

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393480 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.19(22) Дата подачи заявки
2022.07.08(51) Int. Cl. A61K 47/68 (2017.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) НАЦЕЛЕННЫЕ НА МЫШЦЫ КОМПЛЕКСЫ И СОСТАВЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИСТРОФИНОПАТИЙ

(31) 63/220,426

(32) 2021.07.09

(33) US

(86) PCT/US2022/073540

(87) WO 2023/283623 2023.01.12

(71) Заявитель:

ДАЙН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

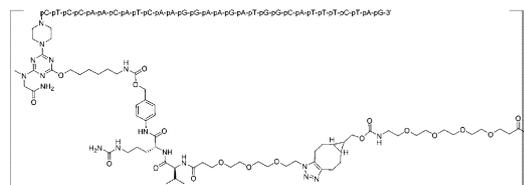
(72) Изобретатель:

Куинн Брендан, Наджим Джон,
Хильдербранд Скотт, Дежарден
Коди А., Катанани Мохаммед Т.,
Спринг Шон, Субраманиян Ромеш Р.,
Шэнь Пэйи, Уиден Тимоти (US)

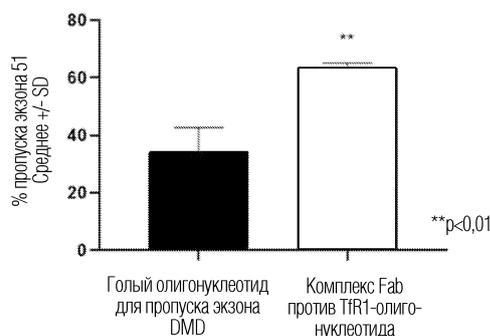
(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Аспекты изобретения относятся к комплексам, а другие аспекты относятся к составам (например, водным, лиофилизированным формам), содержащим такие комплексы (например, где каждый комплекс имеет иллюстративную формулу, показанную ниже), содержащие фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (например, который может применяться для таргетинга DMD), ковалентно связанный с антителом (например, антителом против TfR1). В некоторых вариантах осуществления комплексы содержат составы с гистидином (например, L-гистидином) и сахарозой при указанном pH (например, приблизительно 5,0-7,0). Также предложены применения таких составов для лечения субъекта, имеющего мутантный аллель DMD, ассоциированный с миодистрофией Дюшенна.



Мышечные трубочки DMD Δ52 человека



A1

202393480

202393480

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580214EA/55

НАЦЕЛЕННЫЕ НА МЫШЦЫ КОМПЛЕКСЫ И СОСТАВЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДИСТРОФИНОПАТИЙ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с §119(e) статьи 35 Кодекса США по дате подачи предварительной заявки на патент США 63/220,426 под названием "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND FORMULATIONS FOR TREATING ДИСТРОФИНОПАТИИ", поданной 9 июля 2021 года, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящая заявка относится к направляющим комплексам для доставки олигонуклеотидных молекулярных нагрузок в клетки, к составам, содержащим такие комплексы, и к их применениям, в частности к применениям, связанным с лечением заболевания.

ССЫЛКА НА ЭЛЕКТРОННЫЙ СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Содержание электронного списка последовательностей (D082470061WO00-SEQ-CBD.xml; Размер: 55409 байтов; и дата создания: 6 июля 2022 года) полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Дистрофинопатии являются группой отдельных нейромышечных заболеваний, которые возникают в результате мутаций в гене *DMD*. Дистрофинопатии содержат миодистрофию Дюшенна, миодистрофию Беккера и X-сцепленную дилатационную кардиомиопатию. Ген *DMD*, кодирующий дистрофин, является крупным геном, содержащим 79 экзонов и в общей сложности примерно 2,6 миллиона пар оснований. Многочисленные мутации в *DMD*, включая сдвиг рамок считывания, делецию, замену и дупликативные мутации в экзонных областях, могут снижать экспрессию функционального дистрофина, что приводит к дистрофинопатиям.

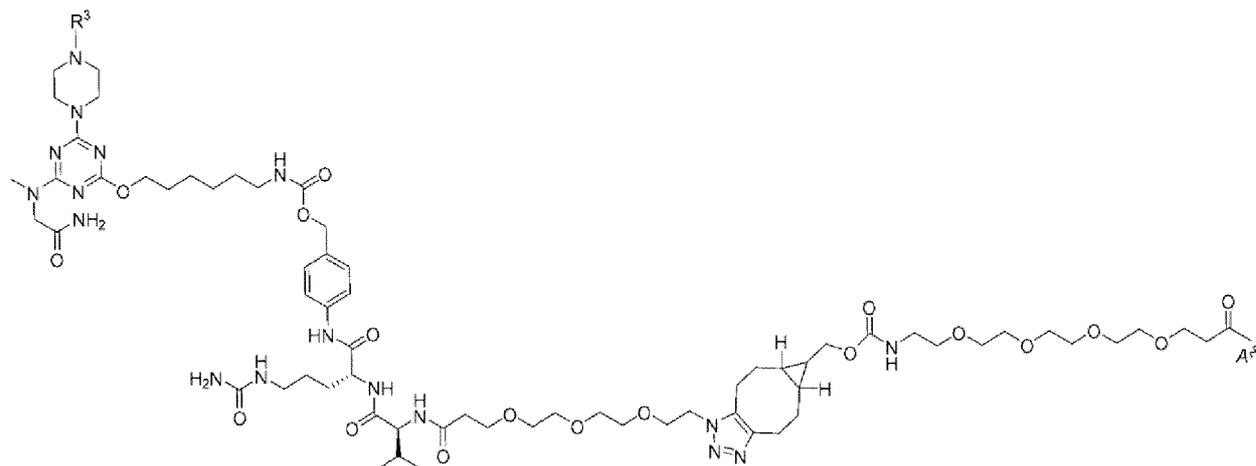
СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Согласно некоторым аспектам в настоящем изобретении предложены комплексы и составы, содержащие такие комплексы. В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, содержат в составы с гистидином (например, L-гистидином) и сахарозой. В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, изготавливают в виде водных или лиофилизированных форм (например, лиофилизированного порошка). В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, изготавливают в виде замороженных форм. В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, содержат фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО), ковалентно связанный с антителом. В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, содержат

нацеленный на мышцы комплекс, содержащий РМО, ковалентно связанный с антителом против рецептора трансферрина 1 (TfR1). В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 было подвергнуто образованию пироглутамата в результате посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит нацеленный на мышцы комплекс, содержащий РМО, ковалентно связанный с антителом против рецептора трансферрина 1 (TfR1), например, имеющим последовательность, представленную в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления РМО направленно взаимодействует с аллелем *DMD* (например, мутантным аллелем *DMD*). Также предложены способы применения комплексов и составов, описанных в настоящем документе, для лечения субъекта, имеющего мутантный аллель *DMD*, ассоциированный с миодистрофией Дюшенна (например, где мутантный аллель *DMD* содержит мутацию, которая может быть подвергнута пропуску экзона), и/или способы стимуляции экспрессии или активности белка дистрофина (например, усеченного белка дистрофина) в клетке (например, мышечной клетке).

[0006] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены составы, содержащие комплексы, которые содержат фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО), ковалентно связанный с антителом против рецептора трансферрина 1 (TfR1), где антитело содержит: определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16, и где комплексы содержат в составы с гистидином и сахарозой.

[0007] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены составы, содержащие комплексы, содержащие структуру формулы: $[R^1]_{n1}-R^2$, где каждый R^1 независимо содержит группу формулы (Ia):



(Ia),

где:

R² содержит антитело, и

R³ содержит фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (PMO);

где R¹ ковалентно связан с R² в точке присоединения A; и

где n1 является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R¹,

где каждая из групп R¹ ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком антитела;

где комплексы содержат в составы с гистидином и сахарозой.

[0008] В некоторых вариантах осуществления каждый отдельный аминокислотный остаток представляет собой лизин.

[0009] В некоторых вариантах осуществления антитело является антителом против Tfr1.

[00010] В некоторых вариантах осуществления среднее значение n1 комплексов в составе находится в пределах 1-5.

[00011] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16.

[00012] В некоторых вариантах осуществления состав находится в лиофилизированной форме, водном растворе или замороженной твердой форме.

[00013] В некоторых вариантах осуществления состав находится в водном растворе, а гистидин присутствует в водном растворе в концентрации в пределах от 10 мМ до 50 мМ.

[00014] В некоторых вариантах осуществления состав находится в водном растворе, а сахароза присутствует в водном растворе в концентрации в пределах от 5% до 15% по массе на объем (% масс/об).

[00015] В некоторых вариантах осуществления состав находится в водном растворе, и водный раствор имеет рН в пределах 5,0-7,0.

[00016] В некоторых вариантах осуществления состав находится в водном растворе, а гистидин присутствует в водном растворе в концентрации 25 мМ, и/или сахароза присутствует в водном растворе в концентрации 10 масс/об %, и/или водный раствор имеет рН 6,0.

[00017] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv.

[00018] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Fab-фрагмент.

[00019] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 17; и/или где антитело содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 18.

[00020] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[00021] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 19; и/или где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 20.

[00022] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

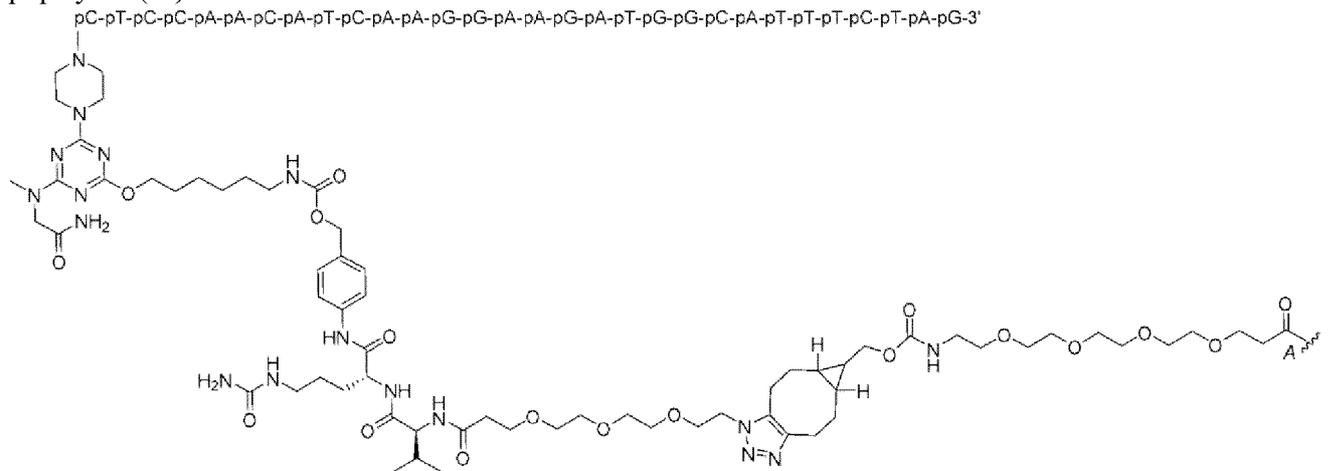
[00023] В некоторых вариантах осуществления РМО содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая имеет длину 15-35 нуклеотидов.

[00024] В некоторых вариантах осуществления РМО содержит нуклеотидную последовательность, имеющую область комплементарности длиной по меньшей мере 8 последовательных нуклеотидов с SEQ ID NO: 23, с SEQ ID NO: 24 или с SEQ ID NO: 22.

[00025] В некоторых вариантах осуществления РМО содержит по меньшей мере 8 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21.

[00026] В некоторых вариантах осуществления РМО содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21.

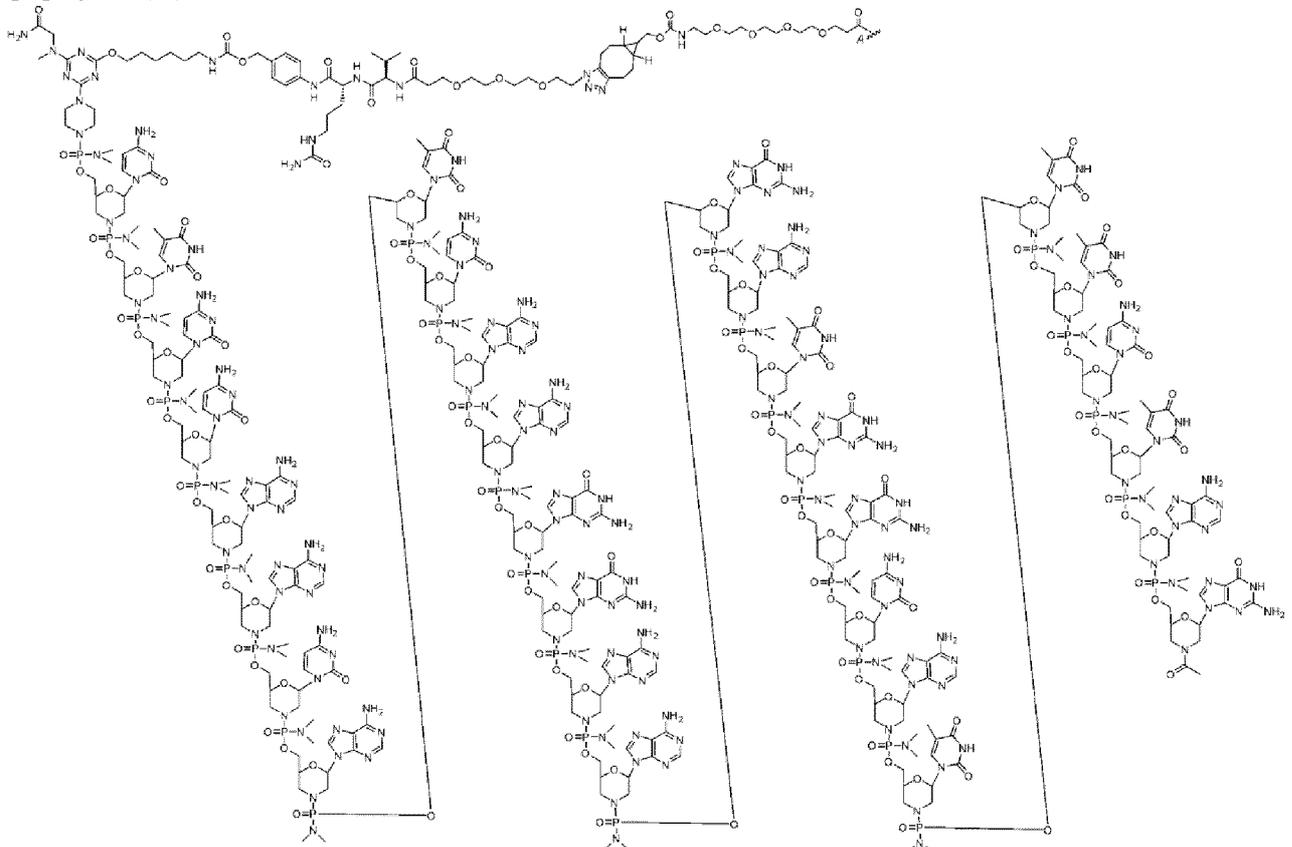
[00027] В некоторых вариантах осуществления каждый R¹ содержит группу формулы (Ib):



(Ib),

в которой -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO), где -p обозначает фосфородиамидатную связь, где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом PMO имеет последовательность нуклеиновых оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO: 21), и где R¹ ковалентно связан с R² в точке присоединения A.

[00028] В некоторых вариантах осуществления каждый R¹ содержит группу формулы (Ic):



(Ic).

[00029] В некоторых вариантах осуществления комплексы присутствуют в составе в концентрации в пределах от 10 мг/мл до 50 мг/мл.

[00030] Кроме того, в настоящем документе предложены способы стимуляции экспрессии или активности белка дистрофина у субъекта, включающие введение субъекту состава, описанного в настоящем документе.

[00031] В некоторых вариантах осуществления белок дистрофин является усеченным белком дистрофином.

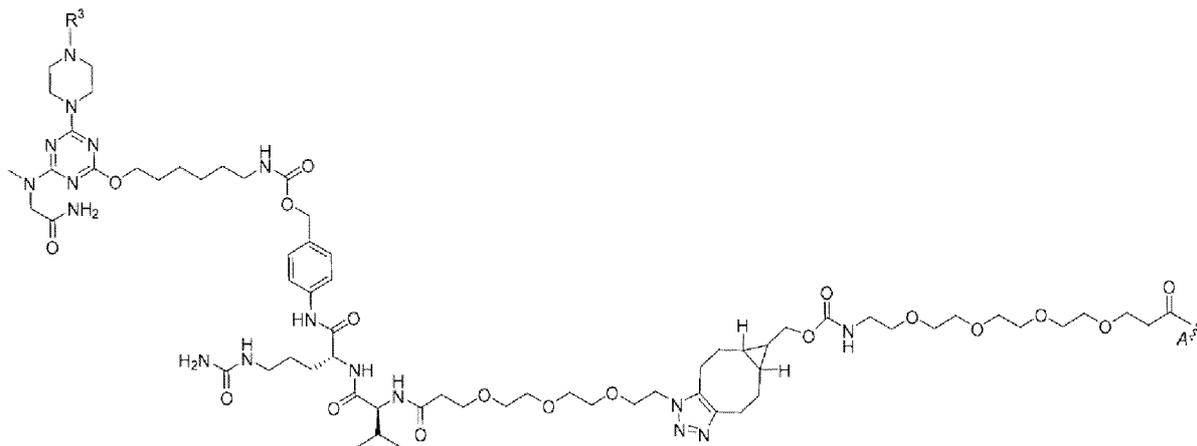
[00032] Также в настоящем документе предложены способы лечения субъекта, имеющего мутантный аллель *DMD*, ассоциированный с миодистрофией Дюшенна, где способ включает введение субъекту состава, описанного в настоящем документе.

[00033] В некоторых вариантах осуществления мутантный аллель *DMD* содержит мутацию, которая может быть подвергнута пропуску экзона 51.

[00034] В некоторых вариантах осуществления мутантный аллель *DMD* содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в экзоне 51.

[00035] В других аспектах настоящего изобретения предложены комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, где:

каждый R^1 содержит группу формулы (Ia):



(Ia),

где R^3 содержит фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (PMO), содержащий последовательность оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO: 21);

где R^2 содержит Fab, и где Fab содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2,

где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; и где n1 независимо является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 в каждом комплексе, где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab.

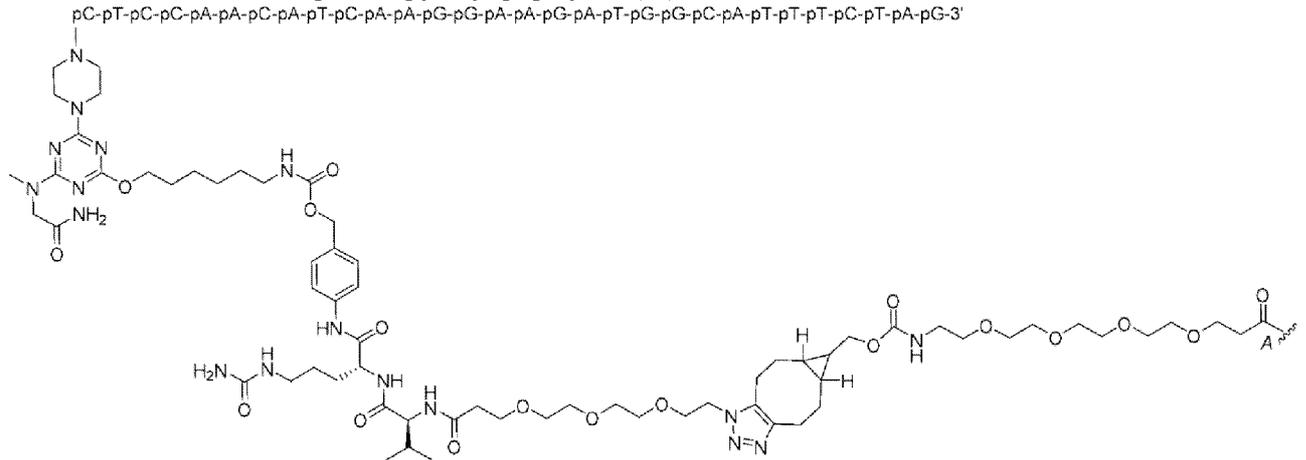
[00036] В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

[00037] В некоторых вариантах осуществления Fab содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[00038] В некоторых вариантах осуществления каждый отдельный аминокислотный остаток представляет собой лизин.

[00039] В других аспектах настоящего изобретения предложены комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, где:

каждый R^1 содержит группу формулы (Ib):



(Ib),

где R^2 содержит Fab, и где Fab содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2,

где -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO), где -p обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G), или тимину (T), при этом олигонуклеотид PMO имеет последовательность нуклеиновых оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG (SEQ ID NO: 21);

где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; и где $n1$ является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab.

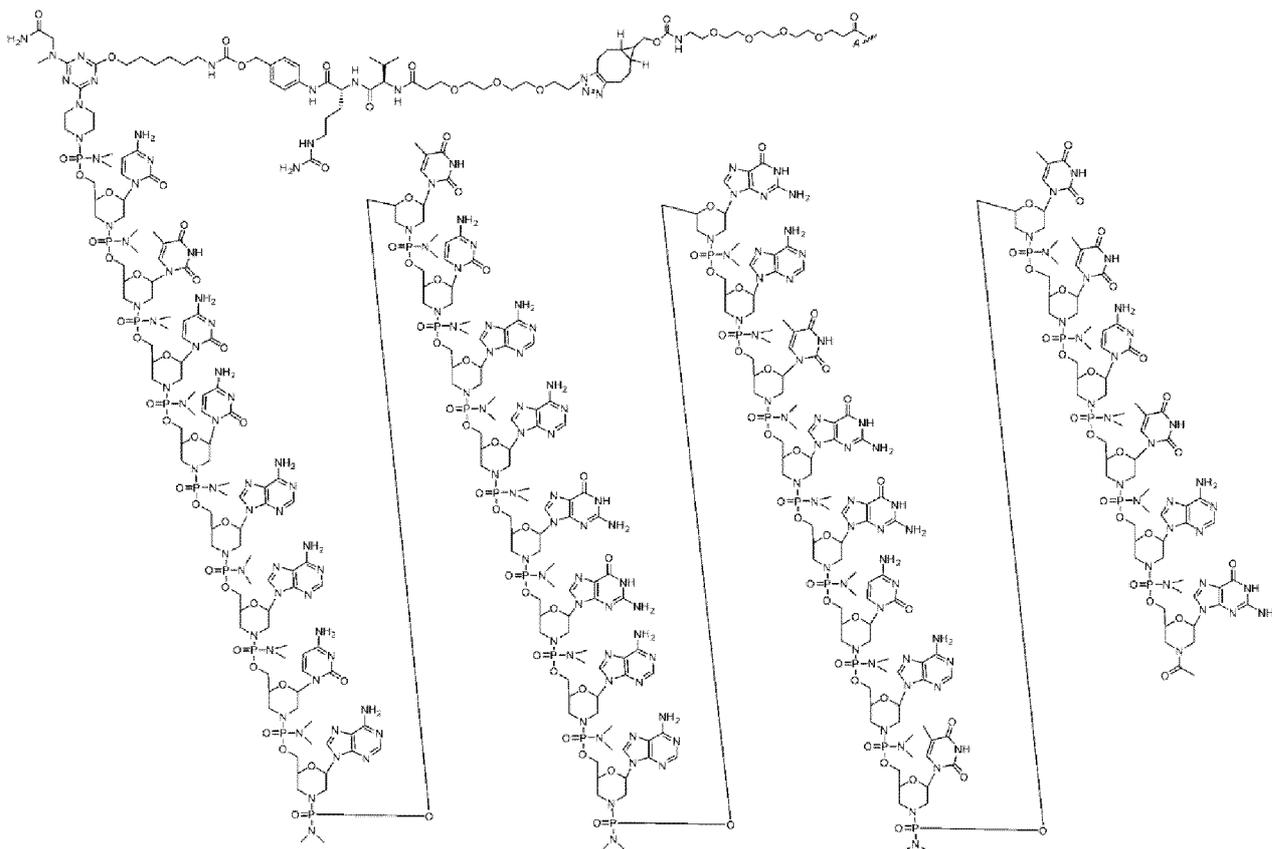
[00040] В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

[00041] В некоторых вариантах осуществления Fab содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20,

[00042] В некоторых вариантах осуществления каждый отдельный аминокислотный остаток представляет собой лизин.

