

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292596** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.08

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.16

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ MuSK

(31) 63/011,986; 63/038,633; 63/112,375

(32) 2020.04.17; 2020.06.12; 2020.11.11

(33) US

(86) PCT/US2021/027801

(87) WO 2021/212053 2021.10.21

(88) 2021.11.18

(71) Заявитель:
НЬЮ-ЙОРК ЮНИВЕРСИТИ (US);
АРДЖЕНКС ИИП БВ (BE)

(72) Изобретатель:

Бёрден Стивен Дж., Койде Сёхей,
Койде Акико, Лелуп Надя, Ури
Жюльен (US), Сайленс Карен,
Ванхауварт Руланд, Бланштот
Кристоф (BE)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к молекулам на основе антител, включая полноразмерные антитела, антигенсвязывающие домены и производные антител, которые способны связывать и активировать специфическую для мышц тирозин-протеинкиназу (MuSK) человека. В соответствии с настоящим изобретением дополнительно раскрыты способы лечения нервно-мышечных состояний с применением указанных выше антител против MuSK.

202292596

A1

A1

202292596

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ MuSK

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительных заявок на патент США, серийные номера 63/011986, поданной 17 апреля 2020 г., 5 63/038633, поданной 12 июня 2020 г., и 63/112375, поданной 11 ноября 2020 г, содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к молекулам на основе антител, включая полноразмерные антитела, их антигенсвязывающие домены и производные антител, 10 которые способны связывать и активировать специфическую для мышц тирозин-протеинкиназу (MuSK) человека. В соответствии с настоящим изобретением дополнительно раскрыты способы лечения нервно-мышечных состояний с применением указанных выше антител против MuSK.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 [0003] Специфическая для мышц киназа (MuSK) представляет собой главный рецептор с тирозинкиназной активностью для формирования и поддержания нервно-мышечного синапса (НМС). Активация MuSK агрином, гепаринсульфат протеогликаном нейронального происхождения, и LRP4, рецептором агрина, приводит к кластеризации ацетилхолиновых рецепторов (AChR) на постсинаптической стороне НМС, позволяя 20 нервно-мышечную передачу и сокращение мышц. Эктодомен MuSK содержит три иммуноглобулин-подобных домена (Ig-подобные домены 1 - 3) и богатый цистеином домен (Fz-CRD), родственный таковому в белках Frizzled, рецепторах для Wnt.

[0004] Характерной чертой множества нервно-мышечных нарушений являются нарушенные НМС. Вследствие важности сигнализации MuSK для формирования и 25 поддержания синапсов, заманчиво предположить, что стимуляция MuSK может иметь терапевтический потенциал для этих нарушений. Следуя этой гипотезе, было показано, что сверхэкспрессия MuSK сохраняла иннервацию и двигательную функцию более чем на месяц в модели бокового амиотрофического склероза (БАС) у мышей. Кроме того, применяя фаговый дисплей, обнаружили несколько моноклональных связывающих MuSK 30 scFv. Один из данных связывающих MuSK агентов был получен в (муринизированном) формате IgG и также исследован на мышцах с БАС (Cantor et al., «Preserving Neuromuscular Synapses in ALS by Stimulating MuSK with a Therapeutic Agonist Antibody,» *Elife* 7:e34375 (2018) и Sengupta-Ghosh et al., «Muscle Specific Kinase (MuSK) Activation Preserves Neuromuscular Junctions in the Diaphragm but is not Sufficient to Provide a Functional Benefit

in the SOD1G93A Mouse Model of ALS,» *Neurobiol. Dis.* 124:340-352 (2019)). В обоих исследованиях осуществляли пассивный перенос антитела № 13 мышам SOD1-G93A и продемонстрировали, что лечение антителом № 13 улучшало иннервацию НМС и замедляло денервацию мышц, по сравнению с мышами с имитацией лечения. Cantor et al.,
5 «Preserving Neuromuscular Synapses in ALS by Stimulating MuSK with a Therapeutic Agonist Antibody,» *Elife* 7:e34375 (2018), дополнительно продемонстрировали улучшенную выживаемость двигательного нейрона и функции мышц, что приводило к незначительно увеличенной продолжительности жизни. Эти исследования продемонстрировали, что агонисты MuSK обладают способностью по меньшей мере сохранять структурную
10 целостность нервно-мышечных синапсов у мышей БАС, необходимо больше исследований, чтобы подтвердить улучшение функции мышц. Оценка терапевтического потенциала агонистических антител против MuSK при других нервно-мышечных нарушениях представляется важной новой линией исследований (Vergoossen et al., «MuSK Antibodies, Lessons Learned from Poly- and Monoclonality,» *J. Autoimmun.* 112:102488
15 (2020)).

[0005] Целью настоящего изобретения является преодоление этого и других недостатков в данной области техники.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0006] ФИГ. 1А - 1D демонстрируют, что С-концевой участок Dok7 необходим для
20 синаптической дифференцировки. На ФИГ. 1А представлена схема, на которой показаны гомологичный плекстрину (РН) и связывающий фосфотирозин (РТВ) домены в Dok7, которые опосредуют димеризацию Dok7 и связывание с фосфорилированным по тирозину MuSK. С-концевой участок содержит два остатка тирозина, Y396 и Y406, которые фосфорилируются после привлечения Dok7 к MuSK. Мыши *Dok7* 1124_1127 dup (также называют в данной заявке мышами *Dok7* CM и *Dok7*^{CM/CM}) несут наиболее
25 распространенную мутацию, обнаруженную у людей с врожденной миастенией *Dok7*, которая приводит к сдвигу рамки считывания, преждевременной терминации и укорачиванию белка Dok7, включая утрату Y396 и Y406. Мыши *Dok7* Y396F; Y406F (*Dok7* 2YF) несут мутации с заменой Y396 и Y406 на фенилаланин. На ФИГ. 1В представлен
30 анализ хи-квадрат потомства, полученного в результате скрещивания мышей *Dok7*^{CM/+} C57BL/6, показывающий, что гомозиготные мыши *Dok7*^{CM/CM} не выживали постнатально. Наоборот, мыши *Dok7* 2YF/2YF присутствовали в ожидаемых количествах, когда их генотипировали на 5 – 10 день после рождения (P5 - P10). На ФИГ. 1С показаны изображения флуоресцентной микроскопии мышц диафрагмы мышей дикого типа, мышей

Dok7^{CM/CM} и *Dok7^{2YF/2YF}* в эмбриональный день E18,5, которые окрашивали Alexa 488-a-BGT, чтобы пометить AChR (красный), и антителами против нейрофиламента/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания (зеленый). Масштабный отрезок = 10 мкм. На ФИГ. 1D представлены диаграммы, на которых показано, что в день E18,5 количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR уменьшались в 4,5, 4 и 5 раз, соответственно. У мышей *Dok7^{2YF/2YF}* размер синапсов был нормальным, но плотность синаптических AChR была незначительно (15%) снижена. Форма синапсов у мышей *Dok7^{2YF/2YF}* часто выглядела удлинённой. На диаграмме показаны значения для 3 мышей каждого генотипа и средние значения $\pm$ стандартные отклонения (CO) для этих мышей (н/з - незначимо; $p: **** < 0,00005$).

[0007] ФИГ. 2A - 2D демонстрируют, что укороченный Dok7 экспрессируется на низком уровне, и фосфорилирование MuSK по тирозину сильно снижено у мышей *Dok7^{CM/CM}*. На ФИГ. 2A - 2B представлены иммуноблоты, на которых Dok7 иммунопреципитировали из мышц мышей дикого типа, *Dok7^{CM/+}* и *Dok7^{2YF/2YF}* в день E18,5. Блоты зондировали антителами против Dok7 (ФИГ. 9A - 9B). На ФИГ. 9A показано, что укороченный Dok7 (t-Dok7), кодируемый *Dok7^{CM}*, мигрирует на прогнозированном уровне размера, но экспрессируется на 3-кратно более низких уровнях, чем Dok7 дикого типа. Определение количества и сравнение белков дикого типа и мутантных белков было упрощено, так как два белка коиммунопреципитировали из одного лизата; аналогичные результаты получили при сравнении экспрессии у мышей дикого типа и мышей *Dok7^{CM/CM}* (ФИГ. 10A - 10C). На диаграмме рассеяния показаны значения для восьми мышей каждого генотипа и средние значения $\pm$ CO ($p: **** < 0,00005$). На ФИГ. 2B показано, что мутированный белок Dok7 Y396F; Y406F мигрирует на прогнозированном уровне размера, и его экспрессия аналогична Dok7 дикого типа. На диаграмме рассеяния показаны значения для одиннадцати мышей каждого генотипа и средние значения $\pm$ CO (н/з - незначимо). На ФИГ. 2C - 2D показано, что MuSK иммунопреципитировали из мышц мышей дикого типа, *Dok7^{CM/CM}* и *Dok7^{2YF/2YF}* в день E18,5, и блоты зондировали антителами против MuSK или фосфотирозина. Проводили количественный анализ фосфорилирования MuSK и нормировали на экспрессию MuSK. На ФИГ. 2C показано, что фосфорилирование MuSK в 7 раз ниже у мышей *Dok7^{CM/CM}*, чем у мышей дикого типа. На диаграмме рассеяния показаны значения для 7 мышей каждого генотипа и средние значения $\pm$ CO ($p: **** < 0,00005$). ФИГ. 2D показано, что фосфорилирование MuSK по тирозину сходно у *Dok7^{2YF/2YF}* и мышей дикого типа. На диаграмме рассеяния показаны значения для 5 мышей каждого генотипа и средние значения $\pm$ CO (н/з - незначимо).

[0008] ФИГ. 3А - 3D демонстрируют, что привлечение (рекрутирование) Crk к синапсу и к комплексу MuSK/Dok7 нарушено у мышей *Dok7^{CM/CM}*. На ФИГ. 3А представлены изображения, на которых показано, что Crk-L (зеленый) колокализуется с AChR в синапсах на поперечных срезах передней большеберцовой мышцы из мышей дикого типа в день E18,5. Окрашивание Crk-L сохраняется в местах синапсов у мышей *Dok7^{CM/CM}* и *Dok7^{2YF/2YF}*, но привлечение выглядит сниженным в синапсах у мышей *Dok7^{CM/CM}*. Масштабный отрезок = 5 мкм. На ФИГ. 3В показано, что MuSK иммунопреципитировали из мышц мышей дикого типа, *Dok7^{CM/CM}* и *Dok7^{2YF/2YF}* в день E18,5, и блоты зондировали антителами против MuSK или Crk. Уровень Crk, который выделялся совместно с комплексом MuSK, нормировали на экспрессию MuSK. Ассоциация Crk с комплексом MuSK снижалась в 2,8 раза у мышей *Dok7^{CM/CM}*, на диаграммах рассеяния показаны значения для 8 мышей каждого генотипа и средние значения $\pm$ СО (р: **** < 0,00005). Ассоциация Crk с комплексом MuSK снижалась на 24% у мышей *Dok7^{2YF/2YF}*; показаны средние значения $\pm$ СО для 4 мышей (р: * < 0,05, **** < 0,00005). На ФИГ. 3С показано, что околосинапсальная область (ОМ) MuSK содержит сайт связывания с Dok7 (остатки 547 - 554 последовательности SEQ ID NO: 129) и потенциальный сайт связывания с Crk (остатки 554 - 557 последовательности SEQ ID NO: 129). На ФИГ. 3D представлены результаты экспериментов, в которых НА-меченные формы Dok7 или Crk-I экспрессировались с трансфицированных клеток 293Т. Меченые биотином пептиды из ОМ MuSK (последовательности SEQ ID NO: 272 - 275) инкубировали с лизатами трансфицированных клеток 293Т. Меченые биотином пептиды захватывали стрептавидин-агарозными гранулами, и блоты выделенных белков зондировали антителами против НА и Crk. Для обоих Dok7 и Crk выявили большее связывание с фосфопептидом, чем с нефосфорилированным пептидом. Мутация важного аспарагина в положении -3 в консенсусном сайте связывания РТВ (NPXY) в фосфопептиде ОМ MuSK предотвращала связывание Dok7, но не Crk. Наоборот, мутация консенсусного сайта SH2 в фосфопептиде ОМ MuSK предотвращала связывание Crk с фосфопептидом ОМ MuSK.

[0009] ФИГ. 4А - 4F демонстрируют, что антитела против MuSK связывают MuSK человека и мыши с высокой аффинностью, стимулируют фосфорилирование MuSK в культивированных мышечных трубочках и связывают MuSK *in vivo*. На ФИГ. 4А представлена таблица, в которой показаны значения K_D клонов антител от различных антигенов MuSK, исследованных в формате моновалентного Fab с применением анализа связывания с гранулами. Значения K_D представляют собой среднее значение и СО для n = 3. Титры приведены на ФИГ. 12А - 12С. На ФИГ. 4В представлены результаты

эксперимента, в котором мышечные трубочки C2 обрабатывали в течение 30 минут биотинилированными Fab, включая Fab отрицательного контроля (изотип), которые тетрамеризовали путем предварительной инкубации со стрептавидином. Иммунопреципитировали MuSK и зондировали вестерн-блоты антителами против MuSK или фосфотирозина (pTyr). Фосфорилирование MuSK нормировали на общую экспрессию MuSK. На диаграмме рассеяния показаны значения для каждого Fab и среднее значение $\pm$ СО. На ФИГ. 4С представлена таблица, в которой показаны значения K_D антител IgG от иммобилизованных hFz, hECD, mFz и mECD, что исследовали, применяя анализ на связывание на основе гранул. Значения K_D представляют собой среднее значение и СО для $n = 3$. Титры приведены на ФИГ. 12А - 12С. На ФИГ. 4D представлены результаты эксперимента, в котором мышечные трубочки C2 обрабатывали 0,5 нМ агрином, 10 нМ антителом X2, X3 или X17, с Fc-областями либо IgG2a мыши, либо IgG1 человека, или изотипическим контролем, и анализировали MuSK, как описано на ФИГ. 4В. На диаграмме рассеяния показаны значения фосфорилирования MuSK, нормированные на экспрессию MuSK, и среднее значение $\pm$ СО. ФИГ. 4Е представляет собой график, на котором показаны измерения времени полужизни в крови X17-mIgG2a-LALAPG. Показана нелинейная аппроксимация методом наименьших квадратов медианных интенсивностей флуоресценции одной экспоненциальной кривой для 3 мышей. Определили, что время полужизни составляло $4,9 \pm 0,2$ дня. На ФИГ. 4F продемонстрировано, что антитело MuSK mIgG2a-X17 привлекает MuSK в синапс и насыщает MuSK до концентрации 10 мг/кг. Мышам дикого типа в день P30 вводили путем интраперитонеальной инъекции агонистическое антитело против MuSK mIgG2a-X17 (0, 0,4, 2, 10 мг/кг). Через два дня мышей умерщвляли и мышцы диафрагмы окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и меченым Alexa 647 антителом козы против IgG человека, специфичным к F(ab')₂-фрагменту, чтобы пометить X17. Уровни насыщения mIgG2a-X17 в синапсе измеряли по отношению интенсивностей сигналов X17 к AChR. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей при каждой концентрации.

[0010] ФИГ. 5А - 5Е демонстрируют, что агонистическое антитело против MuSK - mIgG2a-X17 - спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 5А показано, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей при смешанном фоне *Dok7 1124_1127 dup* лечили в день P4 агонистическим антителом mIgG2a-X17 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* ($n = 11$), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как

мышь *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X17 ($n = 12$) в дни P4, P24 и P44, доживали до взрослого возраста. Шесть из двенадцати мутантных мышей, которым вводили путем инъекции X17, умерщвляли в день P60; 3 мутантные мыши, которым вводили путем инъекции X17, умерли через три недели после рождения, непосредственно перед второй запланированной инъекцией, и 3 мутантным мышам позволили состариться для экспериментов с рецидивом заболевания. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (p : **** $< 0,00005$). На ФИГ. 5В показано, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X17, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции mIgG2a-X17 (10 мг/кг) в дни P4, P24 и P44. На ФИГ. 5С продемонстрировано, что mIgG2a-X17 восстанавливает развитие синапсов у молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мышцы диафрагмы из мышей дикого типа и мышей *Dok7 1124_1127* в день P60 окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания. У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили mIgG2a-X17, синапсы созревали от простой подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей. Масштабный отрезок = 10 мм. У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили mIgG2a-X17, количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR восстанавливались до 60%, 60% и 68%, соответственно, от нормальных уровней. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей (> 50 синапсов на мышь) ($n/3$, ** $< 0,005$, **** $< 0,00005$). На ФИГ. 5D представлены изображения, на которых показано, что Ctk-L (средние панели) концентрировался в синапсах с окрашенными AChR (левые панели) и нервными окончаниями (правые панели) в отдельных мышечных волокнах, выделенных из передних большеберцовых мышц мышей *Dok7 1124_1127 dup*, спасенных с помощью X17. Средние значения $\pm$ СО для 3 мышей (10 синапсов на мышь; $n/3$ - незначимо). Масштабный отрезок = 5 мкм. На ФИГ. 5Е представлены диаграммы, на которых показано, что mIgG2a-X17 спасает двигательную активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Двигательная активность мышей *Dok 1124_1127 dup*, которую оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана, полностью восстанавливалась благодаря лечению mIgG2a-X17. На диаграммах рассеяния показаны значения для 18 мышей дикого типа и 9 мышей *Dok7 1124_1127 dup*, спасенных с помощью X17, и средние значения $\pm$ СО ($n/3$ - незначимо).

[0011] ФИГ. 6А - 6С демонстрируют, что mIgG2a-X17 обращает рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мышам вводили путем инъекции

mIgG2a-X17 (10 мг/кг) либо в дни P4, P24 и P44, либо в дни P4, P18, а затем прекращали лечение антителом. Эти мыши *Dok7^{1124_1127 dup}* набирали массу и сохраняли подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начали терять массу (ФИГ. 6А - 6В) и проявлять двигательные нарушения, которые оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 6С). В этот момент времени, мышам либо не вводили повторно путем инъекции mIgG2a-X17 (ФИГ. 6А), либо повторно вводили путем инъекции mIgG2a-X17 (ФИГ. 6В). Мыши, которым не вводили повторную инъекцию, умирали в течение нескольких дней (ФИГ. 6А), тогда как после возобновления лечения mIgG2a-X17 мыши *Dok7^{1124_1127 dup}* начали набирать массу (ФИГ. 6В), и через одну неделю после возобновления лечения их двигательные нарушения были обращены (ФИГ. 6С). У мышей *Dok7^{1124_1127 dup}* улучшились показатели на барабане в 5,5 раз и сила захвата - в 1,25 раза (р: * <0,05, ***<0,0005) (ФИГ. 6С).

[0012] На ФИГ. 7 представлена ширина концевой пластинки, денервация, колокализация синапсов у мышей *Dok7^{CM}* (т.е., *Dok7^{1124_1127 dup}*). Ширина зоны концевой пластинки (пунктирные линии) была увеличена на 45% у мышей *Dok7^{CM/CM}*, но была нормальной у мышей *Dok7^{2YF/2YF}*. У мышей *Dok7^{CM/CM}*, у 17% кластеров AChR полностью отсутствовали противопоставленные нервные окончания, что указывало на денервированные мышечные волокна. Множество синапсов у мышей *Dok7^{CM/CM}* были частично иннервированы, так как почти половина богатой AChR области в синапсах не располагалась рядом с нервными окончаниями. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей каждого генотипа (100 синапсов на мышь) (р: * <0,05; р: ** <0,005; р: *** <0,0005; р: **** < 0,00005; н/з - незначимо). Масштабный отрезок = 50 мкм.

[0013] ФИГ. 8 демонстрируют, что Y396 и Y406F в карбоксиконцевой области *Dok7* необязательны для созревания нервно-мышечных синапсов. Мышцы диафрагмы из мышей дикого типа и мышей *Dok7^{2YF/2YF}* в день P35 окрашивали Alexa 488-a-BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против нейрофиламента/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания. Масштабный отрезок = 10 мкм. У мышей *Dok7^{2YF/2YF}* синапсы созревали от подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей. Количество синапсов было сходным у мышей дикого типа и мышей *Dok7^{2YF/2YF}*. Плотность синаптических AChR и размер синапсов были больше, на 15% и 20%, соответственно, у мышей *Dok7^{2YF/2YF}*, чем у мышей дикого типа. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей (100 синапсов на мышь) (н/з - незначимо; р: *** <0,0005, **** <0,00005).

[0014] ФИГ. 9А - 9В демонстрируют, что Dok7 дикого типа и укороченный Dok7 детектируют со сходной эффективностью антителами против доменов РН/РТВ в Dok7. На ФИГ. 9А представлены результаты эксперимента, в котором клетки НЕК 293 временно трансфицировали плазмидой, экспрессирующей либо НА-меченый Dok7, либо НА-меченый укороченный Dok7, кодируемый *Dok7 1124_1127 TGCC dup*. Белки в лизатах клеток (в трех повторях) разделяли с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН, и вестерн-блоты зондировали либо антителом кролика против домена РТВ в Dok7, либо моноклональным антителом против НА. Измеряли уровни серого тона полос белков Dok7 дикого типа и укороченного Dok7, и уровень, детектированный с помощью вестерн-блоттинга с применением антитела кролика против Dok7, нормировали на уровень, детектированный с помощью вестерн-блоттинга с применением антитела против НА. Отношение для Dok7 дикого типа было эквивалентно отношению для укороченного Dok7, свидетельствуя о том, что антитело кролика против Dok7 позволяло детектировать с помощью вестерн-блоттинга белки Dok7 дикого типа и укороченный Dok7 со сходной эффективностью. На ФИГ. 9В представлены результаты эксперимента, в котором Dok7 дикого типа и укороченный Dok7 иммунопреципитировали со сходной эффективностью с помощью антитела козы против домена РТВ в Dok7. Клетки НЕК 293 временно котрансфицировали плазмидами, экспрессирующими НА-меченый Dok7 и НА-меченый укороченный Dok7, кодируемый *Dok7 1124_1127 TGCC dup*. Белки Dok7 иммунопреципитировали из лизатов клеток (в трех повторях) либо моноклональным антителом против НА, либо антителом козы против домена РТВ в Dok7, и вестерн-блоты зондировали с помощью моноклонального антитела против НА. Измеряли уровни серого тона; уровень фоновой полосы контрольных нетрансфицированных образцов вычитали; и значение для каждого белка, иммунопреципитированного антителом козы против Dok7, нормировали на значение для того же белка, иммунопреципитированного антителом против НА. Это отношение было эквивалентным для белков Dok7 дикого типа и укороченного Dok7, свидетельствуя о том, что антитело козы против Dok7 иммунопреципитировало белок дикого типа и укороченный белок со сходной эффективностью. На диаграммах рассеяния на ФИГ. 9А - 9В показаны значения по 3 экспериментам и среднее значение $\pm$ СО (н/з - незначимо).

[0015] ФИГ. 10А - 10С демонстрируют, что экспрессия РНК Dok7 была нормальной у мышей *Dok7^{CM/CM}*. На ФИГ. 10А показано, что амплификация с помощью ПЦР-РВ РНК Dok7 показала, что уровни мРНК Dok7 в день E18,5 были сходными в мышце из мышей дикого типа и мышей *Dok7^{CM/CM}*. GAPDH использовали в качестве контроля загрузки. На ФИГ. 10В представлены результаты эксперимента, в котором

проводили количественный анализ уровней мРНК Dok7 с помощью количественной ПЦР, который показал, что уровни мРНК Dok7 были нормальными у мышей *Dok7^{CM/CM}*. На диаграмме рассеяния показаны значения и среднее значение $\pm$ СО для 3 мышей (н/з - незначимо). На ФИГ. 10С представлены результаты эксперимента, в котором Dok7 иммунопреципитировали из мышц мышей дикого типа и мышей *Dok7^{CM/CM}* в день E18,5, и блоты зондировали антителами против Dok7. Укороченный Dok7 (t-Dok7), кодируемый Dok7^{CM/CM}, мигрирует на прогнозированном уровне размера, но экспрессируется на 3-кратно более низких уровнях, чем Dok7 дикого типа. На диаграмме рассеяния показаны значения для десяти мышей каждого генотипа и средние значения $\pm$ СО (p: **** < 0,00005).

[0016] ФИГ. 11 демонстрируют, что Y396 и Y406 являются главными, если не единственными остатками тирозина в Dok7, которые фосфорилируются при стимуляции агрином. Линии клеток мышцы получали из мышей дикого типа и мышей *Dok7^{2YF/2YF}* и обрабатывали культивированные мышечные трубочки агрином в течение 30 минут. MuSK иммунопреципитировали, и вестерн-блоты зондировали антителами против MuSK или фосфотирозина (pTyr). Агрин стимулирует фосфорилирование Dok7 по тирозину в мышечных трубочках мышей дикого типа, но не Dok7^{2YF/2YF}.

[0017] На ФИГ. 12А - 12С показаны свойства связывания клонов антител против MuSK. На ФИГ. 12А - 12С показано титрование связывания антител против MuSK в формате Fab с иммобилизованными hFz, hECD, mFz и mECD, что исследовали, применяя анализ на связывание на основе гранул. На кривых видно, что наилучшая аппроксимация у модели связывания 1:1. Значения K_D перечислены на ФИГ. 5А. Наборы данных на ФИГ. 12А и ФИГ. 12В были получены на различных устройствах, что привело к различным диапазонам сигналов. На ФИГ. 12С показано титрование связывания антител против MuSK в формате IgG, которое осуществляли тем же способом, как и на ФИГ. 12А.

[0018] ФИГ. 13А - 13D демонстрируют, что длительные инъекции агонистического антитела против MuSK mIgG2a-X17 мышам дикого типа не влияют на выживаемость, организацию нервно-мышечных синапсов, набор массы тела или двигательное поведение. На ФИГ. 13А представлена диаграмма рассеяния, на которой показаны результаты эксперимента, в котором мыши дикого типа при смешанном фоне C57BL/6-СВА, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X17 в дни P4, P24 и P44 (n = 4), доживали до дня P60, когда их умерщвляли. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для 9 мышей дикого типа, которым не вводили инъекцию, и 4 мышей дикого типа, которым вводили инъекцию mIgG2a-X17, и средние значения $\pm$ СО (н/з - незначимо). ФИГ. 13В представляет собой график, на котором показаны результаты эксперимента, в

котором мыши дикого типа, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X17 ($n = 4$),
 набирали массу подобно мышам дикого типа ($n = 9$). На ФИГ. 13С показано, что
 длительные инъекции mIgG2a-X17 мышам дикого типа не влияют на организацию
 нервно-мышечных синапсов. Мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и
 5 мышей дикого типа, которым вводили инъекцию mIgG2a-X17, окрашивали Alexa 488- α -
 BGT, чтобы пометить ацетилхолиновые рецепторы (AChR), и антителами против β III-
 тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания. У мышей
 дикого типа, которых лечили mIgG2a-X17, синапсы созревали от простой подобной диску
 формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-
 10 мышечных синапсов мышей. Масштабный отрезок = 10 мм. Инъекция mIgG2a-X17
 мышам дикого типа не влияет на количество синапсов, размер синапсов, и плотность
 AChR. Анализировали по 100 синапсов из 2 мышей в каждой категории. На ФИГ. 13D
 представлены диаграммы рассеяния, показывающие, что длительные инъекции mIgG2a-
 X17 мышам дикого типа не влияют на двигательное поведение. Двигательная активность
 15 мышей дикого типа, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X17, которую оценивали
 по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана, была сходна
 с таковой у мышей дикого типа, которым не вводили инъекцию. На диаграммах рассеяния
 показаны значения для 18 мышей дикого типа и 4 мышей дикого типа, которым вводили
 инъекцию mIgG2a-X17, и средние значения $\pm$ СО (н/з - незначимо).
 20 **[0019]** На ФИГ. 14А - 14В представлены таблицы, показывающие, что мыши
Dok7^{CM/CM} при смешанном генетическом фоне выживают приблизительно две недели
 после рождения. Смешанный генетический фон мышей использовали, чтобы
 анализировать выживаемость мышей *Dok7^{CM/CM}*. Мышей *Dok7^{CM/+}* на фоне C57BL/6
 скрещивали с мышами CBA, 129sv1, FVB или BALB/c дикого типа. Гетерозиготное
 25 потомство F1 затем скрещивали между собой для получения мышей *Dok7^{CM/CM}* при
 смешанном фоне. Определяли генотип потомства в день P5 - P10 или после смерти. На
 ФИГ. 14А представлена таблица, в которой показан анализ χ^2 -квадрат мышей F2,
 показывающий, что встречаемость генотипов маловероятно случайна, свидетельствуя о
 том, что гомозиготные мыши *Dok7^{CM/CM}* на каждом смешанном генетическом фоне
 30 выживают после рождения. На ФИГ. 14В представлена таблица, в которой показаны
 среднее и максимальное время выживаемости (дни) гомозиготных мышей *Dok7^{CM/CM}* при
 смешанном генетическом фоне.
[0020] ФИГ. 15А - 15Е демонстрируют, что С-концевая область Dok7 необходима
 для полной дифференцировки и созревания нервно-мышечного синапса у мышей
 35 *Dok7^{CM/CM}* при смешанном генетическом фоне. На ФИГ. 15А - 15С мышцы диафрагмы из

мышей дикого типа и мышей *Dok7^{CM/CM}* при смешанном фоне C57BL/6-СВА в дни E18,5 и P10 окрашивали Alexa 488-а-BGT, чтобы пометить AChR (красный), и антителами против нейрофиламента/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания (зеленый). На ФИГ. 15А показано, что в день E18,5 зона концевой пластинки (пунктирные 5 белые линии) была на 30% шире у мышей *Dok7^{CM/CM}*, чем у мышей дикого типа. Более того, нервные окончания отсутствовали в 15% кластеров AChR и коэффициент колокализации (синапсин/AChR) был ниже в 3,5 раза у мышей *Dok7^{CM/CM}*. Масштабный отрезок = 50 мкм. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей (р: * $<0,05$; р: **** $< 0,00005$). На ФИГ. 15В показано, что количество синапсов, размер синапсов и плотность 10 синаптических AChR были ниже в 3,2 раза, 4,5 раза и 8 раз, соответственно, у мышей *Dok7^{CM/CM}* на E18,5. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей (100 синапсов на мышь) (р: **** $< 0,00005$). Масштабный отрезок = 10 мкм. На ФИГ. 15С показано, что в день P10 количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR уменьшились более чем в 10 раз у мышей *Dok7^{CM/CM}*. Кроме того, нервные окончания 15 отсутствовали в 20% кластеров AChR у мышей *Dok7^{CM/CM}*. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей (100 синапсов на мышь) (р: **** $< 0,00005$). На ФИГ. 15D показано, что *Dok7* иммунопреципитировали в день E18,5 из мышц мышей дикого типа и мышей *Dok7^{CM/CM}*, и блоты зондировали антителами против *Dok7*. Укороченный *Dok7* (t-*Dok7*), кодируемый *Dok7^{CM/CM}*, мигрирует на прогнозированном уровне размера, но 20 экспрессируется на 3-кратно более низких уровнях, чем *Dok7* дикого типа. Так как экспрессия *Dok7* и фосфорилирование MuSK снижались до одинаковой степени у смешанного потомства C57BL/6-СВА и инбредных мышей C57BL/6, предположительно, другие факторы привели к повышенной выживаемости при смешанном генетическом фоне. На диаграмме рассеяния показаны значения для восьми мышей каждого генотипа и 25 средние значения $\pm$ СО (р: **** $< 0,00005$). На ФИГ. 15Е показано, что MuSK иммунопреципитировали в день E18,5 из мышц мышей дикого типа, мышей *Dok7^{CM/CM}*, и блоты зондировали антителами против MuSK, фосфотирозина и Crk. Уровень фосфотирозина и Crk, который выделялся совместно с комплексом MuSK, нормировали на экспрессию MuSK. Ассоциация Crk с комплексом MuSK была в 2,8 раз ниже у мышей 30 *Dok7^{CM/CM}*, чем у мышей дикого типа. Фосфорилирование MuSK по тирозину было в 5 раз ниже у мышей *Dok7^{CM/CM}*, чем у мышей дикого типа. На диаграммах рассеяния показаны значения для 3 мышей каждого генотипа и средние значения $\pm$ СО (р: ** $<0,005$, **** $<0,00005$). Масштабный отрезок = 10 мкм.

[0021] На ФИГ. 16А - 16В представлены таблицы, в которых показан анализ 35 последовательностей потенциальных нецелевых сайтов, который не смог

идентифицировать мутации в этих генах. Указаны ведущие потенциальные нецелевые последовательности генов 1 – 5 у мышей *Dok7^{CM}* (ФИГ. 16А; последовательности SEQ ID NO: 280 – 284) и нецелевые последовательности генов 1 – 5 у мышей *Dok7^{2YF}* (ФИГ. 16В; последовательности SEQ ID NO: 285 – 289).

- 5 **[0022]** На ФИГ. 17А - 17С представлены диаграммы, на которых показано, что антитела X2 и X3, подобно X17, спасают мышей *Dok7^{CM/CM}* от ранней летальности. На ФИГ. 17А представлены результаты эксперимента, в котором мышам *Dok7^{CM/CM}* при смешанном фоне C57BL/6-СВА вводили путем инъекции в день Р4 10 мг/кг mIgG2а-X3 (см. также ФИГ. 46В). При этой дозе X3 не смогло спасти мышей от летальности.
- 10 Напротив, введение дозы 20 мг/кг mIgG2а-X3 в день Р4 спасало мышей от ранней летальности (ФИГ. 17В (см. также ФИГ. 47В)). Этим мышам впоследствии вводили путем инъекции 10 мг/кг mIgG2а-X3 в день Р18, что приводило к выживаемости до дня Р60, когда мышей умерщвляли. На ФИГ. 17С показано, что введение мышам *Dok7^{CM/CM}* дозы 20 мг/кг hIgG1-X2 в день Р4 аналогичным образом спасало мышей *Dok7^{CM/CM}* от ранней
- 15 летальности; последующая инъекция 10 мг/кг hIgG1-X2 в день Р18 приводила к выживаемости мышей *Dok7^{CM/CM}* до дня Р60, когда мышей умерщвляли.

[0023] На ФИГ. 18 представлена схема, на которой показан обзор стратегии селекций с помощью фагового дисплея из иммунных библиотек Fab ламы.

- [0024]** На ФИГ. 19 представлены результаты экспериментов ELISA, которые
- 20 выявили слабое связывание антител с MuSK человека или мыши.

[0025] На ФИГ. 20 представлен график, демонстрирующий, что 3В2 спасает от ранней постнатальной летальности мышей *Dok7 1124_1127 dup*.

- [0026]** На ФИГ. 21 представлена диаграмма, на которой показан процент фосфорилирования, вызванного антителами против MuSK в соответствии с настоящим
- 25 изобретением, в анализе фосфорилирования C2C12.

[0027] На ФИГ. 22 представлены диаграммы, показывающие аффинность связывания антитела 3В2 и вариантов антитела 3В2 с MuSK человека, яванского макака, крысы или мыши, измеренную с помощью ELISA.

- [0028]** На ФИГ. 23 приведены графические представления связывания
- 30 агонистических Fab против MuSK (Fab X17, X2, X2m4, X3, 3В2, 3В2g2m1, X9) с MuSK мыши в анализе Biacore при pH 7,4 и pH 5,5.

[0029] На ФИГ. 24 представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что фосфорилирование MuSK можно костимулировать с помощью его природного лиганда агрина и агонистического МАТ против MuSK - 3В2g2m1, нацеленного на Fz-домен MuSK.

[0030] На ФИГ. 25А - 25В продемонстрировано, что агонистические антитела против MuSK, mIgG2a-X17 в комбинации с hIgG-X17, спасают летальность у молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 25А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-CBA выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом X17 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля (n = 11), подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X17 (n = 3) в день P4, и hIgG-X17 в дни P24 и P44, доживали до взрослого возраста. Мутантных мышей, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X17, а затем hIgG-X17, умерщвляли в день P60. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (p: **** < 0,00005). На ФИГ. 25В представлен график, показывающий, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X17, а затем hIgG-X17, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции mIgG2a-X17 (10 мг/кг) в день P4 и hIgG-X17 (10 мг/кг) в дни P24 и P44.

[0031] ФИГ. 26 демонстрирует, что mIgG2a-X17 в комбинации с hIgG-X17 спасает двигательную активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Двигательная активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*, что оценивали по силе захвата (левая панель) и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (правая панель), полностью восстанавливалась в результате лечения mIgG2a-X17 в комбинации с hIgG-X17. На диаграммах рассеяния показаны значения для 27 мышей дикого типа и 3 мышей *Dok7 1124_1127 dup*, спасенных с помощью mIgG2a-X17 в комбинации с hIgG-X17, и средние значения $\pm$ СО (н/з - незначимо).

[0032] ФИГ. 27 демонстрирует, что агонистическое антитело против MuSK hIgG-X17 привлекает MuSK в синапс и насыщает MuSK до 20 мг/кг. Мышам дикого типа в день P40 вводили путем интраперитонеальной инъекции агонистическое антитело против MuSK hIgG-X17 (0, 2, 10, 20 мг/кг). Через два дня мышей умерщвляли и мышцы диафрагмы окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и меченым Alexa 647 антителом козы против IgG человека, специфичным к F(ab')₂-фрагменту, чтобы пометить X17. Уровни насыщения X17 в синапсе измеряли по отношению интенсивностей сигналов X17 к AChR. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей при каждой концентрации.

[0033] ФИГ. 28А - 28В демонстрируют, что агонистическое антитело против MuSK - hIgG-X17 - спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 28А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом hIgG-X17 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции hIgG-X17 (n = 4) в дни P4, P18 и P38 или P4 и P18, доживали до взрослого возраста. 2 из 4 мутантных мышей, которым вводили путем инъекции hIgG-X17, умерщвляли в день P60; 2 мутантным мышам позволяли состариться для экспериментов по рецидиву заболевания. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (p: **** < 0,00005). На ФИГ. 28В представлен график, показывающий, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции hIgG-X17, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции hIgG-X17 в дни P4 (20 мг/кг), P18 и P38 (10 мг/кг) или P4 (20 мг/кг) и P18 (10 мг/кг).

[0034] ФИГ. 29 демонстрирует, что hIgG-X17 восстанавливает развитие синапсов у молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и мышей *Dok7 1124_1127 dup* окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания. У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили hIgG-X17, синапсы созревали от простой подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей. Масштабный отрезок = 10 мм. У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили hIgG-X17, количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR восстанавливались до 70%, 50% и 40%, соответственно, от нормальных уровней. Показаны средние значения $\pm$ СО для 2 мышей (> 50 синапсов на мышь).

[0035] ФИГ. 30 демонстрирует, что hIgG-X17 спасает двигательную активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Двигательная активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*, что оценивали по силе захвата (левая панель) и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (правая панель), полностью восстанавливалась в результате лечения hIgG-X17. На диаграммах рассеяния показаны значения для 27 мышей дикого

типа и 2 мышей *Dok7 1124_1127 dup*, спасенных с помощью hIgG-X17, и средние значения $\pm$ СО.

[0036] ФИГ. 31А - 31С демонстрируют, что hIgG-X17 обращает рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции агонистические антитела против MuSK либо в дни P4, P24 и P44, либо в дни P4, P18, а затем прекращали лечение антителом. Эти мыши *Dok7 1124_1127 dup* набирали массу и сохраняли подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начали терять массу (ФИГ. 31А, ФИГ. 31В) и проявлять двигательные нарушения, которые оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 31С). В этот момент времени, мышам либо не вводили повторную инъекцию (ФИГ. 31А), либо вводили повторную инъекцию hIgG-X17 (ФИГ. 31В). Мыши, которым не вводили повторную инъекцию, умирали в течение нескольких дней (ФИГ. 31А), тогда как после возобновления лечения X17, мыши *Dok7 1124_1127 dup* начали набирать массу (ФИГ. 3В), и через одну неделю после возобновления лечения их двигательные нарушения были обращены (ФИГ. 31С, левые панели). У мышей *Dok7 1124_1127 dup* улучшились показатели на барабане в 3,25 раза, тогда как показатели мышей дикого типа улучшились в 1,30 раза (р: ***<0,0005). У мышей *Dok7 1124_1127 dup* улучшилась сила захвата в 1,30 раза, тогда как показатели мышей дикого типа не улучшились (р: ***<0,0005) (ФИГ. 31С).

[0037] ФИГ. 32А - 32В демонстрируют, что длительные инъекции 3В2 мышам дикого типа не влияют на выживаемость или набор массы тела. На ФИГ. 32А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши дикого типа при смешанном фоне C57BL/6-СВА, которым вводили путем инъекции 3В2 (n = 3) в дни P4 и P18, доживали до дня P38, когда их умерщвляли. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости 4 мышей дикого типа, которым не вводили инъекции, и 3 мышей дикого типа, которым вводили инъекцию 3В2, и средние значения $\pm$ СО (n/з - незначимо). На ФИГ. 32В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши дикого типа, которым вводили путем инъекции 3В2 (n = 3), набирали массу подобно мышам дикого типа (n = 4).

[0038] ФИГ. 33А - 33В демонстрируют, что агонистическое антитело против MuSK - 3В2 - спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 33А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом 3В2 или антителом отрицательного контроля эквивалентного

изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* ($n = 11$), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 3B2 ($n = 3$) в дни P4, P18 и P38 или P4 и P18, доживали до взрослого возраста. 2 из 3 мутантных мышей, которым вводили путем инъекции 3B2, умерщвляли в день P60; 1 мутантной мыши позволили состариться для экспериментов по рецидиву заболевания. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (p : **** $< 0,00005$). На ФИГ. 33В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 3B2, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции 3B2 в дни P4 (20 мг/кг), P18 и P38 (10 мг/кг).

[0039] ФИГ. 34 демонстрирует, что 3B2 восстанавливает развитие синапсов у молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и мышей *Dok7 1124_1127 dup* окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания. У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили 3B2, синапсы созревали от простой подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей. Масштабный отрезок = 10 мм. У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили 3B2, количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR и восстанавливались до 80%, 75% и 40%, соответственно, от нормальных уровней. Показаны средние значения $\pm$ СО для 2 мышей (> 50 синапсов на мышь).

[0040] ФИГ. 35 демонстрирует, что 3B2 спасает двигательную активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Двигательная активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*, что оценивали по силе захвата (левая панель) и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (правая панель), полностью восстанавливалась в результате лечения 3B2. На диаграммах рассеяния показаны значения для 27 мышей дикого типа и 2 мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых спасали с помощью 3B2, и средние значения $\pm$ СО.

[0041] ФИГ. 36 демонстрирует, что 3B2 поддерживало мышей *Dok7 1124_1127 dup* здоровыми в течение по меньшей мере двух месяцев. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции 3B2 в дни P4, P18 и P38, а затем прекращали лечение антителом. Эта мышь *Dok7 1124_1127 dup* набирала массу и сохраняла подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начала терять массу и умерла в течение нескольких дней.

[0042] ФИГ. 37 демонстрирует, что 3B2 обращает рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции mIgG2a-X17 в дни P4, P24 и P44, а затем лечение антителом прекращали. Эта мышь *Dok7 1124_1127 dup* набирала массу и сохраняла подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начала терять массу. В этот момент времени указанной мыши повторно вводили путем инъекции 3B2. После возобновления лечения 3B2 эта мышь *Dok7 1124_1127 dup* начала набирать массу.

[0043] ФИГ. 38А - 38В демонстрирует, что длительные инъекции hIgG-X2 мышам дикого типа не влияют на выживаемость или набор массы тела. На ФИГ. 38А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши дикого типа при смешанном фоне C57BL/6-СВА, которым вводили путем инъекции hIgG-X2 (n = 3) в дни P4 и P18, доживали до дня P38, когда их умерщвляли. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости 4 мышей дикого типа, которым не вводили инъекции, и 3 мышей дикого типа, которым вводили инъекцию hIgG-X2, и средние значения $\pm$ СО (н/з - незначимо). На ФИГ. 38В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши дикого типа, которым вводили путем инъекции hIgG-X2 (n = 3), набирали массу подобно мышам дикого типа (n = 4).

[0044] ФИГ. 39А - 39В демонстрирует, что агонистическое антитело против MuSK - hIgG-X2 - спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 39А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом hIgG-X2 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции hIgG-X2 (n = 2) в дни P4 и P18, доживали до взрослого возраста. Мутантным мышам, которым вводили путем инъекции hIgG-X2, позволяли состариться для экспериментов по рецидиву заболевания. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (p: **** < 0,00005). На ФИГ. 39В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции hIgG-X2, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции hIgG-X2 в дни P4 (20 мг/кг) и P18 (10 мг/кг).

[0045] ФИГ. 40А - 40В демонстрируют, что hIgG-X2 обращает рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции hIgG-X2 в дни P4 и P18, а затем прекращали лечение антителом. Эти мыши *Dok7 1124_1127 dup* набирали массу и сохраняли подвижность в течение
5 нескольких недель, но, в конечном итоге, начали терять массу (ФИГ. 40А) и проявлять двигательные нарушения, которые оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 40В). В этот момент времени мышам повторно вводили путем инъекции hIgG-X2. После возобновления лечения X2, мыши *Dok7 1124_1127 dup* начали набирать массу (ФИГ. 40А), и через три недели после
10 возобновления лечения их двигательные нарушения были полностью обращены (ФИГ. 40В).

[0046] ФИГ. 41А - 41В демонстрируют, что агонистическое антитело против MuSK - hIgG-X2m4 - спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 41А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при
15 смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом hIgG-X2m4 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим
20 лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции hIgG-X2m4 (n = 3) в дни P4 и P18, доживали до взрослого возраста. Отслеживали выживаемость мутантных мышей, которым вводили путем инъекции hIgG-X2m4, или позволяли им состариться для экспериментов по рецидиву заболевания с применением hIgG-X17. На диаграмме рассеяния показано время
25 выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (p: **** < 0,00005). На ФИГ. 41В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции hIgG-X2m4, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции hIgG-X2m4 в дни P4 (20 мг/кг) и P18 (10 мг/кг).
30 Одну мышь использовали для экспериментов по рецидиву заболевания с применением hIgG-X17, у других отслеживали выживаемость.

[0047] На ФИГ. 42 представлены диаграммы рассеяния, на которых показано, что hIgG-X2m4 поддерживало мышей *Dok7 1124_1127 dup* здоровыми в течение по меньшей мере двух месяцев. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции X2m4 в дни P4
35 и P18, а затем лечение антителом прекращали. Эти мыши *Dok7 1124_1127 dup* набирали

массу и сохраняли подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начали терять массу и умерли в течение нескольких дней.

[0048] ФИГ. 43А - 43В демонстрируют, что длительные инъекции mIgG2a-X3 мышам дикого типа не влияли на выживаемость или набор массы тела. На ФИГ. 43А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши дикого типа при смешанном фоне C57BL/6-СВА, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3 ($n = 2$) в дни P4, P24 и P44, доживали до дня P60, когда их умерщвляли. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для 9 мышей дикого типа, которым не вводили инъекцию, и 2 мышей дикого типа, которым вводили инъекцию mIgG2a-X3, и средние значения $\pm$ СО. На ФИГ. 43В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши дикого типа, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3 ($n = 2$), набирали массу подобно мышам дикого типа без инъекции ($n = 9$).

[0049] ФИГ. 44 демонстрируют, что длительные инъекции mIgG2a-X3 мышам дикого типа не влияли на организацию нервно-мышечных синапсов. Мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и мышей дикого типа, которым вводили инъекцию mIgG2a-X3, окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить ацетилхолиновые рецепторы, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания. У мышей дикого типа, которых лечили mIgG2a-X3, синапсы созревали от простой подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей. Масштабный отрезок = 10 мм. Инъекция mIgG2a-X3 мышам дикого типа не влияла на количество синапсов, размер синапсов и плотность AChR. Анализировали по 100 синапсов из 2 мышей в каждой категории.

[0050] ФИГ. 45 демонстрируют, что длительные инъекции mIgG2a-X3 мышам дикого типа не влияли на двигательное поведение. Двигательная активность мышей дикого типа, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3, что оценивали по силе захвата (левая панель) и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (правая панель), была сходной с таковой у мышей дикого типа, которым не вводили инъекции. На диаграммах рассеяния показаны значения для 27 мышей дикого типа и 2 мышей дикого типа, которым вводили инъекцию mIgG2a-X3, и средние значения $\pm$ СО.

[0051] На ФИГ. 46А - 46В продемонстрировано, что агонистическое антитело против MuSK, mIgG2a-X3, в дозе 10 мг/кг в день P4, спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup* в течение нескольких дней. На ФИГ. 46А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения.

Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом mIgG2a-X3 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, и мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 4), которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (p: **<0,05). На ФИГ. 46В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3, не набирали массу, подобно мышам *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции mIgG2a-X3 (10 мг/кг) в день P4.

[0052] ФИГ. 47А - 47В демонстрируют, что агонистическое антитело против MuSK - mIgG2a-X3 - в дозе 20 мг/кг в день P4 спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 47А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом mIgG2a-X3 (20 мг/кг) или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 2), которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3 в дни P4 (20 мг/кг) и P18 (10 мг/кг), доживали до взрослого возраста. Мутантным мышам, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3, позволяли состариться для экспериментов по рецидиву заболевания. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО. На ФИГ. 47В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции mIgG2a-X3 в день P4 (20 мг/кг) и в день P18 (10 мг/кг).

[0053] ФИГ. 48 демонстрирует, что mIgG2a-X3 поддерживало мышей *Dok7 1124_1127 dup* здоровыми в течение по меньшей мере двух месяцев. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции mIgG2a-X3 в дни P4 и P18, а затем прекращали лечение антителом. Эти мыши *Dok7 1124_1127 dup* набирали массу и сохраняли подвижность в течение двух месяцев, но, в конечном итоге, начали терять массу и умерли в течение нескольких дней.

- [0054] ФИГ. 49А - 49В демонстрируют, что агонистическое антитело против MuSK - mIgG2a-X9 - могло спасти от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 49А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом mIgG2a-X9 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, и мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 6), которым вводили путем инъекции mIgG2a-X9, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения. Только одна мышь *Dok7 1124_1127 dup*, которой вводили путем инъекции mIgG2a-X9 (10 мг/кг) в дни P4, P24 и P44, дожила до дня P60. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (н/з - незначимо). На ФИГ. 49В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X9, не набирали массу, подобно мышам *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Только одна мышь *Dok7 1124_1127 dup*, которой вводили путем инъекции mIgG2a-X9, набрала массу с течением времени. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции mIgG2a-X9 (10 мг/кг) в дни P4, P24 и P44.
- [0055] ФИГ. 50 демонстрирует, что агонистическое антитело против MuSK 3B2g2m1 привлекает MuSK в синапс и насыщает MuSK до 20 мг/кг. Мышам дикого типа P30 вводили путем интраперитонеальной инъекции агонистическое антитело против MuSK 3B2g2m1 (0, 2, 10, 20 мг/кг). Через два дня мышей умерщвляли и мышцы диафрагмы окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и меченым Alexa 647 антителом козы против IgG человека, специфичного к F(ab')₂-фрагменту, чтобы пометить 3B2g2m1. Уровни насыщения 3B2g2m1 в синапсе измеряли по отношению интенсивностей сигналов 3B2g2m1 к AChR. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей при каждой концентрации.
- [0056] ФИГ. 51А - 51В демонстрируют, что длительные инъекции 3B2g2m1 мышам дикого типа не влияли на выживаемость или набор массы тела. На ФИГ. 51А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши дикого типа при смешанном фоне C57BL/6-СВА, которым в дни P4, P24 и P44 вводили путем инъекции 10 мг/кг 3B2g2m1 (n = 6), выживали и набирали массу подобно мышам дикого типа, которым в дни P4, P24 и P44 вводили путем инъекции 10 мг/кг антитела отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумаба (n = 6). На ФИГ. 51В представлена диаграмма

рассеяния, показывающая, что мыши дикого типа при смешанном фоне C57BL/6-CBA, которым два раза в неделю, начиная в день P4, вводили путем инъекции 20 мг/кг 3B2g2m1 (n = 6), выживали и набирали массу подобно мышам дикого типа, которым два раза в неделю, начиная в день P4, вводили путем инъекции 20 мг/кг антитела отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумаба (n = 6).

[0057] ФИГ. 52А - 52В демонстрируют, что агонистическое антитело против MuSK - 3B2g2m1 - спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 52А представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-CBA выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в день P4 агонистическим антителом 3B2g2m1 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 3B2g2m1 (n = 10) в день P4 (20 мг/кг), P18 (10 мг/кг) и P38 (10 мг/кг), доживали до взрослого возраста. 3 из 10 мутантных мышей, которым вводили путем инъекции 3B2g2m1, умерщвляли в день P60; 7 мутантным мышам позволяли состариться для экспериментов по рецидиву заболевания. На диаграмме рассеяния показано время выживаемости для каждой мыши и средние значения $\pm$ СО (p: **** < 0,00005). На ФИГ. 52В представлена диаграмма рассеяния, показывающая, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 3B2g2m1, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции 3B2g2m1 в дни P4 (20 мг/кг), P18 (10 мг/кг) и P44 (10 мг/кг).

[0058] ФИГ. 53 демонстрирует, что 3B2g2m1 восстанавливало развитие синапсов у молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и мышей *Dok7 1124_1127 dup* окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания. У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили 3B2g2m1, синапсы созревали от простой подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей. Масштабный отрезок = 10 мм. У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили 3B2g2m1, количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR восстанавливались до 80%, 50% и 60%, соответственно, от нормальных уровней. Показаны средние значения $\pm$ СО для 3 мышей (> 50 синапсов на мышь) (p: * < 0,05, **** < 0,00005).

[0059] ФИГ. 54 демонстрирует, что 3B2g2m1 спасает двигательную активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Двигательная активность мышей *Dok7 1124_1127 dup*, что оценивали по силе захвата (левая панель) и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (правая панель), полностью восстанавливалась в результате лечения 3B2g2m1. На диаграммах рассеяния показаны значения для 27 мышей дикого типа и 10 мышей *Dok7 1124_1127 dup*, спасенных с помощью антитела 3B2g2m1, и средние значения $\pm$ СО (н/з - незначимо).

[0060] ФИГ. 55 демонстрируют, что 3B2g2m1 поддерживало мышей *Dok7 1124_1127 dup* здоровыми в течение по меньшей мере двух месяцев. Мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции 3B2g2m1 в дни P4, P18 и P38, а затем прекращали лечение антителом. Эти мыши *Dok7 1124_1127 dup* набирали массу и сохраняли подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начали терять массу. В этот момент времени, указанным мышам повторно вводили путем инъекции либо 5 мг/кг, либо 10 мг/кг 3B2g2m1. После возобновления лечения 3B2g2m1 мышь *Dok7 1124_1127 dup* начала набирать массу.

[0061] ФИГ. 56А - 56С демонстрирует, что 3B2g2m1 обращало рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции 3B2g2m1 в дни P4, P18 и P38, а затем прекращали лечение антителом. Эта мышь *Dok7 1124_1127 dup* набирала массу и сохраняла подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начала терять массу (ФИГ. 56А) и проявлять двигательные нарушения, которые оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 56В). В этот момент времени указанной мыши повторно вводили путем инъекции 3B2g2m1 (ФИГ. 56А). После возобновления лечения 3B2g2m1, мышь *Dok7 1124_1127 dup* начала набирать массу (ФИГ. 56А), и через неделю после возобновления лечения ее двигательные нарушения были обращены (ФИГ. 56В - 56С). У мышей *Dok7 1124_1127 dup* улучшились показатели на барабане в 5,5 раз (ФИГ. 56В), а их сила захвата увеличилась в 1,1 раза (ФИГ. 56С).

[0062] ФИГ. 57 демонстрирует, что агонистическое антитело против MuSK - 3B2g2m1 - спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup* (длительное введение дозы 2 раза в неделю). На ФИГ. 57 продемонстрировано, что мыши *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выживали в течение от одной до двух недель после рождения. Мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили дважды в неделю, начиная в день P4, агонистическим антителом 3B2g2m1 (20 мг/кг). Мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 3B2g2m1 (n = 4), доживали до взрослого возраста и набирали массу.

[0063] На ФИГ. 58А - 58С показано, что лечение антителом MuSK продлевает выживаемость мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 58А показаны графики выживаемости мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции указанные агонистические антитела против MuSK или изотипический контроль (мотавизумаб) в дни P4 (20 мг/кг),
5 P18 (10 мг/кг) и P38 (10 мг/кг). На ФИГ. 58В показаны графики выживаемости мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции агонистические антитела против MuSK или изотипический контроль (мотавизумаб) в дни P4 (20 мг/кг), P18 (10 мг/кг). На ФИГ. 58С показаны графики выживаемости мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым повторно вводили путем инъекции (возобновленное лечение) указанные агонистические
10 антитела против MuSK (10 мг/кг), после того как было вызвано несколько дней потери массы тела (ФИГ. 58С). Эти результаты продемонстрировали, что инъекция агонистического антитела против MuSK продлевает выживаемость мышей *Dok7 1124_1127 dup*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Основные определения.

[0064] Следующие термины или определения предложены исключительно, чтобы облегчить понимание настоящего изобретения. Если не приведено конкретного определения в данной заявке, все термины, используемые в данной заявке, имеют те же значения, какие они имели бы для специалиста в области техники, к которой относится
20 настоящее изобретение. Практикующим специалистам, в частности, рекомендуют искать определения и термины, используемые данной области техники, в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2oe изд., Cold Spring Harbor Press, Плейнвью, Нью-Йорк (1989); и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (приложение 47), John Wiley & Sons, Нью-Йорк (1999). Определения, предложенные в данной заявке, не
25 должны истолковываться, как имеющие меньший объем, чем понимает средний специалист в данной области техники.

[0065] Если не указано иное, все способы, этапы, методики и манипуляции, которые конкретно подробно не описаны, могут быть осуществлены, и их осуществляли способом, по сути известным, что будет ясно квалифицированному специалисту. Например, снова
30 можно сослаться на стандартные справочники, общепринятый уровень техники, на который ссылаются выше, и на дополнительные ссылочные материалы, цитируемые в нем.

[0066] В данной заявке формы единственного числа включают ссылку как на единственное, так и на множественное число, если в контексте явно не указано иное.

[0067] Термины «состоящий», «состоит» и «состоит из» в данной заявке являются синонимами терминов «включающий», «включает» или «содержащий», «содержит», и являются включительными или неограничивающими и не исключают дополнительных, не перечисленных представителей, соединений, продуктов, элементов или этапов способа.

- 5 Выражение «по существу состоит из», используемое в контексте продукта или композиции («продукт, по существу состоящий из» или «композиция, по существу состоящая из»), означает, что могут присутствовать дополнительные молекулы, но что такие молекулы не изменяют/не видоизменяют свойство/активность/функциональность указанного продукта или композиции. Например, композиция может по существу
10 состоять из антитела или фрагмента антитела, если композиция как таковая будет проявлять сходные свойство/активность/функциональность, как таковая с антителом или таковая с фрагментами антитела.

- [0068]** Перечисление числовых диапазонов с помощью конечных точек включает все числа и доли, включенные в соответствующие диапазоны, а также перечисленные
15 конечные точки.

- [0069]** Термин «приблизительно» в данной заявке, при упоминании измеримого значения, такого как параметр, количество, период времени и тому подобное, означает включение отклонений +/-10% или менее, предпочтительно +/-5% или менее, более предпочтительно +/-1% или менее, и еще более предпочтительно +/-0,1% или менее от
20 указанного значения, если только такие отклонения уместно осуществить в описанном изобретении. Должно быть очевидно, что значение, к которому относится модификатор «приблизительно», само также конкретно и предпочтительно описано.

[0070] В данной заявке аминокислотные остатки будут указаны либо по их полному названию, либо по стандартному трехбуквенному или однобуквенному коду аминокислот.

- 25 **[0071]** В данной заявке термины «полипептид» или «белок» используют взаимозаменяемо, и они относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать кодируемые и не кодируемые аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты, и к полипептидам, содержащим модифицированные пептидные остовы. «Пептид» также
30 представляет собой полимер из аминокислот длиной, которая обычно составляет до 50 аминокислот. Полипептид или пептид представлен последовательностью аминокислот.

- [0072]** В данной заявке термины «молекула нуклеиновой кислоты», «полинуклеотид», «полинуклеиновая кислота», «нуклеиновая кислота» используют взаимозаменяемо, и они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо
35 дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Молекула

нуклеиновой кислоты представлена последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, главным образом, характеризуется последовательностью оснований. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут осуществлять любую функцию, известную или неизвестную. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена, экзоны, интроны, информационную РНК (мРНК), транспортную РНК, рибосомную РНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированную ДНК с любой последовательностью, контролирующие области, изолированную РНК с любой последовательностью, зонды на основе нуклеиновой кислоты и праймеры. Молекула нуклеиновой кислоты может быть линейной или кольцевой.

[0073] В данной заявке термин «гомология» обозначает по меньшей мере идентичность или подобие вторичной структуры между двумя макромолекулами, особенно между двумя полипептидами или полинуклеотидами, из одного и того же или из различных таксонов, причем указанное подобие является следствием общего происхождения. Следовательно, термин «гомологи» обозначает родственные таким образом макромолекулы, обладающие указанным подобием вторичной, и необязательно третичной, структуры. Для сравнения двух или более последовательностей нуклеотидов можно рассчитать «(процент) идентичности последовательностей» между первой последовательностью нуклеотидов и второй последовательностью нуклеотидов, применяя способы, известные специалисту в данной области техники, например, путем деления количества нуклеотидов в первой последовательности нуклеотидов, которые идентичны нуклеотидам в соответствующих положениях во второй последовательности нуклеотидов, на суммарное количество нуклеотидов в первой последовательности нуклеотидов и умножения на 100% или путем применения известного компьютерного алгоритма для выравнивания последовательностей, такого как NCBI Blast. При определении степени подобия последовательностей между двумя последовательностями аминокислот, квалифицированный специалист может учесть так называемые «консервативные» замены аминокислот, которые в общем могут быть описаны как замены аминокислот, при которых аминокислотный остаток заменяют на другой аминокислотный остаток со сходной химической структурой, и которые оказывают небольшое влияние или по существу не оказывают влияния на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Примеры возможных консервативных замен аминокислот уже были приведены в данной заявке. Последовательности аминокислот и последовательности нуклеиновых кислот называют «абсолютно одинаковыми», если они идентичны на 100% по всей длине последовательности.

[0074] По всему тексту настоящей заявки, каждый раз, когда упоминается определенная последовательность аминокислот SEQ ID NO (если взять SEQ ID NO: Y в качестве примера), эту формулировку можно заменить на: полипептид, содержащий последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична или
5 подобна последовательности аминокислот SEQ ID NO: Y. По всему тексту настоящей заявки формулировку «последовательность по меньшей мере на X% идентична другой последовательности» можно заменить на «последовательность имеет по меньшей мере X% идентичности другой последовательности».

[0075] Каждая последовательность аминокислот, описанная в данной заявке с
10 помощью процента ее идентичности (по меньшей мере 80%) указанной последовательности аминокислот, соответственно, в дополнительном предпочтительном варианте реализации по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична указанной последовательности аминокислот, соответственно. В предпочтительном варианте
15 реализации идентичность последовательностей определяют путем сравнения последовательностей по всей длине, как указано в данной заявке. Каждая последовательность аминокислот, описанная в данной заявке с помощью процента ее подобия (по меньшей мере 80%) указанной последовательности аминокислот, соответственно, в дополнительном предпочтительном варианте реализации по меньшей
20 мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более подобна указанной последовательности аминокислот, соответственно. В предпочтительном варианте реализации подобие последовательностей определяют путем сравнения последовательностей по всей длине, как указано в данной заявке. Если в данной заявке не указано иное, идентичность или подобие указанной SEQ
25 ID NO означает идентичность или подобие на основании всей длины указанной последовательности (т.е., на протяжении всей длины или целиком).

[0076] «Идентичность последовательностей» в данной заявке определяют как соответствие между двумя или более последовательностями аминокислот (полипептидов или белков) или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот
30 (полинуклеотидов), что определяют путем сравнения указанных последовательностей. Идентичность между двумя последовательностями аминокислот предпочтительно определяют путем оценки их идентичности в пределах всей SEQ ID NO, как указано в данной заявке, или ее части. Ее часть может означать по меньшей мере 50% длины SEQ ID NO, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или
35 по меньшей мере 90%.

- [0077]** В данной области техники «идентичность» также означает степень родства между последовательностями аминокислот, в зависимости от конкретного случая, что определяют по совпадению между цепочками таких последовательностей. «Подобие» между двумя последовательностями аминокислот определяют путем сравнения последовательности аминокислот и ее консервативных замен аминокислот одного полипептида с последовательностью второго полипептида. «Идентичность» и «подобие» можно легко рассчитать с помощью известных способов, включая, но не ограничиваясь описанными в Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, Нью-Йорк, 1991; и Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).
- [0078]** Предпочтительные способы определения идентичности разработаны, чтобы получить наибольшее совпадение между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности и подобия кодируются общедоступными компьютерными программами. Предпочтительные компьютерные программы со способами определения идентичности и подобия между двумя последовательностями включают, например, пакет программ GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12 (1): 387 (1984)), BestFit, FASTA, BLASTN и BLASTP (Altschul, S. F. et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)), EMBOSS Needle (Madeira, F., et al., *Nucleic Acids Research* 47(W1): W636-W641 (2019)). Программа BLAST общедоступна в NCBI и других источниках (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH, Бетесда, Мэриленд 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)). Программа EMBOSS общедоступна в EMBL-EBI. Для определения идентичности также можно применять хорошо известный алгоритм Смита-Уотермана. Программа EMBOSS Needle является предпочтительной используемой программой.
- [0079]** Предпочтительные параметры для сравнения полипептидных последовательностей включают следующие параметры: алгоритм Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48 (3):443-453 (1970); матрица сравнения: BLOSUM62 от Henikoff и Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915-10919 (1992); штраф за открытие гэпа: 10; и штраф за продление гэпа: 0,5. Программа, пригодная для использования с этими параметрами, представляет собой общедоступную программу EMBOSS Needle от EMBL-EBI. Упомянутые выше параметры являются параметрами по умолчанию для глобального

попарного выравнивания последовательностей белков (наряду с отсутствием штрафа за концевые гэпы).

[0080] Предпочтительные параметры для сравнения нуклеиновых кислот включают следующие параметры: алгоритм Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970); матрица сравнения: DNAfull; штраф за открытие гэпа: 10; штраф за продление гэпа: 0,5. Программа, пригодная для использования с этими параметрами, представляет собой общедоступную программу EMBOSS Needle от EMBL-EBI. Упомянутые выше параметры являются параметрами по умолчанию для глобального попарного выравнивания последовательностей нуклеотидов (наряду с отсутствием штрафа за концевые гэпы).

[0081] Также в данной заявке предложены варианты реализации, в которых любой вариант реализации, описанный в данной заявке, можно комбинировать с любыми одним или более другими вариантами реализации, при условии, что комбинация не является несовместимой.

Молекулы на основе антител против MuSK.

[0082] Настоящее изобретение относится к молекулам на основе антител, включая антитела, их связывающие эпитоп домены и производные антител, описанные в данной заявке, которые способны связываться и активировать сигнализацию и/или фосфорилирование специфической для мышц тирозин-протеинкиназы (MuSK). Такие молекулы на основе антител пригодны для лечения состояний, при которых субъект нуждается в повышенной сигнализации MuSK или фосфорилировании MuSK, таких как нервно-мышечные состояния.

[0083] В первом аспекте настоящего изобретения предложена молекула на основе антител, которая связывает эпитоп MuSK. MuSK представляет собой рецептор с тирозинкиназной активностью, который экспрессируется в скелетной мышце и играет решающую, главную роль в образовании и поддержании нервно-мышечных синапсов (Burden et al., «The Role of MuSK in Synapse Formation and Neuromuscular Disease,» *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a009167 (2013), которая настоящим полностью включена в данную заявку посредством ссылки). MuSK представляет собой трансмембранный белок, один раз пронизывающий мембрану, с молекулярной массой 120 кДа, состоящий из внеклеточной области, содержащей три Ig-подобных домена и Frizzled (Fz)-подобный домен, и внутриклеточной области, содержащей околосмембранную область, киназный домен и короткий цитоплазматический хвост (Jennings et al., «Muscle-Specific trk-Related Receptor with a Kringle Domain Defines a Distinct Class of Receptor Tyrosine Kinases,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2895-2899 (1993) и Valenzuela et al., «Receptor Tyrosine Kinase

Specific for the Skeletal Muscle Lineage: Expression in Embryonic muscle, at the Neuromuscular Junction, and After Injury,» *Neuron* 15: 573-584 (1995), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Фосфорилирование MuSK стимулируется агрином - сигналом, который передают двигательные нейроны. После активации, MuSK стимулирует пути, которые (1) кластеризуют и заякоряют AChR и дополнительные белки мышц, критически важные для синаптической передачи, (2) усиливают транскрипцию генов, кодирующих синаптические белки в «синаптических ядрах» в мышце, и (3) вызывают продукцию ретроградных сигналов, которые вызывают пресинаптическую дифференцировку и присоединение окончаний двигательного нерва к мышце. В отсутствие MuSK нервно-мышечные синапсы не могут образоваться (Burden et al., «The Role of MuSK in Synapse Formation and Neuromuscular Disease,» *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a009167 (2013), которая настоящим полностью включена в данную заявку посредством ссылки). Дополнительно к его роли при образовании синапса, MuSK также необходим для поддержания синапсов взрослых, так как ингибирование экспрессии MuSK в мышце взрослого приводит к сильным дефектам в пресинаптической и постсинаптической дифференцировке (Kong et al., «Inhibition of Synapse Assembly in Mammalian Muscle in vivo by RNA Interference,» *EMBO Rep* 5:183-188 (2004) и Hesser et al., «Synapse Disassembly and Formation of New Synapses in Postnatal Muscle Upon Conditional Inactivation of MuSK,» *Mol. Cell. Neurosci.* 31:470-480 (2006), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). В соответствии с этими открытиями у мышей, мутации, которые нарушают активность киназы MuSK или ингибируют этапы сигнализации, следующие после MuSK, вызывают миастению (CM), для которой характерны структурно и функционально дефектные синапсы, что приводит к слабости и утомляемости мышц (Beeson et al., «Dok-7 Mutations Underlie a Neuromuscular Junction Synaptopathy,» *Science* 313:1975-1978 (2006); Muller et al., «Phenotypical Spectrum of DOK7 Mutations in Congenital Myasthenic Syndromes,» *Brain* 130:1497-1506 (2007); и Selcen et al., «A Compensatory Subpopulation of Motor Neurons in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis,» *J. Comp. Neurol.* 490:209-219 (2008), описания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

[0084] Последовательность аминокислот MuSK человека представляет собой последовательность аминокислот SEQ ID NO: 129, приведенную ниже.

MRELVNIPLVHILTLVAFSGTEKLPKAPVITTPLETVDALVEEVATFMCAVESYPQPEIS
WTRNKILIKLFDTRYISIRENGQLLTILSVEDSDDGIYCCTANNGVGGAVESCGALQVKM
KPKITRPPINVKIIIEGLKAVLPCTTMGNPKPSVSWIKGDSPLRENSRIAVLESGSLRIHNV
QKEDAGQYRCVAKNSLGTAYSKVVKLEVEVFARILRAPESHNVTFGSFVTLHCTATGIP
VPTITWIENGNAVSSGSIQESVKDRVIDSRLQLFITKPGLYTCIATNKHGEKFSTAKAAAT

ISIAEWSKPQKDNKGYCAQYRGEVCNAVLAKDALVFLNTSYADPEEAQELLVHTAWNE
 LKVVSPVCRPAAEALLCNHIFQECSPGVVPTPIPICREYCLAVKELFCAKEWLVMEETH
 RGLYRSEMHLHSVPECSKLPSMHWDPTACARLPHLDYNKENLKTFFPMTSSKPSVDIPN
 LPSSSSSSFSVSPTYSMTVIISIMSSFAIFVLLTITTLTYCCRRRKQWKNKKRESAAVTLTTL
 5 SELLDRLHPNPMYQRMPLLLNPKLLSLEYPRNNIEYVRDIGEGAFGRVFQARAPGLLPY
 EPFTMVAVKMLKEEASADMQADFQREAALMAEFDNPNIVKLLGVCAVGKPMCLLFEY
 MAYGDLNEFLRSMSPHTVCSLSHSDLSMRAQVSSPGPPPLSCAEQLCIARQVAAGMAYL
 SERKFVHRDLATRNCLVGENMVVKIADFGLSRNIYSADYYKANENDAIPIRWMPPEISIF
 YNRYTTESDVWAYGVVLWEIFSYGLQPYYGMAHEEVIYYVRDGNILSCPENCVELYN
 10 LMRLCWS KLPADRPSFTSIHRILERMCERAEGTVSV (SEQ ID NO: 129)

[0085] В соответствии с настоящим изобретением, молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, связываются с эпитопом внутри Frizzled (Fz)-подобного домена белка MuSK. Fz-подобный домен MuSK имеет последовательность аминокислот SEQ ID NO: 130, представленную ниже.

DNKGYCAQYRGEVCNAVLAKDALVFLNTSYADPEEAQELLVHTAWNELKVVSPVCRP
 AAEEALLCNHIFQECSPGVVPTPIPICREYCLAVKELFCAKEWLVMEETHRGLYRSEM
 HLLSVPECSKLPSMHWDPTACARL (SEQ ID NO: 130)

[0086] Термин «эпитоп» в данной заявке относится к антигенной детерминанте, с которой способно связываться антитело. Эпитопы обычно содержат на поверхности группировки молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обычно обладают определенными свойствами трехмерной структуры, а также определенными свойствами заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы отличаются тем, что связывание с первым из них, но не с последним из них, утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые напрямую не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим антигенсвязывающим пептидом (другими словами, аминокислотный остаток находится внутри отпечатка специфического антигенсвязывающего пептида). Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, и чаще по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[0087] Молекулы на основе антител против MuSK в соответствии с настоящим изобретением иммуноспецифически связывают эпитоп внутри последовательности Fz-подобного домена MuSK - SEQ ID NO: 130 - чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью или авидностью, чем альтернативный эпитоп. В некотором варианте реализации молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, иммуноспецифически связываются с любыми

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотными остатками в последовательности SEQ ID NO: 130. Термины «аффинность», «специфическое связывание», «связывание», «иммуноспецифическое связывание», «активность связывания» или «активность специфического связывания» в данной заявке относятся к степени, с которой антитело или фрагмент антитела, в соответствии с определением в данной заявке, связывается с эпитопом внутри последовательности Fz-подобного домена MuSK - SEQ ID NO: 130.

[0088] В некотором варианте реализации молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, связываются с Fz-подобным доменом MuSK с аффинностью, соответствующей K_D , равной приблизительно 10^{-7} М или менее. Например, молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, связываются с Fz-подобным доменом MuSK с аффинностью, соответствующей K_D , равной приблизительно 10^{-8} М, равной приблизительно 10^{-9} М, равной приблизительно 10^{-10} М, равной приблизительно 10^{-11} М, равной приблизительно 10^{-12} М или менее, при определении с помощью, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) в устройстве Biacore 3000 (предпочтительно, используя антитело как лиганд и MuSK как аналит). Молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, связываются с Fz-подобным доменом MuSK с аффинностью, соответствующей K_D , которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем их аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, бычьим сывороточным альбумином, казеином и т.д.). Величина, на которую аффинность ниже, зависит от K_D антитела, так что когда K_D антитела очень низка (то есть, антитело высокоспецифично), то величина, на которую аффинность к антигену ниже, чем аффинность к неспецифическому антигену, может составлять по меньшей мере 10000 раз. Термин « k_d » (сек^{-1} или $1/\text{с}$) в данной заявке относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Указанное значение также называют значением k_{off} . Термин « k_a » ($\text{М}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$ или $1/\text{М}$) в данной заявке относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин « K_D » (М) в данной заявке относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, и ее получают путем деления k_d на k_a . Термин « K_A » (М^{-1} или $1/\text{М}$) в данной заявке относится к равновесной константе ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, и ее получают путем деления k_a на k_d .

[0089] В некотором варианте реализации молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, имеют рН-зависимую аффинность связывания с

MuSK, что позволяет рециркуляцию антитела, чтобы повысить связывание антигена. Например, в некотором варианте реализации константа скорости ассоциации или константа скорости диссоциации может отличаться в условиях кислого pH по сравнению с нейтральными или с основными условиями. В одном варианте реализации молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, имеют более высокую константу скорости диссоциации в условиях кислого pH, например, при $\text{pH} < 7,0$, по сравнению с таковой в условиях нейтрального pH, например, $\text{pH} \sim 7,0 - 7,9$. В некоторых вариантах реализации молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, имеют в 2 - 3 раза более высокую константу скорости диссоциации (т.е., сниженную аффинность связывания) при кислом pH (например, $\text{pH} \sim 5,5$) по сравнению с нейтральным pH ($\text{pH} \sim 7,4$). В некотором варианте реализации молекулы на основе антител против MuSK связываются с Fz-подобным доменом MuSK с более высокой аффинностью в условиях нейтрального pH, чем в условиях кислого pH. Другими словами, в некотором варианте реализации молекулы на основе антител против MuSK связываются с Fz-подобным доменом MuSK с более высокой скоростью диссоциации в условиях кислого pH, чем в условиях нейтрального pH. Нейтральные условия pH можно определить как представляющие собой pH в диапазоне от 7,0 до 7,9. Кислые условия pH можно определить как представляющие собой pH менее 7,0. Более высокий может означать по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300% более высокий. Антитела, обладающие таким свойством pH-зависимой диссоциации, диссоциируют от антигена после связывания и активации, но перед лизосомальной деградацией. После диссоциации антитело транспортируется посредством неонатального Fc-рецептора обратно в кровоток и высвобождается, чтобы снова связать антиген.

[0090] Связывание антител против MuSK в соответствии с настоящим изобретением с соответствующими эпитопами в Fz-подобном домене активирует сигнализацию MuSK. В частности, когда антитела против MuSK в соответствии с настоящим изобретением связываются с соответствующим эпитопом Fz-подобного домена MuSK, это связывание индуцирует фосфорилирование и активацию MuSK, как описано выше. Антитела против MuSK в соответствии с настоящим изобретением вызывают фосфорилирование MuSK на от приблизительно 50% до приблизительно 100% по сравнению с фосфорилированием MuSK, вызванным активацией агрином (что измеряли, например, в анализе фосфорилирования C2C12, описанном в данной заявке). В некотором варианте реализации антитела против MuSK в соответствии с настоящим изобретением вызывают приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%

или 100% фосфорилирования MuSK (по сравнению с фосфорилированием MuSK, вызванным активацией агрином). В некотором варианте реализации молекулы на основе антител против MuSK в соответствии с настоящим изобретением вызывают от приблизительно 90% до приблизительно 100% фосфорилирования MuSK (по сравнению с фосфорилированием MuSK, вызванным активацией агрином), при связывании MuSK. Фосфорилирование MuSK можно оценить, применяя методики, известные квалифицированному специалисту, такие как вестерн-блоттинг. Анализ фосфорилирования, описанный в разделе Примеры в данной заявке (т.е., анализ фосфорилирования мышечных трубочек C2C12), также можно применять, чтобы оценить фосфорилирование.

[0091] В некоторых вариантах реализации антитела против MuSK в соответствии с настоящим изобретением, т.е., антитела против MuSK, которые связываются с Fz-доменом MuSK, не препятствуют (т.е., не блокируют, не мешают, не ингибируют или не снижают) связыванию с природным лигандом и стимуляции MuSK. В некоторых вариантах реализации антитела против MuSK костимулируют активацию MuSK его природным лигандом, т.е., агрином, чтобы вызвать аддитивный эффект активации, например, фосфорилирование MuSK. Таким образом, в некоторых вариантах реализации антитела против MuSK в соответствии с настоящим изобретением усиливают природную активацию MuSK, т.е., фосфорилирование, вызванное связыванием с природным лигандом. В некоторых вариантах реализации антитела согласно настоящему изобретению, в комбинации с природным лигандом, активируют MuSK (т.е., фосфорилирование MuSK) до >100% от эндогенных уровней активации, например, по меньшей мере на 110%, 130%, 150%, 200% от эндогенных уровней активации. Фосфорилирование MuSK можно оценить, как указано выше.

[0092] Соответственно, в некотором варианте реализации активности молекул на основе антител против MuSK согласно настоящему изобретению включают: (i) связывание с эпитопом специфической для мышц тирозин-протеинкиназы (MuSK) человека, указанный эпитоп присутствует в последовательности Frizzled (Fz)-подобного домена MuSK SEQ ID NO: 130, причем указанная молекула на основе антитела индуцирует фосфорилирование MuSK при связывании с ее эпитопом, и/или (ii) связывание с Fz-подобным доменом MuSK не блокирует, не мешает или не ингибирует природное или эндогенное вызванное лигандом MuSK фосфорилирование, и может усиливать указанное природное или эндогенное вызванное лигандом MuSK фосфорилирование, и (iii) связывание с Fz-подобным доменом MuSK происходит с более высокой аффинностью в условиях нейтрального pH, чем в условиях кислого pH.

Все эти особенности описаны далее в данной заявке.

[0093] Молекулы на основе антител включают, без ограничения, полноразмерные антитела, связывающие эпитоп фрагменты полноразмерных антител и производные антител. Связывающий эпитоп фрагмент антитела можно получить путем фактического фрагментирования исходного антитела (например, фрагмент Fab или (Fab)₂). В качестве альтернативы, связывающий эпитоп фрагмент представляет собой последовательность аминокислот, которая содержит часть последовательности аминокислот такого исходного антитела. В данной заявке говорят, что молекула представляет собой «производное» антитела (или его важную часть), если она получена посредством фактической химической модификации исходного антитела или его части, или если она содержит последовательность аминокислот, которая по существу сходна с последовательностью аминокислот такого исходного антитела или его важной части (например, отличается менее чем на 30%, менее чем на 20%, менее чем на 10% или менее чем на 5% от такой исходной молекулы или такой ее важной части, или на 10 аминокислотных остатков, или на менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных остатка от такой исходной молекулы или ее важной части).

[0094] В некотором варианте реализации молекула на основе антител в соответствии с настоящим изобретением представляет собой интактный иммуноглобулин или молекулу, содержащую его связывающий эпитоп фрагмент. В данной заявке, как правило, предполагается, что термины «фрагмент», «участок», «часть» и «домен» синонимичны, если контекст их применения не подразумевает иное. Встречающиеся в природе антитела обычно содержат тетрамер, который обычно состоит из по меньшей мере двух тяжелых (H) цепей и по меньшей мере двух легких (L) цепей. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области (V_H) тяжелой цепи и константной области (C_H) тяжелой цепи, обычно состоящей из трех доменов (доменов C_H1, C_H2 и C_H3). Тяжелые цепи могут быть любого изотипа, включая IgG (подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области (V_L) легкой цепи и константной области (C_L) легкой цепи. Легкие цепи включают цепи каппа и цепи лямбда. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей обычно отвечают за распознавание антигена, тогда как константные области тяжелой и легкой цепей могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на участки гипервариабельности, названные «определяющими комплементарность областями» или «CDR», которые рассредоточены

между областями с более консервативной последовательностью, названными «каркасными областями» (FR). Каждая область V_H и V_L состоит из трех доменов CDR и четырех доменов FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Особое значение имеют антитела и их связывающие эпитоп фрагменты, которые были «изолированы» (выделены), чтобы они присутствовали в физическом окружении, отличном от такового, в котором они могут встречаться в природе, или которые были модифицированы таким образом, чтобы они отличались от встречающегося в природе антитела по последовательности аминокислот.

[0095] Фрагменты антител (включая фрагменты Fab и $(Fab)_2$), которые проявляют способность связывать эпитоп, можно получить, например, путем расщепления протеазами интактных антител. Однодоменные фрагменты антител содержат только один вариабельный домен (например, V_L или V_H). Примеры связывающих эпитоп фрагментов, входящих в объем настоящего изобретения, включают (i) фрагменты Fab' или Fab, которые представляют собой моновалентные фрагменты, содержащие домены V_L , V_H , C_L и C_H1 ; (ii) фрагменты $F(ab')_2$, которые представляют собой бивалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагменты Fd, по существу состоящие из доменов V_H и C_H1 ; (iv) фрагменты Fv, по существу состоящие из доменов V_L и V_H , (v) фрагменты dAb (Ward *et al.* «Binding Activities Of A Repertoire Of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted From *Escherichia coli*,» *Nature* 341:544-546 (1989), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки), которые по существу состоят из домена V_H или V_L и также называются доменными антителами (Holt *et al.* «Domain Antibodies: Proteins For Therapy,» *Trends Biotechnol.* 21(11): 484-490 (2003), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки); (vi) нанотела (Revets *et al.* «Nanobodies As Novel Agents For Cancer Therapy,» *Expert Opin. Biol. Ther.* 5(1):111-124 (2005), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки), и (vii) изолированные определяющие комплементарность области (CDR). Связывающий эпитоп фрагмент может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 доменов CDR такого антитела. В некотором варианте реализации фрагмент (или область, или часть, или домен) антитела содержит, по существу состоит или состоит из от 30 до 100 аминокислот, или от 50 до 150 аминокислот, или от 70 до 200 аминокислот. В некотором варианте реализации длина фрагмента (или области, или части, или домена) антитела составляет по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% длины антитела

(полноразмерного антитела). В некотором варианте реализации фрагмент представляет собой связывающий эпитоп фрагмент или функциональный фрагмент указанного антитела, что означает, что будут ожидать от него проявления активности указанного антитела по меньшей мере в некоторой степени. «По меньшей мере в некоторой степени» может означать по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200% или более. В некотором варианте реализации фрагмент антитела или антитело должны вызывать детектируемую активность антитела. Определение активности антитела было приведено выше в данной заявке.

[0096] Такие фрагменты антител можно получить, применяя обычные методики, известные специалистам в данной области техники. Например, F(ab')₂-фрагменты можно получить путем обработки полноразмерного антитела пепсином. Полученный в результате этого фрагмент F(ab')₂ можно обработать, чтобы восстановить дисульфидные мостики, с получением фрагментов Fab'. Фрагменты Fab можно получить путем обработки антитела IgG папаином и фрагменты Fab' можно получить путем расщепления антитела IgG пепсином. Фрагмент Fab' можно получить путем обработки фрагмента F(ab')₂ восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол. Фрагменты антител также можно получить путем экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих такие фрагменты, в рекомбинантных клетках (см., например, Evans *et al.* «Rapid Expression Of An Anti-Human C5 Chimeric Fab Utilizing A Vector That Replicates In COS And 293 Cells,» *J. Immunol. Meth.* 184:123-38 (1995), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Например, химерный ген, кодирующий часть фрагмента F(ab')₂, может содержать последовательности ДНК, кодирующие домен СН1 и шарнирную область тяжелой цепи, за которой следует стоп-кодон трансляции, для получения такой молекулы укороченного фрагмента антитела. Подходящие фрагменты, способные связываться с желательным эпитопом, можно легко подвергнуть скринингу на применимость тем же способом, что и интактное антитело.

[0097] Производные антител включают такие молекулы, которые содержат по меньшей мере один связывающий эпитоп домен антитела, и их обычно получают, применяя рекомбинантные методики. Один пример производного антитела включает одноцепочечный Fv (scFv). scFv образован из двух доменов фрагмента Fv: области V_L и области V_H, - которые могут кодироваться отдельными генами. Такие последовательности генов или кодирующие их кДНК соединяют, применяя рекомбинантные способы, с помощью гибкого линкера (обычно, длиной 10, 12, 15 или более аминокислотных остатков), что позволяет им быть полученными в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H соединяются с образованием моновалентных связывающих эпитоп

молекул (см., например, Bird *et al.* «Single-Chain Antigen-Binding Proteins,» *Science* 242:423-426 (1988); и Huston *et al.* «Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In *Escherichia coli*,» *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:5879-5883 (1988), содержания которых настоящим
5 полностью включены в данную заявку посредством ссылки). В качестве альтернативы, путем применения гибкого линкера, который не слишком короток (например, содержит не менее приблизительно 9 остатков), чтобы позволить областям V_L и V_H различных единичных полипептидных цепей соединиться друг с другом, можно получить биспецифическое антитело со специфичностью связывания с двумя различными эпитопами.

10 **[0098]** В другом варианте реализации производное антитела представляет собой двухвалентный или бивалентный одноцепочечный вариабельный фрагмент, сконструированный путем соединения двух scFv друг с другом либо последовательно (т.е., тандемный scFv), либо так, что они димеризуются с образованием диатела (Holliger *et al.* «'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,» *Proc. Natl. Acad. Sci.*
15 *(U.S.A.)* 90(14), 6444-8 (1993), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). В еще одном варианте реализации антитело представляет собой триатело, т.е., трехвалентный одноцепочечный вариабельный фрагмент, сконструированный путем соединения трех scFv, либо последовательно, либо в трехмерную конфигурацию с образованием триатела. В другом варианте реализации антитело представляет собой тетратело из четырех одноцепочечных вариабельных
20 фрагментов. В другом варианте реализации антитело представляет собой «линейное антитело», которое представляет собой антитело, содержащее пару тандемных фрагментов Fd (V_H - C_H1 - V_H - C_H1), которые образуют пару антигенсвязывающих областей (см. Zapata *et al.* *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995), содержание которого настоящим
25 полностью включено в данную заявку посредством ссылки). В другом варианте реализации производное антитела представляет собой миниантитело, состоящее из областей одноцепочечных Fv, соединенных с областью C_H3 (т.е., scFv- C_H3).

[0099] Эти и другие пригодные фрагменты и производные антител в контексте настоящего изобретения обсуждаются далее в данной заявке. Также должно быть понятно,
30 что термин молекула на основе антитела, если не указано иначе, также включает подобные антителу полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохранившие способность специфично связываться с антигеном (связывающие эпитоп фрагменты или функциональный фрагмент), полученные с помощью любой известной методики, такой как ферментативное расщепление,
35 пептидный синтез и рекомбинантные методики. В некотором варианте реализации

формулировку «молекула на основе антитела» можно заменить на термин «антитело» или на выражение «антитело или его функциональный фрагмент».

[00100] Антитело, полученное в соответствии с данной заявкой, может быть любого изотипа. В данной заявке «изотип» относится к классу иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. При выборе изотипа обычно будут руководствоваться желательными эффекторными функциями, такими как индукция антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Примерами изотипов являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Особенно пригодные изотипы антител против MuSK, описанных в данной заявке, включают IgG1 и IgG2.

