

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390406** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.08.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2023.02.21**

(51) Int. Cl. **C07K 16/26** (2006.01)  
**C12N 9/16** (2006.01)  
**A61K 38/46** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

---

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНОГО ФЕРМЕНТА У СУБЪЕКТА, ИМЕЮЩЕГО МУКОПОЛИСАХАРИДОЗ II ТИПА**

---

(96) **2023000033 (RU) 2023.02.21**

(71) Заявитель:  
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
"ГЕНЕРИУМ" (RU)**

(74) Представитель:

**Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков  
К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В.,  
Стукалова В.В. (RU)**

(72) Изобретатель:

**Шукуров Рахим Рахманкулыевич,  
Решетник Елизавета Вячеславовна,  
Хамитов Равиль Авгатович, Шустер  
Александр Михайлович (RU)**

---

(57) Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к фармацевтической композиции и способу профилактики и лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, что может быть использовано в медицине. Настоящее изобретение относится к соединению HIR-Fab-IDS, применяемому для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где субъекту вводят по меньшей мере одну дозу соединения HIR-Fab-IDS от 1 до 12 мг/кг, к фармацевтической композиции для применения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющей лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где композиция содержит соединение HIR-Fab-IDS, а также к способу профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, включающий введение пациенту по меньшей мере одной дозы соединения HIR-Fab-IDS.

---

**A1**

**202390406**

**202390406**

**A1**

# **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНОГО ФЕРМЕНТА У СУБЪЕКТА, ИМЕЮЩЕГО МУКОПОЛИСАХАРИДОЗ II ТИПА**

## **Область техники**

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно, к фармацевтической композиции и способу профилактики и лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, что может быть использовано в медицине. Настоящее изобретение относится к соединению HIR-Fab-IDS, применяемому для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где субъекту вводят по меньшей мере одну дозу соединения HIR-Fab-IDS от 1 до 12 мг/кг, к фармацевтической композиции для применения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющей лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где композиция содержит соединение HIR-Fab-IDS, а также к способу профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, включающий введение пациенту по меньшей мере одной дозы соединения HIR-Fab-IDS.

## **Предшествующий уровень техники**

Применение ферментов в терапии известно из уровня техники давно. Современная медицина все шире использует терапевтические ферменты в самых различных отраслях медицины вследствие их высокой активности и специфичности. В настоящее время наметились следующие направления энзимотерапии (Казанская Н. Ф. и др., 1984): 1) устранение дефицита ферментов с целью компенсации врожденной или приобретенной функциональной недостаточности; 2) удаление нежизнеспособных, денатурированных структур, клеточных и тканевых осколков; 3) лизис тромбов; 4) комплексная терапия злокачественных новообразований; 5) детоксикация организма.

Применение терапевтических ферментов для устранения дефицита ферментов с целью компенсации врожденной или приобретенной функциональной недостаточности практикуется уже давно. Лечение врожденных дефицитов ферментов, которых описано более 150, является важной проблемой заместительной терапии. Такие наследственные заболевания, как гликогенозы, липидозы, мукополисахаридозы и другие лизосомные болезни накопления преимущественно лечат путем внутривенного введения рекомбинантных аналогов соответствующих нативных ферментов.

Лизосомные болезни накопления – группа редких (орфанных) наследственных метаболических заболеваний, обусловленных отсутствием или недостаточностью лизосомных ферментов, участвующих в расщеплении сложных молекул.

В настоящее время (Новиков П. В., 2014) выделяют следующие группы лизосомных болезней накопления: 1) мукополисахаридозы; 2) липидозы (сфинголипидозы — GM1- и GM2-ганглиозидозы, болезнь Гоше, галактосиалидоз, гранулематоз Фарбера, лейкодистрофии, болезнь Ниманна—Пика типы А и В и др.); 3) муколипидозы, 4) гликопротеинозы (фукозидоз, сиалидоз, маннозидоз, болезнь накопления гликогена II типа — болезнь Помпе, болезнь Данон и др.); 5) нейрональные цероидные липофуцинозы; 6) другие болезни накопления (болезнь Ниманна—Пика тип С, болезнь Вольмана, болезнь накопления холестерина, цистиноз, болезнь Сала, пикнодизостоз и др.).

Мукополисахаридозы (МПС) – группа, объединяющая девять (I–IX, с промежуточными формами - 14) метаболических заболеваний, обусловленных более чем 40 генетическими нарушениями, приводящими к отсутствию или функциональной недостаточности ряда лизосомальных ферментов, участвующих в гидролитическом расщеплении гликозаминогликанов (мукополисахаридов). Гликозаминогликаны - олигосахариды, принимающие участие в формировании костей, хрящей, связок, роговицы, кожи, соединительной ткани и синовиальной жидкости (Burrow T. A. et al, 2013).

У пациентов, страдающих мукополисахаридозом, наблюдается недостаточность или отсутствие, как минимум, одного из 11 ферментов катаболизма гликозаминогликанов, что с течением времени приводит к постепенному накоплению этих углеводов в клетках, жидкостях организма, в т. ч. и в соединительной ткани. В результате перманентное накопление мукополисахаридов приводит к повреждению клеток, дисфункциям тканей и органов, наиболее часто проявляющимся в гипертензионно-гидроцефальном синдроме, гепатоспленомегалии, сердечно-сосудистой недостаточности, костно-суставных осложнениях, функциональных расстройствах центральной нервной системы (ЦНС) вплоть до тяжелых когнитивных расстройств и деменций (таблица 1) (Burrow T. A. et al, 2013).

Таблица 1. Характеристика различных синдромов МПС.

