23 (по системе определения IMGT), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (по системе определения IMGT), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 26. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (по системе определения IMGT), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (по системе определения IMGT), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (по системе определения IMGT), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в любой из SEQ ID NO: 18.

[000105] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (по системе определения Kabat), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 24 (по системе определения Kabat), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (по системе определения Kabat), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 26. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (по системе определения Kabat), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (по системе определения Kabat), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (по системе определения Kabat), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 18.

[000106] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (по системе определения Kabat), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 24 (по системе определения Kabat), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (по системе определения Kabat), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 26. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-

L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (по системе определения Kabat), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (по системе определения Kabat), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (по системе определения Kabat), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в любой из SEQ ID NO: 18.

[000107] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (по системе определения Chothia), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 25 (по системе определения Chothia), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 (по системе определения Chothia), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 26. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 (по системе определения Chothia), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (по системе определения Chothia), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 (по системе определения Chothia), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 18.

[000108] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (по системе определения Chothia), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 25 (по системе определения Chothia), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 (по системе определения Chothia), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 26. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 (по системе определения Chothia), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (по системе определения Chothia), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 (по системе определения Chothia), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в любой из SEQ ID NO: 18.

[000109] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 (по системе определения IMGT), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 (по системе определения IMGT), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 (по системе определения IMGT), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 43. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 (по системе определения IMGT), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 (по системе определения IMGT), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 (по системе определения IMGT), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000110] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 (по системе определения IMGT), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 (по системе определения IMGT), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 (по системе определения IMGT), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 43. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 (по системе определения IMGT), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 (по системе определения IMGT), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 (по системе определения IMGT), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000111] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 (по системе определения Kabat), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 (по системе определения Kabat), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 (по системе определения Kabat), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной

в SEQ ID NO: 43. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 (по системе определения Kabat), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 (по системе определения Kabat), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 (по системе определения Kabat), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000112] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33 (по системе определения Kabat), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 (по системе определения Kabat), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 (по системе определения Kabat), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 43. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 (по системе определения Kabat), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 (по системе определения Kabat), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 (по системе определения Kabat), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000113] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 (по системе определения Chothia), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 (по системе определения Chothia), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 (по системе определения Chothia), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 43. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (по системе определения Chothia), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 (по системе определения Chothia), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (по системе определения Chothia), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1

изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000114] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 (по системе определения Chothia), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 (по системе определения Chothia), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 (по системе определения Chothia), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 43. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 (по системе определения Chothia), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 (по системе определения Chothia), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42 (по системе определения Chothia), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000115] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 63, или SEQ ID NO: 66 (по системе определения IMGT), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 (по системе определения IMGT), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 (по системе определения IMGT), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 68. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (по системе определения IMGT), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (по системе определения IMGT), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (по системе определения IMGT), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000116] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 66 (по системе определения IMGT), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 (по системе определения IMGT), CDR-H3, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 47 (по системе определения IMGT), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 68. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48 (по системе определения IMGT), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (по системе определения IMGT), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (по системе определения IMGT), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000117] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67 (по системе определения Kabat), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (по системе определения Kabat), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (по системе определения Kabat), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 68. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54 (по системе определения Kabat), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 (по системе определения Kabat), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (по системе определения Kabat), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000118] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 67 (по системе определения Kabat), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52 (по системе определения Kabat), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53 (по системе определения Kabat), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 68. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54 (по системе определения Kabat), CDR-

L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55 (по системе определения Kabat), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50 (по системе определения Kabat), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000119] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (по системе определения Chothia), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (по системе определения Chothia), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (по системе определения Chothia), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 68. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (по системе определения Chothia), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (по системе определения Chothia), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (по системе определения Chothia), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000120] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (по системе определения Chothia), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (по системе определения Chothia), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (по системе определения Chothia), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 68. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (по системе определения Chothia), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (по системе определения Chothia), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (по системе определения Chothia), и является по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000121] Примеры аминокислотных последовательностей гуманизированных антител против Tfr, представленных в настоящем описании, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Вариабельные области гуманизированных антител против Tfr

Антитело	Аминокислотная последовательность вариабельных областей**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	V _H : EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGL EWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED AVYYCTLWLRRGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 69)
	V _L : DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	V _H : EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGL EWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED AVYYCTLWLRRGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 71)
	V _L : DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3A4 VH3 /Vκ4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGL EWIGWIDPENGDTTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED AVYYCTLWLRRGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72)
	VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3M12 VH3/Vκ2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT YYCTRSSYDYDVLVDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)
	VL:

	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGHTLP YTFGQGGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)
3M12 VH3/V _k 3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WMGYITFDGANNYNPSLKNRVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT YYCTRSSYD ~~Y~~ DVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGHTLP YTFGQGGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)
3M12 VH4/V _k 2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WIGYITFDGANNYNPSLKNRVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY YCTRSSYD ~~Y~~ DVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGHTLP YTFGQGGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)
3M12 VH4/V _k 3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WIGYITFDGANNYNPSLKNRVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY YCTRSSYD ~~Y~~ DVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGHTLP YTFGQGGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)
5H12 VH5 (C33Y*)/V _k 3	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL EWMGWIYPGSGNTRYSE ~~R~~ FKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDT AVYYCARE ~~D~~ YYPYHGMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 77)
	VL:

	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASE SVDGYDNSFMHWYQQKPGQ PPKLLIFRAS NLE SGVPDRFSGSGSRTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQ SSEDPWTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 78)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT DYDIN WVRQAPGQGL EWMGWI YPGSGNTRYSE RFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDT AVYYCARE DYYPYHGMDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 79)
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASE SVDGYDNSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRAS NLE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQ QSSEDPWTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 80)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT DYYIN WVRQAPGQGL EWMGWI YPGSGNTRYSE RFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDT AVYYCARE DYYPYHGMDY WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 77)
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASE SVDGYDNSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRAS NLE SGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQ QSSEDPWTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO: 80)

**положения мутаций соответствуют нумерации по Kabat соответствующих последовательностей VH, содержащих мутации*

***CDR по системе нумерации Kabat выделены полужирным шрифтом*

[000122] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 любого из антител против TfR, приведенных в таблице 2, и содержит одно или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) изменений аминокислот в каркасных областях по сравнению с соответствующей гуманизированной VH, приведенной в таблице 3. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VL, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого из антител против TfR, приведенных в таблице 2, и содержит одно или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) изменений аминокислот в каркасных областях по сравнению с соответствующей гуманизированной VL, приведенной в таблице 3.

[000123] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 69, и/или (например, и) гуманизированную

[000125] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 72, и/или (например, и) гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[000126] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 73, и/или (например, и) гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

[000127] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 73, и/или (например, и) гуманизованную

[000129] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 76, и/или (например, и) гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

[000130] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 77, и/или (например, и) гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

[000131] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 79, и/или (например, и) гуманизованную

VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и гуманизированную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

[000132] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 77, и/или (например, и) гуманизированную VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизированную VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и гуманизированную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

[000133] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, является полноразмерным IgG, который может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи антитела человека. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любых из антител против TfR, как представлено в настоящем описании, может содержать константную область тяжелой цепи (CH) или ее часть (например, CH1, CH2, CH3 или их комбинацию). Константная область тяжелой цепи может иметь любое подходящее происхождение, например, принадлежать человеку, мыши, крысы или кролика. В одном конкретном примере константная область тяжелой цепи получена из IgG человека (тяжелая цепь гамма), например, IgG1, IgG2 или IgG4. Пример константной области IgG1 человека приведен ниже:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

[000134] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любых из антител против TfR, представленных в настоящем описании, содержит мутантную константную область IgG1 человека. Например, известно, что встраивание мутаций LALA (мутант, полученный из mAb b12, подвергнутого мутагенезу для замены остатков нижней шарнирной области Leu234 Leu235 на Ala234 и Ala235) в домене CH2 IgG1 человека снижает связывание рецептора Fcγ (Bruhns, P., et al. (2009) и Xu, D. et al. (2000)). Мутантная

константная область IgG1 человека приведена ниже (мутации выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

[000135] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь любых из антител против TfR, представленных в настоящем описании, может дополнительно содержать константную область легкой цепи (CL), которая может являться любой CL, известной в этой области. В некоторых примерах, CL относится к легкой цепи каппа. В других примерах CL относится к легкой цепи лямбда. В некоторых вариантах осуществления CL относится к легкой цепи каппа, последовательность которой приведена ниже:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 83)

[000136] Другие константные области хорошо тяжелой и легкой цепи антитела известны в этой области, например, представленные в базе данных IMGT (www.imgt.org) или на www.vbase2.org/vbstat.php, включенных в настоящее описание посредством ссылки.

[000137] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую любую из VH, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область тяжелой цепи, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичной SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую любую из VH, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область тяжелой цепи, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую любую из VH, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую любую из VH, приведенных в таблице 3, любые их варианты и константную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 82.

[000138] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую любую

из VL, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область легкой цепи, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичной SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащий любую из VL, приведенных в таблице 3, или любые их варианты, и константная область легкой цепи содержит не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую любую из VL, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 83.

[000139] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи IgG описанных антител против TfR приведены в таблице 4 ниже.

Таблица 4. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи примеров гуманизированных IgG против TfR

Антитело	Последовательности тяжелой цепи/легкой цепи IgG **
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u> <u>WIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCTLWLRRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQS</u> <u>PRLLIYRMSNLASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u> <u>HLEYPTFTGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u> YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 (N54S*)/Vk4	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u> <u>WIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTA</u>

	<u>YYCTLWLRRGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHLSNGYTYLFWFQQRPGQS</u> <u>PRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u> <u>HLEYPTFTGGGKVEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 /Vκ4	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u> <u>WIGWIDPENGDEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCTLWLRRGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHLSNGYTYLFWFQQRPGQS</u> <u>PRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u> <u>HLEYPTFTGGGKVEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3M12 VH3/Vκ2	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVISIRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY</u> <u>YCTRSSYDYDVLDDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u>

	AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLI</u> <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGHTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u> VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH3/Vκ3	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY</u> <u>YCTRSSYDYYDVLDDYWGQGTITVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLI</u> <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGHTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u> VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
3M12 VH4/Vκ2	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYY</u> <u>CTRSSYDYYDVLDDYWGQGTITVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

	PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGQPVKLLI</u> <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u> VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH4/Vκ3	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTATYY</u> <u>CTRSSYDYYDVLDDYWGQGTITVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGQPVKLLI</u> <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u> VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLE</u> <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSA</u>STAYMELSSLRSEDTA <u>VYYCAREDDYYPYHGMDYWGQGTITVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQP</u> <u>PKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOSS</u> <u>EDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u> PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYDINWVRQAPGQGLE</u> <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQ</u> <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOS</u> <u>SEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u> YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLE</u> <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV

	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQ</u> <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQS</u> <u>SEDPWTFGGQGTKLEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPY YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)

**положения мутаций соответствуют нумерации по Kabat соответствующих последовательностей VH, содержащих мутации*

*** CDR по системе нумерации Kabat выделены полужирным шрифтом; последовательности VH/VL подчеркнуты*

[000140] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с тяжелой цепью, приведенной в любой из SEQ ID NO: 84, 86, 87, 88, 91, 92 и 94. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с легкой цепью, приведенной в любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93 и 95.

[000141] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной любой из SEQ ID NO: 84, 86, 87, 88, 91, 92 и 94. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93, и 95. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 84, 86, 87, 88, 91, 92 и 94. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93 и 95.

[000148] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 91, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90

[000150] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 94, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению

содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[000151] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 92, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[000152] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом или F(ab')₂-фрагментом интактного антитела (полноразмерного антитела). Антигенсвязывающий фрагмент интактного антитела (полноразмерного антитела) можно получать общепринятыми способами (например, рекомбинантно или посредством расщепления константной области тяжелой цепи полноразмерного IgG с использованием фермента, такого как папаин). Например, F(ab')₂-фрагменты можно получать посредством расщепления пепсином или папаином молекулы антитела, и Fab-фрагменты можно получать, восстанавливая дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагментов. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи в Fab-фрагменте антитела против TfR1, представленного в настоящем описании, содержит аминокислотную последовательность: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 96)

[000153] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую любую из VH, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область тяжелой цепи, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичной SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую любую из VH, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область тяжелой цепи, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую любую из VH, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 96.

[000154] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую любую

из VL, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область легкой цепи, являющуюся на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичной SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую любую из VL, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область легкой цепи, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую любую из VL, приведенных в таблице 3, или любые их варианты и константную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 83.

[000155] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи Fab описанных антител против TfR приведены в таблице 5 ниже.

Таблица 5. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи примеров гуманизированных Fab против TfR

Антитело	Fab Тяжелая цепь/Легкая цепь Последовательности**
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u> <u>WIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCTLWLRRGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 97)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQS</u> <u>PRLIYRMSNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u> <u>HLEYPTFEFGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3 (N54S*)/Vk4	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u> <u>WIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCTLWLRRGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u> ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 98)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)

	<u>DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQS</u> <u>PRLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u> <u>HLEYPTFTGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u> YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3A4 VH3/V _κ 4	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u> <u>WIGWIDPENGDEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCTLWLRRGLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 99) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQS</u> <u>PRLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u> <u>HLEYPTFTGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u> YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3M12 VH3/V _κ 2	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVISIRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY</u> <u>YCTRSSYDYDVLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 100) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWIYQKPGQPVKLLI</u> <u>YYTSRLHSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQGHTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u> YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH3/V _κ 3	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVISIRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY</u> <u>YCTRSSYDYDVLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u>

	AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 100) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLI</u> <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOGHTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u> VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
3M12 VH4/V_k2	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYY</u> <u>CTRSSYDYDVLDDYWGQGTITVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLI</u> <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQOGHTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u> VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)
3M12 VH4/V_k3	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVVISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYY</u> <u>CTRSSYDYDVLDDYWGQGTITVTVSS</u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKLLI</u> <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOGHTLPY</u> <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u> VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTLYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)

5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLE</u> <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCAREDDYYPYHGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 102) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVDGYDNSFMHWYQQKPGQP</u> <u>PKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAVYYCQOSS</u> <u>EDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u> PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLE</u> <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCAREDDYYPYHGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 103) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVDGYDNSFMHWYQQKPGQ</u> <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQOS</u> <u>SEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u> YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLE</u> <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCAREDDYYPYHGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 102) Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)

	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQ</u> <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQS</u> <u>SEDPWTFEGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u> YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
--	---

**положения мутаций соответствуют нумерации Kabat соответствующих последовательностей VH, содержащих мутации*

***CDR по системе нумерации Kabat выделены полужирным шрифтом; последовательности VH/VL подчеркнуты*

[000156] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с тяжелой цепью, приведенной в любой из SEQ ID NO: 97-103. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с легкой цепью, приведенной в любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93 и 95.

[000157] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной любой из SEQ ID NO: 97-103. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93 и 95. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 97-103. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93 и 95.

[000158] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 97, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению

вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[000168] В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против рецептора TfR, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме любого антитела, включая, в качестве неограничивающих примеров, интактные (т.е. полноразмерные) антитела, их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела или нанотела. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, является scFv. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, является scFv-Fab (например, scFv, слитым с частью константной области). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора TfR, представленное в настоящем описании, является scFv, слитым с константной областью (например, константной областью IgG1 человека, приведенной в SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82, или ее частью, такой как Fc-часть) на N-конце или C-конце.

[000169] В некоторых вариантах осуществления в последовательности антитела (например, CDR или каркасные последовательности) можно встраивать консервативные мутации в положениях, где маловероятно, что остатки будут участвовать во взаимодействии с антигеном-мишенью (например, рецептором трансферрина), например, что определяют на основе кристаллической структуры. В некоторых вариантах осуществления встраивают одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) в Fc-область антитела против TfR, представленного в настоящем описании (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или (например, и) шарнирную область, при этом нумерацию осуществляют по системе Kabat (например, индексу EU по Kabat)), для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, связывание комплемента, связывание Fc-рецептора и/или (например, и) антиген-зависимая клеточная цитотоксичность.

[000170] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) встраивают в шарнирную область Fc-области (домена CH1) таким образом, что изменяют (например, повышают или снижают) количество остатков цистеина в шарнирной области, как описано, например, в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области домена CH1 можно изменять, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей, или для изменения (например, повышения или снижения) стабильности антитела, или для облегчения конъюгации с линкером.

[000171] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) встраивают в Fc-область мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании (например, в домен CH2 (остатки 231-

340 IgG1 человека), и/или (например, и) домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека), и/или (например, и) шарнирную область, при этом нумерацию осуществляют по системе Kabat (например, индексу EU по Kabat)), для повышения или снижения аффинности антитела к Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки. Специалисту в этой области известны мутации в Fc-области антитела, снижающие или повышающие аффинность антитела к Fc-рецептору, и способы встраивания таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент. Примеры мутаций в Fc-рецепторе антитела, которые можно вносить для изменения аффинности антитела к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186, патенте США № 6737056, и международных патентных публикациях №№ WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631, включенных в настоящее описание посредством ссылки.

[000172] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для изменения (например, снижения или повышения) времени полужизни антитела *in vivo*. См., например, международные патентные публикации №№ WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631 и патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745 для примеров мутаций, которые будут изменять (например, снижать или повышать) время полужизни антитела *in vivo*.

[000173] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для снижения времени полужизни антитела против TfR *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для повышения времени полужизни антитела *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитела могут иметь одну или более мутаций аминокислот (например, замен) во втором константном домене (CH2) (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) третьем константном домене (CH3) (остатки 341-447 IgG1 человека), при этом нумерацию осуществляют по индексу EU по Kabat (Kabat E A et al., (1991) выше). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 антитела, представленного в настоящем описании, содержит замену метионина (M) тирозином (Y) в положении 252, замену серина (S) треонином (T) в положении 254, и замену треонина (T) глутаминовой кислотой (E) в положении 256, пронумерованные с помощью индекса EU по Kabat. См. патент США № 7658921, включенный в настоящее описание посредством ссылки. Показано, что этот тип мутантного IgG, обозначаемый как "YTE-мутант", демонстрирует увеличенное в четыре раза время полужизни по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более замен

аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, пронумерованных с помощью индекса EU по Kabat.

[000174] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более замен аминокислот встраивают в константный домен Fc-области IgG для изменения эффекторных функций антитела против рецептора Tfr. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может являться, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260. В некоторых вариантах осуществления делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или иных средств) константной области может снижать связывание Fc-рецептора циркулирующим антителом, таким образом, повышая локализацию в опухоли. Описание мутаций, приводящих к делеции или инактивации константного домена и, таким образом, повышающих локализацию в опухоли, см., например, в патентах США №№ 5585097 и 8591886. В некоторых вариантах осуществления одну или более замены аминокислот можно встраивать в Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, для удаления потенциальных участков гликозилирования на Fc-области, которые могут приводить к снижению связывания Fc-рецептора (см., например, Shields R L et al., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604).

[000175] В некоторых вариантах осуществления одну или более аминокислот в константной области антитела против Tfr, представленного в настоящем описании, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или (например, и) сниженную или отсутствующую обусловленную компонентом цитотоксичность (CDC). Этот подход подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al). В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в N-концевой области домена CH2 антитела, представленного в настоящем описании, изменяют, чтобы, таким образом, изменить способность антитела связываться с компонентом. Этот подход описан в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, модифицируют для повышения способности антитела для опосредования антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или (например, и) для повышения аффинности антитела к рецептору Fcγ. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 00/42072.

[000176] В некоторых вариантах осуществления последовательности вариабельного домена тяжелой и/или (например, и) легкой цепи антител, представленных в настоящем описании, можно использовать для получения, например, антител с пересаженными CDR, химерных, гуманизированных или составных антител человека или антигенсвязывающих фрагментов, как описано в другом месте в настоящем описании. Как будет понятно специалисту в этой области, любой вариант антитела, антитела с пересаженными CDR, химерные, гуманизированные или составные антитела, полученные из любых из антител, представленных в настоящем описании, можно использовать в композиции и способах, представленных в настоящем описании, и они будут сохранять способность специфически

связываться с рецептором трансферрина, таким образом, что вариант антитела, антитело с пересаженными CDR, химерное, гуманизированное или композитное антитело имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более связывания с рецептором трансферрина относительно исходного антитела, из которого его получают.

[000177] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в настоящем описании, содержат мутации, придающие антителам желаемые свойства. Например, во избежание потенциальных осложнений из-за обмена Fab-фрагментов, как известно, возникающих в случае нативных mAb IgG4, антитела, представленные в настоящем описании, могут содержать стабилизирующую мутацию "Adair" (Angal S., et al., " A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," Mol Immunol 30, 105-108; 1993), где серин 228 (нумерация EU; остаток 241 при нумерации по Kabat) преобразуют в пролин, что приводит к получению IgG1-подобной шарнирной последовательности. Таким образом, любые из антител могут включать стабилизирующую мутацию "Adair".

[000178] В некоторых вариантах осуществления антитело является модифицированным, например, модифицированным посредством гликозилирования, фосфорилирования, сумоилирования, и/или (например, и) метилирования. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным антителом, конъюгированным с одной или более молекулами сахаров или углеводов. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов конъюгированы с антителом посредством N-гликозилирования, O-гликозилирования, C-гликозилирования, глипирования (присоединения GPI-якоря) и/или (например, и) фосфогликозилирования. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов представляют собой моносахариды, дисахариды, олигосахариды или гликаны. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов является разветвленным олигосахаридом или разветвленным гликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов включают маннозное звено, глюкозное звено, звено N-ацетилглюкозамина, звено N-ацетилгалактозамина, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления есть приблизительно 1-10, приблизительно 1-5, приблизительно 5-10, приблизительно 1-4, приблизительно 1-3 или приблизительно 2 молекул сахара. В некоторых вариантах осуществления гликозилированное антитело является полностью или частично гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным в результате химических реакций или ферментативными способами. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным *in vitro* или внутри клетки, которая, необязательно, может иметь дефицит фермента пути N- или O-гликозилирования, например, гликозилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления антитело является функционализированным с использованием молекул сахаров или углеводов, как описано в международной публикации патентной заявки

WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года, названной, "*Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof*".

[000179] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TfR1, представленных в настоящем описании, может содержать сигнальный пептид в последовательности тяжелой и/или (например, и) легкой цепи (например, N-концевой сигнальный пептид). В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит любую из последовательностей VH и VL, любую из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи IgG или любой из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи Fab, представленных в настоящем описании, и дополнительно содержит сигнальный пептид (например, N-концевой сигнальный пептид). В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 104).

Другие известные антитела против рецептора трансферрина

[000180] В качестве мышечно-специфического средства в комплексах, представленных в настоящем описании, можно использовать любые другие подходящие антитела против рецептора трансферрина, известные в этой области. Примеры известных антител против рецептора трансферрина, включая соответствующие ссылки и связывающиеся эпитопы, приведены в таблице 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит определяющие комплементарность области (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) любых из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, например, антител против рецептора трансферрина, приведенных в таблице 8.

[000181] Таблица 8 - Список клонов антител против рецептора трансферрина, включая соответствующие ссылки и информацию о связывающихся эпитопов.

Название клона антитела	Ссылки	Эпитоп/примечания
ОКТ9	Патент США № 4364934, поданный 12/4/1979, названный "MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME" Schneider C. et al. "Structural features of cell surface recepto for transferrin that is recognized by monoclonal antibody OKT9." J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.	Апикальный домен TfR (остатки 305-366 последовательности TfR человека XM_052730.3, доступной в GenBank)
(От JCR) Клон M11 Клон M23	WO 2015/098989, поданная 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier"	Апикальный домен (остатки 230-244 и 326-347 TfR) и

Клон M27 Клон B84	патент США № 9994641, поданный 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier"	протеаза-подобный домен (остатки 461-473)
(От Genentech) 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12 и 13D4	WO 2016/081643, поданный 5/26/2016, названный "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE" патент США № 9708406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"	Апикальный домен и неапикальные области
(От Armagen) 8D3	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. патентная заявка США № 2010/077498, поданная 9/11/2008, названная "COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE"	
OX26	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	Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 и brefeldin A. Plant J 48:757-70 (2006).	
1A1B2, 66IG10, MEM-189, JF0956, 29806, 1A1B2, TFRC/1818, 1E6, 66Ig10,	Коммерчески доступные антитела против рецептора трансферрина.	Novus Biologicals 8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120

TFRC/1059, Q1/71, 23D10, 13E4, TFRC/1149, ER- MP21, YTA74,4, BU54, 2B6, RI7 217		
(От INSERM) BA120g	патентная заявка США № 2011/0311544A1, поданная 6/15/2005, названная "ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS"	Не конкурирует с ОКТ9
LUCA31	патент США № 7572895, поданный 6/7/2004, названный "TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES"	"Эпитоп LUCA31"
(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, ОКТ9 (клеточное BE0023)	Коммерчески доступные антитела против рецептора трансферрина.	BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B West Lebanon, NH 03784-1671 USA
BK19,9, B3/25, T56/14 и T58/1	Gatter, K.C. et al. "Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance." J Clin Pathol. 1983 мая;36(5):539-45.	

[000182] В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по настоящему изобретению включают одну или более из аминокислотных последовательностей CDR-H (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина включают CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные для любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных

из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина включают CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные для любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина включают CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные для любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. Настоящее изобретение также включает любую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу, содержащую CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3, приведенные для любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления домены CDR3 тяжелой и легкой цепи антитела могут играть очень важную роль в специфичности/аффинности связывания антитела с антигеном. Таким образом, антитела против рецептора трансферрина по настоящему изобретению могут включать по меньшей мере CDR3 тяжелой и/или (например, и) легкой цепи любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8.

[000183] В некоторых примерах любые из антител против рецептора трансферрина по настоящему изобретению имеют одну или более последовательностей CDR (например, CDR-H или CDR-L), по существу схожие с любой из последовательностей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и/или (например, и) CDR-L3 из одного из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления положение одной или более CDR в области VH (например, CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3) и/или (например, и) VL (например, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3) антитела, представленного в настоящем описании, может варьироваться на одно, два, три, четыре, пять или шесть положений аминокислот при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают). Например, в некоторых вариантах осуществления положение, определяющее CDR любого антитела, представленного в настоящем описании, можно варьировать посредством сдвига границ N-конца и/или (например, и) С-конца CDR на одну, две, три, четыре, пять или шесть аминокислоты относительно положения CDR любого из антител, представленных в настоящем описании, при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают). В другом варианте осуществления длину одной или более CDR в области VH (например, CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3) и/или (например, и) VL (например, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3) антитела, представленного в настоящем описании, можно варьировать (например, она может быть короче или длиннее) на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот, при условии,

что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают).

[000184] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или (например, и) CDR-H3, представленные в настоящем описании, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот короче одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, и/или (например, и) CDR-H3, представленные в настоящем описании, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот длиннее одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления аминоконцевую часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или (например, и) CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно удлинять на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления карбокси-концевую часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или (например, и) CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно удлинять на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по

меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления аминоконцевую часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или (например, и) CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно укорачивать на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления карбокси-концевую часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или (например, и) CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно укорачивать на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). Для определения того, сохраняется ли иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека), можно использовать любой способ, например, с использованием анализов связывания и условий, описанных в этой области.

[000185] В некоторых примерах любые из антител против рецептора трансферрина по настоящему изобретению имеют одну или более последовательностей CDR (например, CDR-H или CDR-L), по существу схожих любому из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. Например, антитела могут включать одну или более последовательностей CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8, содержащих до 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислотного остатка по сравнению с соответствующей областью CDR в любой из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления любые из изменений аминокислот в любых из CDR, представленных в настоящем описании, могут являться консервативными изменениями.

Консервативные изменения можно вносить в CDR в положениях, где маловероятно, что остатки будут вовлечены во взаимодействие с белком рецептора трансферрина (например, белком рецептора трансферрина человека), например, что определяют на основе кристаллической структуры. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к антителам против рецептора трансферрина, содержащим один или более переменных доменов тяжелой цепи (VH) и/или (например, и) переменных доменов легкой цепи (VL), представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления любые из доменов VH, представленных в настоящем описании, включают одну или более из последовательностей CDR-H (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), представленных в настоящем описании, например, любые из последовательностей CDR-H, приведенных в любом из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления любые из доменов VL, представленных в настоящем описании, включают одну или более из последовательностей CDR-L (например, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) представленных в настоящем описании, например, любые из последовательностей CDR-L, приведенных в любом из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8.

[000186] В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по настоящему изобретению включают любое антитело, включающее переменный домен тяжелой цепи и/или (например, и) переменный домен легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по настоящему изобретению включают любое антитело, включающее пары переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8.

[000187] Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам против рецептора трансферрина, имеющим аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH) и/или (например, и) переменного домена легкой цепи (VL), гомологичную любой из последовательностей, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи или последовательность переменного домена легкой цепи, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или любой последовательности переменного домена легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления гомологичные аминокислотные последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или (например, и) переменного домена легкой цепи не варьируются в любых из последовательностей CDR, представленных в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления степень изменения последовательности (например, 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 98% или 99%) может иметь место в пределах последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или (например, и) переменного домена легкой цепи, за исключением любых из последовательностей CDR, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления любые из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, содержат последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую последовательность каркаса, являющуюся на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной последовательности каркаса любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8.

[000188] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека), содержит переменный домен легкой цепи VL, содержащий любой из доменов CDR-L (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), или варианты домена CDR-L, представленные в настоящем описании, любых из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека), содержит переменный домен легкой цепи VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит последовательность переменной области легкой цепи (VL), содержащую одну, две, три или четыре последовательности каркасных областей переменной области легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит одну, две, три или четыре из последовательностей каркасных областей переменной области легкой цепи, являющиеся на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичными одной, двум, трем или четверем последовательностям каркасных областей переменной области легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления каркасная область переменного домена легкой цепи, полученная из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности, но с наличием до 10 замен, делеций и/или (например, и) инсерций аминокислот, предпочтительно - до 10 замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каркасная область переменного домена легкой цепи, полученная из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности, при этом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков заменены аминокислотой обнаруживаемой в аналогичном положении в

соответствующей каркасной области варибельного домена легкой цепи не являющегося человеком животного, примата или человека.

[000189] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина, содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или примата. Каркасная область легкой цепи примата или человека из антитела, выбранного для использования с последовательностями CDR легкой цепи, представленными в настоящем описании, может иметь, например, по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или по меньшей мере 99%) идентичности в отношении каркасной области легкой цепи не принадлежащего человеку родительского антитела. Выбранное антитело примата или человека может иметь то же или по существу то же количество аминокислот в своих определяющих комплементарность областях легкой цепи, что и определяющие комплементарность области легкой цепи любых из антител, представленных в настоящем описании, например, любых из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи примата или человека получают из природной каркасной области легкой цепи антитела примата или человека, имеющей по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере, 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, по меньшей мере 99% (или более) идентичности в отношении каркасных областей легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина дополнительно содержит одну, две, три или все четыре VL каркасные области, полученные из варибельного домена легкой цепи человека подсемейства каппа. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина дополнительно содержит одну, две, три или все четыре VL каркасные области, полученные из варибельного домена легкой цепи человека подсемейства лямбда.

[000190] В некоторых вариантах осуществления любые из антител против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании содержат, варибельный домен легкой цепи, дополнительно содержащий константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи является константной областью легкой цепи каппа или лямбда. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи каппа или лямбда принадлежит млекопитающему, например, человеку, обезьяне, крысе или мыши. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи является константной областью легкой цепи каппа человека. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи является константной областью

легкой цепи лямбда человека. Следует понимать, что любые из константных областей легкой цепи, представленных в настоящем описании, могут являться вариантами любых из константных областей легкой цепи, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной любой из константных областей легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8.

[000191] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина является любым антителом против рецептора трансферрина, таким как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8.

[000192] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит любые из доменов VL или вариантов доменов VL и любые из доменов VH или вариантов доменов VH, где домены VL и VH или их варианты происходят из одного клона антитела, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина. Неограничивающие примеры константных областей человека описаны в этой области, например, см. Kabat E A et al., (1991) выше.

[000193] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом рецептора трансферрина (например, антителом и его вариантами, описанными в международной патентной публикации № WO 2016/081643, включенной в настоящее описание посредством ссылки).

[000194] CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела по разным системам определения приведены в таблице 9. Описаны разные системы определения, например, определение по Kabat, определение по Chothia и/или (например, и) определение по системе Contact. См., например, 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; и Almagro, J. Mol. Recognit. 17:132-143 (2004). Также см. hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs.

Таблица 9. CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела против рецептора трансферрина мыши

CDR	Kabat	Chothia	Система Contact
CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 110)	GYTFTSY (SEQ ID NO: 116)	TSYWMH (SEQ ID NO: 118)
CDR-H2	EINPTNGRTNYIEK FKS (SEQ ID NO: 111)	NPTNGR (SEQ ID NO: 117)	WIGEINPTNGRTN (SEQ ID NO: 119)
CDR-H3	GTRAYHY (SEQ ID NO: 112)	GTRAYHY (SEQ ID NO: 112)	ARGTRA (SEQ ID NO: 120)
CDR-L1	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 113)	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 113)	YSNLAWY (SEQ ID NO: 121)
CDR-L2	DATNLAD (SEQ ID NO: 114)	DATNLAD (SEQ ID NO: 114)	LLVYDATNLA (SEQ ID NO: 122)
CDR-L3	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 115)	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 115)	QHFWGTPL (SEQ ID NO: 123)

[000195] Также приведены последовательности переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи:

[000196] VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSTVTSS (SEQ ID NO: 124)

[000197] VL

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKGKSPQLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 125)

[000198] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 9. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные в таблице 9.

[000199] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, в совокупности содержащие не более 5 изменений аминокислот (например, не более 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенными в таблице 9. Термин "в совокупности" означает, что общее количество изменений аминокислот во всех трех CDR тяжелой цепи находится в определенном диапазоне. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению могут содержать CDR-L1,

CDR-L2 и CDR-L3, в совокупности содержащие не более 5 изменений аминокислот (например, не более 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенными в таблице 9.

[000200] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, по меньшей мере одна из которых содержит не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с соответствующей CDR тяжелой цепи, приведенной в таблице 9. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению могут содержать CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, по меньшей мере одна из которых содержит не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с соответствующей CDR легкой цеп, приведенной в таблице 9.

[000201] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3, содержащую не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с CDR-L3, приведенной в таблице 9. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3, содержащую одно изменение аминокислоты по сравнению с CDR-L3, приведенной в таблице 9. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3 QHFAGTPLT (SEQ ID NO: 126) по системам определения Kabat и Chothia) или QHFAGTPL (SEQ ID NO: 127) по системе определения Contact). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1 и CDR-L2, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 9, и содержит CDR-L3 QHFAGTPLT (SEQ ID NO: 126) по системам определения Kabat и Chothia) или QHFAGTPL (SEQ ID NO: 127) по системе определения Contact).

[000202] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR тяжелой цепи, в совокупности являющиеся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичными CDR тяжелой цепи, приведенным в таблице 9. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR легкой цепи, в совокупности являющиеся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичными CDR легкой цепи, приведенным в таблице 9.

[000203] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

[000204] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 124. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 125.

[000205] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VH, приведенной в SEQ ID NO: 124. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VL, приведенной в SEQ ID NO: 125.

[000206] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению является гуманизированным антителом (например, гуманизированным вариантом антитела). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 9, и содержит гуманизированную переменную область тяжелой цепи и/или (например, и) гуманизированную переменную область легкой цепи.

[000207] Гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентным антителом), в котором остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменяют остатками из CDR не являющихся человеком видов (донорного антитела), таких как мышь, крыса или кролик, имеющими желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых вариантах осуществления остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизированное антитело может содержать остатки, не содержащиеся ни в реципиентном антителе, ни в импортированной CDR или каркасных последовательностях, но включенные для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик антитела. В основном, гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все из областей CDR соответствуют CDR из не принадлежащего человеку иммуноглобулина, и все или по существу все из областей FR являются областями из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. В оптимальном варианте гуманизированное антитело также будет содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Антитела могут иметь Fc-области, модифицированные, как

описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антитела имеют одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененные относительно исходного антитела, которые также обозначают как одну или более CDR, полученных из одной или более CDR из исходного антитела. Гуманизированные антитела также могут включать созревание аффинности.

[000208] В некоторых вариантах осуществления гуманизации достигают посредством пересадки CDR (например, приведенных в таблице 9) в переменные домены человека IGKV1-NL1*01 и IGHV1-3*01. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим одну или более замен аминокислот в положениях 9, 13, 17, 18, 40, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенным в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) одну или более замен аминокислот в положениях 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 66, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенным в SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим замены аминокислот во всех из положений 9, 13, 17, 18, 40, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенным в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) замены аминокислот во всех из положений 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 66, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенным в SEQ ID NO: 124.

[000209] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным антителом и содержит остатки в положениях 43 и 48 VL, приведенной в SEQ ID NO: 125. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным антителом и содержит остатки в положениях 48, 67, 69, 71 и 73 VH, приведенной в SEQ ID NO: 124.

[000210] Приведены аминокислотные последовательности VH и VL примера гуманизированного антитела, которое можно использовать по настоящему изобретению:

[000211] Гуманизированная VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGT
MVTVSS (SEQ ID NO: 128)

[000212] Гуманизированная VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFHWGTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 129)

[000213] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129.

[000214] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 128. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 129.

[000215] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VH, приведенной в SEQ ID NO: 128. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VL, приведенной в SEQ ID NO: 129.

[000216] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим замены аминокислот в одном или более из положений 43 и 48 по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) замены аминокислот в одном или более из положений 48, 67, 69, 71 и 73 по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим мутацию S43A и/или (например, и) V48L по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) одну или более из мутаций A67V, L69I, V71R и K73T по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 124.

[000217] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению является гуманизированным вариантом, содержащий замены аминокислот в одном или более из положений 9, 13, 17, 18, 40, 43, 48, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) замены аминокислот в одном или более из положений 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 48, 66, 67, 69, 71, 73, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 124.

[000218] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является химерным антителом, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи из антитела человека. Термин "химерные антитела" относится к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области из первого биологического вида и константную область из второго биологического вида. Как правило, в этих химерных антителах переменная область легких и тяжелых цепей имитирует переменные области антител, полученные из одного вида млекопитающих (например, не являющегося

человеком млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части являются гомологичными последовательностям в антителах, полученных из другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления модификации аминокислот можно осуществлять в вариабельной области и/или (например, и) константной области.

[000219] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является химерным антителом, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи из антитела человека. Термин "химерные антитела" относится к антителам, имеющим вариабельную область или часть вариабельной области из первого биологического вида и константную область из второго биологического вида. Как правило, в этих химерных антителах вариабельная область легких и тяжелых цепей имитирует вариабельные области антител, полученные из одного вида млекопитающих (например, не являющегося человеком млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части являются гомологичными последовательностям в антителах, полученных из другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления модификации аминокислот можно осуществлять в вариабельной области и/или (например, и) константной области.

[000220] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любых из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, может содержать константную область тяжелой цепи (CH) или ее часть (например, CH1, CH2, CH3 или их комбинацию). Константная область тяжелой цепи может иметь любое подходящее происхождение, например, принадлежать человеку, мыши, крысе или кролику. В одном конкретном примере константная область тяжелой цепи получена из IgG человека (тяжелая цепь гамма), например, IgG1, IgG2 или IgG4. Пример константной области IgG1 человека приведен ниже:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 130)

[000221] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь любых из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, может дополнительно содержать константную область легкой цепи (CL), может являться любой CL, известной в этой области. В некоторых примерах CL принадлежит легкой цепи каппа. В других примерах CL принадлежит легкой цепи ламбда. В некоторых вариантах осуществления CL принадлежит легкой цепи каппа, последовательность которой приведена ниже:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 83)

[000222] Другие константные области тяжелой и легкой цепи антитела хорошо известны в этой области, например, приведенные в базе данных IMGT (www.imgt.org) или на www.vbase2.org/vbstat.php, включенных в настоящее описание посредством ссылок.

[000223] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи описанных антител против рецептора трансферрина приведены ниже:

[000224] Тяжелая цепь (VH+константная область IgG1 человека)

QVQLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 132)

[000225] Легкая цепь (VL+легкая цепь каппа)

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKGKSPQLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWGTPPLTFGAGTKLELKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
YSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 133)

[000226] Тяжелая цепь (гуманизированная VH+константная область IgG1 человека)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134)

[000227] Легкая цепь (гуманизированная VL+легкая цепь каппа)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPPLTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 135)

[000228] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 132. Альтернативно или

дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

[000229] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с тяжелой цепью, приведенной в SEQ ID NO: 132. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с легкой цепью, приведенной в SEQ ID NO: 133.

[000230] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 134. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

[000231] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с тяжелой цепью гуманизованного антитела, приведенной в SEQ ID NO: 134. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения

аминокислоты) по сравнению с легкой цепью гуманизированного антитела, приведенной в SEQ ID NO: 135.

[000232] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина является антигенсвязывающим фрагментом (Fab) интактного антитела (полноразмерного антитела). Антигенсвязывающий фрагмент интактного антитела (полноразмерного антитела) можно получать общепринятыми способами. Например, F(ab')₂-фрагменты можно получать посредством расщепления пепсином молекулы антитела, и Fab'-фрагменты можно получать посредством восстановления дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагментов. Примеры аминокислотных последовательностей Fab антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, приведены ниже:

[000233] Тяжелая цепь Fab (VH+часть константной области IgG1 человека)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ
ID NO: 136)

[000234] Тяжелая цепь Fab (гуманизированная VH+часть константной области IgG1 человека)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
(SEQ ID NO: 137)

[000235] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

[000236] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

[000237] Антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, могут находиться в любой форме антитела, включая, в качестве неограничивающих примеров, интактные (т.е. полноразмерные) антитела, их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела или нанотела. В некоторых вариантах осуществления

антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является scFv-Fab (например, scFv, слитым с частью константной области). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является scFv, слитым с константной областью (например, константной областью IgG1 человека, приведенной в SEQ ID NO: 130).

[000238] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против Tfr, представленных в настоящем описании, получают посредством технологии рекомбинантных ДНК в суспензионной культуре клеток яичника китайского хомяка (CHO), необязательно, в суспензионной культуре клеток CHO-K1 (например, клетки CHO-K1, полученные из European Collection of Animal Cell Culture, кат. № 85051005).

[000239] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем описании, может иметь одну или более посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах осуществления N-концевая циклизация, также называемая образованием пироглутамата (руго-Glu), может происходить в антителе в N-концевых остатках глутамата (Glu) и/или глутамина (Gln) при производстве. В связи с этим, следует понимать, что антитело, определенное как имеющее последовательность, содержащую N-концевой остаток глутамата или глутамина, включает антитела, подвергнутые образованию пироглутамата, являющемуся результатом посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах осуществления образование пироглутамата происходит в последовательности тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления образование пироглутамата происходит в последовательности легкой цепи.

в. Другие мышечно-специфические антитела

[000240] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающееся с гемоювелином, кавеолином-3, пептидом мышечной дистрофии Дюшенна, миозином IIb или CD63. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с миогенным белком-предшественником. Неограничивающие примеры миогенных белков-предшественников включают ABCG2, М-кадгерин/кадгерин-15, кавеолин-1, CD34, FoxK1, интегрин альфа 7, интегрин альфа 7 бета 1, MYF-5, MyoD, миогенин, NCAM-1/CD56, Pax3, Pax7 и Pax9. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с белком скелетных мышц. Неограничивающие примеры белков скелетных мышц включают альфа-саркогликан, бета-саркогликан, ингибиторы кальпаина, креатинкиназу MM/CKMM, eIF5A, енолазу 2/нейрон-специфическую енолазу, эпсилон-саркогликан, FABP3/H-FABP, GDF-8/миостатин, GDF-11/GDF-8, интегрин альфа 7, интегрин альфа 7 бета 1, интегрин бета 1/CD29, MCAM/CD146, MyoD, миогенин, ингибиторы киназы легких цепей миозина, NCAM-1/CD56 и тропонин I. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с белком

гладких мышц. Неограничивающие примеры белков гладких мышц включают альфа-актин гладких мышц, VE-кадгерин, кальдесмон/CALD1, кальпонин 1, десмин, гистамин H2 R, мотилин R/GPR38, трансглеин/TAGLN и виментин. Однако следует понимать, что антитела против дополнительных мишеней входят в объем настоящего изобретения и списки примеров мишеней, представленные в настоящем описании, не предназначены для ограничения.

с. Признаки/изменения антител

[000241] В некоторых вариантах осуществления в последовательности антител (например, CDR или каркасные последовательности) можно встраивать консервативные мутации в положениях, в которых маловероятно, что остатки будут вовлечены во взаимодействие с антигеном-мишенью (например, рецептором трансферрина), например, что определяют на основе кристаллической структуры. В некоторых вариантах осуществления встраивают одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) в Fc-область мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или (например, и) шарнирную область, при этом нумерацию осуществляют по системе Kabat (например, индексу EU по Kabat)), для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, связывание комплемента, связывание Fc-рецептора и/или (например, и) антиген-зависимая клеточная цитотоксичность.

[000242] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) встраивают в шарнирную область Fc-области (домена CH1) таким образом, что изменяют (например, повышают или снижают) количество остатков цистеина в шарнирной области, как описано, например, в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области домена CH1 можно изменять, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей, или для изменения (например, повышения или снижения) стабильности антитела, или для облегчения конъюгации с линкером.

[000243] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) встраивают в Fc-область мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека), и/или (например, и) домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека), и/или (например, и) шарнирную область, при этом нумерацию осуществляют по системе Kabat (например, индексу EU по Kabat)), для повышения или снижения аффинности антитела к Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки. Специалисту в этой области известны мутации в Fc-области антитела, снижающие или повышающие аффинность антитела к Fc-рецептору, и способы встраивания таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент. Примеры мутаций в Fc-рецепторе антитела, которые можно вносить для изменения аффинности антитела к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186, патенте США № 6737056, и

международных патентных публикациях №№ WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631, включенных в настоящее описание посредством ссылки.

[000244] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для изменения (например, снижения или повышения) времени полужизни антитела *in vivo*. См., например, международные патентные публикации №№ WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631 и патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745 для примеров мутаций, которые будут изменять (например, снижать или повышать) время полужизни антитела *in vivo*.

