

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390410 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.28(22) Дата подачи заявки
2021.07.09(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(54) МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИСТРОФИНОПАТИЙ

(31) 63/055,777; 63/069,077; 63/143,829

(32) 2020.07.23; 2020.08.23; 2021.01.30

(33) US

(86) PCT/US2021/040998

(87) WO 2022/020107 2022.01.27

(71) Заявитель:

ДАЙН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

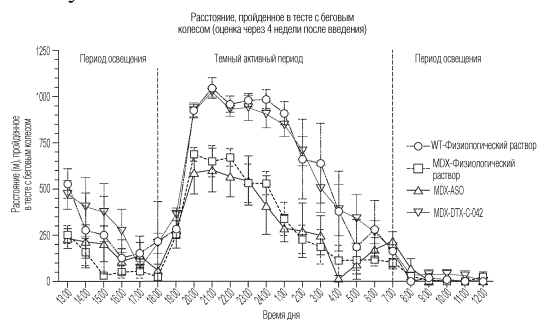
(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Аспекты настоящего изобретения относятся к комплексам, содержащим мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором поверхности клетки на мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка способствует экспрессии или активности функционального белка дистрофина. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, таким как антисмысловой олигонуклеотид, например олигонуклеотидом, вызывающим пропуск экзона в мРНК, экспрессирующей с мутантного аллеля DMD.



A1

202390410

202390410

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577090EA/55

МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИСТРОФИНОПАТИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по 35 U.S.C § 119(e) по предварительной заявке США № 63/143829, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING DYSTROPHINOPATHIES", поданной 30 января 2021 года, предварительной заявке США № 63/069077, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING DYSTROPHINOPATHIES", поданной 23 августа 2020 года, и предварительной заявке США № 63/055777, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING DYSTROPHINOPATHIES", поданной 23 июля 2020 года; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

[0003] Настоящая заявка содержит список последовательностей, поданный в формате ASCII посредством EFS-WEB и включенный, таким образом, посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII копия, созданная 8 июля 2021 года, названа D082470040W000-SEQ-DWY имеет размер 575156 байт.

УРОВЕНЬ Дистрофинопатии являются группой отдельных нервно-мышечных заболеваний, являющихся результатом мутаций гена дистрофина. Дистрофинопатии включают мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера и X-сцепленную дилатационную кардиомиопатию. Дистрофин (DMD) является крупным геном, содержащим 79 экзонов и всего приблизительно 2,6 миллионов пар оснований. Многочисленные мутации в DMD, включая экзонные мутации со сдвигом рамки считывания, делеции, замены и дупликации, могут снижать экспрессию функционального дистрофина, что приводит к дистрофинопатиям. Одно из средств, нацеленных на экзон 51 DMD человека, этеплирсен, предварительно одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), однако эффективность все еще подлежит оценке.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к комплексам, нацеленным на мышечные клетки, для доставки молекулярной нагрузки в эти клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, повышающей или

восстанавливающей экспрессию или активность функционального DMD. В некоторых вариантах осуществления комплексы содержат молекулярную нагрузку на основе олигонуклеотида, способствующую нормальной экспрессии функционального DMD посредством механизма пропуска экзона в рамке считывания или супрессии стоп-кодонов. В других вариантах осуществления комплексы сконфигурированы для доставки гена минидистрофина или синтетической мРНК, повышающих или восстанавливающих функциональную активность дистрофина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, содержат мышечно-специфические средства (например, мышечно-специфические антитела), специфически связывающиеся с рецепторами на поверхности мышечных клеток для доставки молекулярной нагрузки в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы захватываются клетками посредством рецептор-опосредованной интернализации, после которой молекулярная нагрузка может высвобождаться для выполнения функции внутри клеток. Например, комплексы, сконструированные для доставки олигонуклеотидов, могут высвобождать олигонуклеотиды таким образом, что олигонуклеотиды могут способствовать экспрессии функционального DMD (например, посредством механизма пропуска экзона) в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды высвобождаются посредством эндосомального расщепления ковалентных линкеров, соединяющих олигонуклеотиды и мышечно-специфические средства комплексов.

[0006] Один из аспектов настоящего изобретения относится к комплексу, содержащему антитело против рецептора трансферрина (TfR), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для стимуляции экспрессии или активности гена DMD, 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;

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

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

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

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

[0009] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 101; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 90;

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

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

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

[00010] 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.

[00011] В некоторых вариантах осуществления антитело не связывается специфически с участком связывания трансферрина рецептора трансферрина, и/или мышечно-специфическое антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.

[00012] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид способствует пропуску экзона РНК DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид способствует пропуску экзона DMD в диапазоне от экзона 8 до экзона 55. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид способствует пропуску экзона 8, экзона 23,

экзона 43, экзона 44, экзона 45, экзона 46, экзона 50, экзона 51, экзона 52, экзона 53 и/или экзона 55.

[00013] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности в отношении одного или более полных или частичных экзонных энхансеров сплайсинга (ESE) транскрипта DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащей один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 402-436 и 2043-2238.

[00014] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид способствует пропуску экзона 51.

[00015] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащей по меньшей мере 4 последовательных нуклеотида ESE, приведенных в любой из SEQ ID NO: 402-436.

[00016] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит любую из SEQ ID NO: 437-1241 или содержит область комплементарности любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[00017] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности олигонуклеотида, приведенного в таблице 14. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, приведенную в таблице 14, где любое одно или более из урациловых оснований (U) в олигонуклеотиде, необязательно, может являться тиминным основанием (T).

[00018] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь является фосфотиоатной связью.

[00019] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления один или более модифицированных нуклеозидов являются 2'-модифицированными нуклеозидами.

[00020] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит один или более фосфоамидатных морфолинонуклеотидов, необязательно, где олигонуклеотид является фосфоамидатным морфолиновым олигомером (PMO).

[00021] В некоторых вариантах осуществления антители ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит последовательность валин-цитруллин.

[00022] В некоторых вариантах осуществления антители ковалентно связано с молекулярной нагрузкой посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антителя.

[00023] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу стимуляции экспрессии или активности белка DMD в клетке, включающему приведение клетки в контакт с комплексом, представленным в настоящем описании, в количестве, эффективном для стимуляции интернализации молекулярной нагрузки в клетку, необязательно, где клетка является мышечной клеткой.

[00024] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения индивидуума, имеющего мутантный аллель DMD, ассоциированный с дистрофинопатией, включающему введение индивидууму эффективного количества комплекса, представленного в настоящем описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00025] На фиг. 1 представлена неограничивающая схема, на которой показан эффект трансфекции клеток с использованием миРНК.

[00026] На фиг. 2 представлена неограничивающая схема, на которой показана активность мышечно-специфического комплекса, содержащего миРНК.

[00027] На фиг. 3А-3В представлена неограничивающая схема, на которой показана активность мышечно-специфического комплекса, содержащий миРНК, в мышечных тканях мышцы (икроножная мышца и сердце) *in vivo* относительно контрольного ненацеленного комплекса, содержащего ту же миРНК (N=4 мыши C57BL/6 WT).

[00028] На фиг. 4А-4Е представлена неограничивающая схема, на которой показана тканевая селективность мышечно-специфического комплекса, содержащего миРНК.

[00029] На фиг. 5 представлена неограничивающая схема, на которой показана способность мышечно-специфического комплексов против рецептора трансферрина, содержащего приводящий к пропуску экзона-23 фосфоамидатный морфолиновый олигомер (РМО), дозозависимо повышать пропуск экзона в мышечных тканях модели на мышцах *mdx*.

[00030] На фиг. 6А-6В представлена неограничивающая схема, на которой показана способность мышечно-специфического комплексов против рецептора трансферрина, содержащего приводящий к пропуску экзона-23 РМО, дозозависимо повышать дистрофин в скелетных мышцах (четырёхглавой мышце) модели мыши *mdx*.

[00031] На фиг. 7А-7Е представлена неограничивающая схема, на которой показана способность мышечно-специфического комплексов против рецептора трансферрина, содержащего приводящий к пропуску экзона-23 РМО, улучшать функциональные характеристики (фиг. 7А, 7В, 7С и 7D) и снижать уровни креатинкиназы (фиг. 7Е) в модели на мышцах *mdx* (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; NS - незначимо).

[00032] На фиг. 8 показана стабильность в сыворотке линкера, используемого для связывания антитела против TfR и молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотида) в различных биологических видах с течением времени после внутривенного введения.

[00033] На фиг. 9А-9F показано связывание гуманизированных Fab против TfR с TfR1 человека (hTfR1) или TfR1 яванского макака (cTfR1), что измеряли посредством ELISA. На фиг. 9А показано связывание гуманизированных вариантов 3М12 с hTfR1. На

фиг. 9В показано связывание гуманизированных вариантов 3М12 с сTfR1. На фиг. 9С показано связывание гуманизированных вариантов 3А4 с hTfR1. На фиг. 9D показано связывание гуманизированных вариантов 3А4 с сTfR1. На фиг. 9Е показано связывание гуманизированных вариантов 5Н12 с hTfR1. На фиг. 9F показано связывание гуманизированных вариантов 5Н12 с hTfR1.

[00034] На фиг. 10 показан количественно проанализированный клеточный захват конъюгатов Fab против TfR в клетки рабдомиосаркомы (RD). Молекулярной нагрузкой в тестируемых конъюгатах являются DMPK-нацеленные олигонуклеотиды, и захват конъюгатов облегчался указанными 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.

[00035] На фиг. 11А-11F показано связывание конъюгированных или неконъюгированных с олигонуклеотидом гуманизированных Fab против TfR с TfR1 человек (hTfR1) и TfR1 яванского макака (сTfR1), что измеряли посредством ELISA. На фиг. 11А показано связывание гуманизированных вариантов 3М12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 11В показано связывание гуманизированных вариантов 3М12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с сTfR1. На фиг. 11С показано связывание гуманизированных вариантов 3А4 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 11D показано связывание гуманизированных вариантов 3А4 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с сTfR1. На фиг. 11Е показано связывание гуманизированных вариантов 5Н12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с hTfR1. На фиг. 11F показано связывание гуманизированных вариантов 5Н12 в отдельности или в конъюгатах с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом с сTfR1. Также приведены соответствующие значения EC₅₀.

[00036] На фиг. 12 показана экспрессия DMPK в клетках RD, обработанных различными концентрациями конъюгатов, содержащих указанные гуманизированные антитела против TfR, конъюгированные с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом ASO300. Продолжительность обработки составляла 3 дня. ASO300, доставленный с использованием средств для трансфекции, использовали в качестве контроля.

[00037] На фиг. 13 показан пропуск экзона 51 в мышечных трубочках человека с DMD, облегченный олигонуклеотидом (PMO) для пропуска экзона 51 DMD. Клетки обрабатывали "голым" PMO или PMO, конъюгированным с Fab против TfR1 (Ab-PMO).

[00038] На фиг. 14 показано дозозависимое повышение экспрессии дистрофина в четырехглавой мышце мышей mdx после введения антител против TfR1 мыши (RI7 217), конъюгированных с олигонуклеотидом (PMO), нацеленным на экзон 23, что измеряют посредством вестерн-блоттинга для дистрофина с альфа-актином в качестве контроля для

нанесения. Стандарты получали с использованием объединенного белка дикого типа и объединенного белка *mdx*. Процент указывает на количество белка WT, добавленного в образец.

[00039] На фиг. 15 показан количественный анализ уровней белка дистрофина в четырехглавой мышце мышей *mdx* после введения различных доз антитела против TfR1 мышши (RI7 217), конъюгированного с олигонуклеотидом (PMO), нацеленным на экзон 23.

[00040] На фиг. 16 показаны изображения иммунофлуоресцентного окрашивания четырехглавых мышц мышей дикого типа (WT), которым вводили физиологический раствор, или мышей *mdx*, которым вводили физиологический раствор, "голый" олигонуклеотид или олигонуклеотид, конъюгированный с антителом против TfR1 мышши (RI7 217).

[00041] На фиг. 17 представлены данные, свидетельствующие о том, что конъюгаты, содержащие указанные Fab против TfR1 (3M12 VH3/VK2, 3M12 VH4/VK3 и 3A4 VH3 N54S/VK4), конъюгированные с олигонуклеотидом для пропуска экзона DMD, приводили к повышенному пропуску экзонов по сравнению с "голым" олигонуклеотидом для пропуска экзона DMD в мышечных трубочках пациентов с DMD.

[00042] На фиг. 18 показаны измерения ELISA связывания Fab против TfR1 3M12 VH4/Vk3 с рекомбинантным белком TfR1 человека (круги), яванского макака (квадрата), мышши (обращенные вверх треугольники) или крысы (обращенные вниз треугольники) в диапазоне концентраций от 230 пМ до 500 нМ Fab. Результаты измерений свидетельствуют о том, что Fab против TfR1 реагирует с TfR1 человека и яванского макака. Не наблюдали связывания с рекомбинантным TfR1 мышши или крысы. Данные приведены в относительных единицах флуоресценции, нормализованных по исходному уровню.

[00043] На фиг. 19 показаны результаты тестирования ELISA аффинности Fab против TfR1 3M12 VH4/Vk3 с рекомбинантным TfR1 или TfR2 человека в диапазоне концентраций от 230 пМ до 500 нМ Fab. Данные приведены в относительных единицах флуоресценции, нормализованных по исходному уровню. Результаты свидетельствуют о том, что Fab не связывается с рекомбинантным TfR2 человека.

[00044] На фиг. 20 показана стабильность в сыворотке линкера, используемого для связывания Fab против TfR1 3M12 VH4/Vk3 с контрольным бессмысловым олигонуклеотидом, за 72 часа инкубации в PBS или в сыворотке крысы, мышши, яванского макака или человека.

[00045] На фиг. 21A-21C показан количественный анализ пропуска экзона 23 в четырехглавой мышце (фиг. 21A), сердце (фиг. 21B) и диафрагме (фиг. 21C) мышши дикого типа (WT) и *mdx* через две или четыре недели после введения однократной дозы физиологического раствора, неконъюгированного олигонуклеотида (ASO), индуцирующего пропуск экзона 23 в DMD, или конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 RI7217, конъюгированного с ASO (Ab-ASO). Наблюдали низкий пропуск экзона 23 или его отсутствие в тканях мышши WT или мышши *mdx*, которым вводили физиологический раствор или неконъюгированный ASO, в то время как наблюдали значимые уровни

пропуска экзона 23 в тканях мышей *mdx*, которым вводили Ab-ASO (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$).

[00046] На фиг. 22A-22D показано измерение белка дистрофина в четырехглавой мышце мышей *mdx* после введения однократной дозы неконъюгированного олигонуклеотида (ASO), индуцирующего пропуск экзона 23 в DMD, или конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 RI7 217, конъюгированный с ASO (Ab-ASO). На фиг. 22A показан вестерн-блоттинг белка дистрофина и альфа-актина в мышечной ткани через две недели после инъекции ASO или Ab-ASO. На фиг. 22B показан количественный анализ дистрофина при вестерн-блоттинге с фиг. 23A относительно белка дистрофина в мышце дикого типа. На фиг. 22C показан вестерн-блоттинг белка дистрофина и альфа-актина в мышечной ткани через четыре недели после инъекции ASO или Ab-ASO. На фиг. 22D показан количественный анализ дистрофина при вестерн-блоттинге с фиг. 22C относительно белка дистрофина в мышце дикого типа. Стандартные кривые на фиг. 22A и 22C получали посредством объединения ткани из образцов от мышей дикого типа (WT) и *mdx* мышью, и процентом WT указано количество белка WT, добавленного в каждый образец (* $p < 0,05$; ns, незначимо)

[00047] На фиг. 23A-23D показано измерение белка дистрофина в сердечной мышце мышей *mdx* после введения однократной дозы неконъюгированного олигонуклеотида (ASO), индуцирующего пропуск экзона 23 в DMD, или конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 RI7 217, конъюгированный с ASO (Ab-ASO). На фиг. 23A показан вестерн-блоттинг белка дистрофина и альфа-актина в мышечной ткани через две недели после инъекции ASO или Ab-ASO. На фиг. 23B показан количественный анализ дистрофина при вестерн-блоттинге с фиг. 23A относительно белка дистрофина в мышце дикого типа. На фиг. 23C показан вестерн-блоттинг белка дистрофина и альфа-актина в мышечной ткани через четыре недели после инъекции ASO или Ab-ASO. На фиг. 23D показан количественный анализ дистрофина при вестерн-блоттинге с фиг. 23C относительно белка дистрофина в мышце дикого типа. Стандартные кривые на фиг. 23A и 23C получали посредством объединения образцов ткани мышей дикого типа (WT) и *mdx*, и процентом WT указано количество белка WT, добавленного в каждый образец (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$).

[00048] На фиг. 24A-24D показано измерение белка дистрофина в мышце диафрагмы мышей *mdx* после введения однократной дозы неконъюгированного олигонуклеотида (ASO), индуцирующего пропуск экзона 23 в DMD, или конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 RI7 217, конъюгированный с ASO (Ab-ASO). На фиг. 24A показан вестерн-блоттинг белка дистрофина и альфа-актина в мышечной ткани через две недели после инъекции ASO или Ab-ASO. На фиг. 24B показан количественный анализ дистрофина при вестерн-блоттинге с фиг. 24A относительно белка дистрофина в мышце дикого типа. На фиг. 24C показан вестерн-блоттинг белка дистрофина и альфа-актина в мышечной ткани через четыре недели после инъекции ASO или Ab-ASO. На фиг. 24D показан количественный анализ дистрофина при вестерн-блоттинге с фиг. 24C относительно белка дистрофин в мышце дикого типа. Стандартные кривые на фиг. 24A и 24C получали

посредством объединения образцов ткани мышей дикого типа (WT) и *mdx*, и процентом WT указано количество белка WT, добавленного в каждый образец (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

[00049] На фиг. 25A-25C показан анализ количества вводимого олигонуклеотида (ASO) в четырехглавой мышце (фиг. 25A), диафрагме (фиг. 25B) и сердце (фиг. 25C) мышей дикого типа (WT) или *mdx* через две или четыре недели после введения однократной дозы физиологического раствора, неконъюгированного олигонуклеотида для пропуска экзона 23 (ASO), или конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 RI7217, конъюгированный с ASO (Ab-ASO).

[00050] На фиг. 26 показан % пропуска экзона 53 в клетках пациентов с DMD, несущих делецию экзона 52 DMD, после гимнотического захвата вызывающих пропуск экзонов 53 олигонуклеотидов в диапазоне концентраций.

[00051] На фиг. 27 показан % пропуск экзона 53 в клетках пациентов с DMD, несущих делецию экзона 52 DMD, после обработки вызывающим пропуск экзона 53 РМО, несвязанным с антителом ("голым" ASO) или ковалентно связанным с Fab против TfR1 ("комплекс Fab против TfR1-ASO") при различных концентрациях.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00052] Аспекты настоящего изобретения относятся к пониманию того, что, хотя некоторая молекулярная нагрузка (например, олигонуклеотиды, пептиды, низкомолекулярные соединения) может иметь положительный эффект в мышечных клетках, эффективное направленное воздействие на такие клетки оказалось затруднительным. Как представлено в настоящем описании, настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим мышечно-специфические средства, ковалентно связанные с молекулярной нагрузкой, для преодоления таких затруднений. В некоторых вариантах осуществления комплексы особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, модулирующей (например, стимулирующей) экспрессию или активность генов-мишеней в мышечных клетках, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего редкое мышечное заболевание. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к комплексам, нацеленным на DMD, например, мутантный аллель DMD. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, могут содержать олигонуклеотиды, способствующие нормальной экспрессии и активности DMD. В качестве другого примера, комплексы могут содержать олигонуклеотиды, индуцирующим пропуск экзона мРНК DMD. В некоторых вариантах осуществления можно использовать нагрузку синтетической нуклеиновой кислотой (например, нагрузку ДНК или РНК), экспрессирующей один или более белков, способствующих нормальной экспрессии и активности DMD.

[00053] В некоторых вариантах осуществления комплексы могут содержать молекулярную нагрузку синтетической кДНК и/или (например, и) синтетической мРНК, например, экспрессирующей дистрофин или его фрагменты (например, мини-ген дистрофина). В некоторых вариантах осуществления комплексы могут содержать молекулярную нагрузку, такую как гидовые молекулы (например, гидовую РНК),

способную к таргетингу программируемых нуклеиновыми кислотами нуклеаз (например, Cas9) к последовательности в ассоциированной с заболеванием мутации DMD или вблизи нее, например, в мутантном экзоне DMD. В некоторых вариантах осуществления такие программируемые нуклеиновыми кислотами нуклеазы можно использовать для расщепления части или всей ассоциированной с заболеванием мутации DMD, например, мутантного экзона DMD, для стимуляции экспрессии функционального DMD. В некоторых вариантах осуществления комплексы могут содержать молекулярную нагрузку положительно регулируемую экспрессию и/или (например, и) активность генов, которые могут заместить функцию дистрофина, таких как утрофин.

[00054] Дополнительные аспекты изобретения, включая описание определенных терминов, приведены ниже.

I. Определения

[00055] **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).

[00056] **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).

[00057] **Антитело:** В рамках изобретения термин "антитело" относится к полипептиду, включающему по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина или по меньшей мере одну антигенную детерминанту, например, паратоп, специфически связывающийся с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело является полноразмерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным антителом. Однако в некоторых вариантах осуществления антитело является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')₂-фрагментом, Fv-фрагментом или scFv-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело является нанотелом, полученным из антитела Верблюдовых, или нанотелом, полученным из антитела акулы. В некоторых вариантах осуществления антитело является диателом. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит каркас, имеющий последовательность зародышевой линии человека. В другом варианте осуществления антитело содержит константный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из константных доменов IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM и IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (H) (сокращенно

обозначаемую в настоящем описании как VH), и/или (например, и) переменную область легкой цепи (L) (сокращенно обозначающую в настоящем описании как VL). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен, например, Fc-область. Термин "константный домен иммуноглобулина" относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Известны аминокислотные последовательности константного домена тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека и их функциональные варианты. Что касается тяжелой цепи, в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, представленная в настоящем описании, может являться тяжелой цепью альфа (α), дельта (Δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, представленная в настоящем описании, может включать тяжелую цепь альфа (α), дельта (Δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) или мю (μ) человека. В конкретном варианте осуществления антитело, представленное в настоящем описании, содержит домен CH1, CH2 и/или (например, и) CH3 гамма 1 человека. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) человека, такую как любая известная в этой области. Неограничивающие примеры последовательностей константной области человека описаны в этой области, например, см. патент США № 5693780 и Kabat E A et al., (1991) выше. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или по меньшей мере 99% идентичной любой из константных областей 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).

[00058] **CDR:** В рамках изобретения термин "CDR" относится к определяющей комплементарности области в переменных последовательностях антитела. Типичная молекула антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), как правило, участвующие в связывании антигена. Области VH и VL можно дополнительно разделять на области гипервариабельности, также известный как "определяющие комплементарности области" ("CDR"), чередующиеся с областями, являющимися более консервативными, известными как "каркасные области" ("FR"). Каждая VH и VL, как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Протяженность каркасной области и CDR можно точно определять известными в этой области способами, например, посредством определения Kabat, определения IMGT, определения Chothia, определения AbM и/или (например, и) определения по системе Contact, все из которых хорошо известны в этой области. См., например, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; IMGT®, The International ImMunoGeneTics Information System® <http://www.imgt.org>, Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999); Ruiz, M. et al., *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); Lefranc, M.-P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); Lefranc, M.-P., *Nucleic Acids Res.*, 31:307-310 (2003); Lefranc, M.-P. et al., *In Silico Biol.*, 5, 0006 (2004) [Epub], 5:45-60 (2005); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 33:D593-597 (2005); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 37:D1006-1012 (2009); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 43:D413-422 (2015); Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948; и Almagro, *J. Mol. Recognit.* 17:132-143 (2004). Также см. hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs. В рамках изобретения термин "CDR" может относиться к CDR, определенной любым известным в этой области способом. Два антитела, имеющие одинаковую CDR, означают, что два антитела имеют одинаковую аминокислотную последовательность этой CDR, определяемую одним и тем же способом, например, посредством определения IMGT.

[00059] 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

	IMGT ¹	Kabat ²	Chothia ³
CDR-H1	27-38	31-35	26-32
CDR-H2	56-65	50-65	53-55
CDR-H3	105-116/117	95-102	96-101
CDR-L1	27-38	24-34	26-32
CDR-L2	56-65	50-56	50-52
CDR-L3	105-116/117	89-97	91-96

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

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

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

[00060] **Антитело с пересаженным CDR:** Термин "антитело с пересаженным CDR" относится к антителам, содержащим последовательности переменной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида, но в которых последовательности одной или более из областей CDR VH и/или (например, и) VL заменяются последовательностями CDR другого биологического вида, таким как антитела, имеющие переменные области тяжелой

и легкой цепей мыши, в которых одну или более CDR мыши (например, CDR3) заменяют последовательностями CDR человека.

[00061] **Химерное антитело:** Термин "химерное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида и последовательности константной области другого биологического вида, таким как антитела, имеющие варибельные области тяжелой и легкой цепи мыши, соединенные с константными областями человека.

[00062] **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.

[00063] **Консервативная аминокислотная замена:** В рамках изобретения термин "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислоты, не изменяющей относительные характеристики заряда или размера белка, в котором сделана замена аминокислоты. Варианты можно получать способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в этой области, такими как обнаруживаемые в источниках, в которых скомпилированы такие способы, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012, или *Current Protocols in Molecular biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, сделанные среди аминокислот в следующих группах: (a) М, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

[00064] **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.

[00065] **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.

[00066] **DMD:** В рамках изобретения термин "DMD" относится к гену, кодирующему белок дистрофин, ключевой компонент дистрофин-гликопротеинового комплекса, соединяющего мостиком внутренний цитоскелет и внеклеточный матрикс в мышечных клетках, в частности, мышечные волокна. Делеции, дубликации и точечные мутации в DMD могут вызывать дистрофинопатии, такие как мышечная дистрофия Дюшенна, мышечная дистрофия Беккера или кардиомиопатия (например, DMD-ассоциированная дилатационная кардиомиопатия). Альтернативное использование промотора и альтернативный сплайсинг приводят к многочисленным отличающимся вариантам транскриптов и изоформам белка для этого гена. В некоторых вариантах осуществления ген дистрофина может являться геном человека (Gene ID: 1756), не являющегося человеком примата (например, Gene ID: 465559) или грызуна (например, Gene ID: 13405; Gene ID: 24907). Кроме того, охарактеризовано множество вариантов транскрипта человека (например, аннотированных в GenBank RefSeq под регистрационными номерами: NM_000109.3, NM_004006.2 (SEQ ID NO: 2239), NM_004009.3, NM_004010.3 и NM_004011.3), кодирующих разные изоформы белка.

[00067] **Аллель DMD:** В рамках изобретения, термин "аллель DMD" относится к любой из альтернативных форм (например, формам дикого типа или мутантным формам)

гена DMD. В некоторых вариантах осуществления аллель DMD может кодировать дистрофин, сохраняющий свои нормальные и типичные функции. В некоторых вариантах осуществления аллель DMD может содержать одну или более мутаций, приводящих к мышечной дистрофии. Распространенные мутации, приводящие к мышечной дистрофии Дюшенна, включают мутации со сдвигом рамки считывания, делеции, замены и дубликации одного или более из 79 экзонов, присутствующих в аллеле дистрофина, например, экзоне 8, экзоне 23, экзоне 41, экзоне 44, экзоне 50, экзоне 51, экзоне 52, экзоне 53 или экзоне 55. Описаны дополнительные примеры мутаций DMD, например, в Flanigan KM, et al., *Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort*. Hum Mutat. 2009 Dec; 30 (12):1657-66, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[00068] **Дистрофинопатия:** В рамках изобретения, термин "дистрофинопатия" относится к мышечному заболеванию, являющемуся результатом одного или более мутантных аллелей DMD. Дистрофинопатии включают спектр состояний (в диапазоне от слабых до тяжелых), включающий мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера и DMD-ассоциированную дилатационную кардиомиопатию (DCM). В некоторых вариантах осуществления, на одном конце спектра, дистрофинопатия фенотипически ассоциирована с бессимптомным повышением концентрации креатинфосфокиназы (СК) в сыворотке и/или (например, и) мышечными спазмами с миоглобинурией. В некоторых вариантах осуществления, на другом конце спектра, дистрофинопатия фенотипически ассоциирована с прогрессирующими мышечными заболеваниями, как правило, классифицируемыми как мышечная дистрофия Дюшенна или мышечная дистрофия Беккера, если поражены, главным образом, скелетные мышцы, и как DMD-ассоциированная дилатационная кардиомиопатия (DCM), если поражены, главным образом, сердце. Симптомы мышечной дистрофии Дюшенна включают потерю мышц или дегенерацию, снижение функции мышц, псевдогипертрофию языка и икроножных мышц, более высокий риск неврологических отклонений и сниженную продолжительность жизни. Мышечная дистрофия Дюшенна приведена в базе данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) как запись № 310200. Мышечная дистрофия Беккера приведена в базе данных OMIM как запись № 300376. Дилатационная кардиомиопатия приведена в базе данных OMIM запись № 302045.

[00069] **Экзонный энхансер сплайсинга (ESE):** В рамках изобретения термин "экзонный энхансер сплайсинга" или "ESE" относится к мотиву последовательности нуклеиновой кислоты в экзоне гена, пре-мРНК или мРНК, направляющему или усиливающему сплайсинг пре-мРНК в мРНК, например, как описано в Blencowe et al., Trends Biochem Sci 25, 106-10. (2000), включенной в настоящее описание посредством ссылки. ESE могут направлять или усиливать сплайсинг, например, для удаления одного или более интронов и/или одного или более экзонов из транскрипта генов. Мотивы ESE, как правило, имеют длину 6-8 нуклеиновых оснований. Белки SR (например, белки, кодируемые геном SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF8, SRSF9,

SRSF10, SRSF11, SRSF12, TRA2A или TRA2B) связываются с ESE через область мотива распознавания РНК для облегчения сплайсинга. Мотивы ESE можно идентифицировать рядом способов, включая описанные в Cartegni et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, Vol. 31, No. 13, 3568-3571, включенной в настоящее описание посредством ссылки.

[00070] **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.

[00071] **Антитело человека:** В рамках изобретения термин "антитело человека" предназначен для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, неcodируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, встраиваемые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако, в рамках изобретения термин "антитело человека" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, пересаживают на каркасные последовательности человека.

[00072] **Гуманизованное антитело:** Термин "гуманизованное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи не являющихся человеком видов (например, мыши), но в которых по меньшей мере часть последовательности VH и/или (например, и) VL изменена в направлении более "человекоподобной", т.е. более похожей на последовательности вариабельной области зародышевой линии человека. Одним из типов 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 гуманизированным антителам против рецептора трансферрина и их антигенсвязывающим частям. Такие антитела можно получать посредством получения моноклональных антител мыши против рецептора трансферрина с использованием общепринятой гибридомной технологии с последующей гуманизацией с использованием генетической инженерии *in vitro*, например, как описано в публикации РСТ № WO 2005/123126 A2 Kasaian et al.

[00073] **Интернализирующийся рецептор поверхности клетки:** В рамках изобретения термин "интернализующийся рецептор поверхности клетки" относится к рецептору поверхности клетки, интернализуемому клетками, например, после внешней стимуляции, например, связывания лиганда с рецептором. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза. Однако, в некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством клатрин-независимого пути, такого как, например, фагоцитоз, макропиноцитоз, кавеола- и рафт-опосредованный захват или конститутивный клатрин-независимый эндоцитоз. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор поверхности клетки содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен, и/или (например, и) внеклеточный домен, который, необязательно, дополнительно может содержать лиганд-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления рецептор поверхности клетки интернализуется клеткой после связывания лиганда. В некоторых вариантах осуществления лиганд может являться мышечно-специфическим средством или мышечно-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор поверхности клетки является рецептором трансферрина.

[00074] **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.

[00075] **Нумерация по Kabat:** Термины "нумерация по Kabat", "определения по Kabat" и "мечение по Kabat" в настоящем описании используют взаимозаменяемо. Эти термины, известные в этой области, относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, являющихся более переменными (т.е. гиперпеременными), чем другие аминокислотные остатки в переменных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его

антигенсвязывающей части (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 и, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). В случае вариабельной области тяжелой цепи гипервариабельная область занимает положения аминокислот 31-35 в случае CDR1, положения аминокислот 50-65 в случае CDR2 и положения аминокислот 95-102 в случае CDR3. В случае вариабельной области легкой цепи гипервариабельная область занимает положения аминокислот 24-34 в случае CDR1, положения аминокислот 50-56 в случае CDR2 и положения аминокислот 89-97 в случае CDR3.

[00076] **Молекулярная нагрузка:** В рамках изобретения термин "молекулярная нагрузка" относится к молекуле, функционирующей, модулируя биологический исход. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка связана или иначе ассоциирована с мышечно-специфическим средством. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является низкомолекулярным соединением, белком, пептидом, нуклеиновой кислотой или олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка функционирует, модулируя транскрипцию последовательности ДНК, модулируя экспрессию белка или модулируя активность белка. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим цепь, имеющую область комплементарности гену-мишени.

[00077] **Мышечно-специфическое средство:** В рамках изобретения термин "мышечно-специфическое средство" относится к молекуле, специфически связывающейся с антигеном, экспрессирующимся на мышечных клетках. Антиген в мышечных клетках или на них может являться мембранным белком, например, интегральным мембранным белком или периферическим мембранным белком. Как правило, мышечно-специфическое средство специфически связывается с антигеном на мышечных клетках, облегчающим интернализацию мышечно-специфического средства (и любой ассоциированной молекулярной нагрузкой) в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором поверхности клетки на мышцах и может интернализироваться в мышечные клетки через рецептор-опосредованную интернализацию. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является низкомолекулярным соединением, белком, пептидом, нуклеиновой кислотой (например, аптамером) или антителом. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство связано с молекулярной нагрузкой.

[00078] **Мышечно-специфическое антитело:** В рамках изобретения термин "мышечно-специфическое антитело" относится к мышечно-специфическому средству, являющемуся антителом, специфически связывающимся с антигеном, обнаруживаемым в мышечных клетках или на них. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело специфически связывается с антигеном на мышечных клетках, облегчающим интернализацию мышечно-специфического антитела (и любой ассоциированной молекулярной нагрузки) в мышечные клетки. В некоторых вариантах

осуществления мышечно-специфическое антитело специфически связывается с интернализирующимся рецептором поверхности клетки, присутствующим на мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с рецептором трансферрина.

[00079] **Олигонуклеотид:** В рамках изобретения термин "олигонуклеотид" относится к олигомерному соединению нуклеиновой кислотой длиной до 200 нуклеотидов. Неограничивающие примеры олигонуклеотидов включают олигонуклеотиды РНКи (например, миРНК, shRNA), микроРНК, гэпмеры, миксмеры, фосфородиамидатные морфолиносоединения, пептид-нуклеиновые кислоты, аптамеры, гидовые нуклеиновые кислоты (например, гидовую РНК Cas9) и т.д. Олигонуклеотиды могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать один или более модифицированных нуклеотидов (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.

[00080] **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 РСТ № WO 2005/007699 A2 Jermutus et al.

[00081] **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.

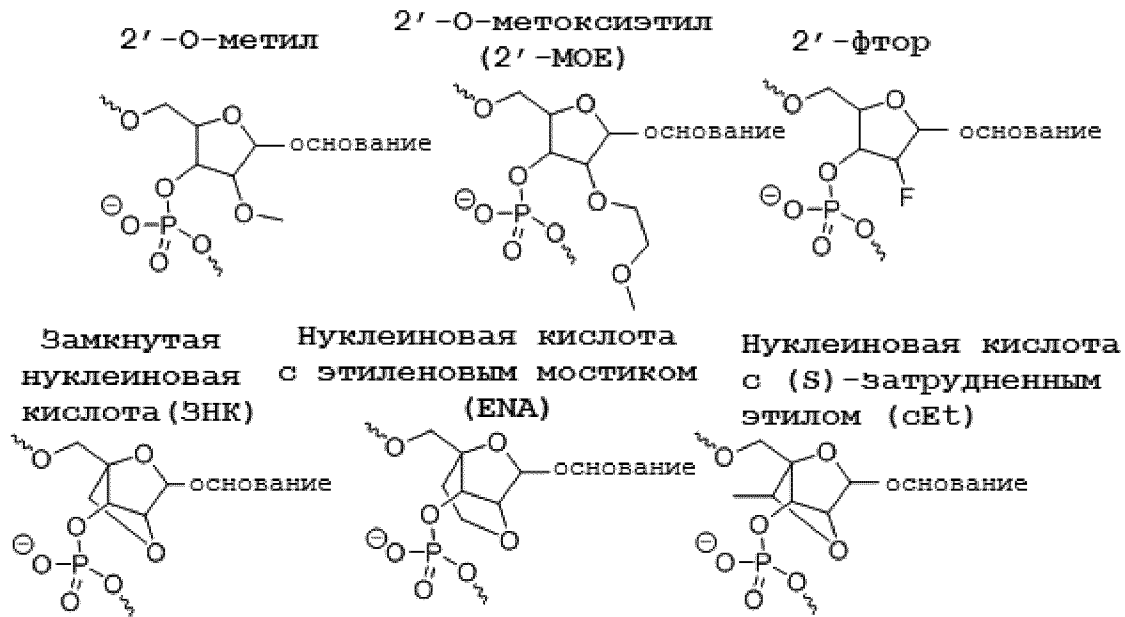
[00082] **Специфически связывается:** В рамках изобретения термин "специфически связывается" относится к способности молекулы связываться с партнером по связыванию со степенью аффинности или авидности, позволяющей использовать молекулу для различения партнера по связыванию и соответствующего контроля в анализе связывания или другом контексте связывания. В отношении антитела термин "специфически связывается" относится к способности антитела связываться со специфическим антигеном со степенью аффинности или авидности по сравнению с соответствующим референсным антигеном или антигенами, что позволяет использовать антитело для различения специфического антигена от других, например, в степени, делающей возможной преференциальный таргетинг к некоторым клеткам, например, мышечным клеткам, через связывание с антигеном, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с мишенью, если антитело имеет K_D для связывания мишени по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с рецептором трансферрина, например, эпитопом апикального домена рецептора трансферрина.

[00083] **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 мутантной последовательности гена DMD, например, мутации в экзоне последовательности гена DMD. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является дистрофинопатией, например, мышечной дистрофией Дюшенна.

[00084] **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).

[00085] **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 небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом, например, где 2'-положение остатка сахара является замещенным. Неограничивающие примеры 2'-модифицированных нуклеозидов включают: 2'-дезокси-, 2'-фтор- (2'-F), 2'-О-метил- (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил- (2'-MOE), 2'-О-аминопропил- (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил- (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил- (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил- (2'-O-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидонуклеозид (2'-O-NMA), замкнутую нуклеиновую кислоту (ЗНК, нуклеиновую кислоту с метиленовым мостиком), нуклеиновую кислоту с этиленовым мостиком (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. Комплексы

[00086] Настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим направляющее средство, например антитело, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит мышечно-специфическое антитело, ковалентно связанное с олигонуклеотидом. Комплекс может содержать антитело, специфически связывающееся с одним участком антигена, или связывающимся с по меньшей мере двумя участками антигена, которые могут существовать на одном или разных антигенах.

[00087] Комплекс можно использовать для модуляции активности или функции по меньшей мере одного гена, белка и/или (например, и) нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка, находящаяся в комплексе, отвечает за модуляцию гена, белка и/или (например, и) нуклеиновых кислот. Молекулярная нагрузка может являться низкомолекулярным соединением, белком, нуклеиновой кислотой, олигонуклеотидом или любой молекулой, способной модулировать активность или функцию гена, белка и/или (например, и) нуклеиновой кислоты в клетке. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, нацеленным на ассоциированный с заболеванием повтор в мышечных клетках.

[00088] В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит мышечно-специфическое средство, например, антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, например, миксмерным антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на мутантный аллель DMD для стимуляции пропуска экзонов.

A. Мышечно-специфические средства

[00089] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим средствам, например, для доставки молекулярной нагрузки в мышечную клетку. В некоторых вариантах осуществления такие мышечно-специфические средства могут связываться с мышечной клеткой, например, посредством специфического

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

[00090] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим средствам, специфически связывающимся с антигеном на мышце, такой как скелетная мышца, гладкая мышца или сердечная мышца. В некоторых вариантах осуществления любые из мышечно-специфических средств, представленных в настоящем описании, связываются (например, специфически связываются) с антигеном на скелетно-мышечной клетке, гладкомышечной клетке и/или (например, и) кардиомиоците.

[00091] С помощью взаимодействия с мышечно-специфическими элементами распознавания поверхности клетки (например, белками клеточной мембраны) можно достигать тканевой локализации и селективного захвата мышечными клетками. В некоторых вариантах осуществления молекулы, являющиеся субстратами для транспортеров мышечного захвата, можно использовать для доставки молекулярной нагрузки в мышечную ткань. Связывание с элементами распознавания поверхности мышечной клетки с последующим эндоцитозом может позволять даже крупным молекулам, таким как антитела, проникать в мышечные клетки. В качестве другого примера, молекулярная нагрузка, конъюгированная с трансферрином или антителами против рецептора трансферрина, может захватываться мышечными клетками посредством связывания с рецептором трансферрина, который затем может подвергаться эндоцитозу, например, посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза.

[00092] Мышечно-специфические средства можно использовать для концентрирования молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотида) в мышце при снижении токсичности, ассоциированной с эффектами в других тканях. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство концентрирует связанную молекулярную нагрузку в мышечных клетках по сравнению с другим типом клеток в организме индивидуума. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство концентрирует связанную молекулярную нагрузку в мышечных клетках (например, скелетно-мышечных клетках, гладкомышечных клетках или кардиомиоцитах) в количестве, составляющем по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше, чем количество в неммышечных клетках (например, клетках

печени, нервных клетках, клетках крови или жировых клетках). В некоторых вариантах осуществления токсичность молекулярной нагрузки у индивидуума снижают по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95% при введении индивидууму в связанном с мышечно-специфическим средством виде.

[00093] В некоторых вариантах осуществления для достижения селективности в отношении мышечных клеток может потребоваться мышечный элемент распознавания (например, антиген мышечной клетки). В качестве одного из примеров, мышечно-специфическое средство может являться низкомолекулярным соединением, являющимся субстратом для транспортера мышечно-специфического захвата. В качестве другого примера, мышечно-специфическое средство может являться антителом, проникающим в мышечную клетку посредством транспортер-опосредованного эндоцитоза. В качестве другого примера, мышечно-специфическое средство может являться лигандом, связывающимся с рецептором поверхности клетки на мышечной клетке. Следует понимать, что, хотя подходы на основе транспортеров представляют собой прямой путь проникновения в клетку, таргетинг на основе рецепторов может включать стимулированный эндоцитоз для достижения желаемого места действия.

i. Мышечно-специфические антитела

[00094] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом. Как правило, высокая специфичность антител к их антигену-мишени обеспечивает потенциал селективного таргетинга мышечных клеток (например, скелетно-мышечных клеток, гладкомышечных клеток и/или (например, и) кардиомиоцитов). Эта специфичность также может ограничивать нецелевую токсичность. Примеры антител, способных к таргетингу поверхностного антигена мышечных клеток, описаны и входят в объем настоящего изобретения. Например, антитела, нацеленные на поверхность мышечных клеток, описаны в Arahata K., et al. "Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide" *Nature* 1988; 333: 861-3; Song K.S., et al. "Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins" *J Biol Chem* 1996; 271: 15160-5; и Weisbart R.H. et al., "Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of monoclonal antibody that binds myosin IIb" *Mol Immunol.* 2003 Mar, 39(13):78309; полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

a. Антитела против рецептора трансферрина

[00095] Некоторые аспекты настоящего изобретения основаны на понимании того, что средства, связывающиеся с рецептором трансферрина, например, антитела против рецептора трансферрина, способны к таргетингу мышечных клеток. Рецепторы трансферрина являются интернализирующимися рецепторами поверхности клетки, транспортирующими трансферрин через клеточную мембрану и участвующими в регуляции и гомеостазе внутриклеточных уровней железа. Некоторые аспекты настоящего

изобретения относятся к белками, связывающимися с рецептором трансферрина, способными связываться с рецептором трансферрина. Таким образом, аспекты настоящего изобретения относятся к связывающим белкам (например, антителам), связывающимся с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки, связывающиеся с рецептором трансферрина, интернализуются вместе с любой связанной молекулярной нагрузкой в мышечную клетку. В рамках изобретения антитело, связывающееся с рецептором трансферрина, можно взаимозаменяемо обозначать как антитело против рецептора трансферрина или антитело против TfR. Антитела, связывающиеся, например, специфически связывающиеся, с рецептором трансферрина, могут интернализироваться в клетку, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, после связывания с рецептором трансферрина.

[00096] Следует понимать, что антитела против рецептора трансферрина можно получать, синтезировать и/или (например, и) дериватизировать с использованием нескольких известных способов, например, дизайна библиотек с использованием фагового дисплея. Примеры способов охарактеризованы в этой области и включены посредством ссылок (Díez, P. et al. "High-throughput phage-display screening in array format", *Enzyme and microbial technology*, 2015, 79, 34-41.; Christoph M. H. and Stanley, J.R. "Antibody Phage Display: Technique and Applications" *J Invest Dermatol.* 2014, 134:2.; Engleman, Edgar (Ed.) "Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies". 1985, Springer). В других вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина охарактеризовано или описано ранее. В этой области известны антитела, специфически связывающиеся с рецептором трансферрина (см., например, патент США № 4364934, поданный 12/4/1979, "Monoclonal antibody to human early thymocyte antigen and methods for preparing same"; патент США № 8409573, поданный 6/14/2006, "Anti-CD71 monoclonal antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells"; патент США № 9708406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"; патент США № 9611323, поданный 12/19/2014, "Low affinity blood brain barrier receptor antibodies and uses therefor"; WO 2015/098989, поданный 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier"; Schneider C. et al. "Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9" *J Biol Chem.* 1982, 257:14, 8516-8522.; Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse", 2000, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 292: 1048-1052).

[00097] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к новым антителам против TfR для применения в качестве мышечно-специфических средств (например, в мышечно-специфических комплексах). В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с рецептором трансферрина с высокой специфичностью и аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, специфически связывается с любым внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина или эпитопом, становящимся экспонированным для антитела. В некоторых вариантах осуществления

антитела против TfR, представленные в настоящем описании, специфически связываются с рецептором трансферрина человека, не являющихся человеком приматов, мыши, крысы и т.д. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с аминокислотным сегментом рецептора трансферрина человека или не являющегося человеком примата, приведенным в SEQ ID NO: 105-108. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с аминокислотным сегментом, соответствующим аминокислотам 90-96 рецептора трансферрина человека, приведенным в SEQ ID NO: 105, не являющимся апикальным доменом рецептора трансферрина.

[00098] 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
 DFPAARRLYWDDLKRK LSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 NAELSSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGD
 CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLT VSNVLKEIKILNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQRDA
 WGPAAKSGVGTALLKLAQMFSDMVLKDG FQPSRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEG
 YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNW
 ASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR
 AA AEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSAR
 GDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMK KLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWS
 GSHTLPALLENLKL RKQNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 105).

[00099] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI NP_001244232.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca mulatta*) является следующим:

MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLG VDEEENTDNNTK
 PNGTKPKRCGGNICYGTIAV IIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRK LSEKLDTTDFSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLT VSNVLKETKILNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPAAKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDG FQPSRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN

WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPRHFVFW
 GSGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 106)

[000100] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI XP_005545315.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca fascicularis*) является следующим:

MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLGVD E EENTDNNTK
 ANGTKPKRCGGNICYGTIAV I IFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLS EKLDTTDF TSTIKLLNENLYVPREAGS QKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQH FVKIQVKDS AQNSV I IVDKNGGLVYLVENPGGYVA YSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDL DSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFP PSQSSGLPNIPVQTISR AAAEKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLT VSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPGA AKSSVGTALLKLA QMFSDMVLK DGFQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKV SASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPRHFVFW
 GSGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 107).

[000101] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина мыши, соответствующей последовательности NCBI NP_001344227.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Mus musculus*) является следующим:

MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA ADEEENADNNM
 KASVRKPKRFNGRLCFAAIALV IFFLIGFMSGYLG YCKRVEQKEECVKLAETEETDKSET
 METEDVPTSSRLYWADLK TLLSEKLN SIEFADTIKQLSQNTYTPREAGS QKDESLAYYIE
 NQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVS
 GKL V HANFGTKKDFEELSY SVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKF
 PVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFP PSQSSGLPNIPVQTISR AAAEKLF GK
 MEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQN VKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGA
 QRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFS DMISKDGF RPSRSIIFASWTAGDFGAVGATE
 WLEGYLSSLHLKAFTYINLDK VVLGTSNFKV SASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLY
 RDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQ
 LNQMVRTAAEVAGQLIKLTHDVELNLDYEMYSKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQ
 WLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNR FVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPRHI
 FWGSGSHTLSALVENLKL RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNE
 F (SEQ ID NO: 108)

[000102] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина связывается со следующим аминокислотным сегментом рецептора: FVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFE DLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSSFFGHAHLG TGDPTYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCR MVTSESKNVKLTVSNVLKE (SEQ ID NO: 109) и не ингибирует связывающие взаимодействия между рецептором трансферрина и трансферрином и/или (например, и) белок гемохроматоза человека (также известный как HFE). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, не связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 109.

[000103] Для получения антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих средств можно использовать соответствующие способы, например, способы рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления антитело также можно получать, получая гибридомы (см., например, Kohler, G and Milstein, C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" Nature, 1975, 256: 495-497). Интересующий антиген можно использовать в качестве иммуногена в любой форме, например, рекомбинантной или природной форме. Гибридомы подвергают скринингу стандартными способами, например, скринингу посредством ELISA, для обнаружения по меньшей мере одной гибридомы, продуцирующей антитело, нацеленное на конкретный антиген. Антитела также можно получать посредством скрининга экспрессирующих библиотек белков, экспрессирующих антитела, например, библиотеки фагового дисплея. В некоторых вариантах осуществления дисплея также можно использовать дизайн библиотек фагового, (см., например, патент США № 5223409, поданный 3/1/1991, "Directed evolution of novel binding proteins"; WO 1992/18619, поданный 4/10/1992, "Heterodimeric receptor libraries using phagemids"; WO 1991/17271, поданный 5/1/1991, "Recombinant library screening methods"; WO 1992/20791, поданный 5/15/1992, "Methods for producing members of specific binding pairs"; WO 1992/15679, поданный 2/28/1992, и "Improved epitope displaying phage"). В некоторых вариантах осуществления интересующий антиген можно использовать для иммунизации не принадлежащего человеку животного, например, грызуна или козы. В некоторых вариантах осуществления затем антитело получают из не принадлежащего человеку животного, и его, необязательно, можно модифицировать с использованием ряда способов, например, способов рекомбинантной ДНК. В этой области известны дополнительные примеры получения антител и способов (см., например, Harlow et al. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

[000104] 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*".

[000105] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR по настоящему изобретению содержит домен VL и/или (например, и) домен VH любого из антител против TfR, выбранных из таблицы 2, и содержит константную область, содержащую аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b). Неограничивающие примеры константных областей человека описаны в этой области, например, см. Kabat E A et al., (1991), выше.

[000106] В некоторых вариантах осуществления средства, связывающие с рецептором трансферрина, например, антитела против TfR, способны к таргетингу мышечной клетки и/или (например, и) опосредуют транспорт средства через гематоэнцефалитический барьер. Рецепторы трансферрина являются интернализирующимися рецепторами поверхности клетки, транспортирующими трансферрин через клеточную мембрану и участвующие в регуляции и гомеостазе внутриклеточных уровней железа. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к белкам, связывающим рецептор трансферрина, способным связываться с рецептором трансферрина. Антитела, связывающиеся, например, специфически связывающиеся, с рецептором трансферрина, могут интернализироваться в клетку, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, после связывания с рецептором трансферрина.

[000107] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, связывающимся с рецептором трансферрина с высокой специфичностью и аффинностью. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, специфически связывается с любым внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина или эпитопом, становящимся экспонированным для антитела. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR, представленные в настоящем описании, специфически связываются с рецептором трансферрина человека, не являющихся человеком приматов, мыши, крысы и т.д. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR представленные в настоящем описании, связываются с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с аминокислотным сегментом рецептора трансферрина человека или не являющегося человеком примата, приведенного в SEQ ID NO: 105-108. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, связывается с аминокислотным сегментом, соответствующим аминокислотам 90-96 рецептора трансферрина человека, приведенного в SEQ ID NO: 105, 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.

[000108] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR специфически связывается с TfR1 (например, TfR1 человека или не являющегося человеком примата) с аффинностью связывания (например, на что указывает K_d) по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с TfR1 с KD в субнанолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, селективно связываются с рецептором трансферрина 1 (TfR1), но не связываются с рецептором трансферрина 2 (TfR2). В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR, представленные в настоящем описании, связываются с TfR1 человека и TfR1 яванского макака (например, с K_d 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее), но не связываются с TfR1 мыши. Аффинность и кинетику связывания антитела против TfR можно тестировать любым подходящим способом, включая, в качестве неограничивающих примеров, биосенсорную технологию (например, OSETT 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.

[000109] 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 против TfR мыши

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 EYASKFQD (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)	RSSKSLLSHNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRP EQGLEWIGWIDPENGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQL SSLTSED TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSI SCRSSKSLLSHNGYTYLFWFLQ RPGQSPQLLIYRMSNLASGV PDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED VGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (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)	WIDPETGDTEYASKFQD (SEQ ID NO: 20)	ETG (SEQ ID NO: 21)

	CDR-H3	TLWLRRGLD Y (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLHLSNGY TY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLHLSNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLHLSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS(SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRP EQGLEWIGWIDPETGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQL SSLTSEDVAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 22)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISSKSLHLSNGYTYLFWFLQ RPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED VGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (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	TLWLRRGLD Y (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLHLSNGY TY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLHLSNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLHLSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)

	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRP EQGLEWIGWIDPESGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQL SSLTSEDTAVYYCTLWLRRLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 26)		
	VL	DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLSNGYTYLFWFLQ RPGQSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED VGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (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)	YITFDGANNYNPSLKN (SEQ ID NO: 34)	FDG (SEQ ID NO: 39)
	CDR-H3	TRSSYDYDV LDY (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	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYITFDGANNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSV TTEDTATYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 43)		
	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWWYQQRPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTVSNLEQEDIATYF CQQGHTLPYTFGGGTKLEIK (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)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYH GMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNS F (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	QIQLQQSGPELVVPGASVKISCKASGYSFTDYCNWVNQRPGQ GLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSS LTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 61)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADV ATYYCQQSSEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33Y*	CDR-H1	GYSFTDY (SEQ ID NO: 63)	DYYN (SEQ ID NO: 64)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYH GMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)

	CDR-L1	ESVDGYDNS F (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	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYINWVNQRPGQ GLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSS LTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 65)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADV ATYYCQQSSEDPWTFGGGTKLEIK (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)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYH GMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNS F (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	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYDINWVNQRPGQ GLEWIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSS		

		LTSEDSAVYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 68)
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQ KPGQPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADV ATYYCQQSSEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)

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

[000110] 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 переменную область тяжелой цепи и/или (например, и) гуманизованную переменную область легкой цепи.

[000111] Гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентным антителом), в котором остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменяют остатками из CDR не являющихся человеком видов (донорного антитела), таких как мышь, крыса или кролик, имеющими желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых вариантах осуществления остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, 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 переменных доменов, в которых все или по существу все из областей CDR соответствуют CDR из не принадлежащего человеку иммуноглобулина, и все или по существу все из областей FR являются областями из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. В оптимальном варианте гуманизованное антитело также будет содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Антитела могут иметь Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененные относительно исходного антитела, которые также обозначают как одну или более CDR, полученных из одной или более CDR из исходного антитела. Гуманизированные антитела также могут включать созревание аффинности.

[000112] Известны гуманизированные антитела и способы их получения, например, как описано в Almagro et al., Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); патенты

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

[000113] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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) гуманизованную VL, содержащую одно или более изменений аминокислот (например, в каркасной области VL) по сравнению с любой из VL, приведенных в таблице 2.

[000114] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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 любых 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), гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную 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).

[000115] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH любых 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 любых из антител против TfR, приведенных в таблице 2 (например, любой из SEQ ID NO: 18, 44 и 62).

[000116] 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 содержащий 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.

[000117] 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 являющуюся на по меньшей мере 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в любой из SEQ ID NO: 18.

[000118] 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.

[000119] 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 являющуюся на по меньшей мере 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в любой из SEQ ID NO: 18.

[000120] 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.

[000121] 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в любой из SEQ ID NO: 18.

[000122] 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 содержащий 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.

[000123] 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 являющуюся на по меньшей мере 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000124] 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.

[000125] 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 являющуюся на по меньшей мере 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000126] 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.

[000127] 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 являющуюся на по меньшей мере 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 44.

[000128] 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.

[000129] 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 являющуюся на по меньшей мере 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000130] 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.

[000131] 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 являющуюся на по меньшей мере 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000132] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую CDR-H1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 (по системе определения Chothia), CDR-H2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 (по системе определения Chothia), CDR-H3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 (по системе определения Chothia), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 68. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизованное антитело против Tfr по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (по системе определения Chothia),

CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (по системе определения Chothia), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (по системе определения Chothia), и содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000133] 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 являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VH, приведенной в SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 68. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VL, содержащую CDR-L1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59 (по системе определения Chothia), CDR-L2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49 (по системе определения Chothia), и CDR-L3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60 (по системе определения Chothia), и являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной в каркасных областях VL, приведенной в SEQ ID NO: 62.

[000134] Примеры аминокислотных последовательностей гуманизованных антител против TfR, представленных в настоящем описании, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Вариабельные области гуманизованных антител против TfR

Антитело	Аминокислотная последовательность вариабельной области**
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	V _H : EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL EWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED AVYYCTLWLRRGLDYWGQGLTVVSS (SEQ ID NO: 69)
	V _L : DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3A4 VH3 (N54S*)/Vk4	V _H : EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL EWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED AVYYCTLWLRRGLDYWGQGLTVVSS (SEQ ID NO: 71)

	<p>VL: DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)</p>
3A4 VH3/Vκ4	<p>VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL EWIGWIDPENGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDT AVYYCTLWLRRGLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 72)</p> <p>VL: DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)</p>
3M12 VH3/Vκ2	<p>VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT YYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)</p> <p>VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWYQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLP YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)</p>
3M12 VH3/Vκ3	<p>VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT YYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)</p> <p>VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWYQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLP YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)</p>
3M12 VH4/Vκ2	<p>VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY YCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)</p> <p>VL:</p>

	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWXQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLP YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)</p>
3M12 VH4/Vκ3	<p>VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY YCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)</p> <p>VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWXQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLP YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	<p>VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)</p> <p>VL: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQ PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ SSEDPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 78)</p>
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	<p>VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYDINWVRQAPGQGL EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 79)</p> <p>VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QSSSEDPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 80)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	<p>VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)</p> <p>VL:</p>

	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QSSSEDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 80)
--	--

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

***CDR, соответствующие системе нумерации Kabat, выделены полужирным шрифтом*

[000135] 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.

[000136] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 69, и/или (например, и), гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 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.

[000137] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит гуманизованную VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 71, и/или (например, и), гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 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: 71, и гуманизованную VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[000146] 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
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

[000147] 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
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

[000148] 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:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDESTYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 83)

[000149] Другие константные области хорошо тяжелой и легкой цепи антитела известны в этой области, например, представленные в базе данных IMGT (www.imgt.org) или на www.vbase2.org/vbstat.php, включенных в настоящее описание посредством ссылки.

[000150] 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 ее 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 ее 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 ее 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, или любые ее варианты и константную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 82.

[000151] 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 ее 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 ее 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 ее варианты и константную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 83.