Синдром	Дефект фермента	Дефектная хромосома, тип наследования	Клиника, лабораторные данные	Неврологическая составляющая
Гурлер (МПС-I-H)	α-L-идуронидаза	Хромосома 4, аутосомно-рецессивный тип	Дети умирают в возрасте 6-10 лет от сердечной и легочной декомпенсации. В моче повышен уровень гепаран- и дерматан-сульфатов (Connock et al. 2006).	Есть
Шейе (МПС-I-S)	α-L-идуронидаза (неполный)	Хромосома 4, аутосомно-рецессивный тип	Мягкий вариант, нормальный интеллект, нормальная статура. Живут до 30 лет. В моче повышен уровень гепаран- и дерматан-сульфатов (Connock et al. 2006, Pastores et al. 2007).	Нет

Хантера (МПС II)	Идуронат-2-сульфатаза	Сцепленный с X-хромосомой, рецессивный тип	Болеют мальчики. Умственное развитие снижено. Живут до 30–40 лет. Нет помутнения роговицы. Нет дорзолобульного горба. Характерна прогрессирующая глухота, гирсутизм. В моче повышен уровень гепаран- и дерматан-сульфатов ( <u>Wraith et al. 2008, da Silva et al. 2016, Burrow and Leslie 2008</u> ).	Есть
Санфилиппо (МПС-III)	Тип А — сульфамидаза. Тип В — b-N-ацетил-люкозаминидаза Тип С — ацетил-КоА-глюкозамини-N-ацетилтрансфераза Тип Д — a-N-ацетил-глюкозамин-6-фосфатаза	Хромосомы 12 и 17, аутосомно-рецессивный тип	Выраженная ретардация интеллекта, макроцефалия, очень агрессивное поведение. Относительно слабые скелетные изменения. Висцеромегалия появляется в школьном возрасте. Клинически типы не могут быть дифференцированы. В моче — гепаран-сульфат ( <u>Valstar et al. 2008</u> ).	Есть
Моркио (МПС-IV)	N-ацетил-галактозамин-6-сульфатаза (тип А) и b-галактозидаза (тип В)	Хромосомы 3 и 16, аутосомно-рецессивный	Нормальный интеллект. Сильно выраженная деформация скелета. Помутнение роговицы. Меньшая степень поражения ЦНС. Первые клинические признаки появляются на 2–3-м году жизни. Умирают в возрасте 20-35 лет. Кератансульфат в моче ( <u>Northover, Cowie and Wraith 1996</u> ).	Нет
Марото-Лами (МПС-VI)	N-ацетил-галактозамин-4-сульфатаза	Хромосома 5, аутосомно-рецессивный	Незначительная задержка роста, выраженный горб, нормальный интеллект, слабое поражение лица. Дерматан-сульфат в моче ( <u>Garrido et al. 2008</u> ).	Нет
Слая (МПС-VII)	b-глюкуронидаза	Хромосома 7, аутосомно-рецессивный	Варьирует ментальное развитие, выраженный горб, гепатоспленомегалия, слабое поражение лица. Дерматан-сульфат в моче.	Есть

Мукополисахаридоз I типа вызывается дефицитом фермента лизосом,  $\alpha$ -L-идуронидазы. Этот недостаток приводит к накоплению мукополисахаридов, особенно дерматансульфата, в тканях и органах. Накопление избыточного сульфата дерматана приводит к постепенному развитию многочисленных морфологических аномалий в тканях и органах. Мукополисахаридоз I типа характеризуется аутосомно-рецессивным типом наследования.

На сегодняшний день разработаны два эффективных метода лечения МПС I типа: трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) и ферментная заместительная терапия (ФЗТ).

ТГСК применяется для лечения только тяжелых форм МПС I типа – синдрома Гурлер, что позволяет корректировать недостаточность фермента  $\alpha$ -L-идуронидазы и, в свою очередь, приводит к значительному улучшению состояния пациента, хотя некоторые тяжелые осложнения заболевания полностью не регрессируют. ТГСК должна быть проведена как можно раньше, до появления грубых неврологических расстройств. Несмотря на улучшение состояния пациента, ТГСК сопровождается высоким риском серьезных посттрансплантационных осложнений и является сложной многоэтапной высокочувствительной процедурой.

ФЗТ безопасна, хорошо переносится больными, не вызывает тяжелых нежелательных явлений и приводит к разложению негидролизованного субстрата. Возможные редкие реакции на введение препарата обусловлены образованием антител против введенного белка, но они не постоянны и, как правило, быстро купируются стандартными лекарственными средствами. Принцип ФЗТ основан на восстановлении уровня энзиматической активности, достаточной для гидролиза накопленных субстратов и для предотвращения их дальнейшего накопления.

Мукополисахаридоз II типа (МПС II, синдром Хантера), в отличие от всех остальных форм мукополисахаридозов, имеющих аутосомно-рецессивный тип наследования, представляет собой единственную форму мукополисахаридозов с X-сцепленным рецессивным типом наследования. МПС II – гетерогенная по клиническим проявлениям, прогрессирующая патология лизосомального накопления, возникающая вследствие недостаточности фермента идуронат-2-сульфатазы (идурсульфазы). Данный фермент в норме участвует в деградации мукополисахаридов дерматан-сульфата и гепаран-сульфата за счет гидролитического отщепления O-связанной сульфатной группы. Соответственно, в случае МПС II основной патогенетический механизм связан с прогрессирующим накоплением дерматан- и гепаран-сульфатов в лизосомах.

Наиболее частыми клиническими симптомами МПС II являются задержка умственного развития, увеличенный язык, характерные патологии лицевого скелета, алопеция, аномалии развития зубов, рестриктивное заболевание легких, гепатоспленомегалия, патология клапанов сердца, костно-суставные патологии, тяжелая низкорослость. Также, часто наблюдаются прогрессирующие неврологические расстройства, сопровождающиеся гидроцефалией и повышенным внутричерепным давлением. Смертельный исход обычно наступает в течение второй – третьей декады жизни, чаще всего, по причине дыхательной и/или сердечной недостаточности. Важно подчеркнуть, что заболевание протекает с вовлечением в патологический процесс нервной системы, в том числе со снижением интеллекта.