[00101] Можно использовать любую из константных областей легкой цепи человека - каппа или лямбда. При необходимости, класс антитела MuSK в соответствии с настоящим изобретением можно переключить с помощью известных способов. Например, класс антитела в соответствии с настоящим изобретением, который изначально был IgM, можно переключить на антитело IgG в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, методики переключения класса можно применять, чтобы превратить один подкласс IgG в другой, например, IgG1 в IgG2. Таким образом, эффекторную функцию антител в соответствии с настоящим изобретением можно изменить путем переключения изотипа, например, на антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM, для различных терапевтических применений.

[00102] В некотором варианте реализации молекулы на основе антител в соответствии с настоящим изобретением являются «гуманизированными», особенно, если они предназначены для применения для терапевтических целей. Термин «гуманизированное» относится к химерной молекуле, как правило, полученной с применением рекомбинантных методик, содержащей антигенсвязывающую область, происходящую из иммуноглобулина из не являющегося человеком вида, и остальную структуру иммуноглобулина на основе структуры и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающая область может содержать либо целые переменные домены из не являющегося человеческим антитела, слитые с константными доменами человека, либо только определяющие комплементарность области (CDR) таких переменных доменов, привитые на подходящие человеческие каркасные области переменных доменов человека. Каркасные остатки таких гуманизированных молекул могут быть дикого типа (например, полностью человеческими) или могут быть модифицированы, чтобы они содержали одну или более замен аминокислот, не присутствующих в антителе человека, последовательность которого служит основой для

гуманизирования. Гуманизирование снижает или устраняет вероятность того, что константная область молекулы будет действовать как иммуноген у людей, но возможность иммунного ответа на чужеродную вариабельную область остается (LoBuglio, A.F. et al. «Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224 (1989), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Другой подход сосредоточен не только на предоставлении происходящих из человека константных областей, но и на модификации вариабельных областей таким образом, чтобы придать им форму, как можно более сходную с их формой у человека. Вариабельные области обеих тяжелой и легкой цепей содержат три определяющие комплементарность области (CDR), которые изменяются в ответ на обсуждаемый антиген и определяют способность к связыванию. Указанные CDR фланкированы четырьмя каркасными областями (FR), которые относительно консервативны у данного вида и которые предположительно создают каркас для CDR. Когда получают не являющиеся человеческими антитела к конкретному антигену, вариабельным областям можно «придать новую форму» или «гуманизировать» их путем прививки CDR, полученных из не являющегося человеческим антитела, на FR, присутствующие в антителе человека, которое нужно модифицировать. Подходящие способы гуманизирования не являющегося человеческим антитела, описанного в данной заявке, известны в данной области техники, см., например, Sato, K. et al., *Cancer Res* 53:851-856 (1993); Riechmann, L. et al., «Reshaping Human Antibodies for Therapy,» *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen, M. et al., «Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,» *Science* 239:1534-1536 (1988); Kettleborough, C. A. et al., «Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,» *Protein Engineering* 4:773-3783 (1991); Maeda, H. et al., «Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,» *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134 (1991); Gorman, S. D. et al., «Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4181-4185 (1991); Tempest, P.R. et al., «Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection In Vivo,» *Bio/Technology* 9:266-271 (1991); Co, M. S. et al., «Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869-2873 (1991); Carter, P. et al., «Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289 (1992); и Co, M.S. et al., «Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen,» *J. Immunol.* 148:1149-1154 (1992), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации в гуманизированных антителах против MuSK в соответствии с

настоящим изобретением сохраняются все последовательности CDR (например, гуманизированное антитело, содержащее все шесть CDR из антитела ламы или мыши). В других вариантах реализации гуманизированные антитела против MuSK в соответствии с настоящим изобретением содержат один или более CDR (один, два, три, четыре, пять, 5 шесть), которые изменены по сравнению с исходным антителом. Способы гуманизирования антитела хорошо известны в данной области техники и подходят для гуманизирования антител, описанных в данной заявке (см., например, патент США № 5225539, выданный Winter; патенты США № 5530101 и 5585089, выданные Queen и Selick; патент США № 5859205, выданный Robert et al.; патент США № 6407213, 10 выданный Carter; и патент США № 6881557, выданный Foote, содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

[00103] В некоторых антителах только часть CDR, а именно, подгруппа остатков CDR, необходимых для связывания, которые называют «определяющими специфичность остатками» («SDR»), необходимы для сохранения связывания антитела. Остатки CDR, не 15 контактирующие с антигеном и не находящиеся среди SDR, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований по областям CDR по Кабату, находящимся снаружи гипервариабельных петель Чотиа (см., Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Национальные институты здравоохранения, публикация № 91-3242 (1992); Chothia, C. et al., «Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of 20 Immunoglobulins,» *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки), путем молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в Gonzales, N.R. et al., «SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity,» *Mol. Immunol.* 41:863-872 (2004), содержание которого настоящим 25 полностью включено в данную заявку посредством ссылки. В таких гуманизированных антителах, в положениях, в которых один или более донорных остатков CDR отсутствует или в которых весь донорный CDR опущен, аминокислотный остаток, занимающий указанное положение, может представлять собой аминокислотный остаток, занимающий соответствующее положение (при нумерации по Кабату) в акцепторной 30 последовательности антитела. Количество таких замен акцепторных на донорные аминокислоты в участках CDR, которые нужно включить, отражает равновесие факторов конкуренции. Такие замены потенциально предпочтительны для уменьшения количества не являющихся человеческими аминокислот в гуманизированном антителе и, следовательно, снижения потенциальной иммуногенности. Тем не менее, замены могут 35 также вызывать изменения аффинности, и значительного снижения аффинности

предпочтительно избегают. Замены могут также вызывать изменения активности. Такие замены, вызывающие значительного снижения активности, также предпочтительно избегают. В этом контексте, антитело или фрагмент антитела все еще должны проявлять детектируемую активность антитела, как описано выше в данной заявке, или активность антитела по меньшей мере в некоторой степени. Положения замен внутри CDR и аминокислоты для замены также можно выбрать опытным путем.

[00104] Технологию фагового дисплея, в качестве альтернативы, можно применять для повышения (или снижения) аффинности CDR молекул на основе антител в соответствии с настоящим изобретением. В этой технологии, называемой созревaniem аффинности, применяют мутагенез или «прогулку по CDR» и повторную селекцию, используя целевой антиген или его антигенный фрагмент, чтобы определить антитела, содержащие CDR, которые связываются с более высокой (или низкой) аффинностью с антигеном, по сравнению с исходным или родительским антителом (см., например, Glaser et al., «Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System,» *J. Immunology* 149:3903-3913 (1992), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Мутагенизация целых кодонов, а не отдельных нуклеотидов, приводит к полурандомизированному репертуару мутаций аминокислот. Можно сконструировать библиотеки, состоящие из пула вариантов клонов, каждый из которых отличается изменением одной аминокислоты в одном CDR от другого представителя такой библиотеки, и которые содержат варианты, потенциально представляющие каждую возможную замену аминокислоты в каждом остатке CDR. Можно осуществить скрининг мутантов с повышенной (или сниженной) аффинностью связывания с антигеном путем приведения в контакт иммобилизованных мутантов с меченым антигеном. Можно применять любой способ скрининга, известный в данной области техники, чтобы определить варианты связывающих молекул на основе антител с повышенной или сниженной аффинностью к антигену (например, ELISA) (см. Wu, H. et al., «Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6037-6042 (1998); Yelton et al., «Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis,» *J. Immunology* 155:1994 (1995), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Можно применять прогулку по CDR, которая рандомизирует легкую цепь (см., Schier, R. et al., «Isolation Of Picomolar Affinity Anti-c-erbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site,» *J. Mol. Biol.* 263:551-567 (1996), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки).

[00105] Способы созревания аффинности молекулы антитела MuSK описаны в данной заявке и раскрыты, например, в Krause, J.C. et al., «An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function of a Human Antibody,» *MBio.* 2(1): e00345-10 (2011); Kuan, C.T. et al., «Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas,» *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645 (2010); Hackel, B.J. et al., «Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes,» *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96 (2010); Montgomery, D.L. et al., «Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41,» *MAbs* 1(5):462-474 (2009); Gustchina, E. et al., «Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth,» *Virology* 393(1):112-119 (2009); Finlay, W.J. et al., «Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions,» *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558 (2009); Bostrom, J. et al., «Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development,» *Methods Mol. Biol.* 525:353-376 (2009); Steidl, S. et al., «In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification,» *Mol. Immunol.* 46(1):135-144 (2008); и Barderas, R. et al., «Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(26):9029-9034 (2008), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

[00106] В некотором аспекте настоящего изобретения, молекула на основе антитела против MuSK, описанная в данной заявке, содержит последовательность аминокислот любого одного, любых двух, любых трех, любых четырех, любых пяти или любых шести CDR, представленных в Таблицах 1 и 2 в данной заявке.

[00107] В одном аспекте, молекула на основе антитела, которая связывается со специфической для мышц тирозин-протеинкиназой (MuSK) человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит: (i) определяющую комплементарность область 1 (CDR-H1), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 1 - 16, 135, 136, 147 - 149, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 1 - 16, 135, 136, или 147 - 149, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 1 - 16, 135, 136 или 147 - 149; (ii) определяющую

комплементарность область 2 (CDR-H2), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 17 - 32, 137, 138, 150 - 155, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 17 - 32, 137, 138 или 150 - 155, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 17 - 32, 137, 138 или 150 - 155; и (iii) определяющую комплементарность область 3 (CDR-H3), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 33 - 48, 139, 140, 156 - 158, 240 - 251, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 33 - 48, 139, 140, 156 - 158, или 240 - 251, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 33 - 48, 139, 140, 156 - 158 или 240 - 251.

[00108] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела, которая связывается со специфической для мышц тирозин-протеинкиназой (MuSK) человека содержит: (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 17 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 33; (ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 34; (iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 3, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 19 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 35; (iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 20 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 36; (v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 21 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 37; (vi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 6, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 38; (vii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 7, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 23 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 39; (viii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 8, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 24 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 40; (ix) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 9, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 25 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 41; (x) вариабельную область тяжелой цепи,

содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 10, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 26 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 42; (xi) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 11, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 27 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 43; (xii) 5 переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 12, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 28 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 44; (xiii) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 13, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 29 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 45; (xiv) переменную область тяжелой цепи, 10 содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 14, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 30 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 46; (xv) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 15, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 31 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 47; (xvi) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 16, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 32 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 48; (xvii) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 139; и (xviii) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 136, CDR-H2 20 последовательности SEQ ID NO: 138 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 140. Последовательности CDR тяжелой цепи представлены ниже в Таблице 1.

[00109] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела, которая связывается со специфической для мышц тирозин-протеинкиназой (MuSK) человека, содержит: (ii.a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 25 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 240 (X2m1); (ii.b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 241 (X2m2); (ii.c) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 30 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 242 (X2m3); (ii.d) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 243 (X2m4); (ii.e) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 35 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-

НЗ последовательности SEQ ID NO: 244 (X2m5); (ii.f) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 245 (X2m6); (ii.g) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 246 (X2m7); (ii.h) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 247 (X2m8).

[00110] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела, которая связывается со специфической для мышц тирозин-протеинкиназой (MuSK) человека, содержит: (xvii.a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 248 (X17m1); (xvii.b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 249 (X17m2); (xvii.c) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 250 (X17m3); (xvii.d) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 251 (X17m6).

[00111] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела, которая связывается со специфической для мышц тирозин-протеинкиназой (MuSK) человека, содержит переменную область тяжелой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит: (xix) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156; (xx) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 148, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 151 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 157; (xxi) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 149, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 152 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 158;

[00112] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела, которая связывается со специфической для мышц тирозин-протеинкиназой (MuSK) человека, содержит переменную область тяжелой цепи, причем переменная область тяжелой

цепи содержит (xxii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156 (3B2g1m1/3B2g2m1); (xxiii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 154 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156 (3B2g1m2/3B2g2m2); (xxiv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 155 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156 (3B2g1m4/3B2g2m4). Последовательности CDR тяжелой цепи представлены в Таблице 1 ниже.

10 **[00113]** В некотором варианте реализации молекула на основе антитела, которая связывается со специфической для мышц тирозин-протеинкиназой (MuSK) человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 или CDR-H2 последовательности аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичной последовательности SEQ ID NO: 153, и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156 (3B2g2m1). В соответствии с этим вариантом реализации, CDR-H2 последовательности аминокислот, по меньшей мере на 80% идентичной последовательности SEQ ID NO: 153, содержит одну или более замен аминокислот по сравнению с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 153, причем 15 указанные замены присутствуют в остатках 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, или в любой их комбинации. В некотором варианте реализации последовательность аминокислот CDR-H2 по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по 25 меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 153. В некотором варианте реализации CDR-H2 антитела содержит пролин (P) в положении 3, триптофан (W) в положении 4 и серин (S) или аспарагин (N) в положении 5.

30 **[00114]** В некотором варианте реализации молекула на основе антитела, которая связывается со специфической для мышц тирозин-протеинкиназой (MuSK) человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156.

35 **[00115]** Последовательности CDR тяжелой цепи представлены в Таблице 1 ниже.

Таблица 1. Последовательности CDR тяжелой цепи антител против MuSK.

Название MAT/Fab	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
X1	SSSIH	1	SISSSSGSTSYADSVKG	17	KYWSQYYWAHYYGGLDY	33
X2	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYMGMDY	34
X2m1	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYFGFDY	240
X2m2	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYFGLDY	241
X2m3	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYSGFDY	242
X2m4	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYSGLDY	243
X2m5	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYFGMDY	244
X2m6	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYSGMDY	245
X2m7	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYMGFDY	246
X2m8	SSSIH	2	SISSSYGSTSYADSVKG	18	SEGDYVSGYMGLDY	247
X3	SSSIH	3	SISSSSGYTTYADSVKG	19	SWYEMWMSGYFGFDY	35
X4	SSSIH	4	SISSSSGSTYYADSVKG	20	GEHDYYVFGYLGMDY	36
X5	SSSIH	5	SISSSSGSTSYADSVKG	21	SYTMFYYGGWYGSYFGMDY	37
X6	SSSIH	6	SISSSYGYTTYADSVKG	22	TYGSYYVSSYTGM DY	38
X7	SSSIH	7	SISSYSSTYYADSVKG	23	LAGLYHYPGYLG LDY	39
X8	SSSIH	8	SISSSSGSTSYADSVKG	24	SWSYHPWYYHV GWYTGLDY	40
X9	SSSIH	9	SIYSSSGSTYYADSVKG	25	SGGEFYTSYYGMDY	41
X10	SSSIH	10	SISSYSSTSYADSVKG	26	KYYRWRHNKYQGFDY	42
X11	SSSIH	11	SISSYSGSTYYADSVKG	27	SWGSYVSGFVGFDY	43
X12	SSSIH	12	YISPSSGYTSYADSVKG	28	QYWVPQWWITQYFGMDY	44
X13	SSSIH	13	SISSSSGSTSYADSVKG	29	SSEHWYTIGYYGIDY	45
X14	SSSIH	14	SISSSSGYTTYADSVKG	30	GSHHWFLWIYSGLDY	46
X15	SSSIH	15	SISSSYGSTSYADSVKG	31	SEGDYVSGYMGMDY	47
X16	SSSIH	16	SIYSSYGYTSYADSVKG	32	NWGYMYWGWYYALDY	48
X17	YSSIH	135	SIYSSSGSTYYADSVKG	137	GDHGYYVFGYLGMDY	139
X17m1	YSSIH	135	SIYSSSGSTYYADSVKG	137	GDHGYYVSGYLGMDY	248
X17m2	YSSIH	135	SIYSSSGSTYYADSVKG	137	GDHGYYVGYLGMDY	249
X17m3	YSSIH	135	SIYSSSGSTYYADSVKG	137	GDHGYYVSGYLGFDY	250
X17m6	YSSIH	135	SIYSSSGSTYYADSVKG	137	GEHGYYVSGYLGFDY	251
X18	SSSIH	136	SISSSSGYTSYADSVKG	138	KYSKRAYPDYYWRGLDY	140
14D10	DYGMS	147	AIPWNGGSTYYKESVKG	150	RSGRIAFGALDA	156
7G4	DYGMS	147	AIPWNGGSTYYKESVKG	150	RSGRIAFGALDA	156
3C4	DYGMS	147	AIPWNGGSTYYKESVKG	150	RSGRIAFGALDA	156
3B2	DYGMS	147	AIPWNGGSTYYKESVKG	150	RSGRIAFGALDA	156

Название MAT/Fab	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
3G3	DYGMS	147	AIPWNGGSTYYKESVKG	150	RSGRIAFGALDA	156
31G2	DYGMS	147	AIPWNGGSTYYKESVKG	150	RSGRIAFGALDA	156
31B7	DYGMS	147	AIPWNGGSTYYKESVKG	150	RSGRIAFGALDA	156
17H10	ARYYSWS	148	VIAYDGSTYYSPSLKS	151	GSSRVAAAFDS	157
23B6	ARYYSWS	148	VIAYDGSTYYSPSLKS	151	GSSRVAAAFDS	157
30E1	ARYYSWS	148	VIAYDGSTYYSPSLKS	151	GSSRVAAAFDS	157
30A11	ARYYSWS	148	VIAYDGSTYYSPSLKS	151	GSSRVAAAFDS	157
16F11	LYYMN	149	VIDTHSIAYYADSVKVG	152	GRTALVR	158
4C11	LYYMN	149	VIDTHSIAYYADSVKVG	152	GRTALVR	158
7A12	LYYMN	149	VIDTHSIAYYADSVKVG	152	GRTALVR	158
7G12	LYYMN	149	VIDTHSIAYYADSVKVG	152	GRTALVR	158
7B8	LYYMN	149	VIDTHSIAYYADSVKVG	152	GRTALVR	158
3B2g1m1	DYGMS	147	AIPWSGGSTYYKESVKG	153	RSGRIAFGALDA	156
3B2g1m2	DYGMS	147	AIPGSGGSTYYKESVKG	154	RSGRIAFGALDA	156
3B2g1m4	DYGMS	147	AIPWQGGSTYYKESVKG	155	RSGRIAFGALDA	156
3B2g2m1	DYGMS	147	AIPWSGGSTYYKESVKG	153	RSGRIAFGALDA	156
3B2g2m2	DYGMS	147	AIPGSGGSTYYKESVKG	154	RSGRIAFGALDA	156
3B2g2m4	DYGMS	147	AIPWQGGSTYYKESVKG	155	RSGRIAFGALDA	156

[00116] В некоторых вариантах реализации молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи. Вариабельная область легкой цепи содержит (i) определяющую комплементарность область 1 (CDR-L1), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 49 - 64, 141, 142, 159 - 169, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 49 - 64, 141, 142 или 159 - 169, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 49 - 64, 141, 142 или 159 - 169;

(ii) определяющую комплементарность область 2 (CDR-L2), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 65 - 80, 143, 144, 170 - 179, или модифицированную последовательность аминокислот любой из

последовательностей SEQ ID NO: 65 - 80, 143, 144 или 170 - 179, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 65 - 80, 143, 144 или 170 - 179; и (iii) определяющую комплементарность область 3 (CDR-L3), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 81 - 96, 145, 146, 180 - 195, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 81 - 96, 145, 146 или 180 - 195, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 81 - 96, 145, 146 или 180 - 195.

- 10 **[00117]** В некотором варианте реализации переменная область легкой цепи молекулы на основе антитела против MuSK, описанной в данной заявке, содержит (i) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 49, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 65 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 81; (ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82; (iii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 51, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 83; (iv) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 52, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 68 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 84; (v) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 53, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 69 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 85; (vi) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 54, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 70 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 86; (vii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 55, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 71 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 87; (viii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 56, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 72 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 88; (ix) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 57, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 73 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 89; (x) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 58, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 74 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 90; (xi) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 59, CDR-L2 последовательности

SEQ ID NO: 75 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 91; (xii) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 60, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 76 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 92; (xiii) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 61, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 77 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 93; (xiv) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 62, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 78 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 94; (xv) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 63, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 79 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 95; (xvi) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 64, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 80 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 96; (xvii) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 141, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 143 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 145; (xviii) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 142, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 144 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 146. Последовательности CDR легкой цепи представлены в Таблице 2 ниже.

[00118] В некотором варианте реализации варибельная область легкой цепи молекулы на основе антитела против MuSK, описанной в данной заявке, содержит (xix) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 170 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 180; (xx) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 171 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 181; (xxi) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 160, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 182; (xxii) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183; (xxiii) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 171 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 184; (xxiv) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 173 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 185; (xxv) варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности

SEQ ID NO: 173 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 186; (xxvi) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 161, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 174 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 187; (xxvii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 162, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 174 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 188; (xxviii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 163, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 174 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 188; (xxix) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 164, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 174 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 189; (xxx) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 165, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 175 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 190; (xxxi) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 166, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 176 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 191; (xxxii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 167, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 177 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 192; (xxxiii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 168, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 178 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 193; (xxxiiii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 169, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 179 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 194.

[00119] В некотором варианте реализации переменная область легкой цепи молекулы на основе антитела против MuSK, описанной в данной заявке, содержит CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195 или CDR-L3, последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 195. В соответствии с этим вариантом реализации, последовательность аминокислот CDR-L3, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 195, содержит одну или более замен аминокислот по сравнению с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 195, причем указанная замена присутствует в остатке 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, или любой их комбинации. В некотором варианте реализации последовательность аминокислот CDR-L3 по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, 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% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 195.

[00120] Последовательности CDR легкой цепи представлены в Таблице 2 ниже.

Таблица 2. Последовательности CDR легкой цепи антител против MuSK.

Название MAT/Fab	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
X1	RASQSVSSAVA	49	SASSLYS	65	QQSSSSLIT	81
X2	RASQSVSSAVA	50	SASSLYS	66	QQSGVWLIT	82
X3	RASQSVSSAVA	51	SASSLYS	67	QQSSSSLIT	83
X4	RASQSVSSAVA	52	SASSLYS	68	QQSYKPGALIT	84
X5	RASQSVSSAVA	53	SASSLYS	69	QQSSSSLIT	85
X6	RASQSVSSAVA	54	SASSLYS	70	QQSSSSLIT	86
X7	RASQSVSSAVA	55	SASSLYS	71	QQSSRSSLIT	87
X8	RASQSVSSAVA	56	SASSLYS	72	QQSSSSLIT	88
X9	RASQSVSSAVA	57	SASSLYS	73	QQSSSSLIT	89
X10	RASQSVSSAVA	58	SASSLYS	74	QQSLWYPVT	90
X11	RASQSVSSAVA	59	SASSLYS	75	QQNSYYLIT	91
X12	RASQSVSSAVA	60	SASSLYS	76	QQSSSSLIT	92
X13	RASQSVSSAVA	61	SASSLYS	77	QQSYGSFSLIT	93
X14	RASQSVSSAVA	62	SASSLYS	78	QQGSYHLIT	94
X15	RASQSVSSAVA	63	SASSLYS	79	QQSGVWLIT	95
X16	RASQSVSSAVA	64	SASSLYS	80	QQWSSAQALIT	96
X17	RASQSVSSAVA	141	SASSLYS	143	QQSYKPGALIT	145
X18	RASQSVSSAVA	142	SASSLYS	144	QQSYWWPIT	146
14D10	GLSSGSVTSSNYPD	159	TTNSRHS	170	ALYMGGSNVYV	180
7G4	GLSSGSVTSSNYPD	159	STNSRHS	171	ALYMGRGSNKDYV	181
3C4	GLSSGSVTASNYPD	160	STDSRHS	172	ALYMYSDSKLYV	182
3B2	GLSSGSVTSSNYPD	159	STDSRHS	172	GLYMYSGSKNYV	183
3G3	GLSSGSVTSSNYPD	159	STNSRHS	171	ALYMGSDIRNYV	184
31G2	GLSSGSVTSSNYPD	159	STNSRHS	173	ALYMGSGSRNYV	185
31B7	GLSSGSVTSSNYPD	159	STNSRHS	173	ALYMGSESRNYV	186
17H10	GGNRIGGKSVQ	161	ADSRPS	174	HVWGSTASAD	187
23B6	GGDNIGSKNAQ	162	ADSRPS	174	HVWDSSTNAW	188
30E1	GGDNIGSKNTQ	163	ADSRPS	174	HVWDSSTNAW	188
30A11	GGDNIASKNVQ	164	ADSRPS	174	QVWDSSTNVAV	189
16F11	KSSQSVVFGSNQKSYLN	165	YASTQES	175	QQAYSAPT	190
4C11	RSSQSVLYSSNQNLYLN	166	WASARES	176	QQSYKPPYG	191
7A12	ESSQSVLYNQKNYLN	167	WASTRQS	177	QQAYNAPLT	192
7G12	KSSQRVQLGSNQKSYLN	168	YASTQQS	178	QQGYSAFFT	193

Название MAT/Fab	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность	SEQ ID NO:
7B8	KSSQSVLYNQKNYLA	169	WASTRES	179	QQGYSVPYT	194
3B2g1m1	GLSSGSVTSSNYPD	159	STDSRHS	172	GLYMYSGSKNYV	183
3B2g1m2	GLSSGSVTSSNYPD	159	STDSRHS	172	GLYMYSGSKNYV	183
3B2g1m4	GLSSGSVTSSNYPD	159	STDSRHS	172	GLYMYSGSKNYV	183
3B2g2m1	GLSSGSVTSSNYPD	159	STDSRHS	172	GLYSYSGSKNYV	195
3B2g2m2	GLSSGSVTSSNYPD	159	STDSRHS	172	GLYSYSGSKNYV	195
3B2g2m4	GLSSGSVTSSNYPD	159	STDSRHS	172	GLYSYSGSKNYV	195

[00121] Подходящие модификации аминокислот в последовательностях CDR тяжелой цепи и/или в последовательностях CDR легкой цепи молекулы на основе антитела против MuSK, описанной в данной заявке, включают, например, консервативные замены или замены на функционально эквивалентный остаток аминокислоты, которые приводят к получению вариантов последовательностей CDR, обладающих сходными или улучшенными свойствами связывания по сравнению с таковыми у последовательностей CDR, описанных в данной заявке, как описано выше. В объем настоящего изобретения входят CDR из Таблиц 1 и 2, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или более замен аминокислот (в зависимости от длины CDR), которые сохраняют или повышают связывание антитела с MuSK. Полученные в результате этого модифицированные CDR по меньшей мере на 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% сходны по последовательности с CDR из Таблицы 1 и 2. Подходящие модификации аминокислот в последовательностях CDR тяжелой цепи из Таблицы 1 и/или в последовательностях CDR легкой цепи из Таблиц 1 и 2 включают, например, консервативные замены или замены на функционально эквивалентный остаток аминокислоты, которые приводят к получению вариантов последовательностей CDR, обладающих сходными или улучшенными свойствами связывания по сравнению с таковыми у последовательностей CDR из Таблицы 1 и Таблицы 2. Консервативные замены представляют собой такие замены, которые происходят в пределах семейства аминокислот с родственными боковыми цепями. Кодированные генетическим кодом аминокислоты можно подразделить на четыре семейства: (1) кислые (аспартат, глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин); (3) неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); и (4) незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин). Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда совокупно классифицируют как ароматические

аминокислоты. В качестве альтернативы, репертуар аминокислот можно сгруппировать как (1) кислые (аспартат, глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин), (3) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), причем серин и треонин необязательно группируют отдельно как алифатические гидроксильные; (4) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); (5) амидные (аспарагин, глутамин); и (6) серосодержащие (цистеин и метионин) (Stryer (ed.), Biochemistry, 2nd ed, WH Freeman и Co., 1981, содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Неконсервативные замены также можно внести в последовательности CDR тяжелой цепи из Таблицы 1 и последовательности CDR легкой цепи из Таблицы 2. Неконсервативные замены включают замены одного или более аминокислотных остатков CDR на один или более аминокислотных остатков из отличного класса аминокислот, чтобы улучшить или повысить свойства связывания CDR. Последовательности аминокислот CDR варибельной области тяжелой цепи из Таблицы 1 и/или CDR варибельной области легкой цепи из Таблицы 2 могут дополнительно содержать одну или более внутренних вставок или делеций нейтральных аминокислот, которые сохраняют или повышают связывание MuSK.

[00122] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK содержит:

(i) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 17 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 33, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 49, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 65 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 81;

(ii) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 34, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82;

(iii) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 3, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 19 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 35, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 51, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 83;

(iv) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 20 и CDR-

НЗ последовательности SEQ ID NO: 43, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 59, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 75 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 91;

5 (xii) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 12, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 28 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 44, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 60, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 76 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 92;

10 (xiii) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 13, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 29 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 45, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 61, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 77 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 93;

15 (xiv) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 14, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 30 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 46, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 62, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 78 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 94;

20 (xv) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 15, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 31 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 47, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 63, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 79 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 95;

25 (xvi) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 16, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 32 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 48, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 64, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 80 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 96;

30 (xvii) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 139, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 141, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 143 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 145; и

35 (xviii) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 136, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 138 и

CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 140, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 142, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 144 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 146.

[00123] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK содержит:

(ii.a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 240, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82 (X2m1);

(ii.b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 241, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82 (X2m2);

(ii.c) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 242, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82 (X2m3);

(ii.d) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 243, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82 (X2m4);

(ii.e) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 244, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82 (X2m5);

(ii.f) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 245, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82 (X2m6);

(ii.g) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 246, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82 (X2m7);

(ii.f) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 247, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82 (X2m8).

[00124] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK содержит:

(xvii.a) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 248, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 141, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 143 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 145 (X17m1);

(xvii.b) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 249, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 141, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 143 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 145 (X17m2);

(xvii.c) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 250, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 141, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 143 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 145 (X17m3);

(xvii.d) варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 251, и варибельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 141, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 143 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 145 (X17m6).

[00125] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK содержит:

(xxii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 155 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195 (3B2g2m4).

[00126] В предпочтительном варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195 (3B2g2m1).

[00127] Молекула на основе антитела против MuSK, описанная в данной заявке, может содержать вариабельную область легкой (VL) цепи, вариабельную область тяжелой (VH) цепи, или комбинацию VL и VH цепей. В некоторых вариантах реализации VH цепь молекулы на основе антитела против MuSK содержит любую из последовательностей аминокислот VH, представленных ниже в Таблице 3, или последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% идентична любой из последовательностей аминокислот VH, перечисленных в Таблице 3. В некоторых вариантах реализации VL цепи молекулы на основе антитела против MuSK содержит любую из последовательностей аминокислот VL, представленных ниже в Таблице 3, или последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% идентична любой из последовательностей аминокислот VL, перечисленных в Таблице 3.

Таблица 3. Последовательности вариабельных областей тяжелой (VH) и вариабельных областей легкой (VL) цепей антитела против MuSK.

Название MAT/Fab	Область	Последовательность	SEQ ID NO:
X1	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSSIHWRQAPGKG LEWVASISSSSGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARKYWSQYYWAHYYGGLDYWGQGTLVTVSS	97
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSSSSLITFGQGQTKVEIK	98
X2	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDYVSGYMGMDYWGQGTLVTVSS	99

Название MAT/Fab	Облас ть	Последовательность	SEQ ID NO:
X2m1	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYFGFDYWGQGTLVTVSS	252
X2m2	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYFGLDYWGQGTLVTVSS	253
X2m3	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYSGFDYWGQGTLVTVSS	254
X2m4	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYSGLDYWGQGTLVTVSS	255
X2m5	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYFGMDYWGQGTLVTVSS	256
X2m6	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYSGMDYWGQGTLVTVSS	257
X2m7	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYMGFDYWGQGTLVTVSS	258
X2m8	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYMGLDYWGQGTLVTVSS	259
X2	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSGVWLITFGQGTKVEIK	100
X3	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSSGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSWYEMWMSGYFGFDYWGQGTLVTVSS	101
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSSSSSLITFGQGTKVEIK	102
X4	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARGEHDYYVFGYLGMDYWGQGTLVTVSS	103
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYKPGALITFGQGTKVEIK	104
X5	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFYSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSSGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSYTMFYGGWYGSYFGMDYWGQGTLVTVSS	105
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSSSSSLITFGQGTKVEIK	106
X6	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSYSGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARTYGSYYVSSYTGMMDYWGQGTLVTVSS	107
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSSSSSLITFGQGTKVEIK	108

Название MAT/Fab	Облас ть	Последовательность	SEQ ID NO:
X7	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLYSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYSSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARLAGLYHYPGYLGLDYWGQGTLVTVSS	109
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSSRSSLLTFGQGTKVEIK	110
X8	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSSGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSWSYHPWYYHVGWYTGLDYWGQGTLVTVSS	111
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSSSSSLITFGQGTKVEIK	112
X9	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSIHWVRQAPGKG LEWVASIYSSSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSGGEFYITSYYGMDYWGQGTLVTVSS	113
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSSSSSLITFGQGTKVEIK	114
X10	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYSSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARKYYRWRHNKYQGFDYWGQGTLVTVSS	115
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSLWYPVTFGQGTKVEIK	116
X11	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSYSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSWGSYVSGFVGFYWGQGTLVTVSS	117
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQNSYYLITFGQGTKVEIK	118
X12	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSIHWVRQAPGKG LEWVAYISPSSGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARQYWVPQWWITQYFGMDYWGQGTLVTVSS	119
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSSSSSLITFGQGTKVEIK	120
X13	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSSGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEHWTIGYYGIDYWGQGTLVTVSS	121
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYGSFSLITFGQGTKVEIK	122
X14	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSSGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARGSHHWFLWIYSGLDYWGQGTLVTVSS	123
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQGSYHLITFGQGTKVEIK	124
X15	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSYGSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARSEGDRYVSGYMGMDYWGQGTLVTVSS	125

Название MAT/Fab	Облас ть	Последовательность	SEQ ID NO:
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSGVWLITFGQGTKVEIK	126
X16	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSIHWVRQAPGKG LEWVASIYSSYGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARNWGYMYWGWYALDYWGQGTLVTVSS	127
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQWSSAQALITFGQGTKVEIK	128
X17	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISYSSSIHWVRQAPGKG LEWVASIYSSSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARGDHGYVFGYLGMDYWGQGTLVTVSS	131
X17m1	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISYSSSIHWVRQAPGKG LEWVASIYSSSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARGDHGYVSGYLGMDYWGQGTLVTVSS	260
X17m2	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISYSSSIHWVRQAPGKG LEWVASIYSSSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARGDHGYVYVGYLGMDYWGQGTLVTVSS	261
X17m3	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISYSSSIHWVRQAPGKG LEWVASIYSSSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARGDHGYVSGYLGFDYWGQGTLVTVSS	262
X17m6	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISYSSSIHWVRQAPGKG LEWVASIYSSSGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARGEHGYYVSGYLGFDYWGQGTLVTVSS	263
X17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYKPGALITFGQGTKVEIK	132
X18	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSSIHWVRQAPGKG LEWVASISSSSGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARKYSKRAYPDYYWRGLDYWGQGTLVTVSS	133
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYWWPITFGQGTKVEIK	134
14D10	VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWNGGSTYYKESVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKS EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGTLVTVSS	196
	VL	QAVVTQEPSSLVSPGGTVTLTCLSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRTLIIYTTNSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADY YCALYMGGGSNVYVFGGGTKLTVL	197
7G4	VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWNGGSTYYKESVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKS EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGTLVTVSS	198
	VL	QAVVTQEPSSLVSPGGTVTLTCLSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRALIYSTNSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADY YCALYMGRGSNKDYVFGGGTKLTVL	199
3C4	VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWNGGSTYYKESVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKS EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGTLVTVSS	200
	VL	QAVVTQEPSSLVSPGGTVTLTCLSGSVTASNYPDWYQQTPGQ APRGLIYSTDSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADY YCALYMSDSKLYVFGGGTKLTVL	201

Название MAT/Fab	Облас ть	Последовательность	SEQ ID NO:
3B2	VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWNGGSTYYKESVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKS EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGT LVT VSS	202
	VL	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRGLIYSTDSRHSGVPSRFSGSISGNKAALTITGAQSEDEADY YCGLYMYSGSKNYVFGGGTKLTVL	203
3G3	VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWNGGSTYYKESVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKS EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGT LVT VSS	204
	VL	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRALIYSTNSRHSGVPSRFSGSTSGNKAALTITGAQPEDEADY YCALYMGSDIRNYVFGGGTKLTVL	205
31G2	VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWNGGSTYYKESVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKS EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGT LVT VSS	206
	VL	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRALIYSTNSRLSGVPSRFSGSFSGNKAALTITGAQPEDEADY YCALYMGSGSRNYVFGGGTKLTVL	207
31B7	VH	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWNGGSTYYKESVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKS EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGT LVT VSS	208
	VL	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRALIYSTNSRLSGVPSRFSGSFSGNKAALTITGAQPEDEADY YCALYMGSESRNYVFGGGTKLTVL	209
17H10	VH	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITARYYSWSWIRQPPG KGLEWMGVIAYDGSTYYPSLKSRTSISRDTSKNQFSLHLSSVT PDDTAVYYCARGSSRVAAAFDSWGQGTQVTVSS	210
	VL	SYELTQSPSVSVALRQTAKITCGGNRIGGKSVQWYQQKPGQAPM LVIYADSRRPSGIPERFTGSNSGNTATLTITGAQAEDEADYYCH VWGSTASADFGGGTHLTVL	211
23B6	VH	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITARYYSWSWIRQPPG KGLEWMGVIAYDGSTYYPSLKSRTSISRDTSKNQFSLHLSSVT PDDTAVYYCARGSSRVAAAFDSWGQGTQVTVSS	212
	VL	SYELTQSPSVSVALRQTAKITCGGDNIGSKNAQWYQQKPGQAPV MVLADSRRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGAQAEDEADYYCH VWDSSTNAWFGGGTHLTVL	213
30E1	VH	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITARYYSWSWIRQPPG KGLEWMGVIAYDGSTYYPSLKSRTSISRDTSKNQFSLHLSSVT PDDTAVYYCARGSSRVAAAFDSWGQGTQVTVSS	214
	VL	SYELTQSPSVSVALRRTAKITCGGDNIGSKNTQWYQQKPGQAPV LVIYADSRRPSGIPERFSGNSGNTATLTISGAQAEDEADYYCH VWDSSTNAWFGGGTHLTVL	215
30A11	VH	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITARYYSWSWIRQPPG KGLEWMGVIAYDGSTYYPSLKSRTSISRDTSKNQFSLHLSSVT PDDTAVYYCARGSSRVAAAFDSWGQGTQVTVSS	216
	VL	SYELTQSPSVTVALRQTAKITCGGDNIAASKNVQWYQQKPGQAPS LVIWADSRRPSGIPVRFSGSNFGNTATLTISGAQAEDEADYYCQ VWDSSTNVAVFGGGTHLTVL	217
16F11	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCVASGFTFSLYYMNWVRQAPGKG LEWLSVIDTHSIAYYADSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLNNLKPE DTALYYCVLGR TALVRWGQGTQVTVSS	218

Название MAT/Fab	Облас ть	Последовательность	SEQ ID NO:
	VL	DIVMTQSPSSVTASVGEKVTINCKSSQSVVFGSNQKSYLNWYQQ RPGQSPRLLIYYASTQESGIPDRFSGSGSTTDFTLTISSVQPED AAVYYCQQAYSAPTFGSGTRLEIK	219
4C11	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCVASGFTFSLYYMNWVRQAPGKG LEWLSVIDTHSIAYYADSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLNNLKPE DTALYYCVLGRTALVRWGQGTQVTVSS	220
	VL	DIVMTQSPSSVTASAGERVTINCRSSQSVLYSSNQKNYLNWYQQ RLGQSPRLLIYWASARESGVPDRFSGSGSTTNFTLTISSFQPED AAVYYCQQSYKPPYGFSGTRLEIK	221
7A12	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCVASGFTFSLYYMNWVRQAPGKG LEWLSVIDTHSIAYYADSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLNNLKPE DTALYYCVLGRTALVRWGQGTQVTVSS	222
	VL	EIVLTQSPSSVTASIGEKVTINCESSQSVLYNQKNYLNWYQQRP GQSPRLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSGSTTDFTLTISSFQPED VAVYYCQQAYNAPLTFGPGTKVELK	223
7G12	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCVASGFTFSLYYMNWVRQAPGKG LEWLSVIDTHSIAYYADSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLNNLKPE DTALYYCVLGRTALVRWGQGTQVTVSS	224
	VL	EIVLTQSPNSVTASVGEKVTINCKSSQRVQLGSNQKSYLNWYQQ RPGQSPRLLIYYASTQQSGIPDRFSGSGSATDFTLTINSVQPED AAVYYCQQGYSAPFTFGQGTKVELK	225
7B8	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCVASGFTFSLYYMNWVRQAPGKG LEWLSVIDTHSIAYYADSVKGRFTISRDNVKNTLYLQLNNLKPE DTALYYCVLGRTALVRWGQGTQVTVSS	226
	VL	EIVLTQSPSSVTASAGEKVTINCKSSQSVLYNQKNYLAWYQQRP GQSPRLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSTTDFTLTISSFQPEDVA VYYCQQGYSVPYTFGSGTRLEIK	227
3B2g1m1	VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWSGGSTYYKESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGT LVTVSS	228
	VL	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRTLIIYSTDSRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YCGLYMYSGSKNYVFGGGTKLTVL	229
3B2g1m2	VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPGSGGSTYYKESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGT LVTVSS	230
	VL	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRTLIIYSTDSRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YCGLYMYSGSKNYVFGGGTKLTVL	231
3B2g1m4	VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWQGGSTYYKESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGT LVTVSS	232
	VL	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRTLIIYSTDSRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YCGLYMYSGSKNYVFGGGTKLTVL	233
3B2g2m1	VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWSGGSTYYKESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRSGRIAFGALDAWGQGT LVTVSS	234
	VL	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRTLIIYSTDSRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YCGLYSYSGSKNYVFGGGTKLTVL	235

Название MAT/Fab	Область	Последовательность	SEQ ID NO:
3B2g2m2	VH	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPGSGGSTYYKESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRSGR IAFGALDAWGQGT LVTVSS	236
	VL	QTVVTQEP SFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRTL IYSTDSRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YCGLYSYSGSKNYVFGGGTKLTVL	237
3B2g2m4	VH	EVQLLES GGGVLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYGMSWVRQAPGKG LEWVSAIPWQGGSTYYKESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRSGR IAFGALDAWGQGT LVTVSS	238
	VL	QTVVTQEP SFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSSNYPDWYQQTPGQ APRTL IYSTDSRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YCGLYSYSGSKNYVFGGGTKLTVL	239

[00128] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK, описанная в данной заявке, содержит: (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 97, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 98; (ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 99 и 252 - 259, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 100; (iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 101, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 102; (iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 103, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 104; (v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 105, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 106; (vi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 107, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80%

[illegible]

содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 126; (xvi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 127, и вариабельную область легкой цепи,

5 содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 128; (xvii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 131 и 260 - 263, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей

10 мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 132; и (xviii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 133, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 134.

15 **[00129]** В некоторых вариантах реализации молекула на основе антитела против MuSK, описанная в данной заявке, содержит: (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 196, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80%

20 идентична последовательности SEQ ID NO: 197; (ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 198, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 199; (iii) вариабельную область тяжелой цепи,

25 содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 200, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 201; (iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80%

30 идентична последовательности SEQ ID NO: 202, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 203; (v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 204, и вариабельную область легкой цепи,

35 содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80%

[illegible]

[illegible]

[00130] В другом аспекте настоящего изобретения предложены изолированные полинуклеотиды, кодирующие молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке. В одном варианте реализации полинуклеотид, кодирующий антитело MuSK в соответствии с настоящим изобретением, содержит последовательность, кодирующую любой один, любые два, любые три, любые четыре, любые пять или любые шесть CDR, описанных выше, включая CDR тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 1 - 48, 135 - 140, 147 - 158, 240 - 251 и CDR легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 49 - 96, 141 - 146 и 159 - 195.

[00131] В некотором варианте реализации указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую домен V_H , где указанный домен V_H содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 17 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 33; (ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 34; (iii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 3, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 19 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 35; (iv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 20 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 36; (v) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 21 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 37; (vi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 6, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 38; (vii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 7, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 23 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 39; (viii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 8, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 24 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 40; (ix) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 9, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 25 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 41; (x) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 10, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 26 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 42; (xi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 11, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 27 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 43; (xii)

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 12, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 28 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 44; (xiii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 13, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 29 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 45; (xiv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 14, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 30 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 46; (xv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 15, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 31 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 47; (xvi) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 16, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 32 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 48; (xvii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 139; и (xviii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 136, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 138 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 140.

[00132] В некоторых вариантах реализации указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую домен V_H, где указанный домен V_H содержит (ii.a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 240 (X2m1); (ii.b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 241 (X2m2); (ii.c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 242 (X2m3); (ii.d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 243 (X2m4); (ii.e) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 244 (X2m5); (ii.f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 245 (X2m6); (ii.g) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-

НЗ последовательности SEQ ID NO: 246 (X2m7); (ii.h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 247 (X2m8).

5 **[00133]** В некоторых вариантах реализации указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую домен V_H , где указанный домен V_H содержит (xvii.a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 248 (X17m1); (xvii.b) вариабельную область
10 тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 249 (X17m2); (xvii.c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 250 (X17m3); (xvii.d) вариабельную область
15 тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 251 (X17m6).

[00134] В некотором варианте реализации указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую домен V_H , где указанный домен V_H
20 содержит: (xix) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156; (xx) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 148, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 151 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 157; (xxi) вариабельную
25 область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 149, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 152 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 158.

[00135] В некотором варианте реализации указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую домен V_H , где указанный домен V_H содержит: (xxii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1
30 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156; (xxiii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 154 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156; (xxiv) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-
35 H2 последовательности SEQ ID NO: 155 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156.

[00136] В некотором варианте реализации указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую домен V_H , где указанный домен V_H содержит (i) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 49, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 65 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 81; (ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82; (iii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 51, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 83; (iv) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 52, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 68 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 84; (v) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 53, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 69 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 85; (vi) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 54, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 70 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 86; (vii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 55, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 71 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 87; (viii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 56, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 72 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 88; (ix) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 57, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 73 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 89; (x) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 58, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 74 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 90; (xi) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 59, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 75 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 91; (xii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 60, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 76 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 92; (xiii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 61, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 77 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 93; (xiv) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 62, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 78 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 94; (xv) переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 63, CDR-L2

последовательности SEQ ID NO: 79 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 95; (xvi) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 64, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 80 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 96; (xvii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 141, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 143 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 145; и (xviii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 142, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 144 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 146.

[00137] В некотором варианте реализации указанный полинуклеотид содержит

последовательность нуклеотидов, кодирующую домен V_H , где указанный домен V_H содержит (xix) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 170 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 180; (xx) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 171 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 181; (xxi) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 160, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 182; (xxii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183; (xxiii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 171 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 184; (xxiv) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 173 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 185; (xxv) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 173 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 186; (xxvi) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 161, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 174 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 187; (xxvii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 162, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 174 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 188; (xxviii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 163, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 174 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 188; (xxix) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 164, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 174 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 189;

(xxx) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 165, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 175 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 190; (xxxi) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 166, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 176 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 191; (xxxii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 167, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 177 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 192; (xxxiii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 168, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 178 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 193; (xxxiiii) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 169, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 179 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 194.

[00138] В некотором варианте реализации указанный полинуклеотид содержит последовательность нуклеотидов, кодирующую домен V_H , где указанный домен V_H содержит (xxxiv) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183; (xxxv) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195.

[00139] В одном варианте реализации изолированный полинуклеотид, кодирующий молекулу на основе антитела против MuSK, кодирует любую из последовательностей доменов V_H и/или V_L , представленных ниже в Таблице 3. Молекулы нуклеиновых кислот, описанные в данной заявке, включают изолированные полинуклеотиды, части векторов экспрессии или части линейных последовательностей ДНК, включая линейные последовательности ДНК, используемые для транскрипции/трансляции *in vitro*, и векторы, совместимые с экспрессией, секрецией и/или дисплеем антител или их связывающих фрагментов, описанных в данной заявке, в прокариотах, эукариотах или нитевидных фагах.

[00140] Полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением можно получить путем химического синтеза, такого как твердофазный синтез полинуклеотидов, на автоматизированном устройстве для синтеза полинуклеотидов и собрать с получением полноразмерных одно- или двухцепочечных молекул. В качестве альтернативы, полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением можно получить с помощью других методик, таких как ПЦР, с последующим обычным клонированием. Методики

производства или получения полинуклеотидов с заданной последовательностью хорошо известны в данной области техники.

[00141] Полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением могут содержать по меньшей мере одну некодирующую последовательность, такую как последовательность промотора или энхансера, интрон, сигнал полиаденилирования, цис-последовательность, способствующая связыванию RepA, и тому подобные последовательности. Полинуклеотидные последовательности также могут содержать дополнительные последовательности, кодирующие, например, последовательность линкера, последовательность маркера или метки, такой как гистидиновая метка или метка НА, чтобы облегчить очистку или детектирование белка, сигнальную последовательность, партнера в слитом белке, такого как RepA, Fc-область или белок оболочки бактериофага, такой как pIX или pIII.

[00142] В другом варианте реализации настоящего изобретения предложен вектор, содержащий по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий молекулу на основе антитела против MuSK, описанную в данной заявке. Такие векторы включают, без ограничения, плазмидные векторы, вирусные векторы, включая, без ограничения, вектор на основе вируса осповакцины, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса, векторы для бакуловирусной экспрессии, векторы на основе транспозонов или любой другой вектор, подходящий для внедрения полинуклеотидов, описанных в данной заявке, в данный организм или генетический фон с помощью любых способов, чтобы способствовать экспрессии кодируемого полипептида антитела. В одном варианте реализации полинуклеотидную последовательность, кодирующую переменный домен тяжелой цепи, отдельно или вместе с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей переменный домен легкой цепи, как описано в данной заявке, объединяют с последовательностями промотора, фрагмента инициации трансляции (например, с последовательностью связывания рибосом и иницирующим кодоном), 3'-нетранслируемой области, сигнала полиаденилирования, кодона терминации и терминации транскрипции, с получением одной или более конструкций векторов экспрессии.

[00143] В одном варианте реализации вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Множество терапевтических векторов AAV, подходящих для доставки полинуклеотидов, кодирующих антитела, описанные в данной заявке, в центральную нервную систему, известно в данной области техники. См., например, Deverman et al., «Gene Therapy for Neurological Disorders: Progress and Prospects,» *Nature Rev.* 17:641-659 (2018), содержание которого настоящим полностью

включено в данную заявку посредством ссылки. Подходящие векторы AAV включают серотипы AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAV11 в их нативной форме или сконструированные для повышения тропизма. Векторы AAV, у которых, как известно, есть тропизм к ЦНС, которые особенно подходят для терапевтической экспрессии антител против MuSK, описанных в данной заявке, включают AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV8 и AAV9 в их нативной форме или сконструированные для повышения тропизма. В одном варианте реализации вектор AAV представляет собой вектор AAV2. В другом варианте реализации вектор AAV представляет собой вектор AAV5 (Vitale et al., «Anti-tau Conformational scFv MC1 Antibody Efficiently Reduces Pathological Tau Species in Adult JNPL3 Mice,» *Acta Neuropathol. Commun.* 6:82 (2018), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). В другом варианте реализации вектор AAV представляет собой вектор AAV9 (Haiyan et al., «Targeting Root Cause by Systemic scAAV9-hIDS Gene Delivery: Functional Correction and Reversal of Severe MPSII in Mice,» *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 10:327-340 (2018), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). В другом варианте реализации вектор AAV представляет собой вектор AAVrh10 (Liu et al., «Vectored Intracerebral Immunizations with the Anti-Tau Monoclonal Antibody PHF1 Markedly Reduces Tau Pathology in Mutant Transgenic Mice,» *J. Neurosci.* 36(49): 12425-35 (2016), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки).

[00144] В другом варианте реализации вектор AAV представляет собой гибридный вектор, содержащий геном одного серотипа, например, AAV2, и капсидный белок другого серотипа, например, AAV1 или AAV3-9, чтобы контролировать тропизм. См., например, Broekman et al., «Adeno-associated Virus Vectors Serotyped with AAV8 Capsid are More Efficient than AAV-1 or -2 Serotypes for Widespread Gene Delivery to the Neonatal Mouse Brain,» *Neuroscience* 138:501-510 (2006), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки. В одном варианте реализации вектор AAV представляет собой гибридный вектор AAV2/8 (Ising et al., «AAV-mediated Expression of Anti-Tau ScFv Decreases Tau Accumulation in a Mouse Model of Tauopathy,» *J. Exp. Med.* 214(5):1227 (2017), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). В другом варианте реализации вектор AAV представляет собой гибридный вектор AAV2/9 (Simon et al., «A Rapid Gene Delivery-Based Mouse Model for Early-Stage Alzheimer Disease-Type Tauopathy,» *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 72(11): 1062-71 (2013), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки).

[00145] В другом варианте реализации вектор AAV представляет собой такой вектор, который был сконструирован или выбран для улучшенной трансдукции ЦНС после внутримышечного введения, например, AAV-DJ (Grimm et al., *J. Virol.* 82:5887-5911 (2008), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки); повышенной трансдукции нейрональных стволовых клеток и клеток-предшественников, например, SCH9 и AAV4.18 (Murlidharan et al., *J. Virol.* 89: 3976-3987 (2015) и Ojala et al., *Mol. Ther.* 26:304-319 (2018), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки); улучшенной ретроградной трансдукции, например, rAAV2-retro (Muller et al., *Nat. Biotechnol.* 21:1040-1046 (2003), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки); селективной трансдукции эндотелиальных клеток головного мозга, например, AAV-BRI (Korbelin et al., *EMBO Mol. Med.* 8: 609-625 (2016), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки); или для улучшенной трансдукции ЦНС взрослых после в/в введения, например, AAV-PHP.B и AAVPHP.eB (Deverman et al., *Nat. Biotechnol.* 34: 204-209 (2016) и Chan et al., *Nat. Neurosci.* 20: 1172-1179 (2017), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

[00146] В соответствии с этим вариантом реализации, конструкция вектора экспрессии, кодирующая молекулу на основе антитела против MuSK, содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид тяжелой цепи, его функциональный фрагмент, его вариант, или их комбинации. Экспрессионная конструкция, в качестве альтернативы, может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид легкой цепи, его функциональный фрагмент, его вариант, или их комбинации. В некотором варианте реализации конструкция вектора экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид тяжелой цепи, его функциональный фрагмент, или его вариант, и полипептид легкой цепи, его функциональный фрагмент, или его вариант.

[00147] В некотором варианте реализации экспрессионная конструкция дополнительно содержит последовательность промотора, подходящую для запуска экспрессии молекулы на основе антитела против MuSK. Подходящие последовательности промотора включают, без ограничения, промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1a), промотор фосфоглицераткиназы-1 (PGK), промотор немедленно-ранних генов цитомегаловируса (CMV), химерный специфичный для печени промотор (LSP), энхансер цитомегаловируса/промотор бета-актина цыпленка (CAG), тетрациклин-чувствительный промотор (TRE), промотор транстиретины (TTR), промотор вируса обезьян 40 (SV40) и

промотор СК6. Другие промоторы, подходящие для запуска экспрессии генов в клетках млекопитающих, которые известны в данной области техники, также подходят для включения в экспрессионные конструкции, описанные в данной заявке.

[00148] В некотором варианте реализации экспрессионная конструкция дополнительно кодирует последовательность линкера. Последовательность линкера может кодировать последовательность аминокислот, которая пространственно разделяет и/или связывает один или более компонентов экспрессионной конструкции (компоненты тяжелой цепи и легкой цепи кодируемого антитела).

[00149] В другом аспекте в соответствии с настоящим изобретением предложена клетка-хозяин, содержащая один или более векторов, кодирующих антитела против MuSK, и продуцирующая указанные антитела против MuSK, описанные в данной заявке. Молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, необязательно могут быть продуцированы линией клеток, смешанной линией клеток, immortalized клеткой или клональной популяцией immortalized клеток, что хорошо известно в данной области техники (см., например, Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2001); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Harlow и Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

[00150] В некоторых вариантах реализации клетка-хозяин, выбранная для экспрессии, может происходить из млекопитающего. Подходящие клетки-хозяева из млекопитающих включают, без ограничения, клетки COS-1, клетки COS-7, клетки HEK293, клетки BHK21, клетки CHO, клетки BSC-1, клетки HeG2, клетки SP2/0, клетки HeLa, клетки миеломы млекопитающих, клетки лимфомы млекопитающих или любые производные, immortalized или трансформированные клетки, полученные из них. Другие подходящие клетки-хозяева включают, без ограничения, клетки дрожжей, клетки насекомого и клетки растения. В качестве альтернативы, клетку-хозяина можно выбрать из вида или организма, неспособного гликозилировать полипептиды, например, из прокариотической клетки или организма, таких как BL21, BL21(DE3), BL21-GOLD(DE3), XL1-Blue, JM109, HMS174, HMS174(DE3), и любого из природных или сконструированных штаммов *E. coli* spp, *Klebsiella* spp. или *Pseudomonas* spp.

[00151] Молекулы на основе антител против MuSK, описанные в данной заявке, можно получить с помощью любых различных методик, применяя изолированные полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева, описанные выше. Обычно, антитела можно получить с помощью методик культивирования клеток, включая получение

5 моноклональных антител с помощью обычных методик, или путем трансфекции подходящей бактериальной клетки-хозяина или клетки-хозяина из млекопитающего генами антител, тяжелых цепей и/или легких цепей, чтобы позволить получение антител, причем антитела могут быть рекомбинантными. В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK, описанная в данной заявке, представляет

10 собой моноклональное антитело или его функциональный связывающий фрагмент. Стандартные методики молекулярной биологии применяют для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, селекции трансформантов, культивирования клеток-хозяев и извлечения антитела из культуральной среды. Трансфекцию клетки-хозяина можно осуществить, применяя различные методики,

15 широко применяемые для внедрения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, путем электропорации, кальций-фосфатной преципитации, трансфекции ДЭАЭ-декстраном и тому подобных методик. Хотя возможна экспрессия антител, описанных в данной заявке, либо в прокариотических, либо в эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотических клетках, в частности, в клетках млекопитающих, иногда предпочтительна, так как такие эукариотические клетки (и, в частности, клетки млекопитающих) с большей вероятностью, чем прокариотические клетки, осуществят сборку и секрецию правильно свернутого и иммунологически активного антитела.

[00152] Выше отмечено, что типичные клетки-хозяева из млекопитающих для

25 экспрессии рекомбинантных антител в соответствии с настоящим изобретением включают клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (включая клетки dhfr-CHO, описанные в Urlaub и Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220 (1980), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Другие подходящие клетки-хозяева из млекопитающих включают, без ограничения, клетки

30 миеломы NS0, клетки COS и клетки SP2. Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антител, внедряют в клетки-хозяева из млекопитающих, антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного, чтобы позволить экспрессию антитела в указанных клетках-хозяевах, или, более предпочтительно, секрецию антитела в культуральную среду, в которой растят

35 клетки-хозяева.

[00153] Клетки-хозяева также можно применять для получения функциональных фрагментов антител, таких как фрагменты Fab или молекулы scFv. Должно быть понятно, что варианты описанной выше процедуры входят в объем настоящего изобретения. Например, может потребоваться трансфицировать клетку-хозяина ДНК, кодирующей функциональные фрагменты любой из легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела, описанного в данной заявке. Технологию рекомбинантных ДНК также можно применять для удаления части или всей ДНК, кодирующей любую или обе из легкой и тяжелой цепей, которая не обязательна для связывания с интересующими антигенами. Молекулы, экспрессированные с таких укороченных молекул ДНК, также входят в объем термина «антитело», описанного в данной заявке.

[00154] Антитела и связывающие фрагменты антител извлекают и очищают из рекомбинантных культур клеток с помощью известных способов, включая, но не ограничиваясь перечисленными способами: очистку на белке А, преципитацию сульфатом аммония или этанолом, экстрагирование кислотой, анион- или катионообменную хроматографию, фосфоцеллюлозную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий, аффинную хроматографию, гидроксилапатитную хроматографию и лектиновую хроматографию. Для очистки также можно применять высокоэффективную жидкостную хроматографию («ВЭЖХ»).

Фармацевтические композиции, содержащие молекулы на основе антител против MuSK.

[00155] Молекулы на основе антител против MuSK или полинуклеотид, кодирующий молекулы на основе антител против MuSK в соответствии с настоящим изобретением, успешно вводят в виде композиций. В некотором варианте реализации такие композиции представляют собой фармацевтические композиции, содержащие активный терапевтический агент (т.е., антитело против MuSK) и один или более различных других фармацевтически приемлемых компонентов. См. REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (21^{ое} издание) (2005) (Troy, D.B. *et al.* (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins (Publs.), Балтимор, Мэриленд), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки. Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Композиции также могут содержать, в зависимости от необходимого состава, фармацевтически приемлемые нетоксичные носители, вспомогательные вещества, разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент, такой как твин-20 или твин-80), стабилизаторы (например, сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, агент для фиксации тканей, солюбилизаторы и/или другие

материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию, и которые представляют собой носители, широко применяемые для составления фармацевтических композиций для введения животному или человеку. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы он не влиял на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, физиологический фосфатно-солевой буферный раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хенкса. Кроме того, указанные фармацевтическая композиция или состав также могут содержать другие носители, или нетоксичные, нетерапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и тому подобные агенты. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях в соответствии с настоящим изобретением, включают воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобные полиолы) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло и кунжутное масло, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовая камедь и инъеклируемые органические эфиры, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Другие носители хорошо известны в области фармацевтики.

[00156] Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. За исключением случаев, когда любые обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях в соответствии с настоящим изобретением.

[00157] Композиции также могут содержать большие, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, такие как хитозан, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты и сополимеры (например, функционализированную сефарозу, агарозу, целлюлозу и тому подобные сополимеры), полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и агрегаты липидов (например, капли масла или липосомы). Пригодность носителей и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основании отсутствия значимого отрицательного влияния на желательные биологические свойства активной молекулы на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением (например, менее чем значительного влияния (например, относительное ингибирование 10% или менее, относительное ингибирование 5% или менее, и т.д.) на связывание антигена).

[00158] Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобные антиоксиданты; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобные антиоксиданты; и (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобные агенты.

[00159] Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением также могут содержать изотонические агенты, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия в указанных композициях.

[00160] Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением также могут содержать один или более адъювантов, подходящих для выбранного пути введения, таких как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты, диспергирующие агенты, консерванты или буферы, которые могут увеличивать срок хранения или эффективность фармацевтической композиции. Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут быть приготовлены с носителями, которые защитят указанные антитела от быстрого высвобождения, например, состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота отдельно или с воском, или другие материалы, хорошо известные в данной области техники. Способы получения таких составов общеизвестны специалистам в данной области техники. См., например, SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[00161] В одном варианте реализации антитела в соответствии с настоящим изобретением могут входить в состав формы, гарантирующей правильное распределение *in vivo*. Фармацевтически приемлемые носители для парентерального введения включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов или дисперсии для инъекций. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники.

[00162] Фармацевтические композиции для инъекции обычно должны быть стерильными и стабильными при условиях производства и хранения. Композиция может входить в состав формы в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой требуемой структуры, подходящей для достижения высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой водный или неводный растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобные полиолы), и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические эфиры, такие как этилолеат. Нужную текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во множестве случаев, предпочтительным будет добавление в композицию изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как глицерин, маннит, сорбит или хлорида натрия. Пролонгированного всасывания инъецируемых композиций можно добиться путем добавления в композицию агента, который замедляет всасывание, например, солей моностеарата и желатина. Стерильные инъекционные растворы можно получить путем добавления активного соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, например, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем микрофльтрации. Как правило, дисперсии получают путем добавления активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, примерами способов получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из его раствора, ранее прошедшего стерильную фильтрацию.

[00163] Для парентерального введения, агенты в соответствии с настоящим изобретением обычно включают в состав в виде инъекционных доз раствора или суспензии вещества в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем, который может представлять собой стерильную жидкость, такую как вода, масло, солевой раствор, глицерин или этанол. Кроме того, в композиции могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, поверхностно-активные вещества, pH-буферные вещества и тому подобные вещества. Другие компоненты фармацевтических композиций представляют собой компоненты нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения.

Арахисовое масло, соевое масло и минеральное масло – все являются примерами пригодных материалов. Обычно, гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, являются предпочтительными жидкими носителями, особенно для инъекционных растворов. Агенты в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в виде депо-инъекции или имплантируемого препарата, который можно составить таким образом, чтобы позволить продолжительное высвобождение активного ингредиента. Пример композиции содержит scFv в концентрации приблизительно 5 мг/мл в составе с водным буфером, состоящим из 50 mM L-гистидина, 150 mM NaCl, pH которого подвели до 6,0 с помощью HCl.

Обычно, композиции получают в виде форм для инъекций, в виде жидких растворов либо суспензий; также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Препарат также можно эмульгировать или инкапсулировать в липосомы или микрочастицы, такие как полилактид, полигликолид или сополимер, для улучшения действия адьюванта (Langer, *et al.*, Science 249:1527 (1990); Hanes, *et al.*, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119 (1997), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Дополнительные составы, подходящие для других способов введения, включают составы для перорального, интраназального и пульмонального применения, суппозитории и составы для трансдермального применения.

Введение фармацевтических композиций, содержащих молекулы на основе антител против MuSK.

Молекулы на основе антител против MuSK в соответствии с настоящим изобретением можно вводить парентеральным, топическим, пероральным или интраназальным способами для терапевтического лечения. Внутримышечная инъекция (например, в мышцы плеча или ноги) и внутривенная инфузия представляют собой предпочтительные способы введения молекул в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых способах такие молекулы вводят в виде композиции или устройства с замедленным высвобождением, такого как устройство Medipad™ (Elan Pharm. Technologies, Дублин, Ирландия). В некоторых способах, антитела, описанные в данной заявке, вводят путем инъекции непосредственно в определенную ткань, например, путем интракраниальной инъекции.

В одном варианте реализации фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением вводят парентерально. Формулировки «парентеральное введение» и «вводят парентерально» в данной заявке обозначают способы введения, отличные от энтерального и топического введения, обычно путем

инъекции, и включают эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, интраартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, интракраниальную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, внутрисухожильную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, интракраниальную, внутригрудную, эпидуральную и внутристернальную инъекцию и подкожную инфузию. В одном варианте реализации эту фармацевтическую композицию вводят путем внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

[00167] При применении в терапии (т.е., при применениях, предполагающих пациента, у которого было диагностировано нервно-мышечное нарушение, такое как боковой амиотрофический склероз (БАС), тяжелая миастения или врожденная миастения), молекулы на основе антител против MuSK в соответствии с настоящим изобретением вводят такому пациенту в количестве, достаточном, чтобы излечить, лечить или по меньшей мере частично купировать симптомы заболевания (о чем свидетельствовала биохимическая, гистологическая и/или поведенческая оценка), включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы при развитии заболевания. В некоторых вариантах реализации введение терапевтических молекул в соответствии с настоящим изобретением уменьшает или устраняет нервно-мышечное нарушение.

[00168] Эффективные дозы предложенных терапевтических молекул в соответствии с настоящим изобретением для лечения описанных выше состояний могут изменяться в зависимости от множества различных факторов, включая способы введения, целевой сайт, физиологическое состояние пациента, другие вводимые лекарственные средства. Дозы лечения обычно титруют, чтобы оптимизировать их безопасность и эффективность. В любой данный день, в который вводят дозу, указанная доза молекул на основе антител против MuSK, описанных в данной заявке, может находиться в диапазоне от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 мг/кг, и чаще от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг, массы тела пациента. Например, доза может составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или может находиться в диапазоне 1 - 10 мг/кг массы тела. Примеры доз, таким образом, включают: от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 2 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 до приблизительно 1 мг/кг массы тела, например, приблизительно 0,15 мг/кг массы тела, приблизительно 0,2 мг/кг массы тела, приблизительно 0,5 мг/кг массы тела, приблизительно 1 мг/кг массы тела, приблизительно 1,5 мг/кг массы тела, приблизительно

2 мг/кг массы тела, приблизительно 5 мг/кг массы тела или приблизительно 10 мг/кг массы тела.

[00169] Врач или ветеринар со средней квалификацией в данной области техники может легко определить и прописать необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с доз молекулы на основе антитела в фармацевтической композиции на более низких уровнях, чем необходимые для достижения желательного терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозировку до тех пор, пока не будет достигнут желательный эффект. Обычно, подходящая суточная доза композиции в соответствии с настоящим изобретением будет представлять собой такое количество соединения, которое составляет наименьшую дозу, эффективную для достижения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза, как правило, будет зависеть от факторов, описанных выше. Введение может быть, например, внутривенным, внутримышечным, интраперитонеальным или подкожным, и, например, может осуществляться вблизи сайта мишени. При желании, эффективную суточную дозу фармацевтической композиции можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более дробных доз, которые вводят отдельно с подходящими интервалами в течение дня, необязательно, в виде единичных лекарственных форм. Хотя возможно вводить молекулу на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением отдельно, предпочтительно вводить указанную молекулу на основе антитела в виде фармацевтической композиции, описанной выше.

[00170] В терапевтических целях, молекулы на основе антител против MuSK в соответствии с настоящим изобретением обычно вводят многократно. Интервалы между разовыми дозами (например, болюсом или инфузией) могут составлять неделю, месяц или год. В некоторых способах, дозу корректируют, чтобы добиться концентрации в плазме 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах - 25 - 300 мкг/мл. В качестве альтернативы, терапевтические молекулы в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, в указанном случае требуется менее частое введение. Дозу и частоту изменяют в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. Обычно, у антител человека выявляют наиболее продолжительное время полужизни, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и не являющиеся человеческими антитела. У молекул scFv, как правило, короткое время полужизни в сыворотке.

[00171] В другом варианте реализации фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу на основе антитела против MuSK, описанную в данной заявке, вводят субъекту,

чтобы обеспечить экспрессию *in vivo* и образование молекулы на основе антитела для лечения состояний, опосредованных сниженной сигнализацией и/или фосфорилированием MuSK. Конструкции векторов экспрессии, подходящие для применения в этом варианте реализации настоящего изобретения, описаны выше.

- 5 **[00172]** Полинуклеотидные композиции могут привести к образованию молекулы на основе антитела против MuSK у субъекта в течение по меньшей мере приблизительно 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 20 часов, 25 часов, 30 часов, 35 часов, 40 часов, 45 часов, 50 часов или 60 часов от момента введения композиции субъекту.
- 10 Указанная композиция может привести к образованию молекулы на основе антитела у субъекта в течение по меньшей мере приблизительно 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней от момента введения композиции субъекту. Указанная композиция может привести к образованию молекулы на основе антитела у субъекта в течение от приблизительно 1 часа до приблизительно 6 дней, от
- 15 приблизительно 1 часа до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 часа до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 часа до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 часа до приблизительно 2 дней, от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 дня, от приблизительно 1 часа до приблизительно 72 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 60 часов, от приблизительно 1 часа до
- 20 приблизительно 48 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 36 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 24 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 12 часов или от приблизительно 1 часа до приблизительно 6 часов от момента введения композиции субъекту.

- [00173]** Указанная композиция, при введении нуждающемуся в этом субъекту,
- 25 может привести к длительному образованию молекулы на основе антитела у субъекта. Композиция может привести к образованию молекулы на основе антитела у субъекта в течение по меньшей мере приблизительно 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27
- 30 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дня, 32 дней, 33 дней, 34 дней, 35 дней, 36 дней, 37 дней, 38 дней, 39 дней, 40 дней, 41 дня, 42 дней, 43 дней, 44 дней, 45 дней, 46 дней, 47 дней, 48 дней, 49 дней, 50 дней, 51 дня, 52 дней, 53 дней, 54 дней, 55 дней, 56 дней, 57 дней, 58 дней, 59 дней или 60 дней.

Терапевтическая пригодность связывающих MuSK молекул на основе антител

[00174] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ повышения сигнализации специфической для мышц тирозин-протеинкиназы (MuSK) у нуждающегося в этом субъекта. Указанный способ включает введение указанному субъекту молекулы на основе антитела против MuSK, описанной в данной заявке, или фармацевтической композиции, содержащей молекулу на основе антитела против MuSK, описанную в данной заявке, или полинуклеотид, кодирующий молекулу на основе антитела против MuSK, описанную в данной заявке. В соответствии с указанным способом, композицию вводят в количестве, эффективном для повышения сигнализации MuSK у субъекта по сравнению с сигнализацией MuSK у субъекта перед указанным введением. Такое введение можно осуществить субъекту, страдающему нервно-мышечным нарушением, таким как боковой амиотрофический склероз (БАС), тяжелая миастения (ТМ), врожденная миастения, MuSK-ТМ, спинальная мышечная атрофия (СМА), спинальная и бульбарная мышечная атрофия (СБМА), болезнь Шарко-Мари-Тута (ШМТ), дистальные наследственные двигательные нейропатии (дНДН), мышечная дистрофия Дюшенна (МДД), конечностно-поясная мышечная дистрофия (КПМД), врожденная мышечная дистрофия (ВМД), саркопения (СП), мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса. В некотором варианте реализации субъект, которого лечат, представляет собой субъекта, страдающего врожденной миастенией. В некотором варианте реализации субъект, которого лечат, представляет собой субъекта, страдающего опосредованной Dok7 врожденной миастенией. В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, такое введение лечит нервно-мышечное состояние.

[00175] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK, которую вводят нуждающемуся в этом субъекту, представляет собой молекулу на основе антитела против MuSK, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195 (3B2g2m1).

[00176] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK, которую вводят нуждающемуся в этом субъекту, представляет собой молекулу на основе антитела против MuSK, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и переменную область

легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183 (3B2g1m1).

[00177] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK, которую вводят нуждающемуся в этом субъекту, представляет собой молекулу на основе антитела против MuSK, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 154 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183 (3B2g1m2).

[00178] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK, которую вводят нуждающемуся в этом субъекту, представляет собой молекулу на основе антитела против MuSK, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 154 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195 (3B2g2m2).

[00179] В некотором варианте реализации молекула на основе антитела против MuSK, которую вводят нуждающемуся в этом субъекту, представляет собой молекулу на основе антитела против MuSK, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183 (3B2).

[00180] Термин «лечение» или «лечить» в данной заявке означает снижение выраженности, замедление или обращение прогрессирования или тяжести заболевания или расстройства, или снижение выраженности, замедление или обращение одного или более симптомов или побочных эффектов такого заболевания или расстройства. Для целей настоящего изобретения, «лечение» или «лечить» дополнительно означает подход к получению полезных или желательных клинических результатов, где «полезные или желательные клинические результаты» включают, без ограничения, смягчение симптома, уменьшение выраженности расстройства или заболевания, стабилизированное (т.е.,

отсутствие ухудшения) состояние заболевания или расстройства, отсрочивание или замедление прогрессирования состояния заболевания или расстройства, снижение выраженности или временное облегчение состояния заболевания или расстройства и ремиссию заболевания или расстройства, либо частичные, либо полные, детектируемые или недетектируемые.

[00181] «Эффективное количество» молекулы на основе антитела относится к количеству, достаточному, при необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени, чтобы добиться предполагаемого биологического эффекта или желательного терапевтического результата, включая, без ограничения, клинические результаты. Предполагается, что формулировка «терапевтически эффективное количество», когда ее применяют по отношению к молекуле на основе антител в соответствии с настоящим изобретением, означает количество антитела, которого достаточно для снижения выраженности, временного облегчения, стабилизации, обращения, замедления или отсрочивания прогрессирования расстройства или болезненного состояния, или симптома расстройства или заболевания. В некотором варианте реализации в способе в соответствии с настоящим изобретением предложено введение молекулы на основе антитела в комбинации с другими соединениями. В таких случаях «эффективное количество» представляет собой количество комбинации, достаточное, чтобы вызвать предполагаемый биологический эффект.

[00182] В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения врожденной миастении у субъекта. Указанный способ включает введение субъекту, страдающему врожденной миастенией, агониста специфической для мышц тирозин-протеинкиназы (MuSK) в количестве, эффективном для повышения фосфорилирования MuSK, тем самым осуществляя лечение врожденной миастении у субъекта.

[00183] В некоторых вариантах реализации агонист MuSK представляет собой агонистическое антитело против MuSK, описанное в данной заявке. Агонистическое антитело против MuSK представляет собой такое антитело, которое связывается с MuSK и повышает сигнализацию или фосфорилирование MuSK. В одном варианте реализации агонистическое антитело против MuSK связывается с Frizzled-подобным доменом MuSK человека. В одном варианте реализации агонистическое антитело против MuSK связывается с эпитопом с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 130 (Fz-подобный домен). Подходящие агонистические антитела против MuSK включают таковые, описанные в данной заявке. В некоторых вариантах реализации врожденная миастения представляет собой опосредованную DOK7 врожденную миастению.

ПРИМЕРЫ

[00184] Настоящее описание далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны истолковываться как ограничивающие его каким-либо образом.

5

Материалы и способы для Примера 1 и Примеров 5 - 12.

[00185] *Мыши.* Для того чтобы получить мышей *Dok7 CM* (также называют в данной заявке мышами *Dok7 1124_1127 dup*), транскрибированную *in vitro* единую направляющую РНК (енРНК) (5'-CTGCTCAGTCTGCCCCC-3' (SEQ ID NO: 264)) (5 нг/мкл) и транскрибированную *in vitro* РНК Cas9 (10 нг/мкл) вводили путем микроинъекции вместе с матрицей для репарации ДНК (5'-ATGCCGGCAATCTG GACGTCTGGCGGGCCGGTGAGGAATTCGGTTCTCTGCTCAGTCTGCCTGCCCCCTGG AGCCAGCGCACCTGAGCCCAGACTGTGTGCCTGCCCCACCTGGGGCGGCCGAGTA-3' (SEQ ID NO: 265)) (10 нг/мкл), содержащей дупликацию TGCC, в пронуклеус зигот C57BL/6 (Price et al., «Specific Disruption of Abca1 Targeting Largely Mimics the Effects of miR-33 Knockout on Macrophage Cholesterol Efflux and Atherosclerotic Plaque Development,» *Circ. Res.* 124:874-880 (2019), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). 14 мышей, которые родились из получивших инъекцию зигот, анализировали путем секвенирования ДНК из хвоста (праймер: 5'-GCAGTTACAG GAGGTTGG-3' (SEQ ID NO: 266)). Одна мышь несла аллель *Dok7* с желательной дупликацией TGCC. Указанную исходную мышь (мышь-основателя) скрещивали с мышами дикого типа C57BL/6 с получением линии *Dok7 CM*. Секвенирование ДНК подтвердило последовательность мутации *Dok7*. Мышей впоследствии генотипировали, применяя праймеры (прямой: 5'-GCGGCCTCGGCAGTTACAG-3' (SEQ ID NO: 267); обратный: 5'-GCTTTACCTTG AGTCCGCCACAGA-3' (SEQ ID NO: 268)). Проанализировали пять геномных локусов, в которых определили наибольшую вероятность нецелевого распознавания. Не обнаружили признаков мутаций в этих генах (ФИГ. 16А - 16В).

[00186] Для получения мышей *Dok7 2YF*, вводили путем инъекции енРНК (5'-TTCGAGGTGTGTCATAG-3' (SEQ ID NO: 269)) (15 нг/мкл) и транскрибировали *in vitro* РНК Cas9 (30 нг/мкл), вместе с матрицей для репарации ДНК (5'-ATGCCGGCAGCAACCTGGACGTGTGGCGGGCCGGTGAGGAATTCGGTTCTCTGCTCA GTCTGCCTGCCCCCTGGAGCCAGCGCACCTGAGCCCAGACTGTGTGCCTGCCCCACCT GGGGCGGCCGAGTA-3' (SEQ ID NO: 270)) (30 нг/мкл), чтобы превратить тирозин 396 и тирозин 406 в фенилаланин, в цитоплазму зигот C57BL/6. 33 мышей, которые родились из получивших инъекцию зигот, анализировали путем секвенирования ДНК из хвоста

(праймер: 5'-TGGCATTGCC ACAGGCAG-3' (SEQ ID NO: 271)). Одна мышь несла аллель *Dok7* с желательными заменами тирозина на фенилаланин. Указанную мышь-основателя скрещивали с мышами дикого типа C57BL/6 с получением линии *Dok7* 2YF. Секвенирование ДНК из указанных линий подтвердило последовательность мутации *Dok7*. Мышей размещали и содержали в соответствии с руководствами Институционального комитета по содержанию и использованию животных (IACUC).

[00187] Рост культивированных клеток скелетных мышц. Клетки мышц мыши C2C12 (ATCC, № в каталоге CRL-1772) растили при 37°C в ростовой среде (GM): модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей 4,5 г/л глюкозы, L-глутамин и пируват натрия (Corning cellgro), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС; GemCell™). Слияние миобластов и дифференцировку мышечных трубочек вызывали, когда миобласты достигали 70% конфлюэнтности, путем перевода на среду для дифференцировки (DM): DMEM с 4,5 г/л глюкозы и 1 mM L-глутамином, дополненную 2% термоинактивированной сывороткой лошади. Иммутизированные миобласты выделяли из зародышей дикого типа и *Dok7* 2YF и растили, как описано ранее (Smith et al., «Src, Fyn, and Yes are not Required for Neuromuscular Synapse Formation but are Necessary for Stabilization of Agrin-Induced Clusters of Acetylcholine Receptors,» *J. Neurosci.* 21:3151-3160 (2001), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки).

[00188] Обработка агрином и антителом мышечных трубочек C2. Через три дня после того, как образовались мышечные трубочки C2C12, культуры обрабатывали в течение 30 минут 10 нМ биотинилированными Fab в комплексе с 2,5 нМ стрептавидином, 10 нМ IgG или 0,5 нМ рекомбинантным нейрональным агрином-B8 (R&D Systems). Мышечные трубочки гомогенизировали при 4°C в лизирующем буфере (50 mM хлорид натрия, 30 mM триэтаноламин, pH 7,5, 50 mM фторид натрия, 5 mM ЭДТА, 5 mM ЭГТА, 2 mM ортованадат натрия, 1 mM N-этилmaleимид, 1 mM тетрационат натрия, 10 мкМ пепстатин плюс смесь полного набора ингибиторов протеаз) (Roche). NP-40 добавляли до конечной концентрации 1% и инкубировали экстракт при покачивании в течение 30 минут при 4°C. Нерастворимые белки удаляли путем центрифугирования при 12000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. Супернатант предварительно осветляли в течение 1 часа при 4°C с помощью гранул агарозы с белком G (Sigma-Aldrich) перед инкубацией в течение ночи при 4°C с антителами против MuSK (MuSK 1A) (Takata, K. et al., «Characterization of Pathogenic Monoclonal Autoantibodies Derived from Muscle-Specific Kinase Myasthenia Gravis Patients,» *JCI Insight* 4(12):e127167 (2019) и Fichtner et al., «Affinity Maturation is Required for Pathogenic Monovalent IgG4 Autoantibody Development in Myasthenia Gravis,»

J. Exp. Med. 217(12):e20200513 (2020), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Комплексы инкубировали в течение 4 часов с гранулами агарозы с белком G. Гранулы затем промывали (три раза в течение 9 минут) в лизирующем буфере, содержащем 1% NP-40. Белки элюировали с гранул с помощью 1% ДСН в лизирующем буфере.

[00189] **Выделение MuSK и Dok7 из мышечной ткани.** Мышцы всей ноги или культивированные клетки мышц гомогенизировали при 4°C в лизирующем буфере (50 мМ хлорид натрия, 30 мМ триэтаноламин pH 7,5, 50 мМ фторид натрия, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ ЭГТА, 2 мМ ортованадат натрия, 1 мМ N-этилмалеимид, 1 мМ тетратионат натрия, 10 мкМ пепстатин плюс смесь полного набора ингибиторов протеаз (Roche)). Добавляли NP-40 до конечной концентрации 1% и инкубировали экстракт при покачивании в течение 30 минут при 4°C. Нерастворимые белки удаляли путем центрифугирования при 12000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. Супернатант предварительно осветляли в течение 1 часа при 4°C с помощью гранул агарозы с белком G (Sigma-Aldrich) перед инкубацией в течение ночи при 4°C с антителами против MuSK (MuSK 1A) (Takata, K. et al., «Characterization of Pathogenic Monoclonal Autoantibodies Derived from Muscle-Specific Kinase Myasthenia Gravis Patients,» *JCI Insight* 4(12):e127167 (2019) и Fichtner et al., «Affinity Maturation is Required for Pathogenic Monovalent IgG4 Autoantibody Development in Myasthenia Gravis,» *J. Exp. Med.* 217(12):e20200513 (2020), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки) или антителами козы против Dok7 (R&D Systems, AF 6398), а затем инкубировали в течение 4 часов с гранулами агарозы с белком G. Гранулы затем промывали (три раза в течение 9 минут) в лизирующем буфере, содержащем 1% NP-40. Белки элюировали с гранул с помощью 1% ДСН в лизирующем буфере.

[00190] **Вестерн-блоттинг.** Белки фракционировали с помощью ЭФ в ПААГ/ДСН и переносили на мембраны ПВДФ. Блоты зондировали антителами против MuSK (R&D Systems, AF562), фосфотирозина (Millipore, 05-321) или Dok7 (№ 1916), как описано ранее (Herbst & Burden, «The Juxtamembrane Region of MuSK has a Critical Role in Agrin-Mediated Signaling,» *EMBO J.* 19:67-77 (2000); Bergamin et al., «The Cytoplasmic Adaptor Protein Dok7 Activates the Receptor Tyrosine Kinase MuSK via Dimerization,» *Mol. Cell* 39:100-109 (2010); Hallock et al., «Dok-7 Regulates Neuromuscular Synapse Formation by Recruiting Crk and Crk-L,» *Genes Dev.* 24:2451-2461 (2010); Remedio et al., «Diverging Roles for Lrp4 and Wnt Signaling in Neuromuscular Synapse Development During Evolution,» *Genes Dev.* 30:1058-1069 (2016); и Jaworski & Burden, «Neuromuscular Synapse Formation in Mice Lacking Motor Neuron- and Skeletal Muscle-Derived Neuregulin-1,» *J. Neurosci.* 26:655-661 (2006),

содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Антитела против Crk (BD Bioscience, 610035) и Crk-L (Santa Cruz Biotechnology, sc-365092) были описаны ранее (Hallock et al., «Dok-7 Regulates Neuromuscular Synapse Formation by Recruiting Crk and Crk-L,» *Genes Dev.* 24:2451-2461 (2010), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Проводили количественный анализ интенсивностей полос с помощью системы визуализации ChemiDoc (BioRad), как описано ранее (Remedio et al., «Diverging Roles for Lrp4 and Wnt Signaling in Neuromuscular Synapse Development During Evolution,» *Genes Dev.* 30:1058-1069 (2016), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). На диаграммах показаны средние значения для по меньшей мере трех отдельных экспериментов. Критерий Уилкоксона-Манна-Уитни применяли для определения статистической значимости, и осуществляли это с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0.

[00191] Иммуногистохимия тотального препарата мышцы. Мышцы диафрагмы иссекали из зародышей в день E18,5 и постнатальных мышцей в оксигенированной среде L-15. Мышцы прикалывали к покрытым Sylgard чашкам для препарирования, фиксировали в течение 1,5 часов в 1% ПФА и блокировали в течение 1 часа в ФБР с 3% БСА (Sigma, без IgG) и 0,5% тритоном X-100 (PBT). Мышцы диафрагмы окрашивали конъюгированным с Alexa 488 α-BGT (Invitrogen), чтобы пометить AChR, и антителами против нейрофиламента-L (Synaptic Systems, 171002), βIII-тубулина (Synaptic Systems, 302302) или синапсина 1/2 (Synaptic Systems, 106002), чтобы пометить двигательный аксон и нервные окончания, соответственно (Kim & Burden, «MuSK Controls where Motor Axons Grow and Form Synapses,» *Nat. Neurosci.* 11:19-27 (2008), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Осуществляли форсированное пипетирование антител в мышцу, и инкубировали мышцу в течение ночи при 4°C на круговой качалке во влажной камере. Мышцы диафрагмы промывали 10 раз в течение 5 часов с помощью РТ при комнатной температуре и промывали ФБР перед получением тотального препарата мышцы в 50% глицерине. Анализировали мышцу из по меньшей мере 3 мышцей каждого генотипа для каждого эксперимента. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 800. Осуществляли регулировки коэффициента усиления детектора и интенсивности лазера, чтобы избежать насыщения. Проводили анализ количества и размера синапсов, плотности синаптических AChR, ширины зоны концевой пластинки, степени денервации и коэффициента колокализации (синапсин/AChR), применяя программное обеспечение FIJI/ImageJ, как описано ранее (Jaworski & Burden, «Neuromuscular Synapse Formation in Mice Lacking

Motor Neuron- and Skeletal Muscle-Derived Neuregulin-1,» *J. Neurosci.* 26:655-661 (2006), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Критерий Уилкоксона-Манна-Уитни применяли для определения статистической значимости, и осуществляли это с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.

[00192] *Выделение и окрашивание отдельных мышечных волокон.* Передние большеберцовые мышцы иссекали в оксигенированной среде L-15, прикалывали к покрытой Sylgard чашке и фиксировали в 2% ПФА (в ФБР) в течение 2 часов. После нескольких споласкиваний в ФБР, от одного до трех мышечных волокон вручную отделяли с помощью остроконечного пинцета (Ralston et al., «The Organization of the Golgi Complex and Microtubules in Skeletal Muscle is Fiber Type-Dependent,» *J. Neurosci.* 19:10694-10705 (1999), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Фиксированные мышечные волокна блокировали в течение 2 часов при комнатной температуре в ФБР, содержащем 5% БСА, 1% нормальную сыворотку козы и 0,04% сапонин. Волокна затем инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C, промывали три раза в течение 5 минут ФБР, содержащим 0,04% сапонин, инкубировали с вторичными антителами в течение 2 часов при комнатной температуре, снова промывали и заливали VectaShield (Vector Laboratories). Использовали антитела против Crk-L (Santa Cruz Biotechnology, sc-365092) и визуализировали постсинаптическую мембрану путем окрашивания Alexa Fluor 488- α -BGT (Invitrogen).

