

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393312** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.23

(22) Дата подачи заявки
2022.07.01

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

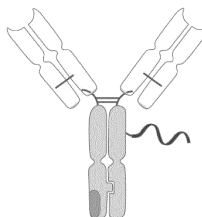
**(54) ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА РЕЦЕПТОР
ТРАНСФЕРРИНА**

(31) **63/217,743; 63/298,193; 63/333,449**
(32) **2021.07.01; 2022.01.10; 2022.04.21**
(33) **US**
(86) **PCT/US2022/073377**
(87) **WO 2023/279099 2023.01.05**
(71) Заявитель:
ДЕНАЛИ ТЕРАПЬЮТИКС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Баркер Скарлетт, Деннис Марк С.,
Девос Сара Л., Эстрада Антони А.,
Кариолис Михалис С., Махон
Катал С., Нилевски Лизанн Г., Парк
Джошуа И., Шань Лу, Тайер Май Б.,
Тонг Рэймонд Ка Ханг, Тран Хай Л.,
Уэллс Роберт К., Дзукеро Джой Ю
(US)**

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,
Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А. (RU)**

(57) В данном документе предложены конъюгаты, содержащие белки, которые связываются с рецептором трансферрина, и олигонуклеотиды, которые способны модулировать экспрессию целевых гена или последовательности, а также способы их применения.



Олигонуклеотидное средство
переноса (OTV)

A1

202393312

202393312

A1

ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА РЕЦЕПТОР ТРАНСФЕРРИНА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [001] В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 63/217743, поданной 1 июля 2021 г., предварительной заявке США № 63/298193, поданной 10 января 2022 г., и предварительной заявке США № 63/333449, поданной 21 апреля, 2022, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 [002] Список последовательностей, записанный в файле 582256_SeqListing.xml, имеет размер 574 килобайта, был создан 29 июня 2022 г. и включен в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 [003] *In vivo* доставка молекул на основе нуклеиновых кислот, таких как антисмысловые олигонуклеотиды или агенты РНКи, часто требует специфического нацеливания для достижения определенных тканей или типов клеток. В частности, доставка в непеченочные ткани остается затрудненной и ограничивает использование таких вариантов терапии. Доставка олигонуклеотидов в центральную нервную систему (ЦНС) представляет собой особую проблему из-за гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Одним из способов доставки олигонуклеотидов в ЦНС является интратекальная доставка. Однако
20 интратекальная доставка является инвазивной, имеет более высокий риск побочных эффектов и часто приводит к неравномерному распределению.

[004] Таким образом, существует постоянная потребность в новых и улучшенных способах доставки терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот *in vivo*, в частности в ткани ЦНС.

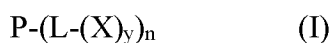
25

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, предложены конъюгаты, содержащие по меньшей мере один олигонуклеотид (например, антисмысловой олигонуклеотид (ASO, англ. «antisense oligonucleotide») или
30 агент РНК-интерференции (РНКи)) и по меньшей мере один белок, сконструированный для связывания с рецептором трансферрина (TfR, англ. «transferrin receptor»). В некоторых аспектах белок, содержащийся в таком конъюгате, содержит модифицированный константный домен с заменами, которые создают сайт связывания TfR. TfR на высоких уровнях экспрессируется в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ), а TfR естественным
35 образом переносит трансферрин из крови в головной мозг. Поскольку эти белки связывают

TfR, они также могут переноситься через ГЭБ и в дальнейшем использоваться для переноса присоединенных олигонуклеотидов через ГЭБ. Этот подход может существенно улучшить поглощение и/или биораспределение этих агентов в головном мозге и поэтому является в высокой степени полезным для лечения нарушений и заболеваний, при которых является предпочтительной доставка в головной мозг. Описанные в данном документе конъюгаты также можно использовать для повышения доставки олигонуклеотидов, таких как ASO и агенты РНКи, в некоторые периферические ткани, такие как периферические ткани, которые экспрессируют TfR (например, мышцы). Также раскрыты полипептиды и белки, содержащие модификации, которые добавляют сайты конъюгации или облегчают конъюгацию, включая замены цистеином, такие как описанные в данном документе.

[006] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном документе, относится к конъюгату формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
P представляет собой белок, содержащий сконструированный сайт связывания, который специфически связывается с рецептором трансферрина (TfR) с аффинностью от около 3 до около 600 нМ;
каждый y независимо равен по меньшей мере 1 (например, 1, 2, 3 или 4); и
n равен по меньшей мере 1 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[007] В некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном документе, относится к димеру Fc-полипептида или слиянию Fab-Fc-димер, содержащему:
(a) первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и
(b) второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом по (a);
при этом слияние Fab-Fc-димер дополнительно содержит первый Fab и второй Fab; и
при этом димер Fc-полипептида или слияние Fab-Fc-димер содержит одну или большее количество замен цистеином.

[008] В некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном документе, относится к димеру Fc-полипептида, содержащему:
(a) первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и
(b) второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом по (a);
при этом первый и/или второй Fc-полипептид содержит одну или большее количество

замен, выбранных из группы, состоящей из N297A и N297G.

[009] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен конъюгат формулы I:



5 где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

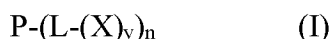
P представляет собой белок, содержащий полипептид, связывающий рецептор трансферрина (TfR), описанный данным документе;

10 каждый y независимо равен по меньшей мере 1 (например, 1, 2, 3 или 4); и

n равен по меньшей мере 1 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[010] В одном аспекте белок, описанный в данном документе, содержит модифицированный константный домен, который связывается (например, специфически связывается) с TfR.

15 **[011]** В одном аспекте белок, описанный в данном документе, дополнительно содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат формулы I:



20 где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее

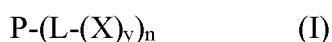
25 количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1 (например, 1, 2, 3 или 4); и

n равен по меньшей мере 1 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[012] В некоторых аспектах к белку присоединено более одного олигонуклеотида, например, посредством присоединения более чем одной связывающей группы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат формулы I, который

30 содержит более одного олигонуклеотида:



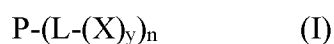
где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

35 каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;
каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен 2 или более (например, 2 или 4).

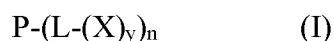
- 5 **[013]** В некоторых других аспектах к одной связывающей группе присоединено более одного олигонуклеотида. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат формулы I, который содержит более одного олигонуклеотида:



где

- 10 каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;
каждый у независимо равен по меньшей мере 1, при этом по меньшей мере один у равен 2
15 или более; и
n равен по меньшей мере единице.

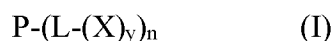
- [014]** Как описано в данном документе, аффинность связывания TfR белка (P) может варьироваться. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предложен
20 низкоаффинный (например, от около 3 до около 600 нМ) связывающий рецептор трансферрина конъюгат формулы I:



где

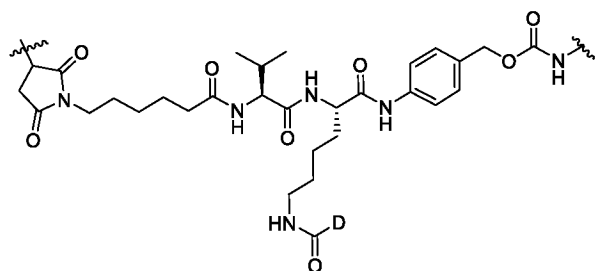
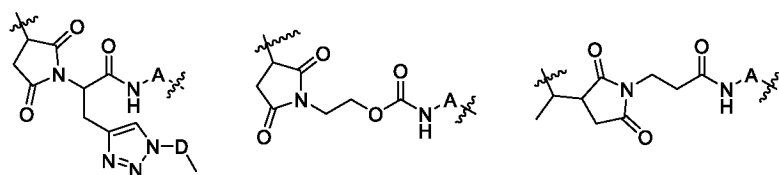
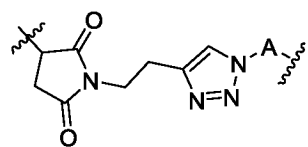
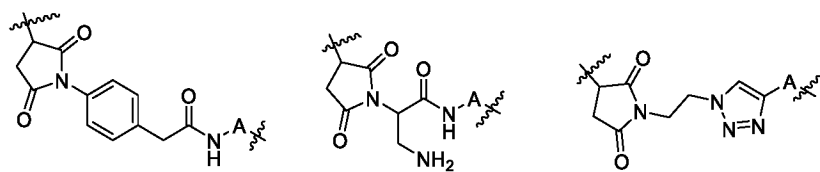
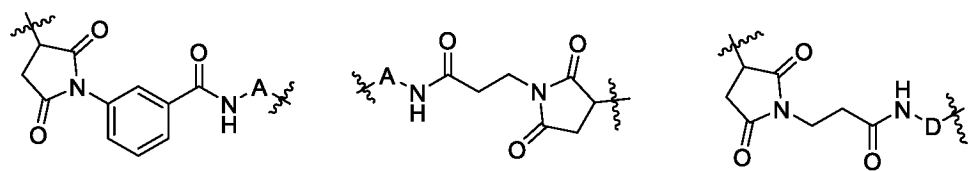
- каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
25 P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина с низкой аффинностью (например, от около 40 нМ до 1200 нМ);
каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен по меньшей мере 1.

- 30 **[015]** В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат формулы I:

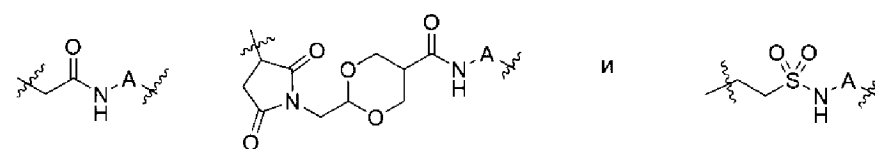
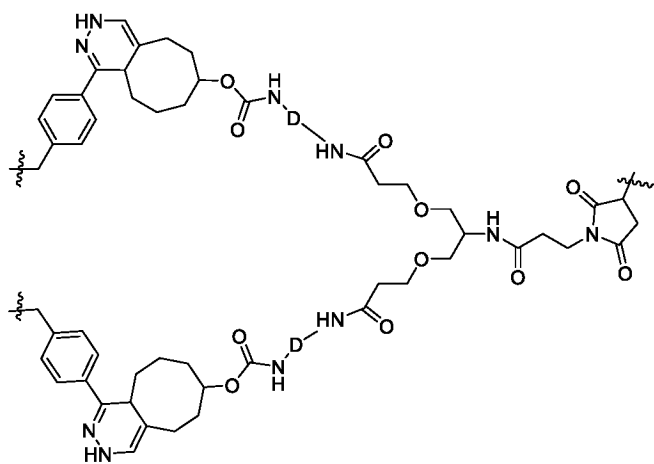


где

- каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L представляет собой связывающую группу, независимо выбранную из группы,
35 состоящей из:



5



где

каждый A независимо представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

10 каждый D представляет собой -(CH₂-CH₂-O)_m-; и

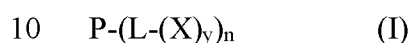
каждый m равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24;

P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;

каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

- 5 **[016]** Как описано в данном документе, белок (P) может содержать или не содержать Fab-фрагмент или его часть. Например, в некоторых вариантах осуществления белок не содержит Fab-фрагмент или его часть. В других вариантах осуществления белок содержит один или большее количество ненацеливающих Fab-фрагментов или их частей. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который

- 15 специфически связывается с рецептором трансферрина, при этом P не содержит Fab-фрагмент или его часть;

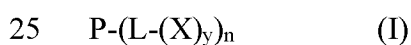
каждый у независимо равен 1 или более; и

n равен 1 или более.

В некоторых вариантах осуществления размер такого конъюгата превышает 50 кДа. В

- 20 некоторых вариантах осуществления P не содержит антигенсвязывающую часть или часть переменного домена Fab-фрагмента. В некоторых вариантах осуществления P содержит слитый Fc-димер, но не содержит антигенсвязывающий домен антитела или переменный домен антитела.

[017] В других аспектах предложен конъюгат формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

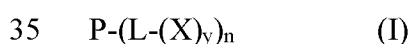
P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен,

- 30 который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или более ненацеливающих Fab-фрагментов или их частей;

каждый у независимо равен 1 или более; и

n равен 1 или более.

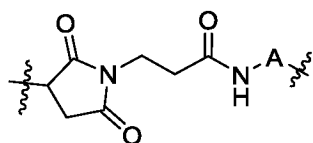
[018] В некоторых вариантах осуществления также предложен конъюгат формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой



5

где A представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

P представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором

10 трансферрина с аффинностью около 100 нМ; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L, выбранных из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU или A114C по нумерации Kabat;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

15 **[019]** В некоторых аспектах модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен CL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен СН1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен СН2. В некоторых вариантах

20 осуществления модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен СН3. В одном аспекте белок, описанный в данном документе, содержит модифицированный домен СН3, который специфически связывается с рецептором трансферрина, при этом модифицированный домен СН3 содержит четыре, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в группе аминокислотных позиций,

25 включающей 157, 159, 160, 161, 162, 163, 186, 189 и 194, и при этом замены и позиции определены в отношении аминокислот 114-220 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СН3 содержит одну, две, три или четыре замены в позициях, включающих 153, 164, 165 и 188. В одном аспекте модифицированный домен СН3 дополнительно содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть или семь замен в

30 позициях, включающих 153, 164, 165, 187, 188, 197 и 199.

[020] В некоторых вариантах осуществления модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен СН3, содержащий две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать,

пятнадцать или шестнадцать позиций, выбранных из следующих: позиция 153 представляет собой Trp, Tyr, Leu, Gln или Glu; позиция 157 представляет собой Leu, Tyr, Met, Val, Phe или Trp; позиция 159 представляет собой Leu, Thr, His, Pro или Phe; позиция 160 представляет собой Val, Pro или кислотную аминокислоту; позиция 161 представляет собой 5 Trp; позиция 162 представляет собой Val, Ser, Ala или Gly; позиция 163 представляет собой Asn, Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala, Asp, Thr или Glu; позиция 164 представляет собой Ser, Thr, Gln, Phe, Tyr или Val; позиция 165 представляет собой Gln, Phe или His; позиция 186 представляет собой Glu, Ala, Ser, Leu, Thr, Pro или Asp; позиция 187 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; позиция 188 представляет собой Glu или Ser; 10 позиция 189 представляет собой Thr, Asn или кислотную аминокислоту; позиция 194 представляет собой Trp, Tyr, His или Phe; позиция 197 представляет собой Ser, Thr, Glu, Lys или Trp; и позиция 199 представляет собой Ser, Trp, Gly, Cys, Pro или Met согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

[021] В некоторых вариантах осуществления белок содержит первые Fc-полипептид 15 или слияние Fab-Fc, содержащие последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 279, 281, 361-366, 491-494, 702-718, 632, 645-649, 738-746, 804; и вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc, содержащие последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% 20 идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 557-561, 627-631, 635-644, 719-723, 724-731, 733-737 и 810, при этом первые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc и/или вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L. В некоторых вариантах осуществления первые Fc-полипептид или слияние Fab- 25 Fc содержат Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ser или Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr или Ser в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194 согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

[022] В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой димер Fc- 30 полипептида или слияние Fab-Fc-димер, содержащие первые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc и вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc, при этом: первые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559; первые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную 35 последовательность SEQ ID NO: 702, а вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559; первые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 708, а вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 722; первые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 718, а вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559; первые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 560; первые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а вторые Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 561; или первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 804, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 810.

[023] В некоторых вариантах осуществления также предложены первый Fc-полипептид или слияние Fab-Fc, содержащие:

1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) одну или большее количество замен цистеином, аланином или глицином (например, S239C, S442C, A330C, K149C (легкая цепь), T289C, N297A и/или N297G в соответствии с нумерацией EU и/или A114C по нумерации Kabat).

[024] В некоторых вариантах осуществления также предложены димер Fc-полипептида или слияние Fab-Fc-димер, содержащие:

(a) первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и

(b) второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом по (a);

При этом первый и/или второй Fc-полипептид содержит одну или большее количество замен цистеином; или при этом первое и/или второе слияние Fab-Fc содержит одну или большее количество замен цистеином (например, S239C, S442C, A330C, K149C, A114C и T289C).

[025] В других аспектах предложен димер Fc-полипептида, содержащий:

(a) первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и

(b) второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом по (a);

при этом первый и/или второй Fc-полипептид содержит одну или большее количество замен, выбранных из группы, состоящей из N297A и N297G.

[026] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-

полипептидов соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.

5 [027] Ненацеливающий Fab (NTF, англ. «non-targeting Fab») не связывается специфически с естественным эпитопом у субъекта. В некоторых вариантах осуществления NTF содержит несвязывающую переменную область (NBVR, англ. «non-binding variable region»). NBVR содержит переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи и не связывается специфически с естественным эпитопом у субъекта. NBVR может представлять собой, но не ограничивается этим, scFv.

10 [028] В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит три CDR тяжелой цепи по Kabat и три CDR легкой цепи по Kabat из NBVR1 или NBVR2. В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит CDR-H1, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из NBVR1 или NBVR2 и CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 869.

15 [029] В некоторых вариантах осуществления NBVR специфически не связывается с естественным эпитопом у субъекта и содержит три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, причем каждая CDR имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности или 100% идентичности последовательности с соответствующей CDR из переменных областей тяжелой и легкой цепей NBVR1 или NBVR2. CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H1, из NBVR1 содержат: SEQ ID NO: 825, 827 или 869 и 829, соответственно. CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L1, из NBVR1 содержат: SEQ ID NO: 819, 821 и 823, соответственно. CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H1, из NBVR2 содержат: SEQ ID NO: 826, 828 или 869 и 829, соответственно. CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L1, из NBVR2 содержат: SEQ ID NO: 820, 822 и 824, соответственно. В некоторых вариантах осуществления CDR-H2 NBVR1 или NBVR2 замещена SEQ ID NO: 869.

25 [030] В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 837, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 832. В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по 30 меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%

или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 853, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 851.

5 **[031]** В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 837; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 832; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 853; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 851.

15 **[032]** В некоторых вариантах осуществления NTF содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846, 847, 854, 855, 856, 857, 859, 860, 861 и 862; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 833, 835, 850 и 852.

20 **[033]** Если легкая цепь NTF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 833, то тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 838, 839, 840 или 841.

25 **[034]** Если легкая цепь NTF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 833, то тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 844, 845, 846 или 847.

30 **[035]** Если легкая цепь NTF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 835, то тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 838, 839, 840 или 841.

[036] Если легкая цепь NTF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 835, то тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 844, 845, 846 или 847.

35 **[037]** Если легкая цепь NTF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 850, то тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 854, 855, 856 или 857.

[038] Если легкая цепь NTF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 850, то тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 859, 860, 861 или 862.

5 **[039]** Если легкая цепь NTF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 852, то тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 854, 855, 856 или 857.

[040] Если легкая цепь NTF содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 852, то тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID
10 NO: 859, 860, 861 или 862.

[041] Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые цепи и/или легкие цепи любой из описанных NBVR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь NBVR, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%,
15 по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 865 или 867. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь NBVR, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%, или 100% идентичности с SEQ ID NO: 864 или 866.

20 **[042]** В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, димер Fc-полипептида, слияние Fab-Fc или слияние Fab-Fc-димер включены в конъюгат формулы (I), описанный данным документе.

[043] В некоторых вариантах осуществления также предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат, описанный в данном документе, и фармацевтически
25 приемлемый носитель.

[044] В некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном документе, относится к способу нацеленной доставки олигонуклеотида в мышечную ткань и/или ткань головного мозга у пациента, включающему введение субъекту любого из конъюгатов или любой из фармацевтических композиций, содержащих конъюгат,
30 описанный в данном документе.

[045] В некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном документе, относится к способу модуляции генной экспрессии в клетке головного мозга или множестве клеток головного мозга, включающему введение пациенту конъюгата, содержащего:

35 (i) белок, который специфически связывает TfR и;

(ii) олигонуклеотид,

при этом белок связывает TfR с низкой аффинностью, а конъюгат переносится через ГЭБ, и при этом в клетке олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена.

[046] В некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном

5 документе, относится к способу доставки олигонуклеотида в глубокие области головного мозга, включающему введение пациенту конъюгата, содержащего:

(i) белок, который специфически связывает TfR и;

(ii) олигонуклеотид,

при этом белок связывает TfR с низкой аффинностью, а конъюгат переносится через ГЭБ,

10 и при этом в клетке головного мозга в глубоких областях головного мозга олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена.

[047] В некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном

документе, относится к способу доставки антисмыслового олигонуклеотида через области головного мозга, включающему введение пациенту конъюгата, содержащего:

15 (i) белок, который специфически связывает TfR и;

(ii) олигонуклеотид,

при этом белок связывает TfR с низкой аффинностью, а конъюгат переносится через ГЭБ,

и при этом в клетке в области головного мозга олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена.

20 **[048]** В некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном

документе, относится к способу создания нейронной клетки со сниженной экспрессией целевого гена, включающему доставку в нейронную клетку олигонуклеотида, при этом олигонуклеотид переносится через ГЭБ как часть конъюгата с белком, который связывает TfR с низкой аффинностью, и при этом указанный олигонуклеотид снижает уровень

25 экспрессии целевого гена.

[049] В некоторых вариантах осуществления объект изобретения, описанный в данном

документе, относится к способу модификации нейронной клетки для снижения экспрессии целевого гена, включающему доставку в нейронную клетку олигонуклеотида, при этом олигонуклеотид переносится через ГЭБ как часть конъюгата с белком, который связывает

30 TfR с низкой аффинностью, и при этом указанный олигонуклеотид снижает уровень экспрессии целевого гена.

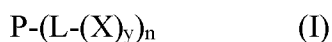
[050] В некоторых вариантах осуществления предложен способ трансцитоза

олигонуклеотида (например, ASO или агента РНКи) через эндотелий, при этом способ включает приведение в контакт эндотелия (например, гематоэнцефалического барьера) с

35 конъюгатом, описанным в данном документе.

[051] В некоторых вариантах осуществления предложен способ переноса олигонуклеотида (например, ASO или агента РНКи) через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) пациента, включающий введение пациенту конъюгата, описанным в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления предложен способ переноса

5 олигонуклеотида через ГЭБ пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

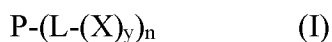
10 каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

15 n равен по меньшей мере 1.

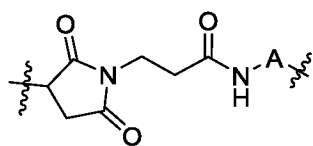
[052] В некоторых вариантах осуществления также предложен способ переноса олигонуклеотида через ГЭБ пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



20 где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой



где A представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

25 P представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина с аффинностью около 100 нМ; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L, выбранных из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с

30 нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

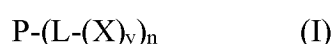
n равен по меньшей мере 1. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят пациенту внутривенно. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид

распределяется по всей центральной нервной системе. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид распределяется через области головного мозга. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид распределяется в глубокой области головного мозга. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид распределяется в спинном мозге. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят пациенту внутривенно. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена. В некоторых вариантах осуществления модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.

5
10 **[053]** В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, описанный в данном документе, для применения для переноса олигонуклеотида (например, ASO или агента РНКи) через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) пациента.

[054] В некоторых вариантах осуществления предложено применение конъюгата, описанного в данном документе, при получении лекарственного средства для переноса олигонуклеотида (например, ASO или агента РНКи) через гематоэнцефалический барьер
15 (ГЭБ) пациента.

[055] В некоторых вариантах осуществления предложен способ модуляции экспрессии целевого гена у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества конъюгата, описанного в данном документе. В частности, в некоторых вариантах осуществления предложен способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке головного
20 мозга пациента, включающий введение пациенту конъюгата, описанного в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления предложен способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке головного мозга пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



25 где

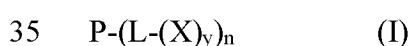
каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее
30 количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

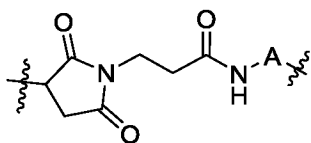
n равен по меньшей мере 1. В некоторых вариантах осуществления также предложен способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке головного мозга пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой



5 где A представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

P представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина с аффинностью около 100 нМ; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L, выбранных из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat;

10

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

[056] В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят пациенту внутривенно.

15 **[057]** В некоторых вариантах осуществления клетка головного мозга представляет собой нейрон, эндотелиальную клетку, олигодендроцит, астроцит или микроглию.

[058] В некоторых вариантах осуществления такой способ позволяет модулировать экспрессию целевого гена во множестве клеток головного мозга пациента. В некоторых вариантах осуществления клетки множества представляют собой клетки одного типа. В других вариантах осуществления множество клеток содержат клетки разных типов. Например, в некоторых вариантах осуществления множество клеток содержат по меньшей мере два, три, четыре или пять типов клеток, выбранных из группы, состоящей из: нейрона, эндотелиальной клетки, олигодендроцита, астроцита и микроглии. В некоторых вариантах осуществления нейрон представляет собой возбуждающий нейрон. В некоторых вариантах осуществления нейрон представляет собой тормозящий нейрон.

20

[059] В некоторых вариантах осуществления модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.

[060] В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, описанный в данном документе, для применения в модуляции экспрессии целевого гена у пациента.

30 **[061]** В некоторых вариантах осуществления предложено применение конъюгата, описанного в данном документе, при получении лекарственного средства для модуляции экспрессии целевого гена у пациента.

[062] В некоторых вариантах осуществления также предложен способ введения

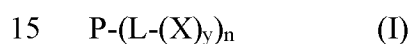
эффективного количества олигонуклеотида в ЦНС пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

- 5 каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;
каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и
10 n равен по меньшей мере 1,
при этом вводимый олигонуклеотид модулирует генную экспрессию по всей ЦНС.

[063] В некоторых вариантах осуществления также предложен способ доставки эффективного количества олигонуклеотида в ЦНС пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

- каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который
20 специфически связывается с рецептором трансферрина;
каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен по меньшей мере 1,
при этом вводимый олигонуклеотид модулирует генную экспрессию по всей ЦНС.

[064] В некоторых вариантах осуществления вводимый олигонуклеотид модулирует
25 генную экспрессию в областях головного мозга и спинном мозге пациента.

[065] В некоторых вариантах осуществления области головного мозга включают глубокие области головного мозга.

[066] В некоторых вариантах осуществления области головного мозга включают лобную долю, теменную долю, височную долю, затылочную долю и мозжечок.

30 **[067]** В некоторых вариантах осуществления области головного мозга содержат эндотелиальные клетки, нейроны, астроциты, олигодендроциты и микроглию.

[068] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид модулирует генную экспрессию в эндотелиальных клетках, нейронах, астроцитах, олигодендроцитах и микроглии.

35 **[069]** В некоторых вариантах осуществления эффективное количество снижает генную

экспрессию по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с экспрессией без введения олигонуклеотида.

[070] В некоторых вариантах осуществления генная экспрессия снижается по меньшей мере на около 50%.

5 **[071]** В некоторых вариантах осуществления генная экспрессия снижается по меньшей мере на около 70%.

[072] В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят субъекту внутривенно.

[073] В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, описанный в данном документе, для применения в способе введения эффективного количества олигонуклеотида в ЦНС пациента, при этом способ включает введение пациенту конъюгата, описанного в данном документе, при этом вводимый олигонуклеотид модулирует генную экспрессию по всей ЦНС.

[074] В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, описанный в данном документе, для применения в способе доставки эффективного количества олигонуклеотида в ЦНС пациента, при этом способ включает введение пациенту конъюгата, описанного в данном документе, при этом вводимый олигонуклеотид модулирует генную экспрессию по всей ЦНС.

[075] В некоторых вариантах осуществления предложено применение конъюгата, описанного в данном документе, при получении лекарственного средства для введения эффективного количества олигонуклеотида в ЦНС пациента путем введения пациенту лекарственного средства, при этом вводимый олигонуклеотид модулирует генную экспрессию по всей ЦНС.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

25 **[076]** Фиг.1 представляет собой иллюстративный вариант осуществления описанного в данном документе конъюгата, который содержит слияние Fab-Fc-димер. Fc-полипептид с левой стороны содержит модифицированный домен СН3, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и замену «выступа» для гетеродимеризации. Fc-полипептид с правой стороны содержит замены «впадин» для гетеродимеризации и присоединен к олигонуклеотиду посредством связывающей группы.

[077] На Фиг. 2 проиллюстрирована плазменная временная динамика у мышей Hu Tfr среди вариантов OTV от дня 1 до дня 7 исследования с многократными дозами.

[078] На Фиг. 3 проиллюстрирован huIgG в плазме мышей Hu Tfr в момент времени 24 часа исследования с многократными дозами среди вариантов OTV.

35 **[079]** На Фиг. 4 проиллюстрированы интактный препарат и общее количество ASO

среди вариантов ОТV от дня 1 до дня 7 исследования с многократными дозами.

[080] На Фиг. 5 проиллюстрирована плазменная временная динамика интактного препарата и общего количества ASO у мышей дикого типа среди вариантов ОТV.

5 **[081]** На Фиг. 6 проиллюстрирована плазменная временная динамика huIgG и % интактного препарата у мышей дикого типа среди вариантов ОТV.

[082] На Фиг. 7 проиллюстрирован обзор тканевой ФК через 24 часа после однократной дозы. Для каждого типа ткани для «HuIgG» столбиками слева направо представлено следующее: RSV-ASO; S239C; OTR2 (1,23); OTR4 (2,5); низкая аффинность; A330C; S442C; и SansFab. Для каждого типа ткани для «интактного препарата» столбиками
10 слева направо представлено следующее: RSV-ASO; S239C; OTR2 (1,23); OTR4 (2,5); низкая аффинность; A330C; S442C; и SansFab. Для каждого типа ткани для «общего кол-ва ASO» столбиками слева направо представлено следующее: RSV-ASO; S239C; OTR2 (1,23); OTR4 (2,5); низкая аффинность; A330C; S442C; SansFab и оголенный ASO.

[083] На Фиг. 8 проиллюстрирован huIgG в ткани через 24 часа после введения в
15 исследовании с однократной дозой, нормализованный относительно плазменной ППК. Для каждого типа ткани столбиками слева направо представлено следующее: RSV-ASO; S239C; OTR2 (1,23); OTR4 (2,5); низкая аффинность; A330C; S442C; и без Fab. Нормализация концентраций huIgG относительно плазменной ППК приводит к большей эквивалентности между вариантами ОТV, что позволяет предположить, что большая часть различий в
20 концентрациях обусловлена кинетикой плазменного клиренса.

[084] На Фиг. 9 проиллюстрированы huIgG, интактный препарат, % интактного препарата и общее количество ASO в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, для вариантов с повышенной нагрузкой OTR/ASO в исследовании с однократной дозой.

[085] На Фиг. 10 проиллюстрированы huIgG, интактный препарат, % интактного
25 препарата и общее количество ASO в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, для низкоаффинного варианта в исследовании с однократной дозой.

[086] На Фиг. 11 проиллюстрированы huIgG, интактный препарат, % интактного препарата и общее количество ASO в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, для вариантов по сайту конъюгации в исследовании с однократной дозой.

30 **[087]** На Фиг. 12 проиллюстрированы huIgG, интактный препарат, % интактного препарата и общее количество ASO в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, для варианта SansFab (т. е. без Fab) в исследовании с однократной дозой.

[088] На Фиг. 13 проиллюстрированы тканевая ФК вариантов с повышенной нагрузкой OTR/ASO и нокдаун в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, через 72 часа после
35 последней дозы исследования с многократными дозами.

- [089]** На Фиг. 14 проиллюстрированы тканевая ФК низкоаффинного варианта и нокдаун в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, через 72 часа после последней дозы исследования с многократными дозами.
- [090]** На Фиг. 15 проиллюстрированы тканевая ФК вариантов по сайту конъюгации и нокдаун в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, через 72 часа после последней дозы исследования с многократными дозами.
- [091]** На Фиг. 16 проиллюстрированы тканевая ФК варианта SansFab (т. е. без Fab) и нокдаун в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, через 72 часа после последней дозы исследования с многократными дозами.
- [092]** На Фиг. 17 проиллюстрирована периферическая тканевая ФК через 72 часа после последней дозы для huIgG, интактного препарата и общего количества ASO. Для каждого типа ткани столбиками слева направо представлено следующее: RSV-ASO; S239C; OTR2 (1,23); OTR4 (2,5); низкая аффинность; A330C; S442C; и без Fab.
- [093]** На Фиг. 18 проиллюстрирован нокдаун в почках, диафрагме, печени и квадрицепсе через 72 часа после последней дозы.
- [094]** На Фиг. 19 проиллюстрирован нокдаун в печени через 72 часа после последней дозы со сравнениями для OTR, аффинности к TfR, различий в сайтах конъюгации и удаления Fab.
- [095]** На Фиг. 20А проиллюстрировано биораспределение ASO в исследованиях с однократной дозой на отличных от человека приматах; а на Фиг. 20В проиллюстрирован нокдаун Malat1 в лобной коре головного мозга.
- [096]** На Фиг. 21 проиллюстрировано биораспределение ASO при интратекальном введении ASO в сравнении с в/в введением OTV у отличных от человека приматов по данным иммунофлуоресценции ASO в корональном срезе полушария мозга (вставка новой коры).
- [097]** На Фиг. 22А проиллюстрирована область рассечения головного мозга для анализа методом ояРНК-секвенирования; а на Фиг. 22В проиллюстрирован целевой нокдаун среди типов клеток ЦНС с использованием анализа методом одноядерного РНК-секвенирования головного мозга мышей, обработанного многократными дозами.
- [098]** На Фиг. 23 проиллюстрирована плазменная ФК вариантов OTV по линкеру у мышей дикого типа: (А) общее кол-во ASO; (В) общее кол-во huIgG; (С) ASO к huIgG (линейная шкала); (D) ASO к huIgG (логарифмическая шкала).
- [099]** На Фиг. 24 проиллюстрирована общая концентрация ASO в головном мозге, спинном мозге и печени для вариантов OTV по линкеру из исследования с многократными дозами с мышами с нокином TfRms/hu.

- [0100] На Фиг. 25 проиллюстрирован нокдаун Malat1 в головном мозге, спинном мозге и печени для вариантов OTV по линкеру из исследования с многократными дозами с мышами с нокином TfRms/hu.
- 5 [0101] На Фиг. 26 проиллюстрирована эффективность нокдауна (нокдаун, нормализованный относительно концентрации ASO) для вариантов OTV по линкеру в исследовании с многократными дозами с мышами с нокином TfRms/hu.
- [0102] На Фиг. 27 проиллюстрирован ФК профиль плазмы для вариантов по сайту конъюгации S239C, A114C и T289C.
- 10 [0103] На Фиг. 28 проиллюстрировано поглощение ASO в головном мозге для вариантов по сайту конъюгации S239C, A114C и T289C в исследованиях с однократными и многократными дозами.
- [0104] На Фиг. 29 проиллюстрировано поглощение ASO в печени для вариантов по сайту конъюгации S239C, A114C и T289C в исследованиях с однократными и многократными дозами.
- 15 [0105] На Фиг. 30 проиллюстрировано поглощение ASO в почках для вариантов по сайту конъюгации S239C, A114C и T289C в исследованиях с однократными и многократными дозами.
- [0106] На Фиг. 31 проиллюстрирован нокдаун Malat1 в головном мозге для вариантов по сайту конъюгации S239C, A114C и T289C в исследованиях с однократными и многократными дозами.
- 20 [0107] На Фиг. 32 проиллюстрирован нокдаун Malat1 в печени и почках для вариантов по сайту конъюгации S239C, A114C и T289C в исследованиях с однократными и многократными дозами.
- [0108] На Фиг. 33 проиллюстрированы huIgG, интактный препарат, % интактного препарата и общее количество ASO в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, для вариантов по аффинности к TfR через 24 часа после однократной дозы.
- 25 [0109] На Фиг. 34 проиллюстрированы huIgG, интактный препарат, общее кол-во ASO и нокдаун Malat1 в ЦНС, т. е. коре головного мозга, спинном мозге, для вариантов по аффинности к TfR через 72 часа после последней дозы в исследовании с многократными дозами.
- 30 [0110] На Фиг. 35 проиллюстрировано измерение MCV для вариантов TfR (A) через 24 часа после однократной дозы; (B) 72 часа после последней дозы в исследовании с многократными дозами.
- [0111] На Фиг. 36 проиллюстрированы (A) распад Tfr, (B) нокдаун Malat1, (C) концентрация ASO для вариантов по аффинности к TfR.
- 35

- [0112] На Фиг. 37 проиллюстрировано общее кол-во ASO в головном мозге и на периферии в исследованиях на отличных от человека приматах.
- [0113] На Фиг. 38 проиллюстрировано биораспределение ASO при однократном и многократном в/в введении ASO в сравнении с в/в введением OTV у отличных от человека приматов по данным иммунофлуоресценции ASO в корональном срезе полушария мозга (вставка новой коры).
- [0114] На Фиг. 39 проиллюстрирован нокдаун Malat1 в ЦНС и на периферии в исследованиях с многократными дозами на отличных от человека приматах с (А) в\в доставкой оголенного ASO; (В) доставкой посредством OTV.
- 10 [0115] На Фиг. 40 проиллюстрированы биораспределение ASO в головном мозге и поясничном отделе спинного мозга по данным иммунофлуоресценции ASO и уровень ASO относительно поясничного отдела спинного мозга (А) при интратекальном введении ASO; (В) при в/в введении OTV.
- [0116] На Фиг. 41 проиллюстрирован нокдаун Malat1 в ЦНС (лобная кора, полосатое тело, поясничный отдел спинного мозга) и периферии (печень и почки) в исследованиях на отличных от человека приматах.
- 15 [0117] На Фиг. 42 проиллюстрирован нокдаун Malat1 в ЦНС и на периферии в исследовании с однократной дозой на мышах при (А) внутривенном введении оголенного ASO; (В) в/в введении OTV.
- 20 [0118] На Фиг. 43 проиллюстрирована ФК/ФД ASO: (А) общая концентрация ASO после введения однократной дозы; (В) общий нокдаун РНК.
- [0119] На Фиг. 44 проиллюстрирована ФК/ФД ASO: (А) общая концентрация ASO после окна загрузки при многократных дозах; (В) общий нокдаун РНК.
- [0120] На Фиг. 45 проиллюстрированы (а) huIgG в мозге мышей, которым вводили аффинные варианты; (В) результаты ELISA для HuIgG после истощения капилляров головного мозга.
- 25

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

V. ВВЕДЕНИЕ

- 30 [0121] Олигонуклеотидная терапия заболеваний ЦНС, вызванных генетическими аномалиями или повышенным накоплением белка, становится все более популярным подходом для модуляции генной экспрессии при таких неврологических нарушениях. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет проблему для доставки системно вводимых олигонуклеотидов к соответствующим участкам действия в ЦНС.
- 35 Интратекальная (и/т) доставка, при которой лекарственные препараты вводят

непосредственно в пространство цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), позволяет обойти ГЭБ. Однако одним из ограничений этого подхода является то, что доставка этих олигонуклеотидных терапевтических средств непосредственно в ЦСЖ с помощью и/т подхода не обеспечивает равномерное распределение по всей ЦНС.

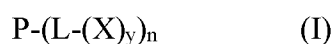
5 **[0122]** В данном изобретении мы используем молекулу, связывающую человеческий рецептор трансферрина, как способ переноса олигонуклеотида через ГЭБ, которая называется олигонуклеотидным средством переноса (OTV, англ. «oligonucleotide transport vehicle»). Внутривенно доставляемый OTV способен пересекать ГЭБ, достигать клеток ЦНС и в конечном итоге обеспечивать целевой нокдаун в головном мозге и спинном мозге.

10 Молекула OTV не только способна обеспечивать нокдаун во всех областях ЦНС, в том числе в областях мозга, которые включают глубокие области головного мозга, а также в лобной доле, теменной доле, височной доле, затылочной доле и мозжечке, она также способна обеспечивать целевой нокдаун во всех типах клеток ЦНС, включая эндотелиальные клетки, нейроны, астроциты, олигодендроциты и микроглию. OTV не

15 только обеспечивало эквивалентные уровни нокдауна в мышечной ткани на периферии с двухвалентной молекулой, такой как антитело, но и приводило к значительно более высоким уровням нокдауна в головном мозге, спинном мозге и диафрагме. В целом, OTV открывает новый потенциальный терапевтический путь для переноса олигонуклеотидов через ГЭБ при системном введении. Кроме того, OTV можно применять для целевой

20 доставки олигонуклеотидных терапевтических средств в скелетные и сердечные мышцы при нервно-мышечных заболеваниях. Такая целевая доставка позволяет использовать более низкую дозу олигонуклеотидных терапевтических средств по сравнению с введением только олигонуклеотидных терапевтических средств, т. е. нецелевой доставкой в периферию.

25 **[0123]** В данном документе представлены конъюгаты, содержащие белки, которые связывают рецептор трансферрина (TfR) и по меньшей мере один олигонуклеотид (например, ASO или агент РНКи). В частности, в данном документе предложены конъюгаты формулы I:



30 где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий полипептид, связывающий TfR, описанный в данном документе;

35 каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

В некоторых вариантах осуществления у равен 1 или более, 2 или более, 3 или более или 4 или более. В некоторых вариантах осуществления у равен 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления у равен от 1 до 3. В некоторых вариантах осуществления у равен от 1 до 4.

5 В некоторых вариантах осуществления у равен от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления у равен 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления у равен 1. В некоторых вариантах осуществления у равен 2. В некоторых вариантах осуществления у равен 3. В некоторых вариантах осуществления у равен 4.

[0124] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один у равен 2 или
10 более (например, 2 или 4, например 2). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один L присоединен отдельно к двум олигонуклеотидам. В некоторых других вариантах осуществления к одному L присоединено более одного олигонуклеотида. Например, олигонуклеотиды могут быть связаны друг с другом в тандеме. В некоторых вариантах осуществления L присоединен к 5'-концу первого олигонуклеотида, а второй
15 олигонуклеотид связан с 3'-концом первого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут быть связаны посредством линкера на основе нуклеиновой кислоты или неолигонуклеотидного расщепляемого линкера.

[0125] В некоторых вариантах осуществления n равен 1 или более; 2 или более; 3 или более; 4 или более; 5 или более; 6 или более; 7 или более; или 8 или более. В некоторых
20 вариантах осуществления, n равен от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления, n равен от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В некоторых вариантах осуществления, n равен от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления, n равен от 2 до 4. В некоторых вариантах осуществления, n равен от 2 до 3. В некоторых вариантах осуществления, n равен 1. В
25 некоторых вариантах осуществления, n равен 2. В некоторых вариантах осуществления, n равен 2. В некоторых вариантах осуществления, n равен 3. В некоторых вариантах осуществления, n равен 4. В некоторых вариантах осуществления, n равен 5. В некоторых вариантах осуществления, n равен 6. В некоторых вариантах осуществления, n равен 7. В некоторых вариантах осуществления n равен 8.

[0126] В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий TfR, содержит константный домен или Fc-полипептид, в котором некоторые аминокислоты были модифицированы для создания сайта связывания, специфического в отношении TfR. С
30 учетом того, что TfR на высоком уровне экспрессируется в гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ) и что TfR естественным образом переносит трансферрин из крови в головной мозг, эти белки можно применять для переноса олигонуклеотидов, таких как ASO и агенты РНКи,
35

через ГЭБ. Этот подход может существенно улучшить поглощение и/или биораспределение этих терапевтических агентов в головном мозге и поэтому является в высокой степени полезным для лечения нарушений и заболеваний, при которых является предпочтительной доставкой в головной мозг. TfR также экспрессируется в некоторых периферических тканях, таких как скелетные и сердечные мышцы. Следовательно, описанные в данном документе конъюгаты также можно использовать для повышения доставки олигонуклеотида в некоторые периферические ткани, такие как периферические ткани, которые экспрессируют TfR (например, скелетные мышцы и сердечные мышцы).

[0127] В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий TfR, содержит домен CL, домен CH1, домен CH2 и/или домен CH3, имеющие замены в некоторых группах аминокислот для создания сайта связывания, специфического в отношении TfR. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий TfR, домен CL с одной или большим количеством замен для создания сайта связывания, специфического в отношении TfR. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий TfR, домен CH1 с одной или большим количеством замен для создания сайта связывания, специфического в отношении TfR. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий TfR, домен CH2 с одной или большим количеством замен для создания сайта связывания, специфического в отношении TfR. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий TfR, домен CH3 с одной или большим количеством замен для создания сайта связывания, специфического в отношении TfR. Типовые домены CH2 и CH3, которые специфически связываются с TfR, описаны, например, в WO 2018/152326, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[0128] В одном аспекте белок, связывающий TfR, содержит домен CH3, имеющий замены в некоторых группах аминокислот. Таким образом, в одном аспекте связывающий трансферрин белок содержит множество замен в группе аминокислот (i) 157, 159, 160, 161, 162, 163, 186, 189 и 194; или (ii) 118, 119, 120, 122, 210, 211, 212 и 213 согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1. Замещенными могут быть от четырех до всех аминокислотных позиций группы. В целях данного изобретения замена определяется со ссылкой на SEQ ID NO: 1, если не указано иное. Таким образом, аминокислота считается заменой, если она отличается от соответствующей аминокислоты в позиции SEQ ID NO: 1, даже если аминокислота присутствует в этой позиции во встречающемся в природе белке домена CH3.

[0129] В дополнительном аспекте в данном документе предложены способы лечения и способы применения конъюгата, описанного в данном документе, для нацеливания олигонуклеотида (например, ASO или агента РНКи) на экспрессирующие рецептор трансферрина клетки, например, для доставки олигонуклеотида в эту клетку или для

доставки молекулы через эндотелий, такой как гематоэнцефалический барьер.

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- 5 **[0130]** В контексте данного документа формы единственного числа включают множественные отсылки, если из содержания четко не следует иное.
- [0131]** В контексте данного документа термины «около» и «приблизительно», используемые для модификации количества, указанного в виде числового значения или диапазона, указывают на то, что числовое значение, а также допустимые отклонения от значения, известные специалисту в данной области техники, например $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ или \pm
10 5% , находятся в пределах предполагаемого значения приведенной величины.
- [0132]** Термин «галоген» означает фтор, хлор, бром или йод. Алкил, алкокси и т. д. обозначают как линейные так и разветвленные группы; но ссылка на отдельный радикал, такой как пропил, охватывает только радикал с линейной цепью, при этом изомер с разветвленной цепью, такой как изопропил, указан конкретно.
- 15 **[0133]** Термин «алкил», сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, углеводородный радикал, имеющий указанное число атомов углерода (т. е. C₁₋₆ означает от одного до шести атомов углерода). Примеры включают (C₁-C₆)алкил, (C₂-C₆)алкил и (C₃-C₆)алкил. Примеры алкильных групп включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил
20 и высшие гомологи и изомеры.
- [0134]** Термин «алкокси» относится к алкильным группам, присоединенным к остальной части молекулы посредством атома кислорода («окси»).
- [0135]** Термин «алкилтио» относится к алкильным группам, присоединенным к остальной части молекулы посредством тио-группы.
- 25 **[0136]** В контексте данного документа термин «алкоксикарбонил» относится к группе (алкил)-O-C(=O)-, при этом термин алкил имеет значение, определенное в данном документе.
- [0137]** В контексте данного документа термин «алканоилокси» относится к группе (алкил)-C(=O)-O-, при этом термин алкил имеет значение, определенное в данном
30 документе.
- [0138]** Термин «арилокси» относится к арильной группе, присоединенной к остальной части молекулы посредством атома кислорода (арил-O-).
- [0139]** Термин «гетероарилокси» относится к гетероарильной группе, присоединенной к остальной части молекулы посредством атома кислорода (гетероарил-O-).
- 35 **[0140]** В контексте данного документа термин «гетероатом» включает кислород (O),

азот (N), серу (S) и кремний (Si).

[0141] Термин «циклоалкил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному (неароматическому) полностью углеродному кольцу, имеющему от 3 до 6 атомов углерода (т. е. (C3-C6)карбоциклу). Неограничивающие примеры циклоалкилов включают

5 циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

[0142] В контексте данного документа термин «арил» относится к одинарному полностью углеродному ароматическому кольцу или множественной конденсированной полностью углеродной кольцевой системе, где по меньшей мере одно из колец является ароматическим. Например, в некоторых вариантах осуществления арильная группа может

10 иметь от 6 до 20 атомов углерода, от 6 до 14 атомов углерода, от 6 до 12 атомов углерода или от 6 до 10 атомов углерода. Арил также включает фенильный радикал. Арил также включает множественные конденсированные углеродные кольцевые системы (например, кольцевые системы, содержащие 2, 3 или 4 кольца), имеющие от около 9 до 20 атомов углерода, в которых по меньшей мере одно кольцо является ароматическим, а другие кольца

15 могут быть ароматическими или неароматическими (т. е. циклоалкил). Кольца множественной конденсированной кольцевой системы могут быть соединены друг с другом посредством конденсированных, спиро- и мостиковых связей, если это допустимо с учетом валентности. Следует понимать, что точка присоединения множественной конденсированной кольцевой системы, определенной выше, может находиться в любом

20 положении кольцевой системы, включая ароматическую или карбоциклическую часть кольца. Неограничивающие примеры арильных групп включают, но не ограничиваются этим, фенил, инденил, инданил, нафтил, 1, 2, 3, 4-тетрагидронафтил, антраценил и т. п.

[0143] В контексте данного документа термин «гетероарил» относится к одинарному насыщенному или частично ненасыщенному кольцу, которое имеет по меньшей мере один

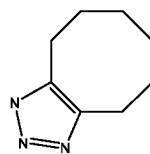
25 отличный от углерода атом в кольце, при этом атом выбран из группы, состоящей из кислорода, азота и серы; этот термин также включает множественные конденсированные кольцевые системы, которые имеют по меньшей мере одно такое насыщенное или частично ненасыщенное кольцо, при этом множественные конденсированные кольцевые системы дополнительно описаны ниже. Таким образом, этот термин включает одинарные

30 насыщенные или частично ненасыщенные кольца (например, 3, 4, 5, 6 или 7-членные кольца) с около 1-6 атомами углерода и около 1-3 гетероатомами, выбранными из группы, состоящей из кислорода, азота и серы, в кольце. Атомы серы и азота также могут присутствовать в окисленной форме. Примеры гетероциклов включают, но не ограничиваются этим, азетидинил, тетрагидрофуранил и пиперидинил. Термин

35 «гетероцикл» также включает множественные конденсированные кольцевые системы


(например, кольцевые системы, содержащие 2, 3 или 4 кольца), где одинарное гетероциклическое кольцо (по определению выше) может быть конденсировано с одной или большим количеством групп, выбранных из циклоалкила, арила и гетероцикла, с образованием множественной конденсированной кольцевой системы. Кольца множественной конденсированной кольцевой системы могут быть соединены друг с другом посредством конденсированных, спиро- и мостиковых связей, если это допустимо с учетом валентности. Следует понимать, что отдельные кольца множественной конденсированной кольцевой системы могут быть соединены в любом порядке относительно друг друга. Также следует понимать, что точка присоединения множественной конденсированной кольцевой системы (по определению выше для гетероцикла) может находиться в любом положении множественной конденсированной кольцевой системы, включая гетероциклическую, арильную и карбоциклическую часть кольца. В одном варианте осуществления термин гетероцикл включает 3-12-членный гетероцикл. В одном варианте осуществления термин гетероцикл включает 3-7-членный гетероцикл. В одном варианте осуществления термин гетероцикл включает 3-6-членный гетероцикл. В одном варианте осуществления термин гетероцикл включает 4-6-членный гетероцикл. В одном варианте осуществления термин гетероцикл включает 3-12-членный моноциклический или бициклический гетероцикл, содержащий от 1 до 3 гетероатомов. В одном варианте осуществления термин гетероцикл включает 3-6-членный моноциклический гетероцикл, содержащий от 1 до 2 гетероатомов. В одном варианте осуществления термин гетероцикл включает 4-6-членный моноциклический гетероцикл, содержащий от 1 до 2 гетероатомов. Примеры гетероциклов включают, но не ограничиваются этим, азиридирил, азетидинил, пирролидинил, пиперидинил, гомопиперидинил, морфолинил, тиоморфолинил, пиперазинил, тетрагидрофуранил, дигидрооксазолил, тетрагидропиранил, тетрагидротиопиранил, 1,2,3,4-тетрагидрохинолил, бензоксазинил, дигидрооксазолил, хроманил, 1,2-дигидропиридинил, 2,3-дигидробензофуранил, 1,3-бензодиоксолил, 1,4-бензодиоксанил, спиро[циклопропан-1,1'-изоиндолинил]-3'-он, изоиндолинил-1-он, 2-окса-6-азаспиро[3.3]гептанил, имидазолидин-2-он, имидазолидин, пиразолидин, бутиролактамы, валеролактамы, имидазолидинон,

30 гидантоин, диоксолан, фталимид, 1,4-диоксан и



[0144] В одном варианте гетероцикл может быть двухвалентным, т. е. присоединенным к остальной части молекулы или связывающей группе в двух положениях гетероцикла (-гетероцикл-). В одном варианте осуществления гетероцикл замещен одним или большим

количеством (например, 1, 2, 3 или 4) заместителей, независимо выбранных из группы, состоящей из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси, (C₁-C₆)алкоксикарбонил, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O) и карбоксии.

5 [0145] В контексте данного документа волнистая линия «», которая пересекает связь в химической структуре, указывает на точку присоединения связи, которую пересекает волнистая связь в химической структуре, с остальной частью молекулы.

[0146] В контексте данного документа «рецептор трансферрина» или «TfR» относится к белку рецептора трансферрина 1. Последовательность полипептида человеческого рецептора трансферрина 1 приведена в SEQ ID NO: 235. Также известны последовательности белка рецептора трансферрина 1 других видов (например, шимпанзе, номер доступа XP_003310238.1; макака-резуса, NP_001244232.1; собаки, NP_001003111.1; крупного рогатого скота, NP_001193506.1; мыши, NP_035768.1; крысы, NP_073203.1; и курицы, NP_990587.1). Термин «рецептор трансферрина» также включает аллельные варианты типовых эталонных последовательностей, например, человеческих последовательностей, которые кодируются геном в хромосомном локусе белка рецептора трансферрина 1. Полноразмерный белок рецептора трансферрина содержит короткую N-концевую внутриклеточную область, трансмембранную область и большой внеклеточный домен. Внеклеточный домен характеризуется тремя доменами: протеазоподобным доменом, спиральным доменом и апикальным доменом. Последовательность апикального домена человеческого рецептора трансферрина 1 приведена в SEQ ID NO: 107.

[0147] «Новый сайт связывания» или «ненативный сайт связывания» относится к сайту вариантного белка, который специфически распознает и связывает антиген, такой как белок рецептора трансферрина, при этом немодифицированный или нативный белок не связывается специфически с антигеном. Например, ненативный сайт связывания антигена можно вносить путем замены, делеции и/или вставки аминокислот в нативную последовательность белка, что приводит к специфическому распознаванию и связыванию в сайте мутации.

[0148] В контексте данного документа термин «константный домен» относится к полипептиду домена константной области легкой цепи (CL) и полипептидам доменов CH1, CH2 и CH3 из тяжелой цепи.

[0149] Термины «домен CH1», «домен CH3» и «домен CH2» в контексте данного документа относятся к полипептидам доменов константной области иммуноглобулина. В контексте антител IgG полипептид домена CH3 относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 341 приблизительно до позиции 447 согласно нумерации в

соответствии со схемой нумерации EU, полипептид домена CH2 относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 231 приблизительно до позиции 340 согласно нумерации в соответствии со схемой нумерации EU, а полипептид домена CH1 относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 118 приблизительно до позиции 215 в соответствии со схемой нумерации EU. Полипептиды доменов CH1, CH2 и CH3 также могут быть пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT (ImMunoGeneTics), в которой нумерация домена CH1 соответствует 1-98, нумерация домена CH2 соответствует 1-110, а нумерация домена CH3 соответствует 1-107 в соответствии с Научной схемой нумерации IMGT (веб-сайт IMGT). Домены CH2 и CH3 являются частью Fc-полипептида иммуноглобулина. В контексте антител IgG Fc-полипептид относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 231 приблизительно до позиции 447 согласно нумерации в соответствии со схемой нумерации EU.

[0150] В контексте данного документа термин «Fc-полипептид» относится к C-концевой области встречающегося в природе полипептида тяжелой цепи иммуноглобулина, который характеризуется укладкой Ig в виде структурного домена. Fc-полипептид, как правило, содержит последовательности константной области, включая по меньшей мере домен CH2 и/или домен CH3, и может содержать по меньшей мере часть шарнирной области. Иллюстративные последовательности шарнирной области или ее частей приведены в SEQ ID NO: 232-234.

[0151] В контексте данного документа термин «домен CL» относится к константному домену легкой цепи иммуноглобулина. В контексте антител IgG полипептид домена CL каппа относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 108 приблизительно до позиции 214 согласно нумерации в соответствии со схемой нумерации EU. В альтернативном варианте домены CL каппа и лямбда могут быть пронумерованы по схеме нумерации IMGT (ImMunoGeneTics), в которой нумерация домена CL каппа соответствует 1-107, а нумерация домена CL лямбда соответствует 1-106 в соответствии с Научной схемой нумерации IMGT (веб-сайт IMGT).

[0152] В контексте данного документа термин «Fab» или «Fab-фрагмент» относится к одновалентному фрагменту, состоящему из доменов VL, VH, CL и CH1. Fab или Fab-фрагмент могут содержать или не содержать всю или часть шарнирной области антитела.

[0153] В контексте данного документа термин «ненацеленный Fab-фрагмент» или «NTF» относится к Fab-фрагменту, который не связывается специфически с антигеном посредством переменных доменов своей тяжелой или легкой цепи или не связывается специфически с антигеном, экспрессируемым в организме заданного млекопитающего, такого как приматы, например человек и отличные от человека приматы, или грызуны,

например мышь, или в конкретной ткани такого млекопитающего посредством
вариабельных доменов своей тяжелой или легкой цепи. В некоторых вариантах
осуществления Fab для применения в слиянии Fab-Fc или слиянии Fab-Fc-димер,
описанными в данном документе, не связывается специфически с трансферрином
5 посредством вариабельных доменов своей тяжелой или легкой цепи. Неограничивающие
примеры ненацеливающих Fab-фрагментов включают (a) Fab-фрагменты RSV
(паливизумаб), которые являются ненацеливающими у мышей и отличных от человека
приматов, и (b) Fab-фрагменты динитрофенил-гаптена (DNP) (смотрите Leahy, PNAS 3661-
3665, 1988).

10 **[0154]** Термины «дикого типа», «нативный» и «встречающийся в природе» в отношении
домена CH3 или CH2 используются в данном документе для обозначения домена, который
имеет последовательность, которая встречается в природе.

[0155] В контексте данного документа термин «мутант» в отношении мутантного
полипептида или мутантного полинуклеотида используется взаимозаменяемо с
15 «вариантом». Вариант в отношении указанной эталонной последовательности домена CH3
или CH2 дикого типа может включать встречающиеся в природе аллельные варианты. «Не
встречающийся в природе» домен CH3 или CH2 относится к вариантному или мутантному
домену, который отсутствует в клетке в естественных условиях и который получен путем
генетической модификации, например с использованием технологии генной инженерии
20 или технологий мутагенеза, нативного полинуклеотида или полипептида домена CH3 или
домена CH2. «Вариант» включает любой домен, содержащий по меньшей мере одну
аминокислотную мутацию относительно дикого типа. Мутации могут включать замены,
вставки и делеции.

[0156] В контексте данного документа термин «модифицированный сайт» относится к
25 конкретной позиции в полипептиде, которая содержит мутацию или вариант относительно
соответствующего полипептида дикого типа (например, домена CL, CH1, CH2 или CH3
дикого типа). В некоторых вариантах осуществления мутация или вариант не встречаются
в природе. Модифицированный сайт может включать, например, вставку или замену. В
контексте данного документа термин «замена» относится к изменению, которое приводит
30 к замене аминокислоты другой аминокислотой. Например, «замена цистеином» относится
к замещению аминокислоты цистеином.

[0157] Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе и синтетическим
аминокислотам, а также аминокислотным аналогам и миметикам, которые функционируют
подобно встречающимся в природе аминокислотам.

35 **[0158]** Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой те аминокислоты,

которые кодируются генетическим кодом, а также аминокислоты, которые впоследствии подвергаются модификации, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. «Аминокислотные аналоги» относятся к соединениям, которые обладают сходной базовой химической структурой с аминокислотами природного происхождения, т. е. имеют α -атом углерода, который связан с атомом водорода, карбоксильную группу, 5 аминокислотную группу и R-группу, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же базовую химическую структуру, что и аминокислота, встречающаяся в природе. «Аминокислотные 10 миметики» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует подобно встречающейся в природе аминокислоте.

[0159] Встречающиеся в природе α -аминокислоты включают, без ограничения, аланин (Ala), цистеин (Cys), аспарагиновую кислоту (Asp), глутаминовую кислоту (Glu), 15 фенилаланин (Phe), глицин (Gly), гистидин (His), изолейцин (Ile), аргинин (Arg), лизин (Lys), лейцин (Leu), метионин (Met), аспарагин (Asn), пролин (Pro), глутамин (Gln), серин (Ser), треонин (Thr), валин (Val), триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и их комбинации. Стереоизомеры встречающихся в природе α -аминокислот включают, без ограничения, D-аланин (D-Ala), D-цистеин (D-Cys), D-аспарагиновую кислоту (D-Asp), D-глутаминовую 20 кислоту (D-Glu), D-фенилаланин (D-Phe), D-гистидин (D-His), D-изолейцин (D-Ile), D-аргинин (D-Arg), D-лизин (D-Lys), D-лейцин (D-Leu), D-метионин (D-Met), D-аспарагин (D-Asn), D-пролин (D-Pro), D-глутамин (D-Gln), D-серин (D-Ser) D-треонин (D-Thr), D-валин (D-Val), D-триптофан (D-Trp), D-тирозин (D-Tyr) и их комбинации.

[0160] Аминокислоты могут быть обозначены в данном документе либо с помощью 25 общеизвестных трехбуквенных символов, либо с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

[0161] Термины «полипептид» и «пептид» используются в данном документе 30 взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков в одной цепи. Эти термины применимы к аминокислотным полимерам, в которых один или большее количество аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе аминокислотным полимерам и не встречающимся в природе аминокислотным полимерам. Аминокислотные полимеры могут включать только L-аминокислоты, только D-аминокислоты или смесь L- и D-аминокислот.

35 Термин «белок» в контексте данного документа относится к полипептиду или к димеру (т.

е. двум), или к мультимеру (т. е. трем или более) одноцепочечных полипептидов. Одноцепочечные полипептиды белка могут быть соединены ковалентной связью, например, дисульфидной связью или за счет нековалентных взаимодействий.

[0162] Термин «консервативная замена», «консервативная мутация» или «консервативно модифицированный вариант» относится к изменению, которое приводит к замене аминокислоты другой аминокислотой, которую можно охарактеризовать как имеющую подобную характеристику. Примеры категорий консервативных аминокислотных групп, определенных таким образом, могут включать: «заряженную/полярную группу», включая Glu (глутаминовую кислоту или E), Asp (аспарагиновую кислоту или D), Asn (аспарагин или N), Gln (глутамин или Q), Lys (лизин или K), Arg (аргинин или R) и His (гистидин или H); «ароматическую группу», включая Phe (фенилаланин или F), Tyr (тирозин или Y), Trp (триптофан или W) и His (гистидин или H); и «алифатическую группу», включая Gly (глицин или G), Ala (аланин или A), Val (валин или V), Leu (лейцин или L), Ile (изолейцин или I), Met (метионин или M), Ser (серин или S), Thr (треонин или T) и Cys (цистеин или C). Внутри каждой группы также можно идентифицировать подгруппы. Например, группу заряженных или полярных аминокислот можно подразделить на подгруппы, включающие: «положительно заряженную подгруппу», включающую Lys, Arg и His; «отрицательно заряженную подгруппу», включающую Glu и Asp; и «полярную подгруппу», включающую Asn и Gln. В другом примере ароматическую или циклическую группу можно подразделить на подгруппы, включающие: «подгруппу азотного кольца», включающую Pro, His и Trp; и «фенильную подгруппу», включающую Phe и Tyr. В другом дополнительном примере алифатическую группу можно подразделить на подгруппы, например, «алифатическую неполярную подгруппу», включающую Val, Leu, Gly и Ala; и «алифатическую слабополярную подгруппу», включающую Met, Ser, Thr и Cys. Примеры категорий консервативных мутаций включают аминокислотные замены аминокислот в пределах подгрупп, приведенных выше, такие как, но не ограничиваясь этим: Lys на Arg или наоборот, так чтобы сохранять положительный заряд; Glu на Asp или наоборот, так чтобы сохранять отрицательный заряд; Ser на Thr или наоборот, так чтобы сохранять свободный -ОН; и Gln на Asn или наоборот, так чтобы сохранять свободный -NH₂. В некоторых вариантах осуществления гидрофобные аминокислоты замещены встречающейся в природе гидрофобной аминокислотой, например, в активном сайте, чтобы сохранить гидрофобность.

[0163] Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или большего количества полипептидных последовательностей, относятся к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые

являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков, например, с по меньшей мере 60% идентичности, по меньшей мере 65% , по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% или более, которые являются идентичными в определенной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, согласно измерению с помощью одного из алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального осмотра.

[0164] Для сравнения последовательностей полипептидов, как правило, одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают кандидатную последовательность. Выравнивание можно проводить с помощью различных способов, доступных для специалиста в данной области техники, например, путем визуального выравнивания или с помощью общедоступного программного обеспечения, использующего известные алгоритмы для достижения максимального выравнивания. Такие программы включают программы BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) или Megalign (DNASTAR). Параметры, используемые для выравнивания для достижения максимального выравнивания, могут быть определены специалистом в данной области техники. Для сравнения последовательностей полипептидных последовательностей в целях данной заявки для выравнивания двух белковых последовательностей используют алгоритм BLASTP стандартной белковой программы BLAST с параметрами по умолчанию.

[0165] Термины «соответствующий», «определенный со ссылкой на» или «пронумерованный со ссылкой на», используемые в контексте идентификации заданного аминокислотного остатка в полипептидной или белковой последовательности, относятся к позиции этого остатка указанной эталонной последовательности, когда заданная аминокислотная последовательность максимально выровнена и сравнена с эталонной последовательностью. Так, например, аминокислотный остаток в полипептиде «соответствует» аминокислоте в области SEQ ID NO: 1 из аминокислот 114-220, когда остаток выравнивается с аминокислотой в SEQ ID NO: 1 при оптимальном выравнивании с SEQ ID NO: 1. Полипептид, который выравнивают с эталонной последовательностью, необязательно должен иметь такую же длину, что и эталонная последовательность.

[0166] В контексте данного документа термин «аффинность связывания» относится к силе нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, одним сайтом связывания на полипептиде/белке и мишенью, например, рецептором трансферрина, с которым он связывается. Таким образом, например, этот термин может относиться к 1:1 взаимодействиям между полипептидом/белком и его мишенью, если иное не указано или

не ясно из контекста. Аффинность связывания можно определить количественно путем измерения равновесной константы диссоциации (K_D), которая относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости ассоциации (k_a , время⁻¹ M⁻¹). Значение K_D можно определить путем измерения кинетики комплексообразования и диссоциации, например, используя методы поверхностного плазмонного резонанса (ППР), например систему *Viasoge*[™]; анализы кинетического исключения, такие как *KinExA*[®]; и биослойную интерферометрию (например, используя платформу *FortéBio*[®] *Octet*[®]). В контексте данного документа термин «аффинность связывания» включает не только формальную аффинность связывания, которая отражает 1:1 взаимодействия между полипептидом/белком и его мишенью, но также кажущуюся аффинность, для которой рассчитывают K_D , что может отражать авидное связывание. Термин «низкая аффинность» относится к аффинности, которой достаточно для нацеливания, а также для высвобождения. В вариантах осуществления низкая аффинность имеет значение от около 600 нМ до около 3 нМ, от около 500 нМ до около 3 нМ, или от около 400 нМ до около 20 нМ, или от около 300 нМ до около 30 нМ, или от около 200 нМ до около 40 нМ, или от около 150 нМ до около 50 нМ, или около 3 нМ, 4 нМ, 5 нМ, 5 нМ, 7 нМ, 8 нМ, 9 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ, 110 нМ, 120 нМ, 130 нМ, 140 нМ, 150 нМ, 160 нМ, 170 нМ, 180 нМ, 190 нМ, 200 нМ, 210 нМ, 220 нМ, 230 нМ, 240 нМ, 250 нМ, 260 нМ, 270 нМ, 280 нМ, 290 нМ, 300 нМ, 310 нМ, 320 нМ, 330 нМ, 340 нМ, 350 нМ, 360 нМ, 370 нМ, 380 нМ, 390 нМ, 400 нМ, 410 нМ, 420 нМ, 430 нМ, 440 нМ, 450 нМ, 460 нМ, 470 нМ, 480 нМ, 490 нМ, 500 нМ.

[0167] Выражение «специфически связывается» или «селективно связывается» с мишенью например рецептором трансферрина, когда оно относится к белку, содержащему модифицированный константный домен, как описано в данном документе, относится к реакции связывания, посредством которой белок связывается с мишенью с большей аффинностью, большей авидностью и/или большей продолжительностью, чем он связывается со структурно отличающейся мишенью, например, когда мишень не относится к семейству рецепторов трансферрина. В типичных вариантах осуществления белок имеет по меньшей мере 5-кратную, 10-кратную, 100-кратную, 1000-кратную, 10000-кратную или большую аффинность в отношении рецептора трансферрина по сравнению с неродственной мишенью при анализе аффинности в одинаковых условиях. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ специфически связывается с эпитопом на рецепторе трансферрина, который является консервативным для разных видов, например, консервативным для отличных от человека приматов и человека. В некоторых вариантах осуществления белок может связываться исключительно с рецептором трансферрина

человека.

[0168] В контексте данного документа термин «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме, состоящим из мономеров (нуклеотидов), содержащих сахарный фрагмент, фосфат и нуклеиновое основание. Если не указано иное, этот термин охватывает как модифицированные, так и немодифицированные нуклеиновые кислоты.

[0169] В контексте данного документа термин «нуклеиновое основание» относится к азотсодержащим соединениям, которые могут быть связаны с сахарным фрагментом с образованием нуклеозидов, которые, в свою очередь, являются компонентами нуклеотидов. Способность нуклеиновых оснований образовывать пары оснований и укладываться друг поверх друга непосредственно приводит к образованию длинноцепочечных спиральных структур, таких как рибонуклеиновая кислота (РНК) и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Нуклеиновые основания могут быть встречающимися в природе (т. е. аденин (А), цитозин (С), гуанин (G), тимин (Т) и урацил (U)) или модифицированными.

[0170] В контексте данного документа термин «нуклеозид» относится к соединению, содержащему нуклеиновое основание и сахарный фрагмент (например, дезоксирибозу или рибозу или ее модифицированный вариант). Термин нуклеозид включает как модифицированные, так и немодифицированные нуклеозиды.