[000152] 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**
----------	---

<p>3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRGLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM</u> <u>QHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRGLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM</u> <u>QHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>3A4</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)</p>

VH3/Vκ4	<p><u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSC</u><u>TASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPENG</u><u>DTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCTLWLRRLDYWGQGL</u><u>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u> GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSP</u><u>SLPVTPGEPASISCRSSKSL</u><u>LHSNGYTYLFWFQORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDF</u><u>TLKISRVEAEDVGVYYCM</u> <u>QHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPS</u><u>VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3M12 VH3/Vκ2	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u><u>SLTCSVTGYSITSGYYWNWIR</u><u>OPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISR</u><u>DTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVL</u><u>DYWGQGTITVTVSS</u><u>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSP</u><u>SSLSASVGDRVTITCRASQDIS</u><u>NFLN</u><u>WYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDF</u><u>TLTISSLOPEDFATYFCQQGHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIKRTVAAPS</u><u>VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u><u>NNFYPRE</u> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
3M12	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)

	<p><u>QVQLQESGPGPLVKPSQTLSTLTCVSTGYISITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVLDDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOQHTL</u> <u>PYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR</u> EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
<p>3M12 VH4/Vκ2</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGPLVKPSQTLSTLCTVTGYISITSGYYWNWIRQPPGKGL</u> <u>EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVLDDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYFCQOQHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLKADYEK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
<p>3M12</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)</p>

	<p><u>QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL</u> <u>EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWyQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOGHTL</u> <u>PYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR</u> EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDGYDNSFMHWYQOKPGQ</u> <u>PKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSR TDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ</u> <u>SSEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN</u> NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)</p>
5H12	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека)

<p>VH5 (C33D*)/Vκ4</p>	<p><u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYDINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ</u> <u>QSSEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPS</u>VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
<p>5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4</p>	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ</u> <u>QSSEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPS</u>VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>

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

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

[000153] 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.

[000154] 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.

[000155] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 84, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 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.

[000156] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%,

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

[000166] 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 ее 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 ее 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 ее варианты и константную область тяжелой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 96.

[000167] 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 ее 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 ее 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 ее варианты и константную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 83.

[000168] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи Fab описанных антител против TfR приведены в таблице 5 ниже.

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

Антитело	Последовательности тяжелой цепи/легкой цепи Fab**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKV</u>SCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL <u>EWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRGLDYWGQGL</u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT(SEQ ID NO: 97)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVT</u>PGEPASISCRSSKSLLHSNGYTYLFWFQORPGQ <u>SPRLLIYRMSN</u>LASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM <u>QHLEYPFTFEGGGTKVEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTL KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKV</u>SCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL <u>EWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRGLDYWGQGL</u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 98)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVT</u>PGEPASISCRSSKSLLHSNGYTYLFWFQORPGQ <u>SPRLLIYRMSN</u>LASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM <u>QHLEYPFTFEGGGTKVEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTL KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3A4 VH3/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKV</u>SCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL <u>EWIGWIDPENGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGL</u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</p>

	<p>GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 99)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIVMTQSPSLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSNGYTYLFWFQORPGQSPRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>3M12 VH3/Vк2</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)</p> <p><u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCSVTGYSITSGYYWNWIRPPGKGLEWMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL DYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 100)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWXQKPGQPVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQOQHLYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 89)</p>
<p>3M12 VH3/Vк3</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)</p> <p><u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCSVTGYSITSGYYWNWIRPPGKGLEWMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYDYDVL DYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 100)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWXQKPGQPVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQHLYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 90)</p>

<p>3M12 VH4/Vκ2</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRPPGKGL</u> <u>EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVLVDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
<p>3M12 VH4/Vκ3</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRPPGKGL</u> <u>EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVLVDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTL</u> <u>PYTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR</u> EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
<p>5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 102)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p>

	<p><u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQ</u> <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ</u> <u>SSEDPWTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN</u> NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)</p>
5H12 VH5 (C33D*)/Vk4	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYDINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 103)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ</u> <u>QSSEDPWTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vk4	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 102)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ</u> <u>QSSEDPWTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>

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

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

[000169] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с тяжелой цепью, приведенной в любой из SEQ ID NO: 97-103. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с легкой цепью, приведенной в любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93 и 95.

[000170] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной любой из SEQ ID NO: 97-103. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), гуманизированное антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93 и 95. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 97-103. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93 и 95.

[000171] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 97, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное 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.

[000172] В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 98, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR по изобретению

последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 101, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[000178] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 102, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 93. 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: 93.

[000179] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 103, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 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.

[000180] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело против TfR по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной SEQ ID NO: 102, и/или (например, и) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 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.

[000181] В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела против рецептора TfR, представленные в настоящем описании, могут находиться в любой форме антитела, включая, в качестве неограничивающих примеров, интактные (т.е. полноразмерные) антитела, их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела или нанотела. В некоторых вариантах осуществления 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 областью). 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.

[000182] 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.

[000183] 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.

[000184] 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.

[000185] 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*.

[000186] 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.

[000187] 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).

[000188] 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 комплементом цитотоксичность (CDC). Этот подход подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al). В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в N-концевой области домена CH2 антитела, представленного в настоящем описании, изменяют, чтобы, таким образом, изменить способность антитела связываться с комплементом. Этот подход описан в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, модифицируют для повышения способности антитела для опосредования антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или (например, и) для повышения аффинности антитела к рецептору Fcγ. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 00/42072.

[000189] 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.

[000190] 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".

[000191] 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*".

[000192] 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).

Другие известные антитела против рецептора трансферрина

[000193] В качестве мышечно-специфического средства в комплексах, представленных в настоящем описании, можно использовать любые другие подходящие антитела против рецептора трансферрина, известные в этой области. Примеры известных антител против рецептора трансферрина, включая соответствующие ссылки и связывающиеся эпитопы, приведены в таблице 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит определяющие комплементарность области (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) любых из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, например, антител против рецептора трансферрина, приведенных в таблице 8.

[000194] Таблица 8 - Список клонов антител против рецептора трансферрина, включая соответствующие ссылки и информацию о связывающихся эпитопов.

Название клона антитела	Ссылки	Эпитоп/примечания
ОКТ9	Патент США № 4364934, поданный 12/4/1979, названный "MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME" Schneider C. et al. "Structural features of cell surface recepto for transferrin that is recognized by monoclonal antibody OKT9." J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.	Апикальный домен TfR (остатки 305-366 последовательности TfR человека XM_052730.3, доступной в GenBank)
(От JCR) Клон M11 Клон M23 Клон M27 Клон B84	WO 2015/098989, поданная 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier" патент США № 9994641, поданный 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier"	Апикальный домен (остатки 230-244 и 326-347 TfR) и протеаза-подобный домен (остатки 461-473)
(От Genentech) 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5,	WO 2016/081643, поданный 5/26/2016, названный "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE"	Апикальный домен и неапикальные области

13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12 и 13D4	патент США № 9708406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"	
(От Armagen) 8D3	Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse" 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052. патентная заявка США № 2010/077498, поданная 9/11/2008, названная "COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE"	
OX26	Haobam, B. et al. 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806-21.	
DF1513	Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. Plant J 48:757- 70 (2006).	
1A1B2, 66IG10, MEM-189, JF0956, 29806, 1A1B2, TFRC/1818, 1E6, 66Ig10, TFRC/1059, Q1/71, 23D10, 13E4, TFRC/1149, ER- MP21, YTA74,4, BU54, 2B6, RI7 217	Коммерчески доступные антитела против рецептора трансферрина.	Novus Biologicals 8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120

(От INSERM) BA120g	патентная заявка США № 2011/0311544A1, поданная 6/15/2005, названная "ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS"		Не конкурирует с ОКТ9		
LUCA31	патент США № 7572895, поданный 6/7/2004, названный "TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES"		"эпитоп LUCA31"		
(Salk Institute) B3/25 T58/30	Trowbridge, I.S. et al. "Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells." Nature, 1981, volume 294, pages 171-173				
R17 217.1.3, 5E9C11, ОКТ9 (клон BE0023)	Коммерчески доступные антитела против рецептора трансферрина.		BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B West Lebanon, NH 03784-1671 USA		
BK19,9, B3/25, T56/14 и T58/1	Gatter, K.C. et al. "Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance." J Clin Pathol. 1983 May;36(5):539-45.				
Антитело против TfR		Дополнительные SEQ ID NO антител против TfR			
CDRH1 (SEQ ID NO: 2)		VH/VL	CDR1	CDR2	CDR3
CDRH2 (SEQ ID NO: 2)	VH1	2280	2273	2274	2267
CDRH3 (SEQ ID NO: 2)	VH2	2281	2273	2275	2267
CDRL1 (SEQ ID NO: 2)	VH3	2282	2273	2276	2267
CDRL2 (SEQ ID NO: 2)	VH4	2283	2273	2275	2267
CDRL3 (SEQ ID NO: 2)	VL1	2284	2268	2269	115
VH (SEQ ID NO: 2)	VL2	2285	2268	2269	115
VL (SEQ ID NO: 2)	VL3	2286	2268	2277	2270
	VL4	2287	2278	2279	2270

[000195] В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по настоящему изобретению включают одну или более из аминокислотных последовательностей CDR-H (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах

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

[000196] В некоторых примерах любые из антител против рецептора трансферрина по настоящему изобретению имеют одну или более последовательностей CDR (например, CDR-H или CDR-L), по существу схожие с любой из последовательностей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и/или (например, и) CDR-L3 из одного из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления положение одной или более CDR в области VH (например, CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3) и/или (например, и) VL (например, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3) антитела, представленного в настоящем описании, может варьироваться на одно, два, три, четыре, пять или шесть положений аминокислот при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают). Например, в некоторых вариантах осуществления положение, определяющее CDR любого антитела, представленного в настоящем описании, можно варьировать посредством сдвига границ N-конца и/или (например, и) C-конца CDR на одну, две, три, четыре, пять или шесть аминокислоты относительно положения CDR любого из антител, представленных в настоящем описании, при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают). В другом варианте осуществления длину одной или более CDR в области VH (например, CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3) и/или (например, и) VL (например, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3) антитела,

представленного в настоящем описании, можно варьировать (например, она может быть короче или длиннее) на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот, при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают).

[000197] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или (например, и) CDR-H3, представленные в настоящем описании, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот короче одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, и/или (например, и) CDR-H3, представленные в настоящем описании, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот длиннее одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления аминоконцевую часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или (например, и) CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно удлинять на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В некоторых вариантах осуществления карбокси-концевую часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или (например, и) CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно удлинять на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что

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

[000198] В некоторых примерах любые из антител против рецептора трансферрина по настоящему изобретению имеют одну или более последовательностей CDR (например, CDR-H или CDR-L), по существу схожих любому из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. Например, антитела могут включать одну или более последовательностей CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8, содержащих до 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислотного остатка по сравнению с соответствующей областью CDR в любой из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания с исходным антителом, из которого оно получено). В

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

[000199] В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по настоящему изобретению включают любое антитело, включающее переменный домен тяжелой цепи и/или (например, и) переменный домен легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по настоящему изобретению включают любое антитело, включающее пары переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8.

[000200] Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам против рецептора трансферрина, имеющим аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH) и/или (например, и) переменного домена легкой цепи (VL), гомологичную любой из последовательностей, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи или последовательность переменного домена легкой цепи, являющуюся на по меньшей мере 75% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или любой последовательности переменного домена легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления гомологичные аминокислотные последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или (например, и) переменного домена легкой цепи не варьируются в любых из

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

[000201] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека), содержит переменный домен легкой цепи VL, содержащий любой из доменов CDR-L (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), или варианты домена CDR-L, представленные в настоящем описании, любых из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека), содержит переменный домен легкой цепи VL, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит последовательность переменной области легкой цепи (VL), содержащую одну, две, три или четыре последовательности каркасных областей переменной области легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит одну, две, три или четыре из последовательностей каркасных областей переменной области легкой цепи, являющиеся на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичными одной, двум, трем или четверем последовательностям каркасных областей переменной области легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления каркасная область переменного домена легкой цепи, полученная из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности, но с наличием до 10 замен, делеций и/или (например, и) инсерций аминокислот, предпочтительно - до 10 замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каркасная область переменного домена легкой цепи, полученная из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности, при этом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных

остатков заменены аминокислотой обнаруживаемой в аналогичном положении в соответствующей каркасной области варибельного домена легкой цепи не являющегося человеком животного, примата или человека.

[000202] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина, содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или примата. Каркасная область легкой цепи примата или человека из антитела, выбранного для использования с последовательностями CDR легкой цепи, представленными в настоящем описании, может иметь, например, по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или по меньшей мере 99%) идентичности в отношении каркасной области легкой цепи не принадлежащего человеку родительского антитела. Выбранное антитело примата или человека может иметь то же или по существу то же количество аминокислот в своих определяющих комплементарность областях легкой цепи, что и определяющие комплементарность области легкой цепи любых из антител, представленных в настоящем описании, например, любых из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи примата или человека получают из природной каркасной области легкой цепи антитела примата или человека, имеющей по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, по меньшей мере 99% (или более) идентичности в отношении каркасных областей легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина дополнительно содержит одну, две, три или все четыре VL каркасные области, полученные из варибельного домена легкой цепи человека подсемейства каппа. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина дополнительно содержит одну, две, три или все четыре VL каркасные области, полученные из варибельного домена легкой цепи человека подсемейства лямбда.

[000203] В некоторых вариантах осуществления любые из антител против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании содержат, варибельный домен легкой цепи, дополнительно содержащий константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи является константной областью легкой цепи каппа или лямбда. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи каппа или лямбда принадлежит млекопитающему, например, человеку, обезьяне, крысе или мыши. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи является константной областью легкой цепи каппа человека. В некоторых

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

[000204] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина является любым антителом против рецептора трансферрина, таким как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8.

[000205] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 8, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит любые из доменов VL или вариантов доменов VL и любые из доменов VH или вариантов доменов VH, где домены VL и VH или их варианты происходят из одного клона антитела, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина. Неограничивающие примеры константных областей человека описаны в этой области, например, см. Kabat E A et al., (1991) выше.

[000206] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом рецептора трансферрина (например, антителом и его вариантами, описанными в международной патентной публикации № WO 2016/081643, включенной в настоящее описание посредством ссылки).

[000207] CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела по разным системам определения приведены в таблице 9. Описаны разные системы определения, например, определение по Kabat, определение по Chothia и/или (например, и) определение по системе Contact. См., например, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948; и Almagro, *J. Mol. Recognit.* 17:132-143 (2004). Также см. hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs.

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

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

[000208] Также приведены последовательности переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи:

[000209] VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGEINPTNGRRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 124)

[00021] VL

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYCYCQHFWTGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 125)

[000211] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 9. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные в таблице 9.

[000212] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, в совокупности содержащие не более 5 изменений аминокислот (например, не более 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенными в таблице 9. Термин "в совокупности" означает, что общее количество изменений аминокислот во всех трех CDR тяжелой цепи находится в определенном диапазоне. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело

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

[000213] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, по меньшей мере одна из которых содержит не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с соответствующей CDR тяжелой цепи, приведенной в таблице 9. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению могут содержать CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, по меньшей мере одна из которых содержит не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с соответствующей CDR легкой цепью, приведенной в таблице 9.

[000214] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3, содержащую не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с CDR-L3, приведенной в таблице 9. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3, содержащую одно изменение аминокислоты по сравнению с CDR-L3, приведенной в таблице 9. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3 QHFGTPLT (SEQ ID NO: 126) по системам определения Kabat и Chothia) или QHFGTPL (SEQ ID NO: 127) по системе определения Contact). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1 и CDR-L2, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 9, и содержит CDR-L3 QHFGTPLT (SEQ ID NO: 126) по системам определения Kabat и Chothia) или QHFGTPL (SEQ ID NO: 127) по системе определения Contact).

[000215] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR тяжелой цепи, в совокупности являющиеся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичными CDR тяжелой цепи, приведенным в таблице 9. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR легкой цепи, в совокупности являющиеся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичными CDR легкой цепи, приведенным в таблице 9.

[000216] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124. Альтернативно или дополнительно (например,

дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

[000217] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 124. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 125.

[000218] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VH, приведенной в SEQ ID NO: 124. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VL, приведенной в SEQ ID NO: 125.

[000219] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению является гуманизированным антителом (например, гуманизированным вариантом антитела). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 9, и содержит гуманизованную переменную область тяжелой цепи и/или (например, и) гуманизованную переменную область легкой цепи.

[000220] Гуманизированные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентным антителом), в котором остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменяют остатками CDR не являющихся человеком видов (донорного антитела), такого как мышь, крыса или кролик, имеющими желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых вариантах осуществления остатки каркасной области Fv (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизованное антитело может содержать остатки, необнаруживаемые ни в реципиентном антителе, ни в импортируемой CDR или последовательностях каркаса, 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 переменных доменов, в которых все или по существу все из областей CDR соответствуют CDR 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 часть константной области иммуноглобулина или домена (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Антитела могут иметь Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененных относительно исходного антитела, также обозначаемых как одна или более CDR, полученных из одной или более CDR из исходного антитела. Гуманизированные антитела также могут включать созревание аффинности.

[000221] В некоторых вариантах осуществления гуманизации достигают посредством пересадки CDR (например, приведенных в таблице 9) в переменные домены человека IGKV1-NL1*01 и IGHV1-3*01. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим одну или более замен аминокислот в положениях 9, 13, 17, 18, 40, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенным в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) одну или более замен аминокислот в положениях 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 66, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенным в SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим замены аминокислот во всех из положений 9, 13, 17, 18, 40, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенным в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) замены аминокислот во всех из положений 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 66, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенным в SEQ ID NO: 124.

[000222] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным антителом и содержит остатки в положениях 43 и 48 VL, приведенной в SEQ ID NO: 125. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным антителом и содержит остатки в положениях 48, 67, 69, 71 и 73 VH, приведенной в SEQ ID NO: 124.

[000223] Приведены аминокислотные последовательности VH и VL примера гуманизированного антитела, которое можно использовать по настоящему изобретению:

[000224] Гуманизированная VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTRAYHYWGQGT
MVTVSS (SEQ ID NO: 128)

[000225] Гуманизированная VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFHWGTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 129)

[000226] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128. Альтернативно или дополнительно (например,

дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129.

[000227] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 128. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 129.

[000228] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VH, приведенной в SEQ ID NO: 128. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VL, приведенной в SEQ ID NO: 129.

[000229] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим замены аминокислот в одном или более из положений 43 и 48 по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) замены аминокислот в одном или более из положений 48, 67, 69, 71 и 73 по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим мутацию S43A и/или (например, и) V48L по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) одну или более из мутаций A67V, L69I, V71R и K73T по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 124.

[000230] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим замены аминокислот в одном или более из положений 9, 13, 17, 18, 40, 43, 48, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 125, и/или (например, и) замены аминокислот в одном или более из положений 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 48, 66, 67, 69, 71, 73, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 124.

[000231] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является химерным антителом, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи из антитела человека. Термин "химерные антитела" относится к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области из первого биологического вида и константную область из второго биологического вида. Как правило, в этих химерных

антителах переменная область легких и тяжелых цепей имитирует переменные области антител, полученные из одного вида млекопитающих (например, не являющегося человеком млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части являются гомологичными последовательностям в антителах, полученных из другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления модификации аминокислот можно осуществлять в переменной области и/или (например, и) константной области.

[000232] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является химерным антителом, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи из антитела человека. Термин "химерные антитела" относится к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области из первого биологического вида и константную область из второго биологического вида. Как правило, в этих химерных антителах переменная область легких и тяжелых цепей имитирует переменные области антител, полученные из одного вида млекопитающих (например, не являющегося человеком млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части являются гомологичными последовательностям в антителах, полученных из другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления модификации аминокислот можно осуществлять в переменной области и/или (например, и) константной области.

[000233] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любых из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, может содержать константную область тяжелой цепи (CH) или ее часть (например, CH1, CH2, CH3 или их комбинацию). Константная область тяжелой цепи может иметь любое подходящее происхождение, например, принадлежать человеку, мыши, крысе или кролику. В одном конкретном примере константная область тяжелой цепи получена из IgG человека (тяжелая цепь гамма), например, IgG1, IgG2 или IgG4. Пример константной области IgG1 человека приведен ниже:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 130)

[000234] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь любых из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, может дополнительно содержать константную область легкой цепи (CL), может являться любой CL, известной в этой области. В некоторых примерах CL принадлежит легкой цепи каппа. В других примерах CL принадлежит легкой цепи лямбда. В некоторых вариантах

осуществления CL принадлежит легкой цепи каппа, последовательность которой приведена ниже:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 83)

[000235] Другие константные области тяжелой и легкой цепи антитела хорошо известны в этой области, например, приведенные в базе данных IMGT (www.imgt.org) или на www.vbase2.org/vbstat.php., включенных в настоящее описание посредством ссылок.

[000236] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи описанных антител против рецептора трансферрина приведены ниже:

[000237] Тяжелая цепь (VH+константная область IgG1 человека)

QVQLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARGTRAYHYWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 132)

[000238] Легкая цепь (VL+легкая цепь каппа)

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKSPQLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFVGTPLTFGAGTKLELKRVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 133)

[000239] Тяжелая цепь (гуманизированная VH+константная область IgG1 человека)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTRAYHYWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134)

[000240] Легкая цепь (гуманизированная VL+легкая цепь каппа)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFVGTPLTFGQGTKVEIKRVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 135)

[000241] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь,

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

[000242] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с тяжелой цепью, приведенной в SEQ ID NO: 132. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с легкой цепью, приведенной в SEQ ID NO: 133.

[000243] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 134. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

[000244] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 25 изменений аминокислот (например, не более 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с тяжелой цепью гуманизованного антитела, приведенной в SEQ ID NO: 134. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина по изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 15 изменений аминокислот

(например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с легкой цепью гуманизированного антитела, приведенной в SEQ ID NO: 135.

[000245] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина является антигенсвязывающим фрагментом (FAB) интактного антитела (полноразмерного антитела). Антигенсвязывающий фрагмент интактного антитела (полноразмерного антитела) можно получать общепринятыми способами. Например, F(ab')₂-фрагменты можно получать посредством расщепления пепсином молекулы антитела, и Fab'-фрагменты можно получать посредством восстановления дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагментов. Примеры аминокислотных последовательностей Fab антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, приведены ниже:

[000246] Тяжелая цепь Fab (VH+часть константной области IgG1 человека)

QVQLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARGTRAYHNYWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCP (SEQ
ID NO: 136)

[000247] Тяжелая цепь Fab (гуманизированная VH+часть константной области IgG1 человека)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHNYWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCP
(SEQ ID NO: 137)

[000248] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

[000249] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

[000250] Антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, могут находиться в любой форме антитела, включая, в качестве неограничивающих примеров, интактные (т.е. полноразмерные) антитела, их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные

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

[000251] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против Tfr, представленных в настоящем описании, получают посредством технологии рекомбинантных ДНК в суспензионной культуре клеток яичника китайского хомяка (CHO), необязательно, в суспензионной культуре клеток CHO-K1 (например, клетках CHO-K1, полученных из European Collection of Animal Cell Culture, кат. № 85051005).

[000252] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем описании, может иметь одну или более посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах осуществления N-концевая циклизация, также называемая образованием пироглутамата (пиро-Glu), может происходить в антителе на N-концевом остатке 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, подвергнутые образованию пироглутамата, являющееся результатом посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах осуществления образование пироглутамата происходит в последовательности тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления образование пироглутамата происходит в последовательности легкой цепи.

в. Другие мышечно-специфические антитела

[000253] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающееся с гемоювелином, кавеолином-3, пептидом мышечной дистрофии Дюшенна, миозином IIb или CD63. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с миогенным белком-предшественником. Неограничивающие примеры миогенных белков-предшественников включают ABCG2, M-кадгерин/кадгерин-15, кавеолин-1, CD34, FoxK1, интегрин альфа 7, интегрин альфа 7 бета 1, MYF-5, MyoD, миогенин, NCAM-1/CD56, Pax3, Pax7 и Pax9. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с белком скелетных мышц. Неограничивающие примеры белков скелетных мышц включают альфа-саркогликан, бета-саркогликан, ингибиторы кальпаина, креатинкиназу MM/CKMM, eIF5A, енолазу 2/нейрон-специфическую енолазу, эpsilon-саркогликан, FABP3/H-FABP, GDF-8/миостатин, GDF-11/GDF-8, интегрин альфа 7, интегрин альфа 7 бета 1, интегрин бета 1/CD29, MCAM/CD146, MyoD, миогенин, ингибиторы киназы легких цепей миозина, NCAM-1/CD56 и тропонин I. В некоторых вариантах осуществления мышечно-

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

с. Признаки/изменения антител

[000254] В некоторых вариантах осуществления в последовательности антител (например, CDR или каркасные последовательности) можно встраивать консервативные мутации в положениях, в которых маловероятно, что остатки будут вовлечены во взаимодействие с антигеном-мишенью (например, рецептором трансферрина), например, что определяют на основе кристаллической структуры. В некоторых вариантах осуществления встраивают одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) в Fc-область мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или (например, и) шарнирную область, при этом нумерацию осуществляют по системе Kabat (например, индексу EU по Kabat)), для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, связывание комплемента, связывание Fc-рецептора и/или (например, и) антиген-зависимая клеточная цитотоксичность.

[000255] 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.

[000256] 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.

[000257] 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*.

[000258] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для снижения времени полужизни антитела против рецептора трансферрина *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для повышения времени полужизни антитела *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитела могут иметь одну или более мутаций аминокислот (например, замен) во втором константном домене (CH2) (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) третьем константном домене (CH3) (остатки 341-447 IgG1 человека), при этом нумерацию осуществляют по индексу EU по Kabat (Kabat E A et al., (1991) выше). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 антитела, представленного в настоящем описании, содержит замену метионина (M) тирозином (Y) в положении 252, замену серина (S) треонином (T) в положении 254, и замену треонина (T) глутаминовой кислотой (E) в положении 256, пронумерованные с помощью индекса EU по Kabat. См. патент США № 7658921, включенный в настоящее описание посредством ссылки. Показано, что этот тип мутантного IgG, обозначаемый как "YTE-мутант", демонстрирует увеличенное в четыре раза время полужизни по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, пронумерованных с помощью индекса EU по Kabat.

[000259] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более замен аминокислот встраивают в константный домен Fc-области IgG для изменения эффекторных функций антитела против рецептора трансферрина. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может являться, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260. В некоторых вариантах осуществления делеция или инактивация (посредством точечных

мутаций или иных средств) константной области может снижать связывание Fc-рецептора циркулирующим антителом, таким образом, повышая локализацию в опухоли. Описание мутаций, приводящих к делеции или инактивации константного домена 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).

[000260] В некоторых вариантах осуществления одну или более аминокислот в константной области мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или (например, и) сниженную или отсутствующую обусловленную комплементом цитотоксичность (CDC). Этот подход подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al). В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в N-концевой области домена CH2 антитела, представленного в настоящем описании, изменяют, чтобы, таким образом, изменить способность антитела связываться с комплементом. Этот подход описан в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, модифицируют для повышения способности антитела для опосредования антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или (например, и) для повышения аффинности антитела к рецептору Fcγ. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 00/42072.

[000261] В некоторых вариантах осуществления последовательности варибельного 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.

[000262] 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".

[000263] Как представлено в настоящем описании, антитела по изобретению, необязательно, могут содержать константные области или их части. Например, домен VL можно присоединять через его С-конец к константному домену легкой цепи, подобной С_κ или С_λ. Аналогично, домен VH или его часть можно присоединять ко всей тяжелой цепи или ее части из IgA, IgD, IgE, IgG, IgM и любого подкласса изотипа. Антитела могут включать подходящие константные области (см., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Таким образом, антитела в объеме настоящего изобретения могут включать домены VH и VL или их антигенсвязывающую часть в комбинации с любыми подходящими константными областями.

ii. Мышечно-специфические пептиды

[000264] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим пептидам в качестве мышечно-специфических средств. Описаны короткие пептидные последовательности (например, пептидные последовательности длиной 5-20 аминокислот), связывающиеся с конкретными типами клеток. Например, клеточно-специфические пептиды описаны в Vines e., et al., A. "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery" *Biochim Biophys Acta* 2008, 1786: 126-38; Jarver P., et al., "In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery" *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 528-35; Samoylova T.I., et al., "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening" *Muscle Nerve* 1999; 22: 460-6; патенте США № 6329501, опубликованном 11 декабря 2001 года, названном "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE"; и Samoylov A.M., et al., "Recognition of cell-specific binding of phage display derived peptides using an acoustic wave sensor", *Biomol Eng* 2002; 18: 269-72; полное содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Конструируя пептиды для взаимодействия со специфическими антигенами поверхности клетки (например, рецепторами), можно достигать селективности в отношении желаемой ткани, например, мышечной. Проводятся исследования таргетинга скелетных мышц, и в них можно доставлять широкий спектр молекулярных нагрузок. Эти подходы могут иметь высокую селективность в отношении мышечной ткани без многих из практических недостатков крупного антитела или вирусной частицы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является мышечно-специфическим пептидом, имеющим длину от 4 до 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид имеет длину 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислот. Мышечно-специфические пептиды можно получать любым из нескольких способов, таких как фаговый дисплей.

[000265] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может связываться с интернализирующимся рецептором поверхности клетки, гиперэкспрессированным или относительно высоко экспрессированным в мышечных клетках, например, рецептором трансферрина, по сравнению с некоторыми другими клетками. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может направленно воздействовать, например, связываться, на рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления пептид, нацеленные на рецептор трансферрина, может содержать сегмент природного лиганда, например, трансферрина. В некоторых вариантах осуществления пептид, нацеленный на рецептор трансферрина, является таким, как описано в патенте США № 6743893, поданном 11/30/2000, "RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF PEPTIDES THAT BIND THE HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR". В некоторых вариантах осуществления пептид, нацеленный на рецептор трансферрина, является таким, как описано в Kawamoto, M. et al, "A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells", BMC Cancer. 2011 Aug 18;11:359. В некоторых вариантах осуществления пептид, нацеленный на рецептор трансферрина, является таким, как описано в патенте США № 8399653, поданном 5/20/2011, "TRANSFERRIN/TRANSFERRIN RECEPTOR-MEDIATED SIRNA DELIVERY".

[000266] Как указано выше, описаны примеры мышечно-специфических пептидов. Например, мышечно-специфические пептиды идентифицированы с использованием библиотеки фагового дисплея, экспонирующего поверхностные гептапептиды. В качестве одного из примеров, пептид, имеющий аминокислотную последовательность ASSLNIA (SEQ ID NO: 138), связывается с мышечными трубочками мыши C2C12 *in vitro* и с мышечной тканью мыши *in vivo*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство содержит аминокислотную последовательность ASSLNIA (SEQ ID NO: 138). Этот пептид демонстрирует улучшенную специфичность в случае связывания с сердечно-мышечной тканью и скелетно-мышечной тканью после внутривенной инъекции мышам при сниженном связывании с печенью, почками и головным мозгом. Дополнительные мышечно-специфические пептиды идентифицированы с использованием фагового дисплея. Например, пептид из 12 аминокислот идентифицирован посредством библиотеки фагового дисплея для таргетинга мышц в контексте лечения DMD. См. Yoshida D., et al., "Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats", *Int J Pharm* 2002; 231: 177-84; полное содержание которой включено, таким образом, в настоящее описание посредством ссылки. В этом случае идентифицирован пептид из 12 аминокислот, имеющий последовательность SKTFNTHPQSTP (SEQ ID NO: 139), и этот мышечно-специфический пептид демонстрировал улучшенное связывание с клетками C2C12 относительно пептида ASSLNIA (SEQ ID NO: 138).

[000267] Дополнительный способ идентификации пептидов, селективных в отношении мышц (например, скелетных мышц) по сравнению с другими типами клеток включает селекцию *in vitro*, описанную в Ghosh D., et al., "Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting", *J Virol* 2005; 79: 13667-72; полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки. С помощью предварительной инкубации библиотеки фагового дисплея случайных 12-мерных пептидов со смесью немышечных типов клеток, осуществляли отрицательную селекцию неспецифических связывающих клетки средства. После раундов селекции пептид из 12 аминокислот TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 140) встречался наиболее часто. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство содержит аминокислотную последовательность TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 140).

[000268] Мышечно-специфическое средство может являться содержащей аминокислоты молекулой или пептидом. Мышечно-специфический пептид может соответствовать последовательности белка, преференциально связывающейся с белковым рецептором, обнаруживаемым в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид содержит высокую долю гидрофобных аминокислот, например, валина, таким образом, что пептид преференциально нацелен на мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид ранее не охарактеризован или не описан. Эти пептиды можно конструировать, продуцировать, синтезировать и/или (например, и) дериватизировать любым из нескольких способов, например, с использованием библиотек фагового дисплея пептидов, пептидных библиотек "одна частица-одно соединение" или комбинаторных библиотек синтетических пептидов с позиционным сканированием. Примеры способов описаны в этой области и включены посредством ссылки (Gray, B.P. and Brown, K.C. "Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides" *Chem Rev.* 2014, 114:2, 1020-1081.; Samoylova, T.I. and Smith, B.F. "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening", *Muscle Nerve*, 1999, 22:4. 460-6). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид описан ранее (см., например, Writer M.J. et al. "Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic vectors incorporating novel targeting peptides selected by phage display", *J. Drug Targeting*. 2004;12:185; Cai, D. "BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart", *Physiol Genomics*. 2006, 24:3, 191-7.; Zhang, L. "Molecular profiling of heart endothelial cells", *Circulation*, 2005, 112:11, 1601-11.; McGuire, M.J. et al. "In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo", *J Mol Biol.* 2004, 342:1, 171-82). Примеры мышечно-специфических пептидов содержат аминокислотную последовательность из следующей группы: CQAQQLVC (SEQ ID NO: 141), CSERSMNFC (SEQ ID NO: 142), CPKTRRVPC (SEQ ID NO: 143), WLSEAGPVVTVRALRGTGSW (SEQ ID NO: 144), ASSLNIA (SEQ ID NO: 138), CMQHSMRVC (SEQ ID NO: 145), и DDTRHWG (SEQ ID NO: 146). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может содержать приблизительно 2-25 аминокислот, приблизительно 2-20 аминокислот,

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

iii. Лиганды мышечно-специфических рецепторов

[000269] Мышечно-специфическое средство может являться лигандом, например, лигандом, связывающимся с рецепторным белком. Мышечно-специфический лиганд может являться белком, например, трансферрином, связывающимся с интернализирующимся рецептором поверхности клетки, экспрессируемым мышечной клеткой. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является трансферрином или его производным, связывающимся с рецептором трансферрина. Мышечно-специфический лиганд альтернативно может являться низкомолекулярным соединением, например, липофильным низкомолекулярным соединением, предпочтительно нацеленным на мышечные клетки относительно других типов клеток. Примеры липофильных низкомолекулярных соединений, которые могут быть нацелены на мышечные клетки, включают соединения, содержащие холестерин, холестерил, стеариновую кислоту, пальмитиновую кислоту, олеиновую кислоту, олеил, линоленовую кислоту, линолевую кислоту, миристиновую кислоту, стерин, дигидротестостерон, производные тестостерона, глицерин, алкиловые цепи, тритильные группы и алкоксикислоты.

iv. Мышечно-специфические аптамеры

[000270] Мышечно-специфическое средство может являться аптамером, например, РНК-аптамером, предпочтительно нацеленным на мышечные клетки относительно других типов клеток. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический аптамер ранее не охарактеризован или не описан. Эти аптамеры можно конструировать, продуцировать, синтезировать и/или (например, и) дериватизировать любым из нескольких способов, например, посредством систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением. Примеры способов описаны в этой области и включены посредством ссылки (Yan, A.C. and Levy, M. "Aptamers and aptamer targeted delivery", *RNA biology*, 2009, 6:3, 316-20.; Germer, K. et al. "RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications", *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2013; 4: 27-40). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический аптамер описан ранее (см., например, Phillippou, S. et al. "Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers", *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018, 10:199-214.; Thiel, W.H. et al. "Smooth Muscle Cell-targeted RNA Aptamer Inhibits Neointimal

Formation", Mol Ther. 2016, 24:4, 779-87). Примеры мышечно-специфических аптамеров включают РНК-аптамер A01B и РНК-аптамер 14. В некоторых вариантах осуществления аптамер является аптамером на основе нуклеиновой кислоты, олигонуклеотидным аптамером или пептидным аптамером. В некоторых вариантах осуществления аптамер может иметь размер приблизительно 5-15 кДа, приблизительно 5-10 кДа, приблизительно 10-15 кДа, приблизительно 1-5 кДа, приблизительно 1-3 кДа или менее.

v. Другие мышечно-специфические средства

[000271] Одной из стратегий таргетинга мышечных клеток (например, скелетно-мышечных клеток) является использование субстрата мышечного белка-транспортера, такого как белок-транспортер, экспрессирующийся на сарколемме. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом инфлюкс-транспортера, специфического для мышечной ткани. В некоторых вариантах осуществления инфлюкс-транспортер является специфическим для скелетно-мышечной ткани. На скелетно-мышечной сарколемме экспрессируются два основных класса транспортеров, (1) суперсемейство аденозинтрифосфат (АТФ)-связывающей кассеты (ABC), облегчающее эффлюкс из скелетно-мышечной ткани, и (2) суперсемейство переносчиков растворенных веществ (SLC), которые могут облегчать инфлюкс субстратов в скелетную мышцу. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом, связывающимся с суперсемейством транспортеров ABC или суперсемейством транспортеров SLC. В некоторых вариантах осуществления субстрат, связывающийся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC, является природным субстратом. В некоторых вариантах осуществления субстрат, связывающийся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC, является неприродным субстратом, например, синтетическим производным, связывающимся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC.

[000272] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом суперсемейства транспортеров SLC. Транспортеры SLC являются равновесными или используют градиент протонов или ионов натрия, создаваемый в мембране для регуляции транспорта субстратов. Неограничивающие примеры транспортеров SLC, имеющих высокую экспрессию в скелетных мышцах, включают транспортер SATT (ASCT1; SLC1A4), транспортер GLUT4 (SLC2A4), транспортер GLUT7 (GLUT7; SLC2A7), транспортер ATRC2 (CAT-2; SLC7A2), транспортер LAT3 (KIAA0245; SLC7A6), транспортер PHT1 (PTR4; SLC15A4), транспортер OATP-J (OATP5A1; SLC21A15), транспортер OCT3 (EMT; SLC22A3), транспортер OCTN2 (FLJ46769; SLC22A5), транспортер ENT (ENT1; SLC29A1 и ENT2; SLC29A2), транспортер PAT2 (SLC36A2) и транспортер SAT2 (KIAA1382; SLC38A2). Эти транспортеры могут облегчать инфлюкс субстратов в скелетную мышцу, что дает возможность таргетинга мышц.

[000273] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом равновесного транспортера нуклеозидов 2 (ENT2). По сравнению с другими транспортерами, ENT2 имеет один из наиболее высоких уровней экспрессии мРНК

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

[000274] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом транспортера органического катиона/карнитина (OCTN2), являющегося натрий-зависимым, высокоаффинным транспортером карнитина. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является карнитином, милдронатом, ацетилкарнитином или любым их производным, связывающимся с OCTN2. В некоторых вариантах осуществления карнитин, милдронат, ацетилкарнитин или их производное ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидной нагрузкой).

[000275] Мышечно-специфическое средство может являться белком, существующим в по меньшей мере одной растворимой форме, нацеленной на мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический белок может являться гемоювелином (также известным как отталкивающая молекула наведения C или белок гемохроматоза типа 2), белком, вовлеченным в перегрузку железом и гомеостаз. В некоторых вариантах осуществления гемоювелин может являться полноразмерным белком, или фрагментом, или мутантом с по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении функционального белка гемоювелина. В некоторых вариантах осуществления мутант гемоювелина может являться растворимым фрагментом, в нем может отсутствовать N-концевая сигнальная последовательность и/или (например, и) C-концевой якорный домен. В некоторых вариантах осуществления гемоювелин может быть аннотирован под регистрационными номерами GenBank RefSeq NM_001316767.1, NM_145277.4, NM_202004.3, NM_213652.3 или NM_213653.3. Следует понимать, что гемоювелин может принадлежать человеку, не являющемуся человеком примату или грызуну.

В. Молекулярная нагрузка

[000276] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к молекулярной нагрузке, например, для модуляции биологического исхода, например, транскрипции последовательности ДНК, сплайсинга и процессинга последовательности РНК, экспрессии белка или активности белка. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка связана или иначе ассоциирована с мышечно-специфическим средством. В некоторых вариантах осуществления такая молекулярная нагрузка может подвергаться таргетингу к мышечной клетке, например, посредством специфического связывания с нуклеиновой кислотой или белком в мышечной клетке после доставки в мышечную клетку с помощью ассоциированного мышечно-специфического средства. Следует понимать, что в изобретении можно использовать различные типы мышечно-специфических средств. Например, молекулярная нагрузка может содержать или состоять из олигонуклеотида (например, антисмыслового олигонуклеотида), пептида (например, пептида, связывающегося с нуклеиновой кислотой, или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке), белка (например, белка, связывающегося с нуклеиновой кислотой, или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке) или низкомолекулярного соединения (например, низкомолекулярного соединения, модулирующего функцию нуклеиновой кислоты или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим цепь, имеющую область комплементарности мутантному аллелю DMD. 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

[000277] Как представлено в настоящем описании, в качестве молекулярной нагрузки можно использовать любой подходящий олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления можно конструировать олигонуклеотид для индуцирования пропуска экзона, например, олигонуклеотид EXONDYS 51 (Sarepta Therapeutics, Inc.), содержащий SEQ ID NO: 343 (CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG); WVE-210201 (Wave Life Sciences), содержащий SEQ ID NO: 334 (UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU); касимерсен (Sarepta Therapeutics, Inc.), содержащий SEQ ID NO: 302 (CAAUGCCAUCCUGGAGUCCUG); или голодирсен (Sarepta Therapeutics, Inc.), содержащий SEQ ID NO: 380 (GUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать олигонуклеотид для индуцирования пропуска экзона, например, вилтоларсен (NS Pharma, Inc.), содержащий SEQ ID NO:2257 (CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC), или ренадирсен (Daiichi Sankyo Company), содержащий SEQ ID NO:2252 (CGCUGCCCAAUGCCAUCC). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность или ее часть (например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более последовательных нуклеозидов) из последовательности, приведенной в таблице 10, и/или олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, приведенной в таблице 10. Любое одно

или более из тиминовых оснований (Т) в любом из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 10), необязательно, может являться урациловым основанием (U), и/или любое одно или более из U в олигонуклеотидах, представленных в настоящем описании, необязательно, может являться Т.

Таблица 10. Примеры олигонуклеотидной молекулярной нагрузки

НАЗВАНИЕ	SEQUENCE ID NO :	АНТИСМЫСЛОВАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ†	SEQ ID NO:	АНТИСМЫСЛОВАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ†	SEQ ID NO:	ЦЕЛЕВАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ†
EXONDYS 51	343	CUCCAACAUC AAGGAAGAU GGCAUUUCUA G	745	CTCCAACATC AAGGAAGAT GGCATTCTA G	1550	CTAGAAATGC CATCTTCSTT GATGTTGGAG
WVE-210201	334	UCAAGGAAG AUGGCAUUUC U	2254	TCAAGGAAG ATGGCATTTC T	2259	AGAAATGCCA TCTTCSTTGA
КАСИМЕР СЕН	302	CAAUGCCAUC CUGGAGUCC UG	2255	CAATGCCATC CTGGAGTTCC TG	2260	CAGGAACTCC AGGATGGCAT TG
ГОЛОДИР СЕН	380	GUUGCCUCCG GUUCUGAAG GUGUUC	2256	GTTGCCTCCG GTTCTGAAGG TGTTCC	2261	GAACACCTTC AGAACCGGA GGCAAC
ВИЛТОЛА РСЕН	225 1	CCUCCGGUUC UGAAGGUGU UC	2257	CCTCCGGTTC TGAAGGTGTT C	2262	GAACACCTTC AGAACCGGA GG
РЕНАДИР СЕН	225 2	CGCUGCCCAA UGCCAUC	2258	CGCTGCCCAA TGCCATCC	2263	GGATGGCATT GGGCAGCG

† Каждое тиминовое основание (Т) в любом из олигонуклеотидов и/или целевых последовательностей, приведенных в таблице 10, можно независимо и необязательно заменять урациловым основанием (U), и/или каждое U можно независимо и необязательно заменять Т. Целевые последовательности, приведенные в таблице 10, содержат Т, но предусмотрено связывание DMD-нацеленного олигонуклеотида с РНК и/или ДНК.

[000278] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать так, чтобы вызывать деградацию мРНК (например, олигонуклеотид может

являться гэммером, 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 вызывать деградацию и блокировать трансляцию мРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать так, чтобы способствовать стабильности мРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать так, чтобы способствовать трансляции мРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать так, чтобы способствовать стабильности и трансляции мРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться гидовой нуклеиновой кислотой (например, гидовой РНК) для направления активности фермента (например, фермента редактирования генома). В некоторых вариантах осуществления гидовая нуклеиновая кислота может направлять фермент для делеции всего мутантного аллеля DMD или его части (например, для облегчения пропуска экзонов в рамке считывания). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать для таргетинга репрессорных регуляторов экспрессии DMD, например, miR-31. 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.

[000279] Примеры олигонуклеотидов, которые можно использовать для таргетинга DMD, приведены в публикации патентной заявки США № 20100130591 A1, опубликованной 27 мая 2010 года, названной "MULTIPLE EXON SKIPPING COMPOSITIONS FOR DMD"; патенте США № 8361979, выданном 29 января 2013 года, названном "MEANS AND METHOD FOR INDUCING EXON-SKIPPING"; публикации патентной заявки США № 20120059042, опубликованной 8 марта 2012 года, названной "METHOD FOR EFFICIENT EXON (44) SKIPPING IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND ASSOCIATED MEANS"; публикации патентной заявки США № 20140329881, опубликованной 6 ноября 2014 года, названной "EXON SKIPPING COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY"; патенте США № 8232384, выданном 31 июля 2012 года, названном "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR INDUCING EXON SKIPPING AND METHODS OF USE THEREOF"; публикации патентной заявки США № 20120022134 A1, опубликованной 26 января 2012 года, названной "METHODS AND MEANS FOR EFFICIENT SKIPPING OF EXON 45 IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY PRE-MRNA"; публикации патентной заявки США № 20120077860, опубликованной 29 марта 2012 года, названной "ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTOR FOR EXON SKIPPING IN A GENE ENCODING A DISPENSABLE

DOMAN PROTEIN"; патенте США № 8324371, выданном 4 декабря 2012 года, названном "OLIGOMERS"; патенте США № 9078911, выданном 14 июля 2015 года, названной "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES"; патенте США № 9079934, выданном 14 июля 2015 года, названном "ANTISENSE NUCLEIC ACIDS"; патенте США № 9034838, выданном 19 мая 2015 года, названном "MIR-31 IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY THERAPY"; и международной патентной публикации № WO2017062862 A3, опубликованной 13 апреля 2017 года, названной "OLIGONUCLEOTIDE COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF"; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000280] В таблице 14 приведены неограничивающие примеры последовательностей олигонуклеотидов, которые можно использовать для таргетинга DMD, например, для пропуска экзонов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать любую последовательность, приведенную в таблице 14.

Таблица 14 - Олигонуклеотидные последовательности для таргетинга DMD.

ЭКЗОН	SEQ ID NO:	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
8	151	CUUCCUGGAUGGCUUCAAU
8	152	GUACAUUAAGAUGGACUUC
8	153	UAUCUGGAUAGGUGGUAUCAAGAUCUGUAA
8	154	AUGUAACUGAAAAUGUUCUUCUUUA
8	155	UGGAUAGGUGGUAUCAACAUCUGUAAGCAC
8	156	GAUAGGUGGUAUCAACAUCUGU
8	157	UAUCUGGAUAGGUGGUAUCAACAUCUGUAA
8	158	AAACUUGGAAGAGUGAUGUGAUGUA
8	159	GCUCACUUGUUGAGGCAAAACUUGGAA
8	160	GCCUUGGCAACAUUCCACUCCUG
8	161	UACACACUUUACCGUUGAGAAUAG
8	162	GAUAGGUGGUAUCAACAUCUGUAA
8	163	GAUAGGUGGUAUCAACAUCUG
8	164	GAUAGGUGGUAUCAACAUCUGUAAG
8	165	GGUGGUAUCAACAUCUGUAA
8	166	GUAUCAACAUCUGUAAGCAC
23	167	CGGCUAAUUUCAGAGGGCGCUUUCUUNGAC
23	168	ACAGUGGUGCUGAGAUAGUAUAGGCC
23	169	UAGGCCACUUUGUUGCUCUUGC
23	170	UUCAGAGGGCGCUUUCUUC
23	171	GGCCAAACCUCGGCUUACCUGAAAU

23	172	GGCAAACCUCGGCUUACCU
35	173	UCUUCAGGUGCACCUUCUGUUUCUCAUUCU
35	174	UCUGUGAUACUCUUCAGGUGCACCUUCUGU
35	175	UCUUCUGCUCGGGAGGUGACA
35	176	CCAGUUACUAUUCAGAAGAC
35	177	UCUUCAGGUGCACCUUCUGU
43	178	UGCUGCUGUCUUCUUGCU
43	179	UUGUUAACUUUUUCCCAUU
43	180	UGUUAACUUUUUCCCAUUGG
43	181	CAUUUUGUUAACUUUUUCCC
43	182	CUGUAGCUUCACCCUUUC
43	183	GAGAGCUUCCUGUAGCUUCACCCUUU
43	184	UCCUGUAGCUUCACCCUUUCCACAGGCG
43	185	UGUGUUACCUACCCUUGUCG
43	186	UAGACUAUCUUUUUAUAUUCUGUAAUUAU
43	187	GAGAGCUUCCUGUAGCUUCACCCUUUCCA
43	188	UUCCUGUAGCUUCACCCUUUCCACAGGCGUU
43	189	AGCUUCCUGUAGCUUCACCCUUU
43	190	GGAGAGAGCUUCCUGUAGCUUCACCCUUU
43	191	GAGAGCUUCCUGUAGCUUCACCC
43	192	UAUGUGUUACCUACCCUUGUCGGUC
43	193	GGAGAGAGCUUCCUGUAGCU
43	194	UCACCCUUUCCACAGGCGUUGCA
43	195	GCUGGGAGAGAGCUUCCUGUAGCUUCAC
43	196	UGUUACCUACCCUUGUCGGUCCUUGUAC
43	197	CUGCUGUCUUCUUGCUAUGAAUAAUGUC
43	198	GGCGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUGUCU
43	199	UUGGAAAUCAAGCUGGGAGAGAGCUUCC
43	200	CUACCCUUGUCGGUCCUUGUACAUUUUG
43	201	GUCAAUCCGACCUGAGCUUUGUUGUAGA
43	202	CUUGCUAUGAAUAAUGUCAAUCCGACC
43	203	UAUAUGUGUUACCUACCCUUGUCGGUCC
43	204	AAUCAGCUGGGAGAGAGCUUCCUGUAGCU
43	205	UCGUUCUUCUGUCGUCGUAACGUUUC

44	206	UUUGUGUCUUUCUGAGAAAC
44	207	AAAGACUUACCUUAAGAUAC
44	208	AUCUGUCAAAUCGCCUGCAG
44	209	CGCCGCCAUUUCUCAACAG
44	210	UUUGUAUUUAGCAUGUUCCC
44	211	CCGCCAUUUCUCAACAG
44	212	UUCUCAGGAAUUUGUGUCUUU
44	213	GACAACUCUUU
44	214	UCAGCUUCUGUUAGCCACUG
44	215	UGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA
44	216	CUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU
44	217	UUCUCAACAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAG
44	218	GCCACUGAUUAAAUAUCUUUAUAUC
44	219	UCUGUUAGCCACUGAUUAAAUAUCUUUAUA
44	220	GAGAAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA
44	221	UCUUUCUGAGAAACUGUUCAGCUUCUGUUAG
44	222	CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGUA
44	223	CAACAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAG
44	224	AAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA AA
44	225	GAAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU
44	226	AAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA
44	227	UGAGAAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCA
44	228	UUCUGAGAAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCA C
44	229	UUCUGAGAAACUGUUCAGCUUCUGUU
44	230	GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGUAA
44	231	AUAAUGAAAACGCCGCAUUUCUCA
44	232	AAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCAC
44	233	UUGUGUCUUUCUGAGAAACUGUUCA
44	234	CCAAUUCUCAGGAAUUUGUGUCUUU
44	235	AUCGCCUGCAGGUAAAAGCAUAUGG
44	236	UGAAAACGCCGCAUUUCUCAACAGAUCUG
44	237	CAUAAUGAAAACGCCGCAUUUCUCAACAG

44	238	UGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAAU
44	239	CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG
44	240	CAACAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG
44	241	CUCAACAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG
44	242	GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGU
44	243	GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGG
44	244	GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAG
44	245	CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGU
44	246	CAGAUCUGUCAAAUCGCCUGCAG
44	247	GUGUCUUUCUGAGAAACUGUUCAGC
44	248	GAGAAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCAC
44	249	GAAACUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUG
44	250	CUGUUCAGCUUCUGUUAGCCACUG
44	251	AUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGUAAAAG
44	252	GAUCUGUCAAAUCGCCUGCAGGUAAAAGC
44	253	CACCGAUUGUCUUCGA
44	254	CCCUUGUACGAUUUAUG
44	255	UCUGUGUUUAAGGACUCU
45	256	GCUGAAUUAUUUCUUCCCC
45	257	UUUUUCUGUCUGACAGCUG
45	258	UCUGUUUUUGAGGAUUGC
45	259	CCACCGCAGAUUCAGGC
45	260	GCCCAAUGCCAUCCUGG
45	261	UUUGCAGACCUCCUGCC
45	262	CAGUUUGCCGCUGCCCA
45	263	GUUGCAUUCA AUGUUCUGAC
45	264	AUUUUUCCUGUAGAAUACUGG
45	265	GCUGCCCAAUGCGAUCCUGGAGUUCUGUAA GAU
45	266	GCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCUG
45	267	GCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCUGUAA
45	268	CAAUGCCAUCCUGGAGUUCUGUAAGAUACC
45	269	GCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCUGUAA G

45	270	CCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU
45	271	UUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCC UGUAAGAU
45	272	GCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAA GAU
45	273	CAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGA
45	274	CAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCC
45	275	CUUCCCCAGUUGCAUUCAAUGUUC
45	276	CUGGCAUCUGUUUUUGAGGAUUG
45	277	UUAGAUCUGUCGCCCUACCU
45	278	GCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAA GAUACCAA
45	279	GCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU ACC
45	280	CAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAUACC
45	281	UGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAUACC
45	282	UGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU
45	283	CAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU
45	284	GCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU
45	285	GCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAA
45	286	GCCGCUGCCCAAUGACAUCCUGGAGUUCCUG UAA
45	287	GCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU
45	288	CCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUA
45	289	CUGACAACAGUUUGCCGCUGCCCAA
45	290	UUUGAGGAUUGCUGAAUUAUUUCUU
45	291	CAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGA
45	292	UUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUC
45	293	UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG
45	294	CCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCU
45	295	CCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGA
45	296	CCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCC
45	297	CCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAGAU
45	298	CCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUG

45	299	UGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAG
45	300	CCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUAAG
45	301	UGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUGUA
45	302	CAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUG
45	303	GCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUG
45	304	AUUAGAUCUGUCGCCCUACCUCUUUUUUC
45	305	UGUCGCCCUACCUCUUUUUUCUGUCUG
45	306	GCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUCCUG
55	307	AGCCUCUCGCUCACUCACCCUGCAAAGGA
50	308	CCACUCAGAGCUCAGAUCUUCUAACUUCC
50	309	CUUCCACUCAGAGCUCAGAUCUUCUAA
50	310	GGGAUCCAGUAUACUACAGGCUC
50	311	CUCAGAGCUCAGAUCUU
50	312	GGCUGCUUUGCCCUC
50	313	CUCAGAUCUUCUAACUUCCUCUUUAAAC
50	314	CUCAGAGCUCAGAUCUUCUAACUUCCUCU
50	315	CGCCUUCCACUCAGAGCUCAGAUCUUC
50	316	UCAGCUCUUGAAGUAAACGGUUUACCG
50	317	UUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAACGG
50	318	GGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGU
50	319	CAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGCC
50	320	UCCAAUAGUGGUCAGUCCAGGAGCU
50	321	AAAGAGAAUGGGAUCCAGUAUACUAC
50	322	AAAUAGCUAGAGCCAAAGAGAAUGGGA
50	323	GGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAAC GG
50	324	AGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAA
50	325	GUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAG
50	326	AGGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGA
50	327	CAGAGCUCAGAUCUUCUAACUUCCU
50	328	CUUACAGGCUCCAAUAGUGGUCAGU
50	329	AUGGGAUCCAGUAUACUACAGGCU
50	330	AGAGAAUGGGAUCCAGUAUACUAC
50	331	AACUUCCUCUUUAAACAGAAAAGCAUAC

50	332	GAGCCUCUCGCUCACUCACCCUGCAAAGGA
51	333	CUCAUACCUUCUGCUUGAUGAUC
51	334	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU
51	335	GAAAGCCAGUCGGUAAGUUC
51	336	CACCCACCAUCACCC
51	337	CCUCUGUGAUUUUAUAACUUGAU
51	338	UGAUAUCCUCAAGGUCACCC
51	339	GGUACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUU
51	340	AUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUC
51	341	CAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUU
51	342	GAGCAGGUACCUCCAACAUCAAGGAA
51	343	CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG
51	344	ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAG
51	345	CACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGA
51	346	UCACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGG
51	347	GUCACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAG
51	348	ACCAGAGUAAACAGUCUGAGUAGGAGC
51	349	UUCUGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC
51	350	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG
51	351	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG
51	352	AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCU
51	353	CACCCACCAUCACCCUCUGUG
51	354	AUCAUCUCGUUGAUAUCCUCA
51	355	CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCU
51	356	CAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGU
51	357	AUCAUUUUUCUCAUACCUUCUGCUAGGAGC UAAAA
52	358	UUGCUGGUCUUGUUUUUC
52	359	CCGUAAUGAUUGUUCU
52	360	GCUGGUCUUGUUUUUCA
52	361	UGGUCUUGUUUUUCAAUUU
52	362	GUCUUGUUUUUCAAUUUUG
52	363	CUUGUUUUUCAAUUUUGGG
52	364	UGUUUUUCAAUUUUGGGC

52	365	UCCAACUGGGGACGCCUCUGUUCCAAAUCCU GC
52	366	UCCUGCAUUGUUGCCUGUAAG
52	367	UCCAACUGGGGACGCCUCUGUUCCAAAUCC
52	368	ACUGGGGACGCCUCUGUCCA
52	369	CCGUAAUGAUUGUUCUAGCC
52	370	UGUUA AAAAACUACUUCGA
53	371	CUGUUGCCUCCGGUUCUG
53	372	UUGGCUCUGGCCUGUCCU
53	373	UUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUU CU
53	374	UACUUCAUCCACUGAUUCUGAAU
53	375	CUGAAGGUGUUCUUGUACUUCAUCC
53	376	CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGU
53	377	CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUG
53	378	CAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC
53	379	UUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUGUAC
53	380	GUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC
53	381	CUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUG
53	382	CUCCGGUUCUGAAGGUGUUCU
53	383	CUCCGGUUCUGAAGGUGUUCU
53	384	CUCCGGUUCUGAAGGUGUUC
53	385	CUCCGGUUCUGAAGGUGUU
53	386	CAUUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUG
53	387	CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG
53	388	CAUUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG
53	389	UACUAACCUUGGUUUCUGUGA
53	390	UGUAUAGGGACCCUCCUCCAUGACUC
53	391	CUAACCUUGGUUUCUGUGAUUUUCU
53	392	GGUAUCUUUGAUACUAACCUUGGUUUC
53	393	AUUCUUUCAACUAGAAUAAAAG
53	394	GAUUCUGAAUUCUUUCAACUAGAAU
53	395	AUCCACUGAUUCUGAAUUC
53	396	AACCGAGACCGGACAGGAUUCU

53	397	GGAAGCUAAGGAAGAAGCUGAGCAGG
55	398	CUGUUGCAGUAAUCUAUGAG
55	399	UGCCAUUGUUUCAUCAGCUCUUU
55	400	UGCAGUAAUCUAUGAGUUUC
55	401	UCCUGUAGGACAUUGGCAGU
55	131	GAGUCUUCUAGGAGCCUU

[000281] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), нацелен на область РНК DMD (например, транскрипт Dp427m SEQ ID NO: 2239). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), содержит область комплементарности РНК DMD (например, транскрипту Dp427m SEQ ID NO: 2239). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), содержит область комплементарности экзону РНК DMD (например, любой из SEQ ID NO: 2240-2250). Примеры последовательности РНК DMD и последовательности экзона приведены ниже.

