

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190417** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.23

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.02

**(54) МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПОМПЕ**

(31) 62/713,959

(32) 2018.08.02

(33) US

(86) PCT/US2019/044960

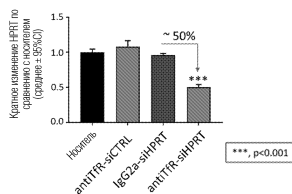
(87) WO 2020/028841 2020.02.06

(71) Заявитель:
ДАЙН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Субраманиян Ромеш Р., Катанани
Мохаммед Т., Уиден Тимоти (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 снижает уровни гликогена в клетке.



A1

202190417

202190417

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567164EA/55

МЫШЕЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПОМПЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по дате подачи предварительной заявки США № 62/713959, названной "MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING POMPE DISEASE", поданной 2 августа 2018 года; содержание которой 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 D082470003WO00-SEQ.txt, созданного 31 июля 2019 года и имеющего размер 65 килобайт. Информация в электронном формате списка последовательностей включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Лизосомальные болезни накопления представляют собой группу наследственных заболеваний, вызванных дефицитом лизосомальных гидролаз или трансмембранных белков. Эти заболевания зачастую характеризуются прогрессирующим накоплением различных нерасщепленных субстратов и дисрегуляцией путей клеточного транспорта. Болезнь Помпе (PD) является аутосомно-рецессивной лизосомальной болезнью накопления, отличающейся накоплением гликогена в мышечных клетках, что приводит к прогрессирующей мышечной слабости, снижению мышечного тонуса (гипотонии), увеличению сердца и затрудненному дыханию. Зачастую в тяжелых случаях симптомы появляются при рождении, хотя дебют может произойти на всем протяжении жизни, и болезнью Помпе страдает приблизительно 1 на 40000 новорожденных в США. Болезнь Помпе является результатом мутаций в гене GAA, кодирующем фермент кислую альфа-глюкозидазу. Фермент GAA расщепляет гликоген на глюкозу в лизосомах. Некоторые мутации в гене GAA приводят к снижению активности фермента, что приводит к токсическому накоплению гликогена в лизосомах. В одном из примеров вариант с.-32-13T>G (IVS1) GAA способствует пропуску экзона 2 во время сплайсинга пре-мРНК и является наиболее распространенным вариантом формы заболевания детского возраста/заболевания с поздним началом. Гликоген синтезируется множеством ферментов, включая гликогенсинтазу 1 (кодируемую геном GYS1). Накопление гликогена является особенно токсичным для мышечных клеток, что приводит к симптомам

прогрессирующей мышечной слабости при PD. Существующее лечение PD включает заместительную ферментную терапию, включающую введение рекомбинантного белка GAA человека дикого типа.

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 олигонуклеотидов, с помощью которых корректируют аномальный сплайсинг в клетках индивидуума, например, индивидуума, имеющего вариант с.-32-13T>G (IVS1) в гене, кодирующем лизосомальный фермент кислую альфа-глюкозидазу (GAA). В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, также особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, ингибирующей экспрессию фермента в пути синтеза гликогена, такого как GYS1, таким образом, снижая синтез гликогена, например, у индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, особенно подходят для доставки молекулярной нагрузки, с помощью которой доставляют белок GAA дикого типа или полинуклеотид, кодирующий его, индивидууму, например, индивидууму, имеющему или, как предполагают, имеющему болезнь Помпе. В некоторых вариантах осуществления два или более из комплексов можно вводить, например, одновременно, для лечения индивидуума, имеющего или, как предполагают, имеющего болезнь Помпе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, содержат мышечно-специфические средства (например, мышечно-специфические антитела), специфически связывающиеся с рецепторами клеточной поверхности на мышечных клетках, 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 высвобождать олигонуклеотиды таким образом, что с помощью олигонуклеотидов можно корректировать вариант сплайсинга (например, корректировать пропуск экзона 2 в GAA) или ингибировать экспрессию генов (например, GYS1 в мышечных клетках). В некоторых вариантах осуществления комплексы, сконструированные для доставки белка GAA дикого типа, могут высвобождать белок GAA дикого типа, или рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей его, для повышения клеточной активности GAA. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды высвобождаются посредством эндосомального расщепления ковалентных линкеров, соединяющих олигонуклеотиды и мышечно-специфические средства в комплексах.

[0006] Некоторые аспекты настоящего изобретения включают комплекс, содержащий мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной

нагрузкой, сконфигурированной для снижения уровней гликогена в мышечных клетках, где мышечно-специфическое средство специфически связывается с интернализирующимся рецептором клеточной поверхности на мышечных клетках.

[0007] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство является мышечно-специфическим антителом. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина (например, эпитопом апикального домена рецептора трансферрина). Мышечно-специфическое антитело может специфически связываться 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.

[0008] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело из комплекса конкурирует за специфическое связывание с эпитопом рецептора трансферрина с антителом, приведенным в таблице 1 (например, конкурирует за специфическое связывание с эпитопом рецептора трансферрина с K_d 10^{-6} М или менее, например, в диапазоне от 10^{-11} М до 10^{-6} М).

[0009] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело не связывается специфически с трансферрин-связывающим участком рецептора трансферрина и/или не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело из комплекса перекрестно реагирует с внеклеточными эпитопами двух или более из рецепторов трансферрина человека, не являющегося человеком примата и грызуна. В некоторых вариантах осуществления способ предназначен для способствования опосредованной рецептором трансферрина интернализации молекулярной нагрузки в мышечную клетку.

[00010] Мышечно-специфическое антитело (например, мышечно-специфическое антитело является антителом, специфически связывающимся с внеклеточным эпитопом рецептора трансферрина) является химерным антителом, где, необязательно, химерное антитело является гуманизированным моноклональным антителом. Мышечно-специфическое антитело находится в форме ScFv, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента или Fv-фрагмента.

[00011] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка из комплекса представляет собой олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид способствует включению экзона 2 в зрелую мРНК GAA. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид ингибирует экспрессию GYS1.

[00012] Олигонуклеотид по изобретению может содержать по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь (например, фосфотиоатную связь). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи в стереохимической конформации Rp и стереохимической конформации Sp. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи, все из которых

находятся в стереохимической конформации R_p. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи, все из которых находятся в стереохимической конформации S_p.

[00013] Олигонуклеотид по изобретению может содержать один или более модифицированных нуклеотидов (например, 2'-модифицированных нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид является 2'-О-метил-, 2'-фтор- (2'-F), 2'-О-метоксиэтил-нуклеотид (2'-МОЕ) или 2', 4'-мостиковый нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид является мостиковым нуклеотидом (например, выбранным из 2',4'-затрудненных 2'-О-этил-нуклеотидов (сEt) и нуклеотидов замкнутой нуклеиновой кислоты (ЗНК)).

[00014] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является гэммерным олигонуклеотидом, направляющим РНКазы Н-опосредованное расщепление транскрипта мРНК GYS1 в клетке. Гэммерный олигонуклеотид может содержать центральную часть из 5-15 дезоксирибонуклеотидов, фланкированных фрагментами по 2-8 модифицированных нуклеотидов (например, 2'-модифицированных нуклеотидов).

[00015] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является миксмерным олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления миксмерный олигонуклеотид способствует сплайсинг-опосредованному включению экзона 2 в вариант с.-32-13T>G (IVS1) GAA. Миксмерный олигонуклеотид может содержать два или более разных 2'-модифицированных нуклеотида.

[00016] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является олигонуклеотидом РНКи, способствующим РНКи-опосредованному расщеплению транскрипта мРНК GYS1. Олигонуклеотид РНКи может являться двухцепочечным олигонуклеотидом длиной от 19 до 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид РНКи содержит по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид.

[00017] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит гидовую последовательность для нуклеазы редактирования генома.

[00018] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является фосфородиамидит-морфолиновым олигомером (РМО).

[00019] В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является полипептидом. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является рекомбинантным полипептидом кислой альфа-глюкозидазы (GAA) дикого типа.

[00020] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через расщепляемый линкер (например, протеаза-чувствительного линкера, рН-чувствительного линкера и глутатион-чувствительного линкера). Протеаза-чувствительный линкер может содержать последовательность, расщепляемую лизосомальной протеазой и/или эндосомальной протеазой. В некоторых вариантах осуществления протеаза-чувствительный линкер

содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин. рН-чувствительный линкер расщепляется при рН в диапазоне от 4 до 6.

[00021] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой через нерасщепляемый линкер (например, алкановый линкер).

[00022] В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело содержит неприродную аминокислоту, с которой может быть ковалентно связан олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело ковалентно связано с олигонуклеотидом посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгирован с остатком цистеина антитела через малеимид-содержащий линкер, необязательно, где малеимид-содержащий линкер содержит малеимидокапроил- или малеимидометил-циклогексан-1-карбоксилатную группу.

[00023] 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 гликозилированное антитело, содержащее по меньшей мере один остаток сахара, являющийся 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. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфическое антитело является полностью гликозилированным антителом или частично гликозилированным антителом. Частично гликозилированное антитело можно получать химическими или ферментативными способами. В некоторых вариантах осуществления частично гликозилированное антитело продуцируют в клетке, являющейся дефектной по ферменту пути N- или O- гликозилирования.

[00024] Аспекты настоящего изобретения включают способ доставки молекулярной нагрузки в клетку, экспрессирующую рецептор трансферрина, включающий приведение клетки в контакт с комплексом, содержащим мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для снижения уровней гликогена в мышечной клетке.

[00025] Некоторые аспекты настоящего изобретения включают способ снижения уровней гликогена в мышечной клетке, имеющей мутантный аллель GAA, ассоциированный с болезнью Помпе (PD), включающий приведение клетки в контакт с комплексом, содержащим мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для снижения уровней гликогена в мышечной клетке, 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. В

некоторых вариантах осуществления мутантный аллель GAA содержит вариант с.-32-13T>G (IVS1) GAA.

[00026] Некоторые аспекты настоящего изобретения включают способ лечения индивидуума, имеющего мутантный аллель GAA, ассоциированный с болезнью Помпе, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса, содержащего мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, сконфигурированной для снижения уровней гликогена в мышечной клетке. В некоторых вариантах осуществления мутантный аллель GAA содержит вариант с.-32-13T>G (IVS1) GAA.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00027] На фиг. 1 представлена неограничивающая схема, на которой показан эффект трансфекции клеток с использованием миРНК;

[00028] На фиг. 2 представлена неограничивающая схема, на которой показана активность мышечно-специфического комплекса, содержащего миРНК.

[00029] На фиг. 3A-3B представлена неограничивающая схема, на которой показана активность мышечно-специфического комплекса, содержащего миРНК, в мышечных тканях мыши (икроножной мышце и сердце) *in vivo* относительно контрольных экспериментов (N=4 мышей C57BL/6 WT).

[00030] На фиг. 4A-4E представлены неограничивающие схемы, на которых показана тканевая селективность мышечно-специфического комплекса, содержащего миРНК.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00031] 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 лечения индивидуумов, имеющих болезнь Помпе, при которой индивидуум имеет по меньшей мере один мутантный аллель GAA, способствующий пропуску экзона 2 мРНК GAA. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления комплексы содержат олигонуклеотиды, способные корретировать такой аномальный сплайсинг GAA. Однако в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к комплексам для доставки белка GAA дикого типа или синтетической нуклеиновой кислоты, кодирующей его. В некоторых вариантах

осуществления настоящее изобретение относится к комплексам отрицательной регуляции GYS1 для лечения индивидуума, имеющего болезнь Помпе.

[00032] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления комплексы, представленные в настоящем описании, могут содержать молекулярную нагрузку, такую как гидовые молекулы (например, гидовые РНК), способные к таргетингу программируемых нуклеиновыми кислотами нуклеаз (например, Cas9) к последовательности ассоциированной с заболеванием мутации GAA (например, мутации, снижающей каталитическую активность GAA, или мутации, изменяющей сплайсинг мРНК) или вблизи нее. В некоторых вариантах осуществления такие программируемые нуклеиновыми кислотами нуклеазы, например, редакторы оснований, содержащие белок Cas9, можно использовать для коррекции одной или более мутаций в PD-ассоциированном аллеле GAA.

[00033] Дополнительные аспекты изобретения, включая описание определенных терминов, приведены ниже.

I. Определения

[00034] **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).

[00035] **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).

[00036] **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).

