

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190415** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2021.06.21(22) Дата подачи заявки
2019.08.02(51) Int. Cl. *A61K 31/712* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/86 (2006.01)(54) **МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИОТОНИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИИ**(31) **62/713,914; 62/779,161; 62/855,761;
62/858,888; 62/859,672**(32) **2018.08.02; 2018.12.13; 2019.05.31;
2019.06.07; 2019.06.10**(33) **US**(86) **PCT/US2019/044987**(87) **WO 2020/028861 2020.02.06**

(71) Заявитель:

ДАЙН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

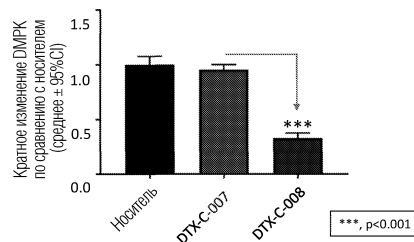
(72) Изобретатель:

**Субраманиян Ромеш Р., Катанани
Мохаммед Т., Уиден Тимоти,
Дежарден Коди А. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Аспекты настоящего изобретения относятся к комплексам, содержащим мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности на мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка ингибирует активность и экспрессию аллеля DMPK, содержащего ассоциированный с заболеванием повтор. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, таким как антисмысловой олигонуклеотид или олигонуклеотид РНКи.

**A1****202190415****202190415****A1**

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567162EA/55

МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИОТОНИЧЕСКОЙ ДИСТРОФИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по дате подачи предварительной заявки США № 62/713914, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY", поданной 2 августа 2018 года; предварительной заявки США № 62/779161, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY", поданной 13 декабря 2018 года; предварительной заявки США № 62/855761, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY", поданной 31 мая 2019 года; предварительной заявки США № 62/858888, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY", поданной 7 июня 2019 года; и предварительной заявки США № 62/859672, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING MYOTONIC DYSTROPHY", поданной 10 июня 2019 года; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Настоящая заявка подана вместе со списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей предоставлен в виде файла, названного D082470000WO00-SEQ.txt, созданного 25 июля 2019 года и имеющего размер 155 килобайт. Информация в электронном формате списка последовательностей включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Миотоническая дистрофия (DM) является доминантно наследуемым генетическим заболеванием, отличающимся миотонией, утратой или дегенерацией мышечной ткани, снижением мышечной функции, резистентностью к инсулину, аритмия сердца, гладкомышечной дисфункцией и неврологическими отклонениями. DM является наиболее распространенной формой мышечной дистрофии с поздним дебютом с частотой по всему миру приблизительно 1 на 8000 населения. Описано два типа заболевания, миотоническая дистрофия типа 1 (DM1) и миотоническая дистрофия типа 2 (DM2). DM1, более распространенная форма заболевания, является результатом экспансии тринуклеотидных повторов CTG в 3'-некодирующей области DMPK на хромосоме 19; DM2 является результатом экспансии тетрануклеотидных повторов CCTG в первом

интроне ZNF9 на хромосоме 3. У пациентов с DM1 экспансия тринуклеотидных повторов CTG, которые могут содержать всего более приблизительно 50-3000 повторов, что приводит к образованию токсических повторов РНК, способных образовывать шпильчатые структуры, связывающиеся с важными внутриклеточными белками, например, Muscleblind-подобных белков, с высокой аффинностью, что приводит к секвестрации белка и фенотипами с потерей функции, что характерно для заболевания. Помимо поддерживающего лечения и симптоматического лечения, в настоящее время нет доступного эффективного терапевтического средства для DM1.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к комплексам, нацеленным на мышечные клетки, для доставки молекулярной нагрузки в эти клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, ингибирующей экспрессию или активность аллеля DMPK, содержащего подвергнутый экспансии, ассоциированный с заболеванием повтор, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего миотоническую дистрофию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, содержат мышечно-специфические средства (например, мышечно-специфические антитела), специфически связывающиеся с рецепторами на поверхности мышечных клеток, для доставки молекулярной нагрузки в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления комплексы захватываются клетками с помощью опосредованной рецептором интернализации, после которой молекулярная нагрузка может высвободиться для выполнения функции внутри клеток. Например, комплексы, сконструированные для доставки олигонуклеотидов, могут высвободить олигонуклеотиды таким образом, что олигонуклеотиды могут ингибировать экспрессию мутантного DMPK в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды высвобождаются посредством эндосомального расщепления ковалентных линкеров, соединяющих олигонуклеотиды и мышечно-специфические средства в комплексах.

[0006] Аспекты настоящего изобретения относятся к комплексам, содержащим мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для ингибирования экспрессии или активности аллеля DMPK, содержащего ассоциированным с заболеванием повтор. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности на мышечных клетках.

В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является мышечно-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело специфически связывается с внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный эпитоп рецептора трансферрина содержит эпитоп апикального домена рецептора трансферрина.

[0007] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело специфически связывается с эпитопом последовательности в диапазоне от C89 до F760 SEQ ID NO: 1-3. В некоторых вариантах осуществления равновесная константа диссоциации (K_d) связывания мышечно-специфического антитела с рецептором трансферрина находится в диапазоне от 10^{-11} М до 10^{-6} М. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело конкурирует за специфическое связывание с эпитопом рецептора трансферрина с антителом, приведенным в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело конкурирует за специфическое связывание с эпитопом рецептора трансферрина с K_d 10^{-6} М или менее. В некоторых вариантах осуществления K_d находится в диапазоне от 10^{-11} М до 10^{-6} М.

[0008] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело не связывается специфически с трансферрин-связывающим участком рецептора трансферрина, и/или где мышечно-специфическое антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело перекрестно реагирует с внеклеточными эпитопами двух или более из рецепторов трансферрина человека, не являющегося человеком примата и грызуна.

[0009] В некоторых вариантах осуществления комплекс предназначен для способствования опосредованной рецептором трансферрина интернализации молекулярной нагрузки в мышечную клетку. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является химерным антителом, где, необязательно, химерное антитело является гуманизированным моноклональным антителом.

[00010] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело находится в форме ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента или Fv-фрагмента. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка представляет собой олигонуклеотид.

[00011] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 45-280. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 45-280. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 56, 59, 69, 71, 77, 79, 85, 87, 92, 93, 98, 100, 109, 112, 115, 119, 145 или 161.

[00012] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности любой из SEQ ID NO: 281-516. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам любой из SEQ ID NO: 281-516. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности аллелю DMPK, содержащему экспансию ассоциированного с заболеванием повтора.

[00013] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нугрузка является полипептидом. В некоторых вариантах осуществления полипептид является Muscleblind-подобным (MBNL) полипептидом.

[00014] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, гибридизующуюся в клетке с транскриптом мРНК DMPK дикого типа, кодируемым аллелем, где транскрипт мРНК DMPK содержит повторяющиеся единицы тринуклеотидной последовательности CUG. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, гибридизующуюся в клетке с транскриптом мРНК мутантного DMPK, кодируемым аллелем, где транскрипт мРНК DMPK содержит повторяющиеся единицы тринуклеотидной последовательности CUG. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор имеет длину от 38 до 200 повторяющихся единиц. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор ассоциирован с миотонической дистрофией с поздним началом. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор имеет длину от 100 до 10000 повторяющихся единиц. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор ассоциирован с конгенитальной мышечной дистрофией.

[00015] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь является фосфотиатной связью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиатные связи в стереохимической конформации Rp и/или стереохимической конформации Sp. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиатные связи, все из которых находятся в стереохимической конформации Rp или все из которых находятся в стереохимической конформации Sp.

[00016] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более модифицированных нуклеотидов являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

[00017] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является гэдмерным олигонуклеотидом, направляющим РНКазы Н-опосредованное расщепление транскрипта мРНК DMPK в клетке. В некоторых вариантах осуществления гэдмерный олигонуклеотид содержит центральную часть из 5-15 дезоксирибонуклеотидов, фланкированных фрагментами по 2-8 модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды фрагментов являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

[00018] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является миксмерным олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления миксмерный олигонуклеотид ингибирует связывание Muscleblind-подобного белка 1, Muscleblind-подобного белка 2 или Muscleblind-подобного белка 3 с транскриптом мРНК DMPK. В

некоторых вариантах осуществления миксерный олигонуклеотид содержит два или более разных 2'-модифицированных нуклеотида.

[00019] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом РНКи, способствующим РНКи-опосредованному расщеплению транскрипта мРНК DMPK, кодируемого геном мышечного заболевания. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид РНКи является двухцепочечным олигонуклеотидом длиной от 19 до 25 нуклеотидов.

[00020] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид РНКи содержит по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждый 2'-модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-О-метил-, 2'-фтор- (2'-F), 2'-О-метоксиэтил- нуклеотидов (2'-МОЕ) и 2',4'-мостиковых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более модифицированных нуклеотидов являются мостиковыми нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид является 2',4'-мостиковым нуклеотидом, выбранным из: 2',4'-затрудненного 2'-О-этила (сEt) и нуклеотидов замкнутой нуклеиновой кислоты (ЗНК).

[00021] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит гидовую последовательность для нуклеазы редактирования генома.

[00022] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является фосфородиамидит-морфолино-олигомером.

[00023] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер выбран из: протеаза-чувствительного линкера, рН-чувствительного линкера и глутатион-чувствительного линкера. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер является протеаза-чувствительным линкером. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер содержит последовательность, расщепляемую лизосомальной протеазой и/или эндосомальной протеазой. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления линкер является рН-чувствительным линкером, расщепляемым при рН в диапазоне от 4 до 6.

[00024] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер является алкановым линкером. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело содержит неприродную аминокислоту, с которой ковалентно связан олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело ковалентно связано с олигонуклеотидом посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела.

[00025] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело конъюгировано с цистеином через малеимид-содержащий линкер, необязательно, где малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроил- или малеимидометилциклогексан-1-карбоксилатную группу.

[00026] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является гликозилированным антителом, содержащим по меньшей мере один остаток сахара, с которым ковалентно связан олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления остаток сахара является разветвленной маннозой. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является гликозилированным антителом, содержащим от одного до четырех остатков сахара, каждый из которых ковалентно связан с отдельным олигонуклеотидом.

[00027] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является полностью гликозилированным антителом. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является частично гликозилированным антителом. В некоторых вариантах осуществления частично гликозилированное антитело получают химическими или ферментативными способами. В некоторых вариантах осуществления частично гликозилированное антитело продуцируют в клетке, являющейся дефектной по ферменту пути N- или O- гликозилирования.

[00028] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам доставки молекулярной нагрузки в клетку, экспрессирующую рецептор трансферрина. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение клетки в контакт с комплексом, представленным в настоящем описании.

[00039] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам ингибирования активности DMPK в клетке. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение клетки в контакт с комплексом, представленным в настоящем описании, в количестве, эффективном для способствования интернализации молекулярной нагрузки в клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка находится *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетка находится в организме индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

[00030] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума, имеющего экспансию ассоциированного с заболеванием повтора аллеля DMPK, ассоциированного с миотонической дистрофией. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение индивидууму эффективного количества комплекса, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор содержит повторяющиеся единицы тринуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления тринуклеотидная последовательность является тринуклеотидной последовательностью CTG. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор имеет длину от 38 до 200 повторяющихся единиц. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор ассоциирован с миотонической дистрофией с

поздним началом. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор имеет длину от 100 до 10000 повторяющихся единиц. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор ассоциирован с конгенитальной миотонической дистрофией.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00031] На фиг. 1 представлена неограничивающая схема, на которой показан эффект трансфекции клеток Нера 1-6 с использованием антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на DMPK (DTX-P-060), в отношении уровней экспрессии DMPK относительно трансфекции с использованием носителя;

[00032] На фиг. 2A представлена неограничивающая схема, на которой показана кривая НЛ-ВЭЖХ, полученная во время очистки мышечно-специфического комплекса, содержащего антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с антисмысловым олигонуклеотидом DMPK.

[00033] На фиг. 2B представлено неограничивающее изображение анализа ПААГ с SDS мышечно-специфического комплекса.

[00034] На фиг. 3 представлена неограничивающая схема, на которой показана способность мышечно-специфического комплекса (DTX-C-008), содержащего DTX-P-060, снижать уровни экспрессии DMPK.

[00035] На фиг. 4A-4E представлены неограничивающие схемы, на которых показана способность мышечно-специфического комплекса (DTX-C-008), содержащего DTX-P-060, снижать уровни экспрессии DMPK в мышечных тканях мыши *in vivo* относительно эксперимента с носителем (N=3 мышей C57Bl/6 WT).

[00036] На фиг. 5A-5B представлены неограничивающие схемы, на которых показана тканевая селективность мышечно-специфического комплекса (DTX-C-008), содержащего DTX-P-060. Мышечно-специфический комплекс (DTX-C-008), содержащий DTX-P-060, не снижает уровни экспрессии DMPK в тканях головного мозга или селезенки мыши *in vivo* относительно эксперимента с носителем (N=3 мышей C57Bl/6 WT).

[00037] На фиг. 6A-6F представлены неограничивающие схемы, на которых показана способность мышечно-специфического комплекса (DTX-C-008), содержащего DTX-P-060, снижать уровни экспрессии DMPK в мышечных тканях мыши *in vivo* относительно эксперимента с носителем (N=5 мышей C57Bl/6 WT).

[00038] На фиг. 7A-7L представлены неограничивающие схемы, на которых показана способность мышечно-специфического комплекса (DTX-C-012), содержащего DTX-P-060, снижать уровни экспрессии DMPK в мышечных тканях яванского макака *in vivo* относительно эксперимента с носителем и по сравнению с "голым" DMPK ASO (DTX-P-060) (N=3 самцов яванского макака).

[00039] На фиг. 8A-8B представлены неограничивающие схемы, на которых показана способность мышечно-специфического комплекса (DTX-C-012), содержащего DTX-P-060, снижать уровни экспрессии DMPK в гладкомышечных тканях яванского

макака *in vivo* относительно эксперимента с носителем и по сравнению с "голым" DMPK ASO (DTX-P-060) (N=3 самцов яванского макака).

[00040] На фиг. 9A-9D представлены неограничивающие схемы, на которых показана тканевая селективность мышечно-специфического комплекса (DTX-C-012), содержащего DTX-P-060. Мышечно-специфический комплекс, содержащий DMPK-ASO, не снижает уровни экспрессии DMPK в тканях печени, почек, головного мозга или селезенки яванского макака *in vivo* относительно эксперимента с носителем (N=3 самцов яванского макака).

[00041] На фиг. 10 показаны нормализованные уровни тканевой экспрессии мРНК DMPK в нескольких типах тканей яванского макака (N=3 самцов яванского макака).

[00042] На фиг. 11A-11B представлены неограничивающие схемы, на которых показана способность мышечно-специфического комплекса (DTX-C-008), содержащего DTX-P-060, снижать уровни экспрессии DMPK в мышечных тканях мышцы *in vivo* в течение до 28 дней после введения DTX-C-008 относительно эксперимента с носителем и по сравнению с "голым" DMPK ASO (DTX-P-060).

[00043] На фиг. 12 показано, что однократная доза мышечно-специфического комплекса (DTX-C-012), содержащего DTX-P-060, является безопасной и переносимой яванскими макаками *in vivo* (N=3 самцов яванского макака).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00044] Аспекты настоящего изобретения относятся к пониманию того, что, хотя некоторые молекулярные нагрузки (например, олигонуклеотиды, пептиды, низкомолекулярные соединения) могут иметь благоприятные эффекты в мышечных клетках, эффективный таргетинг таких клеток оказался затруднительным. Как представлено в настоящем описании, настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим мышечно-специфические средства, ковалентно связанные с молекулярной нагрузкой, для преодоления таких затруднений. В некоторых вариантах осуществления комплексы особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, ингибирующей экспрессию или активность генов-мишеней в мышечных клетках, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего редкое мышечное заболевание. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к комплексам для таргетинга аллеля DMPK, содержащегося подвергнутый экспансии, ассоциированный с заболеванием повтор, для лечения индивидуумов, имеющих DM1. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, могут содержать олигонуклеотиды, ингибирующие экспрессию аллеля DMPK, содержащего подвергнутый экспансии, ассоциированный с заболеванием повтор. В качестве другого примера, комплексы могут содержать олигонуклеотиды, препятствующие связыванию ассоциированной с заболеванием мРНК DMPK с Muscleblind-подобным белком (например, MBNL1, 2 и/или 3), таким образом, снижая токсический эффект ассоциированного с заболеванием аллеля DMPK. В некоторых вариантах осуществления можно использовать нагрузку-синтетическую нуклеиновую

(например, нагрузку ДНК или РНК), экспрессирующую один или более белков, снижающих токсический эффект ассоциированного с заболеванием аллеля DMPK. В некоторых вариантах осуществления комплексы могут содержать молекулярную нагрузку синтетической кДНК и/или синтетической мРНК, например, экспрессирующей один или более Muscleblind-подобных белков (например, MBNL1, 2 и/или 3) их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления комплексы могут содержать молекулярную нагрузку, такую как гидовые молекулы (например, гидовая РНК), способную к таргетингу программируемых нуклеиновыми кислотами нуклеаз (например, Cas9) к последовательности в ассоциированном с заболеванием повторе DMPK или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления такие программируемые нуклеиновыми кислотами нуклеазы можно использовать для расщепления части или всей последовательности ассоциированного с заболеванием повтора из гена DMPK.

[00045] Дополнительные аспекты изобретения, включая описание определенных терминов, приведены ниже.

I. Определения

[00046] **Введение:** В рамках изобретения термин "введение" означает предоставление комплекса индивидууму таким образом, что это можно использовать физиологически и/или фармакологически (например, для лечения состояния у индивидуума).

[00047] **Приблизительно:** В рамках изобретения термин "приблизительно" в отношении одного или более интересующих значений относится к значению, схожему с указанным референсным значением. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, попадающих в 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любом направлении (более чем или менее чем) от указанного референсного значения, если не указано иначе или иное не очевидно из контекста (за исключением того случая, когда такое количество будет превышать 100% возможного значения).

[00048] **Антитело:** В рамках изобретения термин "антитело" относится к полипептиду, включающему по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина или по меньшей мере одну антигенную детерминанту, например, паратоп, специфически связывающийся с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело является полноразмерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным антителом. Однако в некоторых вариантах осуществления антитело является Fab-фрагментом, F(ab')₂-фрагментом, Fv-фрагментом или scFv-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело является нанотелом, полученным из антитела Верблюдовых, или нанотелом, полученным из антитела акулы. В некоторых вариантах осуществления антитело является диателом. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит каркас, имеющий последовательность зародышевой линии человека. В другом варианте осуществления

антитело содержит константный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из константных доменов IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM и IgE. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи (H) (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как VH), и/или переменную область легкой цепи (L) (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как VL). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен, например, Fc-область. Термин "константный домен иммуноглобулина" относится к константному домену тяжелой или легкой цепи. Известны аминокислотные последовательности константного домена тяжелой цепи и легкой цепи IgG человека и их функциональные варианты. Что касается тяжелой цепи, в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, представленная в настоящем описании, может являться тяжелой цепью альфа (α), дельта (Δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела, представленная в настоящем описании, может включать тяжелую цепь альфа (α), дельта (Δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) или мю (μ) человека. В конкретном варианте осуществления антитело, представленное в настоящем описании, содержит домен CH1, CH2 и/или CH3 гамма 1 человека. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность домена VH содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи гамма (γ) человека, такую как любая известная в этой области. Неограничивающие примеры последовательностей константной области человека описаны в этой области, например, см. патент США № 5693780 и Kabat E A et al., (1991) выше. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или по меньшей мере 99% идентичной любой из константных областей переменной цепи, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело является модифицированным, например, модифицированным посредством гликозилирования, фосфорилирования, сумоилирования и/или метилирования. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным антителом, конъюгированным с одной или более молекулами сахара или углевода. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахара или углевода конъюгированы с антителом посредством N-гликозилирования, O-гликозилирования, C-гликозилирования, глипирования (присоединения GPI-якоря) и/или фосфогликозилирования. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахара или углевода представляют собой моносахариды, дисахариды, олигосахариды или гликаны. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахара или углевода представляет собой разветвленный олигосахарид или разветвленный гликан. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахара или углевода включает маннозное звено, глюкозное звено, звено N-ацетилглюкозамина, звено N-ацетилгалактозамина, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления антитело является конструкцией, содержащей полипептид, содержащий один или более

антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, соединенных с линкерным полипептидом или константным доменом иммуноглобулина. Линкерные полипептиды содержат два или более аминокислотных остатка, соединенных пептидными связями, и их используют для соединения одной или более антигенсвязывающих частей. Описаны примеры линкерных полипептидов (см., например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Кроме того, антитело может являться частью более крупной молекулы иммуноадгезии, образованной посредством ковалентного или нековалентного связи антитела или части антитела с одним или более другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human antibodies and Hybridomas 6:93-101) и использование остатка цистеина, пептида-маркера и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058).

[00049] **CDR:** В рамках изобретения термин "CDR" относится к определяющей комплементарности области в варибельных последовательностях антитела. Существует три CDR в каждой из варибельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, обозначаемые как CDR1, CDR2 и CDR3, для каждой из варибельных областей. В рамках изобретения термин "набор CDR" относится к группе из трех CDR, встречающихся в одной варибельной области, способной связывать антиген. Точные границы этих CDR определяют по-разному в разных системах. Система, описанная Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) и (1991)), не только представляет собой систему однозначной нумерации остатков, которую можно использовать в отношении любой варибельной области антитела, но также позволяет определять точные границы остатков и, таким образом, три CDR. Эти CDR можно обозначать как CDR Kabat. Подчасти CDR можно обозначать как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" означают области легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти области можно обозначать как CDR Chothia, имеющие границы, перекрывающиеся с CDR Kabat. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR Kabat, описаны Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) и MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Другие определения границ CDR могут не следовать строго одной из указанных выше систем, но все равно будут перекрываться с CDR Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете прогнозирования или экспериментальных данных о том, что конкретные остатки, или группы остатков, или даже целые CDR не влияют значительно на связывание антигена. В способах, используемых в настоящем описании, можно использовать CDR, определенные по любой из этих систем, хотя в предпочтительных вариантах осуществления используют CDR, определенные по Kabat или Chothia.

[00050] **Антитело с пересаженным CDR:** Термин "антитело с пересаженным CDR" относится к антителам, содержащим последовательности варибельной области

тяжелой и легкой цепей одного биологического вида, но в которых последовательности одной или более из областей CDR VH и/или VL заменяют последовательностями CDR другого биологического вида, таким как антитела, имеющие переменные области тяжелой и легкой цепей мыши, в которых одну или более CDR мыши (например, CDR3) заменяют последовательностями CDR человека.

[00051] **Химерное антитело:** Термин "химерное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности переменной области тяжелой и легкой цепей одного биологического вида и последовательности константной области другого биологического вида, таким как антитела, имеющие переменные области тяжелой и легкой цепи мыши, соединенные с константными областями человека.

[00052] **Комплементарный:** В рамках изобретения термин "комплементарный" относится к возможности точного спаривания между двумя нуклеотидами или двумя наборами нуклеотидов. В частности, "комплементарный" представляет собой термин, характеризующий степень спаривания водородных связей, приводящую к связыванию между двумя нуклеотидами или двумя наборами нуклеотидов. Например, если основание в одном положении олигонуклеотида может связываться посредством водородных связей с основанием в соответствующем положении нуклеиновой кислоты-мишени (например, мРНК), основания считают комплементарными друг другу в этом положении. Спаривание оснований может включать каноническое уотсон-криковское спаривание и не-уотсон-криковское спаривание (например, неоднозначное спаривание оснований и хугстиновское спаривание оснований). Например, в некоторых вариантах осуществления в случае комплементарного спаривания оснований основания типа аденозина (А) являются комплементарными основаниям типа тимидина (Т) или основаниям типа урацила (U), основания типа цитозина (С) являются комплементарными основаниям типа гуанозина (G), и универсальные основания, такие как 3-нитропиррол или 5-нитроиндол, могут гибридизоваться, и их считают комплементарными любому из А, С, U или Т. В этой области инозин (I) также считают универсальным основанием, и его считают комплементарным любому из А, С, U или Т.

[00053] **Консервативная аминокислотная замена:** В рамках изобретения термин "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислоты, не изменяющей относительные характеристики заряда или размера белка, в котором сделана замена аминокислоты. Варианты можно получать способами изменения полипептидной последовательности, известными специалисту в этой области, такими как обнаруживаемые в источниках, в которых скомпилированы такие способы, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012, или *Current Protocols in Molecular biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают замены, сделанные среди аминокислот в следующих группах: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; и (g) E, D.

[00054] **Ковалентно связанный:** В рамках изобретения термин "ковалентно связанный" относится к характеристике двух или более молекулы, соединенных с помощью по меньшей мере одной ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления две молекулы могут являться ковалентно связанными посредством одинарной связи, например, дисульфидной связи или дисульфидного мостика, служащей в качестве линкера между молекулами. Однако в некоторых вариантах осуществления две или более молекулы могут являться ковалентно связанными с помощью молекулы, служащей в качестве линкера, соединяющего две или более молекул через множество ковалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер может являться расщепляемым линкером. Однако в некоторых вариантах осуществления линкер может являться нерасщепляемым линкером.

[00055] **Перекрестно реактивный:** В рамках изобретения и в отношении направляющего средства (например, антитела) термин "перекрестно реактивный" относится к свойству средства быть способным специфически связываться с более чем одним антигеном схожего типа или класса (например, антигенами многочисленных гомологов, паралогов или ортологов) со схожей аффинностью или авидностью. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, перекрестно реактивное в отношении антигенов человека и не являющегося человеком примата схожего типа или класса (например, рецептор трансферрина человека и рецептор трансферрина не являющегося человеком примата), может связываться с антигеном человека и антигенами не являющегося человеком примата со схожей аффинностью или авидностью. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена человека и антигена грызуна схожего типа или класса. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена грызуна и антигена не являющегося человеком примата схожего типа или класса. В некоторых вариантах осуществления антитело является перекрестно реактивным в отношении антигена человека, антигена не являющегося человеком примата и антигена грызуна схожего типа или класса.

[00056] **Ассоциированный с заболеванием повтор:** В рамках изобретения термин "ассоциированный с заболеванием повтор" относится к повторяющейся нуклеотидной последовательности в участке генома, в случае которого количество единиц повторяющейся нуклеотидной последовательности коррелирует, и/или прямо или косвенно вносит вклад, или вызывает генетическое заболевание. Каждая повторяющаяся единица ассоциированного с заболеванием повтора может иметь длину 2, 3, 4, 5 или более нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор является динуклеотидным повтором. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор является тринуклеотидным повтором. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор является тетрануклеотидным повтором. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор является пентануклеотидным повтором. В

некоторых вариантах осуществления варианты осуществления ассоциированный с заболеванием повтор включает повторы CAG, повторы CTG, повторы CUG, повторы CGG, повторы CCTG или нуклеотид, комплементарный любым из них. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор находится в некодирующей части гена. Однако в некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор находится в кодирующей области гена. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии относительно нормального состояния до длины, прямо или косвенно вносящей вклад или вызывающей генетическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор находится в РНК (например, транскрипте РНК). В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор находится в ДНК (например, хромосоме, плазмиде). В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии в хромосоме клетки зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии в хромосоме соматической клетки. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии до количества повторяющихся единиц, ассоциированного с врожденным дебютом заболевания. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии до количества повторяющихся единиц, ассоциированного с дебютом заболевания в детском возрасте. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с заболеванием повтор подвергнут экспансии до количества повторяющихся единиц, ассоциированного с дебютом заболевания во взрослом возрасте.

[00057] **DMPK**: В рамках изобретения термин "DMPK" относится к гену, кодирующему миотонин-протеинкиназу (также известную как протеинкиназа миотонической дистрофии), серин/треониновую протеинкиназу. Субстраты этого фермента могут включать миогенин, бета-субъединицу кальциевых каналов L-типа и фосфолепман. В некоторых вариантах осуществления DMPK может являться DMPK человека (Gene ID: 1760), не являющегося человеком примата (например, Gene ID: 456139, Gene ID: 715328) или грызуна (например, Gene ID: 13400). У людей экспансия повторов CTG в 3'-некодирующей, нетранслируемой области DMPK ассоциирована с миотонической дистрофией типа I (DM1). Кроме того, охарактеризовано множество вариантов транскрипта человека (например, аннотированных под регистрационными номерами GenBank RefSeq: NM_001081563.2, NM_004409.4, NM_001081560.2, NM_001081562.2, NM_001288764.1, NM_001288765.1 и NM_001288766.1), кодирующих разные изоформы белка.

[00058] **Аллель DMPK**: В рамках изобретения термин "аллель DMPK" относится к любой из альтернативных форм (например, формам дикого типа или мутантным формам) гена DMPK. В некоторых вариантах осуществления аллель DMPK может кодировать миотонин-протеинкиназу дикого типа, сохраняющую свои нормальные и типичные

функции. В некоторых вариантах осуществления аллель DMPK может включать одну или более экспансий ассоциированных с заболеванием повторов. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы в норме имеют два аллеля DMPK, имеющих количество повторяющихся единиц в диапазоне от 5 до 37. В некоторых вариантах осуществления количество единиц повторов CTG у индивидуумов, имеющих DM1, находится в диапазоне от приблизительно 50 до приблизительно более 3000, при этом более высокое количество повторов приводит к повышению тяжести заболевания. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы со слабой DM1 имеют по меньшей мере один аллель DMPK, имеющий количество повторяющихся единиц в диапазоне от 50 до 150. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы с классической DM1 имеют по меньшей мере один аллель DMPK, имеющий количество повторяющихся единиц в диапазоне от 100 до 1000 или более. В некоторых вариантах осуществления индивидуумы, имеющие DM1 с конгенитальным началом, могут иметь по меньшей мере один аллель DMPK, содержащий более 2000 повторяющихся единиц.

[00059] **Каркас:** В рамках изобретения термин "каркас" или "каркасная последовательность" относится к остальным последовательностям вариабельной области без CDR. Т.к. точное определение последовательности CDR можно осуществлять с помощью различных систем, значение термина "каркасная последовательность", соответственно, является предметом разной интерпретации. Шесть CDR (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 легкой цепи и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 тяжелой цепи) также разделяют каркасные области легкой цепи и тяжелой цепи на четыре подобласти (FR1, FR2, FR3 и FR4) на каждой цепи, где CDR1 расположена между FR1 и FR2, CDR2 - между FR2 и FR3, и CDR3 - между FR3 и FR4. Без определения конкретных подобластей как FR1, FR2, FR3 или FR4, каркасная область, как указано другими, представляет собой комбинированные FR в вариабельной области одной, природной цепи иммуноглобулина. В рамках изобретения FR представляет собой одну из четырех подобластей, и FR представляют собой две или более из четырех подобластей, составляющих каркасную область. В этой области известны акцепторные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи человека. В одном из вариантов осуществления акцепторные последовательности, известные в этой области, можно использовать в антителах, представленных в настоящем описании.

[00060] **Антитело человека:** В рамках изобретения термин "антитело человека" предназначен для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, неcodируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, встраиваемые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако, в рамках изобретения термин "антитело человека" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из

зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, пересаживают на каркасные последовательности человека.

[00061] **Гуманизованное антитело:** Термин "гуманизованное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи не являющихся человеком видов (например, мыши), но в которых по меньшей мере часть последовательности VH и/или VL изменена в направлении более "человекоподобной", т.е. более похожей на последовательности варибельной области зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизованного антитела является антитело с пересаженными CDR, в котором последовательности CDR человека встраивают в не принадлежащие человеку последовательности VH и VL для замены соответствующих не принадлежащих человеку последовательностей CDR. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к гуманизованным антителам против рецептора трансферрина и антигенсвязывающие части. Такие антитела можно получать посредством получения моноклональных антител мыши против рецептора трансферрина с использованием общепринятой гибридомной технологии с последующей гуманизацией с использованием генетической инженерии *in vitro*, например, как описано в публикации РСТ № WO 2005/123126 A2 Kasaian et al.

[00062] **Интернализующийся рецептор клеточной поверхности:** В рамках изобретения термин "интернализующийся рецептор клеточной поверхности" относится к рецептору клеточной поверхности, интернализуемому клетками, например, после 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. Однако, 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 содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен, и/или внеклеточный домен, который, необязательно, дополнительно может содержать лигандсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления рецептор клеточной поверхности интернализуется клеткой после связывания лиганда. В некоторых вариантах осуществления лиганд может являться мышечно-специфическим средством или мышечно-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления интернализующийся рецептор клеточной поверхности является рецептором трансферрина.

[00063] **Выделенное антитело:** В рамках изобретения термин "выделенное антитело" предназначен для обозначения антитела, по существу, не содержащего другие антитела, имеющие другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело,

специфически связывающееся с рецептором трансферрина, по существу, не содержит антитела, специфически связывающиеся с иными антигенами, чем рецептор трансферрина). Однако, выделенное антитело, специфически связывающееся с комплексом рецептора трансферрина, может иметь перекрестную реактивность в отношении других антигенов, таких как молекулы рецептора трансферрина, другого биологического вида. Кроме того, выделенное антитело может, по существу, не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

[00064] **Нумерация по Kabat:** Термины "нумерация по Kabat", "определения по Kabat" и "мечение по Kabat" в настоящем описании используют взаимозаменяемо. Эти термины, известные в этой области, относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, являющихся более вариабельными (т.е. гипервариабельными), чем другие аминокислотные остатки в вариабельных областях тяжелой и легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части (Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 и, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). В случае вариабельной области тяжелой цепи гипервариабельная область занимает положения аминокислот 31-35 в случае CDR1, положения аминокислот 50-65 в случае CDR2 и положения аминокислот 95-102 в случае CDR3. В случае вариабельной области легкой цепи гипервариабельная область занимает положения аминокислот 24-34 в случае CDR1, положения аминокислот 50-56 в случае CDR2 и положения аминокислот 89-97 в случае CDR3.

[00065] **Молекулярная нагрузка:** В рамках изобретения термин "молекулярная нагрузка" относится к молекуле, функционирующей, модулируя биологический исход. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка связана или иначе ассоциирована с мышечно-специфическим средством. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является низкомолекулярным соединением, белком, пептидом, нуклеиновой кислотой или олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка функционирует, модулируя транскрипцию последовательности ДНК, модулируя экспрессию белка или модулируя активность белка. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим цепь, имеющую область комплементарности гену-мишени.

[00066] **Мышечно-специфическое средство:** В рамках изобретения термин "мышечно-специфическое средство" относится к молекуле, специфически связывающейся с антигеном, экспрессирующимся на мышечных клетках. Антиген в мышечных клетках или на них может являться мембранным белком, например, интегральным мембранным белком или периферическим мембранным белком. Как правило, мышечно-специфическое средство специфически связывается с антигеном на мышечных клетках, облегчающим интернализацию мышечно-специфического средства (и любой ассоциированной молекулярной нагрузкой) в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления

мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности на мышцах и может интернализироваться в мышечные клетки через рецептор-опосредованную интернализацию. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является низкомолекулярным соединением, белком, пептидом, нуклеиновой кислотой (например, аптамером) или антителом. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство связано с молекулярной нагрузкой.

[00067] **Мышечно-специфическое антитело:** В рамках изобретения термин "мышечно-специфическое антитело" относится к мышечно-специфическому средству, являющемуся антителом, специфически связывающимся с антигеном, обнаруживаемым в мышечных клетках или на них. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело специфически связывается с антигеном на мышечных клетках, облегчающим интернализацию мышечно-специфического антитела (и любой ассоциированной молекулярной нагрузки) в мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело специфически связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности, присутствующим на мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с рецептором трансферрина.

[00068] **Миотоническая дистрофия (DM):** В рамках изобретения термин "миотоническая дистрофия (DM)" относится к генетическому заболеванию, вызванному мутациями в гене DMPK или гене CNBP (ZNF9), отличающемуся потерей мышечной ткани, ослаблению мышц и снижению мышечной функции. Описано два типа заболевания, миотоническая дистрофия типа 1 (DM1) и миотоническая дистрофия типа 2 (DM2). DM1 ассоциирована с экспансией тринуклеотидного повтора CTG в 3'-некодирующей области DMPK. DM2 ассоциирована с экспансией тетра nukлеотидного повтора CCTG в первом интроне ZNF9. И при DM1, и при DM2 нуклеотидная экспансия приводит к образованию токсических повторов РНК, способных образовывать шпилечные структуры, связывающиеся с критическими внутриклеточными белками, например, Muscleblind-подобными белками, с высокой аффинностью. В этой области описана миотоническая дистрофия, генетическая основа заболевания и связанные с ним симптомы (см., например, Thornton, C.A., "Myotonic Dystrophy", *Neurol Clin.* (2014), 32(3): 705-719.; и Konieczny et al. "Myotonic dystrophy: candidate small molecule therapeutics", *Drug Discovery Today* (2017), 22:11) В некоторых вариантах осуществления индивидуумы рождаются с вариантом DM1, названным конгенитальной миотонической дистрофией. Симптомы конгенитальной миотонической дистрофии возникают с рождения and включают слабость всех мышц, респираторные проблемы, косолапие, задержку развития и умственную отсталость. DM1 приведена в базе данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) под регистрационным номером 160900. DM2 приведена в базе данных OMIM Entry под регистрационным номером 602668.

[00069] **Олигонуклеотид:** В рамках изобретения термин "олигонуклеотид" относится к олигомерному соединению нуклеиновой кислотой длиной до 200 нуклеотидов. Неограничивающие примеры олигонуклеотидов включают олигонуклеотиды РНКи (например, миРНК, shRNA), микроРНК, гэдмеры, миксмеры, фосфородиамидит-морфолиносоединения, пептид-нуклеиновые кислоты, аптамеры, гидовые нуклеиновые кислоты (например, гидовую РНК Cas9) и т.д. Олигонуклеотиды могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать один или более модифицированных нуклеотидов (например, модификации 2'-О-метил-сахара, модификации пурина или пиримидина). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать одну или более модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать одну или более фосфотиоатных связей, которые могут находиться в стереохимической конформации Rp или Sp.

[00070] **Рекомбинантное антитело:** В рамках изобретения термин "рекомбинантное антитело человека" предназначен для включения всех антител человека, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, с использованием которого трансфицируют клетку-хозяина (что более подробно описано в настоящем описании), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (Hoogenboom H. R., (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J. V., and Larrick J. W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., и Green L. L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21:364-370), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, включающими сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хоть и получены и относятся к последовательностям VH и VL зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*. Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к полностью человеческим антителам человека, способным связываться с рецептором трансферрина человека, которые можно

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

[00071] **Область комплементарности:** В рамках изобретения термин "область комплементарности" относится к нуклеотидной последовательности, например, олигонуклеотида, достаточно комплементарной когнатной нуклеотидной последовательности, например, целевой нуклеиновой кислоты, таким образом, что две нуклеотидные последовательности могут отжигаться друг с другом в физиологических условиях (например, в клетке). В некоторых вариантах осуществления область комплементарности полностью комплементарна когнатной нуклеотидной последовательности целевой нуклеиновой кислоты. Однако, в некоторых вариантах осуществления область комплементарности частично комплементарна когнатной нуклеотидной последовательности целевой нуклеиновой кислоте (например, по меньшей мере, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарности). В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит 1, 2, 3 или 4 неправильных спариваний по сравнению с когнатной нуклеотидной последовательностью целевой нуклеиновой кислоты.

[00072] **Специфически связывается:** В рамках изобретения термин "специфически связывается" относится к способности молекулы связываться с партнером по связыванию со степенью аффинности или avidности, позволяющей использовать молекулу для различения партнера по связыванию и соответствующего контроля в анализе связывания или другом контексте связывания. В отношении антитела термин "специфически связывается" относится к способности антитела связываться со специфическим антигеном со степенью аффинности или avidности по сравнению с соответствующим референсным антигеном или антигенами, что позволяет использовать антитело для различения специфического антигена от других, например, в степени, делающей возможной преференциальный таргетинг к некоторым клеткам, например, мышечным клеткам, через связывание с антигеном, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с мишенью, если антитело имеет K_D для связывания мишени по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с рецептором трансферрина, например, эпитопом апикального домена рецептора трансферрина.

[00073] **Индивидуум:** В рамках изобретения термин "индивидуум" относится к млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой не являющегося человеком примата или грызуна. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом, например, пациентом-человеком, имеющим или, как предполагают, имеющим заболевание. В некоторых вариантах осуществления

индивидуум является пациентом-человеком, имеющим или, как предполагают, имеющим заболевание, являющееся результатом экспансии ассоциированного с заболеванием повтора в аллеле DMPK.

[00074] **Рецептор трансферрина:** В рамках изобретения термин "рецептор трансферрина" (также известный как TFRC, CD71, p90 или TFR1) относится к интернализирующему рецептору клеточной поверхности, связывающемуся с трансферрином, для облегчения захвата железа посредством эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления рецептор трансферрина может принадлежать человеку (NCBI Gene ID 7037), не являющемуся человеком примату (например, NCBI Gene ID 711568 или NCBI Gene ID 102136007) или грызуну (например, NCBI Gene ID 22042). Кроме того, охарактеризовано множество вариантов транскриптов человека, кодирующих разные изоформы рецептора (например, как аннотировано под регистрационными номерами GenBank RefSeq: NP_001121620.1, NP_003225.2, NP_001300894.1 и NP_001300895.1).

II. Комплексы

[00075] Настоящее изобретение относится к комплексам, содержащим направляющее средство, например, антитело, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит мышечно-специфическое антитело, ковалентно связанное с олигонуклеотидом. Комплекс может содержать антитело, специфически связывающееся с одним участком антигена или связывающееся с по меньшей мере двумя участками антигена, которые могут существовать на одном или разных антигенах.