[000282] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, мРНК (референсная последовательность NCBI: NM_004006.2)

TCCTGGCATCAGTACTGTGTTGACTCACTCAGTGTGGGATCACTCACTTTC
CCCCTACAGGACTCAGATCTGGGAGGCAATTACCTTCGGAGAAAAACGAATAGGAA
AAACTGAAGTGTTACTTTTTTTAAAGCTGCTGAAGTTTGTGGTTTCTCATTGTTTTT
AAGCCTACTGGAGCAATAAAGTTTGAAGAACTTTTACCAGGTTTTTTTTATCGCTGC
CTTGATATACACTTTTCAAAATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGGACTGTTATGAAA
GAGAAGATGTTCAAAAGAAAACATTCACAAAATGGGTAAATGCACAATTTTCTAAG
TTTGGGAAGCAGCATATTGAGAACCTCTTCAGTGACCTACAGGATGGGAGGGCGCCT
CCTAGACCTCCTCGAAGGCCTGACAGGGCAAAAACCTGCCAAAAGAAAAGGATCCA
CAAGAGTTCATGCCCTGAACAATGTCAACAAGGCACTGCGGGTTTTGCAGAACAAT
AATGTTGATTTAGTGAATATTGGAAGTACTGACATCGTAGATGGAAATCATAAACTG
ACTCTTGGTTTGATTTGGAATATAATCCTCCACTGGCAGGTCAAAAATGTAATGAAA
AATATCATGGCTGGATTGCAACAAACCAACAGTGAAAAGATTCTCCTGAGCTGGGT
CCGACAATCAACTCGTAATTATCCACAGGTTAATGTAATCAACTTCACCACCAGCTG
GTCTGATGGCCTGGCTTTGAATGCTCTCATCCATAGTCATAGGCCAGACCTATTTGA
CTGGAATAGTGTGGTTTGCCAGCAGTCAGCCACACAACGACTGGAACATGCATTCA
ACATCGCCAGATATCAATTAGGCATAGAGAACTACTCGATCCTGAAGATGTTGAT
ACCACCTATCCAGATAAGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCACTCTTCCAAGTT
TTGCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCCATCCAGGAAGTGGAATGTTGCCAAGGCC
ACCTAAAGTGACTAAAGAAGAACATTTTCAGTTACATCATCAAATGCACTATTCTCA
ACAGATCACGGTCAGTCTAGCACAGGGATATGAGAGAACTTCTTCCCCTAAGCCTCG
ATTCAAGAGCTATGCCTACACACAGGCTGCTTATGTCACCACCTCTGACCCTACACG

GAGCCCATTTCTTCACAGCATTGGAAGCTCCTGAAGACAAGTCATTTGGCAGTTC
ATTGATGGAGAGTGAAGTAAACCTGGACCGTTATCAAACAGCTTTAGAAGAAGTAT
TATCGTGGCTTCTTTCTGCTGAGGACACATTGCAAGCACAAGGAGAGATTTCTAATG
ATGTGGAAGTGGTGAAGACCAGTTTCATACTCATGAGGGGTACATGATGGATTTG
ACAGCCATCAGGGCCGGGTTGGTAATATTCTACAATTGGGAAGTAAGCTGATTGG
AACAGGAAAATTATCAGAAGATGAAGAACTGAAGTACAAGAGCAGATGAATCTC
CTAAATTCAAGATGGGAATGCCTCAGGGTAGCTAGCATGGAAAAACAAAGCAATTT
ACATAGAGTTTTAATGGATCTCCAGAATCAGAACTGAAAGAGTTGAATGACTGGC
TAACAAAAACAGAAGAAAGAACAAGGAAAATGGAGGAAGAGCCTCTTGGACCTGA
TCTTGAAGACCTAAAACGCCAAGTACAACAACATAAGGTGCTTCAAGAAGATCTAG
AACAGAACAAGTCAGGGTCAATTCTCTCACTCACATGGTGGTGGTAGTTGATGAAT
CTAGTGGAGATCACGCAACTGCTGCTTTGGAAGAACA ACTTAAGGTATTGGGAGAT
CGATGGGCAAACATCTGTAGATGGACAGAAGACCGCTGGGTTCTTTTACAAGACAT
CCTTCTCAAATGGCAACGTCTTACTGAAGAACAGTGCCTTTTTAGTGCATGGCTTTC
AGAAAAAGAAGATGCAGTGAACAAGATTCACACA ACTGGCTTTAAAGATCAAATG
AAATGTTATCAAGTCTTCAAAA ACTGGCCGTTTTAAAAGCGGATCTAGAAAAGAAA
AAGCAATCCATGGGCAA ACTGTATTCACTCAAACAAGATCTTCTTTCAACTGAAG
AATAAGTCAGTGACCCAGAAGACGGAAGCATGGCTGGATAACTTTGCCCGGTGTTG
GGATAATTTAGTCCAAAA ACTTGAAAAGAGTACAGCACAGATTTACAGGCTGTCA
CCACCACTCAGCCATCACTAACACAGACA ACTGTAATGGAAACAGTAACTACGGTG
ACCACAAGGGAACAGATCCTGGTAAAGCATGCTCAAGAGGAACTTCCACCACCACC
TCCCCAAAAGAAGAGGCAGATTACTGTGGATTCTGAAATTAGGAAAAGGTTGGATG
TTGATATAACTGAACTTCACAGCTGGATTACTCGCTCAGAAGCTGTGTTGCAGAGTC
CTGAATTTGCAATCTTTCGGAAGGAAGGCAACTTCTCAGACTTAAAAGAAAAAGTC
AATGCCATAGAGCGAGAAAAAGCTGAGAAGTTCAGAAA ACTGCAAGATGCCAGCA
GATCAGCTCAGGCCCTGGTGGAACAGATGGTGAATGAGGGTGTTAATGCAGATAGC
ATCAAACAAGCCTCAGAACA ACTGAACAGCCGGTGGATCGAATTCTGCCAGTTGCT
AAGTGAGAGACTTAACTGGCTGGAGTATCAGAACAACATCATCGCTTTCTATAATCA
GCTACAACAATTGGAGCAGATGACA ACTACTGCTGAAA ACTGGTTGAAAATCCAAC
CCACCACCCATCAGAGCCAACAGCAATTAAGTCAGTTAAAAATTTGTAAGGAT
GAAGTCAACCGGCTATCAGGTCTTCAACCTCAAATTGAACGATTA AAAATTCAAAG
CATAGCCCTGAAAGAGAAAGGACAAGGACCCATGTTCTTGGATGCAGACTTTGTGG
CCTTTACA AATCATTTTAAGCAAGTCTTTTCTGATGTGCAGGCCAGAGAGAAAGAGC
TACAGACAATTTTTGACACTTTGCCACCAATGCGCTATCAGGAGACCATGAGTGCCA
TCAGGACATGGGTCCAGCAGTCAGAAACCAA ACTCTCCATACTCAACTTAGTGTC
CCGACTATGAAATCATGGAGCAGAGACTCGGGGAATTGCAGGCTTTACAAGTTCT
CTGCAAGAGCAACAAAGTGGCCTATACTATCTCAGCACC ACTGTGAAAGAGATGTC
GAAGAAAGCGCCCTCTGAAATTAGCCGGAATATCAATCAGAATTTGAAGAAATTG
AGGGACGCTGGAAGAAGCTCTCCTCCAGCTGGTTGAGCATTGTCAAAGCTAGAG
GAGCAAATGAATAAACTCCGAAAAATTCAGAATCACATACAAACCCTGAAGAAATG

GATGGCTGAAGTTGATGTTTTCTGAAGGAGGAATGGCCTGCCCTTGGGGATTGAGA
AATTCTAAAAAGCAGCTGAAACAGTGCAGACTTTTAGTCAGTGATATTCAGACAA
TTCAGCCCAGTCTAAACAGTGTCAATGAAGGTGGGCAGAAGATAAAGAATGAAGCA
GAGCCAGAGTTTGCTTCGAGACTTGAGACAGAACTCAAAGAACTTAACACTCAGTG
GGATCACATGTGCCAACAGGTCTATGCCAGAAAGGAGGCCTTGAAGGGAGGTTTGG
AGAAAAGTGTAAAGCCTCCAGAAAGATCTATCAGAGATGCACGAATGGATGACACAA
GCTGAAGAAGAGTATCTTGAGAGAGATTTTGAATATAAAACTCCAGATGAATTACA
GAAAGCAGTTGAAGAGATGAAGAGAGCTAAAGAAGAGGCCCAACAAAAAGAAGCG
AAAGTGAACTCCTTACTGAGTCTGTAAATAGTGTTCATAGCTCAAGCTCCACCTGTA
GCACAAGAGGCCTTAAAAAGGAACTTGAACTCTAACCACCAACTACCAGTGGCT
CTGCACTAGGCTGAATGGGAAATGCAAGACTTTGGAAGAAGTTTGGGCATGTTGGC
ATGAGTTATTGTCATACTTGGAGAAAGCAAACAAGTGGCTAAATGAAGTAGAATTT
AACTTAAAACCACTGAAAACATTCTGGCGGAGCTGAGGAAATCTCTGAGGTGCT
AGATTCACCTGAAAATTTGATGCGACATTCAGAGGATAACCCAAATCAGATTCGCAT
ATTGGCACAGACCCTAACAGATGGCGGAGTCATGGATGAGCTAATCAATGAGGAAC
TTGAGACATTTAATTCTCGTTGGAGGGAACACTACATGAAGAGGCTGTAAGGAGGCAA
AAGTTGCTTGAACAGAGCATCCAGTCTGCCAGGAGACTGAAAAATCCTTACACTTA
ATCCAGGAGTCCCTCACATTCATTGACAAGCAGTTGGCAGCTTATATTGCAGACAAG
GTGGACGCAGCTCAAATGCCTCAGGAAGCCCAGAAAATCCAATCTGATTTGACAAG
TCATGAGATCAGTTTAGAAGAAATGAAGAAACATAATCAGGGGAAGGAGGCTGCC
AAAGAGTCTGTCTCAGATTGATGTTGCACAGAAAAAATTACAAGATGTCTCCATGA
AGTTTCGATTATTCCAGAAACCAGCCAATTTTGAGCAGCGTCTACAAGAAAGTAAG
ATGATTTTAGATGAAGTGAAGATGCACTTGCCTGCATTGGAAACAAAGAGTGTGGA
ACAGGAAGTAGTACAGTCACAGCTAAATCATTGTGTGAACTTGTATAAAAGTCTGA
GTGAAGTGAAGTCTGAAGTGGAAATGGTGATAAAGACTGGACGTCAGATTGTACAG
AAAAAGCAGACGGAAAATCCCAAAGAACTTGATGAAAGAGTAACAGCTTTGAAATT
GCATTATAATGAGCTGGGAGCAAAGGTAACAGAAAGAAAGCAACAGTTGGAGAAA
TGCTTGAAATTGTCCCGTAAGATGCGAAAGGAAATGAATGTCTTGACAGAATGGCT
GGCAGCTACAGATATGGAATTGACAAAGAGATCAGCAGTTGAAGGAATGCCTAGTA
ATTTGGATTCTGAAGTTGCCTGGGGAAAGGCTACTCAAAAAGAGATTGAGAAACAG
AAGGTGCACCTGAAGAGTATCACAGAGGTAGGAGAGGCCTTGAAAACAGTTTTGGG
CAAGAAGGAGACGTTGGTGGAAAGATAAACTCAGTCTTCTGAATAGTAACTGGATAG
CTGTCACCTCCCGAGCAGAAGAGTGGTTAAATCTTTTGTGGAATACCAGAAACACA
TGGAAACTTTTGACCAGAATGTGGACCACATCACAAAGTGGATCATTGAGGCTGAC
ACACTTTTGGATGAATCAGAGAAAAAGAAACCCAGCAAAAAGAAGACGTGCTTAA
GCGTTTAAAGGCAGAACTGAATGACATACGCCAAAGGTGGACTCTACACGTGACC
AAGCAGCAAACCTTGATGGCAAACCGCGGTGACCACTGCAGGAAATTAGTAGAGCCC
CAAATCTCAGAGCTCAACCATCGATTTGCAGCCATTTACACAGAATTAAGACTGGA
AAGGCCTCCATTCCTTTGAAGGAATTGGAGCAGTTTAACTCAGATATACAAAATTG
CTTGAACCACTGGAGGCTGAAATTCAGCAGGGGGTGAATCTGAAAGAGGAAGACTT

CAATAAAGATATGAATGAAGACAATGAGGGTACTGTAAAAGAATTGTTGCAAAGAG
GAGACAACCTTACAACAAAGAATCACAGATGAGAGAAAGCGAGAGGAAATAAAGAT
AAAACAGCAGCTGTTACAGACAAAACATAATGCTCTCAAGGATTTGAGGTCTCAA
GAAGAAAAAAGGCTCTAGAAATTTCTCATCAGTGGTATCAGTACAAGAGGCAGGCT
GATGATCTCCTGAAATGCTTGGATGACATTGAAAAAAAATTAGCCAGCCTACCTGA
GCCAGAGATGAAAGGAAAATAAAGGAAATTGATCGGGAATTGCAGAAGAAGAAA
GAGGAGCTGAATGCAGTGCCTAGGCAAGCTGAGGGCTTGTCTGAGGATGGGGCCGC
AATGGCAGTGGAGCCAACCTCAGATCCAGCTCAGCAAGCGCTGGCGGGAAATTGAGA
GCAAATTTGCTCAGTTTTCGAAGACTCAACTTTGCACAAATTCACACTGTCCGTGAAG
AAACGATGATGGTGTGACTGAAGACATGCCTTTGGAAATTTCTTATGTGCCTTCTA
CTTATTTGACTGAAATCACTCATGTCTCACAAGCCCTATTAGAAGTGGAACTTCTC
TCAATGCTCCTGACCTCTGTGCTAAGGACTTTGAAGATCTCTTTAAGCAAGAGGAGT
CTCTGAAGAATATAAAAGATAGTCTACAACAAAGCTCAGGTCGGATTGACATTATTC
ATAGCAAGAAGACAGCAGCATTGCAAAGTGCAACGCCTGTGGAAAGGGTGAAGCT
ACAGGAAGCTCTCTCCAGCTTGATTTCCAATGGGAAAAAGTTAACAAAATGTACA
AGGACCGACAAGGGCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTATTAT
GATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGAC
ACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAGGAACTCC
AGGATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTGTCAGAACATTGAATGCAACTGGGGAA
GAAATAATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAAATTGGG
AAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAAGA
GGCTAGAAGAACAAAAGAATATCTTGTGAGAATTTCAAAGAGATTTAAATGAATTT
GTTTTATGGTTGGAGGAAGCAGATAACATTGCTAGTATCCCCTTGAACCTGGAAAA
GAGCAGCAACTAAAAGAAAAGCTTGAGCAAGTCAAGTTACTGGTGGAAAGAGTTGCC
CCTGCGCCAGGGAATTCTCAAACAATTAATGAACTGGAGGACCCGTGCTTGTA
GTGCTCCATAAGCCCAGAAGAGCAAGATAAACTTGAAAATAAGCTCAAGCAGACA
AATCTCCAGTGGATAAAGGTTTCCAGAGCTTTACCTGAGAAACAAGGAGAAATTGA
AGCTCAAATAAAAGACCTTGGGCAGCTTGAAAAAAGCTTGAAGACCTTGAAGAGC
AGTTAAATCATCTGCTGCTGTGGTTATCTCCTATTAGGAATCAGTTGGAAATTTATA
ACCAACCAACCAAGAAGGACCATTTGACGTTTCAAGGAACTGAAATAGCAGTTCAA
GCTAAACAACCGGATGTGGAAGAGATTTTGTCTAAAGGGCAGCATTGTACAAGGA
AAAACCAGCCACTCAGCCAGTGAAGAGGAAGTTAGAAGATCTGAGCTCTGAGTGG
AGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAGAGCTGAGGGCAAAGCAGCCTGACCTAGCTCCT
GGACTGACCACTATTGGAGCCTCTCCTACTCAGACTGTTACTCTGGTGACACAACCT
GTGGTTACTAAGGAACTGCCATCTCCAACTAGAAATGCCATCTTCTTGTGATGTTG
GAGGTACCTGCTCTGGCAGATTTCAACCGGGCTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTT
TCTCTGCTTGATCAAGTTATAAAATCACAGAGGGTGTGGTGGGTGACCTTGAAGAT
ATCAACGAGATGATCATCAAGCAGAAGGCAACAATGCAGGATTTGGAACAGAGGC
GTCCCAGTTGGAAGAACTCATTACCGCTGCCAAAATTTGAAAAACAAGACCAGC
AATCAAGAGGCTAGAACAATCATTACGGATCGAATTGAAAGAATTCAGAATCAGTG

GGATGAAGTACAAGAACACCTTCAGAACCGGAGGCAACAGTTGAATGAAATGTTAA
AGGATTCAACACAATGGCTGGAAGCTAAGGAAGAAGCTGAGCAGGTCTTAGGACAG
GCCAGAGCCAAGCTTGAGTCATGGAAGGAGGGTCCCTATACAGTAGATGCAATCCA
AAAGAAAATCACAGAAACCAAGCAGTTGGCCAAAGACCTCCGCCAGTGGCAGACA
AATGTAGATGTGGCAAATGACTTGGCCCTGAACTTCTCCGGGATTATTCTGCAGAT
GATACCAGAAAAGTCCACATGATAACAGAGAATATCAATGCCTCTTGGAGAAGCAT
TCATAAAAGGGTGAGTGAGCGAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTCATAGATTACTGC
AACAGTTCCCCCTGGACCTGGAAAAGTTTCTTGCCTGGCTTACAGAAGCTGAAACAA
CTGCCAATGTCCTACAGGATGCTACCCGTAAGGAAAGGCTCCTAGAAGACTCCAAG
GGAGTAAAAGAGCTGATGAAACAATGGCAAGACCTCCAAGGTGAAATTGAAGCTCA
CACAGATGTTTATCACAACTGGATGAAAACAGCCAAAAAATCCTGAGATCCCTGG
AAGGTTCCGATGATGCAGTCCTGTTACAAAGACGTTTGGATAACATGAACTTCAAGT
GGAGTGAACCTCGGAAAAAGTCTCTCAACATTAGGTCCATTTGGAAGCCAGTTCTG
ACCAGTGGAAGCGTCTGCACCTTCTCTGCAGGAACTTCTGGTGTGGCTACAGCTGA
AAGATGATGAATTAAGCCGGCAGGCACCTATTGGAGGCGACTTTCAGCAGTTCAG
AAGCAGAACGATGTACATAGGGCCTTCAAGAGGGAATTGAAAACCTAAAGAACCTGT
AATCATGAGTACTCTTGAGACTGTACGAATATTTCTGACAGAGCAGCCTTTGGAAGG
ACTAGAGAACTCTACCAGGAGCCCAGAGAGCTGCCTCCTGAGGAGAGAGCCCAGA
ATGTCACTCGGCTTCTACGAAAGCAGGCTGAGGAGGTCAATACTGAGTGGGAAAAA
TTGAACCTGCACTCCGCTGACTGGCAGAGAAAAATAGATGAGACCCTTGAAAGACT
CCAGGAACTTCAAGAGGCCACGGATGAGCTGGACCTCAAGCTGCGCCAAGCTGAGG
TGATCAAGGGATCCTGGCAGCCCGTGGGCGATCTCCTCATTGACTCTCTCCAAGATC
ACCTCGAGAAAGTCAAGGCACTTCGAGGAGAAATTGCGCCTCTGAAAGAGAACGTG
AGCCACGTCAATGACCTTGCTCGCCAGCTTACCACTTTGGGCATTCAGCTCTCACCG
TATAACCTCAGCACTCTGGAAGACCTGAACACCAGATGGAAGCTTCTGCAGGTGGC
CGTCGAGGACCGAGTCAGGCAGCTGCATGAAGCCCACAGGGACTTTGGTCCAGCAT
CTCAGCACTTTCTTTCCACGTCTGTCCAGGGTCCCTGGGAGAGAGCCATCTCGCCAA
ACAAAGTGCCCTACTATATCAACCACGAGACTCAAACAACCTTGCTGGGACCATCCC
AAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGATTCTCAGCT
TATAGGACTGCCATGAACTCCGAAGACTGCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTG
AGCCTGTCAGCTGCATGTGATGCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGACCA
GCCCATGGATATCCTGCAGATTATTAATTGTTTGACCACTATTTATGACCGCCTGGA
GCAAGAGCACAAACAATTTGGTCAACGTCCCTCTCTGCGTGGATATGTGTCTGAACTG
GCTGCTGAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCCTGTCTTTTAA
AACTGGCATCATTTCCCTGTGTAAGCACATTTGGAAGACAAGTACAGATACCTTTT
CAAGCAAGTGGCAAGTTCAACAGGATTTTGTGACCAGCGCAGGCTGGGCCTCCTTCT
GCATGATTCTATCCAAATTCGAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCATCCTTTGGGGGCAG
TAACATTGAGCCAAGTGTCCGGAGCTGCTTCCAATTTGCTAATAATAAGCCAGAGAT
CGAAGCGGCCCTCTTCCCTAGACTGGATGAGACTGGAACCCCAAGTCCATGGTGTGGCT
GCCCGTCTGCACAGAGTGGCTGCTGCAGAACTGCCAAGCATCAGGCCAAATGTA

ACATCTGCAAAGAGTGTCCAATCATTGGATTCAGGTACAGGAGTCTAAAGCACTTTA
ATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGTCGAGTTGCAAAGGCCATAAAA
TGACTATCCCATGGTGGAATATTGCACTCCGACTACATCAGGAGAAGATGTTTCGAG
ACTTTGCCAAGGTACTAAAAACAAATTTGGAACCAAAGGTATTTTGCGAAGCAT
CCCCGAATGGGCTACCTGCCAGTGCAGACTGTCTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC
TCCCGTTACTCTGATCAACTTCTGGCCAGTAGATTCTGCGCCTGCCTCGTCCCCTCAG
CTTTCACACGATGATACTCATTACGCATTGAACATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAA
ATGGAAAACAGCAATGGATCTTATCTAAATGATAGCATCTCTCCTAATGAGAGCATA
GATGATGAACATTTGTTAATCCAGCATTACTGCCAAAGTTTGAACCAGGACTCCCC
CTGAGCCAGCCTCGTAGTCCTGCCAGATCTTGATTTCTTAGAGAGTGAGGAAAGA
GGGGAGCTAGAGAGAATCCTAGCAGATCTTGAGGAAGAAAACAGGAATCTGCAAG
CAGAATATGACCGTCTAAAGCAGCAGCACGAACATAAAGGCCTGTCCCCACTGCCG
TCCCCTCCTGAAATGATGCCACCTCTCCCCAGAGTCCCCGGGATGCTGAGCTCATT
GCTGAGGCCAAGCTACTGCGTCAACACAAAGGCCGCCTGGAAGCCAGGATGCAAAT
CCTGGAAGACCACAATAAACAGCTGGAGTCACAGTTACACAGGCTAAGGCAGCTGC
TGGAGCAACCCAGGCAGAGGCCAAAGTGAATGGCACAACGGTGTCTCTCTTCT
ACCTCTCTACAGAGGTCCGACAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGT
CAAACCTTCGGACTCCATGGGTGAGGAAGATCTTCTCAGTCCTCCCCAGGACACAAGC
ACAGGGTTAGAGGAGGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCTTCCCTAGTTCAAGAGG
AAGAAATACCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGGAAGTCTTTTCCA
CATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCTTAGTATCAGTCATGACAGATG
AAGAAGGAGCAGAATAAATGTTTTACAACCTCTGATTCCCGCATGGTTTTTATAATA
TTCATAACAACAAAGAGGATTAGACAGTAAGAGTTTACAAGAAATAAATCTATATTTT
TGTGAAGGGTAGTGGTATTATACTGTAGATTTTCAGTAGTTTCTAAGTCTGTTATTGTT
TTGTTAACAATGGCAGGTTTTTACACGTCTATGCAATTGTACAAAAAAGTTATAAGAA
AACTACATGTAAAATCTTGATAGCTAAATAACTTGCCATTTCTTTATATGGAACGCA
TTTTGGGTTGTTTAAAAATTTATAACAGTTATAAAGAAAGATTGTAAACTAAAGTGT
GCTTTATAAAAAAAGTTGTTTATAAAAACCCCTAAAAACAAAACAAACACACACA
CACACACATACACACACACACACAAAACCTTTGAGGCAGCGCATTGTTTTGCATCCTT
TTGGCGTGATATCCATATGAAATTCATGGCTTTTTCTTTTTTGCATATTAAGATAA
GACTTCCTCTACCACCACACCAAATGACTACTACACACTGCTCATTTGAGAAGTGT
AGCTGAGTGGGGCAGGCTTGAGTTTTCATTTTCATATATCTATATGTCTATAAGTATAT
AAATACTATAGTTATATAGATAAAGAGATACGAATTTCTATAGACTGACTTTTTCCA
TTTTTTAAATGTTTCATGTCACATCCTAATAGAAAGAAATTACTTCTAGTCAGTCATCC
AGGCTTACCTGCTTGGTCTAGAATGGATTTTTCCCGGAGCCGGAAGCCAGGAGGAA
ACTACACCACACTAAAACATTGTCTACAGCTCCAGATGTTTCTCATTTTAAACAAC
TTCCACTGACAACGAAAGTAAAGTAAAGTATTGGATTTTTTTAAAGGGAACATGTGA
ATGAATACACAGGACTTATTATATCAGAGTGAGTAATCGGTTGGTTGGTTGATTGAT
TGATTGATTGATACATTCAGCTTCTGCTGCTAGCAATGCCACGATTTAGATTTAATG
ATGCTTCAGTGGAATCAATCAGAAGGTATTCTGACCTTGTGAACATCAGAAGGTAT

TTTTTAACTCCCAAGCAGTAGCAGGACGATGATAGGGCTGGAGGGCTATGGATTCCC
 AGCCCATCCCTGTGAAGGAGTAGGCCACTCTTTAAGTGAAGGATTGGATGATTGTTT
 ATAATACATAAAGTTCTCTGTAATTACAATAAATTATTATGCCCTCTTCTCACAGTC
 AAAAGGAACTGGGTGGTTTTGGTTTTTTGTTGCTTTTTTAGATTTATTGTCCCATGTGGG
 ATGAGTTTTTAAATGCCACAAGACATAATTTAAAATAAATAAACTTTGGGAAAAGG
 TGTA AACAGTAGCCCCATCACATTTGTGATACTGACAGGTATCAACCCAGAAGCCC
 ATGAACTGTGTTCCATCCTTTGCATTTCTCTGCGAGTAGTTCCACACAGGTTTGTA
 GTAAGTAAGAAAGAAGGCAAATTGATTCAAATGTTACAAAAAACCTTCTTGGTG
 GATTAGACAGGTTAAATATATAAACAAACAAACAAAAATTGCTCAAAAAAGAGGA
 GAAAAGCTCAAGAGGAAAAGCTAAGGACTGGTAGGAAAAGCTTTACTCTTTCATG
 CCATTTTATTTCTTTTTGATTTTTAAATCATTCAATAGATACCACCGTGTGACCT
 ATAATTTTGCAAATCTGTTACCTCTGACATCAAGTGTAATTAGCTTTTGGAGAGTGG
 GCTGACATCAAGTGTAATTAGCTTTTGGAGAGTGGGTTTTGTCCATTATTAATAATT
 AATTAATTAACATCAAACACGGCTTCTCATGCTATTTCTACCTCACTTTGGTTTTGGG
 GTGTTCCCTGATAATTGTGCACACCTGAGTTCACAGCTTCACCACTTGTCCATTGCGTT
 ATTTCTTTTTCTTTTATAATTCTTTCTTTTTCTTTCATAATTTTCAAAGAAAACCCA
 AAGCTCTAAGGTAACAAATTACCAAATTACATGAAGATTTGGTTTTTGTCTTGCATT
 TTTTCTTTTATGTGACGCTGGACCTTTTCTTTACCCAAGGATTTTTAAACTCAGAT
 TAAAACAAGGGTACTTTACATCCTACTAAGAAGTTAAGTAAGTATTCATT
 CAAAATCAGAGGTAATAGAGTGCATAAATAATTTGTTTTAATCTTTTTGTTTTTC
 TTTTAGACACATTAGCTCTGGAGTGAGTCTGTCATAATTTGAACAAAAATTGAGA
 GCTTTATTGCTGCATTTTAAGCATAATTAATTTGGACATTATTTTCGTGTTGTGTTCTTT
 ATAACCACCAAGTATTAAACTGTAATCATAATGTAAGTGAAGCATAAACATCACA
 TGGCATGTTTTGTCATTGTTTTCAGGTAAGTCTTACTTGAGTATCATAATATAT
 TGTGTTTTAACACCAACACTGTAACATTTACGAATTTTTTTTTAACTTCAGTTTTA
 CTGCATTTTCACAACATATCAGACTTCACCAAATATATGCCTTACTATTGTATTATAG
 TACTGCTTTACTGTGTATCTCAATAAAGCACGCAGTTATGTTAC (SEQ ID NO: 2239)

[000283] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 8
 (положения нуклеотидов 894-1075 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

ATGTTGATACCACSTATCCAGATAAGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCA
 CTCTTCCAAGTTTTGCCTCAACAAGTGAGCATTGAAGCCATCCAGGAAGTGGAATG
 TTGCCAAGGCCACSTAAAGTGAAGTAAAGAAGAACATTTTCAGTTACATCATCAAATG
 CACTATTCTCAACAG (SEQ ID NO: 2240)

[000284] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 23
 (положения нуклеотидов 3194-3406 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GCTTTACAAAGTTCTCTGCAAGAGCAACAAAGTGGCCTATACTATCTCAGCA
 CCACTGTGAAAGAGATGTGCAAGAAAGCGCCCTCTGAAATTAGCCGGAATATCAA
 TCAGAATTTGAAGAAATTGAGGGACGCTGGAAGAAGCTCTCCTCCAGCTGGTTGA
 GCATTGTCAAAAGCTAGAGGAGCAAATGAATAAACTCCGAAAAATTCAG (SEQ ID
 NO: 2241)

[000285] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 43 (положения нуклеотидов 6362-6534 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

AATATAAAAGATAGTCTACAACAAAGCTCAGGTCGGATTGACATTATTCATA
GCAAGAAGACAGCAGCATTGCAAAGTGCAACGCCTGTGGAAAGGGTGAAGCTACA
GGAAGCTCTCTCCCAGCTTGATTTCCAATGGGAAAAAGTTAACAAAATGTACAAGG
ACCGACAAGG (SEQ ID NO: 2242)

[000286] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 44 (положения нуклеотидов 6535-6682 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTTCATTATGATATAAAG
ATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCT
GAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG (SEQ ID NO: 2243)

[000287] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 45 (положения нуклеотидов 6683-6858 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GAACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTGTCAGAACATTGAATG
CAACTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTATTCTACAG
GAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGA
CAGAAAAAAGAG (SEQ ID NO: 2244)

[000288] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 46 (положения нуклеотидов 6859-7006 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GCTAGAAGAACAAAAGAATATCTTGTGAGAATTTCAAAGAGATTTAAATGAA
TTTGTTTTATGGTTGGAGGAAGCAGATAACATTGCTAGTATCCCACTTGAACCTGGA
AAAGAGCAGCAACTAAAAGAAAAGCTTGAGCAAGTCAAG (SEQ ID NO: 2245)

[000289] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 50 (положения нуклеотидов 7445-7553 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

AGGAAGTTAGAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTC
AAGAGCTGAGGGCAAAGCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCC
T (SEQ ID NO: 2246)

[000290] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 51 (положения нуклеотидов 7554-7786 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

CTCСТАCTCAGACTGTTACTCTGGTGACACAACCTGTGGTTACTAAGGAAACT
GCCATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCA
GATTTCAACCGGGCTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATCAAGTT
ATAAAATCACAGAGGGTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCAT
CAAGCAGAAG (SEQ ID NO: 2247)

[000291] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 52 (положения нуклеотидов 7787-7904 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GCAACAATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCCCCAGTTGGAAGAACTCATTA
CCGCTGCCCAAATTTGAAAAACAAGACCAGCAATCAAGAGGCTAGAACAATCATT
ACGGATCGAA (SEQ ID NO: 2248)

[000292] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 53 (положения нуклеотидов 7905-8116 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

TTGAAAGAATTTCAGAATCAGTGGGATGAAGTACAAGAACACCTTCAGAACCG
GAGGCAACAGTTGAATGAAATGTTAAAGGATTCAACACAATGGCTGGAAGCTAAGG
AAGAAGCTGAGCAGGTCTTAGGACAGGCCAGAGCCAAGCTTGAGTCATGGAAGGA
GGGTCCTATACAGTAGATGCAATCCAAAAGAAAATCACAGAAACCAAG (SEQ ID
NO: 2249)

[000293] Дистрофин (DMD) *Homo sapiens*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 55 (положения нуклеотидов 8272-8461 референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GGTGAGTGAGCGAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTCATAGATTACTGCAACAG
TTCCCCCTGGACCTGGAAAAGTTTCTTGCCTGGCTTACAGAAGCTGAAACAACCTGCC
AATGTCCTACAGGATGCTACCCGTAAGGAAAGGCTCCTAGAAGACTCCAAGGGAGT
AAAAGAGCTGATGAAACAATGGCAA (SEQ ID NO: 2250)

[000294] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), нацелен на последовательность экзонного энхансера сплайсинга (ESE) в DMD (например, последовательность ESE экзона 23, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53 или 55). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), нацелен на последовательность экзонного энхансера сплайсинга (ESE) в DMD (например, последовательность ESE экзона 8, 23, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53 или 55). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), нацелен на последовательность ESE экзона 51 DMD (например, ESE, приведенных в таблице 15). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), нацелен на последовательность ESE экзона DMD 8, 23, 42, 44, 45, 46, 50, 52, 53 или 55 (например, ESE, приведенного в таблице 11).

[000295] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона, например, для пропуска одного или более экзонов 8, 23, 42, 44, 45, 46, 50, 52, 53 и 55), содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE транскрипта DMD (например, один или более полных или частичных ESE, приведенных в таблице 15 или таблице 11). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 402-436 и 2043-2238. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенных в любой из SEQ ID NO: 402-436 и 2043-2238.

Таблица 15. Экзонные энхансеры сплайсинга в экзоне 51 DMD

№ ESE	Референсное начальное положение*	SEQ NO:	ID	Последовательность мотива ESE	Название
51-1	1565421	402		CTACTCA	Dp427m_51:SRSF5
51-2	1565426	403		CAGACTG	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-3	1565428	404		GACTGTT A	Dp427m_51:SRSF2
51-4	1565433	405		TTACTCT	Dp427m_51:SRSF5
51-5	1565435	406		ACTCTGG	Dp427m_51:SRSF5
51-6	1565436	407		CTCTGGT	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-7	1565442	408		TGACACA	Dp427m_51:SRSF5
51-8	1565443	409		GACACAA	Dp427m_51:SRSF1
51-9	1565444	410		ACACAAC	Dp427m_51:SRSF5
51-10	1565448	411		AACCTGT G	Dp427m_51:SRSF2
51-11	1565450	412		CCTGTGG	Dp427m_51:SRSF5
51-12	1565451	413		CTGTGGT	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-13	1565455	414		GGTACT A	Dp427m_51:SRSF2
51-14	1565457	415		TTACTAA	Dp427m_51:SRSF5
51-15	1565460	416		CTAAGGA	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-16	1565469	417		CTGCCAT	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-17	1565479	418		CAAATA	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-18	1565508	419		TGGAGGT	Dp427m_51:SRSF1
51-19	1565512	420		GGTACCT G	Dp427m_51:SRSF2
51-20	1565528	421		GATTTCA A	Dp427m_51:SRSF2
51-21	1565530	422		TTTCAAC	Dp427m_51:SRSF5
51-22	1565532	423		TCAACCG	Dp427m_51:SRSF5
51-23	1565533	424		CAACCGG	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-24	1565544	425		GGACAGA A	Dp427m_51:SRSF2

51-25	1565556	426	CCGACTG	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-26	1565557	427	CGACTGG	Dp427m_51:SRSF5
51-27	1565565	428	TTTCTCTG	Dp427m_51:SRSF2
51-28	1565567	429	TCTCTGC	Dp427m_51:SRSF5
51-29	1565591	430	TCACAGA	Dp427m_51:SRSF5
51-30	1565592	431	CACAGA	Dp427m_51:SRSF6
51-31	1565593	432	ACAGAGG	Dp427m_51:SRSF5
51-32	1565594	433	CAGAGGG	Dp427m_51:SRSF1 (IgM-BRCA1)
51-33	1565615	434	CTTGAGG	Dp427m_51:SRSF5
51-34	1565617	435	TGAGGA	Dp427m_51:SRSF6
51-35	1565630	436	GAGATGA	Dp427m_51:SRSF1

*Термин "референсное начальное положение" относится к положению первого нуклеотида мотива ESE в нуклеотидах 5,001-2225382 референсной последовательности NCBI NG_012232.1 (NG_012232, версии 1). Нуклеотиды 5001-2225382 референсной последовательности NCBI NG_012232.1 (NG_012232, версии 1) соответствуют гену дистрофина (DMD) *Homo sapiens* на хромосоме X.

Таблица 11. Экзонные энхансеры сплайсинга в экзонах 8, 23, 43, 44, 45, 46, 50, 52, 53 и 55 DMD

Экзон	Референсное начальное положение*	SEQ ID NO:	Последовательность мотива ESE	Название
8	640346	2047	TCCATC	Dp427m_8:SRSF6
8	640358	2048	TACATC	Dp427m_8:SRSF6
8	640362	2049	TCACATC	Dp427m_8:SRSF5
8	640363	2050	CACATC	Dp427m_8:SRSF6
8	640367	2051	TCACTCT	Dp427m_8:SRSF5
8	640368	2052	CACTCTT	Dp427m_8:SRSF1 (IgM-BRCA1)
8	640373	2053	TTCCAAG	Dp427m_8:SRSF5
8	640383	2054	TGCCTC	Dp427m_8:SRSF6
8	640385	2055	CCTCAAC	Dp427m_8:SRSF5
8	640388	2056	CAACAAG	Dp427m_8:SRSF5
8	640434	2057	GGCCACC T	Dp427m_8:SRSF2
8	640439	2058	CCTAAAG	Dp427m_8:SRSF5

8	640447	2059	GACTAAA G	Dp427m_8:SRSF2
8	640469	2060	TTACATC	Dp427m_8:SRSF5
8	640470	2048	TACATC	Dp427m_8:SRSF6
8	640477	2061	TCAAATG	Dp427m_8:SRSF5
8	640490	2062	TCTCAAC	Dp427m_8:SRSF5
23	870903	2063	TTACAAA	Dp427m_23:SRSF5
23	870910	2064	GTTCTCT G	Dp427m_23:SRSF2
23	870912	429	TCTCTGC	Dp427m_23:SRSF5
23	870933	2065	GGCCTAT A	Dp427m_23:SRSF2
23	870944	2066	TCTCAGC	Dp427m_23:SRSF5
23	870945	2067	CTCAGCA	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
23	870950	2068	CACCACT G	Dp427m_23:SRSF2
23	870952	2069	CCACTGT	Dp427m_23:SRSF5
23	870970	2070	CGAAGAA	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
23	870979	2071	CGCCCTC	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
23	870980	2072	GCCCTCT G	Dp427m_23:SRSF2
23	870993	2073	AGCCGGA	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
23	871014	2074	TTTGAAG	Dp427m_23:SRSF5
23	871028	2075	GGGACGC	Dp427m_23:SRSF1
23	871029	2076	GGACGCT G	Dp427m_23:SRSF2
23	871032	2077	CGCTGGA	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
23	871049	2078	CTCCCAG	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
23	871050	2079	TCCCAGC	Dp427m_23:SRSF5
23	871051	2080	CCCAGCT	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
23	871053	2081	CAGCTGG	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
23	871070	2082	TCAAAG	Dp427m_23:SRSF5
23	871077	2083	CTAGAGG	Dp427m_23:SRSF5
23	871078	2084	TAGAGGA	Dp427m_23:SRSF1

23	871090	2085	TGAATA	Dp427m_23:SRSF6
23	871098	2086	CTCCGAA	Dp427m_23:SRSF1 (IgM-BRCA1)
43	1051912	2087	ATAAAAG	Dp427m_43:SRSF5
43	1051922	2088	GTCTACA A	Dp427m_43:SRSF2
43	1051924	2089	CTACAAC	Dp427m_43:SRSF5
43	1051929	2090	ACAAAGC	Dp427m_43:SRSF5
43	1051934	2091	GCTCAGG	Dp427m_43:SRSF5
43	1051935	2092	CTCAGGT	Dp427m_43:SRSF1 (IgM-BRCA1)
43	1051955	2093	TTCATA	Dp427m_43:SRSF6
43	1051956	2094	TCATAGC	Dp427m_43:SRSF5
43	1051967	2095	AGACAGC	Dp427m_43:SRSF5
43	1051971	2096	AGCAGC	Dp427m_43:SRSF6
43	1051986	2097	TGCAAC	Dp427m_43:SRSF6
43	1051991	2098	CGCCTGT G	Dp427m_43:SRSF2
43	1051993	412	CCTGTGG	Dp427m_43:SRSF5
43	1051994	2099	CTGTGGA	Dp427m_43:SRSF1 (IgM-BRCA1)
43	1051995	2100	TGTGGA	Dp427m_43:SRSF6
43	1052009	2101	AGCTACA G	Dp427m_43:SRSF2
43	1052011	2102	CTACAGG	Dp427m_43:SRSF5
43	1052012	2103	TACAGGA	Dp427m_43:SRSF1 (IgM-BRCA1)
43	1052022	2104	TCTCTCC	Dp427m_43:SRSF5
43	1052023	2105	CTCTCCC A	Dp427m_43:SRSF2
43	1052025	2078	CTCCCAG	Dp427m_43:SRSF1 (IgM-BRCA1)
43	1052026	2079	TCCCAGC	Dp427m_43:SRSF5
43	1052027	2080	CCCAGCT	Dp427m_43:SRSF1 (IgM-BRCA1)
43	1052035	2106	GATTTC A	Dp427m_43:SRSF2
43	1052040	2107	CCAATGG	Dp427m_43:SRSF5
43	1052064	2108	GTACAAG	Dp427m_43:SRSF5

43	1052071	2109	GACCGAC A	Dp427m_43:SRSF2
43	1052073	2110	CCGACAA	Dp427m_43:SRSF1 (IgM-BRCA1)
43	1052074	2111	CGACAAG	Dp427m_43:SRSF5
44	1122553	2112	TGACAGA	Dp427m_44:SRSF5
44	1122575	2113	CGGCGTT	Dp427m_44:SRSF1 (IgM-BRCA1)
44	1122607	2114	TCAGTGG	Dp427m_44:SRSF5
44	1122612	2115	GGCTAAC A	Dp427m_44:SRSF2
44	1122617	2116	ACAGAAG	Dp427m_44:SRSF5
44	1122634	2117	TCTCAGA	Dp427m_44:SRSF5
44	1122635	2118	CTCAGAA	Dp427m_44:SRSF1 (IgM-BRCA1)
44	1122643	409	GACACAA	Dp427m_44:SRSF1
44	1122649	2119	AATTCCT G	Dp427m_44:SRSF2
44	1122654	2120	CTGAGAA	Dp427m_44:SRSF1 (IgM-BRCA1)
44	1122685	2121	GTATCTT A	Dp427m_44:SRSF2
45	1371096	2122	GAACTCC A	Dp427m_45:SRSF2
45	1371097	2123	AACTCCA G	Dp427m_45:SRSF2
45	1371099	2124	CTCCAGG	Dp427m_45:SRSF5
45	1371117	2125	CAGCGGC	Dp427m_45:SRSF1 (IgM-BRCA1)
45	1371118	2126	AGCGGC	Dp427m_45:SRSF6
45	1371133	2127	TCAGAAC	Dp427m_45:SRSF5
45	1371136	2128	GAACATT G	Dp427m_45:SRSF2
45	1371142	2129	TGAATGC	Dp427m_45:SRSF5
45	1371143	2130	GAATGCA A	Dp427m_45:SRSF2
45	1371146	2097	TGCAAC	Dp427m_45:SRSF6
45	1371148	2131	CAACTGG	Dp427m_45:SRSF5
45	1371151	2132	CTGGGGA	Dp427m_45:SRSF1 (IgM-BRCA1)

45	1371165	2133	ATTCAGC	Dp427m_45:SRSF5
45	1371188	2134	TGCCAGT A	Dp427m_45:SRSF2
45	1371193	2135	GTATTCT A	Dp427m_45:SRSF2
45	1371198	2102	CTACAGG	Dp427m_45:SRSF5
45	1371199	2103	TACAGGA	Dp427m_45:SRSF1 (IgM-BRCA1)
45	1371220	2136	TGAATC	Dp427m_45:SRSF6
45	1371225	2137	CTGCGGT	Dp427m_45:SRSF1 (IgM-BRCA1)
45	1371226	2138	TGCGGT	Dp427m_45:SRSF6
45	1371228	2139	CGGTGGC	Dp427m_45:SRSF1 (IgM-BRCA1)
45	1371231	2140	TGGCAGG	Dp427m_45:SRSF5
45	1371232	2141	GGCAGGA	Dp427m_45:SRSF1 (IgM-BRCA1)
45	1371235	2142	AGGAGGT	Dp427m_45:SRSF1
45	1371239	2143	GGTCTGC A	Dp427m_45:SRSF2
45	1371240	2144	GTCTGCA A	Dp427m_45:SRSF2
45	1371249	2145	CAGCTGT	Dp427m_45:SRSF1 (IgM-BRCA1)
45	1371256	2146	CAGACAG	Dp427m_45:SRSF1 (IgM-BRCA1)
46	1407384	2147	CTAGAAG	Dp427m_46:SRSF5
46	1407392	2148	ACAAAAG	Dp427m_46:SRSF5
46	1407438	2149	GTTTTAT G	Dp427m_46:SRSF2
46	1407440	2150	TTTATGG	Dp427m_46:SRSF5
46	1407445	2151	GGTTGGA G	Dp427m_46:SRSF2
46	1407448	2152	TGGAGGA	Dp427m_46:SRSF1 (IgM-BRCA1)
46	1407472	2153	GTATCCC A	Dp427m_46:SRSF2
46	1407476	2154	CCCACTT	Dp427m_46:SRSF1 (IgM-BRCA1)
46	1407477	2155	CCACTTG	Dp427m_46:SRSF5
46	1407478	2156	CACTTGA	Dp427m_46:SRSF1 (IgM-BRCA1)
46	1407496	2096	AGCAGC	Dp427m_46:SRSF6

46	1407504	2157	CTAAAAG	Dp427m_46:SRSF5
46	1407524	2158	AGTCAAG	Dp427m_46:SRSF5
50	1519533	2159	TTAGAAG	Dp427m_50:SRSF5
50	1519539	2160	GATCTGA G	Dp427m_50:SRSF2
50	1519541	2161	TCTGAGC	Dp427m_50:SRSF5
50	1519542	2162	CTGAGCT	Dp427m_50:SRSF1 (IgM-BRCA1)
50	1519544	2163	GAGCTCT G	Dp427m_50:SRSF2
50	1519549	2164	CTGAGTG	Dp427m_50:SRSF1 (IgM-BRCA1)
50	1519550	2165	TGAGTGG	Dp427m_50:SRSF5
50	1519572	2166	TTACTTC	Dp427m_50:SRSF5
50	1519573	2167	TACTTC	Dp427m_50:SRSF6
50	1519575	2168	CTTCAAG	Dp427m_50:SRSF5
50	1519584	2169	CTGAGGG	Dp427m_50:SRSF1 (IgM-BRCA1)
50	1519594	2096	AGCAGC	Dp427m_50:SRSF6
50	1519596	2170	CAGCCTG	Dp427m_50:SRSF1 (IgM-BRCA1)
50	1519600	2171	CTGACCT	Dp427m_50:SRSF1 (IgM-BRCA1)
50	1519607	2172	AGCTCCT G	Dp427m_50:SRSF2
50	1519609	2173	CTCCTGG	Dp427m_50:SRSF5
50	1519617	2174	CTGACCA	Dp427m_50:SRSF1 (IgM-BRCA1)
50	1519619	2175	GACCACT A	Dp427m_50:SRSF2
50	1519621	2176	CCACTAT	Dp427m_50:SRSF5
50	1519624	2177	CTATTGG	Dp427m_50:SRSF5
52	1609869	2178	TGCAGG	Dp427m_52:SRSF6
52	1609880	2179	GAACAGA G	Dp427m_52:SRSF2
52	1609882	432	ACAGAGG	Dp427m_52:SRSF5
52	1609883	2180	CAGAGGC	Dp427m_52:SRSF1 (IgM-BRCA1)
52	1609887	2181	GGCGTC	Dp427m_52:SRSF6
52	1609889	2182	CGTCCCC A	Dp427m_52:SRSF2

52	1609890	2183	GTCCCCA G	Dp427m_52:SRSF2
52	1609892	2184	CCCCAGT	Dp427m_52:SRSF1 (IgM-BRCA1)
52	1609893	2185	CCCAGTT	Dp427m_52:SRSF1 (IgM-BRCA1)
52	1609911	2186	TTACCGC	Dp427m_52:SRSF5
52	1609912	2187	TACCGCT G	Dp427m_52:SRSF2
52	1609917	2188	CTGCCCA	Dp427m_52:SRSF1 (IgM-BRCA1)
52	1609939	2189	GACCAGC A	Dp427m_52:SRSF2
52	1609954	2190	GGCTAGA A	Dp427m_52:SRSF2
52	1609969	2191	TACGGA	Dp427m_52:SRSF6
52	1609972	2192	GGATCGA A	Dp427m_52:SRSF2
53	1660030	2193	GAATTCA G	Dp427m_53:SRSF2
53	1660040	2114	TCAGTGG	Dp427m_53:SRSF5
53	1660041	2194	CAGTGGG	Dp427m_53:SRSF1 (IgM-BRCA1)
53	1660053	2108	GTACAAG	Dp427m_53:SRSF5
53	1660067	2127	TCAGAAC	Dp427m_53:SRSF5
53	1660071	2195	AACCGGA	Dp427m_53:SRSF1
53	1660074	2196	CGGAGGC	Dp427m_53:SRSF1 (IgM-BRCA1)
53	1660098	2197	TTAAAGG	Dp427m_53:SRSF5
53	1660103	2198	GGATTCA A	Dp427m_53:SRSF2
53	1660112	2199	ACAATGG	Dp427m_53:SRSF5
53	1660117	2200	GGCTGGA A	Dp427m_53:SRSF2
53	1660126	416	CTAAGGA	Dp427m_53:SRSF1 (IgM-BRCA1)
53	1660138	2201	CTGAGCA	Dp427m_53:SRSF1 (IgM-BRCA1)
53	1660141	2202	AGCAGGT	Dp427m_53:SRSF1 (IgM-BRCA1)
53	1660147	2203	TCTTAGG	Dp427m_53:SRSF5
53	1660148	2204	CTTAGGA	Dp427m_53:SRSF1 (IgM-BRCA1)

53	1660152	2205	GGACAGG	Dp427m_53:SRSF5
53	1660153	2206	GACAGGC	Dp427m_53:SRSF1
53	1660157	2207	GGCCAGA G	Dp427m_53:SRSF2
53	1660159	2208	CCAGAGC	Dp427m_53:SRSF5
53	1660172	2209	TGAGTC	Dp427m_53:SRSF6
53	1660183	2210	AGGAGGG	Dp427m_53:SRSF1
53	1660188	2211	GGTCCCT A	Dp427m_53:SRSF2
53	1660197	2212	ACAGTAG	Dp427m_53:SRSF5
53	1660211	2213	CCAAAAG	Dp427m_53:SRSF5
53	1660222	430	TCACAGA	Dp427m_53:SRSF5
53	1660223	431	CACAGA	Dp427m_53:SRSF6
55	1711758	2214	CGAGAGG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711763	2215	GGCTGCT T	Dp427m_55:SRSF2
55	1711786	2216	GATTACT G	Dp427m_55:SRSF2
55	1711788	2217	TTACTGC	Dp427m_55:SRSF5
55	1711792	2097	TGCAAC	Dp427m_55:SRSF6
55	1711802	2218	CCCCCTG	Dp427m_55:SRSF1 (IgM-BRCA1)
55	1711803	2219	CCCCTGG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711804	2220	CCCTGGA	Dp427m_55:SRSF1 (IgM-BRCA1)
55	1711820	2221	GTTTCTTG	Dp427m_55:SRSF2
55	1711821	2222	TTTCTTG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711826	2223	TGCCTGG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711831	2224	GGCTTAC A	Dp427m_55:SRSF2
55	1711834	2225	TTACAGA	Dp427m_55:SRSF5
55	1711835	2226	TACAGA	Dp427m_55:SRSF6
55	1711836	2116	ACAGAAG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711852	2227	CTGCCAA	Dp427m_55:SRSF1 (IgM-BRCA1)
55	1711853	2228	TGCCAAT G	Dp427m_55:SRSF2

55	1711860	2229	GTCCTAC A	Dp427m_55:SRSF2
55	1711863	2102	CTACAGG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711864	2103	TACAGGA	Dp427m_55:SRSF1 (IgM-BRCA1)
55	1711868	2230	GGATGCT A	Dp427m_55:SRSF2
55	1711873	2231	CTACCCG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711874	2232	TACCCGT A	Dp427m_55:SRSF2
55	1711888	2233	GGCTCCT A	Dp427m_55:SRSF2
55	1711893	2147	CTAGAAG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711898	2234	AGACTCC	Dp427m_55:SRSF5
55	1711899	2235	GACTCCA A	Dp427m_55:SRSF2
55	1711901	2236	CTCCAAG	Dp427m_55:SRSF5
55	1711903	2237	CCAAGGG	Dp427m_55:SRSF1 (IgM-BRCA1)
55	1711920	2238	CTGATGA	Dp427m_55:SRSF1 (IgM-BRCA1)
55	1711928	2199	ACAATGG	Dp427m_55:SRSF5

*Термин "референсное начальное положение" относится к положению первого нуклеотида мотива ESE в нуклеотидах 5001-2225382 референсной последовательности NCBI NG_012232.1 (NG_012232, версии 1). Нуклеотиды 5001-2225382 референсной последовательности NCBI NG_012232.1 (NG_012232, версии 1) соответствуют гену дистрофина (DMD) *Homo sapiens* на хромосоме X.

[000296] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 8 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 8 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 2047-2062. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2047-2062.

[000297] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6

(например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 8 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 2047-2062.

[000298] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотиды и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2047-2062. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2047-2062. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2047-2062. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2047-2062.

[000299] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 23 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 23 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 429 и 2063-2086. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 429 и 2063-2086.

[000300] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 23 DMD. В некоторых

вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 429 и 2063-2086.

[000301] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 429 и 2063-2086. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 429 и 2063-2086. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 429 и 2063-2086. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 429 и 2063-2086.

[000302] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 43 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 43 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 412, 2078-2080 и 2087-2111. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 412, 2078-2080 и 2087-2111.

[000303] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 43 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой

последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 412, 2078-2080 и 2087-2111.

[000304] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 412, 2078-2080 и 2087-2111. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 412, 2078-2080 и 2087-2111. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 412, 2078-2080 и 2087-2111. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 412, 2078-2080 и 2087-2111.

[000305] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 44 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 44 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 409 и 2112-2121. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 409 и 2112-2121.

[000306] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 44 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 409 и 2112-2121.

[000307] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 409 и 2112-2121. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 409 и 2112-2121. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 409 и 2112-2121. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 409 и 2112-2121.

[000308] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 45 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 45 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103 и 2122-2146. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103 и 2122-2146.

[000309] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 45 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103 и 2122-2146.

[000310] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103 и 2122-2146. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103 и 2122-2146. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103 и 2122-2146. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103 и 2122-2146.

[000311] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 46 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 46 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 2096 и 2147-2158. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2147-2158.

[000312] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 46 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 2096 и 2147-2158.

[000313] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2147-2158. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2147-2158. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2147-2158. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2147-2158.

[000314] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 50 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 50 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 2096 и 2160-2177. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2160-2177.

[000315] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 50 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 2096 и 2160-2177.

[000316] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2160-2177. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2160-2177. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2160-2177. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2096 и 2160-2177.

[000317] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 51 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 51 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 402-436. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 402-436. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7, 8) последовательных нуклеотидов ESE, приведенного в SEQ ID NO: 419.

[000318] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 51 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 402-436. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14) нуклеотидов ESE, приведенных в SEQ ID NO: 418 и SEQ ID NO: 419.

[000319] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 402-436. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона) is 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотиды in length, и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 402-436. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона) имеет длину 20 нуклеотидов, и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 402-436. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 402-436.

[000320] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в SEQ ID NO: 419. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в SEQ ID NO: 419.

[000321] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14) нуклеотидов ESE, приведенных в SEQ ID NO: 418 и SEQ ID NO: 419. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6

(например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14) нуклеотидов ESE, приведенных в SEQ ID NO: 418 и SEQ ID NO: 419.

[000322] Неограничивающие примеры олигонуклеотидов, которые можно использовать для пропуска экзона 51 DMD, и их целевые последовательности приведены в SEQ ID NO: 437-1241 и SEQ ID NO: 1242-2046, соответственно. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 1242-2046. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов и содержит по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 437-1241. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 437-1241. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину по меньшей мере 30 нуклеотидов (например, 30, 31, 32, 33, 34 или 35) и содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 437-1241.

[000323] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 1548, 1550, 1551, 1552, 1555, 1558, 1559, 1562, 1565, 1569, 1577, 1583, 1589, 1595, 1600, 1606, 1610, 1614, 1621, 1626, 1629, 1632, 1637, 1640, 1643, 1646, 1650, 1655, 1658 и 1662. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов и содержит по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 743, 745, 746, 747, 750, 753, 754, 757, 760, 764, 772, 778, 784, 790, 795, 801, 805, 809, 816, 821, 824, 827, 832, 835, 838, 841, 845, 850, 853 и 857. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 743, 745, 746, 747, 750, 753, 754, 757, 760, 764, 772, 778, 784, 790, 795, 801, 805, 809, 816, 821, 824, 827, 832, 835, 838, 841, 845, 850, 853 и 857. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 30 нуклеотидов и содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 743, 745, 746, 747, 750, 753, 754, 757, 760, 764, 772, 778, 784, 790, 795, 801, 805, 809, 816, 821, 824, 827, 832, 835, 838, 841, 845, 850, 853 и 857.

[000324] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 52 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 52 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 432 и 2178-2192. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой

последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 432 и 2178-2192.

[000325] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 52 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 432 и 2178-2192.

[000326] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 432 и 2178-2192. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 432 и 2178-2192. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 432 и 2178-2192. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 432 и 2178-2192.

[000327] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 53 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 53 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 416, 430, 431, 2108, 2114, 2127 и 2193-2213. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4

(например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 416, 430, 431, 2108, 2114, 2127 и 2193-2213.

[000328] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 53 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 416, 430, 431, 2108, 2114, 2127 и 2193-2213.

[000329] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 416, 430, 431, 2108, 2114, 2127 и 2193-2213. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 416, 430, 431, 2108, 2114, 2127 и 2193-2213. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 416, 430, 431, 2108, 2114, 2127 и 2193-2213. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 416, 430, 431, 2108, 2114, 2127 и 2193-2213.