[00037] **CDR:** В рамках изобретения термин "CDR" относится к определяющей комплементарность области в переменных последовательностях антитела. Существует три CDR в каждой из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, обозначаемые как CDR1, CDR2 и CDR3, для каждой из переменных областей. В рамках изобретения термин "набор CDR" относится к группе из трех CDR, встречающихся в одной переменной области, способной связывать антиген. Точные границы этих CDR определяют по-разному в разных системах. Система, описанная Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) и (1991)), не только представляет собой систему однозначной нумерации остатков, которую можно использовать в отношении любой переменной области антитела, но также позволяет определять точные границы остатков и, таким образом, три CDR. Эти CDR можно обозначать как CDR Kabat. Подчасти CDR можно обозначать как L1, L2 и L3 или H1, H2 и H3, где "L" и "H" означают области легкой цепи и тяжелой цепи, соответственно. Эти области можно обозначать как CDR Chothia, имеющие границы, перекрывающиеся с CDR Kabat. Другие границы, определяющие CDR, перекрывающиеся с CDR Kabat, описаны Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) и MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Другие определения границ CDR могут не следовать строго одной из указанных выше систем, но все равно будут перекрываться с CDR Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете прогнозирования или экспериментальных данных о том, что конкретные остатки, или группы остатков, или даже целые CDR не влияют значительно на связывание антигена. В способах, используемых в настоящем описании, можно использовать CDR, определенные по любой из этих систем, хотя в предпочтительных вариантах осуществления используют CDR, определенные по Kabat или Chothia.

[00038] **Антитело с пересаженным CDR:** Термин "антитело с пересаженным CDR" относится к антителам, содержащим последовательности переменной 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.

[00039] **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.

[00040] **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.

[00041] **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.

[00042] **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.

[00043] **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.

[00044] **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.

[00045] **GAA:** В рамках изобретения термин "GAA" относится к гену, кодирующему кислую альфа-глюкозидазу, белок, расщепляющий гликоген в лизосомах. В некоторых вариантах осуществления GAA может являться геном GAA человека (Gene ID: 2548), не являющегося человеком примата (например, Gene ID: 712054, Gene ID: 454940) или грызуна (например, Gene ID: 14387, Gene ID: 367562). У людей экспрессия мутантного белка GAA приводит к болезни Помпе. Кроме того, охарактеризовано множество вариантов транскриптов (например, как аннотировано в GenBank RefSeq под регистрационными номерами: NM_000152.4, NM_001079803.2 и NM_001079804.2), кодирующих различные изоформы белка.

[00046] **Аллель GAA:** В рамках изобретения термин "аллель GAA" относится к любой из альтернативной форм (например, форме дикого типа или мутантной форме) гена GAA. В некоторых вариантах осуществления аллель GAA может кодировать кислую альфа-глюкозидазу дикого типа, сохраняющую свои нормальные и типичные функции. В некоторых вариантах осуществления аллель GAA может содержать одну или более мутаций, ассоциированных с болезнью Помпе, таких как, например, описываемые в Moravej, et al. "A New Mutation Causing Severe Infantile-Onset Pompe Disease Responsive to Enzyme Replacement Therapy", Iran J Med Sci, 2018; и van der Wal E., et al, "GAA Deficiency in Pompe Disease Is Alleviated by Exon Inclusion in iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells", Mol Ther Nucleic Acids. 2017 Jun 16; 7: 101-115; содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

[00047] **GYS1:** В рамках изобретения термин "GYS1" относится к гену, кодирующему гликогенсинтазу, белок, участвующий в синтезе гликогена. В некоторых вариантах осуществления GYS1 может являться геном GYS1 человека (Gene ID: 2997), не являющегося человеком примата (например, Gene ID: 574233, Gene ID: 456196) или грызуна (например, Gene ID: 14936, Gene ID: 690987). У людей экспрессия мутантного белка GYS1 приводит к снижению синтеза гликогена. Кроме того, охарактеризовано множество вариантов транскриптов (например, как аннотировано в GenBank RefSeq под регистрационными номерами: NM_001161587.1 и NM_002103.4), кодирующих различные изоформы белка.

[00048] **Антитело человека:** В рамках изобретения термин "антитело человека" предназначен для включения антител, имеющих переменные 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.

[00049] **Гуманизированное антитело:** Термин "гуманизированное антитело" относится к антителам, содержащим последовательности вариабельной 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 вариабельной области зародышевой линии человека. Одним из типов гуманизированного антитела является антитело с пересаженными CDR, в котором последовательности CDR человека встраивают в не принадлежащие человеку последовательности VH и VL для замены соответствующих не принадлежащих человеку последовательностей CDR. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к гуманизированным антителам против 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.

[00050] **Интернализирующийся рецептор клеточной поверхности:** В рамках изобретения термин "интернализирующийся рецептор клеточной поверхности" относится к рецептору клеточной поверхности, интернализуемому клетками, например, после внешней стимуляции, например, связывания лиганда с рецептором. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор клеточной поверхности интернализуется посредством эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления интернализирующийся рецептор клеточной поверхности интернализуется посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза. Однако, в некоторых вариантах осуществления интернализирующийся 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 интернализирующийся рецептор клеточной поверхности содержит внутриклеточный домен, трансмембранный домен, и/или внеклеточный домен, который, необязательно, дополнительно может содержать лиганд-связывающий 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 интернализирующийся рецептор клеточной поверхности является рецептором трансферрина.

[00051] **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.

[00052] **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.

[00053] **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.

[00054] **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.

[00055] **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.

[00056] **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.

[00057] **Болезнь Помпе (PD):** В рамках изобретения термин "болезнь Помпе (PD)" относится к генетическому заболеванию, ассоциированному с тем, что характеризуют как мышечную слабость, затрудненное дыхание, гипотонию и, в крайних случаях, увеличение сердца, приводящее к сердечной недостаточности. Описано три категории PD, связанные с временем манифестации симптомов. Классическая инфантильная PD начинается в течение нескольких месяцев с момента рождения, при этом пациенты имеют мышечную

слабость, гипотонию, увеличение печени и дефекты сердца. При отсутствии лечения классическая инфантильная PD, как правило, приводит к гибели в течение первого года жизни. Неклассическая инфантильная PD, как правило, манифестирует приблизительно в 1 год жизни и отличается задержкой двигательных навыков и прогрессирующей мышечной слабостью. Эта слабость приводит к серьезным дыхательным проблемам, и большинство пациентов с неклассической инфантильной PD погибают в раннем детском возрасте. PD с поздним началом может не манифестировать до позднего детского возраста, подросткового возраста или взрослого возраста и, как правило, является более слабой, чем инфантильная PD. У большинства пациентов с PD с поздним началом наблюдают прогрессирующую мышечную слабость, что может приводить к дыхательным проблемам и дыхательной недостаточности. Болезнь Помпе (PD) приведена в базе данных OMIM Entry #232300. В этой области описаны болезнь Помпе, генетическая основа заболевания и связанные симптомы (см., например, Lim, et al., "Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again", *Frontiers in Aging: Neuroscience*. (2014); and Ferreira, et al. "Lysosomal storage diseases", *Transl Sci Rare Dis*. (2017), 5: 1-71).

[00058] **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.

[00059] **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.

[00060] **Специфически связывается:** В рамках изобретения термин "специфически связывается" относится к способности молекулы связываться с партнером по связыванию со степенью аффинности или авидности, позволяющей использовать молекулу для различения партнера по связыванию и соответствующего контроля в анализе связывания или другом контексте связывания. В отношении антитела термин "специфически связывается" относится к способности антитела связываться со специфическим антигеном со степенью аффинности или авидности по сравнению с соответствующим референсным антигеном или антигенами, что позволяет использовать антитело для различения специфического антигена от других, например, в степени, делающей возможной преференциальный таргетинг к некоторым клеткам, например, мышечным клеткам, через связывание с антигеном, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с мишенью, если антитело имеет K_D для связывания мишени по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, 10^{-5} М, 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело специфически связывается с рецептором трансферрина, например, эпитопом апикального домена рецептора трансферрина.

[00061] **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 болезнь Помпе (PD). В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом-человеком, имеющим один или более мутантных аллелей GAA, ассоциированных с PD.

[00062] **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

[00063] 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.

[00064] 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 мутантный аллель GAA, ассоциированный с PD. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, нацеленным на GYS1. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка содержит или кодирует белок GAA.

[00065] В некоторых вариантах осуществления комплекс содержит мышечно-специфическое средство, например, антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, например, антисмысловым олигонуклеотидом, нацеленным на аллель GAA, ассоциированный с PD.

A. Мышечно-специфические средства

[00066] 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.

[00067] 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.

[00068] С помощью взаимодействия с мышечно-специфическими элементами распознавания клеточной поверхности (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.

[00069] 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 немышечных 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.

[00070] 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

[00071] 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. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins" *J Biol Chem* 1996; 271: 15160-5; и Weisbart R.H. et al., "Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of monoclonal antibody that binds myosin IIb" *Mol Immunol.* 2003 Mar, 39(13):78309; полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

а. Антитела против рецептора трансферрина

[00072] 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 белкам, 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 интернализоваться в клетку, например, посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, после связывания с рецептором трансферрина.

[00073] 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).

[00074] 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.

[00075] 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	"эпитоп LUCA31"

	6/7/2004, названный "TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES"	
(Salk Institute) B3/25 T58/30	Trowbridge, I.S. et al. "Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells", Nature, 1981, volume 294, pages 171-173	
R17 217,1.3, 5E9C11, ОКТ9 (клон BE0023)	Коммерчески доступные антитела против рецептора трансферрина	BioXcell 10 Technology Dr., Suite 2B West Lebanon, NH 03784-1671 USA
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.	

[00076] 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 апикальный 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.

[00077] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина человека, соответствующей последовательности NCBI NP_003225.2 (белка рецептора трансферрина 1 изоформа 1, Homo sapiens), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLA VDEEENADNNTK
 ANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGE
 DFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQF
 REFKLSKVWRDQHFVVKIQVKDSAQNSV IIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 NAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFP PSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGD
 CPSDWKTDSTCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGV IKG FVEPDHYVVVGAQRDA
 WGPAAKSGVGTALLKLAQMFSDMV LKDG FQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLEG
 YLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNW
 ASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVAR
 AAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSAR
 GDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPF RHVFWGS
 GSHTLPALLENLKL RKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 1).

[00078] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI NP_001244232.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca mulatta*), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLG VDEEENTDNNTK
 PNGTKPKRCGNICYGTIAV IIFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVVKIQVKDSAQNSV IIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV
 KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFP PSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
 DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGV IKG FVEPDHYVVVGAQRD
 AWGPAAKSSVGTALLKLAQMFSDMV LKDG FQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLE
 GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSN
 WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
 ARAAAEVAGQFVIKLT HDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
 ARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPF RHVFW
 GSGSHTLSALLES LKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
 (SEQ ID NO: 2)

[00079] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина не являющегося человеком примата, соответствующей последовательности NCBI XP_005545315.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Macaca fascicularis*), является следующим:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKLG VDEEENTDNNTK
 ANGTKPKRCGNICYGTIAV IIFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEE
 DFPAAPRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQF
 REFKLSKVWRDQHFVVKIQVKDSAQNSV IIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGK
 LVHANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIV

KADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEG
DCPSDWKTDSTCKMVTSENKSVKLT VSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRD
AWGPGA AKSSVGTALLKLAQMFS DMVLK DGFQPSRSIIFASWSAGDFG SVGATEWLE
GYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDV KHPVTGRSLYQDSN
WASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKV
ARAAAEVAGQFVIKLTHTDELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWLYS
ARGDFFRATSRLTTDFRNAEK RDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPF RHVFW
GSGSHTLSALLESKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
(SEQ ID NO: 3).

[00080] Пример аминокислотной последовательности рецептора трансферрина мыши, соответствующей последовательности NCBI NP_001344227.1 (белок рецептора трансферрина 1, *Mus musculus*), является следующим:

MMDQARS AFSNLFGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA ADEEENADNNM
KASVRKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGMSGYLG YCKRVEQKEECVKLAETEETDKSET
METEDVPTSSRLYWADLKTLLSEKLSNIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIE
NQFHEFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGNLDPVESPEGYVAFSKPTEVS
GKLVHANFGTKKDFEELSYSVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKF
PVVEADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSQSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGK
MEGSCPARWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGA
QRDALGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFSDMISKDGF RPSRSIIFASWTAGDFGAVGATE
WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKVVLTGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDV KHPVDGKSLY
RDSNWISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQ
LNQMVRTAAEVAGQLIKLTHTDVELNLDYEMYSKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQ
WLYSARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNR FVMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPRHI
FWGSGSHTLSALVENLKLRQKNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNE
F

(SEQ ID NO: 4)

В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина связывается со следующим аминокислотным сегментом рецептора: FVKIQVKDSAQNSVIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGKLVHANFGTKKDFE
DLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLG
TGDYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAA EKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCR
MVTSESKNVKLT VSNVLKE (SEQ ID NO: 5) и не ингибирует связывающие взаимодействия между рецепторами трансферрина и трансферрином и/или белком гемохроматоза человека (также известным как HFE).