[00193] *Иммуногистохимия криосрезов.* Мышцы конечностей заключали в среду ОСТ и замораживали на платформе из сухого льда. Срезы толщиной 10 мкм, собранные на покрытые поли-L-лизинном предметные стекла, фиксировали в 1 – 4% ПФА в течение 10 минут, трижды промывали ФБР с 3% БСА (PB) в течение 5 минут, пермеабелизировали с помощью PB + 0,5% X-тритон (PBT) в течение 10 минут, промывали PB и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами против Crk-L (Santa Cruz Biotechnology, sc-365092) в PBT во влажной камере. Срезы трижды промывали PB в течение 5 минут перед инкубацией в течение ночи при 4°C с вторичными антителами и Alexa Fluor 488- α -BGT (Invitrogen), разбавленными в ФБР, во влажной камере. Срезы трижды промывали в течение 5 минут в PB, затем ФБР, перед заливкой в препятствующую выгоранию флуоресценции гистологическую среду VECTASHIELD.

[00194] *Поведение.* Силу захвата измеряли, применяя устройство для измерения силы захвата (Bioseb), которое измеряет как силу захвата передних конечностей, так и силу захвата всех конечностей. Для измерения силы захвата передних конечностей, мышшь располагали в центре металлической сетки и аккуратно удерживали за основание ее

хвоста, так что только ее передние лапы могли захватить сетку. Мышь равномерно тянули назад до тех пор, пока передние конечности не отпускали сетку. Измеритель силы захвата в цифровом виде отображал максимальную приложенную силу (в граммах) в момент высвобождения захвата. Для измерения для всех конечностей, мыши позволяли схватить сетку как передними конечностями, так и задними конечностями, и мышь равномерно тянули назад до тех пор, пока мышь не теряла захват сетки. Средние значения по шести последовательным испытаниям с измерением как для передних конечностей, так и для всех конечностей принимали за показатель силы захвата передних конечностей или всех конечностей. Мышам давали перерыв 10 - 15 секунд между испытаниями и 1 - 3 часа между тестированиями передних конечностей и всех конечностей. Массу тела определяли после всех измерений силы захвата, чтобы проанализировать потенциальную ковариабельность. Для повышения надежности и достоверности оценки силы захвата, все измерения проводил один экспериментатор (Mandillo et al., «Reliability, Robustness, and Reproducibility in Mouse Behavioral Phenotyping: A Cross-Laboratory Study,» *Physiol. Genomics* 34:243-255 (2008) и Oury et al., «MACF1 Links Rapsyn to Microtubule- and Actin-Binding Proteins to Maintain Neuromuscular Synapses,» *J. Cell Biol.* 218:1686-1705 (2019), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

[00195] Двигательную функцию самцов и самок мышей в день P60 оценивали на барабане (AccuRotor, четырехканальный, Omnitech Electronics, Inc.). Мышей помещали на барабан (вращающийся цилиндр диаметром 3,0 см), вращающийся со скоростью 2,5 об/мин, и скорость вращения увеличивали линейно до 40 об/мин в течение 5 минут. Измеряли время до падения с цилиндра. С каждой мышью проводили по три испытания с 5-минутными интервалами, и регистрировали наибольший латентный период до падения по трем испытаниям. Критерий Уилкоксона-Манна-Уитни применяли для определения статистической значимости, и осуществляли это с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.

[00196] *Разработка синтетических антител человека.* Полноразмерную внеклеточную область (от E22 до T494 в MuSK мыши и от E22 до T495 в MuSK человека), включая Fz-домен и С-концевую фланкирующую последовательность (от D307 до T494 в MuSK мыши и K314 - T495 в MuSK человека) экспрессировали в виде белка, слитого по С-концу с метками Avi и His6, используя сигнальную последовательность секретиции IgkVIII мыши, в клетках EXPI293, применяя набор для трансфекции ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher Scientific), используя стандартные процедуры, предложенные поставщиком. Белки очищали из фильтрованного культурального супернатанта, применяя

колонку HiTrap Nickel (GE Healthcare), и биотинилировали *in vitro*, применяя фермент BirA, в присутствии 0,5 мМ биотина и 10 мМ АТФ. Биотинилированные белки дополнительно очищали, применяя колонку Superdex S75 10/300 (GE Healthcare).

[00197] Сортировку библиотеки фагового дисплея антител проводили, как описано

5 ранее (Miller et al., «T Cell Receptor-Like Recognition of Tumor in vivo by Synthetic Antibody Fragment,» *PLoS One* 7:e43746 (2012), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Вкратце, библиотеку фагового дисплея сначала сортировали с помощью всех четырех антигенов при концентрации 100 нМ в первом раунде, а затем сортировали с помощью одного антигена при концентрации 100,
10 50 и 20 нМ во втором, третьем и четвертом раундах, соответственно. Для того чтобы осуществить обогащение клонами, которые связываются с Fc-доменами как человека, так и мыши, использовали множество стратегий сортировки, в которых использовали чередующиеся антигены в последующих раундах (например, Fc человека – ECD мыши – ECD человека). Проводили скрининг отдельных клонов, применяя ELISA фагов с
15 помощью указанных четырех антигенов 45, и определяли последовательности ДНК клонов, у которых выявили связывание со всеми антигенами.

[00198] Белки Fab с меткой Avi на С-конце тяжелой цепи прошедших селекцию клонов получали в *E. coli* и биотинилировали, как описано ранее (Miller et al., «T Cell Receptor-Like Recognition of Tumor in vivo by Synthetic Antibody Fragment,» *PLoS One*
20 7:e43746 (2012), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Получали образец клона X17 IgG2a-LALAPG мыши, применяя модифицированный вариант вектора pFUSE-mIgG2a-Fc (InvivoGen), содержащий мутации LALAPG в Fc-области (Lo et al., «Effector-Attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice,» *J. Biol. Chem.* 292:3900-3908 (2017), содержание
25 которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки), и домен CH1 человека и вектор pFUSE-CLIg (InvivoGen). Это химерное антитело состояло из последовательностей Fab человека и Fc мыши. Кроме того, последовательности Fc мыши заменяли на таковые из IgG1 человека, содержащие мутации LALA, с получением антител hIgG1-X17, hIgG1-X2 и hIgG1-X3.

30 **[00199]** *Измерения аффинностей.* Аффинность клонов антител в форматах Fab и IgG измеряли, применяя анализ связывания с гранулами (Nishikori et al., «Broad Ranges of Affinity and Specificity of Anti-Histone Antibodies Revealed by a Quantitative Peptide Immunoprecipitation Assay,» *J. Mol. Biol.* 424:391-399 (2012); Nady et al., «ETO Family Protein Mtgr1 Mediates Prdm14 Functions in Stem Cell Maintenance and Primordial Germ Cell
35 Formation,» *Elife* 4:e10150 (2015); и Hattori et al., «Multiplex Bead Binding Assays Using Off-

the-Shelf Components and Common Flow Cytometers,» *J. Immunol. Methods* 490:112952 (2020), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Биотинилированный белок антигена человека иммобилизовали на гранулах со стрептавидином Dynabeads M280 (Thermo Fisher Scientific) путем быстрого смешивания 100 мкл разбавленных в 10 раз гранул в ФБРБ (ФБР, содержащем 0,5% бычий сывороточный альбумин (БСА, GeminiBio)) и 100 мкл 50 нМ белка Fz. Гранулы затем блокировали с помощью 2 мкМ биотина, дважды промывали ФБРБ и ресуспендировали в 1 мл ФБРБ. Эту реакцию соответствующим образом масштабировали на количества измерений, при необходимости. Пять микролитров разбавленных гранул и 20 мкл образца антитела смешивали в лунке 96-луночного полипропиленового планшета (Greiner Bio-One, номер в каталоге 650261) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут при аккуратном взбалтывании. Образцы переносили в лунки 96-луночного фильтрационного планшета (Millipore MultiScreen HTS HV, 0,45 мм, Thermo Fisher); жидкость удаляли, применяя вакуумную установку, и лунки промывали три раза 200 мкл ледяного ФБРБ, применяя вакуумную установку. Гранулы окрашивали антителом против Fab человека, меченым Alexa Fluor 647 (Jackson Immuno Research, Alexa Fluor® 647 AffiniPure, антитело козы против IgG человека, специфичное к фрагменту F(ab')₂, 109-605-097). После промывки гранулы суспендировали в 70 мкл ФБРБ и анализировали, применяя систему анализа iQue (Sartorius) или систему Intellicyt HTFC. Полученные в результате этого кривые титрования анализировали путем нелинейной аппроксимации методом наименьших квадратов модели связывания 1:1, применяя программное обеспечение GraphPad Prism.

[00200] *Измерение времени полужизни в крови.* Центрифугировали образцы крови мыши и разбавляли супернатанты в 2000 раз в ФБРБ. Проводили количественный анализ уровней антитела, применяя анализ на основе гранул, описанный выше, за исключением того, что реакцию связывания проводили при 4°C. Время полужизни определяли путем нелинейной аппроксимации методом наименьших квадратов медианных интенсивностей флуоресценции с помощью одной экспоненциальной кривой.

[00201] *Анализ соосаждения с фосфопептидами.* Клетки 293Т трансфицировали плазмидами, кодирующими меченый HA Dok-7 и меченый HA CrkI, при 37°C в течение 48 часов (липофектамин 3000, Thermofisher Scientific). Через 48 часов трансфицированные клетки гомогенизировали при 4°C в лизирующем буфере; добавляли NP-40 до конечной концентрации 1% и инкубировали экстракт при покачивании в течение 30 мин при 4°C. Нерастворимые белки удаляли путем центрифугирования при 12000 об/мин в течение 20

минут при 4°C. Супернатанты предварительно осветляли в течение 1 часа при 4°C стрептавидин-агарозными гранулами (Sigma-Aldrich).

[00202] Четыре биотинилированных фосфопептида: (1)

ELLLDRLHPNPMYQRMPLLLN (SEQ ID NO: 272), (2) ELLLDRLHPNMP(Y)QRMPLLLN

(SEQ ID NO: 273), (3) ELLLDRLHPAPMP(Y)QRMPLLLN (SEQ ID NO: 274) и (4)

ELLLDRLHPNMP(Y)AAAPLLLN (SEQ ID NO: 275) (ThermoFisher Scientific), -

иммобилизовали на стрептавидин-агарозных гранулах и инкубировали в течение ночи при

4°C в лизирующем буфере (50 mM хлорид натрия, 30 mM триэтаноламин, pH 7,5, 50 mM

фторид натрия, 5 mM ЭДТА, 5 mM ЭГТА, 2 mM ортованадат натрия, 1 mM N-

этилmaleимид, 1 mM тетратионат натрия и 10 мкМ пепстатин, плюс смесь полного набора

ингибиторов протеаз) (Roche), содержащем 1% NP-40. Экстракты клеток, предварительно

осветленные на стрептавидин-агарозных гранулах, инкубировали в течение ночи при 4°C с

биотинилированными фосфопептидами, иммобилизованными на стрептавидин-агарозных

гранулах. Гранулы затем промывали (три раза в течение 9 минут) в лизирующем буфере,

содержащем 1% NP-40. Белки элюировали с гранул с помощью 1% ДСН в лизирующем

буфере. Вестерн-блоттинг проводили, применяя антитела против метки HA (Abcam,

ab49969).

[00203] **КПЦР-РВ.** Общую РНК выделяли из мышц зародышей дикого типа и *Dok-7*

СМ в день E18,5, применяя реагент TRIZOL (Invitrogen) и проводили обратную

транскрипцию с помощью набора Superscript-III First strand kit (Invitrogen).

Количественную ПЦР в реальном времени проводили на LightCycler 480 (Roche),

применяя набор SYBR Green Master kit (Roche). Реакции ПЦР проводили, применяя пары

праймеров 5'-CTGGTGAA AAGGACCTCTCGAAG-3' (SEQ ID NO: 276) и 5'-

CCAGTTTCACTAATGACACAAA CG-3' (SEQ ID NO: 277) для гипоксантин-гуанин

фосфорибозилтрансферазы (Hprt), 5'-TCAGCCTCAGAAGAGCGTGTG-3' (SEQ ID NO:

278) и 5'- GCCTCAGAAGAGGAAGTGGATAG-3' (SEQ ID NO: 279) для *Dok7*. Образцы

анализировали в трех повторах и уровень экспрессии *Dok7* нормировали на уровень

экспрессии Hprt.

ПРИМЕР 1. Механизм заболевания и терапевтическое спасение от опосредованной *Dok7* врожденной миастении.

[00204] Врожденная миастения (СМ) представляет собой группу заболеваний,

вызванных мутациями в генах, которые играют ключевые роли в формировании,

функционировании и поддержании нервно-мышечных синапсов (см., например, Muller et

al., «Congenital Myasthenic Syndromes: Spotlight on Genetic Defects of Neuromuscular

Transmission,» *Expert Rev. Mol. Med.* 9:1-20 (2007); Engel, A. G., «Current Status of the Congenital Myasthenic Syndromes,» *Neuromuscul. Disord.* 22:99-111 (2012); и Engel et al., «Congenital Myasthenic Syndromes: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment,» *Lancet Neurol.* 14:420-434 (2015), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). По большей части, мутации в этих генах рецессивны и снижают активность генов, вызывая синаптические нарушения, которые приводят к раннему началу структурных и функциональных нарушений в нервно-мышечном синапсе, которые являются причиной флуктуирующей и истощающей или длительной мышечной слабости в течение всей жизни.

[00205] Мутации в *Dok7*, гене, кодирующем адаптерный белок, важный для формирования и поддержания нервно-мышечных синапсов (Okada et al., «The Muscle Protein Dok-7 is Essential for Neuromuscular Synaptogenesis,» *Science* 312:1802-1805 (2006), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки), составляют значительную часть (10 - 20%) всех случаев CM (Beeson et al., «Dok-7 Mutations Underlie a Neuromuscular Junction Synaptopathy,» *Science* 313:1975-1978 (2006); Muller et al., «Phenotypical Spectrum of DOK7 Mutations in Congenital Myasthenic Syndromes,» *Brain* 130:1497-1506 (2007); и Hamuro et al., «Mutations Causing DOK7 Congenital Myasthenia Ablate Functional Motifs in Dok-7,» *J. Biol. Chem.* 283:5518-5524 (2008), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Указанное заболевание инвалидизирующее, вызывает слабость в мышцах конечностей, шеи и лица, и четверти пациентов с *Dok7* CM требуется неинвазивная вентиляция легких в некоторый момент времени их жизни. Незначительное число способов лечения ослабляют клинические симптомы, хотя альбутерол/сальбутамол, который активирует адренергические рецепторы, может принести пользу группе пациентов с *Dok7* CM посредством не до конца понятных механизмов (Liewluck et al., «Beneficial Effects of Albuterol in Congenital Endplate Acetylcholinesterase Deficiency and Dok-7 Myasthenia,» *Muscle Nerve* 44:789-794 (2011) и Burke et al., «Salbutamol Benefits Children with Congenital Myasthenic Syndrome due to DOK7 mutations,» *Neuromuscul. Disord.* 23:170-175 (2013), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

[00206] Для формирования и поддержания нервно-мышечных синапсов требуется сборка высокоспециализированных пресинаптических и постсинаптических мембран, требующая скоординированного действия нескольких ключевых молекул (Burden, S. J., «The Formation of Neuromuscular Synapses,» *Genes Dev.* 12:133-148 (1998); Sanes & Lichtman, «Induction, Assembly, Maturation and Maintenance of a Postsynaptic Apparatus,»

Nat. Rev. Neurosci. 2:791-805 (2001); Burden, S. J., «SnapShot: Neuromuscular Junction,» *Cell* 144:826-826(2011); Burden et al., «The Role of MuSK in Synapse Formation and Neuromuscular Disease,» *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a009167 (2013); и Tintignac et al., «Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting,» *Physiol. Rev.* 95:809-852 (2015), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Агрин, высвобожденный из окончаний двигательного нерва, связывается с родственным рецептору липопротеина белком 4 (Lrp4) в мышце, стимулируя образование комплекса между Lrp4 и специфической для мышц киназой (MuSK) - рецептором с тирозинкиназной активностью, который действует как главный регулятор синаптической дифференцировки (Burden et al., «The Role of MuSK in Synapse Formation and Neuromuscular Disease,» *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a009167 (2013); Tintignac et al., «Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting,» *Physiol. Rev.* 95:809-852 (2015); McMahan, U. J., «The Agrin Hypothesis,» *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55:407-418 (1990); Jennings et al., «Muscle-Specific trk-Related Receptor with a Kringle Domain Defines a Distinct Class of Receptor Tyrosine Kinases,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2895-2899 (1993); DeChiara et al., «The Receptor Tyrosine Kinase MuSK is Required for Neuromuscular Junction Formation in vivo,» *Cell* 85:501-512 (1996); Glass et al., «Agrin Acts via a MuSK Receptor Complex,» *Cell* 85:513-523 (1996); Kim et al., «Lrp4 is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK,» *Cell* 135:334-342 (2008); и Zhang et al., «LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin,» *Neuron*. 60:285-297 (2008), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Lrp4, кластеризованный в постсинаптической мембране в результате активации MuSK, ретроградным образом передает сигнал двигательным аксонам стимулировать пресинаптическую дифференцировку (Yumoto et al., «Lrp4 is a Retrograde Signal for Presynaptic Differentiation at Neuromuscular Synapses,» *Nature* 489:438-442 (2012), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Мутации в генах агрина, *Lrp4* и *MuSK*, а также субъединицы ацетилхолинового рецептора (*AChR*), также вызывают CM (Engel et al., «Congenital Myasthenic Syndromes: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment,» *Lancet Neurol.* 14:420-434 (2015) и McMacken et al., «The Increasing Genetic and Phenotypical Diversity of Congenital Myasthenic Syndromes,» *Neuropediatrics* 48:294-308 (2017), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

[00207]

Активация MuSK также зависит от Dok7. Аминоконцевая область Dok7 содержит гомологичный плекстрину (PH) и связывающий фосфотирозин (PTB) домены

(ФИГ. 1А), функция которых состоит в димеризации Dok7 и связывании с мотивом фосфорилированного тирозина в околосмембранной (ОМ) области MuSK (Yamanashi et al., «Activation of Receptor Protein-Tyrosine Kinases from the Cytoplasmic Compartment,» *J. Biochem.* 151:353-359 (2012), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Неспособность Dok7 связывать MuSK, вследствие отсутствия Dok7 или мутации в ОМ области MuSK, которая предотвращает связывание Dok7, приводит к неспособности агрина стимулировать фосфорилирование MuSK (Okada et al., «The Muscle Protein Dok-7 is Essential for Neuromuscular Synaptogenesis,» *Science* 312:1802-1805 (2006); Herbst & Burden, «The Juxtamembrane Region of MuSK has a Critical Role in Agrin-Mediated Signaling,» *EMBO J.* 19:67-77 (2000); и Zhou et al., «Distinct Domains of MuSK Mediate its Abilities to Induce and to Associate with Postsynaptic Specializations,» *J. Cell Biol.* 146:1133-1146 (1999), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки), демонстрируя, что связывание Dok7 с MuSK необходимо для стабилизации фосфорилирования MuSK, вероятно, путем стимуляции димеризации MuSK (Bergamin et al., «The Cytoplasmic Adaptor Protein Dok7 Activates the Receptor Tyrosine Kinase MuSK via Dimerization,» *Mol. Cell* 39:100-109 (2010), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Кроме того, стимулированное агрином фосфорилирование MuSK приводит к фосфорилированию двух остатков тирозина в карбоксиконцевой области Dok7, запуская привлечение белков Crk и Crk-L, которые участвуют в кластеризации ацетилхолиновых рецепторов (AChR) (Hallock et al., «Dok-7 Regulates Neuromuscular Synapse Formation by Recruiting Crk and Crk-L,» *Genes Dev.* 24:2451-2461 (2010) и Hamuro et al., «Mutations Causing DOK7 Congenital Myasthenia Ablate Functional Motifs in Dok-7,» *J. Biol. Chem.* 283:5518-5524 (2008), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

[00208] Наиболее распространенной причиной *Dok7* CM является дупликация четырех пар оснований (1124_1127 *dup TGCC*), которая практически всегда присутствует в виде одного или двух мутантных аллелей при *Dok7* CM, приводящая к сдвигу рамки считывания и преждевременной терминации *Dok7* (Beeson et al., «Dok-7 Mutations Underlie a Neuromuscular Junction Synaptopathy,» *Science* 313:1975-1978 (2006) и Cossins et al., «The Spectrum of Mutations that Underlie the Neuromuscular Junction Synaptopathy in DOK7 Congenital Myasthenic Syndrome,» *Hum. Mol. Genet.* 21:3765-3775 (2012), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). В укороченной форме *Dok7* сохраняются домены PH и PTB, и она связывается с фосфорилированной по тирозину ОМ областью MuSK (Beeson et al., «Dok-7 Mutations

Underlie a Neuromuscular Junction Synaptopathy,» *Science* 313:1975-1978 (2006), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки), но в ней отсутствуют два остатка тирозина, которые фосфорилируются и привлекают белки Crk. Эти и другие открытия указывают на то, что отсутствие этих двух остатков тирозина в укороченном Dok7 являлось причиной синаптических нарушений при этой распространенной форме Dok7 CM (Engel et al., «Congenital Myasthenic Syndromes: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment,» *Lancet Neurol.* 14:420-434 (2015); Hallock et al., «Dok-7 Regulates Neuromuscular Synapse Formation by Recruiting Crk and Crk-L,» *Genes Dev.* 24:2451-2461 (2010); и Hamuro et al., «Mutations Causing DOK7 Congenital Myasthenia Ablate Functional Motifs in Dok-7,» *J. Biol. Chem.* 283:5518-5524 (2008), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Тем не менее, механизм *Dok7 1124_1127 dup TGCC* CM не был выяснен.

С-концевая область Dok7 необходима для формирования синапса.

[00209] Для того чтобы исследовать, как утрата карбоксиконцевой области Dok7 приводит к нарушениям в структуре и функции нервно-мышечных синапсов, получали модель наиболее распространенной формы *Dok7 CM* у мышей (*Dok7 1124_1127 dup*) (ФИГ. 1А). Также получали вторую мутантную мышь (*Dok7 Y396F; Y406F*), у которой два остатка тирозина в карбоксиконцевой области были мутированы на фенилаланин (ФИГ. 1А).

[00210] Гомозиготные мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которых называли мышами *Dok7 CM*, присутствовали в ожидаемых количествах в день E18,5, но редко оказывались живыми на следующий день, при рождении, когда нервно-мышечные синапсы необходимы для дыхания и выживаемости (ФИГ. 1В). Мышцы диафрагмы из зародышей в день E18,5 окрашивали зондами, которые позволяли визуализацию пресинаптической и постсинаптической дифференцировки. Было обнаружено в 5 раз меньше синапсов у мышей *Dok7 CM*, чем у мышей дикого типа (ФИГ. 1С). Более того, синапсы, которые образовались, были незрелыми, так как и размер синапсов, и плотность синаптических AChR были меньше в 5 раз (ФИГ. 1С; ФИГ. 7). Напротив, гомозиготные мыши *Dok7 Y396F; Y406F*, которых называли мышами *Dok7 2YF*, рождались с ожидаемой частотой (ФИГ. 1В), и их нервно-мышечные синапсы выглядели преимущественно нормально (ФИГ. 1С; ФИГ. 8). Более того, мыши *Dok7 2YF* развились в фертильных взрослых мышей. В совокупности, эти открытия свидетельствуют о том, что утрата двух остатков тирозина в карбоксиконцевой области Dok7, неожиданно, не вызывает летальности и тяжелых нарушений в формировании синапса у мышей *Dok7 CM*.

Уровни белка Dok7 и фосфорилирование MuSK по тирозину снижены у мышей Dok7 CM.

[00211] Для того чтобы определить, как утрата карбоксиконцевой области вызывала синаптические дефекты, измеряли экспрессию мРНК *Dok7* и укороченного белка Dok7 у мышей *Dok7 CM*, применяя антитела против домена РТВ Dok7, которые одинаково позволяли детектировать укороченный белок и белок дикого типа (ФИГ. 9А - 9В). Обнаружили, что уровни мРНК Dok7 были нормальными в мышце из мышей *Dok7 CM* (ФИГ. 10А - 10С), тогда как укороченный белок Dok7 экспрессировался на 3-кратно более низких уровнях, чем белок Dok7 дикого типа (ФИГ. 2А; ФИГ. 10А - 10С).

[00212] Так как Dok7 действует как димер, чтобы димеризовать MuSK, стабилизируя фосфорилирование MuSK по тирозину (Bergamin et al., «The Cytoplasmic Adaptor Protein Dok7 Activates the Receptor Tyrosine Kinase MuSK via Dimerization,» Mol. Cell 39:100-109 (2010), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки), изучали, может ли снижение уровней белка Dok7 у мышей *Dok7 CM* приводить к снижению фосфорилирования MuSK по тирозину. MuSK иммунопреципитировали, измеряли фосфорилирование MuSK, и обнаружили, что фосфорилирование MuSK снижалось в 7 раз у мышей *Dok7 CM*, но было нормальным у мышей *Dok7 2YF* (ФИГ. 2С - 2D).

Белки Crk привлекаются напрямую к MuSK, а также к Dok7.

[00213] Ожидалось, что привлечение Crk к синапсу будет отсутствовать или будет сильно снижено у обеих линий мутантных мышей *Dok7 CM* и *Dok7 2YF*. Действительно, привлечение Crk к синапсу и к комплексу MuSK значительно снижалось (в 2,8 раза) у мышей *Dok7 CM* (ФИГ. 3А - 3В), но, неожиданно, лишь незначительно снижалось (28%) у мышей *Dok7 2YF* (ФИГ. 3А - 3В). Эти открытия указывают на то, что Crk привлекался к фосфорилированному(-ым) по тирозину синаптическому(-им) белку(-ам), дополнительно к Dok7.

[00214] Три тирозина петли активации и Y553 становились фосфорилированными в MuSK после стимуляции агрином (Okada et al., «The Muscle Protein Dok-7 is Essential for Neuromuscular Synaptogenesis,» *Science* 312:1802-1805 (2006); Herbst & Burden, «The Juxtamembrane Region of MuSK has a Critical Role in Agrin-Mediated Signaling,» *EMBO J.* 19:67-77 (2000); Watty et al., «The in vitro and in vivo Phosphotyrosine Map of Activated MuSK,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4585-4590 (2000); и Till et al., «Crystal Structure of the MuSK Tyrosine Kinase: Insights into Receptor Autoregulation,» *Structure* 10:1187-1196 (2002), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки). Обнаружили, что Y553 в ОМ области MuSK не только находится внутри сайта

связывания РТВ, который привлекает Dok7, но также является потенциальным SH2-связывающим мотивом для белков Crk (ФИГ. 3С). На ФИГ. 3D показано, что CrkI, а также Dok7, связывали ОМ сайт MuSK зависимым от фосфорилирования образом. Мутация аминокислот, которые составляют SH2-связывающий мотив, но не сайт связывания РТВ, нарушала связывание CrkI (ФИГ. 3D). Таким образом, Crk может связываться не только с фосфорилированной карбоксиконцевой областью Dok7, но также непосредственно с фосфорилированной по тирозину ОМ областью MuSK. Такая избыточность для привлечения Crk к синапсу и комплексу MuSK, вероятно, объясняет практически нормальное связывание Crk с комплексом MuSK у мышей *Dok7 2YF* и может лежать в основе различия фенотипов мышей *Dok7 CM* и *Dok7 2YF*.

[00215] Таким образом, ОМ область MuSK содержит перекрывающиеся сайты связывания с белком, содержащим РТВ- и SH2-домены, систему, которая предлагает гибкость и модуляцию способа передачи сигнала от рецепторов с тирозинкиназной активностью, которая может быть более распространенной, чем считают на данный момент.

Разработка агонистических антител против MuSK человека и мыши.

[00216] Если пониженное фосфорилирование MuSK было важным для заболевания при *Dok7 CM*, пришли к выводу, что стимулирование MuSK может спасти от синаптических нарушений и преодолеть летальность. Представление, что снижение фосфорилирования MuSK было главным для заболевания, исследовали путем создания мышей *Dok7 CM* и их лечения с помощью агонистических антител, нацеленных на MuSK.

[00217] Библиотеку фагового дисплея, экспрессирующую синтетические антитела человека в формате Fab, подвергали скринингу на антитела, которые связывались с Fz-подобным доменом во внеклеточной области MuSK как мыши, так и человека. Нацеливались на Fz-подобный домен, так как этот домен не является необходимым для функционирования MuSK, и так как предыдущие исследования показали, что антитела против Fz-подобного домена не приносят очевидного вреда мышам (Remedio et al., «Diverging Roles for Lrp4 and Wnt Signaling in Neuromuscular Synapse Development During Evolution,» *Genes Dev.* 30:1058-1069 (2016) и Cantor et al., «Preserving Neuromuscular Synapses in ALS by Stimulating MuSK with a Therapeutic Agonist Antibody,» *Elife* 7:e34375 (2018), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

[00218] Были идентифицированы высокоаффинные антитела, которые связывали Fz-подобный домен в MuSK человека и мыши (ФИГ. 4А; ФИГ. 12А - 12С). Тетрамеризованный вариант каждого Fab, за исключением X1, стимулировал

фосфорилирование MuSK в мышечных трубочках C2 мыши (ФИГ. 4B). Антитела X3 и X17 в обоих форматах IgG2a мыши и IgG1 человека, а также X2 в формате IgG1 человека, связывали MuSK человека и мыши с субнанолярной аффинностью и аналогичным образом стимулировали фосфорилирование MuSK по тирозину, независимо от агрина (ФИГ. 4C - 4D). Так как у антител были сходные активности, X17 выбирали для дальнейшего анализа *in vivo*.

[00219] Антитело X17 вводили путем интраперитонеальной инъекции в формате IgG2a мыши с так называемыми мутациями LALAPG, которые снижают эффекторную функцию домена Fc (Lo et al., «Effector-Attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice,» *J. Biol. Chem.* 292:3900-3908 (2017), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки), мышам дикого типа. Обнаружили, что у X17 время полужизни в крови составляло 5 дней (ФИГ. 4E). Путем окрашивания на X17, чтобы провести количественный анализ связывания мишеней в нервно-мышечных синапсах, обнаружили, что дозы 10 мг/кг X17 было достаточно для насыщения синапсов MuSK (ФИГ. 4F). Длительные инъекции mIgG2a-X17 (10 мг/кг в дни P4, P24 и P44) мышам дикого типа в течение двух месяцев не оказывали влияния на организацию нервно-мышечных синапсов, набор массы тела или двигательное поведение (ФИГ. 13A - 13D).

Агонистическое антитело X17 спасает формирование синапса и спасает мышей Dok7 CM от летальности.

[00220] Хотя мыши *Dok7 CM* на фоне C57BL/6 умирали при рождении, обнаружили, что мыши *Dok7 CM* при смешанном генетическом фоне выживали в течение от одной до двух недель после рождения (ФИГ. 14A - 14B), что облегчало эксперименты по исследованию терапевтической эффективности. У мышей *Dok7 CM* при смешанном фоне C57BL/6-СВА выявляли признаки заболевания вскоре после рождения, так как они были низкорослыми и имели нарушения в формировании синапсов (ФИГ. 15A - 15E). Несмотря на выживаемость в течение нескольких недель после рождения, экспрессия Dok7, фосфорилирование MuSK и организация нервных окончаний и AChR были сходными в день E18,5 у мышей инбредной C57BL/6 и смешанной линии C57BL/6-СВА, несущих одинаковую мутацию *Dok7*.

[00221] Мышам *Dok7 CM* вводили путем инъекции в день P4 10 мг/кг антитела X17 или антитела отрицательного контроля соответствующего изотипа. Не получившие лечение мыши *Dok7 CM*, или мыши *Dok7 CM*, которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, продолжали терять массу тела и погибали в течение недели в день P10 - 12 (ФИГ. 5A - 5B). Инъекция антитела X17 обращала потерю массы тела и

спасала мышей *Dok7 CM* от такой ранней летальности (ФИГ. 5A - 5B). В течение следующих трех недель, набор массы тела был непрерывным у девяти из двенадцати мышей *Dok7 CM*, которым вводили путем инъекции антитело X17; набор массы тела замедлился у трех мышей, которым вводили путем инъекции X17, и они умерли в день P23 - P24. Другое антитело, X3, спасало мышей *Dok7 CM* от ранней постнатальной летальности, когда им вводили дозу 20 мг/кг, но не дозу 10 мг/кг (ФИГ. 17A - 17C), позволяя предположить, что более высокая первоначальная доза агонистического антитела против MuSK может быть более эффективной во время раннего постнатального развития, когда синапсы проходят решающие этапы созревания.

[00222] Инъекцию антитела X17 повторяли девяти выжившим мышам *Dok7 CM* в дни P24 и P44, чтобы определить, может ли длительное введение дозы привести к продолжительной выживаемости. Длительное введение дозы антитела X17 девяти выжившим мышам *Dok7 CM* спасало этих мышей *Dok7 CM* в течение по меньшей мере двух месяцев (ФИГ. 5A - 5B), до момента, когда оценивали их двигательную активность и умерщвляли мышей, чтобы исследовать их синапсы.

[00223] Антитело X17 спасало формирование и созревание синапсов, так как нервно-мышечные синапсы развились в сложную подобную кренделю форму, характерную для полностью зрелых нервно-мышечных синапсов мышей (ФИГ. 5C). Более того, X17 спасало привлечение белков Crk к нервно-мышечному синапсу (ФИГ. 5D).

[00224] Антитело X17 спасало двигательную функцию мышей *Dok7 CM*, что оценивали по силе захвата передних конечностей и анализу на барабане (ФИГ. 5E). Более того, мыши *Dok7 CM*, которым вводили путем инъекции антитело X17, были фертильны и производили потомство с ожидаемой частотой. В совокупности, эти открытия поддерживают представление, что снижение фосфорилирования MuSK по тирозину является ключевым для заболевания мышей *Dok7 CM*. Даже если карбоксиконцевая область *Dok7* играла дополнительную роль в формировании синапса, такую функцию можно было обойти путем стимуляции MuSK.

Терапевтическое обращение у взрослых мышей Dok7 CM.

[00225] Затем исследовали, может ли X17 обращать нервно-мышечные нарушения, которые развиваются во взрослом состоянии, вопрос, особенно значимый для разработки терапии человека, так как *Dok7 CM* у людей, вероятно, будут лечить во взрослой жизни. Мышей *Dok7 CM* лечили X17 либо в дни P4, P24 и P44, либо в дни P4 и P18, но затем прекращали лечение антителом. Эти мыши *Dok7 CM* продолжали сохранять свою массу тела и подвижность в течение 2 - 3 месяцев (ФИГ. 6A), свидетельствуя о том, что спасение было более длительным, чем продолжительность присутствия антитела в крови. Тем не

менее, эти мыши *Dok7* CM, в конечном итоге, начали терять массу и проявлять двигательные нарушения (ФИГ. 6А - 6В). Когда мыши теряли массу тела со скоростью ~0,4 г/день, снова вводили путем инъекции X17 и отслеживали массу тела и подвижность мышцей *Dok7* CM. Через два дня после возобновления лечения X17, мыши *Dok7* CM снова
5 начали набирать массу тела, которая повышалась на ~0,4 г/день в течение следующей недели (ФИГ. 6А). В течение одной недели после возобновления лечения антителом, двигательная активность мышцей *Dok7* CM восстанавливалась (ФИГ. 6В). Спасенные мыши продолжали набирать массу, и их двигательная активность продолжала улучшаться в течение по меньшей мере еще одной недели после лечения антителом, когда мышцей
10 умерщвляли (ФИГ. 6А - 6В).

Обсуждение Примера 1.

[00226] Стимулирование MuSK агонистическим антителом спасало формирование синапса и двигательную функцию, предотвращая летальность и позволяя мышцам *Dok7* CM развиваться после рождения в фертильных взрослых. Более того, после отмены лечения
15 антителом, у взрослых мышцей *Dok7* CM, в конечном итоге, проявлялись двигательные нарушения, которые легко обращались после возобновления лечения антителом, позволяя предположить, что эта терапевтическая стратегия может принести пользу при *Dok7* CM, а также других нервно-мышечных заболеваниях у людей.

[00227] В большинстве предыдущих исследований *Dok7* полагались на анализ трансфицированных мышечных и немышечных клеток, которые сверхэкспрессируют *Dok7* (Okada et al., «The Muscle Protein Dok-7 is Essential for Neuromuscular Synaptogenesis,» *Science* 312:1802-1805 (2006); Hamuro et al., «Mutations Causing DOK7 Congenital Myasthenia Ablate Functional Motifs in Dok-7,» *J. Biol. Chem.* 283:5518-5524 (2008); и Hallock et al., «Dok-7 Regulates Neuromuscular Synapse Formation by Recruiting Crk and Crk-L,» *Genes Dev.* 24:2451-2461 (2010), содержания которых настоящим полностью
20 включены в данную заявку посредством ссылки). В этом контексте, который обходит обычную потребность в агрине и Lgr4 для стимуляции MuSK, последствия *in vivo* мутаций *Dok7* могли быть скрыты вследствие сверхэкспрессии *Dok7*.

[00228] В более раннем исследовании была описана сходная модель на мышцах, полученная с применением классического нацеливания на гены эмбриональных
30 стволовых клеток, этой распространенной формы *Dok7* CM (Arimura et al., «Neuromuscular Disease. DOK7 Gene Therapy Benefits Mouse Models of Diseases Characterized by Defects in the Neuromuscular Junction,» *Science* 345:1505-1508 (2014), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки). Хотя этих
35 мутантных мышцей можно было спасти от летальности с помощью вектора на основе

аденоассоциированного вируса, экспрессирующего *Dok7* дикого типа, создавая терапевтический подход к лечению *Dok7 CM* (Arimura et al., «Neuromuscular Disease. DOK7 Gene Therapy Benefits Mouse Models of Diseases Characterized by Defects in the Neuromuscular Junction,» *Science* 345:1505-1508 (2014), содержание которого настоящим
5 полностью включено в данную заявку посредством ссылки), в этом исследовании не изучали причину заболевания в модели *Dok7 1124_1127 dup* у мышей.

[00229] У инбредных мышей C57BL/6, несущих мутацию *Dok7 1124_1127 dup*, выявили более тяжелые функциональные нарушения, чем у людей с той же мутацией. Обнаружили, что мутантный фенотип был менее тяжелым у мышей со смешанным
10 генетическим фоном, так как аутбредные мыши выживали в течение нескольких недель после рождения, тогда как инбредные мутантные мыши погибали при рождении. Модификаторы в гибридных штаммах могли снижать тяжесть заболевания, или мыши C57BL/6 могли нести гены, которые ухудшали фенотип. В любом случае, незначительно
15 большая продолжительность жизни мышей *Dok7 CM* при смешанном фоне позволяет предложить модель на мышах, которая дает большее временное окно для лучшей оценки лекарственных средств.

[00230] Эти эксперименты продемонстрировали полное спасение от врожденной летальности с помощью таргетной терапии. Эти открытия указывают на непредвиденный терапевтический подход к лечению заболевания, так как эта стратегия не направлена
20 напрямую на мутантный белок, но вместо этого направлена на белок дикого типа с пониженной активностью, вызванной мутацией вышестоящего гена в пути передачи сигнала, в данном случае *Dok7*. Такое эпистатическое спасение может обеспечить терапию CM, вызванной мутациями в агрине, *Lrp4* или *MuSK*, дополнительно к *Dok7*, а
25 также других нервно-мышечных заболеваний. Более того, эта стратегия имеет потенциал широкого применения для лечения рецессивных генетических нарушений у людей, для которых понятен механизм заболевания и идентифицированы подходящие мишени.

ПРИМЕР 2. АНТИТЕЛА ПРОТИВ MUSK.

30 Селекция антител SIMPLE, нацеленных на домен Frizzled MuSK.

[00231] Двух лам иммунизировали рекомбинантным MuSK человека (R&D Systems, № в каталоге 9810-МК). ЛПК, выделенные из иммунизированных лам, использовали для выделения РНК, ПЦР-РВ и ПЦР-клонирования Fab в фагмиду, применяя стратегию,
описанную de Haard et al., «A Large Non-Immunized Human Fab Fragment Phage Library that
35 Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies,» *J. Biol. Chem.* 274:18218-18230 (1999), содержание которого настоящим полностью включено в данную

заявку посредством ссылки). Проводили до трех раундов пэннинга после селекции с помощью фагового дисплея, применяя либо полноразмерный MuSK человека, либо полноразмерный MuSK мыши, либо MuSK человека, в котором нет Ig1-подобного, и/или Ig2-подобного, и/или Ig3-подобного доменов (ФИГ. 18).

5 **[00232]** Для каждой селекции с обогащением, отдельные клоны растили в 96-луночном планшете с глубокими лунками и получали периплазматические фракции. Исследовали с помощью ELISA связывание этих периплазматических экстрактов (содержащих Fab) с полноразмерным MuSK человека, полноразмерным MuSK мыши или MuSK человека, в котором нет Ig1-подобного, и/или Ig2-подобного, и/или Ig3-подобного доменов. Fab, для которых продемонстрировали явное связывание в анализе ELISA, затем
10 исследовали в анализе Biacore на скорость диссоциации от чипа CM5, покрытого полноразмерным MuSK человека, полноразмерным MuSK мыши или MuSK человека, в котором нет Ig1-подобного, и/или Ig2-подобного, и/или Ig3-подобного доменов. Связавшиеся Fab с хорошей аффинностью к MuSK человека и мыши и специфичные к домену Frizzled MuSK секвенировали. Получили шесть различных семейств связавшихся Fab: 1E11, 6F8, 10F1, 17H10, 14D10, 16F11. Их клонировали в вектор, содержащий последовательность IgG1 человека с мутациями LALA (L234A, L235A), чтобы
15 осуществить нокаут эффекторных функций. Антитела получали в клетках HEK293 и очищали на колонке с белком А.

20 *Связывание антител с MuSK человека и мыши в анализе ELISA.*

[00233] Планшет для ELISA покрывали MuSK человека (R&D Systems, № в каталоге 10189-MK) или MuSK мыши (полученный самостоятельно в клетках HEK293) при концентрации 0,2 мкг/мл. После промывки и блокирования планшета, наносили серию разведений антител против MuSK и позволяли связываться в течение 2 часов при
25 комнатной температуре. Связывание детектировали с помощью антител козы против Fc человека, конъюгированных с HRP (Jackson Immunoresearch, номер в каталоге 109-035-008), и TMB (Merck Millipore № CL07). Измеряли ОП на 620 нм с помощью спектрофотометра для прочтения 96-луночных планшетов ELISA.

[00234] У всех 6 антител (1E11, 6F8, 10F1, 17H10, 14D10 и 16F11) выявили
30 связывание с MuSK человека. Тем не менее, связывание с MuSK мыши было слабым, за исключением 16F11. У 16F11 выявили повышенное связывание с MuSK мыши при более высоких концентрациях 16F11, чем с MuSK человека (ФИГ. 19). В заключение, этот анализ выявил слабую перекрестную (человек-мышь) реактивность связывания у 5 из 6 исследованных антител.

Перетасовка легких цепей для улучшения перекрестной реактивности с антигеном мыши.

[00235] После повторных контактов с одним и тем же антигеном, например, в процессе иммунизации лам, иммунный ответ оптимизируется путем повышения аффинности антител к мишени. Вторичный ответ может вызывать продукцию антител с аффинностью, на несколько степеней большей, чем при первичном ответе. Вследствие этого, В-клетки продуцируют различные антитела и их варианты с различными аффинностями к антигену. У пяти из шести антител, прошедших описанную выше селекцию, выявили слабую перекрестную реактивность с антигеном мыши.

Следовательно, осуществляли перетасовку цепей MAT. В этом процессе VH молекулы Fab клонировали в полный соответствующий репертуар VL лампы. Полученная в результате этого библиотека будет содержать фаг Fab с цепями VH, специфическими для указанного Fab, и произвольными цепями VL. Применяя фаговый дисплей и различные варианты MuSK (аналогично описанному выше), выбирали путем селекции варианты с более высокой аффинностью из встречающихся в природе у иммунизированных животных. Для каждой селекции с обогащением, отдельные клоны растили в 96-луночной планшете с глубокими лунками и получали периплазматические фракции. Исследовали связывание этих периплазматических экстрактов (содержащих Fab) в анализе Biotec на чипе CM5, покрытом полноразмерным MuSK человека и полноразмерным MuSK мыши. Fab, связывающие с хорошей аффинностью MuSK человека и мыши, секвенировали. Этот подход был успешным для 14D10, 16F11, 6F8 и 17H10. Для 10F1 и 1E11 не получили улучшения перекрестной реактивности с антигеном мыши.

[00236] Для 14D10 получили 6 различных последовательностей Fab с перекрестной реактивностью связывания: 31G2, 31B7, 3C4, 7G4, 3G3 и 3B2. Для 17H10 получили 3 различные последовательности Fab с перекрестной реактивностью связывания: 23B6, 30E1 и 30A11. Для 16F11 получили 4 различные последовательности Fab с перекрестной реактивностью связывания: 4C11, 7G12, 7B8 и 7A12.

[00237] Их всех клонировали в вектор, содержащий последовательность IgG1 человека с мутациями LALA (L234A, L235A), чтобы осуществить нокаут эффекторных функций. Антитела получали в клетках HEK293 и очищали на колонке с белком А.

Связывание антител с MuSK человека и мыши в анализе ELISA.

[00238] Планшет ELISA покрывали MuSK человека (R&D Systems, № в каталоге 10189-MK), MuSK макака-резуса (полученным самостоятельно в клетках HEK293) или MuSK мыши (полученным самостоятельно в клетках HEK293) при концентрации 0,2 мкг/мл. После промывки и блокирования планшета, наносили серию разведений антител

против MuSK и позволяли связываться в течение 2 часов при комнатной температуре. Связывание детектировали с помощью антител козы против Fc человека, конъюгированных с HRP (Jackson ImmunoResearch, номер в каталоге 109-035-008), и TMB (Merck Millipore № CL07). После остановки реакции добавлением 0,5N H₂SO₄ (ChemLab № CL052615), измеряли ОП на 450 нм с помощью спектрофотометра для прочтения 96-луночных планшетов ELISA. Значения EC₅₀ резюмированы в Таблице 4. Улучшенную аффинность к MuSK мыши подтвердили для всех исследованных клонов.

Таблица 4. Определение характеристик клонов с перетасованными легкими цепями, значения EC₅₀ для MAT, полученные в результате ELISA связывания с MuSK человека, мыши и макака-резуса.

Клон*	Гомологи я с человече ским (%)	Идентично сть с человеческ им (%)	Исходн ый клон	MuSK челове ка	MuS К мыш и	MuSK макак а- резуса	Потенциальн ые уязвимости (кол-во)
14D10	97,7	92,4	н/п	23,6	467	20,9	2
7G4	97,7	91,1	14D10	19,1	20,8	17,8	2
3C4	97,7	91,1	14D10	18,6	17,7	20,0	2
3B2	97,7	91,1	14D10	19,7	19,3	17,1	2
3G3	97,7	89,9	14D10	25,9	26,5	23,2	2
31G2	97,7	89,9	14D10	8,2	6,9	7,4	2
31B7	97,7	89,9	14D10	8,6	8,0	8,5	2
17H10	93,7	89,7	н/п	10,8	2493	12,3	4
23B6	93,7	89,7	17H10	10,5	17,9	8,6	4
30E1	94,9	89,7	17H10	10,0	24,1	8,6	4
30A11	89,9	89,7	17H10	12,8	18,4	11,3	4
16F11	90,8	80,0	н/п	43,4	50,3	33,9	1
4C11	90,8	80,0	16F11	33,1	43,7	34,1	1
7A12	90,8	78,8	16F11	26,4	27,5	21,3	1
7G12	90,8	78,8	16F11	38,3	31,3	28,6	1
7B8	90,8	82,5	16F11	28,2	34,9	35,6	1

*Последовательности, выделенные жирным шрифтом, выбрали для крупномасштабного производства антител в клетках НЕК293 и углубленного исследования.

[00239] Следующие критерии использовали для селекции лучших клонов: (i) наибольшая аффинность к MuSK человека, макака-резуса и мыши; (ii) минимальное различие в аффинности между MuSK человека, макака-резуса и мыши; (iii) максимально 10-кратное различие в аффинности между MuSK человека, макака-резуса и мыши; (iv) низкий риск проблем с возможностями производства на основании анализа последовательностей CDR; и (v) наибольшая идентичность/гомология с человеческими последовательностями.

[00240] Клоны 3B2, 30A11 и 30E1 выбирали для крупномасштабного производства антител в клетках НЕК293 и углубленного исследования.

Аффинность связывания с MuSK человека по сравнению с MuSK мыши в анализе Biacore.

[00241] Моновалентное связывание с MuSK может ингибировать индуцируемое агрином фосфорилирование MuSK и кластеризацию AChR, как описано в Huijbers et al., «MuSK Myasthenia Gravis Monoclonal Antibodies: Valency Dictates Pathogenicity,» *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 6(3):e547 (2019), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки. Следовательно, важна оценка аффинности Fab 3B2, 30E1 и 30A11 к MuSK. Действительно, менее аффинный Fab может снижать моновалентное связывание МАТ и, следовательно, имеет потенциальное преимущество в отношении безопасности. Следовательно, аффинность Fab к MuSK человека и мыши сравнивали с аффинностью МАТ в анализе Biacore.

[00242] Для определения аффинности, чип CM5 покрывали либо MuSK человека, либо MuSK мыши (200 единиц ответа (RU)) и наносили серию разведений антител (МАТ и Fab), чтобы была возможность рассчитать аффинность.

[00243] Применяя этот анализ, определили аффинность МАТ 3B2 к обоим MuSK человека и мыши, которая составляла 0,1 нМ. Для Fab 3B2 выявили аффинность 3 нМ к MuSK человека и 1,5 нМ к MuSK мыши, что в 15 - 30 раз ниже, чем аффинность МАТ.

[00244] Для 30E1 выявили 10-кратное различие в аффинности связывания с MuSK человека (0,01 нМ) по сравнению с MuSK мыши (0,1 нМ). Для 30A11 выявили даже 100-кратное различие в аффинности связывания с MuSK человека (0,001 нМ) по сравнению с MuSK мыши (0,1 нМ). Следовательно, оба антитела проявляли недостаточную перекрестную реактивность с антигеном мыши. Более того, для Fab 30E1 и Fab 30A11 выявили высокую аффинность к MuSK человека: соответственно, 0,07 нМ и 0,8 нМ. Отсутствие перекрестной реактивности с антигеном мыши у обоих антител также наблюдали для Fab. Эти результаты позволяют предположить 10- - 100-кратное различие для МАТ 30E1 и 30A11 и по меньшей мере 1000-кратное различие для Fab 30E1 и 30A11 при сравнении их аффинности к MuSK человека по сравнению с MuSK мыши (Таблица 5). Это различие в аффинности антитела к его мишени не рекомендуется для дальнейшей разработки антитела, поскольку будет трудно оценить эксперименты на мышах *in vivo* и перенести результаты на человека. В заключение, для МАТ и Fab 3B2 показали желательные свойства аффинности и перекрестной реактивности между разными видами для дальнейшей разработки.

Таблица 5. Аффинность МАТ и Fab к MuSK человека по сравнению с MuSK мыши в анализе Biacore.

	МАТ		Fab	
К _d (пМ)	Человек	Мышь	Человек	Мышь

3B2	145	134	3180	1520
30E1	11	153	70	5390
30A11	1	110	8	2420

Эффективность антител в анализе фосфорилирования C2C12.

[00245] Для того чтобы оценить степень фосфорилирования MuSK, вызванного by 3B2, 30E1, 30A11, использовали анализ фосфорилирования MuSK *in vitro*, применяя мышечные трубочки C2C12 мыши (91031101, Sigma Cell line service ECACC). Дифференцированные мышечные трубочки стимулировали 10 нМ антитела. Положительным контролем фосфорилирования MuSK было условие стимуляции с нанесением 0,1 нМ нейронального агрина крысы (550-AG-100, R&D Systems). Иммунопреципитацию MuSK начинали незамедлительно после контакта в процессе инкубации в течение ночи при 4°C. Связанные комплексы антиген-антитело преципитировали, применяя покрытые стрептавидином магнитные гранулы (V7820, Promega), в течение по меньшей мере 1 часа при 4°C и после этого тщательно промывали. Одновременно, покрытый стрептавидином планшет MSD (L15SA-1, MSD) блокировали и покрывали биотинилированным hIgG4 против MuSK (клон 13-3B5, получен в Evitria, 801457.1 PID 9860, биотинилирование осуществляли в argenx). Белки MuSK элюировали с гранул, применяя кислотные условия, с последующим этапом нейтрализации, и инкубировали на покрытом hIgG4 против MuSK планшете MSD в течение по меньшей мере 2,5 часов при комнатной температуре. Инкубация образца происходила в присутствии укороченного MuSK (MuSK Δ 1-2-3 Ig, argenx, продукция в HEK) в растворе, чтобы ограничить мешающее лекарственному средству действие совместно элюированных антител hIgG1 против MuSK. Образцы загружали в четырех повторах на планшет, который позволял детектирование общего MuSK (смесь PA1-1741, Thermoscientific и MBS9205728, MyBioSource) и фосфорилированного MuSK (смесь 05-321 Millipore Corp (клон 4G10) и ab10321, Abcam (клон PY20)) в образце в двух повторах. Окончательное детектирование осуществляли, применяя конъюгированные с SULFO-TAG антитела, соответственно, против IgG кролика для детектирования общего MuSK (32AB-1, MSD) и против IgG мыши для детектирования фосфорилированного MuSK (R32AC-1, MSD). Связанные антитела детектировали, применяя Quickplex SQ 120 (MSD).

[00246] Добавление агрина (1 нМ) к мышечным трубочкам C2C12 вызывало фосфорилирование MuSK, и его приняты за 100%. Проводили три независимых эксперимента. При использовании этой схемы эксперимента, 3B2, 30E1 и 30A11 могли вызывать фосфорилирование MuSK в данном анализе, от 50 до 94% (Таблица 6).

Таблица 6. % фосфорилирования, вызванного в анализе C2C12 мышцы.

% от агрина	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 3	Среднее	СО
1 нМ агрин	100	100	100	100	0
0,1 нМ агрин	NA	64	56	60	6
мотавизумаб	38	20	17	25	11
3B2	74	94	64	77	15
30E1	66	82	50	66	16
30A11	73	89	74	79	9

3B2 спасает от ранней постнатальной летальности мышей Dok7 1124_1127 dup.

[00247] В первом эксперименте, интраперитонеальное (и/п) введение 3B2 в дни P4 и P18 в дозе 10 мг/кг мышам дикого типа (C57BL/6//CBA) в течение по меньшей мере 5 недель выявило отсутствие их отличия от мышей дикого типа, которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, в отношении массы тела и общего состояния здоровья, позволяя предположить отсутствие опасений в отношении безопасности или проблем токсичности и показывая, что антитело 3B2 безопасно для дальнейшей экспериментальной работы *in vivo*.

[00248] Затем 3B2 вводили мышам *Dok7 1124_1127 dup* - модели врожденного миастенического синдрома (CMS) у мышей. У мышей *Dok7 1124_1127 dup* (далее называют *Dok7* мыши) укороченный *Dok7* экспрессируется на низком уровне, и фосфорилирование MuSK по тирозину сильно снижено. Сниженный уровень фосфорилирования MuSK у мышей *Dok7* играет ключевую роль в заболевании. Стимулирование фосфорилирования MuSK агонистическим антителом против MuSK может спасти от летальности мышей *Dok7*, позволяя мутантным мышам дожить до взрослого возраста. Действительно, введение 3B2 (20 мг/кг и/п в день P4 и 10 мг/кг и/п в день P18) может спасти от ранней постнатальной летальности мутантных мышей *Dok7* (ФИГ. 20).

Удаление уязвимостей у 3B2 и прививка CDR.

[00249] Антитело 3B2 разбавляли до 1 мг/мл в ФБР-твин и инкубировали при 37°C в течение до 6 недель. Затем образец анализировали с помощью масс-спектрометрии и подвергали скринингу на наличие сайтов дезаминирования, гликозилирования, изомеризации и окисления в VH и VL. Как и предполагали, обнаружили две уязвимости: 1 сайт дезаминирования в VH-CDR2 и 1 сайт окисления в VL-CDR3. Получили мутантов, чтобы удалить обе уязвимости. Более того, 3B2 уже имело высокую идентичность/гомологию последовательностям человека (94,2% и 97,7%, соответственно), но их дополнительно улучшили до 100% путем прививки CDR на наиболее близкую последовательность зародышевого типа человека.

[00250] Комбинируя эти две стратегии, получили всего 8 вариантов, которые кратко представлены в Таблице 7. Антитела продуцировали в клетках HEK293 на каркасе IgG1 - LALA человека и очищали на колонке с белком А.

Таблица 7. Варианты, полученные, чтобы удалить уязвимости и получить 100% идентичность последовательностям человека

	VL	VH
3B2g1m1	VL3B2_g1 (M)	VH3B2m1_m1 (S)
3B2g1m2		VH3B2m2_m2 (GS)
3B2g1m3		VH3B2m3_m3 (SGS)
3B2g1m4		VH3B2m4_m4 (Q)
3B2g2m1	VL3B2_g2 (S)	VH3B2m1_m1 (S)
3B2g2m2		VH3B2m2_m2 (GS)
3B2g2m3		VH3B2m3_m3 (SGS)
3B2g2m4		VH3B2m4_m4 (Q)

Аффинность вариантов 3B2 с оптимизированной последовательностью в анализе Biacore.

[00251] Для определения аффинности, чип CM5 покрывали MuSK яванского макака, крысы и мыши (200 RU) и наносили 66,7 нМ антитела, и рассчитывали кинетические параметры (Таблица 8). Можно сделать следующие выводы: (1) для 3B2g1m3 и 3B2g2m3 (варианты m3) выявили значительный спад аффинности к MuSK для всех исследованных видов; (2) для 3B2g1m2 и 3B2g2m2 (варианты m2) выявили некоторый спад аффинности к MuSK; (3) для 3B2g1m1, 3B2g2m1, 3B2g1m4, 3B2g2m4 (варианты m1 и m4) выявили отсутствие спада аффинности к MuSK для всех исследованных видов; и (4) для всех клонов не наблюдали различия между вариантами g1 и g2 (метионин по сравнению с серином в VL CDR3).

Таблица 8. Аффинность МАТ к MuSK яванского макака по сравнению с MuSK мыши и по сравнению с MuSK крысы в анализе Biacore, ассоциация и диссоциация при pH 7,4.

Ассоциация и диссоциация при pH 7,4	MuSK яванского макака			MuSK мыши			MuSK крысы		
	ka (1/Mc) (10E+4)	kd (1/c)(10E-3)	R0 (RU)	ka (1/Mc) (10E+4)	kd (1/c)(10E-3)	R0 (RU)	ka (1/Mc) (10E+4)	kd (1/c)(10E-3)	R0 (RU)
МАТ									
3B2	79	0,97	143	113	0,61	195	114	1,86	162
3B2g1m1	84	1,17	143	125	1,10	193	132	1,92	157
3B2g1m2	85	1,83	133	161	2,53	155	145	3,14	125
3B2g1m3	141	3,24	104	275	9,82	104	272	15,30	60
3B2g1m4	73	0,86	140	108	0,65	192	112	1,92	155

3B2g2m1	89	1,09	144	132	1,04	195	140	1,93	160
3B2g2m2	89	1,79	136	171	2,31	158	156	2,81	130
3B2g2m3	139	3,06	108	248	8,52	115	235	14,50	69,6
3B2g2m4	79	0,88	142	115	0,64	193	119	1,96	158

[00252] Обычные антитела поглощаются клетками путем неспецифического эндоцитоза или пиноцитоза или путем рецептор-опосредованной интернализации. Сконструировали рециркулирующее антитело, так чтобы одна молекула антитела могла связываться с антигеном множество раз, в противоположность обычным антителам, которые могут связывать антиген только один раз. Действительно, после того как обычные антитела связываются с заякоренным в мембрану антигеном, таким как рецептор, комплекс антитело-антиген интернализуется и деградирует внутри лизосомы. Это приводит к более короткому времени полужизни терапевтического антитела, делая необходимым частое введение терапевтического антитела или введение в более высоких дозах, чтобы поддерживать эффективную концентрацию антитела в плазме. Антитела можно сконструировать так, что указанное антитело диссоциирует от антигена при кислом pH внутри эндосомы. После диссоциации, рециркулирующее антитело оказывается свободным для связывания с FcRn (неонатальным Fc-рецептором) внутри эндосомы, который транспортирует антитело обратно в кровоток для повторного связывания с антигеном.

[00253] MuSK экспрессируется на мембране клеток мышцы, и интернализация MuSK описана в Zhu et al., «Muscle-Specific Receptor Tyrosine Kinase Endocytosis in Acetylcholine Receptor Clustering in Response to Agrin,» *J. Neurosci.* 28(7):1688-1696 (2008), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством ссылки. Следовательно, рециркулирующее антитело против этой мишени может представлять интерес.

[00254] Большинство pH-зависимых антител, о которых сообщали на данный момент, было получено после серьезной инженерии CDR, но иногда это свойство может быть предсуществующим. В анализе Biacore исследовали, есть ли у 3B2 и оптимизированных вариантов последовательности естественно существующая зависимость от pH в отношении связывания с MuSK.

[00255] Для того чтобы исследовать pH-зависимое связывание исследуемых антител против MuSK, применяли тот же анализ Biacore, который описан выше, но теперь диссоциацию проводили при pH 5,5 вместо pH 7,4. Результаты продемонстрировали, что 3B2 связывается с MuSK (яванского макака, крысы или мыши) с зависимостью от pH, причем наблюдается сниженная аффинность при pH 5,5 (Таблица 9). Можно сделать

следующие выводы для различных вариантов: (1) для 3B2g1m3 и 3B2g2m3 (варианты m3) выявили значительный спад аффинности к MuSK для всех исследованных видов; (2) для 3B2g1m2 и 3B2g2m2 (варианты m2) выявили некоторый спад аффинности к MuSK; (3) для 3B2g1m1, 3B2g2m1, 3B2g1m4, 3B2g2m4 (варианты m2 и m4) выявили отсутствие спада аффинности к MuSK для всех исследованных видов; и (4) для всех клонов не наблюдали различия между вариантами g1 и g2 (метионин по сравнению с серином в VL CDR3).

Таблица 9. Аффинность МАТ к MuSK яванского макака по сравнению с MuSK мыши и по сравнению с MuSK крысы в анализе Biacore, ассоциация при pH 7,4, диссоциация при pH 5,5.

Ассоциация при pH 7,4, диссоциация при pH 5,5	MuSK яванского макака			MuSK мыши			MuSK крысы		
	ka (1/Mc) (10E+4)	kd (1/c)(10 E-3)	R0 (RU)	ka (1/Mc) (10E+4)	kd (1/c)(10 E-3)	R0 (RU)	ka (1/Mc) (10E+4)	kd (1/c)(10 E-3)	R0 (RU)
МАТ									
3B2	74	3,17	149	105	2,96	194	98	6,20	174
3B2g1m1	81	2,90	147	119	3,39	192	116	5,95	166
3B2g1m2	80	3,40	148	7	9,15	152	4	86,50	136
3B2g1m3	122	9,17	131	6	491	85,5	3	527	83,2
3B2g1m4	68	2,61	146	98	3,04	191	95	5,58	171
3B2g2m1	85	2,88	151	118	3,39	193	115	5,55	174
3B2g2m2	86	3,26	146	21	88,20	153	4	97,30	145
3B2g2m3	131	8,10	133	4	411	88,3	2	444	85,3
3B2g2m4	75	2,56	148	104	3,00	191	102	5,38	172

Анализ фосфорилирования MuSK *in vitro*, в котором оценивали варианты 3B2.

[00256] Для того чтобы оценить степень фосфорилирования MuSK, вызванного исследуемыми агонистическими вариантами антител 3B2, использовали анализ фосфорилирования MuSK *in vitro*, применяя мышечные трубочки C2C12 мыши. Контроли включали агрин, исходное 3B2 и мотавизумаб (не связывающее MuSK АТ). Добавление агрина к мышечным трубочкам C2C12 вызывало фосфорилирование MuSK, и его уровень приняли за 100%, это включает вычитание фонового фосфорилирования MuSK, которое анализировали путем индукции фосфорилирования MuSK не связывающим MuSK мотавизумабом. Исходное АТ 3B2 вызывало такой же уровень фосфорилирования MuSK, что и 1 нМ агрина. Более того, варианты 3B2 3B2g1m1 и 3B2g2m1 осуществляли это так же хорошо, как и исходное АТ 3B2. 3B2g1m2 и 3B2g2m2 также вызывали сильное фосфорилирование MuSK (+/- 80%). 3B2g1m3 и 3B2g2m3 утратили способность индуцировать MuSK, что привело к фосфорилированию MuSK приблизительно на 13%.

Примечательно, что 3B2g1m4 и 3B2g2m4 утратили способность индуцировать MuSK почти наполовину, что привело к фосфорилированию MuSK приблизительно на 58% (ФИГ. 21).

Аффинность связывания вариантов 3B2 с покрытием MuSK из различных видов в анализе ELISA.

[00257] Для того чтобы оценить аффинность связывания вариантов 3B2 с белком MuSK из различных видов, проводили ELISA. Планшет покрывали MuSK из человека, яванского макака, крысы или мыши, и оценивали связывание различных вариантов 3B2 по сравнению с 3B2, как описано выше. В этом анализе 3B2g1m1, 3B2g2m1, 3B2g1m4 и 3B2g2m4 не утрачивали аффинность по сравнению с 3B2. Тогда как 3B2g1m2, 3B2g2m2, 3B2g1m3 и 3B2g2m3 утрачивали аффинность связывания с MuSK из различных видов (ФИГ. 22).

ПРИМЕР 3. РАЗЛИЧИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ pH АГОНИСТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ MuSK.

[00258] Обычные антитела поглощаются клетками путем неспецифического эндоцитоза или пиноцитоза или путем рецептор-опосредованной интернализации. Выше описано, что сконструировали рециркулирующее антитело, так чтобы одна молекула антитела могла связываться с антигеном множество раз, в противоположность обычным антителам, которые могут связывать антиген только один раз. Действительно, после того как обычные антитела связываются с заякоренным в мембрану антигеном, таким как рецептор, комплекс антитело-антиген интернализуется и деградирует внутри лизосомы. Это приводит к более короткому времени полужизни терапевтического антитела, делая необходимым частое введение лекарственного антитела или введение в более высоких дозах, чтобы поддерживать эффективную концентрацию антитела в плазме. Антитела можно сконструировать так, что указанное антитело диссоциирует от антигена при кислом pH внутри эндосомы. После диссоциации рециркулирующее антитело оказывается свободным для связывания с FcRn (неонатальным Fc-рецептором) внутри эндосомы, который транспортирует антитело обратно в кровоток для повторного связывания с антигеном.

[00259] MuSK экспрессируется на мембране клеток мышцы, и интернализация MuSK описаны в Zhu et al., «Muscle-Specific Receptor Tyrosine Kinase Endocytosis in Acetylcholine Receptor Clustering in Response to Agrin,» *J. Neurosci.* 28(7):1688-1696 (2008), содержание которого настоящим полностью включено в данную заявку посредством

ссылки. Следовательно, рециркулирующее антитело против этой мишени может представлять интерес.

[00260] Большинство pH-зависимых антител, о которых сообщали на данный момент, было получено после серьезной инженерии CDR, но иногда это свойство может
5 быть предсуществующим. В анализе Biacore исследовали, есть ли у X2, X2m4, X3, X9, X17, 3B2 и 3B2g2m1 естественно существующая зависимость от pH в отношении связывания с MuSK.

[00261] Для того чтобы исследовать pH-зависимое связывание антител, описанных в данной заявке, с MuSK, применяли анализ Biacore T200. Вкратце, чип CM5 покрывали
10 MuSK человека и мыши (200 RU) и наносили 22,2 нМ Fab, и рассчитывали кинетические параметры. Ассоциацию осуществляли при pH 7,4, диссоциацию осуществляли при pH 7,4, а также при pH 5,5. Исследовали следующие Fab: X2, X2m4, X3, X9, X17, 3B2 и 3B2g2m1 (Таблица 10 и ФИГ. 23). Примечательно, что эти результаты позволяют предположить, что 3B2g2m1 обладает pH-зависимыми свойствами в отношении обоих MuSK человека и
15 мыши. Аффинность связывания при pH 5,5 очень низкая, что приводит к быстрой диссоциации при pH эндосомы, позволяя 3B2g2m1 рециркулировать.

Таблица 10. Анализ скорости диссоциации агонистических Fab против MuSK от MuSK человека и мыши в анализе Biacore, ассоциация при pH 7,4, диссоциация либо при pH 7,4, либо при pH 5,5.

Анализ скорости диссоциации Kd (1/c) (10E-4)	MuSK человека			MuSK мыши		
	pH 7,4	pH 5,5	Отношение pH 5,5/7,4	pH 7,4	pH 5,5	Отношение pH 5,5/7,4
X17 Fab	8,8	67,8	7,7	12,0	20,0	1,7
X2 Fab	5,7	3,4	0,6	5,3	5,1	1,0
X2m4 Fab	86,7	58,6	0,7	33,7	41,6	1,2
X3 Fab	6,3	22,5	3,5	55,8	246,4	4,4
X9 Fab	5,9	8,3	1,4	1,5	10,5	7,1
3B2 Fab	38,8	224,0	5,8	34,7	1093,0	31,5
3B2g2m1 Fab	47,2	288,4	6,1	76,6	679,2	8,9

ПРИМЕР 4. АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ MUSK, НАЦЕЛЕННЫЕ НА Fz-ДОМЕН, НЕ ПРЕПЯТСТВУЮТ АКТИВАЦИИ MuSK ЕГО ПРИРОДНЫМ ЛИГАНДОМ АГРИНОМ.

[00262] Для активации MuSK требуется секретированный двигательным нейроном агрин, расположенный на мембране мышцы LRP4 и цитоплазматический DOK-7. Происходит предварительная сборка LRP4 и MuSK в отсутствие агрина, но активация MuSK вызывается только в присутствии агрина. Действительно, связывание агрина с
25

LRP4 с MuSK вызывает транс-фосфорилирование и активацию MuSK (Stiegler et al., «Crystal Structure of the Agrin-Responsive Immunoglobulin-Like Domains 1 and 2 of the Receptor Tyrosine Kinase MuSK,» *J. Mol. Biol.* 364:424–433 (2006); Kim et al., «Lrp4 is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK,» *Cell* 135:334-342 (2008); и Zhang et al., «Agrin Binds to the N-Terminal Region of Lrp4 Protein and Stimulates Association between Lrp4 and the First Immunoglobulin-Like Domain in Muscle-Specific Kinase (MuSK),» *J. Biol. Chem.* 286:40624–40630 (2011); и Zong et al., «Structural Basis of Agrin-LRP4-MuSK Signaling,» *Genes Dev.* 26:247–258 (2012), содержания которых настоящим полностью включены в данную заявку посредством ссылки).

10 **[00263]** Агонистические антитела против MuSK, нацеленные на Fz-домен MuSK, потенциально могут препятствовать активации MuSK агрином. Для того чтобы проверить, может ли связывающее Fz агонистическое антитело против MuSK активировать MuSK вместе с агрином, проводили эксперимент по костимуляции *in vitro*.

[00264] Применяли анализ фосфорилирования MuSK *in vitro* с мышечными
15 трубочками C2C12 мыши, чтобы оценить степень фосфорилирования MuSK, вызванного агонистическим антителом против MuSK - 3B2g2m1, в условиях добавления или без ненасыщающего количества агрина (0,1 нМ агрина). Контроли включали агрин (при концентрации 1 нМ и 0,1 нМ) и мотавизумаб (изотипический контроль, не связывающее MuSK МАТ, 333 нМ). Все стимуляции проводили в течение 30 минут. Добавление 1 нМ
20 агрина к мышечным трубочкам C2C12 вызывало фосфорилирование MuSK, и его уровень приняли за 100%, это включает вычитание фонового фосфорилирования MuSK, которое анализировали путем индукции фосфорилирования MuSK не связывающим MuSK мотавизумабом. Стимуляция MuSK 0,1 нМ агрина приводила к индукции фосфорилирования MuSK на 53%, позволяя предположить, что концентрация агрина в
25 этом анализе была субоптимальной. Титрование 3B2g2m1 (без агрина) от 0,01 до 333 нМ приводило к зависимому от дозы повышению уровня фосфорилирования MuSK. Важно отметить, что костимуляция 3B2g2m1 с субоптимальной концентрацией 0,1 нМ агрина приводила к повышению уровня фосфорилирования MuSK по сравнению со стимуляцией 3B2g2m1 или 0,1 нМ агрином отдельно. Примечательно, что 0,3 нМ 3B2g2m1 в
30 комбинации с 0,1 нМ агрина приводили к 100% фосфорилирования MuSK, аналогично стимуляции только 1 нМ агрина (Фигура 24). Этот результат позволяет предположить, что 3B2g2m1, связывающийся с Fz-доменом MuSK, может стимулировать MuSK параллельно с агрином. Более того, можно предположить, что 3B2g2m1 может активировать MuSK, уже связанный с его природным лигандом агрином, приводя к повышенному
35 фосфорилированию MuSK. Действительно, агрин связывается с LRP4, который, в свою

очередь, связывается с Ig-1-подобным доменом MuSK. Следовательно, активация MuSK путем нацеливания на Fz-домен с помощью агонистического антитела против MuSK не препятствует активации MuSK его природным лигандом агрином.

ПРИМЕР 5. Агонистические антитела против MuSK: mIgG2a-X17 и hIgG-X17.

5 [00265] Исследовали терапевтическую пригодность комбинации антител mIgG2a-X17 и hIgG-X17 в модели *Dok7*. Хотя мыши *Dok7 1124_27 dup* при смешанном фоне C57BL/6-CBA, которых лечили в день P4 антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом, погибали через одну - две недели после
10 рождения (как и не получавшие лечения мыши *Dok7 1124_27 dup* при смешанном генетическом фоне), обнаружили, что мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 10 мг/кг mIgG2a-X17 (n = 3) в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X17 в дни P24 и P44, доживали до взрослого возраста (ФИГ. 25A - 25B).

[00266] Мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 10 мг/кг mIgG2a-X17 в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X17 в дни P24 и P44, набирали массу, в отличие от
15 мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля (ФИГ. 25B). Более того, комбинация mIgG2a-X1 и hIgG-X17 спасала двигательную функцию мышей *Dok7 1124_27 dup*, которую оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 26).

[00267] В совокупности, данные открытия продемонстрировали, что агонистические
20 антитела против MuSK - mIgG2a-X17 в комбинации с hIgG-X17 - спасают молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*.

ПРИМЕР 6. Агонистическое антитело против MuSK - hIgG-X17.

[00268] Для того чтобы определить, привлекает ли агонистическое антитело против MuSK - hIgG-X17 - MuSK в синапс, мышам дикого типа в день P40 вводили путем
25 интраперитонеальной инъекции агонистическое антитело против MuSK hIgG-X17 (0, 2, 10, 20 мг/кг). Через два дня мышей умерщвляли и мышцы диафрагмы окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и меченым Alexa 647 антителом козы против IgG человека, специфичным к фрагменту F(ab')₂, чтобы пометить X17. Уровни насыщения X17 в синапсе измеряли по отношению интенсивностей сигналов X17 к AChR. На диаграмме
30 на ФИГ. 27 продемонстрировано, что агонистическое антитело против MuSK hIgG-X17 привлекает MuSK в синапс и насыщает MuSK до 20 мг/кг.

[00269] Затем, чтобы исследовать, спасало ли hIgG-X17 от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне лечили в

день P4 агонистическим антителом hIgG-X17 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции hIgG-X17 (n = 4) в дни P4, P18 и P38, доживали до взрослого возраста (ФИГ. 28А). Более того, мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг hIgG-X17 в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X17 в дни P18 и P38, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля (ФИГ. 28В).

10 **[00270]** Для того чтобы оценить, восстанавливает ли hIgG-X17 развитие синапсов у молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и мышей *Dok7 1124_1127 dup* окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания (ФИГ. 29). У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили hIgG-

15 X17, синапсы созревали от простой подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей (см. иммуногистохимические изображения на ФИГ. 29), и количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR восстанавливались до 70%, 50% и 40%, соответственно, от нормальных уровней (см. диаграммы на ФИГ. 29).

20 **[00271]** hIgG-X17 спасало двигательную функцию мышей *Dok7 1124_27 dup*, которую оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 30).

[00272] Затем оценивали, может ли hIgG-X17 обращать нервно-мышечные нарушения, которые развиваются во взрослом возрасте у мышей *Dok7 1124_1127 dup*.

25 Вкратце, мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции агонистические антитела против MuSK либо в дни P4, P24 и P44, либо в дни P4, P18, а затем лечение антителом прекращали. Эти мыши *Dok7 1124_1127 dup* набирали массу и сохраняли подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начали терять массу (ФИГ. 31А, ФИГ. 31В) и проявлять двигательные нарушения, которые оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 31С). Мышам затем либо не вводили повторную инъекцию (ФИГ. 31А), либо вводили повторную инъекцию hIgG-X17 (ФИГ. 31В). Мыши, которые не получили дополнительную дозу антитела, погибли в течение нескольких дней (ФИГ. 31А), тогда как среди мышей, получивших очередное лечение X17, мыши *Dok7 1124_1127 dup* начали набирать массу (ФИГ. 31В), и

35 через одну неделю после возобновления лечения их двигательные нарушения были

обращены (ФИГ. 31С). У мышей *Dok7 1124_1127 dup* улучшились показатели на барабане в 3,25 раза, тогда как показатели мышей дикого типа улучшились в 1,30 раза (ФИГ. 31С). У мышей *Dok7 1124_1127 dup* улучшилась сила захвата в 1,30 раза, тогда как показатели мышей дикого типа не улучшились (ФИГ. 31С).

5 ПРИМЕР 7. Агонистическое антитело против MuSK - 3B2.

[00273] Для того чтобы определить, оказывали ли влияние длительные инъекции мышам дикого типа агонистического антитела против MuSK - 3B2 - на выживаемость или набор массы тела, мышам при смешанном фоне C57BL/6-СВА вводили путем инъекции 3B2 в дни P4 и P18 (n = 3) и сравнивали с мышами при смешанном фоне C57BL/6-СВА, 10 которым не вводили инъекции (n = 4). Мыши дикого типа, которым вводили путем инъекции 3B2, подобно мышам дикого типа, которым не вводили инъекции, доживали до момента умерщвления в день P38 (ФИГ. 32А) и набирали массу аналогично мышам дикого типа, которым не вводили инъекции (ФИГ. 32В).

[00274] Затем, чтобы исследовать, спасало ли 3B2 от летальности молодых мышей 15 *Dok7 1124_1127 dup*, мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА лечили в день P4 агонистическим антителом против MuSK 3B2 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели 20 после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг 3B2 в день P4, 10 мг/кг 3B2 в день P18 и 10 мг/кг 3B2 в день P38, доживали до взрослого возраста (n = 3) (ФИГ. 33А). Более того, мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг 3B2 в день P4, 10 мг/кг 3B2 в день P18 и 20 мг/кг 3B2 в день P38, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили 25 антитело изотипического контроля (ФИГ. 33В).

[00275] Для того чтобы оценить, восстанавливает ли 3B2 развитие синапсов у молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и мышей *Dok7 1124_1127 dup* окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный 30 аксон/нервные окончания (ФИГ. 34). У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили 3B2, синапсы созревали от простой подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей (см. иммуногистохимические изображения на ФИГ. 34), и количество синапсов, размер

синапсов и плотность синаптических AChR восстанавливались до 80%, 75% и 40%, соответственно, от нормальных уровней (см. диаграммы на ФИГ. 34).

[00276] 3B2 спасает двигательную активность мышей *Dok7 1124_27 dup*, которую оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 35). Более того, инъекция агонистического антитела против MuSK 3B2 в дни P4, P18 и P38 поддерживала мышей *Dok7 1124_1127 dup* здоровыми в течение по меньшей мере двух месяцев (ФИГ. 36).

[00277] Затем оценивали, может ли 3B2 обращать рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Вкратце, мыши *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции 10 мг/кг mIgG2a-X-17 в дни P4, P24 и P44. Мышь *Dok7 1124_1127 dup* набирала массу и сохраняла подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начала терять массу (ФИГ. 37). Указанной мыши затем вводили путем инъекции 10 мг/кг 3B2 (ФИГ. 37). После возобновления лечения 3B2 эта мышь *Dok7 1124_1127 dup* начала набирать массу (ФИГ. 37).

ПРИМЕР 8. Агонистическое антитело против MuSK - hIgG-X2.

[00278] Для того чтобы определить, оказывают ли длительные инъекции агонистического антитела против MuSK - hIgG-X2 мышам дикого типа влияние на выживаемость или набор массы тела, мышам при смешанном фоне C57BL/6-СВА вводили путем инъекции hIgG-X2 (n = 3) в дни P4 и P18 и сравнивали с мышами при смешанном фоне C57BL/6-СВА, которым не вводили инъекции (n = 4). Мыши дикого типа, которым вводили путем инъекции hIgG-X2, подобно мышам дикого типа, которым не вводили инъекции, доживали до момента умерщвления в день P38 (ФИГ. 38А) и набирали массу, аналогично мышам дикого типа, которым не вводили инъекции (ФИГ. 38В).

[00279] Затем, чтобы исследовать, спасало ли hIgG-X2 от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА лечили в день P4 агонистическим антителом против MuSK - hIgG-X2 - или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг hIgG-X2 в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X2 в день P18, доживали до взрослого возраста (n = 2) (ФИГ. 39А). Более того, мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг hIgG-X2 в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X2 в день P18, набирали массу, в

отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля (ФИГ. 39В).

[00280] Затем оценивали, может ли hIgG-X2 обращать рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Вкратце, мышам *Dok7 1124_1127 dup* вводили
5 путем инъекции 20 мг/кг hIgG-X2 в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X2 в день P18. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* набирали массу и сохраняли подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начали терять массу (ФИГ. 40) и проявляли двигательные нарушения, которые оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 40В). Мышам затем вводили путем инъекции 10 мг/кг
10 hIgG-X2 (ФИГ. 40А). После возобновления лечения hIgG-X2, мышь *Dok7 1124_1127 dup* начала набирать массу (ФИГ. 40А), и двигательные нарушения были полностью обращены (ФИГ. 40В).

ПРИМЕР 9. Агонистическое антитело против MuSK - hIgG-X2m4.

[00281] Для того чтобы исследовать, спасало ли hIgG-X2m4 от летальности
15 молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА лечили в день P4 агонистическим антителом против MuSK hIgG-X2m4 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели
20 после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг hIgG-X2m4 в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X2m4 в день P18, доживали до взрослого возраста (n = 3) (ФИГ. 41А). Более того, мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг hIgG-X2m4 в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X2m4 в день P18, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело
25 изотипического контроля (ФИГ. 41В). Более того, инъекция 20 мг/кг hIgG-X2m4 в день P4 и 10 мг/кг hIgG-X2m4 в день P18 поддерживала мышей *Dok7 1124_1127 dup* здоровыми в течение по меньшей мере двух месяцев (ФИГ. 42).

ПРИМЕР 10. Агонистическое антитело против MuSK - mIgG2a-X3.

[00282] Для того чтобы определить, оказывала ли влияние инъекция мышам дикого
30 типа агонистического антитела против MuSK - mIgG2a-X3 - на выживаемость или набор массы тела, мышам при смешанном фоне C57BL/6-СВА вводили путем инъекции 10 мг/кг mIgG2a-X3 в дни P4, P24 и P44 (n = 2) и сравнивали с мышами при смешанном фоне C57BL/6-СВА, которым не вводили инъекции (n = 9). Мыши дикого типа, которым

вводили путем инъекции mIgG2a-X3, подобно мышам дикого типа, которым не вводили инъекции, доживали до момента умерщвления в день P60 (ФИГ. 43А) и набирали массу аналогично мышам дикого типа, которым не вводили инъекции (ФИГ. 43В).

[00283] Для того чтобы оценить, оказывала ли инъекция mIgG2a-X3 влияние на

5 организацию нервно-мышечных синапсов, мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и мышей дикого типа, которым вводили инъекцию mIgG2a-X3, окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания (ФИГ. 44). У мышей дикого типа, которых лечили mIgG2a-X3, синапсы созревали от простой подобной диску формы до
10 сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей (см. иммуногистохимические изображения на ФИГ. 44). Инъекция mIgG2a-X3 мышам дикого типа не оказывала влияния на количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR (см. диаграммы на ФИГ. 44). Более того, длительные инъекции mIgG2a-X3 мышам дикого типа не влияли на двигательное поведение, которое
15 оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 45).

[00284] Для того чтобы исследовать, спасало ли mIgG2a-X3 от летальности молодых

мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА лечили в день P4 10 мг/кг mIgG2a-X3 или антитела отрицательного контроля
20 эквивалентного изотипа - мотавизумаба. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, и мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 4), которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения (ФИГ. 46А - 46В). Результаты, представленные на ФИГ. 46А - 46В, продемонстрировали, что агонистическое антитело
25 против MuSK - mIgG2a-X3, - которое вводили в дозе 10 мг/кг в день P4, спасало от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup* в течение нескольких дней, по сравнению с мотавизумабом.

[00285] Затем мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА

лечили в день P4 20 мг/кг mIgG2a-X3 или антитела отрицательного изотипического
30 контроля и в день P18 10 мг/кг mIgG2a-X3 или антитела отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумаба. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 2), которым вводили путем инъекции mIgG2a-X3, доживали до
35 момента умерщвления (ФИГ. 47А). Мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем

инъекции mIgG2a-X3, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля (ФИГ. 47B). Более того, инъекция 20 мг/кг mIgG2a-X3 в день P4 и 10 мг/кг mIgG2a-X3 в день P18 поддерживала мышей *Dok7 1124_1127 dup* здоровыми в течение по меньшей мере двух месяцев (ФИГ. 47B; ФИГ. 48).

5 ПРИМЕР 11. Агонистическое антитело против MuSK - mIgG2a-X9.

[00286] Для того чтобы исследовать, спасало ли mIgG2a-X9 от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА лечили в дни P4, P24 и P44 10 мг/кг агонистического антитела против MuSK mIgG2a-X9 или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом.

- 10 Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, и большинство мышей *Dok7 1124_1127 dup* (n = 5), которым вводили путем инъекции mIgG2a-X9, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения (ФИГ. 49A). Одна мышь *Dok7 1124_1127 dup*, которой вводили путем инъекции mIgG2a-X9, дожила до дня P60 (ФИГ. 49A).
- 15 Аналогичным образом, большинство мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции mIgG2a-X9, не набирали массу, подобно мышам *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля (ФИГ. 49B). Тем не менее, на ФИГ. 49B продемонстрировано, что одна мышь *Dok7 1124_1127 dup*, которой вводили путем инъекции mIgG2a-X9, набрала массу с течением времени.

20 ПРИМЕР 12. Агонистическое антитело против MuSK - 3B2g2m1.

[00287] Для того чтобы определить, привлекало ли MuSK в синапс агонистическое антитело против MuSK - 3B2g2m1, мышам дикого типа в день P30 вводили путем интраперитонеальной инъекции агонистическое антитело против MuSK - 3B2g2m1 (0, 2, 10, 20 мг/кг). Через два дня мышей умерщвляли и мышцы диафрагмы окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и меченым Alexa 647 антителом козы против IgG человека, специфичным к фрагменту F(ab')₂, чтобы пометить 3B2g2m1. Уровни насыщения 3B2g2m1 в синапсе измеряли по отношению интенсивностей сигналов 3B2g2m1 к AChR. На диаграмме на ФИГ. 50 продемонстрировано, что агонистическое антитело против MuSK 3B2g2m1 привлекало MuSK в синапс и насыщало MuSK до 20

30 мг/кг.

[00288] Для того чтобы определить, оказывали ли длительные инъекции мышам дикого типа агонистического антитела против MuSK - 3B2g2m1 - эффект на выживаемость или набор массы тела, мышам при смешанном фоне C57BL/6-СВА

вводили путем инъекции 10 мг/кг 3B2g2m1 в дни P4, P24 и P44 (n = 6) и сравнивали с мышами при смешанном фоне C57BL/6-CBA, которым вводили путем инъекции в дни P4, P24 и P44 10 мг/кг антитела отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумаба (n = 6). Мыши, которым вводили путем инъекции 3B2g2m1, выживали и набирали массу подобно мышам дикого типа (ФИГ. 51A). На ФИГ. 51B продемонстрировано, что мыши дикого типа при смешанном фоне C57BL/6-CBA, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг 3B2g2m1 два раза в неделю, начиная в день P4 (n = 6), выживали и набирали массу подобно мышам дикого типа, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг антитела отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумаба два раза в неделю, начиная в день P4 (n = 6). Эти результаты указывают на то, что длительные инъекции 3B2g2m1 мышам дикого типа не влияли на выживаемость или набор массы тела.

[00289] Для того чтобы исследовать, спасало ли 3B2g2m1 от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-CBA лечили в день P4 агонистическим антителом против MuSK - 3B2g2m1 - или антителом отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумабом. Мыши *Dok7 1124_1127 dup* (n = 11), которым вводили путем инъекции антитело изотипического контроля, подобно не получившим лечение мышам, погибали через одну - две недели после рождения, тогда как мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 3B2g2m1 (n = 10) в дни P4, P18 и P38, доживали до взрослого возраста (ФИГ. 52A). Более того, мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 20 мг/кг 3B2g2m1 в день P4 и 10 мг/кг 3B2g2m1 в дни P18 и P38, набирали массу, в отличие от мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили антитело изотипического контроля (ФИГ. 52B).

[00290] Для того чтобы оценить, восстанавливало ли 3B2g2m1 развитие синапсов у молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышцы диафрагмы в день P60 из мышей дикого типа и мышей *Dok7 1124_1127 dup* окрашивали Alexa 488- α -BGT, чтобы пометить AChR, и антителами против β III-тубулина/синапсина, чтобы пометить двигательный аксон/нервные окончания (ФИГ. 53). У мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которых лечили 3B2g2m1, синапсы созревали от простой подобной диску формы до сложной подобной кренделю формы, характерной для зрелых нервно-мышечных синапсов мышей (см. иммуногистохимические изображения на ФИГ. 53), и количество синапсов, размер синапсов и плотность синаптических AChR восстанавливались до 80%, 50% и 60%, соответственно, от нормальных уровней (см. диаграммы на ФИГ. 53).

