

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390407** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.03.30**

(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) **АНТИТЕЛО ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА (TFR) И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **63/055,721; 63/069,071; 63/143,825**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.07.23; 2020.08.23; 2021.01.30**

**Субраманиян Ромеш Р., Катанани**

(33) **US**

**Мохаммед Т., Уиден Тимоти,**

(86) **PCT/US2021/040984**

**Дежарден Коди А., Куинн Брендан,**

(87) **WO 2022/020105 2022.01.27**

**Наджим Джон (US)**

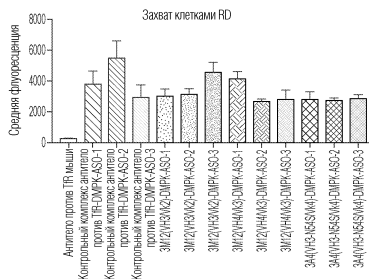
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

**ДАЙН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)**

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам, связывающимся с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина 1), и комплексам, содержащим антитело, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. Настоящее изобретение также относится к способам применения антител.



**A1**

**202390407**

**202390407**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-577087EA/55

### **АНТИТЕЛО ПРОТИВ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА (TFR) И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C § 119(e) по дате подачи предварительной заявки США № 63/143825, названной "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR (TFR) ANTIBODY AND USES THEREOF", поданной 30 января 2021 года, предварительной заявки США № 63/069071, названной "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR (TFR) ANTIBODY AND USES THEREOF", поданной 23 августа 2020 года, и предварительной заявки США № 63/055721, названной "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR (TFR) ANTIBODY AND USES THEREOF", поданной 23 июля 2020 года; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

#### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0002] Настоящая заявка относится к новым антителам против рецептора трансферрина (TfR) и применению антитела.

#### **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 копия ASCII, созданная 8 июля 2021 года, названа D082470037W000-SEQ-DWY и имеет размер 120479 байт.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0004] Рецептор трансферрина (TfR) является димерным трансмембранным гликопротеиновым рецептором, участвующим в транспорте железа. У людей описано два рецептора трансферрина, рецептор трансферрина 1 (TfR1) и рецептор трансферрина 2 (TfR2). Показано, что TfR гиперэкспрессирован в злокачественных клетках с более высоким метастатическим потенциалом. TfR1, как показано, экспрессирующийся на эндотелиальных клетках гематоэнцефалитического барьера, можно использовать, чтобы сделать возможной доставку крупных молекул в головной мозг.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0005] Настоящее изобретение основано по меньшей мере частично на разработке гуманизированных антител, связывающихся с рецептором трансферрина (антител против TfR). В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, селективно связываются с рецептором 1 трансферрина (TfR1) человека или не являющегося человеком примата (NHP) с высокой специфичностью и аффинностью (например, в субнаномолярно-наномолярном диапазоне). В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, можно использовать для таргетинга тканей и/или (например, и) клеток, экспрессирующих

TfR1. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, используют для детекции TfR1 в клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, используют в диагностических, терапевтических или исследовательских целях. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, используют для доставки молекулярной нагрузки в целевую клетку или ткань (например, клетку или ткань, экспрессирующую TfR1).

[0006] В связи с этим, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим антитела против TfR, конъюгированные (например, ковалентно конъюгированные) с молекулярной нагрузкой (например, диагностическим средством или терапевтическое средство). В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR используют для доставки конъюгированной молекулярной нагрузки в клетку или ткань, экспрессирующую TfR1 (например, мышцы или головной мозг) для диагностики и/или (например, и) лечения заболевания (например, мышечного заболевания или неврологического заболевания). В некоторых аспектах в настоящем описании приведены данные, демонстрирующие, что антитела против TfR, представленные в настоящем описании, имеют превосходную активность в доставке молекулярной нагрузки в клетку-мишень (например, мышечную клетку) по сравнению с другими известными антителами против TfR.

[0007] Один из аспектов настоящего изобретения относится к антителу, связывающемуся с рецептором трансферрина человека (TfR), 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





(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.

[0009] В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, scFv, Fv и полноразмерного IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело является Fab-фрагментом.

[0010] 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 аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 85;

(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: 89;

(vi) 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;

(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: 89;

(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.

[00011] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

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

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

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

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

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

(vi) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 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.

[00012] В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации ( $K_D$ ) связывания антитела с рецептором трансферрина находится в диапазоне от  $10^{-11}$  М до  $10^{-6}$  М. В некоторых вариантах осуществления антитело не связывается специфически с участком связывания трансферрина рецептора трансферрина и/или 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.

[00013] Другой аспект настоящего изобретения относится к комплексу, содержащему антитело, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является диагностическим средством или терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка

является олигонуклеотидом, полипептидом или низкомолекулярным соединением. В некоторых вариантах осуществления антитело и молекулярная нагрузка соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность валин-цитруллин.

[00014] Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей антитело или комплекс, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[00015] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу доставки молекулярной нагрузки в клетку, включающий приведение клетки в контакт с комплексом или композицией, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления клетка является мышечной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка находится в организме индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

[00016] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу доставки молекулярной нагрузки в мышцу индивидуума, включающему введение индивидууму эффективного количества комплекса, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления введение является внутривенным.

[00017] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения заболевания, включающему введение индивидууму эффективного количества комплекса или композиции, представленной в настоящем описании, где молекулярная нагрузка является терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления заболевание является мышечным заболеванием, и молекулярная нагрузка является лекарственным средством для лечения мышечного заболевания. В некоторых вариантах осуществления мышечное заболевание является редким мышечным заболеванием или мышечной атрофией.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[00018] На фиг. 1A-1F показано связывание гуманизированных Fab против TfR с TfR1 человека (hTfR1) или TfR1 яванского макака (cTfR1), что измеряют посредством ELISA. На фиг. 1A показано связывание гуманизированных вариантов 3M12 с hTfR1. На фиг. 1B показано связывание гуманизированных вариантов 3M12 с cTfR1. На фиг. 1C показано связывание гуманизированных вариантов 3A4 с hTfR1. На фиг. 1D показано связывание гуманизированных вариантов 3A4 с cTfR1. На фиг. 1E показано связывание гуманизированных вариантов 5H12 с hTfR1. На фиг. 1F показано связывание гуманизированных вариантов 5H12 с hTfR1.

[00019] На фиг. 2 показан количественно анализируемый клеточный захват конъюгатов Fab против TfR в клетки рабдомиосаркомы (RD). Молекулярной нагрузкой в тестируемых конъюгатах являются DMPK-нацеленные олигонуклеотиды, и захват

конъюгатов облегчали с помощью указанных Fab против TfR. В этот анализ также включали 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.

[00020] На фиг. 3A-3F показано связывание олигонуклеотид-конъюгированных или неконъюгированных гуманизированных Fab против TfR с TfR1 человека (hTfR1) и TfR1 яванского макака (сTfR1), что измеряют посредством ELISA. На фиг. 3A показано связывание гуманизированных вариантов 3M12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 3B показано связывание гуманизированных вариантов 3M12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с сTfR1. На фиг. 3C показано связывание гуманизированных вариантов 3A4 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 3D показано связывание гуманизированных вариантов 3A4 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с сTfR1. На фиг. 3E показано связывание гуманизированных вариантов 5H12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 3F показано связывание гуманизированных вариантов 5H12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с сTfR1. Также показаны соответствующие значения EC<sub>50</sub>.

[00021] На фиг. 4 показана экспрессия DMPK в клетках RD, обработанных различными концентрациями конъюгатов, содержащих указанные гуманизированные антитела Fab против TfR, конъюгированные с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом (ASO300). Длительность обработки составляла 3 дня. ASO300, доставляемый с использованием средств для трансфекции (помечены как "транс"), использовали в качестве контроля.

[00022] На фиг. 5 показана стабильность в сыворотке линкера, используемого для связывания антитела против TfR и молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотида) в различных видах с течением времени после внутривенного введения.

[00023] На фиг. 6 показаны данные, свидетельствующие о том, что конъюгаты, содержащие указанные Fab против TfR (3M12 VH3/VK2, 3M12 VH4/VK3 и 3A4 VH3 N54S/VK4), конъюгированные с олигонуклеотидом DMD для пропуска экзонов, приводили к повышенному пропуску экзонов по сравнению с "голым" олигонуклеотидом DMD для пропуска экзонов в мышечных трубочках пациентов с DMD.

[00024] На фиг. 7A-7E показана активность *in vivo* конъюгатов, содержащих указанные Fab против TfR (контроль, 3M12 VH3/VK2, 3M12 VH4/VK3, и 3A4 VH3 N54S/VK4), конъюгированные с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом, в снижении экспрессии мРНК DMPK у мышей, экспрессирующих TfR1 человека (мышей с нокином hTfR1). На фиг. 7A показан экспериментальный дизайн (например, доза IV, частота введения). Уровни мРНК DMPK измеряли через 14 дней после первой дозы в передней

большеберцовой мышце (фиг. 7B), икроножной мышце (фиг. 7C), сердце (фиг. 7D) и диафрагме (фиг. 7E) мышей.

[00025] На фиг. 8 показаны измерения ELISA связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с рекомбинантным белком TfR1 человека (круги), яванского макака (квадраты), мыши (направленные вверх треугольники) или крысы (направленные вниз треугольники) в диапазоне концентраций от 230 пМ до 500 нМ Fab. Результаты измерений 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 как относительные единицы флуоресценции, нормализованные по исходному уровню.

[00026] На фиг. 9 показаны результаты тестирования ELISA аффинности Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 к рекомбинантному TfR1 или TfR2 человека в диапазоне концентраций от 230 пМ до 500 нМ Fab. Данные приведены как относительные единицы флуоресценции, нормализованные по исходному уровню. Результаты свидетельствуют о том, что Fab не связывается с рекомбинантным TfR2 человека.

[00027] На фиг. 10 показана стабильность в сыворотке линкера, используемого для связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с контрольным бессмысловым олигонуклеотидом, за 72 часа инкубации в PBS или в сыворотке крысы, мыши, яванского макака или человека.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

[00028] Настоящее изобретение по меньшей мере частично основано на разработке гуманизованных антител против TfR, например, антител, приведенных в таблице 3, и их вариантов, демонстрирующих высокую аффинность связывания и специфичность к TfR человека. Настоящее изобретение также относится к применению антител против TfR и их вариантов в исследовательских, диагностических/детекторных и терапевтических целях. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, используют для доставки молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотидов, пептидов, низкомолекулярных соединений) в целевую клетку или ткань, экспрессирующую TfR. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка, подлежащая нагрузке, конъюгирована с антителами против TfR, и ее доставляют в целевую клетку или ткань, экспрессирующую TfR, посредством интернализации рецептора. Неограничивающие примеры тканей, экспрессирующих TfR, и которые можно подвергать таргетингу с использованием антител против TfR, представленных в настоящем описании, включают: головной мозг, мышцы, надпочечник, аппендикс, костный мозг, толстый кишечник, двенадцатиперстную кишку, эндометрий, пищевод, жировую ткань, желчный пузырь, сердце, почку, печень, легкое, лимфоузел, яичник, поджелудочную железу, плаценту, предстательную железу, слюнную железу, кожу, тонкий кишечник, селезенку, желудок, яичник, щитовидную железу, мочевого пузырь. В некоторых вариантах осуществления такой подход обладает положительным эффектом в отношении мышечных клеток и для доставки через гематоэнцефалитический барьер, что оказалось затруднительным. В

некоторых аспектах в настоящем описании представлены данные, свидетельствующие о том, что антитела против TfR, представленные в настоящем описании, обладают превосходной активностью при доставке молекулярной нагрузки в клетку-мишень (например, мышечную клетку), по сравнению с другими известными антителами против TfR.

[00029] В связи с этим, настоящее изобретение также относится к комплексам, содержащим любое из антител против TfR1, ковалентно связанных с молекулярной нагрузкой. 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 или мышечную атрофию (например, как указано в таблице 6). В некоторых вариантах осуществления комплексы особенно подходят для доставки лекарственных средств в головной мозг для лечения неврологического заболевания (например, как указано в таблице 7).

[00030] Дополнительные аспекты изобретения, включая описание определенных терминов, приведены ниже.

#### **I. Определения**

[00031] **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).

[00032] **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).

[00033] **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')<sub>2</sub>-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 ( $\alpha$ ), дельта ( $\Delta$ ), эпсилон ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) или мю ( $\mu$ ). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, представленная в настоящем описании, может включать тяжелую цепь альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\Delta$ ), эпсилон ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) или мю ( $\mu$ ) 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 ( $\gamma$ ) 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 переменной 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 С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058).

[00034] **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 гиперпеременные области, также известными как "определяющие комплементарность области" ("CDR"), чередующиеся в областях, являющимися более консервативными, известными как "каркасные области" ("FR"). Каждый VH и VL, как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Протяженность каркасной области и CDR можно точно определять с использованием методологии, известной в этой области, например, определения по Kabat, определения по IMGT, определения по Chothia, определения по 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) *Sequence 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](http://hgmp.mrc.ac.uk) и [bioinf.org.uk/abs](http://bioinf.org.uk/abs). В рамках изобретения термин "CDR" может относиться



к CDR, определенной любым известным в этой области способом. То, что два антитела имеют одинаковую CDR, означает, что два антитела имеют одинаковую аминокислотную последовательность этой CDR, определяемую одним и тем же способом, например, определением по IMGT.

[00035] 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 значительно 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

	<b>IMGT<sup>1</sup></b>	<b>Kabat<sup>2</sup></b>	<b>Chothia<sup>3</sup></b>
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

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

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

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

[00036] **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.

[00037] **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.

[00038] **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.

[00039] **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) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

[00040] **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.

[00041] **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, паралоогов 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.

[00042] **Каркас:** В рамках изобретения термин "каркас" или "каркасная последовательность" относится к остальным последовательностям вариабельной 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.

[00043] **Антитело человека:** В рамках изобретения термин "антитело человека" предназначен для включения антител, имеющих переменные 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.

[00044] **Гуманизованное антитело:** Термин "гуманизованное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности переменной 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 переменной области зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизованного 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 гуманизованным антителам против TfR 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 Kasaiian et al.

[00045] **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.

[00046] **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 антителом против TfR. 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.

[00047] **Олигонуклеотид:** В рамках изобретения термин "олигонуклеотид" относится к олигомерному соединению нуклеиновой кислотой длиной до 200 нуклеотидов. Неограничивающие примеры олигонуклеотидов включают олигонуклеотиды РНКи (например, miРНК, shRNA), микроРНК, гэпмеры, миксмеры, фосфородиамидит-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 (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.

[00048] **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.

[00049] **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.

[00050] **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.

[00051] **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 заболевание, являющееся результатом экспансии ассоциированных с заболеванием повторов, например, в аллеле DMPK.

[00052] **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).

[00053] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина человека, соответствующей последовательности NCBI NP\_003225.2 (изоформа 1 белка рецептора трансферрина 1, *Homo sapiens*), является следующим:

```
MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA VDEEENADNNTK
ANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGE
DFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNEN SYVPREAGSQKDENLALYVENQF
REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRL VYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
LVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEK VANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
NAELSFHGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFP SRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGD
CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLT VSNVLKEIKLNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDA
WGPGA AAKSGVGTALLKLAQMFSDMV LKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEG
YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNW
ASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYP YLGTMDTYKELIERIPELNKVAR
AAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSAR
GDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFVWGS
GSHTLPALLENLKL RKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
(SEQ ID NO: 105).
```

[00054] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI NP\_001244232.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca mulatta*), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDDEEENTDNNTK  
 PNGTKPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLYGYCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE  
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF  
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK  
 LVHANFGTKKDFEDLSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV  
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG  
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD  
 AWGPGA AKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE  
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKV SASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN  
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV  
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS  
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFMKKNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPRHFVFW  
 GSGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF(  
 SEQ ID NO: 106)

[00055] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI XP\_005545315.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca fascicularis*), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDDEEENTDNNTK  
 ANGTKPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLYGYCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE  
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF  
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK  
 LVHANFGTKKDFEDLSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV  
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG  
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD  
 AWGPGA AKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE  
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKV SASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN  
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV  
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS  
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFMKKNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPRHFVFW  
 GSGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF  
 (SEQ ID NO: 107).

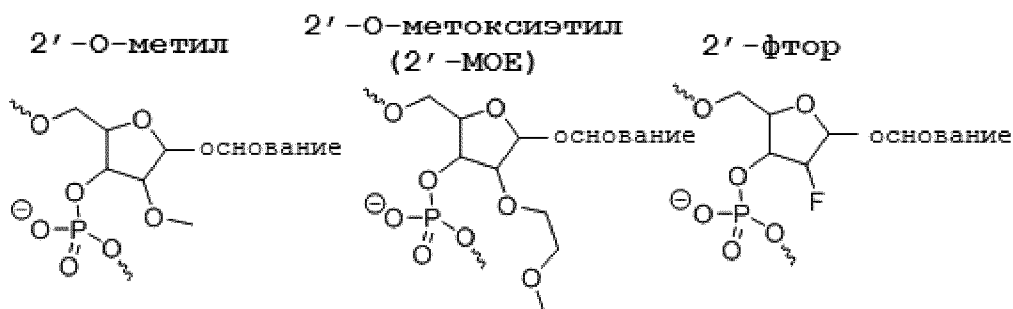
[00056] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина мыши, соответствующей последовательности NCBI NP\_001344227.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Mus musculus*), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLAADDEEENADNNM  
 KASVRKPKRFNGRLCFAAIALVIIFLIGFMSGYLYGYCKRVEQKEECVKLAETEETDKSET



METEDVPTSSRLYWADLK TLLSEKLN SIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIE  
 NQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVS  
 GKL V HANFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKF  
 PVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGK  
 MEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNV LKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGA  
 QRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFS DMISKDGF RPSRSIIFASWTAGDFGAVGATE  
 WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVV L GTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLY  
 RDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYS GIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQ  
 LNQMVRTAAEVAGQLIKLTHDVELNLDYEMYN SKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQ  
 WLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEK TNRFVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPRHI  
 FWGSGSHTLSALVENLKL RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNE  
 F (SEQ ID NO: 108).

[00057] **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'-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), 2'-O-N-метилацетамидонуклеозид (2'-O-NMA), замкнутую нуклеиновую кислоту (ЗНК, нуклеиновую кислоту с метиленовым мостиком), нуклеиновую кислоту с этиленовым мостиком (ENA) 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. Антитела против TfR

[00058] В некоторых вариантах осуществления средства, связывающиеся с рецептором трансферрина, например, антитела против TfR, способны к таргетингу мышечной клетки и/или (например, и) могут опосредовать 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 рецептор трансферрина-связывающим белкам, способным связываться с рецептором трансферрина. Антитела, связывающиеся, например специфически связывающиеся, с рецептором трансферрина, могут интернализироваться в клетке, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза после связывания с рецептором трансферрина.

[00059] 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 являющегося человеком приматов, мыши, крысы и т.д. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с человек рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное 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 гуманизированное 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 находящимся в апикальном домене рецептора трансферрина. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с TfR1, но не связываются с TfR2.

[00060] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании (например, 3M12 и гуманизированные варианты), связывается с эпитопом в TfR1, где эпитоп содержит остатки аминокислот 258-291 и/или аминокислот 358-381 SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR (например, 3M12 и гуманизированные варианты), представленные в настоящем описании, связываются с эпитопом, содержащим остатки аминокислот 258-291 и аминокислот 358-381 SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании (например, 3M12 и гуманизированные варианты), связываются с эпитопом, содержащим один или более из остатков K261, S273, Y282, T362, S368, S370 и K371 TfR1 человека, приведенного в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании (например, 3M12 и гуманизированные варианты), связываются с эпитопом, содержащим остатки K261, S273, Y282, T362, S368, S370 и K371 TfR1 человека, приведенного в SEQ ID NO: 105.

[00061] 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 Kd) 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 Kd  $10^{-7}$  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, OСТЕТ или VIACORE). 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, не конкурирует со связыванием HFE-бета-2-микроглобулина с TfR1 или не ингибирует его.

[00062] Антитела против TfR, представленные в настоящем описании, являются гуманизированными антителами. Аминокислотные последовательности CDR и переменных областей моноклонального антитела мыши против TfR, из которого получают 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 EYAS KFQD (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	KSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSHNGYT YLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHNGYTY(S EQ 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	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPE QGLEWIGWIDPENGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
VL	DIVMTQAAPSPVTPGESVSISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFLQRP GQSPQLLIYRMSNLASGV PDRFSGSGSGTAFTLRISRVEADVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)			
3-A4 N54T*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPETGDT (SEQ ID NO: 19)	WIDPETGDTEYAS KFQD (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	KSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSHNGYT YLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHNGYTY(S EQ 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	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPE QGLEWIGWIDPETGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSS LTSEDTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 22)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKLLHSNGYTYLFWFLQR PGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEADV GVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-A4 N54S*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPESGDT (SEQ ID NO: 23)	WIDPESGDTEYASKFQD (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	KLLHSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKLLHSNGYTYL (SEQ ID NO: 10)	SKLLHSNGYTY(S EQ 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	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPE QGLEWIGWIDPESGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSS LTSEDTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 26)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKLLHSNGYTYLFWFLQR PGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEADV GVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (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)	YITFDGANNYNPS LKN (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	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYITFDGANNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSVT TEDTATYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 43)		
	VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNHWYQQRPDGTV KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTVSNLEQEDIATYFCQ QGHTLPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 44)		
5-H12	CDR-H1	GYSFTDYC (SEQ ID NO: 45)	DYCN (SEQ ID NO: 51)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSE RFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMD Y (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSF MH (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	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYCNWVNQRPGQ GLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSL		

		TSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 61)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33Y*	CDR-H1	GYSFTDYY (SEQ ID NO: 63)	DYYIN (SEQ ID NO: 64)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSE RFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (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	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYYINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 65)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYCQQSSEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33D*	CDR-H1	GYSFTDYD (SEQ ID NO: 66)	DYDIN (SEQ ID NO: 67)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSE RFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)

CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSF MH (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	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYDINWVNQRPGQ GLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSL TSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 68)		
VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQK PGQPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVA TYYCQQSSEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)		

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

[00063] 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 гуманизованную вариабельную область тяжелой цепи и/или (например, и) гуманизованную вариабельную область легкой цепи.

[00064] 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, гуманизованное 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, гуманизованное антитело будет содержать, по существу, все из по меньшей мере одного и, как правило, двух вариабельных 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 гуманизованное антитело также будет содержать по меньшей мере



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.

[00065] 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); Vaca 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.

[00066] 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.

[00067] 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).

[00068] 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 гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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).

[00069] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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 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 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.

[00070] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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), гуманизованное 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.

[00071] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное 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.

[00072] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное 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.

[00073] 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.

[00074] 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.

[00075] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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), гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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.

[00076] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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), гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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.

[00077] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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 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), гуманизованное 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.

[00078] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное 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.

[00079] 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 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), 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 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.

[00080] 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.

[00081] 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.

[00082] 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), 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 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.

[00083] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное 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.

[00084] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное 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.

[00085] 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), гуманизированное 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.

[00086] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное 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), гуманизированное 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.

[00087] Примеры аминокислотных последовательностей гуманизированных антител против TfR, представленных в настоящем описании, приведены в таблице 3.

**Таблица 3. Вариабельные области гуманизированных антител против TfR**

<b>Антитело</b>	<b>Аминокислотная последовательность вариабельных областей**</b>
3A4	V <sub>H</sub> :
VH3	EVQLVQSGSELKPGASVKVVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEWI
(N54T*)/V	<b>GWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYC</b>
κ4	TLWLRRGLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 69)

	<p>V<sub>L</sub>:</p> <p>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQSPR LLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC<b>MQHLEY</b> <b>PFTFGGGTKVEIK</b> (SEQ ID NO: 70)</p>
3A4 VH3 (N54S*)/V κ4	<p>V<sub>H</sub>:</p> <p>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIK<b>DDYMYWVRQPPGKGLEWI</b> <b>GWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</b>TAVYYC TL<b>WLRRLDYWGQGLVTVSS</b> (SEQ ID NO: 71)</p> <p>V<sub>L</sub>:</p> <p>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQSPR LLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC<b>MQHLEY</b> <b>PFTFGGGTKVEIK</b> (SEQ ID NO: 70)</p>
3A4 VH3/Vκ4	<p>V<sub>H</sub>:</p> <p>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIK<b>DDYMYWVRQPPGKGLEWI</b> <b>GWIDPENGTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</b>TAVYYC TL<b>WLRRLDYWGQGLVTVSS</b> (SEQ ID NO: 72)</p> <p>V<sub>L</sub>:</p> <p>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQSPR LLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC<b>MQHLEY</b> <b>PFTFGGGTKVEIK</b> (SEQ ID NO: 70)</p>
3M12 VH3/Vκ2	<p>V<sub>H</sub>:</p> <p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSIT<b>SGYYWNWIRQPPGKGLEWM</b> <b>GYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAED</b>TATYYCTRS <b>SYDYDVLDYWGQGT</b>TVTVSS (SEQ ID NO: 73)</p> <p>V<sub>L</sub>:</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT<b>CRASQDISN</b>FLN<b>WYQQKPGQP</b>VKLLIYY <b>TSRLHSGVPSR</b>FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC<b>QQGHTLPYTFGQ</b> GTKLEIK (SEQ ID NO: 74)</p>
3M12 VH3/Vκ3	<p>V<sub>H</sub>:</p> <p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSIT<b>SGYYWNWIRQPPGKGLEWM</b> <b>GYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAED</b>TATYYCTRS <b>SYDYDVLDYWGQGT</b>TVTVSS (SEQ ID NO: 73)</p>

	<p>VL:</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNFLNWWYQQKPGQPVKLLIYY  <b>TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFGQ</b>        GTKLEIK (SEQ ID NO: 75)</p>
3M12 VH4/Vκ2	<p>VH:</p> <p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWI  <b>GYITFDGANNYNPSLKNRVISIRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRS</b>  <b>SYDYDVLDDYWGQGTTVTVSS</b> (SEQ ID NO: 76)</p>
	<p>VL:</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNFLNWWYQQKPGQPVKLLIYY  <b>TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLPYTFGQ</b>        GTKLEIK (SEQ ID NO: 74)</p>
3M12 VH4/Vκ3	<p>VH:</p> <p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWI  <b>GYITFDGANNYNPSLKNRVISIRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRS</b>  <b>SYDYDVLDDYWGQGTTVTVSS</b> (SEQ ID NO: 76)</p>
	<p>VL:</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNFLNWWYQQKPGQPVKLLIYY  <b>TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFGQ</b>        GTKLEIK (SEQ ID NO: 75)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/V κ3	<p>VH:</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEW  <b>MGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYY</b>  <b>CAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSS</b> (SEQ ID NO: 77)</p>
	<p>VL:</p> <p>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPPK  <b>LLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSSEDP</b>  <b>WTFGQGTKLEIK</b> (SEQ ID NO: 78)</p>
5H12 VH5 (C33D*)/V κ4	<p>VH:</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEW  <b>MGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYY</b>  <b>CAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSS</b> (SEQ ID NO: 79)</p>

	<b>VL:</b> DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPP KLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <b>QQSSED</b> <b>PWTFGQGTKLEIK</b> (SEQ ID NO: 80)
5H12 VH5 (C33Y*)/V κ4	<b>VH:</b> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEW MGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYY CARE <b>DYYPHYHGMDY</b> WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 77)
	<b>VL:</b> DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQPP KLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC <b>QQSSED</b> <b>PWTFGQGTKLEIK</b> (SEQ ID NO: 80)

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

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

[00088] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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 гуманизованной VH, приведенной в таблице 3. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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 гуманизованной VL, приведенной в таблице 3.

[00089] 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: 69, 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: 69, и гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[00090] 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: 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: 80. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

[00099] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

[000100] 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):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
**EAA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

[000101] 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)

[000102] Другие константные области хорошо тяжелой и легкой цепи антитела известны в этой области, например, представленные в базе данных IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) или на [www.vbase2.org/vbstat.php](http://www.vbase2.org/vbstat.php), включенных в настоящее описание посредством ссылки.

[000103] 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.

[000104] 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 гуманизованное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую 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 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, приведенную в SEQ ID NO: 83.

[000105] 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 гуманизованных IgG против TfR**

Антитело	Последовательности тяжелой цепи/легкой цепи IgG**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ 4	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEW</u> <u>IGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVY</u> <u>YCTLWLRRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL</u> GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO: 84)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQQRPGQSP</u> <u>RLLIYRMSNLSAGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHL</u> <u>EYPTFTGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR</u> EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)

<p>3A4 VH3 (N54S*)/Vκ 4</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)  <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEW</u>  <u>IGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDТАVYY</u>  <u>CTLWLRRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGТАALG</u>  CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  LFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQORPGOSP</u>  <u>RLLIYRMSNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHL</u>  <u>EYPTTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR</u>  EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKADYEKH  KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>3A4 VH3 /Vκ4</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)  <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLEW</u>  <u>IGWIDPENGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDТАVY</u>  <u>YCTLWLRRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGТАAL</u>  GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS  SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  FLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL  HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQORPGOSP</u>  <u>RLLIYRMSNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHL</u>  <u>EYPTTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR</u>  EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKADYEKH  KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>

<p>3M12 VH3/Vк2</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)  <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW</u>  <u>MGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYC</u>  <u>TRSSYDYDVLVDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL</u>  GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS  SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL  HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGQPVKLLIY</u>  <u>YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLPYTF</u>  <u>GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ</u>  WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAC  EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
<p>3M12 VH3/Vк3</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)  <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW</u>  <u>MGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYC</u>  <u>TRSSYDYDVLVDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL</u>  GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS  SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV  FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL  HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGQPVKLLIY</u>  <u>YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPYTF</u>  <u>GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ</u>  WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAC  EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>

<p>3M12 VH4/Vк2</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)  <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW</u>  <u>IGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCT</u>  <u>RSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG</u>  CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  LFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH  NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGQPVKLLIY</u>  <u>YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLPYTF</u>  <u>GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ</u>  WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYAC  EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
<p>3M12 VH4/Vк3</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)  <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEW</u>  <u>IGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCT</u>  <u>RSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG</u>  CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF  LFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH  NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWIYQQKPGQPVKLLIY</u>  <u>YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLPYTF</u>  <u>GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ</u>  WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYAC  EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>

<p>5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ 3</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)  <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYIINWVRQAPGOGLE</u>  <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAV</u>  <u>YYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u>  GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)</p> <hr/> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVDGYDNSFMHWYQOKPGQP</u>  <u>KLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOSSE</u>  <u>DPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR</u>  EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEEKH  KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)</p>
<p>5H12 VH5 (C33D*)/Vκ 4</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)  <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYDINWVRQAPGOGLE</u>  <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAV</u>  <u>YYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u>  GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSV  MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)</p> <hr/> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVDGYDNSFMHWYQOKPGQP</u>  <u>PKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOSSE</u>  <u>DPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR</u>  EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEEKH  KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>

5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ 4	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGOGL</u> <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAV</u> <u>YYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDGYDNSFMHWYQQKPGQP</u> <u>PKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOSSE</u> <u>DPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR</u> EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (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*

[000106] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное 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.