[00043] В других аспектах настоящего изобретения предложены комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, где:

каждый R^1 содержит группу формулы (Ic):



(Ic),

где R^2 содержит Fab, содержащий CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2;

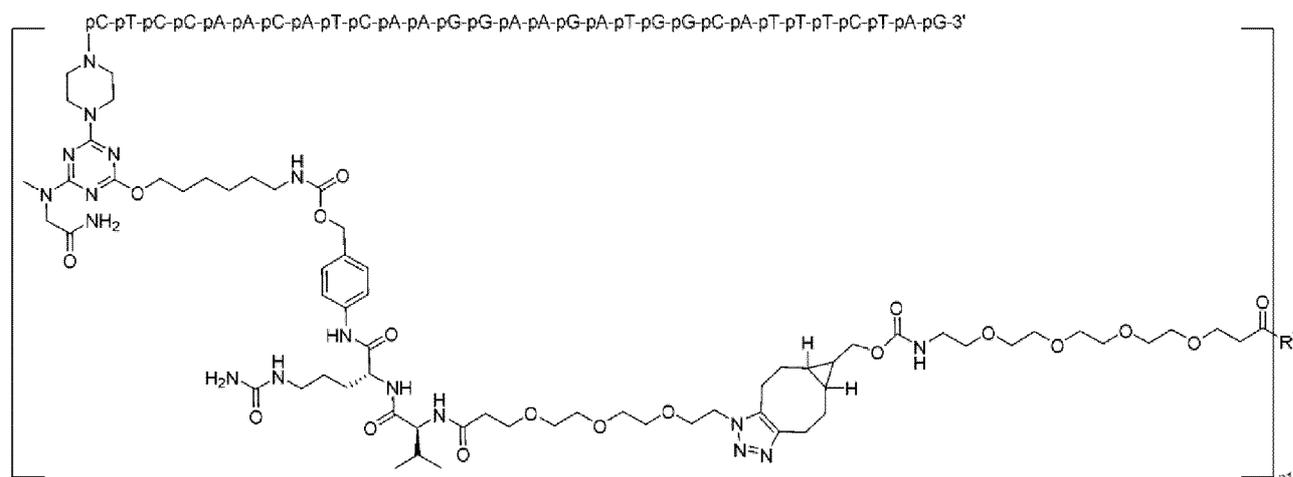
где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; где $n1$ является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab.

[00044] В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит Fab, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[00045] В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит Fab, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[00046] В некоторых вариантах осуществления каждый отдельный аминокислотный остаток представляет собой лизин.

[00047] В других аспектах настоящего изобретения предложены комплексы, содержащие структуру формулы (Id):



(Id),

где R² содержит Fab, содержащий CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2;

где -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO); где -р обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G), или тимину (T), при этом PMO содержит последовательность оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG (SEQ ID NO: 21);

где R¹ ковалентно связан с R² в точке присоединения A; где n1 является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R¹, где каждая группа R¹ ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab.

[00048] В некоторых вариантах осуществления R² содержит Fab, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[00049] В некоторых вариантах осуществления R² содержит Fab, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[00050] В некоторых вариантах осуществления каждый отдельный аминокислотный остаток представляет собой лизин.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00051] На **ФИГ. 1** показаны данные, иллюстрирующие, что композиция, включающая конъюгаты, содержащие Fab против TfR1, имеющий последовательности VH/VL, показанные в Таблице 2, в которых Fab ковалентно связан (путем конъюгирования через лизин) через линкер, содержащий последовательность валин-цитруллин, с олигонуклеотидом, вызывающим пропуск экзона *DMD*, приводила к улучшенному пропуску экзона по сравнению с голым олигонуклеотидом для пропуска экзона *DMD* в мышечных трубках пациента с миодистрофией Дюшенна в подобранной эквимольной дозе олигонуклеотида.

[00052] На **ФИГ. 2** показана стабильность композиции, включающей конъюгаты,

содержащие Fab против TfR1, имеющий последовательности VH/VL, показанные в Таблице 2, ковалентно связанный (путем конъюгирования через лизин) посредством линкера, содержащего последовательность валин-цитруллин, с антисмысловым олигонуклеотидом (АСО), вызывающим пропуск экзона 51 *DMD* (называемый "конъюгатом 1"), в Составе 1 (25 мг/мл конъюгат в 25 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH 6) в отношении концентрации конъюгата в зависимости от времени.

[00053] На **ФИГ. 3** показаны результаты ВСА анализа Составы 1, содержащего Fab против TfR1, имеющий последовательности VH/VL, показанные в Таблице 2, ковалентно связанный (путем конъюгирования через лизин) посредством линкера, содержащего последовательность валин-цитруллин, с АСО, вызывающим пропуск экзона 51 *DMD* ("конъюгат 1"). Когда концентрация конъюгата Fab против TfR1-АСО 1 составила 25 мг/мл, образцы конъюгата добавляли в требуемые контейнеры (стекло, ЭВА, поликарбонат, ПЭНД) и замораживали при -80°C в течение ночи, затем размораживали при $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 4 часов. Калибровочные кривые получали со значением R^2 0,9998. Концентрации образцов вычисляли по этой кривой.

[00054] На **ФИГ. 4** показаны результаты эВЭЖХ Составы 1, содержащего Fab против TfR1, имеющий последовательности VH/VL, показанные в Таблице 2, ковалентно связанный (путем конъюгирования через лизин) посредством линкера, содержащего последовательность валин-цитруллин, с АСО, вызывающим пропуск экзона 51 *DMD* ("конъюгат Fab против TfR1-АСО"). Существенных изменений состава пиков не наблюдали ни для одного состава. HMWS 1 относится к стандарту высокой молекулярной массы 1, а LMWS 1 относится к стандарту низкой молекулярной массы 1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00055] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения предложены комплексы и составы, содержащие такие комплексы. В некоторых вариантах осуществления комплексы состоят из гистидина (например, L-гистидина) и сахарозы. В некоторых вариантах осуществления комплексы изготавливают в виде водных или лиофилизированных форм (например, лиофилизированного порошка). В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО), ковалентно связанный с антителом. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит нацеленный на мышцы комплекс, содержащий РМО, ковалентно связанный с антителом против рецептора трансферрина 1 (TfR1). В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит нацеленный на мышцы комплекс, содержащий РМО, ковалентно связанный с антителом против рецептора трансферрина 1 (TfR1), показанным в Таблице 2. Также предложены способы применения комплексов и составов, описанных в настоящем документе, для лечения субъекта, имеющего мутантный аллель *DMD*, ассоциированный с миодистрофией Дюшенна (например, где мутантный аллель *DMD* содержит мутацию, которая может быть подвергнута пропуску экзона), и/или способы стимуляции экспрессии или активности белка дистрофина (например, усеченного белка дистрофина) в клетке.

[00056] Дополнительные аспекты изобретения, включая описание определенных терминов, представлены ниже.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00057] **Введение:** При использовании в настоящем документе термин "введение" означает предоставление комплекса субъекту таким образом, который является физиологически и/или (например, и) фармакологически полезным (например, для лечения состояния у субъекта).

[00058] **Приблизительно:** При использовании в настоящем документе термин "приблизительно" или "примерно" в отношении одного или более значений, представляющих интерес, относится к значению, подобному указанному референсному значению. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" или "примерно" относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше или меньше) от указанного референсного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случая, когда такое число будет превышать 100% возможного значения).

[00059] **Антитело:** При использовании в настоящем документе термин "антитело" относится к полипептиду, который содержит по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина или по меньшей мере одну антигенную детерминанту, например, паратоп, который специфично связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело является полноразмерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным антителом. Однако в некоторых вариантах осуществления антитело является Fab-фрагментом, Fab'-фрагментом, F(ab')₂-фрагментом, F_v-фрагментом или scF_v-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело является нанотелом, полученным на основе антитела Верблюдового, или нанотелом, полученным на основе антитела акулы. В некоторых вариантах осуществления антитело является диателом. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит каркас, имеющий последовательность зародышевой линии человека. В другом варианте осуществления антитело содержит константный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из константных доменов IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM и IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой (H) цепи (сокращенно именуемую в настоящем документе как VH), и/или (например, и) переменную область легкой (L) цепи (сокращенно именуемую в настоящем документе как VL). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен, например, Fc-область. Константный домен иммуноглобулина относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Известны аминокислотные последовательности константного домена тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека и их функциональных вариантов. Что касается тяжелой цепи, в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, описанного в настоящем документе,

может быть тяжелой цепью альфа (α), дельта (Δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, описанного в настоящем документе, может включать тяжелую цепь альфа (α), дельта (Δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ) человека. В конкретном варианте осуществления антитело, описанное в настоящем документе, содержит домен CH1, CH2 и/или (например, и) CH3 гамма 1 человека. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH домена содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) человека, такую как любая известная в данной области. Неограничивающие примеры последовательностей константной области человека были описаны в уровне техники, например, см. патент США 5,693,780 и Kabat E A et al., (1991) выше. В некоторых вариантах осуществления VH домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из константных областей переменной цепи, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело модифицировано, например, модифицировано путем гликозилирования, фосфорилирования, сумоилирования и/или (например, и) метилирования. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным антителом, которое конъюгировано с одной или больше молекулами сахара или углевода. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахара или углевода конъюгированы с антителом посредством N-гликозилирования, O-гликозилирования, C-гликозилирования, глипирования (присоединения GPI-якоря) и/или (например, и) фосфогликозилирования. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахара или углевода являются моносахаридами, дисахаридами, олигосахаридами или гликанами. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахара или углевода являются разветвленным олигосахаридом или разветвленным гликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахара или углевода содержит маннозное звено, глюкозное звено, N-ацетилглюкозаминовое звено, N-ацетилгалактозаминовое звено, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления антитело является конструкцией, которая содержит полипептид, содержащий один или больше антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, связанных с линкерным полипептидом или константным доменом иммуноглобулина. Линкерные полипептиды содержат два или больше аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями, и используются для соединения одной или больше антигенсвязывающих частей. Примеры линкерных полипептидов описаны в литературе (см., например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Кроме того, антитело может быть частью более крупной молекулы иммуноадгезии, образованной в результате ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или части антитела с одним или больше другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии содержат использование коровой области стрептавидина с получением тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and

Hybridomas 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058).

[00060] **CDR:** При использовании в настоящем документе термин "CDR" относится к определяющей комплементарности области в переменных последовательностях антител. Типичная молекула антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), которые обычно участвуют в связывании антигена. Области VH и VL могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, также известные как "определяющие комплементарность области" ("CDR"), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, которые известны как "каркасные области" ("FR"). Каждая VH и VL, как правило, состоит из трех CDR-областей и четырех FR-областей, расположенных от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Протяженность каркасной области и CDR-областей можно точно определить способами, известными из уровня техники, например, с помощью определения Кабата, определения IMGT, определения Чотиа, определения AbM и/или (например, и) определения по контактной системе, которые хорошо известны в данной области. См., например, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; IMGT[®], the international ImMunoGeneTics information system[®] <http://www.imgt.org>, Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212 (1999); Ruiz, M. et al., *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); Lefranc, M.-P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); Lefranc, M.-P., *Nucleic Acids Res.*, 31:307-310 (2003); Lefranc, M.-P. et al., *In Silico Biol.*, 5, 0006 (2004) [Epub], 5:45-60 (2005); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 33:D593-597 (2005); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 37:D1006-1012 (2009); Lefranc, M.-P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 43:D413-422 (2015); Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948; and Almagro, *J. Mol. Recognit.* 17:132-143 (2004). Также см. bioinf.org.uk/abs. При использовании в настоящем документе "CDR" может относиться к CDR, определенной любым способом, известным в данной области. Если два антитела имеют одну и ту же CDR, то это означает, что два антитела имеют одинаковую аминокислотную последовательность такой CDR, как определено с помощью одного и того же способа, например, определения IMGT.

[00061] В каждой из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи существуют три CDR-области, которые обозначают как CDR1, CDR2 и CDR3, для каждой из переменных областей. При использовании в настоящем документе термин "набор CDR" относится к группе из трех CDR-областей, которые присутствуют в одной переменной области, способной связывать антиген. Точные границы этих CDR-областей определяют по-разному согласно разным системам. Система, описанная Элвином Кабатом (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) и (1991)), не только представляет собой систему точной нумерации остатков, которая может использоваться в отношении любой переменной области

антитела, но также дает точные границы остатков, определяющие три CDR-области. Эти CDR могут быть указаны как CDR Кабата. Подчасти CDR-областей могут быть обозначены как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" означают области легкой цепи и тяжелой цепи соответственно. Эти области могут быть обозначены как CDR-области Чотиа, которые имеют границы, перекрывающиеся с CDR-областями Кабата. Другие границы, определяющие CDR-области, перекрывающиеся с CDR-областями Кабата, описаны в публикациях Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) и MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Другие определения границ CDR не должны обязательно строго следовать одной из указанных выше систем, но при этом они будут перекрываться с CDR-областями Кабата, хотя они могут быть укорочены или удлинены с учетом прогноза или экспериментальных данных, связанных с тем, что конкретные остатки или группы остатков, или даже целые CDR-области не влияют в значимой степени на связывание антигена. В способах, используемых в настоящем описании, могут использоваться CDR-области, определенные согласно любой из этих систем. Примеры систем определения CDR приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Определения CDR

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

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

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

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

[00062] **Комплементарный:** При использовании в настоящем документе термин "комплементарный" относится к возможности точного спаривания между двумя нуклеотидами или двумя наборами нуклеотидов. В частности, "комплементарный" представляет собой термин, который характеризует степень спаривания посредством образования водородных связей, которое приводит к связыванию между двумя нуклеотидами или двумя наборами нуклеотидов. Например, если основание в одном положении олигонуклеотида может связываться посредством образования водородных связей с основанием в соответствующем положении нуклеиновой кислоты-мишени (например, мРНК), то тогда основания считаются комплементарными друг другу в этом положении. Спаривание оснований может включать каноническое спаривание по Уотсону-крику и не-уотсон-криковское спаривание (например, неоднозначное спаривание оснований и хугстиновское спаривание оснований). Например, в некоторых вариантах

осуществления, в случае комплементарного спаривания оснований, основания типа аденозина (А) комплементарны основаниям типа тимидина (Т) или основаниям типа урацила (U), основания типа цитозина (С) комплементарны основаниям типа гуанозина (G), и универсальные основания, такие как 3-нитропиррол или 5-нитроиндол, могут гибридизоваться и считаются комплементарными любому из А, С, U или Т. В уровне техники инозин (I) также считается универсальным основанием и считается комплементарным любому из А, С, U или Т.

[00063] **Ковалентно связанный:** При использовании в настоящем документе термин "ковалентно связанный" относится к характеристике двух или более молекулы, соединенных по меньшей мере одной ковалентной связью. В некоторых вариантах осуществления две молекулы могут быть ковалентно связаны одинарной связью, например, дисульфидной связью или дисульфидным мостиком, которые служат в качестве линкера между молекулами. Однако в некоторых вариантах осуществления две или более молекулы могут быть ковалентно связаны посредством молекулы, которая служит в качестве линкера, который соединяет две или более молекул через множество ковалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть расщепляемым линкером. Впрочем, в некоторых вариантах осуществления линкер может быть нерасщепляемым линкером.

[00064] **DMD:** При использовании в настоящем документе термин "*DMD*" относится к гену, кодирующему белок дистрофин, ключевой компонент дистрофин-гликопротеинового комплекса, который соединяет внутренний цитоскелет и внеклеточный матрикс в мышечных клетках, в частности, в мышечных волокнах. Делеции, дупликации и точечные мутации в *DMD* могут вызывать дистрофинопатии, такие как миодистрофию Дюшенна, миодистрофию Беккера или кардиомиопатию. Использование альтернативных промоторов и альтернативный сплайсинг приводят к образованию множества различных вариантов транскриптов и изоформ белка для этого гена. В некоторых вариантах осуществления ген *DMD* может быть геном человека (Gene ID: 1756), не относящегося к человеку примата (например, Gene ID: 465559) или геном грызуна (например, Gene ID: 13405; Gene ID: 24907). Кроме того, было охарактеризовано несколько вариантов человеческих транскриптов (например, аннотированных под номерами доступа в GenBank RefSeq: NM_000109.3, NM_004006.2 (SEQ ID NO: 24), NM_004009.3, NM_004010.3 и NM_004011.3), которые кодируют различные изоформы белка.

[00065] **Аллель DMD:** При использовании в настоящем документе термин "аллель *DMD*" относится к любой из альтернативных форм (например, дикому типу или мутантным формам) гена *DMD*. В некоторых вариантах осуществления аллель *DMD* может кодировать дистрофин, который сохраняет свои нормальные и типичные функции. В некоторых вариантах осуществления аллель *DMD* может включать одну или больше мутаций, которые приводят к мышечной дистрофии. Обычные мутации, которые приводят к миодистрофии Дюшенна, содержат сдвиг рамки считывания, делеции, замены и дупликативные мутации в одном или больше из 79 экзонов, присутствующих в аллеле *DMD*, например, в экзоне 8,

экзоне 23, экзоне 41, экзоне 44, экзоне 50, экзоне 51, экзоне 52, экзоне 53 или экзоне 55. Дополнительные примеры мутаций *DMD* раскрыты, например, в публикации Flanigan KM, et al., *Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort*. Hum Mutat. 2009 Dec; 30 (12):1657-66, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте

[00066] **Дистрофинопатия:** При использовании в настоящем документе термин "дистрофинопатия" относится к мышечному заболеванию, которое возникает вследствие присутствия одного или больше мутантных аллелей *DMD*. Дистрофинопатии содержат спектр состояний (от легких до тяжелых), содержащих миодистрофию Дюшенна, миодистрофию Беккера и *DMD*-ассоциированную дилатационную кардиомиопатию (ДКМП). В некоторых вариантах осуществления дистрофинопатия с одной стороны фенотипически связана с бессимптомным повышением концентрации креатинфосфокиназы (КФК) в сыворотке крови и/или (например, и) мышечными судорогами с миоглобинурией. В некоторых вариантах осуществления дистрофинопатия с другой стороны фенотипически связана с прогрессирующими мышечными заболеваниями, которые обычно классифицируются как миодистрофия Дюшенна или Беккера, когда преимущественно поражаются скелетные мышцы, и как *DMD*-ассоциированная дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), когда поражается сердце. Симптомы миодистрофии Дюшенна содержат потерю мышечной массы или дегенерацию мышц, снижение мышечной функции, псевдогипертрофию языка и икроножных мышц, повышенный риск неврологических нарушений и сокращение продолжительности жизни. Миодистрофия Дюшенна связана с записью в базе данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) под номером 310200. Миодистрофия Беккера связана с записью в OMIM под номером 300376. Дилатационная кардиомиопатия связана с записью в OMIM под номером X 302045.

[00067] **Экзонный энхансер сплайсинга (ESE):** В настоящем документе термин "экзонный энхансер сплайсинга" или "ESE" относится к мотиву в последовательности нуклеиновой кислоты экзона гена, пре-мРНК или мРНК, который направляет или усиливает сплайсинг пре-мРНК с образованием мРНК, например, как описано в публикации Blencowe et al., Trends Biochem Sci 25, 106-10 (2000), включенной в настоящий документ посредством ссылки. ESE представляют собой элементы сплайсинга. Элементы ESE могут направлять или усиливать сплайсинг, например, с удалением одного или больше интронов и/или одного или больше экзонов из транскрипта гена. Мотивы ESE обычно имеют длину 6-8 нуклеиновых оснований. Белки SR (например, белки, кодируемые генами SRSF1, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SRSF5, SRSF6, SRSF7, SRSF8, SRSF9, SRSF10, SRSF11, SRSF12, TRA2A или TRA2B) связываются с ESE посредством области мотива распознавания РНК, способствуя сплайсингу. Мотивы ESE могут быть идентифицированы с помощью ряда методов, в том числе методов, описанных в публикации Cartegni et al., Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 13, 3568-3571, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

[00068] **Каркасная область:** При использовании в настоящем документе термин "каркасная область" или "каркасная последовательность" относится к остальным последовательностям варибельной области без CDR-областей. Поскольку точное определение последовательности CDR можно выполнить с помощью различных систем, значение термина "каркасная последовательность" подлежит, соответственно, разным интерпретациям. Шесть CDR-областей (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 легкой цепи и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 тяжелой цепи) также разделяют каркасные области легкой цепи и тяжелой цепи на четыре подобласти (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, причем CDR1 располагается между FR1 и FR2, CDR2 - между FR2 и FR3, и CDR3 - между FR3 и FR4. Без определения конкретных подобластей как FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасная область, как указано другими, представляет собой комбинированные FR в варибельной области одной, природной цепи иммуноглобулина. При использовании в настоящем документе FR представляет собой одну из четырех подобластей, и FR-области представляют собой две или больше из четырех подобластей, составляющих каркасную область. Акцепторные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи человека известны в уровне техники. В одном варианте осуществления акцепторные последовательности, известные в уровне техники, могут использоваться в антителах, раскрытых в настоящем документе.

[00069] **Человеческое антитело:** Предполагается, что при использовании в настоящем документе термин "человеческое антитело" содержит антитела, имеющие варибельные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или возникающие в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR-областях и, в частности, CDR3. Впрочем, термин "человеческое антитело" при использовании в настоящем документе не предназначен для включения антител, в которых CDR-последовательности, происходящие из зародышевой линии млекопитающего другого вида, такого как мышь, перевивают на человеческие каркасные последовательности.

[00070] **Гуманизированное антитело:** Термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, которые содержат последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи из не относящихся к человеку видов (например, мыши), но в которых, по меньшей мере, часть последовательности VH и/или (например, и) VL изменена с получением более "человекоподобной" последовательности, т.е. более похожей на последовательности варибельной области зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизированного антитела является антитело с перевитой CDR, в котором человеческие CDR-последовательности содержат нечеловеческие последовательности VH и VL для замены соответствующих нечеловеческих CDR-последовательностей. В одном из вариантов осуществления предложены гуманизированные антитела против рецептора трансферрина и их антигенсвязывающие части. Такие антитела могут быть созданы путем

получения мышинных моноклональных антител против рецептора трансферрина с использованием классической гибридомной технологии с последующей гуманизацией при использовании генной инженерии *in vitro*, например, как раскрыто в публикации PCT WO 2005/123126 A2 Kasaian et al.

[00071] **Нумерация по Кабату:** Термины "нумерация по Кабату", "определения по Кабату" и "мечение по Кабату" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Эти термины, известные в уровне техники, относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, являющихся более вариабельными (т.е. гипервариабельными), нежели другие аминокислотные остатки в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 и Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). В случае вариабельной области тяжелой цепи гипервариабельная область расположена в границах положений аминокислот 31-35 в случае CDR1, положений аминокислот 50-65 в случае CDR2 и положений аминокислот 95-102 в случае CDR3. Что касается вариабельной области легкой цепи, гипервариабельная область расположена в границах положений аминокислот 24-34 в случае CDR1, положений аминокислот 50-56 в случае CDR2 и положений аминокислот 89-97 в случае CDR3.

[00072] **Морфолиноолигомеры:** При использовании в настоящем документе термин "морфолиноолигомер", также называемый "фосфородиамидат-морфолиновым олигомером", относится к молекулярной структуре, которая содержит нуклеиновые основания, присоединенные к скелету из метиленморфолиновых колец, соединенных через фосфородиамидатную группу. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может представлять собой соединения на основе морфолиновых колец. Олигомерные соединения на основе морфолиновых колец описаны в публикациях Dwaine A. Braasch and David R. Corey, Biochemistry, 2002, 41(14), 4503-4510; Genesis, volume 30, issue 3, 2001; Heasman, J., Dev. Biol., 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., Nat. Genet., 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97, 9591-9596; и в патенте США 5,034,506, опубликованном 23 июля 1991 года. В некоторых вариантах осуществления олигомерное соединение на основе морфолиновых колец является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (РМО) (например, как описано в публикациях Iverson, Curr. Opin. Mol. Ther., 3:235-238, 2001; и Wang et al., J. Gene Med., 12:354-364, 2010; содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00073] **Олигонуклеотид:** При использовании в настоящем документе термин "олигонуклеотид" относится к олигомерному соединению нуклеиновой кислоты длиной до 200 нуклеотидов. Неограничивающие примеры олигонуклеотидов содержат РНКи олигонуклеотиды (например, миРНК, мшРНК), микроРНК, гэдмеры, миксмеры, фосфородиамидат-морфолинопроизводные, пептидо-нуклеиновые кислоты, аптамеры, гидовые нуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК Cas9) и т.д. Олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах

осуществления олигонуклеотид может включать один или больше модифицированных нуклеозидов (например, 2'-О-метил- модификации сахара, модификации пурина или пиримидина). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может включать одну или больше модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может включать одну или больше фосфоротиоатных связей, которые могут находиться в стереохимической конформации Rp или Sp.

[00074] **Область комплементарности:** При использовании в настоящем документе термин "область комплементарности" относится к нуклеотидной последовательности, например олигонуклеотида, которая достаточно комплементарна когнатной нуклеотидной последовательности, например, нуклеиновой кислоты-мишени, в результате чего две нуклеотидные последовательности могут отжигаться друг с другом в физиологических условиях (например, в клетке). В некоторых вариантах осуществления область комплементарности полностью комплементарна когнатной нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Впрочем, в некоторых вариантах осуществления область комплементарности частично комплементарна когнатной нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоте-мишени (например, по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 99% комплементарности). В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит 1, 2, 3 или 4 некомплементарных оснований по сравнению с когнатной нуклеотидной последовательностью нуклеиновой кислоты-мишени.