[00076] Комплекс можно использовать для модуляции активности или функции по меньшей мере одного гена, белка и/или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка, находящаяся в комплексе, отвечает за модуляцию гена, белка и/или нуклеиновых кислот. Молекулярная нагрузка может являться низкомолекулярным соединением, белком, нуклеиновой кислотой, олигонуклеотидом или любой молекулой, способной модулировать активность или функцию гена, белка и/или нуклеиновой кислоты в клетке. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, нацеленным на ассоциированный с заболеванием повтор в мышечных клетках.

[00077] В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит мышечно-специфическое средство, например, антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, например, антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на ассоциированный с заболеванием повтор, например, аллель DMPK.

A. Мышечно-специфические средства

[00078] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим средствам, например, для доставки молекулярной нагрузки в мышечную клетку. В некоторых вариантах осуществления такие мышечно-специфические средства могут связываться с мышечной клеткой, например, посредством специфического связывания с антигеном на мышечной клетке, и доставлять ассоциированную

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

[00079] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим средствам, специфически связывающимся с антигеном на мышце, такой как скелетная мышца, гладкая мышца или сердечная мышца. В некоторых вариантах осуществления любые из мышечно-специфических средств, представленных в настоящем описании, связываются (например, специфически связываются) с антигеном на скелетно-мышечной клетке, гладкомышечной клетке и/или кардиомиоците.

[00080] С помощью взаимодействия с мышечно-специфическими элементами распознавания поверхности клетки (например, белками клеточной мембраны) можно достигать тканевой локализации и селективного захвата мышечными клетками. В некоторых вариантах осуществления молекулы, являющиеся субстратами для транспортеров мышечного захвата, можно использовать для доставки молекулярной нагрузки в мышечную ткань. Связывание с элементами распознавания поверхности мышечной клетки с последующим эндоцитозом может позволять даже крупным молекулам, таким как антитела, проникать в мышечные клетки. В качестве другого примера, молекулярная нагрузка, конъюгированная с трансферрином или антителами против рецептора трансферрина, может захватываться мышечными клетками посредством связывания с рецептором трансферрина, который затем может подвергаться эндоцитозу, например, посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза.

[00081] Мышечно-специфические средства можно использовать для концентрирования молекулярной нагрузки (например, олигонуклеотида) в мышце при снижении токсичности, ассоциированной с эффектами в других тканях. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство концентрирует связанную молекулярную нагрузку в мышечных клетках по сравнению с другим типом клеток в организме индивидуума. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство концентрирует связанную молекулярную нагрузку в мышечных клетках (например, скелетно-мышечных клетках, гладкомышечных клетках или кардиомиоцитах) в количестве, составляющем по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз больше, чем количество в неммышечных клетках (например,

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

[00082] В некоторых вариантах осуществления для достижения селективности в отношении мышечных клеток может потребоваться мышечный элемент распознавания (например, антиген мышечной клетки). В качестве одного из примеров, мышечно-специфическое средство может являться низкомолекулярным соединением, являющимся субстратом для транспортера мышечно-специфического захвата. В качестве другого примера, мышечно-специфическое средство может являться антителом, проникающим в мышечную клетку посредством транспортер-опосредованного эндоцитоза. В качестве другого примера, мышечно-специфическое средство может являться лигандом, связывающимся с рецептором клеточной поверхности на мышечной клетке. Следует понимать, что, хотя подходы на основе транспортеров представляют собой прямой путь проникновения в клетку, таргетинг на основе рецепторов может включать стимулированный эндоцитоз для достижения желаемого места действия.

i. Мышечно-специфические антитела

[00083] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом. Как правило, высокая специфичность антител к их антигену-мишени обеспечивает потенциал селективного таргетинга мышечных клеток (например, скелетно-мышечных клеток, гладкомышечных клеток и/или кардиомиоцитов). Эта специфичность также может ограничивать нецелевую токсичность. Примеры антител, способных к таргетингу поверхностного антигена мышечных клеток, описаны и входят в объем настоящего изобретения. Например, антитела, нацеленные на поверхность мышечных клеток, описаны в Arahata K., et al. "Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide" *Nature* 1988; 333: 861-3; Song K.S., et al. "Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Cave Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins" *J Biol Chem* 1996; 271: 15160-5; и Weisbart R.H. et al., "Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of monoclonal antibody that binds myosin IIb" *Mol Immunol.* 2003 Mar, 39(13):78309; полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

a. Антитела против рецептора трансферрина

[00084] Некоторые аспекты настоящего изобретения основаны на понимании того, что средства, связывающиеся с рецептором трансферрина, например, антитела против рецептора трансферрина, способны к таргетингу мышечных клеток. Рецепторы трансферрина являются интернализирующими рецепторами клеточной поверхности, транспортирующими трансферрин через клеточную мембрану и участвующими в регуляции и гомеостазе внутриклеточных уровней железа. Некоторые аспекты настоящего

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

[00085] Следует понимать, что антитела против рецептора трансферрина можно получать, синтезировать и/или дериватизировать с использованием нескольких известных способов, например, дизайна библиотек с использованием фагового дисплея. Примеры способов охарактеризованы в этой области и включены посредством ссылок (Díez, P. et al. "High-throughput phage-display screening in array format", *Enzyme and microbial technology*, 2015, 79, 34-41.; Christoph M. H. and Stanley, J.R. "Antibody Phage Display: Technique and Applications" *J Invest Dermatol.* 2014, 134:2.; Engleman, Edgar (Ed.) "Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies". 1985, Springer). В других вариантах осуществления антитело против трансферрина охарактеризовано или описано ранее. В этой области известны антитела, специфически связывающиеся с рецептором трансферрина (см., например, патент США № 4364934, поданный 12/4/1979, "Monoclonal antibody to human early thymocyte antigen and methods for preparing same"; патент США № 8409573, поданный 6/14/2006, "Anti-CD71 monoclonal antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells"; патент США № 9708406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"; патент США № 9611323, поданный 12/19/2014, "Low affinity blood brain barrier receptor antibodies and uses therefor"; WO 2015/098989, поданный 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier"; Schneider C. et al. "Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9" *J Biol Chem.* 1982, 257:14, 8516-8522.; Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse", 2000, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 292: 1048-1052).

[00086] В комплексах, представленных в настоящем описании, можно использовать любые подходящие антитела против рецептора трансферрина. Примеры антител против рецептора трансферрина, включая связанные ссылки и связывающиеся эпитопы, приведены в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит определяющие комплементарность области (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) любого из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, например, антител против рецептора трансферрина, приведенных в таблице 1.

[00087] Таблица 1 - Список клонов антител против рецептора трансферрина, включая связанные ссылки и информацию о связывающихся эпитопах.

Название клона антитела	Ссылки	Эпитоп/примечания
ОКТ9	Патент США № 4364934, поданный 12/4/1979, названный "MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME" Schneider C. et al. " Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9", J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.	Апикальный домен TfR (остатки 305-366 последовательности TfR человека XM_052730.3, доступные в GenBank)
(Из JCR) Клон M11 Клон M23 Клон M27 Клон B84	WO 2015/098989, поданный 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier" патент США № 9994641, поданный 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier"	Апикальный домен (остатки 230-244 и 326-347 TfR) и протеаза-подобный домен (остатки 461-473)
(Из Genentech) 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12 и 13D4	WO 2016/081643, поданный 5/26/2016, названный "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE" патент США № 9708406, поданный 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"	Апикальный домен и неапикальные области
(Из Armagen) 8D3	Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse" 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052. патентная заявка США № 2010/077498, поданная 9/11/2008, названная	

	"COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE"	
OX26	Haobam, B. et al. 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806-21.	
DF1513	Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of 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	Коммерчески доступные антитела против рецептора трансферрина.	Novus Biologicals 8100 Southpark Way, A-8 Littleton CO 80120
(Из INSERM) BA120 g	патентная заявка США № 2011/0311544A1, поданная 6/15/2005, названная "ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS"	Не конкурирует с ОКТ9
LUCA31	патент США № 7572895, поданный 6/7/2004, названный "TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES"	"эпитоп LUCA31"
(Salk Institute)	Trowbridge, I.S. et al. "Anti-transferrin	

B3/25 T58/30	receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells", Nature, 1981, volume 294, pages 171-173	
R17 217,1.3, 5E9C11, ОКТ9 (клон BE0023)	Коммерчески доступные антитела против рецептора трансферрина	BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B West Lebanon, NH 03784-1671 USA
BK19,9, B3/25, T56/14 и T58/1	Gatter, K.C. et al. "Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance", J Clin Pathol. 1983 May;36(5):539-45.	

[00088] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом против рецептора трансферрина. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина специфически связывается с белком трансферрина, имеющим аминокислотную последовательность, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина может специфически связываться с любым внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина или эпитопом, который начинает подвергаться воздействию антитела, включая апикулярный домен, трансферрин-связывающий домен и протеаза-подобный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина связывается с аминокислотным сегментом рецептора трансферрина человека или не являющегося человеком примата, приведенным в SEQ ID NO: 1-3 в диапазоне аминокислот C89-F760. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина специфически связывается с аффинностью связывания по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее. Антитела против рецептора трансферрина, используемые в настоящем описании, могут конкурировать за связывание с другими антителами против рецептора трансферрина, например ОКТ9, 8D3, связывающихся с рецептором трансферрина с 10^{-3} М, 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М или менее.

[00089] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина человека, соответствующей последовательности NCBI NP_003225.2 (белка рецептора трансферрина 1 изоформа 1, Homo sapiens), является следующим:

MMDQARSFAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA VDEEENADNNTK
ANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGE
DFPAARRLYWDDLKRKLSKLDSTDFGTIKLLNENS YVPREAGSQKDENLALYVENQF
REFKLSKVWRDQH FVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGK

LVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 NAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGD
 CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDA
 WGPAAKSGVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEG
 YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNW
 ASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR
 AAAEVAGQFVIKLTHTDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSAR
 GDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRRHVFWGS
 GSHTLPALLENLKLKQNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 1).

[00090] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI NP_001244232.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca mulatta*), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDDEEENTDNNTK
 PNGTKPKRCGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVA YSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPAAKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNLDYERYNSQLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRRHVFW
 GSGSHTLSALLESKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 2)

[00091] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI XP_005545315.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca fascicularis*), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLGVDDEEENTDNNTK
 ANGTKPKRCGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVA YSKAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPAAKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN

WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNLDYERYNSQLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFMKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPRHVFVW
 GSGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 3).

[00092] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина
 мыши, соответствующей последовательности NCBI NP_001344227.1 (белок рецептора
 трансферрина 1, *Mus musculus*), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLAADDEENADNNM
 KASVRKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGMSGYLG YCKRVEQKEECVKLAETEETDKSET
 METEDVPTSSRLYWADLKTLSEKLN SIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIE
 NQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVS
 GKL V HANFGTKKDFEELS SVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKF
 PVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSPSSGLPNIPVQTISRAAA EKLF GK
 MEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGA
 QRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFS DMISKDGFPRSRSIIFASWTAGDFGAVGATE
 WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLTGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLY
 RDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQ
 LNQMVRTAAEVAGQLIKLTHDVELNLDYEMYSKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQ
 WLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNR FVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPRHI
 FWGSGSHTLSALVENLKL RQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNE
 F

(SEQ ID NO: 4)

В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина
 связывается со следующим аминокислотным сегментом рецептора:
 FVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFE
 DLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSF FGHANLG
 TGDYTPGFPSFNHTQFPSPSSGLPNIPVQTISRAAA EKLF GNMEGDCPSDWKTDSTCR
 MVTSESKNVKLTVSNVLKE (SEQ ID NO: 5) и не ингибирует связывающие
 взаимодействия между рецепторами трансферрина и трансферрином и/или белком
 гемохроматоза человека (также известным как HFE).

[00093] Для получения антител, фрагментов антител или антигенсвязывающих
 средств можно использовать соответствующие способы, например, способы
 рекомбинантной ДНК. В некоторых вариантах осуществления антитело также можно
 получать, получая гибридомы (см., например, Kohler, G and Milstein, C. "Continuous
 cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" *Nature*, 1975, 256: 495-497).
 Интересующий антиген можно использовать в качестве иммуногена в любой форме,
 например, рекомбинантной или природной форме. Гибридомы подвергают скринингу
 стандартными способами, например, скринингу посредством ELISA, для обнаружения по
 меньшей мере одной гибридомы, продуцирующей антитело, нацеленное на конкретный

антиген. Антитела также можно получать посредством скрининга экспрессирующих библиотек белков, экспрессирующих антитела, например, библиотеки фагового дисплея. В некоторых вариантах осуществления дисплея также можно использовать дизайн библиотек фагового, (см., например, патент США № 5223409, поданный 3/1/1991, "Directed evolution of novel binding proteins"; WO 1992/18619, поданный 4/10/1992, "Heterodimeric receptor libraries using phagemids"; WO 1991/17271, поданный 5/1/1991, "Recombinant library screening methods"; WO 1992/20791, поданный 5/15/1992, "Methods for producing members of specific binding pairs"; WO 1992/15679, поданный 2/28/1992, и "Improved epitope displaying phage"). В некоторых вариантах осуществления интересующий антиген можно использовать для иммунизации не принадлежащего человеку животного, например, грызуна или козы. В некоторых вариантах осуществления затем антитело получают из не принадлежащего человеку животного, и его, необязательно, можно модифицировать с использованием ряда способов, например, способов рекомбинантной ДНК. В этой области известны дополнительные примеры получения антител и способов (см., например, Harlow et al. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

[00094] В некоторых вариантах осуществления антитело является модифицированным, например, модифицированным посредством гликозилирования, фосфорилирования, сумоилирования, и/или метилирования. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным антителом, конъюгированным с одной или более молекулами сахаров или углеводов. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов конъюгированы с антителом посредством N-гликозилирования, O-гликозилирования, C-гликозилирования, глипирования (присоединения GPI-якоря) и/или фосфогликозилирования. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов представляют собой моносахариды, дисахариды, олигосахариды или гликаны. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов является разветвленным олигосахаридом или разветвленным гликаном. В некоторых вариантах осуществления одна или более молекул сахаров или углеводов включают маннозное звено, глюкозное звено, звено N-ацетилглюкозамина, звено N-ацетилгалактозамина, галактозное звено, фукозное звено или фосфолипидное звено. В некоторых вариантах осуществления есть приблизительно 1-10, приблизительно 1-5, приблизительно 5-10, приблизительно 1-4, приблизительно 1-3 или приблизительно 2 молекул сахара. В некоторых вариантах осуществления гликозилированное антитело является полностью или частично гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным в результате химических реакций или ферментативными способами. В некоторых вариантах осуществления антитело является гликозилированным *in vitro* или внутри клетки, которая, необязательно, может иметь дефицит фермента пути N- или O-гликозилирования, например, гликозилтрансферазы. В некоторых вариантах осуществления антитело является функционализированным с использованием молекул

сахаров или углеводов, как описано в международной публикации патентной заявки WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года, названной, "Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof".

[00095] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к белкам, связывающимся с рецептором трансферрина (например, внеклеточной частью рецептора трансферрина). В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, специфически связываются с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека). Рецепторы трансферрина являются интернализирующимися рецепторами клеточной поверхности, транспортирующими трансферрин через клеточную мембрану и участвующими в регуляции и гомеостазе внутриклеточных уровней железа. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, специфически связываются с рецептором трансферрина человека, не являющихся человеком приматов, мыши, крысы и т.д. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, связываются с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, специфически связываются с рецептором трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, связываются с апикальным доменом рецептора трансферрина человека. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, специфически связываются с апикальным доменом рецептора трансферрина человека.

[00096] В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по настоящему изобретению включают одну или более из аминокислотных последовательностей CDR-H (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) из любых из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина включают CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные для любого из антител против рецептора трансферрина, выбранного из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина включают CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные для любого из антител против рецептора трансферрина, выбранного из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитела против трансферрина включают CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные для любого из антител против рецептора трансферрина, выбранного из таблицы 1. Настоящее изобретение также включает любую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу, содержащую CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3, приведенные для любого из антител против рецептора трансферрина, выбранного из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления домены CDR3 тяжелой и легкой цепи антитела могут играть особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антитела с

антигеном. Таким образом, антитела против рецептора трансферрина по изобретению могут включать по меньшей мере CDR3 тяжелой и/или легкой цепи любого из антител против рецептора трансферрина, выбранного из таблицы 1.

[00097] В некоторых примерах любое из антител против рецептора трансферрина по изобретению имеют одну или более последовательностей CDR (например, CDR-H или CDR-L), по существу, схожих с любой из последовательностей CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и/или CDR-L3 из одного из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления положение одной или более CDR в области VH (например, CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3) и/или VL (например, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3) антитела, представленного в настоящем описании, может варьироваться на одну, две, три, четыре, пять или шесть положений аминокислот при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают). Например, в некоторых вариантах осуществления положение, определяющее CDR любого антитела, представленного в настоящем описании, может варьироваться в результате сдвига N-концевой и/или C-концевой границы CDR на одну, две, три, четыре, пять или шесть аминокислот относительно положения CDR любого из антител, представленных в настоящем описании, при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают). В другом варианте осуществления длина одной или более CDR в области VH (например, CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3) и/или VL (например, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3) антитела, представленного в настоящем описании, может варьироваться (например, быть меньше или больше) на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот, при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% связывания исходного антитела, из которого его получают).

[00098] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, представленные в настоящем описании, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот короче, чем одна или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1) при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором

трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания исходного антитела, из которого его получают). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, представленные в настоящем описании, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот длиннее, чем одна или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1), при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания исходного антитела, из которого его получают). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно удлинять на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1), при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания исходного антитела, из которого его получают). В некоторых вариантах осуществления карбокси-часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно удлинять на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1), при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания исходного антитела, из которого его получают). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно укорачивать на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1), при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по

меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания исходного антитела, из которого его получают). В некоторых вариантах осуществления карбокси-часть CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и/или CDR-H3, представленных в настоящем описании, можно укорачивать на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одной или более из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1), при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания исходного антитела, из которого его получают). Для определения сохранения иммуноспецифического связывания с рецептором трансферрина (например, рецептор трансферрина человека) можно использовать любой способ, например, с использованием анализов связывания и условий, описанных в этой области.

[00099] В некоторых примерах любые из антител против рецептора трансферрина по изобретению имеют одну или более последовательностей CDR (например, CDR-H или CDR-L), по существу, схожих с любым из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. Например, антитела могут включать одну или более последовательностей CDR из любого из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1, содержащих до 5, 4, 3, 2 или 1 изменений аминокислотных остатков по сравнению с соответствующей областью CDR в любой из CDR, представленных в настоящем описании (например, CDR из любых из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1), при условии, что иммуноспецифическое связывание с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) сохраняется (например, сохраняется в достаточной степени, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% относительно связывания исходного антитела, из которого его получают). В некоторых вариантах осуществления любое из изменений аминокислот в любой из CDR, представленных в настоящем описании, может являться консервативным изменением. Консервативные изменения можно вносить в CDR в положениях, в которых маловероятно, что остатки будут участвовать во взаимодействии с белком рецептора трансферрина (например, белком рецептора трансферрина человека), например, что определяют на основе кристаллической структуры. Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к антителам против рецептора трансферрина, содержащим один или более из переменных доменов тяжелой цепи (VH) и/или переменных доменов легкой цепи (VL), представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления любые из доменов VH, представленных в настоящем описании, включают одну или более из последовательностей CDR-H (например, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), представленных в

настоящем описании, например, любые из последовательностей CDR-H, представленных в любом из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления любые из доменов VL, представленных в настоящем описании, включают одну или более из последовательностей CDR-L (например, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), представленных в настоящем описании, например, любые из последовательностей CDR-L, представленных в любом из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1.

[000100] В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по изобретению включают любое антитело, включающее переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитела против рецептора трансферрина по изобретению включают любое антитело, включающее пары переменных доменов тяжелой цепи и пары переменных доменов легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1.

[000101] Аспекты настоящего изобретения относятся к антителам против рецептора трансферрина, имеющим аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH) и/или переменного домена легкой цепи (VL), гомологичную любой из представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи или последовательность переменного домена легкой цепи, являющуюся по меньшей мере на 75% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) идентичной последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или любой последовательности переменного домена легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любой из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления гомологичные аминокислотные последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или переменного домена легкой цепи не варьируются в любых из последовательностей CDR, представленных в настоящем описании. Например, в некоторых вариантах осуществления степень изменения последовательности (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) может иметь место в последовательности переменного домена тяжелой цепи и/или переменного домена легкой цепи, исключая любые из последовательностей CDR, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления любые из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, содержат последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, содержащих каркасную последовательность, являющуюся по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной каркасной последовательности любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 2.

[000102] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина (например, рецептор трансферрина человека), содержит переменный домен VL легкой цепи, содержащий любой из доменов CDR-L (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3) или вариантов домена CDR-L, представленных в настоящем описании, любых из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина (например, рецептором трансферрина человека), содержит переменный домен VL легкой цепи, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит последовательность переменной области (VL) легкой цепи, содержащую одну, две, три или четыре каркасные области последовательности переменной области легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит одну, две, три или четыре каркасные области последовательности переменной области легкой цепи, являющейся по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичной одной, двум, трем или четверем каркасным областям последовательности переменной области легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления каркасная область переменной области легкой цепи, полученная из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности, за исключением наличия до 10 замен, делеций и/или инсерций аминокислот, предпочтительно - до 10 замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления каркасная область переменной области легкой цепи, полученная из указанной аминокислотной последовательности, состоит из указанной аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными остатками, замещающими аминокислоту, обнаруживаемую в аналогичном положении в соответствующей каркасной области переменной области легкой цепи, не принадлежащей человеку, принадлежащей примату или человеку.

[000103] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина, содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из VL антитела человека или примата. Каркасная область легкой цепи примата или человека из антитела, выбранная для использования с последовательностями CDR легкой цепи, представленными в настоящем

описании, может иметь, например, по меньшей мере 70% (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или по меньшей мере 99%) идентичности в отношении каркасной области легкой цепи не принадлежащего человеку родительского антитела. Выбранное антитело примата или человека может иметь то же или, по существу, то же количество аминокислот в определяющих комплементарность областях легкой цепи, что и определяющие комплементарность области легкой цепи любых из антител, представленных в настоящем описании, например, любых из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки каркасной области легкой цепи примата или человека получают из природной каркасной области легкой цепи антитела примата или человека, имеющей по меньшей мере 75% идентичности, по меньшей мере 80% идентичности, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, по меньшей мере 99% (или более) идентичности в отношении каркасных областей легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из вариабельной области легкой цепи человека подсемейства каппа. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина дополнительно содержит одну, две, три или все четыре каркасные области VL, полученные из вариабельной области легкой цепи человека подсемейства лямбда.

[000104] В некоторых вариантах осуществления любые из антител против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, содержат вариабельный домен легкой цепи, дополнительно содержащий константную область легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи является константной областью легкой цепи каппа или лямбда. В некоторых вариантах осуществления константную область легкой цепи каппа или лямбда получают из млекопитающего, например, человека, обезьяны, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи является константной областью легкой цепи каппа человека. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи является константной областью легкой цепи лямбда человека. Следует понимать, что любые из константных областей легкой цепи, представленных в настоящем описании, могут являться вариантами любых из константных областей легкой цепи, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичной любым из константных областей легкой цепи любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1.

[000105] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина является любым антителом против рецептора трансферрина, таким как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1.

[000106] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит домен VL, содержащий аминокислотную последовательность любого антитела против рецептора трансферрина, такого как любое из антител против рецептора трансферрина, выбранных из таблицы 1, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина содержит любые из доменов VL или вариантов домена VL и любые из доменов VH или вариантов домена VH, где домены VL и VH или их варианты получают из одного клона антитела, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY, любого класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (например, IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина. Неограничивающие примеры константных областей человека описаны в этой области, например, см. Kabat E A et al., (1991) выше.

[000107] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению может связываться с антигеном-мишенью (например, рецептором трансферрина) с относительно высокой аффинностью, например, с K_D менее 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или менее. Например, антитела против рецептора трансферрина могут связываться с белком рецептора трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) с аффинностью от 5 пМ до 500 нМ, например, от 50 пМ до 100 нМ, например, от 500 пМ до 50 нМ. Настоящее изобретение также включает антитела, конкурирующие с любыми из антител, представленных в настоящем описании, за связывание с белком рецептора трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) и имеющие аффинность 50 нМ или менее (например, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 500 пМ или менее, 50 пМ или менее или 5 пМ или менее). Аффинность и кинетику связывания антитела против рецептора трансферрина можно тестировать любым подходящим способом включая, в качестве неограничивающих примеров, биосенсорную технологию (например, ОСТЕТ или BIACORE).

[000108] В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению могут связываться с антигеном-мишенью (например, рецептором трансферрина) с относительно высокой аффинностью, например, с K_D менее 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или менее. Например, антитела против рецептора трансферрина могут связываться с белком рецептора трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) с аффинностью от 5 пМ до 500 нМ, например, от 50 пМ до 100 нМ, например, от 500 пМ до 50 нМ. Настоящее изобретение также включает антитела, конкурирующие с любыми из антител, представленных в настоящем описании, за связывание с белком рецептора

трансферрина (например, рецептором трансферрина человека) и имеющие аффинность 50 нМ или менее (например, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 500 пМ или менее, 50 пМ или менее или 5 пМ или менее). Аффинность и кинетику связывания антитела против рецептора трансферрина можно тестировать любым подходящим способом, включая, в качестве неограничивающих примеров, биосенсорную технологию (например, ОСТЕТ или BIACORE).

[000109] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является антителом против рецептора трансферрина (например, антителом и его вариантами, как описано в публикации международной патентной заявки WO 2016/081643, включенной в настоящее описание посредством ссылки).

[000110] В некоторых вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и легкой цепи примера антитела в соответствии с разными системами определения приведены в таблице 1.1. Описаны разные системы определения, например, определения по Kabat, определения по Chothia и/или определения по Contact. См., например, (например, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Chothia et al., (1989) Nature 342:877; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948; и Almagro, J. Mol. Recognit. 17:132-143 (2004). Также см. hgmp.mrc.ac.uk и bioinf.org.uk/abs).

Таблица 1.1 CDR тяжелой цепи и легкой цепи антитела против рецептора трансферрина

CDR	Kabat	Chothia	Contact
CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 17)	GYTFTSY (SEQ ID NO: 23)	TSYWMH (SEQ ID NO: 25)
CDR-H2	EINPTNGR TNYIEKF KS (SEQ ID NO: 18)	NPTNGR (SEQ ID NO: 24)	WIGEINPTNGR TNTN (SEQ ID NO: 26)
CDR-H3	GTRAYHY (SEQ ID NO: 19)	GTRAYHY (SEQ ID NO: 19)	ARGTRA (SEQ ID NO: 27)
CDR-L1	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 20)	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 20)	YSNLAWY (SEQ ID NO: 28)
CDR-L2	DATNLAD (SEQ ID NO: 21)	DATNLAD (SEQ ID NO: 21)	LLVYDATNLA (SEQ ID NO: 29)
CDR-L3	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 22)	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 22)	QHFWGTPL (SEQ ID NO: 30)

[000111] Также приведены последовательности переменного домена (VH) тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи:

[000112] VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP
TNGRNTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHNYWGQGTS
VTVSS (SEQ ID NO: 33)

[000113] VL

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQGGKSPQLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFHWGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO: 34)

[000114] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 1.1. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные в таблице 1.1.

[000115] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, в совокупности содержащие не более 5 изменений аминокислот (например, не более 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, как показано в таблице 1.1. Термин "в совокупности" означает, что общее количество изменений аминокислот во всех из трех CDR тяжелой цепи находится в пределах определенного диапазона. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению может содержать CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, в совокупности содержащие не более 5 изменений аминокислот (например, не более 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, как показано в таблице 1.1.

[000116] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, по меньшей мере одна из которых содержит не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с соответствующей CDR тяжелой цепи, как показано в таблице 1.1. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению может содержать CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, по меньшей мере одна из которых содержит не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с соответствующей CDR легкой цепи, как показано в таблице 1.1.

[000117] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3, содержащую не более 3 изменений аминокислот (например, не более 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с CDR-L3, как показано в таблице 1.1. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3, содержащую одно изменение аминокислот по сравнению с CDR-L3, как показано в таблице 1.1. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора

трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-L3 QHFAGTPLT (SEQ ID NO: 31 по системам определения Kabat и Chothia) или QHFAGTPL (SEQ ID NO: 32 по системе определения Contact). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1 и CDR-L2, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 1.1, и содержит CDR-L3 QHFAGTPLT (SEQ ID NO: 31 по системам определения Kabat и Chothia) или QHFAGTPL (SEQ ID NO: 32 по системе определения Contact).

[000118] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR тяжелой цепи, в совокупности являющиеся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичными CDR тяжелой цепи, как показано в таблице 1.1. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит CDR легкой цепи, в совокупности являющиеся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичными CDR легкой цепи, как показано в таблице 1.1.

[000119] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

[000120] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VH, содержащую не более 20 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 33. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VL, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 34.

[000121] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичную VH, приведенной в SEQ ID NO: 33. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VL, приведенной в SEQ ID NO: 34.

[000122] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным антителом (например, гуманизированным вариантом, содержащим одну или более CDR из таблицы 1.1). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по

настоящему изобретению содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 1.1, и содержит гуманизованную переменную область тяжелой цепи и/или гуманизованную переменную область легкой цепи.

[000123] Гуманизованные антитела являются иммуноглобулинами человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменяют остатками из CDR не являющихся человеком видов (донорного антитела), таких как мышь, крыса или кролик, имеющими желаемую специфичность, аффинность и емкость. В некоторых вариантах осуществления остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизованное антитело может содержать остатки, необнаруживаемые ни в реципиентном антителе, ни в донорской CDR или каркасных последовательностях, но включенные для дальнейшей доработки и оптимизации свойств антител. В основном, гуманизованное антитело будет содержать, по существу, все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или, по существу, все из областей CDR соответствуют областям из не принадлежащего человеку иммуноглобулина, и все или, по существу, все из областей FR соответствуют областям из консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело также будет содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Антитела могут иметь Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизованных антител имеют одну или более CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), измененных относительно исходного антитела, что также означает одну или более CDR, полученных из одной или более CDR из исходного антитела. Получение гуманизованных антител также может включать созревание аффинности.

[000124] В некоторых вариантах осуществления гуманизации достигают посредством пересадки CDR (например, как показано в таблице 1.1) в переменные домены IGKV1-NL1*01 и IGHV1-3*01 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизованным вариантом, содержащим одну или более замен аминокислот в положениях 9, 13, 17, 18, 40, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 34, и/или одну или более замен аминокислот в положениях 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 66, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизованным вариантом, содержащим замены аминокислот во всех положениях 9, 13, 17, 18, 40, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 34, и/или замены аминокислот во всех положениях 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 66, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 33.

[000125] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизованным антителом и

содержит остатки в положениях 43 и 48 VL, приведенной в SEQ ID NO: 34. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным антителом и содержит остатки в положениях 48, 67, 69, 71 и 73 VH, приведенной в SEQ ID NO: 33.

[000126] Приведены аминокислотные последовательности VH и VL примера гуманизованного антитела, который можно использовать по изобретению:

[000127] Гуманизованная VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHNYWGQGT
MVTVSS (SEQ ID NO: 35)

[000128] Гуманизованная VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSLSQSEDFGTYCYCQHFHWGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO: 36)

[000129] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

[000130] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VH, содержащую не более 20 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 35. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VL, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 36.

[000131] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VH, приведенной в SEQ ID NO: 35. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной VL, приведенной в SEQ ID NO: 36.

[000132] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим замены аминокислот в одном или более из положений 43 и 48 по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 34, и/или замены аминокислот в одном или более из положений 48, 67, 69, 71 и 73 по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 33. В

некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим мутацию S43A и/или V48L по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 34 и/или одну или более из мутаций A67V, L69I, V71R и K73T по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 33.

[000133] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным вариантом, содержащим замены аминокислот в одном или более из положений 9, 13, 17, 18, 40, 43, 48, 45 и 70 по сравнению с VL, приведенной в SEQ ID NO: 34 и/или замены аминокислот в одном или более из положений 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 48, 66, 67, 69, 71, 73, 75, 81, 83, 87 и 108 по сравнению с VH, приведенной в SEQ ID NO: 33.

[000134] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является химерным антителом, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи из антитела человека. Термин "химерные антитела" относится к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области, принадлежащие первому биологическому виду, и константную область, принадлежащую второму биологическому виду. Как правило, в этих химерных антителах переменная область легких и тяжелых цепей имитирует переменные области антител, полученных из одного вида млекопитающих (например, не являющегося человеком млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части являются гомологичными последовательностям в антителах, полученных из другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления модификации аминокислот можно осуществлять в переменной области и/или константной области.

[000135] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является химерным антителом, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи из антитела человека. Термин "химерные антитела" относится к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области, принадлежащие первому биологическому виду, и константную область, принадлежащую второму биологическому виду. Как правило, в этих химерных антителах переменная область легких и тяжелых цепей имитируют переменные области антител, полученных из одного вида млекопитающих (например, не являющегося человеком млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), в то время как константные части являются гомологичными последовательностям в антителах, полученных из другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления модификации аминокислот можно осуществлять в переменной области и/или константной области.

[000136] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь любых из антител против рецептора трансферрина, как представлено в настоящем описании, может содержать константную область тяжелой цепи (CH) или ее часть (например, CH1, CH2, CH3 или их комбинацию). Константная область тяжелой цепи может иметь любое

подходящее происхождение, например, принадлежать человеку, мыши, крысе или кролику. В одном конкретном примере, константную область тяжелой цепи получают из IgG человека (тяжелая цепь гамма), например, IgG1, IgG2 или IgG4. Пример константной области IgG1 человека приведен ниже:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37)

[000137] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь любых из антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, может дополнительно содержать константную область легкой цепи (CL), которая может являться любой CL, известной в этой области. В некоторых примерах, CL принадлежит легкой цепи каппа. В других примерах CL принадлежит легкой цепи лямбда. В некоторых вариантах осуществления CL принадлежит легкой цепи каппа, последовательность которой приведена ниже:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ
ID NO: 38)

[000138] Другие константные области тяжелой и легкой цепи антитела хорошо известны в этой области, например, представленные в базе данных IMGT (www.imgt.org) или на www.vbase2.org/vbstat.php., включенных в настоящее описание посредством ссылки.

[000139] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи описанных антител против рецептора трансферрина приведены ниже:

[000140] Тяжелая цепь (VH+константная область IgG1 человека)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHNYWGQGTS
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

[000141] Легкая цепь (VL+легкая цепь каппа)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHNYWGQGTS
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 40)

[000142] Тяжелая цепь (гуманизированный VH+константная область IgG1 человека)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTRAYHYWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

[000143] Легкая цепь (гуманизированный VL+легкая цепь каппа)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSLSQSEDFGTYCYCQHFHWGTPLTFGAGTKLELKASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 42)

[000144] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 39. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, или 98%) идентичной SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

[000145] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 20 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с тяжелой цепью, приведенной в SEQ ID NO: 39. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с легкой цепью, приведенной в SEQ ID NO: 40.

[000146] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 41. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% (например, 80%, 85%, 90%, 95% или 98%) идентичной SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

[000147] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую не более 20 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с тяжелой цепью гуманизированной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39. Альтернативно или дополнительно, антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению содержит легкую цепь, содержащую не более 15 изменений аминокислот (например, не более 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 изменения аминокислот) по сравнению с легкой цепью гуманизированной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 40.

[000148] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина является антигенсвязывающим фрагментом (FAB) интактного антитела (полноразмерного антитела). Антигенсвязывающий фрагмент интактного антитела (полноразмерного антитела) можно получать общепринятыми способами. Например, F(ab')₂-фрагменты можно получать посредством расщепления пепсином молекулы антитела, и Fab-фрагменты можно получать посредством восстановления дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагментов. Примеры аминокислотных последовательностей FAB антител против рецептора трансферрина, представленных в настоящем описании, приведены ниже:

[000149] Тяжелая цепь FAB (VH+часть константной области IgG1 человека)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIGEINP
TNGRNTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHNYWGQGTS
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKQVEPKSCDKTHTCP (SEQ
ID NO: 43)

[000150] Тяжелая цепь FAB (гуманизированный VH+часть константной области IgG1 человека)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
 TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTRAYHYWGQGT
 MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 (SEQ ID NO: 44)

[000151] Антитела против рецептора трансферрина, представленные в настоящем описании, могут находиться в любой из форм антител, включая, в качестве неограничивающих примеров, интактные (т.е. полноразмерные) антитела, их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела, биспецифические антитела или нанотела. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является scFv-Fab (например, scFv, слитым с частью константной области). В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, представленное в настоящем описании, является scFv, слитым с константной областью (например, константной областью IgG1 человека, приведенной в SEQ ID NO: 39).

в. Другие мышечно-специфические антитела

[000152] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающееся с гемоювелином, кавеолином-3, пептидом мышечной дистрофии Дюшенна, миозином IIb или CD63. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с миогенным белком-предшественником. Неограничивающие примеры миогенных белков-предшественников включают ABCG2, М-кадгерин/кадгерин-15, кавеолин-1, CD34, FoxK1, интегрин альфа 7, интегрин альфа 7 бета 1, MYF-5, MyoD, миогенин, NCAM-1/CD56, Pax3, Pax7 и Pax9. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с белком скелетных мышц. Неограничивающие примеры белков скелетных мышц включают альфа-саркогликан, бета-саркогликан, ингибиторы кальпаина, креатинкиназу MM/CKMM, eIF5A, енолазу 2/нейрон-специфическую енолазу, эпсилон-саркогликан, FABP3/H-FABP, GDF-8/миостатин, GDF-11/GDF-8, интегрин альфа 7, интегрин альфа 7 бета 1, интегрин бета 1/CD29, MCAM/CD146, MyoD, миогенин, ингибиторы киназы легких цепей миозина, NCAM-1/CD56 и тропонин I. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с белком гладких мышц. Неограничивающие примеры белков гладких мышц включают альфа-актин гладких мышц, VE-кадгерин, кальдесмон/CALD1, кальпонин 1, десмин, гистамин H2 R, мотилин R/GPR38, трансглеин/TAGLN и виментин. Однако следует понимать, что антитела против дополнительных мишеней входят в объем настоящего изобретения и списки примеров мишеней, представленные в настоящем описании, не предназначены для ограничения.

с. Признаки/изменения антител

[000153] В некоторых вариантах осуществления в последовательности антител (например, CDR или каркасные последовательности) можно встраивать консервативные мутации в положениях, в которых маловероятно, что остатки будут вовлечены во взаимодействие с антигеном-мишенью (например, рецептором трансферрина), например, что определяют на основе кристаллической структуры. В некоторых вариантах осуществления встраивают одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) в Fc-область мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека) и/или шарнирную область, при этом нумерацию осуществляют по системе Kabat (например, индексу EU по Kabat)), для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, связывание комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность.

[000154] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) встраивают в шарнирную область Fc-области (домена CH1) таким образом, что изменяют (например, повышают или снижают) количество остатков цистеина в шарнирной области, как описано, например, в патенте США № 5677425. Количество остатков цистеина в шарнирной области домена CH1 можно изменять, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей, или для изменения (например, повышения или снижения) стабильности антитела, или для облегчения конъюгации с линкером.

[000155] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций (например, замен аминокислот) встраивают в Fc-область мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании (например, в домен CH2 (остатки 231-340 IgG1 человека), и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG1 человека), и/или шарнирную область, при этом нумерацию осуществляют по системе Kabat (например, индексу EU по Kabat)), для повышения или снижения аффинности антитела к Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки. Специалисту в этой области известны мутации в Fc-области антитела, снижающие или повышающие аффинность антитела к Fc-рецептору, и способы встраивания таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент. Примеры мутаций в Fc-рецепторе антитела, которые можно вносить для изменения аффинности антитела к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186, патенте США № 6737056, и международных патентных публикациях №№ WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631, включенных в настоящее описание посредством ссылки.

[000156] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области- Fc-домена) для изменения (например, снижения или повышения) времени полужизни

антитела *in vivo*. См., например, международные патентные публикации №№ WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631 и патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745 для примеров мутаций, которые будут изменять (например, снижать или повышать) время полужизни антитела *in vivo*.

[000157] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для снижения времени полужизни антитела против рецептора трансферрина *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления одну, две или более мутаций аминокислот (т.е. замен, инсерций или делеций) встраивают в константный домен IgG или его FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно, Fc или фрагмент шарнирной области-Fc-домена) для повышения времени полужизни антитела *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитела могут иметь одну или более мутаций аминокислот (например, замен) во втором константном домене (CH2) (остатки 231-340 IgG1 человека) и/или третьем константном домене (CH3) (остатки 341-447 IgG1 человека), при этом нумерацию осуществляют по индексу EU по Kabat (Kabat E A et al., (1991) выше). В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 антитела, представленного в настоящем описании, содержит замену метионина (M) тирозином (Y) в положении 252, замену серина (S) треонином (T) в положении 254, и замену треонина (T) глутаминовой кислотой (E) в положении 256, пронумерованные с помощью индекса EU по Kabat. См. патент США № 7658921, включенный в настоящее описание посредством ссылки. Показано, что этот тип мутантного IgG, обозначаемый как "YTE-мутант", демонстрирует увеличенное в четыре раза время полужизни по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен IgG, содержащий одну, две, три или более замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, пронумерованных с помощью индекса EU по Kabat.

