

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491213 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.11.08(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.11.10

(54) НАЦЕЛЕННЫЕ НА МЫШЦЫ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНО-ЛИЦЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ

(31) 63/278,882; 63/278,993; 63/312,617;
63/312,633(72) Изобретатель:
Хсиа Нелсон, Субраманиян Ромеш Р.,
Катанани Мохаммед Т., Уиден
Тимоти, Куинн Брендан, Дежарден
Коди А., Наджим Джон, Спринг Шон
(US)(32) 2021.11.12; 2021.11.12; 2022.02.22;
2022.02.22

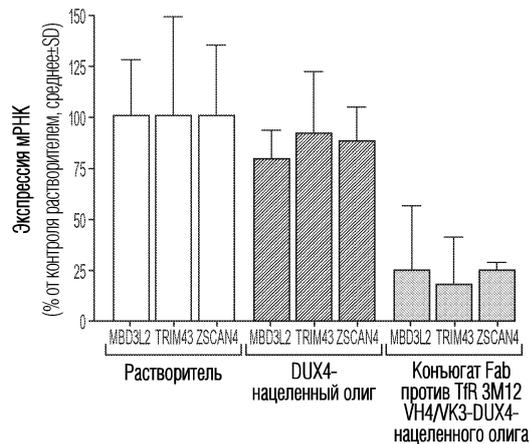
(33) US

(86) PCT/US2022/079604

(87) WO 2023/086864 2023.05.19

(71) Заявитель:
ДАЙН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Аспекты изобретения относятся к олигонуклеотидам, сконструированным для направленного воздействия на РНК DUX4, и к направляющим комплексам для доставки олигонуклеотидов в клетки (например, мышечные клетки), а также в их применениях, в частности к применениям, которые относятся к лечению заболевания (например, ПЛЖИМД), где комплекс включает антитело против рецептора трансферрина 1 (TfR1), ковалентно связанное с олигонуклеотидом, предназначенным для снижения экспрессии и активности DUX4.



A1

202491213

202491213

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580922EA/085

НАЦЕЛЕННЫЕ НА МЫШЦЫ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПЛЕЧЕ-ЛОПАТОЧНО-ЛИЦЕВОЙ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с §119(e) статьи 35 Кодекса США по предварительной заявке на патент США 63/278,882 под названием "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY", поданной 12 ноября 2021 года; предварительной заявке на патент США 63/278,993 под названием "TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY", поданной на 12 ноября 2021 года; предварительной заявке на патент США 63/312,617 под названием "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY", поданной 22 февраля 2022 года; и предварительной заявке на патент США 63/312,633 под названием "TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY", поданной 22 февраля 2022 года, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящая заявка относится к направляющим комплексам для доставки молекулярных нагрузок (например, олигонуклеотидов) в клетки и их применениям, в частности применениям, касающимся лечения заболевания.

ССЫЛКА НА ЭЛЕКТРОННЫЙ СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Содержание электронного списка последовательностей (D082470074WO00-SEQ-CBD.xml; Размер: 467675 байтов; и дата создания: 3 ноября 2022 года), полностью включено в настоящий документ посредством отсылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Мышечные дистрофии (МД) - группа заболеваний, характеризующихся прогрессирующей слабостью и потерей мышечной массы. Эти заболевания вызваны мутациями в генах, которые кодируют белки, необходимые для формирования здоровой мышечной ткани. Плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (ПЛЛМД) представляет собой доминантно наследуемый тип МД, поражающий преимущественно мышцы лица, лопаток и плеч. Другие симптомы ПЛЛМД включают слабость мышц живота, аномалии сетчатки, потерю слуха, боль и воспаление в суставах. ПЛЛМД является наиболее распространенным из девяти типов МД, поражающим как взрослых, так и детей, с частотой случаев во всем мире примерно 1 на 8300 человек. ПЛЛМД вызвана нарушением продукции двойного гомеобокса 4 (DUX4), белка, функция которого неизвестна. Ген DUX4, кодирующий белок DUX4, расположен в области повторов D4Z4 на хромосоме 4 и обычно экспрессируется только в период развития плода, после чего он подавляется

гиперметилованием повторов D4Z4, которые окружают и уплотняют ген DUX4. Описаны два типа ПЛЛМД: тип 1 и тип 2. Тип 1, на который приходится около 95% случаев, связан с делециями повторов D4Z4 на хромосоме 4. В норме у здоровых людей обычно присутствует более 10 повторов, расположенных в субтеломерной области хромосомы 4, тогда как наиболее распространенная форма ПЛЛМД (ПЛЛМД1) вызвана уменьшением последовательности до меньше чем 10 повторов, что связано с пониженной эпигенетической репрессией и неоднородной экспрессией DUX4 в скелетных мышцах. Два аллельных варианта хромосомы 4q (4qA и 4qB) существуют в области, дистальной относительно D4Z4. 4qA находится в цис-положении по отношению к функциональному консенсусному сайту полиаденилирования. Уплотнение аллелей 4qA является патогенным, поскольку транскрипт DUX4 полиаденилирован и транслируется в стабильный белок. ПЛЛМД типа 2, на долю которой приходится около 5% случаев, связан с мутациями гена SMCHD1 на хромосоме 18. Помимо поддерживающей терапии и симптоматического лечения заболевания, эффективных методов терапии ПЛЛМД не существует.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В некоторых аспектах изобретения предложены олигонуклеотиды, сконструированные для таргетинга РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены олигонуклеотиды, комплементарные РНК DUX4, которые могут использоваться для снижения уровней мРНК DUX4 и/или белка, связанного с признаками патологии плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (ПЛЛМД), включая мышечную атрофию, воспаление и сниженный потенциал дифференцировки и окислительный стресс. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем документе, направлены на 3'UTR в РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем документе, предназначены для прямой дегградации РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды предназначены для блокирования трансляции РНК DUX4 с синтезом белка DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они обладали требуемыми показателями биодоступности и/или стабильности в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они обладали требуемыми показателями аффинности связывания. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они обладали требуемыми профилями токсичности и/или иммуногенности.

[0006] Согласно некоторым аспектам изобретения предложены комплексы, которые направленно взаимодействуют с мышечными клетками (например, первичными миобластами) с целью доставки молекулярных нагрузок (например, DUX4-нацеленных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе) в такие клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, особенно полезны для доставки молекулярных нагрузок, которые ингибируют экспрессию или активность DUX4, например, у субъекта, имеющего или подозреваемого на наличие плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (ПЛЛМД). Таким образом, в некоторых

вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, включают нацеленные на мышцы средства (например, нацеленные на мышцы антитела), которые специфично связываются с рецепторами на поверхности мышечных клеток, для доставки молекулярных нагрузок в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы захватываются клетками посредством рецептор-опосредованной интернализации, после которой молекулярная нагрузка может высвободиться с выполнением функции внутри клеток. Например, комплексы, сконструированные для доставки олигонуклеотидов, могут высвободить олигонуклеотиды, в результате чего олигонуклеотиды могут ингибировать экспрессию гена DUX4 в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды высвобождаются в результате расщепления в эндосомах ковалентных линкеров, соединяющих олигонуклеотиды и нацеленные на мышцы средства комплексов.

[0007] Некоторые аспекты настоящего изобретения предложены комплексы, включающие антитело против рецептора трансферрина 1 (TfR1), ковалентно связанное с олигонуклеотидом, предназначенным для снижения экспрессии или активности DUX4, где антитело против TfR1 включает определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) любого из антител против TfR1, перечисленных в Таблицах 2-7, и где олигонуклеотид включает антисмысловую цепь, включающую область комплементарности с последовательностью DUX4, как представлено в SEQ ID NO: 160 или SEQ ID NO: 365.

[0008] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL) любого из антител против TfR1, перечисленных в Таблице 3. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 76, и/или переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 представляет собой Fab, где Fab необязательно включает тяжелую цепь и легкую цепь любого Fab против TfR1, перечисленного в Таблице 5. В некоторых вариантах осуществления Fab включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 101, и/или легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления Fab включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

101, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

[0009] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает область комплементарности длиной по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов с последовательностью DUX4, как представлено в SEQ ID NO: 160 или SEQ ID NO: 365. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает область комплементарности длиной по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов с последовательностью DUX4, как представлено в любой из SEQ ID NO: 161-168 или 213-288. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364, где каждое основание тимин (Т) может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и каждый U может быть независимо и необязательно заменен Т. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид не включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364.

[0010] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид дополнительно включает смысловую цепь, которая гибридизуется с антисмысловой цепью с образованием двухцепочечной миРНК.

[0011] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает один или больше модифицированных нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления один или больше модифицированных нуклеозидов являются 2'-модифицированными нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО).

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело и олигонуклеотид ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность валин-цитруллин.

[0013] В других аспектах настоящего изобретения предложены способы снижения экспрессии DUX4 в мышечной клетке, где способ включает контакт мышечной клеткой с эффективным количеством комплекса, описанного в настоящем документе, для стимуляции интернализации олигонуклеотида в мышечную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка находится у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

[0014] Также в настоящем документе предложены способы лечения плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (ПЛЛМД), где способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества комплекса, описанного в настоящем документе, где субъект имеет нарушенную продукцию белка DUX4. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет одно или больше делеций повтора

D4Z4 в хромосоме 4. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет 10 или меньше повторов D4Z4. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 повтор D4Z4. В некоторых вариантах осуществления субъект не имеет повторов D4Z4.

[0015] Также в настоящем документе предложены олигонуклеотиды, включающие нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0016] На **ФИГ. 1** показано, что конъюгаты, содержащие VH4/Vk3 Fab против TfR 3M12, конъюгированные с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (SEQ ID NO: 151), ингибируют транскриптом DUX4 в иммортализованных клетках C6 (AB1080) FSHD1, на что указывает снижение экспрессии мРНК MBD3L2, TRIM43, и ZSCAN4. Конъюгаты показали превосходную активность по сравнению с неконъюгированным DUX4-нацеленным олигонуклеотидом при ингибировании транскриптома DUX4.

[0017] На **ФИГ. 2A_2B** показаны кривые "доза-эффект" для нокдауна гена. На **ФИГ. 2A** показан нокдаун MBD3L2 в иммортализованных клетках C6 (AB1080) FSHD1, обработанных конъюгатами, содержащими VH4/Vk3 Fab против TfR 3M12, конъюгированные с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (SEQ ID NO: 151). На **ФИГ. 2B** показан нокдаун MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4 в мышечных трубочках пациентов с ПЛЛМД, обработанных конъюгатами, содержащими VH4/Vk3 Fab против TfR 3M12, конъюгированные с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (SEQ ID NO: 151). **ФИГ. 2B** включает данные MBD3L2, показанные на **ФИГ. 2A**.

[0018] На **ФИГ. 3** показаны уровни DUX4-нацеленного олигонуклеотида (SEQ ID NO: 151) в плазме крови приматов, не относящихся к человеку, в динамике после введения 30 мг/кг неконъюгированного ("голого") олигонуклеотида или 3, 10 или 30 мг/кг олигонуклеотидного эквивалента конъюгатов, содержащих VH4/Vk3 Fab против TfR1 3M12, ковалентно связанные с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом ("конъюгат Fab-олигонуклеотид").

[0019] На **ФИГ. 4** показаны уровни DUX4-нацеленного олигонуклеотида (SEQ ID NO: 151) в тканях, измеренные в образцах мышечной ткани приматов, не относящихся к человеку, через две недели после введения 30 мг/кг неконъюгированного ("голого") олигонуклеотида или 3, 10 или 30 мг/кг олигонуклеотидного эквивалента конъюгатов, содержащих VH4/Vk3 Fab против TfR1 3M12, ковалентно связанные с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом ("конъюгат Fab-олигонуклеотид").

[0020] На **ФИГ. 5** показаны уровни DUX4-нацеленного олигонуклеотида (SEQ ID NO: 151) в тканях, измеренные в образцах мышечной ткани приматов, не относящихся к человеку, собранных при биопсии через неделю после введения (5 столбцов слева) или при вскрытии через две недели после введения (5 столбцов справа) 30 мг/кг неконъюгированного олигонуклеотида ("Олиго") или 3, 10 или 30 мг/кг

олигонуклеотидного эквивалента конъюгатов, содержащих VH4/Vk3 Fab против Tfr1 3M12, ковалентно связанные с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом ("Конъюгат").

[0021] На **ФИГ. 6** показано, что конъюгаты, содержащие VH4/Vk3 Fab против Tfr1 3M12, конъюгированные с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (#8, #1 или #2 в Таблице 8, соответствующие SEQ ID NO: 176, 169, 170 соответственно) и контрольный DUX4-нацеленный олигонуклеотид (соответствующий SEQ ID NO: 151), снижали уровни экспрессии маркеров транскриптома DUX4 (MBD3L2, TRIM43, ZSCAN4), что указывает на то, что конъюгаты снижали уровни экспрессии DUX4 в клетках пациента с ПЛЛМД *in vitro*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0022] Некоторые аспекты настоящего описания относятся к олигонуклеотидам, сконструированным для адресного воздействия на РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены олигонуклеотиды, комплементарные РНК DUX4, которые могут использоваться для снижения уровней мРНК и/или белка DUX4, связанных с признаками патологии плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (ПЛЛМД), включая мышечную атрофию, воспаление и снижение потенциала дифференцировки и окислительный стресс. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем документе, направлены на 3'UTR РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем документе, сконструированы для направления деградации РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы для блокирования трансляции РНК DUX4 с синтезом белка DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они обладали требуемой биодоступностью и/или стабильностью в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они обладали требуемыми показателями аффинности связывания. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сконструированы так, чтобы они обладали требуемыми профилями токсичности и/или иммуногенности.

[0023] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены комплексы, включающие нацеленные на мышцы средства, ковалентно связанные с DUX4-нацеленными олигонуклеотидами, для эффективной доставки олигонуклеотидов в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы особенно полезны для доставки молекулярных нагрузок, которые ингибируют экспрессию или активность генов-мишеней в мышечных клетках, например, у субъекта, имеющего или подозреваемого на наличие редкого мышечного заболевания. Например, в некоторых вариантах осуществления предложены комплексы для адресного воздействия на DUX4 для лечения субъектов с ПЛЛМД. В некоторых вариантах осуществления комплексы, предложенные в настоящем документе, включают олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию DUX4 у субъекта, который имеет одну или больше делеций повтора D4Z4 на хромосоме 4.

[0024] Другие аспекты изобретения, включая описание определенных терминов, представлены ниже.

I. Определения

[0025] **Введение:** При использовании в настоящем документе термин "введение" означает предоставление комплекса субъекту таким образом, который является физиологически и/или фармакологически применимым (например, для лечения состояния у лица).

[0026] **Приблизительно:** При использовании в настоящем документе термин "примерно" или "приблизительно" в отношении одного или больше представляющих интерес значений относится к значению, которое аналогично указанному референсному значению. В некоторых вариантах осуществления термин "примерно" или "приблизительно" относится к диапазону значений, которые попадают в 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше в любом направлении (больше чем или меньше чем) от указанного референсного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случая, когда такое количество будет превышать 100% от возможного значения).

[0027] **Антитело:** При использовании в настоящем документе термин "антитело" относится к полипептиду, который включает 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. Впрочем, 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 из антитела верблюдовых, или нанотелом, полученным из антитела акулы. В некоторых вариантах осуществления антитело является диателом. В некоторых вариантах осуществления антитело включает каркас, имеющий последовательность зародышевой линии человека. В другом варианте осуществления антитело включает 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 включает переменную область тяжелой цепи (H) (сокращенно именуемую в настоящем описании как VH) и/или (например, и) переменную область легкой цепи (L) (сокращенно именуемую в настоящем описании как VL). В некоторых вариантах осуществления антитело включает константный домен, например, Fc-область. Константный домен иммуноглобулина относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Аминокислотные последовательности константного домена тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека и их функциональные варианты известны. Что касается тяжелой цепи, в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, описанная в настоящем документе, может быть тяжелой цепью альфа (α), дельта (Δ), эпсилон (ε), гамма (γ) или мю (μ). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, описанная в настоящем документе, может включать тяжелую цепь альфа (α), дельта (Δ), эпсилон (ε), гамма (γ) или мю (μ) человека. В

конкретном варианте осуществления антитело, описанное в настоящем документе, включает домен СН1, СН2 и/или (например, и) СН3 гамма 1 человека. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность домена VH включает аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) человека, такую как любая известная в уровне техники. Неограничивающие примеры последовательностей константной области человека описаны в уровне техники, например, см. патент США 5,693,780 и Kabat E A et al. (1991), выше. В некоторых вариантах осуществления домен VH включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или по меньшей мере 99% идентична любой из константных областей переменной цепи, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело является модифицированным, например, модифицированным посредством гликозилирования, фосфорилирования, сумоилирования и/или (например, и) метилирования. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным антителом, 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 представляют собой моносахариды, дисахариды, олигосахариды или гликаны. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахара или углевода представляют собой разветвленный олигосахарид или разветвленный гликан. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахара или углевода включают маннозное звено, глюкозное звено, N-ацетилглюкозаминное звено, N-ацетилгалактозаминное звено, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления антитело является конструкцией, которая включает полипептид, включающий один или больше антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению, соединенных с линкерным полипептидом или константным доменом иммуноглобулина. Линкерные полипептиды включают 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 ковалентного или нековалентного связывания антитела или части антитела с одним или больше другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование коровой области стрептавидина с получением тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human antibodies and Hybridomas 6:93-101), а также использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки с получением бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol.

Immunol. 31:1047-1058).

[0028] **CDR:** При использовании в настоящем документе термин "CDR" относится к определяющей комплементарности области в переменных последовательностях антител. Типичная молекула антитела включает 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 C-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. hgmp.mrc.ac.uk и 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.

[0029] 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)

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

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

[0030] **Антитело с перевитой CDR:** Термин "антитело с перевитой CDR" относится к антителам, которые включают последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида, но в которых последовательности одной или больше CDR-областей VH и/или (например, и) VL заменены CDR-последовательностями другого биологического вида, таким как антитела, имеющие мышинные варибельные области тяжелой и легкой цепей, в которых одна или больше CDR-областей мыши (например, CDR3) заменены CDR-последовательностями человека.

[0031] **Химерное антитело:** Термин "химерное антитело" относится к антителам, которые включают последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида и последовательности константной области другого биологического вида, таким как антитела, содержащие мышинные варибельные области тяжелой и легкой цепи, соединенные с человеческими константными областями.

[0032] **Комплементарный:** При использовании в настоящем документе термин "комплементарный" относится к возможности точного спаривания между двумя

нуклеозидами или двумя наборами нуклеозидов. В частности, "комплементарный" представляет собой термин, который характеризует степень спаривания посредством образования водородных связей, которое приводит к связыванию между двумя нуклеозидами или двумя наборами нуклеозидов. 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.

[0033] **Консервативная аминокислотная замена:** При использовании в настоящем документе термин "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислоты, которая не приводит к изменению относительных характеристик заряда или размера белка, в котором проведена такая аминокислотная замена. Варианты могут быть получены согласно способам изменения полипептидной последовательности, известным специалисту в данной области, таким как способы, которые можно найти в источниках, в которых собраны такие способы, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012, или *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, проведенные среди аминокислот в следующих группах: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

[0034] **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.

[0035] **Перекрестно реактивный:** При использовании в настоящем документе и в отношении направляющего средства (например, антитела) термин "перекрестно реактивный" относится к способности средства специфично связываться больше чем с одним антигеном подобного типа или класса (например, антигенами множества гомологов, паралоогов или ортологов) со сходной аффинностью или авидностью. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, которое является перекрестно реактивным в отношении антигенов человека и не относящегося к человеку примата аналогичного типа или класса (например, рецептора трансферрина человека и рецептора трансферрина не относящегося к человеку примата), может связываться с антигеном человека и антигенами не относящегося к человеку примата с аналогичной аффинностью или авидностью. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена человека и антигена грызуна аналогичного типа или класса. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена грызуна и антигена не относящегося к человеку примата аналогичного типа или класса. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена человека, антигена не относящегося к человеку примата и антигена грызуна аналогичного типа или класса.

[0036] **DUX4:** При использовании в настоящем документе термин "DUX4" относится к гену, кодирующему белок двойной гомеобокс 4, который обычно экспрессируется во время развития плода и в яичках взрослых мужчин. В некоторых вариантах осуществления DUX4 может быть геном человека (Gene ID: 100288687), не относящегося к человеку примата (например, Gene ID: 750891, Gene ID: 100405864) или грызуна (например, Gene ID: 306226). У человека экспрессия гена DUX4 вне рамок развития плода и вне яичек ассоциирована с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией. Кроме того, были охарактеризованы различные варианты человеческих транскриптов (например, аннотированных под номерами доступа в GenBank RefSeq: NM_001293798.2, NM_001306068.2, NM_001363820.1), которые кодируют разные изоформы белка.

[0037] **Плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (ПЛЛМД):** При использовании в настоящем документе термин "плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (ПЛЛМД)" относится к наследственному заболеванию, вызванному мутациями в гене DUX4 или гене SMCHD1, которое характеризуется потерей мышечной массы и атрофией мышц, прежде всего мышц лица, лопаток и плеч. Были описаны два типа болезни, Тип 1 и Тип 2. Тип 1 связан с делециями в областях повторов D4Z4 на хромосоме 4 аллельного варианта 4qA, которая содержит ген DUX4. Тип 2 связан с мутациями в гене SMCHD1. ПЛЛМД 1 типа и 2 типа характеризуются нарушением синтеза белка DUX4 после развития плода вне яичек. Плече-лопаточно-лицевая дистрофия, генетические основы болезни и связанные симптомы описаны в литературе (см., например, Campbell, A.E., et al., "Facioscapulohumeral dystrophy: Activating an early embryonic transcriptional program in human skeletal muscle" Human Mol Genet. (2018); и Tawil, R. "Facioscapulohumeral muscular dystrophy" Handbook Clin. Neurol. (2018), 148: 541-548). ПЛЛМД 1 типа ассоциирована с

записью под номером 158900 в базе данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). ПЛЛМД 2 типа ассоциирована с записью под номером 158901 в OMIM.

[0038] **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.

[0039] **Человеческое антитело:** Предполагается, что при использовании в настоящем документе термин "человеческое антитело" включает 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.

[0040] **Гуманизированное антитело:** Термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, которые включают 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 включают в нечеловеческие последовательности VH и VL для замены соответствующих нечеловеческих CDR-последовательностей. В одном из

вариантов осуществления предложены гуманизированные антитела против рецептора Tfr1 и их антигенсвязывающие части. Такие антитела могут быть созданы путем получения мышинных антител против Tfr1 с использованием классической гибридомной технологии с последующей гуманизацией при использовании генной инженерии *in vitro*, например, как раскрыто в публикации PCT WO 2005/123126 A2 Kasaiian et al.

[0041] **Интернализующийся рецептор клеточной поверхности:** При использовании в настоящем документе термин "интернализующийся рецептор клеточной поверхности" относится к рецептору клеточной поверхности, который интернализуется клетками, например, в результате внешней стимуляции, например, связывания лиганда с рецептором. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор клеточной поверхности интернализуется посредством эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор клеточной поверхности интернализуется посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза. Впрочем, в некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор клеточной поверхности интернализуется посредством клатрин-независимого пути, такого как, например, фагоцитоз, макропиноцитоз, кавеола- и рафт-опосредованный захват или конститутивный клатрин-независимый эндоцитоз. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор клеточной поверхности включает внутриклеточный домен, трансмембранный домен и/или (например, и) внеклеточный домен, который, необязательно, может дополнительно включать лиганд-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления рецептор клеточной поверхности интернализуется клеткой после связывания лиганда. В некоторых вариантах осуществления лиганд может являться нацеленным на мышцы средством или нацеленным на мышцы антителом. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор клеточной поверхности является трансферриновым рецептором.

[0042] **Выделенное антитело:** При использовании в настоящем документе термин "выделенное антитело" служит для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфично связывает трансферриновый рецептор, по существу не содержит антител, которые специфично связываются с другими антигенами кроме трансферринового рецептора). Впрочем, выделенное антитело, которое специфично связывается с комплексом трансферринового рецептора, может обладать перекрестной реактивностью в отношении других антигенов, таких как молекулы трансферриновых рецепторов из другого биологического вида. Кроме того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или (например, и) химических веществ.

[0043] **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 переменных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части (Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 и Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). В случае переменной области тяжелой цепи гиперпеременная 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 переменной области легкой цепи, гиперпеременная 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.

[0044] **Молекулярная нагрузка:** При использовании в настоящем документе термин "молекулярная нагрузка" относится к молекуле, функция которой заключается в модуляции результата биологического процесса. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка соединена или иным способом ассоциирована с нацеленным на мышцы средством. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является низкомолекулярным соединением, белком, пептидом, нуклеиновой кислотой или олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления функция молекулярной нагрузки заключается в модуляции транскрипции последовательности ДНК, модуляции экспрессии белка или модуляции активности белка. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, который включает цепь, имеющую область комплементарности с геном-мишенью.

[0045] **Нацеленное на мышцы средство:** При использовании в настоящем документе термин "нацеленное на мышцы средство" относится к молекуле, которая специфично связывается с антигеном, экспрессирующимся на мышечных клетках. Антиген в мышечных клетках или на их поверхности может быть мембранным белком, например, интегральным мембранным белком или периферическим мембранным белком. Как правило, средство, нацеленное на мышцы, специфично связывается с антигеном на мышечных клетках, что способствует интернализации нацеленного на мышцы средства (и любой ассоциированной молекулярной нагрузки) в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство специфично связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности на мышцах и может интернализироваться в мышечные клетки посредством рецептор-опосредованной интернализации. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является малой молекулой, белком, пептидом, нуклеиновой кислотой (например, аптамером) или антителом. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство соединено с молекулярной нагрузкой.

[0046] **Нацеленное на мышцы антитело:** При использовании в настоящем документе термин "нацеленное на мышцы антитело" относится к нацеленному на мышцы средству, которое представляет собой антитело, которое специфично связывается с антигеном, присутствующим в мышечных клетках или на их поверхности. В некоторых

вариантах осуществления нацеленное на мышцы антитело специфично связывается с антигеном на мышечных клетках, что способствует интернализации нацеленного на мышцы антитела (и любой ассоциированной молекулярной нагрузки) в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы антитело специфично связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности, присутствующим на мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы антитело является антителом, которое специфично связывается с трансферриновым рецептором.

[0047] **Олигонуклеотид:** При использовании в настоящем документе термин "олигонуклеотид" относится к олигомерному соединению нуклеиновой кислоты длиной до 200 нуклеотидов. Неограничивающие примеры олигонуклеотидов включают РНКи олигонуклеотиды (например, миРНК, мшРНК), микроРНК, гэпмеры, 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.

[0048] **Рекомбинантное антитело:** При использовании в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" служит для включения всех антител человека, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (что более подробно описано в настоящем описании), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., and Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), антитела, выделенные у животного (например, мышцы), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см., например, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Впрочем, в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in*

vitro (или, в случае использования животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности VH и VL областей рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хоть и получены и относятся к последовательностям VH и VL зародышевой линии человека, могут не присутствовать в природном репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*. Один вариант осуществления изобретения относится к полностью человеческим антителам, способным связываться с трансферриновым рецептором человека, которые могут быть созданы способами, хорошо известными в данной области, такими как, без ограничения, использование фаговых библиотек Ig человека, таких как описанные в публикации PCT WO 2005/007699 A2 Jermutus et al.

[0049] **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.

[0050] **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} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M или меньше. В некоторых вариантах осуществления антитело

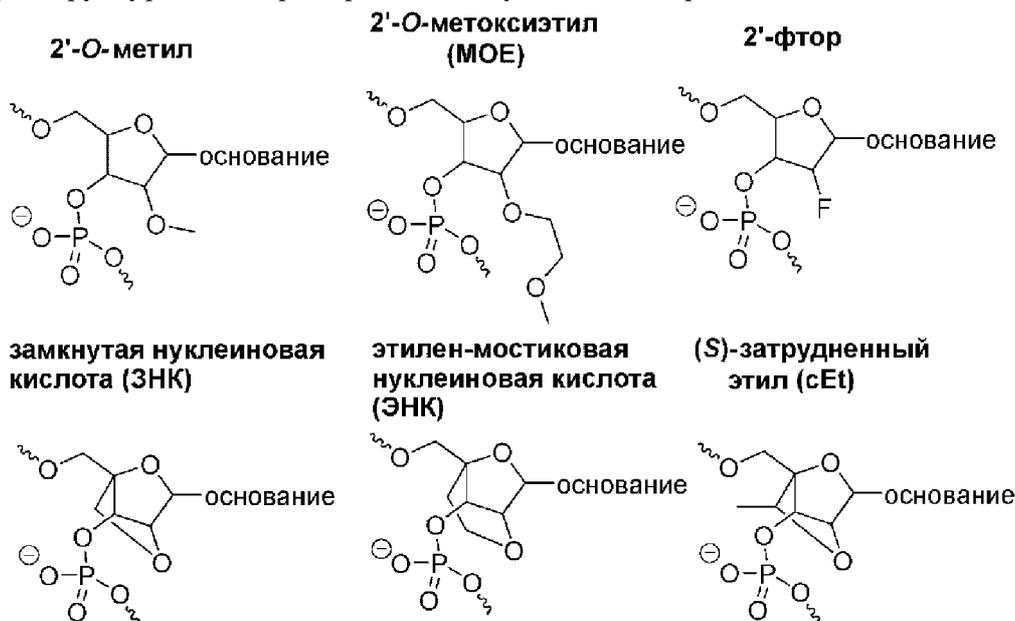
специфично связывается с трансферриновым рецептором, например, эпитопом апикального домена трансферринового рецептора.

[0051] **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, который имеет или подозревается на наличие ПЛЛМД.

[0052] **Трансферриновый рецептор:** При использовании в настоящем документе термин "трансферриновый рецептор" (также известный как TFRC, CD71, p90 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).

[0053] **2'-модифицированный нуклеозид:** При использовании в настоящем документе термины "2'-модифицированный нуклеозид" и "2'-модифицированный рибонуклеозид" используют взаимозаменяемо и относятся к нуклеозиду, имеющему остаток сахара, модифицированный в 2'-положении. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом, где 2'- и 4'-положения сахара соединены мостиком (например, метиленовым, этиленовым или (S)-затрудненным этиловым мостиком). В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является небциклическим 2'-модифицированным нуклеозидом, например, в котором 2'-положение остатка сахара замещено. Неограничивающие примеры 2'-модифицированных нуклеозидов включают: 2'-дезокси, 2'-фтор (2'-F), 2'-O-метил (2'-O-Me), 2'-O-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-O-аминопропил (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-O-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE), 2'-O-M-метилацетамидонуклеозид (2'-O-NMA), замкнутую нуклеиновую кислоту (ЗНК, нуклеиновую кислоту с метиленовым мостиком), нуклеиновую кислоту с этиленовым мостиком (ЭНК) и нуклеиновую кислоту с (S)-затрудненным этиловым мостиком (сEt). В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированные нуклеозиды, описанные в настоящем документе, представляют собой высокоаффинные модифицированные нуклеозиды, при этом олигонуклеотиды, включающие 2'-модифицированные нуклеозиды, обладают повышенной аффинностью к последовательностям-мишеням по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом.

Примеры структур 2'-модифицированных нуклеозидов приведены ниже:



II. Комплексы

[0054] Также в настоящем документе предложены комплексы, которые включают направляющее средство, например антитело, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс включает нацеленное на мышцы антитело, ковалентно связанное с олигонуклеотидом. Комплекс может включать антитело, которое специфично связывается с одним антигенным участком или связывается по меньшей мере с двумя антигенными участками, которые могут существовать на одном или на разных антигенах.

[0055] Комплекс может использоваться для модуляции активности или функции по меньшей мере одного гена, белка и/или (например, и) нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка, присутствующая в комплексе, отвечает за модуляцию гена, белка и/или (например, и) нуклеиновых кислот. Молекулярная нагрузка может быть малой молекулой, белком, нуклеиновой кислотой, олигонуклеотидом или любой молекулой, способной модулировать активность или функцию гена, белка и/или (например, и) нуклеиновой кислоты в клетке. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой олигонуклеотид, который направленно взаимодействует с DUX4 в мышечных клетках или клетках ЦНС.

[00073] В некоторых вариантах осуществления комплекс включают нацеленное на мышцы средство, например, антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, например, антисмысловым олигонуклеотидом, который направленно взаимодействует с DUX4.

A. Нацеленные на мышцы средства

[0057] Некоторые аспекты изобретения относятся к нацеленным на мышцы средствам, например, для доставки молекулярной нагрузки в мышечную клетку. В некоторых вариантах осуществления такие нацеленные на мышцы средства способны

связываться с мышечной клеткой, например, посредством специфичного связывания с антигеном на мышечной клетке и доставлять связанную молекулярную нагрузку в мышечную клетку. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка связана (например, ковалентно связана) с нацеленным на мышцы средством и интернализуется в мышечную клетку при связывании нацеленного на мышцы средства с антигеном на мышечной клетке, например, посредством эндоцитоза. Следует понимать, что в соответствии с изобретением могут использоваться различные типы нацеленных на мышцы средств, и что любые мышечные мишени (например, мышечные поверхностные белки) могут быть подвергнуты адресному воздействию с применением любого типа нацеленного на мышцы средства, описанного в настоящем документе. Например, нацеленное на мышцы средство может включать или состоять из малой молекулы, нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), пептида (например, антитела), липида (например, микровезикулы) или остатка сахара (например, полисахарида). Примеры нацеленных на мышцы средств более подробно описаны в настоящем документе, впрочем, следует понимать, что примеры нацеленных на мышцы средств, представленных в настоящем документе, не являются ограничивающими.

[0058] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены нацеленные на мышцы средства, которые специфично связываются с антигеном на мышце, такой как скелетная мышца, гладкая мышца или сердечная мышца. В некоторых вариантах осуществления любые нацеленные на мышцы средства, предложенные в настоящем документе, связываются (например, специфично связываются) с антигеном на скелетно-мышечной клетке, гладкомышечной клетке и/или (например, и) кардиомиоците.

[0059] При взаимодействии с мышечно-специфическими элементами распознавания клеточной поверхности (например, белками клеточной мембраны) можно обеспечить тканевую локализацию и селективный захват мышечными клетками. В некоторых вариантах осуществления молекулы, которые являются субстратами для переносчиков мышечного захвата, могут использоваться для доставки молекулярной нагрузки в мышечную ткань. Связывание с элементами распознавания поверхности мышечной клетки с последующим эндоцитозом может позволять проникать в мышечные клетки даже крупным молекулам, таким как антитела. В качестве другого примера, молекулярная нагрузка, конъюгированная с трансферрином или антителами против TfR1, может захватываться мышечными клетками посредством связывания с трансферриновым рецептором, который затем может подвергаться эндоцитозу, например, посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза.

[0060] Нацеленные на мышцы средства могут использоваться для сосредоточения молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотида) в мышце при снижении токсического действия, ассоциированного с эффектами в других тканях. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство сосредотачивает связанную молекулярную нагрузку в мышечных клетках по сравнению с другим типом клеток в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство сосредотачивает

связанную молекулярную нагрузку в мышечных клетках (например, скелетно-мышечных, гладкомышечных клетках или кардиомиоцитах) в количестве, которое по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше, чем количество в неммышечных клетках (например, клетках печени, нервных клетках, клетках крови или жировых клетках). В некоторых вариантах осуществления токсичность молекулярной нагрузки у субъекта снижается по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95% при введении субъекту, когда она связана с нацеленным на мышцы средством.

[0061] В некоторых вариантах осуществления для достижения селективности в отношении мышц может потребоваться мышечный элемент распознавания (например, антиген мышечной клетки). В качестве одного примера нацеленное на мышцы средство может быть малой молекулой, которая является субстратом для переносчика мышечно-специфического захвата. В качестве другого примера нацеленное на мышцы средство может быть антителом, которое проникает в мышечную клетку посредством опосредованного переносчиком эндоцитоза. В качестве еще одного примера нацеленное на мышцы средство может быть лигандом, который связывается с рецептором клеточной поверхности на мышечной клетке. Следует понимать, что, хотя подходы на основе переносчиков обеспечивают прямой путь для проникновения в клетку, таргетинг на основе рецепторов может включать стимулируемый эндоцитоз для достижения нужного участка действия.

i. Нацеленные на мышцы антитела

[0062] В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является антителом. Как правило, высокая специфичность антител по отношению к их антигену-мишени обеспечивает потенциал селективного воздействия на мышечные клетки (например, скелетно-мышечные клетки, гладкомышечные клетки и/или (например, и) кардиомиоциты). Такая специфичность также может ограничивать нецелевую токсичность. Примеры антител, способных направленно взаимодействовать с поверхностным антигеном мышечных клеток, были описаны и включены в объем изобретения. Например, антитела, которые направленно взаимодействуют с поверхностью мышечных клеток, описаны в публикациях Arahata K., et al. "Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide" *Nature* 1988; 333: 861-3; Song K.S., et al. "Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins" *J Biol Chem* 1996; 271: 15160-5; и Weisbart R.H. et al., "Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of monoclonal antibody that binds myosin lib" *Mol Immunol.* 2003 Mar, 39(13):78309; полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством отсылки.

a. Антитела против трансферринового рецептора (TfR)

[0063] Некоторые аспекты настоящего изобретения основаны на понимании того, что средства, связывающиеся с трансферриновым рецептором, например антитела против

трансферринового рецептора, способны к адресному взаимодействию с мышечной клеткой. Рецепторы трансферрина являются интернализирующимися рецепторами клеточной поверхности, которые транспортируют трансферрин через клеточную мембрану и участвуют в регуляции и гомеостазе внутриклеточных уровней железа. В некоторых аспектах изобретения предложены связывающие трансферриновый рецептор белки, которые способны связываться с трансферриновым рецептором. Таким образом, в аспектах настоящего изобретения предложены связывающие белки (например, антитела), которые связываются с трансферриновым рецептором. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки, которые связываются с трансферриновым рецептором, интернализируются вместе с любой связанной молекулярной нагрузкой в мышечную клетку. При использовании в настоящем документе антитело, которое связывается с трансферриновым рецептором, может попеременно именоваться как антитело к трансферриновому рецептору, антитело против трансферринового рецептора или антитело против TfR1. Антитела, которые связываются, например специфично связываются, с трансферриновым рецептором, могут интернализироваться в клетку, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, при связывании с трансферриновым рецептором.

[0064] Следует понимать, что антитела против TfR1 могут быть получены, синтезированы и/или (например, и) дериватизированы при использовании нескольких известных способов, например, конструирования библиотек с использованием фагового дисплея. Примеры таких способов охарактеризованы в данной области и включены посредством отсылок (Diez, P. et al. "High-throughput phage-display screening in array format", *Enzyme and microbial technology*, 2015, 79, 34-41; Christoph M. H. and Stanley, J.R. "Antibody Phage Display: Technique and Applications" *J Invest Dermatol.* 2014, 134:2; Engleman, Edgar (Ed.) "Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies", 1985, Springer). В других вариантах осуществления антитело против TfR1 было ранее охарактеризовано или описано. В уровне техники известны антитела, которые специфично связываются с трансферриновым рецептором (см., например, патент США 4,364,934, поданный 12/4/1979, "Monoclonal antibody to human early thymocyte antigen and methods for preparing same"; патент США 8,409,573, поданный 6/14/2006, "Anti-CD71 monoclonal antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells"; патент США 9,708,406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"; патент США 9,611,323, поданный 12/19/2014, "Low affinity blood brain barrier receptor antibodies and uses therefor"; WO 2015/098989, поданную 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier"; Schneider C. et al. "Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9" *J Biol Chem.* 1982, 257:14, 8516-8522; Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse", 2000, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 292: 1048-1052).