[00075] **Специфично связывается:** При использовании в настоящем документе термин "специфично связывается" относится к способности молекулы связываться с партнером по связыванию с такой степенью аффинности или авидности, которая позволяет использовать молекулу для различения партнера по связыванию и соответствующего контроля в анализе связывания или другом контексте связывания. В отношении антитела термин "специфично связывается" относится к способности антитела связываться со специфическим антигеном с такой степенью аффинности или авидности по сравнению с соответствующим референсным антигеном или антигенами, которая позволяет использовать антитело для различения специфического антигена от других, например, в такой степени, которая обеспечивает избирательное направленное взаимодействие с некоторыми клетками, например мышечными клетками, посредством связывания с антигеном, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело специфично связывается с мишенью, если антитело имеет K_D для связывания мишени по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или меньше. В некоторых вариантах осуществления антитело специфично связывается с трансферриновым рецептором, например, эпитопом апикального домена трансферринового рецептора.

[00076] **Субъект:** При использовании в настоящем документе термин "субъект" относится к млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой не относящегося к человеку примата или грызуна. В некоторых

вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом, например, пациентом-человеком, имеющим заболевание или подозреваемым на наличие заболевания. В некоторых вариантах осуществления субъект является пациентом-человеком, имеющим или подозреваемым на наличие заболевания, которое вызвано присутствием мутантной последовательности гена *DMD*, например, с мутацией в экзоне последовательности гена *DMD*. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет дистрофинопатию, например, миодистрофию Дюшенна.

[00077] **Трансферриновый рецептор:** При использовании в настоящем документе термин "трансферриновый рецептор" (также известный как TfRc, CD71, p90, TFR или TFR1) относится к интернализирующемуся рецептору клеточной поверхности, который связывается с трансферрином, способствуя захвату железа посредством эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления трансферриновый рецептор может происходить из человека (NCBI Gene ID 7037), не относящегося к человеку примата (например, NCBI Gene ID 711568 или NCBI Gene ID 102136007) или грызуна (например, NCBI Gene ID 22042). Кроме того, охарактеризовано множество вариантов человеческих транскриптов, кодирующих разные изоформы рецептора (например, аннотированные под номерами доступа в GenBank RefSeq: NP_001121620.1, NP_003225.2, NP_001300894.1 и NP_001300895.1).

[00078] **Диапазоны:** Все диапазоны, приведенные в настоящем изобретении, содержат граничные значения.

Комплексы

[00079] В настоящем документе предложены комплексы, которые содержат направляющее средство, например, антитело, ковалентно связанное с олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит нацеленное на мышцы антитело, ковалентно связанное с одним или больше олигонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой РМО. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом, который адресно взаимодействует с мутантным аллелем *DMD*, способствуя пропуску экзона.

[00080] Комплексы, описанные в настоящем документе, как правило, содержат линкер, который ковалентно связывает антитело (например, любое из антител против TfR1), описанное в настоящем документе, с олигонуклеотидом (например, РМО). Линкер содержит по меньшей мере одну ковалентную связь.

[00081] В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе (например, в композициях или составах, описанных в настоящем документе), содержат структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой каждый R^1 независимо содержит соединение, включающее олигонуклеотид (например, РМО), и R^2 содержит антитело (например, антитело против TfR1), и в которой $n1$ представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество групп R^1 в комплексе. В некоторых вариантах осуществления в каждом комплексе $n1$ независимо представляет

собой целое число (например, ноль или больше), обозначающее количество групп R^1 в каждом комплексе. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 независимо содержит группу, содержащую олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 независимо содержит группу, которая содержит дополнительные элементы в дополнение к олигонуклеотиду. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело (например, антитело против TfR1), включающее тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 в комплексе независимо ковалентно связан с отдельным аминокислотным остатком (например, лизином или цистеином) в R^2 . В некоторых вариантах осуществления, R^2 содержит Fab против TfR1.

[00082] В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, $n1$ независимо является целым числом от нуля или больше. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, $n1$ независимо является целым числом от одного или больше. В некоторых вариантах осуществления $n1$ является целым числом от одного или больше. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или содержит определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых

вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Fab-фрагмент, IgG полноразмерный, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмента, scFv или Fv. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Fab-фрагмент.

[00083] В некоторых вариантах осуществления значение n1 каждого или любого комплекса (например, любого комплекса в любой из композиций или составов, раскрытых в настоящий документ), является целым числом от одного до количества аминокислотных остатков в антителе, с которым конъюгирование предпочтительно или намечено (например, количества остатков лизина). В некоторых вариантах осуществления значение n1 выбрано из 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 и 27. В некоторых вариантах осуществления значение n1 выбрано из 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 и 26. В некоторых вариантах осуществления значение n1 находится в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, значение n1 независимо выбрано из 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 и 27. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, значение n1 независимо выбрано из 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 и 26. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, значение n1 независимо находится в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3. В некоторых вариантах осуществления среднее значение n1 комплексов композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 3-5, или 1-2). В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, содержат комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, где n1 равно 0. В некоторых вариантах осуществления среднее значение n1 комплексов композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5 или 1,8-2,2). В некоторых вариантах осуществления, в комплексе каждого типа, n1 независимо является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R¹ в каждом комплексе данного типа, и в котором различные типы комплексов в композиции характеризуются различными значениями n1 (например, значениями n1 в диапазоне 1-27, 1-26, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5 или 1-3).

[00084] В некоторых вариантах осуществления предложены композиции (например, составы, содержащие гистидин и/или сахарозу, как описано в настоящем документе), которые содержат множество различных комплексов. В некоторых вариантах осуществления множество различных комплексов содержит общее направляющее средство (например, антитело) и общий олигонуклеотид (например, РМО). В таких вариантах

осуществления различные типы комплексов характеризуются наличием разного количества олигонуклеотидов, ковалентно связанных с антителом. Например, в некоторых вариантах осуществления предложены композиции, которые содержат множество типов комплексов, в которых каждый тип комплекса содержит структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в котором каждый R^1 независимо содержит соединение, включающее олигонуклеотид (например, РМО), и R^2 содержит антитело (например, антитело против TfR1), и в котором, в каждом типе комплекса, $n1$ независимо является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 в каждом комплексе данного типа, и в котором различные типы комплексов в композиции характеризуются различными значениями $n1$ (например, значениями $n1$ в диапазоне 1-27, 1-26). В некоторых вариантах осуществления каждый различные типы комплексов в композиции имеют различные значения $n1$ в диапазоне 1-27, 1-26, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5 или 1-3. В некоторых вариантах осуществления, в комплексах композиции, $n1$ независимо является целым числом. В некоторых вариантах осуществления среднее значение $n1$ комплексов в композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5 или 1,8-2,2). В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, содержат комплексы, в которых $n1$ равно 0.

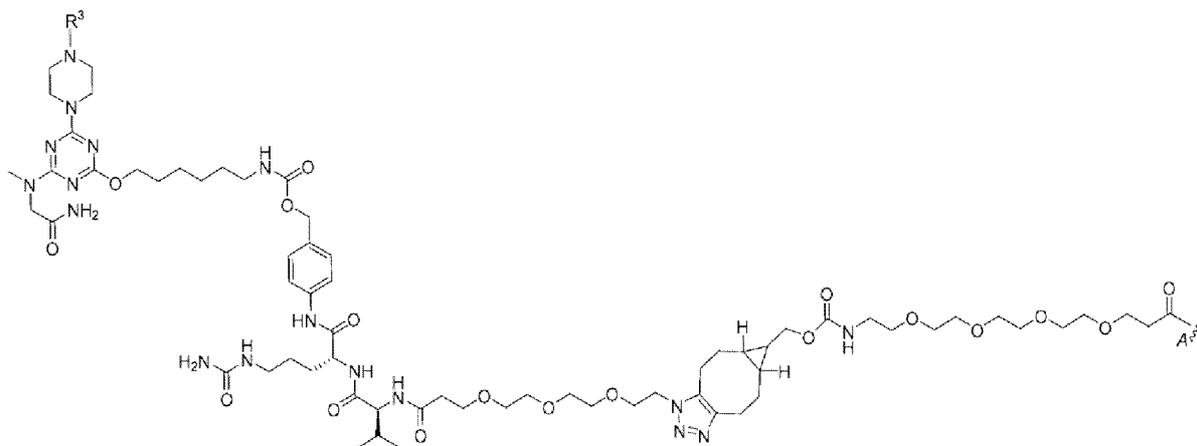
[00085] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены композиции (например, составы, содержащие гистидин и/или сахарозу, как описано в настоящем документе), которые содержат неконъюгированное антитело (например, в следовых количествах) и антитело, конъюгированное с одним или больше олигонуклеотидами. При использовании в настоящем документе "неконъюгированное антитело" относится к антителу, которое не конъюгировано с олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления неконъюгированное антитело может быть указано как соединение, включающее структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой $n1$ равно нулю. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложены композиции (например, составы, как описано в настоящем документе), которые содержат соединения (например, комплексы), содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой каждый R^1 независимо содержит группу, содержащую олигонуклеотид, R^2 содержит антитело, и $n1$ является целым числом от нуля или больше, которое отражает количество групп R^1 в комплексе. В некоторых вариантах осуществления $n1$ независимо является целым числом от нуля или больше, которое отражает количество групп R^1 в каждом соединении (например, комплексе). В некоторых вариантах осуществления часть соединений, содержащих структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в композиции, в которой $n1$ равно нулю, по сравнению со всеми соединениями такой структуры в композиции, в которой $n1$ равно одному или больше, составляет меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,5%,

меньше 0,1%, меньше 0,05% или меньше 0,01%. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления среднее значение n_1 комплексов в композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5, или 1,8-2,2).

[00086] В некоторых вариантах осуществления в каждом случае R^1 в комплексе конъюгирован с разными аминокислотными остатками антитела. В некоторых вариантах осуществления каждая группа R^1 в комплексе ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком антитела. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, с которой ковалентно связан R^1 , содержит ϵ -аминогруппу (например, лизина, аргинина). В некоторых вариантах осуществления каждая отдельная аминокислота содержит ϵ -аминогруппу (например, лизина, аргинина). Однако в некоторых вариантах осуществления, аминокислота, с которой ковалентно связан R^1 , является цистеином. В некоторых вариантах осуществления каждая отдельная аминокислота, с которой ковалентно связан R^1 , является цистеином. В некоторых вариантах осуществления R^1 непосредственно ковалентно связан с аминокислотным остатком антитела. Однако в некоторых вариантах осуществления R^1 ковалентно связан с аминокислотой антитела опосредованно, например, ковалентно связан с сайтом гликозилирования на аминокислоте.

[00087] В некоторых вариантах осуществления R^1 не связан ковалентно с аминокислотным остатком, присутствующим в CDR-области антитела.

[00088] В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе (например, в композициях или составах, описанных в настоящем документе), содержат структуру формулы (I): $[R^1]_{n_1}-R^2$, в которой R^1 в каждом случае независимо содержит группу формулы (Ia):



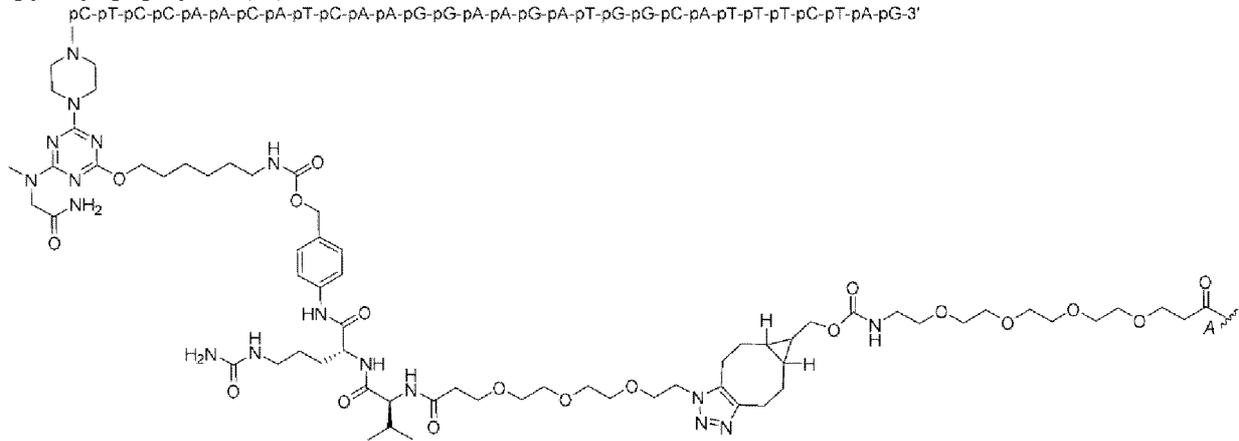
(Ia),

в которой R^3 содержит олигонуклеотид, например, фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО); и R^1 ковалентно связан (например, опосредованно или непосредственно связан, например, непосредственно связан) с R^2 в точке присоединения A .

В некоторых вариантах осуществления в каждом комплексе $n1$ независимо представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество групп R^1 в каждом комплексе. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или включающее определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или включающее вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или включающее VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R^3 содержит олигонуклеотид, например, фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (PMO), содержащий последовательность оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит Fab, и каждый R^1 ковалентно связан в точке присоединения с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин. В некоторых

вариантах осуществления в каждом комплексе $n1$ независимо является целым числом (например, целым числом в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3).

[00089] В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе (например, в композициях или составах, описанных в настоящем документе), содержат структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой каждый R^1 содержит группу формулы (Ib):



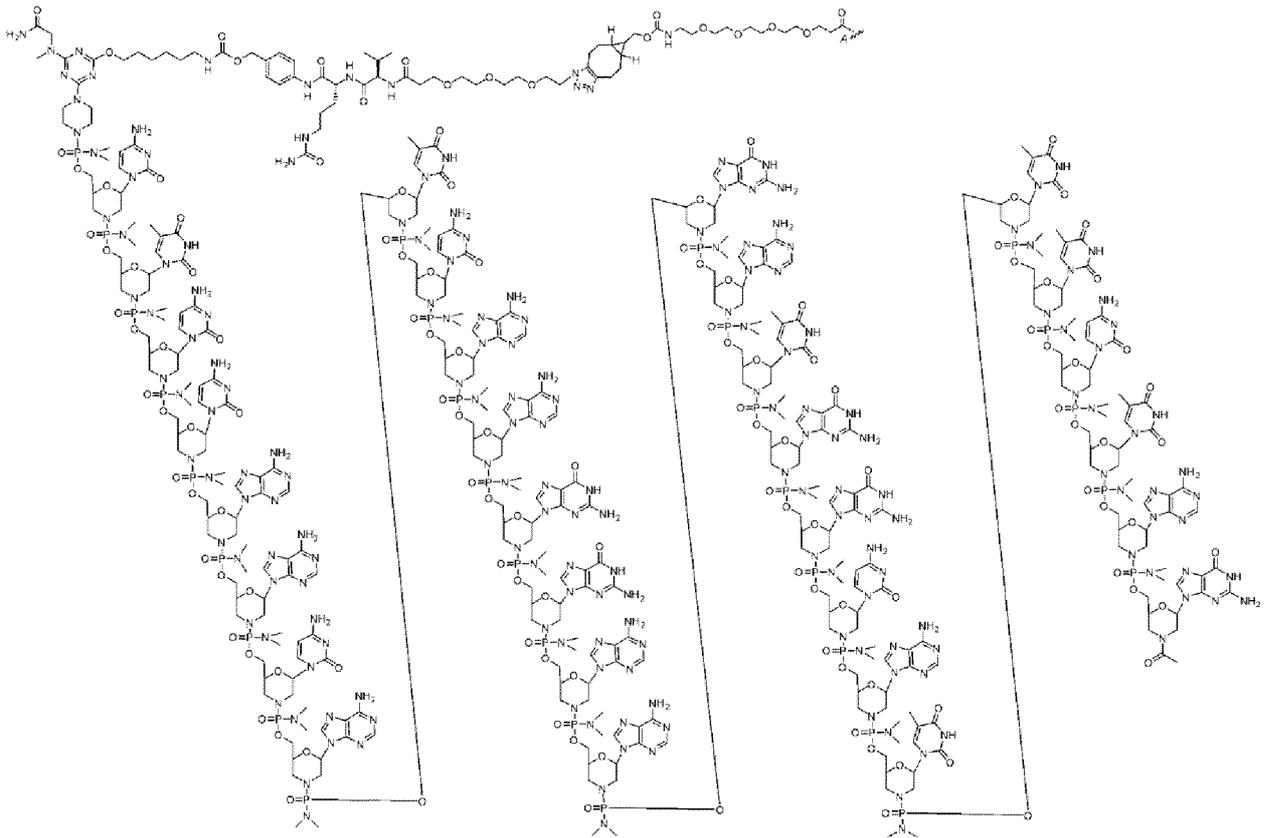
(Ib),

в которой -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO); R^1 ковалентно связан (например, опосредованно или непосредственно связан, например, непосредственно связан) с R^2 в точке присоединения A, где -p обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом PMO содержит последовательность оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления в каждом комплексе $n1$ независимо представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество групп R^1 в каждом комплексе, и каждый R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или включающее определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее переменную область

тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или включающее переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или включающее VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[00090] В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления в каждом комплексе n1 независимо является целым числом (например, целым числом в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3). В некоторых вариантах осуществления R² содержит Fab, и каждый R¹ ковалентно связан в точке присоединения с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

[00091] В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе (например, в композициях или составах, описанных в настоящем документе), содержат структуру формулы (I): [R¹]_{n1}-R², в которой каждый R¹ содержит группу формулы (Ic):

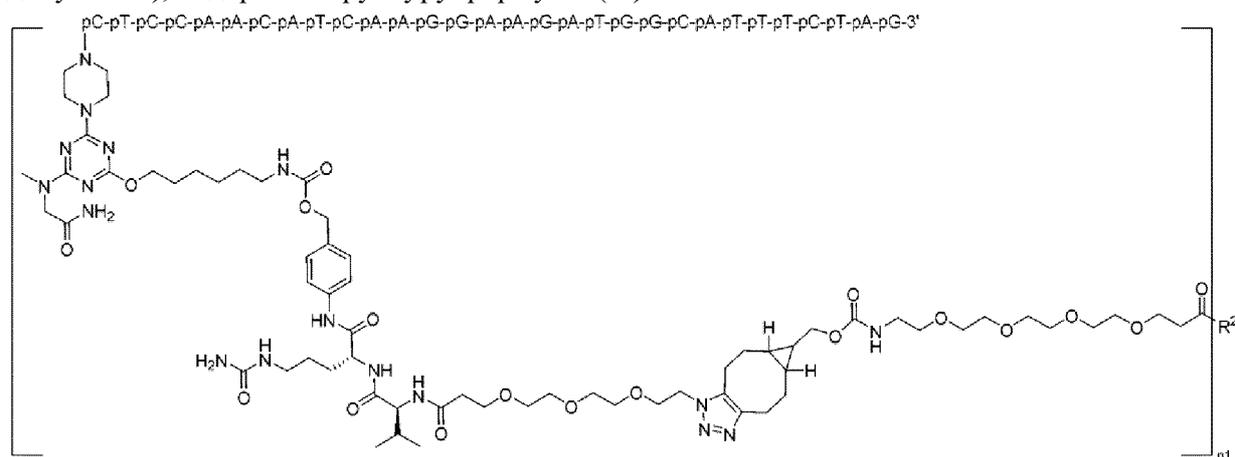


(Ic),

где R^1 ковалентно связан (например, опосредованно или непосредственно связан, например, непосредственно связан) с R^2 в точке присоединения A . В некоторых вариантах осуществления в каждом комплексе $n1$ независимо представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество групп R^1 в каждом комплексе, где каждый R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A . В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее определяющую комплементарную область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарную область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарную область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или включающее определяющую комплементарную область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарную область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарную область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или

включающее переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 и/или включающее VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19 и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления в каждом комплексе n1 независимо является целым числом (например, целым числом в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3). В некоторых вариантах осуществления R² содержит Fab, и каждый R¹ ковалентно связан в точке присоединения с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

[00092] В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе (например, в композициях или составах, описанных в настоящем документе), содержат структуру формулы (Id):



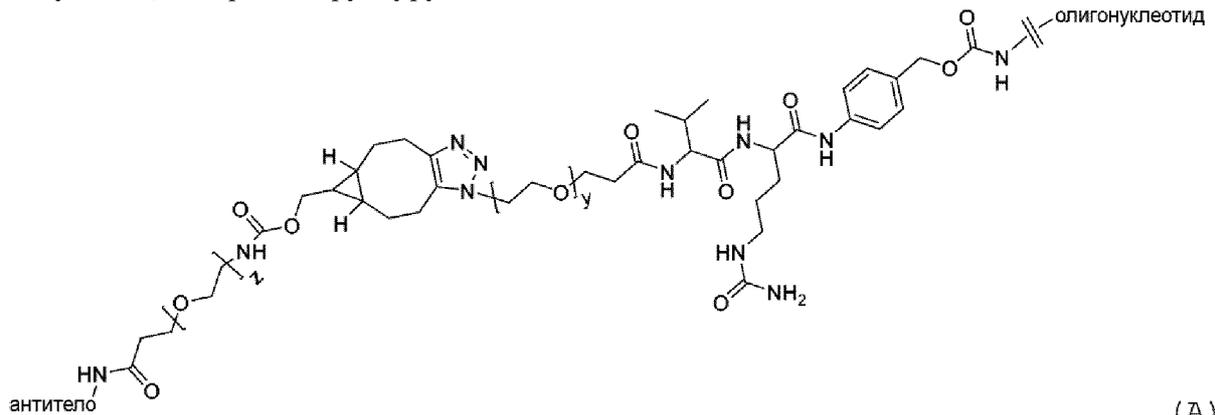
(Id),

в которой -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO); где -р обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом PMO содержит последовательность оснований CTCGAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO: 21); где R² содержит

антитело, включающее последовательность, представленную в Таблице 2; где в каждом комплексе $n1$ независимо представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество групп, заключенных в квадратные скобки, где каждая группа, заключенная в квадратные скобки, ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком антитела (например, Fab), где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело (например, Fab), включающее определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или включающее определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело (например, Fab), включающее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или включающее переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело (например, Fab), включающее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или включающее VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело (например, Fab), включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело (например, Fab), включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления в каждом комплексе $n1$ независимо является целым числом (например, целым числом в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3). В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело (например, Fab), который ковалентно связан через отдельный аминокислотный остаток антитела (например, Fab), где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

[00093] В некоторых вариантах осуществления комплексы, описанные в настоящем

документе, содержат структуру:



где y равно 0-15 (например, 3), и z равно 0-15 (например, 4). В некоторых вариантах осуществления антитело является антителом против TfR1 (например, антителом против TfR1, представленным в Таблице 2). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой РМО и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в структуре (A), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, такого как эpsilon-амин лизина. В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, содержит Fab против TfR1, ковалентно связанный через лизин Fab с 5'-концом РМО. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или содержит определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv.

Антитела

[00094] В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, содержат антитело, которое связывает рецептор трансферрина 1 человека (TfR1). Пример аминокислотной последовательности трансферринового рецептора 1 человека, соответствующей последовательности NCBI NP_003225.2 (изоформы 1 белка трансферринового рецептора 1, *Homo sapiens*), является следующим:

MMDQARSASFNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA VDEEENADNNTK
ANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGE
DFPAARRLYWDDLKRKLEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF
REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
LVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
NAELSFHGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGD
CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQRDA
WGPAAKSGVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEG
YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNW
ASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR
AAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSAR
GDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFVWGS
GSHTLPALLENLKLKRNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
(SEQ ID NO: 35).

[00095] В Таблице 2 представлены примеры последовательностей антител против TfR1, которые могут применяться в комплексах, предложенных в настоящем документе.

Таблица 2. Примеры последовательностей антител против TfR1

антитело	IMGT	Кабат	Чотиа
CDR-H1	GYSITSGYY (SEQ ID NO: 1)	SGYYWN (SEQ ID NO: 7)	GYSITSGY (SEQ ID NO: 12)
CDR-H2	ITFDGAN (SEQ ID NO: 2)	YITFDGANNYNPSLKN (SEQ ID NO: 8)	FDG (SEQ ID NO: 13)
CDR-H3	TRSSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 3)	SSYDYDVLDY (SEQ ID NO: 9)	SYDYDVLD (SEQ ID NO: 14)
CDR-L1	QDISNF (SEQ ID NO: 4)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO: 10)	SQDISNF (SEQ ID NO: 15)
CDR-L2	YTS (SEQ ID NO: 5)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 11)	YTS (SEQ ID NO: 5)

CDR-L3	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 6)	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 6)	GHTLPY (SEQ ID NO: 16)
VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYI TFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYD VLDYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNHWYQQKPGQPVKLLIYYTSR LHSGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFGQGTKLEI K (SEQ ID NO: 18)		
Fab HC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGYI TFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTATYYCTRSSYD VLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 19)		
Fab LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNHWYQQKPGQPVKLLIYYTSR LHSGVPSRFRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQGHTLPYTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 20)		

[00096] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1) SEQ ID NO: 1 (согласно системе определения IMGT), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) SEQ ID NO: 2 (согласно системе определения IMGT), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3) SEQ ID NO: 3 (согласно системе определения IMGT), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1) SEQ ID NO: 4 (согласно системе определения IMGT), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) SEQ ID NO: 5 (согласно системе определения IMGT) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) SEQ ID NO: 6 (согласно системе определения IMGT).