На сегодняшний день имеется два принципиальных способа лечения МПС II – ФЗТ и симптоматическая терапия (включает в себя применение гепатопротекторов, сердечно-

сосудистых и противовоспалительных средств, витаминов и препаратов, улучшающих антиоксидантную защиту). ТГСК для лечения МПС II, в отличие от мукополисахаридоза I типа, не эффективна.

«Элапраза®» (МНН: идурсульфаз) («Шайер», США) – медицинский продукт, представляющий рекомбинантную идуронат-2-сульфатазу человека. Этот фермент отвечает за гидролиз С2-сульфатных эфирных связей остатков идуроновой кислоты, входящей в состав глюкозаминогликанов (мукополисахаридов) дерматан-сульфата и гепаран-сульфата (Burgow T. A. et al., 2013). Обычный режим введения «Элапразы®» – 0,5 мг/кг веса тела, раз в неделю; введение осуществляется путем внутривенной инфузии в течение 3 часов (время инфузии может быть постепенно сокращено до 1 часа).

Идурсульфаз содержит две дисульфидные связи и восемь N-связанных сайтов гликозилирования, занятых сложными высокоманнозными олигосахаридами. Присутствие в олигосахаридных цепях остатков М6Р позволяет рекомбинантному ферменту связываться с М6Р-рецепторами на поверхности целевых клеток, что приводит к интернализации указанного фермента в клетки и его интернализации в лизосомы, где он и обеспечивает деградацию лизосомальных мукополисахаридов (Muenzer J., et al., Genet. Med. 2006 Aug; 8(8):465 – 473).

При проведении ФЗТ продолжительность жизни больных с синдромом Хантера увеличивается в несколько раз. Несмотря на это, «Элапраза®» также не проникает через гематоэнцефалический барьер, в результате при использовании ФЗТ «Элапразой®» пациенты погибают в возрасте 20 лет от нейродегенеративных последствий, при этом во второй декаде жизни больные, получающие «Элапразу®», как правило, испытывают большие сложности в обучении и нуждаются в помощниках даже в бытовой жизни (da Silva E. M. et al., 2016; Wraith J.E. et al., 2008).

Таким образом, общим недостатком всех существующих на сегодняшний день препаратов, используемых для ФЗТ мукополисахаридозов I и II типов, является их неспособность проникать через гематоэнцефалический барьер в центральную нервную систему, что ограничивает эффективность применения данных препаратов у больных с поражением нервной системы, ассоциированным с мукополисахаридозом, включая мукополисахаридоз I и II типов.

При многих болезнях лизосомного накопления есть потребность в улучшенной интернализации фермента в клетки определенных периферических тканей (мышцы диафрагмы в болезни Помпе, печень и селезенка в болезни Хантера, почки в болезни Фабри и т.д.) (Hawkes C. et al., 2004).

Таким образом, актуальна задача разработки терапевтического соединения, фармацевтической композиции и способа профилактики или лечения, которые могли бы использоваться для лечения лизосомной болезни накопления, такой как МПС II типа, и

которые сохраняли бы функциональные свойства соответствующего терапевтического фермента, при этом демонстрируя высокую активность и улучшенную способность транспортироваться к лизосомам клеток тканей различных органов, в том числе, к лизосомам клеток нервной ткани, и позволяли бы достичь значительного улучшения качества и продолжительности жизни больных МПС II типов.

### **Преимущества изобретения**

Вышеуказанные задачи успешно решаются в настоящем изобретении, которое относится к соединению, фармацевтической композиции, предназначенных для лечения лизосомной болезни накопления, содержащих терапевтический фермент и транспортный элемент, соединенные друг с другом непосредственно или при помощи линкера, при этом указанный транспортный элемент представляет собой Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG, специфичного к эпитопу в рецепторе инсулина. Изобретение основано на неожиданном открытии того, что транспортный элемент, представляющий собой Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG, специфичный к эпитопу в рецепторе инсулина, соединенный непосредственно или при помощи линкера с терапевтическим ферментом, приводит неожиданно к улучшению способности фермента транспортироваться к лизосомам различных органов и тканей, в том числе, к лизосомам клеток нервной ткани, и одновременно ферментативная активность соединения остается на высоком уровне. Благодаря этому неожиданному эффекту достигается прогресс в области ферментной заместительной терапии лизосомных болезней накопления, таких как мукополисахаридоз II типа, и увеличение продолжительности и улучшение качества жизни субъектов, страдающих лизосомной болезнью накопления, мукополисахаридозом II типа, и нуждающихся в терапии.

Кроме того неожиданно было обнаружено увеличение ферментативной активности соединения, содержащего транспортный элемент, представляющий собой Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG, специфичный к эпитопу в рецепторе инсулина (human insulin receptor, или HIR), соединенный непосредственно или при помощи линкера с терапевтическим ферментом, в сравнении с терапевтическим ферментом без транспортного элемента; а также, что введение соединения, содержащего транспортный элемент, представляющий собой Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG, специфичный к эпитопу в рецепторе инсулина, соединенный непосредственно или при помощи линкера с терапевтическим ферментом обеспечивает более высокую степень замещения активности терапевтического фермента в мозге человека в сравнении с соединениями, содержащими Mab-фрагмент.

Обнаружено, что соединение HIR-Fab-IDS проникает в ткани головного мозга пациента в 2 раза лучше, чем соединение HIR-Mab-IDS.

Обнаружено, что соединение HIR-Fab-IDS восстанавливает ферментативную функцию IDS в ткани головного мозга пациента на 98%.

Обозначена доза, при которой соединение безопасно и эффективно для субъектов, страдающих лизосомной болезнью накопления, мукополисахаридозом II типа, и нуждающихся в терапии.

Разработана более эффективная фармацевтическая композиция и/или схема введения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего мукополисахаридоз II типа.

Разработана более эффективная схема введения, учитывая повышенные дозы, для предупреждения или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей у человека.

Разработана более эффективная схема введения и/или фармацевтическая композиция, учитывая повышенные дозы, для предупреждения или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей, относящейся к нейропатической форме у человека.