[0065] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, связывается с трансферриновым рецептором с высокой специфичностью и аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитело против

TfR1, описанное в настоящем документе, специфично связывается с любым внеклеточным эпитопом трансферринового рецептора или эпитопом, который становится экспонированным для антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, специфично связываются с трансферриновым рецептором человека, не относящихся к человеку приматов, мыши, крысы и т.д. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, связываются с трансферриновым рецептором человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, связывается с аминокислотным сегментом трансферринового рецептора человека или не относящегося к человеку примата, как представлено в SEQ ID NO: 105-108. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, связывается с аминокислотным сегментом, соответствующим аминокислотам 90-96 трансферринового рецептора человека, как представлено в SEQ ID NO: 105, который не является апикальным доменом трансферринового рецептора.

[0066] В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании (например, клон 8 антитела против TfR в Таблице 2 ниже), связываются с эпитопом в TfR1, где эпитоп включает остатки аминокислот 214-241 и/или аминокислот 354-381 в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, связывают эпитоп, включающий остатки аминокислот 214-241 и аминокислот 354-381 в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, связывают эпитоп, включающий один или больше остатков Y222, T227, K231, H234, T367, S368, S370, T376 и S378 TfR1 человека, как представлено в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании, связывают эпитоп, включающий остатки Y222, T227, K231, H234, T367, S368, S370, T376 и S378 TfR1 человека, как представлено в SEQ ID NO: 105.

[0067] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе (например, 3M12 в Таблице 2 ниже и его варианты), связывает эпитоп в TfR1, где эпитоп включает остатки аминокислот 258-291 и/или аминокислот 358-381 в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1 (например, 3M12 в Таблице 2 ниже и его варианты), представленные в настоящем описании, связывают эпитоп, включающий остатки аминокислот 258-291 и аминокислот 358-381 в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании (например, 3M12 в Таблице 2 ниже и его варианты), связывают эпитоп, включающий один или больше из остатков K261, S273, Y282, T362, S368, S370 и K371 TfR1 человека, как представлено в SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, представленные в настоящем описании (например, 3M12 в Таблице 2 ниже и его варианты), связывают эпитоп, включающий остатки K261, S273, Y282, T362, S368, S370 и K371 TfR1 человека, как представлено в SEQ ID NO: 105.

[0068] Пример аминокислотной последовательности трансферринового рецептора

человека, соответствующей последовательности NCBI NP_003225.2 (изоформы 1 белка трансферринового рецептора 1, *Homo sapiens*) является следующим:

MMDQARSASFNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLA VDEEENADNNTK
 ANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGE
 DFPAARRLYWDDLKRKLEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVA YSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 NAELSSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGD
 CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKLNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQRDA
 WGPAAKSGVGTALLKLAQMFSDMVLDKGFQPSRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEG
 YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNW
 ASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR
 AAAEVAGQFVIKLTHTDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSAR
 GDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWS
 GSHTLPALLENLKRKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 105).

[0069] Пример аминокислотной последовательности трансферринового рецептора не относящегося к человеку примата, соответствующей последовательности NCBI NP_001244232.1 (белка трансферринового рецептора 1, *Macaca mulatta*) является следующим:

MMDQARSASFNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLG VDEEENTDNNTK
 PNGTKPKRCGGNICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLEKLDTTDFSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGGLVYLVENPGGYVA YSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKLNIFGVKGFVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPAAKSSVGTALLKLAQMFSDMVLDKGFQPSRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFMKKNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRHVFWS
 GSGHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 106)

[0070] Пример аминокислотной последовательности трансферринового рецептора не относящегося к человеку примата, соответствующей последовательности NCBI XP_005545315.1 (белка трансферринового рецептора 1, *Macaca fascicularis*) является следующим:

MMDQARSASFNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLG VDEEENTDNNTK
 ANGTKPKRCGGNICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE

DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPGA AKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFMKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPF RHVFW
 GSGSHTLSALLESLKLRQNN SAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 107).

[0071] Пример аминокислотной последовательности трансферринового рецептора мыши, соответствующей последовательности NCBI NP_001344227.1 (белка трансферринового рецептора 1, *Mus musculus*) является следующим:

MMDQARS AFSNLF GGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA ADEEENADNNM
 KASVRKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLYGCKRVEQKEECVKLAETEETDKSET
 METEDVPTSSRLYWADLK TLLSEKLN SIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIE
 NQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVS
 GKL V HANFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKF
 PVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLF GK
 MEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGA
 QRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFS DMISKDGF RPSRSIIFASWTAGDFGAVGATE
 WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVV LGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLY
 RDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQ
 LNQMVRTAAEVAGQLI IKLTHDVELNDYEMYN SKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQ
 WLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNR FVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPRHI
 FWGSGSHTLSALVENLKL RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNE
 F (SEQ ID NO: 108)

[0072] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 связывается со следующим аминокислотным сегментом рецептора:

FVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGT
 KKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAEL SFFGH
 AHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTD
 STCRMVTSESKNVKLTVSNVLKE (SEQ ID NO: 109) и не ингибирует связывающие
 взаимодействия между трансферриновым рецептором и трансферрином и/или (например,
 и) белком гемохроматоза человека (также известным как HFE). В некоторых вариантах
 осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, не связывает
 эпитоп в SEQ ID NO: 109.

[0073] Для получения антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих

средств можно использовать соответствующие методы, например, методики рекомбинантных ДНК. В некоторых вариантах осуществления антитело также может быть получено путем создания гибридом (см., например, Kohler, G and Milstein, C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" *Nature*, 1975, 256:495-497). Представляющий интерес антиген можно использовать в качестве иммуногена в любой форме, например, рекомбинантной или природной форме. Гибридомы подвергают скринингу при использовании стандартных методов, например, скринингу с помощью ИФА, для обнаружения по меньшей мере одной гибридомы, которая продуцирует антитело, которое направлено на конкретный антиген. Антитела также могут быть получены путем скрининга библиотек экспрессии белков, которые экспрессируют антитела, например, библиотеки фагового дисплея. Дизайн библиотек фагового дисплея также может использоваться в некоторых вариантах осуществления (см., например, патент США 5,223,409, поданный 3/1/1991, "Directed evolution of novel binding proteins"; WO 1992/18619, поданную 4/10/1992, "Heterodimeric receptor libraries using phagemids"; WO 1991/17271, поданную 5/1/1991, "Recombinant library screening methods"; WO 1992/20791, поданную 5/15/1992, "Methods for producing members of specific binding pairs"; WO 1992/15679, поданную 2/28/1992, и "Improved epitope displaying phage"). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес антиген может использоваться для иммунизации не относящегося к человеку животного, например, грызуна или козы. В некоторых вариантах осуществления антитело затем получают из не относящегося к человеку животного, и при этом, необязательно, оно может быть модифицировано с использованием ряда методов, например, технологий рекомбинантных ДНК. В уровне техники известны дополнительные примеры получения антител и методов (см., например, Harlow et al. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

[0074] В некоторых вариантах осуществления антитело модифицировано, например, модифицировано посредством гликозилирования, фосфорилирования, сумоилирования и/или (например, и) метилирования. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным антителом, которое конъюгировано с одной или больше молекулами сахаров или углеводов. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахаров или углеводов конъюгированы с антителом посредством N-гликозилирования, O-гликозилирования, C-гликозилирования, глипирования (присоединения GPI-якоря) и/или (например, и) фосфогликозилирования. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахаров или углеводов представляют собой моносахариды, дисахариды, олигосахариды или гликаны. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахаров или углеводов является разветвленным олигосахаридом или разветвленным гликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахаров или углеводов включают маннозное звено, глюкозное звено, N-ацетилглюкозаминовое звено, N-ацетилгалактозаминовое звено, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления присутствует приблизительно 1-10, приблизительно 1-5, приблизительно 5-10,

приблизительно 1-4, приблизительно 1-3 или приблизительно 2 молекул сахара. В некоторых вариантах осуществления гликозилированное антитело полностью или частично гликозилировано. В некоторых вариантах осуществления антитело гликозилировано в результате химических реакций или ферментативными методами. В некоторых вариантах осуществления антитело гликозилировано *in vitro* или внутри клетки, которая, необязательно, может быть дефицитной по ферменту в пути N- или O-гликозилирования, например, гликозилтрансферазе. В некоторых вариантах осуществления антитело функционализовано с использованием молекул сахаров или углеводов, как описано в публикации международной заявки на патент WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года под названием "*Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof*".

[0075] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 согласно настоящему изобретению включает VL домен и/или (например, и) VH домен любого из антител против TfR1, выбранных из любой из Таблиц 2-7, и включает константную область, включающую аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b). Неограничивающие примеры константных областей человека описаны в уровне техники, например, см. Kabat E A et al., (1991), выше.

[0076] В некоторых вариантах осуществления средства, связывающиеся с трансферриновым рецептором, например антитела против TfR1, могут направленно воздействовать на мышечную клетку и/или (например, и) опосредовать транспорт средства через гематоэнцефалитический барьер (например, в клетку ЦНС). Трансферриновые рецепторы являются интернализирующимися рецепторами клеточной поверхности, которые переносят трансферрин через клеточную мембрану и участвуют в регуляции и гомеостазе внутриклеточных уровней железа. В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены связывающие трансферриновый рецептор белки, которые способны связываться с трансферриновым рецептором. Антитела, которые связываются, например специфично связываются, с трансферриновым рецептором, могут интернализироваться в клетку, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, при связывании с трансферриновым рецептором.

[0077] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены гуманизированные антитела, которые связываются с трансферриновым рецептором с высокой специфичностью и аффинностью. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, специфично связывается с любым внеклеточным эпитопом трансферринового рецептора или эпитопом, который становится доступным для взаимодействия с антителом. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR1, описанные в настоящем документе, специфично связываются с трансферриновым рецептором человека, не относящихся к человеку приматов, мыши, крысы и т.д. В некоторых вариантах

осуществления гуманизированные антитела против TfR1, описанные в настоящем документе, связываются с трансферриновым рецептором человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, связывается с аминокислотным сегментом трансферринового рецептора человека или не относящегося к человеку примата, как представлено в SEQ ID NO: 105-108. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, связывается с аминокислотным сегментом, соответствующим аминокислотам 90-96 трансферринового рецептора человека, как представлено в SEQ ID NO: 105, который не присутствует в апикальном домене трансферринового рецептора. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела против TfR1, описанные в настоящем документе, связываются с TfR1, но не связываются с TfR2.

[0078] В некоторых вариантах осуществления антитело против TFR1 специфично связывает TfR1 (например, TfR1 человека или не относящегося к человеку примата) с аффинностью связывания (например, как указано значением Kd) по меньшей мере приблизительно 10 M^{-4} , 10 M^{-5} , 10 M^{-6} , 10 M^{-7} , 10 M^{-8} , 10 M^{-9} , 10 M^{-10} , 10 M^{-11} , 10 M^{-12} , 10 M^{-13} или меньше. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, описанные в настоящем документе, связываются с TfR1 с KD субнаномолярного диапазона. В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, описанные в настоящем документе, селективно связываются с трансферриновым рецептором 1 (TfR1), но не связываются с трансферриновым рецептором 2 (TfR2). В некоторых вариантах осуществления антитела против TfR1, описанные в настоящем документе, связываются с TfR1 человека и TfR1 яванского макака (например, с Kd 10 M^{-7} , 10 M^{-8} , 10 M^{-9} , 10 M^{-10} , 10 M^{-11} , 10 M^{-12} , 10 M^{-13} или меньше), но не связываются с TfR1 мыши. Аффинность и кинетику связывания антитела против TfR1 можно определить с помощью любого подходящего метода, в том числе, без ограничения, биосенсорной технологии (например, ОСТЕТ или VIACORE). В некоторых вариантах осуществления связывание любого из антител против TfR1, описанных в настоящем документе, не конкурирует со связыванием или не ингибирует связывание трансферрина с TfR1. В некоторых вариантах осуществления связывание любого из антител против TfR1, описанных в настоящем документе, не конкурирует со связыванием или не ингибирует связывание HFE-бета-2-микроглобулина с TfR1.

[0079] Неограничивающие примеры антител против TfR1 представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Примеры антител против TfR1

Ат	система нумерации	IMGT	Кабат	Чотиа
3-A4	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)

Ат	система нумерации	IMGT	Кабат	Чотиа
	CDR-H2	IDPENGDT (SEQ ID NO: 2)	WIDPENGDT EYASKF QD (SEQ ID NO: 8)	ENG (SEQ ID NO: 13)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSHNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGL EWIGWIDPENGDT EYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)		
	VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-A4 N54T*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPETGDT (SEQ ID NO: 19)	WIDPETGDTEYASKF QD (SEQ ID NO: 20)	ETG (SEQ ID NO: 21)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSHNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGL EWIGWIDPETGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCTLWLRRGLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 22)		
VL	DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)			
3-A4 N54S*	CDR-H1	GFNIKDDY (SEQ ID NO: 1)	DDYMY (SEQ ID NO: 7)	GFNIKDD (SEQ ID NO: 12)
	CDR-H2	IDPESGDT (SEQ ID NO: 23)	WIDPESGDTEYASKF QD (SEQ ID NO: 24)	ESG (SEQ ID NO: 25)
	CDR-H3	TLWLRRGLDY (SEQ ID NO: 3)	WLRRGLDY (SEQ ID NO: 9)	LRRGLD (SEQ ID NO: 14)
	CDR-L1	KSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 4)	RSSKSLLSHNGYTYLF (SEQ ID NO: 10)	SKSLLSHNGYTY (SEQ ID NO: 15)
	CDR-L2	RMS (SEQ ID NO: 5)	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)	RMS (SEQ ID NO: 5)
	CDR-L3	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	MQHLEYPFT (SEQ ID NO: 6)	HLEYPF (SEQ ID NO: 16)

Ат	система нумерации	IMGT	Кабат	Чотиа
	VH	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMYWVKQRPEQGL EWIGWIDPESGDTEYASKFQDKATVTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCTLWLRRLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 26)		
	VL	DIVMTQAAPSPVPTPGESVSISCRSSKLLHSNGYTYLFWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLAGVPDFRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ HLEYPFTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)		
3-M12	CDR-H1	GYSITSGYY (SEQ ID NO: 27)	SGYYWN (SEQ ID NO: 33)	GYSITSGY (SEQ ID NO: 38)
	CDR-H2	ITFDGAN (SEQ ID NO: 28)	YITFDGANNYNPSLKN (SEQ ID NO: 34)	FDG (SEQ ID NO: 39)
	CDR-H3	TRSSYDYDVLDDY (SEQ ID NO: 29)	SSYDYDVLDDY (SEQ ID NO: 35)	SYDYDVLDDY (SEQ ID NO: 40)
	CDR-L1	QDISNF (SEQ ID NO: 30)	RASQDISNFLN (SEQ ID NO: 36)	SQDISNF (SEQ ID NO: 41)
	CDR-L2	YTS (SEQ ID NO: 31)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 37)	YTS (SEQ ID NO: 31)
	CDR-L3	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	QQGHTLPYT (SEQ ID NO: 32)	GHTLPY (SEQ ID NO: 42)
	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLE WMGYITFDGANNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLTSVTTEDTATY YCTRSSYDYDVLDDYWGQGTTLVSS (SEQ ID NO: 43)		
	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNFLNWWYQQRPDGTVKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTVSNLEQEDIATYFCQQGHTLPY TFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 44)		
5-H12	CDR-H1	GYSFTDYC (SEQ ID NO: 45)	DYCN (SEQ ID NO: 51)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYCNWVNQRPGQGLEW IGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVY FCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 61)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQP PKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFLTINPVEAADVATYYCQQSS EDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33Y*	CDR-H1	GYSFTDYY (SEQ ID NO: 63)	DYYIN (SEQ ID NO: 64)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 58)

Ат	система нумерации	IMGT	Кабат	Чотиа
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYINWVNQRPGQGLE WIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAV YFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 65)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQP PKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFLTINPVEAADVATYYCQQSS EDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
5-H12 C33D*	CDR-H1	GYSFTDYD (SEQ ID NO: 66)	DYDIN (SEQ ID NO: 67)	GYSFTDY (SEQ ID NO: 56)
	CDR-H2	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 46)	WIYPGSGNTRYSERFKG (SEQ ID NO: 52)	GSG (SEQ ID NO: 57)
	CDR-H3	AREDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 47)	EDYYPYHGMDY (SEQ ID NO: 53)	DYYPYHGMD (SEQ ID NO: 58)
	CDR-L1	ESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 48)	RASESVDGYDNSFMH (SEQ ID NO: 54)	SESVDGYDNSF (SEQ ID NO: 59)
	CDR-L2	RAS (SEQ ID NO: 49)	RASNLES (SEQ ID NO: 55)	RAS (SEQ ID NO: 49)
	CDR-L3	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	QQSSEDPWT (SEQ ID NO: 50)	SSEDPW (SEQ ID NO: 60)
	VH	QIQLQQSGPELVRPGASVKISCKASGYSFTDYDINWVNQRPGQGLE WIGWIYPGSGNTRYSERFKGKATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAV YFCAREDYYPYHGMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 68)		
	VL	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASESVDGYDNSFMHWYQQKPGQP PKLLIFRASNLESGIPARFSGSGSRTDFLTINPVEAADVATYYCQQSS EDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)		
Клон 8 против TfR	CDR-H1	GYSFTSYW (SEQ ID NO: 138)	SYWIG (SEQ ID NO: 144)	GYSFTSY (SEQ ID NO: 149)
	CDR-H2	IYPGSDT (SEQ ID NO: 139)	IIYPGSDTRYSPSFQ GQ (SEQ ID NO: 145)	GDS (SEQ ID NO: 130)
	CDR-H3	ARFPYDSSGYYSFDY (SEQ ID NO: 140)	FPYDSSGYYSFDY (SEQ ID NO: 146)	PYDSSGYYSFD (SEQ ID NO: 131)
	CDR-L1	QSISSY (SEQ ID NO: 141)	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 147)	QSISSY (SEQ ID NO: 152)
	CDR-L2	AAS (SEQ ID NO: 142)	AASSLQS (SEQ ID NO: 148)	AAS (SEQ ID NO: 142)
	CDR-L3	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 143)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 143)	SYSTPL (SEQ ID NO: 153)

* положения мутаций в соответствующих последовательностях VH, содержащих мутации, соответствуют нумерации Кабата

[0080] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения является гуманизированным вариантом любого из антител против TfR1, представленных в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1

настоящего изобретения включает CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, которые являются такими же, как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 в любом из антител против TfR1, представленных в Таблице 2, и включает гуманизованную переменную область тяжелой цепи и/или (например, и) гуманизованную переменную область легкой цепи.

[0081] Примеры аминокислотных последовательностей антител против TfR1, описанных в настоящем документе, представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Варибельные области антител против TfR1

Антитело	Аминокислотная последовательность варибельной области**
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	V _H : EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGL EWIG WIDPETGDTEYASKFQDR VTVTADTSTNTAYMELSSLRSED TAVYYCTL WLRRLDYWGQGL VTVSS (SEQ ID NO: 69)
	V _L : DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSN LASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3A4 VH3 (N54S*)/Vk4	V _H : EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGL EWIG WIDPESGDTEYASKFQDR VTVTADTSTNTAYMELSSLRSEDT AVYYCTL WLRRLDYWGQGL VTVSS (SEQ ID NO: 71)
	V _L : DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSN LASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3A4 VH3/Vk4	VH: EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIK DDYMYWVRQPPGKGL EWIG WIDPENG DTTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED TAVYYCTL WLRRLDYWGQGL VTVSS (SEQ ID NO: 72)
	VL: DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSK SLLHSNGYTYLFWFQQRPGQ SPRLLIYRMSN LASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
3M12 VH3/Vk2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL EWMGYITFDGANNYN PSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTA TYYCTR SSYDYD VLDYWGQGT TVT VSS (SEQ ID NO: 73)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDISN FLN WYQQKPGQPVKLL IYY TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYFCQQGHTLP YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)
3M12 VH3/Vk3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL EWMGYITFDGANNYN PSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTA TYYCTR SSYDYD VLDYWGQGT TVT VSS (SEQ ID NO: 73)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDISN FLN WYQQKPGQPVKLL IYY TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGHTL PYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)

3M12 VH4/Vκ2	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT YYCTRSSYD YDVLDY WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDISN FLNHWYQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTLP YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)
3M12 VH4/Vκ3	VH: QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT YYCTRSSYD YDVLDY WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 76)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDISN FLNHWYQQKPGQPVKLL IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGHTL P YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTD YYIN WVRQAPGQGL EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARE DYYPYHGMDY WGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 77)
	VL: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASE SVDGYD NSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRDFTLTISSLQAEDVAVYYC Q QSS EDPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 78)
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTD YDIN WVRQAPGQGL EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARE DYYPYHGMDY WGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 79)
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASE SVDGYD NSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC Q QSS EDPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 80)
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	VH: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTD YYIN WVRQAPGQGL EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARE DYYPYHGMDY WGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 77)
	VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASE SVDGYD NSFMHWYQQKPG QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC Q QSS EDPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 80)
Клон 8 антитела против TfR	VH: QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT SYWIG WVRQMPGKGL EWMGI IYPGDS TRYSPSFQ Q VTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCAR FPYDSSGYYSFDY WGQGTTLTVTVSS (SEQ ID NO: 154)
	VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISSY LNHWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTP L TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 155)

**положения мутаций в соответствующих последовательностях VH, содержащих мутации, соответствуют нумерации Кабата*

*** CDR-области, соответствующие системе нумерации Кабата, выделены*

жирным шрифтом

[0082] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 любого из антител против TfR1, представленных в Таблице 3, и включает одну или больше (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) вариаций аминокислот в каркасных областях по сравнению с соответствующей VH, представленной в Таблице 3. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VL, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого из антител против TfR1, представленных в Таблице 3, и включает одну или больше (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) вариаций аминокислот в каркасных областях по сравнению с соответствующей VL, представленной в Таблице 3.

[0083] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 любого из антител против TfR1, представленных в Таблице 3, и включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% (например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99%) идентична по каркасным областям в сравнении с соответствующей VH, представленной в Таблице 3. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VL, включающую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого из антител против TfR1, представленных в Таблице 3, и включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70% (например, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99%) идентична по каркасным областям в сравнении с соответствующей VL, представленной в Таблице 3.

[0084] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[0085] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[0086] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

[0087] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

[0088] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

[0089] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74.

[0090] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

[0091] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

[0092] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

[0093] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80.

[0094] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155.

[0095] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, является полноразмерным IgG, который может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любого из антител против TfR1, как описано в настоящем документе, может включать константную область тяжелой цепи (CH) или ее часть (например, CH1, CH2, CH3 или их комбинацию). Константная область тяжелой цепи может иметь любое подходящее происхождение, например, человека, мыши, крысы или кролика. В одном определенном примере константная область тяжелой цепи происходит из IgG человека (гамма тяжелой цепи), например, IgG1, IgG2 или IgG4. Пример константной области IgG1 человека приведен ниже:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81).

[0096] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любого из антител против TfR1, описанных в настоящем документе, включает мутантную константную область IgG1 человека. Например, введение мутаций LALA (мутант, полученный из mAb b12, которое было подвергнуто мутации с заменой в нижнем домене шарнирной области остатков Leu234 и Leu 235 на Ala234 и Ala235) в CH2 домен человеческого IgG1, как известно, уменьшает связывание с Fcγ-рецептором (Bruhns, P., et al. (2009) and Xu, D. et al.

(2000)). Мутантная константная область IgG1 человека приведена ниже (мутации выделены жирным шрифтом и подчеркнуты):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 82)

[0097] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь любого из антител против TfR1, описанных в настоящем документе, может дополнительно включать константную область легкой цепи (CL), которая может быть любой CL, известной в данной области. В некоторых примерах CL относится к легкой цепи каппа. В других примерах CL относится к легкой цепи лямбда. В некоторых вариантах осуществления CL относится к легкой цепи каппа, последовательность которой представлена ниже:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 83)

[0098] Другие константные области тяжелой и легкой цепи антител известны в уровне техники, например, представлены в базе данных IMGT (www.imgt.org) или на сайте www.vbase2.org/vbstat.php, которые включены в настоящий документ посредством отсылок.

[0099] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую любую из VH, перечисленных в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую любую из VH, перечисленных в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область тяжелой цепи, которая содержит 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) по сравнению с SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую любую из VH, перечисленных в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 81. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую любую из VH, перечисленных в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 82.

[0100] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую любую из VL, перечисленных

в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую любую из VL, как перечислено в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область легкой цепи, которая содержит 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) по сравнению с SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую любую из VL, перечисленных в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 83.

[0101] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи IgG описанных антител против Tfr1 представлены в Таблице 4 ниже.

Таблица 4. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи примеров IgG против Tfr1

Антитело	Последовательности тяжелой цепи/легкой цепи IgG**
3A4 VH3 (N54T*)/Vk4	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKV</u><u>SCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCTLWLRRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLASGVPDFRSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC</u> <u>MQHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC</u> LLNPFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3A4 VH3 (N54S*)/Vk4	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKV</u><u>SCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCTLWLRRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:</p>

	<p>86)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC</u> <u>MOHLEYPTFTGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC</u> LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3A4 VH3/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>EVQLVQSGSELKPKGASVKVSTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPENGDEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCTLWLRRLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST</u> SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 87)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFQORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC</u> <u>MOHLEYPTFTGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC</u> LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3M12 VH3/Vκ2	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIROPKGL</u> <u>EWMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTA</u> <u>TYCYTRSSYDYDVLVDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u> GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQQKPGQPVKL</u> <u>LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGHT</u> <u>LPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFY</u> PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
3M12 VH3/Vκ3	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIROPKGL</u> <u>EWMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTA</u> <u>TYCYTRSSYDYDVLVDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u> GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN</p>

	<p>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 88)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCOQGHTLPYTFGQGTKLEIK</u> <u>RRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADY</u> <u>EKHKVVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 90)</p>
3M12 VH4/Vк2	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL</u> <u>EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYLDDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <u>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL</u> <u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK</u> <u>SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 91)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYFCQOQHTLPYTFGQGTKLEIK</u> <u>RRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADY</u> <u>EKHKVVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 89)</p>
3M12 VH4/Vк3	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGL</u> <u>EWIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYLDDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> <u>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP</u> <u>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK</u> <u>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL</u> <u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK</u> <u>SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> (SEQ ID NO: 91)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCOQOQHTLPYTFGQGTKLEIK</u> <u>RRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY</u> <u>PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADY</u> <u>EKHKVVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC</u> (SEQ ID NO: 90)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vк3	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> <u>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG</u></p>

	<p>LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAVYYC</u> <u>QOSSEDPWTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL</u> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)</p>
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYDINWVRQAPGOGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC</u> <u>QOSSEDPWTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL</u> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с константной областью человеческого IgG1 дикого типа) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYINWVRQAPGOGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC</u> <u>QOSSEDPWTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL</u> LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
Клон 8 антитела	VH:

против TfR	<u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL</u> <u>EWMGHIYPGDS DTRYSPSFOGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT</u> <u>AMYYCARFPYDSSGYYSFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 156)
	VL: <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLL</u> <u>IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYICQOQSYSTP</u> <u>LTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR</u> EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)

**положения мутации соответствуют нумерации по Кабату соответствующих последовательностей VH, содержащих мутации*

*** CDR согласно системе нумерации Кабата выделены жирным шрифтом; последовательности VH/VL подчеркнуты*

[0102] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает тяжелую цепь, включающую 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) по сравнению с тяжелой цепью, представленной в любой из SEQ ID NO: 84, 86, 87, 88, 91, 92, 94 и 156. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения включает легкую цепь, включающую 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) по сравнению с легкой цепью, представленной в любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93, 95 и 157.

[0103] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентична любой из SEQ ID NO: 84, 86, 87, 88, 91, 92, 94 и 156. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентична любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93, 95 и 157. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 84, 86, 87, 88, 91, 92, 94 и 156. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 85,

NO: 95.

[0114] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

[0115] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 представляет собой Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')₂-фрагмент интактного антитела (полноразмерного антитела). Антигенсвязывающий фрагмент интактного антитела (полноразмерного антитела) может быть получен стандартными методами (например, рекомбинантно или при расщеплении константной области тяжелой цепи полноразмерного IgG ферментом, таким как папаин). Например, F(ab')₂-фрагменты могут быть получены при расщеплении пепсином или папаином молекулы антитела, и Fab-фрагменты могут быть получены при восстановлении дисульфидных связей F(ab')₂-фрагментов. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи в Fab-фрагменте антитела против TfR1, описанного в настоящем документе, включает аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT (SEQ ID
NO: 96)

[0116] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую любую из VH, перечисленных в Таблице 3, или их любых вариантов, и константную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую любую из VH, перечисленную в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область тяжелой цепи, которая содержит 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) по сравнению с SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую любую из VH, перечисленную в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 96.

[0117] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую любую из VL, перечисленных в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую любую из VL, перечисленных в Таблице 3, или их любые варианты, и

константную область легкой цепи, которая содержит 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) по сравнению с SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую любую из VL, перечисленных в Таблице 3, или их любые варианты, и константную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 83.

[0118] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи Fab описанных антител против TfR1 представлены в Таблице 5 ниже.

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

Антитело	Последовательности тяжелой цепи/легкой цепи Fab**
3A4 VH3 (N54T*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPETGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 97)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFOQRPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLAASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM</u> <u>QHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3A4 VH3 (N54S*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPESGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 98)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGYTYLFWFOQRPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLAASGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM</u> <u>QHLEYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3A4 VH3/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCTASGFNIKDDYMYWVRQPPGKGL</u> <u>EWIGWIDPENGDTEYASKFQDRVTVTADTSTNTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCTLWLRRLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 99)</p>

	<p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGYTYLFWFOORPGQ</u> <u>SPRLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM</u> <u>QHLEYPTFTGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 85)</p>
3M12 VH3/Vк2	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYYDVLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 100)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYFCQOQHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
3M12 VH3/Vк3	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCSVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WMGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTAT</u> <u>YYCTRSSYDYYDVLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u> GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 100)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCQOQHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
3M12 VH4/Vк2	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTATY</u> <u>YCTRSSYDYYDVLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNFLNWFYQOKPGQPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYFCQOQHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)</p>
3M12 VH4/Vк3	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSGYYWNWIRQPPGKGLE</u> <u>WIGYITFDGANNYNPSLKNRVSISRDTSKNQFSLKLSVTAEDTATY</u> <u>YCTRSSYDYYDVLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 101)</p>

	<p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNFLNWYQOKPGOPVKLL</u> <u>IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLOPEDFATYYCOOGHTLP</u> <u>YTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ3	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 102)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPGQ</u> <u>PPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLOAEDVAVYYCQO</u> <u>SSEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 93)</p>
5H12 VH5 (C33D*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 103)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYYCQ</u> <u>OSSEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
5H12 VH5 (C33Y*)/Vκ4	<p>Тяжелая цепь (с неполной константной областью IgG1 человека) <u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGL</u> <u>EWMGWIYPGSGNTRYSERFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> <u>AVYYCAREDYYPYHGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 102)</p> <p>Легкая цепь (с константной областью легкой цепи каппа) <u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDGYDNSFMHWYQOKPG</u> <u>QPPKLLIFRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYYCQ</u> <u>OSSEDPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL</u> NFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 95)</p>
Вариант 1 клона 8 антитела против TfR	<p>VH: <u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL</u> <u>EWMGIYPGDS DTRYSPSFOGQVTISADKSISTAYLOWSSLKASDTA</u> <u>MYYCAREFPYDSSGYYSFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT P (SEQ ID NO: 158)</p>

	VL: <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLI</u> <u>YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCOQSYSTPL</u> <u>TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u> KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLISKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)
Вариант 2 клона 8 антитела против TfR	VH: <u>QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL</u> <u>EWMGIIYPGDS DTRYSPSFOGQVTISADKSISTAYLOWSSLKASDTA</u> <u>MYYCARFPYDSSGYYSFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK</u> STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSSGL YLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 159)
	VL: <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAPKLLI</u> <u>YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCOQSYSTPL</u> <u>TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u> KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLISKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)

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

*** CDR согласно системе нумерации Кабата выделены жирным шрифтом; последовательности VH/VL подчеркнуты*

[0119] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает тяжелую цепь, 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) по сравнению с тяжелой цепью, представленной в любой из SEQ ID NO: 97-103, 158 и 159. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1 настоящего изобретения включает легкую цепь, 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) по сравнению с легкой цепью, представленной в любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93, 95 и 157.

[0120] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентична любой из SEQ ID NO: 97-103, 158 и 159. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентична любой из SEQ ID NO: 85, 89, 90, 93, 95 и 157. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 97-103, 158 и 159. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую

ID NO: 95.

[0131] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

[0132] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 159, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157.

Другие известные антитела против TfR1

[0133] Любые другие подходящие антитела против TfR1, известные в данной области, могут использоваться в качестве нацеленного на мышцы средства в комплексах, раскрытых в настоящем документе. Примеры известных антител против TfR1, включая соответствующие ссылки и связываемые эпитопы, перечислены в Таблицах 6А и 6В. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 включает области определения комплементарности (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) любого из антител против TfR1, представленного в настоящем документе, например, антител против TfR1, перечисленных в Таблицах 6А и 6В.

Таблица 6А - Список клонов антител против TfR1, включая соответствующие ссылки и информацию по связываемым эпитопам.

Название клона антитела	Ссылка(и)	Эпитоп/примечания
ОКТ9	Патент США 4,364,934, поданный 12/4/1979 под названием "MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME" Schneider C. et al. "Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody ОКТ9". J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.	Апикальный домен TfR1 (остатки 305-366 последовательности TfR1 человека XM_052730.3, доступной в GenBank)
(JCR) Клон М11 Клон М23 Клон М27 Клон В84	<ul style="list-style-type: none"> • WO 2015/098989, поданная 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier" • Патент США 9,994,641, поданный 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier" 	Апикальный домен (остатки 230-244 и 326-347 TfR1) и протеаза-подобный домен (остатки 461-473)
(Genentech) 7А4, 8А2, 15D2, 10D11, 7В10, 15G11, 16G5, 13С3, 16G4, 16F6, 7G7, 4С2, 1В12, и 13D4	<ul style="list-style-type: none"> • WO 2016/081643, filed 5/26/2016, entitled "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE" • Патент США 9,708,406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use" 	Апикальный домен и неапикальные области

(Armagen) 8D3	<ul style="list-style-type: none"> • Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse" 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052. • Заявка на патент США 2010/077498, поданная 9/11/2008 под названием "COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE" 	
OX26	<ul style="list-style-type: none"> • Naobam, B. et al. 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806-21. 	
DF1513	<ul style="list-style-type: none"> • Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. Plant J 48:757-70 (2006). 	
1A1B2, 66IG10, MEM-189, JF0956, 29806, 1A1B2, TFRC/1818, 1E6, 66Ig10, TFRC/1059, Q1/71, 23D10, 13E4, TFRC/1149, ER-MP21, YTA74.4, BU54, 2B6, RI7 217	<ul style="list-style-type: none"> • Доступные в продаже антитела против рецептора трансферрина. 	Novus Biologicals 8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120
(От INSERM) BA120g	<ul style="list-style-type: none"> • Заявка на патент США 2011/0311544A1, поданная 6/15/2005 под названием "ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS" 	Не конкурирует с ОКТ9
LUCA31	<ul style="list-style-type: none"> • Патент США 7,572,895, поданный 6/7/2004 под названием "TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES" 	"Эпитоп LUCA31"
(Институт Солка) B3/25 T58/30	<ul style="list-style-type: none"> • Trowbridge, I.S. et al. "Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells". Nature, 1981, volume 294, pages 171-173 	
R17 217.1.3, 5E9C11, ОКТ9 (клон BE0023)	<ul style="list-style-type: none"> • Доступные в продаже антитела против рецептора трансферрина. 	BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B West Lebanon, NH 03784- 1671 USA
БК19.9, B3/25, T56/14 и T58/1	<ul style="list-style-type: none"> • Gatter, K.C. et al. "Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance". J Clin Pathol. 1983 May; 36(5):539-45. 	

Таблица 6В – Дополнительные антитела против Tfr1

	VH/VL	CDR1	CDR2	CDR3		VH/VL	CDR1	CDR2	CDR3
VH	SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 190	SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 192	VH1	SEQ ID NO: 205	SEQ ID NO: 198	SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 192
VL	SEQ ID NO: 197	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 195	VH2	SEQ ID NO: 206	SEQ ID NO: 198	SEQ ID NO: 200	SEQ ID NO: 192
					VH3	SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 198	SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 192
					VH4	SEQ ID NO: 208	SEQ ID NO: 198	SEQ ID NO: 200	SEQ ID NO: 192
					VL1	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 115
					VL2	SEQ ID NO: 210	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 115
					VL3	SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 193	SEQ ID NO: 202	SEQ ID NO: 195
					VL4	SEQ ID NO: 212	SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 204	SEQ ID NO: 195

[0134] В некоторых вариантах осуществления антитела против Tfr1 настоящего изобретения включают одну или больше аминокислотных последовательностей CDR-H (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) из любого из антител против Tfr1, выбранных из Таблиц 6А и 6В. В некоторых вариантах осуществления антитела против Tfr1 включают CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные для любого из антител против Tfr1, выбранных из Таблиц 6А и 6В. В некоторых вариантах осуществления антитела против Tfr1 включают CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, представленные для любого из антител против Tfr1, выбранных из Таблиц 6А и 6В.

[0135] В некоторых вариантах осуществления антитела против Tfr1 согласно изобретению включают любое антитело, включающее переменный домен тяжелой цепи и/или (например, и) переменный домен легкой цепи любого антитела против Tfr1, такого как любое из антител против Tfr1, выбранных из Таблицы 6А и 6В. В некоторых вариантах осуществления антитела против Tfr1 согласно изобретению включают любое антитело, включающее пары переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи любого антитела против Tfr1, такого как любое из антител против Tfr1, выбранных из Таблиц 6А и 6В.

[0136] В аспектах изобретения предложены антитела против Tfr1, имеющие аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH) и/или (например, и) переменного домена легкой цепи (VL), гомологичную любой из описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 включает последовательность переменного домена тяжелой цепи или последовательность переменного домена легкой цепи, которая по меньшей мере на 75% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентична последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или любой последовательности переменного домена легкой цепи любого антитела против Tfr1, такого как любое из антител против Tfr1, выбранных из Таблиц 6А и 6В. В

некоторых вариантах осуществления гомологичные аминокислотные последовательности варибельного домена тяжелой цепи и/или (например, и) варибельного домена легкой цепи не отличаются ни по одной из CDR-последовательностей, представленных в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления, некоторая степень вариации последовательности (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) может наблюдаться в последовательности варибельного домена тяжелой цепи и/или (например, и) варибельного домена легкой цепи, за исключением любой из последовательностей CDR, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TfR1, предложенных в настоящем документе, включает последовательность варибельного домена тяжелой цепи и последовательность варибельного домена легкой цепи, включающую каркасную последовательность, которая по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична каркасной последовательности любого антитела против TfR1, такого как любое из антител против TfR1, выбранных из Таблицы 6А и 6В.