[000245] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для снижения времени полужизни антитела против рецептора трансферрина *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для повышения времени полужизни антитела *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитела могут иметь одну или более мутаций аминокислот (например, замен) во втором константном домене (CH2) (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) третьем константном домене (CH3) (остатки 341-447 IgG1 человека), при этом нумерацию осуществляют по индексу EU по Kabat (Kabat E A et al., (1991) выше). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 антитела, представленного в настоящем описании, содержит замену метионина (M) тирозином (Y) в положении 252, замену серина (S) треонином (T) в положении 254, и замену треонина (T) глутаминовой кислотой (E) в положении 256, пронумерованные с помощью индекса EU по Kabat. См. патент США № 7658921, включенный в настоящее описание посредством ссылки. Показано, что этот тип мутантного IgG, обозначаемый как "YTE-мутант", демонстрирует увеличенное в четыре раза время полужизни по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, пронумерованных с помощью индекса EU по Kabat.

[000246] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более замен аминокислот встраивают в константный домен Fc-области IgG для изменения эффекторных функций антитела против рецептора трансферрина. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может являться, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260. В некоторых вариантах осуществления делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или иных средств) константной области может снижать связывание Fc-рецептора

циркулирующим антителом, таким образом, повышая локализацию в опухоли. Описание мутаций, приводящих к делеции или инактивации константного домена μ , таким образом, повышающих локализацию в опухоли, см., например, в патентах США №№ 5585097 и 8591886. В некоторых вариантах осуществления одну или более замены аминокислот можно встраивать в Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, для удаления потенциальных участков гликозилирования на Fc-области, которые могут приводить к снижению связывания Fc-рецептора (см., например, Shields R L et al., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604).

[000247] В некоторых вариантах осуществления одну или более аминокислот в константной области мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или (например, и) сниженную или отсутствующую обусловленную комплементом цитотоксичность (CDC). Этот подход подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al). В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в N-концевой области домена CH2 антитела, представленного в настоящем описании, изменяют, чтобы, таким образом, изменить способность антитела связываться с комплементом. Этот подход описан в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, модифицируют для повышения способности антитела для опосредования антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или (например, и) для повышения аффинности антитела к рецептору Fcγ. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 00/42072.

[000248] В некоторых вариантах осуществления последовательности вариабельного домена тяжелой и/или (например, и) легкой цепи антител, представленных в настоящем описании, можно использовать для получения, например, антител с пересаженными CDR, химерных, гуманизированных или составных антител человека или антигенсвязывающих фрагментов, как описано в другом месте в настоящем описании. Как будет понятно специалисту в этой области, любой вариант антитела, антитела с пересаженными CDR, химерные, гуманизированные или составные антитела, полученные из любых из антител, представленных в настоящем описании, можно использовать в композиции и способах, представленных в настоящем описании, и они будут сохранять способность специфически связываться с рецептором трансферрина, таким образом, что вариант антитела, антитело с пересаженными CDR, химерное, гуманизированное или композитное антитело имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более связывания с рецептором трансферрина относительно исходного антитела, из которого его получают.

[000249] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в настоящем описании, содержат мутации, придающие антителам желаемые свойства. Например, во избежание потенциальных осложнений из-за обмена Fab-фрагментов, как известно, возникающих в случае нативных mAb IgG4, антитела, представленные в

настоящем описании, могут содержать стабилизирующую мутацию "Adair" (Angal S., et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," *Mol Immunol* 30, 105-108; 1993), где серин 228 (нумерация EU; остаток 241 при нумерации по Kabat) преобразуют в пролин, что приводит к получению IgG1-подобной шарнирной последовательности. Таким образом, любые из антител могут включать стабилизирующую мутацию "Adair".

[000250] Как представлено в настоящем описании, антитела по изобретению, необязательно, могут содержать константные области или их части. Например, домен VL можно присоединять через его С-конец к константному домену легкой цепи, подобной С_κ или С_λ. Аналогично, домен VH или его часть можно присоединять ко всей тяжелой цепи или ее части из IgA, IgD, IgE, IgG, IgM и любого подкласса изотипа. Антитела могут включать подходящие константные области (см., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Таким образом, антитела в объеме настоящего изобретения могут включать домены VH и VL или их антигенсвязывающую часть в комбинации с любыми подходящими константными областями.

ii. Мышечно-специфические пептиды

[000251] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим пептидам в качестве мышечно-специфических средств. Описаны короткие пептидные последовательности (например, пептидные последовательности длиной 5-20 аминокислот), связывающиеся с конкретными типами клеток. Например, клеточно-специфические пептиды описаны в 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; патенте США № 6329501, опубликованном 11 декабря 2001 года, названном "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE"; и 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; полное содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Конструируя пептиды для взаимодействия со специфическими антигенами поверхности клетки (например, рецепторами), можно достигать селективности в отношении желаемой ткани, например, мышечной. Проводятся исследования таргетинга скелетных мышц, и в них можно доставлять широкий спектр молекулярных нагрузок. Эти подходы могут иметь высокую селективность в отношении мышечной ткани без многих из практических недостатков крупного антитела или вирусной частицы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является мышечно-специфическим пептидом, имеющим длину от 4 до 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид имеет длину 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 или 50 аминокислот. Мышечно-специфические пептиды можно получать любым из нескольких способов, таких как фаговый дисплей.

[000252] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может связываться с интернализирующим рецептором поверхности клетки, гиперэкспрессированным или относительно высоко экспрессированным в мышечных клетках, например, рецептором трансферрина, по сравнению с некоторыми другими клетками. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может направленно воздействовать, например, связываться, на рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления пептид, нацеленные на рецептор трансферрина, может содержать сегмент природного лиганда, например, трансферрина. В некоторых вариантах осуществления пептид, нацеленный на рецептор трансферрина, является таким, как описано в патенте США № 6743893, поданном 11/30/2000, "RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF PEPTIDES THAT BIND THE HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR". В некоторых вариантах осуществления пептид, нацеленный на рецептор трансферрина, является таким, как описано в 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. В некоторых вариантах осуществления пептид, нацеленный на рецептор трансферрина, является таким, как описано в патенте США № 8399653, поданном 5/20/2011, "TRANSFERRIN/TRANSFERRIN RECEPTOR-MEDIATED SIRNA DELIVERY".

[000253] Как указано выше, описаны примеры мышечно-специфических пептидов. Например, мышечно-специфические пептиды идентифицированы с использованием библиотеки фагового дисплея, экспонирующего поверхностные гептапептиды. В качестве одного из примеров, пептид, имеющий аминокислотную последовательность ASSLNIA (SEQ ID NO: 138), связывается с мышечными трубочками мыши C2C12 *in vitro* и с мышечной тканью мыши *in vivo*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство содержит аминокислотную последовательность ASSLNIA (SEQ ID NO: 138). Этот пептид демонстрирует улучшенную специфичность в случае связывания с сердечно-мышечной тканью и скелетно-мышечной тканью после внутривенной инъекции мышам при сниженном связывании с печенью, почками и головным мозгом. Дополнительные мышечно-специфические пептиды идентифицированы с использованием фагового дисплея. Например, пептид из 12 аминокислот идентифицирован посредством библиотеки фагового дисплея для таргетинга мышц в контексте лечения DMD. См., Yoshida D., et al., "Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats", *Int J Pharm* 2002; 231: 177-84; полное содержание которой включено, таким образом, в настоящее описание посредством ссылки. В этом случае идентифицирован пептид из 12 аминокислот, имеющий последовательность SKTFNTHPQSTP (SEQ ID NO: 139) и этот мышечно-специфический пептид демонстрировал улучшенное связывание с клетками C2C12 относительно пептида ASSLNIA (SEQ ID NO: 138).

[000254] Дополнительный способ идентификации пептидов, селективных в отношении мышц (например, скелетных мышц) по сравнению с другими типами клеток включает селекцию *in vitro*, описанную в 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; полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки. С помощью предварительной инкубации библиотеки фагового дисплея случайных 12-мерных пептидов со смесью немышечных типов клеток, осуществляли отрицательную селекцию неспецифических связывающих клетки средства. После раундов селекции пептид из 12 аминокислот TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 140) встречался наиболее часто. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство содержит аминокислотную последовательность TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 140).

[000255] Мышечно-специфическое средство может являться содержащей аминокислоты молекулой или пептидом. Мышечно-специфический пептид может соответствовать последовательности белка, преференциально связывающейся с белковым рецептором, обнаруживаемым в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид содержит высокую долю гидрофобных аминокислот, например, валина, таким образом, что пептид преференциально нацелен на мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид ранее не охарактеризован или не описан. Эти пептиды можно конструировать, продуцировать, синтезировать и/или (например, и) дериватизировать любым из нескольких способов, например, с использованием библиотек фагового дисплея пептидов, пептидных библиотек "одна частица-одно соединение" или комбинаторных библиотек синтетических пептидов с позиционным сканированием. Примеры способов описаны в этой области и включены посредством ссылки (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). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид описан ранее (см., например, 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). Примеры мышечно-специфических пептидов содержат аминокислотную последовательность из следующей группы: CQAQGQLVC (SEQ ID NO: 141), CSERSMNFC (SEQ ID NO: 142), CPKTRRVPC (SEQ ID NO: 143), WLSEAGPVVTVRALRG TG SW (SEQ ID NO: 144), ASSLNIA (SEQ ID NO: 138), CMQHSMRVC (SEQ ID NO: 145) и DDTRHWG (SEQ ID NO: 146). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может содержать приблизительно 2-25 аминокислот, приблизительно 2-20 аминокислот,

приблизительно 2-15 аминокислот, приблизительно 2-10 аминокислот или приблизительно 2-5 аминокислот. Мышечно-специфические пептиды могут содержать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные аланина, линейные аминокислоты, N-метил-аминокислоты и другие аминокислоты, известные в этой области. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может являться линейным; в других вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может являться циклическим, например, бициклическим (см., например, Silvana, M.G. et al. *Mol. Therapy*, 2018, 26:1, 132-147)).

iii. Лиганды мышечно-специфических рецепторов

[000256] Мышечно-специфическое средство может являться лигандом, например, лигандом, связывающимся с рецепторным белком. Мышечно-специфический лиганд может являться белком, например, трансферрином, связывающимся с интернализирующимся рецептором поверхности клетки, экспрессируемым мышечной клеткой. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является трансферрином или его производным, связывающимся с рецептором трансферрина. Мышечно-специфический лиганд альтернативно может являться низкомолекулярным соединением, например, липофильным низкомолекулярным соединением, предпочтительно нацеленным на мышечные клетки относительно других типов клеток. Примеры липофильных низкомолекулярных соединений, которые могут быть нацелены на мышечные клетки, включают соединения, содержащие холестерин, холестерил, стеариновую кислоту, пальмитиновую кислоту, олеиновую кислоту, олеил, линоленовую кислоту, линолевую кислоту, миристиновую кислоту, стериды, дигидротестостерон, производные тестостерона, глицерин, алкиловые цепи, тритильные группы и алкоксикислоты.

iv. Мышечно-специфические аптамеры

[000257] Мышечно-специфическое средство может являться аптамером, например, РНК-аптамером, предпочтительно нацеленным на мышечные клетки относительно других типов клеток. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический аптамер ранее не охарактеризован или не описан. Эти аптамеры можно конструировать, продуцировать, синтезировать и/или (например, и) дериватизировать любым из нескольких способов, например, посредством систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением. Примеры способов описаны в этой области и включены посредством ссылки (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). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический аптамер описан ранее (см., например, 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). Примеры мышечно-специфических аптамеров включают РНК-аптамер A01B и РНК-аптамер 14. В некоторых вариантах осуществления аптамер является аптамером на основе нуклеиновой кислоты, олигонуклеотидным аптамером или пептидным аптамером. В некоторых вариантах осуществления аптамер может иметь размер приблизительно 5-15 кДа, приблизительно 5-10 кДа, приблизительно 10-15 кДа, приблизительно 1-5 кДа, приблизительно 1-3 кДа или менее.

v. Другие мышечно-специфические средства

[000258] Одной из стратегий таргетинга мышечных клеток (например, скелетно-мышечных клеток) является использование субстрата мышечного белка-транспортера, такого как белок-транспортер, экспрессирующийся на сарколемме. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом инфлюкс-транспортера, специфического для мышечной ткани. В некоторых вариантах осуществления инфлюкс-транспортер является специфическим для скелетно-мышечной ткани. На скелетно-мышечной сарколемме экспрессируются два основных класса транспортеров, (1) суперсемейство аденозинтрифосфат (АТФ)-связывающей кассеты (ABC), облегчающее эффлюкс из скелетно-мышечной ткани, и (2) суперсемейство переносчиков растворенных веществ (SLC), которые могут облегчать инфлюкс субстратов в скелетную мышцу. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом, связывающимся с суперсемейством транспортеров ABC или суперсемейством транспортеров SLC. В некоторых вариантах осуществления субстрат, связывающийся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC, является природным субстратом. В некоторых вариантах осуществления субстрат, связывающийся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC, является неприродным субстратом, например, синтетическим производным, связывающимся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC.

[000259] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом суперсемейства транспортеров SLC. Транспортеры SLC являются равновесными или используют градиент протонов или ионов натрия, создаваемый в мембране для регуляции транспорта субстратов. Неограничивающие примеры транспортеров SLC, имеющих высокую экспрессию в скелетных мышцах, включают транспортер SAT1 (ASCT1; SLC1A4), транспортер GLUT4 (SLC2A4), транспортер GLUT7 (GLUT7; SLC2A7), транспортер ATRC2 (CAT-2; SLC7A2), транспортер LAT3 (KIAA0245; SLC7A6), транспортер PHT1 (PTR4; SLC15A4), транспортер OATP-J (OATP5A1; SLC21A15), транспортер OCT3 (EMT; SLC22A3), транспортер OCTN2 (FLJ46769; SLC22A5), транспортер ENT (ENT1; SLC29A1 и ENT2; SLC29A2), транспортер PAT2 (SLC36A2) и транспортер SAT2 (KIAA1382; SLC38A2). Эти транспортеры могут облегчать инфлюкс субстратов в скелетную мышцу, что дает возможность таргетинга мышц.

[000260] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом равновесного транспортера нуклеозидов 2 (ENT2). По сравнению с другими транспортерами, ENT2 имеет один из наиболее высоких уровней экспрессии мРНК

в скелетных мышцах. Хотя ENT2 человека (hENT2) экспрессируется в большинстве органов тела, таких как головной мозг, сердце, плацента, тимус, поджелудочная железа, предстательная железа и почки, он особенно высок в скелетных мышцах. ENT2 человека облегчает захват его субстратов в зависимости от их градиента концентрации. ENT2 играет роль в поддержании гомеостаза нуклеозидов посредством транспорта широкого спектра пуриновых и пиримидиновых нуклеиновых оснований. Транспортёр hENT2 имеет низкую аффинность для всех нуклеозидов (аденозина, гуанозина, уридина, тимидина и цитидина), за исключением инозина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом ENT2. Неограничивающие примеры субстратов ENT2 включают инозин, 2',3'-дидезоксиинозин и клофарабин. В некоторых вариантах осуществления любые из мышечно-специфических средств, представленных в настоящем описании, связаны с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидной нагрузкой). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство нековалентно связано с молекулярной нагрузкой.

[000261] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом транспортера органического катиона/карнитина (OCTN2), являющегося натрий-зависимым, высокоаффинным транспортером карнитина. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является карнитином, милдронатом, ацетилкарнитином или любым их производным, связывающимся с OCTN2. В некоторых вариантах осуществления карнитин, милдронат, ацетилкарнитин или их производное ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидной нагрузкой).

[000262] Мышечно-специфическое средство может являться белком, существующим в по меньшей мере одной растворимой форме, нацеленной на мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический белок может являться гемоювелином (также известным как отталкивающая молекула наведения С или белок гемохроматоза типа 2), белком, вовлеченным в перегрузку железом и гомеостаз. В некоторых вариантах осуществления гемоювелин может являться полноразмерным белком, или фрагментом, или мутантом с по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении функционального белка гемоювелина. В некоторых вариантах осуществления мутант гемоювелина может являться растворимым фрагментом, в нем может отсутствовать N-концевая сигнальная последовательность и/или (например, и) С-концевой якорный домен. В некоторых вариантах осуществления гемоювелин может быть аннотирован под регистрационными номерами GenBank RefSeq NM_001316767.1, NM_145277.4, NM_202004.3, NM_213652.3 или NM_213653.3. Следует понимать, что гемоювелин может принадлежать человеку, не являющемуся человеком примату или грызуну.

В. Молекулярная нагрузка

[000263] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к молекулярной нагрузке, например, для модуляции биологического исхода, например, транскрипции последовательности ДНК, экспрессии белка или активности белка. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка связана или иначе ассоциирована с мышечно-специфическим средством. В некоторых вариантах осуществления такая молекулярная нагрузка может подвергаться таргетингу к мышечной клетке, например, посредством специфического связывания с нуклеиновой кислотой или белком в мышечной клетке после доставки в мышечную клетку с помощью ассоциированного мышечно-специфического средства. Следует понимать, что в изобретении можно использовать различные типы мышечно-специфических средств. Например, молекулярная нагрузка может содержать или состоять из олигонуклеотида (например, антисмыслового олигонуклеотида), пептида (например, пептида, связывающегося с нуклеиновой кислотой, или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке), белка (например, белка, связывающегося с нуклеиновой кислотой, или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке) или низкомолекулярного соединения (например, низкомолекулярного соединения, модулирующего функцию нуклеиновой кислоты или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим цепь, имеющую область комплементарности DUX4. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является ДНК-ловушкой, например, нуклеиновой кислоты DUX4. Примеры молекулярной нагрузки подробно представлены в настоящем описании, однако, следует понимать, что примеры молекулярной нагрузки, представленные в настоящем описании, не предназначены для ограничения.

i. Олигонуклеотиды

[000264] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любой подходящий олигонуклеотид, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать так, чтобы вызывать деградацию мРНК (например, олигонуклеотид может являться гэпмером, миРНК, рибозимом или аптамером, вызывающим деградацию). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать для блокирования трансляции мРНК (например, олигонуклеотид может являться миксмером, миРНК или аптамером, блокирующим трансляцию). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать так, чтобы он вызывал деградацию и блокировал трансляцию мРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться гидовой нуклеиновой кислотой (например, гидовой РНК) для направления активности фермента (например, фермента редактирования генома). Другие примеры олигонуклеотидов представлены в настоящем описании. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды в одном формате (например, антисмысловые олигонуклеотиды) можно соответствующим образом адаптировать под другой формат (например, олигонуклеотиды миРНК) посредством встраивания функциональных

последовательностей (например, последовательностей антисмысловой цепи) из одного формата в другой формат.

[000265] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любой подходящий олигонуклеотид, как представлено в настоящем описании. Примеры олигонуклеотидов, которые можно использовать для таргетинга DUX4 приведены в патенте США № 9988628, опубликованном 2 февраля 2017 года, названном "AGENTS USEFUL IN TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY"; патенте США № 9469851, опубликованном 30 октября 2014 года, названном "RECOMBINANT VIRUS PRODUCTS AND METHODS FOR INHIBITING EXPRESSION OF DUX4"; публикации патентной заявки США № 20120225034, опубликованной 6 сентября 2012 года, названной "AGENTS USEFUL IN TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY"; публикации патентной заявки PCT № WO 2013/120038, опубликованной 15 августа 2013 года, названной "MORPHOLINO TARGETING DUX4 FOR TREATING FSHD"; Chen et al., "Morpholino-mediated Knockdown of DUX4 Toward Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Therapeutics," *Molecular Therapy*, 2016, 24:8, 1405-1411; и Anseau et al., "Antisense Oligonucleotides Used to Target the DUX4 mRNA as Therapeutic Approaches in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD)," *Genes*, 2017, 8, 93; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является антисмысловым олигонуклеотидом, морфолинонуклеотидом, миРНК, shRNA или другим олигонуклеотидом, гибридизующимся с целевым геном или мРНК DUX4.

[000266] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности в отношении последовательности приведенной как: DUX4 человека, соответствующий последовательности NCBI NM_001293798.1 (SEQ ID NO: 147), NM_001293798.2 (SEQ ID NO: 157) и/или (например, и) NM_001306068.3 (SEQ ID NO: 158), как указано ниже, и/или (например, и) DUX4 мыши, соответствующий последовательности NCBI NM_001081954.1 (SEQ ID NO: 148), как указано ниже. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности гипометилированному, затрудненному повтору D4Z4, как описано в Daxinger, et al., "Genetic and Epigenetic Contributors to FSHD," опубликованной в *Curr Opin Genet Dev* в 2015, Lim J-W, et al., DICER/AGO-dependent epigenetic silencing of D4Z4 repeats enhanced by exogenous siRNA suggests mechanisms and therapies for FSHD *Hum Mol Genet.* 2015 Sep 1; 24(17): 4817-4828, содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000267] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности последовательности, приведенной далее, являющейся примером последовательности гена DUX4 человека (NM_001293798.1) (SEQ ID NO: 147): ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCCCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAGG ACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGCT TTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCCATC

GGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTACGCCAGCT
 GAGGCAGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGGCCCGCCAGAA
 GGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCGAGC
 CTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAGAGA
 CGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGGCCAGGCAC
 CCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAGCGCGGCCCC
 CGGCGGGGGTACCCCTGCTCCCTCGTGGGTGCGCTTCGCCACACCGGCGCGTGGGG
 AACGGGGCTTCCCGCACCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAGGGGG
 CTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCGCGCTGCAGCCCAGCCAGGCCGCG
 CCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTGCGCTACGCCGC
 CCCGGCTCCTCCGACGGGGCGCTCTCCACCCCTCAGGCTCCTCGGTGGCCTCCGCA
 CCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGGCCCT
 GCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCGCTCAAGCGGGGCGCGCAGGGCCAAGGGGTGCTT
 GCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCCAGGT
 CGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCCCGCGC
 CCCCCGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGGCGCCC
 TCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTG
 GATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAAC
 GGAGGCCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCTCGCTGGAAGCACCCC
 TCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAG

[000268] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности последовательности, приведенной далее, являющейся примером последовательности гена DUX4 человека (NM_001293798.2) (SEQ ID NO: 157):

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCCCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGAC
 GAGGACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCC
 TGCTTTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGC
 CATCGGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTACGCC
 AGCTGAGGCAGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGGCCCGCCA
 GAAGGCCGCGCAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCG
 AGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAG
 AGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGG
 CACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAGCGCGG
 CCCCCGGCGGGGGTACCCCTGCTCCCTCGTGGGTGCGCTTCGCCACACCGGCGCGT
 GGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAG
 GGGGCTTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCGCGCTGCAGCCCAGCCAGGC
 CGCGCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTGCGCTACG
 CCGCCCCGGCTCCTCCGACGGGGCGCTCTCCACCCCTCAGGCTCCTCGCTGGCCTC
 CGCACCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGG
 CCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCGCTCAAGCGGGGCGCGCAGGGCCAAGGGG
 TGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCC

CAGGTCGCCGGGGCGGCGTGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCC
 CGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGG
 CGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGC
 TGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAG
 AAACGGAGGCCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCCTCGCTGGAAGC
 ACCCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGT
 CTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAGAACTGCCATTCTTTCTGGGCATCC
 CGGGGATCCCAGAGCCGGCCAGGTACCAGCAGACCTGCGCGCAGTGCGCACCCCG
 GCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTCTTCCGTGAAATTCT
 GGCTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTA
 CATCTCCTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTAAAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCT
 ATAG.

[000269] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности последовательности, приведенной далее, являющейся примером последовательности гена DUX4 человека (NM_001306068.3) (SEQ ID NO: 158):

[000270]

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAGG
 ACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGCT
 TTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCCATC
 GGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCCAGCT
 GAGGCAGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGGGCCCGCCAGAA
 GGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCGAGC
 CTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAGAGA
 CGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGGCAC
 CCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAGCGCGGGCCCC
 CGGCGGGGGTCAACCCTGCTCCCTCGTGGGTGCCTTCGCCCACACCGGCGCGTGGGG
 AACGGGGCTTCCCGCACCCACAGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAGGGGG
 CTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCGCGCTGCAGCCCAGCCAGGCCGCG
 CCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTGCCTACGCCGC
 CCCGGCTCCTCCGACGGGGCGCTCTCCACCCCTCAGGCTCCTCGGTGGCCTCCGCA
 CCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGGCCCCCT
 GCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCCGCTCAAGCGGGGCGCAGGGCCAAGGGGTGCTT
 GCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCCAGGT
 CGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCCCGCGC
 CCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTG
 GATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAAC
 GGAGGCCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCCTCGCTGGAAGCACCCC
 TCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGTTGGGA
 CGGGGTGCGGTGGTTCGGGGCAGGGCGGTGGCCTCTCTTTCGCGGGGAACACCTGG

CTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCCGCCCCCTCCACCGGGCTGACCGGCCTGG
GATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCCGGTGAGAGACTCCACTCCGCGGAGAACTGCC
TTTCTTTCTGGGCATCCCGGGGATCCAGAGCCGGCCAGGTACCAGCAGACCTGC
GCGCAGTGCGCACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTT
GTTCTTCCGTGAAATTCTGGCTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCA
AACCTGGATTAGAGTTACATCTCCTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTAATAATGCC
CCCTCCCTGTGGATCCTATAG. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды
могут иметь область комплементарности последовательности, приведенной далее,
являющейся примером последовательности гена DUX4 мыши (SEQ ID NO: 148)
(NM_001081954.1):

ATGGCAGAAGCTGGCAGCCCTGTTGGTGGCAGTGGTGTGGCACGGGAATCCCGGGCG
GCGCAGGAAGACGGTTTGGCAGGCCTGGCAAGAGCAGGCCCTGCTATCAACTTTCA
AGAAGAAGAGATACCTGAGCTTCAAGGAGAGGAAGGAGCTGGCCAAGCGAATGGG
GGTCTCAGATTGCCGCATCCGCGTGTGGTTTCAGAACCGCAGGAATCGCAGTGGAG
AGGAGGGGGCATGCCTCAAAGAGGTCCATCAGAGGCTCCAGGCGGCTAGCCTCGCCA
CAGCTCCAGGAAGAGCTTGGATCCAGGCCACAGGGTAGAGGCATGCGCTCATCTGG
CAGAAGGCCTCGCACTCGACTCACCTCGCTACAGCTCAGGATCCTAGGGCAAGCCTT
TGAGAGGAACCCACGACCAGGCTTTGCTACCAGGGAGGAGCTGGCGCGTGACACAG
GGTTGCCCCGAGGACACGATCCACATATGGTTTCAAACCGAAGAGCTCGGCGGGCGC
CACAGGAGGGGCAGGCCACAGCTCAAGATCAAGACTTGCTGGCGTCACAAGGGTC
GGATGGGGCCCCCTGCAGGTCCGGAAGGCAGAGAGCGTGAAGGTGCCAGGAGAAC
TTGTTGCCACAGGAAGAAGCAGGAAGTACGGGCATGGATACCTCGAGCCCTAGCGA
CTTGCCCTCCTTCTGCGGAGAGTCCCAGCCTTTCCAAGTGGCACAGCCCCGTGGAGC
AGGCCAACAAAGAGGCCCCCACTCGAGCAGGCAACGCAGGCTCTCTGGAACCCCTCC
TTGATCAGCTGCTGGATGAAGTCCAAGTAGAAGAGCCTGCTCCAGCCCCTCTGAATT
TGGATGGAGACCCTGGTGGCAGGGTGCATGAAGGTTCCCAGGAGAGCTTTTGGCCA
CAGGAAGAAGCAGGAAGTACAGGCATGGATACTTCTAGCCCCAGCGACTCAAACCTC
CTTCTGCAGAGAGTCCCAGCCTTCCCAAGTGGCACAGCCCTGTGGAGCGGGCCAAG
AAGATGCCCCGCACTCAAGCAGACAGCACAGGCCCTCTGGAACCTCCTCCTTGATC
AACTGCTGGACGAAGTCCAAAAGGAAGAGCATGTGCCAGTCCCACTGGATTGGGGT
AGAAATCCTGGCAGCAGGGAGCATGAAGGTTCCAGGACAGCTTACTGCCCCTGGA
GGAAGCAGTAAATTCGGGCATGGATACCTCGATCCCTAGCATCTGGCCAACCTTCTG
CAGAGAATCCCAGCCTCCCCAAGTGGCACAGCCCTCTGGACCAGGCCAAGCACAGG
CCCCCACTCAAGGTGGGAACACGGACCCCTGGAGCTCTTCCTCTATCAACTGTTGG
ATGAAGTCCAAGTAGAAGAGCATGCTCCAGCCCCTCTGAATTGGGATGTAGATCCT
GGTGGCAGGGTGCATGAAGGTTCTGTTGGGAGAGCTTTTGGCCACAGGAAGAAGCAGG
AAGTACAGGCCTGGATACTTCAAGCCCCAGCGACTCAAACCTCCTTCTTCAGAGAGTC
CAAGCCTTCCCAAGTGGCACAGCGCCGTGGAGCGGGCCAAGAAGATGCCCCGCACTC
AAGCAGACAGCACAGGCCCTCTGGAACCTCCTCCTTTGATCAACTGCTGGACGAAG
TCCAAAAGGAAGAGCATGTGCCAGCCCCACTGGATTGGGGTAGAAATCCTGGCAGC

ATGGAGCATGAAGGTTCCCAGGACAGCTTACTGCCCCTGGAGGAAGCAGCAAATTC
GGGCAGGGATACCTCGATCCCTAGCATCTGGCCAGCCTTCTGCAGAAAATCCCAGCC
TCCCCAAGTGGCACAGCCCTCTGGACCAGGCCAAGCACAGGCCCCCATTC AAGGTG
GGAACACGGACCCCCTGGAGCTCTTCCTTGATCAACTGCTGACCGAAGTCCAACCTTG
AGGAGCAGGGGGCCTGCCCCTGTGAATGTGGAGGAAACATGGGAGCAAATGGACAC
AACACCTATCTGCCTCTCACTTCAGAAGAATATCAGACTCTTCTAGATATGCTCTGA.

[000271] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности последовательностям гена DUX4 множества биологических видов, например, выбранных из человека, мыши и не являющихся человеком видов.

[000272] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, нацеленный на DUX4, является последовательностью FM10. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, нацеленный на DUX4, является фосфоамидатной морфолиновой версией последовательности FM10. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, нацеленный на DUX4, содержит последовательность GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT (SEQ ID NO: 151). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, нацеленный на DUX4, содержит последовательность, комплементарную по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам AGTTCAGAGATATATTAATAATGCCC (SEQ ID NO: 150).

[000273] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфические убиквитинлигазы E3 гиперэкспрессированы при FSHD и функционируют при мышечной атрофии (см., например, Vanderplanck, C. et al. "The FSHD Atrophic Myotube Phenotype Is Caused by DUX4 Expression" PLoS One 6,10:e26820, 2011). В некоторых вариантах осуществления отрицательная регуляция этих лигаз представляет собой перспективную терапевтическую стратегию. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть нацелен, например, может ингибировать экспрессию, на мышечно-специфическую убиквитинлигазу E3, вносящую вклад в FSHD, такую как MuRF1 (также известную как TRIM63) и MAFbx (также известную как Fbx032). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности по меньшей мере одной последовательности гена MuRF1, например, MuRF1 человека (NCBI Gene ID 84676). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности по меньшей мере одной последовательности гена MAFbx, например, MAFbx человека (NCBI Gene ID 114907).

[000274] В некоторых вариантах осуществления любой из олигонуклеотидов может находиться в форме соли, например, соли натрия, калия или магния.

[000275] В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'- нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 10 и таблице 16), конъюгирован с аминогруппой, необязательно, через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит алифатический остаток. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит остаток полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления

фосфодиэфирная связь находится между спейсером и 5'- или 3'-нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'-нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любых из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 10 и таблице 16), конъюгирован со спейсером, являющимся замещенным или незамещенным алифатическим, замещенным или незамещенным гетероалифатическим, замещенным или незамещенным карбоциклиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным ариленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, -O-, -N(R^A)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, -NR^AC(=O)-, -NR^AC(=O)R^A-, -C(=O)R^A-, -NR^AC(=O)O-, -NR^AC(=O)N(R^A)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R^A)-, -S(O)₂NR^A-, -NR^AS(O)₂- или их комбинацией; каждый R^A независимо представляет собой атом водорода или замещенный или незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления спейсер является замещенным или незамещенным алкиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, -O-, -N(R^A)-, или -C(=O)N(R^A)₂ или их комбинацией.

[000276] В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'-нуклеозид любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 10 и таблице 16), конъюгирован с соединением формулы -NH₂-(CH₂)_n-, где n является целым числом от 1 до 12. В некоторых вариантах осуществления n составляет 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфирная связь находится между соединением формулы NH₂-(CH₂)_n- и 5'- или 3'-нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы NH₂-(CH₂)₆- конъюгировано с олигонуклеотидом посредством реакции между 6-амино-1-гексанолом (NH₂-(CH₂)₆-OH) и 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000277] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгированы со специфическим средством, например, мышечно-специфическое средство, таким как антитело против TfR, например, через аминокгруппу.

а. Размер/последовательность олигонуклеотида

[000278] Олигонуклеотиды могут иметь разную длину, например, в зависимости от формата. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 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 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину от 8 до 50 нуклеотидов, от 8 до 40 нуклеотидов, от 8 до 30 нуклеотидов, от 10 до 15 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов, от 15 до 25 нуклеотидов, от 21 до 23 нуклеотидов и т.д.

[000279] В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность нуклеиновой кислоты олигонуклеотида для целей по настоящему изобретению может специфически гибридизоваться или является специфической для целевой нуклеиновой кислоты, когда связывание последовательности с молекулой-мишенью (например, мРНК) препятствует нормальной функции мишени (например,

мРНК), вызывая потерю активности (например, ингибирование трансляции) или экспрессии (например, деградацию мРНК-мишени), и существует достаточная степень комплементарности во избежание неспецифического связывания последовательности с нецелевыми последовательностями в условиях, в которых избегание неспецифического связывания является желательным, например, в физиологических условиях в случае анализа *in vivo* или терапевтического лечения, и в случае анализов *in vitro* в условиях, в которых анализы осуществляют в подходящих условиях строгости. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% комплементарным последовательным нуклеотидам целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления комплементарная нуклеотидная последовательность может не являться на 100% комплементарной последовательности своей мишени, чтобы иметь возможность специфически гибридизоваться или являться специфической целевой нуклеиновой кислоты.

[000281] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой нуклеиновой кислоте, имеющую длину в диапазоне от 8 до 15, от 8 до 30, от 8 до 40, или от 10 до 50, или от 5 до 50, или от 5 до 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида целевой нуклеиновой кислоте имеет длину 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 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности является комплементарной по меньшей мере 8 последовательным нуклеотидам целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать 1, 2 или 3 неправильно спаренных оснований по сравнению с частью последовательных нуклеотидов целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать до 3 неправильно спаренных оснований на 15 оснований или до 2 неправильно спаренных оснований на 10 оснований.

[000281] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является комплементарным (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) целевой последовательности любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления такая целевая последовательность является на 100% комплементарной олигонуклеотиду, представленному в настоящем описании.

[000282] В некоторых вариантах осуществления любое одно или более тиминовых оснований (Т) в любом из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, необязательно, могут являться урациловыми основаниями (U), и/или любое одно или более из U, необязательно, могут являться Т.

в. Модификации олигонуклеотидов:

[000283] Олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, могут являться модифицированными, например, содержать модифицированный сахар, модифицированную межнуклеозидную связь, модифицированный нуклеотид и/или (например, и) их комбинации. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут проявлять одно или более из следующих свойств: не опосредуют альтернативный сплайсинг; не являются иммуностимуляторными; являются резистентными к нуклеазам; имеют улучшенный клеточный захват по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами; не являются токсичными для клеток или млекопитающих; имеют улучшенный эндосомальный выход внутрь клетки; минимизируют стимуляцию TLR или избегают рецепторов распознавания паттернов. Любые из модифицированных химических составов или форматов олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, можно комбинировать друг с другом. Например, в один олигонуклеотид можно включать один, два, три, четыре, пять или более различных типов модификаций.

[000284] В некоторых вариантах осуществления можно использовать некоторые модификации нуклеотидов, которые делают олигонуклеотид, в который их вносят, более резистентными к расщеплению нуклеазами, чем нативные молекулы олигодезоксинуклеотидов или олигорибонуклеотидов; эти модифицированные олигонуклеотиды остаются интактными в течение большего периода времени, чем немодифицированные олигонуклеотиды. Конкретные примеры модифицированных олигонуклеотидов включают олигонуклеотиды, содержащие модифицированные остовы, например, модифицированные межнуклеозидные связи, такие как фосфотиоаты, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные связи между сахарами или короткоцепочечные гетероатомные или гетероциклические связи между сахарами. Таким образом, олигонуклеотиды по изобретению можно стабилизировать против нуклеолитической дегградации, например, посредством включения модификации, например, модификации нуклеотида.

[000285] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь длину до 50 или до 100 нуклеотидов, где от 2 до 10, от 2 до 15, от 2 до 16, от 2 до 17, от 2 до 18, от 2 до 19, от 2 до 20, от 2 до 25, от 2 до 30, от 2 до 40, от 2 до 45 или более нуклеотидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами. Олигонуклеотид может иметь длину от 8 до 30 нуклеотидов, где от 2 до 10, от 2 до 15, от 2 до 16, от 2 до 17, от 2 до 18, от 2 до 19, от 2 до 20, от 2 до 25, от 2 до 30 нуклеотидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами. Олигонуклеотид может иметь длину от 8 до 15 нуклеотидов, где от 2 до 4, от 2 до 5, от 2 до 6, от 2 до 7, от 2 до 8, от 2 до 9, от 2 до 10, от 2 до 11, от 2 до 12, от 2 до 13, от 2 до 14 нуклеотидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами. Необязательно, олигонуклеотиды могут содержать все нуклеотиды в модифицированном виде, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Модификации олигонуклеотидов представлены в настоящем описании.

с. Модифицированные нуклеозиды

[0001] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, содержит по меньшей мере один нуклеозид, модифицированный в 2'-положении сахара. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления все нуклеозиды в олигонуклеотиде являются 2'-модифицированными нуклеозидами.

[0002] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, содержит один или более небикалических 2'-модифицированных нуклеозидов, например, 2'-дезоксид, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE), или 2'-О-N-метилацетамидо (2'-O-NMA) модифицированных нуклеозидов.

[0003] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, содержит один или более 2'-4'-бикалических нуклеозидов, в которых кольцо рибозы содержит мостиковый остаток, соединяющий два атома в кольце, например, соединяющий атом 2'-О с атомом 4'-С через метиленовый мостик (ЗНК), этиленовый мостик (ЕНА) или (S)-затрудненный этил (сEt). Примеры ЗНК описаны в публикации международной патентной заявки № WO/2008/043753, опубликованной 17 апреля 2008 года и названной "*RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9*", содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Примеры ЕНА приведены в международной патентной публикации № WO 2005/042777, опубликованной 12 мая 2005 года и названной "*APP/ENA Antisense*"; Morita et al., *Nucleic Acid Res.*, Suppl 1:241-242, 2001; Surono et al., *Hum. Gene Ther.*, 15:749-757, 2004; Koizumi, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 8:144-149, 2006 и Horie et al., *Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf)*, 49:171-172, 2005; описания которых включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Примеры сEt приведены в патентах США №№ 7101993; 7399845 и 7569686, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[0004] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит модифицированный нуклеозид, описанный в одном из следующих патентов США или публикациях патентных заявок: патенте США 7399845, выданном 15 июля 2008 года и названном "*6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs*"; патенте США № 7741457, выданном 22 июня 2010 года и названном "*6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs*"; патенте США № 8022193, выданном 20 сентября 2011 года и названном "*6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs*"; патенте США № 7569686, выданном 4 августа 2009 года и названном "*Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs*"; патенте США № 7335765, выданном 26 февраля 2008 года и названном "*Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues*"; патенте США № 7314923, выданном 1 января 2008 года и названном "*Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues*"; патенте США № 7816333, выданном 19 октября 2010 года и названном "*Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same*" и

патентной публикации США № 2011/0009471, теперь патент США № 8957201, выданный 17 февраля 2015 года и названный "*Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same*", содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

[0005] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеозид, приводящий к повышению T_m олигонуклеотида в диапазоне 1°C, 2°C, 3°C, 4°C или 5°C по сравнению с олигонуклеотидом, неимеющим по меньшей мере один модифицированный нуклеозид. Олигонуклеотид может содержать множество модифицированных нуклеозидов, что приводит к общему повышению T_m олигонуклеотида в диапазоне 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 или более по сравнению с олигонуклеотидом, не содержащим модифицированный нуклеозид.

[0006] Олигонуклеотид может содержать смесь нуклеозидов разных типов. Например, олигонуклеотид может содержать смесь 2'-дезоксирибонуклеозидов или рибонуклеозидов и 2'-фтор модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь дезоксирибонуклеозидов или рибонуклеозидов и 2'-О-Ме-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь 2'-фтор-модифицированных нуклеозидов и 2'-О-Ме-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь 2'-4'-бициклических нуклеозидов и 2'-МОЕ, 2'-фтор, или 2'-О-Ме модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ЕНА, сEt).

[0007] Олигонуклеотид может содержать чередующиеся нуклеозиды разных типов. Например, олигонуклеотид может содержать чередующиеся 2'-дезоксирибонуклеозиды или рибонуклеозиды и 2'-фтор-модифицированные нуклеозиды. олигонуклеотид может содержать чередующиеся дезоксирибонуклеозиды или рибонуклеозиды и 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся 2'-фтор-модифицированные нуклеозиды и 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся 2'-4'-бициклические нуклеозиды и 2'-МОЕ, 2'-фтор, или 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся небициклические 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ЕНА, сEt).

[0008] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, содержит 5'-винилфосфонатную модификацию, один или более абазических остатков и/или один или более инвертированных абазических остатков.

d. Межнуклеозидные связи/остовы

[0009] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать фосфотиоатную или другую модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные межнуклеозидные

связи. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между по меньшей мере двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеотидами. Например, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат модифицированные межнуклеозидные связи в первой, второй и/или (например, и) третьей межнуклеозидной связи на 5'- или 3'-конце нуклеотидной последовательности.

[00010] Фосфорсодержащие связи, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоксилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, содержащие 3'-аминофосфорамидат и аминоксилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры и боронофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, их 2'-5'-связанные аналоги и соединения, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных единиц связаны от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'; см. патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

[00011] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут содержать гетероатомные остовы, такие как метилен(метилямино)-остовы или MMI-остовы; амидные остовы (см. De Mesmaeker et al. *Ace. Chem. Res.* 1995, 28:366-374); морфолиновые остовы (см. Summerton and Weller, патент США № 5034506); или остовы из пептид-нуклеиновой кислоты (ПНК) (где фосфодиэфирный остов олигонуклеотида заменяют полиамидным остовом, где нуклеотиды связаны прямо или косвенно с атомами азота аза-групп полиамидного остова, см. Nielsen et al., *Science* 1991, 254, 1497).

е. Стереоспецифические олигонуклеотиды

[000286] В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные атомы фосфора олигонуклеотидов являются хиральными, и свойства олигонуклеотидов корректируют с учетом конфигурации хиральных атомов фосфора. В некоторых вариантах осуществления можно использовать соответствующие способы для синтеза Р-хиральных аналогов олигонуклеотидов стереоконтролируемым образом (например, как описано в Oka N, Wada T, "Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms", *Chem Soc Rev.* 2011 Dec; 40(12):5829-43). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фосфотиоат-содержащим олигонуклеотидам, содержащим нуклеозидные единицы, соединенные с помощью, по существу, полностью Sp-связей между сахарами или, по существу, полностью Rp-связей между сахарами. В некоторых вариантах осуществления такие фосфотиоатные олигонуклеотиды, имеющие, по существу, хирально чистые связи между сахарами, получают посредством ферментативного или химического синтеза, как описано, например,

в патенте США № 5587261, опубликованном 12 декабря 1996 года, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления хиральноконтролируемые олигонуклеотиды представляют собой паттерны селективного расщепления целевой нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления хиральноконтролируемый олигонуклеотид обеспечивает расщепление по одному участку в комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, как описано, например, в публикации патентной заявки США № 2017/0037399 A1, опубликованной 2 февраля 2017 года, названной "CHIRAL DESIGN", содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

f. Морфолиновые олигонуклеотиды

[000287] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может представлять собой морфолиновые соединения. Морфолиновые олигомерные соединения описаны в Dwaine 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 и патенте США № 5034506, опубликованном 23 июля 1991 года. В некоторых вариантах осуществления морфолиновое олигомерное соединение является фосфоамидачным морфолиновым олигомером (PMO) (например, как описано в Iverson, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3:235-238, 2001; и Wang et al., *J. Gene Med.*, 12:354-364, 2010; содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме).

g. Пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК)

[000288] В некоторых вариантах осуществления сахар и межнуклеозидная связь (остов) нуклеотидных единиц олигонуклеотида заменяют новыми группами. В некоторых вариантах осуществления сохраняют основания для гибридизации с соответствующей целевой нуклеиновой кислотой. Один из таких олигомерных соединений, олигонуклеотидным миметиком, который, как показано, имеет исключительные свойства гибридизации, обозначают как пептид-нуклеиновая кислота (ПНК). В соединениях ПНК сахарный остов олигонуклеотида заменяют амид-содержащим остовом, например, аминоксилотным остовом. Нуклеиновые основания удерживаются и связываются прямо или косвенно с атомами азота аза-группы амидной части остова. Типичные публикации, в которых описано получение соединений ПНК, включают, посредством неограничивающих примеров, патенты США № 5539082; 5714331 и 5719262, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительное описание соединений ПНК можно найти в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

h. Гэпмеры

[000289] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, является гэпмером. Гэпмерный олигонуклеотид, как правило, имеет формулу 5'-X-Y-Z-3', при этом X и Z являются фланкирующими областями вокруг области пропуска Y. В некоторых вариантах осуществления фланкирующую область X формулы 5'-X-Y-Z-3' также обозначают как область X, фланкирующую последовательность X, 5'-

фланкирующую область X или 5'-фланкирующий сегмент. В некоторых вариантах осуществления фланкирующую область Z формулы 5'-X-Y-Z-3' также обозначают как область Z, фланкирующую последовательность Z, 3'-фланкирующую область Z или 3'-фланкирующий сегмент. В некоторых вариантах осуществления область пропуска Y формулы 5'-X-Y-Z-3' также обозначают как область Y, сегмент Y или сегмент пропуска Y. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в области пропуска Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом, и ни 5'-фланкирующая область X, ни 3'-фланкирующая область Z не содержит какие-либо 2'-дезоксирибонуклеозиды.