[000158] В некоторых вариантах осуществления одну, две или более замен аминокислот встраивают в константный домен Fc-области IgG для изменения эффекторных функций антитела против рецептора трансферрина. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может являться, например, Fc-рецептором или компонентом комплемента C1. Этот подход подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260. В некоторых вариантах осуществления делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или иных средств) константной области может снижать связывание Fc-рецептора циркулирующим антителом, таким образом, повышая локализацию в опухоли. Описание мутаций, приводящих к делеции или инактивации константного домена и, таким образом, повышающих локализацию в опухоли, см., например, в патентах США №№ 5585097 и 8591886. В некоторых вариантах осуществления одну или более замены аминокислот можно встраивать в Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, для удаления потенциальных участков

гликозилирования на Fc-области, которые могут приводить к снижению связывания Fc-рецептора (см., например, Shields R L et al., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604).

[000159] В некоторых вариантах осуществления одну или более аминокислот в константной области мышечно-специфического антитела, представленного в настоящем описании, можно заменять другим аминокислотным остатком таким образом, что антитело имеет измененное связывание C1q и/или сниженную или отсутствующую обусловленную комплементом цитотоксичность (CDC). Этот подход подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al). В некоторых вариантах осуществления один или более аминокислотных остатков в N-концевой области домена CH2 антитела, представленного в настоящем описании, изменяют, чтобы, таким образом, изменить способность антитела связываться с комплементом. Этот подход описан в международной публикации № WO 94/29351. В некоторых вариантах осуществления Fc-область антитела, представленного в настоящем описании, модифицируют для повышения способности антитела для опосредования антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела к рецептору Fcγ. Этот подход подробно описан в международной публикации № WO 00/42072.

[000160] В некоторых вариантах осуществления последовательности переменного домена тяжелой и/или легкой цепи антител, представленных в настоящем описании, можно использовать для получения, например, антител с пересаженными CDR, химерных, гуманизированных или составных антител человека или антигенсвязывающих фрагментов, как описано в другом месте в настоящем описании. Как будет понятно специалисту в этой области, любой вариант антитела, антитела с пересаженными CDR, химерные, гуманизированные или составные антитела, полученные из любых из антител, представленных в настоящем описании, можно использовать в композиции и способах, представленных в настоящем описании, и они будут сохранять способность специфически связываться с рецептором трансферрина, таким образом, что вариант антитела, антитело с пересаженными CDR, химерное, гуманизированное или композитное антитело имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более связывания с рецептором трансферрина относительно исходного антитела, из которого его получают.

[000161] В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в настоящем описании, содержат мутации, придающие антителам желаемые свойства. Например, во избежание потенциальных осложнений из-за обмена Fab-фрагментов, как известно, возникающих в случае нативных mAb IgG4, антитела, представленные в настоящем описании, могут содержать стабилизирующую мутацию "Adair" (Angal S., et al., " A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," Mol Immunol 30, 105-108; 1993), где серин 228 (нумерация EU; остаток 241 при нумерации по Kabat) преобразуют в пролин, что приводит к получению IgG1-подобной шарнирной последовательности. Таким образом, любые из антител могут включать стабилизирующую мутацию "Adair".

[000162] Как представлено в настоящем описании, антитела по изобретению, необязательно, могут содержать константные области или их части. Например, домен VL можно присоединять через его С-конец к константному домену легкой цепи, подобной С_κ или С_λ. Аналогично, домен VH или его часть можно присоединять ко всей тяжелой цепи или ее части из IgA, IgD, IgE, IgG, IgM и любого подкласса изотипа. Антитела могут включать подходящие константные области (см., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)). Таким образом, антитела в объеме настоящего изобретения могут включать домены VH и VL или их антигенсвязывающую часть в комбинации с любыми подходящими константными областями.

ii. Мышечно-специфические пептиды

[000163] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к мышечно-специфическим пептидам в качестве мышечно-специфических средств. Описаны короткие пептидные последовательности (например, пептидные последовательности длиной 5-20 аминокислот), связывающиеся с конкретными типами клеток. Например, клеточно-специфические пептиды описаны в Vines e., et al., A. "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery" *Biochim Biophys Acta* 2008, 1786: 126-38; Jarver P., et al., "In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery" *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 528-35; Samoylova T.I., et al., "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening" *Muscle Nerve* 1999; 22: 460-6; патенте США № 6329501, опубликованном 11 декабря 2001 года, названном "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE"; и Samoylov A.M., et al., " Recognition of cell-specific binding of phage display derived peptides using an acoustic wave sensor", *Biomol Eng* 2002; 18: 269-72; полное содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Конструируя пептиды для взаимодействия со специфическими антигенами поверхности клетки (например, рецепторами), можно достигать селективности в отношении желаемой ткани, например, мышечной. Проводятся исследования таргетинга скелетных мышц, и в них можно доставлять широкий спектр молекулярных нагрузок. Эти подходы могут иметь высокую селективность в отношении мышечной ткани без многих из практических недостатков крупного антитела или вирусной частицы. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является мышечно-специфическим пептидом, имеющим длину от 4 до 50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид имеет длину 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислот. Мышечно-специфические пептиды можно получать любым из нескольких способов, таких как фаговый дисплей.

[000164] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может связываться с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности, гиперэкспрессированным или относительно высоко экспрессированным в мышечных

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

[000165] Как указано выше, описаны примеры мышечно-специфических пептидов. Например, мышечно-специфические пептиды идентифицированы с использованием библиотеки фагового дисплея, экспонирующего поверхностные гептапептиды. В качестве одного из примеров, пептид, имеющий аминокислотную последовательность ASSLNIA (SEQ ID NO: 6), связывается с миотрубочками мыши C2C12 *in vitro* и с мышечной тканью мыши *in vivo*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство содержит аминокислотную последовательность ASSLNIA (SEQ ID NO: 6). Этот пептид демонстрирует улучшенную специфичность в случае связывания с сердечно-мышечной тканью и скелетно-мышечной тканью после внутривенной инъекции мышам при сниженном связывании с печенью, почками и головным мозгом. Дополнительные мышечно-специфические пептиды идентифицированы с использованием фагового дисплея. Например, пептид из 12 аминокислот идентифицирован посредством библиотеки фагового дисплея для таргетинга мышц в контексте лечения DMD. Смотри, Yoshida D., et al., "Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats", Int J Pharm 2002; 231: 177-84; полное содержание которой включено, таким образом, в настоящее описание посредством ссылки. В этом случае идентифицирован пептид из 12 аминокислот, имеющий последовательность SKTFNTHPQSTP (SEQ ID NO: 7), и этот мышечно-специфический пептид демонстрировал улучшенное связывание с клетками C2C12 относительно пептида ASSLNIA (SEQ ID NO: 6).

[000166] Дополнительный способ идентификации пептидов, селективных в отношении мышц (например, скелетных мышц) по сравнению с другими типами клеток включает селекцию *in vitro*, описанную в Ghosh D., et al., "Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting", J Virol 2005; 79: 13667-72; полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки. С помощью предварительной инкубации библиотеки

фагового дисплея случайных 12-мерных пептидов со смесью немышечных типов клеток, осуществляли отрицательную селекцию неспецифических связывающих клетки средства. После раундов селекции пептид из 12 аминокислот TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 8) встречался наиболее часто. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство содержит аминокислотную последовательность TARGENKEEELI (SEQ ID NO: 8).

[000167] Мышечно-специфическое средство может являться аминокислота-содержащей молекулой или пептидом. Мышечно-специфический пептид может соответствовать последовательности белка, предпочтительно связывающейся с белковым рецептором, обнаруживаемым в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид содержит высокую долю гидрофобных аминокислот, например, валина, таким образом, что пептид предпочтительно нацелен на мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид ранее не охарактеризован или не описан. Эти пептиды можно конструировать, продуцировать, синтезировать и/или дериватизировать любым из нескольких способов, например, с использованием библиотек фагового дисплея пептидов, пептидных библиотек "одна частица-одно соединение" или комбинаторных библиотек синтетических пептидов с позиционным сканированием. Примеры способов описаны в этой области и включены посредством ссылки (Gray, B.P. and Brown, K.C. "Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides" *Chem Rev.* 2014, 114:2, 1020-1081.; Samoylova, T.I. и Smith, B.F. "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening", *Muscle Nerve*, 1999, 22:4, 460-6). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид описан ранее (см., например, Writer M.J. et al. "Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic vectors incorporating novel targeting peptides selected by phage display", *J. Drug Targeting*. 2004;12:185; Cai, D. "BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart", *Physiol Genomics*. 2006, 24:3, 191-7.; Zhang, L. "Molecular profiling of heart endothelial cells", *Circulation*, 2005, 112:11, 1601-11.; McGuire, M.J. et al. "In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo", *J Mol Biol.* 2004, 342:1, 171-82). Примеры мышечно-специфических пептидов содержат аминокислотную последовательность из следующей группы: CQAQGQLVC (SEQ ID NO: 9), CSERSMNFC (SEQ ID NO: 10), CPKTRRVPC (SEQ ID NO: 11), WLSEAGPVVTVRALRGTSW (SEQ ID NO: 12), ASSLNIA (SEQ ID NO: 6), CMQHSMRVC (SEQ ID NO: 13) и DDTRHWG (SEQ ID NO: 14). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может содержать приблизительно 2-25 аминокислот, приблизительно 2-20 аминокислот, приблизительно 2-15 аминокислот, приблизительно 2-10 аминокислот или приблизительно 2-5 аминокислот. Мышечно-специфические пептиды могут содержать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные аланина, линейные аминокислоты, N-метил-аминокислоты и другие аминокислоты,

известные в этой области. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может являться линейным; в других вариантах осуществления мышечно-специфический пептид может являться циклическим, например, бициклическим (см., например, Silvana, M.G. et al. *Mol. Therapy*, 2018, 26:1, 132-147).

iii. Лиганды мышечно-специфических рецепторов

[000168] Мышечно-специфическое средство может являться лигандом, например, лигандом, связывающимся с рецепторным белком. Мышечно-специфический лиганд может являться белком, например, трансферрином, связывающимся с интернализующимся рецептором клеточной поверхности, экспрессируемым мышечной клеткой. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является трансферрином или его производным, связывающимся с рецептором трансферрина. Мышечно-специфический лиганд альтернативно может являться низкомолекулярным соединением, например, липофильным низкомолекулярным соединением, предпочтительно нацеленным на мышечные клетки относительно других типов клеток. Примеры липофильных низкомолекулярных соединений, которые могут быть нацелены на мышечные клетки, включают соединения, содержащие холестерин, холестерил, стеариновую кислоту, пальмитиновую кислоту, олеиновую кислоту, олеил, линоленовую кислоту, линолевую кислоту, миристиновую кислоту, стерины, дигидротестостерон, производные тестостерона, глицерин, алкиловые цепи, тритильные группы и алкоксикислоты.

iv. Мышечно-специфические аптамеры

[000169] Мышечно-специфическое средство может являться аптамером, например, РНК-аптамером, предпочтительно нацеленным на мышечные клетки относительно других типов клеток. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический аптамер ранее не охарактеризован или не описан. Эти аптамеры можно конструировать, продуцировать, синтезировать и/или дериватизировать любым из нескольких способов, например, посредством систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением. Примеры способов описаны в этой области и включены посредством ссылки (Yan, A.C. and Levy, M. "Aptamers and aptamer targeted delivery", *RNA biology*, 2009, 6:3, 316-20.; Germer, K. et al. "RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications", *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2013; 4: 27-40). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический аптамер описан ранее (см., например, Phillippou, S. et al. "Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers", *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018, 10:199-214.; Thiel, W.H. et al. "Smooth Muscle Cell-targeted RNA Aptamer Inhibits Neointimal Formation", *Mol Ther.* 2016, 24:4, 779-87). Примеры мышечно-специфических аптамеров включают РНК-аптамер A01B и РНК-аптамер 14. В некоторых вариантах осуществления аптамер является аптамером на основе нуклеиновой кислоты, олигонуклеотидным аптамером или пептидным аптамером. В некоторых вариантах осуществления аптамер может иметь размер приблизительно 5-15 кДа, приблизительно 5-

10 кДа, приблизительно 10-15 кДа, приблизительно 1-5 кДа, приблизительно 1-3 кДа или менее.

v. Другие мышечно-специфические средства

[000170] Одной из стратегий таргетинга мышечных клеток (например, скелетно-мышечных клеток) является использование субстрата мышечного белка-транспортера, такого как белок-транспортер, экспрессирующийся на сарколемме. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом инфлюкс-транспортера, специфического для мышечной ткани. В некоторых вариантах осуществления инфлюкс-транспортер является специфическим для скелетно-мышечной ткани. На скелетно-мышечной сарколемме экспрессируются два основных класса транспортеров, (1) суперсемейство аденозинтрифосфат (АТФ)-связывающей кассеты (ABC), облегчающее эффлюкс из скелетно-мышечной ткани, и (2) суперсемейство переносчиков растворенных веществ (SLC), которые могут облегчать инфлюкс субстратов в скелетную мышцу. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом, связывающимся с суперсемейством транспортеров ABC или суперсемейством транспортеров SLC. В некоторых вариантах осуществления субстрат, связывающийся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC, является природным субстратом. В некоторых вариантах осуществления субстрат, связывающийся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC, является неприродным субстратом, например, синтетическим производным, связывающимся с суперсемейством транспортеров ABC или SLC.

[000171] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом суперсемейства транспортеров SLC. Транспортеры SLC являются равновесными или используют градиент протонов или ионов натрия, создаваемый в мембране для регуляции транспорта субстратов. Неограничивающие примеры транспортеров SLC, имеющих высокую экспрессию в скелетных мышцах, включают транспортер SATT (ASCT1; SLC1A4), транспортер GLUT4 (SLC2A4), транспортер GLUT7 (GLUT7; SLC2A7), транспортер ATRC2 (CAT-2; SLC7A2), транспортер LAT3 (KIAA0245; SLC7A6), транспортер PHT1 (PTR4; SLC15A4), транспортер OATP-J (OATP5A1; SLC21A15), транспортер OCT3 (EMT; SLC22A3), транспортер OCTN2 (FLJ46769; SLC22A5), транспортер ENT (ENT1; SLC29A1 и ENT2; SLC29A2), транспортер PAT2 (SLC36A2) и транспортер SAT2 (KIAA1382; SLC38A2). Эти транспортеры могут облегчать инфлюкс субстратов в скелетную мышцу, что дает возможность таргетинга мышц.

[000172] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом равновесного транспортера нуклеозидов 2 (ENT2). По сравнению с другими транспортерами, ENT2 имеет один из наиболее высоких уровней экспрессии мРНК в скелетных мышцах. Хотя ENT2 человека (hENT2) экспрессируется в большинстве органов тела, таких как головной мозг, сердце, плацента, тимус, поджелудочная железа, предстательная железа и почки, он особенно высок в скелетных мышцах. ENT2 человека

облегчает захват его субстратов в зависимости от их градиента концентрации. ENT2 играет роль в поддержании гомеостаза нуклеозидов посредством транспорта широкого спектра пуриновых и пиримидиновых нуклеиновых оснований. Транспортёр hENT2 имеет низкую аффинность для всех нуклеозидов (аденозина, гуанозина, уридина, тимидина и цитидина), за исключением инозина. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом ENT2. Неограничивающие примеры субстратов ENT2 включают инозин, 2',3'-дидезоксиинозин и клофарабин. В некоторых вариантах осуществления любые из мышечно-специфических средств, представленных в настоящем описании, связаны с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидной нагрузкой). В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство нековалентно связано с молекулярной нагрузкой.

[000173] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является субстратом транспортера органического катиона/карнитина (OCTN2), являющегося натрий-зависимым, высокоаффинным транспортером карнитина. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является карнитином, милдронатом, ацетилкарнитином или любым их производным, связывающимся с OCTN2. В некоторых вариантах осуществления карнитин, милдронат, ацетилкарнитин или их производное ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидной нагрузкой).

[000174] Мышечно-специфическое средство может являться белком, существующим в по меньшей мере одной растворимой форме, нацеленной на мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический белок может являться гемоювелином (также известным как отталкивающая молекула наведения С или белок гемохроматоза типа 2), белком, вовлеченным в перегрузку железом и гомеостаз. В некоторых вариантах осуществления гемоювелин может являться полноразмерным белком, или фрагментом, или мутантом с по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении функционального белка гемоювелина. В некоторых вариантах осуществления мутант гемоювелина может являться растворимым фрагментом, в нем может отсутствовать N-концевая сигнальная последовательность и/или С-концевой якорный домен. В некоторых вариантах осуществления гемоювелин может быть аннотирован под регистрационными номерами GenBank RefSeq NM_001316767.1, NM_145277.4, NM_202004.3, NM_213652.3 или NM_213653.3. Следует понимать, что гемоювелин может принадлежать человеку, не являющемуся человеком примату или грызуну.

В. Молекулярная нагрузка

[000175] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к молекулярной нагрузке, например, для модуляции биологического исхода, например, транскрипции

последовательности ДНК, экспрессии белка или активности белка. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка связана или иначе ассоциирована с мышечно-специфическим средством. В некоторых вариантах осуществления такая молекулярная нагрузка может подвергаться таргетингу к мышечной клетке, например, посредством специфического связывания с нуклеиновой кислотой или белком в мышечной клетке после доставки в мышечную клетку с помощью ассоциированного мышечно-специфического средства. Следует понимать, что в изобретении можно использовать различные типы мышечно-специфических средств. Например, молекулярная нагрузка может содержать или состоять из олигонуклеотида (например, антисмыслового олигонуклеотида), пептида (например, пептида, связывающегося с нуклеиновой кислотой, или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке), белка (например, белка, связывающегося с нуклеиновой кислотой, или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке) или низкомолекулярного соединения (например, низкомолекулярного соединения, модулирующего функцию нуклеиновой кислоты или белка, ассоциированного с заболеванием, в мышечной клетке). В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим цепь, имеющую область комплементарности аллелю DMPK, содержащему экспансию ассоциированного с заболеванием повтора. Примеры молекулярной нагрузки подробно представлены в настоящем описании, однако, следует понимать, что примеры молекулярной нагрузки, представленные в настоящем описании, не предназначены для ограничения.

i. Олигонуклеотиды

[000176] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любой подходящий олигонуклеотид, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать так, чтобы вызывать деградацию мРНК (например, олигонуклеотид может являться гэпмером, миРНК, рибозимом или аптамером, вызывающим деградацию). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать для блокирования трансляции мРНК (например, олигонуклеотид может являться миксмером, миРНК или аптамером, блокирующим трансляцию). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно конструировать так, чтобы он вызывал деградацию и блокировал трансляцию мРНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться гидовой нуклеиновой кислотой (например, гидовой РНК) для направления активности фермента (например, фермента редактирования генома). Другие примеры олигонуклеотидов представлены в настоящем описании. Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды в одном формате (например, антисмысловые олигонуклеотиды) можно соответствующим образом адаптировать под другой формат (например, олигонуклеотиды миРНК) посредством встраивания функциональных последовательностей (например, последовательностей антисмысловой цепи) из одного формата в другой формат.

DMPK/DM1

[000177] Олигонуклеотиды, которые можно использовать для таргетинга DMPK приведены в публикации патентной заявки США № 2010/0016215 A1, опубликованной 1 января 2010 года, названной Compound And Method For Treating Myotonic Dystrophy; публикации патентной заявки США № 2013/0237585 A1, опубликованной 19 июля 2010 года, Modulation Of Dystrophia Myotonica-Protein Kinase (DMPK) Expression; публикации патентной заявки США № 2015/0064181 A1, опубликованной 5 марта 2015 года, названной "Antisense Conjugates For Decreasing Expression Of Dmpk"; публикации патентной заявки США № 2015/0238627 A1, опубликованной 27 августа 2015 года, названной "Peptide-Linked Morpholino Antisense Oligonucleotides For Treatment Of Myotonic Dystrophy"; и публикации патентной заявки США № 2016/0304877 A1, опубликованной 20 октября 2016 года, названной "Compounds And Methods For Modulation Of Dystrophia Myotonica-Protein Kinase (Dmpk) Expression", содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000178] Примеры олигонуклеотидов для стимуляции редактирования гена DMPK включают описанные в публикации патентной заявки США № 2017/0088819 A1, опубликованной 3 марта 2017 года, названной "Genetic Correction Of Myotonic Dystrophy Type 1"; и публикации международной патентной заявки № WO18002812 A1, опубликованной 1 апреля 2018 года, названной "Materials And Methods For Treatment Of Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) And Other Related Disorders", содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000179] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности следующей приведенной последовательности, являющейся примером последовательности гена DMPK человека (Gene ID 1760; NM_001081560.2):

```

AGGGGGGCTGGACCAAGGGGTGGGGAGAAGGGGAGGAGGCCTCGGCCGGCC
GCAGAGAGAAGTGGCCAGAGAGGCCAGGGGACAGCCAGGGACAGGCAGACATGC
AGCCAGGGCTCCAGGGCCTGGACAGGGGCTGCCAGGCCCTGTGACAGGAGGACCCC
GAGCCCCCGGCCCGGGAGGGGCCATGGTGTCTGCCTGTCCAACATGTCAGCCGAGG
TGCGGCTGAGGCGGCTCCAGCAGCTGGTGTGGACCCGGGCTTCCTGGGGCTGGAG
CCCCTGCTCGACCTTCTCCTGGGCGTCCACCAGGAGCTGGGCGCCTCCGAACCTGGCC
CAGGACAAGTACGTGGCCGACTTCTTGCAGTGGGCGGAGCCCATCGTGGTGAGGCT
TAAGGAGGTCCGACTGCAGAGGGACGACTTCGAGATTCTGAAGGTGATCGGACGCG
GGGCGTTCAGCGAGGTAGCGGTAGTGAAGATGAAGCAGACGGGCCAGGTGTATGCC
ATGAAGATCATGAACAAGTGGGACATGCTGAAGAGGGGCGAGGTGTCGTGCTTCCG
TGAGGAGAGGGACGTGTTGGTGAATGGGGACCGGCGGTGGATCACGCAGCTGCACT
TCGCCTTCCAGGATGAGAACTACCTGTACCTGGTCATGGAGTATTACGTGGGCGGGG
ACCTGCTGACACTGCTGAGCAAGTTTGGGGAGCGGATTCCGGCCGAGATGGCGCGC
TTCTACCTGGCGGAGATTGTCATGGCCATAGACTCGGTGCACCGGCTTGGCTACGTG
CACAGGGACATCAAACCCGACAACATCCTGCTGGACCGCTGTGGCCACATCCGCCT

```

GGCCGACTTCGGCTCTTGCCTCAAGCTGCGGGCAGATGGAACGGTGCGGTCGCTGGT
 GGCTGTGGGCACCCAGACTACCTGTCCCCGAGATCCTGCAGGCTGTGGGCGGTG
 GGCTGGGACAGGCAGCTACGGGCCGAGTGTGACTGGTGGGCGCTGGGTGTATTC
 GCCTATGAAATGTTCTATGGGCAGACGCCCTTCTACGCGGATTCCACGGCGGAGACC
 TATGGCAAGATCGTCCACTACAAGGAGCACCTCTCTGCGCTGGTGGACGAAGG
 GGTCCCTGAGGAGGCTCGAGACTTCATTCAGCGGTTGCTGTGTCCCCCGGAGACACG
 GCTGGGCCGGGTGGAGCAGGCAGCTCCGGACACATCCCTTCTTCTTTGGCCTCGA
 CTGGGATGGTCTCCGGGACAGCGTGCCCCCTTTACACCGGATTTTGAAGGTGCCAC
 CGACACATGCAACTTCGACTTGGTGGAGGACGGGCTCACTGCCATGGAGACACTGT
 CGGACATTCGGGAAGGTGCGCCGCTAGGGGTCCACCTGCCTTTTGTGGGCTACTCCT
 ACTCCTGCATGGCCCTCAGGGACAGTGAGGTCCCAGGCCCCACACCCATGGAAGTGT
 GAGGCCGAGCAGCTGCTTGAGCCACACGTGCAAGCGCCAGCCTGGAGCCCTCGGT
 GTCCCCACAGGATGAAACAGCTGAAGTGGCAGTTCAGCGGCTGTCCCTGCGGCAG
 AGGCTGAGGCCGAGGTGACGCTGCGGGAGCTCCAGGAAGCCCTGGAGGAGGAGGT
 GCTACCCGGCAGAGCCTGAGCCGGGAGATGGAGGCCATCCGCACGGACAACCAGA
 ACTTCGCCAGTCAACTACGCGAGGCAGAGGCTCGGAACCGGGACCTAGAGGCACAC
 GTCCGGCAGTTGCAGGAGCGGATGGAGTTGCTGCAGGCAGAGGGAGCCACAGCTGT
 CACGGGGGTCCCCAGTCCCCGGGCCACGGATCCACCTTCCATCTAGATGGCCCCC
 GGCCGTGGCTGTGGGCCAGTGCCCGCTGGTGGGGCCAGGCCCATGCACCGCCGCC
 ACCTGCTGCTCCCTGCCAGGGTCCCTAGGCCTGGCCTATCGGAGGCGCTTTCCCTGC
 TCCTGTTCCCGTGTGTTCTGTCTCGTGCCGCCGCCCTGGGCTGCATTGGGTTGGTGGC
 CCACGCCGGCCAACTCACCGCAGTCTGGCGCCGCCAGGAGCCGCCCGCGCTCCCT
 GAACCCTAGAAGTGTCTTCGACTCCGGGGCCCCGTTGGAAGACTGAGTGCCCGGGG
 CACGGCACAGAAGCCGCGCCCACCGCCTGCCAGTTCACAACCGCTCCGAGCGTGGG
 TCTCCGCCAGCTCCAGTCCTGTGATCCGGGCCCGCCCCCTAGCGGCCGGGGAGGGA
 GGGGCCGGGTCCGCGGCCGGCGAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCGGGAATG
 CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGC
 TGGGGGGATCACAGACCATTTCTTTCTTTTCGGCCAGGCTGAGGCCCTGACGTGGATG
 GGCAAAGTGCAGGCCTGGGAAGGCAGCAAGCCGGGCCGTCGCTGTTCCATCCTCCA
 CGCACCCCCACCTATCGTTGGTTCGCAAAGTGCAAAGCTTTCTTGTGCATGACGCCC
 TGCTCTGGGGAGCGTCTGGCGCGATCTCTGCCTGCTTACTCGGGAAATTTGCTTTTGC
 CAAACCCGCTTTTTTCGGGGATCCCGCGCCCCCTCCTCACTTGCGCTGCTCTCGGAG
 CCCCAGCCGGCTCCGCCCCTTCGGCGGTTTGGATATTTATTGACCTCGTCCTCCGAC
 TCGCTGACAGGCTACAGGACCCCCAACAACCCAATCCACGTTTTTGGATGCACTGAG
 ACCCCGACATTCCTCGGTATTTATTGTCTGTCCCCACCTAGGACCCCCACCCCCGACC
 CTCGCGAATAAAAGGCCCTCCATCTGCCCAAAGCTCTGGA(SEQ ID NO: 15).

[000180] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности следующей приведенной последовательности, являющейся примером последовательности гена DMPK мышцы (Gene ID 13400; NM_001190490.1).

GAAGTGGCCAGAGAGACCCCAAGGGATAGTCAGGGACGGGCAGACATGCAGC
TAGGGTTCTGGGGCCTGGACAGGGGCAGCCAGGCCCTGTGACGGGAAGACCCCGAG
CTCCGGCCCCGGGGAGGGGCCATGGTGTTCCTGCCCAACATGTCAGCCGAAGTGCG
GCTGAGGCAGCTCCAGCAGCTGGTGCTGGACCCAGGCTTCCTGGGACTGGAGCCCC
TGCTCGACCTTCTCCTGGGCGTCCACCAGGAGCTGGGTGCCTCTCACCTAGCCCAGG
ACAAGTATGTGGCCGACTTCTTGCAGTGGGTGGAGCCCATTGCAGCAAGGCTTAAG
GAGGTCCGACTGCAGAGGGATGATTTTGAAGTTTGAAGGTGATCGGGCGTGGGGC
GTTTACGCGAGGTAGCGGTGGTGAAGATGAAACAGACGGGCCAAGTGTATGCCATGA
AGATTATGAATAAGTGGGACATGCTGAAGAGAGGGCGAGGTGTCGTGCTTCCGGGAA
GAAAGGGATGTATTAGTGAAGGGGACCGGCGCTGGATCACACAGCTGCACTTTGC
CTTCCAGGATGAGAACTACCTGTACCTGGTTCATGGAATACTACGTGGGCGGGGACCT
GCTAACGCTGCTGAGCAAGTTTGGGGAGCGGATCCCCGCCGAGATGGCTCGCTTCTA
CCTGGCCGAGATTGTCATGGCCATAGACTCCGTGCACCGGCTGGGCTACGTGCACAG
GGACATCAAACCAGATAACATTCTGCTGGACCGATGTGGGCACATTCGCCTGGCAG
ACTTCGGCTCCTGCCTCAAACCTGCAGCCTGATGGAATGGTGAAGTTCGCTGGTGGCTG
TGGGCACCCCGGACTACCTGTCTCCTGAGATTCTGCAGGCCGTTGGTGGAGGGCCTG
GGGCAGGCAGCTACGGGCCAGAGTGTGACTGGTGGGCACTGGGCGTGTTCGCCTAT
GAGATGTTCTATGGGCAGACCCCTTCTACGCGGACTCCACAGCCGAGACATATGCC
AAGATTGTGCACTACAGGGAACACTTGTGCTGCCGCTGGCAGACACAGTTGTCCCC
GAGGAAGCTCAGGACCTCATTTCGTGGGCTGCTGTGTCCTGCTGAGATAAGGCTAGGT
CGAGGTGGGGCAGACTTCGAGGGTGCACGGACACATGCAATTTTCGATGTGGTGGGA
GGACCGGCTCACTGCCATGGTGAAGCGGGGGCGGGGAGACGCTGTCAGACATGCAGG
AAGACATGCCCTTGGGGTGCGCCTGCCCTTCGTGGGCTACTCCTACTGCTGCATGG
CCTTCAGAGACAATCAGGTCCCGGACCCACCCCTATGGAAGTACAGGGCCCTGCAG
TTGCTGTGTCAGACTTGCAAGGGCTTGACTTGCAGCCCCCAGTGTCCCCACCGGAT
CAAGTGGCTGAAGAGGCTGACCTAGTGGCTGTCCCTGCCCTGTGGCTGAGGCAGA
GACCACGGTAACGCTGCAGCAGCTCCAGGAAGCCCTGGAAGAAGAGGTTCTCACCC
GGCAGAGCCTGAGCCGCGAGCTGGAGGCCATCCGGACCGCCAACCAGAACTTCTCC
AGCCAACACTACAGGAGGCCGAGGTCCGAAACCGAGACCTGGAGGGCGCATGTTCCGGCA
GCTACAGGAACGGATGGAGATGCTGCAGGCCCCAGGAGCCGCAGCCATCACGGGG
GTCCCCAGTCCCCGGGCCACGGATCCACCTTCCCATCTAGATGGCCCCCGGCCGTG
GCTGTGGGCCAGTGCCCGCTGGTGGGGCCAGGCCCATGCACCGCCGTCACCTGCTG
CTCCCTGCCAGGATCCCTAGGCCTGGCCTATCCGAGGGCGCGTTGCCCTGCTCCTGTTC
GCCGCTGCTCTGGCTGCTGCCGCCACACTGGGCTGCACTGGGTGGTGGCCTATAACC
GGCGGTCTCACCCAGTCTGGTGTTCGCCGGGAGCCACCTTCGCCCCCTGAACCCTA
AGACTCCAAGCCATCTTTCATTTAGGCCTCCTAGGAAGGTTCGAGCGACCAGGGAGC
GACCCAAAGCGTCTCTGTGCCATCGCGCCCCCCCCCCCCCCCCACCGCTCCGCTCC
ACACTTCTGTGAGCCTGGGTCCCCACCCAGCTCCGCTCCTGTGATCCAGGCCTGCCA
CCTGGCGGCCGGGGAGGGAGGAACAGGGCTCGTGCCAGCACCCCTGGTTCCTGCA
GAGCTGGTAGCCACCGCTGCTGCAGCAGCTGGGCATTCGCCGACCTTGCTTTACTCA

GCCCCGACGTGGATGGGCAAACCTGCTCAGCTCATCCGATTTCACTTTTTCACTCTCCC
 AGCCATCAGTTACAAGCCATAAGCATGAGCCCCCTATTTCCAGGGACATCCCATTCC
 CATAGTGATGGATCAGCAAGACCTCTGCCAGCACACACGGAGTCTTTGGCTTCGGAC
 AGCCTCACTCCTGGGGGTTGCTGCAACTCCTTCCCCGTGTACACGTCTGCACTCTAA
 CAACGGAGCCACAGCTGCACTCCCCCCTCCCCCAAAGCAGTGTGGGTATTTATTGAT
 CTTGTTATCTGACTCACTGACAGACTCCGGGACCCACGTTTTAGATGCATTGAGACT
 CGACATTCCTCGGTATTTATTGTCTGTCCCCACCTACGACCTCCACTCCCGACCCTTG
 CGAATAAAATACTTCTGGTCTGCCCTAAA(SEQ ID NO: 16).

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь область комплементарности последовательностям гена DMPK многих биологических видов, например, человека, мыши и неявляющихся человеком видов.

[000181] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности мутантной форме DMPK, например, мутантной форме, описанной в Botta A. et al. "The CTG repeat expansion size correlates with the splicing defects observed in muscles from myotonic dystrophy type 1 patients", *J Med Genet.* 2008 Oct;45(10):639-46 и Machuca-Tzili L. et al. "Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review", *Muscle Nerve.* 2005 Jul;32(1):1-18; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000182] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть нацелен на lncRNA или mRNA, например, для деградации. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть нацелен, например, для деградации, на нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, участвующий в пути репарации неправильно спаренных оснований, например, MSH2, MutLalpha, MutSbeta, MutLalpha. Неограничивающие примеры белков, участвующих в путях репарации неправильно спаренных оснований, в случае которых мРНК, кодирующие такие белки, можно подвергать таргетингу с помощью олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, описаны в Iyer, R.R. et al., "DNA triplet repeat expansion and mismatch repair", *Annu Rev Biochem.* 2015;84:199-226.; и Schmidt M.H. and Pearson C.E., "Disease-associated repeat instability and mismatch repair" *DNA Repair (Amst).* 2016 Feb;38:117-26.

[000183] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, является антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на DMPK. В некоторых вариантах осуществления нацеленный олигонуклеотид является любым из антисмысловых олигонуклеотидов (например, гэтмером), нацеленным на DMPK, как описано в публикации патентной заявки США № 2016/0304877 A1, опубликованной 20 октября 2016 года, названной "Compounds And Methods For Modulation Of Dystrophia Myotonica-Protein Kinase (DMPK) Expression", включенной в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид нацелен на область последовательности гена DMPK, приведенной под регистрационным номером GenBank NM_001081560.2 (SEQ ID NO: 15) или регистрационным номером GenBank NG_009784.1.

[000184] В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, содержащую область, комплементарную целевой области, составляющей по меньшей мере 10 непрерывных нуклеотидов (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 14, по меньшей мере 16 или более непрерывных нуклеотидов) в SEQ ID NO: 15.

[000185] В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид содержит гэпмерный мотив. Термин "гэпмер" означает химерное антисмысловое соединение, в котором внутренняя область, содержащая множество нуклеотидов, поддерживающая расщепление РНКазой H, расположена между внешними областями, содержащими один или более нуклеотиды, где нуклеотиды, составляющие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеотида или нуклеотидов, составляющих внешние области. Внутреннюю область можно обозначать как "сегмент пропуска", а внешние области можно обозначать как "фланкирующие сегменты". В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеотидов и/или одну или более модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидная связь является фосфотиоатной связью. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит полный фосфотиоатный остов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является ДНК-гэпмером с сЕТ-концами (например, 3-10-3; сЕТ-ДНК-сЕТ). В некоторых вариантах осуществления DMPK-нацеленный олигонуклеотид содержит один или более 6'-(S)-CH₃ бициклических нуклеотидов, один или более β-D-2'-дезоксирибонуклеотидов и/или один или более 5-метилцитозиновых нуклеотидов.

а. Размер/последовательность олигонуклеотида

[000186] Олигонуклеотиды могут иметь разную длину, например, в зависимости от формата. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину от 8 до 50 нуклеотидов, от 8 до 40 нуклеотидов, от 8 до 30 нуклеотидов, от 10 до 15 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов, от 15 до 25 нуклеотидов, от 21 до 23 нуклеотидов и т.д.

[000187] В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность нуклеиновой кислоты олигонуклеотида для целей по настоящему изобретению может специфически гибридизоваться или является специфической для целевой нуклеиновой кислоты, когда связывание последовательности с молекулой-мишенью (например, мРНК) препятствует нормальной функции мишени (например, мРНК), вызывая потерю активности (например, ингибирование трансляции) или экспрессии (например, деградацию мРНК-мишени), и существует достаточная степень комплементарности во избежание неспецифического связывания последовательности с нецелевыми последовательностями в условиях, в которых избегание неспецифического связывания является желательным, например, в физиологических условиях в случае

анализа *in vivo* или терапевтического лечения, и в случае анализов *in vitro* в условиях, в которых анализы осуществляют в подходящих условиях строгости. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% комплементарным последовательным нуклеотидам целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления комплементарная нуклеотидная последовательность может не являться на 100% комплементарной последовательности своей мишени, чтобы иметь возможность специфически гибридизоваться или являться специфической целевой нуклеиновой кислоты.

[000188] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит область комплементарности целевой нуклеиновой кислоте, имеющую длину в диапазоне от 8 до 15, от 8 до 30, от 8 до 40, или от 10 до 50, или от 5 до 50, или от 5 до 40 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида целевой нуклеиновой кислоте имеет длину 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности является комплементарной по меньшей мере 8 последовательным нуклеотидам целевой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать 1, 2 или 3 неправильно спаренных оснований по сравнению с частью последовательных нуклеотидов целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать до 3 неправильно спаренных оснований на 15 оснований или до 2 неправильно спаренных оснований на 10 оснований.

[000189] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов из последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 45-280. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 45-280. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 97% идентичности последовательности в отношении по меньшей мере 12 или по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 45-280.

[000190] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит последовательность, нацеленную на последовательность DMPK, содержащую любую из SEQ ID NO: 281-516. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов (например, последовательных нуклеотидов), комплементарных последовательности DMPK, содержащей любую из SEQ ID NO: 281-516. В некоторых вариантах осуществления

олигонуклеотид содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 97% комплементарности в отношении по меньшей мере 12 или по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 281-516.

в. Модификации олигонуклеотидов

[000191] Олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, могут являться модифицированными, например, содержать модифицированный сахар, модифицированную межнуклеозидную связь, модифицированный нуклеотид и/или их комбинации. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут проявлять одно или более из следующих свойств: не опосредуют альтернативный сплайсинг; не являются иммуностимуляторными; являются резистентными к нуклеазам; имеют улучшенный клеточный захват по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами; не являются токсичными для клеток или млекопитающих; имеют улучшенный эндосомальный выход внутрь клетки; минимизируют стимуляцию TLR или избегают рецепторов распознавания паттернов. Любые из модифицированных химических составов или форматов олигонуклеотидов, представленных в настоящем описании, можно комбинировать друг с другом. Например, в один олигонуклеотид можно включать один, два, три, четыре, пять или более различных типов модификаций.

[000192] В некоторых вариантах осуществления можно использовать некоторые модификации нуклеотидов, которые делают олигонуклеотид, в который их вносят, более резистентными к расщеплению нуклеазами, чем нативные молекулы олигодезоксинуклеотидов или олигорибонуклеотидов; эти модифицированные олигонуклеотиды остаются интактными в течение большего периода времени, чем немодифицированные олигонуклеотиды. Конкретные примеры модифицированных олигонуклеотидов включают олигонуклеотиды, содержащие модифицированные остовы, например, модифицированные межнуклеозидные связи, такие как фосфотиоаты, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные связи между сахарами или короткоцепочечные гетероатомные или гетероциклические связи между сахарами. Таким образом, олигонуклеотиды по изобретению можно стабилизировать против нуклеолитической деградации, например, посредством включения модификации, например, модификации нуклеотида.

[000193] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь длину до 50 или до 100 нуклеотидов, где от 2 до 10, от 2 до 15, от 2 до 16, от 2 до 17, от 2 до 18, от 2 до 19, от 2 до 20, от 2 до 25, от 2 до 30, от 2 до 40, от 2 до 45 или более нуклеотидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами. Олигонуклеотид может иметь длину от 8 до 30 нуклеотидов, где от 2 до 10, от 2 до 15, от 2 до 16, от 2 до 17, от 2 до 18, от 2 до 19, от 2 до 20, от 2 до 25, от 2 до 30 нуклеотидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами. Олигонуклеотид может иметь длину от 8 до 15 нуклеотидов, где от 2 до 4, от 2 до 5, от 2 до 6, от 2 до 7, от 2 до 8, от 2 до 9, от 2 до 10, от 2 до 11, от 2 до 12, от 2 до 13, от 2 до 14 нуклеотидов олигонуклеотида являются модифицированными нуклеотидами. Необязательно,

олигонуклеотиды могут содержать все нуклеотиды в модифицированном виде, за исключением 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Модификации олигонуклеотидов представлены в настоящем описании.

с. Модифицированные нуклеотиды

[000194] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает 2'-модифицированный нуклеотид, например, нуклеотид с 2'-дезоксигруппой, 2'-дезокси-2'-фтором, 2'-О-метильной группой, 2'-О-метоксиэтильной группой (2'-О-МОЕ), 2'-О-аминопропильной группой (2'-О-АР), 2'-О-диметиламиноэтильной группой (2'-О-DMAOE), 2'-О-диметиламинопропильной группой (2'-О-DMAP), 2'-О-диметиламиноэтилоксиэтильной группой (2'-О-DMAEOE), или 2'-О--N-метилацетидамогруппой (2'-О--NMA).