#### **Краткое описание изобретения**

Настоящее краткое описание предлагает краткое описание настоящего изобретения с той целью, чтобы вкратце обозначить предмет и сущность настоящего изобретения. Краткое описание представляют с пониманием того, что его не следует применять для толкования или ограничения объема или смыслового содержания формулы изобретения.

Первым объектом настоящего изобретения является соединение HIR-Fab-IDS, представленное первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа.

Также объектом настоящего изобретения является соединение HIR-Fab-IDS, представленное первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, применяемое для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где субъекту вводят по меньшей мере одну дозу соединения HIR-Fab-IDS от 1 до 12 мг/кг.

Еще одним объектом изобретения является соединение HIR-Fab-IDS, представленное первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, применяемое для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, где субъекту вводят по меньшей мере одну дозу соединения HIR-Fab-IDS, при этом доза выбрана из группы, состоящей из 3 мг/кг, 6 мг/кг, 12 мг/кг соединения HIR-Fab-IDS.

В частном варианте объектом настоящего изобретения является соединение HIR-Fab-IDS, применяемое для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, где лизосомная болезнь накопления представляет собой мукополисахаридоз II типа или мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей, относящейся к нейропатической форме.

В частном варианте объектом настоящего изобретения является соединение HIR-Fab-IDS, применяемое для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где субъектом является человек.

Следующим объектом изобретения является фармацевтическая композиция для применения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где композиция содержит соединение HIR-Fab-IDS, представленное первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, при этом соединение HIR-Fab-IDS вводят субъекту по меньшей мере в одной дозе, выбранной из группы, состоящей из 3 мг/кг, 6 мг/кг, 12 мг/кг соединения HIR-Fab-IDS.

В конкретном варианте изобретение относится к фармацевтической композиции для применения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где композиция содержит соединение HIR-Fab-IDS, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит натрия хлорид, натрия дигидрофосфата дигидрат, натрия гидроксид, полисорбат.

В конкретном варианте изобретение относится к фармацевтической композиции для применения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где композиция содержит соединение HIR-Fab-IDS, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит соединение HIR-Fab-IDS 5,3 мг, натрия хлорид в количестве 8,0 мг, натрия дигидрофосфата дигидрат в количестве 3,12 мг, натрия гидроксид для коррекции pH до pH 6,0, полисорбат 20 в количестве 0,2 мг, вода для инъекций до 1,0 мл.

В конкретном варианте изобретение относится к фармацевтической композиции для применения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где композиция содержит соединение HIR-Fab-IDS, где лизосомная болезнь накопления представляет собой мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей, относящейся к нейропатической форме.

В конкретном варианте изобретение относится к фармацевтической композиции для применения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, где композиция содержит соединение HIR-Fab-IDS, где субъектом является человек.

Следующим объектом изобретения является способ профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, включающий введение пациенту по меньшей мере одной дозы соединения HIR-Fab-IDS, представленного первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, при этом доза выбрана из группы, состоящей из 3 мг/кг, 6 мг/кг, 12 мг/кг соединения HIR-Fab-IDS.

В конкретном варианте изобретение относится к способ профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, включающий введение пациенту по меньшей мере одной дозы соединения HIR-Fab-IDS, представленного первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, где соединение HIR-Fab-IDS в составе фармацевтической композиции вводят внутривенно в течение 3 ч 1 раз в неделю.

В конкретном варианте изобретение относится к способ профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, включающий введение пациенту по меньшей мере одной дозы соединения HIR-Fab-IDS, представленного первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, где лизосомная болезнь накопления представляет собой мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей, относящейся к нейропатической форме.

В конкретном варианте изобретение относится к способ профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, представляющую собой мукополисахаридоз II типа, включающий введение пациенту по меньшей мере одной дозы соединения HIR-Fab-IDS, представленного первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, где субъектом является человек.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаемый в настоящем изобретении подход можно использовать и для лечения других лизосомальных болезней накопления, в частности, для лечения других типов мукополисахаридоза, таких как мукополисахаридоз III типа (синдром Санфилиппо), включая мукополисахаридоз IIIA типа,

IIIB типа, IIIC типа и IIID типа; мукополисахаридоз IV типа (синдром Моркио), включая мукополисахаридоз IVA типа и IVB типа; мукополисахаридоз VI типа (синдром Марото-Лами), мукополисахаридоз VII типа (синдром Слая) и мукополисахаридоз IX типа. В этих случаях в качестве соответствующего терапевтического фермента вместо  $\alpha$ -L-идуронидазы или идуронат-2-сульфатазы используют иной терапевтический фермент, с недостаточностью которого сталкиваются больные соответствующей формой мукополисахаридоза: гепарансульфаминадазу — при мукополисахаридозе IIIA типа, N-ацетилглюкозаминидазу — при мукополисахаридозе IIIB типа, гепаран- $\alpha$ -глюкозаминид-N-ацетилтрансферазу — при мукополисахаридозе IIIC типа, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазу — при мукополисахаридозе IIID типа, галактоза-6-сульфатсульфатазу — при мукополисахаридозе IVA типа,  $\beta$ -галактозидазу — при мукополисахаридозе IVB типа, N-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу — при мукополисахаридозе VI типа,  $\beta$ -глюкуронидазу — при мукополисахаридозе VII типа и гиалуронидазу — при мукополисахаридозе IX типа. Аминокислотные последовательности указанных терапевтических ферментов можно получить при помощи любой из ряда компьютерных программ, известных в данной области техники, например, BLAST или FASTA и т.д. Как в BLAST, так и в FASTA доступны офлайн- и онлайн-поиск (см. Ausubel et al., 1999 *ibid*, pages 7-58–7-60, веб-сайт Национального центра биотехнологической информации на веб-сайте Национального института здравоохранения).