[000290] В некоторых вариантах осуществления область Y представляет собой смежный фрагмент нуклеотидов, например, область 6 или более нуклеотидов ДНК, способный рекрутировать РНКазу, такую как РНКазу H. В некоторых вариантах осуществления гэтмер связывается с целевой нуклеиновой кислотой, где рекрутируется РНКазу, а затем может расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления область Y фланкирована по 5' и 3' областями X и Z, содержащими высокоаффинные модифицированные нуклеозиды, например, от одного до шести высокоаффинных модифицированных нуклеозидов. Неограничивающие примеры высокоаффинных модифицированных нуклеозидов включают 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-MOE, 2'-O-Me, 2'-F) или 2'-4'-бициклические нуклеозиды (например, ЗНК, cEt, ENA). В некоторых вариантах осуществления фланкирующие последовательности X и Z могут иметь длину 1-20 нуклеотидов, 1-8 нуклеотидов или 1-5 нуклеотидов. Фланкирующие последовательности X и Z могут иметь схожую длину или разные длины. В некоторых вариантах осуществления сегмент пропуска Y может являться нуклеотидной последовательностью длиной 5-20 нуклеотидов, 5-15 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов.

[000291] В некоторых вариантах осуществления область пропуска гэтмерных олигонуклеотидов может содержать модифицированные нуклеотиды, как известно, подходящие для эффективного действия РНКазы H, в дополнение к нуклеотидам ДНК, таким как C4'-замещенные нуклеотиды, ациклические нуклеотиды и арабино-сконфигурированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления область пропуска содержит одну или более немодифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления одна или обе фланкирующие области независимо содержат одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей (например, фосфотиоатных межнуклеозидных связей или других связей) между по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или более нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления каждая из области пропуска и двух фланкирующих областей независимо содержит модифицированные межнуклеозидные связи (например, фосфотиоатные межнуклеозидные связи или другие связи) между по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или более нуклеотидами.

[000292] Гэпмер можно получать подходящими способами. Типичные патенты США, патентные публикации США и публикации РСТ, в которых описано получение гэпмеров, включают, в качестве неограничивающих примеров, патенты США №№ 5013830; 5149797; 5220007; 5256775; 5366878; 5403711; 5491133; 5565350; 5623065; 5652355; 5652356; 5700922; 5898031; 7015315; 7101993; 7399845; 7432250; 7569686; 7683036; 7750131; 8580756; 9045754; 9428534; 9695418; 10017764; 10260069; 9428534; 8580756; патентные публикации США №№ US20050074801, US20090221685; US20090286969, US20100197762 и US20110112170; публикации РСТ №№ WO2004069991; WO2005023825; WO2008049085 и WO2009090182; и патент EP № EP2149605, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000293] В некоторых вариантах осуществления гэпмер имеет длину 10-40 нуклеозидов. Например, гэпмер может иметь длину 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-40, 15-35, 15-30, 15-25, 15-20, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 25-40, 25-35, 25-30, 30-40, 30-35 или 35-40 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления гэпмер имеет длину 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 или 40 нуклеозидов.

[000294] В некоторых вариантах осуществления область пропуска Y в гэпмере имеет длину 5-20 нуклеозидов. Например, область пропуска Y может иметь длину 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15 или 15-20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область пропуска Y имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в области пропуска Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления все нуклеозиды в области пропуска Y являются 2'-дезоксирибонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в области пропуска Y являются модифицированным нуклеозидом (например, 2'-модифицированным нуклеозидом, таким как представленные в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления один или более цитозинов в области пропуска Y, необязательно, являются 5-метил-цитозинами. В некоторых вариантах осуществления каждый цитозин в области пропуска Y является 5-метил-цитозином.

[000295] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') независимо имеют длину 1-20 нуклеозидов. Например, 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') независимо может иметь длину 1-20, 1-15, 1-10, 1-7, 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 2-7, 3-5, 3-7, 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15 или 15-20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') независимо имеют длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') имеют одинаковую длину. В некоторых вариантах

осуществления 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') имеют разную длину. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') длиннее 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') короче 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3').

[000296] В некоторых вариантах осуществления гпмер содержит 5'-X-Y-Z-3' 5-10-5, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 4-6-4, 3-6-3, 2-6-2, 4-7-4, 3-7-3, 2-7-2, 4-8-4, 3-8-3, 2-8-2, 1-8-1, 2-9-2, 1-9-1, 2-10-2, 1-10-1, 1-12-1, 1-16-1, 2-15-1, 1-15-2, 1-14-3, 3-14-1, 2-14-2, 1-13-4, 4-13-1, 2-13-3, 3-13-2, 1-12-5, 5-12-1, 2-12-4, 4-12-2, 3-12-3, 1-11-6, 6-11-1, 2-11-5, 5-11-2, 3-11-4, 4-11-3, 1-17-1, 2-16-1, 1-16-2, 1-15-3, 3-15-1, 2-15-2, 1-14-4, 4-14-1, 2-14-3, 3-14-2, 1-13-5, 5-13-1, 2-13-4, 4-13-2, 3-13-3, 1-12-6, 6-12-1, 2-12-5, 5-12-2, 3-12-4, 4-12-3, 1-11-7, 7-11-1, 2-11-6, 6-11-2, 3-11-5, 5-11-3, 4-11-4, 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 1-16-3, 1-16-3, 2-16-2, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-3, 3-15-2, 1-14-5, 5-14-1, 2-14-4, 4-14-2, 3-14-3, 1-13-6, 6-13-1, 2-13-5, 5-13-2, 3-13-4, 4-13-3, 1-12-7, 7-12-1, 2-12-6, 6-12-2, 3-12-5, 5-12-3, 1-11-8, 8-11-1, 2-11-7, 7-11-2, 3-11-6, 6-11-3, 4-11-5, 5-11-4, 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 1-16-3, 3-16-1, 2-16-2, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-3, 3-15-2, 1-14-5, 2-14-4, 4-14-2, 3-14-3, 1-13-6, 6-13-1, 2-13-5, 5-13-2, 3-13-4, 4-13-3, 1-12-7, 7-12-1, 2-12-6, 6-12-2, 3-12-5, 5-12-3, 1-11-8, 8-11-1, 2-11-7, 7-11-2, 3-11-6, 6-11-3, 4-11-5, 5-11-4, 1-19-1, 1-18-2, 2-18-1, 1-17-3, 3-17-1, 2-17-2, 1-16-4, 4-16-1, 2-16-3, 3-16-2, 1-15-5, 2-15-4, 4-15-2, 3-15-3, 1-14-6, 6-14-1, 2-14-5, 5-14-2, 3-14-4, 4-14-3, 1-13-7, 7-13-1, 2-13-6, 6-13-2, 3-13-5, 5-13-3, 4-13-4, 1-12-8, 8-12-1, 2-12-7, 7-12-2, 3-12-6, 6-12-3, 4-12-5, 5-12-4, 2-11-8, 8-11-2, 3-11-7, 7-11-3, 4-11-6, 6-11-4, 5-11-5, 1-20-1, 1-19-2, 2-19-1, 1-18-3, 3-18-1, 2-18-2, 1-17-4, 4-17-1, 2-17-3, 3-17-2, 1-16-5, 2-16-4, 4-16-2, 3-16-3, 1-15-6, 6-15-1, 2-15-5, 5-15-2, 3-15-4, 4-15-3, 1-14-7, 7-14-1, 2-14-6, 6-14-2, 3-14-5, 5-14-3, 4-14-4, 1-13-8, 8-13-1, 2-13-7, 7-13-2, 3-13-6, 6-13-3, 4-13-5, 5-13-4, 2-12-8, 8-12-2, 3-12-7, 7-12-3, 4-12-6, 6-12-4, 5-12-5, 3-11-8, 8-11-3, 4-11-7, 7-11-4, 5-11-6, 6-11-5, 1-21-1, 1-20-2, 2-20-1, 1-20-3, 3-19-1, 2-19-2, 1-18-4, 4-18-1, 2-18-3, 3-18-2, 1-17-5, 2-17-4, 4-17-2, 3-17-3, 1-16-6, 6-16-1, 2-16-5, 5-16-2, 3-16-4, 4-16-3, 1-15-7, 7-15-1, 2-15-6, 6-15-2, 3-15-5, 5-15-3, 4-15-4, 1-14-8, 8-14-1, 2-14-7, 7-14-2, 3-14-6, 6-14-3, 4-14-5, 5-14-4, 2-13-8, 8-13-2, 3-13-7, 7-13-3, 4-13-6, 6-13-4, 5-13-5, 1-12-10, 10-12-1, 2-12-9, 9-12-2, 3-12-8, 8-12-3, 4-12-7, 7-12-4, 5-12-6, 6-12-5, 4-11-8, 8-11-4, 5-11-7, 7-11-5, 6-11-6, 1-22-1, 1-21-2, 2-21-1, 1-21-3, 3-20-1, 2-20-2, 1-19-4, 4-19-1, 2-19-3, 3-19-2, 1-18-5, 2-18-4, 4-18-2, 3-18-3, 1-17-6, 6-17-1, 2-17-5, 5-17-2, 3-17-4, 4-17-3, 1-16-7, 7-16-1, 2-16-6, 6-16-2, 3-16-5, 5-16-3, 4-16-4, 1-15-8, 8-15-1, 2-15-7, 7-15-2, 3-15-6, 6-15-3, 4-15-5, 5-15-4, 2-14-8, 8-14-2, 3-14-7, 7-14-3, 4-14-6, 6-14-4, 5-14-5, 3-13-8, 8-13-3, 4-13-7, 7-13-4, 5-13-6, 6-13-5, 4-12-8, 8-12-4, 5-12-7, 7-12-5, 6-12-6, 5-11-8, 8-11-5, 6-11-7 или 7-11-6. Числами указано количество нуклеозидов в областях X, Y и Z в гпмере 5'-X-Y-Z-3'.

[000297] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') или 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются модифицированными нуклеотидами (например, высокоаффинными модифицированными нуклеотидами). В некоторых

вариантах осуществления модифицированный нуклеозид (например, высокоаффинные модифицированные нуклеозиды) является 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом или небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления высокоаффинный модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК, сEt или ENA) или небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE), или 2'-О-N-метилацетидами (2'-O-NMA) нуклеозидом).

[000298] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами, и один или более нуклеозидов в 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом, и каждый нуклеозид в 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом.

[000299] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит те же высокоаффинные нуклеозиды, что и 3'-фланкирующая область гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). Например, 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') могут содержать один или более небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-MOE или 2'-O-Me). В другом примере 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') могут содержать один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является небициклическим 2'-

модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гэтмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующей области гэтмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt).

[000300] В некоторых вариантах осуществления гэтмер содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, и Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X и Z является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтмер содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, и Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X и Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэтмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит иные высокоаффинные нуклеозиды, чем 3'-фланкирующая область гэтмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). Например, 5'-фланкирующая область гэтмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и 3'-фланкирующая область гэтмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В другом примере 3'-фланкирующая область гэтмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и 5'-фланкирующая область гэтмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt).

[000301] В некоторых вариантах осуществления гэтмер содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, и Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), каждый нуклеозид в Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтмер содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, и Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), каждый нуклеозид в Z является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[000302] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэтмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит один или более небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или более 2'-4'-

бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит один или более небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержат один или более небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt).

[000303] В некоторых вариантах осуществления гэтмер содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 2-7 (например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, и Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где по меньшей мере одно, но не все, (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) из положений 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в X (самым близким к 5' положением является положение 1) является небикалическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-бикалическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтмер содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 2-7 (например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, и Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9, или 10) нуклеозидов, где по меньшей мере одно, но не все, (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) из положений 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в Z (самым близким к 5' положением является положение 1) является небикалическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-бикалическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтмер содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 2-7 (например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, и Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где по меньшей мере одно, но не все, (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) из положений 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в X и по меньшей мере одно из положений, но не все, (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) из положений 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в Z (самым близким к 5' положением является положение 1) является небикалическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-бикалическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[000304] Неограничивающие примеры конфигураций гэлмеров со смесью небииклического 2'-модифицированного нуклеозида (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt) в 5'-фланкирующей области гэлмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и/или 3'-фланкирующей области гэлмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') включают: BBB-(D)n-BBBAA; KKK-(D)n-KKKAA; LLL-(D)n-LLLAA; BBB-(D)n-BBBEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBBAA; KKK-(D)n-KKKAA; LLL-(D)n-LLLAA; BBB-(D)n-BBBEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBBAAA; KKK-(D)n-KKKAAA; LLL-(D)n-LLLAAA; BBB-(D)n-BBBEEE; KKK-

(D)n-KKKEEE; LLL-(D)n-LLLEEE; BBB-(D)n-BBBAAA; KKK-(D)n-KKKAAA; LLL-(D)n-LLLAAA; BBB-(D)n-BBBEEE; KKK-(D)n-KKKEEE; LLL-(D)n-LLLEEE; BABA-(D)n-ABAB; KAKA-(D)n-AKAK; LALA-(D)n-ALAL; BEBE-(D)n-EBEB; KEKE-(D)n-EKEK; LELE-(D)n-ELEL; BABA-(D)n-ABAB; KAKA-(D)n-AKAK; LALA-(D)n-ALAL; BEBE-(D)n-EBEB; KEKE-(D)n-EKEK; LELE-(D)n-ELEL; ABAB-(D)n-ABAB; AKAK-(D)n-AKAK; ALAL-(D)n-ALAL; EBEB-(D)n-EBEB; EKEK-(D)n-EKEK; ELEL-(D)n-ELEL; ABAB-(D)n-ABAB; AKAK-(D)n-AKAK; ALAL-(D)n-ALAL; EBEB-(D)n-EBEB; EKEK-(D)n-EKEK; ELEL-(D)n-ELEL; AABB-(D)n-BBAA; BBAA-(D)n-AABB; AAKK-(D)n-KKAA; AALL-(D)n-LLAA; EEBB-(D)n-BBEE; EEKK-(D)n-KKEE; EELL-(D)n-LLEE; AABB-(D)n-BBAA; AAKK-(D)n-KKAA; AALL-(D)n-LLAA; EEBB-(D)n-BBEE; EEKK-(D)n-KKEE; EELL-(D)n-LLEE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE; ABBB-(D)n-BBBA; AKKK-(D)n-KKKA; ALLL-(D)n-LLLA; EBBB-(D)n-BBBE; EKKK-(D)n-KKKE; ELLL-(D)n-LLLE; ABBB-(D)n-BBBA; AKKK-(D)n-KKKA; ALLL-(D)n-LLLA; EBBB-(D)n-BBBE; EKKK-(D)n-KKKE; ELLL-(D)n-LLLE; ABBB-(D)n-BBBAA; AKKK-(D)n-KKKAA; ALLL-(D)n-LLLAA; EBBB-(D)n-BBBEE; EKKK-(D)n-KKKEE; ELLL-(D)n-LLLEE; ABBB-(D)n-BBBAA; AKKK-(D)n-KKKAA; ALLL-(D)n-LLLAA; EBBB-(D)n-BBBEE; EKKK-(D)n-KKKEE; ELLL-(D)n-LLLEE; AABBB-(D)n-BBB; AAKKK-(D)n-KKK; AALLL-(D)n-LLL; EEBBB-(D)n-BBB; EEKKK-(D)n-KKK; EELLL-(D)n-LLL; AABBB-(D)n-BBBA; AAKKK-(D)n-KKKA; AALLL-(D)n-LLLA; EEBBB-(D)n-BBBE; EEKKK-(D)n-KKKE; EELLL-(D)n-LLLE; ABBAABB-(D)n-BB; AKKAAKK-(D)n-KK; ALLAALLL-(D)n-LL; EBBEEBB-(D)n-BB; EKKEEKK-(D)n-KK; ELLEELL-(D)n-LL; ABBAABB-(D)n-BB; AKKAAKK-(D)n-KK; ALLAALL-(D)n-LL; EBBEEBB-(D)n-BB; EKKEEKK-(D)n-KK; ELLEELL-(D)n-LL; ABBABB-(D)n-BBB; AKKAKK-(D)n-KKK; ALLALLL-(D)n-LLL; EBBEBB-(D)n-BBB; EKKEKK-(D)n-KKK; ELLELL-(D)n-LLL; ABBABB-(D)n-BBB; AKKAKK-(D)n-KKK; ALLALL-(D)n-LLL; EBBEBB-(D)n-BBB; EKKEKK-(D)n-KKK; ELLELL-(D)n-LLL; EEEK-(D)n-EEEEEEEEE; EEK-(D)n-EEEEEEEEE; EK-(D)n-EEEEEEEEE; EK-(D)n-EEEEKK; K-(D)n-EEEEKEKE; K-(D)n-EEEEKEKEE; K-(D)n-EEKEK; EK-(D)n-EEEEKEKE; EK-(D)n-EEKEK; EEK-(D)n-KEEKE; EK-(D)n-EEKEK; EK-(D)n-KEEK; EEK-(D)n-EEEEKEK; EK-(D)n-KEEKEE; EK-(D)n-EEKEKE; EK-(D)n-EEEEKEKE; и EK-(D)n-EEEEKEK;. "A" нуклеозиды содержат 2'-модифицированный нуклеозид; "B" представляет собой 2'-4'-бициклический нуклеозид; "K" представляет собой нуклеозид с затрудненным этилом (сEt); "L" представляет собой нуклеозид ЗНК; и "E" представляет собой 2'-МОЕ-модифицированный рибонуклеозид; "D" представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид; "n" представляет собой длину сегмента пропуска (Y в конфигурации 5'-X-Y-Z-3') и является целым числом 1-20.

[000305] В некоторых вариантах осуществления любой из гэпмеров, представленных в настоящем описании, содержит одну или более модифицированных нуклеозидных связей (например, фосфотиоатную связь) в каждой из областей X, Y и Z. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в любом из гэпмеров, представленных в настоящем описании, является фосфотиоатной связью. В некоторых вариантах осуществления каждая из областей X, Y и Z независимо содержит смесь фосфотиоатных связей и фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в области пропуска Y является фосфотиоатной связью, 5'-фланкирующая область X содержит смесь фосфотиоатных связей и фосфодиэфирных связей, и 3'-фланкирующая область Z содержит смесь фосфотиоатных связей и фосфодиэфирных связей.

i. Миксмеры

[000306] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, может являться миксмером или содержать паттерн последовательности миксмера. В основном, миксмеры являются олигонуклеотидами, содержащими природные и неприродные нуклеозиды, или содержат два разных типа неприродных нуклеозидов, как правило, в чередующемся паттерне. Миксмеры, как правило, имеют более высокую аффинность связывания, чем немодифицированные олигонуклеотиды, и их можно использовать для специфического связывания молекулы-мишени, например, для блокирования участка связывания на молекуле-мишени. В основном, миксмеры не рекрутируют РНКазу к молекуле-мишени и, таким образом, не способствуют расщеплению молекулы-мишени. Такие олигонуклеотиды, неспособные рекрутировать РНКазу H, описаны, например, см. WO2007/112754 или WO2007/112753.

[000307] В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит или состоит из повторяющегося паттерна аналогов нуклеозидов и природных нуклеозидов или одного типа аналога нуклеозида и второго типа аналога нуклеозида. Однако миксмер может не содержать повторяющийся паттерн и, вместо этого, может содержать любой порядок модифицированных нуклеозидов и природных нуклеозидов или любой порядок одного типа модифицированного нуклеозида и второго типа модифицированного нуклеозида. Повторяющийся паттерн, например, может представлять собой паттерн, в котором каждый второй или каждый третий нуклеозид является модифицированным нуклеозидом, таким как ЗНК, и остальные нуклеозиды являются природными нуклеозидами, такими как ДНК, или являются 2'-замещенным аналогом нуклеозида, таким как 2'-МОЕ или 2'-фтора-аналоги, или любым другим модифицированным нуклеозидом, представленным в настоящем описании. Установлено, что повторяющийся паттерн модифицированного нуклеозида, такой как единицы ЗНК, можно комбинировать с модифицированным нуклеозидом в фиксированных положениях, например, на 5'- или 3'-концах.

[000308] В некоторых вариантах осуществления миксмер не содержит область из более чем 5, более чем 4, более чем 3 или более чем 2 последовательных природных нуклеотидов, таких как нуклеотиды ДНК. В некоторых вариантах осуществления миксмер

содержит по меньшей мере область, состоящую из по меньшей мере двух последовательных модифицированных нуклеозидов, таких как по меньшей мере две последовательных ЗНК. В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит по меньшей мере область, состоящую из по меньшей мере трех последовательных модифицированных нуклеозидов, таких как по меньшей мере три последовательных ЗНК.

[000309] В некоторых вариантах осуществления миксмер не содержит область из более чем 7, более чем 6, более чем 5, более чем 4, более чем 3 или более чем 2 последовательных аналогов нуклеозидов, таких как ЗНК. В некоторых вариантах осуществления единицы ЗНК можно заменять другими аналогами нуклеозидов, такими как представленные в настоящем описании.

[000310] Миксмеры можно конструировать так, чтобы они содержали смесь повышающих аффинность модифицированных нуклеозидов, таких как, в неограничивающих примерах, нуклеотиды ЗНК и 2'-О-МЕ-нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит модифицированные межнуклеозидные связи (например, фосфотиоатные межнуклеозидные связи или другие связи) между по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или более нуклеозидами.

[000311] Миксмер можно получать любым подходящим способом. Типичные патенты США, патентные публикации США и публикации РСТ, в которых описано получение миксмеров, включают патентные публикации США №№ 2006/0128646, 2009/0209748, 2009/0298916, 2011/0077288 и 2012/0322851 и патенте США № 7687617.

[000312] В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит один или более морфолиновых нуклеозидов. Например, в некоторых вариантах осуществления миксмер может содержать морфолиновые нуклеозиды, смешанные (например, чередующимся образом) с одним или более другими нуклеозидами (например, нуклеотидами ДНК, РНК) или модифицированными нуклеозидами (например, ЗНК, 2'-О-МЕ-нуклеозидами).

[000313] В некоторых вариантах осуществления миксмеры можно использовать для коррекции сплайсинга или пропуска экзонов, например, как описано в 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, содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

j. РНК-интерференция (РНКи)

[000314] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме малых интерферирующих РНК (миРНК), также известных как короткие интерферирующие РНК или РНК сайленсинга. миРНК представляют собой класс двухцепочечных молекул РНК, как правило, длиной приблизительно 20-25 пар оснований, нацеленных на нуклеиновые кислоты (например,

мРНК) для деградации посредством РНК-интерференции (РНКи) в клетках. Специфичность молекул миРНК можно определять посредством связывания антисмысловой цепи молекулы с ее РНК-мишенью. Эффективные молекулы миРНК, как правило, имеют длину менее 30-35 пар оснований для предотвращения запуска неспецифических путей РНК-интерференции в клетке через интерфероновый ответ, хотя более длинная миРНК также может быть эффективной. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК имеют длину 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 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК имеют длину от 8 до 30 пар оснований, от 10 до 15 пар оснований, от 10 до 20 пар оснований, от 15 до 25 пар оснований, от 19 до 21 пар оснований, от 21 до 23 пар оснований.

[000315] После выбора подходящей последовательности РНК-мишени можно конструировать молекулы миРНК, содержащие нуклеотидную последовательность, комплементарную всей последовательности-мишени или ее частью, т.е. антисмысловую последовательность, и получать их соответствующими способами (см., например, публикацию РСТ № WO 2004/016735 и патентные публикации США №№ 2004/0077574 и 2008/0081791). Молекула миРНК может являться двухцепочечной (т.е. молекулой дцРНК, содержащей антисмысловую цепь и комплементарную смысловую цепь, гибридизующиеся с образованием дцРНК) или одноцепочечной (т.е. молекулой ssRNA, содержащей только антисмысловую цепь). Молекулы миРНК могут содержать дуплекс, асимметричный дуплекс, шпилечную или асимметричную шпилечную вторичную структуру, имеющую самокомплементарные смысловые и антисмысловые цепи.

[000316] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК имеет длину 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 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь имеет длину от 8 до 50 нуклеотидов, от 8 до 40 нуклеотидов, от 8 до 30 нуклеотидов, от 10 до 15 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов, от 15 до 25 нуклеотидов, от 19 до 21 нуклеотидов, от 21 до 23 нуклеотидов.

[000317] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК имеет длину 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 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину от 8 до 50 нуклеотидов, от 8 до 40 нуклеотидов, от 8 до 30 нуклеотидов, от 10 до 15 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов, от 15 до 25 нуклеотидов, от 19 до 21 нуклеотидов, от 21 до 23 нуклеотидов.

[000318] В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК содержат антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности целевой области в мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности является на по меньшей мере 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере

99% или 100% комплементарной целевой области в мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления целевая область является областью последовательных нуклеотидов в мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления комплементарная нуклеотидная последовательность может не являться на 100% комплементарной последовательности своей мишени, чтобы специфически гибридизоваться или являться специфической для целевой последовательности РНК.

[000319] В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК содержат антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности целевой последовательности РНК, и область комплементарности имеет длину в диапазоне от 8 до 15, от 8 до 30, от 8 до 40, или от 10 до 50, или от 5 до 50, или от 5 до 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности имеет длину 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 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности является комплементарной в отношении по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25 или более последовательных нуклеотидов целевой последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК содержат нуклеотидную последовательность, содержащую не более 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочно спаренных оснований по сравнению с частью последовательных нуклеотидов целевой последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК содержат нуклеотидную последовательность, содержащую до 3 ошибочно спаренных оснований на 15 оснований или до 2 ошибочно спаренных оснований на 10 оснований.

[000320] В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК содержат антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, являющуюся комплементарной (например, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) целевой последовательности РНК олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК содержат антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичной олигонуклеотидам, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК содержат антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по

меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25 или более последовательных нуклеотидов из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании.

[000321] Двухцепочечная миРНК может содержать смысловую и антисмысловую цепи РНК, имеющие одинаковую или разную длину. Двухцепочечные молекулы миРНК также могут собираться из одного олигонуклеотида в структуре стебель-петля, где самокомплементарные смысловые и антисмысловые области молекулы миРНК соединены линкерами на основе нуклеиновой кислоты или не на основе нуклеиновой кислоты, а также кольцевой одноцепочечной РНК, имеющей две или более петлевые структуры и стебель, содержащий самокомплементарные смысловые и антисмысловые цепи, где кольцевая РНК может процессироваться *in vivo* или *in vitro* с образованием активной молекулы миРНК, способной опосредовать РНКи. Таким образом, Молекулы малой шпилечной РНК (shRNA) также включены в настоящее изобретение. Эти молекулы содержат специфическую антисмысловую последовательность в дополнение к обратной комплементарной (смысловой) последовательности, как правило, отделенной спейсерной или петлевой последовательностью. Расщепление спейсера или петли приводит к образованию одноцепочечной молекулы РНК и ее обратного комплемента, таким образом, что они могут отжигаться с образованием молекулы дцРНК (необязательно, с дополнительными стадиями процессинга, которые могут приводить к добавлению или удалению одного, двух трех или более нуклеотидов с 3'-конца и/или (например, и) 5'-конца одной или обеих цепей). Спейсер может иметь достаточную длину, чтобы позволить антисмысловым и смысловым последовательностям отжигаться и образовывать двухцепочечную структуру (или стебель) перед расщеплением спейсера (и, необязательно, дальнейшими стадиями процессинга, которые могут приводить к добавлению или удалению одного, двух, трех, четырех или более нуклеотидов с 3'-конца и/или (например, и) 5'-конца одной или обеих цепей). Спейсерная последовательность может являться неродственной нуклеотидной последовательностью, размещенной между двумя комплементарными областями нуклеотидной последовательности, которые при отжиге в двухцепочечную нуклеиновую кислоту содержат shRNA.

[000322] Общая длина молекул миРНК может варьироваться от приблизительно 14 до приблизительно 100 нуклеотидов в зависимости от типа конструируемой молекулы миРНК. Как правило, от приблизительно 14 до приблизительно 50 из этих нуклеотидов являются комплементарными последовательности РНК-мишени, т.е. составляют специфическую антисмысловую последовательность молекулы миРНК. Например, если миРНК является двух- или одноцепочечной миРНК, длина может варьироваться от приблизительно 14 до приблизительно 50 нуклеотидов, в то время как, если миРНК является shRNA или кольцевой молекулой, длина может варьироваться от приблизительно 40 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов.

[000323] Молекула миРНК может содержать 3'-липкий конец на одном конце молекулы. Другой конец может являться тупым концом или липким концом (5' или 3'). Если молекула миРНК содержит липкий конец на обоих концах молекулы, длина липких концов

может быть той же или другой. В одном из вариантов осуществления молекула миРНК по настоящему изобретению содержит 3'-липкие концы от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на обоих концах молекулы. В некоторых вариантах осуществления миРНК молекула содержит 3'-липкие концы из от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления миРНК молекула содержит 3'-липкие концы от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит 3'-липкие концы от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на смысловой цепи и антисмысловой цепи.

[000324] В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит один или более модифицированных нуклеотидов (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более). В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит один или более модифицированных нуклеотидов и/или (например, и) одну или более модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит модифицированный остаток сахара (например, 2'-модифицированный нуклеотид). В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит один или более 2'-модифицированных нуклеотидов, например, 2'-дезоксид, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-О--N-метилацетамидо (2'-O-NMA) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид молекулы миРНК является модифицированным нуклеотидом (например, 2'-модифицированным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит один или более фосфодиамидатных морфолинонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид молекулы миРНК является фосфодиамидатным морфолинонуклеотидом.

[000325] В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит фосфотиоатную или другую модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между по меньшей мере двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеотидами. Например, в некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит модифицированные межнуклеотидные связи в первой, второй и/или (например, и) третьей межнуклеозидной связи на 5'- или 3'-конце молекулы миРНК.

[000326] В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеотидные связи являются фосфорсодержащими связями. В некоторых вариантах осуществления фосфорсодержащие связи, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метильные и другие

алкильные фосфонаты, содержащий 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфоамидаты, содержащие 3'-аминофосфоамидат и аминоалкилфосфоамидаты, тионофосфоамидат, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'; см. патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

[000327] Любые из модифицированных химических составов или форматов молекул миРНК, представленных в настоящем описании, можно комбинировать друг с другом. Например, в одну молекулу миРНК можно включать один, два, три, четыре, пять или более разных типов модификаций.

[000328] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит один или более модифицированных нуклеотидов (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит один или более модифицированных нуклеотидов и/или (например, и) одну или более модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит модифицированный остаток сахара (например, 2'-модифицированный нуклеотид). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит один или более 2'-модифицированных нуклеотидов, например, 2'-дезоксид, 2'-фтор (2'-F), 2'-O-метил (2'-O-Me), 2'-O-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-O-аминопропил (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-O-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-O--N-метилацетамидо (2'-O--NMA) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид антисмысловой цепи является модифицированным нуклеотидом (например, 2'-модифицированным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит один или более фосфодиамидатных морфолинонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь является фосфодиамидатным морфолиновым олигомером (PMO).

[000329] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит фосфотиоатную или другую модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между по меньшей мере двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеотидами. Например, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит модифицированные межнуклеотидные связи в первой, второй и/или (например, и) третьей межнуклеозидной связи на 5'- или 3'-конце молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления

модифицированные межнуклеотидные связи являются фосфорсодержащими связями. В некоторых вариантах осуществления фосфорсодержащие связи, которые можно использовать включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метильные и другие алкильные фосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфоамидаты, содержащие 3'-аминофосфоамидат и аминокилфосфоамидаты, тионофосфоамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары единиц нуклеозидов связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'; см. патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

[000330] Любые из модифицированных химических составов или форматов антисмысловой цепи, представленных в настоящем описании, можно комбинировать друг с другом. Например, в одну антисмысловую цепь можно включать один, два, три, четыре, пять или более разных типов модификаций.

[000331] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит один или более модифицированных нуклеотидов (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит один или более модифицированных нуклеотидов и/или (например, и) одну или более модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит модифицированный остаток сахара (например, 2'-модифицированный нуклеотид). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит один или более 2'-модифицированных нуклеотидов, например, 2'-дезоксид, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-О--N-метилацетида (2'-O--NMA) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид смысловой цепи является модифицированным нуклеотидом (например, 2'-модифицированным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит один или более фосфодиамидатных морфолинонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь является фосфодиамидатным морфолиновым олигомером (РМО). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфотиоатную или другую модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между по меньшей мере двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между всеми нуклеотидами. Например, в некоторых вариантах осуществления

смысловая цепь содержит модифицированные межнуклеотидные связи в первой, второй и/или (например, и) третьей межнуклеозидной связи на 5'- или 3'-конце смысловой цепи.

[000332] В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеотидные связи являются фосфорсодержащими связями. В некоторых вариантах осуществления фосфорсодержащие связи, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоклфосфотриэфиры, метильные и другие алкильные фосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфоамидаты, содержащие 3'-аминофосфоамидат и аминоклфосфоамидаты, тионофосфоамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары единиц нуклеозидов связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'; см. патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

[000333] Любые из модифицированных химических составов или форматов смысловой цепи, представленных в настоящем описании, можно комбинировать друг с другом. Например, в одну смысловую цепь можно включать один, два, три, четыре, пять или более разных типов модификаций.

[000334] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или смысловая цепь молекулы миРНК содержит модификации, повышающие или снижающие нагрузку РНК-индуцируемого сайленсинг-комплекса (RISC). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК содержит модификации, повышающие нагрузку RISC. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК содержит модификации, снижающие нагрузку RISC и нецелевые эффекты. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК содержит 2'-О-метоксиэтильную (2'-МОЕ) модификацию. Добавление 2'-О-метоксиэтильной (2'-МОЕ) группы в участок расщепления улучшает специфичность и активность сайленсинга миРНК посредством облегчения ориентированной нагрузки РНК-индуцируемого сайленсинг-комплекса (RISC) модифицированной цепью, как описано в Song et al., (2017) *Mol Ther Nucleic Acids* 9:242-250, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК содержит 2'-ОМет-фосфодитионатную модификацию, повышающую нагрузку RISC, как описано в Wu et al., (2014) *Nat Commun* 5:3459, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000335] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК содержит 5'-морфолинонуклеотид, снижающий нагрузку RISC смысловой цепью и улучшающий выбор антисмысловой цепи и активность РНКи, как описано в Kumar et al., (2019) *Chem Commun (Camb)* 55(35):5139-5142, включенной в настоящее описание

посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК модифицирована с помощью синтетического РНК-подобного высокоаффинного аналога нуклеотида, замкнутой нуклеиновой кислоты (ЗНК), снижающей нагрузку RISC смысловой цепью и дополнительно повышающей включение антисмысловой цепи в RISC, как описано в Elman et al., (2005) *Nucleic Acids Res.* 33(1): 439-447, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК содержит модификацию 5'-незамкнутой нуклеиновой кислоты (UNA), снижающей нагрузку RISC смысловой цепью и улучшающей активность сайленсинга антисмысловой цепи, как описано в Snead et al., (2013) *Mol Ther Nucleic Acids* 2(7):e103, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК содержит 5-нитроиндольную модификацию, снижающую активность РНКи смысловой цепи и нецелевые эффекты, как описано в Zhang et al., (2012) *Chembiochem* 13(13):1940-1945, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит 2'-О' метильную (2'-О-Me) модификацию, снижающую нагрузку RISC и нецелевые эффекты смысловой цепи, как описано в Zheng et al., *FASEB* (2013) 27(10): 4017-4026, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК полностью замещена морфолиновыми, 2'-МОЕ или 2'-О-Me остатками и не распознается RISC, как описано в Kole et al., (2012) *Nature reviews. Drug Discovery* 11(2):125-140, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК содержит модификацию 2'-МОЕ, и смысловая цепь содержит модификацию 2'-О-Me (см. например, Song et al., (2017) *Mol Ther Nucleic Acids* 9:242-250). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (например, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10) молекула миРНК связана (например, ковалентно) с мышечно-специфическим средством. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство может содержать или состоять из нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), пептид (например, антитело), липид (например, микровезикулу) или остаток сахара (например, полисахарид). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом против рецептора трансферрина (например, любым из антител против TfR, представленных в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство можно связывать с 5'-концом смысловой цепи молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство можно связывать с 3'-концом смысловой цепи молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство можно связывать во внутренней части со смысловой цепью молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство можно связывать с 5'-концом антисмысловой цепи молекулы

миРНК. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство можно связывать с 3'-концом антисмысловой цепи молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство можно связывать во внутренней части с антисмысловой цепью молекулы миРНК.

к. МикроРНК (мкРНК)

[000336] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться микроРНК (мкРНК). МикроРНК (обозначаемые как "мкРНК") являются небольшими некодирующими РНК, принадлежащими к классу регуляторных молекул, контролирующих экспрессию генов посредством связывания с комплементарными участками на целевом транскрипте РНК. Как правило, мкРНК получают из крупных предшественников РНК (обозначаемых как при-мкРНК), процессируемых в ядре в пре-мкРНК длиной приблизительно 70 нуклеотидов, сворачивающуюся в неидеальные структуры петля-стебель. Эти пре-мкРНК, как правило, подвергаются дополнительной стадии процессинга в цитоплазме, где зрелая мкРНК длиной 18-25 нуклеотидов вырезается с одной стороны шпильки пре-мкРНК ферментом РНКазой III Dicer.

[000337] В рамках изобретения мкРНК включает при-мкРНК, пре-мкРНК, зрелую мкРНК или фрагменты их вариантов, сохраняющие биологическую активность зрелой мкРНК. В одном из вариантов осуществления диапазон размеров мкРНК может составлять от 21 нуклеотида до 170 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления диапазон размеров мкРНК составляет от 70 до 170 нуклеотидов. В другом варианте осуществления можно использовать зрелую мкРНК длиной от 21 до 25 нуклеотидов.

l. Аптамеры

[000338] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме аптамеров. Как правило, что касается молекулярной нагрузки, аптамер является любой нуклеиновой кислотой, специфически связывающейся с мишенью, такой как низкомолекулярное соединение, белок, нуклеиновая кислота в клетке. В некоторых вариантах осуществления аптамер является аптамером ДНК или аптамером РНК. В некоторых вариантах осуществления аптамер нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК или РНК (оцДНК или оцРНК). Следует понимать, что одноцепочечный аптамер нуклеиновой кислоты может образовывать спирали и/или (например, и) петлевые структуры. Нуклеиновая кислота, образующая аптамер нуклеиновой кислоты, может содержать природные нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды, природные нуклеотиды с углеводородными линкерами (например, алкиленовыми) или полиэфирным линкером (например, PEG-линкером), встроенным между одним или более нуклеотидами, модифицированными нуклеотидами с углеводородными или PEG-линкерами, встроенными между одним или более нуклеотидами, или их комбинацию. Примеры публикаций и патентов, в которых описывают аптамеры и способ получения аптамеров, включают, например, Lorsch and Szostak, 1996; Jayasena, 1999; патенты США №№ 5270163; 5567588; 5650275; 5670637; 5683867; 5696249; 5789157; 5843653; 5864026; 5989823; 6569630; 8318438 и патентную

заявку РСТ № WO 99/31275, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки.

т. Рибозимы

[000339] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме рибозима. Рибозим (фермент рибонуклеиновой кислоты) представляет собой молекулу, как правило, молекулу РНК, способную осуществлять специфические биохимические реакции, схожие с действием белковых ферментов. Рибозимы являются молекулами с каталитической активностью, включающей способность к расщеплению по специфическим фосфодиэфирным связям в молекулах РНК, с которыми они гибридизуются, таких как мРНК, РНК-содержащих субстратах, lncRNA и самих рибозимах.

[000340] Рибозимы могут принимать форму одной из нескольких физических структур, одну из которых обозначают как "головка молотка". Рибозим-"головка молотка" состоит из каталитического кора, содержащего девять консервативных оснований, двухцепочечного стебля и петлевых структур (петля-стебель II) и двух областей, комплементарных областям, фланкирующим РНК-мишень, каталитического кора. Фланкирующие области позволяют рибозиму связываться с РНК-мишенью специфически посредством образования двухцепочечных стеблей I и III. Расщепление происходит в цис-положении (т.е. расщепление той же молекулы РНК, которая содержит мотив "головка молотка") или в транс-положении (расщепление иного РНК-субстрата, чем содержащий рибозим) вблизи специфического рибонуклеотидного триплета посредством реакции трансэтерификации из 3', 5'-фосфодиэфира в 2', 3'-циклический фосфодиэфир. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что для этой каталитической активности необходимо наличие специфических, высококонсервативных последовательностей в каталитической области рибозима.

[000341] Модификации в структуре рибозима также включают замену некоровых частей молекулы нуклеотидными молекулами. Например, Benseler et al. (J. Am. Chem. Soc. (1993) 115:8483-8484) описывают подобные "головке молотка" молекулы, в которых две из пар оснований стебля II и все четыре из нуклеотидов петли II, заменяют нуклеозидными линкерами на основе гексаэтиленгликоля, пропандиола, бис(триэтиленгликоль)фосфата, трис(пропандиола)бисфосфата или бис(пропандиол)фосфата. Ma et al. (Biochem. (1993) 32:1751-1758; Nucleic Acids Res. (1993) 21:2585-2589) заменяли петлю из шести нуклеотидов шпильки рибозима TAR нуклеотидными, подобными этиленгликолю линкерами. Thomson et al. (Nucleic Acids Res. (1993) 21:5600-5603) заменяли петлю II линейными, нуклеотидными линкерами длиной 13, 17 и 19 атомов.

[000342] Олигонуклеотиды-рибозимы можно получать хорошо известными способами (см., например, публикации РСТ №№ WO9118624; WO9413688; WO9201806 и WO 92/07065 и патенты США №№ 5436143 и 5650502) или приобретать в коммерческих источниках (например, US Biochemicals) и, при желании, в них можно встраивать аналоги

нуклеотидов для повышения резистентности олигонуклеотида к деградации нуклеазами в клетке. Рибозим можно синтезировать любым известным способом, например, с использованием коммерчески доступного синтезатора, производимого, например, Applied Biosystems, Inc. или Milligen. Рибозим также можно получать общепринятыми способами с использованием рекомбинантных векторов. См., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (текущее издание). Последовательности РНК рибозима можно синтезировать общепринятым образом, например, с использованием РНК-полимераз, таких как T7 или SP6.

п. Гидовые нуклеиновые кислоты

[000343] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды представляют собой гидовую нуклеиновую кислоту, например, молекулы гидовой РНК (гРНК). Как правило, гидовая РНК является короткой синтетической РНК, состоящей из (1) каркасной последовательности, связывающейся с программируемой нуклеиновой кислотой, ДНК-связывающим белком (parDNAbr), таким как Cas9, и (2) нуклеотидной спейсерной части, определяющей последовательность ДНК-мишени (например, геномной ДНК-мишени), с которой гРНК связывается для сближения программируемого нуклеиновой кислотой, ДНК-связывающего белка с последовательностью ДНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления parDNAbr является программируемым нуклеиновой кислотой белком, образующим комплекс (например, связывающимся или ассоциированным) с одной или более РНК, нацеливающей программируемый нуклеиновой кислотой белок на последовательность ДНК-мишени (например, последовательность геномной ДНК-мишени). В некоторых вариантах осуществления программируемую нуклеиновой кислотой нуклеазу, когда она находится в комплексе с РНК, можно обозначать как комплекса нуклеаза:РНК. Гидовая РНК может существовать в виде комплекса двух или более РНК или в виде одной молекулы РНК.

[000344] Гидовую РНК (гРНК), существующую в виде одной молекулы РНК, можно обозначать как одинарную гидовую РНК (sgRNA), хотя термин "гРНК" также используют для обозначения гидовой РНК, существующей в виде отдельных молекул или комплекса из двух или более молекул. Как правило, гРНК, существующие в виде отдельных РНК, содержат два домена: (1) домен, обладающий гомологией в отношении целевой нуклеиновой кислоты (т.е. направляет связывание комплекса Cas9 с мишенью); и (2) домен, связывающийся с белком Cas9. В некоторых вариантах осуществления домен (2) соответствует последовательности, известной как tracrRNA и содержащей структуру петля-стебель. В некоторых вариантах осуществления домен (2) идентичен или гомологичен tracrRNA, как описано в Jinek et al., *Science* 337:816-821 (2012), полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

[000345] В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит два или более из доменов (1) и (2), и ее можно обозначать как удлиненную гРНК. Например, удлиненная гРНК будет связываться с двумя или более белками Cas9 и связывается с целевой нуклеиновой кислотой в двух или более отдельных областях, как представлено в настоящем

описании. гРНК содержит нуклеотидную последовательность, являющуюся комплементарной участку-мишени, опосредующую связывание комплекса нуклеаза/РНК с указанным участком-мишенью, обеспечивая специфичность последовательности комплекса нуклеаза:РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-программируемая нуклеаза является (CRISPR-ассоциированной системой) эндонуклеазой Cas9, например, Cas9 (Csn1) из *Streptococcus pyogenes* (см., например, "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., Najar 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 RNA maturation 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); и "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), содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме).

о. Мультимеры

[000346] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка может содержать мультимеры (например, конкатемеры) 2 или более олигонуклеотидов, соединенных линкером. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидную нагрузку комплекса/конъюгата можно повышать за пределами доступных участков связывания на средстве для таргетинга (например, доступных тиоловых участков на антителе) или иным образом корректировать для достижения содержания конкретной нагрузки. Олигонуклеотиды в мультимере могут быть одинаковыми или отличаться (например, быть нацеленными на разные гены или разные участки на одном гене или его продуктах).

[000347] В некоторых вариантах осуществления мультимеры содержат 2 или более олигонуклеотидов, соединенных расщепляемым линкером. Однако в некоторых вариантах осуществления мультимеры содержат 2 или более олигонуклеотидов, соединенных нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более соединенных олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит от 2 до 5, от 2 до 10 или от 4 до 20 соединенных олигонуклеотидов.

[000348] В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 2 или более олигонуклеотида, соединенных "конец-в-конец" (при линейном расположении). В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 2 или более олигонуклеотидов, соединенных "конец-в-конец" с помощью олигонуклеотидного линкера (например, поли-dT-линкера, линкера с удаленными азотистыми основаниями). В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 5'-конец одного олигонуклеотида, соединенный с 3'-концом другого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления мультимер

содержит 3'-конец одного олигонуклеотида, соединенный с 3'-концом другого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 5'-конец одного олигонуклеотида, соединенный с 5'-концом другого олигонуклеотида. Тем не менее, в некоторых вариантах осуществления мультимеры могут содержать разветвленную структуру, содержащую множество олигонуклеотидов, соединенных разветвляющим линкером.