[000107] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное 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.

[000108] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 84, 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 гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000109] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 86, 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 гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000110] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 87, 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 гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000111] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 88, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80%





[000116] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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 гуманизованное 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.

[000117] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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 гуманизованное 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.

[000118] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом или F(ab')<sub>2</sub>-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')<sub>2</sub>-фрагменты можно получать посредством расщепления пепсином или папаином молекулы антитела, и Fab-фрагменты можно получать, восстанавливая дисульфидных мостиков F(ab')<sub>2</sub>-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)

[000119] 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: 96. 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: 96. 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: 96.

[000120] 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 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, 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 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, приведенную в SEQ ID NO: 83.

[000121] 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 гуманизованных Fab против TfR**

<b>Антитело</b>	<b>Последовательности тяжелой цепи/легкой цепи Fab**</b>
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u> <u>WIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDTA</u> <u>VYYCTLWLRRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 97)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQS</u> <u>PRLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u> <u>HLEYPFTEGGGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)

<p>3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)  <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u>  <u>WIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u>  <u>AVYYCTLWLRRLDYGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u>  ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 98)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQORPGOS</u>  <u>PRLLIYRMSNLAGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u>  <u>HLEYPTFEFGGKTKVEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF  YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY  EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>3A4 VH3/Vκ4</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)  <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGLE</u>  <u>WIGWIDPENGTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u>  <u>AVYYCTLWLRRLDYGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u>  AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:  99)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQORPGOS</u>  <u>PRLLIYRMSNLAGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQ</u>  <u>HLEYPTFEFGGKTKVEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF  YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADY  EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>3M12 VH3/Vκ2</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)  <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u>  <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY</u>  <u>YCTRSSYDYDVLDDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u>  AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:  100)</p>

	<p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLLI</u>  <u>YYTSRLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYFCQOGHTLPY</u>  <u>TFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u>  VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSVTLTKADYEEKHKVY  ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
<p>3M12 VH3/Vκ3</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)</p> <p><u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u>  <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTATY</u>  <u>YCTRSSYDLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u>  AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 100)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLLI</u>  <u>YYTSRLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYFCQOGHTLPY</u>  <u>TFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u>  VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSVTLTKADYEEKHKVY  ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
<p>3M12 VH4/Vκ2</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)</p> <p><u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u>  <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTATYY</u>  <u>CTRSSYDLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u>  ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT  PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLLI</u>  <u>YYTSRLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYFCQOGHTLPY</u>  <u>TFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u>  VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSVTLTKADYEEKHKVY  ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>

<p>3M12 VH4/Vк3</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)  <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u>  <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYY</u>  <u>CTRSSYDYDVL DYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA</u>  ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV  PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO:  101)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWYQOKPGQPVKLLI</u>  <u>YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOGHTLPY</u>  <u>TFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u>  VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY  ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
<p>5H12 VH5 (C33Y*)/Vк3</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)  <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTDYIINWVRQAPGQGLE</u>  <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA</u>  <u>VYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u>  SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID  NO: 102)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)  <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVDGYDN SFMHWYQOKPGQP</u>  <u>PKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSR TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOSS</u>  <u>EDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u>  PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYE  KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)</p>
<p>5H12 VH5 (C33D*)/Vк4</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)  <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTDYDINWVRQAPGQGLE</u>  <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA</u>  <u>VYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u>  SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID  NO: 103)</p>

	<p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPGQ</u>  <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQS</u>  <u>SEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u>  YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY  EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vк4	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)</p> <p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLE</u>  <u>WMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA</u>  <u>VYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u>  SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLY  SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID  NO: 102)</p>
	<p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPGQ</u>  <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQS</u>  <u>SEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF</u>  YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY  EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>

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

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

[000122] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное 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.

[000123] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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), гуманизованное

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.

[000124] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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 гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000125] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 98, 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 гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000126] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 99, 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 гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000127] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 100, и/или (например, и) легкую цепь,





содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

[000132] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 103, 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 гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[000133] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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: 102, 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 гуманизованное 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.

[000134] В некоторых вариантах осуществления гуманизованные 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')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела или нанотела. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, является scFv. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное 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.

[000135] 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.

[000136] 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.

[000137] 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.

[000138] 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*.

[000139] 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.

[000140] 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).

[000141] 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 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.

[000142] В некоторых вариантах осуществления последовательности варьируемого 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.

[000143] 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".

[000144] 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*".

[000145] 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 TfR1, 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).

### **III. Получение антител против TfR**

[000146] Антитела, способные связываться с TfR, как представлено в настоящем описании, можно получать любым известным в этой области способом. См., например, Harlow and Lane, (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

[000147] В некоторых вариантах осуществления антитела, специфические для антигена-мишени (например, TfR), можно получать с помощью общепринятой гибридомной технологии. Полноразмерный антиген-мишень или его фрагмент, необязательно, соединенный с белком-носителем, таки как KLH, можно использовать для иммунизации животного-хозяина для получения антител, связывающихся с этим антигеном. Путь и режим иммунизации животного-хозяина, как правило, соответствуют известным и

общепринятым способам стимуляции и продукции антител, как представлено в настоящем описании. Общие способы получения антител мыши, гуманизированных антител и антител человека известны в этой области и представлены в настоящем описании. Предполагают, что любых млекопитающих, включая людей или их антитело-продуцирующие клетки, можно использовать в качестве основы для получения гибридных линий клеток млекопитающих, включая человека. Как правило, животного-хозяина инокулируют интраперитонеально, внутримышечно, перорально, подкожно, внутripодошвенно и/или (например, и) внутрикожно с использованием количества иммуногена, как представлено в настоящем описании.

[000148] При желании, интересующее антитело (моноклональное или поликлональное) (например, продуцируемое гибридомой) можно секвенировать, а затем полинуклеотидную последовательность можно клонировать в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующую интересующее антитело, можно поддерживать в векторе в клетке-хозяине, а затем клетку-хозяина можно подвергать экспансии и замораживать для последующего использования. Альтернативно, полинуклеотидную последовательность можно использовать для генетической манипуляции для "гуманизации" антитела или для улучшения аффинности (созревания аффинности) или других характеристик антитела. Например, константную область можно конструировать так, чтобы она больше напоминала константные области человека во избежание иммунного ответа, если антитело используют в клинических испытаниях и лечении людей. Желательной может являться генетическая манипуляция с последовательностью антител для достижения более высокой аффинности к антигену-мишени и более высокой эффективности. Специалисту в этой области очевидно, что можно осуществлять одно или более изменений полинуклеотидов в антителе и все равно сохранять его специфичность связывания в антиген-мишенью.

[000149] В других вариантах осуществления полностью человеческие антитела можно получать с использованием коммерчески доступных мышей, сконструированных для экспрессии специфических иммуноглобулиновых белков человека. Трансгенных животных, сконструированных для получения более желательного (например, полностью человеческие антитела) или более устойчивого иммунного ответа, также можно использовать для получения гуманизированных антител или антител человека. Примерами такой технологии являются Xenomouse<sup>TM</sup> от Amgen, Inc. (Fremont, CA) и HuMAb-MouseR<sup>TM</sup> и TC Mouse<sup>TM</sup> от Medarex, Inc. (Princeton, NJ) или мыши H2L2 от Harbour Антитела BV (Holland). Альтернативно, антитела можно получать рекомбинантно посредством фагового дисплея или дрожжевой технологии. См., например, патенты США №№ 5565332; 5580717; 5733743 и 6265150; и Winter et al., (1994) Annu. Rev. Immunol. 12:433-455. Альтернативно, можно использовать технологию фагового дисплея (McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-553) для получения антител человека и фрагментов антител *in vitro* из репертуара генов переменных (V) доменов иммуноглобулинов неиммунизированных доноров.

[000150] Антигенсвязывающие фрагменты 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. Генетически сконструированные антитела, такие как гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела и биспецифические антитела, можно получать, например, посредством общепринятой рекомбинантной технологии. В одном из примеров, ДНК, кодирующую моноклональные антитела, специфические для антигена-мишени, легко можно выделять и секвенировать общепринятыми способами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Гибридомные клетки служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК можно помещать в один или более экспрессирующих векторов, с помощью которых затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьян COS, клетки яичника китайского хомяка (СНО), клетки НЕК293 человека или миеломные клетки, которые в иных условиях не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. См., например, публикацию РСТ № WO 87/04462. Затем ДНК можно модифицировать, например, заменяя кодирующую последовательность константными доменами тяжелой и легкой цепи человека вместо гомологичных последовательностей человека, Morrison et al., (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, или ковалентно соединяя всю или часть кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида с кодирующей последовательностью иммуноглобулина. Таким образом, можно получать генетически сконструированные антитела, такие как "химерные" или "гибридные" антитела, имеющие специфичность связывания с антигеном-мишенью.

[000151] Одноцепочечное антитело можно получать посредством рекомбинантной технологии посредством связывания нуклеотидной последовательности, кодирующей переменную область тяжелой цепи, и нуклеотидной последовательности, кодирующей переменную область легкой цепи. Предпочтительно, между двумя переменными областями встраивают гибкий линкер.

[000152] Альтернативно, способы, описанные для получения одноцепочечных антител (патенты США №№ 4946778 и 4704692), можно адаптировать для получения фаговой или дрожжевой библиотеки scFv, и клоны scFv, специфические для TfR, можно идентифицировать с помощью библиотеки общепринятыми способами. Положительных клонов можно подвергать дополнительному скринингу для идентификации клонов, имеющих высокую аффинность связывания с TfR.

[000153] Антитела, полученные известным в этой области способом и представленные в настоящем описании, можно охарактеризовывать хорошо известными в этой области способами. Например, одним из способов является идентификация эпитопа, с которым связывается антиген, или "эпитопное картирование". Существует множество

известных в этой области способов картирования и характеристики локализации эпитопов на белках, включая разрешение кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, конкурентные анализы, анализы экспрессии фрагментов генов и анализы на основе синтетических пептидов, как описано, например, в главе 11 Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. В одном из примеров эпитопное картирование можно осуществлять с использованием H/D-Ex (водород-дейтериевого обмена), сопряженного с протеолизом и масс-спектрометрией. В дополнительном примере, эпитопное картирование можно использовать для определения последовательности, с которой связывается антитело. Эпитоп может являться линейным эпитопом, т.е. содержаться в одном тяже аминокислот, или конформационным эпитопом, образованным в результате трехмерного взаимодействия аминокислот, которые могут не содержаться в едином тяже (линейной последовательности первичной структуры). Пептиды различной длины (например, по меньшей мере 4-6 аминокислот) можно выделять или синтезировать (например, рекомбинантно) и использовать для анализов связывания антитела. В другом примере эпитоп, с которым связывается антитело, можно определять в системной скрининге с использованием перекрывающихся пептидов, полученных из последовательности антигена-мишени, и определения связывания антителом. В соответствии с анализами экспрессии фрагментов генов, открытую рамку считывания, кодирующую антиген-мишень, фрагментируют случайным образом или с помощью специфических генетических конструкций и определяют реактивность экспрессирующихся фрагментов антигена с использованием антитела, подлежащего тестированию. Фрагменты генов, например, можно получать с помощью ПЦР, а затем транскрибировать и транслировать в белок *in vitro* в присутствии радиоактивных аминокислот. Затем связывание антитела с радиоактивно мечеными фрагментами антигена определяют посредством иммунопреципитации и электрофореза в геле. Некоторые эпитопы также можно идентифицировать с использованием крупных библиотек случайных пептидных последовательностей, экспонируемых на поверхности фаговых частиц (фаговых библиотек). Альтернативно, определенную библиотеку перекрывающихся пептидных фрагментов можно тестировать на связывание с тестируемым антителом в простых анализах связывания. В дополнительном примере для идентификации остатков, требуемых, достаточных и/или (например, и) необходимых для связывания эпитопа можно осуществлять мутагенез антигенсвязывающего домена, эксперименты по перестановке доменов и мутагенез с аланиновым сканированием. Альтернативно, можно осуществлять конкурентные анализы с использованием других антител, как известно, связывающихся с тем же антигеном для определения того, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в этой области.

[000154] В некоторых примерах антитело против TfR получают посредством рекомбинантной технологии, как описано ниже. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепь антитела против TfR, представленного в настоящем описании,



можно клонировать в один экспрессирующий вектор, где каждая нуклеотидная последовательность находится в функциональной связи с подходящим промотором. В одном из примеров каждая из нуклеотидных последовательностей, кодирующих тяжелую цепь и легкую цепь находится в функциональной связи с отдельным промотором. Альтернативно, нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь, могут находиться в функциональной связи с одним промотором, таким образом, что тяжелые и легкие цепи экспрессируются в одного промотора. При необходимости, между кодирующими последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи можно встраивать внутренний участок связывания рибосом (IRES).

[000155] В некоторых примерах нуклеотидные последовательности, кодирующие две цепи антитела, клонируют в два вектора, которые можно встраивать в одинаковые или разные клетки. Если две цепи экспрессируют в разных клетках, каждую из них можно выделять из экспрессирующих их клеток-хозяев, и выделенные тяжелые цепи и легкие цепи можно смешивать и инкубировать в подходящих условиях, делающих возможным образование антитела.

[000156] Как правило, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или все цепи антител, можно клонировать в подходящий экспрессирующий вектор в функциональной связи с подходящим промотором, известными в этой области способами. Например, нуклеотидную последовательность и вектор в подходящих условиях можно приводить в контакт с ферментом рестрикции для получения комплементарных концов на каждой молекуле, которые могут спариваться друг с другом, и которые можно соединять друг с другом с помощью лигазы. Альтернативно, синтетические линкеры нуклеиновой кислоты можно лигировать к концам гена. Эти синтетические линкеры содержат последовательности нуклеиновой кислоты, соответствующие конкретному участку рестрикции в векторе. Выбор экспрессирующих векторов/промотора будет зависеть от типа клеток-хозяев для использования в получении антител.

[000157] Для экспрессии антител, представленных в настоящем описании, можно использовать различные промоторы, включая, в качестве неограничивающих примеров, промежуточный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусный LTR, такой как LTR вируса саркомы Рауса, ВИЧ-LTR, LTR HTLV-1, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор УФ *lac E. coli* и промотор вируса простого герпеса tk.

[000158] Также можно использовать регулируемые промоторы. Такие регулируемые промоторы включают промоторы, использующие репрессор *lac* из *E. coli* в качестве модулятора транскрипции для регуляции транскрипции с промоторов клеток млекопитающего, несущих оператор *lac* [Brown, M. et al., Cell, 49:603-612 (1987)], использующие тетрациклиновый репрессор (tetR) [Gossen, M., and Bujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-555115 (1992); Yao, F. et al., Human Gene Therapy, 9:1939-1950 (1998); Shockelt, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6522-6526 (1995)]. Другие системы включают димер FK506, VP16 или p65 с использованием эстрадиола, RU486,

дифенолмурислерона или рапамицина. Индуцибельные системы доступны, помимо прочего, в Invitrogen, Clontech и Ariad.

[000159] Можно использовать регулируемые промоторы, включающие репрессор с опероном. В одном из вариантов осуществления репрессор *lac* из *E. coli* может функционировать как модулятор транскрипции для регуляции транскрипции с промоторов клеток млекопитающего, несущих оператор *lac* [M. Brown et al., *Cell*, 49:603-612 (1987)]; Gossen and Bujard (1992); [M. Gossen et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551(1992)], в комбинации с тетрациклиновым репрессором (*tetR*) с активатором транскрипции (VP 16) для получения слитого белка *tetR*-активатор транскрипции в клетках млекопитающего, tTa (*tetR*-VP 16), с использованием *tetO*, несущих минимальный промотор, полученный из промотора цитомегаловируса человека (hCMV), для получения системы оператора *tetR*-*tet* для контроля экспрессии генов в клетках млекопитающих. В одном из вариантов осуществления используют индуцируемое тетрациклином переключение. Тетрациклиновый репрессор (*tetR*) в отдельности, а не слитые производные *tetR*-фактор транскрипции в клетках млекопитающего, может функционировать как мощный транс-модулятор для регуляции экспрессии генов в клетках млекопитающих, когда тетрациклиновый оператор правильно расположен ниже ТАТА-элемента промотора CMVIE (Yao et al., *Human Gene Therapy*). Одним из конкретных преимуществ этого индуцируемого тетрациклином переключения является то, что оно не требует использования тетрациклинового репрессора-трансактиватора клеток млекопитающих или слитый белок репрессора, которые в некоторых случаях могут быть токсичными для клеток (Gossen et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992); Shockett et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6522-6526 (1995)), для достижения их регулируемых эффектов.

[000160] Кроме того, вектор может содержать, например, некоторое или все из следующего: ген селективного маркера, такой как ген резистентности к неомицину для селекции стабильных или транзиторных трансфектантов в клетках млекопитающих; последовательности энхансера/промотора из предраннего гена CMV человека для высоких уровней транскрипции; сигналы терминации транскрипции и процессирования РНК из SV40 для стабильности мРНК; участки начала репликации SV40 полиомы и ColE1 для правильной эписомальной репликации; внутренние участки связывания рибосомы (IRES), универсальные участки множественного клонирования; и промоторы РНК T7 и SP6 для транскрипции *in vitro* смысловой и антисмысловой РНК. Подходящие векторы и способы для получения векторов, содержащих трансгены, хорошо известны и доступны в этой области. Неограничивающие примеры сигналов полиаденилирования, которые можно использовать для практического осуществления способов, представленных в настоящем описании, включают сигнал полиаденилирования коллагена I человека, сигнал полиаденилирования коллагена II человека и сигнал полиаденилирования SV40.

[000161] В подходящие клетки-хозяева для получения антител можно встраивать один или более векторов (например, экспрессирующих векторов), содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие любые из антител. Клетки-хозяева можно

культивировать в подходящих условиях для экспрессии антител или любой их полипептидной цепи. Такие антитела или полипептидные цепи можно выделять из культивируемых клеток (например, из клеток или супернатанта клеток) общепринятым способом, например, посредством аффинной очистки. При необходимости, полипептидные цепи антитела можно инкубировать в подходящих условиях в течение подходящего периода времени, делающего возможным получение антитела.

[000162] В некоторых вариантах осуществления способы получения антитела, представленного в настоящем описании, включают рекомбинантный экспрессирующий вектор, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь антитела против TfR, как представлено в настоящем описании. Рекомбинантный экспрессирующий вектор можно встраивать в подходящую клетку-хозяина (например, клетку dhfr- CHO) общепринятым способом, например, посредством опосредованной фосфатом кальция трансфекции. Положительных трансформантов клеток-хозяев можно подвергать селекции и культивировать в подходящих условиях, делающих возможной экспрессию двух полипептидных цепей, образующих антитело, которое можно выделять из клеток или среды для культивирования. При необходимости, две цепи, выделенные из клеток-хозяев можно инкубировать в подходящих условиях, делающих возможным образование антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, используемая для экспрессии антител против TfR, представленная в настоящем описании, представляет собой клетки CHO-S (например, ThermoFisher, кат. № R80007).

[000163] В одном из примеров получают два рекомбинантных экспрессирующих вектора, один из которых кодирует тяжелую цепь антитела против TfR, а другой - легкую цепь антитела против TfR. Оба рекомбинантных экспрессирующих вектора можно встраивать в подходящую клетку-хозяина (например, клетку dhfr- CHO) общепринятым способом, например, посредством опосредованной фосфатом кальция трансфекции.

[000164] Альтернативно, каждый из экспрессирующих векторов можно встраивать в подходящие клетки-хозяева. Положительных трансформантов можно подвергать селекции и культивировать в подходящих условиях, делающих возможной экспрессию полипептидных цепей антитела. Если два экспрессирующих вектора встраивают в одни и те же клетки-хозяева, продуцируемое в них антитело можно выделять из клеток-хозяев или среды для культивирования. При необходимости, полипептидные цепи можно выделять из клеток-хозяев или среды для культивирования, а затем инкубировать в подходящих условиях, делающих возможным образование антитела. Если два экспрессирующих вектора встраивают в разные клетки-хозяева, каждый из них можно выделять из соответствующих клеток-хозяев или соответствующих сред для культивирования. Затем две полипептидные цепи можно инкубировать в подходящих условиях для образования антитела.

[000165] Для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфекции клеток-хозяев, селекции трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антител из среды для культивирования используют стандартные способы молекулярной

биологии. Например, некоторые антитела можно выделять посредством аффинной хроматографии с протеином А или протеином G.

[000166] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TfR, представленных в настоящем описании, получают с помощью технологии рекомбинантных ДНК в суспензионной культуре клеток яичника китайского хомяка (СНО), необязательно, в суспензионной культуре клеток СНО-К1 (например, клетках СНО-К1, полученных из European Collection of Animal Cell Culture, кат. № 85051005).

[000167] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем описании, может иметь одну или более посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах осуществления N-концевая циклизация, также обозначаемая как образование пироглутамата (пиро-Glu), может происходить в антителе на N-концевых остатках глутамата (Glu) и/или глутамина (Gln) во время получения. В связи с этим, следует понимать, что антитело, определенное как имеющее последовательность, содержащую N-концевой остаток глутамата или глутамина, включает антитела, подвергающиеся 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.

#### **IV. Комплексы**

[000168] В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR, представленные в настоящем описании, можно использовать для доставки молекулярной нагрузки в клетку-мишень или целевую ткань (например, клетку или ткань, экспрессирующую TfR). Таким образом, некоторые аспекты изобретения относятся к комплексам, содержащим любое из гуманизированных антител против TfR, представленного в настоящем описании, (например, гуманизированного 3-A4, 3-M12 или 5-N12 в форме IgG или Fab, как приведено в таблице 4 и таблица 5) с молекулярной нагрузкой. Комплексы, представленные в настоящем описании, можно использовать для различных целей, например, диагностических или терапевтических целей.

[000169] В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с олигонуклеотидом (например, антисмысловым олигонуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, используют 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 любым веществом, способным модулировать активность или функцию гена, белка и/или (например, и) нуклеиновой кислоты в клетке. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, нацеленным на ассоциированный с заболеванием повтор в мышечных клетках.

### А. Молекулярная нагрузка

[000170] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к молекулярной нагрузке, например, для модуляции биологического исхода, например, транскрипции последовательности ДНК, экспрессии белка или активности белка, которую можно связывать с любым из антител против TfR, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления такая молекулярная нагрузка способна к таргетингу мышечной клетки, например, посредством специфического связывания с нуклеиновой кислотой или белком в мышечной клетке после доставки в мышечную клетку с помощью связанного антитела против TfR. Следует понимать, что в изобретении можно использовать различные типы молекулярной нагрузки. Например, молекулярная нагрузка может содержать или состоять из олигонуклеотидов (например, антисмыслового олигонуклеотида), пептида (например, пептида, связывающегося с нуклеиновой кислотой или белком, ассоциированным с заболеванием, в мышечной клетке), белка (например, белка, связывающегося с нуклеиновой кислотой или белком, ассоциированным с заболеванием, в мышечной клетке) или низкомолекулярного соединения (например, низкомолекулярного соединения, модулирующего функцию нуклеиновой кислоты или белка, ассоциированного с заболеванием в мышечной клетке).

[000171] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим цепь, имеющую область комплементарности гену, приведенному в таблице 6.

Таблица 6. Список мышечных заболеваний и соответствующих генов.

<b>Гены-мишени редких мышечных заболеваний</b>		
<b>Заболевание</b>	<b>Обозначение гена</b>	<b>Инвентарный номер GenBank</b>
Болезнь Помпе с поздним началом	GAA	NM_000152; NM_001079803; NM_001079804
Болезнь Помпе с поздним началом	GYS1	NM_001161587; NM_002103
Центронуклеарная миопатия (CNM)	DNM2	NM_001190716; NM_004945; NM_001005362; NM_001005360; NM_001005361; NM_007871
Мышечная дистрофия Дюшенна	DMD	NM_004023; NM_004020; NM_004018; NM_004012
Плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD)	DUX4	NM_001306068; NM_001363820; NM_001205218; NM_001293798
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия	MYBPC3	NM_000256

Семейная гипертрофическая кардиомиопатия	MYH6	NM_002471; NM_001164171; NM_010856
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия	MYH7	NM_000257; NM_080728
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия	TNNI3	NM_000363
Семейная гипертрофическая кардиомиопатия	TNNT2	NM_001001432; NM_001001431; NM_000364; NM_001001430; NM_001276347; NM_001276346; NM_001276345
Прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия (FOP)	ACVR1	NM_001105; NM_001347663; NM_001347664; NM_001347665; NM_001347666; NM_001347667; NM_001111067
Атаксия Фридрейха (FRDA)	FXN	NM_001161706; NM_181425; NM_000144
Миопатия с тельцами включения 2	GNE	NM_001190383; NM_001190384; NM_001128227; NM_005476; NM_001190388
Дистальная миопатия Лэйнга	MYH7	NM_000257; NM_080728
Миофибриллярная миопатия	BAG3	NM_004281
Миофибриллярная миопатия	CRYAB	NM_001885; NM_001330379; NM_001289807; NM_001289808
Миофибриллярная миопатия	DES	NM_001927
Миофибриллярная миопатия	DNAJB6	NM_005494; NM_058246
Миофибриллярная миопатия	FHL1	NM_001159701; NM_001159699; NM_001159702; NM_001159703; NM_001159704; NM_001159700; NM_001167819; NM_001330659; NM_001449; NM_001077362
Миофибриллярная миопатия	FLNC	NM_001458; NM_001127487
Миофибриллярная миопатия	LDB3	NM_007078; NM_001171611; NM_001171610; NM_001080114; NM_001080115; NM_001080116

Миофибриллярная миопатия	MYOT	NM_001300911; NM_006790; NM_001135940
Миофибриллярная миопатия	PLEC	NM_201378; NM_201379; NM_201380; NM_201381; NM_201382; NM_201383; NM_201384; NM_000445
Миофибриллярная миопатия	TTN	NM_133432; NM_133379; NM_133437; NM_003319; NM_001256850; NM_001267550; NM_133378
Конгенитальная миотония (аутосомно-доминантная форма, болезнь Томсена)	CLCN1	NM_000083; NM_013491
Миотоническая дистрофия типа I	DMPK	NM_001081563; NM_004409; NM_001081560; NM_001081562; NM_001288764; NM_001288765; NM_001288766
Миотоническая дистрофия типа II	CNBP	NM_001127192; NM_001127193; NM_001127194; NM_001127195; NM_001127196; NM_003418
Миотубулярная миопатия	MTM1	NM_000252
Окулофарингеальная мышечная дистрофия	PABPN1	NM_004643
Конгенитальная парамиотония	SCN4A	NM_000334
<b>Гены-мишени мышечной атрофии</b>		
Обозначение гена	Инвентарный номер GenBank	Связанные публикации*
INHBA (также известный как EDF; FRP)	NM_002192; XM_017012175.1; XM_017012176.1; XM_017012174.1	Lee SJ, et al., Regulation of muscle mass by follistatin и activins., Mol Endocrinol. 2010 Oct;24(10):1998-2008. doi: 10.1210/me.2010-0127. Epub 2010 Sep 1.
FBXO32 (также известный как Fbx32; MAFbx)	NM_058229,3; NM_001242463.1; NM_148177.2	Bodine, S. C., et al., Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science 294: 1704-1708, 2001.

		Gomes, M. D., et al., Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. Proc. Nat. Acad. Sci. 98: 14440-14445, 2001.
MSTN (также известный как GDF8; MSLHP)	NM_005259.2	Saunders, M. A., et al., Human adaptive evolution of myostatin (GDF8), a regulator of muscle growth. Am. J. Hum. Genet. 79: 1089-1097, 2006.  Lin, J., et al., Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 291: 701-706, 2002.  Wei Y, et al., Prevention of Muscle Wasting by CRISPR/Cas9-mediated Disruption of Myostatin In Vivo Volume 24, Issue 11, p1889-1891, November 2016
TRIM63 (также известный как IRF; SMRZ; MURF1; MURF2; RNF28)	NM_032588.3; XM_017002559.2	Höllriegel R, et al. Anabolic effects of exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb): impact on ubiquitin-protein ligases expression and skeletal muscle size. Int J Cardiol, 2013 Aug 10.  Eddins MJ, et al. Targeting ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy. Cell Biochem Biophys, 2011 Jun.