[0137] Пример антитела к трансферриновому рецептору, которое может применяться в соответствии с настоящим изобретением, описан в публикации международной заявки WO 2016/081643, включенной в настоящий документ посредством отсылки. Аминокислотные последовательности этого антитела представлены в Таблице 7.

Таблица 7. CDR тяжелой цепи и легкой цепи примера известного антитела против TfR1

Тип последовательности	Кабат	Чотиа	Контакт
CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 110)	GYTFTSY (SEQ ID NO: 116)	TSYWMH (SEQ ID NO: 118)
CDR-H2	EINPTNGRTNYIEKFKS (SEQ ID NO: 111)	NPTNGR (SEQ ID NO: 117)	WIGEINPTNGRTN (SEQ ID NO: 119)
CDR-H3	GTRAYHY (SEQ ID NO: 112)	GTRAYHY (SEQ ID NO: 112)	ARGTRA (SEQ ID NO: 120)
CDR-L1	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 113)	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 113)	YSNLAWY (SEQ ID NO: 121)
CDR-L2	DATNLAD (SEQ ID NO: 114)	DATNLAD (SEQ ID NO: 114)	LLVYDATNLA (SEQ ID NO: 122)
CDR-L3	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 115)	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 115)	QHFWGTPL (SEQ ID NO: 123)
Мышиная VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSTVSS (SEQ ID NO: 124)		
Мышиная VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQKQKSPQLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFHWGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 125)		
Гуманизированная VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLIEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 128)		

Тип последовательности	Кабат	Чотиа	Контакт
Гуманизированная VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHF WGTPITFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 129)		
HC химерного полноразмерного IgG1	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 132)		
LC химерного полноразмерного IgG1	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKSPQLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYYCQHF FWGTPITFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 133)		
HC полностью человеческого полноразмерного IgG1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134)		
LC полностью человеческого полноразмерного IgG1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHF WGTPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 135)		
HC химерного Fab	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 136)		
HC полностью человеческого Fab	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTTCP (SEQ ID NO: 137)		

[0138] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, такие же, как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, показанные в Таблице 7. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, такие же, как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, показанные в Таблице 7.

[0139] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает CDR-L3, которая содержит не больше 3 вариаций аминокислот (например, не больше 3, 2 или 1 вариации аминокислоты) по сравнению с CDR-L3, как показано в Таблице 7. В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает CDR-L3, содержащую одну вариацию аминокислоты по сравнению с CDR-L3, как показано в Таблице 7. В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает CDR-L3 QHFAGTPLT (SEQ ID NO: 126) (согласно системе определения Кабата и Чотиа) или QHFAGTPL (SEQ ID NO: 127) (согласно системе определения Контакт). В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1 и CDR-L2, такие же, как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, показанные в Таблице 7, и включает CDR-L3 QHFAGTPLT (SEQ ID NO: 126) (согласно системе определения Кабата и Чотиа) или QHFAGTPL (SEQ ID NO: 127) (согласно системе определения Контакт).

[0140] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает CDR-области тяжелой цепи, которые в совокупности по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичны CDR-областям тяжелой цепи, показанным в Таблице 7. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает CDR-области легкой цепи, которые в совокупности по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичны CDR-областям легкой цепи, показанным в Таблице 7.

[0141] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

[0142] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129.

[0143] В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1 настоящего изобретения включает 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) по сравнению с VH, представленной в SEQ ID NO: 128. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против Tfr1

настоящего изобретения включает VL, содержащую не больше 15 вариаций аминокислоты (например, не больше 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 вариации аминокислоты) по сравнению с VL, представленной в SEQ ID NO: 129.

[0144] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 настоящего изобретения является полноразмерным антителом IgG1, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи из человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любого из антител против TfR1, как описано в настоящем документе, может включать константную область тяжелой цепи (CH) или ее часть (например, CH1, CH2, CH3 или их комбинацию). Константная область тяжелой цепи может иметь любое соответствующее происхождение, например, человека, мыши, крысы или кролика. В одном конкретном примере константная область тяжелой цепи происходит из IgG человека (тяжелой цепи гамма), например, IgG1, IgG2 или IgG4. Пример константной области IgG1 человека приведен ниже:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 81)

[0145] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь любого из антител против TfR1, описанных в настоящем документе, может дополнительно включать константную область легкой цепи (CL), которая может быть любой CL, известной в уровне техники. В некоторых примерах CL относится к легкой цепи каппа. В других примерах CL относится к легкой цепи лямбда. В некоторых вариантах осуществления CL относится к легкой цепи каппа, последовательность которой представлена ниже:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 83)

[0146] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, является химерным антителом, включающим тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 132. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

[0147] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, является полностью человеческим антителом, включающим тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

[0148] В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 является антигенсвязывающим фрагментом (Fab) интактного антитела (полноразмерного антитела). В некоторых вариантах осуществления Fab против TfR1, описанный в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), Fab против TfR1, описанный в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления Fab против TfR1, описанный в настоящем документе, включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. В альтернативе или дополнительно (например, дополнительно), Fab против TfR1, описанный в настоящем документе, включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135.

[0149] Антитела против TfR1, описанные в настоящем документе, могут быть в любой форме антитела, включая, без ограничения, интактные (т.е. полноразмерные) антитела, их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела, биспецифичные антитела или нанотела. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, представляет собой scFv-Fab (например, scFv, слитый с частью константной области). В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1, описанное в настоящем документе, представляет собой scFv, слитый с константной областью (например, константной областью человеческого IgG1, как представлено в SEQ ID NO: 81).

[0150] В некоторых вариантах осуществления консервативные мутации могут быть введены в последовательности антитела (например, CDR или каркасные последовательности) в положения, где остатки с малой вероятностью будут участвовать во взаимодействии с антигеном-мишенью (например, трансферриновым рецептором), например, как определяют на основе кристаллической структуры. В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замены) вводят в Fc-область антитела против TfR1, описанного в настоящем документе (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или (например, и) шарнирную область, с нумерацией согласно системе нумерации Кабата (например, индекс EU в публикации Кабата)), для изменения одного или больше функциональных свойств антитела, таких как полупериод существования в сыворотке, связывание комплемента, связывание Fc-рецептора и/или (например, и) антигензависимая клеточная цитотоксичность.

[0151] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в шарнирную область Fc-области (домен CH1) таким образом, что число остатков цистеина в шарнирной области изменяется (например, увеличивается или уменьшается), как описано, например, в патенте США 5,677,425.

Количество остатков цистеина в шарнирной области домена СН1 можно изменять, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей, или для изменения (например, повышения или снижения) стабильности антитела или облегчения конъюгирования с линкером.

[0152] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций (например, аминокислотных замен) вводят в Fc-область нацеленного на мышцы антитела, описанного в настоящем документе (например, в домен СН2 (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) домен СН3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или (например, и) шарнирную область, с нумерацией согласно системе нумерации Кабата (например, индекс EU в публикации Кабата)), для повышения или снижения аффинности антитела к Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области антитела, которые снижают или повышают аффинность антитела к Fc-рецептору, а также способы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент, известны специалисту в данной области. Примеры мутаций в Fc-рецепторе антитела, которые можно вводить для изменения аффинности антитела к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186, патент США 6,737,056 и Международный номер Публикации WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631, которые включены в настоящий документ посредством отсылки.

[0153] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций аминокислот (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc или фрагмент шарнир-Fc-домена) для изменения (например, уменьшения или увеличения) полупериода существования антитела *in vivo*. См., например, международные публикации WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631; и патенты США 5,869,046, 6,121,022, 6,277,375 и 6,165,745 для получения примеров мутаций, которые изменяют (например, уменьшают или увеличивают) полупериод существования антитела *in vivo*.

[0154] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций аминокислот (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc или фрагмент шарнир-Fc-домена) для уменьшения полупериода существования антитела против TfR1 *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций аминокислот (*m.e.* замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc или фрагмент шарнир-Fc-домена) для увеличения полупериода существования антитела *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитела могут иметь одну или больше мутаций аминокислот (например, замен) во втором константном домене (СН2) (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) третьем константном домене (СН3) (остатки 341-447 IgG1 человека), с нумерацией согласно индексу EU в публикации Кабата (Kabat E et al., (1991) выше). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 антитела, описанного в настоящем документе, включает замена метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в

положении 254 и замену треонина (Т) на глутаминовую кислоту (Е) в положении 256 с нумерацией согласно индексу EU, как в публикации Кабата. См. патент США 7,658,921, включенный в настоящий документ посредством отсылки. Как было показано, этот тип мутантного IgG, обозначенный как "YTE мутант", показал в четыре раза увеличенный полупериод существования по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). В некоторых вариантах осуществления антитело включает константный домен IgG, включающий одну, две, три или больше замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436 с нумерацией согласно индексу EU, как в публикации Кабата.

[0155] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше замен аминокислот вводят в константный домен Fc-области IgG для изменения эффекторной функции(й) антитела против TfR1. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяется, может быть, например, Fc-рецептором или C1 компонентом комплемента. Этот подход более подробно описан в патентах США 5,624,821 и 5,648,260. В некоторых вариантах осуществления делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других способов) домена константной области могут уменьшать связывание циркулирующего антитела с Fc-рецептором, что повышает локализацию в опухоли. См., например, патенты США 5,585,097 и 8,591,886 для получения описания мутаций, которые приводят к удалению или инактивации константного домена и, таким образом, повышению локализации в опухоли. В некоторых вариантах осуществления одна или больше замен аминокислот могут быть введены в Fc-область антитела, описанного в настоящем документе, для удаления потенциальных сайтов гликозилирования на Fc-области, что может уменьшить связывание с Fc-рецептором (см., например, Shields R L et al., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604).

[0156] В некоторых вариантах осуществления одна или больше аминокислот в константной области антитела против TfR1, описанного в настоящем документе, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или (например, и) сниженную или отсутствующую комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход более подробно описан в патенте США 6,194,551 (Idusogie et al.). В некоторых вариантах осуществления один или больше аминокислотных остатков в N-концевой области CH2 домена антитела, описанного в настоящем документе, изменяют так, чтобы изменить способность антитела связывать комплемент. Этот подход также описан в международной публикации WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, описанного в настоящем документе, изменяют так, чтобы увеличить способность антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или (например, и) увеличить аффинность антитела к Fcγ-рецептору. Данный подход также описан в международной публикации WO 00/42072.

[0157] В некоторых вариантах осуществления последовательность(и) переменного(ых) домена(ов) тяжелой и/или (например, и) легкой цепи антител,

предложенных в настоящем документе, может использоваться для получения, например, антител с перевитыми CDR-областями, химерных, гуманизированных или составных человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов, как описано в другой части настоящего документа. Как известно среднему специалисту в данной области, любые вариантные, с перевитыми CDR-областями, химерные, гуманизированные или составные антитела, полученные на основе любого из антител, предложенных в настоящем документе, могут применяться в композициях и способах, описанных в настоящем документе, и будут сохранять способность специфично связывать трансферриновый рецептор, причем такое вариантное, с перевитыми CDR-областями, химерное, гуманизированное или составное антитело будет иметь по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или большее связывание с трансферриновым рецептором по сравнению с исходным антителом, из которого оно получено.

[0158] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, включают мутации, придающие антителам нужные свойства. Например, чтобы избежать потенциальных осложнений из-за обмена Fab-плечами, который, как известно, происходит в случае нативных мАт IgG4, антитела, предложенные в настоящем документе, могут включать стабилизирующую мутацию 'Adair' (Angal S., et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody", *Mol Immunol* 30, 105-108; 1993), где серин 228 (нумерация EU; остаток 241 согласно нумерации Кабата) превращен в пролин, что дает IgG1-подобную последовательность шарнирной области. Таким образом, любое из антител может включать стабилизирующую мутацию 'Adair'.

[0159] 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 (присоединение 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 представляют собой разветвленный олигосахарид или разветвленный гликан. В некоторых вариантах осуществления одна или больше молекул сахара или углевода включает маннозное звено, глюкозное звено, N-ацетилглюкозаминовое звено, N-ацетилгалактозаминовое звено, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления присутствует приблизительно 1-10, приблизительно 1-5, приблизительно 5-10, приблизительно 1-4, приблизительно 1-3 или приблизительно 2 молекулы сахара. В некоторых вариантах

осуществления гликозилированное антитело полностью или частично гликозилировано. В некоторых вариантах осуществления антитело гликозилировано с помощью химических реакций или ферментативных способов. В некоторых вариантах осуществления антитело гликозилировано *in vitro* или внутри клетки, которая необязательно может быть дефицитной по ферменту в пути N- или O-гликозилирования, например, гликозилтрансферазе. В некоторых вариантах осуществления антитело функционализировано молекулами сахара или углевода, как описано в публикации международной заявки на патент WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года под названием "*Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof*".

[0160] В некоторых вариантах осуществления любое из антител против Tfr1, описанных в настоящем документе, может включать сигнальный пептид в последовательности тяжелой и/или (например, и) легкой цепи (например, N-концевой сигнальный пептид). В некоторых вариантах осуществления антитело против Tfr1, описанное в настоящем документе, включает любую из последовательностей VH и VL, любую из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи IgG, или любую из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи F(ab'), описанных в настоящем документе, и дополнительно включает сигнальный пептид (например, N-концевой сигнальный пептид). В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид включает аминокислотную последовательность MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 104).

[0161] В некоторых вариантах осуществления антитело, 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 глутамин (Gln) в процессе производства. Фактически, нужно понимать, что антитело, указанное как имеющее последовательность, включающую N-концевой остаток глутамата или глутамин, 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.

в. Другие нацеленные на мышцы антитела

[0162] В некоторых вариантах осуществления антитело, нацеленное на мышцы, является антителом, которое специфично связывает гемоувелин, кавеолин 3, пептид миодистрофии Дюшенна, миозин IIb или CD63. В некоторых вариантах осуществления антитело, нацеленное на мышцы, является антителом, которое специфично связывает белок миогенных клеток-предшественников. Примеры белков миогенных предшественников включают, без ограничения, ABCG2, M-кадгерин/кадгерин-15, кавеолин 1, CD34, FoxK1, интегрин альфа-7, интегрин альфа-7 бета-1, MYF-5, MyoD, миогенин, NCAM-1/CD56, Pax3, Pax7 и Pax9. В некоторых вариантах осуществления антитело, нацеленное на мышцы, является антителом, которое специфично связывает белок скелетных мышц. Примеры

белков скелетных мышц включают, без ограничения, альфа-саркогликан, бета-саркогликан, ингибиторы кальпаина, креатинкиназу MM/CKMM, eIF5A, енолазу 2/нейрон-специфическую енолазу, эpsilon-саркогликан, FABP3/H-FABP, GDF-8/миостатин, GDF-11/GDF-8, интегрин альфа-7, интегрин альфа-7 бета-1, интегрин бета-1/CD29, MCAM/CD146, MyoD, миогенин, ингибиторы киназы легких цепей миозина, NCAM-1/CD56 и тропонин I. В некоторых вариантах осуществления антитело, нацеленное на мышцы, является антителом, которое специфично связывает белок гладких мышц. Примеры белков гладких мышц включают, без ограничения, альфа-актин гладких мышц, VE-кадгерин, кальдесмон/CALD1, кальпонин 1, десмин, гистамин H2 R, мотилин R/GPR38, трансгелин/TAGLN и виментин. Однако нужно понимать, что в объем настоящего изобретения входят антитела к дополнительным мишеням, и примерные списки мишеней, представленные в настоящем документе, не должны быть ограничивающими.

с. Признаки/изменения антител

[0163] В некоторых вариантах осуществления консервативные мутации могут быть введены в последовательности антитела (например, CDR или последовательности каркасную) в положениях, в которых остатки с малой вероятностью будут участвовать во взаимодействии с антигеном-мишенью (например, рецептором трансферрина), например, как определяют на основе кристаллической структуры. В некоторых вариантах осуществления, одну, две или больше мутаций (например, замен аминокислот) вводят в Fc-область нацеленного на мышцы антитела, описанного в настоящем документе (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или (например, и) шарнирную область, с нумерацией согласно системе нумерации Кабата (например, индексу EU в публикации Кабата)), для изменения одного или больше функциональных свойств антитела, таких как полупериод существования в сыворотке, связывание комплемента, связывание Fc-рецептора и/или (например, и) антигензависимая клеточная цитотоксичность.

[0164] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций (например, замен аминокислот) вводят в шарнирную область Fc-области (домен CH1) таким образом, что число остатков цистеина в шарнирной области изменяется (например, увеличивается или уменьшается), как описано в, например, патенте США 5,677,425. Количество остатков цистеина в шарнирной области домена CH1 может быть изменено, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для изменения (например, повышения или снижения) стабильности антитела или облегчения конъюгирования с линкером.

[0165] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций (например, замен аминокислот) вводят в Fc-область нацеленного на мышцы антитела, описанного в настоящем документе (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или (например, и) шарнирную область, с нумерацией согласно системе нумерации Кабата (например, индексу EU в публикации Кабата)), для повышения или снижения аффинности антитела к

Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области антитела, которые снижают или повышают аффинность антитела к Fc-рецептору, а также способы введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области. Примеры мутаций в Fc-рецепторе антитела, которые могут быть сделаны для изменения аффинности антитела к Fc-рецептору, описаны, например, Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186, патенте США 6,737,056 и международных публикациях WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631, которые включены в настоящий документ посредством отсылки.

[0166] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций аминокислот (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc или фрагмент шарнир-Fc-домена) для изменения (например, уменьшения или увеличения) полупериода существования антитела *in vivo*. См., например, международные публикации WO 02/060919; WO 98/23289; и WO 97/34631; и патенты США 5,869,046, 6,121,022, 6,277,375 и 6,165,745 для получения примеров мутаций, которые изменяют (например, уменьшают или увеличивают) полупериод существования антитела *in vivo*.

[0167] В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций аминокислот (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc или фрагмент шарнир-Fc-домена) для уменьшения полупериода существования антитела против рецептора трансферрина *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления одну, две или больше мутаций аминокислот (т.е. замен, вставок или делеций) вводят в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc или фрагмент шарнир-Fc-домена) для увеличения полупериода существования антитела *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитела могут иметь одну или больше мутаций аминокислот (например, замен) во втором константном домене (CH2) (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или (например, и) третьем константном домене (CH3) (остатки 341-447 IgG1 человека) с нумерацией согласно индексу EU в публикации Кабата (Kabat E et al., (1991) выше). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 антитела, описанного в настоящем документе, включает замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в положении 256 с нумерацией согласно индексу EU, как в публикации Кабата. См. патент США 7,658,921, включенный в настоящий документ посредством отсылки. Как было показано, такой тип мутантного IgG, называемый "YTE мутантом", показал в четыре раза увеличенный полупериод существования по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). В некоторых вариантах осуществления антитело включает константный домен IgG, включающий одну, две, три или больше замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436 при нумерации согласно индексу EU, как в публикации Кабата.

[0168] В некоторых вариантах осуществления одна, две или больше замен

аминокислот вводят в Fc-область константного домена IgG для изменения эффекторной функции(й) антитела против трансферринового рецептора. Эффекторный лиганд, к которому изменяют аффинность, может быть, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход более подробно описан в Патентах США 5,624,821 и 5,648,260. В некоторых вариантах осуществления делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других средств) домена константной области могут уменьшать связывание циркулирующего антитела с Fc-рецептором, таким образом, увеличивая локализацию опухоли. См., например, патенты США 5,585,097 и 8,591,886 для получения описания мутаций, которые удаляют или инактивируют константный домен и, таким образом, увеличивают локализацию в опухоли. В некоторых вариантах осуществления одна или больше замен аминокислот могут быть введены в Fc-область антитела, описанного в настоящем документе, для удаления потенциальных сайтов гликозилирования на Fc-области, что может уменьшать связывание с Fc-рецептором (см., например, Shields R L et al., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604).

[0169] В некоторых вариантах осуществления одна или больше аминокислот в константной области нацеленного на мышцы антитела, описанного в настоящем документе, могут быть заменены другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или (например, и) сниженную или отсутствующую комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход более подробно описан в патенте США 6,194,551 (Idusogie et al.). В некоторых вариантах осуществления один или больше аминокислотных остатков в N-концевой области домена CH2 антитела, описанного в настоящем документе, изменяют так, чтобы изменить способность антитела связывать комплемент. Этот подход также описан в международной публикации WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, описанного в настоящем документе, изменяют так, чтобы увеличить способность антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или (например, и) повысить аффинность антитела к Fcγ-рецептору. Этот подход также описан в международной публикации WO 00/42072.

[0170] В некоторых вариантах осуществления последовательность(и) переменного домена(ов) тяжелой и/или (например, и) легкой цепи антител, предложенных в настоящем документе, может использоваться для получения, например, антител с перевитыми CDR-областями, химерных, гуманизированных или составных человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов, как описано в другой части настоящего документа. Как известно среднему специалисту в данной области, любые вариантные, с перевитыми CDR-областями, химерные, гуманизированные или составные антитела, полученные на основе любого из антител, предложенных в настоящем документе, могут применяться в композициях и способах, описанных в настоящем документе, и сохраняют способность специфично связывать трансферриновый рецептор, причем вариантное, с перевитыми CDR-областями, химерное, гуманизированное или составное антитело имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 95% или большее связывание с трансферриновым рецептором по сравнению с исходным антителом, из которого оно получено.

[0171] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в настоящем документе, включают мутации, которые придают антителам нужные свойства. Например, чтобы избежать потенциальных осложнений из-за обмена Fab-плечами, который, как известно, происходит в случае нативных мАт IgG4, антитела, предложенные в настоящем документе, могут включать стабилизирующую мутацию 'Adair' (Angal S., et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody", *Mol Immunol* 30, 105-108; 1993), где серин 228 (нумерация EU; остаток 241 согласно нумерации Кабата) превращен в пролин, что приводит к IgG1-подобной последовательности шарнирной области. Таким образом, любое из антител может включать стабилизирующую мутацию 'Adair'.

[0172] Как предусмотрено в настоящем документе, антитела настоящего изобретения необязательно могут включать константные области или их части. Например, VL домен может быть соединен на своем С-конце с константным доменом легкой цепи, таким как С_κ или С_λ. Аналогичным образом, VH домен или его часть могут быть соединены со всей или частью тяжелой цепи, такой как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM и любой подкласс изотипа. Антитела могут включать подходящие константные области (см., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Таким образом, антитела в рамках этого изобретения могут включать VH и VL домены или их антигенсвязывающую часть, объединенные с любыми подходящими константными областями.

ii. Нацеленные на мышцы пептиды

[0173] В некоторых аспектах изобретения предложены нацеленные на мышцы пептиды в качестве средств, адресно воздействующих на мышцы. Были описаны короткие пептидные последовательности (например, пептидные последовательности длиной 5-20 аминокислот), которые связываются с определенными типами клеток. Например, нацеленные на клетки пептиды были описаны в Vines e., et al., A. "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery" *Biochim Biophys Acta* 2008, 1786: 126-38; Jarver P., et al., "In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery" *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 528-35; Samoylova T.I., et al., "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening" *Muscle Nerve* 1999; 22: 460-6; патенте США 6,329,501, опубликованном 11 декабря 2001 года под названием "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE"; и Samoylov A.M., et al., "Recognition of cell-specific binding of phage display derived peptides using an acoustic wave sensor", *Biomol Eng* 2002; 18: 269-72; все содержание которых включено в настоящий документ посредством отсылки. При конструировании пептидов для взаимодействия со специфическими антигенами клеточной поверхности (например, рецепторами) может быть достигнута селективность в отношении требуемой ткани, например, мышечной. Было исследовано направленное воздействие на скелетные мышцы, и при этом можно обеспечивать доставку различных молекулярных

нагрузок. Такие подходы могут обладать высокой селективностью в отношении мышечной ткани без многих практических недостатков крупного антитела или вирусной частицы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство представляет собой нацеленный на мышцы пептид, который имеет длину от 4 до 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид имеет длину 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислот. Нацеленные на мышцы пептиды могут быть получены любым из нескольких методов, таких как фаговый дисплей.

[0174] В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид может связываться с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности, который сверхэкспрессируется или экспрессируется на относительно высоком уровне в мышечных клетках, например, трансферриновый рецептор, по сравнению с некоторыми другими клетками. В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид может направленно взаимодействовать, например связываться, с трансферриновым рецептором. В некоторых вариантах осуществления пептид, который направленно взаимодействует с трансферриновым рецептором, может включать сегмент природного лиганда, например, трансферрина. В некоторых вариантах осуществления пептид, который направленно взаимодействует с трансферриновым рецептором, является таким, как описано в патенте США 6,743,893, поданном 30/11/2000, "RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF PEPTIDES THAT BIND THE HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR". В некоторых вариантах осуществления пептид, который направленно взаимодействует с трансферриновым рецептором, является таким, как описано в публикации Kawamoto, M. et al, "A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid killing of cancer cells", BMC Cancer. 2011 Aug 18; 11:359. В некоторых вариантах осуществления пептид, который направленно взаимодействует с трансферриновым рецептором, является таким, как описано в патенте США 8,399,653, поданном 20/05/2011, "TRANSFERRIN/TRANSFERRIN RECEPTOR-MEDIATED SIRNA DELIVERY".

[0175] Как обсуждается выше, были описаны примеры нацеленных на мышцы пептидов. Например, мышечно-специфические пептиды были идентифицированы с помощью библиотеки фагового дисплея, презентующей поверхностные гептапептиды. В качестве одного примера пептид, имеющий аминокислотную последовательность ASSLNIA (SEQ ID NO: 184), связывался с мышечными трубками C2C12 *in vitro* и связывался с мышечной тканью *in vivo*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство включает аминокислотную последовательность ASSLNIA (SEQ ID NO: 184). Этот пептид демонстрировал улучшенную специфичность при связывании с тканью сердечной и скелетной мышцы после внутривенной инъекции у мышей, а также пониженное связывание с печенью, почкой и головным мозгом. Дополнительные мышечно-специфические пептиды были идентифицированы с помощью фагового дисплея. Например, пептид из 12 аминокислот

был идентифицирован при использовании библиотеки фагового дисплея для направленного воздействия на мышцы в контексте лечения МДД. См. публикацию Yoshida D., et al., "Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats", *Int J Pharm* 2002; 231: 177-84; все содержание которой настоящим включено посредством отсылки. В данном случае был идентифицирован пептид длиной 12 аминокислот, имеющий последовательность SKTFNTHPQSTP (SEQ ID NO: 185), и этот нацеленный на мышцы пептид показал улучшенное связывание с клетками C2C12 по сравнению с пептидом ASSLNIA (SEQ ID NO: 184).

[0176] Дополнительный метод идентификации пептидов, селективных к мышце (например, скелетной мышце) по сравнению с другими типами клеток, включает отбор *in vitro*, описанный в публикации Ghosh D., et al., "Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting" *J Virol* 2005; 79: 13667-72; все содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки. Путем предварительного инкубирования библиотеки фагового дисплея, включающей случайные 12-мерные пептиды, со смесью клеток немышечных типов отбирали неспецифичные пептиды, связывающиеся с клетками. После нескольких раундов отбора наиболее часто присутствовал пептид из 12 аминокислот TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 177). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство включает аминокислотную последовательность TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 177).

[0177] Нацеленное на мышцы средство может быть содержащей аминокислоты молекулой или пептидом. Нацеленный на мышцы пептид может соответствовать последовательности белка, который предпочтительно связывается с белковым рецептором, обнаруженным в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид имеет высокое содержание гидрофобных аминокислот, например, валина, в результате чего пептид предпочтительно взаимодействует с мышечными клетками. В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид не был ранее охарактеризован или раскрыт. Эти пептиды могут быть задуманы, получены, синтезированы и/или (например, и) дериватизированы при использовании любого из различных методов, например, экспонированных на фаге библиотек пептидов, библиотек пептидов "одна гранула - одно соединение" или комбинаторных библиотек синтетических пептидов с позиционным сканированием. Примеры методик были описаны в данной области и включены посредством отсылки (Gray, B.P. and Brown, K.C. "Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides" *Chem Rev.* 2014, 114:2, 1020-1081; Samoylova, T.I. and Smith, B.F. "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening", *Muscle Nerve*, 1999, 22:4 460-6). В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид был раскрыт ранее (см., например, Writer M.J. et al. "Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic vectors incorporating novel targeting peptides selected by phage display", *J. Drug Targeting*. 2004; 12:185; Cai, D. "BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart", *Physiol Genomics*. 2006, 24:3, 191-

7.; Zhang, L. "Molecular profiling of heart endothelial cells", *Circulation*, 2005, 112:11, 1601-11; McGuire, M.J. et al. "In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo", *J Mol Biol.* 2004, 342:1, 171-82). Примеры нацеленных на мышцы пептидов включают аминокислотную последовательность из следующей группы: CQAQGQLVC (SEQ ID NO: 178), CSERSMNFC (SEQ ID NO: 179), CPKTRRVPC (SEQ ID NO: 180), WLSEAGPVVTVRALRGTGSW (SEQ ID NO: 181), ASSLNIA (SEQ ID NO: 184), CMQHSMRVC (SEQ ID NO: 182), and DDTRHWG (SEQ ID NO: 183). В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид может включать приблизительно 2-25 аминокислот, приблизительно 2-20 аминокислот, приблизительно 2-15 аминокислот, приблизительно 2-10 аминокислот или приблизительно 2-5 аминокислот. Нацеленные на мышцы пептиды могут включать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные аланина, аминокислоты с линейной основой, N-метил-аминокислоты и другие аминокислоты, известные в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид может быть линейным; в других вариантах осуществления нацеленный на мышцы пептид может быть циклическим, например, бициклическим (см., например, Silvana, M.G. et al. *Mol. Therapy*, 2018, 26:1, 132-147).

iii. Нацеленные на мышцы лиганды рецепторов

[0178] Нацеленное на мышцы средство может быть лигандом, например, лигандом, который связывается с рецепторным белком. Нацеленный на мышцы лиганд может быть белком, например, трансферрином, который связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности, экспрессируемым мышечной клеткой. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является трансферрином или его производным, которые связываются с трансферриновым рецептором. Нацеленный на мышцы лиганд в альтернативе может быть малой молекулой, например, липофильной малой молекулой, которая предпочтительно взаимодействует с мышечными клетками по сравнению с другими типами клеток. Примеры липофильных малых молекул, которые могут направленно взаимодействовать с мышечными клетками, включают соединения, включающие холестерин, холестерил, стеариновую кислоту, пальмитиновую кислоту, олеиновую кислоту, олеил, линолен, линолевую кислоту, миристиновую кислоту, стерин, дигидротестостерон, производные тестостерона, глицерин, алкильные цепи, тритильные группы и алкоксикислоты.

iv. Нацеленные на мышцы аптамеры

[0179] Нацеленное на мышцы средство может быть аптамером, например, РНК-аптамером, который предпочтительно взаимодействует с мышечными клетками по сравнению с другими типами клеток. В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы аптамер не был ранее охарактеризован или раскрыт. Такие аптамеры могут быть задуманы, получены, синтезированы и/или (например, и) дериватизированы при использовании любой из нескольких методик, например, Систематической эволюции

лигандов экспоненциальным обогащением. Примеры методик были описаны в данной области и включены посредством отсылки (Yan, A.C. and Levy, M. "Aptamers and aptamer targeted delivery" *RNA biology*, 2009, 6:3, 316-20; Germer, K. et al. "RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications", *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2013; 4: 27-40). В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы аптамер был раскрыт ранее (см., например, Phillippou, S. et al. "Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers", *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018, 10:199-214; Thiel, W.H. et al. "Smooth Muscle Cell-targeted RNA Aptamer Inhibits Neointimal Formation", *Mol Ther*. 2016, 24:4, 779-87). Примеры нацеленных на мышцы аптамеров включают РНК-аптамер A01B и РНК Apt 14. В некоторых вариантах осуществления аптамер является аптамером на основе нуклеиновой кислоты, олигонуклеотидным аптамером или пептидным аптамером. В некоторых вариантах осуществления аптамер может иметь массу приблизительно 5-15 кДа, приблизительно 5-10 кДа, приблизительно 10-15 кДа, приблизительно 1-5 Да, приблизительно 1-3 кДа или меньше.

v. Другие нацеленные на мышцы средства

[0180] Одна из стратегий адресного воздействия на мышечную клетку (например, клетку скелетной мышцы) состоит в использовании субстрата мышечного белка-переносчика (транспортера), такого как белок-переносчик, экспрессируемый на сарколемме. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является субстратом инфлюкс-транспортера, который является специфичным в отношении мышечной ткани. В некоторых вариантах осуществления инфлюкс-транспортер является специфичным в отношении ткани скелетной мышцы. На сарколемме скелетной мышцы экспрессируются два основных класса транспортеров: (1) суперсемейство аденозинтрифосфат (АТФ)-связывающей кассеты (ABC), которые облегчают отток из ткани скелетных мышц, и (2) суперсемейство транспортеров растворенных веществ (SLC), которые могут облегчать приток субстратов в скелетную мышцу. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является субстратом, который связывается с суперсемейством ABC- или суперсемейством SLC-транспортеров. В некоторых вариантах осуществления субстрат, который связывается с суперсемейством ABC- или SLC-транспортеров, является природным субстратом. В некоторых вариантах осуществления субстрат, который связывается с суперсемейством ABC- или SLC-транспортеров, является неприродным субстратом, например, синтетическим производным, которое связывается с суперсемейством ABC- или SLC-транспортеров.

[0181] В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является любым нацеленным на мышцы средством, описанным в настоящем документе (например, антителами, нуклеиновыми кислотами, малыми молекулами, пептидами, аптамерами, липидами, молекулами сахаров), которое направленно взаимодействует с суперсемейством SLC-транспортеров. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является субстратом суперсемейства SLC-транспортеров. SLC-транспортеры являются равновесными или используют градиенты протонов или ионов

натрия, создаваемые через мембрану, для направления транспорта субстратов. Примеры SLC-транспортеров, имеющих высокую экспрессию в скелетных мышцах, включают, без ограничения, транспортер SATT (ASCT1; SLC1A4), транспортер GLUT4 (SLC2A4), транспортер GLUT7 (GLUT7; SLC2A7), транспортер ATRC2 (CAT-2; SLC7A2), транспортер LAT3 (KIAA0245; SLC7A6), транспортер PHT1 (PTR4; SLC15A4), транспортер OATP-J (OATP5A1; SLC21A15), транспортер OCT3 (EMT; SLC22A3), транспортер OCTN2 (FLJ46769; SLC22A5), транспортеры ENT (ENT1; SLC29A1 и ENT2; SLC29A2), транспортер PAT2 (SLC36A2) и транспортер SAT2 (KIAA1382; SLC38A2). Эти транспортеры могут облегчать приток субстратов в скелетную мышцу, обеспечивая возможности для направленного воздействия на мышцы.

[0182] В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является субстратом равновесного транспортера нуклеозидов 2 (ENT2). По сравнению с другими транспортерами, ENT2 имеет один из наиболее высоких уровней экспрессии мРНК в скелетных мышцах. Хотя ENT2 человека (hENT2) экспрессируется в большинстве органов тела, таких как головной мозг, сердце, плацента, тимус, поджелудочная железа, предстательная железа и почки, особенно им богаты скелетные мышцы. ENT2 человека облегчает захват своих субстратов в зависимости от их градиента концентрации. ENT2 играет роль в поддержании гомеостаза нуклеозидов посредством транспорта широкого спектра пуриновых и пиримидиновых нуклеиновых оснований. Транспортер hENT2 имеет низкую аффинность ко всем нуклеозидам (аденозину, гуанозину, уридину, тимидину и цитидину) за исключением инозина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является субстратом ENT2. Неограничивающие примеры субстратов ENT2 включают инозин, 2',3'-дидезоксиинозин и клофарабин. В некоторых вариантах осуществления любое из нацеленных на мышцы средств, предложенных в настоящем документе, связаны с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидной нагрузкой). В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство нековалентно связано с молекулярной нагрузкой.

[0183] В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является субстратом транспортера органических катионов/карнитина (OCTN2), который является натрийзависимым высокоаффинным транспортером карнитина. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является карнитином, милдронатом, ацетилкарнитином или их любым производным, которое связывается с OCTN2. В некоторых вариантах осуществления карнитин, милдронат, ацетилкарнитин или их производное ковалентно связаны с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидной нагрузкой).

[0184] Нацеленное на мышцы средство может быть белком, который существует по меньшей мере в одной растворимой форме, которая направленно взаимодействует с мышечными клетками. В некоторых вариантах осуществления нацеленный на мышцы белок может представлять собой гемоювелин (также известный как направляющая

молекула отталкивания С или белок гемоматоза 2 типа), белок, играющий роль в перегрузке железом и гомеостазе железа. В некоторых вариантах осуществления гомоувелин может быть полноразмерным или фрагментом, или мутантом, обладающим по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с функциональным белком гомоувелином. В некоторых вариантах осуществления мутант гомоувелина может быть растворимым фрагментом, может не иметь N-концевого сигнального и/или (например, и) не иметь С-концевого якорного домена. В некоторых вариантах осуществления гомоувелин может быть аннотирован под регистрационными номерами в GenBank RefSeq NM_001316767.1, NM_145277.4, NM_202004.3, NM_213652.3 или NM_213653.3. Нужно понимать, что гомоувелин может происходить из человека, не относящегося к человеку примата или грызуна.

В. Молекулярные нагрузки

[0185] В некоторых аспектах изобретения предложены молекулярные нагрузки, например, олигонуклеотиды, сконструированные для направленного взаимодействия РНК DUX4 для модуляции экспрессии или активности DUX4. В некоторых вариантах осуществления модуляция экспрессии или активности DUX4 включает снижение уровней РНК и/или (например, и) белка DUX4. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид соединен или иным образом связан с нацеленным на мышцы средством, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления такие олигонуклеотиды способны адресно воздействовать на DUX4 в мышечной клетке, например, путем специфичного связывания с последовательностью DUX4 в мышечной клетке после доставки в мышечную клетку с помощью ассоциированного нацеленного на мышцы средства. Следует понимать, что различные типы нацеленных на мышцы средств могут применяться в соответствии с изобретением. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает цепь, имеющую область комплементарности с последовательностью DUX4. Примеры олигонуклеотидов, нацеленных на РНК DUX4, описаны в настоящем документе более подробно, однако следует понимать, что примеры молекулярных нагрузок, представленные в настоящем документе, не должны быть ограничивающими.

i. Олигонуклеотиды

[0186] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть сконструирован, чтобы вызывать деградацию мРНК (например, олигонуклеотид может быть гэпмером, миРНК, рибозимом или аптамером, вызывающим деградацию). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть сконструирован, чтобы блокировать трансляцию мРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть сконструирован, чтобы вызывать деградацию и блокировать трансляцию мРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть сконструирован, чтобы вызывать снижение экспрессии РНК DUX4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть сконструирован, чтобы вызывать снижение

экспрессии белка DUX4. Другие примеры олигонуклеотидов представлены в настоящем документе. Нужно понимать, что в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды в одном формате (например, антисмысловых олигонуклеотидов) могут быть соответственно адаптированы к другому формату (например, миРНК олигонуклеотидов) путем включения функциональных последовательностей (например, последовательностей антисмысловой цепи) из одного формата в другой формат.