[000195] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может включать по меньшей мере один 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и в некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды включают 2'-О-метильную модификацию. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит модифицированные нуклеотиды, в которых рибозное кольцо содержит мостик, соединяющий два атома в кольце, например, соединяющий атом 2'-О с атомом 4'-С. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды являются "замкнутыми", например, содержат модифицированные нуклеотиды, в которых рибозное кольцо является "замкнутым" с помощью метиленового мостика, соединяющего атом 2'-О и атом 4'-С. Примеры ЗНК описаны в публикации международной патентной заявки № WO2008/043753, опубликованной 17 апреля 2008 года и названной "RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9", содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000196] Другие модификации, которые можно использовать в олигонуклеотидах, представленных в настоящем описании, включают нуклеиновые кислоты с этиленовым мостиком (ENA). ENA включают, в качестве неограничивающих примеров, нуклеиновые кислоты с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком. Примеры ENA приведены в международной патентной публикации № WO 2005/042777, опубликованной 12 мая 2005 года и названной "APP/ENA Antisense"; Morita et al., *Nucleic Acid Res., Suppl* 1:241-242, 2001; Surono et al., *Hum. Gene Ther.*, 15:749-757, 2004; Koizumi, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 8:144-149, 2006 и Horie et al., *Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf)*, 49:171-172, 2005; содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[000197] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать мостиковый нуклеотид, такой как нуклеотид замкнутой нуклеиновой кислоты (ЗНК), нуклеотид с затрудненным этилом (сEt) или нуклеотид нуклеиновой кислоты с этиленовым мостиком (ENA). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит модифицированный нуклеотид, описанный в одном из следующих патентов или публикаций патентных заявок США: патенте США № 7399845, опубликованном 15 июля 2008 года и названном "6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs"; патенте США №

7741457, опубликованном 22 июня 2010 года и названном "6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs"; патенте США № 8022193, опубликованном 20 сентября 2011 года и названном "6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs"; патенте США № 7569686, опубликованном 4 августа 2009 года и названном "Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs"; патенте США № 7335765, опубликованном 26 февраля 2008 года и названном "Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues"; патенте США № 7314923, опубликованном 1 января 2008 года и названном "Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues"; патенте США № 7816333, опубликованном 19 октября 2010 года и названном "Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same", и патентной публикации США № 2011/0009471, в настоящее время соответствующей патенту США № 8957201, опубликованному 17 февраля 2015 года и названному "Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same", содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

[000198] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один нуклеотид, модифицированный в 2'-части сахара, предпочтительно, 2'-О-алкил-, 2'-О-алкил-О-алкил- или 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В других предпочтительных вариантах осуществления модификации РНК включают 2'-фтор-, 2'-амино- и 2' О-метил-модификации на рибозе пиримидинов, остатках с удаленным азотистым основанием или инвертированных оснований на 3'-конце РНК.

[000199] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, что приводит к повышению T_m олигонуклеотида, составляющему 1°C, 2°C, 3°C, 4°C или 5°C, по сравнению с олигонуклеотидом, несодержащим по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. Олигонуклеотид может содержать множество модифицированных нуклеотидов, что приводит к общему повышению T_m олигонуклеотида, составляющему 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C или более по сравнению с олигонуклеотидом, несодержащим модифицированный нуклеотид.

[000200] Олигонуклеотид может содержать чередующиеся нуклеотиды разных типов. Например, олигонуклеотид может содержать чередующиеся дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды и 2'-фтор-дезоксирибонуклеотиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды и 2'-О-метил-нуклеотиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся 2'-фтор-нуклеотиды и 2'-О-метил-нуклеотиды. Олигонуклеотид может содержать чередующиеся мостиковые нуклеотиды и 2'-фтор- или 2'-О-метил-нуклеотиды.

d. Межнуклеотидные связи/остовы

[000201] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать фосфотиоатную или другую модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между по меньшей мере двумя нуклеотидами. В некоторых

вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные межнуклеозидные связи между всеми нуклеотидами. Например, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат модифицированные межнуклеотидные связи в первой, второй и/или третьей межнуклеозидной связи на 5'- или 3'-конце нуклеотидной последовательности.

[000202] Фосфор-содержащие связи, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкил-фосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, содержащие 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боронофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, их 2'-5'-связанные аналоги и соединения, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных единиц связаны от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'; см. патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177196; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541306; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361 и 5625050.

[000203] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут содержать гетероатомные остовы, такие как метилен(метилимину)-остовы или ММІ-остовы; амидные остовы (см. De Mesmaeker et al. *Acc. Chem. Res.* 1995, 28:366-374); морфолиновые остовы (см. Summerton and Weller, патент США № 5034506); или остовы из пептид-нуклеиновой кислоты (ПНК) (где фосфодиэфирный остов олигонуклеотида заменяют полиамидным остовом, где нуклеотиды связаны прямо или косвенно с атомами азота аза-групп полиамидного остова, смотри Nielsen et al., *Science* 1991, 254, 1497).

е. Стереоспецифические олигонуклеотиды

[000204] В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные атомы фосфора олигонуклеотидов являются хиральными, и свойства олигонуклеотидов корректируют с учетом конфигурации хиральных атомов фосфора. В некоторых вариантах осуществления можно использовать соответствующие способы для синтеза Р-хиральных аналогов олигонуклеотидов стереоконтролируемым образом (например, как описано в Oka N, Wada T, "Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms", *Chem Soc Rev.* 2011 Dec; 40(12):5829-43). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фосфотиоат-содержащим олигонуклеотидам, содержащим нуклеозидные единицы, соединенные с помощью, по существу, полностью Sp-связей между сахарами или, по существу, полностью Rp-связей между сахарами. В некоторых вариантах осуществления такие фосфотиоатные олигонуклеотиды, имеющие, по существу, хирально чистые связи между сахарами, получают посредством ферментативного или химического синтеза, как описано, например, в патенте США № 5587261, опубликованном 12 декабря 1996 года, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В

некоторых вариантах осуществления хиральноконтролируемые олигонуклеотиды представляют собой паттерны селективного расщепления целевой нуклеиновой кислоты. Например, в некоторых вариантах осуществления хиральноконтролируемый олигонуклеотид обеспечивает расщепление по одному участку в комплементарной последовательности нуклеиновой кислоты, как описано, например, в публикации патентной заявки США № 2017/0037399 A1, опубликованной 2 февраля 2017 года, названной "CHIRAL DESIGN", содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

f. Морфолиновые олигонуклеотиды

[000205] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может представлять собой морфолиновые соединения. Морфолиновые олигомерные соединения описаны в Dwaine A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510; *Genesis*, volume 30, 3 issue 2001 года; Heasman, J., *Dev. Biol.*, 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 9591-9596 и патенте США № 5034506, опубликованном 23 июля 1991 года. В некоторых вариантах осуществления морфолиновое олигомерное соединение является фосфоамидатным морфолиновым олигомером (PMO) (например, как описано в Iverson, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3:235-238, 2001; и Wang et al., *J. Gene Med.*, 12:354-364, 2010; содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме).

g. Пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК)

[000206] В некоторых вариантах осуществления сахар и межнуклеозидная связь (остов) нуклеотидных единиц олигонуклеотида заменяют новыми группами. В некоторых вариантах осуществления сохраняют основания для гибридизации с соответствующей целевой нуклеиновой кислотой. Один из таких олигомерных соединений, олигонуклеотидным миметиком, который, как показано, имеет исключительные свойства гибридизации, обозначают как пептид-нуклеиновая кислота (ПНК). В соединениях ПНК сахарный остов олигонуклеотида заменяют амид-содержащим остовом, например, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания удерживаются и связываются прямо или косвенно с атомами азота аза-группы амидной части остова. Типичные публикации, в которых описано получение соединений ПНК, включают, в качестве неограничивающих примеров, патенты США № 5539082; 5714331 и 5719262, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. Дополнительное описание соединений ПНК можно найти в Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

h. Гэпмеры

[000207] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является гэпмером. Гэпмерный олигонуклеотид, как правило, имеет формулу 5'-X-Y-Z-3', где X и Z являются фланкирующими областями вокруг области пропуска Y. В некоторых вариантах осуществления область Y является смежным фрагментом нуклеотидов, например, областью из по меньшей мере 6 нуклеотидов ДНК, способных рекрутировать РНКазу, такую как РНКаза H. В некоторых вариантах осуществления гэпмер связывается с

целевой нуклеиновой кислотой, при этом рекрутируется РНКазы, которая затем может расщеплять целевую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления область Y фланкирована в 5'- и 3'-направлении областями X и Z, содержащими высокоаффинные модифицированные нуклеотиды, например, от одного до шести модифицированных нуклеотидов. Неограничивающие примеры модифицированных нуклеотидов включают 2'-МОЕ, или 2-ОМе, или основания замкнутой нуклеиновой кислоты (ЗНК). В некоторых вариантах осуществления Фланкирующие последовательности X и Z могут иметь длину от одного до двадцати нуклеотидов, от одного до восьми нуклеотидов или от одного до пяти нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления фланкирующие последовательности X и Z могут иметь схожую длину или разную длину. Сегмент-пропуск Y может являться нуклеотидной последовательностью от пяти до двадцати нуклеотидов, размером до двенадцати нуклеотидов или от шести до десяти нуклеотидов.

[000208] В некоторых вариантах осуществления область пропуска гепмерных олигонуклеотидов может содержать модифицированные нуклеотиды, как известно, подходящие для эффективного действия РНКазы H, в дополнение к нуклеотидам ДНК, таким как C4'-замещенные нуклеотиды, ациклические нуклеотиды и арабино-сконфигурированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления область пропуска содержит одну или более немодифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления одна или обе фланкирующие области независимо содержат одну или более фосфотиоатных межнуклеозидных связей (например, фосфотиоатных межнуклеозидных связей или других связей) между по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или более нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления каждая из области пропуска и двух фланкирующих областей независимо содержит модифицированные межнуклеозидные связи (например, фосфотиоатные межнуклеозидные связи или другие связи) между по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или более нуклеотидами.

[000209] Гепмер можно получать соответствующими способами. Типичные патенты США, патентные публикации США и публикации РСТ, в которых описано получение гепмеров, включают, в качестве неограничивающих примеров, патенты США №№ 5013830; 5149797; 5220007; 5256775; 5366878; 5403711; 5491133; 5565350; 5623065; 5652355; 5652356; 5700922; 5898031; 7432250 и 7683036; патентные публикации США №№ 2009/0286969, 2010/0197762 и 2011/0112170 и публикации РСТ №№ WO2008049085 и WO2009090182, каждая из которых включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

i. Миксмеры

[000210] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, представленный в настоящем описании, может являться миксмером или содержать паттерн последовательности миксмера. В основном, миксмеры являются олигонуклеотидами,

содержащими природные и неприродные нуклеотиды, или содержат два разных типа неприродных нуклеотидов, как правило, в чередующемся паттерне. Миксмеры, как правило, имеют более высокую аффинность связывания, чем немодифицированные олигонуклеотиды, и их можно использовать для специфического связывания молекулы-мишени, например, для блокирования участка связывания на молекуле-мишени. В основном, миксмеры не рекрутируют РНКазу к молекуле-мишени и, таким образом, не способствуют расщеплению молекулы-мишени. Такие олигонуклеотиды, неспособные рекрутировать РНКазу Н, описаны, например, см. WO2007/112754 или WO2007/112753.

[000211] В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит или состоит из повторяющегося паттерна аналогов нуклеотидов и природных нуклеотидов или одного типа аналога нуклеотида и второго типа аналога нуклеотида. Однако миксмер может не содержать повторяющийся паттерн и, вместо этого, может содержать любой порядок модифицированных нуклеотидов и природных нуклеотидов или любой порядок одного типа модифицированного нуклеотида и второго типа модифицированного нуклеотида. Повторяющийся паттерн, например, может представлять собой паттерн, в котором каждый второй или каждый третий нуклеотид является модифицированным нуклеотидом, таким как ЗНК, и остальные нуклеотиды являются природными нуклеотидами, такими как ДНК, или являются 2'-замещенным аналогом нуклеотида, таким как 2'-МОЕ или 2'-фтора-аналоги, или любым другим модифицированным нуклеотидом, представленным в настоящем описании. Установлено, что повторяющийся паттерн модифицированного нуклеотида, такой как единицы ЗНК, можно комбинировать с модифицированным нуклеотидом в фиксированных положениях, например, на 5'- или 3'-концах.

[000212] В некоторых вариантах осуществления миксмер не содержит область из более чем 5, более чем 4, более чем 3 или более чем 2 последовательных природных нуклеотидов, таких как нуклеотиды ДНК. В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит по меньшей мере область, состоящую из по меньшей мере двух последовательных модифицированных нуклеотидов, таких как по меньшей мере две последовательных ЗНК. В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит по меньшей мере область, состоящую из по меньшей мере трех последовательных модифицированных нуклеотидов, таких как по меньшей мере три последовательных ЗНК.

[000213] В некоторых вариантах осуществления миксмер не содержит область из более чем 7, более чем 6, более чем 5, более чем 4, более чем 3 или более чем 2 последовательных аналогов нуклеотидов, таких как ЗНК. В некоторых вариантах осуществления единицы ЗНК можно заменять другими аналогами нуклеотидов, такими как представленные в настоящем описании.

[000214] Миксмеры можно конструировать так, чтобы они содержали смесь повышающих аффинность модифицированных нуклеотидов, таких как, в неограничивающих примерах, нуклеотиды ЗНК и 2'-О-метил-нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит модифицированные межнуклеозидные связи (например, фосфотиоатные межнуклеозидные связи или другие связи) между по меньшей

мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или более нуклеотидами.

[000215] Миксмер можно получать любым подходящим способом. Типичные патенты США, патентные публикации США и публикации РСТ, в которых описано получение миксмеров, включают патентные публикации США №№ 2006/0128646, 2009/0209748, 2009/0298916, 2011/0077288 и 2012/0322851 и патенте США № 7687617.

j. РНК-интерференция (РНКи)

[000216] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме малых интерферирующих РНК (миРНК), также известных как короткие интерферирующие РНК или РНК сайленсинга. МиРНК представляют собой класс двухцепочечных молекул РНК, как правило, длиной приблизительно 20-25 пар оснований, нацеленных на нуклеиновые кислоты (например, мРНК) для деградации посредством РНК-интерференции (РНКи) в клетках. Специфичность молекул миРНК можно определять посредством связывания антисмысловой цепи молекулы с ее РНК-мишенью. Эффективные молекулы миРНК, как правило, имеют длину менее 30-35 пар оснований для предотвращения запуска неспецифических путей РНК-интерференции в клетке через интерфероновый ответ, хотя более длинная миРНК также может быть эффективной.

[000217] После выбора подходящей последовательности РНК-мишени можно конструировать молекулы миРНК, содержащие нуклеотидную последовательность, комплементарную всей последовательности-мишени или ее частью, т.е. антисмысловую последовательность, и получать их соответствующими способами (см., например, публикацию РСТ № WO 2004/016735 и патентные публикации США №№ 2004/0077574 и 2008/0081791).

[000218] Молекула миРНК может являться двухцепочечной (т.е. молекулой дцРНК, содержащей антисмысловую цепь и комплементарную смысловую цепь) или одноцепочечной (т.е. молекулой ssRNA, содержащей только антисмысловую цепь). Молекулы миРНК могут содержать дуплекс, асимметричный дуплекс, шпилечную или асимметричную шпилечную вторичную структуру, имеющую самокомплементарные смысловые и антисмысловые цепи.

[000219] Двухцепочечная миРНК может содержать цепи РНК, имеющие одинаковую или разную длину. Двухцепочечные молекулы миРНК также могут собираться из одного олигонуклеотида в структуре стебель-петля, где самокомплементарные смысловые и антисмысловые области молекулы миРНК соединены линкерами на основе нуклеиновой кислоты или не на основе нуклеиновой кислоты, а также кольцевой одноцепочечной РНК, имеющей две или более петлевые структуры и стебель, содержащий самокомплементарные смысловые и антисмысловые цепи, где кольцевая РНК может процессироваться *in vivo* или *in vitro* с образованием активной молекулы миРНК, способной опосредовать РНКи. Таким образом, Молекулы малой шпилечной РНК (shRNA) также включены в настоящее изобретение. Эти молекулы

содержат специфическую антисмысловую последовательность в дополнение к обратной комплементарной (смысловой) последовательности, как правило, отделенной спейсерной или петлевой последовательностью. Расщепление спейсера или петли приводит к образованию одноцепочечной молекулы РНК и ее обратного комплемента, таким образом, что они могут отжигаться с образованием молекулы дцРНК (необязательно, с дополнительными стадиями процессинга, которые могут приводить к добавлению или удалению одного, двух трех или более нуклеотидов с 3'-конца и/или 5'-конца одной или обеих цепей). Спейсер может иметь достаточную длину, чтобы позволить антисмысловым и смысловым последовательностям отжигаться и образовывать двухцепочечную структуру (или стебель) перед расщеплением спейсера (и, необязательно, дальнейшими стадиями процессинга, которые могут приводить к добавлению или удалению одного, двух, трех, четырех или более нуклеотидов с 3'-конца и/или 5'-конца одной или обеих цепей). Спейсерная последовательность может являться неродственной нуклеотидной последовательностью, размещенной между двумя комплементарными областями нуклеотидной последовательности, которые при отжиге в двухцепочечную нуклеиновую кислоту содержат shRNA.

[000220] Общая длина молекул миРНК может варьироваться от приблизительно 14 до приблизительно 100 нуклеотидов в зависимости от типа конструируемой молекулы миРНК. Как правило, от приблизительно 14 до приблизительно 50 из этих нуклеотидов являются комплементарными последовательности РНК-мишени, т.е. составляют специфическую антисмысловую последовательность молекулы миРНК. Например, если миРНК является двух- или одноцепочечной миРНК, длина может варьироваться от приблизительно 14 до приблизительно 50 нуклеотидов, в то время как, если миРНК является shRNA или кольцевой молекулой, длина может варьироваться от приблизительно 40 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов.

[000221] Молекула миРНК может содержать 3'-липкий конец на одном конце молекулы. Другой конец может являться тупым концом или липким концом (5' или 3'). Если молекула миРНК содержит липкий конец на обоих концах молекулы, длина липких концов может быть той же или другой. В одном из вариантов осуществления молекула миРНК по настоящему изобретению содержит 3'-липкие концы от приблизительно 1 до приблизительно 3 нуклеотидов на обоих концах молекулы.

к. МикроРНК (мкРНК)

[000222] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться микроРНК (мкРНК). МикроРНК (обозначаемые как "мкРНК") являются небольшими некодирующими РНК, принадлежащими к классу регуляторных молекул, контролирующей экспрессию генов посредством связывания с комплементарными участками на целевом транскрипте РНК. Как правило, мкРНК получают из крупных предшественников РНК (обозначаемых как пре-мкРНК), процессируемых в ядре в пре-мкРНК длиной приблизительно 70 нуклеотидов, сворачивающуюся в неидеальные структуры петля-стебель. Эти пре-мкРНК, как правило, подвергаются дополнительной

стадии процессинга в цитоплазме, где зрелая мкРНК длиной 18-25 нуклеотидов вырезается с одной стороны шпильки пре-мкРНК ферментом РНКазой III Dicer.

[000223] В рамках изобретения мкРНК включает при-мкРНК, пре-мкРНК, зрелую мкРНК или фрагменты их вариантов, сохраняющие биологическую активность зрелой мкРНК. В одном из вариантов осуществления диапазон размеров мкРНК может составлять от 21 нуклеотида до 170 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления диапазон размеров мкРНК составляет от 70 до 170 нуклеотидов. В другом варианте осуществления можно использовать зрелую мкРНК длиной от 21 до 25 нуклеотидов.

l. Аптамеры

[000224] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме аптамеров. Как правило, что касается молекулярной нагрузки, аптамер является любой нуклеиновой кислотой, специфически связывающейся с мишенью, такой как низкомолекулярное соединение, белок, нуклеиновая кислота в клетке. В некоторых вариантах осуществления аптамер является аптамером ДНК или аптамером РНК. В некоторых вариантах осуществления аптамер нуклеиновой кислоты представляет собой одноцепочечную ДНК или РНК (оцДНК или оцРНК). Следует понимать, что одноцепочечный аптамер нуклеиновой кислоты может образовывать спирали и/или петлевые структуры. Нуклеиновая кислота, образующая аптамер нуклеиновой кислоты, может содержать природные нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды, природные нуклеотиды с углеводородными линкерами (например, алкиленовыми) или полиэфирным линкером (например, PEG-линкером), встроенным между одним или более нуклеотидами, модифицированными нуклеотидами с углеводородными или PEG-линкерами, встроенными между одним или более нуклеотидами, или их комбинацию. Примеры публикаций и патентов, в которых описывают аптамеры и способ получения аптамеров, включают, например, Lorsch and Szostak, 1996; Jayasena, 1999; патенты США №№ 5270163; 5567588; 5650275; 5670637; 5683867; 5696249; 5789157; 5843653; 5864026; 5989823; 6569630; 8318438 и патентную заявку РСТ № WO 99/31275, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки.

m. Рибозимы

[000225] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, могут находиться в форме рибозима. Рибозим (фермент рибонуклеиновой кислоты) представляет собой молекулу, как правило, молекулу РНК, способную осуществлять специфические биохимические реакции, схожие с действием белковых ферментов. Рибозимы являются молекулами с каталитической активностью, включающей способность к расщеплению по специфическим фосфодиэфирным связям в молекулах РНК, с которыми они гибридизуются, таких как мРНК, РНК-содержащих субстратах, lncRNA и самих рибозимах.

[000226] Рибозимы могут принимать форму одной из нескольких физических структур, одну из которых обозначают как "головка молотка". Рибозим-"головка молотка"

состоит из каталитического кора, содержащего девять консервативных оснований, двухцепочечного стебля и петлевых структур (петля-стебель II) и двух областей, комплементарных областям, фланкирующим РНК-мишень, каталитического кора. Фланкирующие области позволяют рибозиму связываться с РНК-мишенью специфически посредством образования двухцепочечных стеблей I и III. Расщепление происходит в цис-положении (т.е. расщепление той же молекулы РНК, которая содержит мотив "головка молотка") или в транс-положении (расщепление иного РНК-субстрата, чем содержащий рибозим) вблизи специфического рибонуклеотидного триплета посредством реакции трансэтерификации из 3', 5'-фосфодиэфира в 2', 3'-циклический фосфодиэфир. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что для этой каталитической активности необходимо наличие специфических, высококонсервативных последовательностей в каталитической области рибозима.

[000227] Модификации в структуре рибозима также включают замену некоровых частей молекулы ненуклеотидными молекулами. Например, Benseler et al. (J. Am. Chem. Soc. (1993) 115:8483-8484) описывают подобные "головке молотка" молекулы, в которых две из пар оснований стебля II и все четыре из нуклеотидов петли II, заменяют ненуклеозидными линкерами на основе гексаэтиленгликоля, пропандиола, бис(триэтиленгликоль)фосфата, трис(пропандиола)бисфосфата или бис(пропандиол)фосфата. Ma et al. (Biochem. (1993) 32:1751-1758; Nucleic Acids Res. (1993) 21:2585-2589) заменяли петлю из шести нуклеотидов шпильки рибозима TAR ненуклеотидными, подобными этиленгликолю линкерами. Thomson et al. (Nucleic Acids Res. (1993) 21:5600-5603) заменяли петлю II линейными, ненуклеотидными линкерами длиной 13, 17 и 19 атомов.

[000228] Олигонуклеотиды-рибозимы можно получать хорошо известными способами (см., например, публикации РСТ №№ WO9118624; WO9413688; WO9201806 и WO 92/07065 и патенты США №№ 5436143 и 5650502) или приобретать в коммерческих источниках (например, US Biochemicals) и, при желании, в них можно встраивать аналоги нуклеотидов для повышения резистентности олигонуклеотида к деградации нуклеазами в клетке. Рибозим можно синтезировать любым известным способом, например, с использованием коммерчески доступного синтезатора, производимого, например, Applied Biosystems, Inc. или Milligen. Рибозим также можно получать общепринятыми способами с использованием рекомбинантных векторов. См., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (текущее издание). Последовательности РНК рибозима можно синтезировать общепринятым образом, например, с использованием РНК-полимераз, таких как T7 или SP6.

n. Гидовые нуклеиновые кислоты

[000229] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды представляют собой гидовую нуклеиновую кислоту, например, молекулы гидовой РНК (гРНК). Как правило, гидовая РНК является короткой синтетической РНК, состоящей из (1) каркасной последовательности, связывающейся с программируемым нуклеиновой кислотой, ДНК-

связывающим белком (parDNAbp), таким как Cas9, и (2) нуклеотидной спейсерной части, определяющей последовательность ДНК-мишени (например, геномной ДНК-мишени), с которой гРНК связывается для сближения программируемого нуклеиновой кислотой, ДНК-связывающего белка с последовательностью ДНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления parDNAbp является программируемым нуклеиновой кислотой белком, образующим комплекс (например, связывающимся или ассоциированным) с одной или более РНК, нацеливающей программируемый нуклеиновой кислотой белок на последовательность ДНК-мишени (например, последовательность геномной ДНК-мишени). В некоторых вариантах осуществления программируемую нуклеиновой кислотой нуклеазу, когда она находится в комплексе с РНК, можно обозначать как комплекса нуклеаза:РНК. Гидовая РНК может существовать в виде комплекса двух или более РНК или в виде одной молекулы РНК.

[000230] Гидовую РНК (гРНК), существующую в виде одной молекулы РНК, можно обозначать как одинарную гидовую РНК (sgRNA), хотя термин "гРНК" также используют для обозначения гидовой РНК, существующей в виде отдельных молекул или комплекса из двух или более молекул. Как правило, гРНК, существующие в виде отдельных РНК, содержат два домена: (1) домен, обладающий гомологии в отношении целевой нуклеиновой кислоты (т.е. направляет связывание комплекса Cas9 с мишенью); и (2) домен, связывающийся с белком Cas9. В некоторых вариантах осуществления домен (2) соответствует последовательности, известной как tracrPРНК и содержащей структуру петля-стебель. В некоторых вариантах осуществления домен (2) идентичен или гомологичен tracrPРНК, как описано в Jinek et al., *Science* 337:816-821 (2012), полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

[000231] В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит два или более из доменов (1) и (2), и ее можно обозначать как удлиненную гРНК. Например, удлиненная гРНК будет связываться с двумя или более белками Cas9 и связывается с целевой нуклеиновой кислотой в двух или более отдельных областях, как представлено в настоящем описании. гРНК содержит нуклеотидную последовательность, являющуюся комплементарной участку-мишени, опосредующую связывание комплекса нуклеаза/РНК с указанным участком-мишенью, обеспечивая специфичность последовательности комплекса нуклеаза:РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-программируемая нуклеаза является (CRISPR-ассоциированной системой) эндонуклеазой Cas9, например, Cas9 (Csn1) из *Streptococcus pyogenes* (см., например, "Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*." Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:4658-4663 (2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., *Nature* 471:602-607 (2011); и "A programmable dual-PHK-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial

immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821 (2012), содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

о. Мультимеры

[000232] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка может содержать мультимеры (например, конкатемеры) 2 или более олигонуклеотидов, соединенных линкером. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидную нагрузку комплекса/конъюгата можно повышать за пределами доступных участков связывания на средстве для таргетинга (например, доступных тиоловых участков на антителе) или иным образом корректировать для достижения содержания конкретной нагрузки. Олигонуклеотиды в мультимере могут быть одинаковыми или отличаться (например, быть нацеленными на разные гены или разные участки на одном гене или его продуктах).

[000233] В некоторых вариантах осуществления мультимеры содержат 2 или более олигонуклеотидов, соединенных расщепляемым линкером. Однако в некоторых вариантах осуществления мультимеры содержат 2 или более олигонуклеотидов, соединенных нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более соединенных олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит от 2 до 5, от 2 до 10 или от 4 до 20 соединенных олигонуклеотидов.

[000234] В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 2 или более олигонуклеотида, соединенных "конец-в-конец" (при линейном расположении). В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 2 или более олигонуклеотидов, соединенных "конец-в-конец" с помощью олигонуклеотидного линкера (например, поли-dT-линкера, линкера с удаленными азотистыми основаниями). В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 5'-конец одного олигонуклеотида, соединенный с 3'-концом другого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 3'-конец одного олигонуклеотида, соединенный с 3'-концом другого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления мультимер содержит 5'-конец одного олигонуклеотида, соединенный с 5'-концом другого олигонуклеотида. Тем не менее, в некоторых вариантах осуществления мультимеры могут содержать разветвленную структуру, содержащую множество олигонуклеотидов, соединенных разветвляющим линкером.

[000235] Дополнительные примеры мультимеров, которые можно использовать в комплексах, представленных в настоящем описании, описаны, например, в патентной заявке США № 2015/0315588 A1, названной *Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkers*, опубликованной 5 ноября 2015 года; патентной заявке США № 2015/0247141 A1, названной *Multimeric Oligonucleotide Compounds*, опубликованной 3 сентября 2015 года, патентной заявке США № 2011/0158937 A1, названной *Immunostimulatory Oligonucleotide Multimers*, опубликованной

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

ii. Низкомолекулярные соединения

[000236] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любое подходящее низкомолекулярное соединение, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является таким, как описано в публикации патентной заявки США № 2016052914 A1, опубликованной 25 февраля 2016 года, названной "*Compounds And Methods For Myotonic Dystrophy Therapy*". Дополнительные примеры нагрузки низкомолекулярным соединением приведены в Lopez-Morato M, et al., *Small Molecules Which Improve Pathogenesis of Myotonic Dystrophy Type 1, (Review) Front. Neurol.*, 18 May 2018. Например, в некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является положительным регулятором MBNL1, таким как фенилбутазон, кетопрофен, ISOX или вориносат. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является ингибитором пути H-Ras, таким как манумицин А. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является модулятором протеинкиназ, таким как Ro-318220, C16, C51, метформин, AICAR, хлорид лития, TDZD-8 или Bio. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является растительным алкалоидом, таким как гармин. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является ингибитором транскрипции, таким как пентамидин, пропамидин, гептамидин или актиномицин D. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является ингибитором киназы гликогенсинтазы 3 бета (GSK3B), например, как описано в Jones K, et al., *GSK3β mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. J Clin Invest.* 2012 Dec;122(12):4461-72; и Wei C, et al., *GSK3β is a new therapeutic target for myotonic dystrophy type 1. Rare Dis.* 2013; 1: e26555; и Palomo V, et al., *Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3 β: Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases. J Med Chem.* 2017 Jun 22;60(12):4983-5001, содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является замещенным пиридо[2,3-d]пиримидином и пентамидино-подобным соединением, как описано в Gonzalez AL, et al., *In silico discovery of substituted pyrido[2,3-d]pyrimidines and pentamidin-like compounds with biological activity in myotonic dystrophy models. PLoS One.* 2017 Jun 5;12(6):e0178931, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является модулятором MBNL1, например, как описано в Zhange F, et al., *A flow cytometry-based screen identifies MBNL1 modulators that rescue splicing defects in myotonic dystrophy type I. Hum Mol Genet.* 2017 Aug 15;26(16):3056-3068, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

iii. Пептиды

[000237] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любой подходящий пептид или белок, как представлено в настоящем описании. Пептидная или белковая нагрузка может соответствовать последовательности белка, преференциально связывающегося с нуклеиновой кислотой, например, ассоциированным с заболеванием повтором, или белком, например, MBNL1, обнаруживаемыми в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления пептиды или белки можно продуцировать, синтезировать и/или дериватизировать несколькими способами, например, с использованием пептидных библиотек фагового дисплея, пептидных библиотек "одна частица-одно соединение" или комбинаторных библиотек синтетических пептидов с позиционным сканированием. Примеры способов описаны в этой области и включены посредством ссылок (Gray, 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).

[000238] В некоторых вариантах осуществления пептид является таким, как описано в патентной заявке США № 2018/0021449, опубликованной 1/25/2018, "Antisense conjugates for decreasing expression of DMPK". В некоторых вариантах осуществления пептид является таким, как описано в Garcia-Lopez et al., "In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models", *PNAS* July 19, 2011. 108 (29) 11866-11871. В некоторых вариантах осуществления пептид или белок может быть нацелен, например, связывается, с ассоциированным с заболеванием повтором, например, экспансией повторов CUG РНК.

[000239] В некоторых вариантах осуществления пептид или белок содержит фрагмент белка MBNL, например, MBNL1. В некоторых вариантах осуществления пептид или белок содержит по меньшей мере один цинковый палец. В некоторых вариантах осуществления пептид или белок может содержать приблизительно 2-25 аминокислот, приблизительно 2-20 аминокислот, приблизительно 2-15 аминокислот, приблизительно 2-10 аминокислот или приблизительно 2-5 аминокислот. Пептид или белок может содержать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные аланина, линейные аминокислоты, N-метил-аминокислоты и другие аминокислоты, известные в этой области. В некоторых вариантах осуществления пептид может являться линейным; в других вариантах осуществления пептид может являться циклическим, например, бициклическим.

iv. Конструкции нуклеиновой кислоты

[000240] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любую подходящую конструкцию для экспрессии гена, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена может являться

вектором или фрагментом кДНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена может являться матричной РНК (мРНК). В некоторых вариантах осуществления мРНК, используемая в настоящем описании, может являться модифицированной мРНК, например, как описано в патенте США 8710200, опубликованной 24 апреля 2014 года, названной "Engineered nucleic acids encoding a modified erythropoietin and their expression". В некоторых вариантах осуществления мРНК может содержать 5'-метилловый кэп. В некоторых вариантах осуществления мРНК может содержать поли-А-хвост, необязательно, длиной до 160 нуклеотидов. Конструкция для экспрессии гена может кодировать последовательность белка, предпочтительно связывающегося с нуклеиновой кислотой, например, ассоциированным с заболеванием повтором, или белком, например, MBNL1, обнаруживаемых в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена может экспрессировать, например, гиперэкспрессироваться, в ядре мышечной клетки. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует белок MBNL, например, MBNL1. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует белок, содержащий по меньшей мере один цинковый палец. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует белок, связывающийся с ассоциированным с заболеванием повтором. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует белок, приводящий к снижению экспрессии ассоциированного с заболеванием повтора. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует фермент редактирования генома. Дополнительные примеры конструкций нуклеиновой кислоты, которые можно использовать в качестве молекулярной нагрузки, приведены в публикации международной патентной заявки № WO2017152149 A1, опубликованной 19 сентября 2017 года, названной "Closed-Ended Linear Duplex Dna For Non-Viral Gene Transfer"; патенте США № 8853377 B2, опубликованном 7 октября 2014 года, названном "Mrna For Use In Treatment Of Human Genetic Diseases"; и патенте США № 8822663 B2, опубликованном 2 сентября 2014 года, названном "Engineered Nucleic Acids And Methods Of Use Thereof", содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

С. Линкеры

[000241] Комплексы, представленные в настоящем описании, как правило, содержат линкер, соединяющий мышечно-специфическое средство с молекулярной нагрузкой. Линкер содержит по меньшей мере одну ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления линкер может являться одинарной связью, например, дисульфидной связью или дисульфидным мостиком, соединяющей мышечно-специфическое средство с молекулярной нагрузкой. Однако в некоторых вариантах осуществления линкер может соединять мышечно-специфическое средство с молекулярной нагрузкой посредством множества ковалентных связей. В некоторых вариантах осуществления линкер может являться расщепляемым линкером. Однако в

некоторых вариантах осуществления линкер может являться нерасщепляемым линкером. Линкер, как правило, является стабильным *in vitro*, *in vivo* и в некоторых клеточных контекстах. Кроме того, как правило, линкер не влияет отрицательно на функциональные свойства мышечно-специфического средства или молекулярной нагрузки. В этой области известны примеры и способы синтеза линкеров (см., например, Kline, T. et al. "Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates", *Pharmaceutical Research*, 2015, 32:11, 3480-3493.; Jain, N. et al. "Current ADC Linker Chemistry" *Pharm Res.* 2015, 32:11, 3526-3540.; McCombs, J.R. and Owen, S.C. "Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry" *AAPS J.* 2015, 17:2, 339-351).

[000242] Предшественник линкера, как правило, будет содержать две разные реакционноспособные частицы, делающие возможным присоединение к мышечно-специфическому средству и молекулярной нагрузке. В некоторых вариантах осуществления две разные реакционноспособные частицы может являться нуклеофилом и/или электрофилом. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина мышечно-специфического средства. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина мышечно-специфического средства с помощью малеимид-содержащего линкера, где, необязательно, малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроильную или малеимидометилциклогексан-1-карбоксилатную группу. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с остатком цистеина мышечно-специфического средства или тиоловой функционализированной молекулярной нагрузкой с помощью 3-арилпропионитрильной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой посредством амидной связи, гидразидной, триазольной, тиоэфирной или дисульфидной связи.

i. Расщепляемые линкеры

[000243] Расщепляемый линкер может являться протеаза-чувствительным линкером, pH-чувствительным линкером или глутатион-чувствительным линкером. Эти линкеры, как правило, расщепляются исключительно внутриклеточно и, предпочтительно, являются стабильными во внеклеточной среде, например, внеклеточной относительно мышечной клетки.

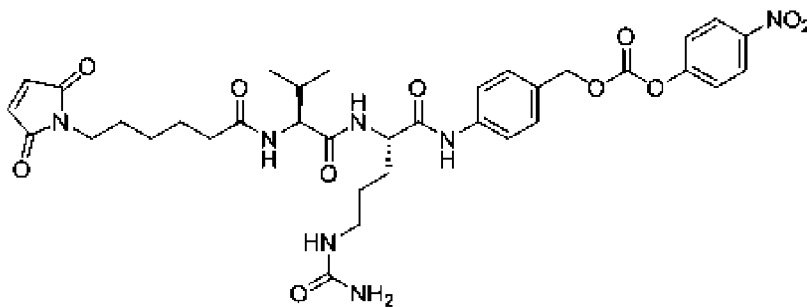
[000244] Протеаза-чувствительные линкеры расщепляются в результате ферментативной активности протеазы. Эти линкеры, как правило, содержат пептидные последовательности и могут иметь длину 2-10 аминокислот, приблизительно 2-5 аминокислот, приблизительно 5-10 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, приблизительно 5 аминокислот, приблизительно 3 аминокислоты или приблизительно 2 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность может содержать природные аминокислоты, например, цистеин, аланин, или неприродные или модифицированные аминокислоты. Неприродные аминокислоты включают β -аминокислоты, гомо-аминокислоты, производные пролина, 3-замещенные производные

аланина, линейные аминокислоты, N-метил-аминокислоты и другие аминокислоты, известные в этой области. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин или аланин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер может расщепляться лизосомальной протеазой, например, катепсином В, и/или эндосомальной протеазой.

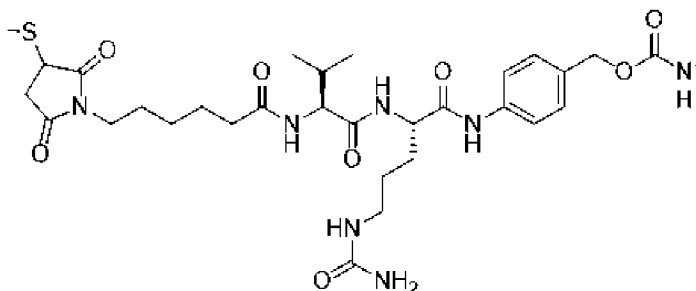
[000245] pH-чувствительный линкер представляет собой ковалентную связь, легко подвергающуюся деградации в условиях высокого или низкого pH. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер может расщепляться при pH в диапазоне от 4 до 6. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер содержит гидразон или циклический ацеталь. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер расщепляется в эндосоме или лизосоме.

[000246] В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный линкер содержит дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный линкер расщепляется в результате реакции дисульфидного обмена с глутатионовым соединением внутри клетки. В некоторых вариантах осуществления дисульфидная связь дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту, например, остаток цистеина.

[000247] В некоторых вариантах осуществления линкер является линкером Val-Cit (например, как описано в патенте США № 6214345, включенном в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления перед конъюгацией линкер Val-Cit имеет структуру:



[000248] В некоторых вариантах осуществления после конъюгации линкер Val-Cit имеет структуру:



[000249]

ii. Нерасщепляемые линкеры

[000250] В некоторых вариантах осуществления можно использовать нерасщепляемые линкеры. Как правило, нерасщепляемый линкер не может легко подвергаться деградации в клеточной или физиологической среде. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер содержит необязательно замещенную алкильную группу, где заместители могут включать галогены, гидроксильные группы, формы кислорода и другие распространенные заместители. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкилен, необязательно замещенный арилен, гетероарилен, пептидную последовательность, содержащую по меньшей мере одну неприродную аминокислоту, укороченный гликан, сахар или сахара, которые не могут подвергаться ферментативной деградации, азид, алкин-азид, пептидную последовательность, содержащую последовательность LPXT, тиоэфир, биотин, бифенил, повторяющиеся единицы полиэтиленгликоля или эквивалентных соединений, кислые сложные эфиры, кислые амиды, сульфамиды и/или алкокси-аминовый линкер. В некоторых вариантах осуществления для ковалентного связывания мышечно-специфического средства, содержащего последовательность LPXT, с молекулярной нагрузкой, содержащей последовательность (G)_n, будут использовать сортаза-опосредованное лигирование (см., например Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. *Biotechnol Lett.* 2010, 32(1):1-10).