[00291] 3B2g2m1 спасало двигательную активность мышей *Dok7 1124_27 dup*, которую оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося

барабана (ФИГ. 54). Более того, инъекция 3B2g2m1 в дни P4, P18 и P38 поддерживала мышей *Dok7 1124_1127 dup* здоровыми в течение по меньшей мере двух месяцев, но мыши в конечном итоге начали терять массу (ФИГ. 55). Тем не менее, введение либо 5 мг/кг, либо 10 мг/кг 3B2g2m1 после первоначальной потери массы тела позволяла получившей лечение мыши *Dok7 1124_1127 dup* набирать массу (ФИГ. 55).

[00292] Затем оценивали, могло ли 3B2g2m1 обращать рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*. Вкратце, мыши *Dok7 1124_1127 dup* вводили путем инъекции 3B2g2m1 в дни P4, P18 и P38. Указанная мышь *Dok7 1124_1127 dup* набирала массу и сохраняла подвижность в течение нескольких месяцев, но, в конечном итоге, начала терять массу (ФИГ. 56А) и проявлять двигательные нарушения, которые оценивали по силе захвата и латентному периоду до падения с вращающегося барабана (ФИГ. 56В). В этот момент времени указанной мыши повторно вводили путем инъекции 3B2g2m1 (ФИГ. 56В). После возобновления лечения 3B2g2m1 мышь *Dok7 1124_1127 dup* начала набирать массу (ФИГ. 56А), и через неделю после возобновления лечения ее двигательные нарушения были обращены (ФИГ. 56В). У мыши *Dok7 1124_1127 dup* улучшились показатели на барабанах в 5,5 раз и сила захвата в 1,1 раза (ФИГ. 56С). Эти результаты продемонстрировали, что 3B2g2m1 обращало рецидив заболевания у взрослых мышей *Dok7 1124_1127 dup*.

[00293] Для того чтобы исследовать, спасали ли длительные инъекции 3B2g2m1 от летальности молодых мышей *Dok7 1124_1127 dup*, мышей *Dok7 1124_1127 dup* при смешанном фоне C57BL/6-СВА лечили дважды в неделю, начиная в день P4, 20 мг/кг агонистического антитела против MuSK - 3B2g2m1 - или антитела отрицательного контроля эквивалентного изотипа - мотавизумаба. Мыши *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции 3B2g2m1 (n = 4), доживали до взрослого возраста и набирали массу (ФИГ. 57).

[00294] На ФИГ. 58А - 58С продемонстрировано, что инъекция указанного агонистического антитела против MuSK продлевала выживаемость мышей *Dok7 1124_1127 dup*. На ФИГ. 58А представлен график выживаемости мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции показанные агонистические антитела против MuSK или изотипический контроль (мотавизумаб) в дни P4 (20 мг/кг), P18 (10 мг/кг), P38 (10 мг/кг), а затем прекращали лечение антителом. На ФИГ. 58В представлен график выживаемости мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым вводили путем инъекции агонистические антитела против MuSK или изотипический контроль (мотавизумаб) в дни P4 (20 мг/кг), P18 (10 мг/кг), а затем прекращали лечение антителом. На ФИГ. 58С представлен график выживаемости мышей *Dok7 1124_1127 dup*, которым повторно

вводили путем инъекции (возобновленное лечение) агонистическое антитело против MuSK (10 мг/кг) после нескольких дней потери массы тела, а затем прекращали лечение антителом.

[00295] Хотя предпочтительные варианты реализации были представлены и
5 подробно описаны в данной заявке, для специалистов с квалификацией в соответствующей области техники должно быть очевидно, что можно внести различные модификации, добавления, замены и тому подобные изменения, не отклоняясь от сущности настоящего изобретения, и, следовательно, их считают входящими в объем настоящего изобретения, который определяется следующей формулой изобретения.

10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула на основе антитела, которая связывается с эпитопом специфической для мышц тирозин-протеинкиназы (MuSK) человека, причем указанный эпитоп присутствует в последовательности Frizzled (Fz)-подобного домена MuSK SEQ ID NO: 130, причем указанная молекула на основе антитела индуцирует фосфорилирование MuSK при связывании с ее эпитопом.

2. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 1, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела связывается с Fz-подобным доменом MuSK с более высокой аффинностью в условиях нейтрального pH, чем в условиях кислого pH.

3. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 1 или п. 2, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела не ингибирует индуцируемое агрином фосфорилирование MuSK при связывании с Fz-подобным доменом MuSK.

4. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 1 или п. 2, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела усиливает индуцируемое агрином фосфорилирование MuSK после связывания Fz-подобного домена MuSK.

5. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 4, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

определяющую комплементарность область 1 (CDR-H1), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 147, 1 - 16, 135, 136, 148, 149, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 147, 1 - 16, 135, 136, 148 или 149, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 147, 1 - 16, 135, 136, 148 или 149;

определяющую комплементарность область 2 (CDR-H2), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 153, 17 - 32, 137, 138, 150, 151, 154, 155, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 153, 17 - 32, 137, 138, 150, 151, 154 или 155,

указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 153, 17 - 32, 137, 138, 150, 151, 154 или 155; и определяющую комплементарность область 3 (CDR-H3), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 156, 33 - 48, 139, 140, 157 - 158, 240 - 251, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 156, 33 - 48, 139, 140, 157 - 158, 240 - 251, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 156, 33 - 48, 139, 140, 157 - 158 или 240 - 251.

10 6. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 5, характеризующаяся тем, что указанная переменная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из:

15 переменной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156;

переменной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 17 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 33;

20 переменной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 34;

переменной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 3, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 19 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 35;

25 переменной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 4, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 20 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 36;

30 переменной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 5, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 21 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 37;

переменной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 6, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 38;

- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 7, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 23 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 39;
- 5 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 8, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 24 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 40;
- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 9, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 25 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 41;
- 10 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 10, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 26 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 42;
- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 11, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 27 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 43;
- 15 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 12, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 28 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 44;
- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 13, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 29 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 45;
- 20 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 14, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 30 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 46;
- 25 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 15, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 31 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 47;
- вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 16, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 32 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 48;
- 30 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 135, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 137 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 139; и

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 136, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 138 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 140.

5 7. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 5, характеризующаяся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из:

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и
10 CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156;

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 148, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 151 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 157;

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1
15 последовательности SEQ ID NO: 149, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 152 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 158;

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 154 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156;

20 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 155 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156; и

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и
25 CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156.

8. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 5 – 7, характеризующаяся тем, что указанная вариабельная область тяжелой цепи указанной молекулы на основе антитела дополнительно содержит человеческие или
30 гуманизированные каркасные области тяжелой цепи иммуноглобулина.

9. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 8, характеризующаяся тем, что указанная молекула содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 256;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 257;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 258;

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 259;

15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 260;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 261;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 262; и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 263.

25 10. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 8, характеризующаяся тем, что указанная молекула содержит:

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 196;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 198;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 222;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 224;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 226;

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 228;

15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 230;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 232;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 234;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 236; и

25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 238.

30 11. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 - 10, характеризующаяся тем, что указанное антитело представляет собой бивалентное или поливалентное однодоменное антитело.

12. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 10, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела содержит

вариабельную область легкой цепи, причем указанная вариабельная область легкой цепи содержит:

определяющую комплементарность область 1 (CDR-L1), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 159, 49 - 64, 141, 142, 160 - 169, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 159, 49 - 64, 141, 142 или 160 - 169, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 159, 49 - 64, 141, 142 или 160 - 169;

определяющую комплементарность область 2 (CDR-L2), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 172, 65 - 80, 143, 144, 170, 171, 173 - 179, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 172, 65 - 80, 143, 144, 170, 171 или 173 - 179, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 172, 65 - 80, 143, 144, 170, 171 или 173 - 179; и

определяющую комплементарность область 3 (CDR-L3), содержащую последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 195, 81 - 96, 145, 146, 180 - 194, или модифицированную последовательность аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 195, 81 - 96, 145, 146 или 180 - 194, указанная модифицированная последовательность по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 195, 81 - 96, 145, 146 или 180 - 194.

13. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 12, характеризующаяся тем, что указанная вариабельная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из:

вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195;

вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 49, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 65 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 81;

вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82;

вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 62, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 78 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 94;

5 вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 63, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 79 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 95;

вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 64, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 80 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 96;

10 вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 141, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 143 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 145;

15 вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 142, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 144 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 146.

14. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 12, характеризующаяся тем, что указанная вариабельная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из:

20 вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 170 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 180;

25 вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 171 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 181;

вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 160, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 182;

30 вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183;

вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 171 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 184;

вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183; и

5 вариабельной области легкой цепи, содержащей CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183.

15. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 13 или п. 14, характеризующаяся тем, что указанная вариабельная область легкой цепи указанной
10 молекулы на основе антитела дополнительно содержит человеческие или гуманизированные каркасные области тяжелой цепи иммуноглобулина.

16. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 4, характеризующаяся тем, что указанное антитело или его связывающий фрагмент содержит:

15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 1, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 17 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 49, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 65 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 81;

25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 2, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 18 и CDR-H3 любой из последовательностей SEQ ID NO: 34 и 240 - 247, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 50, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 66 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 82;

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 3, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 19 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 51, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 83;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1
последовательности SEQ ID NO: 136, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 138 и
CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 140, и вариабельную область легкой цепи,
содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 142, CDR-L2 последовательности
SEQ ID NO: 144 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 146.

17. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 4,
характеризующаяся тем, что указанное антитело или его связывающий фрагмент
содержит:

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1
последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и
CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи,
содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности
SEQ ID NO: 170 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 180;

15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1
последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и
CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи,
содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности
SEQ ID NO: 171 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 181;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1
последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и
CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи,
содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 160, CDR-L2 последовательности
SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 182;

25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1
последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и
CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи,
содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности
SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183;

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1
последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и
CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи,
содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности
SEQ ID NO: 171 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 184;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 154 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195; и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 155 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195.

18. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 4, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 234, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 235;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 228, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 229;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 230, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 231;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 232, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 233;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID

NO: 236, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 237; и

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 238, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 239.

10 19. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 4, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 97, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID
15 NO: 98;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 99 и 252 - 259, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична
20 последовательности SEQ ID NO: 100;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 101, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID
25 NO: 102;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 103, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID
30 NO: 104;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 105, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность

аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 120;

5 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 121, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 122;

10 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 123, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 124;

15 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 125, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 126;

20 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 127, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 128;

25 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 131 и 260 - 263, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 132; и

30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 133, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 134.

20. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 4, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 224, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 225; и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 226, и вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 227.

21. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 20, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела представляет собой химерное антитело или его связывающий эпитоп фрагмент.

22. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 21, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела представляет собой гуманизированное антитело или его связывающий эпитоп фрагмент.

23. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 22, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела представляет собой моноклональное антитело или его связывающий эпитоп фрагмент.

24. Молекула на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 - 23, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела представляет собой полноразмерное антитело, связывающий эпитоп фрагмент антитела или производное антитела.

25. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 24, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела представляет собой связывающий эпитоп фрагмент, выбранный из F(ab)-фрагмента, F(ab')-фрагмента и F(ab')₂-фрагмента.

26. Молекула на основе антитела против MuSK по п. 24, характеризующаяся тем, что указанная молекула на основе антитела представляет собой производное антитела, выбранное из группы, состоящей из scFv, миниантитела, диатела, триатела и тетратела.

27. Изолированный полинуклеотид, кодирующий молекулу на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 – 26.

28. Вектор, содержащий изолированный полинуклеотид по п. 27.

29. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 28.

5 30. Фармацевтическая композиция, содержащая:
молекулу на основе антитела против MuSK по любому из пп. 1 - 26,
полинуклеотид по п. 27 или вектор по п. 28, и
фармацевтически приемлемый носитель.

10 31. Способ повышения сигнализации специфической для мышц тирозин-
протеинкиназы (MuSK) у нуждающегося в этом субъекта, причем указанный способ
включает:

15 введение указанному субъекту фармацевтической композиции по п. 30,
причем указанную композицию вводят в количестве, эффективном для повышения
сигнализации MuSK у субъекта по сравнению с сигнализацией MuSK у субъекта перед
указанным введением.

32. Способ по п. 31, характеризующийся тем, что указанный субъект
страдает нервно-мышечным нарушением.

20 33. Способ по п. 32, характеризующийся тем, что нервно-мышечное
нарушение выбрано из бокового амиотрофического склероза (БАС), тяжелой миастении
(ТМ) и врожденной миастении, MuSK-ТМ, спинальной мышечной атрофии (СМА),
спинальной и бульбарной мышечной атрофии (СБМА), болезни Шарко-Мари-Тута
(ШМТ), дистальных наследственных двигательных нейропатий (дНДН), мышечной
дистрофии Дюшенна (МДД), конечностно-поясной мышечной дистрофии (КПМД),
врожденной мышечной дистрофии (ВМД), саркопии (СП), мышечной дистрофии
25 Эмери-Дрейфуса.

34. Способ по п. 33, характеризующийся тем, что нервно-мышечное
нарушение представляет собой врожденную миастению.

35. Способ по п. 34, характеризующийся тем, что врожденная миастения
представляет собой опосредованную DOK7 врожденную миастению.

36. Способ по любому из пп. 31 – 35, характеризующийся тем, что фармацевтическая композиция содержит молекулу на основе антитела против MuSK, где указанная молекула на основе антитела содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 153 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 154 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 154 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 195; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1 последовательности SEQ ID NO: 147, CDR-H2 последовательности SEQ ID NO: 150 и CDR-H3 последовательности SEQ ID NO: 156, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1 последовательности SEQ ID NO: 159, CDR-L2 последовательности SEQ ID NO: 172 и CDR-L3 последовательности SEQ ID NO: 183.

37. Способ лечения врожденной миастении у субъекта, указанный способ включает:

введение субъекту, страдающему врожденной миастенией, агониста специфической для мышц тирозин-протеинкиназы (MuSK) в количестве, эффективном для повышения фосфорилирования MuSK, тем самым осуществляя лечение врожденной миастении у субъекта.

38. Способ по п. 37, характеризующийся тем, что указанный агонист MuSK представляет собой агонистическое антитело против MuSK.

39. Способ по п. 38, характеризующийся тем, что агонистическое антитело против MuSK связывает последовательность Frizzled-подобного домена MuSK
5 последовательности SEQ ID NO: 130.

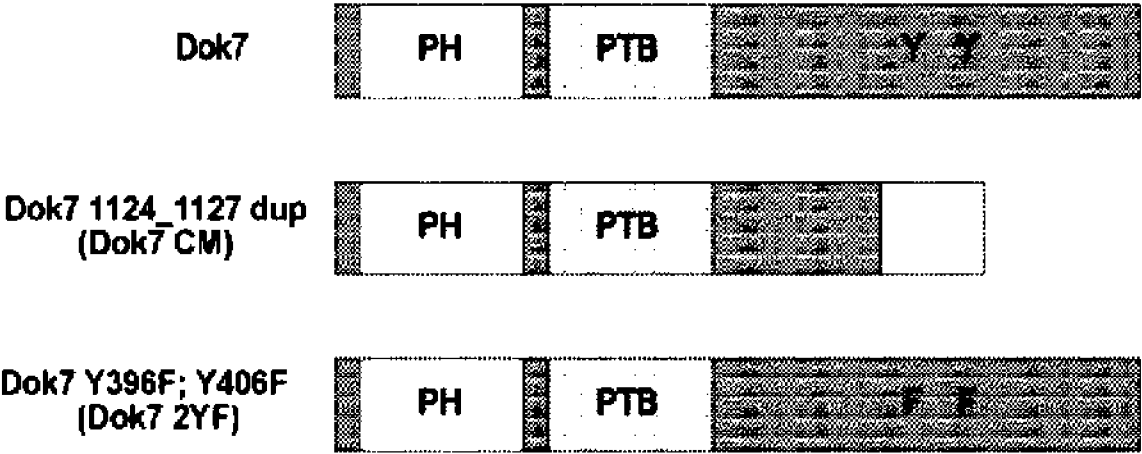
40. Способ по п. 37, характеризующийся тем, что врожденная миастения представляет собой опосредованную DOK7 врожденную миастению.

41. Способ лечения врожденной миастении у субъекта, указанный способ включает:

10 введение субъекту, страдающему врожденной миастенией, фармацевтической композиции по п. 30, тем самым осуществляя лечение врожденной миастении у субъекта.

Фигура 1А-В

A

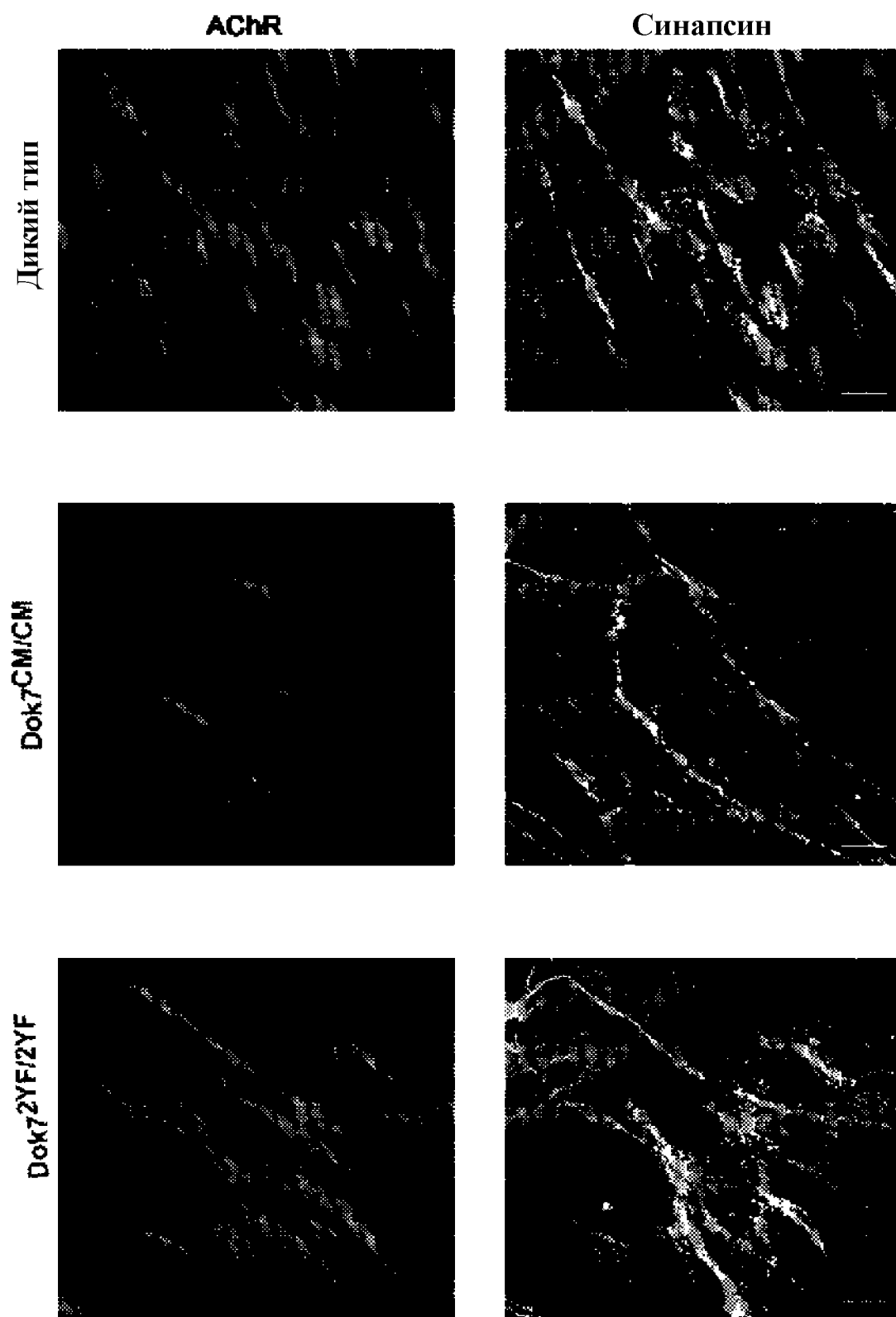


B

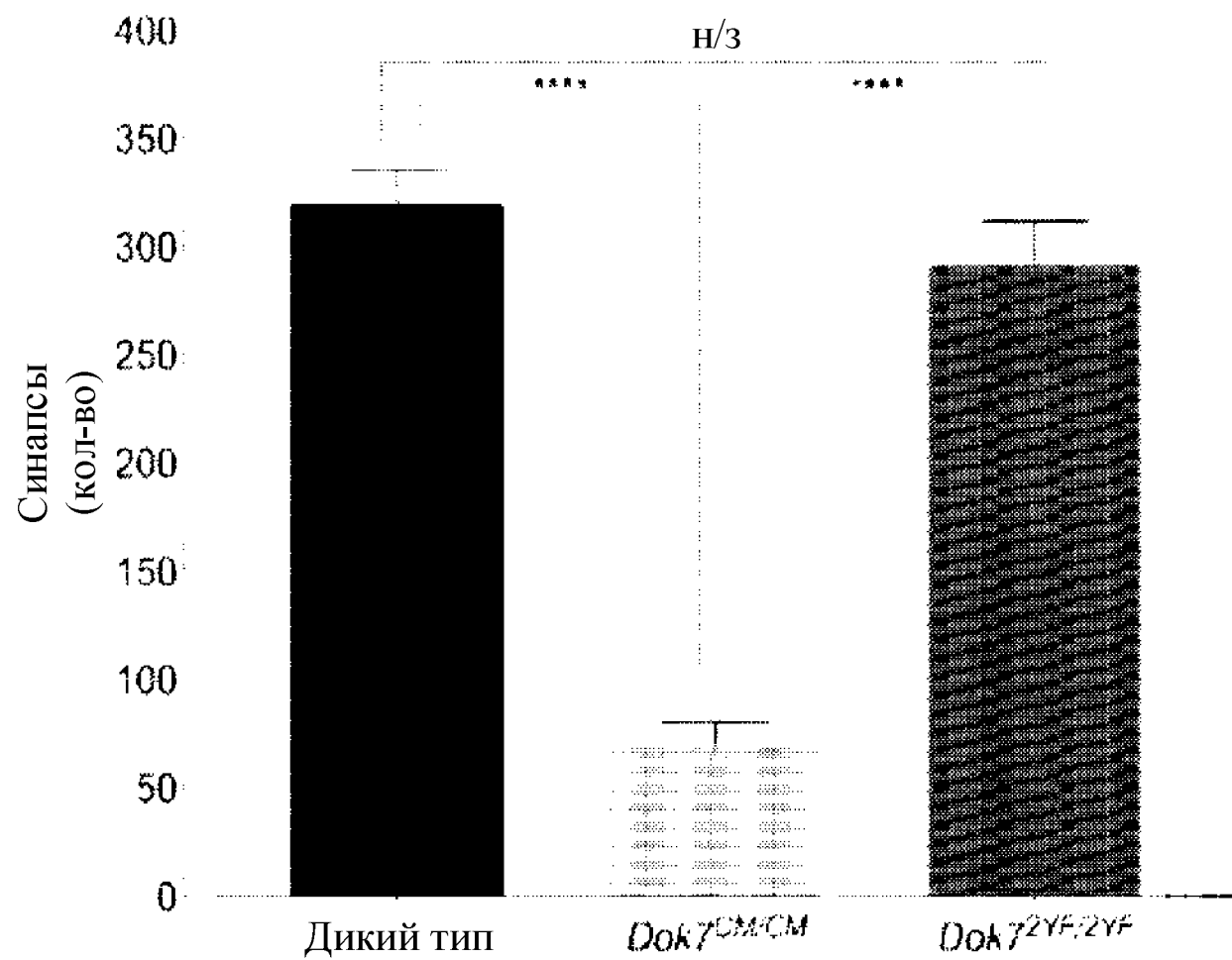
Мыши C57BL/6	Наблюдали	Ожидали	χ^2	Мыши C57BL/6	Наблюдали	Ожидали	χ^2
Дикий тип	12	10	0.66	Дикий тип	18	14	1.14
Dok7 ^{CM/+}	26	19	2.58	Dok7 ^{2YF/+}	23	28	0.89
Dok7 ^{CM/CM}	1	10	8.10	Dok7 ^{2YF/2YF}	15	14	0.07
			Общий χ^2				Общий χ^2
			P-значение				P-значение
			11.08				2.11
			0.001				0.34

Фигура 1С

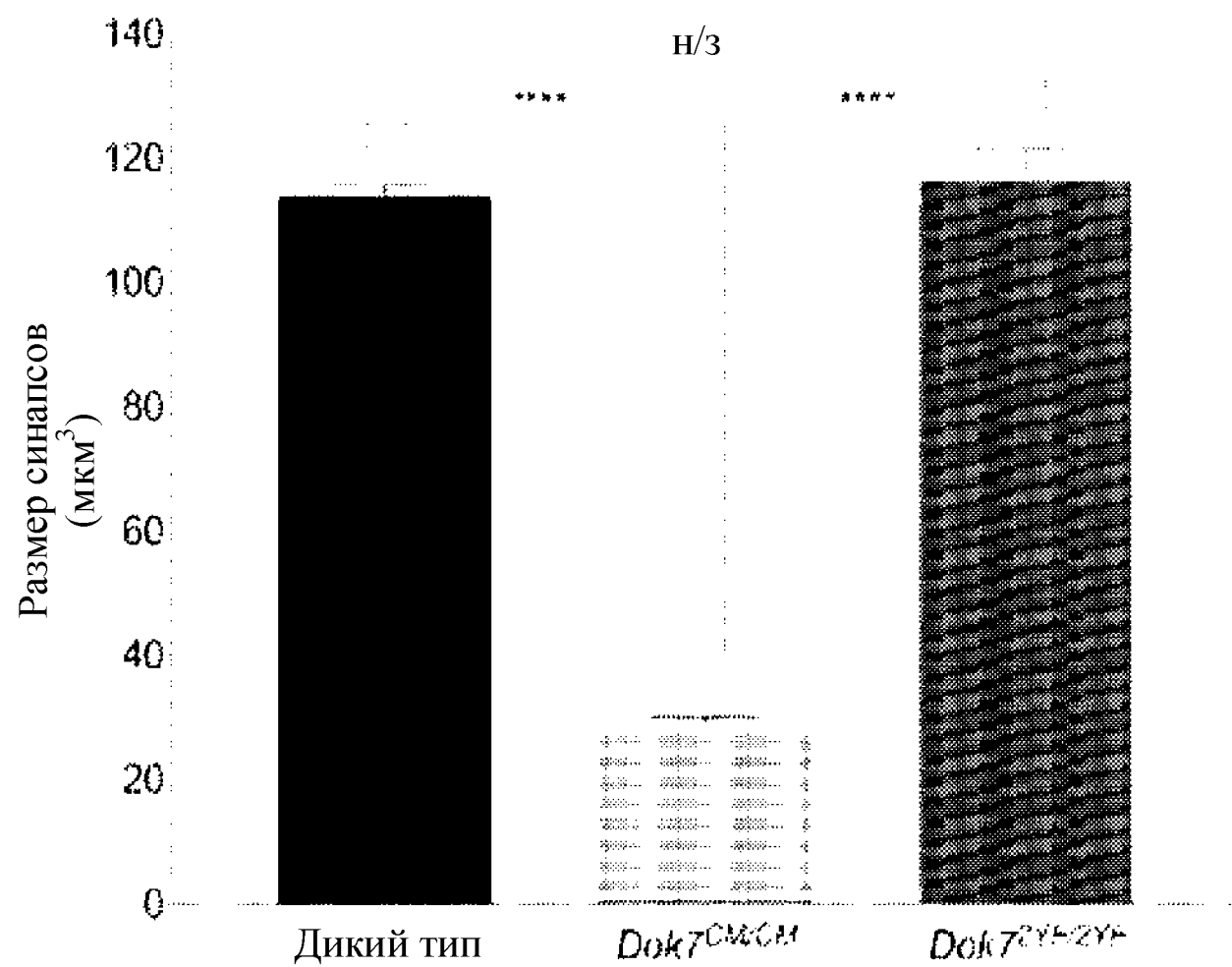
E18.5



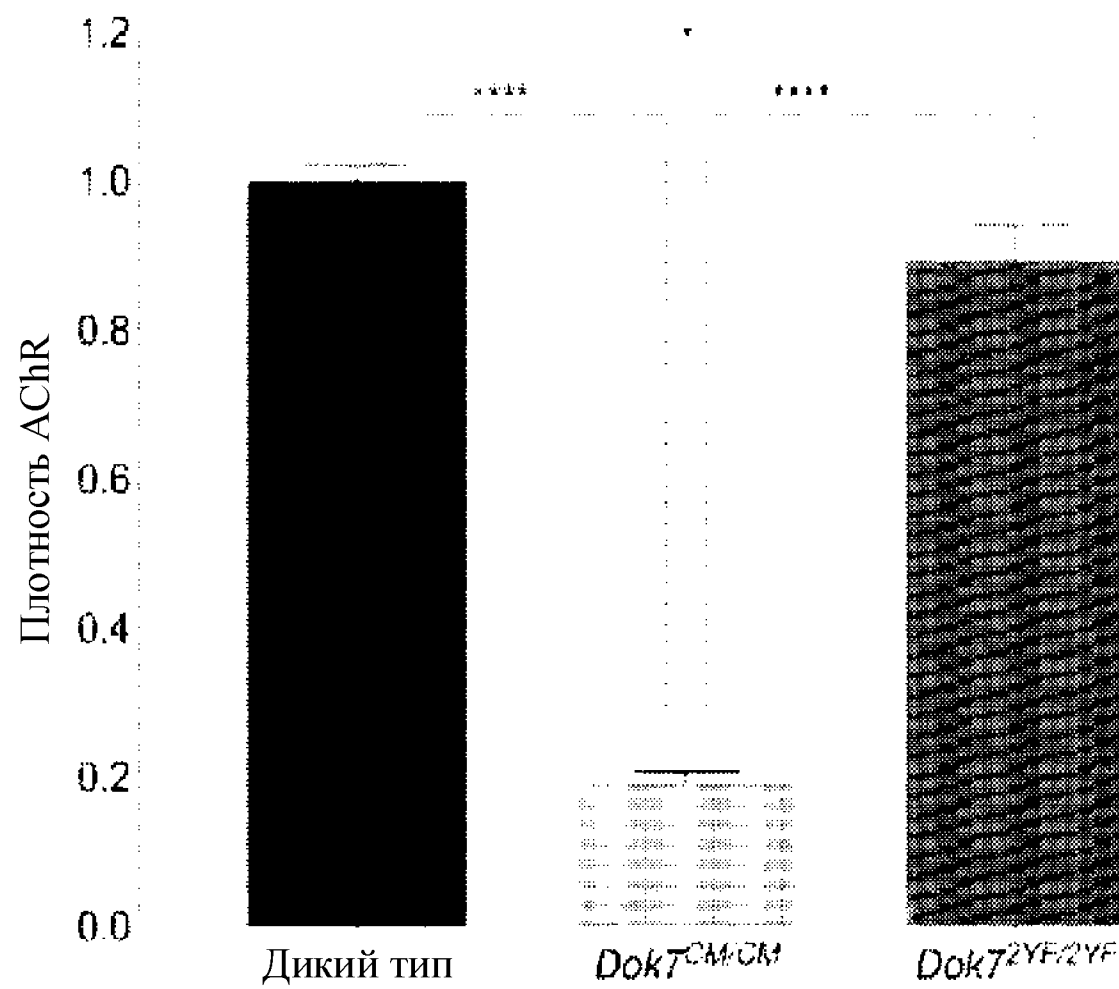
Фигура 1D



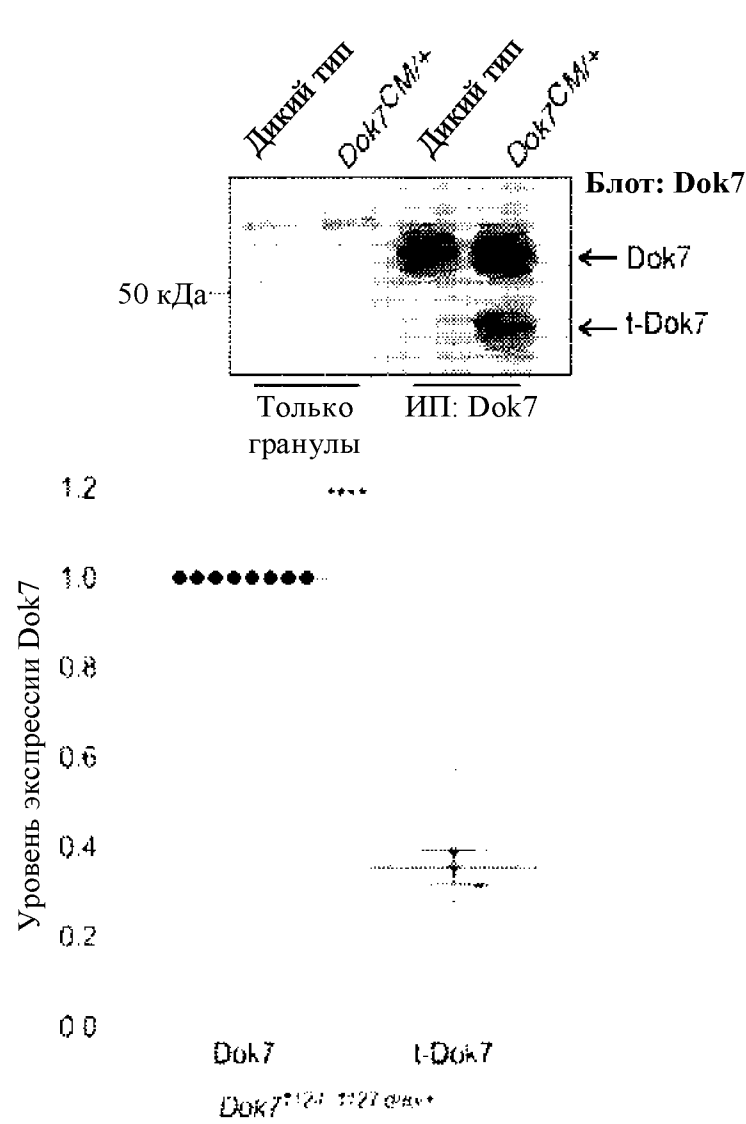
Фигура 1D (продолжение)



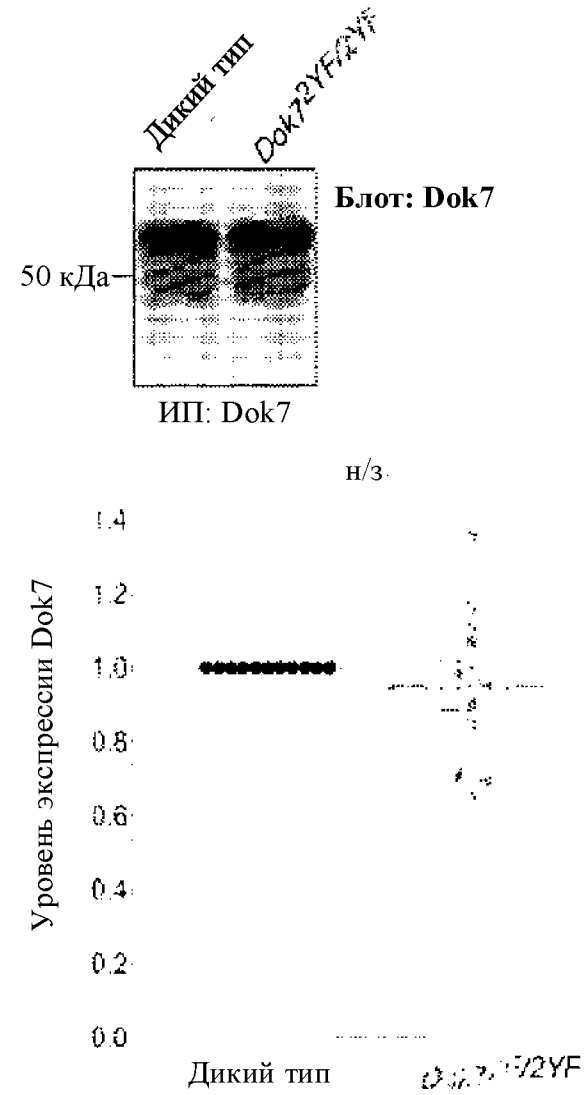
Фигура 1D (продолжение)



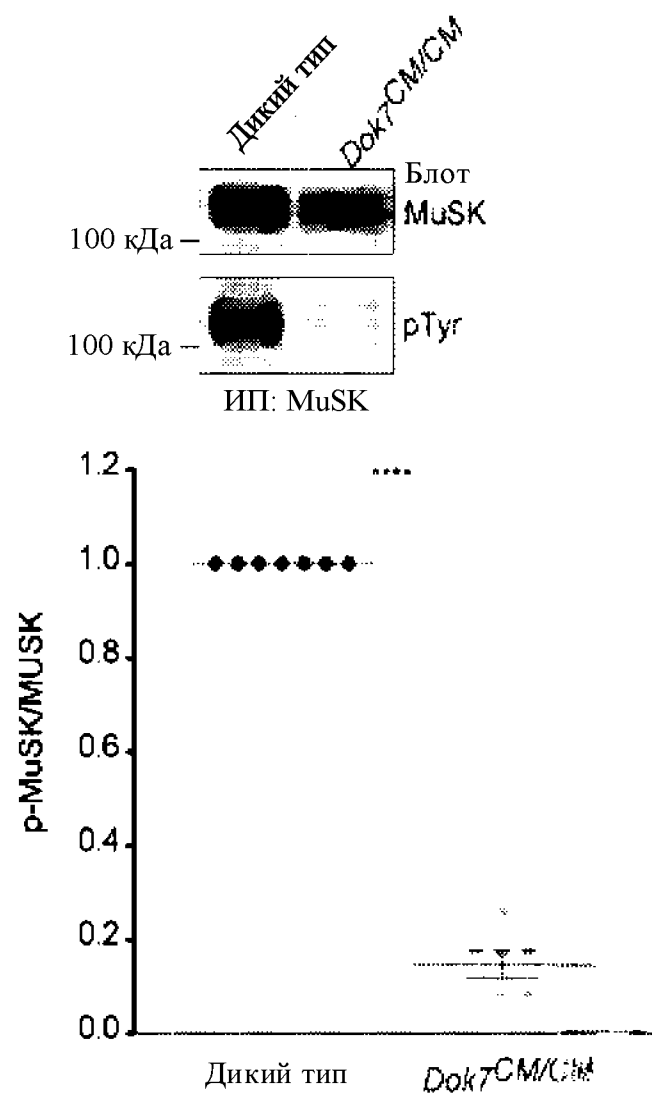
Фигура 2А



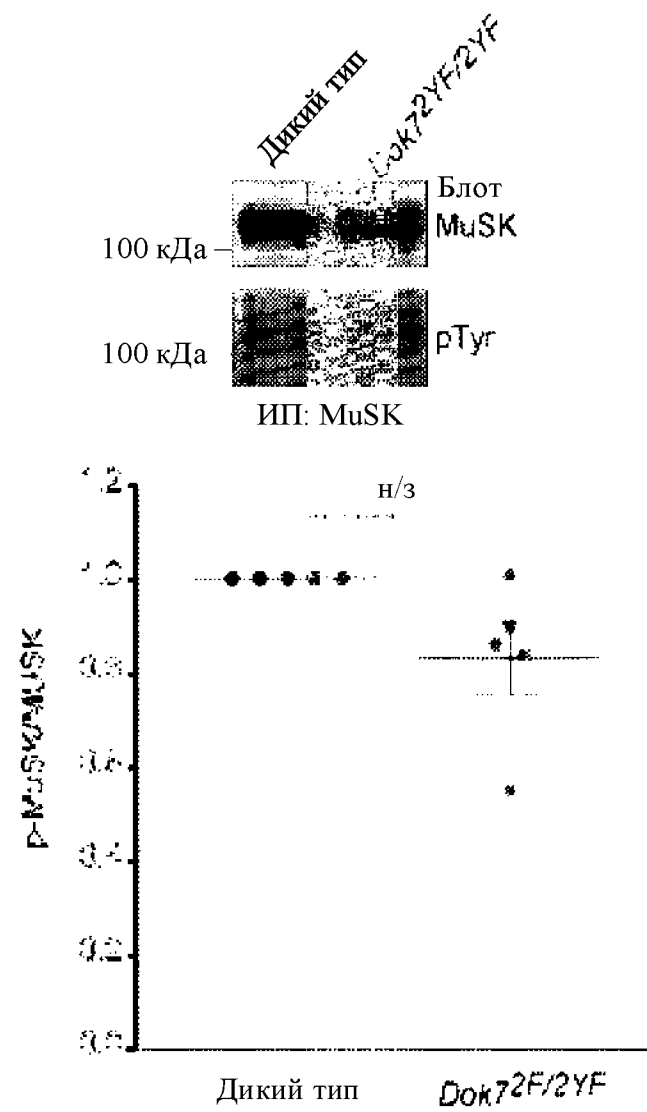
Фигура 2В



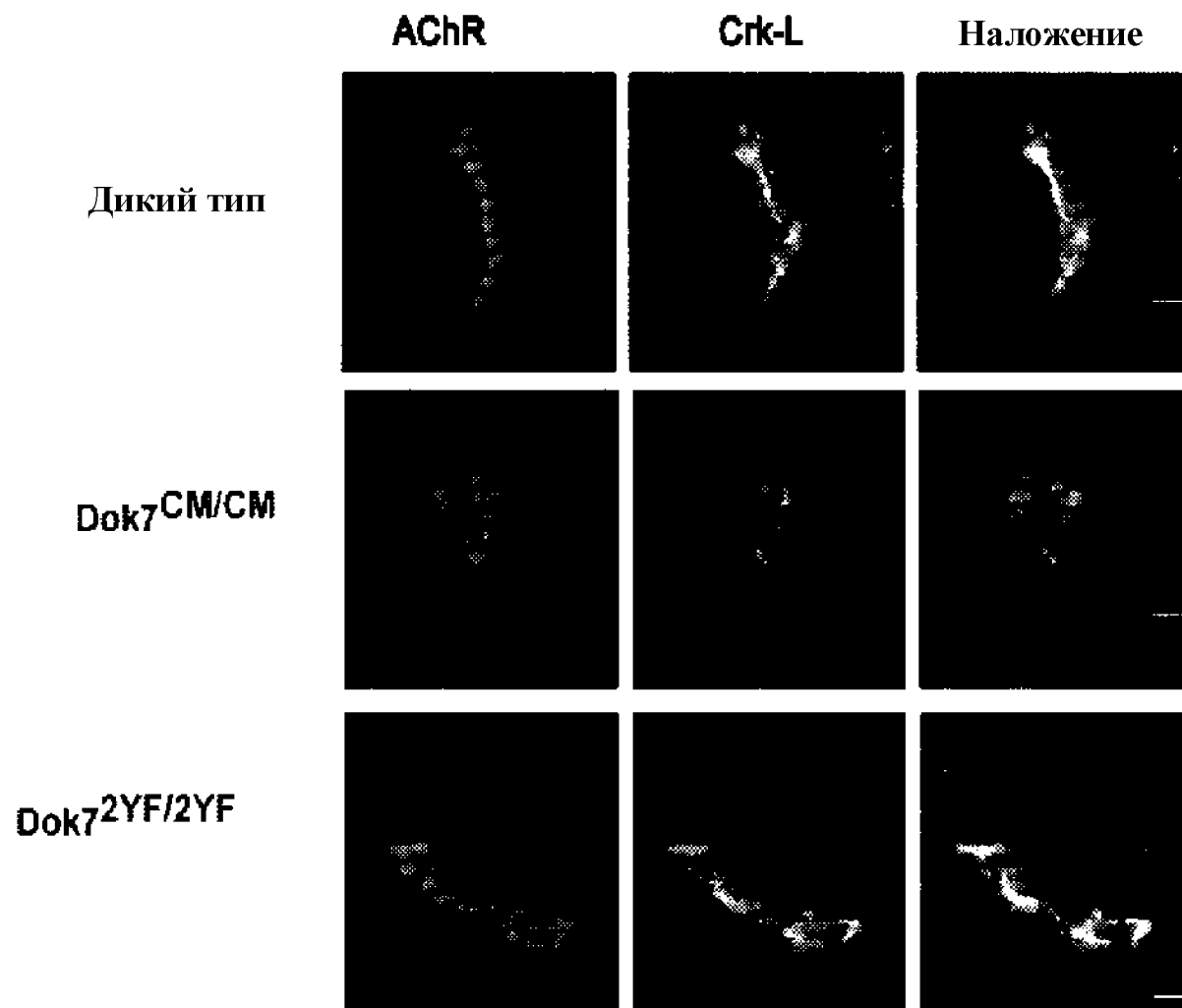
Фигура 2С



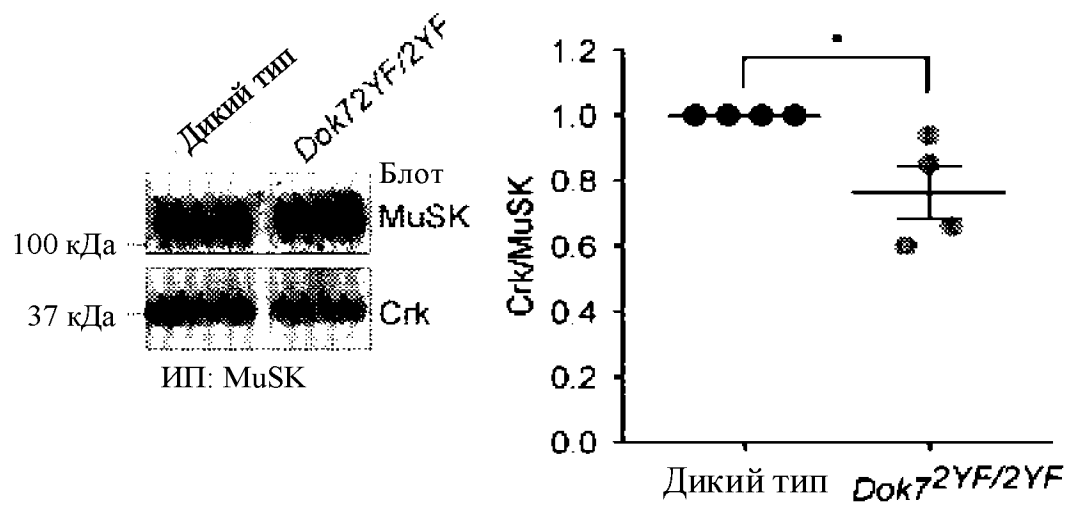
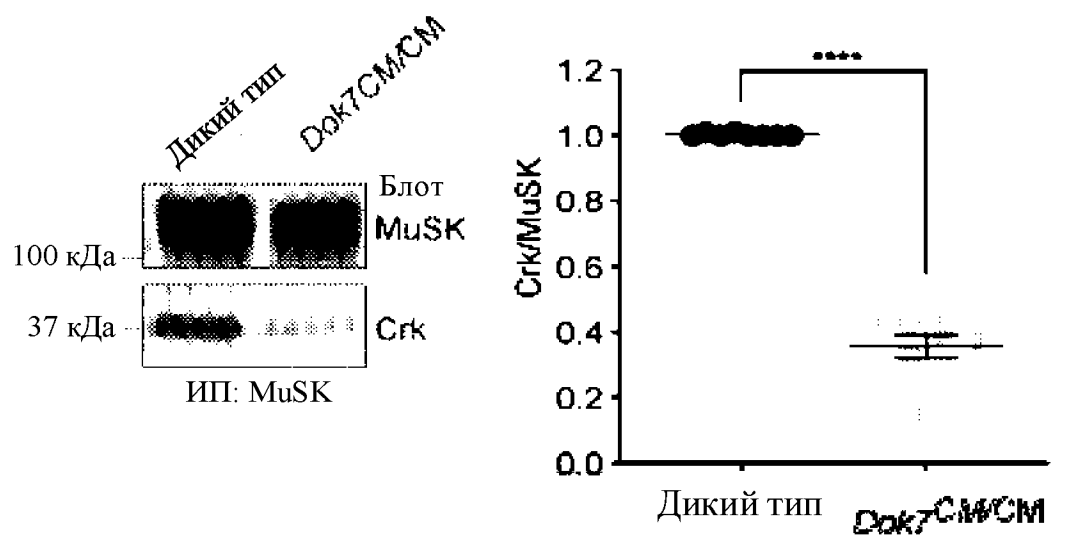
Фигура 2D



Фигура 3А



Фигура 3В



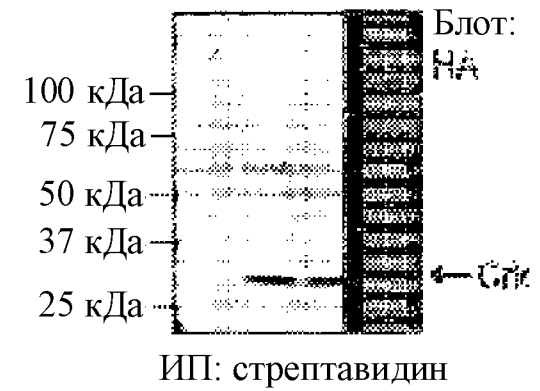
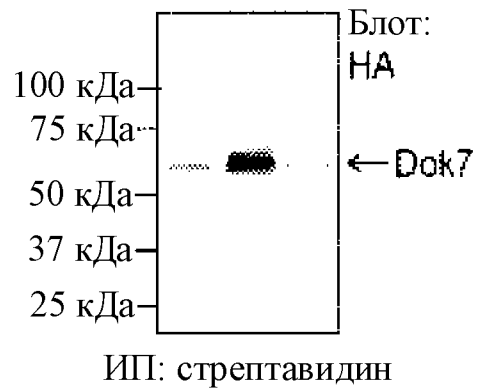
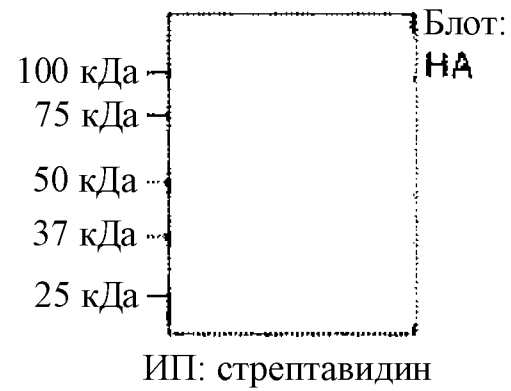
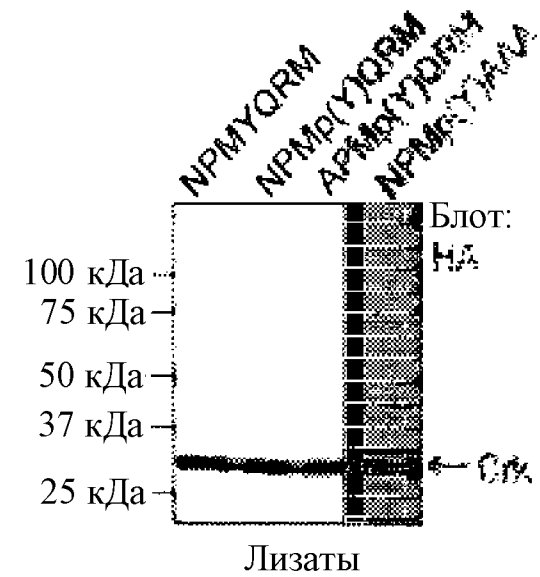
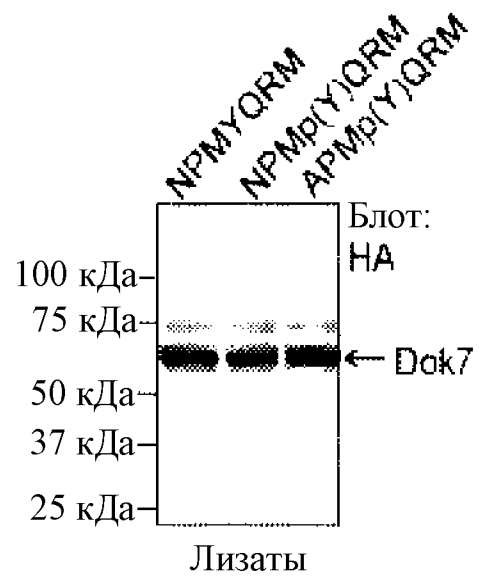
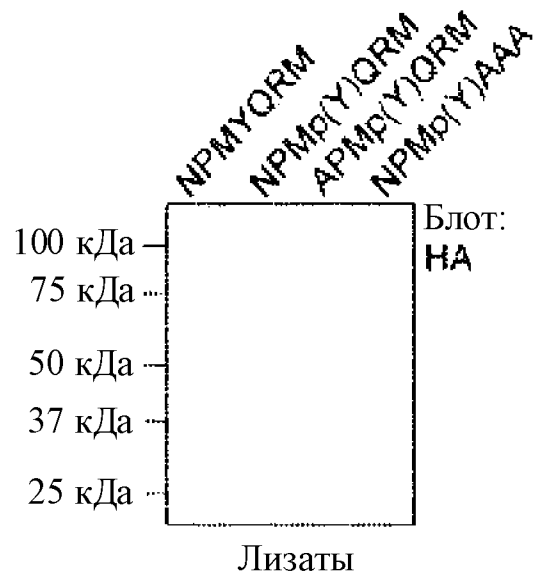
Фигура 3С

Сайт связывания Dok7

MuSK, 541 ELLDRLHPNFMYGRMPLLL 560

Потенциальный сайт связывания Crk

Фигура 3D

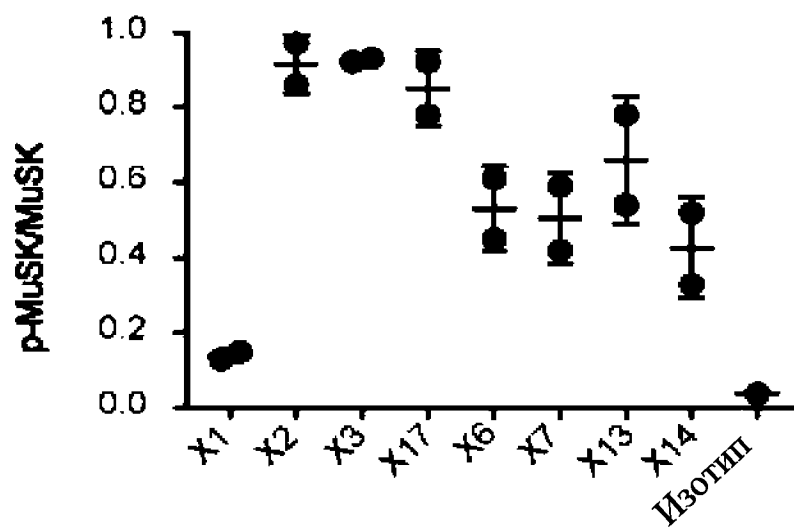
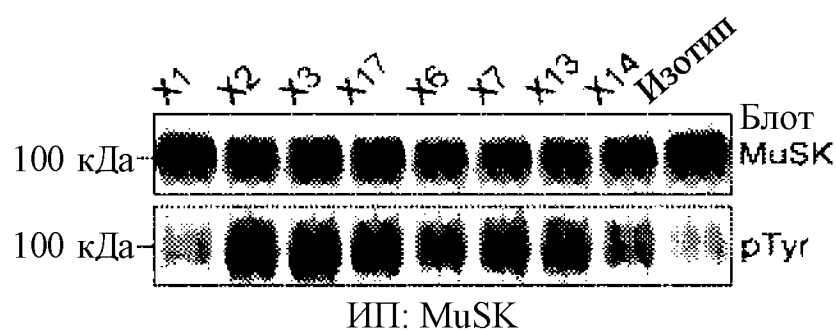


Фигура 4А

Клон Fab	Антиген			
	hFz	hECD	mFz	mECD
X1	0.39 ± 0.05	0.55 ± 0.06	1.09 ± 0.07	1.34 ± 0.07
X2	0.53 ± 0.04	0.86 ± 0.11	0.45 ± 0.08	0.70 ± 0.03
X3	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.40 ± 0.03
X6	0.90 ± 0.08	1.47 ± 0.12	0.42 ± 0.02	0.59 ± 0.06
X7	4.5 ± 0.4	6.0 ± 0.4	12.0 ± 1.20	16.2 ± 1.2
X8	1.4 ± 0.2	1.69 ± 0.14	4.7 ± 0.5	44 ± 14
X13	1.7 ± 0.2	2.39 ± 0.17	1.56 ± 0.18	2.41 ± 0.19
X14	0.31 ± 0.10	0.53 ± 0.07	8.0 ± 1.9	4.1 ± 0.6
X17	0.38 ± 0.05	0.52 ± 0.07	0.47 ± 0.02	0.63 ± 0.04

Значения K_D в нМ

Фигура 4В

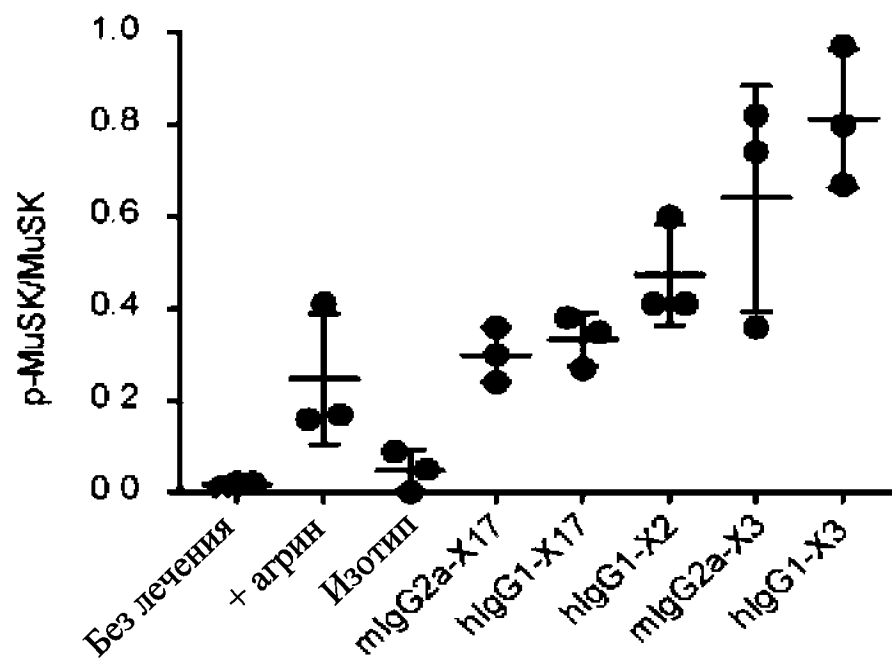
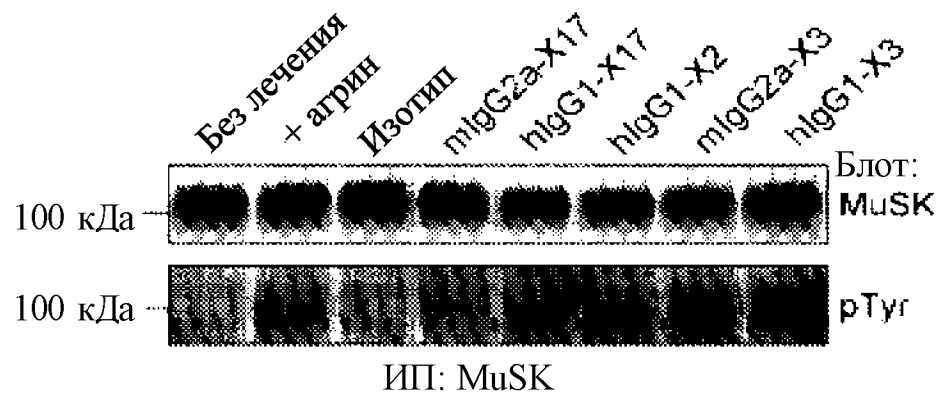


Фигура 4С

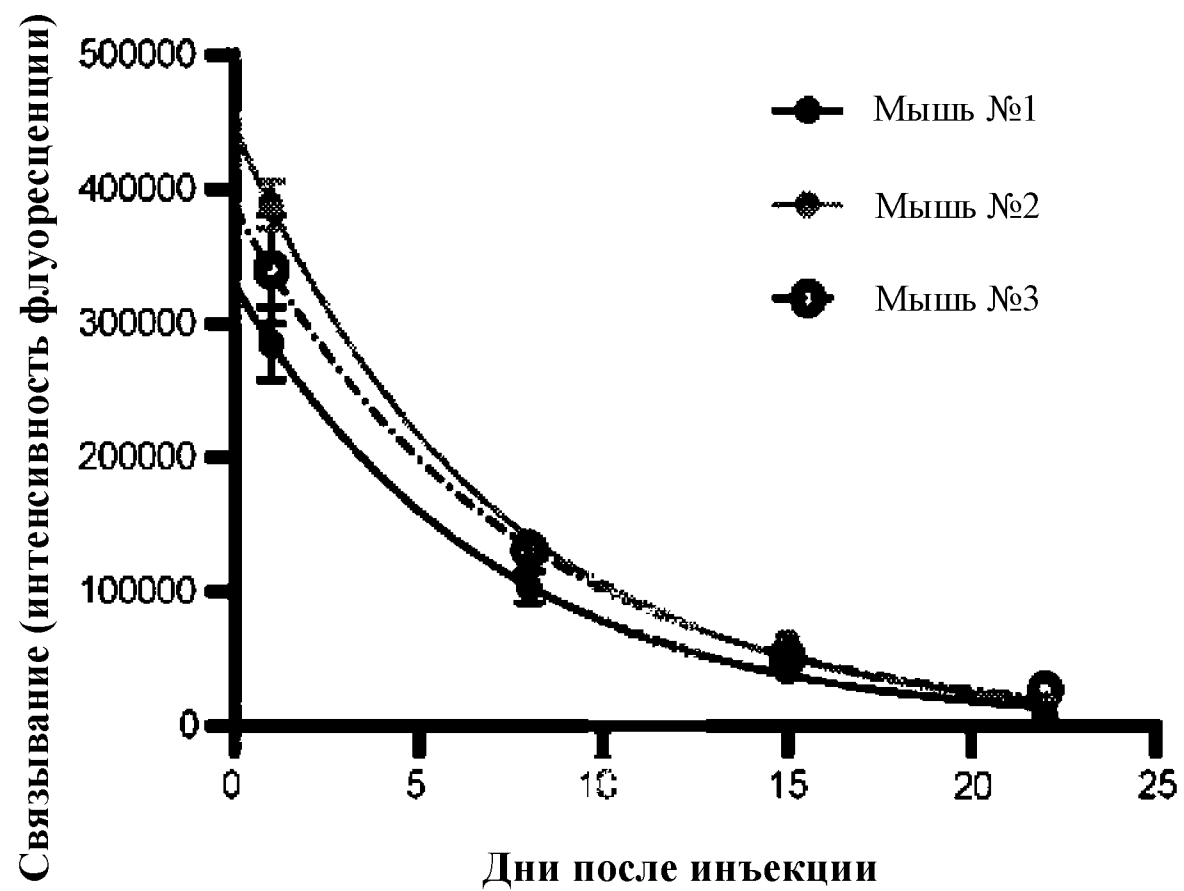
Клон Fab	Антиген			
	hFz	hECD	mFz	mECD
hlgG1-X2	0.421 ± 0.009	0.478 ± 0.009	0.265 ± 0.004	0.307 ± 0.005
mlgG2a-X3	0.079 ± 0.002	0.113 ± 0.003	0.096 ± 0.003	0.118 ± 0.003
hlgG1-X3	0.057 ± 0.001	0.074 ± 0.005	0.070 ± 0.002	0.079 ± 0.004
mlgG2a-X17	0.61 ± 0.02	0.97 ± 0.04	0.74 ± 0.01	1.10 ± 0.02
hlgG1-X17	0.56 ± 0.03	0.86 ± 0.06	0.68 ± 0.03	1.04 ± 0.06

Значения K_D в нМ

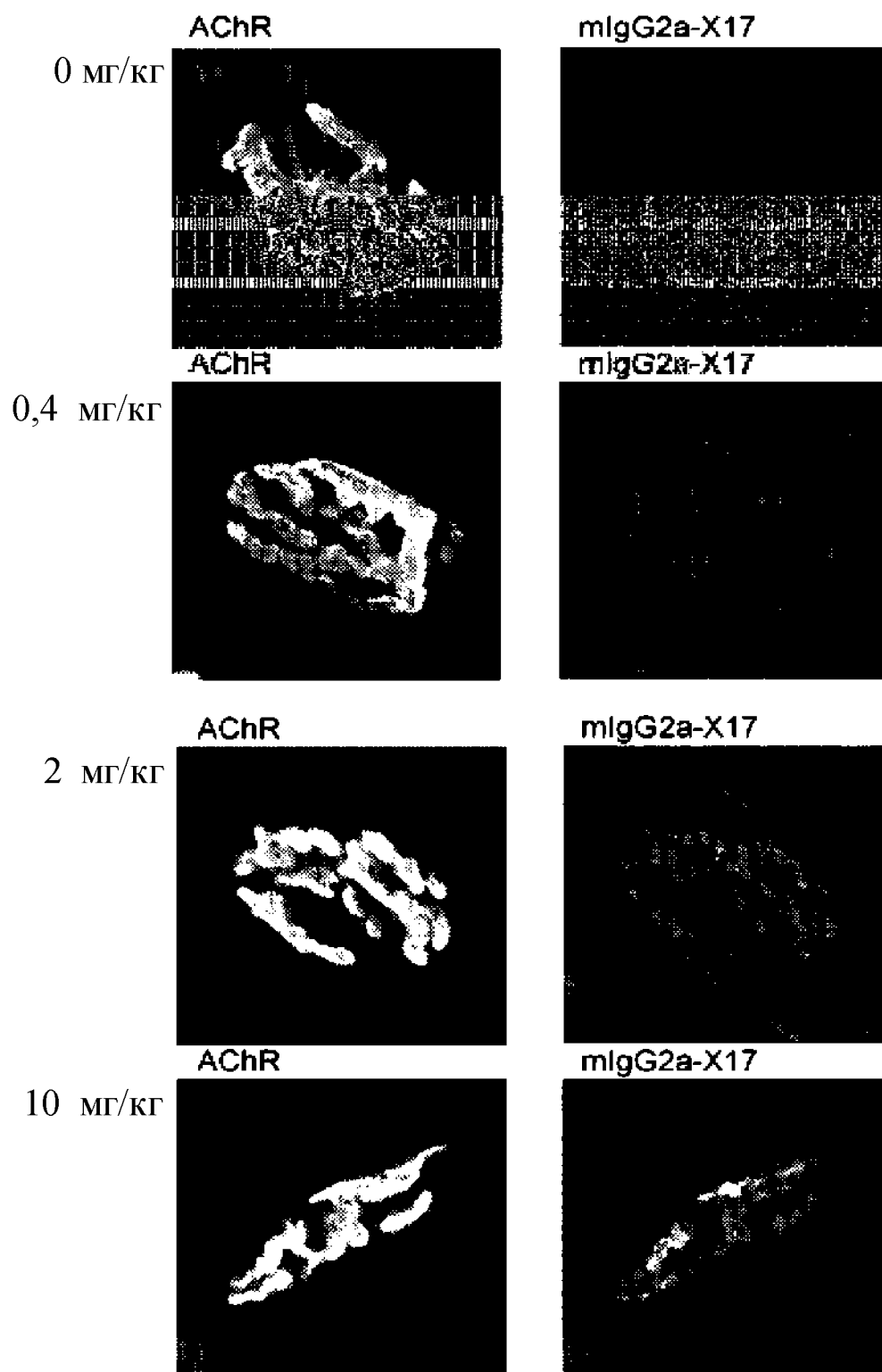
Фигура 4D



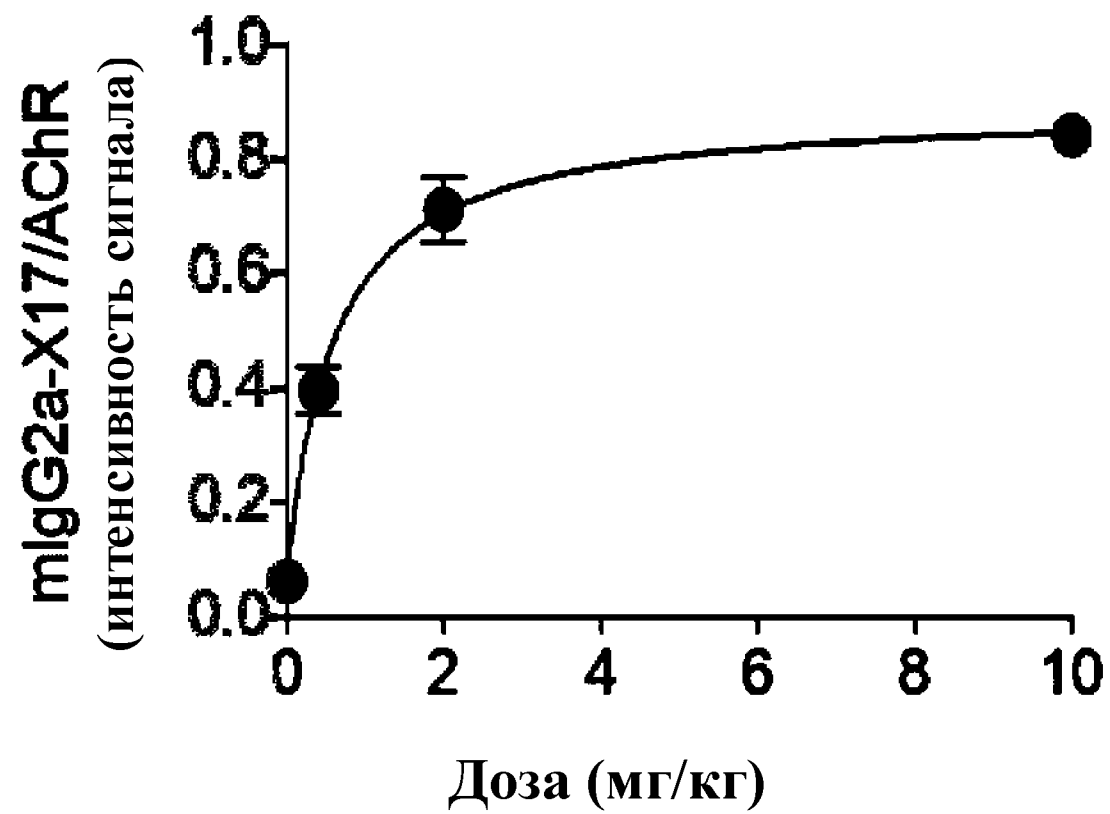
Фигура 4Е



Фигура 4F

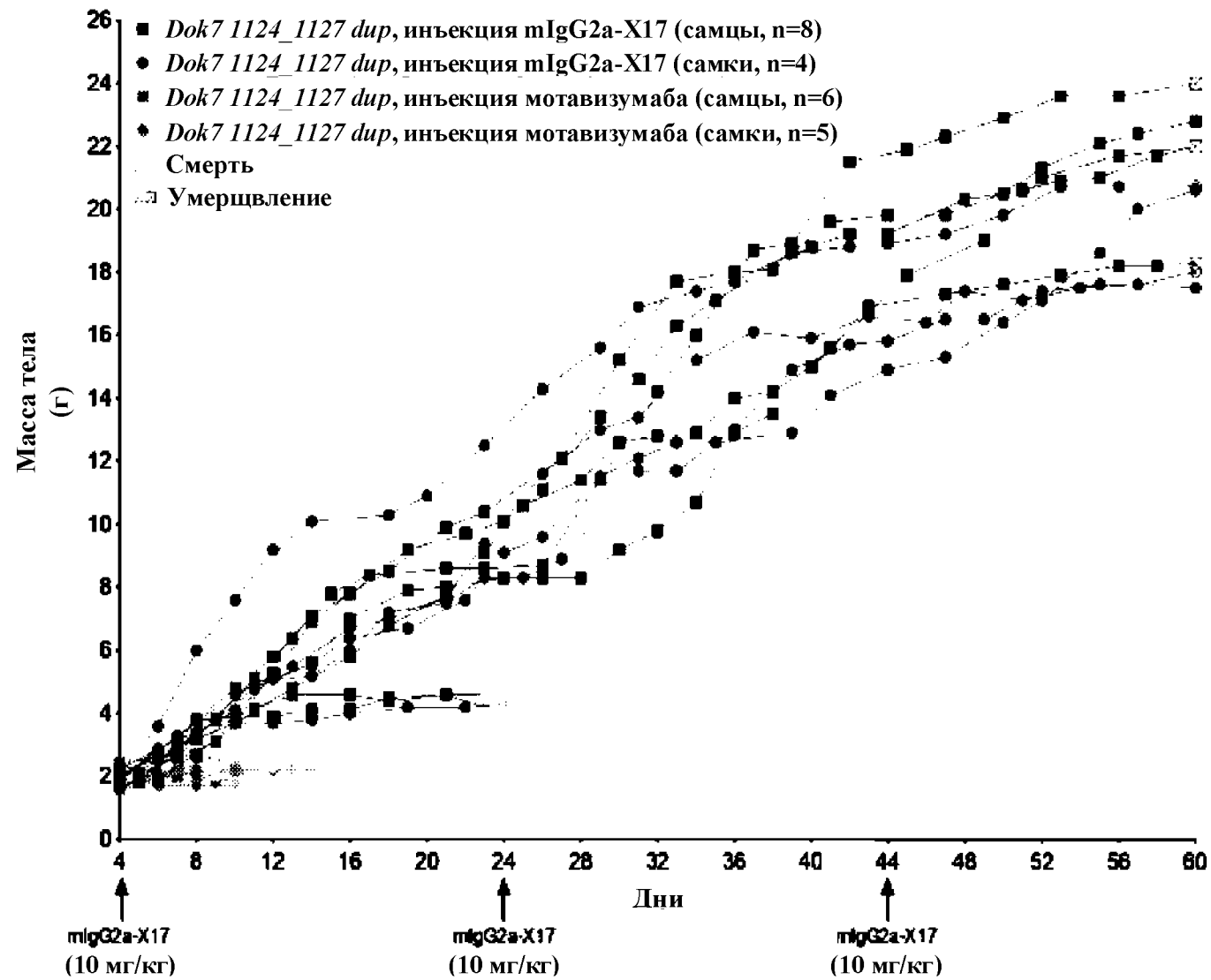


Фигура 4F (продолжение)

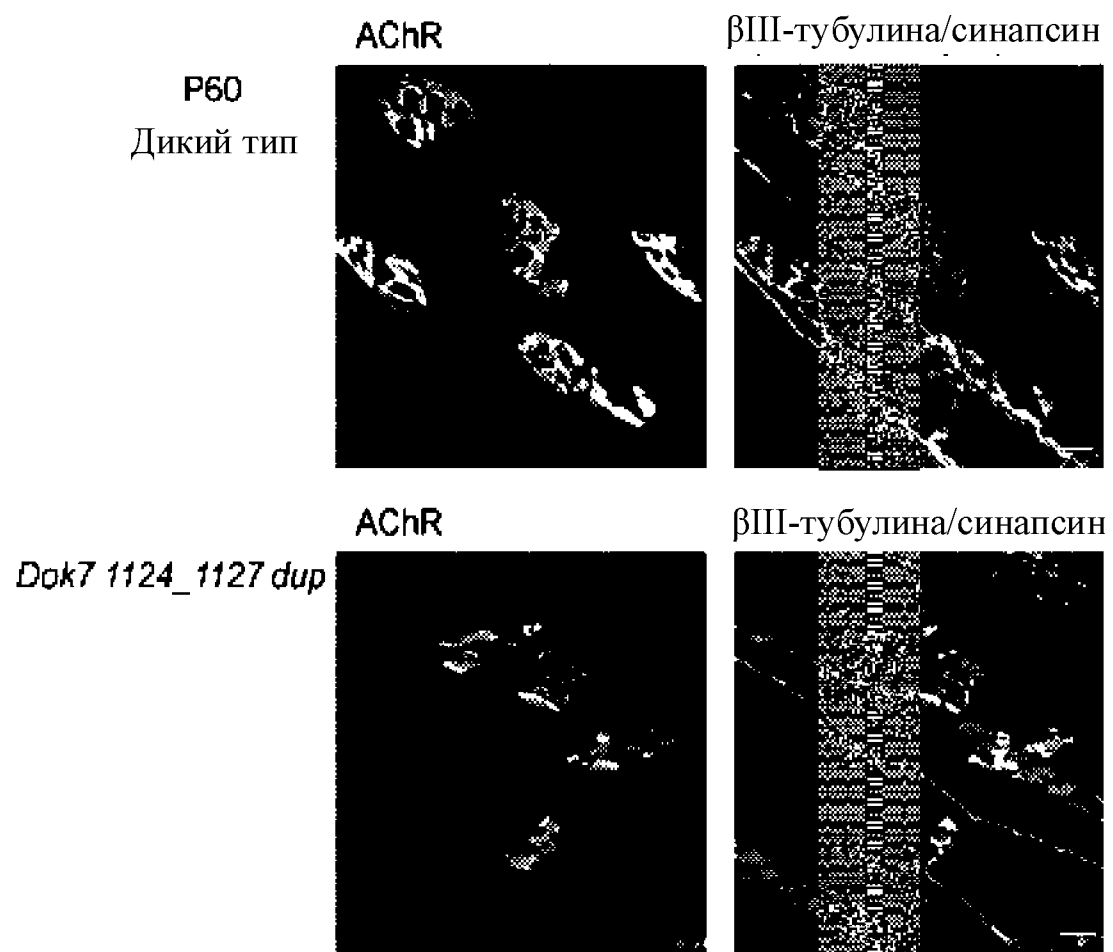




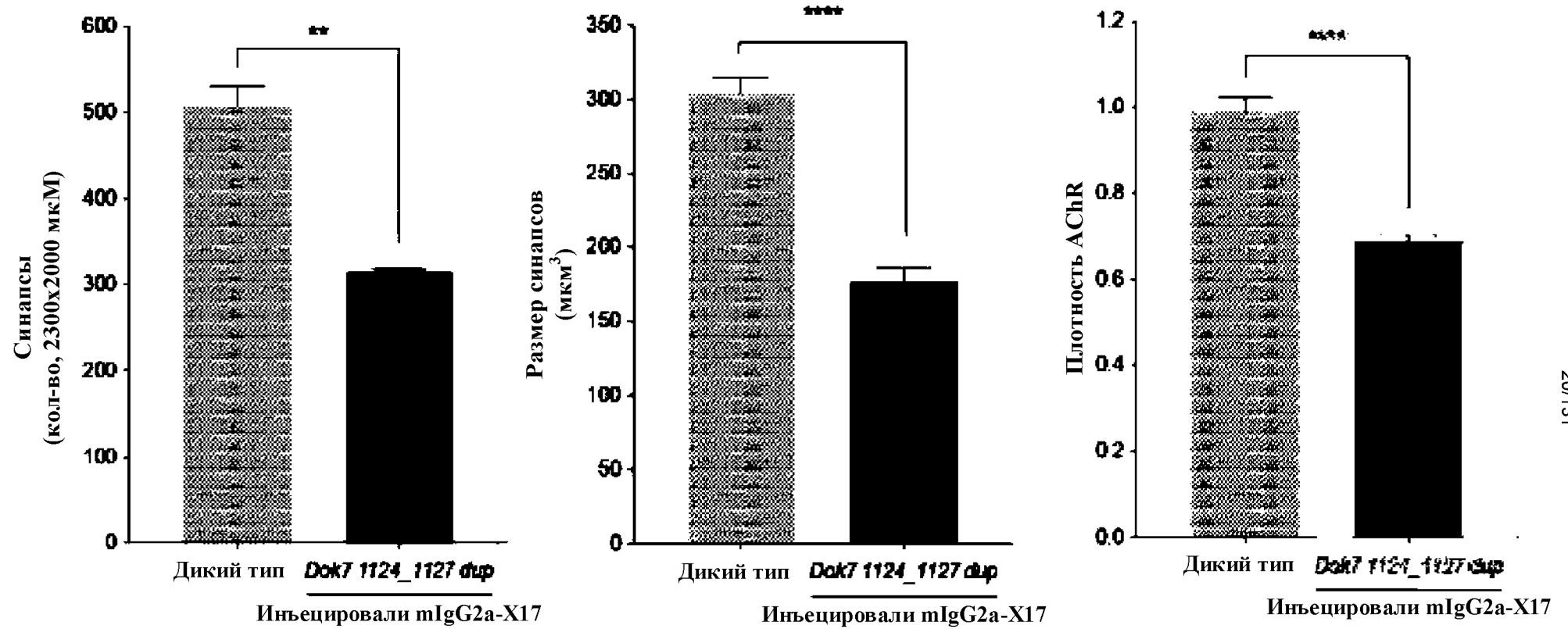
Фигура 5В



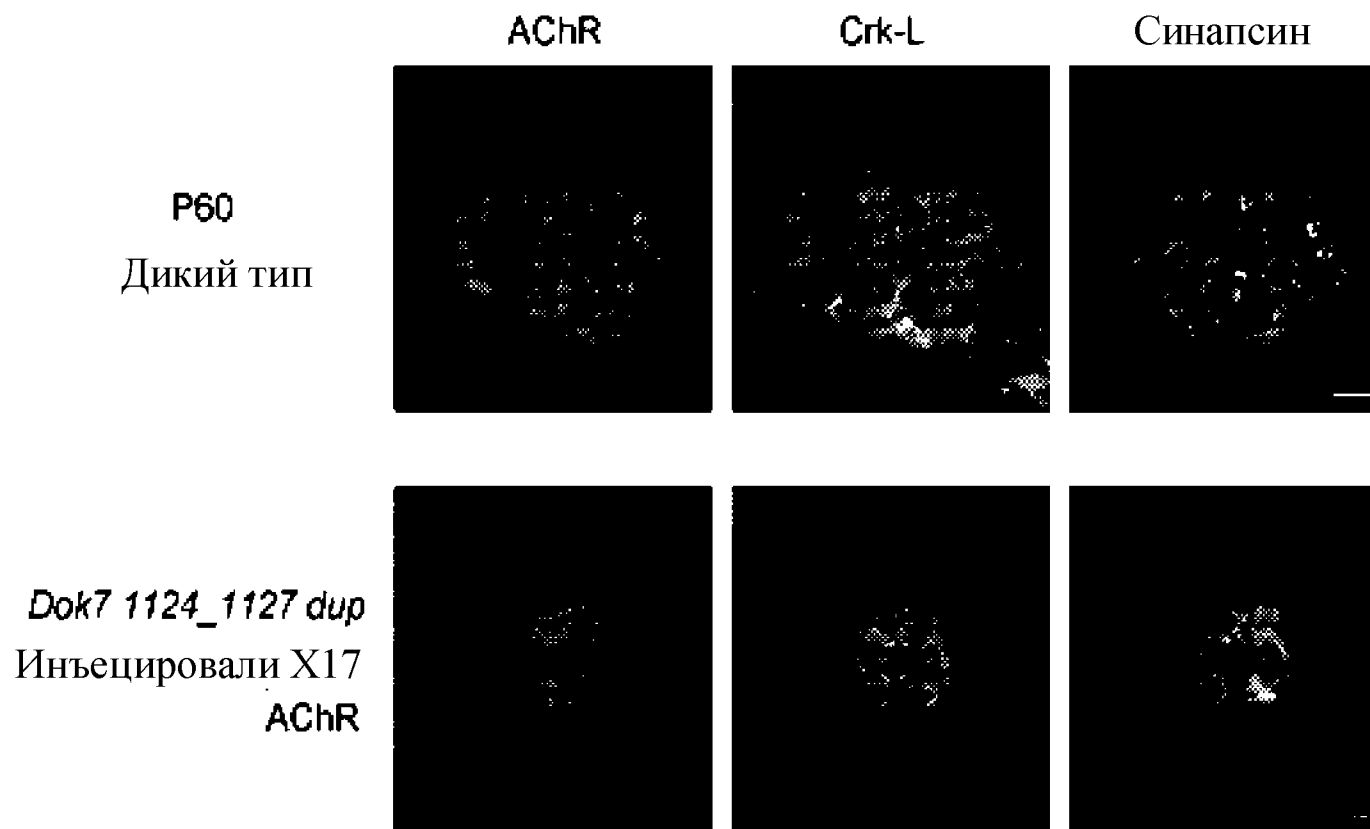
Фигура 5С



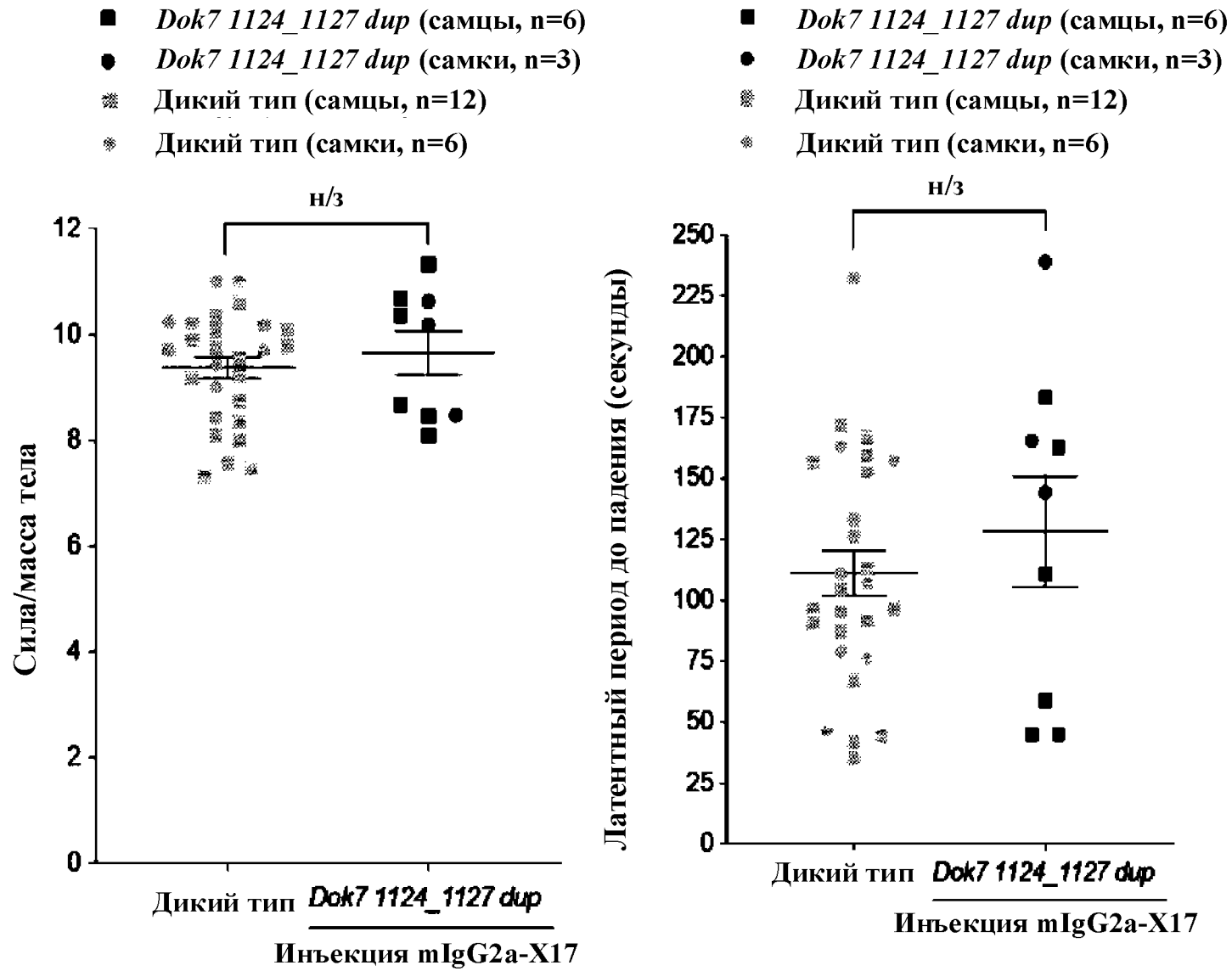
Фигура 5С (продолжение)