[000349] Дополнительные примеры мультимеров, которые можно использовать в комплексах, представленных в настоящем описании, описаны, например, в патентной заявке США № 2015/0315588 A1, названной *Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkers*, опубликованной 5 ноября 2015 года; патентной заявке США № 2015/0247141 A1, названной *Multimeric Oligonucleotide Compounds*, опубликованной 3 сентября 2015 года, патентной заявке США № 2011/0158937 A1, названной *Immunostimulatory Oligonucleotide Multimers*, опубликованной 30 июня 2011 года; и патенте США № 5693773, названной *Triplex-Forming Antisense Oligonucleotides Having Abasic Linkers Targeting Nucleic Acids Comprising Mixed Sequences Of Purines And Pyrimidines*, опубликованной 2 декабря 1997 года, содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

ii. Низкомолекулярные соединения:

[000350] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любое подходящее низкомолекулярное соединение, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является таким, как описано в публикации патентной заявки США № 20170340606, опубликованной 30 ноября 2017 года, названной "METHODS OF TREATING MUSCULAR DYSTROPHY" или публикации патентной заявки США № 20180050043, опубликованной 22 февраля 2018 года, названной "INHIBITION OF DUX4 EXPRESSION USING BROMODOMAIN AND EXTRA-TERMINAL DOMAIN PROTEIN INHIBITORS (BETi)". Дополнительные примеры низкомолекулярной нагрузки приведены в Bosnakovski, D., et al., High-throughput screening identifies inhibitors of DUX4-induced myoblast toxicity, *Skelet Muscle*, Feb 2014, и Choi. S., et al., "Transcriptional Inhibitors Identified in a 160,000-Compound Small-Molecule DUX4 Viability Screen," *Journal of Biomolecular Screening*, 2016. Например, в некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является транскрипционным ингибитором, таким как SHC351, SHC540, SHC572. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является STR00316, повышающим продукцию или активность другого белка, такого как интегрин. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является ингибитором бромодомена (BETi), таким как JQ1, PF1-1, I-BET-762, I-BET-151, RVX-208 или CPI-0610.

iii. Пептиды

[000351] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любой подходящий пептид или белок, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления белок является ферментом. Эти пептиды или белки можно

продуцировать, синтезировать и/или (например, и) дериватизировать несколькими способами, например, с использованием пептидных библиотек фагового дисплея, пептидных библиотек "одна частица-одно соединение" или комбинаторных библиотек синтетических пептидов с позиционным сканированием. В некоторых вариантах осуществления пептид или белок может связываться с энхансером DME1 или DME2 для ингибирования экспрессии DUX4, например, посредством блокирования связывания активатора.

iv. Конструкции нуклеиновой кислоты

[000352] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любую подходящую конструкцию для экспрессии гена, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена может являться вектором или фрагментом кДНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена может являться матричной РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления мРНК, используемая в настоящем описании, может являться модифицированной мРНК, например, как описано в патенте США 8710200, опубликованной 24 апреля 2014 года, названной "*Engineered nucleic acids encoding a modified erythropoietin and their expression*". В некоторых вариантах осуществления мРНК может содержать 5'-метильный кэп. В некоторых вариантах осуществления мРНК может содержать поли-А-хвост, необязательно, длиной до 160 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующую конструкцию гена может экспрессироваться, например, гиперэкспрессироваться, в ядре мышечной клетки. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует олигонуклеотид (например, shRNA, нацеленную на DUX4) или белок, отрицательно регулирующий экспрессию DUX4 (например, пептид или белок, связывающийся с энхансером DME1 или DME2 для ингибирования экспрессии DUX4, например, посредством блокирования связывания с активатором). В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует олигонуклеотид (например, shRNA, нацеленную на MuRF1 или MAFbx), отрицательно регулирующий экспрессию MuRF1 или MAFbx, соответственно. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует белок, содержащий по меньшей мере один "цинковый палец". В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует фермент редактирования генома. Дополнительные примеры конструкций нуклеиновых кислот, которые можно использовать в качестве молекулярной нагрузки, приведены в публикации международной патентной заявки № WO2017152149 A1, опубликованной 19 сентября 2017 года, названной "CLOSED-ENDED LINEAR DUPLEX DNA FOR NON-VIRAL GENE TRANSFER"; патенте США № 8853377 B2, выданном 7 октября 2014 года, названном "MRNA FOR USE IN TREATMENT OF HUMAN GENETIC DISEASES"; и патенте США № 8822663 B2, выданном 2 сентября 2014 года, "ENGINEERED NUCLEIC ACIDS AND METHODS OF USE THEREOF", содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

С. Линкеры

[000353] Комплексы, представленные в настоящем описании, как правило, содержат линкер, соединяющий любое из антител против TfR, представленных в настоящем описании, с молекулярной нагрузкой. Линкер содержит по меньшей мере одну ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления линкер может являться одинарной связью, например, дисульфидной связью или дисульфидным мостиком, соединяющей антитело против TfR с молекулярной нагрузкой. Однако, в некоторых вариантах осуществления линкер может соединять любое из антител против TfR, представленных в настоящем описании, с молекулярной нагрузкой посредством множества ковалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер может являться расщепляемым линкером. Однако в некоторых вариантах осуществления линкер может являться нерасщепляемым линкером. Линкер, как правило, является стабильным *in vitro*, *in vivo* и в некоторых клеточных контекстах. Кроме того, как правило, линкер не влияет отрицательно на функциональные свойства антитела против TfR1 или молекулярной нагрузки. В этой области известны примеры и способы синтеза линкеров (см., например, 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).

[000354] Предшественник линкера, как правило, будет содержать две разные реакционноспособные частицы, делающие возможным присоединение к антителу против TfR1 и молекулярной нагрузке. В некоторых вариантах осуществления две разные реакционноспособные частицы может являться нуклеофилом и/или (например, и) электрофилом. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела против TfR1. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина антитела против TfR1 с помощью малеимид-содержащего линкера, где, необязательно, малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроильную или малеимидометил-циклогексан-1-карбоксилатную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина антитела против TfR1 или тиоловой функционализированной молекулярной нагрузкой с помощью 3-арилпропионитрильной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком лизина антитела против TfR1. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) а молекулярной нагрузкой посредством амидной связи, карбаматной связи гидразидной, триазольной, тиозфирной или дисульфидной связи.

i. Расщепляемые линкеры

[000355] Расщепляемый линкер может являться протеаза-чувствительным линкером, pH-чувствительным линкером или глутатион-чувствительным линкером. Эти линкеры, как правило, расщепляются исключительно внутриклеточно и, предпочтительно,

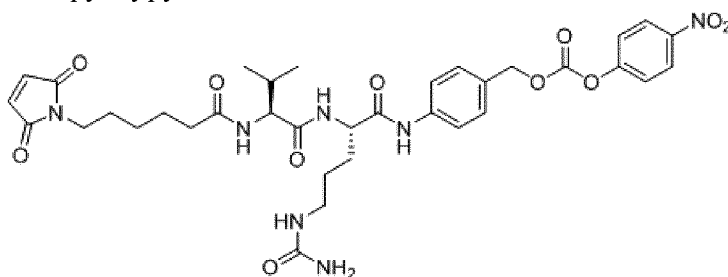
являются стабильными во внеклеточной среде, например, внеклеточной относительно мышечной клетки.

[000356] Протеаза-чувствительные линкеры расщепляются в результате ферментативной активности протеазы. Эти линкеры, как правило, содержат пептидные последовательности и могут иметь длину 2-10 аминокислот, приблизительно 2-5 аминокислот, приблизительно 5-10 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, приблизительно 5 аминокислот, приблизительно 3 аминокислоты или приблизительно 2 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность может содержать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные аланина, линейные аминокислоты, N-метил-аминокислоты и другие аминокислоты, известные в этой области. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин или аланин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер может расщепляться лизосомальной протеазой, например, катепсином В, и/или (например, и) эндосомальной протеазой.

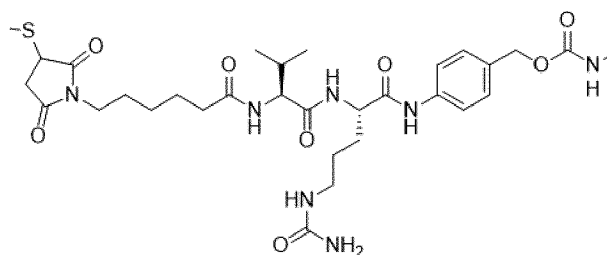
[000357] pH-чувствительный линкер представляет собой ковалентную связь, легко подвергающуюся деградации в условиях высокого или низкого pH. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер может расщепляться при pH в диапазоне от 4 до 6. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер содержит гидразон или циклический ацеталь. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер расщепляется в эндосоме или лизосоме.

[000358] В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный линкер содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный линкер расщепляется в результате реакции дисульфидного обмена с глутатионовым соединением внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления дисульфидная связь дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту, например, остаток цистеина.

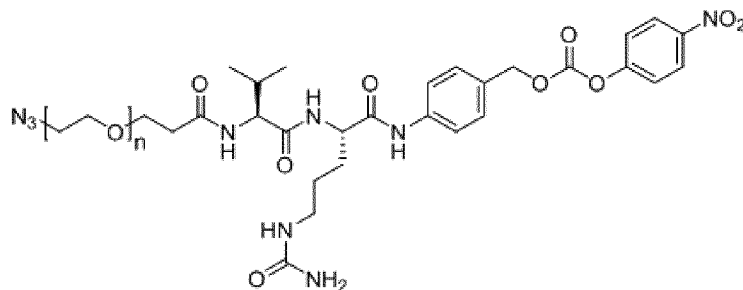
[000359] В некоторых вариантах осуществления линкер является линкером Val-Cit (например, как описано в патенте США № 6214345, включенном в настоящее описание в качестве ссылки). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией линкер Val-Cit имеет структуру:



[000360] В некоторых вариантах осуществления после конъюгации линкер Val-Cit имеет структуру:

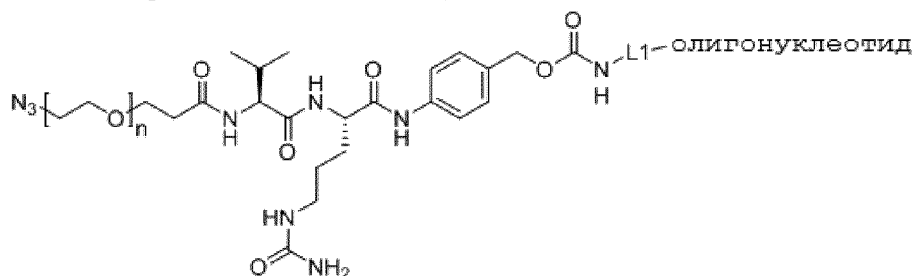


[000361] В некоторых вариантах осуществления линкер Val-cit соединяют с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией посредством клик-химии линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии) имеет структуру:



где n является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3.

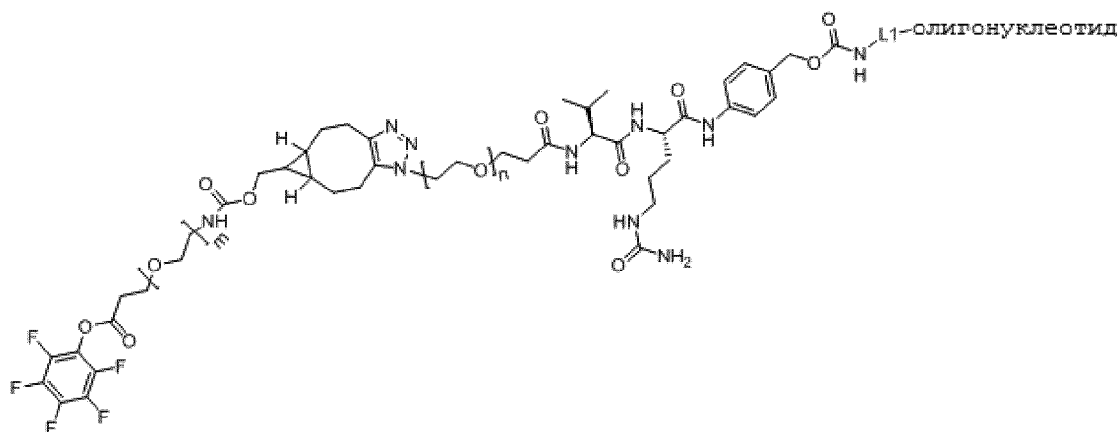
[000362] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии), конъюгирован (например, через другой химический остаток) с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии) и конъюгированный с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) имеет структуру (перед конъюгацией посредством клик-химии):



(A)

где n является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3.

[000363] В некоторых вариантах осуществления после конъюгации с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) линкер val-cit имеет структуру:



(B)

где n является любым числом 0-10, и где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3, и m составляет 4.

ii. Нерасщепляемые линкеры

[000364] В некоторых вариантах осуществления можно использовать нерасщепляемые линкеры. Как правило, нерасщепляемый линкер не может легко подвергаться деградации в клеточной или физиологической среде. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит необязательно замещенную алкильную группу, где заместители могут включать галогены, гидроксильные группы, формы кислорода и другие распространенные заместители. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный арилен, гетероарилен, пептидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, укороченный гликан, сахар или сахара, которые не могут подвергаться ферментативной деградации, азид, алкин-азид, пептидную последовательность, содержащую последовательность LPXT, тиоэфир, биотин, бифенил, повторяющиеся единицы полиэтиленгликоля или эквивалентных соединений, кислые сложные эфиры, кислые амиды, сульфамиды и/или (например, и) алкокси-аминовый линкер. В некоторых вариантах осуществления для ковалентного связывания антитела против TfR, содержащего последовательность LPXT, с молекулярной нагрузкой, содержащей последовательность (G)_n, будут использовать сортаза-опосредованное лигирование (см., например, Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. *Biotechnol Lett.* 2010, 32(1):1-10).

[000365] В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать замещенный алкилен, необязательно замещенный алкенилен, необязательно замещенный алкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный циклоалкенилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дополнительно содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S; необязательно замещенный гетероциклилен, дополнительно содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S; иминогруппу, необязательно

замещенные формы азота, необязательно замещенный формы кислорода О, необязательно замещенный формы серы или поли(алкиленоксид), например, полиэтиленоксид или полипропиленоксид.

iii. Конъюгация линкера

[000366] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой посредством фосфатной, тиоэфирной, простой эфирной, углерод-углеродной, карбаматной или амидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с олигонуклеотидом с помощью фосфатной или фосфотиоатной группы, например, концевого фосфата олигонуклеотидного остова. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 через остаток лизина или цистеина, присутствующий в антитела против TfR1.

[000367] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции циклоприсоединения между азидом и алкином с образованием триазола, где азид и алкин может находиться на антителе против TfR1, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления алкин может являться циклическим алкином, например, циклооктином. В некоторых вариантах осуществления алкин может являться бициклонином (также известным как бицикло[6.1.0]нонин или BCN) или замещенным бициклонином. В некоторых вариантах осуществления циклооктан является таким, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2011136645, опубликованной 3 ноября 2011 года, названной "*Fused Cyclooctyne Compounds And Their Use In Metal-free Click Reactions*". В некоторых вариантах осуществления азид может представлять собой молекулу сахара или углевода, содержащую азид. В некоторых вариантах осуществления азид может представлять собой 6-азидо-6-дезоксигалактозу или 6-азидо-N-ацетилгалактозамин. В некоторых вариантах осуществления молекула сахара или углевода, содержащая азид, является такой, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2016170186, опубликованной 27 октября 2016 года, названной "*Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase*". В некоторых вариантах осуществления реакция циклоприсоединения между азидом и алкином с образованием триазола, где азид и алкин может находиться на антителе против TfR1, молекулярной нагрузке или линкере, является такой, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года, названной "*Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof*"; или публикации международной патентной заявки № WO2016170186, опубликованной 27 октября 2016 года, названной "*Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase*".

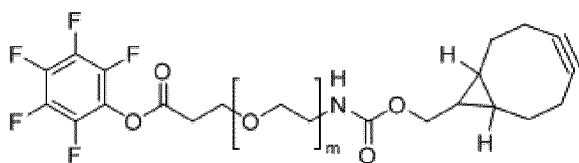
[000368] В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно содержит спейсер, например, полиэтиленгликолевый спейсер или ацил/карбомоил-сульфамидный спейсер, например, спейсер HydraSpace™. В некоторых вариантах осуществления спейсер

является таким, как описано в 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.

[000369] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции Дильса-Альдера между диенофилом и диеном/гетеродиеном, где диенофил и диен/гетеродиен может находиться на антителе против TfR, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой посредством других перициклических реакций, например, еновой реакции. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции амидной, тиоамидной или сульфонамидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции конденсации с образованием оксимной, гидразоновой или семикарбазидной группы, находящейся между линкером и антителом против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой.

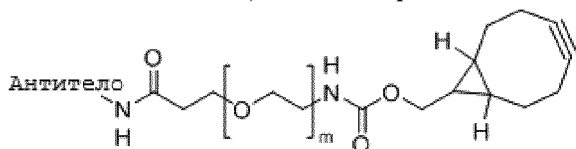
[000370] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакций сопряженного присоединения между нуклеофилом, например, аминогруппой или гидроксильной группой, и электрофилом, например, карбоновой кислотой, карбонатом или альдегидом. В некоторых вариантах осуществления нуклеофил может находиться на линкере, и электрофил может находиться на антителе против TfR или молекулярной нагрузке перед реакцией между линкером и антителом против TfR или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может находиться на линкере, и нуклеофил может находиться на антителе против TfR или молекулярной нагрузке перед реакцией между линкером и антителом против TfR или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может являться азидом, пентафторфенилом, кремниевыми центрами, карбонилем, карбоновой кислотой, ангидридом, изоцианатом, тиоизоцианатом, сукцинимидиловым сложным эфиром, сульфосукцинимидиловым сложным эфиром, малеимидом, алкилгалидом, алкил-псевдогалидом, эпоксидом, эписульфидом, азиридином, арилом, активированным фосфорным центром и/или (например, и) активированным серным центром. В некоторых вариантах осуществления нуклеофил может являться необязательно замещенным алкеном, необязательно замещенным алкином, необязательно замещенным арилом, необязательно замещенным гетероциклилом, гидроксильной группой, аминогруппой, алкиламиногруппой, анилидогруппой или тиоловой группой.

[000371] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии), конъюгированы с антителом против TfR с помощью структуры:



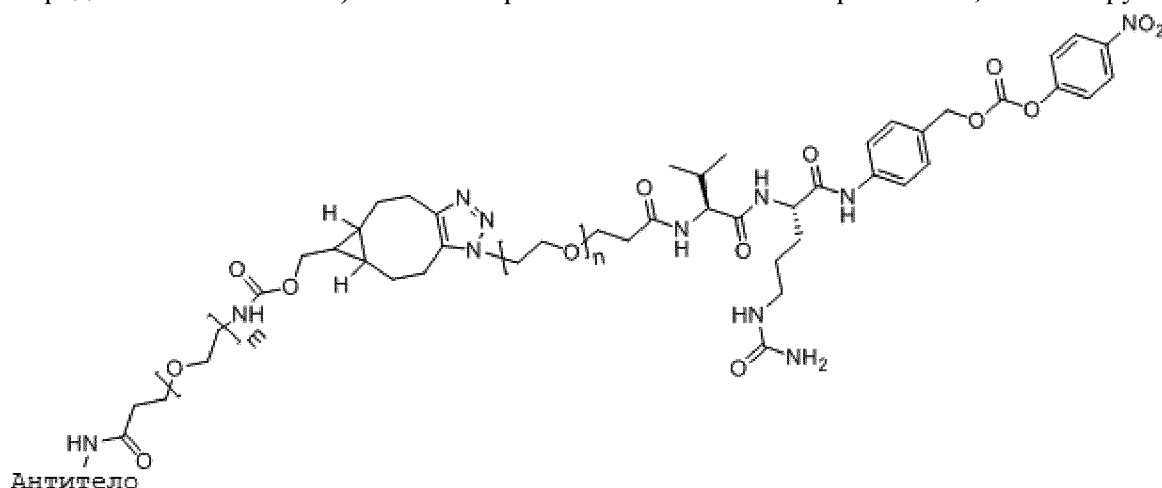
где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления m составляет 4.

[000372] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии), конъюгирован с антителом против TfR, имея структуру:



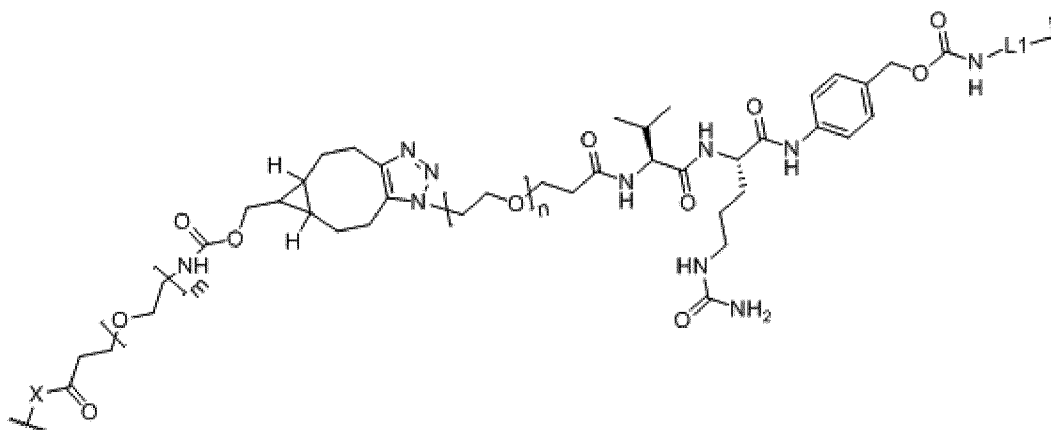
где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления m составляет 4.

[000373] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии) и конъюгированный с антителом против TfR, имеет структуру:



где p является любым числом 0-10, где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления p составляет 3, и/или (например, и) m составляет 4.

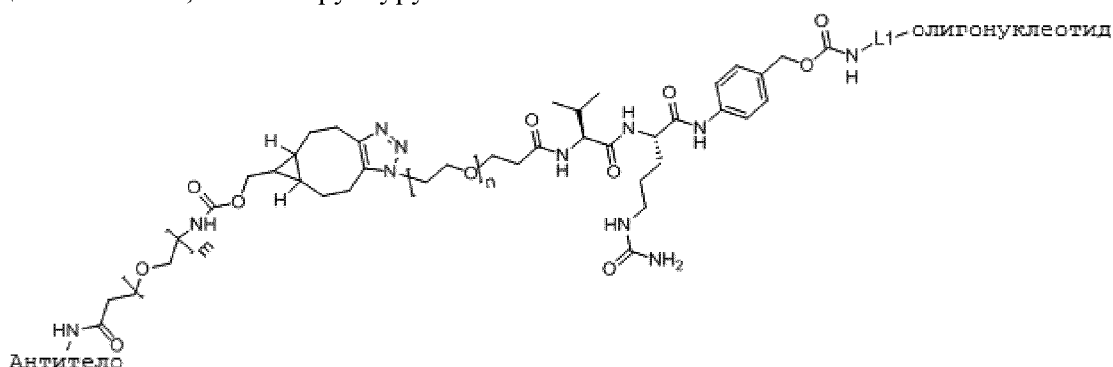
[000374] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, связывающий антитело и молекулярную нагрузку, имеет структуру:



(C)

где n является любым числом 0-10, где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3 и/или (например, 3), m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3, и/или (например, 3) m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления X является NH (например, NH из аминогруппы лизина), S (например, S из тиоловой группой цистеина) или O (например, O из гидроксильной группы серина, треонина или тирозина) антитела.

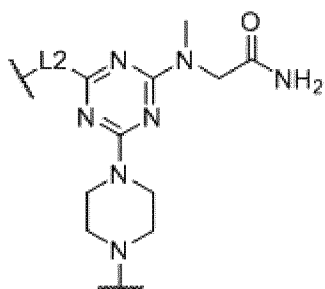
[000375] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, имеет структуру:



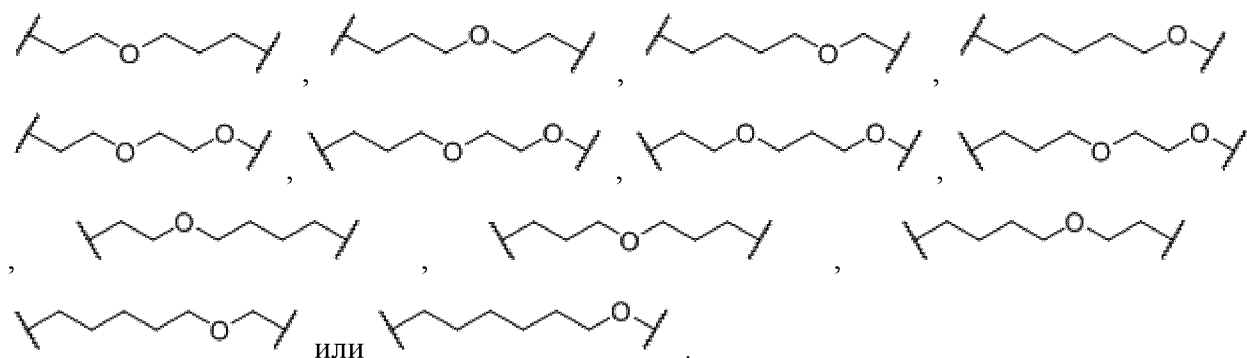
(D)

где n является любым числом 0-10, где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3 и/или (например, 3) m составляет 4.

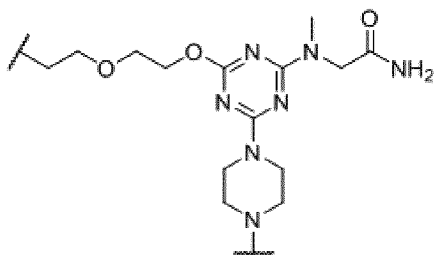
[000376] В структурах формулы (A), (B), (C) и (D) $L1$ в некоторых вариантах осуществления является спейсером, являющимся замещенным или незамещенным алифатическим, замещенным или незамещенным гетероалифатическим, замещенным или незамещенным карбоциклиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным ариленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, $-O-$, $-N(R^A)-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)O-$, $-C(=O)NR^A-$, $-NR^AC(=O)-$, $-NR^AC(=O)R^A-$, $-C(=O)R^A-$, $-NR^AC(=O)O-$, $-NR^AC(=O)N(R^A)-$, $-OC(=O)-$, $-OC(=O)O-$, $-OC(=O)N(R^A)-$, $-S(O)_2NR^A-$, $-NR^AS(O)_2-$ или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления $L1$ является



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом, где L2 является



[000377] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом.

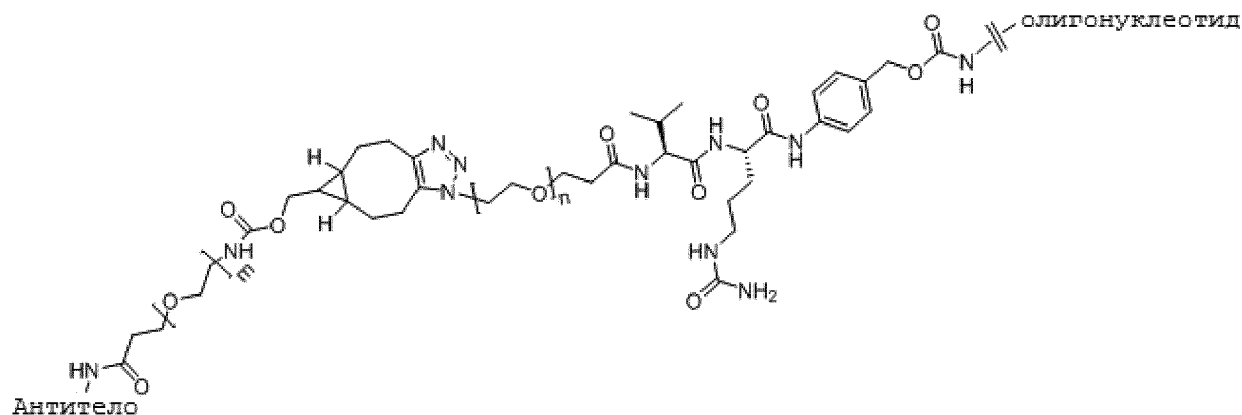
[000378] В некоторых вариантах осуществления L1 является



[000379] В некоторых вариантах осуществления L1 связан с 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000380] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, может не присутствовать).

[000381] В некоторых вариантах осуществления любой из комплексов, представленных в настоящем описании, имеет структуру:



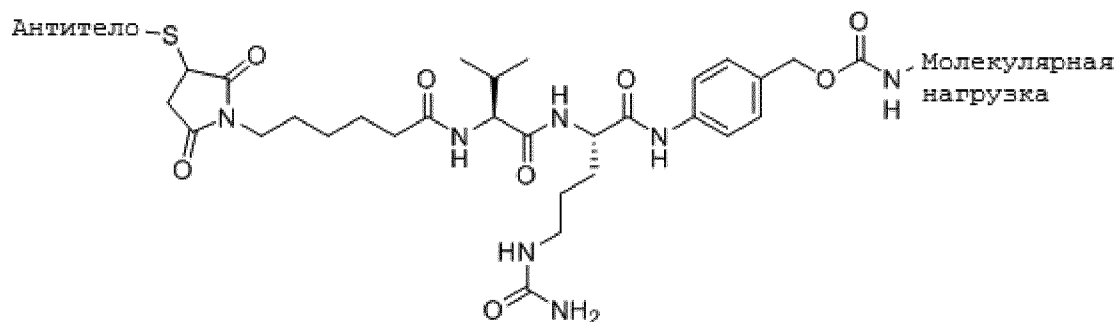
(E),

где n является 0-15 (например, 3), и m является 0-15 (например, 4).

С. Примеры комплексов антитело-молекулярная нагрузка

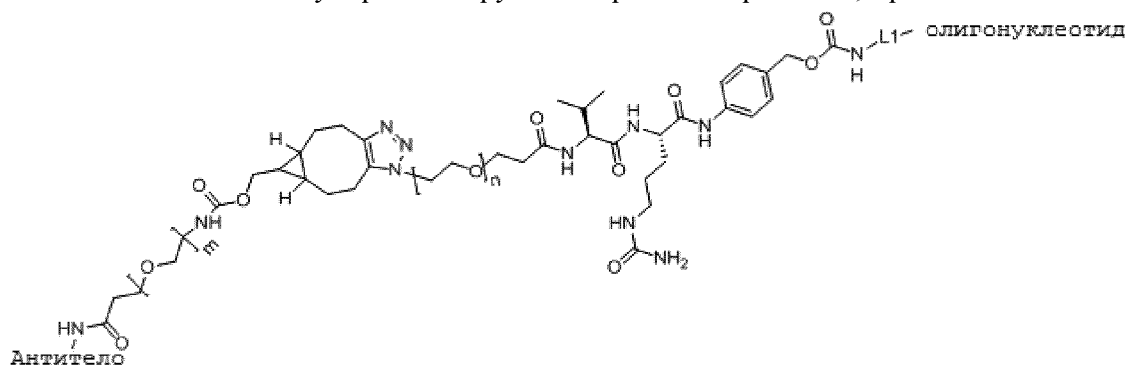
[000382] Настоящее изобретение дополнительно относится к неограничивающим примерам комплексов, содержащих любое из антител против TfR, представленных в настоящем описании, ковалентно связанное с любой из молекулярных нагрузок (например, олигонуклеотидом), представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR (например, любое из антител против TfR, приведенных в таблице 2) ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) с помощью линкера. Можно использовать любые из линкеров, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, если молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, линкер соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе против TfR). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) соединяют с антителом (например, антителом против TfR, представленными в настоящем описании) через аминокгруппу (например, через лизин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000383] Ниже приведен пример структуры комплекса, содержащего антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, с помощью линкера Val-Cit:



где линкер соединяют с антителом с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000384] Другой пример структуры комплекса, содержащего антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер Val-cit, приведен ниже:



(D)

где p является числом 0-10, где m является числом 0-10, где линкер соединен с антителом через аминогруппу (например, на остатке лизина), и/или (например, и), где линкер соединяют с олигонуклеотидом (например, на 5'-конце, 3'-конце или во внутренней части). В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом через лизин, линкер соединяют с олигонуклеотидом на 5'-конце, p составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим смысловую цепь и антисмысловую цепь, и, линкер связан со смысловой цепью или антисмысловой цепью на 5'-конце или 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000385] Следует понимать, что антитела можно соединять с молекулярной нагрузкой с разной стехиометрией, свойством, которое можно обозначать как соотношение лекарственного средства и антитела (DAR), где "лекарственное средство" является молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления одну молекулярную нагрузку соединяют с антителом (DAR=1). В некоторых вариантах осуществления две молекулярные нагрузки соединяют с антителом (DAR=2). В некоторых вариантах осуществления три молекулярные нагрузки соединяют с антителом (DAR=3). В некоторых вариантах осуществления четыре молекулярные нагрузки соединяют с антителом (DAR=4). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к смеси разных комплексов, каждый из которых имеет разное DAR. В некоторых вариантах осуществления среднее DAR комплексов в такой смеси может находиться в диапазоне от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5 или более. DAR можно повышать посредством конъюгации молекулярных нагрузок с разными участками на антителе и/или (например, и) посредством конъюгации мультимеров с одним или более участками на антителе. Например, DAR 2 можно достигать посредством конъюгации одной молекулярной нагрузки с двумя разными участками на

антителе или посредством конъюгации димерной молекулярной нагрузки с одним участком антитела.

[000386] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, представленное в настоящем описании (например, антитела 3-A4, 3-M12 и 5-H12, приведенные в таблице 2, в форме IgG или Fab), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, представленное в настоящем описании (например, антитела 3-A4, 3-M12 и 5-H12, приведенные в таблице 2, в форме IgG или Fab), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер (например, линкер Val-cit). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) соединяют с антителом (например, антителом против TfR, представленным в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) соединяют с антителом (например, антителом против TfR, представленным в настоящем описании) с помощью аминокислотной группы (например, через лизин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000387] В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000388] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 2; и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000389] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000390] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с

молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000391] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000392] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000393] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 79, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000394] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000395] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000396] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000397] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000398] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000399] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 или SEQ ID NO: 99, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000400] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую

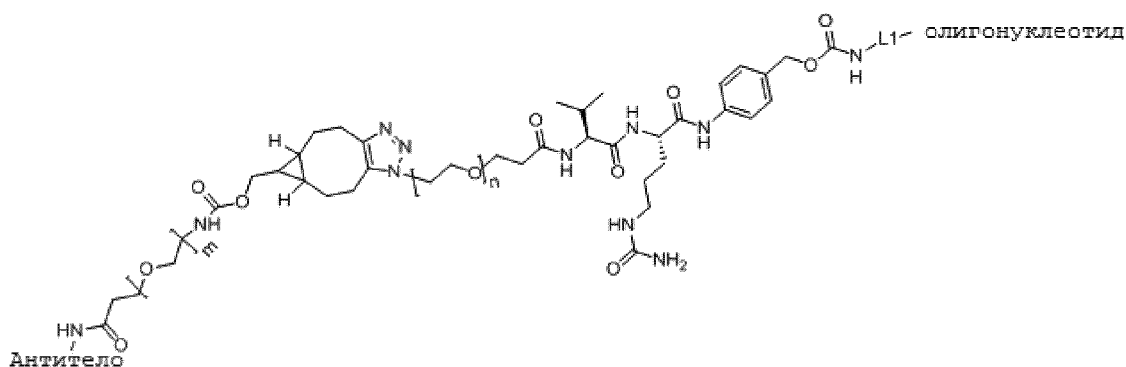
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000401] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000402] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000403] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102 или SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

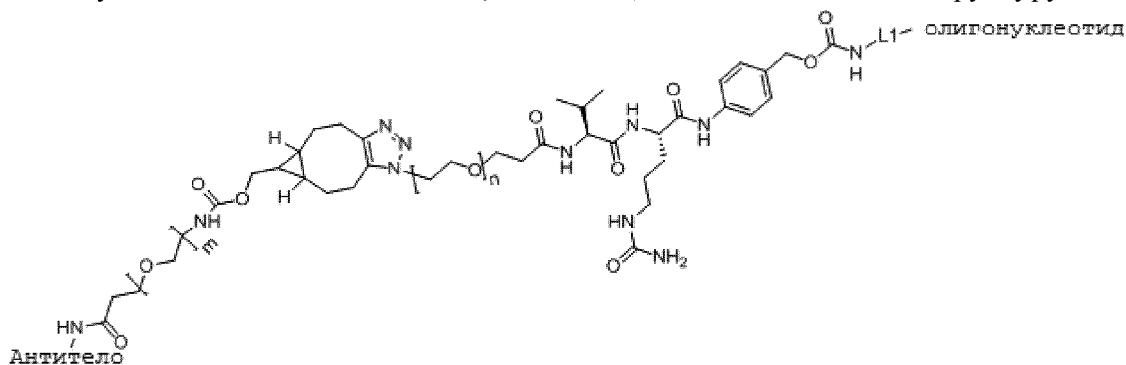
[000404] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

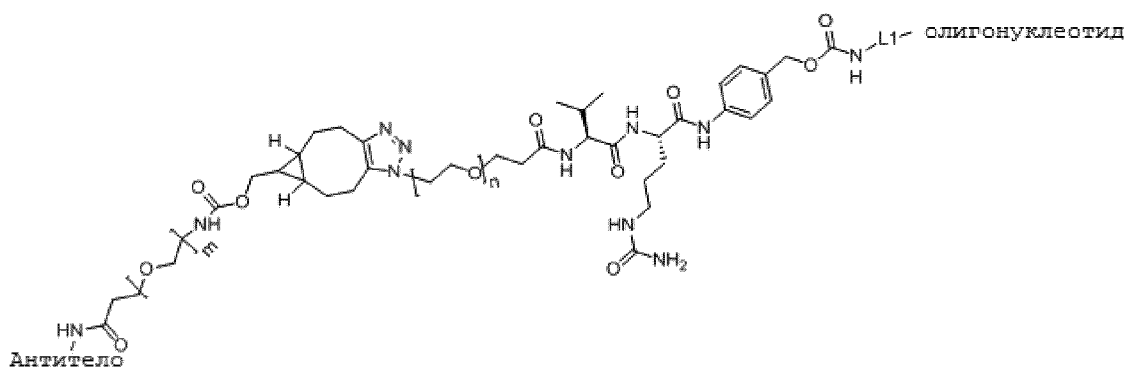
[000405] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

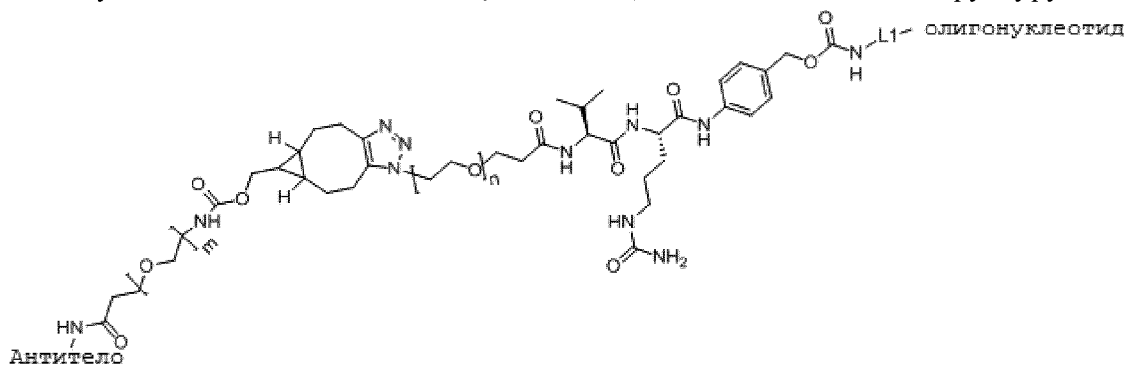
[000406] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

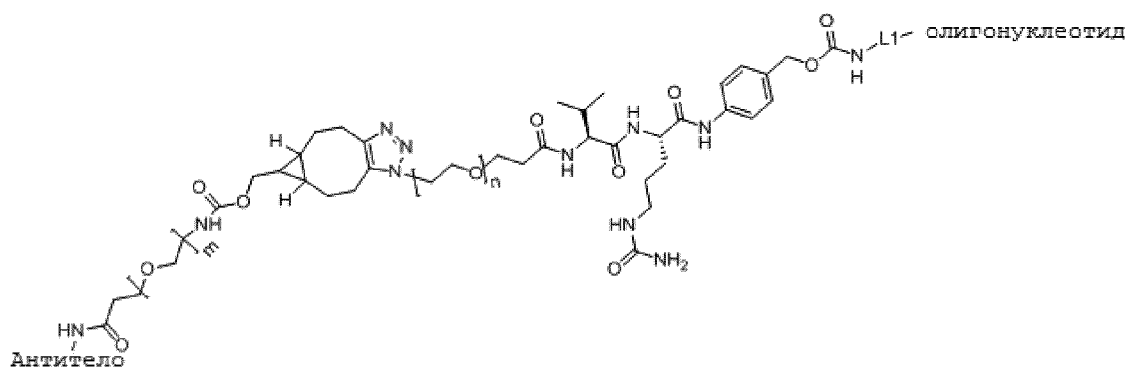
[000407] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

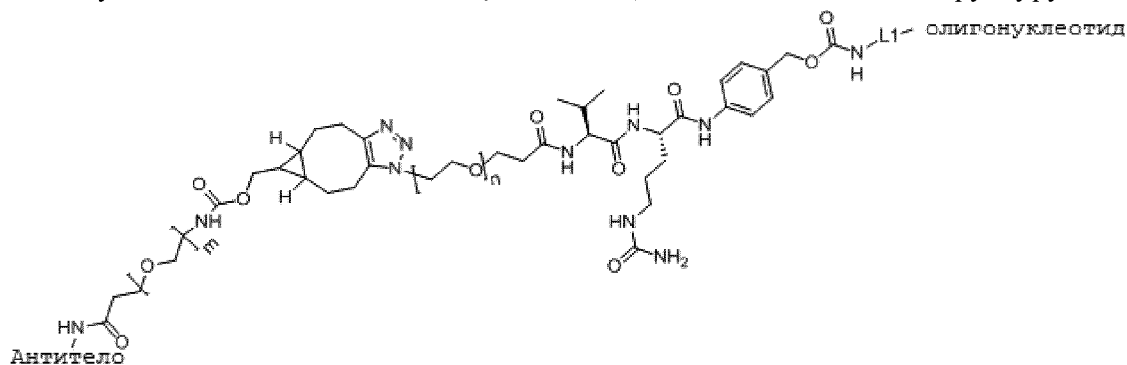
[000408] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

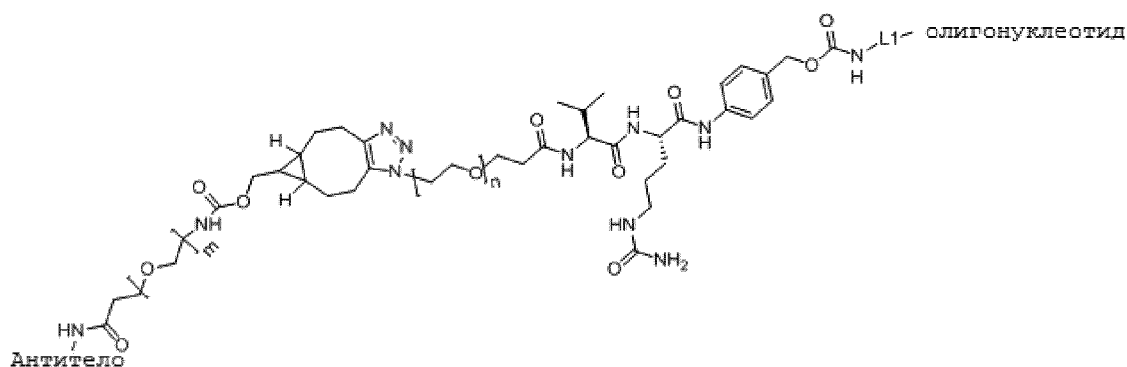
[000409] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

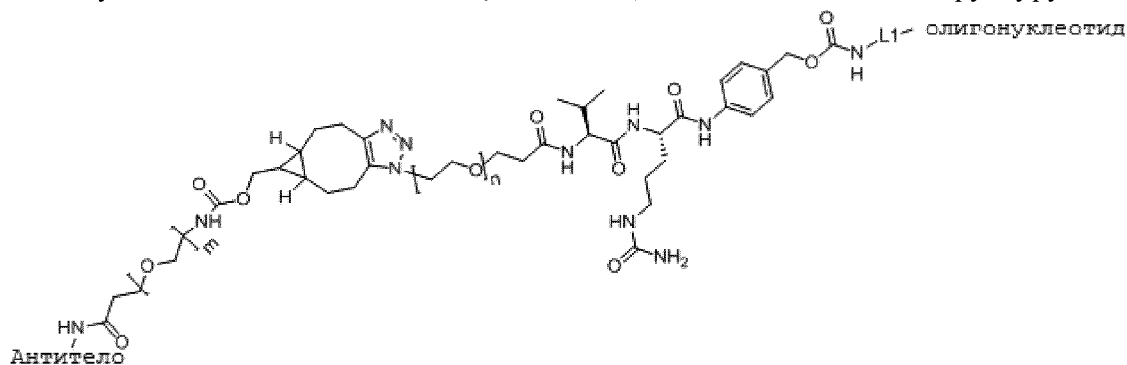
[000410] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

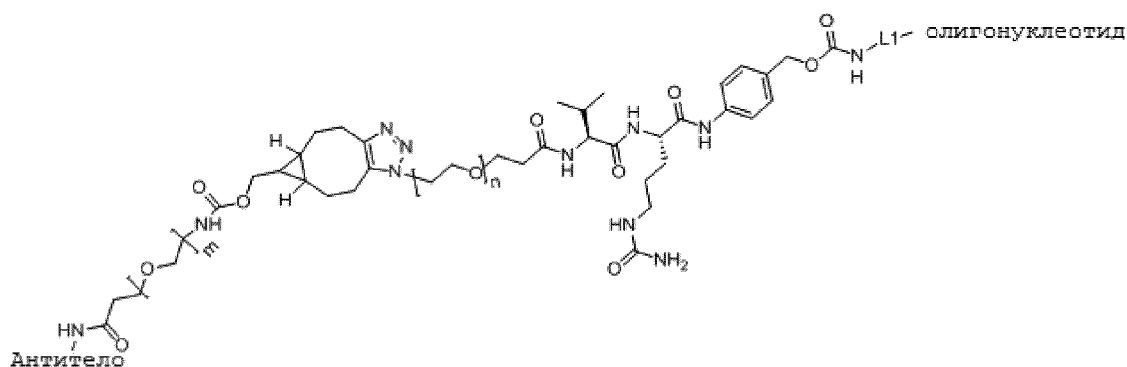
[000411] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