[000251] В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать замещенный алкилен, необязательно замещенный алкенилен, необязательно замещенный алкинилен, необязательно замещенный циклоалкилен, необязательно замещенный циклоалкенилен, необязательно замещенный арилен, необязательно замещенный гетероарилен, дополнительно содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S,; необязательно замещенный гетероциклический, дополнительно содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S,; иминогруппу, необязательно замещенные формы азота, необязательно замещенные формы кислорода O, необязательно замещенные формы серы или поли(алкиленоксид), например, полиэтиленоксид или полипропиленоксид.

iii. Конъюгация линкера

[000252] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой посредством фосфатной, тиоэфирной, простой эфирной, углерод-углеродной или амидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с олигонуклеотидом с помощью фосфатной или фосфотиоатной группы, например, концевой фосфата олигонуклеотидного остова. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством, например антителом, через остаток лизина или цистеина, присутствующий в мышечно-специфическом средством.

[000253] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой с помощью реакции

циклоприсоединения между азидом и алкином с образованием триазола, где азид и алкин может находиться на мышечно-специфическом средстве, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления алкин может являться циклическим алкином, например, циклооктином. В некоторых вариантах осуществления алкин может являться бициклонином (также известным как бицикло[6,1.0]нонин или BCN) или замещенным бициклонином. В некоторых вариантах осуществления циклооктан является таким, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2011136645, опубликованной 3 ноября 2011 года, названной "Fused Cyclooctyne Compounds And Their Use In Metal-free Click Reactions". В некоторых вариантах осуществления азид может представлять собой молекулу сахара или углевода, содержащую азид. В некоторых вариантах осуществления азид может представлять собой 6-азидо-6-дезоксигалактозу или 6-азидо-N-ацетилгалактозамин. В некоторых вариантах осуществления молекула сахара или углевода, содержащая азид, является такой, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2016170186, опубликованной 27 октября 2016 года, названной "Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase". В некоторых вариантах осуществления реакция циклоприсоединения между азидом и алкином с образованием триазола, где азид и алкин может находиться на мышечно-специфическом средстве, молекулярной нагрузке или линкере, является такой, как описано в публикации международной патентной заявки № WO2014065661, опубликованной 1 мая 2014 года, названной "Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof"; или публикации международной патентной заявки № WO2016170186, опубликованной 27 октября 2016 года, названной "Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A $\beta(1,4)$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase".

[000254] В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно содержит спейсер, например, полиэтиленгликолевый спейсер или ацил/карбомоил-сульфамидный спейсер, например, спейсер HydraSpaceTM. 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.

[000255] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой с помощью реакции Дильса-Альдера между диенофилом и диеном/гетеродиеном, где диенофил и диен/гетеродиен может находиться на мышечно-специфическом средстве, молекулярной нагрузке или линкере. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой посредством других перациклических реакций, например, еновой реакции. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой с помощью реакции амидной, тиамидной или сульфонамидной связи. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-

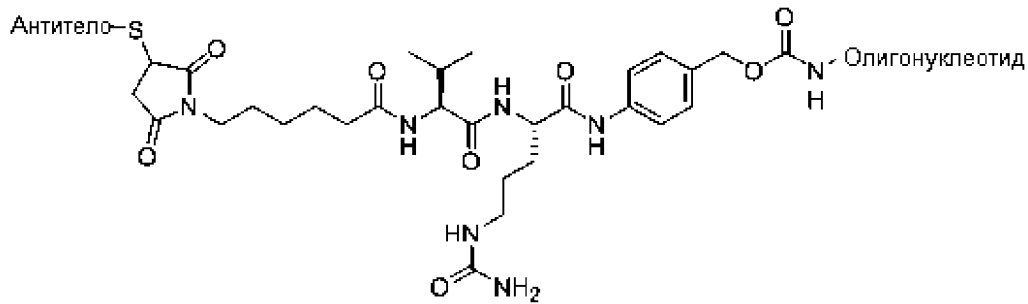
специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой с помощью реакции конденсации с образованием оксимной, гидразоновой или семикарбазидной группы, находящейся между линкером и мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой.

[000256] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой с помощью реакций сопряженного присоединения между нуклеофилом, например, аминогруппой или гидроксильной группой, и электрофилом, например, карбоновой кислотой или альдегидом. В некоторых вариантах осуществления нуклеофил может находиться на линкере, и электрофил может находиться на мышечно-специфическом средстве или молекулярной нагрузке перед реакцией между линкером и мышечно-специфическим средством или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может находиться на линкере, и нуклеофил может находиться на мышечно-специфическом средстве или молекулярной нагрузке перед реакцией между линкером и мышечно-специфическим средством или молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления электрофил может являться азидом, 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 являться необязательно замещенным алкеном, необязательно замещенным алкином, необязательно замещенным арилом, необязательно замещенным гетероциклином, гидроксильной группой, аминогруппой, алкиламиногруппой, анилидогруппой или тиоловой группой.

D. Примеры комплексов антитело-молекулярная нагрузка

[000257] Другие аспекты по настоящему изобретению относятся к комплексам, содержащим любое из мышечно-специфических средств (например, антител против рецептора трансферрина), представленных в настоящем описании, ковалентно связанных с любыми из молекулярных нагрузок (например, олигонуклеотидом), представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство (например, антитело против рецептора трансферрина) ковалентно связано с молекулярной нагрузкой (например, олигонуклеотидом) с помощью линкера. Можно использовать любые из линкеров, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с антителом с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе).

[000258] Ниже приведен пример структуры комплекса, содержащего антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с олигонуклеотидом с помощью линкера Val-Cit:



где линкер соединен с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью олигонуклеотида, и где линкер соединяют с антителом с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе).

[000259] Следует понимать, что антитела можно соединять с олигонуклеотидами с разной стехиометрией, свойством, которое можно обозначать как соотношение лекарственного средства и антитела (DAR), где "лекарственное средство" является олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления один олигонуклеотид соединяют с антителом (DAR=1). В некоторых вариантах осуществления два олигонуклеотида соединяют с антителом (DAR=2). В некоторых вариантах осуществления три олигонуклеотида соединяют с антителом (DAR=3). В некоторых вариантах осуществления четыре олигонуклеотида соединяют с антителом (DAR=4). В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к смеси разных комплексов, каждый из которых имеет разное DAR. В некоторых вариантах осуществления среднее DAR комплексов в такой смеси может находиться в диапазоне от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5 или более. DAR можно повышать посредством конъюгации олигонуклеотидов с разными участками на антителе и/или посредством конъюгации мультимеров с одним или более участками на антителе. Например, DAR 2 можно достигать посредством конъюгации одного олигонуклеотида с двумя разными участками на антителе или посредством конъюгации димерного олигонуклеотида с одним участком антитела.

[000260] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина (например, антитело или любой его вариант, как представлено в настоящем описании), ковалентно связанное с олигонуклеотидом, нацеленным на DMPK (например, олигонуклеотидом, имеющим область комплементарности последовательности гена DMPK, приведенной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина (например, антитело или любой его вариант, как представлено в настоящем описании), ковалентно связанное с олигонуклеотидом, нацеленным на DMPK (например, олигонуклеотидом, имеющим область комплементарности последовательности гена DMPK, приведенной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16), с помощью линкера (например, линкера Val-Cit). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-Cit) соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью нуклеотида, нацеленного на DMPK (например, олигонуклеотида, имеющего область

комплементарности последовательности гена DMPK, приведенной в SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 16). В некоторых вариантах осуществления линкер (например, линкер Val-Cit) соединяют с антителом (например, антителом или любым его вариантом, как представлено в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, через цистеин в антителе).

[000261] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом, где антитело против рецептора трансферрина содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 приведенные в таблице 1.1; и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные в таблице 1.1.

[000262] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом, где антитело против рецептора трансферрина содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом, где антитело против рецептора трансферрина содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

[000263] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом, где антитело против рецептора трансферрина содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом, где антитело против рецептора трансферрина содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

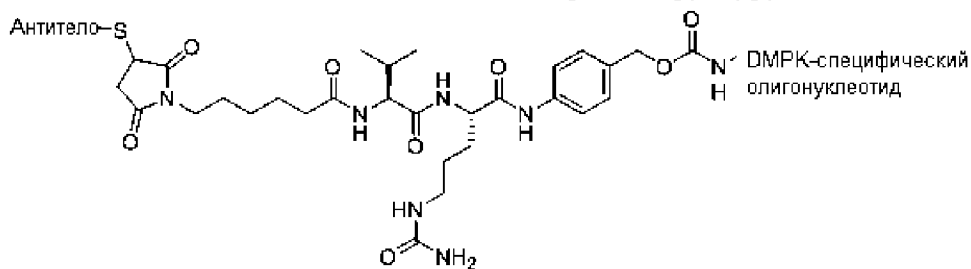
[000264] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера (например, линкера Val-Cit), где антитело против рецептора трансферрина содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 1.1; и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные в таблице 1.1.

[000265] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленные в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно

связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера (например, линкера Val-Cit), где антитело против рецептора трансферрина содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера (например, линкера Val-Cit), где антитело против рецептора трансферрина содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

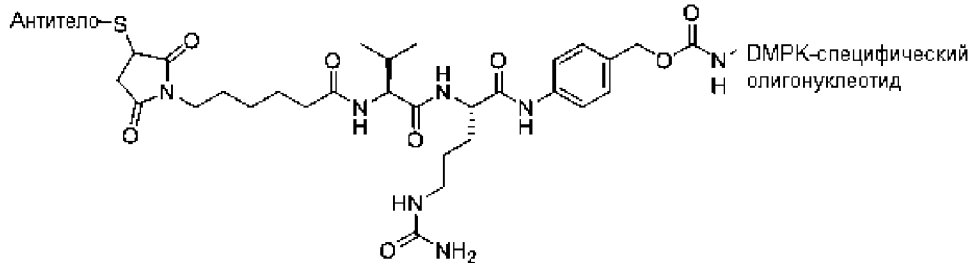
[000266] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера (например, линкера Val-Cit), где антитело против рецептора трансферрина содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный, в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера (например, линкера Val-Cit), где антитело против рецептора трансферрина содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

[000267] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера Val-Cit, где антитело против рецептора трансферрина содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 являющиеся теми же, что и CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, приведенные в таблице 1.1; и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, являющиеся теми же, что и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, приведенные в таблице 1.1, и где комплекс содержит структуру:



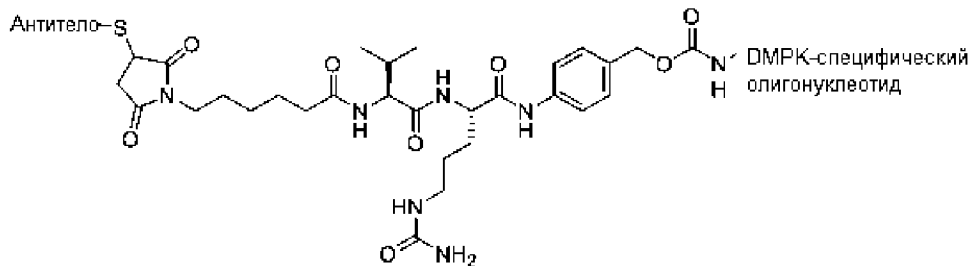
где линкер Val-Cit соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью DMPK-специфического олигонуклеотида, и где линкер Val-Cit соединяют с антителом (например, антителом или любым его вариантом, как представлено в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, с помощью цистеина в антителе).

[000268] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера Val-Cit, где антитело против рецептора трансферрина содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и где комплекс содержит структуру:



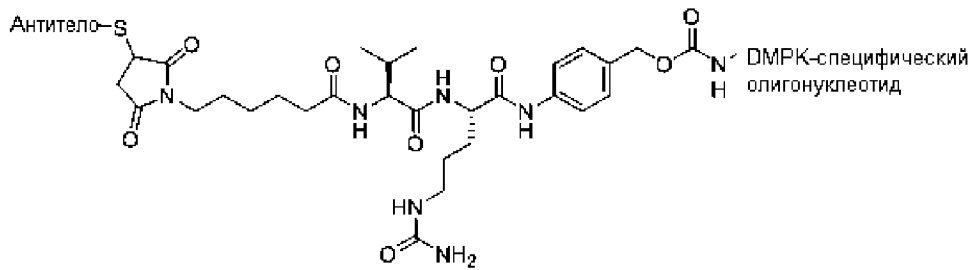
где линкер Val-Cit соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью DMPK-специфического олигонуклеотида, и где линкер Val-Cit соединяют с антителом (например, антителом или любым его вариантом, как представлено в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, с помощью цистеина в антителе).

[000269] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера Val-Cit, где антитело против рецептора трансферрина содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и где комплекс содержит структуру:



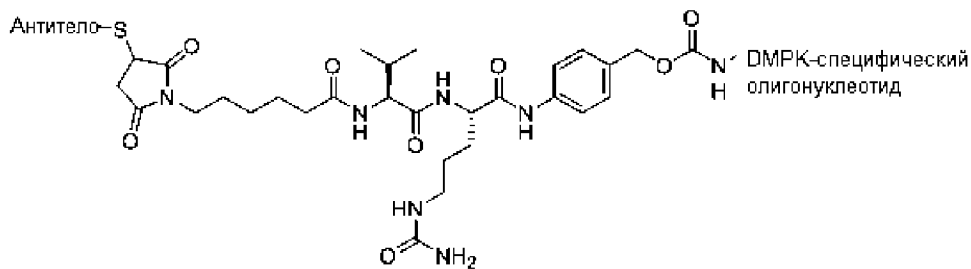
где линкер Val-Cit соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью DMPK-специфического олигонуклеотида, и где линкер Val-Cit соединяют с антителом (например, антителом или любым его вариантом, как представлено в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, с помощью цистеина в антителе).

[000270] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера Val-Cit, где антитело против рецептора трансферрина содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и где комплекс содержит структуру:



где линкер Val-Cit соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью DMPK-специфического олигонуклеотида, и где линкер Val-Cit соединяют с антителом (например, антителом или любым его вариантом, как представлено в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, с помощью цистеина в антителе).

[000271] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с DMPK-специфическим олигонуклеотидом с помощью линкера Val-Cit, где антитело против рецептора трансферрина содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и где комплекс содержит структуру:



где линкер Val-Cit линкер соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью DMPK-специфического олигонуклеотида, и где линкер Val-Cit соединяют с антителом (например, антителом или любым его вариантом, как представлено в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, с помощью цистеина в антителе).

III. Составы

[000272] Комплексы, представленные в настоящем описании, можно составлять любым подходящим образом. Как правило, комплексы, представленные в настоящем описании, составляют способом, подходящим для фармацевтического применения. Например, комплексы можно вводить индивидууму с использованием состава, минимизирующего деградацию, облегчающего доставку и/или захват или обеспечивающего другое благоприятное свойство комплексов в составе. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим комплексы и фармацевтически приемлемые носители. Такие композиции можно соответствующим образом составлять таким образом, что, при введении индивидууму в непосредственное окружение клетки-мишени или системно, в целевые мышечные клетки проникает достаточное количество комплексов. В некоторых вариантах осуществления

комплексы составляют в буферных растворах, таких как растворы фосфатно-солевого буфера, липосомах, мицеллярных структурах и капсидах.

[000273] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления композиции могут включать отдельно один или более компонентов комплексов, представленных в настоящем описании (например, мышечно-специфические средства, линкеры, молекулярную нагрузку или молекулы-предшественники любых из них).

[000274] В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в воде или водном растворе (например, воде с корректировкой pH). В некоторых вариантах осуществления комплексы составляют в основных забуференных водных растворах (например, PBS). В некоторых вариантах осуществления составы, представленные в настоящем описании, содержат эксципиент. В некоторых вариантах осуществления эксципиент придает композиции улучшенную стабильность, улучшенную абсорбцию, улучшенную растворимость и/или терапевтическое усиление активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления эксципиент является буферным средством (например, цитратом натрия, фосфатом натрия, Трис-основанием или гидроксидом натрия) или носителем (например, забуференным раствором, петролатум, диметилсульфоксид или минеральное масло).

[000275] В некоторых вариантах осуществления комплекс или его компонент (например, олигонуклеотид или антители) лиофилизируют для увеличения его срока годности, а затем превращают в раствор перед использованием (например, введением индивидууму). Таким образом, эксципиент в композиции, содержащей комплекс или его компонент, представленный в настоящем описании, может являться лиопротектором (например, маннитом, лактозой, полиэтиленгликолем или поливинилпирролидоном) или модификатором температуры разрушения (например, декстраном, фиколлоном или желатином).

[000276] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют так, чтобы она была совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутривоженное, подкожное, введение. Как правило, путь введения является внутривенным или подкожным.

[000277] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного использования, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых соединений) или дисперсии, и стерильные порошки для экстемпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Носитель может являться растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. В некоторых вариантах осуществления составы включают изотонические средства, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия в композиции. Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством включения комплексов в необходимом количестве в выбранном

растворителе с одним из ингредиентов, перечисленных выше, или их комбинацией, при необходимости, после стерилизации фильтрации.

[000278] В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% комплекса или его компонента или более, хотя процентная доля активных ингредиентов может составлять от приблизительно 1% до приблизительно 80% или более по массе или объему общей композиции. При получении таких фармацевтических составов специалист в этой области будет учитывать факторы, такие как растворимость, биодоступность, биологическое время полужизни, путь введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические факторы, и, в связи с этим, желательными могут являться разные дозы и схемы лечения.

IV. Способы применения/лечения

[000279] Комплексы, содержащие мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, как представлено в настоящем описании, являются эффективными при лечении миотонической дистрофии. В некоторых вариантах осуществления комплексы являются эффективными при лечении миотонической дистрофии типа 1 (DM1). В некоторых вариантах осуществления DM1 ассоциирована с экспансией тринуклеотидного повтора CTG в 3'-некодирующей области DMPK. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидные экспансии приводят к образованию токсических повторов РНК, способных образовывать шпилечные структуры, связывающиеся с критическими внутриклеточными белками, например, Muscleblind-подобными белками, с высокой аффинностью.

[000280] В некоторых вариантах осуществления индивидуум может являться человеком, не являющимся человеком приматом, грызуном или любым подходящим млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь миотоническую дистрофию. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет аллель DMPK, который, необязательно, может содержать ассоциированный с заболеванием повтор. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь аллель DMPK с подвергнутой экспансии, ассоциированным с заболеванием повтором, содержащим приблизительно 2-10 повторяющихся единиц, приблизительно 2-50 повторяющихся единиц, приблизительно 2-100 повторяющихся единиц, приблизительно 50-1000 повторяющихся единиц, приблизительно 50-500 повторяющихся единиц, приблизительно 50-250 повторяющихся единиц, приблизительно 50-100 повторяющихся единиц, приблизительно 500-10000 повторяющихся единиц, приблизительно 500-5000 повторяющихся единиц, about 500-2500 повторяющихся единиц, приблизительно 500-1000 повторяющихся единиц или приблизительно 1000-10000 повторяющихся единиц. В некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает симптомами DM1, например, мышечной атрофией или потерей мышечной ткани. В некоторых вариантах осуществления индивидуум не страдает симптомами DM1. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет конгенитальную миотоническую дистрофию.

[000281] Аспект настоящего изобретения включает способы, включающие введение индивидууму эффективного количества комплекса, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, можно вводить индивидууму, нуждающемуся в лечении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, представленный в настоящем описании, можно вводить подходящим путем, который может включать внутривенное введение, например, в виде болюса или посредством непрерывной инфузии в течение периода времени. В некоторых вариантах осуществления внутривенное введение можно осуществлять внутримышечным, интраперитонеальным, цереброспинальным, подкожным, внутрисуставным, интрасиновиальным или интратекальным путем. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может находиться в твердой форме, водной форме или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления водную или жидкую форму можно подвергать небулизации или лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления небулизированную или лиофилизированную форму можно восстанавливать водным или жидким раствором.

[000282] Композиции для внутривенного введения могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилаксамид, диметилформамид, этиллактат, этилкарбонат, изопропилмиристан, этанол и полиолы (глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.). В случае внутривенной инъекции водорастворимые антитела можно вводить капельным способом, посредством которого фармацевтический состав, содержащий антитело и физиологически приемлемые эксципиенты, подвергают инфузии. Физиологически приемлемые эксципиенты могут включать, например, 5% декстрозу, 0,9% физиологический раствор, раствор Рингера или другие подходящие эксципиенты. Внутримышечные препараты), например, стерильный состав подходящей растворимой солевой формы антитела, можно растворять и вводить в фармацевтическом эксципиенте, таком как вода для инъекций, 0,9% физиологический раствор или 5% раствор глюкозы.

[000283] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, вводят сайт-специфическими способами или способами локальной доставки. Примеры этих способов включают имплантируемые депо-источники комплекса, катетеры для локальной доставки, сайт-специфические носители, прямую инъекцию или прямое нанесение.

[000284] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, вводят в эффективной концентрации, обеспечивающий терапевтический эффект в отношении индивидуума. Как понятно специалистам в этой области, эффективные количества варьируются в зависимости от

тяжести заболевания, уникальных характеристик индивидуума, подвергаемого лечению, например, возраста, физического состояния, состояния здоровья или массы тела, длительности лечения, природы сопутствующей терапии, пути введения и связанных факторов. Эти связанные факторы известны специалистам в этой области, и их можно определять с использованием не более чем рутинного экспериментирования. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация является максимальной дозой, считающейся безопасной для пациента. В некоторых вариантах осуществления эффективная концентрация будет являться наименьшей возможной концентрацией, обеспечивающей максимальную эффективность.

[000285] Эмпирические факторы, например, время полужизни комплекса в организме индивидуума, как правило, будут учитывать при определении концентрации фармацевтической композиции, используемой для лечения. Частоту введения можно определять эмпирически и корректировать для максимизации эффективности лечения.

[000286] Как правило, в случае введения любых из комплексов, представленных в настоящем описании, начальная доза может составлять приблизительно от 1 до 100 мг/кг или более в зависимости от описанных выше факторов, например, безопасности или эффективности. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство будут вводить однократно. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство будут вводить ежедневно, дважды в неделю, еженедельно, дважды в месяц, ежемесячно или через любой временной интервал, обеспечивающий максимальную эффективность при минимизации рисков в отношении безопасности в отношении индивидуума. Как правило, эффективность лечения и риски в отношении безопасности можно подвергать мониторингу на всем протяжении курса лечения.

[000287] Эффективность лечения можно оценивать любыми подходящими способами. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать посредством оценки наблюдения симптомов, ассоциированных с DM1, например, мышечной атрофии или мышечной слабости, посредством измерения сообщаемых индивидуумом исходов, например, подвижности, самообслуживания, повседневной деятельности, боли/дискомфорта тревожности/депрессии, или показателей качества жизни, например, продолжительности жизни.

[000288] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, вводят индивидууму в эффективной концентрации, достаточной для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% относительно контроля, например, базового уровня экспрессии до лечения.

[000289] В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1-5, 1-10, 5-15, 10-20, 15-30, 20-40, 25-50 или более дней. В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленное в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 недели. В некоторых вариантах осуществления однократной дозы или введения индивидууму фармацевтической композиции, содержащей комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, представленной в настоящем описании, достаточно для ингибирования активности или экспрессии гена-мишени в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев.

[000290] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать более одного комплекса, содержащего мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно содержать любое другое подходящее терапевтическое средство для лечения индивидуума, например, человека, имеющего DM1. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические средства могут усиливать или дополнять эффективность комплексов, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления другие терапевтические средства можно использовать для лечения иного симптома или заболевания, чем комплексы, представленные в настоящем описании.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Таргетинг DMPK с использованием трансфицированных антисмысловых олигонуклеотидов

[000291] Гэпмерный антисмысловый олигонуклеотид, нацеленный и на аллель дикого типа, и на мутантные аллели DMPK (DTX-P-060), тестировали *in vitro* на его способность снижать уровни экспрессии DMPK в иммортализованной линии клеток. В кратком изложении, клетки Нера 1-6 трансфицировали с использованием DTX-P-060 (100 нМ), составленного с липофектаминоом 2000. Уровни экспрессии DMPK оценивали через 72 часа после трансфекции. Также осуществляли контрольный эксперимент, в котором носитель (фосфатно-солевой буфер) добавляли к клеткам Нера 1-6 в культуре и клетки поддерживали в течение 72 часов. Как показано на фиг. 1, обнаружено, что DTX-P-060 снижал уровни экспрессии DMPK на ~90% по сравнению с контролями.

Пример 2: Таргетинг DMPK с использованием мышечно-специфического комплекса

[000292] Получали мышечно-специфический комплекс, содержащий DMPK ASO, использованный в примере 1 (DTX-P-060), ковалентно связанный с помощью расщепляемого линкера катепсина с DTX-A-002 (RI7 217 (Fab)), антителом против рецептора трансферрина.

[000293] В кратком изложении, молекулу линкера малеимидакапроил-L-валин-L-цитруллин-p-аминобензиловый спирт p-нитрофенилкарбонат (MC-Val-Cit-PABC-PNP) связывали с NH₂-C₆-DTX-P-060 с использованием реакции сопряжения амидов. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством гель-фильтрации. Затем очищенный Val-Cit-линкер-DTX-P-060 подвергали сопряжению с тиол-реактивным антителом против рецептора трансферрина (DTX-A-002).

[000294] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергали хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ). На фиг. 2А показана полученная хроматограмма HIC-ВЭЖХ, на которой фракции В7-С2 хроматограммы (обозначены вертикальными линиями) содержали комплексы антитело-олигонуклеотид (обозначаемые как DTX-C-008) содержащие 1 или 2 молекулы DMPK ASO, ковалентно связанные с DTX-A-002, что определяли посредством электрофореза в ПААГ с SDS. Эти фракции HIC-HPLC объединяли и с помощью денситометрии подтверждали, что образец комплексов DTX-C-008 имеет среднее соотношение ASO и антитела 1,48. С помощью электрофореза в ПААГ с SDS определяли чистоту 86,4% этого образца комплексов DTX-C-008, содержащих DTX-A-002, связанный с одной или двумя молекулами DMPK ASO (фиг. 2В).

[000295] Используя описанные выше способы, получали контрольный комплекс, содержащий DMPK ASO, используемый в примере 1 (DTX-P-060), ковалентно связанный с помощью линкера Val-Cit с антителом IgG2a (Fab) (DTX-C-007).

[000296] Затем очищенное DTX-C-008 тестировали на интернализацию в клетки и ингибирование DMPK. Клетки Нера 1-6, имеющие относительно высокие уровни экспрессии рецептора трансферрина, инкубировали в присутствии контрольного носителя, DTX-C-008 (100 нМ), или DTX-C-007 (100 нМ) в течение 72 часов. После инкубации в течение 72 часов клетки выделяли и оценивали на уровни экспрессии DMPK (фиг. 3). Клетки, обработанные DTX-C-008, демонстрировали снижение экспрессии DMPK на ~65% относительно клеток, обработанных контрольным носителем. В то же время, клетки, обработанные DTX-C-007, имели уровни экспрессии DMPK, сравнимые с контрольным носителем (без снижения экспрессии DMPK). Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина DTX-C-008 делает возможной интернализацию комплекса в клетки, таким образом, позволяя DMPK ASO ингибировать экспрессию DMPK.

Пример 3: Таргетинг DMPK в мышечных тканях мышцы с использованием мышечно-специфического комплекса

[000297] Мышечно-специфический комплекс, описанный в примере 2, DTX-C-008, тестировали на ингибирование DMPK в тканях мышцы. Мышам C57BL/6 дикого типа внутривенно инъецировали однократную дозу контрольного носителя, DTX-P-060 (3 мг/кг

РНК), DTX-C-008 (3 мг/кг РНК, соответствующие 20 мг/кг конъюгата антитела), или DTX-C-007 (3 мг/кг РНК, соответствующие 20 мг/кг конъюгата антитела). DTX-P-060, DMPK ASO, как описано в примере 1, использовали в качестве контроля. Каждые экспериментальные условия воспроизводили на трех отдельных мышах C57BL/6 дикого типа. После семидневного периода после инъекции мышей умерщвляли и отделяли выделенные типы тканей. Затем отдельные образцы ткани анализировали на уровне экспрессии DMPK (фиг. 4А-4Е и 5А-5В).

[000298] Мыши, которым вводили комплекс DTX-C-008, демонстрировали снижение экспрессии DMPK в различных скелетно-мышечных, сердечно-мышечных и гладкомышечных тканях. Например, как показано на фиг. 4А-4Е, уровни экспрессии DMPK значительно снижались в тканях икроножной мышцы (снижение на 50%), сердца (снижение на 30%), пищевода (снижение на 45%), передней большеберцовой мышцы (снижение на 47%) и камбаловидной мышцы (снижение на 31%) относительно мышей, которым вводили контрольный носитель. В то же время, мыши, которым вводили комплекс DTX-C-007, имели уровни экспрессии DMPK, сравнимые с контрольным носителем (без снижения экспрессии DMPK) во всех анализированных типах мышечной ткани.

[000299] У мышей, которым вводили комплекс DTX-C-008, не наблюдали изменения экспрессии DMPK в немускульных тканях, таких как ткани селезенки и головного мозга (фиг. 5А и 5В).

[000300] Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина DTX-C-008 делает возможным интернализацию комплекса в клетки в мышечных тканях в модели *in vivo* на мышах, таким образом, позволяя DMPK ASO ингибировать экспрессию DMPK. Эти данные также свидетельствуют о том, что комплекс DTX-C-008 способен к специфическому таргетингу мышечных тканей.

Пример 4: Таргетинг DMPK в мышечных тканях мыши с использованием мышечно-специфического комплекса

[000301] Мышечно-специфический комплекс, описанный в примере 2, DTX-C-008, тестировали на дозозависимое ингибирование DMPK в тканях мыши. Мышам C57BL/6 дикого типа внутривенно инъецировали однократную дозу контрольного носителя (фосфатно-солевого буфера, PBS), DTX-P-060 (10 мг/кг РНК), DTX-C-008 (3 мг/кг или 10 мг/кг РНК, где 3 мг/кг соответствуют 20 мг/кг конъюгата антитела) или DTX-C-007 (3 мг/кг или 10 мг/кг РНК, где 3 мг/кг соответствуют 20 мг/кг конъюгата антитела). DTX-P-060, DMPK ASO, как описано в примере 1, использовали в качестве контроля. Каждые экспериментальные условия воспроизводили на пяти отдельных мышах C57BL/6 дикого типа. После семидневного периода после инъекции мышей умерщвляли и отделяли выделенные типы тканей. Затем отдельные образцы ткани анализировали на уровне экспрессии DMPK (фиг. 6А-6F).

[000302] Мыши, которым вводили комплекс DTX-C-008, демонстрировали снижение экспрессии DMPK в различных скелетно-мышечных тканях. Как показано на

фиг 6А-6F, уровни экспрессии DMPK были значимо снижены в тканях передней большеберцовой мышцы (снижение на 58% и 75% в случае 3 мг/кг и 10 мг/кг DTX-C-008, соответственно), камбаловидной мышцы (снижение на 55% и 66% в случае 3 мг/кг и 10 мг/кг DTX-C-008, соответственно), мышцы длинного разгибателя пальцев (EDL) (снижение на 52% и 72% в случае 3 мг/кг и 10 мг/кг DTX-C-008, соответственно), икроножной мышцы (снижение на 55% и 77% в случае 3 мг/кг и 10 мг/кг DTX-C-008, соответственно), сердце (снижение на 19% и 35% в случае 3 мг/кг и 10 мг/кг DTX-C-008, соответственно) и диафрагмы (снижение на 53% и 70% в случае 3 мг/кг и 10 мг/кг DTX-C-008, соответственно) относительно мышей, которым вводили контрольный носитель. Примечательно, что во всех анализируемых типах мышечной ткани наблюдали дозозависимое ингибирование DMPK с большим снижением уровней DMPK при 10 мг/кг конъюгата антитела, чем при 3 мг/кг конъюгата антитела.

[000303] В то же время, мышцы, которым вводили контрольный комплекс DTX-C-007, имели уровни экспрессии DMPK, сравнимые с контрольным носителем (без снижения экспрессии DMPK) в случае всех анализируемых типов мышечной ткани. Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина DTX-C-008 делает возможной интернализацию комплекса в клетки мышечных тканей в модели *in vivo* на мышах, таким образом, позволяя DMPK ASO ингибировать экспрессию DMPK. Эти данные также свидетельствуют о том, что комплекс DTX-C-008 способен к специфическому таргетингу мышечных тканей для дозозависимого ингибирования DMPK.

Пример 5: Таргетинг DMPK в мышечных тканях яванского макака с использованием мышечно-специфического комплекса

[000304] Получали мышечно-специфический комплекс, содержащий DTX-P-060 (DTX-C-012), и очищали его способами, описанными в примере 2. DTX-C-012 является комплексом, содержащим антитело человека против трансферрина, ковалентно связанное с помощью расщепляемого линкера катепсина Val-Cit с бессмысловым олигонуклеотидом DTX-P-060, нацеленным на DMPK. После очистки посредством HIC-ВЭЖХ с помощью денситометрии подтверждали, что DTX-C-012 имело среднее соотношение ASO и антитела 1,32, и с помощью электрофореза в ПААГ с SDS определяли чистоту 92,3%.

[000305] DTX-C-012 тестировали на дозозависимое ингибирование DMPK в тканях самцов яванского макака. Самцам яванского макака (19-31 месяцев; 2-3 кг) внутривенно инъецировали однократную дозу контрольного физиологического раствора, DTX-P-060 ("голый" DMPK ASO) (10 мг/кг РНК) или DTX-C-012 (10 мг/кг РНК) в день 0. Каждые экспериментальные условия воспроизводили на трех отдельных самцах яванского макака. В день 7 после инъекции собирали биоптаты ткани (включая мышечные ткани). Анализировали уровни экспрессии мРНК DMPK, проводили анализ детекции ASO, биохимический анализ сыворотки, гистологический анализ ткани, клинические показатели и массу тела. Обезьян умерщвляли в день 14.

[000306] Значительный нокдаун (KD) экспрессии мРНК DMPK с использованием DTX-C-012 наблюдали в камбаловидной мышце, глубоком сгибателе пальцев и жевательных мышцах относительно контрольного физиологического раствора с 39% KD, 62% KD и 41% KD, соответственно (фиг. 7A-7C). Устойчивый нокдаун экспрессии мРНК DMPK DTX-C-012 дополнительно наблюдали в икроножной мышце (62% KD; фиг. 7D), EDL (29% KD; фиг. 7E), передней большеберцовой мышце (23% KD; фиг. 7F), диафрагме (54% KD; фиг. 7G), языке (43% KD; фиг. 7H), сердечной мышце (36% KD; фиг. 7I), четырехглавой мышце (58% KD; фиг. 7J), двуглавой мышце (51% KD; фиг. 7K) и дельтовидной мышце (47% KD; фиг. 7L). Нокдаун экспрессии мРНК DMPK DTX-C-012 в гладких мышцах также наблюдали в кишечнике с 63% KD в дуоденоюнальном переходе (фиг. 8A) и 70% KD в подвздошной кишке (фиг. 8B). Примечательно, что "голый" DMPK ASO (т.е. несвязанное с мышечно-специфическим средством), DTX-P-060, имело минимальные эффекты в отношении уровней экспрессии DMPK относительно контрольного носителя (т.е. с небольшим снижением или без снижения экспрессии DMPK) во всех анализируемых типах мышечной ткани. У обезьян, которым вводили комплекс DTX-C-012, не наблюдали изменения экспрессии DMPK в немускульных тканях, таких как тканях печени, почек, головного мозга и селезенки (фиг. 9A-9D). Исследовали дополнительные ткани, как показано на фиг. 10, в которых наблюдали нормализованные уровни экспрессии мРНК DMPK в нескольких типах тканей яванских макаков (N=3 самцов яванских макаков).

[000307] Перед умерщвлением всех обезьян тестировали на уровни ретикулоцитов, уровни тромбоцитов, экспрессию гемоглобина, экспрессию аланинаминотрансферазы (АЛТ), экспрессию аспаратаминотрансферазы (АСТ) и уровни азота мочевины крови (BUN) в дни 2, 7 и 14 после введения. Как показано на фиг. 12, обезьяны, которым вводили комплекс антитело-олигонуклеотид, имели нормальные уровни ретикулоцитов, уровни тромбоцитов, экспрессию гемоглобина, экспрессию аланинаминотрансферазы (АЛТ), экспрессию аспаратаминотрансферазы (АСТ) и уровни азота мочевины крови (BUN) на всем протяжении эксперимента. Эти данные свидетельствовали о том, что однократная доза комплекса, содержащего DTX-P-060, является безопасной и переносимой в случае яванских макаков.

[000308] Эти данные свидетельствовали о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса DTX-C-012 делает возможной интернализацию комплекса в клетки мышечных тканей в модели *in vivo* на яванских макаках, таким образом, позволяя DMPK ASO (DTX-P-060) ингибировать экспрессию DMPK. Эти данные также свидетельствуют о том, что комплекс DTX-C-012 способен к специфическому таргетингу мышечных тканей для дозозависимого ингибирования DMPK без существенного влияния на немускульные ткани. Это напрямую контрастирует с ограниченной способностью DTX-P-060, "голого" DMPK ASO (несвязанного с мышечно-специфическим средством), ингибировать экспрессию DMPK в мышечных тканях в модели *in vivo* на яванских макаках.

Пример 6: Таргетинг DMPK в мышечных тканях мыши с использованием мышечно-специфического комплекса

[000309] Мышечно-специфический комплекс, описанный в примере 2, DTX-C-008, тестировали на дозозависимое ингибирование DMPK в тканях мыши. Мышам C57BL/6 дикого типа внутривенно инъецировали однократную дозу контрольного носителя (физиологический раствор), DTX-P-060 (10 мг/кг РНК) или DTX-C-008 (10 мг/кг РНК) и умерщвляли их после заранее определенного периода времени, как описано в таблице 2. После умерщвления из мышей отделяли выделенные типы тканей, а затем образцы ткани анализировали на уровни экспрессии DMPK (фиг. 11А-11В).

Таблица 2. Экспериментальные условия

Группа	Доза	Дни после инъекции перед умерщвлением	Количество мышей
1	Носитель (физиологический раствор)	3 дня	3
2	Носитель (физиологический раствор)	7 дней	3
3	Носитель (физиологический раствор)	14 дней	3
4	Носитель (физиологический раствор)	28 дней	3
5	DTX-P-060	3 дня	3
6	DTX-P-060	7 дней	3
7	DTX-P-060	14 дней	3
8	DTX-P-060	28 дней	3
9	DTX-C-008	3 дня	3
10	DTX-C-008	7 дней	3
11	DTX-C-008	14 дней	3
12	DTX-C-008	28 дней	3

[000310] У мышей, которым вводили комплекс DTX-C-008, наблюдали приблизительно 50% снижение экспрессии DMPK в икроножной (фиг. 11А) и передней большеберцовой (фиг. 11В) мышцах во всех из групп 9-12 (3-28 дней между инъекцией и умерщвлением) относительно носителя. У мышей, которым вводили "голый" олигонуклеотид DTX-P-060, не наблюдали значительного снижения экспрессии DMPK.

[000311] Эти данные свидетельствуют о том, что комплекс DTX-C-008 может обеспечивать устойчивое снижение экспрессии DMPK в течение до 28 дней после введения мышам указанного комплекса DTX-C-008.