[0187] Любой подходящий олигонуклеотид может использоваться в качестве молекулярной нагрузки, как описано в настоящем документе. Примеры олигонуклеотидов, полезных для нацеливания на DUX4, представлены в патенте США 9,988,628, опубликованном 2 февраля 2017 года под названием "AGENTS USEFUL IN TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY"; патенте США 9,469,851, опубликованном 30 октября 2014 года под названием "RECOMBINANT VIRUS PRODUCTS AND METHODS FOR INHIBITING EXPRESSION OF DUX4"; заявке на патент США 20120225034, опубликованной 6 сентября 2012 года под названием "AGENTS USEFUL IN TREATING FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY"; публикации заявки на патент PCT WO 2013/120038, опубликованной 15 августа 2013 года под названием "MORPHOLINO TARGETING DUX4 FOR TREATING FSHD"; Chen et al., "Morpholino-mediated Knockdown of DUX4 Toward Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Therapeutics", *Molecular Therapy*, 2016, 24:8, 1405-1411.; и Anseau et al., "Antisense Oligonucleotides Used to Target the DUX4 mRNA as Therapeutic Approaches in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD)", *Genes*, 2017, 8, 93; содержание которых включено в настоящий документ во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является антисмысловым олигонуклеотидом, морфолиновым олигомером, миРНК, мшРНК или другим олигонуклеотидом, который гибридизуется с геном-мишенью или мРНК DUX4.

[0188] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности с последовательностью, которая указана как: DUX4 человека, соответствующий последовательности NCBI NM_001293798.1 (SEQ ID NO: 186), NM_001293798.2 (SEQ ID NO: 187) и/или (например, и) NM_001306068.3 (SEQ ID NO: 188); как указано ниже и/или (например, и) DUX4 мыши, соответствующий последовательности NCBI NM_001081954.1 (SEQ ID NO: 189), как указано ниже. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности с гипометилированным, укороченным повтором D4Z4, как описано в публикациях Daxinger, et al., "Genetic and Epigenetic Contributors to FSHD", опубликовано в *Curr Opin Genet Dev* в 2015 году, Lim J-W, et al., "DICER/AGO-dependent epigenetic silencing of D4Z4 repeats enhanced by exogenous siRNA suggests mechanisms and therapies for FSHD" *Hum Mol Genet.* 2015 Sep 1; 24(17): 4817-4828, содержание каждой из которых включено во всей полноте.

[0189] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности с последовательностью, представленной ниже, которая является примером последовательности гена DUX4 человека (NM_001293798.1) (SEQ ID

NO: 186):

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCCCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGAC
 GAGGACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCC
 TGCTTTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGC
 CATCGGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCC
 AGCTGAGGCAGCACCCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCC GGGAGACGCGGCCCGCCA
 GAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCG
 AGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAG
 AGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGG
 CACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAGCGCGG
 CCCCCGGCGGGGGTACCCTGCTCCCTCGTGGGTTCGCTTCGCCACACCGGCGCGT
 GGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAG
 GGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCGCGCTGCAGCCAGCCAGGC
 CGCGCCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCGGGCGCGCGGGGATTTGCCTACG
 CCGCCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCACCCCTCAGGCTCCTCGGTGGCCTC
 CGCACCCGGGCAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGG
 CCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCCTCAAGCGGGGCCGAGGGCCAAGGGG
 TGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCC
 CAGGTCGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCAGCC
 CGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGG
 CGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGC
 TGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAG
 AAACGGAGGCCCGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCTCGCTGGAAGC
 ACCCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAG

[0190] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности с последовательностью, представленной ниже, которая является примером последовательности гена DUX4 человека (NM_001293798.2) (SEQ ID NO: 187):

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCCCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGAC
 GAGGACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCC
 TGCTTTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGC
 CATCGGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCC
 AGCTGAGGCAGCACCCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCC GGGAGACGCGGCCCGCCA
 GAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCG
 AGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAG
 AGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGG
 CACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAGCGCGG
 CCCCCGGCGGGGGTACCCTGCTCCCTCGTGGGTTCGCTTCGCCACACCGGCGCGT
 GGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAG
 GGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCGCGCTGCAGCCAGCCAGGC

CGCGCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTTCGCCTACG
 CCGCCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCCACCCTCAGGCTCCTCGCTGGCCTC
 CGCACCCGGGCAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGG
 CCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCCGCTCAAGCGGGGCCGCAGGGCCAAGGGG
 TGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCC
 CAGGTGCGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCC
 CGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGG
 CGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGC
 TGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAG
 AAACGGAGGCCCCCGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCCTCGCTGGAAGC
 ACCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGT
 CTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAGAACTGCCATTCTTTCTGGGCATCC
 CGGGGATCCCAGAGCCGGCCAGGTACCAGCAGACCTGCGCGCAGTGCGCACCCCG
 GCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTCTTCCGTGAAATTCT
 GGCTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTA
 CATCTCCTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTAATAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCT
 ATAG

[0191] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности с последовательностью, представленной ниже, которая является примером последовательности гена DUX4 человека (NM_001306068.3) (SEQ ID NO: 188):

[0192]

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAGG
 ACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGCT
 TTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCCATC
 GGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCCAGCT
 GAGGCAGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGGCCCGCCAGAA
 GGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCGAGC
 CTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAGAGA
 CGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGGCAC
 CCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAGCGCGGCCCC
 CGGCGGGGGTCAACCCTGCTCCCTCGTGGGTGCCTTCGCCACACCGGCGCGTGGGG
 AACGGGGCTTCCCGCACCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAGGGGG
 CTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCGCGCTGCAGCCCAGCCAGGCCGCG
 CCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTTCGCCTACGCCG
 CCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCCACCCTCAGGCTCCTCGGTGGCCTCCGCA
 CCCGGGCAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGGCCCT
 GCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCCGCTCAAGCGGGGCCGCAGGGCCAAGGGGTGCTT
 GCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCCAGGT
 CGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCCCGCGC

CCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCCGGCGCCC
 TCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTG
 GATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAAC
 GGAGGCCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCCGCCTCGCTGGAAGCACCCC
 TCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGTTGGGA
 CGGGGTTCGGGTGGTTCGGGGCAGGGCGGTGGCCTCTCTTTCGCGGGGAACACCTGG
 CTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCCGCCCCCTCCACCGGGCTGACCGGCCTGG
 GATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACTCCGCGGAGAAGTGCC
 TTTCTTTCCTGGGCATCCCAGGAGTCCCAGAGCCGGCCAGGTACCAGCAGACCTGC
 GCGCAGTGCACACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTT
 GTTCTTCCGTGAAATTCTGGCTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCA
 AACCTGGATTAGAGTTACATCTCCTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTAATAATGCC
 CCCTCCCTGTGGATCCTATAG

[0193] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности с последовательностью, представленной ниже, которая является примером последовательности гена DUX4 мыши (SEQ ID NO: 189) (NM_001081954.1):

ATGGCAGAAGCTGGCAGCCCTGTTGGTGGCAGTGGTGTGGCACGGGAATCCC
 GGCGGCGCAGGAAGACGGTTTGGCAGGCCTGGCAAGAGCAGGCCCTGCTATCAACT
 TTCAAGAAGAAGAGATACCTGAGCTTCAAGGAGAGGAAGGAGCTGGCCAAGCGAA
 TGGGGGTCTCAGATTGCCGCATCCGCGTGTGGTTTCAGAACCGCAGGAATCGCAGTG
 GAGAGGAGGGGCATGCCTCAAAGAGGTCCATCAGAGGCTCCAGGCGGCTAGCCTCG
 CCACAGCTCCAGGAAGAGCTTGGATCCAGGCCACAGGGTAGAGGCATGCGCTCATC
 TGGCAGAAGGCCTCGCACTCGACTCACCTCGCTACAGCTCAGGATCCTAGGGCAAG
 CCTTTGAGAGGAACCCACGACCAGGCTTTGCTACCAGGGAGGAGCTGGCGCGTGAC
 ACAGGGTTGCCCGAGGACACGATCCACATATGGTTTCAAACCGAAGAGCTCGGCG
 GCGCCACAGGAGGGGCAGGCCACAGCTCAAGATCAAGACTTGCTGGCGTCAACAAG
 GGTCGGATGGGGCCCCTGCAGGTCCGGAAGGCAGAGAGCGTGAAGGTGCCCAGGA
 GAACTTGTTGCCACAGGAAGAAGCAGGAAGTACGGGCATGGATACTCGAGCCCTA
 GCGACTTGCCCTCCTTCTGCGGAGAGTCCCAGCCTTCCAAGTGGCACAGCCCCGTG
 GAGCAGGCCAACAAGAGGCCCCCACTCGAGCAGGCAACGCAGGCTCTCTGGAACCC
 CTCCTTGATCAGCTGCTGGATGAAGTCCAAGTAGAAGAGCCTGCTCCAGCCCCTCTG
 AATTTGGATGGAGACCCTGGTGGCAGGGTGCATGAAGGTTCCAGGAGAGCTTTTG
 GCCACAGGAAGAAGCAGGAAGTACAGGCATGGATACTTCTAGCCCCAGCGACTCAA
 ACTCCTTCTGCAGAGAGTCCCAGCCTTCCCAAGTGGCACAGCCCTGTGGAGCGGGCC
 AAGAAGATGCCCGCACTCAAGCAGACAGCACAGGCCCTCTGGAACCTCCTCCTCTT
 GATCAACTGCTGGACGAAGTCCAAAAGGAAGAGCATGTGCCAGTCCCACTGGATTG
 GGGTAGAAATCCTGGCAGCAGGGAGCATGAAGGTTCCAGGACAGCTTACTGCCCC
 TGAGGAAGCAGTAAATTCGGGCATGGATACTCGATCCCTAGCATCTGGCCAACC
 TTCTGCAGAGAATCCCAGCCTCCCCAAGTGGCACAGCCCTCTGGACCAGGCCAAGC

ACAGGCCCCACTCAAGGTGGGAACACGGACCCCCTGGAGCTCTTCCTCTATCAACT
 GTTGGATGAAGTCCAAGTAGAAGAGCATGCTCCAGCCCCTCTGAATTGGGATGTAG
 ATCCTGGTGGCAGGGTGCATGAAGGTTTCGTGGGAGAGCTTTTGGCCACAGGAAGAA
 GCAGGAAGTACAGGCCTGGATACTTCAAGCCCCAGCGACTCAAACCTCTTCTCAGA
 GAGTCCAAGCCTTCCAAGTGGCACAGCGCCGTGGAGCGGGCCAAGAAGATGCCCCG
 CACTCAAGCAGACAGCACAGGCCCTCTGGAACCTCCTCCTTTGATCAACTGCTGGA
 CGAAGTCCAAAAGGAAGAGCATGTGCCAGCCCCACTGGATTGGGGTAGAAATCCTG
 GCAGCATGGAGCATGAAGGTTCCCAGGACAGCTTACTGCCCCTGGAGGAAGCAGCA
 AATTCGGGCAGGGATACCTCGATCCCTAGCATCTGGCCAGCCTTCTGCAGAAAATCC
 CAGCCTCCCCAAGTGGCACAGCCCTCTGGACCAGGCCAAGCACAGGCCCCCATTC
 AAGGTGGGAACACGGACCCCCTGGAGCTCTTCCTTGATCAACTGCTGACCGAAGTCCA
 ACTTGAGGAGCAGGGGCCTGCCCTGTGAATGTGGAGGAAACATGGGAGCAAATGG
 ACACAACACCTATCTGCCTCTCACTTCAGAAGAATATCAGACTCTTCTAGATATGCT
 CTGA

[0194] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности с последовательностями генов DUX4 множества видов, например, выбранных из человека, мыши и не относящихся к человеку видов.

[0195] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную по меньшей мере 12 последовательным нуклеотидам (например, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26 или больше последовательным нуклеотидам) в последовательности DUX4, как представлено в любой из SEQ ID NO: 186-189.

[0196] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную последовательности DUX4, соответствующей нуклеотидам 1519-1553 в SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную по меньшей мере 12 последовательным нуклеотидам (например, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26 или больше последовательным нуклеотидам) в последовательности DUX4, соответствующей нуклеотидам 1519-1553 в SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, имеет длину 15-30 нуклеотидов (например, 15-30, 18-28, 20-26, 22-27, 15, 16, 17, 18, 19, 20,

21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов) и включает область комплементарности по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26 или больше последовательным нуклеотидам) в последовательности DUX4, соответствующей нуклеотидам 1519-1553 в SEQ ID NO: 187.

[0197] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную последовательности DUX4, как представлено в SEQ ID NO: 160: CCTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTTAAAATGCC (SEQ ID NO: 160). В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную по меньшей мере 12 последовательным нуклеотидам (например, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30 или больше последовательным нуклеотидам) в последовательности DUX4, представленной в SEQ ID NO: 160. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, имеет длину 15-30 нуклеотидов (например, 15-30, 18-28, 20-26, 22-27, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов) и включает область, комплементарную по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30 или больше последовательным нуклеотидам) в последовательности DUX4, как представлено в SEQ ID NO: 160.

[0198] Неограничивающие примеры DUX4-направленных олигонуклеотидов представлены в Таблице 8.

Таблица 8. Неограничивающие примеры DUX4-направленных олигонуклеотидов†

#	Положение начала в NM_001293798.2 (SEQ ID NO: 187)	Последовательность-мишень	SEQ ID NO:	Последовательность олигонуклеотида	SEQ ID NO:
1	1530	AGTTCAGAGATATA TTAAAATGCC	161	GGCATTTTAATATATCTC TGAAC	169
2	1530	AGTTCAGAGATATA TTAAAATGC	162	GCATTTTAATATATCTCT GAAC	170

3	1530	AGTTCAGAGATATA TTAAAATG	163	CATTTTAATATATCTCTG AACT	171
4	1529	TAGTTCAGAGATAT ATAAAATGCC	164	GGCATTTTAATATATCTC TGAACТА	172
5	1532	TTAGTTCAGAGATAT ATAAAATGC	165	GCATTTTAATATATCTCT GAACTAA	173
6	1527	ATTAGTTCAGAGAT ATATAAAATG	166	CATTTTAATATATCTCTG AACTAAT	174
7	1519	CCTGGATGATTAGTT CAGAGATATA	167	TATATCTCTGAACTAATC ATCCAGG	175
8	1522	GGATGATTAGTTCA GAGATATATAAA	168	TTAATATATCTCTGAAC TAATCATCC	176

† Каждое основание тимин (T) в любом из олигонуклеотидов и/или последовательностей-мишеней, приведенных в Таблице 8, может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и/или каждый U может быть независимо и необязательно заменен T. Последовательности-мишени, перечисленные в Таблице 8, содержат T, но при этом предполагается связывание DUX4-нацеленного олигонуклеотида с РНК и/или ДНК.

[0199] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает область комплементарности по меньшей мере с 15 последовательными нуклеотидами (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30 или больше последовательными нуклеотидами) любой из SEQ ID NO: 161-168. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, имеет длину 15-30 нуклеотидов (например, 15-20, 20-30, 22-27, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов) и включает область комплементарности по меньшей мере с 15 последовательными нуклеотидами (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30 или больше последовательными нуклеотидами) любой из SEQ ID NO: 161-168. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, не включает область комплементарности длиной 25 нуклеотидов с последовательностью-мишенью DUX4 AGTTCAGAGATATATAAAATGCC (SEQ ID NO: 150).

[0200] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеозидов (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по

меньшей мере 26 или больше последовательных нуклеозидов) в нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 169-176, где каждое основание тимин (Т) может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и каждый U может быть независимо и необязательно заменен Т. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО). В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, не включает нуклеотидную последовательность GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT (SEQ ID NO: 151).

[0201] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 169-176, где каждое основание тимин (Т) может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и каждый U может быть независимо и необязательно заменен Т.

[0202] В некоторых вариантах осуществления любой из DUX4-нацеленных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО).

[0203] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную последовательности DUX4, соответствующей нуклеотидам 1474-1574 в SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную по меньшей мере 12 последовательным нуклеотидам (например, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30 или больше последовательным нуклеотидам) в последовательности DUX4, соответствующей нуклеотидам 1474-1574 в SEQ ID NO: 187. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, имеет длину 15-30 нуклеотидов (например, 15-30, 18-28, 20-26, 22-27, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов) и включает область комплементарности по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30 или больше последовательным нуклеотидам) в последовательности DUX4, соответствующей нуклеотидам 1474-1574 в SEQ ID NO: 187.

[0204] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид,

описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную последовательности DUX4, как представлено в SEQ ID NO: 365:

CACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTACATCTCCTGGAT

GATTAGTTCAGAGATATATTAATAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCTATAG (SEQ ID NO: 365). В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность, включающую область, комплементарную по меньшей мере 12 последовательным нуклеотидам (например, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30 или больше последовательным нуклеотидам) в последовательности DUX4, представленной в SEQ ID NO: 365. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, имеет длину 15-30 нуклеотидами (например, 15-30, 18-28, 20-26, 22-27, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов) и включает область комплементарности по меньшей мере с 15 последовательными нуклеотидами (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30 или больше последовательными нуклеотидами) в последовательности DUX4, как представлено в SEQ ID NO: 365.

[0205] Неограничивающие примеры DUX4-направленных олигонуклеотидов представлены в Таблице 9.

Таблица 9. Неограничивающие примеры DUX4-направленных олигонуклеотидов[†]

#	Положение начала в NM_001293798.2 (SEQ ID NO: 187)	Последовательность-мишень	SEQ ID NO:	Последовательность олигонуклеотида	SEQ ID NO:
9	1474	CACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAAC	213	TTTGCCTAGACAGCGTCGG AAGGTG	289
10	1475	ACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAAC	214	GTTTGCCTAGACAGCGTCG GAAGGT	290
11	1476	CCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACC	215	GGTTTGCCTAGACAGCGTC GGAAGG	291
12	1477	CTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCT	216	AGGTTTGCCTAGACAGCGT CGGAAG	292
13	1478	TTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTG	217	CAGGTTTGCCTAGACAGCG TCGGAA	293
14	1479	TCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGG	218	CCAGGTTTGCCTAGACAGC GTCGGA	294

15	1480	CCGACGCTGTCTAGGCAA ACCTGGA	219	TCCAGGTTTGCCTAGACAG CGTCGG	295
16	1481	CGACGCTGTCTAGGCAAA CCTGGAT	220	ATCCAGGTTTGCCTAGACA GCGTCG	296
17	1482	GACGCTGTCTAGGCAAAC CTGGATT	221	AATCCAGGTTTGCCTAGAC AGCGTC	297
18	1483	ACGCTGTCTAGGCAAACC TGGATTA	222	TAATCCAGGTTTGCCTAGA CAGCGT	298
19	1484	CGCTGTCTAGGCAAACCT GGATTAG	223	CTAATCCAGGTTTGCCTAG ACAGCG	299
20	1485	GCTGTCTAGGCAAACCTG GATTAGA	224	TCTAATCCAGGTTTGCCTA GACAGC	300
21	1486	CTGTCTAGGCAAACCTGG ATTAGAG	225	CTCTAATCCAGGTTTGCCT AGACAG	301
22	1487	TGTCTAGGCAAACCTGGA TTAGAGT	226	ACTCTAATCCAGGTTTGCC TAGACA	302
23	1488	GTCTAGGCAAACCTGGAT TAGAGTT	227	AACTCTAATCCAGGTTTGC CTAGAC	303
24	1489	TCTAGGCAAACCTGGATT AGAGTTA	228	TAACTCTAATCCAGGTTTG CCTAGA	304
25	1490	CTAGGCAAACCTGGATTA GAGTTAC	229	GTA ACTCTAATCCAGGTTT GCCTAG	305
26	1491	TAGGCAAACCTGGATTAG AGTTACA	230	TGTA ACTCTAATCCAGGTT TGCCTA	306
27	1492	AGGCAAACCTGGATTAGA GTTACAT	231	ATGTA ACTCTAATCCAGGT TTGCCT	307
28	1493	GGCAAACCTGGATTAGAG TTACATC	232	GATGTA ACTCTAATCCAGG TTTGCC	308
29	1494	GCAAACCTGGATTAGAGT TACATCT	233	AGATGTA ACTCTAATCCAG GTTTGC	309
30	1495	CAAACCTGGATTAGAGTT ACATCTC	234	GAGATGTA ACTCTAATCCA GGTTTG	310
31	1496	AAACCTGGATTAGAGTTA CATCTCC	235	GGAGATGTA ACTCTAATCC AGGTTT	311
32	1497	AACCTGGATTAGAGTTAC ATCTCCT	236	AGGAGATGTA ACTCTAATC CAGGTT	312
33	1498	ACCTGGATTAGAGTTACA TCTCCTG	237	CAGGAGATGTA ACTCTAAT CCAGGT	313
34	1499	CCTGGATTAGAGTTACAT CTCCTGG	238	CCAGGAGATGTA ACTCTA ATCCAGG	314
35	1500	CTGGATTAGAGTTACATCT CCTGGA	239	TCCAGGAGATGTA ACTCTA ATCCAG	315
36	1501	TGGATTAGAGTTACATCTC CTGGAT	240	ATCCAGGAGATGTA ACTCT AATCCA	316
37	1502	GGATTAGAGTTACATCTC CTGGATG	241	CATCCAGGAGATGTA ACTC TAATCC	317
38	1503	GATTAGAGTTACATCTCCT GGATGA	242	TCATCCAGGAGATGTA ACT CTAATC	318
39	1504	ATTAGAGTTACATCTCCTG GATGAT	243	ATCATCCAGGAGATGTAA CTCTAAT	319

40	1505	TTAGAGTTACATCTCCTGG ATGATT	244	AATCATCCAGGAGATGTA ACTCTAA	320
41	1506	TAGAGTTACATCTCCTGG ATGATTA	245	TAATCATCCAGGAGATGTA ACTCTA	321
42	1507	AGAGTTACATCTCCTGGA TGATTAG	246	CTAATCATCCAGGAGATGT AACTCT	322
43	1508	GAGTTACATCTCCTGGAT GATTAGT	247	ACTAATCATCCAGGAGAT GTA ACTC	323
44	1509	AGTTACATCTCCTGGATG ATTAGTT	248	AACTAATCATCCAGGAGA TGTA ACT	324
45	1510	GTTACATCTCCTGGATGAT TAGTTC	249	GA ACTAATCATCCAGGAG ATGTAAC	325
46	1511	TTACATCTCCTGGATGATT AGTTCA	250	TGA ACTAATCATCCAGGA GATGTAA	326
47	1512	TACATCTCCTGGATGATTA GTT CAG	251	CTGAACTAATCATCCAGGA GATGTA	327
48	1513	ACATCTCCTGGATGATTA GTT CAGA	252	TCTGAACTAATCATCCAGG AGATGT	328
49	1514	CATCTCCTGGATGATTAGT TCAGAG	253	CTCTGAACTAATCATCCAG GAGATG	329
50	1515	ATCTCCTGGATGATTAGTT CAGAGA	254	TCTCTGAACTAATCATCCA GGAGAT	330
51	1516	TCTCCTGGATGATTAGTTC AGAGAT	255	ATCTCTGAACTAATCATCC AGGAGA	331
52	1517	CTCCTGGATGATTAGTTCA GAGATA	256	TATCTCTGAACTAATCATC CAGGAG	332
53	1518	TCCTGGATGATTAGTTCAG AGATAT	257	ATATCTCTGAACTAATCAT CCAGGA	333
54	1519	CCTGGATGATTAGTTCAG AGATATA	258	TATATCTCTGAACTAATCA TCCAGG	334
55	1520	CTGGATGATTAGTTCAGA GATATAT	259	ATATATCTCTGAACTAATC ATCCAG	335
56	1521	TGGATGATTAGTTCAGAG ATATATT	260	AATATATCTCTGAACTAAT CATCCA	336
57	1522	GGATGATTAGTTCAGAGA TATATTA	261	TAATATATCTCTGAACTAA TCATCC	337
58	1523	GATGATTAGTTCAGAGAT ATATTAA	262	TTAATATATCTCTGAACTA ATCATC	338
59	1524	ATGATTAGTTCAGAGATA TATTAAA	263	TTTAATATATCTCTGAACT AATCAT	339
60	1525	TGATTAGTTCAGAGATAT ATTAAAA	264	TTTTAATATATCTCTGAAC TAATCA	340
61	1526	GATTAGTTCAGAGATATA TTAAAAT	265	ATTTTAATATATCTCTGAA CTAATC	341
62	1527	ATTAGTTCAGAGATATATT AAAATG	266	CATTTTAATATATCTCTGA ACTAAT	342
63	1528	TTAGTTCAGAGATATATTA AAATGC	267	GCATTTTAATATATCTCTG AACTAA	343
64	1529	TAGTTCAGAGATATATTA AAATGCC	268	GGCATTTTAATATATCTCT GAACTA	344

65	1531	G TTCAGAGATATATTTAAA ATGCCCC	269	G GGGCATTTTAATATATCT CTGAAC	345
66	1532	T TCAGAGATATATTTAAA TGCCCC	270	G GGGGCATTTTAATATATC TCTGAA	346
67	1533	T CAGAGATATATTTAAAAT GCCCCCT	271	A GGGGGCATTTTAATATAT CTCTGA	347
68	1534	C AGAGATATATTTAAAATG CCCCCTC	272	G AGGGGGCATTTTAATATA TCTCTG	348
69	1535	A GAGATATATTTAAAATGC CCCCCTC	273	G GAGGGGGCATTTTAATAT ATCTCT	349
70	1536	G AGATATATTTAAAATGCC CCCTCCC	274	G GGAGGGGGCATTTTAAT ATATCTC	350
71	1537	A GATATATTTAAAATGCC CCTCCCT	275	A GGGAGGGGGCATTTTAA TATATCT	351
72	1538	G ATATATTTAAAATGCC CTCCCTG	276	C AGGGAGGGGGCATTTTA ATATATC	352
73	1539	A TATATTTAAAATGCC CCCTGT	277	A CAGGGAGGGGGCATT AATATAT	353
74	1540	T ATATTTAAAATGCC CCTGTG	278	C ACAGGGAGGGGGCATT TAATATA	354
75	1541	A TATTTAAAATGCC CTGTGG	279	C CACAGGGAGGGGGCATT TTAATAT	355
76	1542	T ATTTAAAATGCC TGTGGA	280	T CACAGGGAGGGGGCAT TTAATA	356
77	1543	A TTTAAAATGCC GTGGAT	281	A TCCACAGGGAGGGGGCA TTTTAAT	357
78	1544	T TTTAAAATGCC TGGATC	282	G ATCCACAGGGAGGGGGC ATTTTAA	358
79	1545	T AAAATGCC GGATCC	283	G GATCCACAGGGAGGGGG CATTTTA	359
80	1546	A AAATGCC GGATCCT	284	A GGATCCACAGGGAGGGG GCATTTT	360
81	1547	A AATGCC GATCCTA	285	T TAGGATCCACAGGGAGGG GGCATT	361
82	1548	A ATGCC ATCCTAT	286	A TAGGATCCACAGGGAGG GGGCATT	362
83	1549	A TGCCCCCTCCCTGTGGAT CCTATA	287	T ATAGGATCCACAGGGAG GGGGCAT	363
84	1550	T GCCCCTCCCTGTGGATC CTATAG	288	C TATAGGATCCACAGGGA GGGGCA	364

† Каждое основание тимин (T) в любом из олигонуклеотидов и/или последовательностей-мишеней, приведенных в Таблице 9, может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и/или каждый U может быть независимо и необязательно заменен T. Последовательности-мишени, перечисленные в Таблице 9, содержат T, но при этом предполагается связывание DUX4-нацеленного олигонуклеотида с РНК и/или ДНК.

[0206] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает область комплементарности по меньшей мере с 15 последовательными нуклеотидами (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере

мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24 или больше последовательными нуклеотидами) в любой из SEQ ID NO: 213-288. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, имеет длину 15-30 нуклеотидов (например, 15-20, 20-30, 22-27, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидами) и включает область комплементарности по меньшей мере с 15 последовательными нуклеотидами (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24 или больше последовательными нуклеотидами) в любой из SEQ ID NO: 213-288. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, не включает область комплементарности из 25 нуклеотидов с последовательностью-мишень DUX4 AGTTCAGAGATATATTAATAATGCC (SEQ ID NO: 150).

[0207] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеозидов (например, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24 или больше последовательных нуклеозидов) нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 289-364, где каждое основание тимин (Т) может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и каждый U может быть независимо и необязательно заменен Т. В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО). В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, не включает нуклеотидную последовательность GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT (SEQ ID NO: 151).

[0208] В некоторых вариантах осуществления DUX4-нацеленный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 289-364, где каждое основание тимин (Т) может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и каждый U может быть независимо и необязательно заменен Т.

[0209] В некоторых вариантах осуществления любой из DUX4-нацеленных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО).

[0210] В некоторых вариантах осуществления любой из олигонуклеотидов может быть в форме соли, например, как натриевой, калиевой или магниевой соли.

[0211] В некоторых вариантах осуществления 5' или 3' нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любого из олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, конъюгирован с аминогруппой, необязательно через спейсер. В некоторых вариантах

осуществления спейсер включает алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления спейсер включает полиэтиленгликолевую группу. В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфирная связь присутствует между спейсером и 5' или 3' нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 5' или 3' нуклеозид (например, концевой нуклеозид) любого из олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, конъюгирован со спейсером, который является замещенным или незамещенным алифатическим, замещенным или незамещенным гетероалифатическим, замещенным или незамещенным карбоциклиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным ариленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, -O-, -N(R^A)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, -NR^AC(=O)-, -NR^AC(=O)R^A-, -C(=O)R^A-, -NR^AC(=O)O-, -NR^AC(=O)N(R^A)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R^A)-, -S(O)₂NR^A-, -NR^AS(O)₂- или их комбинацией; каждый R^A независимо представляет собой водород или замещенный или незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления спейсер является замещенным или незамещенным алкиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, -O-, -N(R^A)- или -C(=O)N(R^A)₂ или их комбинацией.

[0212] В некоторых вариантах осуществления 5' или 3' нуклеозид любого из олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, конъюгирован с соединением формулы -NH₂-(CH₂)_n-, где n является целым числом от 1 до 12. В некоторых вариантах осуществления n равно 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления фосфодиэфирная связь присутствует между соединением формулы NH₂-(CH₂)_n- и 5' или 3' нуклеозидом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы NH₂-(CH₂)₆- конъюгируют с олигонуклеотидом посредством реакции между 6-амино-1-гексанолом (NH₂-(CH₂)₆-OH) и 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[0213] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгирован с направляющим средством, например, нацеленным на мышцы средством, таким как антитело против TfR1, например, через аминогруппу.

а. Размер/последовательность олигонуклеотидов

[0214] Олигонуклеотиды могут иметь различную длину, например, в зависимости от формата. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 8-50 нуклеотидов, 8-40 нуклеотидов, 8-30 нуклеотидов, 10-15 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов, 15-25 нуклеотидов, 21-23 нуклеотидов, 15-20 нуклеотидов, 20-25 нуклеотидов, 20-30 нуклеотидов и т.д.

[0215] В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты олигонуклеотида в рамках настоящего изобретения "комплементарна" нуклеиновой кислоте-мишени, если она специфично гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления гибридизация олигонуклеотида с нуклеиновой кислотой-мишенью (например, молекулой мРНК или пре-

мРНК) приводит к модуляции активности или экспрессии мишени (например, снижению трансляции мРНК, измененному сплайсингу пре-мРНК, пропуску экзонов, деградации мРНК-мишени и др.). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты олигонуклеотида обладает достаточной степенью комплементарности с нуклеиновой кислотой-мишенью, что она не гибридизуется с нецелевыми последовательностями в условиях, при которых предпочтительно избегать неспецифического связывания, например, в физиологических условиях. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% комплементарен последовательным нуклеотидам в нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления комплементарная нуклеотидная последовательность не обязательно должна быть на 100% комплементарна последовательности своей мишени, чтобы она могла специфично гибридизоваться или была специфичной в отношении нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат одно или больше некомплементарных нуклеотидных оснований по отношению к нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления активность в отношении мишени снижается из-за присутствия такого неспаренного основания, однако активность в отношении нецелевой нуклеиновой кислоты снижается в большей степени (т.е. селективность в отношении нуклеиновой кислоты-мишени повышается, а нецелевые эффекты снижаются).

[0216] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает область комплементарности с нуклеиновой кислотой-мишенью, которая имеет длину в пределах 8-15, 8-30, 8-40 или 10-50, или 5-50, 15-20, 20-25 или 5-40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида с нуклеиновой кислотой-мишенью имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности комплементарна по меньшей мере 12 последовательным нуклеотидам в нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать 1, 2 или 3 неспаренных оснований при сравнении с участком последовательных нуклеотидов в нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь до 3 неспаренных оснований на протяжении 15 оснований или до 2 неспаренных оснований на протяжении 10 оснований.

[0217] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27 последовательных нуклеотидов из последовательности, включающей любую из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает последовательность, включающую любую из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364. В некоторых вариантах

осуществления олигонуклеотид включает последовательность, которая обладает по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 97% идентичностью последовательности по меньшей мере с 12 (например, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26) последовательными нуклеотидами любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, который нацелен на DUX4, не включает последовательность GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT (SEQ ID NO: 151)

[0218] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает область комплементарности с нуклеотидной последовательностью, представленной в любой из SEQ ID NO: 161-168 или 213-288. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27 нуклеотидов (например, последовательных нуклеотидов), которые комплементарны нуклеотидной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 161-168 или 213-288. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает последовательность, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%; 99% или 100% комплементарна по меньшей мере 12 или по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам любой из SEQ ID NO: 161-168 или 213-288. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, нацеленный на DUX4, не включает область комплементарности из 25 нуклеотидов с последовательностью-мишенью DUX4 AGTTCAGAGATATATTAATAATGCC (SEQ ID NO: 150)

[0219] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид комплементарен (например, по меньшей мере на 85% по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100%) последовательности-мишени любого из олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе (например, олигонуклеотидов, перечисленных в Таблице 8, Таблице 9 и Таблице 10). В некоторых вариантах осуществления такая последовательность-мишень на 100% комплементарна олигонуклеотидной последовательности, перечисленной в Таблице 8 или Таблице 9.

[0220] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления метилирование нуклеинового основания урацила в положении C5 приводит к появлению тимина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нуклеотид или нуклеозид, имеющий метилированный по C5 урацил (или 5-метилурацил), можно эквивалентно идентифицировать как тиминный нуклеотид или нуклеозид.

[0221] В некоторых вариантах осуществления любое одно или больше тиминовых оснований (Т) в любом из олигонуклеотидов, предложенных в настоящем документе (например, олигонуклеотидов, перечисленных в Таблице 8, Таблице 9 и Таблице 10) независимо и необязательно могут быть урациловыми основаниями (U), и/или любой один или больше U независимо и необязательно могут быть Т.

в. Модификации олигонуклеотидов:

[0222] Олигонуклеотиды, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы, например, могут включать модифицированный сахар, модифицированную межнуклеозидную связь, модифицированный нуклеотид или нуклеозид и/или (например, и) их комбинации. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотиды могут демонстрировать одно или больше следующих свойств: не опосредуют альтернативный сплайсинг; не являются иммуностимулирующими; устойчивы к нуклеазам; демонстрируют улучшенный захват клетками по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами; не токсичны для клеток или млекопитающих; демонстрируют улучшенный выход из эндосом внутри клетки; минимизируют стимуляцию TLR; или избегают рецепторов распознавания паттерна. Любые из модифицированных химических свойств или форматов олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, можно комбинировать друг с другом. Например, в один и тот же олигонуклеотид могут быть включены один, два, три, четыре, пять или больше различных типов модификаций.

[0223] В некоторых вариантах осуществления могут использоваться некоторые модификации нуклеотидов или нуклеозидов, которые делают олигонуклеотид, в который их включают, более устойчивым к расщеплению нуклеазами, чем нативные молекулы олигодезоксинуклеотидов или олигорибонуклеотидов; такие модифицированные олигонуклеотиды остаются интактными в течение более длительного времени, чем немодифицированные олигонуклеотиды. Конкретные примеры модифицированных олигонуклеотидов включают олигонуклеотиды, которые включают модифицированный скелет, например, модифицированные межнуклеозидные связи, такие как фосфоротиоаты, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные межсахарные связи или короткоцепочечные гетероатомные или гетероциклические межсахарные связи. Таким образом, олигонуклеотиды согласно изобретению могут быть стабилизированы против нуклеолитической деградации, например, путем включения модификации, например, модификации нуклеотидов или нуклеозидов.

[0224] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь длину до 50 или до 100 нуклеотидов, где 2-10, 2-15, 2-16, 2-17, 2-18, 2-19, 2-20, 2-25, 2-30, 2-40, 2-45 или больше нуклеотидов или нуклеозидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами/нуклеозидами. Олигонуклеотид может иметь длину 8-30 нуклеотидов, где 2-10, 2-15, 2-16, 2-17, 2-18, 2-19, 2-20, 2-25, 2-30 нуклеотидов или нуклеозидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами/нуклеозидами. Олигонуклеотид может иметь длину 8-15 нуклеотидов, где 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 2-8, 2-9, 2-10, 2-11, 2-12, 2-13, 2-14 нуклеотидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами/нуклеозидами. Необязательно в олигонуклеотидах могут быть модифицированными все нуклеотиды или нуклеозиды кроме 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов/нуклеозидов. Модификации олигонуклеотидов дополнительно описаны в настоящем документе.

с. Модифицированные нуклеозиды

[0225] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в

настоящем документе, включает по меньшей мере один нуклеозид, модифицированный по 2'-положению сахара. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления все нуклеозиды в олигонуклеотиде являются 2'-модифицированными нуклеозидами.

[0226] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает один или больше небциклических 2'-модифицированных нуклеозидов, например, 2'-дезокси, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-МОЕ), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-О-N-метилацетидамо (2'-O-NMA) модифицированный нуклеозид.

[0227] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает один или больше 2'-4'-бициклических нуклеозидов, в которых рибозное кольцо включает мостиковую группу, соединяющую два атома в кольце, например, соединяющую 2'-О атом с 4'-С атомом через метиленовый (ЗНК) мостик, этиленовый (ЭНК) мостик или (S)-затрудненный этильный (сЕТ) мостик. Примеры ЗНК описаны в публикации международной заявки на патент WO/2008/043753, опубликованной 17 апреля 2008 года под названием "*RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9*", содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте. Примеры ЭНК приведены в международной патентной публикации WO 2005/042777, опубликованной 12 мая 2005 года под названием "*APP/ENA Antisense*"; Morita et al., *Nucleic Acid Res.*, Suppl 1:241-242, 2001; Surono et al., *Hum. Gene Ther.*, 15:749-757, 2004; Koizumi, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 8:144-149, 2006 и Horie et al., *Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf)*, 49:171-172, 2005; содержание которых включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте. Примеры сЕТ представлены в патентах США 7,101,993; 7,399,845 и 7,569,686, каждый из которых включен в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

[0228] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает модифицированный нуклеозид, раскрытый в одной из следующих публикаций патентов или заявок на патент США: патенте США 7,399,845, опубликованном 15 июля 2008 года под названием "*6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs*"; патенте США 8,022,193, опубликованном 20 сентября 2011 года под названием "*6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs*"; патенте США 7,569,686, опубликованном 4 августа 2009 года под названием "*Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs*"; патенте США 7,335,765, опубликованном 26 февраля 2008 года под названием "*Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues*"; патенте США 7,314,923, опубликованном 1 января 2008 года под названием "*Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues*"; патенте США 7,816,333, опубликованном 19 октября 2010 года под названием "*Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same*" и в патентной публикации США 2011/0009471, в настоящее время патенте США 8,957,201, опубликованном 17 февраля 2015 года под названием

"*Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same*", все содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством отсылки во всех отношениях.