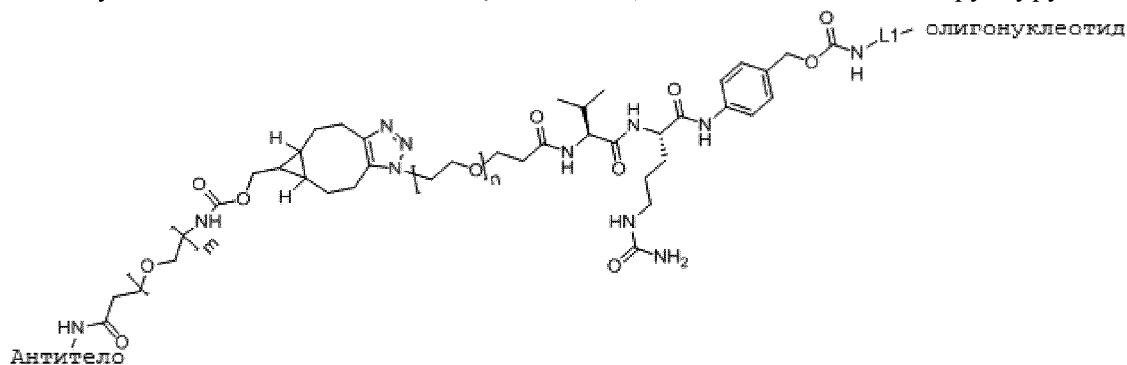
[000412] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

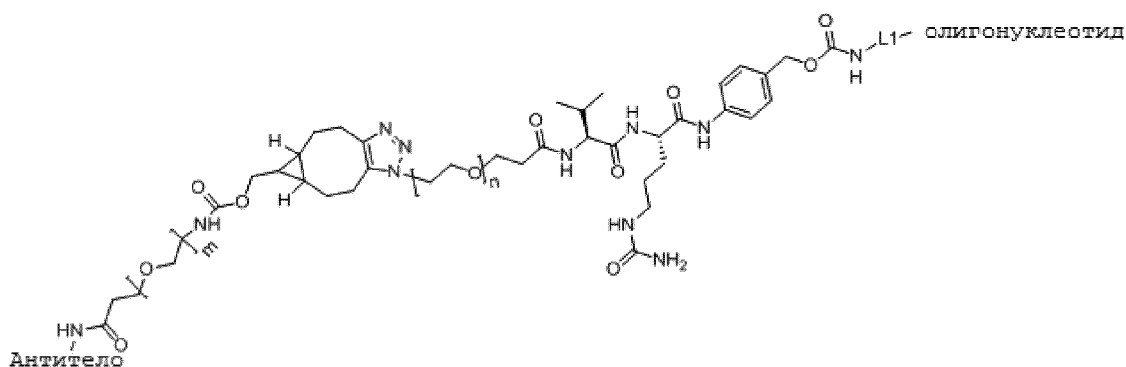
[000413] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

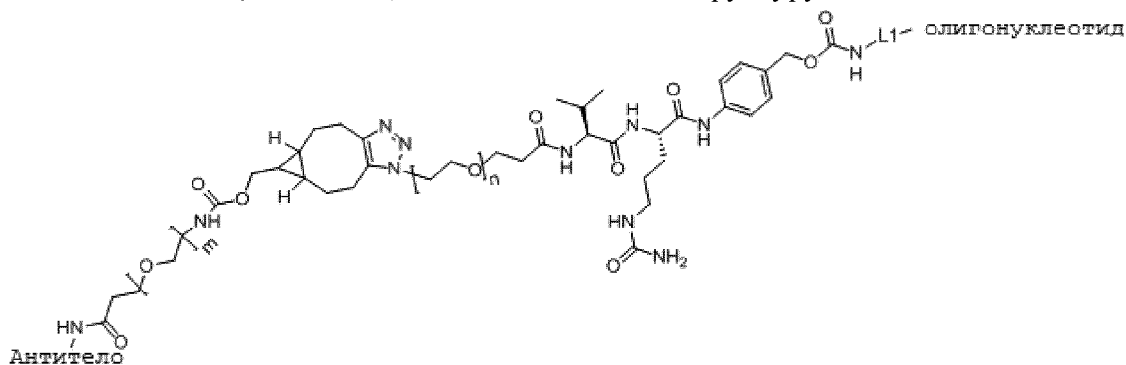
[000414] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

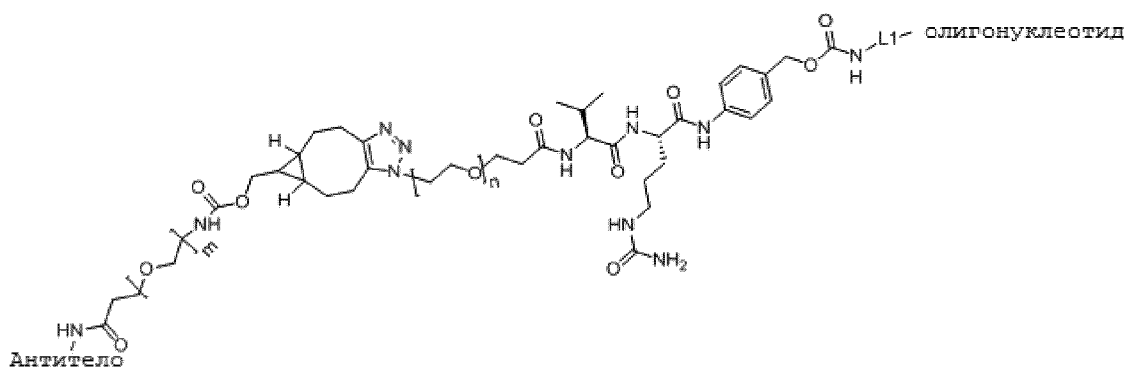
[000415] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

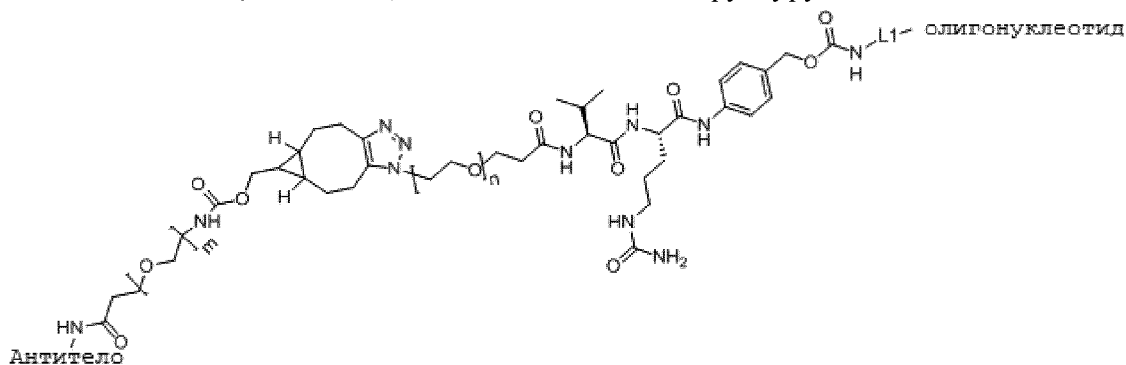
[000416] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

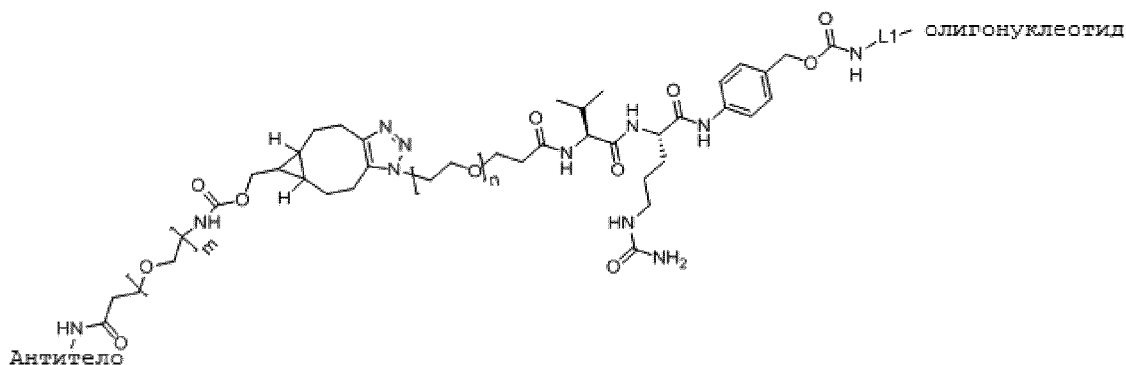
[000417] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

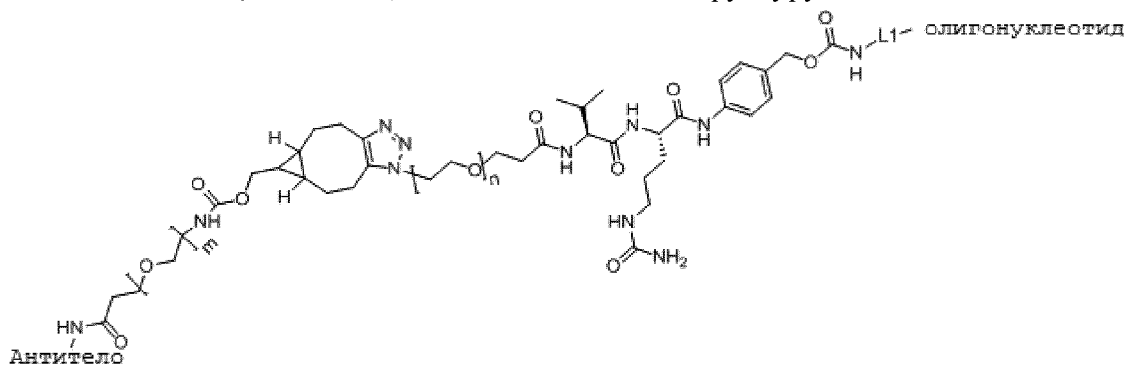
[000418] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

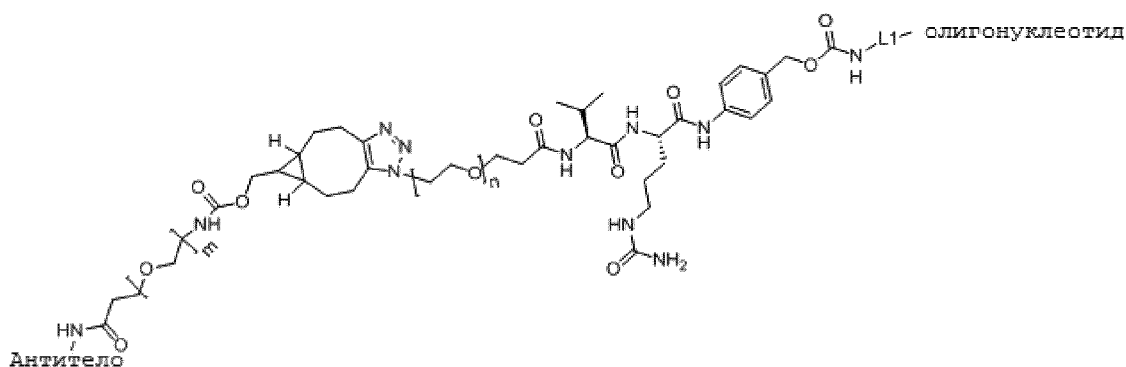
[000419] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

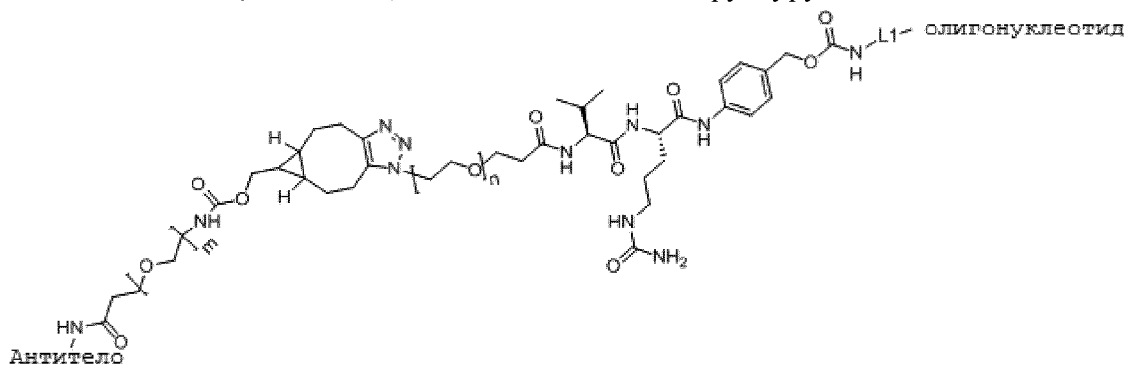
[000420] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

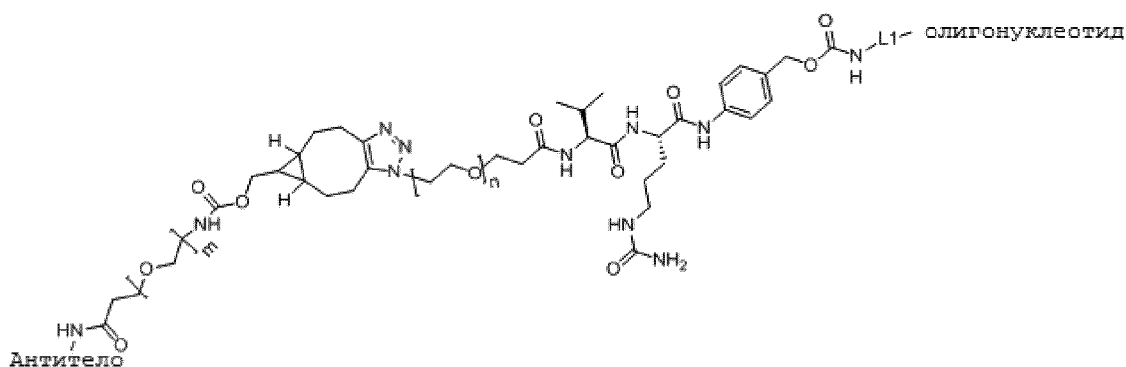
[000421] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

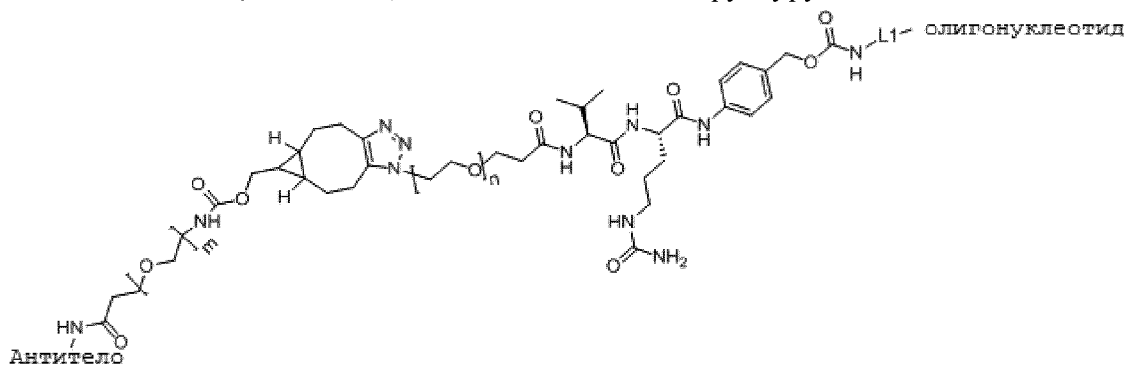
[000422] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

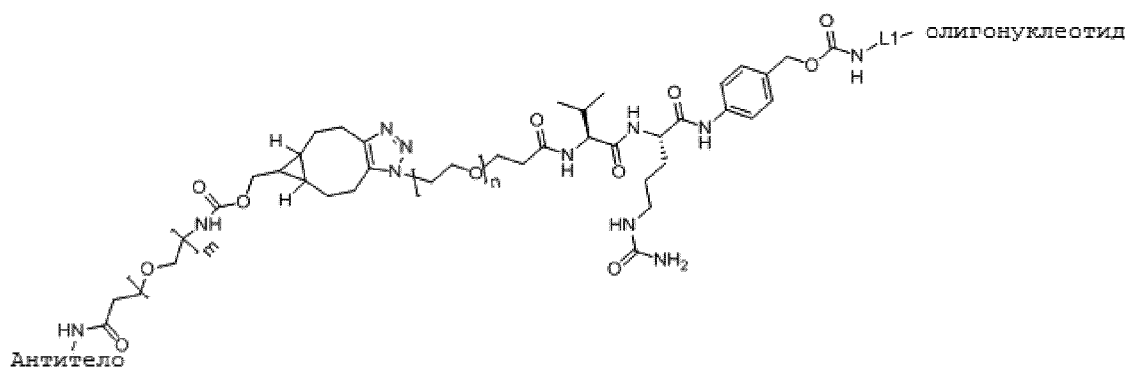
[000423] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

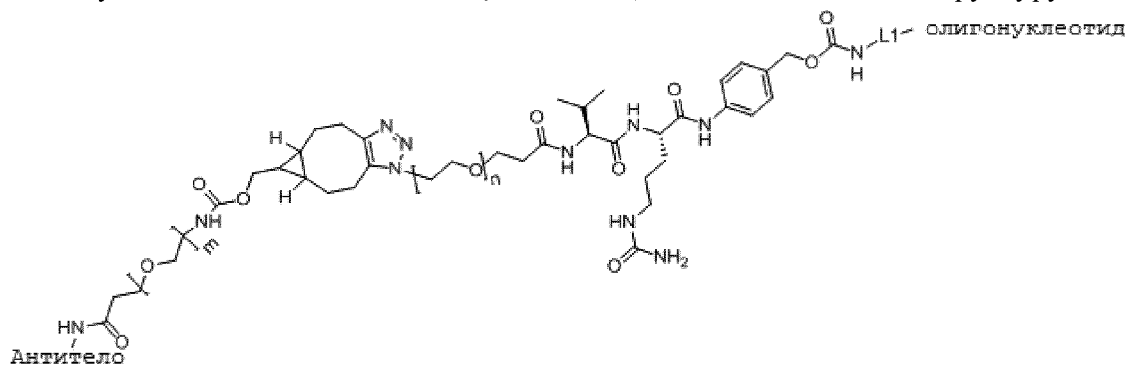
[000424] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

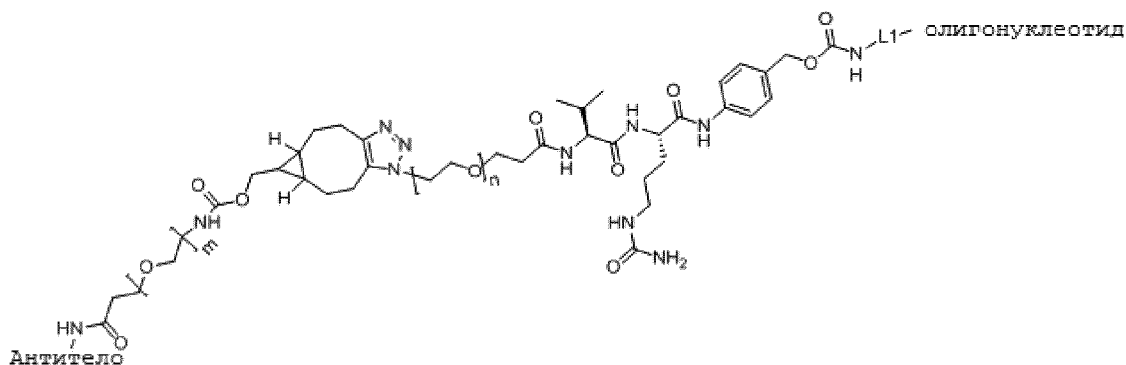
[000425] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

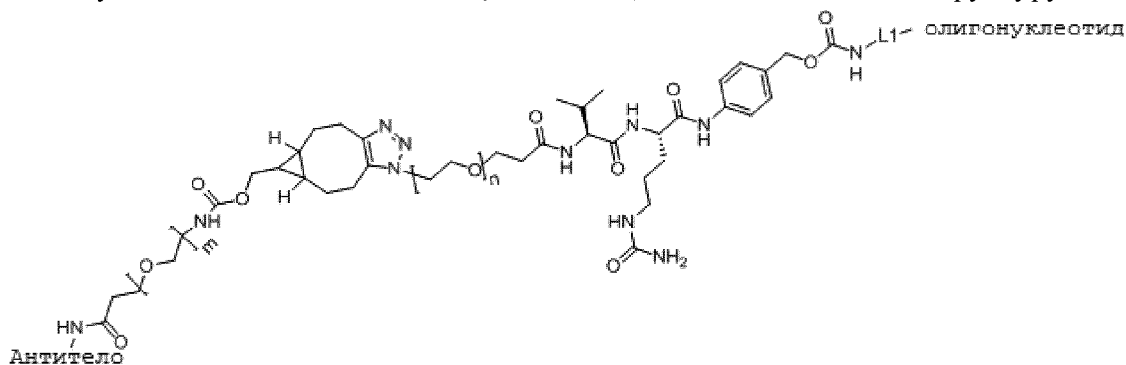
[000426] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

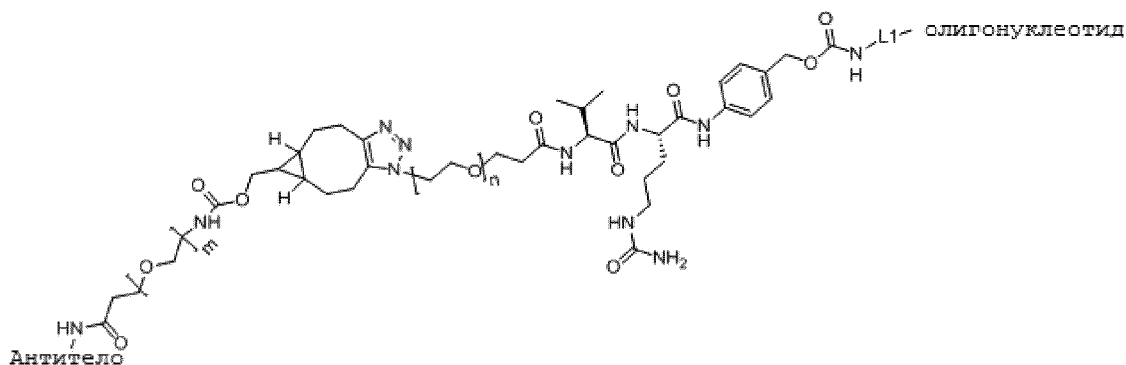
[000427] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

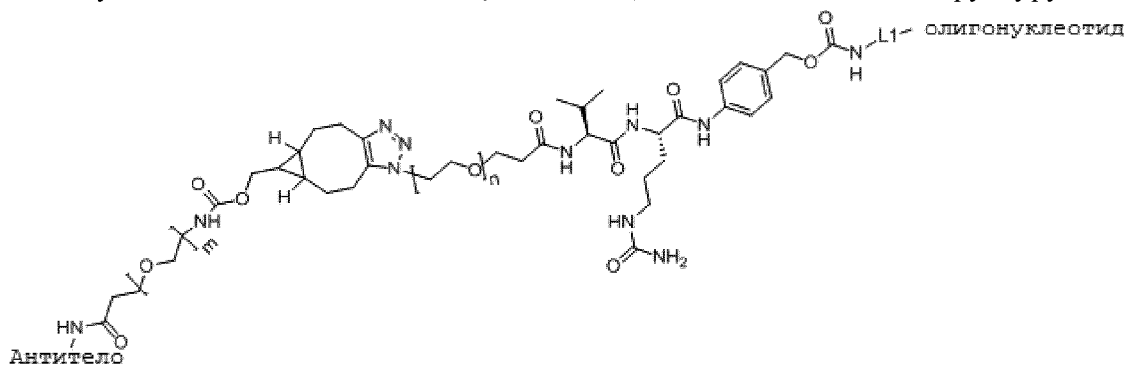
[000428] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

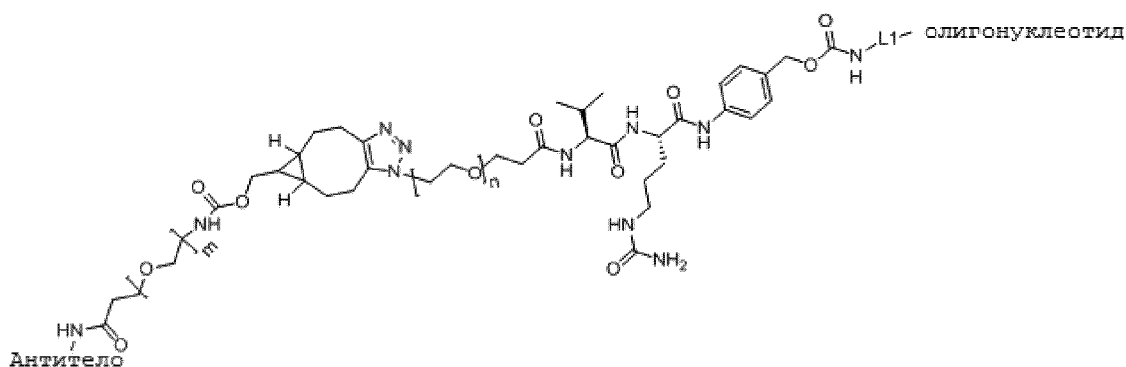
[000429] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

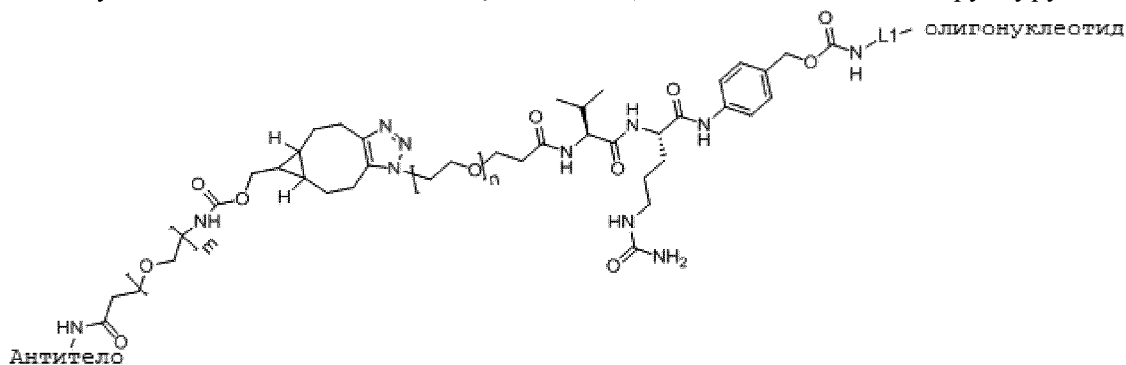
[000430] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

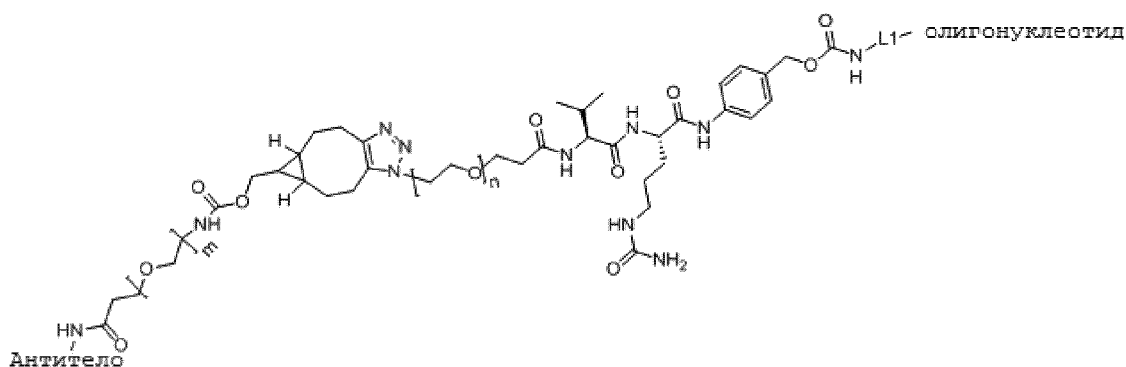
[000431] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

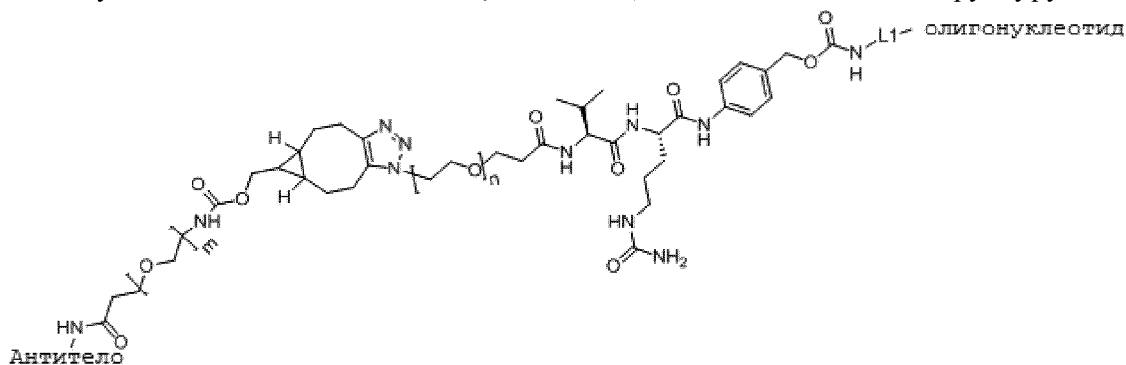
[000432] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[000433] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:

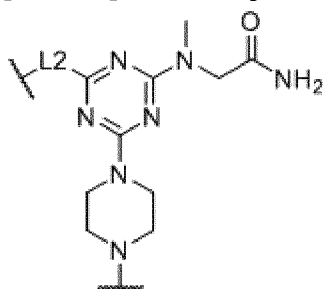


(D),

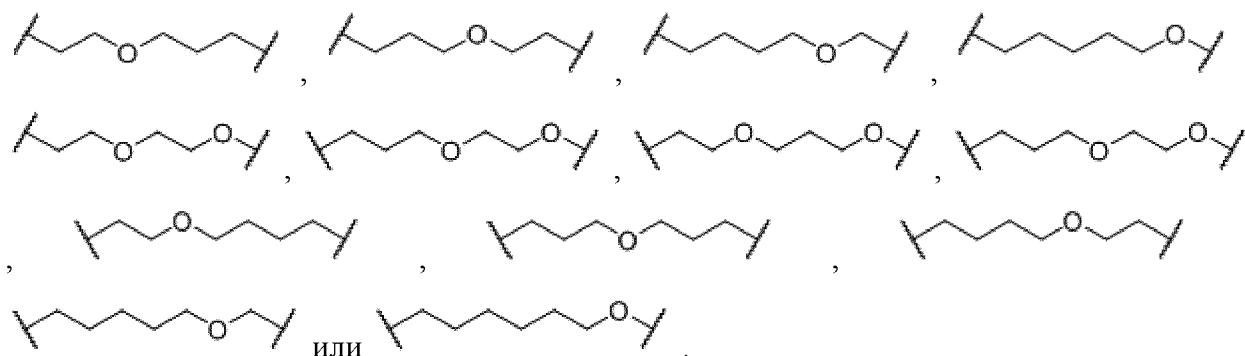
где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151).

[0004334] В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, L1 является любым из спейсеров, представленных в настоящем описании.

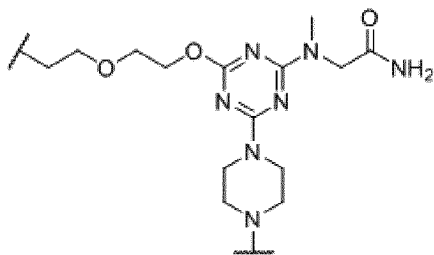
[000435] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом, где L2 является



[000436] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом.

[000437] В некоторых вариантах осуществления L1 является



[000438] В некоторых вариантах осуществления L1 связан с 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000439] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, может не присутствовать).

III. Составы

[000440] Комплексы, представленные в настоящем описании, можно составлять любым подходящим образом. Как правило, комплексы, представленные в настоящем описании, составляют способом, подходящим для фармацевтического применения. Например, комплексы можно вводить индивидууму с использованием состава, минимизирующего деградацию, облегчающего доставку и/или (например, и) захват или обеспечивающего другое благоприятное свойство комплексов в составе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим комплексы и фармацевтически приемлемые носители. Такие композиции можно соответствующим образом составлять таким образом, что, при введении индивидууму в непосредственное окружение клетки-мишени или системно, в целевые мышечные клетки проникает достаточное количество комплексов. В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в буферных растворах, таких как растворы фосфатно-солевого буфера, липосомах, мицеллярных структурах и капсидах.

[000441] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления композиции могут включать отдельно один или более компонентов комплексов, представленных в

настоящем описании (например, мышечно-специфические средства, линкеры, молекулярную нагрузку или молекулы-предшественники любых из них).

[000442] В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в воде или водном растворе (например, воде с корректировкой pH). В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в основных забуференных водных растворах (например, PBS). В некоторых вариантах осуществления составы, представленные в настоящем описании, содержат эксципиент. В некоторых вариантах осуществления эксципиент придает композиции улучшенную стабильность, улучшенную абсорбцию, улучшенную растворимость и/или (например, и) терапевтическое усиление активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления эксципиент является буферным средством (например, цитратом натрия, фосфатом натрия, Трис-основанием или гидроксидом натрия) или носителем (например, забуференным раствором, петролатум, диметилсульфоксид или минеральное масло).

[000443] В некоторых вариантах осуществления комплекс или его компонент (например, олигонуклеотид или антитело) лиофилизируют для увеличения его срока годности, а затем превращают в раствор перед использованием (например, введением индивидууму). Таким образом, эксципиент в композиции, содержащей комплекс или его компонент, представленный в настоящем описании, может являться лиопротектором (например, маннитом, лактозой, полиэтиленгликолем или поливинилпирролидоном) или модификатором температуры разрушения (например, декстраном, фиколлом или желатином).

[000444] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют так, чтобы она была совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, введение. Как правило, путь введения является внутривенным или подкожным.

[000445] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного использования, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых соединений) или дисперсии, и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий. Носитель может являться растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. В некоторых вариантах осуществления составы включают изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия в композиции. Стерильные инъеклируемые растворы можно получать посредством включения комплексов в необходимом количестве в выбранном растворителе с одним из ингредиентов, перечисленных выше, или их комбинацией, при необходимости, после стерилизации фильтрации.

[000446] В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% комплекса или его компонента или более, хотя процентная доля активных ингредиентов может составлять от приблизительно 1% до

приблизительно 80% или более по массе или объему общей композиции. При получении таких фармацевтических составов специалист в этой области будет учитывать факторы, такие как растворимость, биодоступность, биологическое время полужизни, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические факторы, и, в связи с этим, желательными могут являться разные дозы и схемы лечения.

IV. Способы применения/лечения

[000447] Комплексы, содержащие мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, как представлено в настоящем описании, является эффективным в лечении FSHD. В некоторых вариантах осуществления комплексы эффективны в лечении FSHD типа 1. В некоторых вариантах осуществления комплексы эффективны в лечении FSHD типа 2. В некоторых вариантах осуществления FSHD ассоциирована с делециями в областях повторов D4Z4 на хромосоме 4, содержащих ген DUX4. В некоторых вариантах осуществления FSHD ассоциирована с мутациями гена SMCHD1.

[000448] В некоторых вариантах осуществления индивидуум может являться человеком, не являющимся человеком приматом, грызуном или любым подходящим млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь миотоническую дистрофию. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет повышенную экспрессию гена DUX4 вне эмбрионального развития и яичек. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию типа 1 или типа 2. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, имеющий FSHD, имеет мутации в гене SMCHD1. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, имеющий FSHD, имеет делеции в области повторов D4Z4 на хромосоме 4.

[000449] Аспект настоящего изобретения включает способы, включающие введение индивидууму эффективного количества комплекса, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, можно вводить индивидууму, нуждающемуся в лечении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, представленный в настоящем описании, можно вводить подходящим путем, который может включать внутривенное введение, например, в виде болюса или посредством непрерывной инфузии в течение периода времени. В некоторых вариантах осуществления внутривенное введение можно осуществлять внутримышечным, интраперитонеальным, цереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным или интратекальным путем. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может находиться в твердой форме, водной форме или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления водную или жидкую форму можно подвергать небулизации или лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления небулизированную или лиофилизированную форму можно восстанавливать водным или жидким раствором.

[000450] Композиции для внутривенного введения могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилактамид, диметилформамид, этиллактат, этилкарбонат, изопропилмиристат, этанол и полиолы (глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.). В случае внутривенной инъекции водорастворимые антитела можно вводить капельным способом, посредством которого фармацевтический состав, содержащий антитело и физиологически приемлемые эксципиенты, подвергают инфузии. Физиологически приемлемые эксципиенты могут включать, например, 5% декстрозу, 0,9% физиологический раствор, раствор Рингера или другие подходящие эксципиенты. Внутримышечные препараты), например, стерильный состав подходящей растворимой солевой формы антитела, можно растворять и вводить в фармацевтическом эксципиенте, таком как вода для инъекций, 0,9% физиологический раствор или 5% раствор глюкозы.

[000451] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, вводят сайт-специфическими способами или способами локальной доставки. Примеры этих способов включают имплантируемые депо-источники комплекса, катетеры для локальной доставки, сайт-специфические носители, прямую инъекцию или прямое нанесение.

[000452] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, вводят в эффективной концентрации, обеспечивающий терапевтический эффект в отношении индивидуума. Как понятно специалистам в этой области, эффективные количества варьируются в зависимости от тяжести заболевания, уникальных характеристик индивидуума, подвергаемого лечению, например, возраста, физического состояния, состояния здоровья или массы тела, длительности лечения, природы сопутствующей терапии, пути введения и связанных факторов. Эти связанные факторы известны специалистам в этой области, и их можно определять с использованием не более чем рутинного экспериментирования. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация является максимальной дозой, считающейся безопасной для пациента. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация будет являться наименьшей возможной концентрацией, обеспечивающей максимальную эффективность.

[000453] Эмпирические факторы, например, время полужизни комплекса в организме индивидуума, как правило, будут учитывать при определении концентрации фармацевтической композиции, используемой для лечения. Частоту введения можно определять эмпирически и корректировать для максимизации эффективности лечения.

[000454] Как правило, в случае введения любых из комплексов, представленных в настоящем описании, начальная доза может составлять приблизительно от 1 до 100 мг/кг или более в зависимости от описанных выше факторов, например, безопасности или эффективности. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство будут вводить однократно. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство будут

вводить ежедневно, дважды в неделю, еженедельно, дважды в месяц, ежемесячно или через любой временной интервал, обеспечивающий максимальную эффективность при минимизации рисков в отношении безопасности в отношении индивидуума. Как правило, эффективность лечения и риски в отношении безопасности можно подвергать мониторингу на всем протяжении курса лечения.

[000455] Эффективность лечения можно оценивать любыми подходящими способами. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать посредством оценки наблюдения симптомов, ассоциированных с FSHD, включая потерю мышечной массы и мышечную атрофию, главным образом, в мышцах лица, лопаток и плеч.

[000456] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, вводят индивидууму в эффективной концентрации, достаточной для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% относительно контроля, например, базового уровня экспрессии до лечения.

[000457] В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1-5, 1-10, 5-15, 10-20, 15-30, 20-40, 25-50 или более дней. В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель. В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев.

[000458] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать более одного комплекса, содержащего мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно содержать любое другое подходящее терапевтическое средство для лечения индивидуума, например, человека, имеющего FSHD. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические

средства могут усиливать или дополнять эффективность комплексов, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические средства можно использовать для лечения иного симптома или заболевания, чем комплексы, представленные в настоящем описании.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Таргетинг экспрессии генов с помощью трансфицированных антисмысловых олигонуклеотидов

[000459] миРНК, нацеленную на гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), тестировали *in vitro* на способность снижать уровни экспрессии HPRT в иммортализованной линия клеток. В кратком изложении, клетки Нера 1-6 трансфицировали с использованием контрольной миРНК (siCTRL; 100 нМ) или миРНК, нацеленной на HPRT (siHPRT; 100 нМ), составленной с липофектамино 2000. Уровни экспрессии HPRT оценивали через 48 часов после трансфекции. Также осуществляли контрольный эксперимент, в котором носитель (фосфатно-солевой буфер) добавляли к клеткам Нера 1-6 в культуре и клетки поддерживали в течение 48 часов. Как показано на фиг. 1, обнаружено, что миРНК HPRT снижала уровни экспрессии HPRT на приблизительно 90% по сравнению с контролями. Используемые последовательности миРНК приведены в таблице 6.

Таблица 6. Последовательности siHPRT и siCTRL

	Последовательность	SEQ ID NO:
Смысловая цепь siHPRT	5'-UcCuAuGaCuGuAgAuUuUaU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'	152
Антисмысловая цепь siHPRT	5'-aUaAaAuCuAcAgUcAuAgGasAsu-3'	153
Смысловая цепь siCTRL	5'-UgUaAuAaCcAuAuCuAcCuU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'	154
Антисмысловая цепь siCTRL	5'-aAgGuAgAuAuGgUuAuUaCasAsa-3'	155

*строчные буквы - 2'-О-Ме-рибонуклеозиды; заглавные буквы - 2'-фторрибонуклеозиды; s - фосфотиоатная связь

Пример 2: Таргетинг HPRT с помощью мышечно-специфического комплекса

[000460] Получали мышечно-специфический, содержащий миРНК HPRT, используемую в примере 1 (siHPRT), ковалентно связанную через нерасщепляемый линкер N-гамма-малеимидобутирил-оксисукцинимидный сложный эфир (GMBS) с Fab против TfR1 RI7 217 (DTX-A-002), антителом против рецептора трансферрина.

[000461] В кратком изложении, линкер GMBS растворяли в сухом DMSO и соединяли с 3'-концом смысловой цепи siHPRT с помощью образования амидной связи в водных условиях. Завершение реакции проверяли с помощью теста Кайзера. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством гель-фильтрации. Затем очищенную, малеимид-функционализированную смысловую цепь siHPRT соединяли с антителом DTX-A-002 с использованием реакции присоединения Михаэля.

[000462] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергали очистке посредством эксклюзионной хроматографии (SEC). Очищали комплексы антитело против

TfR-siHPRT, содержащие одну или две молекулы siHPRT, ковалентно связанные с антителом DTX-A-002. С помощью денситометрии подтверждали, что очищенный образец комплексов имел среднее соотношение siHPRT и антитела 1,46. Анализ электрофореза в ПААГ с SDS показал, что >90% очищенного образца комплексов содержал DTX-A-002, связанное с одной или двумя молекулами siHPRT.

[000463] Используя способы, описанные выше, получали контрольный комплекс IgG2a-siHPRT, содержащий миРНК HPRT, используемую в примере 1 (siHPRT), ковалентно связанную через линкер GMBS с антителом IgG2a (Fab) (DTX-A-003). С помощью денситометрии подтверждали, что DTX-C-001 (комплекс IgG2a-siHPRT) имел среднее соотношение siHPRT и антитела 1,46, и анализ электрофореза в ПААГ с SDS показал, что >90% очищенного образца комплексов содержал DTX-A-003, связанное с одной или двумя молекулами siHPRT.

[000464] Затем комплекс антитело против TfR-siHPRT тестировали на клеточную интернализацию и ингибирование HPRT *in cellulo*. Клетки Нера 1-6, имеющие относительно высокие уровни экспрессии рецептора трансферрина, инкубировали в присутствии носитель (фосфатно-солевой буфер), IgG2a-siHPRT (100 нМ), комплекс антитело против TfR-siCTRL (100 нМ) или комплекс антитело против TfR-siHPRT (100 нМ) в течение 72 часов. Через 72 часа инкубации клетки выделяли и анализировали на уровни экспрессии HPRT (фиг. 2). Клетки, обработанные комплексом против TfR-siHPRT, демонстрировали снижение экспрессии HPRT на ~50% относительно клеток, обработанных контрольным носителем, и клетками, обработанными комплексом IgG2a-siHPRT. В то же время, клетки, обработанные IgG2a-siHPRT или комплекс антитело против TfR-siCTRL, имели уровни экспрессии HPRT, сравнимые с контрольным носителем (без снижения экспрессии HPRT). Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса антитело против TfR-siHPRT делает возможной клеточную интернализацию комплекса, таким образом, позволяя siHPRT ингибировать экспрессию HPRT.

Пример 3: Таргетинг HPRT в мышечных тканях мыши с помощью мышечно-специфического комплекса

[000465] Мышечно-специфический комплекс, описанный в примере 2, комплекс антитело против TfR-siHPRT, тестировали на ингибирование HPRT в тканях мышь. Мышам C57BL/6 дикого типа внутривенно инъектировали однократную дозу контрольного носителя (фосфатно-солевого буфера); siHPRT (2 мг/кг миРНК); IgG2a-siHPRT (2 мг/кг миРНК, соответствующей 9 мг/кг комплекса антитела); или комплекс антитело против TfR-siHPRT (2 мг/кг миРНК, соответствующий 9 мг/кг комплекса антитела). Каждые экспериментальные условия воспроизводили на четырех отдельных мышцах C57BL/6 дикого типа. После трехдневного периода после инъекции мышей умерщвляли и отделяли выделенные типы тканей. Затем отдельные образцы ткани анализировали на уровни экспрессии of HPRT (фиг. 3А-3В и 4А-4Е).

[000466] Мыши, которым вводили комплекс антитело против TfR-siHPRT, демонстрировали снижение экспрессии HPRT в икроножной мышце (снижение на 31%; $p < 0,05$) и сердце (снижение на 30%; $p < 0,05$) относительно мышей, которым вводили контрольную siHPRT (фиг. 3A-3B). В то же время, мыши, которым вводили комплекс IgG2a-siHPRT, имели уровни экспрессии HPRT, сравнимые с контрольной siHPRT (небольшое снижение экспрессии HPRT или его отсутствие) для всех анализируемых типов мышечных тканей.