[0171] В контексте данного документа термин «нуклеотид» относится к соединению, содержащему нуклеиновое основание, сахарный фрагмент и одну или большее количество фосфатных групп. Термин нуклеотид включает как модифицированные, так и немодифицированные нуклеотиды.

[0172] В контексте данного документа термин «межнуклеозидный линкер» означает ковалентные связи между соседними нуклеозидами в олигонуклеотиде. Нуклеозиды могут быть связаны посредством природных (т. е. фосфодиэфирной (РО) связи) или модифицированных связей.

[0173] Термины «химическая модификация», «модификация» или «модифицированный» могут относиться к химическому изменению соединения по сравнению с его природным аналогом. Например, нуклеиновое основание, сахарный фрагмент или межнуклеозидная связь могут быть химически модифицированы.

[0174] Термины «нуклеотидная последовательность», «последовательность нуклеиновой кислоты» и «цепь нуклеиновой кислоты» относятся к последовательности оснований (пуринов и/или пиримидинов или их синтетических производных) в полимере ДНК или РНК, который может быть одноцепочечным или двухцепочечным, необязательно

содержащим синтетические, не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды, способные к включению в полимеры ДНК или РНК, и/или модификации остова (например, модифицированный олигомер). Термины «олиго», «олигонуклеотид» и «олигомер» могут использоваться взаимозаменяемо и относиться к таким последовательностям пуринов и/или пиримидинов. Например, олигонуклеотид может содержать химически модифицированные или немодифицированные молекулы нуклеиновых кислот (РНК или ДНК), имеющие длину менее чем около, например, около 200 нуклеотидов (например, менее чем около 100 или 50 нуклеотидов). Олигонуклеотид может представлять собой, например, одноцепочечную ДНК или РНК (например, ASO); двухцепочечную ДНК или РНК (например, малую интерферирующую РНК (миРНК)), включая двухцепочечную ДНК или РНК, имеющую петлю шпильки; или гибриды ДНК/РНК. В одном варианте осуществления олигонуклеотид имеет длину в диапазоне от около 5 до около 60 нуклеотидов или от около 10 до около 50 нуклеотидов. В другом варианте осуществления олигонуклеотид имеет длину в диапазоне от около 5 до около 30 нуклеотидов или от около 15 до около 30 нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления олигонуклеотид имеет длину в диапазоне от около 18 до около 24 нуклеотидов.

[0175] Термины «модифицированные олиго», «модифицированные олигонуклеотиды» или «модифицированные олигомеры», аналогично, могут использоваться взаимозаменяемо и относиться к таким последовательностям, которые содержат синтетические, не встречающиеся в природе или измененные основания, сахара и/или модификации остова.

[0176] Описанные в данном документе олигонуклеотиды можно синтезировать, используя стандартные методики синтеза в твердой фазе или растворе, которые известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды синтезируют, используя твердофазную химию фосфорамидитов (патент США № 6773885) с использованием автоматических синтезаторов. Химический синтез нуклеиновых кислот позволяет получать различные формы нуклеиновых кислот с модифицированными связями, химерными композициями и нестандартными основаниями или модифицирующими группами, присоединенными в выбранных местах по всей длине нуклеиновой кислоты.

[0177] Термин «комплементарный» в контексте данного документа относится к широкой концепции комплементарного спаривания оснований между двумя нуклеиновыми кислотами, выровненными в антисмысловом положении по отношению друг к другу. Когда положение нуклеотида в обеих молекулах занято нуклеотидами, обычно способными к спариванию оснований друг с другом, то нуклеиновые кислоты считаются комплементарными друг другу в этом положении. Таким образом, две нуклеиновые

кислоты являются по существу комплементарными друг другу, когда по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60% или по меньшей мере около 80% соответствующих положений в каждой из молекул заняты нуклеотидами, которые обычно образуют пары оснований друг с другом (например, пары нуклеотидов А:Т (А:U для РНК) и G:C).

5 **[0178]** Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или большего количества нуклеотидных последовательностей, относятся к двум или большему количеству последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов, например, с по меньшей мере 60% идентичности, по меньшей мере 65% , по меньшей мере 70%, по меньшей мере 10 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% или более, которые являются идентичными в определенной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, согласно измерению с помощью одного из алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального осмотра.

15 **[0179]** Для сравнения последовательностей олигонуклеотидов (например, для определения идентичности или комплементарности), как правило, одна нуклеотидная последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравнивают кандидатную последовательность. Выравнивание можно проводить с помощью различных способов, доступных для специалиста в данной области техники, например, путем 20 визуального выравнивания или с помощью общедоступного программного обеспечения, использующего известные алгоритмы для достижения максимального выравнивания. Такие программы включают программы BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) или Megalign (DNASTAR). Параметры, используемые для выравнивания для достижения максимального выравнивания, могут быть определены специалистом в 25 данной области техники.

[0180] В контексте данного документа «гибридизироваться» или «гибридизация» означает спаривание комплементарных нуклеотидных последовательностей (например, антисмыслового соединения и его целевой нуклеиновой кислоты; или между антисмысловой и смысловой цепями). В контексте данного документа «специфически 30 гибридизируется» означает способность эталонной нуклеиновой кислоты гибридизироваться с одной молекулой нуклеиновой кислоты с большей аффинностью, чем она гибридизируется с другой.

[0181] «Экспрессия» относится к транскрипции и/или трансляции эндогенного гена, гетерологичного гена или сегмента нуклеиновой кислоты или трансгена в клетках. 35 Например, экспрессия может относиться к транскрипции и стабильному накоплению

смысловой (мРНК) или функциональной РНК. Экспрессия может также относиться к выработке белка.

5 **[0182]** Термин «ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например ДНК или РНК), которая содержит кодирующие последовательности, необходимые для выработки полипептида или предшественника.

[0183] Выражение «модуляция экспрессии целевого гена или последовательности» означает изменение (например, повышение или снижение) экспрессии целевого гена или последовательности (например, посредством деградации мишени или ингибирования трансляции). Например, оно включает ингибирование, снижение или уменьшение
10 экспрессии целевого гена или последовательности. Оно также включает изменение альтернативного сплайсинга, что может приводить к изменению абсолютного или относительного количества конкретного сплайс-варианта.

[0184] Термины «субъект», «индивид» и «пациент», взаимозаменяемо используемые в данном документе, относятся к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим,
15 людей, отличных от человека приматов, грызунов (например, крыс, мышей и морских свинок), кроликов, коров, свиней, лошадей и другие виды млекопитающих. В одном варианте осуществления пациент является человеком.

[0185] Термин «лечение» и т. п. используется в данном документе для обозначения получения необходимого фармакологического и/или физиологического эффекта. Термин
20 «лечение» может относиться к любым показателям успеха в лечении или уменьшении интенсивности поражения, заболевания или патологического состояния, включая любой объективный или субъективный параметр, такой как ослабление, ремиссия, улучшение выживаемости пациента, увеличение времени или частоты выживаемости, уменьшение интенсивности симптомов или повышение переносимости поражения, заболевания или
25 патологического состояния для пациента, замедление скорости дегенерации или ухудшения состояния или улучшение физического или психического благополучия пациента. Кроме того, «лечение» может относиться к модуляции экспрессии целевого гена, такой как нокдаун гена или нокаут гена. Например, экспрессия целевого гена или последовательности ингибируется или снижается, например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%,
30 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с контрольной экспрессией. Лечение или облегчение симптомов может основываться на объективных или субъективных параметрах. Эффект лечения можно сравнивать с индивидом или группой индивидов, не получающих лечение, или с тем же пациентом до лечения или в отличное время в течение лечения.

35 **[0186]** Термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к неактивному

фармацевтическому ингредиенту, который биологически или фармакологически совместим для применения на людях или животных, такому как, но не ограничиваясь ими, буфер, носитель или консервант.

5 **[0187]** В контексте данного документа «терапевтическое количество» или «терапевтически эффективное количество» агента представляет собой количество агента, которое обеспечивает лечение, облегчение, ослабление или уменьшение тяжести симптомов заболевания у субъекта. «Терапевтическое количество» или «терапевтически эффективное количество» агента может улучшать выживаемость пациента, увеличивать время или частоту выживаемости, уменьшать интенсивность симптомов, повышать переносимость поражения, заболевания или патологического состояния, замедлять скорость дегенерации или ухудшения состояния или улучшать физическое или психическое благополучие пациента.

10 **[0188]** Термин «вводить» относится к способу доставки агентов, соединений или композиций в необходимый участок биологического действия. Эти способы включают, но не ограничиваются этим, местную доставку, парентеральную доставку, внутривенную доставку, внутрикожную доставку, внутримышечную доставку, интратекальную доставку, доставку в толстую кишку, ректальную доставку или внутрибрюшинную доставку. В одном варианте осуществления описанные в данном документе белки вводят внутривенно.

15 **[0189]** Термин «объем MCV» является стандартным показателем и относится в данном документе к показателю толерантности к конъюгату.

VII. ПЕРЕМЕННАЯ «X»: ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ.

20 **[0190]** Как описано в данном документе, один или большее количество олигонуклеотидов (например, ASO или агентов РНКи) могут быть связаны посредством «L» с белком, связывающим рецептор трансферрина, описанным в данном документе, с образованием конъюгата.

25 **[0191]** Хотя длина олигонуклеотида может варьироваться, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид составляет от около 10 до около 60 нуклеотидов в длину, или от около 10 до около 30 нуклеотидов в длину, или от около 18 до около 30 нуклеотидов в длину, или от около от 15 до около 25 нуклеотидов в длину, или от около 16 до около 20 нуклеотидов в длину. Кроме того, как описано ниже, олигонуклеотид может содержать определенные химические модификации, такие как модифицированная межнуклеозидная связь, модифицированное нуклеиновое основание, модифицированный сахар или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления один или большее количество олигонуклеотидов связаны (т. е. посредством связывающей группы «L») с белком,

35

связывающим рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления два или большее количество олигонуклеотидов связаны с белком, связывающим рецептор трансферрина (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или более). В некоторых вариантах осуществления один олигонуклеотид связан с белком, связывающим рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления два олигонуклеотида связаны с белком, связывающим рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления четыре олигонуклеотида связаны с белком, связывающим рецептор трансферрина.

[0192] В некоторых вариантах осуществления к одной связывающей группе (L) присоединен 1 олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления к одной связывающей группе (L) присоединены 2 олигонуклеотида. Например, олигонуклеотиды могут быть связаны друг с другом в тандеме. В некоторых вариантах осуществления L присоединен к 5'-концу первого олигонуклеотида, а второй олигонуклеотид связан с 3'-концом первого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут быть связаны посредством линкера на основе нуклеиновой кислоты или неолigonуклеотидного расщепляемого линкера.

[0193] В других вариантах осуществления связывающая группа представляет собой разветвленную связывающую группу, а 2 или большее количество олигонуклеотидов присоединены отдельно к одной связывающей группе (L) (т. е. у равен 2 или более).

[0194] Когда два или большее количество олигонуклеотидов присоединены к TfR-связывающему белку, олигонуклеотиды могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды являются одинаковыми.

ASO

[0195] В одном варианте каждый олигонуклеотид независимо представляет собой ASO. Термин «антисмысловый олигонуклеотид (ASO)» относится к одинарным цепям ДНК-подобных или РНК-подобных молекул (например, модифицированных нуклеотидов, таких как описанные в данном документе), которые являются комплементарными или частично комплементарными выбранной целевой полинуклеотидной последовательности, например мРНК. Связываясь с комплементарной целевой последовательностью, ASO могут изменять или модулировать генную экспрессию посредством ряда механизмов, включая, например, изменение сплайсинга (исключение экзона или включение экзона); путем рекрутирования РНКазы H, что приводит к деградации мишени; посредством ингибирования трансляции; и посредством ингибирования малых РНК.

[0196] как правило, ASO имеют длину в диапазоне от 10 до 30 пар оснований (п. о.), но могут быть длиннее или короче. Например, в некоторых вариантах осуществления ASO составляет от около 10 до около 60 нуклеотидов в длину, или от около 10 до около 50

нуклеотидов в длину, или от около 10 до около 40 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления ASO составляет от около 10 до 30 нуклеотидов в длину, или от около 12 до 30 нуклеотидов в длину, или от около 14 до около 30 нуклеотидов в длину, или от около 15 до около 30 нуклеотидов в длину, или от около 16 до около 30 нуклеотидов в длину, или от около 17 до около 30 нуклеотидов в длину, или от около 18 до около 30 нуклеотидов в длину, или от около 18 до около 28 нуклеотидов в длину или от около 18 до 26 нуклеотидов в длину, или от около 18 до около 24 нуклеотидов в длину, или от около 15 до около 25 нуклеотидов в длину, или от около 16 до около 20 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления ASO составляет около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в длину.

[0197] Выбор антисмысловых олигонуклеотидных последовательностей, специфических в отношении заданной целевой последовательности, основан на анализе выбранной целевой последовательности и определении ряда факторов, включая вторичную структуру, T_m , энергию связывания и относительную стабильность. Кроме того, антисмысловые олигонуклеотиды можно выбирать на основании их относительной неспособности образовывать димеры, шпильки или другие вторичные структуры, которые уменьшали бы или делали невозможным специфическое связывание с целевой мРНК в клетке-хозяине. Целевые области мРНК включают те области, которые находятся в кодоне инициации трансляции AUG или вблизи него, и те последовательности, которые являются по существу комплементарными 5'-областям мРНК. Анализ вторичной структуры и выбор целевого сайта можно проводить, используя программное обеспечение и алгоритмы, известные в данной области техники, например, используя программное обеспечение для анализа праймеров OLIGO v.4 (Molecular Biology Insights) и/или программное обеспечение на основании алгоритма BLASTN 2.0.5 (Altschul et al, Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402).

Агенты РНКи

[0198] В некоторых других вариантах осуществления каждый олигонуклеотид независимо представляет собой агент РНКи (например, миРНК или кшРНК). Термин «агент РНК-интерференции (РНКи)» относится к РНК-агенту или молекуле, которая может расщепляться до РНК-агента, которые могут ингибировать экспрессию целевых гена или последовательности (например, мРНК, тРНК или вирусной РНК) специфическим в отношении последовательности способом (например, посредством Dicer/RISC). Агенты РНКи могут быть одно- или двухцепочечными. Если агент РНКи представляет собой одноцепочечный агент, он может содержать 5'-модификацию, например, одну или большее количество фосфатных групп или один или большее количество аналогов фосфатной

группы. В одном варианте осуществления агент РНКи является двухцепочечным и содержит смысловую и антисмысловую цепь (например, короткая интерферирующая РНК (киРНК)).

5 [0199] Агент РНКи, как правило, содержит область достаточной гомологии с целевым геном и имеет достаточную длину так, чтобы агент РНКи мог опосредовать понижающую регуляцию целевого гена. Комплементарность между агентом РНКи и целевой последовательностью должна быть достаточной, чтобы позволить агенту РНКи или продукту его расщепления направлять специфический в отношении последовательности сайленсинг. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи представляет собой или
10 содержит область, которая является, по меньшей мере частично, комплементарной целевой РНК. В некоторых других вариантах осуществления агент РНКи представляет собой или содержит область, которая является полностью комплементарной целевой РНК.

[0200] В некоторых вариантах осуществления агент РНКи содержит неспаренную область на одном или обоих концах молекулы. Например, двухцепочечный агент РНКи
15 может иметь цепи, спаренные с выступающими концами, например, 5' и/или 3' выступами, такими как выступы из 1-3 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи будет содержать неспаренный выступ длиной 1, 2, 3 или 4 нуклеотида на каждом конце. Выступы могут быть результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом того, что две цепи одинаковой длины расположены в шахматном порядке.

20 [0201] Дуплексные области внутри агента РНКи могут отличаться по длине, но, как правило, их длина составляет от около 5 до около 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексные области имеют длину около 15-60, или около 15-50, или около 15-40, или около 15-30, или около 15-25, или около 19-25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексные области имеют длину около 20-24 или около 21-23
25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексные области имеют длину около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более нуклеотидов.

[0202] «Одноцепочечный агент РНКи» или «агент оцРНКи» в контексте данного документа состоит из одной молекулы. Он может содержать дуплексную область, образованную за счет внутривещечного спаривания, например, он может представлять
30 собой или содержать структуру типа шпильки или «ручки сковороды». Одноцепочечные агент РНКи могут быть антисмысловыми в отношении целевой молекулы. Одноцепочечный агент РНКи может быть достаточно длинным, чтобы он мог проникать в RISC и участвовать в RISC-опосредованном расщеплении целевой мРНК. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечный агент РНКи имеет длину по меньшей мере 10,
35 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления его длина

составляет менее 200, 100, 80 или 60 нуклеотидов.

[0203] Агенты на основе малой шпилечной РНК (миРНК) обычно имеют дуплексную область длиной менее 200, 100 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексная область имеет длину в диапазоне около 15-60, или около 15-50, или около 15-40, или около 15-30, или около 15-25, или около 19-25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексные области имеют длину около 17-23, или около 19-23, или около 20-23, или около 21-23, или около 19-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексная область имеет длину по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов. Шпилька может иметь одноцепочечный выступ или концевую неспаренную область. В некоторых вариантах осуществления длина выступов составляет 2-3 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления выступ находится на смысловой стороне шпильки, а в некоторых вариантах осуществления — на антисмысловой стороне шпильки.

[0204] «Двухцепочечный агент РНКи» или «агент дцРНКи» в контексте данного документа содержит более одной цепи, когда межцепочечная гибридизация может образовывать дуплексную область внутри молекулы (например, гибридизация между смысловой цепью и антисмысловыми цепями). В некоторых вариантах осуществления агент РНКи является достаточно большим, чтобы его можно было расщепить эндогенной молекулой, такой как Dicer, с образованием молекул меньшего размера.

[0205] В некоторых вариантах осуществления агент РНКи представляет собой молекулу миРНК, содержащую смысловую и антисмысловую цепи.

[0206] В контексте данного документа термин «антисмысловая цепь» относится к цепи агента РНКи, которая является в достаточной степени комплементарной целевому полинуклеотиду, например целевой мРНК. В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой цепи двухцепочечного агента РНКи составляет по меньшей мере около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 или 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой цепи двухцепочечного агента РНКи составляет менее чем около 200, 100 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой цепи находится в диапазоне от около 17 до 25, или от около 19 до 23, от около 19 до 21 нуклеотидов.

[0207] В контексте данного документа термин «смысловая цепь» относится к цепи агента РНКи, которая является в достаточной степени комплементарной антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи двухцепочечного агента РНКи составляет по меньшей мере около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 или 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой

цепи двухцепочечного агента РНКи составляет менее чем около 200, 100 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи находится в диапазоне от около 17 до 25, или от около 19 до 23, от около 19 до 21 нуклеотидов.

5 [0208] В некоторых вариантах осуществления длина двухцепочечной части двухцепочечного агента РНКи составляет по меньшей мере около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 или 60 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи двухцепочечного агента РНКи составляет менее чем около 200, 100 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи находится в диапазоне от около 17 до 25, или от около 19 до 23, от около 10 19 до 21 нуклеотидов.

[0209] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи могут быть выбраны таким образом, чтобы агент дцРНКи содержал неспаренную область на одном или обоих концах молекулы. Таким образом, агент дцРНКи может содержать смысловую и антисмысловую цепи, спаренные так, чтобы содержать выступающий конец, 15 например, 5' и/или 3' выступы длиной 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. Выступы могут быть результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом того, что две цепи одинаковой длины расположены в шахматном порядке. В некоторых вариантах осуществления агент дцРНКи содержит по меньшей мере один 3' выступ. В некоторых вариантах осуществления оба конца агента дцРНКи содержат 3' выступ (например, длиной 20 в 2 нуклеотида).

[0210] Дуплексные области внутри агента дцРНКи могут отличаться по длине, но, как правило, их длина составляет от около 5 до около 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексная область имеет длину в диапазоне около 5-60, или около 15-60, или около 15-50, или около 15-40, или около 15-30, или около 15-25, или около 19-25 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексные области имеют длину около 17-23, или около 19-23, или около 20-23, или около 21-23, или около 19-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дуплексные области имеют длину около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более нуклеотидов.

[0211] Способы получения агентов РНКи, таких как миРНК и кшРНК, известны в 30 данной области и могут быть легко адаптированы для получения агента РНКи, нацеленного на любую полинуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления агент РНКи синтезируют химическим путем. Например, олигонуклеотиды можно синтезировать, используя ряд методик, например, описанных в Usman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott *et al.*, *Nucl. 35 Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); и Wincott *et al.*, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997).

Иллюстративные модификации олигонуклеотидов

[0212] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе, может содержать по меньшей мере одну модификацию нуклеиновой кислоты, например выбранную из группы, состоящей из модифицированной межнуклеозидной связи, модифицированного нуклеинового основания, модифицированного сахара и их комбинаций. Такие модификации можно использовать для изменения фармакокинетики (улучшение устойчивости к нуклеазам, приводящее к продлению времени полужизни), фармакодинамики (превосходящая аффинность в отношении целевой РНК) или поглощения эндосомами. Однако многие модификации исключают расщепление РНКазой H, которое является желаемым механизмом действия для многих ASO. Таким образом, некоторые ASO РНКазы H можно конструировать в виде химер, в которых разные основания представляют собой смесь разных химических элементов, или в виде гэтмеров, в которых некоторые модификации размещены на «крыльях», а не на центральных основаниях. Напротив, для агентов РНКи и ASO, предназначенных для изменения сплайсинга или трансляции мРНК, соображения в отношении РНКазы H не являются необходимыми.

[0213] Соответственно, описанный в данном документе олигонуклеотид может содержать одну или большее количество модификаций нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит 1, 2, 3, 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, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 или более модификаций.

[0214] В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе олигонуклеотид содержит одну или большее количество нуклеотидных модификаций (например, в нуклеиновом основании или сахарном фрагменте). В некоторых вариантах осуществления 25% или более количество нуклеотидов, присутствующих в олигонуклеотиде, являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления 50% или более количество нуклеотидов, присутствующих в олигонуклеотиде, являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления 75% или более количество нуклеотидов, присутствующих в олигонуклеотиде, являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления 100% нуклеотидов, присутствующих в олигонуклеотиде, являются модифицированными.

[0215] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит одну или более модификаций нуклеиновых оснований. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит одну или большее количество модификаций сахарного

фрагмента (например, фуранозилы, содержащие заместители в 2'-положении, 3'-положении, 4'-положении и/или 5'-положении). В некоторых вариантах осуществления замещенные сахарные фрагменты включают бициклические сахарные фрагменты.

[0216] В некоторых вариантах осуществления модификации нуклеиновых кислот с помощью олигонуклеотида включены в профиль. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой гэтмер. Профиль модификации гэтмерного олигонуклеотида обычно имеет формулу 5'-Ха-Ya-Za-3', где Ха и Za представляют собой фланкирующие области вокруг гэт-области Ya. В некоторых вариантах осуществления область Ya представляет собой непрерывный участок нуклеотидов, например участок из по меньшей мере 6 нуклеотидов ДНК, которые способны рекрутировать РНКазу, такую как РНКаза H. В некоторых вариантах осуществления область Ya составляет по меньшей мере 8 нуклеотидов ДНК. В некоторых вариантах осуществления гэтмер связывается с целевой нуклеиновой кислотой, после чего рекрутируется РНКаз, которая затем может расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления область Ya фланкируется как с 5', так и с 3' конца областями Ха и Za, которые содержат высокоаффинные модифицированные нуклеотиды, например, от одного до шести модифицированных нуклеотидов в каждой из Ха и Za. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды присутствуют в 5' и 3' областях олигонуклеотида, тогда как некоторые модифицированные нуклеотиды и/или модифицированные связи могут присутствовать или не присутствовать в центральной части молекулы. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды присутствуют в 5' и 3' областях олигонуклеотида, а некоторые модифицированные нуклеотиды не присутствуют в центральной части молекулы (например, остатки ЗНК не присутствуют в центральной части; однако центральная область может содержать модифицированные связи, такие как PS-связи). В некоторых вариантах осуществления каждая из Ха и Za содержит по 3 модифицированных нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 3 модифицированных нуклеотида расположены в тандеме в каждой из Ха и Za.

[0217] Модифицированные нуклеозиды/нуклеотиды известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, остатки 2'-O-метила (2'OMe), остатки 2'-O-метоксиэтила (MOE), ограниченные остатки нуклеиновых кислот (например, S-cEt, R-cEt, S-cMOE и R-cMOE), остатки пептидной нуклеиновой кислоты (ПНК), остатки запертой нуклеиновой кислоты (ЗНК) и остатки 5'-метилцитидина (остатки метилированного цитозина) (также смотрите Scoles, et al., Neurol Genet Apr 2019, 5 (2) e323). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит один или большее количество

остатков МОЕ. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит один или большее количество остатков ОМе или остатков F (например, 2'-F или 2'ОМе). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит один или большее количество ограниченных остатков (например, S-cEt, R-cEt, S-cМОЕ и R-cМОЕ) и/или остатков ЗНК. Нуклеиновые кислоты считаются «запертыми», если они имеют метиленовую мостиковую связь между 2'-кислородом и 4'-углеродом молекулы сахара рибозы. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой морфолино (т. е. содержит определенные модификации сахарного фрагмента). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе, содержит один или большее количество остатков ЗНК и один или большее количество остатков 5'-метилцитидина.

[0218] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит одну или большее количество модификаций межнуклеозидного остова (т. е. модифицирована природная фосфодиэфирная (PO) связь). В некоторых вариантах осуществления такие модификации осуществляют, например, для снижения нуклеазной активности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит 1, 2, 3, 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 или 30 или большее количество модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления 25% или большее количество межнуклеозидных связей являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления 50% или большее количество межнуклеозидных связей являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления 75% или большее количество межнуклеозидных связей являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления 100% межнуклеозидных связей, присутствующих в олигонуклеотиде, являются модифицированными.

[0219] Модификации основной цепи известны в данной области и включают, но не ограничиваются этим, фосфоротиоатные связи, фосфоамидатные связи и фосфородиамидатные связи. Например, в некоторых вариантах осуществления одна или большее количество (например, 1, 2, 3, 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 или большее количество) межнуклеозидных связей в олигонуклеотиде замещены фосфоротиоатной (PS) связью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит смесь связей PO и PS. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит только связи PS. В некоторых других вариантах осуществления одна или большее количество (например, 1, 2, 3, 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 или большее количество) межнуклеозидных связей в олигонуклеотиде замещены фосфоамидатной связью. В

некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой фосфоамидатный морфолино (РМО).

5 [0220] В некоторых вариантах осуществления межнуклеозидные связи являются стереослучайными относительно хиральных центров (R_p и S_p). В некоторых других вариантах осуществления конфигурации R_p и S_p в олигонуклеотиде оптимизированы в конкретных конфигурациях.

10 [0221] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой гэтамер, содержащий модификации ЛНК и PS. Например, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой гэтамер, имеющий профиль модификаций формулы 5'-X_a-Y_a-Z_a-3', где X_a и Z_a представляют собой фланкирующие области вокруг гэта-области Y_a, причем каждая из X_a и Z_a включает 3 ЗНК-модифицированных нуклеотида (например, 3 последовательных ЗНК-модифицированных нуклеотида), причем гэта-область Y_a содержит связи PS. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид дополнительно содержит один или большее количество 15 остатков 5'-метилцитидина. В некоторых вариантах осуществления гэта-область Y_a не содержит остатки ЗНК.

VIII. ПЕРЕМЕННАЯ «L»: СВЯЗЫВАЮЩАЯ ГРУППА

20 [0222] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой связывающую группу, которая соединяет каждый олигонуклеотид (X) с TfR-связывающим белком (P). Связывающая группа может представлять собой любую группу, подходящую для присоединения олигонуклеотида к TfR-связывающему белку.

25 [0223] Связывающая группа может быть присоединена к любой области TfR-связывающего белка, содержащей TfR-связывающий полипептид (например, к N-концевой области, к C-концевой области или к аминокислоте внутри белка, такой как остаток цистеина или остаток глутамина), при условии, что олигонуклеотид не препятствует связыванию TfR-связывающего белка с рецептором трансферрина. Аналогично, связывающая группа может быть присоединена к любой области олигонуклеотида (например, к 5' концу, 3' концу или к остатку нуклеиновой кислоты внутри молекулы) при 30 условию, что TfR-связывающий белок не влияет на функциональность олигонуклеотида (например, комплементарное связывание с целевой нуклеиновой кислотой). Например, линкер может быть присоединен к олигонуклеотиду посредством любого количества синтетически возможных точек, расположенных по всему олигонуклеотиду, например, в 3' или 5' концевых остатках олигонуклеотида; в сахарном фрагменте; в основном фрагменте; 35 или в остатке, находящемся внутри остова.

[0224] В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен к олигонуклеотиду в 5' концевом остатке олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен к олигонуклеотиду в 3' концевом остатке олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен к олигонуклеотиду в остатке внутри олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой двухцепочечную молекулу РНКи, при этом линкер присоединен к смысловой цепи (например, в 5' или 3' концевом остатке). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой двухцепочечную молекулу РНКи, при этом линкер присоединен к антисмысловой цепи (например, в 5' или 3' концевом остатке). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой миРНК, при этом линкер присоединен к 3' концу смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления 3' конец смысловой цепи миРНК модифицирован С6-амином.

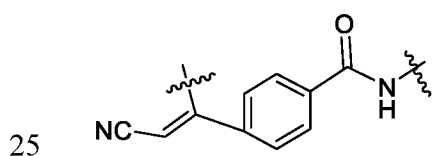
[0225] В некоторых вариантах осуществления связывающая группа содержит спейсеры. В некоторых вариантах осуществления спейсеры представляют собой гидрофильные спейсеры. В некоторых вариантах осуществления гидрофильные спейсеры представляют собой полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0226] В некоторых вариантах осуществления связывающая группа представляет собой гомобифункциональный линкер или гетеробифункциональный линкер.

[0227] В некоторых вариантах осуществления связывающая группа является расщепляемой (например, расщепляемый нуклеазой линкер, кислотолабильный линкер, чувствительный к пептидазам линкер, фотолабильный линкер, диметиловый линкер или дисульфидсодержащий линкер (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); патент США № 5208020). В некоторых вариантах осуществления связывающая группа содержит один или большее количество нуклеотидов (например, 1, 2, 3 или большее количество) или один или большее количество нуклеозидов (например, 1, 2, 3 или большее количество). В некоторых вариантах осуществления один или большее количество нуклеотидов или один или большее количество нуклеозидов являются немодифицированными. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа содержит один или большее количество нуклеотидов, имеющих немодифицированные основания, немодифицированные сахарные группы и/или немодифицированные фосфатные группы. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа содержит один или большее количество нуклеозидов, имеющих немодифицированные основания и/или немодифицированные сахарные группы. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа содержит ТСА, нуклеазный линкер. В некоторых вариантах осуществления ТСА модифицирован С6-амином в Т-положении. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа не содержит ТСА.

В некоторых вариантах осуществления связывающая группа является ферментативно расщепляемой. В определенных вариантах осуществления связывающая группа расщепляется ферментом, присутствующим в центральной нервной системе или мышцах. В некоторых вариантах осуществления для конъюгатов, содержащих ASO, выбирают расщепляемую связывающую группу (например, чтобы обеспечить возможность диссоциации ASO от остальной части конъюгата для переноса в ядро). В некоторых вариантах осуществления расщепляемая связывающая группа представляет собой расщепляемый дипептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый дипептидный линкер представляет собой расщепляемую связывающую группу val-cit или расщепляемый линкер val-ala. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая связывающая группа представляет собой расщепляемый кислотой линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый кислотой линкер представляет собой карбонатный линкер или гидразонный линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая связывающая группа содержит ПЭГ-спейсеры. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая связывающая группа представляет собой дисульфид, такой как SPDP (сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат) или lys-конъюгированный расщепляемый кислотой гидразид.

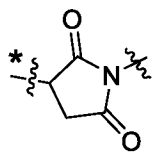
[0228] В некоторых вариантах осуществления связывающая группа представляет собой нерасщепляемую связывающую группу. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа представляет собой ковалентную связывающую группу. В некоторых вариантах осуществления ковалентная связывающая группа может быть получена из APN или акриламида. В некоторых вариантах осуществления ковалентная связывающая группа включает группу $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$. В некоторых вариантах осуществления ковалентная связывающая группа содержит группу:



В некоторых вариантах осуществления ковалентная связывающая группа может быть получена из галогенацетамида, например бромацетамида, хлорацетамида, йодацетамида.

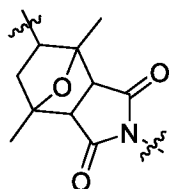
[0229] В некоторых вариантах осуществления связывающая группа содержит C_6 аминогруппу, имеющую формулу $-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-$.

[0230] В некоторых вариантах осуществления связывающая группа может быть получена из малеимида. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая группа содержит группу:



В некоторых вариантах осуществления связывающая группа может быть присоединена к R при валентности, отмеченной * (например, к атому серы модифицированного сайта внутри R).

- 5 **[0231]** В некоторых вариантах осуществления малеимид представляет собой модифицированный малеимид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный малеимид представляет собой алкил-, арил-, циклоалкил- или экзоциклический малеимид. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа содержит защищенный малеимид. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая группа
- 10 содержит защищенный малеимид формулы:



[0232] В некоторых вариантах осуществления защищенный малеимид удаляют после биоконъюгации.

- [0233]** В некоторых вариантах осуществления связывающая группа представляет собой
- 15 самогидролизующуюся связывающую группу.

[0234] Некоторые конкретные неограничивающие варианты осуществления (сокращенно называемые вариантами осуществления линкера LE1-LE42) описаны ниже.

- [0235]** В вариантах осуществления линкера LE1 связывающая группа имеет молекулярную массу от около 20 дальтон до около 5000 дальтон. В вариантах
- 20 осуществления линкера LE2 связывающая группа имеет молекулярную массу от около 20 дальтон до около 1000 дальтон. В вариантах осуществления линкера LE3 связывающая группа имеет молекулярную массу от около 20 дальтон до около 200 дальтон. В вариантах осуществления линкера LE4 связывающая группа имеет длину от около 5 ангстрем до около 60 ангстрем.

- 25 **[0236]** В вариантах осуществления линкера LE5 связывающая группа отделяет пептид от остальной части конъюгата формулы I на длину от около 5 ангстрем до около 40 ангстрем включительно.

- [0237]** В вариантах осуществления линкера LE6 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или
- 30 ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 25 атомов углерода, в которой

один или большее количество (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода необязательно заменены (-O-), (-NH-), (-S), аминокислотой, гидразоном (-C(R')=N=N(R')-), нуклеотидом или 3-12-членным двухвалентным гетероциклом, при этом цепь и любой 3-12-членный двухвалентный гетероцикл необязательно замещены одним или большим количеством (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси, (C₁-C₆)алкоксикарбонила, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O), гидразона (=N=N(R')-), карбокси, ариа, арилокси, гетероарила и гетероарилокси; где каждый R' независимо представляет собой H или (C₁-C₆)алкил.

10 **[0238]** В вариантах осуществления линкера LE7связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 25 атомов углерода, в которой один или большее количество (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода необязательно заменены (-O-), (-NH-) или 3-12-членным двухвалентным гетероциклом, при этом цепь и
15 любой 3-12-членный двухвалентный гетероцикл необязательно замещены одним или большим количеством (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси, (C₁-C₆)алкоксикарбонила, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O), карбокси, ариа, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

20 **[0239]** В вариантах осуществления линкера LE8связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 10 атомов углерода, в которой один или большее количество (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода необязательно заменены (-O-), (-NH-), (-S), аминокислотой, гидразоном (-C(R')=N=N(R')-), нуклеотидом
25 или 3-12-членным двухвалентным гетероциклом, при этом цепь и любой 3-12-членный двухвалентный гетероцикл необязательно замещены одним или большим количеством (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси, (C₁-C₆)алкоксикарбонила, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O), гидразона (=N=N(R')-), карбокси, ариа, арилокси, гетероарила и гетероарилокси; где
30 каждый R' независимо представляет собой H или (C₁-C₆)алкил.

[0240] В вариантах осуществления линкера LE9связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 10 атомов углерода, в которой
35 один или большее количество (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода необязательно

заменены (-O-), (-NH-) или 3-12-членным двухвалентным гетероциклом, при этом цепь и любой 3-12-членный двухвалентный гетероцикл необязательно замещены одним или большим количеством (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси, (C₁-C₆)алкоксикарбонила, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O), карбокси, ариа, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

5 [0241] В вариантах осуществления линкера LE10 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 25 атомов углерода, при этом цепь
10 необязательно замещена в атоме углерода одним или большим количеством (например, 1, 2, 3 или 4) заместителей, выбранных из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси, (C₁-C₆)алкоксикарбонила, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

15 [0242] В вариантах осуществления линкера LE11 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 10 атомов углерода, при этом цепь
20 необязательно замещена в атоме углерода одним или большим количеством (например, 1, 2, 3 или 4) заместителей, выбранных из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси, (C₁-C₆)алкоксикарбонила, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо (=O), карбокси, арила, арилокси, гетероарила и гетероарилокси.

[0243] В вариантах осуществления линкера LE12 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или
25 ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 10 атомов углерода.

[0244] В вариантах осуществления линкера LE13 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 10 атомов углерода.

[0245] В вариантах осуществления линкера LE14 связывающая группа представляет собой двухвалентную, неразветвленную, насыщенную углеводородную цепь, имеющую от
30 2 до 10 атомов углерода.

[0246] В вариантах осуществления линкера LE15 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 25 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота
35 и серы, при этом цепь содержит одну или большее количество дисульфидных связей.

- 5 [0247] В вариантах осуществления линкера LE16 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 25 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит одну или большее количество гидразоновых групп в цепи или присоединенных к атому углерода цепи.
- [0248] В вариантах осуществления линкера LE17 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 35 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит одну или большее количество аминокислот в цепи.
- 10 [0249] В вариантах осуществления линкера LE18 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 35 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит дипептид в цепи.
- [0250] В вариантах осуществления линкера LE19 связывающая группа представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 35 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит дипептид val-cit в цепи.
- 15 [0251] В вариантах осуществления линкера LE20 связывающая группа содержит один или большее количество нуклеотидов в цепи.
- 20 [0252] В вариантах осуществления линкера LE21 связывающая группа содержит два или большее количество нуклеотидов в цепи.
- [0253] В вариантах осуществления линкера LE22 связывающая группа содержит тринуклеотидную группу в цепи.
- [0254] В вариантах осуществления линкера LE23 связывающая группа присоединена к двум или большему количеству олигонуклеотидов (например, в случае соединения формулы (I) по меньшей мере один «у» больше 1).
- 25 [0255] В вариантах осуществления линкера LE24 только одна связывающая группа присоединена к двум или большему количеству олигонуклеотидов (например, в случае соединения формулы (I) один «у» больше 1).
- 30 [0256] В вариантах осуществления линкера LE25 по меньшей мере две связывающие группы присоединены к двум или большему количеству олигонуклеотидов (например, в случае соединения формулы (I) по меньшей мере два «у» больше 1).
- [0257] В вариантах осуществления линкера LE26 по меньшей мере две связывающие группы присоединены к двум олигонуклеотидам (например, в случае соединения формулы
- 35 (I) «у» равен 2, а n больше 1).

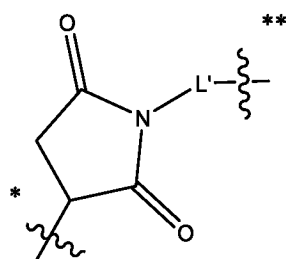
[0258] В вариантах линкера LE27 связывающая группа присоединена к олигонуклеотиду через фосфат олигонуклеотида (например, связанный с 5' концевым остатком).

5 [0259] В вариантах линкера LE28 связывающая группа присоединена к олигонуклеотиду через фосфоротиоат олигонуклеотида (например, связанный с 5' концевым остатком).

[0260] В вариантах осуществления линкера LE29 связывающая группа содержит полиэтиленокси-цепь. В другом варианте осуществления изобретения полиэтиленокси-цепь содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 повторяющихся этиленокси-звеньев.

10 [0261] В вариантах осуществления линкера LE30 связывающая группа содержит 5-членный двухвалентный гетероцикл.

[0262] В вариантах осуществления линкера LE31 связывающая группа имеет следующую структуру:

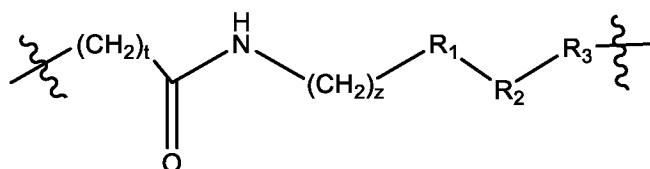


15 где L' представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную углеводородную цепь, имеющую от 2 до 25 атомов углерода, в которой один или большее количество (например, 1, 2, 3 или 4) атомов углерода
необязательно заменены (-O-), (-NH-), (-S), аминокислотой, гидразоном (-C(R')=N=N(R')-),
нуклеотидом или 3-12-членным двухвалентным гетероциклом, при этом цепь и любой 3-
20 12-членный двухвалентный гетероцикл необязательно замещены одним или большим
количеством (например, 1, 2, 3 или 4) заместителями, независимо выбранными из группы,
состоящей из (C₁-C₆)алкокси, (C₃-C₆)циклоалкила, (C₁-C₆)алканоила, (C₁-C₆)алканоилокси,
(C₁-C₆)алкоксикарбонила, (C₁-C₆)алкилтио, азидо, циано, нитро, галогена, гидрокси, оксо
(=O), гидразона (=N=N(R')-), карбоксы, ариа, арилокси, гетероарила и гетероарилокси; где
25 каждый R' независимо представляет собой H или (C₁-C₆)алкил; и при этом валентность,
отмеченная *, присоединена к R, а валентность, отмеченная **, присоединена к X в формуле
(I). В другом варианте осуществления L' представляет собой двухвалентную,
разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от
2 до 25 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит
30 одну или большее количество дисульфидных связей. В другом варианте осуществления L'
представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную

или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 25 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит одну или большее количество гидразоновых групп в цепи или присоединенных к атому углерода цепи. В другом варианте осуществления L' представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 35 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит одну или большее количество аминокислот в цепи. В другом варианте осуществления L' представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 35 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит дипептид в цепи.

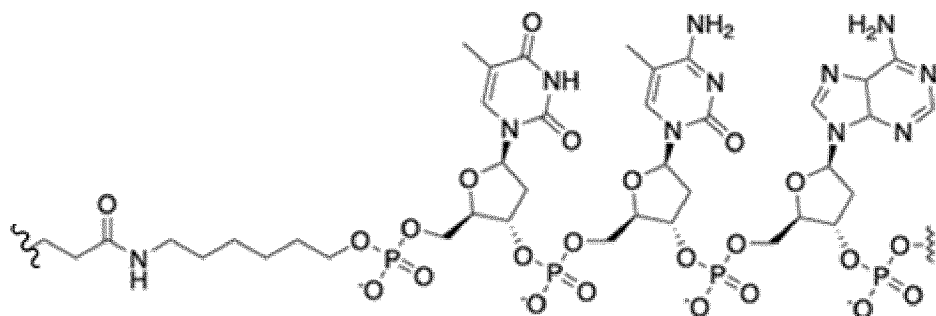
В другом варианте осуществления L' представляет собой двухвалентную, разветвленную или неразветвленную, насыщенную или ненасыщенную цепь, имеющую от 2 до 35 атомов, выбранных из углерода, кислорода, азота и серы, при этом цепь содержит дипептид val-cit в цепи. В другом варианте осуществления L' содержит один или большее количество нуклеотидов. В другом варианте осуществления L' содержит два или большее количество нуклеотидов. В другом варианте осуществления L' содержит тринуклеотидную группу. В другом варианте осуществления L' содержит один или большее количество нуклеотидов, имеющих немодифицированные основания, немодифицированные сахарные группы и/или немодифицированные фосфатные группы.

[0263] В вариантах осуществления линкера LE32 L' имеет следующую структуру:

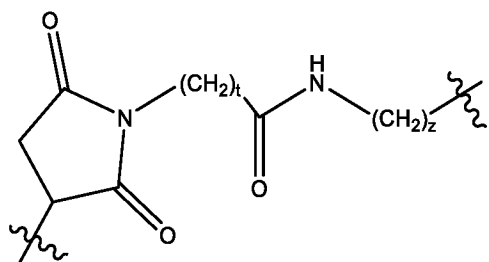


где t равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; z равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; и каждый из R₁, R₂ и R₃ независимо представляет собой нуклеотид.

[0264] В вариантах осуществления линкера LE33 L' имеет следующую структуру:

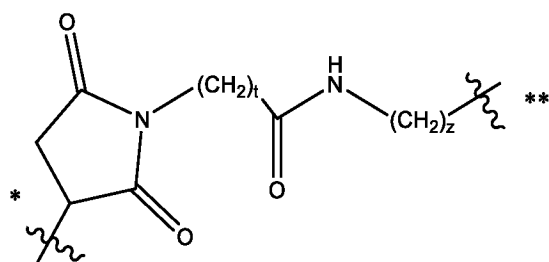


[0265] В вариантах осуществления линкера LE34 связывающая группа имеет следующую структуру:



где t равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; и z равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

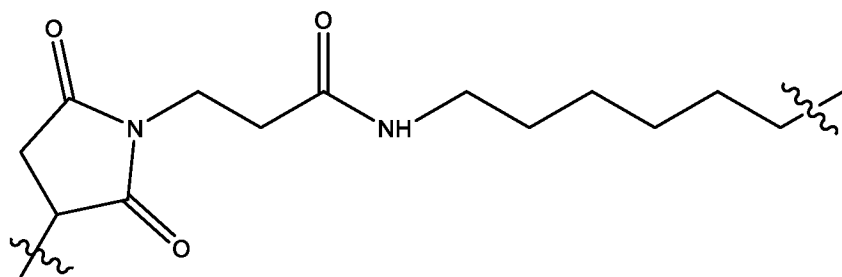
5 [0266] В вариантах осуществления линкера LE35 связывающая группа имеет следующую структуру:



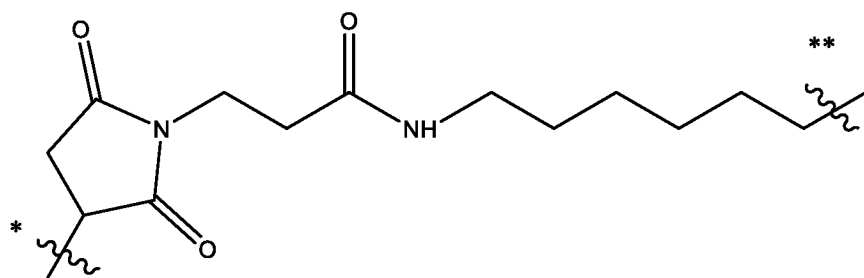
где t равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8; и z равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, при этом валентность, отмеченная *, присоединена к Р, а валентность, отмеченная **, присоединена к Х в формуле

10 (I). В некоторых вариантах осуществления валентность, отмеченная **, присоединена к Х через фосфат олигонуклеотида (например, связанный с 5' концевым остатком).

[0267] В вариантах осуществления линкера LE36 связывающая группа имеет следующую структуру:




15 [0268] В вариантах осуществления линкера LE37 связывающая группа имеет следующую структуру:

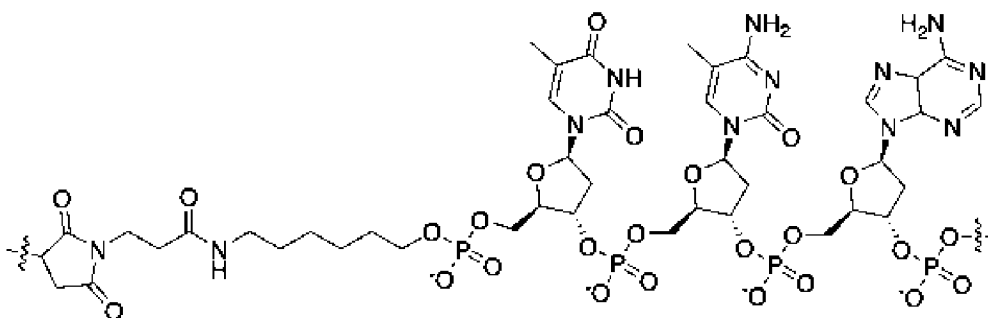


при этом валентность, отмеченная *, присоединена к Р, а валентность, отмеченная **, присоединена к Х

присоединена к X в формуле (I). В некоторых вариантах осуществления валентность, отмеченная **, присоединена к X через фосфат олигонуклеотида (например, связанный с 5' концевым остатком). Таким образом, группа А в линкерных структурах в вариантах

5 осуществления может быть ковалентно связана с $-O-PO_3$ в , который сам ковалентно связан с олигонуклеотидом.

[0269] В вариантах осуществления линкера LE38 связывающая группа имеет следующую структуру:



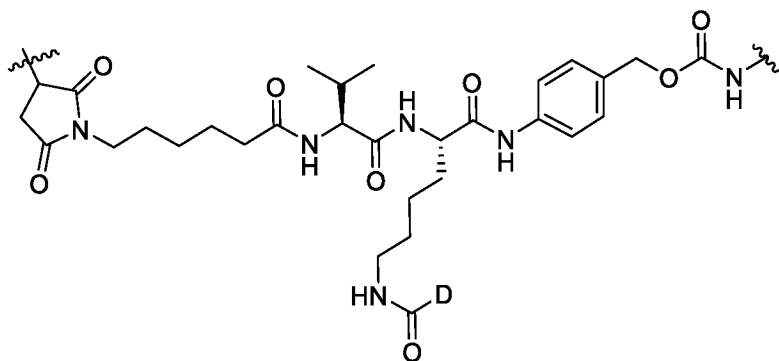
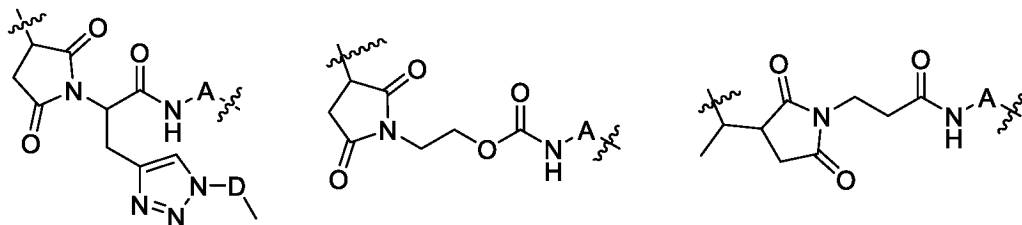
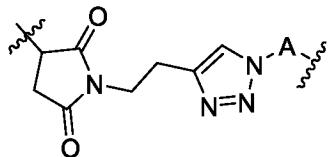
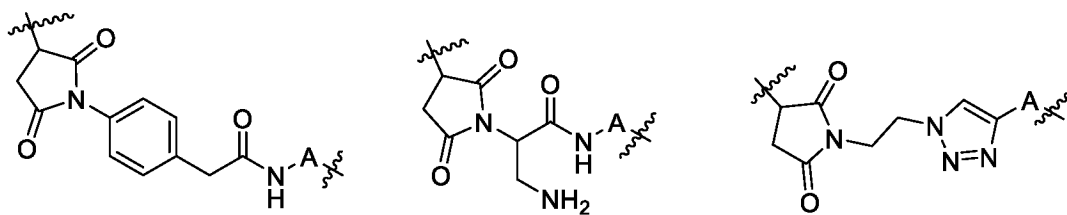
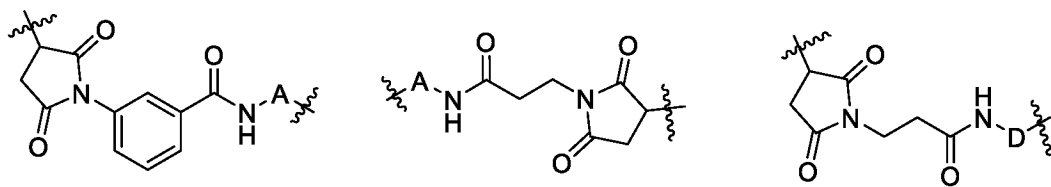
10 [0270] В вариантах осуществления линкера LE39 линкер представляет собой пептидный линкер или образован из белка, пептида или аминокислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая группа представляет собой двухвалентный радикал, образованный из белка. В другом варианте осуществления связывающая группа представляет собой двухвалентный радикал, образованный из пептида. В другом варианте

15 осуществления связывающая группа представляет собой двухвалентный радикал, образованный из аминокислоты.

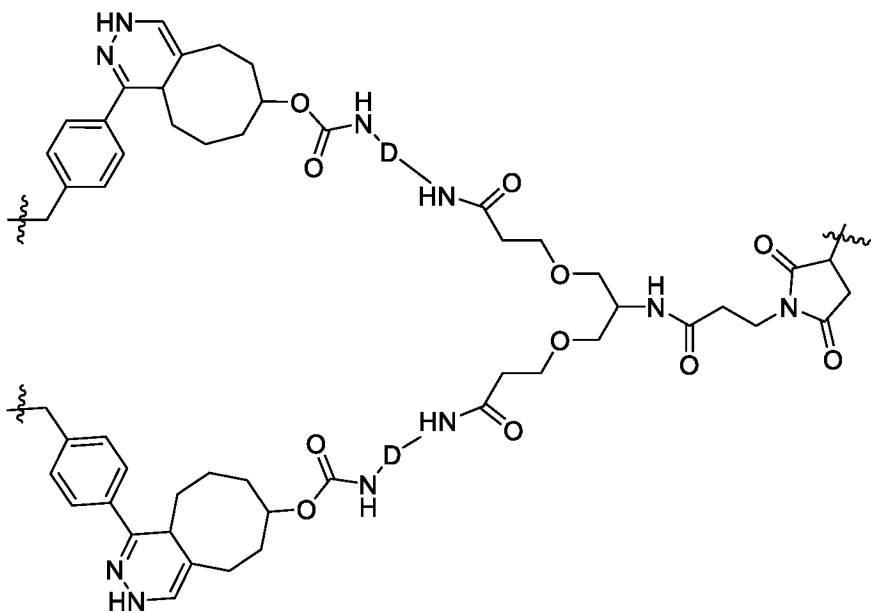
[0271] В вариантах осуществления линкера LE40 связывающая группа может иметь такую конфигурацию, чтобы обеспечивать возможность вращения олигонуклеотида и TfR-связывающего белка относительно друг друга; и/или является устойчивой к расщеплению

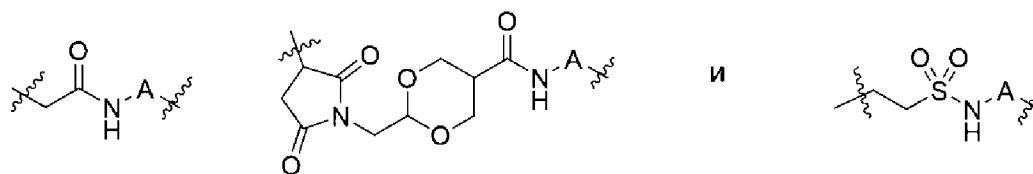
20 протеазами. В некоторых вариантах осуществления связывающая группа может представлять собой гибкий линкер, например, содержащий аминокислоты, такие как Gly, Asn, Ser, Thr, Ala и т. п. Такие связывающие группы конструируют, используя известные параметры. Например, связывающие группы могут иметь повторы, такие как повторы Gly-Ser.

25 [0272] В вариантах осуществления линкера LE41 связывающая группа имеет или содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из:



5





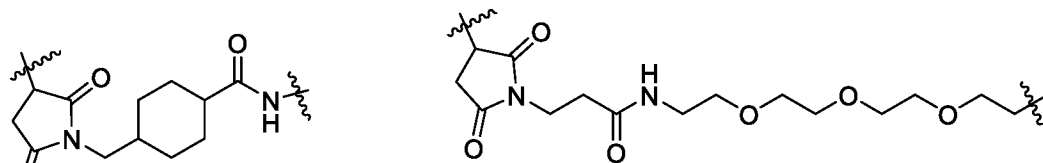
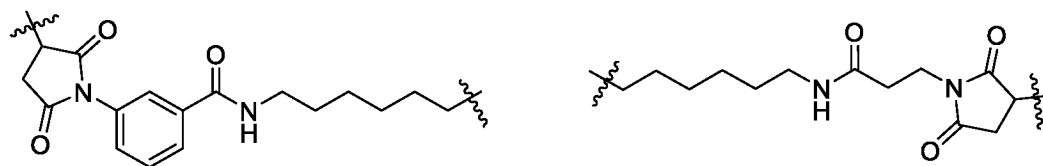
где

каждый A независимо представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

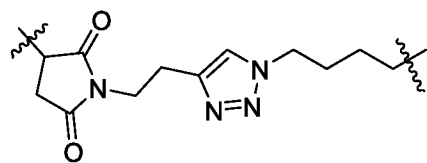
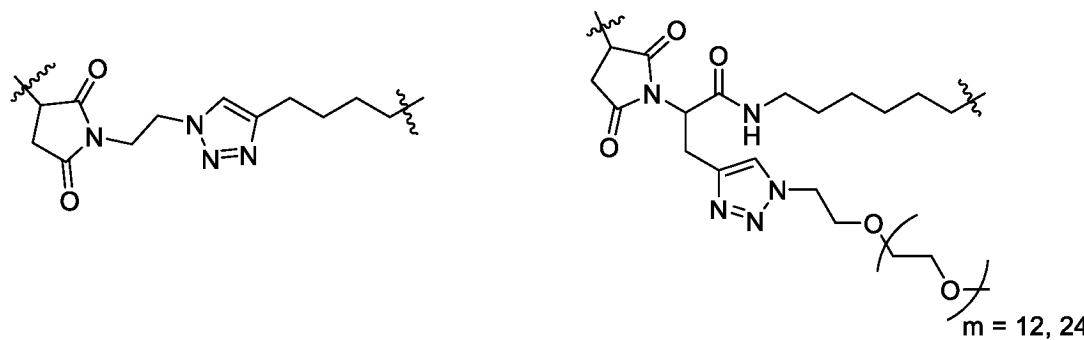
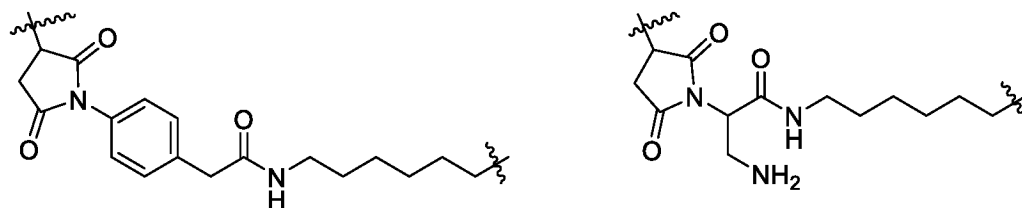
каждый D представляет собой -(CH₂-CH₂-O)_m-; и

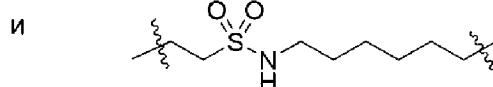
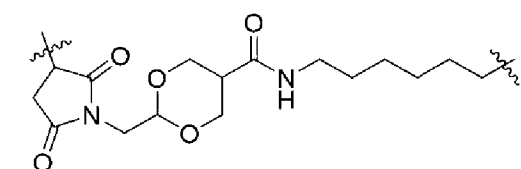
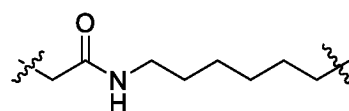
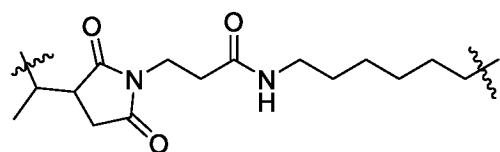
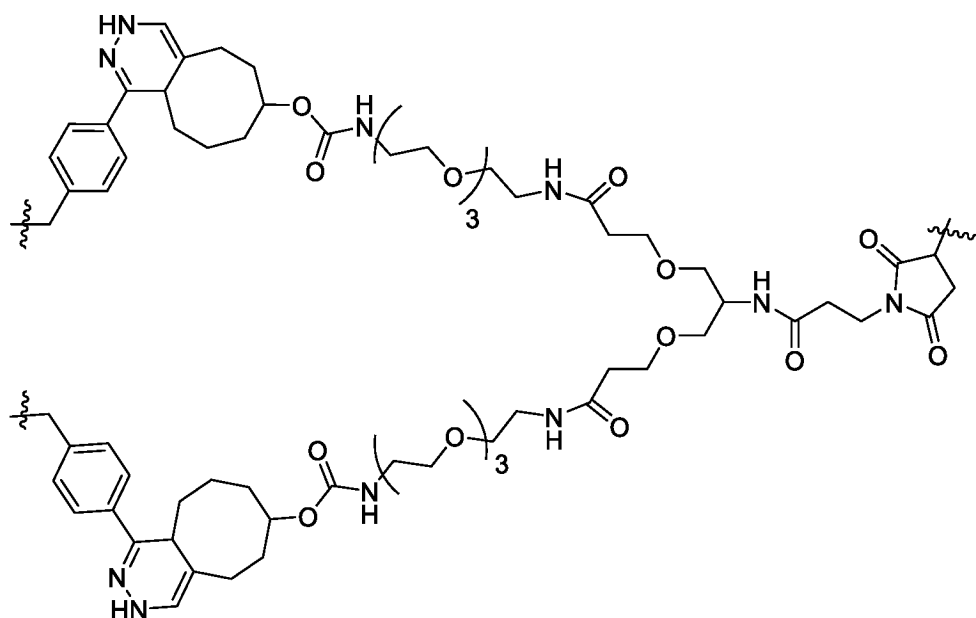
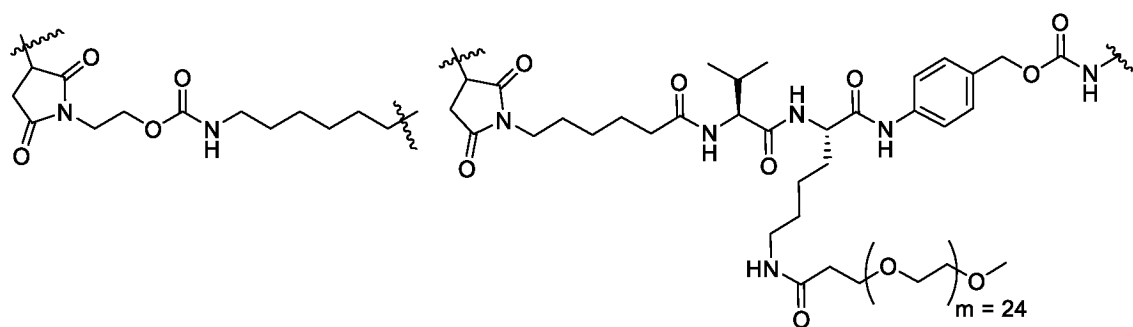
5 каждый m равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24.

[0273] В вариантах осуществления линкера LE42 связывающая группа имеет или содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из:



10





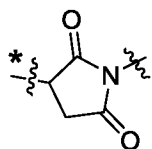
5

[0274] В различных вариантах осуществления конъюгаты можно создавать, используя хорошо известные химические перекрестносшивающие реагенты и протоколы. Например, существует большое количество химических перекрестносшивающих агентов, которые известны специалистам в данной области техники и применимы для перекрестного сшивания белка с представляющим интерес агентом. Например, перекрестносшивающие агенты представляют собой гетеробифункциональные кросс-линкеры, которые можно использовать для пошагового сшивания молекул. Гетеробифункциональные перекрестносшивающие линкеры дают возможность разрабатывать более специфические способы связывания для конъюгации белков, тем самым уменьшая возникновение

10

нежелательных побочных реакций, таких как гомобелковые полимеры. В данной области техники известен широкий ряд гетеробифункциональных перекрестносшивающих линкеров, включая N-гидроксисукцинимид (NHS) или его водорастворимый аналог N-гидроксисульфосукцинимид (сульфо-NHS), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сложный эфир m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS); N-сукцинимидил (4-йодацетил)аминобензоат (SIAB), сукцинимидил 4-(п-малеимидофенил)бутират (SMPB), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC); 4-сукцинимидилоксикарбонил-а-метил-а-(2-пиридилдитио)толуол (SMPT), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сукцинимидил 6-[3-(2-пиридилдитио)пропионат]гексаноат (LC-SPDP). Те перекрестносшивающие агенты, которые имеют N-гидроксисукцинимидные фрагменты, можно получать в виде аналогов N-гидроксисульфосукцинимидов, которые обычно имеют более высокую растворимость в воде. Кроме того, те перекрестносшивающие агенты, которые имеют дисульфидные мостики в связывающей цепи, можно вместо этого синтезировать в виде алкильных производных, чтобы уменьшить уровень расщепления линкера *in vivo*. В дополнение к гетеробифункциональным перекрестносшивающим линкерам существует ряд других перекрестносшивающих агентов, включая гомобифункциональные и фотореактивные перекрестносшивающие линкеры. Дисукцинимидил субкрат (DSS), бисмалеимидогексан (BMH) и диметилпимелимидат.2HCl (DMP) являются примерами применимых гомобифункциональных перекрестносшивающих агентов, а бис-[B-(4-азидосалициламидо)этил]дисульфид (BASED) и N-сукцинимидил-6-(4'-азидо-2'-нитрофениламино)гексаноат (SANPAH) являются примерами применимых фотореактивных перекрестносшивающих агентов.

[0275] В вариантах осуществления связывающая группа L содержит фрагмент, имеющий структуру:



где * обозначает точку присоединения к атому серы модифицированного сайта в Р, относится конкретно к любым таким линкерам, описанным в этом разделе, и вариантам осуществления линкеров, описанным в данном документе.

[0276] В вариантах осуществления, включающих конъюгат формулы (I), описанный в данном документе, каждый L относится конкретно к любому из линкеров, описанных в этом разделе, и вариантам осуществления линкеров, описанным в данном документе.

IX. ПЕРЕМЕННАЯ «Р»: БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕЦЕПТОР ТРАНСФЕРРИНА

[0277] В этом разделе описаны белки, которые связываются с рецептором трансферрина и могут переноситься через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Некоторые белки, которые связываются с рецептором трансферрина, описаны в данном документе, а также в WO2018/152326. Некоторые способы получения TfR-связывающих белков описаны в WO2018/152326, которая включена в данный документ посредством ссылки во всех целях.

[0278] TfR-связывающий белок, описанный в данном документе, может иметь ряд значений аффинности связывания. Например, в некоторых вариантах осуществления белок имеет аффинность к TfR в диапазоне от 1 пМ до 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR находится в диапазоне от 1 нМ до 5 мМ или от 10 нМ до 1 мМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TfR с низкой аффинностью менее 3 нМ, например 3 нМ, 4 нМ, 5 нМ, 5 нМ, 7 нМ, 8 нМ, 9 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ, 110 нМ, 120 нМ, 130 нМ, 140 нМ, 150 нМ, 160 нМ, 170 нМ, 180 нМ, 190 нМ, 200 нМ, 210 нМ, 220 нМ, 230 нМ, 240 нМ, 250 нМ, 260 нМ, 270 нМ, 280 нМ, 290 нМ, 300 нМ, 310 нМ, 320 нМ, 330 нМ, 340 нМ, 350 нМ, 360 нМ, 370 нМ, 380 нМ, 390 нМ, 400 нМ, 410 нМ, 420 нМ, 430 нМ, 440 нМ, 450 нМ, 460 нМ, 470 нМ, 480 нМ, 490 нМ или 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность к TfR находится в диапазоне от около 40 нМ до около 1200 нМ, от 50 нМ до около 500 нМ, или от около 75 нМ до около 300 нМ, или от около 100 нМ до около 250 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается (например, специфически связывается) с TfR со аффинностью около 40, 50, 80, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150 или 1200 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TfR со аффинностью от около 50 нМ до около 300 нМ, от около 80 нМ до около 300 нМ, от 100 нМ до около 300 нМ, или от около 150 нМ до около 250 нМ, или от около 200 нМ до около 250 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TfR со аффинностью от около 40 нМ до около 500 нМ, от около 50 нМ до около 500 нМ, от около 50 нМ до около 400 нМ, от около 50 нМ до около 300 нМ, от около 50 нМ до около 200 нМ, от около 50 нМ до около 100 нМ, от около 100 нМ до около 500 нМ, от около 100 нМ до около 400 нМ, от около 100 нМ до около 300 нМ, от около 100 нМ до около 200 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TfR со аффинностью от около 5 нМ до около 500 нМ, от около 5 нМ до около 400 нМ, от около 5 нМ до около 300 нМ, от около 5 нМ до около 200 нМ, от около 5 нМ до около 100 нМ, от около 10 нМ до около 500 нМ, от около 10 нМ до около 400 нМ, от около 10 нМ до около 300 нМ или от около 10 нМ до около 200 нМ. В некоторых вариантах

осуществления белок связывается с TfR с аффинностью от около 3 нМ до около 600 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TfR с аффинностью от около 80 нМ до около 180 нМ или от около 50 нМ до около 250 нМ. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с TfR с аффинностью около 10 нМ, около 100 нМ или около 500 нМ.

[0279] В одном аспекте TfR-связывающий белок, описанный в данном документе, может иметь новый или ненативный сайт связывания TfR.

[0280] В одном аспекте предложены белки, которые содержат константные домены, имеющие модификации, которые позволяют белкам специфически связываться с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления белок имеет модификации в домене CL. В некоторых вариантах осуществления белок имеет модификации в домене CH1. В некоторых вариантах осуществления белок имеет модификации в домене CH2. В некоторых вариантах осуществления белок имеет модификации в домене CH3. Типовые домены CH2 и CH3 с модификациями, которые обеспечивают специфическое связывание с TfR, описаны, например, в WO 2018/152326, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[0281] В одном аспекте предложены белки, которые содержат константные домены, имеющие модификации, которые позволяют белкам специфически связываться с рецептором трансферрина. Эти модификации вносят в определенные группы аминокислот, которые присутствуют на поверхности константного домена (например, CH3). В некоторых вариантах осуществления белки, содержащие модифицированный константный домен, специфически связываются с эпитопом в апикальном домене рецептора трансферрина. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с рецептором трансферрина без ингибирования связывания трансферрина с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления белок связывается с эпитопом, который содержит аминокислоту 208 последовательности рецептора трансферрина.

[0282] Специалисту в данной области техники будет понятно, что константные (например, CH3) домены других изотипов иммуноглобулина, например IgM, IgA, IgE, IgD и т. д., можно модифицировать аналогичным образом путем идентификации аминокислот в тех доменах, которые соответствуют группам (i)-(ii), описанным в данном документе. Также можно осуществлять модификации в соответствующих доменах иммуноглобулинов других видов, например, отличных от человека приматов, обезьян, мышей, крыс, кроликов, собак, свиней, кур и т. п.