[000330] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE экзона 55 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE экзона 55 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103, 2116, 2147, 2199 и 2214-2238. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область

комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103, 2116, 2147, 2199 и 2214-2238.

[000331] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE) экзона 55 DMD. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 6 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) нуклеотидов одного или более ESE (например, 2, 3, 4 или более смежных ESE), приведенных в SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103, 2116, 2147, 2199 и 2214-2238.

[000332] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 18-35 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103, 2116, 2147, 2199 и 2214-2238. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20-30 (например, 20, 25, 30) нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103, 2116, 2147, 2199 и 2214-2238. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 20 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103, 2116, 2147, 2199 и 2214-2238. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), имеет длину 30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 (например, 4, 5, 6, 7 или 8) последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 2097, 2102, 2103, 2116, 2147, 2199 и 2214-2238.

[000333] В некоторых вариантах осуществления любой из олигонуклеотидов, которые можно использовать для таргетинга DMD (например, для пропуска экзона), является фосфоамидатным морфолиновым олигомером (PMO).

[000334] Дополнительные примеры олигонуклеотидов, нацеленных на DMD (например, для пропуска экзона), приведены в публикации патентной заявки США № 2013-072541, опубликованной 21 марта 2013 года, названной "ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTOR FOR EXON SKIPPING IN A GENE ENCODING A DISPENSIBLE-DOMAIN PROTEIN"; публикации патентной заявки США № 2015-191725, опубликованной 9 июля

2015 года, названной "OLIGONUCLEOTIDE FOR THE TREATMENT OF MUSCULAR DYSTROPHY PATIENTS"; публикации патентной заявки США № 2015-196670, опубликованной 16 июля 2015 года, названной "COMPOSITIONS AND METHODS FOR DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY GENE THERAPY"; публикации патентной заявки США № 2017-349905, опубликованной 7 декабря 2017 года, названной "GENOME EDITING WITH SPLIT CAS9 EXPRESSED FROM TWO VECTORS"; публикации патентной заявки США № 2018-028554, опубликованной 1 февраля 2018 года, названной "OLIGOMERS HAVING BICYCLIC SCAFFOLD MOEITIES"; публикации патентной заявки США № 2018-171333, опубликованной 21 июня 2018 года, названной "ANTISENSE MOLECULES AND METHODS FOR TREATING PATHOLOGIES"; публикации патентной заявки США № 2018-179538, опубликованной 28 июня 2018 года, названной "ANTISENSE NUCLEIC ACIDS"; публикации патентной заявки США № 2018-265859, опубликованной 20 сентября 2018 года, названной "MODIFICATION OF THE DYSTROPHIN GENE AND USES THEREOF"; публикации патентной заявки США № 2018-369400, опубликованной 27 декабря 2018 года, названной "NUCLEIC ACID-POLYPEPTIDE COMPOSITIONS AND METHODS OF INDUCING EXON SKIPPING"; публикации патентной заявки США № 2019-000986, опубликованной 3 января 2019 года, названной "NUCLEIC ACID-POLYPEPTIDE COMPOSITIONS AND METHODS OF INDUCING EXON SKIPPING"; публикации патентной заявки США № 2019-008986, опубликованной 10 января 2019 года, названной "OLIGONUCLEOTIDE COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF"; публикации патентной заявки США № 2019-112604, опубликованной 18 апреля 2019 года, названной "METHODS AND MEANS FOR EFFICIENT SKIPPING OF EXON 45 IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY PRE-MRNA"; публикации патентной заявки США № 2019-119679, опубликованной 25 апреля 2019 года, названной "METHODS AND MEANS FOR EFFICIENT SKIPPING OF EXON 45 IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY PRE-MRNA"; публикации патентной заявки США № 2019-127733, опубликованной 2 мая 2019 года, названной "OLIGONUCLEOTIDE COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF"; публикации патентной заявки США № 2019-151476, опубликованной 23 мая 2019 года, названной "THERAPEUTIC APPLICATIONS OF CPF1-BASED GENOME EDITING"; публикации патентной заявки США № 2019-177723, опубликованной 13 июня 2019 года, названной "COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND RELATED DISORDERS"; публикации патентной заявки США № 2019-177725, опубликованной 13 июня 2019 года, названной "METHODS AND MEANS FOR EFFICIENT SKIPPING OF EXON 45 IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY PRE-MRNA"; публикации патентной заявки США № 2019-209604, опубликованной 11 июля 2019 года, названной "OLIGONUCLEOTIDES, COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF"; публикации патентной заявки США № 2019-249173, опубликованной 15 августа 2019 года, названной "METHODS AND COMPOSITIONS OF BIOLOGICALLY ACTIVE AGENTS"; публикации патентной заявки США № 2019-270994, опубликованной 5 сентября 2019 года, названной "ANTISENSE MOLECULES AND METHODS FOR

TREATING PATHOLOGIES"; публикации патентной заявки США № 2019-284556, опубликованной 19 сентября 2019 года, названной "MULTIPLE EXON SKIPPING COMPOSITIONS FOR DMD"; публикации патентной заявки США № 2019-323010, опубликованной 24 октября 2019 года, названной "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR INDUCING EXON SKIPPING AND METHODS OF USE THEREOF"; публикации патентной заявки США № 2019-330626, опубликованной 31 октября 2019 года, названной "COMPOUNDS AND METHODS FOR USE IN DYSTROPHIN TRANSCRIPT"; публикации патентной заявки США № 2019-338311, опубликованной 7 ноября 2019 года, названной "OPTIMIZED STRATEGY FOR EXON SKIPPING MODIFICATIONS USING CRISPR/CAS9 WITH TRIPLE GUIDE SEQUENCES"; публикации патентной заявки США № 2019-359982, опубликованной 28 ноября 2019 года, названной "COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY"; публикации патентной заявки США № 2019-364862, опубликованной 5 декабря 2019 года, названной "DMD REPORTER MODELS CONTAINING HUMANIZED DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY MUTATIONS"; публикации патентной заявки США № 2019-390197, опубликованной 26 декабря 2019 года, названной "OLIGONUCLEOTIDE COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF"; публикации патентной заявки США № 2020-040337, опубликованной 6 февраля 2020 года, названной "COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY"; патенте США № 10287586, выданном 14 мая 2019 года, названном "ANTISENSE MOLECULES AND METHODS FOR TREATING PATHOLOGIES"; патенте США № 10337003, выданном 2 июля 2019 года, названном "COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY"; патенте США № 10364431, выданном 30 июля 2019 года, названном "COMPOSITIONS FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY"; патенте США № 10450568, выданном 22 октября 2019 года, названном "OLIGONUCLEOTIDE COMPOSITIONS AND METHODS THEREOF"; патенте США № 10487106, выданном 26 ноября 2019 года, названном "ANTISENSE NUCLEIC ACIDS"; патенте США № 10533171, выданном 14 января 2020 года, названном "OLIGONUCLEOTIDE COMPRISING AN INOSINE FOR TREATING DMD"; патенте США № 10704060, выданном 7 июля 2020 года, названном "RNA-GUIDED GENE EDITING AND GENE REGULATION"; патенте США № 10752898, выданном 25 августа 2020 года, названном "EFFECTIVE GENE THERAPY TOOLS FOR DYSTROPHIN EXON 53 SKIPPING"; патенте США № 10876114, выданном 29 декабря 2020 года, названном "METHODS AND MEANS FOR EFFICIENT SKIPPING OF AT LEAST ONE OF THE FOLLOWING EXONS OF THE HUMAN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY GENE: 43, 46, 50-53"; патенте США № 6100099, выданном 8 августа 2000 года, названном "TEST STRIP HAVING A DIAGONAL ARRAY OF CAPTURE SPOTS"; патенте США № 6210898, выданном 3 апреля 2001 года, названном "METHOD OF PERFORMING IMMUNOCHROMATOGRAPHY"; патенте США № 7973015, выданном 5 июля 2011 года, названном "INDUCTION OF EXON SKIPPING IN EUKARYOTIC CELLS"; патенте США № 8039608, выданном 18 октября 2011 года, названном "BIOINFORMATICALLY DETECTABLE GROUP OF NOVEL REGULATORY GENES

AND USES THEREOF"; патенте США № 8361979, выданном 29 января 2013 года, названном "MEANS AND METHOD FOR INDUCING EXON-SKIPPING"; патенте США № 8802437, выданном 12 августа 2014 года, названном "MEGANUCLEASE REAGENTS OF USES THEREOF FOR TREATING GENETIC DISEASES CAUSED BY FRAME SHIFT/NON SENSE MUTATIONS"; патенте США № 8865883, выданном 21 октября 2014 года, названном "MULTIPLE EXON SKIPPING COMPOSITIONS FOR DMD"; патенте США № 9657049, выданном 23 мая 2017 года, названном "ENA NUCLEIC ACID PHARMACEUTICALS CAPABLE OF MODIFYING SPLICING OF MRNA PRECURSORS"; патенте США № 9657050, выданном 23 мая 2017 года, названном "ENA NUCLEIC ACID PHARMACEUTICALS CAPABLE OF MODIFYING SPLICING OF MRNA PRECURSORS"; патенте США № 9988629, выданном 5 июня 2018 года, названном "ANTISENSE NUCLEIC ACIDS"; международной патентной публикации № WO 2011/078797 A2, опубликованной 30 июня 2011 года, названной "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES AND USES THEREOF"; международной патентной публикации № WO 2011/154427 A1, опубликованной 15 декабря 2011 года, названной "MODIFIED SNRNAS FOR USE IN THERAPY"; международной патентной публикации № WO 2018/007475 A1, опубликованной 11 января 2018 года, названной "PRE-MRNA SPLICE SWITCHING OR MODULATING OLIGONUCLEOTIDES COMPRISING BICYCLIC SCAFFOLD MOIETIES, WITH IMPROVED CHARACTERISTICS FOR THE TREATMENT OF GENETIC DISORDERS"; международной патентной публикации № WO 2018/014042 A1, опубликованной 18 января 2018 года, названной "COMPOUNDS AND METHODS FOR MODULATION OF DYSTROPHIN TRANSCRIPT"; международной патентной публикации № WO 2018/017754 A1, опубликованной 25 января 2018 года, названной "THERAPEUTIC APPLICATIONS OF CPF1-BASED GENOME EDITING"; международной патентной публикации № WO 2018/107003 A1, опубликованной 14 июня 2018 года, названной "DMD REPORTER MODELS CONTAINING HUMANIZED DUSCHENE MUSCULAR DYSTROPHY MUTATIONS"; международной патентной публикации № WO 2018/129296 A1, опубликованной 12 июля 2018 года, названной "OPTIMIZED STRATEGY FOR EXON SKIPPING MODIFICATIONS USING CRISPR/CAS9 WITH TRIPLE GUIDE SEQUENCES"; международной патентной публикации № WO 2019/014772 A1, опубликованной 24 января 2019 года, названной "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES THAT BIND TO EXON 51 OF HUMAN DYSTROPHIN PRE-MRNA"; международной патентной публикации № WO 2019/059973 A1, опубликованной 28 марта 2019 года, названной "EXON SKIPPING OLIGOMER CONJUGATES FOR MUSCULAR DYSTROPHY"; международной патентной публикации № WO 2019/060775 A1, опубликованной 28 марта 2019 года, названной "NUCLEIC ACID-POLYPEPTIDE COMPOSITIONS AND METHODS OF INDUCING EXON SKIPPING"; международной патентной публикации № WO 2019/067975 A1, опубликованной 4 апреля 2019 года, названной "COMBINATION THERAPIES FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY"; международной патентной публикации № WO 2019/092507 A2, опубликованной 16 мая 2019 года, названной "CRISPR/CAS SYSTEMS

FOR TREATMENT OF DMD"; международной патентной публикации № WO 2019/136216 A1, опубликованной 11 июля 2019 года, названной "THERAPEUTIC CRISPR/CAS9 COMPOSITIONS AND METHODS OF USE"; международной патентной публикации № WO 2019/152609 A1, опубликованной 8 августа 2019 года, названной "COMPOSITIONS AND METHODS FOR CORRECTING DYSTROPHIN MUTATIONS IN HUMAN CARDIOMYOCYTES"; международной патентной публикации № WO 2019/200185 A1, опубликованной 17 октября 2019 года, названной "OLIGONUCLEOTIDE COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF"; международной патентной публикации № WO 2019/215333 A1, опубликованной 14 ноября 2019 года, названной "OLIGONUCLEOTIDES CONJUGATES COMPRISING 7'-5'-ALPHA-ANOMERIC-BICYCLIC SUGAR NUCLEOSIDES"; международной патентной публикации № WO 2019/241385 A2, опубликованной 19 декабря 2019 года, названной "EXON SKIPPING OLIGOMERS FOR MUSCULAR DYSTROPY"; международной патентной публикации № WO 2019/246480 A1, опубликованной 26 декабря 2019 года, названной "CORRECTION OF DYSTROPHIN EXON 43, EXON 45, OR EXON 52 DELETIONS IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY"; международной патентной публикации № WO 2020/028832 A1, опубликованной 6 февраля 2020 года, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING DYSTROPHINOPATHIES"; международной патентной публикации № WO 2018/091544 A1, опубликованной 24 мая 2018 года, названной "SUBSTANCES FOR TARGETING VARIOUS SELECTED ORGANS OR TISSUES"; международной патентной публикации № WO 2018/098480 A1, опубликованной 31 мая 2018 года, названной "PREVENTION OF MUSCULAR DYSTROPHY BY CRISPR/CPF1-MEDIATED GENE EDITING"; международной патентной публикации № WO 1993/020227 A1, опубликованной 14 октября 1993 года, названной "METHOD OF MULTIPLEX LIGASE CHAIN REACTION"; международной патентной публикации № WO 2013/100190 A1, опубликованной 4 июля 2013 года, названной "ANTISENSE NUCLEIC ACID"; международной патентной публикации № WO 2013/163628 A2, опубликованной 31 октября 2013 года, названной "GENETIC CORRECTION OF MUTATED GENES"; международной патентной публикации № WO 2007/135105 A1, опубликованной 29 ноября 2007 года, названной "MEANS AND METHOD FOR INDUCING EXON-SKIPPING"; международной патентной публикации № WO 2011/150408 A2, опубликованной 1 декабря 2011 года, названной "OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES HAVING MODIFIED INTERSUBUNIT LINKAGES AND/OR TERMINAL GROUPS"; международной патентной публикации № WO 2012/029986 A1, опубликованной 8 марта 2012 года, названной "ANTISENSE NUCLEIC ACID"; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000335] Примеры олигонуклеотидов для стимуляции редактирования гена DMD описаны в международной патентной публикации № WO2018053632 A1, опубликованной 29 марта 2018 года, названной "METHODS OF MODIFYING THE DYSTROPHIN GENE AND RESTORING DYSTROPHIN EXPRESSION AND USES THEREOF"; международной

патентной публикации № WO2017049407 A1, опубликованной 30 марта 2017 года, названной "MODIFICATION OF THE DYSTROPHIN GENE AND USES THEREOF"; международной патентной публикации № WO2016161380 A1, опубликованной 6 октября 2016 года, названной "CRISPR/CAS-RELATED METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND BECKER MUSCULAR DYSTROPHY"; международной патентной публикации № WO2017095967, опубликованной 8 июня 2017 года, названной "THERAPEUTIC TARGETS FOR THE CORRECTION OF THE HUMAN DYSTROPHIN GENE BY GENE EDITING AND METHODS OF USE"; международной патентной публикации № WO2017072590 A1, опубликованной 4 мая 2017 года, названной "MATERIALS AND METHODS FOR TREATMENT OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY"; международной патентной публикации № WO2018098480 A1, опубликованной 31 мая 2018 года, названной "PREVENTION OF MUSCULAR DYSTROPHY BY CRISPR/CPF1-MEDIATED GENE EDITING"; публикации патентной заявки США № 20170266320 A1, опубликованной 21 сентября 2017 года, названной "RNA-Guided Systems for In Vivo Gene Editing"; международной патентной публикации № WO2016025469 A1, опубликованной 18 февраля 2016 года, названной "PREVENTION OF MUSCULAR DYSTROPHY BY CRISPR/CAS9-MEDIATED GENE EDITING"; публикации патентной заявки США № 2016/0201089, опубликованной 14 июля 2016 года, названной "RNA-GUIDED GENE EDITING AND GENE REGULATION"; и публикации патентной заявки США № 2013/0145487, опубликованной 6 июня 2013 года, названной "MEGANUCLEASE VARIANTS CLEAVING A DNA TARGET SEQUENCE FROM THE DYSTROPHIN GENE AND USES THEREOF", содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности последовательностям гена DMD множества биологических видов, например, выбранных из человека, мыши и не являющихся человеком видов.

[000336] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности мутантному аллелю DMD, например, аллелю DMD с по меньшей мере одной мутацией в любых из экзонов 1-79 DMD у людей, приводящей к сдвигу рамки считывания и неправильному сплайсингу/процессингу РНК.

[000337] 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. and

Pearson C.E., "Disease-associated repeat instability and mismatch repair" DNA Repair (Amst). 2016 Feb;38:117-26.

[000338] В некоторых вариантах осуществления любой из олигонуклеотидов может находиться в форме соли, например, соли натрия, калия или магния.

[000339] В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'- нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, конъюгирован с аминогруппой, необязательно, через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит алифатический остаток. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит остаток полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфирная связь находится между спейсером и 5'- или 3'- нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'- нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любых из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, конъюгирован со спейсером, являющимся замещенным или незамещенным алифатическим, замещенным или незамещенным гетероалифатическим, замещенным или незамещенным карбоциклиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным ариленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, -O-, -N(R^A)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, -NR^AC(=O)-, -NR^AC(=O)R^A-, -C(=O)R^A-, -NR^AC(=O)O-, -NR^AC(=O)N(R^A)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R^A)-, -S(O)₂NR^A-, -NR^AS(O)₂- или их комбинацией; каждый R^A независимо представляет собой атом водорода или замещенный или незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления спейсер является замещенным или незамещенным алкиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, -O-, -N(R^A)-, или -C(=O)N(R^A)₂ или их комбинацией.

[000340] В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'- нуклеозид любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, конъюгирован с соединением формулы -NH₂-(CH₂)_n-, где n является целым числом от 1 до 12. В некоторых вариантах осуществления n составляет 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфирная связь находится между соединением формулы NH₂-(CH₂)_n- и 5'- или 3'- нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы NH₂-(CH₂)₆- конъюгировано с олигонуклеотидом посредством реакции между 6-амино-1-гексанолом (NH₂-(CH₂)₆-OH) и 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000341] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгированы со специфическим средством, например, мышечно-специфическое средство, таким как антитело против TfR, например, через аминогруппу.

а. Размер/последовательность олигонуклеотида

[000342] 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.

[000343] 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 функции мишени (например, мРНК), вызывая изменение активности (например, ингибирование трансляции, изменение сплайсинга, пропуск экзонов) 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.

[000344] 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.

[000345] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является комплементарным (например, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей

мере 95% или 100%) целевой последовательности любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является комплементарным (например, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) целевой последовательности любого из олигонуклеотидов, приведенных в SEQ ID NO: 437-1241. В некоторых вариантах осуществления такая целевая последовательность является на 100% комплементарной олигонуклеотиду, приведенному в таблице 14. В некоторых вариантах осуществления такая целевая последовательность является на 100% комплементарной олигонуклеотиду, приведенному в SEQ ID NO: 437-1241. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является комплементарным (например, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) целевой последовательности, представленной в настоящем описании (например, целевой последовательности любого из олигонуклеотидов, приведенных в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является комплементарным (например, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) целевой последовательности любого из олигонуклеотидов, приведенных в SEQ ID NO: 1242-2046.

[000346] В некоторых вариантах осуществления любое одно или более тиминового оснований (T) в любом из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 14), необязательно, могут являться урациловыми основаниями (U), и/или любое одно или более из U, необязательно, могут являться T. В некоторых вариантах осуществления любое одно или более из тиминового оснований (T) в любом из олигонуклеотидов, приведенных в SEQ ID NO: 437-1241, или в олигонуклеотиде, комплементарном любой из SEQ ID NO: 1242-2046, необязательно, могут являться урациловыми основаниями (U), и/или любое одно или более из U в олигонуклеотидах, необязательно, могут являться T.

в. Модификации олигонуклеотидов:

[000347] 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.

[000348] 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.

[000349] 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

[000350] 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.

[000351] 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-метилацетидамо (2'-O-NMA) модифицированных нуклеозидов.

[000352] 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 (ЕНА) или (S)-затрудненный этил (сEt). Примеры ЗНК описаны в публикации международной патентной заявки № WO/2008/043753, опубликованной 17 апреля 2008 года и названной "*RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9*", содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Примеры ЕНА приведены в международной патентной публикации № WO 2005/042777, опубликованной 12 мая 2005 года и названной "*APP/ENA Antisense*"; Morita et al., *Nucleic Acid Res.*, Suppl 1:241-242, 2001; Surono et al., *Hum. Gene Ther.*, 15:749-757, 2004; Koizumi, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 8:144-149, 2006 и Horie et al., *Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf)*, 49:171-172, 2005; описания которых включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Примеры сEt приведены в патентах США №№ 7101993; 7399845 и 7569686, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000353] 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.

[000354] 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.

[000355] Олигонуклеотид может содержать смесь нуклеозидов разных типов. Например, олигонуклеотид может содержать смесь 2'-дезоксирибонуклеозидов или рибонуклеозидов и 2'-фтор модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь дезоксирибонуклеозидов или рибонуклеозидов и 2'-О-Ме модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь 2'-фтор-модифицированных нуклеозидов и 2'-О-Ме-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь 2'-4'-бициклических нуклеозидов и 2'-МОЕ, 2'-фтор, или 2'-О-Ме модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ENA, cEt).

[000356] Олигонуклеотид может содержать чередующиеся нуклеозиды разных типов. Например, олигонуклеотид может содержать чередующиеся 2'-дезоксирибонуклеозиды или рибонуклеозиды и 2'-фтор-модифицированные нуклеозиды. олигонуклеотид может содержать чередующиеся дезоксирибонуклеозиды или рибонуклеозиды и 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся 2'-фтор-модифицированные нуклеозиды и 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся 2'-4'-бициклические нуклеозиды и 2'-МОЕ, 2'-фтор, или 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся небициклические 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ENA, cEt).

[000357] 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

[000358] 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.

[000359] Фосфорсодержащие связи, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкил-фосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, содержащие 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты,

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.

[000360] 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

[000361] В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные атомы фосфора олигонуклеотидов являются хиральными, и свойства олигонуклеотидов корректируют с учетом конфигурации хиральных атомов фосфора. В некоторых вариантах осуществления можно использовать соответствующие способы для синтеза Р-хиральных аналогов олигонуклеотидов стереоконтролируемым образом (например, как описано в Oka N, Wada T, "Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms", *Chem Soc Rev.* 2011 Dec; 40(12):5829-43). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фосфотиоат-содержащим олигонуклеотидам, содержащим нуклеозидные единицы, соединенные с помощью, по существу, полностью Sp-связей между сахарами или, по существу, полностью Rp-связей между сахарами. В некоторых вариантах осуществления такие фосфотиоатные олигонуклеотиды, имеющие, по существу, хирально чистые связи между сахарами, получают посредством ферментативного или химического синтеза, как описано, например, в патенте США № 5587261, опубликованном 12 декабря 1996 года, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления хиральноконтролируемые олигонуклеотиды представляют собой паттерны селективного расщепления целевой нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления хиральноконтролируемый олигонуклеотид обеспечивает расщепление по одному участку в комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, как описано, например, в публикации патентной заявки США № 2017/0037399 A1, опубликованной 2 февраля 2017 года, названной "CHIRAL DESIGN", содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

f. Морфолиновые олигонуклеотиды

[000362] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может представлять собой морфолиновые соединения. Морфолиновые олигомерные соединения

описаны в Dwaine A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510; *Genesis*, volume 30, issue 3, 2001; Heasman, J., *Dev. Biol.*, 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 9591-9596 и патенте США № 5034506, опубликованном 23 июля 1991 года. В некоторых вариантах осуществления морфолиновое олигомерное соединение является 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)

[000363] 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

[000364] 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.

[000365] 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.

[000366] В некоторых вариантах осуществления область пропуска гэнмерных 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.

[000367] Гэнмер можно получать подходящими способами. Типичные патенты США, патентные публикации США и публикации PCT, в которых описано получение гэнмеров, 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.

[000368] В некоторых вариантах осуществления гэнмер имеет длину 10-40 нуклеозидов. Например, гэнмер может иметь длину 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-40, 15-35, 15-30, 15-25, 15-20, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 25-40, 25-35, 25-30, 30-40, 30-35

или 35-40 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления гэпмер имеет длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеозидов.

[000369] В некоторых вариантах осуществления область пропуска Y в гэпмере имеет длину 5-20 нуклеозидов. Например, область пропуска Y может иметь длину 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15 или 15-20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления область пропуска Y имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в области пропуска Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления все нуклеозиды в области пропуска Y являются 2'-дезоксирибонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в области пропуска Y являются модифицированным нуклеозидом (например, 2'-модифицированным нуклеозидом, таким как представленные в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления один или более цитозинов в области пропуска Y, необязательно, являются 5-метил-цитозинами. В некоторых вариантах осуществления каждый цитозин в области пропуска Y является 5-метил-цитозином.

[000370] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') независимо имеют длину 1-20 нуклеозидов. Например, 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') независимо может иметь длину 1-20, 1-15, 1-10, 1-7, 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 2-7, 3-5, 3-7, 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15 или 15-20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') независимо имеют длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') имеют одинаковую длину. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') имеют разную длину. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') длиннее 3'-фланкирующей области гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') короче 3'-фланкирующей области гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3').

[000371] В некоторых вариантах осуществления гэпмер 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 гэммере 5'-X-Y-Z-3'.

[000372] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') или 3'-фланкирующей области гэммера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются модифицированными нуклеотидами (например, высокоаффинными модифицированными нуклеотидами). В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеозид (например, высокоаффинные модифицированные нуклеотиды) является 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом или небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления высокоаффинный модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК, сEt или ENA) или небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE), или 2'-О-N-метилацетамидо (2'-O-NMA) нуклеозидом).

[000373] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными

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

[000374] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит те же высокоаффинные нуклеозиды, что и 3'-фланкирующая область гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). Например, 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') могут содержать один или более небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме). В другом примере 5'-фланкирующая область гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') могут содержать один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующей области гпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt).

[000375] В некоторых вариантах осуществления гпмер содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, и Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X и Z является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гпмер 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

cEt), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит иные высокоаффинные нуклеозиды, чем 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') может содержать один или более небизицических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более 2'-4'-бизицических нуклеозидов (например, ЗНК или cEt). В другом примере 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более небизицических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более 2'-4'-бизицических нуклеозидов (например, ЗНК или cEt).

[000376] В некоторых вариантах осуществления гэнмер 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 небизицическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), каждый нуклеозид в Z является 2'-4'-бизицическим нуклеозидом (например, ЗНК или cEt), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэнмер 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'-бизицическим нуклеозидом (например, ЗНК или cEt), каждый нуклеозид в Z является небизицическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[000377] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит один или более небизицических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или более 2'-4'-бизицических нуклеозидов (например, ЗНК или cEt). В некоторых вариантах осуществления 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит один или более небизицических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или более 2'-4'-бизицических нуклеозидов (например, ЗНК или cEt). В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержат один или более небизицических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или более 2'-4'-бизицических нуклеозидов (например, ЗНК или cEt).

[000378] В некоторых вариантах осуществления гэнмер 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 небизицическим 2'-модифицированным

нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-бициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэпмер 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 небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-бициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэпмер 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 небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальные нуклеозиды в X и Z являются 2'-4'-бициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[000379] Неограничивающие примеры конфигураций гэпмеров со смесью небциклического 2'-модифицированного нуклеозида (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt) в 5'-фланкирующей области гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и/или 3'-фланкирующей области гэпмера (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-BBBA; KKK-(D)n-KKKA; LLL-(D)n-LLLA; BBB-(D)n-BBBEE; 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-EBEB; KEKE-(D)n-EKEK; LELE-(D)n-ELEL; ABAB-(D)n-ABAB; AKAK-(D)n-AKAK; ALAL-(D)n-ALAL; EBEB-(D)n-EBEB; EKEK-(D)n-EKEK; ELEL-(D)n-ELEL; ABAB-(D)n-ABAB; AKAK-(D)n-AKAK; ALAL-(D)n-ALAL; EBEB-(D)n-EBEB; EKEK-(D)n-EKEK; ELEL-(D)n-ELEL; AABB-(D)n-BBAA; BBAA-(D)n-AABB; AAKK-(D)n-KKAA; AALL-(D)n-LLAA; EEBB-(D)n-BBEE; EEKK-(D)n-KKEE; EELL-(D)n-LLEE; AABB-(D)n-BBAA; AAKK-(D)n-KKAA; AALL-(D)n-LLAA; EEBB-(D)n-BBEE; EEKK-(D)n-KKEE; EELL-(D)n-LLEE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-

BBE; KKK-(D)_n-KKE; LLL-(D)_n-LLE; ABBB-(D)_n-BBBA; AKKK-(D)_n-KKKA; ALLL-(D)_n-LLLA; EBBB-(D)_n-BBBE; EKKK-(D)_n-KKKE; ELLL-(D)_n-LLLE; ABBB-(D)_n-BBBA; AKKK-(D)_n-KKKA; ALLL-(D)_n-LLLA; EBBB-(D)_n-BBBE; EKKK-(D)_n-KKKE; ELLL-(D)_n-LLLE; ABBB-(D)_n-BBBAA; AKKK-(D)_n-KKKAA; ALLL-(D)_n-LLLAA; EBBB-(D)_n-BBBEE; EKKK-(D)_n-KKKEE; ELLL-(D)_n-LLLEE; ABBB-(D)_n-BBBAA; AKKK-(D)_n-KKKAA; ALLL-(D)_n-LLLAA; EBBB-(D)_n-BBBEE; EKKK-(D)_n-KKKEE; ELLL-(D)_n-LLLEE; AABBB-(D)_n-BBB; AAKKK-(D)_n-KKK; AALLL-(D)_n-LLL; EEBBB-(D)_n-BBB; EEKKK-(D)_n-KKK; EELLL-(D)_n-LLL; AABBB-(D)_n-BBB; AAKKK-(D)_n-KKK; AALLL-(D)_n-LLL; EEBBB-(D)_n-BBB; EEKKK-(D)_n-KKK; EELLL-(D)_n-LLL; AABBB-(D)_n-BBBA; AAKKK-(D)_n-KKKA; AALLL-(D)_n-LLLA; EEBBB-(D)_n-BBBE; EEKKK-(D)_n-KKKE; EELLL-(D)_n-LLLE; AABBB-(D)_n-BBBA; AAKKK-(D)_n-KKKA; AALLL-(D)_n-LLLA; EEBBB-(D)_n-BBBE; EEKKK-(D)_n-KKKE; EELLL-(D)_n-LLLE; ABBAABB-(D)_n-BB; AKKAAKK-(D)_n-KK; ALLAALLL-(D)_n-LL; EBEEBB-(D)_n-BB; EKKEEKK-(D)_n-KK; ELLEELL-(D)_n-LL; ABBAABB-(D)_n-BB; AKKAAKK-(D)_n-KK; ALLAALLL-(D)_n-LL; EBEEBB-(D)_n-BB; EKKEEKK-(D)_n-KK; ELLEELL-(D)_n-LL; ABBABB-(D)_n-BBB; AKKAKK-(D)_n-KKK; ALLALLL-(D)_n-LLL; EBEEBB-(D)_n-BBB; EKKEKK-(D)_n-KKK; ELLELL-(D)_n-LLL; ABBABB-(D)_n-BBB; AKKAKK-(D)_n-KKK; ALLALLL-(D)_n-LLL; EBEEBB-(D)_n-BBB; EKKEKK-(D)_n-KKK; ELLELL-(D)_n-LLL; EEEK-(D)_n-EEEEEEEEE; EEK-(D)_n-EEEEEEEEE; EK-(D)_n-EEEEEEEEE; EK-(D)_n-EEEKK; K-(D)_n-EEEKEKE; K-(D)_n-EEEKEKEE; K-(D)_n-EEKEK; EK-(D)_n-EEEEKEKE; EK-(D)_n-EEEKEK; EEK-(D)_n-KEEKE; EK-(D)_n-EEKEK; EK-(D)_n-KEEK; EEK-(D)_n-EEEKEK; EK-(D)_n-KEEKEE; EK-(D)_n-EEKEKE; EK-(D)_n-EEEKEKE; и EK-(D)_n-EEEEKEK;. "A" нуклеозиды содержат 2'-модифицированный нуклеозид; "B" представляет собой 2'-4'-бициклический нуклеозид; "K" представляет собой нуклеозид с затрудненным этилом (сEt); "L" представляет собой нуклеозид ЗНК; и "E" представляет собой 2'-МОЕ-модифицированный рибонуклеозид; "D" представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид; "n" представляет собой длину сегмента пропуска (Y в конфигурации 5'-X-Y-Z-3') и является целым числом 1-20.

[000380] В некоторых вариантах осуществления любой из гэпмеров, представленных в настоящем описании, содержит одну или более модифицированных нуклеозидных связей (например, фосфотиоатную связь) в каждой из областей X, Y и Z. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в любом из гэпмеров, представленных в настоящем описании, является фосфотиоатной связью. В некоторых вариантах осуществления каждая из областей X, Y и Z независимо содержит смесь фосфотиоатных связей и фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в области пропуска Y является фосфотиоатной связью, 5'-фланкирующая область X содержит смесь фосфотиоатных связей и фосфодиэфирных связей, и 3'-фланкирующая область Z содержит смесь фосфотиоатных связей и фосфодиэфирных связей.

i. Миксмеры

[000381] 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 Н, описаны, например, см. WO2007/112754 или WO2007/112753.

[000382] 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.

[000383] 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.

[000384] 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.

[000385] 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.

[000386] 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.

[000387] 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).

[000388] 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)

[000389] 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.

[000390] 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.

[000391] 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.

[000392] 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.

[000393] 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.

[000394] 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.

[000395] 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.

[000396] 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.

[000397] 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.

[000398] 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.

[000399] 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'-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-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.

[000400] 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.

[000401] В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеотидные связи являются фосфорсодержащими связями. В некоторых вариантах осуществления фосфорсодержащие связи, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метильные и другие алкильные фосфонаты, содержащий 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфоамидаты, содержащие 3'-аминофосфоамидат и аминоалкилфосфоамидаты, тионофосфоамидат, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'; см. патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

[000402] 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.

[000403] 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'-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) 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).

[000404] 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.

[000405] 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.

[000406] 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.

[000407] 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.

[000408] 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.

[000409] 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-Мет-фосфодитионатную модификацию, повышающую нагрузку RISC, как описано в Wu et al., (2014) *Nat Commun* 5:3459, включенной в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000410] 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)

[000411] 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.

[000412] 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 другом варианте 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

[000413] 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

[000414] 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.

[000415] 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.

[000416] 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.

[000417] 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

[000418] 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.

[000419] 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.

[000420] В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит два или более из доменов (1) и (2), и ее можно обозначать как удлиненную гРНК. Например, удлиненная гРНК будет связываться с двумя или более белками Cas9 и связывается с целевой нуклеиновой кислотой в двух или более отдельных областях, как представлено в настоящем описании. гРНК содержит нуклеотидную последовательность, являющуюся комплементарной участку-мишени, опосредующую связывание комплекса нуклеаза/РНК с указанным участком-мишенью, обеспечивая специфичность последовательности комплекса нуклеаза:РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-программируемая нуклеаза является (CRISPR-ассоциированной системой) эндонуклеазой Cas9, например, Cas9 (Csn1) из *Streptococcus pyogenes* (см., например, "Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*." Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4658-4663 (2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K.,

Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607 (2011); и "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821 (2012), содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

о. Мультимеры

[000421] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка может содержать мультимеры (например, конкатемеры) 2 или более олигонуклеотидов, соединенных линкером. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидную нагрузку комплекса/конъюгата можно повышать за пределами доступных участков связывания на средстве для таргетинга (например, доступных тиоловых участков на антителе) или иным образом корректировать для достижения содержания конкретной нагрузки. Олигонуклеотиды в мультимере могут быть одинаковыми или отличаться (например, быть нацеленными на разные гены или разные участки на одном гене или его продуктах).

[000422] 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.

[000423] 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.

[000424] Дополнительные примеры мультимеров, которые можно использовать в комплексах, представленных в настоящем описании, описаны, например, в патентной заявке США № 2015/0315588 A1, названной *Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkers*, опубликованной 5 ноября 2015 года; патентной заявке США № 2015/0247141 A1, названной *Multimeric Oligonucleotide*

Compounds, опубликованной 3 сентября 2015 года, патентной заявке США № 2011/0158937 A1, названной *Immunostimulatory Oligonucleotide Multimers*, опубликованной 30 июня 2011 года; и патенте США № 5693773, названной *Triplex-Forming Antisense Oligonucleotides Having Abasic Linkers Targeting Nucleic Acids Comprising Mixed Sequences Of Purines And Pyrimidines*, опубликованной 2 декабря 1997 года, содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

ii. Низкомолекулярные соединения:

[000425] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любое подходящее низкомолекулярное соединение, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение повышает пропуск экзонов мутантных последовательностей DMD. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является таким, как описано в публикации патентной заявки США № 20140080896 A1, опубликованной 20 марта 2014 года, названной "IDENTIFICATION OF SMALL MOLECULES THAT FACILITATE THERAPEUTIC EXON SKIPPING". Дополнительные примеры низкомолекулярной нагрузки приведены в патенте США № 9982260, выданном 29 мая 2018 года, названном "Identification of structurally similar small molecules that enhance therapeutic exon skipping". Например, в некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является усилителем пропуска экзонов, таким как перфеназин, флупентиксол, зуклопентиксол или коринантин. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный усилитель пропуска экзонов ингибирует рецептор рианодина или кальмодулин. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является ингибитором пути H-Ras, таким как манумицин А. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является супрессором стоп-кодонов и десенсибилизирует рибосомы к преждевременным стоп-кодоном. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является аталуреном, как описано в McElroy S.P. et al. "A Lack of Premature Termination Codon Read Through Efficacy of PTC124 (Ataluren) in a Diverse Array of Reporter Assays." PLOS Biology, опубликованной 25 июня 2013 года. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является кортикостероидом, например, как описано в Manzur, A.Y. et al. "Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy". Cochrane Database Syst Rev. 2004;(2):CD003725. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение положительно регулирует экспрессию и/или (например, и) активность генов, которые могут замещать функцию дистрофина, таким как утрофин. В некоторых вариантах осуществления утрофиновый модулятор является таким, как описано в международной патентной публикации № WO2007091106, опубликованной 16 августа 2007 года, названной "TREATMENT OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY" и/или (например, и) международной патентной публикации № WO/2017/168151, опубликованной 5 октября 2017 года, названной "COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY".

iii. Пептиды/белки

[000426] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любой подходящий пептид или белок, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления белок является ферментом. В некоторых вариантах осуществления 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, V.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).

[000427] В некоторых вариантах осуществления пептид может облегчать пропуск экзонов в мРНК, экспрессирующей с мутантного аллеля DMD. В некоторых вариантах осуществления пептид может способствовать экспрессии функционального дистрофина и/или (например, и) экспрессии белка, способного функционировать вместо дистрофина. В некоторых вариантах осуществления нагрузка является белком, являющимся функциональным фрагментом дистрофина, например, аминокислотным сегментом функционального белка дистрофина.

[000428] В некоторых вариантах осуществления пептид или белок содержит по меньшей мере один "цинковый палец".

[000429] В некоторых вариантах осуществления пептид или белок может содержать приблизительно 2-25 аминокислот, приблизительно 2-20 аминокислот, приблизительно 2-15 аминокислот, приблизительно 2-10 аминокислот или приблизительно 2-5 аминокислот. Пептид или белок может содержать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные аланина, линейные аминокислоты, N-метил-аминокислоты и другие аминокислоты, известные в этой области. В некоторых вариантах осуществления пептид может являться линейным; в других вариантах осуществления пептид может являться циклическим, например, бициклическим.

iv. Конструкции нуклеиновой кислоты

[000430] 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'-метилловый кэп. В некоторых вариантах осуществления мРНК может содержать поли-А-хвост, необязательно, длиной до 160 нуклеотидов. Конструкция для экспрессии гена может кодировать последовательность белка дистрофина, фрагмент дистрофина, минидистрофин, белок утрофин или любой белок, обладающий общей функцией с дистрофином. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена может экспрессироваться, например, гиперэкспрессироваться, в ядре мышечной клетки. В некоторых вариантах осуществления конструкции для экспрессии гена кодируют белок, содержащий по меньшей мере один "цинковый палец". В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует белок, способствующий экспрессии дистрофина или белка, имеющего общую функцию с дистрофином, например, утрофина. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует фермент редактирования генома. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена является такой, как описано в публикации патентной заявки США № 20170368198 A1, опубликованной 28 декабря 2017 года, названной "Optimized mini-dystrophin genes and expression cassettes and their use"; Duan D. "Myodys, a full-length dystrophin plasmid vector for Duchenne and Becker muscular dystrophy gene therapy." *Curr Opin Mol Ther* 2008;10:86-94; и экспрессирующие кассеты, описанные в Tang, Y. et al., "AAV-directed muscular dystrophy gene therapy" *Expert Opin Biol Ther.* 2010 Mar;10(3):395-408; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

С. Линкеры

[000431] 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).

[000432] 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 с помощью малеимид-содержащего линкера, где, необязательно, малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроильную или малеимидометил-циклогексан-1-карбоксилатную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина антитела против 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 (например, и) молекулярной нагрузкой посредством амидной связи, карбаматной связи гидразидной, триазольной, тиоэфирной или дисульфидной связи.

i. Расщепляемые линкеры

[000433] Расщепляемый линкер может являться протеаза-чувствительным линкером, рН-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.

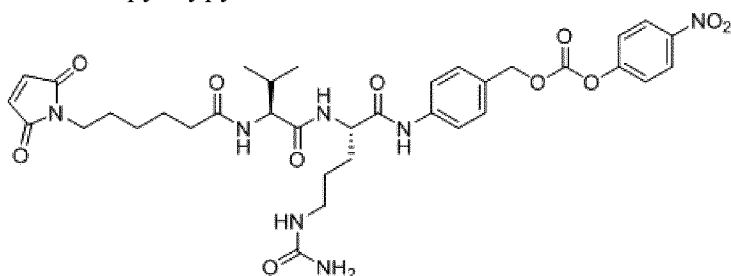
[000434] Протеаза-чувствительные линкеры расщепляются в результате ферментативной активности протеазы. Эти линкеры, как правило, содержат пептидные последовательности и могут иметь длину 2-10 аминокислот, приблизительно 2-5 аминокислот, приблизительно 5-10 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, приблизительно 5 аминокислот, приблизительно 3 аминокислоты или приблизительно 2 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность может содержать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные аланина, линейные аминокислоты, N-метил-аминокислоты и другие аминокислоты, известные в этой области. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин или аланин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер может расщепляться лизосомальной протеазой, например, катепсином В, и/или (например, и) эндосомальной протеазой.

[000435] рН-чувствительный линкер представляет собой ковалентную связь, легко подвергающуюся деградации в условиях высокого или низкого рН. В некоторых вариантах осуществления рН-чувствительный линкер может расщепляться при рН в диапазоне от 4 до

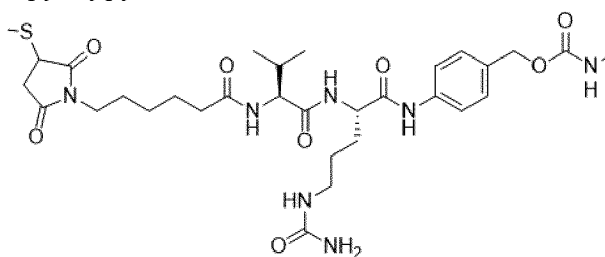
6. В некоторых вариантах осуществления рН-чувствительный линкер содержит гидразон или циклический ацеталь. В некоторых вариантах осуществления рН-чувствительный линкер расщепляется в эндосоме или лизосоме.

[000436] 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.

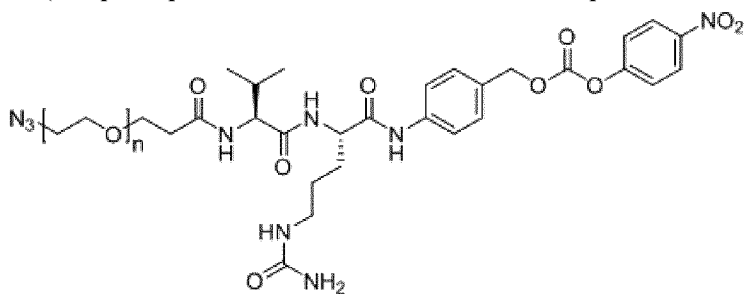
[000437] В некоторых вариантах осуществления линкер является линкером Val-Cit (например, как описано в патенте США № 6214345, включенном в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией линкер Val-Cit имеет структуру:



[000438] В некоторых вариантах осуществления после конъюгации линкер Val-Cit имеет структуру:

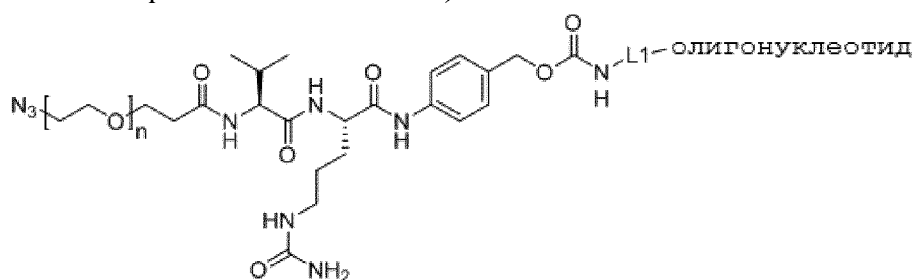


[000439] В некоторых вариантах осуществления линкер Val-cit соединяют с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией посредством клик-химии линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии) имеет структуру:



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

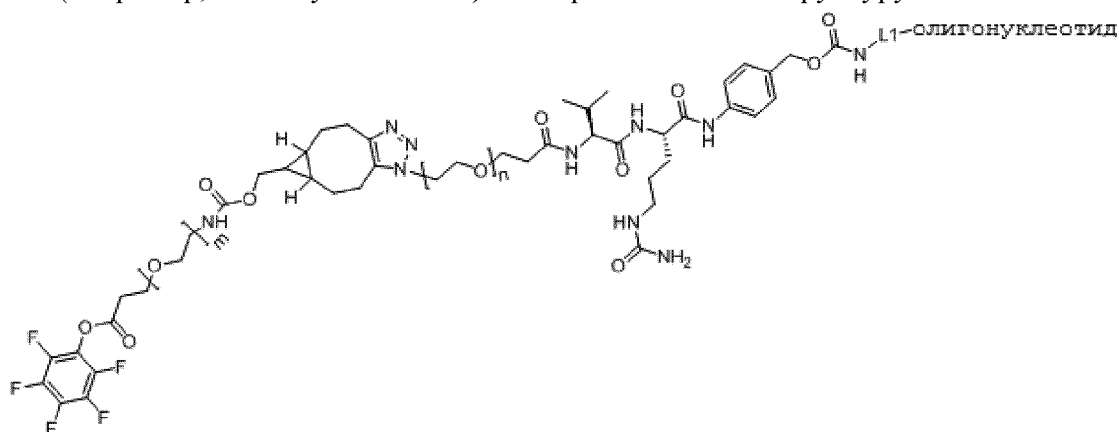
[000440] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии), конъюгирован (например, через другой химический остаток) с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом). В некоторых вариантах 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.

[000441] 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

[000442] В некоторых вариантах осуществления можно использовать нерасщепляемые линкеры. Как правило, нерасщепляемый линкер не может легко подвергаться деградации в клеточной или физиологической среде. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит необязательно замещенную алкильную группу, где заместители могут включать галогены, гидроксильные группы, формы кислорода и другие распространенные заместители. В некоторых вариантах осуществления

линкер может содержать необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный арилен, гетероарилен, пептидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, укороченный гликан, сахар или сахара, которые не могут подвергаться ферментативной деградации, азид, алкин-азид, пептидную последовательность, содержащую последовательность LPXT, тиоэфир, биотин, бифенил, повторяющиеся единицы полиэтиленгликоля или эквивалентных соединений, кислые сложные эфиры, кислые амиды, сульфамиды и/или (например, и) алкокси-аминовый линкер. В некоторых вариантах осуществления для ковалентного связывания антитела против TfR, содержащего последовательность LPXT, с молекулярной нагрузкой, содержащей последовательность (G)_n, будут использовать сортаза-опосредованное лигирование (см., например, Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. *Biotechnol Lett.* 2010, 32(1):1-10).

[000443] 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,₂; необязательно замещенный гетероциклилен, дополнительно содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S,₂; иминогруппу, необязательно замещенные формы азота, необязательно замещенные формы кислорода O, необязательно замещенные формы серы или поли(алкиленоксид), например, полиэтиленоксид или полипропиленоксид.

iii. Конъюгация линкера

[000444] 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, концевого фосфата олигонуклеотидного остова. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR через остаток лизина или цистеина, присутствующий в антителе против TfR.

[000445] 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 антигене 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*".

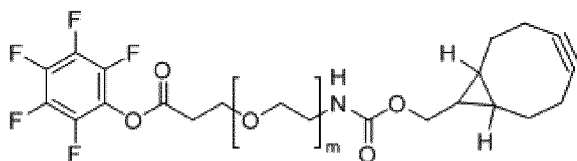
[000446] В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно содержит спейсер, например, полиэтиленгликолевый спейсер или ацил/карбомоил-сульфамидный спейсер, например, спейсер HydraSpace™. В некоторых вариантах осуществления спейсер является таким, как описано в Verkade, J.M.M. et al., "*A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Стабильность, and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates*", *Antibodies*, 2018, 7, 12.

[000447] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антигеном 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 антигене против TfR, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антигеном против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой посредством других перicyклических реакций, например, еновой реакции. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антигеном против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции амидной, тиоамидной или сульфонамидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антигеном против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции конденсации с образованием оксимной, гидразоновой или семикарбазидной группы, находящейся между линкером и антигеном против TfR и/или (например, и) молекулярной нагрузкой.

[000448] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антигеном 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

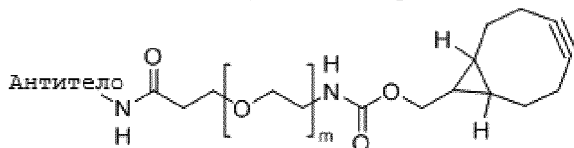
некоторых вариантах осуществления нуклеофил может находиться на линкере, и электрофил может находиться на антителе против TfR или молекулярной нагрузке перед реакцией между линкером и антителом против TfR или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может находиться на линкере, 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.

[000449] 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:



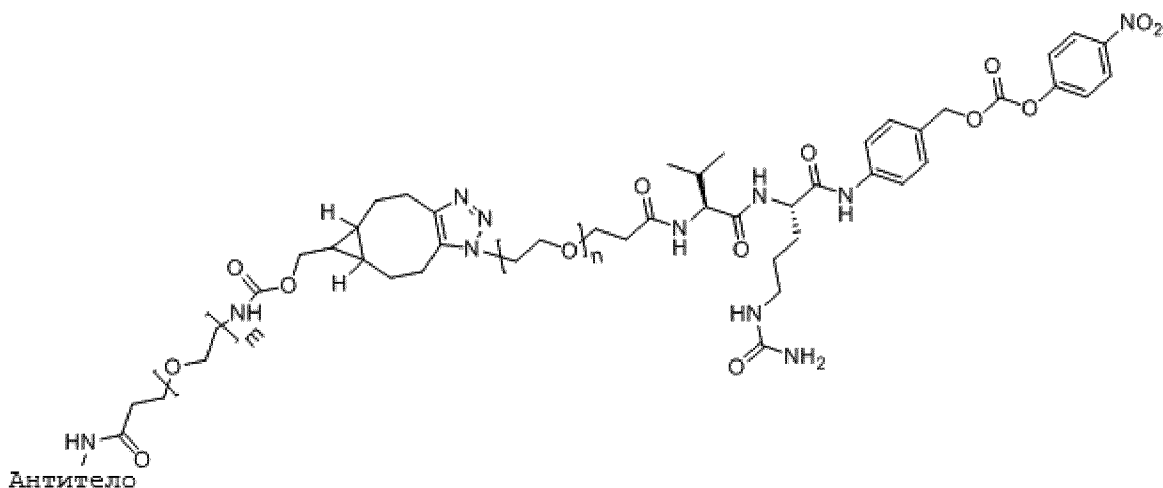
где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления m составляет 4.

[000450] 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:



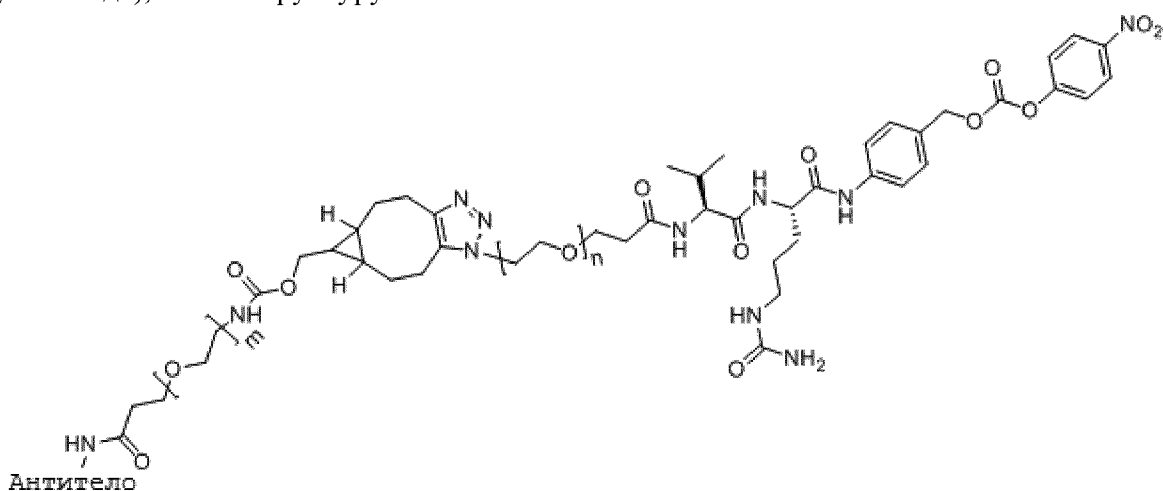
где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления m составляет 4.

[000451] 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:



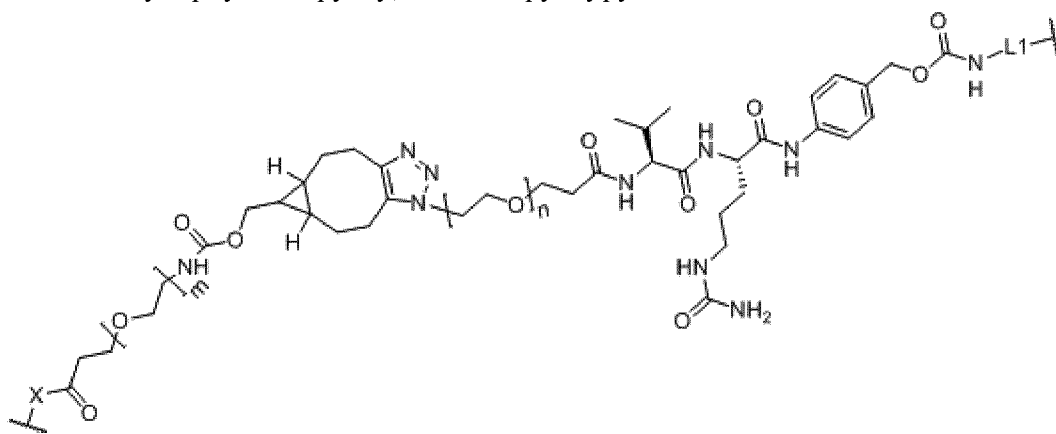
где n является любым числом 0-10, где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3, и/или (например, и) m составляет 4.

[000452] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, используемый для ковалентного связывания антитела против TfR и молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотида), имеет структуру:



где n составляет 3, и m составляет 4.

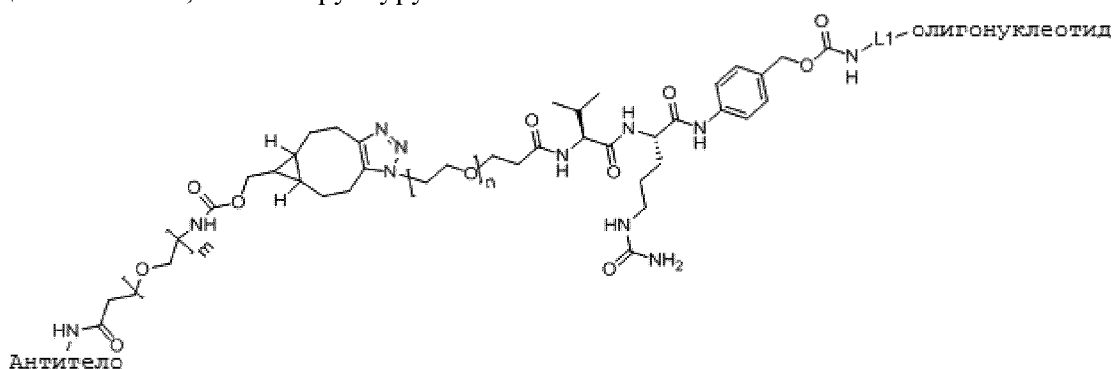
[000453] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, связывающий антитело и молекулярную нагрузку, имеет структуру:



(C)

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

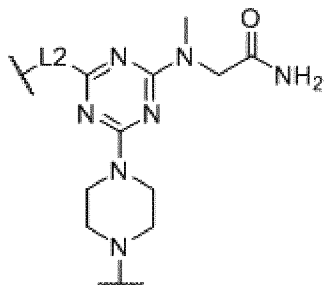
[000454] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, имеет структуру:



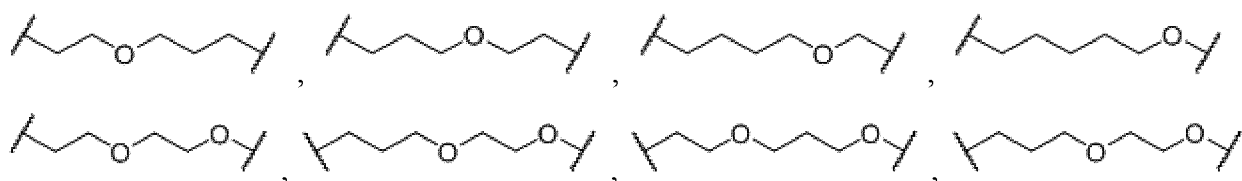
(D)

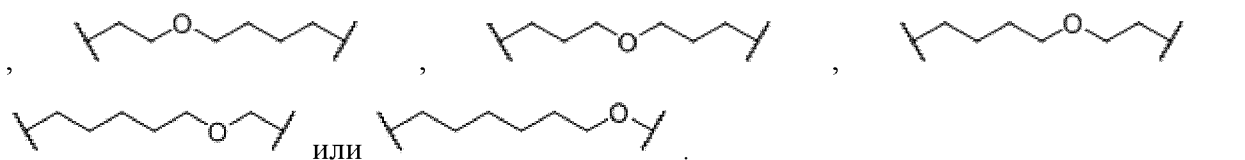
где n является любым числом 0-10, где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3, и/или (например, и) m составляет 4.