[000467] Мыши, которым вводили комплекс антитело против TfR-siHPRT, не демонстрировали изменения экспрессии HPRT в немускульных тканях, таких как ткани головного мозга, печени, легких, почки и селезенки (фиг. 4A-4E).

[000468] Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса антитело против TfR-siHPRT делает возможной клеточную интернализацию комплекса в мышечные ткани в модели на мышцах *in vivo*, таким образом, позволяя siHPRT ингибировать экспрессию HPRT. Эти данные свидетельствуют о том, что комплексы антитело против TfR-олигонуклеотид по изобретению способны к специфическому таргетингу мышечных тканей.

Пример 4: Таргетинг DUX4 с помощью трансфицированных антисмысловых олигонуклеотидов

[000469] Три DUX4-экспрессирующие линии клеток (линии клеток A549, U-2 OS и HepG2) и иммортализованные миобласты скелетных мышц (SkMC) подвергали скринингу на экспрессию мРНК DUX4 (фиг. 5). Клетки высевали при плотности 10000 клеток/лунку и собирали для получения тотальной РНК. кДНК синтезировали из экстрактов тотальной РНК и осуществляли qPCR для определения концентрации DUX4 относительно контрольного гена (PPIB) в четырех параллелях. Эти данные использовали для облегчения выбора линии клеток U-2 OS для последующей разработки DUX4-нацеленных олигонуклеотидов.

[000470] После выбора клеток U-2 OS для разработки DUX4-нацеленных олигонуклеотидов, версии антисмыслового олигонуклеотида в виде фосфоамидатного морфолинового олигомера (PMO), нацеленного на DUX4 (FM10 PMO), оценивали на способность к таргетингу DUX4 *in vitro*. FM10 PMO содержит последовательность GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT (SEQ ID NO: 151). Контрольный фосфоамидатный морфолиновый олигомер (PMO), содержащий последовательность CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA (SEQ ID NO: 149), использовали в качестве отрицательного контроля.

[000471] В кратком изложении, клетки U-2 OS высевали при плотности 10 тыс. клеток/лунку перед восстановлением в течение ночи. Затем клетки обрабатывали контрольным PMO (10 мкМ) или FM10 PMO (10 мкМ). Клетки инкубировали в течение 72 часов перед сбором для получения тотальной РНК. Затем кДНК синтезировали из экстрактов тотальной РНК и осуществляли qPCR для определения экспрессии генов ниже DUX4 (ZSCAN4, MBD3L2, TRIM43) в четырех параллелях. Все данные qPCR

анализировали стандартным способом $\Delta\Delta CT$ и нормализовали по отрицательному контролю на планшете, содержащему необработанные клетки (т.е. без какого-либо олигонуклеотида). Затем результаты преобразовывали в кратное изменение для оценки эффективности.

[000472] Как показано на фиг. 6, все из ZSCAN4, MBD3L2 и TRIM43 демонстрировали сниженную экспрессию в присутствии FM10 РМО по сравнению с контрольным РМО (42%, 34% и 32%; соответственно). Эти данные свидетельствуют о том, что FM10 РМО способен к таргетингу DUX4 *in vitro*.

Пример 5: Таргетинг DUX4 с помощью мышечно-специфического комплекса

[000473] Получали мышечно-специфический комплекс, содержащий антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на мутантный аллель DUX4 (DUX4 ASO), ковалентно связанный через катепсин-расщепляемый линкер с DTX-A-002 (RI7 217 (Fab)), антителом против рецептора трансферрина.

[000474] В кратком изложении, молекулу линкера малеимидакапроил-L-валин-L-цитруллин-р-аминобензиловый спирт р-нитрофенилкарбоната (MC-Val-Cit-PABC-PNP) соединяли с NH_2 -C₆-DUX4 ASO с использованием реакции сопряжения амидов. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством гель-фильтрации. Затем очищенный Val-Cit-линкер-DUX4 ASO соединяли с тиолом на антителом против рецептора трансферрина (DTX-A-002).

[000475] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергали хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ) для очистки мышечно-специфического комплекса. Денситометрия и анализ электрофореза в ПААГ с SDS очищенного комплекса позволяет определять среднее соотношение ASO и антитела и общую чистоту, соответственно.

[000476] Описанными выше способами получали контрольный комплекс, содержащий DUX4 ASO, ковалентно связанный через линкер Val-Cit с антителом IgG2a (Fab).

[000477] Затем очищенный мышечно-специфический комплекс содержащий DTX-A-002, ковалентно связанный с DUX4 ASO, тестировали на клеточную интернализацию и ингибирование DUX4. Ассоциированные с заболеванием мышечные клетки, имеющие относительно высокие уровни экспрессии рецептора трансферрина, инкубировали в присутствии контрольного носителя (физиологического раствора), мышечно-специфического комплекса (100 нМ) или контрольного комплекса (100 нМ) в течение 72 часов. После 72 часов инкубации клетки выделяли и анализировали на уровни экспрессии DUX4.

Пример 6: Мышечно-специфический комплекс делает возможной клеточную интернализацию и таргетинг DUX4

[000478] Получали мышечно-специфический комплекс (антитело против TfR-FM10), содержащий FM10 РМО, ковалентно связанный с антителом против рецептора трансферрина.

[000479] В кратком изложении, очищенный Val-Cit-линкер-FM10 соединяли с функционализированным антителом 15G11, полученным посредством модификации ε-амин на лизине антитела.

[000480] Затем продукт реакции сопряжения антитела очищали. Затем использовали ультрафильтрацию для концентрирования конъюгата и с помощью денситометрии подтверждали, что этот образец комплексов антитело против TfR-FM10 имел среднее соотношение ASO и антитела 1,9.

[000481] FM10 РМО содержит последовательность GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT (SEQ ID NO: 151).

[000482] В клетки U-2 OS человека вводили комплекс. В кратком изложении, U-2 OS клетки высевали при плотности 10 тыс. клеток/лунку перед восстановлением в течение ночи. Затем клетки обрабатывали одним из следующего - контрольным носителем (PBS), миРНК, нацеленной на DUX4, "голым" FM10 РМО (1 мкМ), "голым" FM10 РМО (10 мкМ) или антителом против TfR-FM10 (1 мкМ; эквивалент 800 нМ "голового" РМО). Клетки инкубировали в течение 72 часов перед сбором для получения тотальной РНК. Затем кДНК синтезировали из экстрактов тотальной РНК и осуществляли qPCR для определения экспрессии генов ниже DUX4 (ZSCAN4, MBD3L2, TRIM43) в четырех параллелях. Все данные qPCR анализировали стандартным способом $\Delta\Delta CT$ и нормализовали по отрицательному контролю на планшете, содержащему необработанные клетки (т.е. без какого-либо олигонуклеотида). Затем результаты преобразовывали в кратное изменение для оценки эффективности.

[000483] Как показано на фиг. 7, положительная регуляция of DUX4 при FSHD приводит к положительной регуляции характерных для заболевания генов, включая ZSCAN4, MBD3L2 и TRIM43. В клетках U-2 OS, экспрессирующих DUX4 и имеющих повышенные уровни ZSCAN4, MBD3L2 и TRIM43, отражающие патологически важные явления в клетках пациентов с FSHD, обработка "голым" FM10 в количестве 1 мкМ не может снизить экспрессию ZSCAN4, MBD3L2 и TRIM43. Повышенная концентрация "голового" FM10 (до 10 мкМ) приводит к умеренному снижению экспрессии ZSCAN4 и TRIM43, но не влияет на экспрессию MBD3L2. В отличие от этого, обработка антителом против TfR-FM10 (концентрация 1 мкМ; эквивалент 800 нМ "голового" FM10) значительно снижает экспрессию MBD3L2, ZSCAN4 и TRIM43.

[000484] Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса антитело против TfR-FM10 делает возможной клеточную интернализацию комплекса в клетки U-2 OS, таким образом, позволяя FM10 РМО ингибировать экспрессию DUX4.

Пример 7: Аффинность связывания выбранных антител против TfR1 с TfR1 человека

[000485] Выбранные антитела против TfR1 тестировали на аффинность связывания с TfR1 человека для измерения K_a (константы скорости ассоциации), K_d (константы скорости диссоциации) и K_D (аффинность). В качестве контроля использовали два

известных антитела против TfR1, 15G11 и ОКТ9. Эксперимент по связыванию осуществляли с помощью Carterra LSA при 25°C. Подготавливали "газон" антитела против IgG мыши и IgG человека на чипе HC30M посредством иммобилизации по аминогруппе. IgG захватывали на чипе. Серию разведений hTfR1, cyTfR1 и hTfR2 инъецировали на чип для связывания (начиная с 1000 нМ, разведение 1:3, 8 концентраций).

[000486] Данные по связыванию определяли путем вычитания ответов от инъекции буферного анализатора и глобальной аппроксимации по модели связывания Ленгмюра 1:1 для оценки K_a (константы скорости ассоциации), K_d (константы скорости диссоциации) и K_D (аффинности) с использованием программного обеспечения Carterra™ Kinetics. Для аппроксимации кривой использовали 5-6 концентраций.

[000487] Результаты свидетельствуют о том, что mAb мыши демонстрировали связывание hTfR1 со значениями K_D в диапазоне от 13 пМ до 50 нМ. Большинство mAb мыши имело значения K_D в одноразрядном наномолярно-субнаномолярном диапазоне. 49 из 56 mAb мыши демонстрировали перекрестно-реактивное связывание с cyTfR1 со значениями K_D в диапазоне от 16 пМ до 22 нМ.

[000488] Значения K_a , K_d и K_D антител против TfR1 приведены в таблице 10.

Таблица 10. Значения K_a , K_d и K_D антител против TfR1

Название	K_D (M)	K_a (M)	K_d (M)
ctrl-15G11	2,83E-10	3,70E+05	1,04E-04
ctrl-ОКТ9 mIgG	5,36E-10	7,74E+05	4,15E-04
3-A04	4,36E-10	4,47E+05	1,95E-04
3-M12	7,68E-10	1,66E+05	1,27E-04
5-H12	2,08E-07	6,67E+04	1,39E-02

Пример 8: Конъюгация антител против TfR1 с олигонуклеотидами

[000489] Получали комплексы, содержащие антитело против TfR1, ковалентно конъюгированное с рабочим олигонуклеотидом (ASO300). Сначала Fab-фрагменты антитела против TfR клонов 3-A4, 3-M12 и 5-H12 получали посредством расщепления моноклональных антител мыши ферментом в шарнирной области или ниже шарнирной области полного IgG с последующим частичным восстановлением. Подтверждали, что Fab были сравнимы с mAb по авидности или аффинности.

[000490] Мышечно-специфические комплексы получали посредством ковалентного связывания mAb против TfR с ASO300 через катепсин-расщепляемый линкер. В кратком изложении, молекулу линкера бицикло[6.1.0]нонин-PEG3-L-валин-L-цитруллин-пентафторфенилового сложного эфира (BCN-PEG3-Val-Cit-PFP) соединяли с ASO300 с помощью карбаматной связи. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством тангенциальной поточной фильтрации (TFF). Затем очищенный Val-Cit-линкер-ASO связывали с азид-функционализированным антителом против рецептора трансферрина, полученным посредством модификации ϵ -амин на лизине с помощью азид-

PEG4-PFP. Мышечно-специфический комплекс положительного контроля также получали с использованием 15G11.

[000491] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергали двум способам очистки для удаления свободного антитела и свободной нагрузки. Концентрации конъюгатов определяли с помощью Nanodrop A280 или анализа белка BCA (для антитела) и анализа Quant-It Ribogreen (для нагрузки). Вычисляли соответствующие соотношения лекарственное средство-антитело (DAR). DAR находились в диапазоне от 0,8 до 2,0, и их стандартизировали так, что все образцы получали равное количество нагрузки.

[000492] Затем очищенные комплексы тестировали на клеточную интернализацию и ингибирование гена-мишени DMPK. Клетки не являющегося человеком примата (NHP) или клетки DM1 (полученные от пациентов с DM1) выращивали в 96-луночных планшетах, и они дифференцировались в мышечные трубочки в течение 7 дней. Затем клетки обрабатывали увеличивающимися концентрациями (0,5 нМ, 5 нМ, 50 нМ) каждого комплекса в течение 72 часов. Клетки собирали, выделяли РНК и осуществляли обратную транскрипцию для получения кДНК. qPCR осуществляли с использованием наборов TaqMan, специфических для Prib (контроль) и DMPK, с помощью QuantStudio 7. Вычисляли относительные количества оставшегося транскрипта DMPK в обработанных и необработанных клетках, и результаты приведены в таблице 11.

[000493] Результаты свидетельствовали о том, что антитела против TfR1 способны к таргетингу мышечных клеток, интернализации мышечными клетками с молекулярной нагрузкой (рабочим олигонуклеотидом ASO300), и что молекулярная нагрузка (DMPK ASO) способна к таргетингу и нокдауну гена-мишени (DMPK). Нокдаун-активность комплекса, содержащего антитело против TfR1, конъюгированное с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом), нацеленным на DUX4, можно тестировать в том же анализе с использованием олигонуклеотида, нацеленного на DUX4, такого как олигонуклеотид FM10.

Таблица 11. Аффинность связывания антител против TfR1 и эффективность конъюгатов

Название клона	Средняя K_D huTfR1 (М) (антитело в отдельности)	Средняя K_D суTfR1 (М) (антитело в отдельности)	% нокдауна DMPK в клетках NHP с использование м конъюгата антитело- DMPK ASO	% нокдауна DMPK в клетках людей- пациентов с DM1 с использование м конъюгата антитело- DMPK ASO

15G11 (контроль)	8,0E-10	1,0E-09	36	46
3-A4	4,36E-10	2,32E-09	77	70
3-M12	7,68E-10	5,18E-09	77	52
5-H12	2,02316E-07	1,20E-08	88	57

[000494] Примечательно, что результаты нокдауна DMPK свидетельствовали об отсутствии корреляции между аффинностью связывания антитела против TfR с рецептором трансферрина и эффективностью доставки DMPK ASO в клетки для нокдауна DMPK. Неожиданно, антитела против TfR, представленные в настоящем описании (например, по меньшей мере 3-A4, 3-M12 и 5-H12), демонстрировали превосходную активность при доставке нагрузки (например, DMPK ASO) в клетки-мишени и достижении биологического эффекта молекулярной нагрузки (например, нокдаун DMPK) в клетках яванского макака или клетках людей-пациентов с DM1 по сравнению с контрольным антителом 15G11, несмотря на сравнимую аффинность связывания (или, в некоторых случаях, таким как 5-H12, с более низкой аффинностью связывания) с рецептором трансферрина человека или яванского макака между этими антителами и контрольным антителом 15G11.

[000495] К выбору 3 лучших клонов для гуманизации, 3-A4, 3-M12 и 5-H12, приводили лучшие характеристики, такие как высокая аффинность к huTfR1, >50% нокдауна DMPK в линиях клеток NHP и пациентов с DM1, идентифицированное связывание эпитопов с 3 уникальными последовательностями, низкое количество/отсутствие прогнозируемых участков PTM и хорошая экспрессия и эффективность конъюгации.

Пример 9: Гуманизированные антитела против TfR1

[000496] Антитела против TfR, приведенные в таблице 2, подвергали гуманизации и мутагенезу для снижения производственных обязательств. Гуманизированные варианты подвергали скринингу и тестировали на их связывающие свойства и биологическую активность. Гуманизированные варианты вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антитела против TfR1 (5 вариантов каждой) конструировали технологии составного антитела человека. Синтезировали гены, кодирующие Fab, имеющие эти вариабельные области тяжелой и легкой цепи и конструировали векторы для экспрессии каждого варианта гуманизированных тяжелой и легкой цепей. Затем каждый вектор экспрессировали в малом масштабе и анализировали полученные гуманизированные Fab против TfR1. Гуманизированные Fab выбирали для дальнейшего тестирования в зависимости от нескольких критериев, включая анализы Biacore о аффинности антитела к антигену-мишени, относительную экспрессию, процент гомологии последовательности зародышевой линии человека и количество прогнозируемых Т-клеточных эпитопов MHC классов II (определяемых с помощью анализа *in silico* iTope™ MHC класса II).

[000497] Идентифицировали потенциальные проблемы в родительской последовательности некоторых антител, встраивая замены аминокислот в вариабельные

области тяжелой цепи и легкой цепи. Эти замены выбирали с учетом относительных уровней экспрессии, баллов iTope™ и относительной K_D в одной цикле анализа кинетики Biacore. Тестировали гуманизированные варианты и выбирали варианты исходно в зависимости от аффинности к антигену-мишени. Затем выбранные гуманизированные Fab подвергали дополнительному скринингу на основе серии биофизических оценок стабильности и склонности к агрегации и деградации каждого анализируемого варианта, приведенного в таблице 13 и таблице 14. Выбранные Fab анализировали на их свойства связывания TfR1 посредством анализа кинетики. Результаты этих анализов приведены в таблице 7. В случае конъюгатов, приведенных в таблице 13 и таблице 14, выбранные гуманизированные Fabs конъюгировали с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом ASO300. Выбранные Fab являются термически стабильными, на что указывает сравнимая аффинность связывания с TfR1 человека и яванского макака после воздействия высокой температуры (40°C) в течение 9 дней по сравнению с состоянием до воздействия (см. таблицу 7).

Таблица 13. Данные биофизической оценки гуманизированных Fab против TfR

Вариант Критерий	3M12 (VH3/Vk2)	3M12 (VH3/Vk3)	3M12 (VH4/Vk2)	3M12 (VH4/Vk3)	3A4 (VH3- N54T/Vk4)
Аффинность связывания (Biacore, день 0)	395 пМ	345 пМ	396 пМ	341 пМ	3,09 нМ
Аффинность связывания (Biacore, день 25)	567 пМ	515 пМ	510 пМ	486 пМ	3,01 нМ
Аффинность связывания Fab по результатам ELISA (TfR1 человека/яванского макака)	0,8 нМ/9,9 нМ	0,6 нМ/4,7 нМ	0,4 нМ/1,4 нМ	0,5 нМ/2,2 нМ	2,6 нМ/156 нМ*
Аффинность связывания конъюгата по результатам ELISA (TfR1 человека/яванского макака)	2,2 нМ/2,9 нМ	N/A	N/A	1,7 нМ/2,1 нМ	2,8 нМ/4,7 нМ

Вариант Критерий	3A4 (VH3- N54S/Vk4)	3A4 (VH3/Vk4)	5H12 (VH5- C33Y/Vk3)	5H12 (VH5- C33D/Vk4)	5H12 (VH4- C33Y/Vk4)
Аффинность связывания (Biacore, день 0)	1,34 нМ	1,5 нМ	627 пМ	991 пМ	626 пМ
Аффинность связывания (Biacore, день 25)	1,39 нМ	1,35 нМ	1,07 нМ	3,01 нМ	1,33 нМ
Аффинность связывания Fab по результатам ELISA (TfR1 человека/яванского макака)	1,6 нМ/398 нМ*	1,5 нМ/122 нМ*	6,3 нМ/2,1 нМ	6,0 нМ/3,5 нМ	2,8 нМ/3,3 нМ
Аффинность связывания конъюгата по результатам ELISA (TfR1 человека/яванского макака)	2,9 нМ/7,8 нМ	2,8 нМ/7,6 нМ	33,4 нМ/2,3 нМ	110 нМ/10,2 нМ	23,7 нМ/3,3 нМ

*Восстанавливает связывание с вариантом яванского макака после конъюгации;

Таблица 14. Термическая стабильность гуманизированных Fab против TfR и конъюгатов

Вариант Критерий	3M12 (VH3/Vk2)	3M12 (VH3/Vk3)	3M12 (VH4/Vk2)	3M12 (VH4/Vk3)	3A4 (VH3- N54T/Vk4)
Аффинность связывания hTfR1, день 0 (нМ)	0,8	0,6	0,4	0,5	2,6

Аффинность связывания hTfR1, день 9 (нМ)	0,98	1,49	0,50	0,28	0,40
Аффинность связывания TfR1 яванского макака, день 0 (нМ)	9,9	4,7	1,4	2,2	156
Аффинность связывания TfR1 яванского макака, день 9 (нМ)	19,51	15,58	5,01	16,40	127,50
Связывание конъюгата DMPK-олигонуклеотида с hTfR1 (нМ)	1,14	N/A	N/A	1,18	2,22
Связывание конъюгата DMPK-олигонуклеотида с TfR1 яванского макака (нМ)	2,26	N/A	N/A	1,85	5,12
Вариант Критерий	3A4 (VH3-N54S/Vk4)	3A4 (VH3/Vk4)	5H12 (VH5-C33Y/Vk3)	5H12 (VH5-C33D/Vk4)	5H12 (VH4-C33Y/Vk4)
Аффинность связывания hTfR1, день 0 (нМ)	1,6	1,5	6,3	6	2,8

Аффинность связывания hTfR1, день 9 (нМ)	0,65	0,46	71,90	92,34	1731,00
Аффинность связывания TfR1 яванского макака, день 0 (нМ)	398	122	2,1	3,5	3,3
Аффинность связывания TfR1 яванского макака, день 9 (нМ)	248,30	878,40	0,69	0,63	0,26
Связывание конъюгата DMPK-олигонуклеотида с hTfR1 (нМ)	2,71	2,837	N/A	110,5	13,9
Связывание конъюгата DMPK-олигонуклеотида с TfR1 яванского макака (нМ)	4,1	7,594	N/A	10,18	13,9

Таблица 7. Анализ кинетики связывания гуманизированных Fab против TfR с TfR1

Гуманизированные Fab против TfR	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	R_{MAX}	Chi² (RU²)
3A4 (VH3/Vk4)	7,65E+10	1,15E+02	1,50E-09	48,0	0,776
3A4 (VH3-N54S/Vk4)	4,90E+10	6,56E+01	1,34E-09	49,4	0,622
3A4 (VH3-N54T/Vk4)	2,28E+05	7,05E-04	3,09E-09	61,1	1,650
3M12 (VH3/Vk2)	2,64E+05	1,04E-04	3,95E-10	78,4	0,037
3M12 (VH3/Vk3)	2,42E+05	8,34E-05	3,45E-10	91,1	0,025
3M12 (VH4/Vk2)	2,52E+05	9,98E-05	3,96E-10	74,8	0,024

3M12 (VH4/Vk3)	2,52E+05	8,61E-05	3,41E-10	82,4	0,030
5H12 (VH5-C33D/Vk4)	6,78E+05	6,72E-04	9,91E-10	49,3	0,093
5H12 (VH5-C33Y/Vk3)	1,95E+05	1,22E-04	6,27E-10	68,5	0,021
5H12 (VH5-C33Y/Vk4)	1,86E+05	1,17E-04	6,26E-10	75,2	0,026

Связывание гуманизированных Fab против TfR1 с TfR1 (ELISA)

[000498] Для измерения связывания гуманизированных антител против TfR с TfR1 осуществляли ELISA. Сначала черные, плоскодонные 96-луночные планшеты с высоким связыванием (Corning, кат. № 3925) покрывали 100 мкл/лунку рекомбинантного huTfR1 в количестве 1 мкг/мл в PBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. Лунки опустошали и удаляли остаточную жидкость. Блокирование осуществляли посредством добавления в каждую лунку 200 мкл 1% BSA (масс./масс.) в PBS. Блокированию позволяли происходить в течение 2 часов при комнатной температуре на шейкере при 300 об./мин. После блокирования жидкость удаляли и лунки три раза промывали 300 мкл TBST. Затем добавляли антитела против TfR1 в 0,5% BSA/TBST в трех параллелях в серийных разведениях с 8 точками (диапазон разведения 5 мкг/мл-5 нг/мл). В планшеты для ELISA также включали положительный контроль и изотипический контроль. Планшеты инкубировали при комнатной температуре на орбитальном шейкере в течение 60 минут при 300 об./мин. и промывали планшеты три раза 300 мкл TBST. Антитело против (H+L)IgG-A488 (1:500) (Invitrogen, кат. № A11013) разводили 0,5% BSA в TBST и в каждую лунку добавляли 100 мкл. Затем планшеты позволяли инкубироваться при комнатной температуре в течение 60 минут при 300 об./мин. на орбитальном шейкере. Жидкость удаляли и планшеты промывали четыре раза 300 мкл TBST. Затем измеряли поглощение при длине волны возбуждения 495 нм и испускания 50 нм (с шириной полосы 15 нм) с помощью спектрофотометра для чтения планшетов. Данные регистрировали и анализировали на EC₅₀. Данные о связывании с TfR1 человека (hTfR1) для гуманизированных Fab 3M12, 3A4 и 5H12 приведены на фиг. 9А, 9С и 9Е, соответственно. Измерения ELISA осуществляли с использованием TfR1 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (сTfR1) тем же способом, описанным выше для hTfR1, и результаты приведены на фиг. 9В, 9D и 9F.

[000499] Результаты этих двух наборов анализов ELISA на связывание гуманизированных Fab против TfR с hTfR1 и сTfR1 свидетельствуют о том, что гуманизированные Fab 3M12 демонстрируют устойчивое связывание с hTfR1 и сTfR1, и что гуманизированные Fab 3A4 демонстрируют сниженное связывание с сTfR1 относительно hTfR1.

[000500] Конъюгаты антитело-олигонуклеотид получали с использованием шести гуманизированных Fab против TfR, каждый из которых конъюгирован с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом ASO300. Охарактеризовывали эффективность конъюгации и последующую очистку и измеряли различные свойства конъюгатов-продуктов. Результаты свидетельствуют о том, что эффективность конъюгации являлась устойчивой среди всех 10 тестируемых вариантов, и что способ очистки (хроматография гидрофобных

взаимодействий с последующей хроматографией на гидроксипатитной) являлся эффективным. Очищенные конъюгаты демонстрировали >97% чистоты, что анализировали посредством эксклюзионной хроматографии.

[0006] Несколько гуманизованных Fab тестировали в экспериментах по клеточному захвату для оценки TfR1-опосредованной интернализации. Для измерения такого клеточного захвата, опосредованного антителами, конъюгаты гуманизованных Fab против TfR метили Cypher5e, pH-чувствительным красителем. Клетки рабдомиосаркомы (RD) обрабатывали в течение 4 часов 100 нМ конъюгатов, трипсинизировали, дважды промывали и анализировали посредством проточной цитометрии. Среднюю флуоресценцию Cypher5e (соответствующую захвату) вычисляли с использованием программного обеспечения Attune NxT. Как показано на фиг. 10, гуманизованные Fab против TfR демонстрируют схожий или лучший эндосомальный захват по сравнению с Fab против TfR1 положительного контроля. Схожие эффективности интернализации наблюдали для разных олигонуклеотидных нагрузок. Антитело против TfR мыши использовали в качестве отрицательного контроля. Нерабочие (неинтернализующие) условия устраняли сигнал флуоресценции антитела-конъюгата положительного контроля (данные не представлены), что свидетельствует о том, что положительный сигнал в положительном контроле и конъюгатах гуманизованных Fab против TfR является результатом интернализации Fab-конъюгатов. Аналогично, олигонуклеотиды, нацеленные на DUX4, также можно конъюгировать с гуманизованными Fab против TfR, и они могут интернализироваться в мышечные клетки.

[000501] Конъюгаты шести гуманизованных Fab против TfR также тестировали на связывание с hTfR1 и cTfR1 посредством ELISA и сравнивали с неконъюгированными формами гуманизованных Fab. Результаты свидетельствуют о том, что гуманизованные Fab 3M12 и 5H12 поддерживали схожие уровни связывания hTfR1 и cTfR1 после конъюгации относительно их неконъюгированных форм (3M12, фиг. 11A и 11B; 5H12, фиг. 11E и 11F). Примечательно, что клоны 3A4 демонстрируют улучшенное связывание с cTfR1 после конъюгации относительно их неконъюгированных форм (фиг. 11C и 11D).

[000502] Как используют в этом примере, термин "неконъюгированный" означает, что антитело не конъюгировали с олигонуклеотидом.

Пример 10. Нокдаун уровня мРНК DMPK, облегчаемый конъюгатами антитело-олигонуклеотид *in vitro*

[000503] Конъюгаты, содержащие гуманизованные Fab против TfR 3M12 (VH3/Vk2), 3M-12 (VH4/Vk3) и 3A4 (VH3-N54S/Vk4), конъюгировали с DMPK-нацеленным антисмысловым олигонуклеотидом ASO300 и тестировали в клетках рабдомиосаркомы (RD) на нокдаун экспрессии транскрипта DMPK. Антитела конъюгировали с ASO300 через линкер, показанный в формуле (C).

[000504] Клетки RD культивировали в среде для выращивания DMEM с глутамином, дополненной 10% FBS и пенициллином/стрептомицином, почти до достижения

конфлюэнтности. Затем клетки высевали на 96-луночный планшет в количестве 20 тыс. клеток на лунку и позволяли им восстанавливаться в течение 24 часов. Затем клетки обрабатывали конъюгатами в течение 3 дней. Из клеток собирали тотальную РНК, синтезировали кДНК и измеряли экспрессию DMPK посредством qPCR.

[000505] Результаты на фиг. 12 свидетельствуют о том, что уровень экспрессии DMPK снижался в клетках, обработанных каждым указанным конъюгатом, относительно экспрессии в обработанных PBS клетках, что свидетельствует о том, что гуманизированные Fab против TfR могут опосредовать захват DMPK-нацеленного олигонуклеотида клетками RD, и что интернализованный DMPK-нацеленный олигонуклеотид является эффективным в нокдауне уровня мРНК DMPK. Аналогично, гуманизированные против Fab TfR также могут облегчать доставку DUX4-нацеленных олигонуклеотидов в мышечные клетки для нокдауна экспрессии DUX4.

Пример 11. Функциональная активность конъюгированных с антителом олигонуклеотидов, нацеленных на DUX4, для лечения FSHD.

[000506] Мышечные трубочки, полученные из пациентов с FSHD, обрабатывали FM10, конъюгированным с Fab против TfR1, или "голым" FM10. FM10 имеет последовательность 5'-GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT-3' (SEQ ID NO: 151). Затем в мышечных трубочках измеряли экспрессию мРНК, транскрибируемой с трех генов, как известно, экспрессирующихся только после активации DUX4. Экспрессия этих трех DUX4-ассоциированных генов снижалась, как показано на фиг. 13A ("голый" олигонуклеотид) и 13B (Ab-олигонуклеотид). Кроме того, значения полумаксимальной концентрации, необходимой для ингибирования (IC_{50}), для конъюгата были в до 9,6 раз ниже, чем наблюдаемые для "голового" FM-10, как показано в таблице 12 ниже, что свидетельствует о том, что конъюгаты являлись в до 9,6 раз более активными, чем "голый" FM10, в супрессии экспрессии DUX4-ассоциированных генов.

[000507] Дополнительными DUX4-нацеленными олигонуклеотидами, которые также можно использовать для супрессии DUX4-ассоциированных генов, являются ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 131) и UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 156).

Таблица 12. Значения IC_{50} для ингибирования DUX4-ассоциированных генов.

Транскрипт	Ab-FM-10 IC_{50} (нМ)	"Голый" FM-10 IC_{50} (нМ)	Кратное улучшение при конъюгации с Ab
ZSCAN4	67	643	9,6 раз
MBD3L2	144	1208	8,4 раз
TRIM43	352	1117	3,2 раз

Пример 12. Стабильность в сыворотке линкера, связывающего антитело против TfR и молекулярную нагрузку

[000508] Олигонуклеотиды, связанные с антителами, в примерах конъюгировали через расщепляемый линкер, показанный в формуле (C). Важно, что линкер поддерживает

стабильность в сыворотке и обеспечивает кинетику высвобождения, способствующую достаточному накоплению нагрузки в целевой мышечной клетке. Эта стабильность в сыворотке важна для системного внутривенного введения, стабильности конъюгированного олигонуклеотида в кровотоке, доставки в мышечную ткань и интернализацию терапевтической нагрузки в мышечных клетках. Подтверждено, что линкер облегчает точную конъюгацию множества типов нагрузок (включая ASO, миРНК и РМО) с Fab. Эта гибкость делает возможным рациональный выбор подходящего типа нагрузки для соответствия генетической основе каждого мышечного заболевания. Кроме того, линкер и реакция конъюгации делают возможной оптимизацию соотношения молекул нагрузки, присоединенных к каждому Fab для каждого типа нагрузки, и быстрый дизайн, производство и скрининг молекул для использования при различных мышечных заболеваниях.

[000509] На фиг. 8 показана стабильность линкера в сыворотке *in vivo*, сравниваемая между разными биологическими видами в течение 72 часов после внутривенного введения. В каждом случае измеряли по меньшей мере 75% стабильности через 72 часа после введения.

Пример 13. Характеризация связывающих активностей Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3

[000510] Осуществляли исследования *in vitro* для тестирования специфичности Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 на связывание TfR1 человека и яванского макака и подтверждения его селективности для TfR1 человека относительно TfR2. Аффинность связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с TfR1 различных видов определяли с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Серийные разведения Fab добавляли на планшеты, предварительно покрытые рекомбинантным TfR1 человека, яванского макака, мыши или крысы. После кратковременной инкубации связывание Fab количественно анализировали посредством добавления флуоресцентно меченого вторичного антитела против (H+L) IgG и измерения интенсивности флуоресценции при длине волны возбуждения 495 нм и испускания 520 нм. Fab демонстрировал сильную аффинность связывания с TfR1 человека и яванского макака, и не наблюдали детектируемого связывания TfR1 мыши или крысы (фиг. 8). Также осуществляли измерения поверхностного плазмонного резонанса (SPR), и результаты приведены в таблице 13. K_d Fab против рецептора TfR1 человека вычисляли как $7,68 \times 10^{-10}$ М и K_d Fab против рецептора TfR1 яванского макака вычисляли как $5,18 \times 10^{-9}$ М.

Таблица 15. Анализ кинетики связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с TfR1 человека и яванского макака или TfR2 человека, измеренного с использованием поверхностного плазмонного резонанса

	Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3				
Мишень	K_d (М)	k_a (М ⁻¹ с ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	R_{max}	R_{es} SD
TfR1 человека	7,68E-10	1,66E+05	1,27E-04	1,11E+02	3,45E+00

TfR1 яванского макака	5,18E-09	9,19E+04	4,76E-04	1,87E+02	6,24E+00
TfR2 человека	ND	ND	ND	ND	ND

ND=отсутствие детектируемого связывания по результатам SPR (10 пМ - 100 мкМ)

[000511] Для тестирования перекрестной реактивности Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 в отношении TfR2 человека осуществляли ELISA. Рекомбинантный белок TfR2 человека инкубировали в течение ночи в количестве 2 мкг/мл и блокировали в течение 1 часа с помощью 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) в PBS. Серийные разведения Fab или антитела против TfR2 положительного контроля добавляли в 0,5% BSA/TBST на 1 час. После промывки добавляли флуоресцентно меченое вторичное антитело против (H+L) IgG-A488 (Invitrogen, кат. № MA5-25932) в разведении 1:500 0,5% BSA/TBST и планшеты инкубировали в течение 1 часа. Относительную флуоресценцию измеряли с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Biotek Synergy при длине волны возбуждения 495 нм и испускания 520 нм. Не наблюдали связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с hTfR2 (фиг. 15).

Пример 14. Стабильность конъюгата Fab против TfR-ASO в сыворотке

[000512] Fab против TfR VH4/Vk3 конъюгировали с контрольным бессмысловым олигонуклеотидом (ASO) через линкер, как показано в формуле (C), и полученный конъюгат тестировали на стабильность линкера, с помощью которого конъюгировали Fab с ASO. Стабильность в сыворотке измеряли посредством инкубации флуоресцентно-меченого конъюгата в PBS или в сыворотке крысы, мыши, яванского макака или человека и измерения относительной интенсивности флуоресценции с течением времени, при этом более высокая флуоресценция свидетельствует о том, что больше конъюгата оставалось интактным. На фиг. 16 показано, что стабильность в сыворотке была схожей среди многих видов и оставалась высокой через 72 часа.

Пример 15. Эффекты конъюгатов, содержащих Fab против TfR, конъюгированный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом, в отношении иммортализованных миобластов, полученных от пациентов с FSHD

[000513] Fab против TfR 3M12 VH4/VK3 конъюгировали с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (SEQ ID NO: 151) через расщепляемый линкер Val-Cit для достижения повышенной доставки олигонуклеотида в мышцы. Олигонуклеотид является РМО и нацеливает сигнал полиаденилирования транскрипта DUX4. Активность конъюгата оценивали на линии иммортализованных клеток FSHD1 C6(AB1080), имеющей значительные уровни поверхностной экспрессии TfR1 и активации маркеров транскриптома DUX4 (MBD3L2, TRIM43, ZSCAN4). Показано, что рецептор-опосредованная доставка РМО (SEQ ID NO: 151) с помощью Fab против TfR в мышечные клетки приводила к ~75% снижению биомаркеров транскриптома DUX4 при концентрации РМО 8 нМ, в то время как эквивалентный неконъюгированный РМО не демонстрировал значимого снижения биомаркеров по сравнению с клетками, обработанными носителем

(фиг. 17). Результаты свидетельствуют о том, что конъюгация с Fab против TfR повышает доставку терапевтических олигонуклеотидов в мышечные клетки для лечения FSHD.

[000514] Как используют в этом примере, термин "неконъюгированный" означает, что олигонуклеотид не конъюгировали с антителом.

[000515] Кроме того, на фиг. 18А показана кривая доза-эффект для снижения мРНК MBD3L2. Значение полумаксимальной концентрации, необходимой для ингибирования (IC_{50}), для конъюгата составляло 189 пМ. Кривые доза-эффект для снижения мРНК MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4 показаны на фиг. 18В. Значения IC_{50} для конъюгата, ингибирующего MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4, составляли 200 пМ, 50 пМ и 200 пМ, соответственно.

Методика эксперимента для примера 15

Культивирование клеток и обработка тестируемым образцом

[000516] Иммутизированные миобласты FSHD C6 (AB1080) высевали до плотности 45000 клеток/лунку на 96-луночной планшете (ThermoFisher Scientific) средах для выращивания клеток скелетных мышц (кат. № C-23060, Promocell) с дополнительной смесью (C-39365, Promocell) и 1% пенициллином/стрептомицином (15140-122, Gibco). Через 24 часа среды для выращивания заменяли средами для дифференцировки, NbActiv4 (Brainbits) и 1% пенициллином/стрептомицином (Gibco). Клетки обрабатывали неконъюгированным DUX4-нацеленным олигонуклеотидом, конъюгатом с концентрацией РМО 8 нМ, носителем в технических параллелях в течение 4 часов перед однократной промывкой 1-кратным PBS (10010023, Gibco). В лунки незамедлительно снова добавляли кондиционированные среды для дифференцировки и собирали клетки через 5 дней для последующих анализов.

[000517] Для получения кривых доза-эффект для нокдауна MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4 иммутизированные миобласты FSHD C6 (AB1080) обрабатывали, как описано выше, но разными концентрациями конъюгатов.

Выделение РНК и qPCR

[000518] общую РНК выделяли из монослоев клеток с помощью набора RNeasy 96 (Qiagen) по инструкциям производителя. РНК количественно анализировали с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Biotek, разводили водой без нуклеаз (Qiagen) до 50 нг на образец и подвергали обратной транскрипцией с использованием qScript cDNA SuperMix (QuantaBio). Экспрессию генов анализировали посредством qPCR with с использованием специфических анализов TaqMan (ThermoFisher) посредством измерения уровней транскриптов TRIM43 (Hs00299174_m1), MBD3L2 (Hs00544743_m1), ZSCAN4 (Hs00537549_m1) и RPL13A (Hs04194366_g1). Двухстадийные реакции амплификации и измерения флуоресценции для определения C_t осуществляли с помощью устройства QuantStudio 7 (Thermo Scientific). Логарифмические кратные изменения экспрессии интересующих транскриптов вычисляли способом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ с использованием RPL13A в качестве референсного гена и клетки подвергали воздействию носителя в качестве контроля. Данные выражали как средние значения $\pm$ S.D.

Пример 16. Фармакокинетические свойства конъюгата антитело-олигонуклеотид у не являющихся человеком приматов

[000519] DUX4-нацеленный олигонуклеотид (SEQ ID NO: 151) вводили внутривенно не являющимся человеком приматам "голым" или конъюгированным с антителом против TfR1 (Fab 3M12 VH4/Vk3). "Голый" олигонуклеотид вводили в дозе 30 мг/кг и конъюгат вводили в дозе 3 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг эквивалента олигонуклеотида. Уровни олигонуклеотида в плазме, измеряемые с течением времени, показаны на фиг. 19. Результаты свидетельствуют о том, что системное воздействие конъюгата антитело-олигонуклеотид демонстрирует дозозависимые фармакокинетические свойства и позволяет достигать более высокого воздействия относительно "голового" олигонуклеотида. Измерения в плазме также свидетельствуют о том, что конъюгат антитело-олигонуклеотид имеет большое время полужизни в сыворотке приблизительно 60 часов. Кроме того, конъюгат антитело-олигонуклеотид демонстрирует 58-кратное повышение площади под кривой (AUC) и 3-кратное повышение C_{max} по сравнению с "голым" олигонуклеотидом в дозе эквивалента олигонуклеотида 30 мг/кг. Эти результаты обобщены в таблице 16.

Таблица 16. Фармакокинетические значения, вычисленные с помощью измерений концентраций в плазме

	Конъюгат антитело-олигонуклеотид			Олигонуклеотид
Доза (мг/кг)	3	10	30	30
C_{max} (мкг/мл)	84	242	893	305
AUC _t (ч.*мкг/мл)	969	4714	15191	260
T _{1/2} (ч.)	61	58	56	N/A

[000520] Через две недели после введения олигонуклеотида или конъюгата антитело-олигонуклеотид осуществляли некропсию, собирали мышечные ткани не являющихся человеком приматов и измеряли уровни олигонуклеотидов. В каждой тестируемой мышечной ткани (сердце, круговой мышце рта, большой скуловой мышце, диафрагме, трапециевидной мышце, дельтовидной мышце, икроножной мышце, двуглавой мышце, четырехглавой мышце и передней большеберцовой мышце) уровни олигонуклеотидов в ткани были выше для каждой дозы конъюгата антитело-олигонуклеотид (3, 10 или 30 мг/кг эквивалента олигонуклеотида) по сравнению с "голым" олигонуклеотидом (30 мг/кг) (фиг. 20). В качестве контроля также измеряли уровни олигонуклеотидов в тканях, собранных из животных, которым вводили носитель, и не определяли олигонуклеотид в любой из тестируемых мышечных тканях. Эти результаты свидетельствуют о том, что конъюгат антитело-олигонуклеотид позволяет достигать высокого воздействия DUX4-нацеленного олигонуклеотида на мышечную ткань и значимо более высокого, чем вводимый "голый" олигонуклеотид. При дозе эквивалента олигонуклеотида 30 мг/кг концентрации олигонуклеотида в каждой тестируемой мышце

были в 26-139 выше у животных, которым вводили конъюгаты антитело-олигонуклеотид, относительно "голого" олигонуклеотида.

[000521] Для оценки накопления DUX4-нацеленного олигонуклеотида в ткани с течением времени измеряли уровни олигонуклеотидов в ткани в биоптатах икроножной мышцы, собранных через неделю после введения, и сравнивали со значениями, измеренными в образцах, полученных посредством некропсии, собранных через две недели после введения. Уровни олигонуклеотида были значимо выше в биоптатах икроножной мышцы, собранных из животных, которым вводили 3, 10 или 30 мг/кг эквивалента олигонуклеотида из конъюгата антитело-олигонуклеотид, чем в биоптатах, собранных из животных, которым вводили 30 мг/кг "голого" олигонуклеотида, и уровни были даже выше в тканях, собранных через две недели после введения (фиг. 21). Не определяли олигонуклеотид в образцах тканей животных, которым вводили носитель. Эти результаты свидетельствуют о том, что конъюгат антитело-олигонуклеотид позволяет достигать высокого воздействия DUX4-нацеленного олигонуклеотида на мышечную ткань по сравнению с "голым" олигонуклеотидом, и что конъюгат продолжает накапливаться с течением времени.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для ингибирования экспрессии или активности DUX4, где мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором поверхности клетки на мышечных клетках, где мышечно-специфическое средство является гуманизированным антителом, связывающимся с рецептором трансферрина, где антитело содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 69; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 70;

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 71; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 70;

(iii) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 72; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 70;

(iv) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 73; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 74;

(viii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78;

(ix) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; или

(x) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

3. Комплекс по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, где антитело выбрано из группы, состоящей из полноразмерного IgG, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, scFv и Fv.

4. Комплекс по варианту осуществления 3, где антитело является полноразмерным IgG, необязательно, где полноразмерный IgG содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

5. Комплекс по варианту осуществления 4, где антитело содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 84; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

(ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 86; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

(iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 87; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

(iv) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 88; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 89;

(v) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 88; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 90;

(vi) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 91; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 89;

(vii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 91; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 90;

(viii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 92; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 93;

(ix) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 94; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 95; или

(x) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 92; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 95.

6. Комплекс по варианту осуществления 3, где антитело является Fab-фрагментом.

7. Комплекс по варианту осуществления 6, где антитело содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 97; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

(ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 98; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

(iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 99; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

(iv) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 100; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 89;

(v) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 100; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 90;

(vi) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 101; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 89;

(vii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 101; и/или легкую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 90;

(viii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 102; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 93;

(ix) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 103; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 95; или

(x) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 102; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 95.

8. Комплекс по варианту осуществления 6 или варианту осуществления 7, где антитело содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85;

(ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85;

(iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85;

(iv) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89;

(v) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

(vi) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89;

(vii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;

(viii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93;

(ix) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; или

(x) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

9. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-5, где равновесная константа диссоциации (K_D) связывания антитела с рецептором трансферрина находится в диапазоне от 10^{-11} М до 10^{-6} М.

10. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-9, где антитело не связывается специфически с участком связывания трансферрина рецептора трансферрина, и/или где антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.

11. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-10, где антитело перекрестно реагирует с внеклеточными эпитопами двух или более из рецепторов трансферрина человека, не являющегося человеком примата и грызуна.

12. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-11, где комплекс сконфигурирован для стимуляции опосредованной рецептором трансферрина интернализации молекулярной нагрузки в мышечную клетку.

13. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-12, где антитело является химерным антителом, где, необязательно, химерное антитело является гуманизированным моноклональным антителом.

14. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-13, где антитело находится в форме ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента или Fv-фрагмента.

15. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-14, где молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом.

16. Комплекс по варианту осуществления 15, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов SEQ ID NO: 151 (GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT).