[00081] 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).

[00082] 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".

[00083] 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.

[00084] 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.

[00085] 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 1. 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).

[00086] 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.

[00087] 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.

[00088] 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.

[00089] 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 1. 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

вариабельного 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 1.

[00090] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина, специфически связывающееся с рецептором трансферрина (например, рецептор трансферрина человека), содержит вариабельный 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 вариабельный 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 вариабельной области (VL) легкой цепи, содержащую одну, две, три или четыре каркасные области последовательности вариабельной 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 вариабельной области легкой цепи, являющейся по меньшей мере на 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичной одной, двум, трем или четырем каркасным областям последовательности вариабельной 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 вариабельной 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 вариабельной 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 вариабельной области легкой цепи, не принадлежащей человеку, принадлежащей примату или человеку.

[00091] 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.

[00092] 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.

[00093] 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.

[00094] 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.

[00095] 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).

[00096] 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).

[00097] 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).

[00098] CDR тяжелой цепи и легкой цепи 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 мыши 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	EINPTNGRTNYIEKF KS (SEQ ID NO: 18)	NPTNGR (SEQ ID NO: 24)	WIGEINPTNGRTN (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)

[00099] Также приведены последовательности переменного домена (VH) тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи:

[000100] VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHNYWGQGTS
VTVSS (SEQ ID NO: 33)

[000101] VL

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKGKSPQLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFHWGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO: 34)

[000102] 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.

[000103] 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.

[000104] 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.

[000105] 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).

[000106] 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.

[000107] 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.

[000108] 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.

[000109] 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.

[000110] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным антителом (например, гуманизированным вариантом антитела). 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 гуманизированную переменную область тяжелой цепи и/или гуманизированную переменную область легкой цепи.

[000111] Гуманизированные 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, гуманизированное 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, гуманизированное 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. Гуманизированное 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 гуманизированных 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 гуманизированных антител также может включать созревание аффинности.

[000112] 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 гуманизированным 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 гуманизированным 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.

[000113] В некоторых вариантах осуществления антитело против рецептора трансферрина по настоящему изобретению является гуманизированным 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.

[000114] Приведены аминокислотные последовательности VH и VL примера гуманизованного антитела, который можно использовать по изобретению:

[000115] Гуманизованная VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGT
MVTVSS (SEQ ID NO: 35)

[000116] Гуманизованная VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSLSQSEDFGTYYCQHFHWGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO: 36)

[000117] 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.

[000118] 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.

[000119] 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.

[000120] 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.

[000121] 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.

[000122] 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" относятся 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.

[000123] 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.

[000124] 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
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37)

[000125] 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)

[000126] 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.

[000127] Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи описанных антител против рецептора трансферрина приведены ниже:

[000128] Тяжелая цепь (VH+константная область IgG1 человека)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTS
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

[000129] Легкая цепь (VL+легкая цепь каппа)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTS

VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ
ID NO: 40)

[000130] Тяжелая цепь (гуманизированный VH+константная область IgG1 человека)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

[000131] Легкая цепь (гуманизированный VL+легкая цепь каппа)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSLSQSEDFGTYYCQHFWGTPPLTFGAGTKLELKASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 42)

[000132] 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.

[000133] 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.

[000134] 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.

[000135] 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 гуманизированного антитела, 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 гуманизированного антитела, приведенной в SEQ ID NO: 40.

[000136] 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:

[000137] Тяжелая цепь FAB (VH+часть константной области IgG1 человека)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQGLEWIGEINP
TNGRTNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHNYWGQGT
STVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTP (SEQ
ID NO: 43)

[000138] Тяжелая цепь FAB (гуманизированный VH+часть константной области IgG1 человека)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINP
 TNGRTNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTRAYHYWGQGT
 MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 (SEQ ID NO: 44)

[000139] 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

[000140] 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, эпислон-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

[000141] 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.

[000142] 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.

[000143] 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.

[000144] 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*.

[000145] 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.

[000146] 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).

[000147] 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 Clq 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.

[000148] 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.

[000149] 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".

[000150] 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

[000151] 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.

[000152] 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, связывать, 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".

[000153] 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 мышцы C2C12 *in vitro* и с мышечной тканью мышцы *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 в качестве 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).

[000154] 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).

[000155] Мышечно-специфическое средство может являться аминокислота-содержащей молекулой или пептидом. Мышечно-специфический пептид может соответствовать последовательности белка, преференциально связывающейся с белковым рецептором, обнаруживаемым в мышечных клетках. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид содержит высокую долю гидрофобных аминокислот, например, валина, таким образом, что пептид преференциально нацелен на мышечные клетки. В некоторых вариантах осуществления мышечно-специфический пептид ранее не охарактеризован или не описан. Эти пептиды можно конструировать, продуцировать, синтезировать и/или 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

[000156] Мышечно-специфическое средство может являться лигандом, например, лигандом, связывающимся с рецепторным белком. Мышечно-специфический лиганд может являться белком, например, трансферрином, связывающимся с интернализирующим 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, стерин, дигидротестостерон, производные тестостерона, глицерин, алкиловые цепи, тритильные группы и алкоксикислоты.

iv. Мышечно-специфические аптамеры

[000157] 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

[000158] 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.

[000159] 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.

[000160] 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.

[000161] 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).

[000162] 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 C 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 C-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

[000163] 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 мутантному аллелю GAA. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка является олигонуклеотидом, содержащим цепь, имеющую область комплементарности GYS1. В некоторых вариантах осуществления молекулярная нагрузка содержит или кодирует белок GAA дикого типа. 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

[000164] 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.

[000165] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид опосредует включение экзона 2 в PD-ассоциированный аллель GAA, как описано в van der Wal, et al., "GAA Deficiency in Pompe Disease is Alleviated by Exon Inclusion in iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells", *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Jun 16; 7: 101-115, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь область комплементарности PD-ассоциированному аллелю GAA.

[000166] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, такой как олигонуклеотид РНКи или антисмысловой олигонуклеотид, используют для супрессии экспрессии GYS1 дикого типа в мышечных клетках, как описано, например, в Clayton, et al., "Antisense Oligonucleotide-mediated Suppression of Muscle Glycogen Synthase 1 Synthesis as an Approach for Substrate Reduction Therapy of Pompe Disease", опубликованной в *Mol Ther Nucleic Acids* в 2017 году, или публикации патентной заявки США № 2017/182189, опубликованной 29 июня 2017 года, названной "INHIBITING OR DOWNREGULATING GLYCOGEN SYNTHASE BY CREATING PREMATURE STOP CODONS USING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES", содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности последовательности GYS1 человека, соответствующую RefSeq № NM_002103.4, и/или последовательности GYS1 мыши, соответствующей RefSeq № NM_030678.3 (SEQ ID NO: 15), как описано ниже.

[000167] GYS1 человека (NM_002103.4):
 TCCTGGCGGCTGCGAGGTTTCACTGCAGGGGCGCCAGTGGGCTCAGTGACGCTGCG
 GCCTCCTTCTGCCTAGGTCCCAACGCTTCGGGGCAGGGGTGCGGTCTTGCAATAGGA
 AGCCGAGCGTCTTGCAAGCTTCCCGTCGGGCACCAGCTACTCGGCCCCGCACCCTAC
 CTGGTGCAATCCCTAGACACCTCCGGGGTCCCTACCTGGAGATCCCCGGAGCCCCC
 TTCCTGCGCCAGCCATGCCTTTAAACCGCACTTTGTCCATGTCCTCACTGCCAGGACT
 GGAGGACTGGGAGGATGAATTCGACCTGGAGAACGCAGTGCTCTTCGAAGTGGCCT
 GGGAGGTGGCTAACAAGGTGGGTGGCATCTACACGGTGCTGCAGACGAAGGCGAA
 GGTGACAGGGGACGAATGGGGCGACAATACTTCTGCTGGTGGGGCCGTACACGGAGC
 AGGGCGTGAGGACCCAGGTGGAAGTCTGGAGGCCCCACCCCGGCCCTGAAGAGG
 AACTGGATTCCATGAACAGCAAGGGCTGCAAGGTGTATTTCTGGGCGCTGGCTGAT
 CGAGGGAGGCCCTCTGGTGGTGCTCCTGGACGTGGGTGCCTCAGCTTGGGCCCTGGA
 GCGCTGGAAGGGAGAGCTCTGGGATACCTGCAACATCGGAGTGCCGTGGTACGACC
 GCGAGGCCAACGACGCTGTCCTCTTTGGCTTTCTGACCACCTGGTTCCTGGGTGAGT
 TCCTGGCACAGAGTGAGGAGAAGCCACATGTGGTTGCTCACTTCCATGAGTGGTTGG
 CAGGCGTTGGACTCTGCCTGTGTCTGTCGCGGCGACTGCCTGTAGCAACCATCTTCA
 CCACCCATGCCACGCTGCTGGGGCGCTACCTGTGTGCCGGTGCCGTGGACTTCTACA

ACAACCTGGAGAACTTCAACGTGGACAAGGAAGCAGGGGAGAGGCAGATCTACCA
CCGATACTGCATGGAAAGGGCGGCAGCCCACTGCGCTCACGTCTTCACTACTGTGTC
CCAGATCACCGCCATCGAGGCACAGCACTTGCTCAAGAGGAAACCAGATATTGTGA
CCCCCAATGGGCTGAATGTGAAGAAGTTTTCTGCCATGCATGAGTTCCAGAACCTCC
ATGCTCAGAGCAAGGCTCGAATCCAGGAGTTTGTGCGGGGCCATTTTTATGGGCATC
TGGACTTCAACTTGGACAAGACCTTATACTTCTTTATCGCCGGCCGCTATGAGTTCTC
CAACAAGGGTGCTGACGTCTTCCTGGAGGCATTGGCTCGGCTCAACTATCTGCTCAG
AGTGAACGGCAGCGAGCAGACAGTGGTTGCCTTCTTCATCATGCCAGCGCGGACCA
ACAATTTCAACGTGGAAACCTCAAAGGCCAAGCTGTGCGCAAACAGCTTTGGGAC
ACGGCCAACACGGTGAAGGAAAAGTTCGGGAGGAAGCTTTATGAATCCTTACTGGT
TGGGAGCCTTCCCGACATGAACAAGATGCTGGATAAGGAAGACTTCACTATGATGA
AGAGAGCCATCTTTGCAACGCAGCGGCAGTCTTCCCCCCTGTGTGCACCCACAATA
TGCTGGATGACTCCTCAGACCCCATCCTGACCACCATCCGCCGAATCGGCCTCTTCA
ATAGCAGTGCCGACAGGGTGAAGGTGATTTTCCACCCGGAGTTCCTCTCCTCCACAA
GCCCCCTGCTCCCTGTGGACTATGAGGAGTTTGTCCGTGGCTGTCACCTTGGAGTCTT
CCCCTCCTACTATGAGCCTTGGGGCTACACACCGGCTGAGTGCACGGTTATGGGAAT
CCCCAGTATCTCCACCAATCTCTCCGGCTTCGGCTGCTTCATGGAGGAACACATCGC
AGACCCCTCAGCTTACGGTATCTACATTCTTGACCGGCGGTTCCGCAGCCTGGATGA
TTCCTGCTCGCAGCTCACCTCCTTCTCTACAGTTTCTGTCAGCAGAGCCGGCGGCA
GCGTATCATCCAGCGGAACCGCACGGAGCGCCTCTCCGACCTTCTGGACTGGAAAT
ACCTAGGCCGGTACTATATGTCTGCGCGCCACATGGCGCTGTCCAAGGCCTTTCCAG
AGCACTTCACCTACGAGCCCAACGAGGCGGATGCGGCCCAGGGGTACCGCTACCCA
CGGCCAGCCTCGGTGCCACCGTCGCCCTCGCTGTCACGACACTCCAGCCCGCACCAG
AGTGAGGACGAGGAGGATCCCCGGAACGGGCGGCTGGAGGAAGACGGCGAGCGCT
ACGATGAGGACGAGGAGGCCCGCAAGGACCGGCGCAACATCCGTGCACCAGAGTG
GCCGCGCCGAGCGTCCTGCACCTCCTCCACCAGCGGCAGCAAGCGCAACTCTGTGG
ACACGGCCACCTCCAGCTCACTCAGCACCCCGAGCGAGCCCCTCAGCCCCACCAGCT
CCCTGGGCGAGGAGCGTAACTAAGTCCGCCCCACCACACTCCCCGCCTGTCCTGCCT
CTCTGCTCCAGAGAGAGGATGCAGAGGGGTGCTGCTCCTAAACCCCCGCTCCAGAT
CTGCACTGGGTGTGGCCCCGCAGTGCCCCCACCAGTCCGCCAAACACTCCACCCCC
TCCAGCTCCAGTTTCCAAGTTCCTGCACTCCAGAATCCACAAAGCCGTGCCTTTCTCT
GGCTCCAGAATATGCATAATCAGCGCCCTGGAGTCCCCTGGGCCTGGACCGCTTCCC
AGAGGCCAGGAATCTGCCATTACTCTGCGGTGGTGCCAGAGGTTTTAGGAAACCTG
GCATGGTGCTTTCAGGTCTGGGGCTTTTAGAGCCCCCGTGTGGCTTACAAATTCTA
CAGCATAACAGAGCAGGCCACGCTCAGGCCCGGCATGCGGGGCCACCAAGTTCTGGAA
ACCACGTGGTGTCCCTGCGAATGGGGCGATCAAGTCCAGAGCCGGGGCACTTTCAG
AGTTTGAAGGTAACCTGAGAGCAGATGGTCCTCCATTTCAACTCCAGAAGTGGGGCTC
TGGGAGGGATGTTCTAGCCCTCCCTGGCATGTCAGAGCCAGGCTCTGCCTGGAGGAT
CCCTCCATCCGGCTCCTGTCATCCCTACACTTTGGCCAAGCAAGAGGTGGTAGAAC
CACTTGGCTGCTCATTCTTCTGGAGGACACACAGTCTCAGTCCAGATGCCTTCCTGT