\*Содержание процитированных ссылок включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000172] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является средством для лечения неврологического нарушения. В рамках изобретения "неврологическое нарушение" относится к заболеванию или нарушению, поражающему ЦНС и/или (например, и) имеющему этиологию, связанную с ЦНС. Неограничивающие примеры заболеваний или нарушений ЦНС включают нейропатию, амилоидоз, злокачественное новообразование, заболевание или нарушение глаз, вирусную или микробную инфекцию, воспаление, ишемию, нейродегенеративное заболевание, судороги, поведенческие нарушения и лизосомальную болезнь накопления. В целях по изобретению, термин "ЦНС" будет включать глаз, в норме секвестрированный от остального организма



гематоретинальным барьером. Конкретные неограничивающие примеры неврологических нарушений включают нейродегенеративные заболевания (включая, в качестве неограничивающих примеров, болезнь телец Леви, постполиомиелитный синдром, синдром Шая-Дрейджера, оливопонтocerebellярную атрофию, болезнь Паркинсона, множественную системную атрофию, стриатонигральную дегенерацию, таупатии (включая, в качестве неограничивающих примеров, болезнь Альцгеймера и надъядерный паралич), прионные болезни (включая, в качестве неограничивающих примеров, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота, почесуху, болезнь Крейтцфельда-Якоба, куру, синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, хроническую изнуряющую болезнь и фатальную семейную бессонницу), бульбарный паралич, болезнь двигательных нейронов и гетеродегенеративные нарушения нервной системы (включая, в качестве неограничивающих примеров, болезнь Канавана, болезнь Гентингтона, нейрональный цероидный липофусциноз, болезнь Александера, синдром Туретта, болезнь Менкеса, синдром Коккейна, болезнь Галлервордена-Шпатца, болезнь Лафора, синдром Ретта, гепатолентикулярную дегенерацию, синдром Леша-Нихана и синдром Унферрихта Лундборга), деменцию (включая в качестве неограничивающих примеров, болезнь Пика и спиноцереbellярную атаксию), злокачественное новообразование (например, злокачественное новообразование ЦНС, включая метастазы в головном мозге, являющиеся результатом злокачественного новообразования где-либо в организме). Неограничивающие примеры лекарственных средств для неврологических нарушений, которые можно конъюгировать с любым из антител против TfR, представленных в настоящем описании, и соответствующие состояния, которые можно лечить с помощью них, приведены в таблице 7.

Таблица 7. Примеры лекарственных средств для неврологических нарушений и состояний, подвергаемых лечению

<b>Лекарственное средство</b>	<b>Неврологическое нарушение</b>
Антитело против BACE1	Болезнь Альцгеймера, острое и хроническое повреждение головного мозга, инсульт
Антитело против амилоида бета	Болезнь Альцгеймера
Антитело против тау-белка	Болезнь Альцгеймера, таупатии
Нейротрофин	Инсульт, острое повреждение головного мозга, повреждение спинного мозга
Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста фибробластов 2 (FGF-2)	Хроническое повреждение головного мозга (нейрогенез)
Антитело против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR)	Злокачественное новообразование головного мозга

Глиальный нейротрофический фактор (GDNF)	Болезнь Паркинсона
Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF)	Боковой амиотрофический склероз, депрессия
Лизосомальный фермент	Лизосомальные болезни накопления головного мозга
Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF)	Боковой амиотрофический склероз
Нейрегулин-1	Шизофрения
Антитело против HER2 (например, трастузумаб, пертузумаб и т.д.)	Метастазы HER2-положительного рака в головном мозге
Антитело против VEGF (например, бевацизумаб)	Рецидивирующая или недавно диагностированная глиобластома, рецидивирующая злокачественная глиома, метастазы в головном мозге

[000173] 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) молекулярная нагрузка (например, олигонуклеотиды) связана с любым из антител против TfR, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления вся молекулярная нагрузка, соединенная с антителом против TfR, является одинаковой, например, нацеленной на один и тот же ген. В некоторых вариантах осуществления вся молекулярная нагрузка, соединенная с антителом против TfR, является разной, например молекулярная нагрузка может быть нацелена на разные части одного и того же гена-мишени, или молекулярная нагрузка может быть нацелена на по меньшей мере два разных гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, можно соединять с некоторой молекулярной нагрузкой, являющейся одинаковой, и некоторой молекулярной нагрузкой, которая отличается.

[000174] Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей множество комплексов, где по меньшей мере 80% (например, 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% или по меньшей мере 99%) комплексов содержат антитело против TfR, связанное с одинаковым количеством молекулярных нагрузок (например, олигонуклеотидов).

[000175] 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**

[000176] 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 гэдмером, 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. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать область комплементарности гену-мишени, приведенному в таблице 6.

[000177] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может нацеливать lncRNA или мРНК, например, на деградацию. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может нацеливать, например, на деградацию, нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, участвующий в пути репарации ошибочно спаренных оснований, например, MSH2, MutLalpha, MutSbeta, MutLalpha. Неограничивающие примеры белков, участвующих в путях репарации ошибочно спаренных оснований, на которые мРНК, кодирующая такие белки, может быть нацелена с помощью олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, описаны в Iyer, R.R. et al., "*DNA triplet repeat expansion and mismatch repair*" *Annu Rev Biochem.* 2015;84:199-226.; и Schmidt M.H. и Pearson C.E., "*Disease-associated repeat instability and mismatch repair*" *DNA Repair (Amst).* 2016 Feb;38:117-26.

[000178] В некоторых вариантах осуществления любой из олигонуклеотидов может находиться в форме соли, например, соли натрия, калия или магния.

[000179] В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'- нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, конъюгирован с аминокислотой, 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, 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<sup>A</sup>)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR<sup>A</sup>-, -NR<sup>A</sup>C(=O)-, -NR<sup>A</sup>C(=O)R<sup>A</sup>-, -C(=O)R<sup>A</sup>-, -NR<sup>A</sup>C(=O)O-, -NR<sup>A</sup>C(=O)N(R<sup>A</sup>)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R<sup>A</sup>)-, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>A</sup>-, -NR<sup>A</sup>S(O)<sub>2</sub>- или их комбинацией; каждый R<sup>A</sup> 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<sup>A</sup>)-, или -C(=O)N(R<sup>A</sup>)<sub>2</sub> или их комбинацией.

[000180] В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'-нуклеозид любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, конъюгирован с соединением формулы -NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, 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 NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- и 5'- или 3'-нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>- конъюгировано с олигонуклеотидом посредством реакции между 6-амино-1-гексанолом (NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-OH) и 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000181] 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**

[000182] 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.

[000183] 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.

[000184] 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 кислоте. 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.

[000185] 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.

[000186] В некоторых вариантах осуществления любое одно или более тиминового 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:**

[000187] 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.

[000188] 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 деградациии, например, посредством включения модификации, например, модификации нуклеотида.

[000189] 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 небциклических 2'-модифицированных нуклеозидов, например, 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), или 2'-О-N-метилацетидами (2'-O-NMA) модифицированных нуклеозидов.

[0003] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, содержит один или более 2'-4'-бициклических 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 (ENA) 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 ENA 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, несодержащим 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 небциклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ENA, cEt).

[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 небциклические 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ENA, cEt).

[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, фосфотиаты, хиральные фосфотиаты, фосфородитиаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкил-фосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, содержащие 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры 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(метилимину)-остовы или ММІ-остовы; амидные остовы (см. De Mesmaeker et al. *Acc. 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**

[000190] 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 фосфотиат-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 фосфотиатные 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 хирально контролируемые 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**

[000191] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может представлять собой морфолиновое соединение. Морфолиновые олигомерные соединения описаны в Dwaine A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510; *Genesis*, volume 30, 3 issue 2001 года; 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 фосфоамидатным морфолиновым олигомером (РМО) (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)**

[000192] 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, аминоэтилглициновым 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, в качестве 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**

[000193] 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.

[000194] В некоторых вариантах осуществления область Y представляет собой смежный фрагмент нуклеотидов, например, область 6 или более нуклеотидов ДНК, способный рекрутировать РНКазу, такую как РНКаза H. В некоторых вариантах осуществления гЭпмер связывается с целевой нуклеиновой кислотой, где рекрутируется РНКаза, 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'-МОЕ, 2'-О-Ме, 2'-F) или 2'-4'-бициклические нуклеозиды (например, ЗНК, сEt, 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.

[000195] В некоторых вариантах осуществления область пропуска гЭпмерных 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.

[000196] 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 PCT №№ WO2004069991; WO2005023825; WO2008049085 и WO2009090182; и патент EP № EP2149605, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000197] В некоторых вариантах осуществления гепмер имеет длину 10-40 нуклеозидов. Например, гепмер 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 гепмер 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.

[000198] В некоторых вариантах осуществления область пропуска Y в гепмере 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.

[000199] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гепмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гепмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') независимо имеют длину 1-20 нуклеозидов. Например, 5'-фланкирующая область гепмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гепмера (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 гепмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гепмера (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 гепмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гепмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') имеют одинаковую длину. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гепмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гепмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') имеют разную длину. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гепмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') длиннее 3'-фланкирующей области гепмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). В

некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') короче 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3').

[000200] В некоторых вариантах осуществления гэнмер 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 гэнмере 5'-X-Y-Z-3'.

[000201] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') или 3'-фланкирующей области гэнмера (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 небиициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом. В

некоторых вариантах осуществления высокоаффинный модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК, сEt или ENA) или небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-О-Ме), 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-DMAEOE), или 2'-О-N-метилацетидами (2'-О-NMA) нуклеозидом).

[000202] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами, и один или более нуклеозидов в 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом, и каждый нуклеозид в 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом.

[000203] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит те же высокоаффинные нуклеозиды, что и 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). Например, 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') могут содержать один или более небциклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме). В другом примере 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') могут содержать один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt).

[000204] В некоторых вариантах осуществления гэтамер 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 небикалическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтамер 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 гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит иные высокоаффинные нуклеозиды, чем 3'-фланкирующая область гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). Например, 5'-фланкирующая область гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более небикалических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и 3'-фланкирующая область гэтамера (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 гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более небикалических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и 5'-фланкирующая область гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt).

[000205] В некоторых вариантах осуществления гэтамер 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 небикалическим 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 гэтамер 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 небикалическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[000206] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит один или более небикалических 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 гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит один или более небикалических 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 гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержат один или более небиициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или более 2'-4'-биициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt).

[000207] В некоторых вариантах осуществления гэтамер 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 небиициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-биициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтамер 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 небиициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-биициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтамер 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 небиициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-биициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[000208] Неограничивающие примеры конфигураций гэтамеров со смесью небиициклического 2'-модифицированного нуклеозида (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и 2'-4'-биициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt) в 5'-фланкирующей области гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и/или 3'-фланкирующей области гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') включают: BBB-(D)n-BBBA; KKK-(D)n-KKKA; LLL-(D)n-LLLA; BBB-(D)n-BBBEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBBA; KKK-(D)n-KKKA; LLL-(D)n-LLLA; BBB-(D)n-BBBEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBAAA; KKK-(D)n-KKAAA; LLL-(D)n-LLAAA; BBB-(D)n-BBBEEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBAAA; KKK-(D)n-KKAAA; LLL-(D)n-LLAAA; BBB-(D)n-BBBEEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; 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-





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**

[000210] 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.

[000211] 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.

[000212] 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.

[000213] 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.

[000214] 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.

[000215] 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.

[000216] 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).

[000217] 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)**

[000218] 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.

[000219] 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, гибридизирующиеся 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.

[000220] 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.

[000221] 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.

[000222] 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.

[000223] 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.

[000224] 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.

[000225] 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.

[000226] 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.

[000227] 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.

[000228] 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 является модифицированным остатком сахара (например, 2'-модифицированным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК 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-метилацетиламино (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.

[000229] 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.

[000230] 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, тионофосфоамидаты, 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.

[000231] 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.

[000232] 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-метилацетиламино (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).

[000233] 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, аминоалкилфосфотриэфиры,



метильные и другие алкильные фосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфоамидаты, содержащие 3'-аминофосфоамидат и аминоалкилфосфоамидаты, 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.

[000234] 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.

[000235] 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 является модифицированным остатком 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'-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-метилацетиламино (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 межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между по меньшей мере двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеозидные 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.

[000236] 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.

[000237] 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.

[000238] 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'-О-метилфосфодитионатную модификацию, повышающую нагрузку RISC, как описано в Wu et al., (2014) *Nat Commun* 5:3459, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000239] 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-Ме) 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-Ме 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-Ме (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)**

[000240] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться микроРНК (мкРНК). МикроРНК (обозначаемые как "мкРНК") являются небольшими некодирующими РНК, принадлежащими к классу регуляторных молекул, контролирующей 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.

[000241] 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**

[000242] 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.

### **m. Рибозимы**

[000243] 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.

[000244] 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.

[000245] 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.

[000246] 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**

[000247] 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 программируемым 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.

[000248] 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 гомологии 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.

[000249] 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., Najjar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663 (2001); "CRISPR 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**

[000250] 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 или аминокислотных 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).

[000251] 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.

[000252] 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.

[000253] 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.

#### **о. Изменяющие сплайсинг олигонуклеотиды**

[000254] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид (например, антисмысловый олигонуклеотид, включая морфолиновый олигонуклеотид) по настоящему изобретению, нацелен на сплайсинг. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид направленно воздействует на сплайсинг, индуцируя пропуск экзона и восстановление рамки считывания в гене. В качестве неограничивающего примера, олигонуклеотид может индуцировать пропуск экзона, кодирующего мутацию со сдвигом рамки считывания, и/или (например, и) экзона, кодирующего преждевременный стоп-кодон. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может индуцировать пропуск экзона посредством блокирования распознавания сплайсосома участка сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления пропуск экзона приводит к образованию укороченного, но функционального белка по сравнению с референсным белком (например, укороченного, но функционального белка DMD, как описано ниже). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид способствует включению конкретного экзона (например, экзона 7 описанного ниже гена SMN2). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может индуцировать включение экзона посредством таргетинга ингибирующей участок сплайсинга последовательности. Сплайсинг РНК вовлечен в мышечные заболевания, включая мышечную дистрофию Дюшенна (DMD) и спинальную мышечную атрофию (SMA).

[000255] Изменения (например, делеции, точечные мутации и дупликации) в гене, кодирующем дистрофин (DMD), вызывают DMD. Эти изменения могут приводить к мутациям со сдвигом рамки считывания и/или (например, и) нонсенс-мутациям. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению способствует пропуску одного или более экзонов DMD (например, экзона 8, экзона 43, экзона 44, экзона 45, экзона 50, экзона 51, экзона 52, экзона 53 и/или (например, и) экзона 55) и приводит к образованию функционального укороченного белка. См., например,



патент США № 8486907, опубликованный 16 июля 2013 года, и патентную заявку США № 20140275212, опубликованную 18 сентября 2014 года.

[000256] При SMA наблюдают утрату функционального SMN1. Хотя ген SMN2 является апаралогом SMN1, альтернативный сплайсинг гена SMN2 преимущественно приводит к пропуску экзона 7 и последующей продукции укороченного белка SMN, который не может компенсировать утрату SMN1. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению способствует включению экзона 7 SMN2. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на ингибиторные последовательности участка сплайсинга SMN2 (см., например, патент США № 7838657, опубликованный 23 ноября 2010 года).

#### **ii. Низкомолекулярные соединения:**

[000257] В качестве молекулярной нагрузки, представленной в настоящем описании, можно использовать любое подходящее низкомолекулярное соединение.

#### **iii. Пептиды/белки**

[000258] В качестве молекулярной нагрузки, представленной в настоящем описании, можно использовать любой подходящий пептид или белок. В некоторых вариантах осуществления белок является ферментом (например, кислой альфа-глюкозидазой, например, кодируемой геном *GAA*). 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. Примеры способов описаны в этой области и включены посредством ссылок (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).

#### **iv. Конструкции нуклеиновой кислоты**

[000259] 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. Экспрессирующая конструкция гена может кодировать последовательность белка, дефицитного в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующую конструкцию гена

может экспрессироваться, например, гиперэкспрессироваться, в ядре мышечной клетки. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая конструкция гена кодирует ген, дефицитный при мышечном заболевании. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие конструкции гена кодируют белок, содержащий по меньшей мере один "цинковый палец". В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая конструкция гена кодирует белок, связывающийся с геном из таблицы 6. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая конструкция гена кодирует белок, приводящий к снижению экспрессии белка (например, мутантного белка), кодируемого геном из таблицы 6. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующая конструкция гена кодирует фермент редактирования генома. Дополнительные примеры конструкций нуклеиновой кислоты, 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.

#### **v. Детектируемые метки/диагностические средства**

[000260] В качестве молекулярной нагрузки по настоящему изобретению можно использовать любую подходящую детектируемую метку или диагностическое средство. Термин "диагностическое средство" относится к средству, используемому для диагностических целей, например, посредством детекции другой молекулы в клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления диагностическое средство является средством, нацеленным (например, связывающимся) на биомаркер, как известно, ассоциированным с заболеванием (например, нуклеиновой кислотой-биомаркером, белковым биомаркером или метаболитом-биомаркером) у индивидуума, и генерирующим детектируемый сигнал, который можно использовать для определения наличия/отсутствия биомаркера и, таким образом, для диагностики заболевания. В качестве неограничивающих примеров, диагностическое средство может являться антителом или антисмысловой нуклеиновой кислотой.

[000261] В некоторых вариантах осуществления диагностическое средство содержит детектируемую метку. Термин "детектируемая метка" относится к веществу, имеющему по меньшей мере один встроенный элемент, изотоп или структурную или функциональную группу, делающую возможной детекцию молекулы, например, белка или полипептида, или другого вещества, с которым связывается диагностическое средство. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка попадает в любой один (или более) из пяти классов: а) средство, содержащее изотопы, которые могут являться радиоактивными или тяжелыми изотопами, включая, в качестве неограничивающих примеров,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $\text{Tc-}^{99\text{m}}$ ),  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,

$^{153}\text{Gd}$ ,  $^{169}\text{Yb}$  и  $^{186}\text{Re}$ ; b) средство, содержащее иммуноактивное вещество, которое может являться антителом или антигеном, которое может связываться с ферментом (например, таким как пероксидаза хрена); c) а средство, содержащее окрашенное, люминесцентное, фосфоресцентное или флуоресцентное вещество (например, такое как флуоресцентная метка флуоресцеинизотиоцианат (FITC); d) средство, имеющее один или более фотоаффинных веществ; и e) средство, являющееся лигандом для одного или более известных партнеров по связыванию (например, биотин-стрептавидин, His-NiTNAFK506-FKBP). В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка содержит радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка содержит флуоресцентное вещество. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка содержит краситель, например, флуоресцентный краситель, например, флуоресцеинизотиоцианат, техасский красный, родамин, Cy3, Cy5, Cy5,5, Alexa 647 и их производные. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка содержит биотин. В некоторых вариантах осуществления детектируемая молекула является флуоресцентным полипептидом (например, GFP или его производным, таким как усиленный GFP (EGFP)) или люциферазой (например, люциферазой светлячка, *Renilla* или *Gaussia*). В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка может реагировать с подходящим субстратом (например, люциферин) с генерированием детектируемого сигнала. Неограничивающие примеры флуоресцентных белков включают GFP и его производные, белки, содержащие хромофоры, испускающие свет разных цветов, таких как красный, желтый и голубой флуоресцентный белок, и т.д. Примеры флуоресцентных белков включают, например, Sirius, Azurite, EBFP2, TagBFP, mTurquoise, ECFP, Cerulean, TagCFP, mTFP1, mUkG1, mAG1, AcGFP1, TagGFP2, EGFP, mWasabi, EmGFP, TagYFP, EYFP, Topaz, SYFP2, Venus, Citrine, mKO, mKO2, mOrange, mOrange2, TagRFP, TagRFP-T, mStrawberry, mRuby, mCherry, mRaspberry, mKate2, mPlum, mNeptune, T-Sapphire, mAmetrine, mKeima. См., например, Chalfie, M. and Kain, SR (eds.) Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols (Methods of biochemical analysis, v. 47, Wiley-Interscience, and Hoboken, N.J., 2006, и/или (например, и) Chudakov, DM, et al., *Physiol Rev.* 90(3):1103-63, 2010, включенные в настоящее описание посредством ссылки, для обсуждения GFP и множества других флуоресцентных или люминесцентных белков. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка содержит темновой гаситель, например, вещество, поглощающее энергию возбуждения от флуорофора и рассеивающее энергию в виде тепла.

### **В. Линкеры**

[000262] 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 TfR 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).

[000263] Предшественник линкера, как правило, будет содержать две разные реакционноспособные частицы, делающие возможным присоединение к антителу против TfR 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 TfR посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела против TfR. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина антитела против TfR с помощью малеимид-содержащего линкера, где, необязательно, малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроильную или малеимидометилциклогексан-1-карбоксилатную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина антитела против TfR или тиоловой функционализированной молекулярной нагрузкой с помощью 3-арилпропионитрильной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком лизина антитела против TfR. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR и/или молекулярной нагрузкой посредством амидной связи, карбаматной связи гидразидной, триазольной, тиоэфирной или дисульфидной связи.

#### **i. Расщепляемые линкеры**

[000264] 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.

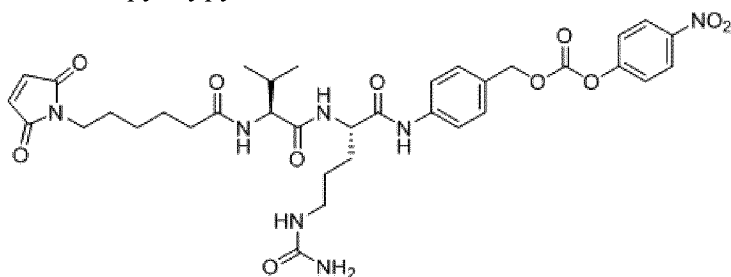
[000265] Протеаза-чувствительные линкеры расщепляются в результате ферментативной активности протеазы. Эти линкеры, как правило, содержат пептидные последовательности и могут иметь длину 2-10 аминокислот, приблизительно 2-5 аминокислот, приблизительно 5-10 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, 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  $\beta$ -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.

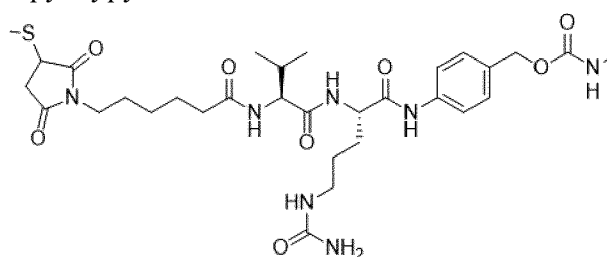
[000266] pH-чувствительный линкер представляет собой ковалентную связь, легко подвергающуюся деградации в условиях высокого или низкого pH. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер может расщепляться при pH в диапазоне от 4 до 6. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер содержит гидразон или циклический ацеталь. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер расщепляется в эндосоме или лизосоме.

[000267] 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.

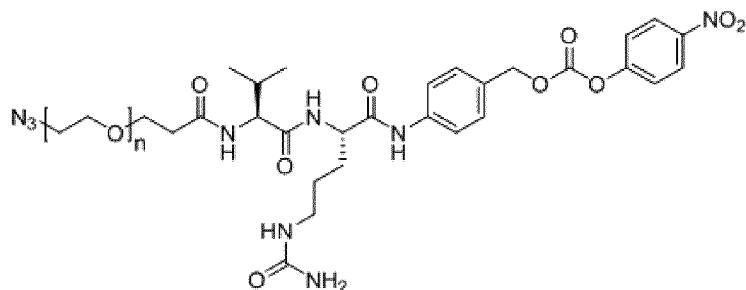
[000268] В некоторых вариантах осуществления линкер является линкером Val-Cit (например, как описано в патенте США № 6214345, включенном в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией линкер Val-Cit имеет структуру:



[000269] В некоторых вариантах осуществления после конъюгации линкер Val-Cit имеет структуру:

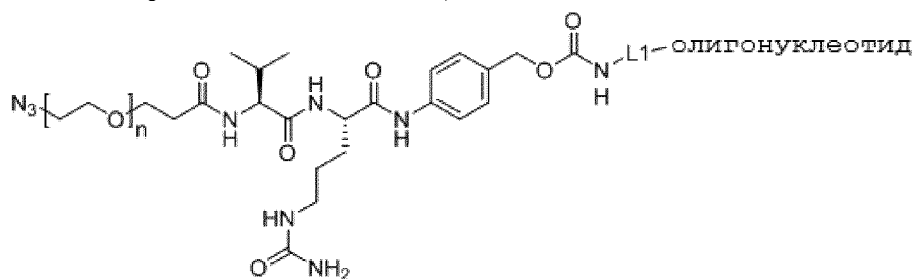


[000270] В некоторых вариантах осуществления линкер Val-cit соединяют с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией посредством клик-химии линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии) имеет структуру:



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

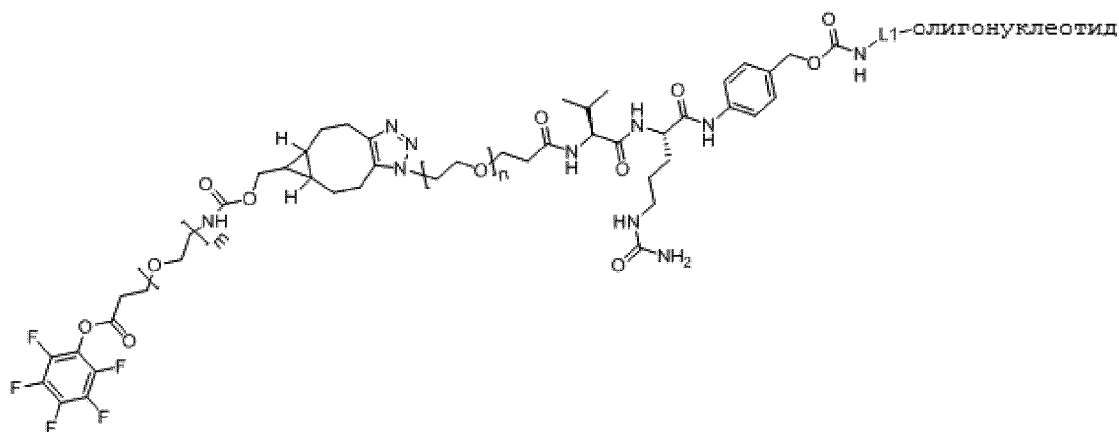
[000271] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии), конъюгирован (например, через другой химический остаток) с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом). В некоторых вариантах 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.

[000272] 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

[000273] 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)<sub>n</sub>, 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).

[000274] 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 O, необязательно замещенный формы серы или поли(алкиленоксид), например, полиэтиленоксид или полипропиленоксид.

### iii. Конъюгация линкера

[000275] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR 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, концевой фосфата олигонуклеотидного остова. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR, например антителом, через остаток лизина или цистеина, присутствующий в антителе против TfR.

[000276] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR 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 TfR, 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 TfR, 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*".

[000277] В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно содержит спейсер, например, полиэтиленгликолевый спейсер или ацил/карбомоил-сульфамидный

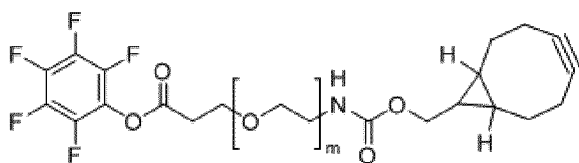


спейсер, например, спейсер HydraSpace™. В некоторых вариантах осуществления спейсер является таким, как описано в Verkade, J.M.M. et al., "*A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Stability, and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates*", *Antibodies*, 2018, 7, 12.

[000278] 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.

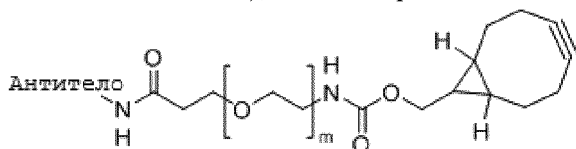
[000279] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакций сопряженного присоединения между нуклеофилом, например, аминогруппой или гидроксильной группой, и электрофилом, например, карбоновой кислотой, карбонатом или 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, алкилпсевдогалидом, 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.

[000280] 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:



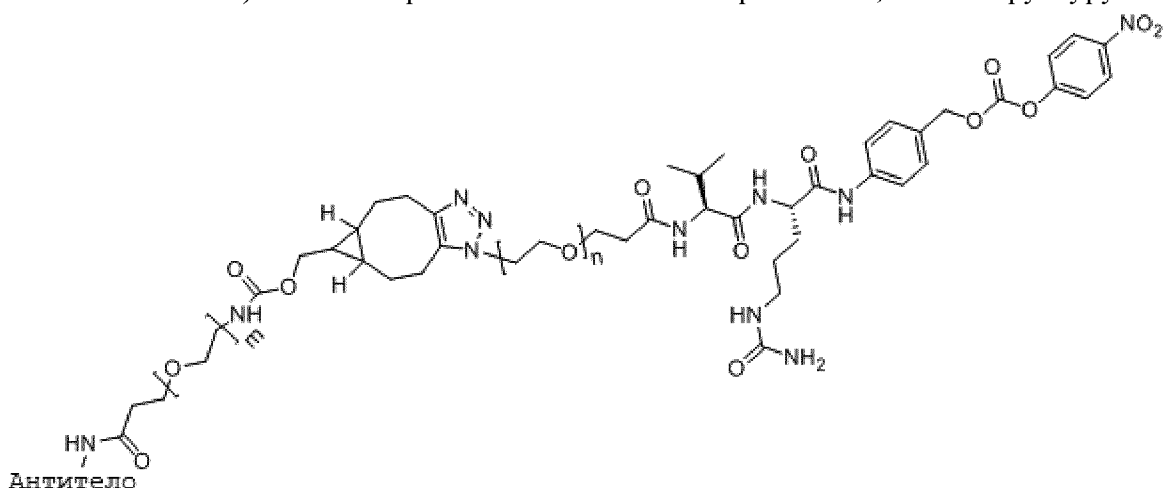
где  $m$  является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления  $m$  составляет 4.