[000455] В структурах формулы (A), (B), (C) и (D) L1 в некоторых вариантах осуществления является спейсером, являющимся замещенным или незамещенным алифатическим, замещенным или незамещенным гетероалифатическим, замещенным или незамещенным карбоциклиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным ариленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, -O-, -N(R^A)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, -NR^AC(=O)-, -NR^AC(=O)R^A-, -C(=O)R^A-, -NR^AC(=O)O-, -NR^AC(=O)N(R^A)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R^A)-, -S(O)₂NR^A-, -NR^AS(O)₂- или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления L1 является

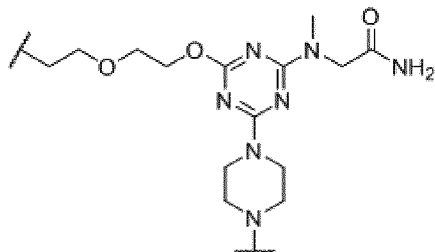


где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом, где L2 является





[000456] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом.

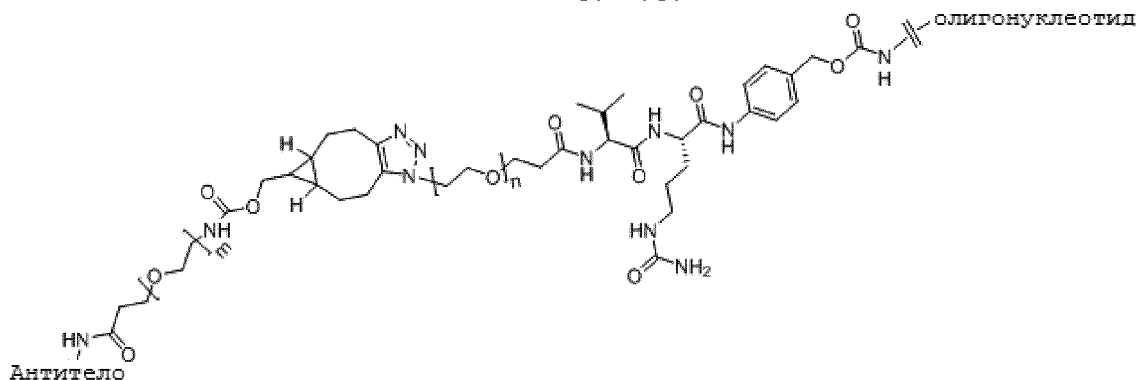
[000457] В некоторых вариантах осуществления L1 является



[000458] В некоторых вариантах осуществления L1 связан с 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000459] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, может не присутствовать).

[000460] В некоторых вариантах осуществления любой из комплексов, представленных в настоящем описании, имеет структуру:



(E),

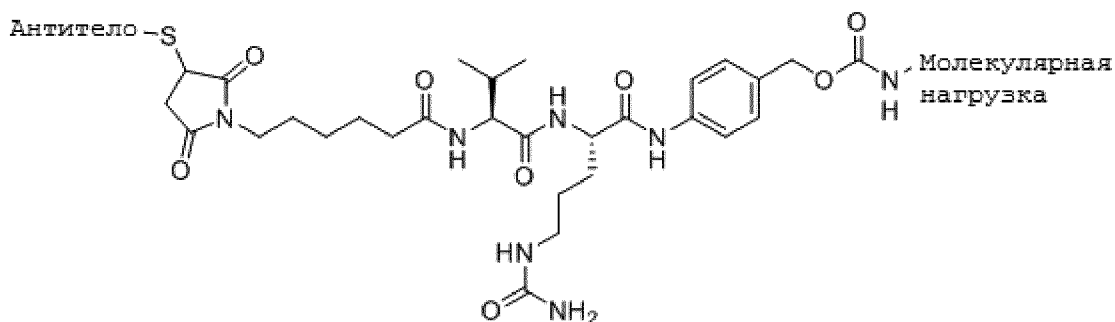
где n является 0-15 (например, 3), и m является 0-15 (например, 4).

С. Примеры комплексов антитело-молекулярная нагрузка

[000461] Настоящее изобретение дополнительно относится к неограничивающим примерам комплексов, содержащих любое из антител против TfR, представленных в настоящем описании, ковалентно связанное с любыми из молекулярных нагрузок (например, олигонуклеотидом), представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR (например, любое из антител против TfR, приведенных в таблице 2) ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) 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

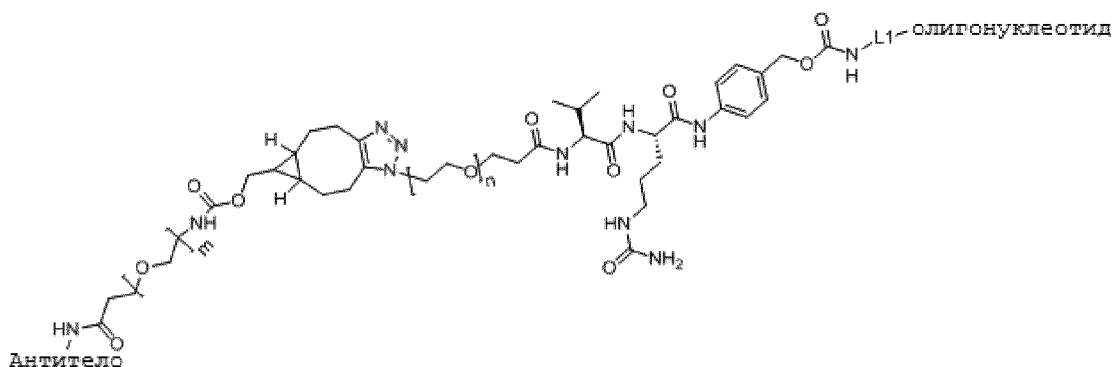
или внутренней частью олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе против TfR). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) соединяют с антителом (например, антителом против TfR, представленным в настоящем описании) с помощью аминогруппы (например, через лизин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046).

[000462] Ниже приведен пример структуры комплекса, содержащего антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер Val-cit:



где линкер соединяют с антителом с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046).

[000463] Ниже приведен другой пример структуры комплекса, содержащего антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер Val-cit:



(D)

где n является числом 0-10, где m является числом 0-10, где линкер соединяют с антителом через аминоклиппу (например, на остатке лизина), и/или (например, и), где линкер соединяют с олигонуклеотидом (например, на 5'-конце, 3'-конце или внутренней части олигонуклеотида). 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 соединяют со смысловой цепью или антисмысловой цепью на 5'-конце или 3'-конце.

[000464] Следует понимать, что антитела можно соединять с молекулярной нагрузкой с разной стехиометрией, свойством, которое можно обозначать как соотношение лекарственного средства и антитела (DAR), где "лекарственное средство" является молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления одну молекулярную нагрузку соединяют с антителом (DAR=1). В некоторых вариантах осуществления две молекулярные нагрузки соединяют с антителом (DAR=2). В некоторых вариантах осуществления три молекулярные нагрузки соединяют с антителом (DAR=3). В некоторых вариантах осуществления четыре молекулярные нагрузки соединяют с антителом (DAR=4). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к смеси разных комплексов, каждый из которых имеет разное DAR. В некоторых вариантах осуществления среднее DAR комплексов в такой смеси может находиться в диапазоне от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5 или более. DAR можно повышать посредством конъюгации молекулярных нагрузок с разными участками на антителе и/или (например, и) посредством конъюгации мультимеров с одним или более участками на антителе. Например, DAR 2 можно достигать посредством конъюгации одной молекулярной нагрузки с двумя разными участками на антителе или посредством конъюгации димерной молекулярной нагрузки с одним участком антитела.

[000465] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, представленное в настоящем описании (например, антитела 3-A4, 3-M12 и 5-H12, приведенные в таблице 2, в форме IgG или Fab), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, представленное в настоящем описании (например, антитела 3-A4, 3-M12 и 5-H12, приведенные в таблице 2, в форме IgG или Fab), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер (например, линкер Val-cit). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) соединяют с антителом (например, антителом против TfR, представленным в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) соединяют с антителом (например, антителом против TfR, представленным в настоящем описании) через аминоклиппу (например, через лизин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В

некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046).

[000466] В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом, содержащим область комплементарности по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов целевой последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 1242-2046. В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом, содержащим область комплементарности по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 437-1241. В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом, содержащим область комплементарности по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов ESE, приведенного в таблице 15. В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом, выбранным из олигонуклеотидов, приведенных в таблице 14. В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом, выбранным из олигонуклеотидов, приведенных в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000467] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 2; и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000468] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом,

приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000469] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000470] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000471] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241, или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000472] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 79, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000473] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с

молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000474] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000475] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000476] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000477] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах

осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000478] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 или SEQ ID NO: 99, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000479] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

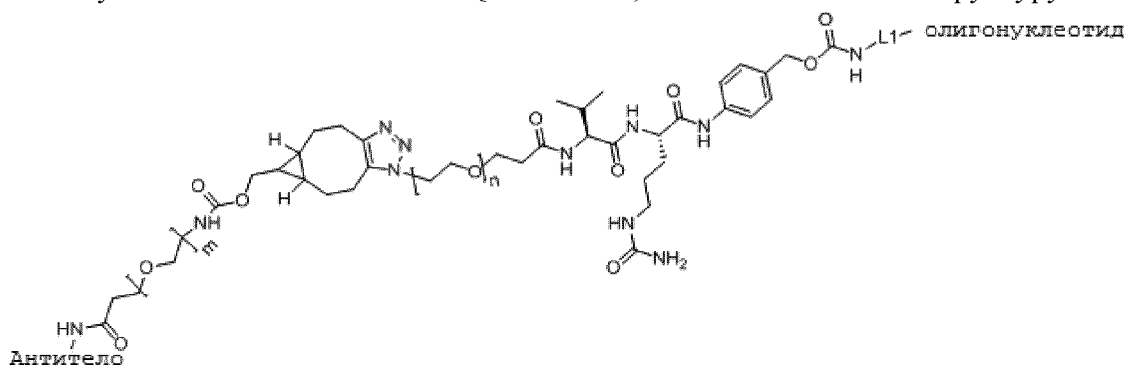
[000480] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000481] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах

осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000482] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102 или SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

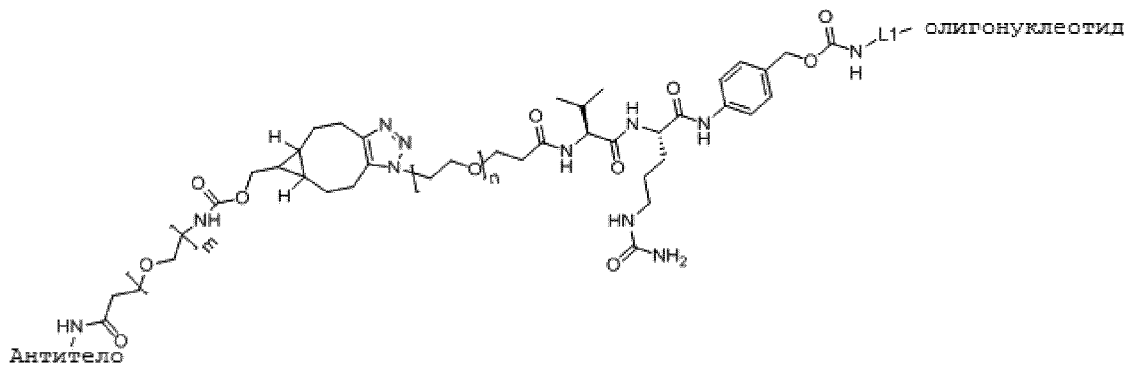
[000483] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

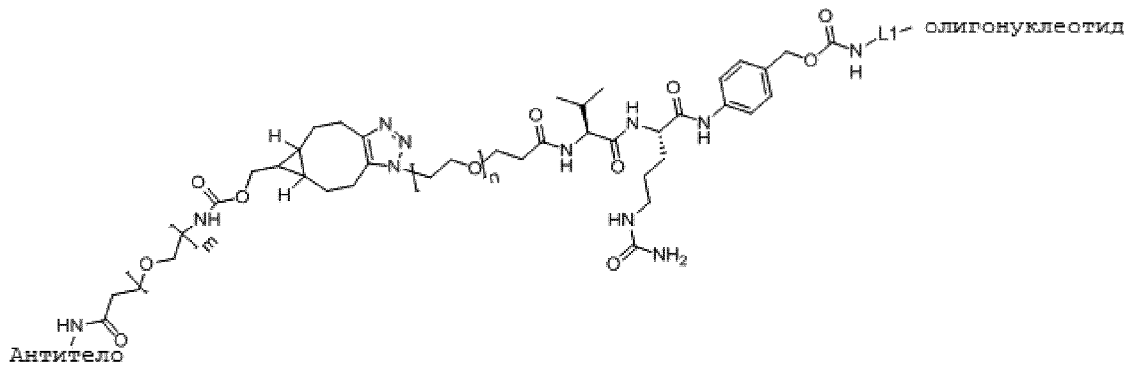
[000484] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

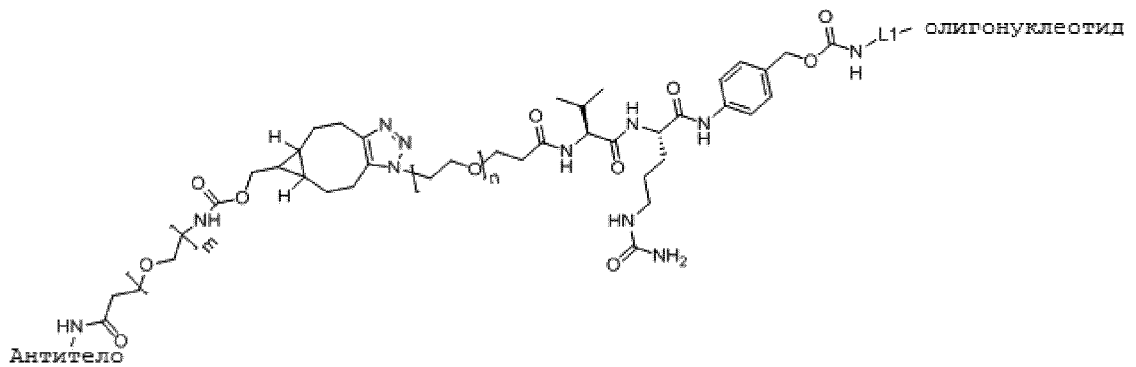
[000485] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

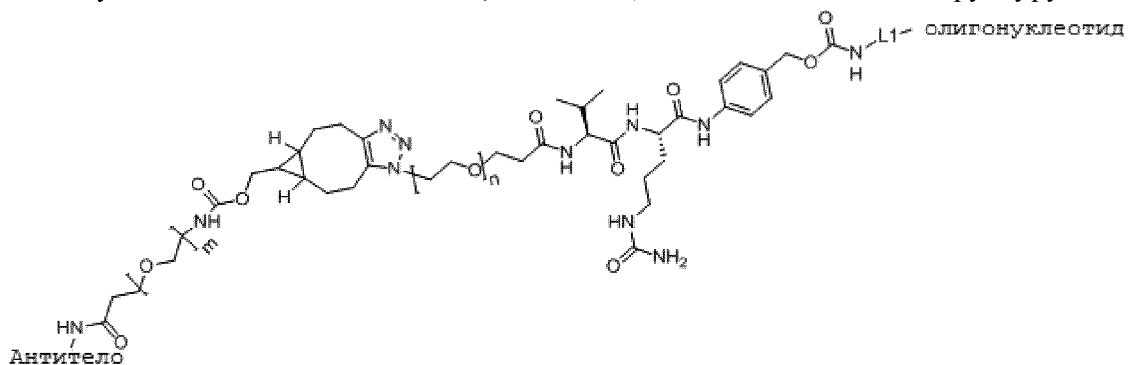
[000486] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

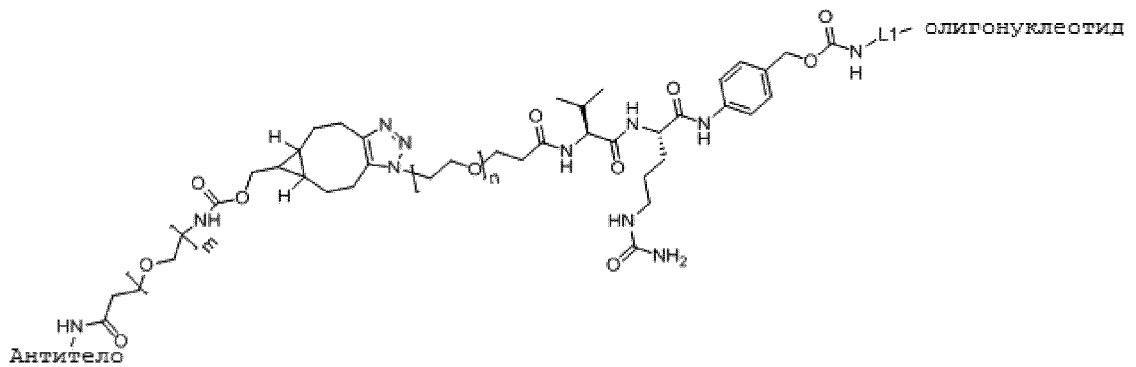
[000487] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

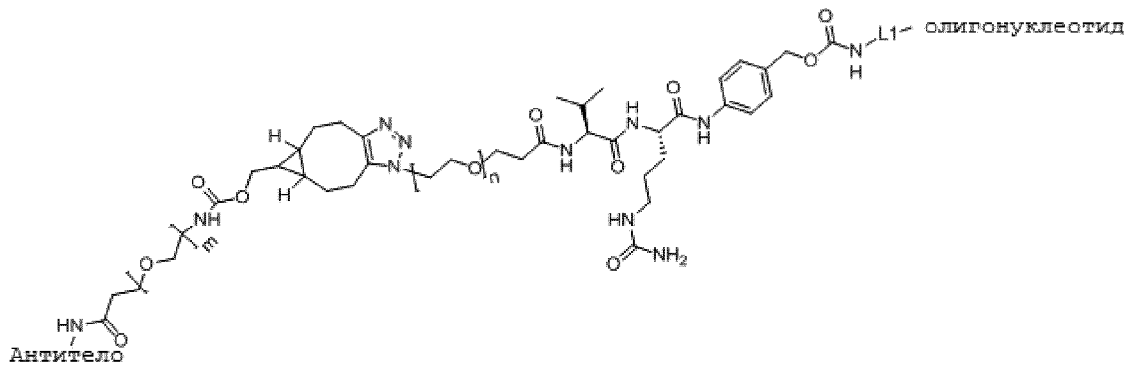
[000488] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

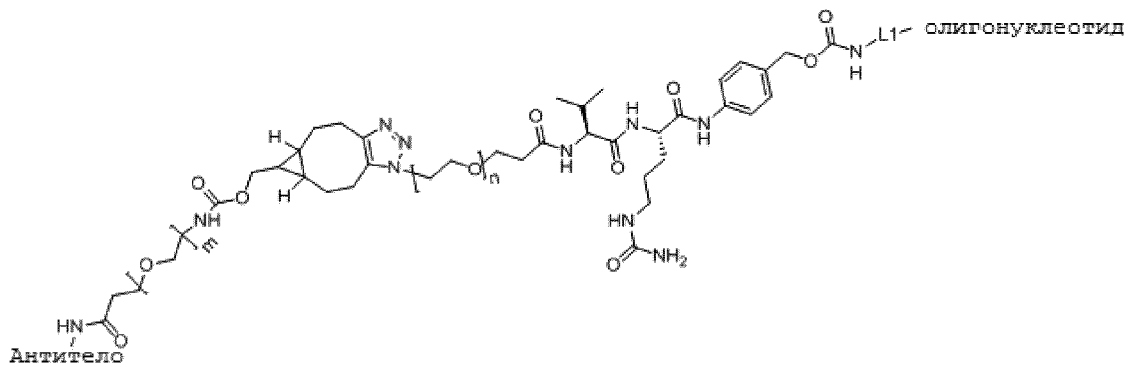
[000489] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

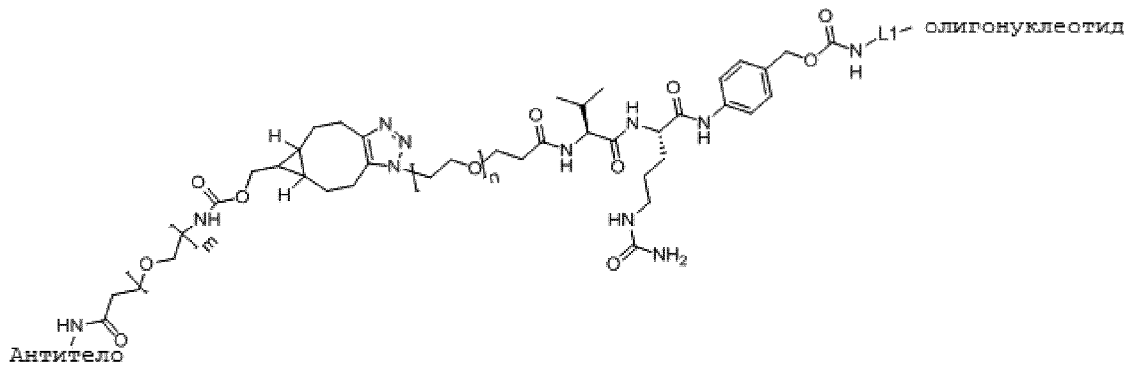
[000490] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

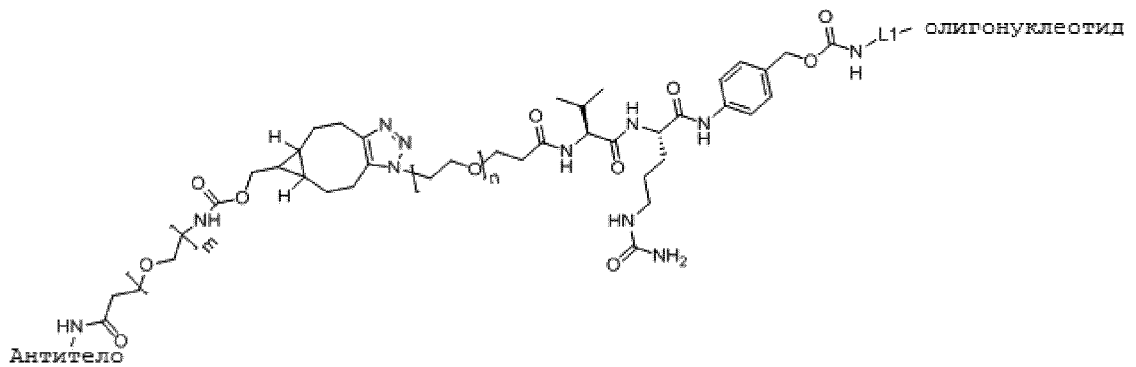
[000491] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

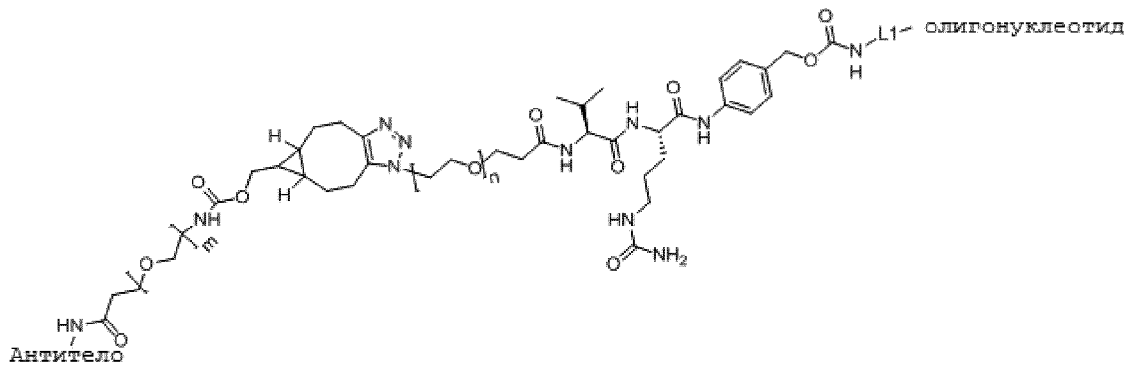
[000492] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR, ковалентно связанное через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где антитело против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

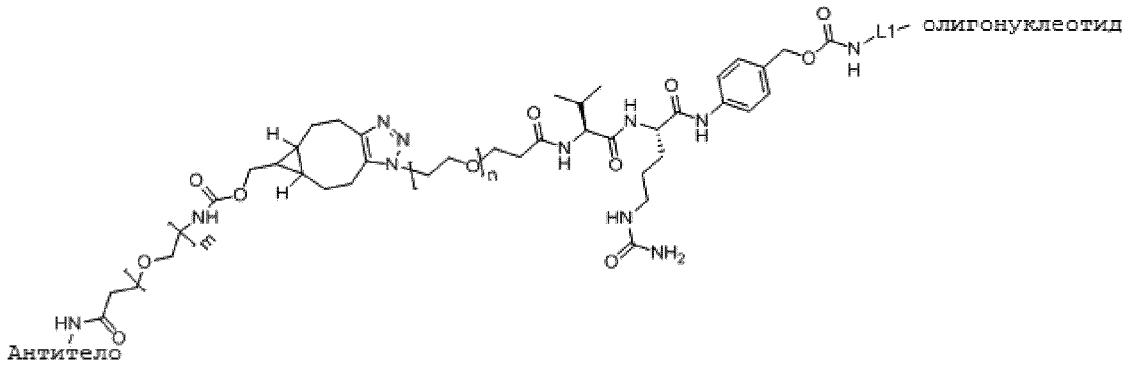
[000493] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

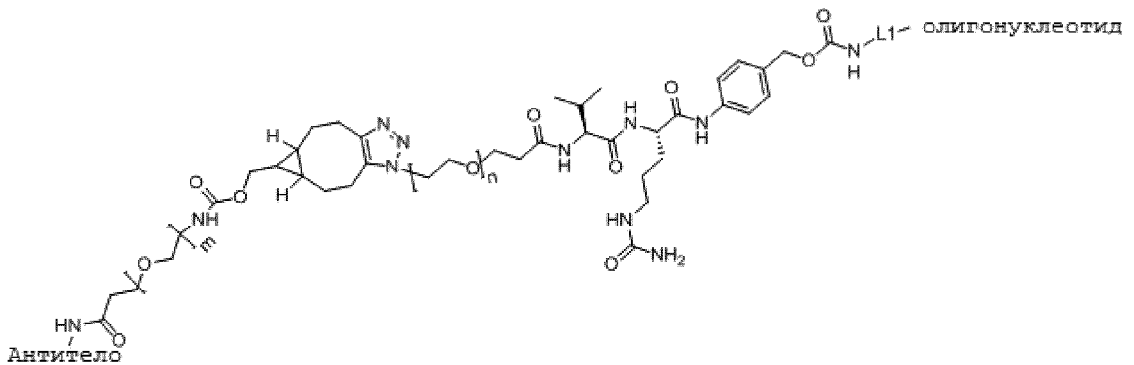
[000494] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

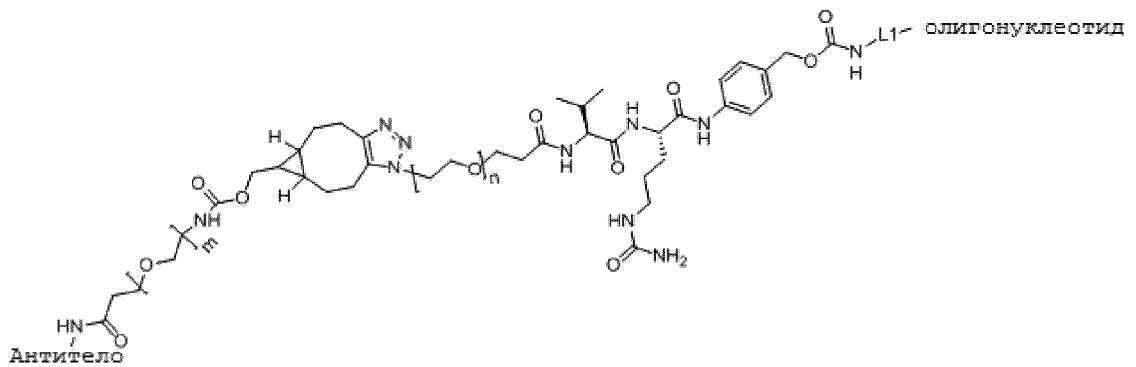
[000495] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

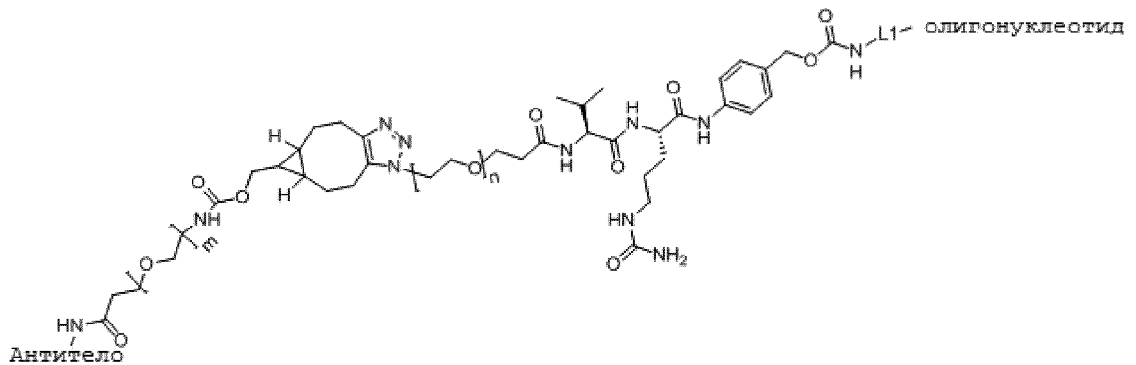
[000496] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

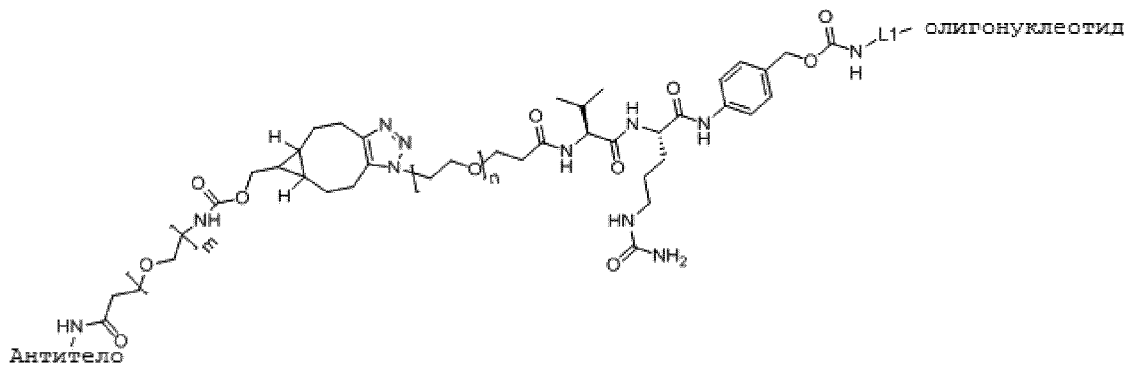
[000497] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

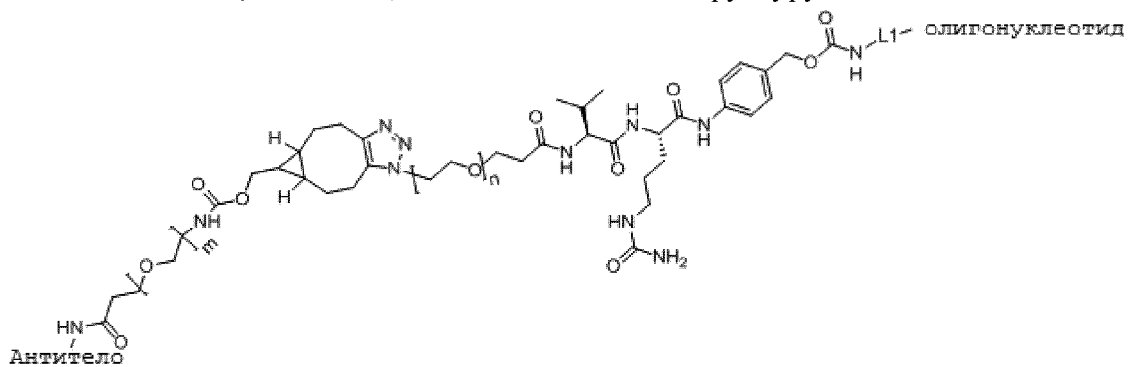
[000498] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

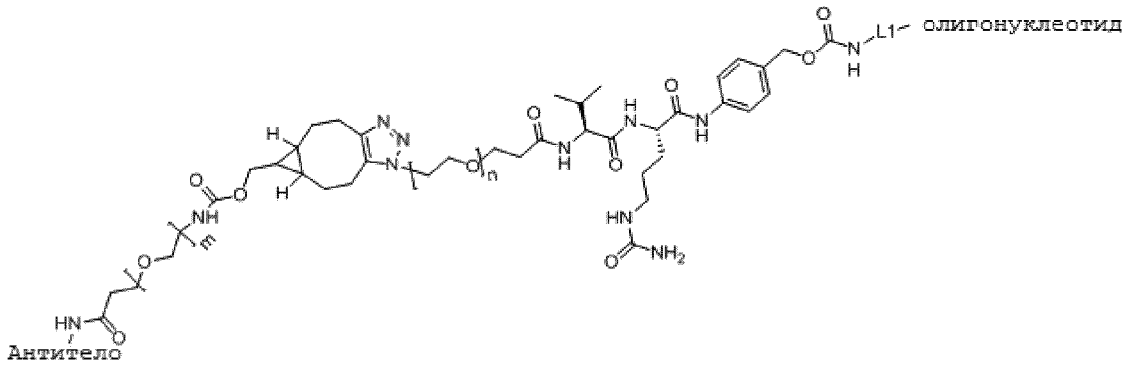
[000499] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241, или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

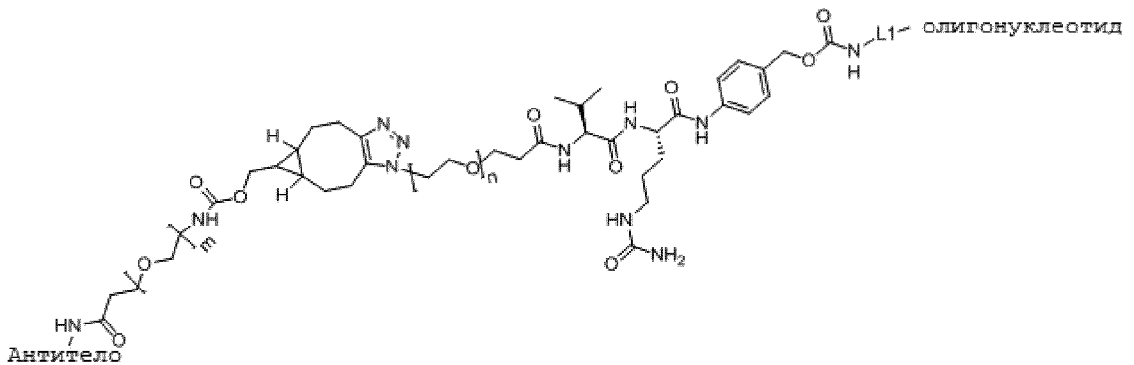
[000500] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

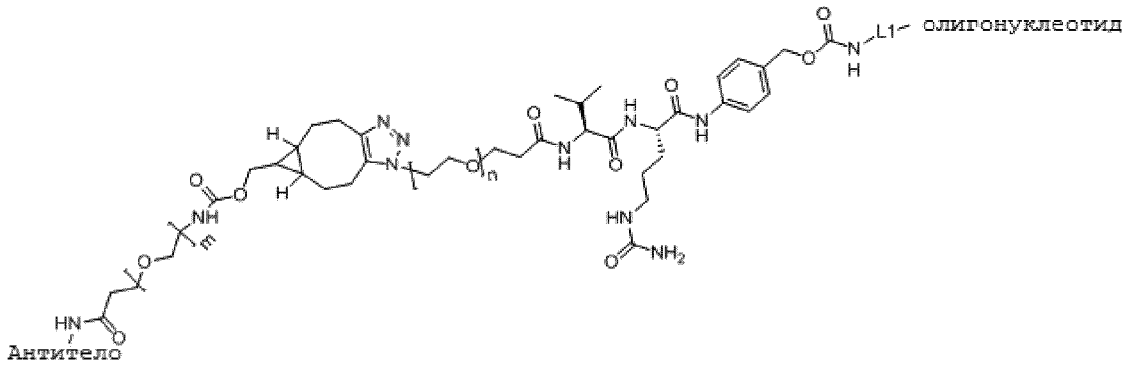
[000501] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241, или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

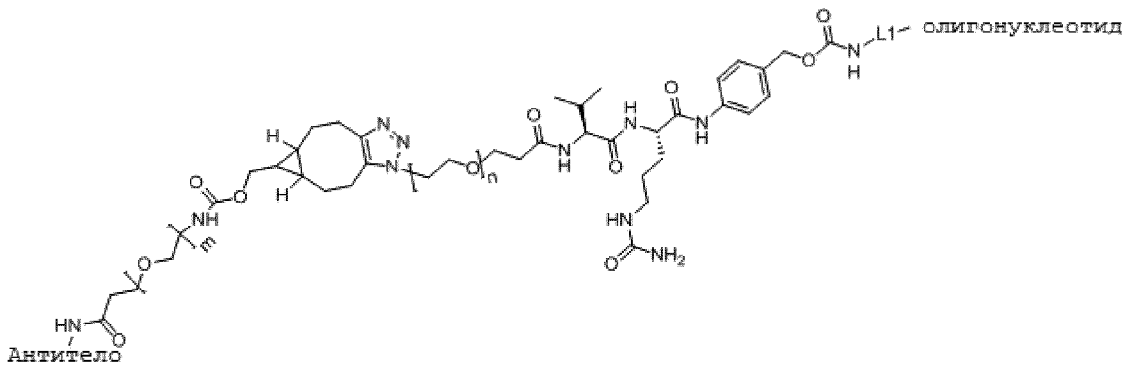
[000502] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

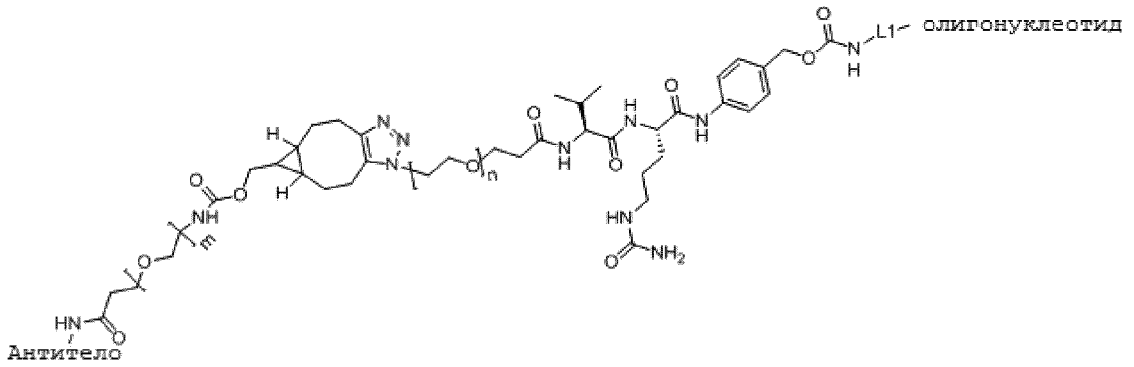
[000503] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

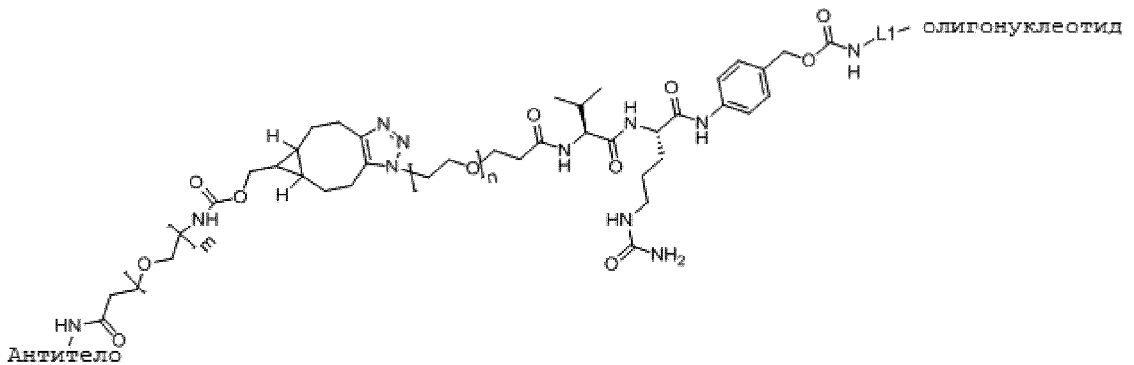
[000504] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

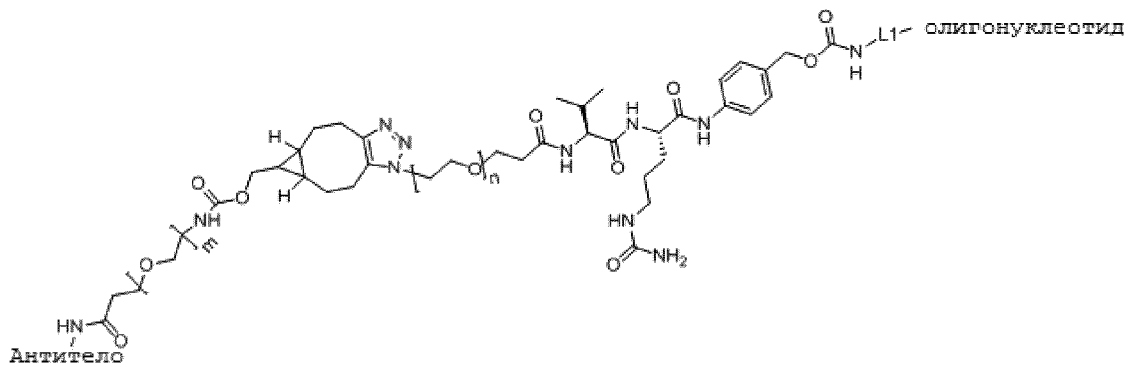
[000505] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

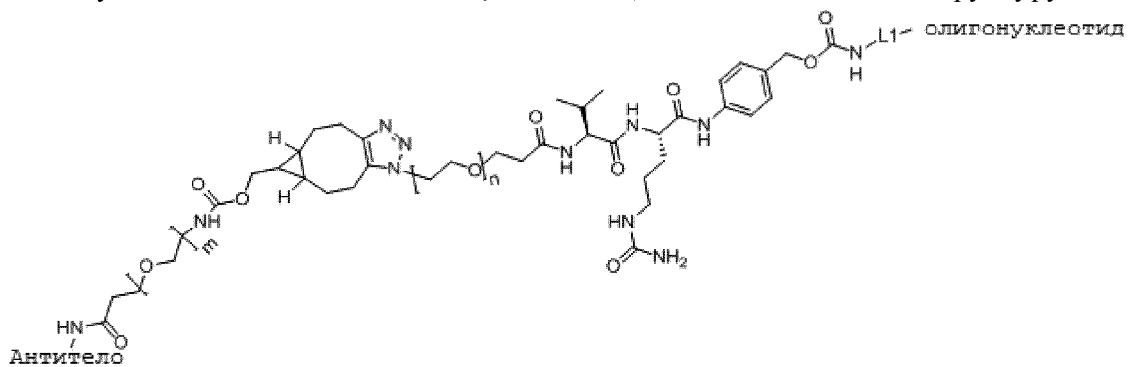
[000506] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

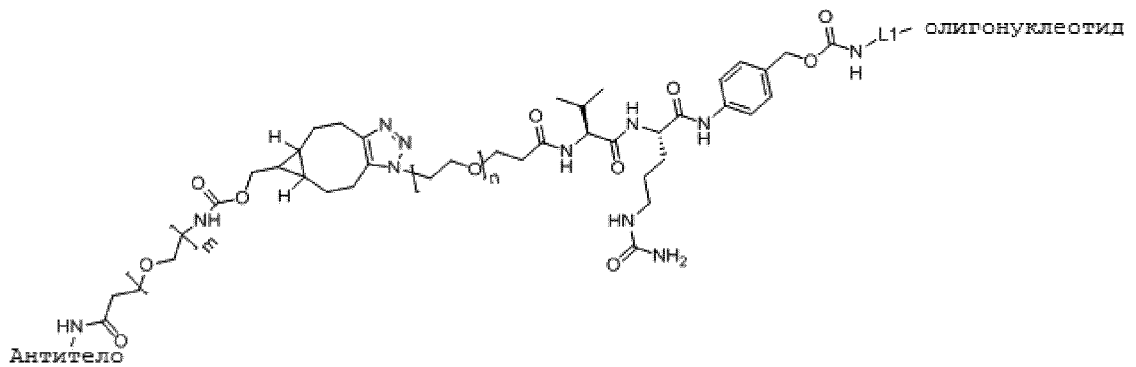
[000507] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

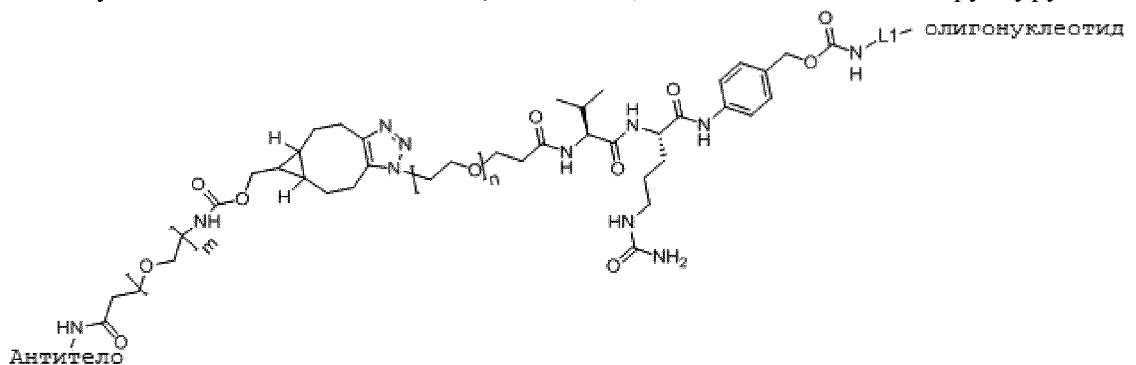
[000508] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

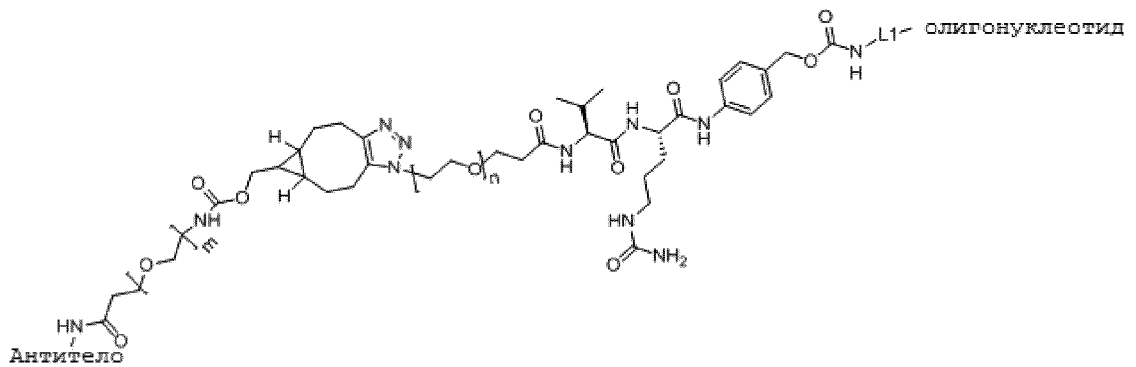
[000509] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

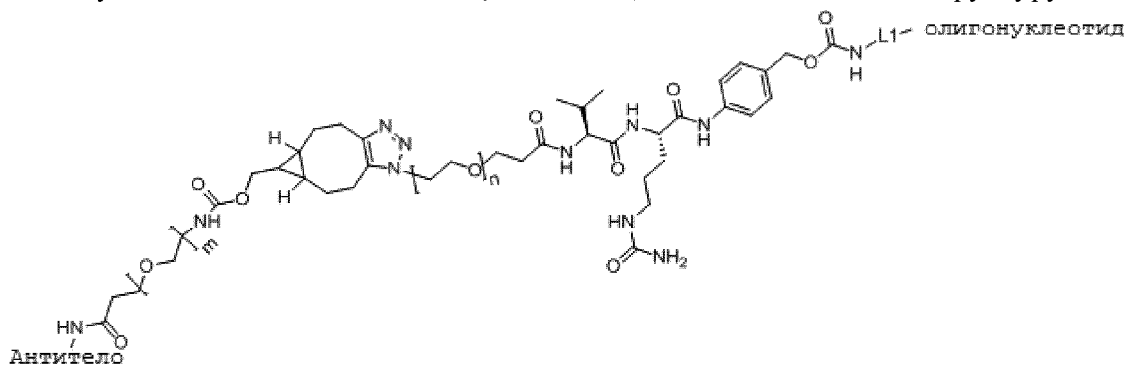
[000510] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

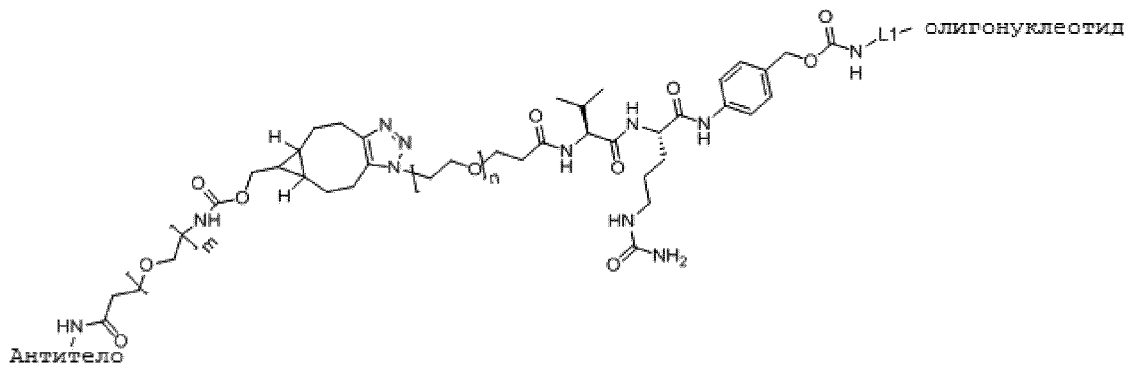
[000511] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:



(D),

где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000512] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR, ковалентно связанный через лизин с 5'-концом олигонуклеотида, где Fab против TfR содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; где комплекс имеет структуру:

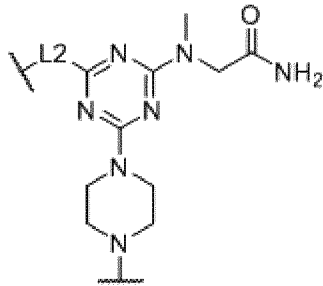


(D),

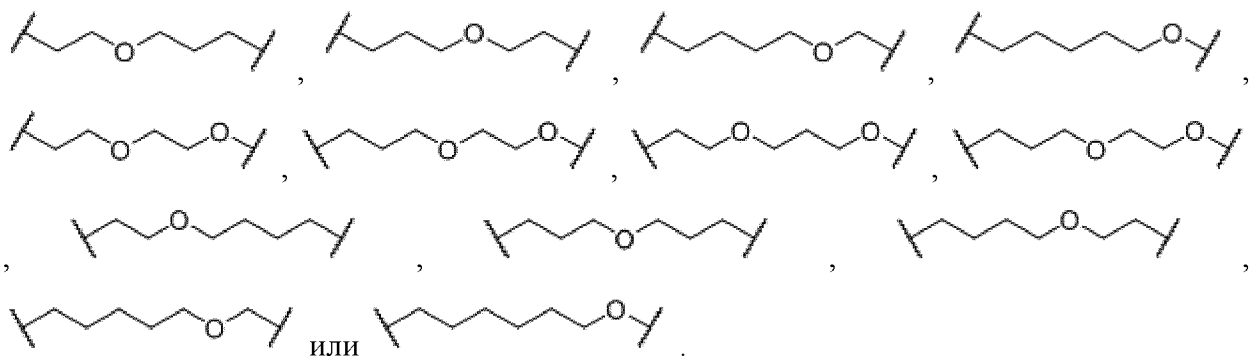
где n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является DMD-нацеленным олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом, приведенным в таблице 14). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, приведенным в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

[000513] В некоторых вариантах осуществления в любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, L1 является любым из спейсеров, представленных в настоящем описании.

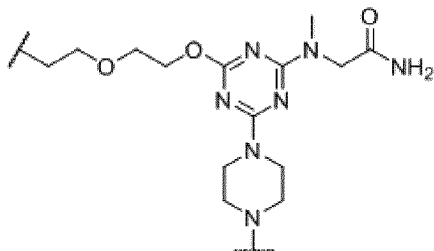
[000514] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом, где L2 является



[000515] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где остаток пиперазина связан с олигонуклеотидом.

[000516] В некоторых вариантах осуществления L1 является



[000517] В некоторых вариантах осуществления L1 связан с 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000518] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, может не присутствовать).

III. Составы

[000519] Комплексы, представленные в настоящем описании, можно составлять любым подходящим образом. Как правило, комплексы, представленные в настоящем описании, составляют способом, подходящим для фармацевтического применения. Например, комплексы можно вводить индивидууму с использованием состава, минимизирующего деградацию, облегчающего доставку и/или (например, и) захват или обеспечивающего другое благоприятное свойство комплексов в составе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим комплексы и фармацевтически приемлемые носители. Такие композиции можно соответствующим образом составлять таким образом, что, при введении индивидууму в непосредственное окружение клетки-мишени или системно, в целевые мышечные клетки проникает достаточное количество комплексов. В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в буферных растворах, таких как растворы фосфатно-солевого буфера, липосомах, мицеллярных структурах и капсидах.

[000520] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления композиции могут включать отдельно один или более компонентов комплексов, представленных в настоящем описании (например, мышечно-специфические средства, линкеры, молекулярную нагрузку или молекулы-предшественники любых из них).

[000521] В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в воде или водном растворе (например, воде с корректировкой pH). В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в основных забуференных водных растворах (например, PBS). В некоторых вариантах осуществления составы, представленные в настоящем описании, содержат эксципиент. В некоторых вариантах осуществления эксципиент придает композиции улучшенную стабильность, улучшенную абсорбцию, улучшенную растворимость и/или (например, и) терапевтическое усиление активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления эксципиент является буферным средством (например, цитратом натрия, фосфатом натрия, Трис-основанием или гидроксидом натрия) или носителем (например, забуференным раствором, петролатум, диметилсульфоксид или минеральное масло).

[000522] В некоторых вариантах осуществления комплекс или его компонент (например, олигонуклеотид или антитело) лиофилизуют 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, фиколлоном или желатином).

[000523] 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.

[000524] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного использования, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых соединений) или дисперсии, и стерильные порошки для экстемпорального 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.

[000525] В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% комплекса или его компонента или более, хотя процентная доля активных ингредиентов может составлять от приблизительно 1% до приблизительно 80% или более по массе или объему общей композиции. При получении таких фармацевтических составов специалист в этой области будет учитывать факторы, такие как растворимость, биодоступность, биологическое время полужизни, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические факторы, и, в связи с этим, желательными могут являться разные дозы и схемы лечения.

IV. Способы применения/лечения

[000526] Комплексы, содержащие мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, являются эффективными в лечении индивидуума, имеющего дистрофинопатию, например, мышечную дистрофию Дюшенна. В некоторых вариантах осуществления комплексы содержат молекулярную нагрузку, являющуюся олигонуклеотидом, например, антисмысловым олигонуклеотидом, облегчающим пропуск экзонов мРНК, экспрессирующей с мутантного аллеля DMD.

[000527] В некоторых вариантах осуществления индивидуум может являться человеком, не являющийся человеком приматом, грызуном или любым подходящим млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь мышечную дистрофию Дюшенна или другую дистрофинопатию. В некоторых вариантах

осуществления индивидуум имеет мутантный аллель DMD, который, необязательно, может содержать по меньшей мере одну мутацию в экзоне DMD, вызывающую мутацию со сдвигом рамки считывания и приводящую к неправильному сплайсингу/процессингу РНК. В некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает симптомами тяжелой дистрофинопатии, например, мышечной атрофией или потерей мышц. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет бессимптомное повышение концентрации креатинфосфокиназы в сыворотке (СК) и/или (например, и) мышечные спазмы с миоглобинурией. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет прогрессирующее мышечное заболевание, такое как мышечная дистрофия Дюшенна, или мышечная дистрофия Беккера, или DMD-ассоциированная дилатационная кардиомиопатия (DCM). В некоторых вариантах осуществления индивидуум не страдает симптомами дистрофинопатии.

[000528] Аспект настоящего изобретения включает способы, включающие введение индивидууму эффективного количества комплекса, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, можно вводить индивидууму, нуждающемуся в лечении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, представленный в настоящем описании, можно вводить подходящим путем, который может включать внутривенное введение, например, в виде болюса или посредством непрерывной инфузии в течение периода времени. В некоторых вариантах осуществления внутривенное введение можно осуществлять внутримышечным, интраперитонеальным, цереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным или интратекальным путем. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может находиться в твердой форме, водной форме или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления водную или жидкую форму можно подвергать небулизации или лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления небулизированную или лиофилизированную форму можно восстанавливать водным или жидким раствором.

[000529] Композиции для внутривенного введения могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилактамид, диметилформаид, этиллактат, этилкарбонат, изопропилмиристант, 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.

[000530] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, вводят сайт-специфическими способами или способами локальной доставки. Примеры этих способов включают имплантируемые депо-источники комплекса, катетеры для локальной доставки, сайт-специфические носители, прямую инъекцию или прямое нанесение.

[000531] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, вводят в эффективной концентрации, обеспечивающий терапевтический эффект в отношении индивидуума. Как понятно специалистам в этой области, эффективные количества варьируются в зависимости от тяжести заболевания, уникальных характеристик индивидуума, подвергаемого лечению, например, возраста, физического состояния, состояния здоровья или массы тела, длительности лечения, природы сопутствующей терапии, пути введения и связанных факторов. Эти связанные факторы известны специалистам в этой области, и их можно определять с использованием не более чем рутинного экспериментирования. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация является максимальной дозой, считающейся безопасной для пациента. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация будет являться наименьшей возможной концентрацией, обеспечивающей максимальную эффективность.

[000532] 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.

[000533] 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.

[000534] Эффективность лечения можно оценивать любыми подходящими способами. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать посредством оценки наблюдения симптомов, ассоциированных с дистрофинопатией, например, мышечной атрофии или слабости мышц, посредством измерения сообщаемых пациентом исходов, например, подвижности, навыков самообслуживания, повседневной активности, боли/дискомфорта и

тревожности/депрессии, или показателей качества жизни, например, продолжительности жизни.

[000535] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, вводят индивидууму в эффективной концентрации, достаточной для модуляции 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.

[000536] В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1-5, 1-10, 5-15, 10-20, 15-30, 20-40, 25-50 или более дней. В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленное в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недель. В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев.

[000537] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать более одного комплекса, содержащего мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно содержать любое другое подходящее терапевтическое средство для лечения индивидуума, например, человека, имеющего дистрофинопатию. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические средства могут усиливать или дополнять эффективность комплексов, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические средства можно использовать для лечения иного симптома или заболевания, чем комплексы, представленные в настоящем описании.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Таргетинг HPRT с помощью трансфицированных антисмысловых олигонуклеотидов

[000538] миРНК, нацеленную на гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), тестировали *in vitro* на способность снижать уровни экспрессии HPRT в иммортализованной линия клеток. В кратком изложении, клетки Нера 1-6 трансфицировали с использованием контрольной миРНК (siCTRL; 100 нМ) или миРНК, нацеленной на HPRT (siHPRT; 100 нМ), составленной с липофектаминоом 2000. Уровни экспрессии HPRT оценивали через 48 часов после трансфекции. Также осуществляли контрольный эксперимент, в котором носитель (фосфатно-солевой буфер) добавляли к клеткам Нера 1-6 в культуре и клетки поддерживали в течение 48 часов. Как показано на фиг. 1, обнаружено, что миРНК HPRT снижала уровни экспрессии HPRT на приблизительно 90% по сравнению с контролями. Используемые последовательности миРНК приведены в таблице 6.