CTTTCTGGCCCTTTCTGGACCAGATCCTACTCTTCCTTTCTAAATCTGAGATCTCCCT
 CCAGGGAATCCGCCTGCAGAGGACAGAGCTGGCTGTCTTCCCCCACCCTAACCTGG
 CTTATTTCCCAACTGCTCTGCCCCTGTGAAACCACTAGGTTCTAGGTCCTGGCTTCTA
 GATCTGGAACCTTACCACGTTACTGCATACTGATCCCTTTCCCATGATCCAGAACTG
 AGGTCCTGGGTTCTAGAACCCCCACATTTACCTCGAGGCTCTTCCATCCCCAACT
 GTGCCCTGCCTTCAGCTTTGGTGAAAGGGAGGGCCCCCTCATGTGTGCTGTGCTGTGT
 CTGCACCGCTTGGTTTGCAGTTGAGAGGGGAGGGCAGGAGGGGTGTGATTGGAGTG
 TGTCGGGAGATGAGATGAAAAAATACATCTATATTTAAGAATCCCCAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 15)

[000168] GYS1 мышцы (NM_030678.3):

ACTGCAGCTGCCCCGCCGATTCACTGTCTCAGCTCACCTACCTGAGTCGGAG
 CGCTCTGGGGCGGGGGTGCGGTCGTGCAATAGGAAGCGGAGCGCCTTGCAAGCTTC
 CCCTGGGACACCCGCTAACTCTACCGGTCACCAAGTCTGCTGCGTTCCAGCCGATC
 TCTCTGGTTTCCAGTTTTTGGTGCTCGAAGTCCCCTGCCCCGAGTAGCCATGCCTCTCA
 GCCGCAGTCTCTCTGTGTCTCGCTTCCAGGATTGGAAGACTGGGAGGATGAATTTCG
 ACCCCGAGAACGCAGTGCTTTTCGAGGTGGCCTGGGAGGTGGCCAACAAGGTGGGT
 GGCATCTACACTGTGCTGCAGACGAAGGCGAAGGTGACAGGGGATGAATGGGGTGTA
 CAACTACTATCTGGTGGGACCATAACGGAGCAGGGTGTGAGGACGCAGGTAGAGC
 TCCTGGAGCCCCCACTCCGGAAGTGAAGAGGACTTTGGATTCCATGAACAGCAAG
 GGTTGTAAGGTGTATTTTGGGCGTTGGCTGATCGAGGGGGGACCCCTAGTGGTGCTC
 CTGGATGTAGGAGCCTCAGCTTGGGCCCTGGAGCGCTGGAAGGGTGAGCTTTGGGA
 CACCTGCAACATCGGGGTACCCTGGTACGACCGCGAGGCCAATGACGCTGTCCTGTT
 CGGCTTCCTCACCACCTGGTTCCTGGGTGAGTTCCTGGCCCAGAACGAAGAGAAGCC
 GTATGTGGTTGCCCACTTCCACGAATGGTTGGCTGGCGTTGGTCTGTGTCTGTGCCGT
 GCCCGGCGCTTGCCGGTGGCAACCATCTTCACCACTCATGCCACGCTGCTGGGGCGC
 TACCTGTGTGCTGGCGCTGTGGACTTCTACAACAACCTGGAGAATTTCAATGTAGAC
 AAGGAAGCAGGAGAGAGGCAGATCTATACCGGTACTGCATGGAGCGTGCAGCAG
 CTCCTGTGCCCATGTCTTCACTACCGTATCCCAGATCACCGCAATCGAGGCTCAAC
 ACCTCCTTAAGAGAAAACCAGATATTGTGACCCCCAACGGGCTGAATGTGAAGAAG
 TTCTCTGCTATGCACGAATTCCAGAACCTTCATGCTCAGAGCAAAGCACGAATCCAG
 GAATTTGTGCGTGGCCATTTTTATGGGCACCTGGACTTCAACCTAGACAAGACTTTG
 TATTTCTTTATCGCTGGCCGCTATGAGTTTTCCAACAAGGGAGCTGATGTGTTCTGG
 AGGCATTGGCCCGGCTCAACTATCTGCTCAGAGTGAATGGCAGTGAGCAAACAGTT
 GTCGCATTCTTCATCATGCCGGCCCGGACCAATAATTTCAACGTGGAAACCCTGAAG
 GGCCAAGCCGTGCGCAAACAACCTATGGGACACAGCCAATACAGTCAAGGAGAAATT
 TGGGAGGAAGCTCTACGAATCCCTTTTAGTGGGGAGCCTCCCGGACATGAACAAGA
 TGCTGGACAAGGAGGACTTCACTATGATGAAGAGAGCCATCTTTGCCACTCAGCGG
 CAGTCTTTCCCACCAGTGTGCACCCACAACATGCTGGACGACTCCTCAGACCCCATC
 TTGACCACCATCCGCCGAATTGGCCTTTTCAACAGCAGTGCCGACCGTGTGAAGGTG
 ATTTTTCACCCAGAATTCCTTTCTTCCACAAGCCCTCTCCTCCCCGTGGATTATGAGG

AATTTGTCCGCGGCTGTCACCTTGGGGTCTTCCCCTCCTACTATGAGCCCTGGGGCTA
CACACCAGCGGAGTGCACCTGTCATGGGCATCCCCAGCATCTCCACCAACCTCTCCGG
CTTTGGCTGCTTTATGGAGGAACACATCGCAGATCCCTCAGCTTACGGCATTACAT
TCTGGATCGGAGGTTCCGCAGCCTGGATGATTCATGCTCACAGCTCACCTCCTTCCT
GTACAGCTTCTGCCAGCAGAGCCGGCGACAGCGCATCATCCAGCGGAACCGCACAG
AACGGTTGTCGGACTTGCTAGATTGGAAGTACCTGGGCGCGTACTACATGTCTGCGC
GCCACATGGCTCTGGCCAAGGCCTTTCCAGACCACTTCACCTATGAACCCCATGAGG
TAGATGCGACCCAGGGGTACCGGTACCCACGACCAGCCTCCGTCCCGCCGTCGCCCT
CACTGTCTCGACACTCCAGCCCACACCAGAGTGAGGATGAGGAAGAGCCACGGGAT
GGACCCCTGGGGGAAGACAGTGAGCGTTATGATGAGGAAGAGGAGGCTGCCAAGG
ACCGCCGCAACATCCGGGCACCTGAGTGGCCACGCAGGGCCTCCTGTTCTCTCTCCA
CAGGTGGCAGCAAGAGAAGCAACTCGGTGGACACTGGGCCCTCCAGCTCACTCAGC
ACACCCACTGAGCCCCTGAGTCCTACCAGTTCCTGGGTGAGGAGCGCAACTAAGCT
CCCACCCCATCCCATTCCTGCCTGTCCAGTGCTCCTCTCGCAGAGGGCCTATGCA
GATGGGAGGGTGCCTGAACCCCACTCCAGACTCTTGAGTGGGACCCCTACCCAGTGT
GGTCCATAGCCTAACCTCTGTTTCAGACACTCCAGCCCTTGAGCTCCAATCTTGAG
TTCCCGCACTCCACGCCGCCGTGCCTTTCTTGATTGCAGGATGCATTCTTTGTGCAC
TGATCTGGAGTCTCCAGGCTTAGACTGGGTCCCAGAGGCCAGGCATCTGCCATTGTT
TTTCAATGCCAGAGGTTTTAGGACACCTGGTTTATTGGCTTCCAGGCTGTGGCTTCTT
CGTTTGATCCTATAATCATAACAGAGTATGCTTTGCTCAGGCCTGCCTCTGGGACCAC
CTCATGTTGGATTCTGTGTGGCTTCCCGAATCAGCCAAGTTCAGAGTTAGGACATTT
CAGGGATTAACATAATTGAAAATCAGCCTGCAAGGTAGCTCAGTAGCTCTGTGAC
AGATTGCTTGTCTAGCATGCCCCGAAGCCCTGGGATCTAACTCTAGAACCTCATAAAC
CTGGTGCGGTGATACACATCTGTAATCCCAGCACTCGGTAGGTAGAGGTAGACGGA
TCAAGAGTTAAAGGCCATCATCCTCTGCTACATAGGGAGTTCAAGGCCAAACTGGG
CAACATGAGACACTGTCTCAAAAGCAAAGTAAAGGTGGTGGAATGCTCACGGTCCT
CCATTTCAACCCACGACTGCGATGCTGGGACATGCTGCAAGGTTGGCCTCCCTGGGT
GTGTTCTTCAAAGGAGCATGCGGAGTTGGACCAGACACCTTTCTGCCTTTTTTCTGG
ACCAGACCTTCTTTTCTTGGTCCAGTGTCCCCTCTAGGGAATGCCTCCATTGAGGGC
AGAATGTCTGTCAACCCCAACAAGTGCTCAGCCCACTGTGAAACCACTGGGTTCTGGG
TCCAGTGGCTGAATCAGGAGTCTTTTGTCACTGTGCTGCACCCCGGTCCCCTTTCT
GATACAAAACCGAGCCCACCGGCTTCTTGAAGCCCCACATGTACCTCGAGGCCTTTC
TGCCTGCAAGCTTCAGTGAATGGGCGGGCCCCCTCCTCACGTGTGCTGTGTCTGGCCC
AGTGCCTTTGGTTTGCATTTGGGAGGGGGAGGGCAGAAGGTGTGTGATTGGAGTGT
GTCTAGAGATGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAATACACCTGTATTTAAGAATGCC (SEQ
ID NO: 16)

а. Размер/последовательность олигонуклеотида

[000169] 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.

[000170] 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.

[000171] 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.

в. Модификации олигонуклеотидов

[000172] 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.

[000173] 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.

[000174] 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

[000175] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид включает 2'-модифицированный нуклеотид, например, нуклеотид с 2'-дезоксигруппой, 2'-дезоксидезоксифтором, 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-метилацетамидогруппой (2'-О--NMA).

[000176] 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.

[000177] 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.

[000178] 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.

[000179] 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.

[000180] 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, не содержащим 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, не содержащим модифицированный нуклеотид.

[000181] 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

[000182] 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.

[000183] Фосфор-содержащие связи, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоклфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, содержащие 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, содержащие 3'-аминофосфорамидат и аминоклфосфорамидаты, 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.