[00097] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1) SEQ ID NO: 7 (согласно системе определения Кабата), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) SEQ ID NO: 8 (согласно системе определения Кабата), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3) SEQ ID NO: 9 (согласно системе определения Кабата), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1) SEQ ID NO: 10 (согласно системе определения Кабата), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) SEQ ID NO: 11 (согласно системе определения Кабата) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) SEQ ID NO: 6 (согласно системе определения Кабата).

[00098] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1) SEQ ID NO: 12 (согласно системе определения Чотиа), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2) SEQ ID NO: 13 (согласно системе определения Чотиа), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3)

SEQ ID NO: 14 (согласно системе определения Чотиа), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1) SEQ ID NO: 15 (согласно системе определения Чотиа), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2) SEQ ID NO: 5 (согласно системе определения Чотиа) и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) SEQ ID NO: 16 (согласно системе определения Чотиа).

[00099] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую не больше 25 вариаций аминокислот (например, не больше 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 вариации аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VH, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую не больше 25 вариаций аминокислот (например, не больше 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 вариации аминокислоты) в каркасных областях по сравнению с VL, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[000100] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентична в каркасных областях VH, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), в некоторых вариантах осуществления, антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентична в каркасных областях VL, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[000101] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), в некоторых вариантах осуществления, антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[000102] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения представляет собой Fab, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75%

(например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения представляет собой Fab, содержащий легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

[000103] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения представляет собой Fab, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения представляет собой Fab, содержащий легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[000104] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, предложенное в настоящем документе, может иметь одну или больше посттрансляционных модификаций. В некоторых вариантах осуществления N-концевая циклизация, также называемая образованием пироглутамата (пиро-Glu), может присутствовать в антителе на N-концевых остатках глутамата (Glu) и/или глутамина (Gln) в процессе производства. Фактически, нужно понимать, что антитело, указанное как имеющее последовательность, содержащую N-концевой остаток глутамата или глутамина, охватывает антитела, которые подвергнуты образованию пироглутамата в результате посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах осуществления образование пироглутамата происходит в последовательности тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления образование пироглутамата происходит в последовательности легкой цепи.

Олигонуклеотиды

[000105] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид комплексов, описанных в настоящем документе, является одноцепочечным олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), направленно взаимодействует с аллелем *DMD* (например, мутантным аллелем *DMD*). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), направленно взаимодействует с областью РНК *DMD* (например, транскрипта Dp427m SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), содержит область комплементарности с РНК *DMD* (например, транскриптом Dp427m SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах

осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), содержит область комплементарности с экзоном (например, экзонами 8, 23, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53 или 55) или интроном РНК *DMD*. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), направленно взаимодействует с донорным сайтом сплайсинга, акцепторным сайтом сплайсинга, точкой ветвления или экзонным энхансером сплайсинга (ESE) в РНК *DMD* (например, пре-мРНК *DMD*, кодируемой геном *DMD Homo sapiens* (например, под номером доступа в NCBI NG_012232.1). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), направленно взаимодействует с последовательностью экзонного энхансера сплайсинга (ESE) в *DMD* (например, последовательностью ESE в экзоне 23, 44, 45, 46, 50, 51, 52, 53 или 55).

[000106] Примеры последовательностей РНК *DMD* и последовательностей экзонов, которые могут являться мишенью олигонуклеотида комплекса, представлены ниже.

[000107] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, мРНК (референсная последовательность NCBI: NM_004006.2) (SEQ ID NO: 23).

[000108] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 51 (положения нуклеотидов 7554-7786 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

СТССТАСТСАГАСТГТТАСТСТГГТГАСАСААССТГТГГТТАСТААГГАААСТ
GCCATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCA
GATTTCAACCGGGCTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATCAAGTT
ATAAAATCACAGAGGGTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCAT
CAAGCAGAAG (SEQ ID NO: 24)

[000109] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 8 (положения нуклеотидов 894-1075 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

ATGTTGATACCACSTATCCAGATAAGAAGTCCATCTTAATGTACATCACATCA
СТСТТССААГТТТТГССТСААСААГТГАГСАТТГААГССАТССАГГААГТГГАААТГ
ТТГССААГГССАСТАААГТГАСТАААГААГААСАТТТТСАГТТАСАТСАААТГ
САСТАТТСТСААСАГ (SEQ ID NO: 25)

[000110] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 23 (положения нуклеотидов 3194-3406 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GCTTTACAAAGTTCTCTGCAAGAGCAACAAAGTGGCCTATACTATCTCAGCA
ССАСТГТГАААГАГАТГТСГААГАААГСГСССТГГАААТТАГССГГАААТАТСАА
ТСАГААТТТГААГАААТТГАГГГАГСГТГГААГААГСТСТССТССАГСТГГТТГА
ГСАТТГТСААААГСТАГАГГАГСАААТГААТАААСТССГАААААТТСАГ (SEQ ID
NO: 26)

[000111] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 43

(положения нуклеотидов 6362-6534 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

AATATAAAAGATAGTCTACAACAAAGCTCAGGTCGGATTGACATTATTCATAGCAAGAAGACAGCAGCATTGCAAAGTGCAACGCCTGTGGAAAGGGTGAAGCTACAGGAAGCTCTCTCCCAGCTTGATTTCCAATGGGAAAAAGTTAACAAAATGTACAAGGACCGACAAGG (SEQ ID NO: 27)

[000112] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 44 (положения нуклеотидов 6535-6682 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GCGATTTGACAGATCTGTTGAGAAATGGCGGCGTTTTTCATTATGATATAAAGATATTTAATCAGTGGCTAACAGAAGCTGAACAGTTTTCTCAGAAAGACACAAATTCCTGAGAATTGGGAACATGCTAAATACAAATGGTATCTTAAG (SEQ ID NO: 28)

[000113] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 45 (положения нуклеотидов 6683-6858 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GAACTCCAGGATGGCATTGGGCAGCGGCAAACCTGTTGTCAGAACATTGAATGCAACTGGGGAAGAAATAATTCAGCAATCCTCAAAAACAGATGCCAGTATTCTACAGGAAAAATTGGGAAGCCTGAATCTGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAAACAGCTGTCAGACAGAAAAAAGAG (SEQ ID NO: 36)

[000114] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 46 (положения нуклеотидов 6859-7006 в референсной Последовательности NCBI: NM_004006.2)

gctagaagaacaaaagaatatctgtcagaatttcaagagatttaaatgaattgtttatggttgagggaagcagataacattgctagtatcccactgaaactggaaaagagcagcaactaaaagaaaagcttgagcaagtcaag (SEQ ID NO: 29)

[000115] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 50 (положения нуклеотидов 7445-7553 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

AGGAAGTTAGAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTACTTCAAGAGCTGAGGGCAAAGCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCC T (SEQ ID NO: 30)

[000116] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 51 (положения нуклеотидов 7554-7786 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

CTCCTACTCAGACTGTACTCTGGTGACACAACCTGTGGTTACTAAGGAAACTGCCATCTCCAAACTAGAAATGCCATCTTCCTTGATGTTGGAGGTACCTGCTCTGGCAGATTTCAACCGGGCTTGGACAGAACTTACCGACTGGCTTTCTCTGCTTGATCAAGTTATAAAATCACAGAGGGTGATGGTGGGTGACCTTGAGGATATCAACGAGATGATCATCAAGCAGAAG (SEQ ID NO: 31)

[000117] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 52 (положения нуклеотидов 7787-7904 в референсной последовательности NCBI:

NM_004006.2)

GCAACAATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCCCCAGTTGGAAGAACTCATTA
CCGCTGCCCAAATTTGAAAAACAAGACCAGCAATCAAGAGGCTAGAACAATCATT
ACGGATCGAA (SEQ ID NO: 32)

[000118] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 53 (положения нуклеотидов 7905-8116 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

TTGAAAGAATTCAGAATCAGTGGGATGAAGTACAAGAACACCTTCAGAACCG
GAGGCAACAGTTGAATGAAATGTTAAAGGATTCAACACAATGGCTGGAAGCTAAGG
AAGAAGCTGAGCAGGTCTTAGGACAGGCCAGAGCCAAGCTTGAGTCATGGAAGGA
GGGTCCSTATACAGTAGATGCAATCCAAAAGAAAATCACAGAAACCAAG (SEQ ID
NO: 33)

[000119] Дистрофин *Homo sapiens (DMD)*, вариант транскрипта Dp427m, экзон 55 (положения нуклеотидов 8272-8461 в референсной последовательности NCBI: NM_004006.2)

GGTGAGTGAGCGAGAGGCTGCTTTGGAAGAACTCATAGATTACTGCAACAG
TTCCCCCTGGACCTGGAAAAGTTTCTTGCCTGGCTTACAGAAGCTGAAACAACCTGCC
AATGTCCTACAGGATGCTACCCGTAAGGAAAGGCTCCTAGAAGACTCCAAGGGAGT
AAAAGAGCTGATGAAACAATGGCAA (SEQ ID NO: 34)

[000120] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), имеет длину 15-40 (например, 15-40, 15-35, 15-30, 15-25, 15-20, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 25-40, 25-35, 25-30, 25-28, 28-30, 30-40, 30-32, 32-35, 30-35 или 35-40) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), имеет длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов, необязательно 20-35 или 30 нуклеотидов.

[000121] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), содержит область комплементарности длиной по меньшей мере 8 (например, по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) последовательных нуклеотидов с РНК *DMD*. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), содержит область комплементарности длиной по меньшей мере 8 (например, по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) последовательных нуклеотидов с экзоном РНК *DMD*.

[000122] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), содержит область комплементарности длиной по меньшей мере 8 (например, по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) последовательных нуклеотидов с последовательностью *DMD*, как указано в любой из SEQ ID NO: 23-34.

[000123] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), содержит область комплементарности длиной по меньшей мере 8 (например, по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) последовательных нуклеотидов с последовательностью-мишенью, представленной в SEQ ID NO: 22 (CTAGAAATGCCATCTTCSTTGATGTTGGAG). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), содержит по меньшей мере 8 (например, по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) последовательных нуклеотидов последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG).

[000124] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который может применяться для таргетинга *DMD* (например, для пропуска экзона), содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления любой из олигонуклеотидов, предложенных в настоящем документе, представляет собой РМО.

[000125] В некоторых вариантах осуществления следует понимать, что метилирование нуклеинового основания урацила в положении C5 приводит к образованию тимина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нуклеотид или нуклеозид, имеющий C5-метилованный урацил (или 5-метилурацил), может быть эквивалентно идентифицирован как тиминный нуклеотид или нуклеозид.

[000126] В некоторых вариантах осуществления любое одно или больше тиминовых оснований (Т) в любом из олигонуклеотидов, предложенных в настоящем документе (например, олигонуклеотида, представленного в SEQ ID NO: 21), независимо и необязательно могут быть урациловыми основаниями (U), и/или любой один или больше U в олигонуклеотидах, предложенных в настоящем документе, независимо и необязательно может быть Т.

Композиции

[000127] В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, содержат комплексы (т.е. множество комплексов), каждый из которых содержит антитело (например, антитело против TFR1), ковалентно связанное с одним или больше олигонуклеотидами (например, олигонуклеотидом, описанным в настоящем документе), где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело в таких комплексах содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, как указано в Таблице 2. Комплексы композиции, описанной в настоящем документе, могут включать любую структуру, представленную в настоящем документе, например, структуру формулы (I) (например, содержащую группу формулы (Ia), формулы (Ib), формулы (Ic) или формулы (Id)) или

формулы (A).

[000128] В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, содержат комплексы (т.е. множество комплексов), где каждый комплекс содержит структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой каждый R^1 независимо содержит соединение, включающее олигонуклеотид (например, олигонуклеотид, описанный в настоящем документе), и ковалентно связан с R^2 , где R^2 содержит антитело (например, антитело против TfR1), включающее тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления каждый R^1 комплекса независимо ковалентно связан с разными аминокислотными остатками (например, лизином или цистеином) в R^2 .

[000129] В некоторых вариантах осуществления значение $n1$ комплексов в композиции независимо и необязательно представляет собой целое число от одного до количества аминокислотных остатков, с которыми конъюгирование предпочтительно или намечено (например, количества остатков лизина) в антителе (например, антителе, содержащемся в R^2). В некоторых вариантах осуществления значение $n1$ каждого комплекса в композиции независимо и необязательно выбрано из 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 и 27. В некоторых вариантах осуществления значение $n1$ каждого комплекса в композиции независимо и необязательно выбрано из 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 и 26. В некоторых вариантах осуществления значение $n1$ каждого комплекса в композиции независимо и необязательно выбрано из целого числа в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3. В некоторых вариантах осуществления среднее значение $n1$ комплексов композиции находится в диапазоне 1-2, 1-3, 1-5, 1-10, 1-26 или 1-27. В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в настоящем документе, содержат комплексы, в которых значение $n1$ равно 0. В некоторых вариантах осуществления среднее значение $n1$ комплексов композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5 или 1,8-2,2).

[000130] В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем документе, содержит антитело, не конъюгированное с олигонуклеотидом (например, в следовых количествах), и антитело, конъюгированное с одним или больше олигонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления антитело, не конъюгированное с олигонуклеотидом, может быть указано как соединение, включающее структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой $n1$ равно нулю. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиция для введения субъекту в способах, описанных в настоящем документе, содержит соединения (например, комплексы), содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой каждый R^1 независимо содержит группу, содержащую

олигонуклеотид, R^2 содержит антитело, и $n1$ независимо является целым числом от нуля или больше, которое отражает количество случаев R^1 в каждом соединении (например, комплексе). В некоторых вариантах осуществления часть соединений, содержащих структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в композиции, в которых $n1$ равно нулю, по сравнению со всеми соединениями такой структуры в композиции, в которых $n1$ равно одному или больше, составляет меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,5%, меньше 0,1%, меньше 0,05% или меньше 0,01%. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления среднее значение $n1$ комплексов в композиции, раскрытой в настоящем документе, находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5, или 1,8-2,2).

Составы

[000131] Комплексы, предложенные в настоящем документе, изготавливают способом, подходящим для фармацевтического применения. В некоторых вариантах осуществления комплексы могут быть доставлены субъекту с использованием состава, который сводит к минимуму разложение, облегчает доставку и/или (например, и) всасывание, или придает другое полезное свойство комплексам в составе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления было обнаружено, что включение комплексов (например, комплексов, содержащих РМО, ковалентно связанный с Fab) в составы с гистидином и/или сахарозой особенно выгодно для фармацевтического применения, например, как описано в настоящем документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены составы (например, водные растворы, лиофилизированные формы), содержащие комплексы вместе с гистидином и/или сахарозой. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены составы, содержащие комплексы вместе с гистидином и/или сахарозой в замороженных формах. В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в настоящем документе, содержат комплексы (например, множество комплексов, содержащих РМО, ковалентно связанных с Fab), гистидин и сахарозу. В некоторых вариантах осуществления составы, содержащие нацеленные на мышцы комплексы (например, комплексы, содержащие РМО, ковалентно связанный с Fab), содержат с гистидином и/или сахарозой в водные растворы. В некоторых вариантах осуществления состав, содержащий множество комплексов, гистидин и сахарозу, может быть лиофилизирован (например, для хранения). В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав могут восстанавливать (например, водой) для введения субъекту. Такие составы могут быть соответствующим образом приготовлены так, что при введении субъекту или в непосредственное окружение клетки-мишени, или системно, достаточное количество комплексов проникает в мышечные клетки-мишени.

[000132] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе

предложены составы, которые содержат комплексы (т.е. множество комплексов), каждый из которых содержит фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО), ковалентно связанный с антителом. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен состав, содержащий комплексы, каждый из которых содержит фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО), ковалентно связанный с антителом против Tfr1, где антитело в таких комплексах необязательно содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в Таблице 2, а также, в некоторых вариантах осуществления, где комплексы включены в состав с гистидином (например, L-гистидином) и сахарозой. В некоторых вариантах осуществления антитело является антителом против Tfr1.

[000133] В некоторых вариантах осуществления предложены составы, которые содержат комплексы формулы: $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой каждый R^1 независимо содержит соединение, включающее олигонуклеотид (например, РМО), и R^2 содержит антитело (например, антитело против Tfr1), и в которой $n1$ является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 в комплексе. В некоторых вариантах осуществления предложены составы, которые содержат множество комплексов, где каждый комплекс содержит структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой каждый R^1 независимо содержит соединение, включающее олигонуклеотид (например, РМО), и R^2 содержит антитело (например, антитело против Tfr1), и в которой, в каждом комплексе, $n1$ независимо является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 в каждом комплексе.

[000134] В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в настоящем документе, содержат комплексы, содержащие антитело, включающее CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Fab и содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[000135] В некоторых вариантах осуществления значение $n1$ каждого комплекса в составе независимо и необязательно является целым числом от одного до количества аминокислотных остатков, с которыми конъюгирование предпочтительно или намечено (например, количества остатков лизина), в антителе $(R)^2$. В некоторых вариантах осуществления значение $n1$ каждого комплекса в составе независимо и необязательно выбрано из 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 и 27. В некоторых вариантах осуществления значение $n1$ каждого комплекса в составе независимо и необязательно выбрано из 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 и 26. В некоторых вариантах осуществления значение $n1$ каждого комплекса в составе независимо и необязательно выбрано из целого числа в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3. В некоторых вариантах осуществления среднее значение $n1$

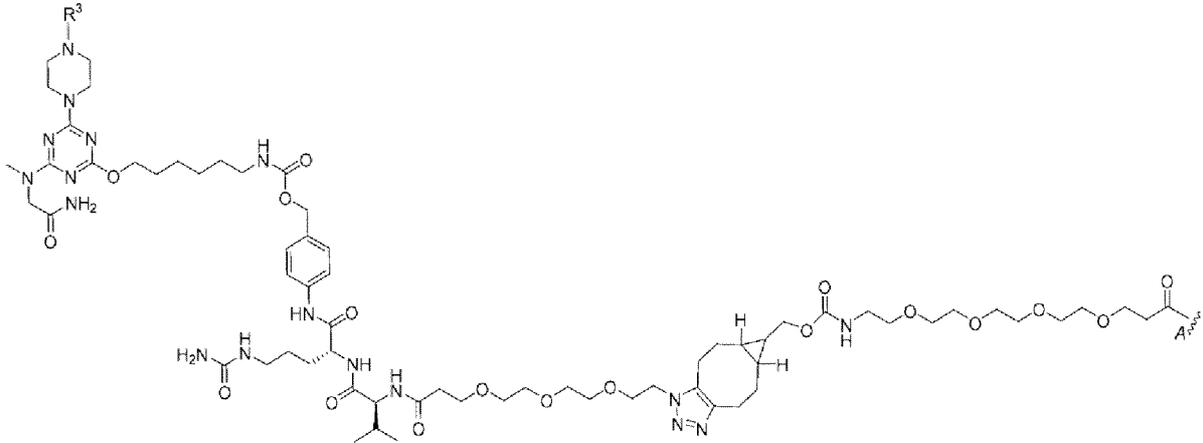
комплексов составы находится в диапазоне 1-3, 1-5, 1-10, 1-26 или 1-27.

[000136] В некоторых вариантах осуществления состав, описанный в настоящем документе, содержит антитело, не конъюгированное с олигонуклеотидом (например, в следовых количествах), и антитело, конъюгированное с одним или больше олигонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления антитело, не конъюгированное с олигонуклеотидом, может быть указано как соединение, включающее структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой $n1$ равно нулю. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложены составы, которые содержат соединения (например, комплексы), содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой каждый R^1 независимо содержит группу, содержащую олигонуклеотид, R^2 содержит антитело, и $n1$ независимо является целым числом от нуля или больше, которое отражает количество случаев R^1 в каждом соединении (например, комплексе). В некоторых вариантах осуществления часть соединений, содержащих структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в составе, в которых $n1$ равно нулю, по сравнению со всеми соединениями такой структуры в составе, в которых $n1$ равно одному или больше, составляет меньше 10%, меньше 5%, меньше 1%, меньше 0,5%, меньше 0,1%, меньше 0,05% или меньше 0,01%. В некоторых вариантах осуществления среднее значение $n1$ комплексов в составе находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5 или 1,8-2,2).

[000137] В некоторых вариантах осуществления в каждом случае R^1 в комплексе в настоящем документе (например, комплексе состава, предложенного в настоящем документе) конъюгирован с отдельным аминокислотным остатком антитела. В некоторых вариантах осуществления каждая отдельная аминокислота содержит ϵ -аминогруппу (например, лизин, аргинин). Однако в некоторых вариантах осуществления каждая отдельная аминокислота, с которой ковалентно связан R^1 , является цистеином. В некоторых вариантах осуществления R^1 непосредственно ковалентно связан с аминокислотным остатком антитела. Однако в некоторых вариантах осуществления R^1 опосредованно ковалентно связан с аминокислотой антитела, например, ковалентно связан с сайтом гликозилирования на аминокислоте. В некоторых вариантах осуществления предложены составы, в которых комплексы, в которых R^1 ковалентно связан с аминокислотным остатком, присутствующим в CDR-области антитела, присутствуют только в следовых количествах, или в не поддающемся обнаружению количестве, или не присутствуют совсем. В некоторых вариантах осуществления предложены составы, в которых комплексы, в которых R^1 ковалентно связан с аминокислотным остатком, присутствующим в CDR-области антитела, не поддаются обнаружению в составе с помощью стандартных методов обнаружения.

[000138] В некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в

настоящем документе, содержат комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой в каждом случае R^1 в комплексе состава, предложенного в настоящем документе, независимо содержит группу формулы (Ia):

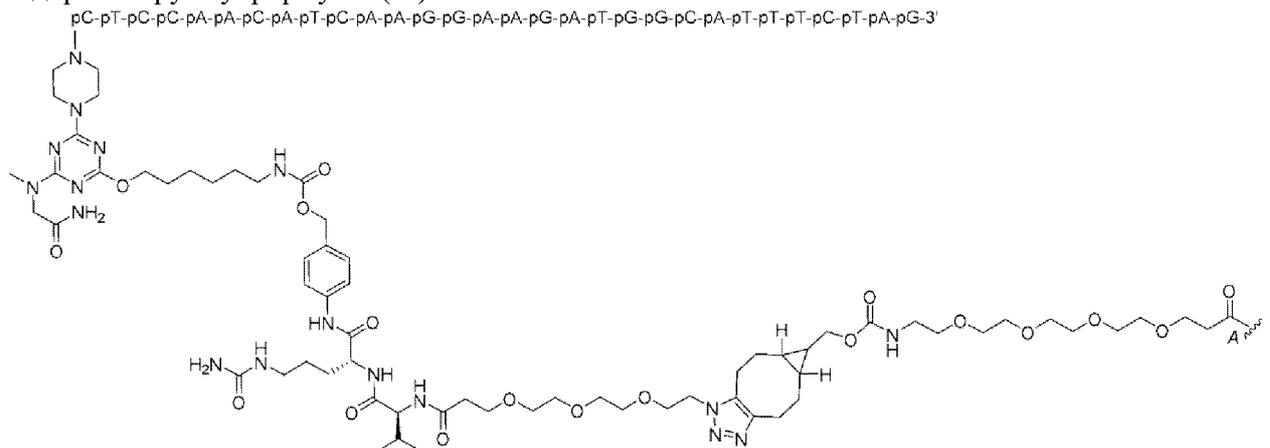


(Ia),

в которой R^3 содержит олигонуклеотид, например, фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (PMO); и R^1 ковалентно связан (например, опосредованно или непосредственно связан, например, непосредственно связан) с R^2 в точке присоединения A . В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, $n1$ независимо представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество групп R^1 в каждом комплексе. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или включающее определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или включающее варибельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или включающее VL, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, $F(ab')_2$ -фрагмент, scFv или Fv. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления R^3 содержит олигонуклеотид, например, фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (PMO), содержащий последовательность оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело Fab, и каждый R^1 ковалентно связан в точке присоединения с отдельным аминокислотным остатком антитела Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, $n1$ независимо является целым числом (например, целым числом в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3). В некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в настоящем документе, содержат комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, где $n1$ равно 0. В некоторых вариантах осуществления среднее значение $n1$ комплексов композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5 или 1,8-2,2).