CH3 белков, связывающих рецептор трансферрина

[0283] В одном аспекте предложены белки, которые содержат домены СНЗ, имеющие модификации, которые позволяют белкам специфически связываться с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен представляет собой домен СНЗ Ig человека. Домен СНЗ может относиться к любому подтипу IgG, т. е. IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В контексте антител IgG домен СНЗ относится к сегменту аминокислот приблизительно от позиции 341 приблизительно до позиции 447 согласно нумерации в соответствии со схемой нумерации EU. Указанные позиции в домене СНЗ в целях идентификации соответствующей группы аминокислотных позиций для связывания рецептора трансферрина определены со ссылкой на SEQ ID NO: 3 или определены со ссылкой на аминокислоты 114-220 из SEQ ID NO: 1, если не указано иное. Замены также определены со ссылкой на SEQ ID NO: 1, т. е. аминокислота считается заменой относительно аминокислоты в соответствующей позиции в SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 включает частичную последовательность шарнирной области, PCP, в качестве аминокислот 1-3. Нумерация позиций в домене СНЗ со ссылкой на SEQ ID NO: 1 включает первые три аминокислоты.

[0284] Как указано выше, группы остатков домена СНЗ, которые можно модифицировать, как описано в данном документе, пронумерованы в данном документе со ссылкой на SEQ ID NO: 1; однако любой домен СНЗ, например домен СНЗ IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, может иметь модификации, например аминокислотные замены, в одной или большем количестве групп остатков, которые соответствуют остаткам в отмеченных позициях в SEQ ID NO: 1. Позиции каждой из последовательностей IgG2, IgG3 и IgG4, которые соответствуют любой заданной позиции в SEQ ID NO: 1, можно легко определить.

[0285] В одном варианте осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, который специфически связывает рецептор трансферрина, связывается с апикальным доменом рецептора трансферрина в эпитопе, который содержит позицию 208 полноразмерной последовательности рецептора трансферрина человека (SEQ ID NO: 235), которая соответствует позиции 11 последовательности апикального домена рецептора трансферрина человека, приведенной в SEQ ID NO: 107. SEQ ID NO: 107 соответствует аминокислотам 198-378 последовательности UniProt P02786 белка рецептора трансферрина человека 1 (SEQ ID NO: 235). В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ связывается с апикальным доменом рецептора трансферрина в эпитопе, который содержит позиции 158, 188, 199, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215 и/или 294 полноразмерной последовательности рецептора трансферрина человека (SEQ ID NO: 235). Белок с модифицированным доменом СНЗ может связываться с рецептором трансферрина без блокирования или иного ингибирования связывания

трансферрина с рецептором. В некоторых вариантах осуществления не происходит существенного ингибирования связывания трансферрина с TfR. В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR ингибируется менее чем на около 50% (например, менее чем на около 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%). В некоторых вариантах осуществления связывание трансферрина с TfR ингибируется менее чем на около 20% (например, менее чем на около 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%). Иллюстративные белки с доменом СНЗ, которые демонстрируют такую специфичность связывания, включают белки, имеющие аминокислотные замены в позициях 157, 159, 160, 161, 162, 163, 186, 189 и 194, определенных со ссылкой на аминокислоты 114-220 в SEQ ID NO: 1.

Группа СНЗ для связывания рецептора трансферрина (i): 157, 159, 160, 161, 162, 163, 186, 189 и 194

[0286] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, описанный в данном документе, содержит по меньшей мере три или по меньшей мере четыре и, как правило, пять, шесть, семь, восемь или девять замен в группе аминокислотных позиций, содержащей 157, 159, 160, 161, 162, 163, 186, 189 и 194 (группа i). Иллюстративные замены, которые можно вносить в эти позиции, приведены в таблицах В и С. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 161 и/или 194 представляет собой ароматическую аминокислоту, например Trp, Phe или Tyr. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 161 представляет собой Trp. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в позиции 161 представляет собой Gly. В некоторых вариантах осуществления ароматическая аминокислота в позиции 194 представляет собой Trp или Phe.

[0287] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, который специфически связывается с рецептором трансферрина, содержит по меньшей мере одну позицию, имеющую замену относительно SEQ ID NO: 1, следующим образом: Leu, Tyr, Met или Val в позиции 157; Leu, Thr, His или Pro в позиции 159; Val, Pro или кислую аминокислоту в позиции 160; ароматическую аминокислоту, например, Trp или Gly (например, Trp) в позиции 161; Val, Ser или Ala в позиции 162; кислую аминокислоту, Ala, Ser, Leu, Thr или Pro в позиции 186; Thr или кислую аминокислоту в позиции 189; или Trp, Tyr, His или Phe в позиции 194. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ содержит две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь позиций, выбранных из следующих: позиция 157 представляет собой Leu, Tyr, Met или Val; позиция 159 представляет собой Leu, Thr, His или Pro; позиция 160 представляет собой Val,

Pro или кислую аминокислоту; позиция 161 представляет собой Trp или Gly; позиция 162 представляет собой Val, Ser или Ala; позиция 186 представляет собой Glu, Ala, Ser, Leu, Thr или Pro; позиция 189 представляет собой Thr или кислую аминокислоту; и позиция 194 представляет собой Trp, Tyr, His или Phe. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ содержит Leu или Met в позиции 157; Leu, His или Pro в позиции 159; Val в позиции 160; Trp или Gly в позиции 161; Val или Ala в позиции 162; Pro в позиции 186; Thr в позиции 189; и/или Trp в позиции 194. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать консервативную замену, например аминокислотой из одной и той же группы по заряду, группы по гидрофобности, группы по структуре боковой цепи (например, ароматические аминокислоты) или группы по размеру и/или полярной или неполярной группы указанной аминокислоты, в одной или большем количестве позиций в группе. Таким образом, Leu может присутствовать в позиции 157, 159 и/или в позиции 186. В некоторых вариантах осуществления кислая аминокислота в одной, двух или в каждой из позиций 160, 186 и 189 представляет собой Glu. В других вариантах осуществления кислая аминокислота в одной, двух или в каждой из позиций 160, 186 и 189 представляет собой Asp. В некоторых вариантах осуществления две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь позиций 157, 159, 160, 161, 162, 186, 189 и 194 имеют аминокислотную замену, указанную в этом параграфе.

[0288] В некоторых вариантах осуществления белок с доменом СНЗ, имеющий модификации в группе (i), содержит нативный Asn в позиции 163. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala или Asp в позиции 163. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ дополнительно содержит одну, две, три или четыре замены в позициях, включающих 153, 164, 165 и 188. В некоторых вариантах осуществления в позиции 153 могут присутствовать Trp, Tyr, Leu или Gln. В некоторых вариантах осуществления в позиции 164 могут присутствовать Ser, Thr, Gln или Phe. В некоторых вариантах осуществления в позиции 165 могут присутствовать Gln, Phe или His. В некоторых вариантах осуществления в позиции 188 может присутствовать Glu.

[0289] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять позиций, выбранных из следующих: Trp, Leu или Glu в позиции 153; Tyr или Phe в позиции 157; Thr в позиции 159; Glu в позиции 160; Trp в позиции 161; Ser, Ala, Val или Asn в позиции 162; Ser или Asn в позиции 163; Thr или Ser в позиции 186; Glu или Ser в позиции 188; Glu в позиции 189; и/или Phe в позиции 194. В некоторых вариантах осуществления белок с

модифицированным доменом СНЗ содержит все одиннадцать из следующих позиций: Trp, Leu или Glu в позиции 153; Tyr или Phe в позиции 157; Thr в позиции 159; Glu в позиции 160; Trp в позиции 161; Ser, Ala, Val или Asn в позиции 162; Ser или Asn в позиции 163; Thr или Ser в позиции 186; Glu или Ser в позиции 188; Glu в позиции 189; и/или Phe в позиции 194.

5 [0290] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Leu или Met в позиции 157; Leu, His или Pro в позиции 159; Val в позиции 160; Trp в позиции 161; Val или Ala в позиции 162; Pro в позиции 186; Thr в позиции 189; и/или Trp в позиции 194. В некоторых вариантах осуществления белок с
10 модифицированным доменом СНЗ дополнительно содержит Ser, Thr, Gln или Phe в позиции 164. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ дополнительно содержит Trp, Tyr, Leu или Gln в позиции 153 и/или Gln, Phe или His в позиции 165. В некоторых вариантах осуществления Trp присутствует в позиции 153 и/или Gln присутствует в позиции 165. В некоторых вариантах осуществления белок с
15 модифицированным доменом СНЗ не имеет Trp в позиции 153.

[0291] В других вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Tyr в позиции 157; Thr в позиции 159; Glu или Val в позиции 160; Trp в позиции 161; Ser в позиции 162; Ser или Thr в позиции 186; Glu в позиции 189; и/или Phe в позиции 194. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ
20 содержит Asn в позиции 163. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ дополнительно содержит Trp, Tyr, Leu или Gln в позиции 153; и/или Glu в позиции 188. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ дополнительно содержит Trp в позиции 153 и/или Glu в позиции 188.

25 [0292] В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ содержит одну или более из следующих замен: Trp в позиции 153; Thr в позиции 159; Trp в позиции 161; Val в позиции 162; Ser или Thr в позиции 186; Glu в позиции 188; и/или Phe в позиции 194.

[0293] В дополнительных вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ
30 дополнительно содержит одну, две или три позиции, выбранных из следующих: позиция 187 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; позиция 197 представляет собой Ser, Thr, Glu или Lys; и позиция 199 представляет собой Ser, Trp или Gly.

[0294] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, который специфически связывает рецептор трансферрина, имеет по меньшей мере
35 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80%

идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотами 114-220 любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления такой белок с модифицированным доменом СНЗ содержит аминокислоты 157-163 и/или 186-194 любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления такой белок с модифицированным доменом СНЗ содержит аминокислоты 153-163 и/или 186-194 любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит аминокислоты 153-163 и/или 186-199 любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления остатки по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 (например, от 11 до 16) позиций, соответствующих позициям 153, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 186, 187, 188, 189, 194, 197 и 199, определенным со ссылкой на SEQ ID NO: 1, не удалены и не заменены в SEQ ID NO: 4-29, 236-299 645, 650 или 746.

[0295] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, который специфически связывает рецептор трансферрина, имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотами 114-220 SEQ ID NO: 1 или 634, при условии, что процент идентичности не включает группу позиций 157, 159, 160, 161, 162, 163, 186, 189 и 194. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит аминокислоты 157-163 и/или аминокислоты 186-194, приведенные в любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746.

[0296] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, при условии, что по меньшей мере пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, или шестнадцать позиций, соответствующих позициям 153, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 186, 187,

188, 189, 194, 197 и 199 любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, не удалены или не заменены.

[0297] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ имеет по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NOS:4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 and 746 и также содержит по меньшей мере пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать или шестнадцать следующих позиций: Trp, Tyr, Leu, Gln или Glu в позиции 153; Leu, Tyr, Met или Val в позиции 157; Leu, Thr, His или Pro в позиции 159; Val, Pro или кислотную аминокислоту в позиции 160; ароматическую аминокислоту, например Trp, в позиции 161; Val, Ser или Ala в позиции 162; Ser или Asn в позиции 163; Ser, Thr, Gln или Phe в позиции 164; Gln, Phe или His в позиции 165; кислотную аминокислоту, Ala, Ser, Leu, Thr или Pro в позиции 186; Lys, Arg, Gly или Pro в позиции 187; Glu или Ser в позиции 188; Thr или кислотную аминокислоту в позиции 189; Trp, Tyr, His или Phe в позиции 194; Ser, Thr, Glu или Lys в позиции 197; и Ser, Trp или Gly в позиции 199.

[0298] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, описанный в данном документе, содержит одну или большее количество замен в группе аминокислотных позиций, содержащей 153, 157, 159, 160, 162, 163, 186, 188, 189, 194, 197 и 199; и при этом замены и позиции определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ содержит Glu, Leu, Ser, Val, Trp или Tyr в позиции 153; ароматическую аминокислоту (например, Tyr, Phe или Trp), Met, Pro или Val в позиции 157; Thr, Asn или Val в позиции 159; Glu, Ile, Pro или Val в позиции 160; алифатическую аминокислоту (например, Ala, Ile или Val), Ser или Thr в позиции 162; Ser, Asn, Arg или Thr в позиции 163; Thr, His или Ser в позиции 186; Glu, Ser, Asp, Gly, Thr, Pro, Gln или Arg в позиции 188; Glu или Arg в позиции 189; Phe, His, Lys, Tyr или Trp в позиции 194; Ser, Thr или Trp в позиции 197; и Ser, Cys, Pro, Met или Trp в позиции 199. Белок с модифицированным доменом СНЗ может иметь последовательность:

30 GQPREPQVYTLPPS-
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVX₁WESX₂GX₃X₄WX₅X₆YKTTTPVLDSDGSFFLYS-
KLTVMX₇KX₈X₉WQQGX₁₀VFX₁₁CX₁₂VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:556),
где X₁ представляет собой E, L, S, V, W или Y; X₂ представляет собой ароматическую
аминокислоту (например, Y, F или W), M, P или V; X₃ представляет собой T, N или V; X₄
35 представляет собой E, I, P или V; X₅ представляет собой алифатическую аминокислоту

(например, А, I или V), S или T; X₆ представляет собой S, N, R или T; X₇ представляет собой T, H или S; X₈ представляет собой E, S, D, G, T, P, Q или R; X₉ представляет собой E or R; X₁₀ представляет собой F, H, K, Y или W; X₁₁ представляет собой S, T или W; и X₁₂ представляет собой S, C, P, M или W. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать последовательность: X₁WESX₂GX₃X₄WX₅X₆ (SEQ ID NO:554), где X₁ представляет собой E, L, S, V, W или Y; X₂ представляет собой ароматическую аминокислоту (например, Y, F или W), M, P или V; X₃ представляет собой T, N или V; X₄ представляет собой E, I, P или V; X₅ представляет собой алифатическую аминокислоту (например, А, I или V), S или T; и X₆ представляет собой S, N, R или T. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать последовательность: X₁KX₂X₃WQQGX₄VFX₅CX₆ (SEQ ID NO:555), где X₁ представляет собой T, H или S; X₂ представляет собой E, S, D, G, T, P, Q или R; X₃ представляет собой E или R; X₄ представляет собой F, H, K, Y или W; X₅ представляет собой S, T или W; и X₆ представляет собой S, C, P, M или W.

[0299] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Glu, Leu или Trp в позиции 153; ароматическую аминокислоту в позиции 157; Thr в позиции 159; Glu в позиции 160; алифатическую аминокислоту или Ser в позиции 162; Ser или Asn в позиции 163; Thr или Ser в позиции 186; Glu или Ser в позиции 188; Glu в позиции 189; Phe, His, Tyr или Trp в позиции 194; Ser в позиции 197; и Ser в позиции 199, при этом замены и позиции определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 13. В конкретных вариантах осуществления ароматическая аминокислота в позиции 157 представляет собой Tyr или Phe, а алифатическая аминокислота в позиции 162 представляет собой Ala или Val. В других вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Glu, Leu или Trp в позиции 153; Tyr или Phe в позиции 157; Thr в позиции 159; Glu в позиции 160; Ala, Val или Ser в позиции 162; Ser или Asn в позиции 163; Thr или Ser в позиции 186; Glu или Ser в позиции 188; Glu в позиции 189; Phe в позиции 194; Ser в позиции 197; и Ser в позиции 199, при этом замены и позиции определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 13.

[0300] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, описанный в данном документе, содержит только одну замену в группе аминокислотных позиций, содержащей 153, 157, 159, 160, 162, 163, 186, 188, 189, 194, 197 и 199; и при этом замены и позиции определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 238. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Glu, Leu, Ser, Val, Trp или Tyr в позиции 153. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Glu в позиции 153. Белок с модифицированным доменом

Ser в позиции 186. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Glu, Ser, Asp, Gly, Thr, Pro, Gln или Arg в позиции 188. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Glu в позиции 188. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Ser в позиции 188. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Asp в позиции 188. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Gly в позиции 188. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Thr в позиции 188. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Pro в позиции 188. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Gln в позиции 188. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Arg в позиции 188. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Glu или Arg в позиции 189. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Glu в позиции 189. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Arg в позиции 189. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Phe, His, Lys, Tyr или Trp в позиции 194. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Phe в позиции 194. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать His в позиции 194. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Lys в позиции 194. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Tyr в позиции 194. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Trp в позиции 194. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Ser, Thr или Trp в позиции 197. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Ser в позиции 197. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Thr в позиции 197. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Trp в позиции 197. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Ser, Cys, Pro, Met или Trp в позиции 199. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Ser в позиции 199. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Cys в позиции 199. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Pro в позиции 199. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Met в позиции 199. Белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать Trp в позиции 199.

[0301] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, описанный в данном документе, содержит одну или большее количество замен в группе аминокислотных позиций, содержащей 153, 157, 159, 160, 162, 163, 164, 186, 189 и 194; при этом замены и позиции определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ содержит Glu или

Trp в позиции 153; Val, Trp, Leu или Tyr в позиции 157; Leu, Pro, Phe, Thr или His в позиции 159; Pro, Val или Glu в позиции 160; Ala, Ser, Val или Gly в позиции 162; Leu, His, Gln, Gly, Val, Ala, Asn, Asp, Thr или Glu в позиции 163; Thr, Phe, Gln, Val или Tyr в позиции 164; Leu, Ser, Glu, Ala или Pro в позиции 186; Glu, Asp, Thr или Asn в позиции 189; и Trp, Tyr, Phe или His в позиции 194.

[0302] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Glu или Trp в позиции 153; Trp, Leu или Tyr в позиции 157; Thr или His в позиции 159; Val в позиции 160; Ala, Ser или Val в позиции 162; Val, Asn или Thr в позиции 163; Gln или Tyr в позиции 164; Pro в позиции 186; Thr или Asn в позиции 189; и Trp, Tyr, Phe или His в позиции 194, при этом замены и позиции определены со ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 9.

[0303] В дополнительных вариантах осуществления белок, связывающий рецептор трансферрина, содержит аминокислоты 157-194, аминокислоты 153-194 или аминокислоты 153-199 любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299 и 422-435. В дополнительных вариантах осуществления белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотами 157-194 любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, или с аминокислотами 153-194, или с аминокислотами 153-199 любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746.

[0304] В некоторых вариантах осуществления белок содержит любую из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645-650 и 746. В дополнительных вариантах осуществления белок содержит любую из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645-650 и 746 без первых трех аминокислот «PCP» на аминоконце. В дополнительных вариантах осуществления белок может иметь по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, определенных без первых трех аминокислот «PCP» на аминоконце.

Группа СНЗ для связывания рецептора трансферрина (ii): 118, 119, 120, 122, 210, 211, 212 и 213

[0305] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ, описанный в данном документе, содержит по меньшей мере три или по меньшей мере четыре и, как правило, пять, шесть, семь или восемь замен в группе аминокислотных позиций, содержащей 118, 119, 120, 122, 210, 211, 212 и 213 (группа ii). Иллюстративные замены, которые можно вносить в эти позиции приведены в таблице А. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит Gly в позиции 210; Phe в позиции 211; и/или Asp в позиции 213. В некоторых вариантах осуществления Glu присутствует в позиции 213. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ содержит по меньшей мере одну замену в следующих позициях: Phe или Ile в позиции 118; Asp, Glu, Gly, Ala или Lys в позиции 119; Tyr, Met, Leu, Ile или Asp в позиции 120; Thr или Ala в позиции 122; Gly в позиции 210; Phe в позиции 211; His, Tyr, Ser или Phe в позиции 212; или Asp в позиции 213. В некоторых вариантах осуществления две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь позиций 118, 119, 120, 122, 210, 211, 212 и 213 имеют замену, указанную в этом параграфе. В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ может содержать консервативную замену, например аминокислотой из одной и той же группы по заряду, группы по гидрофобности, группы по структуре боковой цепи (например, ароматические аминокислоты) или группы по размеру и/или полярной или неполярной группы указанной аминокислоты, в одной или большем количестве позиций в группе.

[0306] В некоторых вариантах осуществления белок с модифицированным доменом СНЗ имеет по меньшей мере 70% идентичности, по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотами 114-220 SEQ ID NO: 1 или 634, при условии, что процент идентичности не включает группу позиций 118, 119, 120, 122, 210, 211, 212 и 213.

Иллюстративные белки, содержащие модифицированные домены СН2 или СНЗ

[0307] Модифицированный константный домен (например, СНЗ), описанный в данном документе, может быть присоединен к другому домену Fc-полипептида. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СНЗ, описанный в данном документе, может быть присоединен к домену СН2, который может представлять собой встречающийся в природе домен СН2 или вариантный домен СН2, как правило, на С-конце домена СН2. В некоторых вариантах осуществления модифицированный домен СН2,

описанный в данном документе, может быть присоединен к домену СНЗ, который может представлять собой встречающийся в природе домен СНЗ или вариантный домен СНЗ, как правило, на N-конце домена СНЗ. В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий модифицированный домен СНЗ, присоединенный к домену СН2, или модифицированный домен СН2, присоединенный к домену СНЗ, дополнительно содержит частичную или полную шарнирную область антитела, что приводит к формату, в котором модифицированный домен СН2 или СНЗ является частью Fc-полипептида, имеющего частичную или полную шарнирную область. Шарнирная область может относиться к любому подклассу или изотипу иммуноглобулина. Иллюстративной шарнирной областью иммуноглобулина является шарнирная область IgG, такая как шарнирная область IgG1, например, аминокислотная последовательность шарнирной области IgG1 человека EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 234) или ее части, приведенные в SEQ ID NO: 232-233. В дополнительных вариантах осуществления белок, который может иметь Fc-формат, содержащий шарнирную область или частичную шарнирную область, дополнительно присоединен к другому фрагменту, например, Fab-фрагменту или его части с образованием тем самым слияния Fab-Fc, связывающего рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления слияние Fab-Fc, связывающее рецептор трансферрина, содержит модифицированный домен СН2 или СНЗ и Fab-фрагмент или его часть. Fab-фрагмент может быть нацеливающим или ненацеливающим. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент является нацеливающим. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент является ненацеливающим. В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент не связывается специфически с трансферрином посредством переменных областей своей тяжелой или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления TfR-связывающий белок, описанный в данном документе, не содержит Fab-фрагмент или его часть. В некоторых вариантах осуществления TfR-связывающий белок, описанный в данном документе, не содержит антигенсвязывающую часть или часть переменного домена Fab-фрагмента. В некоторых вариантах осуществления TfR-связывающий белок, описанный в данном документе, не содержит антигенсвязывающий домен антитела или переменный домен антитела.

30 **[0308]** В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, содержащий модифицированный домен СН2 или СНЗ, описанный в данном документе, или слияние Fab-Fc, содержащее модифицированный домен СН2 или СНЗ, описанный в данном документе, представляет собой субъединицу димера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления белок, описанный в данном документе, может содержать димер Fc-полипептида или слияние Fab-Fc-димер, содержащее первый Fc-полипептид, содержащий

35

модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом. В некоторых вариантах осуществления димер представляет собой гетеродимер. В некоторых вариантах осуществления димер представляет собой гомодимер. В некоторых вариантах осуществления димер содержит один полипептид, который связывается с рецептором трансферрина, т. е. является 5 одновалентным в отношении связывания рецептора трансферрина. В некоторых вариантах осуществления димер содержит второй полипептид, который связывается с рецептором трансферрина. Второй полипептид может содержать такой же модифицированный домен CH2/CH3, присутствующий в слиянии Fc-Fab, для обеспечения двухвалентного 10 связывающего гомодимера, или второй модифицированный домен CH2/CH3, описанный в данном документе, может обеспечивать второй сайт связывания рецептора трансферрина. В некоторых вариантах осуществления димер содержит первую субъединицу, содержащую модифицированный домен CH2 или CH3, и вторую субъединицу, содержащую модифицированные домены CH2 или CH3, при этом ни один из них не связывает рецептор 15 трансферрина.

[0309] Белки, связывающие рецептор трансферрина, описанные в данном документе, могут иметь широкий диапазон значений аффинности связывания, например, в зависимости от формата белка. Например, в некоторых вариантах осуществления белок, содержащий модифицированный домен CH3, имеет аффинность в отношении связывания рецептора 20 трансферрина в диапазоне от 1 пМ до 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность можно измерять в одновалентном формате. В других вариантах осуществления аффинность можно измерять в двухвалентном формате, например, в виде димера, содержащего слитый белок полипептид-Fab.

[0310] Способы анализа аффинности связывания, кинетики связывания и перекрестной 25 реактивности известны в данной области техники. Эти способы включают, но не ограничиваются этим, твердофазные анализы связывания (например, анализ ELISA), иммунопреципитацию, поверхностный плазмонный резонанс (например, Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)), анализы кинетического исключения (например, KinExA®), проточную цитометрию, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), 30 биослойную интерферометрию (например, Octet® (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA)), и вестерн-блот анализ. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания и/или перекрестной реактивности используют анализ ELISA. Способы проведения анализов ELISA известны в данной области техники и также описаны в разделе примеров ниже. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности 35 связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности используют

поверхностный плазмонный резонанс (ППР). В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности используют анализ кинетического исключения. В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности связывания, кинетики связывания и/или перекрестной реактивности используют биослойную интерферометрию.

Дополнительные мутации в Fc-полипептиде

[0311] Как описано в данном документе, константный домен, модифицированный для связывания с TfR, может содержаться в Fc-полипептиде или в слиянии Fab-Fc. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать дополнительные мутации, например, для повышения сывороточной стабильности, модуляции эффекторной функции, влияния на гликозилирование, снижение иммуногенности для людей и/или обеспечения гетеродимеризации полипептида по принципу выступов и впадин. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе, может быть дополнительно модифицирован для удаления C-концевого остатка Lys (т. е. остатка Lys в позиции 220, пронумерованного со ссылкой на SEQ ID NO: 1)).

[0312] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, модифицированный для связывания с TfR, может димеризоваться со вторым Fc-полипептидом. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления белок, описанный в данном документе, может содержать Fc-димер, содержащий модифицированный домен CH2 или CH3 в первом полипептиде; и второй Fc-полипептид. Таким образом, в некоторых аспектах белок, описанный в данном документе, содержит два Fc-полипептида, при этом каждый из одного или обоих Fc-полипептидов содержит независимо выбранные модификации (например, модификацию или мутацию, описанную в данном документе).

[0313] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе, имеет идентичность аминокислотной последовательности, составляющую по меньшей мере около 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, с соответствующим Fc-полипептидом дикого типа (например, Fc-полипептидом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека).

[0314] В некоторых вариантах осуществления полипептиды, присутствующие в Fc-димере, могут содержать мутации выступов и впадин, способствующие образованию гетеродимера. Обычно этот метод включает внесение выпуклости («выступа») на поверхности контакта одного полипептида и соответствующей полости («впадины») на поверхности контакта другого полипептида. Выпуклости конструируют путем замены

небольших аминокислотных боковых цепей на поверхности контакта первого полипептида более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие полости идентичного или подобного размера с выпуклостям создают на границе контакта второго полипептида путем замены больших боковых цепей аминокислот меньшими (например, аланином или треонином). Такие дополнительные мутации находятся в позиции в полипептиде, которая не оказывает отрицательного влияния на связывание модифицированного домена CH2 или CH3 с рецептором трансферрина.

5 [0315] В одном иллюстративном варианте осуществления подхода к димеризации по принципу выступов и впадин позиция, соответствующая позиции 139 последовательности SEQ ID NO: 1 первой субъединицы Fc-полипептида, подлежащей димеризации, содержит триптофан вместо нативного треонина, а вторая субъединица Fc-полипептида димера содержит валин в позиции, соответствующей позиции 180 последовательности SEQ ID NO: 1 вместо нативного тирозина. Вторая субъединица Fc-полипептида может дополнительно содержать замену, в которой нативный треонин в позиции, соответствующей позиции 139 10 последовательности SEQ ID NO: 1, замещен серином, а нативный лейцин в позиции, соответствующей позиции 141 последовательности SEQ ID NO: 1, замещен аланином.

15 [0316] Полипептид, описанный в данном документе, также может быть сконструирован так, чтобы содержать другие модификации для гетеродимеризации, например, электростатическое конструирование контактных остатков на поверхности контакта CH3-CH3, которые являются модификациями природно-заряженных или гидрофобных участков.

[0317] В некоторых вариантах осуществления можно вносить модификации для увеличения сывороточного времени полужизни. Например, в некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит домен CH2, содержащий Tyr в позиции, соответствующей позиции 25 в SEQ ID NO: 1, Thr в позиции, соответствующей 27 в SEQ ID NO: 1, и Glu в позиции, соответствующей позиции 29 в SEQ ID NO: 1.

[0318] В некоторых вариантах осуществления мутацию, например замену, вносят в одну или большее количество позиций 17-30, 52-57, 80-90, 156-163 и 201-208, определенных со ссылкой на SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одну или большее количество мутаций вносят в позициях 24, 25, 27, 28, 29, 80, 81, 82, 84, 85, 87, 158, 159, 160, 162, 201, 206, 207 или 209, определенных со ссылкой на SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутации вносят в одну или две из позиций 201 и 207, определенных со ссылкой на SEQ ID NO: 1 (например, M201L и N207S). В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе, дополнительно 30 содержит мутацию N207S или N207A с или без M201L. В некоторых вариантах 35

осуществления полипептид, описанный в данном документе, содержит замену в одной, двух или во всех трех позициях T80, E153 и N207, пронумерованных со ссылкой на SEQ ID NO: 1 (например, T80Q и N207A или T80A, E153A и N207A). В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе, содержит замены в позициях T23 и M201, пронумерованных со ссылкой на SEQ ID NO: 1 (например, T23Q и M201L).

5 [0319] В некоторых вариантах осуществления С-концевой остаток Lys удален или отсутствует в Fc-полипептиде, описанном в данном документе (т. е. удален или отсутствует остаток Lys в позиции 220, пронумерованной со ссылкой на SEQ ID NO: 1) или в белке, содержащем Fc-полипептид, описанный в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления С-концевой остаток Lys может быть удален или отсутствовать в любой из SEQ ID NO: 1, 4-29, 236-299, 302, 361-372, 397-408, 421-435, 491-497, 521-518, 557-561, 623-633, 655, 702-731, 743-744, 801-810 и 812-818. Иллюстративные усеченные последовательности Fc-полипептида или белки, содержащие такие усеченные последовательности Fc-полипептида, включают, например, SEQ ID NO: 634-654, 733-742 и 15 745-746.

Fc-эффекторные функции

[0320] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный домен CH2 или CH3, и/или второй Fc-полипептид имеет эффекторную функцию, т. е. они обладают способностью индуцировать определенные биологические функции при связывании с Fc-рецептором, экспрессируемым на эффекторной клетке, которая опосредует эффекторную функцию. Эффекторные клетки включают, но не ограничиваются этим, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, тромбоциты, В-клетки, крупные гранулярные лимфоциты, клетки Лангерганса, естественные клетки-киллеры (NK) и цитотоксические Т-клетки.

20

[0321] Примеры эффекторных функций антител включают, но не ограничиваются этим, связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), связывание Fc-рецептора, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (АЗКФ), снижение уровня экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток) и активацию В-клеток. Эффекторные функции могут варьироваться в зависимости от класса антитела. Например, нативные антитела IgG1 и IgG3 человека могут вызывать активность АЗКЦ и КЗЦ при связывании с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим на клетке иммунной системы; а нативные IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека могут вызывать функции АЗКФ при связывании с соответствующим Fc-рецептором, присутствующим на

30

35

иммунной клетке.

[0322] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе, может содержать дополнительные модификации, которые снижают эффекторную функцию или устраняют эффекторную функцию. В некоторых альтернативных вариантах осуществления первый полипептид, содержащий модифицированный домен CH2 или CH3, описанный в данном документе, и/или второй полипептид могут содержать дополнительные модификации, которые усиливают эффекторную функцию.

[0323] Иллюстративные мутации Fc-полипептида, которые модулируют эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются этим, замены в домене CH2, например, в позициях, соответствующих позициям 7 и 8 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления замены в модифицированном домене CH2 включают Ala в позициях 7 и 8 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления замены в модифицированном домене CH2 включают Ala в позициях 7 и 8 и Gly в позиции 102 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления замены в модифицированном домене CH2 включают Ala в позициях 7 и 8 и Ser в позиции 102 SEQ ID NO: 1.

[0324] Дополнительные мутации Fc-полипептида, которые модулируют эффекторную функцию, включают, но не ограничиваются этим, одну или большее количество замен в позициях 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (схема нумерации EU, что соответствует позициям 11, 38, 42, 43, 70, 100 и 102, пронумерованным со ссылкой на SEQ ID NO: 1). Иллюстративные замены (пронумерованные по схеме нумерации EU) включают следующие: позиция 329 может содержать мутацию, при которой пролин замещается глицином, аланином, серином или аргинином или аминокислотным остатком, достаточно большим для разрушения поверхности контакта Fc/Fc γ -рецептора, образовавшейся между пролином 329 Fc и остатками триптофана Trp 87 и Trp 110 Fc γ RIII. Дополнительные иллюстративные замены включают S228P, E233P, L235E, N297A, N297D и P331S. Также могут присутствовать множественные замены, например, L234A и L235A Fc-полипептида IgG1 человека; L234A, L235A и P329G Fc-полипептида IgG1 человека; L234A, L235A и P329S Fc-полипептида IgG1 человека; S228P и L235E Fc-полипептида IgG4 человека; L234A и G237A Fc-полипептида IgG1 человека; L234A, L235A и G237A Fc-полипептида IgG1 человека; V234A и G237A Fc-полипептида IgG2 человека; L235A, G237A и E318A Fc-полипептида IgG4 человека; и S228P и L236E Fc-полипептида IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе, может иметь одну или большее количество аминокислотных замен, которые модулируют АЗКЦ, например замены в позициях 298, 333 и/или 334 Fc-полипептида в соответствии со схемой нумерации

EU.

5 [0325] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе, может иметь одну или большее количество аминокислотных замен, которые повышают или снижают АЗКЦ, или может содержать мутации, которые изменяют связывание С1q и/или КЗЦ.

Иллюстративные полипептиды, содержащие дополнительные мутации

10 [0326] Полипептид, описанный в данном документе, такой как полипептид, содержащий модифицированный домен СНЗ (например, любой из клонов СНЗС.35.20.1, СНЗС.35.23.2, СНЗС.35.23.3, СНЗС.35.23.4, СНЗС.35.21.17.2, СНЗС.35.23, СНЗС.35.21, СНЗС.35.20.1.1, СНЗС.23.2.1 и СНЗС.35.23.1.1), и/или второй полипептид могут содержать мутации, включая мутацию выступа (например, Т139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации впадины (например, Т139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и/или мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii) N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

20 [0327] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, любой из клонов СНЗС.35.20.1, СНЗС.35.23.2, СНЗС.35.23.3, СНЗС.35.23.4, СНЗС.35.21.17.2, СНЗС.35.23, СНЗС.35.21, СНЗС.35.20.1.1, СНЗС.23.2.1 и СНЗС.35.23.1.1), может иметь мутацию выступа (например, Т139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, может быть модифицирован, чтобы содержать мутацию выступа. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, второй Fc-полипептид), может иметь мутацию выступа (например, Т139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей

мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 634. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или 634, может быть модифицирован, чтобы содержать мутацию выступа.

[0328] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, любой из клонов CH3C.35.20.1, CH3C.35.23.2, CH3C.35.23.3, CH3C.35.23.4, CH3C.35.21.17.2, CH3C.35.23, CH3C.35.21, CH3C.35.20.1.1, CH3C.23.2.1 и CH3C.35.23.1.1), может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, может быть модифицирован, чтобы содержать мутацию выступа и мутации, которые модулируют эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, второй Fc-полипептид), может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 634. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или 634, может быть модифицирован, чтобы содержать мутацию выступа и мутации, которые модулируют эффекторную функцию.

[0329] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, любой из клонов CH3C.35.20.1, CH3C.35.23.2, CH3C.35.23.3, CH3C.35.23.4, CH3C.35.21.17.2, CH3C.35.23, CH3C.35.21, CH3C.35.20.1.1, CH3C.23.2.1 и CH3C.35.23.1.1), может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii)

N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, может быть модифицирован, чтобы содержать мутацию выступа и мутации, которые повышают сывороточную стабильность. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, второй Fc-полипептид), может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii) N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 634. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или 634, может быть модифицирован, чтобы содержать мутацию выступа и мутации, которые повышают сывороточную стабильность.

[0330] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, любой из клонов CH3C.35.20.1, CH3C.35.23.2, CH3C.35.23.3, CH3C.35.23.4, CH3C.35.21.17.2, CH3C.35.23, CH3C.35.21, CH3C.35.20.1.1, CH3C.23.2.1 и CH3C.35.23.1.1), может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii) N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435,

645, 650 и 746, может быть модифицирован, чтобы содержать мутацию выступа, мутации, которые модулируют эффекторную функцию, и мутации, которые повышают сывороточную стабильность. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, второй Fc-полипептид), может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii) N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 634. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или 634, может быть модифицирован, чтобы содержать мутацию выступа, мутации, которые модулируют эффекторную функцию, и мутации, которые повышают сывороточную стабильность.

[0331] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, любой из клонов CH3C.35.20.1, CH3C.35.23.2, CH3C.35.23.3, CH3C.35.23.4, CH3C.35.21.17.2, CH3C.35.23, CH3C.35.21, CH3C.35.20.1.1, CH3C.23.2.1 и CH3C.35.23.1.1), может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, может быть модифицирован, чтобы содержать мутации впадины. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, второй Fc-полипептид), может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 634. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий

последовательность SEQ ID NO: 1 или 634, может быть модифицирован, чтобы содержать мутации впадины.

[0332] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, любой из клонов СНЗС.35.20.1, СНЗС.35.23.2, СНЗС.35.23.3, СНЗС.35.23.4, СНЗС.35.21.17.2, СНЗС.35.23, СНЗС.35.21, СНЗС.35.20.1.1, СНЗС.23.2.1 и СНЗС.35.23.1.1), может иметь мутации впадины (например, Т139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, может быть модифицирован, чтобы содержать мутации впадины и мутации, которые модулируют эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, второй Fc-полипептид), может иметь мутации впадины (например, Т139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 1 или 634. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или 634, может быть модифицирован, чтобы содержать мутации впадины и мутации, которые модулируют эффекторную функцию.

[0333] В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, любой из клонов СНЗС.35.20.1, СНЗС.35.23.2, СНЗС.35.23.3, СНЗС.35.23.4, СНЗС.35.21.17.2, СНЗС.35.23, СНЗС.35.21, СНЗС.35.20.1.1, СНЗС.23.2.1 и СНЗС.35.23.1.1), может иметь мутации впадины (например, Т139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii) N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой

на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, может быть модифицирован, чтобы содержать мутации впадины и мутации, которые повышают сывороточную стабильность. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, второй Fc-полипептид), может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii) N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 634. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или 634, может быть модифицирован, чтобы содержать мутации впадины и мутации, которые повышают сывороточную стабильность.

20 **[0334]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, любой из клонов CH3C.35.20.1, CH3C.35.23.2, CH3C.35.23.3, CH3C.35.23.4, CH3C.35.21.17.2, CH3C.35.23, CH3C.35.21, CH3C.35.20.1.1, CH3C.23.2.1 и CH3C.35.23.1.1), может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii) N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 422-435, 645, 650 и 746, может быть модифицирован, чтобы содержать мутации

впадины, мутации, которые модулируют эффекторную функцию, и мутации, которые повышают сывороточную стабильность. В некоторых вариантах осуществления полипептид, описанный в данном документе (например, второй Fc-полипептид), может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, (i) M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1 или (ii) N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 634. В некоторых вариантах осуществления полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или 634, может быть модифицирован, чтобы содержать мутации впадины, мутации, которые модулируют эффекторную функцию, и мутации, которые повышают сывороточную стабильность.

Клон CH3C.35.23.2

[0335] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 361 или 646. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа имеет последовательность SEQ ID NO: 361. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа имеет последовательность SEQ ID NO: 646.

[0336] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 362, 363, 632 и 647-649

(например, 362 или 363). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, имеет последовательность SEQ ID NO: 362, 363 или 632. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, имеет последовательность SEQ ID NO: 647-649. В некоторых вариантах осуществления N-конец клона CH3C.35.23.2 с мутацией выступа и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, содержит шарнирную последовательность или часть шарнирной последовательности (смотрите, например, SEQ ID NO: 804 или 741). В некоторых вариантах осуществления N-конец клона CH3C.35.23.2 с мутацией выступа и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, дополнительно присоединен к области CH1 (смотрите, например, SEQ ID NO: 743-745).

[0337] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 364. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 364.

[0338] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 492. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 492.

[0339] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со

ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 365 или 366. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа, мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 365 или 366.

10 **[0340]** В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность
15 (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 493 или 494. В некоторых вариантах
20 осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа, мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 493 или 494.

[0341] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO:
25 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 367. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины имеет последовательность SEQ ID
30 NO: 367.

[0342] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO:
1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S))
35 согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности,

по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 368 или 369. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутациями
5 впадины и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, имеет последовательность SEQ ID NO: 368 или 369.

[0343] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и
10 T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 370. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины
15 и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 370.

[0344] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без
20 M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 495. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины
25 и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 495.

[0345] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или
30 P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности,
35 по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере

мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 371 или 372. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины, мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 371 или 372.

5 **[0346]** В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 496 или 497. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины, мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 496 или 497.

Клон CH3C.35.23.3

20 **[0347]** В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со

ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

[0348] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.3 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

Клон CH3C.35.23.4

[0349] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). Например, в некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 718 или 742. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

[0350] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутации

впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.4 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

Клон CH3C.35.21.17.2

[0351] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 397 или 651. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа имеет последовательность SEQ ID NO: 397. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией

выступа имеет последовательность SEQ ID NO: 651.

[0352] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 398, 399, 633 или 652-654 (например, 398 или 399). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, имеет последовательность SEQ ID NO: 398, 399 или 633. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, имеет последовательность SEQ ID NO: 652-654.

[0353] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 400. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 400.

[0354] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 513. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 513.

[0355] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 401 или 402. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа, мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 401 или 402.

[0356] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 514 или 515. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа, мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 514 или 515.

[0357] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 403. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины имеет последовательность SEQ ID NO: 403.

[0358] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь

мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 404 или 405. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, имеет последовательность SEQ ID NO: 404 или 405.

[0359] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 406. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 406.

[0360] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 516. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 516.

[0361] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают

сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 407 или 408. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины, мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 407 или 408.

[0362] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 517 или 518. В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины, мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, и мутациями, которые повышают сывороточную стабильность, имеет последовательность SEQ ID NO: 517 или 518.

Клон CH3C.35.23

[0363] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В

некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

[0364] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и

L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

Клон CH3C.35.21

5 **[0365]** В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и
10 L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон
15 CH3C.35.21 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со
20 ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со
25 ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

30 **[0366]** В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G
35 или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S) согласно

нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.21 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

Клон CH3C.35.23.1.1

[0367] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1

может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

[0368] В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, M25Y, S27T и T29E согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления клон CH3C.35.23.1.1 может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию

(например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и мутации, которые повышают сывороточную стабильность (например, N207S с или без M201L согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

5 *Fc-полипептиды*

[0369] В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид, содержащий модифицированный домен CH2 или CH3, описанный в данном документе, или слияние Fab-Fc, содержащее модифицированный константный домен, описанный в данном документе, представляет собой субъединицу димера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления белок, описанный в данном документе, может содержать Fc-димер, содержащий константный домен, модифицированный для связывания TfR, в первом полипептиде; и второй Fc-полипептид.

[0370] В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1) и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 557 или 635. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид с мутациями впадины имеет последовательность SEQ ID NO: 557 или 635.

[0371] В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид может иметь мутации впадины (например, T139S, L141A и Y180V согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 558, 627, 628, 636, 637 или 638. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид с мутациями впадины и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, имеет последовательность SEQ ID NO: 558, 627, 628, 636, 637 или 638.

[0372] В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид может иметь мутацию выступа (например, T139W согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), мутации, которые

модулируют эффекторную функцию (например, L7A, L8A и/или P102G или P102S (например, L7A и L8A; L7A, L8A и P102G; или L7A, L8A и P102S)) согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1), и по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 655. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид с мутацией выступа и мутациями, которые модулируют эффекторную функцию, имеет последовательность SEQ ID NO: 655.

10 **Иллюстративные белки, содержащие ненацеливающие Fab-фрагменты**

[0373] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-полипептидов соединен с NTF или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.

[0374] В некоторых вариантах осуществления NTF или его часть содержит несвязывающую вариабельную область (NBVR). NBVR содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи и не связывается специфически с естественным эпитопом у субъекта. В некоторых вариантах осуществления NBVR не связывается специфически с антигеном, экспрессируемым в организме заданного млекопитающего, ткани млекопитающего или типе клеток млекопитающего. Антиген может представлять собой антиген млекопитающего или антиген, присутствующий в организме млекопитающего, например, из инфекционного организма, такого как вирус, бактерия, грибок или паразит. Млекопитающее может представлять собой, но не ограничивается этим, отличного от человека примата, человека или грызуна (например, мышь). NBVR может представлять собой, но не ограничивается этим, scFv.

[0375] Специфическое связывание антитела с антигеном означает аффинность по меньшей мере 10^6 M⁻¹. Специфическое связывание выявляемо сильнее по амплитуде и отличается от неспецифического связывания, происходящего с по меньшей мере одной неродственной мишенью. Неспецифическое связывание часто является результатом действия сил Ван-дер-Ваальса. Отсутствие связывания не означает, что NBVR не связывает никакой антиген с любой аффинностью. Скорее, в некоторых вариантах осуществления NBVR не демонстрирует специфическое связывание с (a) любым белком или эпитопом в клетке млекопитающего, ткани млекопитающего или организме млекопитающего; (b) любой поверхностно-доступный белок или эпитоп клетки млекопитающего или ткани млекопитающего; или (c) любой доступный сывороточный белок или эпитоп в ткани млекопитающего или организме млекопитающего.

[0376] В некоторых вариантах осуществления NBVR представляет собой

гуманизованную NBVR. Гуманизированные Fab могут быть гуманизованы в одном или большем количестве из: переменного домена легкой цепи, переменного домена тяжелой цепи, константного домена легкой цепи и константного домена тяжелой цепи (CH1). Гуманизованная NBVR представляет собой генетически сконструированную NBVR, в которой CDR из нечеловеческого «донорного» антитела привиты в последовательности переменной области тяжелой и/или легкой цепи, константной области легкой цепи и/или CH1 тяжелой цепи человеческого «акцепторного» антитела (смотрите, например, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205; и Foote, US 6881557). Акцепторные последовательности антител могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, совокупность таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека или последовательность зародышевой линии. Таким образом, гуманизованное антитело представляет собой антитело, имеющее по меньшей мере три, четыре, пять или все CDR, полностью или по существу из донорного антитела и полностью или по существу каркасные последовательности переменной области человеческого антитела и/или последовательности константной области. Аналогично, гуманизованная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, а каркасная последовательность переменной области тяжелой цепи и последовательности константной области тяжелой цепи, если они присутствуют, получены по существу из каркасной последовательности переменной области тяжелой цепи и последовательностей константной области. Аналогично, гуманизованная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела, а каркасная последовательность переменной области легкой цепи и последовательности константной области легкой цепи, если они присутствуют, получены по существу из каркасной последовательности переменной области легкой цепи и константной области. CDR в гуманизованном антителе по существу отличается от соответствующей CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (по определению согласно любому традиционному определению, но предпочтительно определению по Kabat) являются идентичными между соответствующими CDR. Каркасные последовательности переменной области цепи антитела или константная область цепи антитела по существу получены из каркасной последовательности переменной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков определению по Kabat являются идентичными.

[0377] В некоторых вариантах осуществления NBVR представляет собой химерную NBVR. Химерная NBVR содержит нечеловеческую переменную область легкой и/или тяжелой цепи и человеческую константную область тяжелой цепи (CH1) и/или легкой цепи.

[0378] В некоторых вариантах осуществления NBVR представляет собой винирную NBVR. Винирная NBVR содержит частично гуманизованную переменную область легкой и/или тяжелой цепи и человеческую константную область тяжелой цепи (CH1) и/или легкой цепи.

[0379] Типовые NBVR включают NBVR1 или NBVR2. Если иное не очевидно из контекста, ссылку на NBVR1 или NBVR2 следует понимать как относящуюся к любой из мышиной, химерной, винирной, гуманизованной и модифицированной форм NBVR1 или NBVR2.

[0380] Типовые NTF включают NBVR1 или NBVR2. Если иное не очевидно из контекста, ссылку на NBVR1 или NBVR2 следует понимать как относящуюся к любой из мышиной, химерной, винирной, гуманизованной и модифицированной форм NBVR1 или NBVR2.

[0381] Последовательности переменных областей легкой и тяжелой цепи NBVR1 обозначены SEQ ID NO: 832 и 837, соответственно. Последовательности легкой и тяжелой цепей NBVR1 обозначены SEQ ID NO: 833 и 838, соответственно.

[0382] В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит последовательности CDR NBVR1. CDR (L1, L2 и L3) легкой цепи NBVR1 обозначены SEQ ID NO: 819, 821 и 823, соответственно. CDR (H1, H2 и H3) тяжелой цепи NBVR1 обозначены SEQ ID NO: 825, 827 и 829, соответственно. В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1 и CDR-H3 из NBVR1 и последовательность и CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 869.

[0383] В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 833 или 835, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846 или 847.

[0384] В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 832, 833 или 835, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей

мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 837, 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846 или 847, и содержит последовательность CDR NBVR1 и сохраняет несвязывающие свойства NBVR1.

5 **[0385]** В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит переменные области легкой цепи и тяжелой цепи, которые отличаются от переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи NBVR1 небольшим количеством функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок. Также включены NBVR, имеющие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR по определению согласно любому
10 традиционному определению, но предпочтительно по Kabat, которые являются на 90%, 95%, 99% или 100% идентичными соответствующим CDR NBVR1 или NBVR2.

[0386] Последовательности переменных областей легкой и тяжелой цепи NBVR2 обозначены SEQ ID NO: 851 и 853, соответственно. Последовательности легкой и тяжелой цепей NBVR2 обозначены SEQ ID NO: 851 и 854, соответственно.

15 **[0387]** В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит последовательности CDR NBVR2. CDR (L1, L2 и L3) легкой цепи NBVR2 обозначены SEQ ID NO: 820, 822 и 824, соответственно. CDR (H1, H2 и H3) тяжелой цепи NBVR2 обозначены SEQ ID NO: 826, 828 и 829, соответственно. В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1 и CDR-H3 из NBVR2 и
20 последовательность и CDR-H2, содержащую SEQ ID NO: 869.

[0388] В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей
25 мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 850, 851 или 852, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO:
30 853, 854, 855, 856, 857, 859, 860, 861 или 862, и содержит последовательность CDR NBVR2 и сохраняет несвязывающие свойства NBVR2.

[0389] В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит переменные области легкой цепи и тяжелой цепи, которые отличаются от переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи NBVR2 небольшим количеством функционально несущественных
35 аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или вставок. Также

включены NBVR, имеющие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR по определению согласно любому традиционному определению, но предпочтительно по Kabat, которые являются на 90%, 95%, 99% или 100% идентичными соответствующим CDR NBVR1 или NBVR2.

[0390] В некоторых вариантах осуществления NBVR содержит переменные области легкой и тяжелой цепи, имеющие некоторые или все (например, 3, 4, 5 и 6) CDR, полностью или практически полученные из NBVR1 или NBVR2. Такие NBVR могут содержать переменную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере две и обычно все три CDR, полностью или по существу полученные из переменной области тяжелой цепи NBVR1 или NBVR2, и/или переменную область легкой цепи, содержащую по меньшей мере две и обычно все три CDR, полностью или по существу полученные из переменной области легкой цепи NBVR1 или NBVR2. CDR по существу получены из соответствующей CDR NBVR1 или NBVR2, если она содержит не более 4, 3, 2 или 1 замены, вставки или делеции, за исключением того, что CDR-H2 (по определению по Kabat) может иметь не более 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замены, вставки или делеции. Такие антитела могут иметь по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с любой из описанных аминокислотных последовательностей легкой цепи и тяжелой цепи NBVR1 или NBVR2 и сохранять свои функциональные свойства и/или отличаться от NBVR1 или NBVR2. В некоторых вариантах осуществления NBVR не демонстрирует специфическое связывание с (a) любым белком или эпитопом в клетке млекопитающего, ткани млекопитающего или организме млекопитающего природного происхождения; (b) любой поверхностно-доступный белок или эпитоп клетки млекопитающего или ткани млекопитающего природного происхождения; или (c) любой доступный сывороточный белок или эпитоп в ткани млекопитающего или организме млекопитающего природного происхождения.

[0391] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь NBVR, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 832, 833, 835, 850, 851 или 852. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь NBVR, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 837, 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846, 847, 853, 854, 855, 856, 857, 859, 860, 861 или 862.

[0392] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь NBVR, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую 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 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 864 или 866. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь NBVR, содержит нуклеотидную последовательность, имеющую 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 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, или 100% идентичности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 865 или 867.

[0393] Описаны клетки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи любой из описанных NBVR. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь NBVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 832, 833 или 835, и нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь NBVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 837, 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846 или 847. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь NBVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 850, 851 и 852, и нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь NBVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 853, 854, 855, 856, 857, 859, 860, 861 или 862. Клетка может представлять собой бактериальную клетку дрожжевую клетку, клетку насекомого или клетку млекопитающего.

Сконструированные варианты белка для конъюгации с «L»

[0394] Как описано в данном документе, TfR-связывающий белок может быть связан с олигонуклеотидом(ами) посредством связывающей группы «L». В одном аспекте белок содержит один или большее количество аминокислотных остатков (например, аминокислотных остатков, которые присутствуют в доступных сайтах белка), которые можно использовать для присоединения белка к L. Например, в одном аспекте белок содержит один или большее количество остатков цистеина (например, остатков цистеина, которые присутствуют в доступных сайтах белка). В некоторых вариантах осуществления белок присоединен к L через остаток цистеина белка (например, через атом серы остатка цистеина). В других вариантах осуществления белок содержит один или большее количество остатков глутамин. В некоторых вариантах осуществления белок присоединен к L через остаток глутамин (например, через амидную связь в боковой цепи остатка глутамин).

[0395] В других аспектах может быть желательно создать сконструированные белки с

одним или большим количеством модифицированных сайтов. Эти модифицированные сайты можно использовать для облегчения присоединения Р к каждому L. Например, Р можно присоединить к каждому L в модифицированном сайте. В других вариантах осуществления модифицированный сайт может обеспечивать присоединение L к 5 аминокислотному остатку, расположенному рядом с модифицированным сайтом (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот от модифицированного сайта, например, в пределах 2 или 3 аминокислот от модифицированного сайта). В конкретных вариантах осуществления такие модифицированные остатки представляют собой замещенные остатки, находящиеся в доступных сайтах белка. В некоторых вариантах 10 осуществления белок, описанный в данном документе, содержит один или большее количество модифицированных сайтов (например, одну или большее количество аминокислотных замен, таких как замена цистеином, аланином или глицином). В некоторых вариантах осуществления белок содержит по меньшей мере или точно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 модифицированных сайтов. В некоторых вариантах осуществления белок 15 содержит от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2 модифицированных сайтов. В некоторых вариантах осуществления белок содержит от 2 до 4 модифицированных сайтов.

[0396] В некоторых вариантах осуществления модифицированный сайт в белке (Р) представляет собой аминокислотную замену или вставку. В некоторых вариантах 20 осуществления белок (Р) представляет собой или содержит Fc-димер, например, когда по меньшей мере один из Fc-полипептидов был модифицирован для связывания TfR. Модифицированный сайт в белке (Р) может находиться в Fc-полипептиде, который связывает TfR, и/или в Fc-полипептиде, который образовал димер с Fc-полипептидом, который связывает TfR. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид(ы) 25 может(гут) быть частью слияния Fab-Fc или слияния Fab-Fc-димер, а модифицированный сайт может находиться в полипептиде Fab-Fc, который связывает TfR, и/или в полипептиде Fab-Fc, который образовал димер с полипептидом Fab-Fc, который связывает TfR.

[0397] В некоторых вариантах осуществления модифицированный сайт находится в домене CL. В некоторых вариантах осуществления модифицированный сайт находится в 30 домене CH1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный сайт находится в домене CH2. В некоторых вариантах осуществления модифицированный сайт находится в домене CH3.

[0398] В некоторых вариантах осуществления модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену. В некоторых вариантах осуществления модифицированный 35 сайт представляет собой замену цистеином, глицином или аланином.

[0399] В некоторых вариантах осуществления модифицированный сайт представляет собой замену цистеином. За счет замещения этих остатков цистеином реакционноспособные тиоловые группы располагаются в доступных сайтах белка и могут использоваться для конъюгации белка (P) с олигонуклеотидом (X) посредством связывающей группы (L) для создания конъюгата, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления белок содержит Fc-полипептид или димер Fc-полипептида и содержит замену цистеином, выбранную из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C и T289C, при этом позиции и замены соответствуют нумерации EU. В других вариантах осуществления Fc-полипептид присоединен к домену CH1 и содержит замену A114C. В других вариантах осуществления белок содержит слияние Fab-Fc, а легкая цепь содержит замену K149C.

[0400] В других аспектах модифицированный сайт представляет собой замену аланином или глицином. Такие модифицированные аминокислоты могут облегчать ферментативную конъюгацию L с белком в близлежащей аминокислоте, такой как остаток глутамина (например, с использованием бактериальной трансглутаминазы (BTG)). Например, в некоторых вариантах осуществления замена аланином/глицином представляет собой N297A или N297G, при этом позиции и замены соответствуют нумерации EU. Эти замены устраняют гликозилирование в позиции 297, которое могло бы препятствовать ферментативной конъюгации линкера с белком в позиции Q295 (т. е. линкер присоединен к белку через амидную связь в боковой цепи глутамина). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления модифицированный сайт представляет собой N297A или N297G, а белок (P) присоединен к L в позиции Q295 (например, посредством ферментативной конъюгации).

[0401] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложена Fc-полипептид, Fc-димер (например, содержащий Fc-полипептид («первый Fc-полипептид») и второй Fc-полипептид) или слияние Fab-Fc (например, содержащее Fc-димер), содержащие:

- a) одну или большее количество замен цистеином, аланином или глицином (например, S239C, S442C, A330C, K149C (легкая цепь), T289C, N297A и/или N297G в соответствии с нумерацией EU и/или A114C в соответствии с нумерацией Kabat); и
- b) модифицированный домен (например, модифицированный домен CH2 или CH3), который специфически связывается с рецептором трансферрина, описанным в данном документе (например, модифицированный домен CH3 содержит пять, шесть, семь, восемь или девять замен в группе аминокислотных позиций, включающей 157, 159, 160, 161, 162, 163, 186, 189 и 194; при этом замены и позиции определены со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 361-372, 397-408, 422-435, 491-497, 512-518, 632-633, 645-654, 702-708, 710-716, 718, 738-740 и 742. В некоторых вариантах осуществления N-конец Fc-полипептида содержит часть шарнирной области (например, DKTHTCP (SEQ ID NO:232 или DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:233)). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 804 и 741. В некоторых вариантах осуществления N-конец Fc-полипептида связан через шарнирную область с последовательностью домена СН1. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления белок содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 709, 717 и 743-745. В некоторых вариантах осуществления Fc-полипептид содержит триптофан в позиции, соответствующей позиции 139 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид или второе слияние Fab-Fc может содержать или не содержать модифицированный константный домен. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид или второе слияние Fab-Fc может содержать или не содержать один или большее количество модифицированных сайтов (например, S239C, S442C, A330C, K149C (легкая цепь), T289C, N297A и/или N297G в соответствии с нумерацией EU и/или A114C в соответствии с нумерацией Kabat).

[0402] В некоторых вариантах осуществления также предложен белок, описанный в данном документе, который представляет собой или содержит димер Fc-полипептида или слияние Fab-Fc-димер, содержащее первый и второй Fc-полипептид, причем первый Fc-полипептид содержит модифицированный константный домен (например, модифицированный домен СН2 или СН3), который специфически связывается с рецептором трансферрина; при этом второй Fc-полипептид способен димеризоваться с первым Fc-полипептидом; и при этом первый и/или второй Fc-полипептид содержит один или большее количество модифицированных сайтов; или при этом первое и/или второе слияние Fab-Fc содержит один или большее количество модифицированных сайтов

(например, одну или большее количество аминокислотных замен, таких как замены цистеином). В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид содержит модифицированный домен СНЗ, который специфически связывается с рецептором трансферрина, при этом модифицированный домен СНЗ содержит пять, шесть, семь, восемь или девять замен в группе аминокислотных позиций, включающей 157, 159, 160, 161, 162, 163, 186, 189 и 194. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-полипептидов соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид и второй Fc-полипептид (или первое и второе слияние Fab-Fc) димера содержат замены, которые способствуют гетеродимеризации. Например, в некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит триптофан вместо нативного треонина в позиции, соответствующей позиции 139 в SEQ ID NO: 1, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит валин в позиции 180 в SEQ ID NO: 1, серин в позиции, соответствующей позиции 139 в SEQ ID NO: 1, и аланин в позиции, соответствующей позиции 141 в SEQ ID NO: 1.

[0403] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержит одну или большее количество аминокислотных замен (например, 1 или большее количество замен цистеином). В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержит одну или большее количество замен, выбранных из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C (легкая цепь), T289C, N297A и N297G в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит S239C. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит S442C. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит A330C. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит T289C. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит N297A. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит N297G. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит S239C и A330C. В некоторых вариантах осуществления первое слияние Fab-Fc содержит K149C в легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления первое слияние Fab-Fc содержит A114C. В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности,

по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 4-29, 236-299, 361-372, 397-408, 422-435, 491-497, 512-518, 632-633, 645-654, 702-708, 709-717, 718, 738-740, 741-746 и 804.

[0404] В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержит одну или большее количество аминокислотных замен (например, 1 или большее количество замен цистеином). В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержит одну или большее количество замен, выбранных из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C (легкая цепь), T289C, N297A и N297G в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит S239C. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит S442C. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит A330C. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит T289C. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит N297A. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или второй слитый полипептид Fab-Fc содержит N297G. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит S239C и A330C. В некоторых вариантах осуществления второе слияние Fab-Fc содержит K149C в легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления второе слияние Fab-Fc содержит A114C. В некоторых вариантах осуществления второй Fc-полипептид или слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 96% идентичности, по меньшей мере 97% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности или по меньшей мере 99% идентичности с любой из последовательностей любой из SEQ ID NO: 557-561, 627-631, 635-644, 719-723 и 724-731, 733-737 и 810.

[0405] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида (или первого и второго слияния Fab-Fc) содержит одну или большее количество аминокислотных замен (например, 1 или большее количество замен цистеином). В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество замен представляют собой: S239C, S442C, A330C, T289C, N297A и/или N297G в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит замену K149C. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество замен представляют собой: S239C, S442C, A330C, K149C (легкая цепь), A114C и/или T289C. В некоторых вариантах осуществления

одна или большее количество замен представляют собой: S239C, S442C, A114C и/или T289C. В некоторых вариантах осуществления одна или большее количество замен представляют собой: N297A и/или N297G. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида (или первого и второго слияния Fab-Fc) содержит одну аминокислотную замену (например, 1 замену цистеином). В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит замену цистеином в S239C; или каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит замену цистеином в S239C. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит две аминокислотные замены (например, 2 замены цистеином); или при этом каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит две аминокислотные замены (например, замены цистеином). В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит замену цистеином в S239C и A330C; или каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит замену цистеином в S239C и A330C.

[0406] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 279, 361, 362, 363, 743-744 или 804, при этом полипептид содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 1; а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 559-561, 719-731 или 810. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 362, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 559. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 362, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 560. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 362, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 561. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 363, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 726. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 744, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 731. В некоторых вариантах осуществления

первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 363, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 725. В некоторых вариантах осуществления N-конец первого и второго Fc-полипептида содержит часть шарнирной области (например, DKTHTCP (SEQ ID NO:232 или DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:233)). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 804, а второй полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 810.

[0407] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 645-648, 741 и 745, при этом полипептид содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 1; а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 639-641 и 733-737. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 647, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 639. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 647, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 640. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 647, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 641. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 648, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 735. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 745, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 737. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 648, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 734. В некоторых вариантах осуществления N-конец первого и второго Fc-полипептида содержит часть шарнирной области (например, DKTHTCP (SEQ ID NO:232 или DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:233)). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 741, а второй полипептид содержит последовательность

SEQ ID NO: 736.

[0408] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 702-717, при этом полипептид содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 1; а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 557-561, 627, 719-731 и 810. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 702, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 559. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 708, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 722. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 713, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 726. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 713, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 627.

[0409] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 738-741, при этом полипептид содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 1; а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 635-637, 639-641 и 733-737. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 738, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 639. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 739, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 733. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 740, а второй полипептид или второе

слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 735. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 740, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 637.

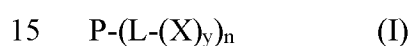
5 **[0410]** В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 281 или 718, при этом полипептид содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ser в позиции 162, Asn в позиции 163, Ser в позиции 186,
10 Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 1; а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 559-561, 719-731 или 810. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 718, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc
15 содержит последовательность SEQ ID NO: 559.

[0411] В некоторых вариантах осуществления первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 742 или 746, при этом полипептид содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ser в позиции 162, Asn в позиции 163, Ser в позиции 186,
20 Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 1; а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 639-641 и 733-737. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность SEQ ID NO: 742, а второй полипептид или второе слияние Fab-Fc
25 содержит последовательность SEQ ID NO: 639.

[0412] В некоторых вариантах осуществления первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 279, 361, 362, 363, 743-744 или 804, при этом полипептид содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr в позиции 186,
30 Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 1; а второе слияние Fab-Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 557-558 и 627. В некоторых вариантах осуществления каждое из первого и второго слияния
35 Fab-Fc дополнительно содержит CL, содержащий последовательность SEQ ID NO: 732.

[0413] В некоторых вариантах осуществления первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 645-648, 741 и 745, при этом полипептид содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 1; а второе слияние Fab-Fc содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 635-637. В некоторых вариантах осуществления каждое из первого и второго слияния Fab-Fc дополнительно содержит CL, содержащий последовательность SEQ ID NO: 732.

[0414] Fc-полипептиды или слияния Fab-Fc, описанные в данном документе, или их димеры, которые содержат один или большее количество модифицированных сайтов (например, замены цистеином) (P), можно использовать в конъюгате, описанном в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления также предложен конъюгат формулы (I):



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид (например, выбранный из ASO и агента РНКи);

каждый L независимо представляет собой связывающую группу, описанную в данном документе;

P представляет собой белок, содержащий первый Fc-полипептид, описанный в данном документе, или его димер, или слияние Fab-Fc, описанное в данном документе, или его димер, при этом белок содержит один или большее количество модифицированных сайтов (например, замен цистеином), которые облегчают присоединение P к каждому L;

каждый y независимо равен 1 или более (например, 1, 2, 3 или 4); и

n равен 1 или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[0415] В некоторых вариантах осуществления к одной связывающей группе (L) присоединены 1 или более олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления к одной связывающей группе (L) присоединены 2 или более олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления к связывающей группе (L) присоединен 1 олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления к связывающей группе (L) присоединены 2 олигонуклеотида.

[0416] В вариантах осуществления применимые значения y включают целые числа в диапазоне 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10 или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

[0417] В вариантах осуществления применимые значения n включают целые числа в диапазоне 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10 или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

5 X. СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

[0418] Конъюгат, описанный в данном документе, можно применять в различных целях, включая терапевтические показания.

[0419] В некоторых вариантах осуществления конъюгат применяют для доставки олигонуклеотида (например, ASO или агента РНКи) в тип целевых клеток, которые экспрессируют рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления конъюгат можно применять для переноса олигонуклеотида (например, ASO или агента РНКи) через эндотелий, например, гематоэнцефалический барьер, для поглощения в головном мозге.

[0420] Например, в некоторых вариантах осуществления предложен способ трансцитоза олигонуклеотида (например, ASO или агента РНКи) через эндотелий, при этом способ включает приведение в контакт эндотелия (например, гематоэнцефалического барьера (ГЭБ)) с конъюгатом, описанным в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложен способ переноса олигонуклеотида через ГЭБ нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конъюгата, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, описанный в данном документе, для применения в переносе олигонуклеотида через ГЭБ нуждающегося в этом субъекта. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы доставки олигонуклеотидов в ЦНС. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы доставки олигонуклеотида в глубокие области головного мозга (например, кору, ствол головного мозга, гиппокамп, полосатое тело, мозжечок, таламус, дорсальный стриатум и черное вещество). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы доставки олигонуклеотида в глубокие области головного мозга и спинной мозг (например, шейный отдел спинного мозга, поясничный отдел спинного мозга). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы доставки олигонуклеотидов в ЦНС и мышцы (например, сердечные и скелетные). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены способы доставки олигонуклеотидов в ЦНС, периферические нервы (например, сетчатку, седалищный нерв), мышцы (например, квадрицепс) и другие периферические органы (например, сердце, диафрагму, селезенку, кишечник, легкие, печень и почки).

[0421] В некоторых вариантах осуществления также предложен способ модуляции

экспрессии целевого гена или последовательности у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложен конъюгат, описанный в данном документе, для применения в модуляции экспрессии целевого гена.

5 [0422] В некоторых вариантах осуществления целевые ген или последовательность экспрессируются в клетке головного мозга субъекта. В некоторых вариантах осуществления целевые ген или последовательность экспрессируются в клетке, экспрессирующей TfR. В некоторых вариантах осуществления целевые ген или последовательность экспрессируются в мышечной клетке, такой как клетка скелетной
10 мышцы или клетка сердечной мышцы.

[0423] В некоторых вариантах осуществления модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена. Например, в некоторых вариантах осуществления экспрессия целевого гена или последовательности ингибируется или снижается, например, по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%,
15 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с контрольной экспрессией (например, у субъекта, которому не вводили конъюгат).

[0424] Конъюгат, описанный в данном документе, вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве или дозе. Однако дозировки могут варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая выбранный путь введения, состав композиции, ответ
20 пациента, тяжесть патологического состояния, массу субъекта и мнение врача, назначающего препарат. Дозировку можно повышать или снижать с течением времени, если это необходимо в случае индивидуального пациента.

[0425] В различных вариантах осуществления конъюгат, описанный в данном документе, вводят парентерально. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят
25 внутривенно. Внутривенное введение можно осуществлять посредством инфузии, например, в течение периода от около 10 до около 30 минут или в течение периода, составляющего по меньшей мере 1 час, 2 часа или 3 часа. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят в виде внутривенного болюса. Также можно применять комбинации инфузии и болюсного введения.

30 [0426] В некоторых парентеральных вариантах осуществления конъюгат вводят внутрибрюшинно, подкожно, внутрикожно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят внутрикожно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления конъюгат вводят интратекально, например путем эпидурального введения, или интрацеребровентрикулярно.

35 [0427] В других вариантах осуществления конъюгат, описанный в данном документе,

можно вводить перорально, посредством легочного введения, интраназального введения, внутриглазного введения или местного введения. Легочное введение также можно применять, например, путем использования ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным агентом.

5

XI. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ И НАБОРЫ

[0428] В другом аспекте предложены фармацевтические композиции и наборы, содержащие конъюгат, описанный в данном документе.