[000281] 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:



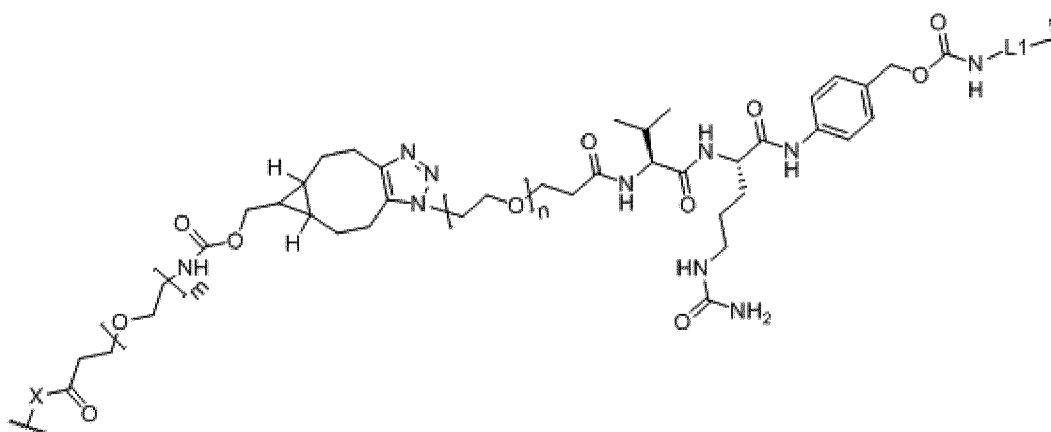
где  $m$  является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления  $m$  составляет 4.

[000282] 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.

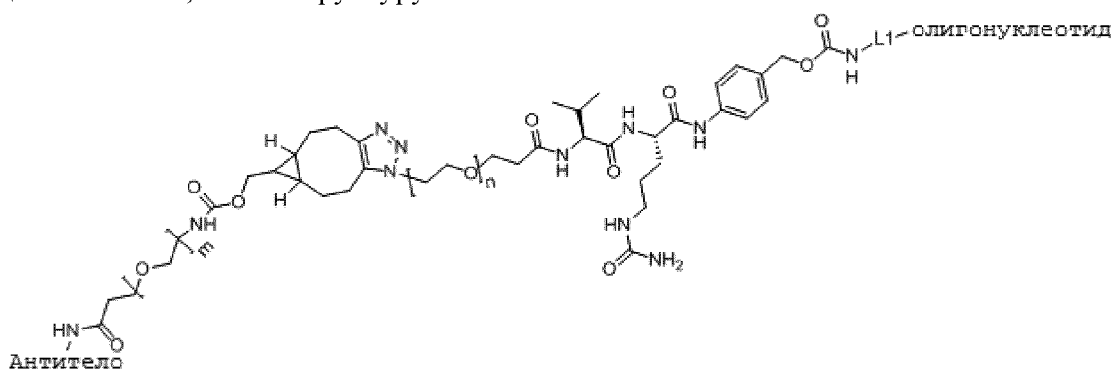
[000283] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединяющий антитело и молекулярную нагрузку, имеет структуру:



(C)

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

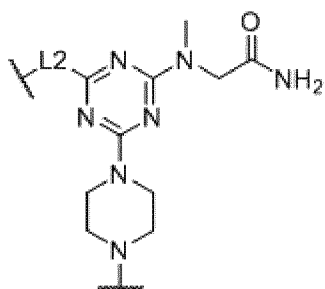
[000284] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, имеет структуру:



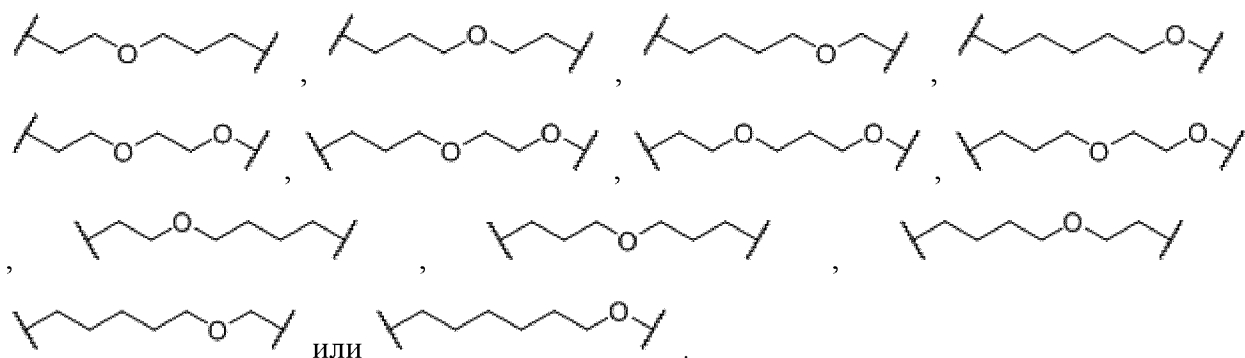
(D)

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

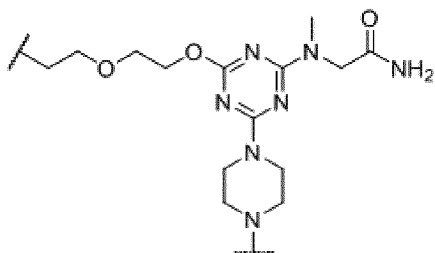
[000285] В структурах формулы (A), (B), (C) и (D)  $L1$  в некоторых вариантах осуществления является спейсером, являющимся замещенным или незамещенным алифатическим, замещенным или незамещенным гетероалифатическим, замещенным или незамещенным карбоциклическим, замещенным или незамещенным гетероциклическим, 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 комбинаций. В некоторых вариантах осуществления  $L1$  является



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом, где L2 является



[000286] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом.

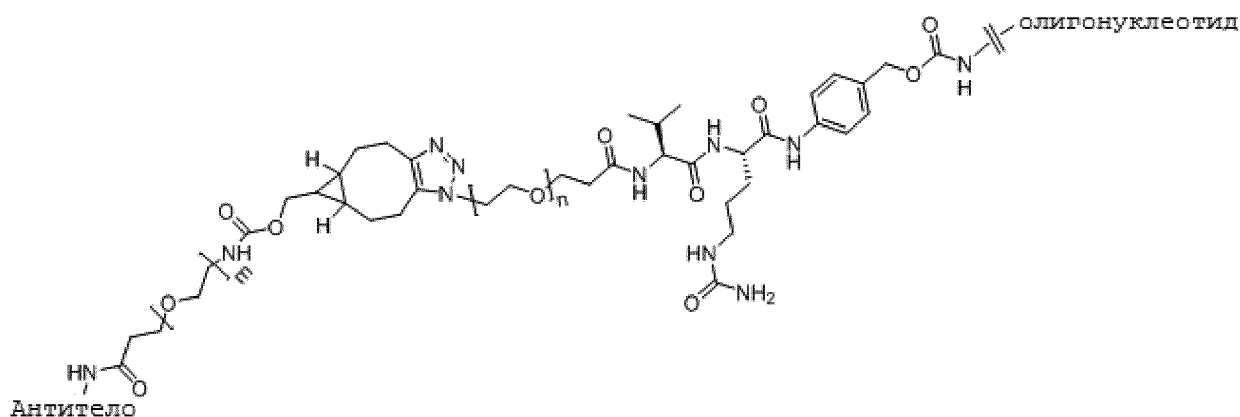
[000287] В некоторых вариантах осуществления L1 является



[000288] В некоторых вариантах осуществления L1 связан с 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000289] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, может не присутствовать).

[000290] В некоторых вариантах осуществления любой из комплексов, представленных в настоящем описании, имеет структуру:



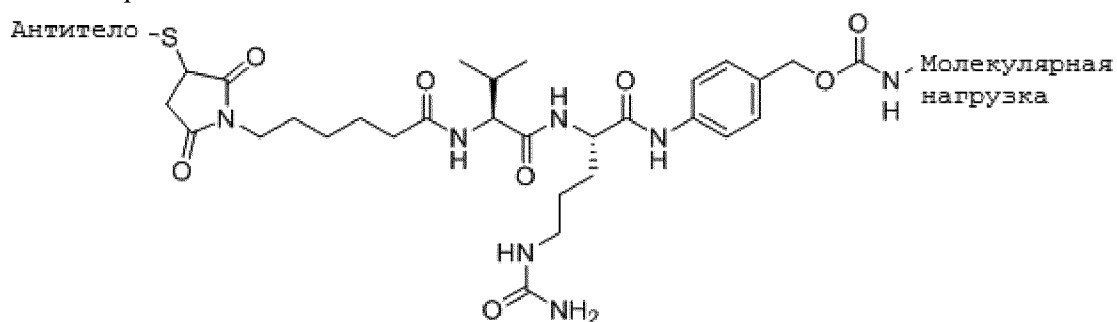
(E),

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

### С. Примеры комплексов антитело-молекулярная нагрузка

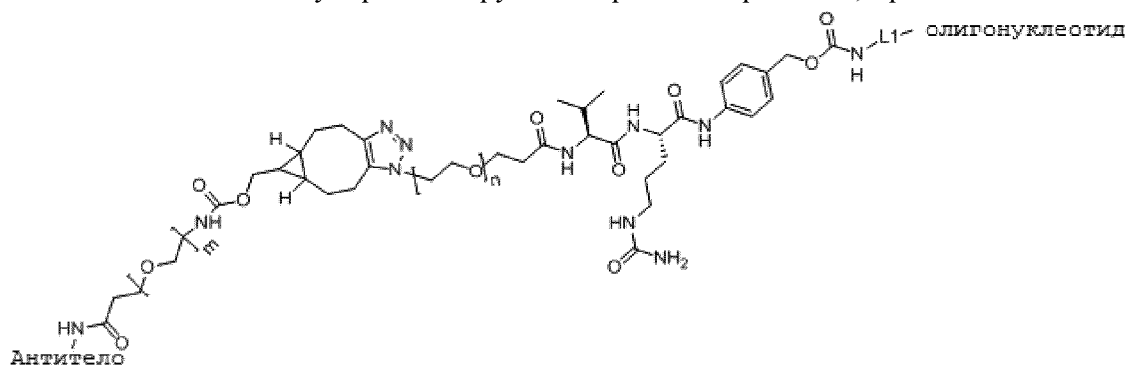
[000291] Настоящее изобретение дополнительно относится к неограничивающим примерам комплексов, содержащих любое из антител против TfR, представленных в настоящем описании, ковалентно связанных с любой молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом), представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR (например, любое из антител против TfR, приведенных в таблице 2) ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) через линкер. Можно использовать любые из линкеров, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, если молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, линкер связан с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер связан с антителом против TfR с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе против TfR). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) связан с антителом (например, антителом против TfR, представленным в настоящем описании) через аминокгруппу  $n$  (например, через лизин в антителе).

[000292] Ниже приведен пример структуры комплекса, содержащего антитело против рецептора трансферрина, 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).

[000293] Другой пример структуры комплекса, содержащего антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер Val-cit, приведен ниже:



(D)

где  $n$  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,  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим смысловую цепь и антисмысловую цепь, и, линкер связывают со смысловой цепью или антисмысловой цепью на 5'-конце или 3'-конце.

[000294] 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 один олигонуклеотид 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 молекулярной нагрузки 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.

[000295] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, представленное в настоящем описании, (например, антитела в таблицах 2-5) ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем

описании, содержит антитело против TfR, представленное в настоящем описании, (например, антитела в таблицах 2-5) ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер (например, линкер Val-cit). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) связан 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) связан с антителом (например, антителом против TfR, представленным в настоящем описании) с помощью аминокислотной группы (например, через лизин в антителе).

[000296] В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим область комплементарности из по меньшей мере 15 нуклеотидов в отношении любой из последовательностей гена-мишени, представленных в настоящем описании.

[000297] 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.

[000298] 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.

[000299] 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.

[000300] 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.

[000301] 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.



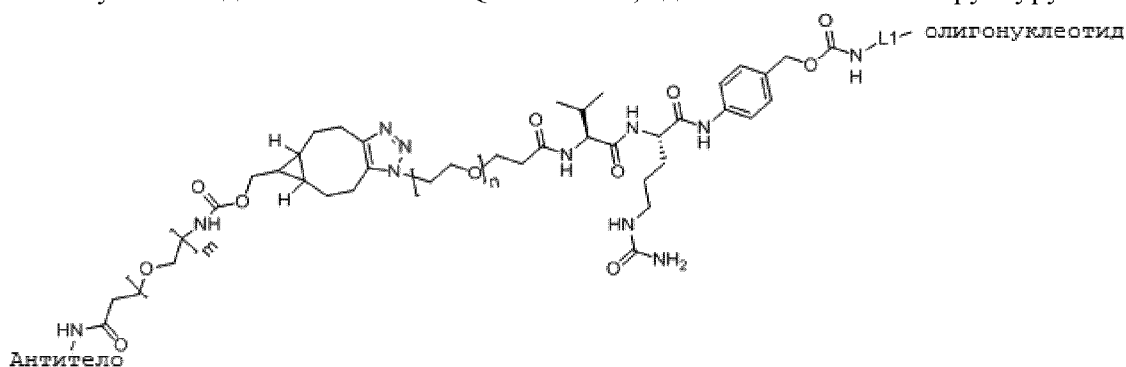


[000310] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[000311] 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.

[000312] 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.

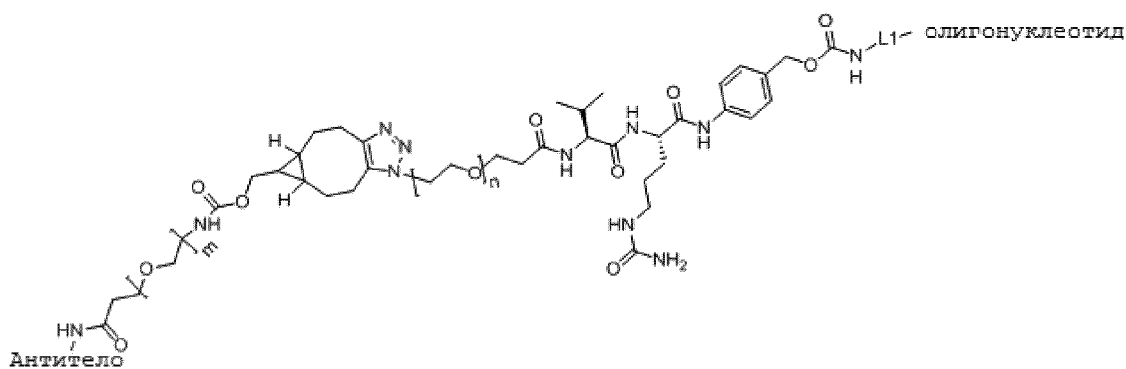
[000313] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

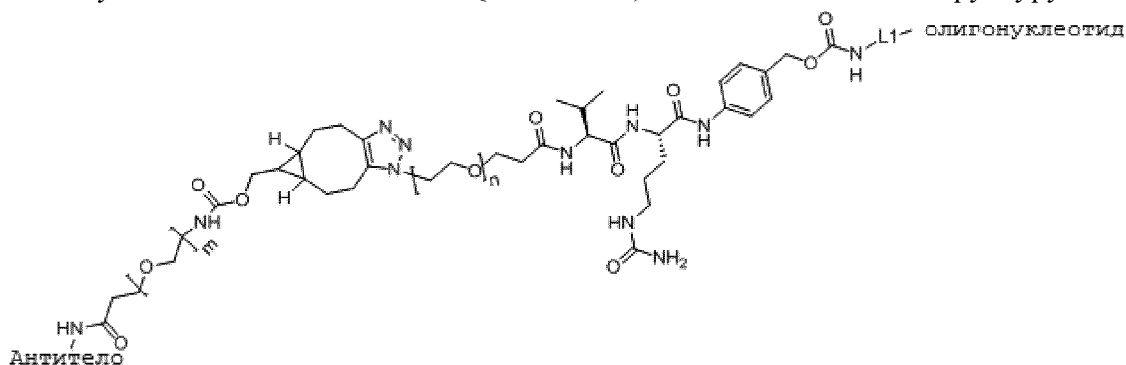
[000314] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

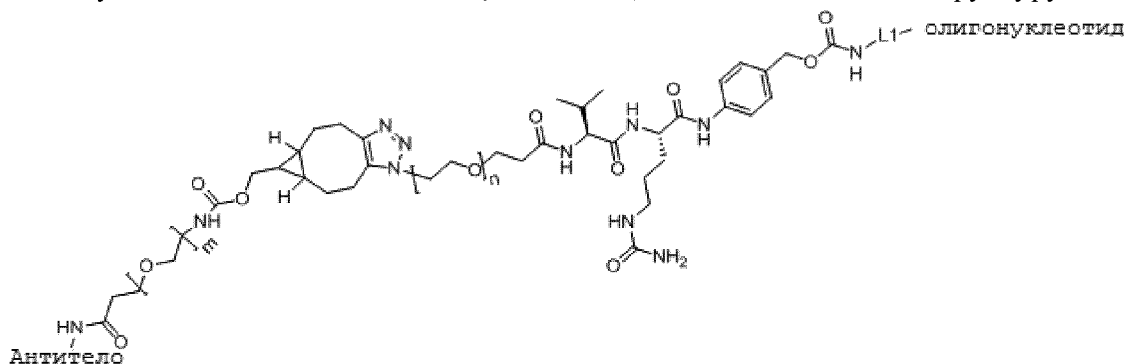
[000315] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

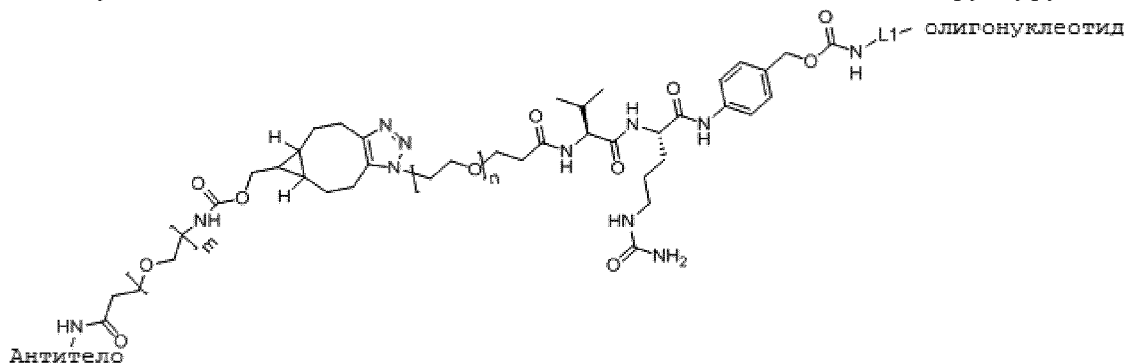
[000316] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

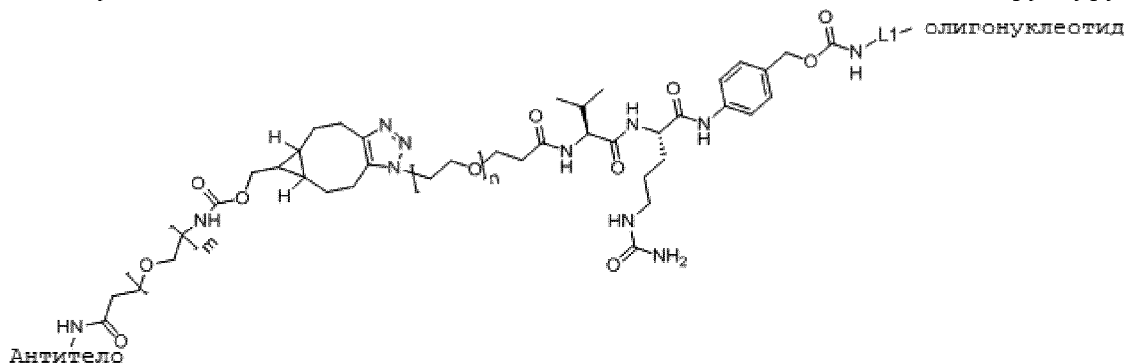
[000317] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

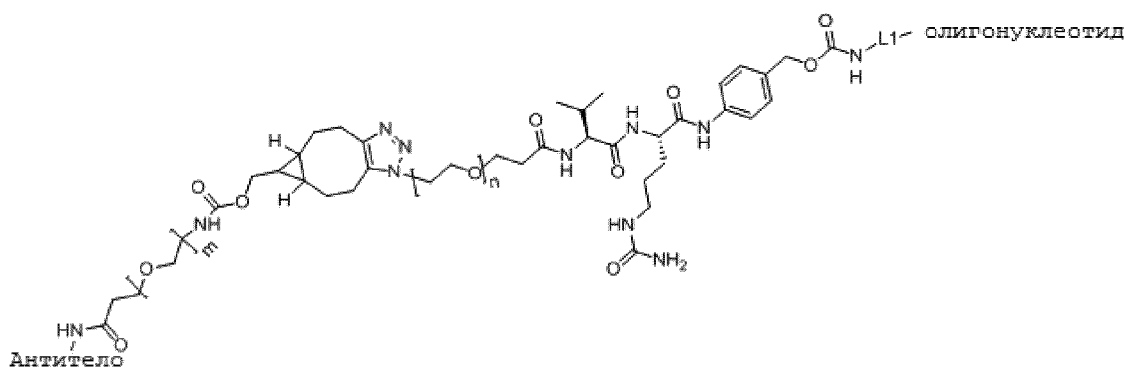
[000318] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность of n SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

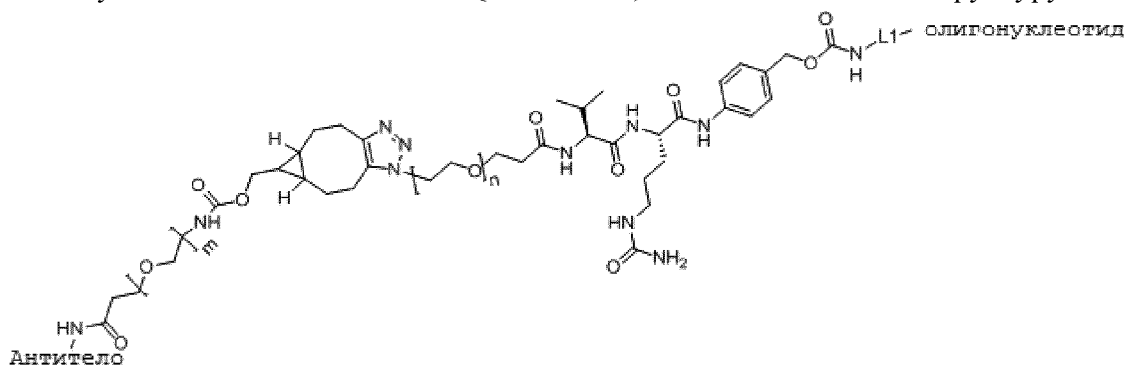
[000319] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

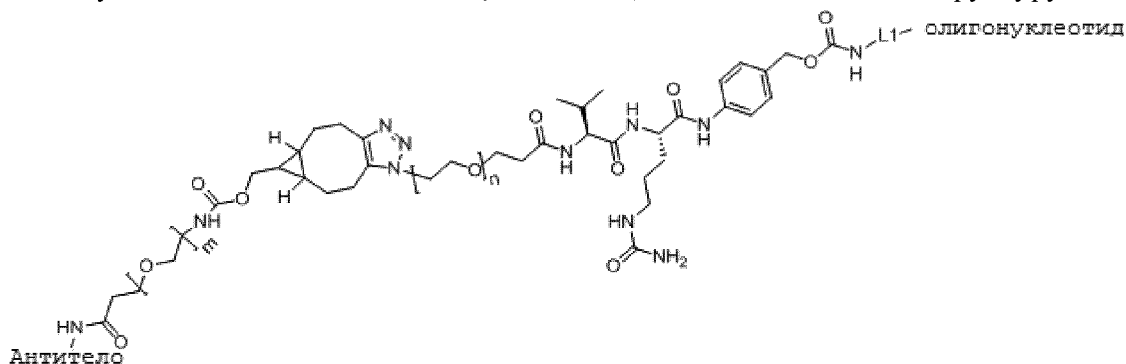
[000320] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

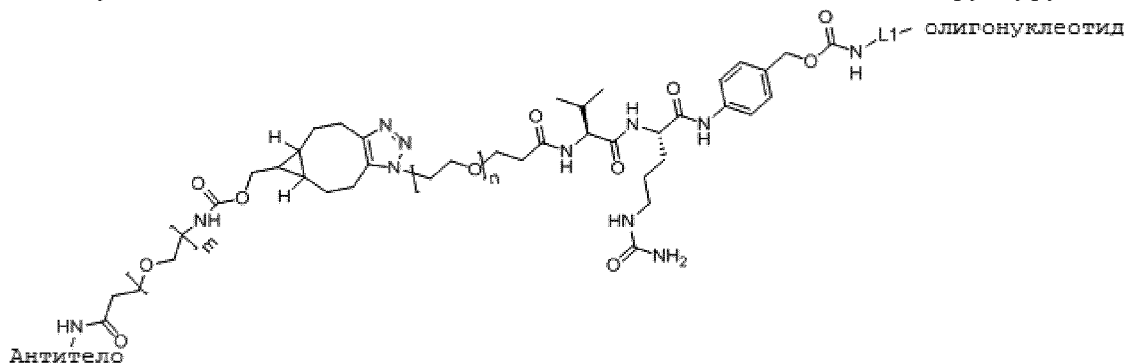
[000321] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

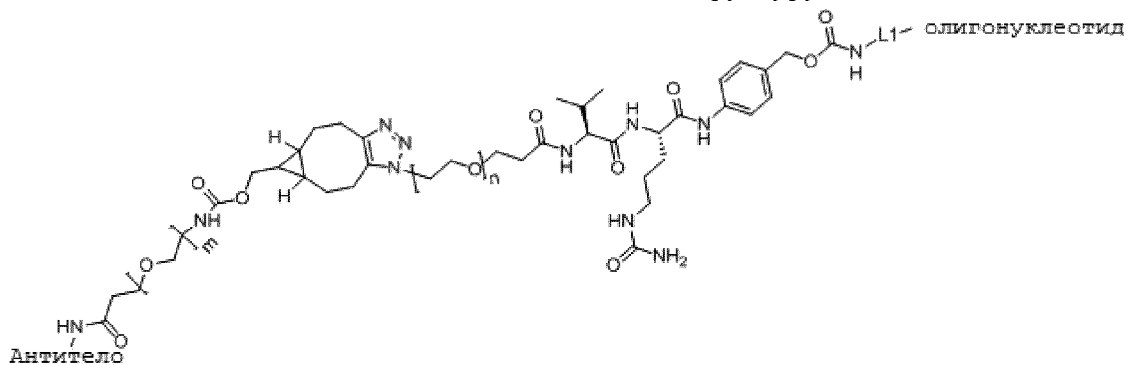
[000322] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

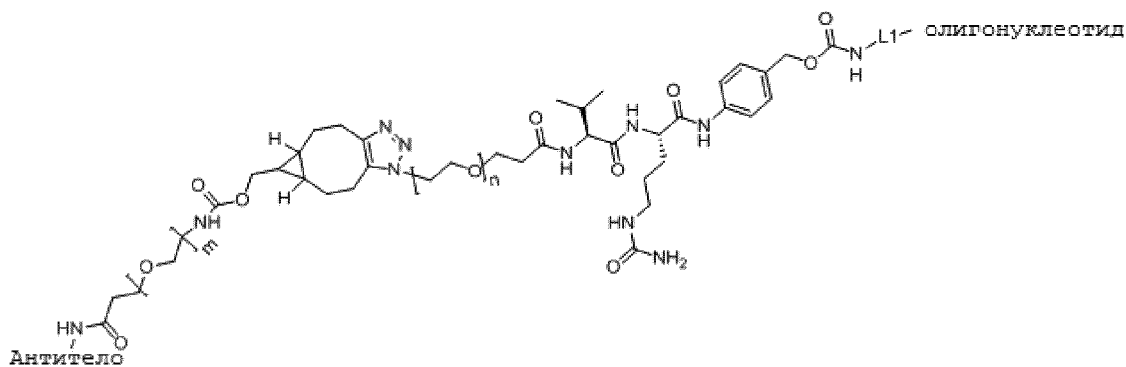
[000323] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

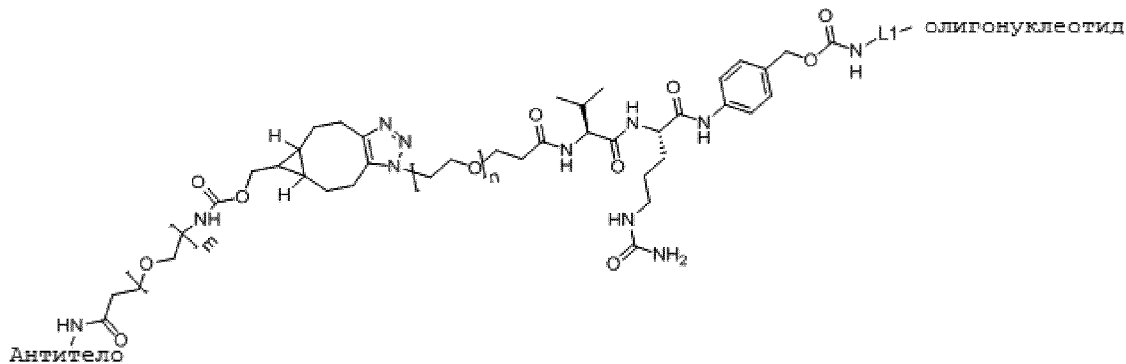
[000324] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