Таблица 6. Последовательности siHPRT и siCTRL

	Последовательность*	SEQ ID NO:
Смысловая цепь siHPRT	5'-UcCuAuGaCuGuAgAuUuUaU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'	147
Антисмысловая цепь siHPRT	5'-paUaAaAuCuAcAgUcAuAgGasAsu-3'	148
Смысловая цепь siCTRL	5'-UgUaAuAaCcAuAuCuAcCuU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'	149
Антисмысловая цепь siCTRL	5'-aAgGuAgAuAuGgUuAuUaCasAsa-3'	150

*строчные буквы - 2'-О-Ме-рибоза; заглавные буквы - 2'-фтор-рибоза; p - фосфатная связь; s - фосфотиоатная связь

Пример 2: Таргетинг HPRT с помощью мышечно-специфического комплекса

[000539] Получали мышечно-специфический, содержащий миРНК HPRT, используемую в примере 1 (siHPRT), ковалентно связанную через нерасщепляемый линкер N-гамма-малеимидобутирил-оксисукцинимидный сложный эфир (GMBS) с Fab против TfR1 RI7 217 (DTX-A-002), антителом против рецептора трансферрина.

[000540] В кратком изложении, линкер GMBS растворяли в сухом DMSO и соединяли с 3'-концом смысловой цепи siHPRT с помощью образования амидной связи в водных условиях. Завершение реакции проверяли с помощью теста Кайзера. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством гель-фильтрации. Затем очищенную, малеимид-функционализированную смысловую цепь siHPRT соединяли с антителом DTX-A-002 с использованием реакции присоединения Михаэля.

[000541] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергали очистке посредством эксклюзионной хроматографии (SEC). Очищали комплексы антитело против TfR-siHPRT, содержащие одну или две молекулы siHPRT, ковалентно связанные с антителом DTX-A-002. С помощью денситометрии подтверждали, что очищенный образец комплексов имел среднее соотношение siHPRT и антитела 1,46. Анализ электрофореза в ПААГ с SDS показал, что >90% очищенного образца комплексов содержал DTX-A-002, связанное с одной или двумя молекулами siHPRT.

[000542] Используя способы, описанные выше, получали контрольный комплекс IgG2a-siHPRT, содержащий миРНК HPRT, используемую в примере 1 (siHPRT), ковалентно связанную через линкер GMBS с антителом IgG2a (Fab) (DTX-A-003). С помощью денситометрии подтверждали, что DTX-C-001 (комплекс IgG2a-siHPRT) имело среднее соотношение siHPRT и антитела 1,46, и анализ электрофореза в ПААГ с SDS показал, что >90% очищенного образца комплексов содержал DTX-A-003, связанное с одной или двумя молекулами siHPRT.

[000543] Затем комплекс антитело против TfR-siHPRT тестировали на клеточную интернализацию и ингибирование HPRT *in cellulo*. Клетки Нера 1-6, имеющие относительно высокие уровни экспрессии рецептора трансферрина, инкубировали в присутствии носитель (фосфатно-солевой буфер), IgG2a-siHPRT (100 нМ), комплекс антитело против TfR-siCTRL (100 нМ) или комплекс антитело против TfR-siHPRT (100 нМ) в течение 72 часов. Через 72 часа инкубации клетки выделяли и анализировали на уровни экспрессии HPRT (фиг. 2). Клетки, обработанные комплексом против TfR-siHPRT, демонстрировали снижение экспрессии HPRT на приблизительно 50% относительно клеток, обработанных контрольным носителем, и клеток, обработанных комплексом IgG2a-siHPRT. В то же время, клетки, обработанные IgG2a-siHPRT или комплексом антитело против TfR-siCTRL, имели уровни экспрессии HPRT, сравнимые с контрольным носителем (без снижения экспрессии HPRT). Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса антитело против TfR-siHPRT делает возможной клеточную интернализацию комплекса, таким образом, позволяя siHPRT ингибировать экспрессию HPRT.

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

[000544] Мышечно-специфический комплекс, описанный в примере 2, комплекс антитело против TfR-siHPRT, тестировали на ингибирование HPRT в тканях мыш. Мышам C57BL/6 дикого типа внутривенно инъекцировали однократную дозу контрольного носителя (фосфатно-солевого буфера); siHPRT (2 мг/кг миРНК); IgG2a-siHPRT (2 мг/кг миРНК, соответствующей 9 мг/кг комплекса антитела); или комплекс антитело против TfR-siHPRT (2 мг/кг миРНК, соответствующий 9 мг/кг комплекса антитела). Каждые экспериментальные условия воспроизводили на четырех отдельных мышцах C57BL/6 дикого типа. После трехдневного периода после инъекции мышей умерщвляли и отделяли выделенные типы тканей. Затем отдельные образцы ткани анализировали на уровни экспрессии HPRT (фиг. 3А-3В и 4А-4Е).

[000545] Мыши, которым вводили комплекс антитело против TfR-siHPRT, демонстрировали снижение экспрессии HPRT в икроножной мышце (снижение на 31%; $p < 0,05$) и сердце (снижение на 30%; $p < 0,05$) относительно мышей, которым вводили контрольную siHPRT (фиг. 3А-3В). В то же время, мыши, которым вводили комплекс IgG2a-siHPRT, имели уровни экспрессии HPRT, сравнимые с контрольной siHPRT

(небольшое снижение экспрессии HPRT или его отсутствие) для всех анализируемых типов мышечных тканей.

[000546] Мыши, которым вводили комплекс антитело против TfR-siHPRT, не демонстрировали изменения экспрессии HPRT в немускульных тканях, таких как ткани головного мозга, печени, легких, почки и селезенки (фиг. 4А-4Е). Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса антитело против TfR-siHPRT делает возможной клеточную интернализацию комплекса в мышечные ткани в модели на мышцах *in vivo*, таким образом, позволяя siHPRT ингибировать экспрессию HPRT. Эти данные свидетельствуют о том, что комплексы антитело против TfR-олигонуклеотид по изобретению способны к специфическому таргетингу мышечных тканей.

Пример 4: Таргетинг DMD с помощью мышечно-специфического комплекса

[000547] Получали мышечно-специфический комплекс, содержащий антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на мутантный аллель DMD (DMD ASO), для пропуска экзонов, например, олигонуклеотид, имеющий последовательность, приведенную в таблице 14, ковалентно связанный через катепсин-расщепляемый линкер с DTX-A-002 (RI7 217 (Fab)), антителом против рецептора трансферрина.

[000548] В кратком изложении, очищенный Val-Cit-линкер-DMD ASO соединяли с функционализированным фрагментом антитела (например, RI7 217 (Fab) или 15G11 (Fab)), полученным посредством модификации ε-амин на лизине антитела.

[000549] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергали хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ) для очистки мышечно-специфического комплекса. Денситометрию анализ электрофореза в ПААГ в присутствии SDS очищенного комплекса позволяет определять среднее соотношение ASO и антитела и общую чистоту, соответственно.

[000550] Используя описанные выше способы, получали контрольный комплекс, содержащий DMD ASO, ковалентно связанный через линкер Val-Cit с антителом IgG2a (Fab). Затем очищенный мышечно-специфический комплекс, содержащий DTX-A-002, ковалентно связанное в DMD ASO, тестировали на клеточную интернализацию и модуляцию пропуска экзонов DMD. Ассоциированные с заболеванием мышечные клетки, имеющие относительно высокие уровни экспрессии рецептора трансферрина, инкубировали в присутствии контрольного носителя (физиологического раствора), мышечно-специфического комплекса (100 нМ) или контрольного комплекса (100 нМ) в течение 72 часов. После 72 часов инкубации клетки выделяли и анализировали на уровни экспрессии DMD.

Пример 5: Таргетинг DMD с помощью мышечно-специфического комплекса

[000551] Получали мышечно-специфический комплекс (DTX-C-042), содержащий PМО ASO, нацеленный на экзон 23 DMD, ковалентно связанный с DTX-A-002 (RI7 217 (Fab)), антителом против рецептора трансферрина.

[000552] В кратком изложении, молекулу линкера бицикло[6.1.0]нонин-PEG3-L-валин-L-цитруллин-пентафторфенилового сложного эфира (BCN-PEG3-Val-Cit-PFP) соединяли с NH₂-C₆-(экзон-23 РМО) с использованием реакции сопряжения амида reaction. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством гель-фильтрации. Затем очищенный Val-Cit-линкер-(экзон-23 РМО) соединяли с азид-функциональным антителом против рецептора трансферрина (DTX-A-002), полученным посредством модификации ε-амин на лизине с помощью азид-PEG4-PFP.

[000553] Затем продукт реакции сопряжения антитела очищали и с помощью денситометрии подтверждали, что этот образец комплексов DTX-C-042, имел среднее соотношение ASO с антителом 1,9.

[000554] РМО ASO, нацеленный на экзон 23 DMD, используемый в этом примере, содержит последовательность, состоящую из GGCCAAACCUCGGCUUACCUGAAAU (SEQ ID NO: 171).

[000555] DTX-C-042 тестировали на способность индуцировать пропуск экзона 23 гена дистрофина, а затем повышать экспрессию белка дистрофина в целевых мышцах, ассоциированных с DMD *in vivo*. Мышам *mdx*, модели DMD на мышах, внутривенно инъецировали однократную дозу контрольного носителя (физиологического раствора); комплекса DTX-C-042 в дозе 10 мг/кг ASO; комплекса DTX-C-042 в дозе 20 мг/кг ASO или комплекса DTX-C-042 в дозе 30 мг/кг ASO. Каждые экспериментальные условия воспроизводили на четырех мышах *mdx*. Четырем мышам дикого типа также вводили контрольный носитель (физиологический раствор) в качестве контрольного эксперимента.

[000556] Через четырнадцать дней после введения мышей умерщвляли и собирали целевые мышечные ткани. Затем отдельные образцы мышечной ткани анализировали на процент пропуск экзона 23 гена дистрофина (фиг. 5). Кроме того, также количественно анализировали уровни белка дистрофина в целевых мышцах (количественный анализ дистрофина в четырехглавой мышце показан на фиг. 6A-6B).

[000557] Мыши, которым вводили комплекс DTX-C-042, демонстрировали дозозависимое повышение процента пропуска экзона 23 в четырехглавой мышце, диафрагме и сердце. Мыши, которым вводили комплекс DTX-C-042, также демонстрировали дозозависимое повышение экспрессии белка дистрофина в четырехглавой мышце в среднем на >4% белка дистрофина у мышей, которым вводили 30 мг/кг эквивалента ASO из DTX-C-042.

[000558] Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса антитело-ASO, делает возможной клеточную интернализацию комплекса в мышечные ткани в модели на мышах *mdx in vivo*, таким образом, позволяя РМО ASO экзона 23 индуцировать пропуск экзона 23 DMD. Эти данные также свидетельствуют о том, что комплекс антитело-ASO, способен к специфическому таргетингу мышечных тканей.

Пример 6: Таргетинг DMD с помощью мышечно-специфического комплекса для демонстрации функциональной пользы в модели на мышах *mdx*

[000559] Мышам *Mdx* (модель DMD на мышах; больным мышам) внутривенно инъецировали однократную дозу контрольного носителя (физиологического раствора); MDX-ASO ("голого" РМО ASO для пропуска экзон 23, 30 мг/кг); или комплекса DTX-C-042, как описано в примере 5 (антитела Fab против рецептора трансферрина RI7 217, связанного с вызывающим пропуск экзона 23 РМО, 30 мг/кг эквивалента ASO). Каждые экспериментальные условия воспроизводили на пяти мышах *mdx*. Пяти мышам дикого типа (здоровым мышам) также вводили контрольный носитель (физиологический раствор).

[000560] Через две и четыре недели после инъекции функциональную активность у всех мышей определяли с использованием эксперимента в камере "открытое поле". Эксперимент включал три последовательные стадии: (1) 10-минутный период, в течение которого каждую мышь помещали в камеру "открытое поле"; (2) 10-минутный период, в течение которого каждую мышь подвергали тесту на слабость задней конечности; и (3) 10-минутный период, в течение которого каждую мышь помещали в камеру "открытое поле". Регистрировали общее горизонтальное расстояние, покрываемое во время стадий (1) и (3). Процент изменения общего покрываемого расстояния между первым и вторым тестами. Как показано на фиг. 7А, через две недели мыши дикого типа, которым вводили физиологический раствор, покрывали в среднем на приблизительно 20% меньше во время стадии (3) относительно стадии (1); мыши *mdx*, которым вводили физиологический раствор, покрывали в среднем на приблизительно 70% меньше во время стадии (3) относительно стадии (1); мыши *mdx*, которым вводили MDX-ASO, покрывали в среднем на приблизительно 85% меньше во время стадии (3) относительно стадии (1); и мыши *mdx*, которым вводили комплекс MDX-ASO, покрывали в среднем на приблизительно 40% меньше во время стадии (3) относительно стадии (1). При сравнении с мышами дикого типа, которым вводили физиологический раствор, у мышей *mdx*, которым вводили физиологический раствор, наблюдали значимо худшие результаты (на что указывает значительное уменьшение расстояния, покрываемого во время стадии (3) относительно стадии (1)). Это наблюдение соответствует нарушенной двигательной функции, которой страдают пациенты с DMD. Мыши *mdx*, которым вводили "голый" MDX-ASO, демонстрировали те же функциональные нарушения, что и мыши, которым вводили носитель. В отличие от этого, результаты у мышей *mdx*, которым вводили DTX-C-042, не демонстрировали статистически значимых различий относительно мышей дикого типа, которым вводили носитель. Как показано на фиг. 7В, через четыре недели мыши дикого типа, которым вводили физиологический раствор, покрывали в среднем на приблизительно 35% меньше во время стадии (3) относительно стадии (1); мыши *mdx*, которым вводили физиологический раствор, покрывали в среднем на приблизительно 80% меньше во время стадии (3) относительно стадии (1); мыши *mdx*, которым вводили MDX-ASO, покрывали в среднем на приблизительно 55% меньше во время стадии (3) относительно стадии (1); и мыши *mdx*, которым вводили DTX-C-042, покрывали в среднем на приблизительно 50% меньше во время стадии (3) относительно стадии (1).

[000561] Через две и четыре недели после инъекции активность всех мышей определяли с использованием теста бега в колесе. Каждую мышь отдельно помещали в клетки с беговыми колесами на период 24 часа. 24-часовой период включал пять часов освещения с последующими тринадцатью часами в темноте, а затем шестью часами освещения. Общее пройденное расстояние (в метрах, м) на каждую мышь в беговом колесе непрерывно регистрировали на всем протяжении 24-часового периода, а затем разбивали на дискретные интервалы в один час. Как показано на фиг. 7C, через две недели расстояние, пройденное мышами *mdx*, которым вводили DTX-C-042, было больше расстояния, пройденного мышами *mdx*, которым вводили MDX-ASO или физиологический раствор, и приближались к расстоянию, пройденному мышами дикого типа в некоторые моменты времени. Как показано на фиг. 7D, через четыре недели расстояние, пройденное мышами *mdx*, которым вводили комплекс DTX-C-042, точно отражало общее расстояние, пройденное мышами дикого типа, которым вводили физиологический раствор, во время темного периода (т.е. когда мыши активны). Это отличается от мышей *mdx*, которым вводили физиологический раствор или MDX-ASO, покрывавшим значительно меньшие расстояния в темный период.

[000562] Всех мышей в этом примере дополнительно тестировали на уровни активности креатинкиназы через две недели и четыре недели после инъекции. Мыши дикого типа не секретируют значительные количества креатинкиназы из мышечных тканей. В отличие от них, мыши *mdx* (имеющие пораженные мышечные ткани) секретируют высокие уровни креатинкиназы, которые можно наблюдать посредством определения ферментативной активности креатинкиназы. Как показано на фиг. 7E, мыши *mdx*, которым вводили физиологический раствор, имели приблизительно в 9 и 10 раз более высокую ферментативную активность креатинкиназы относительно мышей дикого типа, которым вводили физиологический раствор, через две и четыре недели, соответственно. Введение "голого" ASO не приводило к значимой пользе для мышей *mdx*. Однако введение мышам *mdx* комплекса DTX-C-042 обеспечивало статистически значимое снижение уровней активности креатинкиназы через две и четыре недели.

[000563] Эти неожиданные результаты свидетельствуют о том, что комплекс антитело-ASO может обеспечивать функциональную пользу для мышей, имеющих фенотип DMD (мышей *mdx*), таким образом, что эти мыши имеют фенотипические показатели, напоминающие здоровых мышей (дикого типа). Результаты комплекса антитело-ASO относительно "голого" PMO (MDX-ASO) свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса антитело-ASO отвечает за обеспечение функциональной пользы, показанной в этом примере.

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

[000564] Выбранные антитела против TfR1 тестировали на аффинность связывания с TfR1 человека для измерения K_a (константы скорости ассоциации), K_d (константы скорости диссоциации) и K_D (аффинность). В качестве контроля использовали два

известных антитела против TfR1, 15G11 и ОКТ9. Эксперимент по связыванию осуществляли с помощью Cytterra LSA при 25°C. Подготавливали "газон" антитела против IgG мыши и IgG человека на чипе HC30M посредством иммобилизации по аминокислотной группе. IgG захватывали на чипе. Серию разведений hTfR1, суTfR1 и hTfR2 инъецировали на чип для связывания (начиная с 1000 нМ, разведение 1:3, 8 концентраций).

[000565] Данные по связыванию определяли путем вычитания ответов от инъекции буферного анализатора и глобальной аппроксимации по модели связывания Ленгмюра 1:1 для оценки K_a (константы скорости ассоциации), K_d (константы скорости диссоциации) и K_D (аффинности) с использованием программного обеспечения Cytterra™ Kinetics. Для аппроксимации кривой использовали 5-6 концентраций.

[000566] Результаты свидетельствуют о том, что mAb мыши демонстрировали связывание hTfR1 со значениями K_D в диапазоне от 13 пМ до 50 нМ. Большинство mAb мыши имело значения K_D в одноразрядном наномолярно-субнаномолярном диапазоне. 49 из 56 mAb мыши демонстрировали перекрестно-реактивное связывание с суTfR1 со значениями K_D в диапазоне от 16 пМ до 22 нМ.

[000567] Значения K_a , K_d и K_D антител против TfR1 приведены в таблице 7.

Таблица 7. Значения K_a , K_d и K_D антител против TfR1

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

Пример 8: Конъюгация антител против TfR1 с олигонуклеотидами

[000568] Получали комплексы, содержащие антитело против TfR1, ковалентно конъюгированное с рабочим олигонуклеотидом (ASO300). Сначала Fab-фрагменты антитела против TfR клонов 3-A4, 3-M12 и 5-H12 получали посредством расщепления моноклональных антител мыши ферментом в шарнирной области или ниже шарнирной области полного IgG с последующим частичным восстановлением. Подтверждали, что Fab' были сравнимы с mAb по авидности или аффинности.

[000569] Мышечно-специфические комплексы получали посредством ковалентного связывания mAb против TfR с ASO300 через катепсин-расщепляемый линкер. В кратком изложении, молекулу линкера бицикло[6.1.0]нонин-PEG3-L-валин-L-цитруллин-пентафторфенилового сложного эфира (BCN-PEG3-Val-Cit-PFP) соединяли с ASO300 с помощью карбаматной связи. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством тангенциальной поточной фильтрации (TFF). Затем очищенный Val-Cit-линкер-ASO связывали с азид-функционализированным антителом против рецептора трансферрина, полученным посредством модификации ε-аминной группы на лизине с помощью азид-

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

[000570] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергали двум способам очистки для удаления свободного антитела и свободной нагрузки. Концентрации конъюгатов определяли с помощью Nanodrop A280 или анализа белка BCA (для антитела) и анализа Quant-It Ribogreen (для нагрузки). Вычисляли соответствующие соотношения лекарственное средство-антитело (DAR). DAR находились в диапазоне от 0,8 до 2,0, и их стандартизировали так, что все образцы получали равное количество нагрузки.

[000571] Затем очищенные комплексы тестировали на клеточную интернализацию и ингибирование гена-мишени DMPK. Клетки не являющегося человеком примата (NHP) или клетки DM1 (полученные от пациентов с DM1) выращивали в 96-луночных планшетах, и они дифференцировались в мышечные трубочки в течение 7 дней. Затем клетки обрабатывали увеличивающимися концентрациями (0,5 нМ, 5 нМ, 50 нМ) каждого комплекса в течение 72 часов. Клетки собирали, выделяли РНК и осуществляли обратную транскрипцию для получения кДНК. qPCR осуществляли с использованием наборов TaqMan, специфических для Prib (контроль) и DMPK, с помощью QuantStudio 7. Вычисляли относительные количества оставшегося транскрипта DMPK в обработанных и необработанных клетках, и результаты приведены в таблице 12.

[000572] Результаты свидетельствовали о том, что антитела против TfR1 способны к таргетингу мышечных клеток, интернализации мышечными клетками с молекулярной нагрузкой (рабочий олигонуклеотид ASO300), и что молекулярная нагрузка способна к таргетингу и нокдауну гена-мишени (DMPK). Нокдаун-активность комплекса, содержащего антитело против TfR1, конъюгированное с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом), нацеленной на DMD, можно тестировать с использованием анализа, представленного в настоящем описании, например, с использованием одного из олигонуклеотидов, приведенных в таблице 14, приведенных в любой из SEQ ID NO: 437-1241 или комплементарных любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

Таблица 12. Аффинность связывания антител против TfR1 и эффективность конъюгатов

Название клона	Средняя K_D huTfR1 (M) (антитело в отдельности)	Средняя K_D cyTfR1 (M) (антитело в отдельности)	% нокдауна DMPK в клетках NHP с использование м конъюгата антитело- DMPK ASO	% нокдауна DMPK в клетках людей- пациентов с DM1 с использование м конъюгата антитело- DMPK ASO

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

[000573] Примечательно, что результаты нокдауна DMPK свидетельствовали об отсутствии корреляции между аффинностью связывания антитела против TfR с рецептором трансферрина и эффективностью доставки DMPK ASO в клетки для нокдауна DMPK. Неожиданно, антитела против TfR, представленные в настоящем описании (например, по меньшей мере 3-A4, 3-M12 и 5-H12), демонстрировали превосходную активность при доставке нагрузки (например, DMPK ASO) в клетки-мишени и достижении биологического эффекта молекулярной нагрузки (например, нокдаун DMPK) в клетках яванского макака или клетках людей-пациентов с DM1 по сравнению с контрольным антителом 15G11, несмотря на сравнимую аффинность связывания (или, в некоторых случаях, таким как 5-H12, с более низкой аффинностью связывания) с рецептором трансферрина человека или яванского макака между этими антителами и контрольным антителом 15G11.

[000574] К выбору лучших 3 клонов для гуманизации, 3-A4, 3-M12 и 5-H12, привели лучшие характеристики, такие как высокая аффинность к huTfR1, >50% нокдауна DMPK в линиях клеток NHP и пациентов с DM1, идентифицированное связывание эпитопов с 3 уникальными последовательностями, низкое количество/отсутствие прогнозируемых участков PTM и хорошая экспрессия и эффективность конъюгации.

Пример 9: Гуманизированные антитела против TfR1

[000575] Антитела против TfR, приведенные в таблице 2, подвергали гуманизации и мутагенезу для снижения проблем с производством. Гуманизированные варианты подвергали скринингу и тестировали на их связывающие свойства и биологическую активность. Гуманизированные варианты переменных областей тяжелой и легкой цепи антитела против TfR1 (по 5 вариантов каждой) конструировали с использованием технологии составного антитела человека. Синтезировали гены, кодирующие Fab, имеющие эти переменные области тяжелой и легкой цепи, и конструировали векторы для экспрессии каждого варианта гуманизированной тяжелой и легкой цепи. 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 аффинности антитела к антигену-мишени, относительную экспрессию, процент гомологии в отношении последовательности зародышевой линии человека, и количество прогнозируемых Т-клеточных эпитопов MHC класса II (определенных с использованием анализа *in silico* MHC класса II iTope™).

[000576] Идентифицировали потенциальные проблемы в родительской последовательности некоторых антител посредством встраивания замен аминокислот в

вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи. Эти замены выбирали с учетом относительных уровней экспрессии, баллов iTope™ и относительной K_D одного цикла анализа кинетики Biacore. Тестировали гуманизированные варианты и выбирали варианты исходно в зависимости от аффинности к антигену-мишени. Затем выбранные гуманизированные Fab подвергали дополнительному скринингу на основе серии биофизических оценок стабильности и склонности к агрегации и деградации каждого проанализированного варианта, приведенного в таблице 16 и таблице 17. Выбранные Fab анализировали на их связывающие свойства в отношении TfR1 посредством анализа кинетики. Результаты этих анализов приведены в таблице 13. Для конъюгатов, приведенных в таблице 16 и таблице 17, выбранные гуманизированные Fab конъюгировали с DMPK-нацеленным олигонуклеотидом ASO300. Выбранные Fab являются термически стабильными, на что указывает сравнимая аффинность связывания с TfR1 человек и яванского макака после воздействия высокой температуры (40°C) в течение 9 дней по сравнению с состоянием перед воздействием (см. таблицу 13).

Таблица 16. Данные биофизической оценки гуманизированных Fab против TfR

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

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

* Восстанавливает связывание с вариантом яванского макака после конъюгации;

Таблица 17. Термическая стабильность гуманизированных Fab против TfR и конъюгатов

Вариант Критерий	3M12 (VH3/Vk2)	3M12 (VH3/Vk3)	3M12 (VH4/Vk2)	3M12 (VH4/Vk3)	3A4 (VH3- N54T/Vk4)
Аффинность связывания hTfR1, день 0 (нМ)	0,8	0,6	0,4	0,5	2,6
Аффинность связывания hTfR1, день 9 (нМ)	0,98	1,49	0,50	0,28	0,40

Аффинность связывания TfR1 яванского макака, день 0 (нМ)	9,9	4,7	1,4	2,2	156
Аффинность связывания TfR1 яванского макака, день 9 (нМ)	19,51	15,58	5,01	16,40	127,50
Связывание конъюгата DMPK-олигонуклеотида с hTfR1 (нМ)	1,14	N/A	N/A	1,18	2,22
Связывание конъюгата DMPK-олигонуклеотида с TfR1 яванского макака (нМ)	2,26	N/A	N/A	1,85	5,12
Вариант Критерий	3A4 (VH3-N54S/Vk4)	3A4 (VH3/Vk4)	5H12 (VH5-C33Y/Vk3)	5H12 (VH5-C33D/Vk4)	5H12 (VH4-C33Y/Vk4)
Аффинность связывания hTfR1, день 0 (нМ)	1,6	1,5	6,3	6	2,8
Аффинность связывания hTfR1, день 9 (нМ)	0,65	0,46	71,90	92,34	1731,00
Аффинность связывания TfR1 яванского макака, день 0 (нМ)	398	122	2,1	3,5	3,3

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

Таблица 13. Анализ кинетики связывания гуманизированных Fab против TfR с TfR1

Гуманизированные Fab против TfR	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	R_{MAX}	Chi^2 (RU²)
3A4 (VH3/Vk4)	7,65E+10	1,15E+02	1,50E-09	48,0	0,776
3A4 (VH3-N54S/Vk4)	4,90E+10	6,56E+01	1,34E-09	49,4	0,622
3A4 (VH3-N54T/Vk4)	2,28E+05	7,05E-04	3,09E-09	61,1	1,650
3M12 (VH3/Vk2)	2,64E+05	1,04E-04	3,95E-10	78,4	0,037
3M12 (VH3/Vk3)	2,42E+05	8,34E-05	3,45E-10	91,1	0,025
3M12 (VH4/Vk2)	2,52E+05	9,98E-05	3,96E-10	74,8	0,024
3M12 (VH4/Vk3)	2,52E+05	8,61E-05	3,41E-10	82,4	0,030
5H12 (VH5-C33D/Vk4)	6,78E+05	6,72E-04	9,91E-10	49,3	0,093
5H12 (VH5-C33Y/Vk3)	1,95E+05	1,22E-04	6,27E-10	68,5	0,021
5H12 (VH5-C33Y/Vk4)	1,86E+05	1,17E-04	6,26E-10	75,2	0,026

Связывание гуманизированных Fab против TfR1 с TfR1 (ELISA)

[000577] Для измерения связывания гуманизированных антител против TfR с TfR1 осуществляли ELISA. Сначала черные, плоскодонные 96-луночные планшеты с высоким связыванием (Corning, кат. № 3925) покрывали 100 мкл/лунку рекомбинантного huTfR1 в количестве 1 мкг/мл в PBS и инкубировали при 4°C в течение ночи. Лунки опустошали и удаляли остаточную жидкость. Блокирование осуществляли посредством добавления в каждую лунку 200 мкл 1% BSA (масс./масс.) в PBS. Блокированию позволяли происходить

в течение 2 часов при комнатной температуре на шейкере при 300 об./мин. После блокирования жидкость удаляли и лунки три раза промывали 300 мкл TBST. Затем добавляли антитела против TfR1 в 0,5% BSA/TBST в трех параллелях в серийных разведениях с 8 точками (диапазон разведения 5 мкг/мл-5 нг/мл). В планшеты для ELISA также включали положительный контроль и изотипический контроль. Планшеты инкубировали при комнатной температуре на орбитальном шейкере в течение 60 минут при 300 об./мин. и промывали планшеты три раза 300 мкл TBST. Антитело против (H+L)IgG-A488 (1:500) (Invitrogen, кат. № A11013) разводили 0,5% BSA в TBST и в каждую лунку добавляли 100 мкл. Затем 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 волны возбуждения 495 нм и испускания 50 нм (с шириной полосы 15 нм) с помощью спектрофотометра для чтения планшетов. Данные регистрировали и анализировали на EC_{50} . Данные о связывании с TfR1 человека (hTfR1) для гуманизированных Fab 3M12, 3A4 и 5H12 приведены на фиг. 9A, 9C и 9E, соответственно. Измерения ELISA осуществляли с использованием TfR1 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (сTfR1) тем же способом, описанным выше для hTfR1, и результаты приведены на фиг. 9B, 9D и 9F.

[000578] 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.

[000579] 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.

[000580] 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. 22, 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.

[000581] 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. 11A и 11B; 5H12, фиг. 11E и 11F). Примечательно, что клоны 3A4 демонстрируют улучшенное связывание с cTfR1 после конъюгации относительно их неконъюгированных форм (фиг. 11C и 11D).

[000582] Как используют в этом примере, термин "неконъюгированный" означает, что антитело не конъюгировали с олигонуклеотидом.

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

[000583] Конъюгаты, содержащие гуманизированные Fab против TfR Fab 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).

[000584] Клетки RD культивировали в среде для выращивания DMEM с глутамином, дополненной 10% FBS и пенициллином/стрептомицином, почти до достижения конfluence. 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.

[000585] Результаты на фиг. 12 свидетельствуют о том, что уровень экспрессии DMPK снижался в клетках, обработанных каждым указанным конъюгатом, относительно экспрессии в обработанных PBS клетках, что свидетельствует о том, что гуманизированные Fab против TfR могут опосредовать захват DMPK-нацеленного олигонуклеотида клетками RD, и что интернализированный DMPK-нацеленный олигонуклеотид является эффективным в нокдауне уровня мРНК DMPK.

[000586] Аналогично, олигонуклеотид, индуцирующий пропуск экзона DMD, также могут являться конъюгированными гуманизированными Fab против TfR для доставки в мышечные клетки и индуцирующими пропуск экзона DMD в мышечных клетках.

Пример 11. Обработка конъюгатом антитело против TfR-олигонуклеотид повышала экспрессию дистрофина в модели DMD на мышцах *mdx*

[000587] Для тестирования эффектов другого олигонуклеотида, индуцирующего пропуск экзона DMD *in vivo*, олигонуклеотид (РМО), индуцирующий пропуск экзона 23, вводили в виде "голового" олигонуклеотида или в конъюгате с антителом против TfR мышца мышцам *mdx* в модели DMD. Измеряли экспрессию дистрофина. Пропуск экзона, стимулируемый конъюгатом, приводила к дозозависимой продукции белка дистрофина, что продемонстрировано посредством вестерн-блоттинга (фиг. 14) и количественно проанализировано на фиг. 15. Альфа-актин использовали в качестве контроля для нанесения.

[000588] Однократная доза конъюгата для экзона 23, вводимого мышцам *mdx*, также восстанавливала экспрессию дистрофина на мембране мышечной клетки в дополнение к повышению общих уровней дистрофина, как показано на фиг. 16. Иммунофлуоресцентное окрашивание дистрофина в четырехглавых мышцах показало, что мыши *mdx*, которым вводили конъюгат, имели более высокие уровни дистрофина в своих четырехглавых мышцах, чем мыши, которым вводили "голый" олигонуклеотид или физиологический раствор.

Пример 12. Олигонуклеотид-опосредованный пропуск экзонов в мышечных трубочках при DMD

[000589] Стимуляция пропуска специфических экзонов DMD в ядре может позволить мышечным клеткам продуцировать более полный, функциональный белок дистрофин. Олигонуклеотид (РМО), индуцирующий пропуск экзона 51 DMD, конъюгировали с Fab против TfR1 и тестировали конъюгаты на мышечных трубочках мужчины с DMD с мутацией, отвечающей за пропуск экзона 51. Введение конъюгата приводило к 50%-ному повышению пропуска экзонов по сравнению с 25%-ным повышением пропуска экзонов после введения эквимолярной дозы "голового" олигонуклеотида (значение $p=0,001$), как показано на фиг. 13. Схожие результаты наблюдали в модели DMD на мышцах *mdx*, такие как показанные на фиг. 5.

Пример 13. Стабильность линкера, связывающего антитело против TfR и молекулярную нагрузку, в сыворотке

[000590] Олигонуклеотиды, связанные с антителами, в примерах конъюгировали через расщепляемый линкер, показанный в формуле (С). 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.

[000591] На фиг. 8 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 14. Активность пропуска экзонов конъюгатов против TfR в мышечных трубочках пациентов с DMD

[000592] В этом исследовании оценивали активность пропуска экзонов конъюгатов против TfR, содержащих Fab против TfR (3M12 VH3/Vκ2, 3M12 VH4/Vκ3 и 3A4 VH3 N54S/Vκ4), конъюгированный с олигонуклеотидом для пропуска экзона 51 DMD. Иммуортиализованные миобласты человека, несущие делецию экзона 52, размораживали, высевали при плотности 1е6 клеток/флакон в среды для выращивания клеток Promocell Skeletal (с 5% FBS и 1-кратным пенициллином-стрептомицином) и позволяли расти до конfluence. После достижения конfluence клетки трипсинизировали, осаждали посредством центрифугирования и ресуспендировали в свежих средах для выращивания клеток Promocell Skeletal. Подсчитывали количество клеток и клетки высевали в покрытые матригелем 96-луночные планшеты при плотности 50 тыс. клеток/лунку. Клеткам позволяли восстанавливаться в течение 24 часов. Клетки индуцировали для дифференцировки посредством аспирации сред для выращивания и замещения бессывороточными средами для дифференцировки. Затем клетки обрабатывали конъюгированным или неконъюгированным олигонуклеотидом для пропуска экзонов DMD в количестве 10 мкМ. Клетки инкубировали с тестовыми изделиями в течение десяти дней, затем из 96-луночных планшетов собирали тотальную РНК. Синтез кДНК осуществляли на 75 нг тотальной РНК, и осуществляли специфические в отношении мутаций ПЦР для оценки степени пропуска экзона 51 в каждом типе клеток. Продукты специфических в отношении мутаций ПЦР подвергали электрофорезу на 4%-ном агарозном геле и визуализировали с использованием SYBR gold. Денситометрию использовали для вычисления относительных количеств ампликонов с пропуском и без пропуска и определяли пропуск экзонов как количество ампликонов с пропуском экзона 51, разделенное на общее количество присутствующих ампликонов:

$$\%Exon\ Skipping = \frac{Skipped\ Amplicon}{(Skipped\ Amplicon + Unskipped\ Amplicon)} * 100$$

[000593] Результаты свидетельствуют о том, что конъюгаты с Fab 3M12 VH3/Vκ2 или 3M12 VH4/Vκ3, ковалентно связанным с олигонуклеотидом для пропуска экзона 51 DMD, приводили к повышенному пропуску экзонов по сравнению с неконъюгированным олигонуклеотидом для пропуска экзона DMD в мышечных трубочках пациентов (фиг. 17).

[000594] Как используют в этом примере, термин "неконъюгированный" означает, что антитело не конъюгировали с олигонуклеотидом.

Пример 15. Характеризация связывающих активностей Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3

[000595] 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 иммуоферментного 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. 18). Также осуществляли измерения поверхностного плазмонного резонанса (SPR), и результаты приведены в таблице 18. 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 18. Анализ кинетики связывания Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 с TfR1 человека и яванского макака или человек TfR2, измеряемой с использованием поверхностного плазмонного резонанса

	Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3				
Мишень	K_d (М)	k_a (М ⁻¹ с ⁻¹)	k_d (с ⁻¹)	R_{max}	R_{es} SD
TfR1 человека	7,68E-10	1,66E+05	1,27E-04	1,11E+02	3,45E+00
TfR1 яванского макака	5,18E-09	9,19E+04	4,76E-04	1,87E+02	6,24E+00
TfR2 человека	ND	ND	ND	ND	ND

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

[000596] 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 планшет 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. 19).

Пример 16. Стабильность конъюгата Fab против TfR-ASO в сыворотке

[000597] 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. 20 показано, что стабильность в сыворотке была схожей среди многих видов и оставалась высокой через 72 часа.

Пример 17. Активность пропуска экзонов конъюгата Fab против TfR-ASO *in vivo* у яванских макаков

[000598] 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 экзонов 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.

[000599] Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР использовали для оценки пропуска экзонов 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 19.

Таблица 19. Пропуск экзона 51 дистрофина у яванского макака

Время	2 недели			4 недели	
	Носитель	ASO в отдельности ^a	Конъюгат	ASO в отдельности ^a	Конъюгат
Доза конъюгата ^b	0	n/a	122	n/a	122
Доза ASO в отдельности ^c	0	30	30	30	30

Четырехглавая мышца ^d	0,00 (0,00)	1,216 (1,083)	4,906 (3,131)	0,840 (1,169)	1,708 (1,395)
Диафрагма ^d	0,00 (0,00)	1,891 (2,911)	7,315 (1,532)	0,717 (1,315)	9,225 (4,696)
Сердце ^d	0,00 (0,00)	0,043 (0,096)	3,42 (1,192)	0,00 (0,00)	4,525 (1,400)
Двуглавая мышца ^d	0,00 (0,00)	0,607 (0,615)	3,129 (0,912)	1,214 (1,441)	4,863 (3,881)
Передняя большеберцовая мышца ^d	0,00 (0,00)	0,699 (0,997)	1,042 (0,685)	0,384 (0,615)	0,816 (0,915)
Икроножная мышца ^d	0,00 (0,00)	0,388 (0,573)	2,424 (2,329)	0,00 (0,00)	5,393 (2,695)

^aASO=антисмысловой олигонуклеотид.

^bДозы конъюгата приведены в мг/кг конъюгата Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3-ASO.

^cДозы ASO приведены в мг/кг эквивалента ASO дозы Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3-ASO.

^dЗначения пропуска экзонов представляют собой средний % пропуска экзона 51 со стандартным отклонением (n=5) в скобках.

[000600] 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 VH4/Vk3-ASO приводило к распределению ASO в оцениваемых тканях в ранговом порядке сердце>диафрагма>двуглавая мышца>четырехглавая мышца>икроножная мышца>передняя большеберцовая мышца через 2 недели после первого введения. Также оценивали длительность сохранения концентрации в ткани. Концентрации ASO в четырехглавой 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 20).

[000601] Как используют в этом примере, термин "неконъюгированный" означает, что олигонуклеотид не конъюгировали с антителом.

Таблица 20. Распределение вызывающего пропуск экзона 51 DMD ASO в тканях яванского макака

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

^aASO=Антисмысловой олигонуклеотид.

^bДозы конъюгата приведены в мг/кг конъюгата Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3 ASO.

^cДозы ASO приведены в мг/кг ASO или эквивалента ASO дозы конъюгата Fab против TfR 3M12 VH4/Vk3-ASO.

^dЗначения ASO представляют собой средние концентрации ASO в ткани в нг/г со стандартным отклонением (n=5) в скобках.

Пример 18. Эффект конъюгатов, содержащих Fab против TfR1, конъюгированный с олигонуклеотидом, индуцирующим пропуск экзона 23 DMD, в отношении экспрессии биомаркеров и мышечной функции у мышей *mdx*

[000602] Целью этого исследования являлось определение эффекта однократной дозы Fab против TfR мыши, конъюгированного с антисмысловым олигонуклеотидом (Ab-ASO), или однократной дозы того же "голого" ASO в отношении экспрессии дистрофина и мышечной функции у мышей *mdx*. Комплексом, используемым в этом примере, являлся DTX-C-042, как описано в примере 5.

[000603] Самцов гомозиготных мышей *mdx* возрастом семь недель случайным образом приписывали к каждой из восьми исследуемых групп. Мышам через хвостовую вену вводили однократную дозу ASO 30 мг/кг, Ab-ASO в дозе, эквивалентной 30 мг/кг ASO, или физиологический раствор. Ткани собирали и анализировали через 2 недели или 4 недели после введения.

[000604] *Измерение пропуска экзона 23 в мышцах*: Количественный анализ пропуска экзона 23 осуществляли посредством одностадийной реакции RT-ПЦР с использованием SuperScript® III (Thermo Fisher) с 75 нг исходной тотальной РНК. Используемые праймеры ПЦР представляли собой 5'-CACATCTTTGATGGTGTGAGG (прямой) (SEQ ID NO: 2264) и 5'-CAACTTCAGCCATCCATTTCTG (обратный) (SEQ ID NO:2253). Капиллярный электрофорез использовали для количественного анализа полос с пропуском или без пропуска в интересующих скелетных мышцах по следующей формуле:

$$\% \text{ пропуска экзона 23} = \frac{\text{Полоса с пропуском}}{(\text{Полоса с пропуском} + \text{Полоса без пропуска})} * 100$$

Результаты свидетельствуют о том, что однократное введение конъюгата Fab против TfR-олигонуклеотид (Ab-ASO) облегчает значительное повышение пропуска экзона 23 в четырехглавой мышце (фиг. 21A), сердце (фиг. 21B) и диафрагме (фиг. 21C) мышей *mdx*. В отличие от этого, наблюдали низкий пропуск экзона 23 или его отсутствие в одних и тех же мышечных тканях мышей дикого типа (WT) или мышей *mdx*, которым вводили физиологический раствор или "голый" ASO.

[000605] *Измерение белка дистрофина в мышцах*: Образцы мышечной ткани, полученные из четырехглавой мышцы, гомогенизировали и измеряли концентрации белка посредством анализа ВСА. Общий белок (25 мкг) наносили на 3-8% Tris-ацетатный гель для белкового электрофореза и проводили эксперимент при 150 В в течение 1 часа. Затем гель переносили на поливинилидендифторидную мембрану, мембрану нарезали и часть, содержащую дистрофин, инкубировали в течение ночи с антителом против дистрофина (Abscam, кат. № 15277) при 4°C, а затем с конъюгатом антитела козы против IgG кролика (H+L) с пероксидазой хрена (Bio-Rad) в течение 30 минут при комнатной температуре. В качестве контроля остальную часть блота инкубировали в течение ночи с антителом против альфа-актина (Abscam, кат. № 9465) при 4°C, а затем с конъюгатом антитела козы против IgG мыши (H+L) с пероксидазой хрена (Bio-Rad) в течение 15 минут при комнатной температуре. Блот проявляли с использованием набора для детекции для вестерн-блоттинга ECL (Cytiva) и количественно анализировали с помощью программного обеспечения iBright (Thermo Fisher Scientific). Изображения вестерн-блоттинга показаны для мышечных тканей, собранных через две недели после инъекций, на фиг. 22A (четырёхглавая мышца), 23A (сердце) и 24A (диафрагма), и количественный анализ результатом вестерн-блоттинга показан на фиг. 22B (четырёхглавая мышца), 23B (сердце) и 24B (диафрагма). Изображения вестерн-блоттинга показаны для мышечных тканей, собранных через четыре недели после инъекций, на фиг. 22C (четырёхглавая мышца), 23C (сердце) и 25C (диафрагма), и

количественный анализ результатом вестерн-блоттинга показан на фиг. 22D (четырёхглавая мышца), 23D (сердце) и 24D (диафрагма). При каждом вестерн-блоттинге получали стандартную кривую с использованием объединенного белка из тканей дикого типа и *mdx*, и процент белка дикого типа (% WT) на каждой стандартной кривой свидетельствует о количестве белка дикого типа в образце. На фиг. 22A-22D показано, что через две и четыре недели после введения Ab-ASO облегчал повышение белка дистрофина в четырёхглавой мышце в большей степени, чем неконъюгированный ASO. На фиг. 23A-23D показано, что через две и четыре недели после введения Ab-ASO облегчал повышение белка дистрофина в сердечной мышце, в то время как измеряли небольшое количество дистрофина дикого типа или его отсутствие в сердечной мышце мышцей, которым вводили "голый" ASO. На фиг. 24A-24D показано, что через две и четыре недели после введения Ab-ASO облегчал повышение белка дистрофина в диафрагме, в то время как измеряли небольшое количество дистрофина дикого типа или его отсутствие в диафрагме мышцей, которым вводили "голый" ASO.

[000606] *Измерение содержания ASO в тканях*: Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) осуществляли посредством покрытия покрытых нейтралитином планшетов зондом захвата, специфическим для интересующего ASO. Лизат расщепленной протеиназой К ткани инкубировали на покрытых планшетах, чтобы сделать возможным связывание интересующего ASO с зондом захвата. Затем планшеты промывали и несвязавшийся зонд захвата расщепляли микрококковой нуклеазой с последующей дополнительной промывкой и блокированием. Добавляли HRP-конъюгированное антитело против дигоксигенина для связывания с интактным зондом захвата, затем визуализировали с использованием субстрата TMB (R&D Systems, Inc.). Количественный анализ осуществляли с использованием стандартной кривой с известной концентрацией, разведенной в матрице для скелетных мышц. Результаты свидетельствуют о том, что введение конъюгата Fab помогало достичь значительного накопления ASO в четырёхглавой мышце (фиг. 25A), диафрагме (фиг. 25B) и сердце (фиг. 25C), в то время как введение "голового" ASO демонстрировало низкое содержание ASO или его отсутствие в каждой мышечной ткани. Эти результаты свидетельствуют о том, что небольшое количество ASO или его отсутствие определяли в мышечных тканях мышцей, которым вводили физиологический раствор или "голый" ASO, в то время как введение Ab-ASO приводило к измеримым количествам ASO в каждой из тестируемых тканей через две и четыре недели после введения.

Пример 19. Конъюгация олигонуклеотидов для пропуска экзона 53 DMD с антителами против TfR1 улучшает их активность

[000607] Для тестирования эффекта таргетинга против TfR1 в отношении олигонуклеотидов для пропуска экзона 53 получали комплексы, содержащие антитело Fab против TfR1 (3M12 VH4/Vk3), ковалентно связанное с РМО для пропуска экзона 53 через линкер, имеющий структуру формулы (C). В этом примере использовали два РМО для пропуска экзона 53: РМО для экзона 53-А, содержащий последовательность

GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC (SEQ ID NO: 2256), и РМО для экзон 53-В, содержащий последовательность CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC (SEQ ID NO: 2257).

[000608] Сначала РМО для пропуска экзона 53 в отдельности тестировали на их способность облегчать пропуск экзона 53 после гипнотического захвата (т.е. без средств для трансфекции или модификации для придания мышечного таргетинга). Клетки пациентов с DMD KM1328, несущие делецию экзона 52 DMD, обрабатывали диапазоном концентраций РМО для экзона 53-А или РМО для экзона 53-В и измеряли пропуск экзона 53. Как показано на фиг. 26, РМО для экзона 53-А являлся приблизительно в 2 раза более активным, чем РМО для экзона 53-В. Учитывая кривые доза-эффект, вычисляли, что для достижения 50% пропуска экзона 53 необходима концентрация 2,5 мкМ РМО для экзона 53-А или 4,7 мкМ РМО для экзона 53-В.

[000609] Затем комплексы, содержащие Fab против Tfr1, ковалентно связанный с РМО для экзона 53-А или РМО для экзона 53-В ("комплекс Fab против Tfr1-ASO"), тестировали на их способность облегчать пропуск экзона 53 в клетках пациентов с DMD KM1328 по сравнению с теми же РМО, несвязанными с антителом ("голым" ASO). Клетки обрабатывали "голым" ASO в концентрациях 0,16 мкМ, 0,32 мкМ, 0,63 мкМ или 1,25 мкМ или комплексом Fab против Tfr1-ASO в концентрациях эквивалента ASO 0,16 мкМ, 0,32 мкМ, 0,63 мкМ или 1,25 мкМ. Как показано на фиг. 27, комплексы Fab-ASO позволяли достигать большего пропуска экзона 53, чем "голый" ASO в каждой из тестируемых концентраций, включая достижение значимо улучшенного пропуска экзона 53 с помощью РМО для экзон 53-А в более низких тестируемых дозах (0,16 мкМ, 0,32 мкМ и 0,63 мкМ). Эти результаты свидетельствуют о том, что ковалентно связанные олигонуклеотиды для пропуска экзона с антителами против Tfr1 могут способствовать активности пропуска экзона в более низких дозах, таким образом, делая возможной эффективность олигонуклеотидов в более низких дозах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для стимуляции экспрессии или активности гена DMD, где мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором поверхности клетки на мышечных клетках, где мышечно-специфическое средство является гуманизированным антителом, 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;

(iv) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74;

(v) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75;

(vi) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74;

(vii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(ix) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; или
(x) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

9. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-8, где равновесная константа диссоциации (K_D) связывания антитела с рецептором трансферрина находится в диапазоне от 10^{-11} М до 10^{-6} М.

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

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

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

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

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

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

16. Комплекс по варианту осуществления 15, где олигонуклеотид содержит последовательность, приведенную в таблице 14.

16.1. Комплекс по варианту осуществления 15, где олигонуклеотид содержит любую из SEQ ID NO: 437-1241 или является комплементарным любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

17. Комплекс по варианту осуществления 16 или варианту осуществления 16.1, где олигонуклеотид содержит область комплементарности мутантному аллелю DMD.

18. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-14, где молекулярная нагрузка является полипептидом.

19. Комплекс по варианту осуществления 18, где полипептид является функциональным фрагментом белка дистрофина.

20. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17, где олигонуклеотид сконфигурирован для супрессии укорачивающей мутации в аллеле DMD посредством пропуска одного или множества экзонов.

21. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17, где олигонуклеотид способствует опосредованному антисмысловым олигонуклеотидом пропуску экзона для продукции мРНК дистрофина в рамке считывания.

22. Комплекс по варианту осуществления 21, где олигонуклеотид способствует пропуску экзона DMD в диапазоне от экзона 8 до экзона 55, необязательно, от экзона 23 до экзона 53.

23. Комплекс по варианту осуществления 22, где олигонуклеотид способствует пропуску экзона 8, экзона 23, экзона 44, экзона 45, экзона 50, экзона 51, экзона 52, экзона 53 и/или экзона 55.

24. Комплекс по варианту осуществления 21, где олигонуклеотид способствует пропуску экзона 51.

25. Комплекс по варианту осуществления 24, где олигонуклеотид способствует пропуску множества экзонов в диапазоне от экзона 44 до экзона 53.

26. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17 или 20-25, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь.

27. Комплекс по варианту осуществления 26, где по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь является фосфотиоатной связью.

28. Комплекс по варианту осуществления 27, где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи в стереохимической конформации Rp и/или стереохимической конформации Sp.

29. Комплекс по варианту осуществления 28, где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи, все из которых находятся в стереохимической конформации Rp, или все из которых находятся в стереохимической конформации Sp.

30. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17 или 20-29, где олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеотидов.

31. Комплекс по варианту осуществления 30, где один или более модифицированных нуклеотидов являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

32. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17 или 20-31, где олигонуклеотид является гэпмерным олигонуклеотидом, направляющим РНКазу Н-опосредованное расщепление мкРНК, что отрицательно регулирует экспрессию DMD в клетке, необязательно, где мкРНК является miR-31.

33. Комплекс по варианту осуществления 32, где гэпмерный олигонуклеотид содержит центральную часть из 5-15 дезоксирибонуклеотидов, фланкированных 2-8 модифицированными нуклеотидами.

34. Комплекс по варианту осуществления 33, где фланкирующие модифицированные нуклеотиды являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

35. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17 или 20-31, где олигонуклеотид является миксмерным олигонуклеотидом.

36. Комплекс по варианту осуществления 35, где миксмерный олигонуклеотид способствует пропуску экзонов.

37. Комплекс по варианту осуществления 35 или 36, где миксмерный олигонуклеотид содержит два или более разных 2'-модифицированных нуклеотида.

38. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17 или 20-31, где олигонуклеотид является РНКи-олигонуклеотидом, способствующим РНКи-опосредованному расщеплению мкРНК, что отрицательно регулирует экспрессию DMD в клетке, необязательно, где мкРНК является miR-31.

39. Комплекс по варианту осуществления 38, где РНКи-олигонуклеотид является двухцепочечным олигонуклеотидом длиной от 19 до 25 нуклеотидов.

40. Комплекс по варианту осуществления 38 или 39, где РНКи-олигонуклеотид содержит по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид.

41. Комплекс по любому из вариантов осуществления 31, 34, 37 или 40, где каждый 2'-модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-О-метил-, 2'-фтор-(2'-F), 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ) и 2',4'-мостиковых нуклеотидов.

42. Комплекс по варианту осуществления 30, где один или более модифицированных нуклеотидов являются мостиковыми нуклеотидами.

43. Комплекс по любому из вариантов осуществления 31, 34, 37 или 40, где по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид является 2',4'-мостиковым нуклеотидом, выбранным из: нуклеиновой кислоты с 2',4'-затрудненным 2'-О-этилом (сEt) и замкнутой нуклеиновой кислоты (ЗНК).

44. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17 или 20-31, где олигонуклеотид содержит геновую последовательность для нуклеазы редактирования генома.

45. Комплекс по любому из вариантов осуществления 15-17 или 20-31, где олигонуклеотид является фосфоамидатным морфолиновым олигомером.

46. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-45, где мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через расщепляемый линкер.

47. Комплекс по варианту осуществления 46, где расщепляемый линкер выбран из: протеаза-чувствительного линкера, рН-чувствительного линкера и глутатион-чувствительного линкера.

48. Комплекс по варианту осуществления 47, где расщепляемый линкер является протеаза-чувствительным линкером.

49. Комплекс по варианту осуществления 48, где протеаза-чувствительный линкер содержит последовательность, расщепляемую лизосомальной протеазой и/или эндосомальной протеазой.

50. Комплекс по варианту осуществления 48, где протеаза-чувствительный линкер содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин.

51. Комплекс по варианту осуществления 47, где линкер является рН-чувствительным линкером, расщепляемым при рН в диапазоне от 4 до 6.

52. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-45, где мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через нерасщепляемый линкер.

53. Комплекс по варианту осуществления 52, где нерасщепляемый линкер является алкановым линкером.

54. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-53, где антитело содержит неприродную аминокислоту, с которой олигонуклеотид ковалентно связан.

55. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-53, где антитело ковалентно связано с олигонуклеотидом посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела.

56. Комплекс по варианту осуществления 55, где олигонуклеотид конъюгирован с цистеином антитела через малеимид-содержащий линкер, необязательно, где малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроил- или малеимидометил-циклогексан-1-карбоксилатную группу.

57. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-56, где антитело является гликозилированным антителом, содержащим по меньшей мере один остаток сахара, с которым ковалентно связан олигонуклеотид.

58. Комплекс по варианту осуществления 57, где остаток сахара является разветвленной маннозой.

59. Комплекс по варианту осуществления 57 или 58, где антитело является гликозилированным антителом, содержащим от одного до четырех остатков сахара, каждый из которых ковалентно связан с отдельным олигонуклеотидом.

60. Комплекс по варианту осуществления 57, где антитело является полностью гликозилированным антителом.

61. Комплекс по варианту осуществления 57, где антитело является частично гликозилированным антителом.

62. Комплекс по варианту осуществления 61, где частично гликозилированное антитело получают химическими или ферментативными средствами.

63. Комплекс по варианту осуществления 61, где частично гликозилированное антитело продуцируют в клетке, дефицитной по ферменту пути N- или O-гликозилирования.

64. Способ доставки молекулярной нагрузки в клетку, экспрессирующую рецептор трансферрина, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из вариантов осуществления 1-63.

65. Способ стимуляции экспрессии или активности белка DMD в клетке, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из вариантов осуществления 1-63 в количестве, эффективном для стимуляции интернализации молекулярной нагрузки в клетку.

66. способ по варианту осуществления 65, где клетка находится *in vitro*.

67. способ по варианту осуществления 65, где клетка находится в организме индивидуума.

68. способ по варианту осуществления 67, где индивидуум является человеком.

69. Способ лечения индивидуума, имеющего мутантный аллель DMD, ассоциированный с дистрофинопатией, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из вариантов осуществления 1-63.

70. Способ стимуляции пропуска экзона в транскрипте мРНК DMD в клетке, включающий введение в клетку эффективного количества комплекса по любому из вариантов осуществления 1-63.

71. Способ по варианту осуществления 70, где способ способствует пропуску экзона 8, экзона 23, экзона 44, экзона 45, экзона 50, экзона 51, экзона 52, экзона 53 и/или экзона 55 транскрипта мРНК DMD.

72. Способ по варианту осуществления 70 или 71, где способ способствует пропуску экзона 51 транскрипта мРНК DMD.

73. Комплекс, содержащий антитело против рецептора трансферрина (TfR), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для стимуляции экспрессии или активности гена DMD, где антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 76; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 75;

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

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

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

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

(vi) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 73; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 75;

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

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.

73. Комплекс, содержащий антитело против рецептора трансферрина (TfR), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для стимуляции экспрессии или активности гена DMD, где антитело против TfR подвергается образованию пироглутамата, являющемуся результатом посттрансляционной модификации.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ТЕРМИНОЛОГИЯ

[000610] 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.

[000611] 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.

[000612] 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.

[000613] 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.

[000614] Варианты осуществления настоящего изобретения представлены в настоящем описании. Варианты этих вариантов осуществления могут становиться очевидными специалистам в этой области после прочтения изложенного выше описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в этой области будут использовать такие варианты при необходимости, и авторы настоящего изобретения предполагают, что изобретение будут осуществлять на практике иначе, чем конкретно представлено в настоящем описании. Таким образом, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объектов изобретения, описанных в формуле изобретения в соответствии с действующим законодательством. Кроме того, изобретение включает любую комбинацию описанных выше элементов во всех возможных вариантах, если в настоящем описании не указано иначе или это четко не противоречит контексту. Специалистам в этой области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, или они могут

определить их с использованием не более чем рутинного экспериментирования. Такие эквиваленты предусмотрены формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комплекс, содержащий антитело против рецептора трансферрина (TfR), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для стимуляции экспрессии или активности гена DMD, где антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 76; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 75;

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 69; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 70;

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 71; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 70;

(iv) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 72; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 70;

(v) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 73; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 74;

(vi) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 73; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 75;

(vii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 76; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 74;

(viii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 77; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 78;

(ix) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 79; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 80; или

(x) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 77; и/или вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 80.

2. Комплекс по п.1, где антитело содержит:

(i) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75;

(ii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(iii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(iv) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70;

(v) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74;

(vi) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75;

(vii) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74;

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

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

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

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

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

5. Комплекс по п.4, где антитело содержит:

(i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 101; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 90;

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

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

100; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90;
(vii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89;
(viii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93;
(ix) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; или
(x) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

7. Комплекс по любому из пп.1-6, где антитело не связывается специфически с участком связывания трансферрина рецептора трансферрина, и/или где мышечно-специфическое антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.