10 Фармацевтические композиции

[0429] Руководство по приготовлению составов для применения согласно данному документу можно найти в ряде справочников по фармацевтическому приготовлению и составлению, которые известны специалистам в данной области техники.

[0430] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит конъюгат, описанный в данном документе, и дополнительно содержит один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей и/или эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество конъюгатов, описанных в данном документе, которые могут быть одинаковыми или разными (например, смесь разных конъюгатов). В некоторых вариантах осуществления отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 1:1 до около 4:1. В некоторых вариантах осуществления отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 1:1 до около 2:1. В некоторых вариантах осуществления отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет около 1,23. В некоторых вариантах осуществления отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 2:1 до около 3:1. В некоторых вариантах осуществления отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет около 2,5.

[0431] В контексте данного документа термин фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды или покрытия, которые являются физиологически совместимыми и которые предпочтительно не препятствуют или иным образом не ингибируют активность активного агента. Различные фармацевтически приемлемые эксципиенты являются хорошо известными. В некоторых вариантах осуществления носитель подходит для внутривенного, интратекального, интрацеребровентрикулярного, внутримышечного, перорального, внутрибрюшинного, трансдермального, местного или подкожного введения. Фармацевтически приемлемые носители могут содержать одно или большее количество физиологически приемлемых

35

соединений, которые действуют, например, для стабилизации композиции или для повышения или снижения всасывания конъюгата. Физиологически приемлемые соединения могут включать, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки, композиции, которые снижают клиренс или гидролиз активных агентов, или эксципиенты или другие стабилизаторы и/или буферы. Другие фармацевтически приемлемые носители и их составы также являются доступными в данной области техники.

5
10 **[0432]** Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно изготавливать способами, известными специалистам в данной области техники, например, посредством традиционных процессов смешивания, растворения, гранулирования, приготовления драже, эмульгирования, капсулирования, заключения или лиофилизации. Следующие способы и эксципиенты являются просто примерами и никоим образом не ограничивающими.

15 **[0433]** Для перорального введения, конъюгат, описанный в данном документе, можно составлять путем объединения его с фармацевтически приемлемыми носителями, которые хорошо известны в данной области техники. Такие носители позволяют составлять соединения в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, эмульсий, липофильных и гидрофильных суспензий, жидкостей, гелей, сиропов, пастообразных смесей, суспензий и
20 т. п. для перорального приема пациентом, подлежащим лечению. Фармацевтические препараты для перорального применения можно получать путем смешивания конъюгатов с твердым эксципиентом, необязательного измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ, если это желательно, для получения таблеток или сердцевин драже. Подходящие эксципиенты
25 включают, например, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия и/или поливинилпирролидон. При необходимости можно добавлять дезинтегрирующие агенты,
30 такие как перекрестно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

[0434] Как описано выше, конъюгат, описанный в данном документе, можно составлять для парентерального введения путем инъекции, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В случае инъекции, конъюгаты можно составлять в препараты
35 путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном

растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатической кислоты, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; и, при необходимости, с традиционными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты можно составлять в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Составы для инъекций могут быть представлены в единичной лекарственной форме, например в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавленным консервантом. Композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных жидких носителях, и при этом они могут содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

[0435] Как правило, фармацевтическая композиция для применения при введении *in vivo* является стерильной. Стерилизацию можно проводить в соответствии со способами, известными в данной области техники, например, путем термической стерилизации, стерилизации паром, стерильной фильтрации или облучения.

[0436] Дозировки и необходимая концентрация препарата в фармацевтических композициях, описанных в данном документе, могут варьироваться в зависимости от конкретного предусмотренного применения. Определение соответствующих дозировки или пути введения находится в компетенции специалиста в данной области техники. Подходящие дозировки также описаны выше.

Наборы

[0437] В некоторых вариантах осуществления предложены наборы, содержащие конъюгат, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы предназначены для применения для модуляции экспрессии целевого гена или последовательности (например, целевого гена, экспрессируемого в головном мозге или центральной нервной системе (ЦНС)). В некоторых вариантах осуществления наборы предназначены для применения для модуляции экспрессии целевого гена.

[0438] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит один или большее количество дополнительных терапевтических агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит конъюгат, описанный в данном документе, и дополнительно содержит один или большее количество дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкции, содержащие указания (т. е. протоколы) для практического применения способов, описанных в данном документе (например, инструкции по применению набора

для введения композиции через гематоэнцефалический барьер). Хотя инструкции, как правило, содержат письменные или печатные материалы, они не ограничиваются ими. Предусмотрен любой носитель информации, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю. Такие носители включают, но не ограничиваются этим, электронные носители (например, магнитные диски, кассеты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и т. п. Такие носители могут содержать адреса интернет-сайтов, которые предоставляют такие инструктирующие материалы.

[0439] Предмет изобретения, описанный в данном документе, включает следующие неограничивающие варианты осуществления:

- 10 1. Димер Fc-полипептида или слияние Fab-Fc-димер, содержащие:
 - (a) первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и
 - (b) второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом по (a);При этом первый и/или второй Fc-полипептид содержит одну или большее количество
- 15 замен цистеином; или при этом первое и/или второе слияние Fab-Fc содержит одну или большее количество замен цистеином.
2. Димер Fc-полипептида по варианту осуществления 1, причем слияние Fab-Fc-димер представляет собой ненацеливающее слияние Fab-Fc-димер.
3. Димер Fc-полипептида по варианту осуществления 1 или 2, причем замена(ы) цистеином выбрана(ы) из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C.
- 20 4. Димер Fc-полипептида по любому из вариантов осуществления 1-3, причем каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит замену цистеином; или каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит замену цистеином.
- 25 5. Димер Fc-полипептида по варианту осуществления 4, причем каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит замену цистеином в S239C; или каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит замену цистеином в S239C.
6. Димер Fc-полипептида по любому из вариантов осуществления 1-5, причем каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит две замены цистеином; или каждое из
- 30 первого и второго слияний Fab-Fc содержит две замены цистеином.
7. Димер Fc-полипептида по варианту осуществления 6, причем каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит замену цистеином в S239C и A330C; или каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит замену цистеином в S239C и A330C.
8. Димер Fc-полипептида по любому из вариантов осуществления 1-3, причем второй
- 35 Fc-полипептид содержит замену цистеином; или второе слияние Fab-Fc содержит замену

цистеином.

9. Димер Fc-полипептида по варианту осуществления 8, причем замена цистеином представляет собой S239C.

10. Димер Fc-полипептида, содержащий:

5 (a) первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и

(b) второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом по (a); при этом первый и/или второй Fc-полипептид содержит одну или большее количество замен, выбранных из группы, состоящей из N297A и N297G.

10 11. Димер Fc-полипептида по варианту осуществления 10, причем каждый из первого и второго Fc-полипептидов соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.

12. Димер Fc-полипептида по любому из вариантов осуществления 1-11, причем модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен
15 СНЗ, содержащий две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать или шестнадцать позиций, выбранных из следующих: позиция 153 представляет собой Trp, Tyr, Leu, Gln или Glu; позиция 157 представляет собой Leu, Tyr, Met, Val, Phe или Trp; позиция 159 представляет собой Leu, Thr, His, Pro или Phe; позиция 160 представляет собой Val, Pro или кислотную
20 аминокислоту; позиция 161 представляет собой Trp; позиция 162 представляет собой Val, Ser, Ala или Gly; позиция 163 представляет собой Asn, Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala, Asp, Thr или Glu; позиция 164 представляет собой Ser, Thr, Gln, Phe, Tyr или Val; позиция 165 представляет собой Gln, Phe или His; позиция 186 представляет собой Glu, Ala, Ser, Leu, Thr, Pro или Asp; позиция 187 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; позиция
25 188 представляет собой Glu или Ser; позиция 189 представляет собой Thr, Asn или кислотную аминокислоту; позиция 194 представляет собой Trp, Tyr, His или Phe; позиция 197 представляет собой Ser, Thr, Glu, Lys или Trp; и позиция 199 представляет собой Ser, Trp, Gly, Cys, Pro или Met согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

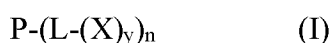
13. Димер Fc-полипептида по любому из вариантов осуществления 1-12,
30 при этом первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 279, 281, 361-366, 491-494, 702-718, 632, 645-649, 738-746, 804, и
при этом второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность,
35 имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности

последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 557-561, 627-631, 635-644, 719-723, 724-731, 733-737 и 810.

14. Димер Fc-полипептида по варианту осуществления 13, причем первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит Glu в позиции 153, Tug в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ser или Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr или Ser в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194 согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

15. Димер Fc-полипептида по варианту осуществления 13, причем:
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 702, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
15 первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 708, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 722;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 718, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc
20 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 560;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc
25 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 561; или
первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 804, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 810.

30 16. Конъюгат формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

35 P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен,

который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L; каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и n равен по меньшей мере 1.

5 17. Конъюгат по варианту осуществления 16, причем белок (Р) содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.

18. Конъюгат по варианту осуществления 16, причем белок содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом.

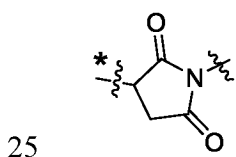
10 19. Конъюгат по варианту осуществления 17 или 18, причем Fc-полипептид присоединен к ненацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-
15 Fc-димер.

20. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-19, причем модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену или вставку.

21. Конъюгат по варианту осуществления 20, причем модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.

20 22. Конъюгат по варианту осуществления 21, причем замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C в соответствии с нумерацией EU.

23. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-22, причем связывающая группа L содержит группу следующей формулы:



которая присоединена в положении, отмеченном *, к атому серы модифицированного сайта в Р.

24. Конъюгат по варианту осуществления 20, причем модифицированный сайт представляет собой замену аланином или глицином.

30 25. Конъюгат по варианту осуществления 24, причем замена аланином или глицином представляет собой N297A или N297G в соответствии с нумерацией EU.

6. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-20 и 24-25, который получают путем конъюгации L с Р в Q295 посредством ферментативной конъюгации.

27. Конъюгат по варианту осуществления 26, причем в ферментативной конъюгации используется бактериальная трансглутаминаза (BTG).
28. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-27, причем модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен СНЗ, содержащий две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать или шестнадцать позиций, выбранных из следующих: позиция 153 представляет собой Trp, Tyr, Leu, Gln или Glu; позиция 157 представляет собой Leu, Tyr, Met, Val, Phe или Trp; позиция 159 представляет собой Leu, Thr, His, Pro или Phe; позиция 160 представляет собой Val, Pro или кислотную аминокислоту; позиция 161 представляет собой Trp; позиция 162 представляет собой Val, Ser, Ala или Gly; позиция 163 представляет собой Asn, Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala, Asp, Thr или Glu; позиция 164 представляет собой Ser, Thr, Gln, Phe, Tyr или Val; позиция 165 представляет собой Gln, Phe или His; позиция 186 представляет собой Glu, Ala, Ser, Leu, Thr, Pro или Asp; позиция 187 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; позиция 188 представляет собой Glu или Ser; позиция 189 представляет собой Thr, Asn или кислотную аминокислоту; позиция 194 представляет собой Trp, Tyr, His или Phe; позиция 197 представляет собой Ser, Thr, Glu, Lys или Trp; и позиция 199 представляет собой Ser, Trp, Gly, Cys, Pro или Met согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.
29. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-28, причем первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 279, 281, 361-366, 491-494, 702-718, 632, 645-649, 738-746, 804; и при этом второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 557-561, 627-631, 635-644, 719-723, 724-731, 733-737 и 810.
30. Конъюгат по варианту осуществления 29, причем первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ser или Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr или Ser в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194 согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.
31. Конъюгат по варианту осуществления 29, причем: первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc

- содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
- первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 702, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
- 5 первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 708, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 722;
- первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 718, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc
- 10 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
- первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 560;
- первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc содержит аминокислотную
- 15 последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 561; или
- первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 804, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 810.
32. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-31, причем олигонуклеотид
- 20 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO) или миРНК.
33. Конъюгат по варианту осуществления 32, причем каждый олигонуклеотид независимо представляет собой ASO.
34. Конъюгат по варианту осуществления 33, причем ASO представляет собой гэпмер, имеющий профиль модификации формулы 5'-X_a-Y_a-Z_a-3', где каждый из X_a и Z_a содержит
- 25 3 модифицированных нуклеотида ЗНК, и при этом область гэпа Y_a содержит PS-связи.
35. Конъюгат по варианту осуществления 33 или 34, причем каждый L связан с 5' концом ASO.
36. Конъюгат по варианту осуществления 33 или 34, причем каждый L связан с 3' концом ASO.
- 30 37. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-36, причем L содержит C₆ аминогруппу, имеющую формулу -(CH₂)₆-NH-.
38. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-37, причем Р связывается с рецептором трансферрина с аффинностью от 3 нМ до 600 нМ или от 50 нМ до 250 нМ.
39. Конъюгат по варианту осуществления 38, причем Р связывается с рецептором
- 35 трансферрина с аффинностью около 100 нМ.

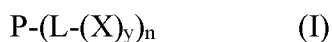
40. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 16-18 и 20-39, причем Р не содержит Fab-фрагмент или его часть.
41. Конъюгат формулы I, который содержит более одного олигонуклеотида:
$$P-(L-(X)_y)_n \quad (I)$$
- 5 где
каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
Р представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;
- 10 каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен 2 или более.
42. Конъюгат по варианту осуществления 41, причем n равен 2 или 4.
43. Конъюгат по варианту осуществления 41 или 42, причем белок (Р) содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.
- 15 44. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 41-43, причем белок (Р) содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом.
45. Конъюгат по варианту осуществления 43 или 44, причем Fc-полипептид
20 присоединен к ненацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.
46. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 41-45, причем белок (Р) содержит
25 один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L.
47. Конъюгат по варианту осуществления 46, причем модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену или вставку.
48. Конъюгат по варианту осуществления 47, причем модифицированный сайт
30 представляет собой замену цистеином.
49. Конъюгат по варианту осуществления 48, причем замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C в соответствии с нумерацией EU.
50. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 44-49, причем n равен 2, и при
35 этом каждый из первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида присоединен к L через

остаток цистеина в позиции 239.

51. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 44-49, причем n равен 4, и при этом каждый из первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида присоединен к двум L через остатки цистеина в позициях 239 и 330.

5 52. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 41-51, причем олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO) или миРНК.

53. Конъюгат формулы I, который содержит более одного олигонуклеотида:



где

10 каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1, при этом по меньшей мере один y равен 2

15 или более; и

n равен по меньшей мере единице.

54. Конъюгат по варианту осуществления 53, причем y равен 2.

55. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 53-54, причем по меньшей мере один L присоединен отдельно к двум олигонуклеотидам.

20 56. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 53-55, причем y равен 2, и при этом по меньшей мере один L присоединен к 5' концу первого олигонуклеотида, а второй олигонуклеотид связан с 3' концом первого олигонуклеотида.

25 57. Конъюгат по варианту осуществления 56, причем первый и второй олигонуклеотиды связаны линкером на основе нуклеиновой кислоты или неолigonуклеотидным расщепляемым линкером.

58. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 53-57, причем белок (P) содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.

30 59. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 53-57, причем белок (P) содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом.

35 60. Конъюгат по варианту осуществления 58 или 59, причем Fc-полипептид присоединен к неацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с неацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-

Fc-димер.

61. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 53-60, причем Р дополнительно содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L.
- 5 62. Конъюгат по варианту осуществления 61, причем модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену или вставку.
63. Конъюгат по варианту осуществления 62, причем модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.
64. Конъюгат по варианту осуществления 63, причем замена цистеином выбрана из
10 группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C в соответствии с нумерацией EU.
65. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 53-64, причем олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид (ASO) или миРНК.
66. Низкоаффинный связывающий рецептор трансферрина конъюгат формулы I:
- 15
$$P-(L-(X)_y)_n \quad (I)$$
где
каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
Р представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который
20 специфически связывается с рецептором трансферрина с низкой аффинностью от около 3 нМ до около 600 нМ;
каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен по меньшей мере 1.
67. Конъюгат по варианту осуществления 66, причем Р связывается с рецептором
25 трансферрина с аффинностью необязательно от около 3 нМ до около 600 нМ или от около 40 нМ до около 1200 нМ.
68. Конъюгат по варианту осуществления 67, причем Р связывается с рецептором трансферрина с аффинностью от около 50 нМ до 250 нМ.
69. Конъюгат по варианту осуществления 68, причем Р связывается с рецептором
30 трансферрина с аффинностью около 100 нМ.
70. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 66-69, причем олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид (ASO) или миРНК.
71. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 66-70, причем белок (Р) содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.
- 35 72. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 66-70, причем белок (Р) содержит

димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом.

73. Конъюгат по варианту осуществления 71 или 72, причем Fc-полипептид 5 присоединен к ненацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.

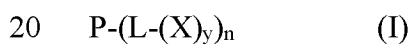
74. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 66-73, причем P дополнительно 10 содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L.

75. Конъюгат по варианту осуществления 74, причем модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену или вставку.

76. Конъюгат по варианту осуществления 75, причем модифицированный сайт 15 представляет собой замену цистеином.

77. Конъюгат по варианту осуществления 76, причем замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C в соответствии с нумерацией EU.

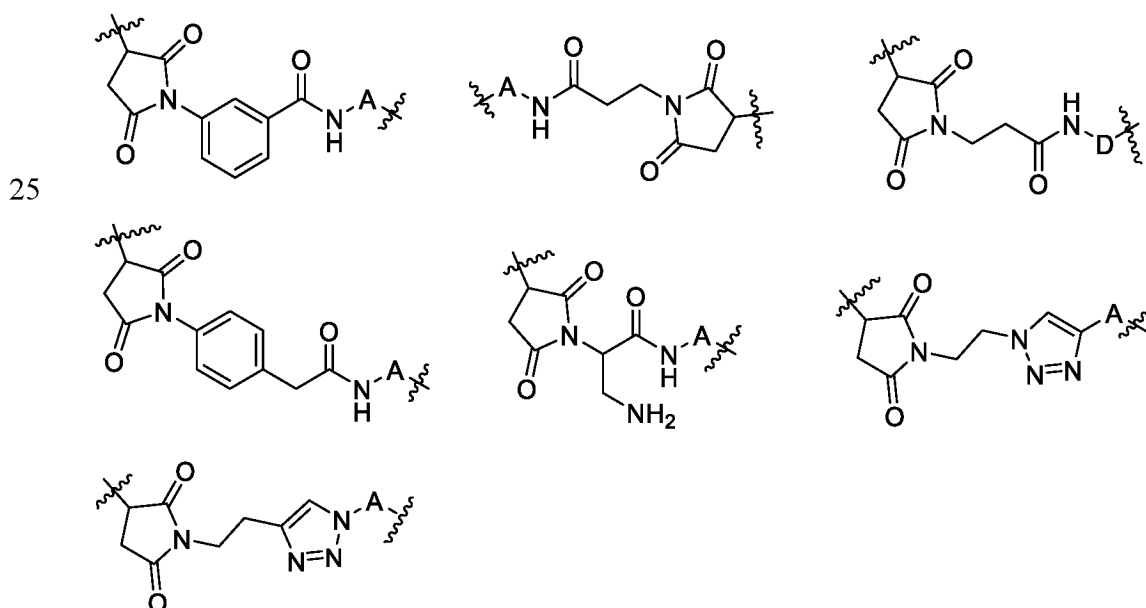
78. Конъюгат формулы I:

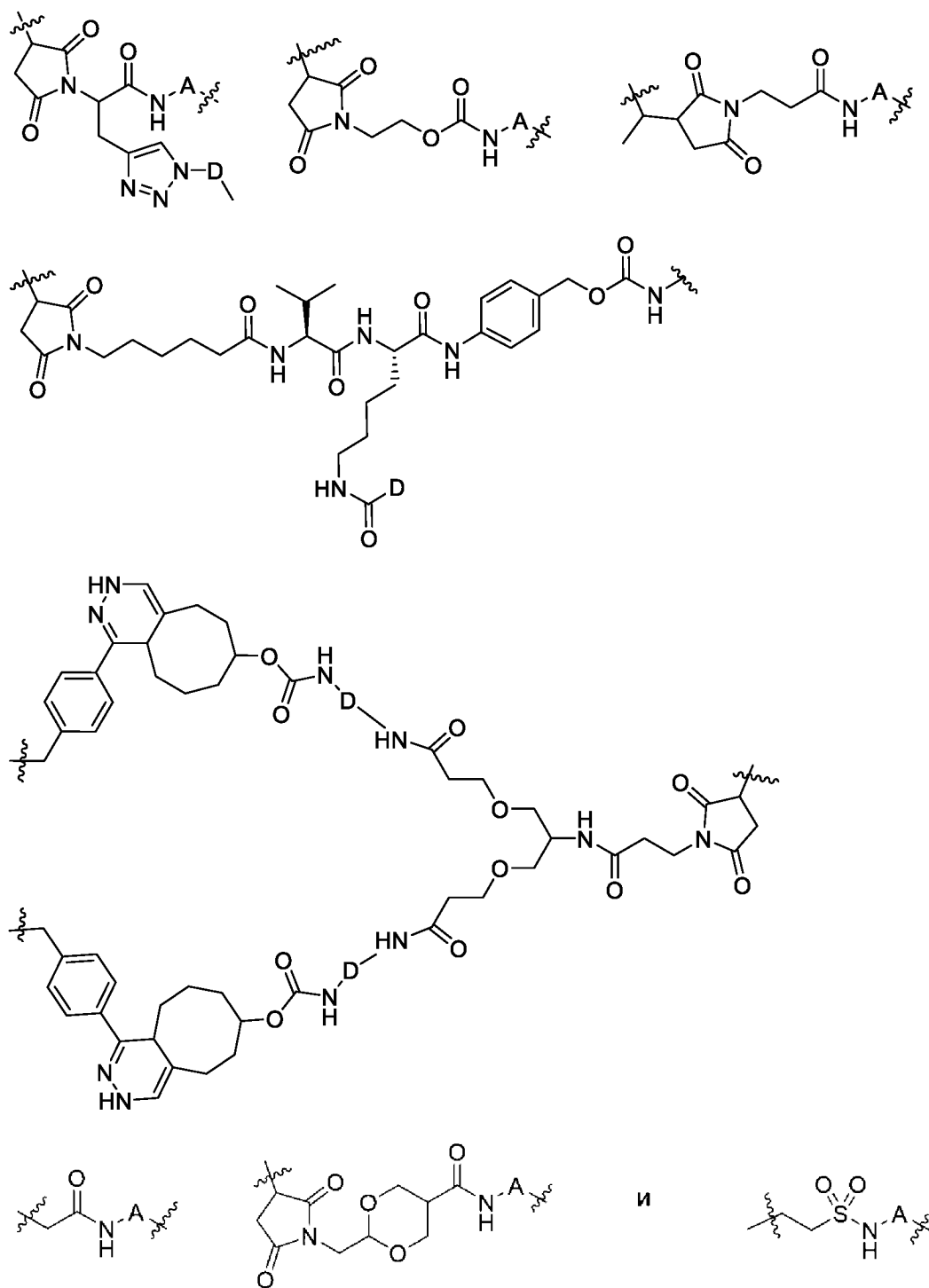


где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L представляет собой связывающую группу, независимо выбранную из группы, состоящей из:





5 где

каждый А независимо представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

каждый D представляет собой -(CH₂-CH₂-O)_m-; и

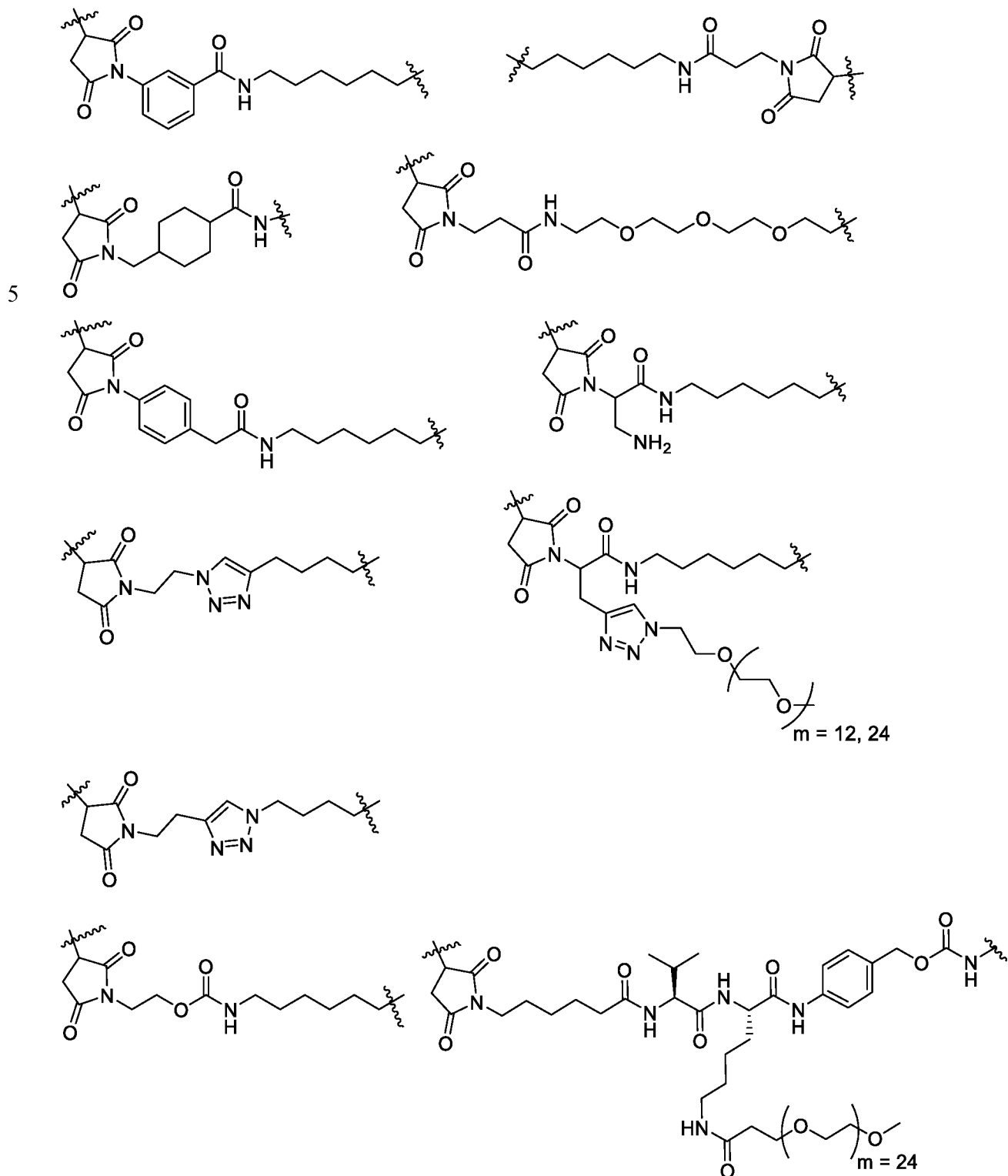
каждый m равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24;

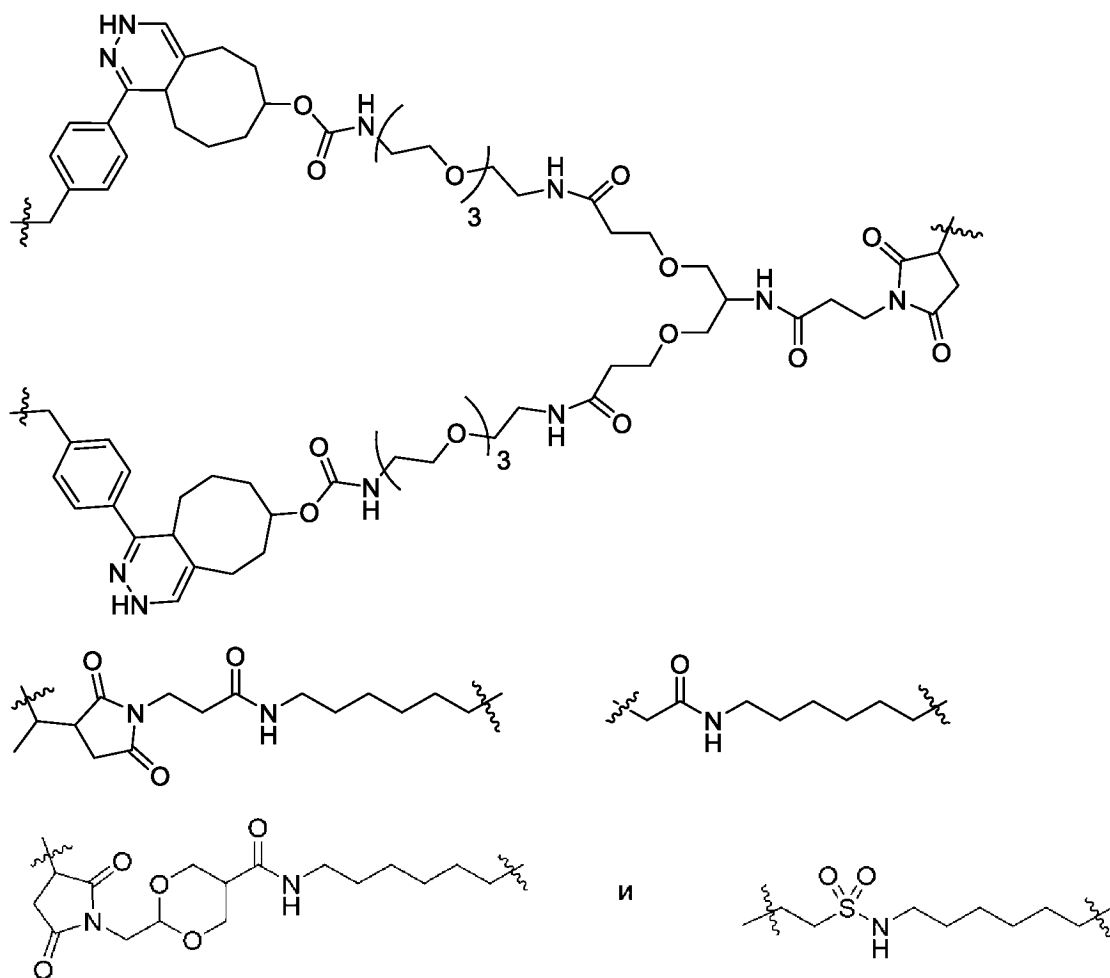
10 Р представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;

каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и

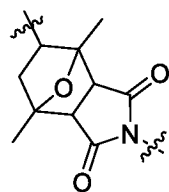
n равен по меньшей мере 1.

79. Конъюгат по варианту осуществления 78, причем каждый L представляет собой связывающую группу, независимо выбранную из группы, состоящей из:





80. Конъюгат по варианту осуществления 78, причем каждый L представляет собой
5 связывающую группу, которая содержит защищенный малеимид формулы:



81. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 78-80, причем белок (P) содержит
Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.
- 10 82. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 78-80, причем белок (P) содержит
димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий
модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный
димеризоваться с первым Fc-полипептидом.
- 15 83. Конъюгат по варианту осуществления 81 или 82, причем Fc-полипептид
присоединен к неацеливующему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния
Fab-Fc; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида
соединен с неацеливующим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-

Fc-димер.

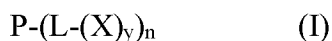
84. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 78-83, причем Р дополнительно содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L.
- 5 85. Конъюгат по варианту осуществления 84, причем модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену или вставку.
86. Конъюгат по варианту осуществления 85, причем модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.
87. Конъюгат по варианту осуществления 86, причем замена цистеином выбрана из
10 группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C.
88. Конъюгат формулы I:
- $$P-(L-(X)_y)_n \quad (I)$$
- где
каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
15 каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
Р представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина, при этом Р не содержит Fab-фрагмент или его часть;
каждый у независимо равен 1 или более; и
20 n равен 1 или более.
89. Конъюгат по варианту осуществления 88, причем олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид (ASO) или миРНК.
90. Конъюгат по варианту осуществления 88, причем размер конъюгата превышает 50 кДа.
- 25 91. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 88-90, причем белок (Р) содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.
92. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 88-90, причем белок (Р) содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный
30 димеризоваться с первым Fc-полипептидом.
93. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 88-92, причем Р дополнительно содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L.
94. Конъюгат по варианту осуществления 93, причем модифицированный сайт
35 представляет собой аминокислотную замену или вставку.

95. Конъюгат по варианту осуществления 94, причем модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.
96. Конъюгат по варианту осуществления 95, причем замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C и T289C.
- 5 97. Конъюгат формулы I:

$$P-(L-(X)_y)_n \quad (I)$$
где
каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
- 10 P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или более ненацеливающих Fab-фрагментов или их частей;
каждый y независимо равен 1 или более; и
n равен 1 или более.
- 15 98. Конъюгат по варианту осуществления 97, причем олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO) или миРНК.
99. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 97-98, причем белок (P) содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.
100. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 97-98, причем белок (P) содержит
20 димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом.
101. Конъюгат по варианту осуществления 99 или 100, причем Fc-полипептид присоединен к ненацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния
25 Fab-Fc; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.
102. Конъюгат по любому из вариантов осуществления 97-101, причем P дополнительно содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают
30 присоединение P к каждому L.
103. Конъюгат по варианту осуществления 102, причем модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену или вставку.
104. Конъюгат по варианту осуществления 103, причем модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.
- 35 105. Конъюгат по варианту осуществления 104, причем замена цистеином выбрана из

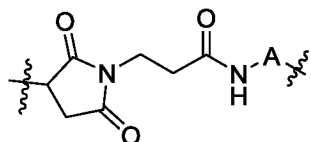
группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C.

106. Конъюгат формулы I:



где

- 5 каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой



где A представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

- P представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1)
10 модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина с аффинностью около 100 нМ; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L, при этом один или большее количество модифицированных сайтов выбраны из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C в соответствии с нумерацией EU;
15 каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен по меньшей мере 1.

107. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат формулы (I), описанный в любом из вариантов осуществления 16-106, и фармацевтически приемлемый носитель.

108. Композиция по варианту осуществления 107, содержащая множество конъюгатов
20 формулы (I).

109. Композиция по варианту осуществления 108, причем отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 1:1 до около 4:1.

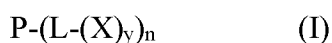
110. Композиция по варианту осуществления 108, причем отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 1:1 до около 2:1.

- 25 111. Композиция по варианту осуществления 108, причем отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет около 1,23.

112. Композиция по варианту осуществления 108, причем отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 2:1 до около 3:1.

113. Композиция по варианту осуществления 108, причем отношение олигонуклеотида
30 к белку в композиции составляет около 2,5.

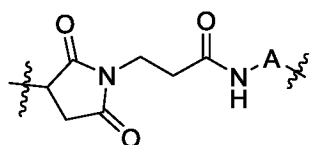
114. Способ переноса олигонуклеотида через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой



5

где A представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

P представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором

10 модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L, при этом один или большее количество модифицированных сайтов выбраны из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C в соответствии с нумерацией EU;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

15 115. Способ по варианту осуществления 114, причем конъюгат вводят пациенту внутривенно.

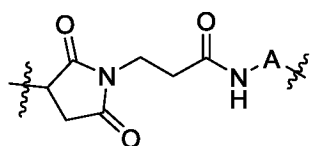
116. Способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке головного мозга пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



20 где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой



где A представляет собой (C₁-C₁₅)алкил;

25 P представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором

трансферрина с аффинностью около 100 нМ; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L, выбранных

30 из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C, A118C и T289C в соответствии с нумерацией EU;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

117. Способ по варианту осуществления 116, причем модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.

5 118. Способ по любому из вариантов осуществления 116 или 117, причем конъюгат вводят пациенту внутривенно.

119. Способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке головного мозга пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

10 каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L;

15 каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

120. Способ по варианту осуществления 119, причем клетка головного мозга представляет собой нейрон, эндотелиальную клетку, олигодендроцит, астроцит или микроглию.

20 121. Способ по варианту осуществления 119, который позволяет модулировать экспрессию целевого гена во множестве клеток головного мозга пациента.

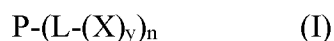
122. Способ по варианту осуществления 121, причем множество клеток содержат по меньшей мере два, три, четыре или пять типов клеток, выбранных из группы, состоящей из: нейрона, эндотелиальной клетки, олигодендроцита, астроцита и микроглии.

25 123. Способ по любому из вариантов осуществления 120-122, причем нейрон представляет собой возбуждательный нейрон или тормозящий нейрон.

124. Способ по любому из вариантов осуществления 119-123, причем модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.

30 125. Способ по любому из вариантов осуществления 119-124, причем конъюгат вводят пациенту внутривенно.

126. Способ переноса олигонуклеотида через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

35 каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L;

5 каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1,

при этом олигонуклеотид распределяется по всей центральной нервной системе.

127. Способ по варианту осуществления 126, причем олигонуклеотид распределяется по всем областям мозга.

10 128. Способ по варианту осуществления 126 или 127, причем олигонуклеотид распределяется в глубокой области головного мозга.

129. Способ по варианту осуществления 126, причем олигонуклеотид распределяется в спинном мозге.

15 130. Способ по любому из вариантов осуществления 126-129, причем конъюгат вводят пациенту внутривенно.

131. Способ по любому из вариантов осуществления 126-130, причем олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена.

132. Способ по варианту осуществления 131, причем модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.

20 133. Способ доставки эффективного количества олигонуклеотида в ЦНС пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

25 каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1,

30 при этом вводимый олигонуклеотид модулирует генную экспрессию по всей ЦНС.

134. Способ по варианту осуществления 133, причем вводимый олигонуклеотид модулирует генную экспрессию в областях головного мозга и спинном мозге пациента.

135. Способ по варианту осуществления 134, причем области головного мозга включают глубокие области головного мозга.

35 136. Способ по любому из вариантов осуществления 134-135, причем области головного

мозга включают лобную долю, теменную долю, височную долю, затылочную долю и мозжечок.

137. Способ по любому из 134-136, причем области головного мозга содержат эндотелиальные клетки, нейроны, астроциты, олигодендроциты и микроглию.

5 138. Способ по варианту осуществления 137, причем олигонуклеотид модулирует генную экспрессию в эндотелиальных клетках, нейронах, астроцитах, олигодендроцитах и микроглии.

139. Способ по любому из вариантов осуществления 133-138, причем эффективное количество снижает генную экспрессию по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%,
10 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с экспрессией без введения олигонуклеотида.

140. Способ по любому из вариантов осуществления 133-139, причем экспрессия гена снижается по меньшей мере около на 50%.

141. Способ по любому из вариантов осуществления 133-140, причем экспрессия гена
15 снижается по меньшей мере около на 70%.

142. Способ по любому из вариантов осуществления 133-141, причем конъюгат вводят пациенту внутривенно.

143. Fab-Fc-димер по любому из вариантов осуществления 2-9 или 11-15 или конъюгат по любому из вариантов осуществления 19-40, 45-52, 60-65, 73-77, 83-87 или 97-105, причем
20 каждый из Fab Fab-Fc-димера и неацеливающего Fab (NTF) конъюгата содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, не связывается специфически с встречающимся в природе эпитопом у субъекта и содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, при этом

CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%
25 идентичности последовательности с SEQ ID NO: 825 или 826,

CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 827, 828 или 869,

CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 829,

30 CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 819 или 820,

CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 821 или 822, и

35 CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 823 или 824.

144. Fab-Fc-димер или конъюгат по варианту осуществления 143, причем
- (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 837 или 853; и
- (b) вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 832 или 851.
145. Fab-Fc-димер или конъюгат по варианту осуществления 144, причем
- (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 837, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 832; или
- (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 853, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 851.
146. Fab-Fc-димер или конъюгат по варианту осуществления 144, причем
- (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 837 или 853; и
- (b) вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 832 или 851.
147. Fab-Fc-димер или конъюгат по варианту осуществления 149, причем
- (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 837, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 832; или

(a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 853, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 851.

148. Fab-Fc-димер или конъюгат по варианту осуществления 143, причем NTF содержит

5 (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846, 847, 854, 855, 856, 857, 859, 860, 861 и 862; и

10 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 833, 835, 850 и 852.

149. Fab-Fc-димер или конъюгат по варианту осуществления 148, причем

15 (a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846, 847, 854, 855, 856, 857, 859, 860, 861 и 862; и

(b) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 833, 835, 850 и 852.

150. Fab-Fc-димер или конъюгат по варианту осуществления 149, причем

20 (a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 838, 839, 840 или 841, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 833;

(b) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 844, 845, 846 или 847, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 833;

25 (c) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 838, 839, 840 или 841, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 835;

(d) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 844, 845, 846 или 847, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 835;

(e) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 854, 855, 856 или 857, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 850;

30 (f) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 859, 860, 861 или 862, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 850;

(g) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 854, 855, 856 или 857, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 852;

и

35 (h) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 859, 860,

861 или 862, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 852. 151. Fab-Fc-димер по любому из вариантов осуществления 2-9 или 11-15 или конъюгат по любому из вариантов осуществления 19-40, 45-52, 60-65, 73-77, 83-87 или 97-105, причем каждый из Fab Fab-Fc-димера и ненацеливающего Fab (NTF) конъюгата содержит 5 переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, не связывается специфически с встречающимся в природе эпитопом у субъекта и содержит три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, при этом

CDR-H1 содержит SEQ ID NO: 825 или 826,

CDR-H2 содержит SEQ ID NO: 827, 828 или 869,

10 CDR-H3 содержит SEQ ID NO: 829,

CDR-L1 содержит SEQ ID NO: 819 или 820,

CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 821 или 822 и

CDR-L3 содержит SEQ ID NO: 823 или 824.

XII. ПРИМЕРЫ

15 **[0440]** Настоящее изобретение будет более подробно описано на конкретных примерах. Следующие примеры приведены исключительно в иллюстративных целях и никоим образом не подразумевают ограничения изобретения. Специалисты в данной области техники легко распознают ряд некритичных параметров, которые можно изменять или модифицировать, чтобы получить по существу такие же результаты. Были предприняты 20 усилия для того, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, температур и т. п.), однако могут присутствовать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, при практической реализации настоящего изобретения применяют традиционные способы химии белков, биохимии, технологий рекомбинантных ДНК и фармакологии, которые относятся к данной области 25 техники. Такие технологии подробно описаны в литературе.

ПРИМЕР 1. Конструирование типовых вариантов TV

[0441] Слияние Fab-Fc-димер, в котором один Fc был модифицирован для связывания с TfR, как описано в данном документе, а Fab-область является ненацеливающей, создавали, 30 используя способы, аналогичных описанным в WO2018/152326. Этот модифицированный слитый белок далее называется «TV» (*смотрите, например, Фиг. 1*). Как описано в данном документе, эти молекулы TV можно присоединять к олигонуклеотиду посредством связывающей группы; такие конъюгаты могут называться «OTV».

Конструирование TV с заменами цистеином (S239C, S442C, A330C) для OTV

35 **[0442]** Следующие гены OTV синтезировали, используя Gblock (IDT DNA) и

клонировали в конструкцию, содержащую Fab RSV (паливизумаб), мутации LALA и TV35.23.2 (т. е. CH3C.35.23.2) в цепи выступа (дикого типа в цепи впадины), с остовом IgG с нумерацией Eu с различными мутациями конъюгации следующим образом:

«S239C» содержит S239C только в цепи впадины.

5 «S442C» содержит S442C только в цепи впадины.

«A330C» содержит A330C только в цепи впадины.

Легкие цепи представляют собой RSV (паливизумаб). FabRSV (паливизумаб) являются ненацеливающими у мышей и отличных от человека приматов.

Конструирование 500 нМ TV для OTV

10 **[0443]** Конструкции были такими же, как и выше, за исключением того, что вместо этого в цепи выступа использовали TV35.23.4 (т. е. CH3C.35.23.4), а S239C была включена только в цепь впадины.

Конструирование TV для нагрузки ASO/увеличения отношения олигонуклеотида к TV (варианты с повышенным OTR)

15 **[0444]** Конструкции были такими же, как и выше, с TV35.23.2 (т. е. CH3C.35.23.2) в цепи выступа, за исключением:

«OTR2» содержит S239C в цепи выступа и в цепи впадины.

«OTR4» содержит S239C и A330C в цепи выступа и в цепи впадины.

Конструирование SansFab TV для OTV

20 **[0445]** Модифицированный константный домен получали без fab-области («Sans Fab»), необязательно с частью или всей шарнирной областью IgG1. Ген SansFab синтезировали, используя Gblock (IDT DNA), содержащий «S239C» с частью шарнирной области IgG1, мутации LALA, в формате выступа и впадины с TV35.23.2 (т. е. CH3C.35.23.2) в цепи выступа (ДТ Fc в цепи впадины) и S239C в цепи впадины. В контексте данного документа
25 «SansFab» также можно взаимозаменяемо использовать с «Без Fab».

Таблица 1. Типовые последовательности вариантов TV

Название варианта	Fab	Сайт(ы) конъюгации	Аффинность	Описание цепи	SEQ ID
S239C	RSV	S239C	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 801
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 800

Название варианта	Fab	Сайт(ы) конъюгации	Аффинность	Описание цепи	SEQ ID
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 806
OTR2	RSV	S239C (с обеих сторон)	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 802
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 806
OTR4	RSV	S239C (с обеих сторон) и A330C (с обеих сторон)	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 803
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 807
500 нМ, низкая аффинность	RSV	S239C	500 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 805
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 806
A330C	RSV	A330C	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 801
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 800

Название варианта	Fab	Сайт(ы) конъюгации	Аффинность	Описание цепи	SEQ ID
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 808
S442C	RSV	S442C	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 801
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 800
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 809
SansFab	Нет	S239C	100 нМ	Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 804
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 810

[0446] Тяжелая цепь может дополнительно подвергаться процессингу во время производства культуры клеток, поэтому С-концевой остаток лизина удаляют. Таким образом, названия вариантов, перечисленные в таблице 1 выше, могут относиться к белковым молекулам, содержащим непроцессированные тяжелые цепи (т. е. содержащие С-концевой остаток лизина); белковые молекулы, содержащие одну или большее количество процессированных тяжелых цепей (т. е. С-концевой остаток лизина отсутствует); или смесь белковых молекул, имеющих процессированные и/или непроцессированные тяжелые цепи.

10

ПРИМЕР 2. Биоконъюгация ОТV

[0447] TV, содержащие цистеин(ы) для конъюгации, сначала восстанавливали, используя восстанавливающий реагент (например, TCEP). После восстановления оставшийся восстанавливающий агент удаляли (очисткой, например, посредством диализа), а TV повторно окисляли окисляющим агентом (например, dHAA). Также получали ASO, содержащий связывающую группу, с последующим этапом восстановления и окисления. Восстановленный и окисленный линкер-ASO затем конъюгировали со свободным цистеином в полипептиде TV и в контрольном антителе. Полученные конъюгаты называются TV-ASO или ОТV. Полученный конъюгат очищали для удаления

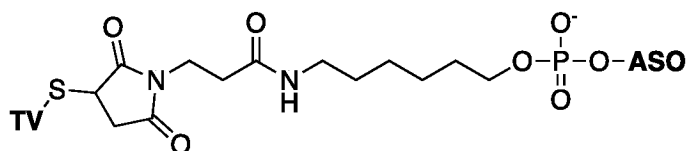
15

нежелательных и неконъюгированных продуктов и определяли чистоту с помощью ЖХ/МС и ЭХ.

[0448] Типовая последовательность ASO, используемая в данном документе, нацеленная на MALAT1, представляет собой:

- 5 5'-GksmCksAksTdsTdsmCdsTdsAdsAdsTdsAdsGdsmCdsAksGksmCk -3' (SEQ ID NO: 656).
Сокращения относятся к компонентам следующим образом: d: ДНК; к: ЛНК; mC: 5-метилцитидин (метилированный цитозин); s: фосфоротиоатный остов (PS). ASO модифицирован 5' С6 амином.

- [0449]** Типовая связывающая группа, используемая в данном документе, приведена ниже, при этом связывающая группа присоединена к атому серы остатка цистеина в белке TV и присоединена к ASO через фосфат, связанный с 5' концевым остатком ASO.:



ПРИМЕР 3. Конструирование типовых OTV с ненацеливающими Fab, DNP02

- 15 **[0450]** Дополнительные слияния Fab-Fc-димер, в которых один Fc был модифицирован для связывания с TfR, как описано в данном документе, а Fab-область является ненацеливающей, создавали, используя альтернативный ненацеливающий Fab, DNP02.

Конструирование TV с заменой N297G

- 20 **[0451]** Следующие гены OTV синтезировали, используя Gblock (IDT DNA) и клонировали в конструкцию, содержащую Fab DNP02, мутации LALA и PG и TV35.23.2 (т. е. СНЗС.35.23.2) в цепи выступа (дикого типа в цепи впадины), с остовом IgG с нумерацией Eu, за исключением мутаций, конъюгации следующим образом:

Следующие молекулы клонировали для конъюгации BTGase ASO:

- 25 «BTGase DAR2»: содержит N297G в димере TV (содержит мутации типа выступ-во-впадину)

«BTGase выступ» содержит N297G только в выступе

«BTGase впадина» содержит N297G только во впадине

Конструирование TV с заменами цистеином (A114C, T239C, K149C) для OTV

- 30 **[0452]** Следующие гены OTV синтезировали, используя Gblock (IDT DNA) и клонировали в конструкцию, содержащую Fab DNP02, мутации LALA и PG и TV35.23.2 (т. е. СНЗС.35.23.2) в цепи выступа (дикого типа в цепи впадины), с остовом IgG с нумерацией Eu, за исключением мутаций, конъюгации следующим образом:

[0453] Следующие молекулы клонировали для конъюгации следующим образом:

«A114C» содержит A114C во впадине (нумерация Kabat).

«T289C» содержит T289C во впадине (нумерация EU).

«K149C» содержит K149C в легкой цепи DNP02 с использованием нумерации EU

5 **Таблица 2.** Типовые последовательности вариантов TV

Название варианта	Fab	Сайт(ы) конъюгации	Аффинность	Описание цепи	SEQ ID NO.
N297G OTR2	DNP02	N297G (с обеих сторон)	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 814
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 816
N297G, выступ	DNP02	N297G	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 814
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 815
N297G, впадина	DNP02	N297G	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 813
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 816
A114C	DNP02	A114C	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь	SEQ ID NO:

Название варианта	Fab	Сайт(ы) конъюгации	Аффинность	Описание цепи	SEQ ID NO.
				(выступ)	813
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 817
T289C	DNP02	T289C	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 813
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 811
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 818
K149C	DNP02	K149C	100 нМ	Легкая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 812
				Тяжелая цепь (выступ)	SEQ ID NO: 813
				Легкая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 812
				Тяжелая цепь (впадина)	SEQ ID NO: 815

[0454] Тяжелая цепь может дополнительно подвергаться процессингу во время производства культуры клеток, поэтому С-концевой остаток лизина удаляют. Таким образом, названия вариантов, перечисленные в таблице 2 выше, могут относиться к белковым молекулам, содержащим непротессированные тяжелые цепи (т. е. содержащие С-концевой остаток лизина); белковые молекулы, содержащие одну или большее количество протессированных тяжелых цепей (т. е. С-концевой остаток лизина отсутствует); или смесь белковых молекул, имеющих протессированные и/или непротессированные тяжелые цепи.

10 **[0455]** Полученные TV конъюгировали с ASO для дополнительного исследования методом биоконъюгации, описанным выше для цистеиновых вариантов, или будут конъюгировать через остаток Q295, используя ферментативную конъюгацию для

вариантов, содержащих модификацию N297G.

ПРИМЕР 4. Исследование с однократной дозой молекул вариантов OTV

5 [0456] Самкам мышей TfR^{ms/hu} в возрасте 2 месяцев внутривенно вводили дозы в соответствии с группами (n = 4) в таблице 3. В качестве контроля были включены группы физиологического раствора, неконъюгированного ASO и RSV-ASO с использованием той же схемы лечения. В контексте данного документа термин «RSV-ASO» относится к паливизумабу, связанному с ASO через остаток цистеина в позиции 239, при этом позиция соответствует нумерации EU.

10

Таблица 3. Группы исследования с однократной дозой

	Группа	Доза
1	Отриц. контроль: физраствор	
2	Отриц. контроль: оголенный ASO (неконъюгированный ASO)	1 мг/кг
3	Отриц. контроль: RSV-ASO	25 мг/кг
4	Сайт конъюгации S239C	25 мг/кг
5	OTR2	молярный эквивалент (соответствует такому же количеству молекул TV)
6	OTR4	молярный эквивалент (соответствует такому же количеству молекул TV)
7	Низкая аффинность (500 нМ)	25 мг/кг
8	Сайт конъюгации A330C	25 мг/кг
9	Сайт конъюгации S442C	25mpk
10	SansFab	молярный эквивалент (8,7 мг/кг) ИЛИ 25 мг/кг

15 [0457] Ткань собирали через 24 часа после однократной дозы. В частности, собирали головной мозг, спинной мозг и периферические органы (почки, легкие, печень и квадрицепс). Терминальный сбор крови также проводили через 24 часа после однократной дозы.

20 [0458] Анализ *hulgG*. Количественное определение гуманизированных антител в плазме и тканевых лизатах мышей проводили, используя общий электрохемилюминесцентный иммуноанализ (ECLIA). Вкратце, в лунки 96-луночного микротитровального планшета MSD GOLD, покрытого стрептавидином (Meso Scale Discovery, Rockville, MD), вносили рабочую концентрацию биотинилированного козьего поликлонального первичного

антитела к IgG человека (Southern Biotech, Birmingham, AL), приготовленного в аналитическом разбавителе, и инкубировали в течение около 1 ч. После этой инкубации и этапа промывки планшета в планшет для анализа добавляли подготовленные исследуемые образцы (с предварительным разведением образца при необходимости) и соответствующие стандарты и оставляли для инкубации в течение около 1 ч. После инкубации исследуемого образца и этапа промывки планшета в аналитический планшет добавляли вторичное рутенированное (SULFO-TAG) козьё антитело к IgG человека (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) в рабочей концентрации в аналитическом разбавителе и инкубировали в течение около 1 ч. После промывки планшета добавляли 1x MSD Read Buffer T (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) для генерации сигнала электрохемилюминесцентного анализа (ЭХЛ), который затем выражали в единицах ЭХЛ (ЕЭХЛ). Все этапы аналитической реакции проводили при температуре окружающей среды со встряхиванием на планшетном шейкере (при необходимости); и все исследуемые образцы предварительно разводили при аналитическом МНР 1:20 перед анализом в аналитическом планшете. Сигналы ЕЭХЛ образца, генерируемые в ходе анализа, впоследствии преобразовывали в концентрации путем обратного расчета аналитической калибровочной кривой (КК). Аналитическую КК кривую аппроксимировали взвешенной четырехпараметрической нелинейной логистической регрессией для использования при расчете концентраций для неизвестных/исследуемых образцов.

20 **[0459]** *Анализ интактного OTV.* Количественное определение интактного OTV (гуманизированного антитела к TfR, конъюгированного с антисмысловым олигонуклеотидом (ASO)) в плазме и тканевых лизатах мышей проводили, используя электрохемилюминесцентный иммуноанализ на основе гибридизации (ECLIA). Вкратце, специальные биотинилированные антисмысловые зонды (синтезированные компанией

25 Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) в рабочей концентрации инкубировали с подготовленными исследуемыми образцами (с предварительным разведением образцов при необходимости) и соответствующими стандартами в буфере TE (10 mM Трис-HCL, содержащий 1 mM ЭДТА) и гибридизировали при соответствующей температуре в течение 45 мин. После инкубации гибридизованный продукт добавляли в лунки 96-луночного

30 микротитровального планшета MSD GOLD, покрытого стрептавидином (Meso Scale Discovery, Rockville, MD), и инкубировали в течение около 30 мин. После инкубации гибридного продукта и этапа промывки планшета в аналитический планшет добавляли вторичное рутенированное (SULFO-TAG) козьё антитело к IgG человека (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) в рабочей концентрации в аналитическом разбавителе и

35 инкубировали в течение около 1 ч. После промывки планшета добавляли 1x MSD Read

Buffer T (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) для генерации сигнала электрохемилюминесцентного анализа (ЭХЛ), который затем выражали в единицах ЭХЛ (ЕЭХЛ). Все этапы аналитической реакции проводили при температуре окружающей среды со встряхиванием на планшетном шейкере (при необходимости); и все исследуемые образцы предварительно разводили при аналитическом МНР 1:20 перед анализом в аналитическом планшете. Сигналы ЕЭХЛ образца, генерируемые в ходе анализа, впоследствии преобразовывали в концентрации путем обратного расчета аналитической калибровочной кривой (КК). Аналитическую КК кривую аппроксимировали взвешенной четырехпараметрической нелинейной логистической регрессией для использования при расчете концентраций для неизвестных/исследуемых образцов.

[0460] *Анализ общего ASO.* Количественное определение общего количества ASO (в конъюгированной и свободной формах) в плазме и тканевых гомогенатах мышечной проводили, используя электрохемилюминесцентный иммуноанализ на основе гибридизации (ECLIA). Вкратце, специальные биотинилированные и конъюгированные с дигоксигенином антисмысловые зонды (синтезированные компанией Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) в рабочих концентрациях объединяли с подготовленными исследуемыми образцами (с предварительным разведением образцов при необходимости) и соответствующими стандартами в буфере TE (10 mM Трис-HCL, содержащий 1 mM ЭДТА). Подготовленные образцы в буфере TE добавляли в 1:1 смесь в 1x буфер SSC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), содержащий рабочую концентрацию рекомбинантного фермента протеиназы К (ThermoFisher, Waltham, MA). Затем гибридизационную/ферментную смесь расщепляли, денатурировали, гибридизировали и охлаждали в термоциклере. После инкубации гибридного продукта образцы добавляли в лунки 96-луночного микротитровального планшета MSD GOLD, покрытого стрептавидином (Meso Scale Discovery, Rockville, MD), и инкубировали в течение около 30 мин. После инкубации и этапа промывки планшета в планшет добавляли вторичное рутенированное (SULFO-TAG) овечьё антитело к дигоксигенину (Novus Biologicals, Littleton, CO) в рабочей концентрации в аналитическом разбавителе и инкубировали в течение около 30 мин. После промывки планшета добавляли 1x MSD Read Buffer T (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) для генерации сигнала электрохемилюминесцентного анализа (ЭХЛ), который затем выражали в единицах ЭХЛ (ЕЭХЛ). Все этапы аналитической реакции проводили при температуре окружающей среды со встряхиванием на планшетном шейкере (при необходимости); и все исследуемые образцы предварительно разводили при аналитическом МНР 1:20 перед анализом в аналитическом планшете. Сигналы ЕЭХЛ образца, генерируемые в ходе анализа, впоследствии преобразовывали в

концентрации путем обратного расчета аналитической калибровочной кривой (КК). Аналитическую КК кривую аппроксимировали взвешенной четырехпараметрической нелинейной логистической регрессией для использования при расчете концентраций для неизвестных/исследуемых образцов.

5 **[0461]** На Фиг. 7-8 показана ФК тканей (как ЦНС, так и периферических) через 24 часа после однократной дозы. Данные показывают, что печень является поглотителем ASO через 24 часа после введения дозы. На Фиг. 9 показана доставка интактного препарата и общего количества ASO в ЦНС вариантами по нагрузке ASO. Данные показывают, что увеличение нагрузки препаратом доставляет в ЦНС меньше интактного препарата, но обеспечивает аналогичные уровни общего ASO. На Фиг. 10 показана доставка интактного препарата и общего количества ASO в ЦНС 500 нМ вариантом. Данные показывают снижение доставки интактного препарата и общего ASO в ЦНС по сравнению с 100 нМ вариантом. На Фиг. 11 показана доставка интактного препарата и общего количества ASO в ЦНС вариантами по сайту конъюгации. Данные показывают снижение доставки интактного препарата и общего ASO в ЦНС вариантами A330C и S442C по сравнению с вариантом S239C. На Фиг. 12 показана доставка интактного препарата и общего количества ASO в ЦНС вариантом SansFab. Данные показывают, что, несмотря на снижение доставки интактного препарата вариантом SansFab, вариант SansFab доставляет неожиданное количество общего ASO в ЦНС.

20

ПРИМЕР 5: Многократные дозы вариантов молекул OTV

[0462] Самкам мышей TfR^{ms/hu} в возрасте 2 месяцев внутривенно вводили дозы в соответствии с группами (n = 6) в таблице 4 в день 1, день 7 и день 14. В качестве контроля были включены группы физиологического раствора, неконъюгированного ASO и RSV-ASO с использованием той же схемы лечения.

25

Таблица 4. Группы исследования с многократной дозой

	Группа	Доза
1	Отриц. контроль: физраствор	
2	Отриц. контроль: оголенный ASO (неконъюгированный ASO)	1 мг/кг
3	Отриц. контроль: RSV-ASO	25 мг/кг
4	Сайт конъюгации S239C	25 мг/кг
5	OTR2	молярный эквивалент (соответствует

		такому же количеству молекул TV)
6	OTR4	молярный эквивалент (соответствует такому же количеству молекул TV)
7	Низкая аффинность (500 нМ)	25 мг/кг
8	Сайт конъюгации A330C	25 мг/кг
9	Сайт конъюгации S442C	25 мг/кг
10	Без Fab	молярный эквивалент (8,7 мг/кг)

[0463] Сбор плазмы проводили через 30 минут, 4 часа, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 1 неделю. Ткань собирали через 72 часа после последней дозы. В частности, собирали головной мозг, спинной мозг и периферические органы (почки, легкие, печень и квадрицепс). Терминальный сбор крови также проводили через 72 часа после последней дозы.

[0464] Плазменная ФК молекул вариантов OTV показана на Фиг. 2. Вариант OTR4(2.5) и сайт конъюгации S442C демонстрируют существенно более быстрый клиренс, чем молекула с сайтом конъюгации S239C, в то время как 500 нМ молекула с более низкой аффинностью выводится медленнее.

Таблица 5. C₀, ППК, CL с Фиг. 2

	C ₀ (мкМ)	ППК (мкМ*ч)	CL (мл/д/кг)
RSV-ASO	2,04	84,7	35,5
S239C	2,53	36,2	113
OTR2 (1,23)	2,03	24,6	160
OTR4 (2,5)	2,17	7,07	569
Низкая аффинность	3,29	50,0	81,0
A330C	2,36	33,7	120
S442	2,27	16,5	246
SansFab	0,73	9,97	1140

[0465] Плазменная ФК в момент времени 24 часа показана на Фиг. 3. Переменными, которые повышают плазменный клиренс, являются увеличение лекарственной нагрузки ASO, сайт конъюгации S442C и молекулы SansFab. Концентрация интактного препарата и общего ASO в плазме показана на Фиг. 4. Как и ожидалось, оголенный контрольный ASO выводится быстро. Кроме того, молекулы OTR4(2.5), S442C и SansFab выводятся быстрее, чем молекулы S239C. Варианты с повышенным OTR доставляют в ЦНС меньше интактного

препарата, но обеспечивают аналогичные уровни общего ASO (Фиг. 9). Однако повышение OTR приводит к более быстрому плазменному клиренсу (Фиг. 2-3). OTR1 доставлял такое же количество ASO в ЦНС, но имел сниженный плазменный клиренс.

[0466] Результаты по ФК и нокдауну MALAT1 в ЦНС в коре головного мозга и спинном мозге через 72 часа после последней дозы показаны на Фиг. 13-15. На Фиг. 13 показано, что увеличение нагрузки ASO увеличивает общее количество ASO в коре головного мозга и спинном мозге и демонстрирует нокдаун MALAT1. Повышенная нагрузка ASO доставляет значительное количество ASO в головной мозг, несмотря на более быстрый клиренс. Более быстрый клиренс вариантов с повышенным OTR можно компенсировать повышением нацеленной доставки нагрузки на молекулу OTV. На Фиг. 14 показано, что снижение аффинности, т. е. 500 нМ вариант («низкая аффинность»), снижает общее количество ASO по сравнению с 100 нМ вариантом («S239C»). Тем не менее нокдаун MALAT1 в коре головного мозга и спинном мозге все еще наблюдали с вариантом со сниженной аффинностью, хотя и на более низком уровне по сравнению с 100 нМ вариантом. На Фиг. 15 показано, что сайты конъюгации A330C и S442C снижали общее количество ASO в коре головного мозга и спинном мозге по сравнению с S239C, но все же были способны обеспечивать нокдаун MALAT1. На Фиг. 16 показано, что удаление плеч Fab снижает доставку препарата в кору головного мозга и спинной мозг, но, тем не менее, все же обеспечивает нокдаун MALAT1. Быстрый клиренс молекулы SansFab, вероятно, обусловлен меньшей молекулярной массой этих молекул, составляющей около одной трети молекулярной массы других молекул. Порогом почечного клиренса считается молекулярная масса 30-50 кДа. Следовательно, увеличение массы молекулы SansFab, например, за счет увеличения лекарственной нагрузки, может замедлить клиренс.

[0467] ФК в периферических тканях и нокдаун через 72 часа после последней дозы показаны на Фиг. 17-19. Уровни ASO приблизительно одинаковы для разных вариантов в периферических тканях через 72 часа после последней дозы. Все варианты индуцируют целевой нокдаун в периферических тканях. Оголенный ASO, как и ожидалось, значительно снижает уровни MALAT1 в печени из-за накопления свободного ASO в печени. Варианты OTR2(1,23), OTR4 (2,5) и SansFab приводят к значительно большей степени целевого нокдауна в печени.

ПРИМЕР 6. ФК у мышей дикого типа

[0468] Мышам дикого типа, т. е. без человеческого TfR, в/в вводили дозу 10 мг/кг. Сбор плазмы проводили через 4 часа, 1 день, 3 дня и 7 дней после введения дозы.

[0469] Плазменная ФК интактного препарата и общее количество ASO показаны на

Фиг. 5. Концентрация huIgG и % интактного препарата показаны на Фиг. 6. Эти данные показывают не опосредованную TfR скорость клиренса вариантов OTV. Все молекулы вариантов OTV выводятся медленнее у мышей дикого типа по сравнению с мышами huTfR-KI. Скорость деконъюгации для молекул вариантов OTV значительно ниже (при наличии), чем у мышей huTfR-KI, что позволяет предположить, что деконъюгация опосредована рецепторным путем. Данные также свидетельствуют о том, что молекулы вариантов OTV стабильны *in vivo* в отсутствие интернализации. Конъюгация S442C и молекулы SansFab выводятся быстрее, чем S239C и RSV-ASO. Это свидетельствует о том, что частичное объяснение их более быстрого клиренса у мышей huTfR-KI не опосредовано TfR и может быть результатом почечного клиренса или молекулярной нестабильности.

ПРИМЕР 7: Нокдаун и биораспределение ASO в головном мозге в исследованиях на отличных от человека приматах с однократной и многократной дозой

[0470] Malat1 ASO биоконъюгировали, как описано выше, посредством малеимидного линкера с TV с модификацией S239C, который связывает TfR яванских макаков с аффинностью 250 нМ. Полученную молекулу («OTV:MALAT1») использовали для сравнения биораспределения внутривенно доставляемого OTV, внутривенно доставляемого ASO и интратекально доставляемого ASO в центральной нервной системе яванских макаков, при этом каждой из пяти когорт из трех яванских макаков вводили дозы, как описано ниже:

- 1) Однократная доза в 4 мг MALAT1 ASO интратекально («ASO и/т»);
- 2) Однократная доза в 30 мг/кг OTV:MALAT1 внутривенно («OTV в/в»);
- 3) Четыре дозы физраствора внутривенно раз в две недели («физраствор» или «носитель»);
- 4) Четыре дозы по 30 мг/кг OTV:MALAT1 внутривенно раз в две недели («OTV в/в»);
- 5) Четыре дозы по 1,1 мкл MALAT1 ASO внутривенно раз в две недели (т. е. молярное эквивалентное количество ASO) («ASO в/в»).

[0471] Через неделю после введения собирали ткани в группе 2, указанной выше, для фармакокинетического моделирования. В случае всех остальных когорт ткани собирали через две недели после последней дозы, чтобы дать достаточно времени для целевого нокдауна. Полушурия головного мозга и спинной мозг иссекали и либо фиксировали для иммуноокрашивания против ASO, либо гомогенизировали для фармакокинетического и фармакодинамического анализа.

[0472] Общее количество ASO в головном мозге и на периферии в исследованиях с однократной и многократной дозой на отличных от человека приматах, показано на Фиг.

37. OTV обуславливает поглощение ASO посредством TfR в аналогичных органах у ОЧП, как это наблюдалось в исследованиях на мышцах TfR KI, а именно в ЦНС, мышцах и сетчатке. Кроме того, введение многократных доз OTV демонстрирует накопление ASO по сравнению с однократной дозой OTV.

- 5 [0473] Неконъюгированный ASO, доставляемый внутривенно, отсутствует в центральной нервной системе, поскольку он быстро выводится и эффективно не проникает через гематоэнцефалический барьер. По сравнению с интратекальной инъекцией ASO системное введение OTV приводит к значительно более широкому и гомогенному биораспределению ASO в центральной нервной системе. (Смотрите **Фиг. 20А, 21 и 38**)
- 10 После интратекальной инъекции концентрация ASO в спинном мозге значительно выше, чем в головном мозге (>10-кратная разница во многих областях). Даже внутри головного мозга концентрация ASO намного выше в поверхностных областях, прилегающих к ЦСЖ и вдоль кортикальных поверхностей. Очень небольшое количество ASO наблюдается в глубоких областях головного мозга (**Фиг. 40А**). Однако после системного введения OTV
- 15 наблюдается превосходное биораспределение ASO по всем областям головного мозга. Концентрация ASO является приблизительно одинаковой в спинном мозге и во многих областях головного мозга, включая глубокие структуры головного мозга и более глубокие кортикальные слои (**Фиг. 40В**). Кроме того, на **Фиг. 38** также показаны совокупные уровни ASO при введении многократных доз OTV.
- 20 [0474] Кроме того, измеряли относительные уровни РНК MALAT1 посредством кПЦР после экстракции РНК Trizol из образцов головного мозга. После однократной 30 мг/кг дозы OTV экспрессия MALAT1 во лобной коре снизилась до 46% от контрольного уровня. Экспрессия MALAT1 существенно не снижалась в лобной коре после однократной интратекальной или внутривенной дозы оголенного ASO (**Фиг. 20В**). В исследовании с
- 25 многократными дозами OTV обеспечивает нокдаун целевой РНК не только во многих областях ЦНС, но и в периферических мышцах у отличных от человека приматов по сравнению с оголенным ASO (**Фиг. 41**). Это позволяет использовать OTV не только при связанных с ЦНС нарушениях, но и при нейромышечных нарушениях, включая нарушения, которые имеют фенотип как ЦНС, так и мышц.
- 30 [0475] Разница в биораспределении ASO по всей центральной нервной системе в конечном итоге приводит к разнице в целевом нокдауне. После интратекального введения наблюдали значительно больший нокдаун MALAT1 в спинном мозге по сравнению с головным. Напротив, системное введение OTV обеспечивает усиленный нокдаун в головном мозге по сравнению с интратекально доставляемым ASO, а степень нокдауна
- 35 MALAT1 в спинном и головном мозге более схожа. По сравнению с однократной

внутривенной дозой OTV в группе с многократными дозами (группа 4) наблюдается накопление ASO в головном и спинном мозге с аналогичным профилем биораспределения, который демонстрирует равномерное накопление ASO во всей ЦНС. В целом, OTV является превосходным методом доставки ASO и достижения более равномерного целевого нокдауна по всей центральной нервной системе.