Предлагаемый в настоящем изобретении подход, в альтернативных вариантах осуществления изобретения, может быть также применен и для лечения лизосомных болезней накопления, не относящихся к мукополисахаридозам, путем использования вместо  $\alpha$ -L-идуронидазы или идуронат-2-сульфатазы иного лизосомального фермента, с недостаточностью которого сталкиваются больные соответствующей лизосомной болезнью накопления. В отдельных неограничивающих вариантах осуществления настоящего изобретения, предлагаемый подход может быть, в частности, применен для лечения нарушений обмена аминокислот, таких как цистиноз; для лечения нарушений обмена углеводов, таких как болезни накопления гликогена, в частности, болезнь Помпе; нарушений обмена сфинголипидов и других болезней накопления липидов, в частности, GM<sub>2</sub> ганглиозидоза, включая болезнь Сандхоффа и болезнь Тау-Сакса; других ганглиозидозов, в частности, GM<sub>1</sub> ганглиозидоза и муколипидоза IV; других сфинголипидозов, в частности, болезни Фабри, болезни Гоше, болезни Краббе, болезни Ниманна-Пика, синдрома Фарбера, метахромной лейкодистрофии и множественной сульфатазной недостаточности; липофусциноза нейронов, в частности, болезни Баттена, Бильшовского-Янского, Куфса, Шпильмейера-Фогта; других нарушений накопления липидов, в частности, болезни Вольмана, а также для лечения нарушений обмена гликопротеинов, включая муколипидоз II (I-клеточную болезнь), муколипидоз III

(псевдолиподистрофию Гурлер), и для лечения дефектов деградации гликопротеинов, включая аспартилглюкозаминоурию, фукозидоз, маннозидоз и сиалидоз.

В этих случаях к транспортному элементу вместо идуронат-2-сульфатазы присоединяют непосредственно или при помощи линкера, аминокислотную последовательность соответствующего фермента, с недостаточностью которого сталкиваются больные с лизосомной болезнью накопления.

Наиболее предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже. При этом указанные предпочтительные варианты приводятся лишь для целей иллюстрации настоящего изобретения, а не для ограничения объема притязаний.

### **Краткое описание фигур**

Изобретение проиллюстрировано следующими фигурами.

На фиг. 1 показана репрезентативная авторадиограмма самца яванского макака, зарегистрированная через 2 часа после однократного внутривенного введения [<sup>125</sup>I]-HIR-Fab-IDS с номинальным уровнем дозы 0,0020 мг/кг массы тела.

На фиг. 2 показана репрезентативная авторадиограмма самца яванского макака, зарегистрированная через 2 часа после однократного внутривенного введения [<sup>125</sup>I]-HIR-Mab-IDS с номинальным уровнем дозы 0,0015 мг/кг массы тела.

На фиг. 3 показана репрезентативная авторадиограмма самца яванского макака, зарегистрированная через 2 часа после однократного внутривенного введения [<sup>125</sup>I]-IDS (контроль) с номинальным уровнем дозы 0,0010 мг/кг массы тела.

На фиг. 4 показан уровень ГАГ в моче животных в течение исследования. Индивидуальные значения.

На фиг. 5 показана масса печени у животных групп исследования. 1- группа дикого типа, 2 – группа – нокаутные животные группы контроля, 3 – нокаутные животные, 0,3 мг/кг, 4 – нокаутные животные, 1,0 мг/кг, 5 – нокаутные животные, 3,0 мг/кг. Индивидуальные значения.

На фиг. 6 показан уровень активности идуронат-2-сульфатазы в плазме подопытных животных. 1- группа дикого типа, 2 – группа – нокаутные животные группы контроля, 3 – нокаутные животные, 0,3 мг/кг, 4 – нокаутные животные, 1,0 мг/кг, 5 – нокаутные животные, 3,0 мг/кг. Индивидуальные значения.

На фиг. 7 показаны концентрации препарата соединения HIR-FAB-IDS в сыворотке крови пациента 1001, определенные на этапе эскалации дозы. НПКО метода составляет 50 нг/мл.

На фиг. 8 показана динамика концентрации гепарансульфата в СМЖ при применении различных доз препарата.

## Подробное описание

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем описании, используют то же значение, какое обычно понимается средним специалистом в данной области техники (например, в молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот, химии белков, биохимии, органической химии, иммунологии, микробиологии, генетике и т.д.).

В контексте настоящего описания термин **«соединение»** понимается в самом широком смысле как по меньшей мере одна молекула, представляющая собой конъюгат, слитый белок, слитое антитело, гибридный белок, фьюжен-протеин, белковый конструктор, белковый комплекс и т. д.

Соединение, предназначенное для лечения лизосомной болезни накопления, содержащее терапевтический фермент и транспортный элемент, соединенные друг с другом непосредственно или при помощи линкера, где транспортный элемент представляет собой Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG1, состоящий из легких цепей иммуноглобулина IgG1 к рецептору инсулина (SEQ ID NO:2) и тяжелой цепи с идурсульфазой (SEQ ID NO:4) .

Как используется в настоящем описании, под термином **«содержащий»** понимают соединение, включающие перечисленные элементы, не исключая другие.

В настоящем описании термины **«терапевтический фермент»** и **«фермент»** являются синонимами и относятся к ферменту для лечения заболеваний, возникающих вследствие отсутствия, дефицита, нарушений функций фермента и так далее, при этом субъекта, страдающего заболеваниями, можно лечить посредством ФЗТ, введения фермента и так далее. В частности, фермент может представлять собой фермент для лечения заболеваний, которые могут возникать вследствие отсутствия, дефицита и нарушений функций лизосомного фермента, но, не ограничиваясь таковым.