[0229] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает по меньшей мере один модифицированный нуклеозид, что приводит к повышению T_p олигонуклеотида в пределах 1°C, 2°C, 3°C, 4°C или 5°C по сравнению с олигонуклеотидом, который не имеет по меньшей мере один модифицированный нуклеозид. Олигонуклеотид может иметь множество модифицированных нуклеозидов, что приводит к общему повышению T_p олигонуклеотида в пределах 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C или больше по сравнению с олигонуклеотидом, который не имеет модифицированного нуклеозида.

[0230] Олигонуклеотид может включать комбинацию нуклеозидов различных видов. Например, олигонуклеотид может включать комбинацию 2'-дезоксирибонуклеозидов или рибонуклеозидов и 2'-фтор-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может включать комбинацию дезоксирибонуклеозидов или рибонуклеозидов и 2'-О-Ме-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может включать комбинацию 2'-фтор-модифицированных нуклеозидов и 2'-О-метил-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может включать комбинацию мостиковых нуклеозидов и 2'-фтор или 2'-О-метил-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может включать комбинацию небиициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-О-МОЕ) и 2'-4'-биициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ЭНК, сEt). Олигонуклеотид может включать комбинацию 2'-фтор-модифицированных нуклеозидов и 2'-О-Ме-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может включать комбинацию 2'-4'-биициклических нуклеозидов и 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме-модифицированных нуклеозидов. Олигонуклеотид может включать комбинацию небиициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-биициклических нуклеозидов (например, ЗНК, ЭНК, сEt).

[0231] Олигонуклеотид может включать чередующиеся нуклеозиды разных типов. Например, олигонуклеотид может включать чередующиеся 2'-дезоксирибонуклеозиды или рибонуклеозиды и 2'-фтор-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может включать чередующиеся дезоксирибонуклеозиды или рибонуклеозиды и 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может включать чередующиеся 2'-фтор-модифицированные нуклеозиды и 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может включать чередующиеся мостиковые нуклеозиды и 2'-фтор- или 2'-О-метил-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может включать чередующиеся небиициклические 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-О-МОЕ) и 2'-4'-биициклические нуклеозиды (например, ЗНК, ЭНК, сEt). Олигонуклеотид может включать чередующиеся 2'-4'-биициклические нуклеозиды и 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме-модифицированные нуклеозиды. Олигонуклеотид может включать чередующиеся небиициклические 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-МОЕ, 2'-фтор или 2'-О-Ме) и 2'-4'-биициклические нуклеозиды (например, ЗНК, ЭНК, сEt).

[0232] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, включает 5'-винилфосфонатную модификацию, один или больше абазических остатков и/или один или больше инвертированных абазических остатков.

d. Межнуклеозидные/скелетные связи

[0233] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать фосфоротиоатную или другую модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи по меньшей мере между двумя нуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеозидами. Например, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды включают модифицированные межнуклеозидные связи в положении первой, второй и/или (например, и) третьей межнуклеозидной связи на 5' или 3'-конце нуклеотидной последовательности.

[0234] Фосфорсодержащие связи, которые могут использоваться, включают, без ограничения, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкил-фосфонаты включающие 3'-алкилен-фосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты включающие 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты имеющие обычные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и связи, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'; см. патенты США 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361 и 5,625,050.

[0235] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь гетероатомные скелеты, такие как метилен(метилямино) или ММІ-скелеты; амидные скелеты (см. De Mesmaeker et al. *Acc. Chem. Res.* 1995, 28:366-374); морфолино-скелеты (см. Summerton and Weller, патент США 5,034,506); или скелеты пептидо-нуклеиновой кислоты (ПНК) (где фосфодизфирный скелет олигонуклеотида заменен полиамидным скелетом, причем нуклеотиды связаны напрямую или непрямо с атомами азота азатрупп полиамидного скелета, см. Nielsen et al., *Science* 1991, 254, 1497).

e. Стереоспецифические олигонуклеотиды

[0236] В некоторых вариантах осуществления, межнуклеотидные атомы фосфора олигонуклеотидов являются хиральными, при этом свойства олигонуклеотидов можно изменять в зависимости от конфигурации хиральных атомов фосфора. В некоторых вариантах осуществления подходящие способы могут использоваться для синтеза Р-хиральных аналогов олигонуклеотидов стереоконтролируемым методом (например, как описано в Oka N, Wada T, *Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral*

internucleotidic phosphorus atoms. *Chem Soc Rev.* 2011 Dec; 40(12):5829-43). В некоторых вариантах осуществления представлены фосфоротиоатсодержащие олигонуклеотиды, которые включают нуклеозидные единицы, соединенные по существу полностью Sp или по существу полностью Rp фосфоротиоатными межсахарными связями. В некоторых вариантах осуществления такие фосфоротиоатные олигонуклеотиды, имеющие по существу хирально чистые межсахарные связи, получают с помощью ферментативного или химического синтеза, как описано, например, в патенте США 5,587,261, опубликованном 12 декабря 1996 года, содержание которого включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления хирально контролируемые олигонуклеотиды обеспечивают селективные профили расщепления нуклеиновой кислоты-мишени. Например, в некоторых вариантах осуществления хирально контролируемый олигонуклеотид обеспечивает расщепления в одном участке комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, как описано, например, в публикации заявки на патент США 20170037399 A1, опубликованной 2 февраля 2017 года под названием "CHIRAL DESIGN", содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

f. Морфолиноолигомеры

[0237] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть соединениями на основе морфолиновых олигомеров. Морфолиновые олигомерные соединения описаны в Dwaine A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510); *Genesis*, volume 30, issue 3, 2001; Heasman, J., *Dev. Biol.*, 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 9591-9596; и патенте США 5,034,506, опубликованном 23 июля 1991 года. В некоторых вариантах осуществления морфолиновое олигомерное соединение является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО) (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 отсылки во всей своей полноте).

g. Пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК)

[0238] В некоторых вариантах осуществления сахар и межнуклеозидную связь (скелет) нуклеотидных звеньев олигонуклеотида заменяют новыми группами. В некоторых вариантах осуществления звенья оснований сохраняют для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одним из таких олигомерных соединений, миметиком олигонуклеотидов, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, является пептидо-нуклеиновая кислота (ПНК). В соединениях ПНК сахарный скелет олигонуклеотида заменен амид-содержащим скелетом, например, аминоэтилглициновым скелетом. Нуклеиновые основания сохраняются и связаны напрямую или опосредованно с аза-атомами азота амидной части скелета. Репрезентативная публикация, в которой описано получение соединений ПНК, включает, без ограничения, патенты США 5,539,082; 5,714,331 и

5,719,262, каждый из которых включен в настоящий документ посредством отсылок. Дополнительное описание соединений ПНК можно найти в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

h. Гэпмеры

[0235] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, представляет собой гэпмер. Гэпмерный олигонуклеотид обычно имеет формулу 5'-X-Y-Z-3', при этом X и Z как фланкирующие области расположены вокруг гэп-области Y. В некоторых вариантах осуществления фланкирующую область X в формуле 5'-X-Y-Z-3' также обозначают областью X, фланкирующей последовательностью X, 5'-фланговой областью X или 5'-фланговым сегментом. В некоторых вариантах осуществления фланкирующую область Z в формуле 5'-X-Y-Z-3' также обозначают областью Z, фланкирующей последовательностью Z, 3'-фланговой областью Z или 3'-фланговым сегментом. В некоторых вариантах осуществления гэп-область Y в формуле 5'-X-Y-Z-3' также обозначают областью Y, сегментом Y или гэп-сегментом Y. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозиде в гэп-области Y представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид, причем ни 5'-фланговая область X, ни 3'-фланговая область Z не содержат 2'-дезоксирибонуклеозидов.

[0240] В некоторых вариантах осуществления область Y представляет собой непрерывный сегмент нуклеотидов, например, область из 6 или больше ДНК нуклеотидов, которая способна рекрутировать РНКазу, такую как РНКаза H. В некоторых вариантах осуществления гэпмер связывается с нуклеиновой кислотой-мишенью, после чего РНКаза рекрутируется, а затем может расщеплять нуклеиновую кислоту-мишень. В некоторых вариантах осуществления область Y фланкирована на 5' и 3' областями X и Z, включающими высокоаффинные модифицированные нуклеозиды, например, от одного до шести высокоаффинных модифицированных нуклеозидов. Примеры высокоаффинных модифицированных нуклеозидов включают, без ограничения перечисленными, 2'-модифицированные нуклеозиды (например, 2'-МОЕ, 2'-О-Ме, 2'-F) или 2'-4'-бициклические нуклеозиды (например, ЗНК, сEt, ЭНК). В некоторых вариантах осуществления фланкирующие последовательности X и Z могут иметь длину 1-20 нуклеотидов, 1-8 нуклеотидов или 1-5 нуклеотидов. Фланкирующие последовательности X и Z могут иметь одинаковую длину или разную длину. В некоторых вариантах осуществления гэп-сегмент Y может быть нуклеотидной последовательностью длиной 5-20 нуклеотидов, 5-15 нуклеотидов, 5-12 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов.

[0241] В некоторых вариантах осуществления гэп-область гэпмерных олигонуклеотидов может содержать модифицированные нуклеозиды, которые, как известно, подходят для эффективного действия РНКазы H в дополнение к ДНК-нуклеозидам, таким как С4'-замещенные нуклеозиды, нециклические нуклеозиды и нуклеозиды с арабино-конфигурацией. В некоторых вариантах осуществления гэп-область включает один или больше немодифицированных межнуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления одна или обе фланкирующие области независимо включают одну или

больше фосфоротиоатных межнуклеозидных связей (например, фосфоротиоатные межнуклеозидные связи или другие связи) между по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или больше нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления каждая из гэп-области и двух фланкирующих областей независимо включает модифицированные межнуклеозидные связи (например, фосфоротиоатные межнуклеозидные связи или другие связи) между по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или больше нуклеотидами.

[0242] Гэпмер может быть получен с помощью подходящих способов. Репрезентативные патенты США, патентные публикации США и публикации РСТ, в которых описано получение гэпмеров, включают, в качестве неограничивающих примеров, патенты США 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; 5,700,922; 5,898,031; 7,015,315; 7,101,993; 7,399,845; 7,432,250; 7,569,686; 7,683,036; 7,750,131; 8,580,756; 9,045,754; 9,428,534; 9,695,418; 10,017,764; 10,260,069; 9,428,534; 8,580,756; патентные публикации США US20050074801, US20090221685; US20090286969, US20100197762 и US20110112170; публикации РСТ WO2004069991; WO2005023825; WO2008049085 и WO2009090182; и патент EP EP2,149,605, каждый из которых включен в настоящий документ посредством отсылки во всей полноте.

[0243] В некоторых вариантах осуществления гэпмер имеет длину 10-40 нуклеозидов. Например, гэпмер может иметь длину 10-40, 10-35, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 15-40, 15-35, 15-30, 15-25, 15-20, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 25-40, 25-35, 25-30, 30-40, 30-35 или 35-40 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления гэпмер имеет длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеозидов.

[0244] В некоторых вариантах осуществления гэп-область Y в гэпмере имеет длину 5-20 нуклеозидов. Например, гэп-область Y может иметь длину 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15 или 15-20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления гэп-область Y имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в гэп-области Y представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления все нуклеозиды в гэп-области Y являются 2'-дезоксирибонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления один или больше нуклеозидов в гэп-области Y является модифицированным нуклеозидом (например, 2'-модифицированным нуклеозидом, таким как описанные в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления один или больше цитозинов в гэп-области Y необязательно являются 5-метил-цитозинами. В некоторых вариантах осуществления каждый цитозин в гэп-области Y является 5-метилцитозином.

[0245] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланговая область гэпмера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланговая область гэпмера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') независимо имеют длину 1-20 нуклеозидов. Например, 5'-фланговая область гэпмера (X в формуле 5'-

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

[0246] В некоторых вариантах осуществления гэпмер включает 5'-X-Y-Z-3' 5-10-5, 4-12-4, 3-14-3, 2-16-2, 1-18-1, 3-10-3, 2-10-2, 1-10-1, 2-8-2, 4-6-4, 3-6-3, 2-6-2, 4-7-4, 3-7-3, 2-7-2, 4-8-4, 3-8-3, 2-8-2, 1-8-1, 2-9-2, 1-9-1, 2-10-2, 1-10-1, 1-12-1, 1-16-1, 2-15-1, 1-15-2, 1-14-3, 3-14-1, 2-14-2, 1-13-4, 4-13-1, 2-13-3, 3-13-2, 1-12-5, 5-12-1, 2-12-4, 4-12-2, 3-12-3, 1-11-6, 6-11-1, 2-11-5, 5-11-2, 3-11-4, 4-11-3, 1-17-1, 2-16-1, 1-16-2, 1-15-3, 3-15-1, 2-15-2, 1-14-4, 4-14-1, 2-14-3, 3-14-2, 1-13-5, 5-13-1, 2-13-4, 4-13-2, 3-13-3, 1-12-6, 6-12-1, 2-12-5, 5-12-2, 3-12-4, 4-12-3, 1-11-7, 7-11-1, 2-11-6, 6-11-2, 3-11-5, 5-11-3, 4-11-4, 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 1-16-3, 1-16-3, 2-16-2, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-3, 3-15-2, 1-14-5, 5-14-1, 2-14-4, 4-14-2, 3-14-3, 1-13-6, 6-13-1, 2-13-5, 5-13-2, 3-13-4, 4-13-3, 1-12-7, 7-12-1, 2-12-6, 6-12-2, 3-12-5, 5-12-3, 1-11-8, 8-11-1, 2-11-7, 7-11-2, 3-11-6, 6-11-3, 4-11-5, 5-11-4, 1-18-1, 1-17-2, 2-17-1, 1-16-3, 3-16-1, 2-16-2, 1-15-4, 4-15-1, 2-15-3, 3-15-2, 1-14-5, 2-14-4, 4-14-2, 3-14-3, 1-13-6, 6-13-1, 2-13-5, 5-13-2, 3-13-4, 4-13-3, 1-12-7, 7-12-1, 2-12-6, 6-12-2, 3-12-5, 5-12-3, 1-11-8, 8-11-1, 2-11-7, 7-11-2, 3-11-6, 6-11-3, 4-11-5, 5-11-4, 1-19-1, 1-18-2, 2-18-1, 1-17-3, 3-17-1, 2-17-2, 1-16-4, 4-16-1, 2-16-3, 3-16-2, 1-15-5, 2-15-4, 4-15-2, 3-15-3, 1-14-6, 6-14-1, 2-14-5, 5-14-2, 3-14-4, 4-14-3, 1-13-7, 7-13-1, 2-13-6, 6-13-2, 3-13-5, 5-13-3, 4-13-4, 1-12-8, 8-12-1, 2-12-7, 7-12-2, 3-12-6, 6-12-3, 4-12-5, 5-12-4, 2-11-8, 8-11-2, 3-11-7, 7-11-3, 4-11-6, 6-11-4, 5-11-5, 1-20-1, 1-19-2, 2-19-1, 1-18-3, 3-18-1, 2-18-2, 1-17-4, 4-17-1, 2-17-3, 3-17-2, 1-16-5, 2-16-4, 4-16-2, 3-16-3, 1-15-6, 6-15-1, 2-15-5, 5-15-2, 3-15-4, 4-15-3, 1-14-7, 7-14-1, 2-14-6, 6-14-2, 3-14-5, 5-14-3, 4-14-4, 1-13-8, 8-13-1, 2-13-7, 7-13-2, 3-13-6, 6-13-3, 4-13-5, 5-13-4, 2-12-8, 8-12-2, 3-12-7, 7-12-3, 4-12-6, 6-12-4, 5-12-5, 3-11-8, 8-11-3, 4-11-7, 7-11-4, 5-11-6, 6-11-5, 1-21-1, 1-20-2, 2-20-1, 1-20-3, 3-19-1, 2-19-2, 1-18-4, 4-18-1, 2-18-3, 3-18-2, 1-17-5, 2-17-4, 4-17-2, 3-17-3, 1-16-6, 6-16-1, 2-16-5, 5-16-2, 3-16-4, 4-16-3, 1-15-7, 7-15-1, 2-15-6, 6-15-2, 3-15-5, 5-15-3, 4-15-4, 1-14-8, 8-14-1, 2-14-7, 7-14-2, 3-14-6, 6-14-3, 4-14-5, 5-14-4, 2-13-8, 8-13-2, 3-13-7, 7-13-3, 4-13-6, 6-13-4, 5-13-5, 1-12-10, 10-12-1, 2-12-9, 9-12-2, 3-12-8, 8-12-3, 4-12-7, 7-12-4, 5-12-6, 6-12-5, 4-11-8, 8-11-4, 5-11-7, 7-11-5, 6-11-6, 1-22-1, 1-21-2, 2-21-1, 1-21-3, 3-20-1, 2-20-2, 1-19-4, 4-19-1, 2-19-3, 3-19-2, 1-18-5, 2-18-4, 4-18-2, 3-18-3, 1-17-6, 6-17-1, 2-17-5, 5-17-2, 3-17-4, 4-17-3, 1-16-7, 7-16-1, 2-16-6, 6-16-2, 3-16-5, 5-16-3, 4-16-4, 1-15-8, 8-15-1, 2-15-7, 7-15-2, 3-15-6, 6-15-3, 4-15-5,

5-15-4, 2-14-8, 8-14-2, 3-14-7, 7-14-3, 4-14-6, 6-14-4, 5-14-5, 3-13-8, 8-13-3, 4-13-7, 7-13-4, 5-13-6, 6-13-5, 4-12-8, 8-12-4, 5-12-7, 7-12-5, 6-12-6, 5-11-8, 8-11-5, 6-11-7 или 7-11-6. Числами указано количество нуклеозидов в областях X, Y и Z в гэммере 5'-X-Y-Z-3'.

[0247] В некоторых вариантах осуществления один или больше нуклеозидов в 5'-фланговой области гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') или 3'-фланговой области гэммера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') являются модифицированными нуклеозидами (например, высокоаффинными модифицированными нуклеозидами). В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеозид (например, высокоаффинный модифицированный нуклеозид) является 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом или небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления высокоаффинный модифицированный нуклеозид является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК, сEt или ЭНК) или небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-О-N-метилацетамидо (2'-O-NMA)).

[0248] В некоторых вариантах осуществления один или больше нуклеозидов в 5'-фланговой области гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') представляют собой высокоаффинные модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланговой области гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления один или больше нуклеозидов в 3'-фланговой области гэммера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') представляют собой высокоаффинные модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 3'-фланговой области гэммера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления один или больше нуклеозидов в 5'-фланговой области гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') представляют собой высокоаффинные модифицированные нуклеозиды, а один или больше нуклеозидов в 3'-фланговой области гэммера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') представляют собой высокоаффинные модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланговой области гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом, и каждый нуклеозид в 3'-фланговой области гэммера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является высокоаффинным модифицированным нуклеозидом.

[0249] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланговая область гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') включает такие же высокоаффинные нуклеозиды, как и 3'-фланговая область гэммера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). Например, 5'-фланговая область гэммера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланговая область гэммера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может включать один или больше небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-MOE или 2'-O-Me). В другом примере 5'-фланговая область гэммера (X в

формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланговая область гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может включать один или больше 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланговой области гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланговой области гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеозид в 5'-фланговой области гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланговой области гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt).

[0250] В некоторых вариантах осуществления гэтамер включает конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, а Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X и Z является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтамер включает конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, а Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X и Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления 5'-фланговая область гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') включает различные высокоаффинные нуклеозиды, как и 3'-фланговая область гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3'). Например, 5'-фланговая область гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') может включать один или больше небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и 3'-фланговая область гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может включать один или больше 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В другом примере 3'-фланговая область гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') может включать один или больше небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и 5'-фланговая область гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') может включать один или больше 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt).

[0251] В некоторых вариантах осуществления гэтамер включает конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, а Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), каждый нуклеозид в Z является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтамер включает конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 1-7 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, а Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где каждый нуклеозид в X является 2'-4'-бициклическим нуклеозидом (например, ЗНК или сEt), каждый нуклеозид в Z является небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), и каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[0252] В некоторых вариантах осуществления 5'-фланговая область гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') включает один или больше небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или больше 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления 3'-фланговая область гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') включает один или больше небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или больше 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt). В некоторых вариантах осуществления 5'-фланговая область гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и 3'-фланговая область гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') включают один или больше небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и один или больше 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt).

[0253] В некоторых вариантах осуществления гэтамер включает конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 2-7 (например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, а Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где по меньшей мере одно, но не все (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) положения из 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в X (5'-концевое положение является положением 1) занимает небициклический 2'-модифицированный нуклеозид (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальная часть нуклеозидов в X и в Z является 2'-4'-бициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтамер включает конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 2-7 (например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, а Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где по меньшей мере одно, но не все (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) положения из 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в Z (5'-концевое положение является положением 1) занимает небициклический 2'-модифицированный нуклеозид (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальная часть нуклеозидов в X и в Z является 2'-4'-бициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом. В некоторых вариантах осуществления гэтамер включает конфигурацию 5'-X-Y-Z-3', где X и Z независимо имеют длину 2-7 (например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) нуклеозидов, а Y имеет длину 6-10 (например, 6, 7, 8, 9 или 10) нуклеозидов, где по меньшей мере одно, но не все (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) положения из 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в X и по меньшей мере одно из положений, но не все (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) положения из 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 в Z (5'-концевое положение является положением 1) заняты небициклическим 2'-модифицированным нуклеозидом (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме), где остальная часть нуклеозидов в X и в Z является 2'-4'-бициклическими нуклеозидами (например, ЗНК или сEt), и где каждый нуклеозид в Y является 2'-дезоксирибонуклеозидом.

[0254] Неограничивающие примеры конфигураций гэтамеров с комбинацией небициклических 2'-модифицированных нуклеозидов (например, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме) и 2'-4'-бициклических нуклеозидов (например, ЗНК или сEt) в 5'-фланговой области гэтамера (X в формуле 5'-X-Y-Z-3') и/или 3'-фланговой области гэтамера (Z в формуле 5'-X-Y-Z-3') включают: BBB-(D)n-BBBA; KKK-(D)n-KKKA; LLL-(D)n-LLLA; BBB-(D)n-BBBEE;

KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBBAA; KKK-(D)n-KKKAA; LLL-(D)n-
 LLLAA; BBB-(D)n-BBBEE; KKK-(D)n-KKKEE; LLL-(D)n-LLLEE; BBB-(D)n-BBBAAA;
 KKK-(D)n-KKKAAA; LLL-(D)n-LLLAAA; BBB-(D)n-BBBEEE; KKK-(D)n-KKKEEE; LLL-
 (D)n-LLLEEE; BBB-(D)n-BBBAAA; KKK-(D)n-KKKAAA; LLL-(D)n-LLLAAA; BBB-(D)n-
 BBBEEE; KKK-(D)n-KKKEEE; LLL-(D)n-LLLEEE; BABA-(D)n-ABAB; KAKA-(D)n-
 AKAK; LALA-(D)n-ALAL; BEBE-(D)n-EBEB; KEKE-(D)n-EKEK; LELE-(D)n-ELEL;
 BABA-(D)n-ABAB; KAKA-(D)n-AKAK; LALA-(D)n-ALAL; BEBE-(D)n-EBEB; KEKE-
 (D)n-EKEK; LELE-(D)n-ELEL; ABAB-(D)n-ABAB; AKAK-(D)n-AKAK; ALAL-(D)n-ALAL;
 EBEB-(D)n-EBEB; EKEK-(D)n-EKEK; ELEL-(D)n-ELEL; ABAB-(D)n-ABAB; AKAK-(D)n-
 AKAK; ALAL-(D)n-ALAL; EBEB-(D)n-EBEB; EKEK-(D)n-EKEK; ELEL-(D)n-ELEL;
 AABB-(D)n-BBAA; BBAA-(D)n-AABB; AAKK-(D)n-KKAA; AALL-(D)n-LLAA; EEBB-
 (D)n-BBEE; EEKK-(D)n-KKEE; EELL-(D)n-LLEE; AABB-(D)n-BBAA; AAKK-(D)n-KKAA;
 AALL-(D)n-LLAA; EEBB-(D)n-BBEE; EEKK-(D)n-KKEE; EELL-(D)n-LLEE; BBB-(D)n-
 BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-(D)n-LLE;
 BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-KKE; LLL-
 (D)n-LLE; BBB-(D)n-BBA; KKK-(D)n-KKA; LLL-(D)n-LLA; BBB-(D)n-BBE; KKK-(D)n-
 KKE; LLL-(D)n-LLE; ABBB-(D)n-BBBA; AKKK-(D)n-KKKA; ALLL-(D)n-LLLA; EBBB-
 (D)n-BBBE; EKKK-(D)n-KKKE; ELLL-(D)n-LLLE; ABBB-(D)n-BBBA; AKKK-(D)n-KKKA;
 ALLL-(D)n-LLLA; EBBB-(D)n-BBBE; EKKK-(D)n-KKKE; ELLL-(D)n-LLLE; ABBB-(D)n-
 BBBA; AKKK-(D)n-KKKA; ALLL-(D)n-LLLA; EBBB-(D)n-BBBE; EKKK-(D)n-
 KKKE; ELLL-(D)n-LLLE; ABBB-(D)n-BBBA; AKKK-(D)n-KKKA; ALLL-(D)n-
 LLLAA; EBBB-(D)n-BBBE; EKKK-(D)n-KKKEE; ELLL-(D)n-LLLEE; AABBB-(D)n-BBB;
 AAKKK-(D)n-KKK; AALLL-(D)n-LLL; EE BBB-(D)n-BBB; EEKKK-(D)n-KKK; EELL-
 (D)n-LLL; AABBB-(D)n-BBB; AAKKK-(D)n-KKK; AALLL-(D)n-LLL; EE BBB-(D)n-BBB;
 EEKKK-(D)n-KKK; EELL-(D)n-LLL; AABBB-(D)n-BBBA; AAKKK-(D)n-KKKA; AALL-
 (D)n-LLLA; EE BBB-(D)n-BBBE; EEKKK-(D)n-KKKE; EELL-(D)n-LLLE; AABBB-(D)n-
 BBBA; AAKKK-(D)n-KKKA; AALLL-(D)n-LLLA; EE BBB-(D)n-BBBE; EEKKK-(D)n-
 KKKE; EELL-(D)n-LLLE; ABBAABB-(D)n-BB; AKKAACK-(D)n-KK; ALLAALLL-(D)n-
 LL; EBEEBB-(D)n-BB; EKKEEK-(D)n-KK; ELLELL-(D)n-LL; ABBAABB-(D)n-BB;
 AKKAACK-(D)n-KK; ALLAALL-(D)n-LL; EBEEBB-(D)n-BB; EKKEEK-(D)n-KK;
 ELLELL-(D)n-LL; ABBABB-(D)n-BBB; AKKAKK-(D)n-KKK; ALLALLL-(D)n-LLL;
 EBEEBB-(D)n-BBB; EKKEEK-(D)n-KKK; ELLELL-(D)n-LLL; ABBABB-(D)n-BBB;
 AKKAKK-(D)n-KKK; ALLALL-(D)n-LLL; EBEEBB-(D)n-BBB; EKKEEK-(D)n-KKK;
 ELLELL-(D)n-LLL; EEEK-(D)n-EEEEEEEE; EEK-(D)n-EEEEEEEE; EK-(D)n-
 EEEEEEEEE; EK-(D)n-EEEEK; K-(D)n-EEEKEKE; K-(D)n-EEEKEKEE; K-(D)n-EEKEK;
 EK-(D)n-EEEEKEKE; EK-(D)n-EEKEK; EEK-(D)n-KEEKE; EK-(D)n-EEKEK; EK-(D)n-
 KEEK; EEK-(D)n-EEKEK; EK-(D)n-KEEKEE; EK-(D)n-EEKEKE; EK-(D)n-EEKEKE и
 EK-(D)n-EEKEKE; где "А" представляет собой 2'-модифицированный нуклеозид; "В"
 представляет собой 2'-4'-бициклический нуклеозид; "К" представляет собой нуклеозид с
 затрудненным этилом (сEt); "L" представляет собой нуклеозид ЗНК; и "Е" представляет

собой модифицированный рибонуклеозид 2'-МОЕ; "D" представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид; "n" представляет собой длину гэта-сегмента (Y в конфигурации 5'-X-Y-Z-3') и является целым числом в пределах 1-20.

[0255] В некоторых вариантах осуществления любой из гэтамеров, описанных в настоящем документе, включает одну или больше модифицированных нуклеозидных связей (например, фосфоротиоатную связь) в каждой из областей X, Y и Z. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в любом из гэтамеров, описанных в настоящем документе, является фосфоротиоатной связью. В некоторых вариантах осуществления каждая из областей X, Y и Z независимо включает комбинацию фосфоротиоатных связей и фосфодизфирных связей. В некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь в гэта-области Y является фосфоротиоатной связью, 5'-фланговая область X включает комбинацию фосфоротиоатных связей и фосфодизфирных связей, и 3'-фланговая область Z включает комбинацию фосфоротиоатных связей и фосфодизфирных связей.

h. Миксмеры

[0256] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, может быть миксмером или может включать структуру последовательности миксмера. Обычно миксмеры являются олигонуклеотидами, включающими природные и неприродные нуклеозиды или два разных типа неприродных нуклеозидов, как правило, в чередующейся структуре. Миксмеры обычно обладают более высокой аффинностью связывания, чем немодифицированные олигонуклеотиды, и могут использоваться для специфичного связывания молекулы-мишени, например, блокирования участка связывания на молекуле-мишени. Как правило, миксмеры не рекрутируют РНКазу к молекуле-мишени и, таким образом, не вызывают расщепление молекулы-мишени. Такие олигонуклеотиды, которые неспособны к рекрутингу РНКазы H, были описаны, например, в WO2007/112754 или WO2007/112753.

[0257] В некоторых вариантах осуществления миксмер включает или состоит из повторяющейся структуры аналогов нуклеозидов и природных нуклеозидов или одного типа аналога нуклеозида и второго типа аналога нуклеозида. Однако миксмер не должен обязательно включать повторяющуюся структуру и может вместо этого включать любой паттерн модифицированных нуклеозидов и природных нуклеозидов или любой паттерн одного типа модифицированного нуклеозида и второго типа модифицированного нуклеозида. Повторяющийся паттерн, может представлять собой, например, структуру, в которой каждый второй или каждый третий нуклеозид является модифицированным нуклеозидом, таким как ЗНК, а остальные нуклеозиды являются природными нуклеозидами, такими как ДНК, или являются 2'-замещенным аналогом нуклеозидов, таким как 2'-МОЕ или 2'-фторозамещенные аналоги, или любой другой модифицированный нуклеозид, описанный в настоящем документе. Общеизвестно, что повторяющийся паттерн модифицированных нуклеозидов, таких как звенья ЗНК, можно комбинировать с модифицированным нуклеозидом в фиксированных положениях, например, на 5'- или 3'-

концах.

[0258] В некоторых вариантах осуществления миксмер не включает область больше чем из 5, больше чем из 4, больше чем из 3 или больше чем из 2 последовательных природных нуклеозидов, таких как ДНК нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления миксмер включает, по меньшей мере, область, состоящую по меньшей мере из двух последовательных модифицированных нуклеозидов, таких как по меньшей мере два последовательных ЗНК. В некоторых вариантах осуществления миксмер включает, по меньшей мере, область, состоящую по меньшей мере из трех последовательных модифицированных нуклеозидных звеньев, таких как по меньшей мере три последовательных ЗНК.

[0259] В некоторых вариантах осуществления миксмер не включает область больше чем из 7, больше чем из 6, больше чем из 5, больше чем из 4, больше чем из 3 или больше чем из 2 последовательных аналогов нуклеозидов, таких как ЗНК. В некоторых вариантах осуществления звенья ЗНК могут быть заменены другими аналогами нуклеозидов, такими как аналоги, указанные в настоящем документе.

[0260] Миксмеры могут быть сконструированы так, чтобы они включали комбинацию модифицированных нуклеозидов, повышающих аффинность, таких как, в качестве неограничивающих примеров, ЗНК нуклеозиды и 2'-О-Ме-нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления миксмер включает модифицированные межнуклеозидные связи (например, фосфоротиоатные межнуклеозидные связи или другие связи) между по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или больше нуклеозидами.

[0261] Миксмер может быть получен с помощью любого подходящего способа. Репрезентативные патенты США, патентные публикации США и публикации РСТ, в которых описано получение миксмеров, включают патентные публикации США US20060128646, US20090209748, US20090298916, US20110077288 и US20120322851, и патент США 7687617.

[0262] В некоторых вариантах осуществления миксмер включает один или больше морфолиновых нуклеозидов. Например, в некоторых вариантах осуществления миксмер может включать морфолиновые нуклеозиды, смешанные (например, в чередующемся порядке) с одним или больше другими нуклеозидами (например, ДНК, РНК нуклеозидами) или модифицированными нуклеозидами (например, ЗНК, 2'-О-Ме-нуклеозидами).

В некоторых вариантах осуществления миксмеры могут использоваться для коррекции сплайсинга или пропуска экзона, например, как описано в публикациях Touznik A., et al., *LNA/DNA mixmer-based antisense oligonucleotides correct alternative splicing of the SMN2 gene and restore SMN protein expression in type 1 SMA fibroblasts* Scientific Reports, volume 7, Article number: 3672 (2017), Chen S. et al., *Synthesis of a Morpholino Nucleic Acid (MNA)-Uridine Phosphoramidite, and Exon Skipping Using MNA/2'-O-Methyl Mixmer Antisense Oligonucleotide*, Molecules 2016, 21, 1582, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством отсылки.

j. РНК-интерференция (РНКи)

[0263] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, предложенные в настоящем документе, могут находиться в форме малых интерферирующих РНК (миРНК), также известных как короткая интерферирующая РНК или РНК сайленсинга. МиРНК представляют собой класс двухцепочечных молекул РНК, как правило, длиной приблизительно 20-25 пар оснований, которые направленно взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами (например, мРНК), вызывая их расщепление посредством РНК-интерференции (РНКи) в клетках. Специфичность молекул миРНК может определяться связыванием антисмысловой цепи молекулы с ее РНК-мишенью. Эффективные молекулы миРНК, как правило, имеют длину меньше 30-35 пар оснований для предотвращения активации неспецифических путей РНК-интерференции в клетке посредством интерферонового ответа, хотя более длинная миРНК также может быть эффективной. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК имеют длину 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК имеют длину от 8 до 30 пар оснований, от 10 до 15 пар оснований, от 10 до 20 пар оснований, от 15 до 25 пар оснований, от 19 до 21 пар оснований, от 21 до 23 пар оснований.

[0264] После выбора подходящей последовательности РНК-мишени можно конструировать молекулы миРНК, которые включают нуклеотидную последовательность, комплементарную всей последовательности-мишени или ее части, т.е. антисмысловую последовательность, и получать их соответствующими способами (см., например, публикацию РСТ WO 2004/016735 и патентные публикации США 2004/0077574 и 2008/0081791). Молекула миРНК может быть двухцепочечной (т.е. молекулой дцРНК, включающей антисмысловую цепь и комплементарную смысловую цепь, которая гибридизуется с образованием дцРНК) или одноцепочечной (т.е. молекулой оцРНК, включающей только антисмысловую цепь). Молекулы миРНК могут включать дуплекс, асимметричный дуплекс, шпилечную или асимметричную шпилечную вторичную структуру, имеющую самокомплементарные смысловые и антисмысловые цепи.

[0265] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК имеет длину 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь имеет длину 8-50 нуклеотидов, 8-40 нуклеотидов, 8-30 нуклеотидов, 10-15 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов, 15-25 нуклеотидов, 19-21 нуклеотидов, 21-23 нуклеотидов.

[0266] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК имеет длину 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или больше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину 8-50 нуклеотидов, 8-40 нуклеотидов, 8-30 нуклеотидов, 10-15 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов, 15-25 нуклеотидов, 19-21 нуклеотидов, 21-23 нуклеотидов.

[0267] В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК включают антисмысловую цепь, включающую область комплементарности с областью-мишенью в мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности по меньшей мере на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% комплементарна области-мишени в мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления область-мишень является областью последовательных нуклеотидов в мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления комплементарная нуклеотидная последовательность не должна быть на 100% комплементарной последовательности своей мишени, чтобы специфично гибридизоваться или быть специфичной в отношении РНК последовательности-мишени.

[0268] В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК включают антисмысловую цепь, которая включает область комплементарности с РНК последовательностью-мишенью, при этом область комплементарности имеет длину в пределах от 8 до 15, от 8 до 30, от 8 до 40 или от 10 до 50, или от 5 до 50, или от 5 до 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности комплементарна по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25 или больше последовательным нуклеотидам в РНК последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК включают нуклеотидную последовательность, которая содержит не больше 1, 2, 3, 4 или 5 некомплементарных оснований по сравнению с частью последовательных нуклеотидов РНК последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК включают нуклеотидную последовательность, которая содержит до 3 некомплементарных оснований на 15 оснований или до 2 некомплементарных оснований на 10 оснований.

[0269] В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК включают антисмысловую цепь, включающую нуклеотидную последовательность, комплементарную (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100%) РНК последовательности-мишени олигонуклеотидов, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления молекулы миРНК включают антисмысловую цепь, включающую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или на 100% идентична олигонуклеотидам, предложенным в настоящем документе. В некоторых

вариантах осуществления молекулы миРНК включают антисмысловую цепь, включающую по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25 или больше последовательных нуклеотидов из олигонуклеотидов, предложенных в настоящем документе.

[0270] Двухцепочечная миРНК может включать смысловую и антисмысловую цепи РНК, имеющие одинаковую или разную длину. Двухцепочечные молекулы миРНК также могут собираться из одного олигонуклеотида в структуру стебель-петля, в которой самокомплементарные смысловые и антисмысловые области молекулы миРНК соединены линкерами на основе нуклеиновой кислоты или не на основе нуклеиновой кислоты, а также кольцевой одноцепочечной РНК, имеющей две или больше петлевых структур и стебель, включающий самокомплементарные смысловые и антисмысловые цепи, где кольцевая РНК может процессироваться *in vivo* или *in vitro* с образованием активной молекулы миРНК, способной опосредовать РНКи. Таким образом, молекулы малых шпилечных РНК (мшРНК) также включены в настоящее изобретение. Эти молекулы включают специфическую антисмысловую последовательность в дополнение к обратнo комплементарной (смысловой) последовательности, как правило, отделенной спейсерной или петлевой последовательностью. Расщепление спейсера или петли приводит к образованию одноцепочечной молекулы РНК и ее обратного комплемента, таким образом, что они могут отжигаться с образованием молекулы дцРНК (необязательно с дополнительными этапами процессинга, которые могут приводить к добавлению или удалению одного, двух трех или больше нуклеотидов с 3'-конца и/или (например, и) 5'-конца одной или обеих цепей). Спейсер может иметь достаточную длину, чтобы антисмысловые и смысловые последовательности могли отжигаться и образовывать двухцепочечную структуру (или стебель) перед расщеплением спейсера (и, необязательно, последующими этапами процессинга, которые могут приводить к добавлению или удалению одного, двух, трех, четырех или больше нуклеотидов с 3'-конца и/или (например, и) 5'-конца одной или обеих цепей). Спейсерная последовательность может быть неродственной нуклеотидной последовательностью, которая располагается между двумя комплементарными областями нуклеотидной последовательности, которые при отжиге с образованием двухцепочечной нуклеиновой кислоты включают мшРНК.