ПРИМЕР 8: Анализ методом одноядерного РНК-секвенирования для мышей hTfR-KI, обработанных многократными дозами

[0476] Мышам hTfR-KI четыре раза в неделю вводили Malat1 ASO («ASO»); TV без ASO («контрольный ATV»); OTV, конъюгированный с Malat1 ASO («OTV»); или отличное от TV слияние Fab-Fc-димер (т. е. не имеющее сайта связывания Tfr в константном домене), конъюгированное с ASO Malat1 («не-ATV ASO») при молярной эквивалентности. Через три дня после последней дозы проводили перфузию мышей ФСБ и иссекали головной мозг для анализа методом одноядерного РНК-секвенирования («ояРНК-секв.») в соответствии с **Фиг. 22А.**

[0477] *Генерация данных ояРНК-секвенирования.* Готовили 16 одноядерных суспензий и обрабатывали в четырех партиях из четырех образцов тканей, каждая из которых содержала образцы из всех четырех экспериментальных групп. Ядра готовили в буфере Nuclei EZ Prep (Sigma Aldrich, № NUC101), содержащем 1X ингибитор протеазы (полный, без ЭДТА (Roche, кат. № 11873580001) и 0,4 Е/мкл ингибитора РНКазы (Ambion, кат. № AM2682). В случае каждого образца 80 мг ткани диссоциировали 25 ударами песта А и В с использованием 2 мл стеклянного гомогенизатора, а лизаты инкубировали на льду в течение 15 минут. После этого суспензию центрифугировали при 500 g и 4°C в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в буфере Nuclei EZ Prep и инкубировали еще 15 минут на льду.

[0478] Наконец, ядра осаждали центрифугированием при 300 g при 4°C в течение 5 мин, ресуспендировали в 500 мкл 1% БСА в ФСБ, загружали на 2 М сахарозную подушку и центрифугировали при 13000 g при 4°C в течение 45 мин. Осадок ресуспендировали в 2% БСА в ФСБ и пропускали через 30 мкм сито. Концентрацию ядер определяли, используя счетчик клеток Vi-CELL (Beckman Coulter).

[0479] Захват отдельных ядер проводили на приборе 10x Genomics Chromium с набором Chromium Next GEM Single Cell 3' (версия 3.1), нацеленным на извлечение 10000 ядер на образец. Подготовку библиотеки секвенирования нового поколения проводили в соответствии с протоколом производителя CG000204 (10x Genomics, Revision B).

[0480] Секвенирование нового поколения проводили с помощью SeqMatic (Fremont,

СА) на приборе Illumina NovaSeq с проточной ячейкой S2, генерирующей считывания со спаренными концами (28x10x10x90 оснований). Для каждого образца получали минимум 200 миллионов пар считываний.

5 **[0481]** *Анализ данных ояРНК-секвенирования.* Необработанные файлы последовательностей в формате FASTQ картировали на эталонный мышинный геном (10x Genomics, версия mm10-2020-A) и количественно оценивали с помощью Cell Ranger (10x Genomics, версия 5.0.0). Необработанные матрицы подсчета обрабатывали в R (версия 4.0.3)/Bioconductor (версия 3.12), используя пакет DropletUtils (версия 1.10.2) для идентификации содержащих клетки капель. Капли с высокой фракцией митохондриальных транскриптов (> 3 абсолютных медианных отклонений выше медианного значения
10 выборки) отбрасывали.

[0482] После удаления предполагаемых дублетов с помощью пакета scDbfFinder (версия 1.4.0) оставалось всего 108959 ядер (7378-13521 на образец, медиана 9724). Числа нормализовали с помощью размерных коэффициентов библиотеки, рассчитанных с
15 помощью функции CompeSumFactors из пакета scran R (версия 1.18.3), и проводили логарифмическое преобразование.

[0483] Приблизительные метки типов клеток присвоили 107261 ядру (98%), используя алгоритм SingleR (версия 1.4.0) с параметрами по умолчанию и данными для отдельных клеток, опубликованными Zeisel et al, Cell 174(4): 999-1014, 2018 в качестве ссылки.

20 **[0484]** В целях уменьшения размерности и визуализации было идентифицировано 1000 наиболее вариабельных генов с помощью функций modelGeneVar и getTopHVGs из пакета scran R. Анализ главных компонент (АГК) проводили для этих элементов с помощью пакета BiocSingular R (версия 1.6.0). После этого проводили уменьшение размерности TSNE и UMAP на основе 50 главных компонент с помощью пакета scater R (версия
25 1.18.3).

[0485] Для анализа дифференциальной экспрессии агрегировали показатели генной экспрессии в каждом типе клеток для каждого биологического повтора, используя пакет muscat R (версия 1.4.0). В этот анализ были включены только типы клеток, наблюдаемые при медиане ≥ 50 клеток на образец.

30 **[0486]** Для каждого типа клеток условия сравнивали обработки, используя общую линейную регрессию с поправкой на пол животного, с помощью пакета EdgeR R (версия 3.32.1). Статистическую значимость дифференциальной экспрессии корректировали с учетом множественности как генов, так и типов клеток, используя метод Бонферрони.

[0487] После кластеризации по типу клеток анализировали нокдаун Malat1 в
35 возбудительных нейронах, тормозящих нейронах, эндотелиальных клетках,

олигодендрocyтax, астроцитах и микроглии. Результаты нокдауна в конкретном типе клеток показаны на **Фиг. 22**. OTV обеспечивает нокдаун ЦНС во всех основных типах клеток по сравнению с группами ASO, не-ATV ASO и контрольного ATV.

5 Пример 9: Плазменная ФК и концентрация ASO и нокдаун в головном мозге, спинном мозге и печени вариантов OTV по линкеру.

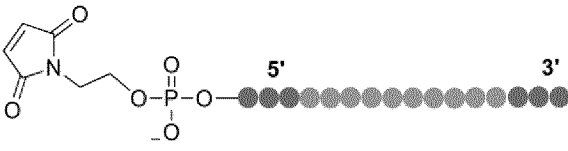
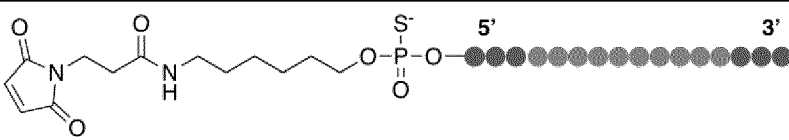
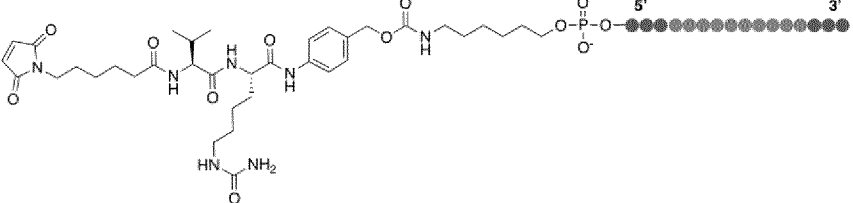
[0488] Семь различных химических линкеров использовали для конъюгации ASO Malat1 со слияниями Fab-Fc-димер (TV35.23.2 (т. е. CH3C.35.23.2), DNP02 Fab, S239C), описанными выше. Полученные конъюгаты OTV разводили стерильным физиологическим раствором и вводили мышам следующим образом:

[0489] Для определения плазменной ФК (скорости клиренса и потери интактного OTV в кровообращении) у мышей дикого типа 6 мышам дикого типа для каждой связывающей группы в таблице 6 внутривенно вводили конъюгаты OTV в дозе 25 мг/кг, а плазму собирали через 15 минут, 30 минут, 4 часа, 24 часа, 48 часов, 72 часа и одну неделю после дозы.

[0490] Чтобы определить биораспределение ASO и целевой нокдаун в головном мозге, спинном мозге и печени, 6 мышам Tfr^{ms/hu} с нокином для каждой связывающей группы в таблице 6 внутривенно вводили конъюгаты OTV три раза в день 1, день 4, день 8 в дозе 25 мг/кг. Плазму собирали через 4 часа, 24 часа и 72 часа после последней дозы. Сбор тканей проводили через неделю после последней дозы. Мышей, которым вводили OTV, сравнивали с мышами, которым вводили стерильный физиологический раствор в качестве контроля.

Таблица 6.

Связывающая группа 1	
Связывающая группа 2	
Связывающая группа 3	
Связывающая группа 4	

Связывающая группа 5	
Связывающая группа 6	
Связывающая группа 7	

- [0491] Образцы плазмы анализировали в отношении общей концентрации ASO и общей концентрации huIgG, используя анализы, описанные выше. Результаты показаны на Фиг. 23. Все варианты по линкеру показали одинаковую скорость клиренса и потери интактного OTV у мышей дикого типа.
- [0492] Концентрацию ASO в головном мозге, спинном мозге и печени через одну неделю после трех доз по 25 мкг измеряли, используя методы, описанные выше. Результаты показаны на Фиг. 24. Все варианты по линкеру приводили к отложению от 10 до 40 нМ ASO в головном мозге; отложению от 5 до 20 нМ в спинном мозге; и отложению от 200 до 400 нМ в печени.
- [0493] Экспрессию Malat1 измеряли в головном мозге (лобная доля), спинном мозге (шейная часть) и печени (правая доля) следующим образом. ~50 мг кусок ткани гомогенизировали с помощью шарикового гомогенизатора в Trizol для выделения общей РНК. Вкратце, гомогенизированные ткани инкубировали с хлороформом в течение 3-5 минут, чтобы обеспечить разделение фаз после центрифугирования. Затем водную фазу инкубировали с изопропанолом в течение 10 минут для осаждения РНК, после чего промывали 75% этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей нуклеазы. Затем измеряли экспрессию Malat1 с помощью кПЦР, используя набор Express One-Step Superscript Kit, и нормализовали относительно экспрессии конститутивного гена Gapdh. Результаты показаны на Фиг. 25. Все варианты по линкеру привели к сильному нокдауну Malat1 в головном мозге, спинном мозге и печени. Интересно, что нокдаун Malat1, нормализованный относительно общей концентрации ASO (Фиг. 26), позволил выявить менее эффективный нокдаун для связывающей группы 3 как в головном мозге, так и в спинном мозге (большее значение % нокдауна к концентрации ASO соответствует более эффективному нокдауну).

Пример 10: ФК/ФД анализ вариантов по сайту конъюгации S239C, A114C и T289C

[0494] Анализировали системную стабильность, поглощение в головном мозге и нокдаун в головном мозге вариантов по сайту конъюгации S239C, A114C и T289C. Malat1 ASO конъюгировали посредством связывающей группы 1 в таблице 6 со слияниями Fab-Fc-димер с S239C, A114C и T289C, описанными выше. Полученные конъюгаты OTV разводили в стерильном физиологическом растворе и вводили 3-месячным мышам, экспрессирующим гуманизированный рецептор трансферрина (hTfR KI), путем внутривенной инъекции в хвостовую вену в дозе 25 мг/кг следующим образом: Одна группа животных получала однократную дозу для оценки плазменной фармакокинетики. У этих мышей прижизненно собирали плазму через 0,5, 24 и 72 часа после введения дозы, а терминальный сбор плазмы и тканей проводили через 168 часов после инъекции. Вторая группа животных получала 3 дозы вариантов OTV для оценки влияния на тканевой нокдаун мишени ASO (Malat1). У этих мышей прижизненно собирали плазму после первой дозы через 4 и 48 часов для дополнительного профилирования плазменной фармакокинетики при однократной дозе. Дополнительные дозы вводили через 72 и 168 часов после первой дозы, а терминальный сбор тканей проводили через 336 часов после первой инъекции. По окончании исследования собирали образцы головного мозга, печени и почек для определения тканевого фармакокинетического и фармакодинамического ответа.

Способы

[0495] *Уход за мышами и сбор тканей.* Мышам периферически проводили терапевтическую обработку посредством внутривенной (в/в) инъекции в хвостовую вену (общий объем ~200 мкл). В случае прижизненного сбора плазмы кровь брали посредством подподбородочной пункции и переносили в пробирки, покрытые ЭДТА. Затем центрифугировали при 12700 об/мин в течение 7 мин при 4С перед тем, как собрать верхний слой плазмы. Для сбора тканей животных анестезировали трибромэтанолом и собирали цельную кровь посредством пункции сердца в пробирки, покрытые ЭДТА, для оценки плазменной концентрации препарата. После переноса в пробирки, покрытые ЭДТА, цельную кровь центрифугировали при 12700 об/мин в течение 7 мин при 4С перед тем, как собрать верхний слой плазмы. Затем проводили транскардиальную перфузию мышей ледяным ФСБ со скоростью 5 мл/мин в течение 5 мин. Для биохимического анализа ткани собирали, взвешивали, быстро замораживали на сухом льду, а затем хранили при -80°C.

[0496] *Гомогенизация тканей для измерения концентрации препарата.* Взвешенные замороженные образцы тканей обрабатывали для биохимических анализов путем добавления 5X или 10X объема охлажденного 1% NP40 + ФСБ буфера для гомогенизации

с добавлением полного ингибитора протеаз (Roche № 04693132001) и ингибиторов фосфатаз PhosStop (Roche 04906837001). Образцы гомогенизировали, используя 3 мм гранулы из карбида вольфрама в 1,5 мл пробирках Эппендорфа, встряхивали, используя Qiagen TissueLyzer II (кат. №/ID: 85300) (2×3 мин при 27 Гц). Для тех образцов, для анализа которых использовали лизат, образцы центрифугировали при 14 000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатант лизата или неочищенный гомогенат затем использовали для последующих анализов. Для анализов, требующих нормализации общего белка, проводили ВСА.

[0497] *Гомогенизация тканей для измерений РНК.* Взвешенные образцы замороженной ткани обрабатывали для анализа РНК путем добавления 10X объема реагента Qiazol. Образцы гомогенизировали, используя 5 мм гранулы из карбида вольфрама в 2 мл пробирках Эппендорфа, встряхивали, используя Qiagen TissueLyzer II (кат. №/ID: 85300) (2х3 мин при 27 Гц). После лизиса образцы инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, затем добавляли хлороформ. Образцы перемешивали на вортексе, инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин, затем центрифугировали в течение 15 мин при 12000хg при 4°C. Затем выделяли водную фазу. Затем выделяли РНК путем добавления изопропанола, перемешивания на вортексе, инкубации в течение 10 минут при комнатной температуре, затем центрифугирования в течение 10 мин при 12000хg при 4°C. Полученный осадок затем ресуспендировали в 75% этаноле, перемешивали на вортексе и центрифугировали в течение 5 мин при 7500хg при 4°C. Конечный осадок ресуспендировали в воде.

[0498] *Протокол ELISA для HuIgG.* Общие концентрации терапевтических антител в мышинной плазме и гомогенатах тканей определяли количественно, используя общий иммуноферментный анализ против человеческого IgG в сэндвич-формате (ELISA). Вкратце, планшеты покрывали на ночь при 4°C ослиным рAb к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, № 709-006-098) при 1 мкг/мл в растворе бикарбоната натрия (Sigma, № С3041-50CAP). После инкубации и промывки планшета буфером (ФСБ + 0,05% Твин 20) подготовленные исследуемые образцы (с предварительным разведением образцов при необходимости, в ФСБ + 0,05% Твин 20 + БСА (10 мг/мл)) и соответствующие стандарты добавляли в аналитический планшет и инкубировали в течение 2 ч. После инкубации исследуемого образца и этапа промывки вторичное антитело, козье к IgG человека (Jackson ImmunoResearch, № 109-036-098), разводили в блокирующем буфере (ФСБ + 0,05% Твин 20 + 5% БСА (50 мг/мл)) до конечной концентрации 0,02 мкг/мл. После инкубации в течение 1 часа и конечного этапа промывки планшеты проявляли путем добавления субстрата ТМБ (Thermo Fisher Scientific, № 34028) и инкубировали в течение 5-10 минут. Реакцию гасили

добавлением 4 н. H₂SO₄ (Life Technologies, № SS03) и считывали, используя поглощение на 450 нМ. Все этапы аналитической реакции проводили при температуре окружающей среды с аккуратным перемешиванием (при необходимости); при этом все исследуемые образцы предварительно разводили до минимально необходимого для анализа разведения (МНР) 1:20 перед анализом. Аналитические стандартные кривые аппроксимировали взвешенной четырехпараметрической (4PL) нелинейной логистической регрессией для использования при расчете концентраций для неизвестных/исследуемых образцов.

[0499] *Анализ интактного ОТВ и анализ общего ASO описаны выше. кПЦР-анализ.* Чтобы оценить уровни целевой мРНК, проводили кРВ-ПЦР для РНК, выделенной из лизатов тканей. Уровни целевой мРНК оценивали, используя зонды Taqman: mMalat1, mGAPDH. Express One-Step Kit Taqman. Для каждого образца уровни мРНК Malat1 нормализовали относительно конститутивного гена Gapdh. кРВ-ПЦР проводили, используя систему QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems), и измеряли средние значения СТ для каждого зонда, используя дубликаты образцов. Затем рассчитывали значения дельта-дельта-СТ относительно группы, не обработанной ASO, и отображали на графике как относительные уровни экспрессии.

[0500] Результаты приведены в Фиг. 27-32. Данные демонстрируют, что конъюгация ASO в A114C или T289C существенно не меняет плазменный фармакокинетический профиль ОТВ по сравнению с ранее описанным сайтом S239C (Фиг. 27). Данные также демонстрируют, что все три сайта конъюгации обеспечивают поглощение ASO в головном мозге, печени и почках (Фиг. 28-30), а также нокдаун целевой РНК ASO (Malat1) (Фиг. 31-32). Данные также подтверждают, что сайт S239C обеспечивает наибольшую плазменную стабильность, поглощение в головном мозге и нокдаун в головном мозге из трех исследованных сайтов конъюгации.

Пример 11: Конструирование миРНК ОТВ:HPRT

[0501] *Синтез и дуплексирование цепи миРНК HPRT, модифицированной 5'-малеимидом.* Смысловую и антисмысловую цепи миРНК HPRT синтезировали в соответствии с последовательностями в таблице 7 ниже. Смысловая цепь была модифицирована малеимидным линкером на 3' конце посредством С6 аминомодификатора и сочетания сложного эфира NHS малеимидопропионовой кислоты. Смысловую и антисмысловую цепи гибридизировали путем встряхивания 1:1 раствора в воде при кт в течение 5 мин. Степень конверсии анализировали с помощью ЭХ-ВЭЖХ.

[0502] Полученные 5'-малеимид-модифицированные миРНК HPRT конъюгировали со слияниями Fab-Fc-димер, полученными выше, содержащими модификацию цистеином

S239C для конъюгации в соответствии с методом биоконъюгации, описанным ниже.

Таблица 7

HPRT, смысловая цепь	5'- U _{fo} C _{mo} C _{fo} U _{mo} A _{fo} U _{mo} G _{fo} A _{mo} C _{fo} U _{mo} G _{fo} U _{mo} A _{fo} G _{mo} A _{fo} U _{mo} U _{fo} U _{mo} U _{fo} A _{mo} U _{fo} -3'	SEQ ID NO: 870
HPRT, антисмысловая цепь	5'- A _{mo} U _{fo} A _{mo} A _{fo} A _{mo} A _{fo} U _{mo} C _{fo} U _{mo} A _{fo} C _{mo} A _{fo} G _{mo} U _{fo} C _{mo} A _{fo} U _{mo} A _{fo} G _{mo} G _{fo} A _{ms} A _{fs} U _{mo} -3'	SEQ ID NO: 871
<i>f = 2'-F РНК; m = 2'-метокси РНК; o = фосфодиэфирная связь; s = фосфоротиоатная связь</i>		

- 5 **[0503]** Биоконъюгация линкера:миРНК HPRT с TV. Слияния Fab-Fc-димер, созданные выше, содержащие модификацию цистеином S239C для конъюгации, сначала восстанавливали, используя 30 молярных эквивалентов ТКЭФ и 2 mM ЭДТА, 37°C в течение 1 часа. Восстановление подтверждали с помощью ЖХ/МС. После восстановления оставшийся ТКЭФ удаляли посредством диализа, используя 1XФСБ, pH 6,8, с 2 mM ЭДТА
- 10 (очистка, например, посредством диализа), а слияния Fab-Fc-димер повторно окисляли 50 молярными эквивалентами dHAA при комнатной температуре в течение 3 часов. Окисление подтверждали посредством ЖХ/МС dHAA. Для биоконъюгации 1,2 молярных эквивалента модифицированной 5'-малеимидом миРНК HPRT, полученной выше, добавляли к окисленным слияниям Fab-Fc-димер при комнатной температуре в течение 1 часа.
- 15 Полученные конъюгаты очищали посредством анионообменной хроматографии, используя колонку Resource Q (уравновешивающий буфер: 50 mM Трис, pH 7,5, элюирующий буфер: 50 mM Трис, pH 7,5 + 2 M NaCl) для удаления нежелательных и неконъюгированных продуктов. Чистоту конъюгатов определяли с помощью ЖХ/МС и ЭХ. Полученные конъюгаты называются миРНК OTV:HPRT. Буфер для составления для миРНК OTV:HPRT
- 20 представлял собой 40 mM ФБ, 40 mM аргинина, 100 mM NaCl, 6% сахарозы, pH 8,0.

Пример 12: Распределение миРНК OTV:HPRT и уровень нокдауна HPRT мышей

- [0504]** Полученную выше миРНК OTV:HPRT исследовали в отношении доставки малых интерферирующих РНК (миРНК) через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в
- 25 нейроны и глубокие области головного мозга. миРНК представляют собой двухцепочечные некодирующие олигонуклеотиды, которые взаимодействуют с каталитическим РНК-индуцированным комплексом сплайсинга (RISC) для деградации продуктов мРНК после

транскрипции, тем самым предотвращая трансляцию белка. В отличие от антисмысловых олигонуклеотидов (ASO), синтетические молекулы миРНК плохо поглощаются клетками, при этом для их проникновения в клетку необходимы конъюгированные лиганды. В нашем исследовании миРНК была разработана для нацеливания на мышиную гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), обычный конститутивный ген, экспрессируемый в клетках. Молекулы OTV:миРНК также анализировали в отношении их стабильности в кровотоке, проникновения в головной мозг, селективного/неселективного клеточного поглощения, эффективности сайленсинга генов и продолжительности сайленсинга генов.

5
10 **[0505]** Мышам с нокином Tfr^{ms/hu} вводили внутривенно однократную дозу или внутривенно и подкожно в группах с многократными дозами: четыре дозы (дни 0, 3, 7, 10). Антитело к CD4 вводили перед начальными дозами во всех группах, чтобы предотвратить ответы антител на препарат у мышей. Конъюгат OTV:миРНК разводили в стерильном физиологическом растворе и вводили в дозе 25 мг/кг. Плазму собирали через 4 и 24 часа
15 после начальной дозы и через 48 часов после третьей дозы. Сбор образцов тканей (т. е. головного мозга, спинного мозга, почек, печени и квадрицепса) и терминальный сбор крови проводили через 72 часа после последней дозы для определения распределения миРНК и уровня нокдауна HPRT у мышей по сравнению с мышами, которым вводили физиологический раствор. Для всех животных проводили перфузию стерильным физиологическим раствором, кровь собирали в пробирки для плазмы с ЭДТК,
20 центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 минут, а затем выделяли плазму для последующего анализа.

[0506] *Анализ HuIgG.* Общие концентрации huIgG в плазме количественно оценивали, используя общий анализ ELISA против человеческого IgG в сэндвич-формате. Вкратце,
25 планшеты покрывали на ночь при 4°C ослиным к IgG человека (JIR № 709-006-098) при 1 мкг/мл в растворе бикарбоната натрия (Sigma, № C3041-50CAP) с аккуратным встряхиванием. Затем планшеты 3х промывали промывочным буфером (ФСБ + 0,05% Твин 20). Аналитические стандарты и образцы разводили в ФСБ + 0,05% Твин 20 и 1% БСА (10 мг/мл). Подготовка стандартной кривой варьировалась от 0,41 до 1500 нг/мл или от 0,003
30 до 10 нМ (НПКО <0,03 нМ). Стандарты и разведенные образцы инкубировали со встряхиванием в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты промывали 3х промывочным буфером. Выявляющее антитело, козье к IgG человека (JIR № 109-036-098), разводили в блокирующем буфере (ФСБ + 0,05% Твин 20 + 5% БСА (50 мг/мл)) до конечной концентрации 0,02 мкг/мл и инкубировали планшеты со
35 встряхиванием в течение 1 ч при комнатной температуре. После заключительной 3х

промывки планшеты проявляли добавлением субстрата ТМБ и инкубировали в течение 5-10 минут. Реакцию гасили добавлением 4 н. H₂SO₄ и считывали, используя поглощение на 450 нМ.

[0507] *Анализ общего количества антисмысловой (AS) и смысловой цепи (SS).*

5 Количественное определение AS или SS (в конъюгированной и свободной формах) в плазме и тканевых гомогенатах мышей проводили, используя электрохемилюминесцентный иммуноанализ на основе гибридизации (ECLIA). Вкратце, специальные биотинилированные и конъюгированные с дигоксигенином антисмысловые зонды

10 (синтезированные компанией Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) в рабочих концентрациях объединяли с подготовленными исследуемыми образцами (с предварительным разведением образцов при необходимости) и соответствующими стандартами в буфере TE (10 мМ Трис-HCL, содержащий 1 мМ ЭДТА). Подготовленные образцы в буфере TE добавляли в 1:1 смесь в 1х буфер SSC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),

15 содержащий рабочую концентрацию рекомбинантного фермента протеиназы К (ThermoFisher, Waltham, MA). Затем гибридизационную/ферментную смесь расщепляли, денатурировали, гибридизировали и охлаждали в термоциклере. После инкубации гибридного продукта образцы добавляли в лунки 96-луночного микротитровального планшета MSD GOLD, покрытого стрептавидином (Meso Scale Discovery, Rockville, MD), и инкубировали в течение около 30 мин. После инкубации и этапа промывки планшета в

20 планшет добавляли вторичное рутенированное (SULFO-TAG) овечьё антитело к дигоксигенину (Novus Biologicals, Littleton, CO, меченное в лаборатории) в рабочей концентрации в аналитическом разбавителе и инкубировали в течение около 30 мин. После промывки планшета добавляли 1х MSD Read Buffer T (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) для генерации сигнала электрохемилюминесцентного анализа (ЭХЛ), который затем

25 выражали в единицах ЭХЛ (ЕЭХЛ). Все этапы аналитической реакции проводили при температуре окружающей среды со встряхиванием на планшетном шейкере (при необходимости); и все исследуемые образцы предварительно разводили при аналитическом МНР 1:20 перед анализом в аналитическом планшете. Сигналы ЕЭХЛ образца, генерируемые в ходе анализа, впоследствии преобразовывали в концентрации путем

30 обратного расчета аналитической калибровочной кривой (КК). Аналитическую КК кривую аппроксимировали взвешенной четырехпараметрической нелинейной логистической регрессией для использования при расчете концентраций для неизвестных/исследуемых образцов.

[0508] *Анализ интактного миРНК-OTV.* Количественное определение интактного OTV

35 (гуманизированного антитела к TfR, конъюгированного с антисмысловым

олигонуклеотидом (ASO)) в плазме и тканевых лизатах мышей проводили, используя электрохемилюминесцентный иммуноанализ на основе гибридизации (ECLIA). Вкратце, специальные биотинилированные антисмысловые зонды (синтезированные компанией Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) в рабочей концентрации инкубировали с 5 подготовленными исследуемыми образцами (с предварительным разведением образцов при необходимости) и соответствующими стандартами в буфере TE (10 mM Трис-HCL, содержащий 1 mM ЭДТА) и гибридизовали при соответствующей температуре в течение 45 мин. После инкубации гибридизованный продукт добавляли в лунки 96-луночного микротитровального планшета MSD GOLD, покрытого стрептавидином (Meso Scale 10 Discovery, Rockville, MD), и инкубировали в течение около 30 мин. После инкубации гибридного продукта и этапа промывки планшета в аналитический планшет добавляли вторичное рутенированное (SULFO-TAG) козье антитело к IgG человека (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) в рабочей концентрации в аналитическом разбавителе и инкубировали в течение около 1 ч. После промывки планшета добавляли 1x MSD Read 15 Buffer T (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) для генерации сигнала электрохемилюминесцентного анализа (ЭХЛ), который затем выражали в единицах ЭХЛ (ЕЭХЛ). Все этапы аналитической реакции проводили при температуре окружающей среды со встряхиванием на планшетном шейкере (при необходимости); и все исследуемые образцы предварительно разводили при аналитическом МНР 1:20 перед анализом в 20 аналитическом планшете. Сигналы ЕЭХЛ образца, генерируемые в ходе анализа, впоследствии преобразовывали в концентрации путем обратного расчета аналитической калибровочной кривой (КК). Аналитическую КК кривую аппроксимировали взвешенной четырехпараметрической нелинейной логистической регрессией для использования при расчете концентраций для неизвестных/исследуемых образцов.

25

Таблица 8

<i>Зонды для анализа AS HPRT</i>		
Захват	/5BioTEG/ATTC+CTAT+GACT	SEQ ID NO: 872
Выявление	GT+A+GA+TTT+TAT/3Dig_N/	SEQ ID NO: 873
<i>Зонды для анализа SS HPRT</i>		
Захват	/5BioTEG/AT+A+AAAT+C+TAC	SEQ ID NO: 874
Выявление	AGT+CATA+G+GA/3Dig_N/	SEQ ID NO: 875

Зонды для анализа <i>OTV:HPRT</i>		
Захват	/5BioTEG/ATAAAAT+CTA+CA+GT+CATA+GGA	SEQ ID NO: 876
<p>«/5BioTEG/» представляет собой конъюгацию биотина со спейсером TEG</p> <p>«/3Dig_N/» представляет собой конъюгацию диоксигенина</p> <p>«+» перед нуклеотидом означает, что это модификация сахара запертой нуклеиновой кислоты.</p>		

[0509] Нокдаун HPRT в головном мозге, спинном мозге и квадрицепсе наблюдали с помощью миРНК OTV:HPRT, что указывает на функциональную доставку миРНК в эти ткани с использованием OTV.

5

Пример 14: Анализ аффинности связывания TfR, нокдауна гена ЦНС и профиля безопасности

[0510] Чтобы оценить влияние аффинности связывания TfR на нокдаун гена ЦНС и профиль безопасности, варианты по аффинности к TfR S239C (100 нМ) и 500 нМ, описанные выше, сравнивали с TfR-связывающим фрагментом с аффинностью 10 нМ. TfR-связывающий фрагмент с аффинностью 10 нМ представляет собой отличное от TV слияние Fab-Fc-димер (т. е. не имеющее сайта связывания Tfr в константном домене), конъюгированное с ASO Malat1, при этом одновалентный Fab связывает TfR с аффинностью 10 нМ (а другой Fab представляет собой несвязывающий Fab RSV). Варианты 100 нМ, 500 нМ и 10 нМ перед введением разводили в стерильном физиологическом растворе. В качестве контроля были включены группы физиологического раствора, неконъюгированного ASO и RSV-ASO.

[0511] В исследовании с однократной дозой самкам мышей TfRms/hu в возрасте 2 месяца внутривенно вводили дозы в соответствии с группами (n = 4) в таблице 9. Ткани собирали через 24 часа после однократной дозы. В частности, собирали головной мозг, спинной мозг и периферические органы (почки, легкие, печень и квадрицепс). Терминальный сбор крови также проводили через 24 часа после однократной дозы.

[0512] В исследовании с многократными дозами самкам мышей TfRms/hu в возрасте 2 месяца внутривенно вводили дозы в соответствии с группами (n = 6) в таблице 8 в день 1, день 7 и день 14. Сбор плазмы проводили через 30 минут, 4 часа, 24 часа, 48 часов, 72 часа и 1 неделю. Ткань собирали через 72 часа после последней дозы. В частности, собирали головной мозг, спинной мозг и периферические органы (почки, легкие, печень и

25

квадрицепс). Терминальный сбор крови также проводили через 72 часа после последней дозы.

Таблица 9

	Группа	Доза
1	Отриц. контроль: Физраствор	
2	Отриц. контроль: Оголенный ASO (неконъюгированный ASO)	1 мг/кг
3	Отриц. контроль: RSV-ASO	25 мг/кг
4	S239C (100 нМ)	25 мг/кг
7	500 нМ	25 мг/кг
8	10 нМ	25 мг/кг

5

[0513] Интактный препарат и общее количество ASO в головном мозге и спинном мозге для исследования с однократной и многократной дозой измеряли в соответствии с методами, описанными выше. На Фиг. 33 показано повышение доставки интактного препарата и повышение общего количества ASO в ЦНС с увеличением аффинности к TfR в исследовании с однократной дозой, т. е. 10 нМ аффинность к TfR обеспечивает наибольшую доставку интактного препарата и общего количества ASO в ЦНС. Аналогичная тенденция наблюдается в исследовании с многократными дозами (Фиг. 34). Нокдаун Malat1 в головном мозге и спинном мозге в исследовании с многократными дозами определяли количественно, используя методы, описанные выше. Результаты показаны на слайде (Фиг. 34). Нокдаун Malat1 наблюдался при всех 3 аффинностях связывания TfR. Увеличение аффинности к TfR повышает нокдаун Malat1 в ЦНС, при этом наибольший нокдаун наблюдается при 10 нМ аффинности к TfR.

[0514] Плазменную ФК в исследовании с многократными дозами определяли количественно, используя методы, описанные выше. Результаты для C₀ (C₀), общей экспозиции (ППК) и клиренса приведены в таблице 10 ниже. Молекула с 500 нМ аффинности к TfR выводится медленнее, чем молекулы с аффинностями к TfR 100 нМ и 10 нМ.

Таблица 10. Плазменная ФК

	C ₀ (мкМ)	ППК (мкМ*ч)	CL (мл/д/кг)
RSV-ASO	2,04	84,7	35,5

500 нМ, аффинность	3,29	50,0	81,0
S239C (100 нМ, аффинность)	2,53	36,2	113
10 нМ, аффинность	2,07	28,0	124

[0515] Кроме того, в образцах плазмы, собранных в ходе исследований с однократной и многократной дозой измеряли MCV (средний объем клетки). Средний объем клетки (MCV) указывает объем «средних» эритроцитов (RBC) в образце и является показателем поглощения железа. Образцы крови собирали в покрытые антикоагулянтом ЭДТА пробирки и измеряли MCV с помощью автоматического гематологического анализатора. Результаты показаны на Фиг. 35. MCV ниже при 10 нМ связывании TfR в исследовании с однократной дозой, при этом MCV дополнительно снижается в исследовании с многократными дозами. Это свидетельствует о повышении нарушения поглощения железа и эритропоэза, что может приводить к усилению железодефицитной анемии в случае связывания TfR с более высокой аффинностью, чем 10 нМ, особенно при длительном введении.

[0516] Кроме того, вариант S239 (описанный выше), который связывает TfR с аффинностью 100 нМ, сравнивали с двухвалентным антителом к TfR, которое связывается с аффинностью 0,12 нМ, конъюгированным с Malat1 ASO.

[0517] Каждую из этих молекул разводили в стерильном физиологическом растворе и внутривенно вводили мышам с нокаутом TfR^{ms/hu} в дозе 50 мг/кг раз в неделю в течение 4 недель. Двум контрольным группам мышей TfR^{ms/hu} внутривенно вводили стерильный физиологический раствор или неконъюгированный ASO. Через три дня после четвертой дозы ткани собирали и замораживали для молекулярного и биохимического анализа. Ткани включают головной мозг, спинной мозг, печень, сердце, квадрицепс, диафрагму и седалищный нерв.

[0518] Четыре ткани с устойчивой экспрессией TfR (сосудистая система головного мозга, паренхима головного мозга, печень и сердце) гомогенизировали с помощью шарикового гомогенизатора в 1% буфере NP-40 при конечной концентрации 100 мг ткани на мл буфера. Гомогенизированные ткани затем центрифугировали при 15000xg в течение 15 минут и готовили супернатант для вестерн-блоттинга. Вкратце, образцы смешивали с восстанавливающим агентом и кипятили при 95°C, а затем помещали на гель и переносили на нитроцеллюлозный блот. Блот блокировали 5% молоком, затем инкубировали в растворе антител, содержащем антитела к TfR в разведении 1:2000. Один кусок ткани головного мозга использовали для истощения капилляров, чтобы отделить сосуды головного мозга от паренхимы головного мозга.

- [0519]** Экспрессию Malat1 измеряли в головном мозге, спинном мозге, печени, сердце, квадрицепсе, диафрагме и седалищном нерве следующим образом. <50 мг кусок ткани гомогенизировали с помощью шарикового гомогенизатора в Trizol для выделения общей РНК. Гомогенизированные ткани инкубировали с хлороформом в течение 3-5 минут, чтобы
- 5 обеспечить разделение фаз после центрифугирования. Затем водную фазу инкубировали с изопропанолом в течение 10 минут для осаждения РНК, после чего промывали 75% этанолом и ресуспендировали в воде, не содержащей нуклеазы. Затем измеряли экспрессию Malat1 с помощью кПЦР, используя набор Express One-Step Superscript Kit, и нормализовали относительно экспрессии конститутивного гена Gapdh.
- 10 **[0520]** Результаты показаны на слайде 36А-С. 100 нМ вариант приводил значительно большему отложению ASO в головном мозге и спинном мозге (Фиг. 36С) и сердце и сопоставимым уровням в печени и квадрицепсе. Наблюдается превосходящий нокдаун ЦНС при 100 нМ связывании TfR по сравнению с 0,12 нМ связыванием TfR (Фиг. 36В). В
- 15 коре головного мозга и спинном мозге наблюдается очень слабый нокдаун с аффинностью 0,12 нМ, что свидетельствует о том, что эта молекула не попадает в головной мозг, т. е. не пересекает слой эндотелиальных клеток ГЭБ, а вместо этого накапливается в сосудистой сети головного мозга и не может проникнуть в паренхиматозную ткань. Кроме того, образцы ткани головного мозга окрашивали на huIgG через 24 часа после введения 100 нМ
- и 0,1 мМ варианта. Наблюдали гомогенный сигнал huIgG в головном мозге мышей, которым вводили 100 нМ вариант, но очень гетерогенное распределение у мышей, которым
- 20 вводили 0,12 нМ вариант, с сильным сигналом huIgG в сосудах, но минимальным количеством huIgG, выявляемым в паренхиматозной ткани (Фиг. 45А). Эту разницу подтвердили с помощью анализа ELISA huIgG после истощения капилляров головного мозга, который показал значительно большее количество huIgG в паренхиме мышей,
- 25 которым вводили 100 нМ вариант, но сопоставимые уровни huIgG в сосудистой сети (Фиг. 45В).
- [0521]** Более того, деградация TfR наблюдается в печени, сердце и сосудистой сети головного мозга, но не в паренхиме головного мозга с 0,12 нМ аффинным вариантом, что дополнительно свидетельствует об неэффективном пересечении ГЭБ из-за повышенного
- 30 связывания TfR в сосудистой сети. Кроме того, значительная деградация TfR, наблюдаемая при 0,12 нМ связывании TfR по сравнению с 100 нМ связыванием TfR (Фиг. 36А), является проблемой безопасности. Меньшее количество TfR на поверхности клетки приводит к снижению связывания трансферрина и нарушает механизм поглощения клеткой железа.
- [0522]** В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что доставка ASO
- 35 посредством аффинности к TfR в диапазоне от 500 нМ до 10 нМ обеспечивает баланс между

скоростью клиренса, фармакодинамикой/нокдауном и проблемами безопасности.

Пример 15: Нокдаун Malat1 при внутривенной доставке неконъюгированного ASO в сравнении с OTV:ASO

5 [0523] Неконъюгированный Malat1 ASO («оголенный ASO») и OTV, конъюгированный с Malat1 ASO («OTV»), однократно внутривенно вводили 2-месячным мышам TfR^{ms/hu} KI в дозе 2,5 мг/кг ASO (или молярного эквивалента), а ATV:BACE1 вводили контрольной группой мышей TfR^{ms/hu} KI в дозе 57 мг/кг (белковый молярный эквивалент OTV). В группе с многократными дозами оголенный ASO, OTV и контроль вводили мышам, как указано
10 выше, один раз в неделю в течение 4 недель. Размер каждой когорты составлял n = 5 мышей.

[0524] Когорты мышей умерщвляли для анализа через 72 часа после введения однократной дозы или через 72 часа после четвертой дозы в исследовании с многократными дозами. Проводили перфузию мышей охлажденным ФСБ и собирали следующие органы для экстракции РНК: кора головного мозга, ствол головного мозга, гиппокамп, полосатое
15 тело, мозжечок, таламус, шейный отдел спинного мозга, поясничный отдел спинного мозга, сетчатка, седалищный нерв, квадрицепс, сердце, диафрагма, селезенка, кишечник, легкие, печень и почки.

[0525] Выделение РНК и измерение мРНК Malat1: РНК выделяли, используя мини-набор RNeasy Plus (Qiagen) и определяли концентрацию на нанокапле. Уровни мРНК Malat1
20 измеряли с помощью кРВ-ПЦР (ThermoFisher EXPRESS One-Step) с праймерами/зондами Malat1 (ThermoFisher Mm01227912) и нормализовали относительно уровней мРНК Gapdh (ThermoFisher Mm99999915) и Ppia (ThermoFisher Mm02342430). Использовали метод количественного определения дельта-дельта-St.

[0526] Результаты исследования с однократной дозой показаны на Фиг. 42. OTV
25 обеспечивает равномерный нокдаун целевой РНК не только во многих областях ЦНС, но также в периферических нервах, мышцах и других периферических органах. Это позволяет использовать OTV не только при нарушениях, связанных с ЦНС, но и при нейромышечных нарушениях, при которых присутствует фенотип как ЦНС, так и мышц.

Пример 16: ФК/ФД кинетика ASO после введения OTV

[0527] Чтобы понять уровни деградации ASO в различных тканях ЦНС и периферии, а также влияние деградации ASO на целевой нокдаун, мышам TfR^{ms/hu} KI (n = 5) внутривенно вводили однократную дозу OTV или окно загрузки из 6х в/в доз OTV следующим образом:

35 [0528] Однократная доза: 1 мг/кг молярного эквивалента ASO OTV. Плазму, головной

мозг (лобная кора), спинной мозг, квадрицепс, печень и почки собирали через 1 день, 4 дня, 1 неделю, 2 недели, 4 недели и 8 недель после введения дозы.

[0529] Многократные дозы: 6 в/в доз OTV (1 мг/кг исходного ASO), вводимых дважды в неделю (два раза в неделю); после 6х введения OTV в 1 мг/кг молярном эквиваленте ASO в течение 3 недель собирали плазму, головной мозг (лобная кора), спинной мозг, квадрицепс, печень и почки через 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 8 недель и 12 недель после введения дозы.

[0530] Однократная доза OTV демонстрирует самую высокую начальную концентрацию ASO в печени и почках, хотя период полужизни ASO в этих тканях намного короче, чем в тканях с опосредованным TfR поглощением, таких как головной мозг, спинной мозг и квадрицепс (Фиг. 43А). Несмотря на более высокую начальную концентрацию ASO в печени и почках, не наблюдается дополнительного эффекта нокдауна по сравнению с тканями с опосредованным TfR поглощением (головной мозг, спинной мозг, квадрицепс) (Фиг. 43В). Примечательно, что однократная доза OTV обеспечивает устойчивый 8-недельный нокдаун в тканях квадрицепса, спинного мозга и ЦНС.

[0531] Аналогично, загрузочное окно OTV с многократными дозами демонстрирует самую высокую начальную концентрацию ASO в печени и почках, хотя период полужизни ASO в этих тканях намного короче, чем в тканях с опосредованным TfR поглощением, таких как головной мозг, спинной мозг и квадрицепс (Фиг. 44А). Как и в исследовании с однократной дозой, несмотря на более высокую начальную концентрацию ASO в печени и почках, не наблюдается дополнительного эффекта нокдауна по сравнению с тканями с опосредованным TfR поглощением (головной мозг, спинной мозг, квадрицепс) (Фиг. 44В). ASO, доставляемый посредством OTV, демонстрирует более длительный нокдаун в ЦНС и мышцах по сравнению с печенью. Печеночные уровни РНК Malat1 восстанавливаются наиболее быстро. Напротив, в головном мозге, спинном мозге и квадрицепсе все еще наблюдается нокдаун Malat1 даже через 12 недель после загрузочных доз.

Таблица А. Позиции и мутации регистра СНЗВ

Название последовательности	Группа посл.	118	119	120	121	122	...	210	211	212	213
Дикий тип	н/д	E	P	Q	V	Y	...	T	Q	K	S
СНЗВ.1	1	F	D	Y	V	T	...	G	F	H	D
СНЗВ.2	1	F	D	M	V	T	...	G	F	H	D
СНЗВ.3	1	F	E	Y	V	T	...	G	F	H	D

CH3B.4	1	F	E	M	V	T	...	G	F	H	D
CH3B.5	1	F	E	L	V	T	...	G	F	H	D
CH3B.6	1	F	E	I	V	T	...	G	F	H	D
CH3B.7	1	F	D	I	V	T	...	G	F	H	D
CH3B.8	1	F	D	Y	V	T	...	G	F	H	D
CH3B.9	1	F	G	M	V	T	...	G	F	H	D
CH3B.10	1	F	A	D	V	T	...	G	F	Y	D
CH3B.11	1	F	G	L	V	T	...	G	F	H	D
CH3B.12	1	F	D	Y	V	T	...	G	F	S	D
CH3B.13	1	I	D	Y	V	T	...	G	F	S	D
CH3B.14	1	F	K	D	V	T	...	G	F	F	D
CH3B.15	1	F	D	L	V	T	...	G	F	Y	D
CH3B.16	1	I	D	Y	V	T	...	G	F	S	D
CH3B.17	1	F	E	L	V	A	...	G	F	H	D

Таблица В. Позиции и мутации регистра CH3C

Название последовательности	Группа посл.	157	158	159	160	161	162	163	164	186	187	188	189	190	191	192	193	194
		н/д	N	G	Q	P	E	N	N	Y	D	K	S	R	W	Q	Q	G
Дикий тип	н/д	N	G	Q	P	E	N	N	Y	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
CH3C.1		L	G	L	V	W	V	G	Y	A	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.2		Y	G	T	V	W	S	H	Y	S	K	S	E	W	Q	Q	G	Y
CH3C.3		Y	G	T	E	W	S	Q	Y	E	K	S	D	W	Q	Q	G	H
CH3C.4		V	G	T	P	W	A	L	Y	L	K	S	E	W	Q	Q	G	W
CH3C.17	2	Y	G	T	V	W	S	K	Y	S	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.18	1	L	G	H	V	W	A	V	Y	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.21	1	L	G	L	V	W	V	G	Y	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.25	1	M	G	H	V	W	V	G	Y	D	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.34	1	L	G	L	V	W	V	F	S	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.35	2	Y	G	T	E	W	S	S	Y	T	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.44	2	Y	G	T	E	W	S	N	Y	S	K	S	E	W	Q	Q	G	F
CH3C.51	1/2	L	G	H	V	W	V	G	Y	S	K	S	E	W	Q	Q	G	W

CH3C.3.1-3	1	L	G	H	V	W	V	A	T	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.1-9	1	L	G	P	V	W	V	H	T	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-5	1	L	G	H	V	W	V	D	Q	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-19	1	L	G	H	V	W	V	N	Q	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-1	1	L	G	H	V	W	V	N	F	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.4-1		W	G	F	V	W	S	T	Y	P	K	S	N	W	Q	Q	G	F
CH3C.3.4-19		W	G	H	V	W	S	T	Y	P	K	S	N	W	Q	Q	G	Y
CH3C.3.2-3		L	G	H	V	W	V	E	Q	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-14		L	G	H	V	W	V	G	V	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.2-24		L	G	H	V	W	V	H	T	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W
CH3C.3.4-26		W	G	T	V	W	G	T	Y	P	K	S	N	W	Q	Q	G	Y
CH3C.3.2-17		L	G	H	V	W	V	G	T	P	K	S	T	W	Q	Q	G	W

Таблица С. Исследование приемлемого разнообразия в регистре и положениях горячих точек для CH3C.35.21

	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196
Дикий тип	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
CH3C.35.20.1	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.20.2	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.20.3	Y	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.20.4	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.	

	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	
Дикий тип	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	
CH3C.35.20.5	F	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.20.6	F	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.a.																													
1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.a.																													
2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.a.																													
3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.a.																													
4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.a.																													
5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.a.																													
6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.23.1	F	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.23.2	Y	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.23.3	Y	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.23.4	Y	.	T	E	W	S	S	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.23.5	F	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.23.6	F	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.24.1	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.24.2	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.24.3	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.24.4	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.24.5	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	A	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.24.6	.	.	W	.	.	.	F	.	T	E	W	V	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.1																													
7.1	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.1																													
7.2	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.	
CH3C.35.21.1	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.	

	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196
Дикий тип	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
7.3																												
CH3C.35.21.1																												
7.4	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.21.1																												
7.5	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	A	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.21.1																												
7.6	.	.	L	.	.	.	F	.	T	E	W	V	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.20	Y	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.21	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.22	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.23	Y	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.24	.	.	W	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.21.1																												
7	.	.	L	.	.	.	Y	.	T	E	W	S	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.N39																												
0	Y	.	T	E	W	S	T	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.20.1.																												
1	F	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.23.2.																												
1	Y	.	T	E	W	A	S	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.23.1.																												
1	F	.	T	E	W	S	S	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.S41																												
3	Y	.	T	E	W	S	S	S	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.23.3.																												
1	Y	.	T	E	W	V	S	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.N39																												
0.1	Y	.	T	E	W	S	S	.	E	E	F	.	.
CH3C.35.23.6.																												
1	F	.	T	E	W	V	S	.	E	E	F	.	.

Последовательности

SEQ ID NO:	Последовательность	Описание
1	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Человеческая Fc- последовательность дикого типа аминокислоты 1-3 (PCP) принадлежат шарнирной области
2	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	Последовательность домена CH2, включая три аминокислоты (PCP) на N-конце из шарнирной области
3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность домена CH3
700	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKV	Последовательность домена CH1
232	DKTHTCP	Часть шарнирной последовательности человеческого IgG1
233	DKTHTCPPCP	Часть шарнирной последовательности человеческого IgG1
234	EPKSCDKTHTCPPCP	Аминокислотная последовательность шарнирной области человеческого IgG1

623	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	IGHG1_P01857
624	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT YTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTPP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	IGHG2_P01859
625	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKS CDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPEN NYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVM HEALHNRFTQKSLSLSPGK	IGHG3_P01860

626	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKLSLSLGK	IGHG4_P01861
701	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Последовательность константной области каппа
107	NSVHVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHAN FGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAI GVLIIYMDQTKFPIVNAELSFHGHHLGTGDPYTPGFPSFN HTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFNMEGDCPSDW KTDSTCRMVTSESKNVKLTVS	Апикальный домен человеческого TfR
235	MMDQARSAFSLNFGGEPVSYTRFSLARQVDGDNHSHVEM KLAIVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLI GFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAA RRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYPREAGS QKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQ NSVHVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHAN FGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAI GVLIIYMDQTKFPIVNAELSFHGHHLGTGDPYTPGFPSFN HTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFNMEGDCPSDW KTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVKGFVE PDHYVVVGAQRDAWGPGAAGSGVGTALLKLAQMFSD MVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEGYLSLH LKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKH PVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSF CFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVA GQFVIKLTVDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKE	Белок человеческого рецептора трансферрина 1 (TFR1)

	MGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMK KLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPF RHVFWGSGSHTLPA LLENLKLKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALS GDVWDIDNEF	
4	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG LVWVGYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVAKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.1 (Клон CH3C.18.4)
5	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TVWSHYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGYVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.2 (Клон CH3C.18.2)
6	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSQYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV EKSDWQQGHVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.3 (Клон CH3C.18.3)
7	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESVG TPWALYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVLKSEWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.4 (Клон CH3C.18.1)
8	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TVWSKYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.17

9	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVVAVYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18 (Клон CH3C.18.1.18)
10	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG LVWVGYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.21
11	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESMG HVVWVGYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.25
12	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG LVWVFSKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.34
13	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35

14	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.44
15	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVGKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.51
16	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVATKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.3.1-3 (Клон CH3C.18.3.1-3)
17	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG PVVWHTKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.3.1-9 (Клон CH3C.18.3.1-9)
18	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVDQKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.3.2-5 (Клон CH3C.18.3.2-5)

19	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVNQKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.3.2-19 (Клон CH3C.18.3.2-19)
20	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVNFKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.3.2-1 (Клон CH3C.18.3.2-1)
21	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESL GHVWAVYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTPVKSTWQQGWV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.E153W (CH3C.35.13)
22	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWAVYQTTPVLDSGDGSFFLYSKLTPVKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.K165Q (CH3C.35.14)
23	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESL GHVWAVYQTTPVLDSGDGSFFLYSKLTPVKSTWQQGWV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.E153W. K165Q (CH3C.35.15)

24	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.E153W (CH3C.35.19)
25	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.S188E (CH3C.35.20)
26	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.E153W. S188E (CH3C.35.21)
27	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.N163
28	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSSYQTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.K165Q

29	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSNYQTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.N163. K165Q
236	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYKTPPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.19
237	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSSYKTPPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20
238	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYKTPPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21
239	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSNYKTPPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.22

240	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23
241	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24
242	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEVSL GHVWAVYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Вариант CH3C.18
243	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESLG HVWAVYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Вариант CH3C.18
244	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEVSL GHVWAVYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Вариант CH3C.18

245	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVVAVYQTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Вариант CH3C.18
246	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVVAVYFTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Вариант CH3C.18
247	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVVAVYHTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Вариант CH3C.18
248	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.1
249	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.2

250	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.3
251	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTGEEWQQGFVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.4
252	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFC WVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.5
253	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFC WVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.6
254	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFC WVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.7

255	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFTC GVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.8
256	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFEC WVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.9
257	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFKC WVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.10
258	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTPPEWQQGFVFKC WVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.11
259	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESY GTEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.12

260	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTGE EWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.13
261	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFT CWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.14
262	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTGE EWQQGFVFT CWVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.15
263	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYRTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTREEWQQGFVFT CGVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.16
264	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17

265	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYRTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.18
266	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1
267	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.2
268	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.3
269	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.4

270	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWASYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.5
271	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWVSYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.6
272	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESFG TEWSSYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C35.21.a.1
273	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESY GTEWASYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.2
274	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESY GTEWVSYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.3

275	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.4
276	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWESEFG TEWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.5
277	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWESEFG TEWVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.a.6
278	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.1
279	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2

280	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWVNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3
281	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4
282	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.5
283	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWVNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.6
284	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESFG TEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.1

285	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.2
286	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWVNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.3
287	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWEYSY GTEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.4
288	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWESEFG TEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.5
289	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWESEFG TEWVNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.24.6

290	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESFG TEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.1
291	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2
292	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.3
293	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.4
294	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESFG TEWASYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.5

295	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESFG TEWVSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.6
296	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.N390
297	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESL GHVWVNQKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.16
298	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVNQQTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.17
299	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWVESL GHVWVNQQTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVPKSTWQQGWV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.18

302	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLGHWAVYKTTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Экспрессируемая Fc- последовательность CH3C.18
421	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSSYKTTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVTKSEWQQGFVVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	Экспрессируемая Fc- последовательность CH3C.35
422	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESW GFVWSTYKTTTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVPKSNWQQGFV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.3.4-1 (CH3C.3.4-1)
423	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESW GHVWSTYKTTTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVPKSNWQQGYVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.3.4- 19 (CH3C.3.4-19)
424	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVVWEQKTTTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.3.2-3 (CH3C.3.2-3)

425	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVGVKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPKSTWQQGWVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.3.2- 14 (CH3C.3.2-14)
426	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVHTKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.3.2- 24 (CH3C.3.2-24)
427	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESW GTVWGTYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPKSNWQQGYVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.3.4- 26 (CH3C.3.4-26)
428	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESLG HVWVGTKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTPKSTWQQGWVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.18.3.2- 17 (CH3C.3.2-17)
429	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWSSYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.20.1.1

430	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2.1
431	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.1.1
432	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSSYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.S413
433	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWVNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.3.1
434	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKSEWQQGFVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.N390.1

435	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFG TEWVNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.6.1
554	X ₁ WESX ₂ GX ₃ X ₄ WX ₅ X ₆ X ₁ представляет собой E, L, S, V, W или Y; X ₂ представляет собой ароматическую аминокислоту (например, Y, F или W), M, P или V; X ₃ представляет собой T, N или V; X ₄ представляет собой E, I, P или V; X ₅ представляет собой алифатическую аминокислоту (например, A, I или V), S или T; и X ₆ представляет собой S, N, R или T	CH3C.35_ консенсусная последовательность _1
555	X ₁ KX ₂ X ₃ WQGX ₄ VFX ₅ CX ₆ X ₁ представляет собой T, H или S; X ₂ представляет собой E, S, D, G, T, P, Q или R; X ₃ представляет собой E или R; X ₄ представляет собой F, H, K, Y или W; X ₅ представляет собой S, T или W; и X ₆ представляет собой S, C, P, M или W	CH3C.35_консенсус ная последовательность _2
556	GQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVX ₁ WESX ₂ GX ₃ X ₄ WX ₅ X ₆ YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVX ₇ KX ₈ X ₉ WQGX ₁₀ VFX ₁₁ CX ₁₂ VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK X ₁ представляет собой E, L, S, V, W или Y; X ₂ представляет собой ароматическую аминокислоту (например, Y, F или W), M, P или V; X ₃ представляет собой T, N или V; X ₄ представляет собой E, I, P или V; X ₅ представляет собой алифатическую аминокислоту (например, A, I или V), S или T; X ₆ представляет собой S, N, R или T; X ₇ представляет собой T, H или S; X ₈ представляет собой E, S, D, G, T, P, Q или R; X ₉ представляет собой E or R; X ₁₀ представляет собой F, H, K, Y или W; X ₁₁ представляет собой S, T или W; и X ₁₂ представляет собой S, C, P, M или W	CH3C.35_консенсус ная последовательность _3

361	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа
362	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа и LALA
363	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа и LALAPG
632	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа и LALAPS
364	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа и YTE

365	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA и YTE
366	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и YTE
367	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESY TEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины
368	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины и LALA
369	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины и LALAPG

370	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYG TEWANYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины и YTE
371	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYG TEWANYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины, LALA и YTE
372	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYG TEWANYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины, LALAPG и YTE
491	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYG TEWANYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями M201L и N207S
492	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа и M201L и N207S

493	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA и M201L и N207S
494	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и M201L и N207S
495	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYG TEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины и M201L и N207S
496	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины, LALA и M201L и N207S
497	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESY GTEWANYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями впадины, LALAPG и M201L и N207S

702	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA и S239C
703	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKCKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA и T289C
704	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA и N297A
705	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA и N297G
706	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA и A330C

707	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA и S442C
708	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALA, S239C, A330C
709	CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность константной области тяжелой цепи с мутациями 35.23.2, выступа, LALA и A114C
710	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и S239C
711	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKCKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и T289C

712	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и N297A
713	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и N297G
714	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и A330C
715	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLCLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и S442C
716	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG, S239C, A330C

717	CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность константной области тяжелой цепи с мутациями 35.23.2, выступа, LALAPG и A114C
743	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность константной области тяжелой цепи с мутациями 35.23.2, выступа и LALA
744	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность константной области тяжелой цепи с мутациями 35.23.2, выступа и LALAPG
718	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями выступа и LALA

397	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа
398	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWES YGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа и LALA
399	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWES YGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа и LALAPG
633	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWES YGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа и LALAPS
400	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа и YTE

401	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа, LALA и YTE
402	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа, LALAPG и YTE
403	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESY TEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины
404	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины и LALA
405	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины и LALAPG

406	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYG TEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины и YTE
407	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYG TEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины, LALA и YTE
408	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYG TEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины, LALAPG и YTE
512	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями M201L и N207S
513	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа и M201L и N207S

514	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWES YGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа, LALA и M201L и N207S
515	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWES YGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа, LALAPG и M201L и N207S
516	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYG TEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины и M201L и N207S
517	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины, LALA и M201L и N207S
518	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVLHEALSHYDQKSLSLSPGK	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями впадины, LALAPG и M201L и N207S

655	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями выступа и LALA
557	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины
558	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины и LALA
559	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и S239C
560	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и A330C

561	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и S442C
719	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKCKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и T289C
720	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и N297A
721	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и N297G
722	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA, S239C и A330C

723	CSTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	Последовательность константной области тяжелой цепи с мутациями впадины, LALA и A114C
627	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины и LALAPG
628	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины и LALAPS
629	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPS и S239C
630	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSCPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPS и A330C

631	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPS и S442C
724	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG и S239C
725	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKCKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG и T289C
726	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG и N297G
727	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG и N297A

728	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGCIPIKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG и A330C
729	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG и S442C
730	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGCIPIKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG, S239C и A330C
731	CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKLSLSPGK	Последовательность константной области тяжелой цепи с мутациями впадины, LALAPG и A114C
732	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WCVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Последовательность константной области каппа с мутацией K149C

800	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKCQLSVGYMHWYQQKP GKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPD DFATYYCFQGSYPTFTGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC</p>	Легкая цепь RSV
801	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVWIR QPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQ VVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYITLP PSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQGGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Тяжелая цепь RSV: 35.23.2 с мутациями выступа и LALA
802	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVWIR QPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQ VVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYITLP PSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVTKKEEWQGGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	Тяжелая цепь RSV: 35.23.2 с мутациями выступа, LALA и S239C

803	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVWIR QPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQ VVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKKEEWQGGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь RSV: 35.23.2 с мутациями выступа, LALA, S239C и A330C</p>
804	<p>DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESYGTEWANYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVTKKEEW QGGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Клон 35.23.2 с частью шарнирной последовательности человеческого IgG1 и мутациями выступа и LALA</p>
805	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVWIR QPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQ VVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVSKEEWQGGFVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь RSV: 35.23.4 с мутациями выступа и LALA</p>

806	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWIR QPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQ VVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь RSV: Fc с мутациями впадины, LALA и S239C</p>
807	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWIR QPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQ VVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь RSV: Fc с мутациями впадины, LALA, S239C и A330C</p>

808	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVWIR QPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQ VVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPCPIEK TISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь RSV: Fc с мутациями впадины, LALA и A330C</p>
809	<p>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVWIR QPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQ VVLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWFYFDVWGAGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLCLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь RSV: Fc с мутациями впадины, LALA и S442C</p>
810	<p>DKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Fc с частью шарнирной последовательности человеческого IgG1 и мутациями впадины, LALA и S239C</p>

811	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWYQQKPG QAPRLLIYDTSNLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQWSSYPPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь DNP02
812	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWYQQKPG QAPRLLIYDTSNLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQWSSYPPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь DNP02 с мутацией K149C
813	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI PPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	Тяжелая цепь DNP02: 35.23.2 с мутациями выступа и LALAPG

814	<p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWRQ PPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVTKKEEWQQGFVFSVSMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь DNP02: 35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и N297G</p>
815	<p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWRQ PPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь DNP02: Fc с мутациями впадины и LALAPG</p>

816	<p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI PPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь DNP02: Fc с мутациями впадины, LALAPG и N297G</p>
817	<p>QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI PPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь DNP02: Fc с мутациями впадины, LALAPG и A114C</p>

818	<p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI PPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLSRVTVISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKCKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>	<p>Тяжелая цепь DNP02: Fc с мутациями впадины, LALAPG и T289C</p>
634	<p>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	<p>Человеческая Fc- последовательность дикого типа аминокислоты 1-3 (PCP) принадлежат шарнирной области</p>
635	<p>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	<p>Fc- последовательность с мутациями впадины</p>
636	<p>PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	<p>Fc- последовательность с мутациями впадины и LALA</p>

637	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины и LALAPG
638	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины и LALAPS
639	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и S239C
640	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и A330C
641	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA и S442C

642	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPS и S239C
643	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPS и A330C
644	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPS и S442C
733	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALA, S239C и A330C
734	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKCKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG и T289C

735	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Fc- последовательность с мутациями впадины, LALAPG и N297G
736	DKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Fc с частью шарнирной последовательности человеческого IgG1 и мутациями впадины, LALA и S239C
737	CSTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Последовательность константной области тяжелой цепи с мутациями впадины, LALAPG и A114C
645	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2
646	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутацией выступа

647	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступления и LALA
648	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступления и LALAPG
649	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступления и LALAPS
738	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступления, LALA и S239C
739	PCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES YGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступления, LALA, S239C, A330C

740	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.2 с мутациями выступа, LALAPG и N297G
741	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон 35.23.2 с частью шарнирной последовательности человеческого IgG1 и мутациями выступа и LALA
745	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Последовательность константной области тяжелой цепи с мутациями 35.23.2, выступа и LALAPG
746	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.4
742	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.23.4 с мутациями выступа и LALA

650	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYG TEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.21.17.2
651	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESY GTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутацией выступа
652	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWES YGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа и LALA
653	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWES YGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа и LALAPG
654	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALSAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWES YGTEWASYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	Клон CH3C.35.21.17.2 с мутациями выступа и LALAPS
656	$G_{ks}^m C_{ks} A_{ks} T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} T_{ds} A_{ds} A_{ds} T_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} A_{ks} G_{ks}^m C_k$	Типовой ASO1
657	$L^{\prime} - G_{ks}^m C_{ks} A_{ks} T_{ds} T_{ds}^m C_{ds} T_{ds} A_{ds} A_{ds} T_{ds} A_{ds} G_{ds}^m C_{ds} A_{ks} G_{ks}^m C_k$	Типовой ASO1, связанный с «L»
819	SASSVSMYWY	NBVR1 CDR-L1

820	RASQSVSSYLAWY	NBVR2 CDR-L1
821	DTSNLAS	NBVR1 CDR-L2
822	DASNLAT	NBVR2 CDR-L2
823	QQWSSYPPIT	NBVR1 CDR-L3
824	QQRSNWPPIT	NBVR2 CDR-L3
825	GYSITSDYAWN	NBVR1 CDR-H1
826	GYSITSDYAWG	NBVR2 CDR-H1
827	YMSYSGSTRYNPSLRS	NBVR1 CDR-H2
828	SMSYSGSTYYNPSLKS	NBVR2 CDR-H2
829	ARGWPLAY	NBVR1 CDR-H3
829	ARGWPLAY	NBVR2 CDR-H3
830	MDFQVQIFSLLISASVILSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVT MTCSASSSVYYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPV RFSGSGSGTYSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPPITFG VGTKLELKRA	Вариабельный домен легкой цепи AN02
831	MRVILLWLFTAAPGILSDVQLQESGPGLVKPSQSQSLTCT VTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYMSYSGSTRYN PSLRSRISITRDTSKNQFFLQLKSVTTEDTATYFCARGWPL AYWGQGTQVSVSE	Вариабельный домен тяжелой цепи AN02
832	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWYQQKPG QAPRLLIYDTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQWSSYPPITFGQGTKVEIK	Вариабельный домен легкой цепи NBVR1
833	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWYQQKPG QAPRLLIYDTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQWSSYPPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь NBVR1
834	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADY EKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Константный домен легкой цепи NBVR1

835	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWYQQKPG QAPRLLIYDTSNLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQWSSYPFITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь NBVR1 K149C
836	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WCVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Константный домен легкой цепи NBVR1
837	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSS	Вариабельный домен тяжелой цепи NBVR1
838	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPK	Fab тяжелой цепи NBVR1
839	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC	Fab тяжелой цепи NBVR1
840	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP	Fab тяжелой цепи NBVR1

841	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDT SKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQ GTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP	Fab' тяжелой цепи NBVR1
842	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK	Домен CH1 тяжелой цепи NBVR1
843	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDT SKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQ GTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc-конъюгат тяжелой цепи NBVR1
844	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDT SKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQ GTLVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPK	Fab тяжелой цепи NBVR1 A114C
845	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDT SKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQ GTLVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC	Fab тяжелой цепи NBVR1 A114C

846	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTA VYYCARGWPLAYWGQGLTVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP	Fab тяжелой цепи NBVR1 A114C
847	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTA VYYCARGWPLAYWGQGLTVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP	Fab' тяжелой цепи NBVR1
848	CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK	Домен CH1 тяжелой цепи NBVR1 A114C
849	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWI RQPPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTA VYYCARGWPLAYWGQGLTVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY TQKLSLSPGK	Fc-конъюгат тяжелой цепи NBVR1 A114C
850	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK P GQAPRLLIYDASNLATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQRSNWPPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSD EQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь NBVR2

851	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNLATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPITFGQGTKVEIK	Вариабельный домен легкой цепи NBVR2
852	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNLATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDAEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWCVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Легкая цепь NBVR2 K149C
853	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQPPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSS	Вариабельный домен тяжелой цепи NBVR2
854	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQPPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK	Fab тяжелой цепи NBVR2
855	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQPPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	Fab тяжелой цепи NBVR2
856	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQPPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP	Fab тяжелой цепи NBVR2

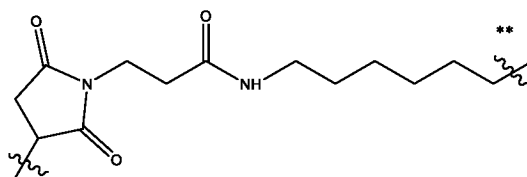
857	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQ PPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP	Fab' тяжелой цепи NBVR2
858	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQ PPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK	Fc-конъюгат тяжелой цепи NBVR2
859	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQ PPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGTLVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPK	Fab тяжелой цепи NBVR2 A114C
860	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQ PPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGTLVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC	Fab тяжелой цепи NBVR2 A114C

861	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQ PPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP	Fab тяжелой цепи NBVR2 A114C
862	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQ PPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP	Fab' тяжелой цепи NBVR2 A114C
863	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWGWIRQ PPGKGLEWIGSMSYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGLVTVSSCST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK	Fc-конъюгат тяжелой цепи NBVR2 A114C
864	gaaattgtcctcaccagagcccagccactcttccctctctccaggggaaagagcaact gagttgccggcctcccagagtgaagttcctacctcgcatggtatcaacagaagcctggc aagcaccggcgtctgatttacgatgccagcaatctcgccaccggaatccccgcaaggtt tcaggagcgggtcaggactgactttaccctgaccataagcagtcttgagcctgaggattt gcagtgtattactgccaacagagaagtaactggccccataaccttggacaggggacta aggtggagattaa	Кодирующая последовательность вариабельного домена легкой цепи NBVR2

865	caagtgcaactgcaggaagtgggcctggttgggtcaaacccagtgaaacacttagtcttac ttgcgctgtatctggatactctattacaagcgattatgcctgggggtggattcggcagccccc tggaaaaggcttggagtgatcggtcaatgagttatagtggtagtagtatacaaaccttc cctgaagtctcgcgtcacaataagcgtagatacaagtaagaatcaatttcctgaaacttag cagtgtaactgccgctgataccgcagtctactattgtgccagaggatggcccctggcctact ggggtcagggcaccctcgtgaccgtatcatca	Кодирующая последовательность вариабельного домена тяжелой цепи NBVR2
866	gagatcgtactcactcaaagtccagccaccctgtcactttctccaggagaacgcgcccactct ctcttgcgggctagtcagagcgttagtagctatctcgcattggtatcaacaaaagcccggtsa ggccccacgcctgttgatctatgatgccagtaacctggccaccggattccagcccgtttctc tggcagtggaagtggaaactgacttcacactgaccatcagctccctcgagcccgaagatttg ctgtgtattactgccagcaaatccaactggcctccaatcactttcggccaaggaacaaaa gtagagattaag	Кодирующая последовательность вариабельного домена легкой цепи NBVR2
867	caggttcaactcaagagtcaggcccaggcttgggaagccctccgaaacttgagcttgac ttgcgctgtgtccggttacagtataacctctgactatgcctgggggtggataaggcaacctcc tggcaaaggattggaatggatcggttcaatgtcctactccggttctacatactataaccctcc ttgaagtcccagtaactatcagtgtggacacttcaagaatcaatttagtctgaaattgtcttc agtcaccgctgcagacactgctgtctattattgtgccaggggttggccccttgcttattgggg ccaggggaccctggtgacagtatcaagc	Кодирующая последовательность вариабельного домена тяжелой цепи NBVR2
868	EPKSCDKTHTCPPCP	Последовательность шарнирной области антитела
869	X ₁ MSYSGSTX ₂ YNPSLX ₃ S Где: X ₁ =Y или S; X ₂ = R или Y; и X ₃ = R или K	Консенсусная последовательность NBVR CDR-H2
870	<u>UcCuAuGaCuGuAgAuUuUaU</u>	Последовательность смысловой цепи миРНК HPRT
871	<u>aUaAaAuCuAcAgUcAuAgGaAu</u>	Последовательность антисмысловой цепи миРНК HPRT
872	ATTCCTATGACT	AS аналитический захватывающий зонд миРНК HPRT

873	GTAGATTTTAT	AS аналитический выявляющий зонд миРНК HPRT
874	АТААААТСТАС	SS аналитический захватывающий зонд миРНК HPRT
875	AGTCATAGGA	SS аналитический выявляющий зонд миРНК HPRT
876	АТААААТСТАСАGTCАTАGGA	Аналитический захватывающий зонд ОTV:HPRT

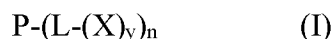
Сокращения соотносятся с компонентами следующим образом: d: ДНК; k: ЗНК; ^mC: 5-метилцитидин (метилированный цитозин); s: фосфоротиоатный остов (PS); и L' представляет собой:



где валентность, обозначенная **, присоединена через фосфат (-O-P(=O)₂-O-) на 5' конце ASO.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат формулы I:



5 где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

10 P представляет собой белок, содержащий сконструированный сайт связывания, который специфически связывается с рецептором трансферрина (TfR) с низкой аффинностью от около 3 нМ до около 600 нМ;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

15 2. Конъюгат по п. 1, в котором сконструированный сайт связывания связывает TfR с аффинностью от около 500 нМ до около 3 нМ.