Терапевтический фермент, который входит в состав соединения по настоящему описанию, охватывает любой фермент, который обладает терапевтическим эффектом в отношении лизосомной болезни накопления, включая, без ограничения,  $\beta$ -глюкозидазу,  $\beta$ -галактозидазу, галактозо-6-сульфатазу, кислую церамидазу, кислую сфингомиелиназу, галактоцереброзидазу, арилсульфатазу А,  $\beta$ -гексозаминидазу А,  $\beta$ -гексозаминидазу В, гепарин-N-сульфатазу,  $\alpha$ -D-маннозидазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, N-ацетилгалактозамин-6-сульфатазу, лизосомную кислую липазу,  $\alpha$ -N-ацетил-D-глюкозаминидазу (NAGLU), глюкоцереброзидазу, бутирилхолинэстеразу, хитиназу, глутаматдекарбоксилазу, липазу, уриказу, ацетилгидролазу фактора активации тромбоцитов, нейтральную эндопептидазу, миелопероксидазу, ацетил-CoA-глюкозаминид-N-ацетилтрансферазу, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатазу, галактозамин-6-сульфатазу (GALN), гиалуронидазу,  $\alpha$ -фукозидазу,  $\beta$ -маннозидазу,  $\alpha$ -нейраминидазу (сиалидазу), N-ацетил-глюкозамин-1-фосфотрансферазу, муколипина-1,  $\alpha$ -N-ацетил-галактозаминидазу, N-аспартил- $\beta$ -

глюкозаминидазу, LAMP-2 (связанный с лизосомами мембранный белок 2), цистинозин, сиалин, церамидазу, кислую Р-глюкозидазу, галактозилцерамидазу, NPC1 (белок болезни Ниманна-Пика типа С1), катепсин А, SUMF-1 (модифицирующий сульфатазу фактор-1), лизосомную кислую липазу (LIPA) и трипептидилпептидазу 1.

В частности, терапевтический фермент охватывает такие ферменты как агалсидаза, имиглуцераза, галсульфаза, идуронат-2-сульфатаза и  $\alpha$ -L-идуронидаза. Наиболее предпочтительно, терапевтический фермент представляет собой идуронат-2-сульфатазу или  $\alpha$ -L-идуронидазу.

Однако настоящее описание также может охватывать любой терапевтический фермент, без ограничения, независимо от типа или происхождения фермента.

В настоящем описании термин «**идуронат-2-сульфатаза**», а также «**идурсульфаз**», «**IDS**», «**ИДС**», «**I2S**» подразумевает рекомбинантный аналог лизосомного фермента идуронат-2-сульфатазы, в норме гидролизующего О-связанную сульфатную группу мукополисахаридов – дерматан- и гепаран-сульфатов. В настоящем изобретении термин «**идуронат-2-сульфатаза**» можно использовать взаимозаменяемо с термином «**идурсульфаз**».

В контексте настоящего описания термины «**HIR-Fab-IDS**», а также «**rIDS-FAB-HI**», «**rHI-FAB-IDS**», «**rIDS-FAB-HIR**» и «**rHIR-FAB-IDS**» являются синонимами и обозначают гибридный рекомбинантный белок идуронат-2-сульфатазы, ковалентно соединенный с Fab-фрагментом моноклонального антитела к инсулиновому рецептору человека. В контексте настоящего описания «**HIR-Fab-IDS**» подразумевает, не ограничиваясь таковым, идуронат-2-сульфатазу с фрагментом моноклонального антитела к инсулиновому рецептору человека. В частных (неограничивающих) вариантах настоящего изобретения, варианты HIR-Fab-IDS, представлены первой аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:2, 8, 9, 10 или 11, и второй аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:4, 5, 12, 13, 14 или 15. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения HIR-Fab-IDS представлено первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4.

В контексте настоящего описания «**HIR-Mab-IDS**» - гибридный рекомбинантный белок идуронат-2-сульфатазы, ковалентно соединенный с полноразмерным моноклональным антителом к инсулиновому рецептору человека. В частных (неограничивающих) вариантах настоящего изобретения, варианты HIR-Mab-IDS представляют собой варианты согласно патентному документу США US8834874 B2, 16.09.2014. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения HIR-Mab-IDS представлено аминокислотной последовательностью продукта по проекту AGT-182 компании ArmaGen Technologies Inc.

В настоящем описании термин « **$\alpha$ -L-идуронидаза**», а также «**идуронидаза**», «**ларонидаза**», «**IDUA**» подразумевает фермент, задействованный в гидролизе

гликозаминогликанов, таких как дерматансульфат и гепарансульфат. В настоящем описании термин «**α-L-идуронидаза**» можно использовать взаимозаменяемо с термином «**ларонидаза**». Дефицит (генетически обусловленная недостаточность) идуронидазы, имеющая место при мукополисахаридозе типа I, приводит к постепенному накоплению в клетках и тканях организма гликозаминогликанов – гепарансульфата и дерматансульфата.

«**HIR-Fab-IDUA**», а также «**rIDUA-FAB-HI**», «**rHI-FAB-IDUA**», «**rIDUA-FAB-HIR**», «**rHIR-FAB-IDS**» - гибридный рекомбинантный белок α-L-идуронидаза, ковалентно соединенный с Fab-фрагментом моноклонального антитела к инсулиновому рецептору человека. В частных (неограничивающих) вариантах настоящего изобретения, варианты HIR-Fab- IDUA, представлены первой аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:2, 8, 9, 10 или 11, и второй аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:6,7.

**HIR-Mab-IDUA** - гибридный рекомбинантный белок α-L-идуронидаза, ковалентно соединенный с полноразмерным моноклональным антителом к инсулиновому рецептору человека.