[000139] В некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в настоящем документе, содержат комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой в каждом случае R^1 в комплексе состава, предложенного в настоящем документе, содержит группу формулы (Ib):

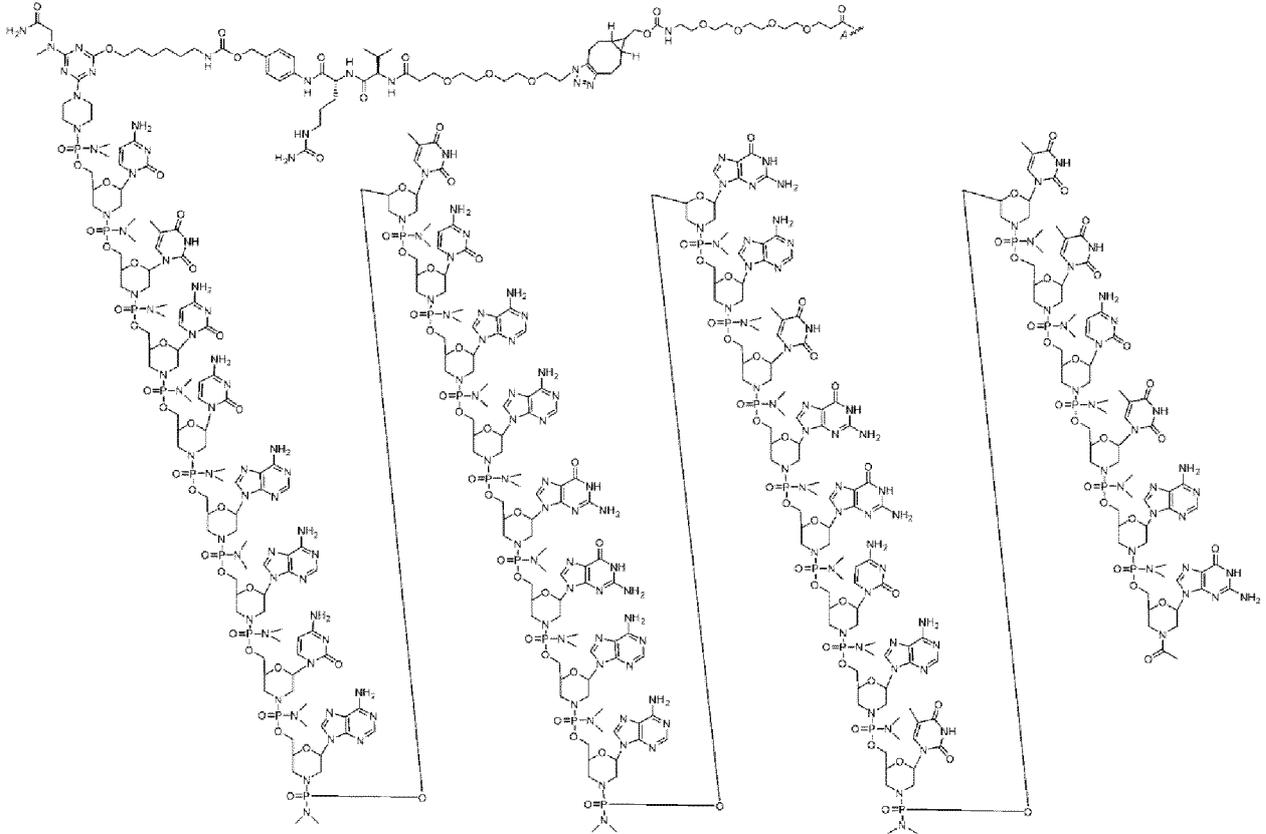


(Ib),

в которой -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO); R¹ ковалентно связан (например, опосредованно или непосредственно связан, например, непосредственно связан) с R² в точке присоединения A, где -р обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом PMO содержит последовательность оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, n1 независимо представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество случаев R¹ в каждом комплексе, и каждый R¹ ковалентно связан с R² в точке присоединения A. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее определяющую комплементарную область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарную область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарную область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или включающее определяющую комплементарную область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарную область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарную область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или включающее переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или включающее VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент,

полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, n1 независимо является целым числом (например, целым числом в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3). В некоторых вариантах осуществления R² содержит Fab, и каждый R¹ ковалентно связан в точке присоединения с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления предложенные в настоящем документе составы, содержат комплексы, содержащие структуру формулы (I): [R¹]_{n1}-R², где n1 равно 0. В некоторых вариантах осуществления среднее значение n1 комплексов композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5 или 1,8-2,2).

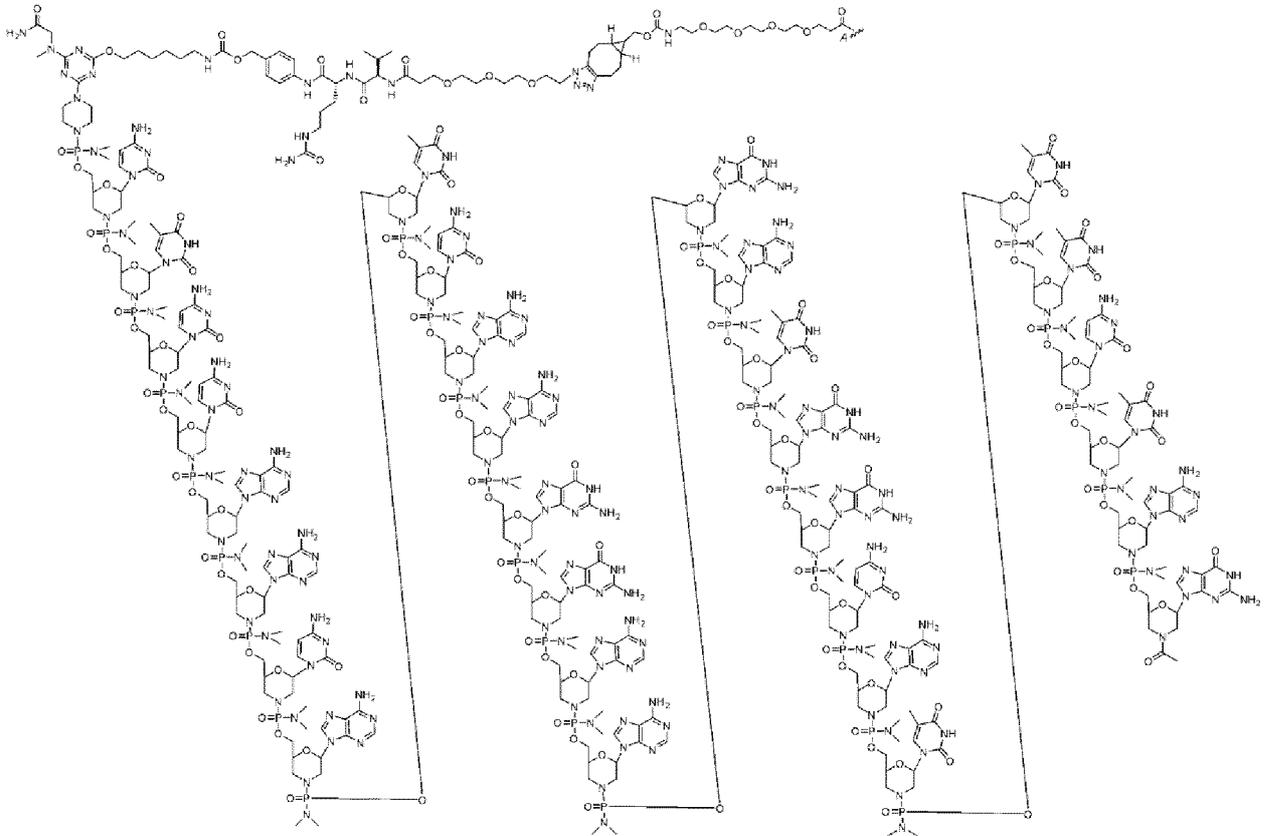
[000140] В некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в настоящем документе, содержат комплексы, содержащие структуру формулы (I): [R¹]_{n1}-R², в которой в каждом случае R¹ в комплексе состава, предложенного в настоящем документе, содержит группу формулы (Ic):



(Ic),

где R¹ ковалентно связан (например, опосредованно или непосредственно связан, например, непосредственно связан) с R² в точке присоединения A.

[000141] В некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в настоящем документе, содержат комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, в которой в каждом случае R^1 в комплексе состава, предложенного в настоящем документе, представляет собой:

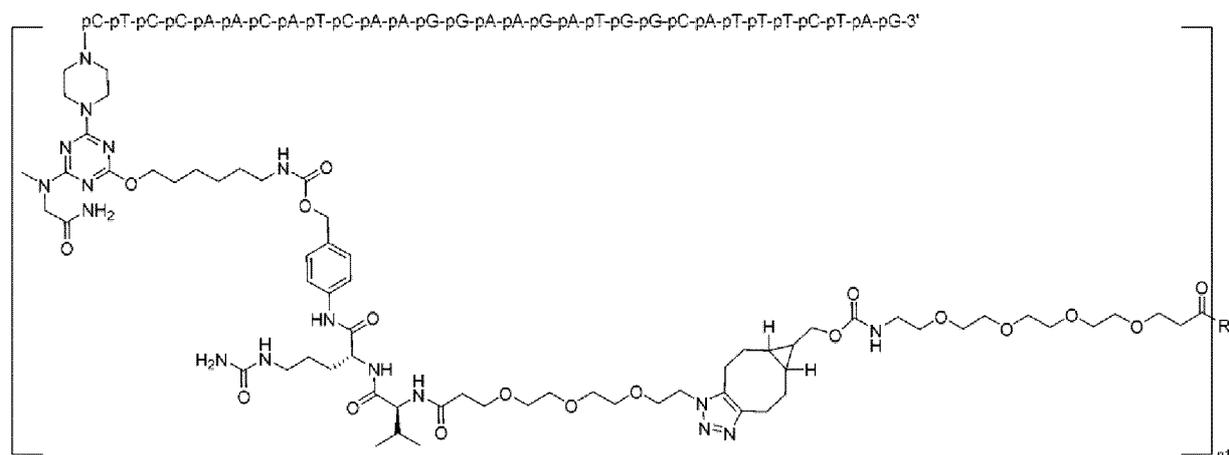


(Ic),

где R^1 ковалентно связан (например, опосредованно или непосредственно связан, например, непосредственно связан) с R^2 в точке присоединения A. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, $n1$ независимо представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество групп R^1 в каждом комплексе. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или включающее определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO:

6 или 16. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или включающее переменную область легкой цепи (VL) содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или включающее VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv. В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит антитело, которое представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, n1 независимо является целым числом (например, целым числом в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3). В некоторых вариантах осуществления R^2 содержит Fab, и каждый R^1 ковалентно связан в точке присоединения с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат комплексы, содержащие структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, где n1 равно 0. В некоторых вариантах осуществления среднее значение n1 комплексов композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5 или 1,8-2,2).

[000142] В некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в настоящем документе, содержат комплексы, содержащие структуру формулы (Id):

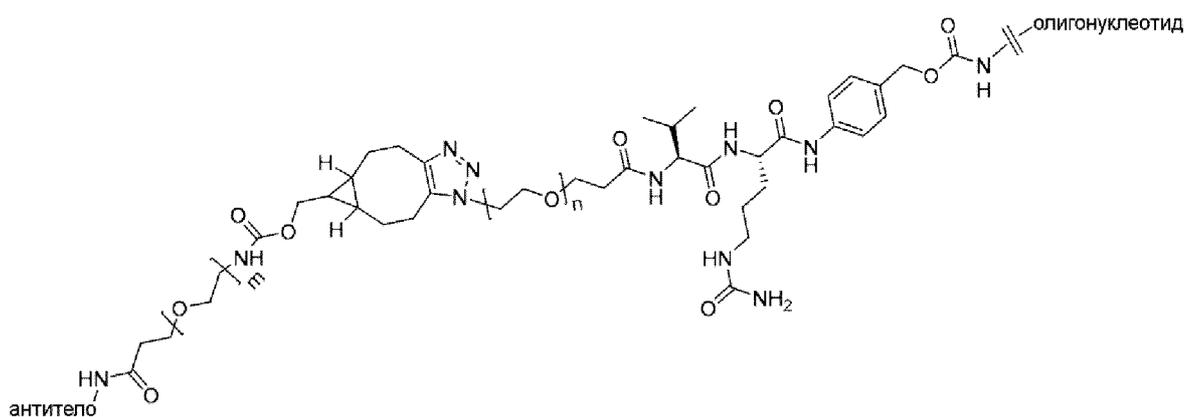


(Id),

в которой -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO); где -p обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом PMO содержит последовательность оснований СТССААСАТСААГГААГАТGGCАТТТСТАГ (SEQ ID NO: 21); где R² содержит антитело, включающее последовательность, представленную в Таблице 2; где в каждом комплексе n1 независимо представляет собой целое число (например, один или больше), обозначающее количество случаев группы, заключенной в квадратные скобки, где каждая группа, заключенная в квадратные скобки, ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком антитела (например, Fab), где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело (например, Fab), включающее определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или включающее определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело (например, Fab), включающее варибельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или включающее варибельную область легкой цепи (VL) содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело

(например, Fab), включающее VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или включающее VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело (например, Fab), включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело (например, Fab), включающее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или включающее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления, в каждом комплексе, n1 независимо является целым числом (например, целым числом в диапазоне 1-27, 1-26, 1-10, 1-5 или 1-3). В некоторых вариантах осуществления R² содержит антитело (например, Fab), которое ковалентно связано через отдельный аминокислотный остаток антитела (например, Fab), где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин. В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат комплексы, в которых n1 равно 0. В некоторых вариантах осуществления среднее значение n1 комплексов композиции находится в диапазоне 1-5 (например, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-4, 3-5, 1-4,6, 1-4,5, 1-4,4, 1-4,3, 1-4,2, 1-3,5, 1-2,5, 1,1-5, 1,1-4,5, 1,1-4, 1,1-3,5, 1,1-3, 1,1-2,5, 1,1-2,2, 1,2-5, 1,2-4,5, 1,2-4, 1,2-3,5, 1,2-3, 1,2-2,5, 1,2-2,2, 1,3-5, 1,3-4,5, 1,3-4, 1,3-3,5, 1,3-3, 1,3-2,5, 1,3-2,2, 1,4-5, 1,4-4,5, 1,4-4, 1,4-3,5, 1,4-3, 1,4-2,5, 1,4-2,2, 1,5-5, 1,5-4,5, 1,5-4, 1,5-3,5, 1,5-3, 1,5-2,5, 1,5-2,2, 1,6-3, 1,6-2,5, 1,6-2,2, 1,7-3, 1,7-2,5, 1,7-2,2, 1,8-3, 1,8-2,5 или 1,8-2,2).

[000143] В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в составах, описанных в настоящем документе, содержат структуру формулы (A):



(A),

где y равно 0-15 (например, 3), а z равно 0-15 (например, 4). В некоторых вариантах осуществления антитело является антителом против TfR1 (например, антителом против TfR1, представленным в Таблице 2). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой РМО и содержит последовательность оснований SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления амид, показанный соединенным с

антителом против TfR1 в структуре (A), образуется в результате реакции с амином антитела, таким как эpsilon-амин лизина. В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, содержит Fab против TfR1, ковалентно связанный через лизин Fab с 5'-концом РМО. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, представленную в Таблице 2. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14; и/или содержит определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 17, и/или содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и/или содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 19, и/или содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 95%) идентичную SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и/или содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv.

[000144] В некоторых вариантах осуществления предложен состав, содержащий комплексы, описанные в настоящем документе, где концентрация комплексов в составе составляет 1-50 мг/мл комплекса, необязательно 10-50 мг/мл или 20-35 мг/мл (например, 1-10 мг/мл, 10-15 мг/мл, 15-20 мг/мл, 20-22 мг/мл, 22-24 мг/мл, 24-26 мг/мл, 24-25 мг/мл, 25-26 мг/мл, 22-25 мг/мл, 25-27 мг/мл, 27-29 мг/мл, 29-30 мг/мл, 25-30 мг/мл, 29-31 мг/мл, 30-31 мг/мл, 31-32 мг/мл, 30-32 мг/мл, 32-33 мг/мл, 32-35 мг/мл, 30-35 мг/мл, 35-40 мг/мл, 40-45 мг/мл, 45-50 мг/мл), необязательно приблизительно 25 мг/мл (например, 25 мг/мл) или

приблизительно 30 мг/мл (например, 30 мг/мл).

[000145] В некоторых вариантах осуществления любой один или множество комплексов, описанных в настоящем документе, содержат в составы с гистидином (например, L-гистидином) и сахарозой в лиофилизированной форме (например, лиофилизированный порошок).

[000146] В некоторых вариантах осуществления любой один или множество комплексов, описанных в настоящем документе, содержат в составы с гистидином (например, L-гистидином) и сахарозой в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления гистидин (например, L-гистидин) присутствует в водном растворе в концентрации в диапазоне 10-50 мМ, 10-20 мМ, от 20 мМ до 30 мМ или от 20 мМ до 40 мМ, например, 20-22 мМ, 22-24 мМ, 24-25 мМ, 25-26 мМ, 24-26 мМ, 26-27 мМ, 24-27 мМ, 27-28 мМ, 28-29 мМ, 29-30 мМ, 27-30 мМ, приблизительно 22-27 мМ, приблизительно 23-26 мМ, приблизительно 24-26 мМ, приблизительно 26-28 мМ, приблизительно 28-30 мМ, приблизительно 30-32 мМ, приблизительно 32-35 мМ, приблизительно 35-40 мМ, 40-45 мМ, 45-50 мМ, приблизительно 25 мМ или, необязательно, 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления сахароза присутствует в водном растворе в концентрации в диапазоне от 5% до 15% по массе на объем (масс/об %), например, 8-15 масс/об %, 9-15 масс/об %, 9-11 масс/об %, 9,5-11 масс/об % или, например, в диапазоне 5-6 масс/об %, 6-7 масс/об %, 7-8 масс/об %, 8-9 масс/об %, 9-10 масс/об %, в10-11 масс/об %, 11-12 масс/об %, 10-12 масс/об %, 12-13 масс/об %, 13-14 масс/об %, 12-14 масс/об %, 14-15 масс/об % или 8-12 масс/об %. В некоторых вариантах осуществления сахароза присутствует в водном растворе в концентрации в диапазоне 8-12 масс/об % (например, 10 масс/об %). В некоторых вариантах осуществления водный раствор имеет рН в диапазоне 5,0-7,0, например, 5,0-5,2, 5,2-5,4, 5,4-5,6, 5,6-5,8, 5,8-6,0, 5,9-6,0, 5,9-6,1, 6,0-6,1; например, 5,5-6,5 или, например, рН в диапазоне 5,5-5,8, 5,8-6,0, 5,9-6,1, 6,0-6,1, 6,0-6,2, 6,2-6,4, 6,4-6,5, 6,5-6,7, 6,7-6,8, 6,8-6,9, 6,9-7,0, 7,0-7,1 или 5,8-6,2. В некоторых вариантах осуществления водный раствор имеет рН в диапазоне 5,8-6,2 (например, 5,8-6,0, 5,8-6,1, 5,9-6,1). В некоторых вариантах осуществления водный раствор имеет рН в диапазоне 5,9-6,2. В некоторых вариантах осуществления водный раствор имеет рН в диапазоне 6,0-6,1 (например, приблизительно 6,0 или 6,0).

[000147] В некоторых вариантах осуществления предложен состав (например, в водном растворе), описанный в настоящем документе, содержащий один или множество комплексов, гистидин и сахарозу. В некоторых вариантах осуществления любой из составов, описанных в настоящем документе, представляет собой водный раствор, где гистидин (например, L-гистидин) присутствует в водном растворе в концентрации 25 мМ, где сахароза присутствует в водном растворе в концентрации 10 масс/об %, и где водный раствор имеет рН приблизительно 6,0 (например, 6,0, 5,9-6,1).

[000148] В некоторых вариантах осуществления предложен состав (например, в водном растворе), описанный в настоящем документе, содержащий множество комплексов, гистидин и сахарозу, где гистидин (например, L-гистидин) присутствует в водном растворе

в концентрации 25 мМ, где сахароза присутствует в водном растворе в концентрации 10 масс/об %, и где рН составляет приблизительно 6,0 (например, 6,0, 5,9-6,1), и концентрация комплексов в составе составляет 10-50 мг/мл или 20-35 мг/мл (например, 1-10 мг/мл, 10-15 мг/мл, 15-20 мг/мл, 20-22 мг/мл, 22-24 мг/мл, 24-26 мг/мл, 22-25 мг/мл, 25-27 мг/мл, 27-29 мг/мл, 29-31 мг/мл, 29-30 мг/мл, 30-31 мг/мл, 31-32 мг/мл, 25-30 мг/мл, 30-32 мг/мл, 32-35 мг/мл, 30-35 мг/мл, 35-40 мг/мл, 40-45 мг/мл, 45-50 мг/мл), необязательно 25 мг/мл или 30 мг/мл.

[000149] Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления составы, предложенные в настоящем документе, содержат сахарозу. В некоторых вариантах осуществления сахароза служит, по меньшей мере частично, в качестве лиопротектора. В некоторых вариантах осуществления сахароза получена из растительного, например, травяного, плодового или овощного (например, корнеплода) источника (например, свеклы (например, сахарной свеклы, например, видов *Saccharum*)), сахарного тростника (например, *Beta vulgaris*), фиников, сахарного клена, сладкого сорго, яблок, апельсинов, моркови, мелассы, кленового сиропа, кукурузных сахаров), или животного продукта (например, меда). В некоторых вариантах осуществления сахарозу получают из свеклы или сахарного тростника (например, свекловичной сахарозы, сахарозы сахарного тростника). В некоторых вариантах осуществления может использоваться другой лиопротектор, отличный от сахарозы, например, трегалоза, маннит, лактоза, полиэтиленгликоль или поливинилпирролидон. Однако в некоторых вариантах осуществления в состав может быть включен модификатор температуры коллапса (например, декстран, фикоилл или желатин).

[000150] В некоторых вариантах осуществления любой один или множество комплексов, описанных в настоящем документе, содержат в составы с гистидином и сахарозой в лиофилизированной форме (например, лиофилизированный порошок). В некоторых вариантах осуществления лиофилизированную форму (например, лиофилизированный порошок) получают при лиофилизации любого из водных растворов, описанных в настоящем документе.

[000151] В некоторых вариантах осуществления предложен продукт (например, лиофилизированный состав, описанный в настоящем документе), полученный в процессе, включающем лиофилизацию водного раствора состава (например, в водной форме), описанного в настоящем документе.

[000152] В некоторых вариантах осуществления любой один или множество комплексов, описанных в настоящем документе, содержат в составы с гистидином и сахарозой в замороженной форме (например, замороженное водное твердое вещество). В некоторых вариантах осуществления замороженную форму (например, замороженное водное твердое вещество) получают при замораживании любого из водных растворов, описанных в настоящем документе. Замороженную форму могут замораживать при температуре ниже -20°C (например, ниже -20°C , ниже -30°C , ниже -40°C , ниже -50°C , ниже -60°C , ниже -70°C , ниже -80°C или ниже).

[000153] В некоторых вариантах осуществления предложен продукт (например, замороженный состав, описанный в настоящем документе), полученный в процессе, включающем замораживание водного раствора состава (например, в водной форме), описанного в настоящем документе.

[000154] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет такой состав, чтобы она была совместимой с ее предполагаемым путем введения. Примеры путей введения содержат парентеральное, например внутривенное, кожное, подкожное, введение. Как правило, путь введения является внутривенным или подкожным.

Способы применения/лечения

[000155] Комплексы, содержащие антитело против TfR1 (например, Fab), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом, например, фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (PMO)), как описано в настоящем документе, являются эффективными при лечении субъекта, имеющего дистрофинопатию, например, миодистрофию Дюшенна. В некоторых вариантах осуществления комплексы содержат молекулярную нагрузку, которая представляет собой олигонуклеотид, например, антисмысловый олигонуклеотид, который способствует пропуску экзона из мРНК, экспрессируемой с мутантного аллеля *DMD*.

[000156] В некоторых вариантах осуществления субъектом может быть субъект-человек, не относящийся к человеку примат, грызун или любой подходящий субъект-млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления не относящийся к человеку субъектом-приматом является яванский макак. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек возрастом 2-60 (например, 2-60, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-10) лет. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек возрастом 5-30 (например, 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) лет. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек возрастом 5-12 (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) лет. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек возрастом 4-16 (например, 4-16, 5-16, 6-16, 7-16, 8-16, 9-16, 10-16, 11-16, 12-16, 13-16, 14-16, 15-16, 4-15, 5-15, 6-15, 7-15, 8-15, 9-15, 10-15, 11-15, 12-15, 13-15, 14-15, 4-14, 5-14, 6-14, 7-14, 8-14, 9-14, 10-14, 11-14, 12-14, 13-14, 4-13, 5-13, 6-13, 7-13, 8-13, 9-13, 10-13, 11-13, 12-13, 4-12, 5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12, 11-12, 4-11, 5-11, 6-11, 7-11, 8-11, 9-11, 10-11, 4-10, 5-10, 6-10, 7-10, 8-10, 9-10, 4-9, 5-9, 6-9, 7-9, 8-9, 4-9, 5-9, 6-9, 7-9, 8-9, 4-8, 5-8, 6-8, 7-8, 4-7, 5-7, 6-7, 4-6, 5-6 или 4-5) лет. В некоторых вариантах осуществления субъектом является субъект-человек возрастом приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 лет.