3. Конъюгат по п. 1 или 2, в котором сконструированный сайт связывания связывает TfR с аффинностью от около 400 нМ до около 20 нМ.

20 4. Конъюгат по п. 1 или 2, в котором сконструированный сайт связывания связывает TfR с аффинностью от около 300 нМ до около 30 нМ.

5. Конъюгат по п. 1 или 2, в котором сконструированный сайт связывания связывает TfR с аффинностью от около 200 нМ до около 40 нМ.

25 6. Конъюгат по п. 1 или 2, в котором сконструированный сайт связывания связывает TfR с аффинностью от около 150 нМ до около 50 нМ.

7. Конъюгат по п. 1 или 2, в котором сконструированный сайт связывания связывает 30 TfR с аффинностью от около 130 нМ до около 80 нМ.

8. Конъюгат по любому из пп. 1-7, в котором сконструированный сайт связывания представляет собой ненативный сайт связывания.

35 9. Конъюгат по п. 8, в котором ненативный сайт связывания находится в константном

домене Р.

10. Конъюгат по любому из пп. 1-9, в котором Р представляет собой белок, содержащий
1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с
5 рецептором трансферрина; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов,
которые облегчают присоединение Р к каждому L.

11. Конъюгат по п. 10, в котором Р содержит Fc-полипептид, содержащий
модифицированный константный домен.

10
12. Конъюгат по п. 11, в котором Р содержит димер Fc-полипептида, содержащий
первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-
полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом.

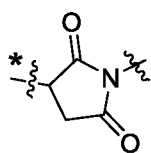
15
13. Конъюгат по любому из пп. 10-12, в котором модифицированный сайт представляет
собой аминокислотную замену.

14. Конъюгат по п. 13, в котором модифицированный сайт представляет собой замену
цистеином.

20
15. Конъюгат по п. 14, в котором замена цистеином выбрана из группы, состоящей из:
S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в
соответствии с нумерацией Kabat.

25
16. Конъюгат по любому из пп. 1-15, в котором олигонуклеотид представляет собой
антисмысловый олигонуклеотид (ASO) или мРНК.

17. Конъюгат по любому из пп. 1-16, в котором связывающая группа L содержит
фрагмент, имеющий структуру:



где * обозначает точку присоединения к атому серы модифицированного сайта в Р.

18. Конъюгат по любому из пп. 1-17, в котором у равен целому числу от 1 до 4.

19. Конъюгат по п. 18, в котором n равен 1.
20. Конъюгат по любому из пп. 1-19, в котором n представляет собой целое число от 1 до 6.
21. Конъюгат по п. 20, в котором n равен 1.
22. Димер Fc-полипептида или слияние Fab-Fc-димер, содержащие:
- 10 (а) первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и
- (б) второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом по (а);
- при этом слияние Fab-Fc-димер дополнительно содержит первый Fab и второй Fab; и
- при этом димер Fc-полипептида или слияние Fab-Fc-димер содержит одну или большее
- 15 количество замен цистеином.
23. Димер Fc-полипептида по п. 22, в котором слияние Fab-Fc-димер представляет собой ненацеливающее слияние Fab-Fc-димер.
- 20 24. Димер Fc-полипептида по п. 22 или 23, в котором замена(ы) цистеином выбрана(ы) из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat.
25. Димер Fc-полипептида по любому из пп. 22-24, в котором каждый из первого и
- 25 второго Fc-полипептидов содержит замену цистеином; или каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит замену цистеином.
26. Димер Fc-полипептида по п. 25, в котором каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит замену цистеином в S239C; или каждое из первого и второго
- 30 слияний Fab-Fc содержит замену цистеином в S239C.
27. Димер Fc-полипептида по любому из пп. 22-26, в котором каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит две замены цистеином; или каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит две замены цистеином.

28. Димер Fc-полипептида по п. 27, в котором каждый из первого и второго Fc-полипептидов содержит замену цистеином в S239C и A330C; или каждое из первого и второго слияний Fab-Fc содержит замену цистеином в S239C и A330C.
- 5 29. Димер Fc-полипептида по любому из пп. 22-24, в котором второй Fc-полипептид содержит замену цистеином; или второе слияние Fab-Fc содержит замену цистеином.
30. Димер Fc-полипептида по п. 29, в котором замена цистеином представляет собой S239C.
- 10 31. Димер Fc-полипептида, содержащий:
(а) первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и
(b) второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом по (а);
15 при этом первый и/или второй Fc-полипептид содержит одну или большее количество замен, выбранных из группы, состоящей из N297A и N297G.
32. Димер Fc-полипептида по п. 31, в котором каждый из первого и второго Fc-полипептидов соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с
20 образованием слияния Fab-Fc-димер.
33. Димер Fc-полипептида по любому из пп. 22-33, в котором модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен СНЗ, содержащий две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать,
25 тринадцать, четырнадцать, пятнадцать или шестнадцать позиций, выбранных из следующих: позиция 153 представляет собой Trp, Tyr, Leu, Gln или Glu; позиция 157 представляет собой Leu, Tyr, Met, Val, Phe или Trp; позиция 159 представляет собой Leu, Thr, His, Pro или Phe; позиция 160 представляет собой Val, Pro или кислотную аминокислоту; позиция 161 представляет собой Trp; позиция 162 представляет собой Val,
30 Ser, Ala или Gly; позиция 163 представляет собой Asn, Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala, Asp, Thr или Glu; позиция 164 представляет собой Ser, Thr, Gln, Phe, Tyr или Val; позиция 165 представляет собой Gln, Phe или His; позиция 186 представляет собой Glu, Ala, Ser, Leu, Thr, Pro или Asp; позиция 187 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; позиция 188 представляет собой Glu или Ser; позиция 189 представляет собой Thr, Asn или
35 кислотную аминокислоту; позиция 194 представляет собой Trp, Tyr, His или Phe; позиция

197 представляет собой Ser, Thr, Glu, Lys или Trp; и позиция 199 представляет собой Ser, Trp, Gly, Cys, Pro или Met согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

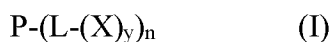
34. Димер Fc-полипептида по любому из пп. 22-33,
5 в котором первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 279, 281, 361-366, 491-494, 702-718, 632, 645-649, 738-746, 804, и
10 при этом второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 557-561, 627-631, 635-644, 719-723, 724-731, 733-737 и 810.

35. Димер Fc-полипептида по п. 34, в котором первый Fc-полипептид или первое
15 слияние Fab-Fc-димер содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ser или Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr или Ser в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194 согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

20 36. Димер Fc-полипептида по п. 35, в котором:
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную
25 последовательность SEQ ID NO: 702, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 708, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 722;
30 первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 718, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-
35 димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 560;

первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 561; или первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 804, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 810.

37. Конъюгат формулы I:



где

- каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L;
каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен по меньшей мере 1.

38. Конъюгат по п. 37, в котором P содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.

39. Конъюгат по п. 38, в котором белок содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом.

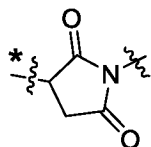
40. Конъюгат по п. 38 или 39, в котором Fc-полипептид присоединен к ненацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc-димер; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.

41. Конъюгат по любому из пп. 37-40, в котором модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену.

42. Конъюгат по п. 41, в котором модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.

43. Конъюгат по п. 42, в котором замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat.

5 44. Конъюгат по любому из пп. 37-43, в котором связывающая группа L содержит фрагмент, имеющий структуру:



где * обозначает точку присоединения к атому серы модифицированного сайта в Р.

10 45. Конъюгат по п. 41, в котором модифицированный сайт представляет собой замену аланином или глицином.

46. Конъюгат по п. 45, в котором замена аланином или глицином представляет собой N297A или N297G в соответствии с нумерацией EU.

15

47. Конъюгат по любому из пп. 37-41 и 45-46, в котором L конъюгирован с Р в Q295.

48. Конъюгат по п. 47, в котором L конъюгирован с Р посредством ферментативной конъюгации.

20

49. Конъюгат по п. 48, в котором в ферментативной конъюгации используется бактериальная трансглутаминаза (BTG).

50. Конъюгат по любому из пп. 37-49, в котором модифицированный константный домен представляет собой модифицированный домен СНЗ, содержащий две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать или шестнадцать позиций, выбранных из следующих: позиция 153 представляет собой Trp, Tyr, Leu, Gln или Glu; позиция 157 представляет собой Leu, Tyr, Met, Val, Phe или Trp; позиция 159 представляет собой Leu, Thr, His, Pro или Phe; позиция 160 представляет собой Val, Pro или кислотную аминокислоту; позиция 161 представляет собой Trp; позиция 162 представляет собой Val, Ser, Ala или Gly; позиция 163 представляет собой Asn, Gly, His, Gln, Leu, Lys, Val, Phe, Ser, Ala, Asp, Thr или Glu; позиция 164 представляет собой Ser, Thr, Gln, Phe, Tyr или Val; позиция 165 представляет собой Gln,

30

Phe или His; позиция 186 представляет собой Glu, Ala, Ser, Leu, Thr, Pro или Asp; позиция 187 представляет собой Lys, Arg, Gly или Pro; позиция 188 представляет собой Glu или Ser; позиция 189 представляет собой Thr, Asn или кислотную аминокислоту; позиция 194 представляет собой Trp, Tyr, His или Phe; позиция 197 представляет собой Ser, Thr, Glu, Lys или Trp; и позиция 199 представляет собой Ser, Trp, Gly, Cys, Pro или Met согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

51. Конъюгат по любому из пп. 37-50, в котором первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 279, 281, 361-366, 491-494, 702-718, 632, 645-649, 738-746, 804; и при этом второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 557-561, 627-631, 635-644, 719-723, 724-731, 733-737 и 810.

52. Конъюгат по п. 51, в котором первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит Glu в позиции 153, Tyr в позиции 157, Thr в позиции 159, Glu в позиции 160, Trp в позиции 161, Ser или Ala в позиции 162, Asn в позиции 163, Thr или Ser в позиции 186, Glu в позиции 188, Glu в позиции 189 и Phe в позиции 194 согласно нумерации со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

53. Конъюгат по п. 51, в котором:
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 702, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 708, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 722;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 718, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-

- димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 559;
первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 560;
- 5 первый Fc-полипептид или первое слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 362, а второй Fc-полипептид или второе слияние Fab-Fc-димер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 561; или первый Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 804, а второй Fc-полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 810.
- 10
54. Конъюгат по любому из пп. 37-53, в котором олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид (ASO) или мРНК.
55. Конъюгат по п. 54, в котором каждый олигонуклеотид независимо представляет собой ASO.
- 15
56. Конъюгат по п. 55, в котором ASO представляет собой гэпмер, имеющий профиль модификации формулы 5'-X_a-Y_a-Z_a-3', где каждый из X_a и Z_a содержит 3 модифицированных нуклеотида ЗНК, и при этом область гэта Y_a содержит PS-связи.
- 20
57. Конъюгат по п. 55 или 56, в котором каждый L связан с 5' концом ASO.
58. Конъюгат по п. 55 или 56, в котором каждый L связан с 3' концом ASO.
- 25
59. Конъюгат по любому из пп. 37-58, в котором L содержит C₆ аминогруппу, имеющую формулу -(CH₂)₆-NH-.
60. Конъюгат по любому из пп. 37-59, в котором Р связывает TfR с аффинностью от около 500 нМ до около 10 нМ.
- 30
61. Конъюгат по п. 60, в котором Р связывает TfR с аффинностью от около 400 нМ до около 20 нМ.
62. Конъюгат по п. 61, в котором Р связывает TfR с аффинностью от около 300 нМ до
- 35 около 30 нМ.

63. Конъюгат по п. 62, в котором Р связывает TfR с аффинностью от около 200 нМ до около 40 нМ.
- 5 64. Конъюгат по п. 63, в котором Р связывает TfR с аффинностью от около 150 нМ до около 50 нМ.
65. Конъюгат по п. 64, в котором Р связывает TfR с аффинностью около 100 нМ.
- 10 66. Конъюгат по любому из пп. 37-65, в котором у представляет собой целое число от 1 до 4.
67. Конъюгат по п. 66, в котором у равен 1.
- 15 68. Конъюгат по любому из пп. 37-67, в котором n представляет собой целое число от 1 до 6.
69. Конъюгат по п. 68, в котором n равен 1.
- 20 70. Конъюгат по любому из пп. 37-39 и 41-69, в котором Р не содержит Fab-фрагмент или его антигенсвязывающую часть или часть варибельного домена.
71. Конъюгат формулы I, который содержит более одного олигонуклеотида:

$$P-(L-(X)_y)_n \quad (I)$$
- 25 где
каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
Р представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;
- 30 каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен 2 или более.
72. Конъюгат по п. 71, в котором n равен 2 или 4.
- 35 73. Конъюгат по п. 71 или 72, в котором у равен 1.

74. Конъюгат по п. 71 или 73, в котором Р содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.
- 5 75. Конъюгат по любому из пп. 71-74, в котором Р содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, способный димеризоваться с первым Fc-полипептидом.
- 10 76. Конъюгат по п. 74 или 75, в котором Fc-полипептид присоединен к ненацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc-димер; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.
- 15 77. Конъюгат по любому из пп. 71-76, в котором Р содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L.
78. Конъюгат по п. 77, в котором модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену.
- 20 79. Конъюгат по п. 78, в котором модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.
80. Конъюгат по п. 79, в котором замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в
25 соответствии с нумерацией Kabat.
81. Конъюгат по любому из пп. 75-80, в котором n равен 2, и при этом каждый из первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида присоединен к L через остаток цистеина в
30 позиции 239.
82. Конъюгат по любому из пп. 75-80, в котором n равен 4, и при этом каждый из первого Fc-полипептида и второго Fc-полипептида присоединен к двум L через остатки цистеина в
позициях 239 и 330, соответственно.
- 35 83. Конъюгат по любому из пп. 71-82, в котором олигонуклеотид представляет собой

антисмысловой олигонуклеотид (ASO) или миРНК.

84. Конъюгат формулы I, который содержит более одного олигонуклеотида:



5 где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;

10 каждый y независимо равен по меньшей мере 1, при этом по меньшей мере один y равен 2 или более; и

n равен по меньшей мере единице.

85. Конъюгат по п. 84, в котором y равен 2.

15

86. Конъюгат по п. 85, в котором по меньшей мере один L присоединен к 5' концу первого олигонуклеотида, а второй олигонуклеотид связан с 3' концом первого олигонуклеотида.

20 87. Конъюгат по п. 86, в котором первый и второй олигонуклеотиды связаны линкером на основе нуклеиновой кислоты или неолigonуклеотидным расщепляемым линкером.

88. Конъюгат по любому из пп. 84-87, в котором P содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.

25

89. Конъюгат по любому из пп. 84-87, в котором P содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом.

30 90. Конъюгат по п. 88 или 89, в котором Fc-полипептид присоединен к ненацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc-димер; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.

35 91. Конъюгат по любому из пп. 84-90, в котором P дополнительно содержит один или

большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L.

92. Конъюгат по п. 91, в котором модифицированный сайт представляет собой
5 аминокислотную замену.

93. Конъюгат по п. 92, в котором модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.

10 94. Конъюгат по п. 93, в котором замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat.

95. Конъюгат по любому из пп. 84-94, в котором олигонуклеотид представляет собой
15 антисмысловой олигонуклеотид (ASO) или миРНК.

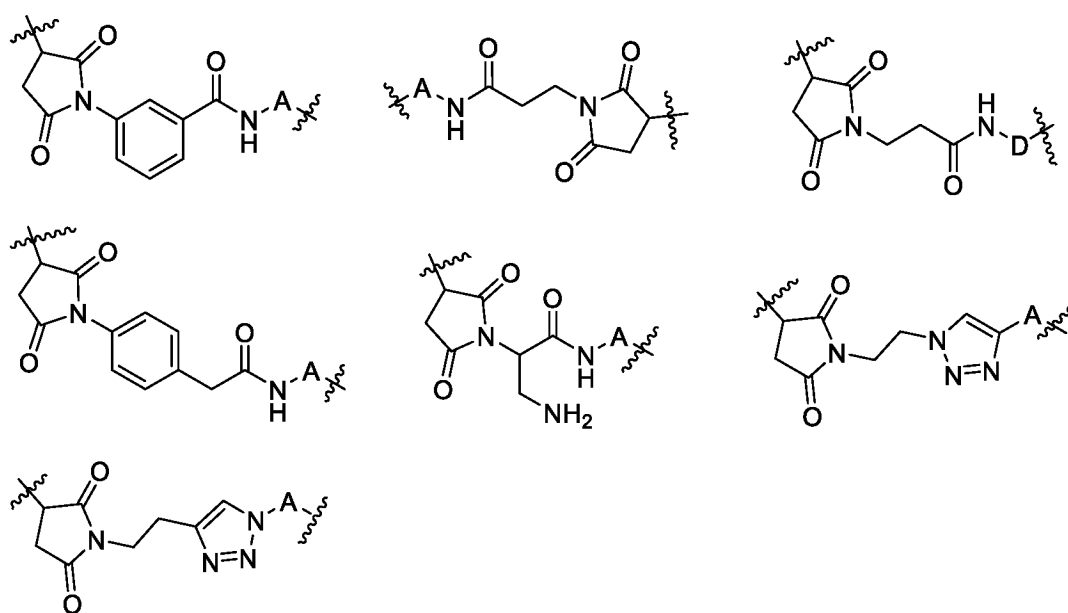
96. Конъюгат формулы I:

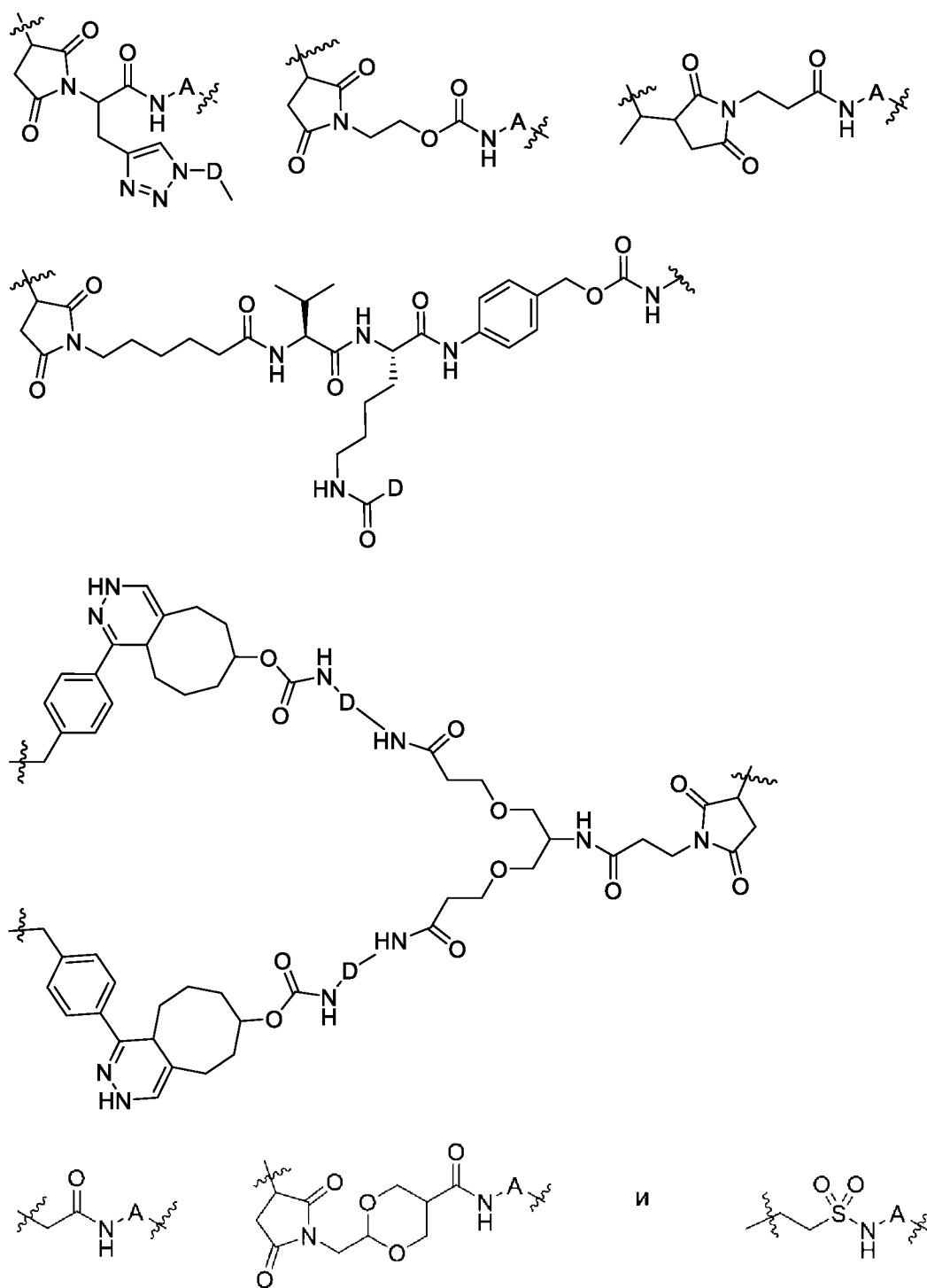


где

20 каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L представляет собой связывающую группу, независимо выбранную из группы, состоящей из:





5 где

каждый А независимо представляет собой (C₁-C₁₅)алкилен;

каждый D представляет собой -(CH₂-CH₂-O)_m-; и

каждый m равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24;

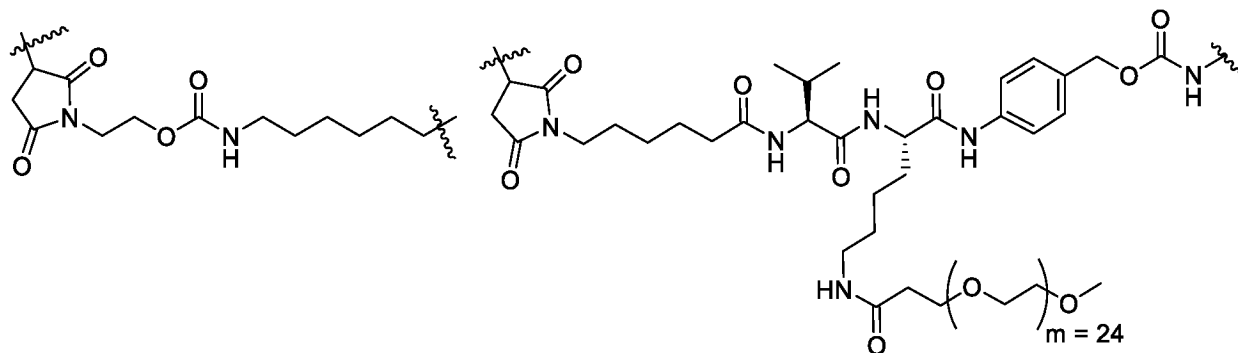
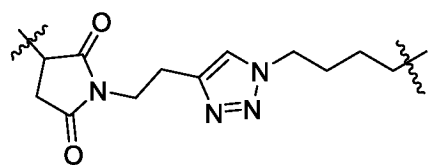
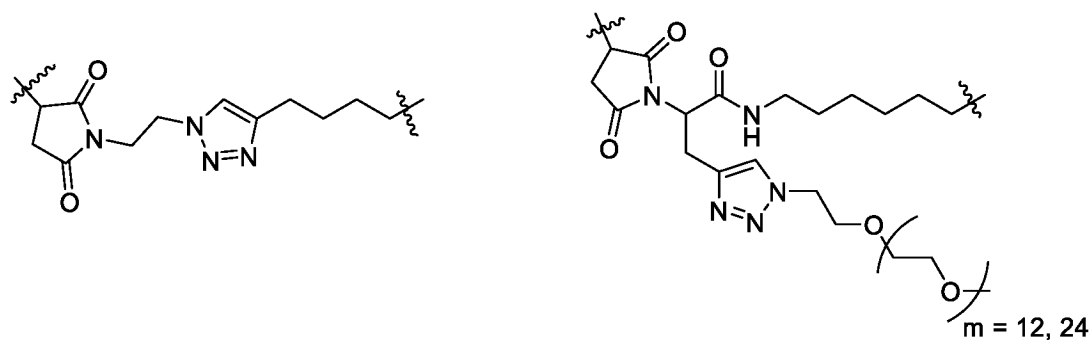
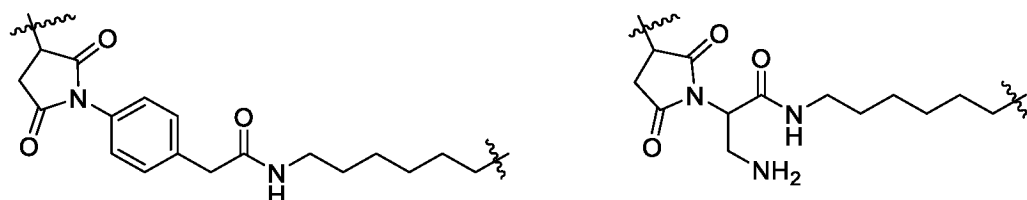
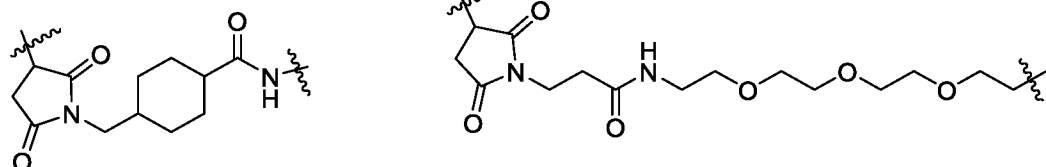
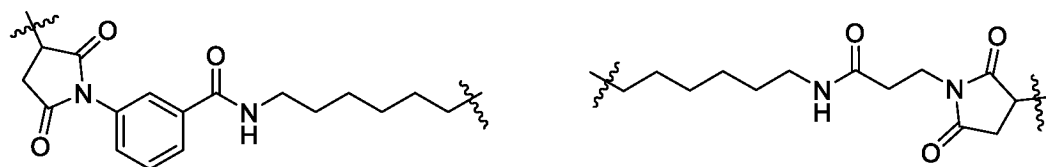
10 Р представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;

каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и

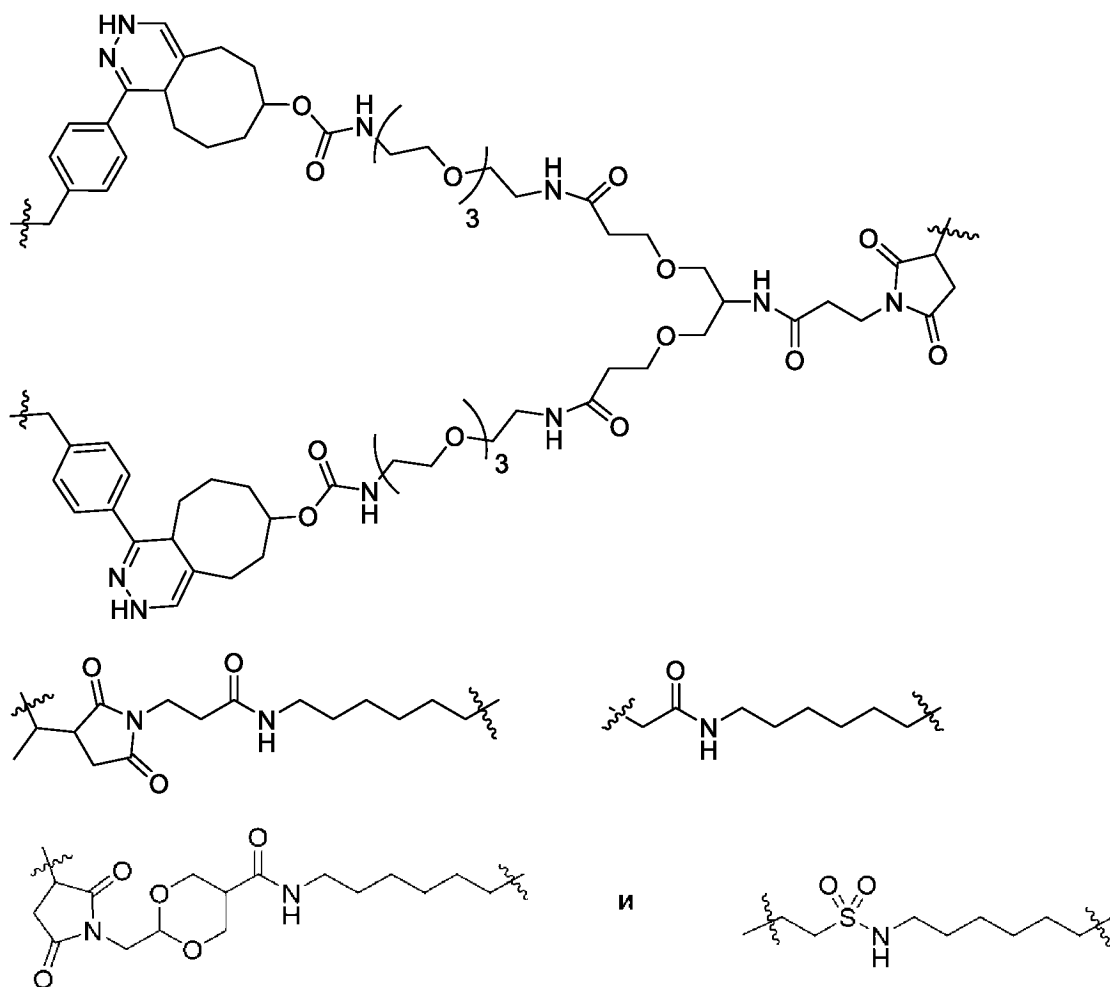
n равен по меньшей мере 1.

97. Конъюгат по п. 96, в котором каждый L представляет собой связывающую группу, независимо выбранную из группы, состоящей из:

5



10



- 5 98. Конъюгат по любому из пп. 96-97, в котором Р содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.
99. Конъюгат по любому из пп. 96-97, в котором Р содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен;
- 10 и второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом.
100. Конъюгат по п. 98 или 99, в котором Fc-полипептид присоединен к неацеливующему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc-димер; или каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с
- 15 неацеливующим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.
101. Конъюгат по любому из пп. 96-100, в котором Р дополнительно содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L.

102. Конъюгат по п. 101, в котором модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену.
103. Конъюгат по п. 102, в котором модифицированный сайт представляет собой замену
5 цистеином.
104. Конъюгат по п. 103, в котором замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A114C и T289C.
- 10 105. Конъюгат формулы I:
$$P-(L-(X)_y)_n \quad (I)$$
где
каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
15 P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина, при этом P не содержит Fab-фрагмент или его часть;
каждый y независимо равен 1 или более; и
n равен 1 или более.
- 20 106. Конъюгат по п. 105, в котором олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид (ASO) или миРНК.
107. Конъюгат по п. 105, в котором размер конъюгата превышает 50 кДа.
- 25 108. Конъюгат по любому из пп. 105-107, в котором P содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.
109. Конъюгат по любому из пп. 105-107, в котором P содержит димер Fc-полипептида,
30 содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен; и второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом.
110. Конъюгат по любому из пп. 105-110, в котором P дополнительно содержит один или
35 большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L.

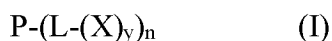
111. Конъюгат по п. 110, в котором модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену.

5 112. Конъюгат по п. 111, в котором модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.

113. Конъюгат по п. 112, в котором замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C и T289C.

10

114. Конъюгат формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

15 каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или более ненацеливающих Fab-фрагментов или их частей;

каждый y независимо равен 1 или более; и

20 n равен 1 или более.

115. Конъюгат по п. 114, в котором олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид (ASO) или миРНК.

25 116. Конъюгат по любому из пп. 114-115, в котором P содержит Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен.

117. Конъюгат по любому из пп. 114-115, в котором P содержит димер Fc-полипептида, содержащий первый Fc-полипептид, содержащий модифицированный константный домен;

30 и второй Fc-полипептид, димеризованный с первым Fc-полипептидом.

118. Конъюгат по п. 116 или 117, в котором Fc-полипептид присоединен к ненацеливающему Fab-фрагменту или его части с образованием слияния Fab-Fc-димер; или

каждый из первого и второго Fc-полипептидов димера Fc-полипептида соединен с

35 ненацеливающим Fab-фрагментом или его частью с образованием слияния Fab-Fc-димер.

119. Конъюгат по любому из пп. 114-118, в котором Р дополнительно содержит один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L.

5

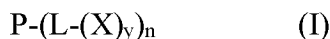
120. Конъюгат по п. 119, в котором модифицированный сайт представляет собой аминокислотную замену.

121. Конъюгат по п. 120, в котором модифицированный сайт представляет собой замену цистеином.

10

122. Конъюгат по п. 121, в котором замена цистеином выбрана из группы, состоящей из: S239C, S442C, A330C, K149C, A114C и T289C.

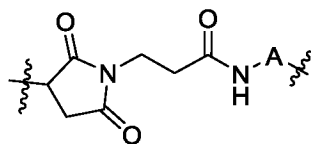
15 123. Конъюгат формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой



где А представляет собой (C₁-C₁₅)алкилен;

Р представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина с аффинностью около 100 нМ; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение Р к каждому L, при этом один или большее количество модифицированных сайтов выбраны из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat;

25

каждый у независимо равен по меньшей мере 1; и

п равен по меньшей мере 1.

30

124. Конъюгат по п. 123, в котором у представляет собой целое число от 1 до 4.

125. Конъюгат по п. 124, в котором y равен 1.
126. Конъюгат по любому из пп. 123-125, в котором n представляет собой целое число от 1 до 6.
- 5
127. Конъюгат по п. 126, в котором n равен 1.
128. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат формулы (I) по любому из пп. 1-21 и 37-127, и фармацевтически приемлемый эксципиент.
- 10
129. Композиция по п. 128, содержащая множество конъюгатов формулы (I).
130. Композиция по п. 129, в которой отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 1:1 до около 4:1.
- 15
131. Композиция по п. 129, в которой отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 1:1 до около 2:1.
132. Композиция по п. 129, в которой отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет около 1,23.
- 20
133. Композиция по п. 129, в которой отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет от около 2:1 до около 3:1.
- 25
134. Композиция по п. 133, в которой отношение олигонуклеотида к белку в композиции составляет около 2,5.
135. Способ нацеленной доставки олигонуклеотида в мышечную ткань и/или ткань головного мозга пациента, включающий:
- 30 введение субъекту конъюгата по любому из пп. 1-21 и 37-127 или фармацевтической композиции по п. 128.
136. Способ модуляции генной экспрессии в клетке головного мозга или множестве клеток головного мозга, включающий введение пациенту конъюгата, содержащего:
- 35 (i) белок, который специфически связывает TfR и;

(ii) олигонуклеотид,

при этом белок связывает TfR с низкой аффинностью от около 3 нМ до около 600 нМ, а конъюгат переносится через ГЭБ, и при этом в клетке олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена.

5

137. Способ по п. 136, в котором низкая аффинность составляет от около 500 нМ до около 3 нМ, или от около 400 нМ до около 20 нМ, или от около 300 нМ до около 30 нМ, или от около 200 нМ до около 40 нМ, или от около 150 нМ до около 50 нМ.

10 138. Способ по любому из пп. 136-137, в котором модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.

139. Способ по п. 138, в котором нокдаун гена или нокаут гена составляет по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% по сравнению с экспрессией в отсутствие введения олигонуклеотида.

15

140. Способ по любому из пп. 136-139, в котором введение конъюгата уменьшает объем MCV менее чем около на 2 фемтолитра.

20 141. Способ по любому из пп. 136-140, в котором введение конъюгата снижает уровни белка TfR в сосудистой сети головного мозга менее чем на около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 40%, около 50%, или около 60%.

142. Способ по любому из пп. 136-141, в котором клетка головного мозга представляет собой нейрон, эндотелиальную клетку, олигодендроцит, астроцит или микроглию.

25

143. Способ по любому из пп. 136-141, в котором множество клеток содержат по меньшей мере два, три, четыре или пять типов клеток, выбранных из группы, состоящей из: нейрона, эндотелиальной клетки, олигодендрокита, астроцита и микроглии.

30

144. Способ по п. 142 или 143, в котором нейрон представляет собой возбуждающий нейрон или тормозящий нейрон.

145. Способ по любому из пп. 136-144, в котором конъюгат вводят пациенту внутривенно.

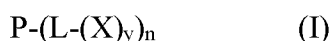
35

146. Способ доставки олигонуклеотида в глубокие области головного мозга, включающий введение пациенту конъюгата, содержащего:
- (i) белок, который специфически связывает TfR и;
 - (ii) олигонуклеотид,
- при этом белок связывает TfR с аффинностью от около 3 нМ до около 600 нМ, а конъюгат переносится через ГЭБ, и при этом в клетке головного мозга в глубоких областях головного мозга олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена.
147. Способ по п. 146, в котором низкая аффинность составляет от около 500 нМ до около 3 нМ, или от около 400 нМ до около 20 нМ, или от около 300 нМ до около 30 нМ, или от около 200 нМ до около 40 нМ, или от около 150 нМ до около 50 нМ.
148. Способ по любому из пп. 146-147, в котором глубокие области головного мозга содержат по меньшей мере одно из коры головного мозга, ствола мозга, гиппокампа, полосатого тела, мозжечка или таламуса.
149. Способ по любому из пп. 146-148, дополнительно включающий доставку олигонуклеотида в спинной мозг.
150. Способ по п. 149, отличающийся тем, что спинной мозг представляет собой шейный отдел спинного мозга и/или поясничный отдел спинного мозга.
151. Способ доставки антисмыслового олигонуклеотида в глубокие области головного мозга, включающий введение пациенту конъюгата, содержащего:
- (i) белок, который специфически связывает TfR и;
 - (ii) олигонуклеотид,
- при этом белок связывает TfR с аффинностью от около 3 нМ до около 600 нМ, а конъюгат переносится через ГЭБ, и при этом в клетке в области головного мозга олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена.
152. Способ создания нейронной клетки со сниженной экспрессией целевого гена, включающий доставку в нейронную клетку олигонуклеотида, при этом олигонуклеотид переносится через ГЭБ как часть конъюгата с белком, который связывает TfR с низкой аффинностью, составляющей от около 3 нМ до около 600 нМ, и при этом указанный

олигонуклеотид снижает уровень экспрессии целевого гена.

153. Способ модификации нейронной клетки для снижения экспрессии целевого гена, включающий доставку в нейронную клетку олигонуклеотида, при этом олигонуклеотид переносится через ГЭБ как часть конъюгата с белком, который связывает TfR с низкой аффинностью, составляющей от около 3 нМ до около 600 нМ, и при этом указанный олигонуклеотид снижает уровень экспрессии целевого гена.

154. Способ переноса олигонуклеотида через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:

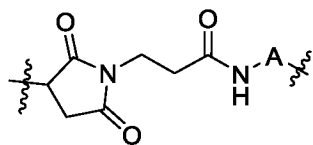


где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой

15



где A представляет собой (C₁-C₁₅)алкилен;

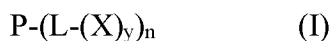
P представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина с аффинностью около 100 нМ; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L, при этом один или большее количество модифицированных сайтов выбраны из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat;

каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и

n равен по меньшей мере 1.

155. Способ по п. 154, в котором конъюгат вводят пациенту внутривенно.

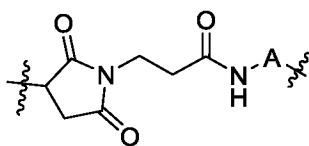
156. Способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке головного мозга пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

каждый L независимо представляет собой



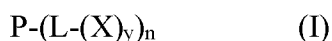
где A представляет собой (C₁-C₁₅)алкилен;

- 5 P представляет собой белок, содержащий слияние Fab-Fc-димер, содержащее 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина с аффинностью около 100 нМ; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L, выбранных из группы, состоящей из S239C, S442C, A330C, K149C и T289C в соответствии с нумерацией EU и A114C в соответствии с нумерацией Kabat;
- 10 каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен по меньшей мере 1.

157. Способ по п. 156, в котором модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.

158. Способ по любому из пп. 156 или 157, в котором конъюгат вводят пациенту внутривенно.

- 20 159. Способ модуляции экспрессии целевого гена в клетке головного мозга пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:



где

каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;

- 25 каждый L независимо представляет собой связывающую группу;

P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L;

- 30 каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен по меньшей мере 1.

160. Способ по п. 159, в котором клетка представляет собой нейрон, эндотелиальную клетку, олигодендроцит, астроцит или микроглию.

161. Способ по п. 159, который позволяет модулировать экспрессию целевого гена во множестве клеток головного мозга пациента.
- 5 162. Способ по п. 161, в котором множество клеток содержат по меньшей мере два, три, четыре или пять типов клеток, выбранных из группы, состоящей из: нейрона, эндотелиальной клетки, олигодендроцита, астроцита и микроглии.
- 10 163. Способ по любому из пп. 160-162, в котором нейрон представляет собой возбуждающий нейрон или тормозящий нейрон.
164. Способ по любому из пп. 160-163, в котором модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.
- 15 165. Способ по любому из пп. 160-164, в котором конъюгат вводят пациенту внутривенно.
166. Способ переноса олигонуклеотида через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:
- 20
$$P-(L-(X)_y)_n \quad (I)$$
где
каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
P представляет собой белок, содержащий 1) модифицированный константный домен,
25 который специфически связывается с рецептором трансферрина; и 2) один или большее количество модифицированных сайтов, которые облегчают присоединение P к каждому L;
каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и
n равен по меньшей мере 1,
и
30 при этом олигонуклеотид распределяется по всем областям головного мозга или всей центральной нервной системе.
167. Способ по п. 166, в котором области головного мозга включают по меньшей мере одну глубокую область головного мозга.

168. Способ по любому из пп. 166-167, в котором конъюгат вводят пациенту внутривенно.
169. Способ по любому из пп. 166-168, в котором олигонуклеотид модулирует экспрессию целевого гена.
170. Способ по п. 169, в котором модуляция экспрессии целевого гена представляет собой нокдаун гена или нокаут гена.
171. Способ доставки эффективного количества олигонуклеотида в ЦНС пациента, включающий введение пациенту конъюгата формулы I:
- $$P-(L-(X)_y)_n \quad (I)$$
- где
- каждый X независимо представляет собой олигонуклеотид;
- каждый L независимо представляет собой связывающую группу;
- P представляет собой белок, содержащий модифицированный константный домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина;
- каждый y независимо равен по меньшей мере 1; и
- n равен по меньшей мере 1,
- и
- при этом вводимый олигонуклеотид модулирует генную экспрессию по всем областям головного мозга или всей центральной нервной системе.
172. Способ по п. 171, в котором области головного мозга включают по меньшей мере одну глубокую область головного мозга.
173. Способ по п. 172, в котором по меньшей мере одна глубокая область головного мозга выбрана из: полосатого тела, таламуса, дорсального стриатума, черного вещества и ствола головного мозга.
174. Способ по любому из 171-173, в котором области головного мозга содержат клетки внутри областей головного мозга.
175. Способ по п. 174, в котором клетки областей головного мозга включают эндотелиальные клетки, нейроны, астроциты, олигодендроциты и микроглию.

176. Способ по п. 175, в котором олигонуклеотид модулирует генную экспрессию в эндотелиальных клетках, нейронах, астроцитах, олигодендроцитах и микроглии.
- 5 177. Способ по любому из пп. 171-176, в котором эффективное количество снижает генную экспрессию по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с экспрессией без введения олигонуклеотида.
178. Способ по любому из пп. 171-176, в котором экспрессия гена снижается по меньшей
10 мере около на 50%.
179. Способ по любому из пп. 171-178, в котором экспрессия гена снижается по меньшей мере около на 70%.
- 15 180. Способ по любому из пп. 171-179, в котором конъюгат вводят пациенту внутривенно.
181. Fab-Fc-димер по любому из пп. 22-30 или 32-36 или конъюгат по любому из пп. 40-70, 76-83, 90-95, 100-104 или 119-134, в котором каждый из Fab Fab-Fc-димера и ненацеливающего Fab (NTF) конъюгата содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, не связывается специфически с встречающимся в
20 природе эпитопом у субъекта и содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, при этом
- CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 825 или 826,
- 25 CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 827, 828 или 869,
- CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 829,
- CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%
30 идентичности последовательности с SEQ ID NO: 819 или 820,
- CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 821 или 822, и
- CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 823 или 824.

182. Fab-Fc-димер или конъюгат по п. 181, в котором
- (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 837 или 853; и
- 5 (b) вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 832 или 851.
- 10
183. Fab-Fc-димер или конъюгат по п. 182, в котором
- (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с
- 15 аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 837, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 832; или
- 20 (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 853, а вариабельная область легкой
- 25 цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 851.
184. Fab-Fc-димер или конъюгат по п. 182, в котором
- 30 (a) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 837 или 853; и
- (b) вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 832 или 851.
- 35 185. Fab-Fc-димер или конъюгат по п. 1847, в котором

(a) варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 837, а варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 832; или

5 (a) варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 853, а варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 851.

186. Fab-Fc-димер или конъюгат по п. 181, в котором NTF содержит

10 (a) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846, 847, 854, 855, 856, 857, 859, 860, 861 и 862; и

15 (b) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 833, 835, 850 и 852.

187. Fab-Fc-димер или конъюгат по п. 186, в котором

20 (a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 838, 839, 840, 841, 844, 845, 846, 847, 854, 855, 856, 857, 859, 860, 861 и 862; и

(b) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 833, 835, 850 и 852.

25 188. Fab-Fc-димер или конъюгат по п. 187, в котором

(a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 838, 839, 840 или 841, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 833;

(b) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 844, 845, 846 или 847, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 833;

30 (c) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 838, 839, 840 или 841, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 835;

(d) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 844, 845, 846 или 847, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 835;

35 (e) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 854, 855, 856 или 857, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 850;

(f) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 859, 860, 861 или 862, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 850;

(g) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 854, 855, 856 или 857, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 852;

5 и

(h) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 859, 860, 861 или 862, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 852.

189. Fab-Fc-димер по любому из пп. 23-30 или 32-36 или конъюгат по любому из пп. 40-
10 70, 76-83, 90-95, 100-104 или 119-134, в котором каждый из Fab Fab-Fc-димера и
ненацеливающего Fab (NTF) конъюгата содержит вариабельную область легкой цепи и
вариабельную область тяжелой цепи, не связывается специфически с встречающимся в
природе эпитопом у субъекта и содержит три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи,
при этом

15 CDR-H1 содержит SEQ ID NO: 825 или 826,

CDR-H2 содержит SEQ ID NO: 827, 828 или 869,

CDR-H3 содержит SEQ ID NO: 829,

CDR-L1 содержит SEQ ID NO: 819 или 820,

CDR-L2 содержит SEQ ID NO: 821 или 822 и

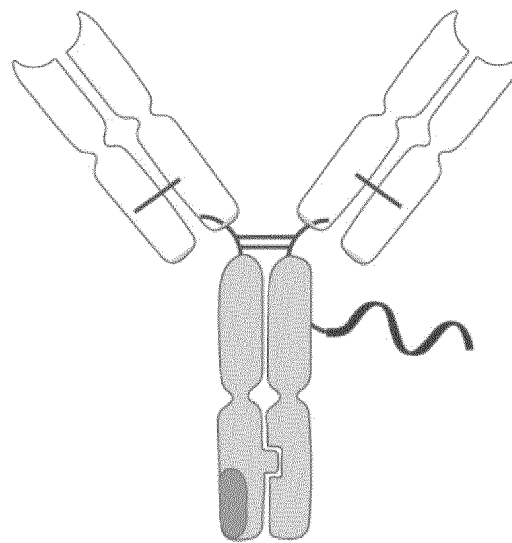
20 CDR-L3 содержит SEQ ID NO: 823 или 824.

25

30

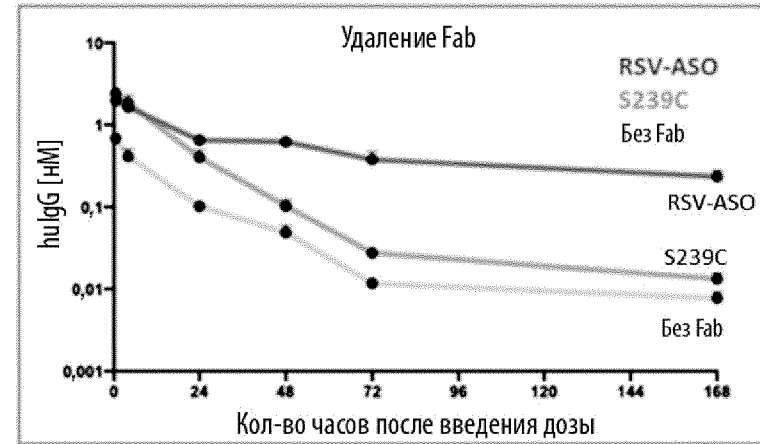
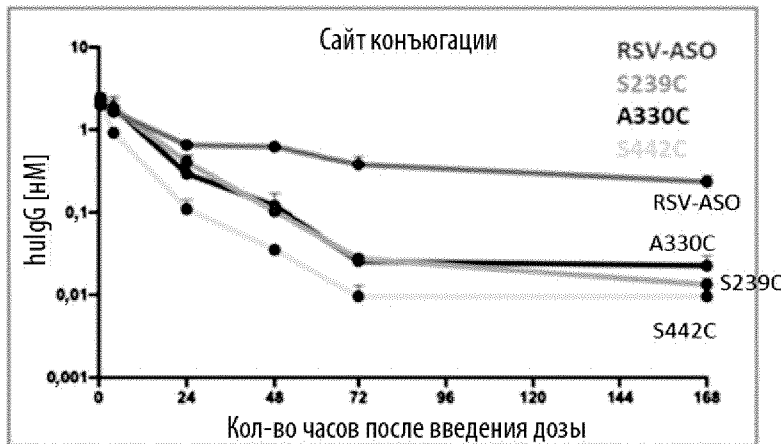
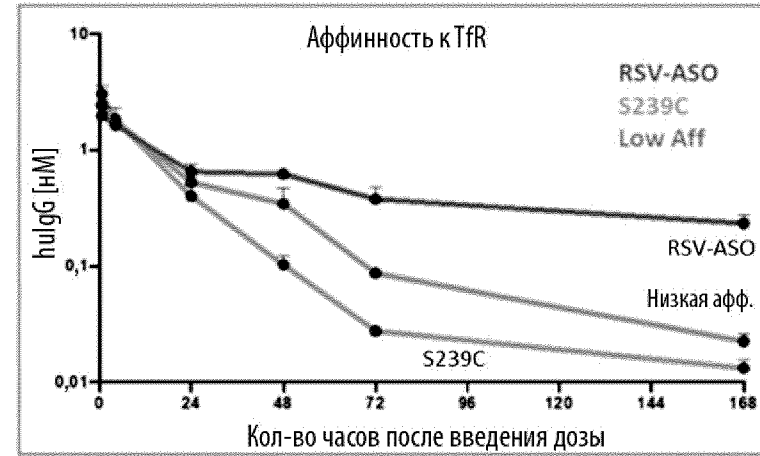
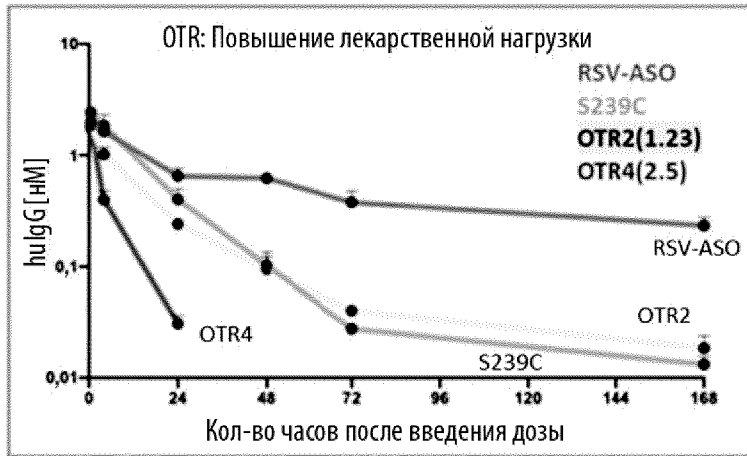
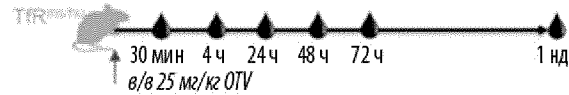
35

Фиг. 1



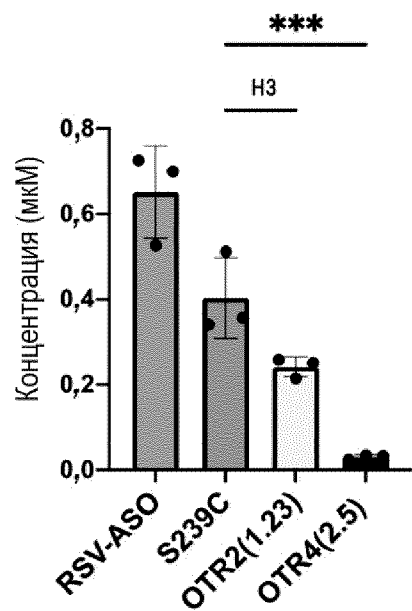
Олигонуклеотидное средство переноса (ОТВ)

Фиг. 2

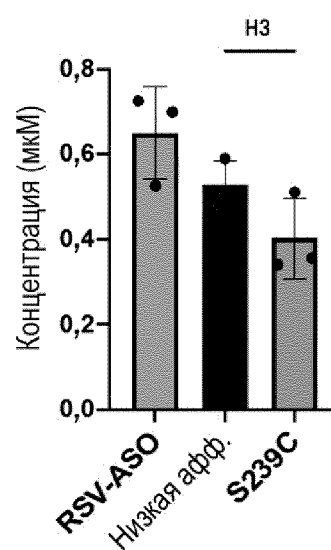


Фиг. 3

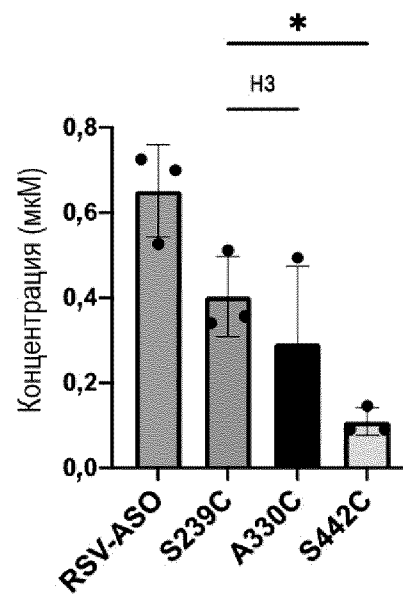
OTR: Повышение нагрузки ASO



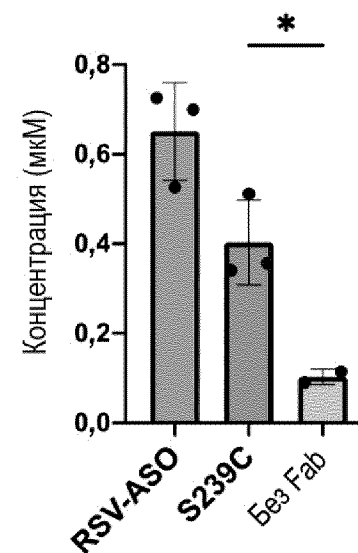
Аффинность к TfR



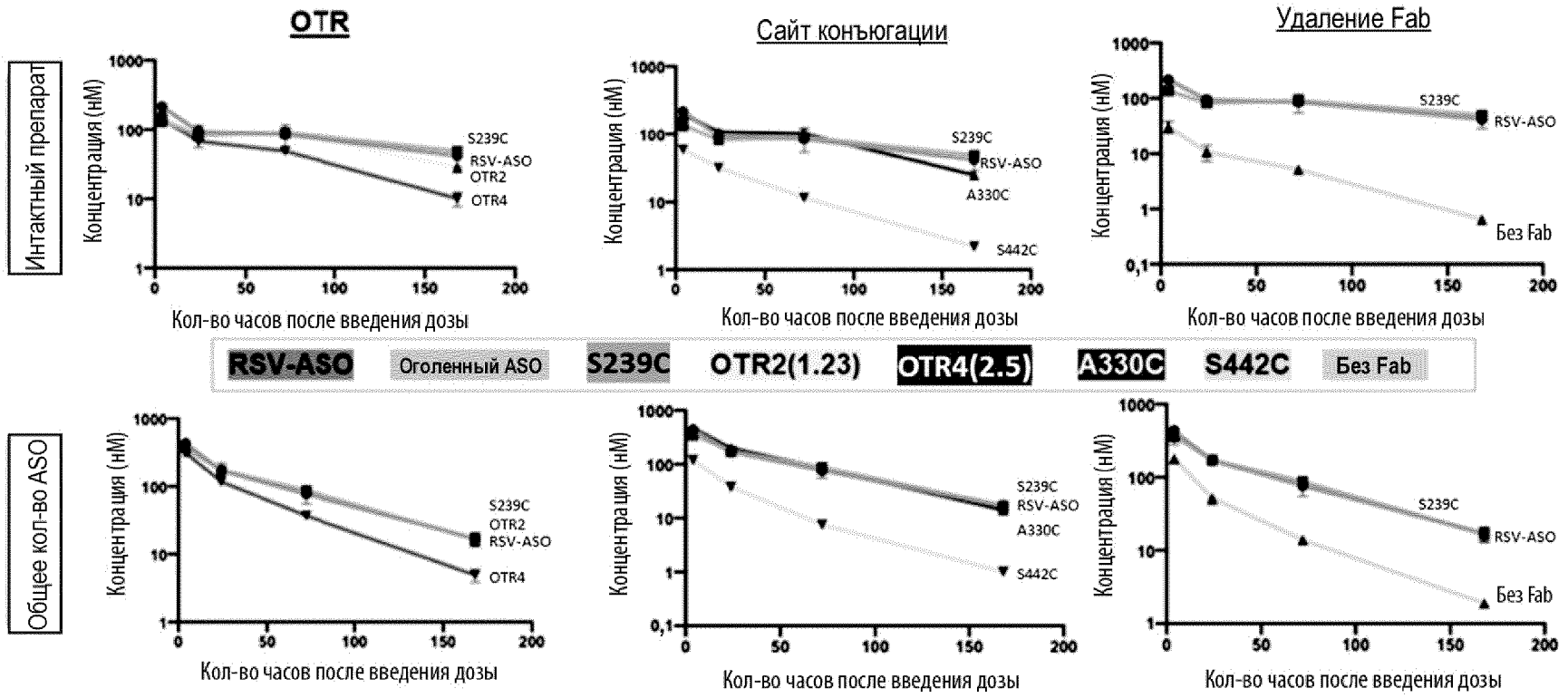
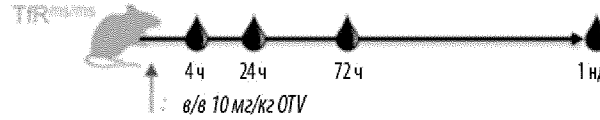
Сайт конъюгации



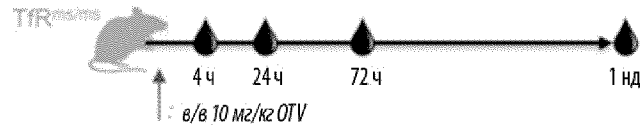
Удаление Fab



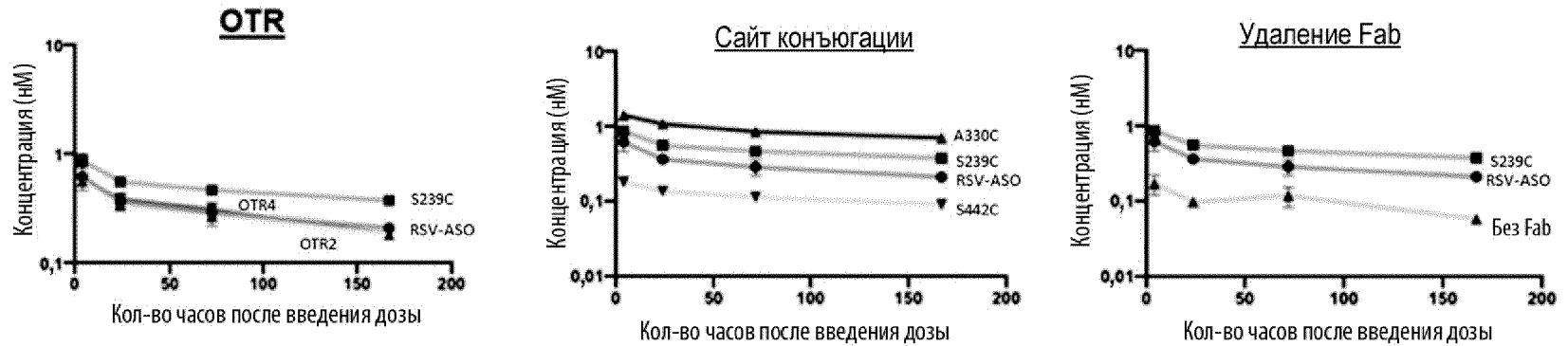
Фиг. 5



Фиг. 6



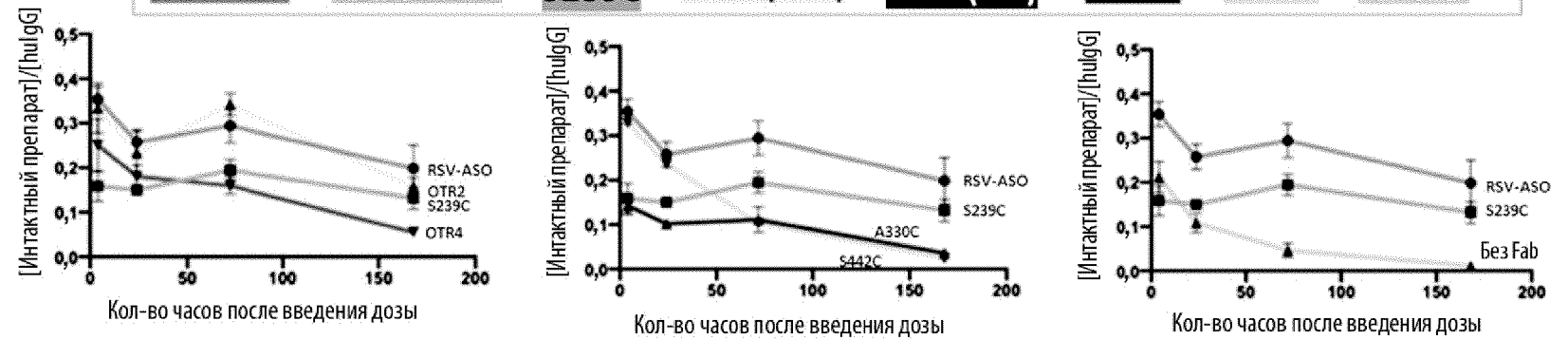
hulgG



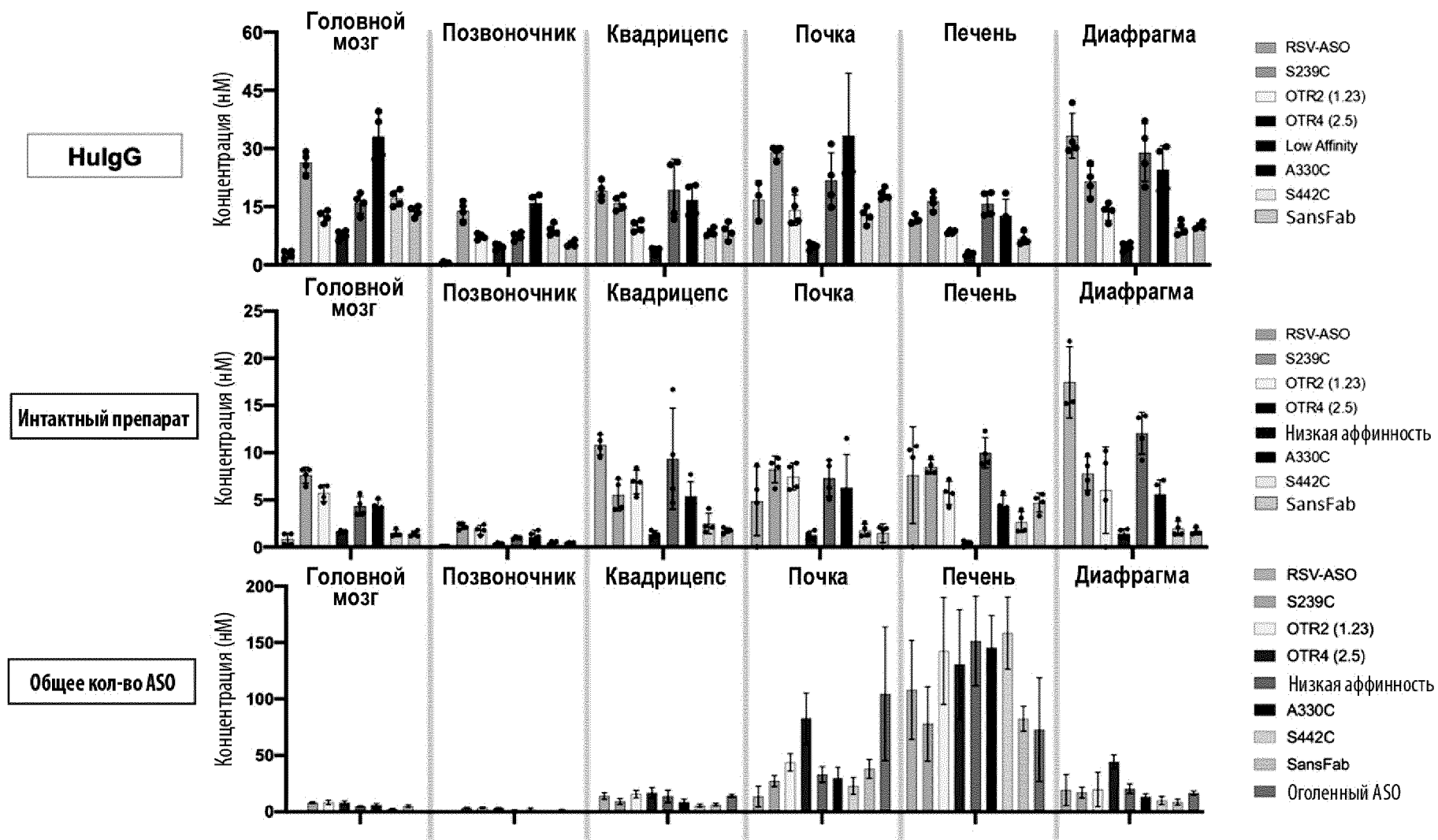
6/45

RSV-ASO Оголенный ASO S239C OTR2(1.23) OTR4(2.5) A330C S442C Без Fab

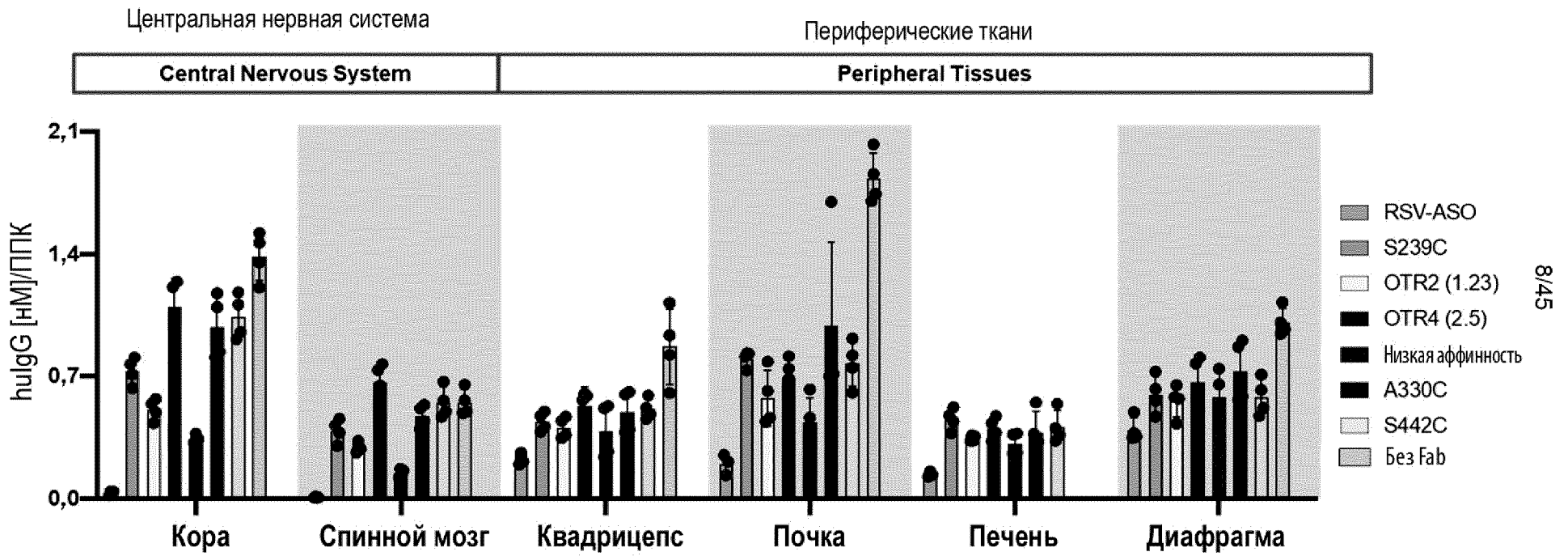
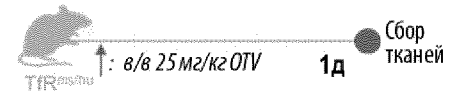
% интактного препарата