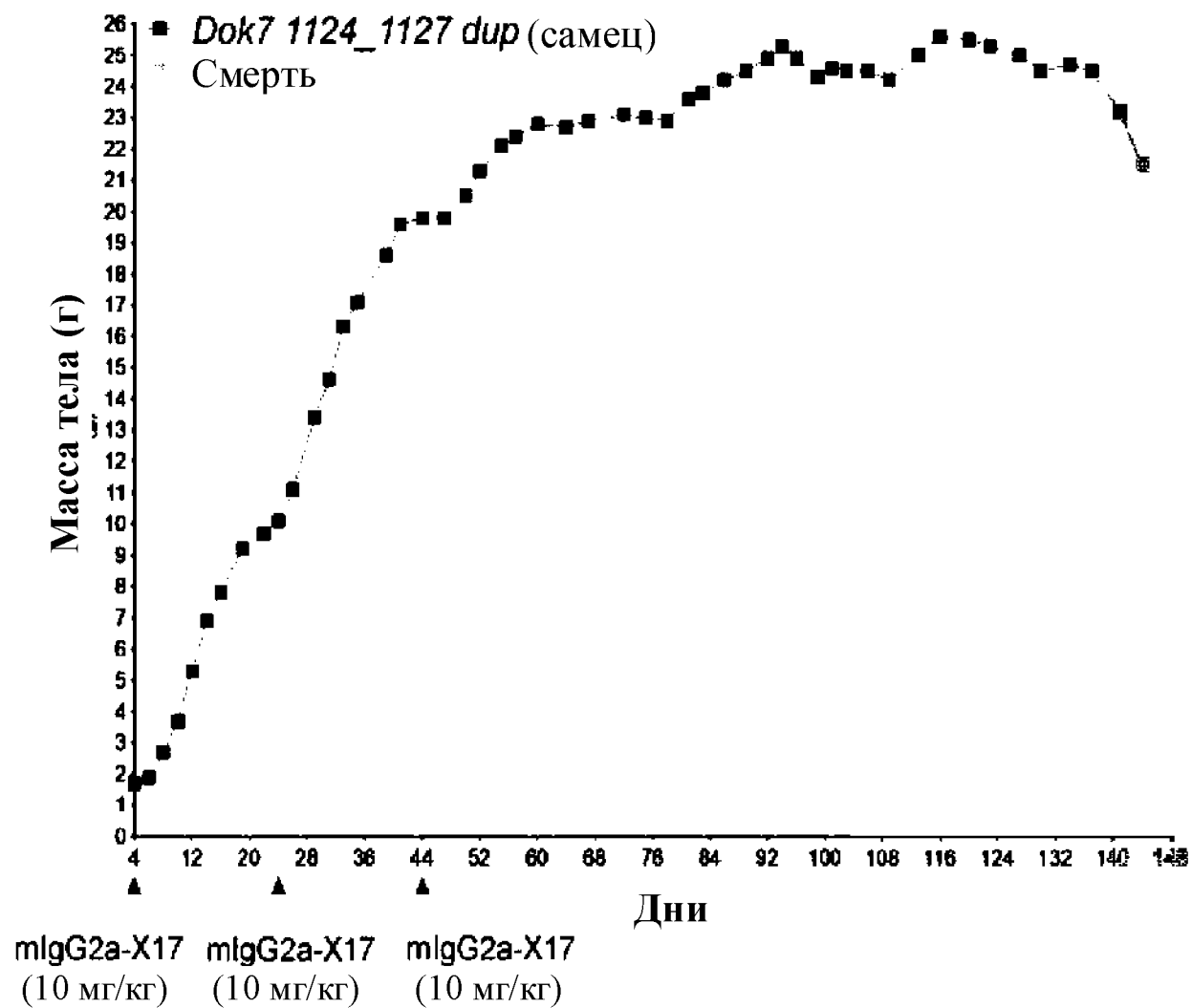
Фигура 5D



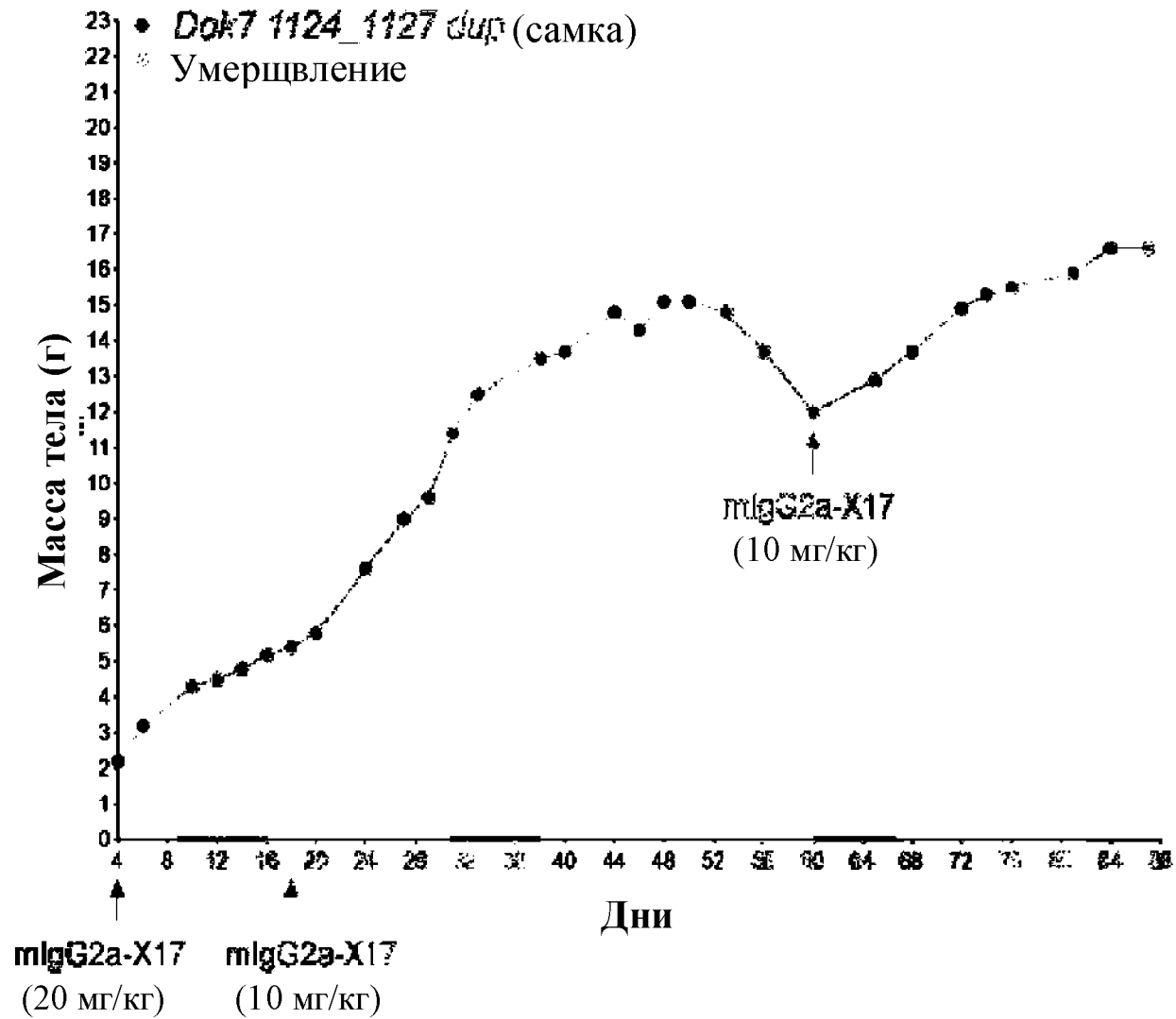
Фигура 5Е



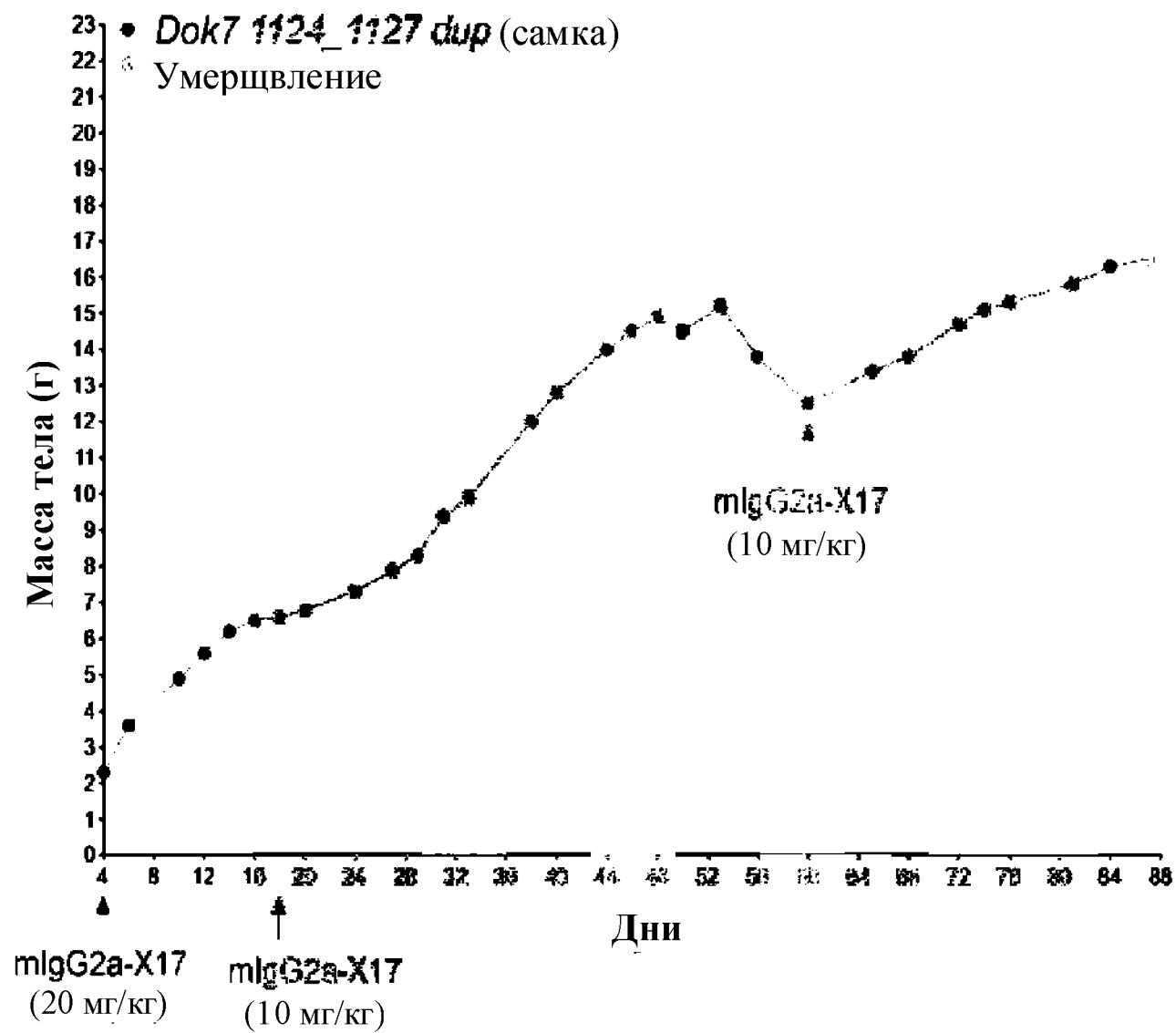
Фигура 6А



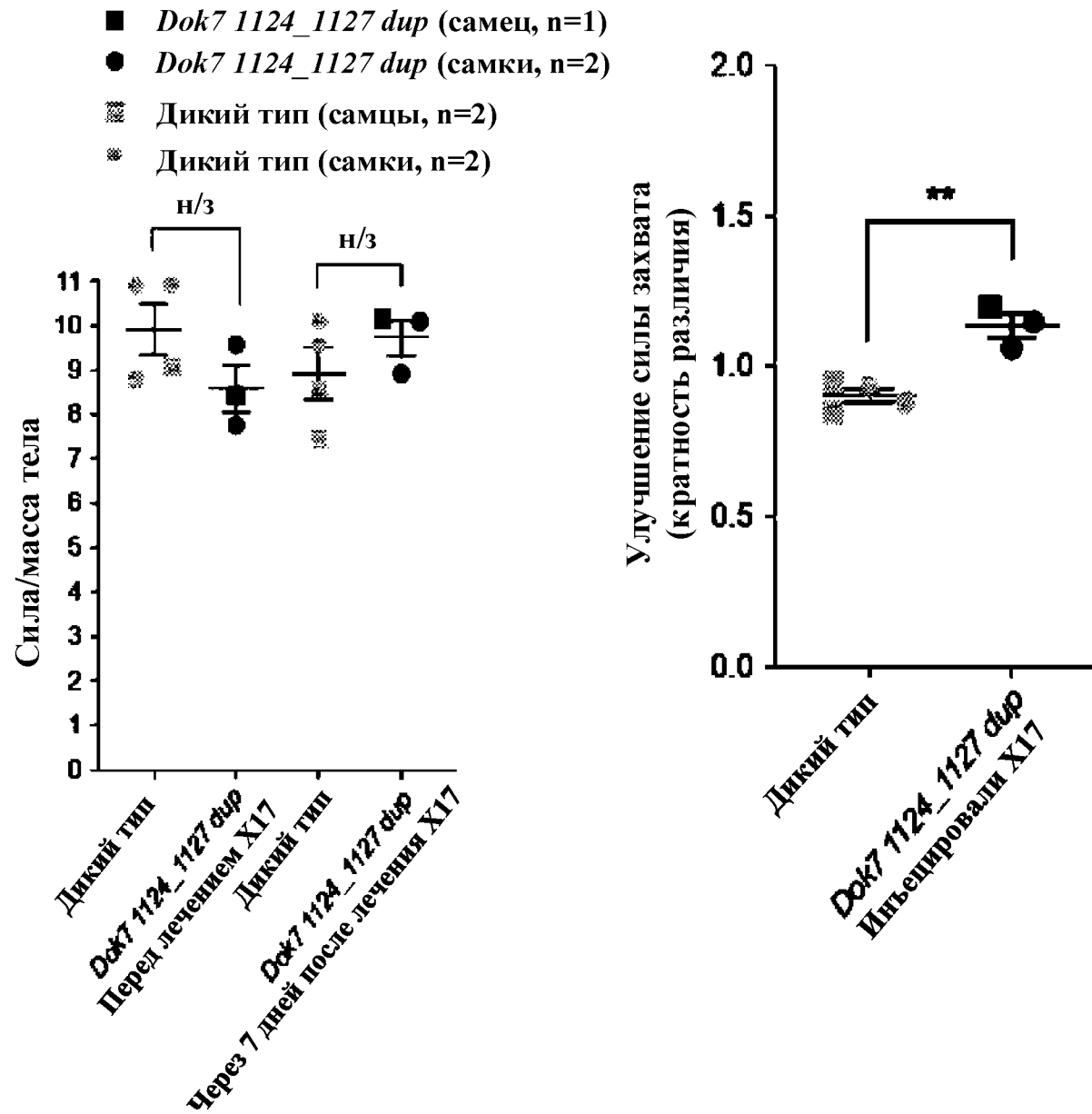
Фигура 6В



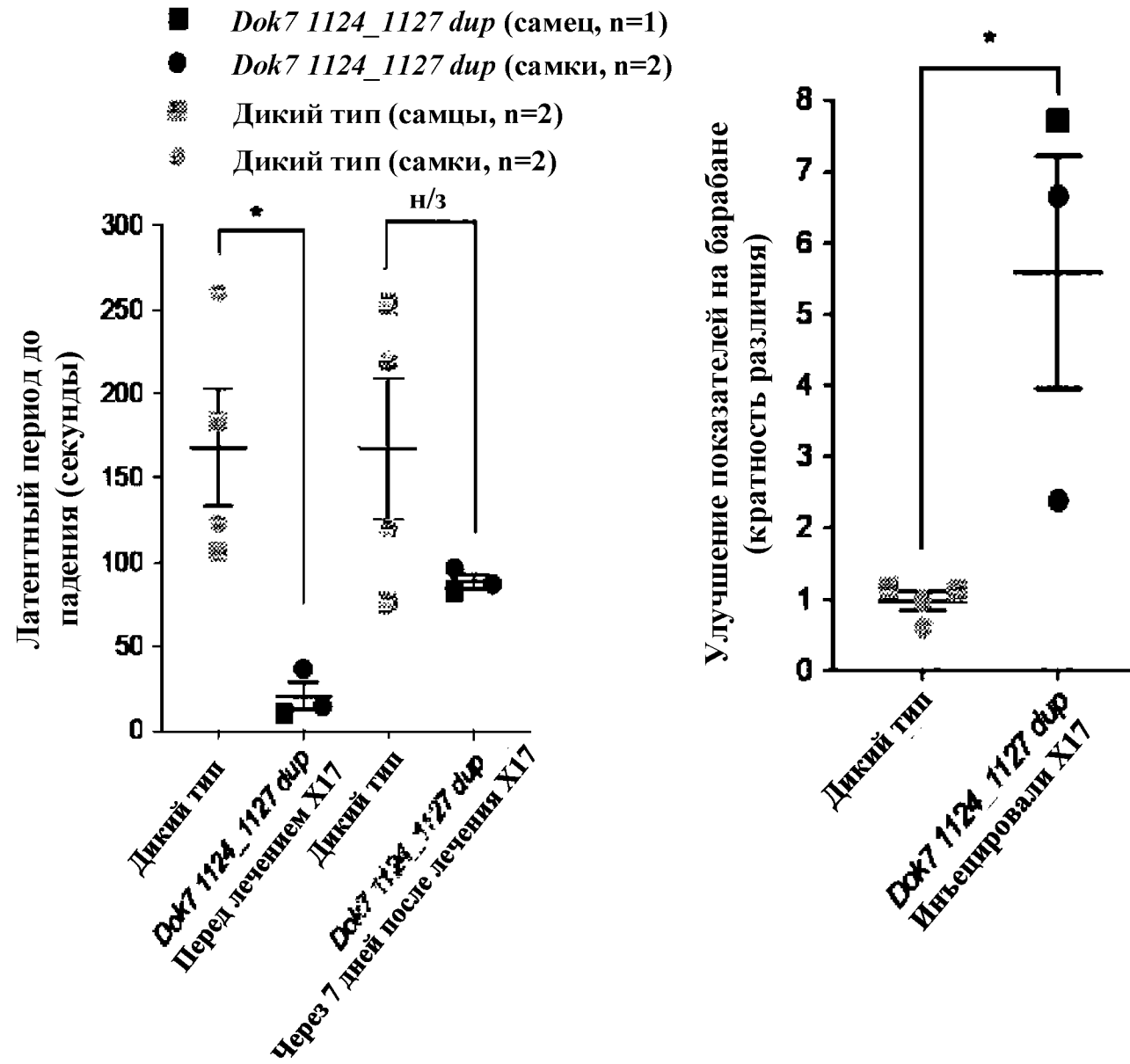
Фигура 6В (продолжение)



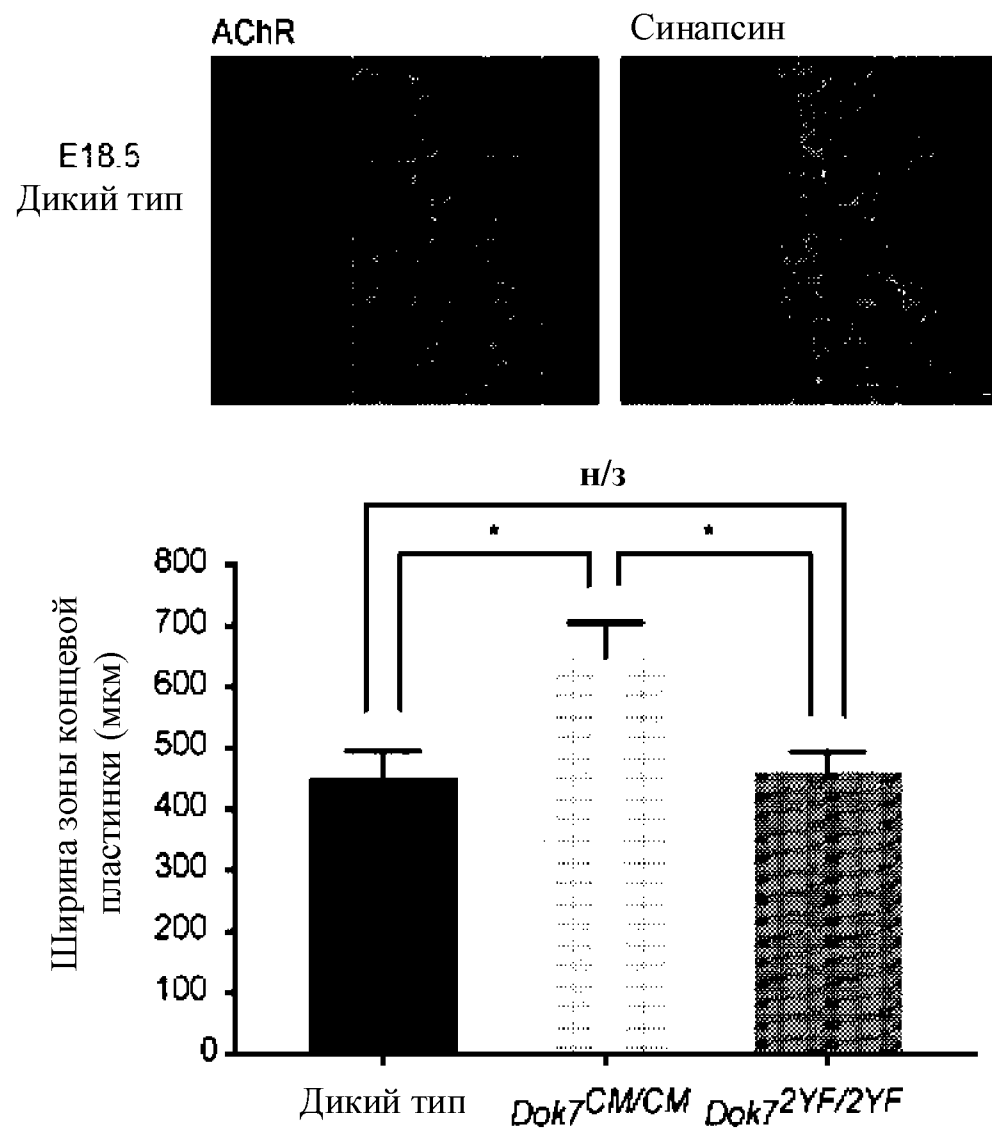
Фигура 6С



Фигура 6С (продолжение)



Фигура 7

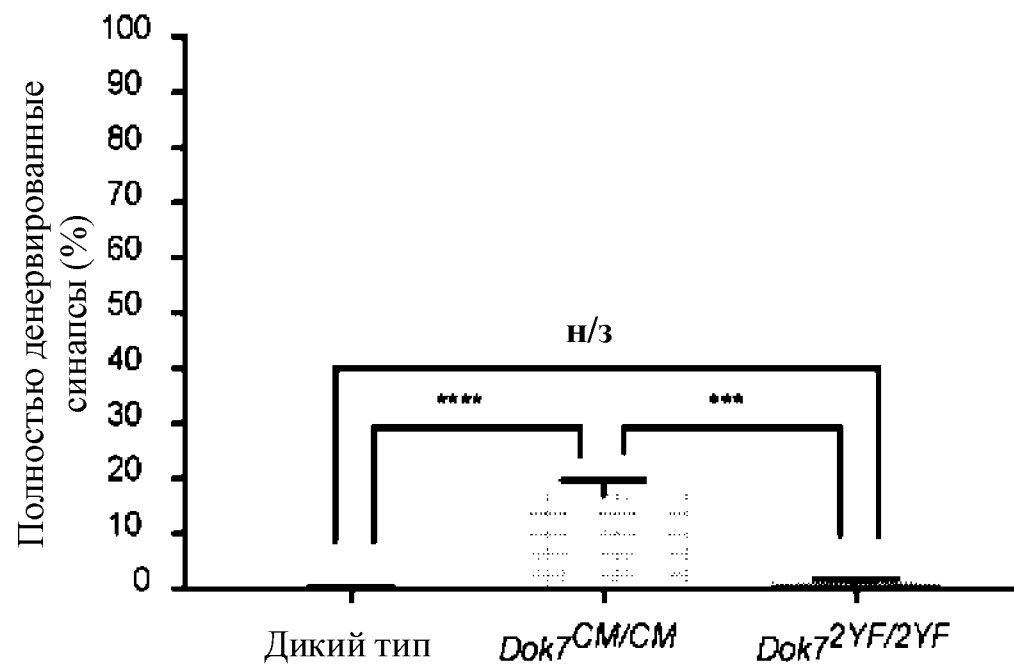
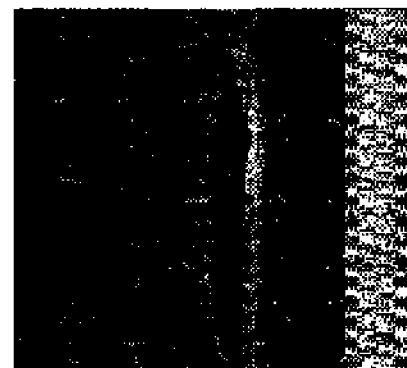
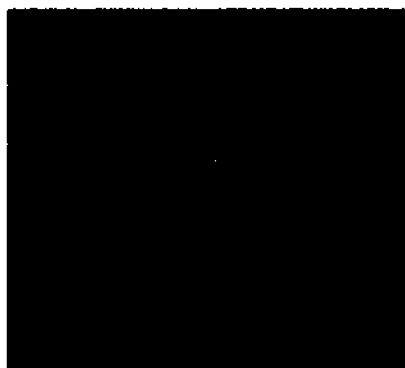


Фигура 7 (продолжение)

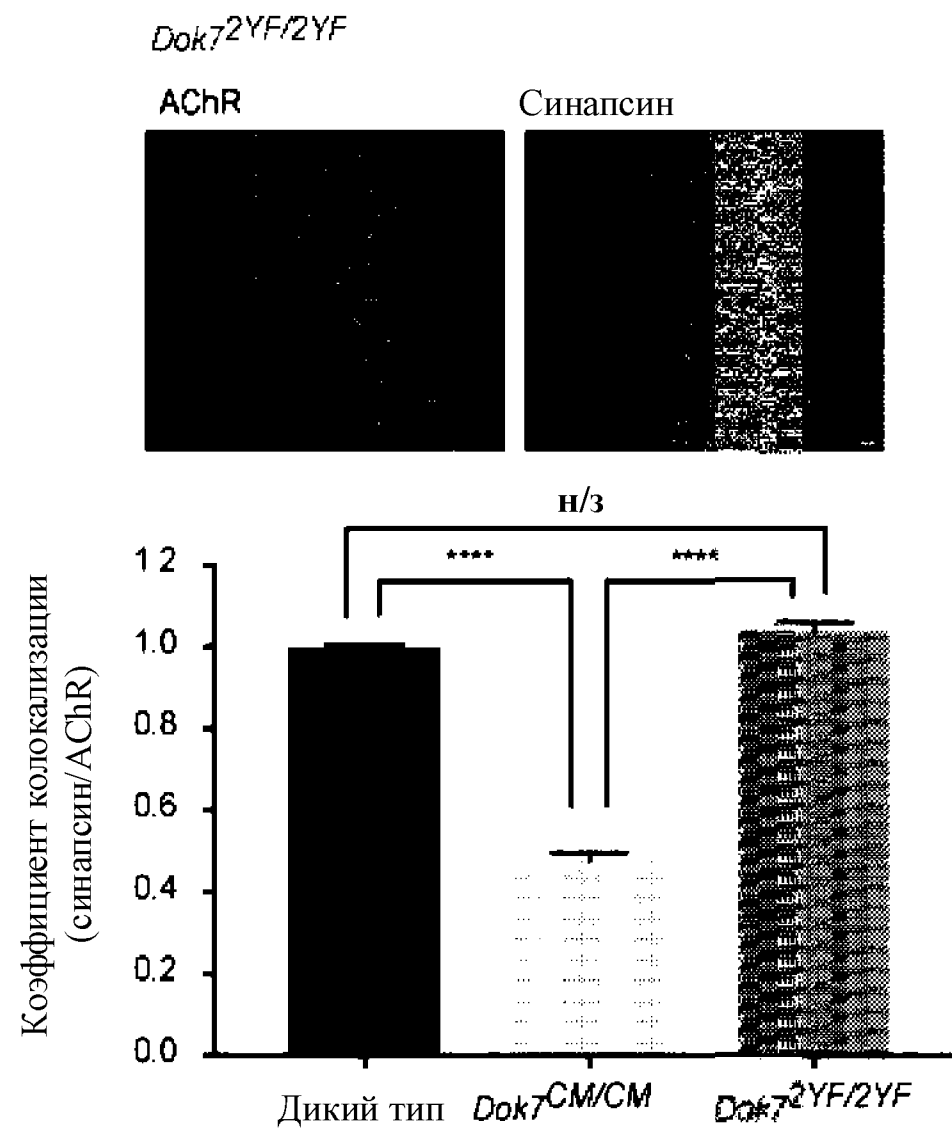
Dok7^{CM/CM}

AChR

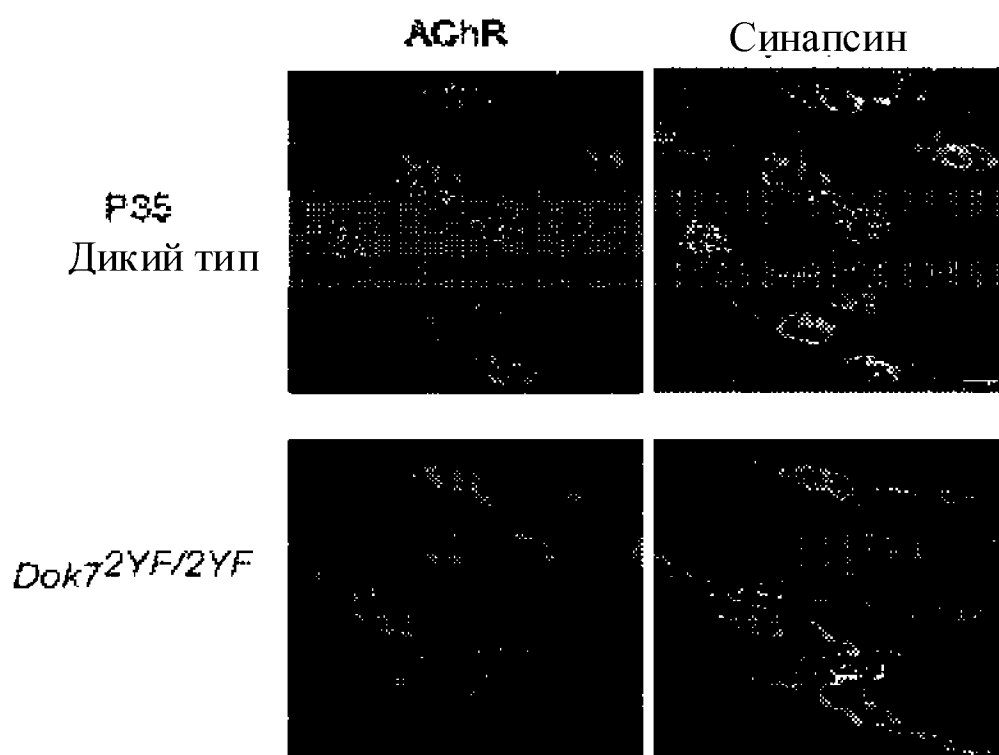
Синапсин



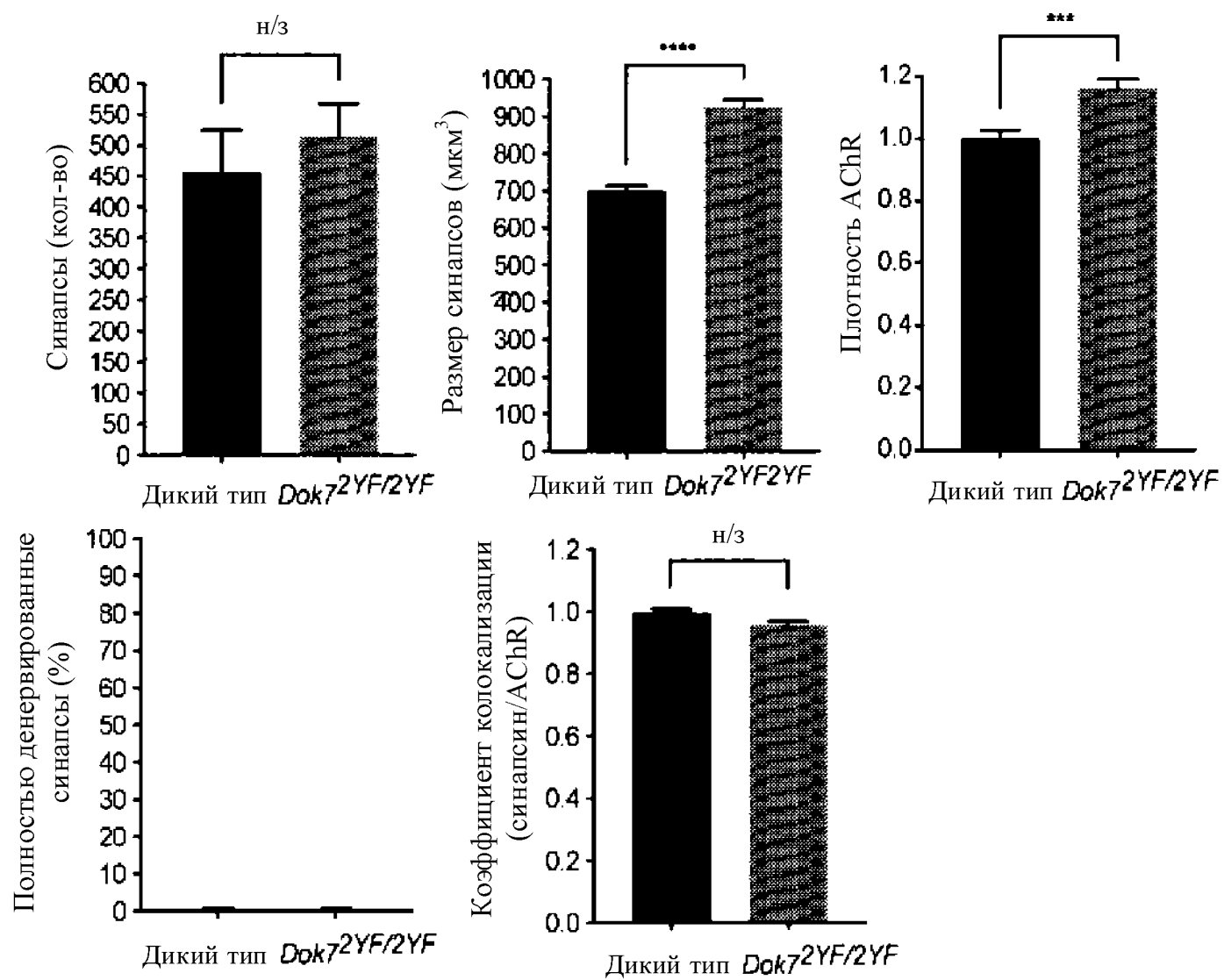
Фигура 7 (продолжение)



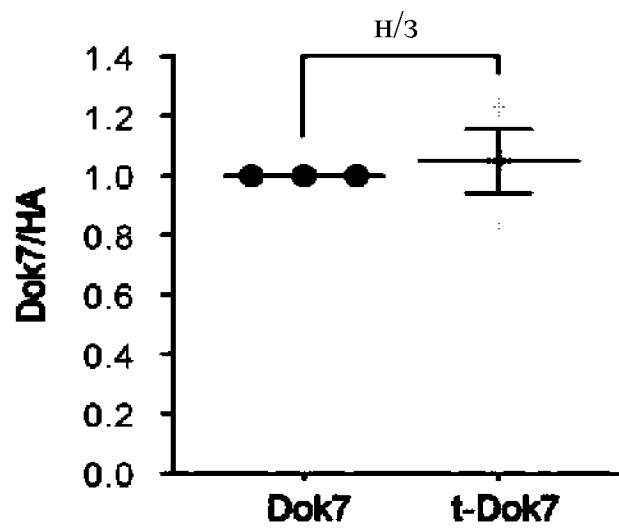
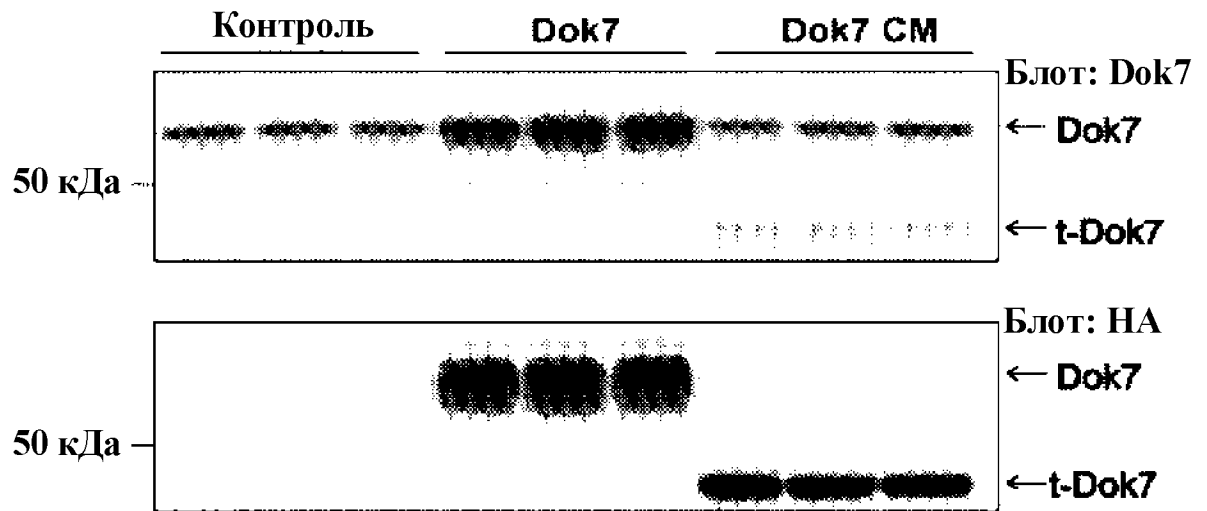
Фигура 8



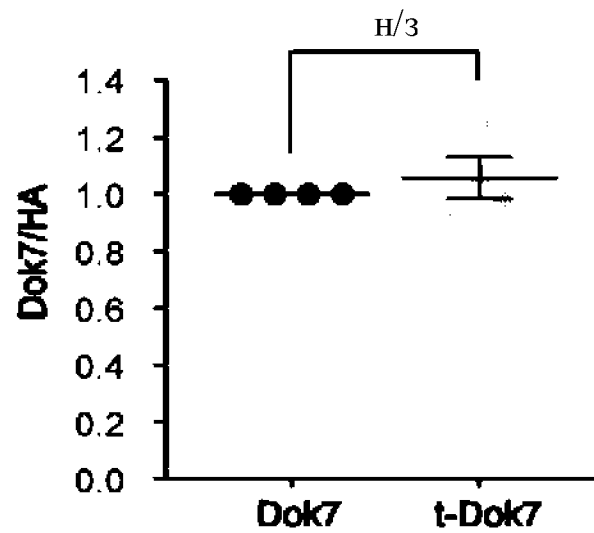
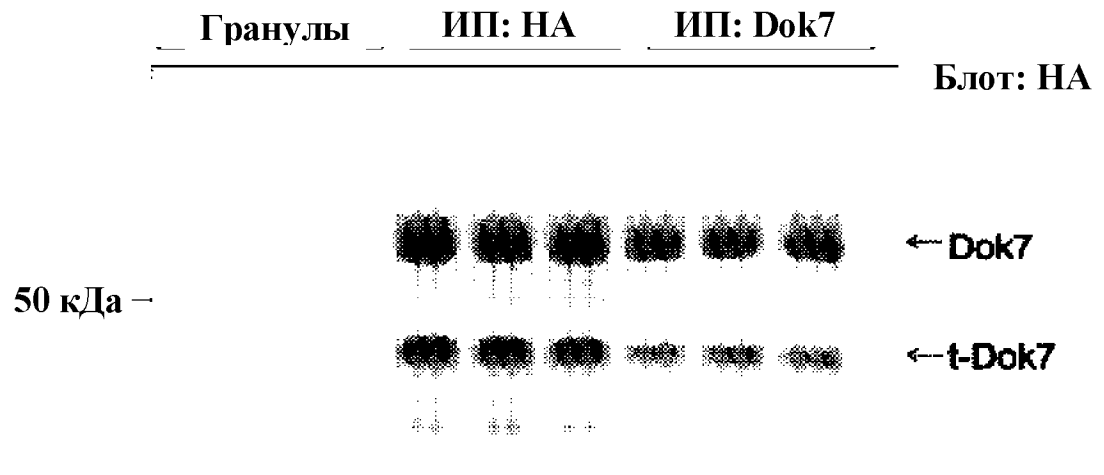
Фигура 8 (продолжение)



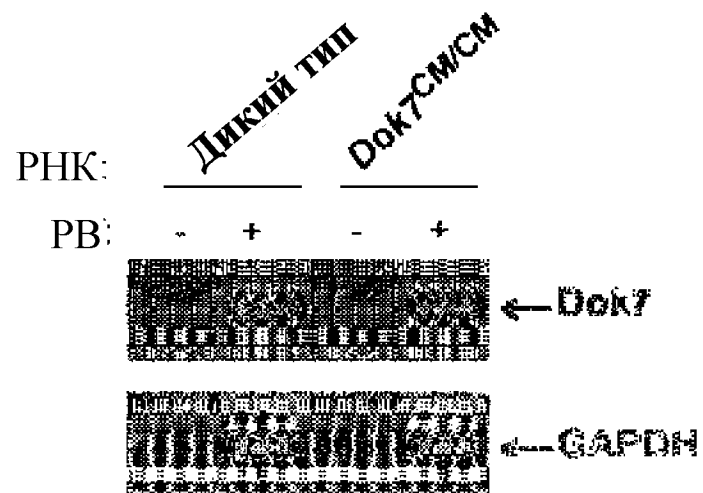
Фигура 9А



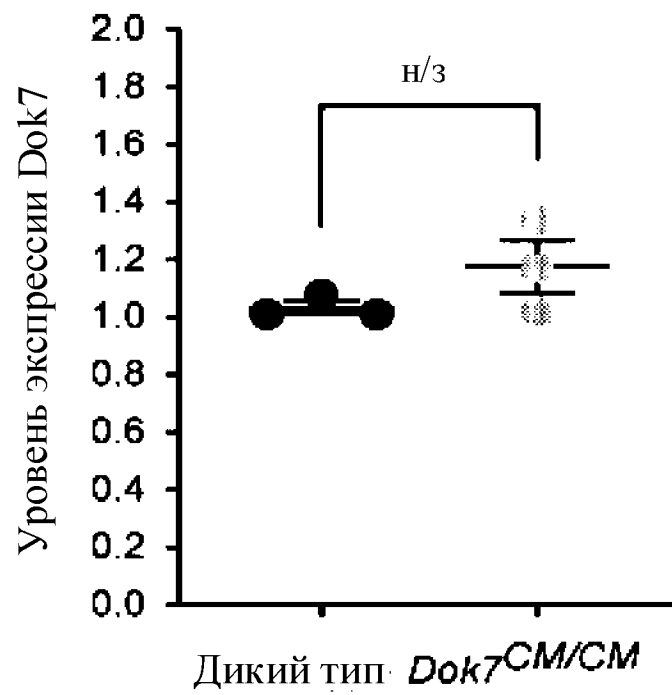
Фигура 9В



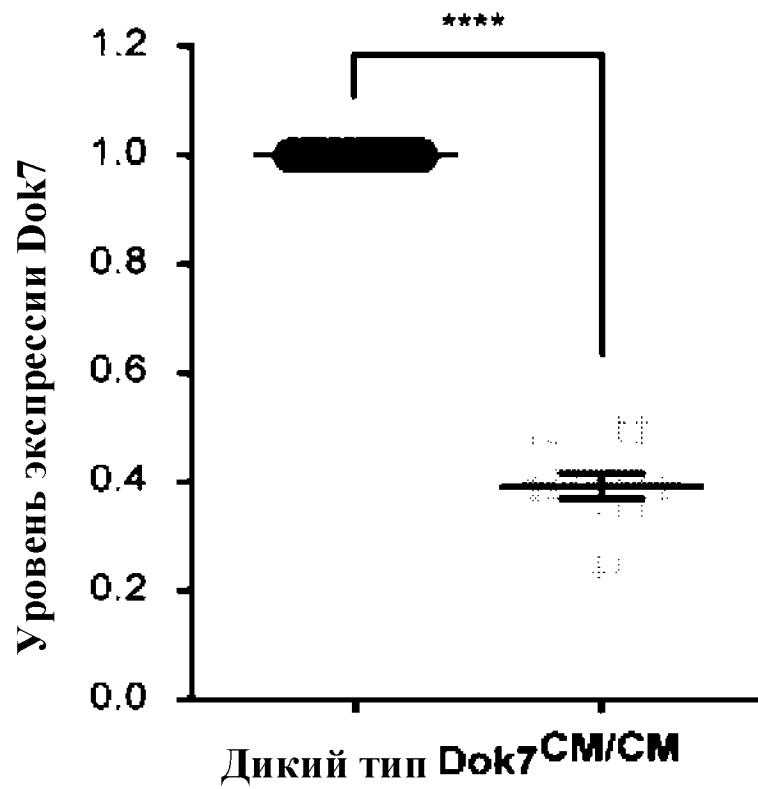
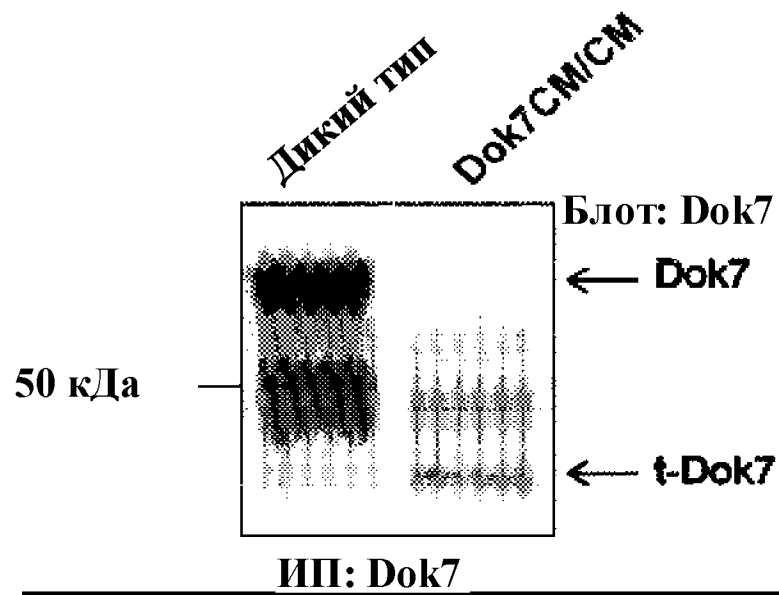
Фигура 10А



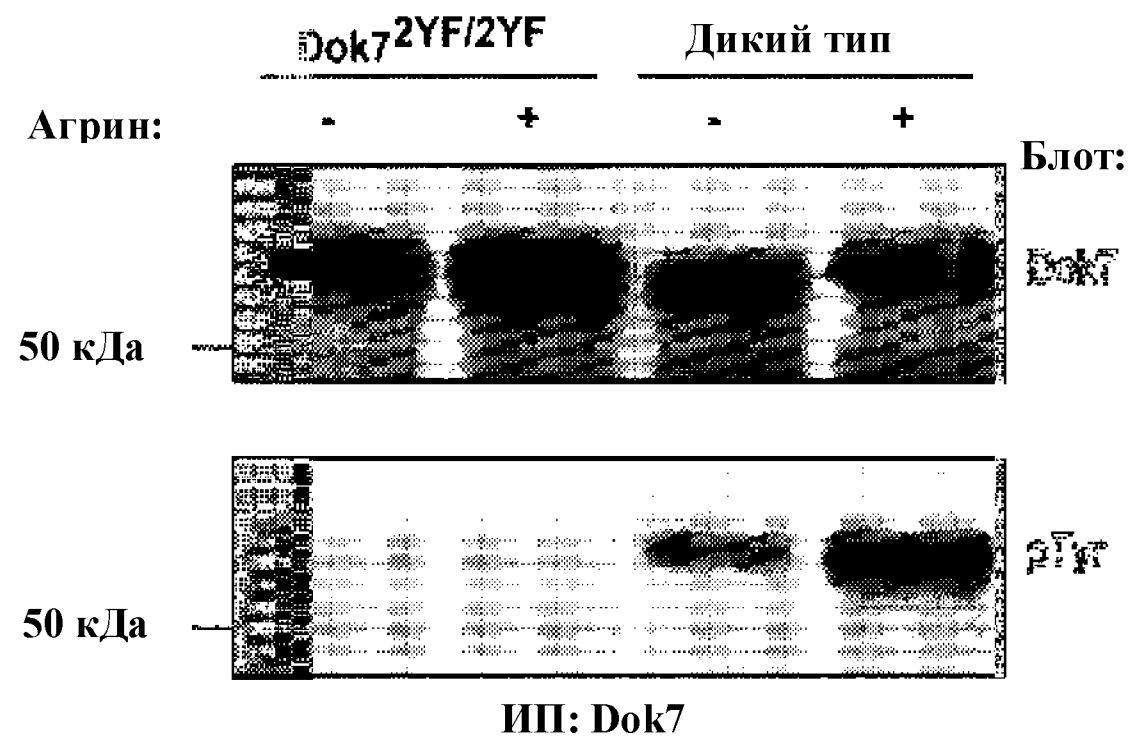
Фигура 10В



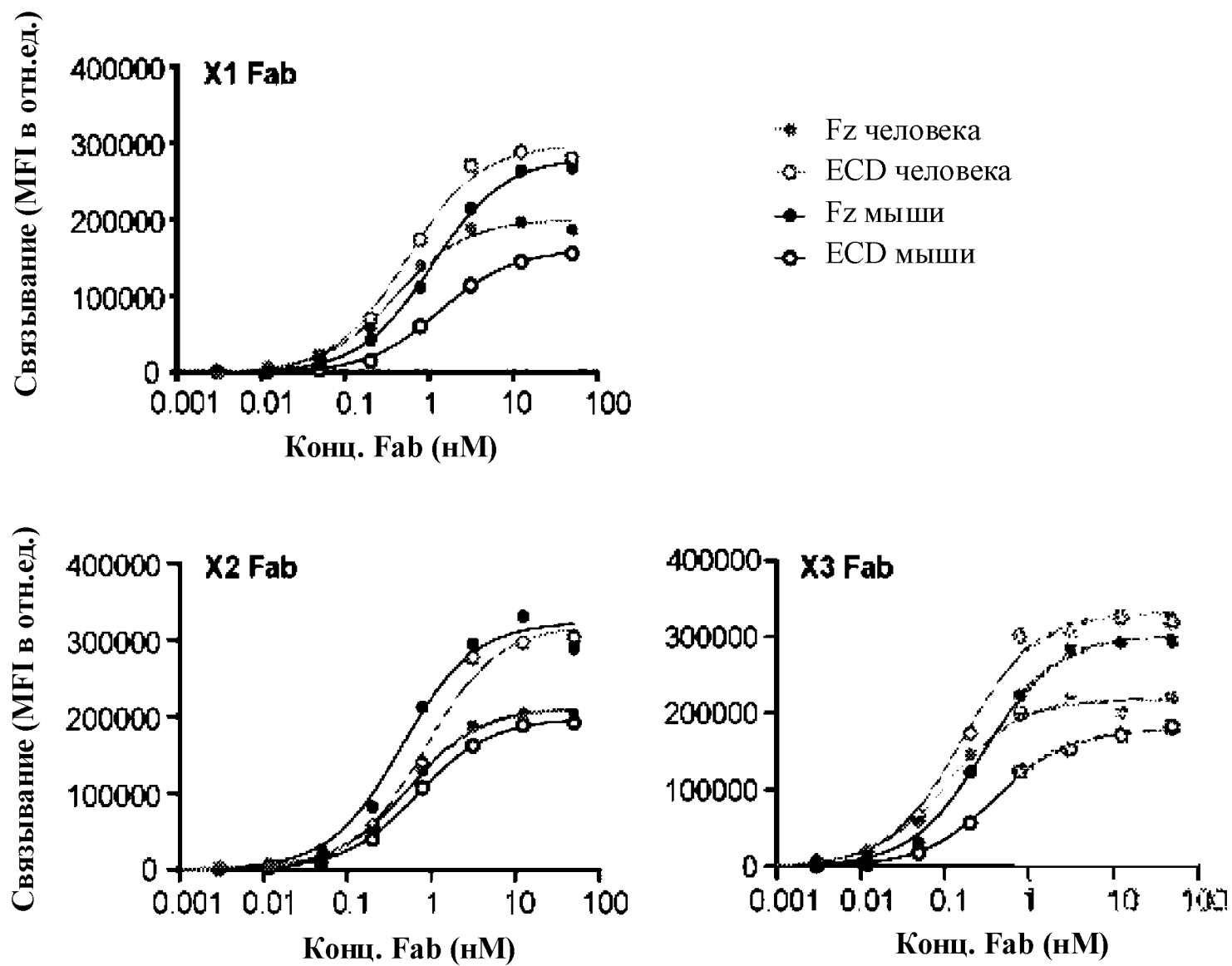
Фигура 10С



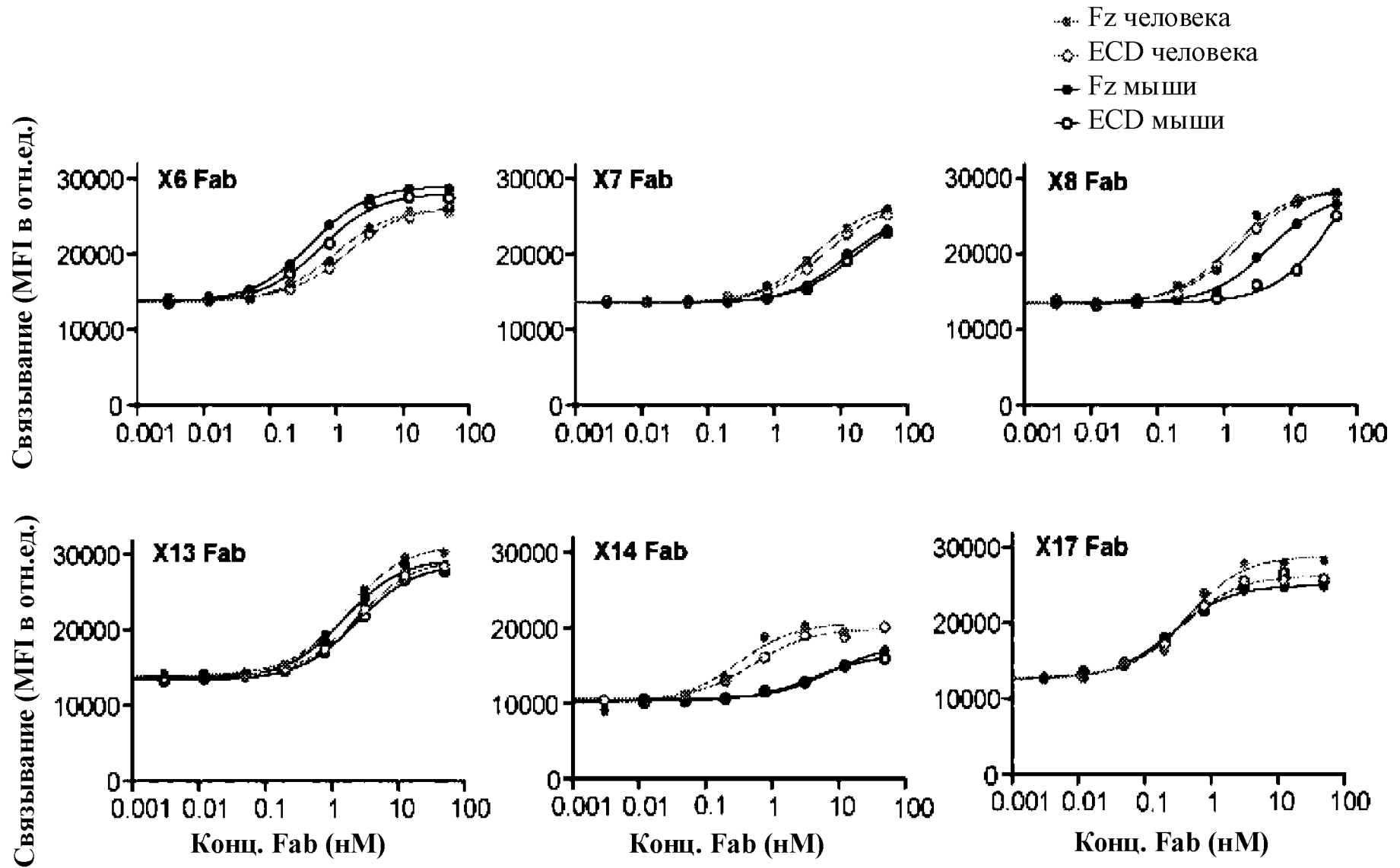
Фигура 11



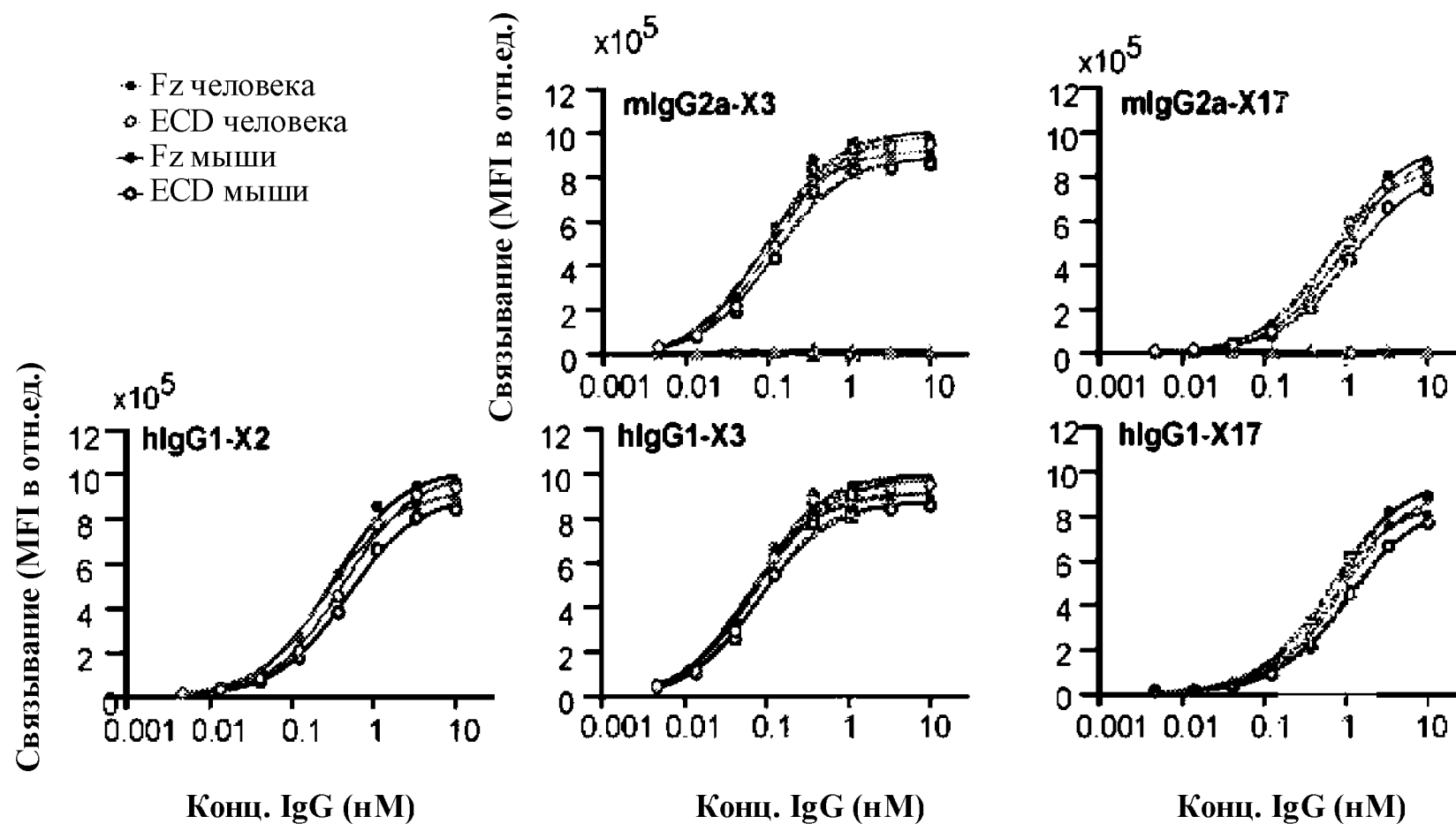
Фигура 12А



Фигура 12В



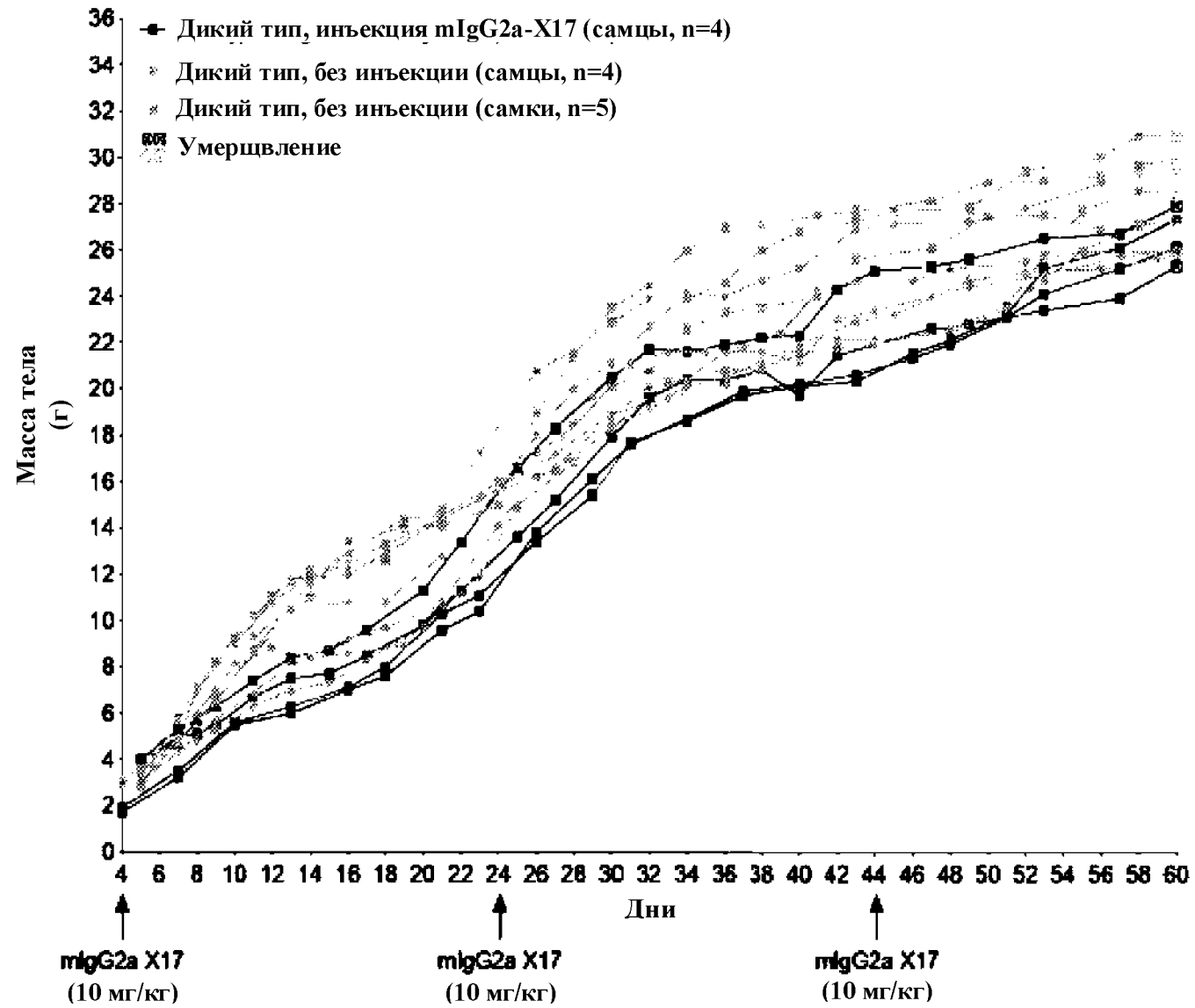
Фигура 12С



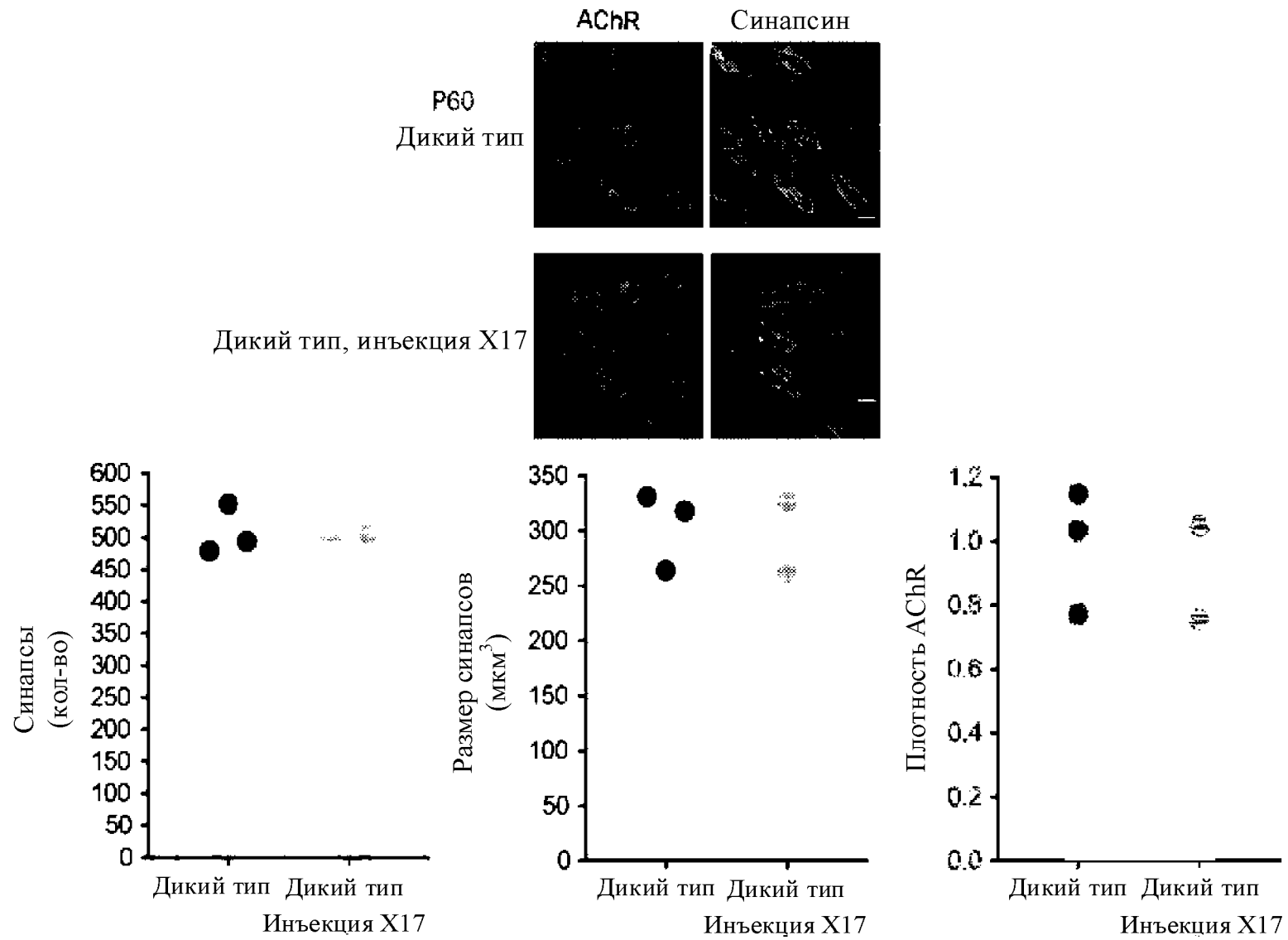
Фигура 13А



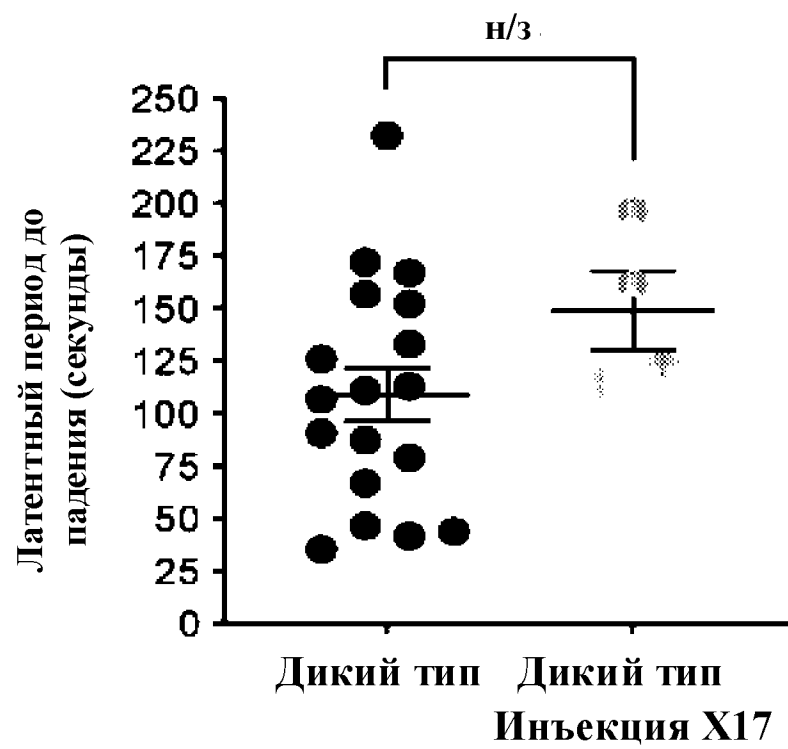
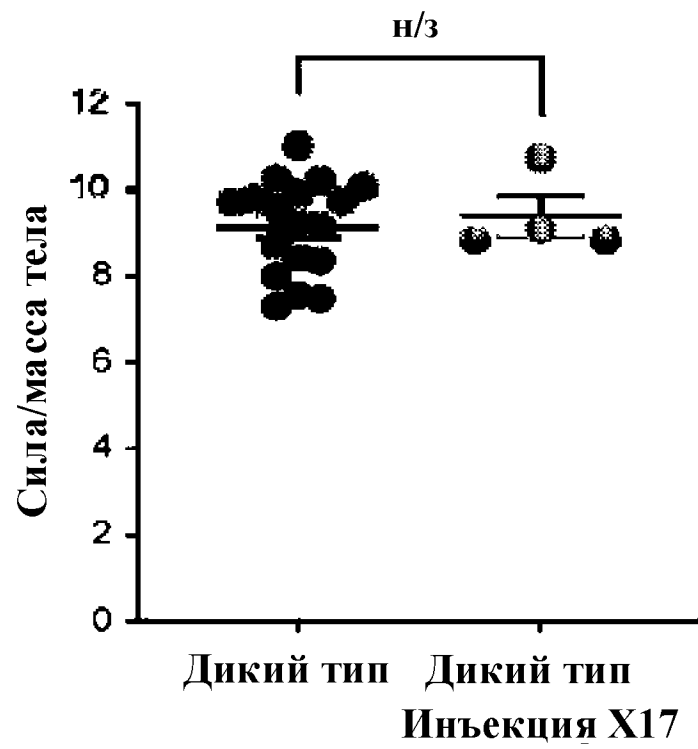
Фигура 13В



Фигура 13С



Фигура 13D



Фигура 14А

C57BL/6-CBA	Наблюдали	Ожидали	χ^2
Дикий тип	14	15	0.04
<i>Dok7^{CM/+}</i>	36	29	1.43
<i>Dok7^{CM/CM}</i>	9	15	2.24
Общий χ^2			3.71
Р-значение			0.156

C57BL/6-FVB	Наблюдали	Ожидали	χ^2
Дикий тип	23	14	5.79
<i>Dok7^{CM/+}</i>	26	28	0.14
<i>Dok7^{CM/CM}</i>	7	14	3.50
Общий χ^2			9.43
Р-значение			0.008

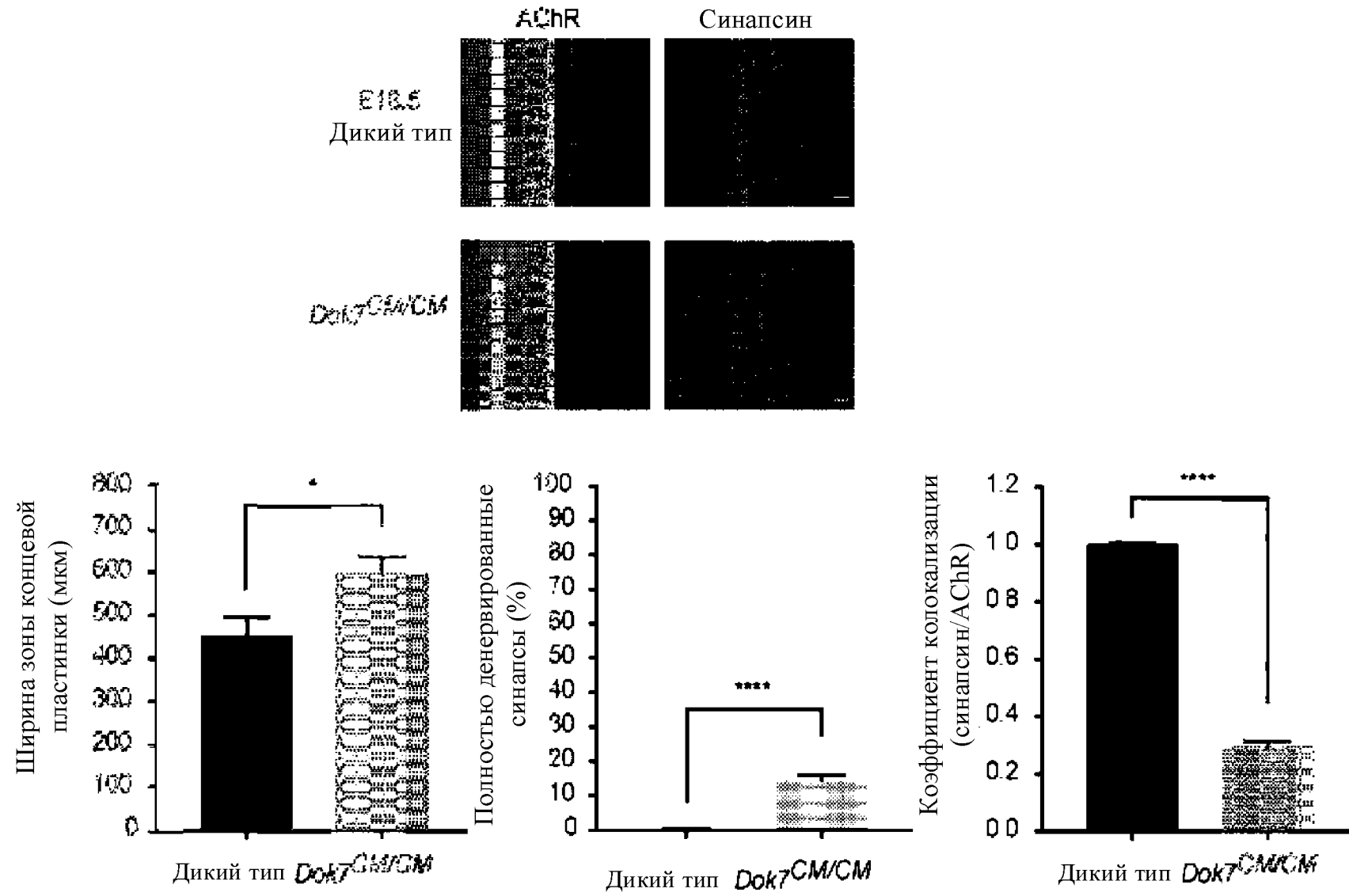
C57BL/6-129sv1	Наблюдали	Ожидали	χ^2
Дикий тип	10	9	0.06
<i>Dok7^{CM/+}</i>	22	19	0.66
<i>Dok7^{CM/CM}</i>	5	9	1.95
Общий χ^2			2.68
Р-значение			0.262

C57BL/6-BalbC	Наблюдали	Ожидали	χ^2
Дикий тип	15	10	3.18
<i>Dok7^{CM/+}</i>	20	19	0.05
<i>Dok7^{CM/CM}</i>	3	9	4.45
Общий χ^2			7.68
Р-значение			0.021

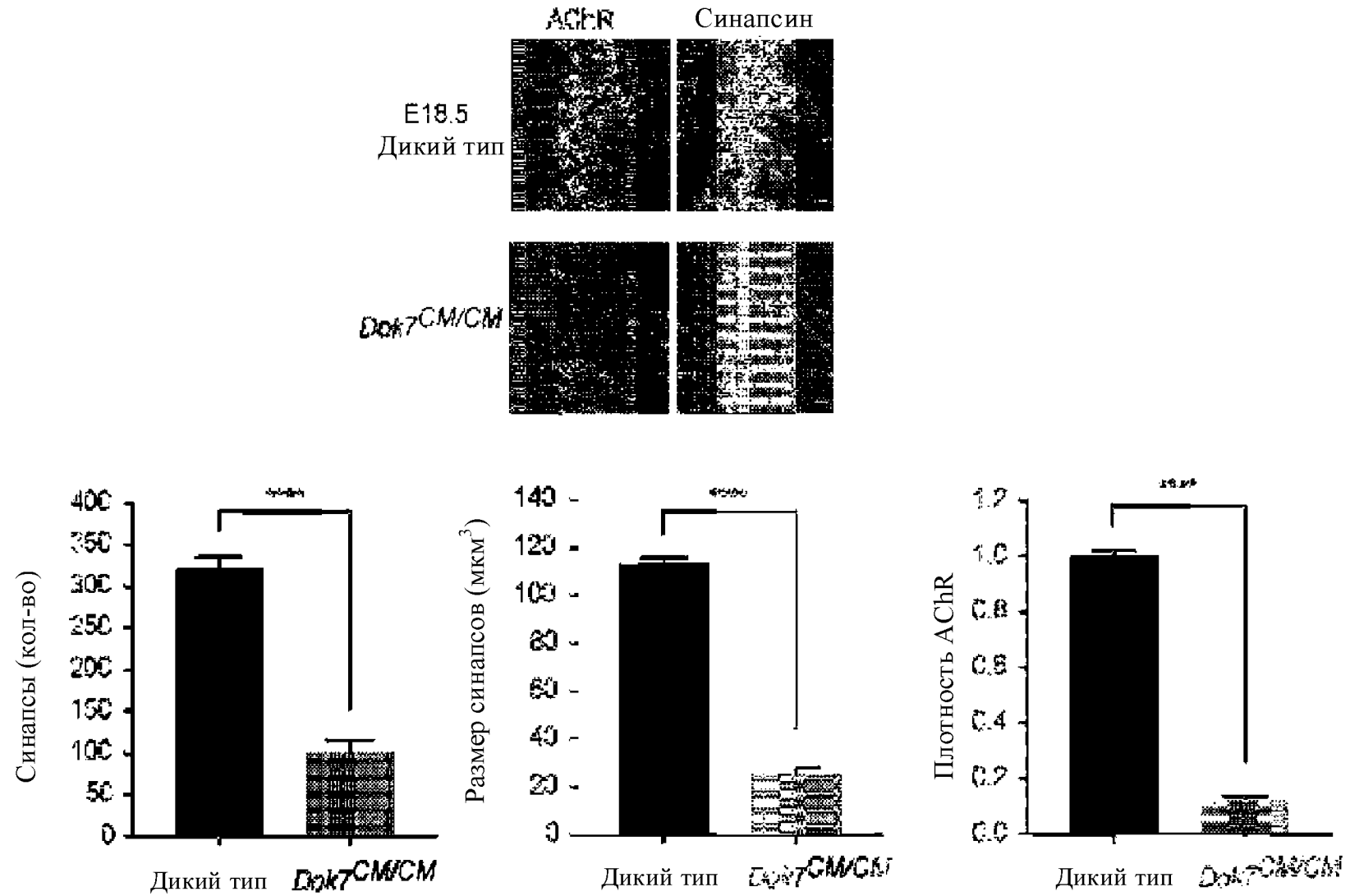
Фигура 14В

Штамм	Макс. выживаемость	Сред. выживаемость	СО	Кол-во
C57BL/6	5		0	1
C57BL/6-CBA	21	11.2	2.28	14
C57BL/6-FVB	17	11.5	1.38	7
C57BL/6-129sv1	17	15.2	1.32	5
C57BL/6-BalbC	15	12.5	1.38	3

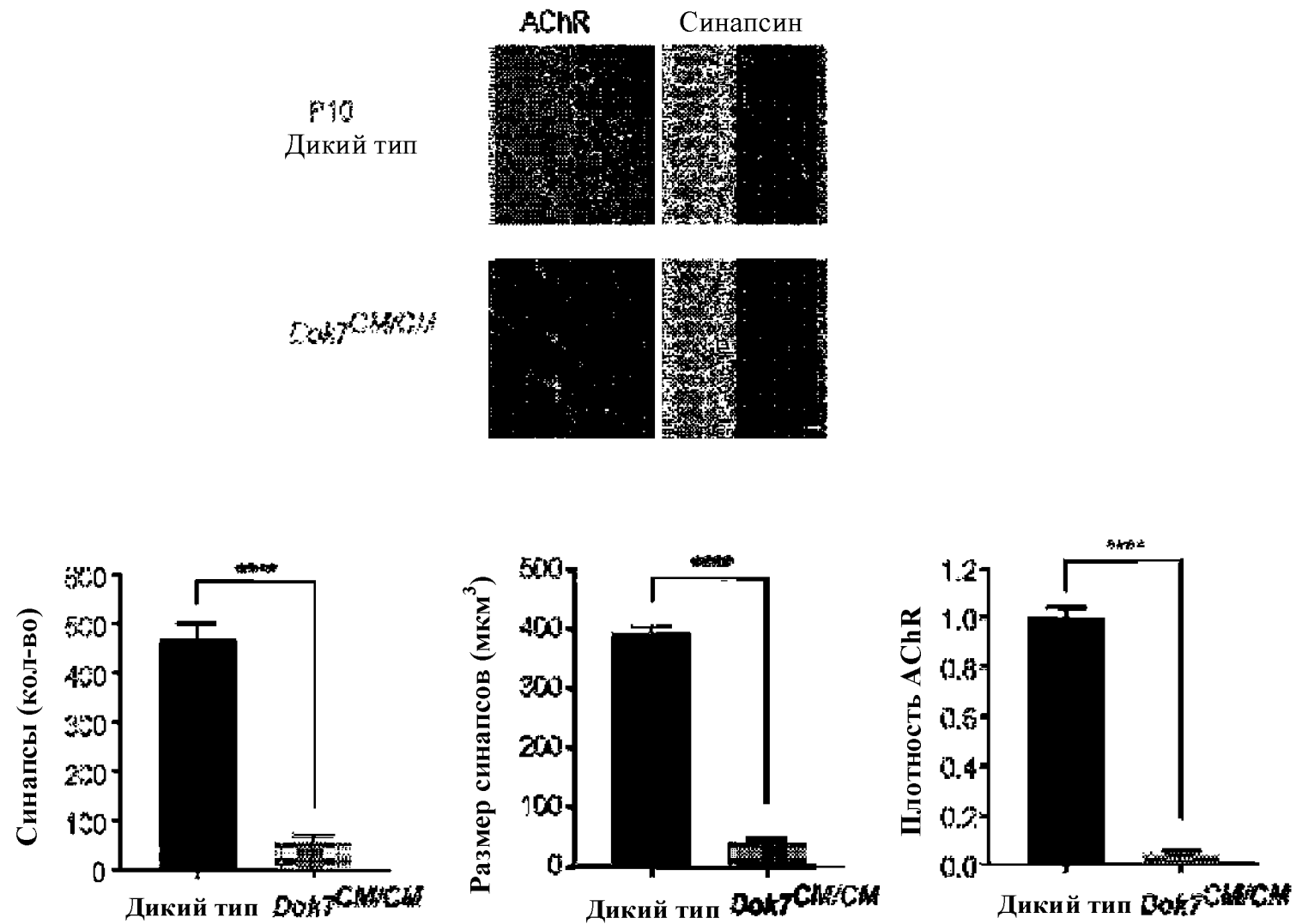
Фигура 15А



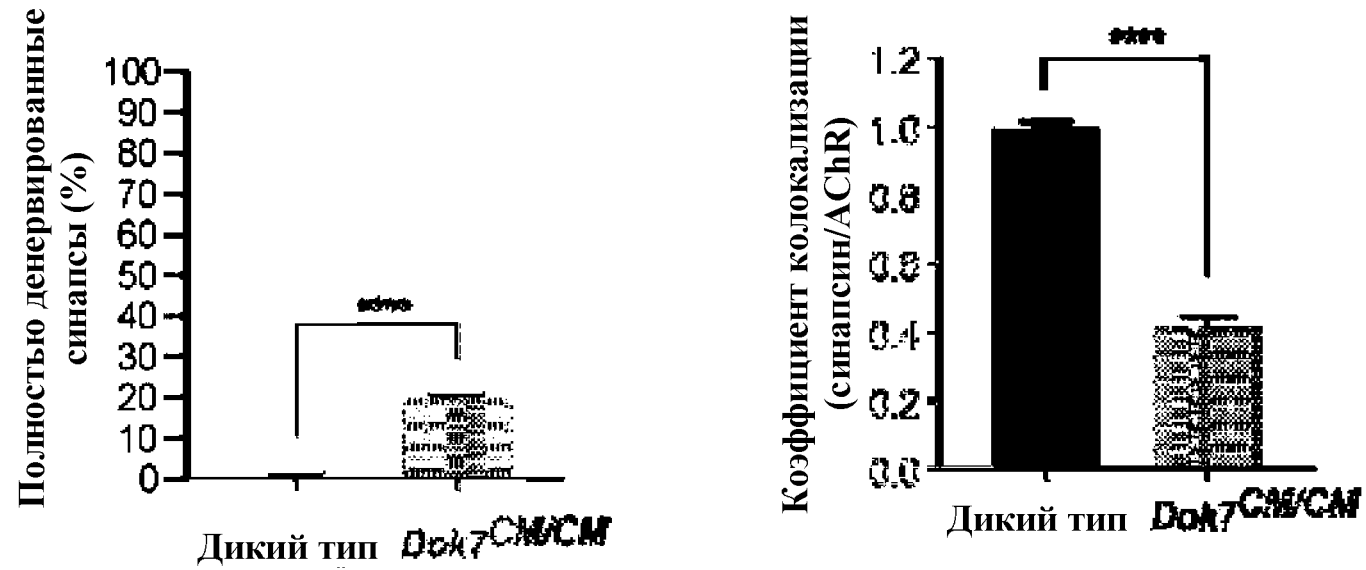
Фигура 15В



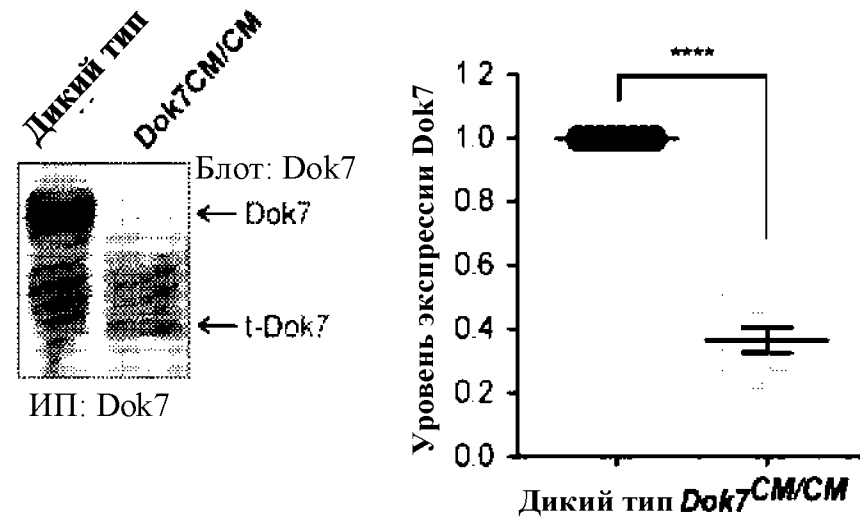
Фигура 15С



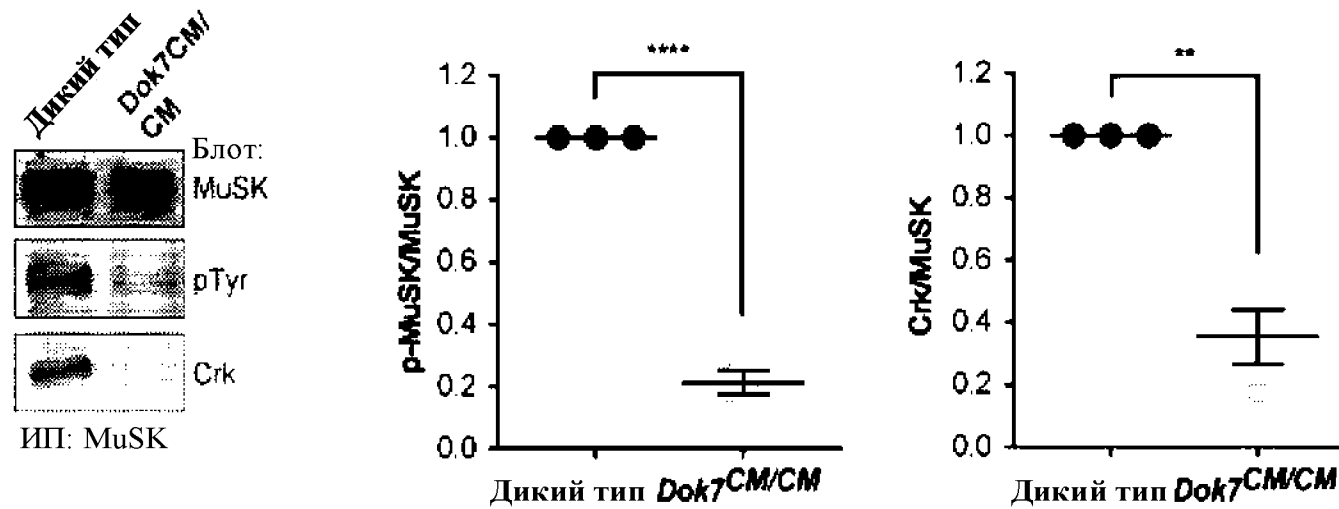
Фигура 15С (продолжение)