[0271] Общая длина молекул миРНК может варьировать от приблизительно 14 до приблизительно 100 нуклеотидов в зависимости от типа конструируемой молекулы миРНК. Как правило, от приблизительно 14 до приблизительно 50 из этих нуклеотидов комплементарны последовательности РНК-мишени, т.е. составляют специфическую антисмысловую последовательность молекулы миРНК. Например, если миРНК является двух- или одноцепочечной миРНК, длина может варьировать от приблизительно 14 до приблизительно 50 нуклеотидов, тогда как в случае, если миРНК является мшРНК или

кольцевой молекулой, длина может варьировать от приблизительно 40 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов.

[0272] Молекула миРНК может включать 3'-оверхэнг на одном конце молекулы. Другой конец может быть тупым концом или также имеет оверхэнг (5' или 3'). Если молекула миРНК включает оверхэнг на обоих концах молекулы, длина оверхэнгов может быть одинаковой или разной. В одном из вариантов осуществления молекула миРНК согласно настоящему изобретению включает 3'-оверхэнги длиной от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на обоих концах молекулы. В некоторых вариантах осуществления миРНК молекула включает 3'-оверхэнги длиной от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления миРНК молекула включает 3'-оверхэнги длиной от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает 3'-оверхэнги длиной от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на смысловой цепи и антисмысловой цепи.

[0273] В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает один или больше модифицированных нуклеотидов (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше). В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает один или больше модифицированных нуклеотидов и/или (например, и) одну или больше модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид является модифицированным остатком сахара (например, 2'-модифицированным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает один или больше 2'-модифицированных нуклеотидов, например, 2'-дезоксид, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-О-N-метилацетиламидо (2'-O-NMA). В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид молекулы миРНК является модифицированным нуклеотидом (например, 2'-модифицированным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает один или больше фосфородиамидатных морфолиновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид молекулы миРНК является фосфородиамидатным морфолиновым нуклеотидом.

[0274] В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит фосфоротиоатную или другую модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи по меньшей мере между двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеотидами. Например, в некоторых вариантах осуществления молекула миРНК включает модифицированные межнуклеотидные связи в положении первой, второй и/или (например, и) третьей межнуклеозидной связи на 5'- или

3'-конце молекулы миРНК.

[0275] В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеотидные связи являются фосфорсодержащими связями. В некоторых вариантах осуществления фосфорсодержащие связи, которые могут использоваться, включают, без ограничения, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включающие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включающие 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие обычные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'; см. патенты США 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361 и 5,625,050.

[0276] Любые из модифицированных химических составов или форматов молекул миРНК, предложенных в настоящем документе, можно комбинировать друг с другом. Например, в одну молекулу миРНК могут быть включены один, два, три, четыре, пять или больше разных типов модификаций.

[0277] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает один или больше модифицированных нуклеотидов (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает один или больше модифицированных нуклеотидов и/или (например, и) одну или больше модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает модифицированный остаток сахара (например, 2'-модифицированный нуклеотид). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает один или больше 2'-модифицированных нуклеотидов, например, 2'-дезоксид, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-О-N-метилацетиламино (2'-O-NMA) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид антисмысловой цепи является модифицированным нуклеотидом (например, 2'-модифицированным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает один или больше фосфородиамидатных морфолинонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь является фосфородиамидатным морфолиновым олигомером (РМО).

[0278] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит фосфоротиоатную или другую модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь

включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи между по меньшей мере двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеотидами. Например, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает модифицированные межнуклеотидные связи в положении первой, второй и/или (например, и) третьей межнуклеозидной связи на 5'- или 3'-конце молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеотидные связи являются фосфорсодержащими связями. В некоторых вариантах осуществления фосфорсодержащие связи, которые могут использоваться, включают, без ограничения, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, металльные и другие алкильные фосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, содержащие 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие обычные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары единиц нуклеозидов связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'; см. патенты США 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5, 177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455, 233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563, 253; 5,571,799; 5,587,361 и 5,625,050.

[0279] Любые из модифицированных химических фрагментов или форматов антисмысловой цепи, предложенных в настоящем документе, можно комбинировать друг с другом. Например, в одну антисмысловую цепь могут быть включены один, два, три, четыре, пять или больше разных типов модификаций.

[0280] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает один или больше модифицированных нуклеотидов (например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает один или больше модифицированных нуклеотидов и/или (например, и) одну или больше модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает модифицированный остаток сахара (например, 2'-модифицированный нуклеотид). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает один или больше 2'-модифицированных нуклеотидов, например, 2'-дезоксид, 2'-фтор (2'-F), 2'-О-метил (2'-O-Me), 2'-О-метоксиэтил (2'-MOE), 2'-О-аминопропил (2'-O-AP), 2'-О-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) или 2'-0-N-метилацетиламино (2'-0-NMA) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид смысловой цепи является модифицированным нуклеотидом (например, 2'-модифицированным нуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает один или больше фосфородиамидатных морфолинонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь является фосфородиамидатным морфолиновым

олигомером (РМО). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфоротиоатную или другую модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи по меньшей мере между двумя нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает фосфоротиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеотидами. Например, в некоторых вариантах осуществления смысловая цепь включает модифицированные межнуклеотидные связи в положении первой, второй и/или (например, и) третьей межнуклеозидной связи на 5'- или 3'-конце смысловой цепи.

[0281] В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеотидные связи являются фосфорсодержащими связями. В некоторых вариантах осуществления фосфорсодержащие связи, которые могут использоваться, включают, без ограничения, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включающие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включающие 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие обычные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары единиц нуклеозидов связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'; см. патенты США 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5, 177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455, 233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563, 253; 5,571,799; 5,587,361 и 5,625,050.

[0282] Любые из модифицированных химических фрагментов или форматов смысловой цепи, предложенных в настоящем документе, можно комбинировать друг с другом. Например, в одну смысловую цепь могут быть включены один, два, три, четыре, пять или больше разных типов модификаций.

[0283] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая или смысловая цепь молекулы миРНК включает модификации, которые повышают или снижают нагрузку РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК включает модификации, которые повышают нагрузку RISC. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК включает модификации, которые снижают нагрузку RISC и снижают ненаправленные эффекты. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК включает 2'-О-метоксиэтильную (2'-МОЕ) модификацию. Добавление 2'-О-метоксиэтильной (2'-МОЕ) группы в участок расщепления повышает специфичность и активность сайленсинга миРНК посредством облегчения ориентированной нагрузки РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC) модифицированной цепи, как описано в публикации Song et al., (2017) *Mol Ther Nucleic Acids* 9:242-250, включенной в настоящий

документ посредством отсылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК включает 2'-ОМе-фосфородитионатную модификацию, повышающую нагрузку RISC, как описано в публикации Wu et al., (2014) Nat Commun 5:3459, включенной в настоящий документ посредством отсылки во всей полноте.

[0284] В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК включает 5'-морфолиновый нуклеотид, снижающий нагрузку RISC смысловой цепью и улучшающий выбор антисмысловой цепи и активность РНКи, как описано в публикации Kumar et al., (2019) Chem Commun (Camb) 55(35):5139-5142, включенной в настоящий документ посредством отсылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК модифицирована синтетическим РНК-подобным высокоаффинным аналога нуклеотидом, замкнутой нуклеиновой кислотой (ЗНК), снижающей нагрузку RISC смысловой цепью и дополнительно повышающей включение антисмысловой цепи в RISC, как описано в публикации Elman et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33(1): 439-447, включенной в настоящий документ посредством отсылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК включает модификацию 5'-незамкнутой нуклеиновой кислотой (UNA), снижающей нагрузку RISC смысловой цепью и улучшающей активность сайленсинга антисмысловой цепи, как описано в публикации Snead et al., (2013) Mol Ther Nucleic Acids 2(7):e103, включенной в настоящий документ посредством отсылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК включает 5-нитроиндольную модификацию, снижающую активность РНКи смысловой цепи и нецелевые эффекты, как описано в публикации Zhang et al., (2012) Chembiochem 13(13):1940-1945, включенной в настоящий документ посредством отсылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК включает 2'-O'-метил (2'-O-Me) модификацию, снижающую нагрузку RISC и нецелевые эффекты смысловой цепи, как описано в публикации Zheng et al., FASEB (2013) 27(10): 4017-4026, включенной в настоящий документ посредством отсылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК полностью замещена морфолиновыми, 2'-МОЕ или 2'-О-Ме остатками и не распознается комплексом RISC, как описано в публикации Kole et al., (2012) Nature reviews. Drug Discovery 11(2):125-140, включенной в настоящий документ посредством отсылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК включает модификацию 2'-МОЕ, а смысловая цепь включает модификацию 2'-О-Ме (см. например, Song et al., (2017) Mol Ther Nucleic Acids 9:242-250). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (например, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10) молекула миРНК связана (например, ковалентно) с нацеленным на мышцы средством. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство может включать или состоять из нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), пептида (например, антитела), липида (например, микровезикулы) или остатка сахара (например,

полисахарида). В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является антителом. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство является антителом против рецептора трансферрина (например, любым из антител против TfR, предложенных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство может быть соединено с 5'-концом смысловой цепи молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство может быть соединено с 3'-концом смысловой цепи молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство может быть соединено внутренним положением со смысловой цепью молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство может быть соединено с 5'-концом антисмысловой цепи молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство может быть соединено с 3'-концом антисмысловой цепи молекулы миРНК. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на мышцы средство может быть соединено внутренним положением с антисмысловой цепью молекулы миРНК.

к. МикроРНК (мкРНК)

[0285] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может представлять собой микроРНК (мкРНК). МикроРНК (обозначаемые как "мкРНК") являются небольшими некодирующими РНК, принадлежащими к классу регуляторных молекул, которые регулируют экспрессию генов путем связывания с комплементарными участками на РНК транскрипте-мишени. Как правило, мкРНК образуются из крупных предшественников РНК (называемых прай-мкРНК), которые процессируются в ядре в пре-мкРНК длиной примерно 70 нуклеотидов, которые сворачиваются в несовершенные структуры типа стебель-петля. Такие пре-мкРНК обычно подвергаются дополнительной стадии процессинга в цитоплазме, где зрелые мкРНК длиной 18-25 нуклеотидов нарезаются с одной стороны шпильки пре-мкРНК ферментом РНКазой III, Дайсером.

[0286] При использовании в настоящем документе мкРНК включают прай-мкРНК, пре-мкРНК, зрелую мкРНК или фрагменты их вариантов, которые сохраняют биологическую активность зрелой мкРНК. В одном варианте осуществления диапазон размеров мкРНК может составлять от 21 нуклеотида до 170 нуклеотидов. В другом варианте осуществления диапазон размеров мкРНК составляет от 70 до 170 нуклеотидов. В другом варианте осуществления может использоваться зрелая мкРНК длиной от 21 до 25 нуклеотидов.

l. Аптамеры

[0287] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, предложенные в настоящем документе, могут находиться в форме аптамеров. Как правило, в отношении молекулярной нагрузки, аптамер является любой нуклеиновой кислотой, которая специфично связывается с мишенью, такой как малая молекула, белок, нуклеиновая кислота в клетке. В некоторых вариантах осуществления аптамер является ДНК аптамером или РНК аптамером. В некоторых вариантах осуществления аптамер нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК или РНК (оцДНК или оцРНК). Следует

понимать, что одноцепочечный аптамер нуклеиновой кислоты может образовывать спирали и/или (например, и) петлевые структуры. Нуклеиновая кислота, образующая аптамер нуклеиновой кислоты, может включать природные нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды, природные нуклеотиды с углеводородными линкерами (например, алкиленовыми) или полиэфирным линкером (например, ПЭГ-линкером), встроенным между одним или больше нуклеотидами, модифицированные нуклеотиды с углеводородными или ПЭГ-линкерами, встроенными между одним или более нуклеотидами, или их комбинацию. Примеры публикаций и патентов, в которых описаны аптамеры и способ получения аптамеров, включают, например, Lorsch and Szostak, 1996; Jayasena, 1999; патенты США 5,270,163; 5,567,588; 5,650,275; 5,670,637; 5,683,867; 5,696,249; 5,789,157; 5,843,653; 5,864,026; 5,989,823; 6,569,630; 8,318,438 и заявку РСТ WO 99/31275, которые включены в настоящее описание посредством отсылки.

m. Мультимеры

[0288] В некоторых вариантах осуществления молекулярные нагрузки могут включать мультимеры (например, конкатемеры) из 2 или больше олигонуклеотидов, соединенных линкером. В результате, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидная нагрузка комплекса/конъюгата может быть увеличена с выходом за пределы доступных сайтов присоединения на направляющем средстве (например, доступных тиоловых сайтов на антители) или устроена иным образом для достижения конкретного содержания полезной нагрузки. Олигонуклеотиды в мультимере могут быть одинаковыми или разными (например, могут направленно взаимодействовать с различными генами или разными сайтами на одном гене или его продуктах).

[0289] В некоторых вариантах осуществления мультимеры включают 2 или больше олигонуклеотидов, соединенных расщепляемым линкером. Однако в некоторых вариантах осуществления мультимеры включают 2 или больше олигонуклеотидов, соединенных нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления мультимер включает 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше соединенных олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления мультимер включает 2-5, 2-10 или 4-20 соединенных олигонуклеотидов.

[0290] В некоторых вариантах осуществления мультимер включает 2 или больше олигонуклеотидов, соединенных концом к концу (в линейной конфигурации). В некоторых вариантах осуществления мультимер включает 2 или больше олигонуклеотидов, соединенных концом к концу через линкер на основе олигонуклеотида (например, поли-dT линкер, абазический линкер). В некоторых вариантах осуществления в мультимере 5'-конец одного олигонуклеотида соединен с 3'-концом другого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления в мультимере 3'-конец одного олигонуклеотида соединен с 3'-концом другого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления в мультимере 5'-конец одного олигонуклеотида соединен с 5'-концом другого олигонуклеотида. Впрочем, в некоторых вариантах осуществления мультимеры могут включать разветвленную структуру, включающую множество олигонуклеотидов, соединенных разветвляющим линкером.

[0291] Дополнительные примеры мультимеров, которые могут использоваться в комплексах, предложенных в настоящем документе, раскрыты, например, в заявке на патент США 2015/0315588 A1 под названием *Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkers*, которая была опубликована 5 ноября 2015 года; заявке на патент США 2015/0247141 A1 под названием *Multimeric Oligonucleotide Compounds*, которая была опубликована 3 сентября 2015 года; заявке на патент США 2011/0158937 A1 под названием *Immunostimulatory Oligonucleotide Multimers*, которая была опубликована 30 июня 2011 года; и в патенте США 5,693,773 под названием *Triplex-Forming Antisense Oligonucleotides Having Abasic Linkers Targeting Nucleic Acids Comprising Mixed Sequences Of Purines And Pyrimidines*, который был опубликован 2 декабря 1997 года, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

С. Линкеры

[0292] Комплексы, описанные в настоящем документе, как правило, включают линкер, который ковалентно связывает любое из антител против TfR1, описанных в настоящем документе, с молекулярной нагрузкой. Линкер включает по меньшей мере одну ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть одинарной связью, например, дисульфидной связью или дисульфидным мостиком, которые ковалентно связывают антитело против TfR1 с молекулярной нагрузкой. Однако в некоторых вариантах осуществления линкер может ковалентно связывать любое из антител против TfR1, описанных в настоящем документе, с молекулярной нагрузкой посредством множества ковалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть расщепляемым линкером. Однако в некоторых вариантах осуществления линкер может быть нерасщепляемым линкером. Линкер обычно стабилен *in vitro* и *in vivo* и может быть стабильным в некоторых клеточных окружениях. Кроме того, как правило, линкер не оказывает отрицательного влияния на функциональные свойства антитела против TfR1 или молекулярной нагрузки. Примеры и способы синтеза линкеров известны в уровне техники (см., например, Kline, T. et al., "Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates", *Pharmaceutical Research*, 2015, 32:11, 3480-3493.; Jain, N. et al. "Current ADC Linker Chemistry" *Pharm Res.* 2015, 32:11, 3526-3540; McCombs, J.R. and Owen, S.C. "Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry" *AAPS J.* 2015, 17:2, 339-351).

[0293] Линкер, как правило, будет содержать две разные реакционноспособные группы, которые обеспечивают возможность присоединения как к антителу против TfR1, так и к молекулярной нагрузке. В некоторых вариантах осуществления две разных реакционноспособных группы могут быть нуклеофилом и/или электрофилом. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит два разных электрофила или нуклеофила, которые являются специфичными в отношении двух разных нуклеофилов или электрофилов. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связан с антителом против TfR1 путем конъюгирования с остатком лизина или остатком цистеина

антитела против TfR1. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связан с остатком цистеина антитела против TfR1 через малеимидсодержащий линкер, где, необязательно, малеимидсодержащий линкер включает малеимидокапроильную или малеимидометил-циклогексан-1-карбоксилатную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связан с остатком цистеина антитела против TfR1 или тиол-функционализированной молекулярной нагрузкой через 3-арилпропионитрильную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связан с остатком лизина антитела против TfR1. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связан с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой независимо через амидную связь, карбаматную связь, гидразид, триазол, тиоэфир и/или дисульфидную связь.

i. Расщепляемые линкеры

[0294] Расщепляемый линкер может быть протеаза-чувствительным линкером, рН-чувствительным линкером или глутатион-чувствительным линкером. Такие линкеры, как правило, расщепляются только внутриклеточно и предпочтительно являются стабильными во внеклеточных средах, например, внеклеточных по отношению к мышечной клетке или клетке ЦНС.

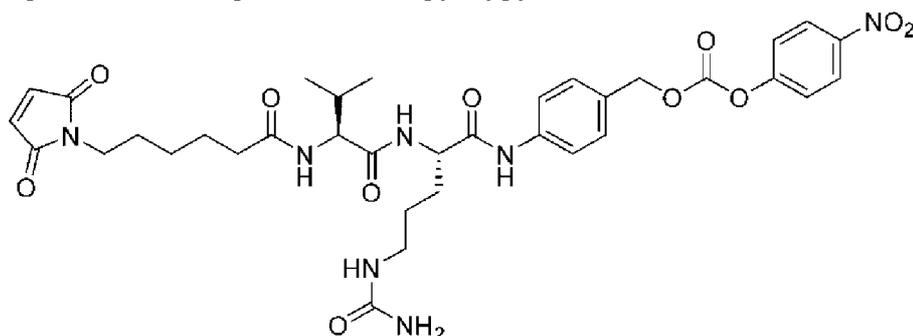
[0295] Протеаза-чувствительные линкеры расщепляются в результате ферментативной активности протеазы. Эти линкеры, как правило, включают пептидные последовательности и могут иметь длину 2-10 аминокислот, приблизительно 2-5 аминокислот, приблизительно 5-10 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, приблизительно 5 аминокислот, приблизительно 3 аминокислоты или приблизительно 2 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность может включать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные аланина, аминокислоты с линейной основной цепью, N-метиламинокислоты и другие аминокислоты, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер включает последовательность валин-цитруллин или аланин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер может расщепляться лизосомальной протеазой, например, катепсином В, и/или (например, и) эндосомальной протеазой.

[0296] рН-чувствительный линкер представляет собой ковалентную связь, которая с легкостью расщепляется в условиях высокого или низкого рН. В некоторых вариантах осуществления рН-чувствительный линкер может расщепляться при рН в диапазоне 4-6. В некоторых вариантах осуществления рН-чувствительный линкер включает гидразин или циклический ацеталь. В некоторых вариантах осуществления рН-чувствительный линкер расщепляется в эндосоме или лизосоме.

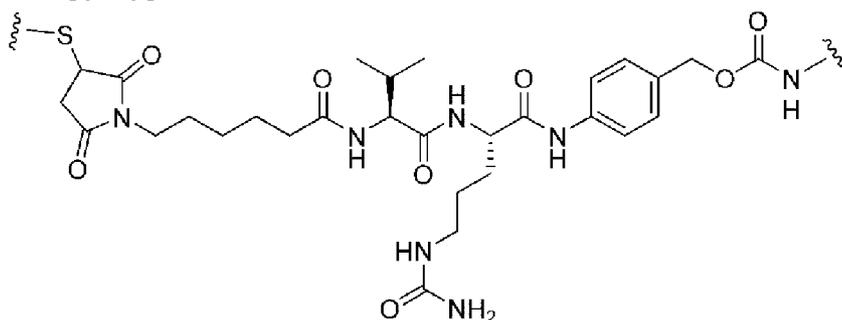
[0297] В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный линкер включает дисульфидную группу. В некоторых вариантах осуществления глутатион-

чувствительный линкер расщепляется в результате реакции дисульфидного обмена с глутатионсодержащим соединением в клетке. В некоторых вариантах осуществления дисульфидная группа дополнительно включает по меньшей мере одну аминокислоту, например, остаток цистеина.

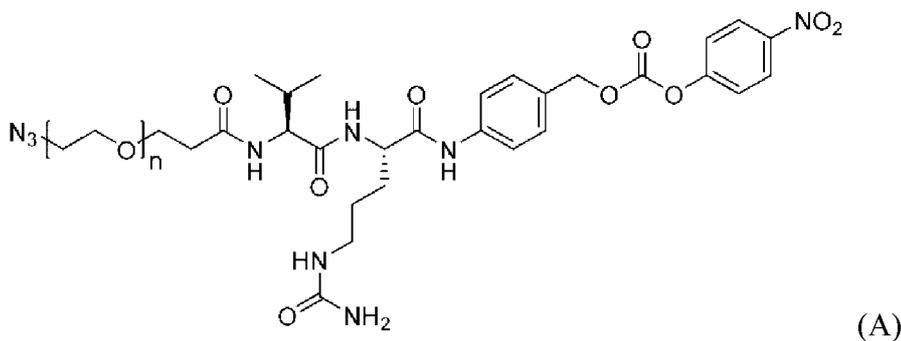
[0298] В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность валин-цитруллин (например, как описано в патенте США 6,214,345, включенном в настоящий документ посредством отсылки). В некоторых вариантах осуществления, до конъюгирования, линкер включает структуру:



[0299] В некоторых вариантах осуществления, после конъюгирования, линкер включает структура:

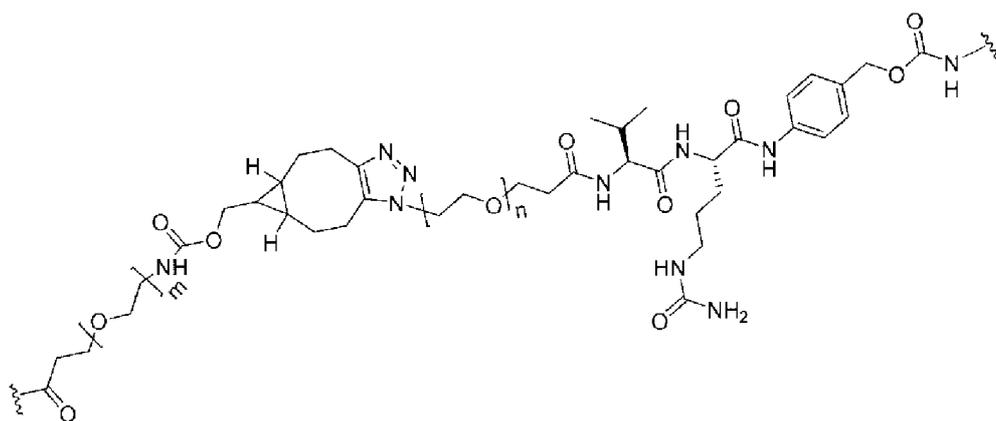


[0300] В некоторых вариантах осуществления, перед конъюгированием, линкер включает структуру Формулы (А):



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

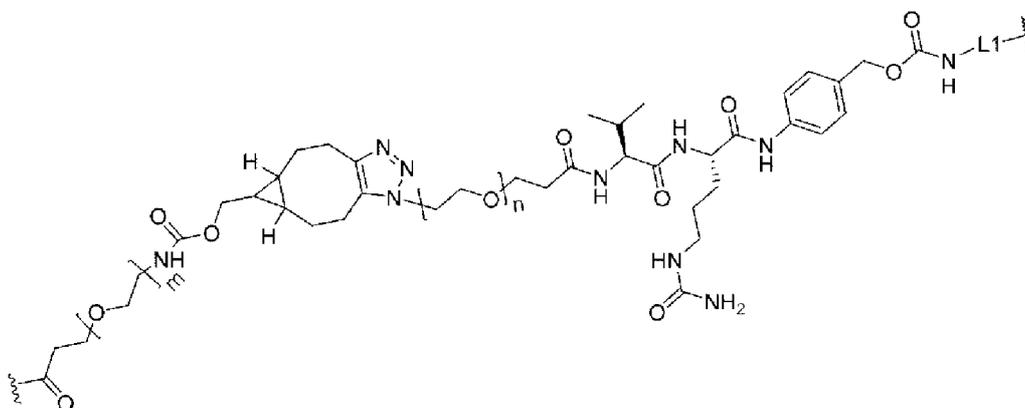
[0301] В некоторых вариантах осуществления линкер включает структуру Формулы (H):



(H),

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

[0302] В некоторых вариантах осуществления линкер включает структуру Формулы (I):



(I),

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

ii. Нерасщепляемые линкеры

[0303] В некоторых вариантах осуществления могут использоваться нерасщепляемые линкеры. Обычно нерасщепляемый линкер не может легко расщепляться в клеточном или физиологическом окружении. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер включает необязательно замещенную алкильную группу, где заместители могут включать галогены, гидроксильные группы, кислородсодержащие группы и другие обычные заместители. В некоторых вариантах осуществления линкер может включать необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный арилен, гетероарилен, пептидную последовательность, включающую по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, усеченный гликан, сахар или сахара, которые не могут подвергаться ферментативному расщеплению, азид, алкин-азид, пептидную последовательность, включающую последовательность LPXT, тиоэфир, биотин, бифенил, повторяющиеся звенья полиэтиленгликоля или эквивалентных соединений, сложные эфиры кислот, амиды кислот, сульфамиды и/или алкокси-амино линкер. В некоторых вариантах осуществления для ковалентного связывания антитела

против TfR1, включающего последовательность LPXT, с молекулярной нагрузкой, включающей последовательность (G)_n, может использоваться сортаза-опосредованное лигирование (см., например, Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. *Biotechnol Lett.* 2010, 32(1):1-10).

[0304] В некоторых вариантах осуществления линкер может включать замещенный алкилен, необязательно замещенный алкенилен, необязательно замещенный алкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный циклоалкенилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дополнительно включающий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S; необязательно замещенный гетероциклилен, дополнительно включающий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S, имин, необязательно замещенные азотсодержащие соединения, необязательно замещенные кислородсодержащие O соединения, необязательно замещенные серасодержащие соединения или поли(алкиленоксид), например, полиэтиленоксид или полипропиленоксид. В некоторых вариантах осуществления линкер может быть нерасщепляемым N-гамма-малеимидобутирил-оксисукцинимид-сложноэфирным (GMBS) линкером.

iii. Конъюгирование линкера

[0305] В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связан с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой посредством фосфатной, тиоэфирной, эфирной, углерод-углеродной, карбаматной или амидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связан с олигонуклеотидом через фосфатную или фосфоротиоатную группу, например, концевой фосфат олигонуклеотидного скелета. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связан с антителом против TfR1 через остаток лизина или цистеина, присутствующий в антителе против TfR1.

[0306] В некоторых вариантах осуществления линкер или его часть ковалентно связывают с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции циклоприсоединения между азидом и алкином с образованием триазола, где азид или алкин могут присутствовать на антителе против TfR1, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления алкин может быть циклическим алкином, например, циклооктином. В некоторых вариантах осуществления алкин может быть бициклононином (также известным как бицикло[6.1.0]нонин или BCN) или замещенным бициклононином. В некоторых вариантах осуществления циклооктин является таким, как описано в публикации международной заявки на патент WO2011136645, опубликованной 3 ноября 2011 года под названием "*Fused Cyclooctyne Compounds And Their Use In Metal-free Click Reactions*". В некоторых вариантах осуществления азид может быть молекулой сахара или углевода, который включает азид. В некоторых вариантах осуществления азид может быть 6-азидо-6-дезоксигалактозой или 6-азидо-N-ацетилгалактозамином. В некоторых вариантах осуществления молекула сахара или углевода, включающая азид, является такой, как описано в публикации международной

заявки на патент WO2016170186, опубликованной 27 октября 2016 года под названием "*Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase*". В некоторых вариантах осуществления реакция циклоприсоединения между азидом и алкином с образованием триазола, где азид или алкин могут быть расположены на антителе против TfR1, молекулярной нагрузке или линкере, является такой, как описано в публикации международной заявки на патент WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года под названием "*Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof*"; или публикации международной заявки на патент WO2016170186, опубликованной 27 октября 2016 года под названием "*Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase*".

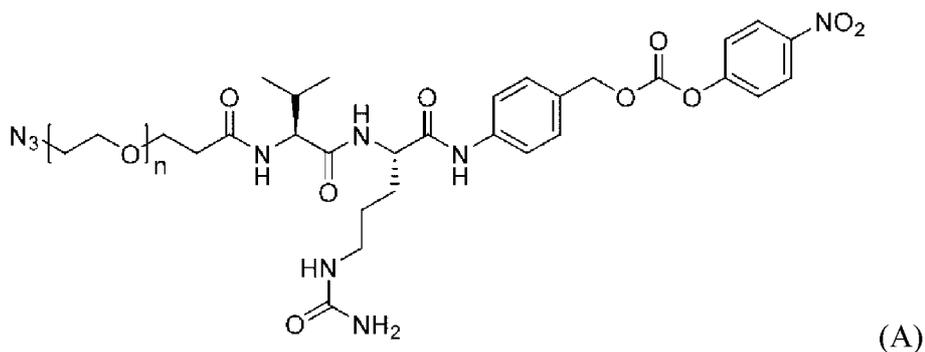
[0307] В некоторых вариантах осуществления линкер включает спейсер, например, полиэтиленгликолевый спейсер или ацил/карбамоил-сульфамидный спейсер, например, HydraSpacespacer™. В некоторых вариантах осуществления спейсер является таким, как описано в Verkade, J.M.M. et al., "*A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Stability, and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates*", *Antibodies*, 2018, 7, 12.

[0308] В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связывают с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции Дильса-Альдера между диенофилом и диен/гетеродиеном, где диенофил или диен/гетеродиен могут присутствовать на антителе против TfR1, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связывают с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью других перicyклических реакций, таких как еновая реакция. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связывают с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции образования амидной, тиоамидной или сульфонамидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связывают с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакции конденсации с образованием оксимной, гидразоновой или семикарбазидной группы, присутствующей между линкером и антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой.

[0309] В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно связывают с антителом против TfR1 и/или (например, и) молекулярной нагрузкой с помощью реакций сопряженного присоединения между нуклеофилом, например, амином или гидроксильной группой, и электрофилом, например, карбоновой кислотой, карбонатом или альдегидом. В некоторых вариантах осуществления нуклеофил может присутствовать на линкере, а электрофил может присутствовать на антителе против TfR1 или молекулярной нагрузке до реакции между линкером и антителом против TfR1 или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может присутствовать на линкере, а нуклеофил может присутствовать на антителе против TfR1 или молекулярной нагрузке до

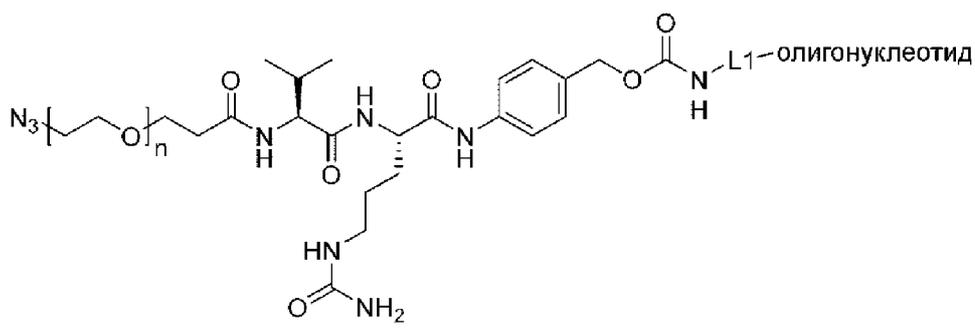
реакции между линкером и антителом против TfR1 или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может быть азидом, пентафторфенилом, кремниевыми центрами, карбонилем, карбоновой кислотой, ангидридом, изоцианатом, тиоизоцианатом, сукцинимидиловым сложным эфиром, сульфосукцинимидиловым сложным эфиром, малеимидом, алкилгалидом, алкил-псевдогалидом, эпоксидом, эписульфидом, азиридином, арилом, активированным фосфорным центром и/или активированным серным центром. В некоторых вариантах осуществления нуклеофил может быть необязательно замещенным алкеном, необязательно замещенным алкином, необязательно замещенным арилом, необязательно замещенным гетероциклилом, гидроксильной группой, аминогруппой, алкиламиногруппой, анилидогруппой и/или тиоловой группой.

[0310] В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность валин-цитруллин, ковалентно связанную с реакционноспособной химической группой (например, азидной группой или BCN группой для клик-химии). В некоторых вариантах осуществления линкер, включающий последовательность валин-цитруллин, ковалентно связанную с реакционноспособной химической группой (например, азидной группой для клик-химии), включает структуру Формулы (A):



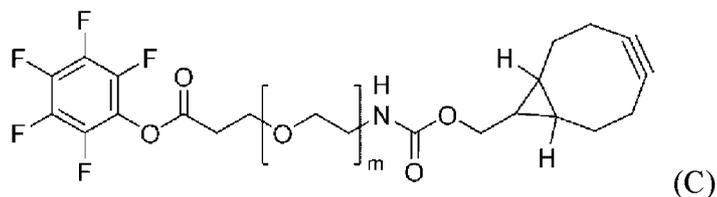
где n является любым числом от 0-10. В некоторых вариантах осуществления n равно 3.

[0311] В некоторых вариантах осуществления линкер, включающий структуру Формулы (A), ковалентно связан (например, необязательно через дополнительные химические группы) с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом). В некоторых вариантах осуществления линкер, включающий структуру Формулы (A), ковалентно связан с олигонуклеотидом, например, посредством нуклеофильного замещения амин-L1-олигонуклеотидами, образующими карбаматную связь, с получением соединения, включающего структуру Формулы (B):



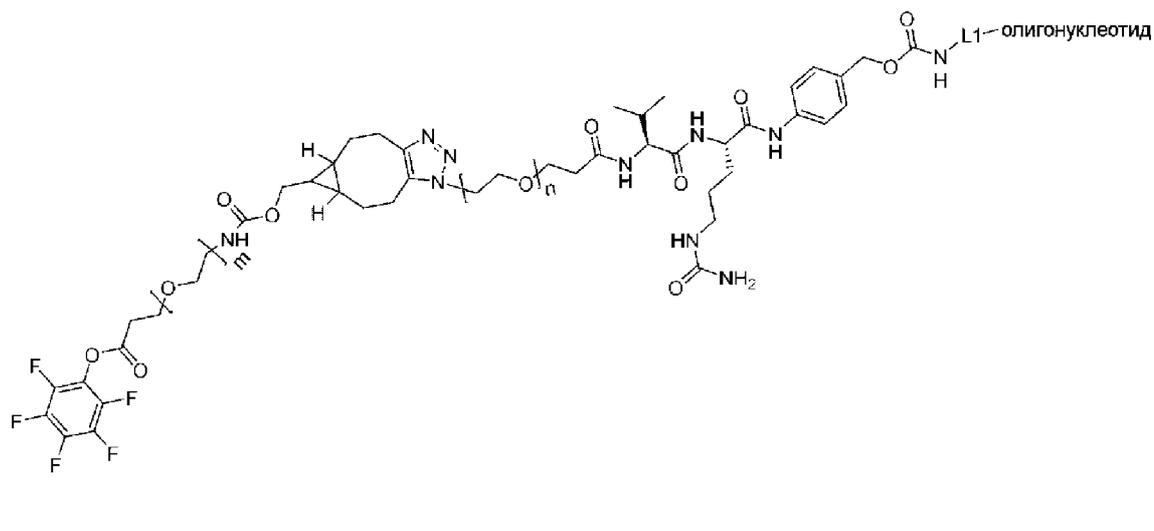
где n является любым числом от 0-10. В некоторых вариантах осуществления n равно 3.

[0312] В некоторых вариантах осуществления соединение Формулы (B) дополнительно ковалентно связано через триазол с дополнительными группами, где триазол образуется в результате клик-реакции между азидом Формулы (A) или Формулы (B) и алкином, присутствующим на бициклононине. В некоторых вариантах осуществления соединение, включающее бициклононин, включает структуру Формулы (C):



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

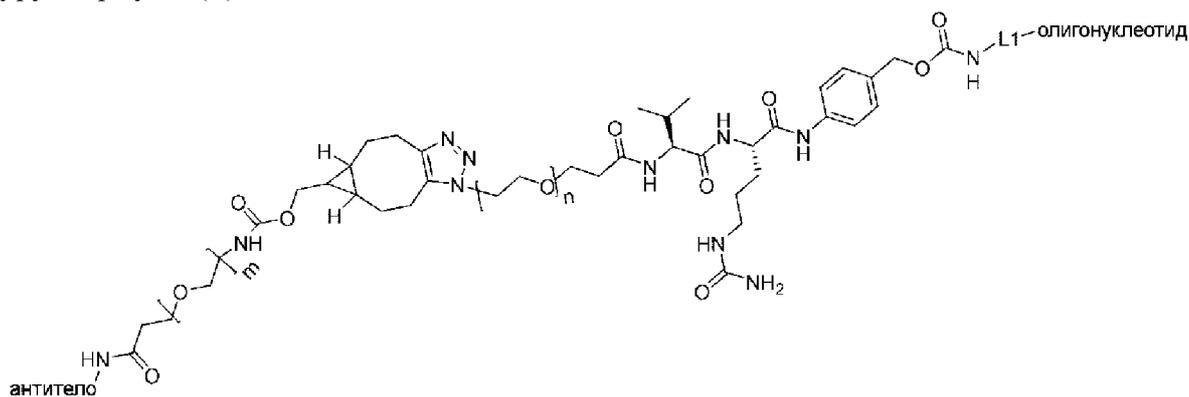
[0313] В некоторых вариантах осуществления азид соединения, имеющего структуру (B), образует триазол в результате клик-реакции с алкином соединения, имеющего структуру (C), с образованием соединения, включающего структуру Формулы (D):



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

[0314] В некоторых вариантах осуществления соединение структуры (D) далее ковалентно связано с лизином антитела против TfR1, формируя комплекс, включающий

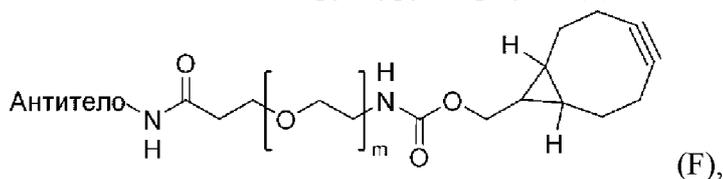
структуру Формулы (E):



(E),

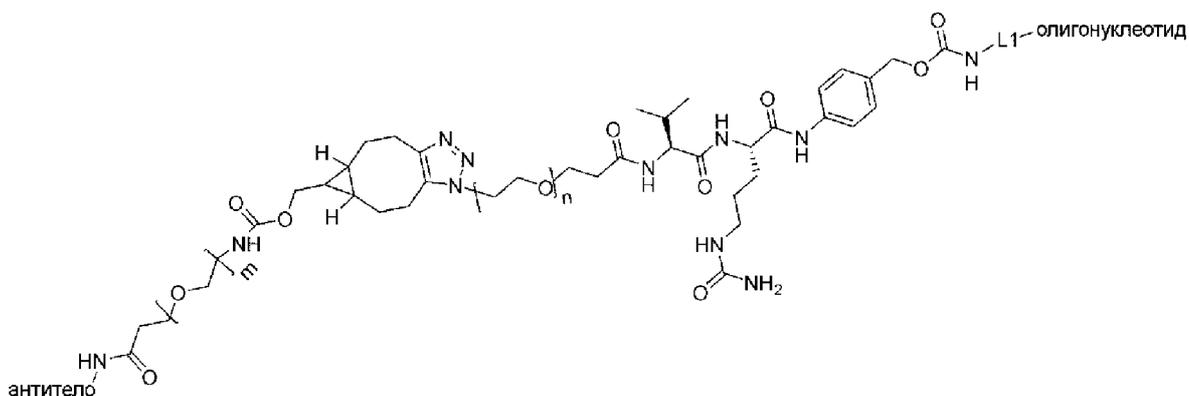
где n является любым числом от 0-10, где m является любым числом от 0-10. В некоторых вариантах осуществления n равно 3 и/или (например, и) m равно 4. Нужно понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (E), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

[0315] В некоторых вариантах осуществления соединение Формулы (C) дополнительно ковалентно связано с лизином антитела против TfR1 с образованием соединения, включающего структуру Формулы (F):



где m равно 0-15 (например, 4). Нужно понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (F), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, такого как эpsilon-амин лизина.

