

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391904 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.29

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.30

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

(31) 63/133,013; 63/179,100; 63/245,262

(72) Изобретатель:

(32) 2020.12.31; 2021.04.23; 2021.09.17

Субраманиян Ромеш Р., Уиден

(33) US

Тимоти, Дежарден Коди А., Занотти

(86) PCT/US2021/065628

Стефано, Танг Ким, Катанани

(87) WO 2022/147209 2022.07.07

Мохаммед Т., Куинн Брендан, Наджим

(71) Заявитель:

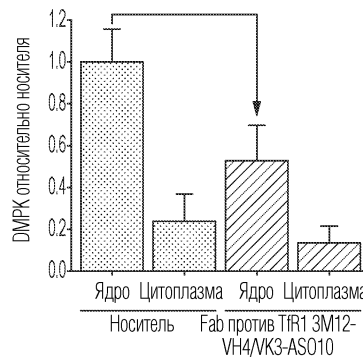
Джон (US)

ДАЙН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам (например, антисмысловым олигонуклеотидам, таким как гэпмеры), сконструированные для таргетинга РНК DMPK и таргетинга комплексов для доставки олигонуклеотидов в клетки (например, мышечные клетки) и их применению, в частности применению, относящемуся к лечению заболевания. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующим рецептором поверхности клетки на мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка ингибирует экспрессию или активность DMPK.



A1

202391904

202391904

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578448EA/55

МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИОТОНИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по 35 U.S.C. § 119(e) по предварительной заявке США № 63/245262, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY", поданной 17 сентября 2021 года; предварительной заявке США № 63/179100, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY", поданной 23 апреля 2021 года; и предварительной заявке США № 63/133013, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY", поданной 31 декабря 2020 года; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, сконструированным для таргетинга РНК DMPK, и направленным комплексам для доставки олигонуклеотидов в клетки (например, мышечные клетки) и их применению, в частности, применению, относящемуся к лечению 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 30 декабря 2021 года, названа D082470046W000-SEQ-ZJG имеет размер 177748 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Миотоническая дистрофия (DM) является, в основном, наследственным генетическим заболеванием, отличающимся миотонией, потерей или дегенерацией мышц, снижением функции мышц, резистентностью к инсулину, сердечной аритмией, дисфункцией гладких мышц и неврологическими отклонениями. DM является наиболее распространенной формой мышечной дистрофии с дебютом во взрослом возрасте с распространенностью приблизительно 1 на 8000 человек по всему миру. Описано два типа заболевания, миотоническая дистрофия типа 1 (DM1) и миотоническая дистрофия типа 2 (DM2). DM1, более распространенная форма заболевания, является результатом экспансии тринуклеотидных повторов CTG в 3'-некодирующей области DMPK на хромосоме 19; DM2 является результатом экспансии тетрануклеотидных повторов CCTG в первом интроне ZNF9 на хромосоме 3. У пациентов с DM1 экспансия тринуклеотидных повторов CTG, которая может включать всего более чем от приблизительно 50 до приблизительно 3000 или более повторов, приводит к образованию токсических повторов РНК, способных

образовывать шпилечные структуры, связывающиеся с важными внутриклеточными белками, например, Muscleblind-подобными белками, с высокой аффинностью, что приводит к секвестрации белков и фенотипам потери функции, характерным для заболевания. Помимо поддерживающей терапии и лечения, направленного на симптомы заболевания, в настоящее время недоступно эффективное терапевтическое средство для DM1.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, сконструированным для таргетинга РНК DMPK. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, комплементарным РНК DMPK, которые можно использовать для снижения уровней токсического DMPK, имеющего экспансию ассоциированных с заболеванием повторов, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего миотоническую дистрофию. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK, находящейся в ядре клеток, например, мышечных клеток, например, мышечных трубочках. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK, находящейся в ядре клеток, например, клеток нервной системы (например, клеток центральной нервной системы (ЦНС)). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые свойства биодоступности и/или стабильности в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые свойства аффинности связывания. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые профили токсичности. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели свойства низкой активации комплемента и/или индукции цитокинов.

[0006] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, конструируют для облегчения конъюгации с другими молекулами, например, направленными средствами, например, мышечно-специфическими средствами. Таким образом, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к комплексам, направленным на специфические типы клеток для доставки олигонуклеотидов в эти клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к комплексам, направленным на мышечные клетки для доставки олигонуклеотидов в эти клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, ингибирующей экспрессию или активность аллеля DMPK, содержащего подвергнутый экспансии, ассоциированный с заболеванием повтор, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего миотоническую дистрофию. Таким образом, в некоторых

вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, содержат мышечно-специфические средства (например, мышечно-специфические антитела), специфически связывающиеся с рецепторами на поверхности мышечных клеток, для доставки молекулярной нагрузки в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы захватываются клетками с помощью рецептор-опосредованной интернализации, после чего молекулярная нагрузка может высвободиться для выполнения функции внутри клеток. Например, комплексы, сконструированные для доставки олигонуклеотидов, могут высвободить олигонуклеотиды таким образом, что олигонуклеотиды могут ингибировать экспрессию мутантного DMPK в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды высвобождаются посредством эндосомального расщепления ковалентных линкеров, соединяющих олигонуклеотиды и мышечно-специфические средства из комплексов. Следует понимать, что олигонуклеотиды и/или комплексы, представленные в настоящем описании, можно использовать для множества типов тканей и клеток, например, в мышечных тканях (например, мышечных клетках) и центральной нервной системе (например, клетках ЦНС, таких как нейроны).

[0007] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с антисмысловым олигонуклеотидом, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину 15-20 нуклеотидов, содержит область комплементарности к по меньшей мере 15 последовательным нуклеозидам любой из SEQ ID NO: 166, 163, 167, 160, 169, 171, 202, 161, 162, 170, 165, 164, 172 и 168 и содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где

X содержит 3-5 связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в X является 2'-модифицированным нуклеозидом;

Y содержит 6-10 связанных 2'-дезоксирибонуклеозидов, где каждый цитозин в Y необязательно и независимо представляет собой 5-метилцитозин; и

Z содержит 3-5 связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом.

[0008] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство содержит антитело против рецептора трансферрина 1 (TfR1).

[0009] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 179, 187, 180, 185, 189, 182, 191, 184, 174, 186, 190, 188, 177, 192 и 181.

[00010] В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в X является 2'-модифицированным нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления каждый 2'-модифицированный нуклеозид независимо представляет собой 2'-4'-бициклический нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид.

[00011] В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в X является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z

является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления небициклический 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом.

[00012] В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в X является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 2'-4'-бициклический нуклеозид выбран из ЗНК, сEt и ENA.

[00013] В некоторых вариантах осуществления X содержит по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид и по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид, и/или Z содержит по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид и по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом, и по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид выбран из ЗНК, сEt и ENA.

[00014] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3':

X	Y	Z
EEEEEE	(D) ₁₀	EEEEEE,
EEE	(D) ₁₀	EEE,
EEEEEE	(D) ₁₀	EEEE,
EEEEEE	(D) ₁₀	EE,
LLL	(D) ₁₀	LLL,
LLEE	(D) ₈	EELL, или
LLEEE	(D) ₁₀	EEELL,

где "E" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "L" является ЗНК; "D" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; и "10" или "8" является количеством 2'-дезоксирибонуклеозидов в Y.

[00015] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей.

[00016] В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в антисмысловом олигонуклеотиде является фосфотиоатной межнуклеозидной связью.

[00017] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфирные межнуклеозидные связи находятся в X и/или Z.

[00018] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит олигонуклеотид, выбранный из:

+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

+C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A (SEQ ID NO: 179),
oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA (SEQ ID NO: 179),
oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC
(SEQ ID NO: 185),
oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA
(SEQ ID NO: 174),
oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*oG*oC
(SEQ ID NO: 186),
+G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+C (SEQ ID NO: 187),
+G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C (SEQ ID NO: 187),
+C*+G*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*oU*oC*+U*+G (SEQ ID NO: 177),
+U*+A*oG*oA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*+C*+C (SEQ ID NO: 188),
+C*+C*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*oA*oG*+U*+C (SEQ ID NO: 180),
+A*+G*oC*oG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*+A*+C (SEQ ID NO: 181),
+A*+U*+C*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*+U*+C*+C (SEQ ID NO: 189),
+C*+A*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*oA*oA*+U*+C (SEQ ID NO: 190),
+A*+U*oC*oU*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*oA*oU*+C*+C (SEQ ID NO: 182),
+U*+C*oU*oC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*+C*+G (SEQ ID NO: 184),
oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC (SEQ ID NO: 187),
oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC (SEQ ID NO: 189),
+G*+C*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*+C*+C
(SEQ ID NO: 185),
+C*+C*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*+C*+A
(SEQ ID NO: 174),
+C*+C*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*+G*+C
(SEQ ID NO: 186),
oG*oCoG*oUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC*oC (SEQ ID
NO: 185),
oC*oCoC*oAoG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoC*oAoC*oA (SEQ ID
NO: 174),
oC*oCoA*oUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoC*oCoG*oC (SEQ
ID NO: 186),
oG*oCoGoUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoGoCoC*oC (SEQ ID
NO: 185),
oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCoAoC*oA (SEQ ID
NO: 174),
oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoCoCoG*oC (SEQ ID
NO: 186),
oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC (SEQ ID NO:
191), и

oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG (SEQ ID NO: 192), где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C" является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU" является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

[00019] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) любого из антител против Tfr1, указанных в таблице 2.

[00020] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL) любого из антител против Tfr1, указанных в таблице 3.

[00021] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 является Fab. В некоторых вариантах осуществления Fab содержит тяжелую цепь и легкую цепь любого из Fab против Tfr1, указанных в таблице 5.

[00022] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 содержит:

(i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(ii) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; или

(ii) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, CDR-L2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

[00023] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

[00024] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 является Fab и содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[00025] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство и антисмысловой олигонуклеотид ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит последовательность валин-цитруллин.

[00026] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам снижения экспрессии DMPK в мышечной клетке, включающему приведение мышечной клетки в контакт с эффективным количеством комплекса, представленного в настоящем описании, для стимуляции интернализации антисмыслового олигонуклеотида в мышечную клетку.

[00027] В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии DMPK включает снижение уровня мРНК DMPK в мышечной клетке. В некоторых вариантах осуществления мРНК DMPK является мутантной мРНК DMPK.

[00028] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения миотонической дистрофии типа 1 (DM1), включающим введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества комплекса, представленного в настоящем описании, где индивидуум имеет мутантный аллель DMPK, содержащий ассоциированные с заболеванием повторы CUG.

[00029] В некоторых вариантах осуществления введение комплекса приводит к снижению DMPK мРНК по меньшей мере на 30%.

[00030] Настоящее изобретение дополнительно относится к антисмысловые олигонуклеотидам, содержащим олигонуклеотид, выбранный из:

+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

+C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA (SEQ ID NO: 179),

oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC

(SEQ ID NO: 185),

oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA

(SEQ ID NO: 174),

oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*oG*oC

(SEQ ID NO: 186),

+G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

+G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

+C*+G*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*oU*oC*+U*+G (SEQ ID NO: 177),

+U*+A*oG*oA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*+C*+C (SEQ ID NO: 188),

+C*+C*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*oA*oG*+U*+C (SEQ ID NO: 180),
 +A*+G*oC*oG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*+A*+C (SEQ ID NO: 181),
 +A*+U*+C*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*+U*+C*+C (SEQ ID NO: 189),
 +C*+A*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*oA*oA*+U*+C (SEQ ID NO: 190),
 +A*+U*oC*oU*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*oA*oU*+C*+C (SEQ ID NO: 182),
 +U*+C*oU*oC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*+C*+G (SEQ ID NO: 184),
 oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC (SEQ ID NO: 187),
 oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC (SEQ ID NO: 189),
 +G*+C*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*+C*+C
 (SEQ ID NO: 185),
 +C*+C*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*+C*+A
 (SEQ ID NO: 174),
 +C*+C*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*+G*+C
 (SEQ ID NO: 186),
 oG*oCoG*oUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC*oC (SEQ ID
 NO: 185),
 oC*oCoC*oAoG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoC*oAoC*oA (SEQ ID
 NO: 174),
 oC*oCoA*oUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoC*oCoG*oC (SEQ
 ID NO: 186),
 oG*oCoGoUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoGoCoC*oC (SEQ ID
 NO: 185),
 oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCoAoC*oA (SEQ ID
 NO: 174),
 oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoCoCoG*oC (SEQ ID
 NO: 186),
 oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC (SEQ ID NO:
 191), и
 oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG (SEQ ID NO: 192),
 где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-
 дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-
 модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C"
 является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU"
 является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим
 уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную
 связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную
 связь.

[00031] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид
 содержит олигонуклеотид, выбранный из:

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $+G^*+C^*oG^*oU^*oA^*dG^*dA^*dA^*dG^*dG^*dG^*xdC^*dG^*dT^*dC^*oU^*oG^*oC^*+C^*+C$ (SEQ ID NO: 185),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $+C^*+C^*oC^*oA^*oG^*xdC^*dG^*dC^*dC^*dA^*dC^*dC^*dA^*dG^*oU^*oC^*oA^*+C^*+A$ (SEQ ID NO: 174),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $+C^*+C^*oA^*oU^*oC^*dT^*xdC^*dG^*dG^*dC^*xdC^*dG^*dG^*dA^*dA^*oU^*oC^*oC^*+G^*+C$ (SEQ ID NO: 186),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $oG^*oCoG^*oUoA^*dG^*dA^*dA^*dG^*dG^*dG^*xdC^*dG^*dT^*dC^*oUoG^*oCoC^*oC$ (SEQ ID NO: 185),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $oC^*oCoC^*oAoG^*xdC^*dG^*dC^*dC^*dA^*dC^*dC^*dA^*dG^*oUoC^*oAoC^*oA$ (SEQ ID NO: 174),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $oC^*oCoA^*oUoC^*dT^*xdC^*dG^*dG^*dC^*xdC^*dG^*dG^*dA^*dA^*oUoC^*oCoG^*oC$ (SEQ ID NO: 186),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $oG^*oCoGoUoA^*dG^*dA^*dA^*dG^*dG^*dG^*xdC^*dG^*dT^*dC^*oUoGoCoC^*oC$ (SEQ ID NO: 185),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $oC^*oCoCoAoG^*xdC^*dG^*dC^*dC^*dA^*dC^*dC^*dA^*dG^*oUoCoAoC^*oA$ (SEQ ID NO: 174),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$
 $oC^*oCoAoUoC^*dT^*xdC^*dG^*dG^*dC^*xdC^*dG^*dG^*dA^*dA^*oUoCoCoG^*oC$ (SEQ ID NO: 186),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-oGoC^*oGoU^*oAdG^*dA^*dA^*dG^*dG^*dG^*xdC^*dG^*dT^*dC^*oUoG^*oCoC$
 (SEQ ID NO: 191), и

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-oGoC^*oGoU^*oAdG^*dA^*dA^*dG^*dG^*dG^*xdC^*dG^*dT^*dC^*oU^*oG$ (SEQ ID NO: 192),

где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C" является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU" является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь,

и где фосфодиэфирная связь находится между 5'- $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$ и антисмысловым олигонуклеотидом.

[00032] Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим антисмысловые олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, в форме натриевой соли.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00033] На фиг. 1А-1В показана экспрессия мРНК DMPK в первичных клетках DM1-32F (экспрессирующих мутантную мРНК DMPK, имеющую 380 повторов CUG) и иммортализованных клетках DM1-CL5 (экспрессирующих мутантную мРНК DMPK, имеющую 2600 повторов CUG) относительно линии клеток, полученных из здоровых добровольцев. На фиг. 1А показан целевой участок ASO1 в мРНК DMPK в клетках 32F. На фиг. 1В показан целевой участок ASO1 в мРНК DMPK в клетках CL5.

[00034] На фиг. 2А-2D показана активность конъюгатов, имеющих контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1 или ASO32, в отношении снижения экспрессии мРНК DMPK, корректирующих дефект сплайсинга экзона 11 BIN1 и уменьшающих ядерные фокусы в первичных клетках DM1-32F. На фиг. 2А показано, что оба конъюгата снижали уровень экспрессии мРНК DMPK в клетках 32F. На фиг. 2В показано, что сплайсинг экзона 11 BIN1 был скорректирован в клетках 32F после обработки конъюгатами. На фиг. 2С-2D показано, что оба конъюгата уменьшали ядерные фокусы в клетках 32F. На изображениях микроскопии, показанных на фиг. 2D, светлые округлые формы представляют собой ядра клеток, и яркие точки в ядрах клеток DM1 (правые три панели микроскопии) представляют собой фокусы CUG.

[00035] На фиг. 3А-3D показана активность конъюгатов, имеющих контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1 или ASO32, в отношении снижения экспрессии мРНК DMPK, корректирующих дефект сплайсинга экзона 11 BIN1 и уменьшающих ядерные фокусы (что измеряют как соотношение площади ядерных фокусов и площади ядер) в клетках CL5. На фиг. 3А показано, что оба конъюгата снижали уровень экспрессии мРНК DMPK в клетках CL5. На фиг. 3В показано, что сплайсинг экзона 11 BIN1 был скорректирован в клетках CL5 после обработки конъюгатов. На фиг. 3С-3D показано, что оба конъюгата уменьшали ядерные фокусы в клетках CL5. На изображениях микроскопии, показанных на фиг. 3D, светлые округлые формы представляют собой ядра клеток, и яркие точки в ядрах клеток DM1 (правые три панели микроскопии) представляют собой фокусы CUG.

[00036] На фиг. 4А-4Н показаны активности конъюгатов, имеющих Fab против TfR1, конъюгированный с ASO32, ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1, в отношении снижения экспрессии мРНК DMPK, корректирующих дефект сплайсинга экзона 11 BIN1 и уменьшающих ядерные фокусы (что измеряют как соотношение площади ядерных фокусов и площади ядер) в клетках 32F. Все ASO конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. На фиг. 4А показаны целевые участки ASO1, ASO2 и ASO32 в мРНК DMPK в клетках 32F, имеющих 380 повторов CUG. На фиг. 4В показано, что тестируемые конъюгаты снижали уровень экспрессии мРНК DMPK в клетках 32F. На фиг. 4С показано, что сплайсинг экзона 11 BIN1 был скорректирован в клетках 32F после обработки

конъюгатами. На фиг. 4D-4E показано, что тестируемые конъюгаты снижали площадь ядерных фокусов в клетках 32F. На изображениях микроскопии, показанных на фиг. 4E, светлые округлые формы представляют собой ядра клеток, и яркие точки в ядрах представляют собой фокусы DMPK. На фиг. 4F показано, что тестируемые конъюгаты снижали экспрессию DMPK в клетках 32F дозозависимым образом. На фиг. 4G показано, что тестируемые конъюгаты приводили к коррекции неправильного сплайсинга BIN1 в клетках 32F дозозависимым образом. На фиг. 4H показано, что тестируемые конъюгаты уменьшали площадь ядерных фокусов в клетках 32F дозозависимым образом.

[00037] На фиг. 5A-5H показаны активности конъюгатов, имеющих Fab против TfR1, конъюгированный с одним из ASO32, ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1, в отношении снижения экспрессии мРНК DMPK, корректирующих дефект сплайсинга экзона 11 BIN1 и снижающих ядерные фокусы (что измеряют как соотношение площади ядерных фокусов и площади ядер) в клетках CL5. Все ASO конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. На фиг. 5A показаны целевые участки ASO1, ASO2 и ASO32 в мРНК DMPK в клетках CL5, имеющих 2600 повторов CUG. На фиг. 5B показано, что тестируемые конъюгаты снижали уровень экспрессии мРНК DMPK в клетках CL5. На фиг. 5C показано, что сплайсинг экзона 11 BIN1 был скорректирован в клетках CL5 после обработки конъюгатами. На фиг. 5D-5E показано, что тестируемые конъюгаты уменьшали площадь ядерных фокусов в клетках CL5. На изображениях микроскопии, показанных на фиг. 5E, светлые округлые формы представляют собой ядра клеток, и яркие точки в ядрах представляют собой фокусы DMPK. На фиг. 5F показано, что конъюгаты, имеющие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO10 или ASO8, снижали экспрессию DMPK в клетках CL5 дозозависимым образом. На фиг. 5G показано, что тестируемые конъюгаты приводили к коррекции неправильного сплайсинга BIN1 в клетках CL5 дозозависимым образом. На фиг. 5H показано, что тестируемые конъюгаты уменьшали площадь ядерных фокусов в клетках CL5 до схожих уровней в случае всех тестируемых доз.

[00038] На фиг. 6 показано, что конъюгаты, имеющие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO10, ASO8 и ASO26, могли приводить к нокдауну экспрессии DMPK в клетках рабдомиосаркомы (RD) дозозависимым образом, и конъюгат ASO1 мог приводить к нокдауну DMPK в клетках неявляющегося человеком примата (NHP) дозозависимым образом. Все ASO конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3.

[00039] На фиг. 7 показано, что разные химические модификации одной и той же последовательности нуклеиновых оснований могут влиять на активность DMPK-специфических олигонуклеотидов. Все ASO конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. При концентрации олигонуклеотидов 500 нМ конъюгат ASO32 мог снижать экспрессию DMPK на 88%, конъюгат ASO31 мог снижать экспрессию DMPK на 70%, и конъюгат ASO30 мог снижать экспрессию DMPK на 39%.

[00040] На фиг. 8A-8B показано, что разная длина и химические модификации родительской последовательности нуклеинового основания могут влиять на активность DMPK-специфических олигонуклеотидов. Все ASO конъюгировали с Fab против TfR1

3M12-VH4/VK3. На фиг. 8А показаны активности конъюгата ASO32, конъюгата ASO10, конъюгата ASO8 и конъюгата ASO9 при нокдауне DMPK в клетках RD человека. На фиг. 8В показаны активности конъюгата ASO32, конъюгата ASO11, конъюгата ASO20, конъюгата ASO26 и конъюгата ASO2 при нокдауне DMPK в клетках RD человека.

[00041] На фиг. 9А-9С показано, что конъюгаты, имеющие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO32, снижали экспрессию мутантного DMPK человека в различных мышечных тканях в модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. На фиг. 9D-9К показано, что конъюгаты, имеющие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO32, снижали экспрессию DMPK мышцы в различных мышечных тканях в модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека. На фиг. 9А-9С ASO32 конъюгировали с контрольным Fab против TfR1. На фиг. 9D-9К ASO32 конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. На фиг. 9А показано, что конъюгат ASO32 снижал уровень мРНК DMPK в передней большеберцовой мышце на 36%. На фиг. 9В показано, что конъюгат ASO32 снижал уровень мРНК DMPK в диафрагме на 46%. На фиг. 9С показано, что конъюгат ASO32 снижал мутантный DMPK человека в сердце на 42%. На фиг. 9D показано, что конъюгат ASO32 снижал *Dmpk* мышцы дикого типа в передней большеберцовой мышце на 79%. На фиг. 9Е показано, что конъюгат ASO32 снижал *Dmpk* мышцы дикого типа в икроножной мышце на 76%. На фиг. 9F показано, что конъюгат ASO32 снижал *Dmpk* мышцы дикого типа в сердце на 70%. На фиг. 9G показано, что конъюгат ASO32 снижал *Dmpk* мышцы дикого типа и в диафрагме на 88%. На фиг. 9H-9К показано распределение ASO32 в передней большеберцовой мышце, икроножной мышце, сердце и диафрагме. Во всех тканях наблюдали повышенный уровень ASO32 по сравнению с контрольным носителем.

[00042] На фиг. 10А-10Е показано, что в модели на мышах, экспрессирующей TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG, конъюгаты, имеющие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO32, ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1, снижали экспрессию мутантного DMPK человека в различных мышечных тканях, и что конъюгат ASO10 уменьшал ядерные фокусы в сердце. ASO32 конъюгировали с контрольным Fab против TfR1. Все другие ASO конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. Конъюгаты снижали уровень мРНК DMPK человека в сердце (фиг. 10А), диафрагме (фиг. 10В), икроножной мышце (фиг. 10С) и передней большеберцовой мышце (фиг. 10D). На фиг. 10Е показано, что у мышей, которым инъецировали конъюгат ASO10 в дозе, эквивалентной 10 мг/кг ASO10, уменьшались ядерные фокусы в сердце. На изображениях микроскопии, показанных на фиг. 10Е, округлые формы представляют собой ядра клеток, и темные точки в ядрах представляют собой фокусы DMPK.

[00043] На фиг. 11А-11D показано, что конъюгаты, имеющие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO32, ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1, снижали экспрессию *Dmpk* мышцы в различных мышечных тканях в модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG, несмотря на один ошибочно спаренный нуклеотид в целевой последовательности. ASO32

конъюгировали с контрольным Fab против TfR1. Все другие ASO конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. Конъюгаты снижали уровень мРНК DMPK мышцы в сердце (фиг. 11A), диафрагме (фиг. 11B), икроножной мышце (фиг. 11C), и передней большеберцовой мышце (фиг. 11D).

[00044] На фиг. 12A-12D показано количество ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1 в сердце (фиг. 12A), диафрагме (фиг. 12B), икроножной мышце (фиг. 12C) или передней большеберцовой мышце (фиг. 12D), соответственно, после введения конъюгатов, содержащих Fab против TfR1, конъюгированных с указанными олигонуклеотидами. Все ASO конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3.

[00045] На фиг. 13A-13D показано, что конъюгаты, содержащие контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1, снижали экспрессию мутантного DMPK человека в различных мышечных тканях в модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG в условиях длительного эксперимента. На фиг. 13A показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в сердце на 9% через две недели после инъекции и 15% через четыре недели после инъекции. На фиг. 13B показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в диафрагме на 19% через две недели после инъекции и 34% через четыре недели после инъекции. На фиг. 13C показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в икроножной мышце на 7% через две недели после инъекции и 17% через четыре недели после инъекции. На фиг. 13D показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 6% через две недели после инъекции и 0% через четыре недели после инъекции.

[00046] На фиг. 14A-14D показано, что конъюгаты, содержащие контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1, снижали экспрессию *Dmpk* мышцы в той же модели на мышах, что и на фиг. 13A-13D. На фиг. 14A показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в сердце на 8% через две недели после инъекции и 13% через четыре недели после инъекции. На фиг. 14B показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в диафрагме на 14% через две недели после инъекции и 33% через четыре недели после инъекции. На фиг. 14C показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в икроножной мышце на 0% через две недели после инъекции и 6% через четыре недели после инъекции. На фиг. 14D показано, что конъюгат ASO1 не приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в передней большеберцовой мышце через две недели после инъекции и через четыре недели после инъекции.

[00047] На фиг. 15A-15D показано количество ASO1 в сердце (фиг. 15A), диафрагме (фиг. 15B), икроножной мышце (фиг. 15C) или передней большеберцовой мышце (фиг. 15D), соответственно, после введения конъюгатов, содержащих контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1.

[00048] На фиг. 16A-16D показана активность конъюгатов, содержащих контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1, в другом дизайне эксперимента

в той же модели на мышах, что и на фиг. 13A-13D. Конъюгаты вводили в другой дозе и с другой частотой по сравнению с фиг. 13A-13D. На фиг. 16A показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в сердце на 5% через пять недель после инъекции. На фиг. 16B показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в диафрагме на 35% через пять недель после инъекции. На фиг. 16C показано, что конъюгат ASO1, по-видимому, не приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в икроножной мышце через пять недель после инъекции. На фиг. 16D показано, что конъюгат ASO1, по-видимому, не приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в передней большеберцовой мышце через пять недель после инъекции.

[00049] На фиг. 17A-17D показано, что конъюгат, содержащий контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1, снижал экспрессию *Dmpk* мыши в той же модели на мышах, что и на фиг. 13A-13D. На фиг. 17A показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в сердце на 13% через пять недель после инъекции. На фиг. 17B показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в диафрагме на 41% через пять недель после инъекции. На фиг. 17C показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в икроножной мышце на 5% через пять недель после инъекции. На фиг. 17D показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну *Dmpk* мыши на 10% в передней большеберцовой мышце через пять недель после инъекции.

[00050] На фиг. 18A-18D показано количество ASO1 в сердце (фиг. 18A), диафрагме (фиг. 18B), икроножной мышце (фиг. 18C) или передней большеберцовой мышце (фиг. 18D), соответственно, после введения конъюгатов, содержащих контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1.

[00051] На фиг. 19A-19D показано, что конъюгаты, содержащие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO9, снижали экспрессию мутантного DMPK человека в различных мышечных тканях в модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. ASO9 конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. На фиг. 19A показано, что конъюгат ASO9 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в сердце на 50% через две недели после инъекции. На фиг. 19B показано, что конъюгат ASO9 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в диафрагме на 58% через две недели после инъекции. На фиг. 19C показано, что конъюгат ASO9 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 30% через две недели после инъекции. На фиг. 19D показано, что конъюгат ASO9 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в икроножной мышце на 35% через две недели после инъекции.

[00052] На фиг. 20A-20D показано, что конъюгаты, содержащие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO9, снижал экспрессию *Dmpk* мыши в той же модели на мышах, что и на фиг. 19A-19D. ASO9 конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. На фиг. 20A показано, что конъюгат ASO9 приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в сердце на 48% через две недели после инъекции. На фиг. 20B показано, что конъюгат ASO9 приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в диафрагме на 68% через две недели после инъекции. На фиг. 20C показано,

что конъюгат ASO9 приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в икроножной мышце на 45% через две недели после инъекции. На фиг. 20D показано, что конъюгат ASO9 приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы на 20% в передней большеберцовой мышце через две недели после инъекции.

[00053] На фиг. 21A-21D показано количество ASO9 в сердце (фиг. 21A), диафрагме (фиг. 21B), икроножной мышце (фиг. 21C) или передней большеберцовой мышце (фиг. 21D), соответственно, после введения конъюгатов, содержащих Fab против TfR1, конъюгированный с ASO9. ASO9 конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3.

[00054] На фиг. 22A-22D показано, что конъюгаты, содержащие контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1, снижал экспрессию DMPK в различных мышечных тканях у неявляющегося человеком примата *Synomolgus macaque* (яванского макака). На фиг. 22A показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну DMPK в сердце на 10% через семь недель после инъекции. На фиг. 22B показано, что конъюгат ASO1, по-видимому, не приводил к нокдауну DMPK в диафрагме через семь недель после инъекции. На фиг. 22C показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну DMPK в икроножной мышце на 29% через семь недель после инъекции. На фиг. 22D показано, что конъюгат ASO1 приводил к нокдауну DMPK в передней большеберцовой мышце на 31% через семь недель после инъекции.

[00055] На фиг. 23A-23D показано количество ASO1 в сердце (фиг. 23A), диафрагме (фиг. 23B), икроножной мышце (фиг. 23C) или передней большеберцовой мышце (фиг. 23D) у яванского макака, соответственно, через две недели после введения конъюгатов, содержащих контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1.

[00056] На фиг. 24A-24D показано, что конъюгаты, содержащие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO10, снижали экспрессию мутантного DMPK человека в различных мышечных тканях в модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. ASO10 конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. На фиг. 24A показано, что конъюгат ASO10 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в сердце во всех тестируемых дозах через 28 дня после инъекции. На фиг. 24B показано, что конъюгат ASO10 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в диафрагме во всех тестируемых дозах через 28 дней после инъекции. На фиг. 24C показано, что конъюгат ASO10 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в икроножной мышце во всех тестируемых дозах через 28 дня после инъекции. На фиг. 24D показано, что конъюгат ASO10 приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в передней большеберцовой мышце во всех тестируемых дозах через 28 дней после инъекции.

[00057] На фиг. 25A-25H показано, что, у мышей, которым инъецировали конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO10, в дозе, эквивалентной 10 мг/кг ASO10, ASO10 доставлялся в ядро, и конъюгат ASO10 снижал накопление мутантного мРНК DMPK человека, захваченного в ядре. Конъюгат ASO10 тестировали в модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK

человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. На фиг. 25A показано, что мутантный DMPK человек захватывался в ядрах мышечных клеток посредством субклеточного фракционирования икроножной мышцы мышцей, которым инъецировали контрольный носитель. На фиг. 25B показано, что *Malat1* использовали в качестве ядерного РНК-маркера. На фиг. 25C показано, что *Birc5* использовали в качестве цитоплазматического РНК-маркера. На фиг. 25D показано, что *Gapdh* использовали в качестве цитоплазматического РНК-маркера. На фиг. 25E показано, что ядерный белковый маркер гистон H3 присутствовал только в ядерной фракции. На фиг. 25F показано, что цитоплазматический белковый маркер GAPDH присутствовал только в цитоплазматической фракции. На фиг. 25G показано, что ASO10 снижал мутантный DMPK человека в тотальных тканевых экстрактах. На фиг. 25H показано, что ASO10 снижал мутантный DMPK человека в ядерной фракции мышечных клеток икроножной мышцы.

[00058] На фиг. 26A-26H показано, что конъюгаты, содержащие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO10 или ASO26, снижал DMPK дикого типа в *Cynomolgus macaque* (яванского макака). ASO10 или ASO26 конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. На фиг. 26A-26D показано, что ASO10 присутствовал в сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце дозозависимым образом. На фиг. 26E-26H показано, что ASO26 присутствовал в сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце дозозависимым образом.

[00059] На фиг. 27A-27D показано, что конъюгаты, содержащие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO10, являлись активными в сердце и скелетных мышцах у неявляющегося человеком примата, и конъюгаты, содержащие Fab против TfR1, конъюгированный с ASO26, являлись активными в скелетных мышцах. ASO10 или ASO26 конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. На фиг. 27A показано, что конъюгат ASO10 являлся активным в сердце, и конъюгат ASO26, по-видимому, не имел активности в сердце. На фиг. 27B показано, что конъюгат ASO10 и конъюгат ASO26 являлись активными в диафрагме. На фиг. 27C показано, что конъюгат ASO10 и конъюгат ASO26 являлись активными в икроножной мышце. На фиг. 27D показано, что конъюгат ASO10 и конъюгат ASO26 являлись активными в передней большеберцовой мышце.

[00060] На фиг. 28A-28D показана активность нокдауна DMPK конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO10 или ASO26 в сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце. Конъюгат ASO10 или конъюгат ASO26 вводили мышам, экспрессирующим TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG в дозе, эквивалентной 10 мг/кг ASO10 или ASO26. На фиг. 28A показано, что конъюгат ASO10 являлся активным в сердце, и конъюгат ASO26, по-видимому, не являлся активным в сердце. На фиг. 28B показано, что конъюгат ASO10 и конъюгат ASO26 являлись активными в диафрагме. На фиг. 28C показано, что конъюгат ASO10 и конъюгат ASO26 являлись активными в икроножной мышце. На фиг. 28D показано, что конъюгат ASO10 и конъюгат ASO26 являлись активными в передней большеберцовой мышце.

[00061] На фиг. 29A-29D показана способность конъюгатов, содержащих Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO10, приводить к нокдауну РНК DMPK человека в сердце (фиг. 29A), диафрагме (фиг. 29B), передней большеберцовой мышце (фиг. 29C) и икроножной мышце (фиг. 29D) мышей, экспрессирующих TfR1 человека и две копии мутантного трансгена DMPK человека, несущего подвергнутые экспансии повторы CTG.

[00062] На фиг. 30A-30B показаны уменьшенные фокусы DMPK в ядрах сердечных мышечных волокон у мышей, экспрессирующих TfR1 человека и две копии мутантного трансгена DMPK человека, несущего подвергнутые экспансии повторы CTG, и подвергнутых введению Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированного с ASO10. На фиг. 30A показаны типичные изображения образцов после окрашивания с гибридизацией *in situ* на фокусы DMPK и флуоресцентное окрашивание мышечных волокон (панели на вставке). На изображениях микроскопии, показанных на фиг. 30A, светлые округлые формы представляют собой ядра клеток, и яркие точки в ядрах представляют собой фокусы DMPK. На фиг. 30B показан количественный анализ фокусов DMPK.

[00063] На фиг. 31 показана активность коррекции сплайсинга конъюгатами, содержащими Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO10, в сердце мышей, экспрессирующих TfR1 человека и две копии мутантного трансгена DMPK человека, несущего подвергнутые экспансии повторы CTG (мышей hTfR1/DMSXL). Интегральные индексы сплайсинга на основе сплайсинга экзона 11 *Ldb3*, экзона 6 *Mbnl2* и экзона 7 *Nfix* приведены для контрольных мышей, которым вводили контрольный носитель ("hTfR1 - PBS"), мышей hTfR1/DMSXL, которым вводили контрольный носитель ("hTfR1/DMSXL - PBS"), и мышей hTfR1/DMSXL, которым вводили конъюгат Fab против TfR1-ASO10 ("hTfR1/DMSXL - конъюгат").

[00064] На фиг. 32 показана активность коррекции сплайсинга конъюгатами, содержащими Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO10, в диафрагме мышей, экспрессирующих TfR1 человека и две копии мутантного трансгена DMPK человека, несущего подвергнутые экспансии повторы CTG (мышей hTfR1/DMSXL). Интегральные индексы сплайсинга на основе сплайсинга экзона 11 *Bin1*, экзона 11 *Insr*, экзона 11 *Ldb3* и экзона 7 *Nfix* приведены для контрольных мышей, которым вводили контрольный носитель ("hTfR1 - PBS"), мышей hTfR1/DMSXL, которым вводили контрольный носитель ("hTfR1/DMSXL - PBS"), и мышей hTfR1/DMSXL, которым вводили конъюгат Fab против TfR1-ASO10 ("hTfR1/DMSXL - конъюгат").

[00065] На фиг. 33 показана активность коррекции сплайсинга конъюгатами, содержащими Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO10, в передней большеберцовой мышце мышей, экспрессирующих TfR1 человека и две копии мутантного трансгена DMPK человека, несущего подвергнутые экспансии повторы CTG (мышей hTfR1/DMSXL). Интегральные индексы сплайсинга на основе сплайсинга экзона 11 *Bin1*, экзона 11 *Ldb3*, экзона 6 *Mbnl2* и экзона 7 *Nfix* приведены для контрольных мышей, которым вводили контрольный носитель ("hTfR1 - PBS"), мышей hTfR1/DMSXL, которым вводили

контрольный носитель ("hTfR1/DMSXL - PBS"), и мышей hTfR1/DMSXL, которым вводили конъюгат Fab против TfR1-ASO10 ("hTfR1/DMSXL - конъюгат").

[00066] На фиг. 34 показана активность коррекции сплайсинга конъюгатами, содержащими Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO10, в икроножной мышце мышей, экспрессирующей TfR1 человека и две копии мутантного трансгена DMPK человека, несущего подвергнутые экспансии повторы CTG (мышей hTfR1/DMSXL). Интегральные индексы сплайсинга на основе сплайсинга экзона 6 *Mbnl2*, экзона 7 *Nfix* и экзона 313 *Ttn* приведены для контрольных мышей, которым вводили контрольный носитель ("hTfR1 - PBS"), мышей hTfR1/DMSXL, которым вводили контрольный носитель ("hTfR1/DMSXL - PBS"), и мышей hTfR1/DMSXL, которым вводили конъюгат Fab против TfR1-ASO10 ("hTfR1/DMSXL - конъюгат").

[00067] На фиг. 35 показан нокдаун DMPK в мышечных трубочках пациента с DM1 и мышечных трубочках неявляющегося человеком примата (NHP) дикого типа, достигнутый при инкубации с конъюгатами, содержащими Fab против TfR1 3M12-VH4/Vk3, ковалентно связанный с ASO10. Результаты показаны нормализованными по экспрессии в мышечных трубочках пациента с DM1 или мышечных трубочках NHP, которые обрабатывали только носителем. Данные приведены как среднее+стандартное отклонение для n=4 параллелей на условие. Статистические показатели вычисляли посредством одностороннего ANOVA (*, $P < 0,05$, **, $P < 0,01$).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00068] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, сконструированным для таргетинга РНК DMPK. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, комплементарным РНК DMPK, которые можно использовать для снижения уровней токсического DMPK, имеющего экспансию ассоциированных с заболеванием повторов, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего миотоническую дистрофию. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK, находящейся в ядре клеток, например, мышечных клеток, например, мышечных трубочек. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK, находящейся в ядре клеток, например, клеток центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые свойства биодоступности и/или стабильности в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые свойства аффинности связывания. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые профили токсичности. В некоторых вариантах

осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели свойства низкой активации комплемента и/или индукции цитокинов.

[00069] В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим мышечно-специфические средства, ковалентно связанные с DMPK-специфическими олигонуклеотидами, представленными в настоящем описании, для эффективной доставки олигонуклеотидов в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к комплексам для таргетинга аллеля DMPK, содержащего подвергнутый экспансии, ассоциированный с заболеванием повтор, для лечения индивидуума, имеющего DM1. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, могут содержать олигонуклеотиды, ингибирующие экспрессию аллеля DMPK, содержащего подвергнутый экспансии, ассоциированный с заболеванием повтор. В качестве другого примера, комплексы могут содержать олигонуклеотиды, мешающие связыванию ассоциированной с заболеванием мРНК DMPK с Muscleblind-подобным белком (например, MBNL1, 2 и/или (например, и) 3), таким образом, снижающие токсический эффект ассоциированного с заболеванием аллеля DMPK.

[00070] Дополнительные аспекты изобретения, включая описание определенных терминов, приведены ниже.

I. Определения

[00071] **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).

[00072] **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).

[00073] **Антитело:** В рамках изобретения термин "антитело" относится к полипептиду, включающему по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина или по меньшей мере одну антигенную детерминанту, например, паратоп, специфически связывающийся с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело является полноразмерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным антителом. Однако в некоторых вариантах осуществления антитело является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')₂-фрагментом, Fv-фрагментом или scFv-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело является нанотелом, полученным из антитела Верблюдовых, или нанотелом, полученным из антитела акулы. В

некоторых вариантах осуществления антитело является диателом. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит каркас, имеющий последовательность зародышевой линии человека. В другом варианте осуществления антитело содержит константный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из константных доменов IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM и IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (H) (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как VH), и/или (например, и) переменную область легкой цепи (L) (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как VL). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен, например, Fc-область. Термин "константный домен иммуноглобулина" относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Известны аминокислотные последовательности константного домена тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека и их функциональные варианты. Что касается тяжелой цепи, в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, представленная в настоящем описании, может являться тяжелой цепью альфа (α), дельта (Δ), эpsilon (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), эpsilon (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).

[00074] **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 известные как "определяющие комплементарность области" ("CDR"), чередующиеся с областями, являющимися более консервативными, которые известны 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, с помощью 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 одну и ту же CDR, означают, что два антитела имеют одинаковую аминокислотную последовательность этой CDR, что определяют одним и тем же способом, например, с помощью определения IMGT.

[00075] 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

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

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

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

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

[00076] **Антитело с пересаженным CDR:** Термин "антитело с пересаженным CDR" относится к антителам, содержащим последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида, но в которых последовательности одной или более из областей CDR VH и/или (например, и) VL заменяют последовательностями CDR другого биологического вида, таким как антитела, имеющие вариабельные области тяжелой и легкой цепей мыши, в которых одну или более CDR мыши (например, CDR3) заменяют последовательностями CDR человека.

[00077] **Химерное антитело:** Термин "химерное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида и последовательности константной области другого биологического вида, таким как антитела, имеющие вариабельные области тяжелой и легкой цепи мыши, соединенные с константными областями человека.

[00078] **Комплементарный:** В рамках изобретения термин "комплементарный" относится к возможности точного спаривания между двумя нуклеозидами или двумя наборами нуклеозидов. В частности, "комплементарный" представляет собой термин, характеризующий степень спаривания водородных связей, приводящую к связыванию между двумя нуклеозидами или двумя наборами нуклеозидов. 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.

[00079] **Консервативная аминокислотная замена:** В рамках изобретения термин "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислоты, не изменяющей относительные характеристики заряда или размера белка, в котором сделана замена аминокислоты. Варианты можно получать способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в этой области, такими как обнаруживаемые в источниках, в которых скомпилированы такие способы, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012, или *Current Protocols in Molecular biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот

включают замены, сделанные среди аминокислот в следующих группах: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D

[00080] **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.

[00081] **Перекрестно реактивный:** В рамках изобретения и в отношении направляющего средства (например, антитела) термин "перекрестно реактивный" относится к свойству средства быть способным специфически связываться с более чем одним антигеном схожего типа или класса (например, антигенами многочисленных гомологов, паралогов или ортологов) со схожей аффинностью или авидностью. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, перекрестно реактивное в отношении антигенов человека и не являющегося человеком примата схожего типа или класса (например, рецептор трансферрина человека и рецептор трансферрина не являющегося человеком примата), может связываться с антигеном человека и антигенами не являющегося человеком примата со схожей аффинностью или авидностью. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена человека и антигена грызуна схожего типа или класса. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена грызуна и антигена не являющегося человеком примата схожего типа или класса. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена человека, антигена не являющегося человеком примата и антигена грызуна схожего типа или класса.

[00082] **Ассоциированный с заболеванием повтор:** В рамках изобретения термин "ассоциированный с заболеванием повтор" относится к повторяющейся нуклеотидной последовательности в участке генома, в случае которого количество единиц повторяющейся нуклеотидной последовательности коррелирует, и/или (например, и) прямо или косвенно вносит вклад, или вызывает генетическое заболевание, такое как DM1. Каждая повторяющаяся единица ассоциированного с заболеванием повтора может иметь длину 2, 3, 4, 5 или более нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор является динуклеотидным повтором. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор является тринуклеотидным повтором. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с

заболеванием повтор является тетрануклеотидным повтором. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор является пентануклеотидным повтором. В некоторых вариантах осуществления варианты осуществления ассоциированный с заболеванием повтор включает повторы CAG, повторы CTG, повторы CUG, повторы CGG, повторы CCTG или нуклеотид, комплементарный любым из них. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор находится в некодирующей части гена. Однако в некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор находится в кодирующей области гена. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии относительно нормального состояния до длины, прямо или косвенно вносящей вклад или вызывающей генетическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор находится в РНК (например, транскрипте РНК). В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор находится в ДНК (например, хромосоме, плазмиде). В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии в хромосоме клетки зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии в хромосоме соматической клетки. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии до количества повторяющихся единиц, ассоциированного с врожденным дебютом заболевания. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии до количества повторяющихся единиц, ассоциированного с дебютом заболевания в детском возрасте. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии до количества повторяющихся единиц, ассоциированного с дебютом заболевания во взрослом возрасте. При DM1 область тринуклеотидных повторов единиц CTG в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) DMPK ассоциирована с заболеванием. Нормальный аллель DMPK содержит от приблизительно 5 до приблизительно 37 единиц повторов CTG, в то время как у пациентов с DM1 длина области повторов CTG значимо повышена до сотен или тысяч тринуклеотидов повторов.

[00083]] **DMPK:** В рамках изобретения термин "DMPK" относится к гену, кодирующему миотонин-протеинкиназу (также известную как протеинкиназа миотонической дистрофии), серин/треониновую протеинкиназу. Субстраты этого фермента могут включать миогенин, бета-субъединицу кальциевых каналов L-типа и фосфолепман. В некоторых вариантах осуществления DMPK может являться геном человека (Gene ID: 1760), геном не являющегося человеком примата (например, Gene ID: 456139, Gene ID: 715328) или геном грызуна (например, Gene ID: 13400). У людей экспансия повтора CTG в 3'-некодирующей, нетранслируемой области DMPK ассоциирована с миотонической дистрофией типа I (DM1). Кроме того, охарактеризовано множество вариантов транскриптов человека (например, аннотированные под регистрационными номерами в GenBank RefSeq: NM_001081563.2, NM_004409.4,

NM_001081560.2, NM_001081562.2, NM_001288764.1, NM_001288765.1 и NM_001288766.1), кодирующие разные изоформы белка.

[00084] **Аллель DMPK:** В рамках изобретения термин "аллель DMPK" относится к любой из альтернативных форм (например, форм дикого типа или мутантных форм) гена DMPK. В некоторых вариантах осуществления аллель DMPK может кодировать миотонин-протеинкиназу дикого типа, сохраняющую свои нормальные и типичные функции. В некоторых вариантах осуществления аллель DMPK может включать экспансию одного или более ассоциированных с заболеванием повторов. В некоторых вариантах осуществления нормальные индивидуумы имеют два аллеля DMPK, содержащих повторы в диапазоне от 5 до 37 единиц. В некоторых вариантах осуществления количество единиц повторов CTG у индивидуума, имеющего DM1, находится в диапазоне от приблизительно 50 до приблизительно 3000 или более, при этом более высокие количества повторов приводят к повышенной тяжести заболевания. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы со слабой DM1 имеют по меньшей мере один аллель DMPK, содержащий повторы в диапазоне от 50 до 150 единиц. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы с классической DM1 имеют по меньшей мере один аллель DMPK, содержащий повторы в диапазоне от 100 до 1000 или более единиц. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы, имеющие DM1 с врожденным дебютом, может иметь по меньшей мере один аллель DMPK, содержащий более 2000 единиц повторов.

[00085] **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.

[00086] **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.

[00087] **Гуманизированное антитело:** Термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности варибельной 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 варибельной области зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизированного антитела является антитело с пересаженными CDR, в котором последовательности CDR человека встраивают в не принадлежащие человеку последовательности VH и VL для замены соответствующих не принадлежащих человеку последовательностей CDR. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к гуманизированным антителам против Tfr1 и их антигенсвязывающим частям. Такие антитела можно получать посредством получения моноклональных антител мыши против Tfr1 с использованием общепринятой гибридомной технологии с последующей гуманизацией с использованием генетической инженерии *in vitro*, например, как описано в публикации РСТ № WO 2005/123126 A2 Kasaiian et al.

[00088] **Интернализирующийся рецептор поверхности клетки:** В рамках изобретения термин "интернализирующийся рецептор поверхности клетки" относится к рецептору поверхности клетки, интернализуемому клетками, например, после внешней стимуляции, например, связывания лиганда с рецептором. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза. Однако, в некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки интернализуется посредством клатрин-независимого пути, такого как, например, фагоцитоз, макропиноцитоз, кавеола- и рафт-опосредованный захват или конститутивный клатрин-независимый эндоцитоз. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен, и/или (например, и) внеклеточный домен, который, необязательно, дополнительно может содержать лиганд-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления рецептор поверхности клетки интернализуется клеткой после связывания лиганда. В некоторых вариантах осуществления лиганд может являться мышечно-специфическим средством или мышечно-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор поверхности клетки является рецептором трансферрина.

[00089] **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.

[00090] **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 вариабельными (т.е. гипервариабельными), чем другие аминокислотные остатки в вариабельных 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.

[00091] **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.

[00092] **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.

[00093] **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.

[00094] **Миотоническая дистрофия (DM):** В рамках изобретения термин "миотоническая дистрофия (DM)" относится к генетическому заболеванию, вызванному мутациями в гене DMPK или гене CNBP (ZNF9), отличающемуся потерей мышц, ослаблением мышц и функции мышц. Описано два типа заболевания, миотоническая дистрофия типа 1 (DM1) и миотоническая дистрофия типа 2 (DM2). DM1 ассоциирована с экспансией тринуклеотидного повтора CTG в 3'-некодирующей области DMPK. DM2 ассоциирована с экспансией тетрануклеотидного повтора CCTG в первом интроне ZNF9. И при DM1, и при DM2 экспансия нуклеотидов приводит к образованию токсических повторов РНК, способных образовывать шпилечные структуры, связывающиеся с критическими внутриклеточными белками, например, Muscleblind-подобными белками, с высокой аффинностью. В этой области описана миотоническая дистрофия, генетическая основа заболевания, и связанные симптомы (см., например, Thornton, С.А., "Myotonic Dysrtophy" *Neurol Clin.* (2014), 32(3): 705-719.; и Konieczny et al. "Myotonic Dysrtophy: candidate small molecule therapeutics" *Drug Discovery Today* (2017), 22:11). В некоторых вариантах осуществления индивидуумы рождаются с вариантом DM1, названным врожденной миотонической дистрофией. Симптомы врожденной миотонической дистрофии проявляются с рождения и включают слабость всех мышц, проблемы с дыханием, косолапость, задержки развития и умственной отсталостью. DM1 ассоциирована с записью № 160900 в базе данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). DM2 ассоциирована с записью № 602668 в OMIM.

[00095] **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, фосфородиамидат-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 нуклеозидов (например, модификации 2'-О-метил-сахара, модификации пурина или пиримидина). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать одну или более фосфотиоатных связей, которые могут находиться в стереохимической конформации Rp или Sp.

[00096] **Рекомбинантное антитело:** В рамках изобретения термин "рекомбинантное антитело человека" предназначен для включения всех антител человека, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, с использованием которого трансфицируют клетку-хозяина (что более подробно описано в настоящем описании), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., and Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., и Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, включающими сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хоть и получены и относятся к последовательностям VH и VL зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*. Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к полностью человеческим антителам человека, способным связываться с рецептором трансферрина человека, которые можно

получать способами, хорошо известными в этой области, в качестве неограничивающих примеров, такими как, использование фаговых библиотек Ig человека, таких как описываемые в публикации PCT № WO 2005/007699 A2 Jermutus et al.

[00097] **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.

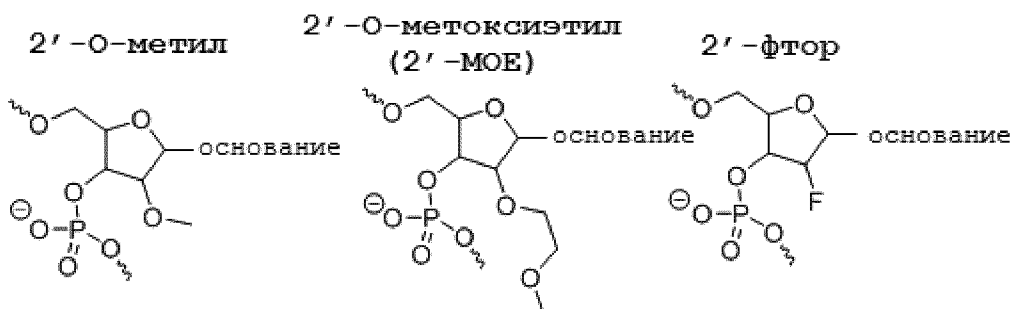
[00098] **Специфически связывается:** В рамках изобретения термин "специфически связывается" относится к способности молекулы связываться с партнером по связыванию со степенью аффинности или авидности, позволяющей использовать молекулу для различения партнера по связыванию и соответствующего контроля 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.

[00099] **Индивидуум:** В рамках изобретения термин "индивидуум" относится к млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой не являющегося человеком примата или грызуна. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом, например, пациентом-человеком, имеющим или, как предполагают, имеющим заболевание. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом-человеком, имеющим или, как предполагают, имеющим заболевание,

являющееся результатом экспансии ассоциированных с заболеванием повторов, например, в аллеле DMPK.

[000100] **Рецептор трансферрина:** В рамках изобретения термин "рецептор трансферрина" (также известный как TFRC, CD71, p90 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).

[000101] **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'-О-Me), 2'-О-метоксиэтил- (2'-МОЕ), 2'-О-аминопропил- (2'-О-AP), 2'-О-диметиламиноэтил- (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил- (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил- (2'-О-DMAEOE), 2'-О-N-метилацетамидонуклеозид (2'-О-NMA), замкнутую нуклеиновую кислоту (ЗНК, нуклеиновую кислоту с метиленовым мостиком), нуклеиновую кислоту с этиленовым мостиком (ЕНА) и нуклеиновую кислоту с (S)-затрудненным этилом (сEt). В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированные нуклеозиды, представленные в настоящем описании, являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами, и олигонуклеотиды, содержащие 2'-модифицированные нуклеозиды, имеют повышенную аффинность к последовательностям-мишеням относительно немодифицированного олигонуклеотида. Примеры структур 2'-модифицированных нуклеозидов приведены ниже:





Эти примеры приведены с фосфатными группами, но предусмотрены любые межнуклеозидные связи между 2'-модифицированными нуклеозидами.

II. Комплексы

[000102] Настоящее изобретение дополнительно 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.

[000103] 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. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, нацеленным на ассоциированный с заболеванием повтор в клетках ЦНС. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, нацеленным на ассоциированный с заболеванием повтор. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, нацеленным на кодирующую или некодирующую область транскрипта DMPK (например, пре-мРНК или мРНК), такую как 3'-нетранслируемая область, интронная область или экзонная область, в клетках (например, мышечных клетках или клетках ЦНС).

[000104] В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит мышечно-специфическое средство, например, антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, например, антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на DMPK, таким как нуклеиновая кислота, содержащая ассоциированный с заболеванием повтор, например, аллель DMPK.

A. Мышечно-специфические средства

[000105] 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, и что любые мышечные мишени (например, мышечные поверхностные белки) можно подвергать таргетингу любым типом мышечно-специфического средства, представленным в настоящем описании. Например, мышечно-специфическое средство может содержать или состоять из низкомолекулярного соединения, 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.

[000106] 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.

[000107] 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 TfR1, может захватываться мышечными клетками посредством связывания с рецептором трансферрина, который затем может подвергаться эндоцитозу, например, посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза.

[000108] 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 раза 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.

[000109] 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

[000110] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом. Как правило, высокая специфичность антител к их антигену-мишени обеспечивает потенциал селективного таргетинга мышечных клеток (например, скелетно-мышечных клеток, гладкомышечных клеток и/или (например, и) кардиомиоцитов). Эта специфичность также может ограничивать нецелевую токсичность. Примеры антител, способных к таргетингу поверхностного антигена мышечных клеток, описаны и входят в объем настоящего изобретения. Например, антитела, нацеленные на поверхность мышечных клеток, описаны в Arahata K., et al. "Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide" *Nature* 1988; 333: 861-3; Song K.S., et al. "Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins" *J Biol Chem* 1996; 271: 15160-5; и Weisbart R.H. et al., "Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of monoclonal antibody that binds myosin IIb" *Mol Immunol.* 2003 Mar, 39(13):78309; полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

а. Антитела против рецептора трансферрина (TfR)

[000111] 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, связывающимся с рецептором трансферрина, способными связываться с рецептором трансферрина. Таким образом, аспекты настоящего изобретения относятся к связывающим белкам (например, антителам), связывающимся с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки, связывающиеся с рецептором трансферрина, интернализуются вместе с любой связанной молекулярной нагрузкой в мышечную клетку. В рамках изобретения антитело, связывающееся с рецептором трансферрина, можно взаимозаменяемо обозначать как антитело против рецептора трансферрина или антитело против TfR1. Антитела, связывающиеся, например, специфически связывающиеся, с рецептором трансферрина, могут интернализироваться в клетку, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, после связывания с рецептором трансферрина.

[000112] Следует понимать, что антитела против TfR1 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 TfR1 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).

[000113] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, связывается с рецептором трансферрина с высокой специфичностью и аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, специфически связывается с любым внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина или эпитопом, становящимся экспонированным для антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, 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 TfR1, представленные в настоящем описании, связываются с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, 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 TfR1, 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.