[000184] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут содержать гетероатомные остовы, такие как метилен(метилямино)-остовы или ММl-остовы; амидные остовы (см. De Mesmaeker et al. *Ace. 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

[000185] 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

[000186] 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)

[000187] 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, аминоксилотным 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

[000188] 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 РНКазу H. В некоторых вариантах осуществления гэпмер связывается с целевой нуклеиновой кислотой, при этом рекрутируется РНКазу, 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.

[000189] 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.

[000190] 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

[000191] 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.

[000192] 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.

[000193] 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.

[000194] 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.

[000195] 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.

[000196] 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.

[000197] В некоторых вариантах осуществления миксмер содержит один или более морфолиновых нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления миксмер может содержать морфолиновые нуклеотиды, смешанные (например, чередующимся образом) с одним или более другими нуклеотидами (например, нуклеотидами ДНК, РНК) или модифицированными нуклеотидами (например, ЗНК, 2'-О-метил-нуклеотидами).

[000198] В некоторых вариантах осуществления миксмеры можно использовать для коррекции сплайсинга или пропуска экзонов, например, как описано в Touznik A., et al., "LNA/DNA mixmer-based antisense oligonucleotides correct alternative splicing of the SMN2 gene and restore SMN protein expression in type 1 SMA fibroblasts", Scientific Reports, volume 7, Article number: 3672 (2017), Chen S. et al., Synthesis of a Morpholino Nucleic Acid (MNA)-Uridine Phosphoramidite, and Exon Skipping Using MNA/2'-O-Methyl Mixmer Antisense Oligonucleotide, Molecules 2016, 21, 1582, содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

j. РНК-интерференция (РНКи)

[000199] 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.

[000200] 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).

[000201] 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.

[000202] 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.

[000203] 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.

[000204] 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)

[000205] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может являться микроРНК (мкРНК). МикроРНК (обозначаемые как "мкРНК") являются небольшими некодирующими РНК, принадлежащими к классу регуляторных молекул, контролирующих экспрессию генов посредством связывания с комплементарными участками на целевом транскрипте РНК. Как правило, мкРНК получают из крупных предшественников РНК (обозначаемых как при-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.

[000206] 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

[000207] 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

[000208] 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.

[000209] 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.

[000210] 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.

[000211] 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.

п. Гидовые нуклеиновые кислоты

[000212] 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 программируемой нуклеиновой кислотой, ДНК-связывающим белком (parDNAbr), 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 parDNAbr 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 нуклеиновую 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.

[000213] 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.

[000214] 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-РНК-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

[000215] 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).

[000216] 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.

[000217] 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.

[000218] 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

[000219] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любое подходящее низкомолекулярное соединение, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение является производным 1-дезоксиримицина (DNJ), таким как N-бутил-DNJ, N-метил-DNJ или N-циклопропилметил-DNJ, как описано в публикации патентной заявки США № 2016/0051528, опубликованной 25 февраля 2016 года, названной "METHOD FOR TREATMENT OF POMPE DISEASE USING 1-DEOXYNOJIRIMYCIN DERIVATIVES". В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение производное DNJ используют в качестве молекулярного шаперона для повышения активности GAA. В некоторых вариантах осуществления используют низкомолекулярный неингибиторный шаперон кислой альфа-глюкозидазы ML247, как описано в Marugan, et al., "Discovery, SAR, and Biological Evaluation of a Non-Inhibitory Chaperone for Acid Alpha Glucosidase", опубликованной в *Probe Reports from NIH Molecular Libraries* в декабре 2011 года. Например, используют низкомолекулярный шаперон ML247 для повышения активности PD-ассоциированного аллеля GAA или аллеля GAA дикого типа. Содержание каждой из этих публикаций, указанных выше, включено в настоящее описание посредством ссылок в полном объеме.

iii. Пептиды/белки

[000220] В качестве молекулярной нагрузки можно использовать любой подходящий пептид или белок, как представлено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления белок является ферментом (например, кислой альфа-глюкозидазой, например, кодируемой геном GAA). В некоторых вариантах осуществления

молекулярная нагрузка является белком или ферментом, таким как кислая альфа-глюкозидаза, или белок GAA дикого типа, или его активный фрагмент, как описано в публикации патентной заявки США № 2016/0346363, опубликованной 1 декабря 2016 года, названной "METHODS AND ORAL FORMULATIONS FOR ENZYME REPLACEMENT THERAPY OF HUMAN LYSOSOMAL AND METABOLIC DISEASES", публикации патентной заявки США № 2016/0279254, опубликованной 29 сентября 2016 года, названной "METHODS AND MATERIALS FOR TREATMENT OF POMPE'S DISEASE", или публикации патентной заявки США № 2013/0243746, опубликованной 19 сентября 2013 года, названной "METHODS AND MATERIALS FOR TREATMENT OF POMPE'S DISEASE". В некоторых вариантах осуществления кислая альфа-глюкозидаза или белок GAA дикого типа повышает активность GAA у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления кислая альфа-глюкозидаза или белок GAA дикого типа кодируется геном GAA.

[000221] Пример последовательности белка GAA человека дикого типа, соответствующей последовательности NCBI XP_005257251.1 (изоформе X1 лизосомальной альфа-глюкозидазы) является следующим:

MGVRHPPCSHRLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPA
 HQQGASRPGPRDAQAHPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAK
 QGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVM
 ETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNT
 TVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGS
 HPFYLALEDGGSANHGVLNNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQ
 YLDVVGYPFMPYWGGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD
 SRRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGVFI
 TNETGQPLIGKVWPGSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI
 RGSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIAISHR
 ALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVG
 ADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKATL
 RYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGK
 AEVTGYFPLGTWYDLQTPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRA
 GYIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTGGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFL
 ARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDIC
 VSLLMGEQFLVSWC

iv. Конструкции нуклеиновой кислоты

[000222] 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'-метиловый кэп. В некоторых вариантах осуществления мРНК может содержать поли-А-хвост, необязательно, длиной до 160 нуклеотидов. 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, содержащий по меньшей мере один цинковый палец. В некоторых вариантах осуществления конструкция для экспрессии гена кодирует белок GAA дикого типа. 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

[000223] 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).

[000224] 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 малеимидометил-циклогексан-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

[000225] 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.

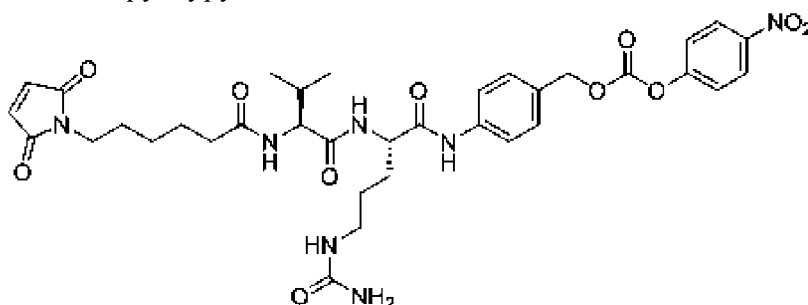
[000226] Протеаза-чувствительные линкеры расщепляются в результате ферментативной активности протеазы. Эти линкеры, как правило, содержат пептидные последовательности и могут иметь длину 2-10 аминокислот, приблизительно 2-5 аминокислот, приблизительно 5-10 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, 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.

[000227] 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

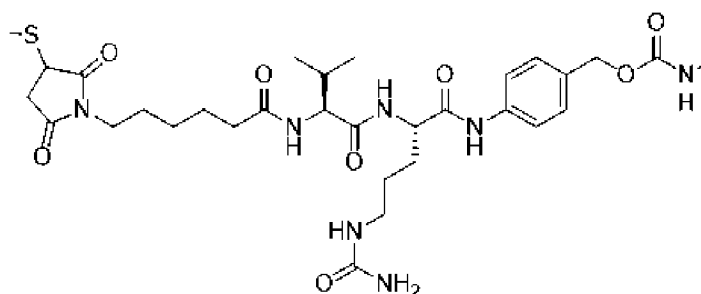
диапазоне от 4 до 6. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер содержит гидразон или циклический ацеталь. В некоторых вариантах осуществления pH-чувствительный линкер расщепляется в эндосоме или лизосоме.

[000228] 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.

[000229] 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:



[000230] В некоторых вариантах осуществления после конъюгации линкер Val-Cit имеет структуру:



ii. Нерасщепляемые линкеры

[000231] 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, гетероарил, 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).

[000232] 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,₂; необязательно замещенный гетероциклилен, дополнительно содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из N, O и S,₂; иминогруппу, необязательно замещенные формы азота, необязательно замещенные формы кислорода O, необязательно замещенные формы серы или поли(алкиленоксид), например, полиэтиленоксид или полипропиленоксид.

iii. Конъюгация линкера

[000233] 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 средстве.

[000234] 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".

[000235] 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.

[000236] 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 перициклических 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.

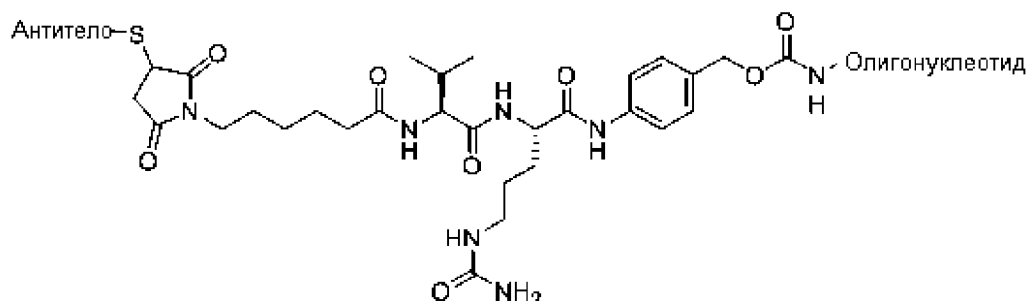
[000237] В некоторых вариантах осуществления линкер соединяют с мышечно-специфическим средством и/или молекулярной нагрузкой с помощью реакций сопряженного присоединения между нуклеофилом, например, аминогруппой или гидроксильной группой, и электрофилом, например, карбоновой кислотой или альдегидом. 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, тизоцианатом, 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 гетероциклилом, гидроксильной группой, аминогруппой, алкиламиногруппой, анилидогруппой или тиоловой группой.

D. Примеры комплексов антитело-молекулярная нагрузка

[000238] 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).

[000239] 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).

[000240] 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.

[000241] 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. 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 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 олигонуклеотида. 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).

[000242] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с 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.

[000243] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с 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 олигонуклеотидом, где антитело против рецептора трансферрина содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

[000244] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с 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 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.

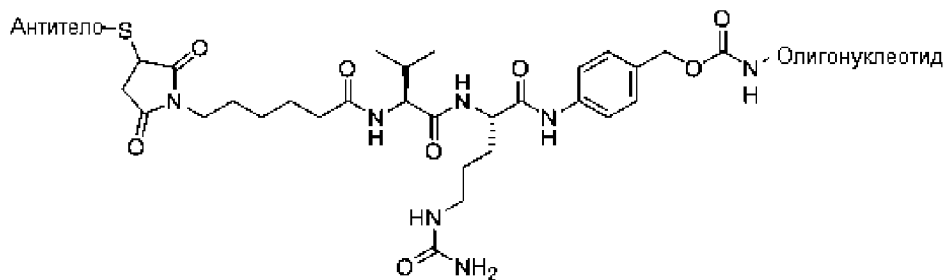
[000245] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с олигонуклеотидом с помощью линкера (например, линкера Val-Cit), где антитело против рецептора трансферрина содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, 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.

[000246] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленные в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с 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 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.

[000247] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с 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

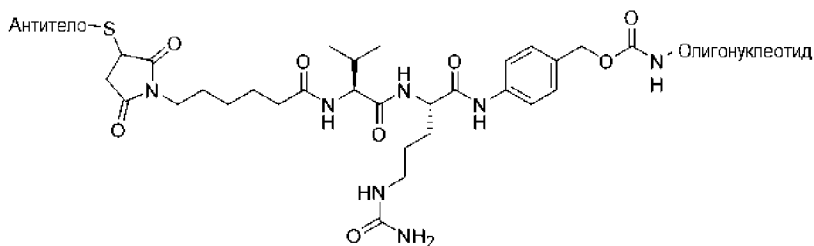
против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с олигонуклеотидом с помощью линкера (например, линкера Val-Cit), где антитело против рецептора трансферрина содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

[000248] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с 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 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).