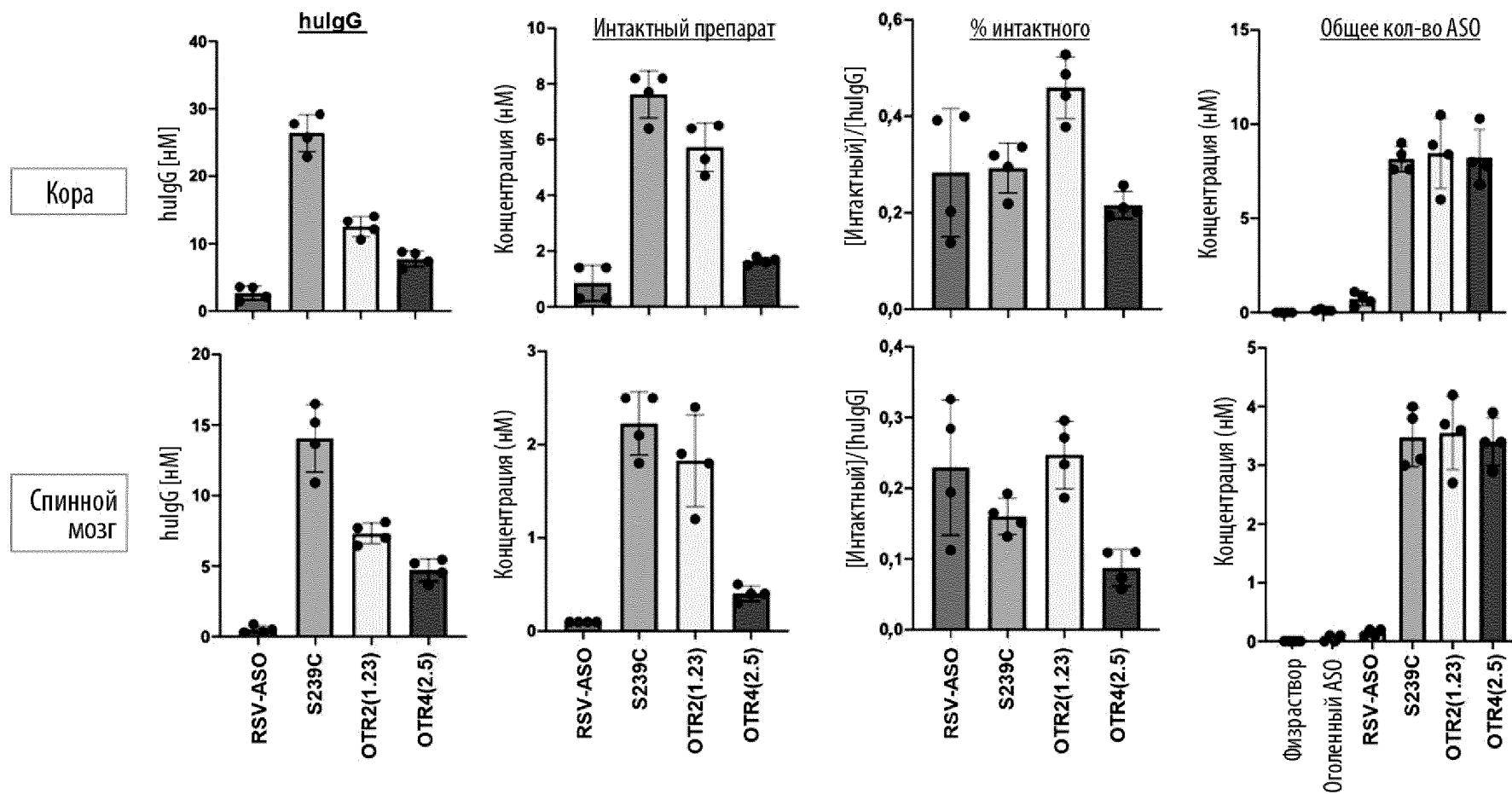
Фиг. 7



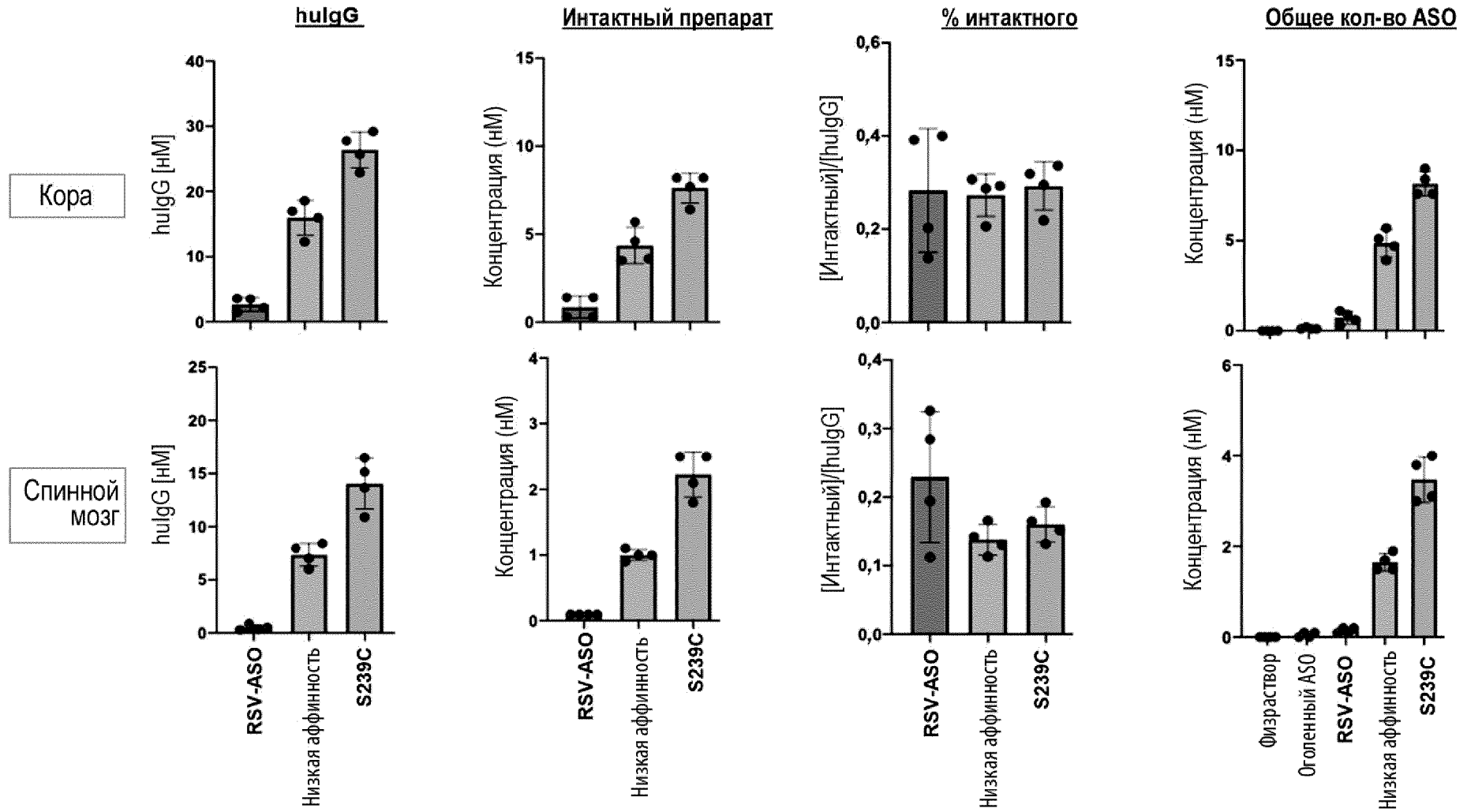
Фиг. 8



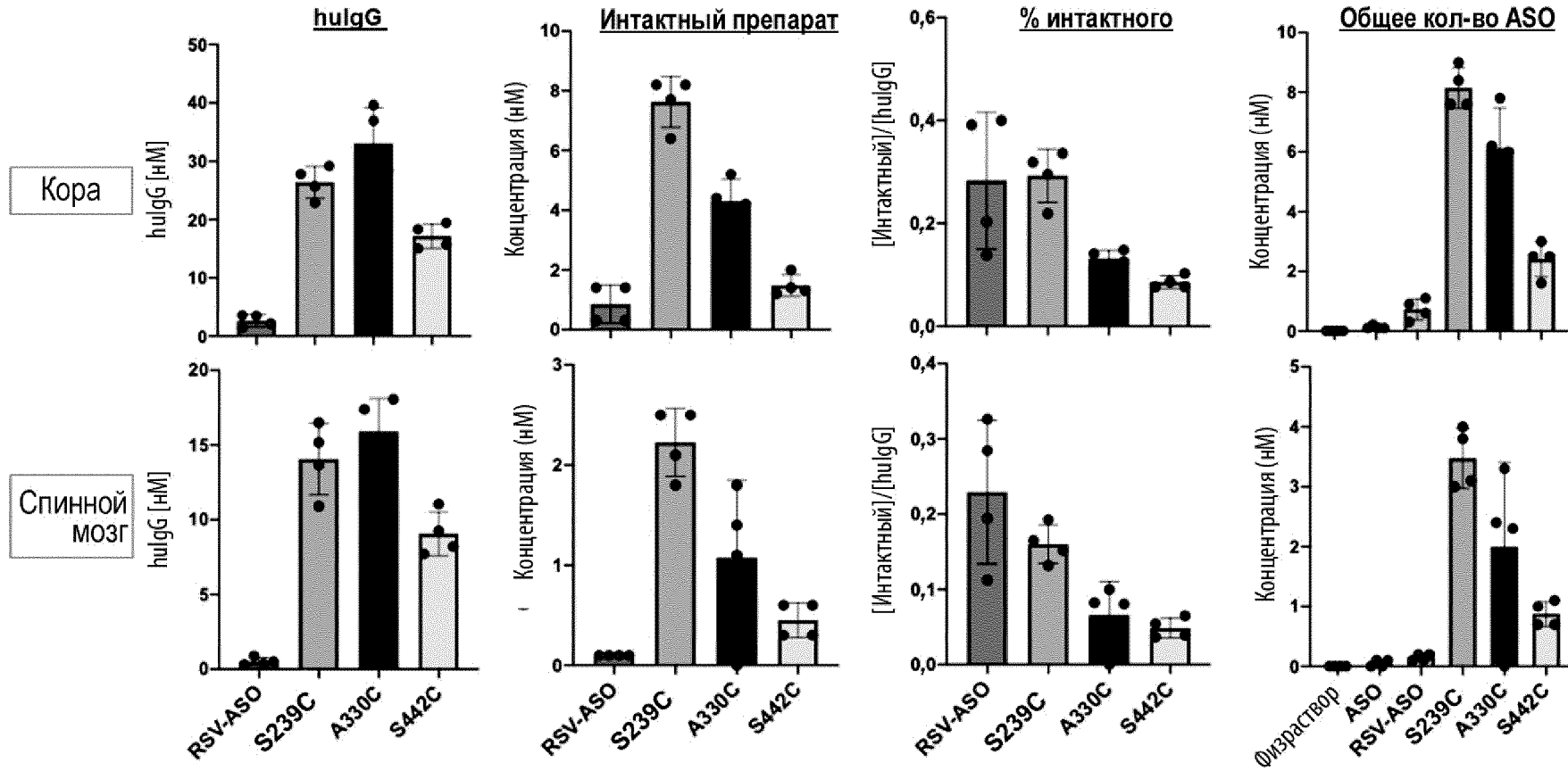
Фиг. 9



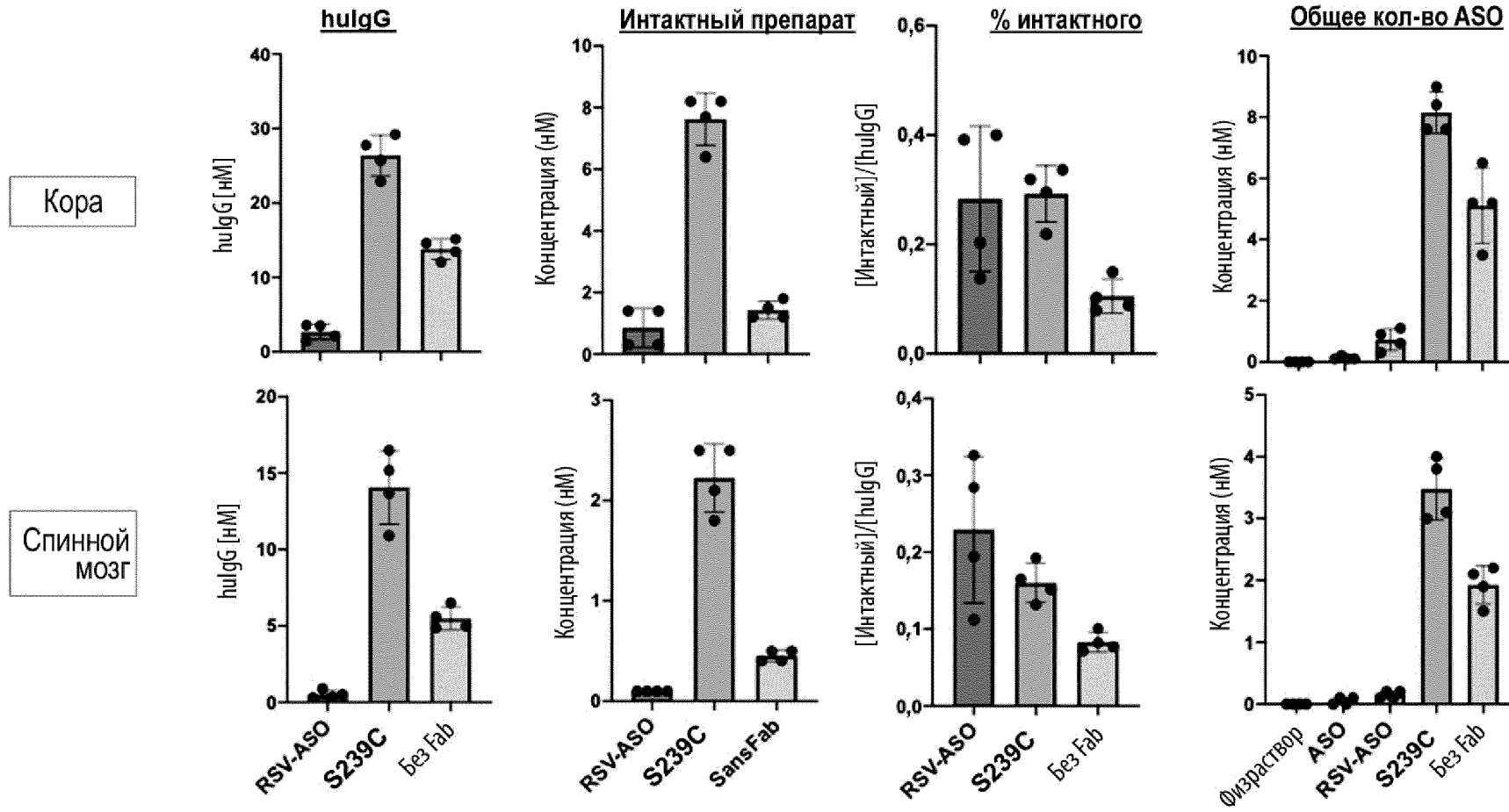
Фиг. 10



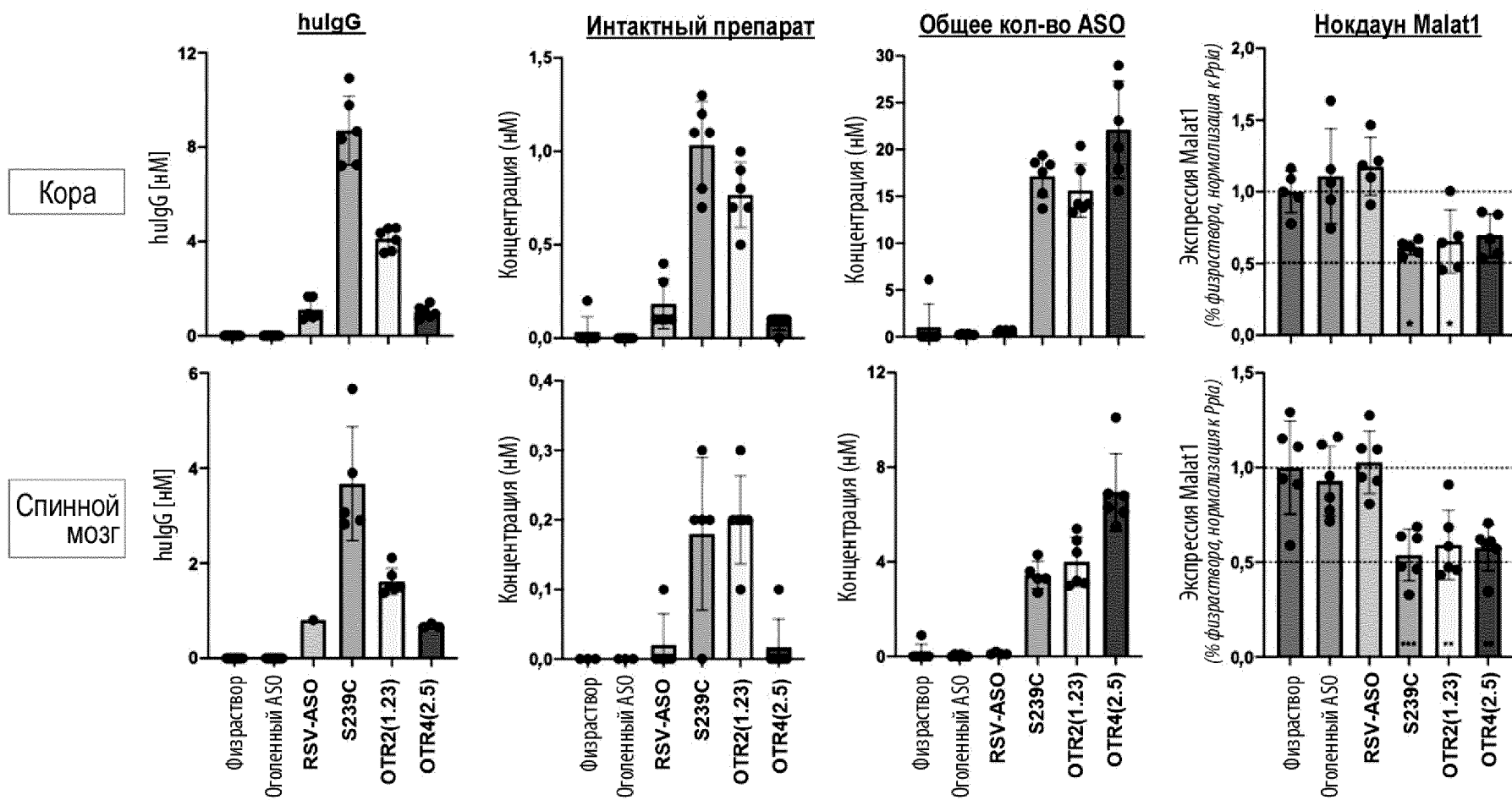
Фиг. 11



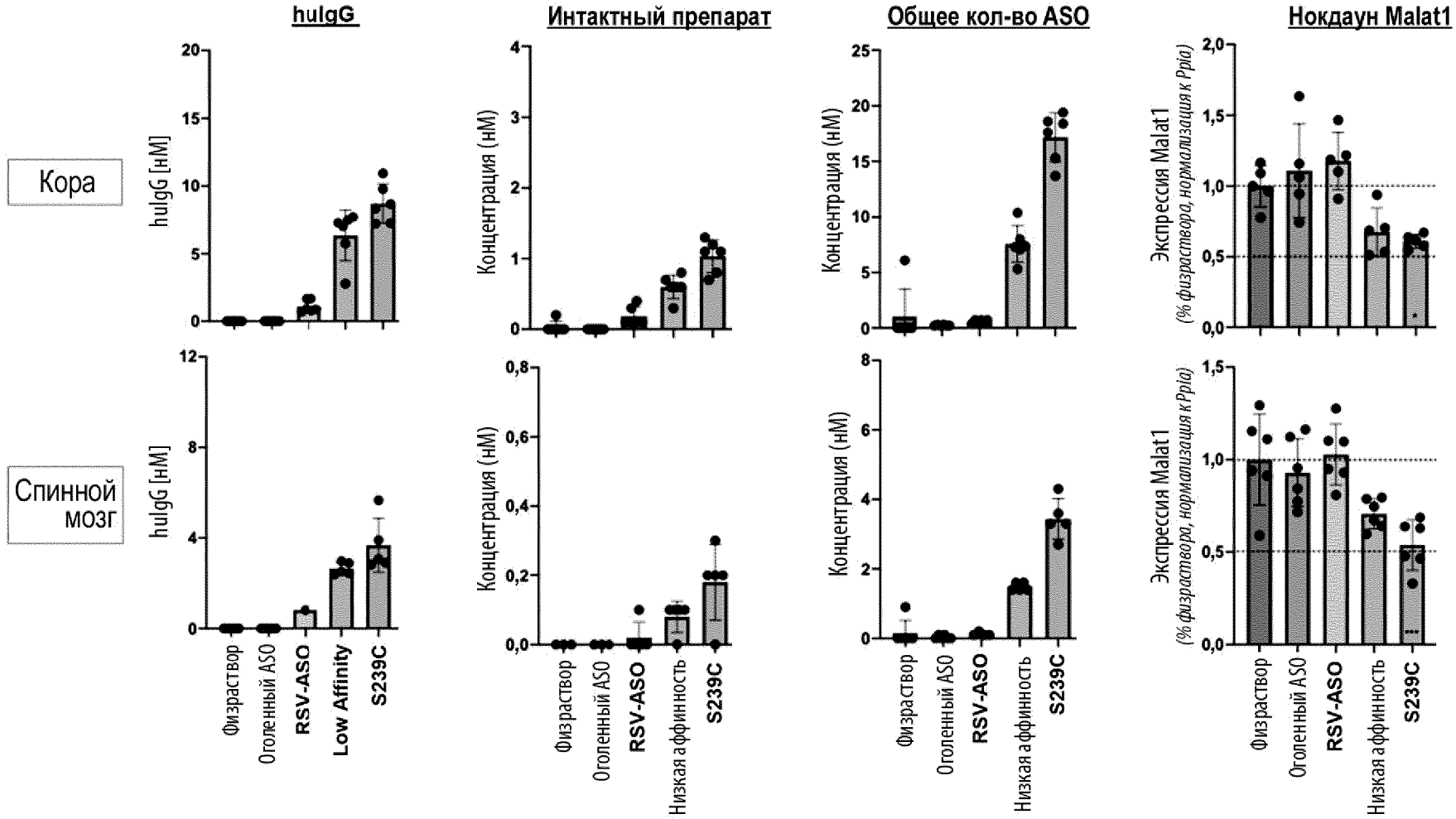
Фиг. 12



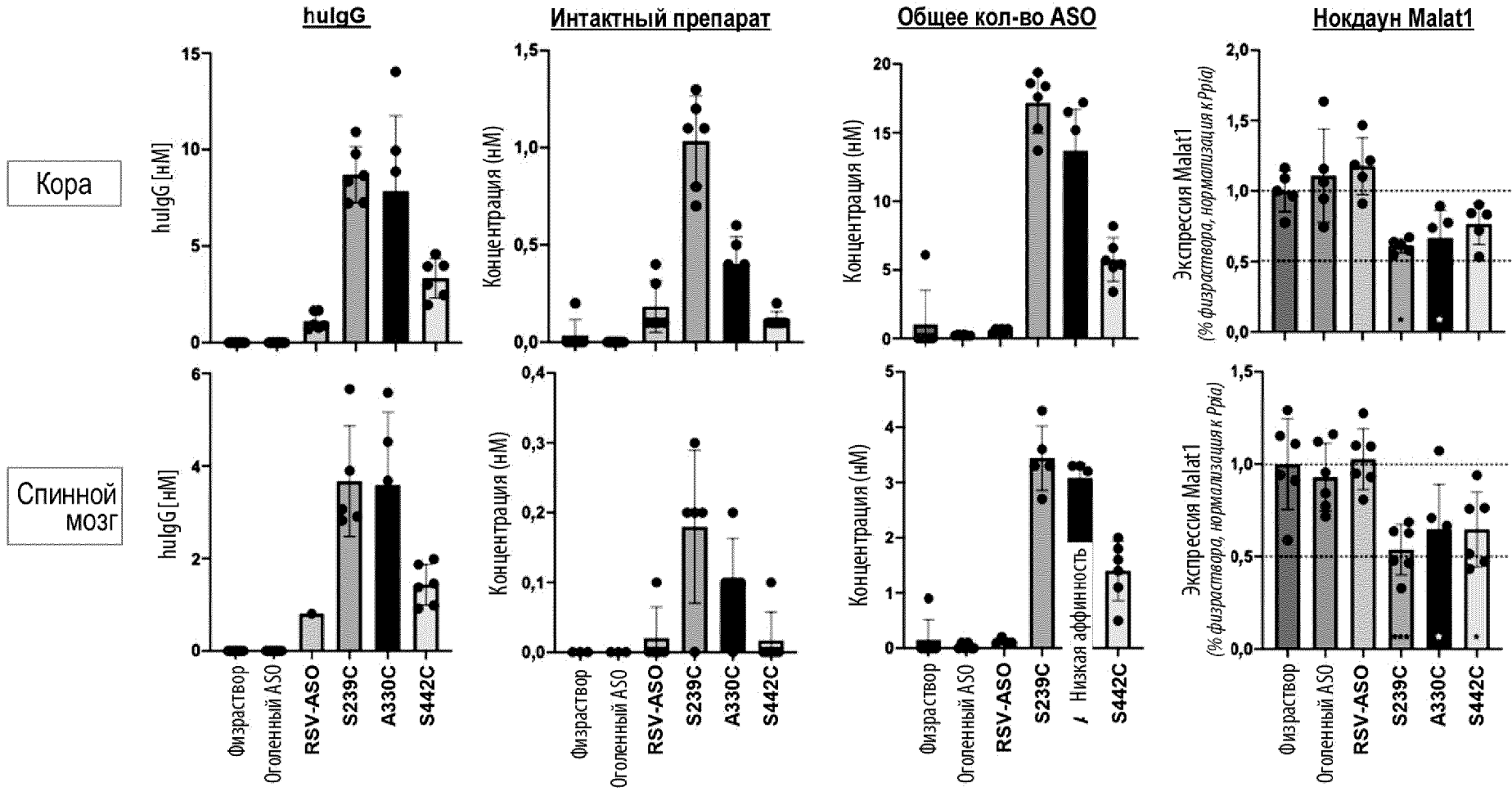
Фиг. 13



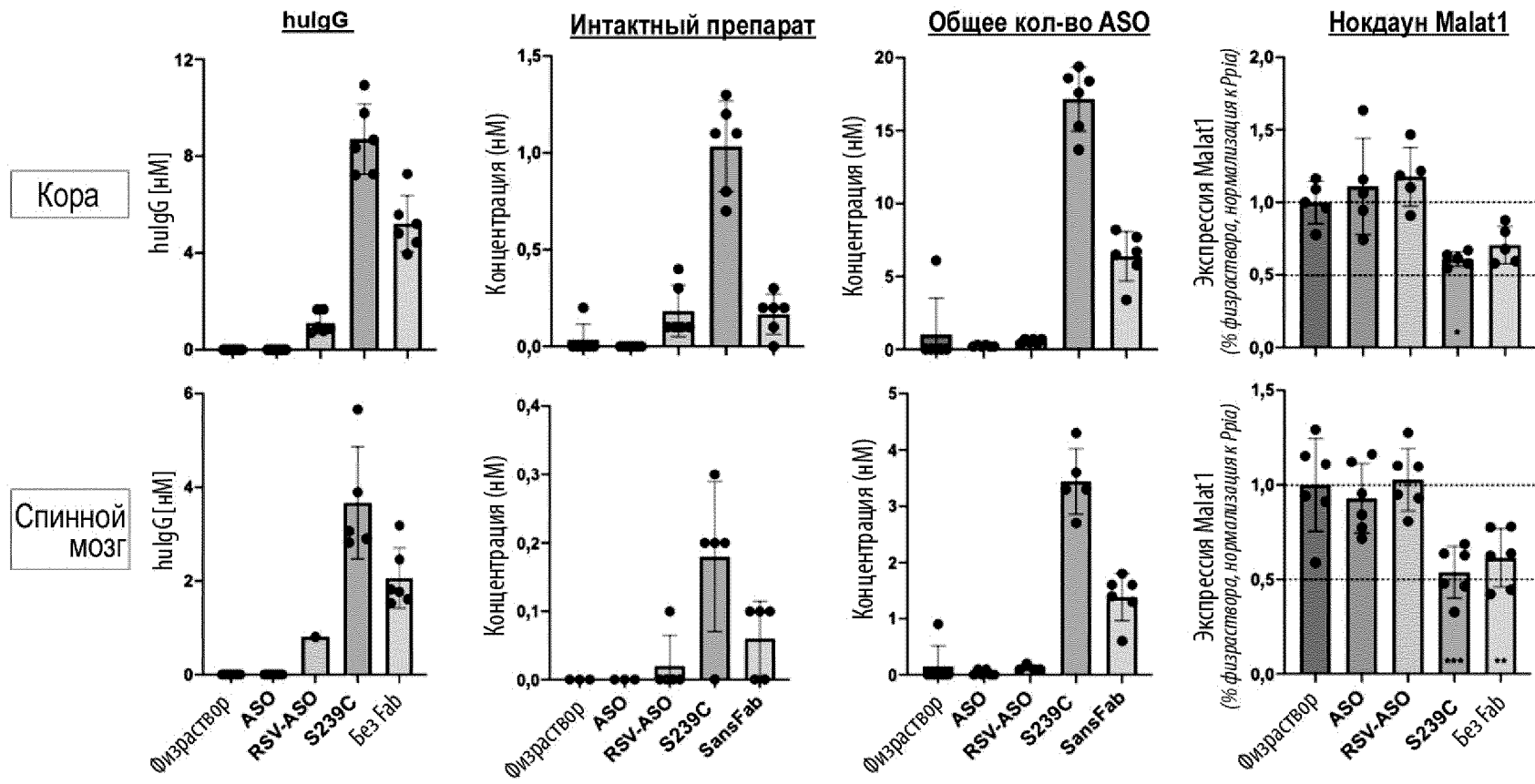
Фиг. 14



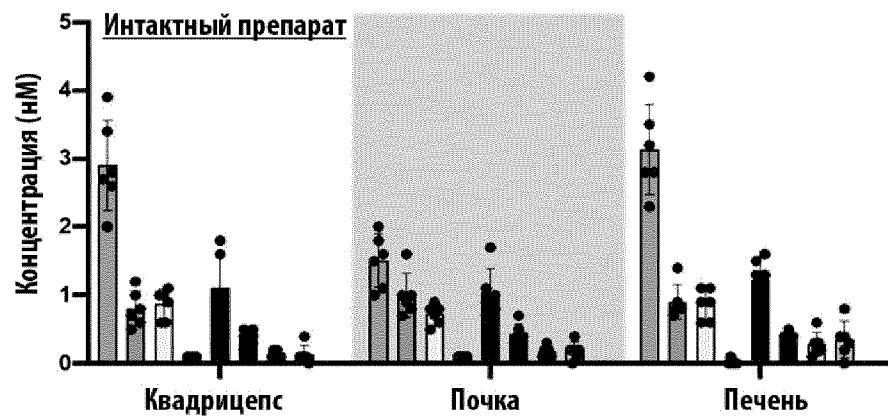
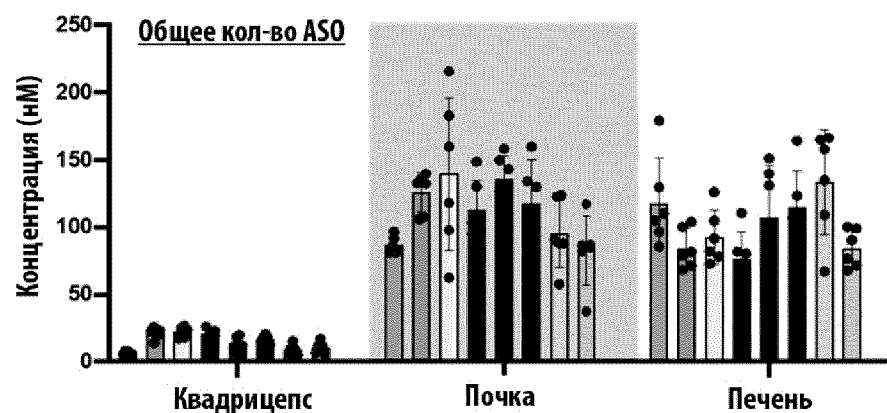
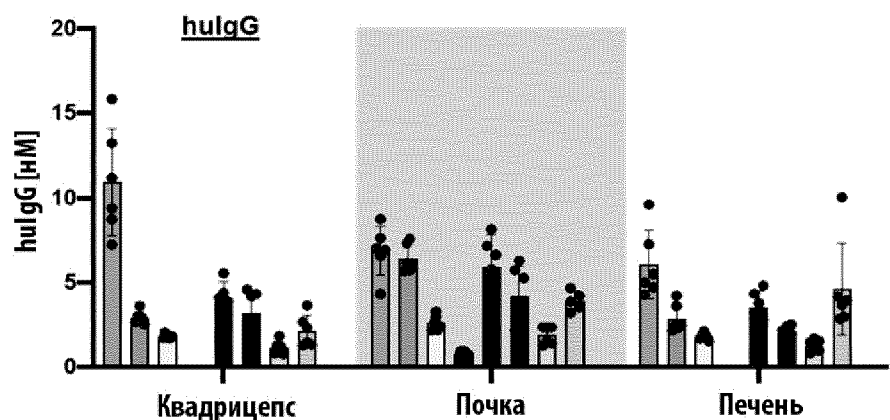
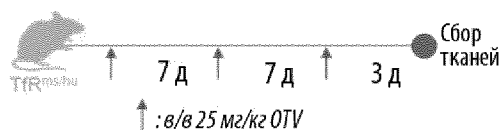
Фиг. 15



Фиг. 16

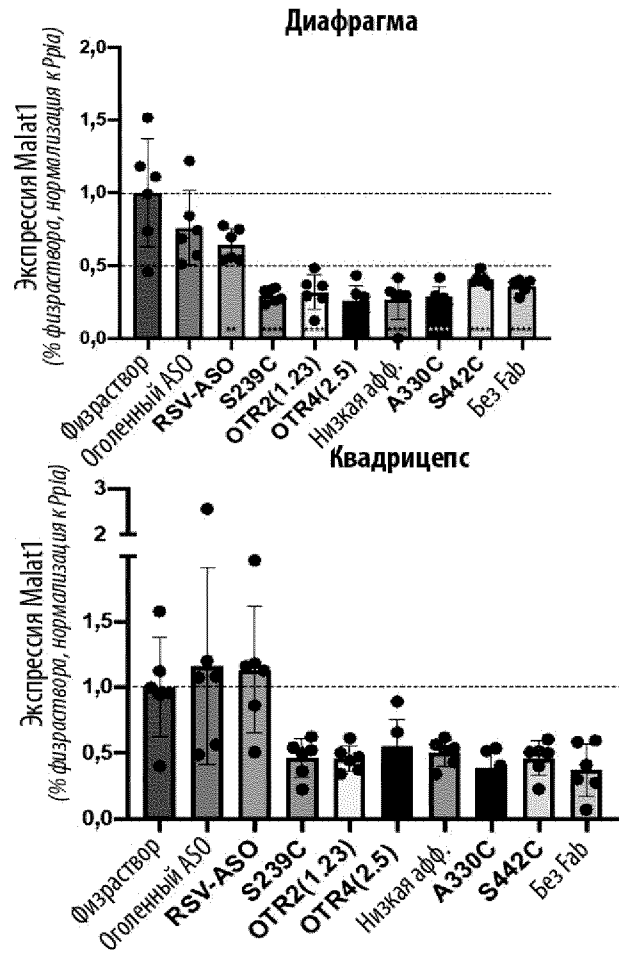
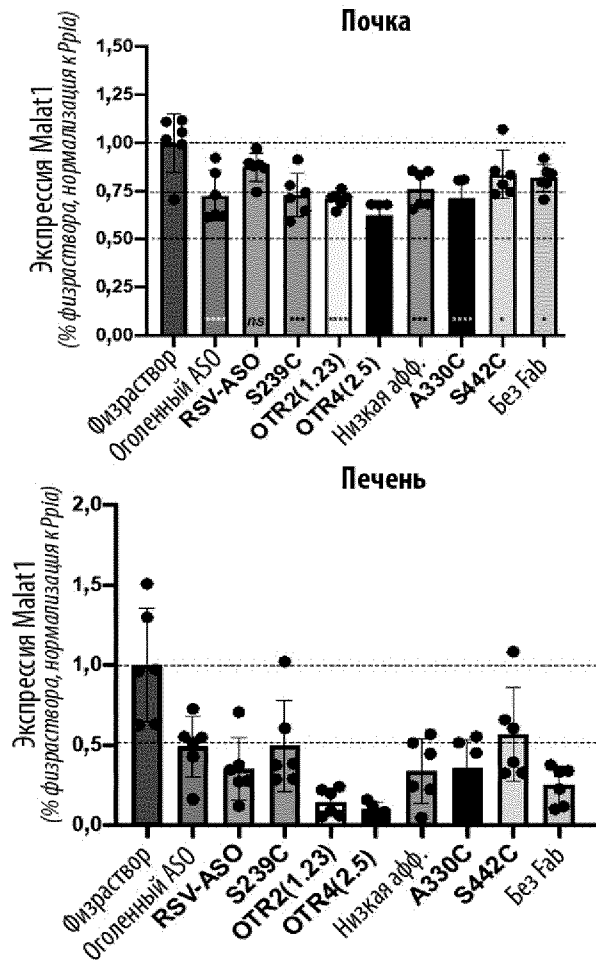


Фиг. 17

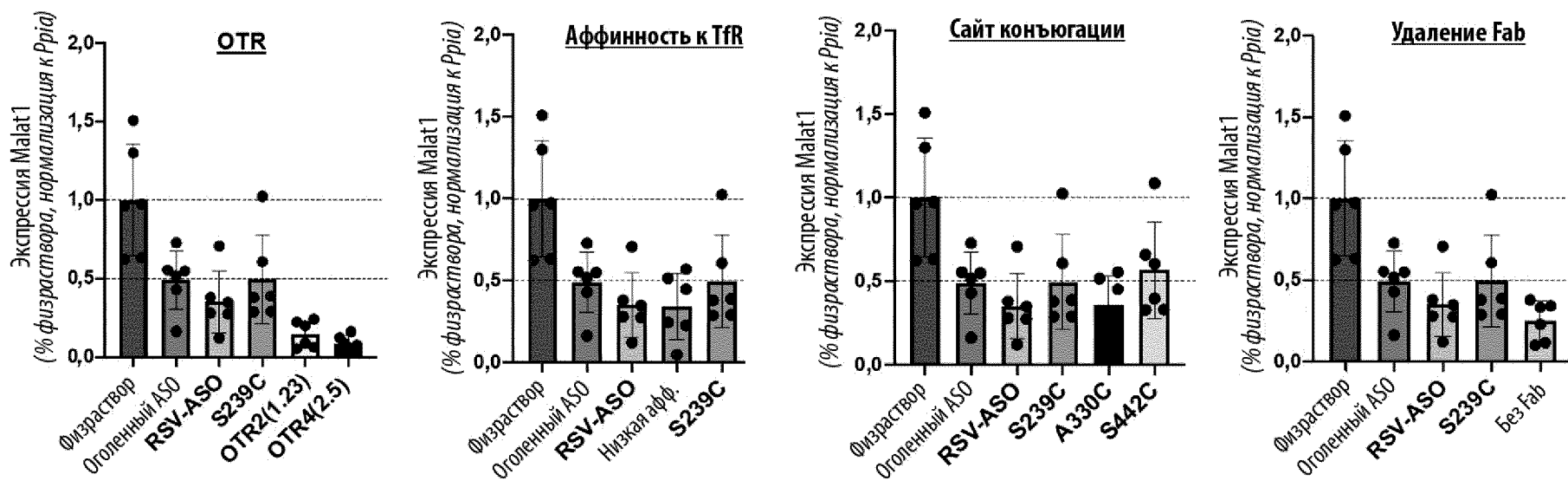


- RSV-ASO
- S239C
- OTR2 (1.23)
- OTR4 (2.5)
- Низкая аффинность
- A330C
- S442C
- Без Fab

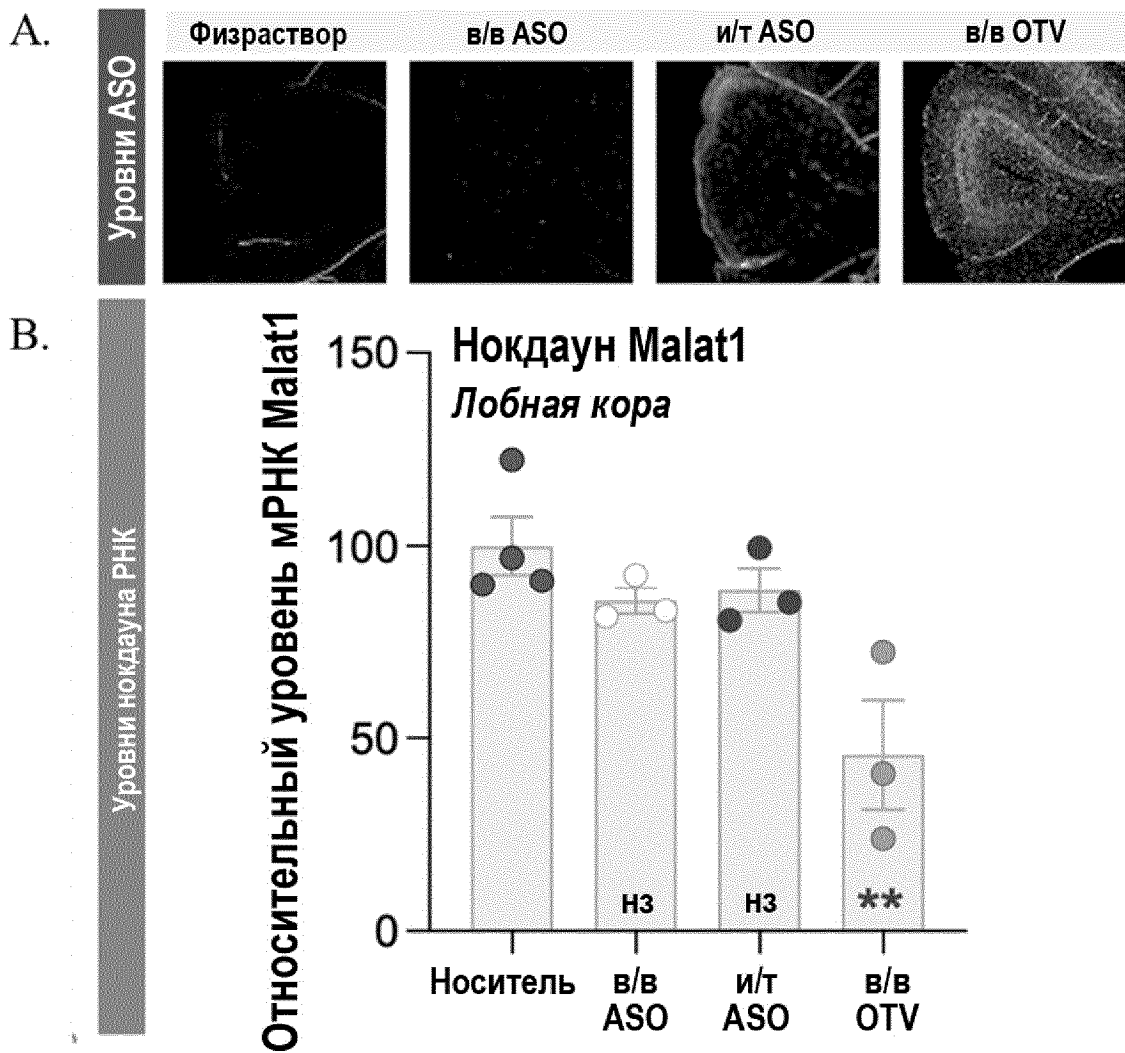
Фиг. 18



Фиг. 19

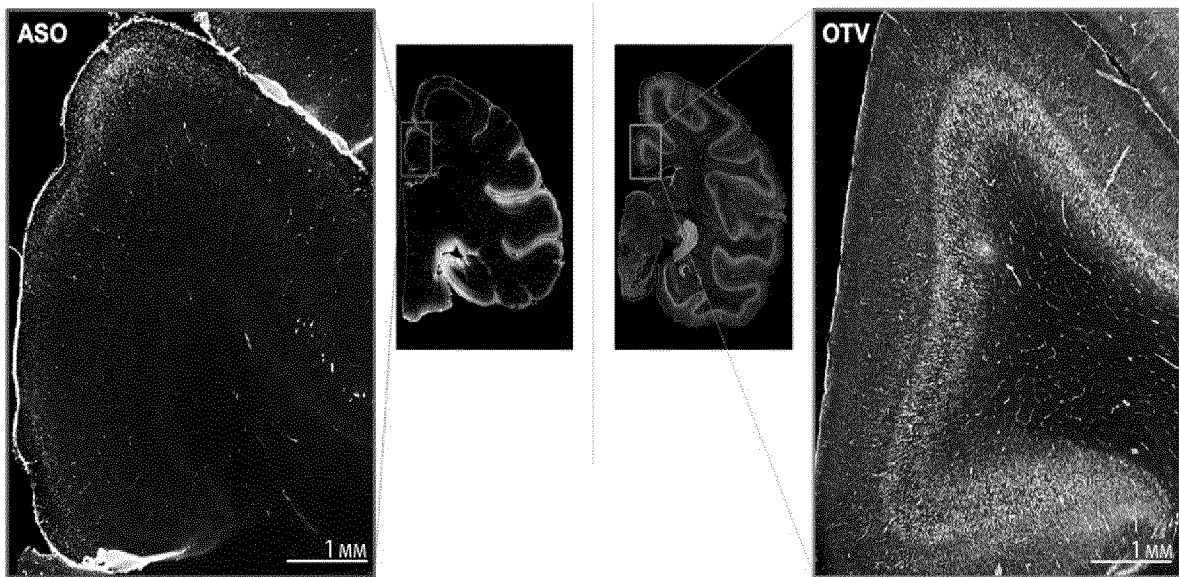


Фиг. 20А-20В

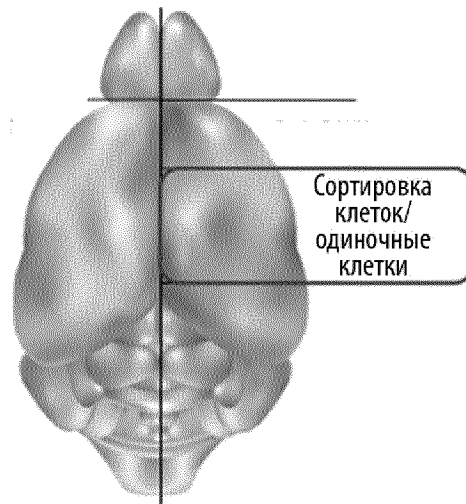


Данные представлены как среднее \pm СПС; каждая точка = 1 животное
 Однофакторный Анова, апостериорный критерий Сидака * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

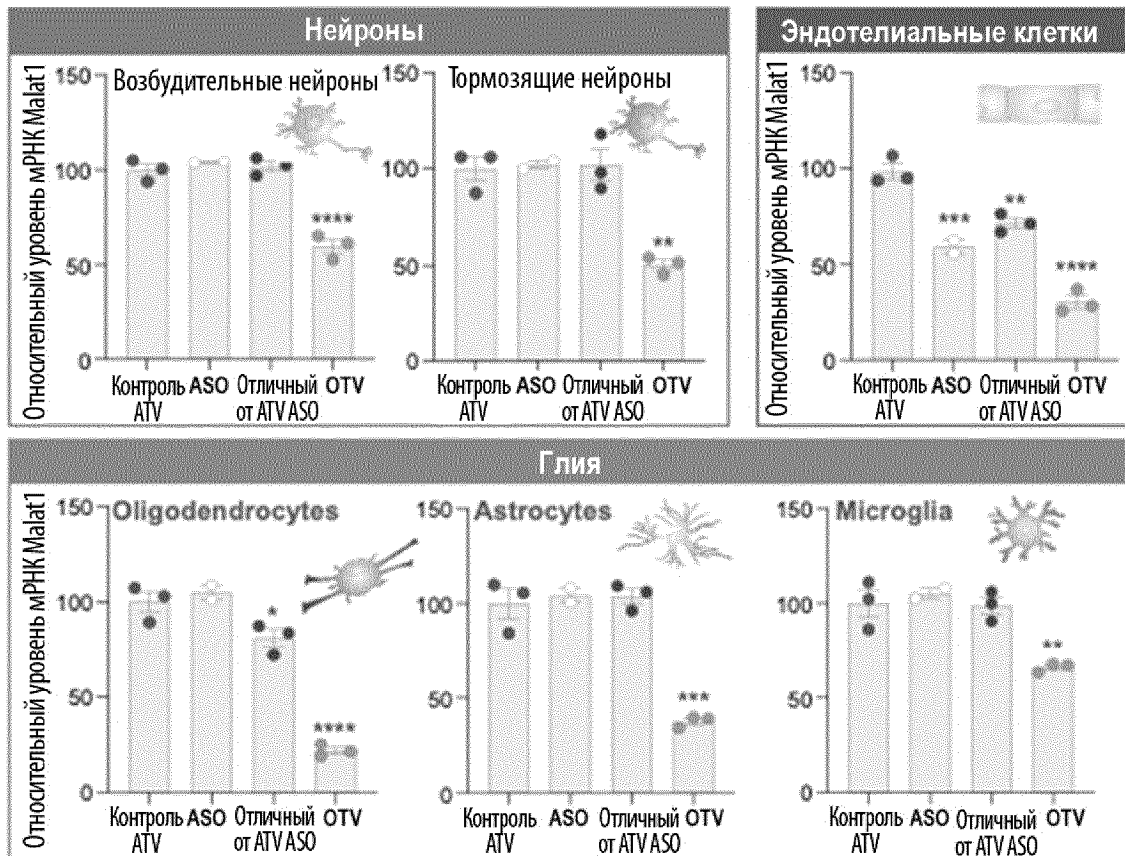
Фиг. 21



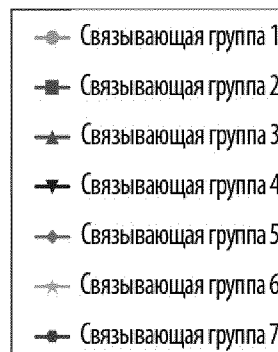
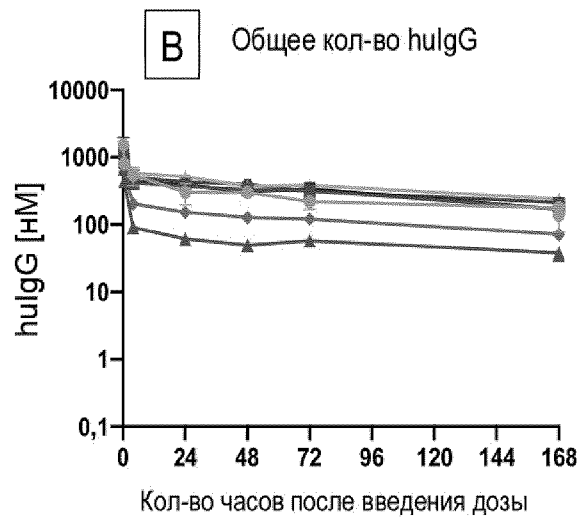
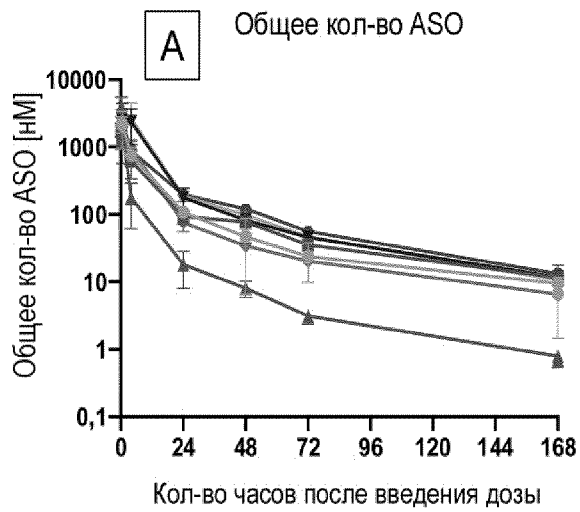
Фиг. 22А



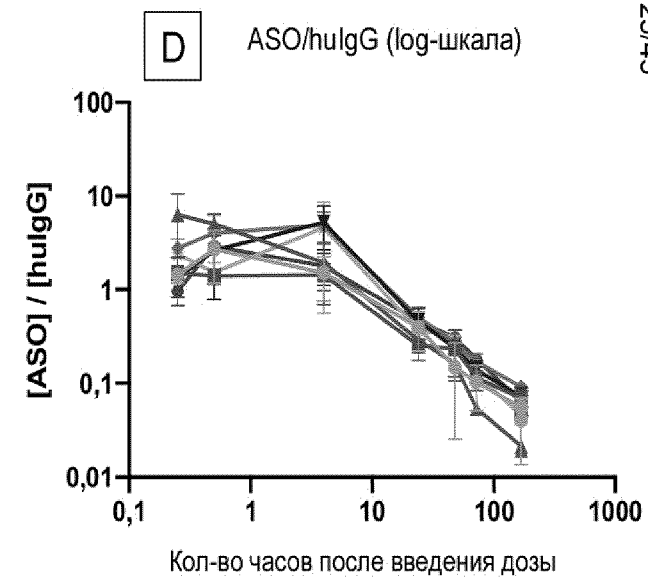
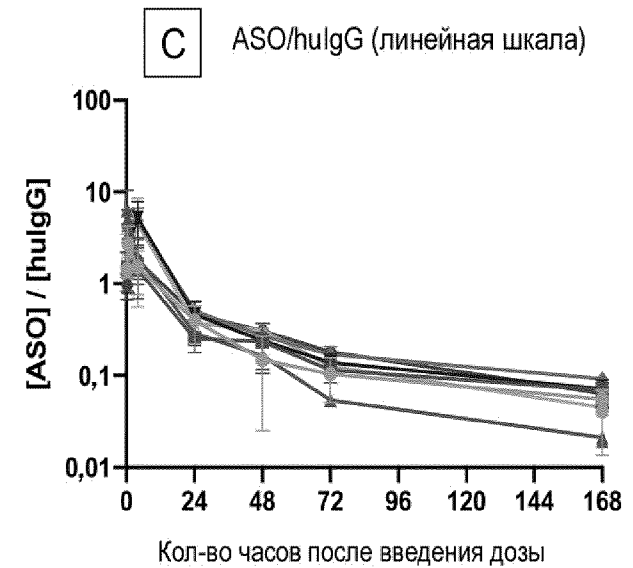
Фиг. 22В

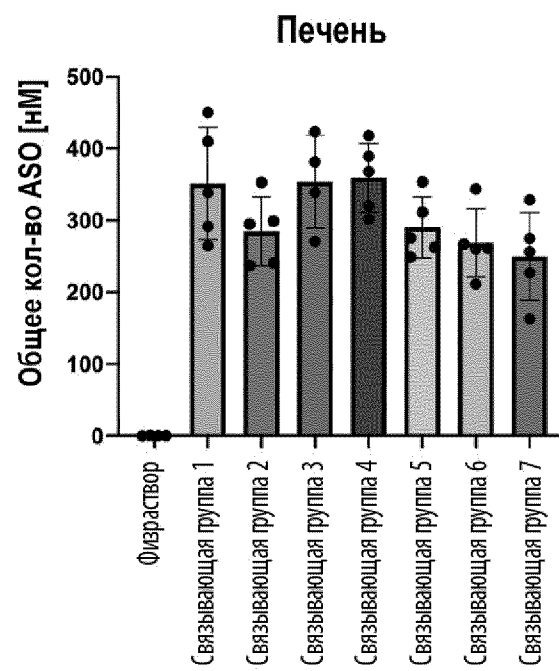
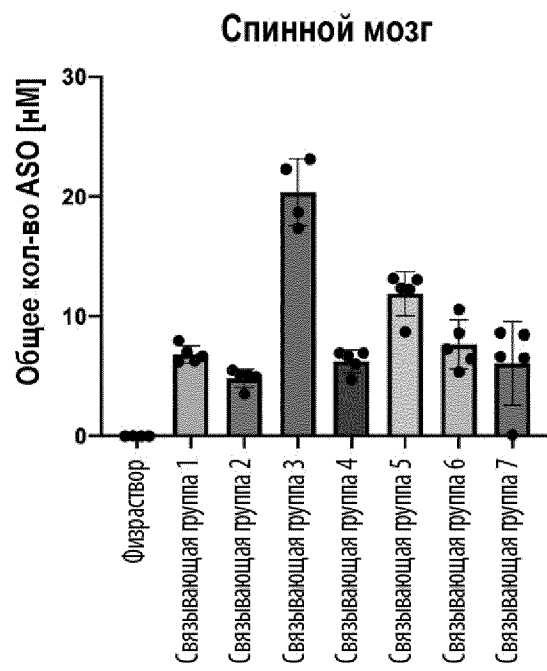
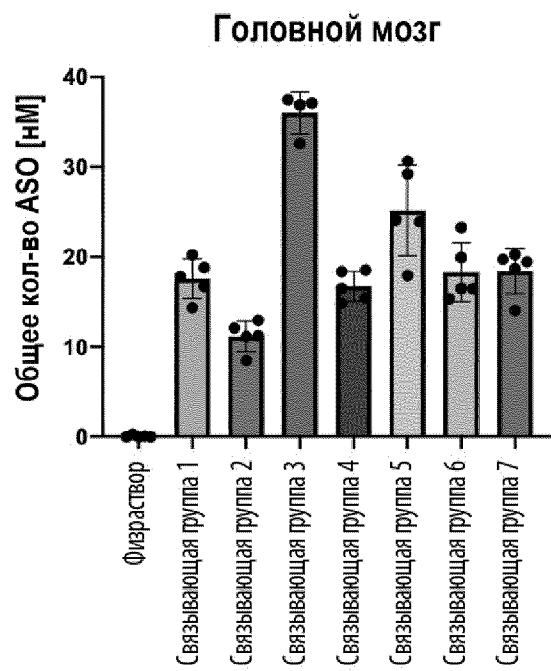


Данные представлены как среднее +/- СПС; каждая точка = 1 животное
 Однофакторный Анова, апостериорный критерий Сидака * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

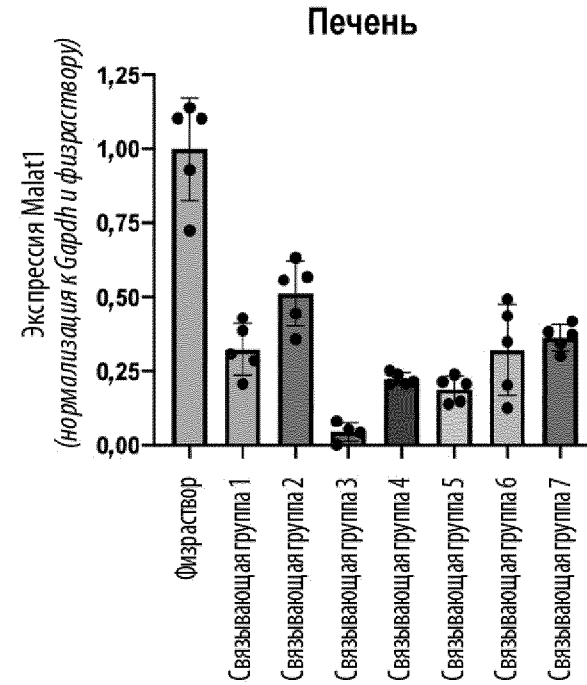
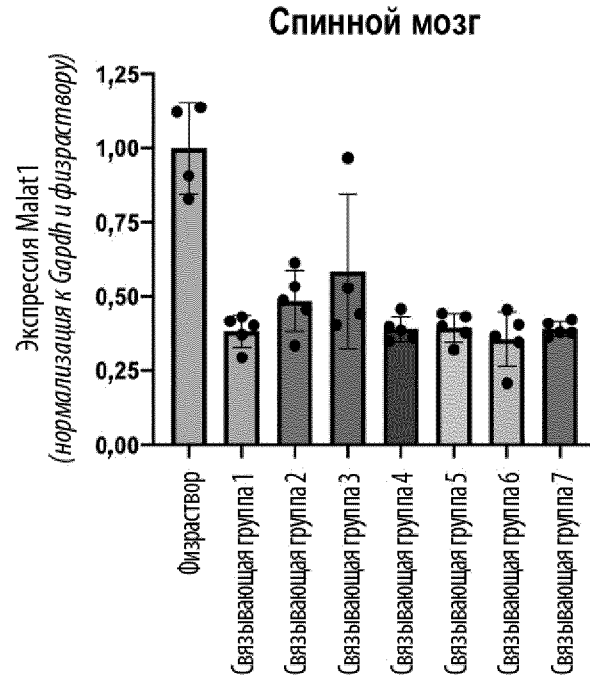
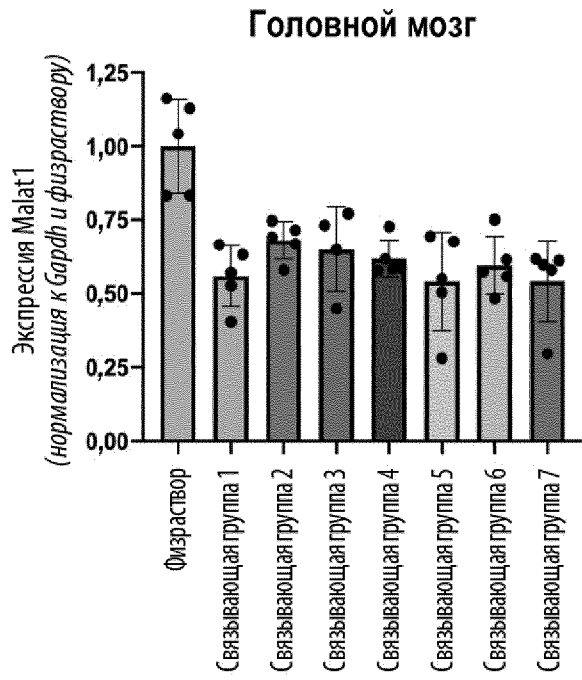


Фиг. 23А-Д

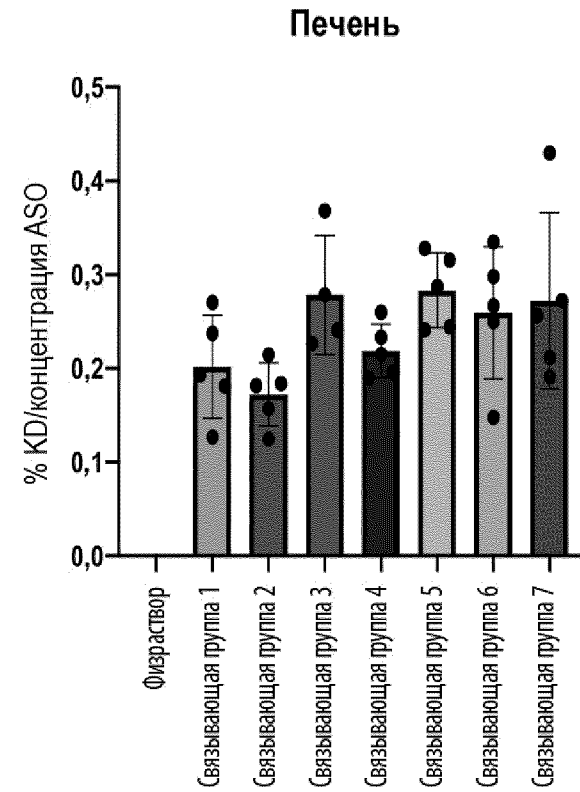
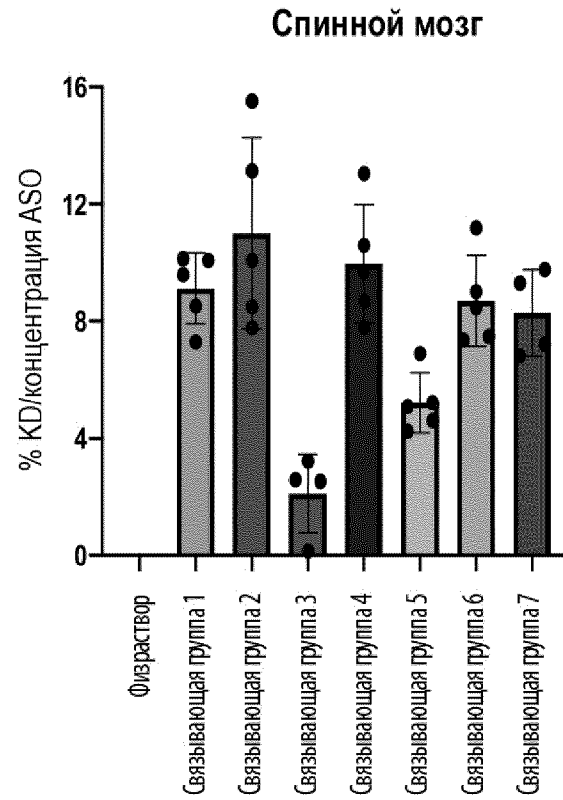
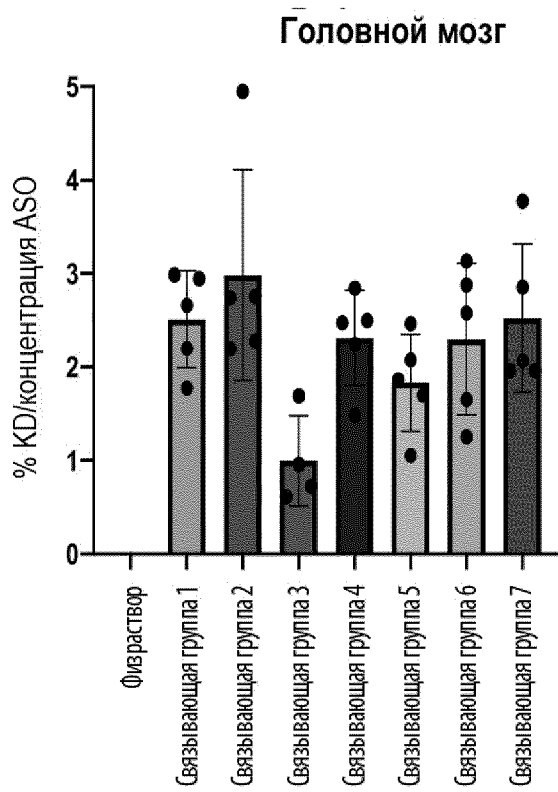