[000114] В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании (например, клон 8 антитела против TfR в таблице 2 ниже), связываются с эпитопом в TfR1, где эпитоп содержит остатки в аминокислотах 214-241 и/или аминокислотах 354-381 SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, связываются с эпитопом, содержащим остатки в аминокислотах 214-241 и аминокислотах 354-381 SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, связываются с эпитопом, содержащим один или более из остатков Y222, T227, K231, H234, T367, S368, S370, T376 и S378 TfR1 человека, как приведено в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, связываются с эпитопом, содержащим остатки Y222, T227, K231, H234, T367, S368, S370, T376 и S378 TfR1 человека, как приведено в SEQ ID NO: 105.

[000115] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании (например, 3M12 в таблице 2 ниже и его варианты), связываются с эпитопом в TfR1, где эпитоп содержит остатки в аминокислотах 258-291 и/или аминокислоты 358-381 SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1 (например, 3M12 в таблице 2 ниже и его варианты), представленные в настоящем описании, связываются с эпитопом, содержащим остатки в аминокислотах 258-291 и аминокислотах 358-381 SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании (например, 3M12 в таблице 2 ниже и его варианты), связываются с эпитопом, содержащим один или более из остатков K261, S273, Y282, T362, S368, S370 и K371 TfR1 человека, как приведено в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем

описании (например, 3M12 в таблице 2 ниже и его варианты), связываются с эпитопом, содержащим остатки K261, S273, Y282, T362, S368, S370 и K371 Tfr1 человека, как приведено в SEQ ID NO: 105.

[000116] 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
 DFPAARRLYWDDLKRKLEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 NAELSFHGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSSLNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGD
 CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKLNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQRDA
 WGPAAKSGVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEG
 YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNW
 ASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR
 AAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSAR
 GDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWS
 GSHTLPALLENLKLRRQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 105).

[000117] 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
 PNGTKPKRCGNICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLEKLDTTDFSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFHGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSQSSGLNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKLNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPAAKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLT HDTELNLDYERYNSQLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRHVFWS
 GSGHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 106)

[000118] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI

XP_005545315.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca fascicularis*) является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDEEENTDNNTK
 ANGTKPKRCGGNICYGTIAVHFFLIGFMIGYLYGCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQQDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVHVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPGA AKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDG FQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKV SASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDK FVMKKNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPF RHVFW
 GSGSHTLSALLESLKLRQNN SAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 107).

[000119] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина мыши, соответствующей последовательности NCBI NP_001344227.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Mus musculus*) является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLA ADEEENADNNM
 KASVRKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLYGCKRVEQKEECVKLAETEETDKSET
 METEDVPTSSRLYWADLKTLLSEKLN SIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQQDES LAYYIE
 NQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVS
 GKL V HANFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKF
 PVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLF GK
 MEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGA
 QRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFS DMISKDGF RPSRSIIFASWTAGDFGAVGATE
 WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVV LGTSNFKV SASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLY
 RDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEAL TQKVPQ
 LNQMVRTAAEVAGQLIKLTHDVELNDYEMYN SKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQ
 WLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEK TNRFVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPRHI
 FWGSGSHTLSALVENLKL RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNE
 F (SEQ ID NO: 108)

[000120] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 связывается со следующим аминокислотным сегментом рецептора: FVKIQVKDSAQNSVHVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFE
 DLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLG
 TGDYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCR
 MVTSESKNVKLTVSNVLKE (SEQ ID NO: 109) и не ингибирует связывающие взаимодействия между рецептором трансферрина и трансферрином и/или (например, и)

белок гемомохроматоза человека (также известный как HFE). В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, не связывается с эпитопом в SEQ ID NO: 109.

[000121] 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).

[000122] 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*"-conjugate and process for preparation thereof".

[000123] 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 любой из таблиц 2-7, 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.

[000124] В некоторых вариантах осуществления средства, связывающиеся с рецептором трансферрина, например, антитела против TfR1, могут направленно воздействовать на мышечную клетку и/или (например, и) опосредовать транспорт средства через гематоэнцефалитический барьер (например, в клетки ЦНС). 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 связывающим рецептор трансферрина белкам, 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.

[000125] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к антителам, связывающимся с рецептором трансферрина с высокой специфичностью и аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, специфически связывается с любым внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина или эпитопом, становящимся экспонированным для антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, 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 TfR1, представленные в настоящем описании, связываются с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, 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 TfR1, 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 антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, связываются с TfR1, но не связываются с TfR2.

[000126] 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 TfR1, представленные в настоящем описании, связываются с TfR1 с KD в субнанолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, 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 TfR1, 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 TfR1 можно тестировать любым подходящим способом, включая, в качестве неограничивающих примеров, биосенсорную технологию (например, OSET или BIACORE). В некоторых вариантах осуществления связывание любого из антител против TfR1, представленных в настоящем описании, не конкурирует со связыванием трансферрина с TfR1 или не ингибирует его. В некоторых вариантах осуществления связывание любого из антител против TfR1, представленных в настоящем описании, не конкурирует со связыванием HFE-бета-2-микроглобулина с TfR1 или не ингибирует его.

[000127] Неограничивающие примеры антител против TfR1 приведены в таблице 2.

Таблица 2. Примеры антител против TfR1

Ab	Без системы	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 EYASKF QD (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	KSLLSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSNGYTYL F (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQG LEWIGWIDPENGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSNGYTYLFWLQRPQ QSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-A4 N54 T*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPETGDT (SEQ ID NO: 19)	WIDPETGDTEYASKF QD (SEQ ID NO: 20)	ETG (SEQ ID NO: 21)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSNGYTYL F (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQG LEWIGWIDPETGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 22)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSNGYTYLFWLQRPQ QSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		

3-A4 N54 S*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPESGDT (SEQ ID NO: 23)	WIDPESGDTEYASKF QD (SEQ ID NO: 24)	ESG (SEQ ID NO: 25)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLSHSNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSHSNGYTYL F (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHSNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQG LEWIGWIDPESGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 26)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSHSNGYTYLFWFLQRPQ QSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3- M12	CDR-H1	GYSITSGYY (SEQ ID NO: 27)	SGYYWN (SEQ ID NO: 33)	GYSITSGY (SEQ ID NO: 38)
	CDR-H2	ITFDGAN (SEQ ID NO: 28)	YITFDGANNYNPSLK N (SEQ ID NO: 34)	FDG (SEQ ID NO: 39)
	CDR-H3	TRSSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 29)	SSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 35)	SYDYDVLD (SEQ ID NO: 40)
	CDR-L1	QDISNF (SEQ ID NO: 30)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO: 36)	SQDISNF (SEQ ID NO: 41)
	CDR-L2	YTS (SEQ ID NO: 31)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 37)	YTS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	GHTLPY (SEQ ID NO: 42)
	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKL EWMGYITFDGANNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSVTTEDTA TYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 43)		

	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWWYQQRPDGTVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTVSNLEQEDIATYFCQQGHT LPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 44)		
5- H12	CDR-H1	GYSFTDYC (SEQ ID NO: 45)	DYCIN (SEQ ID NO: 51)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERF KG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMD Y (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYCINWVNQRPGQGLE WIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSA VYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 61)		
VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYC QQSSEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)			
5- H12 C33 Y*	CDR-H1	GYSFTDY (SEQ ID NO: 63)	DYYIN (SEQ ID NO: 64)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERF KG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMD Y (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)

	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYINWVNQRPGQGLE WIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSA VYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 65)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYC QQSSEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5- H12 C33 D*	CDR-H1	GYSFTDYD (SEQ ID NO: 66)	DYDIN (SEQ ID NO: 67)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYDINWVNQRPGQGLE WIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSA VYFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 68)		
VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEAADVATYYC QQSSEDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)			
Кло н 8 анти тела прот ив TfR	CDR-H1	GYSFTSYW (SEQ ID NO: 138)	SYWIG (SEQ ID NO: 144)	GYSFTSY (SEQ ID NO: 149)
	CDR-H2	IYPGSDT (SEQ ID NO: 139)	IIYPGSDTRYSPSFQGQ (SEQ ID NO: 145)	GDS (SEQ ID NO: 150)
	CDR-H3	ARFPYDSSGYYSFDY (SEQ ID NO: 140)	FPYDSSGYYSFDY (SEQ ID NO: 146)	PYDSSGYYSFD (SEQ ID NO: 151)
	CDR-L1	QSISSY (SEQ ID NO: 141)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 147)	QSISSY (SEQ ID NO: 152)
	CDR-L2	AAS (SEQ ID NO: 142)	AASSLQS (SEQ ID NO: 148)	AAS (SEQ ID NO: 142)

	CDR-L3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 143)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 143)	SYSTPL (SEQ ID NO: 153)
--	--------	----------------------------	----------------------------	-------------------------

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

[000128] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению является вариантом любого из антител против TfR1, приведенных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 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 TfR1, приведенных в таблице 2, и содержит переменную область тяжелой цепи и/или (например, и) переменную область легкой цепи.

[000129] Примеры аминокислотных последовательностей антител против TfR1, представленных в настоящем описании, приведены в таблице 3.

Таблица 3. Вариабельные области антител против TfR1

Антитело	Вариабельная область Аминокислотная последовательность**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	V _H : EVQLVQSGSELKKPGASVKV SCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKG LEWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSE DTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 69)
	V _L : DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SISRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPG QSPRLLIYRMSNLAGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	V _H : EVQLVQSGSELKKPGASVKV SCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKG LEWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSE DTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 71)
	V _L : DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA SISRSSKSLLSNGYTYLFWFQQRPG QSPRLLIYRMSNLAGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3A4 VH3/Vκ4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKV SCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKG LEWIGWIDPENGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSE DTAVYYCTLWLRRGLDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 72)
	VL:

	<p>DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQQRPG QSPRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)</p>
3M12 VH3/Vκ2	<p>VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL EWMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDT ATYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)</p> <p>VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHT LPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)</p>
3M12 VH3/Vκ3	<p>VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL EWMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDT ATYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)</p> <p>VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHT LPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)</p>
3M12 VH4/Vκ2	<p>VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKG LEWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDT ATYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)</p> <p>VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHT LPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)</p>
3M12 VH4/Vκ3	<p>VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKG LEWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDT ATYYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)</p> <p>VL:</p>

	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHT LPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	<p>VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQG LEWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 77)</p> <p>VL: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYC QQSSEDPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 78)</p>
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	<p>VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYDINWVRQAPGQG LEWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 79)</p> <p>VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKP GPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQSSEDPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 80)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	<p>VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQG LEWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 77)</p> <p>VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQQKP GPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQSSEDPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 80)</p>
Клон 8 антитела против TfR	<p>VH: QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG LEWMGIIYPGDSTRYSPSFQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARFPYDSSGYYSFDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 154)</p> <p>VL:</p>

	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 155)
--	--

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

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

[000130] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 любого из антител против TfR1, приведенных в таблице 3, 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 VH, приведенной в таблице 3. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 по изобретению содержит VL, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого из антител против TfR1, приведенных в таблице 3, 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 VL, приведенной в таблице 3.

[000131] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую CDR-H1, CDR-H2, и CDR-H3 любого из антител против TfR1, приведенных в таблице 3, и содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%) идентичной в каркасных областях по сравнению с соответствующей VH, приведенной в таблице 3. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 по изобретению содержит VL, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого из антител против TfR1, приведенных в таблице 3, и содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%) идентичной по сравнению с соответствующей VL, приведенной в таблице 3.

[000132] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[000133] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[000134] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[000135] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

[000136] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

[000137] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

[000138] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

[000139] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

[000140] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

[000141] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

[000142] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155.

[000143] В некоторых вариантах осуществления 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)

[000144] 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
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

[000145] 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:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 83)

[000146] Другие константные области хорошо тяжелой и легкой цепи антитела известны в этой области, например, представленные в базе данных IMGT (imgt.org) или на vbase2.org/vbstat.php., включенных в настоящее описание посредством ссылки.

[000147] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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.

[000148] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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.

[000149] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи IgG описанных антител против TfR1 приведены в таблице 4 ниже.

Таблица 4. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи примеров IgG против TfR1

Антитело	Последовательности тяжелой цепи/легкой цепи IgG**
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSC</u> <u>TASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVT</u> <u>VTADTSTNTAYMELSSLRSEDT</u> <u>AVYYCTLWLRRGLDYWGQGT</u> <u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <u>GTAALGCLVKDYFPEPVT</u> <u>SVWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS</u> <u>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK</u> <u>VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA</u> <u>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV</u> <u>VSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQV</u> <u>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK</u> <u>GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> <u>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL</u> <u>SLSPGK (SEQ ID NO: 84)</u>
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSK</u> <u>SLLSNGYTYLFWFQQRPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLAGVPDFRFSGSGSGT</u> <u>DFTLKISRVEAEDVGVYYCM</u>

	<p><u>QHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKGASVKVSC TASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 86)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHSNGYTYLFWFQORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLAGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM</u> <u>QHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3A4 VH3/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>EVQLVQSGSELKKGASVKVSC TASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPENG DTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHSNGYTYLFWFQORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLAGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM</u> <u>QHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u></p>

	NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)
3M12 VH3/Vк2	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
3M12 VH3/Vк3	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</p>

	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
3M12 VH4/Vк2	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY</u> <u>YCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
3M12 VH4/Vк3	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATY</u> <u>YCTRSSYDYDVLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 91)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</p>

	AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vk3	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDGYDNSFMHWYQOKPGQ</u> <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQ</u> <u>SSEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN</u> FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)</p>
5H12 VH5 (C33D*)/Vk4	<p>Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYDINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ</u> <u>QSSEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u></p>

		NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4		Тяжелая цепь (с константной областью IgG1 дикого типа человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDT</u> <u>AVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)
		Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ</u> <u>QSEDPWTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)
Клон антитела против TfR	8	Тяжелая цепь(с константной областью IgG1 дикого типа человека): <u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLE</u> <u>WMGHIYPGDS DTRYSPSFQGOVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA</u> <u>MYICARFPYDSSGYYSFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK(SEQ ID NO: 156)
		Легкая цепь(с константной областью легкой цепи каппа): <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLI</u> <u>YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQSYSTPL</u> <u>TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u>

	KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)
--	---

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

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

[000150] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 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, 94 и 156. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 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: 85, 89, 90, 93, 95 и 157.

[000151] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, 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, 94, и 156. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, 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, 95 и 157. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 84, 86, 87, 88, 91, 92, 94 и 156. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93, 95 и 157.

[000152] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000153] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000154] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000155] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

[000156] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[000157] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

[000158] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[000159] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

[000160] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[000161] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[000162] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

[000163] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом или F(ab')₂-фрагментом интактного антитела (полноразмерного антитела). Антигенсвязывающий фрагмент интактного антитела (полноразмерного антитела) можно получать общепринятыми способами (например, рекомбинантно или посредством расщепления константной области тяжелой цепи полноразмерного IgG с использованием фермента, такого как папаин). Например, F(ab')₂-

фрагмент 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)

[000164] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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.

[000165] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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 антитело против TfR1, 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.

[000166] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи Fab описанных антител против TfR1 приведены в таблице 5 ниже.

Таблица 5. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи примеров Fab против TfR1

Антитело	Последовательности тяжелой цепи/легкой цепи Fab**
3A4	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)

<p>VH3 (N54T*)/Vκ4</p>	<p><u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSC</u>TASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL <u>EWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVT</u>VTADTSTNTAYMELSSLRSEDT <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 QHLEYPPFTEGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSC</u>TASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL <u>EWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVT</u>VTADTSTNTAYMELSSLRSEDT <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 QHLEYPPFTEGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
<p>3A4 VH3/Vκ4</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSC</u>TASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL <u>EWIGWIDPENG</u>DTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDT <u>TAVYYCTLWLRRGLDYWGQGL</u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 99)</p>
	<p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVT</u>PGEPASISCRSSKSLLHSNGYTYLFWFQORPGQ <u>SPRLLIYRMSN</u>LASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM</p>

	<p><u>QHLEYPFTEGGGKVEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3M12 VH3/Vκ2	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u>SLTCSVTGYSIT<u>SGYYWNWIR</u>OPPGK<u>GLE</u> <u>W</u>MGYIT<u>FDGANNYNPSL</u>KNRV<u>SISR</u>DTSKNQ<u>FSLKLSSV</u>TAEDTAT <u>YYCTR</u>SS<u>YDYD</u>VLDYWGQ<u>GTTVT</u>VSSASTK<u>GPSVF</u>PLAPSSK<u>STSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVT<u>VS</u>WNSGAL<u>TSGVHT</u>FPAVLQSSGLYSLSS V<u>VT</u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK<u>VD</u>KKVEPK<u>SCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 100)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISN</u>FLNWYQ<u>QKPGQP</u>VKLL <u>IYYTSRLHSGVPSR</u>FSGSGSG<u>TDFTLTISS</u>LQPEDFATY<u>FCQOGHTL</u> <u>YTFGQ</u>GTKLEIK<u>RTVAAPSVFIFPPS</u>DEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
3M12 VH3/Vκ3	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u>SLTCSVTGYSIT<u>SGYYWNWIR</u>OPPGK<u>GLE</u> <u>W</u>MGYIT<u>FDGANNYNPSL</u>KNRV<u>SISR</u>DTSKNQ<u>FSLKLSSV</u>TAEDTAT <u>YYCTR</u>SS<u>YDYD</u>VLDYWGQ<u>GTTVT</u>VSSASTK<u>GPSVF</u>PLAPSSK<u>STSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVT<u>VS</u>WNSGAL<u>TSGVHT</u>FPAVLQSSGLYSLSS V<u>VT</u>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK<u>VD</u>KKVEPK<u>SCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 100)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISN</u>FLNWYQ<u>QKPGQP</u>VKLL <u>IYYTSRLHSGVPSR</u>FSGSGSG<u>TDFTLTISS</u>LQPEDFATY<u>YCQOGHTL</u> <u>PYTFGQ</u>GTKLEIK<u>RTVAAPSVFIFPPS</u>DEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
3M12 VH4/Vκ2	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTL</u>SLTCTVTGYSIT<u>SGYYWNWIR</u>OPPGK<u>GL</u> <u>E</u>WIGYIT<u>FDGANNYNPSL</u>KNRV<u>SISR</u>DTSKNQ<u>FSLKLSSV</u>TAEDTAT <u>YYCTR</u>SS<u>YDYD</u>VLDYWGQ<u>GTTVT</u>VSSASTK<u>GPSVF</u>PLAPSSK<u>STSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVT<u>VS</u>WNSGAL<u>TSGVHT</u>FPAVLQSSGLYSLSS</p>

	<p>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWDYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQOQHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
<p>3M12 VH4/Vк3</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)</p> <p><u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL</u> <u>EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYDVLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа)</p> <p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWDYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQHTL</u> <u>PYTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
<p>5H12 VH5 (C33Y*)/Vк3</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)</p> <p><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>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDGYDNSFMHWYQOKPGQ</u> <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ</u> <u>SSEDPWTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)</p>
<p>5H12</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека)</p>

<p>VH5 (C33D*)/Vκ4</p>	<p><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>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYYCQ</u> <u>QSSEDPWTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
<p>5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4</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) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYYCQ</u> <u>QSSEDPWTFGQGTKLEIK</u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
<p>Версия 1 клон 8 антитела против TfR</p>	<p>Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека): <u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL</u> <u>EWMGIIYPGDSTRYSPFOGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT</u> <u>AMYYCARFPYDSSGYSFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CP(SEQ ID NO: 158)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа): <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLL</u> <u>IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQQSYSTP</u></p>

	<u>LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> <u>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKH</u> <u>KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)</u>
Версия 2 клон 8 антитела против TfR	Тяжелая цепь (с частичной константной областью IgG1 человека): <u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL</u> <u>EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT</u> <u>AMYYCARFPYDSSGYYSFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> <u>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG</u> <u>LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT</u> (SEQ ID NO: 159)
	Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа): <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL</u> <u>IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOQSYSTP</u> <u>LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> <u>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKH</u> <u>KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)</u>

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

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

[000167] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 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, 158 и 159. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 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, 95 и 157.

[000168] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, 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, 158 и 159. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, 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,

95 и 157. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 97-103, 158 и 159. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93, 95 и 157.

[000169] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000170] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000171] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[000172] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

[000173] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[000174] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89.

[000175] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[000176] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93.

[000177] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[000178] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

[000179] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

[000180] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

Другие известные антитела против TfR1

[000181] 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 6. 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 6.

[000182] Таблица 6 - 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 receptor 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, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12 и 13D4	WO 2016/081643, поданный 5/26/2016, названный "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE" патент США № 9708406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"	Апикальный домен и неапикальные области
(От Armagen) 8D3	Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse" 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052. патентная заявка США № 2010/077498, поданная 9/11/2008, названная "COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE"	
OX26	Haobam, B. et al. 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806-21.	
DF1513	Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 и brefeldin A. Plant J 48:757-70 (2006).	
1A1B2, 66IG10, MEM-189, JF0956,	Коммерчески доступные антитела против рецептора трансферрина.	Novus Biologicals

29806, 1A1B2, TFRC/1818, 1E6, 66Ig10, TFRC/1059, Q1/71, 23D10, 13E4, TFRC/1149, ER- MP21, YTA74,4, BU54, 2B6, RI7 217		8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120
(От INSERM) BA120g	патентная заявка США № 2011/0311544 A1, 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
БК19,9, 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.	

[000183] В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1 по изобретению включают одну или более из аминокислотных последовательностей CDR-H (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) из любого из антител против TfR1, выбранных из

таблицы 6. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1 включают CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в любом из антител против TfR1, выбранных из таблицы 6. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1 включают CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в любом из антител против TfR1, выбранных из таблицы 6.

[000184] В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1 по изобретению включают любое антитело, включающее переменный домен тяжелой цепи и/или (например, и) переменный домен легкой цепи любого антитела против TfR1, такого как любое из антител против TfR1, выбранных из таблицы 6. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1 по изобретению включают любое антитело, включающее пары переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи любого антитела против TfR1, такого как любое из антител против TfR1, выбранных из таблицы 6.

[000185] Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам против TfR1, имеющим аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH) и/или (например, и) переменного домена легкой цепи (VL), гомологичную любой из представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 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 TfR1, например, любого из антител против TfR1, выбранных из таблицы 6. В некоторых вариантах осуществления гомологичные аминокислотные последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или (например, и) переменного домена легкой цепи не варьируются по любым 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 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 TfR1, представленных в настоящем описании, содержат последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащую каркасную последовательность, являющуюся на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной каркасной последовательности любого из антител против TfR1, такого как любое из антител против TfR1, выбранных из таблицы 6.

[000186] Пример антитела против рецептора трансферрина, который можно использовать по изобретению, описан в публикации международной заявки № WO 2016/081643, включенной в настоящее описание посредством ссылки. Аминокислотные последовательности этого антитела приведены в таблице 7.

Таблица 7. CDR тяжелой цепи и легкой цепи примера известного антитела против Tfr1

Тип последовательности	Kabat	Chothia	Система Contact
CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 110)	GYTFTSY (SEQ ID NO: 116)	TSYWMH (SEQ ID NO: 118)
CDR-H2	EINPTNGRTNYIEKFKS (SEQ ID NO: 111)	NPTNGR (SEQ ID NO: 117)	WIGEINPTNGRTN (SEQ ID NO: 119)
CDR-H3	GTRAYHY (SEQ ID NO: 112)	GTRAYHY (SEQ ID NO: 112)	ARGTRA (SEQ ID NO: 120)
CDR-L1	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 113)	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 113)	YSNLAWY (SEQ ID NO: 121)
CDR-L2	DATNLAD (SEQ ID NO: 114)	DATNLAD (SEQ ID NO: 114)	LLVYDATNLA (SEQ ID NO: 122)
CDR-L3	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 115)	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 115)	QHFWGTPL (SEQ ID NO: 123)
Murine VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 124)		
Murine VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKSPQLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWGPTLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 125)		
Гуманизированный VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 128)		
Гуманизированный VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 129)		
HC химерного полноразмерного IgG1	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH		

	NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 132)
LC химерного полноразмер ного IgG1	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQGKSPQLL VYDATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFWGTP LTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 133)
HC полностью человеческо го полноразмер ного IgG1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRL EWIGEINPTNGRNTNIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAV YYCARGTRAYHYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134)
LC полностью человеческо го полноразмер ного IgG1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLV YDATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTP LTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 135)
HC химерного Fab	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLE WIGEINPTNGRNTNIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCARGTRAYHYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 136)
HC полностью человеческо го Fab	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRL EWIGEINPTNGRNTNIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAV YYCARGTRAYHYWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

	SSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 137)
--	--

[000187] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 7. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 по изобретению содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, приведенные в таблице 7.

[000188] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит CDR-L3, содержащий не более 3 изменения аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислоты) по сравнению с CDR-L3, приведенной в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит CDR-L3, содержащую одно изменение аминокислоты по сравнению с CDR-L3, приведенной в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит CDR-L3 QHFAGTPLT (SEQ ID NO: 126) (по системам определения Kabat и Chothia) или QHFAGTPL (SEQ ID NO: 127) (по системе определения Contact). В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по 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 7, и содержит CDR-L3 QHFAGTPLT (SEQ ID NO: 126) по системам определения Kabat и Chothia или QHFAGTPL (SEQ ID NO: 127) по системе определения Contact.

[000189] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по 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 7. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 по 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 7.

[000190] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

[000191] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 по изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129.

[000192] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 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 TfR1 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.

[000193] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 по изобретению является полноразмерным антителом IgG1, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи антитела человека. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любого из антител против TfR1, 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 соответствующее 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
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

[000194] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь любого из антител против TfR1, 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
SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 83)

[000195] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, является химерным антителом, содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

[000196] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, является полностью человеческим антителом,

содержащим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

[000197] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 является антигенсвязывающим фрагментом (Fab) интактного антитела (полноразмерного антитела). В некоторых вариантах осуществления Fab против TfR1, представленный в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), Fab против TfR1, представленный в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления Fab против TfR1, представленный в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. Альтернативно или дополнительно (например, дополнительно), Fab против TfR1, представленный в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

[000198] Антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме любого антитела, включая, в качестве неограничивающих примеров, интактные (т.е. полноразмерные) антитела, их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела или нанотела. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, является scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, является scFv-Fab (например, scFv, слитым с частью константной области). В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, представленное в настоящем описании, является scFv, слитым с константной областью (например, константной областью IgG1 человека, приведенной в SEQ ID NO: 81).

[000199] В некоторых вариантах осуществления в последовательности антитела (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.

[000200] 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.

[000201] 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.

[000202] 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*.

[000203] 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 TfR1 *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 (СН3) (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 (М) тирозином (Y) в положении 252, замену серина (S) треонином (Т) в положении 254, и замену треонина (Т) глутаминовой кислотой (Е) в положении 256, пронумерованные с помощью индекса EU по Kabat. См. патент США № 7658921, включенный в настоящее описание в качестве 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.

[000204] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более замен аминокислот встраивают в константный домен Fc-области IgG для изменения эффекторных функций антитела против Tfr1. 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).

[000205] В некоторых вариантах осуществления одну или более аминокислот в константной области антитела против Tfr1, представленного в настоящем описании, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или (например, и) сниженную или отсутствующую обусловленную компонентом цитотоксичность (CDC). Этот подход подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al.). В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в N-концевой области домена СН2 антитела, представленного в настоящем описании, изменяют, чтобы, таким образом, изменить способность антитела связываться с компонентом. Этот подход описан в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, модифицируют для повышения способности антитела для опосредования антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или

(например, и) для повышения аффинности антитела к рецептору Fc γ . Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 00/42072.

[000206] 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.

[000207] 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".

[000208] 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*".

[000209] 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 любую из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи F(ab'), 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).

[000210] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем описании, может иметь одну или более посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах осуществления N-концевая циклизация, также называемая образованием пироглутамата (руго-Glu), может происходить в антителе в N-концевых остатках глутамата (Glu) и/или глутамина (Gln) при производстве. В связи с этим, следует понимать, что антитело, определенное как имеющее последовательность, содержащую N-концевой остаток глутамата или глутамина, включает антитела, подвергнутые образованию пироглутамата, являющемуся результатом посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах осуществления образование пироглутамата происходит в последовательности тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления образование пироглутамата происходит в последовательности легкой цепи.

в. Другие мышечно-специфические антитела

[000211] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающееся с гемоювелином, кавеолином-3, пептидом мышечной дистрофии Дюшенна, миозином IIb или CD63. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с миогенным белком-предшественником. Неограничивающие примеры

миогенных белков-предшественников включают ABCG2, М-кадгерин/кадгерин-15, кавеолин-1, CD34, FоxK1, 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

[000212] 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.

[000213] 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.

[000214] 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.

[000215] 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*.

[000216] 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.

[000217] 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).

[000218] 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 компонентом цитотоксичность (CDC). Этот подход подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al.). В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в N-концевой области домена CH2 антитела, представленного в настоящем описании, изменяют, чтобы, таким образом, изменить способность антитела связываться с компонентом. Этот подход описан в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, модифицируют для повышения способности антитела для опосредования антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или (например, и) для повышения аффинности антитела к рецептору Fcγ. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 00/42072.

[000219] В некоторых вариантах осуществления последовательности переменного 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 композициях 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.

[000220] 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".

[000221] 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

[000222] 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.

[000223] 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".

[000224] 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: 205), 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: 205). 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: 206), и этот мышечно-специфический пептид демонстрировал улучшенное связывание с клетками C2C12 относительно пептида ASSLNIA (SEQ ID NO: 205).

[000225] 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 неммышечных типов клеток, осуществляли отрицательную селекцию неспецифических связывающих клетки средства. После раундов селекции пептид из 12 аминокислот TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 207) встречался наиболее часто. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство содержит аминокислотную последовательность TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 207).

[000226] 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: 208), CSERSMNFC (SEQ ID NO: 209), CPKTRRVPC (SEQ ID NO: 210), WLSEAGPVVTVRALRGTGSW (SEQ ID NO: 211), ASSLNIA (SEQ ID NO: 205), CMQHSMRVC (SEQ ID NO: 212) и DDTRHWG (SEQ ID NO: 213). 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

[000227] 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

[000228] 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

[000229] 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.

[000230] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является любым мышечно-специфическим средством, представленным в настоящем описании (например, антителами, нуклеиновыми кислотами, низкомолекулярными соединениями, пептидами, аптамерами, липидами, остатками сахаров), нацеленными на

суперсемейство транспортеров SLC. 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.

[000231] 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. Транспортер 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.

[000232] 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).

[000233] Мышечно-специфическое средство может являться белком, существующим в по меньшей мере одной растворимой форме, нацеленной на мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический белок может являться гемоювелином (также известным как отталкивающая молекула наведения С или белок гемохроматоза типа 2), белком, вовлеченным в перегрузку железом и гомеостаз. В некоторых вариантах осуществления гемоювелин может являться полноразмерным белком, или фрагментом, или мутантом с по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении функционального белка гемоювелина. В некоторых вариантах осуществления мутант гемоювелина может являться растворимым фрагментом, в нем может отсутствовать N-концевая сигнальная последовательность и/или (например, и) С-концевой якорный домен. В некоторых вариантах осуществления гемоювелин может быть аннотирован под регистрационными номерами GenBank RefSeq NM_001316767.1, NM_145277.4, NM_202004.3, NM_213652.3 или NM_213653.3. Следует понимать, что гемоювелин может принадлежать человеку, не являющемуся человеком примату или грызуну.

В. Молекулярная нагрузка

[000234] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к молекулярной нагрузке, например, олигонуклеотидам, сконструированным для таргетинга РНК DMPK, для модуляции экспрессии или активности DMPK. В некоторых вариантах осуществления модуляция экспрессии или активности DMPK включает снижение уровней РНК DMPK и/или (например, и) белка. В некоторых вариантах осуществления РНК DMPK ассоциирована с заболеванием, например, имеет экспансию ассоциированного с заболеванием повтора или кодируется аллелем, имеющим экспансию ассоциированного с заболеванием повтора. В некоторых вариантах осуществления РНК DMPK содержит экспансию повторов CUG, или аллель, которым она кодируется, включает экспансию повторов CTG. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, комплементарным РНК DMPK, которые можно использовать для снижения уровней токсичного DMPK, имеющего экспансию ассоциированного с заболеванием повтора, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего миотоническую дистрофию. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK, находящейся в ядре клеток, например, мышечные клетки, например, мышечные трубочки. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы вызывать РНКазу Н-опосредованную деградацию целевой РНК DMPK, находящейся в ядре клеток, например, клеток ЦНС (например, нейронов). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые свойства биодоступности и/или стабильности в сыворотке. В некоторых

вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые свойства аффинности связывания. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели желаемые профили токсичности. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они имели свойства низкой активации комплемента и/или индукции цитокинов.

[000235] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид связан или иначе ассоциирован с мышечно-специфическим средством, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления такие олигонуклеотиды способны к таргетингу DMPK в мышечную клетку, например, посредством специфического связывания с последовательностью DMPK в мышечной клетке после доставки в мышечную клетку с помощью связанного мышечно-специфического средства. Следует понимать, что в изобретении можно использовать различные типы мышечно-специфических средств. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности аллелю DMPK, содержащему экспансию ассоциированных с заболеванием повторов. Примеры олигонуклеотидов, нацеленных на РНК DMPK, более подробно описаны в настоящем описании, однако, следует понимать, что примеры молекулярной нагрузки, представленные в настоящем описании, не предназначены для ограничения.

i. Олигонуклеотиды

[000236] В некоторых вариантах осуществления DMPK-специфические олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, сконструированы так, чтобы вызывать РНКазой опосредованную деградацию мРНК DMPK. 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.

[000237] Примеры олигонуклеотидов, которые можно использовать для таргетинга DMPK, например, для лечения DM1, приведены в публикации патентной заявки США № 2010/0016215 A1, опубликованной 1 января 2010 года, названной *Compound And Method For Treating Myotonic Dystrophy*; публикации патентной заявки США № 2013/0237585 A1, опубликованной 19 июля 2010 года, *Modulation Of Dystrophia Myotonica-Protein Kinase (DMPK) Expression*; публикации патентной заявки США № 2015/0064181 A1, опубликованной 5 марта 2015 года, названной *"Antisense Conjugates For Decreasing Expression Of Dmpk"*; публикации патентной заявки США № 2015/0238627 A1, опубликованной 27 августа 2015 года, названной *"Peptide-Linked Morpholino Antisense Oligonucleotides For Treatment Of Myotonic Dystrophy"*; и публикации патентной заявки США № 2016/0304877 A1, опубликованной 20 октября 2016 года, названной *"Compounds And Methods For Modulation Of Dystrophia Myotonica-Protein Kinase (Dmpk) Expression"*,

содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000238] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности в отношении последовательности, приведенной далее, являющейся примером последовательности гена DMPK человека (Gene ID 1760; NM_001081560.2):

```
AGGGGGGCTGGACCAAGGGGTGGGGAGAAGGGGAGGAGGCCTCGGCCGGCC
GCAGAGAGAAGTGGCCAGAGAGGCCAGGGGACAGCCAGGGACAGGCAGACATGC
AGCCAGGGCTCCAGGGCCTGGACAGGGGCTGCCAGGCCCTGTGACAGGAGGACCC
GAGCCCCCGGCCCGGGGAGGGGCCATGGTGCTGCCTGTCCAACATGTCAGCCGAGG
TGCGGCTGAGGCGGCTCCAGCAGCTGGTGTGGACCCGGGCTTCCCTGGGGCTGGAG
CCCCTGCTCGACCTTCTCCTGGGCGTCCACCAGGAGCTGGGCGCCTCCGAACTGGCC
CAGGACAAGTACGTGGCCGACTTCTTGCAGTGGGCGGAGCCCATCGTGGTGAGGCT
TAAGGAGGTCCGACTGCAGAGGGACGACTTCGAGATTCTGAAGGTGATCGGACGCG
GGGCGTTCAGCGAGGTAGCGGTAGTGAAGATGAAGCAGACGGGCCAGGTGTATGCC
ATGAAGATCATGAACAAGTGGGACATGCTGAAGAGGGGCGAGGTGTCGTGCTCCG
TGAGGAGAGGGACGTGTTGGTGAATGGGGACCGGCGGTGGATCACGCAGCTGCACT
TCGCCTTCCAGGATGAGAACTACCTGTACCTGGTCATGGAGTATTACGTGGGCGGGG
ACCTGCTGACACTGCTGAGCAAGTTTGGGGAGCGGATTCCGGCCGAGATGGCGCGC
TTCTACCTGGCGGAGATTGTCATGGCCATAGACTCGGTGCACCGGCTTGGCTACGTG
CACAGGGACATCAAACCCGACAACATCCTGCTGGACCGCTGTGGCCACATCCGCCT
GGCCGACTTCGGCTCTTGCCTCAAGCTGCGGGCAGATGGAACGGTGCGGTGCCTGGT
GGCTGTGGGCACCCAGACTACCTGTCCCCCGAGATCCTGCAGGCTGTGGGCGGTG
GGCCTGGGACAGGCAGCTACGGGCCCGAGTGTGACTGGTGGGCGCTGGGTGTATTC
GCCTATGAAATGTTCTATGGGCAGACGCCCTTCTACGCGGATTCCACGGCGGAGACC
TATGGCAAGATCGTCCACTACAAGGAGCACCTCTCTCTGCCGCTGGTGGACGAAGG
GGTCCCTGAGGAGGCTCGAGACTTCATTCAGCGGTTGCTGTGTCCCCCGGAGACAG
GCTGGGCCGGGGTGGAGCAGGCAGCTTCCGGACACATCCCTTCTTCTTTGGCCTCGA
CTGGGATGGTCTCCGGGACAGCGTGCCCCCTTTACACCGGATTTTGAAGGTGCCAC
CGACACATGCAACTTCGACTTGGTGGAGGACGGGCTCACTGCCATGGAGACACTGT
CGGACATTCGGGAAGGTGCGCCGCTAGGGGTCCACCTGCCTTTTGTGGGCTACTCCT
ACTCCTGCATGGCCCTCAGGGACAGTGAGGTCCCAGGCCCCACACCCATGGAAGT
GAGGCCGAGCAGCTGCTTGAGCCACACGTGCAAGCGCCAGCCTGGAGCCCTCGGT
GTCCCCACAGGATGAAACAGCTGAAGTGGCAGTTCAGCGGCTGTCCCTGCGGCAG
AGGCTGAGGCCGAGGTGACGCTGCGGGAGCTCCAGGAAGCCCTGGAGGAGGAGGT
GCTCACCCGGCAGAGCCTGAGCCGGGAGATGGAGGCCATCCGCACGGACAACCAGA
ACTTCGCCAGTCAACTACGCGAGGCAGAGGCTCGGAACCGGGACCTAGAGGCACAC
GTCCGGCAGTTGCAGGAGCGGATGGAGTTGCTGCAGGCAGAGGGAGCCACAGCTGT
CACGGGGGTCCCCAGTCCCCGGGCCACGGATCCACCTTCCATCTAGATGGCCCCC
GGCCGTGGCTGTGGGCCAGTGCCCGCTGGTGGGGCCAGGCCCCATGCACCGCCGCC
```

ACCTGCTGCTCCCTGCCAGGGTCCCTAGGCCTGGCCTATCGGAGGCGCTTTCCCTGC
 TCCTGTTCCGCGTTGTTCTGTCTCGTGCCGCCGCCCTGGGCTGCATTGGGTTGGTGGC
 CCACGCCGGCCAACCTACCGCAGTCTGGCGCCGCCAGGAGCCGCCCGCGCTCCCT
 GAACCCTAGAACTGTCTTCGACTCCGGGGCCCCGTTGGAAGACTGAGTGCCCCGGGG
 CACGGCACAGAAGCCGCGCCCCACCGCCTGCCAGTTCACAACCGCTCCGAGCGTGGG
 TCTCCGCCCAGCTCCAGTCCTGTGATCCGGGGCCCCCCCCCTAGCGGCCGGGGAGGGA
 GGGGCCGGGTCCGCGGGCCGGCGAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCGGGAATG
 CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGC
 TGGGGGGATCACAGACCATTTCTTTCTTTTCGGCCAGGCTGAGGCCCTGACGTGGATG
 GGCAAATGCAGGCCTGGGAAGGCAGCAAGCCGGGGCCGTCCGTGTTCCATCCTCCA
 CGCACCCCCACCTATCGTTGGTTCGCAAAGTGCAAAGCTTTCTTGTGCATGACGCCC
 TGCTCTGGGGAGCGTCTGGCGCGATCTCTGCCTGCTTACTCGGGAAATTTGCTTTTGC
 CAAACCCGCTTTTTTCGGGGATCCCGCGCCCCCTCCTCACTTGCGCTGCTCTCGGAG
 CCCCAGCCGGTCCGCCCGCTTCGGCGGTTTGGATATTTATTGACCTCGTCCTCCGAC
 TCGCTGACAGGCTACAGGACCCCCAACAACCCAATCCACGTTTTTGGATGCACTGAG
 ACCCCGACATTCCTCGGTATTTATTGTCTGTCCCCACCTAGGACCCCCACCCCGACC
 CTCGCGAATAAAAGGCCCTCCATCTGCCCAAAGCTCTGGA (SEQ ID NO: 130).

[000239] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности в отношении последовательности, приведенной далее, являющейся примером последовательности гена DMPK мыши (Gene ID 13400; NM_001190490.1).

GAACTGGCCAGAGAGACCCAAGGGATAGTCAGGGACGGGCAGACATGCAGC
 TAGGGTTCTGGGGCCTGGACAGGGGCAGCCAGGCCCTGTGACGGGAAGACCCCGAG
 CTCCGGCCCCGGGGAGGGGCCATGGTGTTCCTGCCAACATGTCAGCCGAAGTGCG
 GCTGAGGCAGCTCCAGCAGCTGGTGCTGGACCCAGGCTTCCTGGGACTGGAGCCCC
 TGCTCGACCTTCTCCTGGGCGTCCACCAGGAGCTGGGTGCCTCTCACCTAGCCCAGG
 ACAAGTATGTGGCCGACTTCTTGCACTGGGTGGAGCCATTGCAGCAAGGCTTAAG
 GAGGTCCGACTGCAGAGGGATGATTTTGAAGATTTTGAAGGTGATCGGGCGTGGGGC
 GTTCAGCGAGGTAGCGGTGGTGAAGATGAAACAGACGGGCCAAGTGTATGCCATGA
 AGATTATGAATAAGTGGGACATGCTGAAGAGAGGCGAGGTGTCGTGCTTCCGGGAA
 GAAAGGGATGTATTAGTGAAAGGGGACCGGCGCTGGATCACACAGCTGCACTTTGC
 CTCCAGGATGAGAACTACCTGTACCTGGTCATGGAATACTACGTGGGCGGGGACCT
 GCTAACGCTGCTGAGCAAGTTTGGGGAGCGGATCCCCGCCGAGATGGCTCGCTTCTA
 CCTGGCCGAGATTGTCATGGCCATAGACTCCGTGCACCGGCTGGGCTACGTGCACAG
 GGACATCAAACCAGATAACATTCTGCTGGACCGATGTGGGCACATTCGCCTGGCAG
 ACTTCGGCTCCTGCCTCAAACCTGCAGCCTGATGGAATGGTGAGGTGCTGGTGGCTG
 TGGGCACCCCGACTACCTGTCTCCTGAGATTCTGCAGGCCGTTGGTGGAGGGCCTG
 GGGCAGGCAGCTACGGGCCAGAGTGTGACTGGTGGGCACTGGGCGTGTTGCCTAT
 GAGATGTTCTATGGGCAGACCCCTTCTACGCGGACTCCACAGCCGAGACATATGCC
 AAGATTGTGCACTACAGGGAACACTTGTCGCTGCCGCTGGCAGACACAGTTGTCCCC

GAGGAAGCTCAGGACCTCATTTCGTGGGCTGCTGTGTCCTGCTGAGATAAGGCTAGGT
 CGAGGTGGGGCAGACTTCGAGGGTGCCACGGACACATGCAATTTTCGATGTGGTGGA
 GGACCGGCTCACTGCCATGGTGAGCGGGGGCGGGGAGACGCTGTCAGACATGCAGG
 AAGACATGCCCCCTTGGGGTGCGCCTGCCCTTCGTGGGCTACTCCTACTGCTGCATGG
 CCTTCAGAGACAATCAGGTCCCGGACCCACCCCTATGGAAGTAGAGGCCCTGCAG
 TTGCCTGTGTCAGACTTGCAAGGGCTTGACTTGCAGCCCCAGTGTCCCCACCGGAT
 CAAGTGGCTGAAGAGGCTGACCTAGTGGCTGTCCCTGCCCTGTGGCTGAGGCAGA
 GACCACGGTAACGCTGCAGCAGCTCCAGGAAGCCCTGGAAGAAGAGGTTCTCACCC
 GGCAGAGCCTGAGCCGCGAGCTGGAGGCCATCCGGACCGCCAACCAGAACTTCTCC
 AGCCAACTACAGGAGGCCGAGGTCCGAAACCGAGACCTGGAGGCGCATGTTTCGGCA
 GCTACAGGAACGGATGGAGATGCTGCAGGCCCCAGGAGCCGCAGCCATCACGGGG
 GTCCCCAGTCCCCGGGCCACGGATCCACCTTCCCATCTAGATGGCCCCCGGCCGTG
 GCTGTGGGCCAGTGCCCGCTGGTGGGGCCAGGCCCCATGCACCGCCGTACCTGCTG
 CTCCCTGCCAGGATCCCTAGGCCTGGCCTATCCGAGGCGCGTTGCCTGCTCCTGTTC
 GCCGCTGCTCTGGCTGCTGCCGCCACACTGGGCTGCACTGGGTTGGTGGCCTATAACC
 GGCGGTCTCACCCCAGTCTGGTGTTCCTCCGGGAGCCACCTTCGCCCCCTGAACCCTA
 AGACTCCAAGCCATCTTTTCATTTAGGCCTCCTAGGAAGGTCGAGCGACCAGGGAGC
 GACCCAAAGCGTCTCTGTGCCATCGCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCACCGCTCCGCTCC
 ACACTTCTGTGAGCCTGGGTCCCCACCCAGCTCCGCTCCTGTGATCCAGGCCTGCCA
 CCTGGCGGCCGGGGAGGGAGGAACAGGGCTCGTGCCAGCACCCCTGGTTCCTGCA
 GAGCTGGTAGCCACCGCTGCTGCAGCAGCTGGGCATTCGCCGACCTTGCTTTACTCA
 GCCCCGACGTGGATGGGCAAACCTGCTCAGCTCATCCGATTTCACTTTTTCACTCTCCC
 AGCCATCAGTTACAAGCCATAAGCATGAGCCCCCTATTTCCAGGGACATCCCATTCC
 CATAGTGATGGATCAGCAAGACCTCTGCCAGCACACACGGAGTCTTTGGCTTCGGAC
 AGCCTCACTCCTGGGGGTGCTGCAACTCCTTCCCCGTGTACACGTCTGCACTCTAA
 CAACGGAGCCACAGCTGCACTCCCCCTCCCCAAAGCAGTGTGGGTATTTATTGAT
 CTTGTTATCTGACTCACTGACAGACTCCGGGACCCACGTTTTAGATGCATTGAGACT
 CGACATTCCTCGGTATTTATTGTCTGTCCCCACCTACGACCTCCACTCCCGACCCTTG
 CGAATAAAATACTTCTGGTCTGCCCTAAA (SEQ ID NO: 131).

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности в отношении последовательностей гена DMPK множества биологических видов, например, выбранных из человека, мыши и не являющихся человеком видов.

[000240] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности в отношении мутантной формы DMPK, например, мутантной формы, описанной в Botta A. et al. "The CTG repeat expansion size correlates with the splicing defects observed in muscles from myotonic dystrophy type 1 patients." *J Med Genet.* 2008 Oct;45(10):639-46.; и Machuca-Tzili L. et al. "Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review." *Muscle Nerve.* 2005 Jul;32(1):1-18; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000241] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, является антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на DMPK. В некоторых вариантах осуществления нацеленный олигонуклеотид является любым из антисмысловых олигонуклеотидов (например, гэпмером), нацеленным на DMPK, как описано в публикации патентной заявки США № 20160304877 A1, опубликованной 20 октября 2016 года, названной "Compounds And Methods For Modulation Of Dystrophia Myotonica-Proteinkinase (DMPK) Expression", включенной в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид нацелен на последовательность области гена DMPK, приведенную под регистрационным номером GenBank NM_001081560.2 (SEQ ID NO: 130) или регистрационным номером GenBank NG_009784.1.

[000242] В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, содержащую область, комплементарную целевой области, составляющей по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 14, по меньшей мере 16, по меньшей мере 18, по меньшей мере 20 или более последовательных нуклеотидов) в SEQ ID NO: 10.

[000243] В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид содержат гэпмерный мотив. Термин "гэпмер" означает химерное антисмысловое соединение, в котором внутренняя область, имеющая множество нуклеотидов, поддерживающих расщепление РНКазой H, расположена между внешними областями, содержащими один или более нуклеотидов, где нуклеотиды, составляющие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеотида или нуклеотидов, составляющих внешние области. Внутреннюю область можно обозначать как "сегмент пропуска", и внешние области можно обозначать как "фланкирующие сегменты". В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеотидов, и/или (например, и) одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления межнуклеозидная связь является фосфотиоатной связью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит полный фосфотиоатный остов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является ДНК-гэпмером с концами сЕТ (например, 3-10-3; сЕТ-ДНК-сЕТ). В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид содержит один или более 6'-(S)-CH₃-бициклических нуклеотидов, один или более β-D-2'-дезоксирибонуклеотидов и/или (например, и) один или более 5-метилцитозиновых нуклеотидов.

а. Размер/последовательность олигонуклеотида

[000244] 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. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину от 15 до 20 нуклеотидов или от 20 до 25 нуклеотидов.

[000245] В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность нуклеиновой кислоты олигонуклеотида по изобретению может специфически гибридизоваться или является специфической для целевой нуклеиновой кислоты, если связывание последовательности с целевой молекулой (например, мРНК) мешает нормальной функции мишени (например, мРНК), вызывая потерю активности (например, ингибируя трансляцию) или экспрессии (например, приводя к деградации мРНК-мишени), и существует достаточная степень комплементарности для избегания неспецифического связывания последовательности с нецелевыми последовательностями в условиях, в которых желательным является избегание неспецифического связывания, например, в физиологических условиях в случае анализов *in vivo* или терапевтического лечения и в случае *in vitro* в условиях, в которых анализы осуществляют в подходящих условиях строгости. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться 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% комплементарным последовательным нуклеотидам целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления комплементарная нуклеотидная последовательность может не являться 100% комплементарной последовательности своей мишени, чтобы иметь возможность специфически гибридизоваться или являться специфической для целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат один или более неправильно спаренных нуклеиновых оснований относительно целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления активность, относящаяся к мишени, снижена в результате такого неправильного спаривания, но активность, относящаяся к нецелевой последовательности, снижена в большей степени (т.е. селективность для целевой нуклеиновой кислоте повышена, и нецелевые эффекты снижены). В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота является молекулой пре-мРНК или молекулой мРНК.

[000246] 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 олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой нуклеиновой кислоте, имеющую длину в диапазоне от 15 до 20 или от 20 до 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида целевой нуклеиновой кислоте имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34,

35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности является комплементарной по меньшей мере 8 последовательным нуклеотидам целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать 1, 2 или 3 неправильно спаренных оснований по сравнению с частью последовательных нуклеотидов целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать до 3 неправильно спаренных оснований на 15 оснований или до 2 неправильно спаренных оснований на 10 оснований.

[000247] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 173-192 и 196-201. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 173-192 и 196-201. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 97% идентичности последовательности в отношении по меньшей мере 12 или по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 173-192 и 196-201.

[000248] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности нуклеотидной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 160-172 и 193-195. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов (например, последовательных нуклеотидов), комплементарных нуклеотидной последовательности, приведенной в любой из SEQ ID NO: 160-172 и 193-195. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, являющуюся на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100% комплементарной по меньшей мере 12 или по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам любой из SEQ ID NO: 160-172 и 193-195.

[000249] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является комплементарным (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) целевой последовательности любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 8). В некоторых вариантах осуществления такая целевая последовательность является на 100% комплементарной олигонуклеотиду, приведенному в таблице 8.

[000250] В некоторых вариантах осуществления следует понимать, что метилирование нуклеинового основания урацила в положении C5 приводит к образованию тимина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нуклеотид или нуклеозид, имеющий C5-метилированный урацил (или 5-метилурацил), можно в равной степени идентифицировать как тиминный нуклеотид или нуклеозид.

[000251] В некоторых вариантах осуществления одно или более тиминовых оснований (Т) в любом из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании

(например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 8), независимо и необязательно могут являться урациловыми основаниями (U), и/или одно или более из U независимо и необязательно могут являться T.

в. Модификации олигонуклеотидов:

[000252] 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.

[000253] 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.

[000254] 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

[000255] 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.

[000256] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, содержит один или более небциклических 2'-модифицированных нуклеозидов, 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) модифицированных нуклеозидов.

[000257] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, содержит один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов, в которых кольцо рибозы содержит мостиковый остаток, соединяющий два атома в кольце, например, соединяющий атом 2'-О с атомом 4'-С через метиленовый мостик (ЗНК), этиленовый мостик (ENA) или (S)-затрудненный этил (сEt). Примеры ЗНК описаны в публикации международной патентной заявки № WO/2008/043753, опубликованной 17 апреля 2008 года и названной "*RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9*", содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Примеры ENA приведены в международной патентной публикации № WO 2005/042777, опубликованной 12 мая 2005 года и названной "*APP/ENA Antisense*"; Morita et al., *Nucleic Acid Res.*, Suppl 1:241-242, 2001; Surono et al., *Hum. Gene Ther.*, 15:749-757, 2004; Koizumi, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 8:144-149, 2006 и Horie et al., *Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf)*, 49:171-172, 2005; описания которых включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Примеры сEt приведены в патентах США №№ 7101993; 7399845 и 7569686, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000258] 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.

[000259] 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.

[000260] 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-метил-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь мостиковых нуклеозидов и 2'-фтор- или 2'-О-метил-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь небциклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-О-МОЕ) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ЕНА, сЕт). Олигонуклеотид может содержать смесь 2'-фтор-модифицированных нуклеозидов и 2'-О-Ме-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь 2'-4'-бициклических нуклеозидов и 2'-МОЕ, 2'-фтор, или 2'-О-Ме-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может содержать смесь небциклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ЕНА, сЕт).

[000261] 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 мостиковые нуклеозиды и 2'-фтор- или 2'-О-метил-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся небциклические 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-О-МОЕ) и 2'-4'-бициклические нуклеозиды (например, ЗНК,

ENA, cEt). Олигонуклеотид может содержать чередующиеся 2'-4'-бициклические нуклеозиды и 2'-МОЕ, 2'-фтор, или 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся небциклические 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ENA, cEt).

[000262] 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

[000263] 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 нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеозидами. 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.

[000264] 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.

[000265] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут содержать гетероатомные остовы, такие как метилен(метилямино)-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).

e. Стереоспецифические олигонуклеотиды

[000266] 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.

h. Гэпмеры

[000267] 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. В некоторых вариантах осуществления гэпмерный олигонуклеотид содержит область комплементарности по меньшей мере 15 последовательным нуклеозидам (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или 20 последовательным нуклеозидам) целевой последовательности, приведенной в таблице 8

(например, любой из SEQ ID NO: 160-172), и/или содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеозидов (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или 20 последовательных нуклеозидов) нуклеотидной последовательности антисмысловой последовательности, гэтмерной последовательности или структуры ASO, приведенной в таблице 8 (например, любой из SEQ ID NO: 173-192), где каждое тиминовое основание (Т) независимо и необязательно можно заменять урациловым основанием (U), и каждое U независимо и необязательно можно заменять Т.

[000268] В некоторых вариантах осуществления область Y представляет собой смежный фрагмент нуклеотидов, например, область 6 или более нуклеотидов ДНК, способный рекрутировать РНКазу, такую как РНКазу Н. В некоторых вариантах осуществления гэтмер связывается с целевой нуклеиновой кислотой, где рекрутируется РНКазу, а затем может расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления область Y фланкирована по 5' и 3' областями X и Z, содержащими высокоаффинные модифицированные нуклеозиды, например, от одного до шести высокоаффинных модифицированных нуклеозидов. Неограничивающие примеры высокоаффинных модифицированных нуклеозидов включают 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-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, 5-12 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов.

[000269] В некоторых вариантах осуществления область пропуска гэтмерных олигонуклеотидов может содержать модифицированные нуклеотиды, как известно, подходящие для эффективного действия РНКазы Н, 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.

[000270] Гэпмер можно получать подходящими способами. Типичные патенты США, патентные публикации США и публикации PCT, в которых описано получение гэпмеров, включают, в качестве неограничивающих примеров, патенты США №№ 5013830; 5149797; 5220007; 5256775; 5366878; 5403711; 5491133; 5565350; 5623065; 5652355; 5652356; 5700922; 5898031; 7015315; 7101993; 7399845; 7432250; 7569686; 7683036; 7750131; 8580756; 9045754; 9428534; 9695418; 10017764; 10260069; 9428534; 8580756; патентные публикации США №№ US20050074801, US20090221685; US20090286969, US20100197762 и US20110112170; публикации PCT №№ WO2004069991; WO2005023825; WO2008049085 и WO2009090182; и патент EP № EP2149605, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000271] В некоторых вариантах осуществления гэпмер имеет длину 10-40 нуклеозидов. Например, гэпмер может иметь длину 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-40, 15-35, 15-30, 15-25, 15-20, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 25-40, 25-35, 25-30, 30-40, 30-35 или 35-40 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления гэпмер имеет длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеозидов.

[000272] 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-метилцитозинами. В некоторых вариантах осуществления каждый цитозин в области пропуска Y является 5-метилцитозином.

[000273] 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 гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') имеют разную длину. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') длиннее 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') короче 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3').