17. Комплекс по варианту осуществления 16, где олигонуклеотид содержит SEQ ID NO: 151 (GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT).

18. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17, где олигонуклеотид содержит последовательность, комплементарную по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам SEQ ID NO: 150 (AGTTCAGAGATATATTAATGCCC).

19. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-18, где олигонуклеотид содержит область комплементарности гену DUX4.

20. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-14, где молекулярная нагрузка является полипептидом, ингибирующим экспрессию DUX4.

21. Комплекс по варианту осуществления 20, где полипептид связывается с энхансерной последовательностью DUX4, таким образом, блокируя рекрутирование одного или более активаторов экспрессии DUX4.

22. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19, где олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, гибридизующуюся в клетке с транскриптом мРНК DUX4 дикого типа, кодируемым аллелем.

23. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19, где олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, гибридизующуюся в клетке с мутантным транскриптом мРНК DUX4, кодируемым аллелем.

24. Комплекс по варианту осуществления 23, где олигонуклеотид содержит цепь, комплементарную кодирующей последовательности DUX4.

25. Комплекс по варианту осуществления 23, где олигонуклеотид содержит цепь, комплементарную некодирующей последовательности DUX4.

26. Комплекс по варианту осуществления 25, где олигонуклеотид содержит цепь, комплементарную последовательности 5'- или 3'-UTR DUX4.

27. Комплекс по варианту осуществления 23, где олигонуклеотид опосредует эпигенетический сайленсинг DUX4.

28. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19 или 22-27, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь.

29. Комплекс по варианту осуществления 28, где по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь является фосфотиоатной связью.

30. Комплекс по варианту осуществления 29, где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи в стереохимической конформации Rp и/или стереохимической конформации Sp.

31. Комплекс по варианту осуществления 30, где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи, все из которых находятся в стереохимической конформации Rp или все из которых находятся в стереохимической конформации Sp.

32. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19 или 22-31, где олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеотидов.

33. Комплекс по варианту осуществления 32, где один или более модифицированных нуклеотидов являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

34. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19 или 22-33, где олигонуклеотид является гэлмерным олигонуклеотидом, направляющим опосредованное РНКазой H расщепление транскрипта мРНК DUX4 в клетке.

35. Комплекс по варианту осуществления 34, где гэлмерный олигонуклеотид содержит центральную часть из 5-15 дезоксирибонуклеотидов, фланкированную 2-8 модифицированными нуклеотидами.

36. Комплекс по варианту осуществления 35, где фланкирующие модифицированные нуклеотиды являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

37. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19 или 22-33, где олигонуклеотид является миксмерным олигонуклеотидом.

38. Комплекс по варианту осуществления 37, где миксмерный олигонуклеотид ингибирует трансляцию транскрипта мРНК DUX4.

39. Комплекс по варианту осуществления 37 или 38, где миксмерный олигонуклеотид содержит два или более разных 2'-модифицированных нуклеотида.

40. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19 или 22-33, где олигонуклеотид является РНКи-олигонуклеотидом, способствующим РНКи-опосредованному расщеплению транскрипта мРНК DUX4.

41. Комплекс по варианту осуществления 40, где РНКи-олигонуклеотид является двухцепочечным олигонуклеотидом длиной 19-25 нуклеотидов.

42. Комплекс по варианту осуществления 40 или 41, где РНК-олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид.

43. Комплекс по варианту осуществления 33, 36, 39 или 42, где каждый 2'-модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-О-метил-, 2'-фтор- (2'-F), 2'-О-метоксиэтил- (2'-МОЕ) и 2',4'-мостиковых нуклеотидов.

44. Комплекс по варианту осуществления 32, где один или более модифицированных нуклеотидов являются мостиковыми нуклеотидами.

45. Комплекс по варианту осуществления 33, 36, 39 или 42, где по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид является 2',4'-мостиковым нуклеотидом, выбранным из: 2',4'-нуклеотидами с затрудненным 2'-О-этилом (сEt) и замкнутой нуклеиновой кислотой (ЗНК).

46. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19 или 22-33, где олигонуклеотид содержит гидовую последовательность для нуклеазы редактирования генома.

47. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-19 или 22-33, где олигонуклеотид является фософамидатным морфолиновым олигомером.

48. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-47, где мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через расщепляемый линкер.

49. Комплекс по варианту осуществления 48, где расщепляемый линкер выбран из: протеаза-чувствительного линкера, рН-чувствительного линкера и глутатион-чувствительного линкера.

50. Комплекс по варианту осуществления 49, где расщепляемый линкер является протеаза-чувствительным линкером.

51. Комплекс по варианту осуществления 50, где протеаза-чувствительный линкер содержит последовательность, расщепляемую лизосомальной протеазой и/или эндосомальной протеазой.

52. Комплекс по варианту осуществления 50, где протеаза-чувствительный линкер содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин.

53. Комплекс по варианту осуществления 49, где линкер является рН-чувствительным линкером, расщепляемым при рН в диапазоне от 4 до 6.

54. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-47, где мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через нерасщепляемый линкер.

55. Комплекс по варианту осуществления 54, где нерасщепляемый линкер является алкановым линкером.

56. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-55, где антитело содержит неприродную аминокислоту, с которой олигонуклеотид ковалентно связан.

57. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-55, где антитело ковалентно связано с олигонуклеотидом посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела.

58. Комплекс по варианту осуществления 57, где олигонуклеотид конъюгирован с цистеином антитела через малеимид-содержащий линкер, необязательно, где малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроил- или малеимидоометил-циклогексан-1-карбоксилатную группу.

59. Комплекс по вариантам осуществления 1-58, где антитело является гликозилированным антителом, содержащим по меньшей мере один остаток сахара, с которым ковалентно связан олигонуклеотид.

60. Комплекс по варианту осуществления 59, где остаток сахара является разветвленной маннозой.

61. Комплекс по варианту осуществления 59 или 60, где антитело является гликозилированным антителом, содержащим от одного до четырех остатков сахара, каждый из которых ковалентно связан с отдельным олигонуклеотидом.

62. Комплекс по варианту осуществления 59, где антитело является полностью гликозилированным антителом.

63. Комплекс по варианту осуществления 59, где антитело является частично гликозилированным антителом.

64. Комплекс по варианту осуществления 63, где частично гликозилированное получают химическими или ферментативными средствами.

65. Комплекс по варианту осуществления 63, где частично гликозилированное антитело продуцируется в клетке с дефицитом фермента пути N- или O-гликозилирования.

66. Способ доставки молекулярной нагрузкой в клетку, экспрессирующую рецептор трансферрина, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из вариантов осуществления 1-65.

67. Способ ингибирования экспрессии или активности DUX4 в клетке, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из вариантов осуществления 1-65 в количестве, эффективном для стимуляции интернализации молекулярной нагрузки в клетку.

68. Способ по варианту осуществления 67, где клетка находится *in vitro*.

69. Способ по варианту осуществления 67, где клетка находится в организме индивидуума.

70. Способ по варианту осуществления 69, где индивидуум является человеком.

71. Способ лечения индивидуума, имеющего одну или более делеций повтора D4Z4 на хромосоме 4, ассоциированного с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из вариантов осуществления 1-65.

72. Способ по варианту осуществления 71, где индивидуум имеет 10 или менее повторов D4Z4.

73. Способ по варианту осуществления 72, где индивидиум имеет 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 повтор D4Z4.

74. Способ по варианту осуществления 72, где индивидиум не имеет повторов D4Z4.

75. Комплекс, содержащий антитело против рецептора трансферрина (TfR), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для снижения экспрессии или активности DUX4, где антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 76; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 75;

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 69; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 70;

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 71; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 70;

(iv) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 72; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 70;

(v) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 73; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 74;

(vi) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 73; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 75;

(vii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 76; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 74;

(viii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 77; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 78;

(ix) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 79; и/или

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 80; или

(х) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 77; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 80.

76. Комплекс, содержащий антитело против рецептора трансферрина (TfR), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для снижения экспрессии или активности DUX4, где антитело против TfR подвергается образованию пироглутамата, являющемуся результатом посттрансляционной модификации.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ТЕРМИНОЛОГИЯ

[000522] Настоящее изобретение, иллюстративно представленное в настоящем описании, соответствующим образом можно осуществлять на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не представленных в настоящем описании. Таким образом, например, в каждом случае в настоящем описании любой из терминов "содержащий", "состоящий, по существу, из" и "состоящий из" можно заменять любым из других двух терминов. Используемые термины и выражения используют в качестве описательных терминов, а не ограничивающих, и в использовании таких терминов и выражений нет намерений исключить любые эквиваленты, приведенные и описанные признаки или их части, но известно, что в объеме настоящего изобретения возможны различные модификации. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящее изобретение конкретно описано с помощью предпочтительных вариантов осуществления, специалисты в этой области могут определять необязательные признаки, модификации и варианты концепций, представленных в настоящем описании, и что такие модификации и варианты считают входящими в объем настоящего изобретения.

[000523] Кроме того, если признаки или аспекты настоящего изобретения описаны в терминах групп Маркуша или другой группировки альтернатив, специалистам в этой области понятно, что изобретение, таким образом, также описано в терминах любого отдельного члена, или подгруппы членов группы Маркуша, или другой группы.

[000524] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления последовательности, приведенные в списке последовательностей, могут относиться к описанию структуры олигонуклеотида или другой нуклеиновой кислоты. В таких вариантах осуществления конкретный олигонуклеотид или другая нуклеиновая кислота может содержать один или более альтернативных нуклеотидов (например, РНК, соответствующей нуклеотиду ДНК, или ДНК, соответствующей нуклеотиду РНК), и/или (например, и) один или более модифицированных нуклеотидов, и/или (например, и) одну или более модифицированных межнуклеотидных связей, и/или (например, и) одну или более других модификаций по сравнению с определенной последовательностью при

сохранении, по существу, тех же или схожих комплементарных свойств, что и определенная последовательность.

[000525] Использование терминов в единственном числе в отношении описания изобретения (особенно в отношении формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее единственное и множественное число, если иное не указано в настоящем описании или это ясно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" следует истолковывать как неограничивающие термины (т.е. означающие "включающий в качестве неограничивающих примеров"), если не указано иначе. Перечисление диапазонов значений в настоящем описании является исключительно способом сокращенной записи со ссылкой индивидуально на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если в настоящем описании не указано иначе, и каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно было отдельно приведено в настоящем описании. Все способы, представленные в настоящем описании, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если не указано иначе в настоящем описании или это четко не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или вводных слов перед примерами (например, "таких как"), представленных в настоящем описании, предназначено исключительно для лучшего иллюстрирования настоящего изобретения, а не для ограничения объема изобретения, если не указано иначе. Никакие термины в описании не следует истолковывать как указывающие на любой незаявленный элемент как необходимый для практического осуществления изобретения.

[000526] Варианты осуществления настоящего изобретения представлены в настоящем описании. Варианты этих вариантов осуществления могут становиться очевидными специалистам в этой области после прочтения изложенного выше описания.

[000527] Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в этой области будут использовать такие варианты при необходимости, и авторы настоящего изобретения предполагают, что изобретение будут осуществлять на практике иначе, чем конкретно представлено в настоящем описании. Таким образом, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объектов изобретения, описанных в формуле изобретения в соответствии с действующим законодательством. Кроме того, изобретение включает любую комбинацию описанных выше элементов во всех возможных вариантах, если в настоящем описании не указано иначе или это четко не противоречит контексту. Специалистам в этой области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, или они могут определить их с использованием не более чем рутинного экспериментирования. Такие эквиваленты предусмотрены формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комплекс, содержащий антитело против рецептора трансферрина (TfR), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для снижения экспрессии или активности DUX4, где антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 76; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 75;

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 69; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 70;

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 71; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 70;

(iv) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 72; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 70;

(v) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 73; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 74;

(vi) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 73; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 75;

(vii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 76; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 74;

(viii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 77; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 78;

(ix) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 79; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 80; или

(х) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 77; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 80.

2. Комплекс по п.1, где антитело содержит:

(i) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75;

(ii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(iii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(iv) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(v) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74;

(vi) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75;

(vii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74;

(viii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78;

(ix) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; или

(х) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

3. Комплекс по п.1 или 2, где антитело выбрано из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, scFv, Fv и полноразмерного IgG.

4. Комплекс по п.3, где антитело является Fab-фрагментом.

5. Комплекс по п.4, где антитело содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 101; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 90;

(ii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 97; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

(iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 98; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

100; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;
 (vii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89;
 (viii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93;
 (ix) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; или
 (x) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

7. Комплекс по любому из пп.1-6, где антитело не связывается специфически с участком связывания трансферрина рецептора трансферрина, и/или где антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.

8. Комплекс по любому из пп.1-7, где антитело перекрестно реагирует с внеклеточными эпитопами двух или более из рецепторов трансферрина человека, не являющегося человеком примата и грызуна.

9. Комплекс по любому из пп.1-8, где комплекс сконфигурирован для стимуляции опосредованной рецептором трансферрина интернализации молекулярной нагрузки в мышечную клетку.

10. Комплекс по любому из пп.1-9, где молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом.

11. Комплекс по п.10, где олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности РНК DUX4.

12. Комплекс по п.11, где олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности не кодирующей области РНК DUX4.

13. Комплекс по п.11, где олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, содержащую область комплементарности 5'- или 3'-UTR РНК DUX4.

14. Комплекс по п.10, где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов SEQ ID NO: 151 (GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT).

15. Комплекс по п.11, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151 (GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT).

16. Комплекс по любому из пп.11-15, где олигонуклеотид дополнительно содержит смысловую цепь, гибридизующуюся с антисмысловой цепью с образованием двухцепочечной миРНК.

17. Комплекс по любому из пп.10-16, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

18. Комплекс по любому из пп.10-17, где олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеозидов.

19. Комплекс по п.18, где один или более модифицированных нуклеозидов являются 2'-модифицированными нуклеозидами.

20. Комплекс по любому из пп.10-15, где олигонуклеотид является фосфоамидатным

морфолиновым олигомером.

21. Комплекс по любому из пп.1-20, где антитело ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через расщепляемый линкер.

22. Комплекс по п.21, где расщепляемый линкер содержит последовательность валин-цитруллин.

23. Комплекс по любому из пп.1-22, где антитело ковалентно связано с молекулярной нагрузкой посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела.

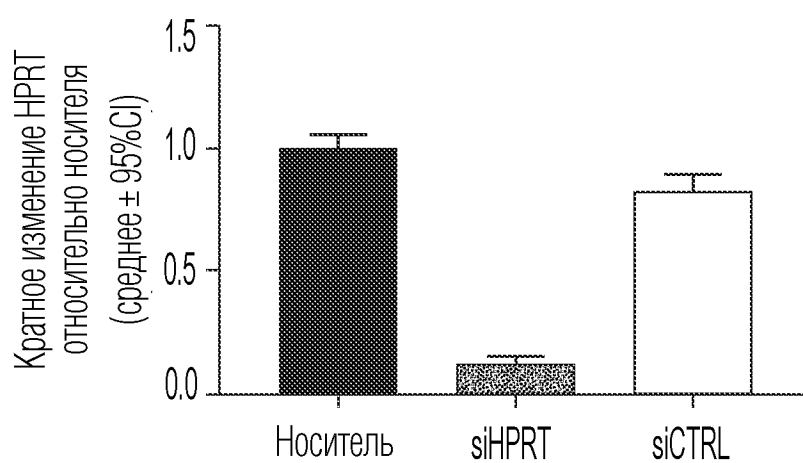
24. Комплекс по любому из пп.1-23, где снижение экспрессии или активности DUX4 включает снижение уровней РНК DUX4.

25. Комплекс по любому из пп.1-24, где снижение экспрессии или активности DUX4 включает снижение уровней белка DUX4.

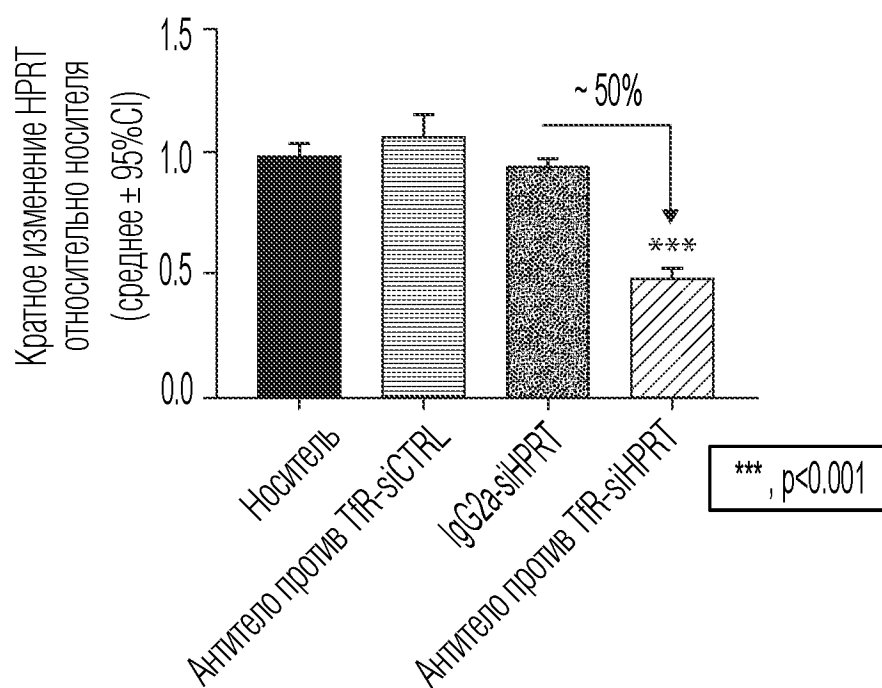
26. Способ снижения экспрессии или активности DUX4 в клетке, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из пп.1-25 в эффективном количестве для стимуляции интернализации молекулярной нагрузки в клетку, необязательно, где клетка является мышечной клеткой.

27. Способ лечения индивидуума, имеющего одну или более делеций повтора D4Z4 на хромосоме 4, ассоциированного с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из пп.1-25.