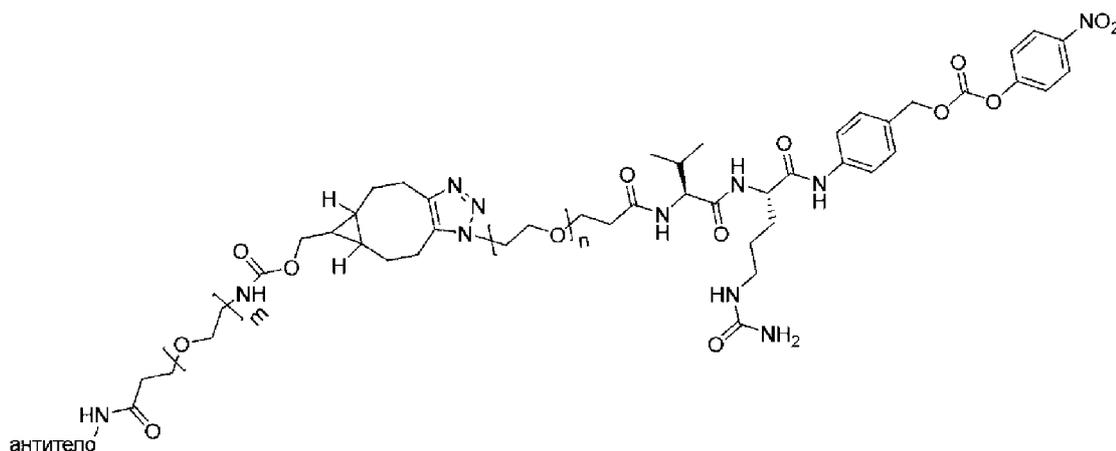
[0316] В некоторых вариантах осуществления азид соединения, имеющего структуру (B), образует триазол в результате клик-реакции с алкином соединения, имеющего структуру (F), с образованием комплекса, включающего структуру Формулы (E):



(E),

где n является любым числом от 0-10, где m является любым числом от 0-10. В некоторых вариантах осуществления n равно 3 и/или (например, и) m равно 4. Нужно понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (E), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

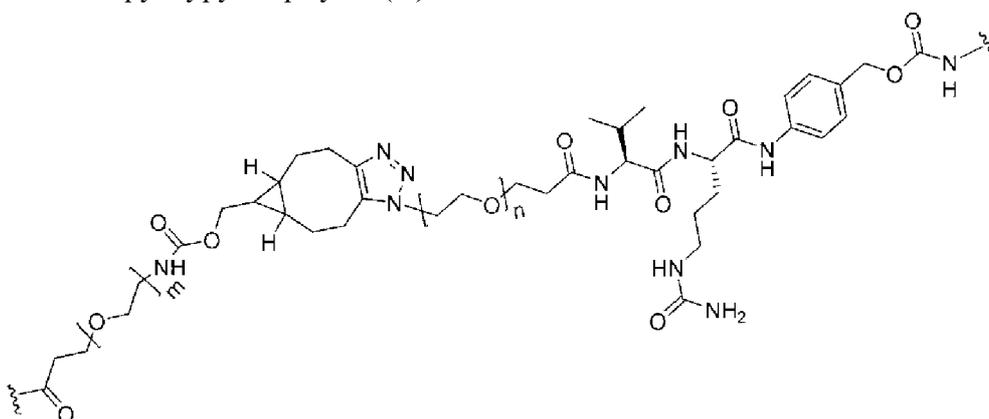
[0317] В некоторых вариантах осуществления азид соединения, имеющего структуру (A), образует триазол в результате клик-реакции с алкином соединения, имеющего структуру (F), с образованием соединения, включающего структуру Формулы (G):



(G),

где n является любым числом от 0-10, где m является любым числом от 0-10. В некоторых вариантах осуществления n равно 3 и/или (например, и) m равно 4. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид ковалентно связан с соединением, включающим структуру формулы (G), с образованием в результате комплекса, включающего структуру формулы (E). Следует понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (G), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

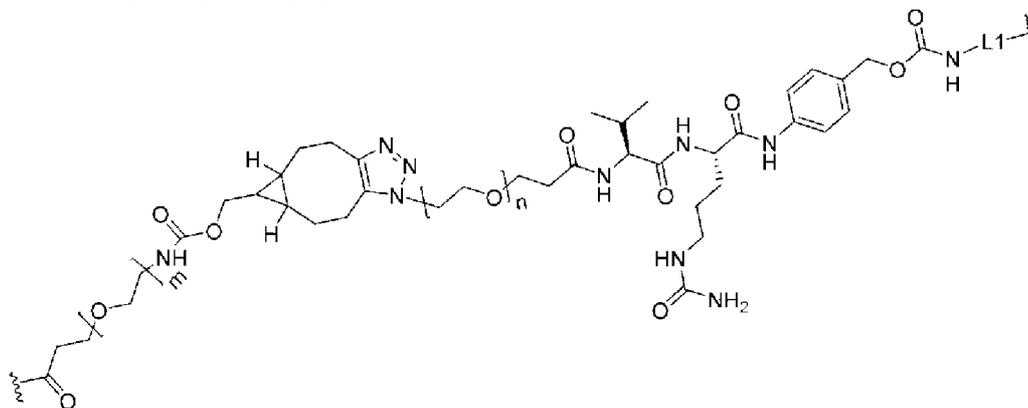
[0318] В некоторых вариантах осуществления, в любом из комплексов, описанных в настоящем документе, антитело против TfR1 ковалентно связано через лизин антитела против TfR1 с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) через линкер, включающий структуру Формулы (H):



(H),

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

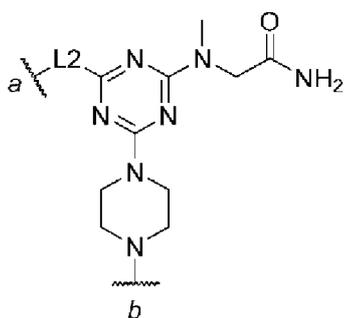
[0319] В некоторых вариантах осуществления, в любом из комплексов, описанных в настоящем документе, антитело против TfR1 ковалентно связано через лизин антитела против TfR1 с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) через линкер, включающий структуру Формулы (I):



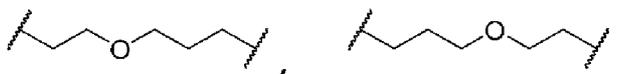
(I),

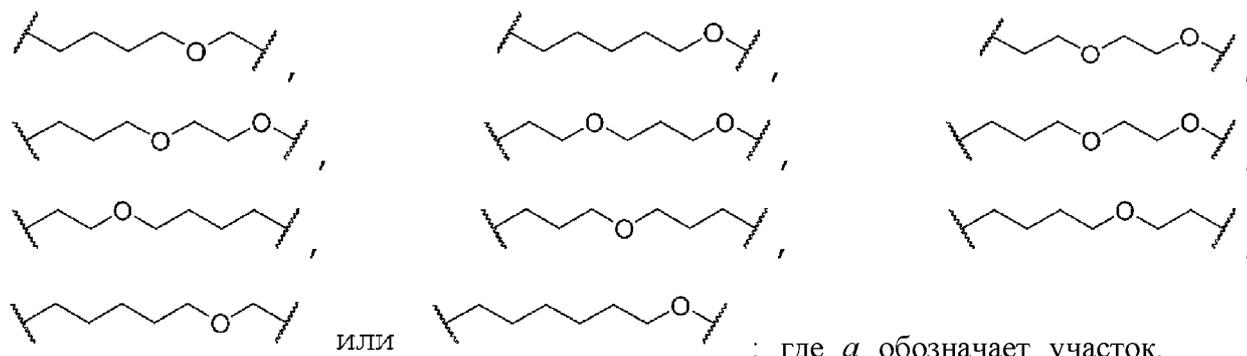
где n является любым числом от 0-10, где m является любым числом от 0-10. В некоторых вариантах осуществления n равно 3 и/или (например, и) m равно 4.

[0320] В некоторых вариантах осуществления, в формулах (B), (D), (E) и (I), L1 является спейсером, который представляет собой замещенный или незамещенный алифатический, замещенный или незамещенный гетероалифатический, замещенный или незамещенный карбоциклический, замещенный или незамещенный гетероциклический, замещенный или незамещенный арилен, замещенный или незамещенный гетероарилен, -O-, -N(R^A)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, -NR^{AC}(=O)-, -NR^{AC}(=O)R^A-, -C(=O)R^A-, -NR^{AC}(=O)O-, -NR^{AC}(=O)N(R^A)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R^A)-, -S(O)₂NR^A-, -NR^{AS}(O)₂- или их комбинацию, где каждый R^A независимо представляет собой водород или замещенный или незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления L1 представляет собой:



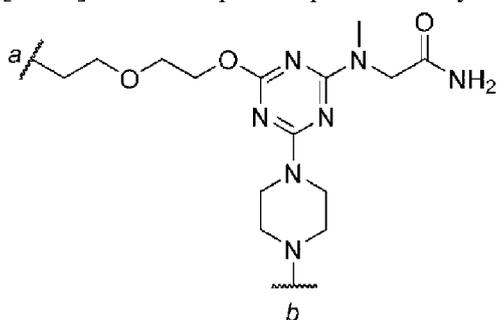
где L2 представляет собой





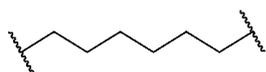
; где *a* обозначает участок, непосредственно связанный с карбаматной группой формул (B), (D), (E) и (I); и *b* обозначает участок, ковалентно связанный (непосредственно или через дополнительные химические группы) с олигонуклеотидом.

[0321] В некоторых вариантах осуществления L1 представляет собой:



где *a* обозначает участок, непосредственно связанный с карбаматной группой формул (B), (D), (E) и (I); и *b* обозначает участок, ковалентно связанный (непосредственно или через дополнительные химические группы) с олигонуклеотидом.

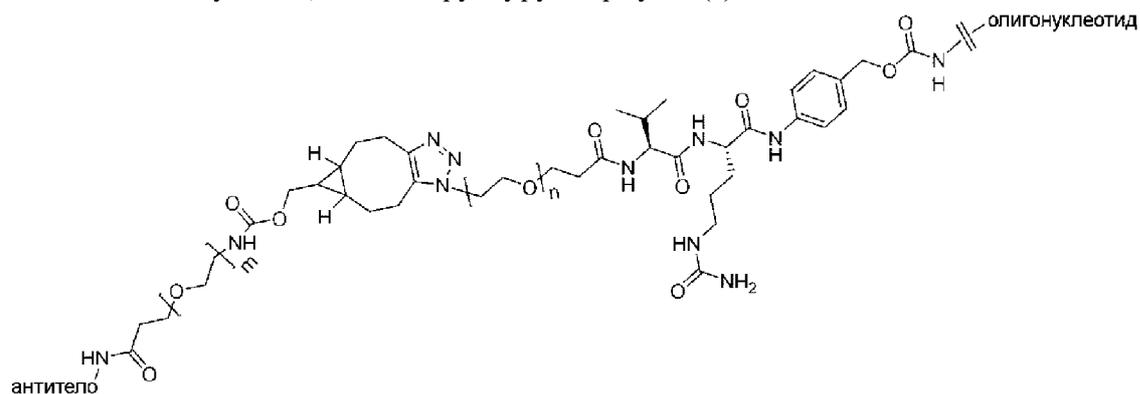
[0322] В некоторых вариантах осуществления L1 представляет собой



[0323] В некоторых вариантах осуществления L1 соединен с 5'-фосфатом олигонуклеотида.

[0324] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, не должен обязательно присутствовать).

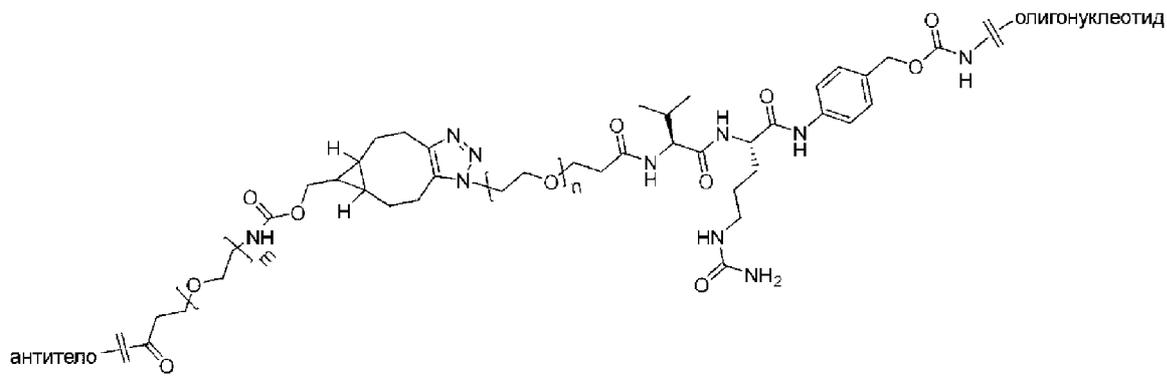
[0325] В некоторых вариантах осуществления любой из комплексов, описанных в настоящем документе, имеет структуру Формулы (J):



(J),

где n равно 0-15 (например, 3), и m равно 0-15 (например, 4). Нужно понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (J), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

[0326] В некоторых вариантах осуществления любой из комплексов, описанных в настоящем документе, имеет структуру Формулы (K):



где n равно 0-15 (например, 3), а m равно 0-15 (например, 4).

[0327] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид модифицируют путем включения аминогруппы на 5'-конце, 3'-конце или внутри (например, в виде аминофункционализированного нуклеинового основания), перед связыванием с соединением, например, соединением формулы (A) или формулы (G).

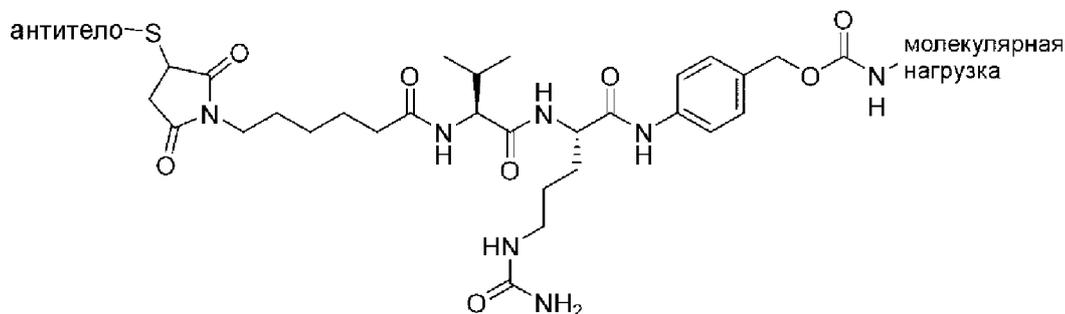
[0328] Несмотря на то, что конъюгирование линкера описано в контексте антител против TfR1 и олигонуклеотидных молекулярных нагрузок, следует понимать, что предусмотрено использование такого конъюгирования линкера с другими нацеленными на мышцы средствами, такими как другие нацеленные на мышцы антитела, и/или с другими молекулярными нагрузками.

D. Примеры комплексов антител-молекулярных нагрузок

[0329] Кроме того, в настоящем документе предложены неограничивающие примеры комплексов, включающих любые антитела против TfR1, описанные в настоящем документе, ковалентно связанные с любой из молекулярных нагрузок (например, олигонуклеотидом), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело против TfR1 (например, любое из антител против TfR1, представленных в Таблицах 2-7) ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом, таким как олигонуклеотиды, представленные в Таблице 8 или Таблице 9) через линкер. Может использоваться любой из линкеров, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, если молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, линкер соединяют с 5'-концом олигонуклеотида, 3'-концом олигонуклеотида или внутренним участком олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом против TfR1 через тиол-реакционноспособную связь (например, через цистеин в антителе против TfR1). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер, включающий последовательность валин-цитруллин), соединяют с антителом (например, антителом против TfR1, описанным в настоящем документе) через аминогруппу (например, через лизин в антителе). В

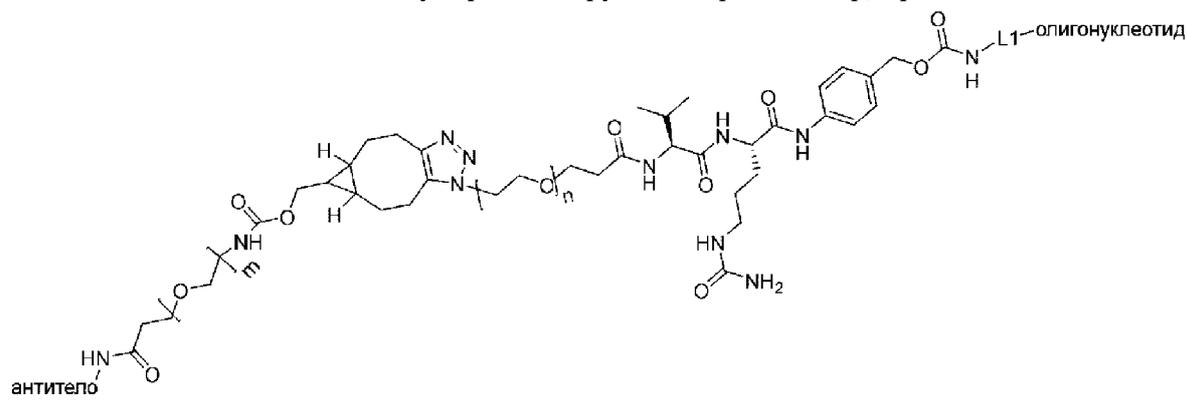
некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0330] Пример структуры комплекса, включающего антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер, представлен ниже:



где линкер связан с антителом через тиол-реактивную связь (например, через цистеин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0331] Другой пример структуры комплекса, включающего антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер, представлен ниже:



где p является числом между 0-10, где m является числом между 0-10, где линкер связан с антителом через аминогруппу (например, на остатке лизина), и/или (например, и) где линкер соединен с олигонуклеотидом (например, на 5'-конце, 3'-конце или внутри). В некоторых вариантах осуществления линкер соединен с антителом через лизин, линкер соединен с олигонуклеотидом на 5'-конце, p равно 3, и m равно 4. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9). Следует понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (E), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, такого как эpsilon-амин лизина.

[0332] Следует понимать, что антитела можно соединять с молекулярными нагрузками с разной стехиометрией, такое свойство может быть указано как соотношение лекарственного средства и антитела (DAR), где "лекарственное средство" является

молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления с антителом соединена одна молекулярная нагрузка (DAR=1). В некоторых вариантах осуществления с антителом соединены две молекулярных нагрузки (DAR=2). В некоторых вариантах осуществления с антителом соединены три молекулярных нагрузки (DAR=3). В некоторых вариантах осуществления с антителом соединены четыре молекулярных нагрузки (DAR=4). В некоторых вариантах осуществления предложена смесь различных комплексов, каждый из которых имеет разное DAR. В некоторых вариантах осуществления среднее DAR комплексов в такой смеси может находиться в диапазоне 1-3, 1-4, 1-5 или больше. Среднее DAR комплексов в смеси не должно быть обязательно целочисленным значением. DAR можно увеличивать путем конъюгирования молекулярных нагрузок с разными участками на антителе и/или (например, и) путем конъюгирования мультимеров с одним или более участками на антителе. Например, DAR 2 может быть достигнуто при конъюгировании одной молекулярной нагрузки с двумя разными участками на антителе или при конъюгировании димерной молекулярной нагрузки с одним участком антитела.

[0333] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, описанное в настоящем документе (например, антитела, представленные в Таблицах 2-7), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, описанное в настоящем документе (например, антитела, представленные в Таблицах 2-7), ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой через линкер (например, линкер, включающий последовательность валин-цитруллин). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер, включающий последовательность валин-цитруллин), соединяют с антителом (например, антителом против TfR1, описанным в настоящем документе) через тиол-реакционноспособную связь (например, через цистеин в антителе). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер, включающий последовательность валин-цитруллин), соединяют с антителом (например, антителом против TfR1, описанным в настоящем документе) через аминокгруппу (например, через лизин в антителе). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0334] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого из антител, перечисленных в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0335] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной

нагрузкой, где антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0336] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 76, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0337] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или SEQ ID NO: 76, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0338] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0339] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 79, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0340] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 154, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0341] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0342] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0343] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 или SEQ ID NO: 91, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0344] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 94, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0345] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и легкую цепь, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

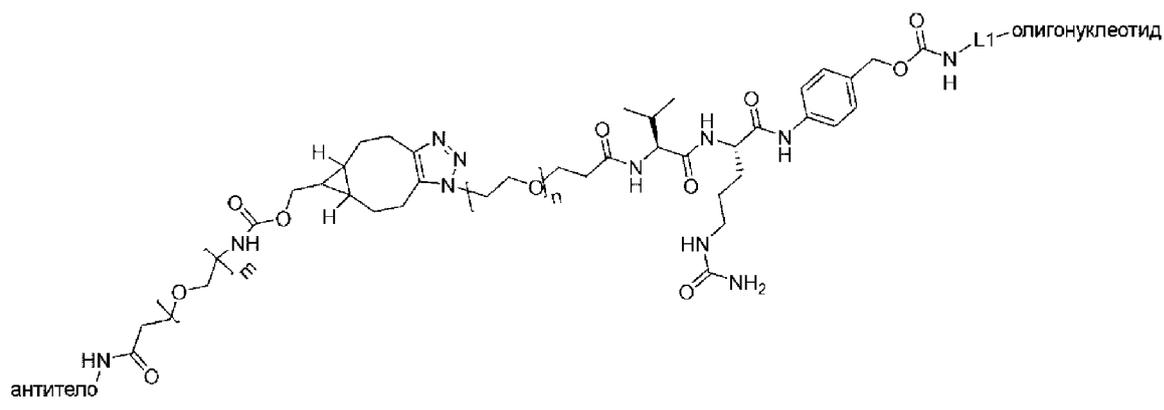
[0346] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0347] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 или SEQ ID NO: 99, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0348] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

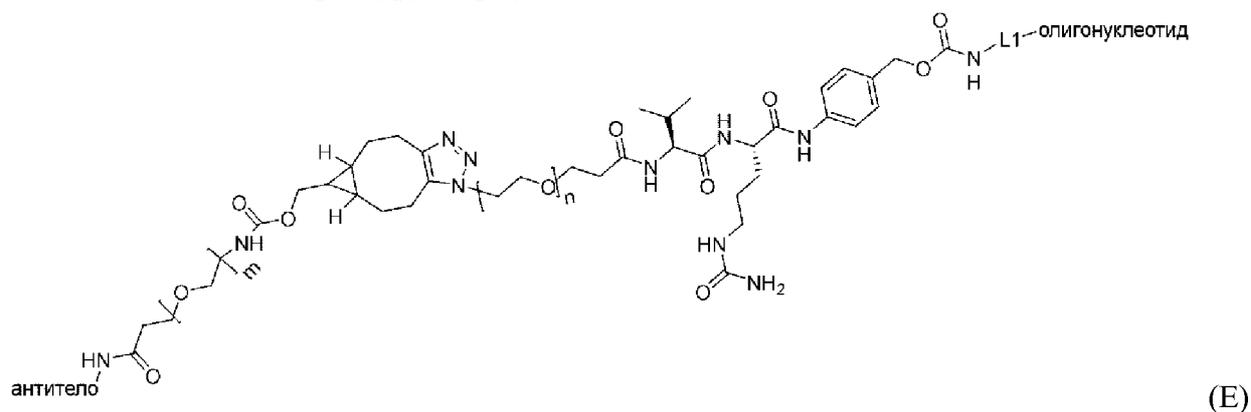
[0349] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 или SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой DUX4-нацеленный олигонуклеотид (например, DUX4-нацеленный олигонуклеотид, перечисленный в Таблице 8 или Таблице 9).

[0350] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и легкую цепь, включающую



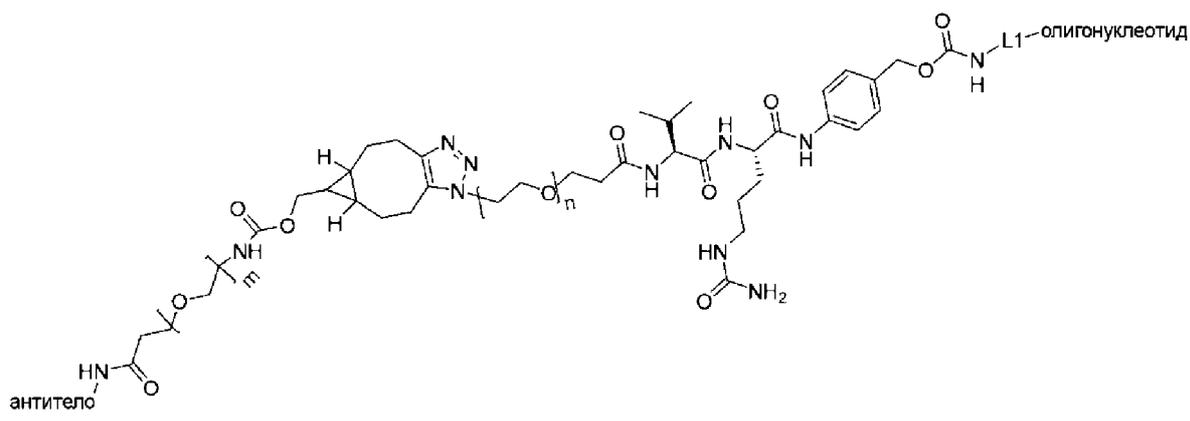
где n равно 3, и m равно 4. Следует понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (E), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

[0355] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с 5'-концом DUX4-нацеленного олигонуклеотида (например, DUX4-нацеленного олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 8 или Таблице 9) через лизин в антителе против TfR1, где антитело против TfR1 включает VH и VL любого из антител, перечисленных в Таблице 3, где комплекс имеет структуру Формулы (E):



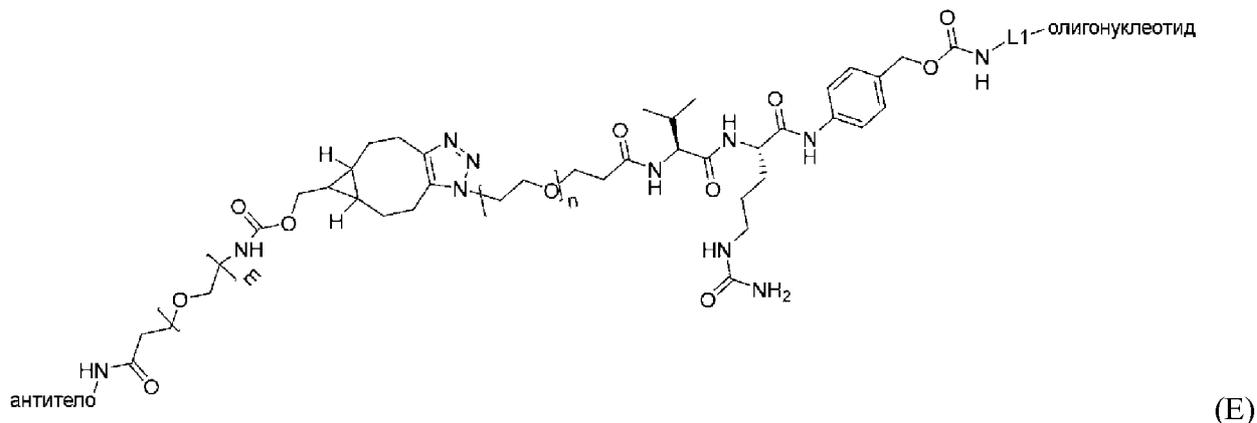
где n равно 3, и m равно 4. Следует понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (E), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

[0356] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает антитело против TfR1, ковалентно связанное с 5'-концом DUX4-нацеленного олигонуклеотида (например, DUX4-нацеленного олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 8 или Таблице 9) через лизин в антителе против TfR1, где антитело против TfR1 включает тяжелую цепь и легкую цепь любого из антител, перечисленных в Таблице 4, где комплекс имеет структуру Формулы (E):



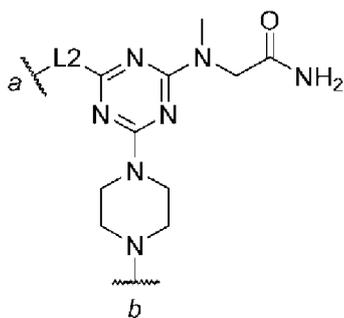
где n равно 3, и m равно 4. Следует понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (E), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

[0357] В некоторых вариантах осуществления комплекс, описанный в настоящем документе, включает Fab против TfR1, ковалентно связанное с 5'-концом DUX4-нацеленного олигонуклеотида (например, DUX4-нацеленного олигонуклеотида, перечисленного в Таблице 8 или Таблице 9) через лизин в антителе против TfR1, где Fab против TfR1 включает тяжелую цепь и легкую цепь любого из антител, перечисленных в Таблице 5, где комплекс имеет структуру Формулы (E):

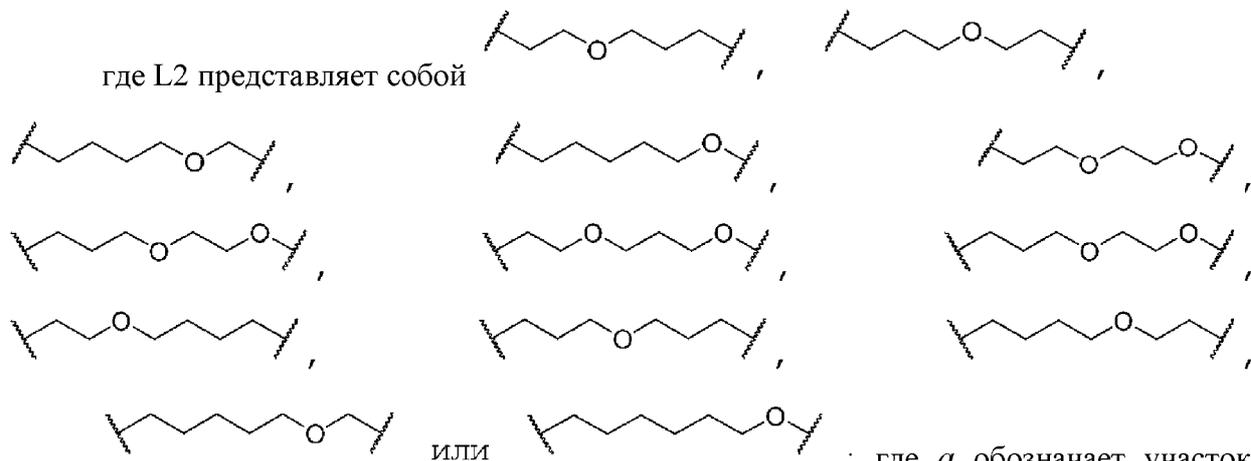


где n равно 3, и m равно 4. Следует понимать, что амид, показанный соединенным с антителом против TfR1 в Формуле (E), образуется в результате реакции с амином антитела против TfR1, таким как эpsilon-амин лизина.

[0358] В некоторых вариантах осуществления, в любом из примеров комплексов, описанных в настоящем документе, L1 представляет собой спейсер, который является замещенным или незамещенным алифатическим, замещенным или незамещенным гетероалифатическим, замещенным или незамещенным карбоциклиленом, замещенным или незамещенным гетероциклиленом, замещенным или незамещенным ариленом, замещенным или незамещенным гетероариленом, -O-, -N(R^A)-, -S-, -C(=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)NR^A-, -NR^AC(=O)-, -NR^AC(=O)R^A-, -C(=O)R^A-, -NR^AC(=O)O-, -NR^AC(=O)N(R^A)-, -OC(=O)-, -OC(=O)O-, -OC(=O)N(R^A)-, -S(O)₂NR^A-, -NR^AS(O)₂- или их комбинацией, где каждый R^A независимо представляет собой водород или замещенный или незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления L1 представляет собой:

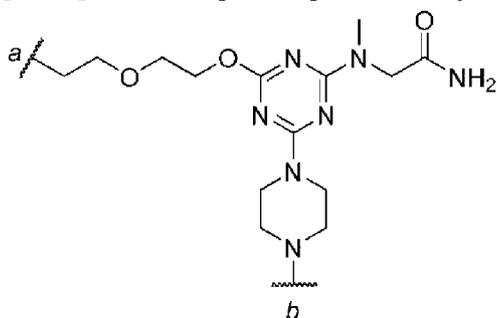


где L2 представляет собой



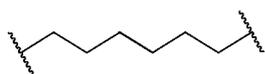
или ; где *a* обозначает участок, непосредственно связанный с карбаматной группой формулы (E); и *b* обозначает участок, ковалентно связанный (непосредственно или через дополнительные химические группы) с олигонуклеотидом.

[0359] В некоторых вариантах осуществления L1 представляет собой:



где *a* обозначает участок, непосредственно связанный с карбаматной группой формулы (E); и *b* обозначает участок, ковалентно связанный (непосредственно или через дополнительные химические группы) с олигонуклеотидом.

[0360] В некоторых вариантах осуществления L1 представляет собой



[0361] В некоторых вариантах осуществления L1 соединен с 5'-фосфатом олигонуклеотид.

[0362] В некоторых вариантах осуществления L1 является необязательным (например, не должен обязательно присутствовать).

III. Составы

[0363] Комплексы, предложенные в настоящем документе, могут быть изготовлены любым подходящим образом. Как правило, комплексы, предложенные в настоящем документе, изготавливают способом, подходящим для фармацевтического применения. Например, комплексы могут доставлять субъекту при использовании состава, который сводит к минимуму разложение, облегчает доставку и/или (например, и) всасывание, или придает другое полезное свойство комплексам в составе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены композиции, включающие комплексы и фармацевтически приемлемые носители. Такие композиции могут изготавливать соответствующим образом в виде таких составов, что при введении субъекту либо в непосредственное окружение клетки-мишени, либо системно, достаточное количество комплексов проникает в клетки-мишени (например, мышечные клетки или клетки ЦНС). В некоторых вариантах осуществления комплексы изготавливают в виде составов в буферных растворах, таких как фосфатно-солевые буферные растворы, липосомы, мицеллярные структуры и капсиды.

[0364] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления композиции могут включать отдельно один или больше компонентов комплексов, представленных в настоящем документе, (например, нацеленные на мышцы средства, линкеры, молекулярные нагрузки или молекулы-предшественники любых из них).

[0365] В некоторых вариантах осуществления комплексы включают в воду или в водный раствор (например, воду с регуляторами pH). В некоторых вариантах осуществления комплексы включают в основные буферные водные растворы (например, PBS). В некоторых вариантах осуществления составы, раскрытые в настоящем документе, содержат вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество придает композиции улучшенную стабильность, улучшенное всасывание, улучшенную растворимость и/или (например, и) повышение терапевтической эффективности активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество является буферным веществом (например, цитратом натрия, фосфатом натрия, Трис-основанием или гидроксидом натрия) или растворителем (например, буферным раствором, петролатумом, диметилсульфоксидом или минеральным маслом).

[0366] В некоторых вариантах осуществления комплекс или его компонент (например, олигонуклеотид или антитело) лиофилизируют для увеличения его срока годности, а затем превращают в раствор перед применением (например, введением субъекту). Таким образом, вспомогательное вещество в композиции, включающей комплекс или его компонент, описанный в настоящем документе, может быть лиопротектором (например, маннитом, лактозой, полиэтиленгликолем или поливинилпирролидоном) или модификатором температуры коллапса (например, декстраном, фиколлом или желатином).

[0367] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию изготавливают так, чтобы она была совместима с ее предполагаемым путем введения.

Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, кожное, подкожное, введение. Как правило, путь введения является внутривенным или подкожным.

[0368] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (в случае их растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. В некоторых вариантах осуществления составы включают изотонические вещества, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия в композиции. Стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены путем включения комплексов в необходимом количестве в выбранный растворитель с одним из компонентов, перечисленных выше, или их комбинацией, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием.

[0369] В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% комплекса или его компонента или больше, несмотря на то, что процентное содержание активного ингредиента(ов) может составлять от приблизительно 1% до приблизительно 80% или больше по весу или объему общей композиции. Факторы, такие как растворимость, биодоступность, период полувыведения, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические показатели будут предусмотрены специалистом в области изготовления таких фармацевтических составов, и, таким образом, могут быть желательными различные дозы и схемы лечения.

IV. Способы применения/лечения

[0370] Комплексы, включающие нацеленное на мышцы средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, как описано в настоящем документе, являются эффективными при лечении ПЛЛМД. В некоторых вариантах осуществления комплексы являются эффективными при лечении ПЛЛМД 1 типа. В некоторых вариантах осуществления комплексы являются эффективными при лечении ПЛЛМД 2 типа. В некоторых вариантах осуществления ПЛЛМД ассоциирована с делецией в областях повторов D4Z4 на хромосоме 4, которые содержат ген DUX4. В некоторых вариантах осуществления ПЛЛМД ассоциирована с мутациями в гене SMCHD1.