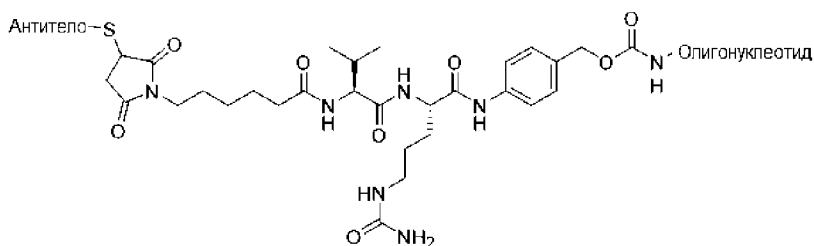
[000249] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с олигонуклеотидом с помощью линкера Val-Cit, где антитело против рецептора трансферрина содержит VH, имеющую аминокислотную последовательность 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 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).

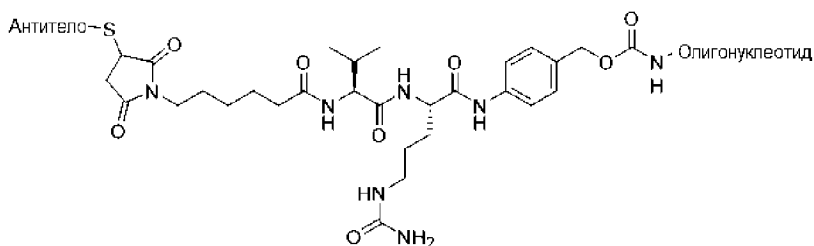
[000250] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с олигонуклеотидом с помощью линкера Val-Cit, где антитело против

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:



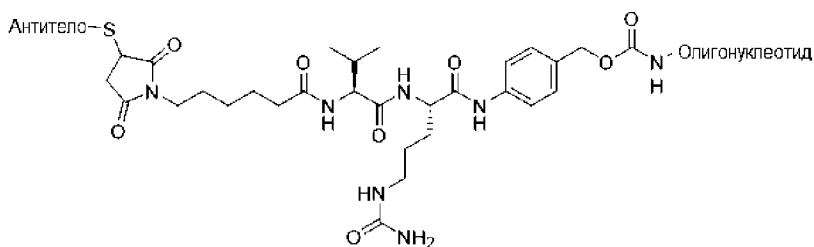
где линкер Val-Cit соединяют с 5'-концом, 3'-концом или внутренней частью олигонуклеотида, и где линкер Val-Cit соединяют с антителом (например, антителом или любым его вариантом, как представлено в настоящем описании) с помощью тиол-реактивной связи (например, с помощью цистеина в антителе).

[000251] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с 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 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).

[000252] В некоторых вариантах осуществления комплекс, представленный в настоящем описании, содержит антитело против рецептора трансферрина, ковалентно связанное с 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 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

[000253] 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.

[000254] 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).

[000255] 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).

[000256] В некоторых вариантах осуществления комплекс или его компонент (например, олигонуклеотид или антитело) лиофилизируют для увеличения его срока годности, а затем превращают в раствор перед использованием (например, введением индивидууму). Таким образом, эксципиент в композиции, содержащей комплекс или его компонент, представленный в настоящем описании, может являться лиопротектором (например, маннитом, лактозой, полиэтиленгликолем или поливинилпирролидоном) или

модификатором температуры разрушения (например, декстраном, фикоλλом или желатином).

[000257] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют так, чтобы она была совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, введение. Как правило, путь введения является внутривенным или подкожным.

[000258] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного использования, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых соединений) или дисперсии, и стерильные порошки для экстемпорального получения стерильных инъектируемых 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 инъектируемые 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.

[000259] 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

[000260] Комплексы, содержащие мышечно-специфическое средство, ковалентно связанное с молекулярной нагрузкой, как представлено в настоящем описании, являются эффективными при лечении болезни Помпе. В некоторых вариантах осуществления болезнь Помпе ассоциирована с аллелем GAA, содержащим мутации, ассоциированные с PD.

[000261] 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 токсическое накопление гликогена в лизосомах. В некоторых вариантах осуществления индивидуума, имеющего болезнь Помпе, в настоящее время подвергают или подвергали ранее заместительной ферментной терапии.

[000262] 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.

[000263] Композиции для внутривенного введения могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилактамид, 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.

[000264] 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.

[000265] 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.

[000266] 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.

[000267] 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.

[000268] Эффективность лечения можно оценивать любыми подходящими способами. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценивать посредством оценки наблюдения симптомов, ассоциированных с болезнью Помпе, включая мышечную слабость и дыхательные проблемы.

[000269] 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.

[000270] 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.

[000271] 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 болезнь Помпе. 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 HPRTc использованием трансфицированных антисмысловых олигонуклеотидов

[000272] МиРНК, нацеленную на гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), тестировали *in vitro* на его способность снижать уровни экспрессии HPRTв immortalized линии клеток. В кратком изложении, клетки Нера 1-6 трансфицировали с использованием контрольной миРНК (siCTRL; 100 нМ) или миРНК, нацеленной на HPRT (siHPRT; 100 нМ), составленных с липофектами 2000. Уровни экспрессии HPRTоценивали через 48 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 48 часов. Как показано на фиг. 1, обнаружено, что миРНК HPRT снижала уровни экспрессии HPRTна ~90% по сравнению с контролями.

Таблица 2. Последовательности siHPRT и siCTRL

	Последовательность
Смысловая цепь siHPRT	5'-UcCuAuGaCuGuAgAuUuUaU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'
Антисмысловая цепь siHPRT	5'-paUaAaAuCuAcAgUcAuAgGasAsu-3'

Смысловая цепь siCTRL	5'-UgUaAuAaCcAuAuCuAcCuU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'
Антисмысловая цепь siCTRL	5'-aAgGuAgAuAuGgUuAuUaCasAa-3'

*Строчные буквы - 2'-О-метил-рибоза; прописные буквы - 2'-фторрибоза; р - фосфатная связь; s - фосфотиоатная связь

Пример 2: Таргетинг HPRTc использованием мышечно-специфического комплекса

[000273] Получали мышечно-специфический комплекс, содержащий миРНК HPRT, использованную в примере 1 (siHPRT), ковалентно связанную с помощью нерасщепляемого линкера N-гамма-малеимидобутирил-оксисукцинимидного эфира (GMBS) с DTX-A-002, антителом против рецептора трансферрина.

[000274] В кратком изложении, линкер GMBS растворяли в сухом DMSO и связывали с 3'-концом смысловой цепи с помощью образования амидной связи в водных условиях. Завершили реакции проверяли с помощью теста Кайзера. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством гель-фильтрации. Затем очищенную малеимид-функционализированную цепь siHPRT подвергали сопряжению с антителом DTX-A-002 с использованием реакции присоединения Михаэля.

[000275] Продукт реакции сопряжения антитела подвергали хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ). Очищали комплексы antiTfR-siHPRT, содержащие одну или две молекулы siHPRT, ковалентно связанные с антителом DTX-A-002. С помощью денситометрии подтверждали, что очищенный образец комплексов имел среднее соотношение siHPRT и антитела 1,46. Анализ электрофореза в ПААГ с SDS показал, что >90% очищенного образца комплексов содержали DTX-A-002, соединенное с одной или двумя молекулами siHPRT.

[000276] Используя описанные выше способы, получали контрольный комплекс IgG2a-siHPRT, содержащий миРНК HPRT, используемую в примере 1 (siHPRT), ковалентно связанную с помощью линкера GMBS с антителом IgG2a (Fab) (DTX-A-003). С помощью денситометрии подтверждали, что DTX-C-001 имел среднее соотношение siHPRT и антитела 1,46, и электрофорез в ПААГ с SDS показал, что >90% очищенного образца комплексов содержали DTX-A-003, связанное с одной или двумя молекулами siHPRT.

[000277] Затем комплекс antiTfR-siHPRT тестировали на интернализацию в клетки и ингибирование HPRT in cellulo. Клетки Нера 1-6, имеющие относительно высокие уровни экспрессии рецептора трансферрина, инкубировали в присутствии контрольного носителя (фосфатно-солевого буфера), IgG2a-siHPRT (100 нМ), antiTfR-siCTRL (100 нМ) или antiTfR-siHPRT (100 нМ) в течение 72 часов. После инкубации в течение 72 часов клетки выделяли и оценивали на уровни экспрессии HPRT (фиг. 2). Клетки, обработанные antiTfR-siHPRT, демонстрировали снижение экспрессии HPRT на ~50% относительно клеток, обработанных контрольным носителем. В то же время, клетки, обработанные IgG2a-siHPRT или antiTfR-siCTRL, имели уровни экспрессии HPRT, сравнимые с контрольным носителем (без снижения экспрессии HPRT). Эти данные свидетельствуют о

том, что антитело против рецептора трансферрина antiTfR-siHPRT делает возможной интернализацию комплекса в клетки, таким образом, позволяя siHPRT ингибировать экспрессию HPRT.

Пример 3: Таргетинг HPRT в мышечных тканях мыши с использованием мышечно-специфического комплекса

[000278] Мышечно-специфический комплекс, описанный в примере 2, antiTfR-siHPRT, тестировали на ингибирование HPRT в тканях мыши. Мышам C57BL/6 дикого типа внутривенно инъектировали однократную дозу контрольного носителя (фосфатно-солевого буфера); siHPRT (2 мг/кг РНК); IgG2a-siHPRT (2 мг/кг РНК, соответствующие 9 мг/кг комплекса антитела) или antiTfR-siHPRT (2 мг/кг РНК, соответствующие 9 мг/кг комплекса антитела). Каждые экспериментальные условия воспроизводили на четырех отдельных мышках C57BL/6 дикого типа. После трехдневного периода после инъекции мышцей умерщвляли и отделяли выделенные типы тканей. Затем отдельные образцы ткани анализировали на уровне экспрессии HPRT (фиг. 3А-3В и 4А-4Е).

[000279] Мыши, которым вводили комплекс antiTfR-siHPRT, демонстрировали снижение экспрессии HPRT в икроножной мышце (снижение на 31%; $p < 0,05$) и сердце (снижение на 30%; $p < 0,05$) относительно мышцей, которым вводили контрольную siHPRT (фиг. 3А-3В). В то же время, мыши, которым вводили комплекс IgG2a-siHPRT, имели уровни экспрессии HPRT, сравнимые с контрольной siHPRT (небольшое снижение экспрессии HPRT или его отсутствие) во всех анализируемых типах мышечной ткани.

[000280] У мышцей, которым вводили комплекс antiTfR-siHPRT, не наблюдали изменения экспрессии HPRT в немускульных тканях, таких как ткани головного мозга, печени, легких, почки и селезенки (фиг. 4А-4Е).

[000281] Эти данные свидетельствуют о том, что антитело против рецептора трансферрина из комплекса antiTfR-siHPRT делает возможной интернализацию комплекса в клетки мышечных тканей в модели *in vivo* на мышках, таким образом, позволяя siHPRT ингибировать экспрессию HPRT. Эти данные также свидетельствуют о том, что комплексы antiTfR-олигонуклеотида по изобретению способны к специфическому таргетингу мышечных тканей.

Пример 4: Таргетинг GYS1 с использованием мышечно-специфического комплекса

[000282] Получали мышечно-специфический комплекс, содержащий антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на мутантный аллель GYS1 (GYS1 ASO), ковалентно связанный с помощью расщепляемого линкера катепсина с DTX-A-002 (RI7 217 (Fab)), антителом против рецептора трансферрина.

[000283] В кратком изложении, молекулу линкера малеимидакапроил-L-валин-L-цитруллин-*p*-амидобензиловый спирт-*p*-нитрофенилкарбоната (MC-Val-Cit-PABC-PNP) связывают с NH₂-C₆-GYS1 ASO с использованием реакции сопряжения амидов. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством гель-фильтрации. Затем

очищенный Val-Cit-линкер-GYS1 ASO связывали с тиол-реактивным антителом против рецептора трансферрина (DTX-A-002).

[000284] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергают хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ) для очистки мышечно-специфического комплекса. С помощью денситометрии и анализа электрофореза в ПААГ с SDS очищенного комплекса определяли среднее соотношение ASO и антитела и общую чистоту, соответственно.

[000285] Используя описанные выше способы, получали контрольный комплекс, содержащий GYS1 ASO, ковалентно связанный с помощью линкера Val-Cit с антителом IgG2a (Fab).

[000286] Затем очищенный мышечно-специфический комплекс, содержащий DTX-A-002, ковалентно связанное с GYS1 ASO, тестировали на интернализацию в клетки и ингибирование GYS1. Пораженные заболеванием мышечные клетки, имеющие относительно высокие уровни экспрессии рецептора трансферрина, инкубировали в присутствии контрольного носителя (физиологического раствора), мышечно-специфического комплекса (100 нМ) или контрольного комплекса (100 нМ) в течение 72 часов. После инкубации в течение 72 часов клетки выделяли и анализировали на уровни экспрессии GYS1.