[000157] В некоторых вариантах осуществления субъект может иметь миодистрофию Дюшенна или другую дистрофинопатию. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет мутантный аллель *DMD*, который необязательно может включать по меньшей мере одну мутацию в экзоне *DMD*, которая вызывает мутацию со сдвигом рамки считывания и приводит к неправильному сплайсингу/процессингу РНК. В

некоторых вариантах осуществления субъект страдает от симптомов тяжелой дистрофинопатии, например, мышечной атрофии или потери мышечной массы. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет бессимптомное повышение концентрации креатинфосфокиназы (КФК) в сыворотке крови и/или (например, и) мышечные спазмы с миоглобинурией. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет прогрессирующее мышечное заболевание, такое как миодистрофию Дюшенна или Беккера или *DMD*-ассоциированную дилатационную кардиомиопатию (ДКМП). В некоторых вариантах осуществления субъект не страдает от симптомов дистрофинопатии. В некоторых вариантах осуществления субъект способен самостоятельно передвигаться. В некоторых вариантах осуществления субъект не способен самостоятельно передвигаться.

[000158] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет мутацию в гене *DMD*, который может быть подвергнут пропуску экзона 51. В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, является эффективным при лечении субъекта, имеющего мутацию в гене *DMD*, который может быть подвергнут пропуску экзона 51. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит олигонуклеотид, например, олигонуклеотид, который способствует пропуску экзона 51 пре-мРНК, например, в пре-мРНК, кодируемой с мутантного гена *DMD* (например, мутантного гена *DMD*, который может быть подвергнут пропуску экзона 51).

[000159] Один из аспектов изобретения содержит способы, содержащие введение субъекту состава, содержащего эффективное количество комплекса(ов), как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции, включающей комплекс(ы), который содержит антитело (например, Fab), описанное в настоящем документе, ковалентно связанное с олигонуклеотидом (например, РМО), описанным в настоящем документе, могут вводить субъекту, нуждающемуся в лечении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят системно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую комплекс(ы), как описано в настоящем документе, могут вводить подходящим путем, который может включать внутривенное введение, например, в виде болюса или непрерывной инфузии, в течение некоторого времени. В некоторых вариантах осуществления введение могут производить внутривенным, внутримышечным, внутривентральным, спинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным или интратекальным путями. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую комплекс(ы), как описано в настоящем документе, вводят путем инфузии (например, внутривенной инфузии). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, включающая множество комплексов, описанных в настоящем документе, может находиться в твердой форме, водной форме или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления водную или жидкую форму можно небулизировать или лиофилизировать. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированную форму можно восстанавливать водным или жидким раствором.

[000160] В некоторых вариантах осуществления предложены способы и/или применения для лечения субъекта, имеющего мутантный аллель *DMD*, ассоциированный с миодистрофией Дюшенна, включающие введение субъекту состава, содержащего комплекс или множество комплексов, описанных в настоящем документе, с эффективным количеством комплекса(ов). В некоторых вариантах осуществления предложены способы и/или применения для стимуляции экспрессии или активности белка дистрофина у субъекта, включающие контакт клетки с составом, содержащим множество комплексов, описанных в настоящем документе, с эффективным количеством комплекса(ов). В некоторых вариантах осуществления белок дистрофин является усеченным белком дистрофином. Усеченный белок дистрофин является функциональным (например, сохраняет активности белка дистрофина дикого типа). В некоторых вариантах осуществления усеченный белок дистрофин сохраняет частичную функцию белка дистрофина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение лиофилизированной формы (например, лиофилизированного порошка) состава, содержащего множество комплексов, описанных в настоящем документе, включающее восстановление лиофилизированной формы состава в водном растворе и введение водного раствора состава нуждающемуся в этом субъекту. Например, в некоторых вариантах осуществления лиофилизированная форма состава, содержащего комплекс или множество комплексов, транспортируют и/или хранят в лиофилизированной форме, восстанавливают в месте введения водного раствора состава (например, в медицинском учреждении) и вводят в ресуспендированной форме (например, в виде водного раствора) путем инъекции или внутривенно, например, путем инфузии. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет мутантный аллель *DMD*, содержащий мутацию, которая может быть подвергнута пропуску экзона 51. В некоторых вариантах осуществления мутантный аллель *DMD* содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в экзоне 51.

[000161] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят методами сайт-специфической или местной доставки. Примеры таких методов содержат имплантируемые депо-источники комплекса, катетеры для местной доставки, сайт-специфические носители, прямую инъекцию или прямое нанесение.

[000162] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую комплекс, содержащий антитело против TfR1 (например, Fab), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом, например, фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (PMO)), вводят в эффективной концентрации, которая обеспечивает терапевтический эффект у субъекта. Эффективные количества изменяются, как известно специалистам в данной области, в зависимости от тяжести заболевания, уникальных особенностей субъекта, подвергаемого лечению, например, возраст, физического состояния, состояния здоровья или массы тела, продолжительности лечения, природы любой сопутствующей терапии, пути введения и связанных факторов. Такие связанные факторы известны специалистам и могут быть установлены без излишнего экспериментирования. В некоторых вариантах осуществления

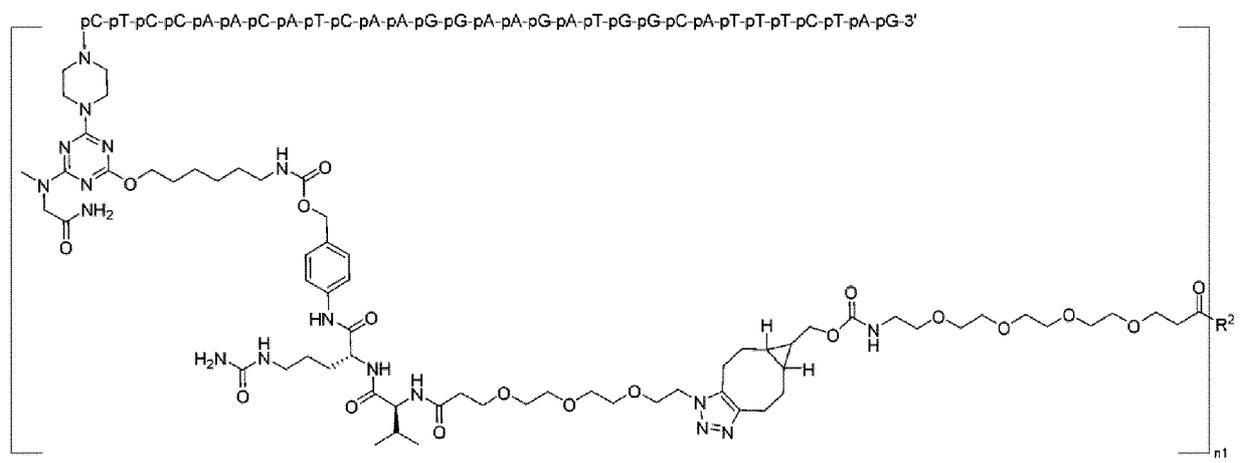
эффективная концентрация является максимальной дозой, которая считается безопасной для пациента. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация будет наименьшей концентрацией, которая обеспечивает максимальную эффективность.

[000163] Эмпирические факторы, например полупериод существования комплекса в организме субъекта, обычно будут способствовать определению концентрации фармацевтической композиции, используемой для лечения. Частоту введения можно определять эмпирически и корректировать для максимального повышения эффективности лечения. Эффективность лечения могут оценивать с помощью любых подходящих методов. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения могут оценивать при оценке или наблюдении симптомов, связанных с дистрофинопатией, например, мышечной атрофии или слабости мышц, на основе собственных оценок результатов лечения, сообщаемых субъектом, например, двигательная активность, способность к самообслуживанию, повседневная деятельность, боль/дискомфорт и тревога/депрессия, или показателей качества жизни, например, продолжительности жизни. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую комплекс, содержащий нацеленное на мышцы средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в эффективной концентрации, достаточной для модуляции активности или экспрессии гена-мишени по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с контролем, например, исходным уровнем экспрессии гена до лечения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Активность пропуска экзона конъюгатов против TfR1 в мышечных трубочках пациента с миодистрофией Дюшенна

[000164] Это исследование проводили с целью оценки активностей пропуска экзона конъюгатов против TfR1, содержащих Fab против TfR1, имеющий последовательности VH и VL, показанные в Таблице 2, ковалентно связанный (путем конъюгирования через лизин) посредством линкера, содержащего последовательность валин-цитруллин, с антисмысловым олигонуклеотидом (ACO), вызывающим пропуск экзона *DMD* 51. ACO, вызывающий пропуск экзона 51 *DMD*, представляет собой РМО и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21. Конъюгат содержит следующую структуру:



где R² представляет собой Fab против TfR1, показанный в Таблице 2, и где в каждом конъюгате n1 независимо является целым числом от нуля или больше.

[000165] Иммутиализованные человеческие миобласты с делецией экзона 52, размораживали и сеяли при плотности 1×10^6 клеток/флакон в среду для роста клеток скелетных мышц Promocell (с 5% FBS и $1 \times$ Pen-Strep) и позволяли расти до конфлюэнтности. После достижения конфлюэнтности клетки трипсинизировали, осаждали с помощью центрифугирования и ресуспендировали в свежей среде для роста клеток скелетных мышц Promocell. Количество клеток подсчитывали и сеяли клетки в покрытые Матригелем 96-луночные планшеты при плотности 50000 клеток/лунка. Клеткам позволяли восстановиться в течение 24 часов. Дифференцировку клеток индуцировали при аспирации среды для роста и ее замены бессывороточной средой для дифференцировки. Затем клетки обрабатывали олигонуклеотидом, вызывающим пропуск экзона 51 DMD (не связанным ковалентно с антителом - "голым"), при концентрации олигонуклеотида 10 мкМ или обрабатывали конъюгатом в конечной концентрации, эквивалентной 10 мкМ олигонуклеотида. Клетки инкубировали с тестируемыми препаратами в течение десяти дней, после чего из 96-луночных планшетов выделяли суммарную РНК. Синтез кДНК проводили с 75 нг суммарной РНК, и проводили специфичные в отношении мутаций реакции ПЦР для оценки уровня пропуска экзона 51 в клетках каждого типа. Продукты специфичной к мутациям ПЦР разделяли в 4% агарозном геле и визуализировали с использованием SYBR gold. Денситометрию использовали для вычисления относительных количеств ампликона с пропуском и без пропуска, и пропуск экзона определяли как отношение ампликона с пропуском экзона 51 к общему количеству присутствующих

$$\text{ампликонов: } \% \text{ Пропуска экзона} = \frac{\text{Ампликон с пропуском}}{(\text{Ампликон с пропуском} + \text{Ампликон без пропуска})} * 100$$

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

[000166] Результаты демонстрируют, что конъюгаты приводили к улучшенному

пропуску экзона по сравнению с таким же олигонуклеотидом, вызывающим пропуск экзона 51 *DMD*, который не был ковалентно связан с антителом, в мышечных трубочках пациента (ФИГ. 1). Это указывает, что Fab против TfR1 (например, имеющий последовательность, представленную в Таблице 2) способствовал клеточной интернализации конъюгата в мышечные клетки, что привело к активности олигонуклеотид для пропуска экзона 51 в мышечных клетках. Аналогичным образом, антитело против TfR1 может способствовать интернализации конъюгата, содержащего антитело против TfR1, ковалентно связанное с другими олигонуклеотидами для пропуска экзона (например, олигонуклеотидом для пропуска экзона, предложенным в настоящем документе, таким как олигонуклеотид для пропуска экзона 51), в мышечные клетки и способствовать активности олигонуклеотида, вызывающего пропуск экзона, в мышечных клетках.

Пример 2. Активность пропуска экзона конъюгата Fab против TfR1-АСО *in vivo* у яванских макаков

[000167] Конъюгаты олигонуклеотида против TfR1, описанные в Примере 1, тестировали *in vivo* на активность пропуска экзона на здоровых приматах, не относящихся к человеку. Интактным самцам яванских макаков (n=4-5 на группу) вводили две дозы растворителя, 30 мг/кг голого АСО (т.е. не связанного ковалентно с антителом) или 122 мг/кг Fab против TfR1, ковалентно связанного с олигонуклеотидом для пропуска экзона *DMD* 51 (эквивалентного 30 мг/кг АСО), путем внутривенной инфузии в дни 1 и 8. Животных умерщвляли и собирали ткани через 2 недели или 4 недели после введения первой дозы. Суммарную РНК выделяли из образцов ткани с помощью системы Promega Maxwell® RSC и производили синтез кДНК с использованием qScript cDNA SuperMix. Оценку пропуска экзона 51 проводили с помощью ПЦР с анализом конечной точки.

[000168] Капиллярный электрофорез продуктов ПЦР использовали для оценки пропуска экзона и % пропуска экзона 51 вычисляли с использованием следующей формулы:

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

Результаты вычисления пропуска экзона 51 показаны в Таблице 4.

Таблица 4. Пропуск экзона 51 *DMD* в *DMD* яванского макака

Время	2 недели			4 недели	
	Растворитель	Только АСО ^a	Конъюгат	Только АСО ^a	Конъюгат
Доза конъюгата ^b		n/a	122	n/a	122
Доза только АСО ^c		30	30	30	30
Квадрицепс ^d	0,00 (0,00)	1,216 (1,083)	4,906 (3,131)	0,840 (1,169)	1,708 (1,395)
Диафрагма ^d	0,00 (0,00)	1,891 (2,911)	7,315 (1,532)	0,717 (1,315)	9,225 (4,696)
Сердце ^d	0,00 (0,00)	0,043 (0,096)	3,42 (1,192)	0,00 (0,00)	4,525 (1,400)

Бицепс ^d	0,00 (0,00)	0,607 (0,615)	3,129 (0,912)	1,214 (1,441)	4,863 (3,881)
Передняя большеберцовая мышца ^d	0,00 (0,00)	0,699 (0,997)	1,042 (0,685)	0,384 (0,615)	0,816 (0,915)
Икроножная мышца ^d	0,00 (0,00)	0,388 (0,573)	2,424 (2,329)	0,00 (0,00)	5,393 (2,695)

^aАСО=антисмысловой олигонуклеотид.

^bДозы конъюгата указаны в мг/кг конъюгата Fab против TfR1-АСО.

^cДозы АСО указаны в мг/кг АСО эквивалента дозы Fab против TfR1-АСО.

^dЗначения пропуска экзона являются средним % пропуска экзона 51 со стандартным отклонением (n=5) в круглых скобках.

[000169] Накопление АСО в ткани также определяли количественно с помощью гибридизации ИФА с зондом, комплементарным последовательности АСО. Строили калибровочную кривую и получали уровни АСО (в нг/н) при линейной регрессии с калибровочной кривой. Согласно оценкам, АСО распределялся во всех тканях на более высоком уровне после введения конъюгата Fab против TfR1-АСО по сравнению с введением неконъюгированного АСО (не связанного ковалентно с антителом). Внутривенное введение неконъюгированного АСО привело к уровням АСО, которые были близки к фоновым уровням во всех тканях при оценке через 2 и 4 недели после введения первой дозы. Введение конъюгата приводило к распределению АСО в тканях в порядке убывания сердце>диафрагма>бицепс>квадрицепс>икроножная мышца>передняя большеберцовая мышца через 2 недели после первого введения дозы. Также оценивали длительность сохранения концентрации в ткани. Уровни АСО поддавались обнаружению через 4 недели после введения доз во всех тканях (Таблица 5). Это указывает, что Fab против TfR1, показанный в Таблице 2, обеспечивал клеточную интернализацию конъюгата в мышечные клетки *in vivo*, что приводит к активности пропуска экзона олигонуклеотида в мышечных клетках.

Таблица 5. Распределение в ткани АСО для пропуска экзона 51 DMD у яванских макаков

Время	2 недели			4 недели	
	Растворитель	Только АСО ^a	Конъюгат	Только АСО ^a	Конъюгат
Доза конъюгата ^b		n/a	122	n/a	122
Доза только АСО ^c		30	30	30	30
Квадрицепс ^d	0 (59,05)	696,8 (868,15)	2436 (954,0)	197 (134)	682 (281)
Диафрагма ^d	0± (144,3)	580,02 (360,11)	6750 (2256)	60 (120)	3131 (1618)
Сердце ^d	0 (396,03)	1449 (1337)	27138 (6315)	943 (1803)	30410 (9247)
Бицепс ^d	0 (69,58)	615,63 (335,17)	2840 (980,31)	130 (80)	1326 (623)

Передняя большеберцовая мышца ^d	(76,31)	564,71 (327,88)	1591 (253,50)	169 (110)	1087 (514)
Икроножная мышца ^d	0 (41,15)	705,47 (863,75)	2096 (474,04)	170 (69)	1265 (272)

^aАСО=Антисмысловой олигонуклеотид.

^bДозы конъюгата указаны в мг/кг конъюгата Fab против TfR1-АСО.

^cДозы АСО указаны в мг/кг АСО или в эквивалентной по АСО дозе конъюгата Fab против TfR1-АСО.

^dЗначения АСО являются средними концентрациями АСО в ткани в нг/г со стандартным отклонением (n=5) в круглых скобках.

Пример 3. Сравнение анализов стабильности различных иллюстративных составов в циклах замораживания-размораживания

[000170] Приготавливали следующие составы. Состав содержит Fab против TfR1, имеющий последовательности VH/VL, показанные в Таблице 2, ковалентно связанный (путем конъюгирования через лизин) посредством линкера, содержащего последовательность валин-цитруллин, с АСО, вызывающим пропуск экзона 51 *DMD*, где конъюгат Fab против TfR1-АСО присутствовал в концентрации 25 мг/мл в стеклянном флаконе объемом 2 мл с заполненным объемом 500 мкл. АСО, вызывающий пропуск экзона 51 *DMD*, представляет собой РМО и содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21.

[000171] Состав 1: 25 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH 6

[000172] Состав 2: 25 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH 5,5.

[000173] Состав 3: 25 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH 6,5.

[000174] Состав 4: 25 мМ гистидина, 10% сахарозы, 0,02% PS-80, pH 6.

[000175] Состав 5: 10 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH 6

[000176] Состав 6: 50 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH 6

[000177] Состав 7: 25 мМ гистидина, 150 мМ NaCl, pH 6

[000178] Состав 8: 25 мМ фосфата, 150 мМ NaCl, pH 7

[000179] Составы замораживали при -80°C с последующим размораживанием при окружающей температуре (например, комнатной температуре примерно 20°C), с 5 циклами З/Р (замораживания/размораживания) и выдерживали при 2-8°C в течение 3-4 часов перед анализом.

[000180] Приготовление буферов для состава: Лекарственную субстанцию для состава (состава с конъюгатом, описанным в настоящем документе) подвергали замене буфера на соответствующий буфер для состава. Использовали фильтры Sartorius Vivaspin (MWCO 30 кДа). После 5 замен буфера, Fab против TfR1-АСО концентрировали до 25 мг/мл. Лекарственные продукты стерилизовали фильтрованием и помещали во флаконы (для заполнения флаконов использовали 700 мкл). Образцы составов наблюдали визуально в следующие точки времени: T0 (неделя 0), T1 (неделя 1), T2 (неделя 2), T4 (неделя 4), T8 (неделя 8) и при температурах -20°C, 2-8°C, 25°C и 40°C.

[000181] При наблюдении в точках времени T0, T1, T2, T4 и T8 составы 1-6 были прозрачными и бесцветными при всех температурах, содержащих -20°C, 2-8°C, 25°C и 40°C. Было обнаружено, что составы 7 и 8 дают осадок с опалесценцией и частицами при всех температурах, включая -20°C, 2-8°C, 25°C и 40°C.

Пример 4. Анализ термической стабильности иллюстративного состава.

[000182] Приготавливали следующий состав. Состав содержал Fab против TfR1, имеющий последовательности VH/VL, показанные в Таблице 2, ковалентно связанные (путем конъюгирования через лизин) посредством линкера, содержащего последовательность валин-цитруллин, с АСО, вызывающим пропуск экзона 51 *DMD* (РМО, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21), где конъюгат Fab против TfR1-АСО присутствовал в концентрации 25 мг/мл в стеклянном флаконе емкостью 2 мл с заполненным объемом 500 мкл. В этом составе (Состав 1) присутствовали: 25 мМ гистидина, 10% сахарозы, рН 6.

[000183] Приготавливали буферы для состава: Лекарственную субстанцию для состава (состава с конъюгатом, описанным в настоящем документе) подвергали замене буфера на соответствующий буфер для состава. Использовали фильтры Sartorius Vivaspin (MWC0 30 кДа). После 5 замен буфера, Fab против TfR1-АСО концентрировали до 25 мг/мл. Лекарственные продукты стерилизовали фильтрованием и помещали во флаконы (для заполнения флаконов использовали 700 мкл). Затем проводили анализ термической стабильности состава, описанного выше в Примере 4 ("Состав 1"). Этот анализ показывает концентрацию конъюгата Fab против TfR1-АСО в указанные точки времени T0 (неделя 0) и T8 (неделя 8)) и при указанных температурах. См. Фиг. 2. Для измерения концентрации белкового конъюгата использовали стандартный анализ ВСА (с бичинхониновой кислотой). Анализ ВСА проводили по стандартной методике:

1) Приготовьте рабочий реагент (WR). Для каждого образца в процедуре на микропланшетах требуется по 100 мкл WR. Приготовьте WR, тщательно смешав 50:1 (ВСА реагент А:ВСА реагент В). Для заполнения 96-луночного планшета требуется 10 мл реагента WR. Таким образом, 10 мл реагента А объедините с 200 мкл реагента В и убедитесь, что буфер имеет комнатную температуру, и используйте его в течение 90 минут после смешивания. Рекомендуется использовать свежеприготовленный рабочий раствор.

2) Подготовьте стандартную кривую и кривую разведения для неизвестных образцов. 10 мкл стандартного или неизвестного образца добавляют к 200 мкл WR и инкубируют при 60°C в течение 10 минут. Его добавляют в первый ряд планшета и последовательно разводят 100 мкл:100 мкл в последующих колонках, 96-луночный прозрачный планшет: Стандарт: Известный Fab: 15G11 (11 мг/мл). Постройте стандартную кривую по 8 точкам и кривую разведения неизвестного образца, подготовив разведение 1:1 для каждой точки.

3) Инкубируйте 5 минут.

4) Измерьте поглощение при 480 нМ на планшетном ридере.

5) Используйте стандартную кривую для определения концентрации белка в каждом

неизвестном образце (измеряли в 6 разведениях).

[000184] В составе 1 наблюдали небольшое снижение концентрации конъюгата в разных контейнерах (стеклянный флакон 2 мл с объемом заполнения 600 мкл, обозначенный как "флакон"; пластиковый мешок Flexboy с объемом заполнения 1 мл, обозначенный как "flex"), что указывает на общую стабильность этого состава при указанных температурах и в указанных контейнерах. Меньшее снижение концентрации конъюгата с недели 0 (T0) до точки времени на неделе 8 (T8) наблюдали у составов в пластиковом мешке Flexboy по сравнению со стеклянным флаконом при температурах -20°C и 2-8°C. Однако в точке времени 8 (T8) для Составы 1 в стеклянных флаконах при 40°C не наблюдалось снижения концентрации конъюгата.

Пример 5. Анализ адгезии к материалу контейнеров разных типов.

[000185] Проводили исследование с целью анализа потерь материала из-за адгезии составов, для оценки возможной адгезии к различным пластикам, содержащим иллюстративный Fab против TfR1, имеющий последовательности VH/VL, показанные в Таблице 2, ковалентно связанные (путем конъюгирования через лизин) посредством линкера, содержащего последовательность валин-цитруллин, с АСО, вызывающим пропуск экзона 51 *DMD* (РМО, содержащим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21). Этот конъюгат TfR1 Fab-АСО, приготовленный в Составе 1 (буфер 25 мМ гистидина, 10% сахарозы (рН 6)) и описанный в Примере 3, показал меньшие потери материала. Исследование проводили следующим образом: повторяли предыдущее исследование из Примера 3 при концентрации 25 мг/мл; составы добавляли к пластикам и подвергали 1 циклу замораживания/размораживания (З/Р) (замораживание при -80°C в течение ночи, размораживание при 2-8°C в течение 4 часов); и исследовали с помощью стандартных тестов, включая визуальный анализ, ВСА, эВЭЖХ (SEC). После одного цикла замораживания/размораживания при -80°C, как обсуждалось, измеряли концентрацию конъюгата в Составе 1. Для измерения концентрации белкового конъюгата использовали стандартный анализ ВСА (с бицинониновой кислотой), как описано в Примере 4.

[000186] Аналитический метод эВЭЖХ проводили следующим образом:

- Система УВЭЖХ HPLC System Thermo Ultimate-3000
- Концентрация образца: 1 мг/мл (разбавлен водой для ВЭЖХ); Объем вводимой пробы: 10 мкл
- Буфер: 100 мМ фосфата натрия, 100 мМ NaCl, 15% ацетонитрила, рН 7,0.
- Режим: изократический, 0,25 мл/мин, 20 мин.
- Температура термостата колонки: Комнатная. Колонка: Waters AQUITY UPLC Protein BEH SEC, 200 Å, 1,7 мкм, 4,6×300 мм (артикул: 186005226)
- Длины волн: 280 нм и 260 нм. Пробы вводили в двух повторностях, приведены средние значения.