Пример 7: Оценка антисмысловых нуклеотидов, нацеленных на DMPK, в иммортализованных миобластах

[000312] Используя анализ *in silico* получали Двести тридцать шесть олигонуклеотидов для таргетинга DMPK. Каждый отдельный олигонуклеотид оценивали

GGACGGC CCGGCUU GCUGCC	45	GGCAGCAA GCCGGGCC GTCC	281	0,42	58,25	0,31	69,30
GGGCCCCG GAUCACA GGACUG	46	CAGTCCTG TGATCCGG GCCC	282	0,42	57,97	0,38	61,96
CAAACUU GCUCAGC AGUGUC	47	GACACTGC TGAGCAAG TTTG	283	0,69	31,45	0,46	53,93
AAACUUG CUCAGCA GUGUCA	48	TGACACTG CTGAGCAA GTTT	284	0,69	30,85	0,49	50,69
CGGAUGG CCUCCA CUCCCG	49	CGGGAGAT GGAGGCCA TCCG	285	0,71	28,92	0,44	55,57
CUCGGCC GGAAUCC GCUCCC	50	GGGAGCGG ATTCCGGC CGAG	286	0,71	28,64	0,35	64,75
UCUCGGC CGGAAUC CGCUCC	51	GGAGCGGA TTCCGGCC GAGA	287	0,72	27,88	0,33	67,46
UGCUCAG CAGUGUC AGCAGG	52	CCTGCTGA CACTGCTG AGCA	288	0,73	27,08	0,34	65,78
UUGUCGG GUUUGAU GUCCCU	53	AGGGACAT CAAACCCG ACAA	289	0,66	34,16	0,44	55,56
GUUGCGG GUUUGAU GUCCC	54	GGGACATC AAACCCGA CAAC	290	0,67	33,31	0,39	61,07
UCCGCCA GGUAGAA GCGCGC	55	GCGCGCTT CTACCTGG CGGA	291	0,72	27,99	0,20	80,06
CAUGGCA UACACCU GGCCCG	56	CGGGCCAG GTGTATGC CATG	292	0,68	31,63	0,26	74,03
AACUUGC UCAGCAG UGUCAG	57	CTGACACT GCTGAGCA AGTT	293	0,80	19,81	0,47	52,64
CAGCUGC GUGAUCC ACCGCC	58	GGCGGTGG ATCACGCA GCTG	294	0,81	19,03	0,32	68,34
CGAAUGU CCGACAG UGUCUC	59	GAGACACT GTCGGACA TTCG	295	0,60	40,21	0,36	64,42
GAAGUCG GCCAGGC GGAUGU	60	ACATCCGC CTGGCCGA CTTC	296	0,82	18,36	0,56	44,04
UGUCGGG UUUGAUG UCCUG	61	CAGGGACA TCAAACCC GACA	297	0,70	30,09	0,32	68,14
GGAUGGC	62	CCGGGAGA	298	0,75	24,93	0,39	60,77

CUCCAUC UCCCCG		TGGAGGCC ATCC					
AGGAUGU UGUCGGG UUUGAU	63	ATCAAACC CGACAACA TCCT	299	0,76	24,19	0,61	39,48
GUCGGGU UUGAUGU CCCUGU	64	ACAGGGAC ATCAAACC CGAC	300	0,71	28,89	0,36	64,15
AAUACUC CAUGACC AGGUAC	65	GTACCTGG TCATGGAG TATT	301	0,71	28,86	0,48	52,07
CUUGUUC AUGAUCU UCAUGG	66	CCATGAAG ATCATGAA CAAG	302	0,84	16,06	0,51	49,47
UCAGUGC AUCCAAA ACGUGG	67	CCACGTTT TGGATGCA CTGA	303	0,84	15,76	0,58	42,06
CUGUCCC GGAGACC AUCCCA	68	TGGGATGG TCTCCGGG ACAG	304	0,64	35,85	0,49	50,78
GGGCCUG GGACCUC ACUGUC	69	GACAGTGA GGTCCCAG GCCC	305	0,63	37,19	0,23	76,81
CCCACGU AAUACUC CAUGAC	70	GTCATGGA GTATTACG TGGG	306	0,72	28,21	0,54	45,94
CUCUGCC GCAGGGA CAGCCG	71	CGGCTGTC CCTGCGGC AGAG	307	0,63	37,09	0,06	93,59
CUGUGCA CGUAGCC AAGCCG	72	CGGCTTGG CTACGTGC ACAG	308	0,74	25,67	0,30	70,10
UGCCCAU CCACGUC AGGGCC	73	GGCCCTGA CGTGGATG GGCA	309	0,86	13,63	0,67	33,09
AGCGCCU CCGAUAG GCCAGG	74	CCTGGCCT ATCGGAGG CGCT	310	0,79	21,19	0,38	61,91
UGUGCAC GUAGCCA AGCCGG	75	CCGGCTTG GCTACGTG CACA	311	0,75	24,74	0,25	75,09
GACCAGG UACAGGU AGUUCU	76	AGAACTAC CTGTACCT GGTC	312	0,57	42,85	0,29	70,95
CCAUCUC GGCCGGA AUCCGC	77	GCGGATTC CGGCCGAG ATGG	313	0,79	20,50	0,40	59,76
CAUCUCG GCCGGAA UCCGCU	78	AGCGGATT CCGGCCGA GATG	314	0,80	20,21	0,41	59,40
UUGCCAU AGGUCUC	79	ACGGCGGA GACCTATG	315	0,64	36,30	0,40	60,12

CGCCGU		GCAA					
ACAGCGG UCCAGCA GGAUGU	80	ACATCCTG CTGGACCG CTGT	316	0,80	19,94	0,45	55,14
AAAGCGC CUCCGAU AGGCCA	81	TGGCCTAT CGGAGGCG CTTT	317	0,80	19,89	0,38	62,04
GCCAAAG AAGAAGG GAUGUG	82	CACATCCC TTCTTCTT GGC	318	0,75	24,87	0,44	56,19
CACGUAA UACUCCA UGACCA	83	TGGTCATG GAGTATTA CGTG	319	0,76	24,40	0,54	46,50
AUCUCGG CCGGAAU CCGCUC	84	GAGCGGAT TCCGGCCG AGAT	320	0,88	11,61	0,34	65,98
GCUUCAU CUUCACU ACCGCU	85	AGCGGTAG TGAAGATG AAGC	321	0,69	31,44	0,48	51,78
GCCAUCU CGGCCGG AAUCCG	86	CGGATTCC GGCCGAGA TGGC	322	0,81	18,56	0,14	86,39
CAGGGAC AGCCGCU GGAACU	87	AGTTCCAG CGGCTGTC CCTG	323	0,68	32,09	0,41	58,84
AUGACAA UCUCCGC CAGGUA	88	TACCTGGC GGAGATTG TCAT	324	0,58	42,38	0,40	60,47
GGCCAUG ACAAUCU CCGCCA	89	TGGCGGAG ATTGTCAT GGCC	325	0,58	42,38	0,25	75,00
AUACUCC AUGACCA GGUACA	90	TGTACCTG GTCATGGA GTAT	326	0,77	23,07	0,43	56,84
GCCUCUG CCUCGCG UAGUUG	91	CAACTACG CGAGGCAG AGGC	327	0,65	35,38	0,19	81,18
GAAUGUC CGACAGU GUCUCC	92	GGAGACAC TGTCGGAC ATTC	328	0,70	30,09	0,37	63,41
CGUUCCA UCUGCCC GCAGCU	93	AGCTGCGG GCAGATGG AACG	329	0,66	33,74	0,31	68,72
CCUUGUA GUGGACG AUCUUG	94	CAAGATCG TCCACTAC AAGG	330	0,83	17,20	0,34	65,91
AUCUCCG CCAGGUA GAAGCG	95	CGCTTCTA CCTGGCGG AGAT	331	0,58	42,37	0,35	65,50
CUCAGGC UCUGCCG GGUGAG	96	CTCACCCG GCAGAGCC TGAG	332	0,70	30,13	0,37	63,07

UGCUUCA UCUUCAC UACCGC	97	GCGGTAGT GAAGATGA AGCA	333	0,71	28,82	0,40	60,24
GCAGGAU GUUGUCG GGUUUG	98	CAAACCCG ACAACATC CTGC	334	0,56	44,39	0,22	78,03
GGCCUCA GCCUCUG CCGCAG	99	CTGCGGCA GAGGCTGA GGCC	335	0,80	20,12	0,29	71,28
UGUUGUC GGGUUUG AUGUCC	100	GGACATCA AACCCGAC AACA	336	0,79	21,00	0,58	42,19
CCACGUA AUACUCC AUGACC	101	GGTCATGG AGTATTAC GTGG	337	0,79	20,84	0,50	50,06
CCGUUCC AUCUGCC CGCAGC	102	GCTGCGGG CAGATGGA ACGG	338	0,68	31,74	0,23	77,46
UUCCCGA GUAAGCA GGCAGA	103	TCTGCCTG CTTACTCG GGAA	339	0,69	31,49	0,50	49,81
UGAUCUU CAUGGCA UACACC	104	GGTGTATG CCATGAAG ATCA	340	0,72	27,70	0,10	89,68
AGGGACA GCCGCUG GAACTG	105	CAGTTCCA GCGGCTGT CCCT	341	0,71	28,72	0,55	45,34
GGGUUUG AUGUCCC UGUGCA	106	TGCACAGG GACATCAA ACCC	342	0,60	40,12	0,37	62,61
UGACAAU CUCCGCC AGGUAG	107	CTACCTGG CGGAGATT GTCA	343	0,61	38,86	0,33	66,56
CACAGCG GUCCAGC AGGAUG	108	CATCCTGC TGGACCGC TGTG	344	0,93	6,62	0,40	59,58
GCGUAGA AGGGCGU CUGCCC	109	GGGCAGAC GCCCTTCT ACGC	345	0,60	39,53	0,22	77,91
CUCAGCC UCUGCCG CAGGGA	110	TCCCTGCG GCAGAGGC TGAG	346	0,82	17,86	0,20	79,58
GUCUCAG UGCAUCC AAAACG	111	CGTTTTGG ATGCACTG AGAC	347	0,81	18,85	0,54	46,13
GGACGAU CUUGCCA UAGGUC	112	GACCTATG GCAAGATC GTCC	348	0,70	29,82	0,51	48,97
UCAGCAG UGUCAGC AGGUCC	113	GGACCTGC TGACACTG CTGA	349	0,67	33,46	0,39	61,11
GCUCCUG	114	GTCTGGCG	350	0,91	8,52	0,21	78,79

GGCGGCG CCAGAC		CCGCCCAG GAGC					
AGCAGGA UGUUGUC GGUUU	115	AAACCCGA CAACATCC TGCT	351	0,59	41,05	0,26	74,02
AUCCGCU CCUGCAA CUGCCG	116	CGGCAGTT GCAGGAGC GGAT	352	0,87	12,80	0,60	40,06
AGGAGCA GGGAAAG CGCCUC	117	GAGGCGCT TTCCTGCT CCT	353	0,67	33,24	0,38	62,37
ACACCUG GCCCGUC UGCUC	118	GAAGCAGA CGGGCCAG GTGT	354	0,67	33,00	0,45	55,40
CCCAGCG CCCACCA GUCACA	119	TGTGACTG GTGGGCGC TGGG	355	0,62	37,93	0,32	67,82
GCUCCU CUGCCUG CAGCAA	120	TTGCTGCA GGCAGAGG GAGC	356	0,74	26,41	0,30	70,15
GCUCAGG CUCUGCC GGUGA	121	TCACCCGG CAGAGCCT GAGC	357	0,74	25,69	0,39	60,71
UUGAUGU CCCUGUG CACGUA	122	TACGTGCA CAGGGACA TCAA	358	0,74	25,67	0,45	55,13
GCCUCAG CCUCUGC CGCAGG	123	CCTGCGGC AGAGGCTG AGGC	359	0,84	16,37	0,54	46,42
GGUAGUU CUCAUCC UGGAAG	124	CTTCCAGG ATGAGAAC TACC	360	0,75	25,48	0,44	56,15
CAGCGCC CACCAGU CACACU	125	AGTGTGAC TGGTGGGC GCTG	361	0,63	37,28	0,35	64,93
CCCAAAC UUGCUC GCAGUG	126	CACTGCTG AGCAAGTT TGGG	362	0,63	37,02	0,38	61,78
CUUGCCA UAGGUCU CCGCCG	127	CGGCGGAG ACCTATGG CAAG	363	0,73	27,04	0,29	71,05
UACACCU GGCCCGU CUGCUU	128	AAGCAGAC GGGCCAGG TGTA	364	0,69	31,10	0,43	57,43
CCAGCGC CCACCAG UCACAC	129	GTGTGACT GGTGGGCG CTGG	365	0,64	36,17	0,29	70,96
GGCCUCA GCCUGGC CGAAAG	130	CTTTCGGC CAGGCTGA GGCC	366	0,86	14,49	0,35	64,80
AAUCUCC GCCAGGU	131	GCTTCTAC CTGGCGGA	367	0,64	35,85	0,35	65,27

AGAAGC		GATT					
AUGGCAU ACACCUG GCCCGU	132	ACGGGCCA GGTGTATG CCAT	368	0,86	14,31	0,50	49,63
CCAUGAC AAUCUCC GCCAGG	133	CCTGGCGG AGATTGTC ATGG	369	0,65	34,53	0,24	76,46
UCCCCAA ACUUGCU CAGCAG	134	CTGCTGAG CAAGTTTG GGGA	370	0,94	5,73	0,55	44,67
GAUGUUG UCGGGUU UGAUGU	135	ACATCAA CCCGACAA CATC	371	0,90	10,06	0,58	42,42
GUUUGCC CAUCCAC GUCAGG	136	CCTGACGT GGATGGGC AAAC	372	0,66	34,36	0,46	54,49
CGGACGG CCCGGCU UGCUGC	137	GCAGCAAG CCGGGCCG TCCG	373	0,95	5,42	0,70	30,41
CUCCGCC AGGUAGA AGCGCG	138	CGCGCTTC TACCTGGC GGAG	374	0,70	30,22	0,22	78,14
GUACAGG UAGUUCU CAUCCU	139	AGGATGAG AACTACCT GTAC	375	0,68	31,52	0,34	65,57
AGGGCGU CUGCCCA UAGAAC	140	GTTCTATG GGCAGACG CCCT	376	0,87	13,23	0,41	58,98
UGGCCAC AGCGGUC CAGCAG	141	CTGCTGGA CCGCTGTG GCCA	377	0,70	29,59	0,31	69,44
CGUAGUU GACUGGC GAAGUU	142	AACTTCGC CAGTCAAC TACG	378	0,75	25,26	0,38	61,52
UCUGCCG CAGGGAC AGCCGC	143	GCGGCTGT CCCTGCGG CAGA	379	0,77	22,97	0,18	82,10
AAGCGCC UCCGAUA GGCCAG	144	CTGGCCTA TCGGAGGC GCTT	380	0,91	8,91	0,56	43,93
GACAGAA CAACGGC GAACAG	145	CTGTTCGC CGTTGTTCT GTC	381	0,79	21,41	0,30	70,49
GCUCAGC AGUGUCA GCAGGU	146	ACCTGCTG ACACTGCT GAGC	382	0,71	29,18	0,27	73,46
AUGAUCU UCAUGGC AUACAC	147	GTGTATGC CATGAAGA TCAT	383	0,87	12,76	0,60	39,97
UUUGCCC AUCCACG UCAGGG	148	CCCTGACG TGGATGGG CAAA	384	0,67	32,79	0,41	59,36

ACUUGCU CAGCAGU GUCAGC	149	GCTGACAC TGCTGAGC AAGT	385	0,72	27,84	0,39	60,71
UGAUGUC CCUGUGC ACGUAG	150	CTACGTGC ACAGGGAC ATCA	386	0,79	20,58	0,41	59,00
AAAUACC GAGGAU GUCGGG	151	CCCGACAT TCCTCGGT ATTT	387	0,89	11,25	0,49	50,91
GGCGAAU ACACCCA GCGCCC	152	GGGCGCTG GGTGTATT CGCC	388	0,80	19,77	0,31	68,72
AGACAAU AAAUACC GAGGAA	153	TTCCTCGG TATTTATTG TCT	389	0,71	29,37	0,52	48,20
CCCGUCU GCUUCAU CUUCAC	154	GTGAAGAT GAAGCAGA CGGG	390	0,80	20,31	0,56	43,97
CUGCCUG CAGCAAC UCCAUC	155	GATGGAGT TGCTGCAG GCAG	391	0,77	23,10	0,53	46,69
CCUCAGC CUCUGCC GCAGGG	156	CCCTGCGG CAGAGGCT GAGG	392	0,89	10,87	0,45	55,22
GUGUCCG GAAGUCG CCUGCU	157	AGCAGGCG ACTTCCGG ACAC	393	0,77	22,99	0,26	73,65
UGCACGU GUGGCUC AAGCAG	158	CTGCTTGA GCCACACG TGCA	394	0,89	10,81	0,36	64,18
GACAAUA AAUACCG AGGAAU	159	ATTCCTCG GTATTTATT GTC	395	0,71	28,97	0,52	47,51
GCCAUGA CAAUCUC CGCCAG	160	CTGGCGGA GATTGTCA TGGC	396	0,69	30,96	0,19	81,00
GCUGUCC CGGAGAC CAUCCC	161	GGGATGGT CTCCGGGA CAGC	397	0,77	22,57	0,34	66,27
CAUGACC AGGUACA GGUAGU	162	ACTACCTG TACCTGGT CATG	398	0,81	19,39	0,41	59,09
AGCGCCC ACCAGUC ACACUC	163	GAGTGTGA CTGGTGGG CGCT	399	0,70	30,36	0,36	63,67
UCUCAGU GCAUCCA AAACGU	164	ACGTTTTG GATGCACT GAGA	400	0,89	10,88	0,49	51,34
UUUGGGC AGAUGGA GGGCCU	165	AGGCCCTC CATCTGCC CAAA	401	0,65	35,14	0,30	70,00
GAUGUCC	166	GCTACGTG	402	0,81	18,99	0,38	62,46

CUGUGCA CGUAGC		CACAGGGA CATC					
CAGCAGU GUCAGCA GGUCCC	167	GGGACCTG CTGACACT GCTG	403	0,74	25,67	0,48	51,97
CAUGACA AUCUCCG CCAGGU	168	ACCTGGCG GAGATTGT CATG	404	0,71	29,45	0,29	70,52
ACUUGUU CAUGAUC UUCAUG	169	CATGAAGA TCATGAAC AAGT	405	0,75	25,47	0,47	52,89
GUGGAAU CCGCGUA GAAGGG	170	CCCTTCTA CGCGGATT CCAC	406	0,69	30,55	0,51	49,34
UGGCCAU GACAAUC UCCGCC	171	GGCGGAGA TTGTCATG GCCA	407	0,70	30,46	0,27	72,55
GGGACAG ACAAUAA AUACCG	172	CGGTATTT ATTGTCTG TCCC	408	0,73	27,19	0,49	50,50
CCGCUCC CCAAACU UGCUC A	173	TGAGCAAG TTTGGGGA GCGG	409	1,00	0,28	0,43	56,82
CGGCUCA GGCUCUG CCGGGU	174	ACCCGGCA GAGCCTGA GCCG	410	0,82	17,97	0,31	69,03
GGCUCCU GGGCGGC GCCAGA	175	TCTGGCGC CGCCAGG AGCC	411	1,00	0,05	0,04	96,23
UUUCCCG AGUAAGC AGGCAG	176	CTGCCTGC T TACTCGG GAAA	412	0,79	20,69	0,55	44,89
GGAUGUU GUCGGGU UUGAUG	177	CATCAAAC CCGACAAC ATCC	413	0,96	4,26	0,59	40,81
CAGGUAG UUCUCAU CCUGGA	178	TCCAGGAT GAGAACTA CCTG	414	0,74	25,92	0,23	76,71
UGCCCAU AGAACAU UUCAUA	179	TATGAAAT GTTCTATG GGCA	415	0,92	7,67	0,65	34,56
UAGUUCU CAUCCUG GAAGGC	180	GCCTTCCA GGATGAGA ACTA	416	0,83	16,83	0,56	43,88
AUGUCCC UGUGCAC GUAGCC	181	GGCTACGT GCACAGGG ACAT	417	0,83	16,78	0,51	49,29
CGGGCCC GGAUCAC AGGACU	182	AGTCCTGT GATCCGGG CCCG	418	0,83	17,45	0,33	67,11
UGGACGA UCUUGCC	183	ACCTATGG CAAGATCG	419	0,81	19,20	0,57	42,52

AUAGGU		TCCA					
GUUGGCC GGCGUGG GCCACC	184	GGTGGCCC ACGCCGGC CAAC	420	1,02	-1,82	0,56	43,57
CUCAGUG CAUCCAA AACGUG	185	CACGTTTT GGATGCAC TGAG	421	0,92	7,65	0,46	54,26
UCGAAGU UGCAUGU GUCGGU	186	ACCGACAC ATGCAACT TCGA	422	0,77	22,96	0,42	58,15
UGGAACA CGGACGG CCCGGC	187	GCCGGGCC GTCCGTGT TCCA	423	1,02	-1,90	0,39	60,96
CCGAGAG CAGCGCA AGUGAG	188	CTCACTTG CGCTGCTC TCGG	424	0,84	16,13	0,59	40,93
UCCUGCA ACUGCCG GACGUG	189	CACGTCCG GCAGTTGC AGGA	425	0,84	16,06	0,55	44,61
UCACCAA CACGUCC CUCUCC	190	GGAGAGGG ACGTGTTG GTGA	426	0,53	47,12	0,16	84,09
UGCCUGC AGCAACU CCAUCC	191	GGATGGAG TTGCTGCA GGCA	427	0,86	13,99	0,50	49,75
UUGGCCG GCGUGGG CCACCA	192	TGGTGGCC CACGCCGG CCAA	428	1,03	-3,19	0,56	44,37
GAGCCUC UGCCUCG CGUAGU	193	ACTACGCG AGGCAGAG GCTC	429	0,81	18,77	0,22	77,78
AAGGGCG UCUGCCC AUAGAA	194	TTCTATGG GCAGACGC CCTT	430	0,87	13,15	0,65	34,56
ACAGACA AUAUAUA CCGAGG	195	CCTCGGTA TTTATTGTC TGT	431	1,04	-3,95	0,26	74,02
GGACAGA CAAUAAA UACCGA	196	TCGGTATT TATTGTCT GTCC	432	0,77	22,57	0,47	52,51
ACGUGUG CCUCUAG GUCCCG	197	CGGGACCT AGAGGCAC ACGT	433	0,84	16,47	0,22	77,73
GGCACGA GACAGAA CAACGG	198	CCGTTGTT CTGTCTCG TGCC	434	0,84	16,10	0,32	68,01
UGACCAG GUACAGG UAGUUC	199	GAACTACC TGTACCTG GTCA	435	0,78	22,00	0,36	63,73
CUCUGCC GGGUGAG CACCUC	200	GAGGTGCT CACCCGGC AGAG	436	0,75	25,25	0,26	74,36

GACAAUC UCCGCCA GGUAGA	201	TCTACCTG GCGGAGAT TGTC	437	0,76	23,70	0,50	49,82
UCUCCGC CAGGUAG AAGCGC	202	GCGCTTCT ACCTGGCG GAGA	438	0,80	19,59	0,33	66,52
CUCUGCC UCGCGUA GUUGAC	203	GTCAACTA CGCGAGGC AGAG	439	0,83	16,61	0,09	91,21
CUUUGGG CAGAUGG AGGGCC	204	GGCCCTCC ATCTGCCC AAAG	440	0,72	28,06	0,33	67,50
ACAGGUA GUUCUCA UCCUGG	205	CCAGGATG AGAACTAC CTGT	441	0,79	20,51	0,15	85,36
CCAAACU UGCTCAG CAGUGU	206	ACACTGCT GAGCAAGT TTGG	442	0,76	23,64	0,42	57,70
UCGGGUU UGAUGUC CCUGUG	207	CACAGGGA CATCAAAC CCGA	443	0,78	22,49	0,43	57,16
GGCUUGC UGCCUUC CCAGGC	208	GCCTGGGA AGGCAGCA AGCC	444	1,06	-6,32	0,52	48,15
UACAGGU AGUUCUC AUCCUG	209	CAGGATGA GAACTACC TGTA	445	0,80	19,83	0,27	72,51
UUGCCCA UCCACGU CAGGGC	210	GCCCTGAC GTGGATGG GCAA	446	0,78	22,23	0,33	67,15
AGGUACA GGUAGUU CUCAUC	211	GATGAGAA CTACCTGT ACCT	447	0,81	18,68	0,41	58,92
GACAGAC AAUAAU ACCGAG	212	CTCGGTAT TTATTGTCT GTC	448	0,82	18,26	0,62	38,07
UAGAACA UUUCAUA GGCGAA	213	TTCGCCTA TGAAATGT TCTA	449	0,80	20,23	0,56	43,67
AGGGCCU UUUAUUC GCGAGG	214	CCTCGCGA ATAAAAGG CCCT	450	0,86	13,63	0,34	66,43
GCCUCGC GUAGUUG ACUGGC	215	GCCAGTCA ACTACGCG AGGC	451	0,87	12,98	0,09	91,10
CCAGCAG GAUGUUG UCGGGU	216	ACCCGACA ACATCCTG CTGG	452	0,60	40,29	0,10	89,59
GUAGUUG ACUGGCG AAGUUC	217	GAACTTCG CCAGTCAA CTAC	453	0,93	7,50	0,55	45,33
UGC GGAU	218	GGAGATGG	454	0,60	40,15	0,16	84,43

GGCCUCC AUCUCC		AGGCCATC CGCA					
ACAAUCU CCGCCAG GUAGAA	219	TTCTACCT GGCGGAGA TTGT	455	0,81	19,09	0,50	49,75
GCGAAUA CACCCAG CGCCA	220	TGGGCGCT GGGTGTAT TCGC	456	0,93	6,94	0,30	69,72
GUAGUUC UCAUCCU GGAAGG	221	CCTTCCAG GATGAGAA CTAC	457	0,93	7,43	0,45	55,09
GGCUCAG GCUCUGC CGGGUG	222	CACCCGGC AGAGCCTG AGCC	458	0,93	7,38	0,34	65,82
CCAUUCA CCAACAC GUCCCU	223	AGGGACGT GTTGGTGA ATGG	459	0,61	39,26	0,13	86,83
ACCAGGU ACAGGUA GUUCUC	224	GAGAACTA CCTGTACC TGGT	460	0,84	16,09	0,23	76,96
CTGCAGU UUGCCCA UCCACG	225	CGTGGATG GGCAAAC GCAG	461	1,11	-10,69	0,40	60,08
UUGUUCA UGAUCUU CAUGGC	226	GCCATGAA GATCATGA ACAA	462	0,86	14,13	0,55	45,23
UUGAUGU CCCUGUG CACGU	227	ACGTGCAC AGGGACAT CAAA	463	0,93	6,92	0,57	43,07
GCGGUCC AGCAGGA UGUUGU	228	ACAACATC CTGCTGGA CCGC	464	0,61	38,84	0,16	83,64
GUCUAUG GCCAUGA CAAUCU	229	AGATTGTC ATGGCCAT AGAC	465	1,11	-11,00	0,27	73,11
GGAGCAG GGAAAGC GCCUCC	230	GGAGGCGC TTCCCTGC TCC	466	0,79	21,46	0,12	88,35
UGCCUCG CGUAGUU GACUGG	231	CCAGTCAA CTACGCGA GGCA	467	0,89	11,03	0,12	88,02
GCGGAUG GCCUCCA UCUCCC	232	GGGAGATG GAGGCCAT CCGC	468	0,79	21,25	0,28	71,77
UUUCAUA GGCGAAU ACACCC	233	GGGTGTAT TCGCCTAT GAAA	469	0,94	5,56	0,47	53,28
GCCUGUC AGCGAGU CGGAGG	234	CCTCCGAC TCGCTGAC AGGC	470	0,89	10,81	0,24	75,67
CCACUUC AGCUGUU	235	GGATGAAA CAGCTGAA	471	0,78	22,40	0,36	64,20

UCAUCC		GTGG					
CAUCCGC UCCUGCA ACUGCC	236	GGCAGTTG CAGGAGCG GATG	472	0,79	21,04	0,23	76,81
UCUAGGG UUCAGGG AGCGCG	237	CGCGCTCC CTGAACCC TAGA	473	0,78	21,81	0,17	83,22
CACCAAC ACGUCCC UCUCCU	238	AGGAGAGG GACGTGTT GGTG	474	0,62	37,51	0,18	81,57
CAGGAGC AGGGAAA GCGCCU	239	AGGCGCTT TCCCTGCT CCTG	475	0,88	12,48	0,48	51,82
CAAUCUC CGCCAGG UAGAAG	240	CTTCTACCT GGCGGAGA TTG	476	0,84	15,95	0,51	49,25
AUGUUGU CGGGUUU GAUGUC	241	GACATCAA ACCCGACA ACAT	477	0,83	16,93	0,47	52,83
CCAUCCG CUCCUGC AACUGC	242	GCAGTTGC AGGAGCGG ATGG	478	0,80	19,53	0,28	71,62
GCGUCAC CUCGGCC UCAGCC	243	GGCTGAGG CCGAGGTG ACGC	479	0,80	20,02	0,19	81,27
GAGGGCC UUUUAAU CGCGAG	244	CTCGCGAA TAAAAGGC CCTC	480	0,92	8,23	0,38	62,21
AGCGGCA GAGAGAG GUGCUC	245	GAGCACCT CTCTCTGC CGCT	481	0,80	19,75	0,09	90,71
CAUCCAA AACGUGG AUUGGG	246	CCCAATCC ACGTTTTG GATG	482	0,81	19,12	0,22	77,98
UUGGGCA GAUGGAG GGCCUU	247	AAGGCCCT CCATCTGC CCAA	483	0,81	19,08	0,22	78,39
CCUCUGC CUCGCGU AGUUGA	248	TCAACTAC GCGAGGCA GAGG	484	0,93	7,39	0,15	85,33
ACAGAAC AACGGCG AACAGG	249	CCTGTTCG CCGTTGTT CTGT	485	0,98	2,07	0,44	55,96
CAGGAUG UUGUCGG GUUUGA	250	TCAAACCC GACAACAT CCTG	486	0,83	17,17	0,21	79,31
CGGCCUC AGCCUCU GCCGCA	251	TGCGGCAG AGGCTGAG GCCG	487	0,93	6,71	0,40	60,06
CAGCAGG AUGUUGU CGGGUU	252	AACCCGAC AACATCCT GCTG	488	0,66	34,18	0,15	84,54

GCAGAGA GAGGUGC UCCUUG	253	CAAGGAGC ACCTCTCT CTGC	489	0,83	17,29	0,14	85,95
UCCAGUU CCAUGGG UGUGGG	254	CCCACACC CATGGAAC TGGA	490	0,84	15,66	0,22	78,48
CCUCAGC CUGGCCG AAAGAA	255	TTCTTTCGG CCAGGCTG AGG	491	0,83	16,83	0,36	63,99
GGGCCUU UUAUUCG CGAGGG	256	CCCTCGCG AATAAAAG GCCC	492	0,95	5,11	0,49	50,65
GUCGGCC AGGCGGA UGUGGC	257	GCCACATC CGCCTGGC CGAC	493	0,85	15,35	0,25	74,59
GCUUGCU GCCUUCC CAGGCC	258	GGCCTGGG AAGGCAGC AAGC	494	0,99	1,14	0,19	81,01
GGUCCAG CAGGAUG UUGUCG	259	CGACAACA TCCTGCTG GACC	495	0,68	31,78	0,20	79,93
CGGAGAC CAUCCA GUCGAG	260	CTCGACTG GGATGGTC TCCG	496	0,86	14,08	0,20	79,93
UCUGCCU CGCGUAG UGACU	261	AGTCAACT ACGCGAGG CAGA	497	0,96	3,53	0,13	86,86
AGGUAGU UCUCAUC CUGGAA	262	TTCCAGGA TGAGAACT ACCT	498	0,93	7,36	0,37	62,62
UCCUUGU AGUGGAC GAUCUU	263	AAGATCGT CCACTACA AGGA	499	0,87	12,96	0,15	84,87
GCAUCCA AAACGUG GAUUGG	264	CCAATCCA CGTTTTGG ATGC	500	0,97	2,54	0,27	72,69
GUCCAGC AGGAUGU GUCGG	265	CCGACAAC ATCCTGCT GGAC	501	0,70	30,00	0,17	82,64
AGCUCCC GCAGCGU CACCUC	266	GAGGTGAC GCTGCGGG AGCT	502	0,86	13,72	0,20	80,40
CGAGAGC AGCGCAA GUGAGG	267	CCTCACTT GCGCTGCT CTCG	503	1,02	-2,19	0,63	37,11
CAGGGAA AGCGCCU CCGAUA	268	TATCGGAG GCGCTTTC CCTG	504	0,89	11,10	0,08	91,59
AUUUCAU AGGCGAA UACACC	269	GGTGTATT CGCCTATG AAAT	505	1,05	-4,54	0,56	44,15
UCGGCCA	270	GGCCACAT	506	0,73	26,53	0,17	83,04

GGCGGAU GUGGCC		CCGCCTGG CCGA					
AAGGGAU GUGUCCG GAAGUC	271	GACTTCCG GACACATC CCTT	507	0,90	10,37	0,26	73,52
CUUGUAG UGGACGA UCUUGC	272	GCAAGATC GTCCACTA CAAG	508	0,76	24,09	0,11	89,16
AGUCGGC CAGGCGG AUGUGG	273	CCACATCC GCCTGGCC GACT	509	0,94	6,15	0,33	67,44
GCCUCAG CCUGGCC GAAAGA	274	TCTTTCGG CCAGGCTG AGGC	510	1,05	-4,82	0,37	63,11
AGCGUCA CCUCGGC CUCAGC	275	GCTGAGGC CGAGGTGA CGCT	511	0,78	22,10	0,35	64,70
CAGCGGC AGAGAGA GGUGCT	276	AGCACCTC TCTCTGCC GCTG	512	0,96	4,49	0,14	86,00
CCAGCGG CAGAGAG AGGUGC	277	GCACCTCT CTCTGCCG CTGG	513	0,97	3,23	0,15	84,55
UUGUAGU GGACGAU CUUGCC	278	GGCAAGAT CGTCCACT ACAA	514	0,83	17,22	0,19	81,05
AGGGAAA GCGCCUC CGAUAG	279	CTATCGGA GGCGCTTT CCCT	515	1,01	-1,12	0,25	75,50
GGGAAAG CGCCUCC GAUAGG	280	CSTATCGG AGGCGCTT TCCC	516	0,90	10,02	0,23	76,79

Пример 8: Выбранные антисмысловые олигонуклеотиды обеспечивали дозозависимое снижение экспрессии DMPK в иммортализованных миобластах

[000316] Выбирали восемнадцать олигонуклеотидов из примера 7 для оценки их способности снижать экспрессию DMPK дозозависимым образом. Миобласты DM1 C15 получали, как описано в примере 7, то для получения дифференцированных миотрубочек в 96-луночных микропланшетах. После семи дней дифференцировки клетки трансфицировали отдельными олигонуклеотидами с использованием липофектамина MessengerMax. Каждый олигонуклеотид тестировали в трех параллелях в концентрациях 0,046 нМ, 0,137 нМ, 0,412 нМ, 1,235 нМ, 3,704 нМ, 11,11 нМ, 33,33 нМ и 100 нМ посредством 3-кратных серийных разведений с использованием 0,3 мкл липофектамина MessengerMax на лунку.

[000317] После добавления олигонуклеотида клетки инкубировали в течение 72 часов перед сбором для получения тотальной РНК. кДНК синтезировали из экстрактов тотальной и осуществляли qPCR для определения уровней экспрессии DMPK с использованием коммерчески доступного набора зондов Taqman в четырех технических

параллелях. Все данные qPCR анализировали общепринятым способом $\Delta\Delta CT$ и нормализовали по отрицательному контролю на планшете, содержащему клетки, обработанные контрольным носителем (0,3 мкл/лунку липофектамина MessengerMax без каких-либо олигонуклеотидов). Данные для каждого олигонуклеотида аппроксимировали к сигмовидной кривой для определения эффективной концентрации каждого олигонуклеотида, обеспечивающей полумаксимальный ответ (EC_{50}). Результаты этих экспериментов приведены в таблице 4.

[000318] Каждый из восемнадцати антисмысловых олигонуклеотидов, выбранных для экспериментов по определению зависимости от дозы, могли дозозависимо снижать DMPK в дифференцированных миотрубочках. Кроме того, каждый из тестируемых антисмысловых олигонуклеотидов снижал DMPK со значением EC_{50} менее 25 нМ. Например, антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие SEQ ID NO: 161, 112, 119, 87 и 109, приводили к получению значений EC_{50} 3,27 нМ, 3,59 нМ, 5,45 нМ, 6,04 нМ и 24,59 нМ, соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что антисмысловые олигонуклеотиды, приведенные в таблице 4, могут дозозависимо снижать DMPK in cellulo, что позволяет предполагать, что мышечно-специфические комплексы, содержащие эти антисмысловые олигонуклеотиды, будут способны к таргетингу DMPK в мышечных тканях in vivo.

Таблица 4. Способность DMPK-специфических антисмысловых нуклеотидов снижать экспрессию DMPK дозозависимым образом in cellulo

Последовательность антисмыслового олигонуклеотида	SEQ ID NO:	Целевая последовательность DMPK	SEQ ID NO:	Результаты	
				EC_{50} (нМ)	Процент снижения DMPK при 100 нМ
GCAGGAUGUUGU CGGGUUUG	98	CAAACCCGACA ACATCCTGC	334	0,1679	89,77
AGCAGGAUGUUG UCGGGUUU	115	AAACCCGACAA CATCCTGCT	351	0,2266	85,81
GCGUAGAAGGGC GUCUGCCC	109	GGGCAGACGCC CTTCTACGC	345	24,59	95,13
CCCAGCGCCCACC AGUCACA	119	TGTGACTGGTG GGCGCTGGG	355	5,454	63,69
CCAUCUCGGCCG GAAUCCGC	77	GCGGATTCGGG CCGAGATGG	313	0,44	95,42
CGUCCAUCUGC CCGCAGCU	93	AGCTGCGGGCA GATGGAACG	329	0,19	89,97
CAGGGACAGCCG CUGGAACU	87	AGTTCCAGCGG CTGTCCCTG	323	6,04	90,59

CAUGGCAUACAC CUGGCCCG	56	CGGGCCAGGTG TATGCCATG	292	0,42	75,28
GCUUCAUCUUCA CUACCGCU	85	AGCGGTAGTGA AGATGAAGC	321	0,03	64,06
GAAUGUCCGACA GUGUCUCC	92	GGAGACACTGT CGGACATTC	328	0,07	97,23
GGACGAUCUUGC CAUAGGUC	112	GACCTATGGCA AGATCGTCC	348	3,59	92,18
GCUGUCCCGGAG ACCAUCCC	161	GGGATGGTCTC CGGGACAGC	397	3,27	93,07
GACAGAACAACG GCGAACAG	145	CTGTTCGCCGTT GTTCTGTC	381	0,08	94,32
UGUUGUCGGGUU UGAUGUCC	100	GGACATCAAAC CCGACAACA	336	0,21	93,95
CGAAUGUCCGAC AGUGUCUC	59	GAGACACTGTC GGACATTCG	295	0,18	95,93
GGGCCUGGGACC UCACUGUC	69	GACAGTGAGGT CCCAGGCC	305	0,07	90,58
CUCUGCCGCAGG GACAGCCG	71	CGGCTGTCCCTG CGGCAGAG	307	0,42	93,66
UUGCCAUAGGUC UCCGCCGU	79	ACGGCGGAGAC CTATGGCAA	315	0,37	93,70

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ТЕРМОНОЛОГИЯ

[000319] Настоящее изобретение, иллюстративно представленное в настоящем описании, соответствующим образом можно осуществлять на практике в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, конкретно не представленных в настоящем описании. Таким образом, например, в каждом случае в настоящем описании любой из терминов "содержащий", "состоящий, по существу, из" и "состоящий из" можно заменять любым из других двух терминов. Используемые термины и выражения используют в качестве описательных терминов, а не ограничивающих, и в использовании таких терминов и выражений нет намерений исключить любые эквиваленты, приведенные и описанные признаки или их части, но известно, что в объеме настоящего изобретения возможны различные модификации. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящее изобретение конкретно описано с помощью предпочтительных вариантов осуществления, специалисты в этой области могут определять необязательные признаки, модификации и варианты концепций, представленных в настоящем описании, и что такие модификации и варианты считают входящими в объем настоящего изобретения.

[000320] Кроме того, если признаки или аспекты настоящего изобретения описаны в терминах групп Маркуша или другой группировки альтернатив, специалистам в этой области понятно, что изобретение, таким образом, также описано в терминах любого отдельного члена, или подгруппы членов группы Маркуша, или другой группы.

[000321] Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления последовательности, приведенные в списке последовательностей, могут относиться к описанию структуры олигонуклеотида или другой нуклеиновой кислоты. В таких вариантах осуществления конкретный олигонуклеотид или другая нуклеиновая кислота может содержать один или более альтернативных нуклеотидов (например, РНК, соответствующей нуклеотиду ДНК, или ДНК, соответствующей нуклеотиду РНК), и/или один или более модифицированных нуклеотидов, и/или одну или более модифицированных межнуклеотидных связей, и/или одну или более других модификаций по сравнению с определенной последовательностью при сохранении, по существу, тех же или схожих комплементарных свойств, что и определенная последовательность.

[000322] Использование терминов в единственном числе в отношении описания изобретения (особенно в отношении формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее единственное и множественное число, если иное не указано в настоящем описании или это ясно не противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" следует истолковывать как неограничивающие термины (т.е. означающие "включающий в качестве неограничивающих примеров"), если не указано иначе. Перечисление диапазонов значений в настоящем описании является исключительно способом сокращенной записи со ссылкой индивидуально на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если в настоящем описании не указано иначе, и каждое отдельное значение включено в описание так, как если бы оно было отдельно приведено в настоящем описании. Все способы, представленные в настоящем описании, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если не указано иначе в настоящем описании или это четко не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или вводных слов перед примерами (например, "таких как"), представленных в настоящем описании, предназначено исключительно для лучшего иллюстрирования настоящего изобретения, а не для ограничения объема изобретения, если не указано иначе. Никакие термины в описании не следует истолковывать как указывающие на любой незаявленный элемент как необходимый для практического осуществления изобретения.

[000323] Варианты осуществления настоящего изобретения представлены в настоящем описании. Варианты этих вариантов осуществления могут становиться очевидными специалистам в этой области после прочтения изложенного выше описания.

[000324] Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в этой области будут использовать такие варианты при необходимости, и авторы настоящего изобретения предполагают, что изобретение будут осуществлять на практике иначе, чем конкретно представлено в настоящем описании. Таким образом, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объектов изобретения, описанных в формуле

изобретения в соответствии с действующим законодательством. Кроме того, изобретение включает любую комбинацию описанных выше элементов во всех возможных вариантах, если в настоящем описании не указано иначе или это четко не противоречит контексту. Специалистам в этой области будут понятны многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, или они могут определить их с использованием не более чем рутинного экспериментирования. Такие эквиваленты предусмотрены формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для ингибирования экспрессии или активности аллеля DMPK, содержащего ассоциированный с заболеванием повтор, где мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности на мышечных клетках.
2. Комплекс по п.1, где мышечно-специфическое средство является мышечно-специфическим антителом.
3. Комплекс по п.2, где мышечно-специфическое антитело специфически связывается с внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина.
4. Комплекс по п.3, где внеклеточный эпитоп рецептора трансферрина содержит эпитоп апикального домена рецептора трансферрина.
5. Комплекс по п.3 или 4, где мышечно-специфическое антитело специфически связывается с эпитопом последовательности в диапазоне от C89 до F760 SEQ ID NO: 1-3.
6. Комплекс по любому из пп.3-5, где равновесная константа диссоциации (Kd) связывания мышечно-специфического антитела с рецептором трансферрина находится в диапазоне от 10^{-11} М до 10^{-6} М.
7. Комплекс по любому из пп.3-6, где мышечно-специфическое антитело конкурирует за специфическое связывание с эпитопом рецептора трансферрина с антителом, приведенным в таблице 2.
8. Комплекс по п.7, где мышечно-специфическое антитело конкурирует за специфическое связывание с эпитопом рецептора трансферрина с Kd 10^{-6} М или менее.
9. Комплекс по п.8, где Kd находится в диапазоне от 10^{-11} М до 10^{-6} М.
10. Комплекс по любому из пп.3-9, где мышечно-специфическое антитело не связывается специфически с трансферрин-связывающим участком рецептора трансферрина и/или где мышечно-специфическое антитело не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.
11. Комплекс по любому из пп.3-10, где мышечно-специфическое антитело является перекрестно реактивным в отношении внеклеточных эпитопов двух или более из рецепторов трансферрина человека, не являющегося человеком примата и грызуна.
12. Комплекс по любому из пп.3-11, где комплекс предназначен для способствования опосредованной рецептором трансферрина интернализации молекулярной нагрузки в мышечную клетку.
13. Комплекс по любому из пп.2-12, где мышечно-специфическое антитело является химерным антителом, необязательно, где химерное антитело является гуманизированным моноклональным антителом.
14. Комплекс по любому из пп.2-13, где мышечно-специфическое антитело находится в форме ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента или Fv-фрагмента.
15. Комплекс по любому из пп.1-14, где молекулярная нагрузка является

олигонуклеотидом.