[000274] В некоторых вариантах осуществления гэнмер содержит 5'-X-Y-Z-3' 5-10-5, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 4-6-4, 3-6-3, 2-6-2, 4-7-4, 3-7-3, 2-7-2, 4-8-4, 3-8-3, 2-8-2, 1-8-1, 2-9-2, 1-9-1, 2-10-2, 1-10-1, 1-12-1, 1-16-1, 2-15-1, 1-15-2, 1-14-3, 3-14-1, 2-14-2, 1-13-4, 4-13-1, 2-13-3, 3-13-2, 1-12-5, 5-12-1, 2-12-4, 4-12-2, 3-12-3, 1-11-6, 6-11-1, 2-11-5, 5-11-2, 3-11-4, 4-11-3, 1-17-1, 2-16-1, 1-16-2, 1-15-3, 3-15-1, 2-15-2, 1-14-4, 4-14-1, 2-14-3, 3-14-2, 1-13-5, 5-13-1, 2-13-4, 4-13-2, 3-13-3, 1-12-6, 6-12-1, 2-12-5, 5-12-2, 3-12-4, 4-12-3, 1-11-7, 7-11-1, 2-11-6, 6-11-2, 3-11-5, 5-11-3, 4-11-4, 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 1-16-3, 1-16-3, 2-16-2, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-3, 3-15-2, 1-14-5, 5-14-1, 2-14-4, 4-14-2, 3-14-3, 1-13-6, 6-13-1, 2-13-5, 5-13-2, 3-13-4, 4-13-3, 1-12-7, 7-12-1, 2-12-6, 6-12-2, 3-12-5, 5-12-3, 1-11-8, 8-11-1, 2-11-7, 7-11-2, 3-11-6, 6-11-3, 4-11-5, 5-11-4, 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 1-16-3, 3-16-1, 2-16-2, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-3, 3-15-2, 1-14-5, 2-14-4, 4-14-2, 3-14-3, 1-13-6, 6-13-1, 2-13-5, 5-13-2, 3-13-4, 4-13-3, 1-12-7, 7-12-1, 2-12-6, 6-12-2, 3-12-5, 5-12-3, 1-11-8, 8-11-1, 2-11-7, 7-11-2, 3-11-6, 6-11-3, 4-11-5, 5-11-4, 1-19-1, 1-18-2, 2-18-1, 1-17-3, 3-17-1, 2-17-2, 1-16-4, 4-16-1, 2-16-3, 3-16-2, 1-15-5, 2-15-4, 4-15-2, 3-15-3, 1-14-6, 6-14-1, 2-14-5, 5-14-2, 3-14-4, 4-14-3, 1-13-7, 7-13-1, 2-13-6, 6-13-2, 3-13-5, 5-13-3, 4-13-4, 1-12-8, 8-12-1, 2-12-7, 7-12-2, 3-12-6, 6-12-3, 4-12-5, 5-12-4, 2-11-8, 8-11-2, 3-11-7, 7-11-3, 4-11-6, 6-11-4, 5-11-5, 1-20-1, 1-19-2, 2-19-1, 1-18-3, 3-18-1, 2-18-2, 1-17-4, 4-17-1, 2-17-3, 3-17-2, 1-16-5, 2-16-4, 4-16-2, 3-16-3, 1-15-6, 6-15-1, 2-15-5, 5-15-2, 3-15-4, 4-15-3, 1-14-7, 7-14-1, 2-14-6, 6-14-2, 3-14-5, 5-14-3, 4-14-4, 1-13-8, 8-13-1, 2-13-7, 7-13-2, 3-13-6, 6-13-3, 4-13-5, 5-13-4, 2-12-8, 8-12-2, 3-12-7, 7-12-3, 4-12-6, 6-12-4, 5-12-5, 3-11-8, 8-11-3, 4-11-7, 7-11-4, 5-11-6, 6-11-5, 1-21-1, 1-20-2, 2-20-1, 1-20-3, 3-19-1, 2-19-2, 1-18-4, 4-18-1, 2-18-3, 3-18-2, 1-17-5, 2-17-4, 4-17-2, 3-17-3, 1-16-6, 6-16-1, 2-16-5, 5-16-2, 3-16-4, 4-16-3, 1-15-7, 7-15-1, 2-15-6, 6-15-2, 3-15-5, 5-15-3, 4-15-4, 1-14-8, 8-14-1, 2-14-7, 7-14-2, 3-14-6, 6-14-3, 4-14-5, 5-14-4, 2-13-8, 8-13-2, 3-13-7, 7-13-3, 4-13-6, 6-13-4, 5-13-5, 1-12-10, 10-12-1, 2-12-9, 9-12-2, 3-12-8, 8-12-3, 4-12-7, 7-12-4, 5-12-6, 6-12-5, 4-11-8, 8-11-4, 5-11-7, 7-11-5, 6-11-6, 1-22-1, 1-21-2, 2-21-1, 1-21-3, 3-20-1, 2-20-2, 1-19-4, 4-19-1, 2-19-3, 3-19-2, 1-18-5, 2-18-4, 4-18-2, 3-18-3, 1-17-6, 6-17-1, 2-17-5, 5-17-2, 3-17-4, 4-17-3, 1-16-7, 7-16-1, 2-16-6, 6-16-2, 3-16-5, 5-16-3, 4-16-4, 1-15-8, 8-15-1, 2-15-7, 7-15-2, 3-15-6, 6-15-3, 4-15-5, 5-15-4, 2-14-8, 8-14-2, 3-14-7, 7-14-3, 4-14-6, 6-14-4, 5-14-5, 3-13-8, 8-13-3, 4-13-7, 7-13-4, 5-13-6, 6-13-5, 4-12-8, 8-12-4, 5-12-7, 7-12-5, 6-12-6, 5-11-8, 8-11-5, 6-11-7 или 7-11-6. Числами указано количество нуклеозидов в областях X, Y и Z в гэнмере 5'-X-Y-Z-3'.

[000275] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') или 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются модифицированными нуклеотидами (например, высокоаффинными модифицированными нуклеотидами). В некоторых

вариантах осуществления модифицированный нуклеозид (например, высокоаффинные модифицированные нуклеозиды) является 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом или 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'-О-Ме), 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-О-АP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-О-DMAEOE), или 2'-О-N-метилацетидами (2'-О-NMA) нуклеозидом).

[000276] В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеозидов в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами, и один или более нуклеозидов в 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются высокоаффинными модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом, и каждый нуклеозид в 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом.

[000277] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит те же высокоаффинные нуклеозиды, что и 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). Например, 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') могут содержать один или более небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме). В другом примере 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') могут содержать один или более 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланкирующей области гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланкирующей области гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является небициклическим 2'-

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

[000278] 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 и Z является небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), 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 и Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область 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 небциклических 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'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В другом примере 3'-фланкирующая область гэнмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может содержать один или более небциклических 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'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt).

[000279] 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 небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), каждый нуклеозид в Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 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'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), каждый нуклеозид в Z является небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[000280] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланкирующая область гэнмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') содержит один или более небциклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или более 2'-4'-

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

[000281] 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 (самым близким к 5' положением является положение 1) является небициклическим 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 небициклическим 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 небициклическим 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.

[000282] Неограничивающие примеры конфигураций гэпмеров со смесью небициклического 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-BBBAА; KKK-(D)n-KKKAA; LLL-(D)n-LLLAA; BBB-(D)n-BBBEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBBAА; KKK-(D)n-KKKAA; LLL-(D)n-LLLAA; BBB-(D)n-BBBEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBBAАА; KKK-(D)n-KKKAAA; LLL-(D)n-LLLAAA; BBB-(D)n-BBBEEE; KKK-

(D)n-KKKEEE; LLL-(D)n-LLLEEE; BBB-(D)n-BBBAAA; KKK-(D)n-KKKAAA; LLL-(D)n-LLLAAA; BBB-(D)n-BBBEEE; KKK-(D)n-KKKEEE; LLL-(D)n-LLLEEE; BABA-(D)n-ABAB; KAKA-(D)n-AKAK; LALA-(D)n-ALAL; BEBE-(D)n-EBEB; KEKE-(D)n-EKEK; LELE-(D)n-ELEL; BABA-(D)n-ABAB; KAKA-(D)n-AKAK; LALA-(D)n-ALAL; BEBE-(D)n-EBEB; KEKE-(D)n-EKEK; LELE-(D)n-ELEL; ABAB-(D)n-ABAB; AKAK-(D)n-AKAK; ALAL-(D)n-ALAL; EBEB-(D)n-EBEB; EKEK-(D)n-EKEK; ELEL-(D)n-ELEL; ABAB-(D)n-ABAB; AKAK-(D)n-AKAK; ALAL-(D)n-ALAL; EBEB-(D)n-EBEB; EKEK-(D)n-EKEK; ELEL-(D)n-ELEL; AABB-(D)n-BBAA; BBAA-(D)n-AABB; AAKK-(D)n-KKAA; AALL-(D)n-LLAA; EEBB-(D)n-BBEE; EEKK-(D)n-KKEE; EELL-(D)n-LLEE; AABB-(D)n-BBAA; AAKK-(D)n-KKAA; AALL-(D)n-LLAA; EEBB-(D)n-BBEE; EEKK-(D)n-KKEE; EELL-(D)n-LLEE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE; ABBB-(D)n-BBBA; AKKK-(D)n-KKKA; ALLL-(D)n-LLLA; EBBB-(D)n-BBBE; EKKK-(D)n-KKKE; ELLL-(D)n-LLLE; ABBB-(D)n-BBBA; AKKK-(D)n-KKKA; ALLL-(D)n-LLLA; EBBB-(D)n-BBBE; EKKK-(D)n-KKKE; ELLL-(D)n-LLLE; ABBB-(D)n-BBBAA; AKKK-(D)n-KKKAA; ALLL-(D)n-LLLAA; EBBB-(D)n-BBBEE; EKKK-(D)n-KKKEE; ELLL-(D)n-LLLEE; ABBB-(D)n-BBBAA; AKKK-(D)n-KKKAA; ALLL-(D)n-LLLAA; EBBB-(D)n-BBBEE; EKKK-(D)n-KKKEE; ELLL-(D)n-LLLEE; ABBBB-(D)n-BBB; AAKKK-(D)n-KKK; AALLL-(D)n-LLL; EEBBB-(D)n-BBB; EEKKK-(D)n-KKK; EELLL-(D)n-LLL; ABBBB-(D)n-BBBA; AAKKK-(D)n-KKKA; AALLL-(D)n-LLLA; EEBBB-(D)n-BBBE; EEKKK-(D)n-KKKE; EELLL-(D)n-LLLE; ABBAABB-(D)n-BB; AKKAAKK-(D)n-KK; ALLAALLL-(D)n-LL; EBBEEBB-(D)n-BB; EKKEEKK-(D)n-KK; ELLEELL-(D)n-LL; ABBAABB-(D)n-BB; AKKAAKK-(D)n-KK; ALLAALLL-(D)n-LL; EBBEEBB-(D)n-BB; EKKEEKK-(D)n-KK; ELLEELL-(D)n-LL; ABBABB-(D)n-BBB; AKKAKK-(D)n-KKK; ALLALLL-(D)n-LLL; EBBEBB-(D)n-BBB; EKKEKK-(D)n-KKK; ELLELL-(D)n-LLL; ABBABB-(D)n-BBB; AKKAKK-(D)n-KKK; ALLALLL-(D)n-LLL; EBBEBB-(D)n-BBB; EKKEKK-(D)n-KKK; ELLELL-(D)n-LLL; EEEK-(D)n-EEEEEEEEE; EEK-(D)n-EEEEEEEEE; EK-(D)n-EEEEEEEEE; EK-(D)n-EEEKK; K-(D)n-EEEEKEKE; K-(D)n-EEEEKEKEE; K-(D)n-EEKEK; EK-(D)n-EEEEKEKE; EK-(D)n-EEKEK; EEK-(D)n-KEEKEE; EK-(D)n-EEKEK; EK-(D)n-KEEK; EEK-(D)n-EEKEK; EK-(D)n-KEEKEE; EK-(D)n-EEKEKE; EK-(D)n-EEKEKE; и EK-(D)n-EEEEKEK; где "A" представляет собой 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.

[000283] 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.

[000284] Неограничивающие примеры DMPK-специфических олигонуклеотидов приведены в таблице 8.

Таблица 8. Примеры DMPK-специфических олигонуклеотидов (ASO)

ID ASO	Целевая последовательность (5'-3')	Антисмысловая последовательность (5'-3')	Последовательность гэтамера (5'-3')	Конфигурация гэтамера*	Структура ASO**, [†] (5'-3')	Структура ASO, конъюгированная с NH ₂ -(CH ₂) ₆ на 5'-конце (5'-3')
ASO 1	GGGCA GACGC CCTTCT ACGC (SEQ ID NO: 160)	GCGUA GAAGG GCGUC UGCCC (SEQ ID NO: 173)	GCGUA GAAGG GCGTC UGCCC (SEQ ID NO: 185)	EEEE-(D) ₁₀ - EEEE Полный PS-остов	ASO 1 (SEQ ID NO: 185) oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC	ASO 1 (SEQ ID NO: 185) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC
ASO 2	TGTGA CTGGT GGGCG CTGGG (SEQ ID NO: 161)	CCCAG CGCCC ACCAG UCACA (SEQ ID NO: 174)	CCCAG CGCCC ACCAG UCACA (SEQ ID NO: 174)	EEEE-(D) ₁₀ - EEEE Полный PS-остов	ASO 2 (SEQ ID NO: 174) oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA	ASO 2 (SEQ ID NO: 174) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA

ASO 3	GCGGA TTCCG GCCGA GATGG (SEQ ID NO: 162)	CCAUC UCGGC CGGAA UCCGC (SEQ ID NO: 175)	CCAUC TCGGC CGGAA UCCGC (SEQ ID NO: 186)	EEEE-(D) ₁₀ - EEEE Полный PS- остов	ASO 3 (SEQ ID NO: 186) oC*oC*oA*oU*o C*dT*xdC*dG*d G*dC*xdC*dG*d G*dA*dA*oU*oC *oC*oG*oC	ASO 3 (SEQ ID NO: 186) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oC*oC*oA*oU*oC* dT*xdC*dG*dG*dC *xdC*dG*dG*dA*d A*oU*oC*oC*oG*o C
ASO 4	GCAGA CGCCC TTCTAC (SEQ ID NO: 163)	GUAGA AGGGC GUCUG C (SEQ ID NO: 176)	GUAGA AGGGC GTCUG C (SEQ ID NO: 187)	LLL-(D) ₁₀ - LLL Полный PS- остов	ASO 4 (SEQ ID NO: 187) +G*+U*+A*dG*d A*dA*dG*dG*dG *xdC*dG*dT*dC *+U*+G*+C	ASO 4 (SEQ ID NO: 187) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +G*+U*+A*dG*dA *dA*dG*dG*dG*xd C*dG*dT*dC*+U*+ G*+C
ASO 5	GCAGA CGCCC TTCTAC (SEQ ID NO: 163)	GUAGA AGGGC GUCUG C (SEQ ID NO: 176)	GUAGA AGGGC GTCUG C (SEQ ID NO: 187)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS- остов	ASO 5 (SEQ ID NO: 187) +G*+U*oA*oG*d A*dA*dG*dG*dG *xdC*dG*dT*oC *oU*+G*+C	ASO 5 (SEQ ID NO: 187) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +G*+U*oA*oG*dA* dA*dG*dG*dG*xdC *dG*dT*oC*oU*+G *+C
ASO 6	CAGAC GCCCT TCTAC G (SEQ ID NO: 164)	CGUAG AAGGG CGUCU G (SEQ ID NO: 177)	CGUAG AAGGG CGUCU G (SEQ ID NO: 177)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS- остов	ASO 6 (SEQ ID NO: 177) +C*+G*oU*oA*d G*dA*dA*dG*dG *dG*xdC*dG*oU *oC*+U*+G	ASO 6 (SEQ ID NO: 177) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +C*+G*oU*oA*dG* dA*dA*dG*dG*dG* xdC*dG*oU*oC*+U *+G

ASO 7	GGCAG ACGCC CTTCTA (SEQ ID NO: 165)	UAGAA GGGCG UCUGC C (SEQ ID NO: 178)	UAGAA GGGCG TCUGC C (SEQ ID NO: 188)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS- остов	ASO 7 (SEQ ID NO: 188) +U*+A*oG*oA*d A*dG*dG*dG*xd C*dG*dT*dC*oU *oG*+C*+C	ASO 7 (SEQ ID NO: 188) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +U*+A*oG*oA*dA* dG*dG*dG*xdC*dG *dT*dC*oU*oG*+C *+C
ASO 8	TGACT GGTGG GCGCT G (SEQ ID NO: 166)	CAGCG CCCAC CAGUC A (SEQ ID NO: 179)	CAGCG CCCAC CAGUC A (SEQ ID NO: 179)	LLL-(D) ₁₀ - LLL Полный PS- остов	ASO 8 (SEQ ID NO: 179) +C*+A*+G*xdC* dG*dC*dC*dC*d A*dC*dC*dA*dG *+U*+C*+A	ASO 8 (SEQ ID NO: 179) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +C*+A*+G*xdC*dG *dC*dC*dC*dA*dC *dC*dA*dG*+U*+C *+A
ASO 9	GACTG GTGGG CGCTG G (SEQ ID NO: 167)	CCAGC GCCCA CCAGU C (SEQ ID NO: 180)	CCAGC GCCCA CCAGU C (SEQ ID NO: 180)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS- остов	ASO 9 (SEQ ID NO: 180) +C*+C*oA*oG*x dC*dG*dC*dC*d C*dA*dC*dC*oA *oG*+U*+C	ASO 9 (SEQ ID NO: 180) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +C*+C*oA*oG*xdC *dG*dC*dC*dC*dA *dC*dC*oA*oG*+U *+C
ASO 10	TGACT GGTGG GCGCT G (SEQ ID NO: 166)	CAGCG CCCAC CAGUC A (SEQ ID NO: 179)	CAGCG CCCAC CAGUC A (SEQ ID NO: 179)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS- остов	ASO 10 (SEQ ID NO: 179) +C*+A*oG*oC*d G*dC*dC*dC*dA *dC*dC*dA*oG* oU*+C*+A	ASO 10 (SEQ ID NO: 179) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +C*+A*oG*oC*dG* dC*dC*dC*dA*dC* dC*dA*oG*oU*+C* +A

ASO 11	GTGAC TGGTG GGCGC T (SEQ ID NO: 168)	AGCGC CCACC AGUCA C (SEQ ID NO: 181)	AGCGC CCACC AGUCA C (SEQ ID NO: 181)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS- остов	ASO 11 (SEQ ID NO: 181) +A*+G*oC*oG*d C*dC*dC*dA*dC *dC*dA*dG*oU* oC*+A*+C	ASO 11 (SEQ ID NO: 181) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +A*+G*oC*oG*dC* dC*dC*dA*dC*dC* dA*dG*oU*oC*+A* +C (SEQ ID NO: 181)
ASO 12	GGATT CCGGC CGAGA T (SEQ ID NO: 169)	AUCUC GGCCG GAAUC C (SEQ ID NO: 182)	AUCTC GGCCG GAAUC C (SEQ ID NO: 189)	LLL-(D) ₁₀ - LLL Полный PS- остов	ASO 12 (SEQ ID NO: 189) +A*+U*+C*dT*x dC*dG*dG*dC*x dC*dG*dG*dA*d A*+U*+C*+C	ASO 12 (SEQ ID NO: 189) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +A*+U*+C*dT*xdC *dG*dG*dC*xdC*d G*dG*dA*dA*+U*+ C*+C
ASO 13	GATTC CGGCC GAGAT G (SEQ ID NO: 170)	CAUCU CGGCC GGAAU C (SEQ ID NO: 183)	CAUCT CGGCC GGAAU C (SEQ ID NO: 190)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS- остов	ASO 13 (SEQ ID NO: 190) +C*+A*oU*oC*d T*xdC*dG*dG*d C*xdC*dG*dG*o A*oA*+U*+C	ASO 13 (SEQ ID NO: 190) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +C*+A*oU*oC*dT* xdC*dG*dG*dC*xd C*dG*dG*oA*oA*+ U*+C
ASO 14	GGATT CCGGC CGAGA T (SEQ ID NO: 169)	AUCUC GGCCG GAAUC C (SEQ ID NO: 182)	AUCUC GGCCG GAAUC C (SEQ ID NO: 182)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS- остов	ASO 14 (SEQ ID NO: 182) +A*+U*oC*oU*x dC*dG*dG*dC*x dC*dG*dG*dA*o A*oU*+C*+C	ASO 14 (SEQ ID NO: 182) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +A*+U*oC*oU*xdC *dG*dG*dC*xdC*d G*dG*dA*oA*oU*+ C*+C

ASO 15	CGGAT TCCGG CCGAG A (SEQ ID NO: 171)	UCUCG GCCGG AAUCC G (SEQ ID NO: 184)	UCUCG GCCGG AAUCC G (SEQ ID NO: 184)	LLEE-(D) ₈ - EELL Полный PS-остов	ASO 15 (SEQ ID NO: 184) +U*+C*oU*oC*d G*dG*dC*xdC*d G*dG*dA*dA*oU *oC*+C*+G	ASO 15 (SEQ ID NO: 184) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +U*+C*oU*oC*dG* dG*dC*xdC*dG*dG *dA*dA*oU*oC*+C *+G
ASO 16	GCAGA CGCCC TTCTAC (SEQ ID NO: 163)	GUAGA AGGGC GUCUG C (SEQ ID NO: 176)	GUAGA AGGGC GTCUG C (SEQ ID NO: 187)	EEE-(D) ₁₀ - EEE Полный PS-остов	ASO 16 (SEQ ID NO: 187) oG*oU*oA*dG*d A*dA*dG*dG*dG *xdC*dG*dT*dC *oU*oG*oC	ASO 16 (SEQ ID NO: 187) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oG*oU*oA*dG*dA* dA*dG*dG*dG*xdC *dG*dT*dC*oU*oG *oC
ASO 17	TGACT GGTGG GCGCT G (SEQ ID NO: 166)	CAGCG CCCAC CAGUC A (SEQ ID NO: 179)	CAGCG CCCAC CAGUC A (SEQ ID NO: 179)	EEE-(D) ₁₀ - EEE Полный PS-остов	ASO 17 (SEQ ID NO: 179) oC*oA*oG*xdC* dG*dC*dC*dC*d A*dC*dC*dA*dG *oU*oC*oA	ASO 17 (SEQ ID NO: 179) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oC*oA*oG*xdC*dG *dC*dC*dC*dA*dC *dC*dA*dG*oU*oC *oA
ASO 18	GGATT CCGGC CGAGA T (SEQ ID NO: 169)	AUCUC GGCCG GAAUC C (SEQ ID NO: 182)	AUCTC GGCCG GAAUC C (SEQ ID NO: 189)	EEE-(D) ₁₀ - EEE Полный PS-остов	ASO 18 (SEQ ID NO: 189) oA*oU*oC*dT*x dC*dG*dG*dC*x dC*dG*dG*dA*d A*oU*oC*oC	ASO 18 (SEQ ID NO: 189) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oA*oU*oC*dT*xdC *dG*dG*dC*xdC*d G*dG*dA*dA*oU*o C*oC
ASO 19	GGGCA GACGC CCTTCT ACGC (SEQ ID NO: 160)	GCGUA GAAGG GCGUC UGCCC (SEQ ID NO: 173)	GCGUA GAAGG GCGTC UGCCC (SEQ ID NO: 185)	LLEEE-(D) ₁₀ - EEELL Полный PS-остов	ASO 19 (SEQ ID NO: 185) +G*+C*oG*oU*o A*dG*dA*dA*dG *dG*dG*xdC*dG *dT*dC*oU*oG* oC*+C*+C	ASO 19 (SEQ ID NO: 185) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +G*+C*oG*oU*oA* dG*dA*dA*dG*dG* dG*xdC*dG*dT*dC *oU*oG*oC*+C*+C

ASO 20	TGTGA CTGGT GGGCG CTGGG (SEQ ID NO: 161)	CCCAG CGCCC ACCAG UCACA (SEQ ID NO: 174)	CCCAG CGCCC ACCAG UCACA (SEQ ID NO: 174)	LLEEE- (D) ₁₀ - EEELL Полный PS- остов	ASO 20 (SEQ ID NO: 174) +C*+C*oC*oA*o G*xdC*dG*dC*d C*dC*dA*dC*dC *dA*dG*oU*oC* oA*+C*+A	ASO 20 (SEQ ID NO: 174) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +C*+C*oC*oA*oG* xdC*dG*dC*dC*dC *dA*dC*dC*dA*dG *oU*oC*oA*+C*+A
ASO 21	GCGGA TTCCG GCCGA GATGG (SEQ ID NO: 162)	CCAUC UCGGC CGGAA UCCGC (SEQ ID NO: 175)	CCAUC TCGGC CGGAA UCCGC (SEQ ID NO: 186)	LLEEE- (D) ₁₀ - EEELL Полный PS- остов	ASO 21 (SEQ ID NO: 186) +C*+C*oA*oU*o C*dT*xdC*dG*d G*dC*xdC*dG*d G*dA*dA*oU*oC *oC*+G*+C	ASO 21 (SEQ ID NO: 186) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +C*+C*oA*oU*oC* dT*xdC*dG*dG*dC *xdC*dG*dG*dA*d A*oU*oC*oC*+G*+ C
ASO 22	GGGCA GACGC CCTTCT ACGC (SEQ ID NO: 160)	GCGUA GAAGG GCGUC UGCCC (SEQ ID NO: 173)	GCGUA GAAGG GCGTC UGCCC (SEQ ID NO: 185)	EEEE- (D) ₁₀ - EEEE Смесь PS/PO во фланкирую щих областях	ASO 22 (SEQ ID NO: 185) oG*oCoG*oUoA* dG*dA*dA*dG*d G*dG*xdC*dG*d T*dC*oUoG*oCo C*oC	ASO 22 (SEQ ID NO: 185) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oG*oCoG*oUoA*dG *dA*dA*dG*dG*dG *xdC*dG*dT*dC*o UoG*oCoC*oC
ASO 23	TGTGA CTGGT GGGCG CTGGG (SEQ ID NO: 161)	CCCAG CGCCC ACCAG UCACA (SEQ ID NO: 174)	CCCAG CGCCC ACCAG UCACA (SEQ ID NO: 174)	EEEE- (D) ₁₀ - EEEE Смесь PS/PO во фланкирую щих областях	ASO 23 (SEQ ID NO: 174) oC*oCoC*oAoG* xdC*dG*dC*dC* dC*dA*dC*dC*d A*dG*oUoC*oAo C*oA	ASO 23 (SEQ ID NO: 174) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oC*oCoC*oAoG*xd C*dG*dC*dC*dC*d A*dC*dC*dA*dG*o UoC*oAoC*oA

ASO 24	GCGGA TTCCG GCCGA GATGG (SEQ ID NO: 162)	CCAUC UCGGC CGGAA UCCGC (SEQ ID NO: 175)	CCAUC TCGGC CGGAA UCCGC (SEQ ID NO: 186)	EEEEE- (D) ₁₀ - EEEEE Смесь PS/PO во фланкирую щих областях	ASO 24 (SEQ ID NO: 186) oC*oCoA*oUoC* dT*xC*dG*dG* dC*xC*dG*dG* dA*dA*oUoC*oC oG*oC	ASO 24 (SEQ ID NO: 186) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oC*oCoA*oUoC*dT *xC*dG*dG*dC*xd C*dG*dG*dA*dA*o UoC*oCoG*oC
ASO 25	GGGCA GACGC CCTTCT ACGC (SEQ ID NO: 160)	GCGUA GAAGG GCGUC UGCCC (SEQ ID NO: 173)	GCGUA GAAGG GCGTC UGCCC (SEQ ID NO: 185)	EEEEE- (D) ₁₀ - EEEEE Смесь PS/PO во фланкирую щих областях	ASO 25 (SEQ ID NO: 185) oG*oCoGoUoA*d G*dA*dA*dG*dG *dG*xC*dG*dT *dC*oUoGoCoC* oC	ASO 25 (SEQ ID NO: 185) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oG*oCoGoUoA*dG* dA*dA*dG*dG*dG* xC*dG*dT*dC*oU oGoCoC*oC
ASO 26	TGTGA CTGGT GGGCG CTGGG (SEQ ID NO: 161)	CCCAG CGCCC ACCAG UCACA (SEQ ID NO: 174)	CCCAG CGCCC ACCAG UCACA (SEQ ID NO: 174)	EEEEE- (D) ₁₀ - EEEEE Смесь PS/PO во фланкирую щих областях	ASO 26 (SEQ ID NO: 174) oC*oCoCoAoG*x dC*dG*dC*dC*d C*dA*dC*dC*dA *dG*oUoCoAoC* oA	ASO 26 (SEQ ID NO: 174) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oC*oCoCoAoG*xC *dG*dC*dC*dC*dA *dC*dC*dA*dG*oU oCoAoC*oA
ASO 27	GCGGA TTCCG GCCGA GATGG (SEQ ID NO: 162)	CCAUC UCGGC CGGAA UCCGC (SEQ ID NO: 175)	CCAUC TCGGC CGGAA UCCGC (SEQ ID NO: 186)	EEEEE- (D) ₁₀ - EEEEE Смесь PS/PO во фланкирую щих областях	ASO 27 (SEQ ID NO: 186) oC*oCoAoUoC*d T*xC*dG*dG*d C*xC*dG*dG*d A*dA*oUoCoCo G*oC	ASO 27 (SEQ ID NO: 186) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oC*oCoAoUoC*dT* xC*dG*dG*dC*xd C*dG*dG*dA*dA*o UoCoCoG*oC

ASO 28	GGCAG ACGCC CTTCTA CGC (SEQ ID NO: 202)	GCGUA GAAGG GCGUC UGCC (SEQ ID NO: 203)	GCGUA GAAGG GCGTC UGCC (SEQ ID NO: 191)	EEEE- (D) ₁₀ -EEEE Смесь PS/PO во фланкирую щих областях	ASO 28 (SEQ ID NO: 191) oGoC*oGoU*oAd G*dA*dA*dG*dG *dG*xdC*dG*dT *dC*oUoG*oCoC	ASO 28 (SEQ ID NO: 191) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oGoC*oGoU*oAdG* dA*dA*dG*dG*dG* xdC*dG*dT*dC*oU oG*oCoC
ASO 29	CAGAC GCCCT TCTAC GC (SEQ ID NO: 172)	GCGUA GAAGG GCGUC UG (SEQ ID NO: 204)	GCGUA GAAGG GCGTC UG (SEQ ID NO: 192)	EEEE- (D) ₁₀ -EE Смесь PS/PO во фланкирую щих областях	ASO 29 (SEQ ID NO: 192) oGoC*oGoU*oAd G*dA*dA*dG*dG *dG*xdC*dG*dT *dC*oU*oG	ASO 29 (SEQ ID NO: 192) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oGoC*oGoU*oAdG* dA*dA*dG*dG*dG* xdC*dG*dT*dC*oU *oG
ASO 30	TTCCTC GGTAT TTATTG TCT (SEQ ID NO: 193)	AGACA AUAAA UACCG AGGAA (SEQ ID NO: 196)	AGACA ATAAA TACCG AGGAA (SEQ ID NO: 199)	EEEE- (D) ₁₀ - EEEE Полный PS- остов	ASO 30 (SEQ ID NO: 199) oA*oG*oA*oC*o A*dA*dT*dA*dA *dA*dT*dA*xdC *xdC*dG*oA*oG *oG*oA*oA	ASO 30 (SEQ ID NO: 199) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oA*oG*oA*oC*oA* dA*dT*dA*dA*dA* dT*dA*xdC*xdC*d G*oA*oG*oG*oA*o A
ASO 31	TTCCTC GGTAT TTATTG TCT (SEQ ID NO: 193)	AGACA AUAAA UACCG AGGAA (SEQ ID NO: 196)	AGACA ATAAA TACCG AGGAA (SEQ ID NO: 199)	LLEEE- (D) ₁₀ - EEELL Полный PS- остов	ASO 31 (SEQ ID NO: 199) +A*+G*oA*oC*o A*dA*dT*dA*dA *dA*dT*dA*xdC *xdC*dG*oA*oG *oG*+A*+A	ASO 31 (SEQ ID NO: 199) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - +A*+G*oA*oC*oA* dA*dT*dA*dA*dA* dT*dA*xdC*xdC*d G*oA*oG*oG*+A*+ A

ASO 32	CCTCG GTATTT ATTGTT (SEQ ID NO: 194)	AACAA UAAAU ACCGA GG (SEQ ID NO: 197)	AACAA TAAAT ACCGA GG (SEQ ID NO: 200)	DLLL-(D) ₁₀ - LLL Полный PS-остов	ASO 32 (SEQ ID NO: 200) dA*+A*+C*+A*d A*dT*dA*dA*dA *dT*dA*xdC*xd C*dG*+A*+G*+ G	ASO 32 (SEQ ID NO: 200) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - dA*+A*+C*+A*dA* dT*dA*dA*dA*dT* dA*xdC*xdC*dG*+ A*+G*+G
ASO 33	CCTCG GTATTT ATTGT (SEQ ID NO: 195)	ACAAU AAAUA CCGAG G (SEQ ID NO: 198)	ACAAT AAATA CCGAG G (SEQ ID NO: 201)	EEE-(D) ₁₀ - EEE Полный PS-остов	ASO 33 (SEQ ID NO: 201) oA*oC*oA*dA*d T*dA*dA*dA*dT *dA*xdC*xdC*d G*oA*oG*oG	ASO 33 (SEQ ID NO: 201) NH ₂ -(CH ₂) ₆ - oA*oC*oA*dA*dT* dA*dA*dA*dT*dA* xdC*xdC*dG*oA*o G*oG

*"E" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "L" является нуклеозидом ЗНК; "D" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "10" или "8" является количеством 2'-дезоксирибонуклеозидов в Y; "PS" является фосфотиоатной межнуклеозидной связью; и "PO" является фосфодиэфирной межнуклеозидной связью

** "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C" является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU" является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную связь; отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь; и связь между NH₂-(CH₂)₆- и 5'-концевым нуклеозидом, необязательно, является фосфодиэфирной связью.

† Каждое тиминное основание (T) в любой из последовательностей и/или структур, приведенных в таблице 8, независимо и необязательно можно заменять урациловым основанием (U), и каждый U независимо и необязательно можно заменять T. Целевые последовательности, приведенные в таблице 8, содержат T, но предусмотрено связывание DMPK-специфического олигонуклеотида с РНК и/или ДНК.

[000285] В некоторых вариантах осуществления DMPK-специфический олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, имеет длину 15-20 нуклеозидов (например, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеозидов), содержит область комплементарности по меньшей мере 15 последовательным нуклеозидам (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или 20 последовательным нуклеозидам) любой из SEQ ID NO: 160-172 и 193-195 и содержит

конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X содержит 3-5 (например, 3, 4 или 5) связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в X является 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ модифицированным нуклеозидом, 2'-О-Ме-модифицированным нуклеозидом, ЗНК, сEt или ENA); Y содержит 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) связанных 2'-дезоксирибонуклеозидов, где каждый цитозин в Y необязательно и независимо является 5-метилцитозином; и Z содержит 3-5 (например, 3, 4 или 5) связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ модифицированным нуклеозидом, 2'-О-Ме-модифицированным нуклеозидом, ЗНК, сEt или ENA).

[000286] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеозидов (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или 20 последовательных нуклеозидов) из нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 174, 177, 179-182 и 184-192 и содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X содержит 3-5 (например, 3, 4 или 5) связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в X является 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом, 2'-О-Ме-модифицированным нуклеозидом, ЗНК, сEt или ENA); Y содержит 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) связанных 2'-дезоксирибонуклеозидов, где каждый цитозин в Y необязательно и независимо является 5-метилцитозином; и Z содержит 3-5 (например, 3, 4 или 5) связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом, 2'-О-Ме-модифицированным нуклеозидом, ЗНК, сEt или ENA). В некоторых вариантах осуществления каждое тиминное основание (T) нуклеотидной последовательности антисмыслового олигонуклеотида независимо и необязательно можно заменять урациловым основанием (U), и каждый U независимо и необязательно можно заменять T.

[000287] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 174, 177, 179-182 и 184-192 и содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X содержит 3-5 (например, 3, 4, или 5) связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в X является 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом, 2'-О-Ме-модифицированным нуклеозидом, ЗНК, сEt или ENA); Y содержит 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) связанных 2'-дезоксирибонуклеозидов, где каждый цитозин в Y необязательно и независимо является 5-метилцитозином; и Z содержит 3-5 (например, 3, 4 или 5) связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом, 2'-О-Ме-модифицированным нуклеозидом, ЗНК, сEt или ENA). В некоторых вариантах осуществления каждое тиминное основание (T) нуклеотидной последовательности антисмыслового олигонуклеотида независимо и необязательно можно заменять урациловым основанием (U), и каждый U независимо и необязательно можно заменять T.

[000288] В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в X является 2'-модифицированным нуклеозидом, и/или (например, и) каждый нуклеозид в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК, сEt или ENA) или небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом или 2'-О-Ме-модифицированным нуклеозидом).

[000289] В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в X является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ модифицированным нуклеозидом), и/или (например, и) каждый нуклеозид в Z является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в X является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК, сEt или ENA), и/или (например, и) каждый нуклеозид в Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК, сEt или ENA).

[000290] В некоторых вариантах осуществления X содержит по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид (например, ЗНК, сEt или ENA) и по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид, например, 2'-МОЕ-модифицированный нуклеозид или 2'-О-Ме-модифицированный нуклеозид, и/или (например, и) Z содержит по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид (например, ЗНК, сEt или ENA) и по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид (например, 2'-МОЕ модифицированный нуклеозид или 2'-О-Ме-модифицированный нуклеозид).

[000291] В некоторых вариантах осуществления DMPK-специфический олигонуклеотид содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в DMPK-специфическом олигонуклеотиде является фосфотиоатной межнуклеозидной связью. В некоторых вариантах осуществления DMPK-специфический олигонуклеотид содержит одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей, необязательно, где фосфодиэфирные межнуклеозидные связи находятся в X и/или Z. В некоторых вариантах осуществления DMPK-специфический олигонуклеотид содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей и одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления DMPK-специфический олигонуклеотид содержит 1 фосфодиэфирную межнуклеозидную связь (PO), 2 PO, 3 PO, 4 PO, 5 PO, 6 PO, 7 PO, 8 PO, 9 PO, 10 PO, 11 PO, 12 PO, 13 PO, 14 PO, 15 PO, 16 PO, 17 PO, 18 PO, 19 PO, 20 PO, 21 PO, 22 PO, 23 PO, 24 PO, 25 PO, 26 PO, 27 PO, 28 PO или 29 PO, и остальные межнуклеозидные связи являются фосфотиоатными межнуклеозидными связями (PS). Например, 20-нуклеотидный DMPK-специфический олигонуклеотид может содержать 1 PO и 18 PS, 2 PO и 17 PS, 3 PO и 16 PS, 4 PO и 15 PS, 5 PO и 14 PS, 6 PO и 13 PS, 7 PO и 12 PS, 8 PO и 11 PS, 9 PO и 10 PS, 10 PO и 9 PS, 11 PO и 8 PS, 12 PO и 7 PS, 13

PO и 6 PS, 14 PO и 5 PS, 15 PO и 4 PS, 16 PO и 3 PS, 17 PO и 2 PS или 18 PO и 1 PS. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в области пропуска Y является фосфотиоатной межнуклеозидной связью, X содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей и одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей, и Z содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей и одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в области пропуска Y является фосфотиоатной межнуклеозидной связью, каждая межнуклеозидная связь в X является фосфотиоатной межнуклеозидной связью, и Z содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей и одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в области пропуска Y является фосфотиоатной межнуклеозидной связью, X содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей и одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей, и каждая межнуклеозидная связь в Z является фосфотиоатной межнуклеозидной связью. Например, DMPK-специфический олигонуклеотид может содержать/содержат фланкирующие области X и Z, имеющие смешанные фосфодиэфирные/фосфотиоатные остовы, и область пропуска Y, имеющую полностью фосфотиоатный остов, или может содержать одну фланкирующую область (т.е. X или Z), имеющую смешанный фосфодиэфирный/фосфотиоатный остов, другую фланкирующую область, имеющую полностью фосфотиоатный остов, и область пропуска Y, имеющую полностью фосфотиоатный остов. В некоторых вариантах осуществления область пропуска Y содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей и одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей и фланкирующих областей X и Y, каждая из которых независимо имеет полностью фосфотиоатный остов или содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей и одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей. Например, DMPK-специфический олигонуклеотид может содержать фланкирующие области X и Z, имеющие смешанные фосфодиэфирные/фосфотиоатные остовы, и область пропуска Y, имеющую смешанный фосфодиэфирный/фосфотиоатный остов.

[000292] В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид имеет формулу: $(L)_{X1}(E)_{X2}(L)_{X3}(D)_{X4}(L)_{X5}(E)_{X6}(L)_{X7}$:

где каждый (L) является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом,

где каждый (E) является небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом,

где каждый (D) является 2'-дезоксирибонуклеозидом,

где X1 независимо представляет собой целое число от 0 до 5, представляющее количество случаев соответствующего L,

где X2 независимо представляет собой целое число от 0 до 5, представляющее количество случаев соответствующего E,

где X3 независимо представляет собой целое число от 0 до 5, представляющее количество случаев соответствующего L,

где X4 независимо представляет собой целое число от 5 до 12, представляющее количество случаев D,

где X5 независимо представляет собой целое число от 0 до 5, представляющее количество случаев соответствующего L,

где X6 независимо представляет собой целое число от 0 до 5, представляющее количество случаев соответствующего E,

где X7 независимо представляет собой целое число от 0 до 5, представляющее количество случаев соответствующего L, и

где, по меньшей мере один из X1, X2 и X3 находится в диапазоне от 1 до 5, и по меньшей мере один из X5, X6 и X7 находится в диапазоне от 1 до 5.

[000293] В некоторых вариантах осуществления каждый из X1, X3, X5 и X7 является 0, и X2 и X6 независимо представляют собой 1, 2, 3, 4 или 5.

[000294] В некоторых вариантах осуществления каждый из X1, X2, X5 и X6 является 0, и X3 и X7 независимо представляют собой 1, 2, 3, 4 или 5.

[000295] В некоторых вариантах осуществления каждый из X3 и X5 является 0, и X1, X2, X6 и X7 независимо представляют собой 1, 2, 3, 4 или 5.

[000296] В некоторых вариантах осуществления каждый из X1 и X7 является 0, и X2, X3, X5 и X6 независимо представляют собой 1, 2, 3, 4 или 5.

[000297] В некоторых вариантах осуществления X4 является 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

[000298] В некоторых вариантах осуществления 2'-4'-бициклический нуклеозид выбран из нуклеозидов ЗНК, сEt и ENA. В некоторых вариантах осуществления небциклический 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом или 2'-ОМе-модифицированным нуклеозидом.

[000299] В некоторых вариантах осуществления нуклеозиды олигонуклеотидов соединены фосфотиоатными межнуклеозидными связями, фосфодиэфирными межнуклеозидными связями или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит только фосфотиоатные межнуклеозидные связи, соединяющие каждый нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит смесь фосфотиоатных и фосфодиэфирных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит только фосфотиоатные межнуклеозидные связи, соединяющие каждую пару 2'-дезоксирибонуклеозидов и смесь фосфотиоатных и фосфодиэфирных межнуклеозидных связей, соединяющих остальные нуклеозиды.

[000300] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3':

X	Y	Z
EEEE	(D) ₁₀	EEEE,
EEE	(D) ₁₀	EEE,

EEEE	(D) ₁₀	EEEE,
EEEE	(D) ₁₀	EE,
LLL	(D) ₁₀	LLL,
LLEE	(D) ₈	EELL, или
LLEE	(D) ₁₀	EEELL,

где "E" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "L" является ЗНК; "D" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; и "10" или "8" является количеством 2'-дезоксирибонуклеозидов в Y, и где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи, фосфодифирные межнуклеозидные связи или их комбинацию.

[000301] В некоторых вариантах осуществления в любом из DMPK-специфических олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, каждый цитидин (например, 2'-модифицированный цитидин) в X и/или Z необязательно и независимо является 5-метилцитидином, и/или каждый уридин (например, 2'-модифицированный уридин) в X и/или Z необязательно и независимо является 5-метилуридином.

[000302] В некоторых вариантах осуществления DMPK-специфический олигонуклеотид выбран из ASO 1-29, приведенных в таблице 8. В некоторых вариантах осуществления любой из DMPK-специфических олигонуклеотидов может находиться в форме соли, например, соли натрия, калия или магния.

[000303] В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'-нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 8), 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 фосфодифирная связь находится между спейсером и 5'- или 3'-нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'-нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 8), конъюгирован со спейсером, являющимся замещенным или незамещенным алифатическим остатком, замещенным или незамещенным гетероалифатическим остатком, 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 водород 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.

[000304] В некоторых вариантах осуществления 5'- или 3'-нуклеозид любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании (например, олигонуклеотидов, приведенных в таблице 8), конъюгирован с соединением формулы $-\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-$, 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 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-$ и 5'- или 3'-нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-$ конъюгировано с олигонуклеотидом посредством реакции между 6-амино-1-гексанолом ($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{OH}$) и 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000305] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгирован с нацеливающим средством, например, мышечно-специфическим средством, таким как антитело против TfR1, например, через аминогруппу.

С. Линкеры

[000306] Комплексы, представленные в настоящем описании, как правило, содержат линкер, соединяющий любое из антител против TfR1, 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 TfR1 с молекулярной нагрузкой. Однако в некоторых вариантах осуществления линкер может соединять любое из антител против TfR1, представленных в настоящем описании, с молекулярной нагрузкой посредством множества ковалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер может являться расщепляемым линкером. Однако в некоторых вариантах осуществления линкер может являться нерасщепляемым линкером. Линкер, как правило, является стабильным *in vitro*, *in vivo* и в некоторых клеточных контекстах. Кроме того, как правило, линкер не влияет отрицательно на функциональные свойства антитела против TfR1 или молекулярной нагрузки. В этой области известны примеры и способы синтеза линкеров (см., например, Kline, T. et al. "Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates", *Pharmaceutical Research*, 2015, 32:11, 3480-3493.; Jain, N. et al. "Current ADC Linker Chemistry" *Pharm Res.* 2015, 32:11, 3526-3540.; McCombs, J.R. and Owen, S.C. "Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry" *AAPS J.* 2015, 17:2, 339-351).

[000307] Предшественник линкера, как правило, будет содержать две разные реакционноспособные частицы, делающие возможным присоединение к антителу против TfR1 и молекулярной нагрузке. В некоторых вариантах осуществления две разные реакционноспособные частицы может являться нуклеофилом и/или (например, и) электрофилом. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела против TfR1. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина антитела против TfR с помощью малеимид-содержащего линкера, где, необязательно, малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроильную или

малеимидометил-циклогексан-1-карбоксилатную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина антитела против TfR1 или тиоловой функционализированной молекулярной нагрузкой с помощью 3-арилпропионитрильной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком лизина антитела против TfR1. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой посредством амидной связи, карбаматной связи гидразидной, триазольной, тиозфирной или дисульфидной связи.

i. Расщепляемые линкеры

[000308] 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 или клетки ЦНС.

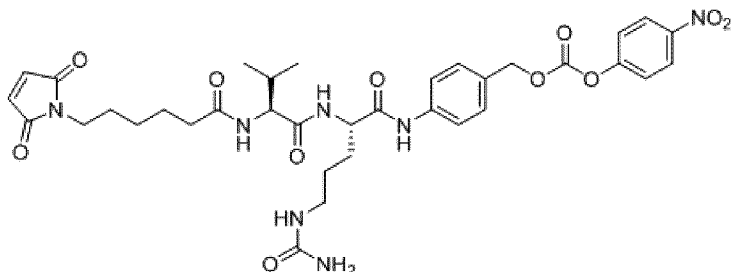
[000309] Протеаза-чувствительные линкеры расщепляются в результате ферментативной активности протеазы. Эти линкеры, как правило, содержат пептидные последовательности и могут иметь длину 2-10 аминокислот, приблизительно 2-5 аминокислот, приблизительно 5-10 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, 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 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.

[000310] 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.

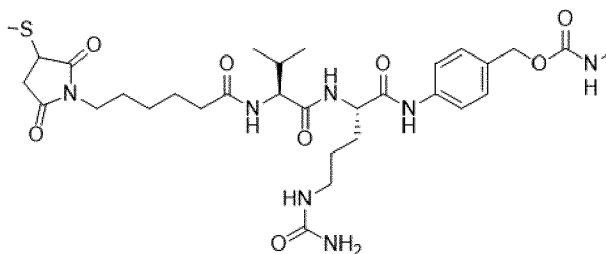
[000311] В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный линкер содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный линкер расщепляется в результате реакции дисульфидного обмена с глутатионовым соединением внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления

дисульфидная связь дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту, например, остаток цистеина.

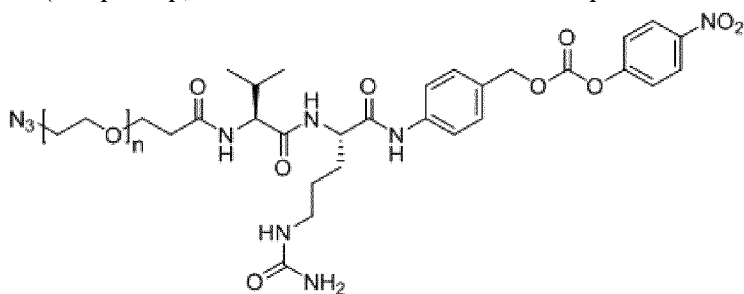
[000312] В некоторых вариантах осуществления линкер является линкером Val-Cit (например, как описано в патенте США № 6214345, включенном в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией линкер Val-Cit имеет структуру:



[000313] В некоторых вариантах осуществления после конъюгации линкер Val-Cit имеет структуру:



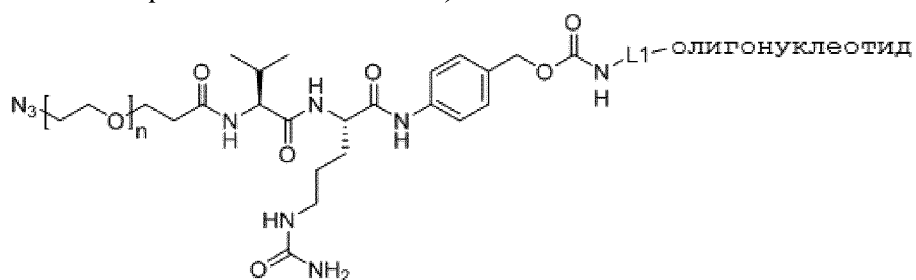
[000314] В некоторых вариантах осуществления линкер Val-cit соединяют с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией посредством клик-химии линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии) имеет структуру:



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

[000315] 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

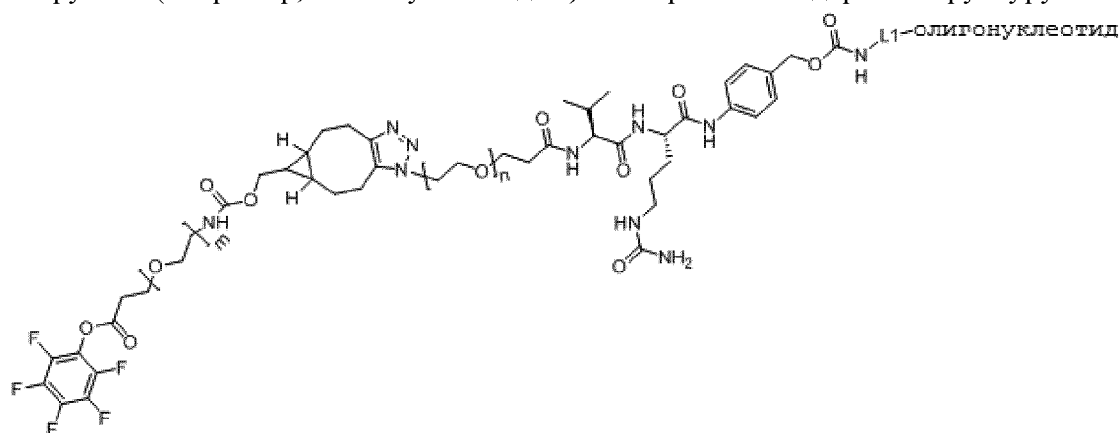
молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом), имеет структуру (перед конъюгацией посредством клик-химии):



(A)

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

[000316] В некоторых вариантах осуществления после конъюгации с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) линкер val-cit содержит 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

[000317] 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 TfR1, 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).

[000318] 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,_n; необязательно замещенный гетероциклилен, дополнительно содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S,_n; иминогруппу, необязательно замещенные формы азота, необязательно замещенные формы кислорода O, необязательно замещенные формы серы или поли(алкиленоксид), например, полиэтиленоксид или полипропиленоксид.

iii. Конъюгация линкера

[000319] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой посредством фосфатной, тиоэфирной, простой эфирной, углерод-углеродной, карбаматной или амидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с олигонуклеотидом с помощью фосфатной или фосфотиоатной группы, например, концевого фосфата олигонуклеотидного остова. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 через остаток лизина или цистеина, присутствующий в антителе против TfR1.

[000320] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции циклоприсоединения между азидом и алкином с образованием триазола, где азид и алкин может находиться на антителе против TfR1, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления алкин может являться циклическим алкином, например, циклооктином. В некоторых вариантах осуществления алкин может являться бициклонином (также известным как бицикло[6.1.0]нонин или BCN) или замещенным бициклонином. В некоторых вариантах осуществления циклооктин 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 или алкин может находиться на антителе против TfR1, молекулярной нагрузке или линкере, является такой, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года, названной "*Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof*"; или публикации международной патентной заявки № WO2016170186, опубликованной 27 октября 2016 года, названной "*Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase*".

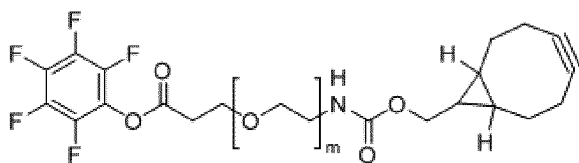
[000321] В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно содержит спейсер, например, полиэтиленгликолевый спейсер или ацил/карбомоил-сульфамидный спейсер, например, спейсер HydraSpace™. В некоторых вариантах осуществления спейсер является таким, как описано в Verkade, J.M.M. et al., "*A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Stability, and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates*", *Antibodies*, 2018, 7, 12.

[000322] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции Дильса-Альдера между диенофилом и диеном/гетеродиеном, где диенофил и диен/гетеродиен может находиться на антителе против TfR1, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой посредством других перициклических реакций, например, еновой реакции. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции амидной, тиоамидной или сульфонамидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции конденсации с образованием оксимной, гидразоновой или семикарбазидной группы, находящейся между линкером и антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой.

[000323] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 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 TfR1 или молекулярной нагрузке перед реакцией между линкером и антителом против TfR1 или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может находиться на линкере, и нуклеофил может находиться на антителе против TfR1 или молекулярной нагрузке перед реакцией между линкером и антителом против TfR1 или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может являться азидом, пентафторфенилом, кремниевыми центрами, карбонилем, карбоновой кислотой, ангидридом, изоцианатом, тиоизоцианатом, сукцинимидиловым сложным эфиром,

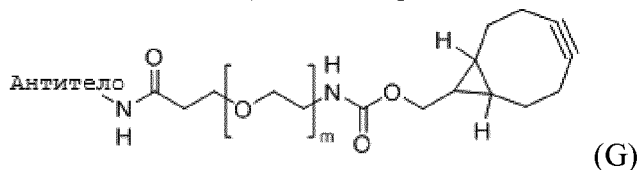
сульфосукцинимидиловым сложным эфиром, малеимидом, алкилгалидом, алкилпсевдогалидом, эпоксидом, эписульфидом, азиридином, арилом, активированным фосфорным центром и/или (например, и) активированным серным центром. В некоторых вариантах осуществления нуклеофил может являться необязательно замещенным алкеном, необязательно замещенным алкином, необязательно замещенным арилом, необязательно замещенным гетероциклилом, гидроксильной группой, аминогруппой, алкиламиногруппой, анилидогруппой или тиоловой группой.

[000324] 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:



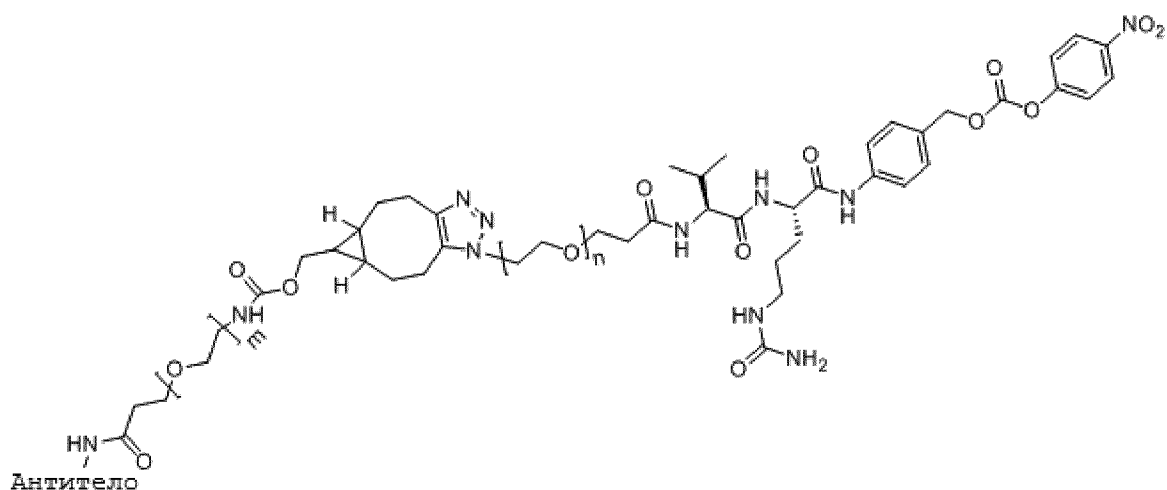
где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления m составляет 4.

[000325] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии), конъюгирован с антителом против TfR1, имея структуру:



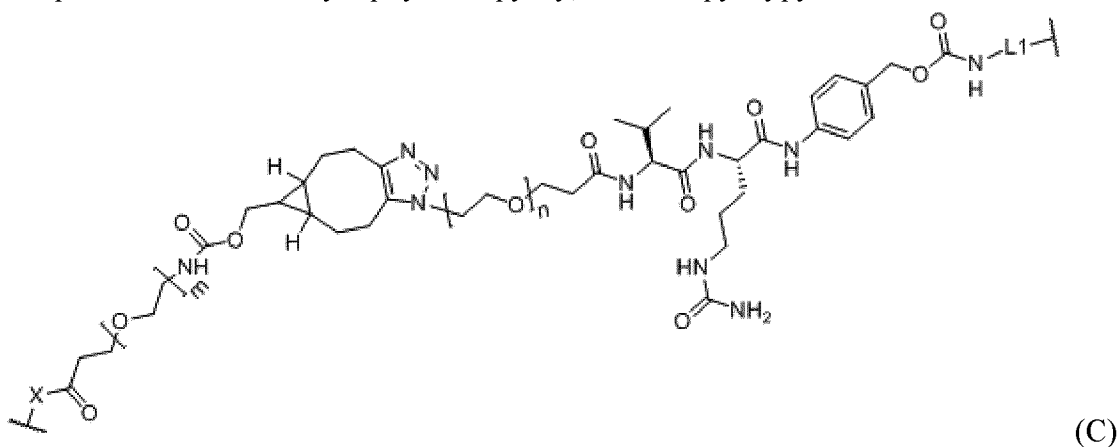
где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления m составляет 4. Следует понимать, что амид, показанный смежным с антителом против TfR1 в формуле (G), является результатом реакции с амином антитела против TfR1, таки как эpsilon-амин лизина.