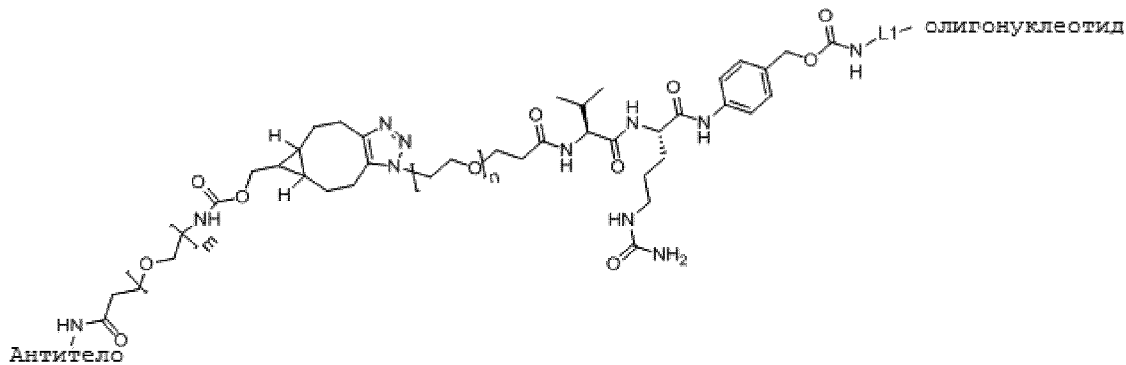
[000325] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D)

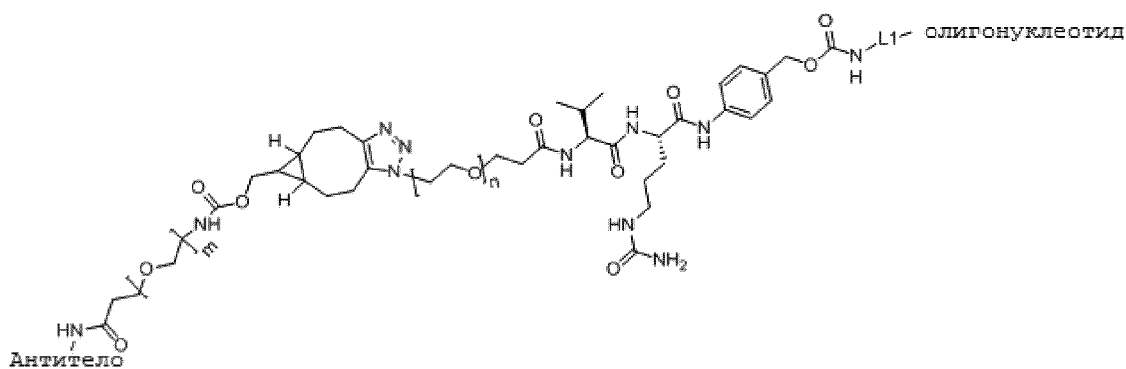
где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

[000326] 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)

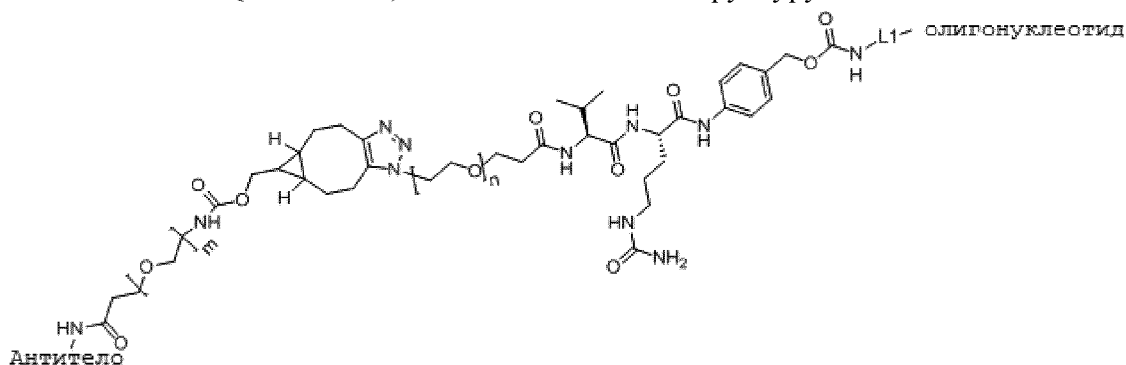




(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

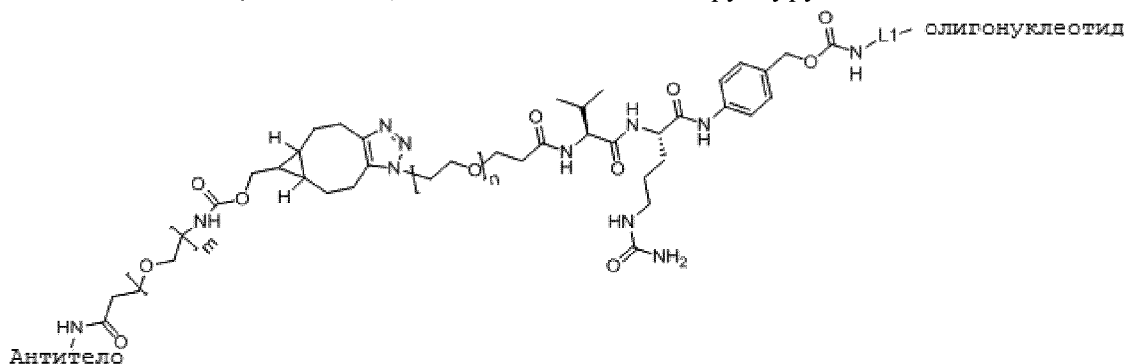
[000330] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

[000331] 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:

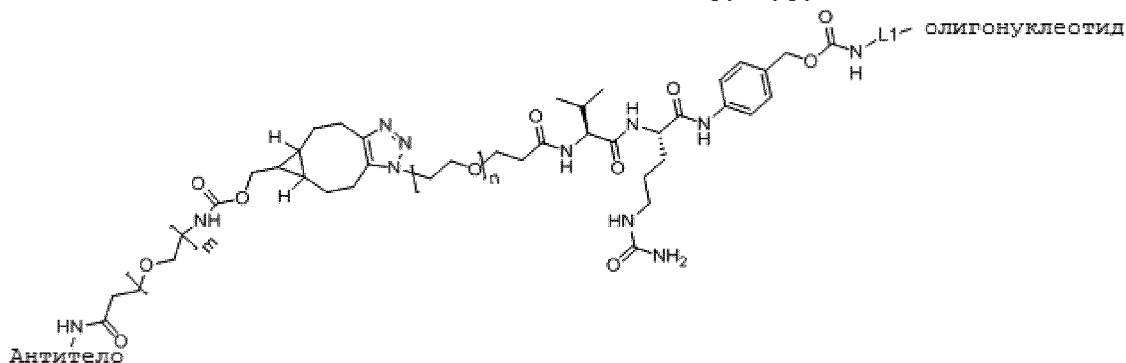


(D)



где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

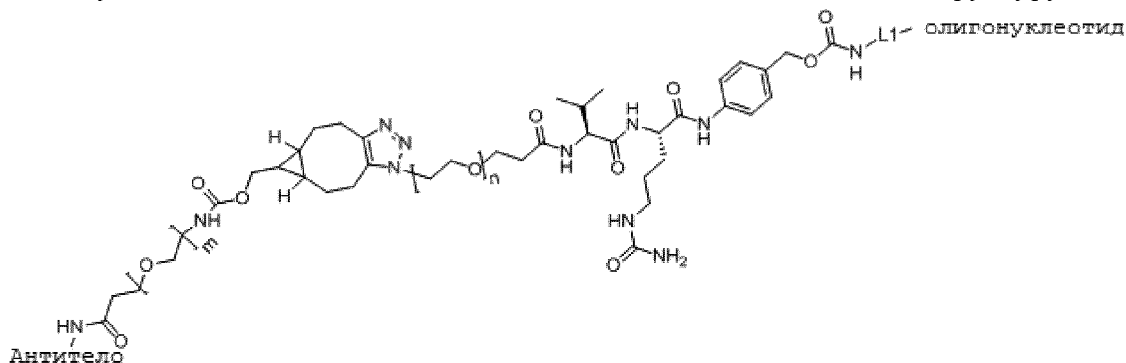
[000332] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

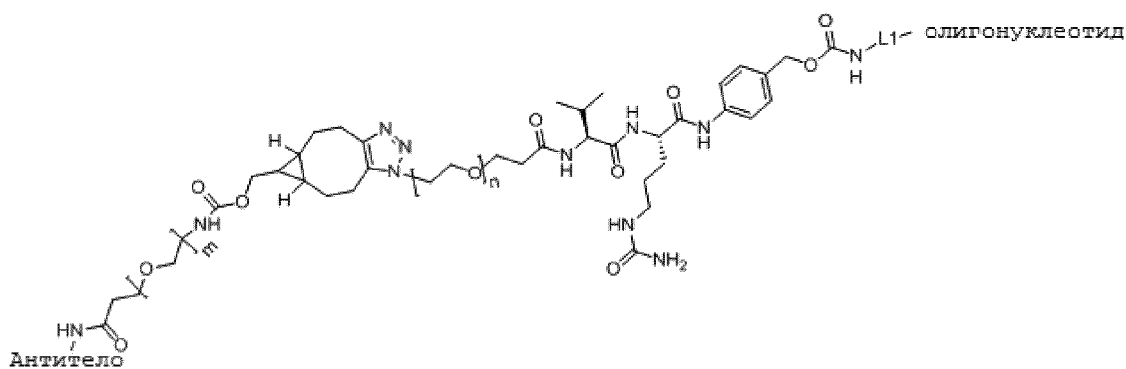
[000333] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

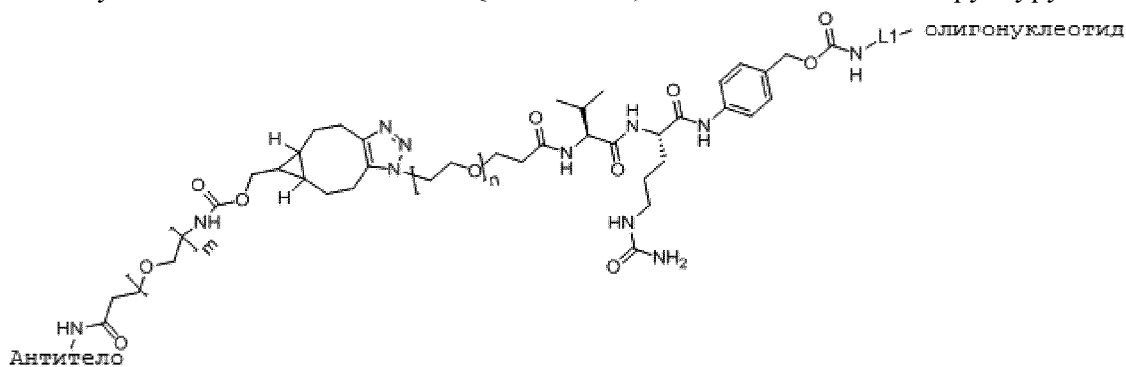
[000334] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

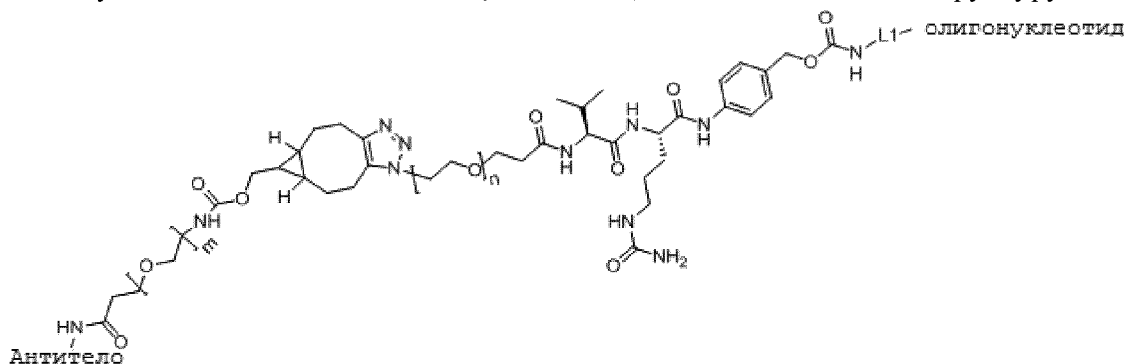
[000335] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

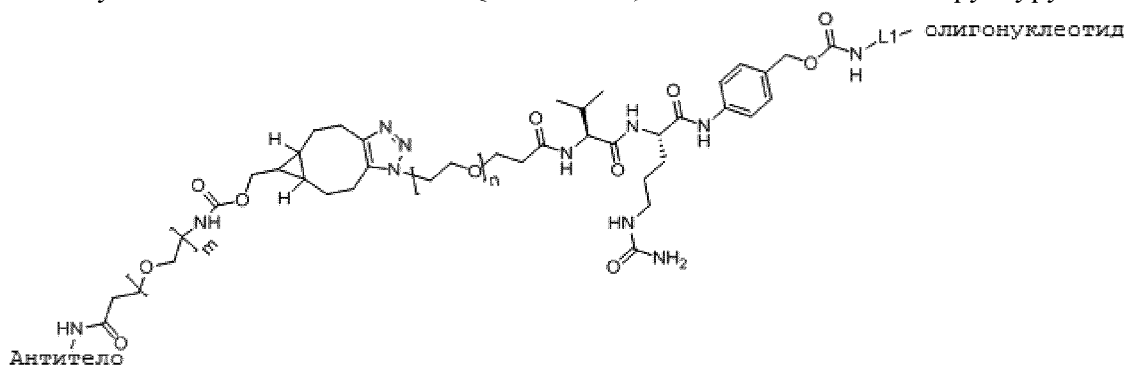
[000336] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

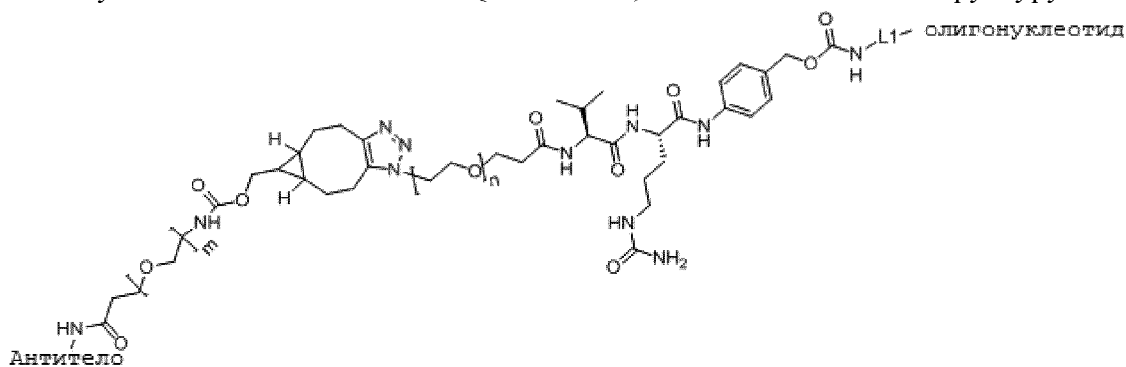
[000337] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

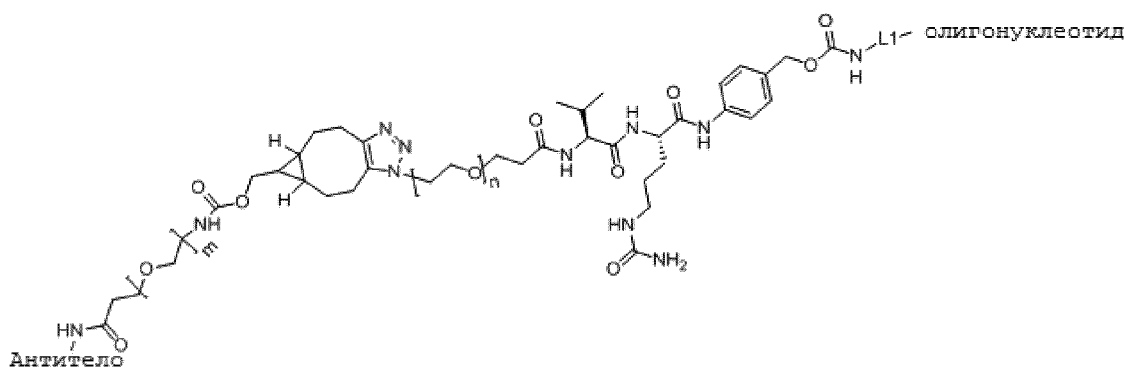
[000338] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

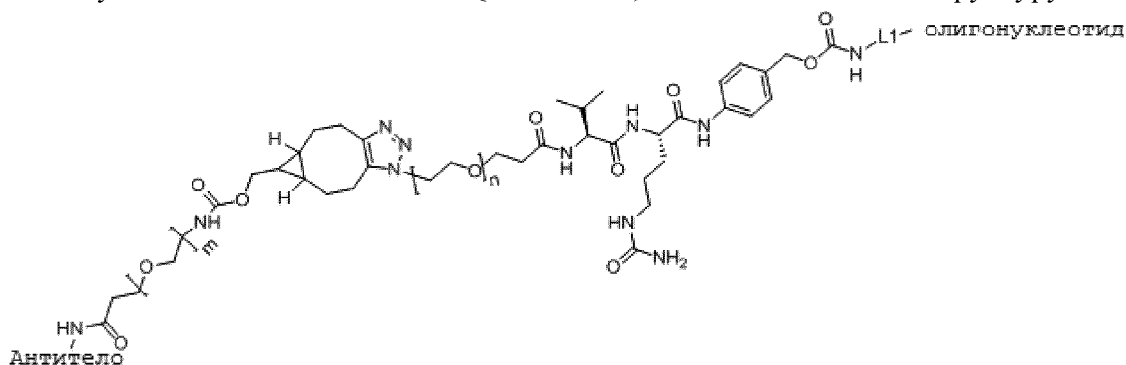
[000339] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

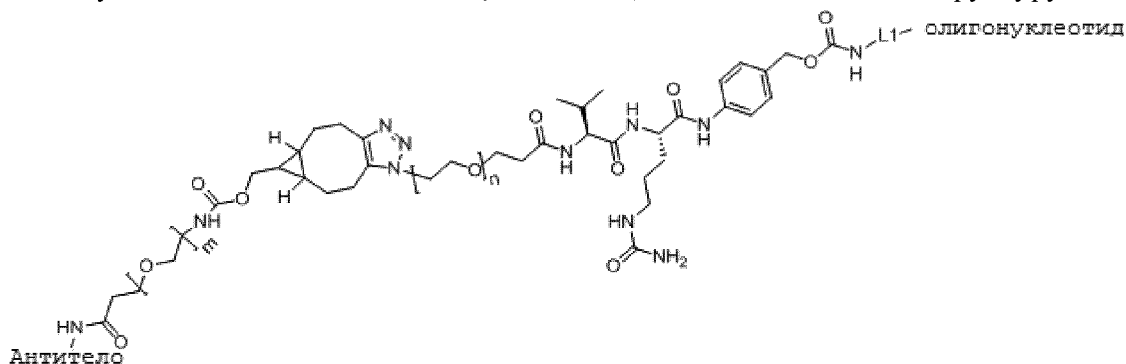
[000340] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

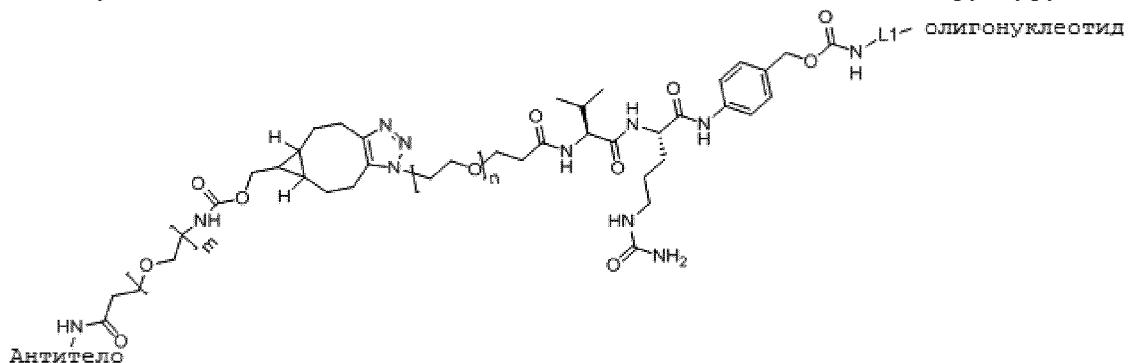
[000341] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D)

где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

[000342] 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:

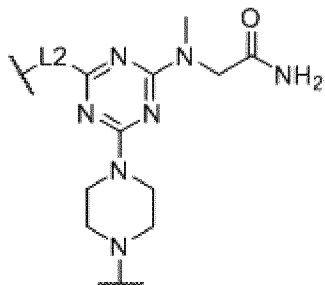


(D)

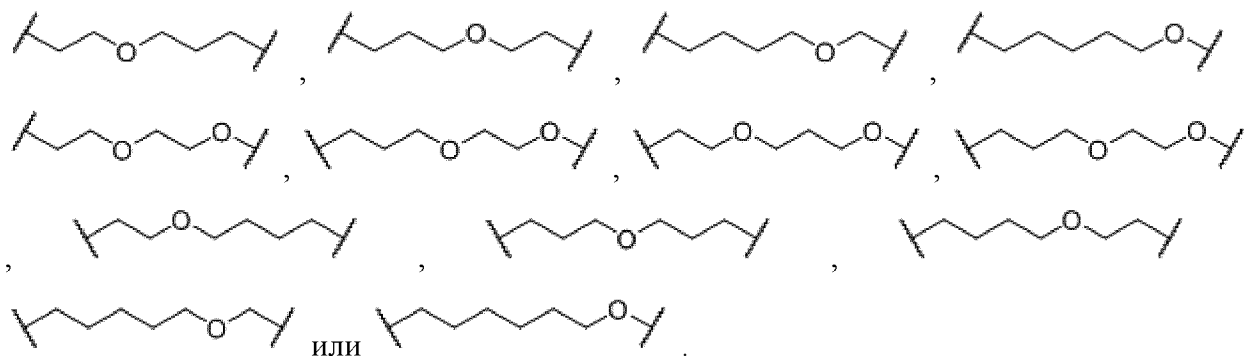
где  $n$  составляет 3, и  $m$  составляет 4.

[000343] В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, L1 является любым из спейсеров, представленных в настоящем описании.

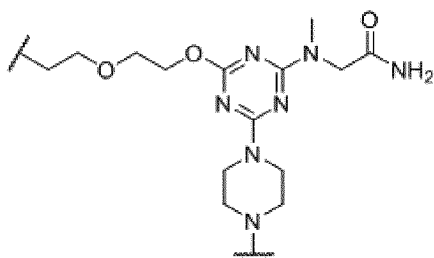
[000344] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом, где L2 является



[000345] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом.

[000346] В некоторых вариантах осуществления L1 является



[000347] В некоторых вариантах осуществления L1 связан с 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000348] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, может не присутствовать).

#### IV. Составы

[000349] Комплексы антител против TfR, представленные в настоящем описании, можно составлять любым подходящим образом. Как правило, антитела или комплексы, представленные в настоящем описании, составляют способ, подходящим для фармацевтического применения. Например, антитела или 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 антитела или 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 антитела или комплексы составляют в буферных растворах, таких как растворы фосфатно-солевого буфера, липосомах, мицеллярных структурах и капсидах.

[000350] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления композиции могут включать отдельно один или более компонентов комплексов, представленных в настоящем описании (например, антитела против TfR, линкеры, молекулярную нагрузку или молекулы-предшественники любых из них).

[000351] В некоторых вариантах осуществления антитела или комплексы составляют в воде или водном растворе (например, воде с корректировкой pH). В некоторых вариантах осуществления антитела или 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).

[000352] 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, фикоаллом или желатином).

[000353] 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.

[000354] 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.

[000355] 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.

## **V. Способы применения**

[000356] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к различному применению антител против TfR, фрагментов или вариантов антител, кодирующих их нуклеиновых кислот и комплексов, представленных в настоящем описании, включая исследования, диагностические способы, способы детекции и терапевтические способы. В

некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, используют для доставки молекулярной нагрузки (например, диагностического или терапевтического средства) в целевую клетку или ткань, экспрессирующую рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень является мышечной клеткой. В некоторых вариантах осуществления целевая ткань является мышечной. В некоторых вариантах осуществления целевая ткань является головным мозгом. Для доставки молекулярной нагрузки антитело против TfR можно конъюгировать (например, ковалентно конъюгировать) с молекулярной нагрузкой для получения комплекса.

#### **а. Диагностические способы и способы детекции**

[000357] Настоящее изобретение также относится к применению любого из описанных выше антител, антигенсвязывающих фрагментов, полинуклеотидов, векторов или клеток и, необязательно, подходящих средств в диагностических способах и/или (например, и) способах детекции. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, например, подходят для использования в иммунологических анализах, в которых их можно использовать в жидкой фазе или связанными с твердофазным носителем. Примерами иммунологических анализов, в которых можно использовать антитело или антигенсвязывающие фрагменты, являются конкурентные и неконкурентные иммунологические анализы в прямом или непрямом формате. Примерами таких иммунологических анализов являются твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), анализ сэндвич-типа (иммунометрический анализ), проточная цитометрия, вестерн-блоттинг, иммунопреципитация, иммуногистохимия, иммуномикроскопия, иммунохроматографические анализы и протеомные чипы. Антигены и антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно связывать со множеством разных твердых подложек (например, носителей, мембран, колонок, протеомных чипов и т.д.). Примеры хорошо известных материалов твердых подложек включают стекло, полистирол, поливинилхлорид, поливинилидендифторид, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, декстран, нейлон, амилозы, природные и модифицированные целлюлозы, такие как нитроцеллюлоза, полиакриламиды, агарозы и магнетит. Материал подложки может являться фиксированным или суспендированным в растворе (например, бусы).

[000358] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TfR, представленных в настоящем описании, можно использовать для детекции наличия рецептора трансферрина в биологическом образце. В рамках изобретения термин "детекция" включает количественную или качественную детекцию. В некоторых вариантах осуществления биологический образец содержит клетку или ткань, такую как кровь, CSF и ВВВ-содержащую ткань. Биологический образец может находиться *in vitro* (например, в культуре) или *in vivo* (например, в организме индивидуума). Настоящее изобретение также относится к применению любого из антител против TfR, представленных в настоящем описании, в исследованиях (например, в качестве реагента для иммунологических анализов, таких как вестерн-блоттинг, иммуноокрашивание, ELISA и/или (например, и) FACS).



[000359] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против TfR для применения в способе диагностики или детекции. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу детекции наличия рецептора трансферрина в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом против TfR, как представлено в настоящем описании, в условиях, допускающих связывание антитела против TfR с рецептором трансферрина, и детекцию образования комплекса между антителом против TfR и рецептором трансферрина. Такой способ может являться способом *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR используют для выбора индивидуумов, подходящих для терапии антителом против TfR, например, если рецептор трансферрина является биомаркером для выбора пациентов.

[000360] Примеры нарушений, которые можно диагностировать с использованием антитела против TfR, представленного в настоящем описании, включают нарушения, включающие незрелые эритроциты, из-за того, что рецептор трансферрина экспрессируется на ретикулоцитах, и, таким образом, его можно определять с помощью любых из антител по изобретению. Такие нарушения включают анемию и другие нарушения, возникающие из-за сниженных уровней ретикулоцитов, или конгенитальную полицитемию или неопластическую истинную полицитемию, где повышенные количества эритроцитов по причине гиперпролиферации, например, ретикулоцитов приводит к загущению крови и сопутствующим физиологическим симптомам.

[000361] В некоторых вариантах осуществления для детекции наличия/уровня рецептора трансферрина в биологическом образце используют меченые антитела против TfR. В качестве неограничивающих примеров, метки включают метки или вещества, определяемые напрямую (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотностные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также вещества, такие как ферменты или лиганды, определяемые косвенно, например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. Неограничивающие примеры метки включают радиоактивные изотопы  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  и  $^{131}\text{I}$ , флуорофоры, такие как редкоземельные хелаты или флуоресцеин и его производные, родамин и его производные, данзил, умбеллиферон, люциферазы, например, люциферазы светлячка и бактериальной люциферазы (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигидрофалазиндионы, пероксидазу хрена (HRP), щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы, например, глюкозо-оксидазу, галактозо-оксидазу, и глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназу, гетероциклические оксидазы, такие как уриказа и ксантинооксидаза, сопряженные с ферментом, использующим пероксид водорода для окисления предшественника красителя, таким как HRP, лактопероксидаза или микропероксидаза, биотин/авидин, спиновые метки, метки-бактериофаги, стабильные свободные радикалы и т.п. В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка является средством, подходящим для детекции рецептора трансферрина в клетке *in vitro*, которое может являться радиоактивной молекулой, радиофармацевтическим средством или частицей

оксида железа. Радиоактивные молекулы, подходящие для визуализации *in vivo* включают, в качестве неограничивающих примеров,  $^{122}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  и  $^{67}\text{Ga}$ . Примеры радиофармацевтических средств, подходящих для визуализации *in vivo*, включают  $^{111}\text{In}$ -оксихинолин,  $^{131}\text{I}$ -йодид натрия,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -меброфенин и  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -эритроциты,  $^{123}\text{I}$ -йодид натрия,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -эксаметазим,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -макроагрегат альбумина,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -медронат,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -мертиатид,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -оксидронат,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -пентетат,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -пертехнетат,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -сестамиби,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -коллоидная сера,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -тетрофосмин, таллий-201 или ксенон-133.