Пример 5: Таргетинг GAAc использованием мышечно-специфического комплекса

[000287] Получали мышечно-специфический комплекс, содержащий антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на мутантный аллель GAA (GAA ASO), ковалентно связанный с помощью расщепляемого линкера катепсина с DTX-A-002 (R17 217 (Fab)), антителом против рецептора трансферрина. GAA ASO является олигонуклеотидом, нацеленным на GAA, способствующим включению экзона 2 транскрипта мРНК GAA.

[000288] В кратком изложении, молекулу линкера малеимидакапроил-L-валин-L-цитруллин-p-аминобензилового спирта-p-нитрофенилкарбоната (MC-Val-Cit-PABC-PNP) связывают с $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-GAA ASO}$ с использованием реакции сопряжения амидов. Избыток линкера и органические растворители удаляли посредством гель-фильтрации. Затем очищенный Val-Cit-линкер-GAA ASO связывают с тиол-реактивным антителом против рецептора трансферрина (DTX-A-002).

[000289] Затем продукт реакции сопряжения антитела подвергали хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC-ВЭЖХ) для очистки мышечно-специфического комплекса. С помощью денситометрии и анализа электрофореза в ПААГ с SDS очищенного комплекса определяли среднее соотношение ASO и антитела и общую чистоту, соответственно.

[000290] Используя описанные выше способы, получали контрольный комплекс, содержащий GAA ASO, ковалентно связанный с помощью линкера Val-Cit с антителом IgG2a (Fab).

[000291] Затем очищенный мышечно-специфический комплекс, содержащий DTX-A-002, ковалентно связанное с GAA ASO, тестировали на интернализацию в клетки и включение экзона exon 2 в зрелые транскрипты мРНК GAA. Пораженные заболеванием мышечные клетки, имеющие относительно высокие уровни экспрессии рецептора трансферрина, инкубировали в присутствии контрольного носителя (физиологического раствора), мышечно-специфического комплекса (100 нМ) или контрольного комплекса (100 нМ) в течение 72 часов. После инкубации в течение 72 часов клетки выделяли и анализировали на уровни экспрессии мРНК GAA, включающей экзон 2.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ТЕРМОНОЛОГИЯ

[000292] 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.

[000293] 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.

[000294] 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.

[000295] 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.

[000296] Варианты осуществления настоящего изобретения представлены в настоящем описании. Варианты этих вариантов осуществления могут становиться очевидными специалистам в этой области после прочтения изложенного выше описания.

[000297] 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 снижения уровней гликогена в мышечной клетке, 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 (K_d) 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 1.
8. Комплекс по п.7, где мышечно-специфическое антитело конкурирует за специфическое связывание с эпитопом рецептора трансферрина с K_d 10^{-6} М или менее.
9. Комплекс по п.8, где K_d 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.9-13, 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 способствует включению экзона 2 в зрелую мРНК GAA.

17. Комплекс по п.15, где олигонуклеотид ингибирует экспрессию GYS1.

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

19. Комплекс по п.17, где полипептид является рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазой (GAA) дикого типа.

20. Комплекс по любому из пп.15-17, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь.

21. Комплекс по п.20, где по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь является фосфотиоатной связью.

22. Комплекс по п.21, где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи в стереохимической конформации Rp и/или стереохимической конформации Sp.

23. Комплекс по п.22, где олигонуклеотид содержит фосфотиоатные связи, все из которых находятся в стереохимической конформации Rp или стереохимической конформации Sp.

24. Комплекс по любому из пп.15-17 или 20-23, где олигонуклеотид содержит один или более модифицированных нуклеотидов.

25. Комплекс по п.24, где один или более модифицированных нуклеотиды являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

26. Комплекс по любому из пп.15 или 20-25, где олигонуклеотид является гэммерным олигонуклеотидом, направляющим РНКазы Н-опосредованное расщепление транскрипта мРНК GYS1 в клетке.

27. Комплекс по п.26, где гэммерный олигонуклеотид содержит центральную часть из 5-15 дезоксирибонуклеотидов, фланкированных фрагментами из 2-8 модифицированных нуклеотидов.

28. Комплекс по п.27, где модифицированные нуклеотиды из фрагментов являются 2'-модифицированными нуклеотидами.

29. Комплекс по любому из пп.15 или 20-25, где олигонуклеотид является миксмерным олигонуклеотидом.

30. Комплекс по п.29, где миксмерный олигонуклеотид способствует сплайсинг-опосредованному включению экзона 2 в вариант с.-32-13T>G (IVS1) GAA.

31. Комплекс по п.29 или 30, где миксмерный олигонуклеотид содержит два или более разных 2'-модифицированных нуклеотида.

32. Комплекс по любому из пп.15 или 20-25, где олигонуклеотид является олигонуклеотидом РНКи, способствующим РНКи-опосредованному расщеплению транскрипта мРНК GYS1.

33. Комплекс по п.32, где олигонуклеотид РНКи является двухцепочечным олигонуклеотидом длиной от 19 до 25 нуклеотидов.

34. Комплекс по п.32 или 33, где олигонуклеотид РНКи содержит по меньшей мере один 2'-модифицированный нуклеотид.

35. Комплекс по любому из пп.25, 28, 31 или 34, 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.

36. Комплекс по п.24, где один или более модифицированных нуклеотидов являются мостиковыми нуклеотидами.

37. Комплекс по любому из пп.25, 28, 31 или 34, 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).

38. Комплекс по любому из пп.15 или 20-25, где олигонуклеотид содержит геновую последовательность для нуклеазы редактирования генома.

39. Комплекс по любому из пп.15, 16 или 20-25, где олигонуклеотид является фосфородиамидитным морфолиновым олигомером.

40. Комплекс по любому из пп.1-39, где мышечно-специфическое средство ковалентно связано с молекулярной нагрузкой с помощью расщепляемого линкера.

41. Комплекс по п.40, где расщепляемый линкер выбран из: протеаза-чувствительного линкера, рН-чувствительного линкера и глутатион-чувствительного линкера.

42. Комплекс по п.41, где расщепляемый линкер является протеаза-чувствительным линкером.

43. Комплекс по п.42, где протеаза-чувствительный линкер содержит последовательность, расщепляемую лизосомальной протеазой и/или эндосомальной протеазой.

44. Комплекс по п.42, где протеаза-чувствительный линкер содержит дипептидную последовательность валин-цитруллин.

45. Комплекс по п.47, где линкер является рН-чувствительным линкером, расщепляемым при рН в диапазоне от 4 до 6.

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

47. Комплекс по п.46, где нерасщепляемый линкер является алкановым линкером.

48. Комплекс по любому из пп.2-47, где мышечно-специфическое антитело содержит неприродную аминокислоту, с которой олигонуклеотид ковалентно связан.

49. Комплекс по любому из пп.2-48, где мышечно-специфическое антитело ковалентно связано с олигонуклеотидом посредством конъюгации с остатком лизина или остатком цистеина антитела.

50. Комплекс по п.49, где олигонуклеотид конъюгируют с цистеином антитела с помощью малеимид-содержащего линкера, необязательно, где малеимид-содержащего линкер содержит малеимидокапроил- или малеимидометил-циклогексан-1-

карбоксилатную группу.

51. Комплекс по любому из пп.2-50, где мышечно-специфическое антитело является гликозилированным антителом, содержащим по меньшей мере один остаток сахара, с которым ковалентно связан олигонуклеотид.

52. Комплекс по п.51, где остаток сахар является разветвленной маннозой.

53. Комплекс по п.51 или 52, где мышечно-специфическое антитело является гликозилированным антителом, содержащим от одного до четырех остатков сахара, каждый из которых ковалентно связан с отдельным олигонуклеотидом.

54. Комплекс по п.51, где мышечно-специфическое антитело является полностью гликозилированным антителом.

55. Комплекс по п.51, где мышечно-специфическое антитело является частично гликозилированным антителом.

56. Комплекс по п.55, где частично гликозилированное антитело получают химическими или ферментативными способами.

57. Комплекс по п.55, где частично гликозилированное антитело продуцируют в клетке, имеющей дефицит фермента пути N- или O-гликозилирования.

58. Способ доставки молекулярной нагрузки в клетку, экспрессирующую рецептор трансферрина, включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из пп.1-57.

59. Способ снижения уровней гликогена в мышечной клетке, имеющей мутантный аллель GAA, ассоциированный с болезнью Помпе (PD), включающий приведение клетки в контакт с комплексом по любому из пп.29-83 в количестве, эффективном для стимуляции интернализации молекулярной нагрузки в клетку.

60. Способ по п.59, где клетка находится *in vitro*.

61. Способ по п.59, где клетка находится в организме индивидуума.

62. Способ по п.61, где индивидуум является человеком.

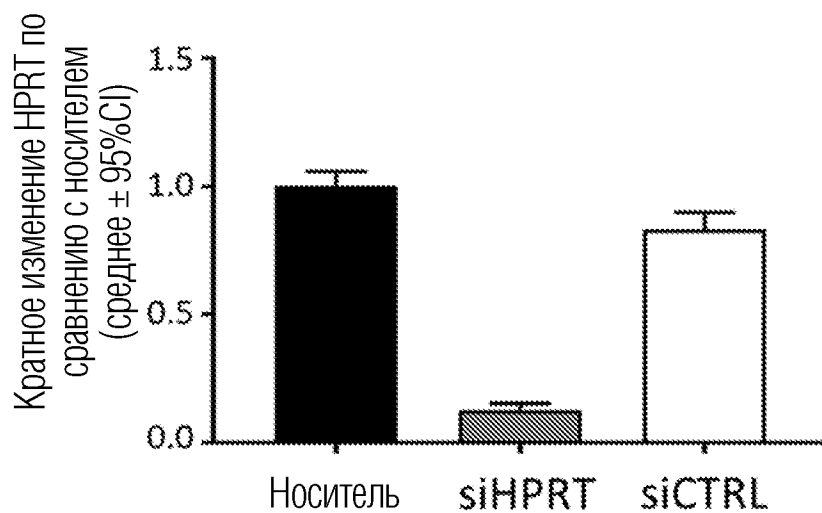
63. Способ по п.61, где мутантный аллель GAA содержит вариант с.-32-13T>G (IVS1) GAA.

64. Способ лечения индивидуума, имеющего мутантный аллель GAA, ассоциированный с болезнью Помпе, включающий введение индивидууму эффективного количества комплекса по любому из пп.1-57.

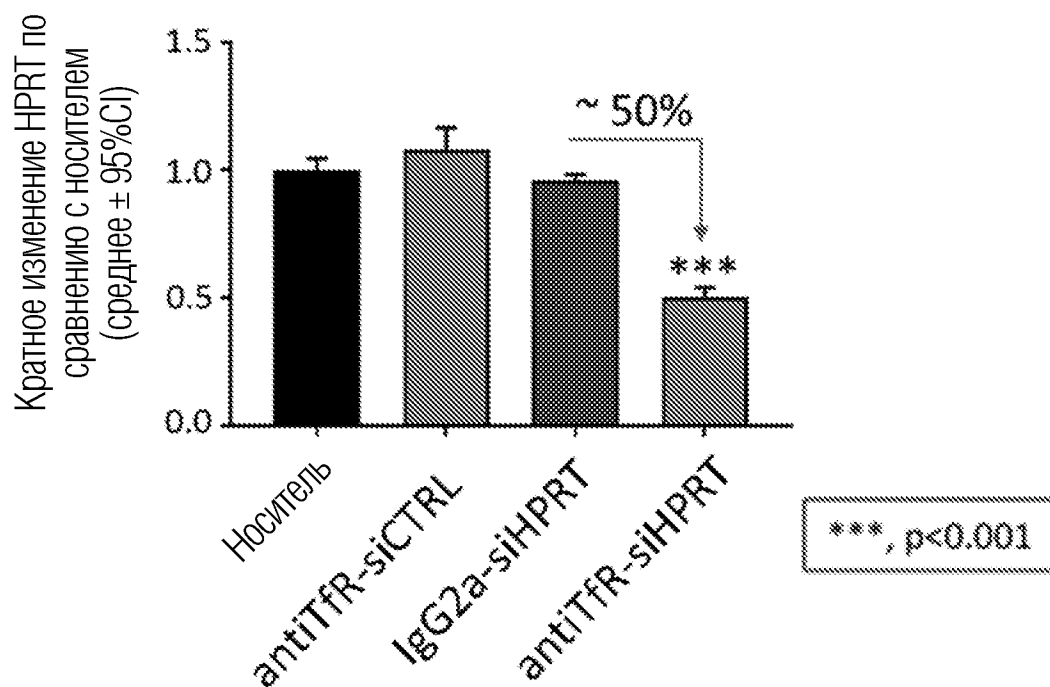
65. Способ по п.64, где мутантный аллель GAA содержит вариант с.-32-13T>G (IVS1) GAA.