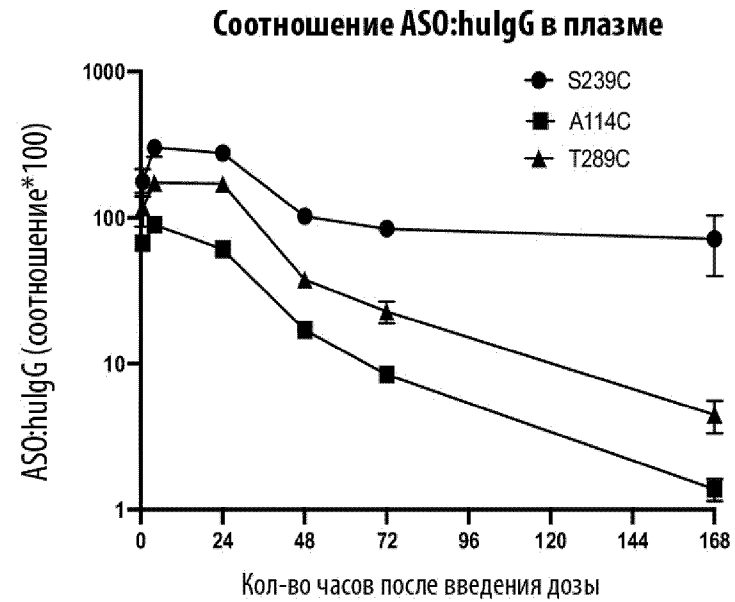
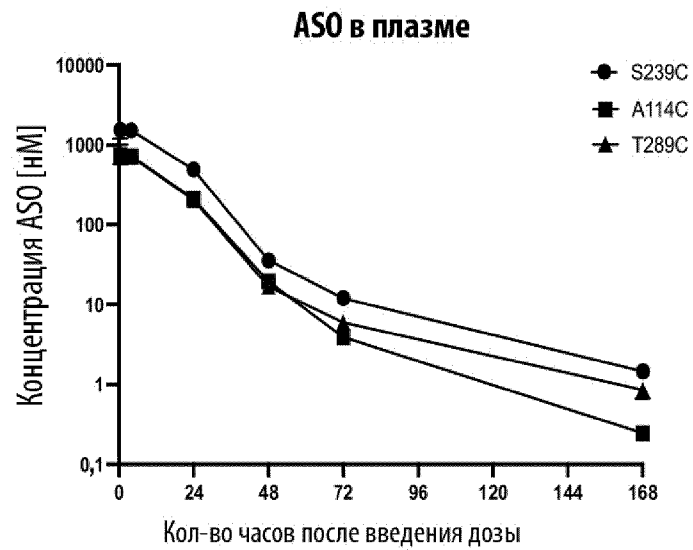
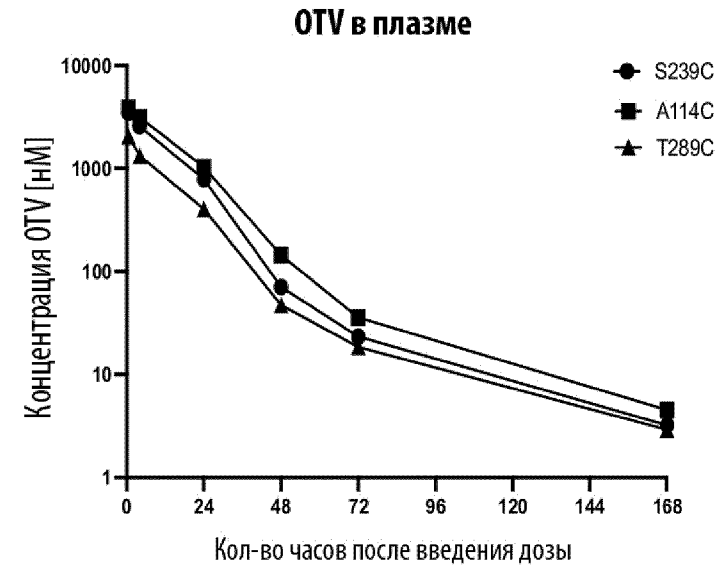
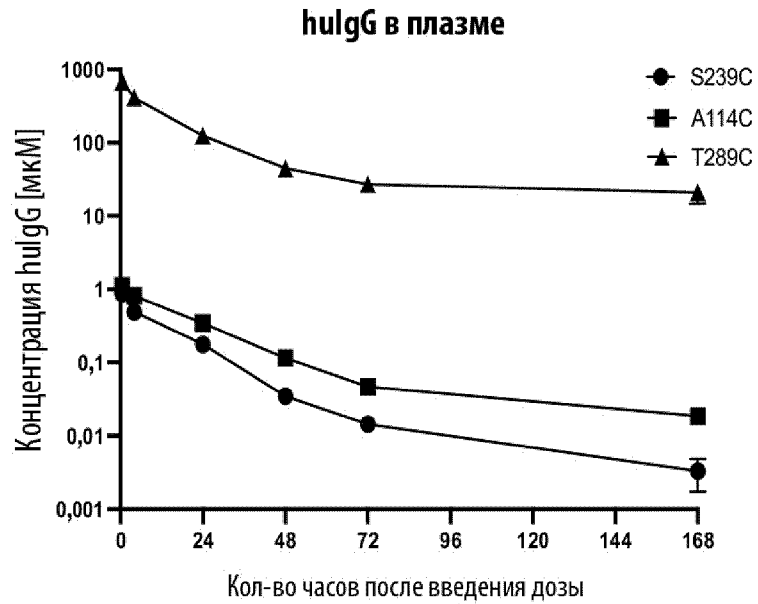
Фиг. 24



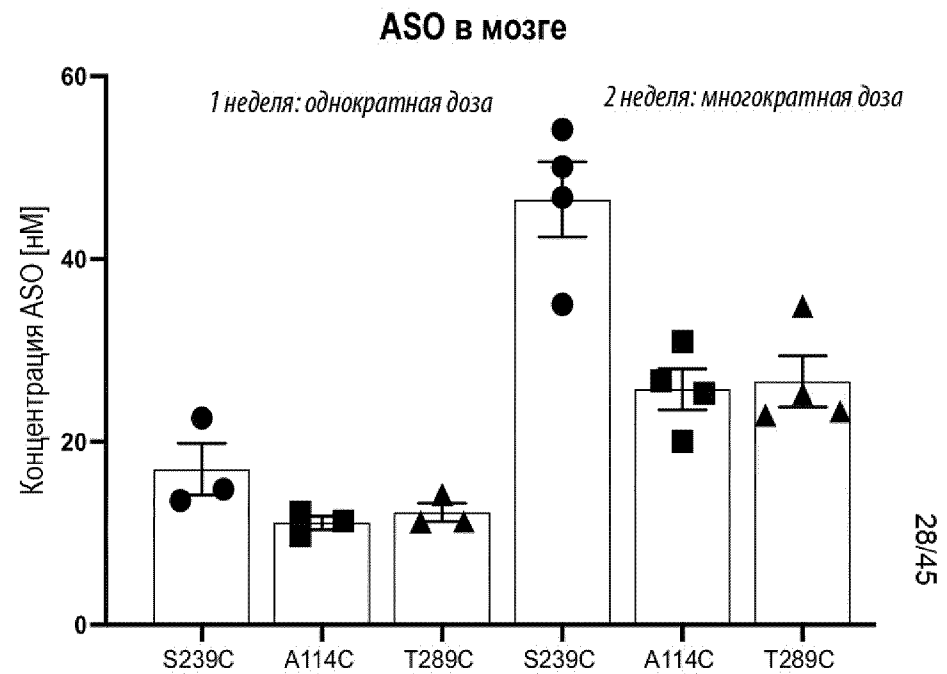
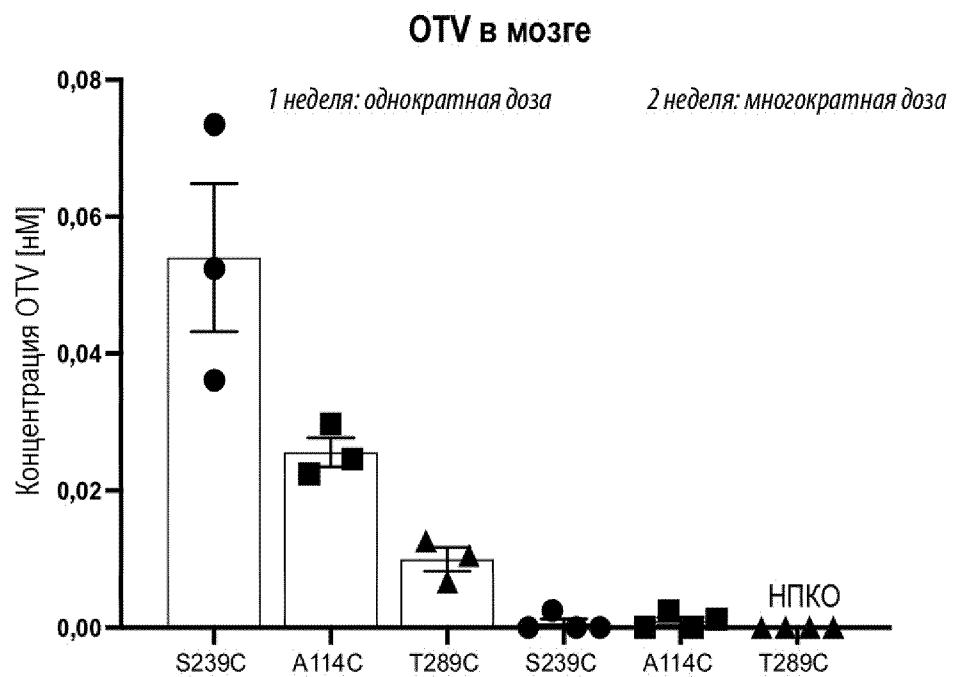
Фиг. 25



Фиг. 26

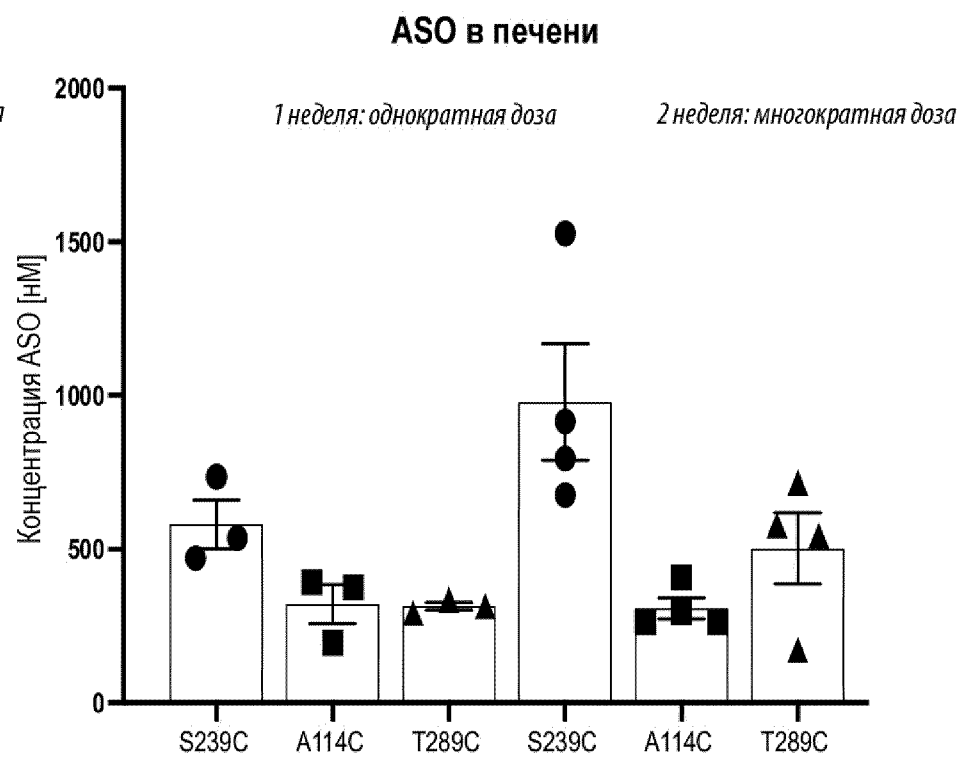
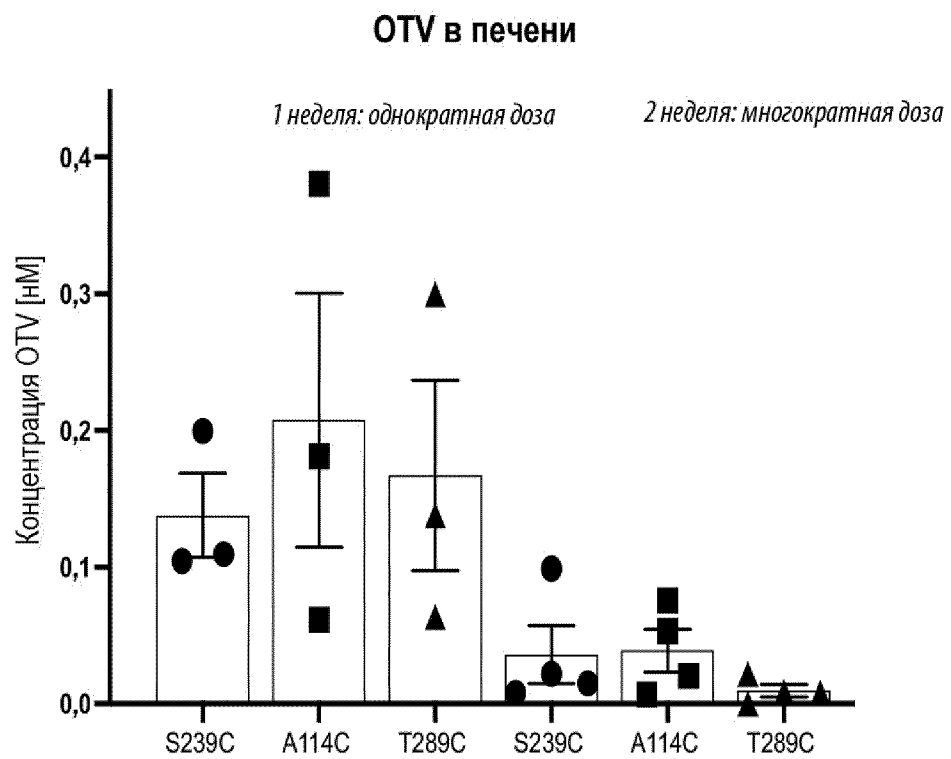


Фиг. 27

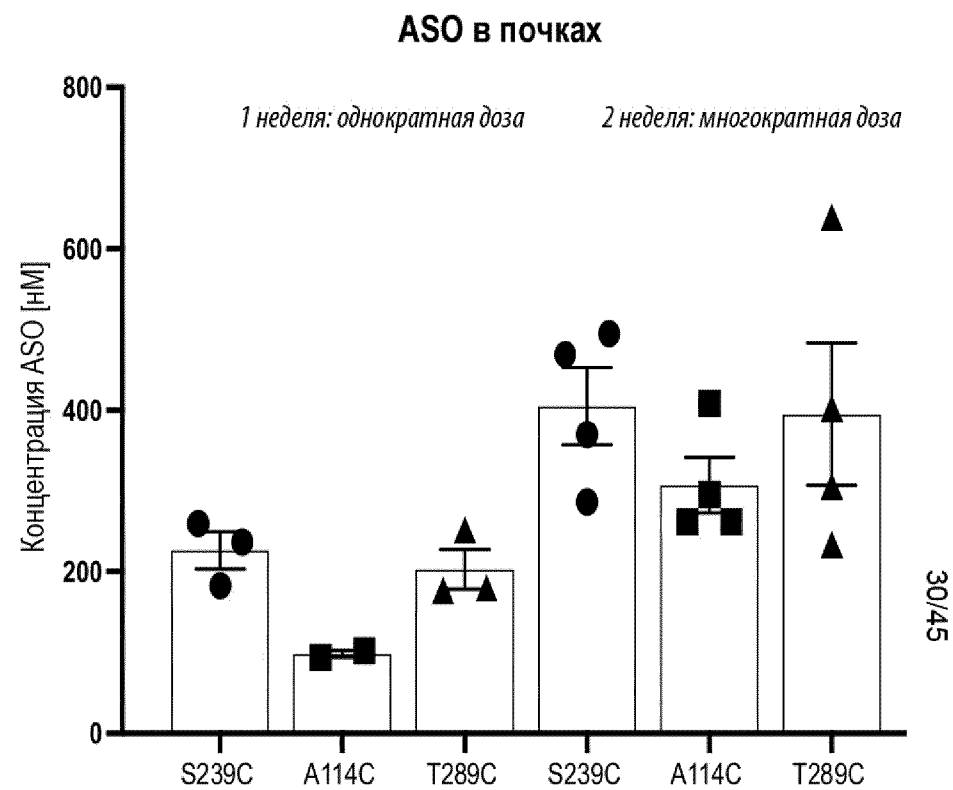
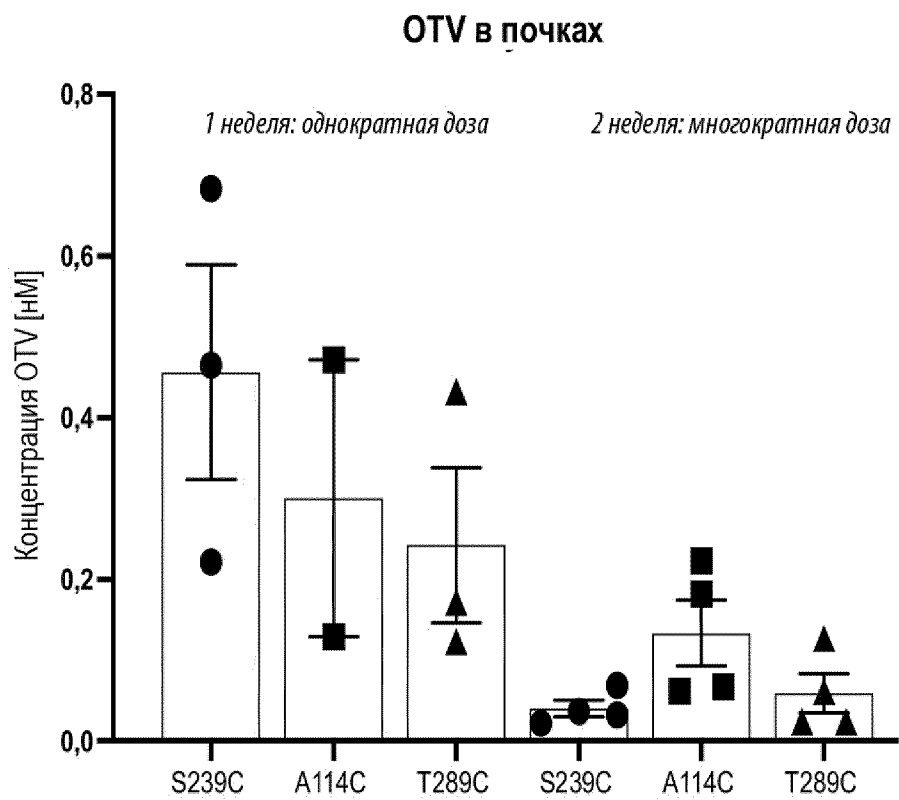


28/45

Фиг. 28

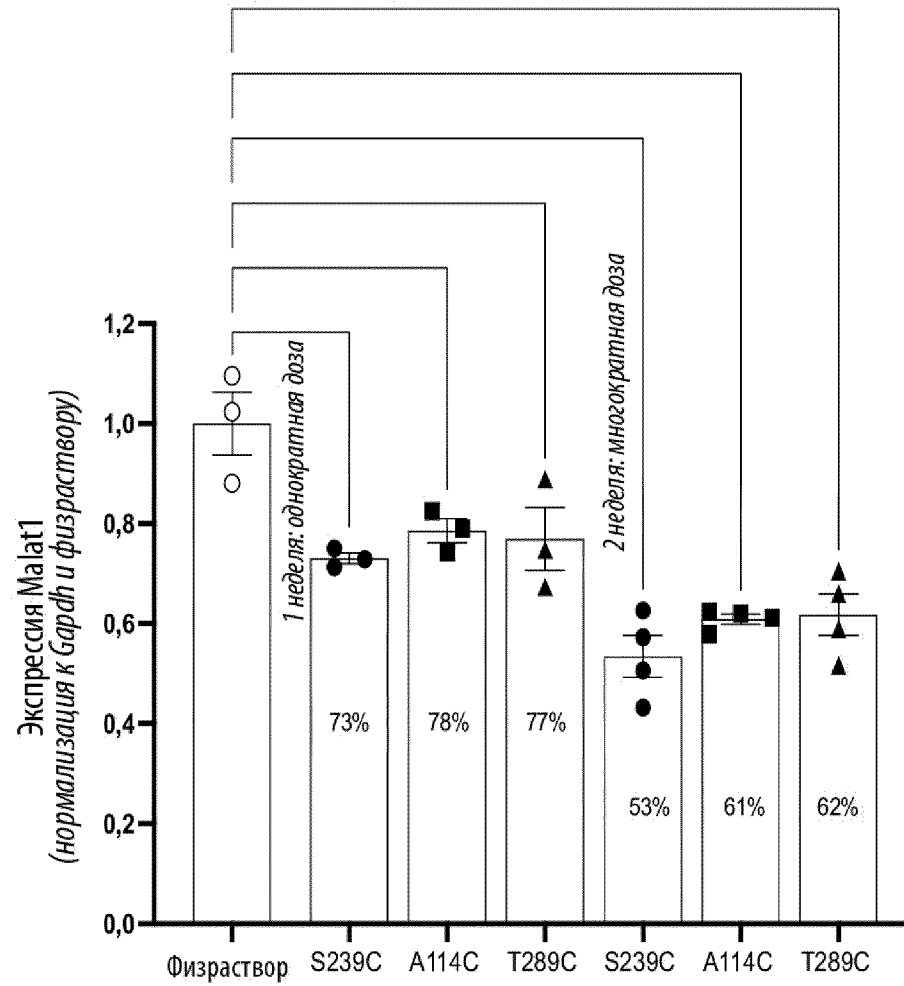


Фиг. 29

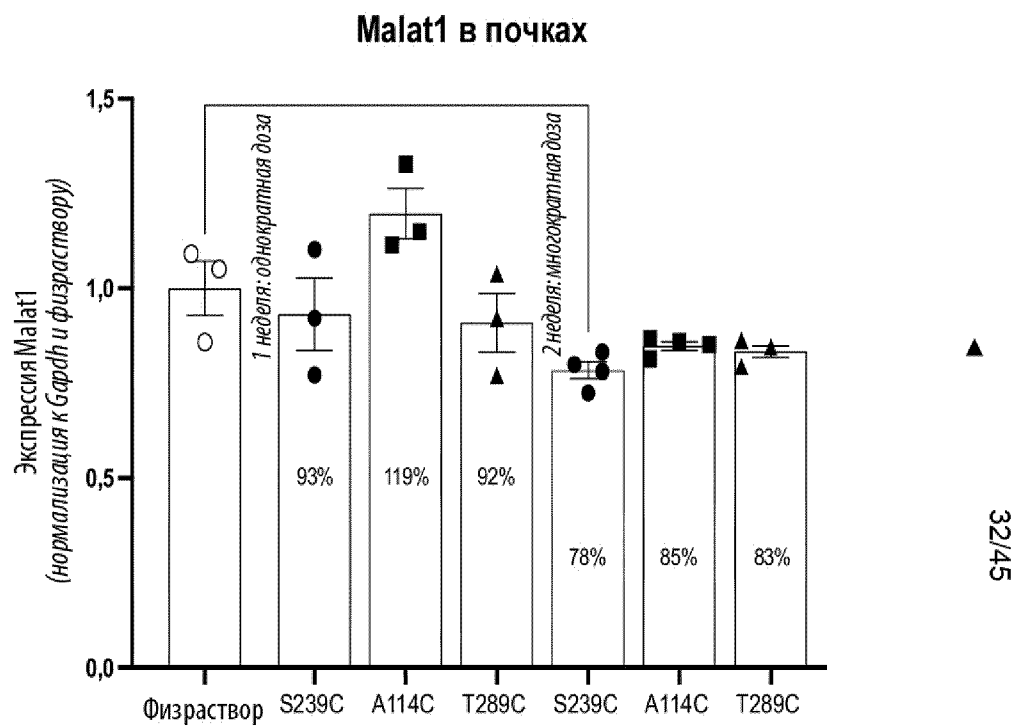
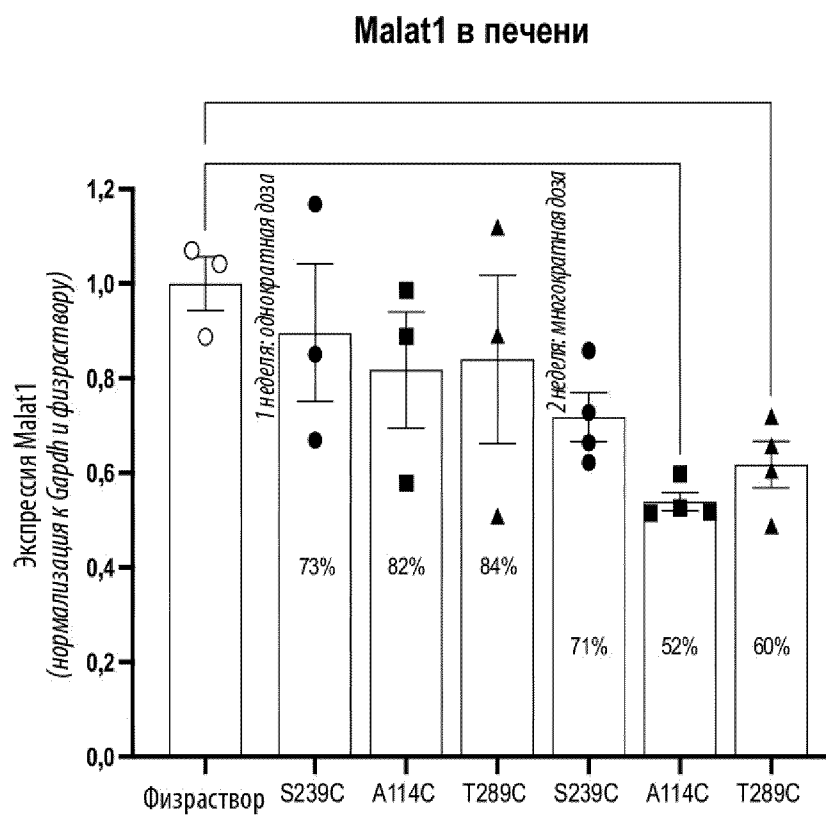


Фиг. 30

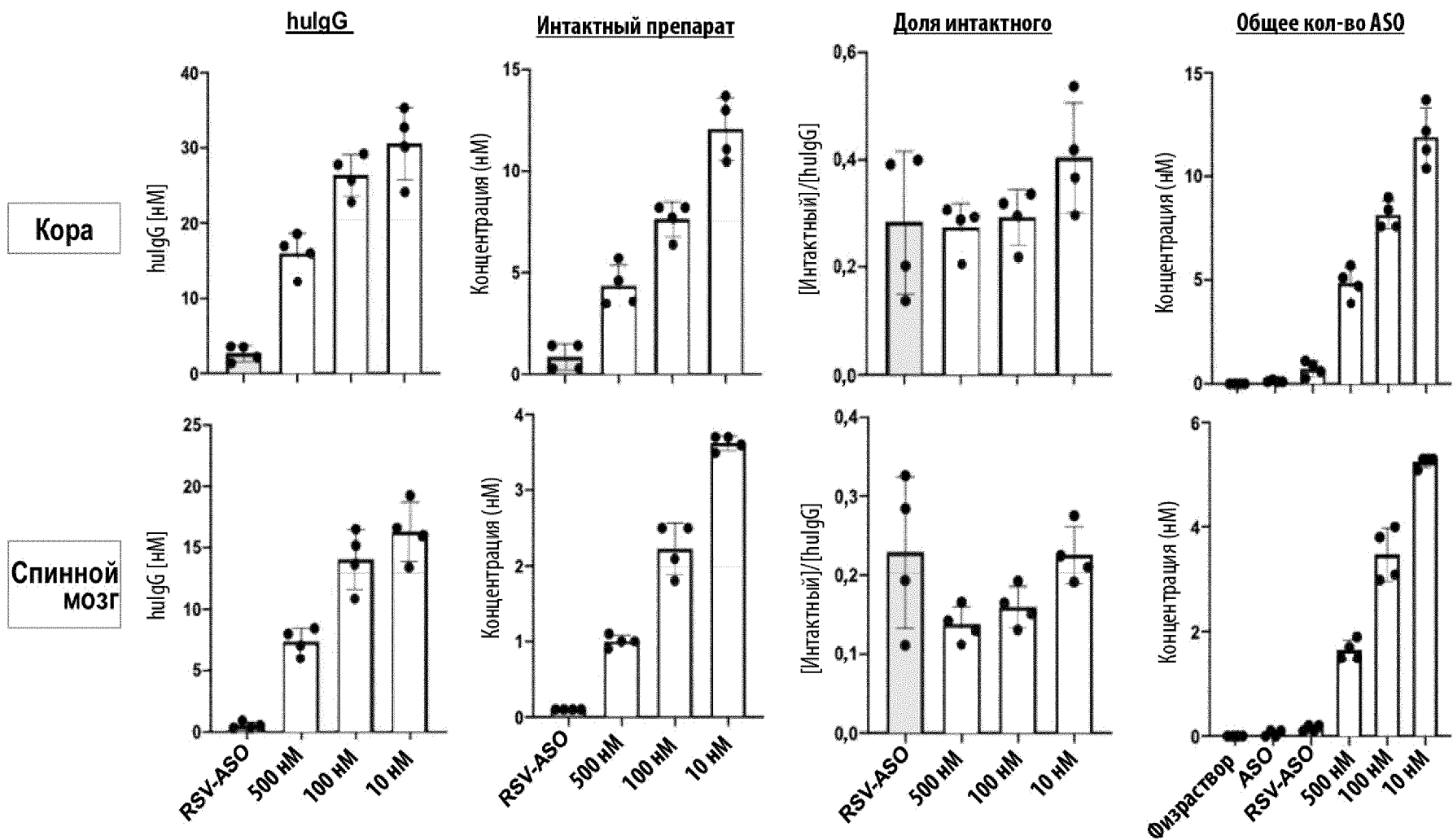
Malat1 в мозге



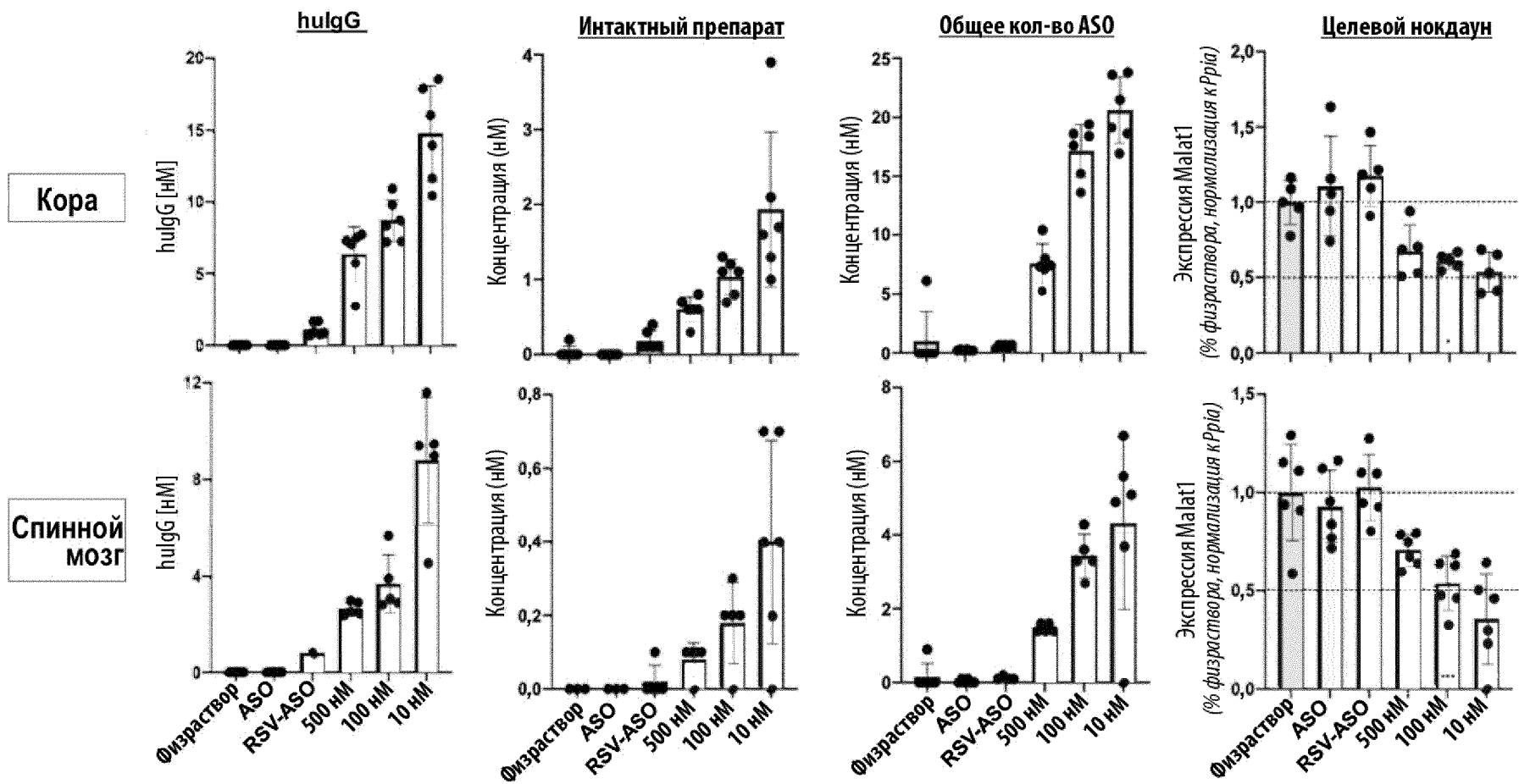
Фиг. 31



Фиг. 32

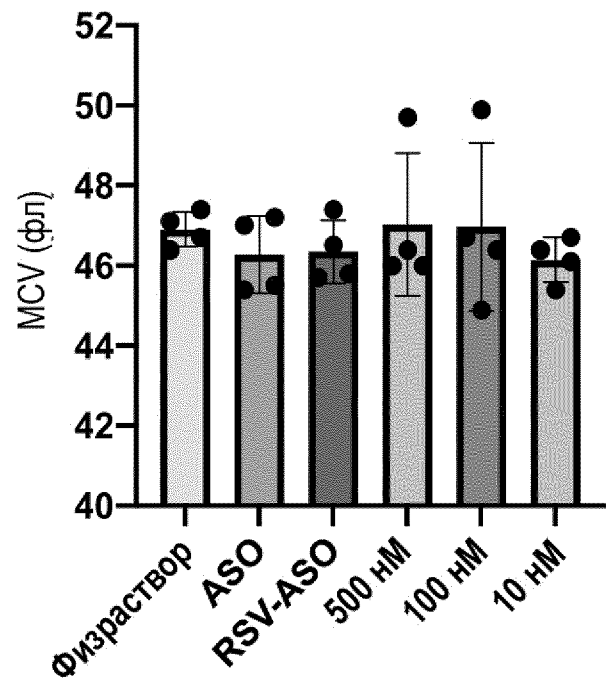


Фиг. 33

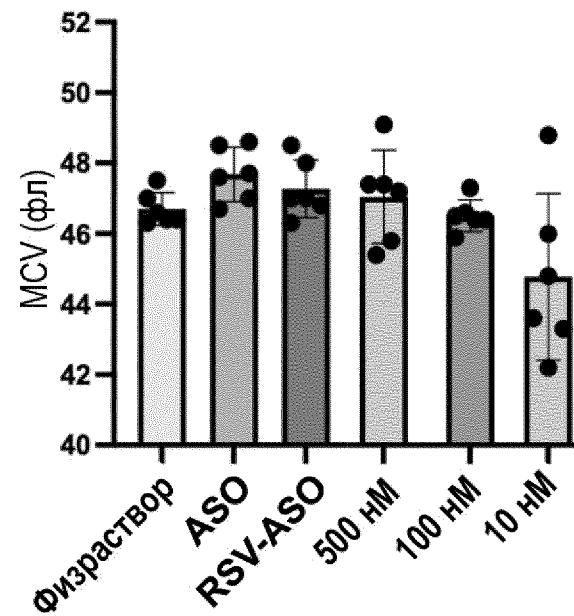


Фиг. 34

A.

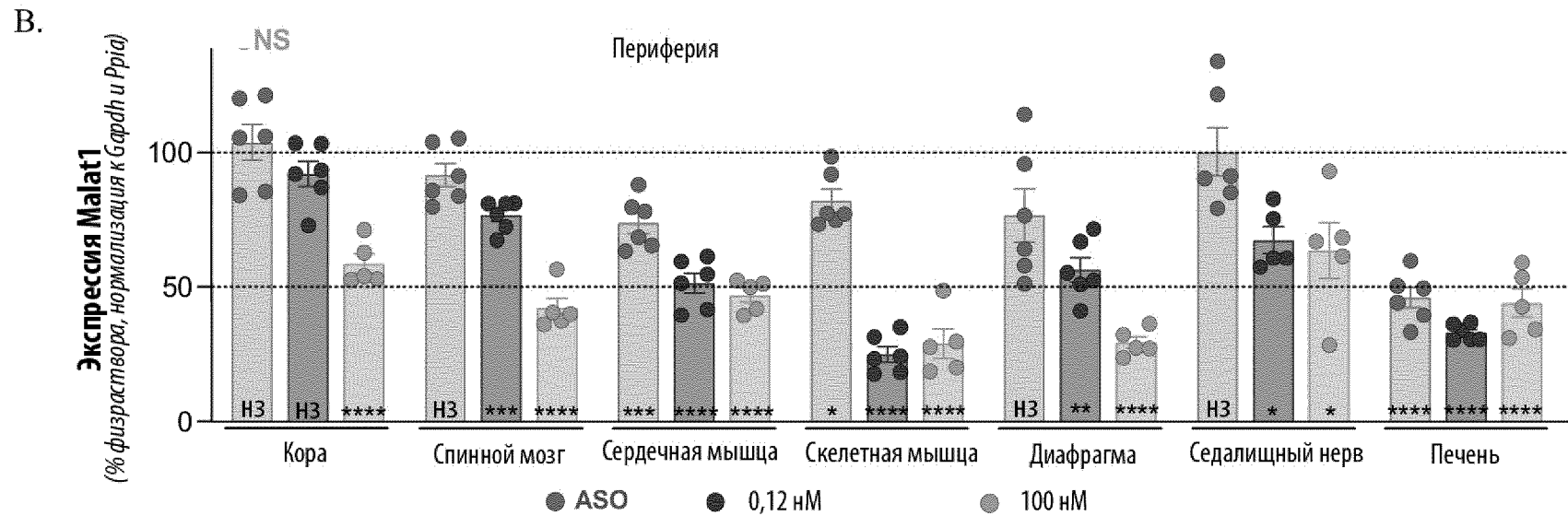
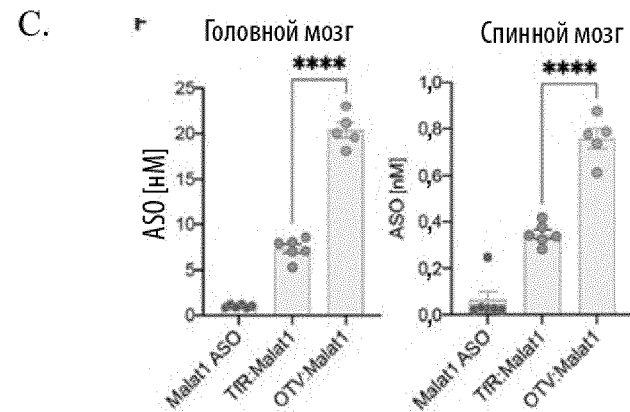
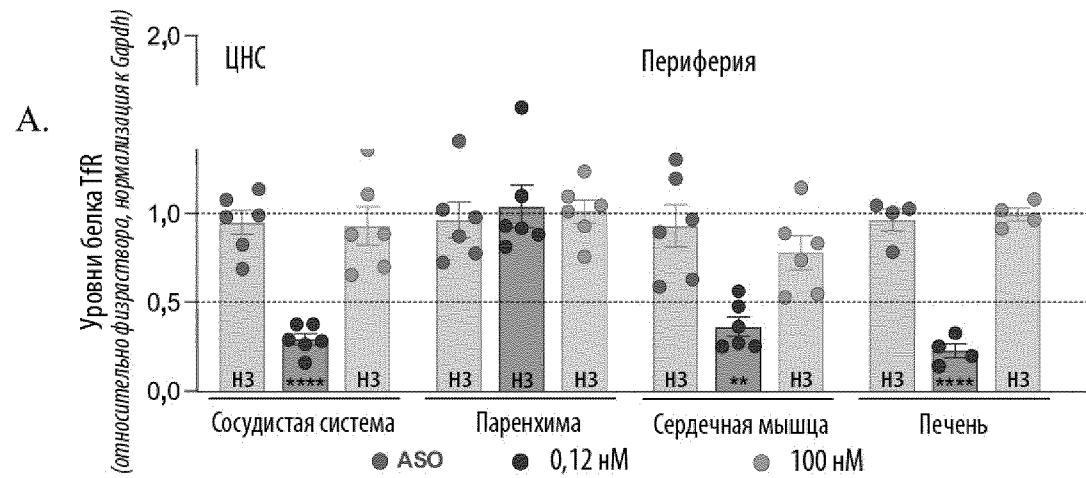


B.

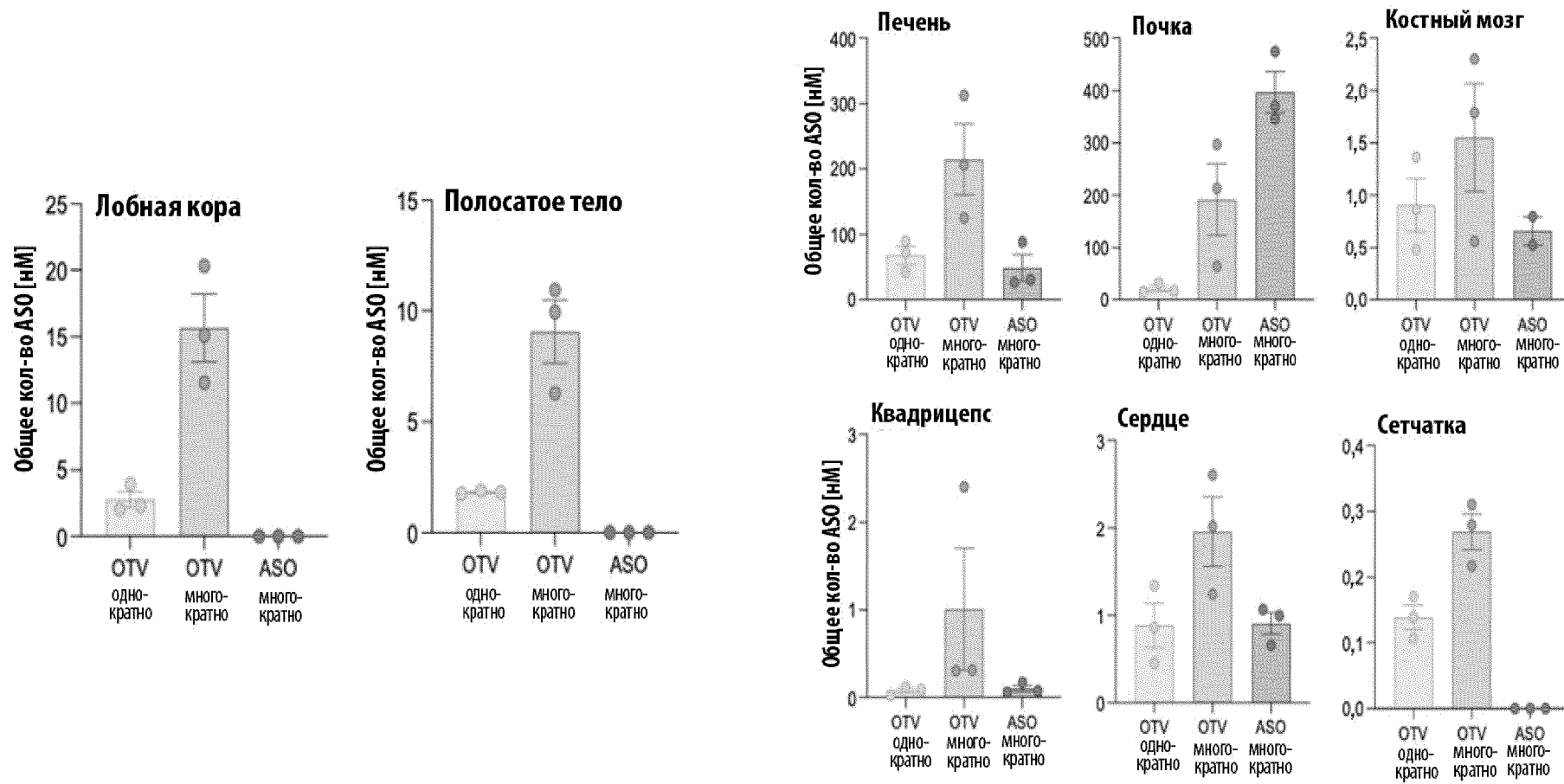


35/45

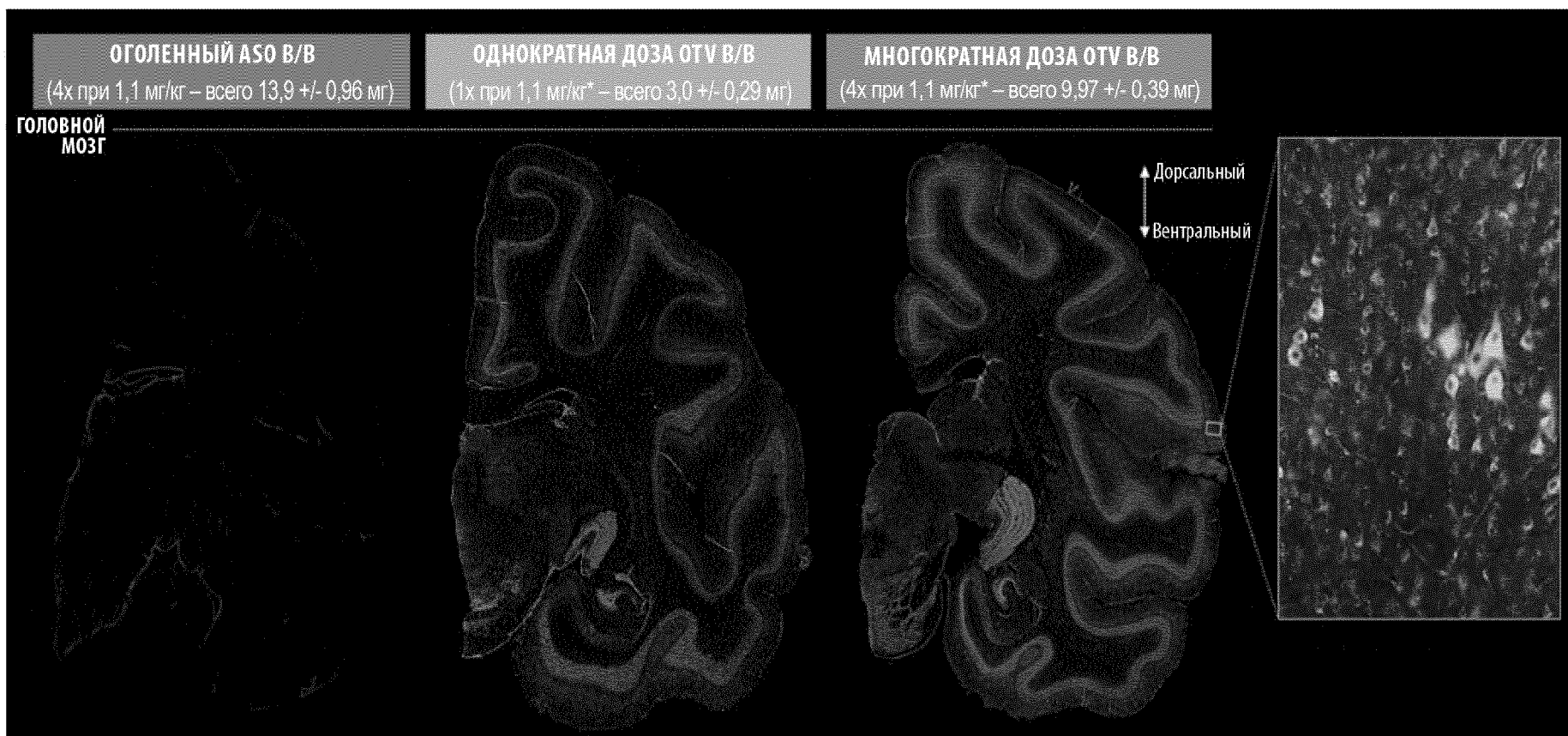
Фиг. 35А-В



Фиг. 36А-С

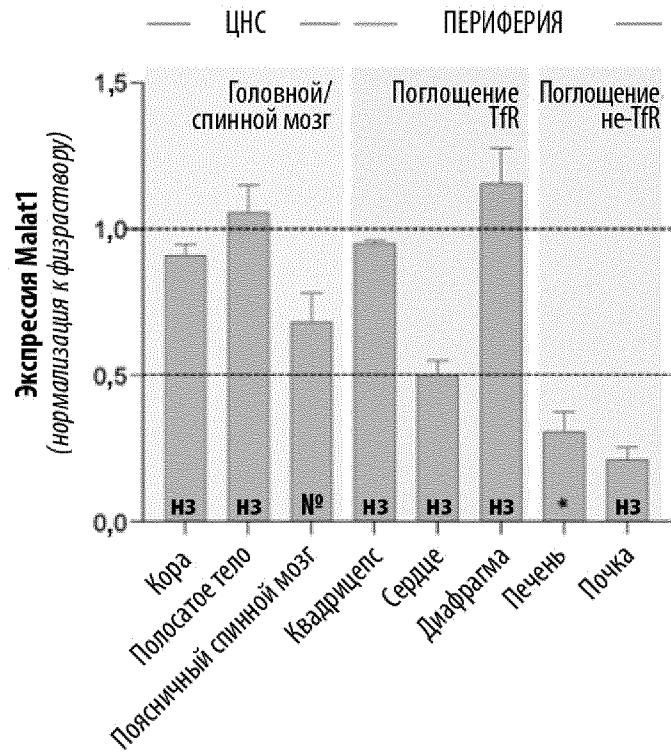


Фиг. 37

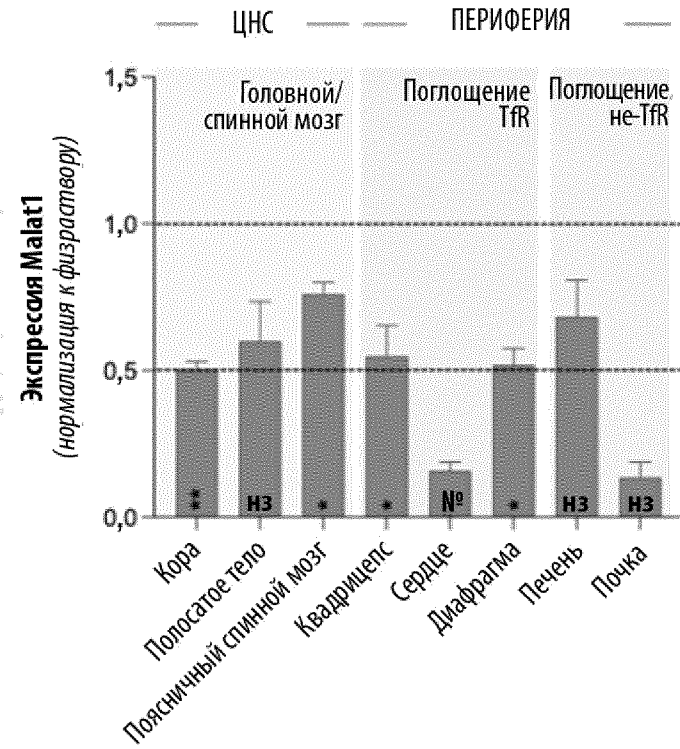


Фиг. 38

А.

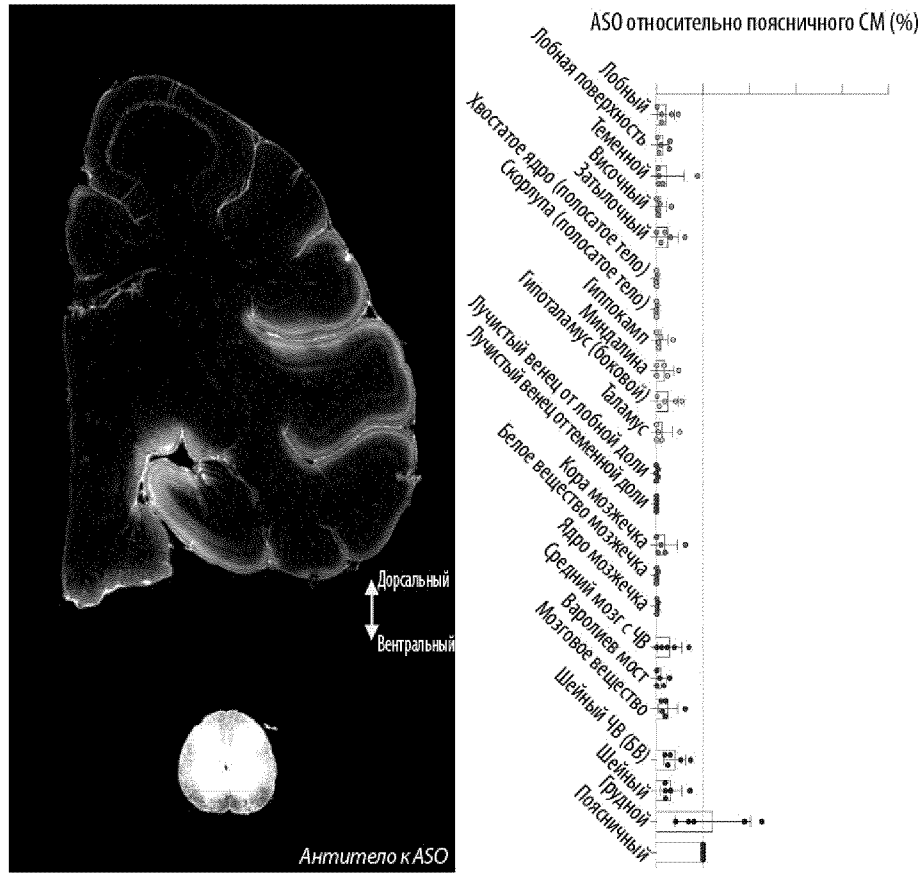


В.

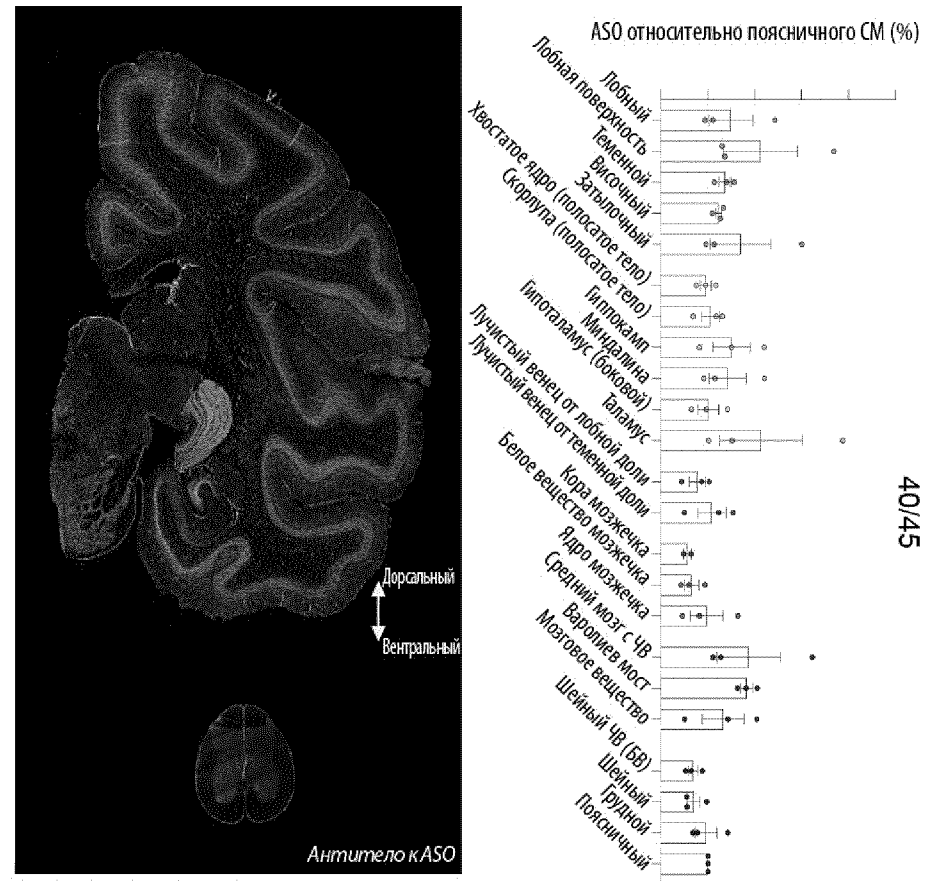


Фиг. 39А-В

A.



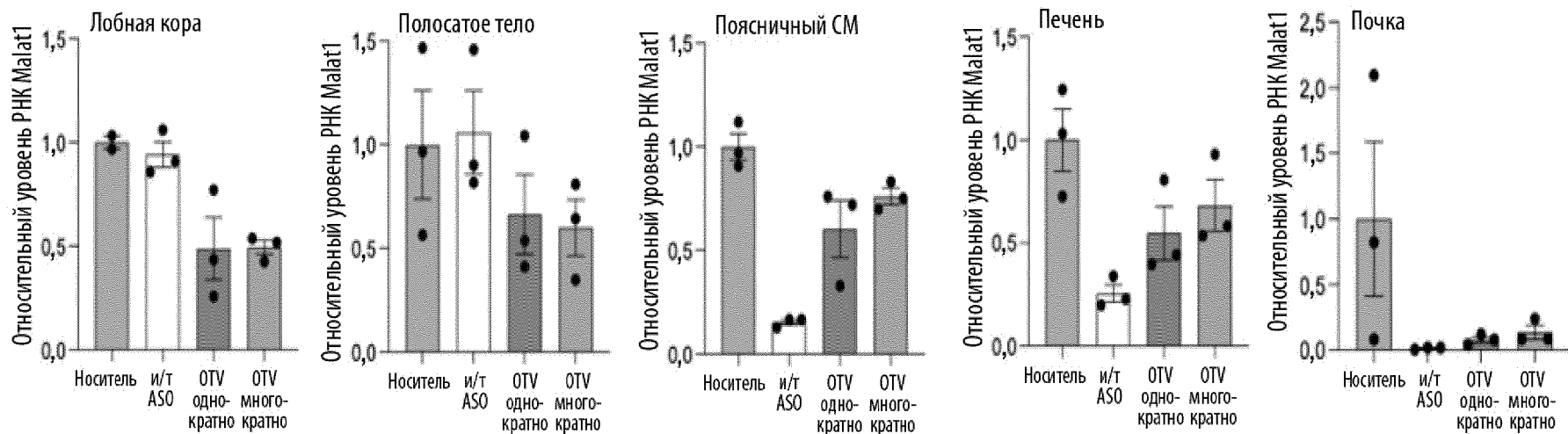
B.



Фиг. 40А-В

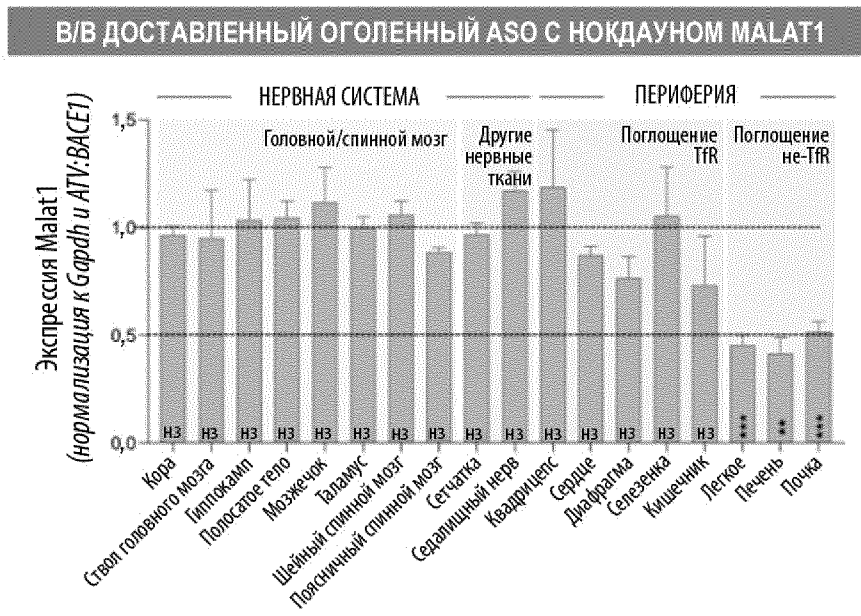
Нокдаун Malat1 в ЦНС

Нокдаун Malat1 в печени/почках

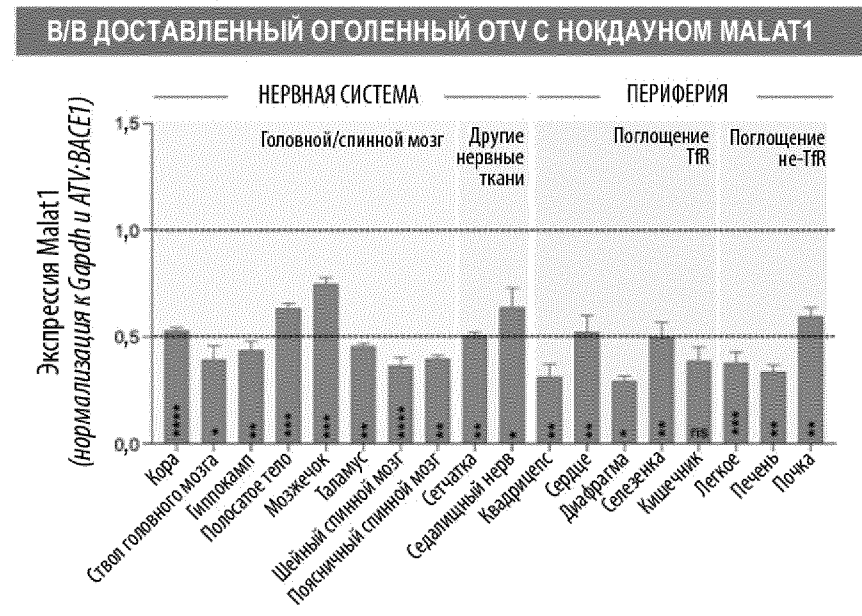


Фиг. 41

A.

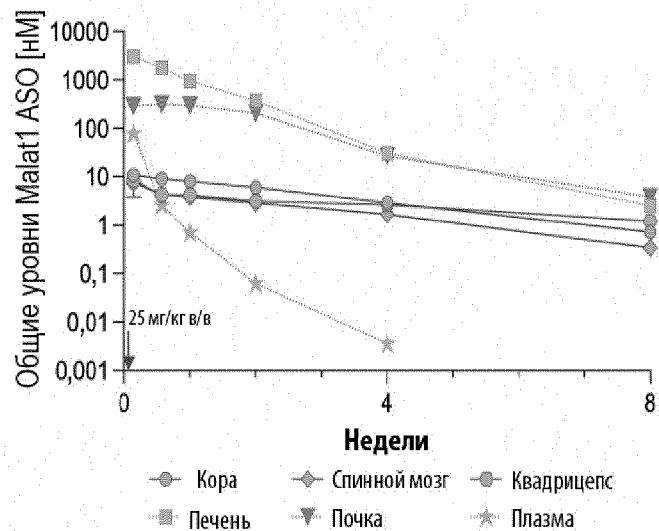


B.



Фиг. 42А-В

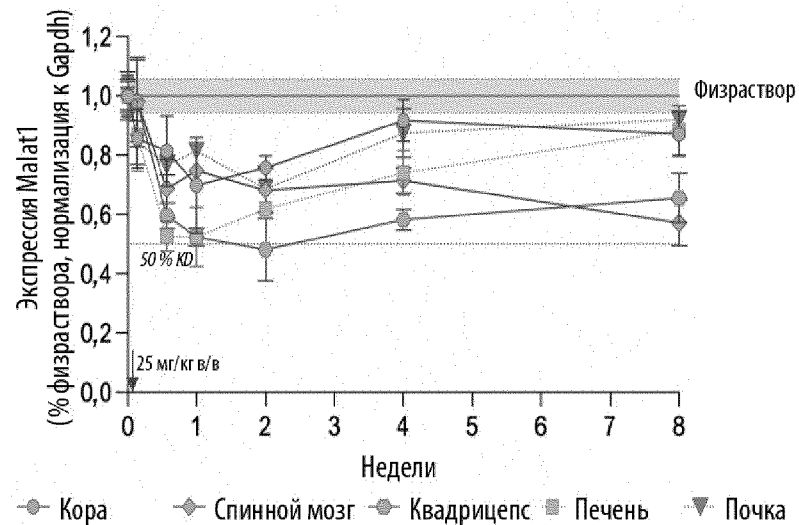
А.



Однократная доза ОТВ – % ASO относительно дня 1			
	Кора	Спинальный мозг	Квадрицепс
День 1	100,0	100,0	100,0
День 4	84,2	57,0	50,6
Неделя 1	74,1	51,7	49,8
Неделя 2	55,6	38,3	37,4
Неделя 4	26,7	22,2	31,4
Неделя 8	6,7	4,6	14,4

	Печень	Почка	Плазма
Day 1	100,0	100,0	100,0
Day 4	59,4	108,7	3,3
Week 1	31,7	103,0	0,9
Week 2	12,4	70,1	0,1
Week 4	1,0	9,1	0,0
Week 8	0,1	1,3	0,0

В.

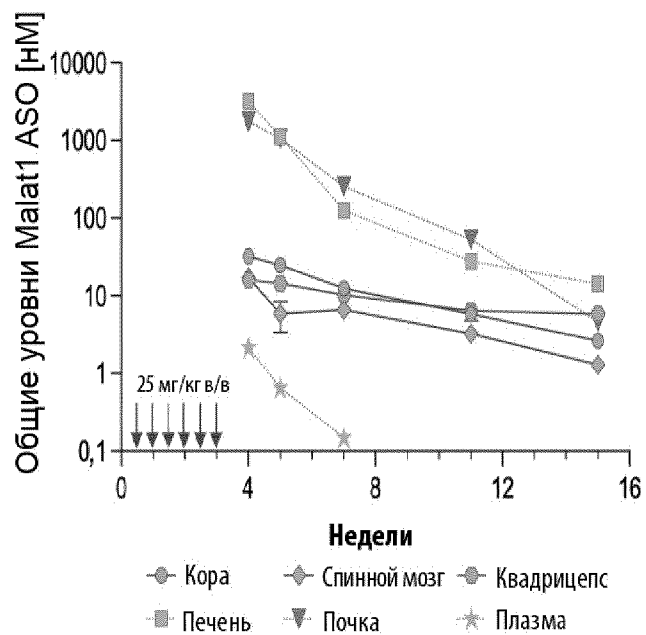


Данные представлены как среднее +/- СПС

Фиг. 43А-В

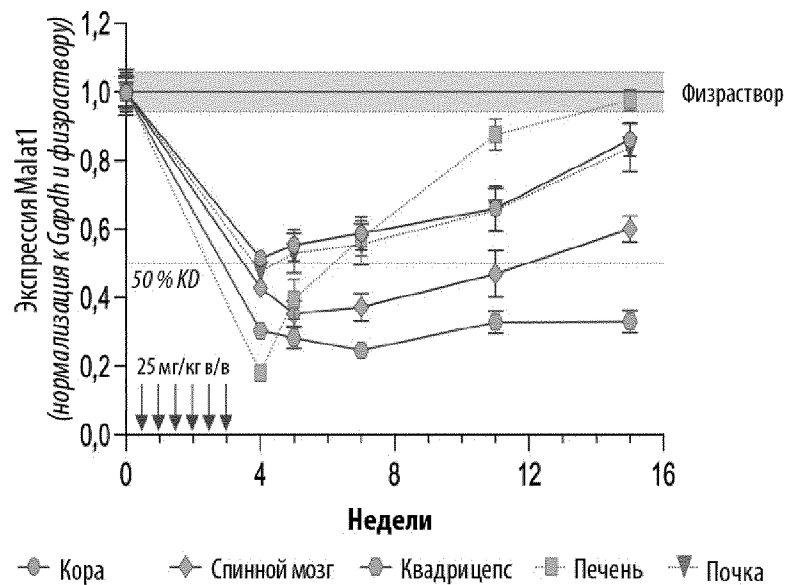
A.

Общая концентрация ASO



B.

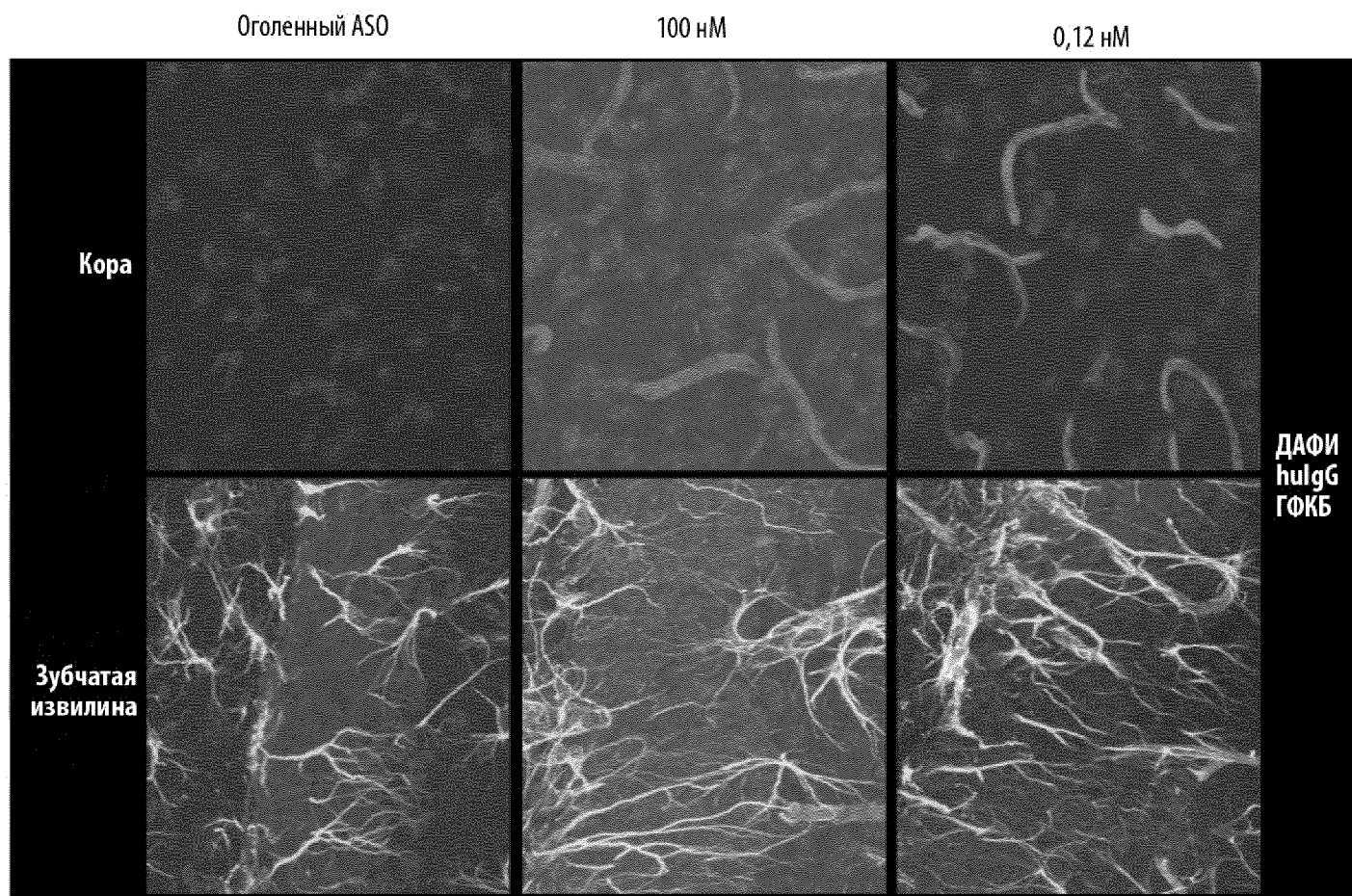
Целевой нокадаун РНК



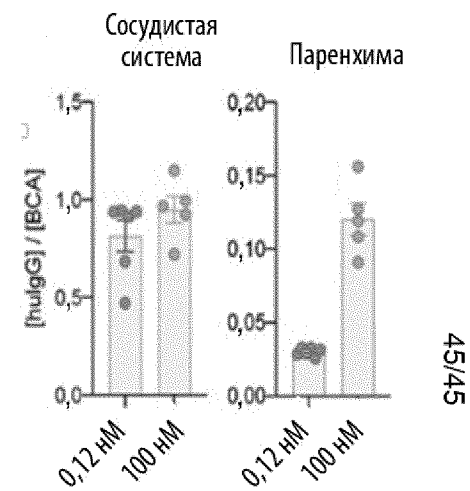
Данные представлены как среднее +/- СПС

Фиг. 44А-В

А.



В.



Фиг. 45А-В