[000187] Высокая стабильность и отсутствие поверхностной адгезии к разным типам пластиковых контейнеров (этиленвинилацетатный полимер (ЭВА), поликарбонатный полимер (ПК), полиэтилен низкого давления (ПЭНД)) при использовании Составы

конъюгата с 25 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH 6,0, в целом продемонстрирован на Фиг. 3 и 4. На ФИГ. 3 и 4 показана хорошая стабильность и отсутствие поверхностной адгезии, что подтверждается более высокой концентрацией конъюгата в Составе 1 для разных типов пластиковых контейнеров по сравнению с более низкой концентрацией конъюгата для стеклянных контейнеров. На ФИГ. 4 показано, что в анализе с помощью эксклюзионной хроматографии не наблюдали значимых изменений состава пиков ВЭЖХ для всех образцов, включая стандартный образец 10 мг/мл в стекле (конъюгат FDC, который имел концентрацию ~10 мг/мл, хранили в стекле и подвергали одному циклу замораживания-размораживания (замораживали при транспортировке и выдерживали при температуре 2-8°C)), и образцы с концентрацией 25 мг/мл - в стекле или пластике указанного типа (конъюгат 25 мг/мл концентрировали на центрифужных фильтрах, затем добавляли к указанному пластику или стеклу и подвергали одному циклу З/Р).

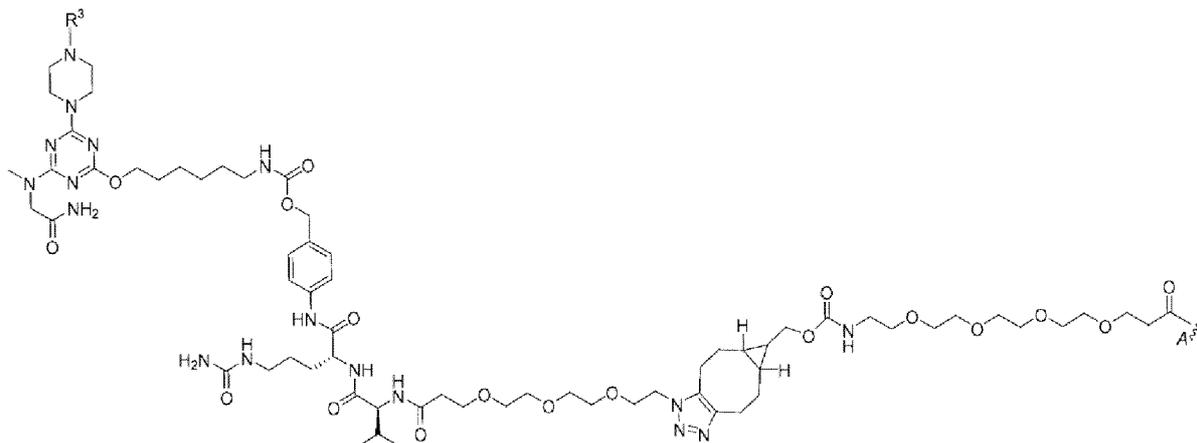
[000188] Результаты на ФИГ. 4 указывают на хорошую стабильность Состава 1.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Состав, содержащий комплексы, которые содержат фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО), ковалентно связанный с антителом против рецептора трансферрина 1 (TfR1), где антитело содержит: определяющую комплементарную область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарную область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарную область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14, определяющую комплементарную область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарную область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарную область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16, и где комплексы включены в составы с гистидином и сахарозой.

2. Состав, содержащий комплексы формулы: $[R^1]_{n1}-R^2$, где:

каждый R^1 независимо содержит группу формулы:



R^2 содержит антитело, и

R^3 представляет собой фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО);

где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A ; и

где n_1 является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком антитела, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин;

где комплексы включены в составы с гистидином и сахарозой,

где антитело необязательно является антителом против TfR1, и, необязательно, где среднее значение n_1 комплексов в составе находится в диапазоне 1-5.

3. Состав согласно варианту осуществления 2, где антитело содержит:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16.

4. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где состав находится в лиофилизированной форме.

5. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где состав находится в водном растворе.

6. Состав согласно варианту осуществления 5, где гистидин присутствует в водном растворе в концентрации от 10 мМ до 50 мМ.

7. Состав согласно варианту осуществления 5 или 6, где сахароза присутствует в водном растворе в концентрации от 5% до 15% по массе на объем (масс/об %).

8. Состав согласно любому из вариантов осуществления 5-7, где водный раствор имеет pH от 5,0 до 7,0.

9. Состав согласно любому из вариантов осуществления 5-8, где гистидин присутствует в водном растворе в концентрации 25 мМ, и/или сахароза присутствует в водном растворе в концентрации 10 масс/об %, и/или водный раствор имеет pH 6,0.

10. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где антитело представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv.

11. Состав согласно варианту осуществления 10, где антитело представляет собой Fab-фрагмент.

12. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 17; и/или где антитело содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 18, где антитело необязательно содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

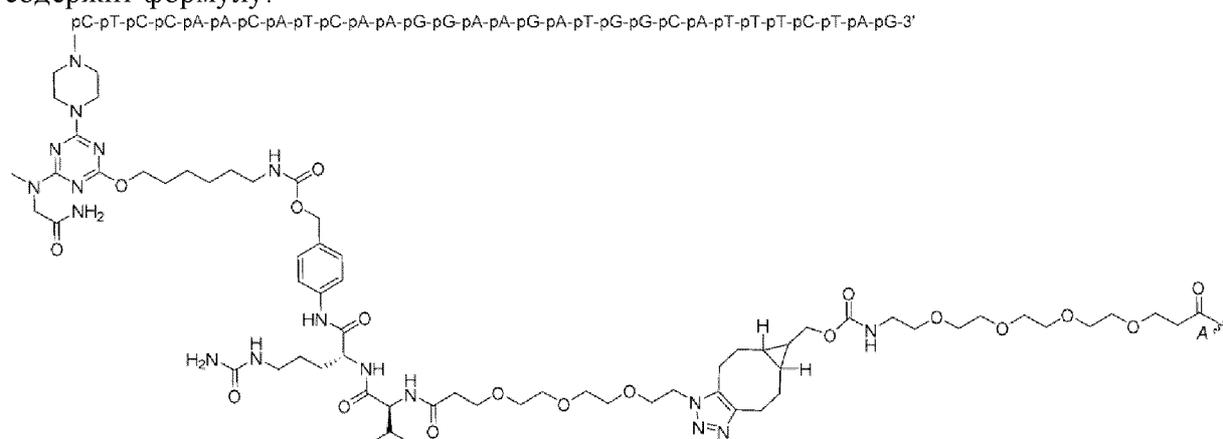
13. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 19; и/или где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 20, где антитело необязательно содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

14. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где РМО содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет длину 15-35 нуклеотидов.

15. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-14, где РМО содержит нуклеотидную последовательность, имеющую область комплементарности длиной по меньшей мере 8 последовательных нуклеотидов с SEQ ID NO: 23, с SEQ ID NO: 24 или с SEQ ID NO: 22.

16. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-15, где РМО содержит по меньшей мере 8 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, где РМО необязательно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21.

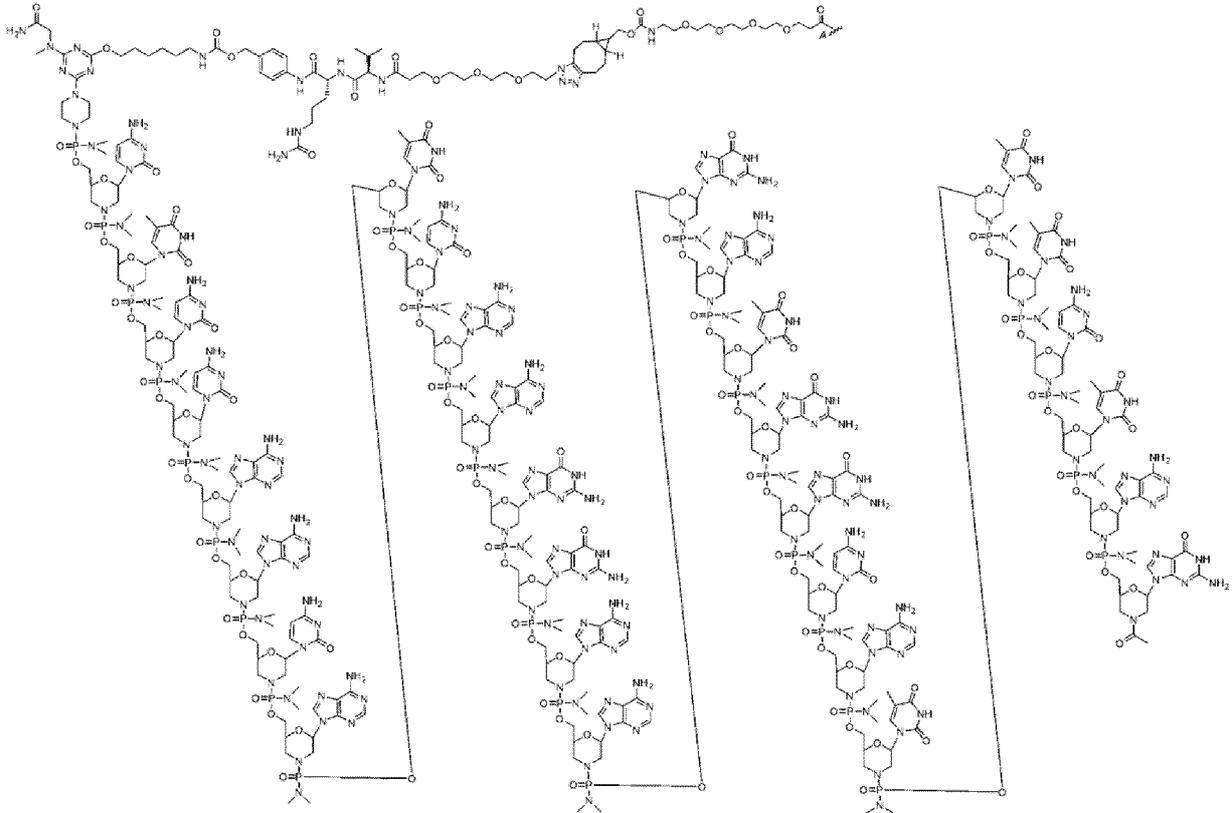
17. Состав согласно любому из вариантов осуществления 2-16, где каждый R¹ содержит формулу:



в которой -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (РМО), R¹ ковалентно связан с R² в точке присоединения A; где -p обозначает фосфородиамидатную связь, где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом РМО имеет последовательность

нуклеиновых оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO: 21).

18. Состав согласно любому из вариантов осуществления 2-16, где каждый R¹ содержит формулу:



19. Состав согласно любому из вариантов осуществления 1-18, где комплексы присутствуют в составе в концентрации от 10 мг/мл до 50 мг/мл.

20. Способ стимуляции экспрессии или активности белка дистрофина у субъекта, включающий введение субъекту состава согласно любому из вариантов осуществления 1-19.

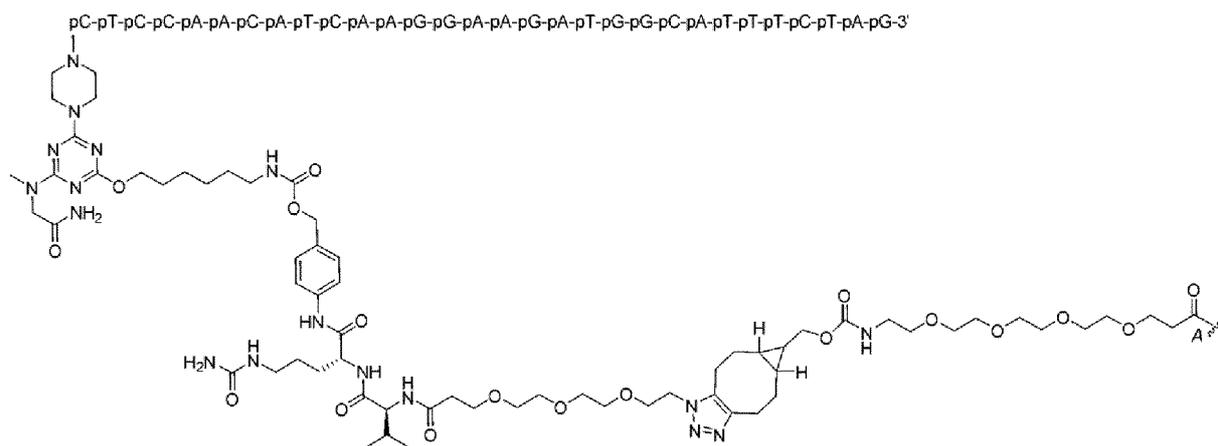
21. Способ согласно варианту осуществления 20, где белок дистрофин является усеченным белком дистрофином.

22. Способ лечения субъекта, имеющего мутантный аллель *DMD*, ассоциированный с миодистрофией Дюшенна, где способ включает введение субъекту состава согласно любому из вариантов осуществления 1-19.

23. Способ согласно варианту осуществления 22, где мутантный аллель *DMD* содержит мутацию, которая может быть подвергнута пропуску экзона 51.

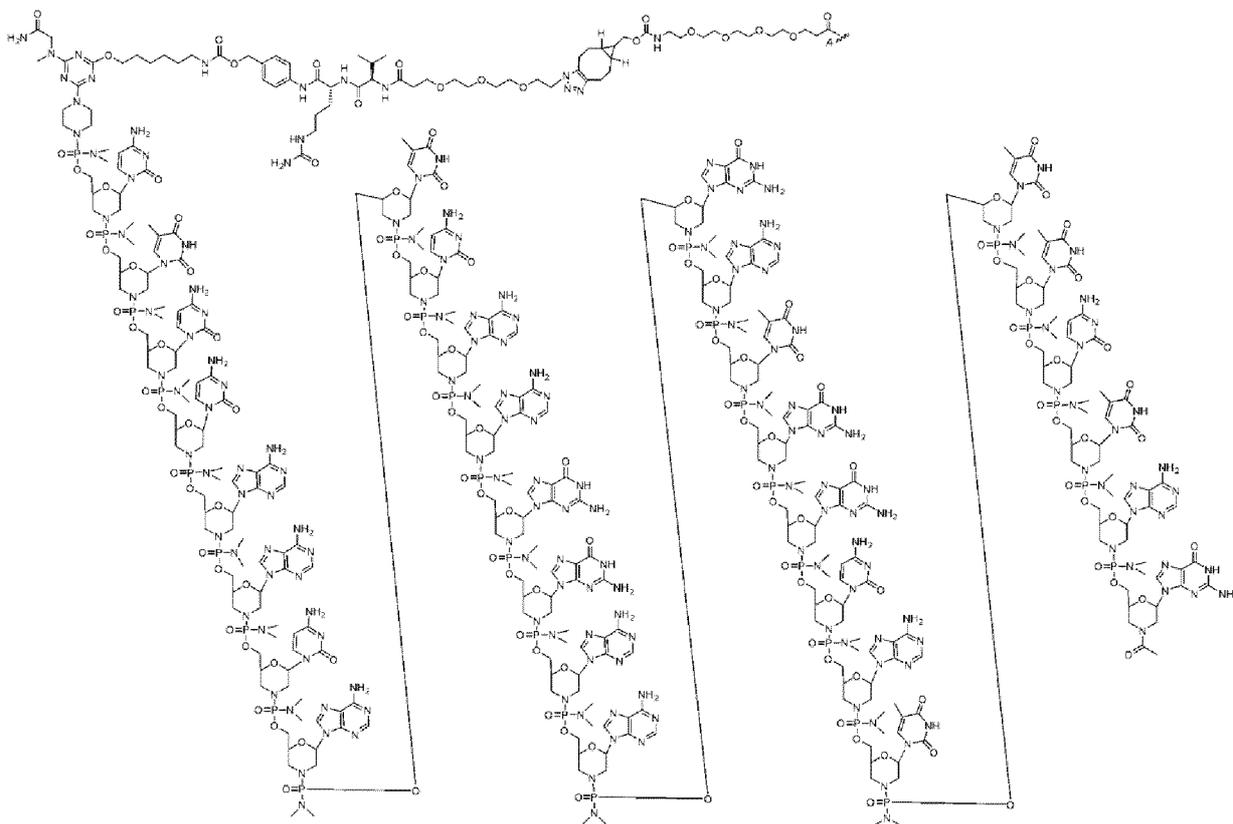
24. Способ согласно варианту осуществления 22 или согласно варианту осуществления 23, где мутантный аллель *DMD* содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в экзоне 51.

25. Комплекс, содержащий структуру формулы $[R^1]_n-R^2$, где:
каждый R¹ содержит группу формулы:



где R^2 содержит Fab, и где Fab содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2, где Fab необязательно содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а также, необязательно, где Fab содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, где -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO), где -p обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом олигонуклеотид PMO имеет последовательность нуклеиновых оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG (SEQ ID NO: 21); где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; и где n1 является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

26. Комплекс, содержащий структуру формулы $[R^1]_{n1}-R^2$, где R^1 содержит группу формулы:



где R^2 содержит Fab, содержащий CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2, где R^2 необязательно содержит Fab, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а также, необязательно, где R^2 содержит Fab, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; где $n1$ является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

27. Состав, содержащий множество комплексов согласно варианту осуществления 25 или согласно варианту осуществления 26 и гистидин в концентрации 25 мМ и сахарозу в концентрации 10 масс/об %, где состав является водным раствором и имеет pH 6,0.

28. Лиофилизованная форма состава согласно варианту осуществления 27.

29. Продукт, полученный в процессе, включающем лиофилизацию состава согласно варианту осуществления 27.

30. Замороженная форма состава согласно варианту осуществления 27.

31. Продукт, полученный в процессе, включающем замораживание состава согласно варианту осуществления 27.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ТЕРМИНОЛОГИЯ

[000189] Изобретение, иллюстративно описанное в настоящем документе, соответствующим образом можно реализовать на практике в отсутствие какого-либо

элемента или элементов, ограничения или ограничений, которые прямо не раскрыты в настоящем описании. Таким образом, например, в каждом случае в настоящем документе любой из терминов "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменен любым из двух оставшихся терминов. Используемые термины и выражения используются в качестве описательных, но не ограничивающих терминов, и при использовании таких терминов и выражений не предполагается исключение каких-либо эквивалентов показанных и описанных признаков или их частей, однако следует считать, что в объеме настоящего изобретения допускаются различные модификации. Таким образом, нужно понимать, что, хотя настоящее изобретение было конкретно описано предпочтительными вариантами осуществления, специалисты в данной области смогут определить необязательные признаки, модификации и вариации концепций, раскрытых в настоящем документе, и что такие модификации и вариации считаются включенными в объем настоящего изобретения.

[000190] Кроме того, когда признаки или аспекты настоящего изобретения описаны с применением групп Маркуша или других групп альтернатив, специалистам в данной области будет понятно, что изобретение, таким образом, также описано в отношении любого отдельного члена или подгруппы членов группы Маркуша, или другой группы.

[000191] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления последовательности, представленные в списке последовательностей, могут относиться к описанию структуры олигонуклеотида или другой нуклеиновой кислоты. В таких вариантах осуществления конкретный олигонуклеотид или другая нуклеиновая кислота может содержать один или больше альтернативных нуклеотидов (например, РНК, соответствующую ДНК нуклеотиду, или ДНК, соответствующую РНК нуклеотиду) и/или (например, и) один или больше модифицированных нуклеотидов, и/или (например, и) одну или больше модифицированных межнуклеотидных связей, и/или (например, и) одну или больше других модификаций по сравнению с описанной последовательностью, при сохранении по существу таких же или подобных комплементарных свойств, как у описанной последовательности.

[000192] Использование терминов в единственном числе и подобных ссылок в контексте описания изобретения (особенно в формуле изобретения) следует рассматривать как охватывающее единственное и множественное число, если в настоящем документе не указано иное или явно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий" и "содержащий" следует считать неограничивающими терминами (т.е. означающими "содержащий, но не ограниченный"), если не указано иное. Перечисление диапазонов значений в настоящем документе служит исключительно для сокращенной ссылки индивидуально на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если в настоящем документе не указано иное, при этом каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно перечислено в настоящем документе. Все способы, описанные в настоящем документе, можно проводить в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное или явно не противоречит контексту. Использование любых

возможных примеров или вводных слов (например, "такой как"), представленных в настоящем документе, предназначено исключительно для лучшей иллюстрации настоящего изобретения, и не служит в качестве ограничения объема изобретения, если не указано иное. Никакие формулировки в описании не следует считать указанием того, что какой-либо незаявленный элемент является существенным для практической реализации изобретения.

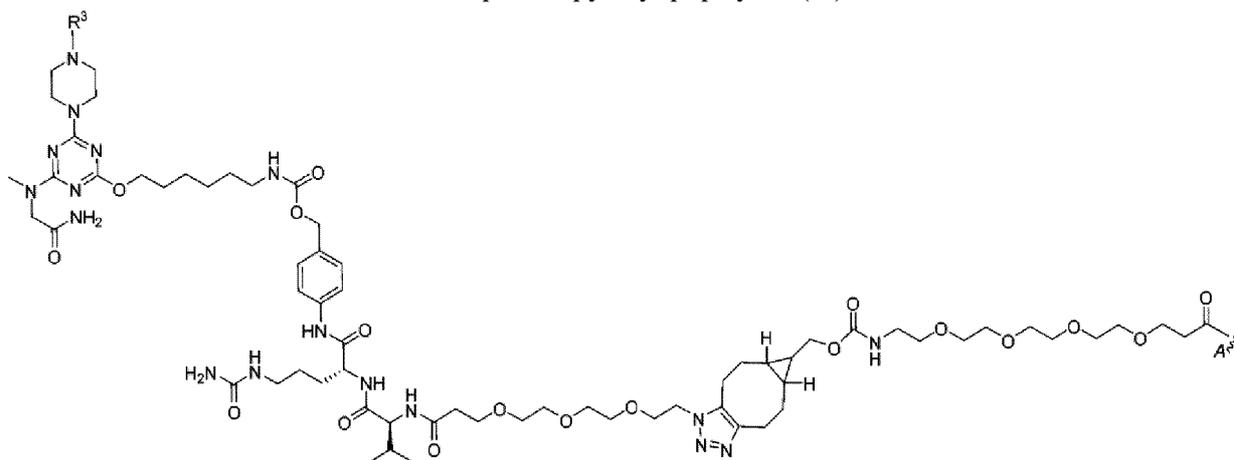
[000193] Варианты осуществления настоящего изобретения описаны в настоящем документе. Вариации таких вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области после прочтения представленного выше описания.

[000194] Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области будут применять такие вариации по мере необходимости, при этом авторы настоящего изобретения предполагают, что изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в настоящем документе. Таким образом, данное изобретение содержит все модификации и эквиваленты объектов изобретения, описанных в формуле изобретения в соответствии с действующим законодательством. Кроме того, изобретение охватывает любую комбинацию вышеописанных элементов во всех возможных вариациях, если в настоящем описании не указано иное или иное прямо не противоречит контексту. Специалистам в данной области будут понятны, или они смогут определить с использованием не более чем рутинного экспериментирования, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Состав, содержащий комплексы, которые содержат фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО), ковалентно связанный с антителом против рецептора трансферрина 1 (TfR1), где антитело содержит: определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16, и где комплексы включены в составы с гистидином и сахарозой.

2. Состав, содержащий комплексы, содержащие структуру формулы: $[R^1]_{n1}-R^2$, где: каждый R^1 независимо содержит группу формулы (Ia):



(Ia),

где:

R^2 содержит антитело, и

R^3 содержит фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (РМО);

где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; и

где $n1$ является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком антитела, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин;

где комплексы содержат в составы с гистидином и сахарозой,

где антитело необязательно является антителом против TfR1, и где среднее значение $n1$ комплексов в составе необязательно находится в диапазоне 1-5.

3. Состав по п.2, где антитело содержит:

определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, 7 или 12, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, 8 или 13, определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, 9 или 14, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, 10 или 15, определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или 11, и определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3), содержащую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или 16.

4. Состав по любому из пп.1-3, где состав находится в лиофилизированной форме, водном растворе или замороженной твердой форме.

5. Состав по п.4, где состав находится в водном растворе, и где гистидин присутствует в водном растворе в концентрации от 10 мМ до 50 мМ.

6. Состав по п.4 или 5, где состав находится в водном растворе, и где сахара присутствует в водном растворе в концентрации от 5% до 15% по массе на объем (масс/об %).

7. Состав по любому из пп.4-6, где состав находится в водном растворе, и где водный раствор имеет pH от 5,0 до 7,0.

8. Состав по любому из пп.4-7, где состав находится в водном растворе, и где гистидин присутствует в водном растворе в концентрации 25 мМ, и/или сахара присутствует в водном растворе в концентрации 10 масс/об %, и/или водный раствор имеет pH 6,0.