[0371] В некоторых вариантах осуществления субъектом может быть субъект-человек, не относящийся к человеку примат, грызун или любой подходящий субъект-млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект может иметь миотоническую дистрофию. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет повышенную экспрессию гена DUX4 вне рамок развития плода и вне яичек. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию 1 типа или 2 типа. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий ПЛЛМД, имеет мутации в гене SMCHD1. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий ПЛЛМД, имеет мутации с делецией в областях повторов D4Z4 на хромосоме 4.

[0372] Один из аспектов изобретения включает способ, включающий введение субъекту эффективного количества комплекса, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции, включающей комплекс, включающий нацеленное на мышцы средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, могут вводить субъекту, нуждающемуся в лечении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, включающую комплекс, описанный 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 внутривенное введение могут производить внутримышечным, внутривентральным, спинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным или интратракеальным путями. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может находиться в твердой форме, водной форме или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления водную или жидкую форму можно небулизировать или лиофилизировать. В некоторых вариантах осуществления небулизированную или лиофилизированную форму можно восстанавливать водным или жидким раствором.

[0373] Композиции для внутривенного введения могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилацетамид, диметилформамид, этиллактат, этилкарбонат, изопропилмирикат, этанол и полиолы (глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.). В случае внутривенной инъекции водорастворимые антитела могут вводить методом капельного вливания, посредством которого производят инфузию фармацевтического состава, содержащего антитело и физиологически приемлемые вспомогательные вещества. Физиологически приемлемые вспомогательные вещества могут включать, например, 5% декстрозу, 0,9% раствор хлорида натрия, раствор Рингера или другие подходящие вспомогательные вещества. Препараты для внутримышечного введения, например, стерильный состав подходящей растворимой солевой формы антитела, могут растворять и вводить в фармацевтическом вспомогательном веществе, таком как вода для инъекций, 0,9% раствор хлорида натрия или 5% раствор глюкозы.

[0374] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, включающую комплекс, включающий нацеленное на мышцы средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, вводят методами сайт-специфической или местной доставки. Примеры таких методов включают имплантируемые депо-источники комплекса, катетеры для местной доставки, сайт-специфические носители, прямую инъекцию или прямое нанесение.

[0375] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, включающую комплекс, включающий нацеленное на мышцы средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, 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.

[0376] 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.

[0377] Эффективность лечения могут оценивать с помощью любых подходящих методов. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения могут оценивать при наблюдении симптомов, связанных с ПЛЛМД, включая потерю мышечной массы и атрофию мышц, прежде всего мышц лица, лопаток и плеч.

[0378] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, включающую комплекс, включающий нацеленное на мышцы средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в эффективной концентрации, достаточной для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% по сравнению с контролем, например, исходным уровнем экспрессии гена до лечения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Эффекты конъюгатов, содержащих Fab против TfR, конъюгированный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом, в иммортализованных миобластах, полученных у пациента с ПЛЛМД

[0379] VH4/VK3 Fab против TfR 3M12 конъюгировали с олигонуклеотидом, нацеленным на DUX4 (SEQ ID NO: 151), через расщепляемый линкер Val-Cit для обеспечения улучшенной доставки олигонуклеотида в мышцы. Олигонуклеотид представляет собой ФМО и направленно воздействует на сигнал полиаденилирования транскрипта DUX4. Активность конъюгата оценивали на линии иммортализованных клеток FSHD1 C6(AB1080), которая имеет значительные уровни поверхностной экспрессии TfR1 и активации маркеров транскриптома DUX4 (MBD3L2, TRIM43, ZSCAN4). Было продемонстрировано, что рецептор-опосредованная доставка ФМО (SEQ ID NO: 151) с помощью Fab против TfR в мышечные клетки приводит к снижению биомаркеров транскриптома DUX4 на ~75% при концентрации ФМО 8 нМ, тогда как эквивалентный неконъюгированный ФМО не показывал значимого снижения биомаркеров по сравнению с клетками, обработанными растворителем (ФИГ. 1). Результаты показывают, что

конъюгирование с Fab против TfR улучшает доставку терапевтических олигонуклеотидов в мышечные клетки для лечения ПЛЛМД.

[0380] Используемый в данном примере термин "неконъюгированный" означает, что олигонуклеотид не был конъюгирован с антителом.

[0381] Кроме того, кривая доза-эффект для снижения мРНК MBD3L2 показана на ФИГ. 2А. Значение полумаксимальной концентрации конъюгата, требуемой для ингибирования (IC₅₀), составляло 189 пМ. Кривые доза-эффект для снижения мРНК MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4 показаны на ФИГ. 2В. Значения IC₅₀ для конъюгата, ингибирующего MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4, составляли 200 пМ, 50 пМ и 200 пМ соответственно.

Экспериментальные методики для Примера 1

Культура клеток и обработка тестируемым препаратом

[0382] Иммуортиализованные миобласты ПЛЛМД С6 (AB1080) сеяли до плотности 45000 клеток/лунка в 96-луночный планшет (ThermoFisher Scientific) в среде для роста скелетных мышц Skeletal Growth Media (номер по кат. C-23060, Promocell) со смесью добавок (C-39365, Promocell) и 1% Penstrep (15140-122, Gibco). Через 24 часа среду для роста заменяли средой для дифференцировки NbActiv4 (Brainbits) и 1% Pen/Strep (Gibco). Клетки обрабатывали неконъюгированным DUX4-нацеленным олигонуклеотидом, конъюгатом с концентрацией ФМО 8 нМ или растворителем в технических повторностях в течение 4 часов перед промывкой 1×PBS (10010023, Gibco). Кондиционированную среду для дифференцировки сразу добавляли обратно в лунки и через 5 дней клетки собирали для последующего исследования.

[0383] Для получения кривых доза-эффект для нокдауна MBD3L2, TRIM43 и ZSCAN4 иммуортиализованные миобласты ПЛЛМД С6 (AB1080) обрабатывали, как описано выше, но с разными концентрациями конъюгатов.

Выделение РНК и кПЦР

[0384] Суммарную РНК выделяли из клеточных монослоев с использованием набора RNeasy 96 (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. РНК определяли количественно с использованием планшетного анализатора Biotek, разбавляли до концентрации 50 нг на образец водой без нуклеаз (Qiagen) и подвергали обратной транскрипции при использовании qScript cDNA SuperMix (QuantaBio). Анализ экспрессии генов проводили с помощью кПЦР со специфичными анализами TaqMan (ThermoFisher) путем измерения уровней транскриптов TRIM43 (Hs00299174_m1), MBD3L2 (Hs00544743_m1), ZSCAN4 (Hs00537549_m1) и RPL13A (Hs04194366_g1). Двухстадийные реакции амплификации и измерения флуоресценции для определения Ct проводили на приборе QuantStudio 7 (Thermo Scientific). Изменения логарифмического порядка экспрессии представляющих интерес транскриптов вычисляли в соответствии с методом 2- $\Delta\Delta CT$ при использовании RPL13A в качестве референсного гена и клеток, обработанных растворителем, в качестве контрольной группы. Данные представлены как среднее \pm SD.

Пример 2. Фармакокинетические свойства конъюгата антитела-

олигонуклеотида у не относящихся к человеку приматов

[0385] DUX4-нацеленный олигонуклеотид (SEQ ID NO: 151) вводили внутривенно не относящимся к человеку приматам, либо голый, либо в виде конъюгата с антителом против TfR1 (VH4/Vk3 Fab 3M12). Голый олигонуклеотид вводили в дозе 30 мг/кг, а конъюгат вводили в дозе, эквивалентной 3 мг/кг, 10 мг/кг или 30 мг/кг олигонуклеотида. Уровни олигонуклеотида в плазме крови, измеренные в динамике, показаны на ФИГ. 3. Результаты показывают, что системное воздействие конъюгата антитела-олигонуклеотида демонстрирует дозозависимые фармакокинетические показатели и обеспечивает более высокую экспозицию по сравнению с голым олигонуклеотидом. Измерения в плазме также показывают, что конъюгат антитела-олигонуклеотида имеет длительный период полувыведения из сыворотки, составляющий приблизительно 60 часов. Кроме того, конъюгат антитела-олигонуклеотида демонстрирует 58-кратное увеличение площади под кривой (AUC) и 3-кратное увеличение C_{max} по сравнению с голым олигонуклеотидом в дозе, эквивалентной 30 мг/кг олигонуклеотида. Эти результаты приведены в Таблице 16.

Таблица 16. Фармакокинетические значения, вычисленные на основе измерений концентрации в плазме

	Конъюгат антитела-олигонуклеотида			Олигонуклеотид
Доза (мг/кг)	3	10	30	30
C_{max} (мкг/мл)	84	242	893	305
AUC _t (ч*мкг/мл)	969	4714	15191	260
T _{1/2} (ч)	61	58	56	N/A

[0386] Через две недели после введения олигонуклеотида или конъюгата антитела-олигонуклеотида проводили вскрытие и собирали мышечные ткани у не относящихся к человеку приматов и измеряли уровни олигонуклеотидов. В каждой исследованной мышечной ткани (сердце, круговая мышца рта, большая скуловая мышца, диафрагма, трапециевидная, дельтовидная, икроножная, двуглавая, четырехглавая и передняя большеберцовая мышца) уровни олигонуклеотидов в тканях были выше для каждой дозы конъюгата антитела-олигонуклеотида (эквивалентной 3, 10 или 30 мг/кг олигонуклеотида) по сравнению с голым олигонуклеотидом (30 мг/кг) (ФИГ. 4). В качестве контроля уровни олигонуклеотидов также измеряли в тканях, собранных у животных, получавших растворитель, при этом ни в одной из исследованных мышечных тканей олигонуклеотиды не были обнаружены. Эти результаты демонстрируют, что конъюгат антитела-олигонуклеотида обеспечивает высокую концентрацию DUX4-нацеленного олигонуклеотида в мышечной ткани, и значительно более высокую, чем при введении голого олигонуклеотида. При дозе, эквивалентной 30 мг/кг олигонуклеотида, концентрации олигонуклеотидов в каждой тестируемой мышце были в 26-139 раз выше у животных, получавших конъюгаты антитела-олигонуклеотида, по сравнению с голым олигонуклеотидом.

[0387] Чтобы оценить накопление DUX4-нацеленного олигонуклеотида в ткани с течением времени, уровни тканевых олигонуклеотидов измеряли в образцах биопсии икроножной мышцы, собранных через одну неделю после введения, и сравнивали со

значениями, измеренными в образцах после аутопсии, собранных через две недели после введения. Уровни олигонуклеотидов были заметно выше в образцах биопсии икроножной мышцы, взятых у животных, которым вводили 3, 10 или 30 мг/кг эквивалента олигонуклеотида конъюгата антитела-олигонуклеотида, чем в образцах биопсии, взятых у животных, которым вводили 30 мг/кг голого олигонуклеотида, причем в тканях, собранных через две недели после введения, уровни были еще выше (ФИГ. 5). В образцах тканей животных, получавших растворитель, олигонуклеотиды не были обнаружены. Эти результаты демонстрируют, что конъюгат антитела-олигонуклеотида обеспечивает более высокую экспозицию DUX4-нацеленного олигонуклеотида в мышечной ткани по сравнению с голым олигонуклеотидом, и что конъюгат продолжает накапливаться с течением времени.

Пример 3. Эффекты конъюгатов, содержащих Fab против TfR, конъюгированный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом, на иммортализованные миобласты, полученные у пациентов с ПЛЛМД

[0388] VH4/VK3 Fab против TfR 3M12 конъюгировали с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (олигонуклеотиды #8, #1 или #2, как перечислено в Таблице 8, соответствующие SEQ ID NO: 176, 169, 170 соответственно) через расщепляемый линкер Val-Cit для обеспечения улучшенной доставки олигонуклеотида в мышцы. Контрольный конъюгат также получали путем конъюгирования VH4/VK3 Fab против TfR 3M12 с контрольным DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (SEQ ID NO: 151) через такой же расщепляемый линкер Val-Cit. Активность конъюгатов оценивали на линии иммортализованных клеток FSHD1 C6(AB1080), которая имеет значительные уровни поверхностной экспрессии TfR1 и активации маркеров транскриптома DUX4 (MBD3L2, TRIM43, ZSCAN4).

[0389] Иммортализованные миобласты FSHD C6 (AB1080) сеяли до плотности 410000 клеток/лунка в 384-луночный планшет (ThermoFisher Scientific) в среде для роста скелетных мышц Skeletal Growth Media (номер по кат. C-23060, Promocell) со смесью добавок (C-39365), Promocell) и 1% Penstrep (15140-122, Gibco). Через 24 часа среду для роста заменяли средой для дифференцировки NbActiv4 (Brainbits) и 1% Pen/Strep (Gibco). Клетки обрабатывали конъюгатами в концентрации, эквивалентной 10 пМ, 1 нМ или 100 нМ олигонуклеотида, в течение 10 дней и собирали позже для последующего исследования.

[0390] Как показано на ФИГ. 6, конъюгаты, содержащие VH4/Vk3 Fab против TfR 3M12, конъюгированный с DUX4-нацеленным олигонуклеотидом (#8, #1 или #2 в Таблице 8, соответствующие SEQ ID NO: 176, 169, 170 соответственно), и контрольный конъюгат снижали уровни экспрессии маркеров транскриптома DUX4 в клетках пациента с ПЛЛМД. Эти результаты показывают, что конъюгаты снижали уровень экспрессии DUX4 в клетках пациента с ПЛЛМД *in vitro*.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. Комплекс, включающий антитело против рецептора трансферрина 1 (TfR1), ковалентно связанное с олигонуклеотидом, предназначенным для снижения экспрессии или

активности DUX4, где антитело против TfR1 включает определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR-H1), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (CDR-H2), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) любого из антител против TfR1, перечисленных в Таблицах 2-7, и где олигонуклеотид включает антисмысловую цепь, включающую область комплементарности с последовательностью DUX4, как представлено в SEQ ID NO: 160 или SEQ ID NO: 365.

2. Комплекс согласно варианту осуществления 1, где антитело против TfR1 включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL) любого из антител против TfR1, перечисленных в Таблице 3.

3. Комплекс согласно любому из варианта осуществления 1 или варианта осуществления 2, где антитело против TfR1 включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 76, и/или переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 75,

необязательно, где антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

4. Комплекс согласно варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, где антитело против TfR1 представляет собой Fab, где Fab необязательно включает тяжелую цепь и легкую цепь любого из Fab против TfR1, перечисленных в Таблице 5.

5. Комплекс согласно варианту осуществления 4, где Fab включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 101, и/или легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 90,

необязательно, где Fab включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

6. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов.

7. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где олигонуклеотид включает область, комплементарную по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам в последовательности DUX4, как указано в SEQ ID NO: 160 или SEQ ID NO: 365.

8. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где олигонуклеотид включает область комплементарности по меньшей мере с 15 последовательными нуклеотидами в последовательности DUX4, как представлено в любой из SEQ ID NO: 161-168 или 213-288.

9. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-8, где олигонуклеотид включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364, где каждое основание тимин (Т) может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и каждый U может быть независимо и необязательно заменен Т.

10. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где олигонуклеотид не включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151.

11. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где олигонуклеотид включает нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364.

12. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где олигонуклеотид дополнительно включает смысловую цепь, которая гибридизуется с антисмысловой цепью, образуя двухцепочечную миРНК.

13. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где олигонуклеотид включает по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

14. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где олигонуклеотид включает один или больше модифицированных нуклеозидов, где один или больше модифицированных нуклеозидов необязательно являются 2'-модифицированными нуклеозидами.

15. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где олигонуклеотид является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО).

16. Комплекс согласно любому из вариантов осуществления 1-15, где антитело и олигонуклеотид ковалентно связаны через линкер.

17. Комплекс согласно варианту осуществления 16, где линкер является расщепляемым линкером, где линкер необязательно включает последовательность валин-цитруллин.

18. Способ снижения экспрессия DUX4 в мышечной клетке, включающий контакт мышечной клетки с эффективным количеством комплекса согласно любому из вариантов осуществления 1-17 для стимуляции интернализации олигонуклеотида в мышечную клетку.

19. Способ согласно варианту осуществления 18, где клетка находится *in vitro*.

20. Способ согласно варианту осуществления 18, где клетка находится у субъекта.

21. Способ согласно варианту осуществления 20, где субъектом является человек.

22. Способ лечения плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (ПЛЛМД), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества комплекса согласно любому из вариантов осуществления 1-17, где субъект имеет нарушенную продукцию белка DUX4.

23. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20-22, где субъект имеет одну или больше делеций повтора D4Z4 в хромосоме 4.

24. Способ согласно варианту осуществления 23, где субъект имеет 10 или меньше

повторов D4Z4.

25. Способ согласно варианту осуществления 24, где субъект имеет 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 повтор D4Z4.

26. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20-22, где субъект не имеет повторов D4Z4.

27. Олигонуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364, где олигонуклеотид необязательно является фосфородиамидат-морфолиновым олигомером (ФМО).

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ТЕРМИНОЛОГИЯ

[0391] 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 "включающий", "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.

[0392] 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.

[0393] 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.

[0394] 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 "включающий", "имеющий" и "содержащий" следует считать неограничивающими терминами (т.е. означающими "включающий, 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.

[0395] 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.

[0396] 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 включает 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. Комплекс, включающий антитело против рецептора трансферрина 1 (TfR1), ковалентно связанное с олигонуклеотидом, предназначенным для снижения экспрессии или активности DUX4, где антитело против TfR1 включает определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (H1 CDR), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (H2 CDR), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (CDR-H3), определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (CDR-L1), определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (CDR-L2), определяющую комплементарность область легкой цепи 3 (CDR-L3) любого из антител против TfR1, перечисленных в Таблицах 2-7, и где олигонуклеотид включает антисмысловую цепь, включающую область комплементарности с последовательностью DUX4, как представлено в SEQ ID NO: 160 или SEQ ID NO: 365.

2. Комплекс по п.1, где антитело против TfR1 включает переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL) любого из антител против TfR1, перечисленных в Таблице 3.

3. Комплекс по любому из п.1 или п.2, где антитело против TfR1 включает переменную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 76, и/или переменную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 75,

необязательно, где антитело против TfR1 включает VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75.

4. Комплекс по п.1 или по п.2, где антитело против TfR1 представляет собой Fab, где Fab необязательно включает тяжелую цепь и легкую цепь любого из Fab против TfR1, перечисленных в Таблице 5.

5. Комплекс по п.4, где Fab включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 101, и/или легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную SEQ ID NO: 90,

где Fab необязательно включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90.

6. Комплекс по любому из пп.1-5, где олигонуклеотид имеет длину 20-30 нуклеотидов.

7. Комплекс по любому из пп.1-6, где олигонуклеотид включает область комплементарности по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов с последовательностью DUX4, как указано в SEQ ID NO: 160 или SEQ ID NO: 365, где олигонуклеотид необязательно включает область комплементарности по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов с последовательностью DUX4, как представлено в любой

из SEQ ID NO: 161-168 или 213-288.

8. Комплекс по любому из пп.1-7, где олигонуклеотид включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364, где каждое основание тимин (Т) может быть независимо и необязательно заменено основанием урацил (U), и каждый U может быть независимо и необязательно заменен Т, где олигонуклеотид необязательно включает нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364.

9. Комплекс по любому из пп.1-8, где олигонуклеотид не включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 151.

10. Комплекс по любому из пп.1-9, где олигонуклеотид дополнительно включает смысловую цепь, которая гибридизуется с антисмысловой цепью, образуя двухцепочечную миРНК.

11. Комплекс по любому из пп.1-10, где олигонуклеотид включает по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

12. Комплекс по любому из пп.1-11, где олигонуклеотид включает одну или больше модифицированных нуклеозидов, где один или больше модифицированных нуклеозидов необязательно являются 2'-модифицированными нуклеозидами.

13. Комплекс по любому из пп.1-12, где антители и олигонуклеотид ковалентно связаны через линкер, где линкер необязательно является расщепляемым линкером, где линкер, также необязательно, включает последовательность валин-цитруллин.

14. Способ снижения экспрессии DUX4 в мышечной клетке, включающий контакт мышечной клетки с эффективным количеством комплекса по любому из пп.1-13 для стимуляции интернализации олигонуклеотида в мышечную клетку.

15. Способ по п.14, где клетка находится *in vitro*.

16. Способ по п.14, где клетка находится у субъекта, где субъектом необязательно является человек.

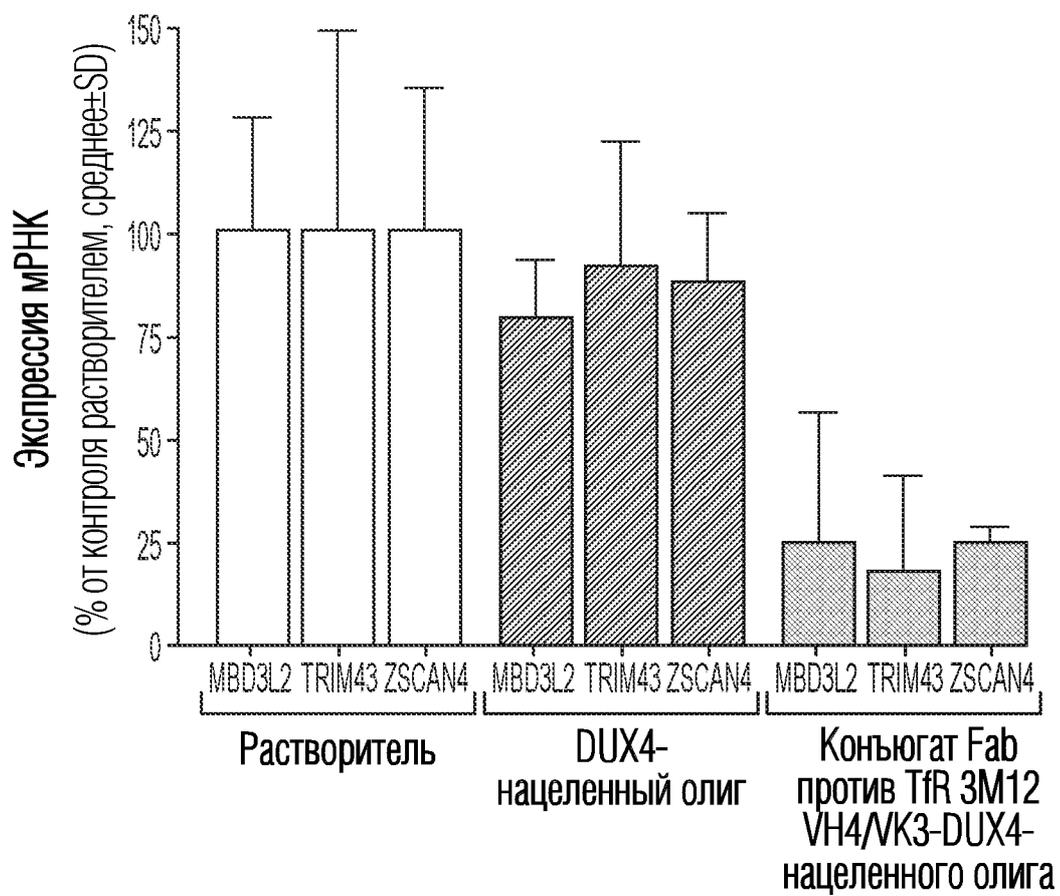
17. Способ лечения плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (ПЛЛМД), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества комплекса по любому из пп.1-13, где субъект имеет нарушенную продукцию белка DUX4, где субъектом необязательно является человек.

18. Способ по любому из пп.16-17, где субъект-человек имеет одну или больше делеций повтора D4Z4 в хромосоме 4.

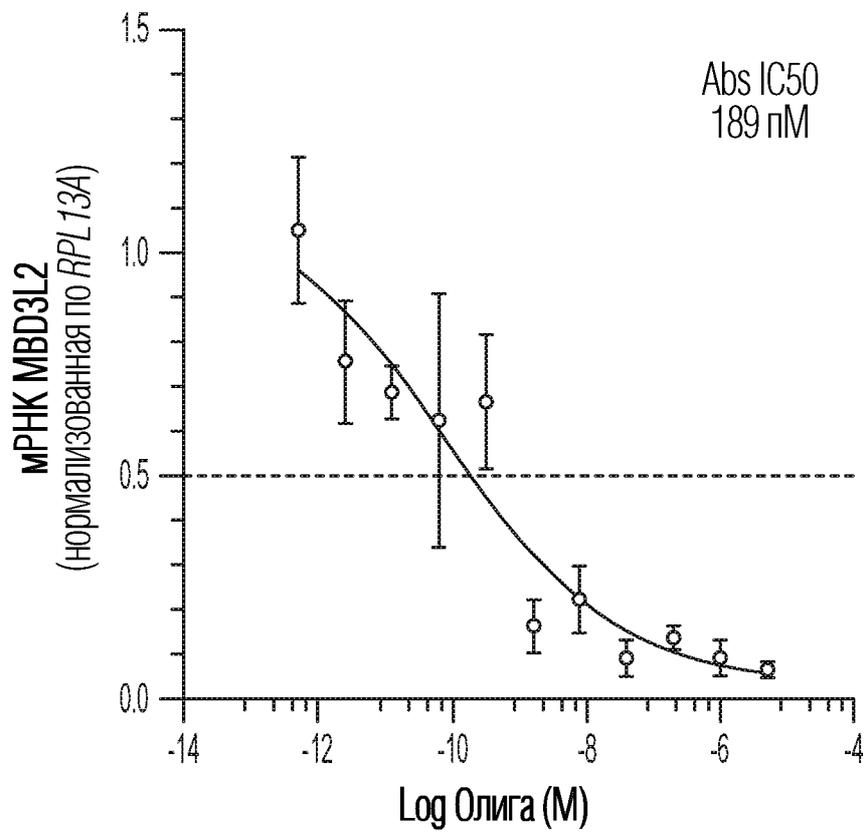
19. Способ по п.18, где субъект имеет 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 повтор D4Z4 или не имеет повторов D4Z4.

20. Олигонуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 169-176 или 289-364.

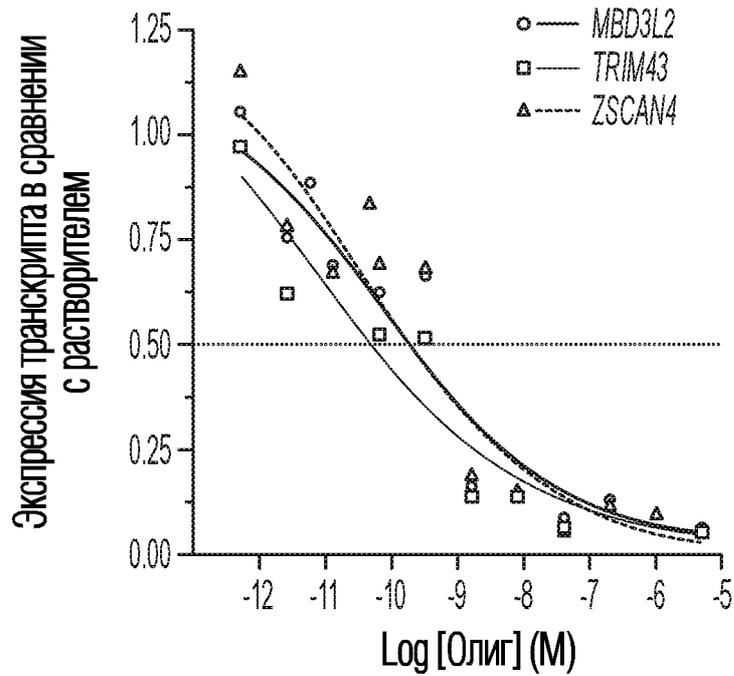
По доверенности



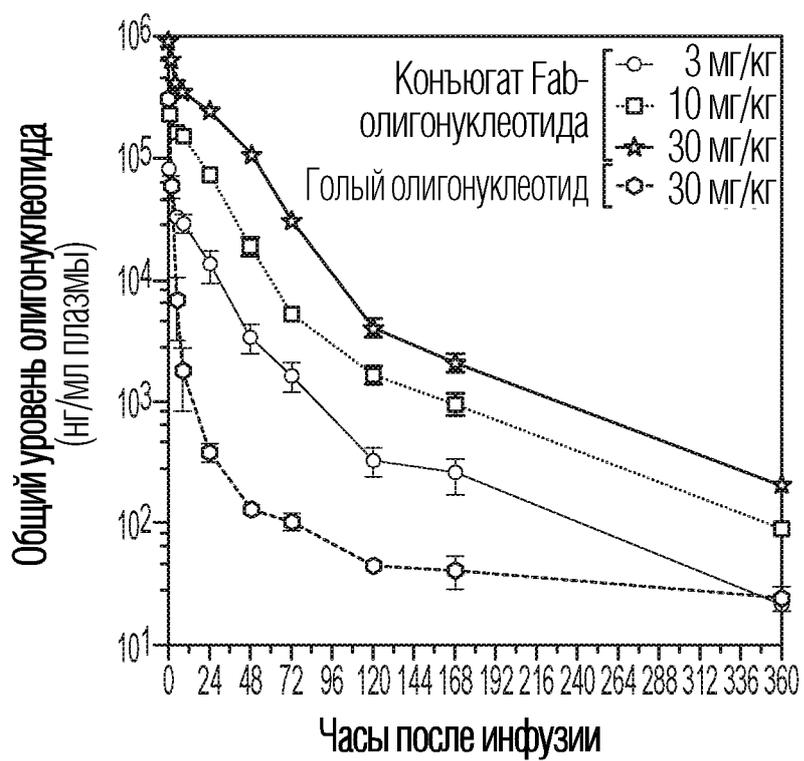
ФИГ. 1



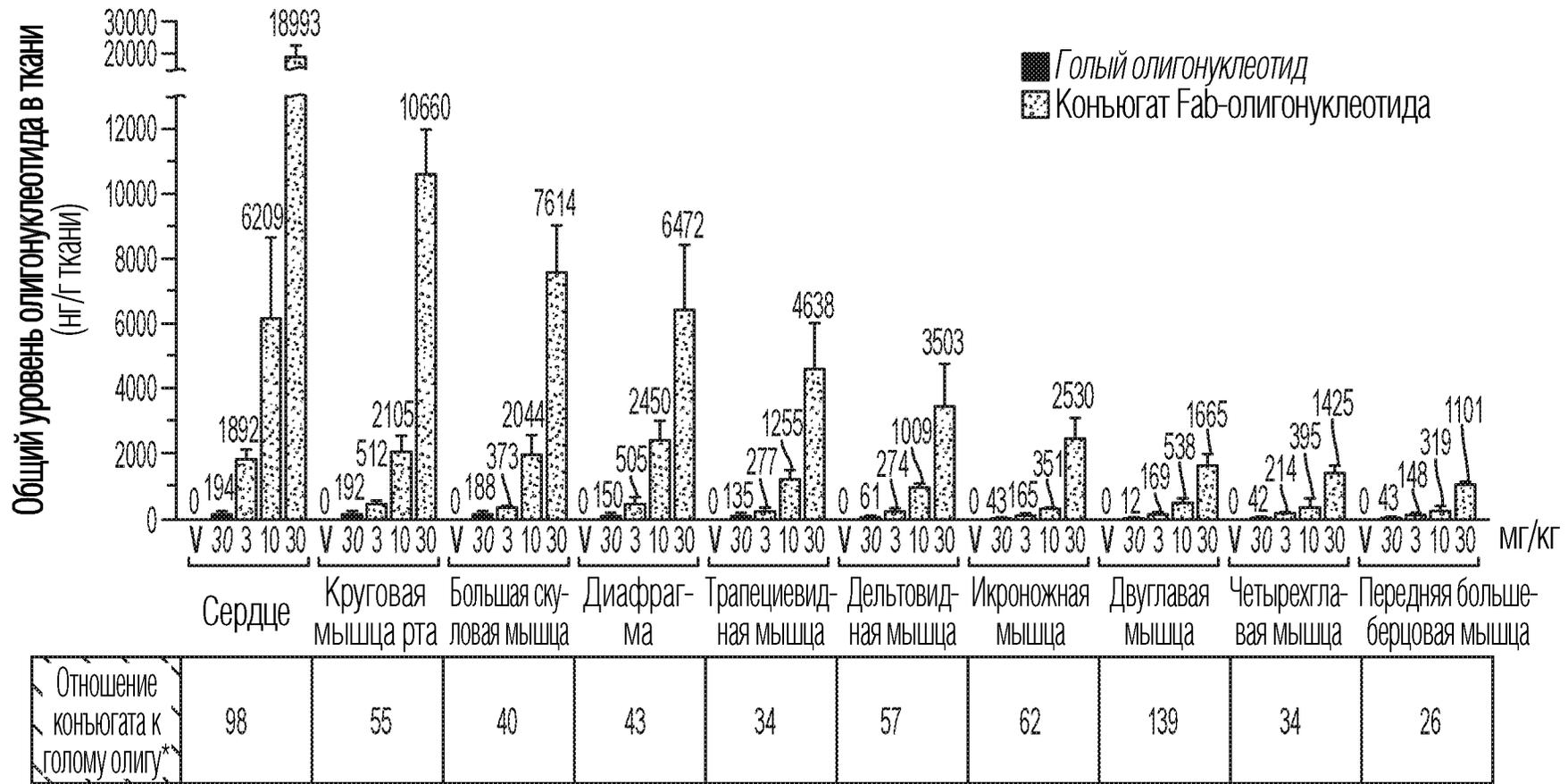
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



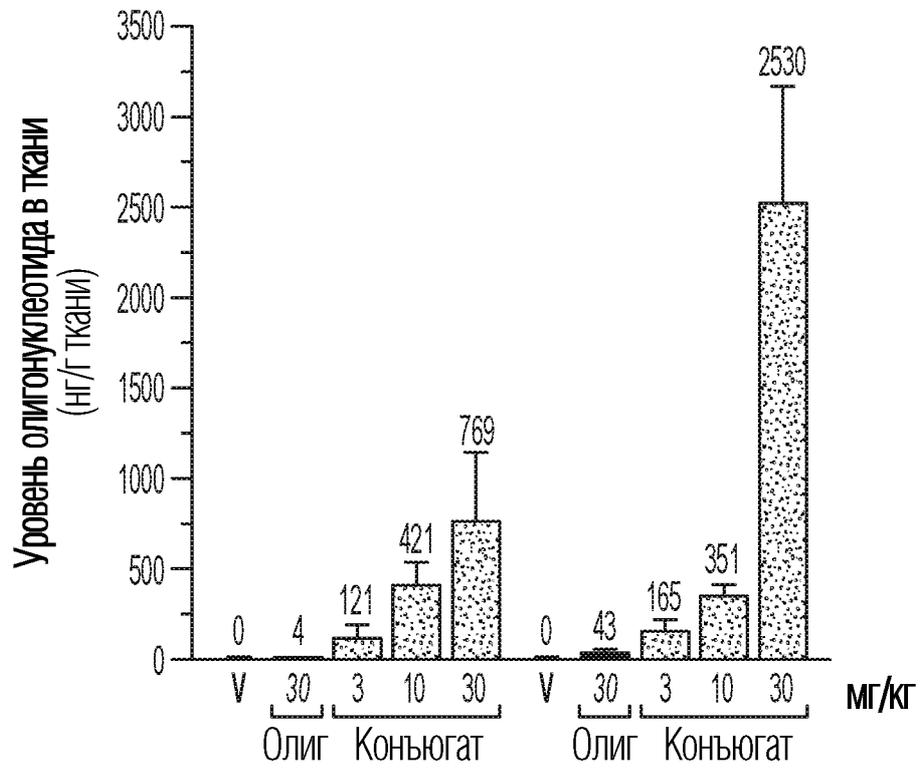
ФИГ. 3



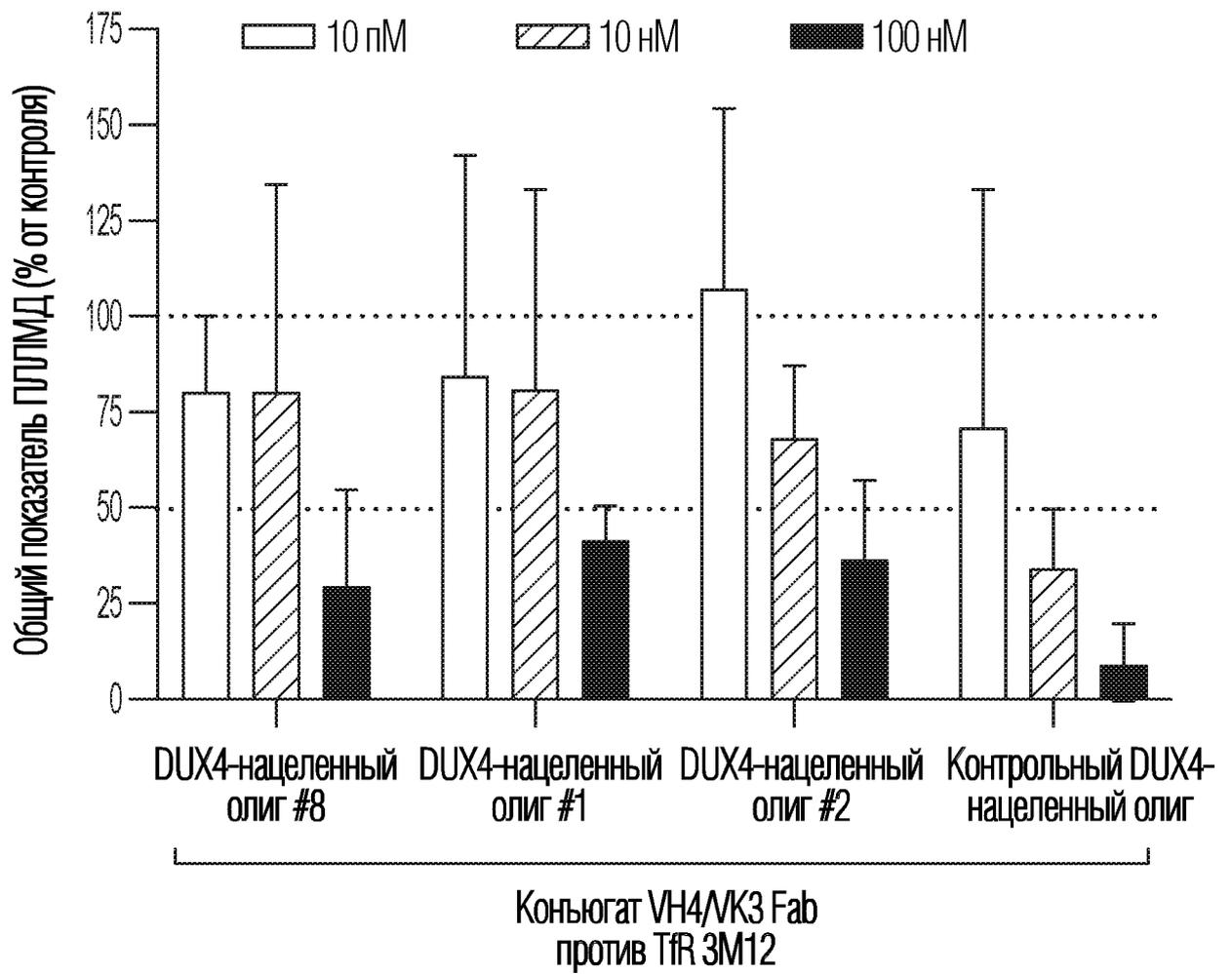
* Сравнение с 30 мг/кг олига
 V - Растворитель

Мышцы лица, поражаемые при ПЛЛМД

ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6