[000326] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединенный с реакционноспособным химическим остатком (например, SPAAC для конъюгации посредством клик-химии) и конъюгированный с антителом против TfR1, имеет структуру:



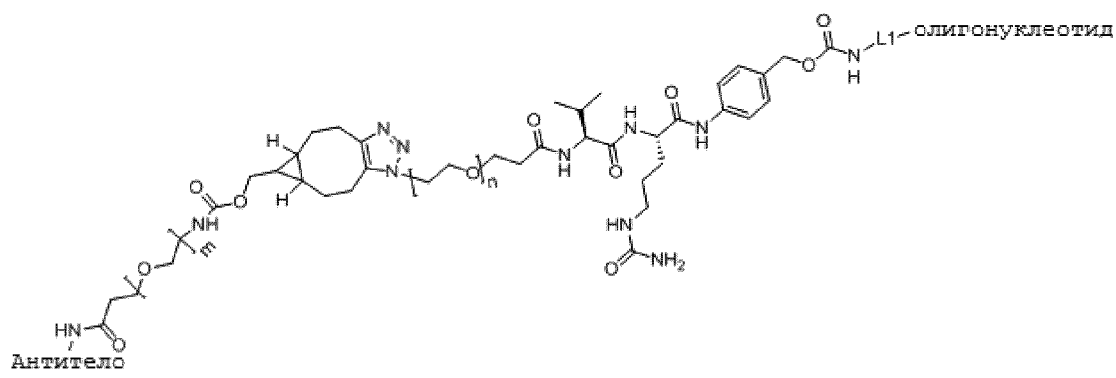
где n является любым числом 0-10, где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3, и/или (например, и) m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид ковалентно связан с соединением, содержащим структуру формулы (F), таким образом, образуя комплекс, содержащий структуру формулы (D). Следует понимать, что амид, показанный смежным с антителом против TfR1 в формуле (F), является результатом реакции с амином антитела против TfR1, тако как эpsilon-амин лизина.

[000327] В некоторых вариантах осуществления линкер val-cit, соединяющий антитело против TfR1 и молекулярную нагрузку, имеет структуру:



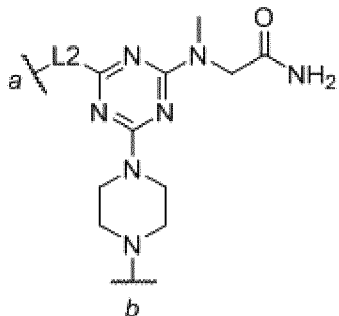
где n является любым числом 0-10, где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3, и/или (например, и) m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3, и/или (например, и) m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления X является NH (например,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

[000328] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, имеет структуру:

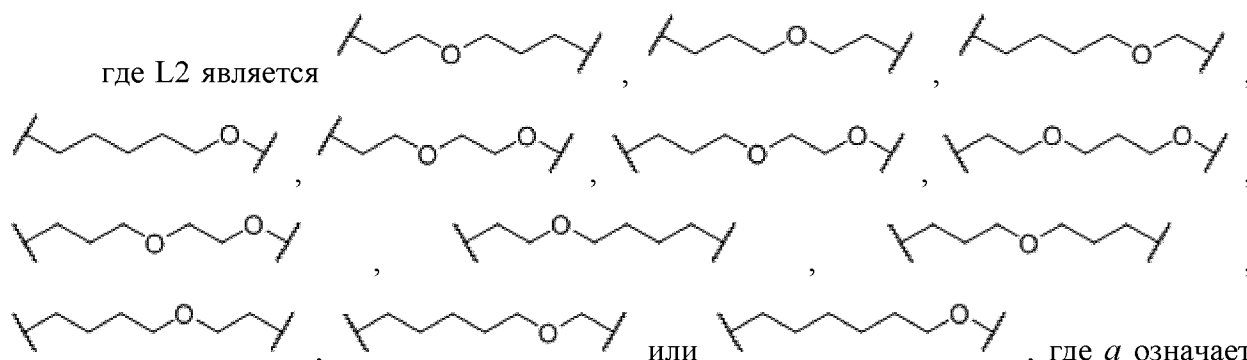


где n является любым числом 0-10, где m является любым числом 0-10. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3, и m составляет 4.

[000329] 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, где каждый R^A независимо представляет собой водород или замещенный или незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления L1 является

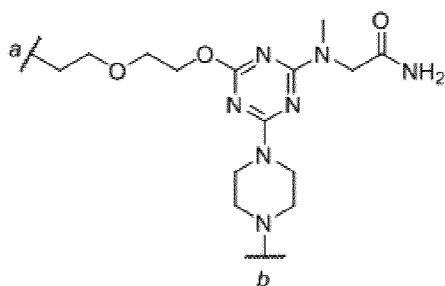


где L2 является



где a означает участок, напрямую связанный с остатком карбамата из формул (A), (B), (C) и (D); и b означает участок, ковалентно связанный (напрямую или через дополнительные химические остатки) с олигонуклеотидом.

[000330] В некоторых вариантах осуществления L1 является:



где *a* означает участок, напрямую связанный с остатком карбамата из формул (A), (B), (C) и (D); и *b* означает участок, ковалентно связанный (напрямую или через дополнительные химические остатки) с олигонуклеотидом.

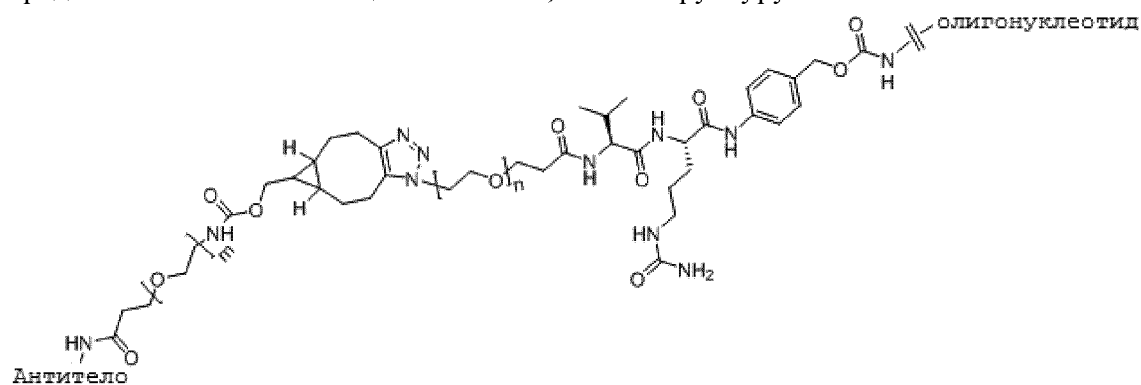
[000331] В некоторых вариантах осуществления L1 является



[000332] В некоторых вариантах осуществления L1 связан с 5'-фосфатом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления связь L1 с 5'-фосфатом олигонуклеотида образует фосфодиэфирную связь между L1 и олигонуклеотидом.

[000333] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, может не присутствовать).

[000334] В некоторых вариантах осуществления любой из комплексов, представленных в настоящем описании, имеет структуру:



(E),

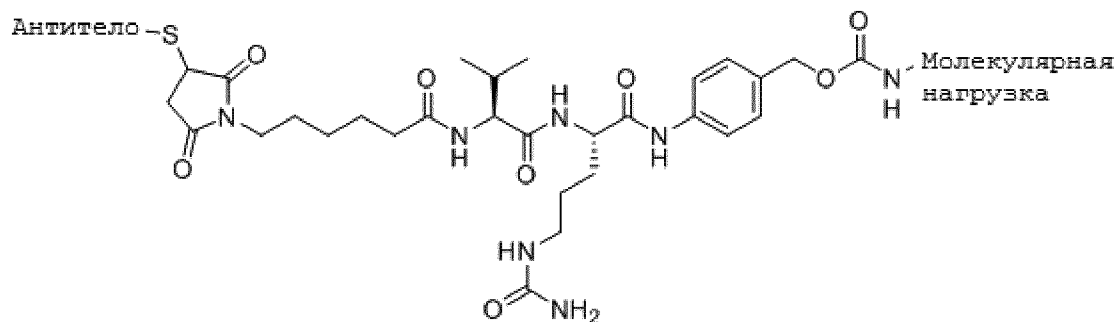
где *n* составляет 0-15 (например, 3), и *m* составляет 0-15 (например, 4).

С. Примеры комплексов антитело-молекулярная нагрузка

[000335] Настоящее изобретение дополнительно относится к неограничивающим примерам комплексов, содержащих любое из антител против TfR1, представленных в настоящем описании, ковалентно связанное с любой молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом), представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 (например, любое из антител против TfR, приведенных в таблицах 2-7) ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом, таким как олигонуклеотиды, приведенные в таблице 8) 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

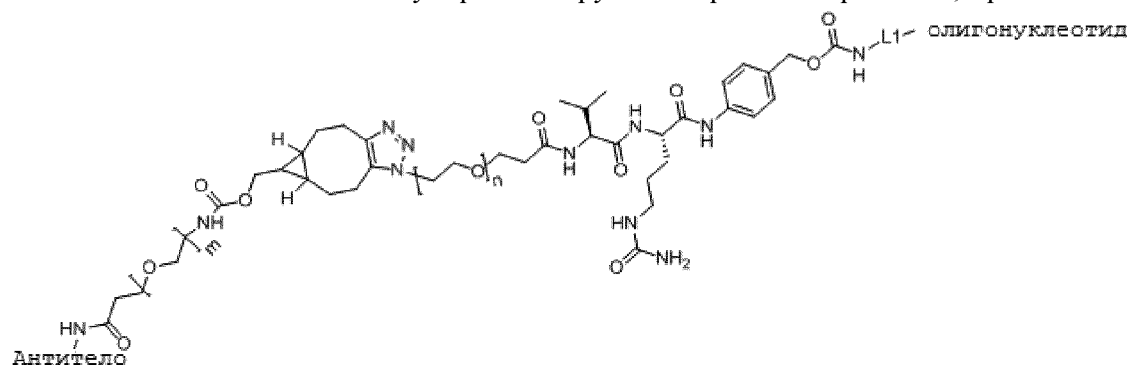
олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе против TfR1). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-cit) связывают с антителом (например, антителом против TfR1, представленным в настоящем описании) через аминокгруппу (например, через лизин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-нацеленным олигонуклеотидом (например, DMPK-нацеленным олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000336] Ниже приведен пример структуры комплекса, содержащего антитело против TfR1, 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 DMPK-нацеленным олигонуклеотидом (например, DMPK-нацеленным олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000337] Другой пример структуры комплекса, содержащего антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер Val-cit, приведен ниже:



(D)

где n является числом 0-10, где m является числом 0-10, где линкер соединяют с антителом через аминокгруппу (например, на остатке лизина), и/или (например, и), где линкер соединяют с олигонуклеотидом (например, на 5'-конце, 3'-конце или во внутренней части). В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом через лизин, линкер соединяют с олигонуклеотидом через 5'-конец, n составляет 3, и m составляет 4. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-нацеленным олигонуклеотидом (например, DMPK-нацеленным олигонуклеотидом, приведенным в

таблице 8). В некоторых вариантах осуществления L1 является



Следует понимать, что амид, показанный смежным с антителом против TfR1 в формуле (D), является результатом реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

[000338] 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.

[000339] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, представленное в настоящем описании (например, антитела, приведенные в таблицах 2-7), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, представленное в настоящем описании (например, антитела, приведенные в таблицах 2-7), 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 TfR1, 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 TfR1, представленным в настоящем описании) через аминокгруппу (например, через лизин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-нацеленным олигонуклеотидом (например, DMPK-нацеленным олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000340] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с

молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого из антител, приведенных в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000341] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000342] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000343] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000344] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000345] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000346] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000347] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000348] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000349] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000350] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000351] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с

молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000352] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000353] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 или SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000354] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000355] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

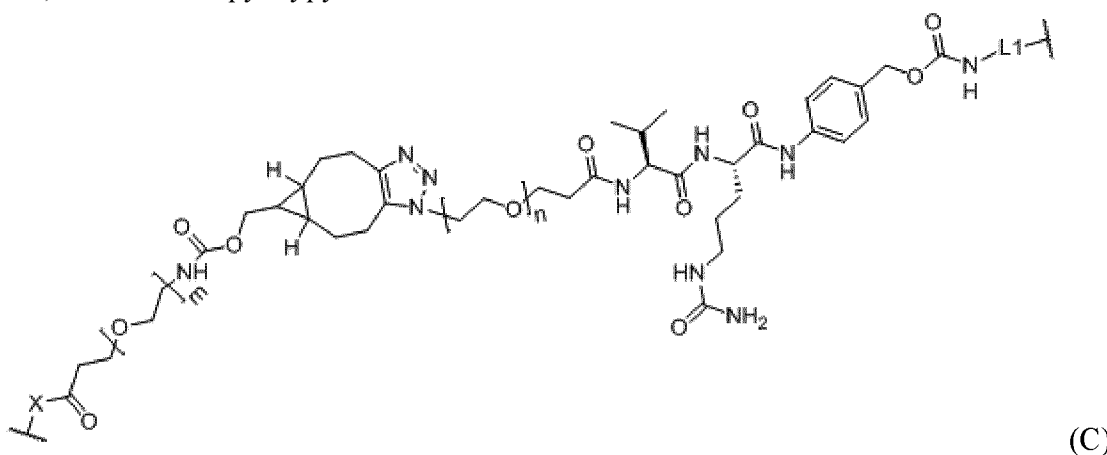
[000356] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах

осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000357] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 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 DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

[000358] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158 или SEQ ID NO: 159, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является DMPK-специфическим олигонуклеотидом (например, DMPK-специфическим олигонуклеотидом, приведенным в таблице 8).

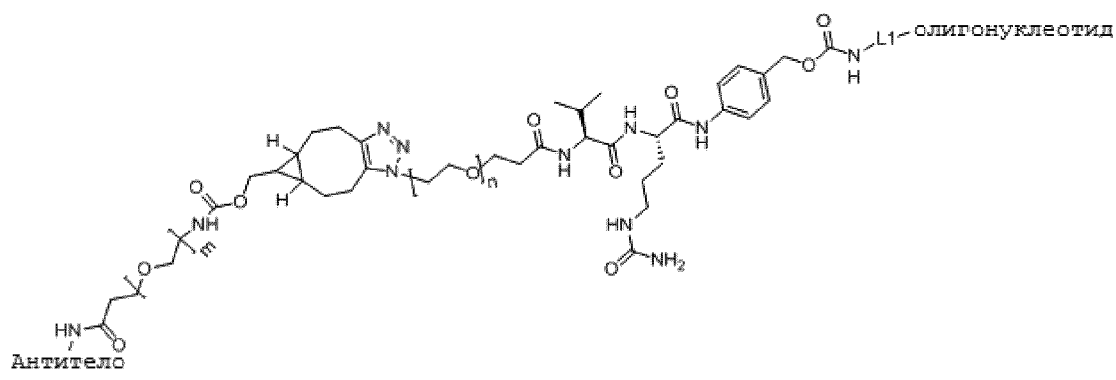
[000359] В любом из примеров комплексов, представленных в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 связано с молекулярной нагрузкой, имеющей структуру:




где n составляет 3, m составляет 4, X составляет NH (например, NH из аминогруппы

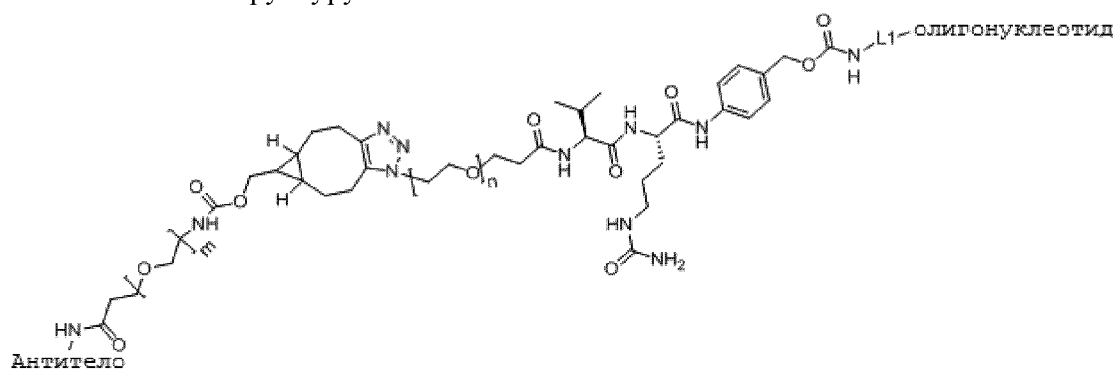
лизина), и L1 является 


[000360] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с 5'-концом DMPK-специфического олигонуклеотида (например, DMPK-специфического олигонуклеотида, приведенного в таблице 8) через лизин в антителе против TfR1, где антитело против TfR1 содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого из антител, приведенных в таблице 2, где комплекс имеет структуру:



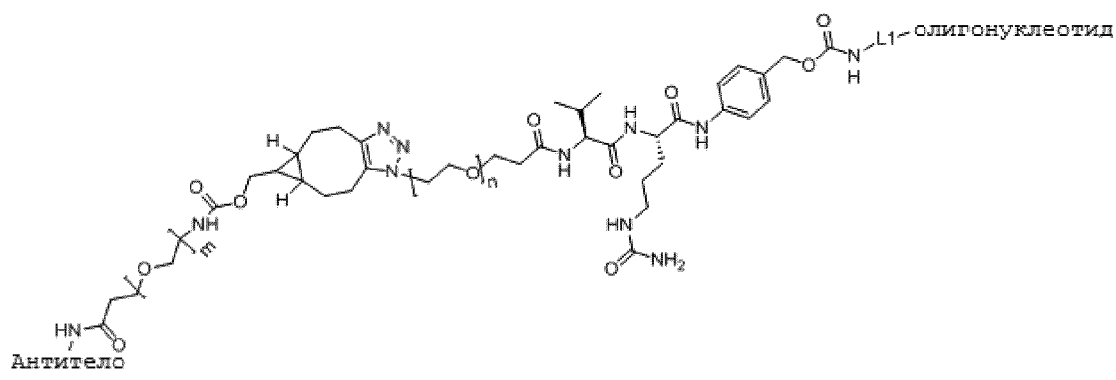
где n составляет 3, и m составляет 4, и где $L1$ является . Следует понимать, что амид, показанный смежным с антителом против TfR1 в формуле (D), является результатом реакции с амином антитела против TfR1, такого как эpsilon-амин лизина.


[000361] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с 5'-концом DMPK-специфического олигонуклеотида (например, DMPK-специфического олигонуклеотида, приведенного в таблице 8) через лизин в антителе против TfR1, где антитело против TfR1 содержит VH и VL любого из антител, приведенных в таблице 3, где комплекс имеет структуру:



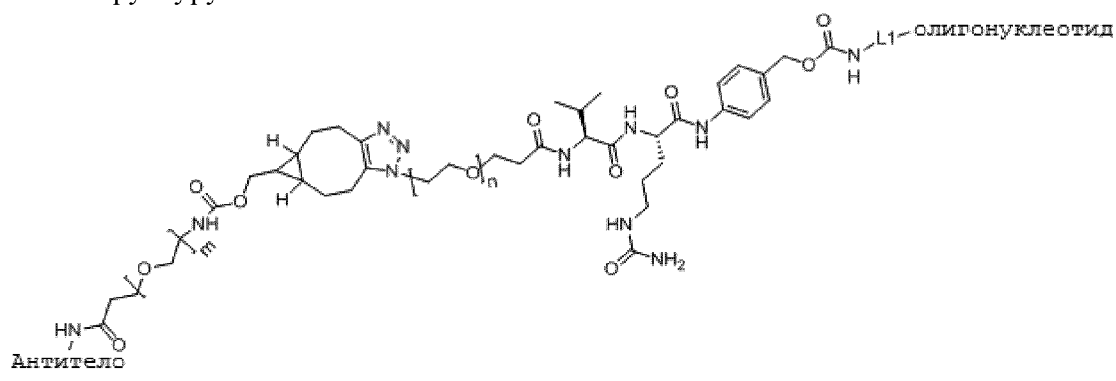
где n составляет 3, и m составляет 4, и где $L1$ является . Следует понимать, что амид, показанный смежным с антителом против TfR1 в формуле (D), является результатом реакции с амином антитела против TfR1, такого как эpsilon-амин лизина.


[000362] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против TfR1, ковалентно связанное с 5'-концом DMPK-специфического олигонуклеотида (например, DMPK-специфического олигонуклеотида, приведенного в таблице 8) через лизин в антителе против TfR1, где антитело против TfR1 содержит тяжелую цепь и легкую цепь любого из антител, приведенных в таблице 4, где комплекс имеет структуру:



где n составляет 3, и m составляет 4, и где $L1$ является . Следует понимать, что амид, показанный смежным с антителом против TfR1 в формуле (D), является результатом реакции с амином антитела против TfR1, такого как эpsilon-амин лизина.

[000363] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fab против TfR1, ковалентно связанный с 5'-концом DMPK-специфического олигонуклеотида (например, DMPK-специфического олигонуклеотида, приведенного в таблице 8) через лизин в Fab против TfR1, где Fab против TfR1 содержит тяжелую цепь и легкую цепь любого из антител, приведенных в таблице 5, где комплекс имеет структуру:



где n составляет 3, и m составляет 4, и где $L1$ является . Следует понимать, что амид, показанный смежным с антителом против TfR1 в формуле (D), является результатом реакции с амином антитела против TfR1, такого как эpsilon-амин лизина.

[000364] В некоторых вариантах осуществления $L1$ связан с 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[000365] В некоторых вариантах осуществления $L1$ является необязательным (например, может не присутствовать).

III. Составы

[000366] 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. Такие композиции можно соответствующим образом составлять таким образом, что при введении индивидууму в промежуточное окружение клетки-мишени или системно в клетки ЦНС проникает достаточное количество комплексов. В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в буферных растворах, таких как фосфатно-солевые буферные растворы, липосомы, мицеллярные структуры и капсиды.

[000367] 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).

[000368] 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).

[000369] В некоторых вариантах осуществления комплекс или его компонент (например, олигонуклеотид или антитело) лиофилизируют для увеличения его срока годности, а затем превращают в раствор перед использованием (например, введением индивидууму). Таким образом, эксципиент в композиции, содержащей комплекс или его компонент, представленный в настоящем описании, может являться лиопротектором (например, маннитом, лактозой, полиэтиленгликолем или поливинилпирролидоном) или модификатором температуры разрушения (например, декстраном, фикоλλом или желатином).

[000370] 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.

[000371] 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.

[000372] 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

[000373] Комплексы, содержащие мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, являются эффективными в лечении миотонической дистрофии. В некоторых вариантах осуществления комплексы являются эффективными в лечении миотонической дистрофии типа 1 (DM1). В некоторых вариантах осуществления DM1 ассоциирована с экспансией тринуклеотидного повтора CTG/CUG в 3'-некодирующей области DMPK. В некоторых вариантах осуществления экспансия нуклеотидов приводит к токсическим повторам РНК, способных образовывать шпилечные структуры, связывающиеся с критическими внутриклеточными белками, например, Muscleblind-подобными белками, с высокой аффинностью.

[000374] В некоторых вариантах осуществления индивидуум может являться человеком, не являющийся человеком приматом, грызуном или любым подходящим млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь миотоническую дистрофию. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет аллель DMPK, который, необязательно, может содержать ассоциированный с заболеванием

повтор. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь аллель DMPK с подвергнутым экспансии, ассоциированным с заболеванием повтором, содержащий приблизительно 2-10 единиц повторов, приблизительно 2-50 единиц повторов, приблизительно 2-100 единиц повторов, приблизительно 50-1000 единиц повторов, приблизительно 50-500 единиц повторов, приблизительно 50-250 единиц повторов, приблизительно 50-100 единиц повторов, приблизительно 500-10000 единиц повторов, приблизительно 500-5000 единиц повторов, приблизительно 500-2500 единиц повторов, приблизительно 500-1000 единиц повторов или приблизительно 1000-10000 единиц повторов. В некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает симптомами DM1, например, мышечной атрофией или потерей мышц. В некоторых вариантах осуществления индивидуум не страдает симптомами DM1. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет врожденную миотоническую дистрофию.

[000375] 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.

[000376] Композиции для внутривенного введения могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилактаид, диметилформаид, этиллактат, этилкарбонат, изопропилмиридат, 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.

[000377] 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.

[000378] 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.

[000379] 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.

[000380] Эффективность лечения можно оценивать любыми подходящими способами. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать посредством оценки наблюдения симптомов, ассоциированных с DM1, 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.

[000381] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, вводят индивидууму в эффективной концентрации, достаточной для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% относительно контроля, например, базового уровня экспрессии до лечения.

[000382] 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, 12, 15, 20 или 24 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 1-5, 1-10, 2-5, 2-10, 4-8, 4-12, 5-10, 5-12, 5-15, 8-12, 8-15, 10-12, 10-15, 10-20, 12-15, 12-20, 15-20 или 15-25 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.

[000383] 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 DM1. 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. Активность *in vitro* конъюгатов, содержащих Fab против TfR1, конъюгированный с DMPK-специфическими олигонуклеотидами (ASO)

[000384] Эксперимент *in vitro* проводили для определения активностей DMPK-специфических олигонуклеотидов (ASO), приведенных в таблице 8, в снижении экспрессии мРНК DMPK в клетках рабдомиосаркомы (RD) и клетках 32F и коррекции дефекта сплайсинга экзона 11 BIN1 в первичных клетках DM1-32F (клетках 32F; Cook MyoSite, Pittsburg, PA), экспрессирующих мутантную мРНК DMPK, содержащую 380 повторов CTG (фиг. 1A). Все ASO конъюгировали с Fab против TfR1 (3M12-VH4/VK3).

[000385] Клетки RD подвергали экспансии и высевали в 96-луночные планшеты при плотности 20000 клеток/лунку. Клеткам позволяли восстанавливаться в течение ночи при 37°C. На следующий день среды меняли, клетки обрабатывали эквивалентом 500 нМ ASO конъюгатов и позволяли им инкубироваться в течение 72 часов. Через 72 часа выделяли тотальную РНК с использованием набора для выделения РНК PureLink Pro 96 и получали кДНК с использованием набора для синтеза кДНК qScript. кДНК использовали для оценки общего нокдауна DMPK с использованием Taqman-ПЦР. Данные нормализовали по экспрессии PPIB и использовали способ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ для определения нокдауна DMPK по сравнению с контролем только с носителем. Строили график данных как среднего со стандартным отклонением.

[000386] Первичные клетки DM1 32F размораживали и позволяли им восстанавливаться, затем высевали при плотности 50000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты в среду для выращивания, а затем позволяли им восстанавливаться в течение ночи. На следующий день среду для выращивания меняли на дифференцировочную среду с низким содержанием сыворотки и клетки обрабатывали эквивалентом 100 нМ ASO конъюгатов. Клеткам позволяли инкубироваться в течение десяти дней, затем собирали тотальную РНК с использованием набора для выделения Qiagen MiRNeasy и синтезировали кДНК с использованием набора для синтеза кДНК qScript.

[000387] кДНК использовали для оценки общего нокдауна DMPK с использованием Taqman-ПЦР. Данные нормализовали по экспрессии PPIB и использовали способ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ для определения нокдауна DMPK по сравнению с контролем только с носителем. Данные представляли как % среднего для нокдауна DMPK со стандартным отклонением (таблица 9). Кроме того, модификацию DM1-опосредованного аномального сплайсинга оценивали с использованием мультиплексного Taqman qPCR для оценки аномально сплайсированного и нормального транскрипта. Эти данные представляли как среднее соотношение аномально сплайсированного и нормального транскрипта со стандартным отклонением (таблица 9). Соотношение 1 означает отсутствие изменения при аномальном сплайсинге по сравнению с мышечными трубочками пациента с DM1, обработанными контрольным носителем. Соотношение более 1 означает, что больше транскриптов имели профиль сплайсинга дикого типа. Соотношение менее 1 означает, что больше транскриптов имели DM1-опосредованный профиль сплайсинга.

Таблица 9. Нокдаун DMPK и коррекция дефекта сплайсинга экзона 11 BIN1

Структура (5'-3')	% нокдауна DMPK в клетках RD (500 нМ)	% нокдауна DMPK в клетках 32F (100 нМ)	Коррекция дефекта сплайсинга экзона BIN1 в клетках 32F (100 нМ)

ASO 1 (SEQ ID NO: 185) oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA* dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU *oG*oC*oC*oC	2,876±1,023	16,33±3,06	1,339±0,08232
ASO 2 (SEQ ID NO: 174) oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC *dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU *oC*oA*oC*oA	32,01±0,9827	45,31±6	1,505±0,1903
ASO 3 (SEQ ID NO: 186) oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG *dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*o U*oC*oC*oG*oC	0,5418±2,474	24,21±7,184	1,361±0,06994
ASO 4 (SEQ ID NO: 187) +G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG *dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+ C	1,489±2,11	-11,31±9,112	1,291±0,09112
ASO 5 (SEQ ID NO: 187) +G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG* dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C	5,784±8,66	9,585±10,55	1,226±0,04184
ASO 6 (SEQ ID NO: 177) +C*+G*oU*oA*dG*dA*dA*dG* dG*dG*xdC*dG*oU*oC*+U*+G	0,8591±4,052	-13,69±1,396	1,206±0,1016
ASO 7 (SEQ ID NO: 188) +U*+A*oG*oA*dA*dG*dG*dG* xdC*dG*dT*dC*oU*oG*+C*+C	10,42±0,9196	6,556±7,894	1,034±0,06545
ASO 8 (SEQ ID NO: 179) +C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dC *dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A	72,69±0,0925	64,09±3,003	2,634±0,2439
ASO 9 (SEQ ID NO: 180) +C*+C*oA*oG*xdC*dG*dC*dC *dC*dA*dC*dC*oA*oG*+U*+C	62,7±1,697	51,7±2,621	1,75±0,1389
ASO 10 (SEQ ID NO: 179) +C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dC* dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A	79,21±0,4157	51,36±7,308	2,385±0,1754

ASO 11 (SEQ ID NO: 181) +A*+G*oC*oG*dC*dC*dA* dC*dC*dA*dG*oU*oC*+A*+C	41,68±4,945	49,13±4,16	1,977±0,118
ASO 12 (SEQ ID NO: 189) +A*+U*+C*dT*xdC*dG*dG*dC *xdC*dG*dG*dA*dA*+U*+C*+ C	17,25±0,7433	29,18±18,33	1,3±0,185
ASO 13 (SEQ ID NO: 190) +C*+A*oU*oC*dT*xdC*dG*dG *dC*xdC*dG*dG*oA*oA*+U*+ C	-1,373±0,8316	41,13±3,429	0,937±0,0442
ASO 14 (SEQ ID NO: 182) +A*+U*oC*oU*xdC*dG*dG*dC *xdC*dG*dG*dA*oA*oU*+C*+ C	13,53±5,021	0,1502±0,9425	1,428±0,05905
ASO 15 (SEQ ID NO: 184) +U*+C*oU*oC*dG*dG*dC*xdC *dG*dG*dA*dA*oU*oC*+C*+G	-2,995±6,742	31,33±2,531	1,114±0,01049
ASO 16 (SEQ ID NO: 187) oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG* dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC	-3,26±2,672	-28,08±8,032	1,069±0,05999
ASO 17 (SEQ ID NO: 179) oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC *dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA	14,11±1,836	-23,1±16,3	1,317±0,07201
ASO 18 (SEQ ID NO: 189) oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC *xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*o C	0,8259±8,181	-12,32±8,02	1,093±0,04767
ASO 19 (SEQ ID NO: 185) +G*+C*oG*oU*oA*dG*dA*dA* dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU *oG*oC*+C*+C	16,96±2,216	26,62±7,439	1,477±0,08409

ASO 20 (SEQ ID NO: 174) +C*+C*oC*oA*oG*xdC*dG*dC *dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU *oC*oA*+C*+A	40,66±6,29	46,33±2,487	2,001±0,1277
ASO 21 (SEQ ID NO: 186) +C*+C*oA*oU*oC*dT*xdC*dG *dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*o U*oC*oC*+G*+C	8,562±1,943	20,2±10,3	1,473±0,05935
ASO 22 (SEQ ID NO: 185) oG*oCoG*oUoA*dG*dA*dA*d G*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUo G*oCoC*oC	7,946±7,294	-6,135±5,415	1,336±0,02241
ASO 23 (SEQ ID NO: 174) oC*oCoC*oAoG*xdC*dG*dC*d C*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoC *oAoC*oA	22,63±0,6132	10,93±1,624	1,632±0,1185
ASO 24 (SEQ ID NO: 186) oC*oCoA*oUoC*dT*xdC*dG*d G*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUo C*oCoG*oC	12,85±1,974	-1,46±5,006	1,242±0,03159
ASO 25 (SEQ ID NO: 185) oG*oCoGoUoA*dG*dA*dA*dG *dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG oCoC*oC	-1,373±0,8316	-13,29±9,194	1,256±0,1138
ASO 26 (SEQ ID NO: 174) oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC *dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCo AoC*oA	34,04±1,713	45,9±37,25	1,174±0,442
ASO 27 (SEQ ID NO: 186) oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG *dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoC oCoG*oC	-3,184±0,1963	-1,202±8,264	1,223±0,1369

ASO 28 (SEQ ID NO: 191) oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG *dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG *oCoC	4,256±4,69	-18,94±16,43	1,205±0,1149
ASO 29 (SEQ ID NO: 192) oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG *dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*o G	7,574±4,352	-11,28±10,33	1,117±0,03764
ASO 30 (SEQ ID NO: 199) oA*oG*oA*oC*oA*dA*dT*dA* dA*dA*dT*dA*xdC*xdC*dG*o A*oG*oG*oA*oA	38,5±0,7329	-25,89±16,94	1,147±0,1053
ASO 31 (SEQ ID NO: 199) +A*+G*oA*oC*oA*dA*dT*dA* dA*dA*dT*dA*xdC*xdC*dG*o A*oG*oG*+A*+A	47,95±3,676	38,32±7,816	1,475±0,09237
ASO 32 (SEQ ID NO: 200) dA*+A*+C*+A*A*T*A*A*A*T *A*xC*xC*G*+A*+G*+G	88,48±1,516	71,55±0,9784	1,472±0,03488

Пример 2. Активность *in vitro* конъюгатов, содержащих Fab против Tfr1, конъюгированный с DMPK-специфическими ASO, в полученных из пациента клетках

[000388] Эксперимент *in vitro* проводили для определения активностей DMPK-специфического олигонуклеотида ASO1 в снижении экспрессии мРНК DMPK, коррекции дефекта сплайсинга экзона 11 BIN1 и уменьшении ядерных фокусов (что измеряют как соотношение площади ядерных фокусов и площади ядер) в первичных клетках DM1-32F (клетках 32F; Cook MyoSite, Pittsburg, PA), экспрессирующих мутантную мРНК DMPK, содержащую 380 повторов CTG (фиг. 1A), и иммортализованных клетках DM1-CL5 (клетках CL5), экспрессирующих мутантную мРНК DMPK, содержащую 2600 повторов CTG (фиг. 1B). Сначала подтверждали, что ASO1 мог снижать мутантную мРНК DMPK в клетках DM1-32F и клетках DM1-CL5, но не влиял на уровень мРНК DMPK в здоровых клетках по результатам RT-ПЦР (фиг. 1A-1B).

[000389] Конъюгаты, содержащие контрольный Fab против Tfr1, конъюгированный с ASO1 или ASO 32, тестировали на способность снижать экспрессию мРНК DMPK, коррекцию дефекта сплайсинга экзона 11 BIN1 и уменьшение ядерных фокусов (что измеряют как соотношение площади ядерных фокусов и площади ядер) в клетках 32F. Клетки 32F высевали при плотности 156000 клеток/см², позволяли им восстанавливаться в

течение 24 часов, переносили на дифференцировочную среду для индукции образования мышечных трубочек, как описано (Arandel et al., *Disease Models & Mechanisms* 2017 10: 487-497, включенную в настоящее описание посредством ссылки), а затем подвергали воздействию ASO32-конъюгата и ASO1-конъюгата при концентрации нагрузки 500 нМ. Параллельные культуры подвергали воздействию носителя PBS, и они служили в качестве отрицательных контролей. Клетки собирали после 10 дней культуры.

[000390] Для анализа экспрессии генов клетки собирали с помощью Qiazol для выделения тотальной РНК с использованием набора Qiagen miRNAeasy. Очищенную РНК подвергали обратной транскрипции и определяли уровни транскриптов DMPK, PPIB, BIN1 и мРНК изоформы BIN1, содержащей экзон 11, посредством qRT-ПЦР с конкретными анализами TaqMan (ThermoFisher). Логарифмы кратных изменений экспрессии DMPK вычисляли способом $2^{-\Delta\Delta CT}$ с использованием PPIB в качестве референсного гена и клетки подвергали воздействию носителя в качестве контрольной группы. Логарифмы кратных изменений уровней изоформы BIN1, содержащей экзон 11, вычисляли способом $2^{-\Delta\Delta CT}$ с использованием BIN1 в качестве референсного гена, и клетки подвергали воздействию носителя в качестве контрольной группы.

[000391] Для измерения площади ядерных фокусов мутантного DMPK клетки фиксировали в 4% формалине, пермеабелизовали с помощью 0,1% Triton X-100 и гибридизовали при 70°C с зондом пептид-нуклеиновой кислоты CAG, конъюгированным с флуорофором Cy5 (PNA Bio). После многократных промывок в гибридизационном буфере и 2-кратном растворе SSC ядра докрашивали DAPI. Изображения получали при увеличении 400x посредством конфокальной микроскопии и измеряли площадь фокусов как площадь сигнала Cy5, содержащуюся в площади сигнала DAPI. Данные выражали как соотношения площади ядерных фокусов и площади ядер.

[000392] Результаты свидетельствуют о том, что однократная доза ASO32-конъюгата или ASO1-конъюгата приводила к сниженной экспрессии мутантного DMPK (фиг. 2A), скорректированному дефекту сплайсинга экзона 11 BIN1 (фиг. 2B) и ядерным фокусам, уменьшенным на приблизительно 40% (фиг. 2C-2D).

[000393] Схожие эксперименты проводили на клетках CL5, и результаты свидетельствуют о том, что однократная доза ASO32-конъюгата или ASO1-конъюгата приводила к сниженной экспрессии мутантного DMPK (фиг. 3A), скорректированному дефекту сплайсинга экзона 11 BIN1 (фиг. 3B) и ядерным фокусам, уменьшенным ASO32-конъюгатом на приблизительно 30%, в то время как ASO1-конъюгат уменьшал ядерные фокусы на приблизительно 3% (фиг. 3C-3D).

[000394] Кроме того, конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 (3M12-VH4/VK3), конъюгированные с другими DMPK-специфическими олигонуклеотидами, такими как ASO32, ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1, тестировали на активности в отношении уменьшения экспрессии мРНК DMPK, коррекции дефекта сплайсинга экзона 11 BIN1 и уменьшении ядерных фокусов в клетках 32F (фиг. 4A). Эксперименты проводили, как описано выше.

[000395] Результаты свидетельствуют о том, что однократная доза ASO32-конъюгата, ASO10-конъюгата, ASO8-конъюгата, ASO26-конъюгата или ASO1-конъюгата приводила к сниженной экспрессии мутантного DMPK (фиг. 4B), скорректированному дефекту сплайсинга экзона 11 BIN1 (фиг. 4C) и ядерным фокусам, сниженным на приблизительно по меньшей мере 20% (фиг. 4D-4E). На фиг. 4F показано, что ASO32-конъюгат, ASO10-конъюгат, ASO8-конъюгат, ASO26-конъюгат и ASO1-конъюгат могли снижать экспрессию DMPK в клетках 32F дозозависимым образом (клетки подвергали воздействию конъюгатов DMPK-специфический олигонуклеотидов в концентрации ASO 14 нМ, 45 нМ и 150 нМ). На фиг. 4G показано, что ASO32-конъюгат, ASO10-конъюгат, ASO8-конъюгат, ASO26-конъюгат и ASO1-конъюгат могли корректировать дефект сплайсинга экзона 11 BIN1 в клетках 32F дозозависимым образом (клетки подвергали воздействию конъюгатов DMPK-специфический олигонуклеотидов в концентрации ASO 14 нМ, 45 нМ и 150 нМ). На фиг. 4H показано, что ASO32-конъюгат, ASO10-конъюгат, ASO8-конъюгат, ASO26-конъюгат и ASO1-конъюгат могли уменьшать фокусы CUG в клетках 32F дозозависимым образом (клетки подвергали воздействию конъюгатов DMPK-специфический олигонуклеотидов в концентрации ASO 14 нМ, 45 нМ и 150 нМ).

[000396] Схожие эксперименты проводили на клетках CL5 (фиг. 5A). В этом эксперименте все тестируемые DMPK-специфические олигонуклеотиды конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. Эксперименты проводили, как описано выше.

[000397] Результаты свидетельствуют о том, что однократная доза ASO32-конъюгата, ASO10-конъюгата, ASO8-конъюгата, ASO26-конъюгата или ASO1-конъюгата приводила к сниженной экспрессии мутантного DMPK (фиг. 5B) и скорректированному дефекту сплайсинга экзона 11 BIN1 (фиг. 5C). ASO32-конъюгат, ASO10-конъюгат и ASO8-конъюгат уменьшали ядерные фокусы на приблизительно 30%, ASO26-конъюгат уменьшал ядерные фокусы на приблизительно 10%, и ASO1-конъюгат, по-видимому, не уменьшал ядерные фокусы (фиг. 5D-5E). На фиг. 5F показано, что ASO32-конъюгат, ASO10-конъюгат, ASO8-конъюгат, ASO26-конъюгат и ASO1-конъюгат могли снижать экспрессию DMPK в клетках CL5 дозозависимым образом (клетки подвергали воздействию конъюгатов DMPK-специфический олигонуклеотидов в концентрации ASO 14 нМ, 45 нМ и 150 нМ). На фиг. 5G показано, что ASO32-конъюгат, ASO10-конъюгат, ASO8-конъюгат, ASO26-конъюгат и ASO1-конъюгат могли корректировать дефект сплайсинга экзона 11 BIN1 в клетках CL5 дозозависимым образом (клетки подвергали воздействию конъюгатов DMPK-специфический олигонуклеотидов в концентрации ASO 14 нМ, 45 нМ и 150 нМ). На фиг. 5H показано, что ASO32-конъюгат, ASO10-конъюгат и ASO8-конъюгат могли уменьшать фокусы CUG в клетках CL5 дозозависимым образом. ASO26-конъюгат уменьшал ядерные фокусы в наиболее высокой концентрации, и ASO1-конъюгат, по-видимому, не уменьшал ядерные фокусы (клетки подвергали воздействию конъюгатов DMPK-специфический олигонуклеотидов в концентрации ASO 14 нМ, 45 нМ и 150 нМ).

[000398] Кроме того, ASO10-конъюгат, ASO8-конъюгат, ASO26-конъюгат могли приводить к нокдауну экспрессии DMPK в клетках рабдомиосаркомы (RD) дозозависимым

образом, и ASO1-конъюгат мог приводить к нокдауну DMPK в клетках неявляющегося человеком примата (NHP) дозозависимым образом (клетки подвергали воздействию ASO в концентрации 4 нМ, 20 нМ, 100 нМ или 500 нМ) (фиг. 6). Все ASO конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3.

Пример 3. Химическая модификация DMPK-специфических олигонуклеотидов влияет на активность конъюгатов, содержащих Fab против TfR1, конъюгированный с олигонуклеотидами

[000399] Для анализа того, как разные химические модификации могут влиять на активность DMPK-специфических олигонуклеотидов, рабочий DMPK-специфический олигонуклеотид ASO32, имеющий разные профили химических модификаций, тестировали на активности в отношении снижения экспрессии DMPK. ASO30, ASO31 и ASO32 имеют одинаковые нуклеотидные последовательности, но содержат разные профили модификаций (см. таблицу 8). Все олигонуклеотиды конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3 перед контактом с клетками рабдомиосаркомы (RD). Клетки приводили в контакт с ASO32-конъюгатом, ASO31-конъюгатом или ASO30-конъюгатом в концентрации ASO 4 нМ, 20 нМ, 100 нМ или 500 нМ, и оценивали уровень экспрессии DMPK для определения способности олигонуклеотидов к нокдауну экспрессии DMPK. Все тестируемые олигонуклеотид-конъюгаты могли снижать экспрессию DMPK дозозависимым образом. При концентрации олигонуклеотидов 500 нМ ASO32-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на 88%, ASO31-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на 70%, и ASO30-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на 39% (фиг. 7).

[000400] Схожие эксперименты проводили на других DMPK-специфических олигонуклеотидах, чтобы показать, что длина и разные химические модификации влияют на активность олигонуклеотидов. В этом эксперименте тестировали конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 (3M12-VH4/VK3), конъюгированные с ASO32, ASO2, ASO8, ASO9, ASO10, ASO11, ASO20 и ASO26. ASO32, ASO2, ASO8, ASO9, ASO10, ASO11, ASO20 и ASO26 являются гэтмерами с разными профилями модификаций (см. таблицу 8). Клетки RD человека подвергали воздействию ASO32-конъюгата, ASO10-конъюгата, ASO8-конъюгата, ASO9-конъюгата, ASO11-конъюгата, ASO20-конъюгата, ASO26-конъюгата и ASO2-конъюгата в концентрации ASO 4 нМ, 20 нМ, 100 нМ или 500 нМ и оценивали уровень экспрессии DMPK для определения способности олигонуклеотидов к нокдауну экспрессии DMPK. Все тестируемые олигонуклеотид-конъюгаты могли снижать экспрессию DMPK дозозависимым образом. При концентрации олигонуклеотидов 500 нМ ASO10-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на приблизительно 80%, ASO8-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на приблизительно 70%, ASO9-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на приблизительно 60% (фиг. 8A), ASO11-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на приблизительно 40%, ASO20-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на приблизительно 40%, ASO26-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на приблизительно 30%, и ASO2-конъюгат мог снижать экспрессию DMPK на приблизительно 40% (фиг. 8B).

[000401] Также проводили эксперименты с использованием ELISA hTfR1 для измерения EC₅₀ ASO10-конъюгата (EC₅₀ 11 нМ эквивалента ASO), ASO8-конъюгата (EC₅₀ 29 нМ эквивалента ASO), ASO26-конъюгат (EC₅₀ 1 нМ эквивалента ASO) и ASO1-конъюгата (EC₅₀ 17 нМ эквивалента ASO).

Пример 4. Активность *in vivo* конъюгатов, содержащих Fab против TfR1, конъюгированный с DMPK-специфическим олигонуклеотидом в модели DM1 на мышцах

[000402] Конъюгаты, содержащие Fab против TfR1, конъюгированные с различными DMPK-специфическими олигонуклеотидами, тестировали в модели на мышцах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. В первом эксперименте ASO32 конъюгировали с контрольным Fab против TfR1 и вводили конъюгат мышам посредством внутривенной инъекции в день 0 и в день 7 в эквиваленте дозы 10 мг/кг ASO32. Мышей умерщвляли в день 14 и оценивали экспрессию мутантного DMPK человека в различных мышечных тканях. Результаты свидетельствуют о том, что ASO32-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 36% (фиг. 9A), в диафрагме на 46% (фиг. 9B) и в сердце на 42% (фиг. 9C).

[000403] Кроме того, конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO32, тестировали в модели на мышцах, экспрессирующих TfR1 человека. ASO32-конъюгат снижал *dmpk* мыши дикого типа в передней большеберцовой мышце на 79% (фиг. 9D), в икроножной мышце на 76% (фиг. 9E), в сердце на 70% (фиг. 9F) и в диафрагме на 88% (фиг. 9G). Распределение ASO32 в передней большеберцовой мышце, икроножной мышце, сердце и диафрагме показано на фиг. 9H-9K. Во всех тканях наблюдали повышенный уровень ASO32 по сравнению с контрольным носителем.

[000404] ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1 тестировали в той же модели на мышцах, описанной выше и экспрессирующей TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. ASO32 включали в качестве контроля и конъюгировали с контрольным Fab против TfR1. ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1 конъюгировали с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3. Мышам инъецировали олигонуклеотид в день 0 и день 7 и умерщвляли в день 14. Экспериментальная группа включает: (i) контрольный носитель, инъецируемый мышам, экспрессирующей TfR1 человека (n=4); (ii) контрольный носитель, инъецируемый мышам, экспрессирующей TfR1 человеку и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG (n=10); (iii) ASO10-конъюгат, инъецируемый мышам, экспрессирующей TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG (n=6) в дозе, эквивалентной 2×9,7 мг/кг ASO10; (iv) ASO8-конъюгат, инъецируемый мышам, экспрессирующей TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG (n=5) в дозе, эквивалентной 2×9,2 мг/кг ASO8; (v) ASO26-конъюгат, инъецируемый мышам, экспрессирующей TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG (n=6) в дозе, эквивалентной

2×12,3 мг/кг ASO26; и (vi) ASO1-конъюгат инъектируемый мыши, экспрессирующей Tfr1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG (n=6) в дозе, эквивалентной 2×12,7 мг/кг ASO1. После умерщвления мышей оценивали экспрессию мутантного DMPK человека в различных мышечных тканях. На фиг. 10А показано, что ASO32-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в сердце на 42%, ASO10-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в сердце на 60%, ASO8-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в сердце на 67%, ASO26-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в сердце на 49%; и ASO1-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в сердце на 15%. На фиг. 10В показано, что ASO32-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в диафрагме на 46%, ASO10-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в диафрагме на 56%, ASO8-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в диафрагме на 58%, ASO26-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в диафрагме на 38%; и ASO1-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в диафрагме на 35%. На фиг. 10С показано, что ASO32-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в икроножной мышце на 25%, ASO10-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в икроножной мышце на 39%, ASO8-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в икроножной мышце на 42%, ASO26-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в икроножной мышце на 26%; и ASO1-конъюгат, по-видимому, не снижал мутантный DMPK человека в икроножной мышце. На фиг. 10D показано, что ASO32-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 36%, ASO10-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 54%, ASO8-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 51%, ASO26-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 52%; и ASO1-конъюгат снижал мутантный DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 6%. Кроме того, ASO10-конъюгат, вводимый в дозе, эквивалентной 10 мг/кг ASO10, уменьшал ядерные фокусы в сердце у мышей (фиг. 10E).

[000405] Кроме того, несмотря на один ошибочно спаренный нуклеотид между тестируемыми олигонуклеотидами и *Dmpk* мыши дикого типа, олигонуклеотиды могли снижать экспрессию *Dmpk* мыши в модели на мышах, описанной выше. На фиг. 11А показано, что ASO32-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в сердце на 73%, ASO10-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в сердце на 47%, ASO8-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в сердце на 53%, ASO26-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в сердце на 38%; и ASO1-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в сердце на 12%. На фиг. 11В показано, что ASO32-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в диафрагме на 75%, ASO10-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в диафрагме на 51%, ASO8-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в диафрагме на 27%, ASO26-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в диафрагме на 32%; и ASO1-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в диафрагме на 40%. На фиг. 11С показано, что ASO32-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в икроножной мышце на 69%, ASO10-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в икроножной мышце на 33%, ASO8-конъюгат снижал *Dmpk* мыши в икроножной мышце на 22%, и ASO26-конъюгат и ASO1-конъюгат, по-видимому, не снижал *Dmpk* мыши в икроножной мышце. На фиг. 11D показано, что

ASO32-конъюгат снижал *Dmpk* мышцы в передней большеберцовой мышце на 68%, ASO10-конъюгат снижал *Dmpk* мышцы в передней большеберцовой мышце на 40%, ASO8-конъюгат снижал *Dmpk* мышцы в передней большеберцовой мышце на 32%, ASO26-конъюгат снижал *Dmpk* мышцы в передней большеберцовой мышце на 28%; и ASO1-конъюгат, по-видимому, не снижал *Dmpk* мышцы в передней большеберцовой мышце.

[000406] Воздействие олигонуклеотидов на ткань тестировали посредством гибридационного ELISA (Burki et al., *Nucleic Acid Ther.* 2015 Oct;25(5):275-84, включенная в настоящее описание посредством ссылки), и строили график уровней ASO в ткани. На фиг. 12A-12D показано количество ASO10, ASO8, ASO26 и ASO1 в сердце, диафрагме, икроножной мышце или передней большеберцовой мышце, соответственно, через две недели после инъекции.

[000407] Долговременный эффект конъюгатов, содержащих контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1, тестировали в той же модели на мышцах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. Мышам инъекцировали ASO1-конъюгат в дозе, эквивалентной 10 мг/кг ASO1 в день 0 и день 7. Некоторых из мышей умерщвляли через две недели после инъекции и остальных умерщвляли через четыре недели после инъекции. Тестировали уровень экспрессии мутантного DMPK человека и *Dmpk* мышцы в различных мышечных тканях. На фиг. 13A показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в сердце на 9% через две недели после инъекции и 15% через четыре недели после инъекции. На фиг. 13B показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в диафрагме на 19% через две недели после инъекции и 34% через четыре недели после инъекции. На фиг. 13C показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в икроножной мышце на 7% через две недели после инъекции и 17% через четыре недели после инъекции. На фиг. 13D показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 6% через две недели после инъекции и 0% через четыре недели после инъекции. На фиг. 14A показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в сердце на 8% через две недели после инъекции и 13% через четыре недели после инъекции. На фиг. 14B показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в диафрагме на 14% через две недели после инъекции и 33% через четыре недели после инъекции. На фиг. 14C показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в икроножной мышце на 0% через две недели после инъекции и 6% через четыре недели после инъекции. На фиг. 14D показано, что ASO1-конъюгат не приводил к нокдауну *Dmpk* мышцы в передней большеберцовой мышце через две недели после инъекции и через четыре недели после инъекции. Количество ASO1 в сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце через 4 недели после инъекции показано на фиг. 15A-15D.

[000408] Кроме того, конъюгаты, содержащие контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1, тестировали в той же модели на мышцах, экспрессирующей TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущей подвергнутые экспансии повторы CUG,

но с использованием другой схемы инъекций/умерщвления. В этих экспериментах, ASO1-конъюгат инъецировали мышам в дозе, эквивалентной 12,7 мг/кг ASO1 в день 0, день 7, день 14 и день 21. Мышей умерщвляли через пять недель после инъекции. Тестировали уровень экспрессии мутантный DMPK человека и *Dmpk* мыши в различных мышечных тканях. На фиг. 16А показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в сердце на 5% через пять недель после инъекции. На фиг. 16В показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в диафрагме на 35% через пять недель после инъекции. На фиг. 16С показано, что ASO1-конъюгат, по-видимому, не приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в икроножной мышце через пять недель после инъекции. На фиг. 16D показано, что ASO1-конъюгат, по-видимому, не приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в передней большеберцовой мышце через пять недель после инъекции. На фиг. 17А показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в сердце на 13% через пять недель после инъекции. На фиг. 17В показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в диафрагме на 41% через пять недель после инъекции. На фиг. 17С показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в икроножной мышце на 5% через пять недель после инъекции. На фиг. 17D показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мыши на 10% в передней большеберцовой мышце через пять недель после инъекции. Количество ASO1 в сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце через пять недель после инъекции показано на фиг. 18А-18D.

[000409] Конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 (3M12-VH4/VK3), конъюгированный с ASO9, тестировали на активность в отношении снижения экспрессии DMPK в той же модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. ASO9-конъюгат инъецировали мышам в дозе, эквивалентной 10 мг/кг ASO9 в день 0 и день 7. Мышей умерщвляли через две недели после инъекции. Тестировали уровень экспрессии мутантного DMPK человека и *Dmpk* мыши в различных мышечных тканях. На фиг. 19А показано, что ASO9-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в сердце на 50% через две недели после инъекции. На фиг. 19В показано, что ASO9-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в диафрагме на 58% через две недели после инъекции. На фиг. 19С показано, что ASO9-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в передней большеберцовой мышце на 30% через две недели после инъекции. На фиг. 19D показано, что ASO9-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в икроножной мышце на 35% через две недели после инъекции. На фиг. 20А показано, что ASO9-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в сердце на 48% через две недели после инъекции. На фиг. 20В показано, что ASO9-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в диафрагме на 68% через две недели после инъекции. На фиг. 20С показано, что ASO9-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мыши в икроножной мышце на 45% через две недели после инъекции. На фиг. 20D показано, что ASO9-конъюгат приводил к нокдауну *Dmpk* мыши на 20% в передней большеберцовой мышце через две недели после инъекции. Количество ASO9 в

сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце через 2 недели после инъекции показано на фиг. 21A-21D.

[000410] Конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 (3M12-VH4/VK3), конъюгированный с ASO10, тестировали на активность в отношении снижения экспрессии DMPK в модели на мышах, экспрессирующих TfR1 человека и мутантный DMPK человека, несущий подвергнутые экспансии повторы CUG. Конъюгаты ASO10 инъецировали мышам в день 0 посредством инъекции в хвостовую вену в дозах, эквивалентных 5 мг/кг, 10 мг/кг или 20 мг/кг ASO10. Мышей умерщвляли через 28 дней инъекции. Тестировали уровень экспрессии мутантного DMPK человека в различных мышечных тканях. На фиг. 24A показано, что ASO10-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в сердце во всех тестируемых дозах через 28 дней инъекции. На фиг. 24B показано, что ASO10-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в диафрагме во всех тестируемых дозах через 28 дней инъекции. На фиг. 24C показано, что ASO10-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в икроножной мышце во всех тестируемых дозах через 28 дней инъекции. На фиг. 24D показано, что ASO10-конъюгат приводил к нокдауну мутантного DMPK человека в передней большеберцовой мышце во всех тестируемых дозах через 28 дней инъекции.

[000411] Кроме того, при субклеточном фракционировании с последующим анализом экспрессии генов в ядерных фракциях у мышей, которым инъецировали ASO10-конъюгат в дозе, эквивалентной 10 мг/кг ASO10, наблюдали доставку ASO10 в ядро, и что ASO10-конъюгат снижал накопление мутантной мРНК DMPK человека, захваченной в ядре. При субклеточном фракционировании икроножной мышцы мышей, которым инъецировали контрольный носитель, наблюдали, что мутантный DMPK человека захватывался в ядрах мышечных клеток (фиг. 25A). *Malat1* использовали в качестве маркера ядерной РНК (фиг. 25B) и *Birc5* и *Gapdh* использовали в качестве маркеров цитоплазматической РНК (фиг. 25C и фиг. 25D). Чистоту фракции подтверждали посредством вестерн-блоттинга на ядерные и цитоплазматические белковые маркеры: ядерный белковый маркер гистон H3 являлся единственным, присутствующим в ядерной фракции (фиг. 25E), и цитоплазматический белковый маркер GAPDH являлся единственным, присутствующим в цитоплазматической фракции (фиг. 25F). При субклеточном фракционировании икроножной мышцы мышей, которым инъецировали ASO10-конъюгат, наблюдали, что ASO10 снижал мутантный DMPK человека в тотальных тканевых экстрактах (фиг. 25G), и нокдаун был устойчивым в ядерной фракции мышечных клеток икроножной мышцы (фиг. 25H).