Фигура 15D



Фигура 15E



Фигура 16А

Потенциальные нецелевые последовательности у мышей *Dok7 CM*

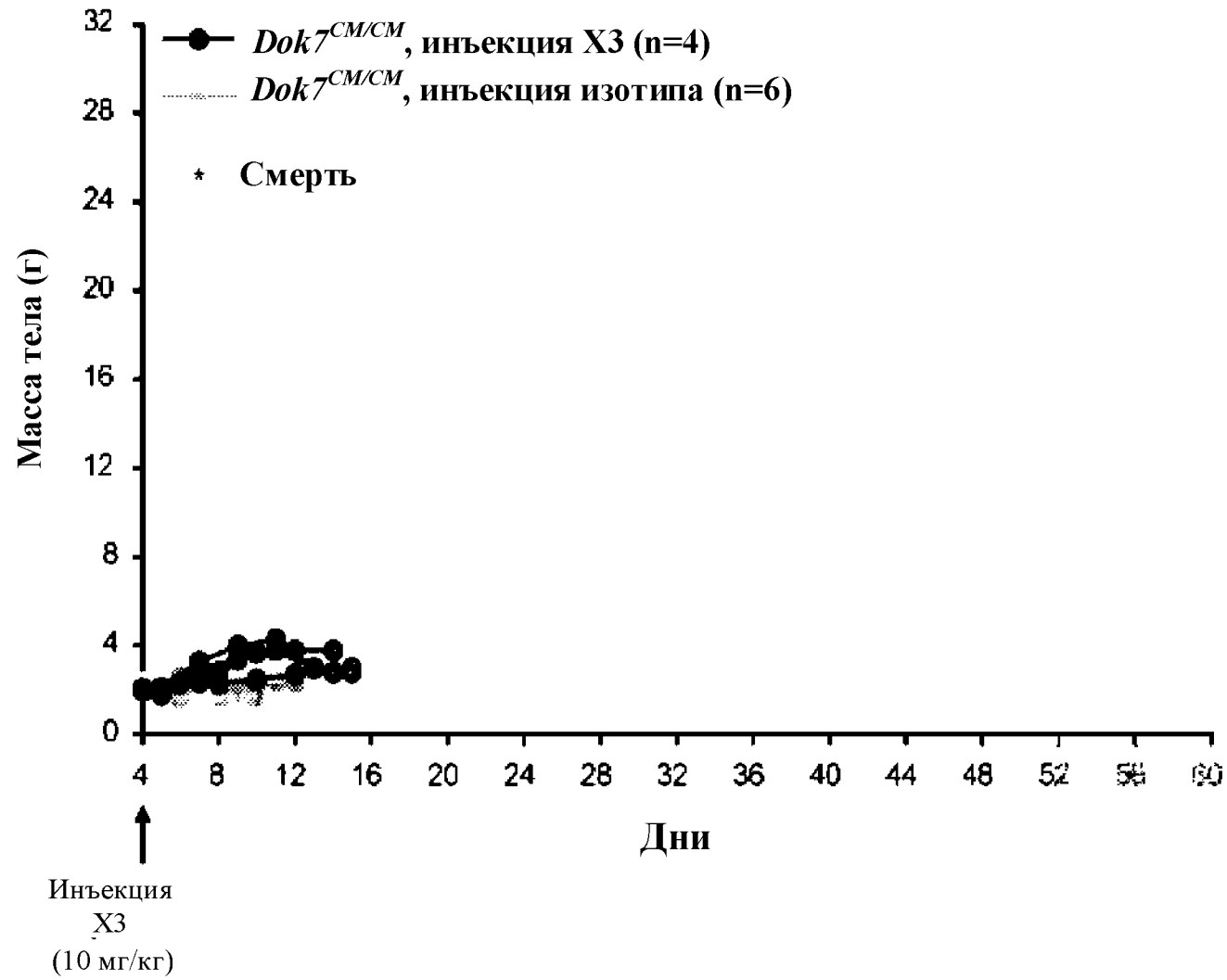
Нецелевая	Последовательность	Балл	Ошиб. спар.	ИН послед-ти	Локус
1	GCCCTGCACAGTCTGCCCCCTGG	2.6	3 OC [1:3:8]	AL645994.7	Chr11:-9049672
2	GCACTGCACAGTCTGCCCCCTGG	2.6	3 OC [1:3:8]	AC129606.4	Chr8:+97387576
3	TTTATGCTCTGTCTGCCCCCAAG	2.5	3 OC [2:4:10]	AC103939.9	Chr18:+28885886
4	GGCCTGCTCAGTCTGCCCCCTGG	2.3	3 OC [1:2:3]	AC154126.2	Chr7:+36061330
5	TCAGTCCTCAGTCTGCCCCCTGG	1.4	3 OC [3:4:6]	CT033750.18	Chr17:-15692194

Фигура 16В

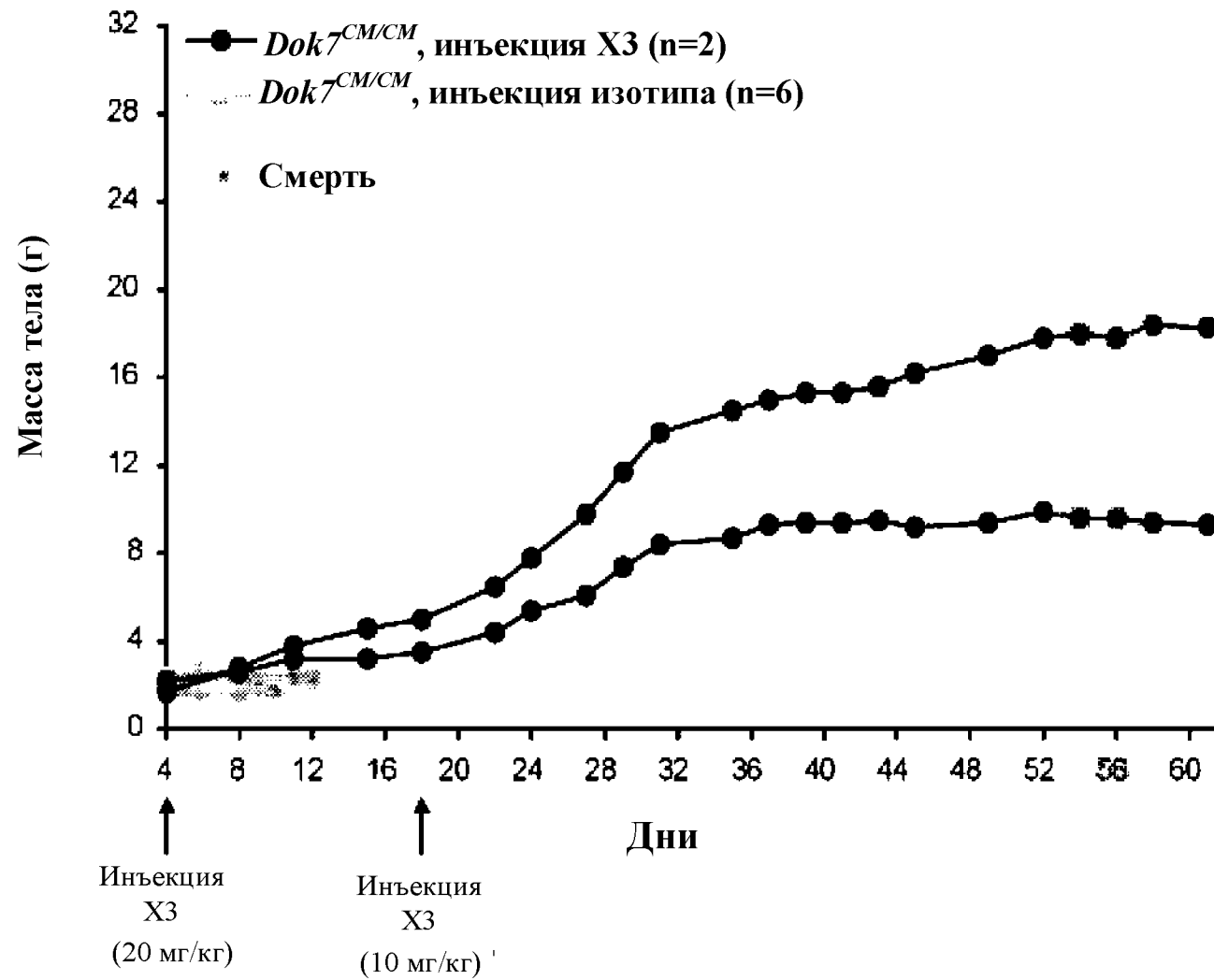
Потенциальные нецелевые последовательности у мышей *Dok7 2YF*

Нецелевая	Последовательность	Балл	Ошиб. спар.	ИН послед-ти	Локус
1	GAATTCTAGGTGTGTCATAGAGG	1.7	3 OC [2:3:7]	AC113509.14	Chr1:+183488722
2	GGATTCTAGGTGTGTCATCGCGG	0.7	3 OC [3:7:19]	AC120877.15	Chr6:+16848270
3	GGGTTCAATTTGTGTCATAGCAG	0.5	4 OC [3:7:4:10]	AC129777.4	Chr8:+117950828
4	AGCTGCTAGGTATGTCATAGTGG	0.5	4 OC [1:5:7:12]	AL596263.8	Chr2:+161115283
5	CAC TTGGAGGGGTGTCATAGAGG	0.5	4 OC [1:2:6:11]	AL772268.6	Chr11:-55192181

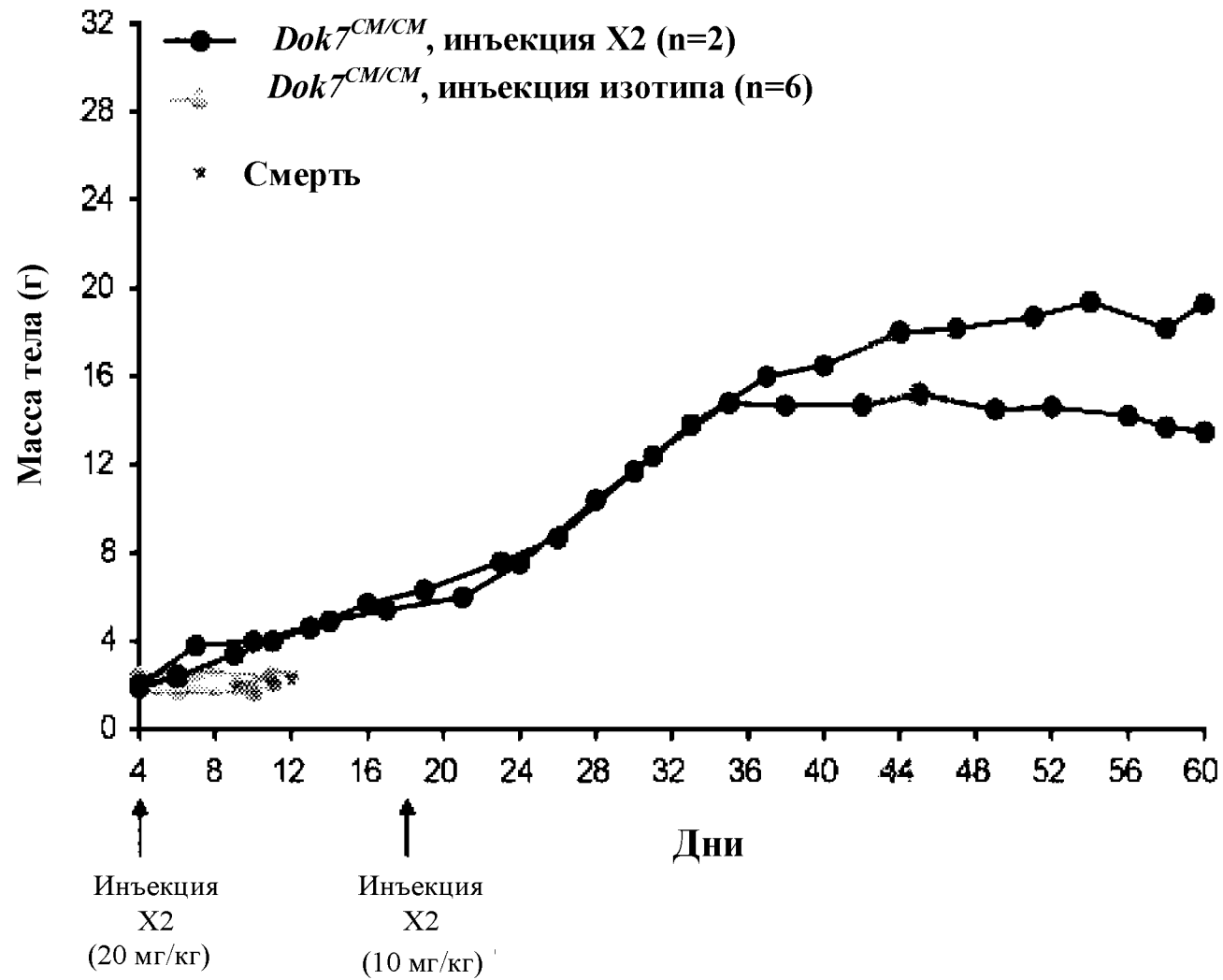
Фигура 17А



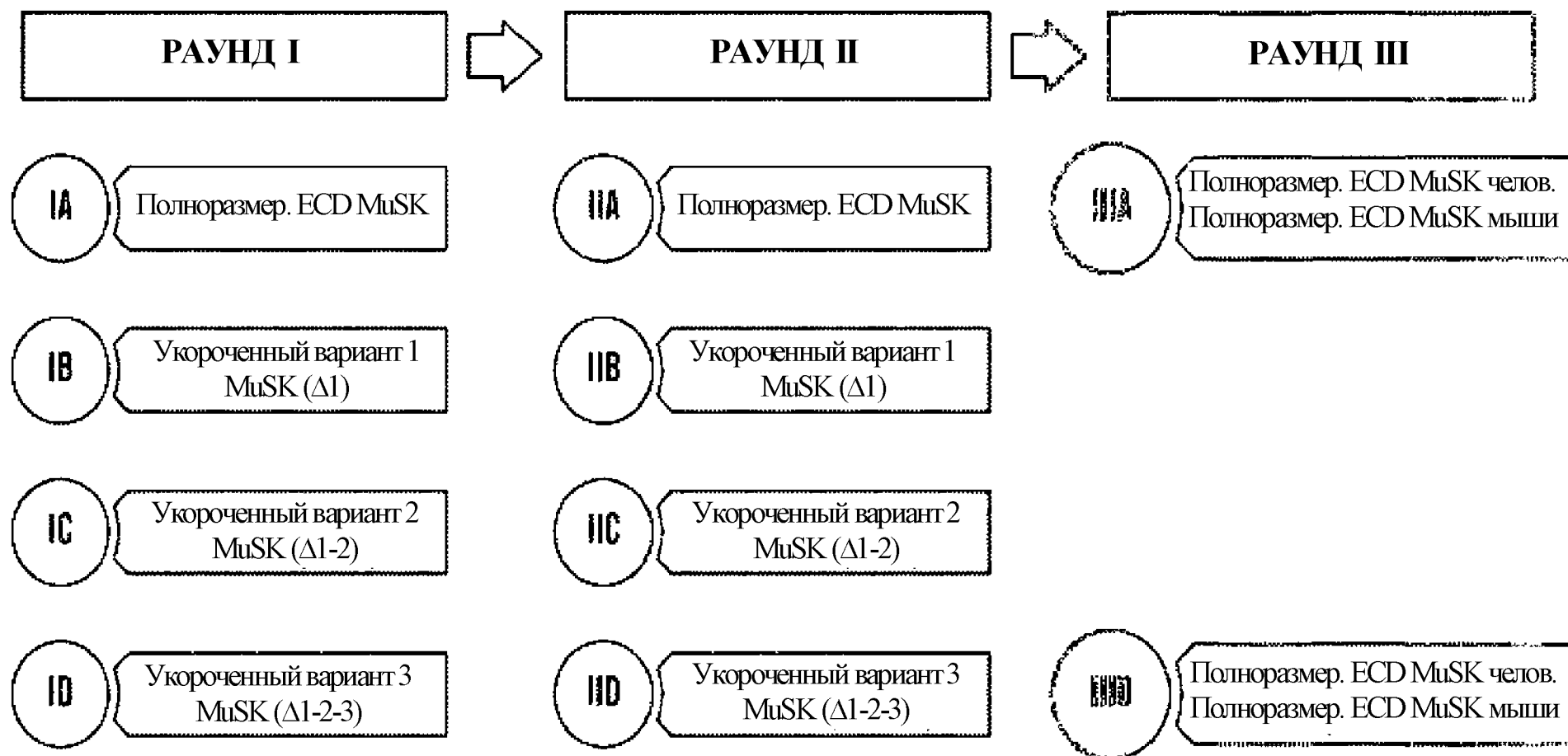
Фигура 17В



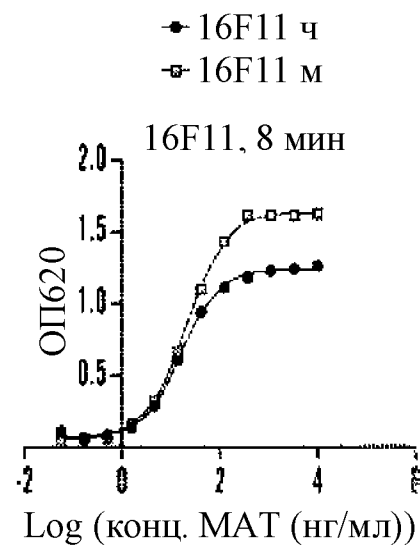
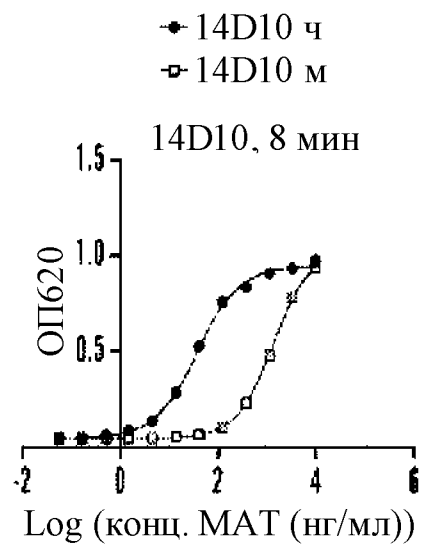
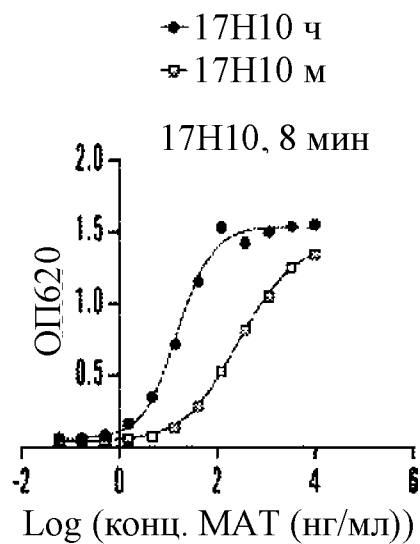
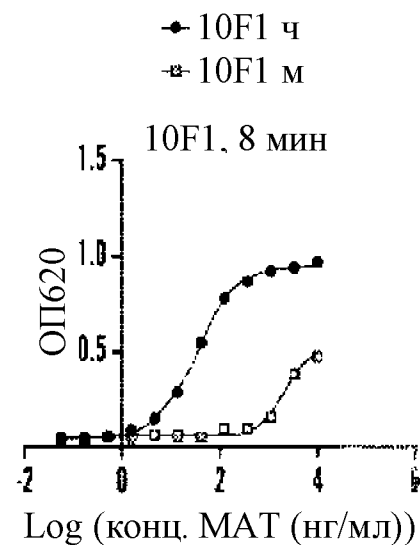
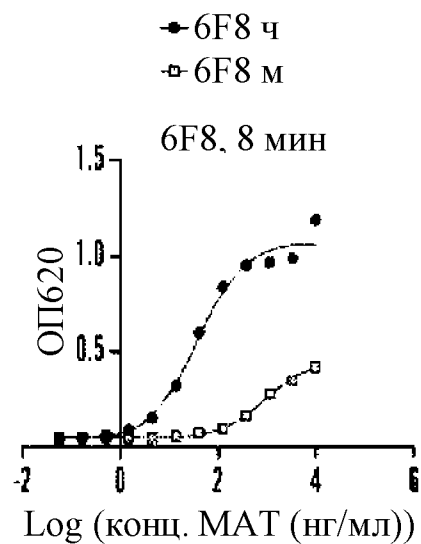
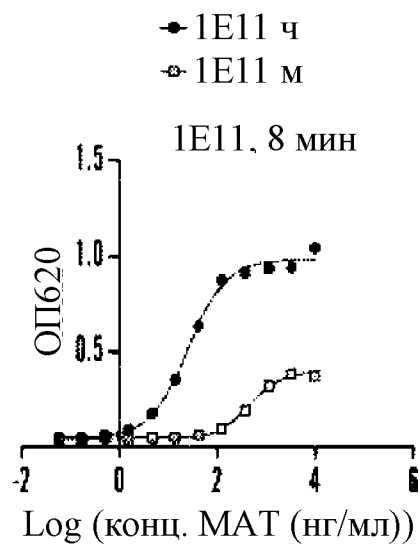
Фигура 17С



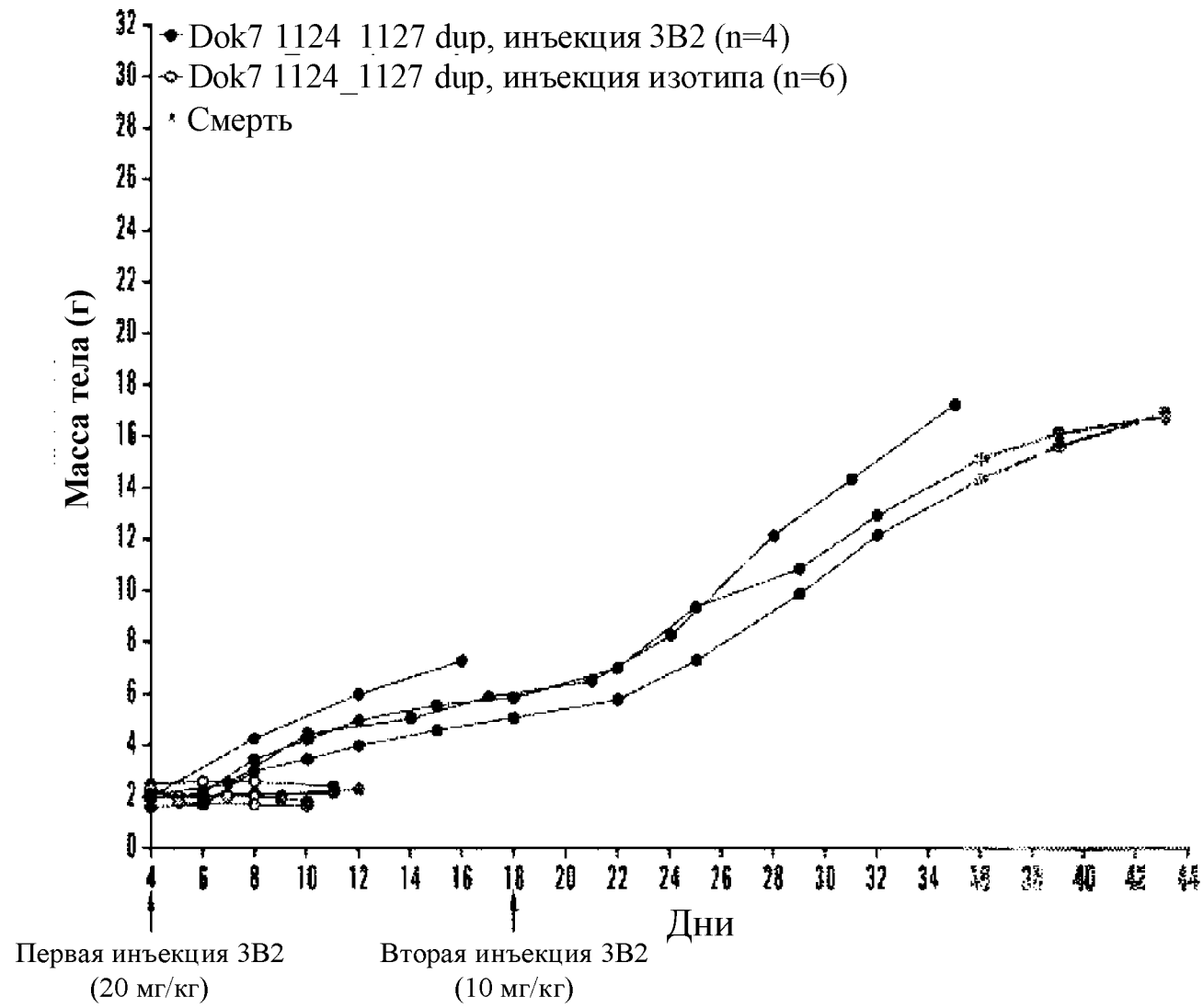
Фигура 18



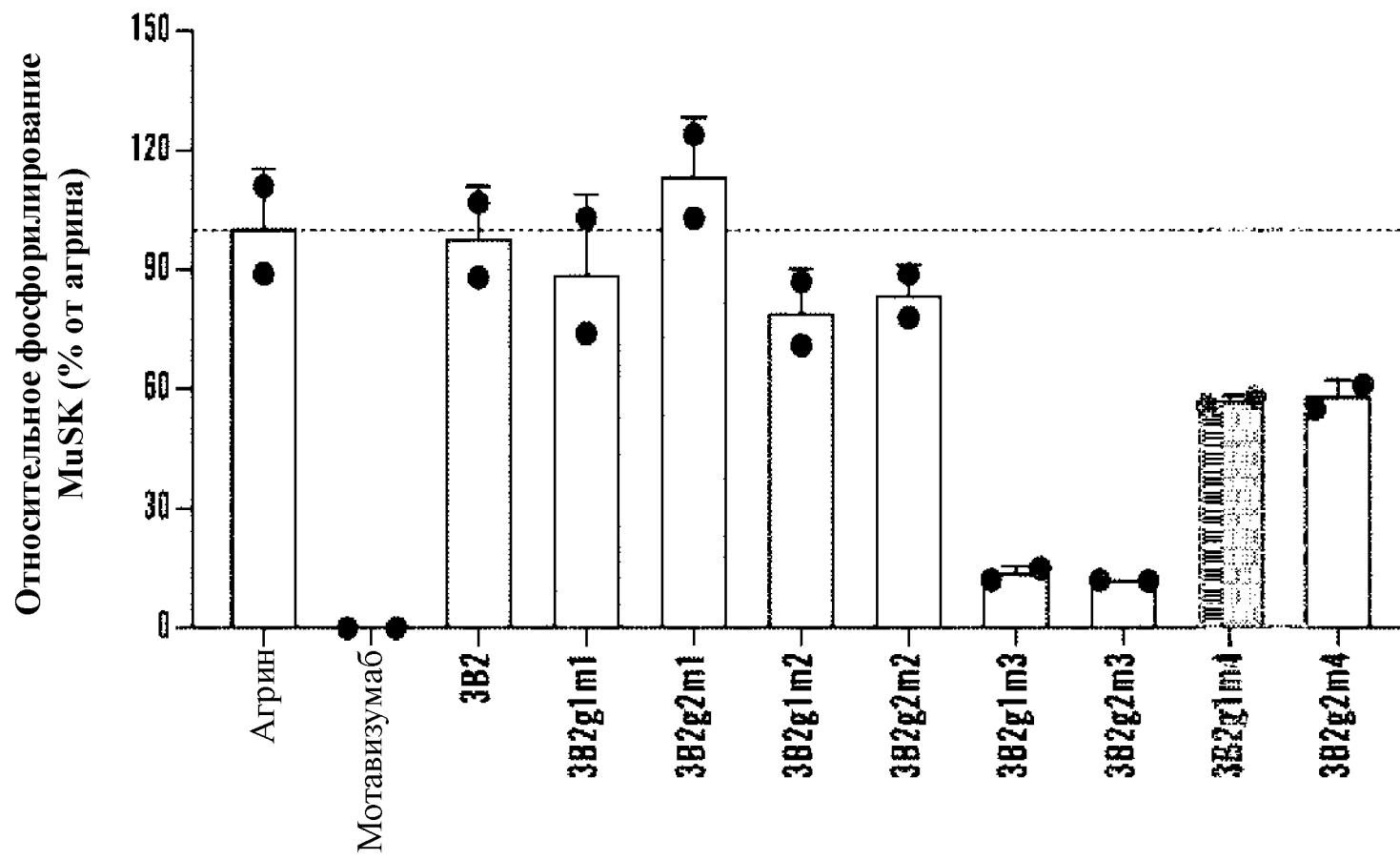
Фигура 19



Фигура 20

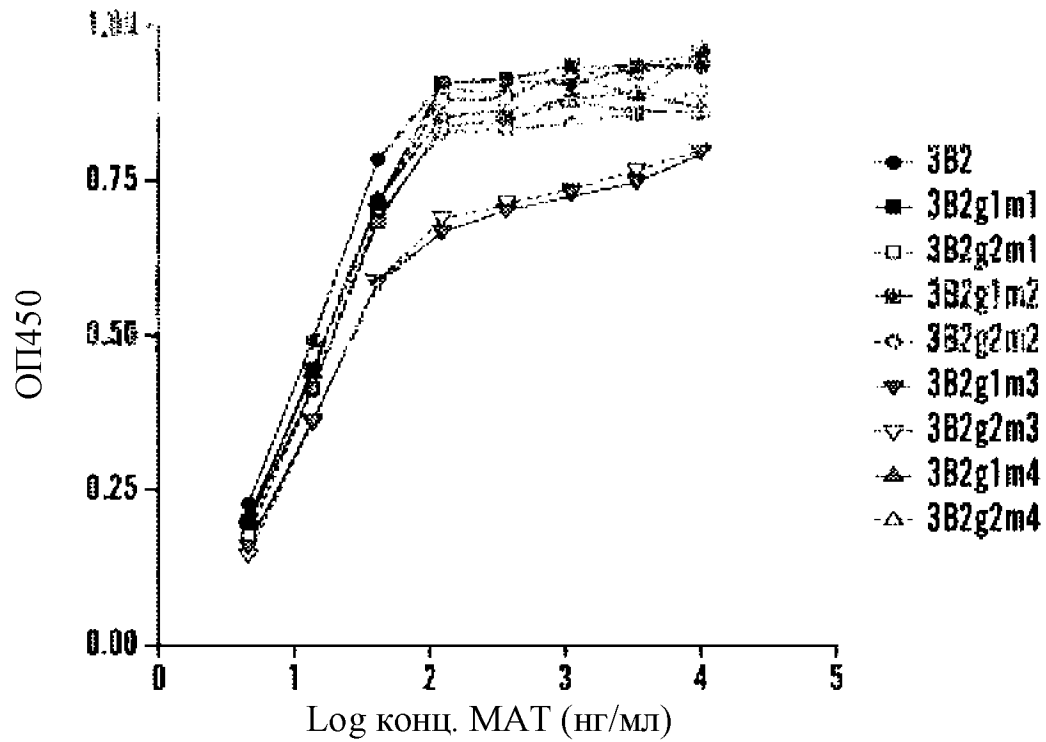


Фигура 21

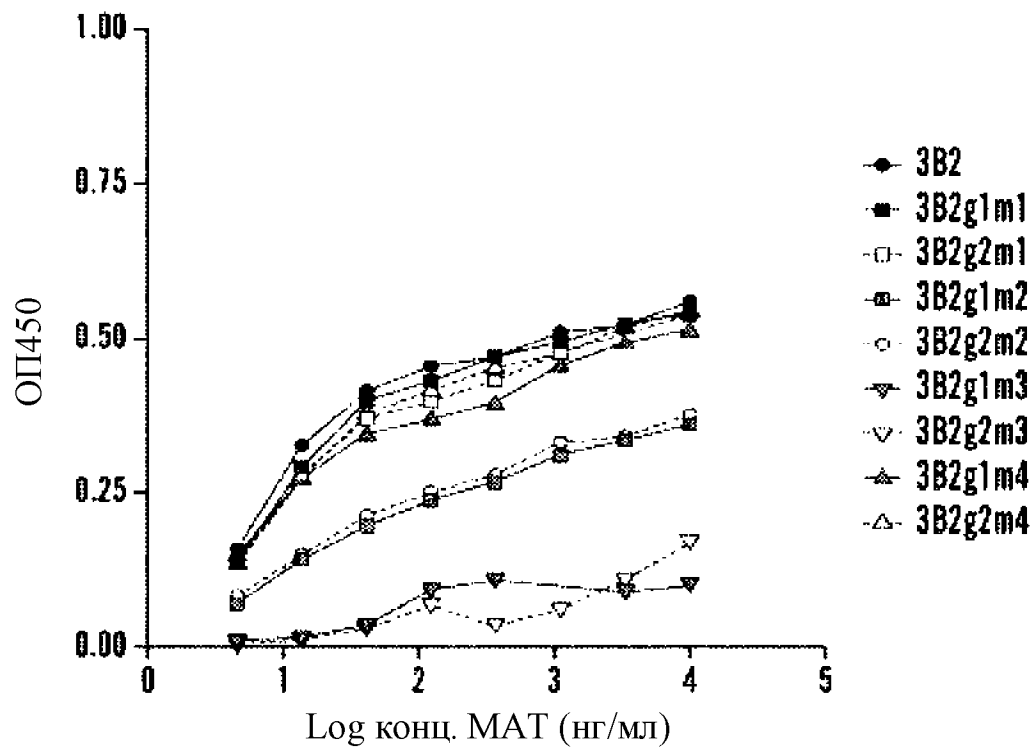


Фигура 22

МуСК человека

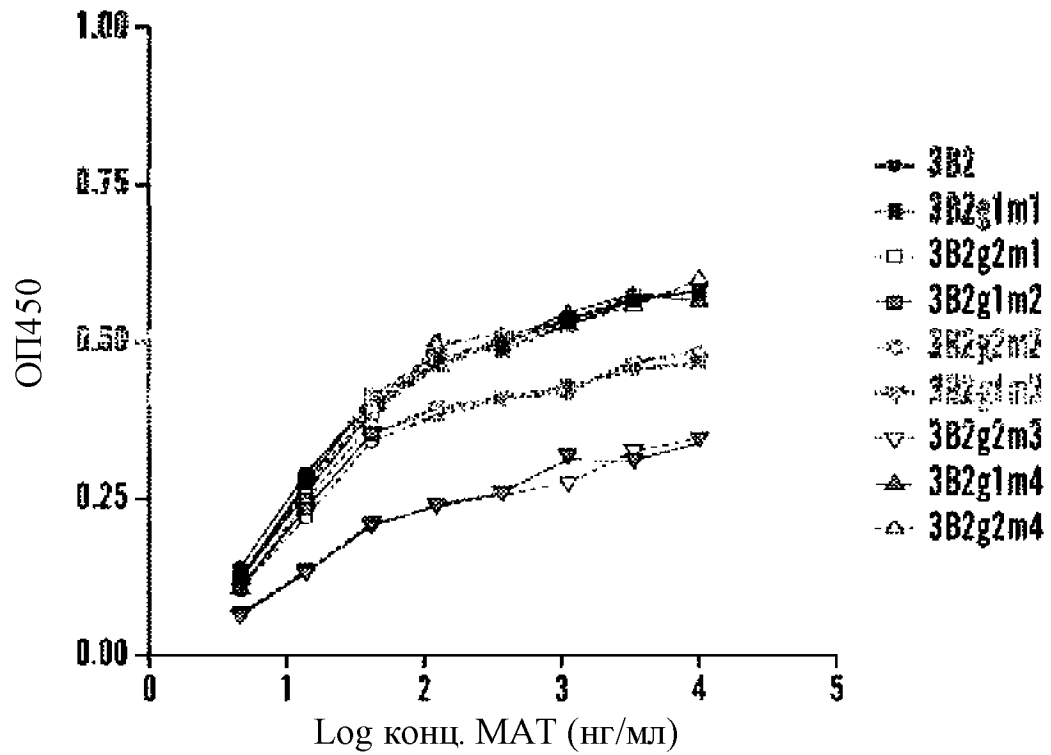


МуСК крысы

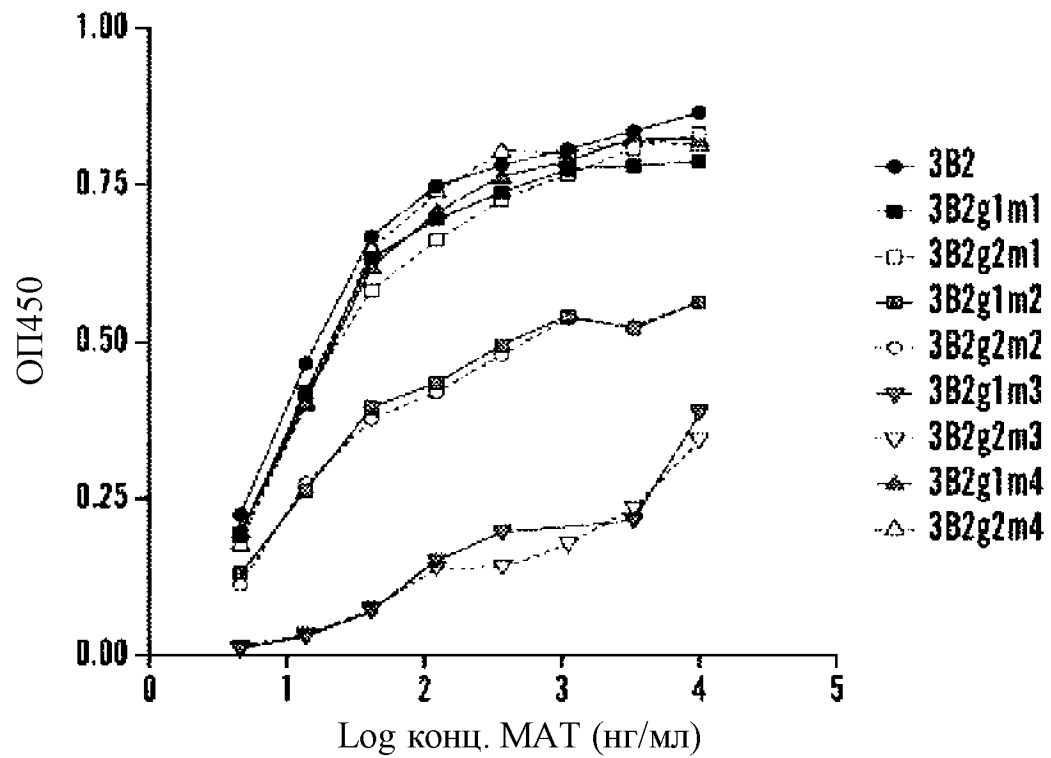


Фигура 22 (продолжение)

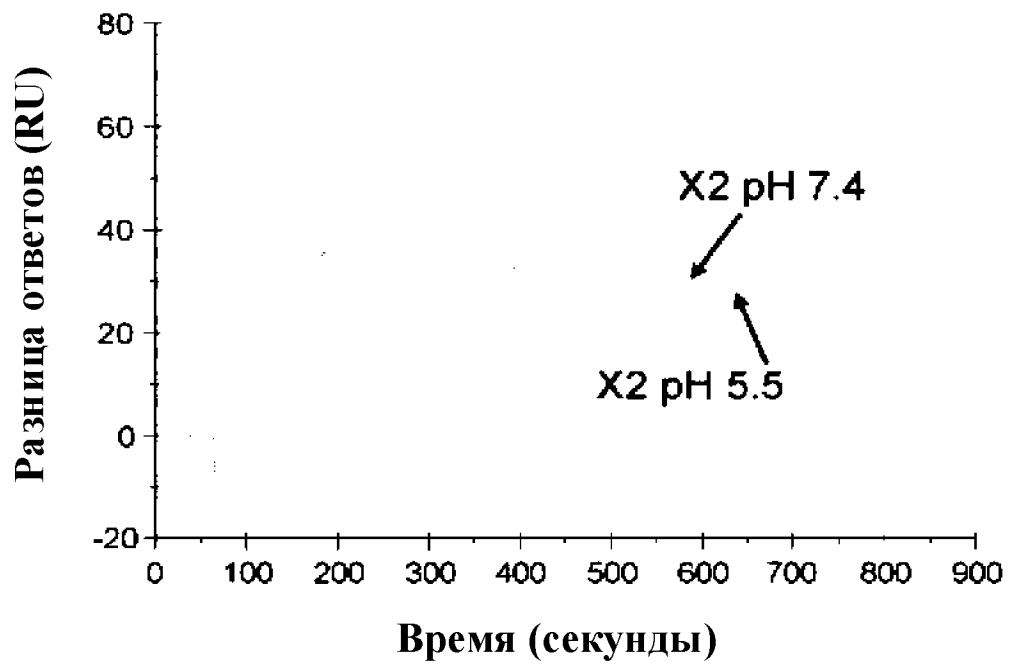
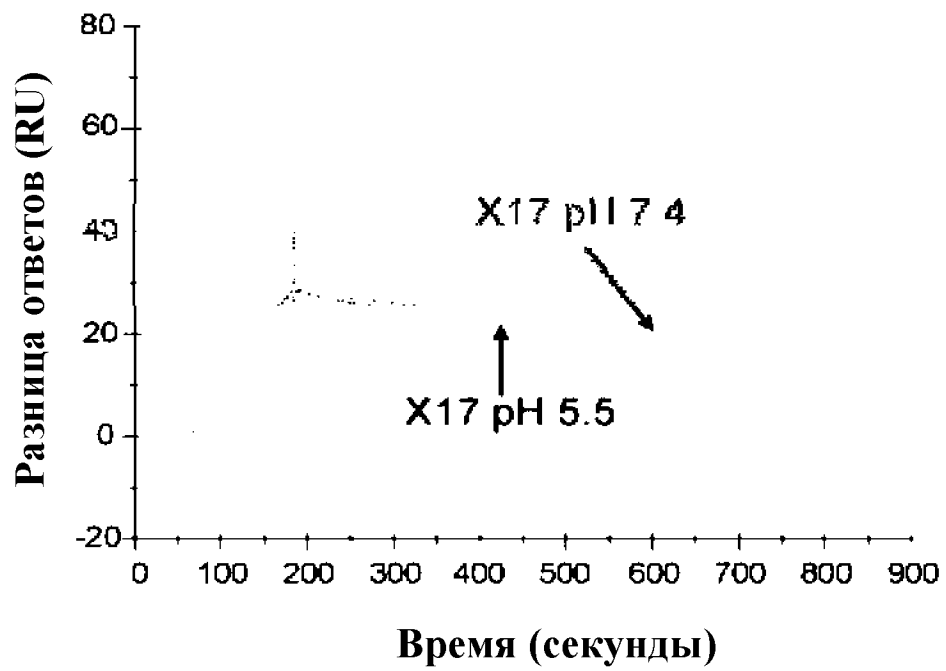
MuSK яванского макака

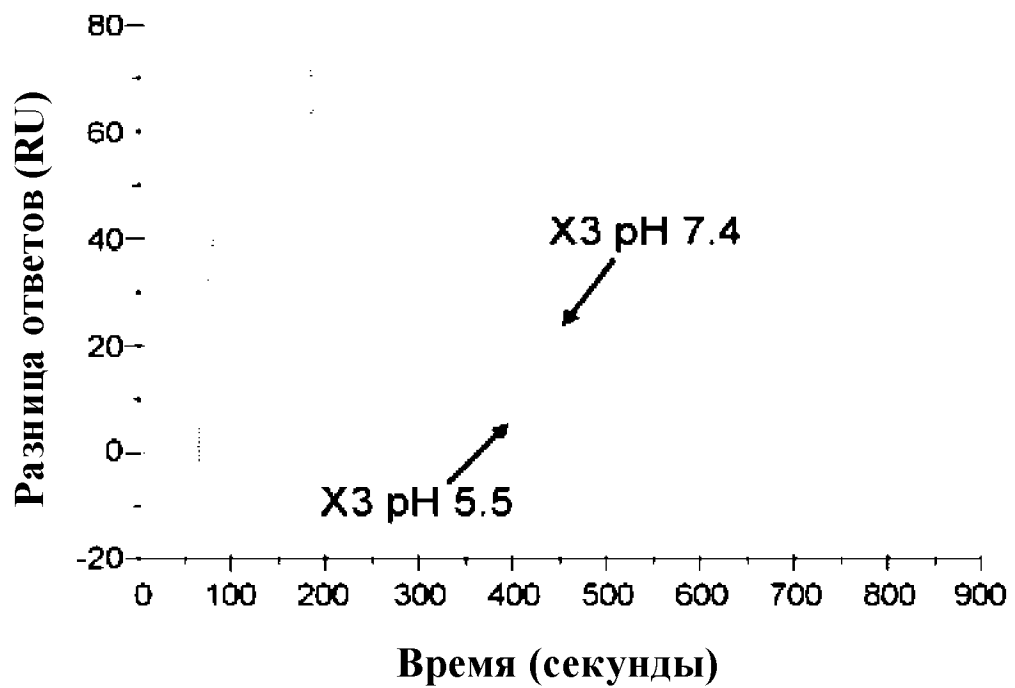
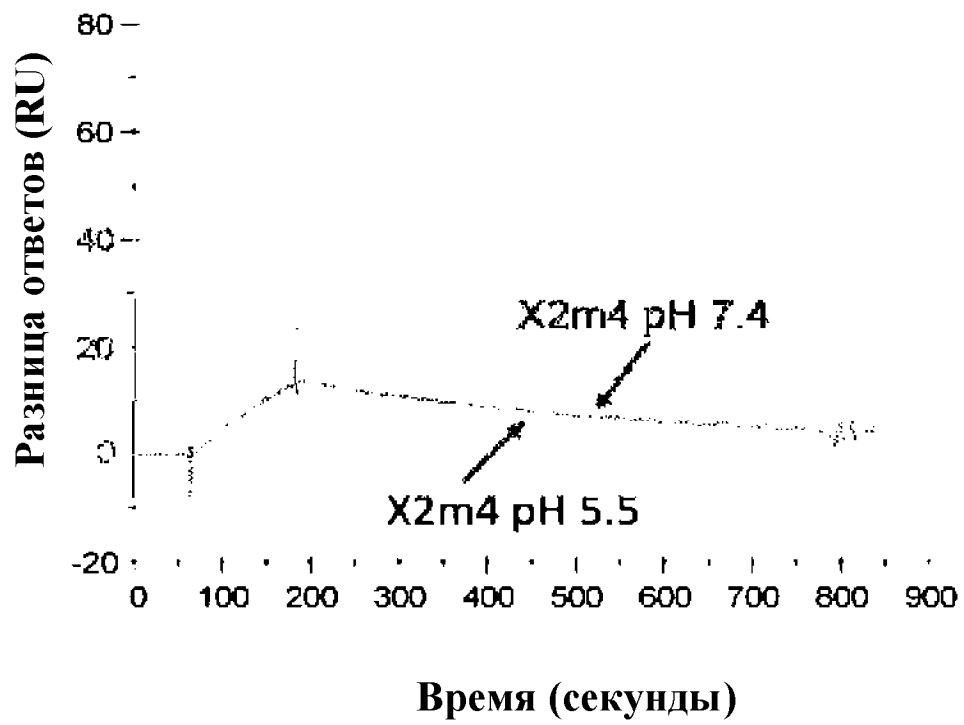


MuSK мыши

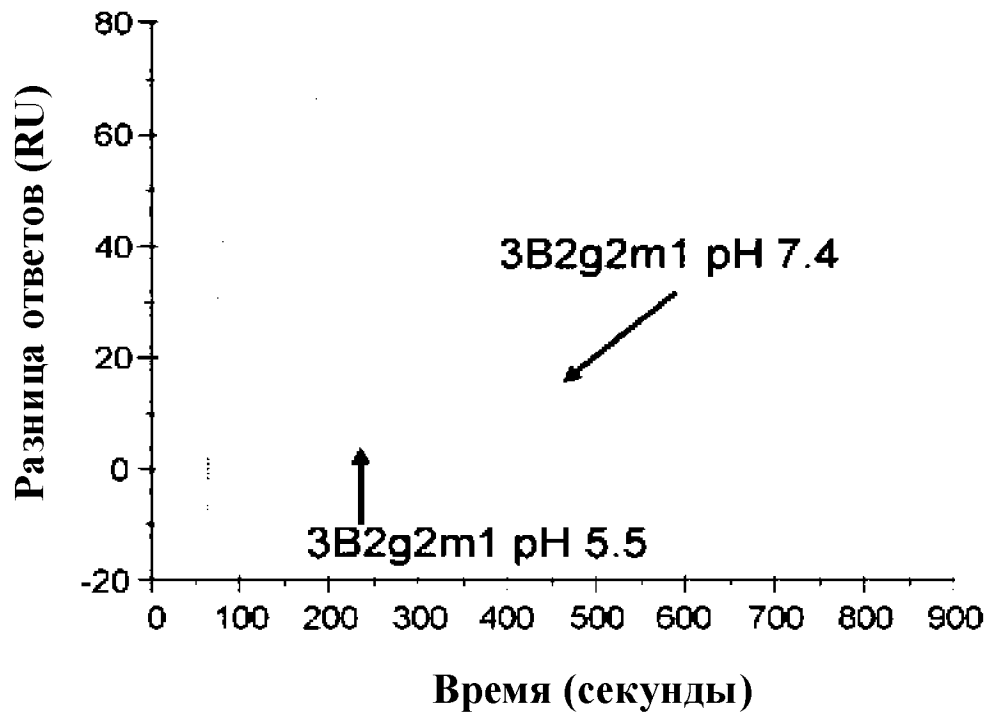
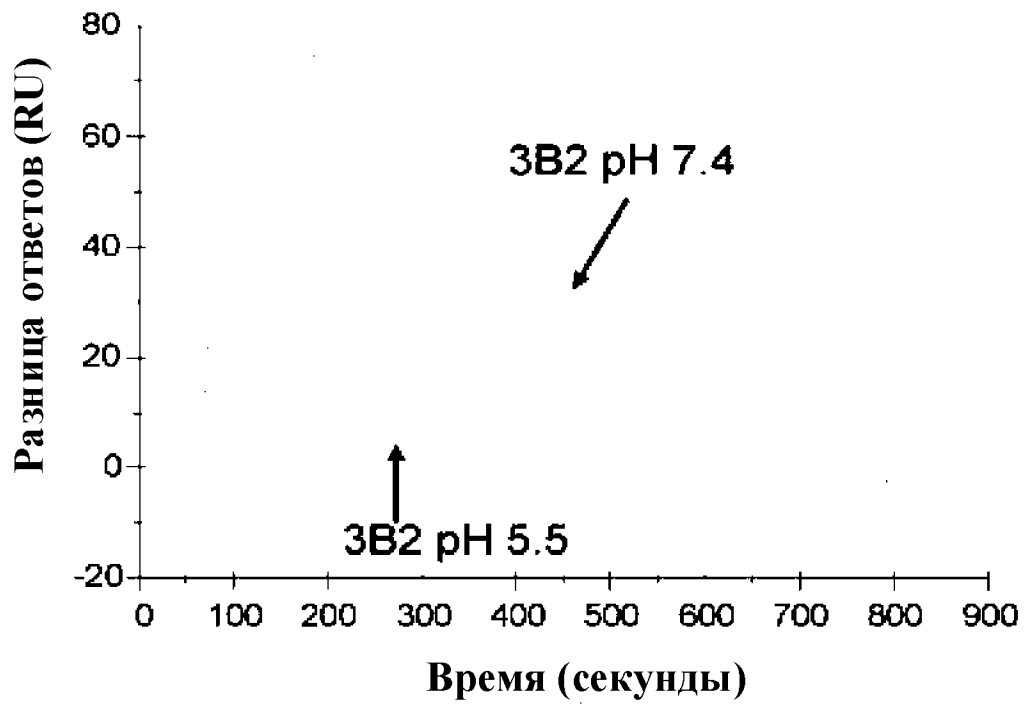


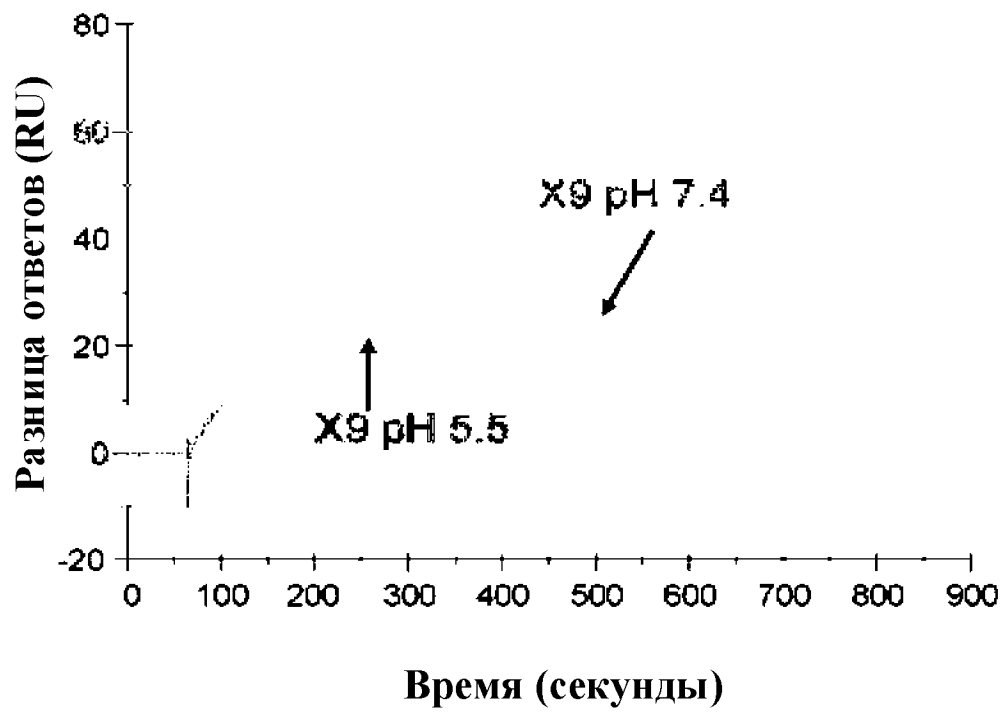
Фигура 23



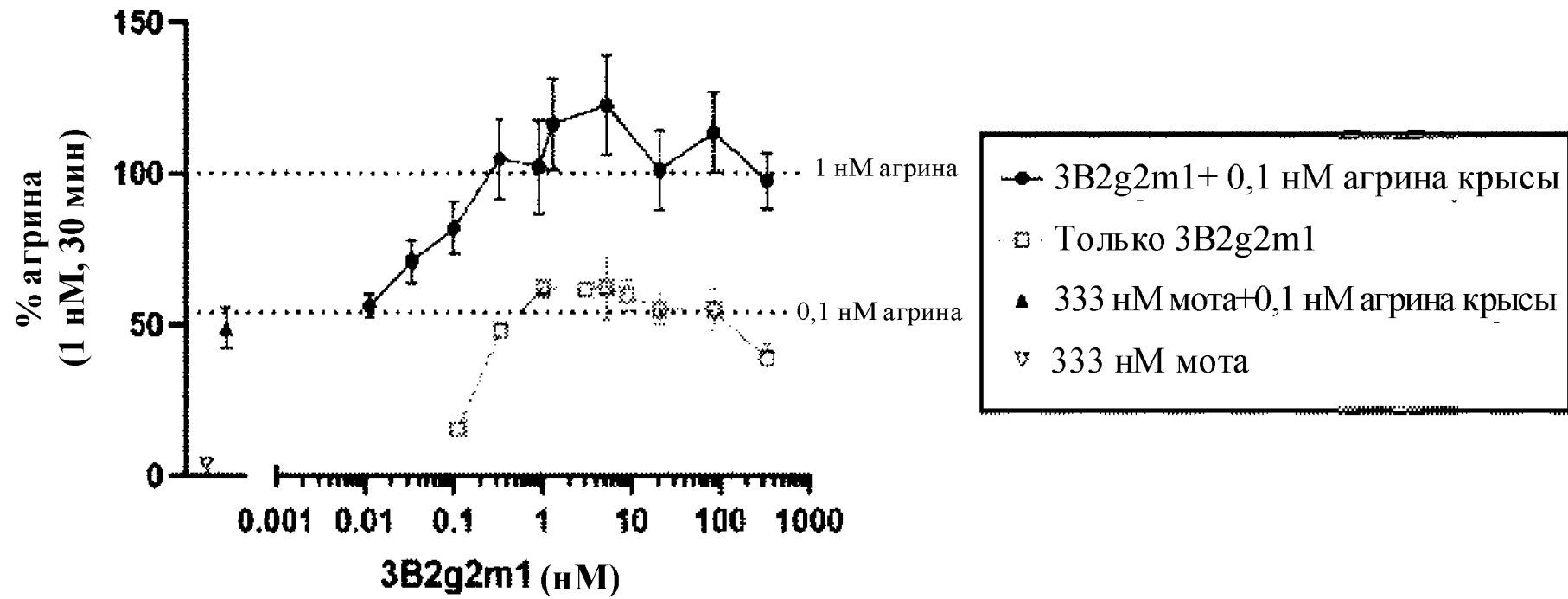
Фигура 23 (продолжение)

Фигура 23 (продолжение)

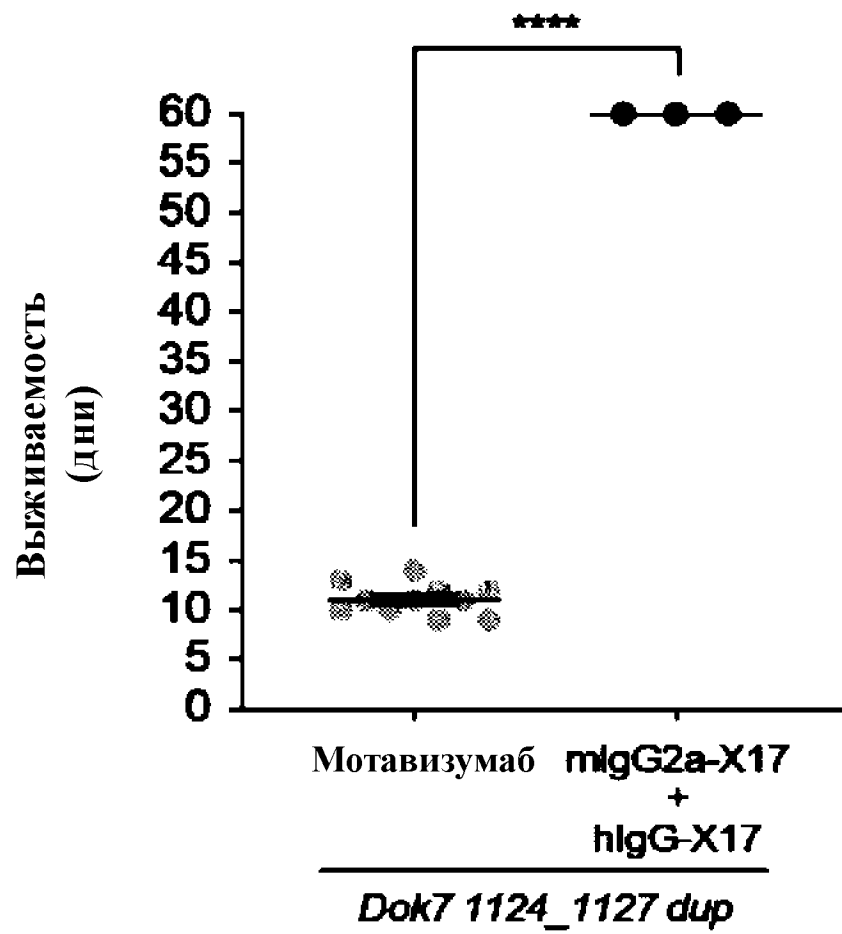


Фигура 23 (продолжение)

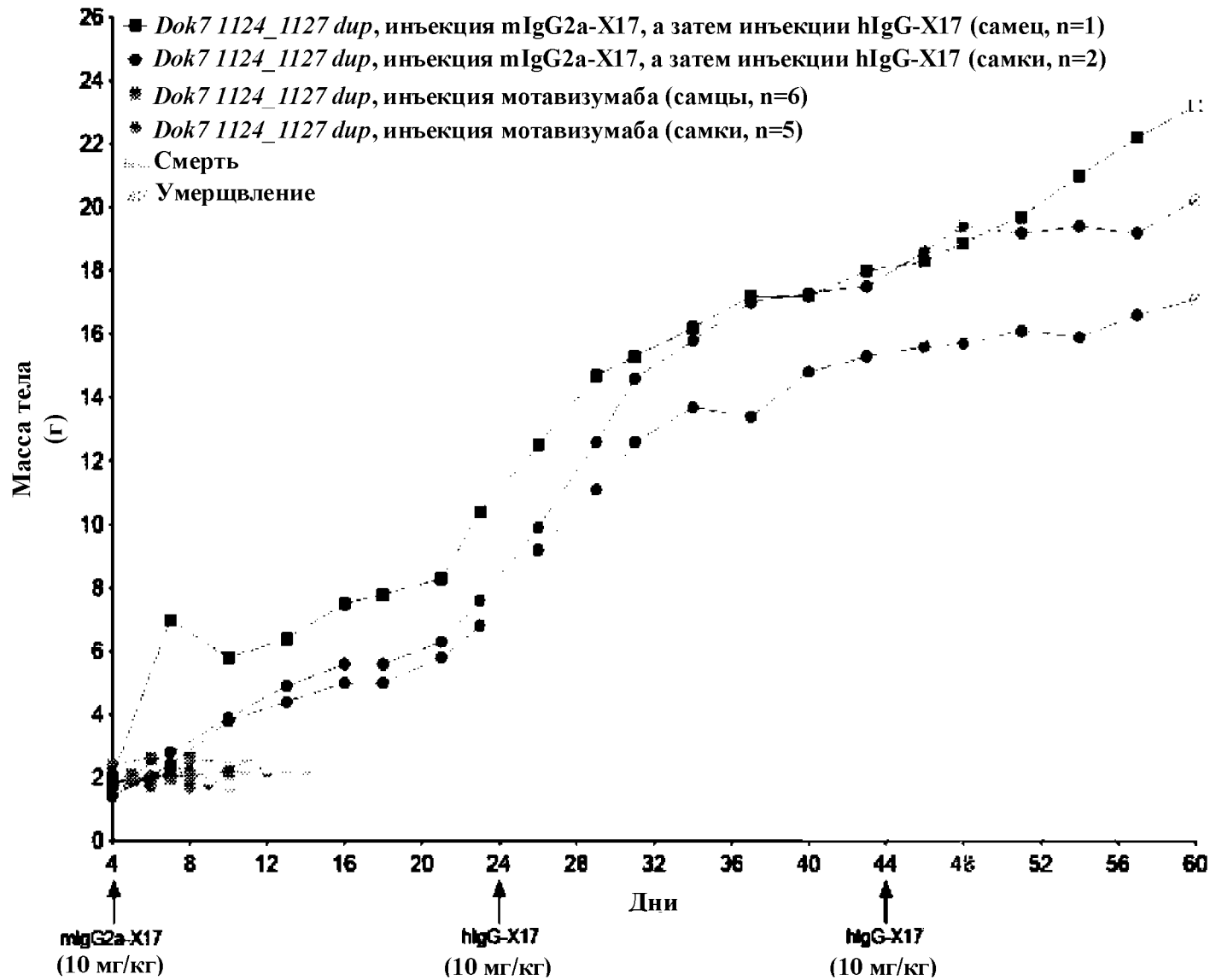
Фигура 24



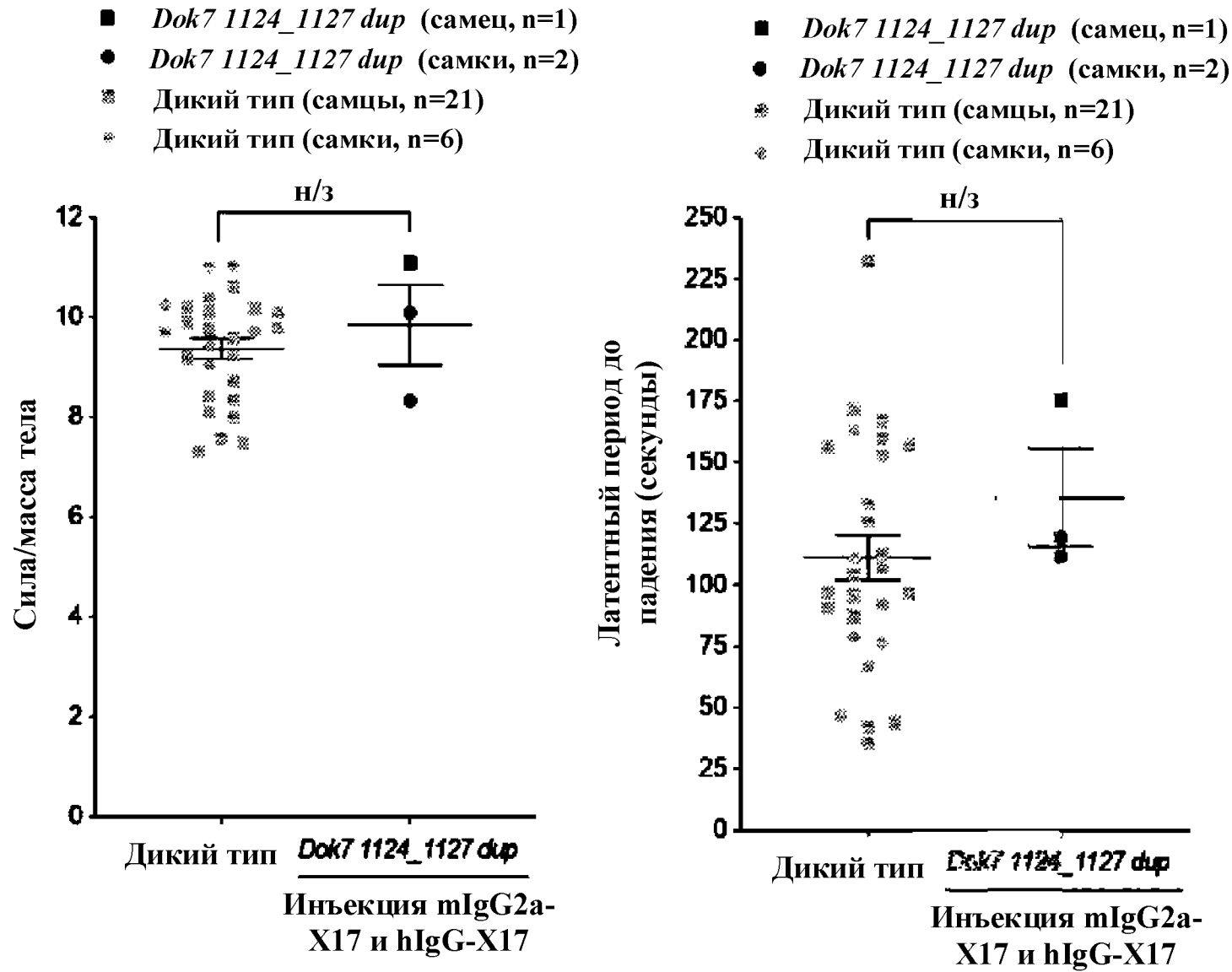
Фигура 25А



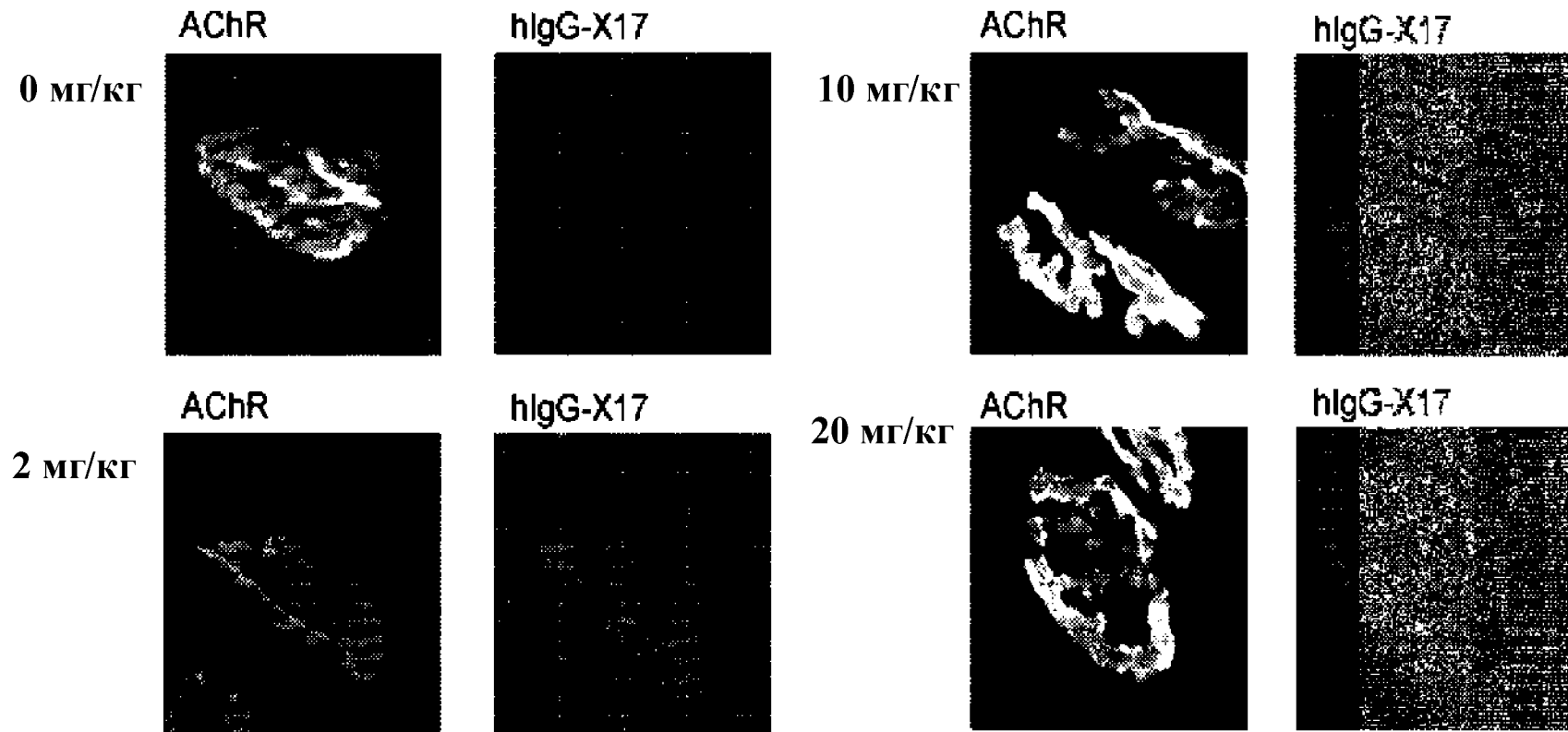
Фигура 25В



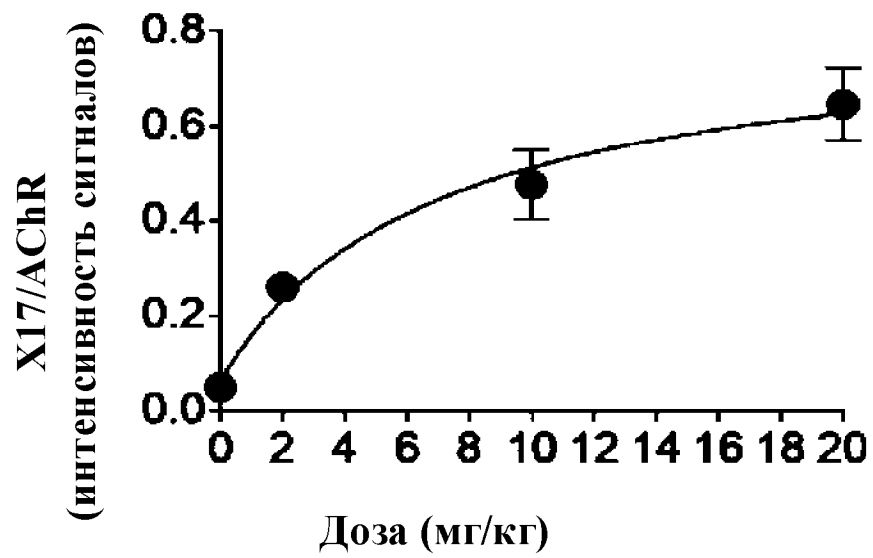
Фигура 26



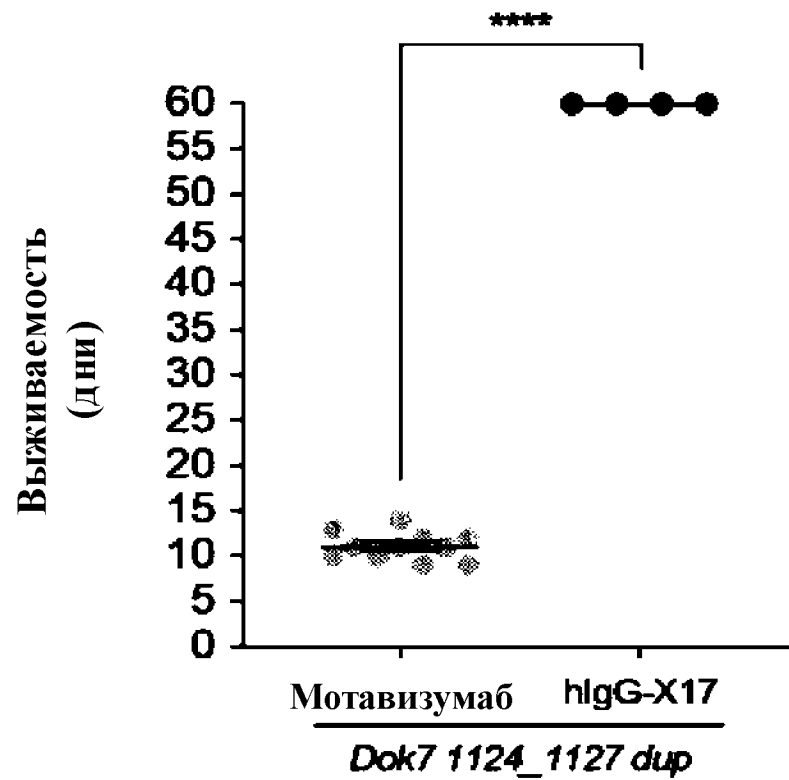
Фигура 27



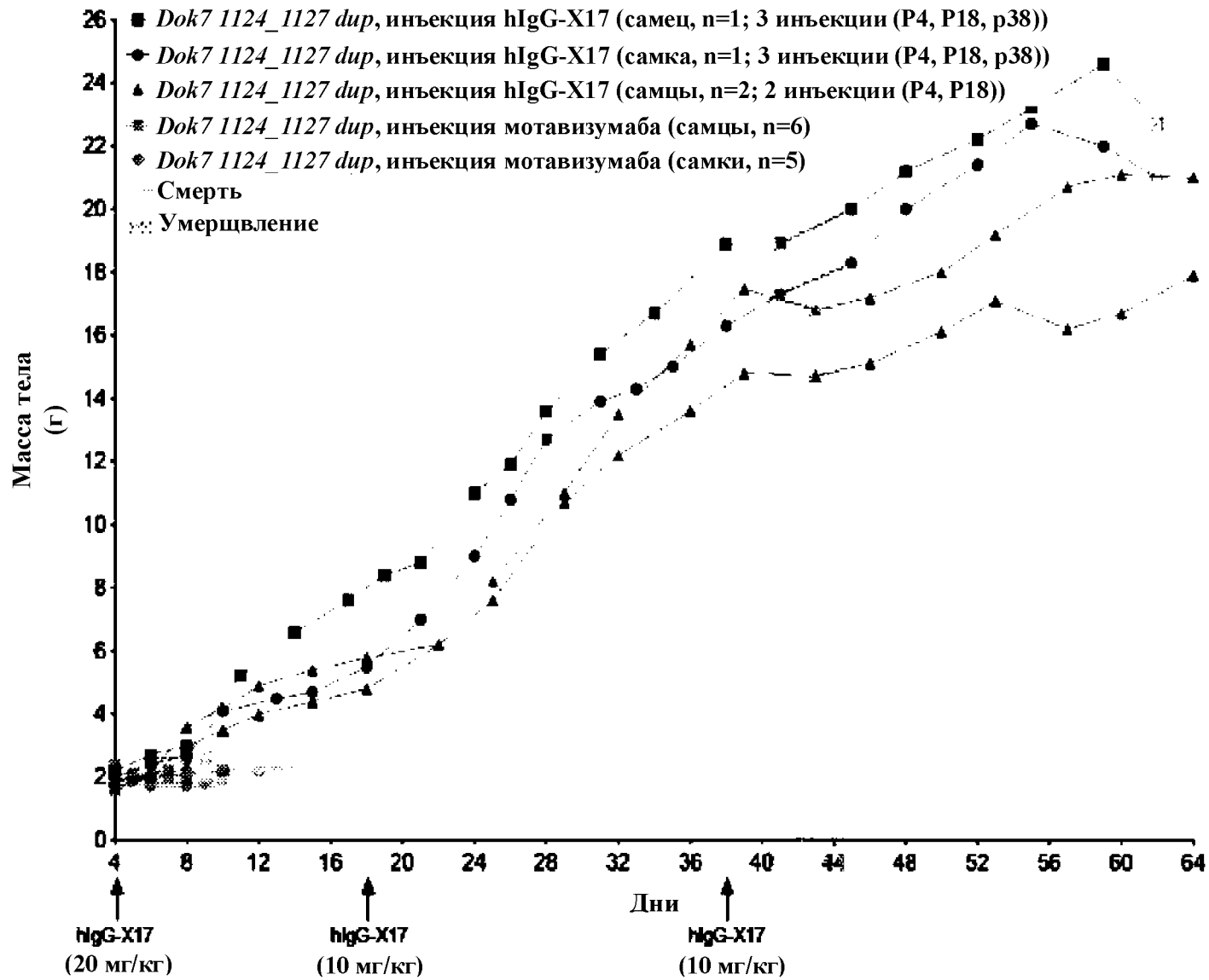
Фигура 27 (продолжение)



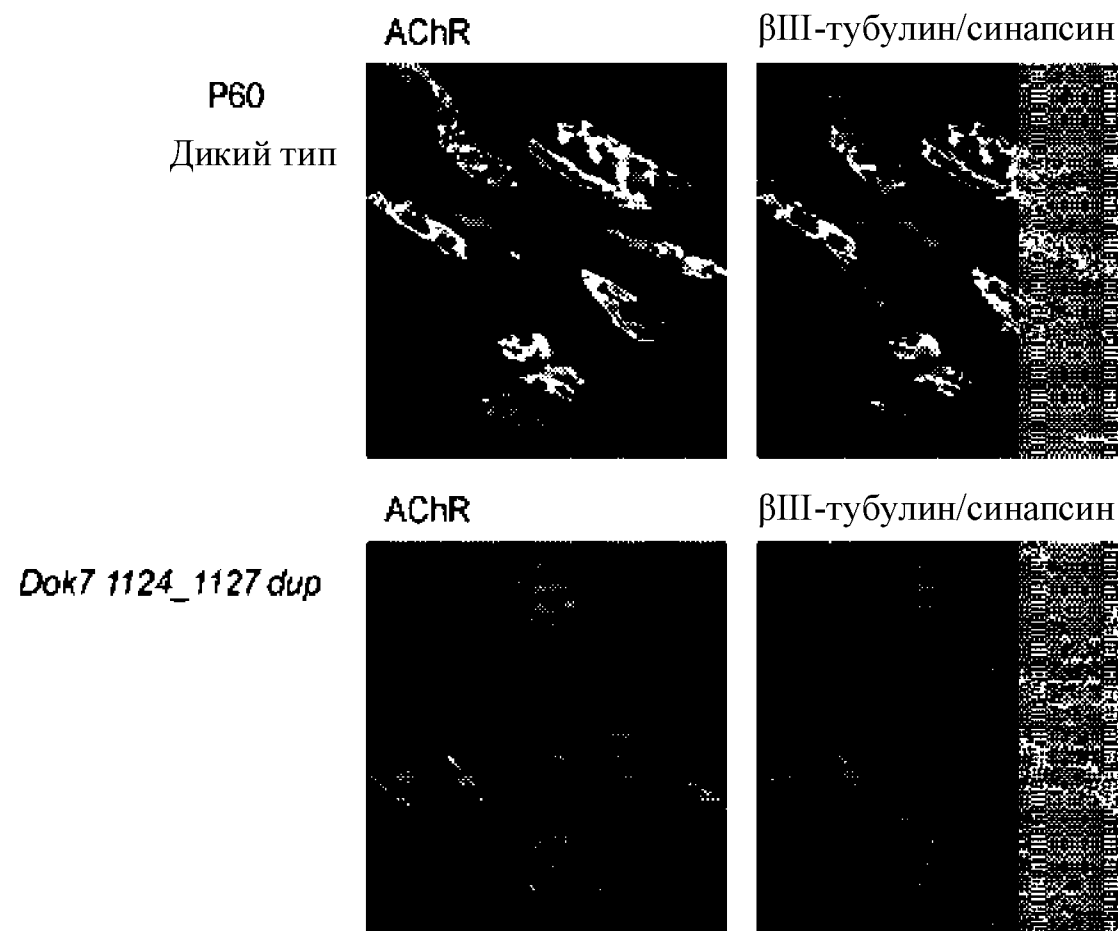
Фигура 28А



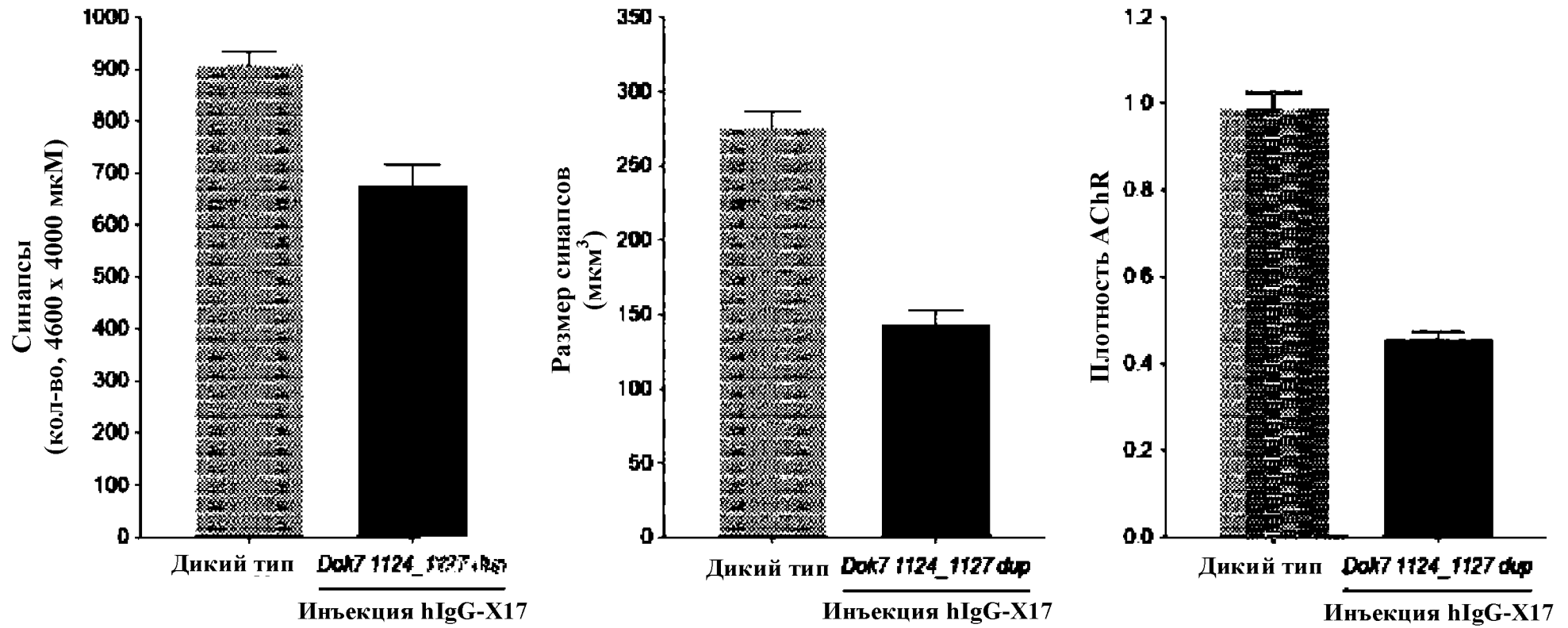
Фигура 28В



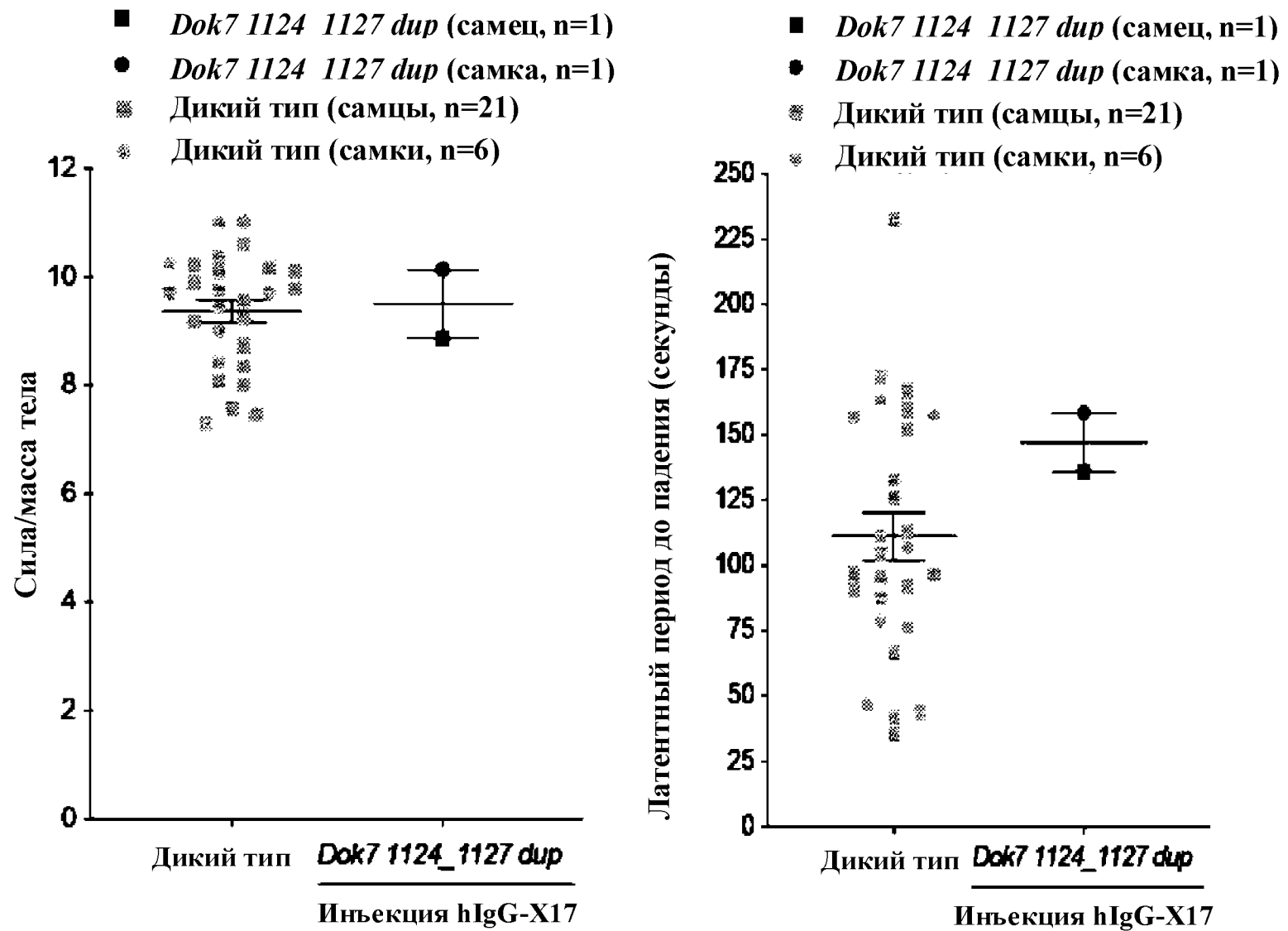
Фигура 29



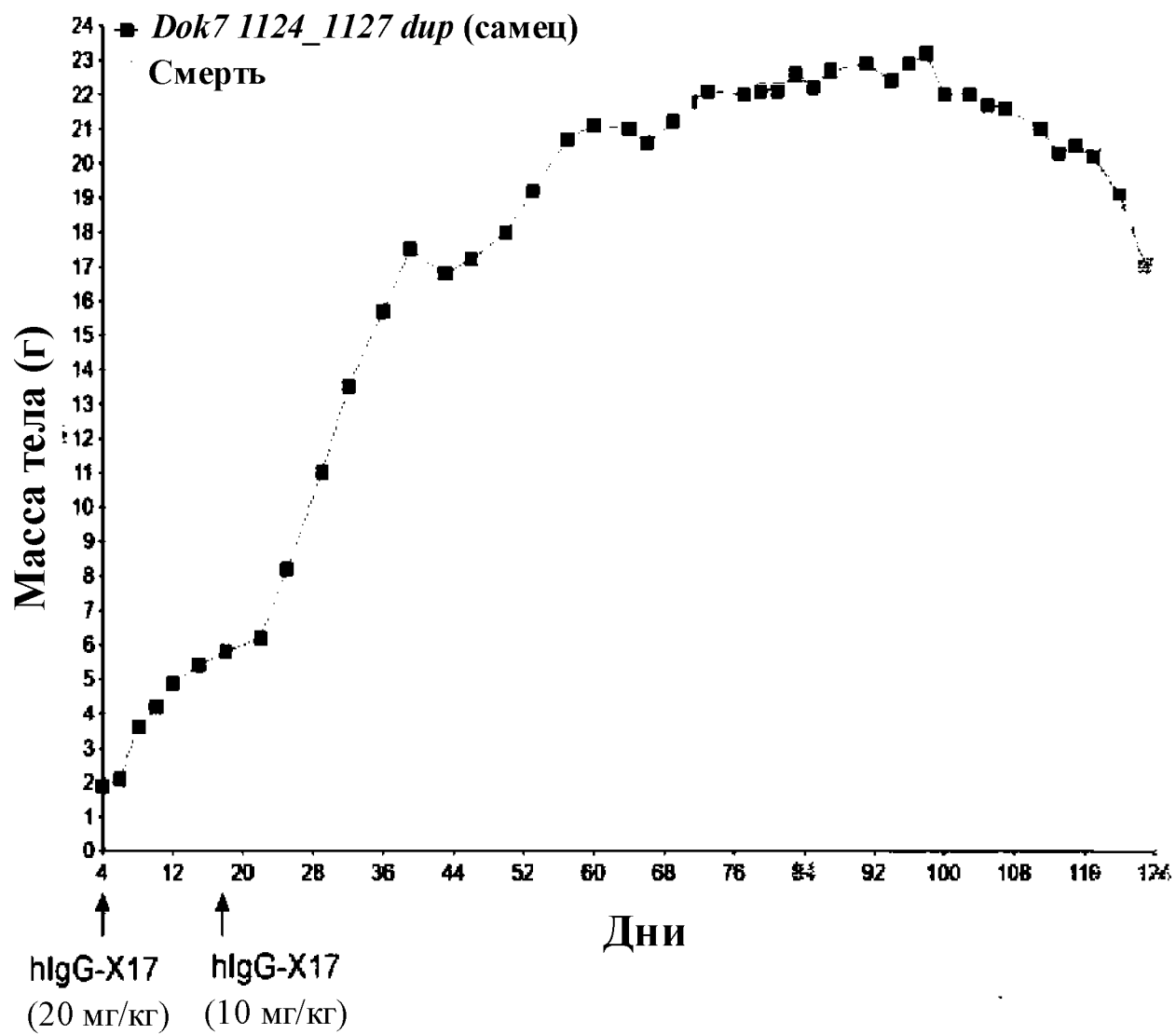
Фигура 29 (продолжение)