16. Комплекс по п.15, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере 15 последовательных олигонуклеотидов из последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 45-280.

17. Комплекс по п.16, где олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 45-280.

18. Комплекс по п.17, где олигонуклеотид содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 56, 59, 69, 71, 77, 79, 85, 87, 92, 93, 98, 100, 109, 112, 115, 119, 145 или 161.

19. Комплекс по любому из пп.15-18, где олигонуклеотид содержит область комплементарности любой из SEQ ID NO: 281-516.

20. Комплекс по п.19, где олигонуклеотид содержит область комплементарности по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам из любой из SEQ ID NO: 281-516.

21. Комплекс по любому из пп.15-20, где олигонуклеотид содержит область комплементарности аллелю DMPK, содержащему экспансию ассоциированного с заболеванием повтора.

22. Комплекс по любому из пп.1-14, где молекулярная нагрузка является полипептидом.

23. Комплекс по п.22, где полипептид является Muscleblind-подобным (MBNL) полипептидом.

24. Комплекс по любому из пп.15-21, где олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, гибридизующуюся в клетке с транскриптом мРНК DMPK дикого типа, кодируемым аллелем, где транскрипт мРНК DMPK содержит повторяющиеся единицы тринуклеотидной последовательности CUG.

25. Комплекс по любому из пп.15-21, олигонуклеотид содержит антисмысловую цепь, гибридизующуюся в клетке с мутантным транскриптом мРНК DMPK, кодируемым аллелем, где транскрипт мРНК DMPK содержит повторяющиеся единицы тринуклеотидной последовательности CUG.

26. Комплекс по любому из пп.1-25, где ассоциированный с заболеванием повтор имеет длину от 38 до 200 повторяющихся единиц.

27. Комплекс по п.26, где ассоциированный с заболеванием повтор ассоциирован с миотонической дистрофией с поздним началом.

28. Комплекс по любому из пп.1-25, ассоциированный с заболеванием повтор имеет длину от 100 до 10000 повторяющихся единиц.

29. Комплекс по п.28, ассоциированный с заболеванием повтор ассоциирован с конгенитальной миотонической дистрофией.

30. Комплекс по любому из пп.15-21 и 24-29, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь.

31. Комплекс по п.30, где по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь является фосфотиоатной связью.

32. Комплекс по п.31, где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи в стереохимической конформации Rp и/или стереохимической конформации Sp.

33. Комплекс по п.32, где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи, все из которых находятся в стереохимической конформации Rp или стереохимической конформации Sp.

34. Комплекс по любому из пп.15-21 и 24-33, где олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеотидов.

35. Комплекс по п.34, где один или более модифицированных нуклеотиды являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

36. Комплекс по любому из пп.15-21 и 24-35, где олигонуклеотид является гэдмерным олигонуклеотидом, направляющим РНКазы Н-опосредованное расщепление транскрипта мРНК DMPK в клетке.

37. Комплекс по п.36, где гэдмерный олигонуклеотид содержит центральную часть из 5-15 дезоксирибонуклеотидов, фланкированных фрагментами из 2-8 модифицированных нуклеотидов.

38. Комплекс по п.37, где модифицированные нуклеотиды из фрагментов являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

39. Комплекс по любому из пп. 15-21 и 24-35, где олигонуклеотид является миксмерным олигонуклеотидом.

40. Комплекс по п.39, где миксмерный олигонуклеотид ингибирует связывание Muscleblind-подобного белка 1, Muscleblind-подобного белка 2 или Muscleblind-подобного белка 3 с транскриптом мРНК DMPK.

41. Комплекс по п.39 или 40, где миксмерный олигонуклеотид содержит два или более разных 2'-модифицированных нуклеотида.

42. Комплекс по любому из пп. 15-21 и 24-35, где олигонуклеотид является олигонуклеотидом РНКи, способствующим РНКи-опосредованному расщеплению транскрипта мРНК DMPK.

43. Комплекс по п.42, где олигонуклеотид РНКи является двухцепочечным олигонуклеотидом длиной от 19 до 25 нуклеотидов.

44. Комплекс по п.42 или 43, где олигонуклеотид РНКи содержит по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид.

45. Комплекс по любому из пп. 35, 38, 41 или 44, где каждый 2'-модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: 2'-О-метил-, 2'-фтор- (2'-F), 2'-О-метоксиэтил-нуклеотидов (2'-МОЕ) и 2',4'-мостиковых нуклеотидов.

46. Комплекс по п.34, где один или более модифицированных нуклеотидов являются мостиковыми нуклеотидами.

47. Комплекс по любому из пп. 35, 38, 41 или 44, где по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид является 2',4'-мостиковым нуклеотидом, выбранным из: 2',4'-затрудненных 2'-О-этилнуклеотидов (сEt) и нуклеотидов замкнутой нуклеиновой кислоты (ЗНК).

48. Комплекс по любому из пп.15-21 и 24-35, где олигонуклеотид содержит фиговую последовательность для нуклеазы редактирования генома.

49. Комплекс по любому из пп. 15-21 и 24-35, где олигонуклеотид является фосфородиамидитным морфолиновым олигомером.

50. Комплекс по любому из пп.1-49, где мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой с помощью расщепляемого линкера.

51. Комплекс по п.50, где расщепляемый линкер выбран из: протеаза-чувствительного линкера, рН-чувствительного линкера и глутатион-чувствительного линкера.

52. Комплекс по п.51, где расщепляемый линкер является протеаза-чувствительным линкером.

53. Комплекс по п.52, где протеаза-чувствительный линкер содержит последовательность, расщепляемую лизосомальной протеазой и/или эндосомальной протеазой.

54. Комплекс по п.52, где протеаза-чувствительный линкер содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин.

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

56. Комплекс по любому из пп.1-49, где мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой с помощью нерасщепляемого линкера.

57. Комплекс по п.56, где нерасщепляемый линкер является алкановым линкером.

58. Комплекс по любому из пп.2-57, где мышечно-специфическое антитело содержит неприродную аминокислоту, с которой олигонуклеотид ковалентно связан.

59. Комплекс по любому из пп.2-57, где мышечно-специфическое антитело ковалентно связано с олигонуклеотидом посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела.

60. Комплекс по п.59, где мышечно-специфическое антитело конъюгируют с цистеином с помощью малеимид-содержащего линкера, необязательно, где малеимид-содержащего линкер содержит малеимидокапроил- или малеимидометил-циклогексан-1-карбоксилатную группу.

61. Комплекс по любому из пп.2-60, где мышечно-специфическое антитело является гликозилированным антителом, содержащим по меньшей мере один остаток сахара, с которым ковалентно связан олигонуклеотид.

62. Комплекс по п.61, где остаток сахара является разветвленной маннозой.

63. Комплекс по п.61 или 62, где мышечно-специфическое антитело является гликозилированным антителом, содержащим от одного до четырех остатков сахара, каждый из которых ковалентно связан с отдельным олигонуклеотидом.

64. Комплекс по п.61, где мышечно-специфическое антитело является полностью гликозилированным антителом.

65. Комплекс по п.61, где мышечно-специфическое антитело является частично

гликозилированным антителом.

66. Комплекс по п.65, где частично гликозилированное антитело получают химическими или ферментативными способами.

67. Комплекс по п.65, где частично гликозилированное антитело продуцируют в клетке, имеющей дефицит фермента пути N- или O-гликозилирования.

68. Способ доставки молекулярной нагрузки в клетку, экспрессирующую рецептор трансферрина, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из пп.1-67.

69. Способ ингибирования активности DMPK в клетке, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из пп.1-67 в количестве, эффективном для стимуляции интернализации молекулярной нагрузки в клетку.

70. Способ по п.69, где клетка находится *in vitro*.

71. Способ по п.69, где клетка находится в организме индивидуума.

72. Способ по п.71, где индивидуум является человеком.

73. Способ лечения индивидуума, имеющего экспансию ассоциированного с заболеванием повтора аллеля DMPK, ассоциированного с миотонической дистрофией, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из пп.1-67.

74. Способ по п.73, где ассоциированный с заболеванием повтор содержит повторяющиеся единицы тринуклеотидной последовательности.

75. Способ по п.73, где тринуклеотидная последовательность является тринуклеотидной последовательностью CTG.

76. Способ по любому из пп.73-75, где ассоциированный с заболеванием повтор имеет длину от 38 до 200 повторяющихся единиц.

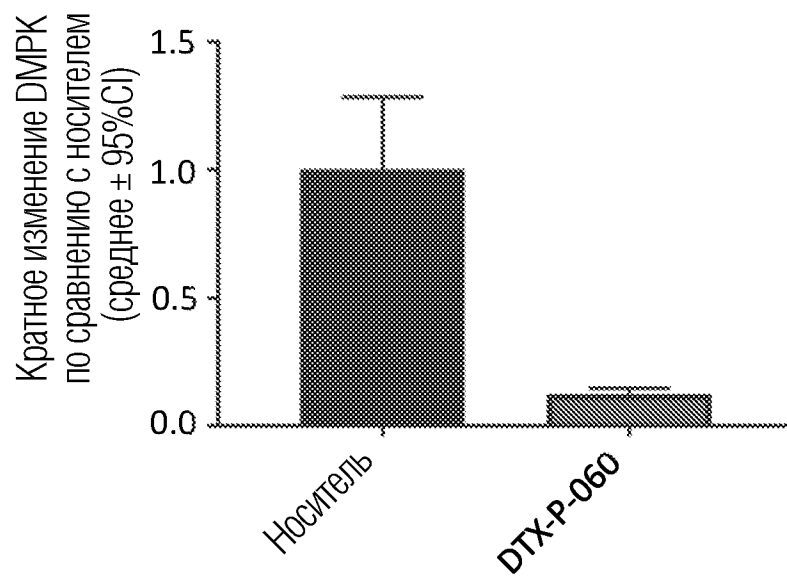
77. Способ по п.76, где ассоциированный с заболеванием повтор ассоциирован с миотонической дистрофией с поздним началом.

78. Способ по любому из пп.73-75, где ассоциированный с заболеванием повтор имеет длину от 100 до 10000 повторяющихся единиц.

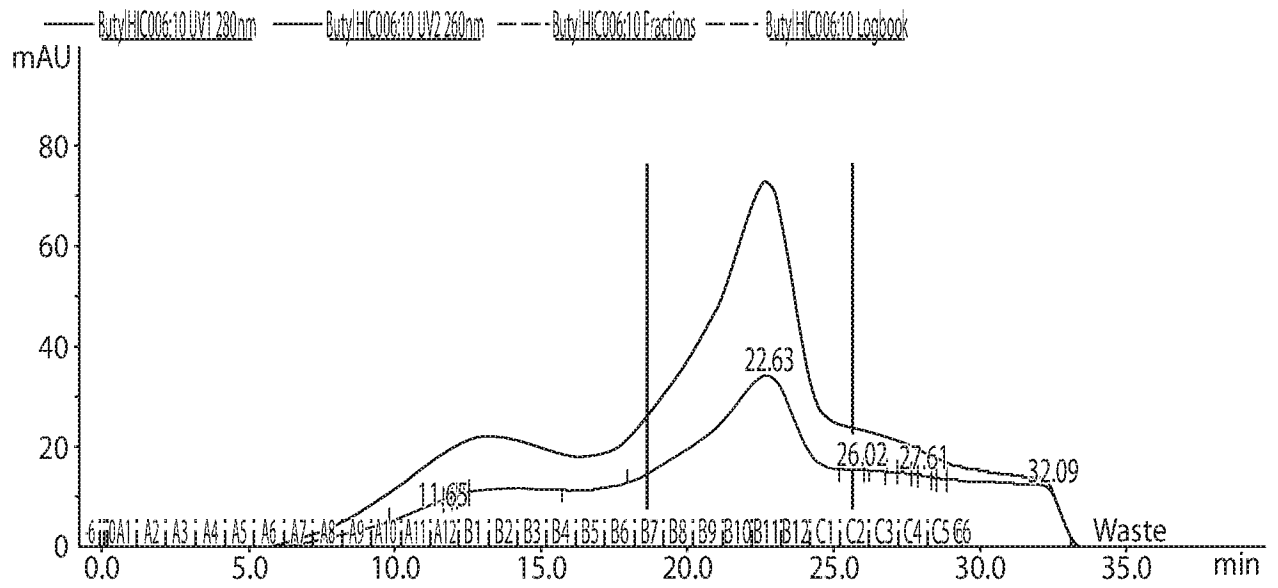
79. Способ по п.78, ассоциированный с заболеванием повтор ассоциирован с конгенитальной миотонической дистрофией.

По доверенности

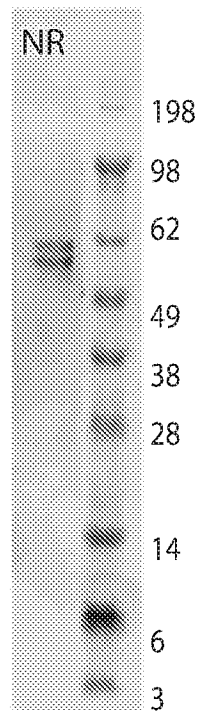
1/21



ФИГ. 1



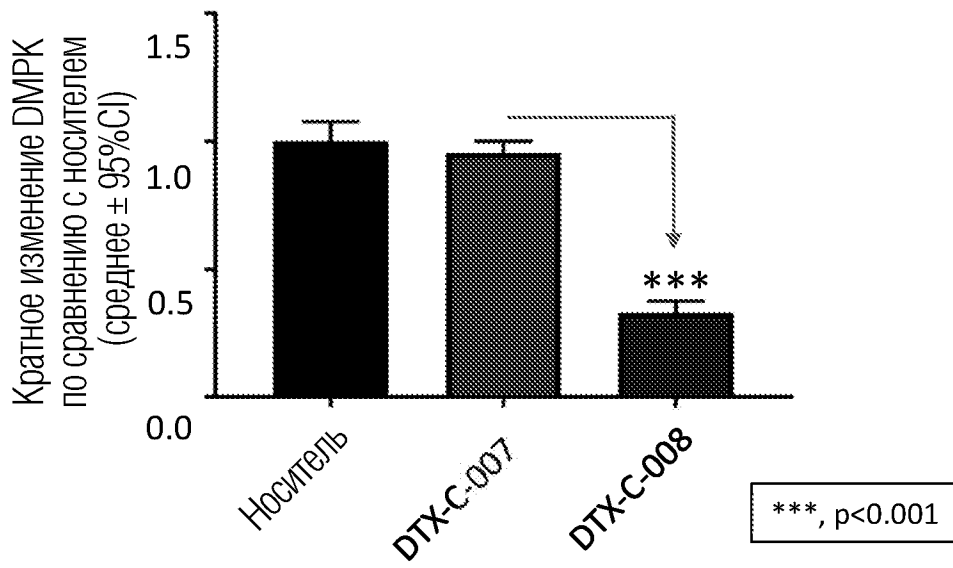
ФИГ. 2А



ПААГ с SDS NuPage 4-12%, 1 мм
 Подвижный буфер MES, 150 В, 50 мин

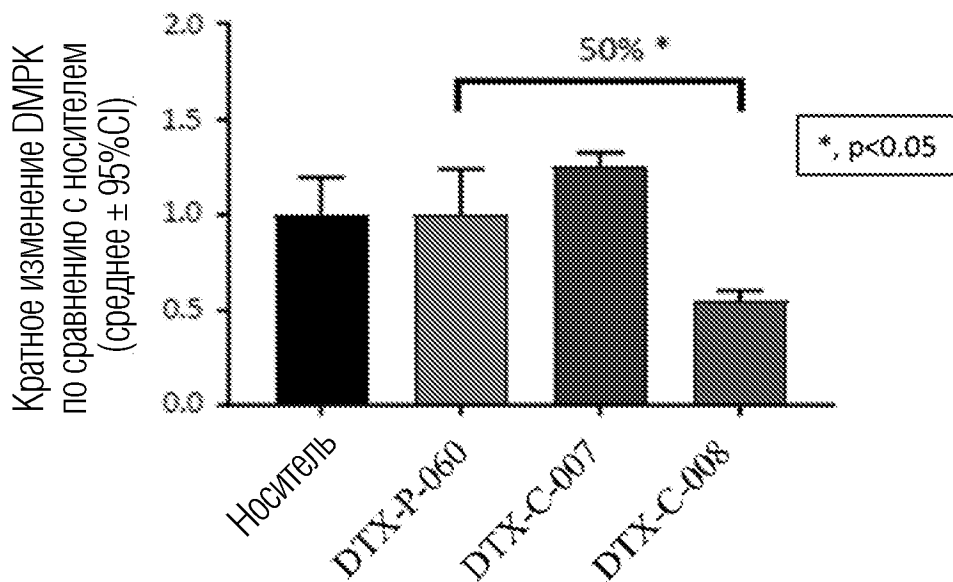
ФИГ. 2В

3/21



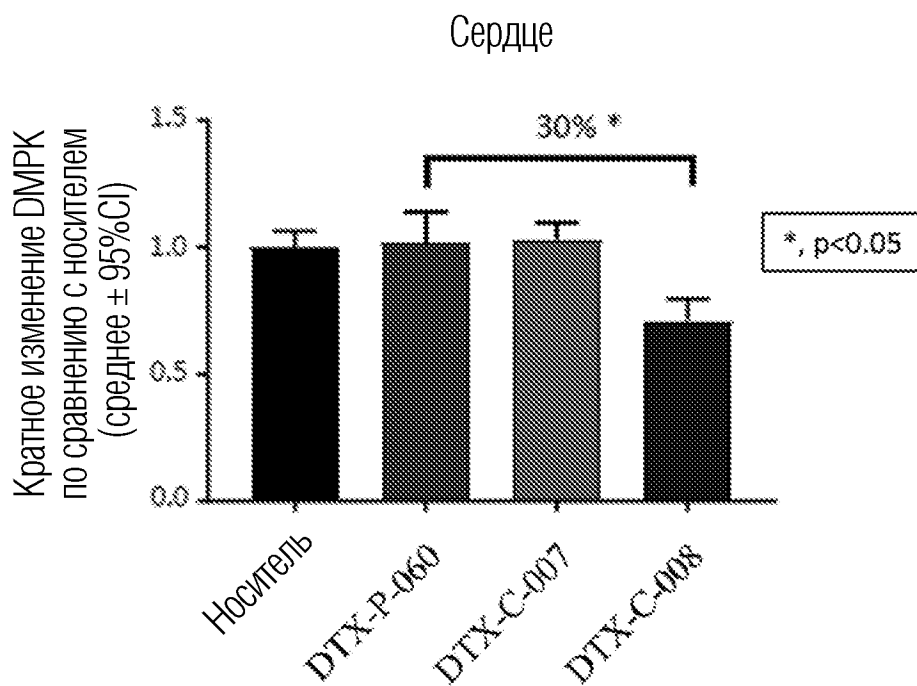
ФИГ. 3

Икроножная мышца

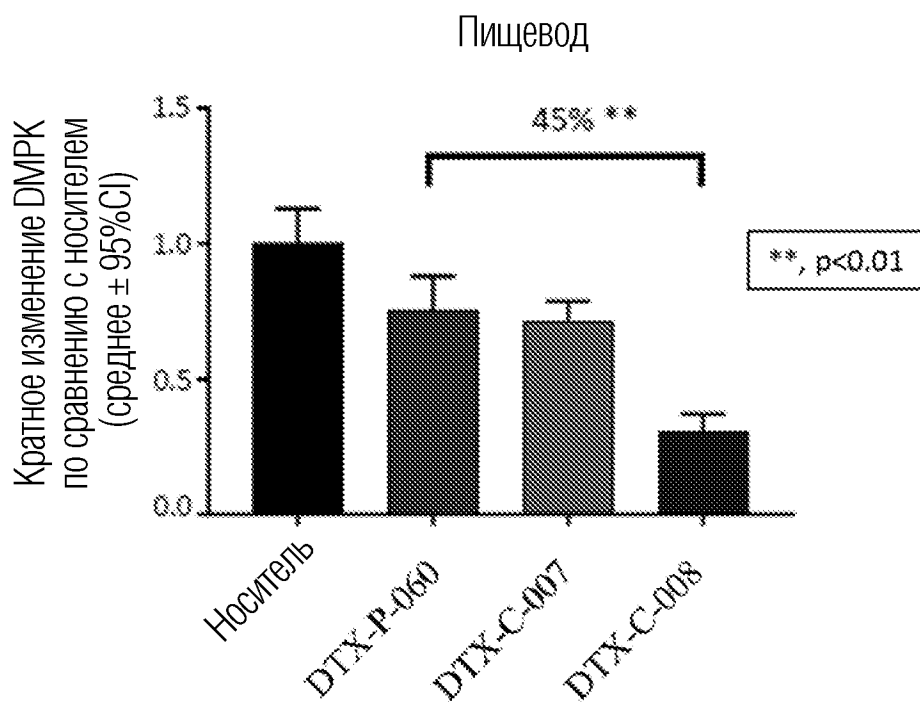


ФИГ. 4А

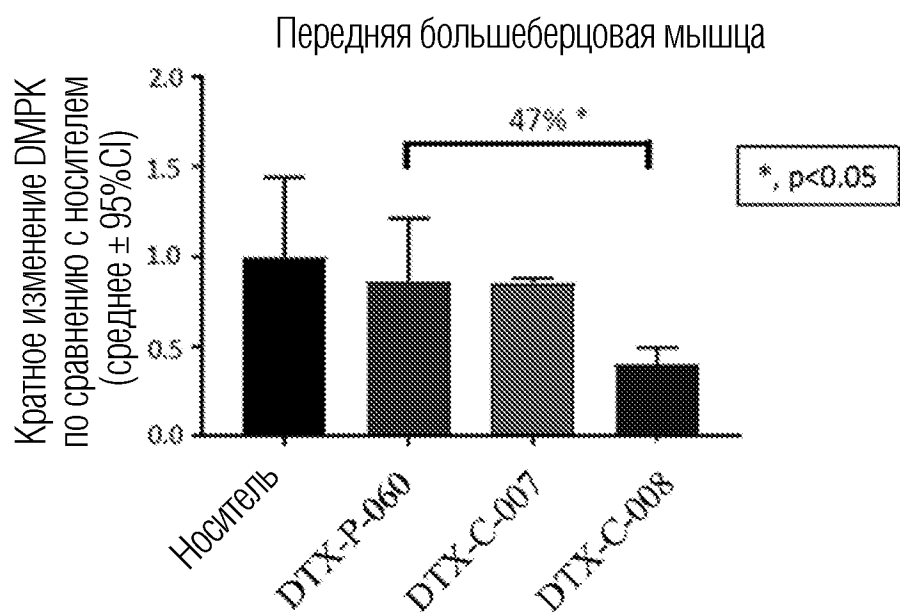
4/21



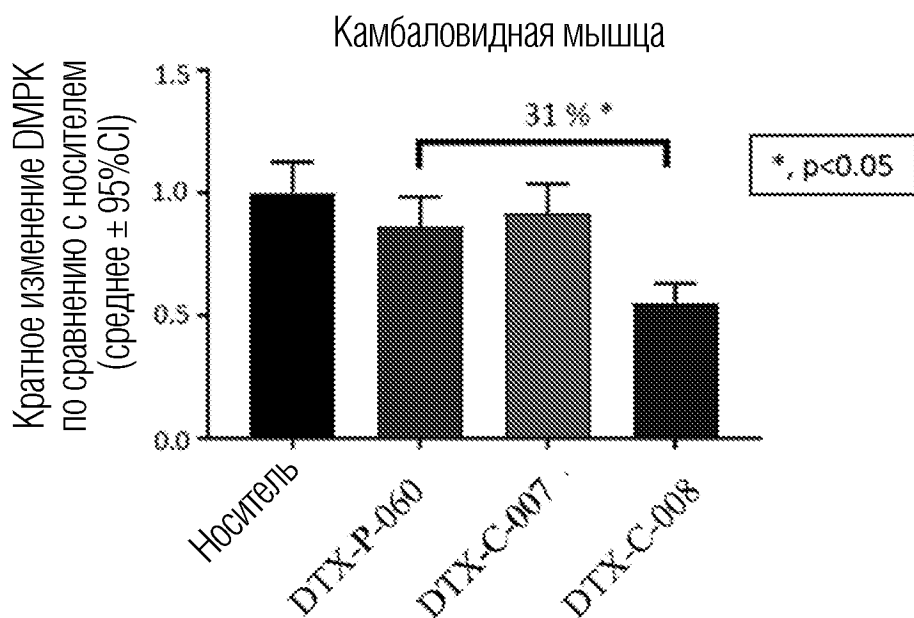
ФИГ. 4В



ФИГ. 4С



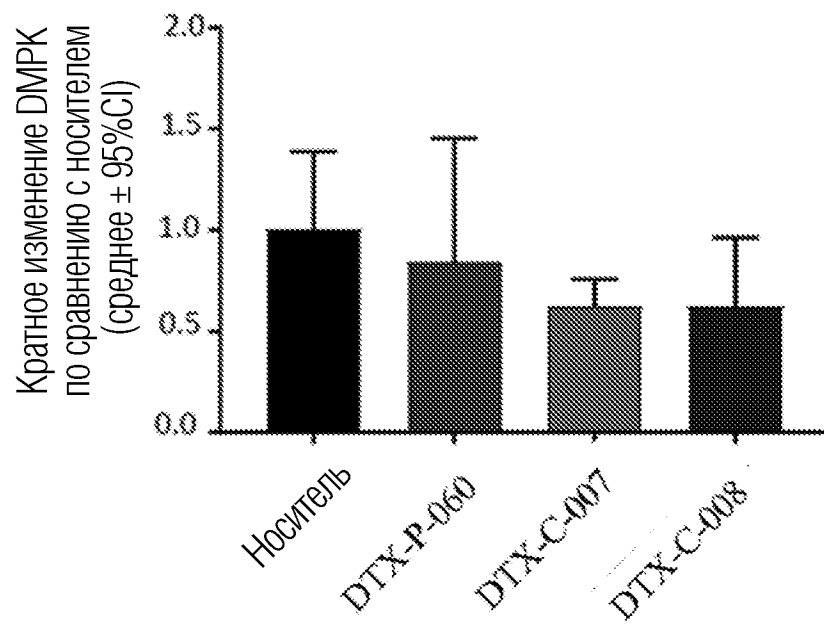
ФИГ. 4D



ФИГ. 4E

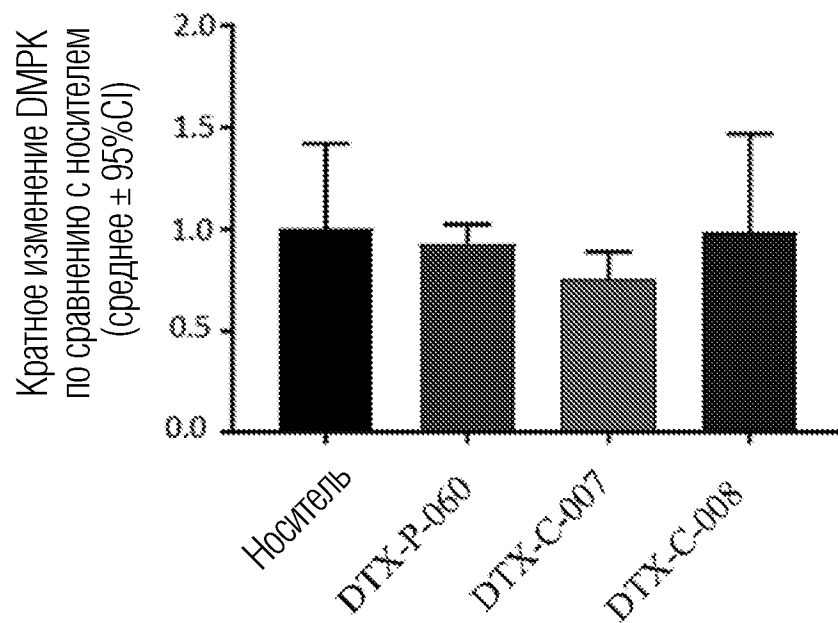
6/21

Селезенка

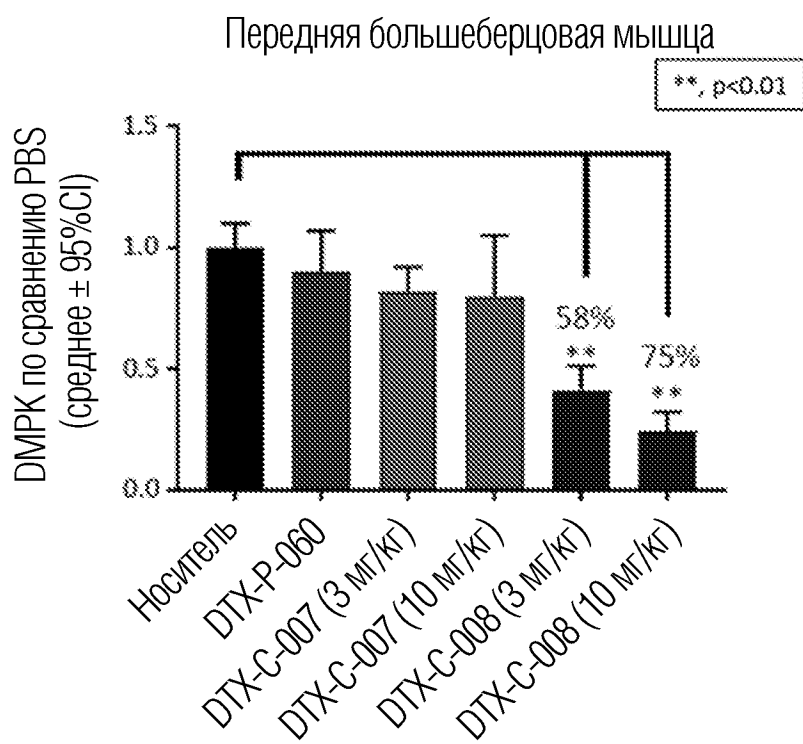


ФИГ. 5А

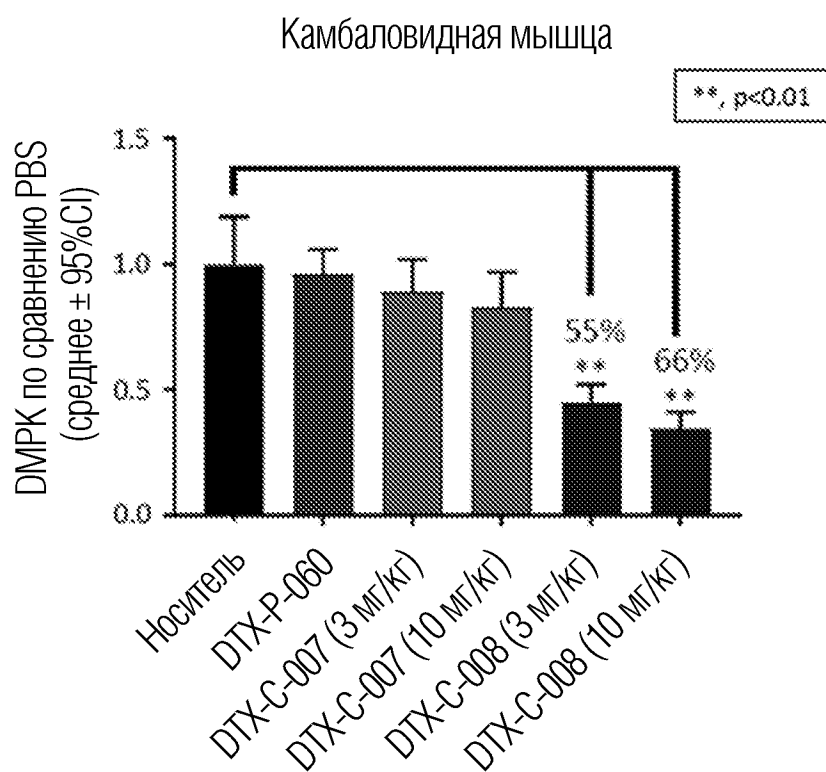
Головной мозг



ФИГ. 5В

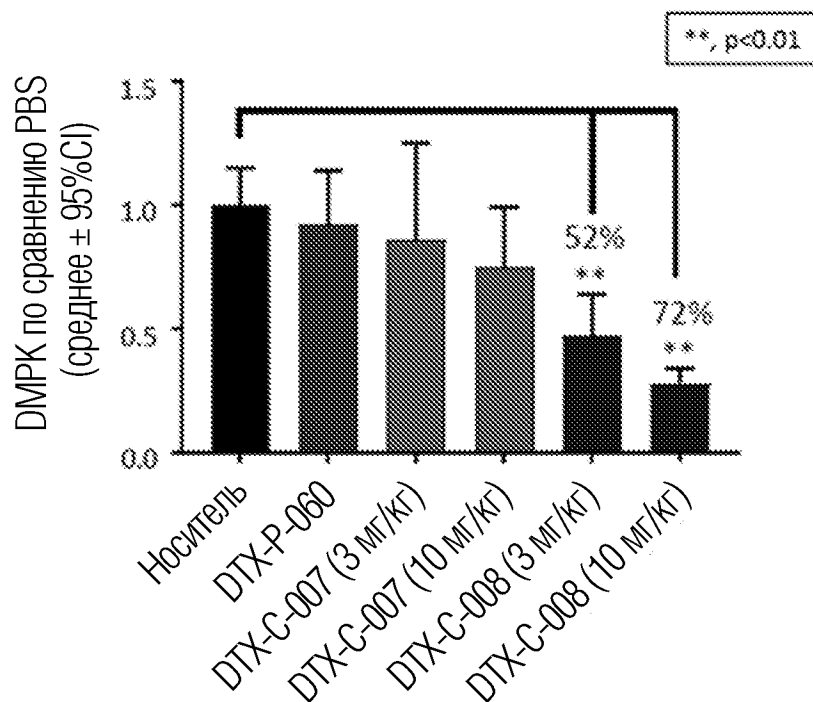


ФИГ. 6А

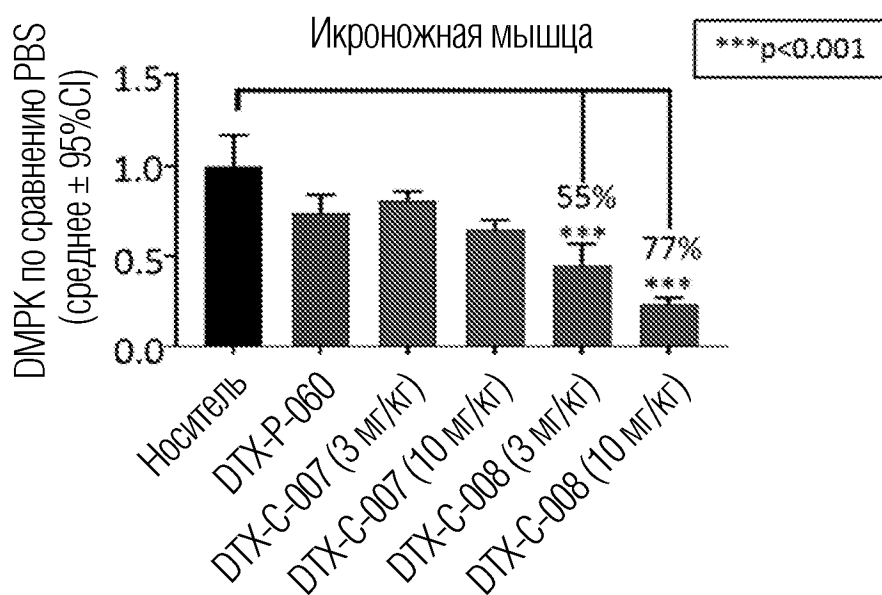


ФИГ. 6В

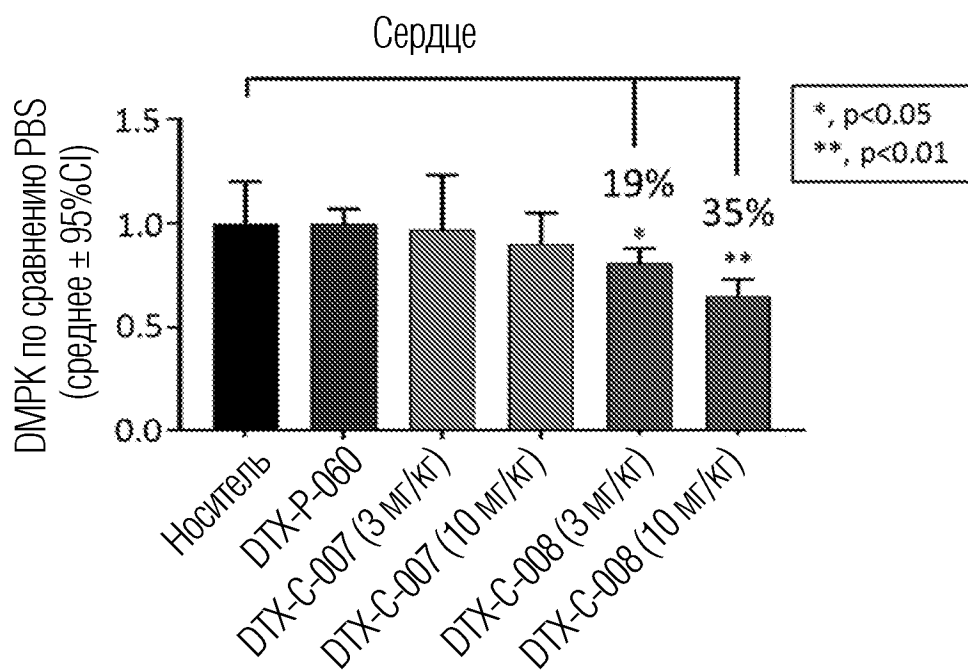
Длинный разгибатель пальцев (EDL)