Пример 5. Активность *in vivo* конъюгатов, содержащих Fab против TfR1, конъюгированный с DMPK-специфическими олигонуклеотидами, у *Cynomolgus macaque*

[000412] Конъюгаты, содержащие контрольный Fab против TfR1, конъюгированный с ASO1, также тестировали на неявляющемся человеком примате (NHP) *Cynomolgus macaque* (яванском макаке). Яванским макакам вводили ASO1-конъюгат в дозе,

эквивалентной 10 мг/кг ASO1 в день 0 и день 7 и умерщвляли через 7 недель после инъекции. Тестировали экспрессию DMPK в различных мышечных тканях. На фиг. 22A показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну DMPK в сердце на 10% через семь недель после инъекции. На фиг. 22B показано, что ASO1-конъюгат, по-видимому, не приводил к нокдауну DMPK в диафрагме через семь недель после инъекции. На фиг. 22C показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну DMPK в икроножной мышце на 29% через семь недель после инъекции. На фиг. 22D показано, что ASO1-конъюгат приводил к нокдауну DMPK в передней большеберцовой мышце на 31% через семь недель после инъекции. Количество ASO1 в сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце через 7 недель после инъекции показано на 23A-23D.

[000413] Конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3, конъюгированный с ASO10 или ASO26, также тестировали на *Cynomolgus macaque* (яванском макаке). Яванским макакам вводили ASO10-конъюгат или ASO26-конъюгат посредством внутривенной инфузии в дозах, эквивалентных 1 мг/кг, 5 мг/кг или 10 мг/кг ASO10 или ASO26, соответственно. Яванских макаков умерщвляли через 28 дней после введения. Оценивали тканевые уровни ASO в сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце. Результаты свидетельствуют о том, что ASO10 и ASO26 присутствовали в тканях в зависимости от дозы (фиг. 26A-26D - ASO10 и фиг. 26E-26H - ASO26). Тестировали уровни экспрессии DMPK яванского макака дикого типа в различных мышечных тканях. Данные свидетельствуют о том, что ASO10-конъюгат являлся активным в клетках сердца и скелетных мышц у неявляющегося человеком примата, т.к. ASO10-конъюгат снижал DMPK яванского макака дикого типа в сердце, диафрагме, икроножной мышце и передней большеберцовой мышце (фиг. 27A-27D). ASO26 являлся активным в скелетных мышцах, но, по-видимому, не являлся активным в сердце (фиг. 27A-27D). Строили график данных для ASO10-конъюгата и ASO26-конъюгата в дозе, эквивалентной 10 мг/кг олигонуклеотида, вместе с ASO32, конъюгированным с контрольным антителом против TfR1, чтобы показать, что ASO10-конъюгат имел устойчивую активность в отношении нокдауна DMPK в сердечной и скелетной мышечных тканях, в то время как ASO26-конъюгат являлся активным в отношении нокдауна DMPK в скелетных мышечных тканях (фиг. 28A-28D).

Пример 6. Постоянный нокдаун токсичного DMPK человека у гомозиготных по hTfR1/DMSXL мышей через 4 недели после повторного введения конъюгатов Fab против TfR1-ASO10

[000414] Конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 (3M12 VH4/Vk3), ковалентно связанный с DMPK-специфическим олигонуклеотидом ASO10 ("конъюгат Fab против TfR1-ASO10") тестировали в модели на мышях, экспрессирующих TfR1 человека и две копии мутантного трансгена DMPK человека, несущего подвергнутые экспансии повторы CUG (мышь hTfR1/DMSXL). Мышам вводили контрольный носитель (PBS) или дозу конъюгата Fab против TfR1-ASO10, эквивалентную 10 мг/кг ASO10, в дни 0 и 7. Мышей умерщвляли в день 28 (через четыре недели после введения первой дозы конъюгата Fab

против TfR1-ASO10) и собирали ткани. Выделяли РНК и выбранные образцы ткани фиксировали, погружали в парафин и получали срезы, затем подвергали гибридизации *in situ*. Осуществляли количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (RT-qPCR) образцов РНК для измерения DMPK человека и Prib мыши (пептидилпролилизомеразы) в качестве внутреннего контроля. Экспрессия DMPK показан на фиг. 29А-29D в виде геометрических средних \pm стандартное отклонение (n=6-9). Значимость оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (*** $P < 0,0001$).

[000415] На фиг. 29А показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 приводил к нокдауну экспрессии DMPK в сердце на 49% относительно мышей, которым вводили PBS. На фиг. 29В показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 приводил к нокдауну экспрессии DMPK в диафрагме на 40% относительно мышей, которым вводили PBS. На фиг. 29С показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 приводил к нокдауну экспрессии DMPK в передней большеберцовой мышце на 49% относительно мышей, которым вводили PBS. На фиг. 29D показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 приводил к нокдауну экспрессии DMPK в икроножной мышце на 44% относительно мышей, которым вводили PBS.

[000416] На фиг. 30А и 30В показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 уменьшал фокусы DMPK в ядрах мышечных волокон. На фиг. 30А показаны уменьшенные фокусы DMPK по результатам гибридизации *in situ*, и на фиг. 30В показан количественный анализ фокусов DMPK на изображениях флуоресцентной микроскопии, на которых показано, что конъюгат уменьшал площадь фокусов на 49%. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (n=7). Значимость оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (* $P < 0,05$).

[000417] Эти результаты свидетельствуют о том, что введение конъюгата Fab против TfR1-ASO10 приводит к устойчивому, постоянному нокдауну токсического DMPK человека в сердечной и скелетной мышце.

Пример 7. Коррекция дефектов сплайсинга у гомозиготных по hTfR1/DMSXL мышей с помощью конъюгатов Fab против TfR1-ASO10

[000418] Конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 (3M12 VH4/Vk3), ковалентно связанный с DMPK-специфическим олигонуклеотидом ASO10 (конъюгат Fab против TfR1-ASO10), тестировали в модели на мышах ("hTfR1/DMSXL"), экспрессирующих TfR1 человека и две копии мутантного трансгена DMPK человека, несущего подвергнутые экспансии повторы CUG. Известно, что эти мыши демонстрируют дефекты сплайсинга, соответствующие наблюдаемым у пациентов, страдающих DM1 (Huguet, et al. (2012) *PLoS Genetics* 8(11): e1003043). Мышам вводили контрольный носитель ("hTfR1/DMSXL-PBS") или дозу конъюгат Fab против TfR1-ASO10 ("hTfR1/DMSXL-конъюгат"), эквивалентную 10 мг/кг ASO10, в дни 0 и 7. Мышей, экспрессирующих только TfR1 человека, но не мутантный трансген DMPK человека (мышей hTfR1), и которым вводили PBS ("hTfR1-PBS"), использовали в качестве другого контроля для определения степени фенотипа сплайсинга у мышей hTfR1/DMSXL и оценки величины эффекта конъюгата в отношении

сплайсинга. Мышей умерщвляли в день 28 (через четыре недели после введения первой дозы конъюгата Fab против TfR1-ASO10), собирали ткани и выделяли РНК. Количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (RT-qPCR) осуществляли для измерения включения экзонов в набор РНК, как известно, подвергающийся неправильному сплайсингу при прогрессировании DM1 у людей и мышей (Nakamori, et al. (2013) *Ann. Neurol.* 74(6): 862-872; Huguet, et al. (2012) *PLOS Genetics* 8(11): e1003043). Включение экзонов вычисляли как нормализованный процент сплайсированных в (PSI) для каждого маркера сплайсинга РНК, и интегральные индексы сплайсинга вычисляли с использованием нормализованных значений PSI маркеров сплайсинга в сердце (фиг. 31), диафрагме (фиг. 32), передней большеберцовой мышце (фиг. 33) и икроножной мышце (фиг. 34). Интегральные индексы сплайсинга вычисляли, как описано ранее (Tanner MK, et al. (2021) *Nucleic Acids Res.* 49:2240-2254), и они приведены как среднее \pm стандартное отклонение.

[000419] На фиг. 31 показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 корректировал сплайсинг в ткани сердца мышей hTfR1/DMSXL, о чем свидетельствуют данные интегральных индексов сплайсинга. Нормализованные значения PSI, используемые для получения данных интегральных индексов сплайсинга, демонстрировали коррекцию сплайсинга экзона 6 *Mbnl2* (E6) и E7 *Nfix* в ткани сердца мышей hTfR1/DMSXL при введении конъюгата Fab против TfR1-ASO10, но не демонстрировали коррекцию сплайсинга E11*Ldb3*. Данные интегральных индексов сплайсинга, показанные на фиг. 31, основаны на данных о сплайсинге E11 *Ldb3*, E6 *Mbnl2* и E7 *Nfix*; E11 *Bin1*, E12 *Dtna*, E11 *Insr* и E5 *Mbnl2* не включали, т.к. их нормализованные значения PSI в ткани сердца не изменялись у мышей hTfR1/DMSXL относительно мышей hTfR1 в тестируемых экспериментальных условиях.

[000420] На фиг. 32 показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 корректировал сплайсинг в ткани диафрагмы мышей hTfR1/DMSXL, о чем свидетельствуют данные интегральных индексов сплайсинга. Нормализованные значения PSI, используемые для получения данных интегральных индексов сплайсинга, демонстрировали коррекцию сплайсинга E11 *Bin1*, E11*Insr*, E11 *Ldb3* и E7 *Nfix* в ткани диафрагмы мышей hTfR1/DMSXL при введении конъюгата Fab против TfR1-ASO10. Данные интегральных индексов сплайсинга, показанные на фиг. 32, основаны на данных о сплайсинге E11 *Bin1*, E11 *Insr*, E11 *Ldb3* и E7 *Nfix*; E12 *Dtna*, E5 *Mbnl2*, E6 *Mbnl2* и E313 *Ttn* не включали, т.к. их нормализованные значения PSI в ткани диафрагмы не изменялись у мышей hTfR1/DMSXL относительно мышей hTfR1 в тестируемых экспериментальных условиях.

[000421] На фиг. 33 показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 корректировал сплайсинг в ткани передней большеберцовой мышцы мышей hTfR1/DMSXL, о чем свидетельствуют данные интегральных индексов сплайсинга. Нормализованные значения PSI, используемые для получения данных интегральных индексов сплайсинга, демонстрировали коррекцию сплайсинга E11 *Bin1*, E11 *Ldb3* и E7 *Nfix* в ткани передней большеберцовой мышцы мышей hTfR1/DMSXL при введении конъюгата Fab против TfR1-

ASO10, но не демонстрировали коррекцию сплайсинга E6 *Mbnl2*. Данные интегральных индексов сплайсинга, показанные на фиг. 33, основаны на данных о сплайсинге E11 *Bin1*, E11 *Ldb3*, E6 *Mbnl2* и E7 *Nfix*; E12 *Dtna*, E11 *Insr*, E5 *Mbnl2* и E313 *Ttn* не включали, т.к. их нормализованные значения PSI в ткани диафрагмы не изменялись у мышей hTfR1/DMSXL относительно мышей hTfR1 в тестируемых экспериментальных условиях.

[000422] На фиг. 34 показано, что конъюгат Fab против TfR1-ASO10 корректировал сплайсинг в ткани икроножной мышцы мышей hTfR1/DMSXL, о чем свидетельствуют данные интегральных индексов сплайсинга. Нормализованные значения PSI, используемые для получения данных интегральных индексов сплайсинга, демонстрировали коррекцию сплайсинга E6 *Mbnl2*, E7 *Nfix* и E313 *Ttn* в ткани икроножной мышцы мышей hTfR1/DMSXL при введении конъюгата Fab против TfR1-ASO10. Данные интегральных индексов сплайсинга, показанные на фиг. 34, основаны на данных о сплайсинге E6 *Mbnl2*, E7 *Nfix* и E313 *Ttn*; E11 *Bin1*, E12 *Dtna*, E11 *Insr*, E11 *Ldb3* и E5 *Mbnl2* не включали, т.к. их нормализованные значения PSI в ткани диафрагмы не изменялись у мышей hTfR1/DMSXL относительно мышей hTfR1 в тестируемых экспериментальных условиях.

[000423] Эти результаты свидетельствуют о том, что введение конъюгата Fab против TfR1-ASO10 облегчает коррекцию дефектов сплайсинга DM1 в сердечной и скелетной мышце.

Пример 8. Нокдаун DMPK в мышечных трубочках неявляющегося человеком примата и пациента с DM1

[000424] Конъюгаты, содержащие Fab против TfR1 (3M12 VH4/Vk3), ковалентно связанный с DMPK-специфическим олигонуклеотидом ASO10 (конъюгат Fab против TfR1-ASO10), тестировали на мышечных трубочках пациента-человека с DM1 (клетках 32F) и мышечных трубочках неявляющегося человеком примата (NHP). Используемые мышечные трубочки пациента с DM1 экспрессируют мутантный мРНК DMPK, содержащий 380 повторов CUG и мРНК DMPK дикого типа. Используемые NHP мышечные трубочки экспрессируют только DMPK дикого типа.

[000425] Клетки пациента с DM1 или клетки NHP высевали при плотности 50000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты в среде для выращивания и позволяли им восстанавливаться в течение ночи. На следующий день среду для выращивания меняли на дифференцировочную среду с низким содержанием сыворотки и клетки обрабатывали конъюгатами в концентрации, эквивалентной 125 нМ, 250 нМ или 500 нМ ASO10. Клетки инкубировали в течение десяти дней, затем кДНК синтезировали с использованием набора Cell-to-Ct с необработанными лизатами клеток в качестве источника тотальной РНК.

[000426] кДНК использовали для оценки нокдауна тотальной DMPK с использованием Taqman-ПЦР. Данные нормализовали по экспрессии PPIВ и использовали способ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ для определения нокдауна DMPK по сравнению с обработанным PBS контролем ("носитель"). Данные, показанные на фиг. 35, представлены как средняя экспрессия DMPK относительно совпадающего по виду контрольный носитель+стандартное отклонение (n=4 параллели на условие).

[000427] Результаты свидетельствуют о том, что с помощью конъюгатов Fab против TfR1-ASO10 достигали нокдауна экспрессии DMPK в мышечных трубочках NHP WT и мышечных трубочках пациента с DM1, при этом больший нокдаун экспрессии DMPK наблюдали в клетках пациента DM1 (экспрессирующих мРНК DMPK, содержащую 380 повторов CUG, и мРНК DMPK дикого типа) по сравнению с клетками NHP (экспрессирующими только мРНК DMPK дикого типа) при обработке в физиологически значимых концентрациях (фиг. 35). При концентрации ASO10-эквивалента 125 нМ с помощью конъюгатов достигали нокдауна приблизительно 40% DMPK относительно контроля только с носителем в мышечных трубочках NHP и приблизительно 65% DMPK в мышечных трубочках пациента с DM1. При концентрации ASO10-эквивалента 250 нМ с помощью конъюгатов достигали нокдауна приблизительно 45% DMPK относительно контроля только с носителем в мышечных трубочках NHP и приблизительно 80% DMPK в мышечных трубочках пациента с DM1. При концентрации ASO10-эквивалента 500 нМ с помощью конъюгатов достигали нокдауна приблизительно 60% DMPK относительно контроля только с носителем в мышечных трубочках NHP и приблизительно 90% DMPK в мышечных трубочках пациента DM1.

[000428] Эти результаты свидетельствуют о том, что с помощью конъюгатов, содержащих Fab против TfR1, ковалентно связанный с DMPK-специфическим олигонуклеотидом, можно достигать большего нокдауна DMPK в мышечных трубочках человека, экспрессирующих мРНК DMPK дикого типа и мутантную мРНК DMPK (с подвергнутыми экспансии повторами CUG), относительно мышечных трубочек яванского макака, экспрессирующих DMPK дикого типа.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с антисмысловым олигонуклеотидом, сконфигурированным для ингибирования экспрессии или активности аллеля DMPK, содержащего ассоциированный с заболеванием повтор, где антисмысловый олигонуклеотид имеет длину 15-20 нуклеотидов, содержит область комплементарности по меньшей мере 15 последовательным нуклеозидам любой из SEQ ID NO: 160-172 и 202 и содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где

X содержит 3-5 связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в X является 2'-модифицированным нуклеозидом;

Y содержит 6-10 связанных 2'-дезоксирибонуклеозидов, где каждый цитозин в Y необязательно и независимо является 5-метилцитозином; и

Z содержит 3-5 связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом.

2. Комплекс по варианту осуществления 1, где мышечно-специфическое средство содержит антитело против рецептора трансферрина 1 (TfR1).

3. Комплекс по варианту осуществления 1 или вариант осуществления 2, где антисмысловый олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 174177179-182 и 184-192.

4. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-3, где каждый нуклеозид в X является 2'-модифицированным нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом, необязательно, где каждый 2'-модифицированный нуклеозид независимо представляет собой 2'-4'-бициклический нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид.

5. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-4, где каждый нуклеозид в X является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом, необязательно, где небициклический 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом.

6. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-4, где каждый нуклеозид в X является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом, необязательно, где 2'-4'-бициклический нуклеозид выбран из ЗНК, сEt и ENA.

7. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-4, где X содержит по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид и по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид, и/или Z содержит по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид и по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид, необязательно, где по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом, и по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид выбран из ЗНК, сEt и ENA.

8. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-7, где антисмысловой олигонуклеотид содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3':

X	Y	Z
EEEE	(D) ₁₀	EEEE,
EEE	(D) ₁₀	EEE,
EEEE	(D) ₁₀	EEEE,
EEEE	(D) ₁₀	EE,
LLL	(D) ₁₀	LLL,
LLEE	(D) ₈	EELL, или
LLEE	(D) ₁₀	EEELL,

где "E" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "L" является ЗНК; "D" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; и "10" или "8" является количеством 2'-дезоксирибонуклеозидов в Y.

9. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-8, где антисмысловой олигонуклеотид содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей.

10. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-9, где каждая межнуклеозидная связь в антисмысловом олигонуклеотиде является фосфотиоатной межнуклеозидной связью.

11. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-9, где антисмысловый олигонуклеотид содержит одну или более фосфодиэфирных межнуклеозидных связей, необязательно, где фосфодиэфирные межнуклеозидные связи находятся в X и или Z.

12. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-3, где антисмысловый олигонуклеотид выбран из:

+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

+C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA (SEQ ID NO: 179),

oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC

(SEQ ID NO: 185),

oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA

(SEQ ID NO: 174),

oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*oG*oC

(SEQ ID NO: 186),

+G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

+G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

+C*+G*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*oU*oC*+U*+G (SEQ ID NO: 177),

+U*+A*oG*oA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*+C*+C (SEQ ID NO: 188),

+C*+C*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*oA*oG*+U*+C (SEQ ID NO: 180),

+A*+G*oC*oG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*+A*+C (SEQ ID NO: 181),

+A*+U*+C*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*+U*+C*+C (SEQ ID NO: 189),

+C*+A*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*oA*oA*+U*+C (SEQ ID NO: 190),

+A*+U*oC*oU*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*oA*oU*+C*+C (SEQ ID NO: 182),

+U*+C*oU*oC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*+C*+G (SEQ ID NO: 184),

oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC (SEQ ID NO: 187),

oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC (SEQ ID NO: 189),

+G*+C*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*+C*+C

(SEQ ID NO: 185),

+C*+C*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*+C*+A

(SEQ ID NO: 174),

+C*+C*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*+G*+C

(SEQ ID NO: 186),

oG*oCoG*oUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC*oC (SEQ ID

NO: 185),

oC*oCoC*oAoG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoC*oAoC*oA (SEQ ID

NO: 174),

oC*oCoA*oUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoC*oCoG*oC (SEQ ID NO: 186),

oG*oCoGoUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoGoCoC*oC (SEQ ID NO: 185),

oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCoAoC*oA (SEQ ID NO: 174),

oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoCoCoG*oC (SEQ ID NO: 186),

oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC (SEQ ID NO: 191), и

oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG (SEQ ID NO: 192),

где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C" является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU" является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

13. Комплекс по любому из вариантов осуществления 2-12, где антитело против Tfr1 содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) любого из антител против Tfr1, приведенных в таблице 2.

14. Комплекс по любому из вариантов осуществления 2-13, где антитело против Tfr1 содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL) любого из антител против Tfr1, приведенных в таблице 3.

15. Комплекс по любому из вариантов осуществления 2-13, где антитело против Tfr1 является Fab, необязательно, где Fab содержит тяжелую цепь и легкую цепь любого из Fab против Tfr1, приведенных в таблице 5.

16. Комплекс по любому из вариантов осуществления 1-15, где мышечно-специфическое средство и антисмысловой олигонуклеотид ковалентно связаны через линкер, необязательно, где линкер содержит дипептид валин-цитруллин.

17. Способ снижения экспрессии DMPK в мышечной клетке, включающий приведение мышечной клетки в контакт с эффективным количеством комплекса по любому из вариантов осуществления 1-16 для стимуляции интернализации антисмыслового олигонуклеотида в мышечную клетку.

18. Способ лечения миотонической дистрофии типа 1 (DM1), включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества комплекса по любому из вариантов осуществления 1-16.

19. Способ по варианту осуществления 18, где введение комплекса приводит к снижению мРНК DMPK на по меньшей мере 30%.

20. Способ по варианту осуществления 18, где введение комплекса приводит к снижению мутантной мРНК DMPK в ядре мышечной клетки у индивидуума.

21. Антисмысловой олигонуклеотид, выбранный из:

+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

+C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA (SEQ ID NO: 179),

oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC

(SEQ ID NO: 185),

oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA

(SEQ ID NO: 174),

oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*oG*oC

(SEQ ID NO: 186),

+G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

+G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

+C*+G*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*oU*oC*+U*+G (SEQ ID NO: 177),

+U*+A*oG*oA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*+C*+C (SEQ ID NO: 188),

+C*+C*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*oA*oG*+U*+C (SEQ ID NO: 180),

+A*+G*oC*oG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*+A*+C (SEQ ID NO: 181),

+A*+U*+C*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*+U*+C*+C (SEQ ID NO: 189),

+C*+A*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*oA*oA*+U*+C (SEQ ID NO: 190),

+A*+U*oC*oU*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*oA*oU*+C*+C (SEQ ID NO: 182),

+U*+C*oU*oC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*+C*+G (SEQ ID NO: 184),

oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC (SEQ ID NO: 187),

oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC (SEQ ID NO: 189),

+G*+C*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*+C*+C

(SEQ ID NO: 185),

+C*+C*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*+C*+A(SEQ

Q ID NO: 174),

+C*+C*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*+G*+C

(SEQ ID NO: 186),

oG*oCoG*oUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC*oC (SEQ ID

NO: 185),

oC*oCoC*oAoG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoC*oAoC*oA (SEQ ID

NO: 174),

oC*oCoA*oUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoC*oCoG*oC (SEQ ID NO: 186),

oG*oCoGoUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoGoCoC*oC (SEQ ID NO: 185),

oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCoAoC*oA (SEQ ID NO: 174),

oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoCoCoG*oC (SEQ ID NO: 186),

oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC (SEQ ID NO: 191), и

oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG (SEQ ID NO: 192),

где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C" является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU" является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

22. Антисмысловой олигонуклеотид по варианту осуществления 21, где антисмысловой олигонуклеотид выбран из:

NH₂-(CH₂)₆-+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

NH₂-(CH₂)₆-+C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

NH₂-(CH₂)₆-oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA (SEQ ID NO: 179),

NH₂-(CH₂)₆-oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC (SEQ ID NO: 185),

NH₂-(CH₂)₆-oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA (SEQ ID NO: 174),

NH₂-(CH₂)₆-oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*oG*oC (SEQ ID NO: 186),

NH₂-(CH₂)₆-+G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

NH₂-(CH₂)₆-+G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{C}^*+\text{G}^*\text{oU}^*\text{oA}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{oU}^*\text{oC}^*+\text{U}^*+\text{G}$ (SEQ ID NO: 177),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{U}^*+\text{A}^*\text{oG}^*\text{oA}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dT}^*\text{dC}^*\text{oU}^*\text{oG}^*+\text{C}^*+\text{C}$ (SEQ ID NO: 188),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{C}^*+\text{C}^*\text{oA}^*\text{oG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dA}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{oA}^*\text{oG}^*+\text{U}^*+\text{C}$ (SEQ ID NO: 180),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{A}^*+\text{G}^*\text{oC}^*\text{oG}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dA}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{oU}^*\text{oC}^*+\text{A}^*+\text{C}$ (SEQ ID NO: 181),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{A}^*+\text{U}^*+\text{C}^*\text{dT}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dA}^*+\text{U}^*+\text{C}^*+\text{C}$ (SEQ ID NO: 189),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{C}^*+\text{A}^*\text{oU}^*\text{oC}^*\text{dT}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{oA}^*\text{oA}^*+\text{U}^*+\text{C}$ (SEQ ID NO: 190),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{A}^*+\text{U}^*\text{oC}^*\text{oU}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{oA}^*\text{oU}^*+\text{C}^*+\text{C}$ (SEQ ID NO: 182),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{U}^*+\text{C}^*\text{oU}^*\text{oC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dA}^*\text{oU}^*\text{oC}^*+\text{C}^*+\text{G}$ (SEQ ID NO: 184),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{oG}^*\text{oU}^*\text{oA}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dT}^*\text{dC}^*\text{oU}^*\text{oG}^*\text{oC}$ (SEQ ID NO: 187),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{oA}^*\text{oU}^*\text{oC}^*\text{dT}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dA}^*\text{oU}^*\text{oC}^*\text{oC}$ (SEQ ID NO: 189),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{G}^*+\text{C}^*\text{oG}^*\text{oU}^*\text{oA}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dT}^*\text{dC}^*\text{oU}^*\text{oG}^*\text{oC}^*+\text{C}^*+\text{C}$ (SEQ ID NO: 185),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{C}^*+\text{C}^*\text{oC}^*\text{oA}^*\text{oG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dA}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{oU}^*\text{oC}^*\text{oA}^*+\text{C}^*+\text{A}$ (SEQ ID NO: 174),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{C}^*+\text{C}^*\text{oA}^*\text{oU}^*\text{oC}^*\text{dT}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dA}^*\text{oU}^*\text{oC}^*\text{oC}^*+\text{G}^*+\text{C}$ (SEQ ID NO: 186),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{oG}^*\text{oCoG}^*\text{oUoA}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dT}^*\text{dC}^*\text{oUoG}^*\text{oCoC}^*\text{oC}$ (SEQ ID NO: 185),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{oC}^*\text{oCoC}^*\text{oAoG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dA}^*\text{dC}^*\text{dC}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{oUoC}^*\text{oAoC}^*\text{oA}$ (SEQ ID NO: 174),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{oC}^*\text{oCoA}^*\text{oUoC}^*\text{dT}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dC}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dA}^*\text{oUoC}^*\text{oCoG}^*\text{oC}$ (SEQ ID NO: 186),

$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{oG}^*\text{oCoGoUoA}^*\text{dG}^*\text{dA}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{dG}^*\text{xdC}^*\text{dG}^*\text{dT}^*\text{dC}^*\text{oUoGoCoC}^*\text{oC}$ (SEQ ID NO: 185),

NH₂-(CH₂)₆-
oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCoAoC*oA (SEQ ID NO: 174),

NH₂-(CH₂)₆-
oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoCoCoG*oC (SEQ ID NO: 186),

NH₂-(CH₂)₆-oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC
(SEQ ID NO: 191), и

NH₂-(CH₂)₆-oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG (SEQ ID NO: 192),

где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C" является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU" является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь,

и где фосфодиэфирная связь находится между 5'-NH₂-(CH₂)₆- и антисмысловым олигонуклеотидом.

23. Композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид по варианту осуществления 21 или варианту осуществления 22 в форме натриевой соли.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ТЕРМИНОЛОГИЯ

[000429] 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.

[000430] 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.

[000431] 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.

[000432] 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.

[000433] Варианты осуществления настоящего изобретения представлены в настоящем описании. Варианты этих вариантов осуществления могут становиться очевидными специалистам в этой области после прочтения изложенного выше описания.

[000434] 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 мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с антисмысловым олигонуклеотидом, где антисмысловый олигонуклеотид имеет длину 15-20 нуклеотидов, содержит область комплементарности по меньшей мере 15 последовательным нуклеозидам любой из SEQ ID NO: 166, 163, 167, 160, 169, 171, 202, 161, 162, 170, 165, 164, 172 и 168 и содержит конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где

X содержит 3-5 связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в X является 2'-модифицированным нуклеозидом;

Y содержит 6-10 связанных 2'-дезоксирибонуклеозидов, где каждый цитозин в Y необязательно и независимо является 5-метилцитозином; и

Z содержит 3-5 связанных нуклеозидов, где по меньшей мере один из нуклеозидов в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом.

2. Комплекс по п.1, где мышечно-специфическое средство содержит антитело против рецептора трансферрина 1 (TfR1).

3. Комплекс по п.1 или 2, где антисмысловый олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 179, 187, 180, 185, 189, 182, 191, 184, 174, 186, 190, 188, 177, 192 и 181.

4. Комплекс по любому из пп.1-3, где каждый нуклеозид в X является 2'-модифицированным нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z является 2'-модифицированным нуклеозидом, необязательно, где каждый 2'-модифицированный нуклеозид независимо представляет собой 2'-4'-бициклический нуклеозид или небициклический 2'-модифицированный нуклеозид.

5. Комплекс по любому из пп.1-4, где каждый нуклеозид в X является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом, необязательно, где небициклический 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом.

6. Комплекс по любому из пп.1-4, где каждый нуклеозид в X является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом, и/или каждый нуклеозид в Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом, необязательно, где 2'-4'-бициклический нуклеозид выбран из ЗНК, сEt и ENA.

7. Комплекс по любому из пп.1-4, где X содержит по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид и по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид, и/или Z содержит по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид и по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид, необязательно, где по меньшей мере один небициклический 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-МОЕ-модифицированным нуклеозидом, и по меньшей мере один 2'-4'-бициклический нуклеозид выбран из ЗНК, сEt и ENA.

8. Комплекс по любому из пп.1-7, где антисмысловый олигонуклеотид содержит

конфигурацию 5'-X-Y-Z-3':

X	Y	Z
EEEEEE	(D) ₁₀	EEEEEE,
EEE	(D) ₁₀	EEE,
EEEEEE	(D) ₁₀	EEEE,
EEEEEE	(D) ₁₀	EE,
LLL	(D) ₁₀	LLL,
LLEE	(D) ₈	EELL, или
LLEEE	(D) ₁₀	EEELL,

где "E" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "L" является ЗНК; "D" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; и "10" или "8" является количеством 2'-дезоксирибонуклеозидов в Y.

9. Комплекс по любому из пп.1-8, где антисмысловый олигонуклеотид содержит одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей.

10. Комплекс по любому из пп.1-9, где каждая межнуклеозидная связь в антисмысловом олигонуклеотиде является фосфотиоатной межнуклеозидной связью.

11. Комплекс по любому из пп.1-9, где антисмысловый олигонуклеотид содержит одну или более фосфодизфирных межнуклеозидных связей, необязательно, где фосфодизфирные межнуклеозидные связи находятся в X и/или Z.

12. Комплекс по любому из пп.1-3, где антисмысловый олигонуклеотид содержит олигонуклеотид, выбранный из:

+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A (SEQ ID NO: 179),
 +C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A (SEQ ID NO: 179),
 oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA (SEQ ID NO: 179),
 oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC

(SEQ ID NO: 185),

oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA

(SEQ ID NO: 174),

oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*oG*oC

(SEQ ID NO: 186),

+G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+C (SEQ ID NO: 187),
 +G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C (SEQ ID NO: 187),
 +C*+G*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*oU*oC*+U*+G (SEQ ID NO: 177),
 +U*+A*oG*oA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*+C*+C (SEQ ID NO: 188),
 +C*+C*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*oA*oG*+U*+C (SEQ ID NO: 180),
 +A*+G*oC*oG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*+A*+C (SEQ ID NO: 181),
 +A*+U*+C*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*+U*+C*+C (SEQ ID NO: 189),
 +C*+A*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*oA*oA*+U*+C (SEQ ID NO: 190),
 +A*+U*oC*oU*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*oA*oU*+C*+C (SEQ ID NO: 182),

+U*+C*oU*oC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*+C*+G (SEQ ID NO: 184),
oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC (SEQ ID NO: 187),
oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC (SEQ ID NO: 189),
+G*+C*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*+C*+C
(SEQ ID NO: 185),
+C*+C*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*+C*+A
(SEQ ID NO: 174),
+C*+C*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*+G*+C
(SEQ ID NO: 186),
oG*oCoG*oUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC*oC (SEQ ID
NO: 185),
oC*oCoC*oAoG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoC*oAoC*oA (SEQ ID
NO: 174),
oC*oCoA*oUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoC*oCoG*oC (SEQ
ID NO: 186),
oG*oCoGoUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoGoCoC*oC (SEQ ID
NO: 185),
oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCoAoC*oA (SEQ ID
NO: 174),
oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoCoCoG*oC (SEQ ID
NO: 186),
oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC (SEQ ID NO:
191), и
oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG (SEQ ID NO: 192),
где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-
дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-
модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C"
является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU"
является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим
уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную
связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодизэфирную межнуклеозидную
связь.

13. Комплекс по любому из пп.2-12, где антитело против TfR1 содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) любого из антител против TfR1, приведенных в таблице 2.

14. Комплекс по любому из пп.2-13, где антитело против TfR1 содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) любого из антител против TfR1, приведенных в таблице 3.

15. Комплекс по любому из пп.2-13, где антитело против TfR1 является Fab, необязательно, где Fab содержит тяжелую цепь и легкую цепь любого из Fab против TfR1, приведенных в таблице 5.

16. Комплекс по любому из пп.2-13, где антитело против TfR1 содержит:

(i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(ii) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; или

(ii) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

17. Комплекс по п.16, где антитело против TfR1 содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

18. Комплекс по п.17, где антитело против TfR1 является Fab и содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

19. Комплекс по любому из пп.1-18, где мышечно-специфическое средство и антисмысловой олигонуклеотид ковалентно связаны через линкер, необязательно, где линкер содержит дипептид валин-цитруллин.

20. Способ снижения экспрессии DMPK в мышечной клетке, включающий приведение мышечной клетки в контакт с эффективным количеством комплекса по любому из пп.1-19 для стимуляции интернализации антисмыслового олигонуклеотида в мышечную клетку.

21. Способ по п.20, где снижение экспрессии DMPK включает снижение уровня мРНК DMPK в мышечной клетке, необязательно, где мРНК DMPK является мутантной мРНК DMPK.

22. Способ лечения миотонической дистрофии типа 1 (DM1), включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества комплекса по любому из пп.1-19.

23. Способ по п.22, где индивидуум имеет мутантный аллель DMPK, содержащий ассоциированные с заболеванием повторы CUG.

24. Способ по п.22 или 23, где введение комплекса приводит к снижению мРНК DMPK на по меньшей мере 30%.

25. Способ по п.23 или 24, где введение комплекса приводит к снижению мутантного мРНК DMPK в ядре мышечной клетки индивидуума.

26. Антисмысловый олигонуклеотид, содержащий олигонуклеотид, выбранный из:
 +C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A (SEQ ID NO: 179),
 +C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A (SEQ ID NO: 179),
 oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA (SEQ ID NO: 179),
 oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC
 (SEQ ID NO: 185),

oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA
 (SEQ ID NO: 174),

oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*oG*oC
 (SEQ ID NO: 186),

+G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+C (SEQ ID NO: 187),
 +G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C (SEQ ID NO: 187),
 +C*+G*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*oU*oC*+U*+G (SEQ ID NO: 177),
 +U*+A*oG*oA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*+C*+C (SEQ ID NO: 188),
 +C*+C*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*oA*oG*+U*+C (SEQ ID NO: 180),
 +A*+G*oC*oG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*+A*+C (SEQ ID NO: 181),
 +A*+U*+C*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*+U*+C*+C (SEQ ID NO: 189),
 +C*+A*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*oA*oA*+U*+C (SEQ ID NO: 190),
 +A*+U*oC*oU*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*oA*oU*+C*+C (SEQ ID NO: 182),
 +U*+C*oU*oC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*+C*+G (SEQ ID NO: 184),
 oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC (SEQ ID NO: 187),
 oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC (SEQ ID NO: 189),
 +G*+C*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*+C*+C
 (SEQ ID NO: 185),

+C*+C*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*+C*+A
 (SEQ ID NO: 174),

+C*+C*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*+G*+C
 (SEQ ID NO: 186),

oG*oCoG*oUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC*oC (SEQ ID
 NO: 185),

oC*oCoC*oAoG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoC*oAoC*oA (SEQ ID

NO: 174),

oC*oCoA*oUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoC*oCoG*oC (SEQ ID NO: 186),

oG*oCoGoUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoGoCoC*oC (SEQ ID NO: 185),

oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCoAoC*oA (SEQ ID NO: 174),

oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoCoCoG*oC (SEQ ID NO: 186),

oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC (SEQ ID NO: 191), и

oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG (SEQ ID NO: 192),

где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C" является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU" является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

27. Антисмысловый олигонуклеотид по п.26, где антисмысловый олигонуклеотид содержит олигонуклеотид, выбранный из:

NH₂-(CH₂)₆-+C*+A*oG*oC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*oG*oU*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

NH₂-(CH₂)₆-+C*+A*+G*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*+U*+C*+A (SEQ ID NO: 179),

NH₂-(CH₂)₆-oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA (SEQ ID NO: 179),

NH₂-(CH₂)₆-

oG*oC*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*oC*oC (SEQ ID NO: 185),

NH₂-(CH₂)₆-

oC*oC*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*oC*oA (SEQ ID NO: 174),

NH₂-(CH₂)₆-

oC*oC*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*oG*oC (SEQ ID NO: 186),

NH₂-(CH₂)₆-+G*+U*+A*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*+U*+G*+C (SEQ ID NO: 187),

NH₂-(CH₂)₆-+G*+U*oA*oG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*oC*oU*+G*+C (SEQ

ID NO: 187),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-+C*+G*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*oU*oC*+U*+G}$ (SEQ

ID NO: 177),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-+U*+A*oG*oA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*+C*+C}$ (SEQ

ID NO: 188),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-+C*+C*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*oA*oG*+U*+C}$ (SEQ

ID NO: 180),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-+A*+G*oC*oG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*+A*+C}$ (SEQ ID

NO: 181),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-+A*+U*+C*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*+U*+C*+C}$ (SEQ

ID NO: 189),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-+C*+A*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*oA*oA*+U*+C}$ (SEQ

ID NO: 190),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-+A*+U*oC*oU*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*oA*oU*+C*+C}$ (SEQ

ID NO: 182),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-+U*+C*oU*oC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*+C*+G}$ (SEQ

ID NO: 184),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC}$ (SEQ

ID NO: 187),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC}$ (SEQ

ID NO: 189),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$

$\text{+G*+C*oG*oU*oA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG*oC*+C*+C}$ (SEQ ID
NO: 185),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$

$\text{+C*+C*oC*oA*oG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oU*oC*oA*+C*+A}$ (SEQ ID
NO: 174),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$

$\text{+C*+C*oA*oU*oC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oU*oC*oC*+G*+C}$ (SEQ ID
NO: 186),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$

$\text{oG*oCoG*oUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC*oC}$ (SEQ ID NO:
185),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$

$\text{oC*oCoC*oAoG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoC*oAoC*oA}$ (SEQ ID NO:
174),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$

$\text{oC*oCoA*oUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoC*oCoG*oC}$ (SEQ ID NO:
186),

$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-}$

oG*oCoGoUoA*dG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoGoCoC*oC (SEQ ID NO: 185),
NH₂-(CH₂)₆-

oC*oCoCoAoG*xdC*dG*dC*dC*dC*dA*dC*dC*dA*dG*oUoCoAoC*oA (SEQ ID NO: 174),
NH₂-(CH₂)₆-

oC*oCoAoUoC*dT*xdC*dG*dG*dC*xdC*dG*dG*dA*dA*oUoCoCoG*oC (SEQ ID NO:
186),

NH₂-(CH₂)₆-oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oUoG*oCoC
(SEQ ID NO: 191), и

NH₂-(CH₂)₆-oGoC*oGoU*oAdG*dA*dA*dG*dG*dG*xdC*dG*dT*dC*oU*oG (SEQ
ID NO: 192),

где "xdC" является 5-метил-дезоксцитидином; "dN" является 2'-дезоксирибонуклеозидом; "+N" является нуклеозидом ЗНК; "oN" является 2'-МОЕ-модифицированным рибонуклеозидом; "oC" является 5-метил-2'-МОЕ-цитидином; "+C" является 5-метил-2'-4'-бициклическим цитидином (2'-4'-метиленовым мостиком); "oU" является 5-метил-2'-МОЕ-уридином; "+U" является 5-метил-2'-4'-бициклическим уридином (2'-4'-метиленовым мостиком); "*" означает фосфотиоатную межнуклеозидную связь; и отсутствие "*" между нуклеозидами означает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь,

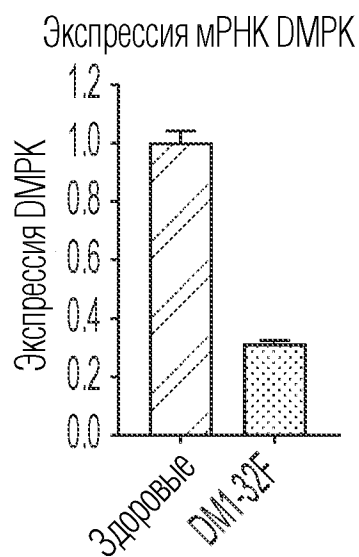
и где фосфодиэфирная связь находится между 5'-NH₂-(CH₂)₆- и антисмысловым олигонуклеотидом.

28. Композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид по п.26 или 27 в форме натриевой соли.