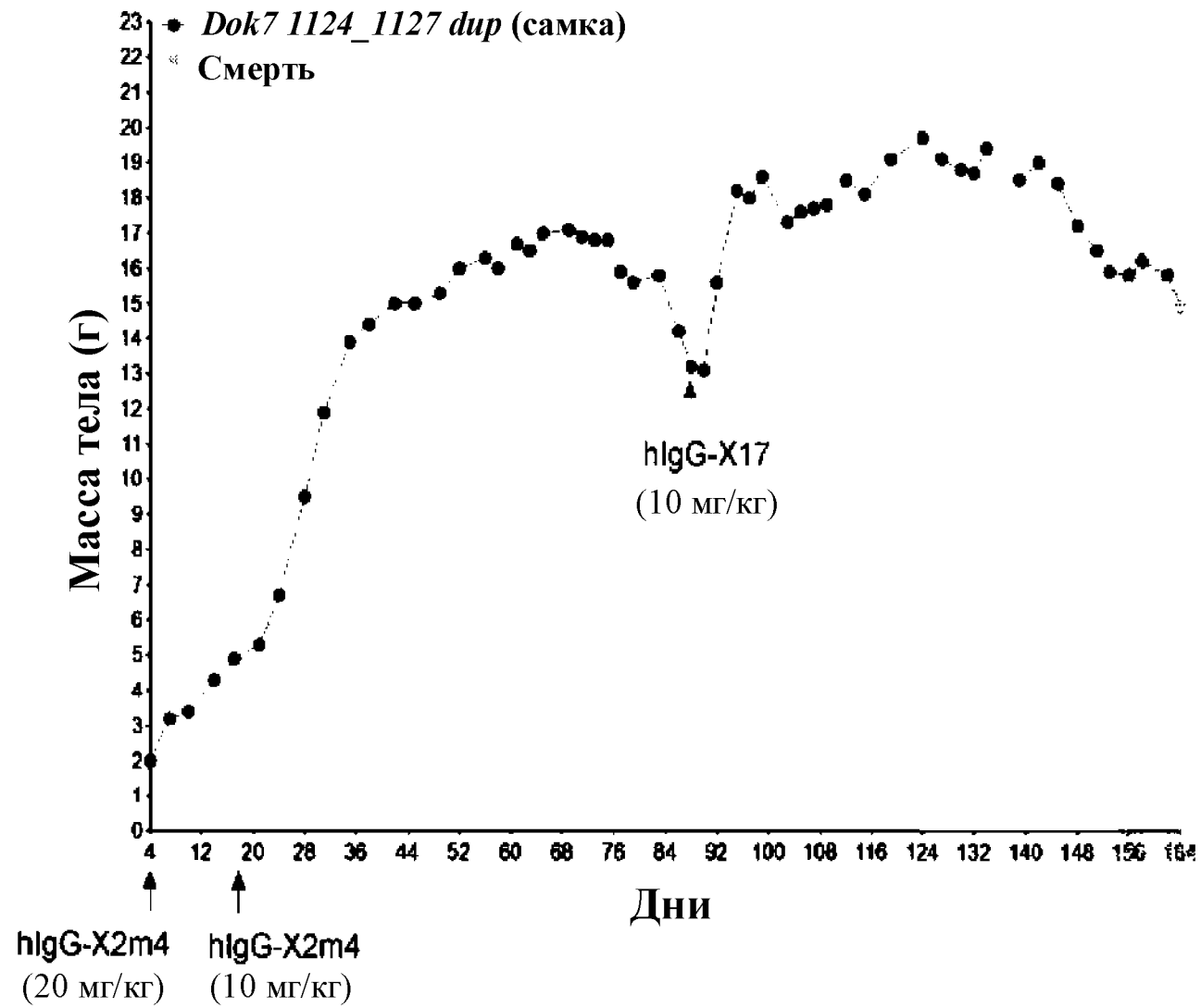
Фигура 30



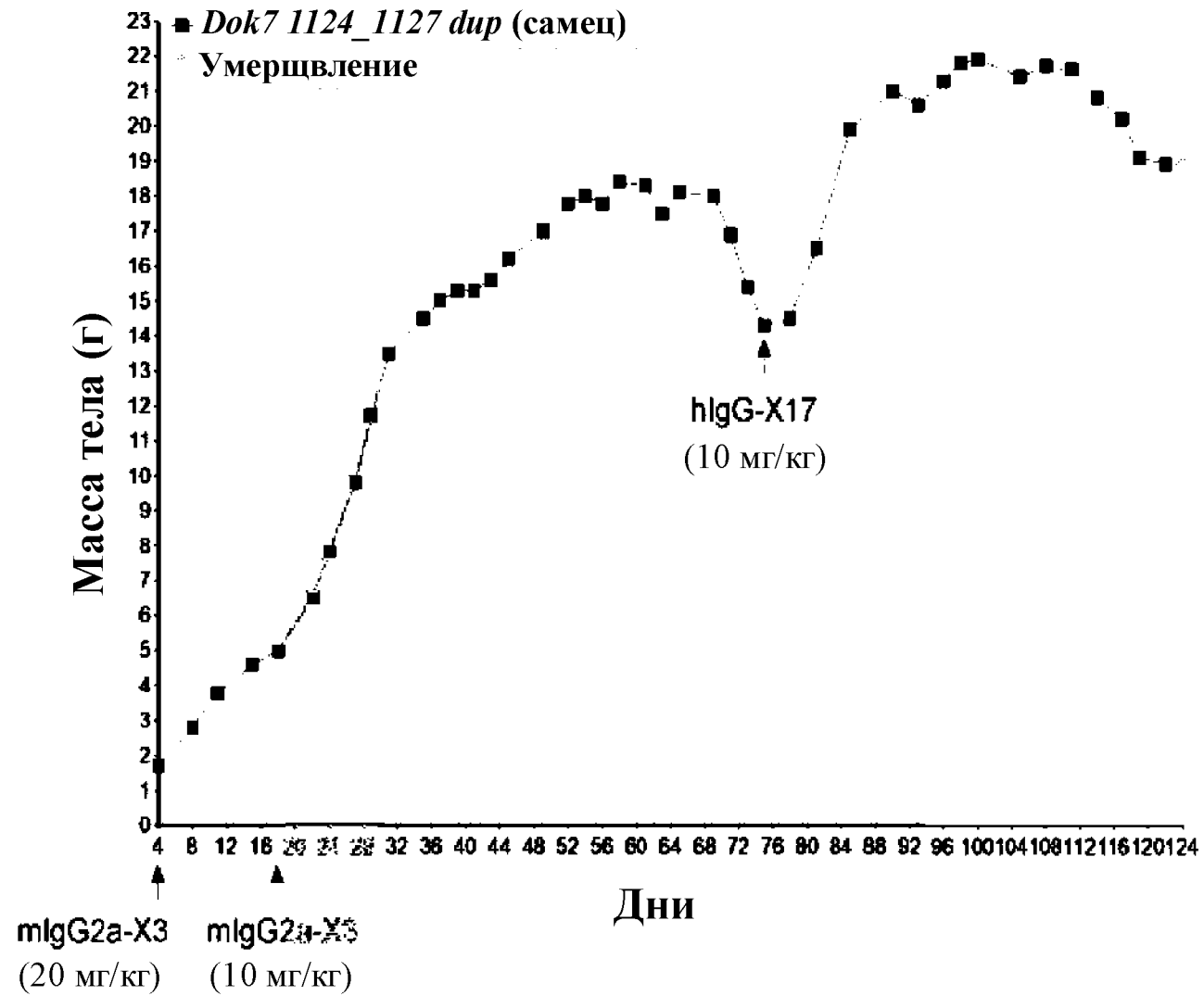
Фигура 31А



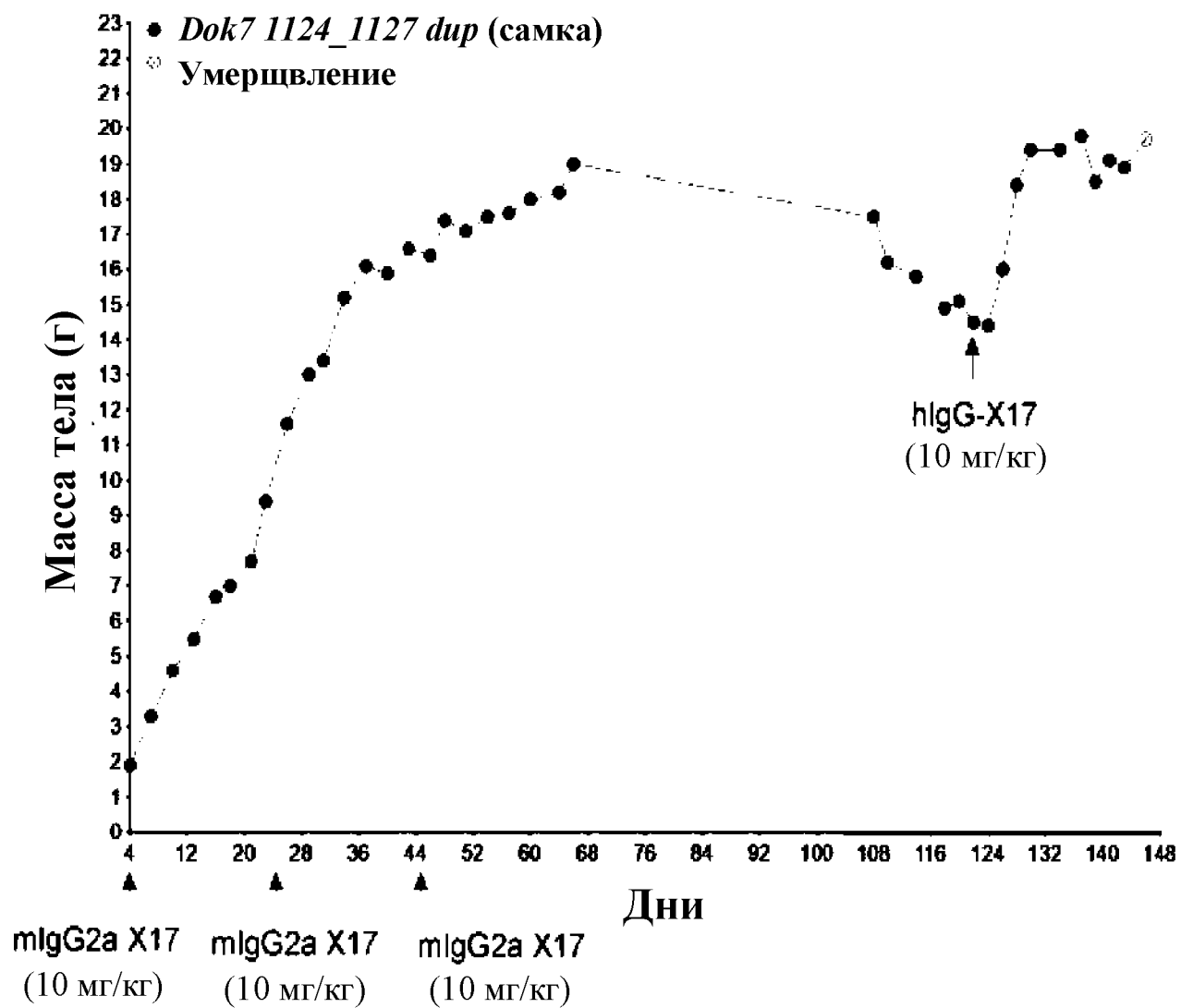
Фигура 31В



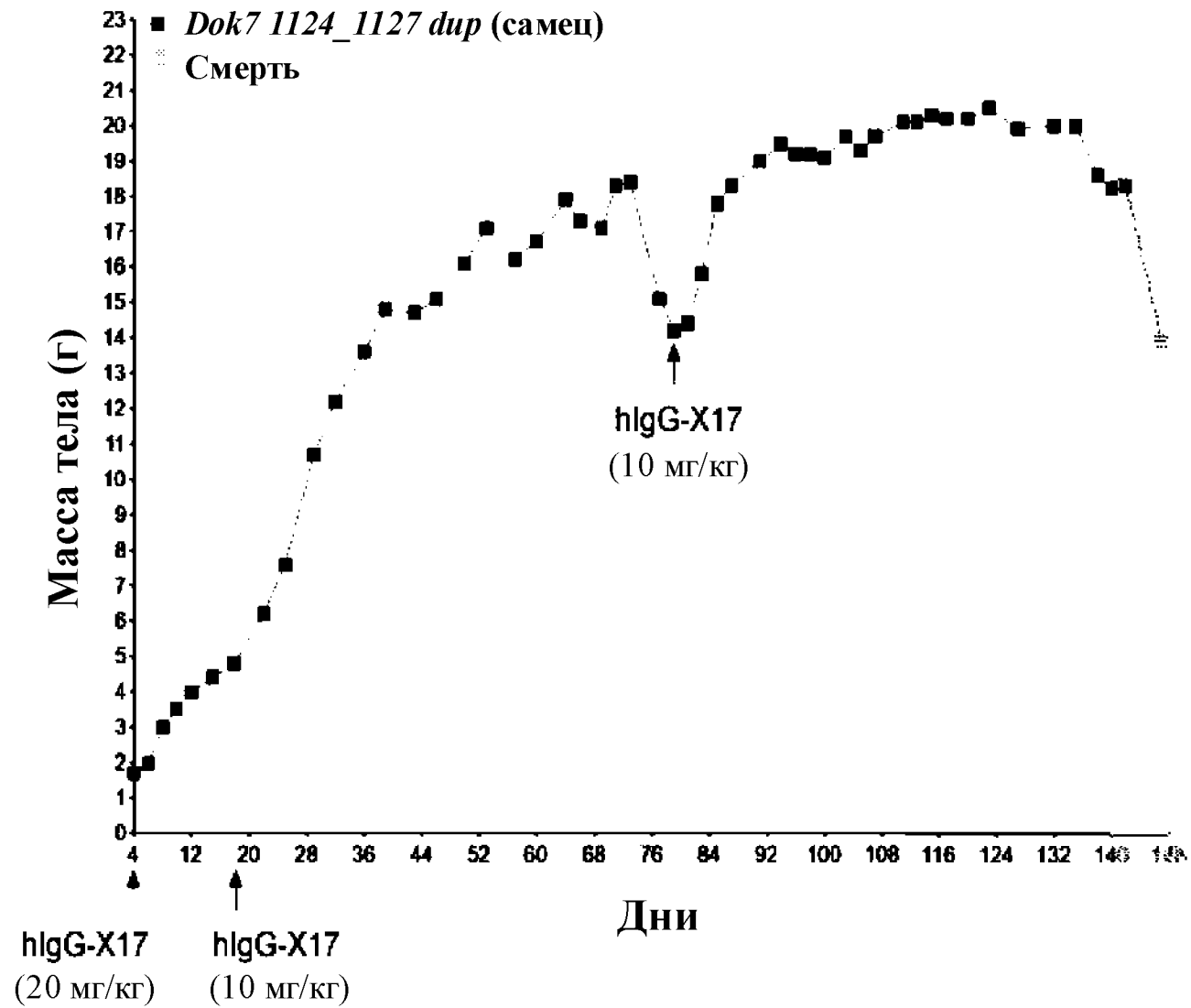
Фигура 31В (продолжение)



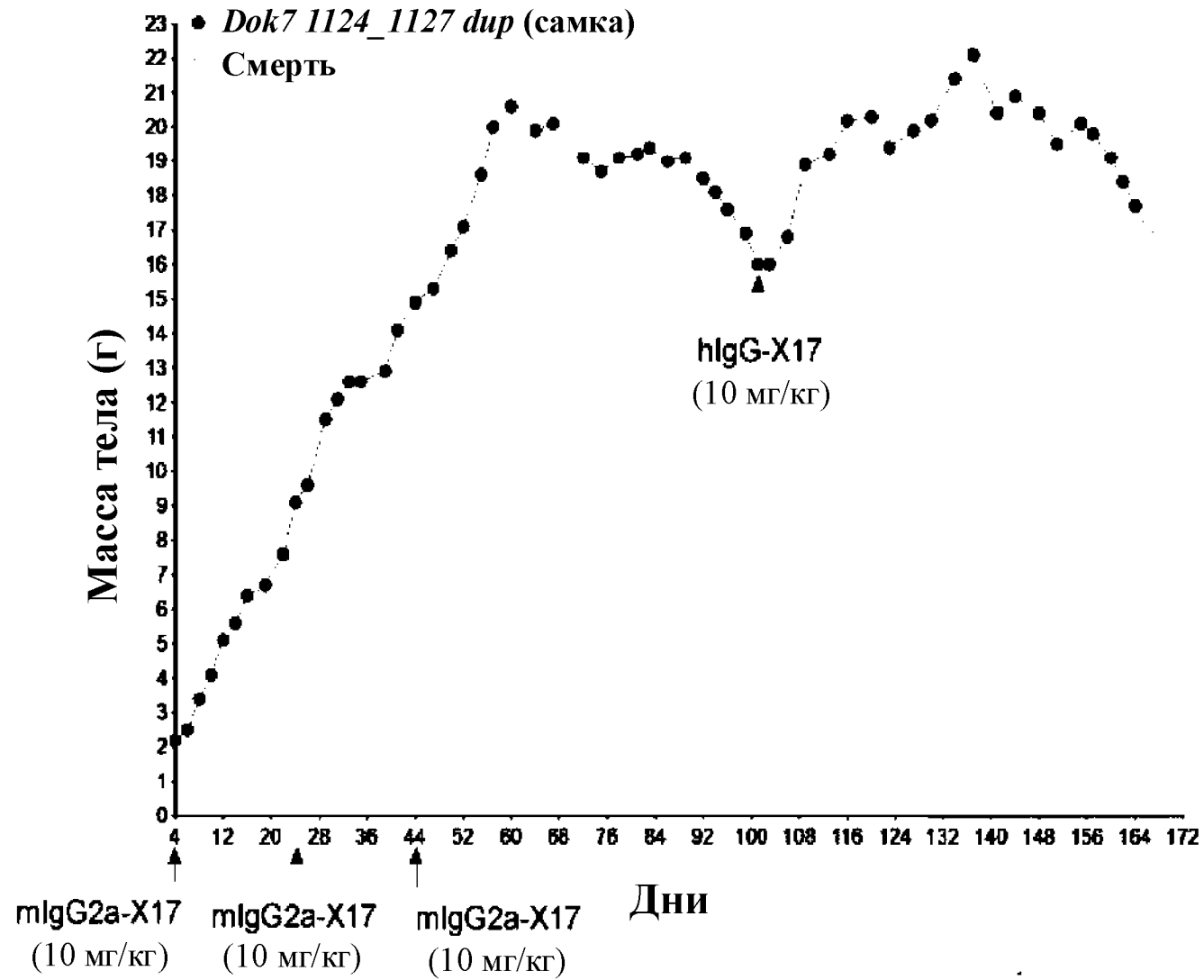
Фигура 31В (продолжение)



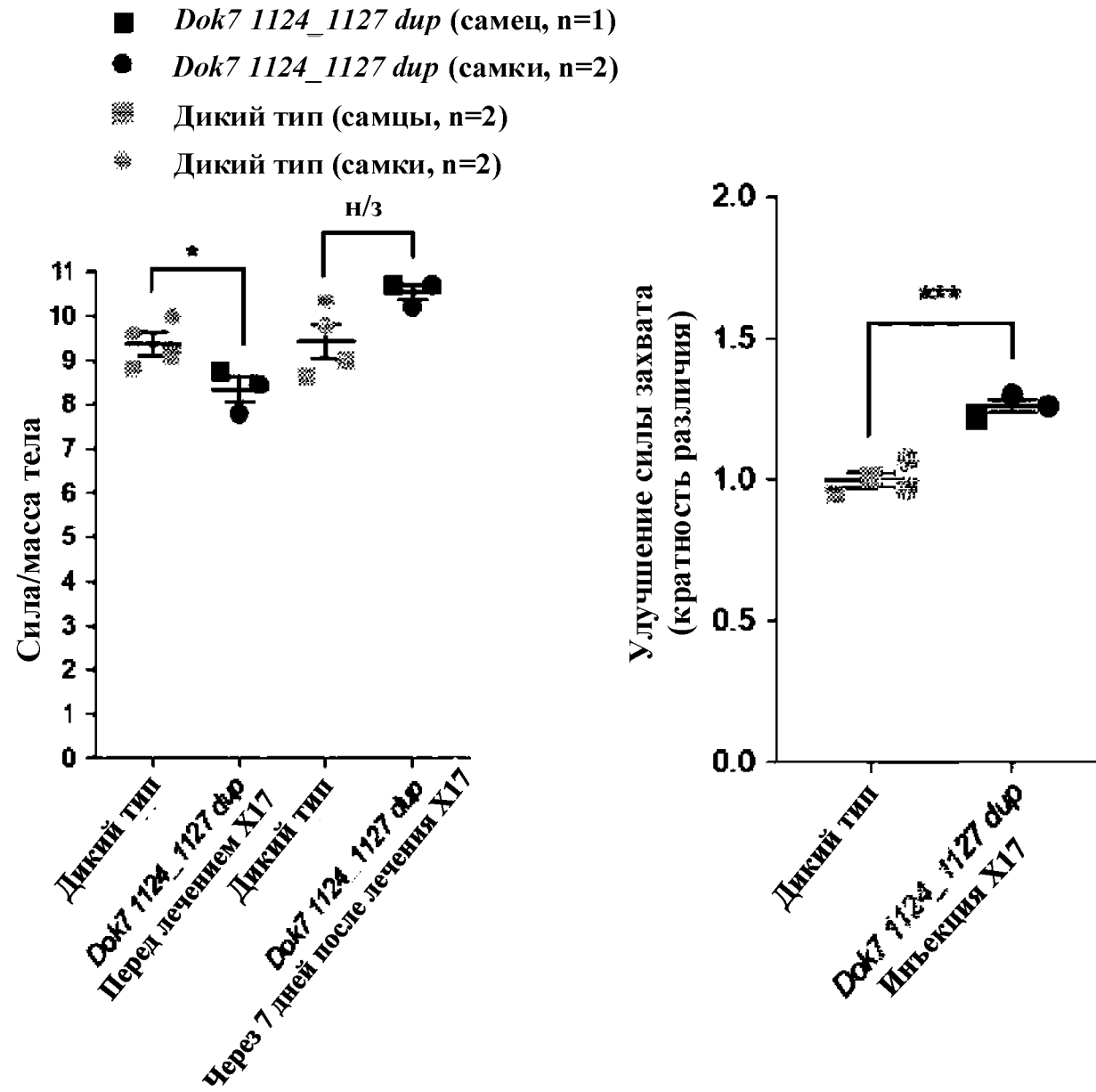
Фигура 31В (продолжение)



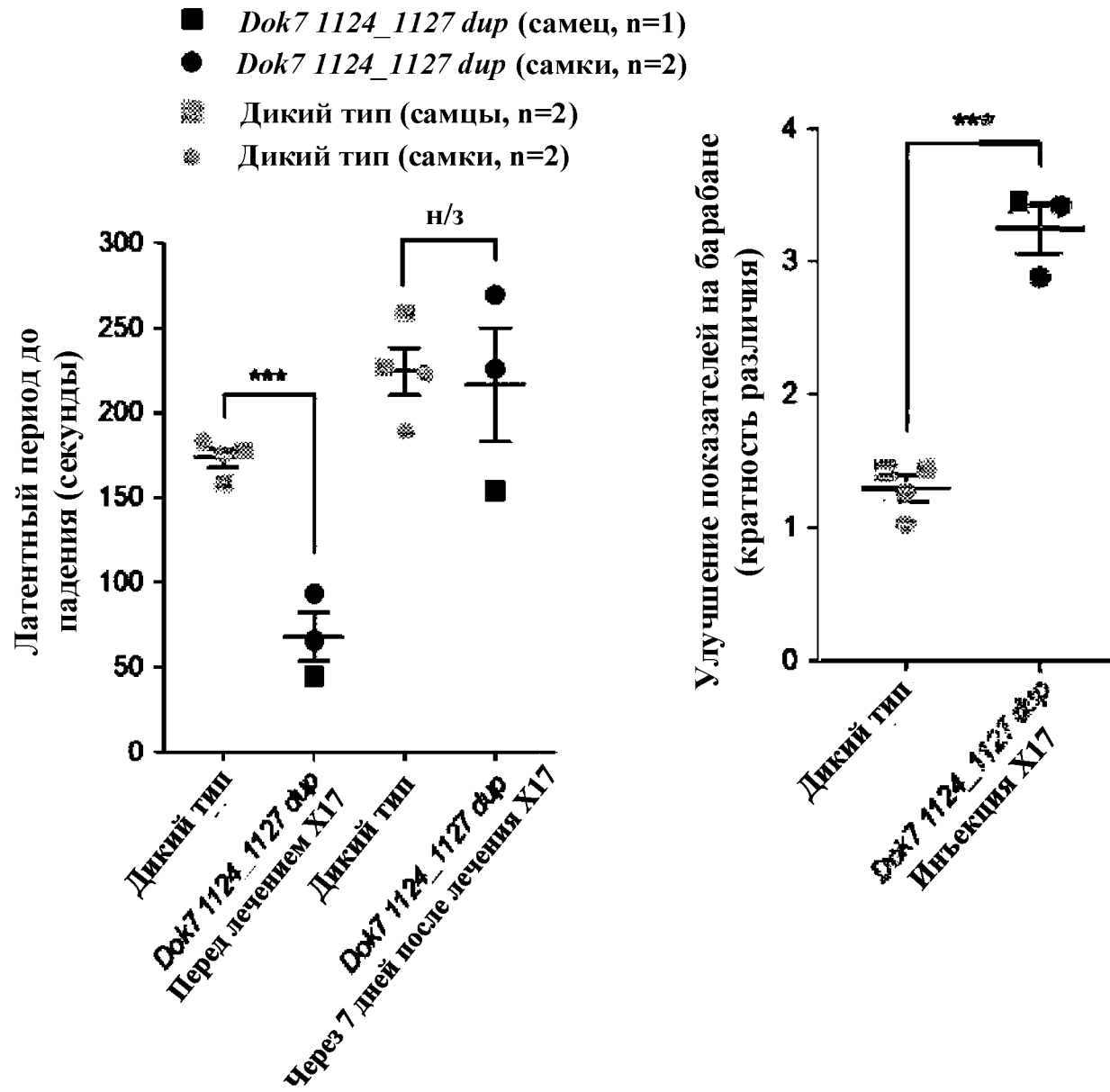
Фигура 31В (продолжение)



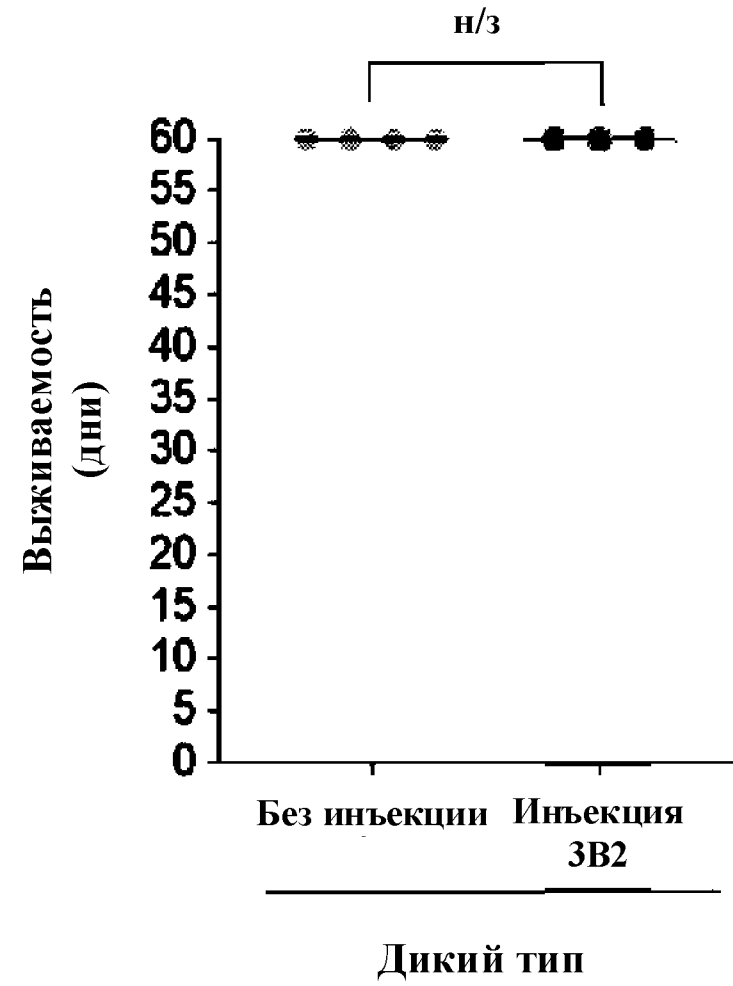
Фигура 31С



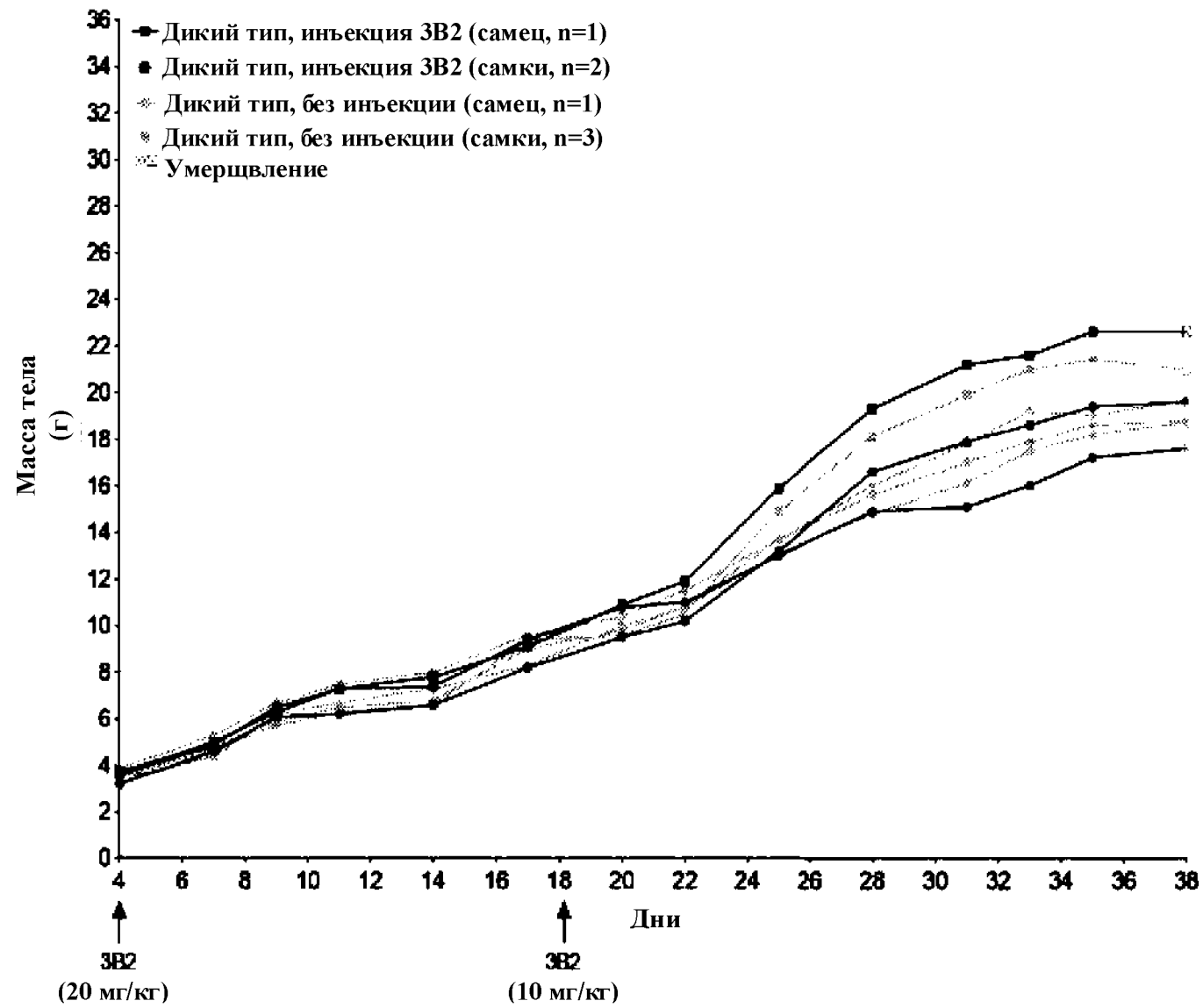
Фигура 31С (продолжение)



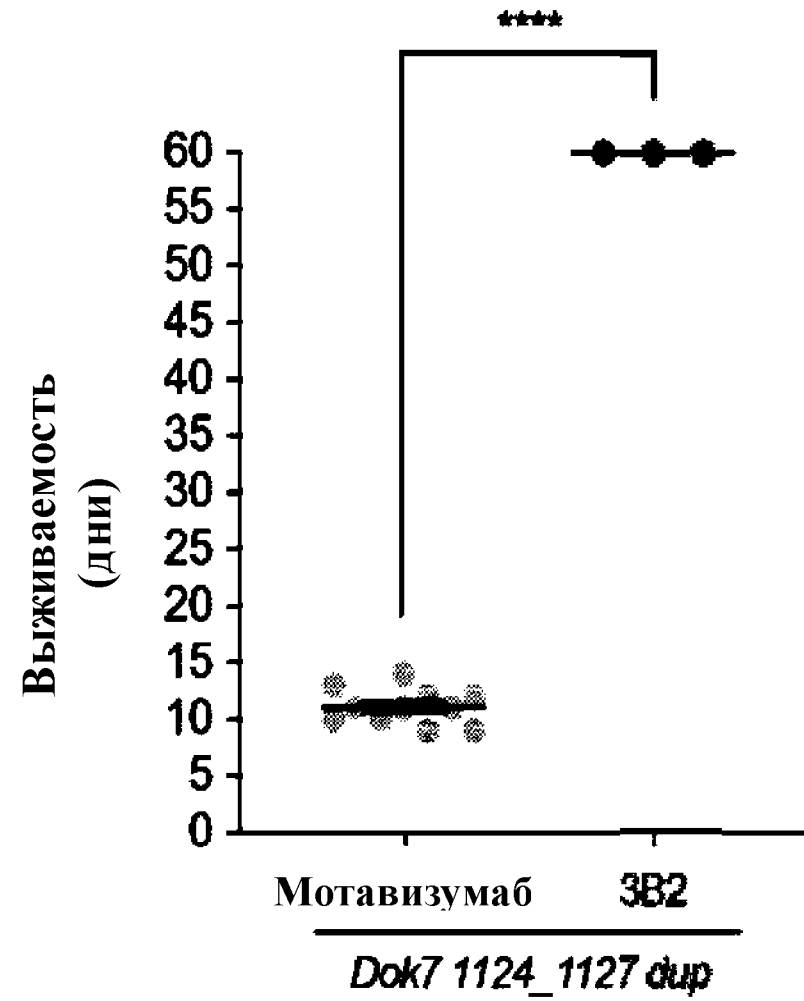
Фигура 32А



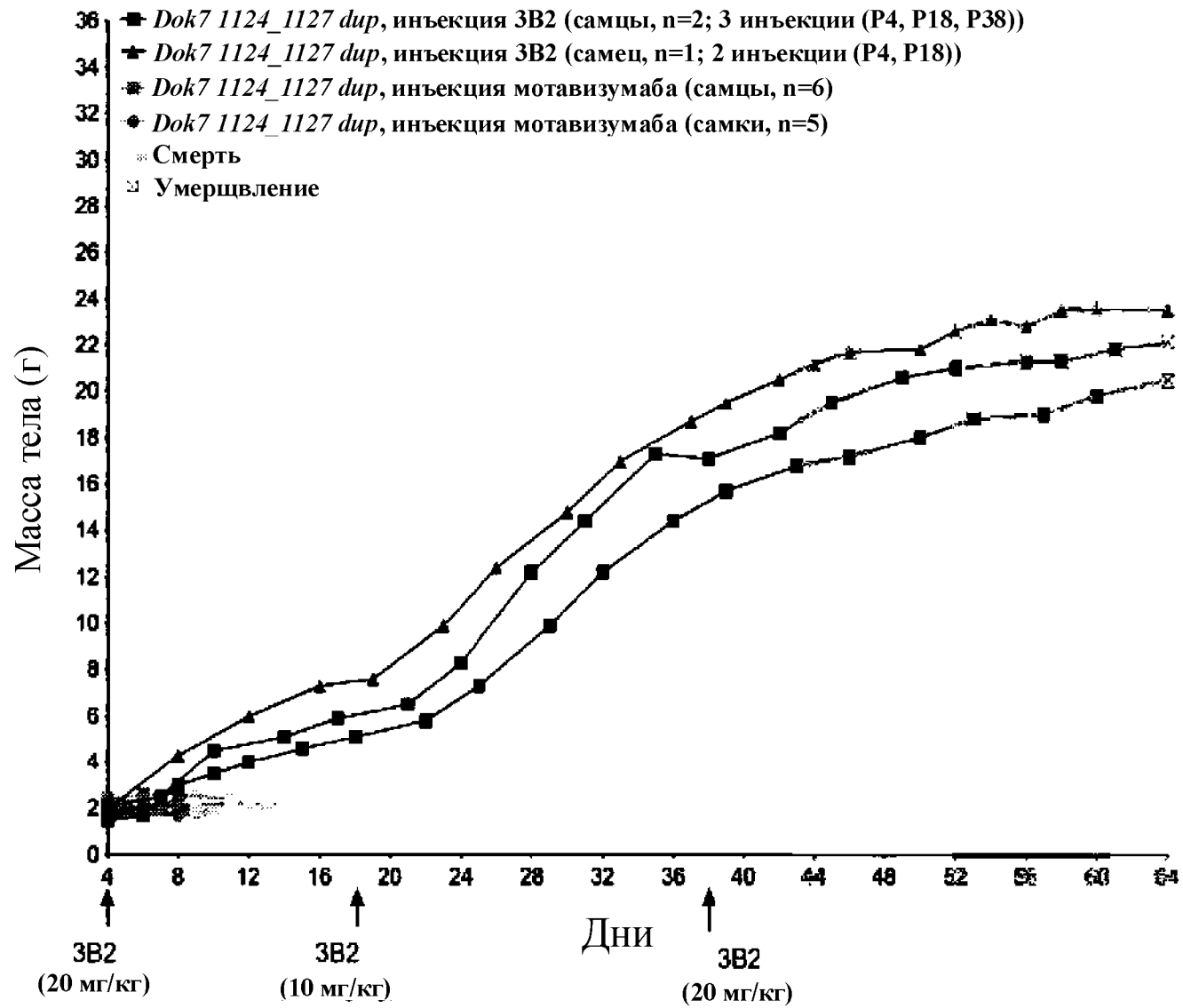
Фигура 32В



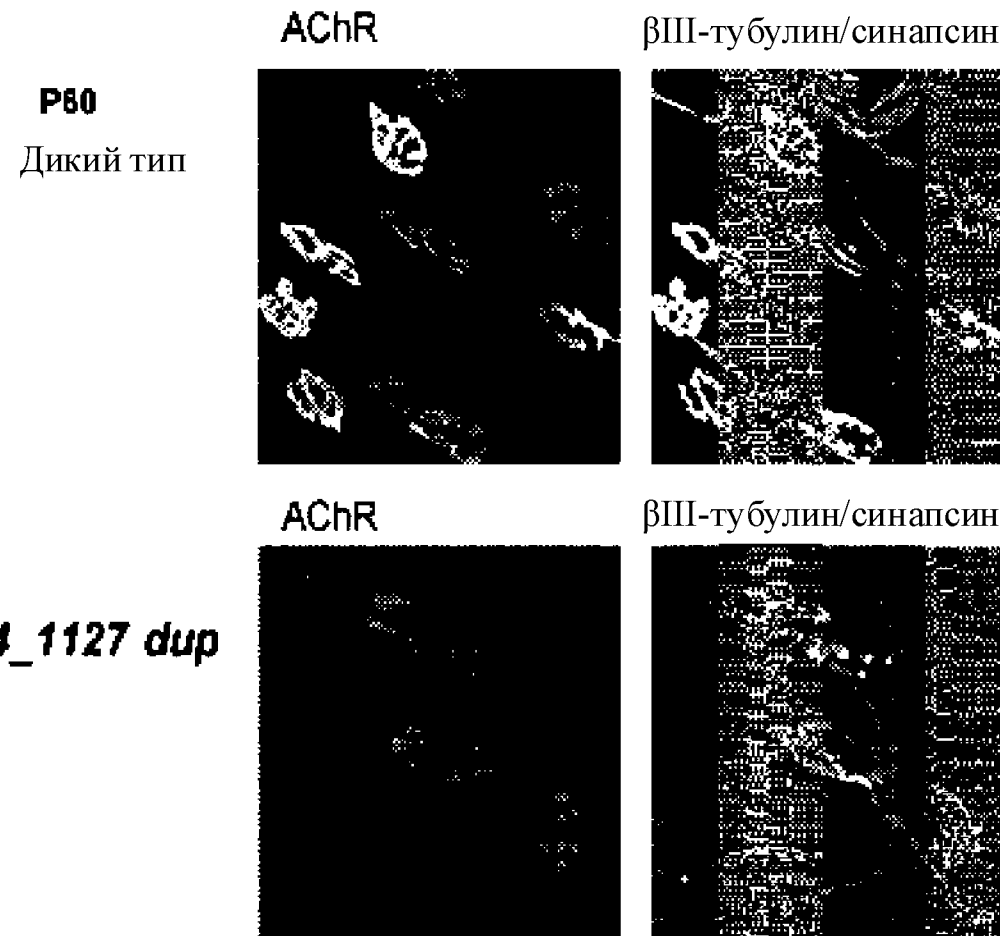
Фигура 33А



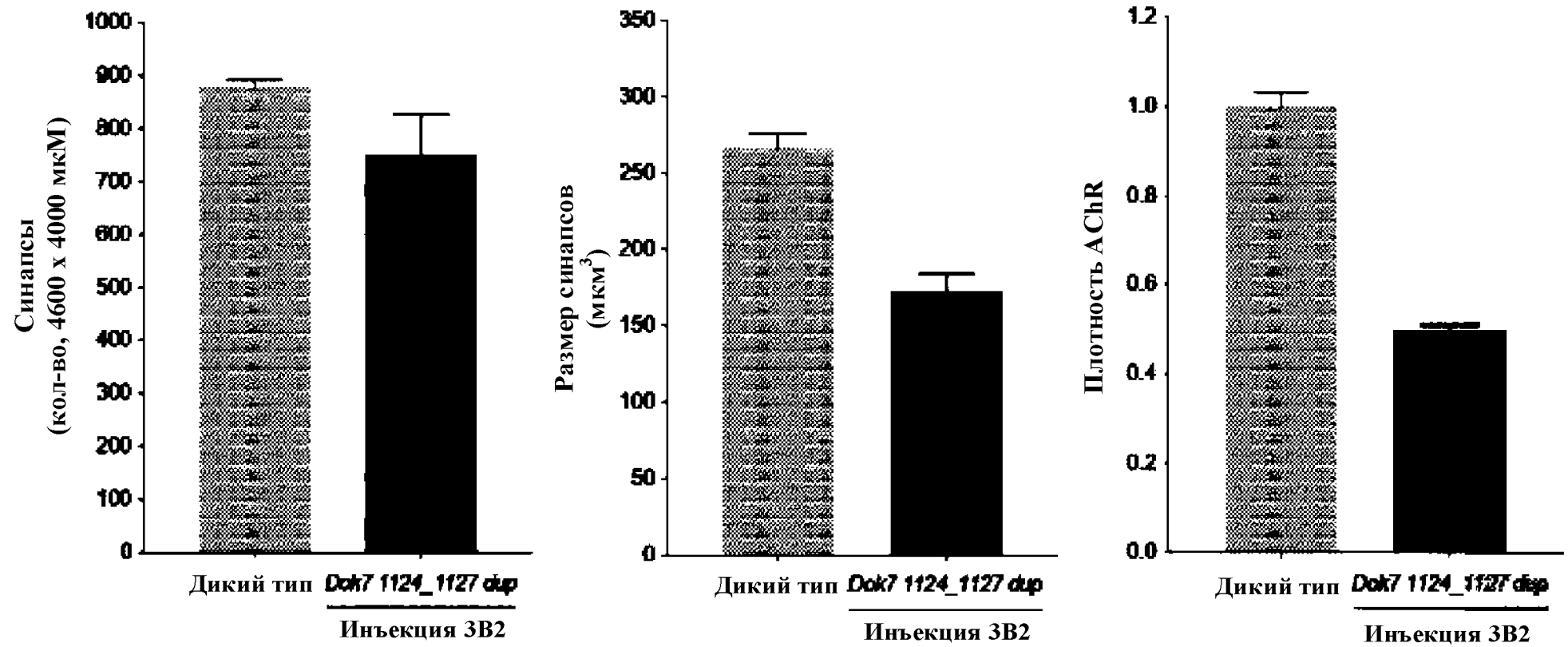
Фигура 33В



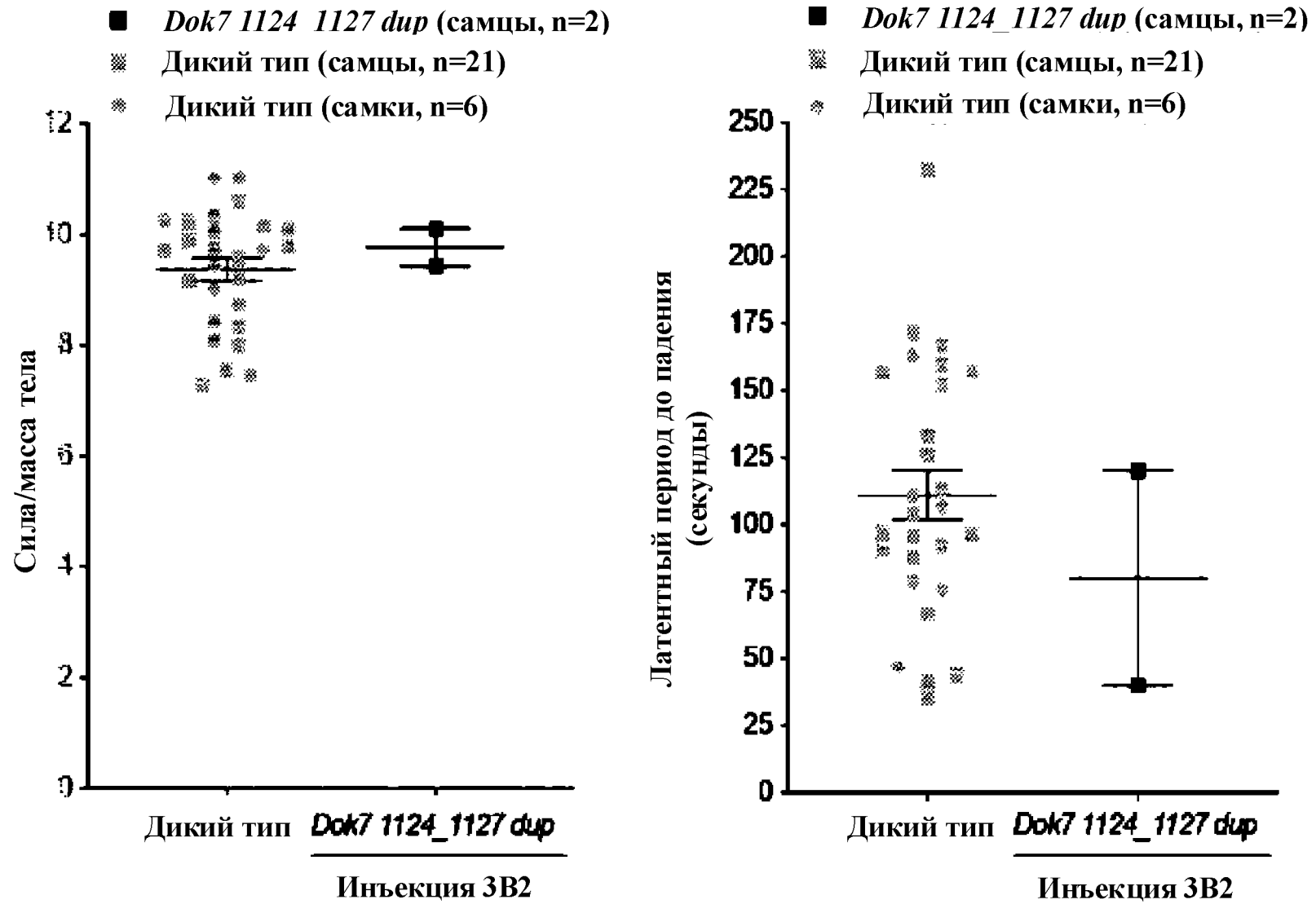
Фигура 34



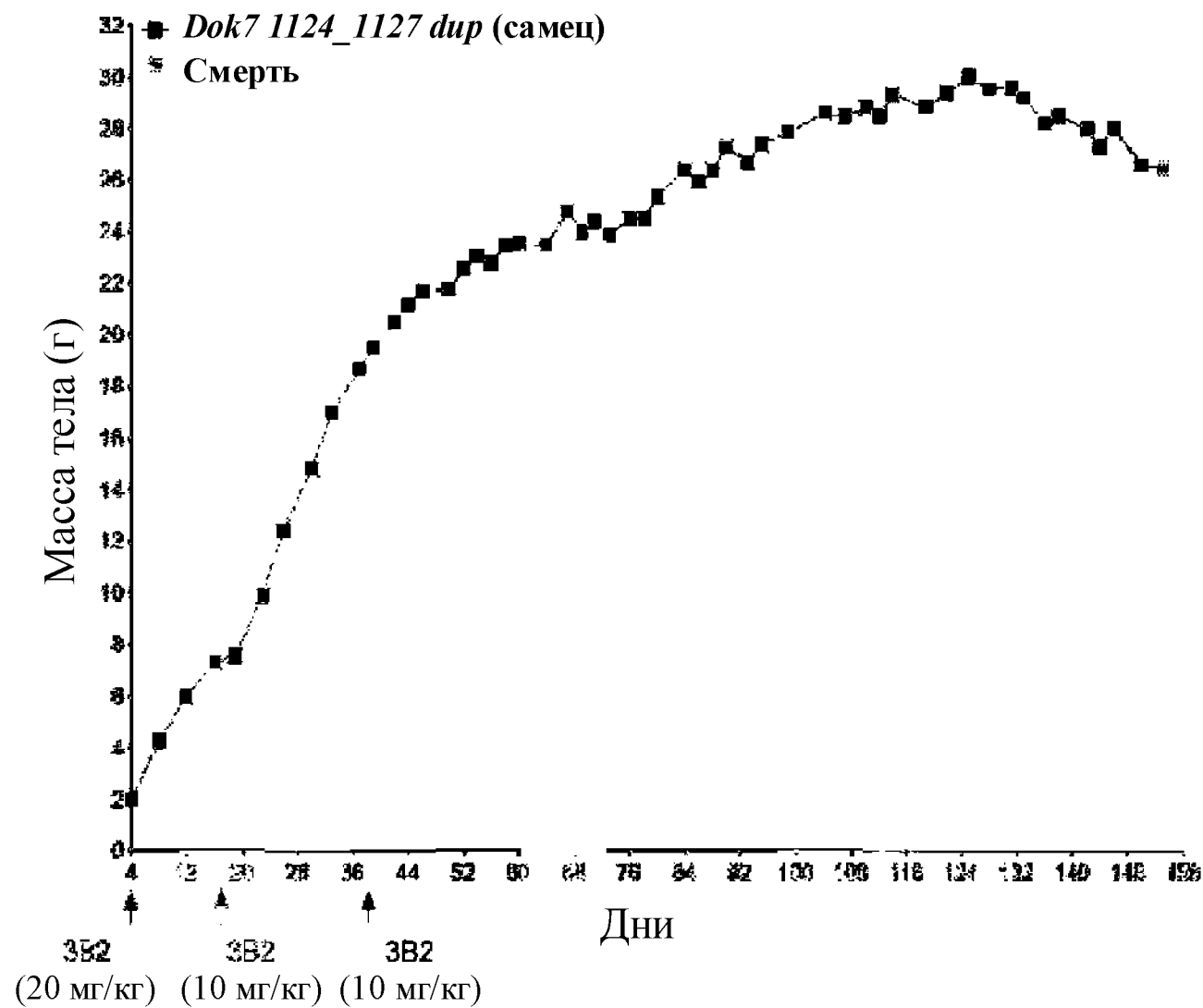
Фигура 34 (продолжение)



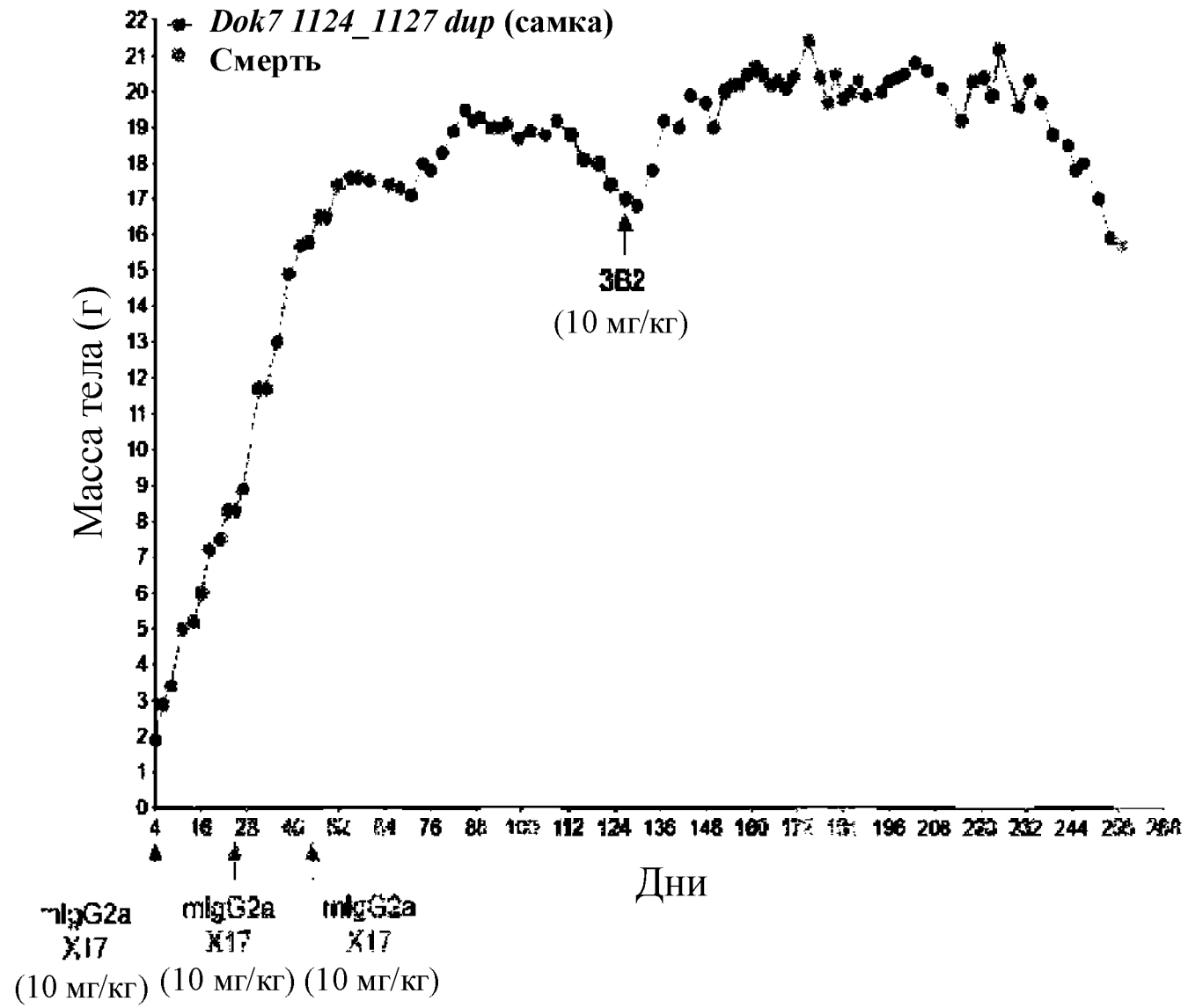
Фигура 35



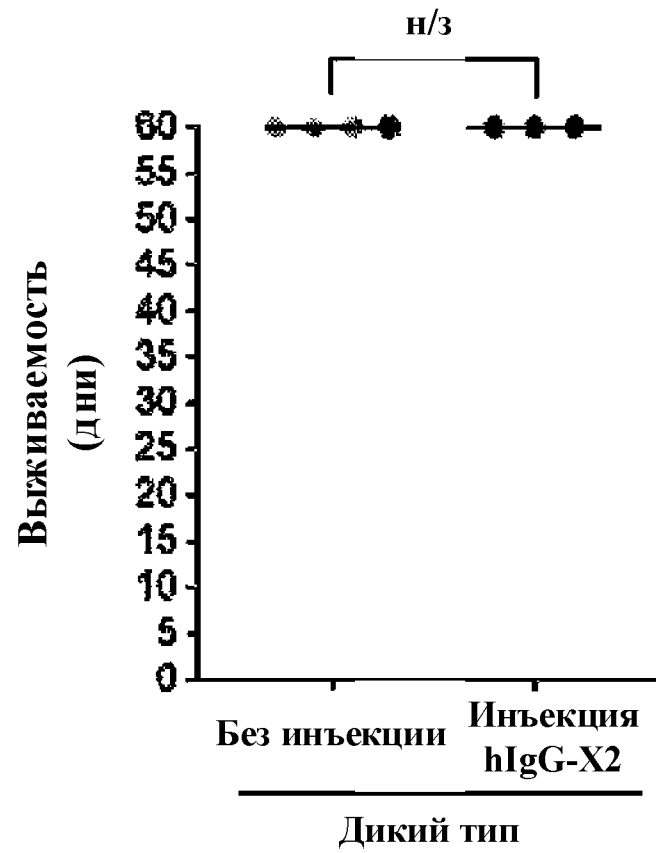
Фигура 36



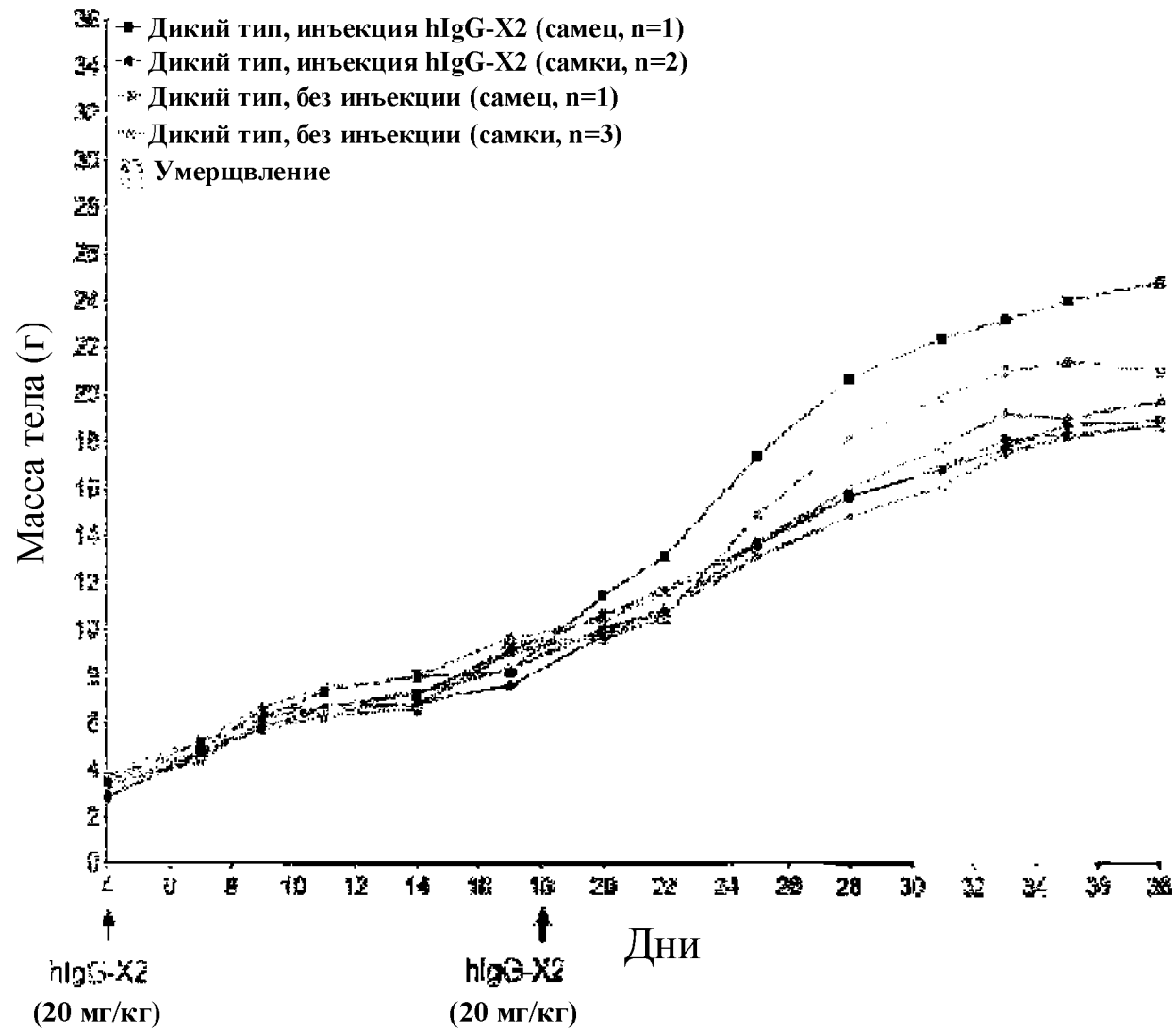
Фигура 37



Фигура 38А

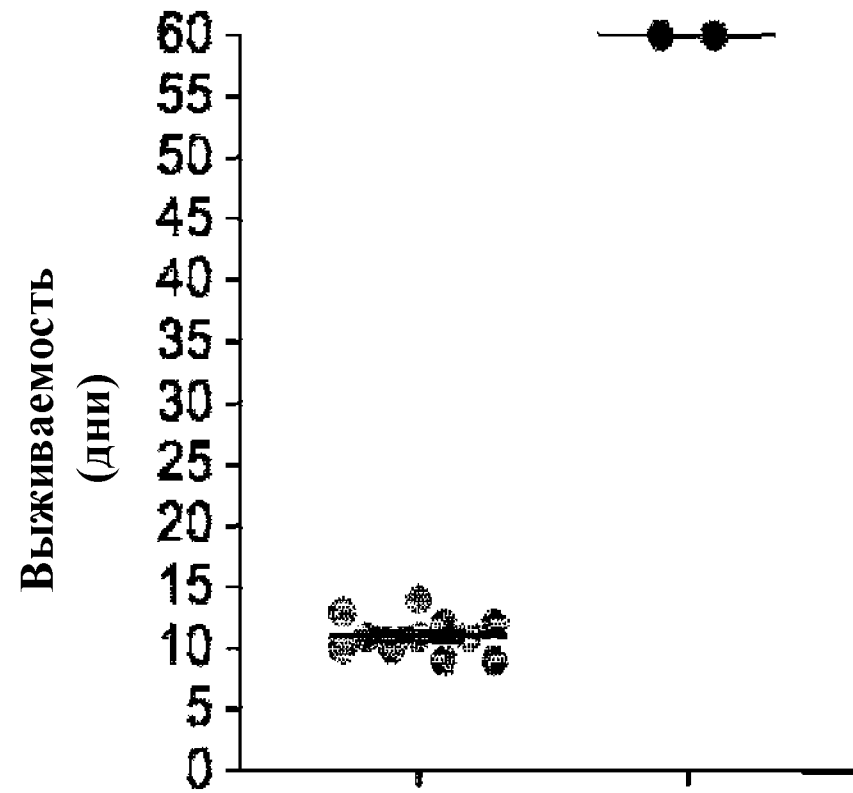


Фигура 38В

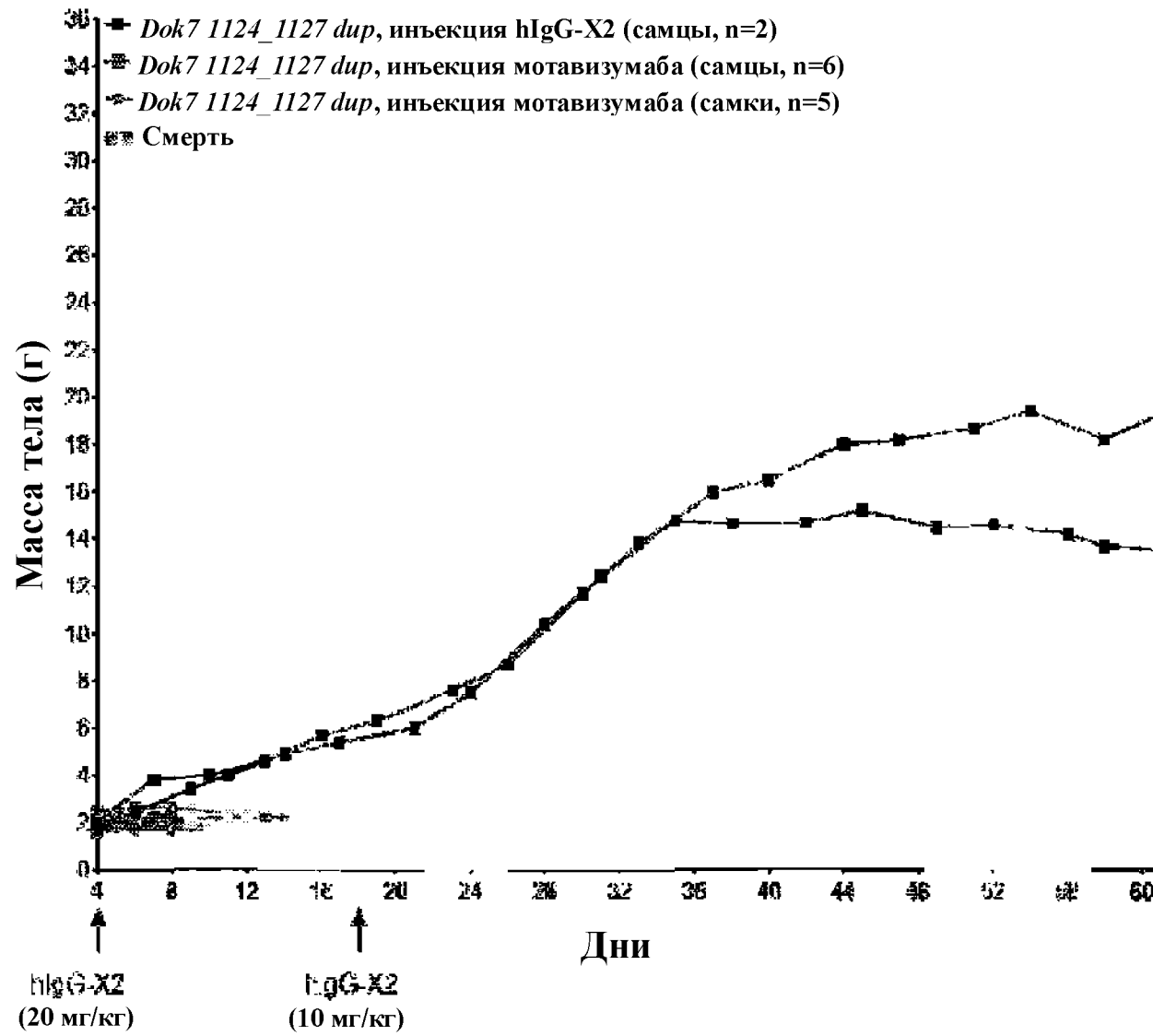


Мотавизумаб **hlgG-X2**

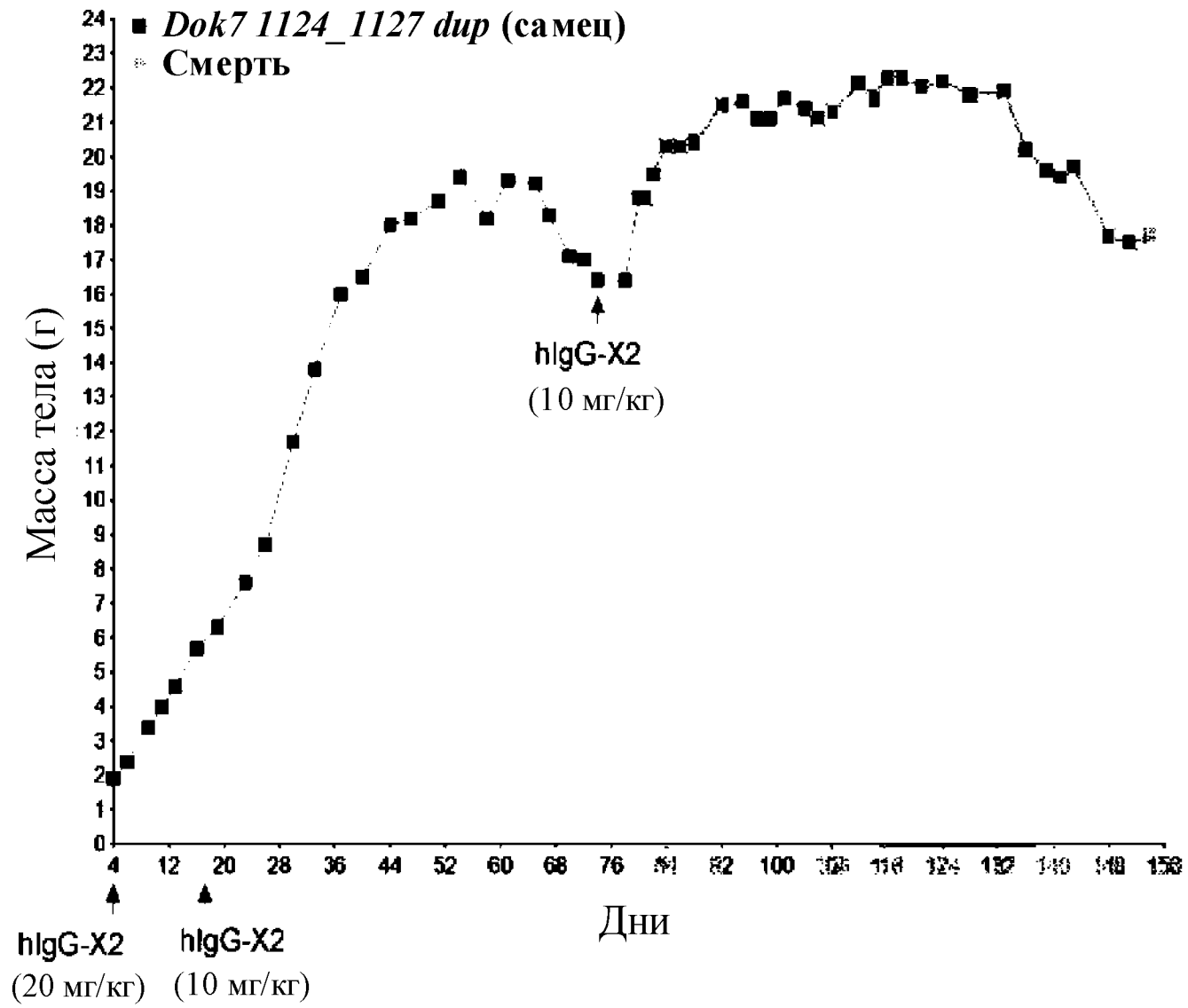
Dok7 1124_1127 dup



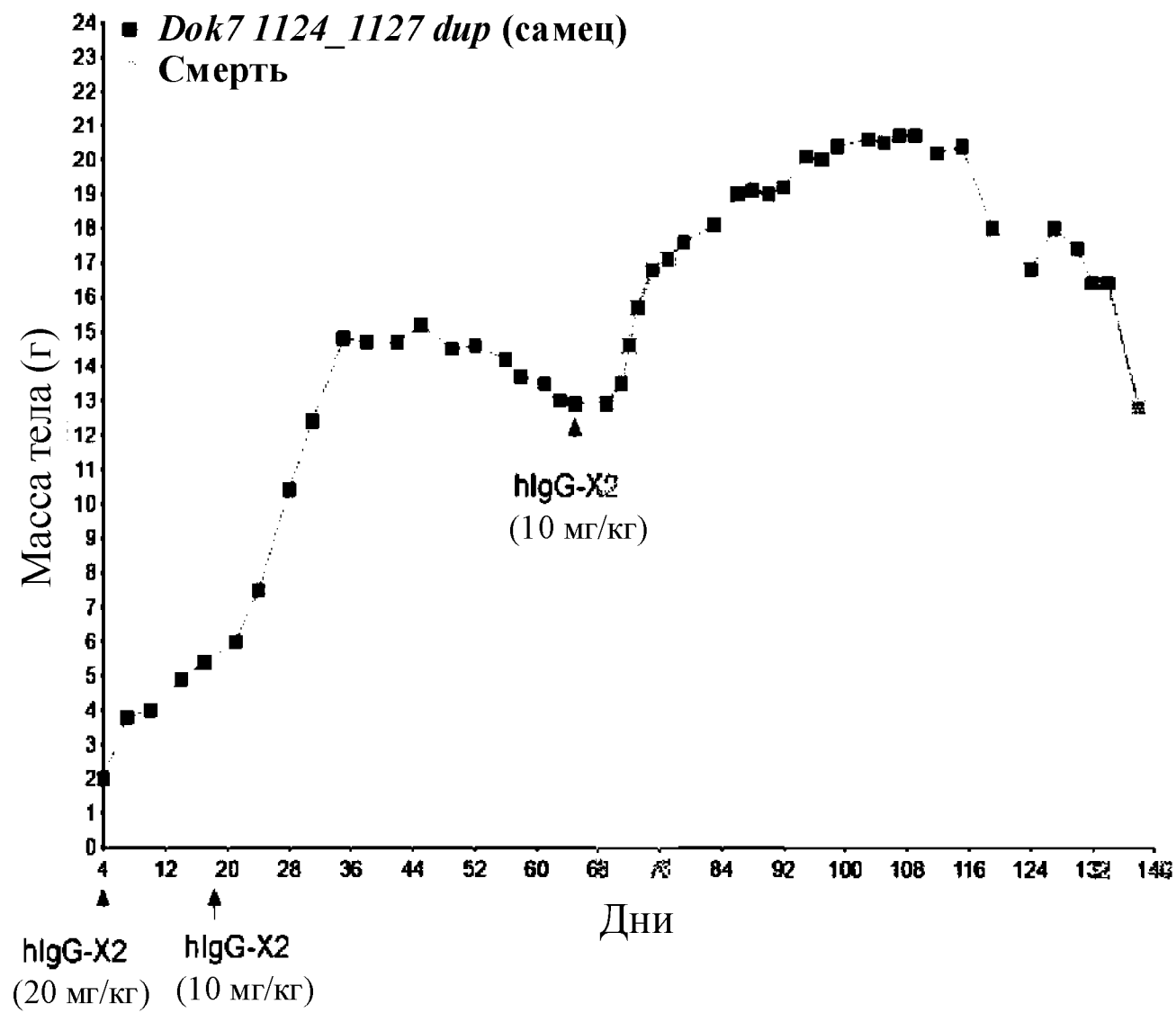
Фигура 39В



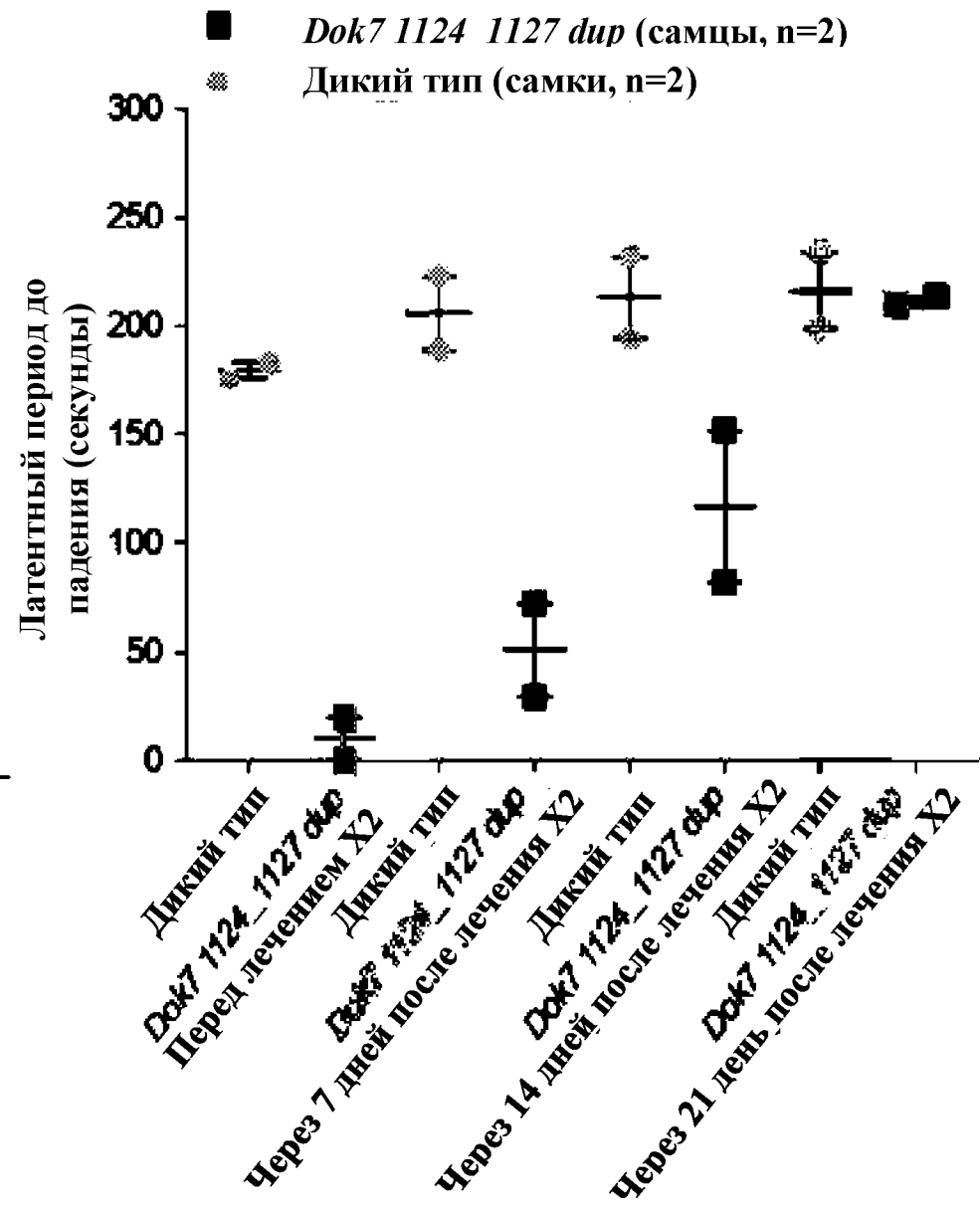
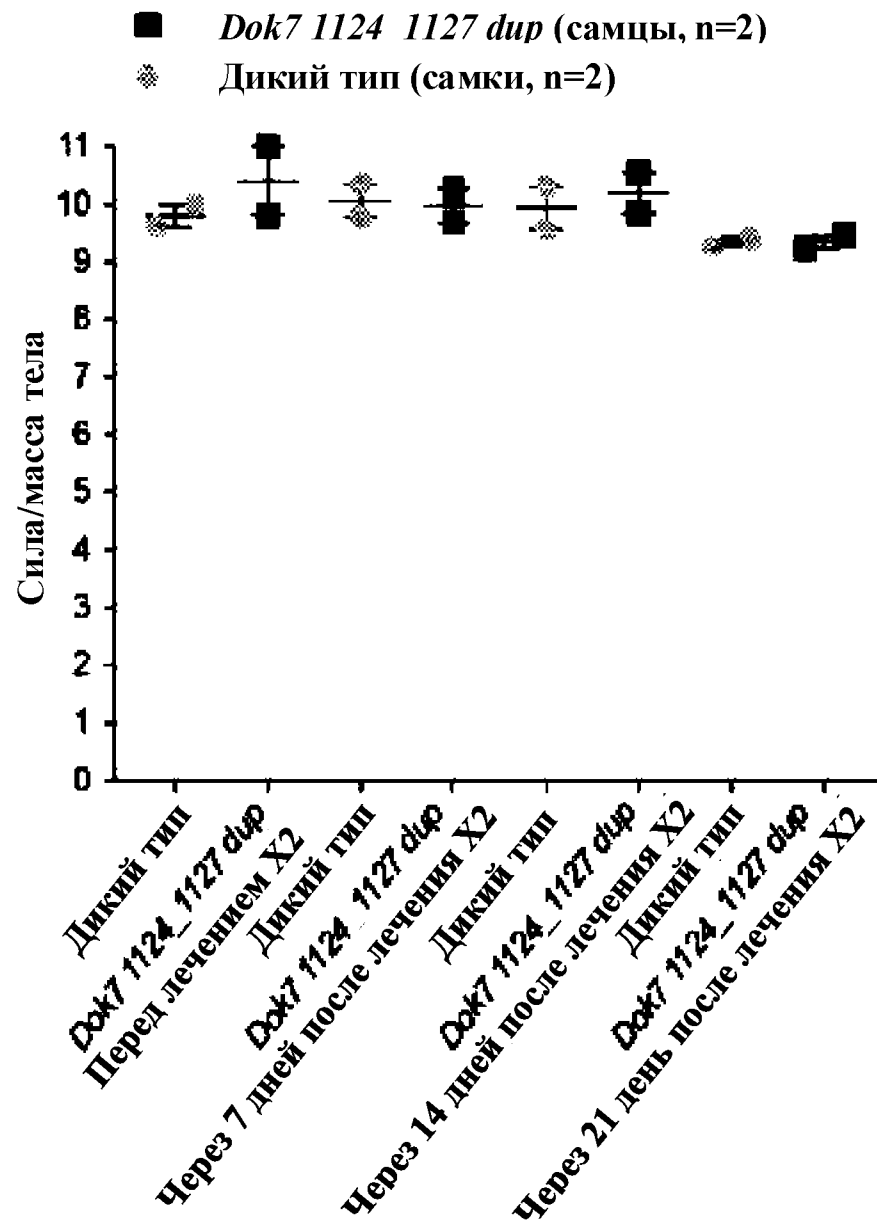
Фигура 40А



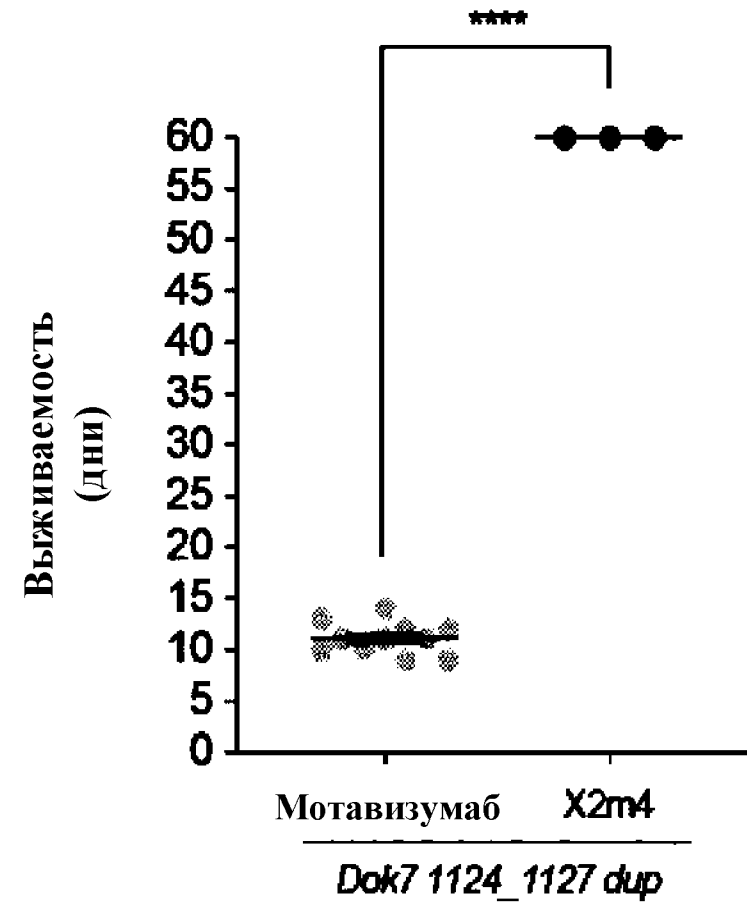
Фигура 40А (продолжение)