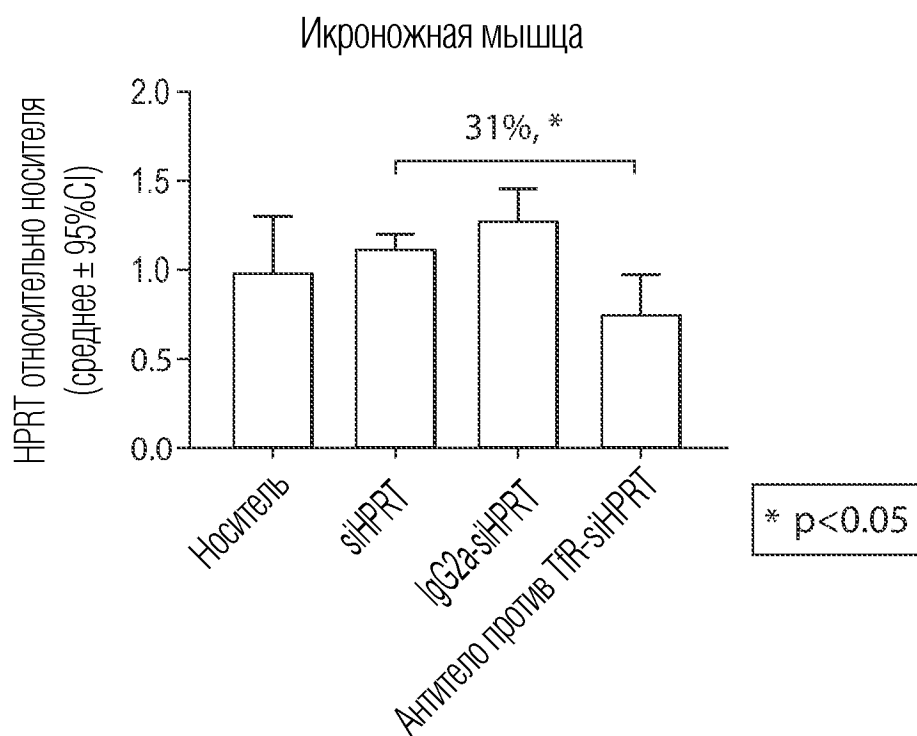
По доверенности



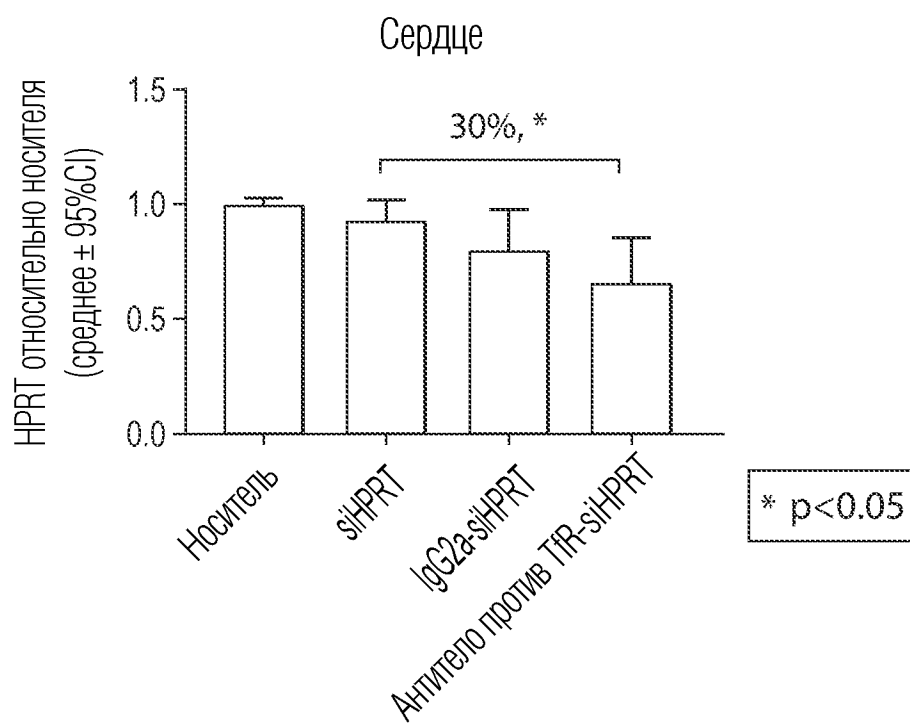
ФИГ. 1



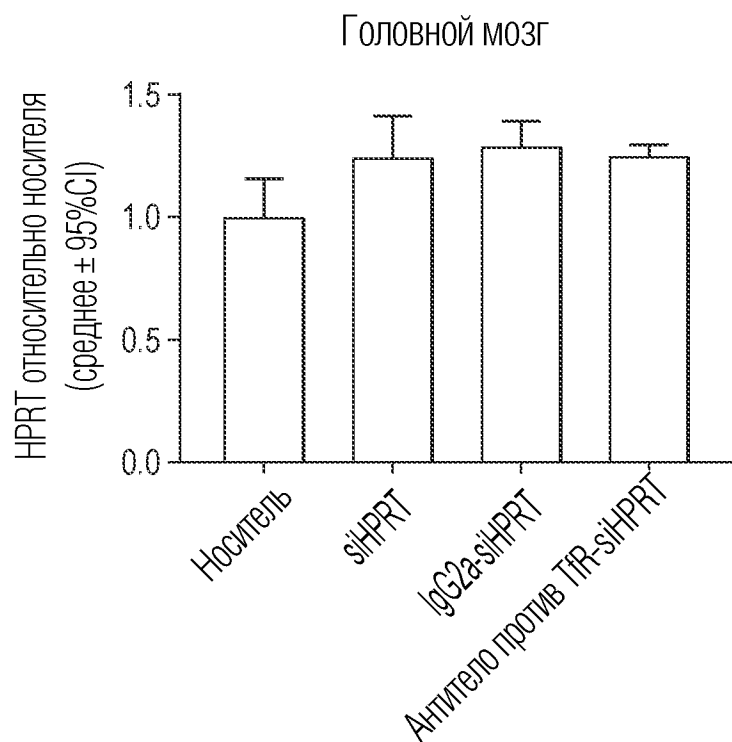
ФИГ. 2



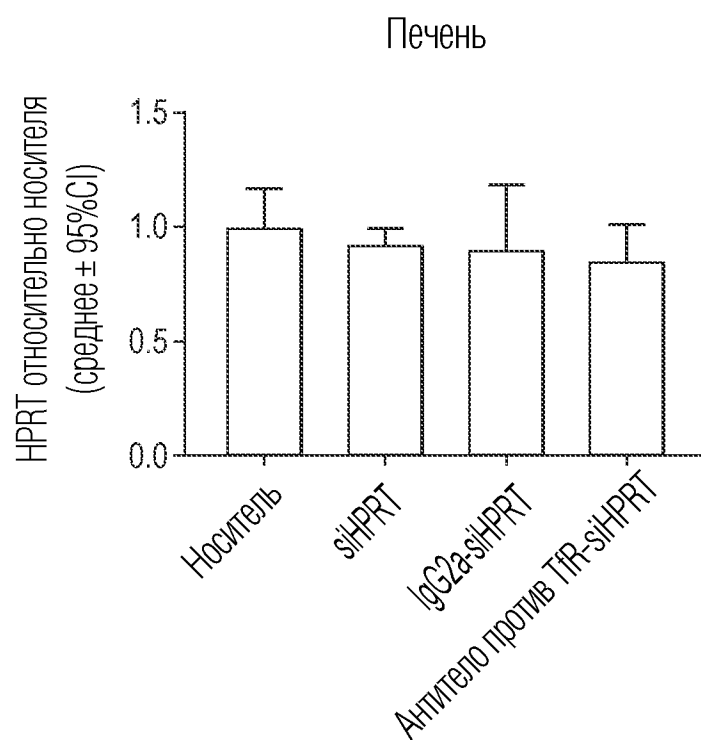
ФИГ. 3А



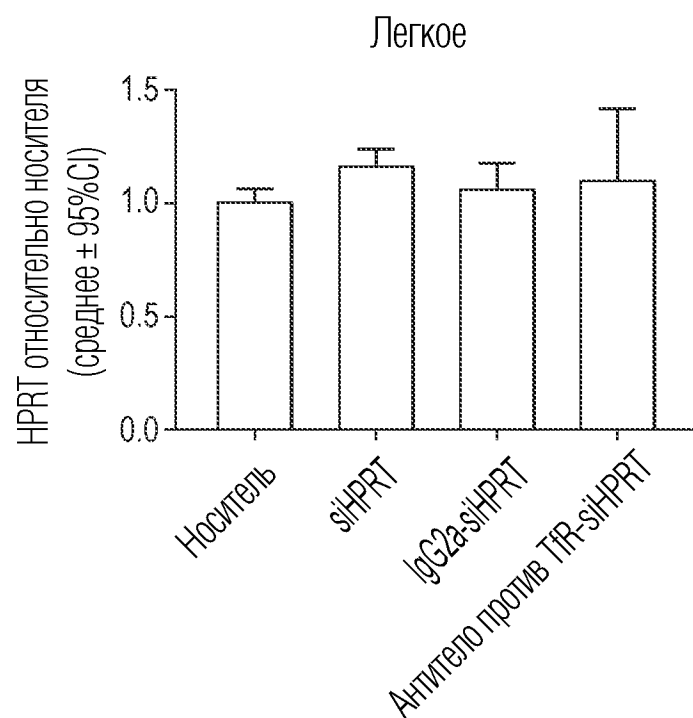
ФИГ. 3В



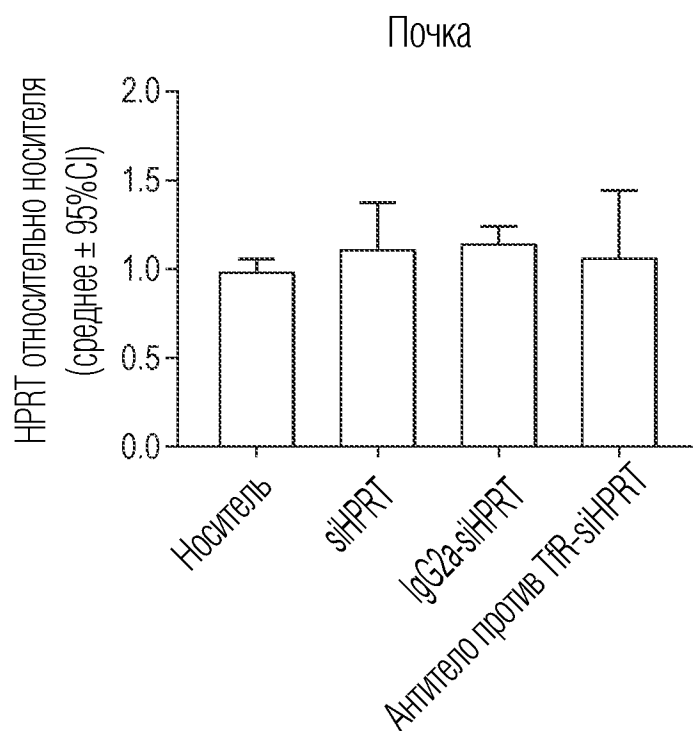
ФИГ. 4А



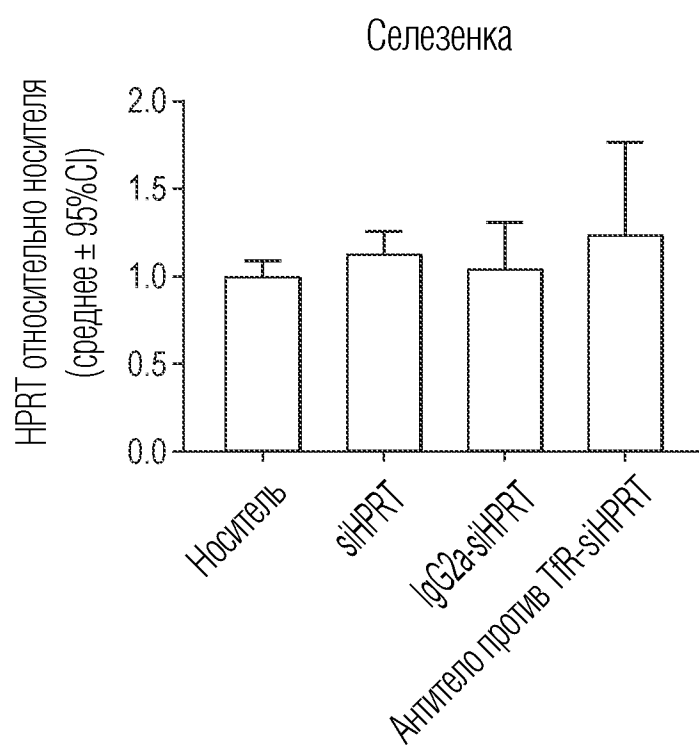
ФИГ. 4В



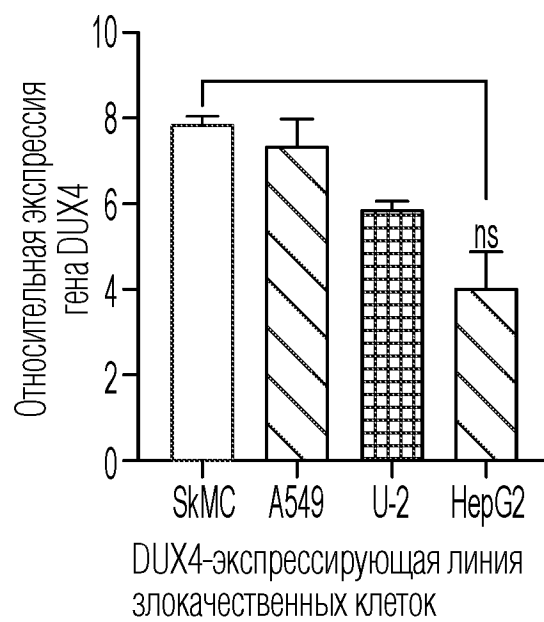
ФИГ. 4С



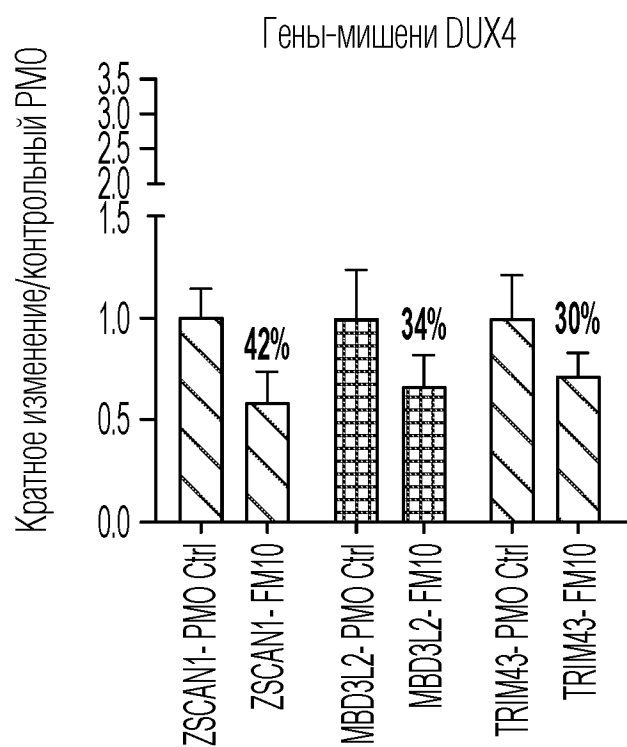
ФИГ. 4D



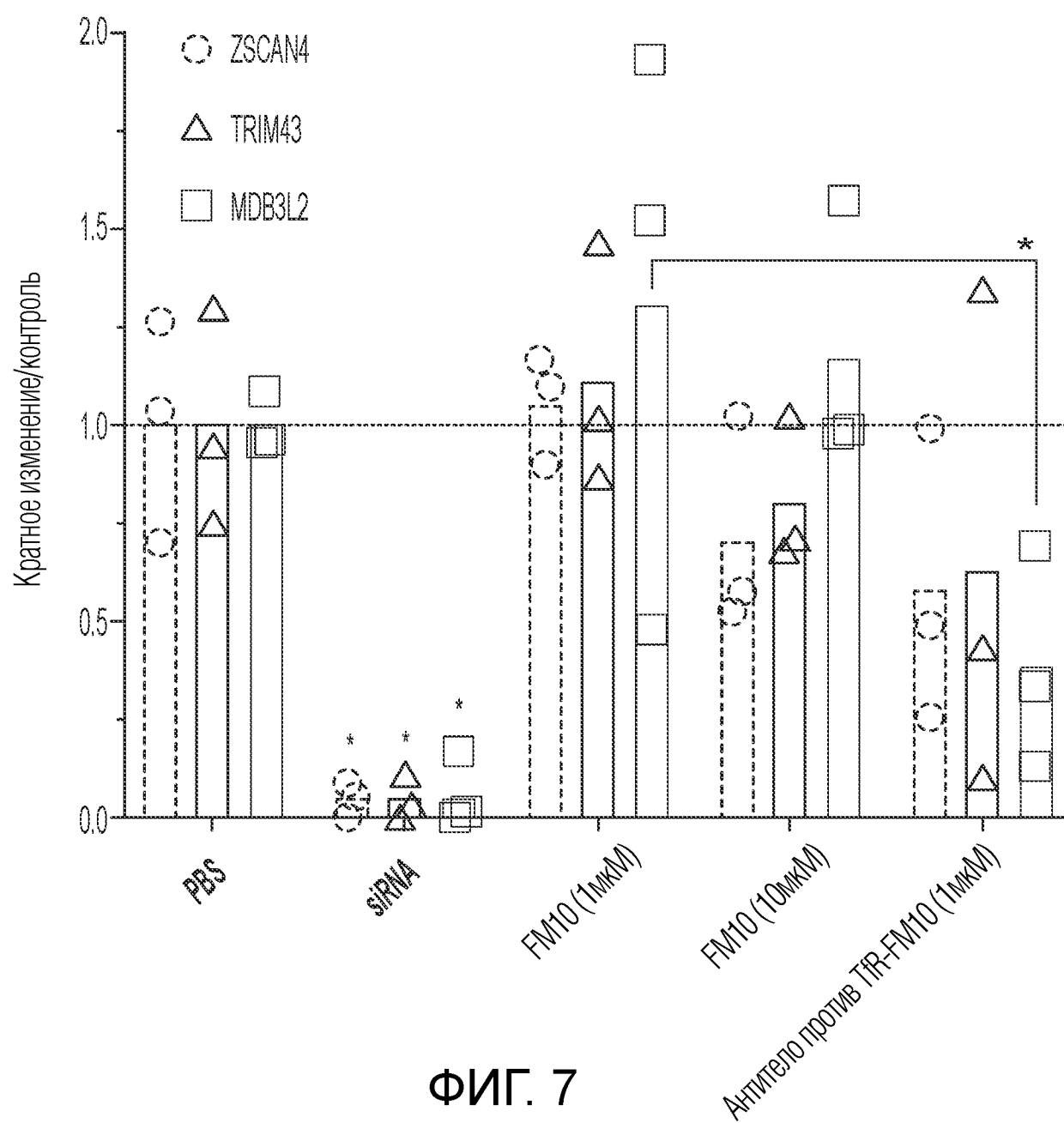
ФИГ. 4Е

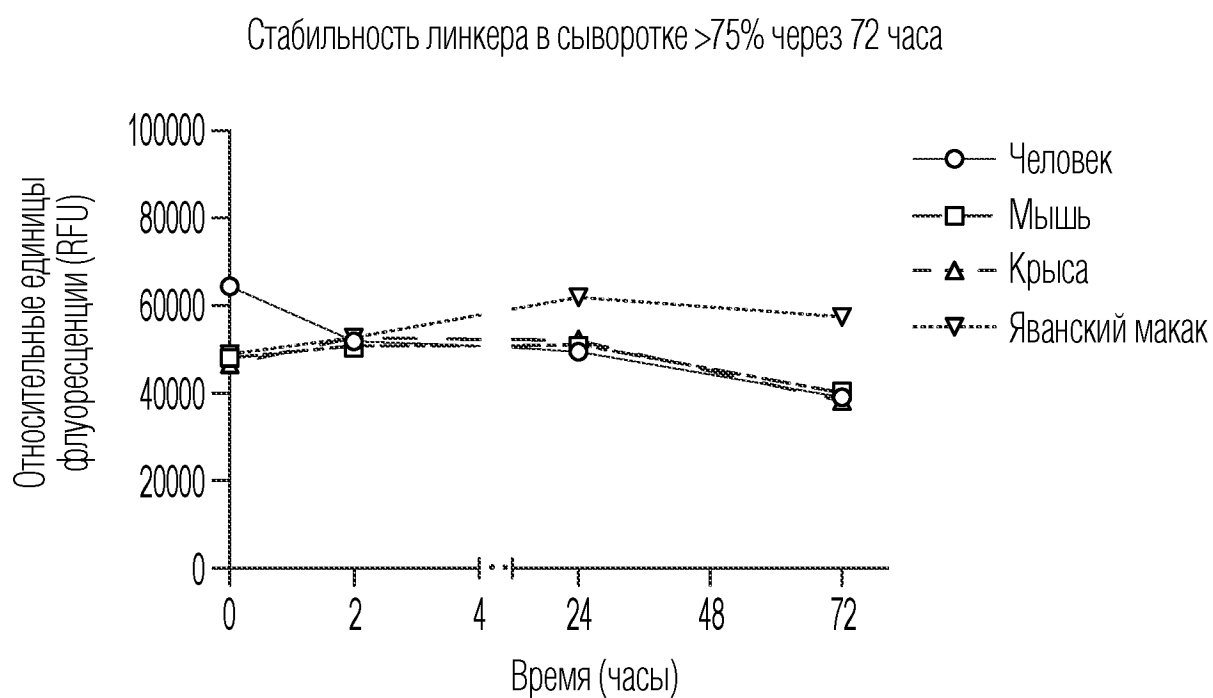


ФИГ. 5

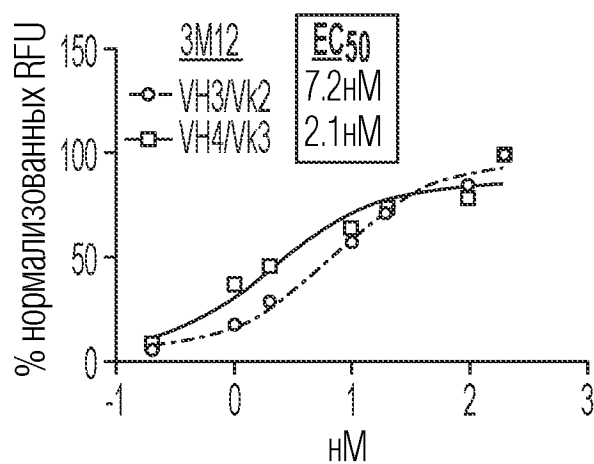


ФИГ. 6

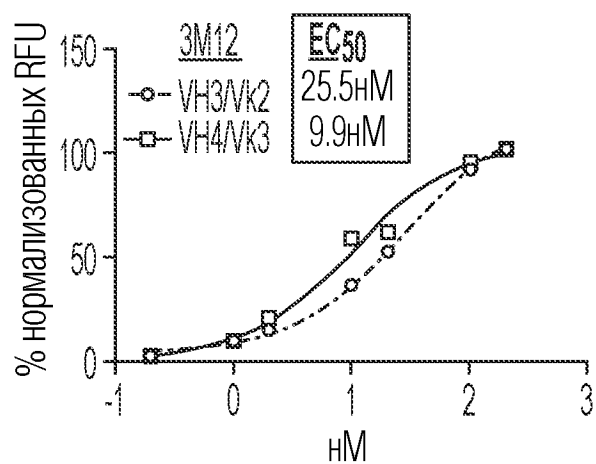




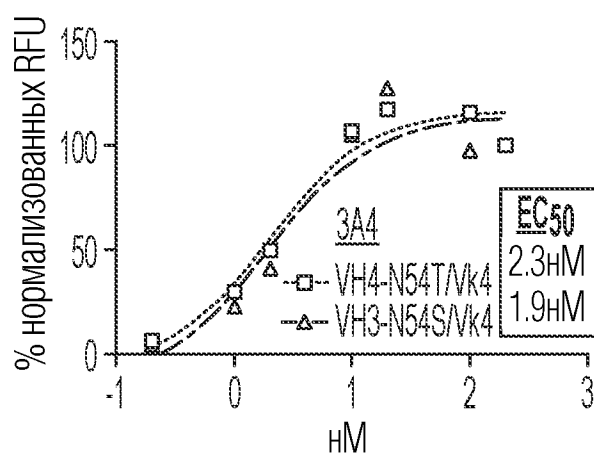
ФИГ. 8



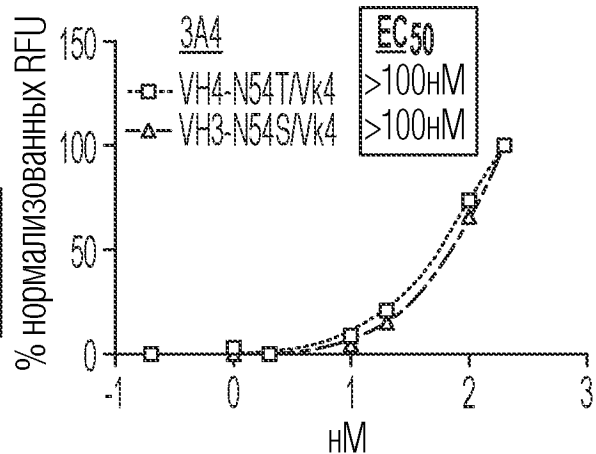
ФИГ. 9А



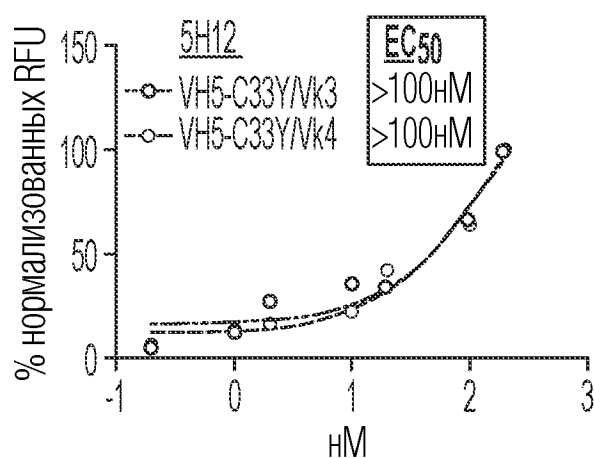
ФИГ. 9В



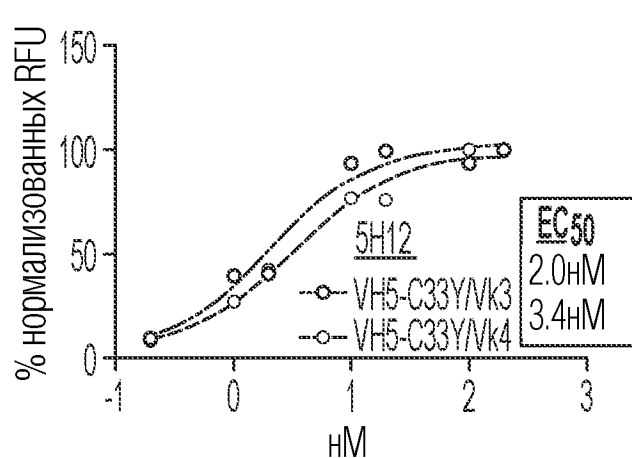
ФИГ. 9С



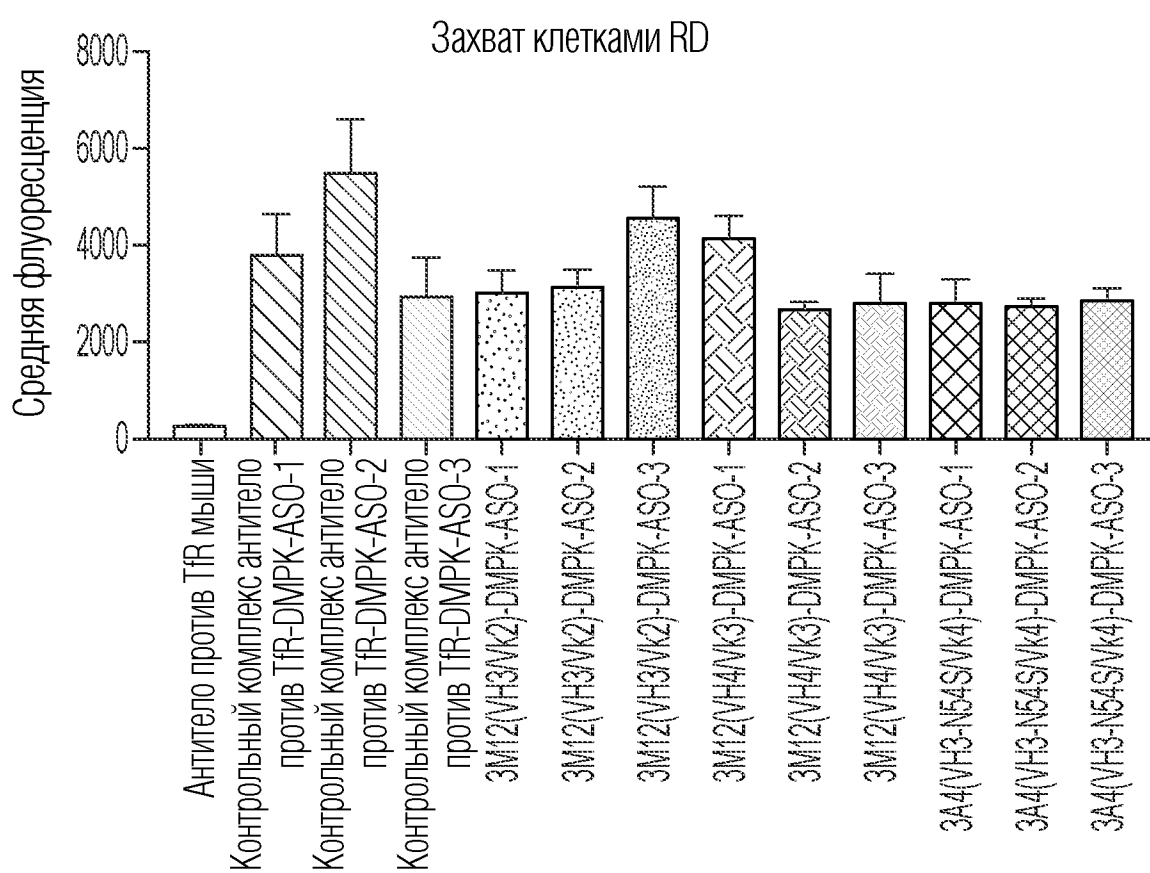
ФИГ. 9D



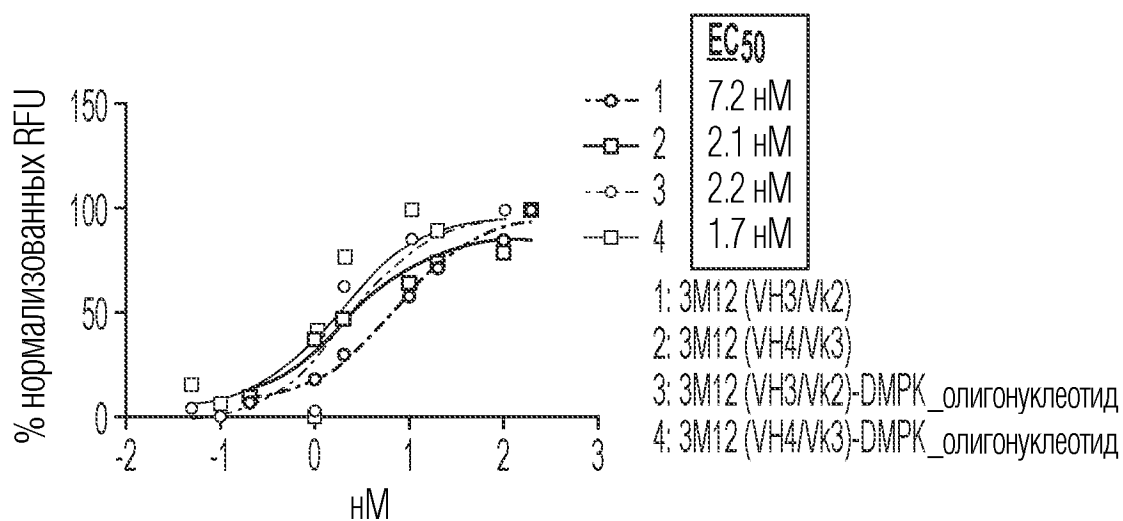
ФИГ. 9Е



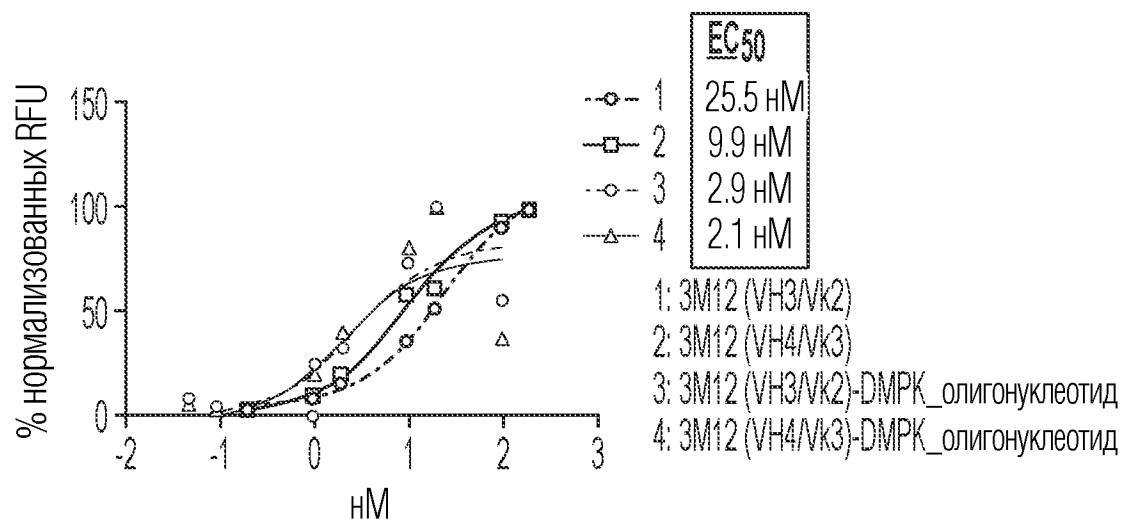
ФИГ. 9F



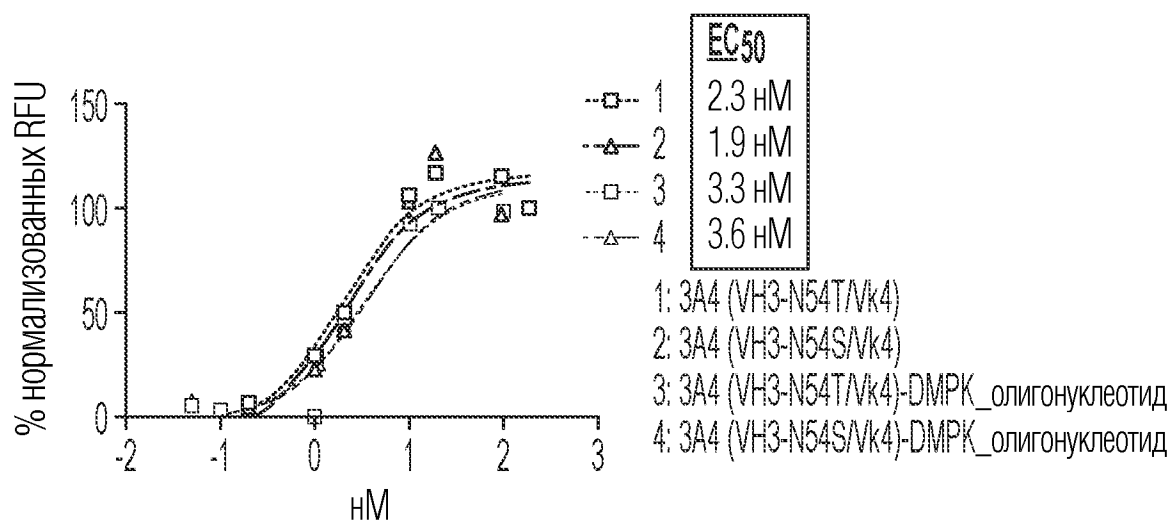
ФИГ. 10



ФИГ. 11А

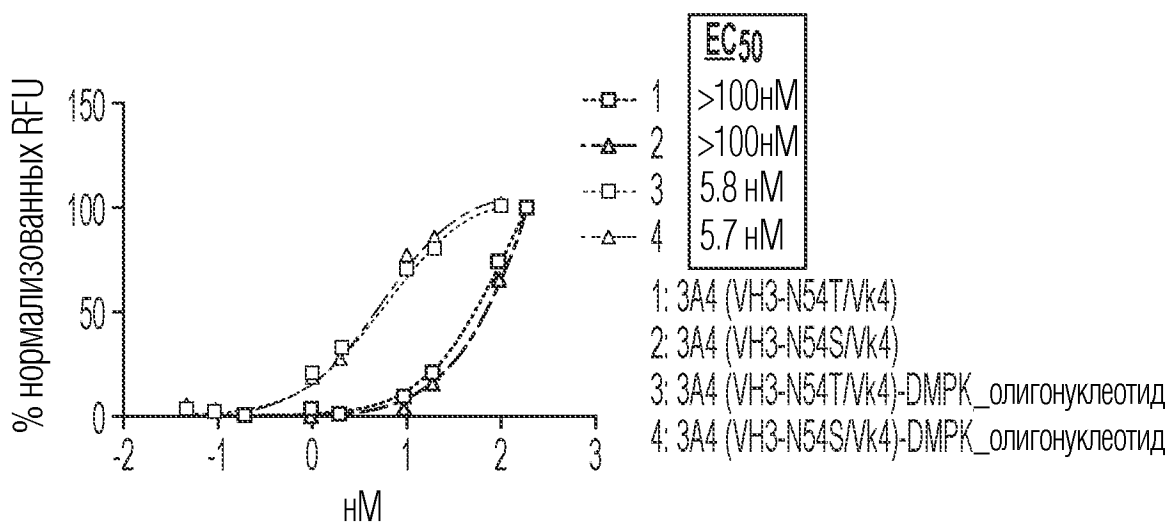


ФИГ. 11В

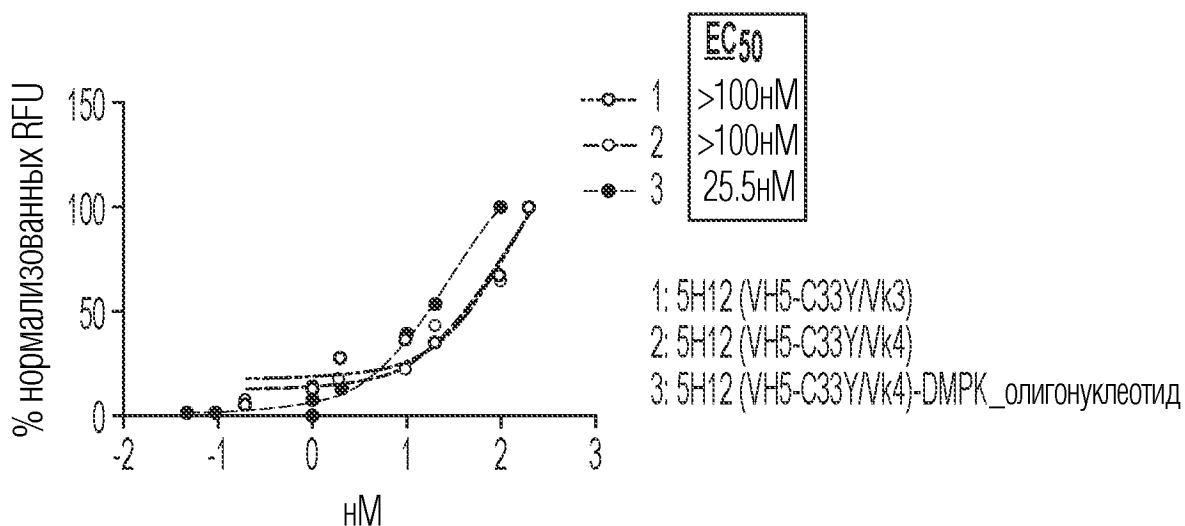


ФИГ. 11С

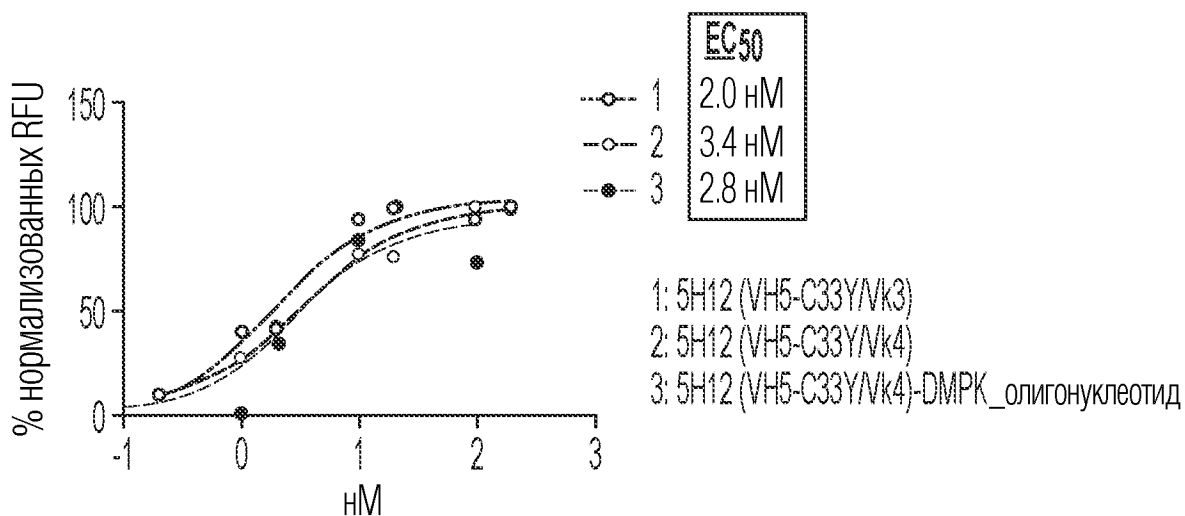
12/21



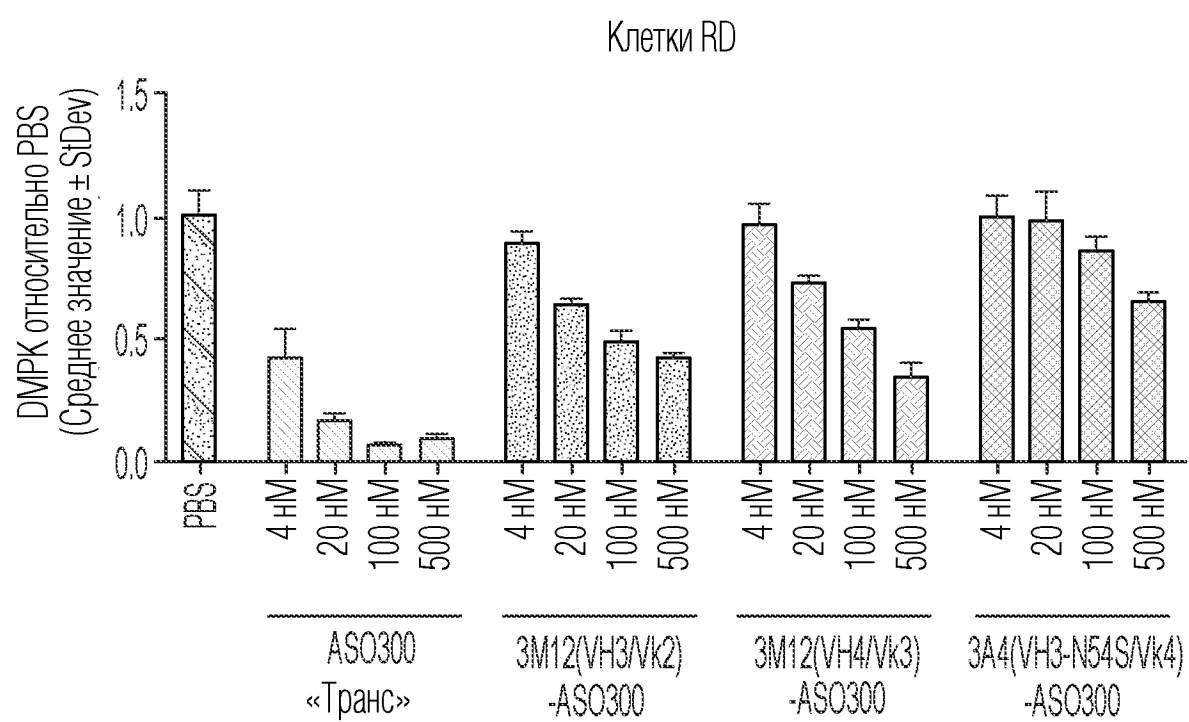
ФИГ. 11D



ФИГ. 11E



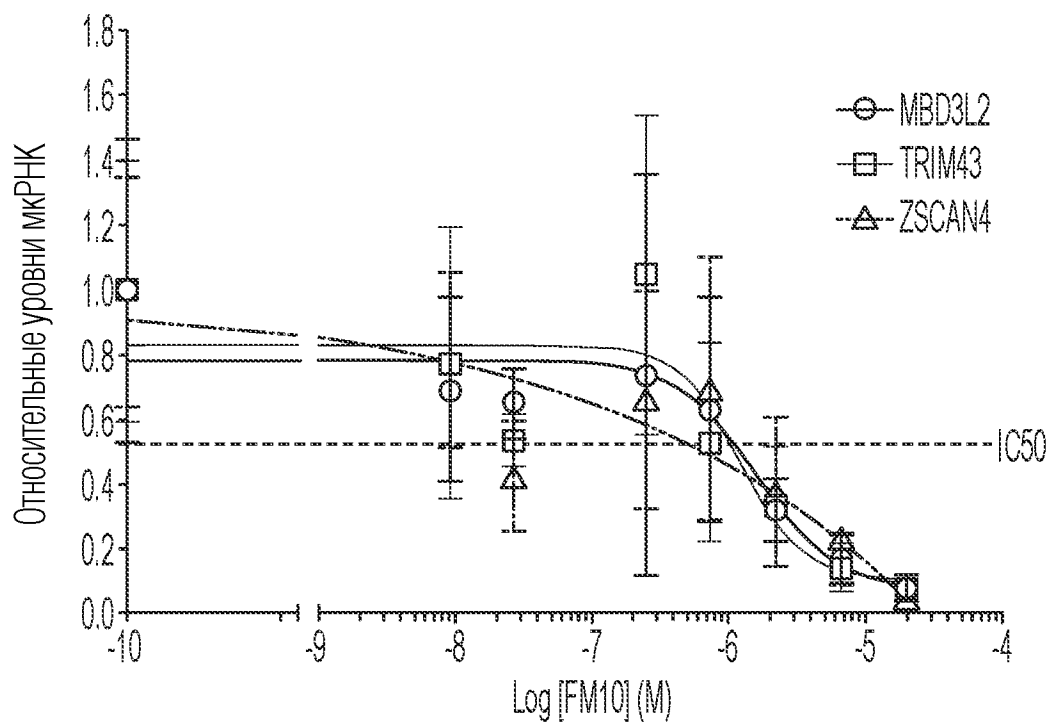
ФИГ. 11F



ФИГ. 12

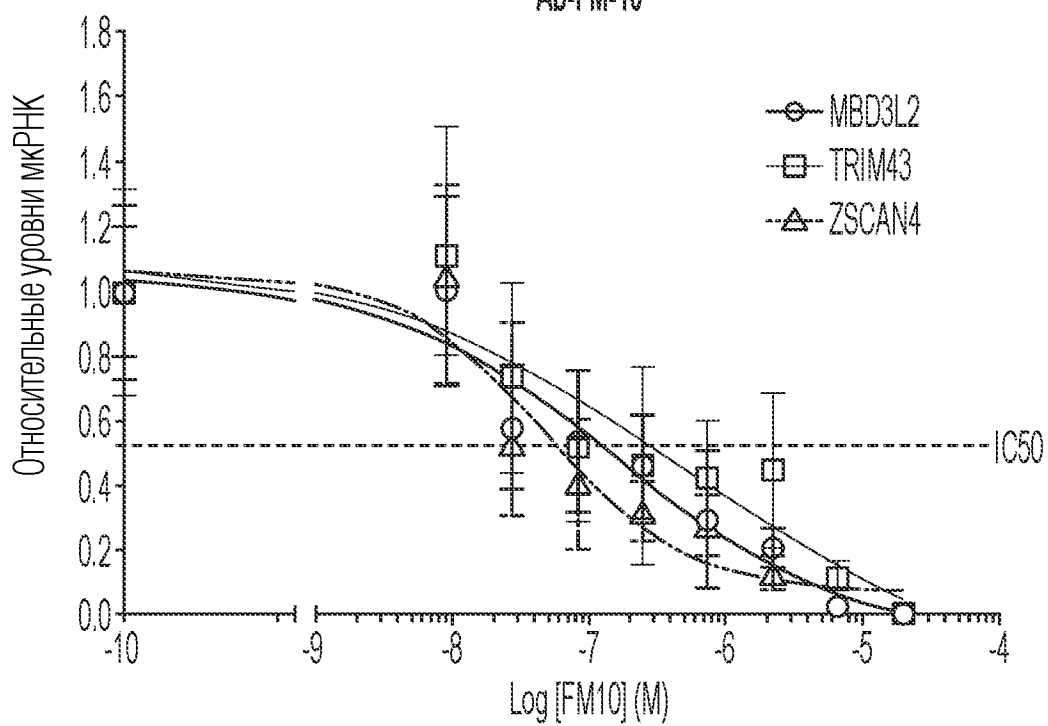
14/21

«Голый» FM-10

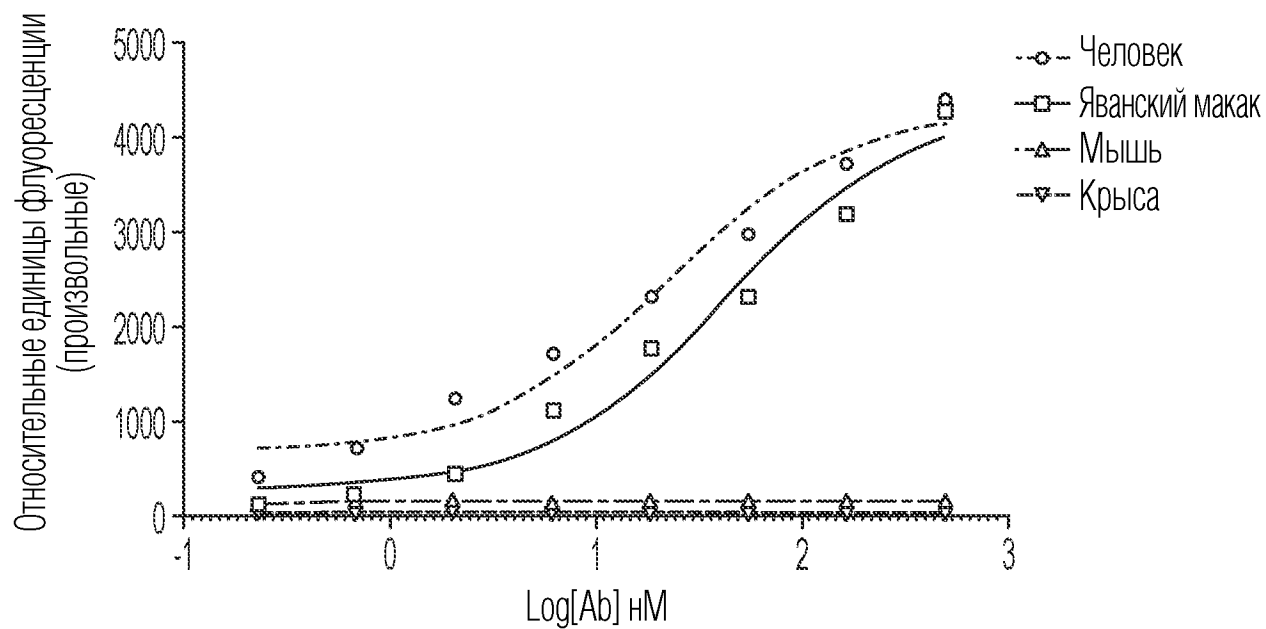


ФИГ. 13А

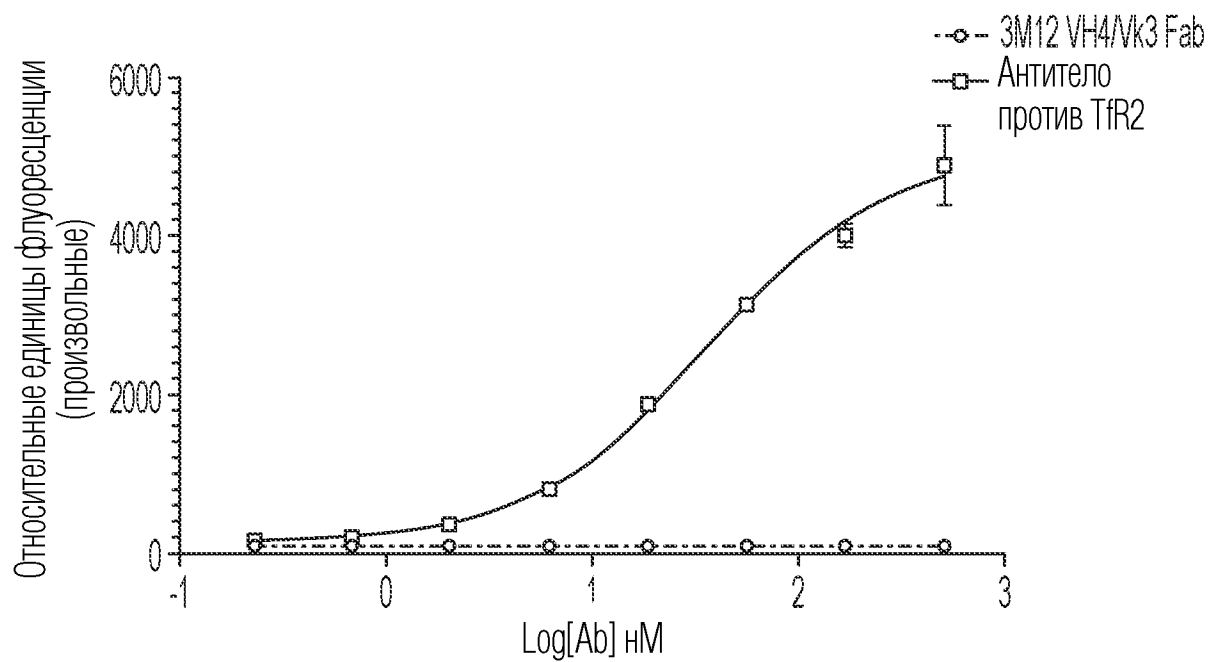
Ab-FM-10



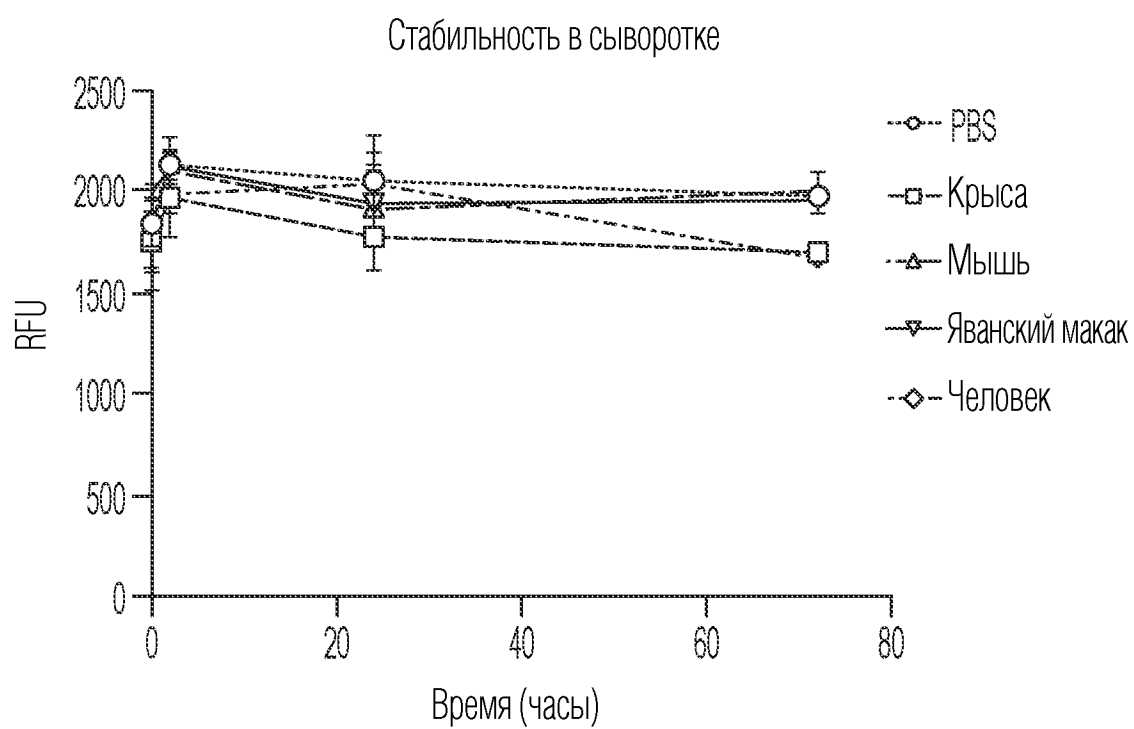
ФИГ. 13В



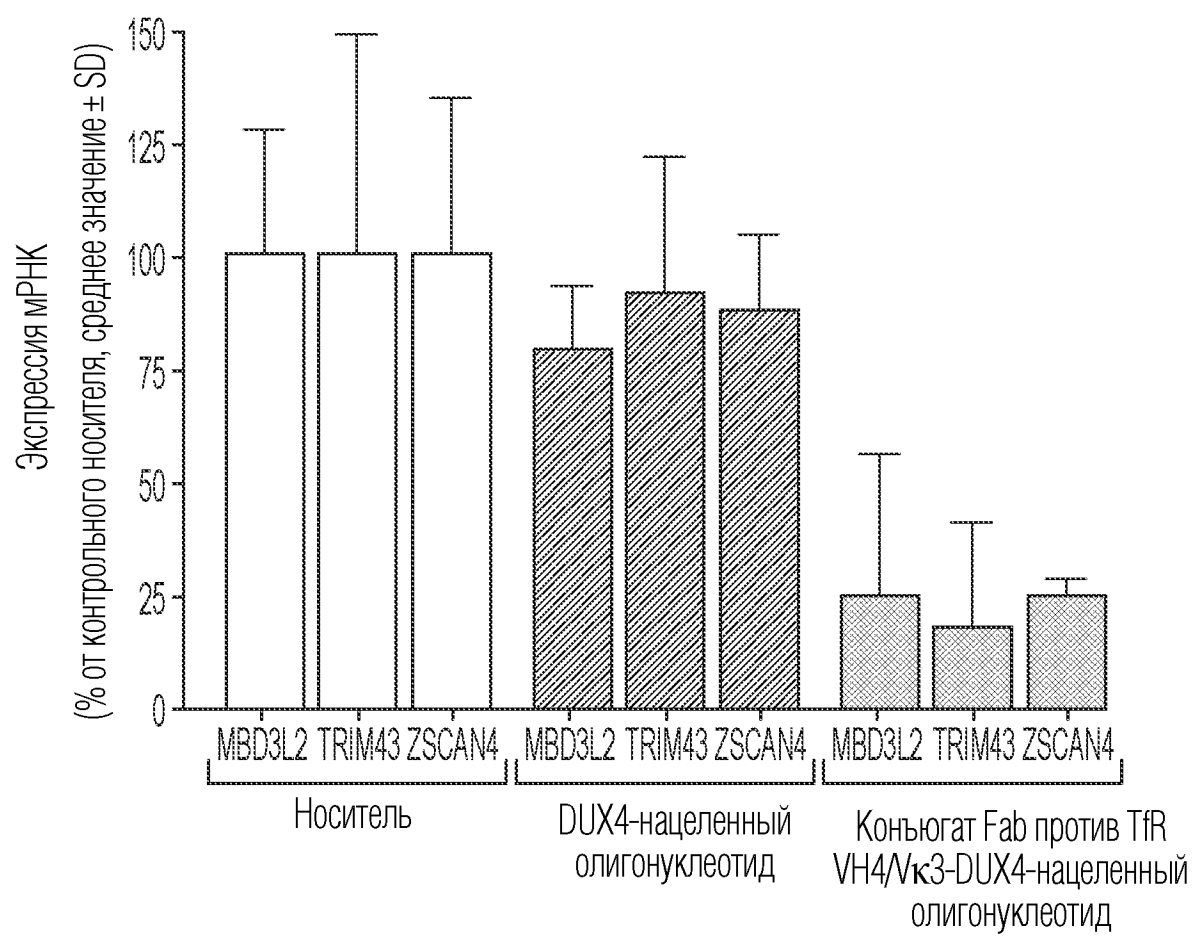
ФИГ. 14



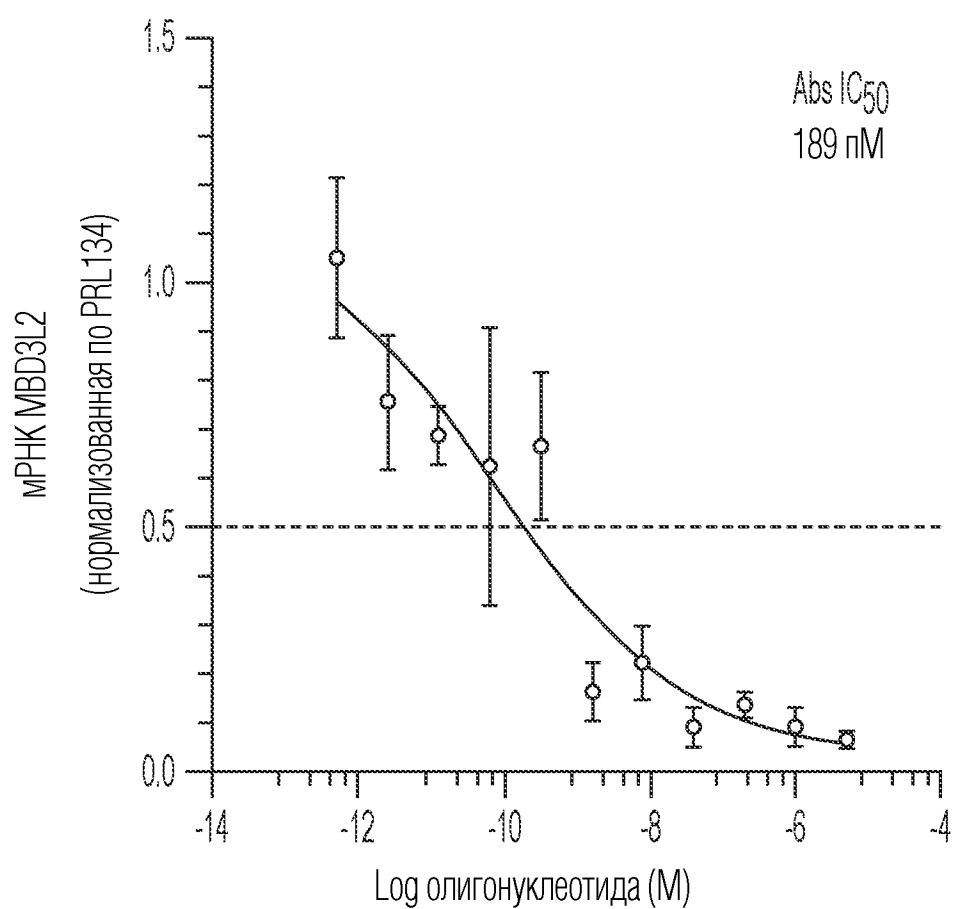
ФИГ. 15



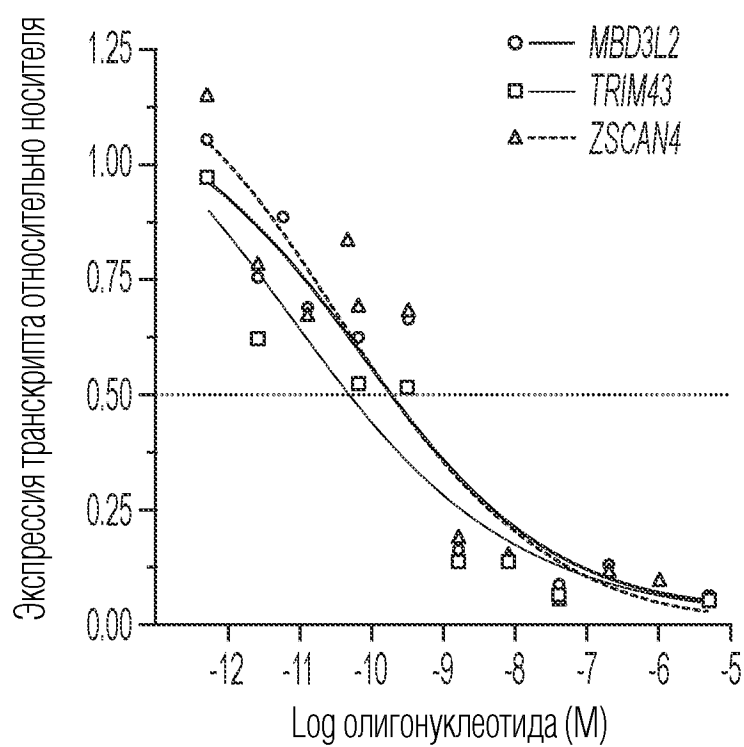
ФИГ. 16



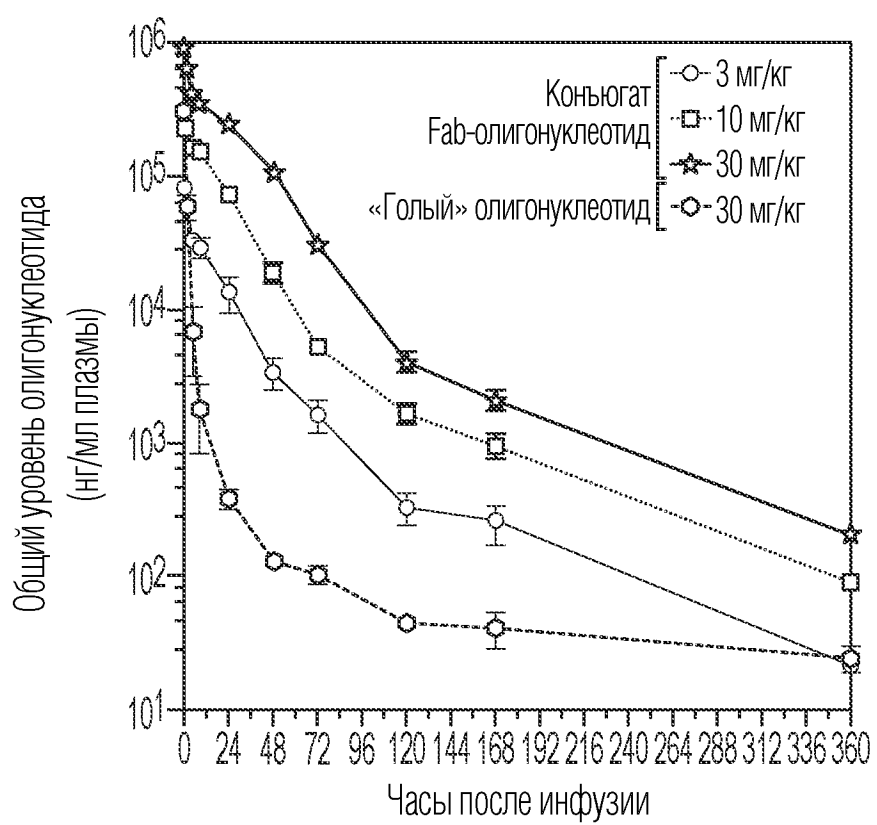
ФИГ. 17



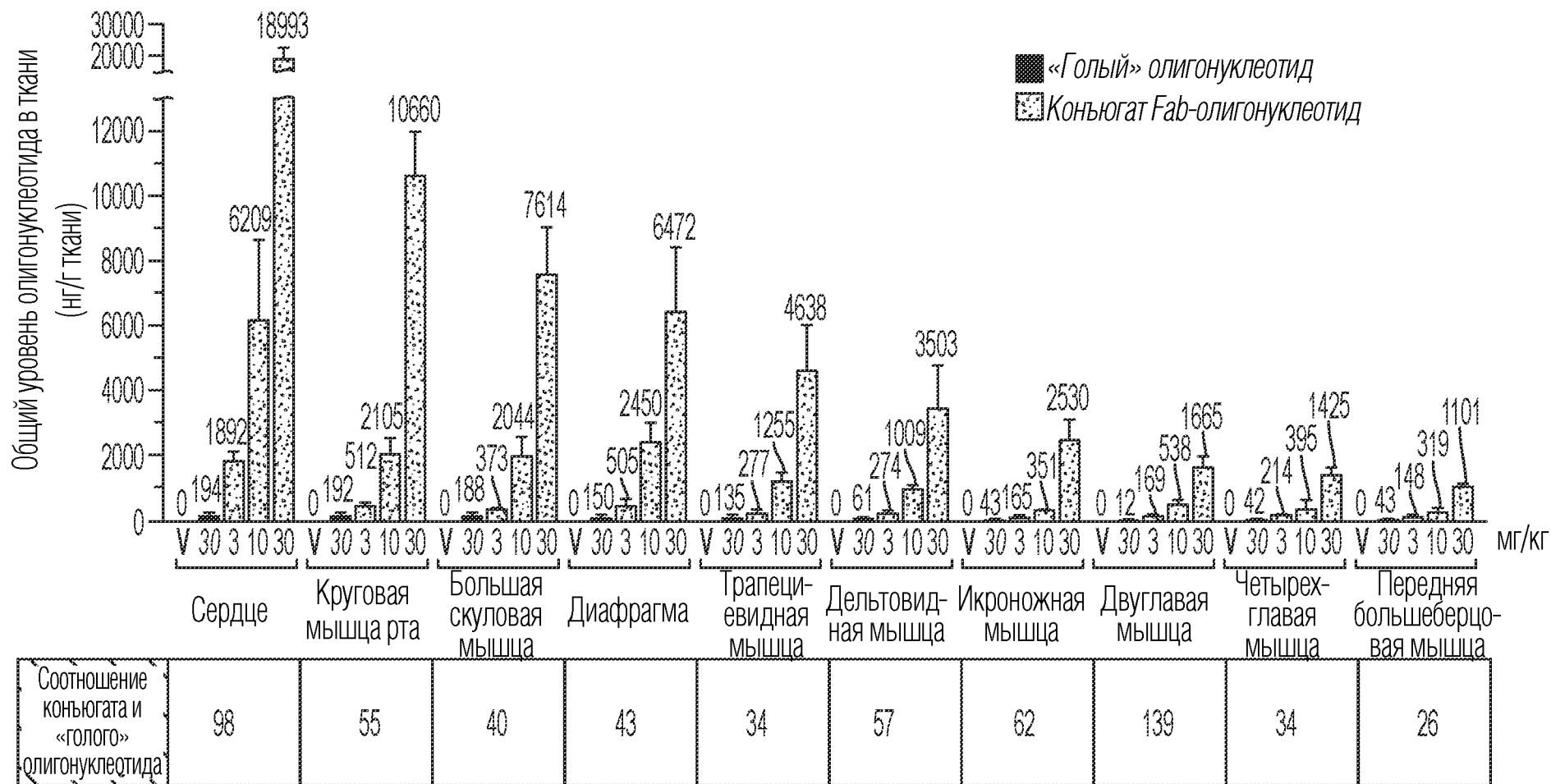
ФИГ. 18А



ФИГ. 18В



ФИГ. 19



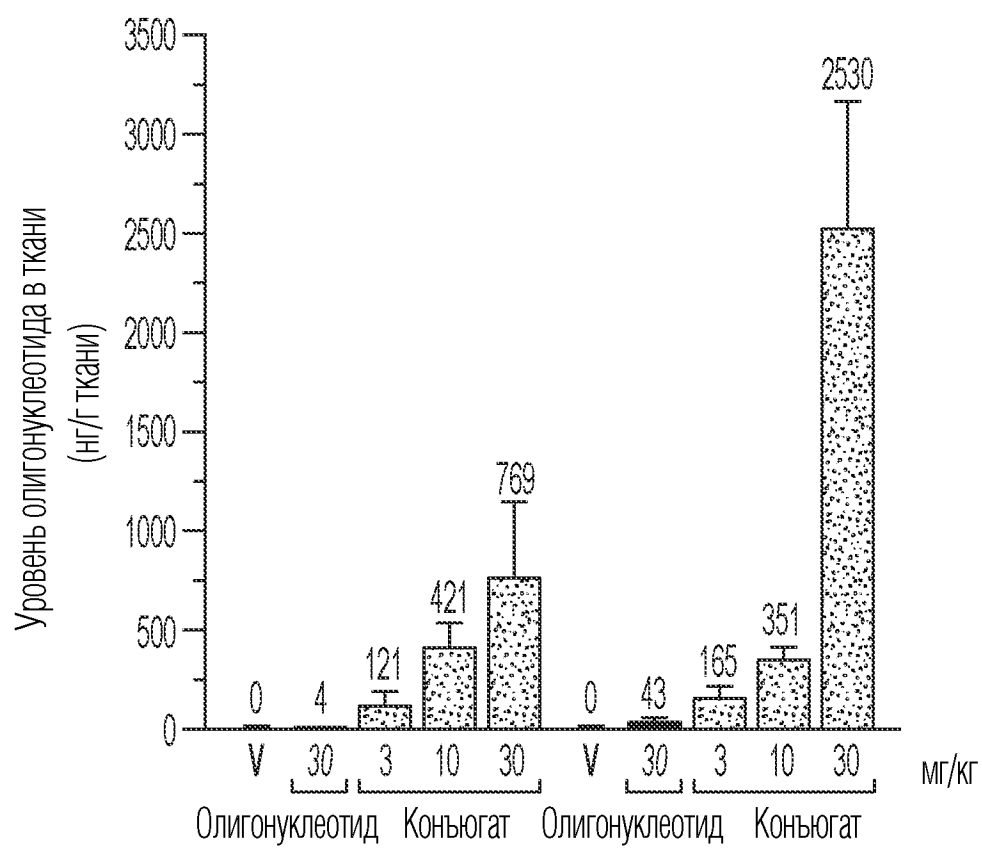
* Сравнение с 30 мг/кг

олигонуклеотида

Мышцы лица, пораженные FSND

V - Носитель

ФИГ. 20



ФИГ. 21