По доверенности

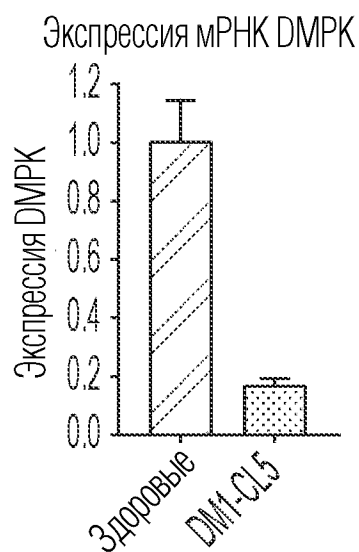
1/43

Первичные клетки DM1-32F

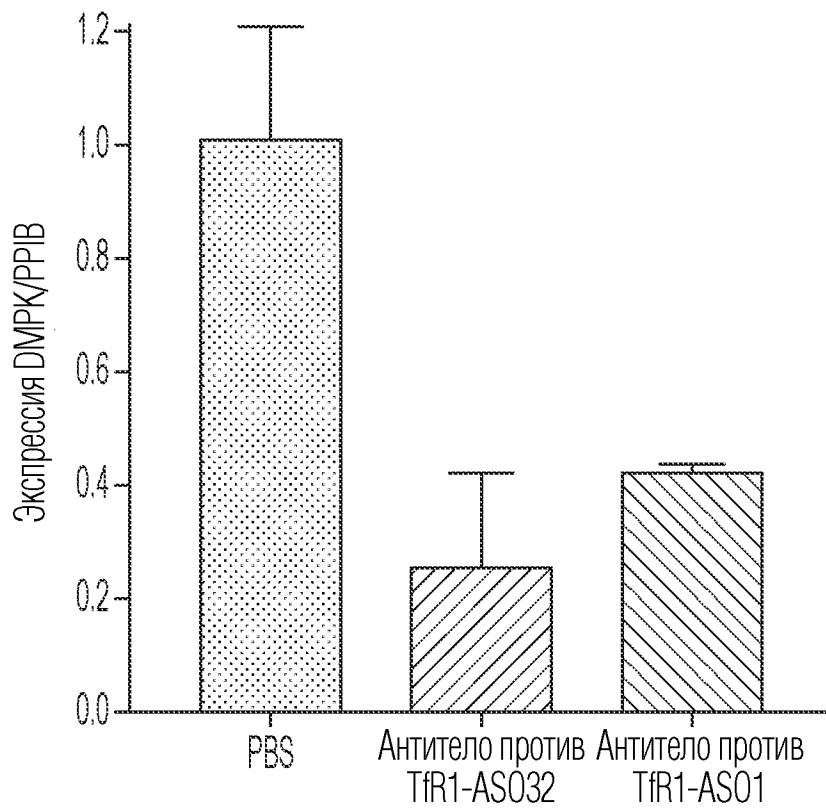


ФИГ. 1А

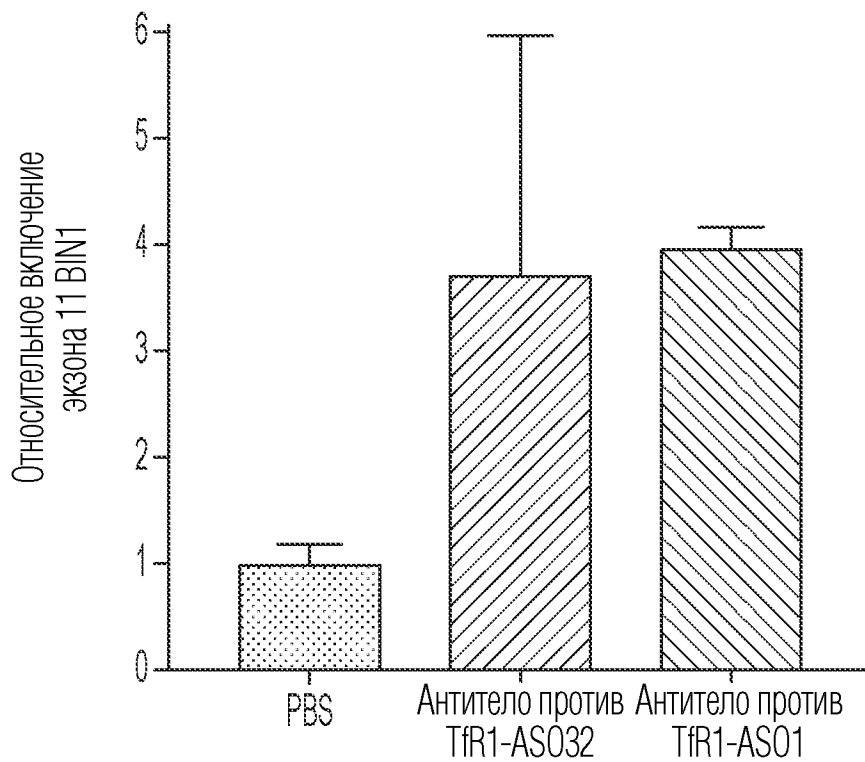
Иммортализованные клетки DM1-CL5



ФИГ. 1В

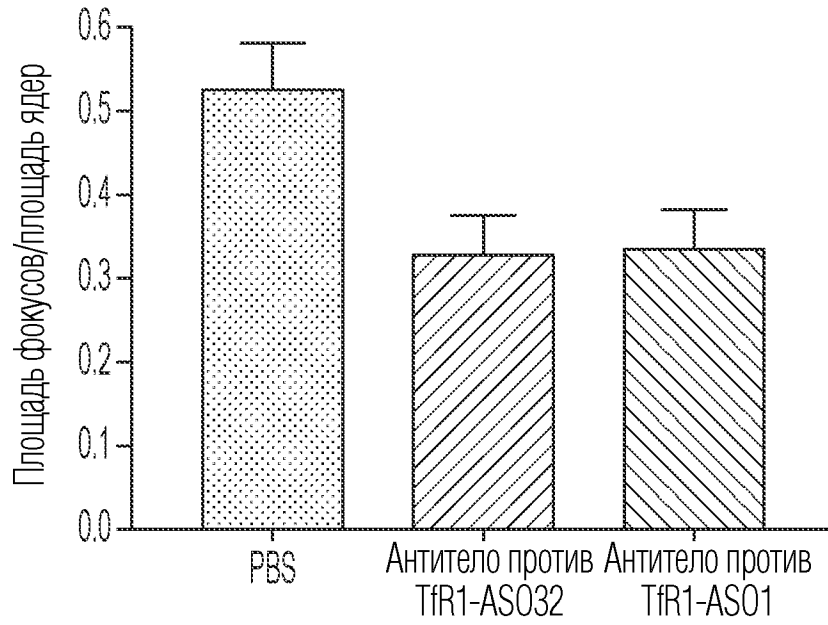


ФИГ. 2А

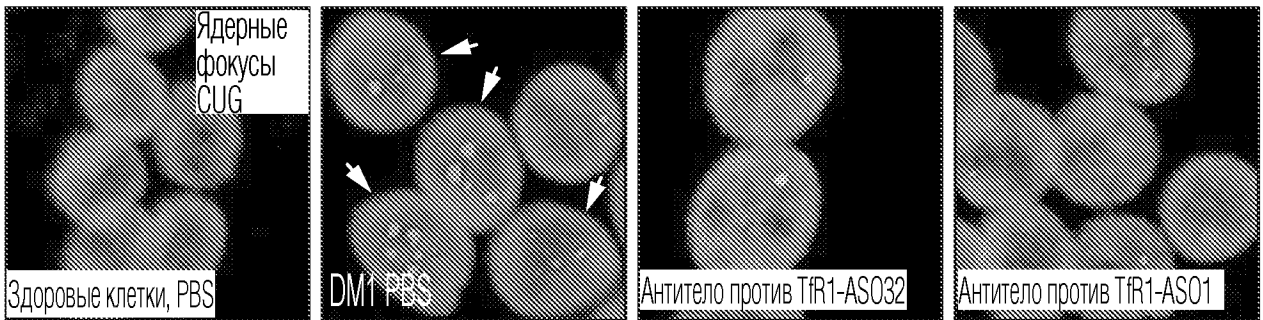


ФИГ. 2В

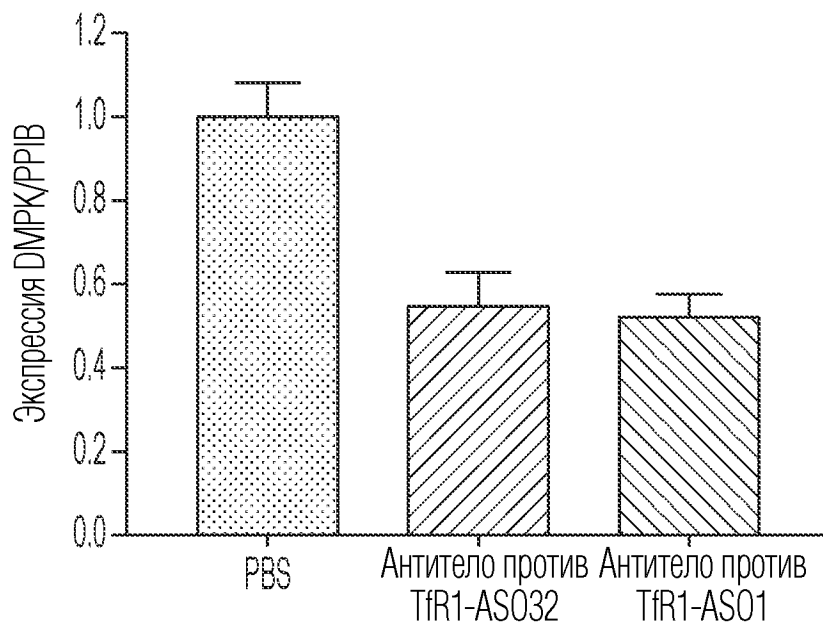
3/43



ФИГ. 2С

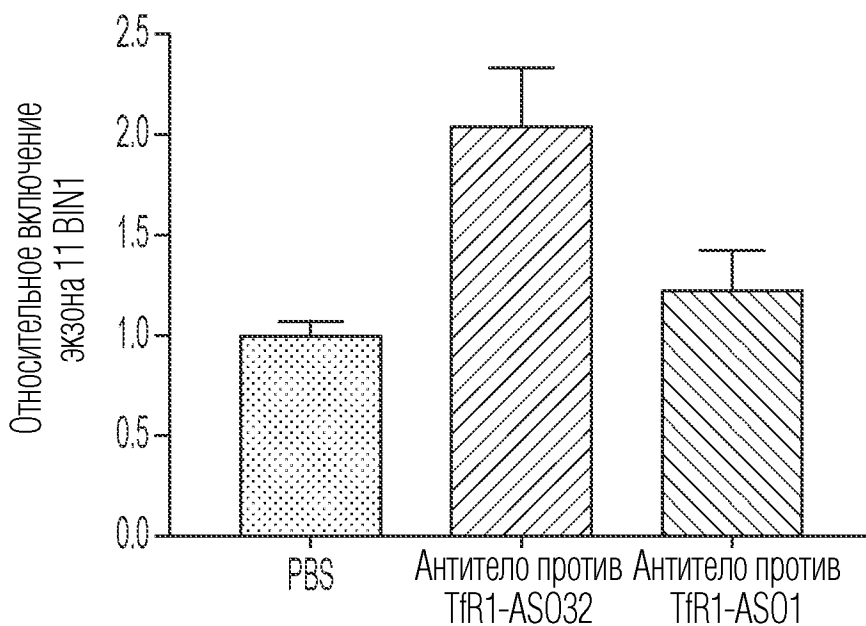


ФИГ. 2D

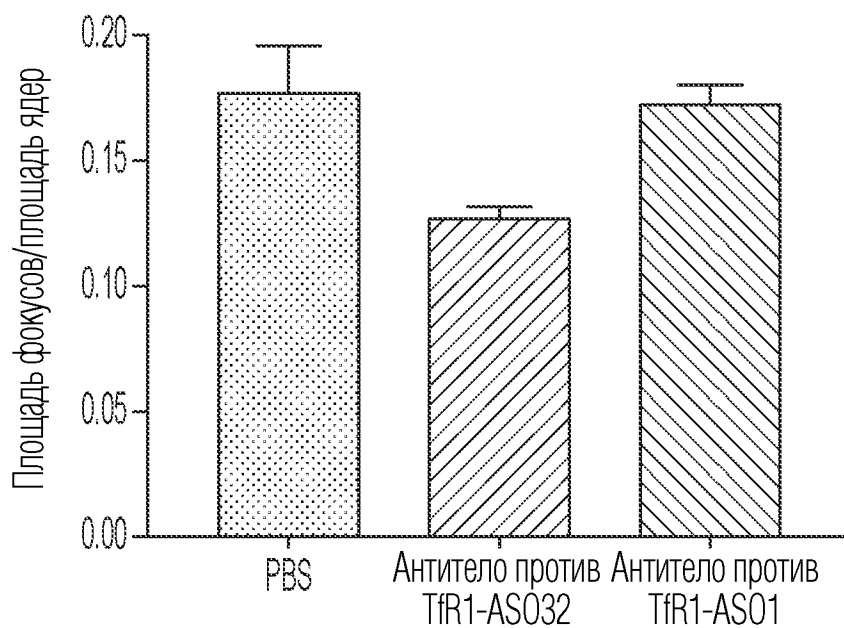


ФИГ. 3А

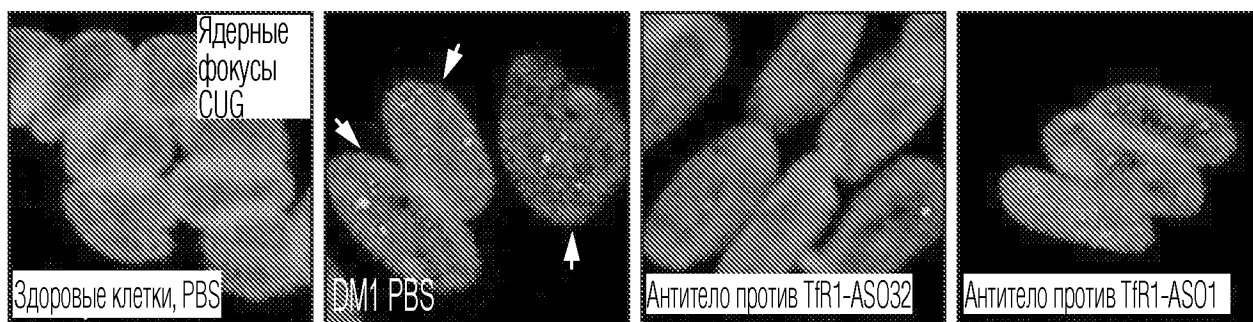
4/43



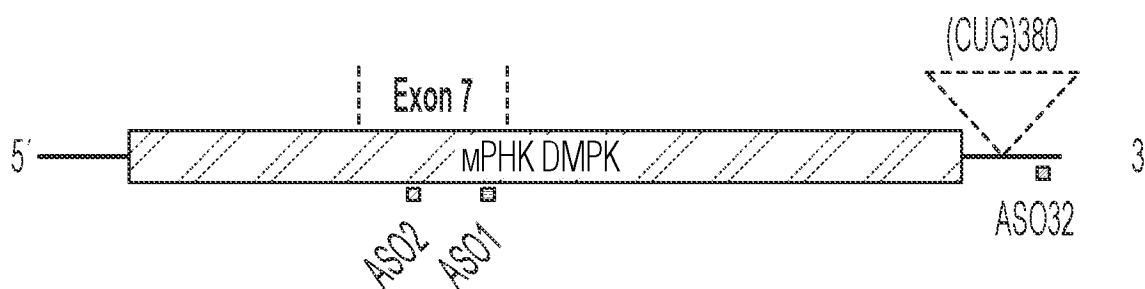
ФИГ. 3В



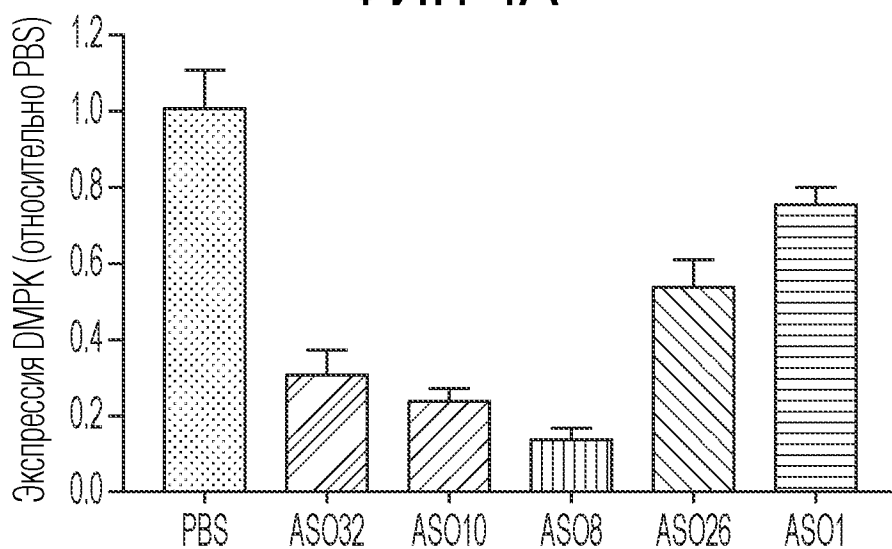
ФИГ. 3С



ФИГ. 3D

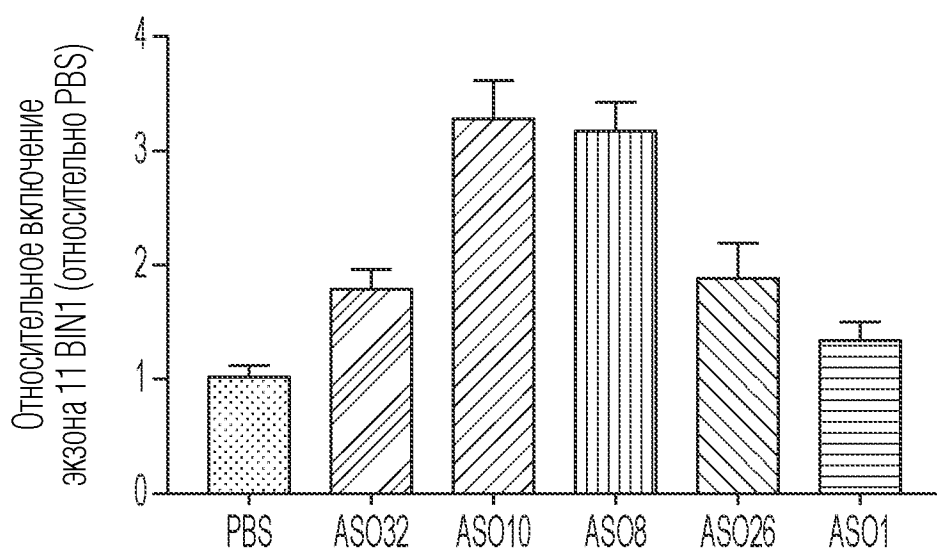


ФИГ. 4А



конъюгированные с Fab против Tfr1 3M12-VH4/VK3

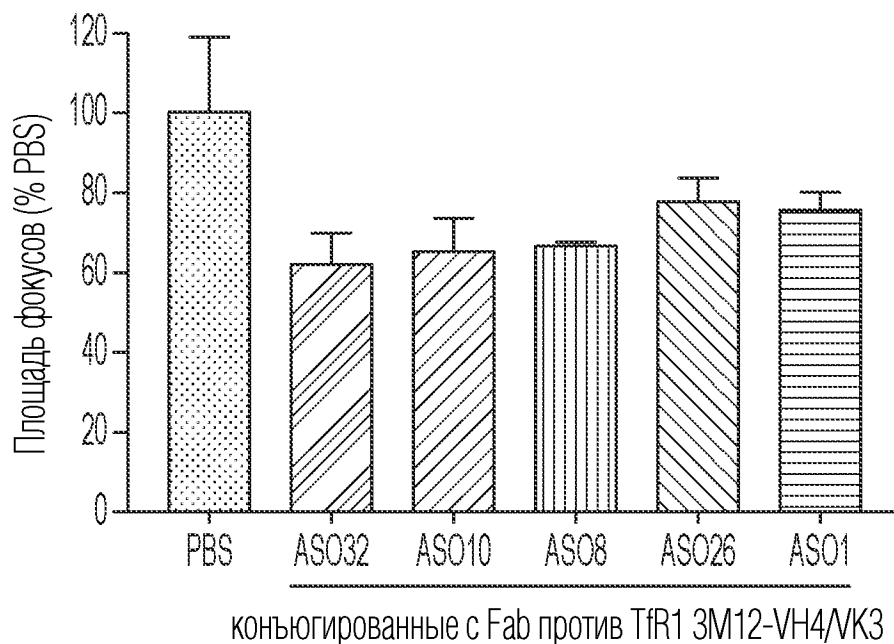
ФИГ. 4В



конъюгированные с Fab против Tfr1 3M12-VH4/VK3

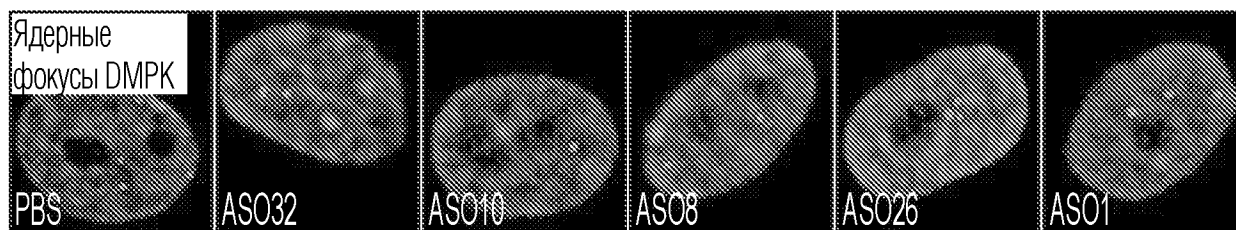
ФИГ. 4С

6/43



ФИГ. 4D

Токсические фокусы DMPK по результатам FISH с использованием зонда CUG

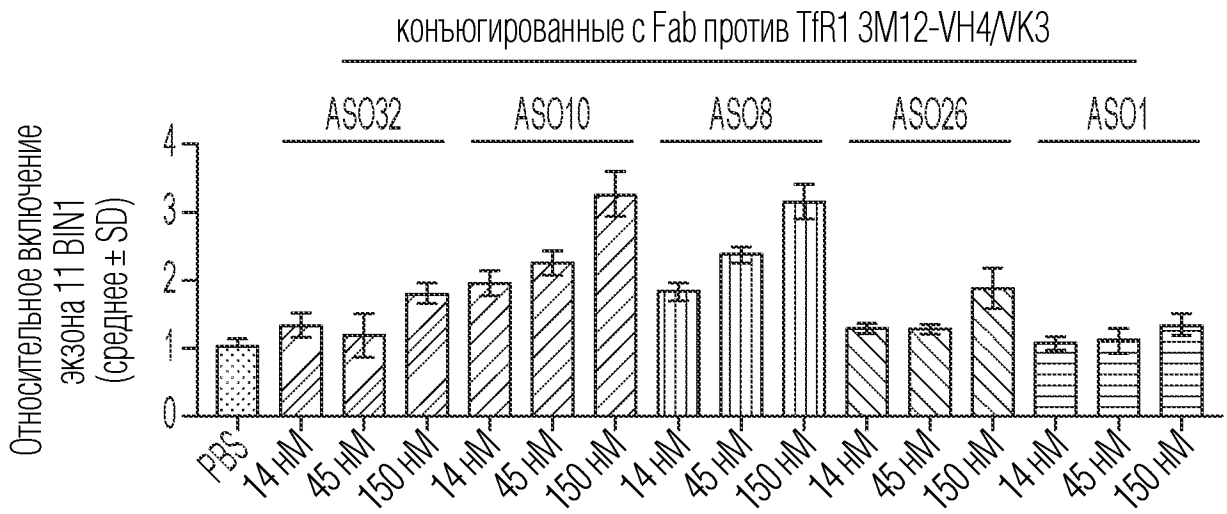


конъюгированные с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3

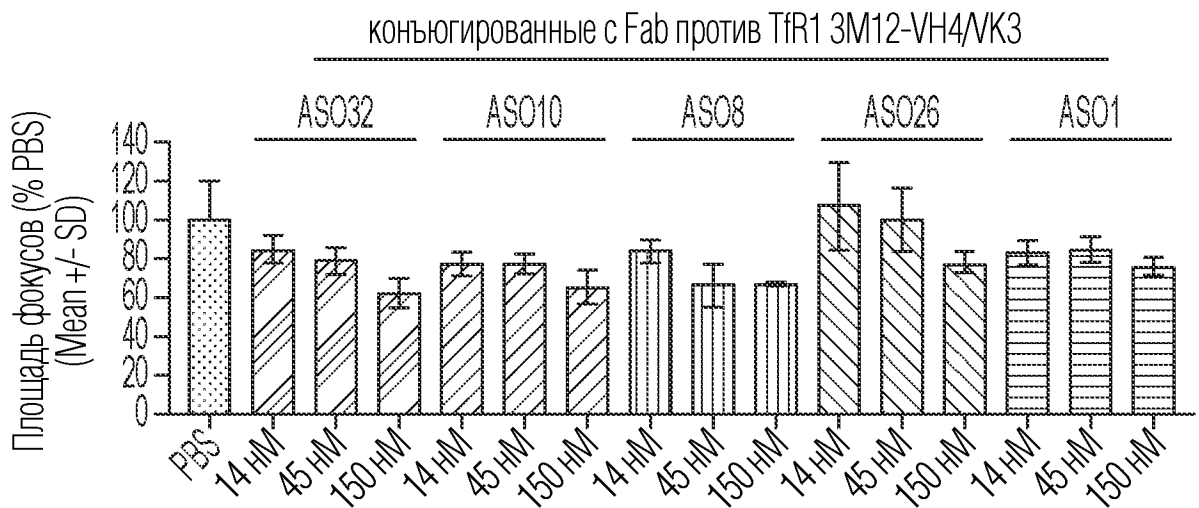
ФИГ. 4E



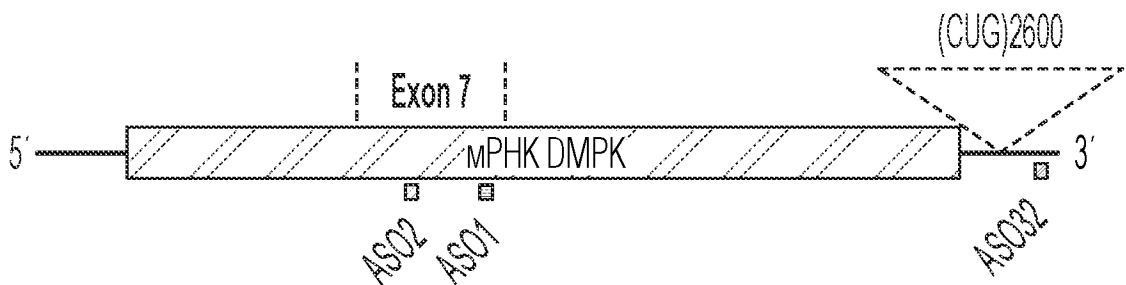
ФИГ. 4F



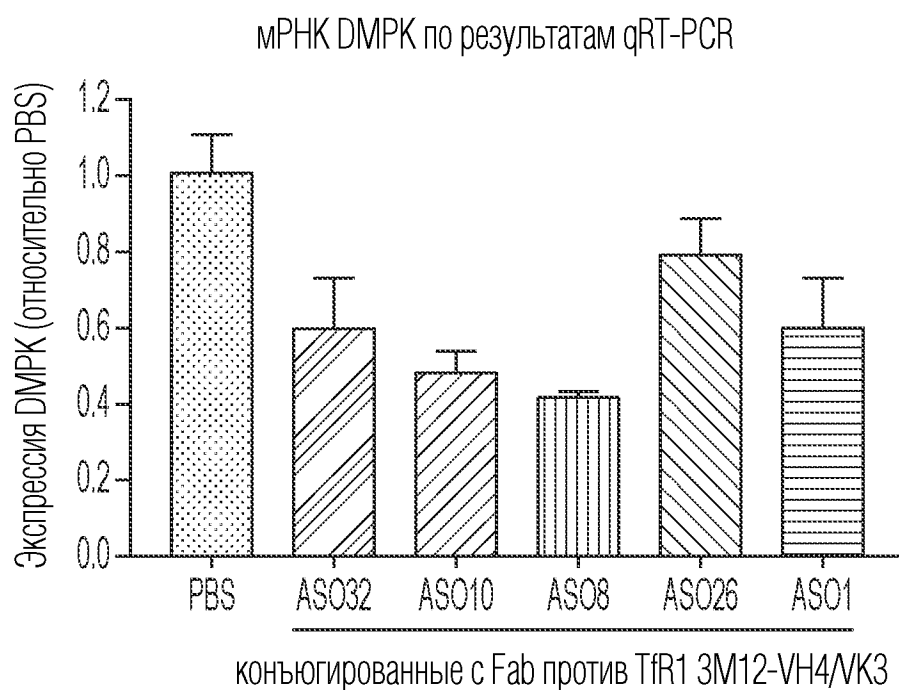
ФИГ. 4G



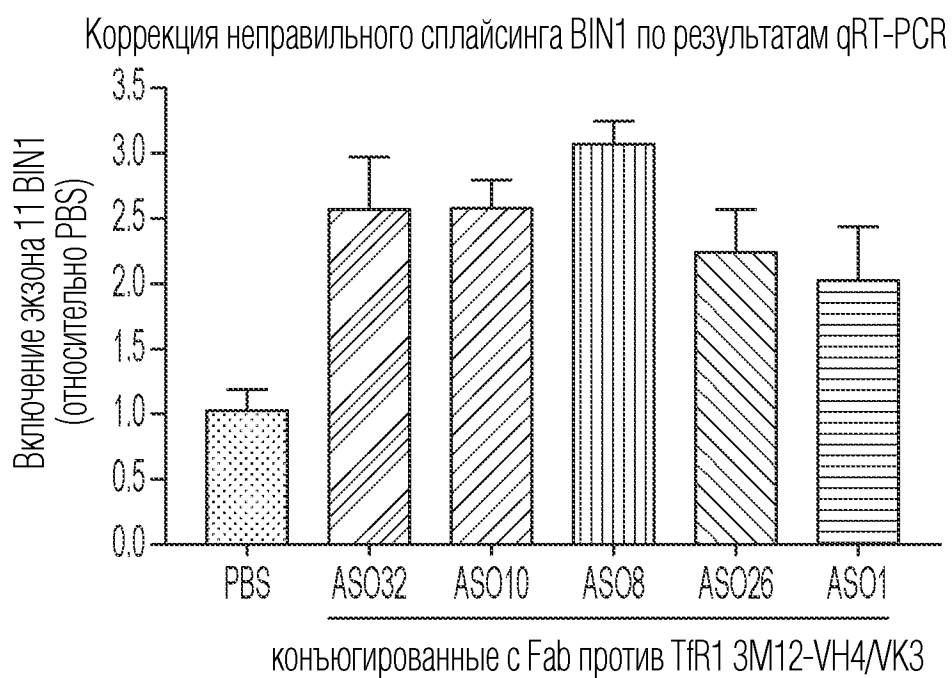
ФИГ. 4H



ФИГ. 5A



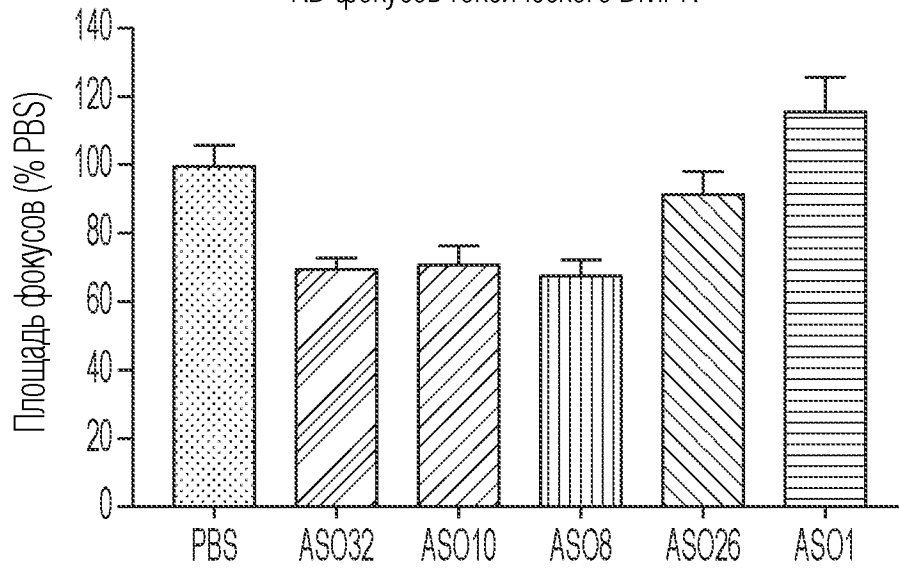
ФИГ. 5В



ФИГ. 5С

9/43

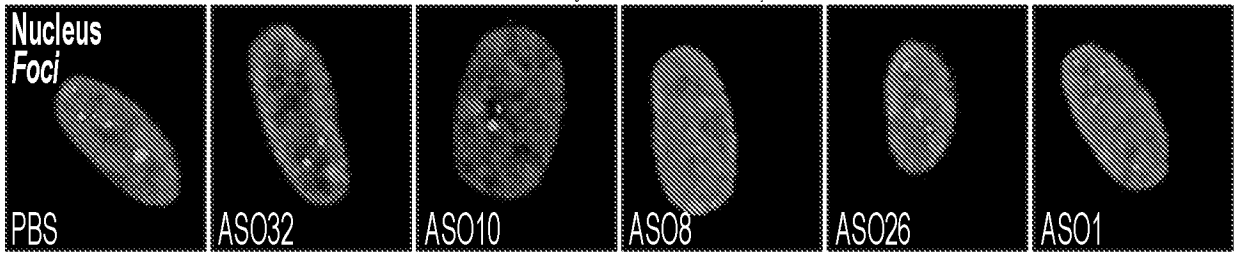
KD фокусов токсического DMPK



конъюгированные с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3

ФИГ. 5D

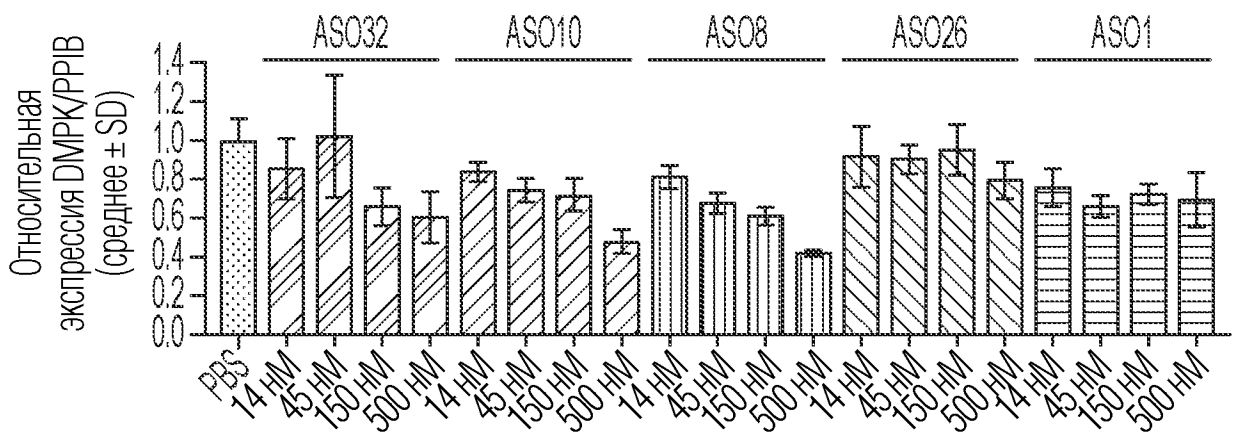
Токсические фокусы DMPK по результатам FISH с использованием зонда CUG



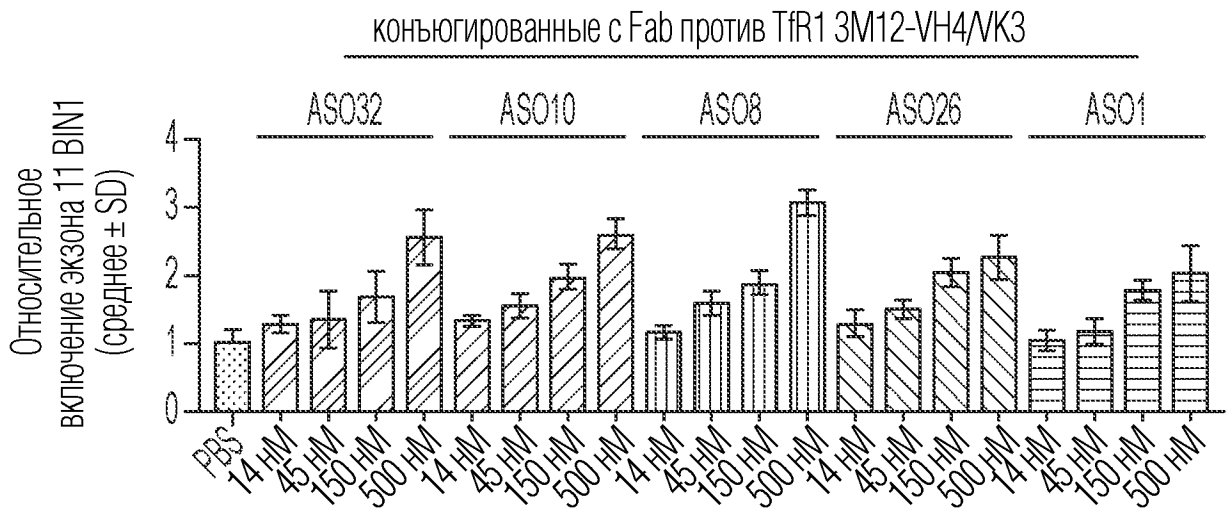
конъюгированные с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3

ФИГ. 5E

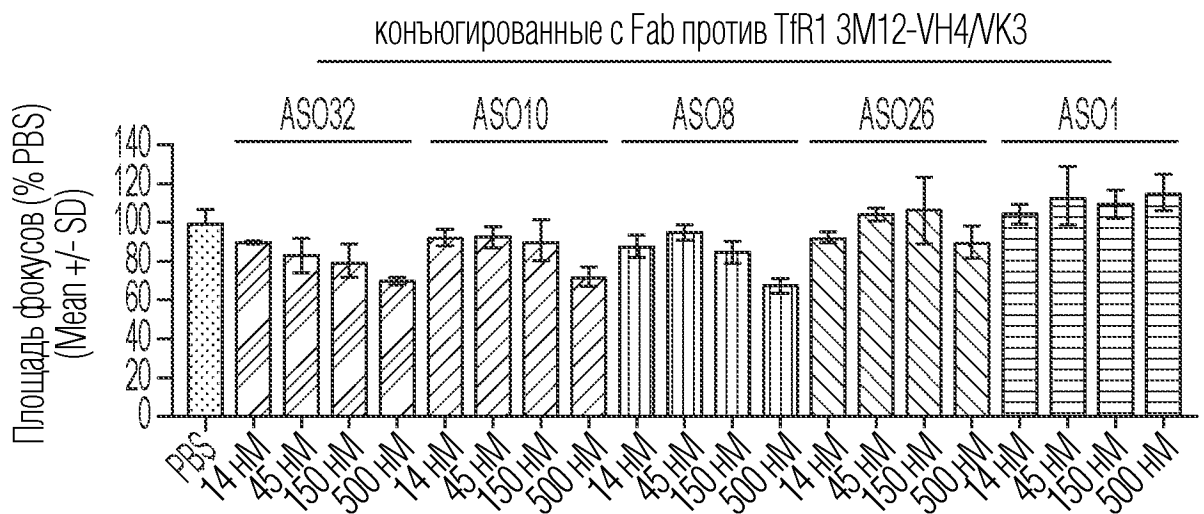
конъюгированные с Fab против TfR1 3M12-VH4/VK3



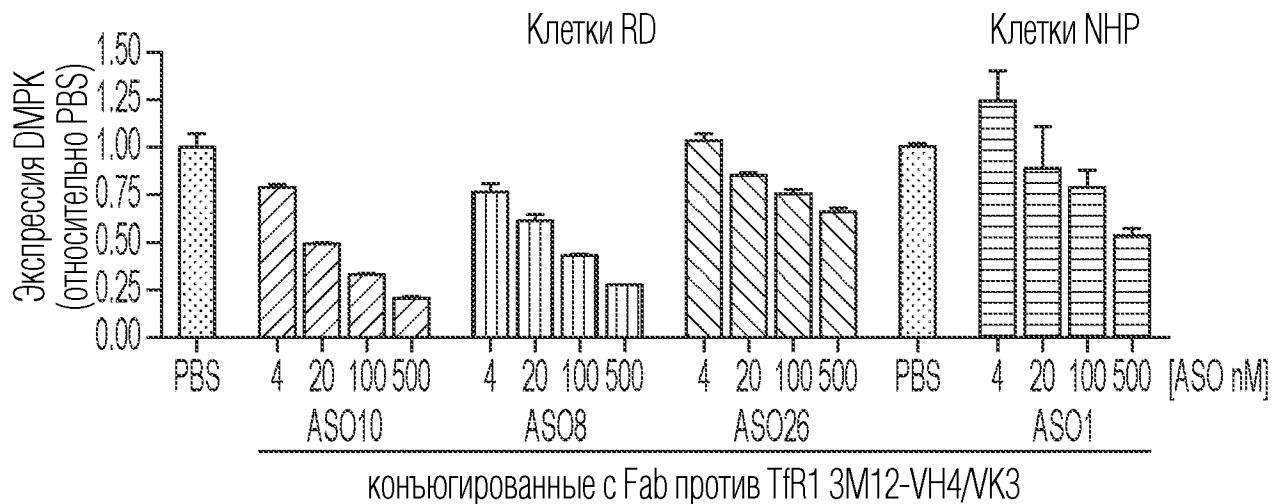
ФИГ. 5F



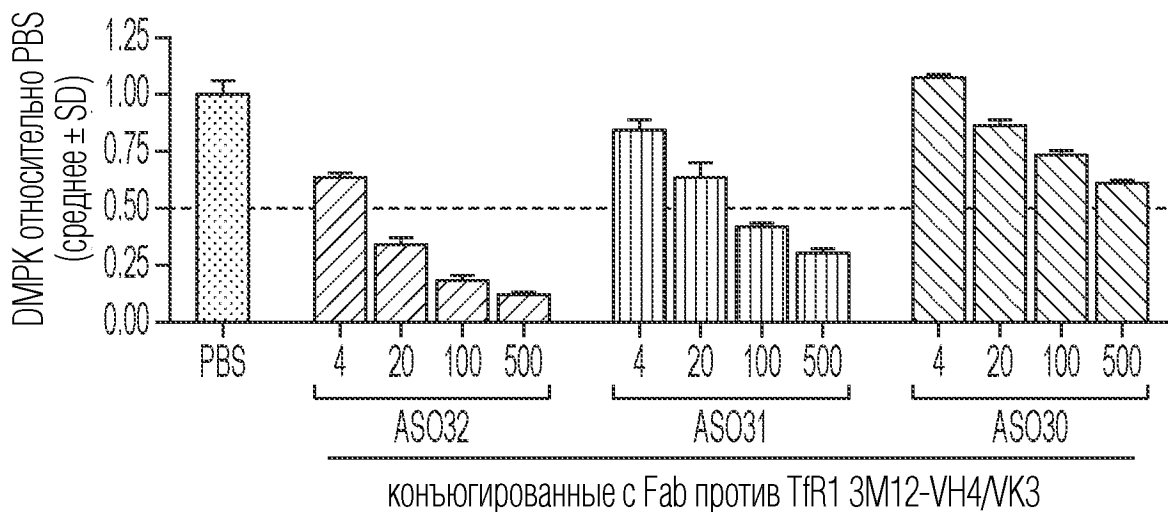
ФИГ. 5G



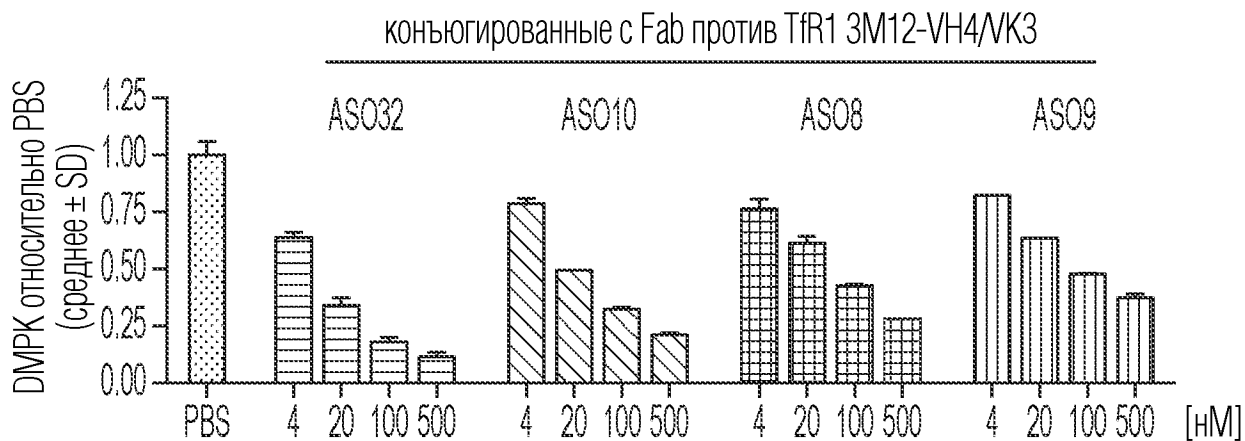
ФИГ. 5H



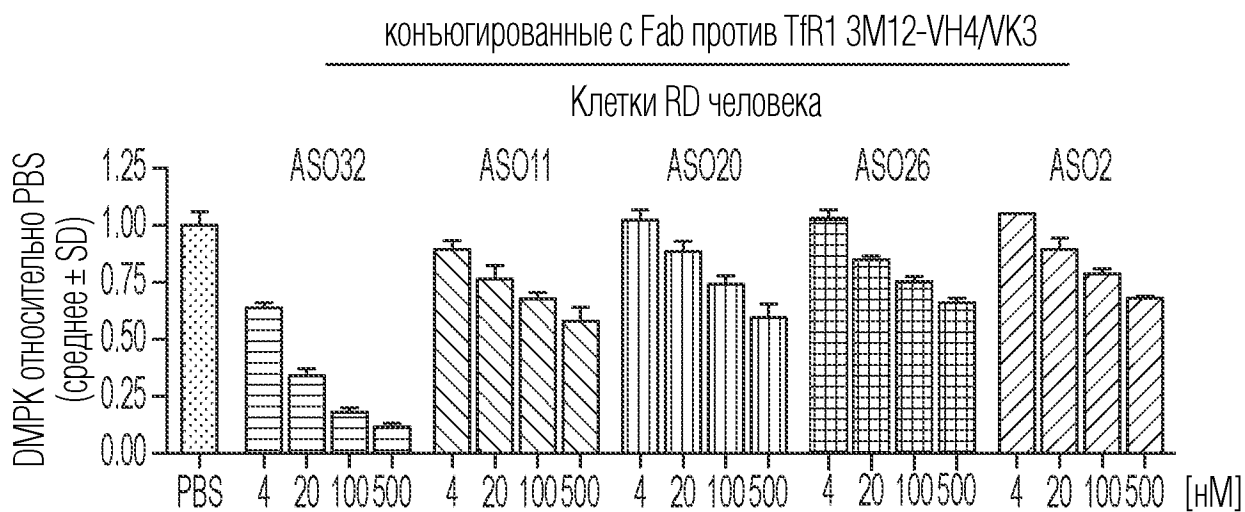
ФИГ. 6



ФИГ. 7



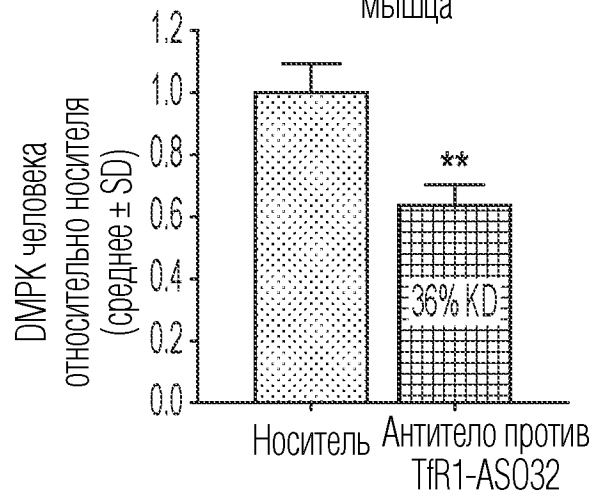
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В