Терапевтические ферменты, которые могут входить в состав соединений по настоящему изобретению, могут находиться в своей нативной форме, а также в форме фрагментов, состоящих из частей ферментов, или аналогов ферментов, в которых возникла вариация, выбранная из группы, состоящей из замены, добавления, делеции, модификации некоторых аминокислот и их комбинации, без ограничения, при условии, что они обладают такой же ферментативной активностью, как и нативные формы соответствующих терапевтических ферментов. В частных (неограничивающих) вариантах осуществления изобретения, могут использоваться фрагменты ферментов, обладающие активностью нативных форм соответствующих ферментов. Аналогами ферментов, без ограничения, считаются те ферменты, которые, имеют различные характеристики гликозилирования и степень гликозилирования, обусловленные экспрессией известного фермента в различных хозяевах, а также различную степень замен конкретных аминокислотных остатков соответствующего фермента относительно стандартной последовательности, где степень замен не является 100% заменой. В частных (неограничивающих) вариантах осуществления изобретения, могут использоваться аналоги α-L-идуронидазы, известные из патентов US5932211 A, 03.08.1999, US6153188 A, 28.11.2006 и US6541254 B1, 01.04.2003, а также аналоги идуронат-2-сульфатазы. Специалисту в данной области понятно, что могут использоваться и другие фрагменты и аналоги ферментов α-L-идуронидазы и идуронат-2-сульфатазы, обладающие активностью нативных форм соответствующих ферментов, которые известны из уровня техники в настоящее время или станут известны впоследствии.

Ферменты можно получать традиционными для данной области техники методами, например, посредством генетической рекомбинации в клетках животных, *E. coli*, дрожжей,

насекомых, растений и в живых животных и так далее, с использованием различных экспрессирующих векторов, хорошо известных специалисту в данной области. Способы получения не ограничиваются указанными и включают в себя также другие способы получения ферментов, известные специалисту в данной области. Неограничивающие примеры таких способов получения ферментов в клетках различных организмов, а также неограничивающие примеры экспрессирующих векторов см. в руководстве Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" - CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989, "Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 2001. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, ферменты получают в клетках млекопитающих. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения, ферменты получают в клетках яичника китайского хомячка.

В отдельных предпочтительных воплощениях изобретения, ферменты могут быть коммерчески доступными ферментами. Кроме того, ферменты могут включать аминокислотную последовательность, которая обладает гомологией по меньшей мере 80%, более конкретно, 90% и еще более конкретно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или выше с указанными выше ферментами или их аналогами, и ферменты могут быть получены из микроорганизмов при помощи рекомбинантной технологии или могут быть приобретены из коммерческих источников, без ограничения.

В настоящем описании термин «гомология» означает степень сходства с аминокислотной последовательностью белка дикого типа или нуклеотидной последовательностью, кодирующей аминокислоты, и охватывает последовательности, которые имеют указанную выше степень сходства последовательностей, выраженную в процентах, с аминокислотными последовательностями или нуклеотидными последовательностями по настоящему изобретению. Гомологию можно определять путем сравнения двух заданных последовательностей невооруженным глазом или можно определять при помощи биоинформационного алгоритма, который позволяет анализировать гомологию путем выравнивания рассматриваемых последовательностей для сравнения. Гомология между двумя заданными аминокислотными последовательностями может быть указана в процентах. Существуют эффективные автоматизированные алгоритмы, которые можно применять в программных модулях GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA пакета программ Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI, США). Алгоритм выравнивания, автоматизированный в указанных модулях, включает алгоритмы выравнивания последовательностей Нидлмана и Вунша, Пирсона и Липмана, а также Смита и Ватермана. Другие алгоритмы, которые можно применять для выравнивания последовательностей и определения гомологии, автоматизированы в программах FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST и CLUSTAL W. Аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности, кодирующие ферменты и их

аналоги, могут быть взяты в известной базе данных, такой как GenBank NCBI, не ограничиваясь ей.

В некоторых вариантах реализации изобретения транспортный элемент соединения содержит Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG1, состоящий из первой аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную SEQ ID NO:2.

В конкретных вариантах реализации изобретения транспортный элемент соединения содержит Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG1, состоящий из первой аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80% или более идентичную SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение, представленное первой аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную SEQ ID NO:2, и второй аминокислотной последовательностью, по меньшей мере идентичной SEQ ID NO:4, применяемое для лечения или профилактики недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего мукополисахаридоз II типа.

В конкретных вариантах реализации изобретения соединение, представленное первой аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 80% или более идентичную SEQ ID NO:2, и второй аминокислотной последовательностью, по меньшей мере идентичной SEQ ID NO:4, применяемое для лечения или профилактики недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего мукополисахаридоз II типа.

Термин «**аминокислота**» обозначает группу карбокси- $\alpha$ -аминокислот либо встречающихся в природе, т.е. которые непосредственно или в виде предшественника могут кодироваться нуклеиновой кислотой, либо не встречающихся в природе. Индивидуальные встречающиеся в природе аминокислоты кодируются нуклеиновыми кислотами, состоящими из трех нуклеотидов - так называемых кодонов или триплетов оснований. Каждая аминокислота кодируется по меньшей мере одним кодоном.

Термин «**аминокислота**» в том виде, в котором он используется в пределах настоящего описания, обозначает встречающиеся в природе карбокси- $\alpha$ -аминокислоты, включающие следующие: аланин (трехбуквенный код: Ala, однобуквенный код: A), аргинин (Arg, R), аспарагин (Asn, N), аспарагиновая кислота (Asp, D), цистеин (Cys, C), глутамин (Gln, Q), глутаминовая кислота (Glu, E), глицин (Gly, G), гистидин (His, H), изолейцин (Ile, I), лейцин (Leu, L), лизин (Lys, K), метионин (Met, M), фенилаланин (Phe, F), пролин (Pro, P), серин (Ser, S), треонин (Thr, T), триптофан (Trp, W), тирозин (Tyr, Y) и валин (Val, V). Примеры аминокислот, не встречающихся в природе (непротеиногенных аминокислот), включают, Aad (альфа-аминоадипиновая кислота), Abu (аминомасляная кислота), Ach (альфа-аминоциклогексан-карбоновая кислота), Asp (альфа-аминоциклопентан-карбоновая