По доверенности

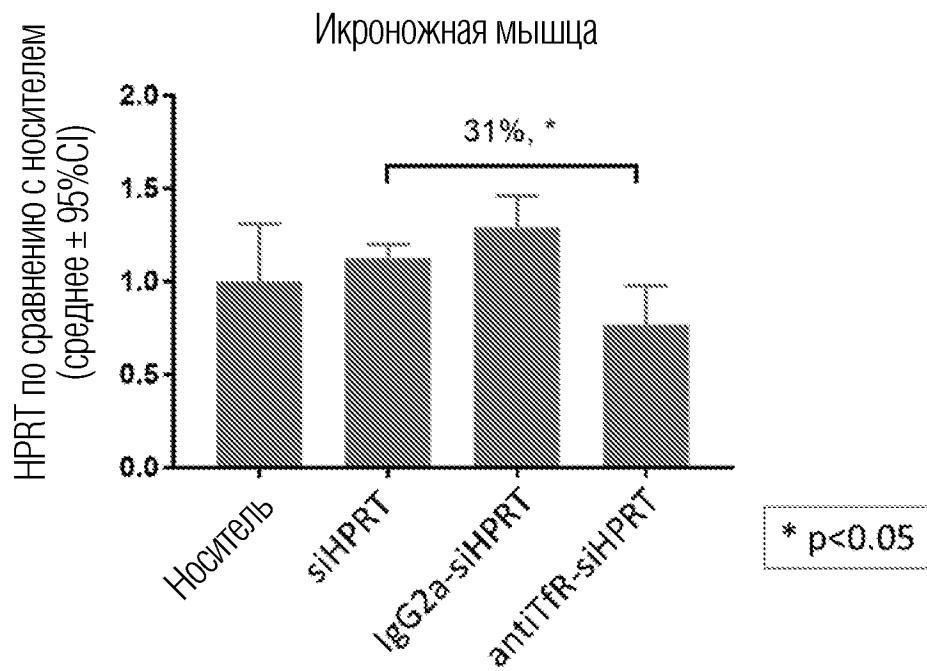
1/5



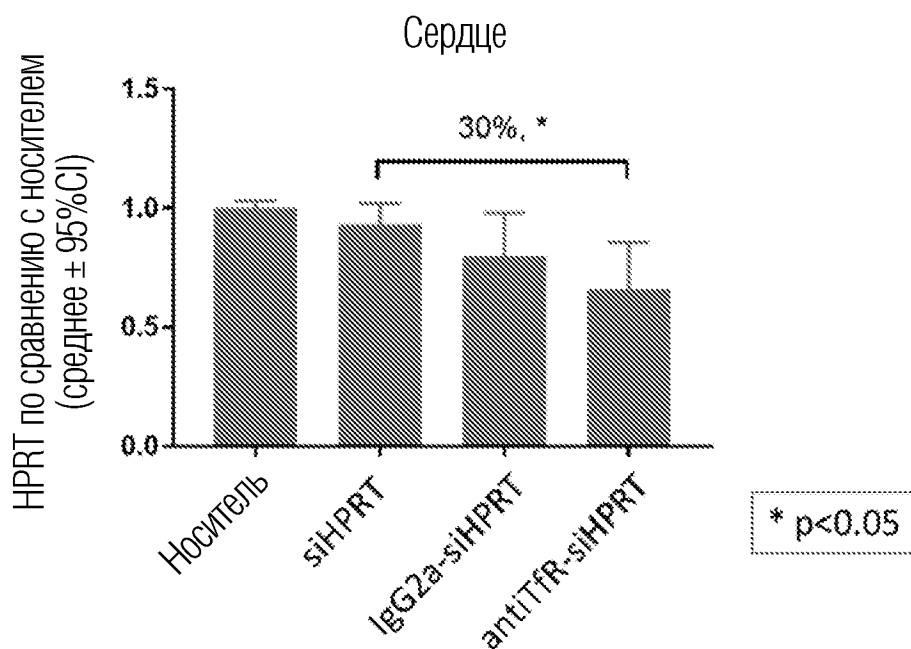
ФИГ. 1



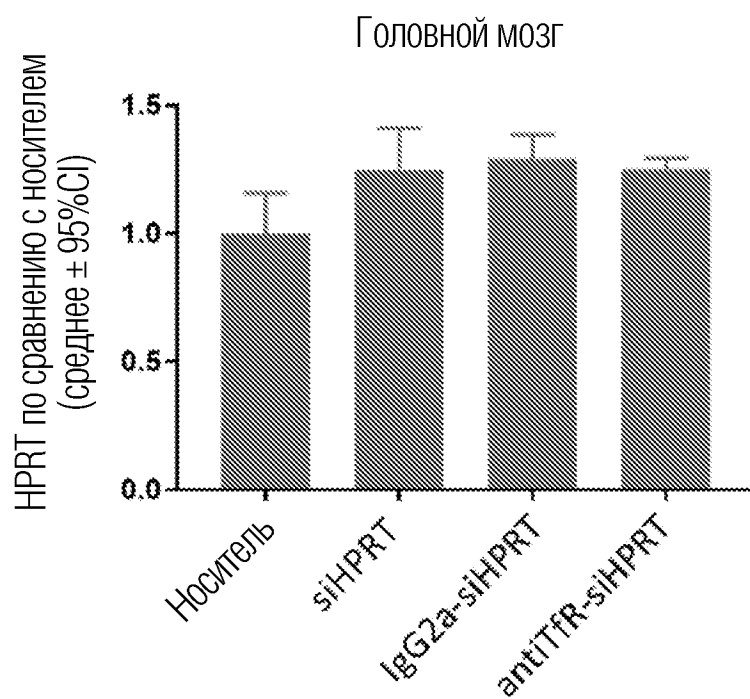
ФИГ. 2



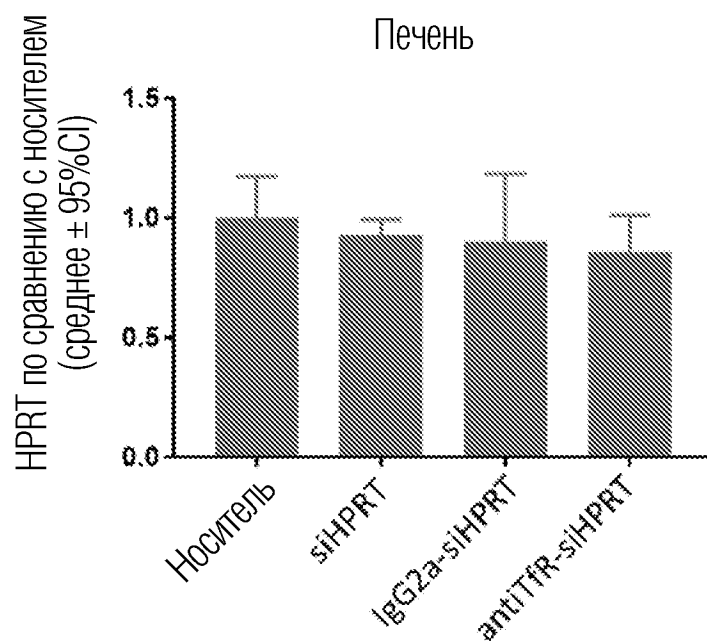
ФИГ. 3А



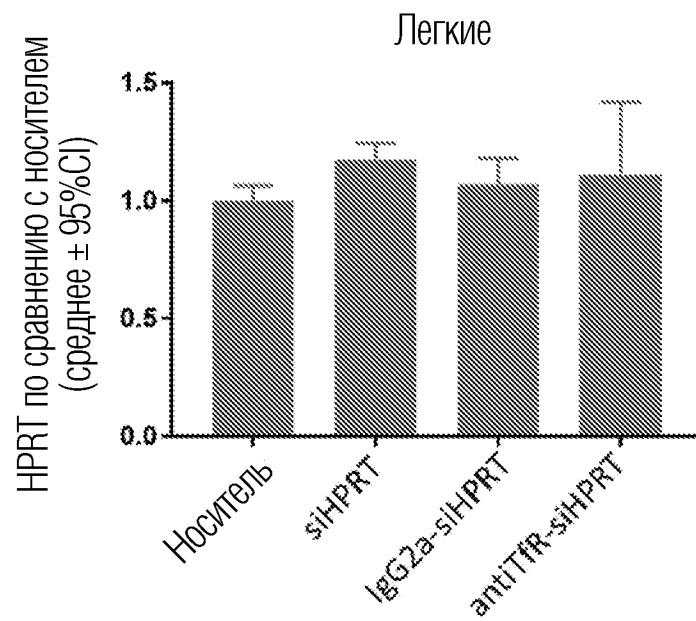
ФИГ. 3В



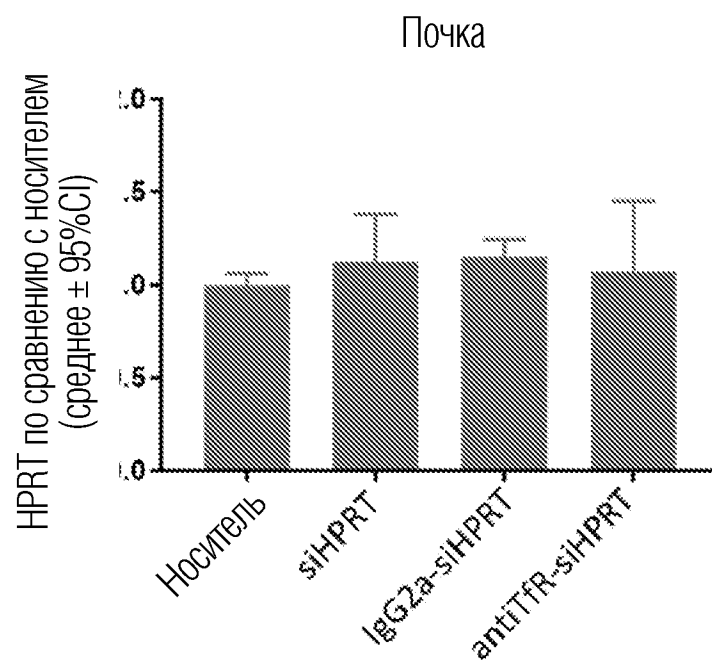
ФИГ. 4А



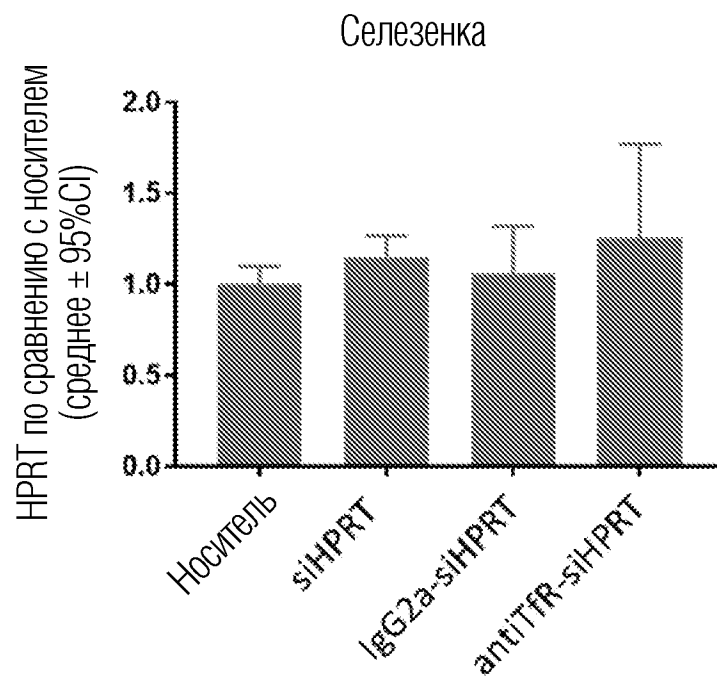
ФИГ. 4В



ФИГ. 4С



ФИГ. 4D



ФИГ. 4Е