9. Состав по любому из пп.1-8, где антитело представляет собой Fab-фрагмент, полноразмерный IgG, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv или Fv.

10. Состав по п.9, где антитело представляет собой Fab-фрагмент.

11. Состав по любому из пп.1-10, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 17; и/или где антитело содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 18, где антитело необязательно содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

12. Состав по любому из пп.1-11, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 19; и/или где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 20, где антитело необязательно содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID

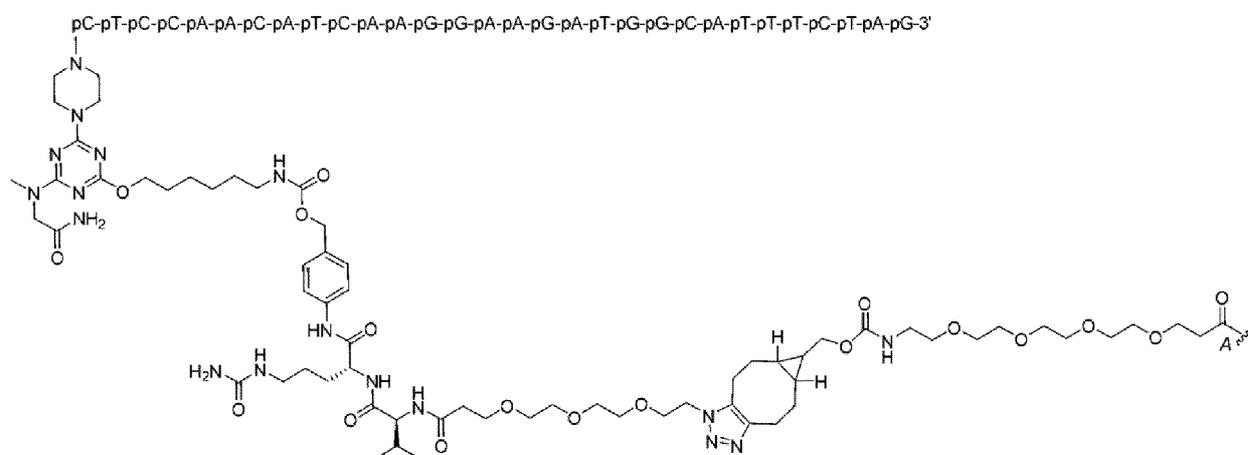
NO: 20.

13. Состав по любому из пп.1-12, где РМО содержит последовательность нуклеиновых оснований, которая имеет длину 15-35 нуклеотидов.

14. Состав по любому из пп.1-13, где РМО содержит нуклеотидную последовательность, имеющую область комплементарности длиной по меньшей мере 8 последовательных нуклеотидов с SEQ ID NO: 23, с SEQ ID NO: 24 или с SEQ ID NO: 22.

15. Состав по любому из пп.1-14, где РМО содержит по меньшей мере 8 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, где РМО необязательно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 21.

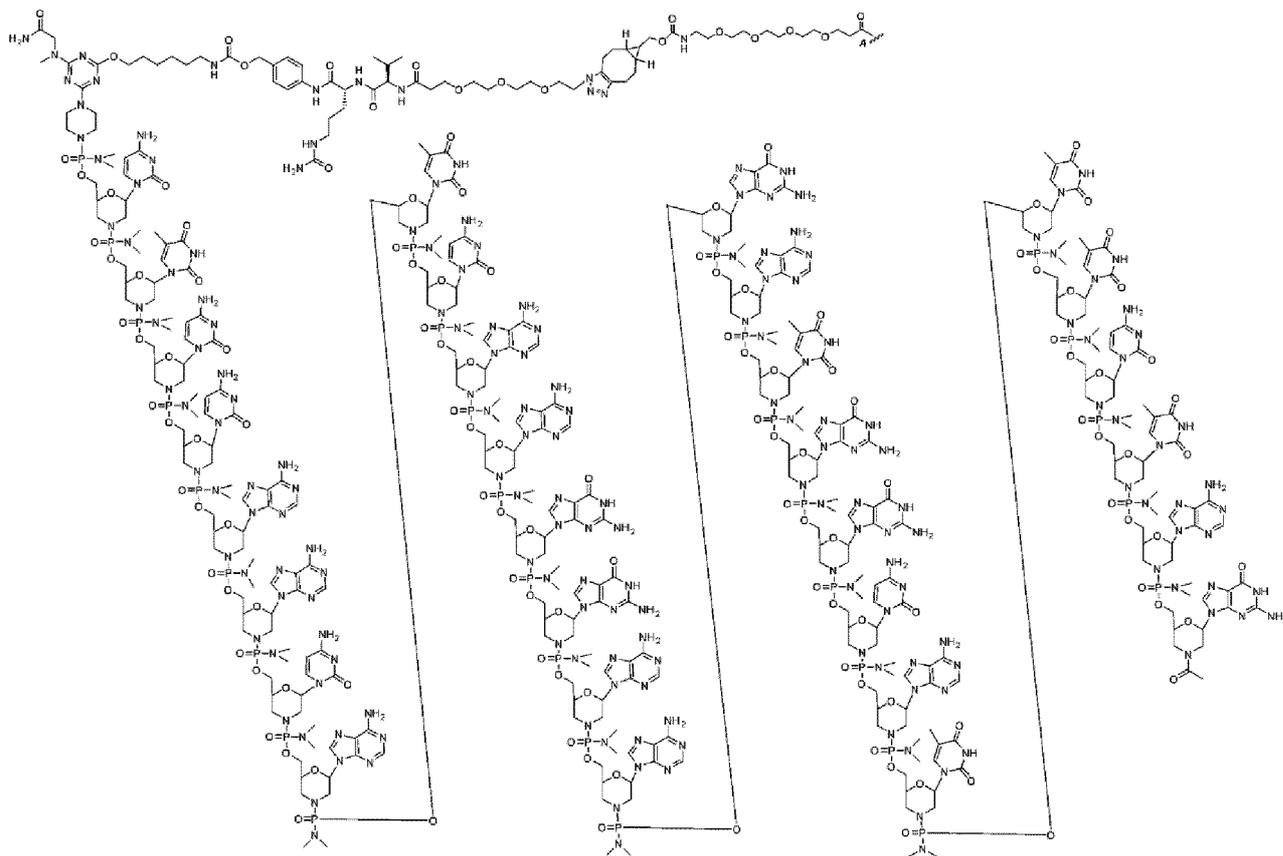
16. Состав по любому из пп.2-15, где каждый R¹ содержит группу формулы (Ib):



(Ib),

в которой -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (РМО), где -р обозначает фосфородиамидатную связь, где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (А), цитозину (С), гуанину (G) или тимину (Т), при этом РМО имеет последовательность нуклеиновых оснований СТССААСАТСААГГААГАТGGCАТТТСТАG (SEQ ID NO: 21), и где R¹ ковалентно связан с R² в точке присоединения А.

17. Состав по любому из пп.2-16, где каждый R¹ содержит группу формулы (Ic):



(Ic).

18. Состав по любому из пп.1-17, где комплексы присутствуют в составе в концентрации от 10 мг/мл до 50 мг/мл.

19. Способ стимуляции экспрессии или активности белка дистрофина у субъекта, включающий введение субъекту состава по любому из пп.1-18.

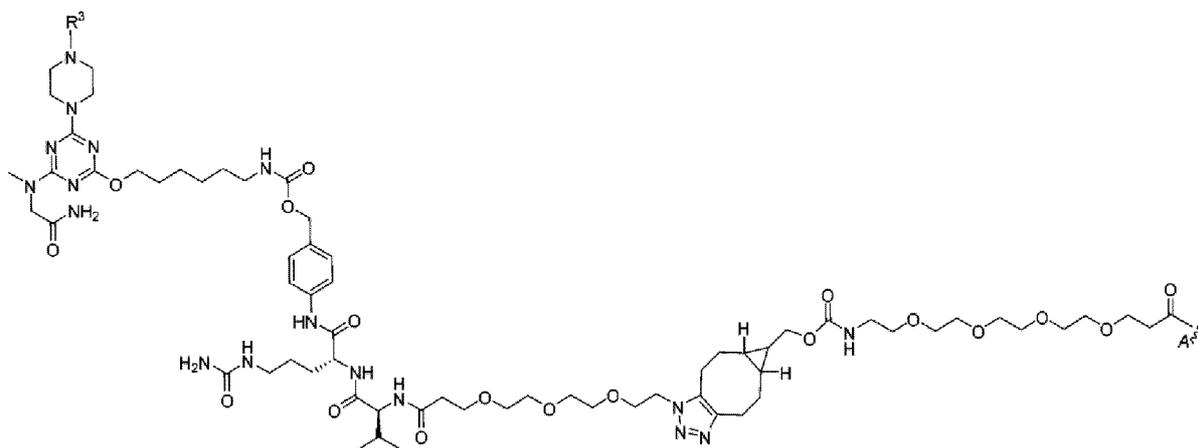
20. Способ по п.19, где белок дистрофин является усеченным белком дистрофином.

21. Способ лечения субъекта, имеющего мутантный аллель *DMD*, ассоциированный с миодистрофией Дюшенна, где способ включает введение субъекту состава по любому из пп.1-18.

22. Способ по п.21, где мутантный аллель *DMD* содержит мутацию, которая может быть подвергнута пропуску экзона 51.

23. Способ по п.22 или п.21, где мутантный аллель *DMD* содержит мутацию со сдвигом рамки считывания в экзоне 51.

24. Комплекс, содержащий структуру формулы (I): $[R^1]_n-R^2$, где: каждый R^1 содержит группу формулы (Ia):



(Ia),

где R³ содержит фосфородиамидат-морфолиновый олигомер (PMO), содержащий последовательность оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG (SEQ ID NO: 21);

где R² содержит Fab, и где Fab содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2,

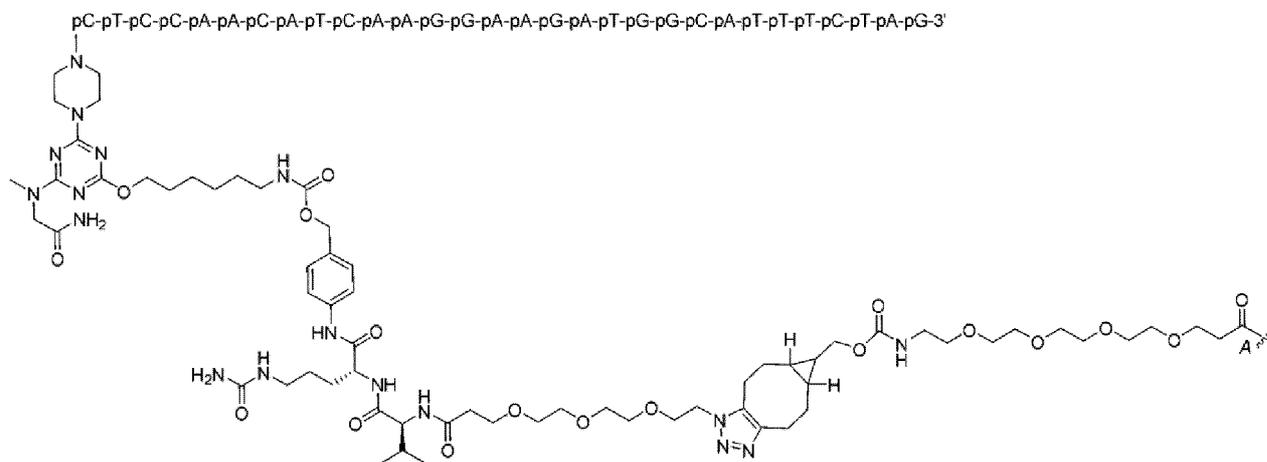
где Fab необязательно содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

а также, где Fab необязательно содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20,

где R¹ ковалентно связан с R² в точке присоединения A; и где n1 независимо является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R¹ в каждом комплексе, где каждая группа R¹ ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

25. Комплекс, содержащий структуру формулы (I): [R¹]_{n1}-R², где:

каждый R¹ содержит группу формулы (Ib):



(Ib),

где R^2 содержит Fab, и где Fab содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2,

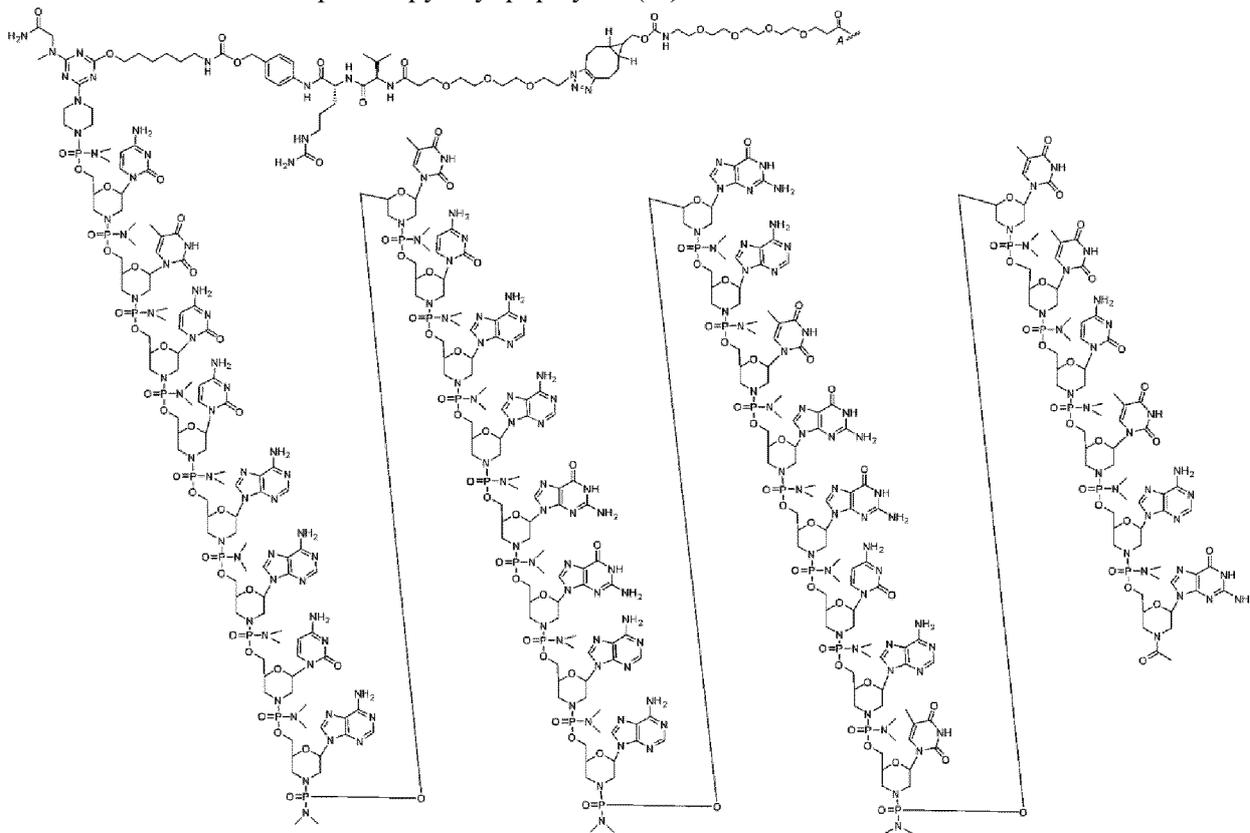
где Fab необязательно содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

а также, где Fab необязательно содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20,

где -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO), где -р обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом олигонуклеотид PMO имеет последовательность нуклеиновых оснований CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG (SEQ ID NO: 21);

где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; и где n1 является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

26. Комплекс, содержащий структуру формулы (I): $[R^1]_{n1}-R^2$, где:
каждый R^1 содержит группу формулы (Ic):



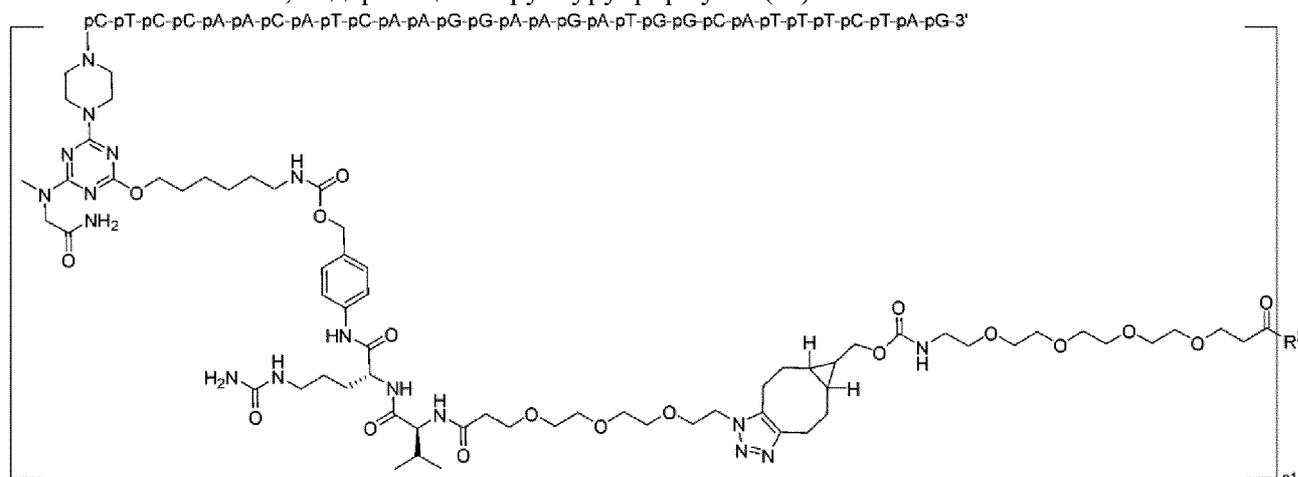
(Ic),

где R^2 содержит Fab, содержащий CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2,

где R^2 необязательно содержит Fab, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

а также, где R^2 необязательно содержит Fab, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; где $n1$ является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

27. Комплекс, содержащий структуру формулы (Id):



(Id),

где R^2 содержит Fab, содержащий CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из Таблицы 2,

где R^2 необязательно содержит Fab, содержащий VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

а также, где R^2 необязательно содержит Fab, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20;

где -pN обозначает положение основания фосфородиамидат-морфолинового олигомера (PMO); где -р обозначает фосфородиамидатную связь, и где N соответствует нуклеиновому основанию аденину (A), цитозину (C), гуанину (G) или тимину (T), при этом PMO содержит последовательность оснований СТССААСАТСААГГААГАТGGCАТТТСТАG (SEQ ID NO: 21);

где R^1 ковалентно связан с R^2 в точке присоединения A; где $n1$ является целым числом от одного или больше, обозначающим количество групп R^1 , где каждая группа R^1 ковалентно связана с отдельным аминокислотным остатком Fab, где каждый отдельный аминокислотный остаток необязательно представляет собой лизин.

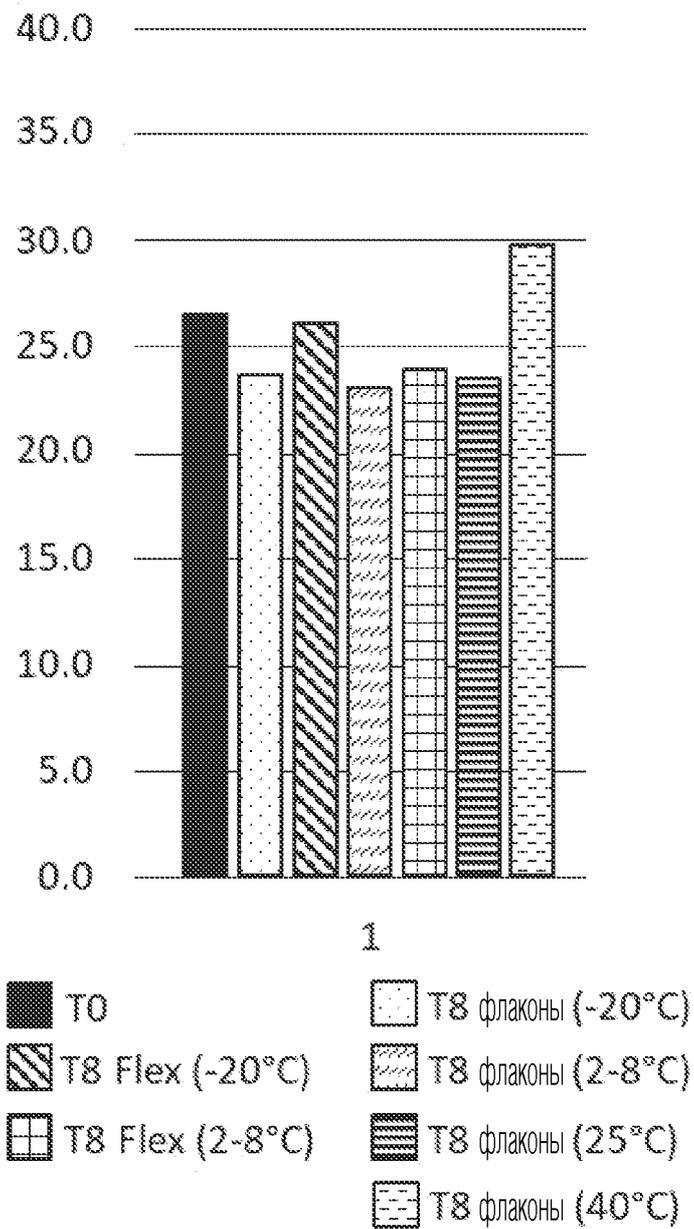
По доверенности

1/4

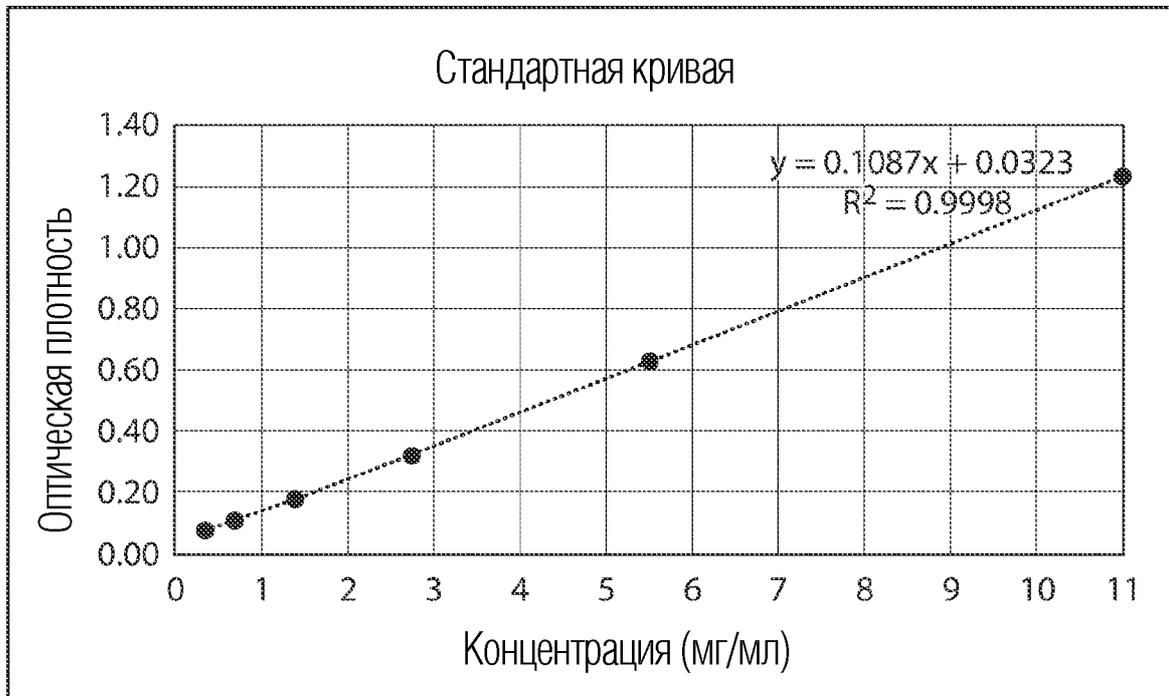


ФИГ. 1

Концентрация FDC



ФИГ. 2



МАТЕРИАЛ	Концентрация (мг/мл)
СТЕКЛО	21.7
ЭВА	23.3
ПК	22.4
ПЭНД	22.6

ФИГ. 3

Название пробы	% ВМС 1	% димера	Общий % ВМС	% пика 1	% пика 2	% пика 3	% НМС	% свободного олига
Стандарт 10 мг/мл в стекле	п.а.	7,8	7,8	26	40	23,8	1,2	1,1
25 мг/мл в стекле	п.а.	7,8	7,9	25,9	40,1	23,8	1,2	1,1
25 мг/мл в ЭВА	п.а.	7,8	7,9	28	40,1	23,8	1,2	1,1
25 мг/мл в ПЭНД	п.а.	7,8	7,8	26,1	39,9	23,8	1,2	1,1
25 мг/мл в ПК	п.а.	7,8	7,9	26,1	39,9	23,8	1,2	1,1

4/4

ФИГ. 4