[000362] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, можно использовать для доставки детектируемой метки в целевую клетку или ткань (например, мышечную клетку или через гематоэнцефалитический барьер в головной мозг) для визуализации клетки или ткани (например, посредством флуоресцентной микроскопии или магнитно-резонансной томографии (MRI)). С этой целью можно использовать любые из детектируемых меток, представленных в настоящем описании.

[000363] В некоторых вариантах осуществления у антитела против TfR, используемого в диагностическом способе или способе детекции, отсутствует эффекторная функция, или оно имеет сниженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, используемое в диагностическом способе/способе детекции, конструируют так, чтобы оно не имело эффекторную функцию или имело сниженную эффекторную функцию (например, используя Fab, модифицируя остов Ig, встраивая одну или более мутаций в Fc, снижающих или устраняющих эффекторную функцию, и/или (например, и) модифицируя гликозилирование антитела).

[000364] Доступны различные способы определения связывания антитела с рецептором трансферрина. Одним из таких анализов является твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) для подтверждения способности связывания с рецептором трансферрина человека (и антигеном головного мозга). В этом анализе планшеты, покрытые антигеном (например, рекомбинантным рецептором трансферрина), инкубируют с образцом, содержащим антитело против TfR, и определяют связывание антитела с интересующим антигеном.

[000365] Для проведения диагностического анализа *in vivo* подходящее количество антител против TfR, конъюгированных с меткой (например, средством для визуализации или контрастным средством), можно вводить индивидууму, нуждающемуся в обследовании. Наличие меченого антитела можно определять с учетом сигнала, высвобождаемого меткой, общепринятыми способами. Специалистам в этой области известны анализы для оценки захвата системно вводимого антитела и другой биологической активности антитела.

[000366] При проведении научных исследовательских анализов антитело против TfR можно использовать для исследования биологической активности рецептора трансферрина и/или (например, и) детекции внутриклеточного наличия рецептора трансферрина.

Например, подходящее количество антитела против TfR можно приводить в контакт с образцом (например, новым типом клеток, ранее не идентифицированным как продуцирующие рецептор трансферрина клетки), как предполагают, продуцирующим рецептор трансферрина. Антитело и образец можно инкубировать в подходящих условиях в течение подходящего периода времени для связывания антитела с антигеном-рецептором трансферрина. Затем такое взаимодействие можно определять общепринятыми способами, например, посредством ELISA, гистологического окрашивания или FACS.

#### **в. Способы лечения**

[000367] Антитела против TfR, представленные в настоящем описании, можно использовать для доставки молекулярной нагрузки, являющейся терапевтическими средствами (например, олигонуклеотидами, пептидами/белками, конструкциями нуклеиновой кислоты и т.д.). В некоторых аспектах настоящее изобретение также относится к комплексам, содержащим антитела против TfR, ковалентно связанные с молекулярной нагрузкой, для применения в лечении заболеваний.

[000368] В некоторых аспектах комплексы, содержащие антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, как представлено в настоящем описании, являются эффективными в лечении мышечного заболевания (например, редкого мышечного заболевания или мышечной атрофии). В некоторых вариантах осуществления комплексы являются эффективными в лечении редкого мышечного заболевания, приведенного в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления мышечное заболевание ассоциировано с аллелем заболевания, например, аллелем заболевания для конкретного мышечного заболевания, который может содержать генетическое изменение в соответствующем гене, приведенном в таблице 6.

[000369] В некоторых вариантах осуществления комплексы являются эффективными в лечении мышечной атрофии, ассоциированной с активностью одного или более генов, приведенных в таблице 6 в разделе "Гены-мишени мышечной атрофии". В некоторых вариантах осуществления мышечная атрофия возникает по причине хронического заболевания, включая СПИД, застойную сердечную недостаточность, злокачественное новообразование, хроническую обструктивную болезнь легких и почечную недостаточность, или мышечного заболевания.

[000370] В других аспектах комплексы, содержащие антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, как представлено в настоящем описании, являются эффективными в лечении неврологического заболевания. В некоторых вариантах осуществления неврологические заболевания включают, в качестве неограничивающих примеров, нейропатию, амилоидоз, злокачественное новообразование, ап заболевание или нарушение глаз, вирусную или микробную инфекцию, воспаление, ишемию, нейродегенеративное заболевание, судороги, поведенческие нарушения и лизосомальную болезнь накопления. В целях по изобретению, термин "ЦНС" будет включать глаз, в норме секвестрированный от остального организма гематоретинальным барьером. Конкретные неограничивающие примеры неврологических нарушений включают

нейродегенеративные заболевания (включая, в качестве неограничивающих примеров, болезнь телец Леви, постполиомиелитный синдром, синдром Шая-Дрейджера, оливопонтocerebellарную атрофию, болезнь Паркинсона, множественную системную атрофию, стриатонигральную дегенерацию, таупатии (включая, в качестве неограничивающих примеров, болезнь Альцгеймера и надъядерный паралич), прионные болезни (включая, в качестве неограничивающих примеров, губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота, почесуху, болезнь Крейтцфельда-Якоба, куру, синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, хроническую изнуряющую болезнь и фатальную семейную бессонницу), бульбарный паралич, болезнь двигательных нейронов и гетеродегенеративные нарушения нервной системы (включая, в качестве неограничивающих примеров, болезнь Канавана, болезнь Гентингтона, нейрональный цероидный липофусциноз, болезнь Александра, синдром Туретта, болезнь Менкеса, синдром Коккейна, болезнь Галлервордена-Шпатца, болезнь Лафора, синдром Ретта, гепатолентикулярную дегенерацию, синдром Леша-Нихана и синдром Унферрихта Лундборга), деменцию (включая в качестве неограничивающих примеров, болезнь Пика и спиноцереbellарную атаксию), злокачественное новообразование (например, злокачественное новообразование ЦНС, включая метастазы в головном мозге, являющиеся результатом злокачественного новообразования где-либо в организме). В некоторых вариантах осуществления в случае лечения неврологического заболевания комплекс содержит антитело против TfR, представленное в настоящем описании, конъюгированное с лекарственным средством для лечения неврологического заболевания (например, лекарственные средства, приведенные в таблице 7).

[000371] В некоторых вариантах осуществления индивидуум может являться человеком, не являющимся человеком приматом, грызуном или любым подходящим млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь мышечное заболевание, приведенное в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь мышечную атрофию или риск ее развития.

[000372] 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 антитело против TfR, 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.

[000373] Композиции для внутривенного введения могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилактамид, диметилформамид, этиллактат, этилкарбонат, изопропилмирилат, 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.

[000374] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий антитело против TfR, 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.

[000375] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий антитело против TfR, 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.

[000376] 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.

[000377] 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.

[000378] Эффективность лечения можно оценивать любыми подходящими способами. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать посредством оценки наблюдения симптомов, ассоциированных с мышечным заболеванием и/или (например, и) мышечной атрофией.

[000379] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий антитело против TfR, 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.

[000380] В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий антитело против TfR, 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 антитело против TfR, 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 антитело против TfR, 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.

[000381] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать более одного комплекса, содержащего антитело против TfR, 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 мышечное заболевание (например, мышечное заболевание, приведенное в таблице 6). 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.

### **с. Наборы для терапевтического и диагностического использования**

[000382] Настоящее изобретение также относится к наборам для терапевтического и диагностического использования, как представлено в настоящем описании. Такие наборы могут включать один или более контейнеров, содержащих антитело против TfR, например, любое из антител, представленных в настоящем описании.

[000383] В некоторых вариантах осуществления набор может содержать инструкции по использованию любых из способов, представленных в настоящем описании. Включенные инструкции могут содержать описание введения антитела против TfR для лечения, задержки дебюта или облегчения целевого заболевания, как представлено в настоящем описании. Набор может дополнительно содержать описание выбора индивидуума, подходящего для лечения с учетом определения того, что этот индивидуум имеет целевое заболевание. В других вариантах осуществления инструкции содержат описание введения антитела индивидуумам, имеющим риск целевого заболевания.

[000384] Инструкции, касающиеся использования антитела против TfR, как правило, включают информацию о дозе, режиме введения и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут включать однократные дозы, нерасфасованные упаковки (например, упаковки со множеством доз) или субоднократные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах по изобретению, как правило, являются письменными инструкциями на ярлыке или вкладыше в упаковку (например, бумажном листе, включенном в набор), но также возможны машиночитаемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом диске).

[000385] На ярлыке или вкладыше в упаковку указывают, что композицию используют для лечения, задержки дебюта и/или (например, и) облегчения заболевания или нарушения, которое можно лечить посредством модуляции иммунных ответов, таких как аутоиммунные заболевания. Инструкции можно предоставлять для практического осуществления любых из способов, представленных в настоящем описании.

[000386] Наборы по настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, в качестве неограничивающих примеров, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, запаиваемые майларовые или пластиковые пакеты) и т.п.

[000387] Также предусмотрена упаковка для использования в комбинации с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения

(например, атомайзер) или инфузионное устройство, такое как мининасос. Набор может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может являться мешком для внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций). Контейнер также может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может являться мешком для внутривенного раствора или флаконом, имеющим пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере одно активное средство в композиции является антителом против TfR, представленным в настоящем описании.

[000388] Наборы, необязательно, могут включать дополнительные компоненты, такие как буферы и информация для интерпретации. Как правило, набор содержит контейнер и ярлык или вкладыши в упаковку на контейнере или связанные с контейнером. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к промышленным изделиям, содержащим содержимое описанных выше наборов.

[000389] Настоящее изобретение также относится к наборам для использования в детекции рецептора трансферрина в образце. Такой набор может содержать любые из антител против TfR, представленных в настоящем описании. В некоторых случаях, антитело против TfR можно конъюгировать с детектируемой меткой, представленной в настоящем описании. В рамках изобретения, термин "конъюгированный" или "соединенный" означает, что два вещества связаны, предпочтительно, с достаточной аффинностью, таким образом, что получают терапевтическую/диагностическую пользу от связывания между двумя веществами. Связывание двух веществ может являться прямым или через линкер, такой как полимерный линкер. Термины "конъюгированный" или "соединенный" могут включать ковалентное или нековалентное связывание, а также другие формы связывания, такие как заключение, например, одного вещества на другом веществе или в нем или любого или обоих веществ на третьем веществе или в нем, таком как мицелла.

[000390] Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), набор может содержать вторичное антитело, способное связываться с антителом против TfR. Набор может дополнительно содержать инструкции по использованию антитела против TfR для детекции рецептора трансферрина.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1: Гуманизированные антитела против TfR1**

[000391] 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 переменных областей тяжелой и легкой цепи антитела против TfR1 (5 вариантов каждой) конструировали технологии составного антитела человека. Синтезировали гены, кодирующие Fab, имеющие эти переменные 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 Viacore о аффинности антитела к антигену-мишени, относительную экспрессию, процент гомологии последовательности зародышевой линии человека и количество прогнозируемых Т-клеточных эпитопов МНС классов II (определяемых с помощью анализа *in silico* iTope™ MСН класса II).

[000392] Идентифицировали потенциальные проблемы в родительской последовательности некоторых антител, встраивая замены аминокислот в переменные 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 Viacore. 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 8 и таблице 9. Выбранные Fab анализировали на их свойства связывания TfR1 посредством анализа кинетики. Результаты этих анализов приведены в таблице 10. В случае конъюгатов, приведенных в таблице 8 и таблице 9, 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 10).

Таблица 8. Данные биофизической оценки гуманизированных Fab против TfR

<b>Вариант</b> <b>Критерий</b>	<b>3M12</b> <b>(VH3/Vk2)</b>	<b>3M12</b> <b>(VH3/Vk3)</b>	<b>3M12</b> <b>(VH4/Vk2)</b>	<b>3M12</b> <b>(VH4/Vk3)</b>	<b>3A4 (VH3- N54T/Vk4)</b>
<b>Аффинность</b> <b>связывания</b> <b>(Viacore, день 0)</b>	395 пМ	345 пМ	396 пМ	341 пМ	3,09 нМ
<b>Аффинность</b> <b>связывания</b> <b>(Viacore, день 25)</b>	567 пМ	515 пМ	510 пМ	486 пМ	3,01 нМ
<b>Аффинность</b> <b>связывания Fab по</b> <b>результатам ELISA</b> <b>(TfR1</b> <b>человека/яванского</b> <b>макака)</b>	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*

<b>Аффинность связывания конъюгата по результатам ELISA (TfR1 человека/яванского макака)</b>	2,2 нМ/2,9 нМ	N/A	N/A	1,7 нМ/2,1 нМ	2,8 нМ/4,7 нМ
<b>Вариант Критерий</b>	<b>3A4 (VH3-N54S/Vk4)</b>	<b>3A4 (VH3/Vk4)</b>	<b>5H12 (VH5-C33Y/Vk3)</b>	<b>5H12 (VH5-C33D/Vk4)</b>	<b>5H12 (VH4-C33Y/Vk4)</b>
<b>Аффинность связывания (Biacore, день 0)</b>	1,34 нМ	1,5 нМ	627 пМ	991 пМ	626 пМ
<b>Аффинность связывания (Biacore, день 25)</b>	1,39 нМ	1,35 нМ	1,07 нМ	3,01 нМ	1,33 нМ
<b>Аффинность связывания Fab по результатам ELISA (TfR1 человека/яванского макака)</b>	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
<b>Аффинность связывания конъюгата по результатам ELISA (TfR1 человека/яванского макака)</b>	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 9. Термическая стабильность гуманизированных Fab против TfR и конъюгатов

<b>Вариант Критерий</b>	<b>3M12 (VH3/Vk2)</b>	<b>3M12 (VH3/Vk3)</b>	<b>3M12 (VH4/Vk2)</b>	<b>3M12 (VH4/Vk3)</b>	<b>3A4 (VH3-N54T/Vk4)</b>
-------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	---------------------------

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

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

Таблица 10. Анализ кинетики связывания гуманизированных Fab против TfR с TfR1

<b>Гуманизированные Fab против TfR</b>	<b><math>k_a</math> (1/Мс)</b>	<b><math>k_d</math> (1/с)</b>	<b><math>K_D</math> (М)</b>	<b><math>R_{MAX}</math></b>	<b><math>Chi^2</math> (RU<sup>2</sup>)</b>
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)*

[000393] 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 планшет для ELISA также включали положительный контроль и изотипический контроль. Планшет инкубировали при комнатной температуре на орбитальном шейкере в течение 60 минут при 300 об./мин. и промывали планшет 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 планшету позволяли инкубироваться при комнатной температуре в течение 60 минут при 300 об./мин. на орбитальном шейкере. Жидкость удаляли и планшет промывали четыре раза 300 мкл TBST. Затем измеряли поглощение при длине волне возбуждения 495 нм и испускания 50 нм (с шириной полосы 15 нм) с помощью спектрофотометра для чтения планшетов. Данные регистрировали и анализировали на EC<sub>50</sub>. Данные о связывании с TfR1 человека (hTfR1) для гуманизированных Fab 3M12, 3A4 и 5H12 приведены на фиг. 1A, 1C и 1E, соответственно. Измерения ELISA осуществляли с использованием TfR1 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (сTfR1) тем же способом, описанным выше для hTfR1, и результаты приведены на фиг. 1B, 1D и 1F.

[000394] 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.

[000395] 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.

[000396] Несколько гуманизированных Fab тестировали в экспериментах по клеточному захвату для оценки TfR1-опосредованной интернализации. Для измерения такого клеточного захвата, опосредованного антителами, конъюгаты гуманизированных 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. 2, гуманизированные 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 гуманизированных Fab против TfR является результатом интернализации Fab-конъюгатов.

[000397] Конъюгаты шести гуманизированных Fab против TfR также тестировали на связывание с hTfR1 и cTfR1 посредством ELISA и сравнивали с неконъюгированными формами гуманизированных Fab. Результаты свидетельствуют о том, что гуманизированные Fab 3M12 и 5H12 поддерживали схожие уровни связывания hTfR1 и cTfR1 после конъюгации относительно их неконъюгированных форм (3M12, фиг. 3A и 3B; 5H12, фиг. 3E и 3F). Примечательно, что клоны 3A4 демонстрируют улучшенное связывание с cTfR1 после конъюгации относительно их неконъюгированных форм (фиг. 3C и 3D).

[000398] Как используют в этом примере, термин "неконъюгированный" означает, что антитело не конъюгировали с олигонуклеотидом.

**Пример 2. Нокдаун уровня мРНК DMPK, облегчаемый конъюгатами антитело-олигонуклеотид *in vitro***

[000399] Конъюгаты, содержащие гуманизированные 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).

[000400] 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.

[000401] Результаты на фиг. 4 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 интернализированный DMPK-нацеленный олигонуклеотид является эффективным в нокадауне уровня мРНК DMPK.

### **Пример 3. Стабильность линкера, связывающего антитело против TfR и молекулярную нагрузку, в сыворотке**

[000402] 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.

[000403] На фиг. 5 показана стабильность линкера в сыворотке *in vivo*, сравнимая 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 4. Активность пропуска экзона конъюгатов против TfR в мышечных трубочках пациентов с DMD**

[000404] В этом исследовании оценивали активность пропуска экзона конъюгатов против TfR, содержащих Fab против TfR (3M12 VH3/VK2, 3M12 VH4/VK3, и 3A4 VH3 N54S/VK4), конъюгированный с вызывающим пропуск экзона 51 DMD олигонуклеотидом. Иммуортализованные миобласты человека, несущие делецию экзона 52, размораживали, высевали при плотности 1е6 клеток/флакон в средах для выращивания клеток скелетных мышц Promocell (с 5% FBS и 1-кратным Pen-Strep) и позволяли им расти до достижения конфлюэнтности. После достижения конфлюэнтности клетки трипсинизировали, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в свежих средах для выращивания клеток

скелетных мышц Promocell. Подсчитывали количество клеток и клетки высевали в покрытые матригелем 96-луночные планшеты при плотности 50 тыс. клеток/луночку. Клеткам позволяли восстанавливаться в течение 24 часов. Клетки индуцировали для дифференцировки посредством аспирации сред для выращивания и замены средами для дифференцировки без сыворотки. Затем клетки обрабатывали конъюгированным или неконъюгированным олигонуклеотидом для пропуска экзонов DMD в количестве 10 мкМ. Клетки инкубировали с тестируемыми образцами в течение десяти дней, затем из 96-луночных планшетов собирали тотальную РНК. Синтез кДНК осуществляли на 75 нг тотальной РНК и осуществляли мутационно-специфические PCR для оценки степени пропуска экзона 51 в каждом типе клеток. Продукты мутационно-специфической ПЦР анализировали на 4% агарозном геле и визуализировали с использованием SYBR gold. Денситометрию использовали для вычисления относительных количеств ампликона с пропуском и ампликона без пропуска и пропуск экзонов определяли как количество ампликона с пропуском экзона 51, разделенное на общее количество присутствующих ампликонов:

$$\% \text{ пропуска экзонов} = \frac{\text{Ампликон с пропуском}}{(\text{Ампликон с пропуском} + \text{Ампликон без пропуска})} * 100$$

[000405] Данные свидетельствуют о том, что конъюгаты с Fab 3M12 VH3/Vk2 или 3M12 VH4/Vk3, конъюгированным с вызывающим пропуск экзона 51 DMD олигонуклеотидом, приводили к повышенному пропуску экзонов по сравнению с неконъюгированным вызывающим пропуск экзона DMD олигонуклеотидом в мышечных трубочках пациентов (фиг. 6).

[000406] Как используют в этом примере, термин "неконъюгированный" означает, что олигонуклеотид не конъюгировали с антителом.

#### **Пример 5. Активность *in vivo* конъюгатов против TfR у мышей с hTfR1**

[000407] При DM1 более высокой, чем в норме, количество повторов CUG образуют крупные петли-шпильки, остающиеся заключенными в ядро, образующие ядерные фокусы, связывающие белки сплайсинга и ингибирующие их способность выполнять свою нормальную функцию. Если токсические ядерные уровни DMPK снижаются, ядерные фокусы уменьшаются, высвобождая белки сплайсинга, что делает возможным восстановление нормального процессинга мРНК и потенциально останавливая или реверсируя прогрессирование заболевания.

[000408] Оценивали активность *in vivo* конъюгатов, содержащих Fab против TfR (контроль, 3M12 VH3/VK2, 3M12 VH4/VK3, 3A4 VH3 N54S/VK4), конъюгированный с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом ASO300, в снижении уровня мРНК DMPK в многочисленных мышечных тканях после системного внутривенного введения мышам.

[000409] Самцов и самок мышей C57BL/6, у которых один аллель TfR1 заменен аллелем TFR1 человека, в возрасте между 5 и 15 неделям подвергали введению по схеме, приведенной в таблице 11 и на фиг. 7A. Мышей умерщвляли через 14 дней после первой инъекции и собирали выбранные мышцы, как указано в таблице 12.



Группа	Количество животных	Обработка антителом	Обработка олигонуклеотидом	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Схема введения	Конечный момент времени
1	4	Носитель	NA	0	10	День 0 и день 7 посредством IV	День 14
2	4	NA	ASO300	10	5,0		
3	4	Контрольный Fab против TfR	ASO300		10,2		
4	4	3M12 VH3/VK2	ASO300		11,5		
5	4	3M12 VH4/VK3	ASO300		10,1		
6	4	3A4 VH3 N54S/VK4	ASO300		10,7		

Ткань	Хранение
Икроножная мышца	Правая задняя конечность каждого животного, хранящаяся в RNALater при -80°C
Передняя большеберцовая мышца	Одна задняя конечность (R) каждого животного, хранящаяся в RNALater при -80°C
Сердце	Рассекали поперечно и хранили верхушку в RNALater при -80°C
Диафрагма	Разделяли пополам и половину собирали в RNALater при -80°C

[000410] Тотальную РНК выделяли с помощью устройства Maxwell Rapid Sample Concentrator (RSC) с использованием наборов, предоставленных производителем (Promega). Очищенную РНК подвергали обратной транскрипции и определяли уровни транскриптов *Dmpk* и *Ppib* посредством qRT-ПЦР с использованием специфических анализов TaqMan (ThermoFisher). Логарифм кратных изменений экспрессии *Dmpk* вычисляли способом  $2^{-\Delta\Delta CT}$  с использованием *Ppib* в качестве референсного гена и мышам

инъекцировали носитель в качестве контроля. Статистическую значимость различий экспрессии Dmpk между контрольными мышами и мышами, которым вводили конъюгаты, определяли с помощью одностороннего ANOVA с поправкой Даннета на множественные сравнения. Как показано на фиг. 7B-7E, тестируемые конъюгаты демонстрировали устойчивую активность в снижении уровня мРНК DMPK *in vivo* в различных мышечных тканях.

#### **Пример 6. Эпитопное картирование**

[000411] Для определения эпитопа комплекса hTfR1/Fab против TfR (3M12 VN4/Vk3) с высоким разрешением белковый комплекс инкубировали с дейтерированными кросслинкерами и подвергали многоферментному расщеплению. После обогащения перекрестно сшитых пептидов образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (nLC-LTQ-Orbitrap MS) и полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения XQuest и Stavroх.

[000412] 20 мкл полученной смеси hTfR1 (внеклеточного домена TfR1 человека, приведенного в SEQ ID NO: 35, аминокислоты C89-F760)/антитела против TfR смешивали с 2 мкл DSS в день 0/день 12 (2 мг/мл; DMF) перед 180 минутами инкубации при комнатной температуре. После инкубации реакцию останавливали добавлением 1 мкл бикарбоната аммония (конечная концентрация 20 мМ) перед 1 часом инкубации при комнатной температуре. Затем раствор сушили с использованием SpeedVac перед суспендированием в H<sub>2</sub>O 8 М мочевины (20 мкл). После смешивания в раствор добавляли 2 мкл DTT (500 мМ). Затем смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°C. После инкубации добавляли 2 мкл йодацетамида (1 М) перед 1 часом инкубации при комнатной температуре в темном помещении. После инкубации добавляли 80 мкл протеолитического буфера. трипсиновый буфер содержит 50 мМ AmBic, pH 8,5, 5% ацетонитрила; химотрипсиновый буфер содержит Трис HCl 100 мМ, CaCl<sub>2</sub> 10 мМ, pH 7,8; буфер ASP-N содержит фосфатный буфер 50 мМ, pH 7,8; эластазный буфер содержит Трис HCl 50 мМ, pH 8,0, и термолизиновый буфер содержит Трис HCl 50 мМ, CaCl<sub>2</sub> 0,5 мМ, pH 9,0.

[000413] 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного hTfR1/Fab против TfR смешивали с 4 мкл трипсина (Promega) в соотношении 1/100. Протеолитическую смесь инкубировали в течение ночи при 37°C.

[000414] 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного hTfR1/Fab против TfR смешивали с 2 мкл химотрипсина (Promega) в соотношении 1/200. Протеолитическую смесь инкубировали в течение ночи при 25°C.

[000415] 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного hTfR1/Fab против TfR смешивали с 2 мкл ASP-N (Promega) в соотношении 1/200. Протеолитическую смесь инкубировали в течение ночи при 37°C.

[000416] 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного hTfR1/Fab против TfR смешивали с 4 мкл эластазы (Promega) в соотношении 1/100. Протеолитическую смесь инкубировали в течение ночи при 37°C.

[000417] 100 мкл смеси восстановленного/алкилированного hTfR1/Fab против TfR смешивали с 8 мкл термолизина (Promega) в соотношении 1/50. Протеолитическую смесь инкубировали в течение ночи при 70°C. После расщепления в раствор добавляли 1% муравьиную кислоту.

[000418] Образцы анализировали с использованием хроматографии nLC в комбинации с масс-спектрометрией на LTQ-Orbitrap. Перекрестно сшитые пептиды анализировали с использованием программного обеспечения Xquest версии 2.0 и Stavroх 3.6. С помощью анализа MS/MS на nLC-Orbitrap определяли 15 перекрестно сшитых пептидов между hTfR1 и Fab против TfR. Анализ показал, что взаимодействие включает следующие аминокислоты на hTfR1: K261, S273, Y282, T362, S368, S370 и K371 SEQ ID NO: 105.

### **Пример 7. Характеризация связывающих активностей Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3**

[000419] 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 волне 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 13. Анализ кинетики связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с TfR1 человека и яванского макака или TfR2 человека, измеряемой с использованием поверхностного плазмонного резонанса**

Мишень	Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3				
	$K_d$ (M)	$k_a$ (M <sup>-1</sup> c <sup>-1</sup> )	$k_d$ (c <sup>-1</sup> )	$R_{max}$	$R_{es}$ 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)

[000420] 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. 9).

#### **Пример 8. Стабильность конъюгата Fab против TfR-ASO в сыворотке**

[000421] Fab против TfR VH4/Vk3 конъюгировали с контрольным бессмысленным 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. 10 показано, что стабильность в сыворотке была схожей среди многих видов и оставалась высокой через 72 часа.

#### **Пример 9. Активность пропуска экзона конъюгата Fab против TfR-ASO *in vivo* у яванских макаков**

[000422] Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 конъюгировали вызывающим пропуск экзона 51 в гене дистрофина (DMD) бессмысленным олигонуклеотидом (ASO), нацеленным на последовательность экзонного энхансера сплайсинга (ESE) в экзоне 51 DMD. Вызывающий пропуск экзона 51 олигонуклеотид является фосфоамидатным морфолиноолигомером (PMO) длиной 30 нуклеотидов. Активность пропуска экзона конъюгата тестировали *in vivo* на здоровых не являющихся человеком приматах. Наивным самцам яванского макака (n=4-5 на группу) вводили две дозы носителя, 30 мг/кг ASO в отдельности или 122 мг/кг конъюгата (30 мг/кг эквивалента ASO) посредством внутривенной инфузии в дни 1 и 8. Животных умерщвляли и собирали ткани через 2 недели или 4 недели после введения первой дозы. Из образцов ткани собирали тотальную РНК с использованием устройства RSC Promega Maxwell® и осуществляли синтез кДНК с использованием qScript cDNA SuperMix. Оценку пропуска экзона 51 осуществляли с использованием ПЦР с анализом результатов по конечной точке.

Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР использовали для оценки пропуска экзона и % пропуска экзона 51 вычисляли по следующей формуле:

$$\% \text{ пропуска экзона} = \frac{\text{Молярность полосы с пропуском}}{\text{Молярность полосы с пропуском} + \text{Молярность полосы без пропуска}} * 100$$

Результаты вычисления пропуска экзона 51 приведены в таблице 14.

**Таблица 14. Пропуск экзона 51 дистрофина у яванского макака**

Время	2 недели			4 недели	
	Носитель	ASO в отдельности <sup>a</sup>	Конъюгат	ASO в отдельности <sup>a</sup>	Конъюгат
Доза конъюгата <sup>b</sup>	0	n/a	122	n/a	122
Доза ASO в отдельности <sup>c</sup>	0	30	30	30	30
Четырехгла вая мышца <sup>d</sup>	0,00 (0,00)	1,216 (1,083)	4,906 (3,131)	0,840 (1,169)	1,708 (1,395)
Диафрагма <sup>d</sup>	0,00 (0,00)	1,891 (2,911)	7,315 (1,532)	0,717 (1,315)	9,225 (4,696)
Сердце <sup>d</sup>	0,00 (0,00)	0,043 (0,096)	3,42 (1,192)	0,00 (0,00)	4,525 (1,400)
Двуглавая мышца <sup>d</sup>	0,00 (0,00)	0,607 (0,615)	3,129 (0,912)	1,214 (1,441)	4,863 (3,881)
Передняя большеберц овая мышца <sup>d</sup>	0,00 (0,00)	0,699 (0,997)	1,042 (0,685)	0,384 (0,615)	0,816 (0,915)
Икроножная мышца <sup>d</sup>	0,00 (0,00)	0,388 (0,573)	2,424 (2,329)	0,00 (0,00)	5,393 (2,695)

<sup>a</sup>ASO=антисмысловой олигонуклеотид,

<sup>b</sup>Дозы конъюгата приведены в мг/кг конъюгата Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3-ASO.