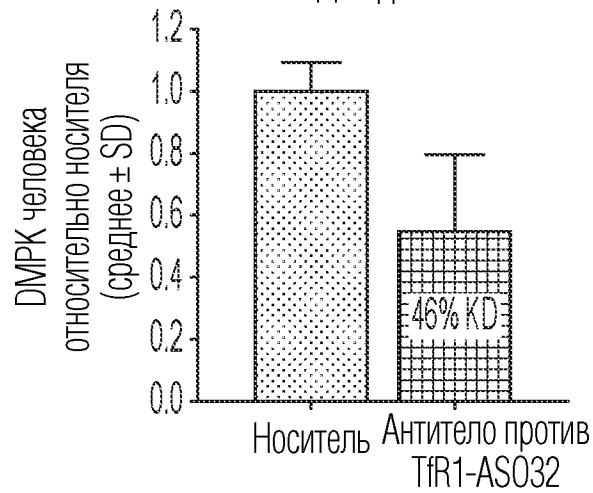
12/43

Передняя большеберцовая
мышца



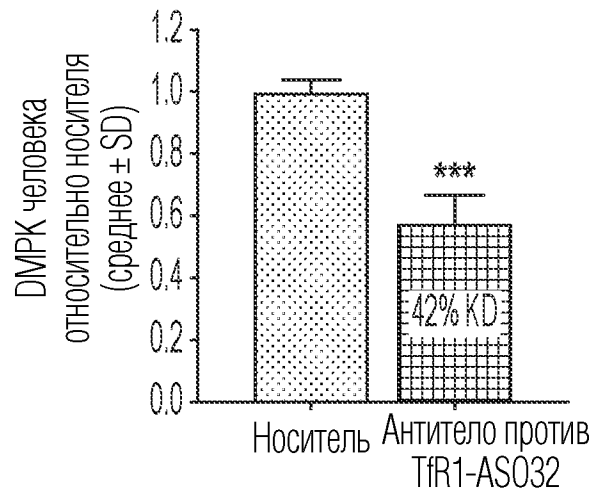
ФИГ. 9А

Диафрагма

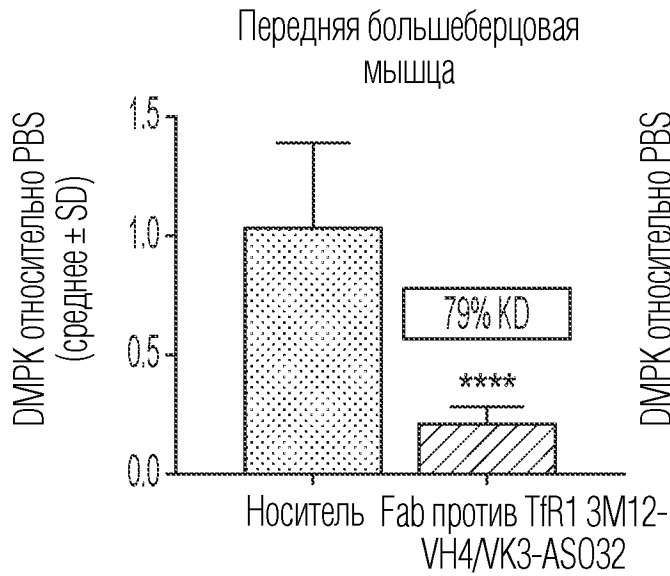


ФИГ. 9В

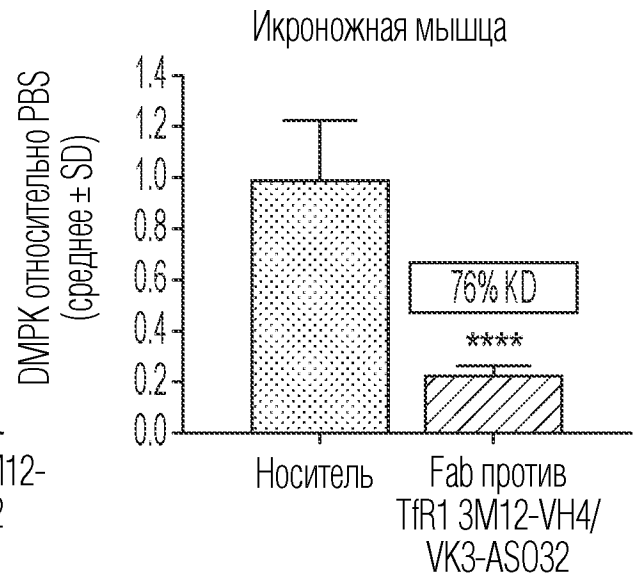
Сердце



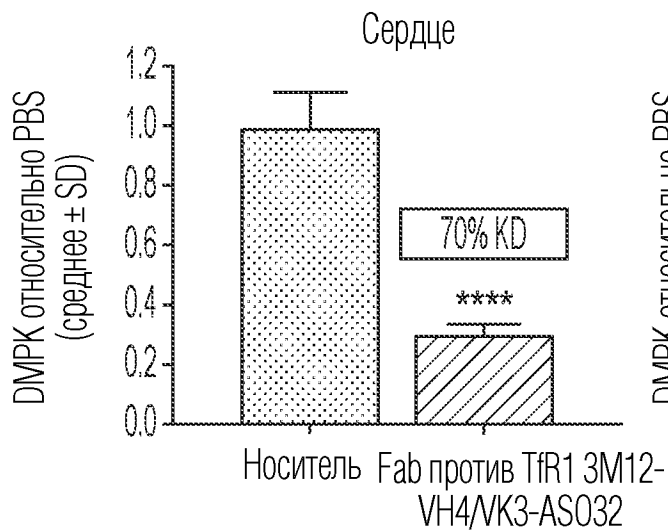
ФИГ. 9С



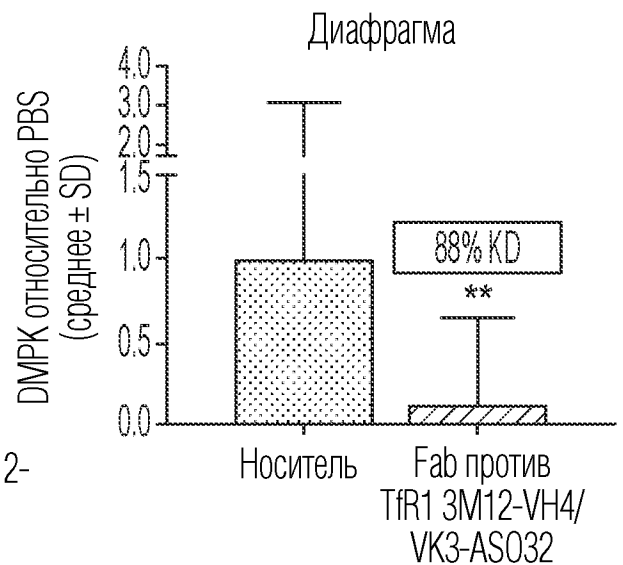
ФИГ. 9D



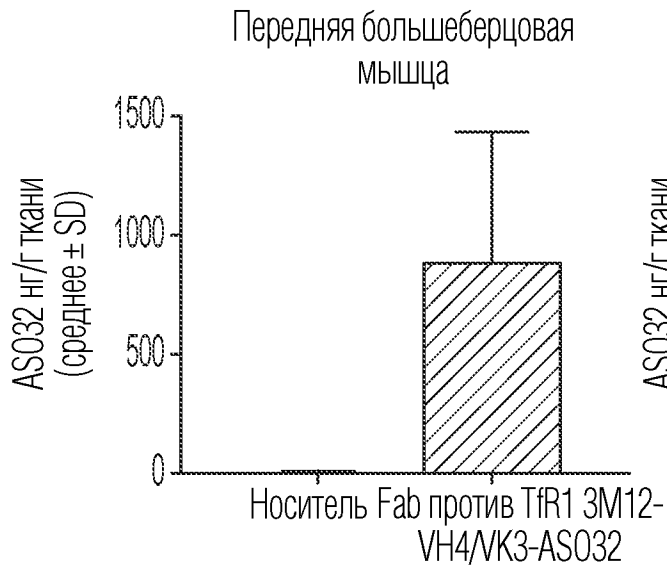
ФИГ. 9E



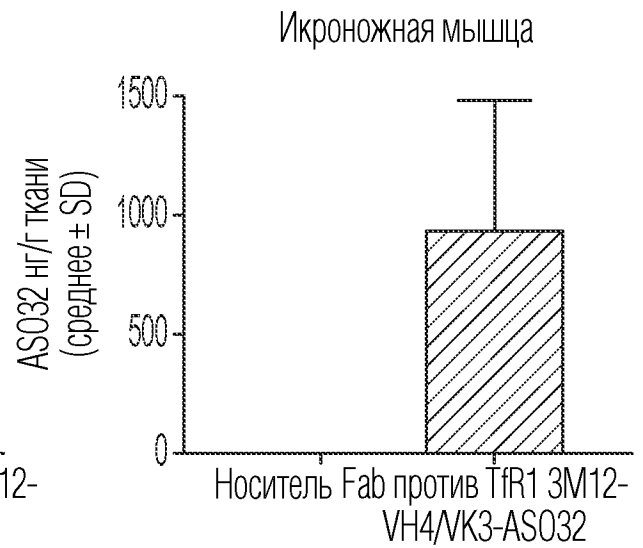
ФИГ. 9F



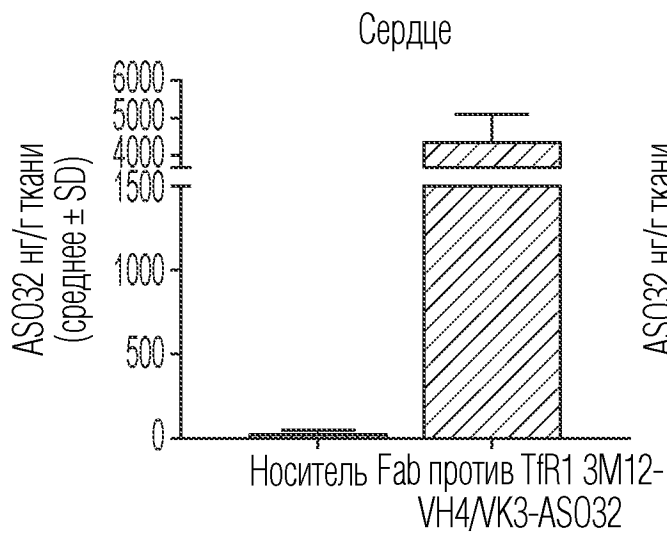
ФИГ. 9G



ФИГ. 9H



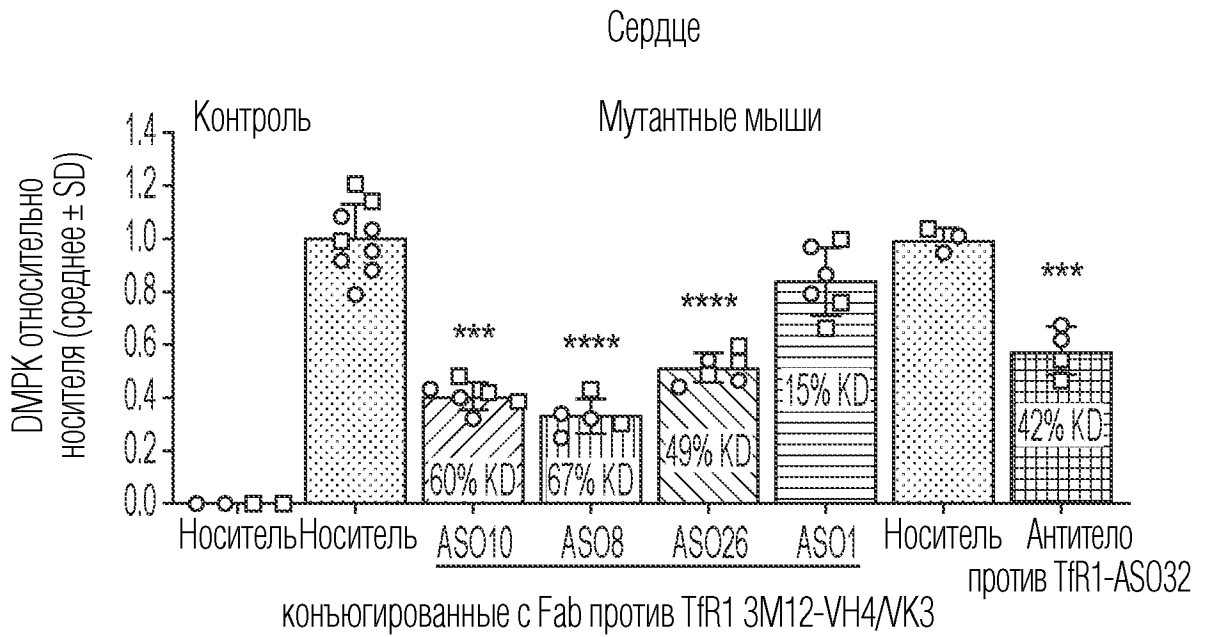
ФИГ. 9I



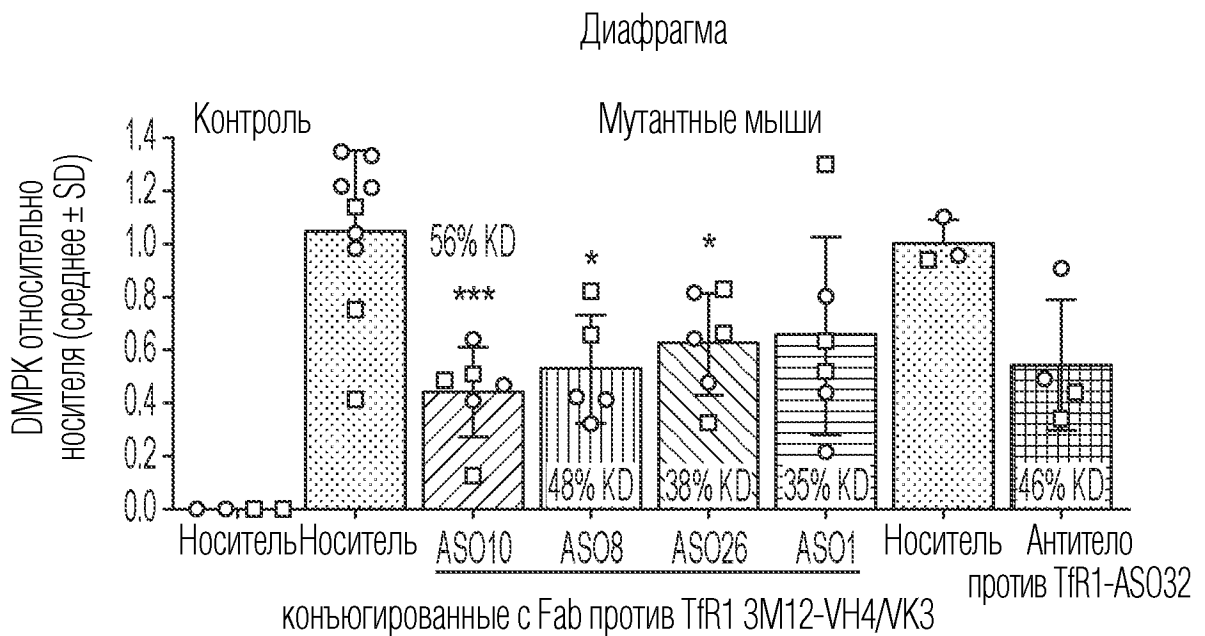
ФИГ. 9J



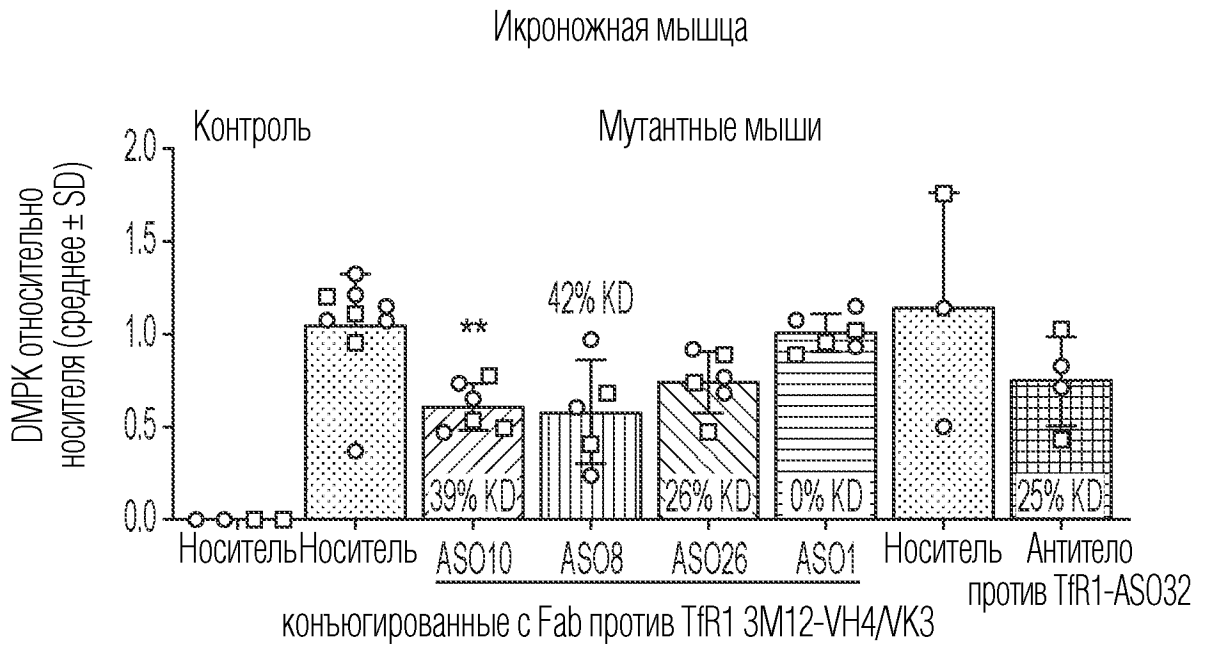
ФИГ. 9K



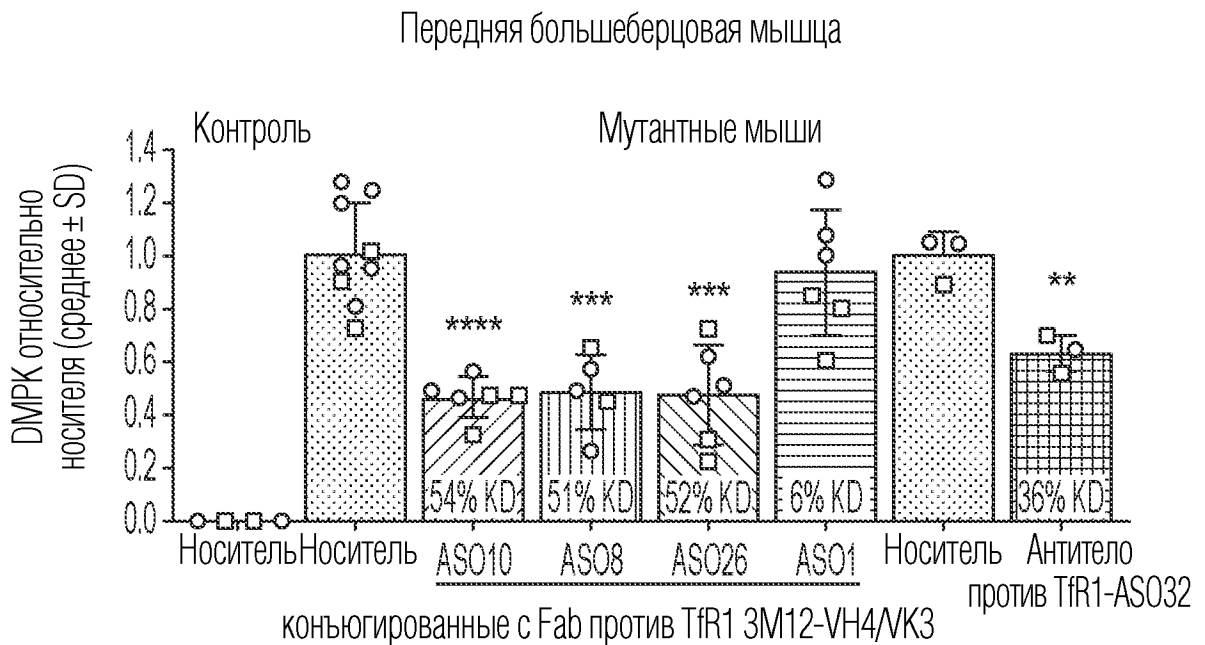
ФИГ. 10А



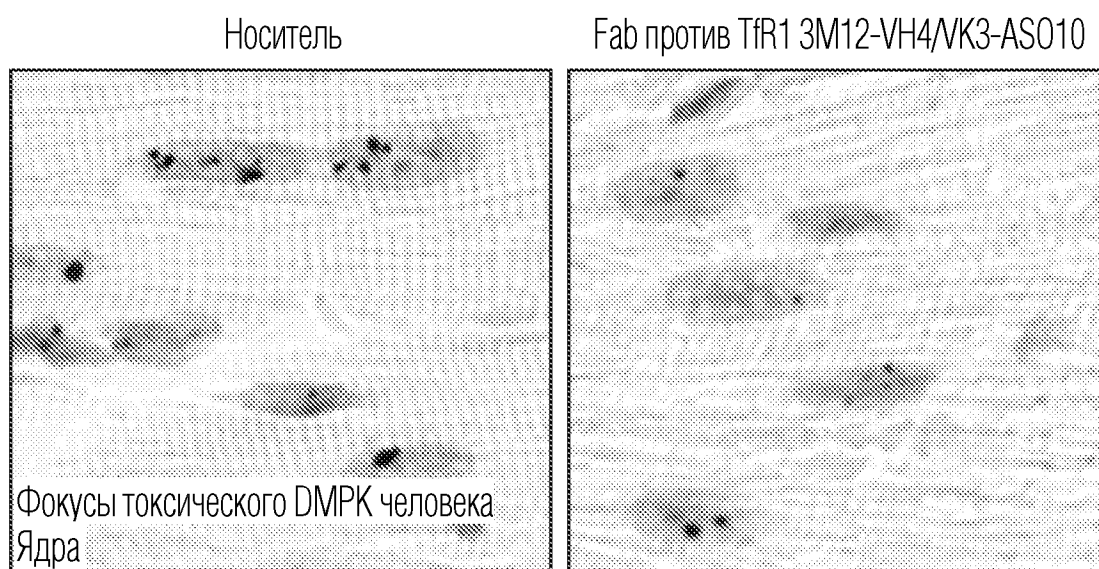
ФИГ. 10В



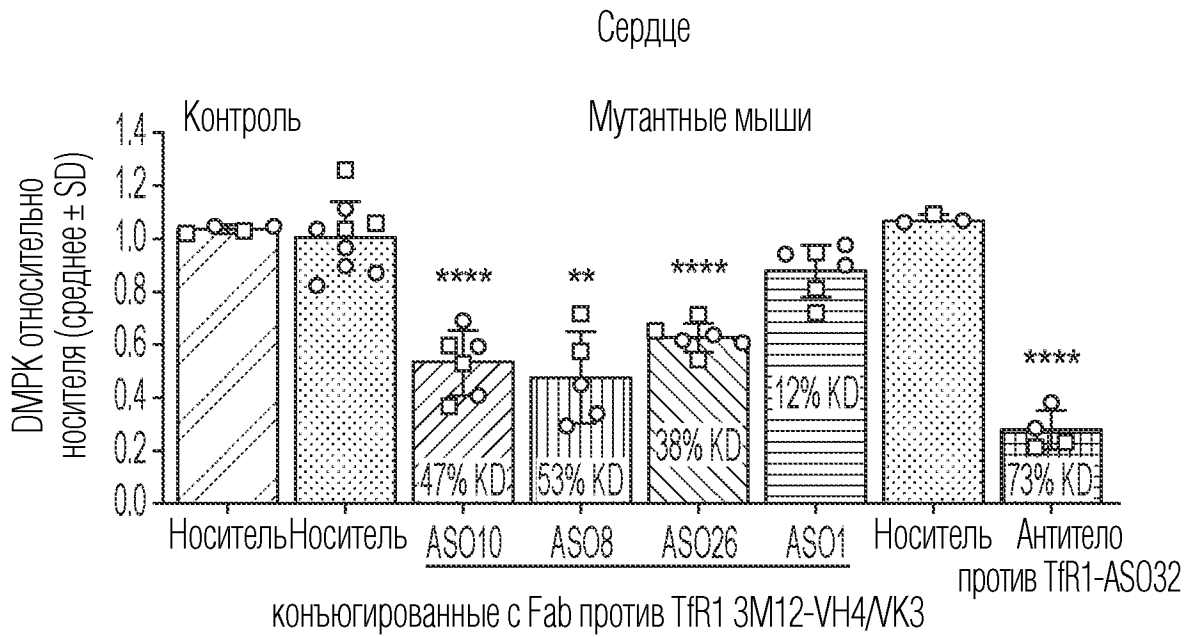
ФИГ. 10С



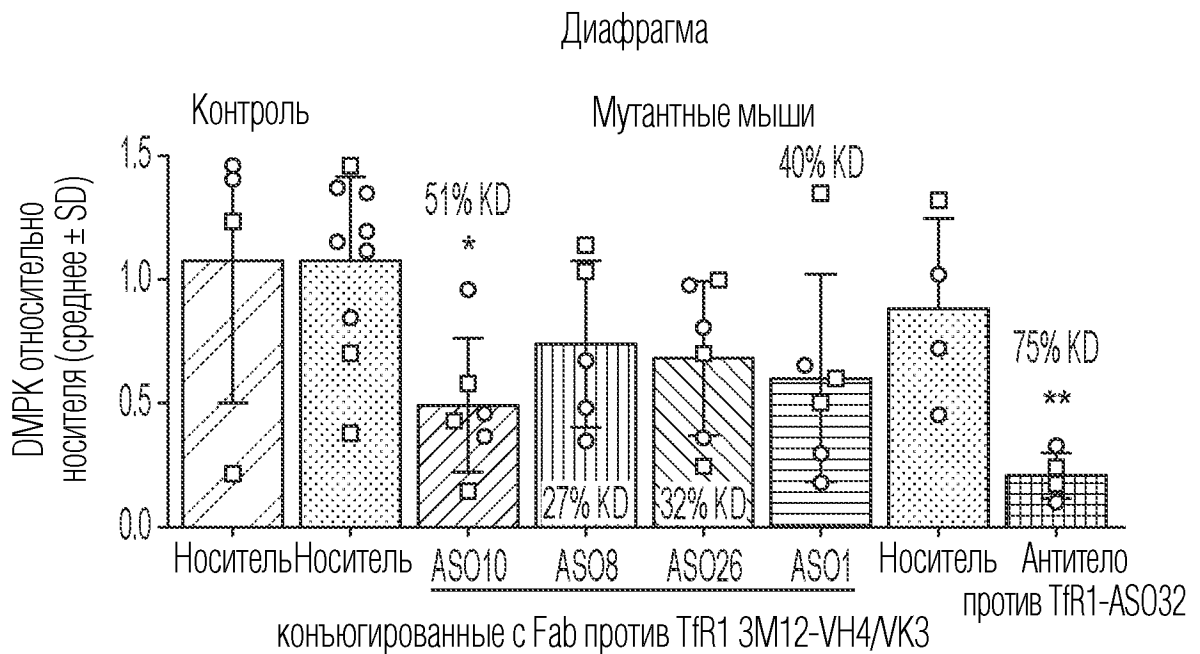
ФИГ. 10D



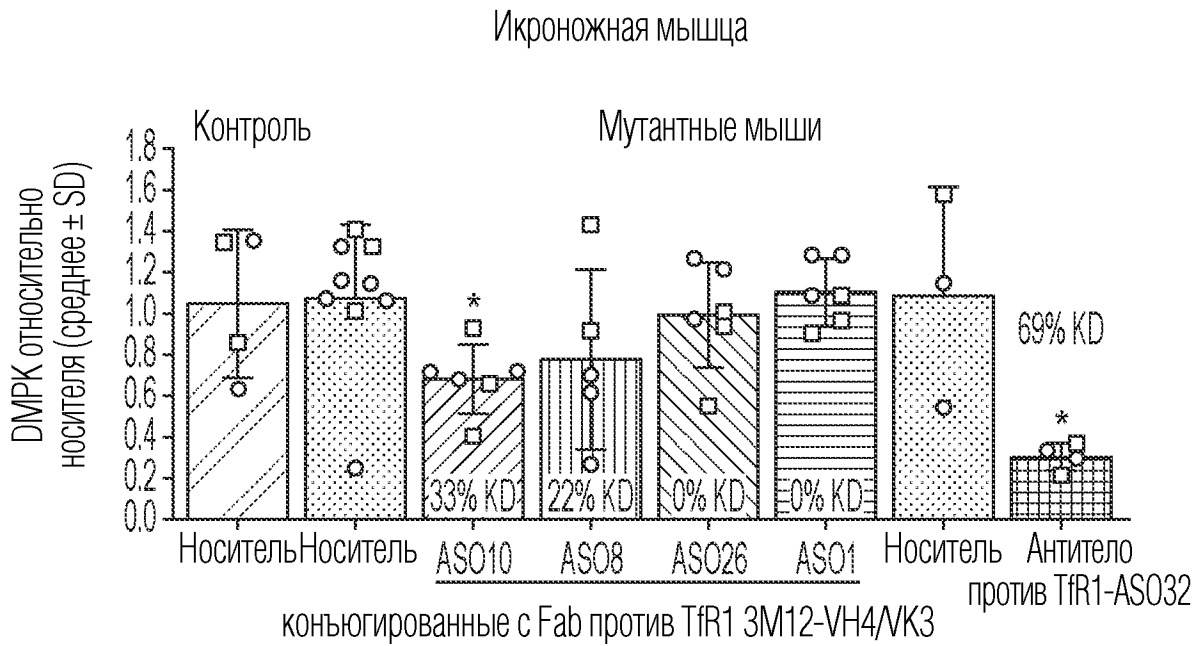
ФИГ. 10Е



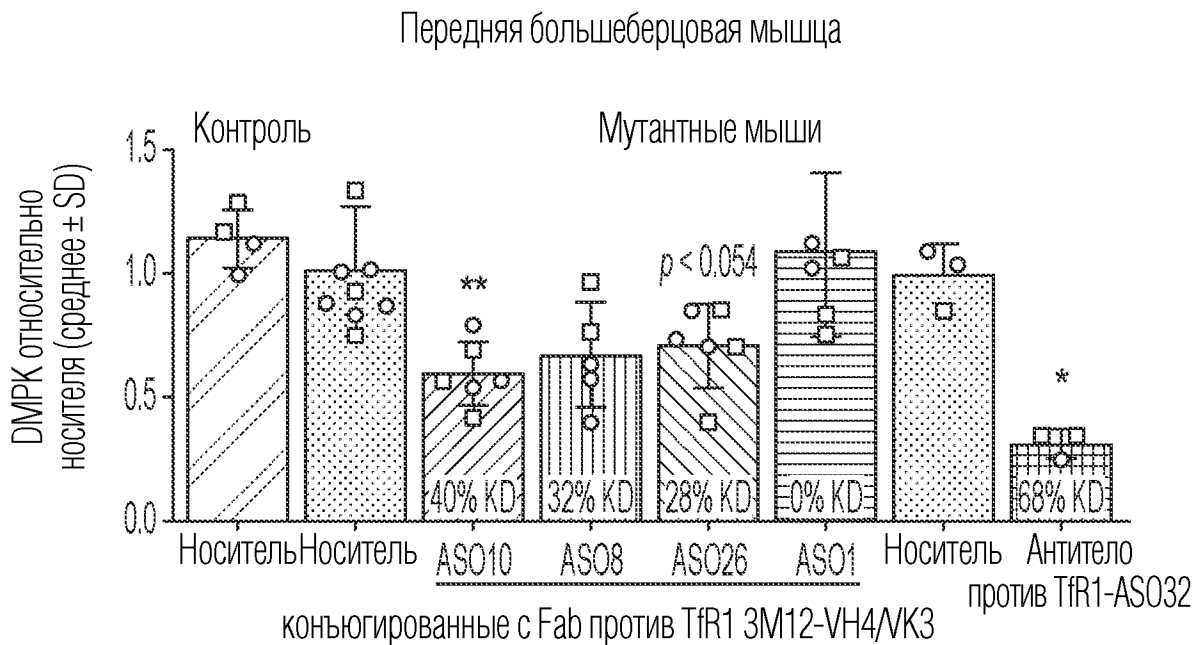
ФИГ. 11А



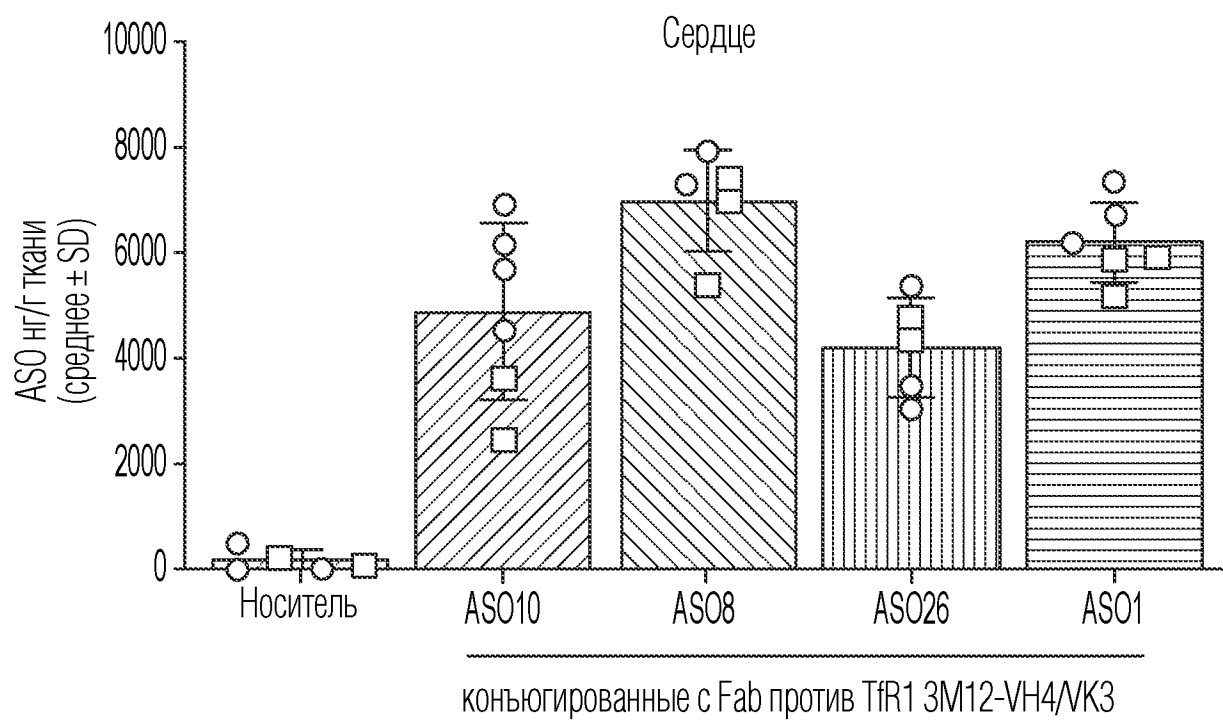
ФИГ. 11В



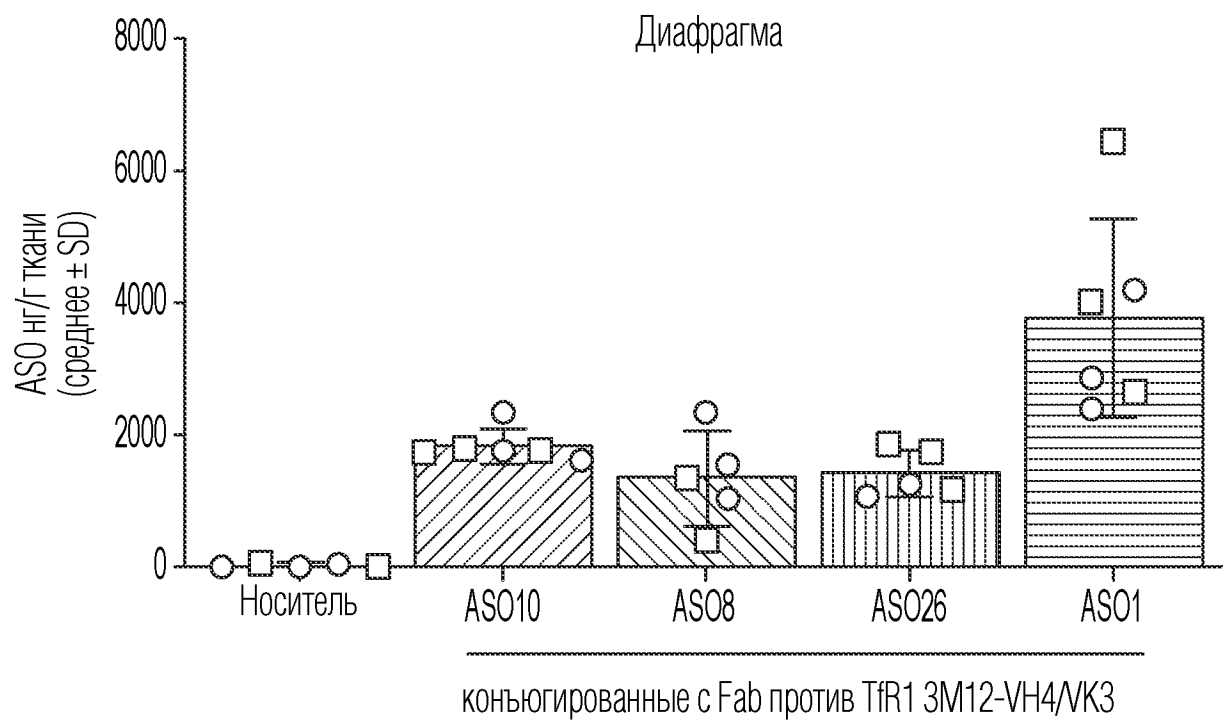
ФИГ. 11С



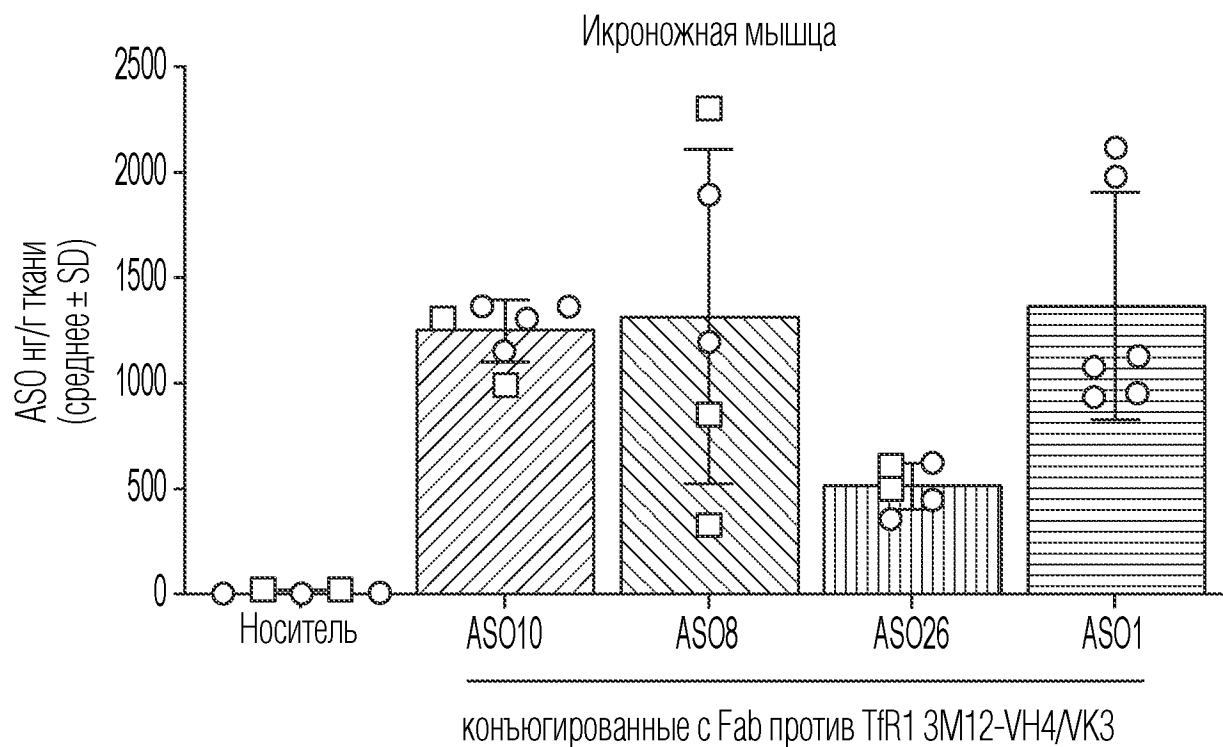
ФИГ. 11D



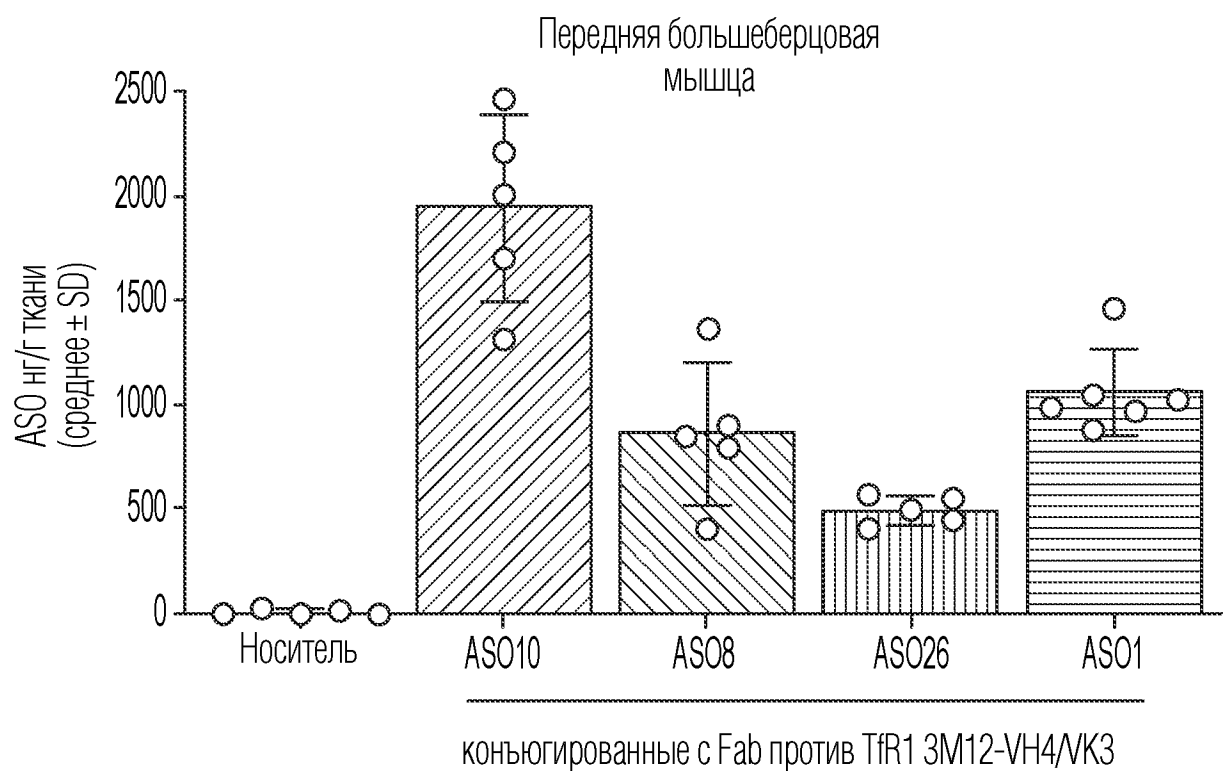
ФИГ. 12А



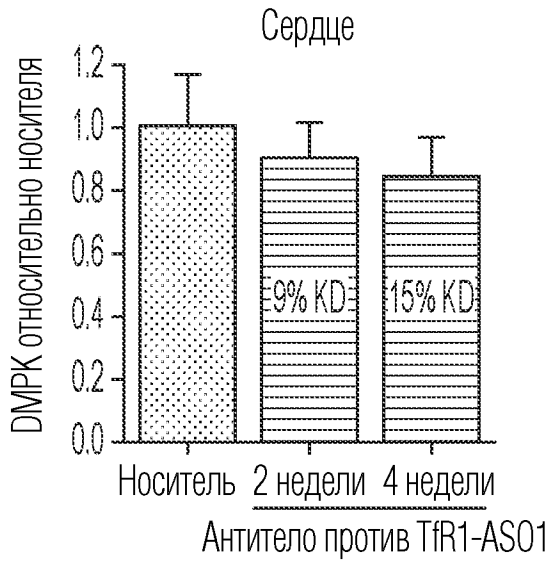
ФИГ. 12В



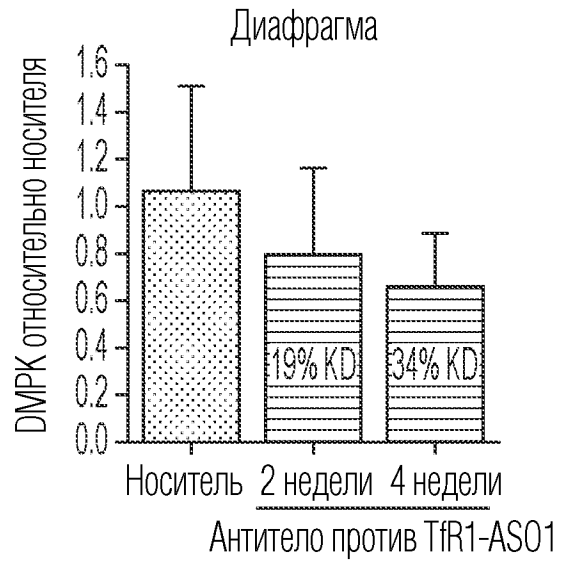
ФИГ. 12С



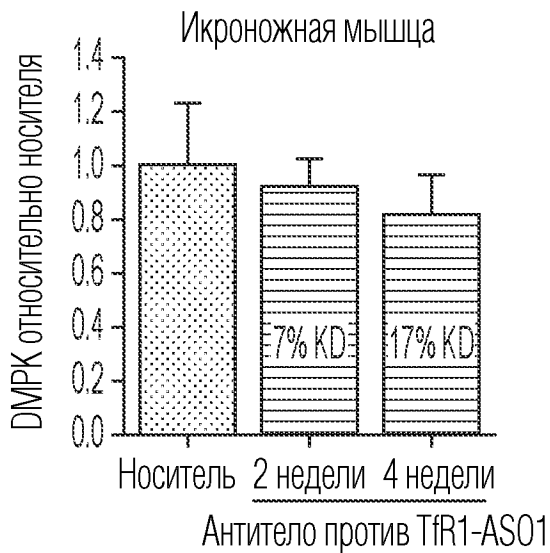
ФИГ. 12D



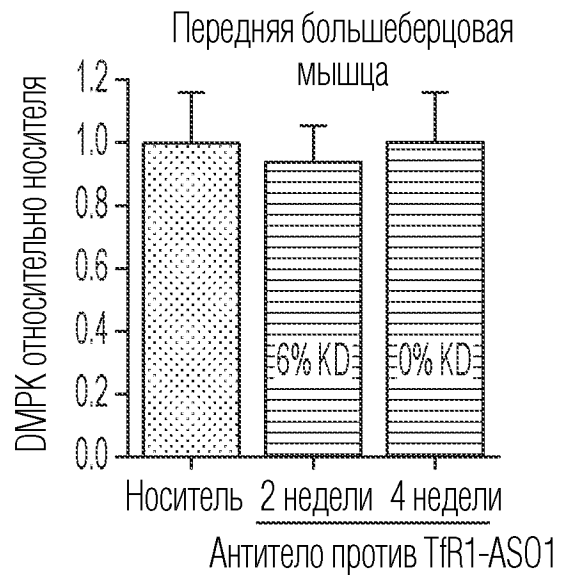
ФИГ. 13А



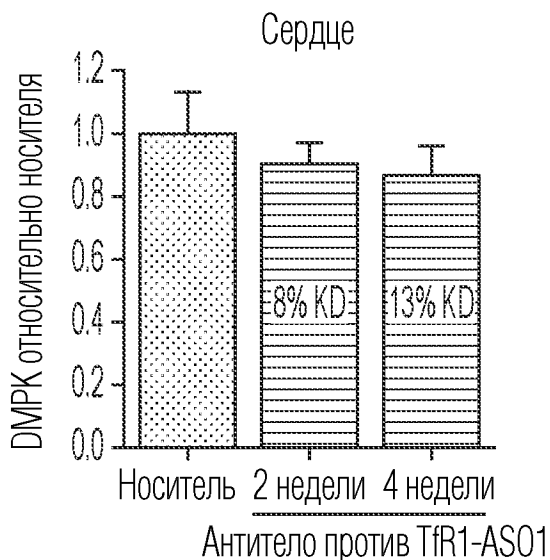
ФИГ. 13В



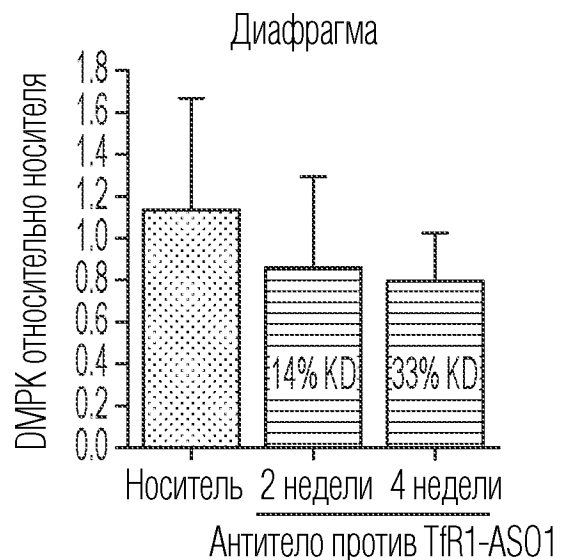
ФИГ. 13С



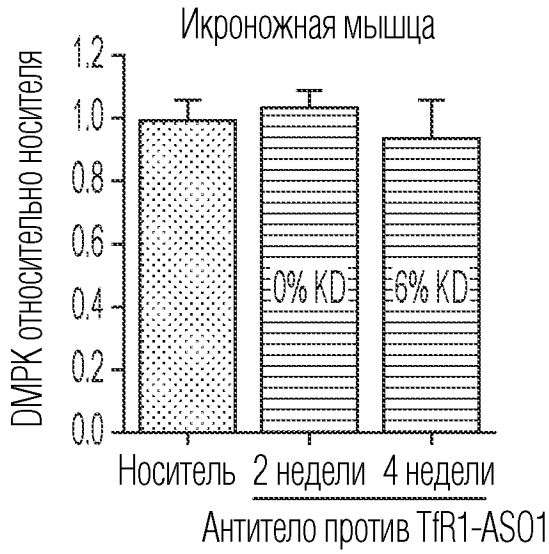
ФИГ. 13D



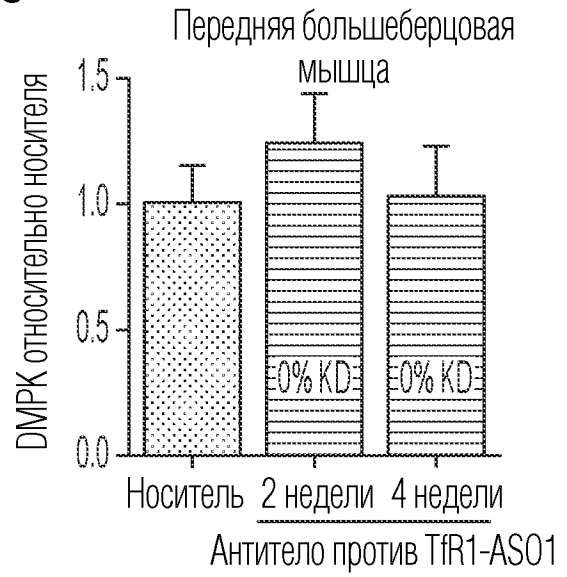
ФИГ. 14А



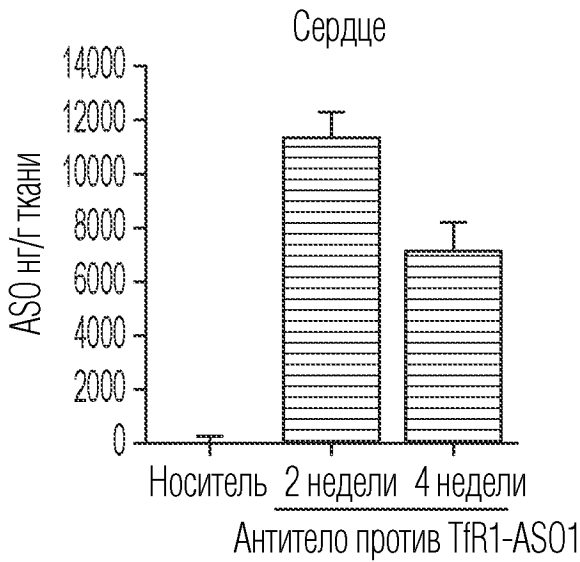
ФИГ. 14В



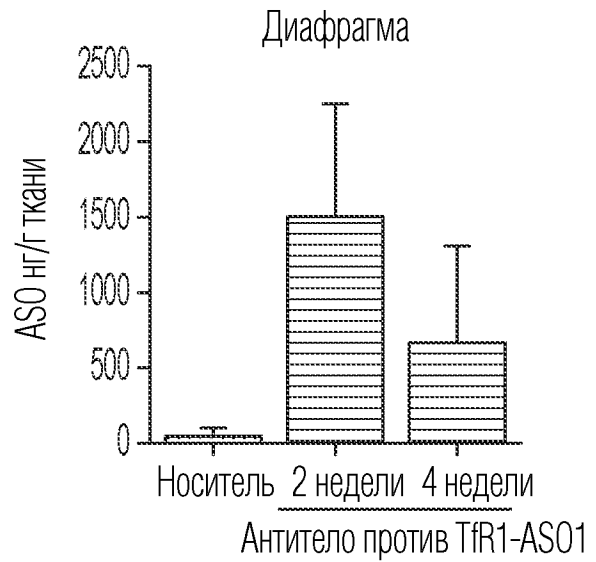
ФИГ. 14С



ФИГ. 14D



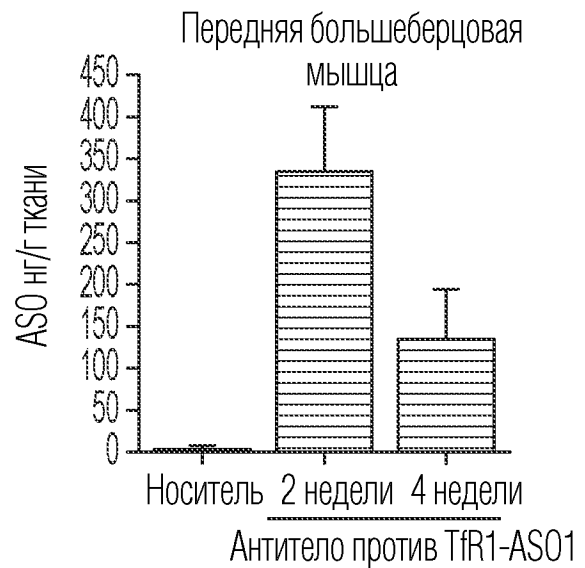
ФИГ. 15А



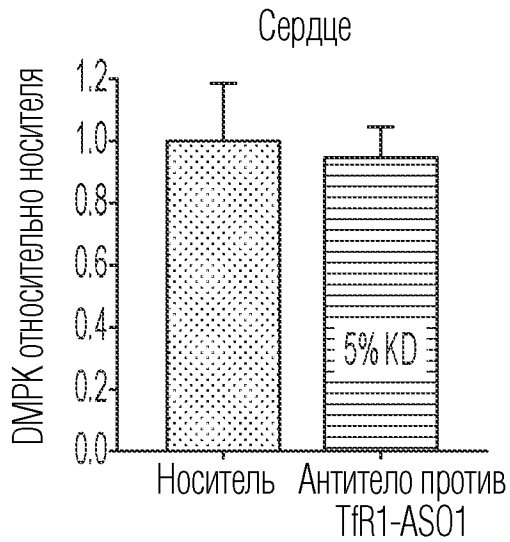
ФИГ. 15В



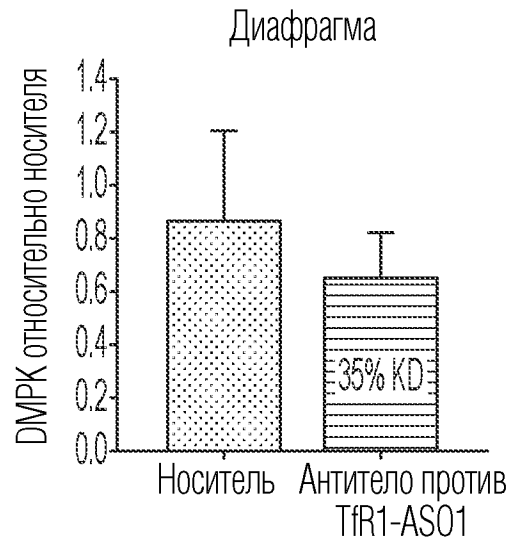
ФИГ. 15С



ФИГ. 15D



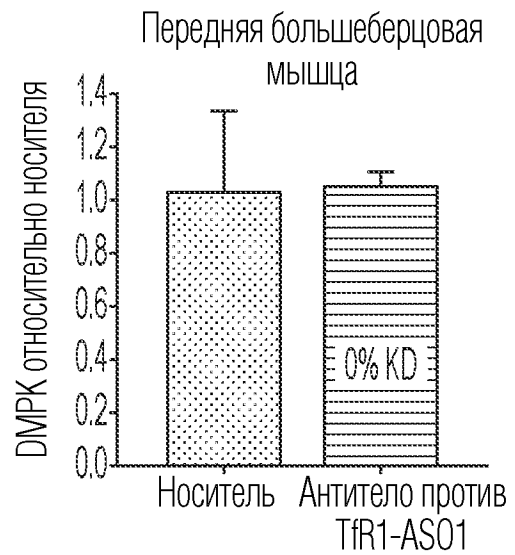
ФИГ. 16А



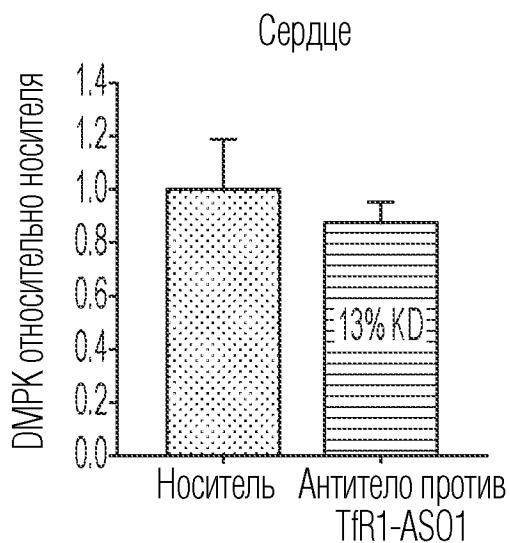
ФИГ. 16В



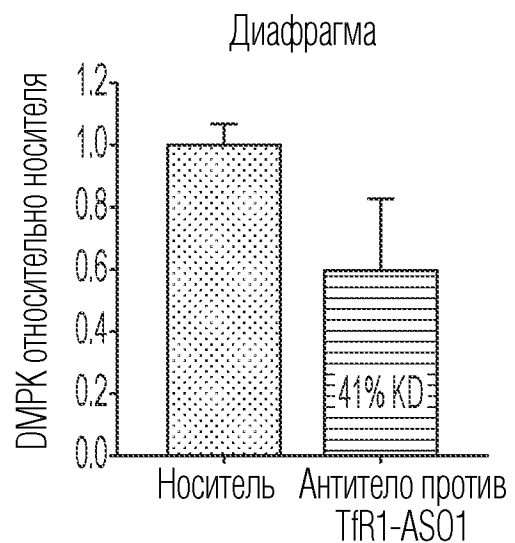
ФИГ. 16С



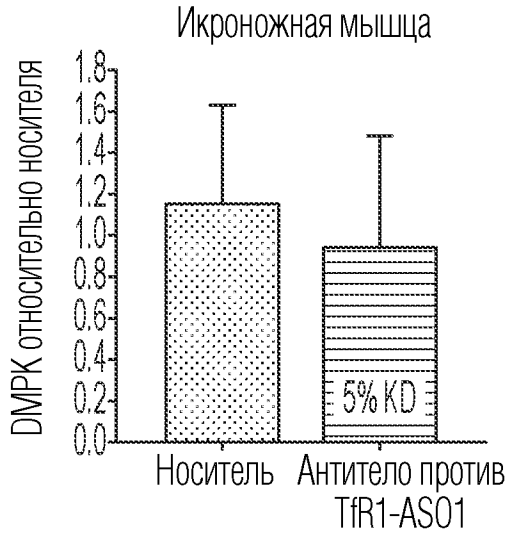
ФИГ. 16D



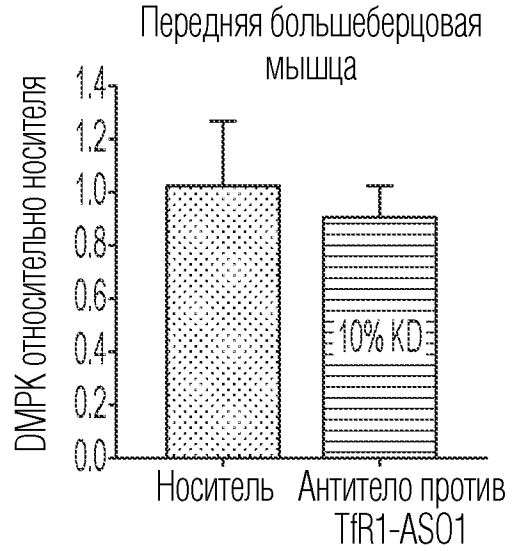
ФИГ. 17А



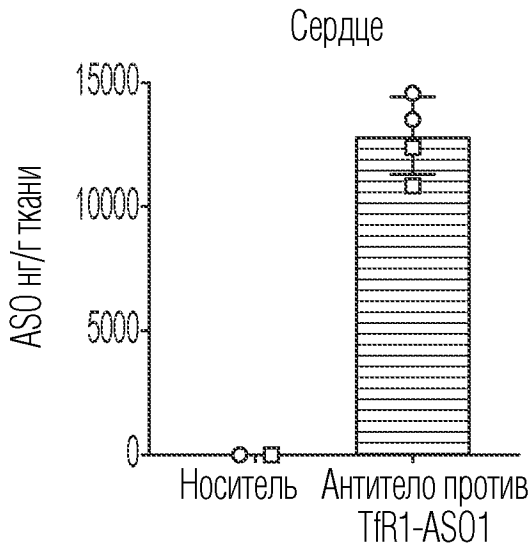
ФИГ. 17В



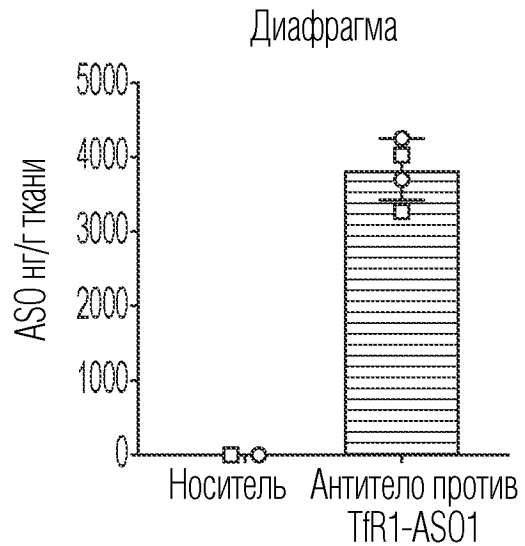
ФИГ. 17С



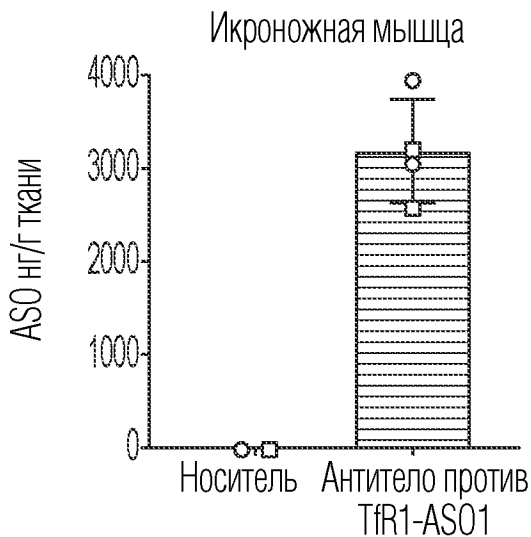
ФИГ. 17D



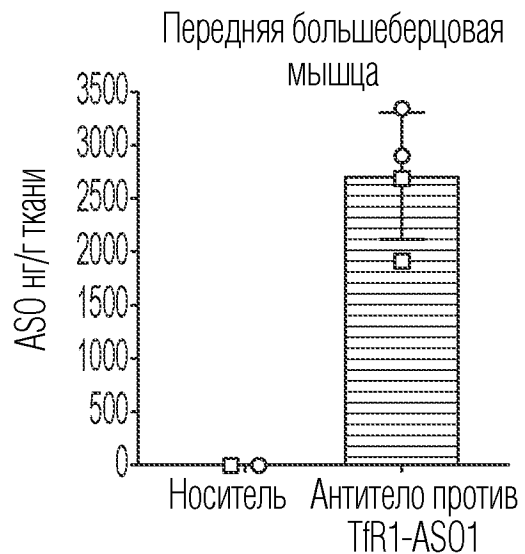
ФИГ. 18А



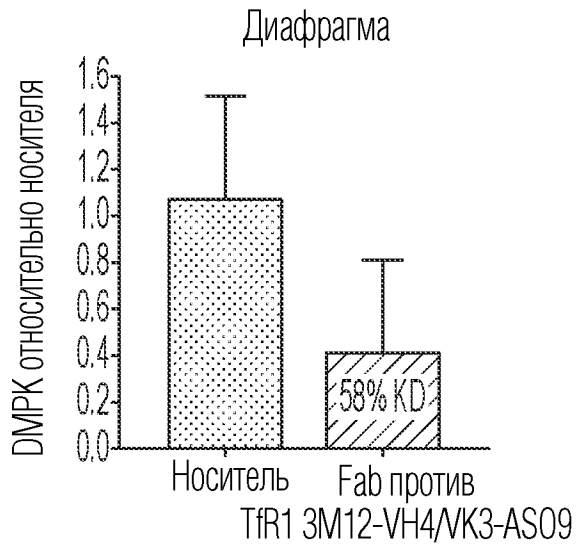
ФИГ. 18В



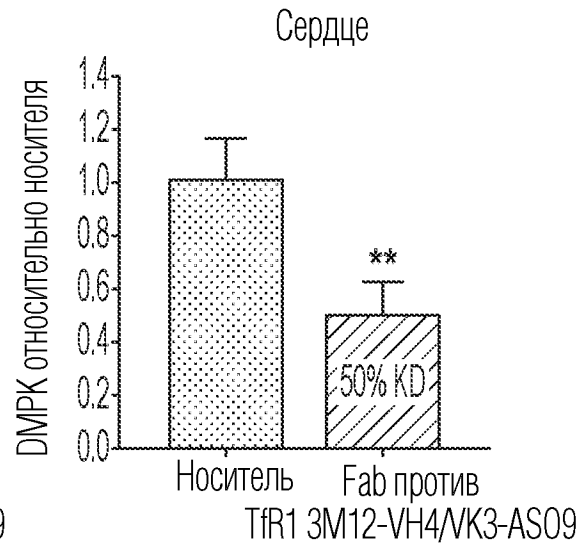
ФИГ. 18С



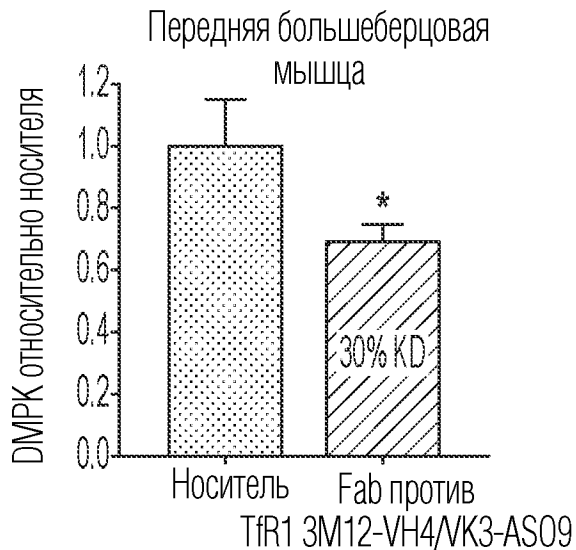
ФИГ. 18D



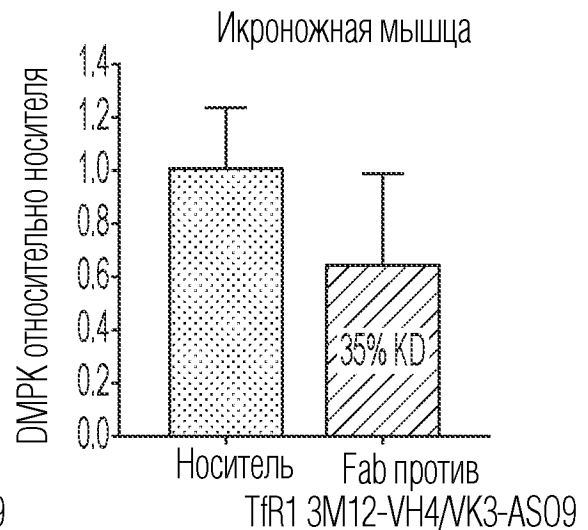
ФИГ. 19А



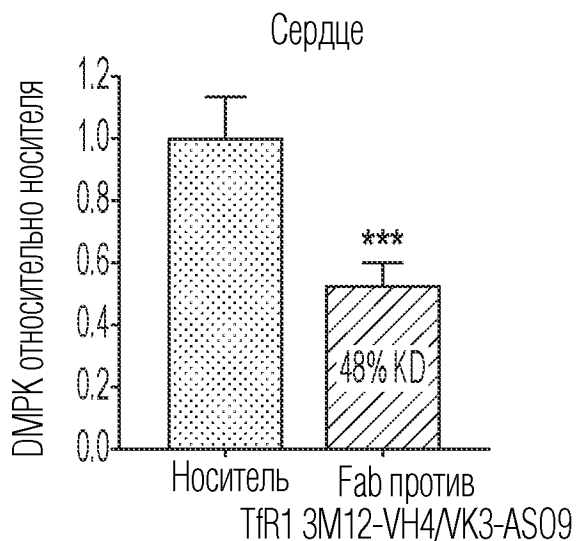
ФИГ. 19В



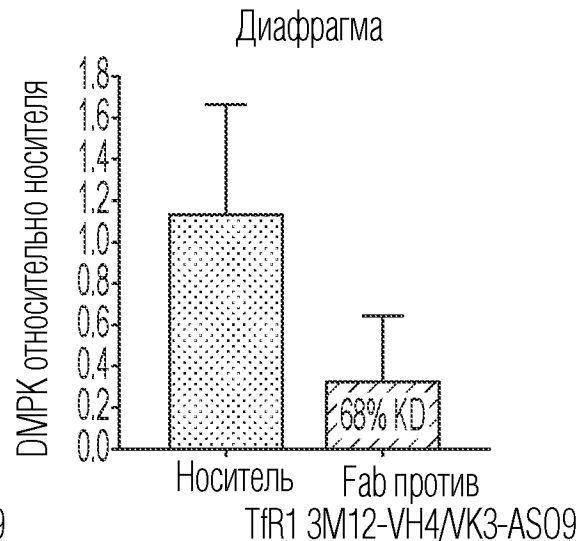
ФИГ. 19С



ФИГ. 19D

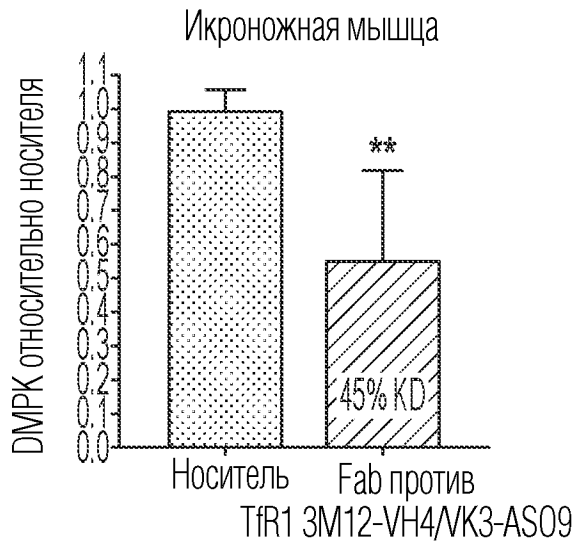


ФИГ. 20А