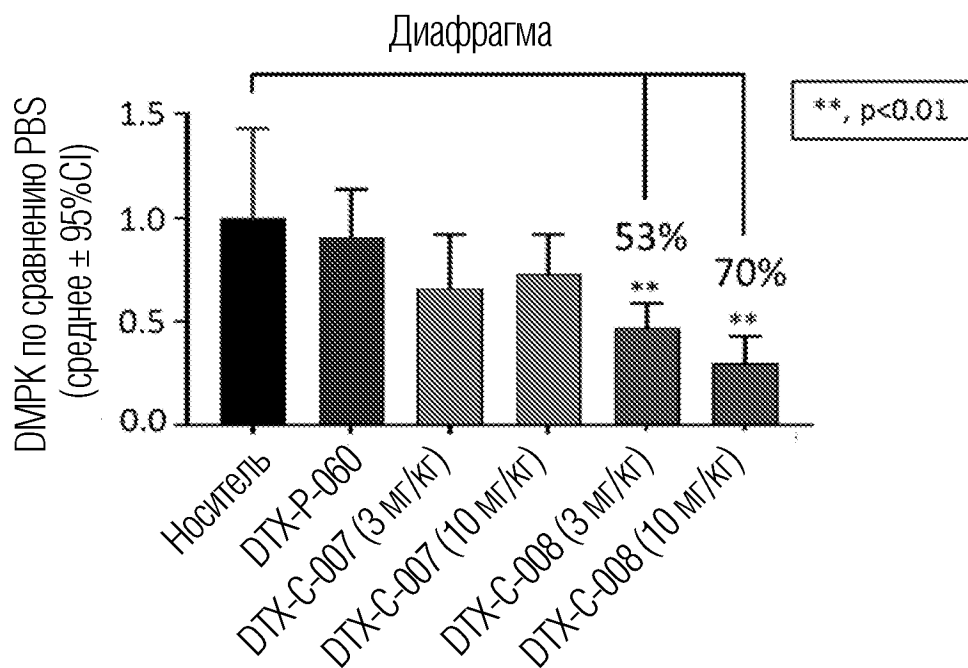
ФИГ. 6С



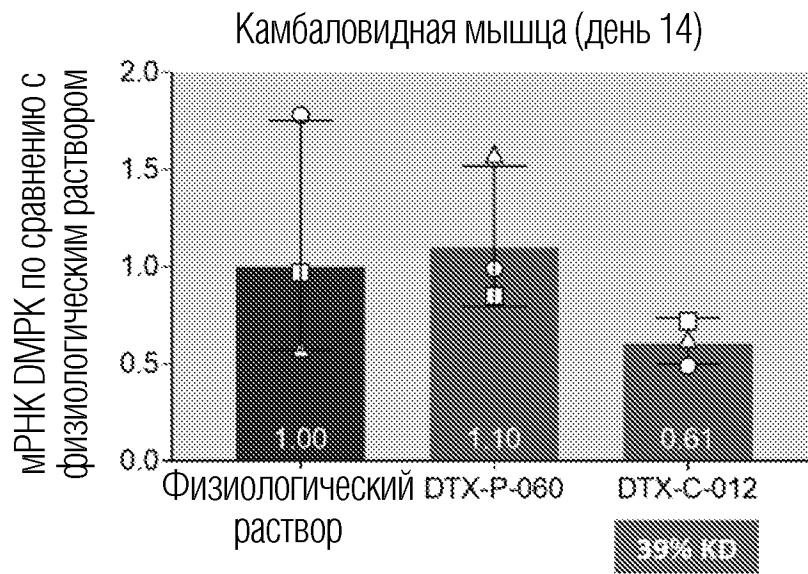
ФИГ. 6D



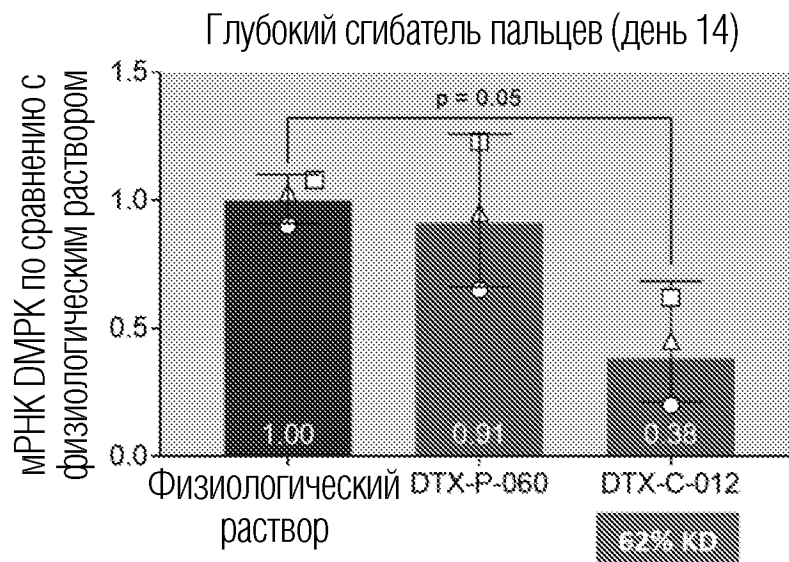
ФИГ. 6Е



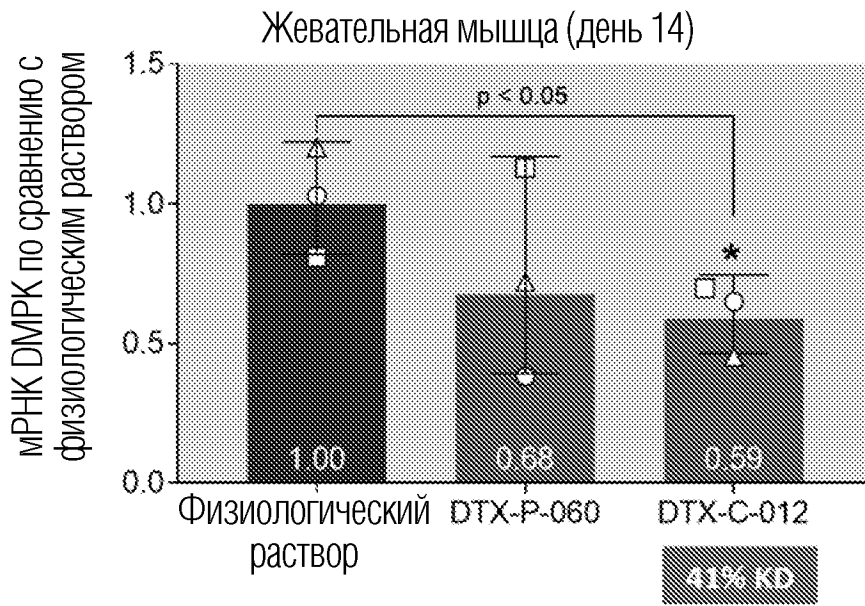
ФИГ. 6F



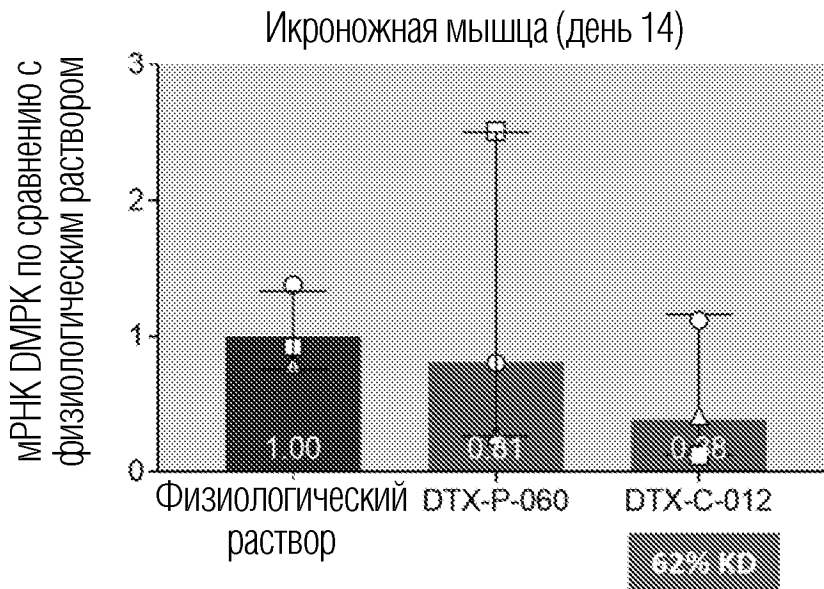
ФИГ. 7А



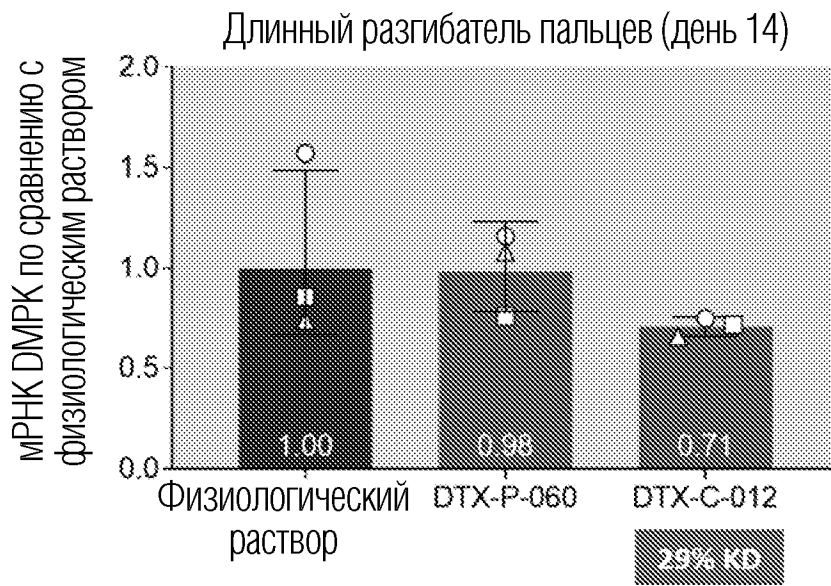
ФИГ. 7В



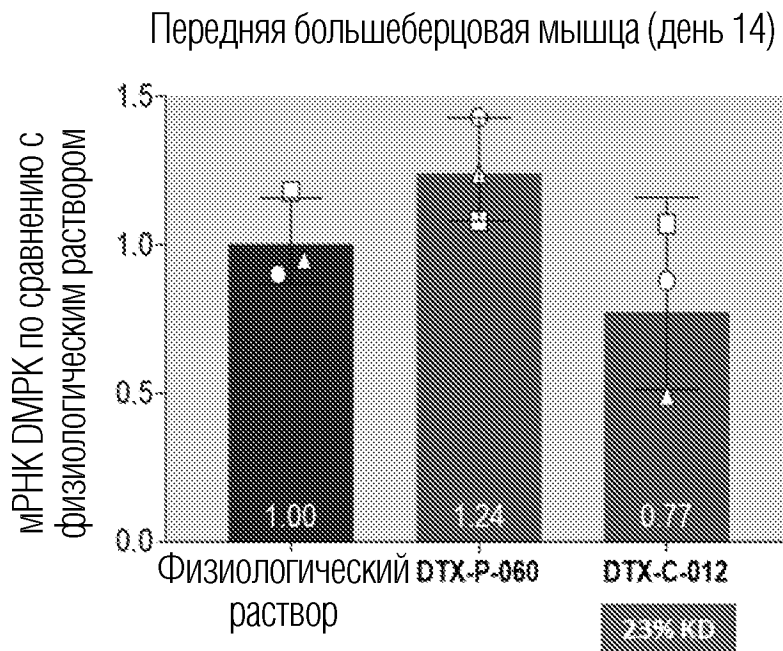
ФИГ. 7С



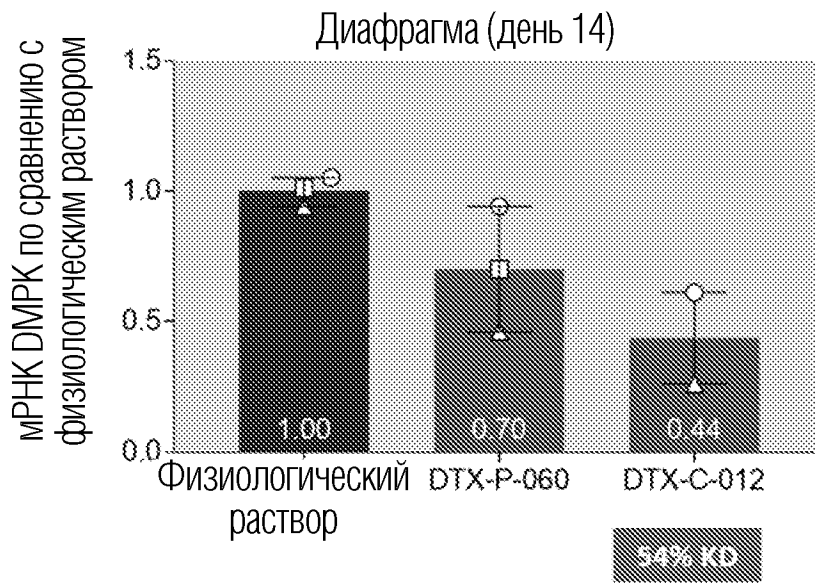
ФИГ. 7D



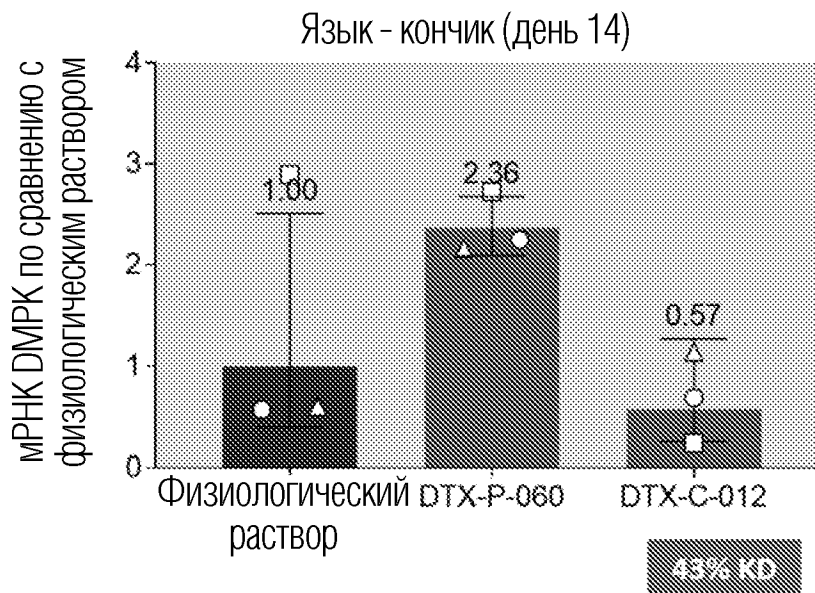
ФИГ. 7Е



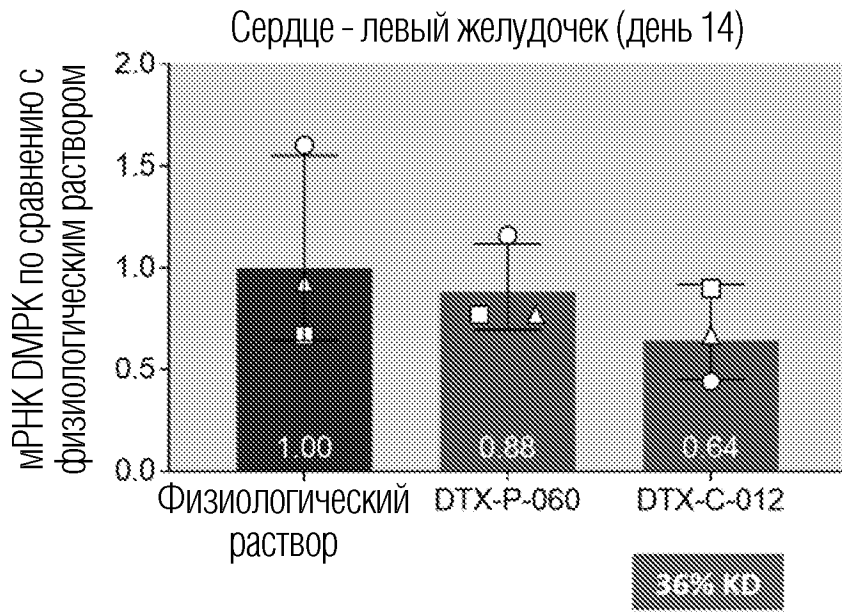
ФИГ. 7F



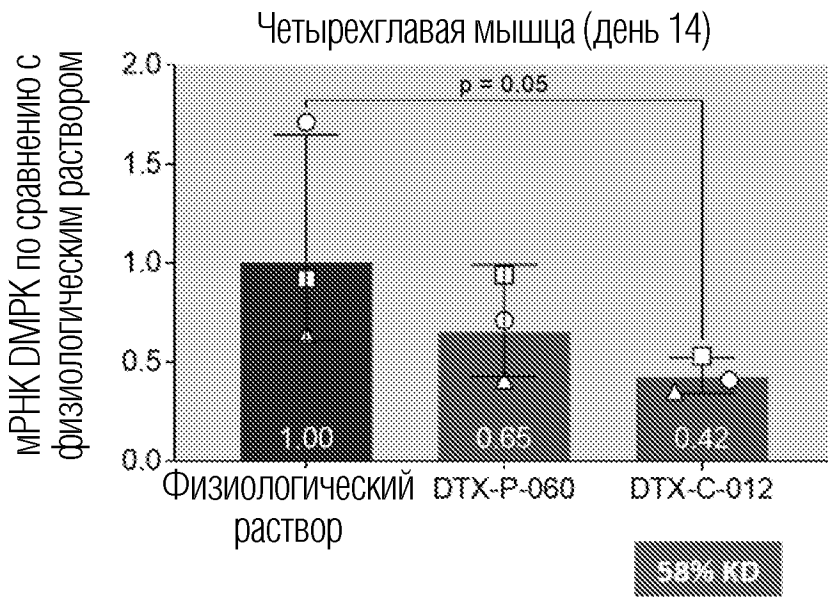
ФИГ. 7G



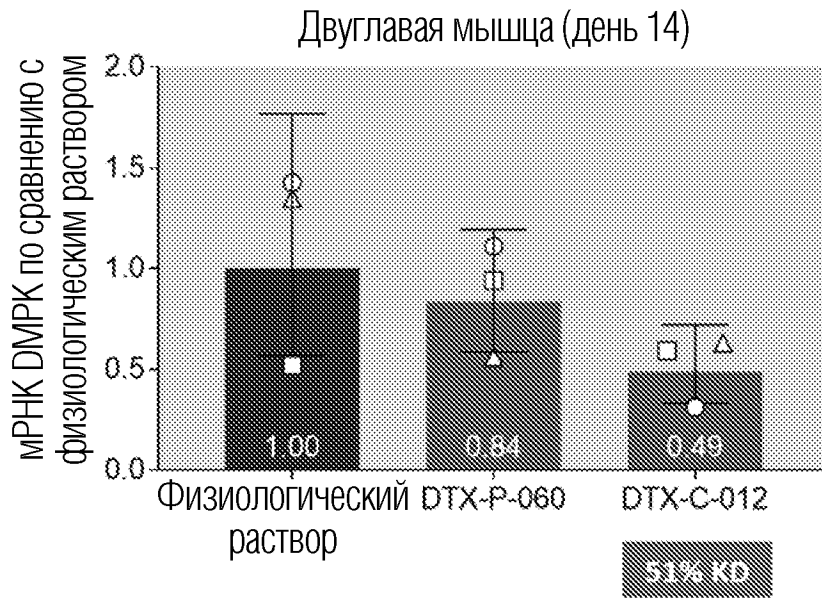
ФИГ. 7H



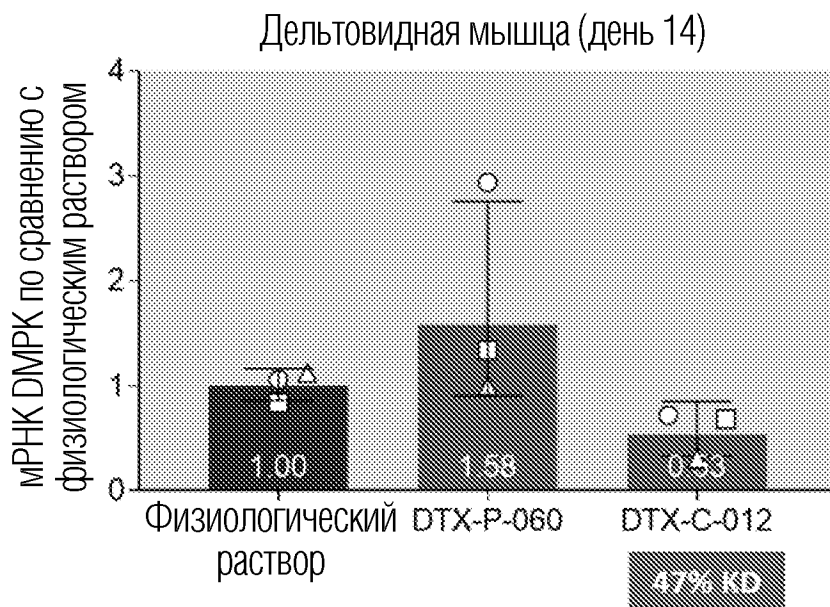
ФИГ. 7I



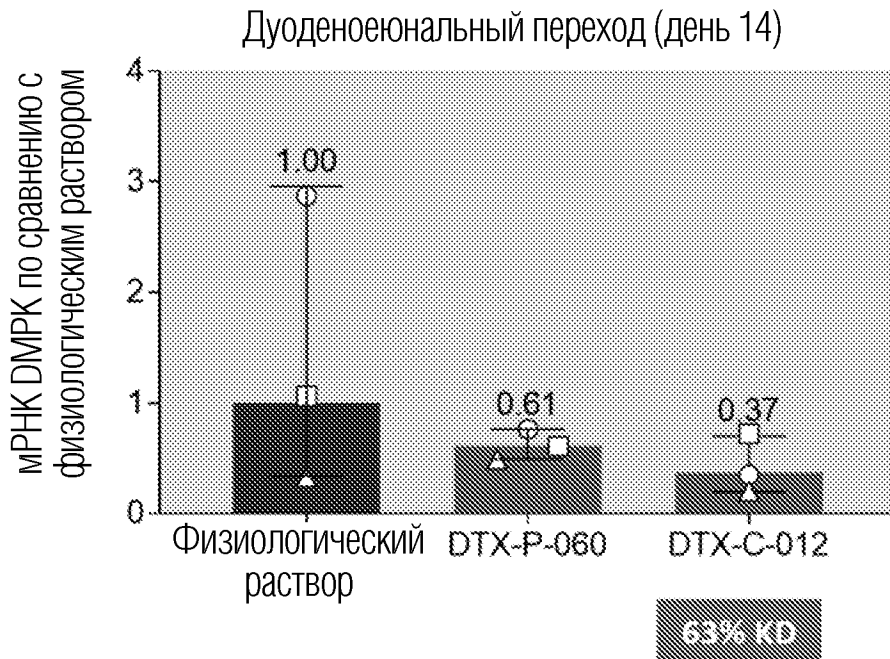
ФИГ. 7J



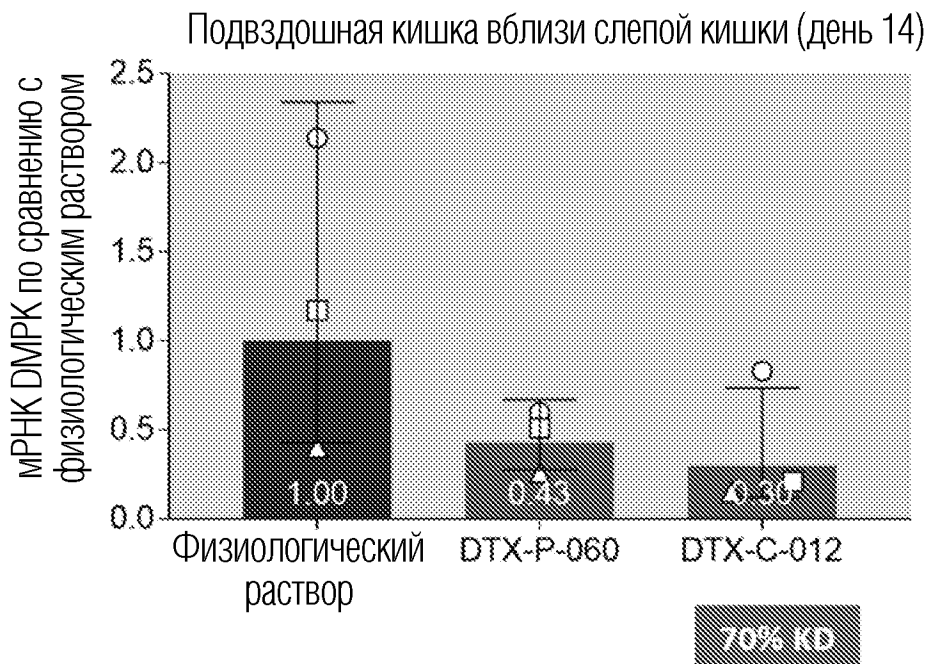
ФИГ. 7К



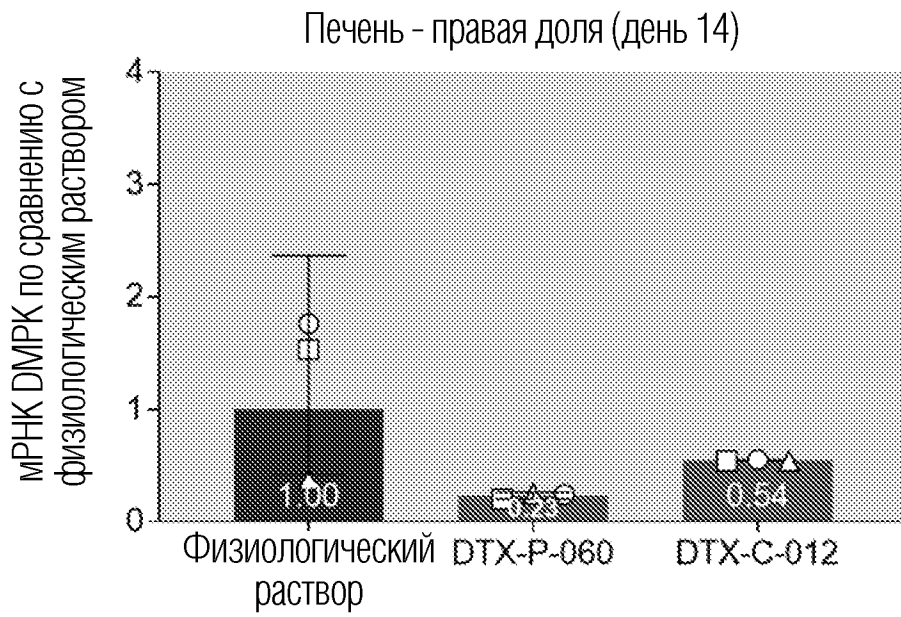
ФИГ. 7L



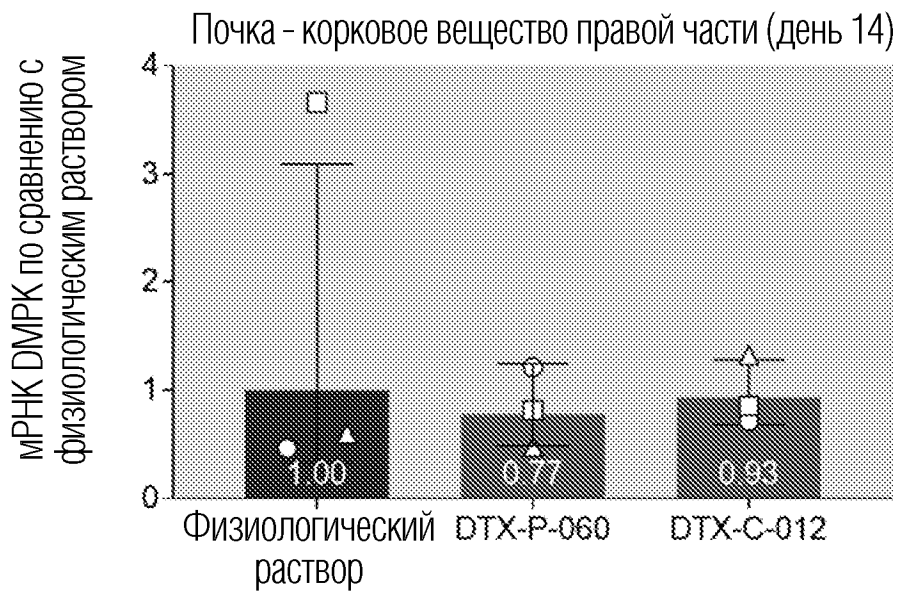
ФИГ. 8А



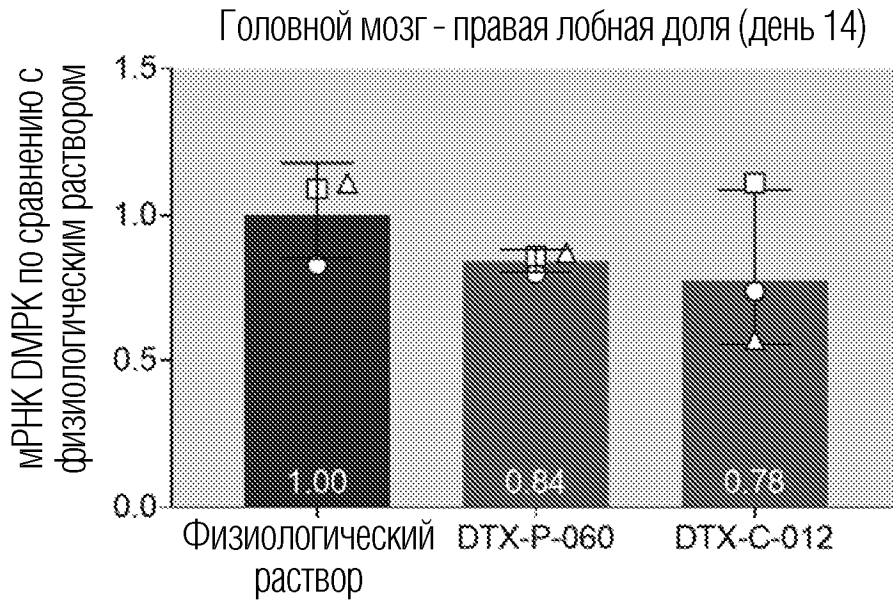
ФИГ. 8В



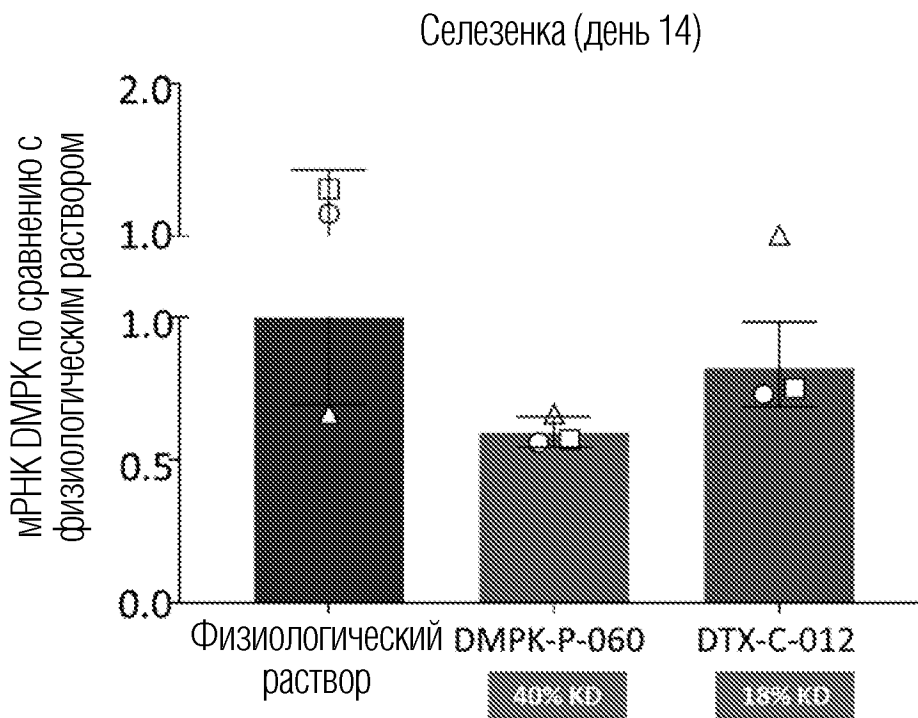
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В

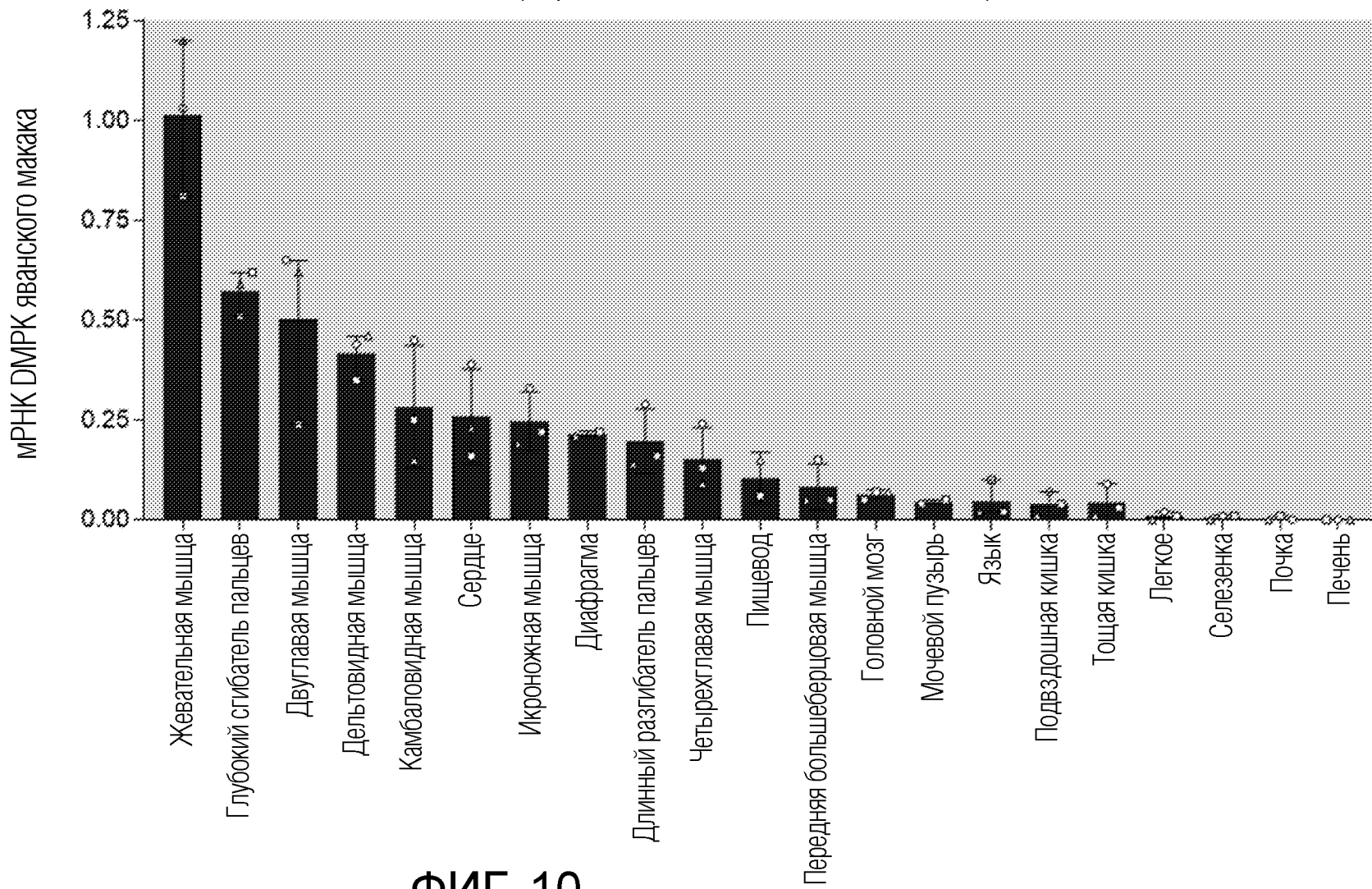


ФИГ. 9С



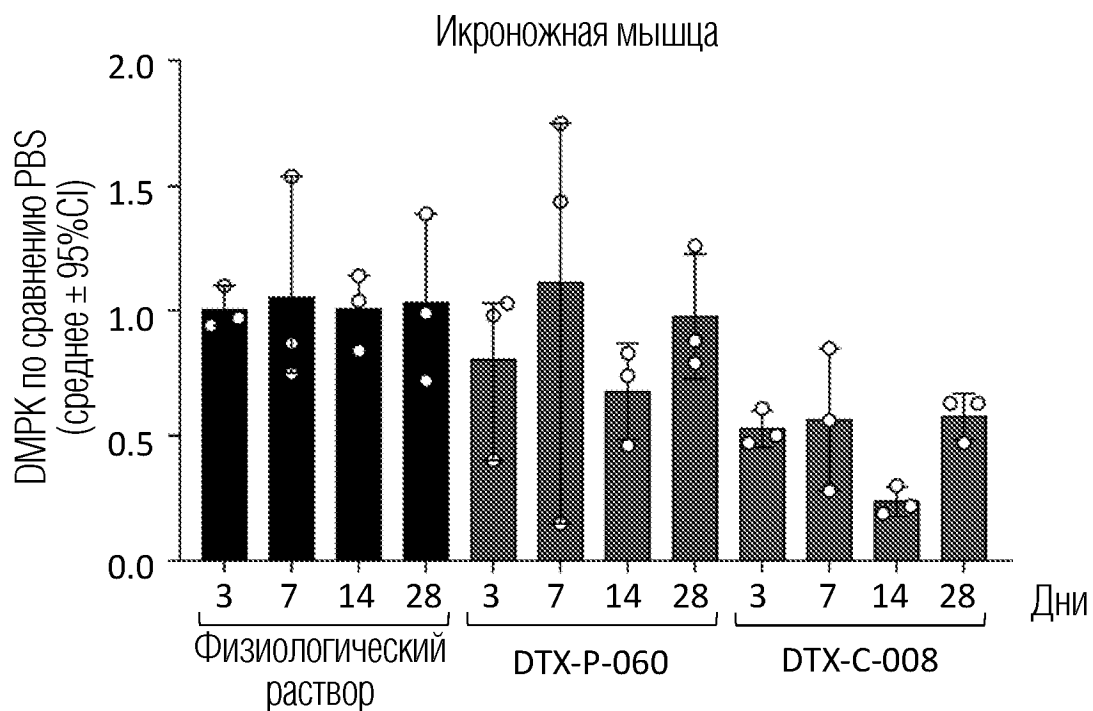
ФИГ. 9D

Экспрессия мРНК DMPK в тканях
(Нормализовано по жевательной мышце)

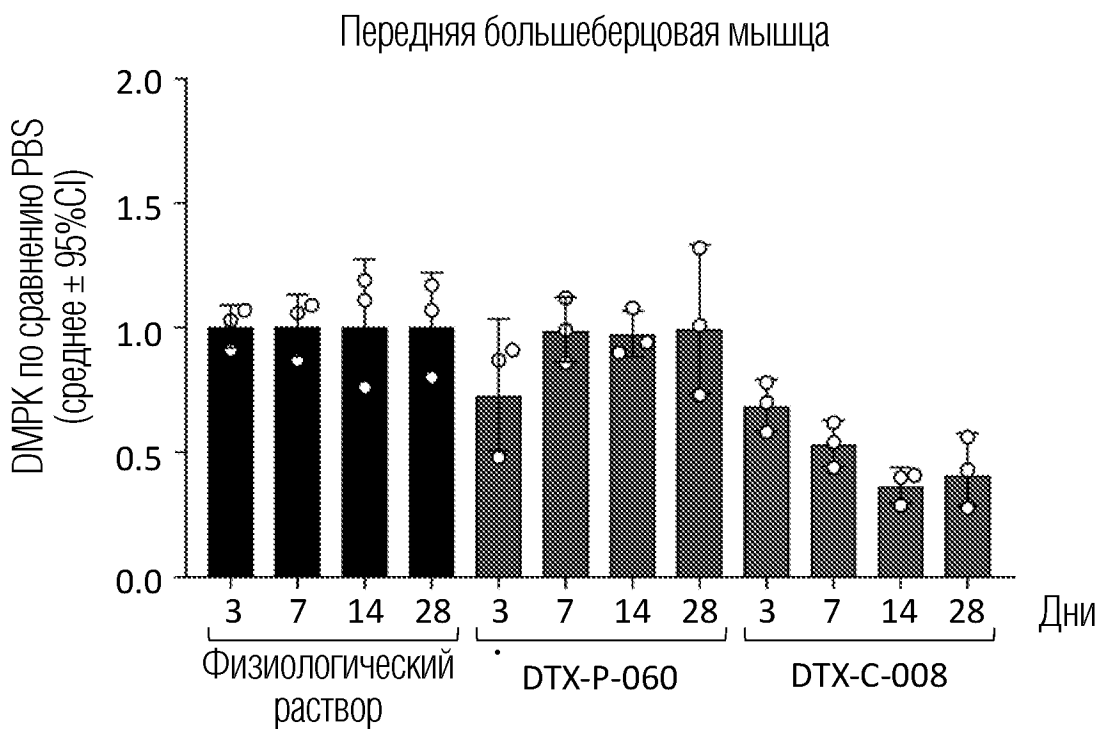


ФИГ. 10

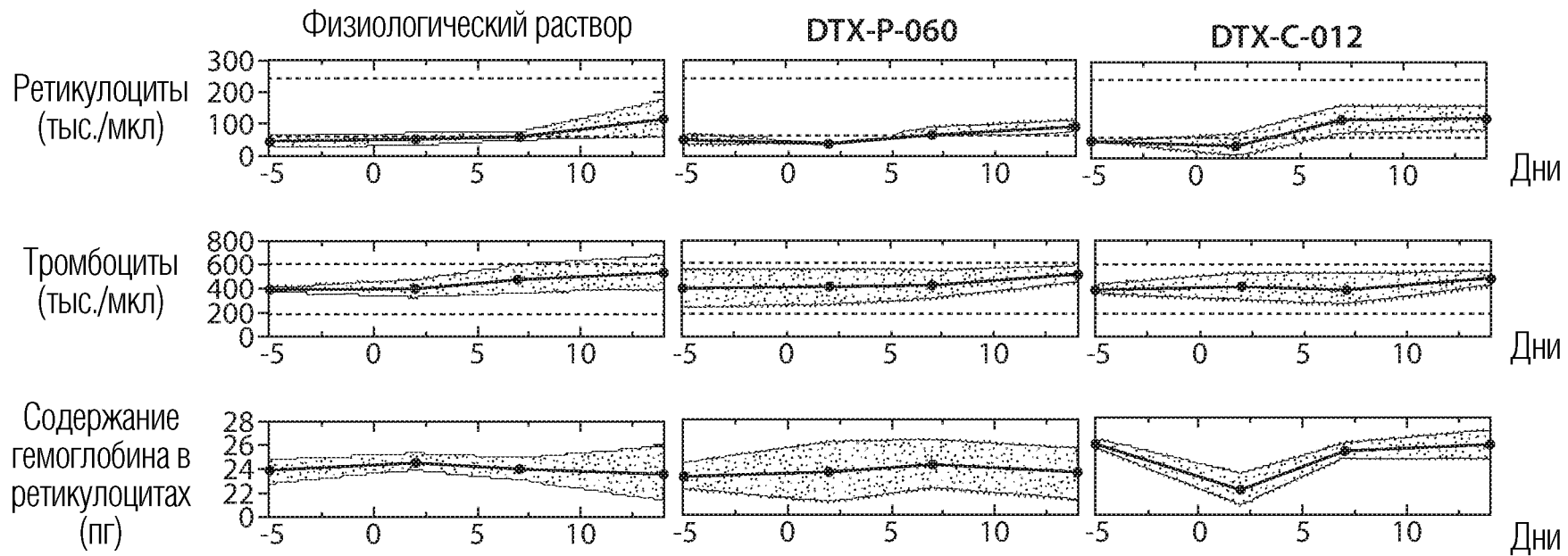
20/21



ФИГ. 11А



ФИГ. 11В



ФИГ. 12