<sup>c</sup>Дозы ASO приведены в мг/кг эквивалента ASO дозы Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3-ASO.

<sup>d</sup>Значения пропуска экзона представляют собой средний % пропуска экзона 51 со стандартным отклонением (n=5) в скобках.

[000423] Накопление ASO в ткани также количественно анализировали с использованием гибридационного ELISA с зондом, комплементарным последовательности ASO. Получали стандартную кривую и получали уровни ASO (в нг/г) с помощью линейной регрессии стандартной кривой. ASO распределялся во всех оцениваемых тканях на более высоком уровне после введения конъюгата Fab против TfR VH4/Vk3-ASO по сравнению с введением неконъюгированного ASO. Внутривенное

введение неконъюгированного ASO приводило к уровням ASO, близким к фоновым уровням во всех оцениваемых тканях через 2 и 4 недели после введения первой дозы. Введение конъюгата Fab против TfR VN4/Vk3-ASO приводило к распределению ASO в оцениваемых тканях в ранговом порядке сердце>диафрагма>двуглавая мышца>четырёхглавая мышца>икроножная мышца>передняя большеберцовая мышца через 2 недели после первого введения. Также оценивали длительность сохранения концентрации в ткани. Концентрации ASO в четырёхглавой мышце, двуглавой мышце и диафрагме снижались на менее чем 50% за оцениваемый период времени (от 2 до 4 недель), в то время как уровни ASO в сердце, передней большеберцовой мышце и икроножной мышце оставались практически неизменными (таблица 15).

[000424] Как используют в этом примере, термин "неконъюгированный" означает, что олигонуклеотид не конъюгировали с антителом.

**Таблица 15. Распределение вызывающего пропуск экзона 51 DMD ASO в тканях яванского макака**

Время	2 недели			4 недели	
	Носитель	ASO в отдельности <sup>a</sup>	Конъюгат	ASO в отдельности <sup>a</sup>	Конъюгат
Доза конъюгата <sup>b</sup>	0	n/a	122	n/a	122
Доза ASO в отдельности <sup>c</sup>	0	30	30	30	30
Четырёхглавая мышца <sup>d</sup>	0 (59,05)	696,8 (868,15)	2436 (954,0)	197 (134)	682 (281)
Диафрагма <sup>d</sup>	0± (144,3)	580,02 (360,11)	6750 (2256)	60 (120)	3131 (1618)
Сердце <sup>d</sup>	0 (396,03)	1449 (1337)	27138 (6315)	943 (1803)	30410 (9247)
Двуглавая мышца <sup>d</sup>	0 (69,58)	615,63 (335,17)	2840 (980,31)	130 (80)	1326 (623)
Передняя большеберцовая мышца <sup>d</sup>	0 (76,31)	564,71 (327,88)	1591 (253,50)	169 (110)	1087 (514)
Икроножная мышца <sup>d</sup>	0 (41,15)	705,47 (863,75)	2096 (474,04)	170 (69)	1265 (272)

<sup>a</sup>ASO=Антисмысловой олигонуклеотид.

<sup>b</sup>Дозы конъюгата приведены в мг/кг конъюгата Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 ASO.

<sup>c</sup>Дозы ASO приведены в мг/кг ASO или эквивалента ASO дозы конъюгата Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3-ASO.

<sup>d</sup>Значения ASO представляют собой средние концентрации ASO в ткани в нг/г со стандартным отклонением (n=5) в скобках.

### **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

1. Гуманизированное антитело, связывающееся с рецептором трансферрина (TfR) человека, где антитело содержит:

(i) 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;

(ii) 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;

(iii) 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;

(iv) 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;

(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: 75;

(vi) 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;

(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: 75;

(viii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 77; и/или





12. Гуманизированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-11, где антитело выбрано из группы, состоящей из полноразмерного IgG, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, scFv и Fv.

13. Гуманизированное антитело по варианту осуществления 12, где антитело является полноразмерным IgG.

14. Гуманизированное антитело по варианту осуществления 13, где антитело содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

15. Гуманизированное антитело по варианту осуществления 13 или вариант осуществления 14, 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.

16. Гуманизированное антитело по варианту осуществления 12, где антитело является Fab-фрагментом.

17. Гуманизированное антитело по варианту осуществления 16, 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.

18. Гуманизированное антитело по варианту осуществления 17, где антитело содержит:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

19. Гуманизированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-18, где равновесная константа диссоциации ( $K_D$ ) связывания антитела с рецептором трансферрина находится в диапазоне от  $10^{-11}$  М до  $10^{-6}$  М.

20. Гуманизированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-19, где антитело не связывается специфически с участком связывания трансферрина рецептора

трансферрина, и/или где антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.

21. Гуманизированное антитело по любому из вариантов осуществления 1-20, где антитело перекрестно реагирует с внеклеточными эпитопами двух или более из рецепторов трансферрина человека, не являющегося человеком примата и грызуна.

22. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из вариантов осуществления 1-21.

23. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 22.

24. Клетка, содержащая вектор по варианту осуществления 23.

25. Способ получения антитела против TfR, включающий культивирование клетки по варианту осуществления 24 в условиях, подходящих для экспрессии антитела.

26. Комплекс, содержащий антитело по любому из вариантов осуществления 1-21, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой.

27. Комплекс по варианту осуществления 26, где молекулярная нагрузка является диагностическим средством или терапевтическим средством.

28. Комплекс по варианту осуществления 26, где молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, полипептидом или низкомолекулярным соединением.

29. Комплекс по любому из вариантов осуществления 26-28, где антитело и молекулярная нагрузка соединены линкером.

30. Комплекс по варианту осуществления 29, где линкер является расщепляемым линкером.

31. Комплекс по варианту осуществления 30, где линкер содержит последовательность валин-цитруллин.

32. Композиция, содержащая антитело по любому из вариантов осуществления 1-21, нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 22, вектор по варианту осуществления 23 или комплекс по любому из вариантов осуществления 26-31.

33. Композиция по варианту осуществления 32, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

34. Способ детекции рецептора трансферрина в биологическом образце, включающий приведение антитела по любому из вариантов осуществления 1-21 в контакт с биологическим образцом и измерение связывания антитела с биологическим образцом.

35. Способ по варианту осуществления 34, где антитело ковалентно связано с диагностическим средством.

36. Способ по варианту осуществления 35, где биологический образец получают из человека, как предполагают, имеющего заболевание или риск развития заболевания, ассоциированного с рецептором трансферрина.

37. Способ по варианту осуществления 36, где стадию приведения в контакт осуществляют посредством введения индивидууму эффективного количества антитела против TfR.

38. Способ доставки молекулярной нагрузки в клетку, включающий приведение комплекса по любому из вариантов осуществления 26-31 в контакт с клеткой.

39. Способ по варианту осуществления 38, где клетка является мышечной клеткой.

40. Способ по варианту осуществления 38 или варианту осуществления 39, где клетка находится *in vitro*.

41. Способ по варианту осуществления 40, где клетка находится в организме индивидуума.

42. Способ по варианту осуществления 41, где индивидуум является человеком.

43. Способ доставки молекулярной нагрузки в головной мозг или мышцу индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из вариантов осуществления 26-31.

44. Способ по варианту осуществления 43, где введение является внутривенным.

45. Способ лечения заболевания, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из вариантов осуществления 26-31, где молекулярная нагрузка является терапевтическим средством.

46. Способ по варианту осуществления 45, где заболевание является неврологическим заболеванием, и молекулярная нагрузка является лекарственным средством для лечения неврологического заболевания.

47. Способ по варианту осуществления 45, где заболевание является мышечным заболеванием, и молекулярная нагрузка является лекарственным средством для лечения мышечного заболевания.

48. Способ по варианту осуществления 47, где мышечное заболевание является редким мышечным заболеванием или мышечной атрофией.

49. Антитело, связывающееся с рецептором трансферрина (TfR) человека, 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

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 70;

(v) 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;

(vi) 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: 75;

(vii) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 76; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 74;

(viii) 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: 78;

(ix) вариабельную 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

(x) 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.

50. Антитело, связывающееся с рецептором трансферрина (TfR) человека, где антитело подвергается образованию пироглутамата, являющегося результатом посттрансляционной модификации.

### **ЭКВИВАЛЕНТЫ И ТЕРМИНОЛОГИЯ**

[000425] 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.

[000426] 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.

[000427] 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.

[000428] 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.

[000429] Варианты осуществления настоящего изобретения представлены в настоящем описании. Варианты этих вариантов осуществления могут становиться очевидными специалистам в этой области после прочтения изложенного выше описания.

[000430] Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в этой области будут использовать такие варианты при необходимости, и авторы настоящего изобретения предполагают, что изобретение будет осуществляться 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.





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: 80.

2. Антитело 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

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

3. Антитело по п.1 или 2, где антитело выбрано из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, scFv, Fv и полноразмерного IgG.

4. Антитело по п.3, где антитело является Fab-фрагментом.

5. Антитело 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;

(iv) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по



(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. Антитело по любому из пп.1-6, где равновесная константа диссоциации ( $K_D$ ) связывания антитела с рецептором трансферрина находится в диапазоне от  $10^{-11}$  М до  $10^{-6}$  М.

8. Антитело по любому из пп.1-7, где антитело не связывается специфически с участком связывания трансферрина рецептора трансферрина, и/или где антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.

9. Антитело по любому из пп.1-8, где антитело перекрестно реагирует с внеклеточными эпитопами двух или более из рецепторов трансферрина человека, не являющегося человеком примата и грызуна.

10. Комплекс, содержащий антитело по любому из пп.1-9, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой.

11. Комплекс по п.10, где молекулярная нагрузка является диагностическим средством или терапевтическим средством.

12. Комплекс по п.10, где молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, полипептидом или низкомолекулярным соединением.

13. Комплекс по любому из пп.10-12, где антитело и молекулярная нагрузка соединены линкером.

14. Комплекс по п.13, где линкер является расщепляемым линкером.

15. Комплекс по п.13 или 14, где линкер содержит последовательность валин-цитруллин.

16. Композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-9 или комплекс по любому из пп.10-15.

17. Композиция по п.16, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

18. Способ доставки молекулярной нагрузки в клетку, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из пп.10-15 или композицией по п.16 или 17.

19. Способ по п.18, где клетка является мышечной клеткой.

20. Способ по п.18 или 19, где клетка находится *in vitro*.

21. Способ по п.18 или 19, где клетка находится в организме индивидуума.

22. Способ по п.21, где индивидуум является человеком.

23. Способ доставки молекулярной нагрузки в мышцу индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из пп.10-15 или

композиции по п.16 или 17.

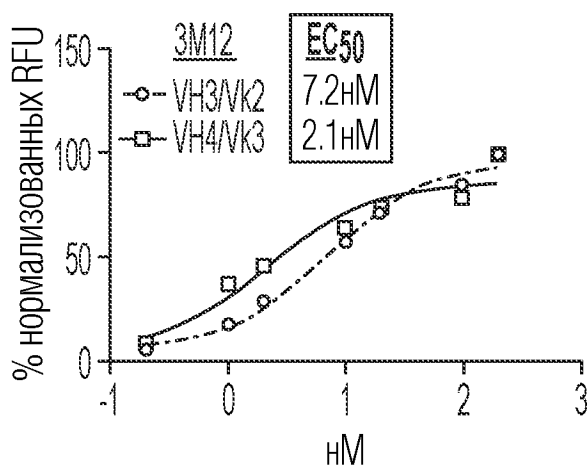
24. Способ по п.23, где введение является внутривенным.

25. Способ лечения заболевания, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из пп.10-15 или композиции по п.16 или 17, где молекулярная нагрузка является терапевтическим средством.

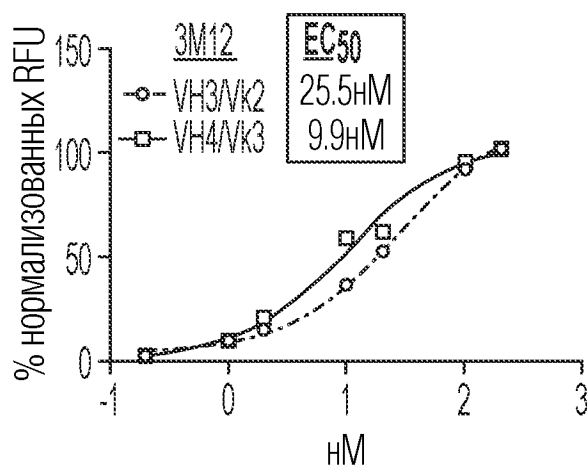
26. Способ по п.25, где заболевание является мышечным заболеванием, и молекулярная нагрузка является лекарственным средством для лечения мышечного заболевания.

27. Способ по п.26, где мышечное заболевание является редким мышечным заболеванием или мышечной атрофией.