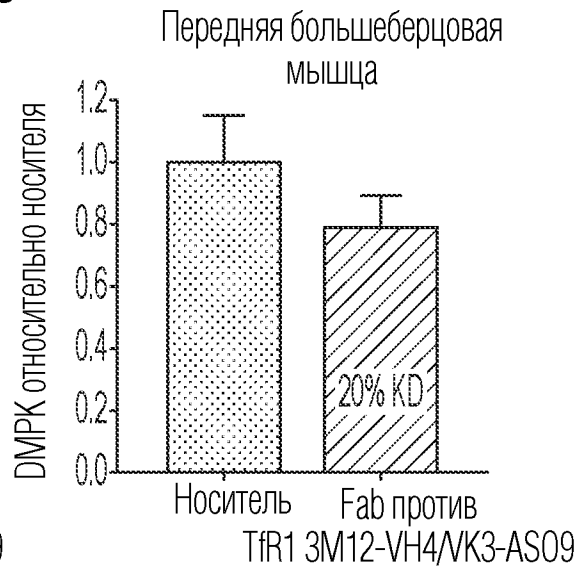


ФИГ. 20В

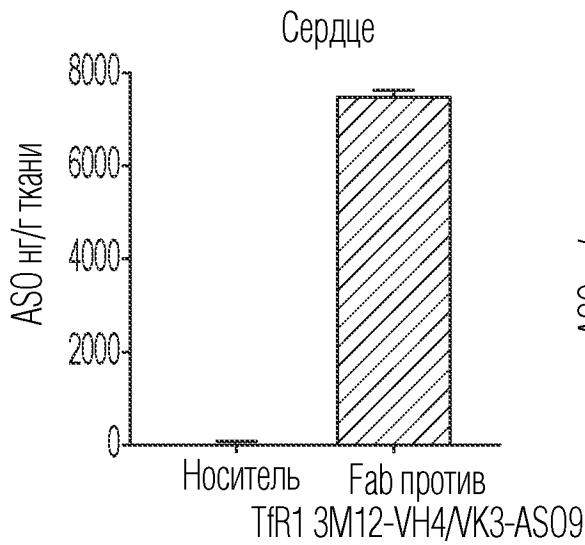
27/43



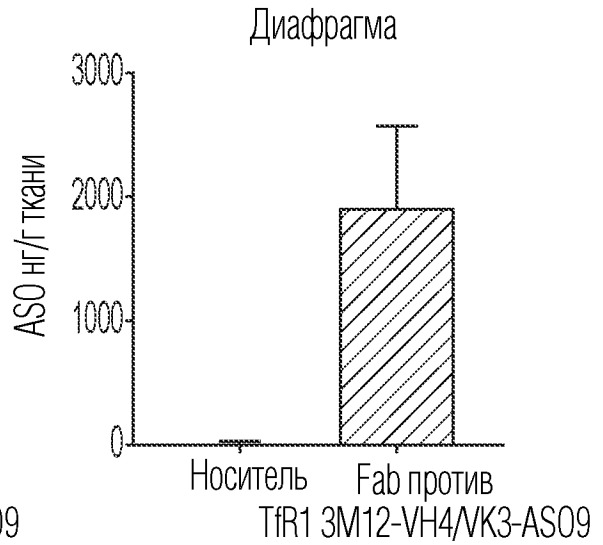
ФИГ. 20С



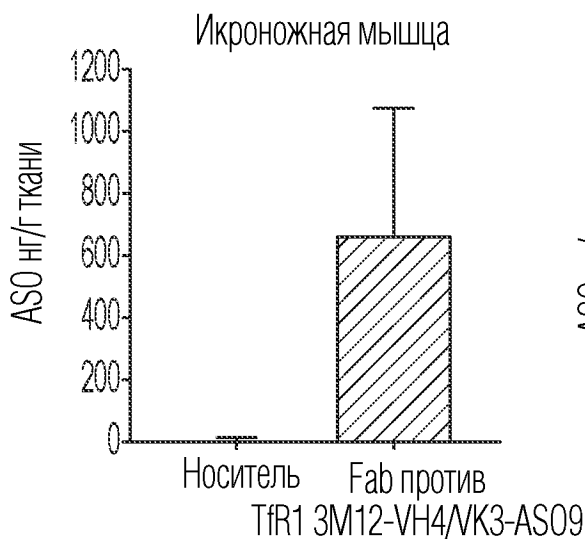
ФИГ. 20D



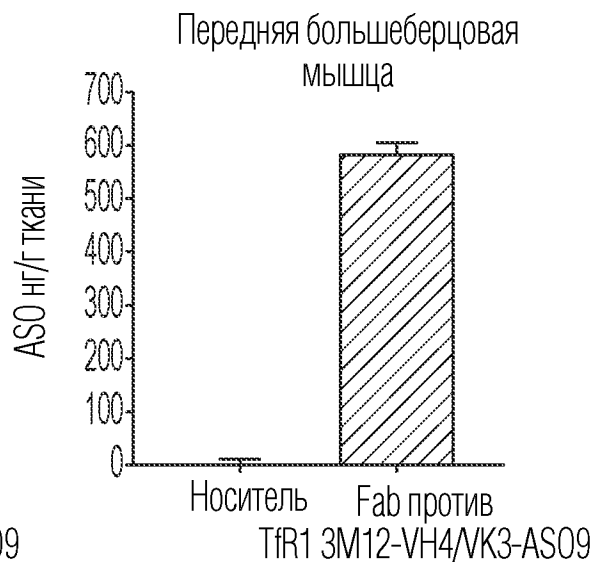
ФИГ. 21А



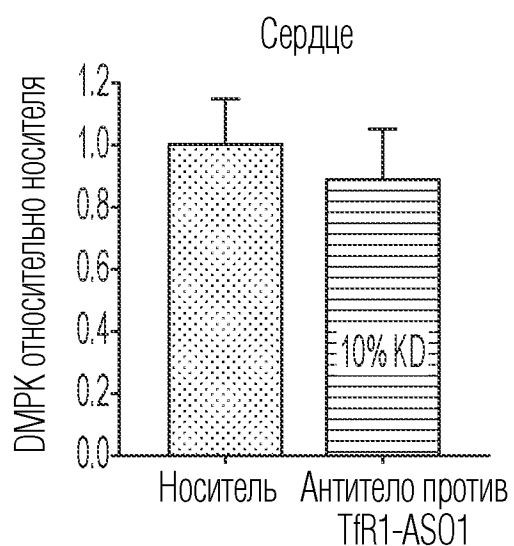
ФИГ. 21В



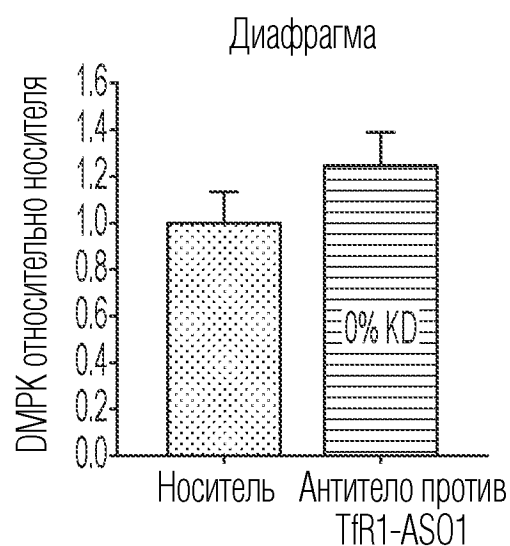
ФИГ. 21С



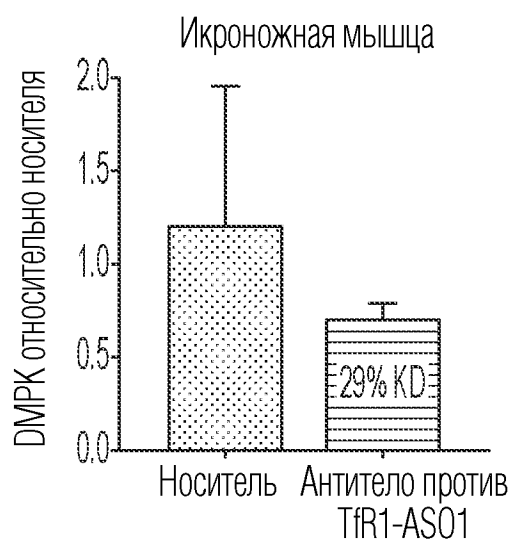
ФИГ. 21D



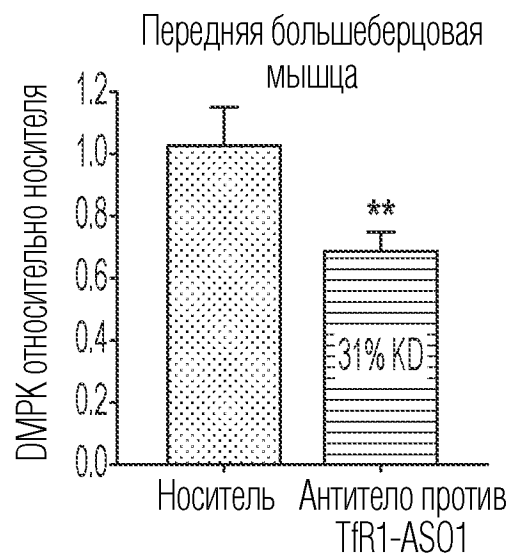
ФИГ. 22А



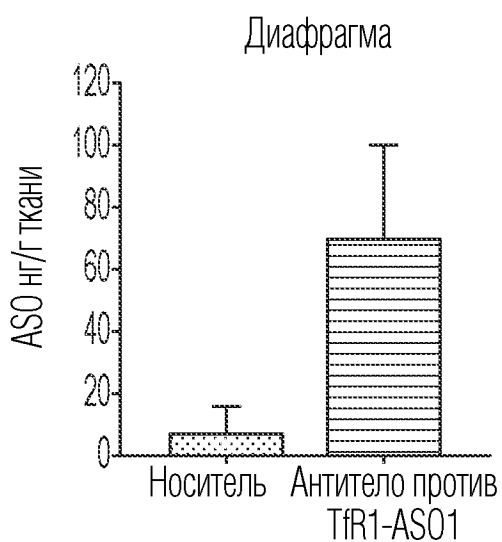
ФИГ. 22В



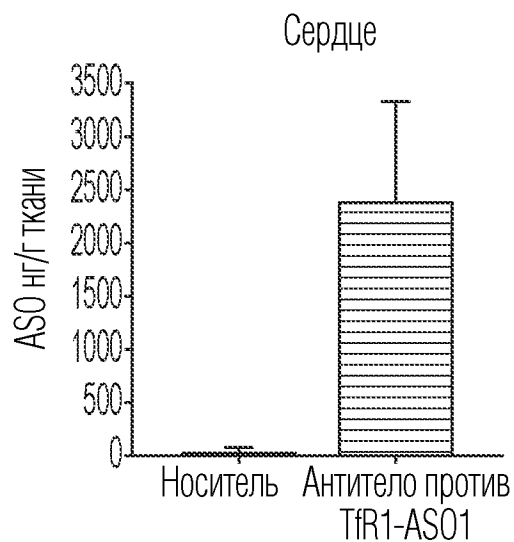
ФИГ. 22С



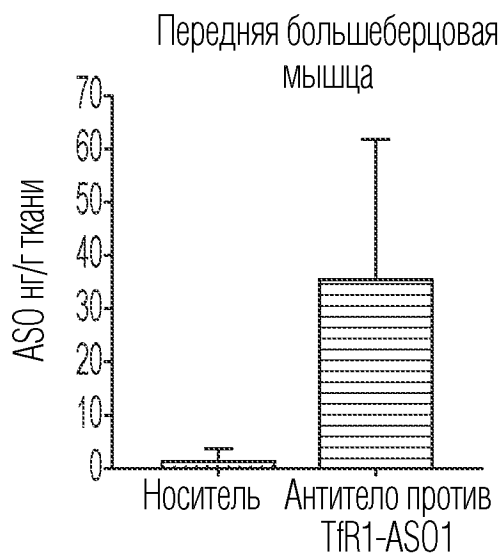
ФИГ. 22D



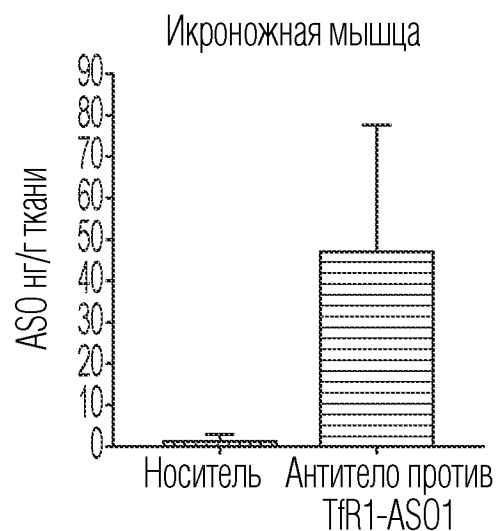
ФИГ. 23А



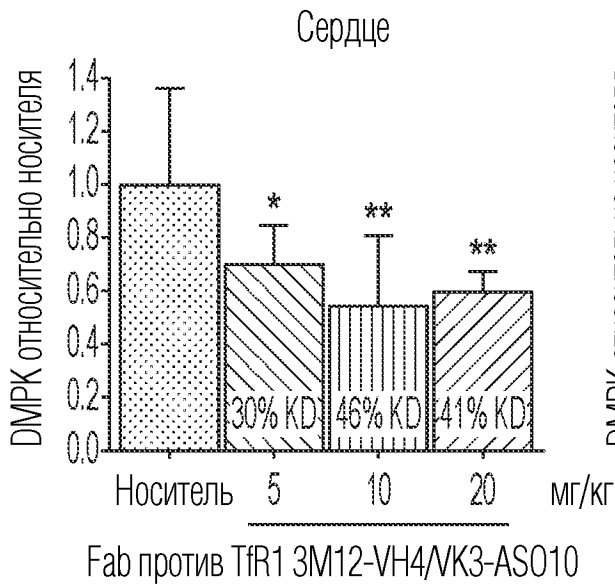
ФИГ. 23В



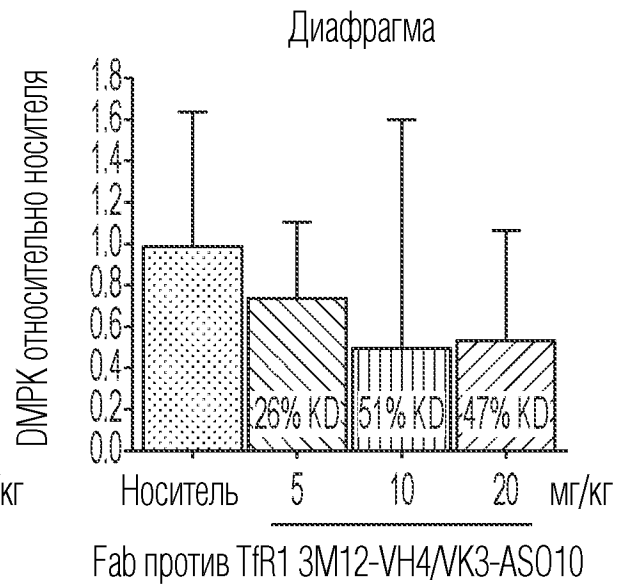
ФИГ. 23С



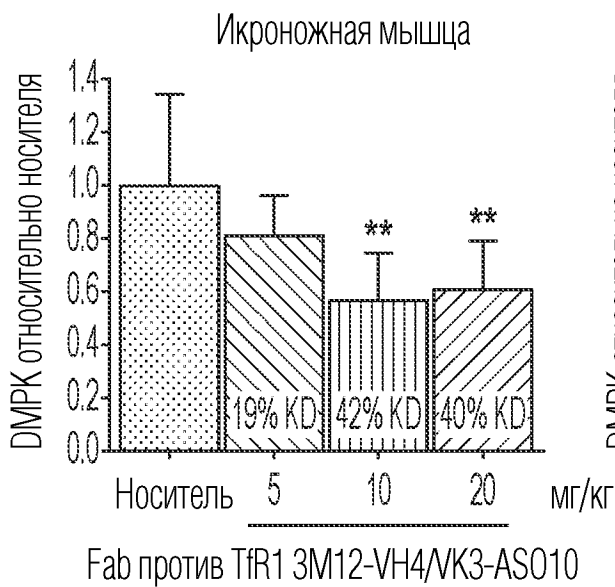
ФИГ. 23D



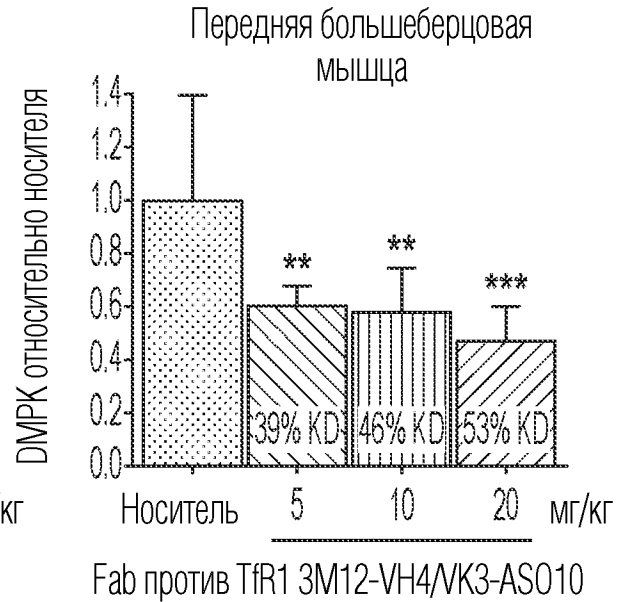
ФИГ. 24А



ФИГ. 24В

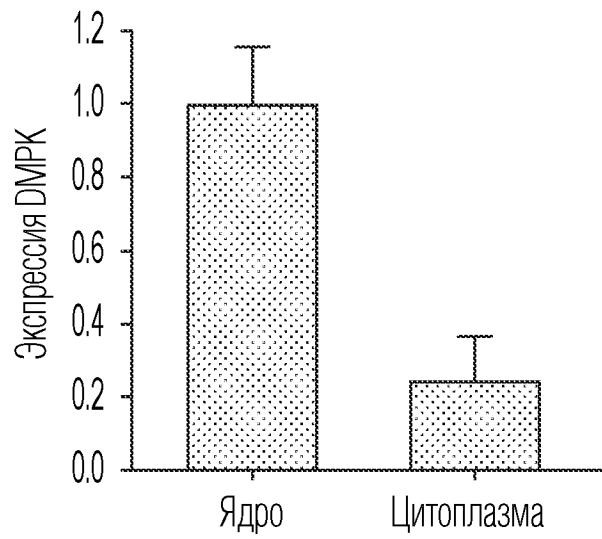


ФИГ. 24С

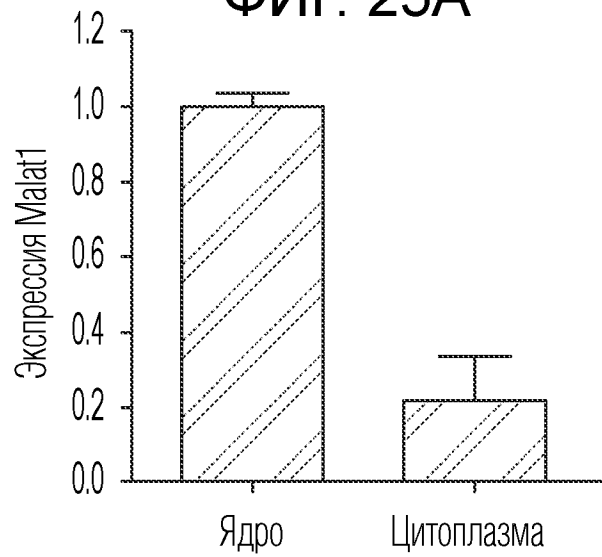


ФИГ. 24D

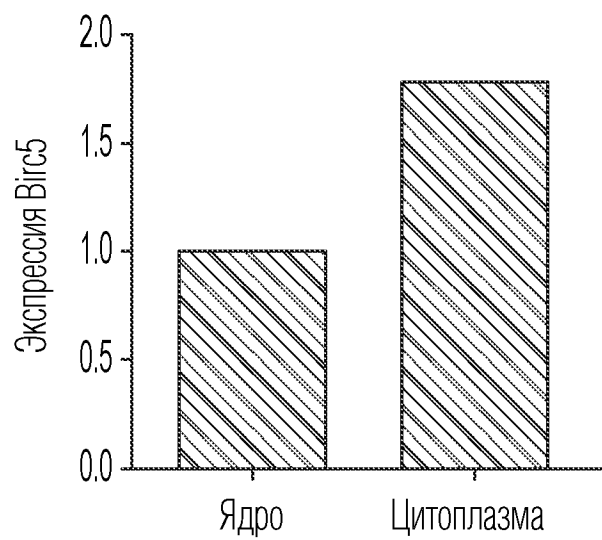
31/43



ФИГ. 25А

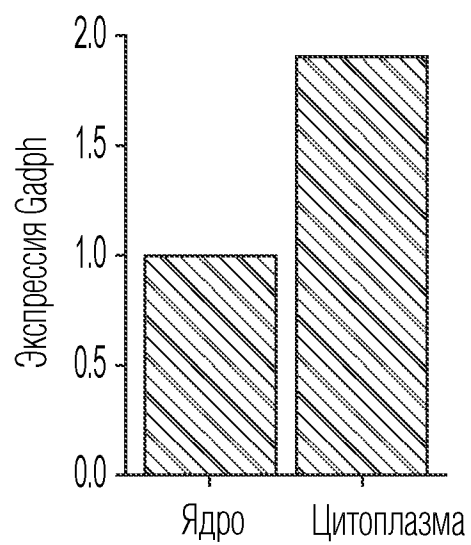


ФИГ. 25В

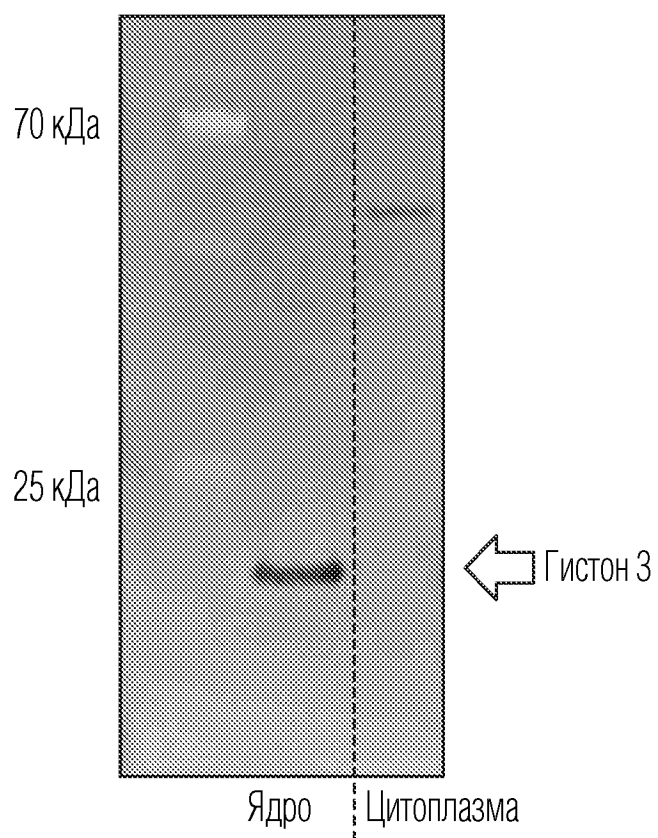


ФИГ. 25С

32/43

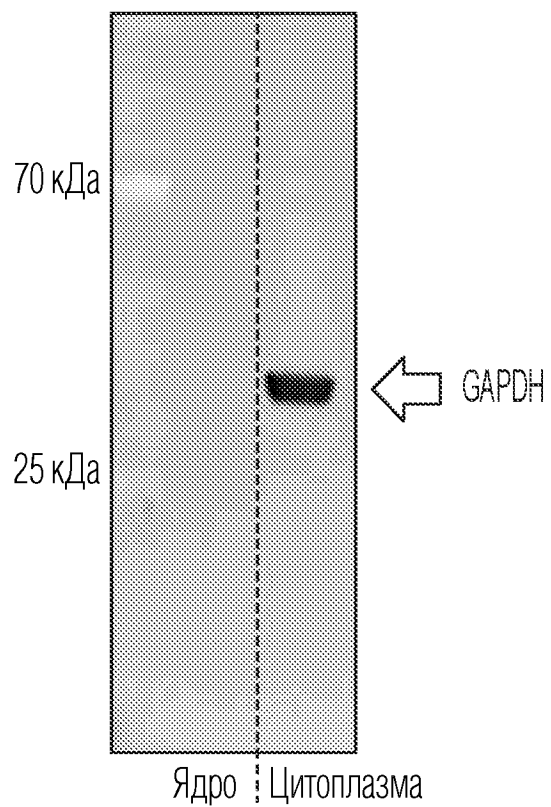


ФИГ. 25D

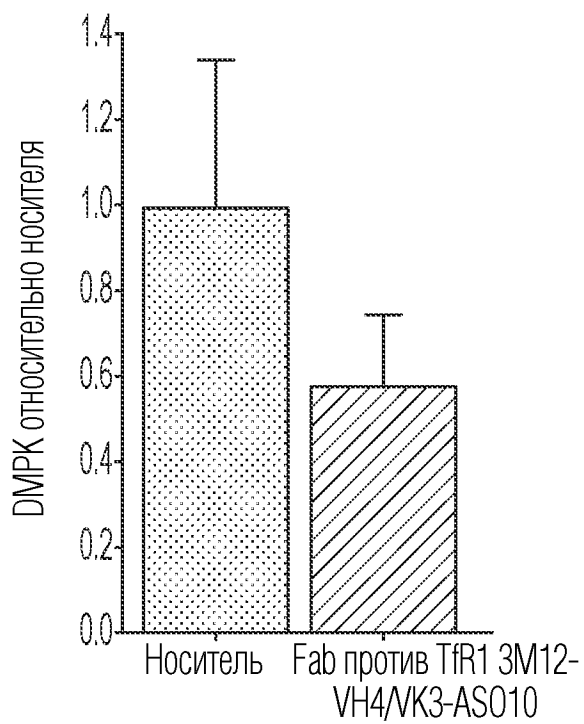


ФИГ. 25E

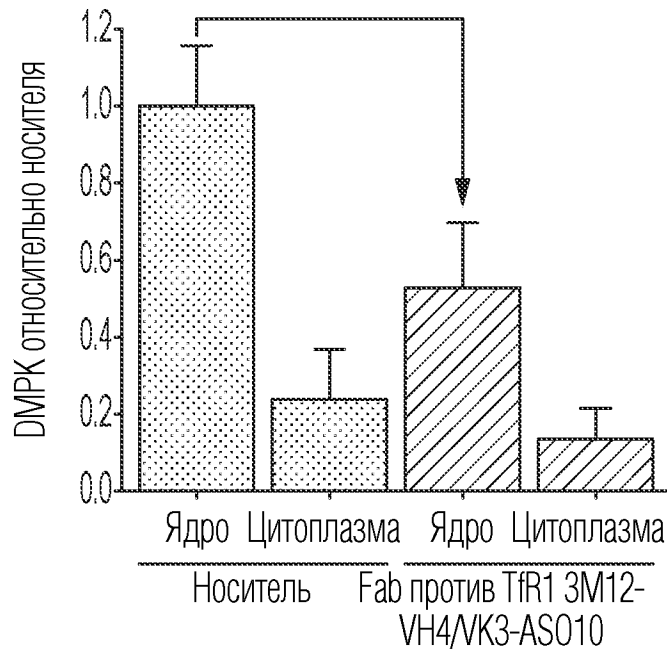
33/43



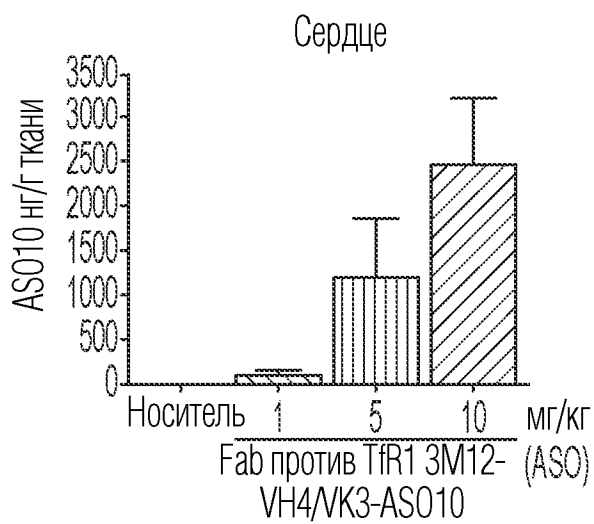
ФИГ. 25F



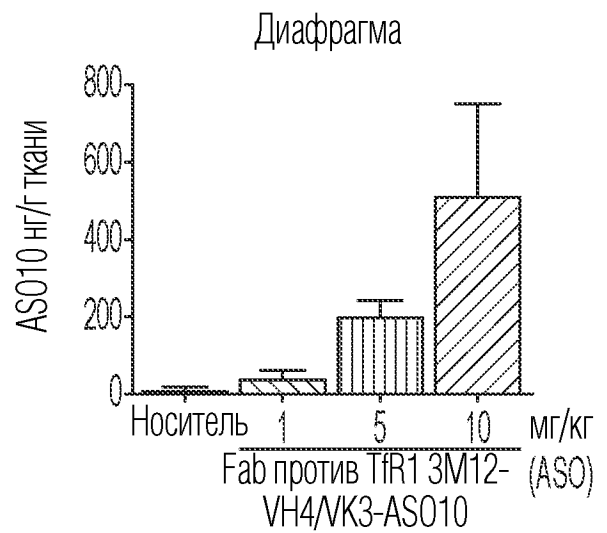
ФИГ. 25G



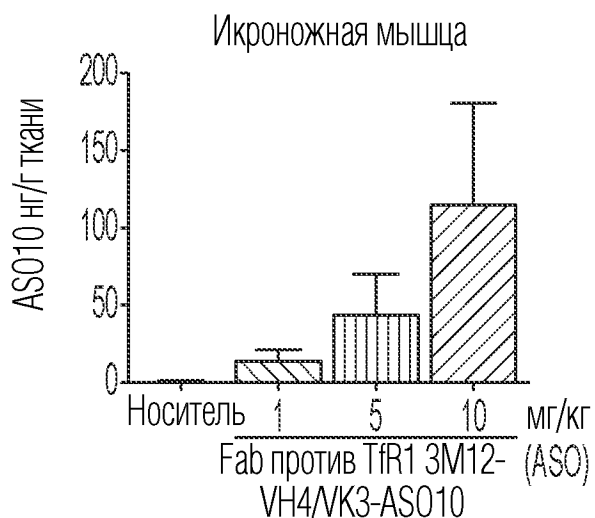
ФИГ. 25Н



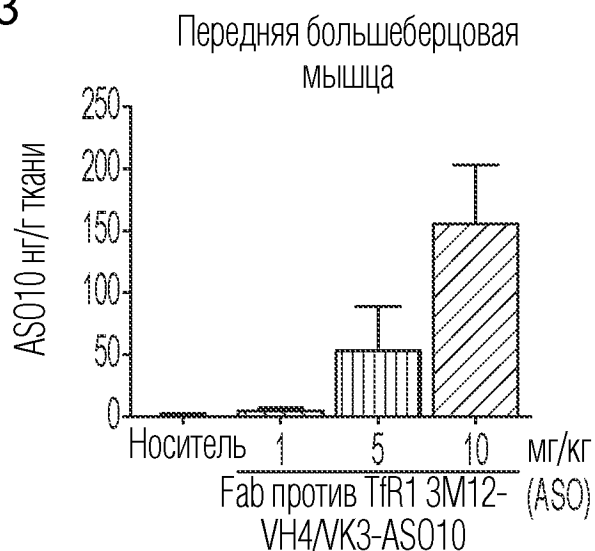
ФИГ. 26А



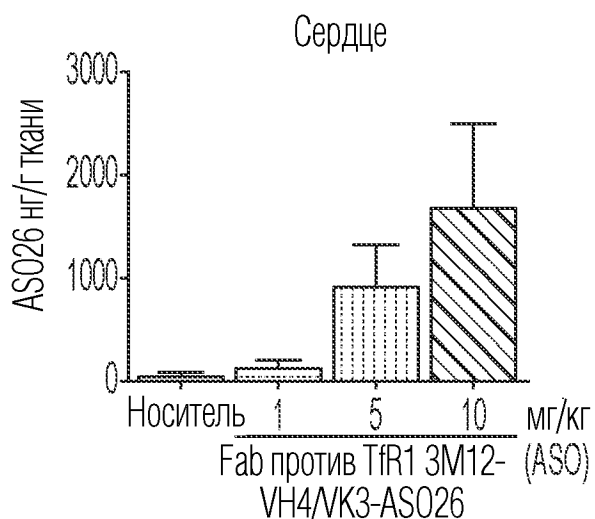
ФИГ. 26В



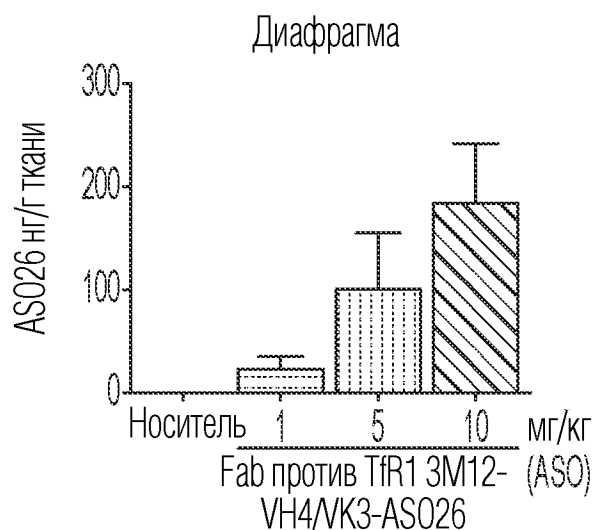
ФИГ. 26С



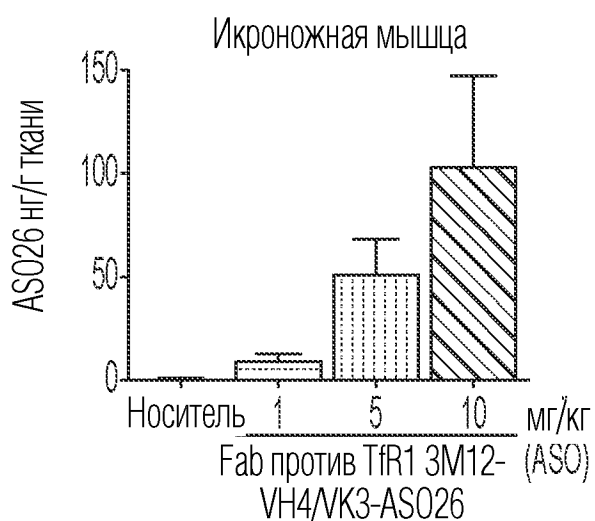
ФИГ. 26D



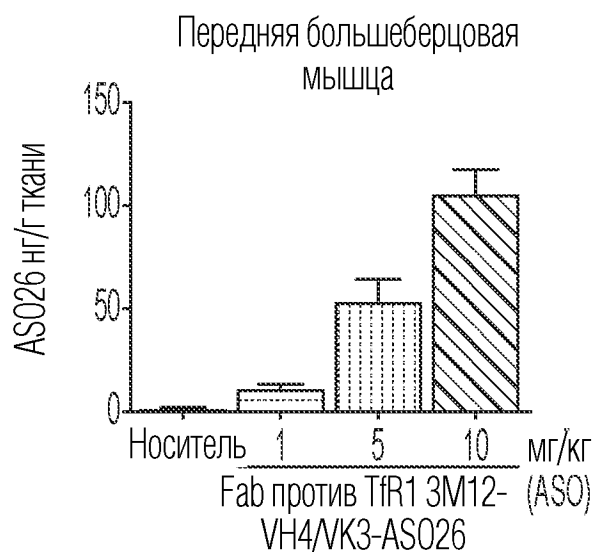
ФИГ. 26Е



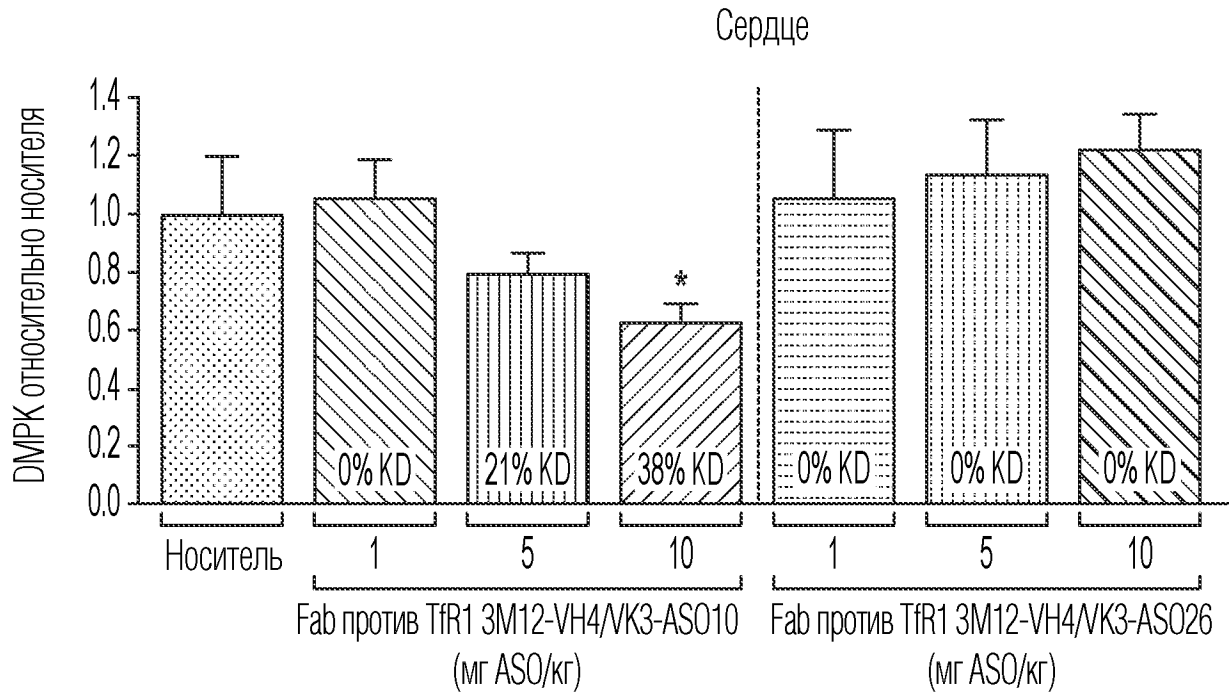
ФИГ. 26F



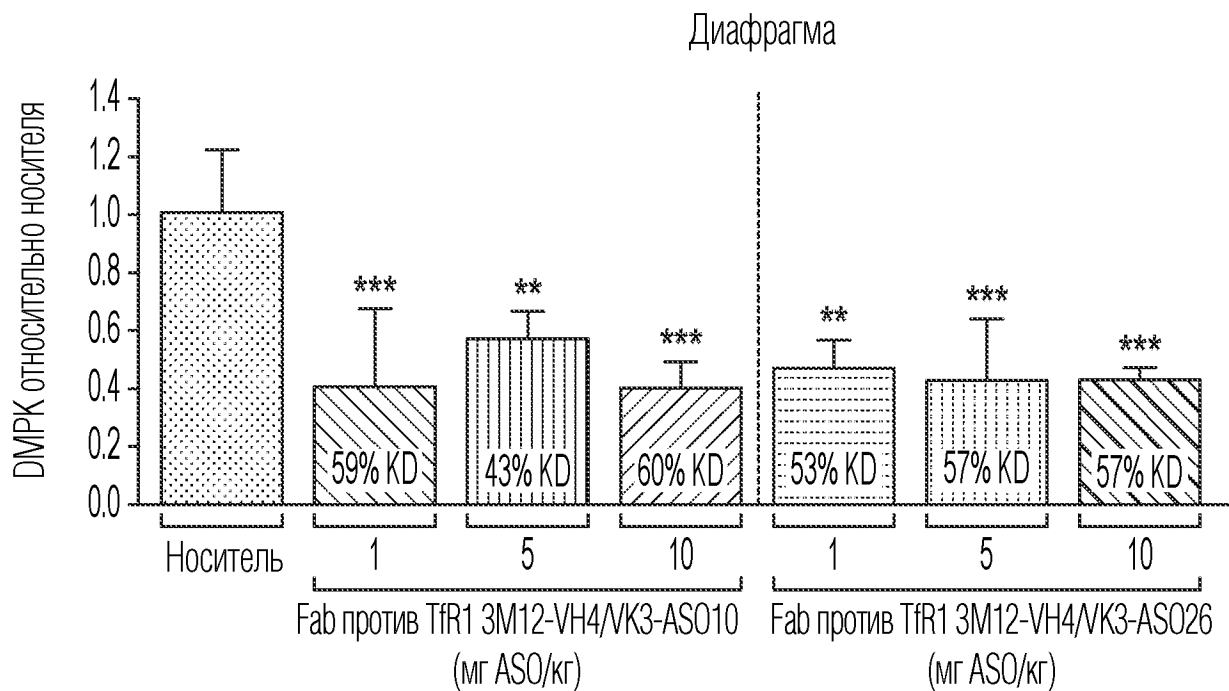
ФИГ. 26G



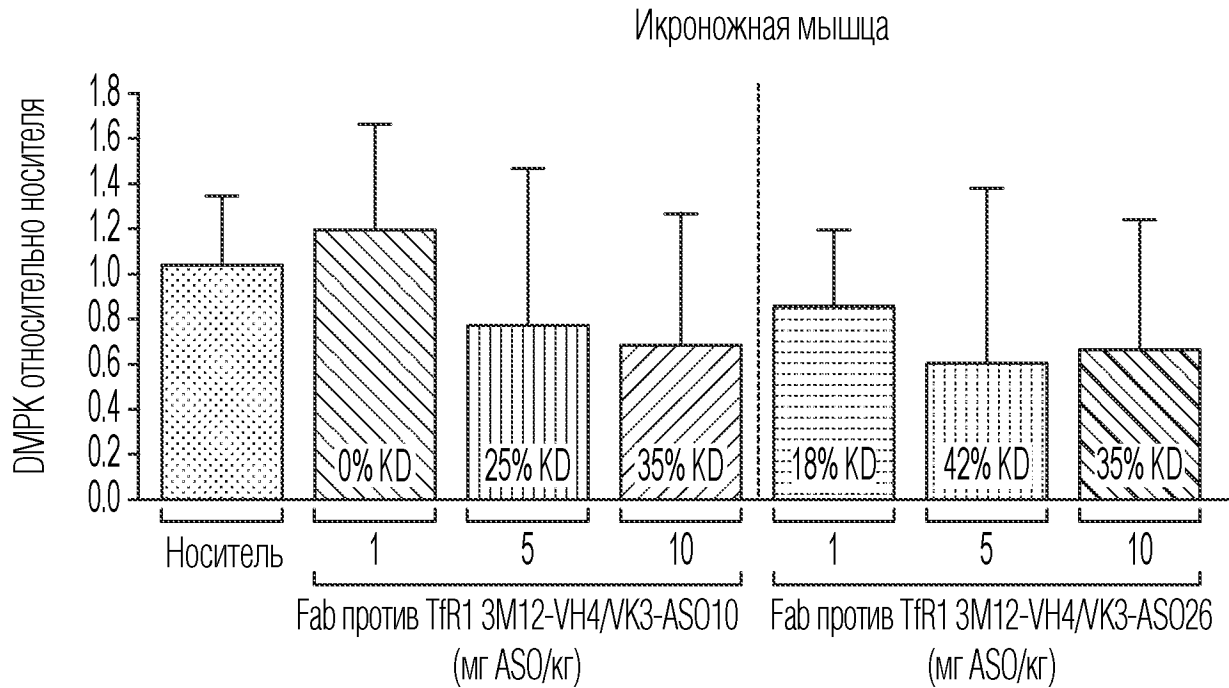
ФИГ. 26H



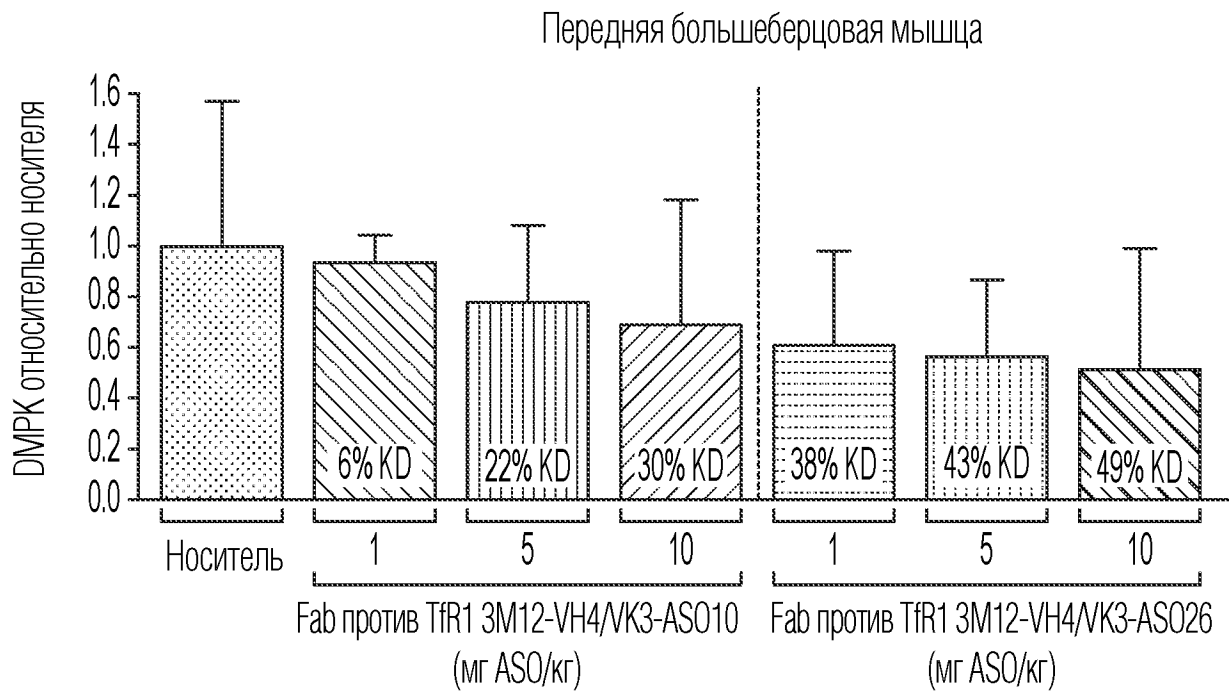
ФИГ. 27А



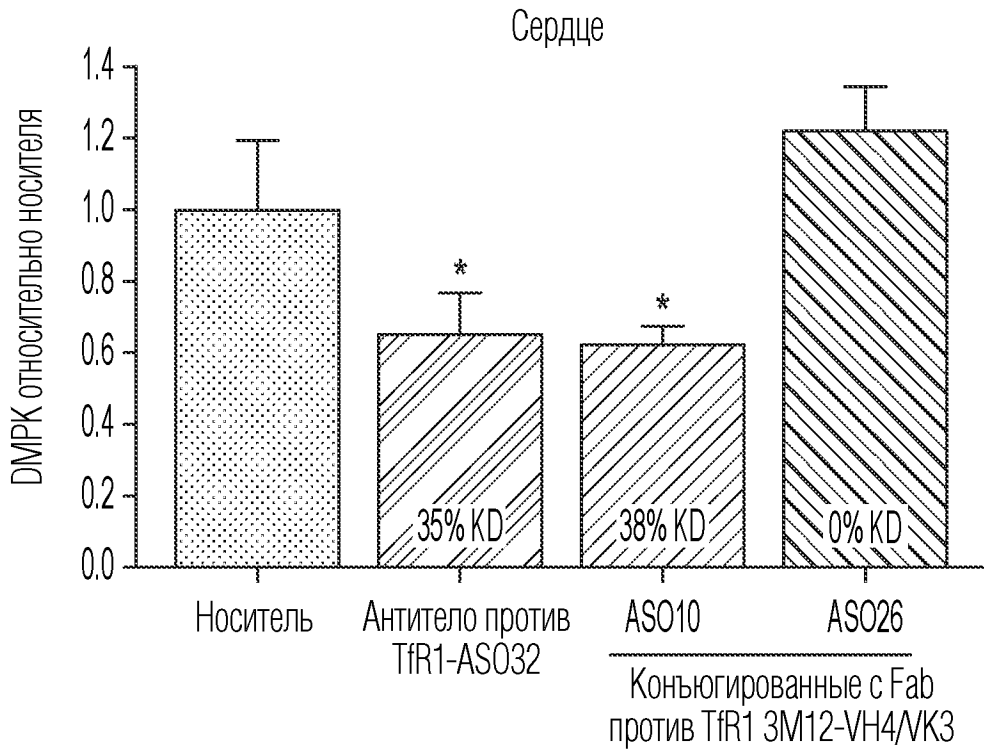
ФИГ. 27В



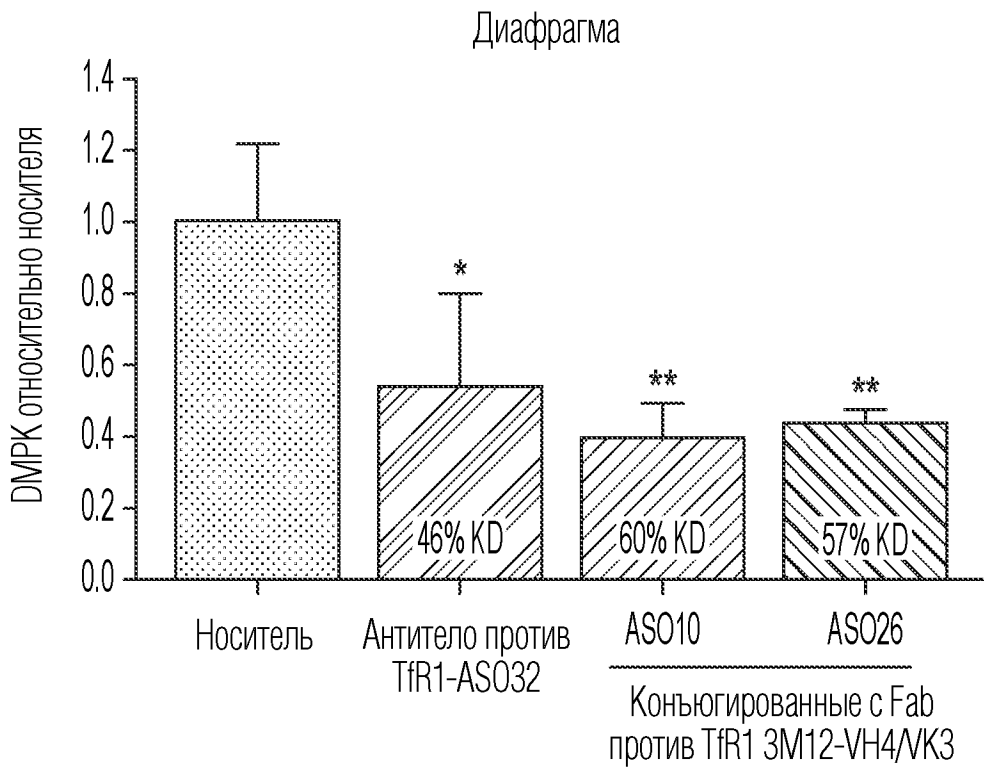
ФИГ. 27С



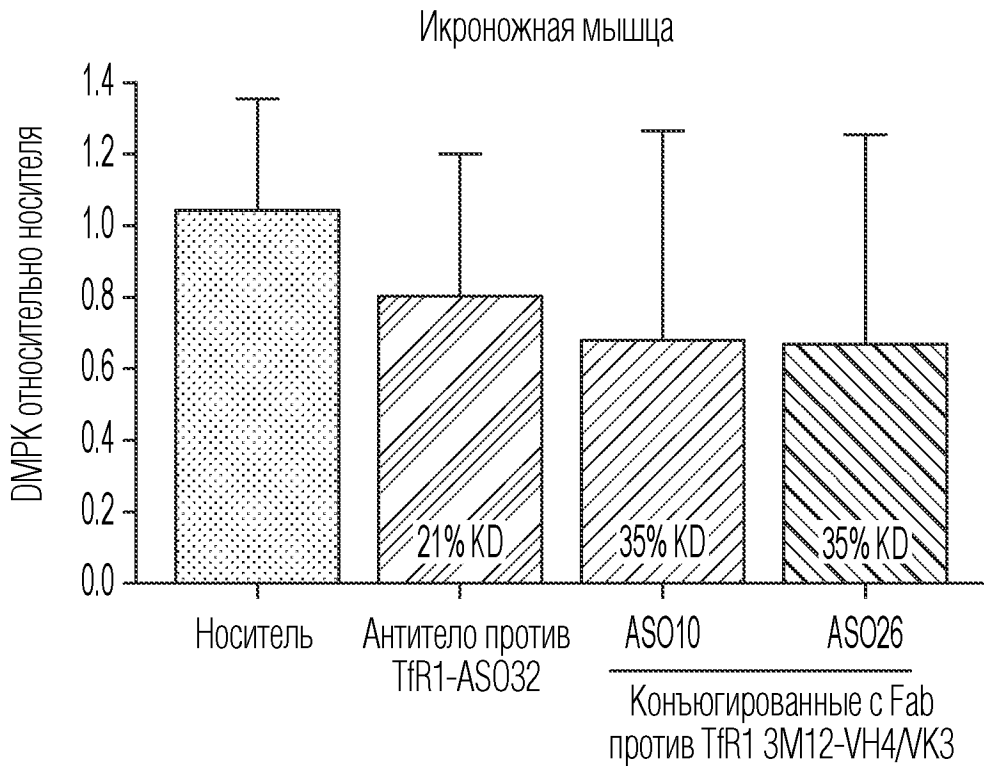
ФИГ. 27D



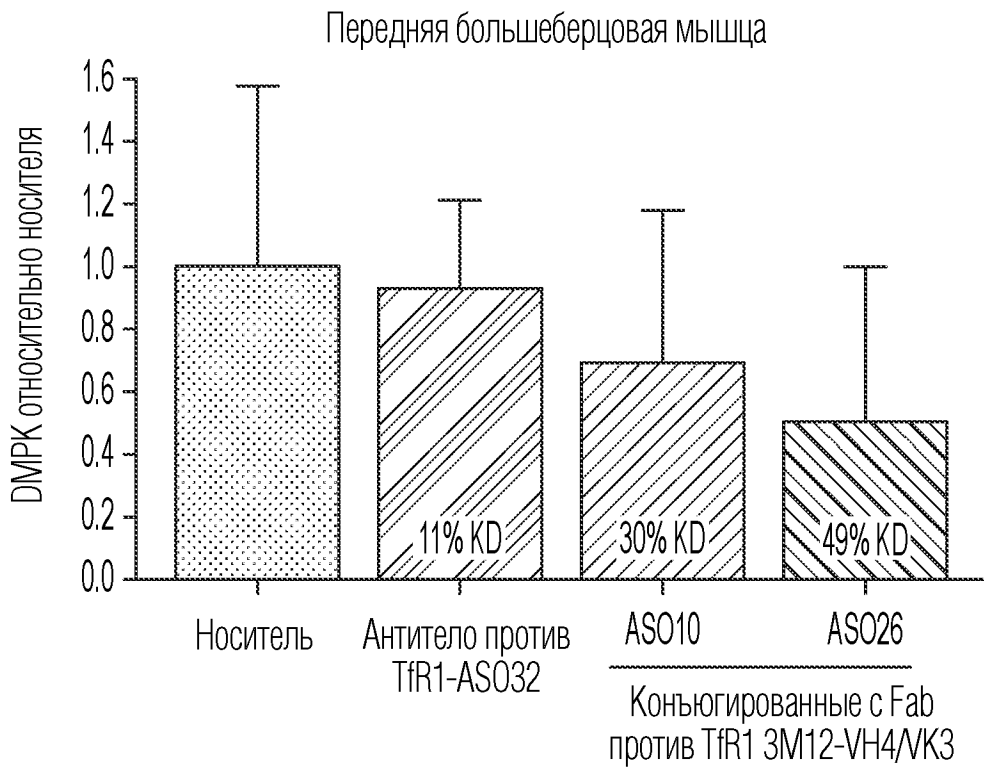
ФИГ. 28А



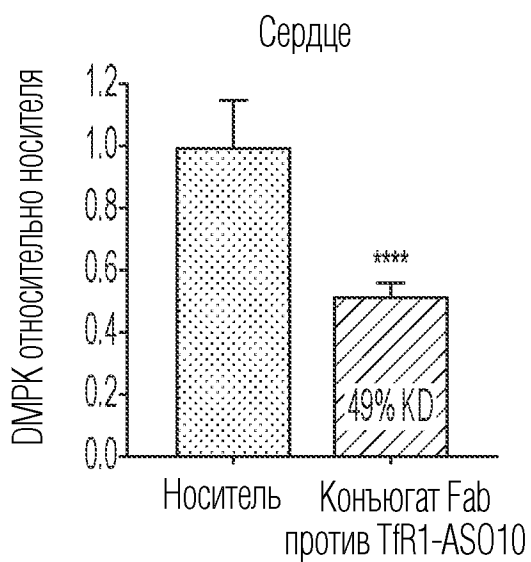
ФИГ. 28В



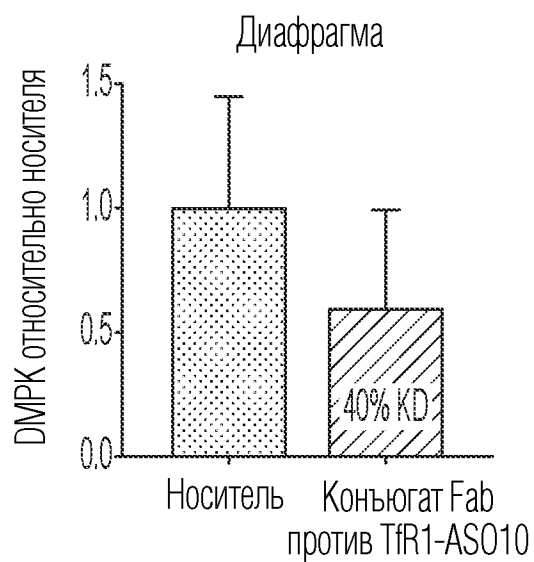
ФИГ. 28С



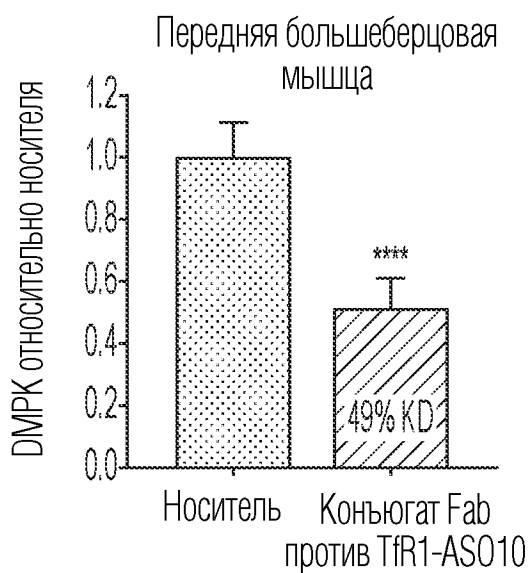
ФИГ. 28D



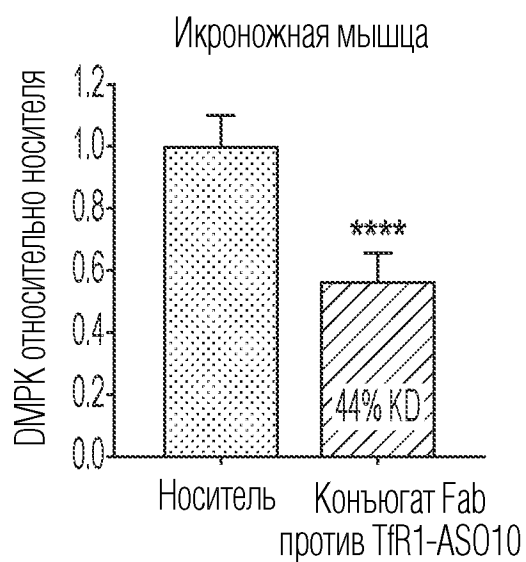
ФИГ. 29А



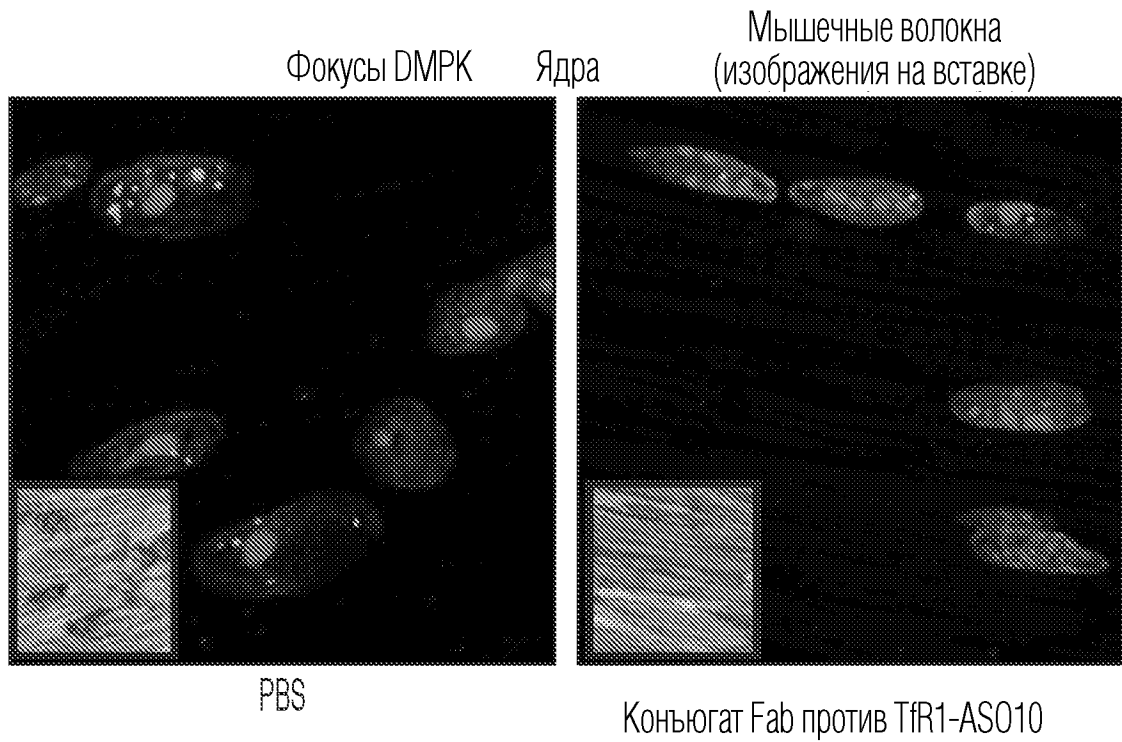
ФИГ. 29В



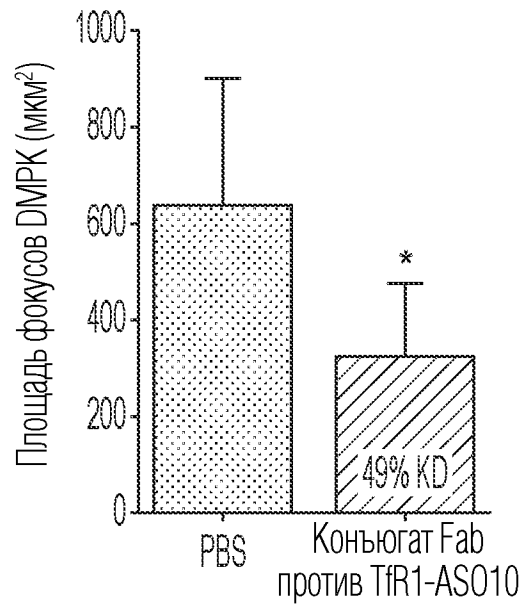
ФИГ. 29С



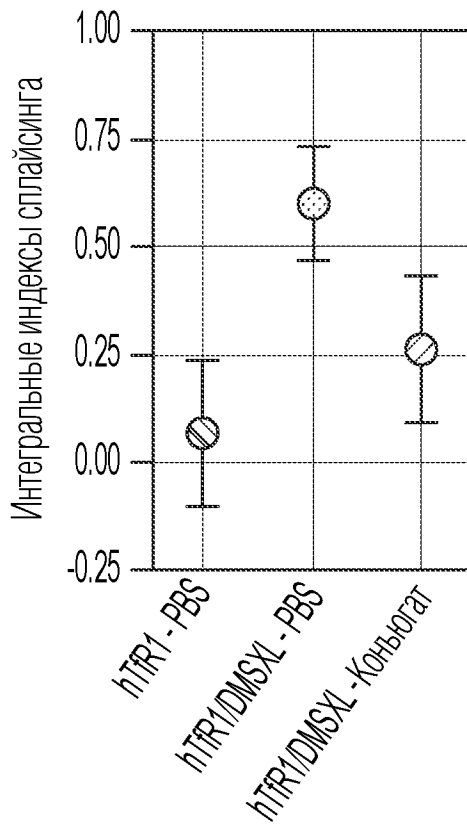
ФИГ. 29D



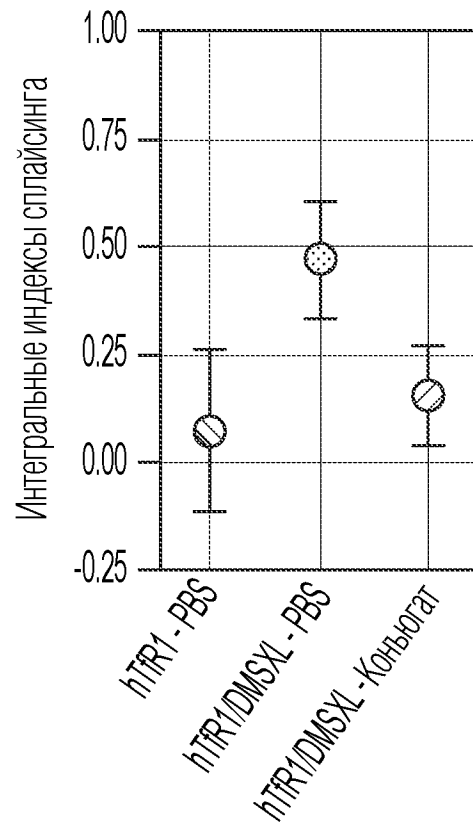
ФИГ. 30А



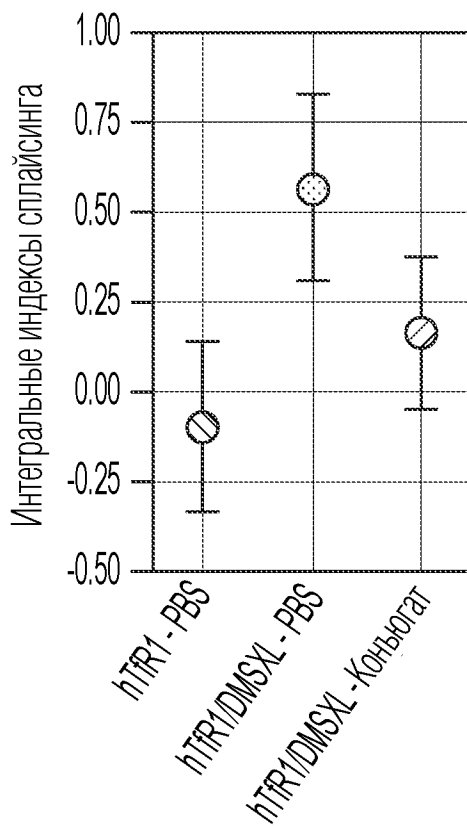
ФИГ. 30В



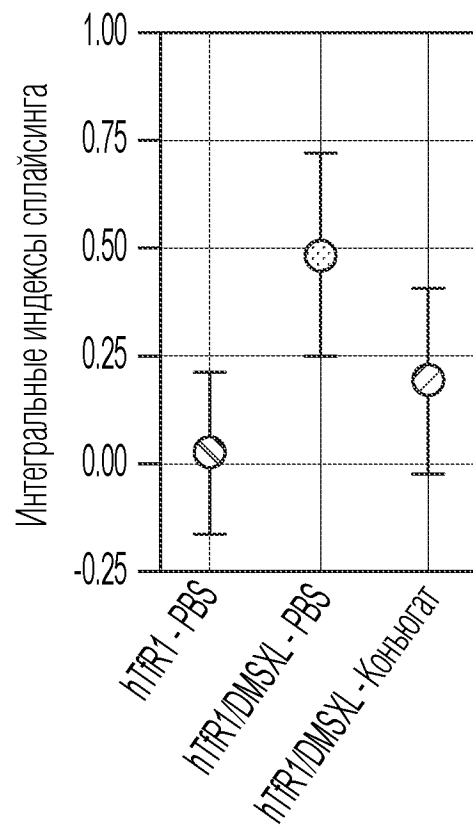
ФИГ. 31



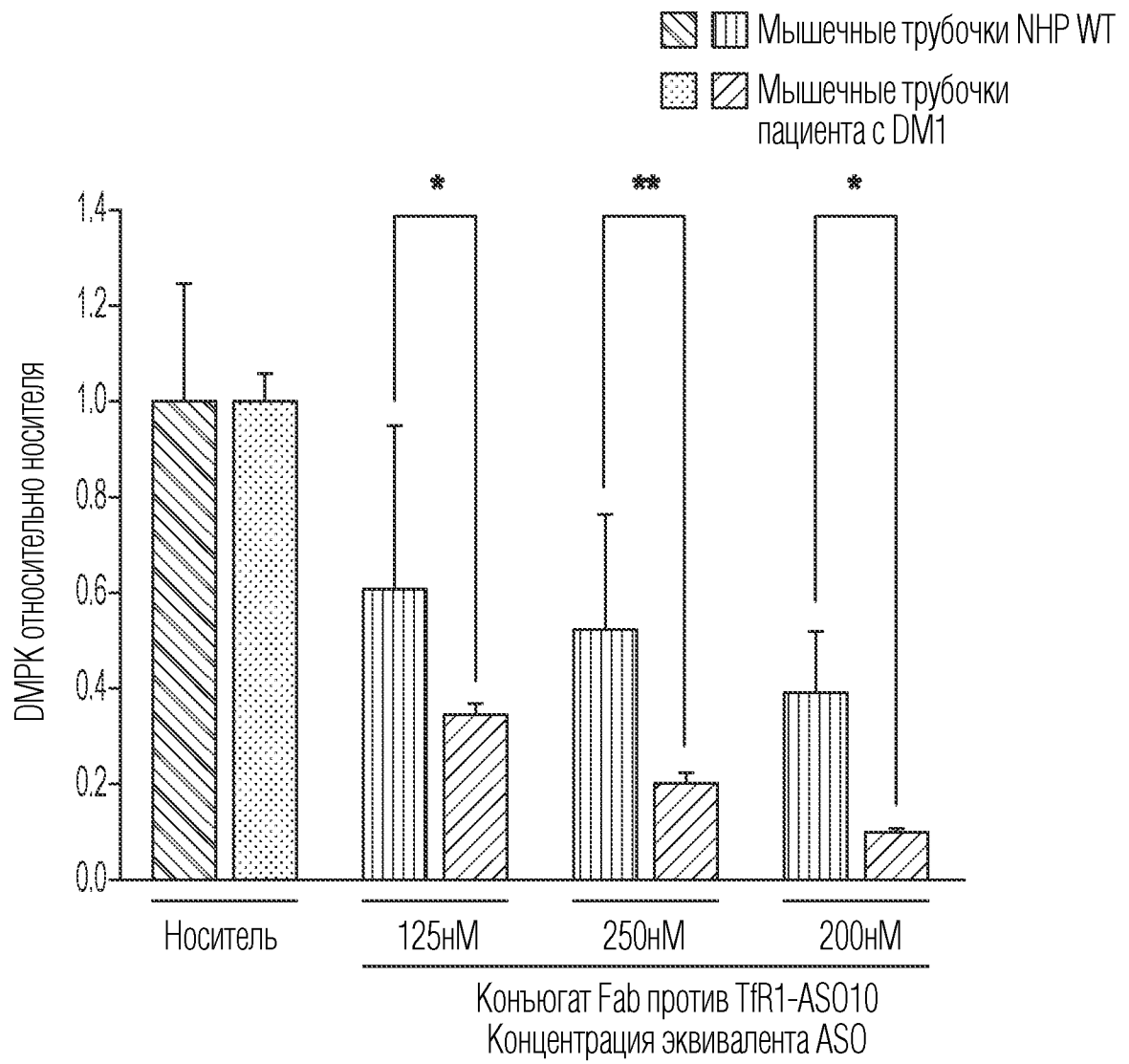
ФИГ. 32



ФИГ. 33



ФИГ. 34



ФИГ. 35