8. Комплекс по любому из пп.1-7, где молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом.

9. Комплекс по п.8, где олигонуклеотид способствует пропуску экзона в РНК DMD.

10. Комплекс по п.9, где олигонуклеотид способствует пропуску экзона DMD в диапазоне от экзона 8 до экзона 55.

11. Комплекс по п.9 или 10, где олигонуклеотид способствует пропуску экзона 8, экзона 23, экзона 43, экзона 44, экзона 45, экзона 46, экзона 50, экзона 51, экзона 52, экзона 53 и/или экзона 55.

12. Комплекс по любому из пп.8-11, где олигонуклеотид содержит область комплементарности одному или более полным или частичным экзонным энхансерам сплайсинга (ESE) транскрипта DMD.

13. Комплекс по любому из пп.8-12, где олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую один или более полных или частичных ESE, приведенных в SEQ ID NO: 402-436 и 2043-2238.

14. Комплекс по любому из пп.8-13, где олигонуклеотид способствует пропуску экзона 51.

15. Комплекс по любому из пп.8-14, где олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов и содержит область комплементарности целевой последовательности, содержащую по меньшей мере 4 последовательных нуклеотида ESE, приведенного в любой из SEQ ID NO: 402-436.

16. Комплекс по любому из пп.8-14, где олигонуклеотид содержит любую из SEQ ID NO: 437-1241 или содержит область комплементарности любой из SEQ ID NO: 1242-2046.

17. Комплекс по любому из пп.8-10, где олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой последовательности олигонуклеотида, приведенного в таблице 14.

18. Комплекс по любому из пп.8-10 и 17, где олигонуклеотид содержит последовательность, приведенную в таблице 14, где любое одно или более из урациловых

оснований (U) в олигонуклеотиде, необязательно, могут являться тиминовых оснований (T).

19. Комплекс по любому из пп.8-18, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

20. Комплекс по п.19, где по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь является фосфотиоатной связью.

21. Комплекс по любому из пп.8-20, где олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеозидов.

22. Комплекс по п.21, где один или более модифицированных нуклеозидов являются 2'-модифицированными нуклеозидами.

23. Комплекс по любому из пп.8-18, где олигонуклеотид содержит один или более фосфоамидатных морфолинонуклеотидов, необязательно, где олигонуклеотид является фосфоамидатным морфолиновым олигомером (РМО).

24. Комплекс по любому из пп.1-23, где антитело ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через расщепляемый линкер.

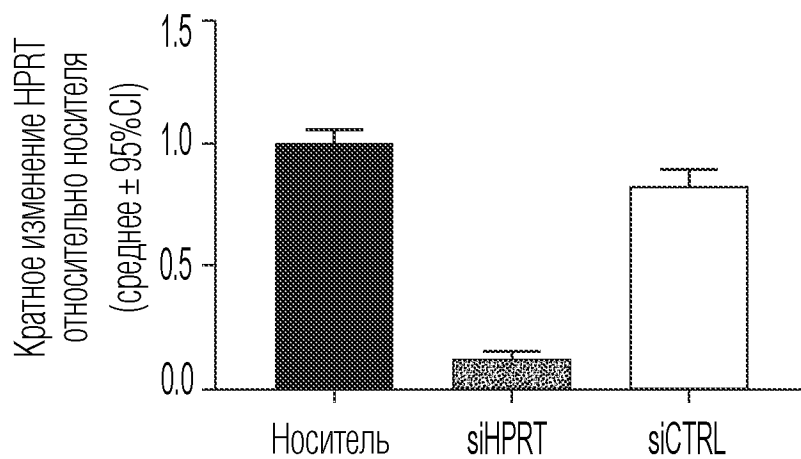
25. Комплекс по п.24, где расщепляемый линкер содержит последовательность валин-цитруллин.

26. Комплекс по любому из пп.1-25, где антитело ковалентно связано с молекулярной нагрузкой посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела.

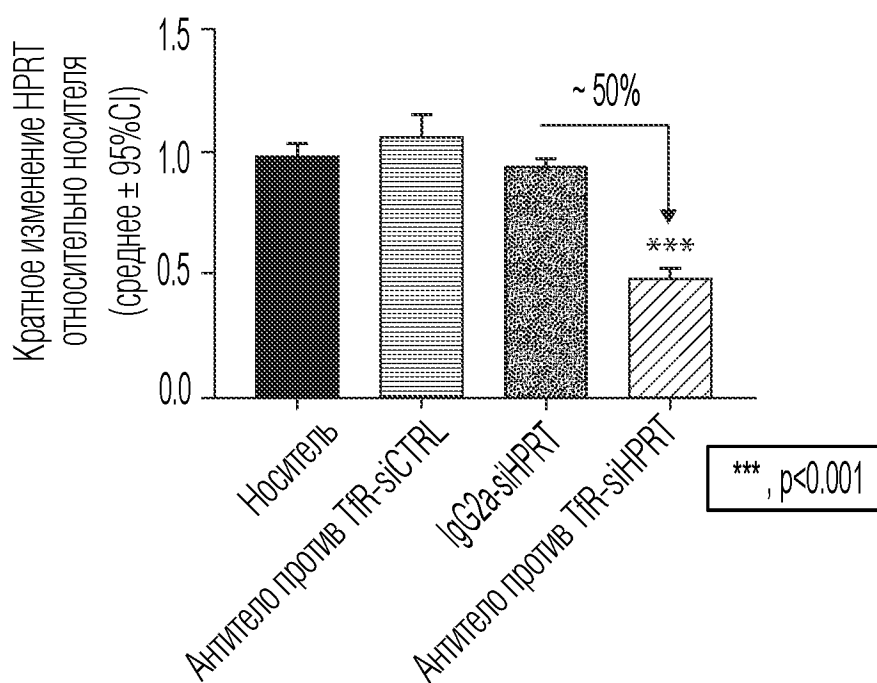
27. Способ стимуляции экспрессии или активности белка DMD в клетке, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из пп.1-26 в количестве, эффективном для стимуляции интернализации молекулярной нагрузки в клетку, необязательно, где клетка является мышечной клеткой.

28. Способ лечения индивидуума, имеющего мутантный аллель DMD, ассоциированный с дистрофинопатией, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из пп.1-26.

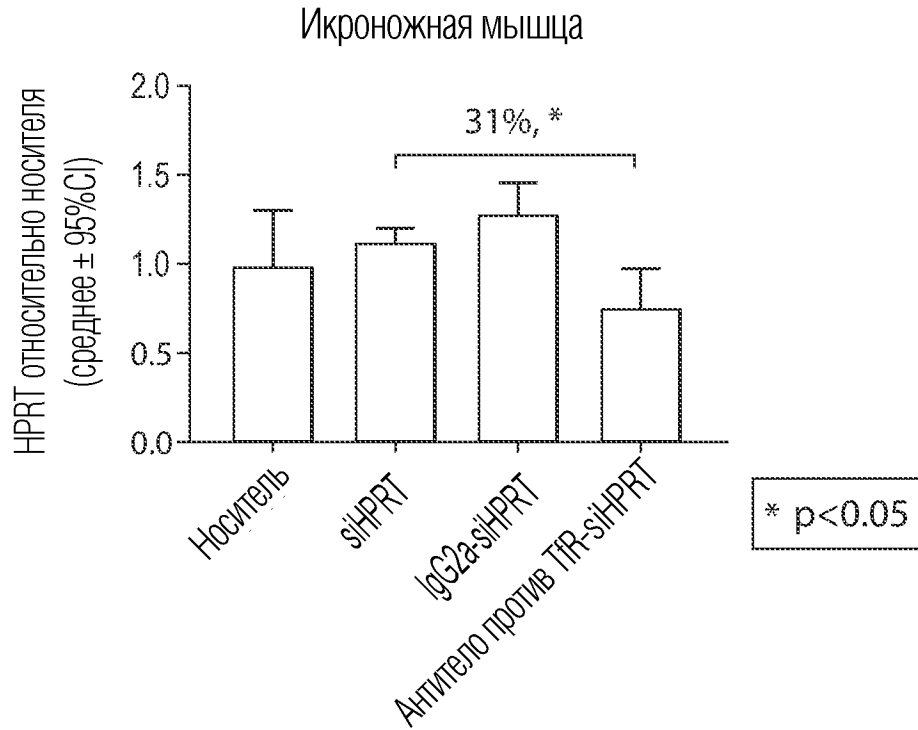
По доверенности



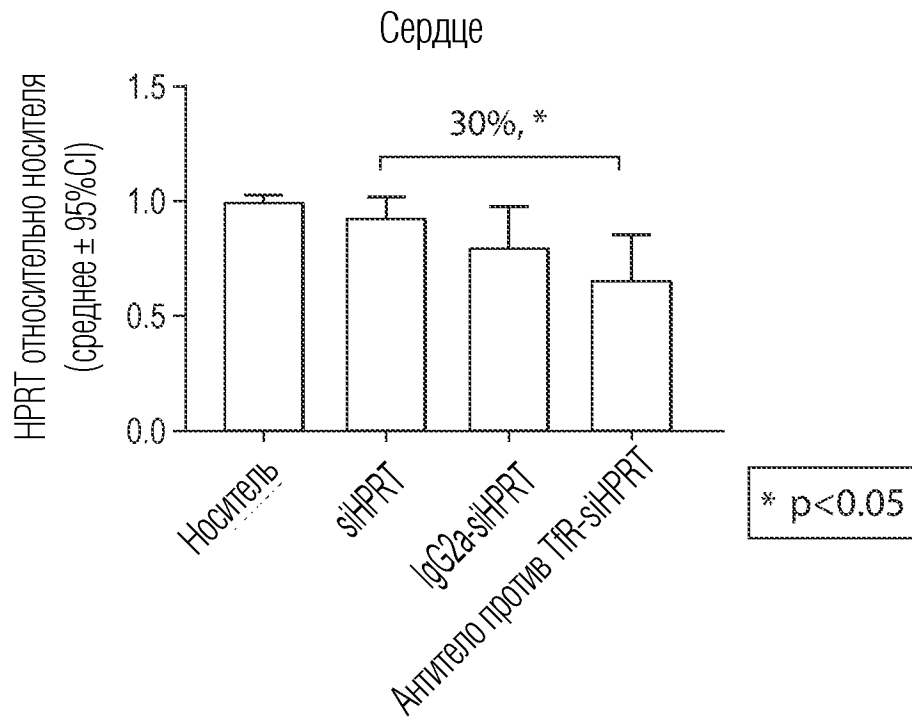
ФИГ. 1



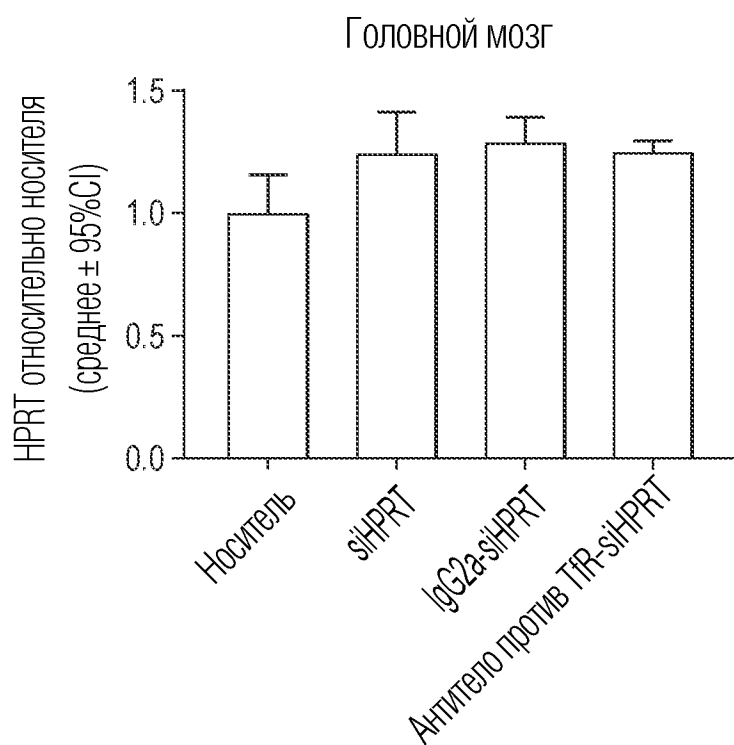
ФИГ. 2



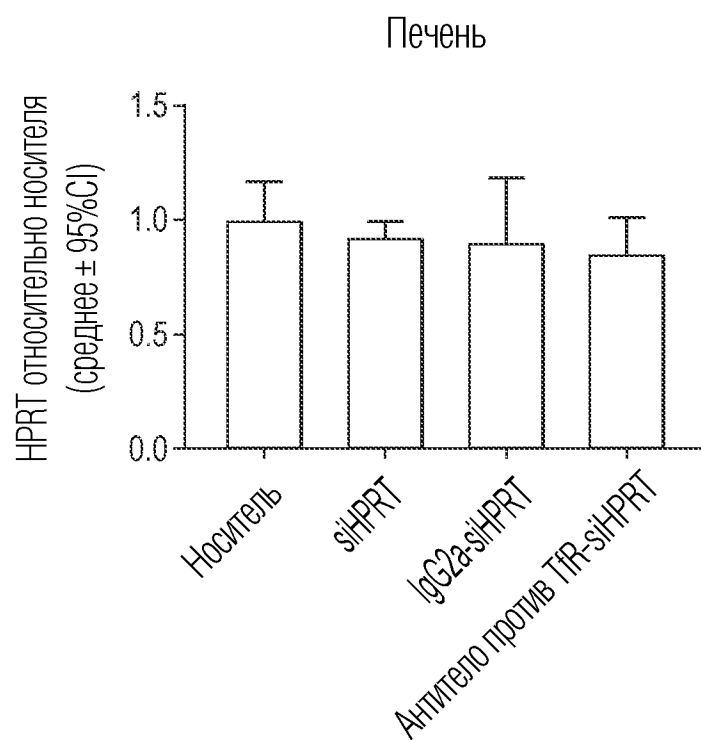
ФИГ. 3А



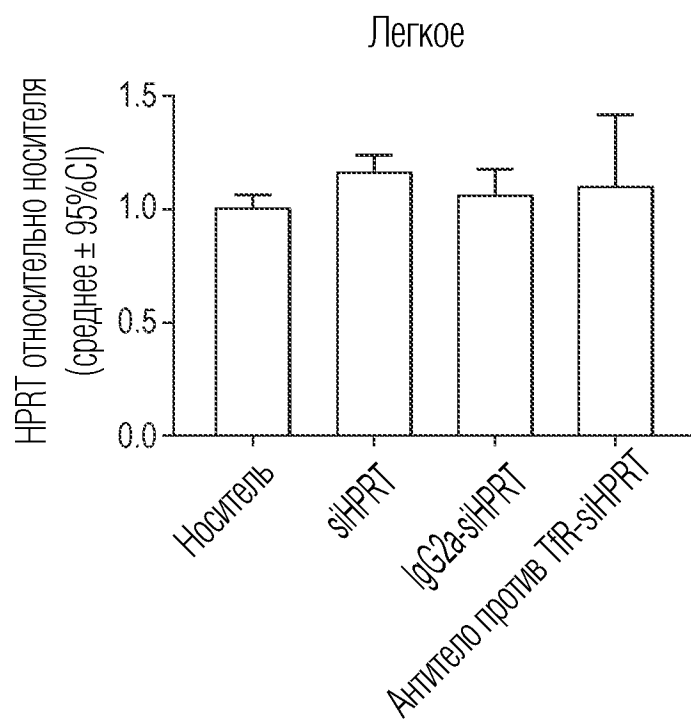
ФИГ. 3В



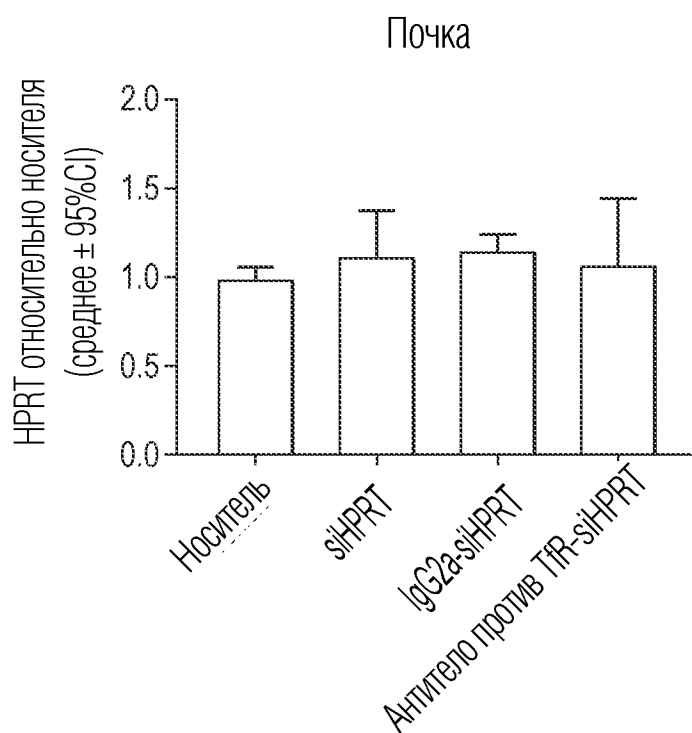
ФИГ. 4А



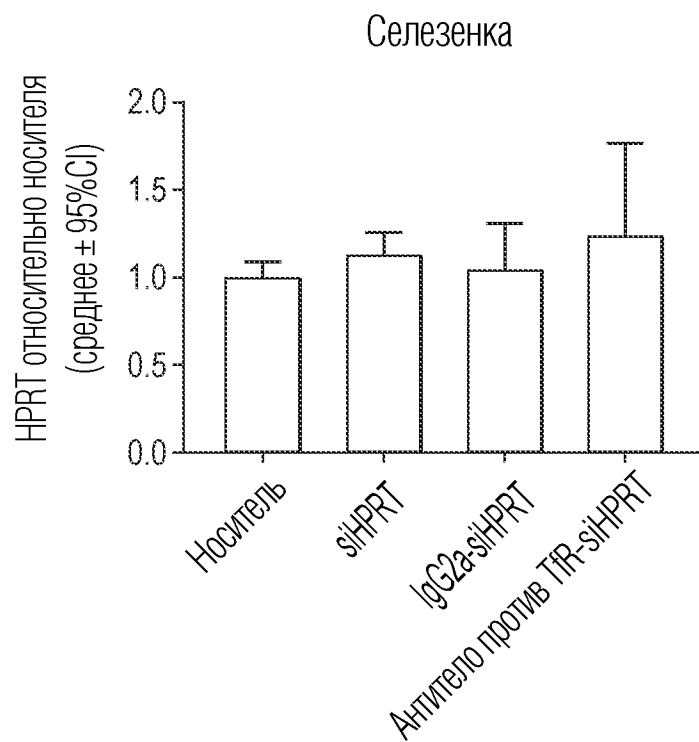
ФИГ. 4В



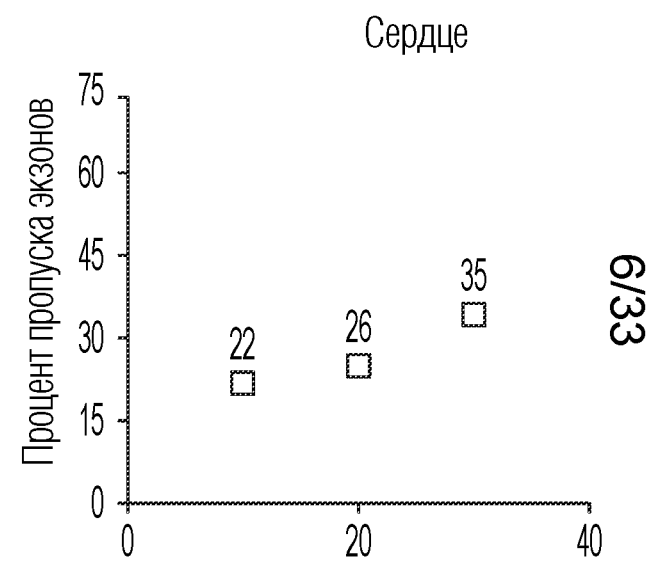
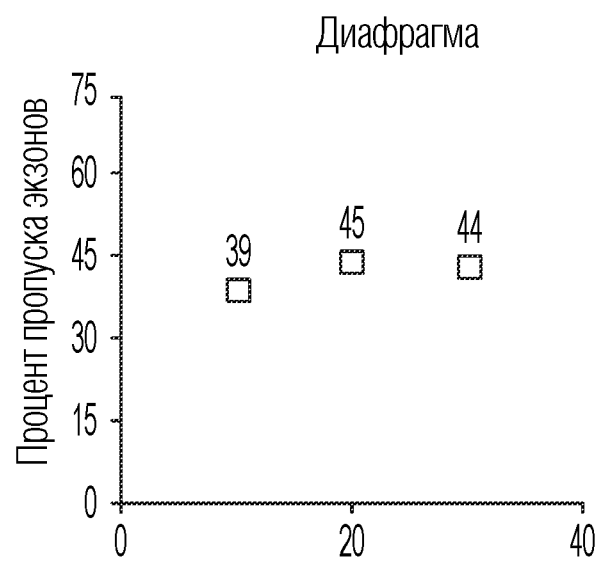
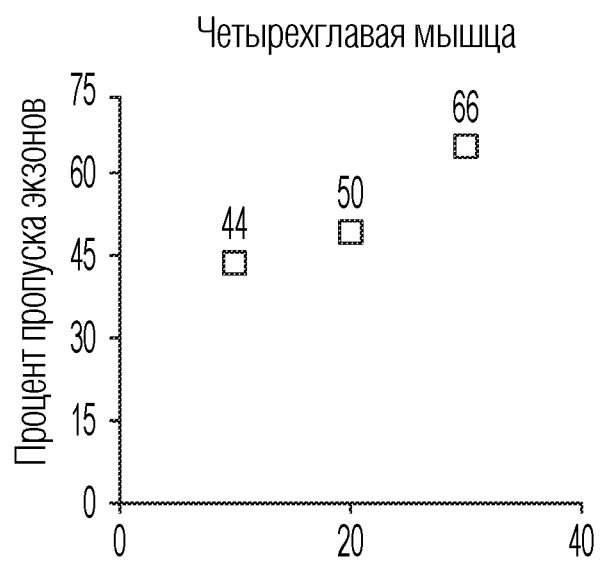
ФИГ. 4С



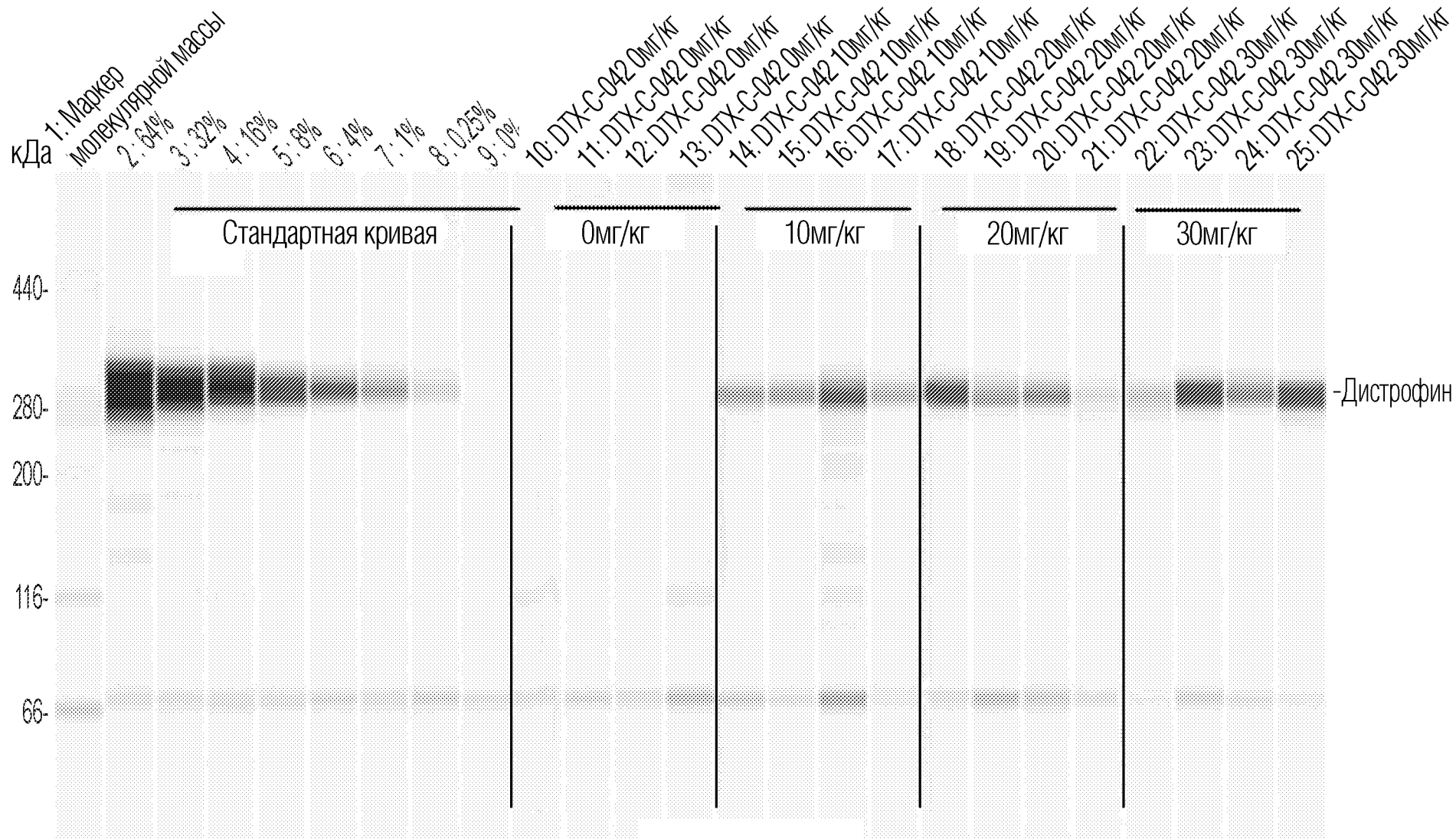
ФИГ. 4D



ФИГ. 4Е

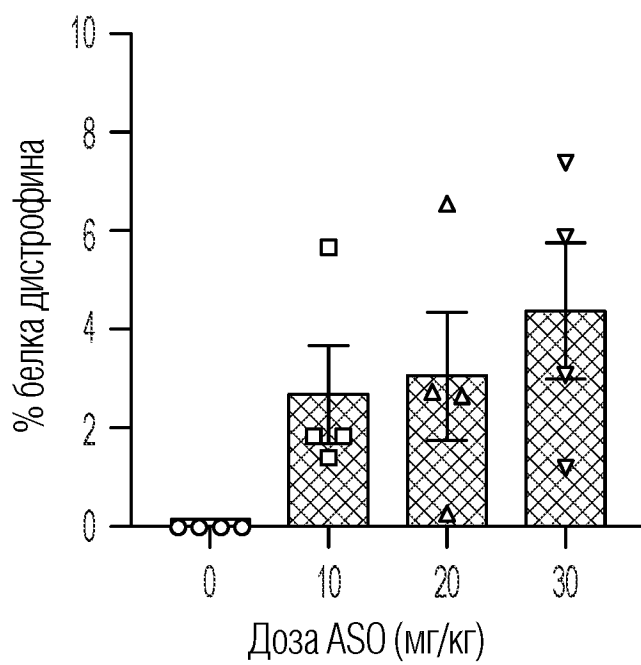


ФИГ. 5



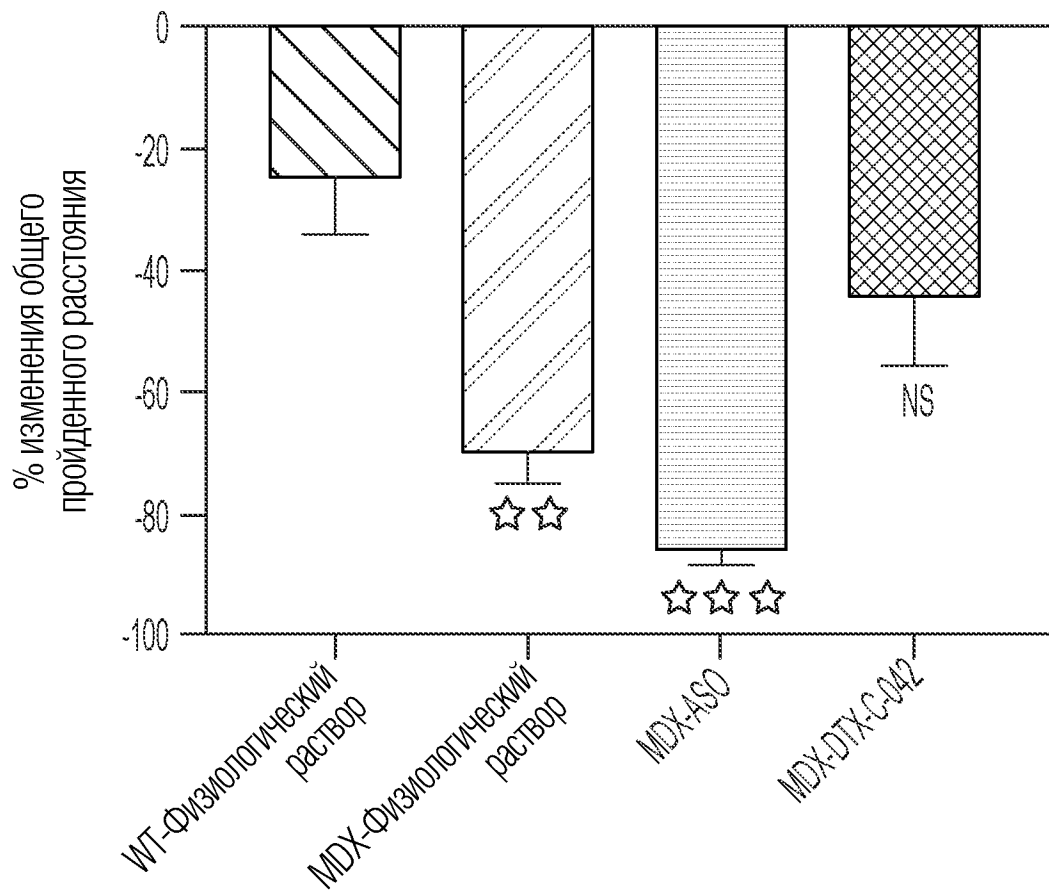
7/33

ФИГ. 6А

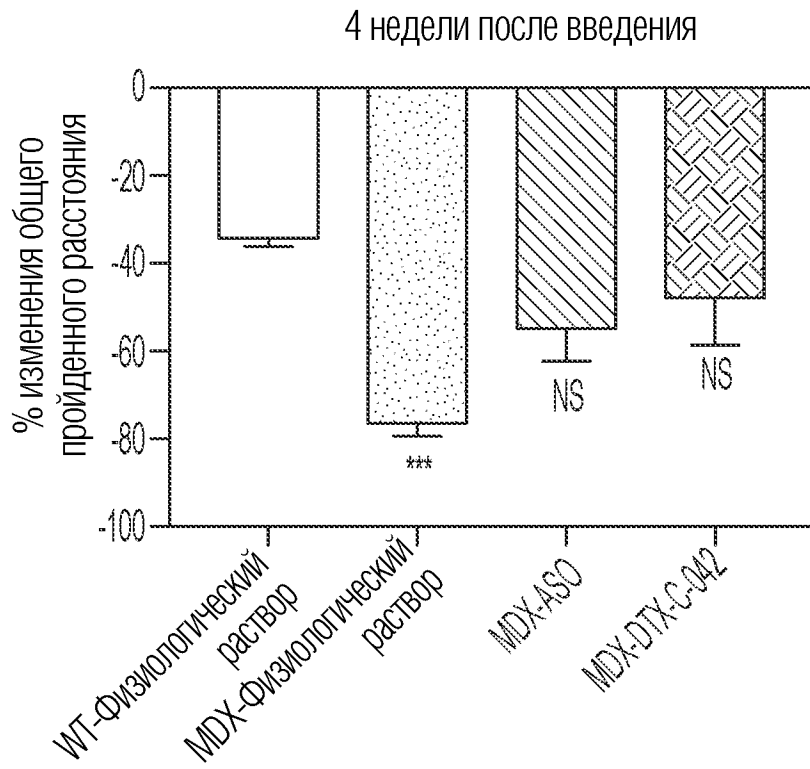


ФИГ. 6В

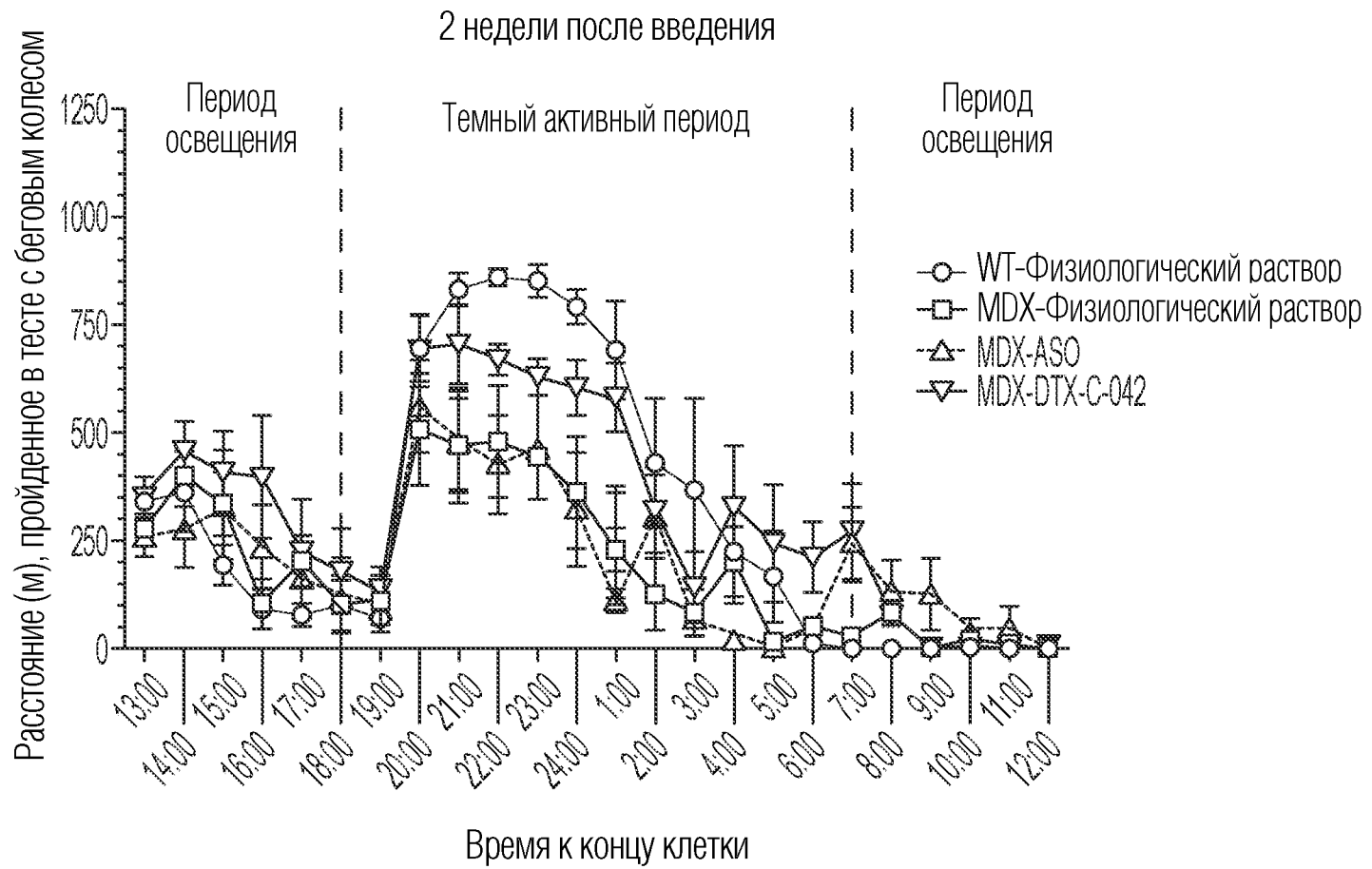
Расстояние, пройденное в тесте «открытого поля»
после теста на слабость задней конечности
(оценка через 2 недели после введения)



ФИГ. 7А

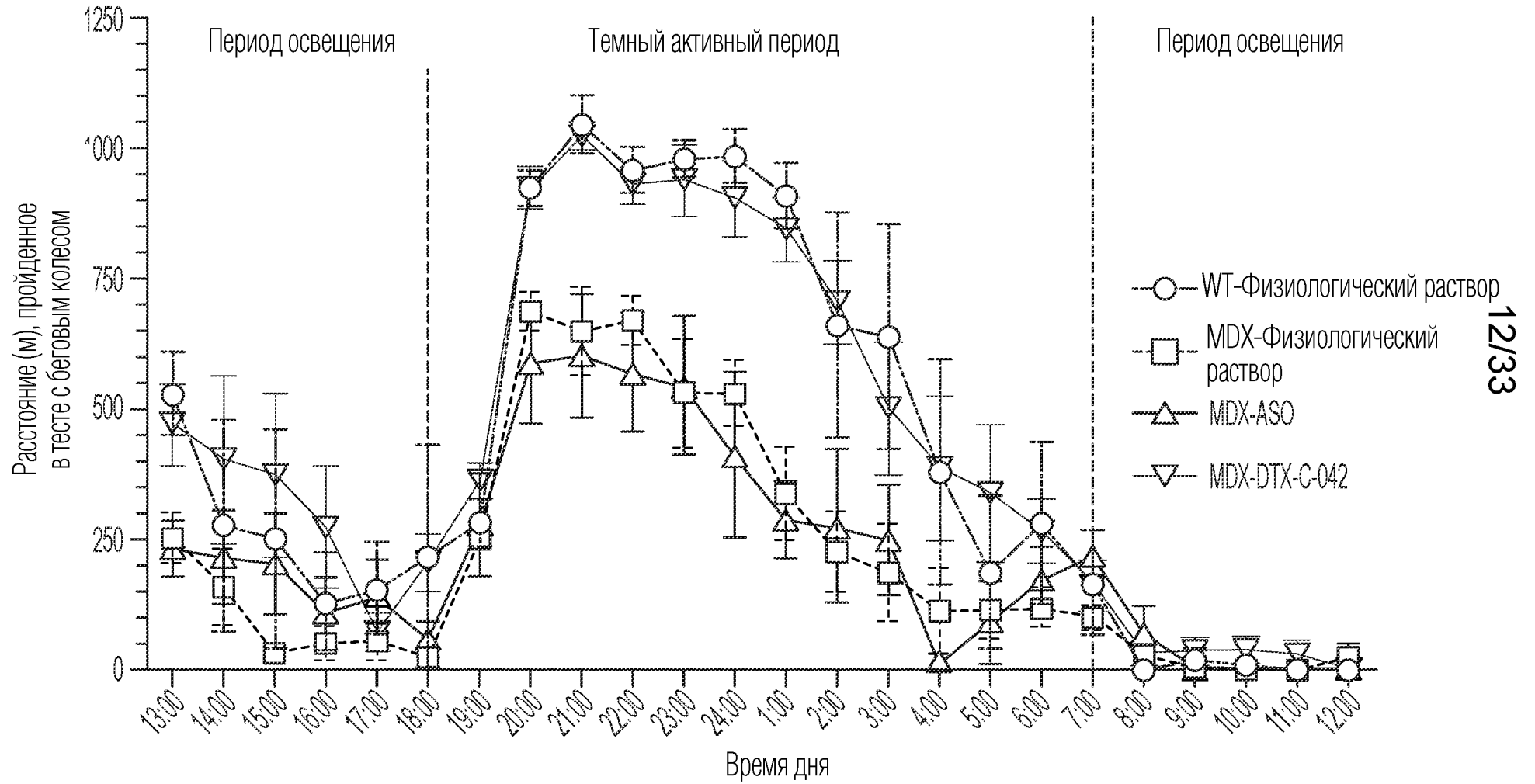


ФИГ. 7В



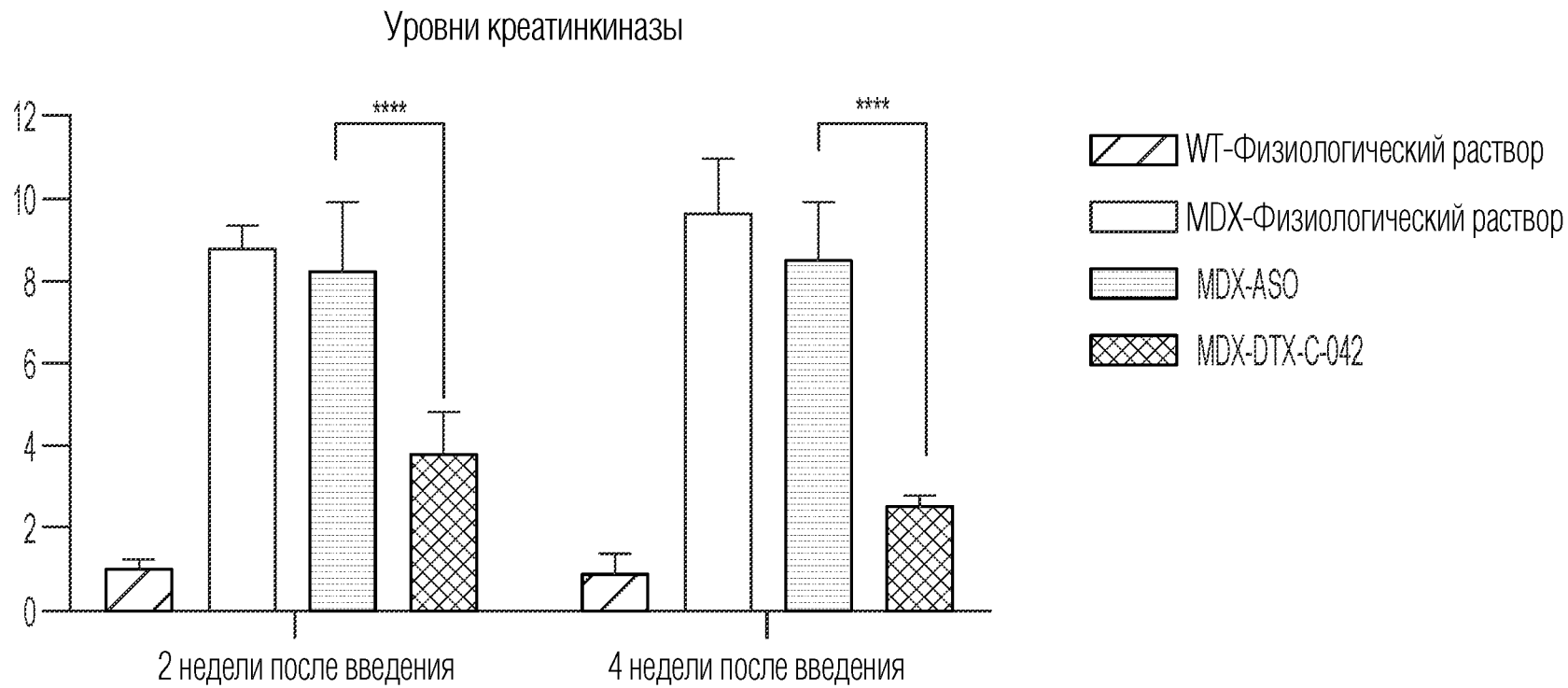
ФИГ. 7С

Расстояние, пройденное в тесте с беговым колесом (оценка через 4 недели после введения)

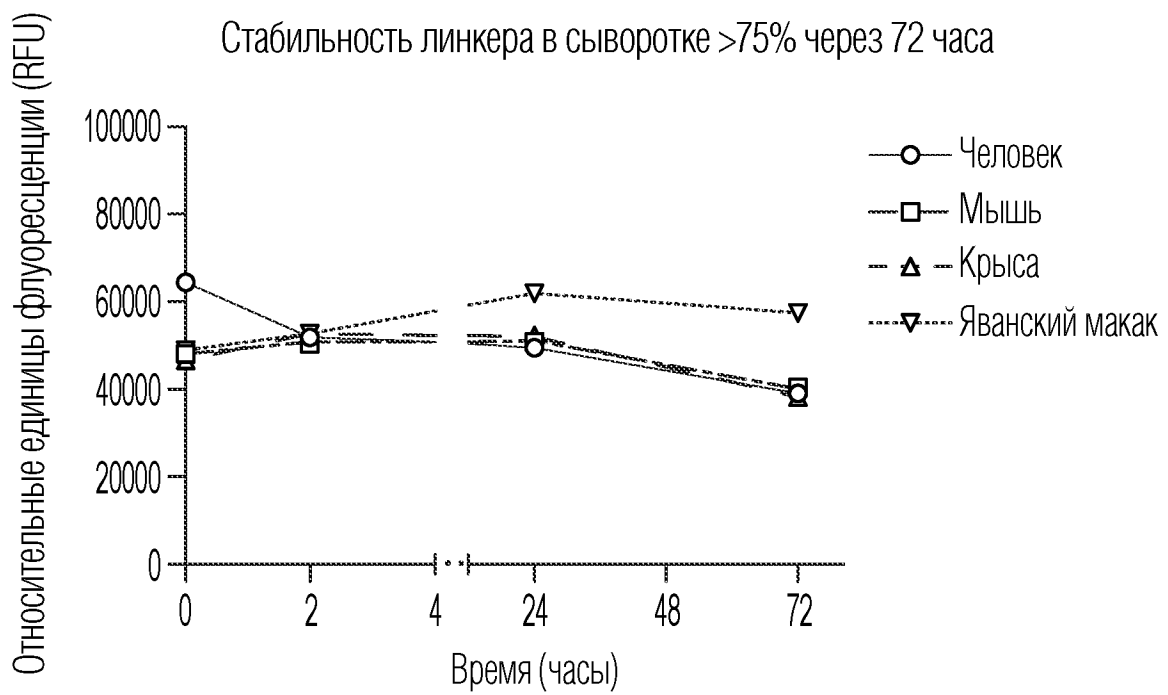


ФИГ. 7D

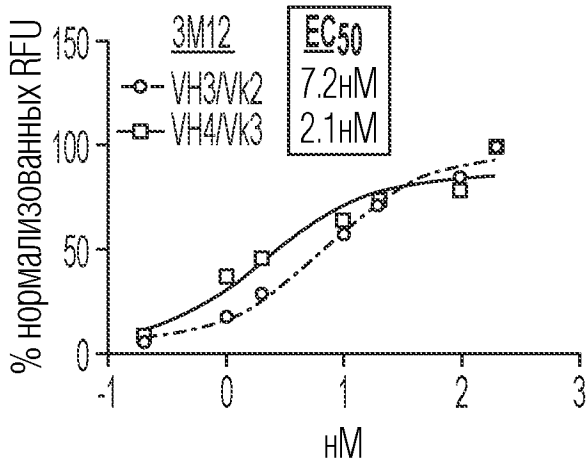
Относительное изменение активности креатинкиназы, нормализованное по мышам WT, которым вводили физиологический раствор