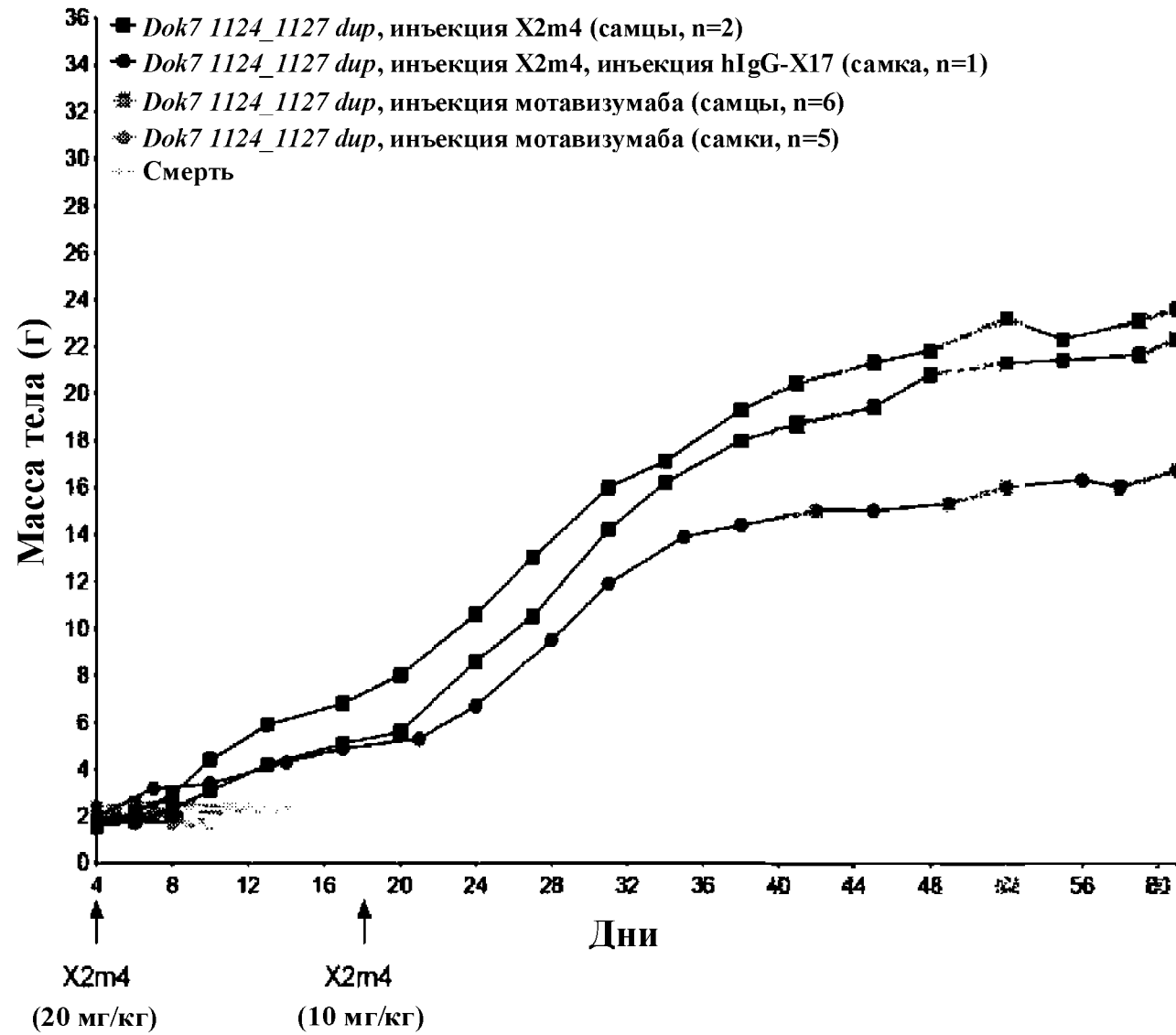
Фигура 40В



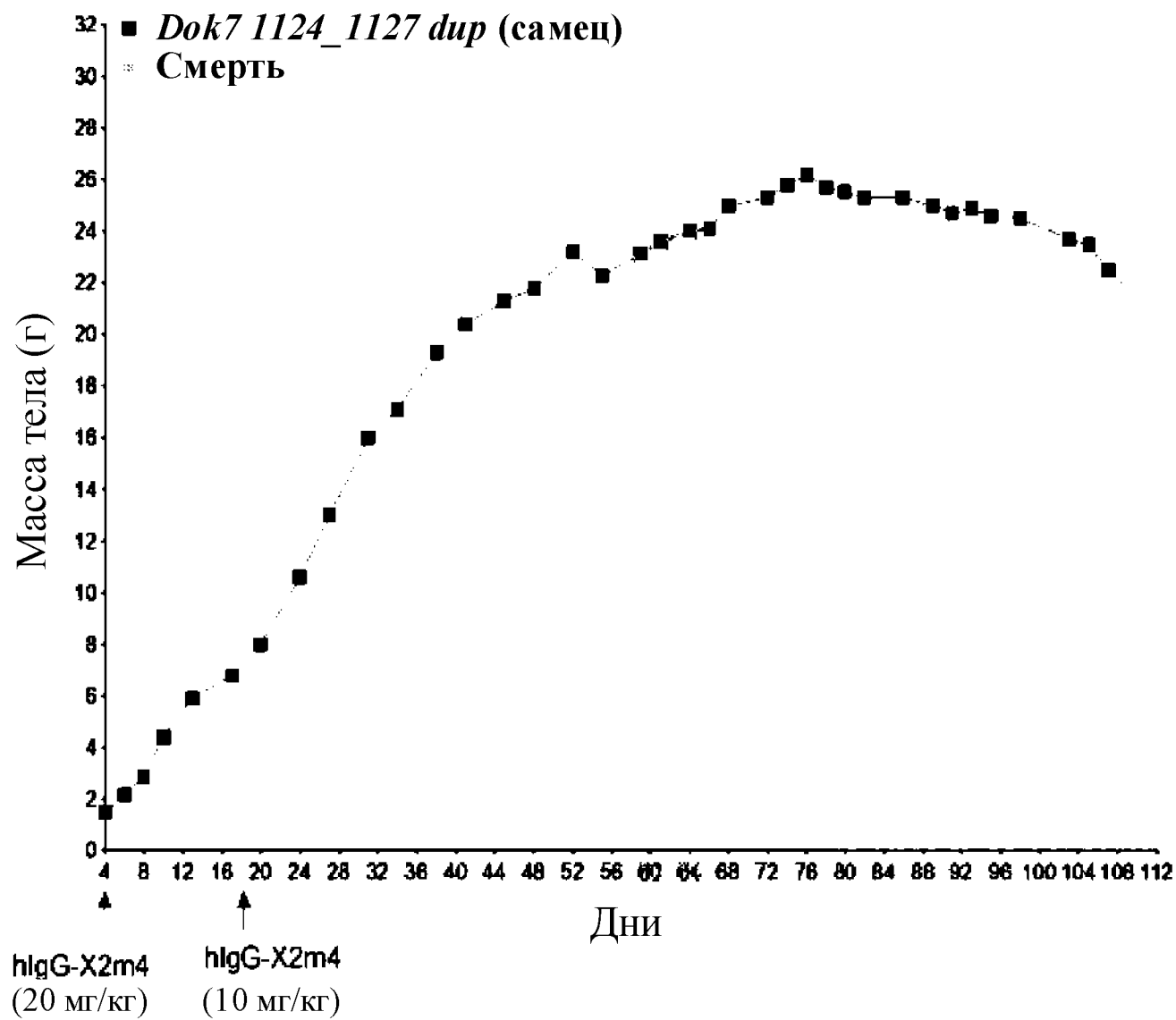
Фигура 41А



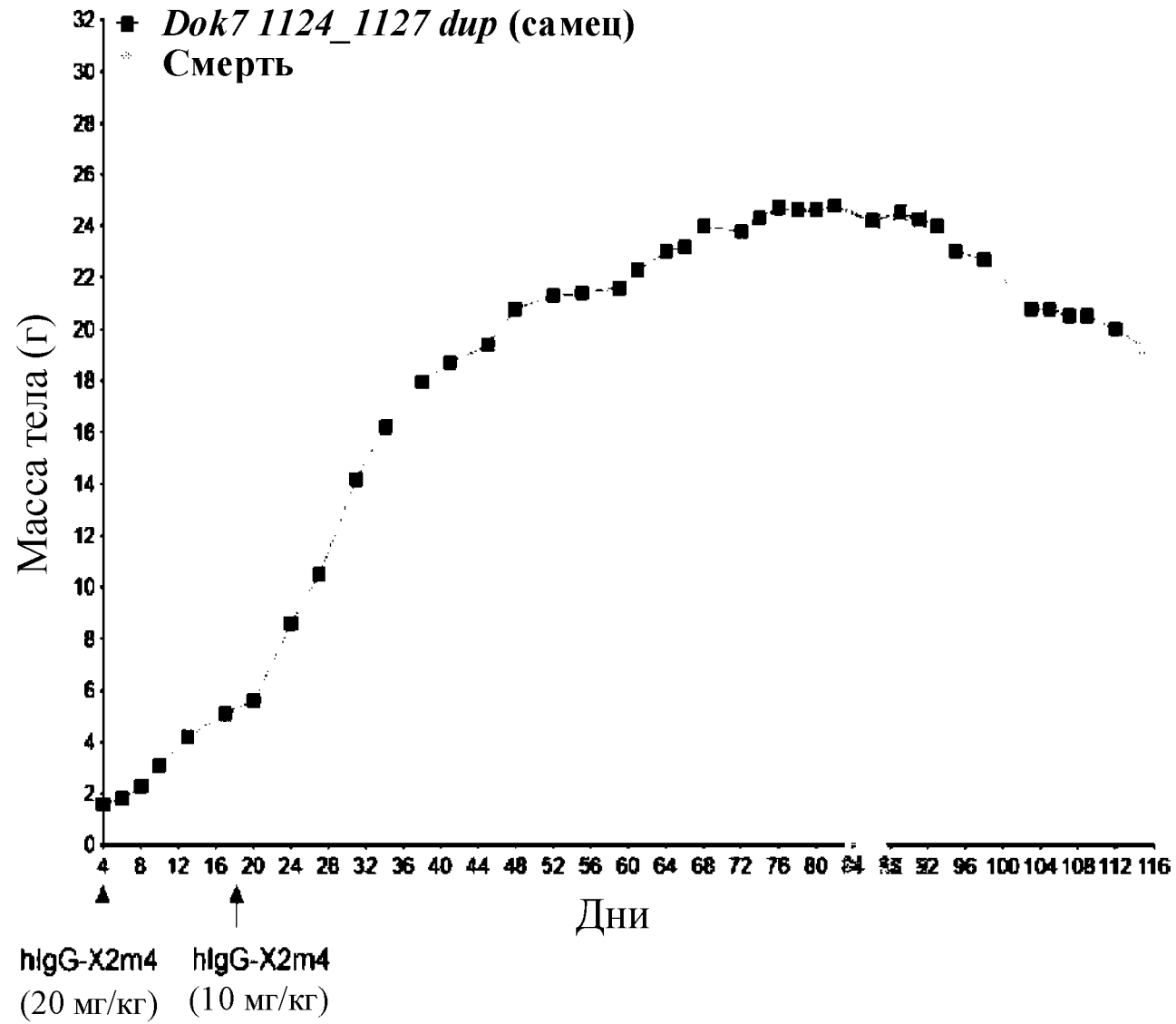
Фигура 41В



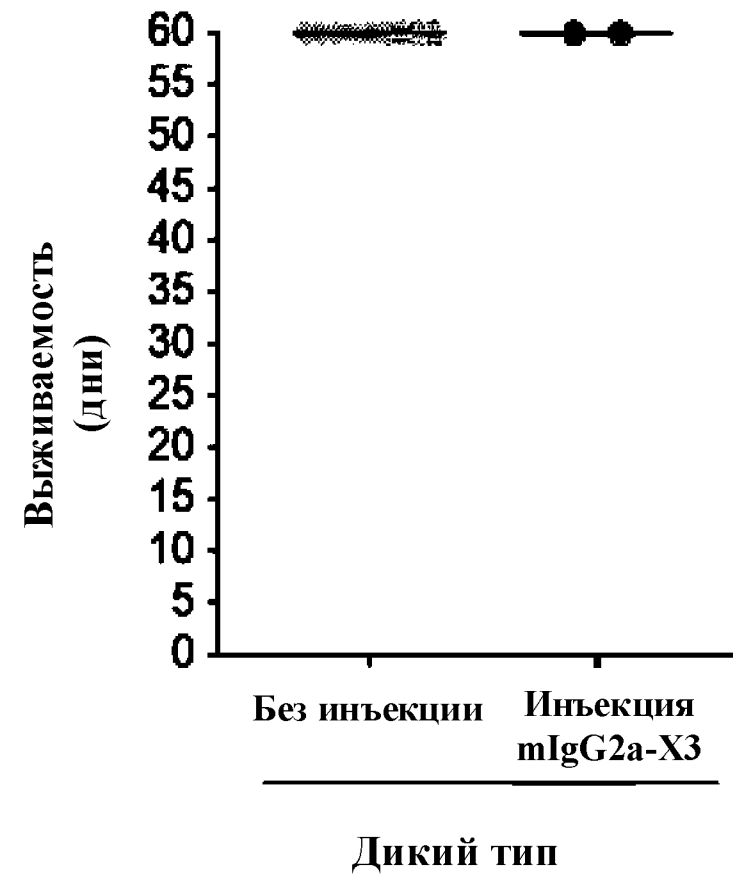
Фигура 42



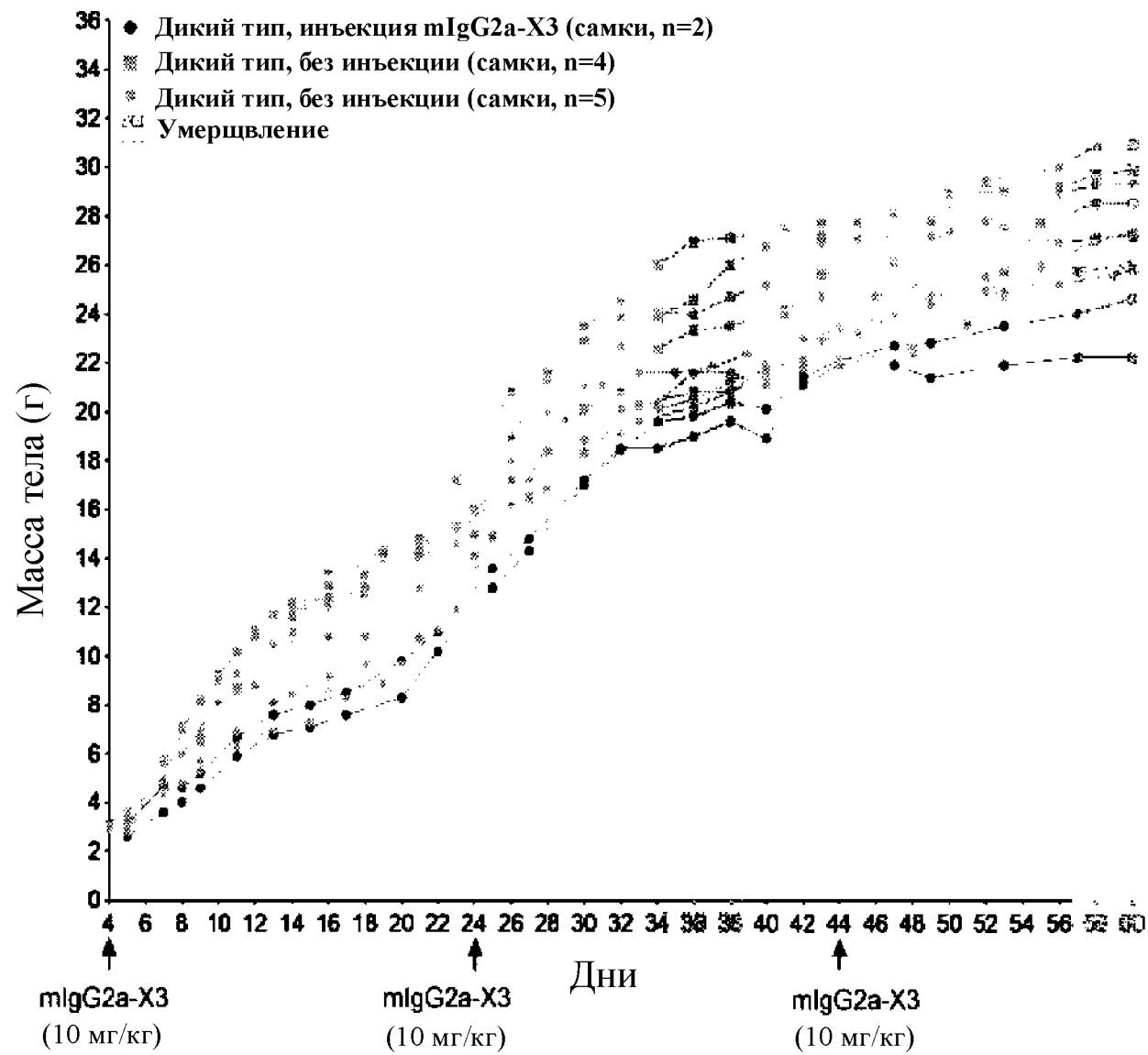
Фигура 42 (продолжение)



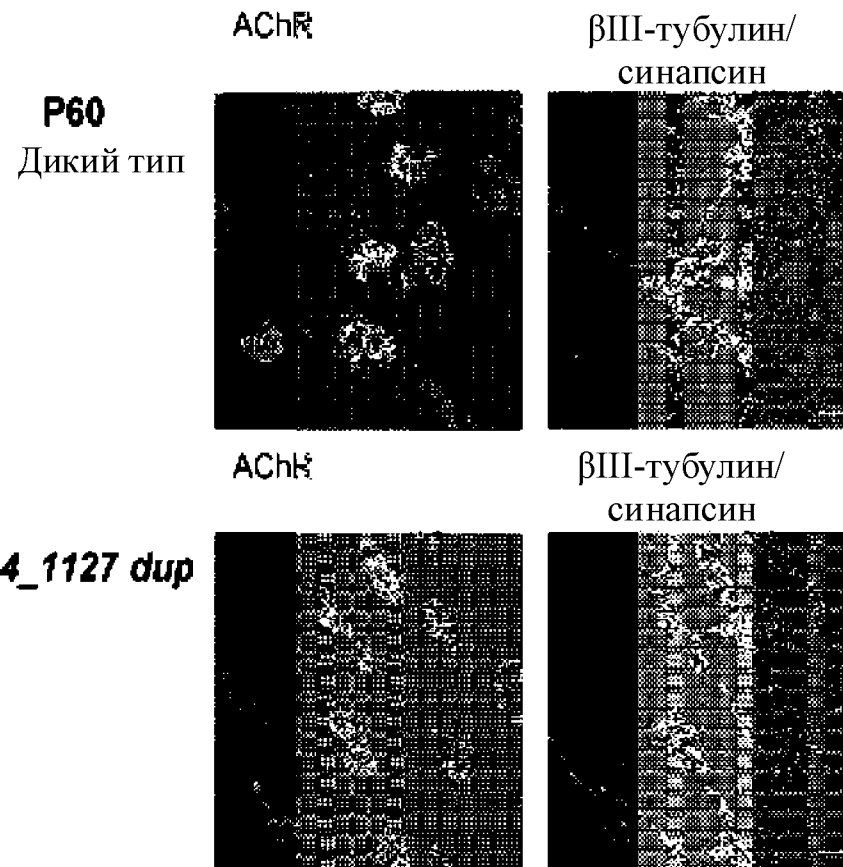
Фигура 43А



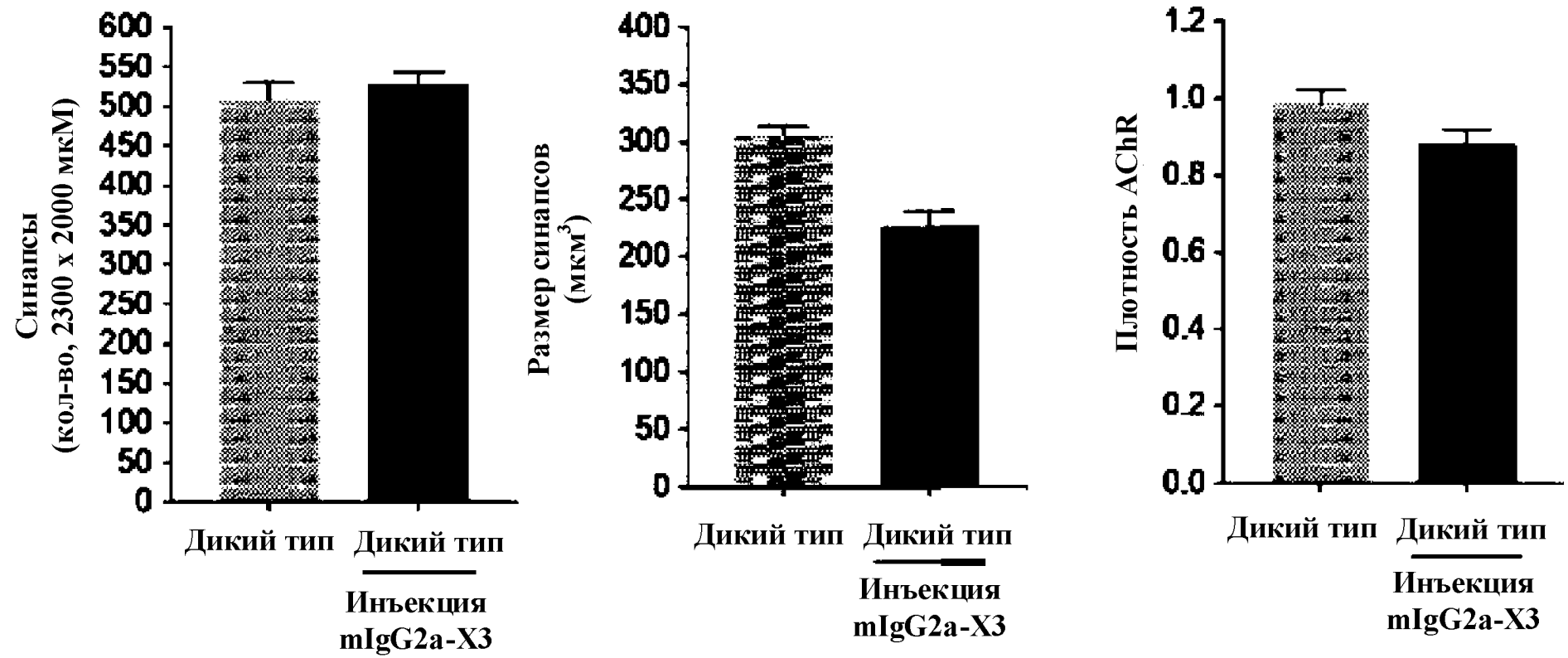
Фигура 43В



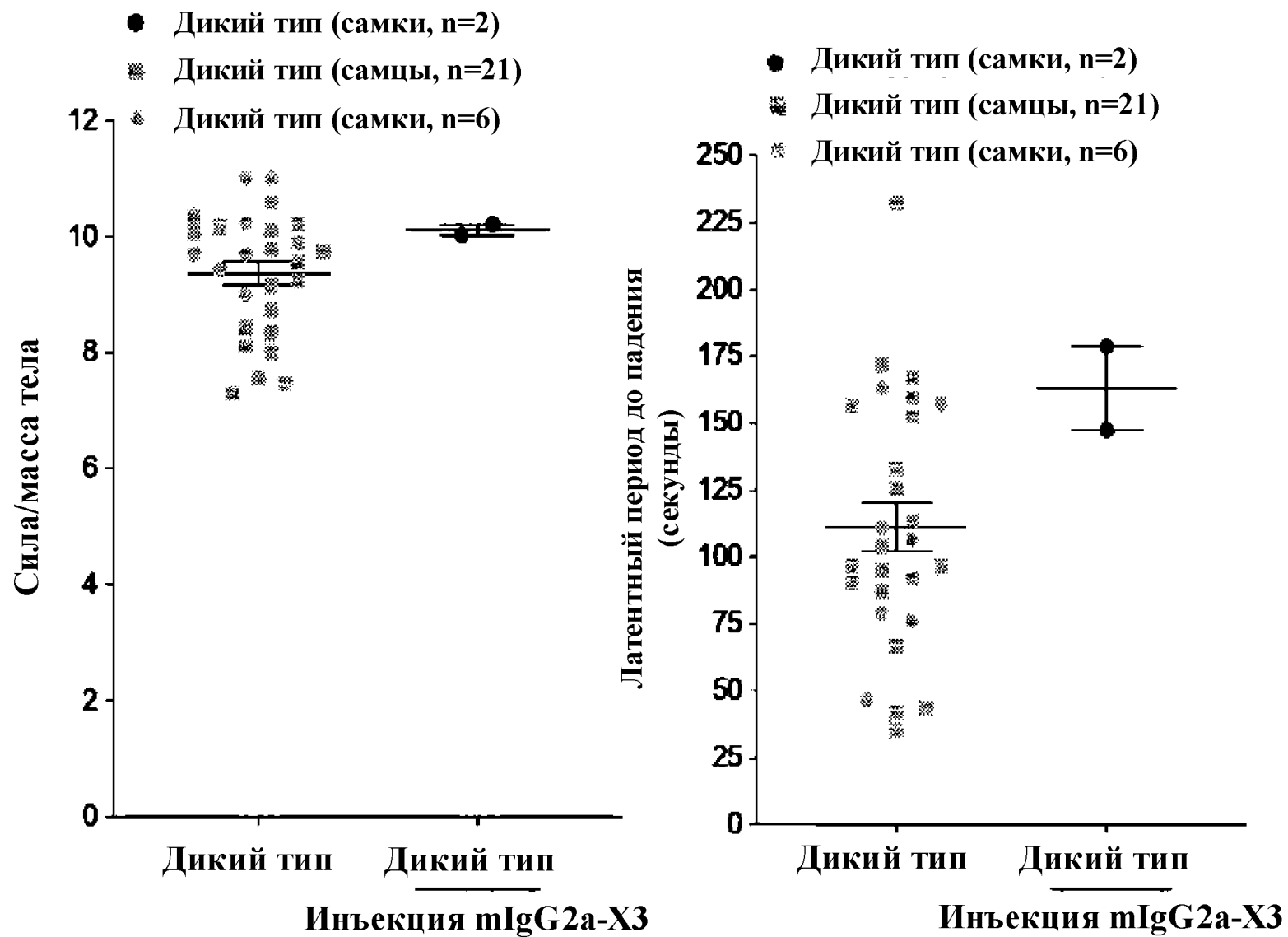
Фигура 44



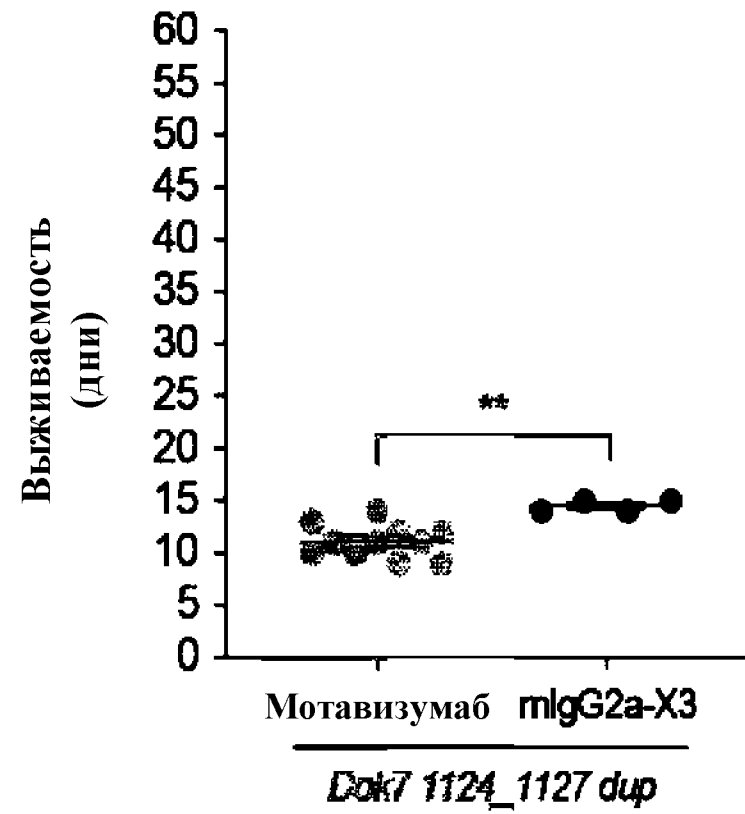
Фигура 44 (продолжение)



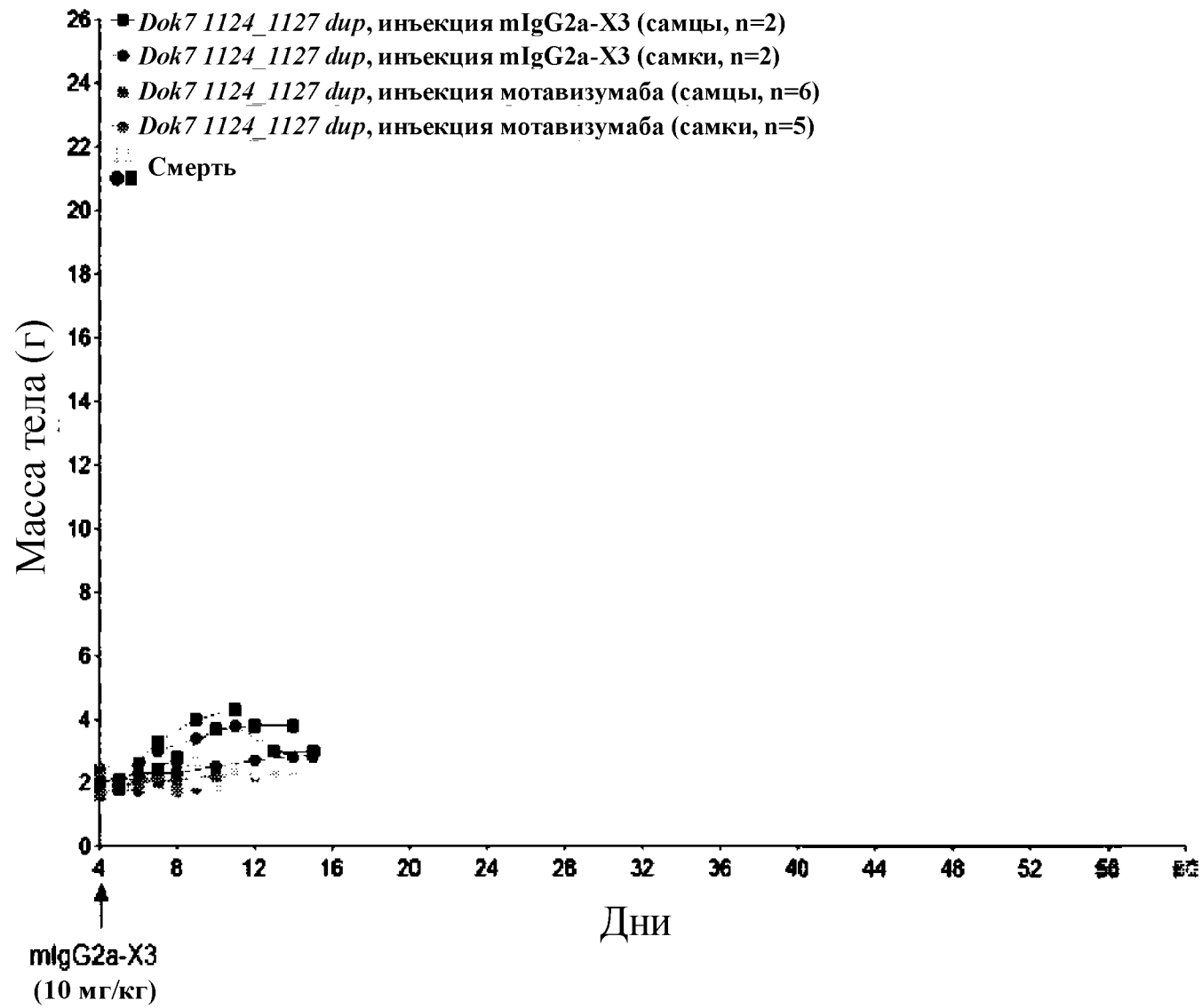
Фигура 45



Фигура 46А



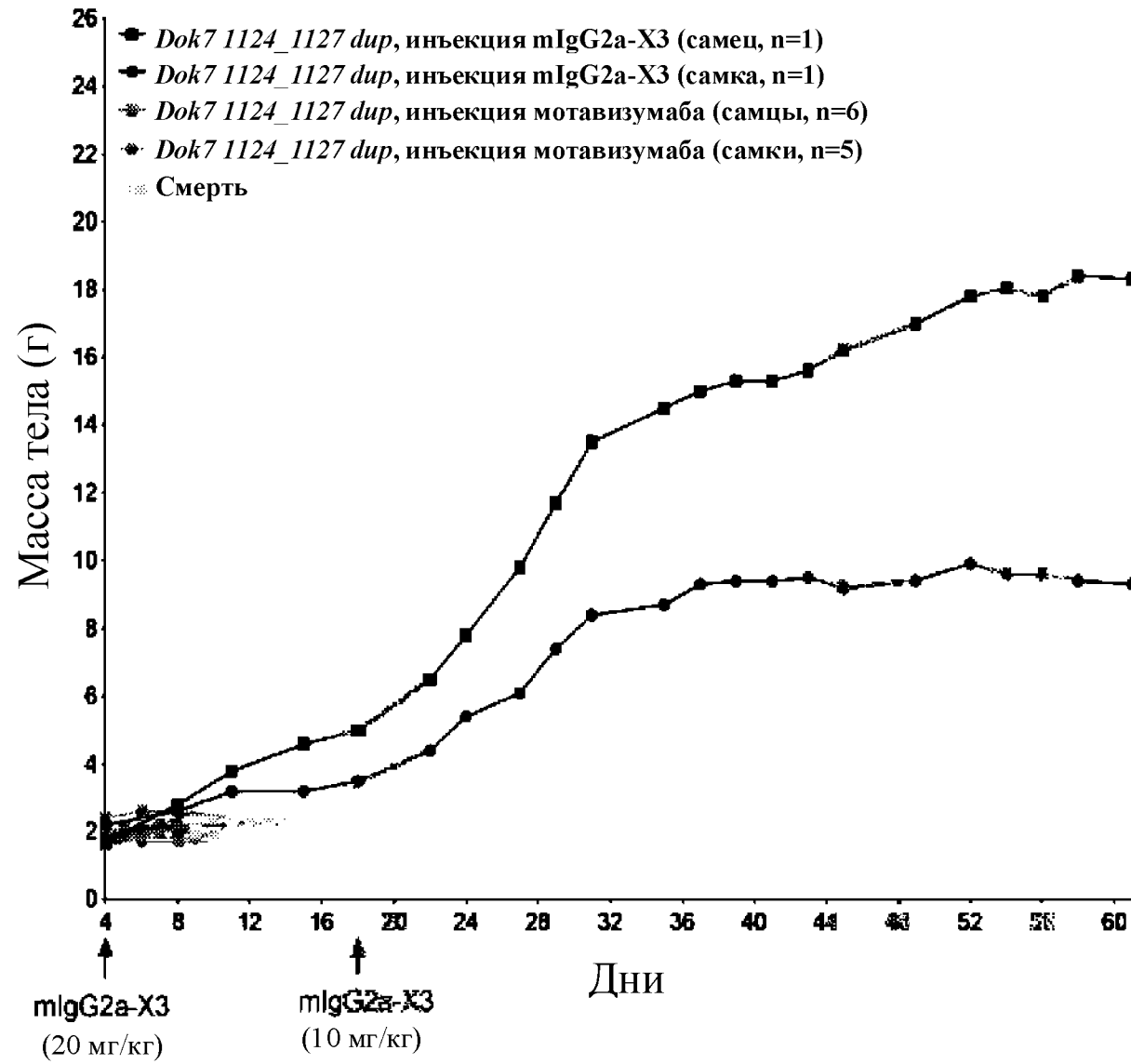
Фигура 46В



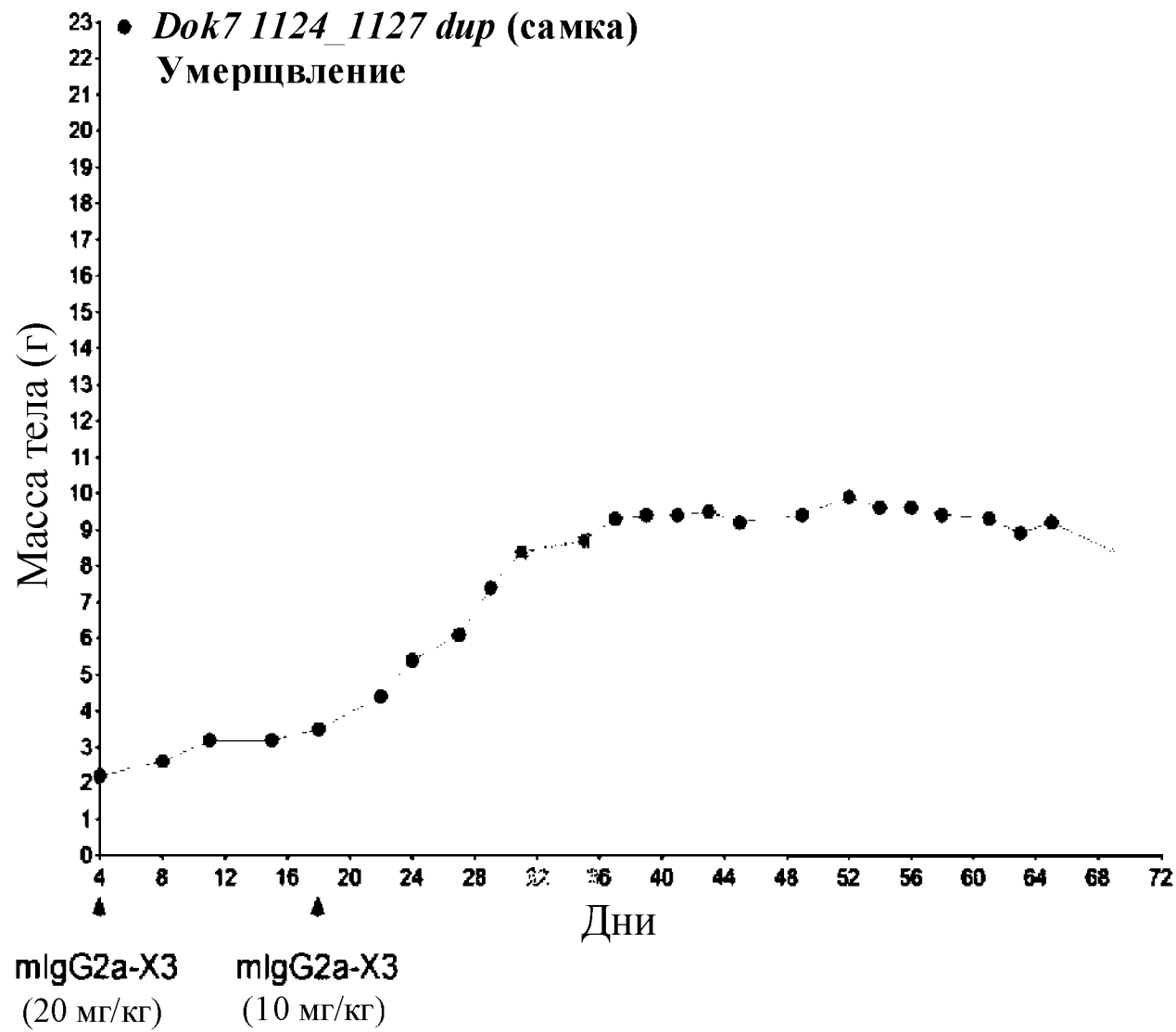
Мотавизумаб mIgG2a-X3



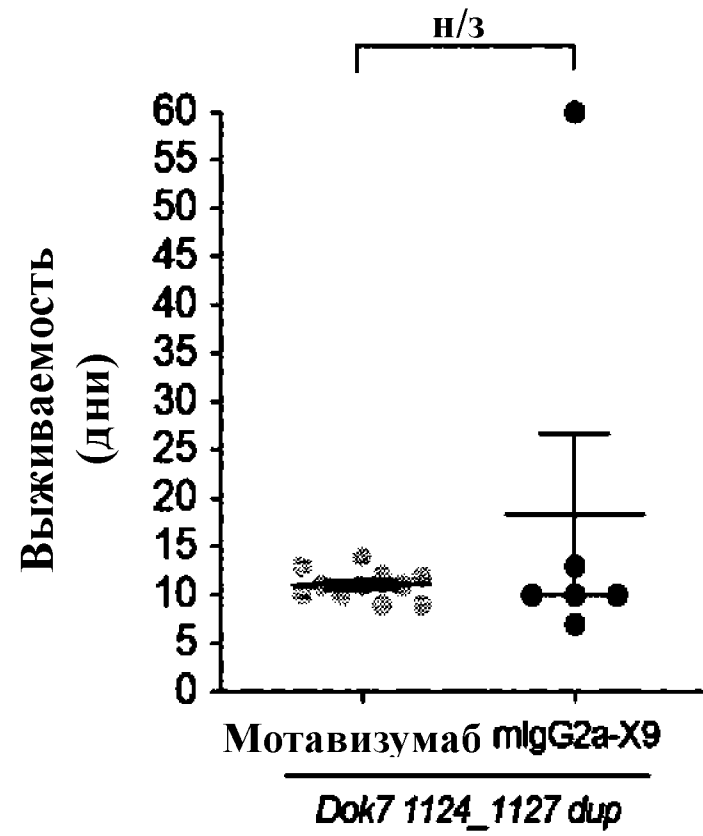
Фигура 47В



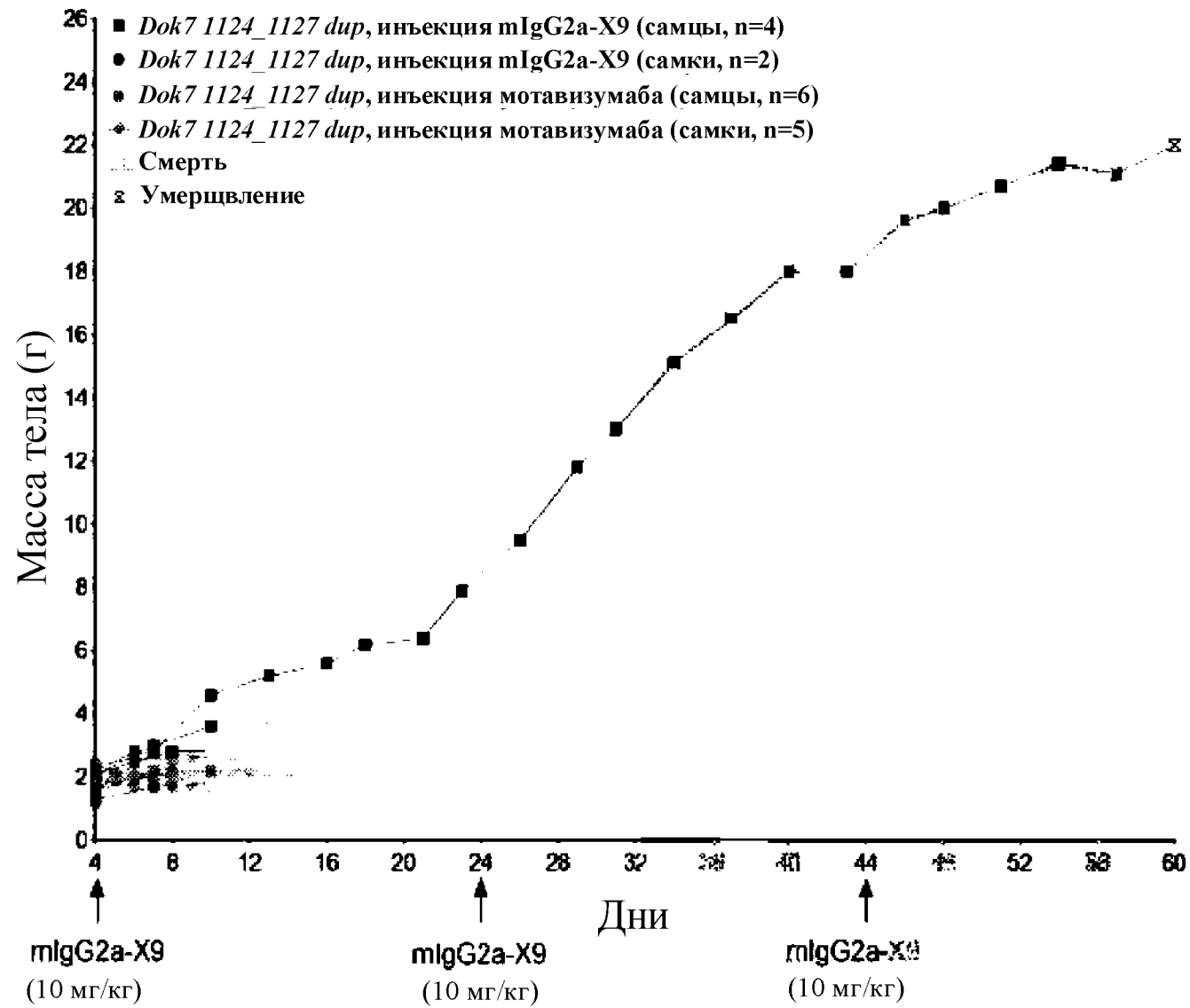
Фигура 48



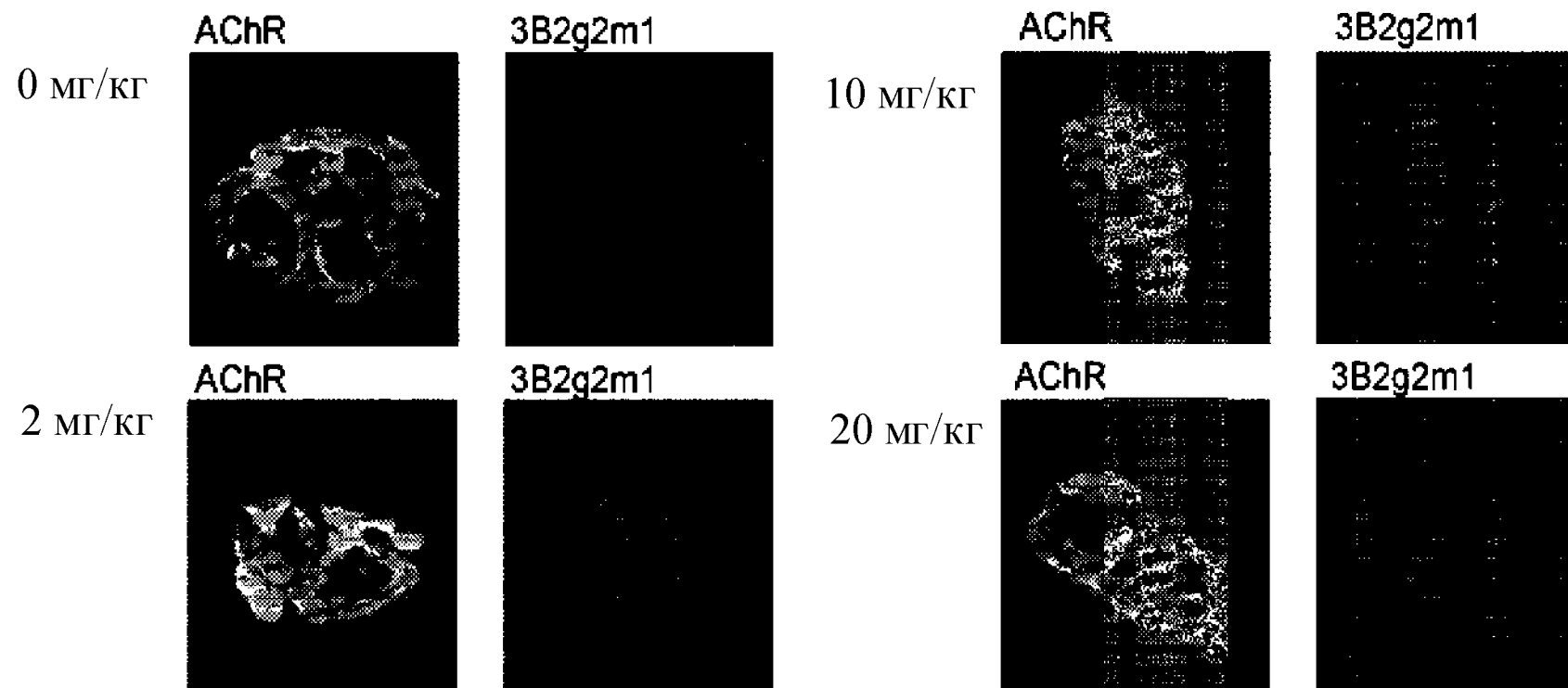
Фигура 49А



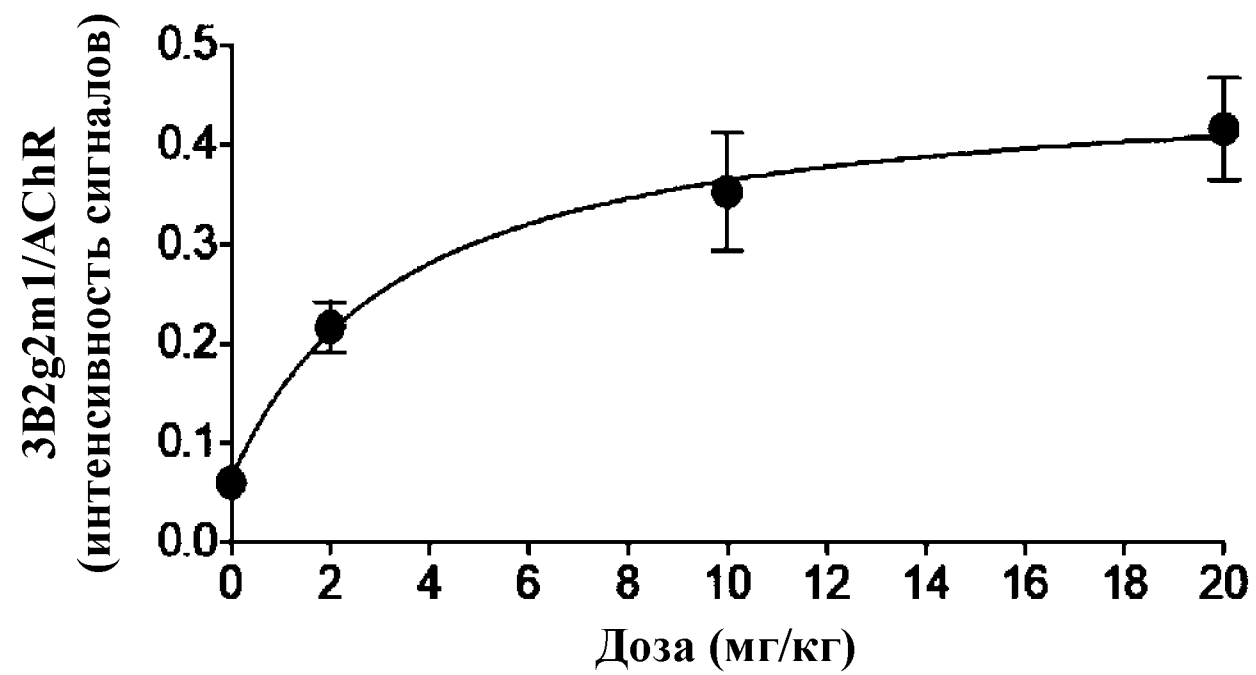
Фигура 49В



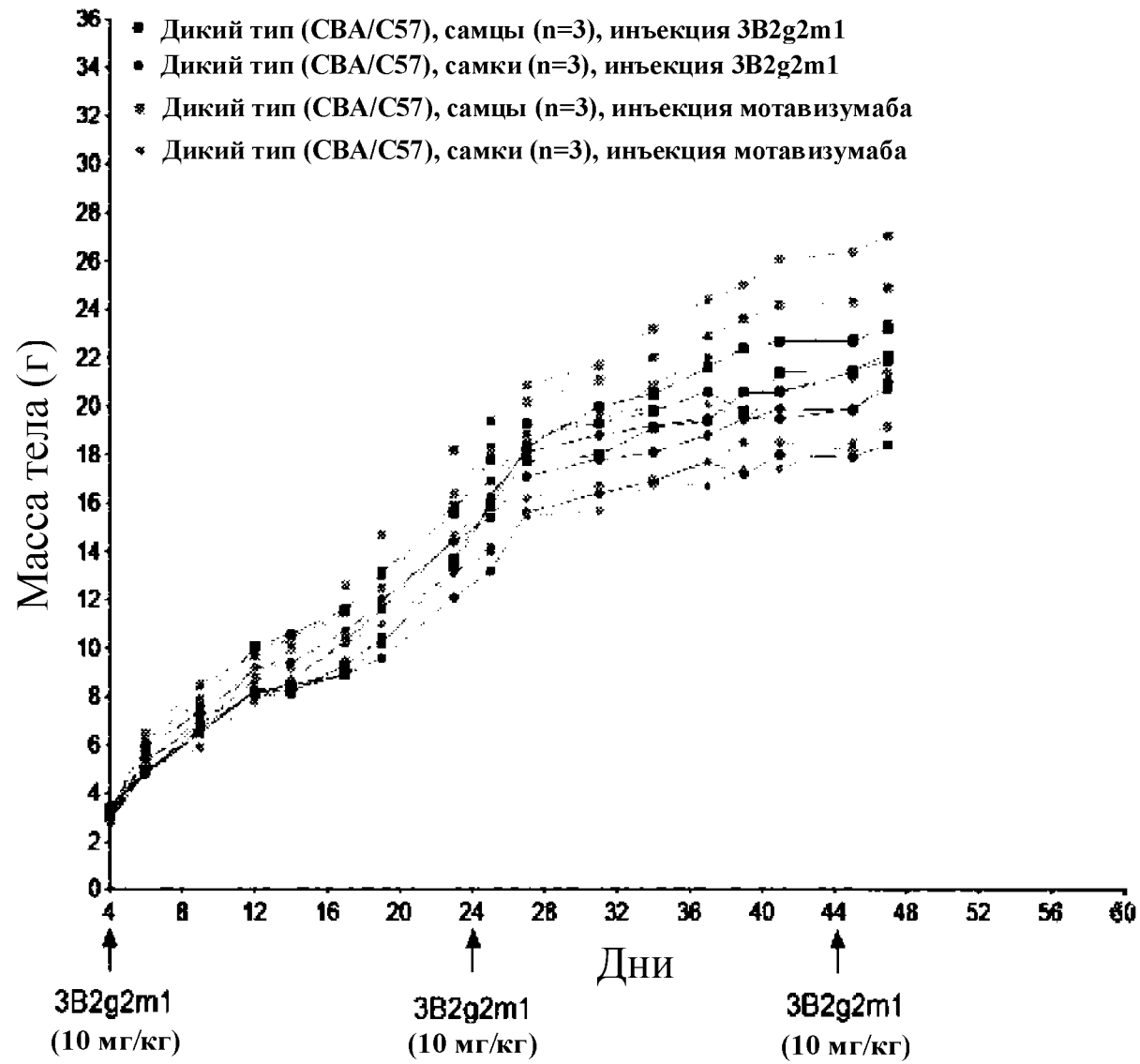
Фигура 50



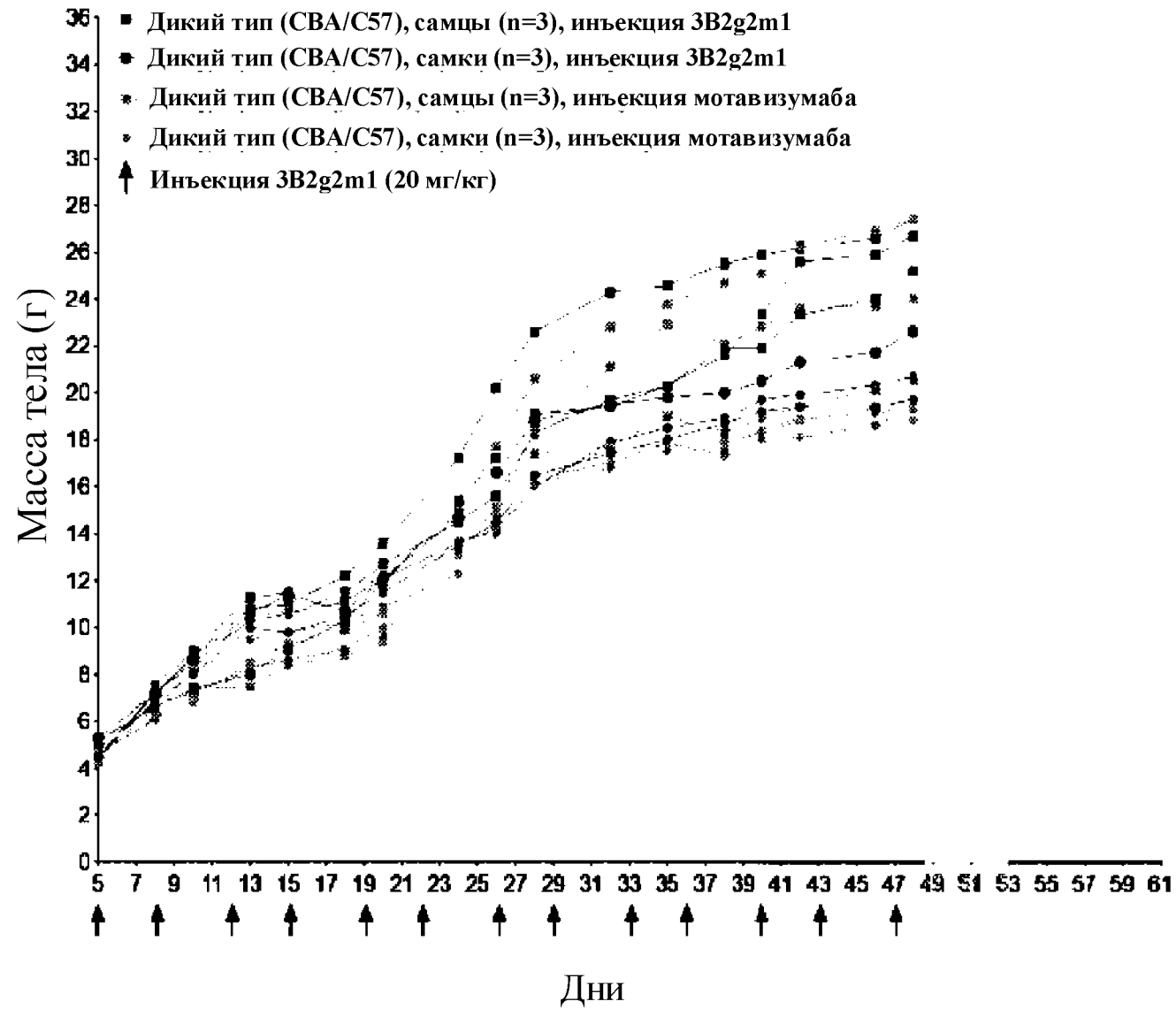
Фигура 50 (продолжение)



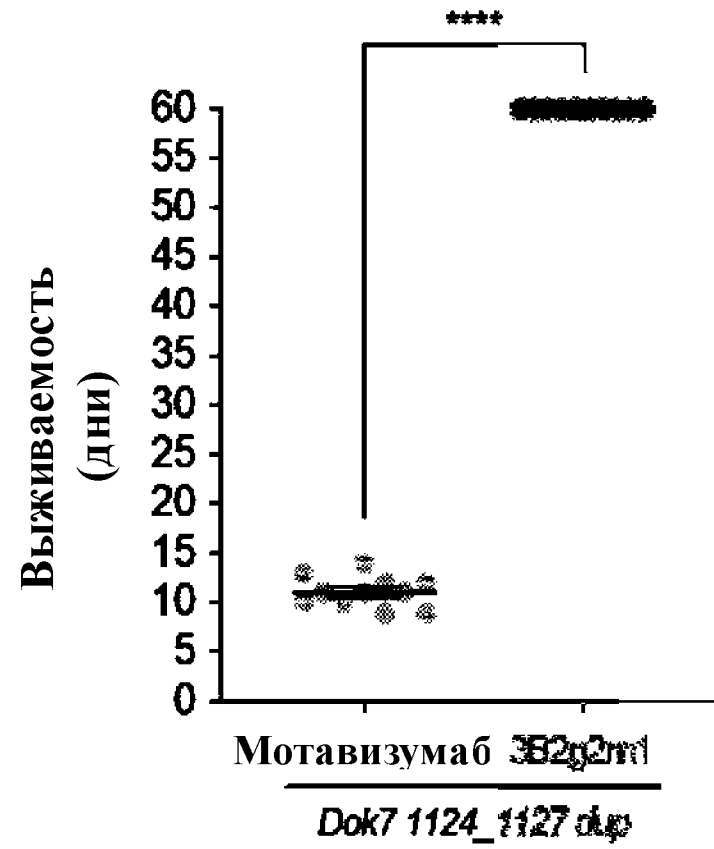
Фигура 51А



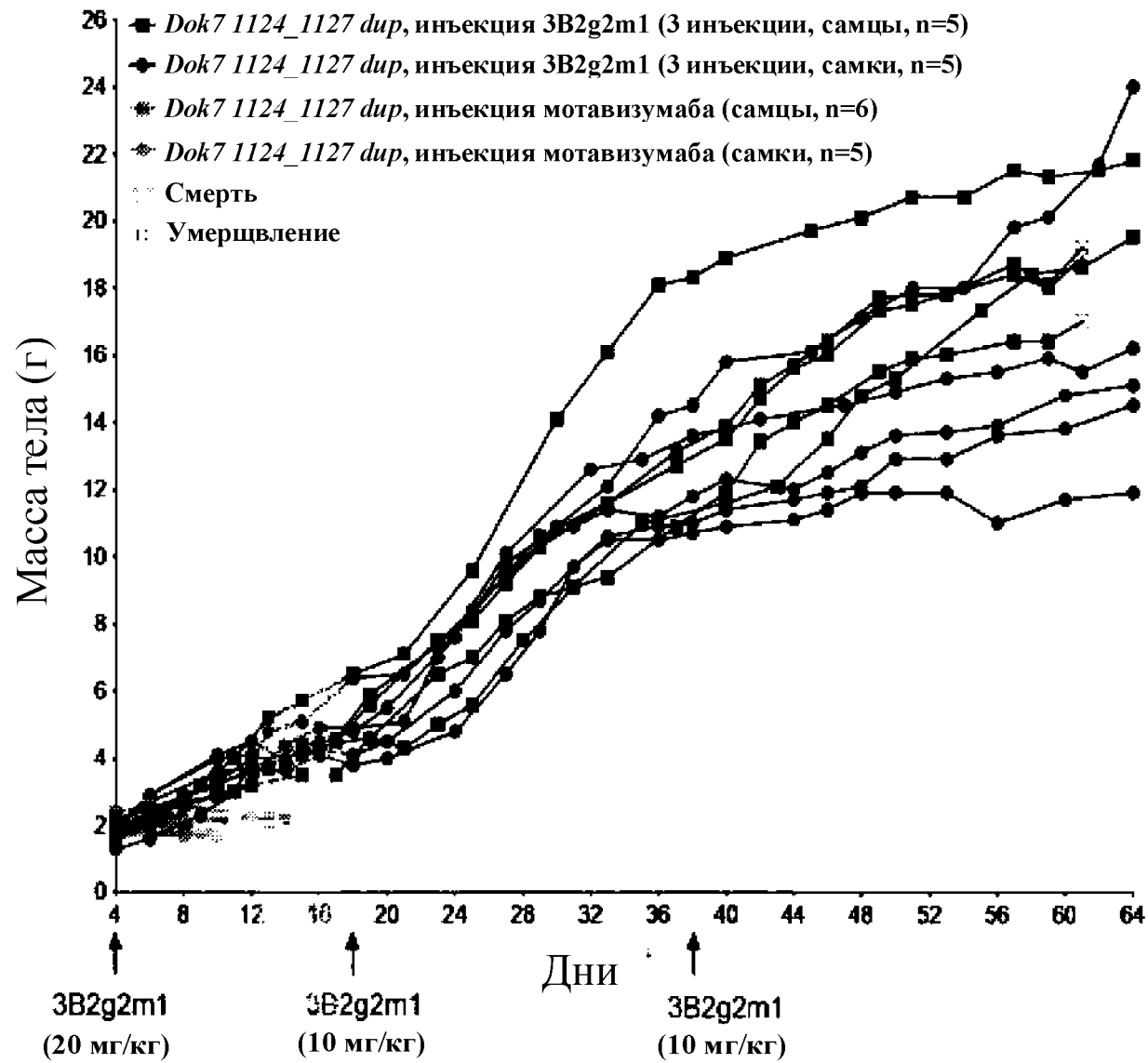
Фигура 51В



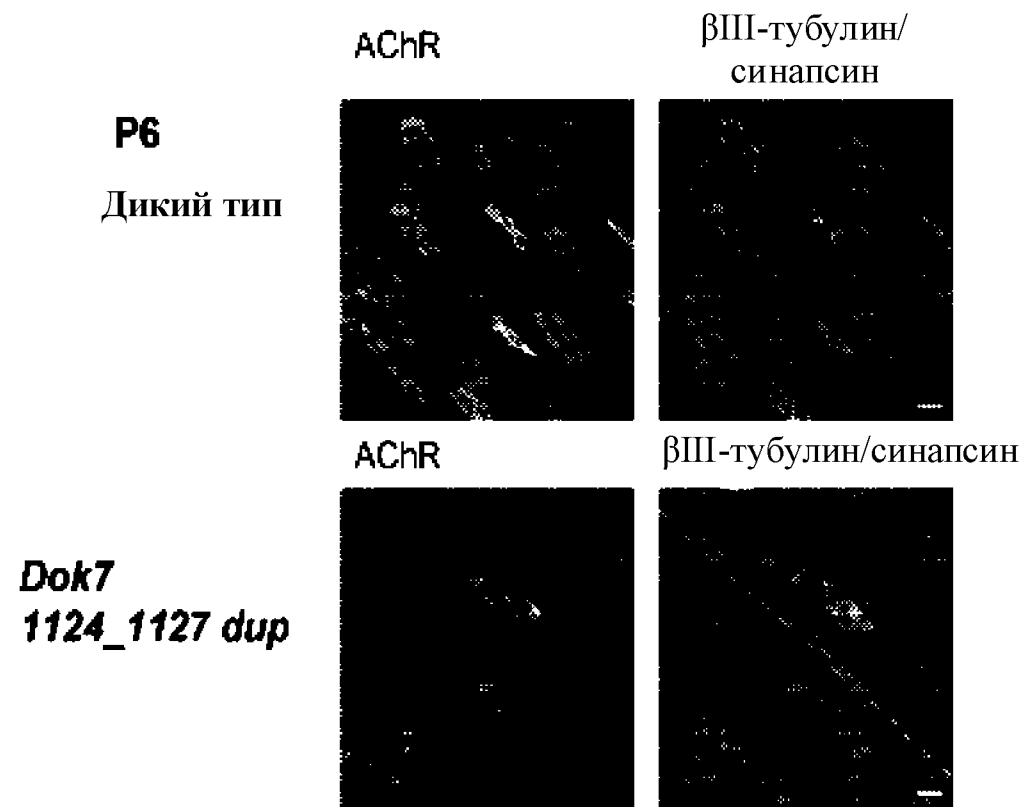
Фигура 52А



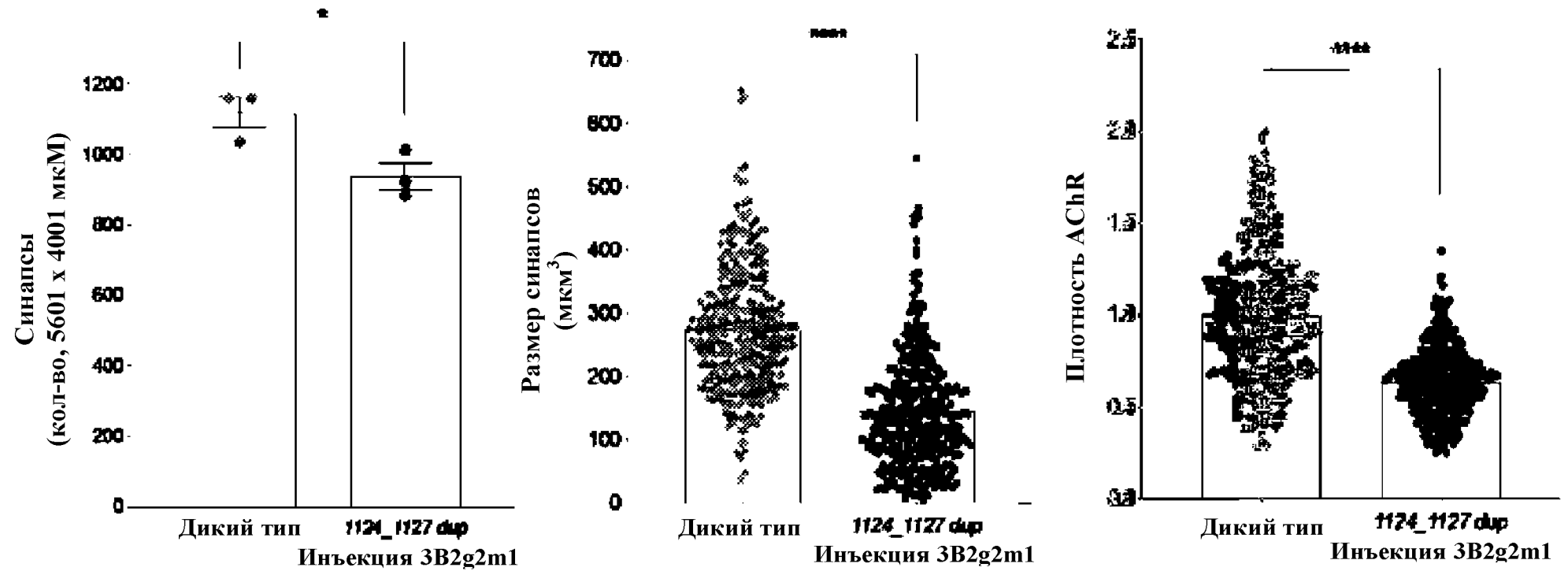
Фигура 52В



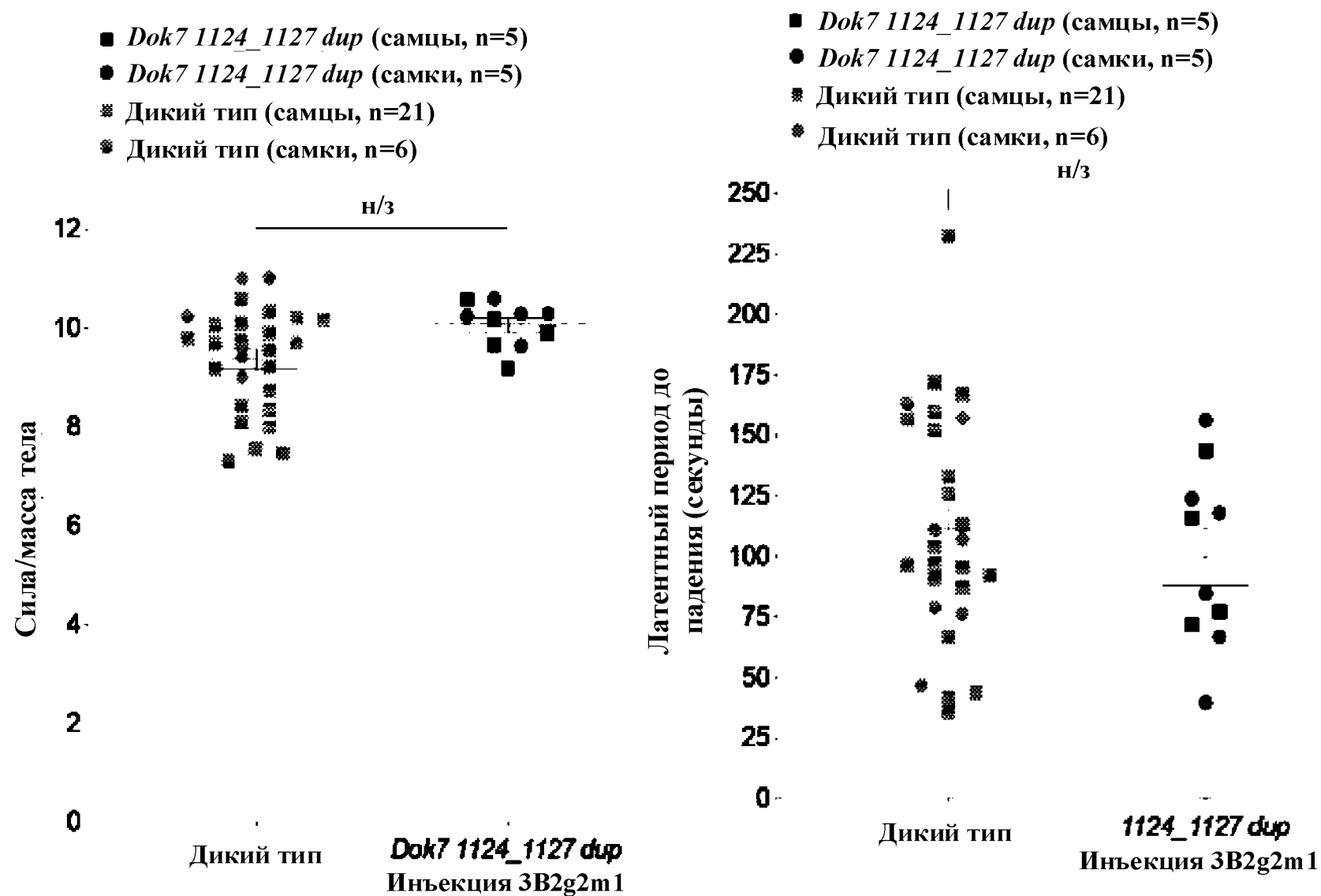
Фигура 53



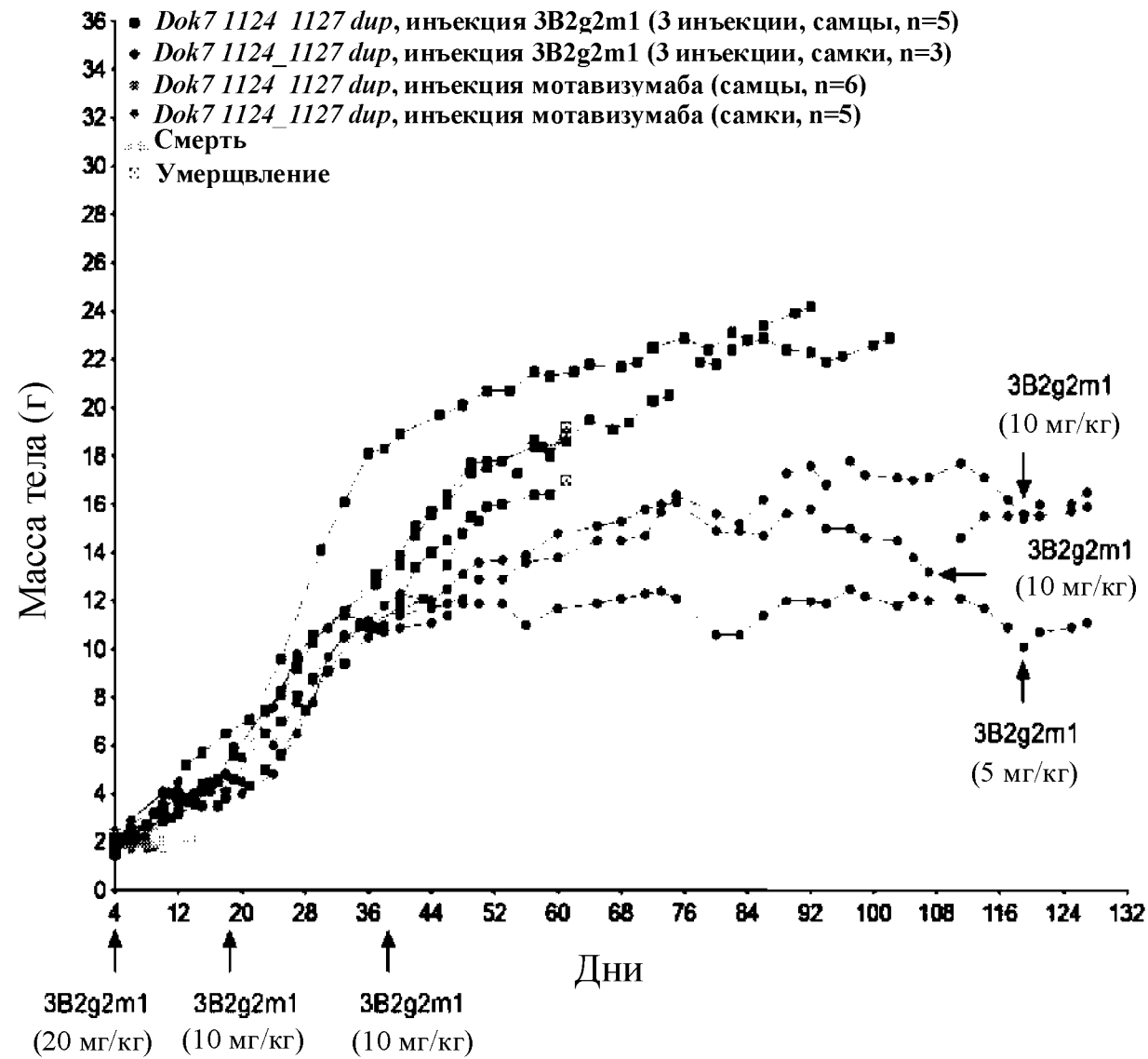
Фигура 53 (продолжение)



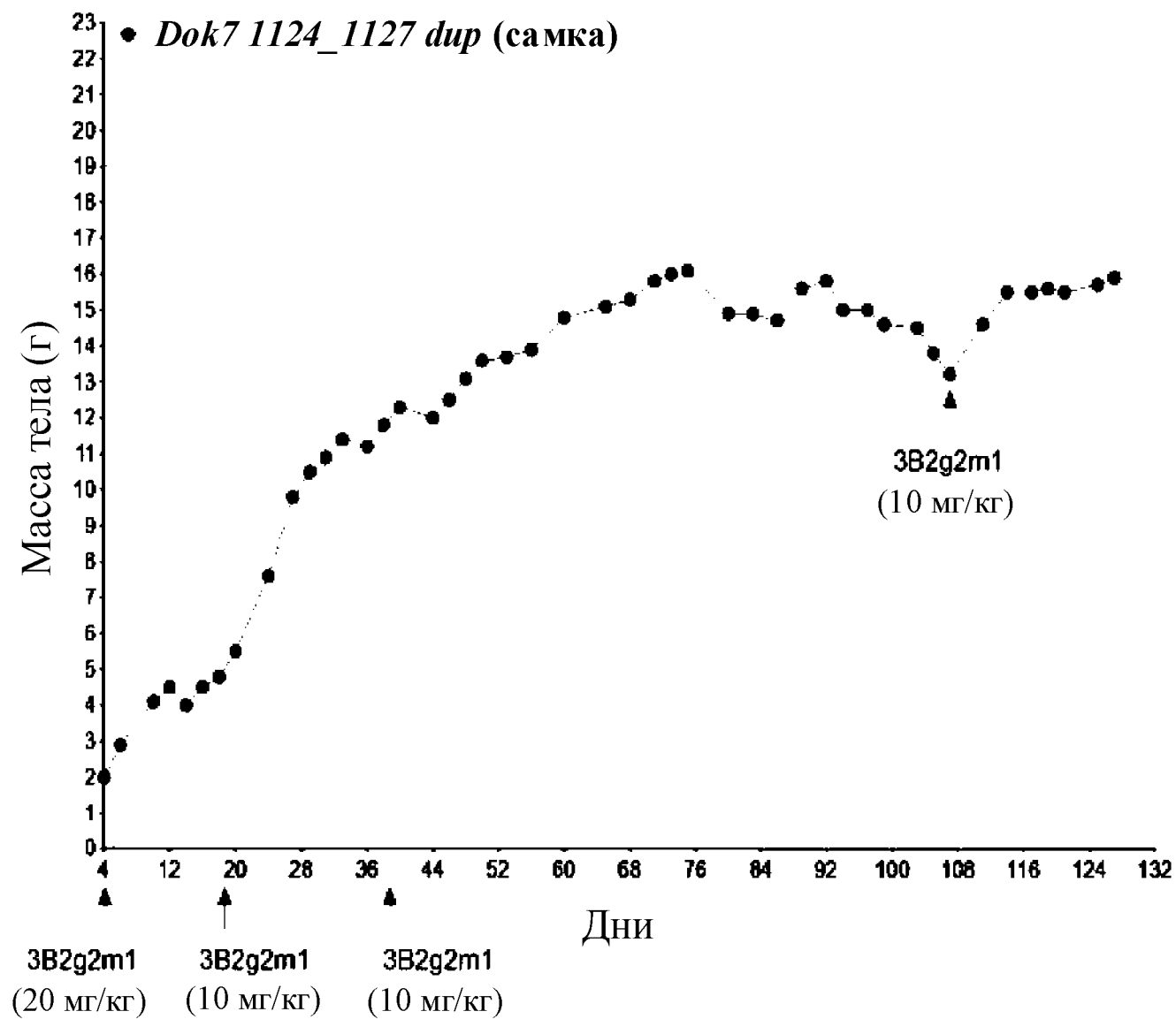
Фигура 54



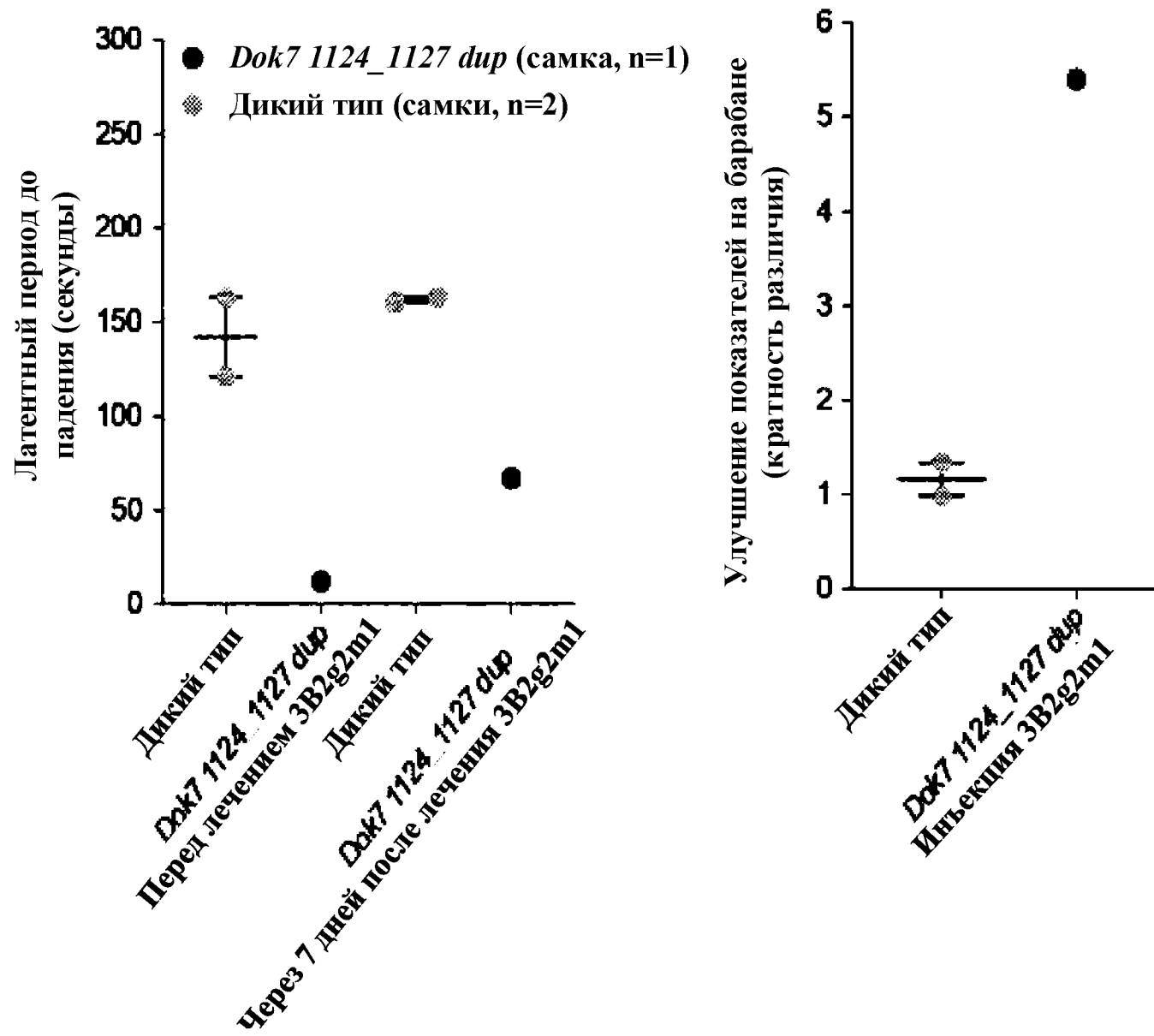
Фигура 55



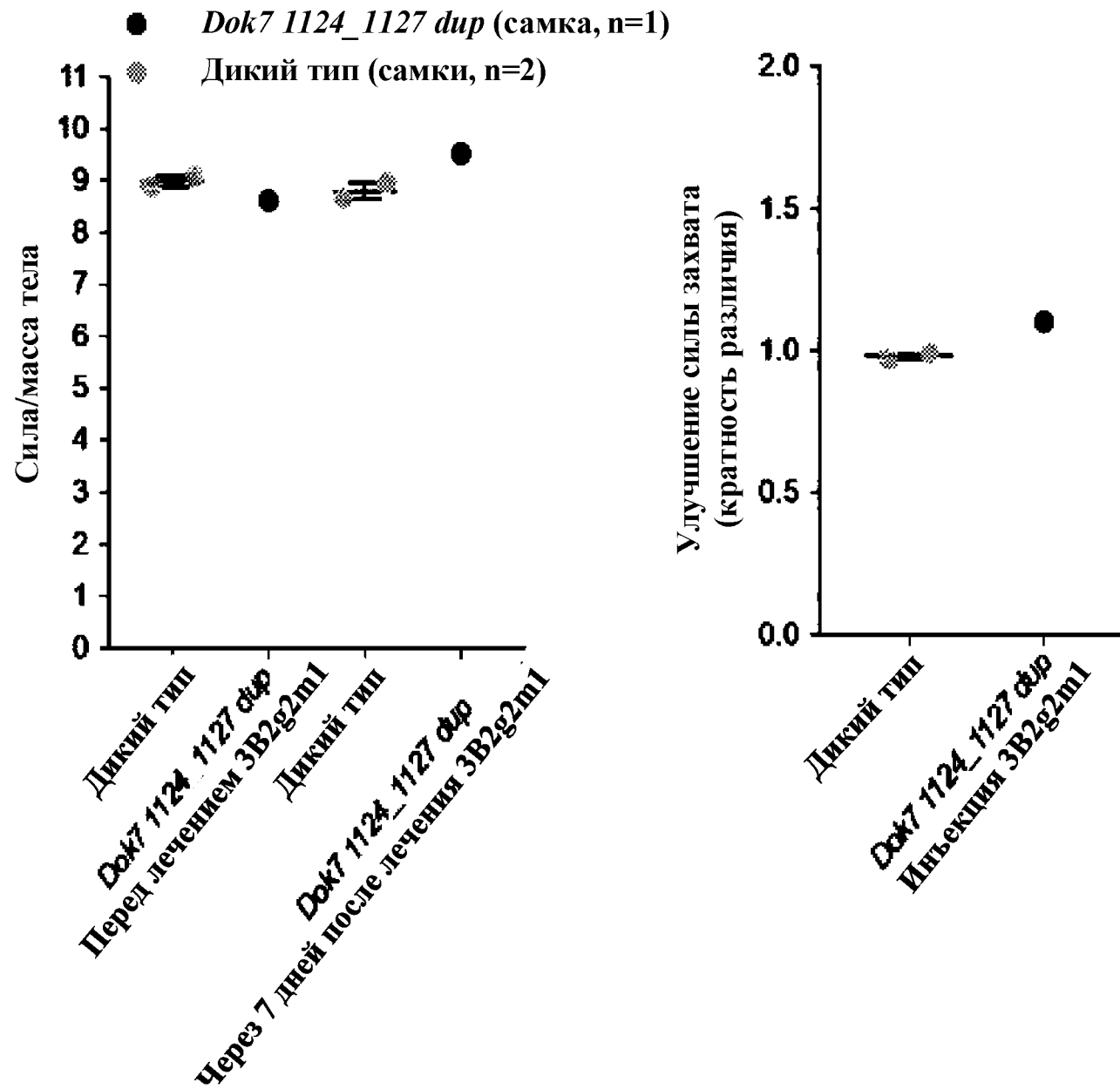
Фигура 56А



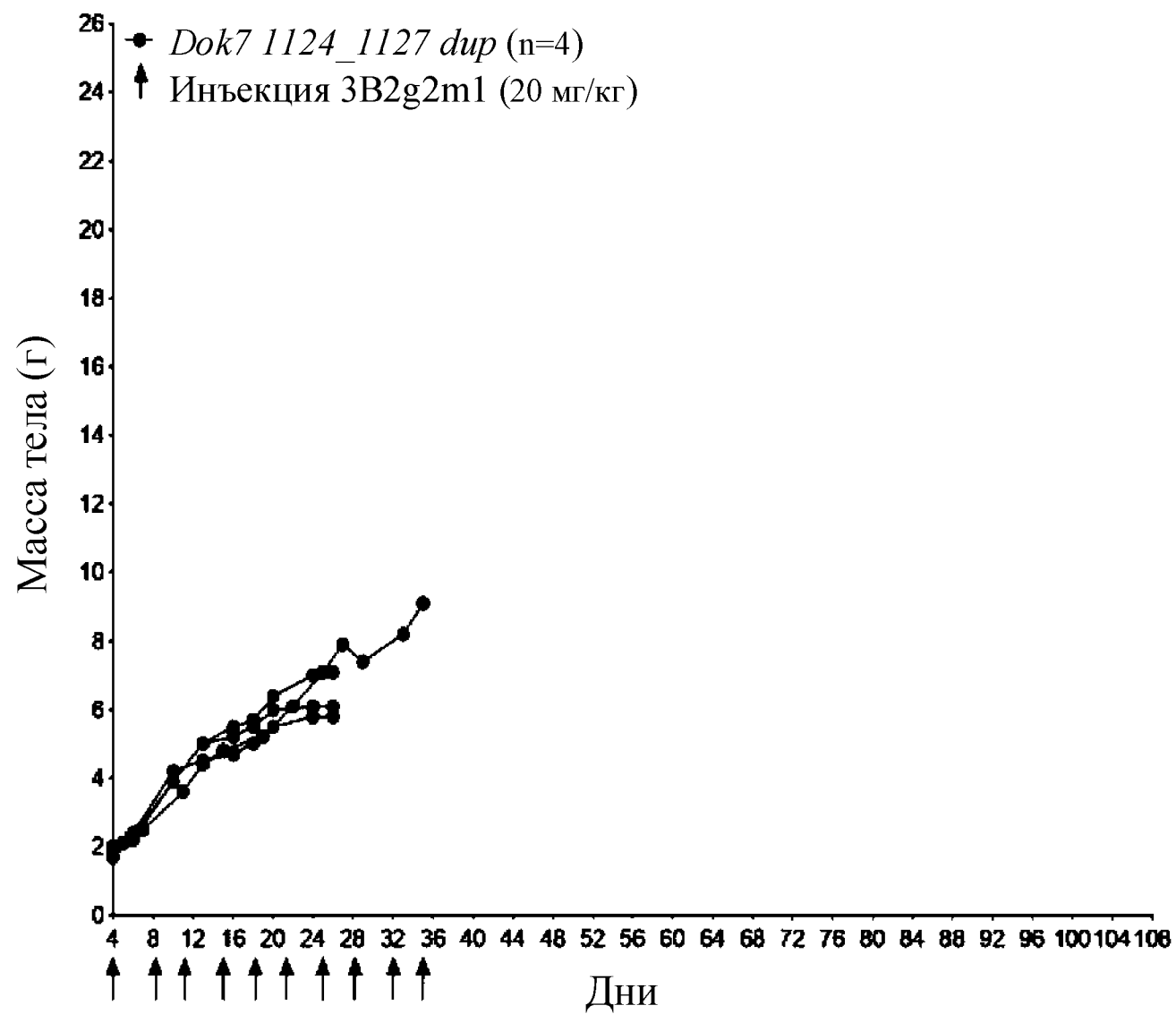
Фигура 56В



Фигура 56С

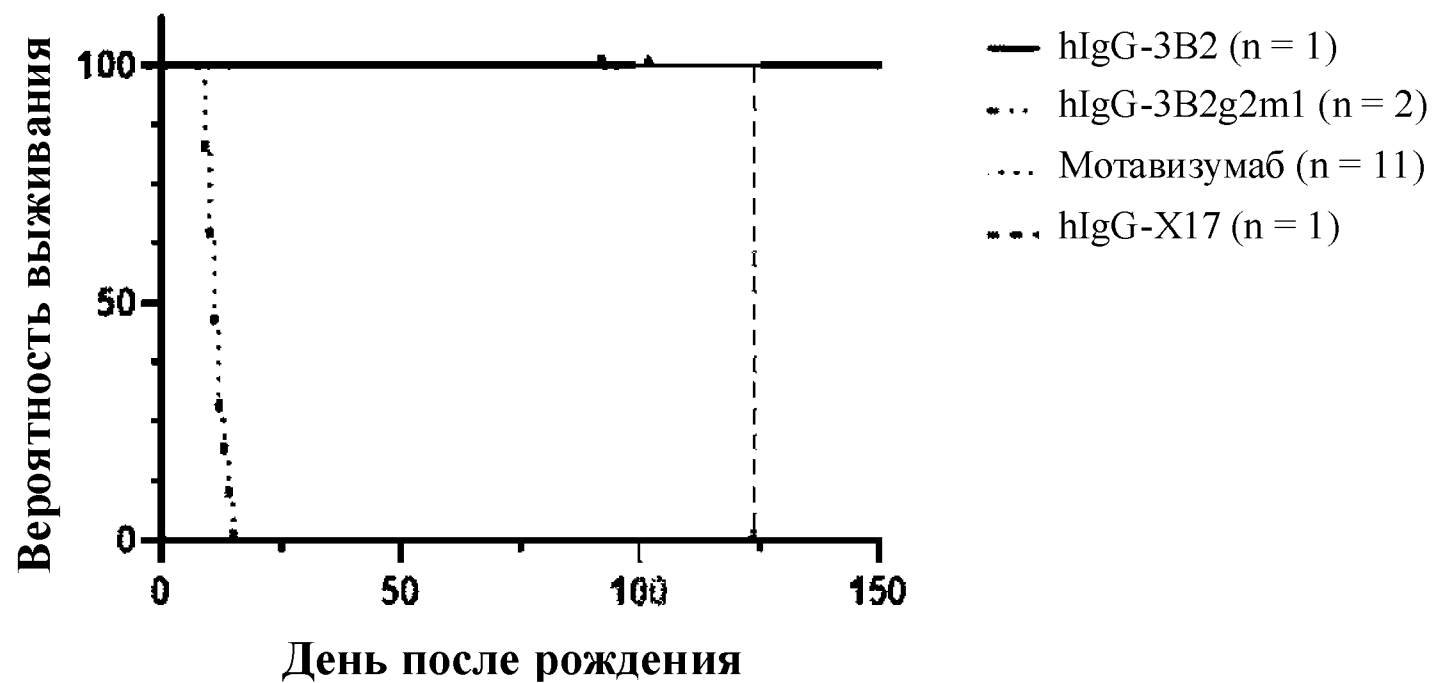


Фигура 57



Фигура 58А

P4 (20 мг/кг) – P18 (10 мг/кг) – P38 (10 мг/кг)



Фигура 58В

P4 (20 мг/кг) – P18 (10 мг/кг)



Фигура 58С

Повторная инъекция 10 мг/кг указанных МАТ