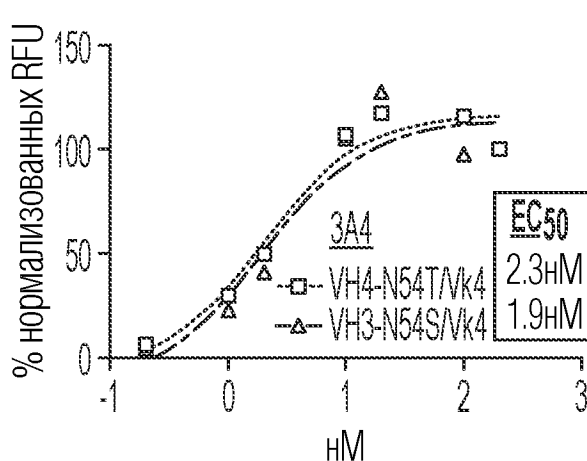
По доверенности



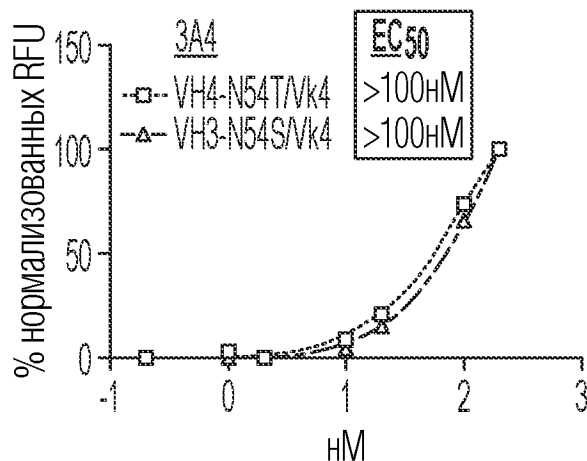
ФИГ. 1А



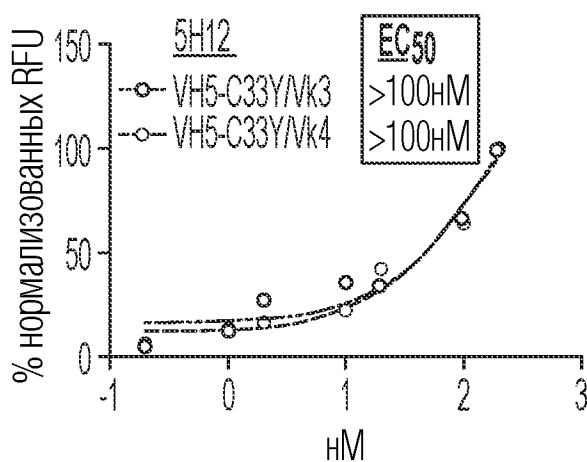
ФИГ. 1В



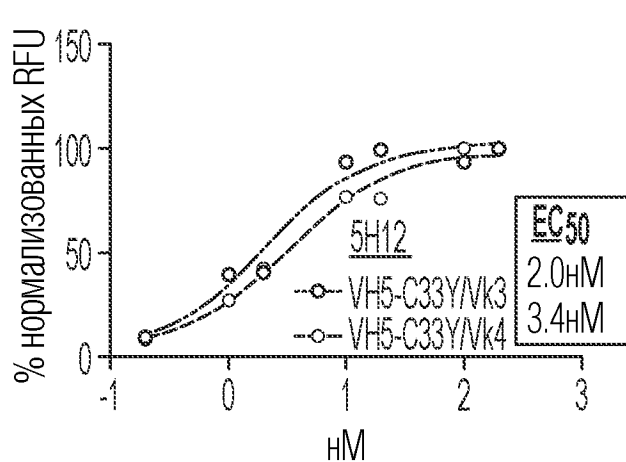
ФИГ. 1С



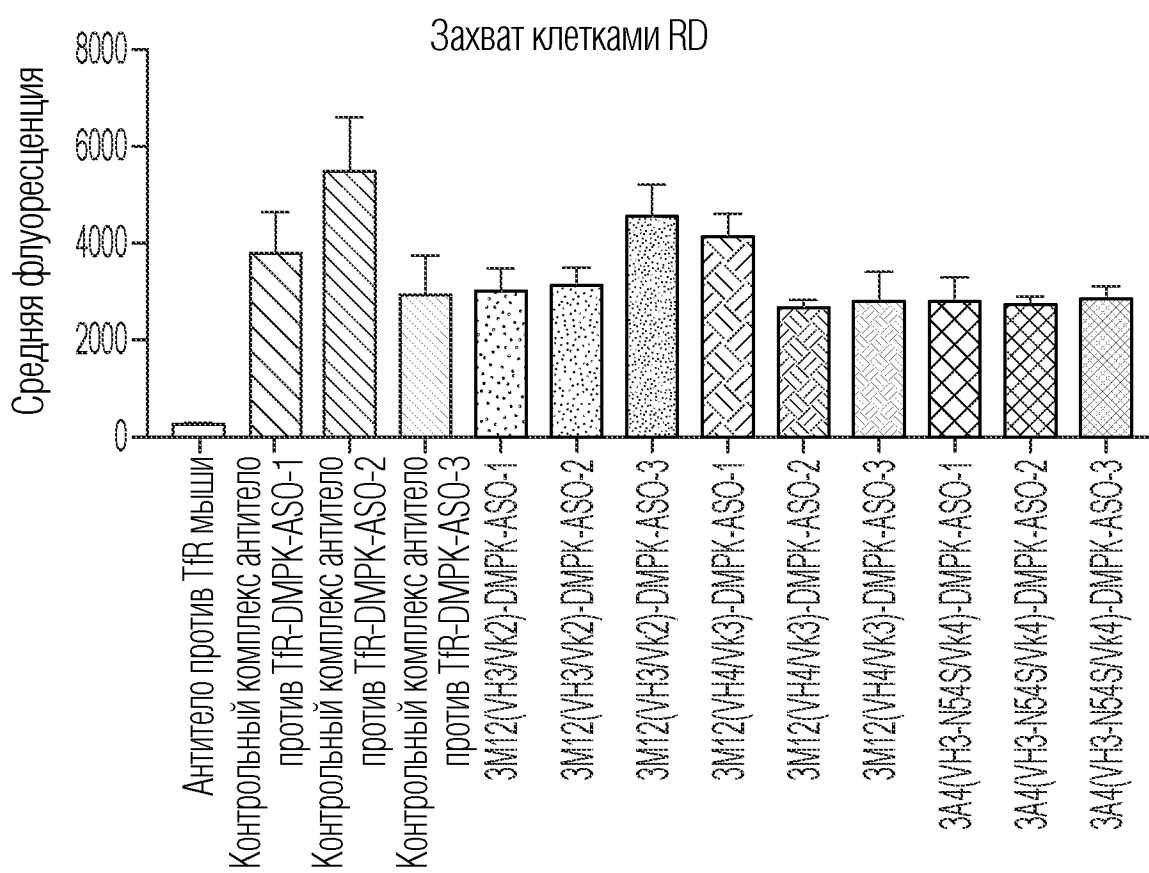
ФИГ. 1D



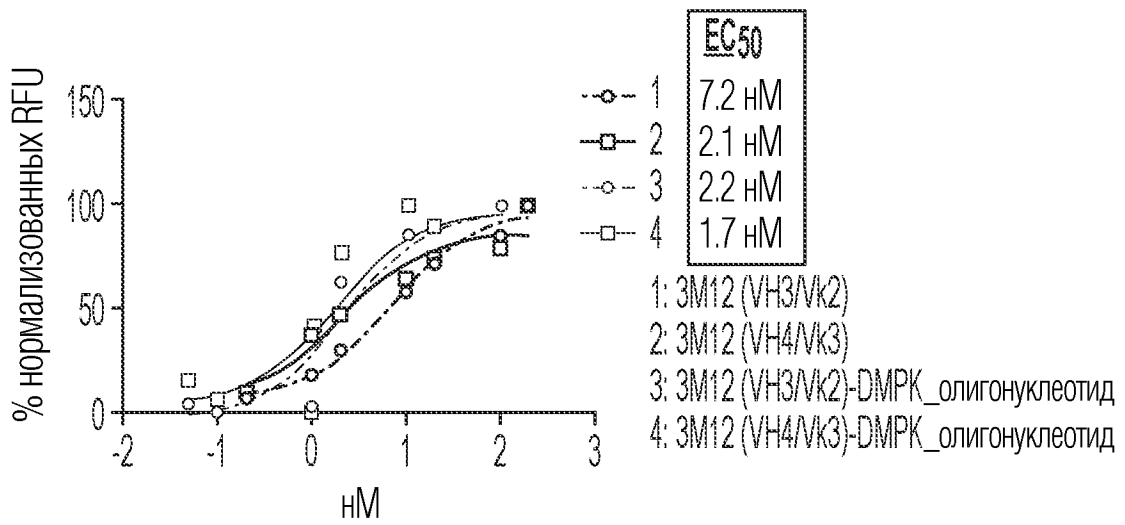
ФИГ. 1Е



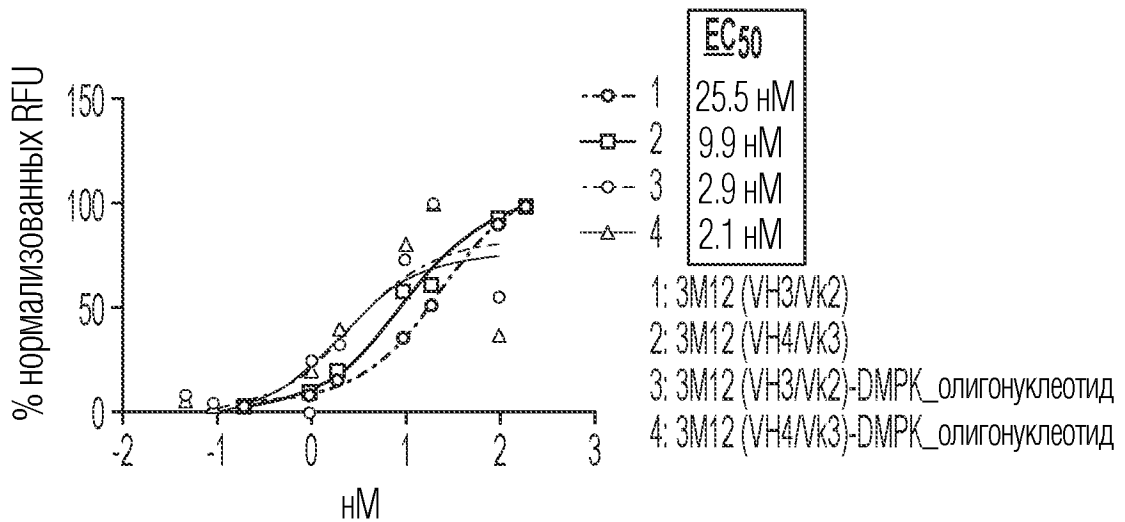
ФИГ. 1F



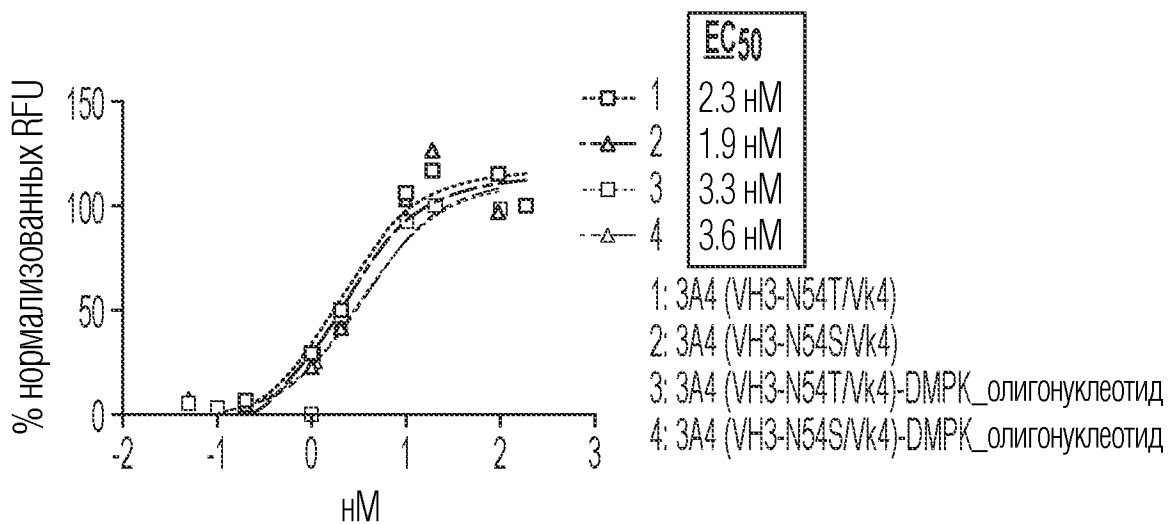
ФИГ. 2



ФИГ. 3А

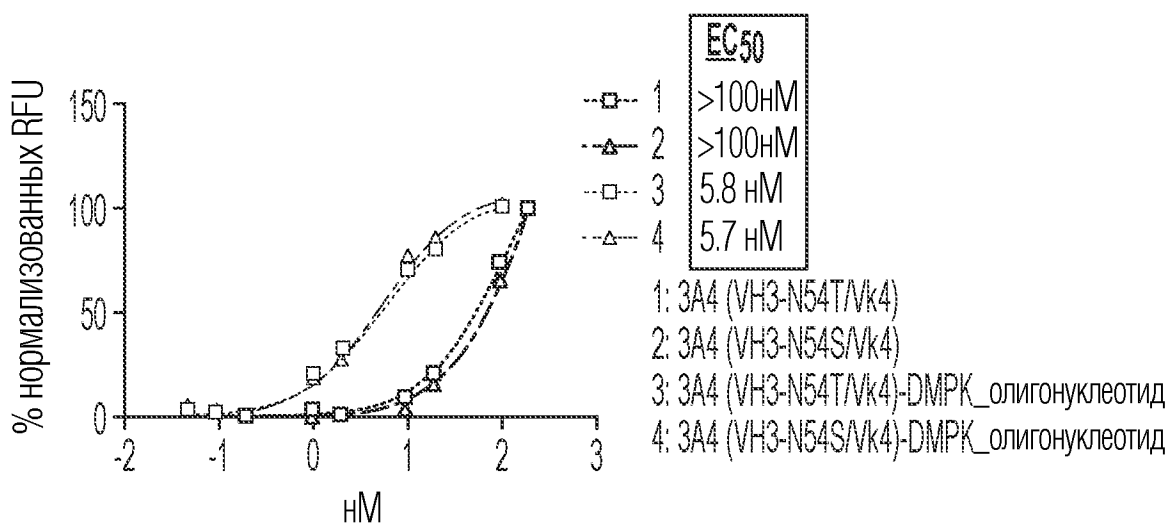


ФИГ. 3В

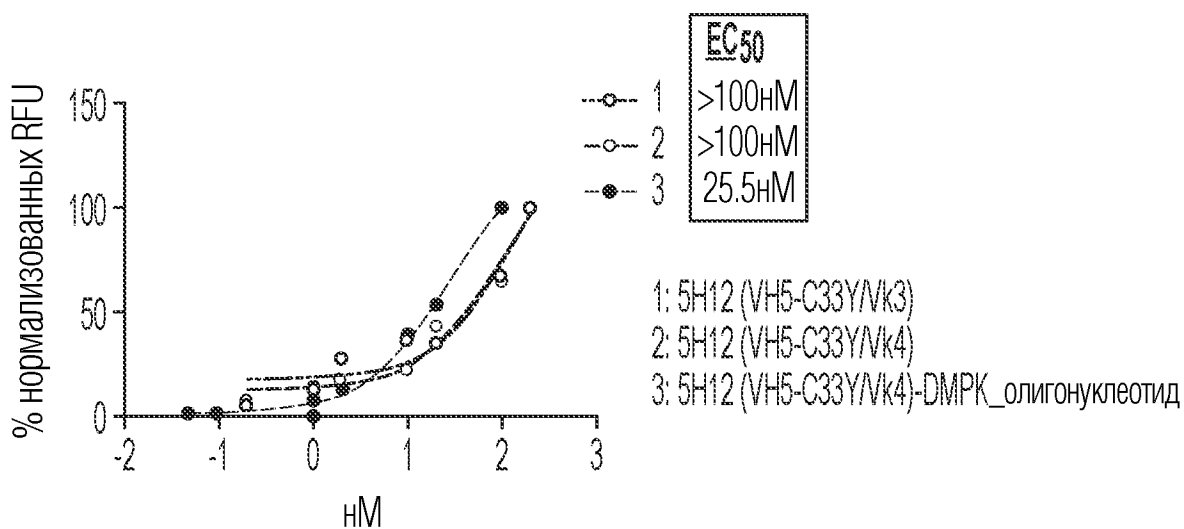


ФИГ. 3С

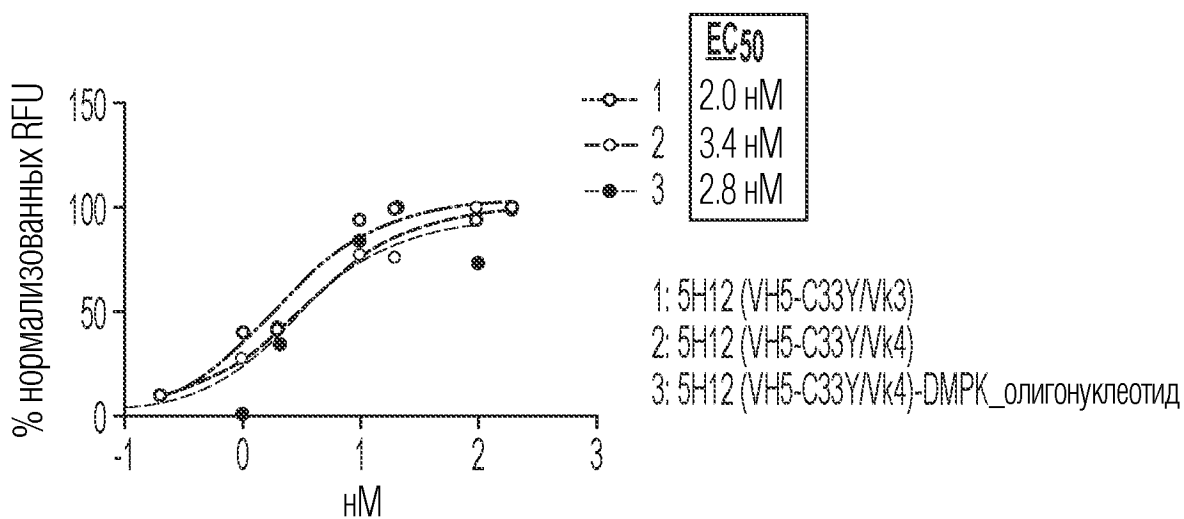




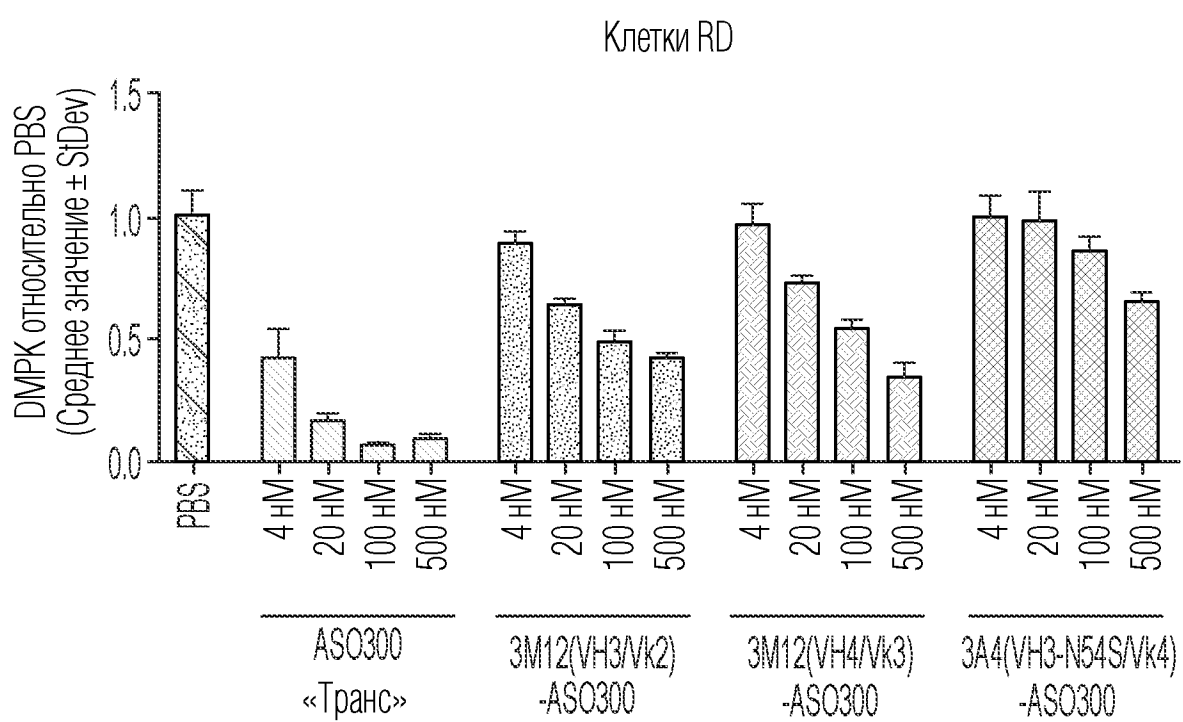
ФИГ. 3D



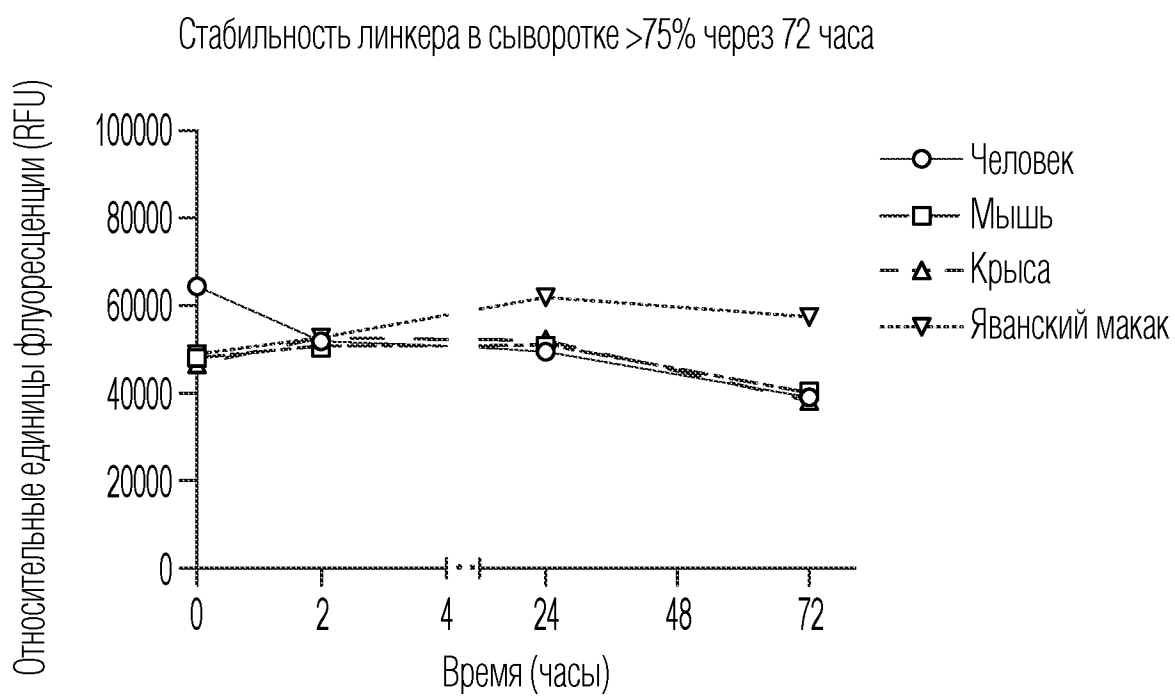
ФИГ. 3E



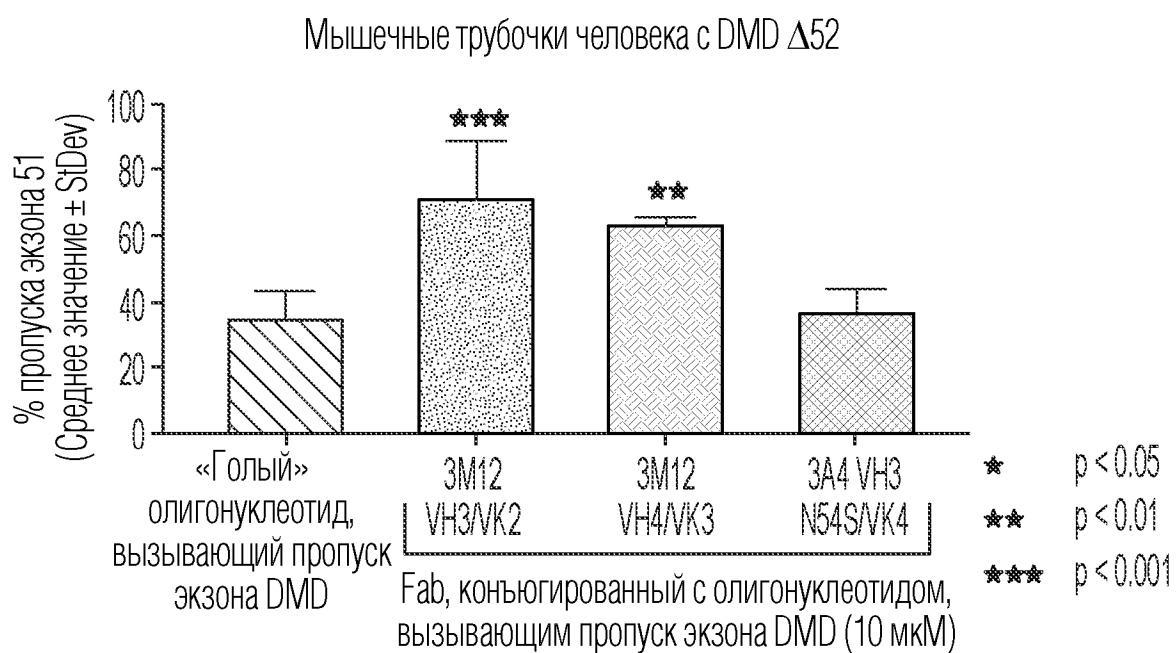
ФИГ. 3F



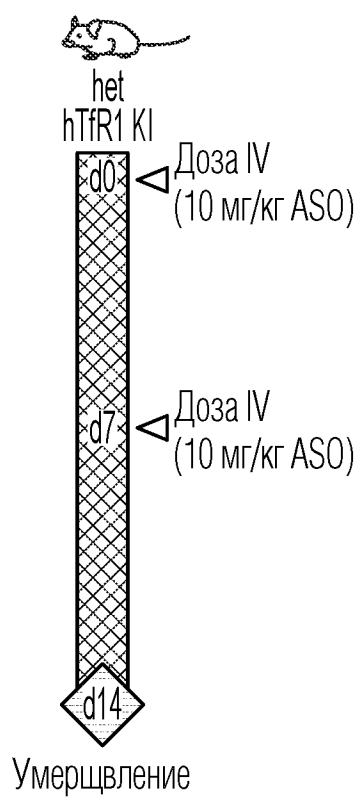
ФИГ. 4



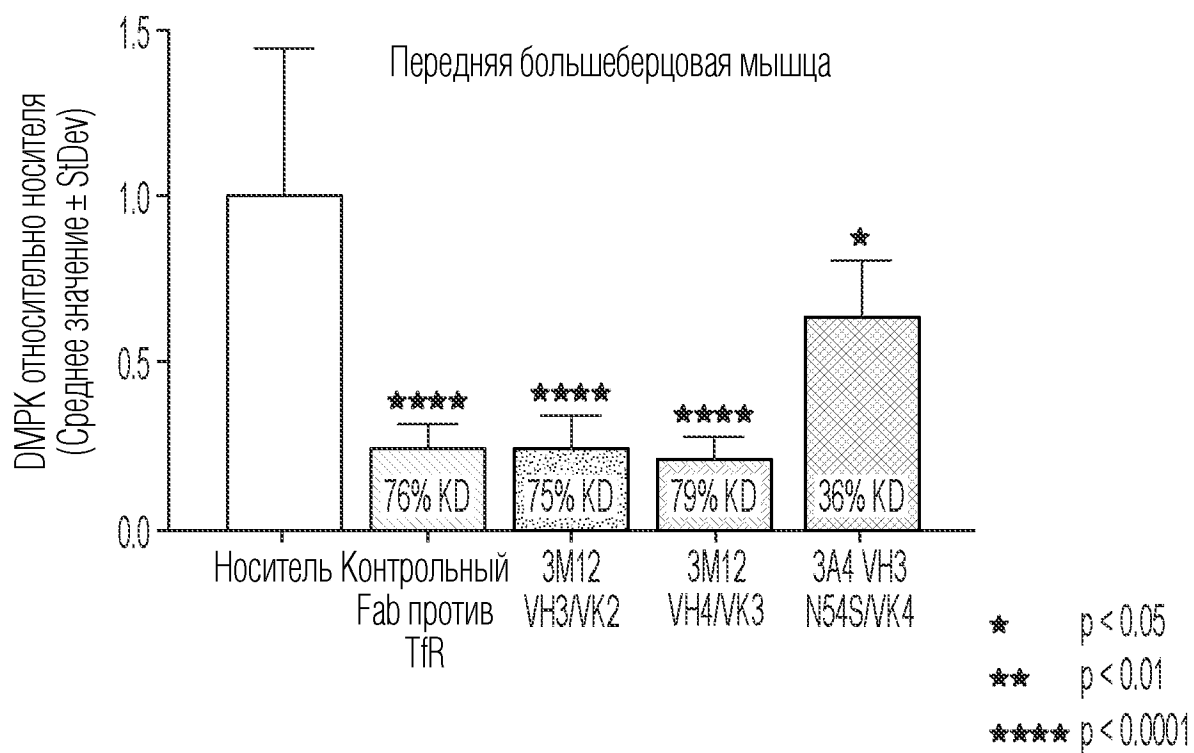
ФИГ. 5



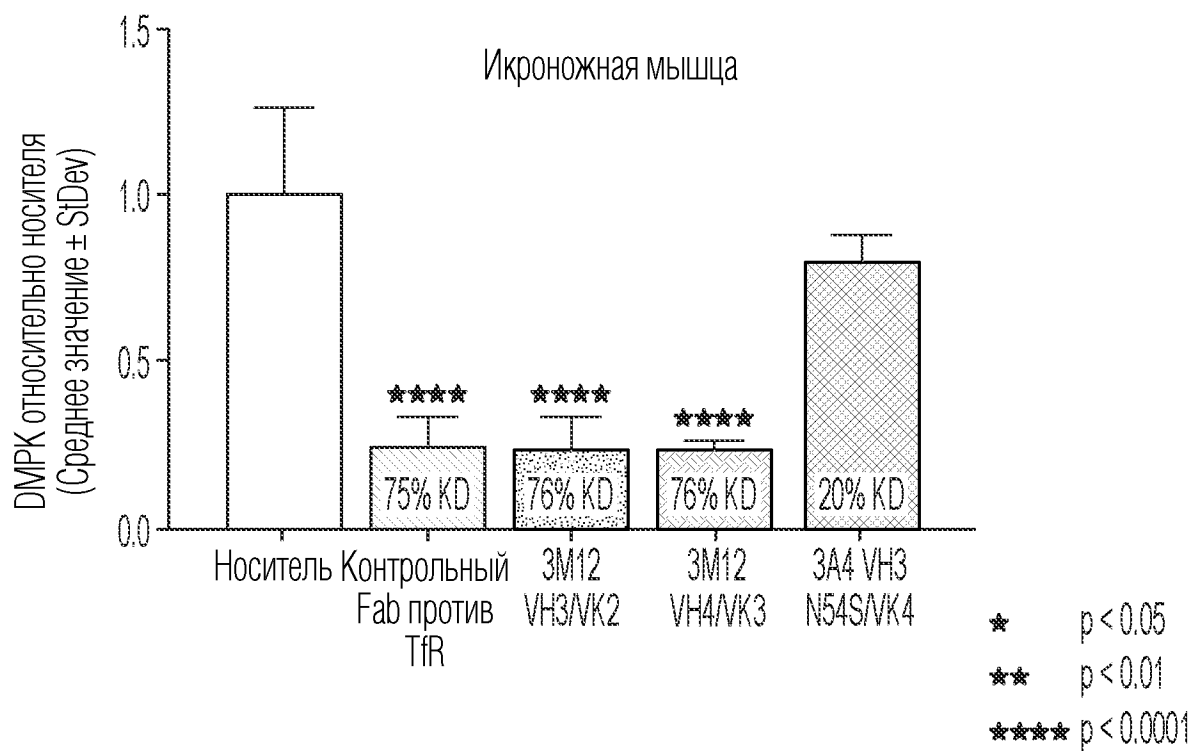
ФИГ. 6



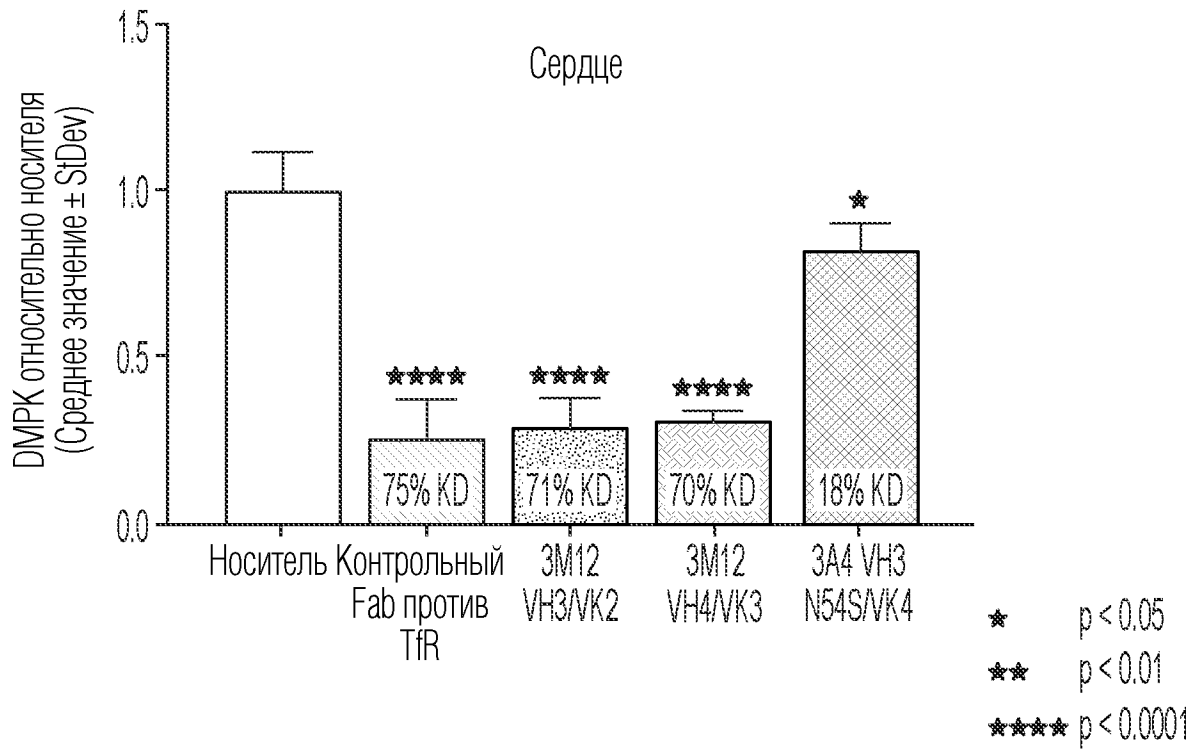
ФИГ. 7А



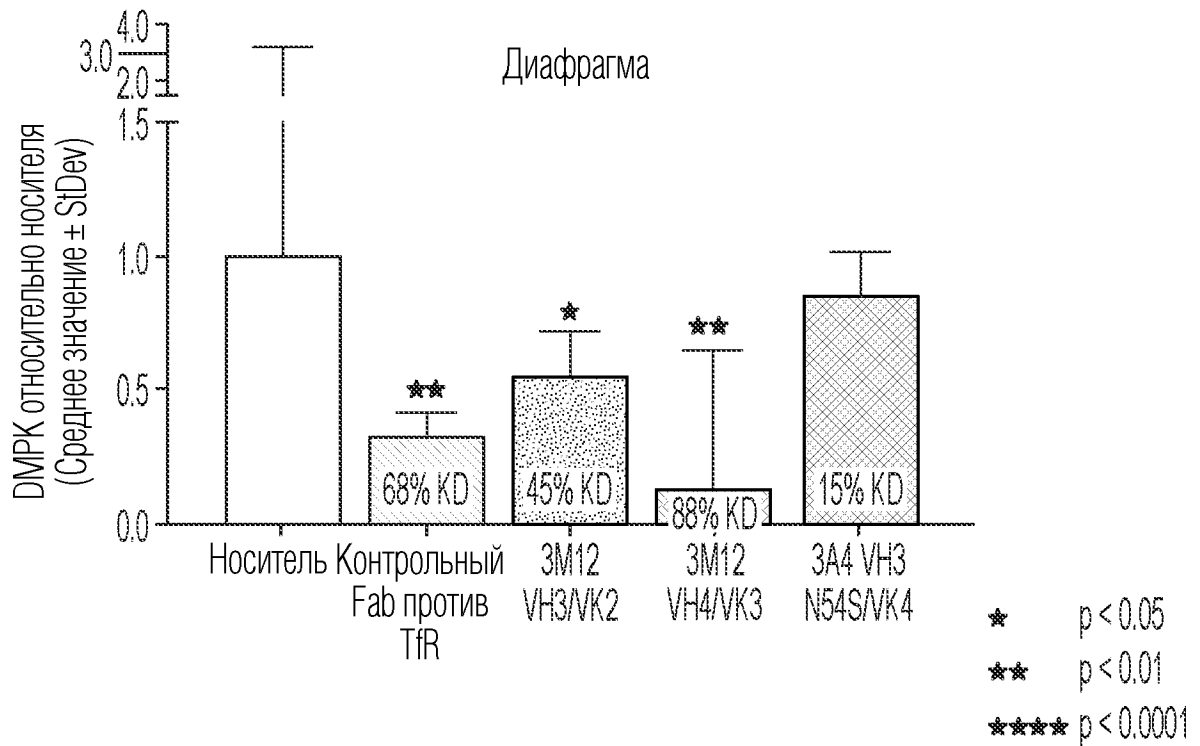
ФИГ. 7В



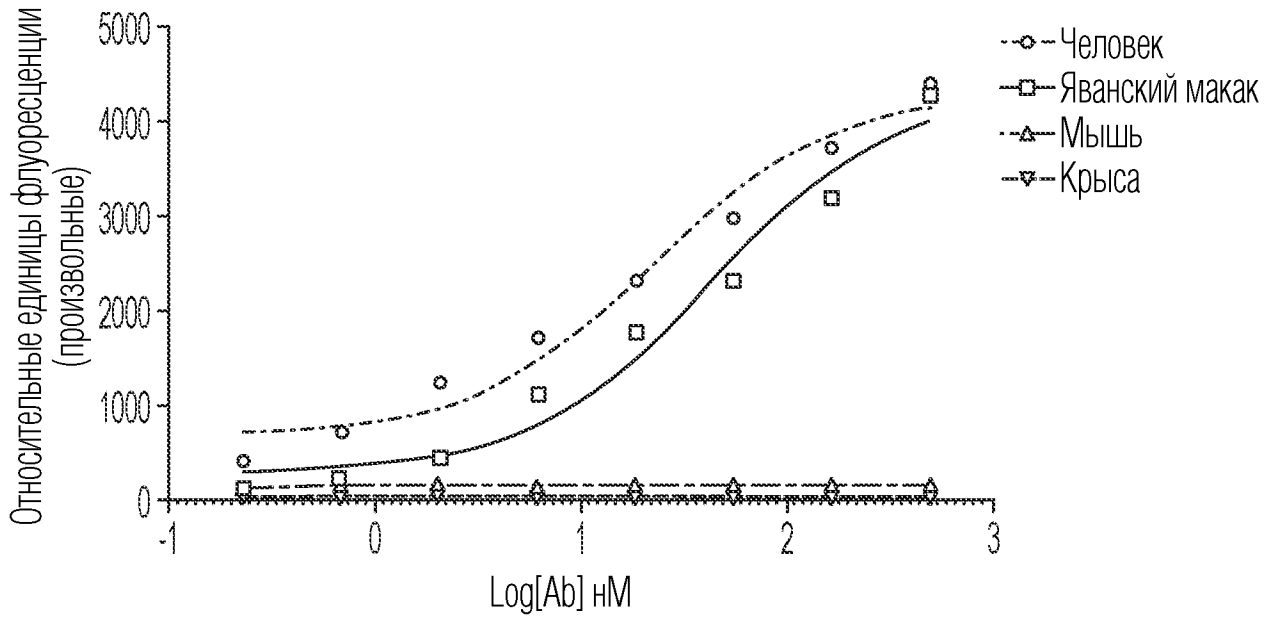
ФИГ. 7С



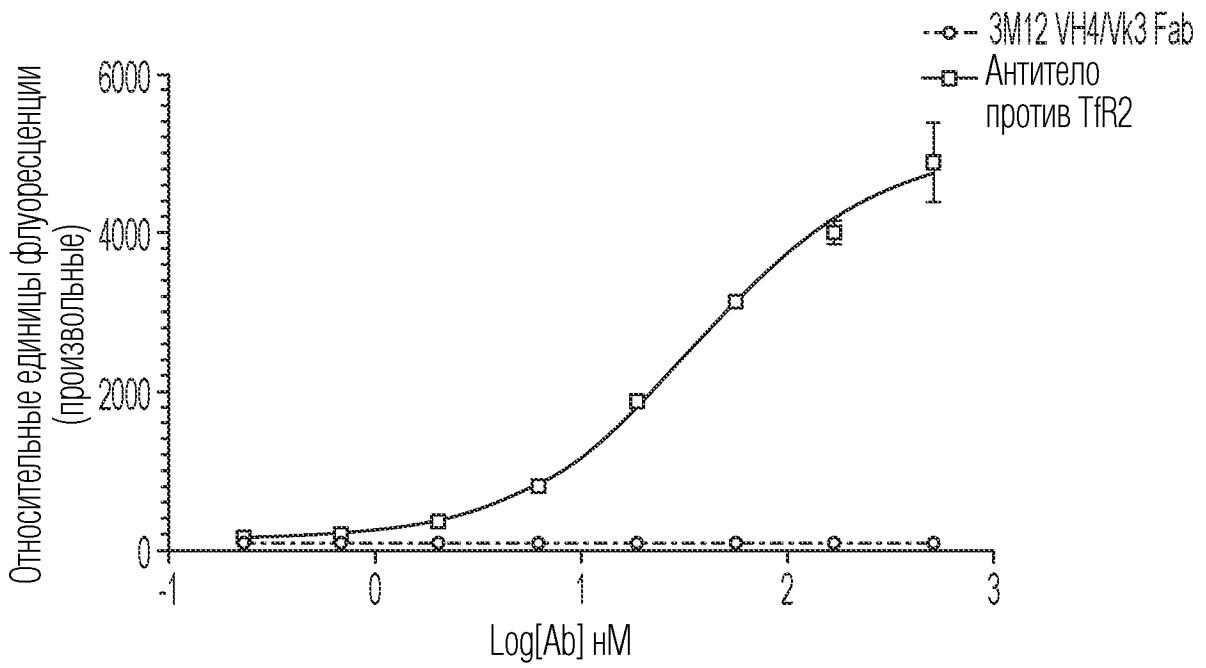
ФИГ. 7D



ФИГ. 7E

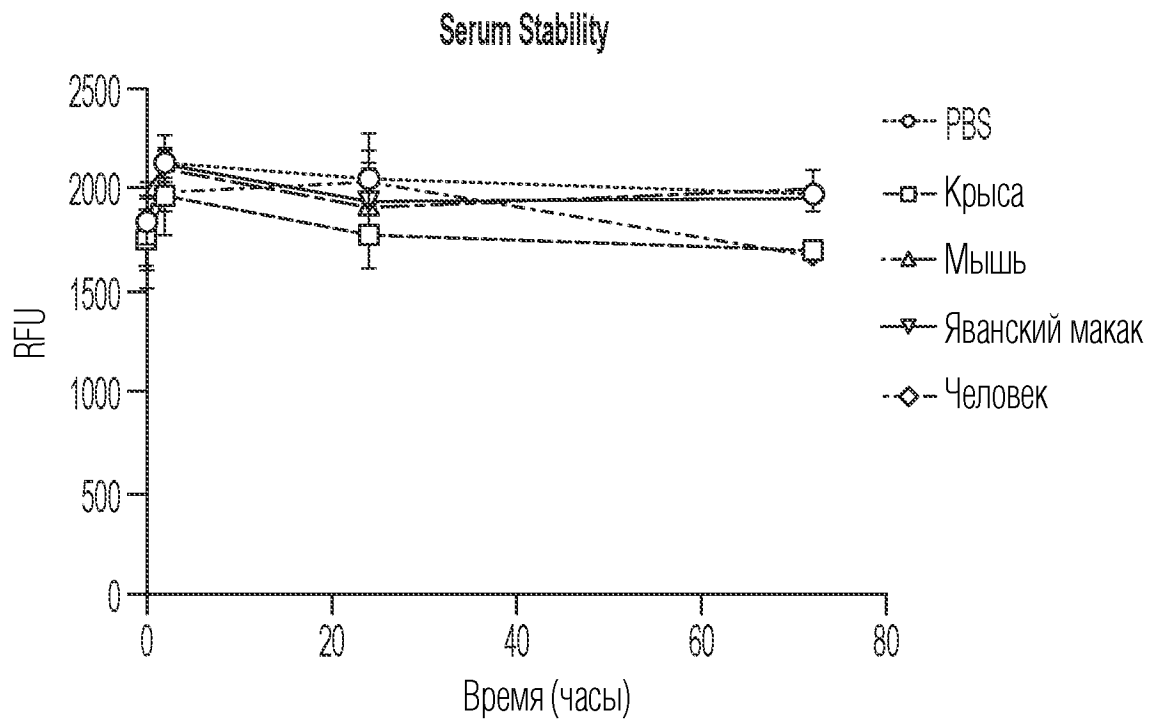


ФИГ. 8



ФИГ. 9



**ФИГ. 10**