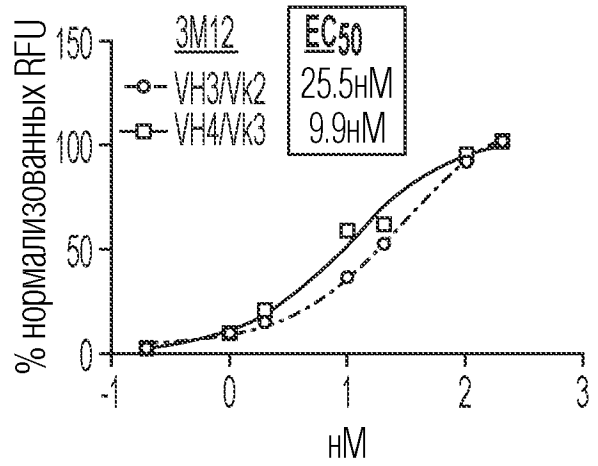
ФИГ. 7E



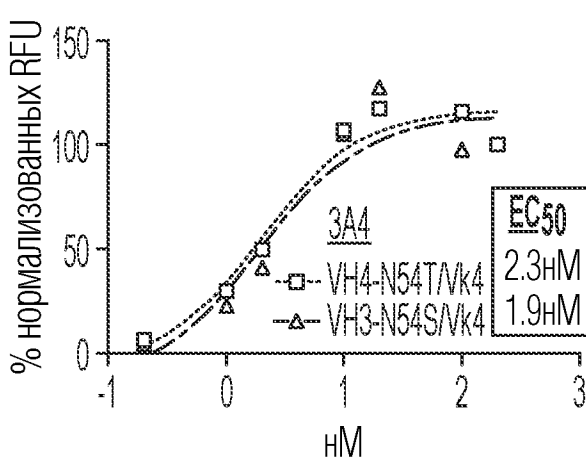
ФИГ. 8



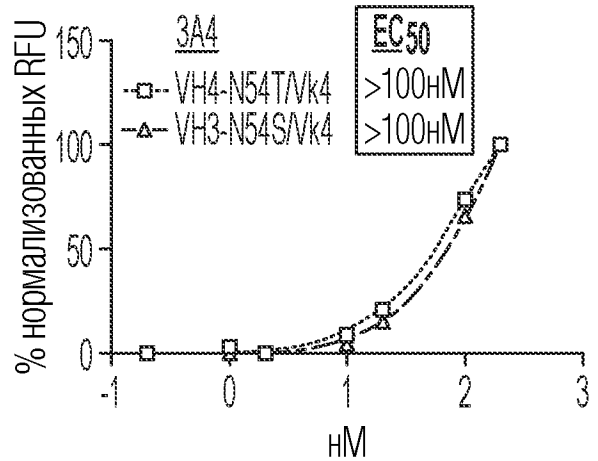
ФИГ. 9А



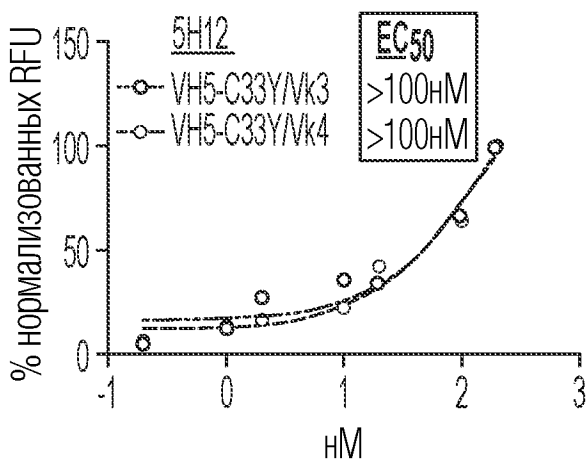
ФИГ. 9В



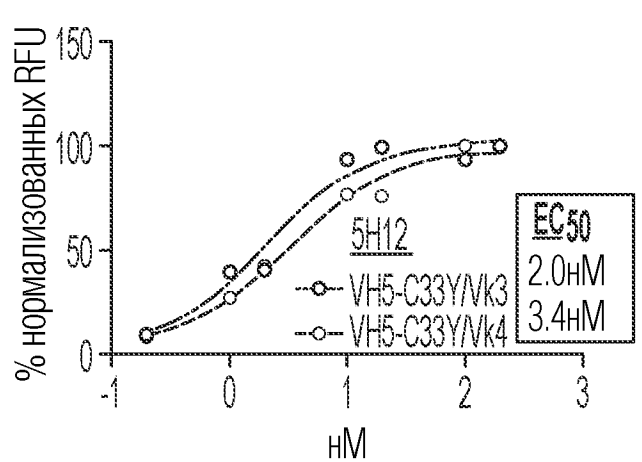
ФИГ. 9С



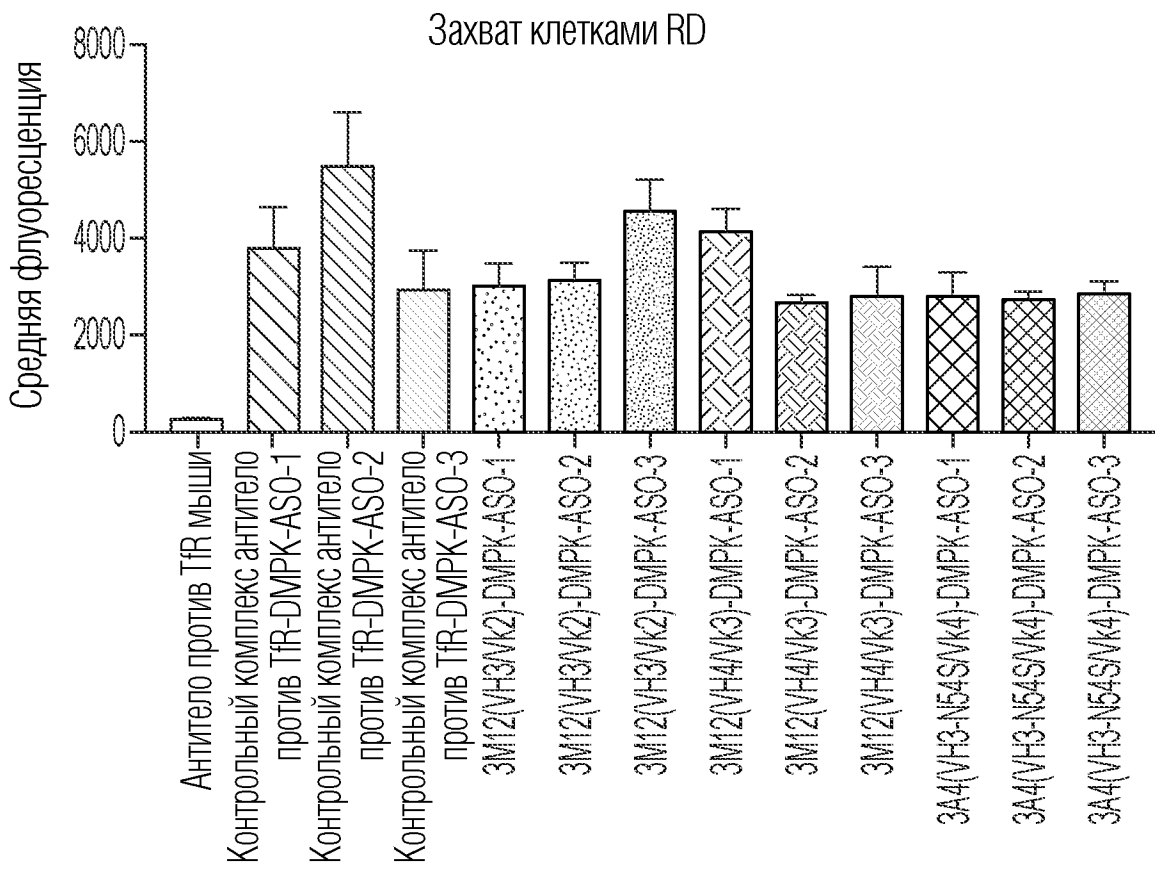
ФИГ. 9D



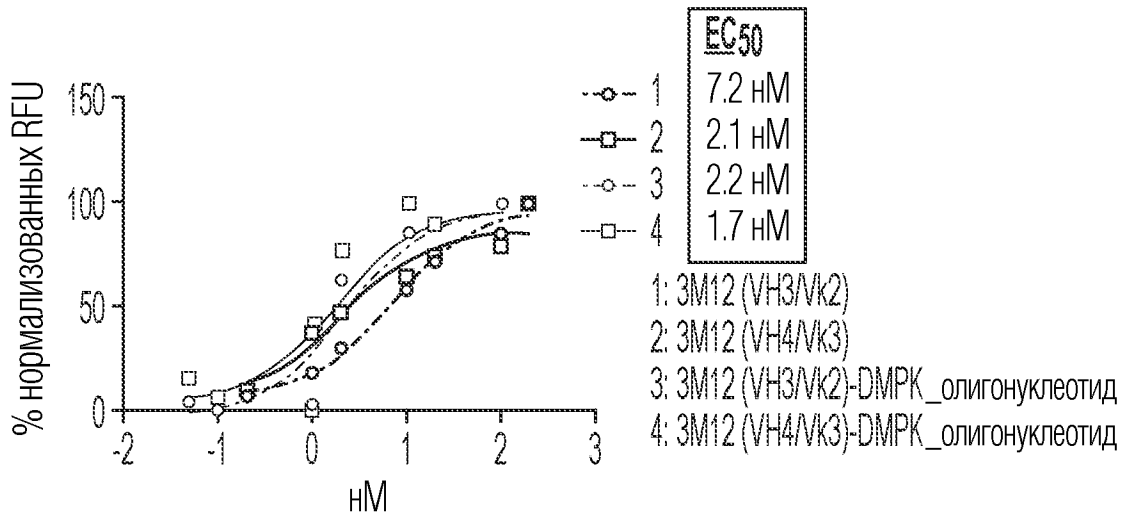
ФИГ. 9Е



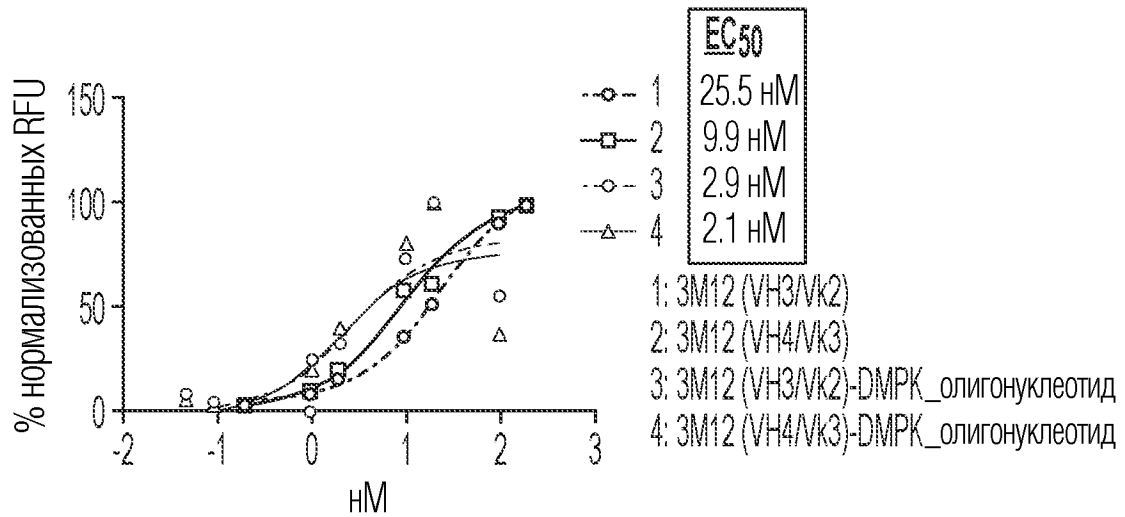
ФИГ. 9F



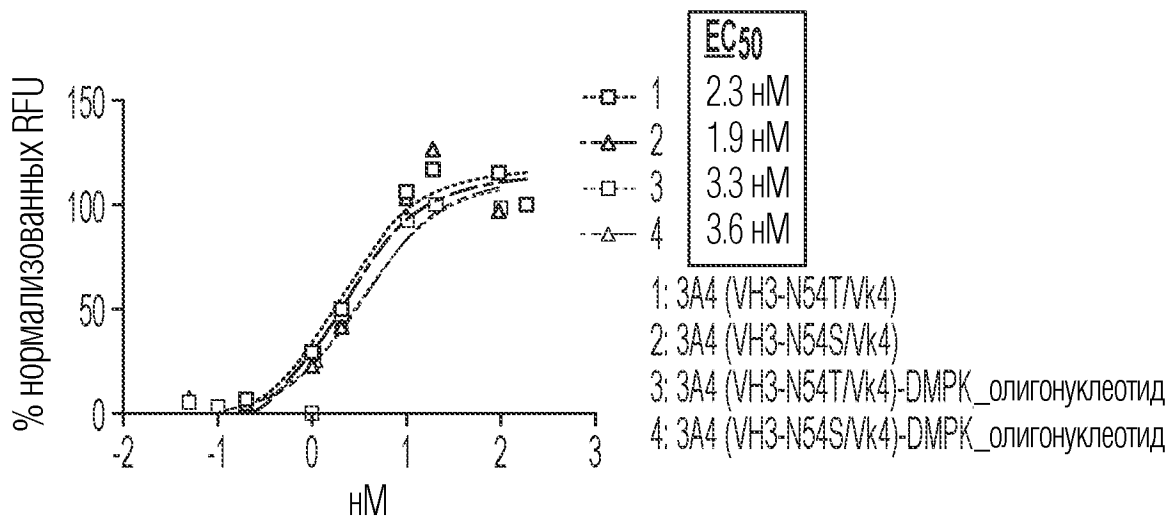
ФИГ. 10



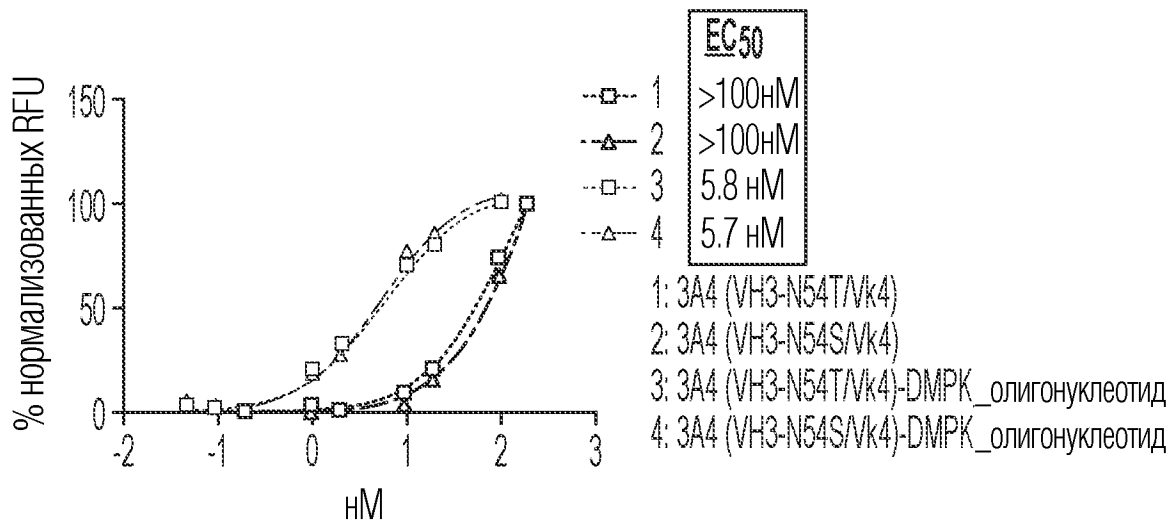
ФИГ. 11А



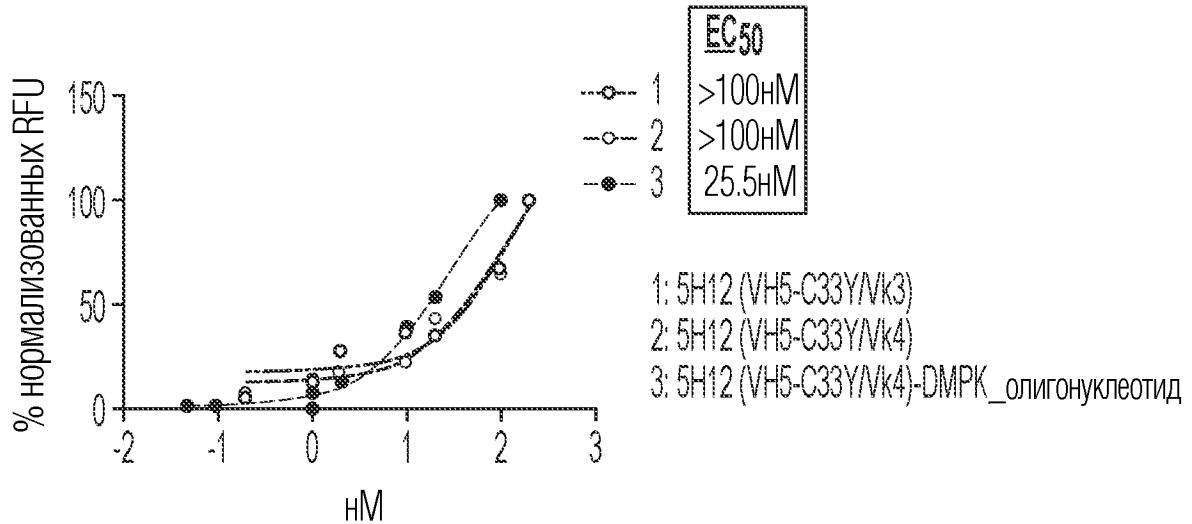
ФИГ. 11В



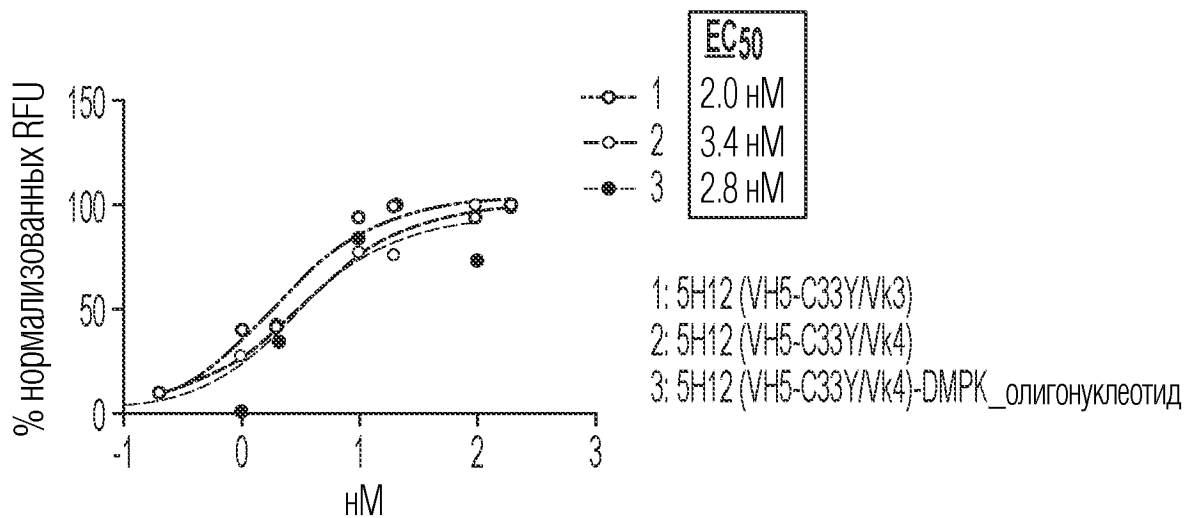
ФИГ. 11С



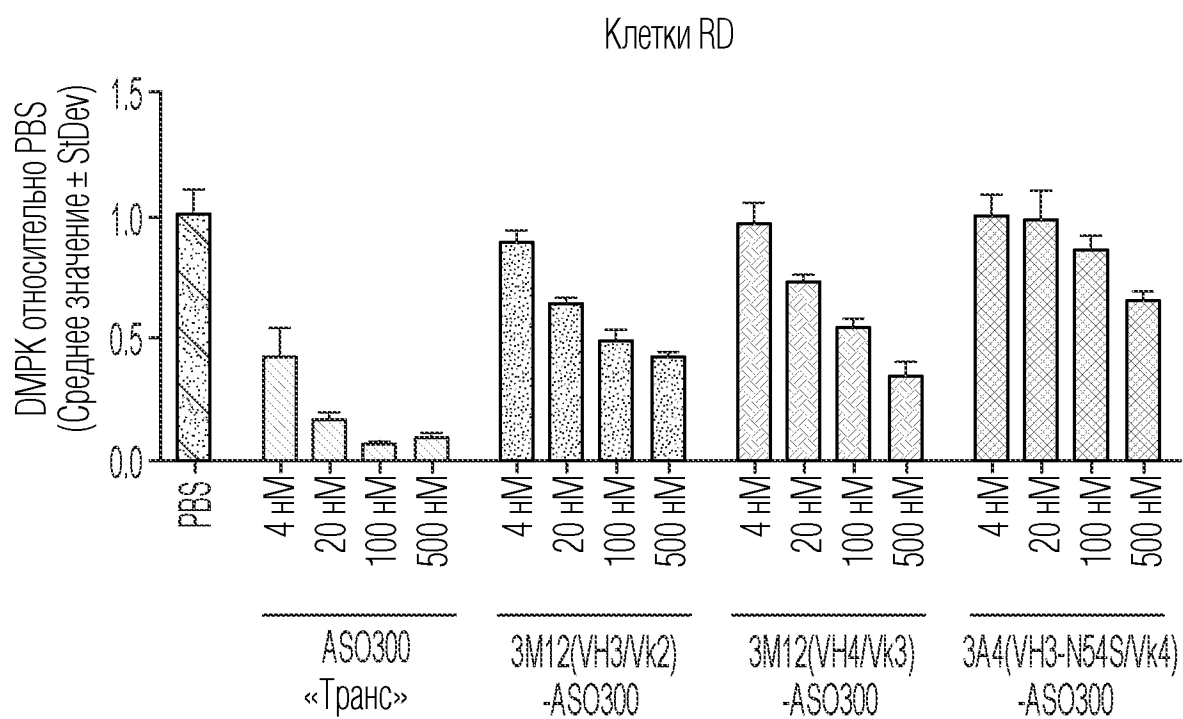
ФИГ. 11D



ФИГ. 11E

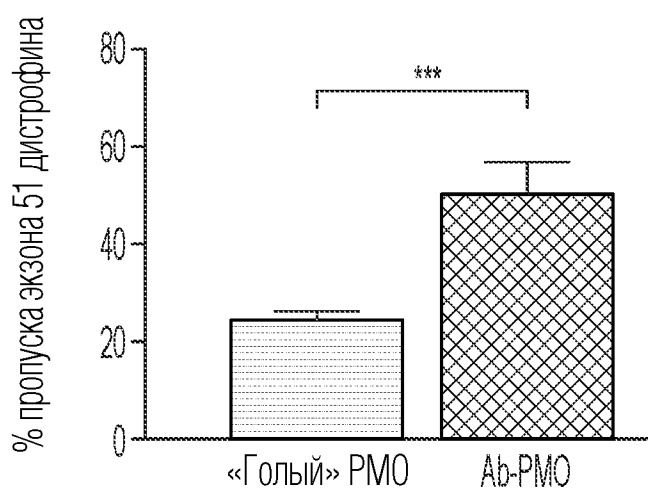


ФИГ. 11F

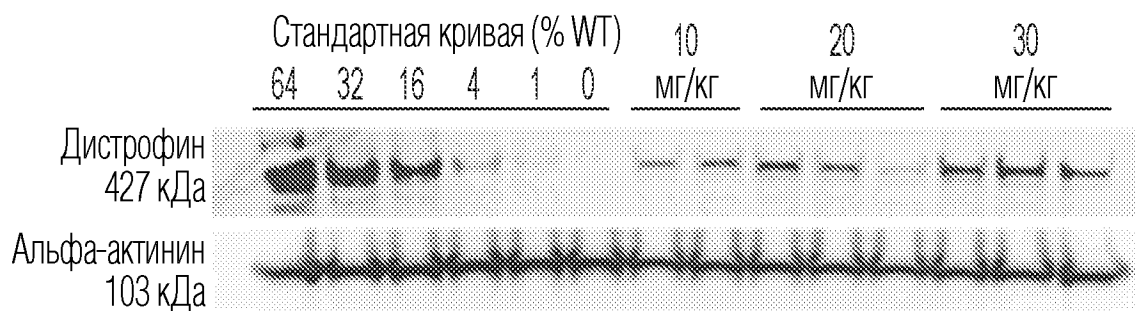


ФИГ. 12

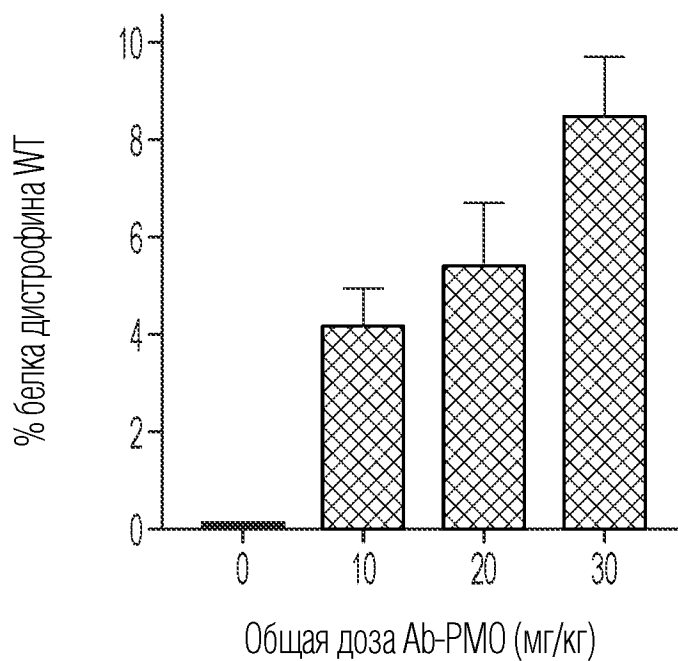
20/33



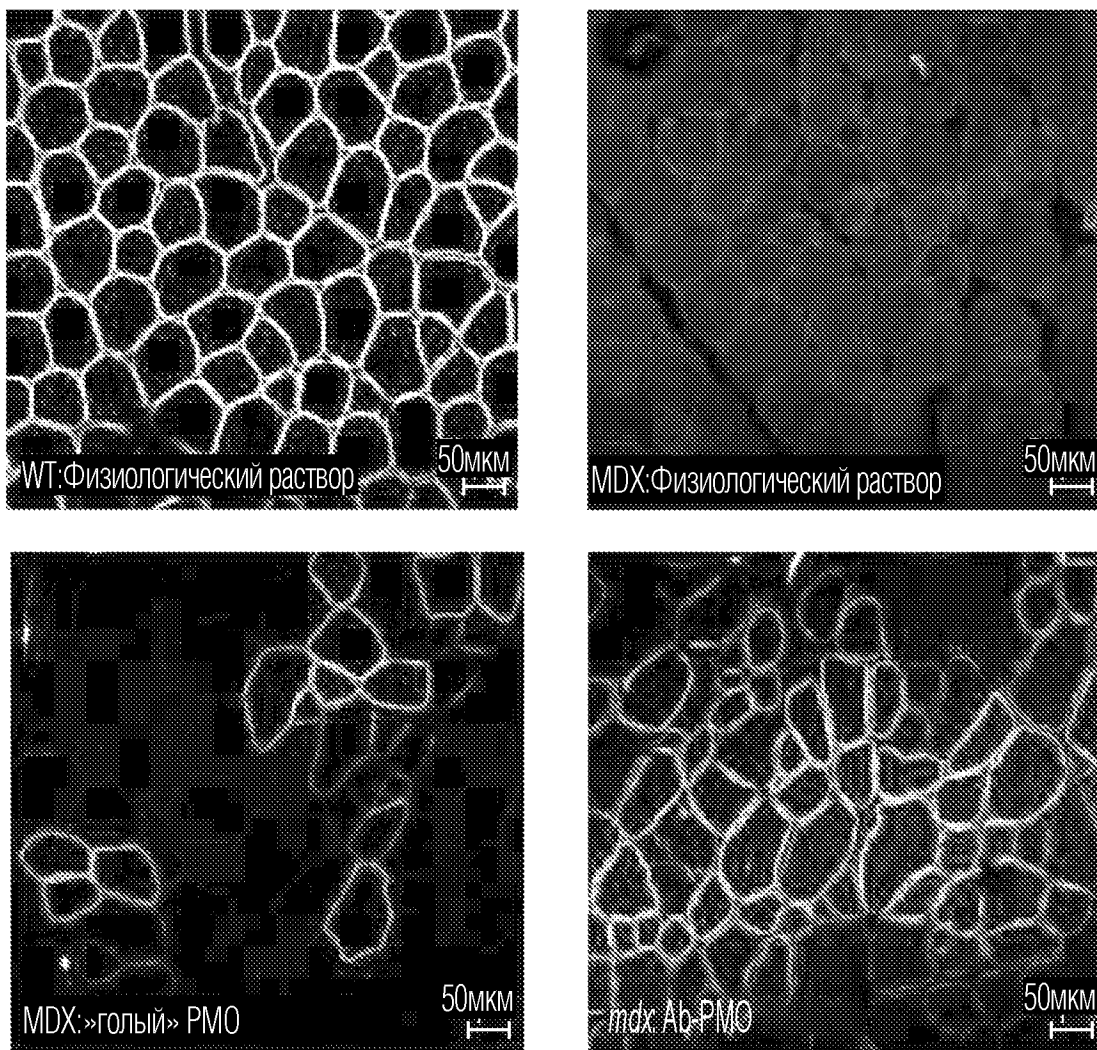
ФИГ. 13



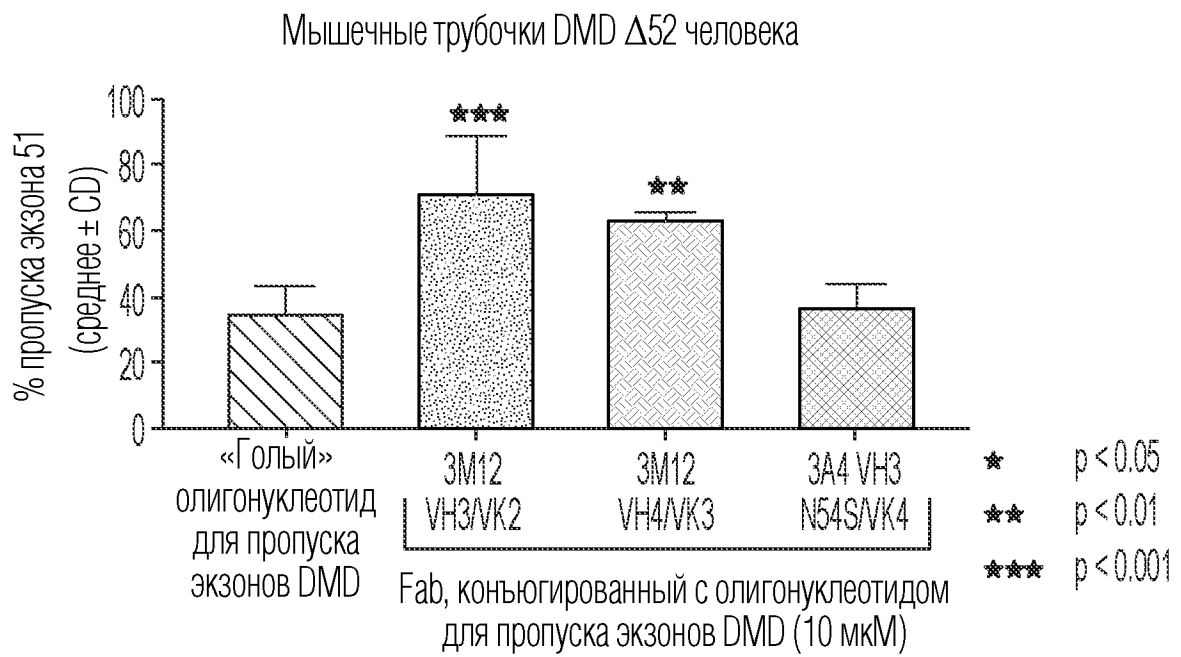
ФИГ. 14



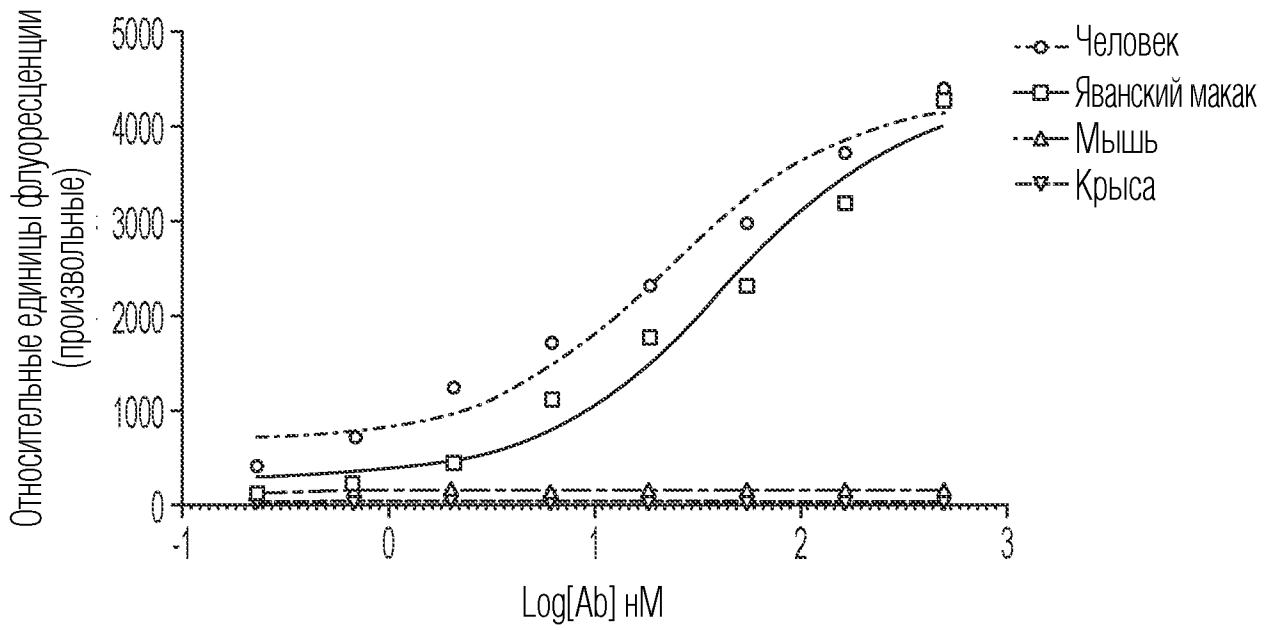
ФИГ. 15



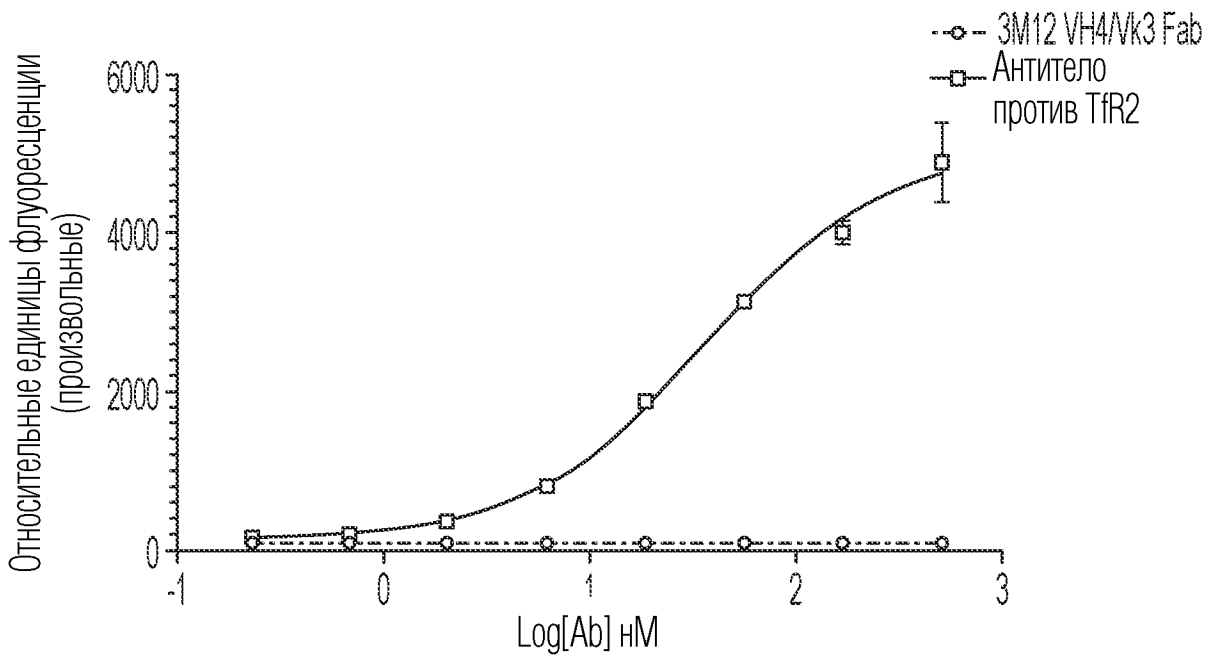
ФИГ. 16



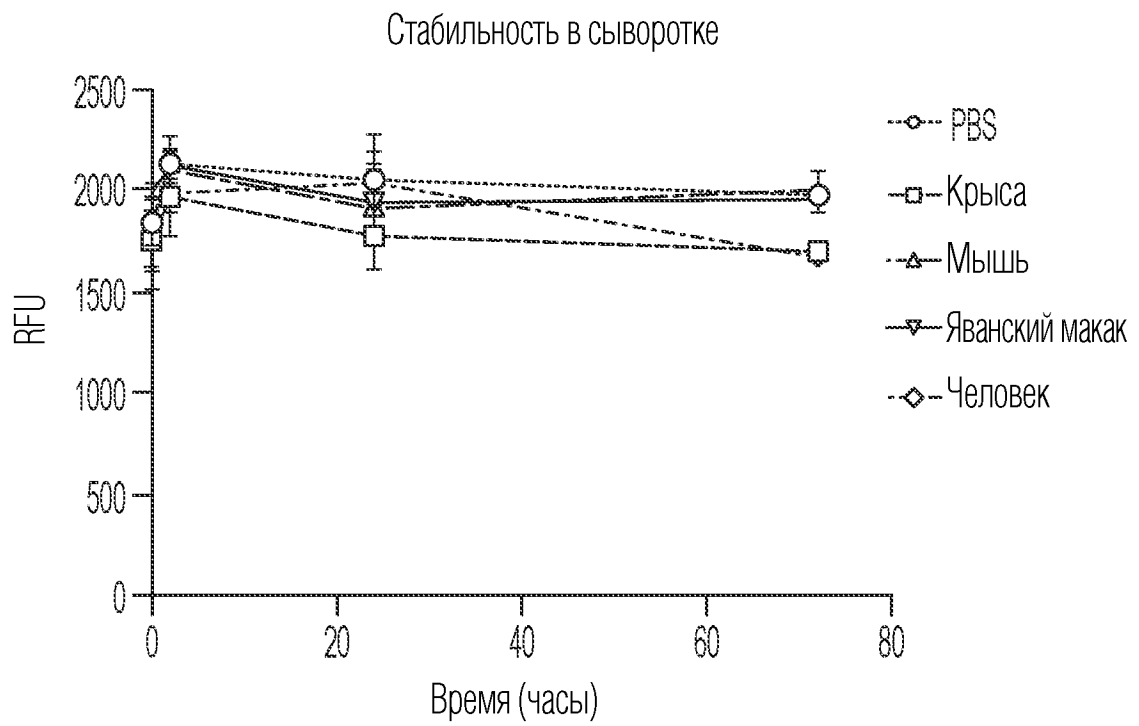
ФИГ. 17



ФИГ. 18



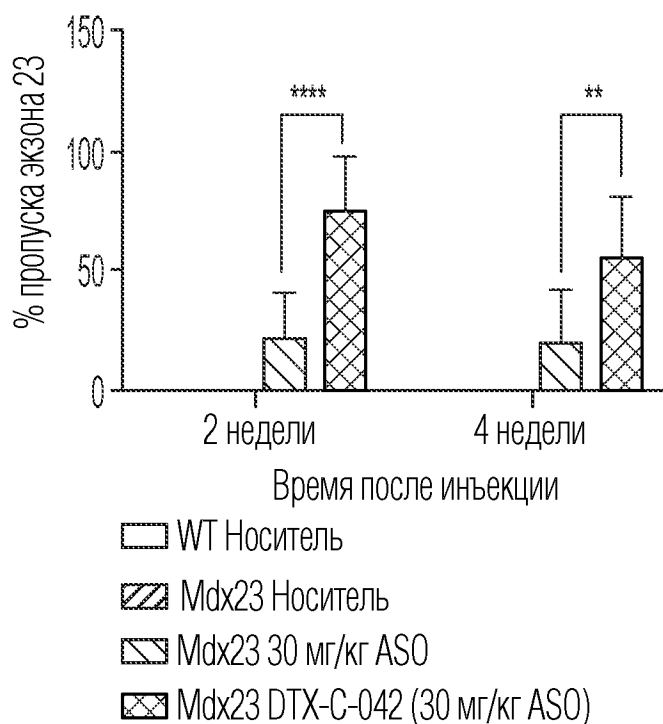
ФИГ. 19



ФИГ. 20

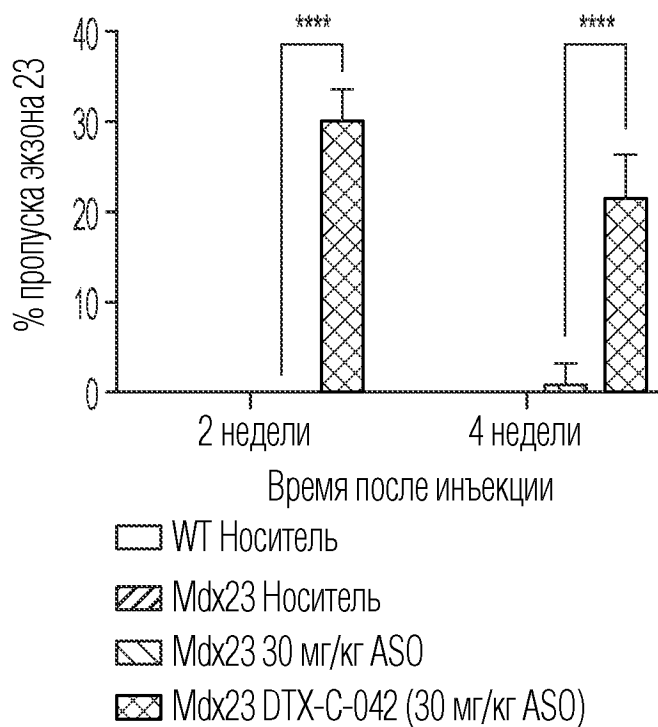
25/33

Четырехглавая мышца



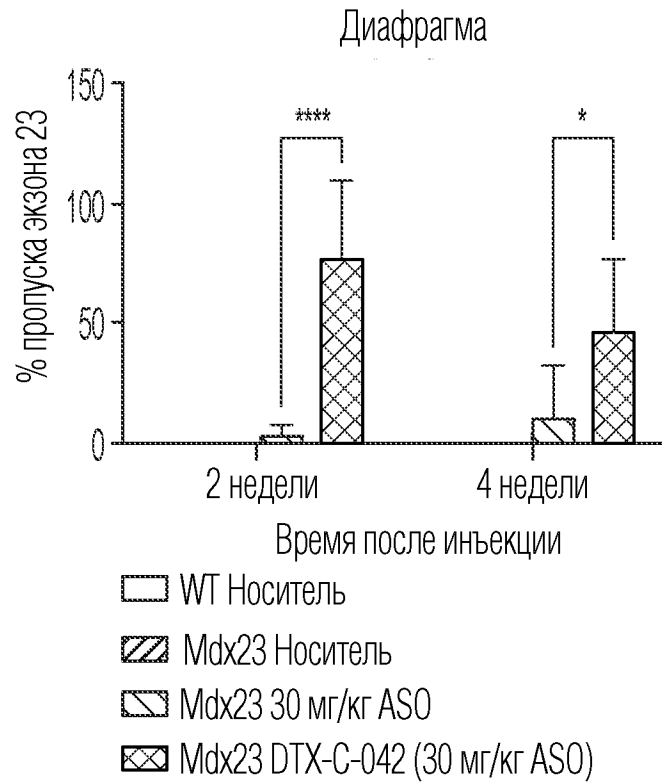
ФИГ. 21А

Сердце

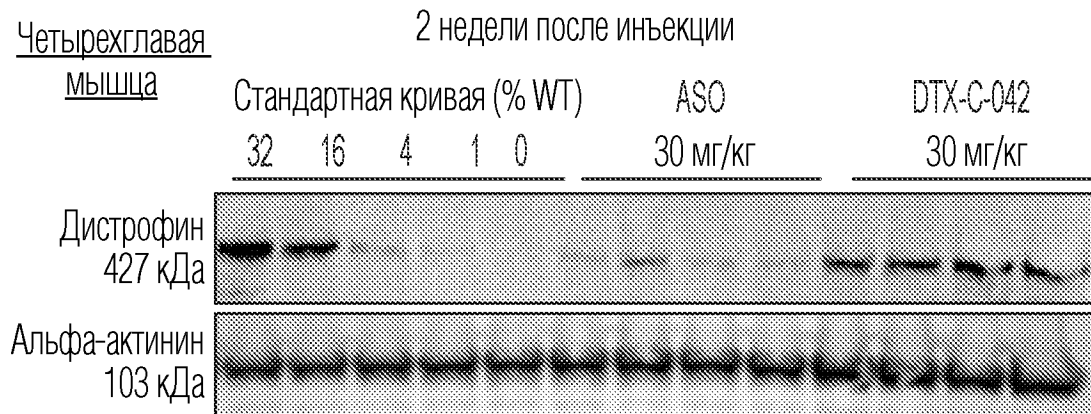


ФИГ. 21В

26/33



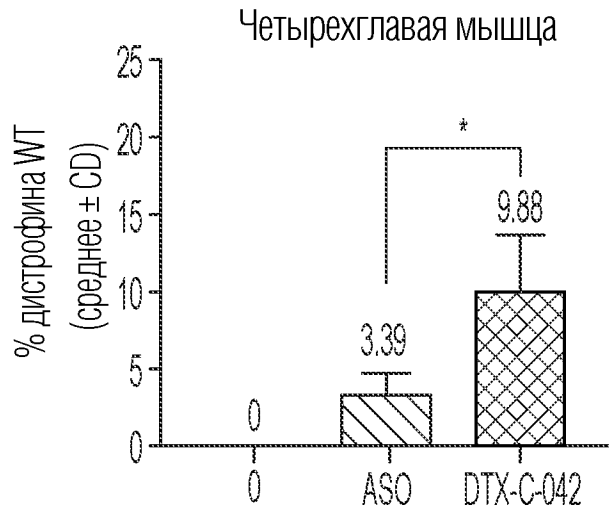
ФИГ. 21С



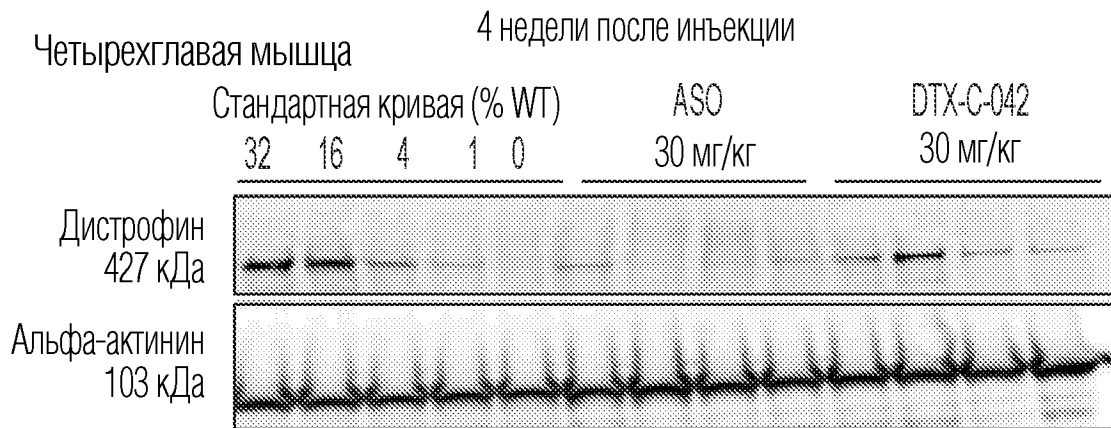
Стандартная кривая - Использовали объединенный белок WT и объединенный белок *mdx*, % указано количество белка WT, добавленного в образец

ФИГ. 22А

27/33

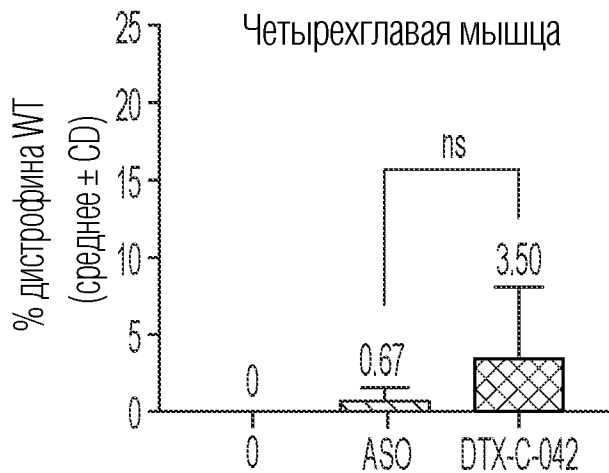


ФИГ. 22В



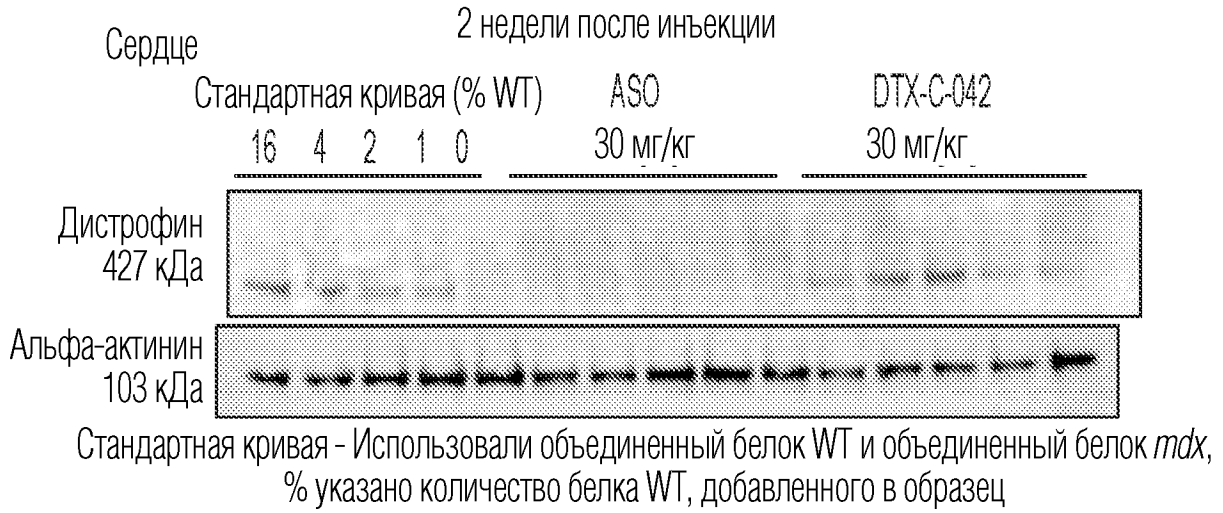
Стандартная кривая - Использовали объединенный белок WT и объединенный белок *mdx*,
% указано количество белка WT, добавленного в образец

ФИГ. 22С

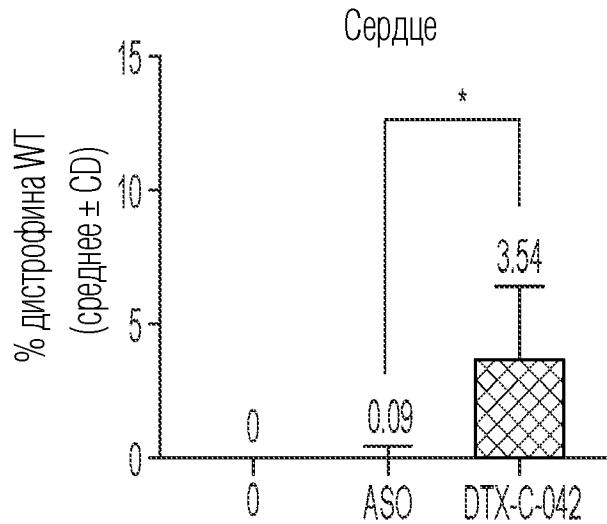


ФИГ. 22D

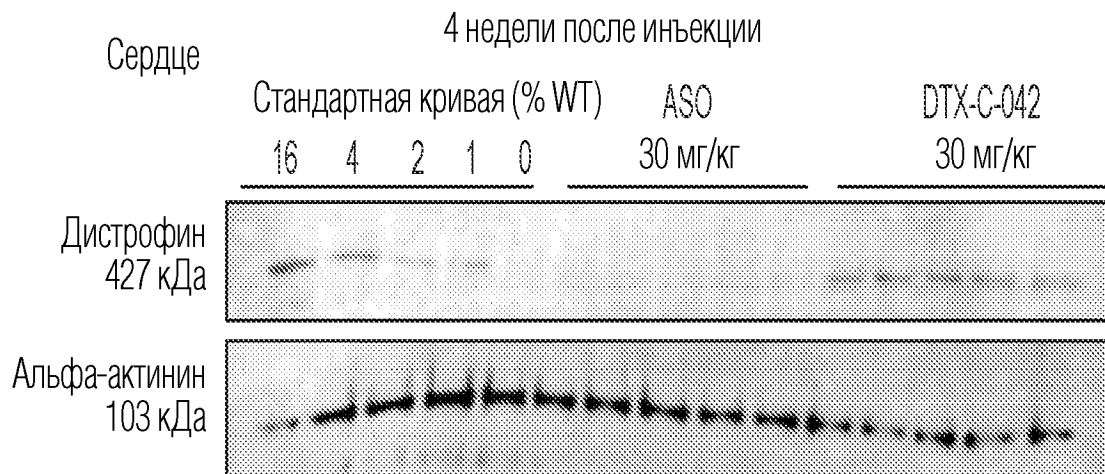
28/33



ФИГ. 23А

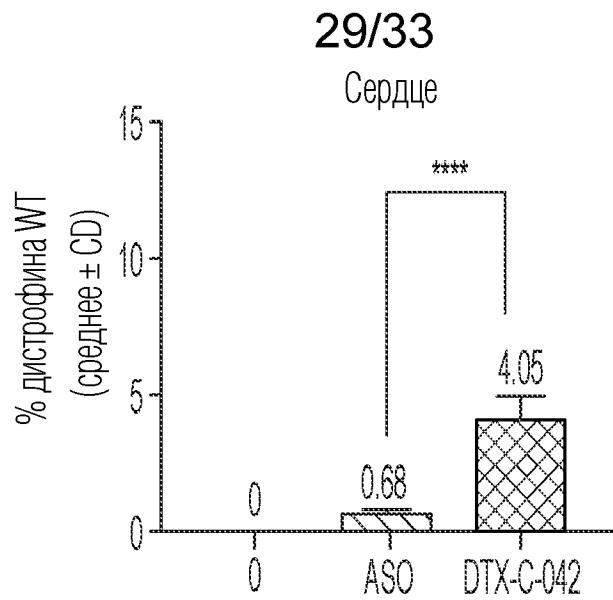


ФИГ. 23В

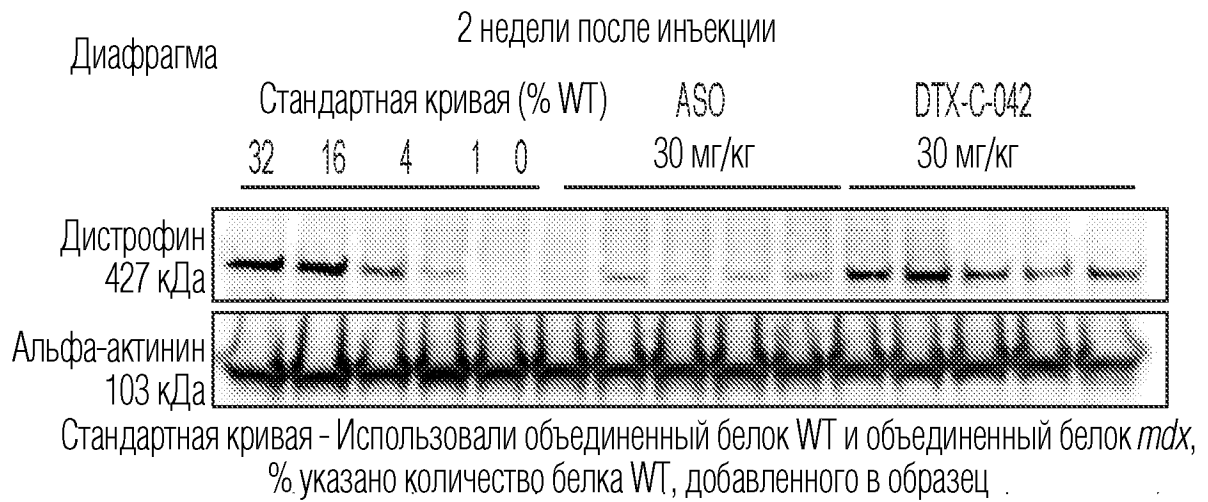


Стандартная кривая - Использовали объединенный белок WT и объединенный белок *mdx*, % указано количество белка WT, добавленного в образец

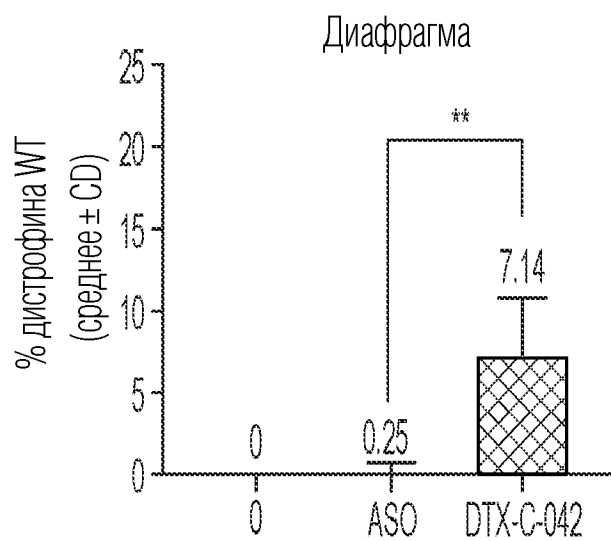
ФИГ. 23С



ФИГ. 23D



ФИГ. 24А

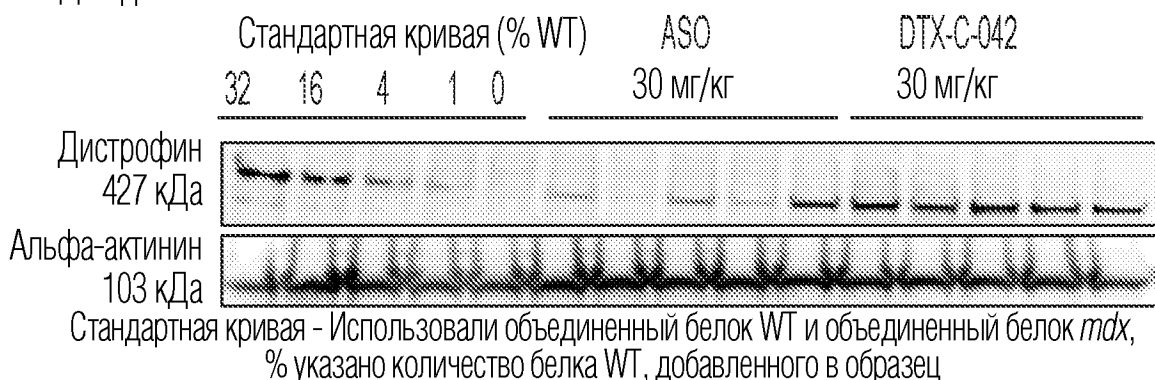


ФИГ. 24В

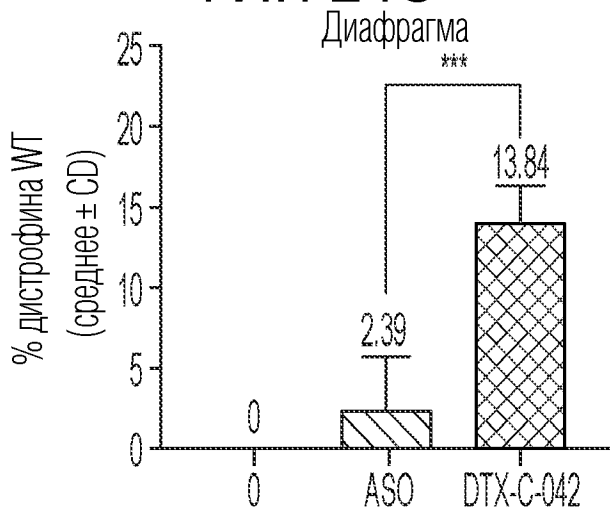
30/33

4 недели после инъекции

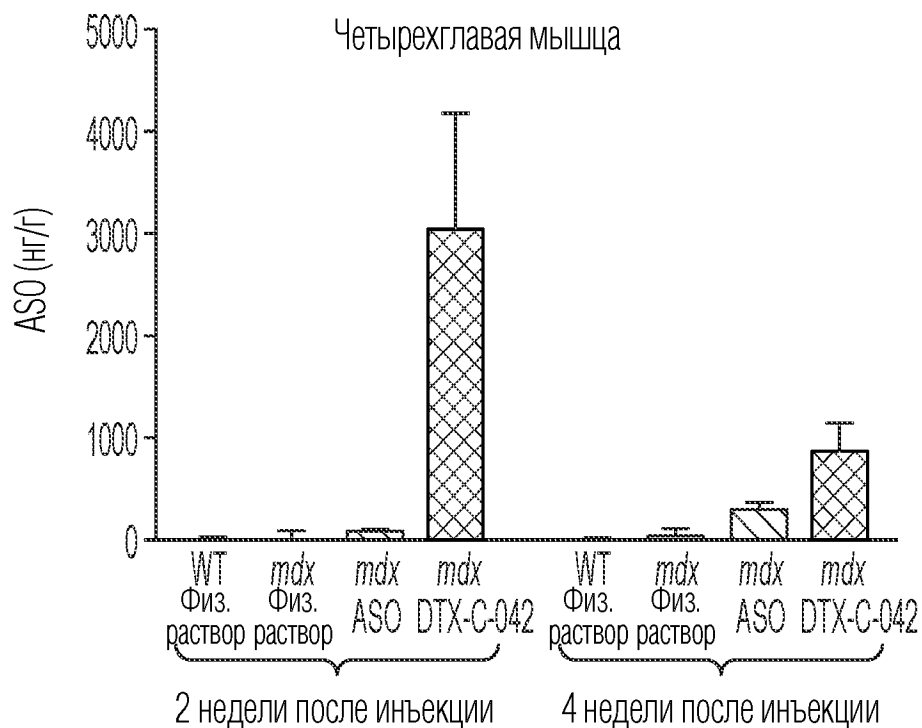
Диафрагма



ФИГ. 24С



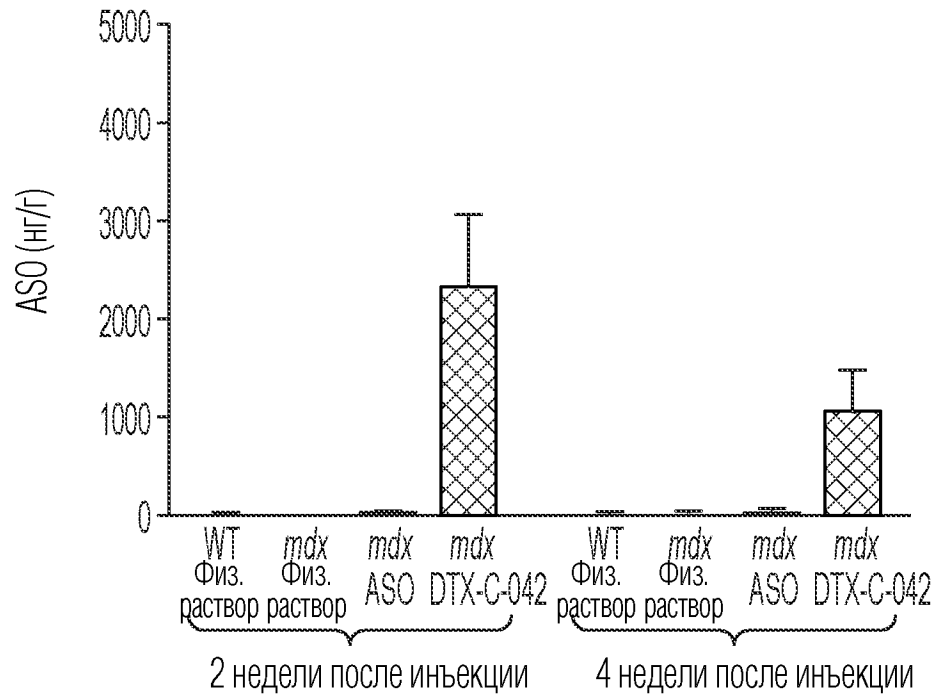
ФИГ. 24D



ФИГ. 25А

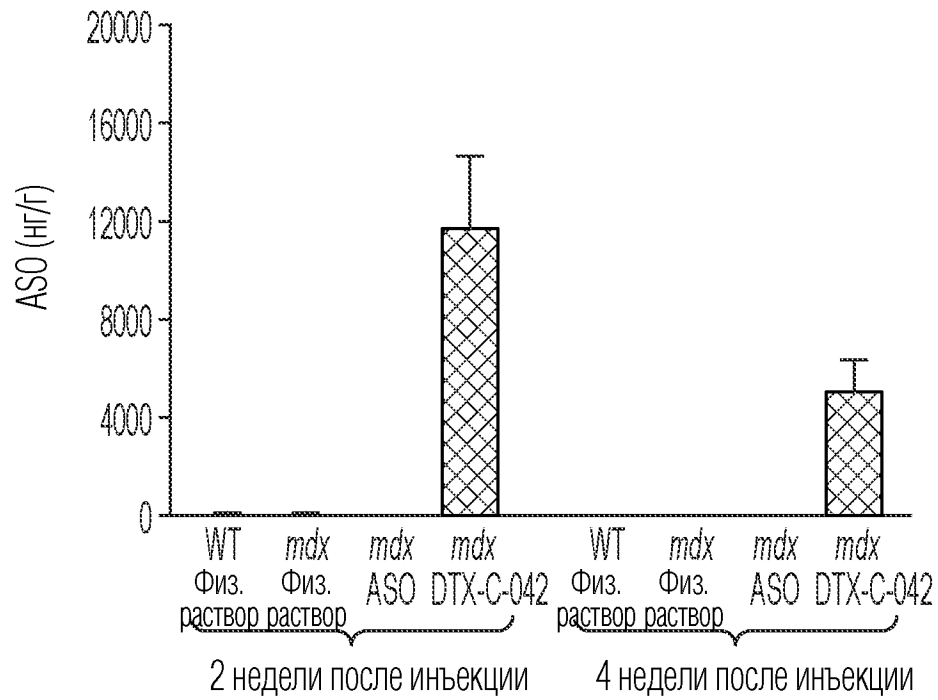
31/33

Диафрагма



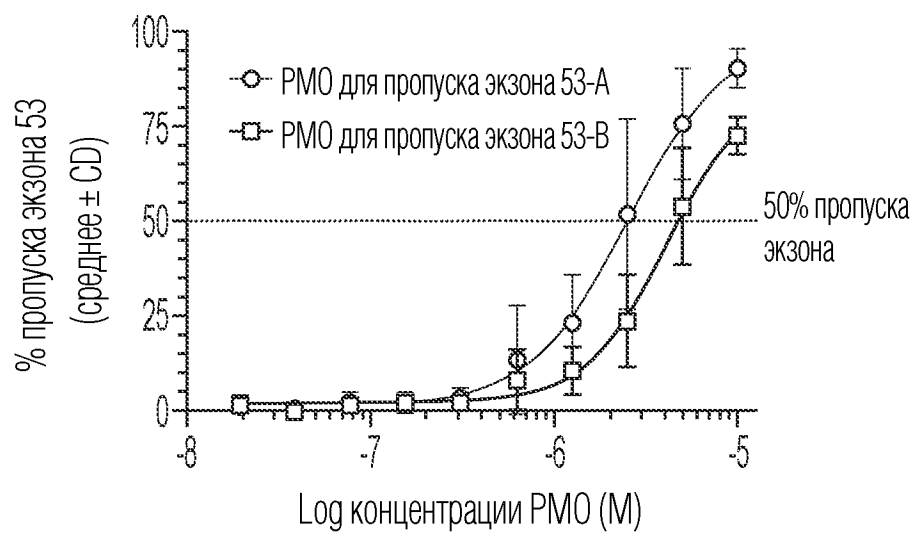
ФИГ. 25В

Сердце

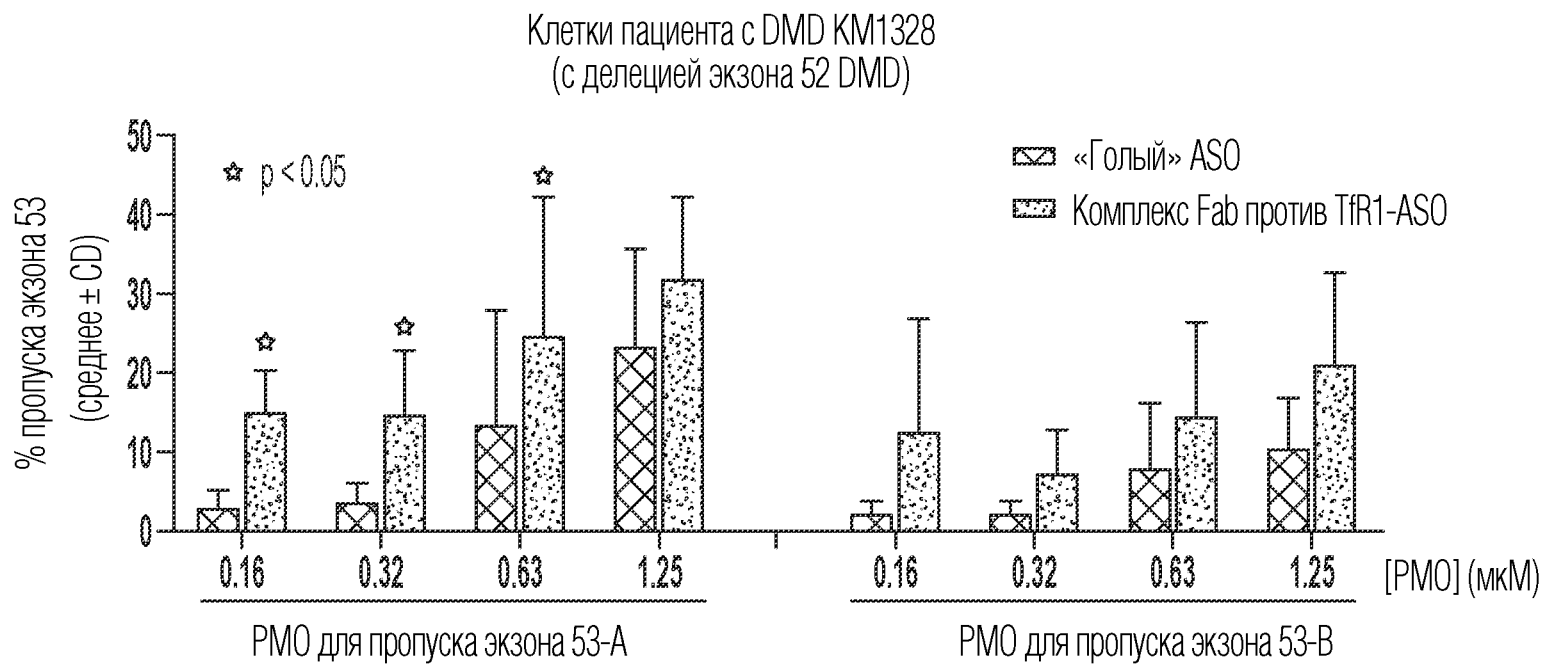


ФИГ. 25С

Клетки пациента с DMD KM1328
(с делецией экзона 52 DMD)



ФИГ. 26



ФИГ. 27