кислота), Aspс (1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота), Aib (альфа-аминоизомасляная кислота), Aic (2-аминоиндан-2-карбоновая кислота; также именуемая 2-2-Aic), 1-1-Aic (1-аминоиндан-1-карбоновая кислота), (2-аминоиндан-2-карбоновая кислота), аллилглицин (аллилGly), аллоизолейцин (allo-Ile), Asu (альфа-аминосубериновая кислота, 2-аминооктандиовая кислота), Bip (4-фенил-фенилаланин-карбоновая кислота), BnHP ((2S,4R)-4-гидроксипролин), Cha (бета-циклогексилаланин), Cit (цитруллин), циклогексилглицин (Chg), циклопентилаланин, бета-циклопропилаланин, Dab (1,4-диаминомасляная кислота), Dar (1,3-диаминопропионовая кислота), п-(3,3-дифенилаланин-карбоновая кислота), 3,3-дифенилаланин, ди-н-пропилглицин (Dpg), 2-фурилаланин, гомоциклогексилаланин (HoCha), гомоцитруллин (HoCit), гомоциклолейцин, гомолейцин (HoLeu), гомоаргинин (HoArg), гомосерин (HoSer), гидроксипролин, Lys(Ac), (1) Nal (1-нафтилаланин), (2) Nal (2-нафтилаланин), 4-MeO-Apc (1-амино-4-(4-метоксифенил)-циклогексан-1-карбоновая кислота), нор-лейцин (Nle), Nva (норвалин), оматин, 3-Pal (альфа-амино-3-пиридилаланин-карбоновая кислота), 4-Pal (альфа-амино-4-пиридилаланин-карбоновая кислота), 3,4,5,F3-Phe (3,4,5-трифтор-фенилаланин), 2,3,4,5,6,F5-Phe (2,3,4,5,6-пентафтор-фенилаланин), Pqa (4-оксо-6-(1-пиперазинил)-3(4H)-хиназолин-уксусная кислота (CAS 889958-08-1)), пиридилаланин, хинолилаланин, саркозин (Sar), тиазолилаланин, тиенилаланин, Tic (альфа-амино-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота), Tic(OH), Tle (трет-бутилглицин) и Tyr(Me), но не ограничиваются ими.

Термин **«аминокислотная последовательность»** относится к полипептидам, имеющим аминокислотные последовательности, которые в некоторой степени отличаются от полипептида с нативной последовательностью соответствующего терапевтического фермента. Обычно варианты аминокислотной последовательности будут обладать по меньшей мере примерно 70%-ной идентичностью последовательности с полипептидом с нативной последовательностью соответствующего терапевтического фермента. В одном воплощении вариант имеет примерно 80% или более идентичности последовательности с полипептидом с нативной последовательностью соответствующего терапевтического фермента. В одном воплощении вариант имеет примерно 90% или более идентичности последовательности с полипептидом с нативной последовательностью соответствующего терапевтического фермента. В одном воплощении вариант имеет примерно 95% или более идентичности последовательности с полипептидом с нативной последовательностью соответствующего терапевтического фермента. В одном воплощении вариант имеет примерно 98% или более идентичности последовательности с полипептидом с нативной последовательностью соответствующего терапевтического фермента. Варианты аминокислотной последовательности обладают заменами, делециями и/или вставками в определенных положениях в пределах аминокислотной последовательности нативной аминокислотной последовательности соответствующего терапевтического фермента.

Аминокислоты обозначаются традиционными названиями, однобуквенными и трехбуквенными кодами.

Термин «первая аминокислотная последовательность», используемый в данном изобретении, относится к аминокислотной последовательности иммуноглобулина IgG в общем, к легкой цепи иммуноглобулина IgG, в частности. В частных (неограничивающих) вариантах первая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность иммуноглобулина IgG1, аминокислотную последовательности легкой цепи иммуноглобулина IgG1, фрагмент аминокислотной последовательности легкой цепи иммуноглобулина IgG1, выбранную из SEQ ID NO:2, 8, 9, 10 или 11. В конкретном воплощении первая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи иммуноглобулина IgG – SEQ ID NO:2.

Термин «вторая аминокислотная последовательность», используемый в данном изобретении, относится к аминокислотной последовательности иммуноглобулина IgG в общем; к тяжелой цепи иммуноглобулина IgG, к фрагменту тяжелой цепи иммуноглобулина IgG, к фрагменту тяжелой цепи иммуноглобулина IgG, соединенного с последовательностью фермента непосредственно или при помощи линкера, в частности. В частных (неограничивающих) вариантах вторая аминокислотная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность иммуноглобулина IgG1, аминокислотную последовательность фрагмента тяжелой цепи - SEQ ID NO:3, представляет собой фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина IgG1, соединенный с последовательностью идуронат-2-сульфатазы, выбранный из SEQ ID NO:4, 5, 12, 13, 14 или 15.

Термин «транспортный элемент», используемый в данном изобретении, относится к веществу, которое способно переносить, транспортировать, доставлять терапевтический фермент к лизосомам клеток различных тканей. В частности, но, не ограничиваясь таковым, транспортный элемент будет специфически взаимодействовать с эпитопом, антигеном, рецептором или мишенью таким образом, чтобы обеспечивать эффективную доставку к лизосомам клеток нервной ткани. Таким эпитопом, антигеном, рецептором или мишенью в контексте настоящего описания может являться инсулиновый рецептор человека или его часть, через который осуществляется доставка лекарственного средства, пептида или белка в том числе через ГЭБ.

«Иммуноглобулин» является тетрамерной молекулой, в контексте настоящего описания понятие «полноразмерное антитело». В иммуноглобулине природного происхождения каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (примерно 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область длиной примерно от 100 до 110 или более аминокислот, главным образом, ответственных за

узнавание антигена. Часть карбоксильного конца каждой цепи определяет константную область, главным образом, ответственную за эффекторную функцию.

В контексте настоящего описания понятие «**антитело**» применяют в его наиболее широком смысле и оно включает, в частности, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, и фрагменты антитела при условии, что они обладают требуемой биологической активностью.

В контексте настоящего описания «**фрагменты антител**» содержат часть интактного антитела, которая сохраняет способность связываться с антигеном. Примерами фрагментов антител являются Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv-фрагменты; димерные антитела (диабоды); линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител, такие, например, как одноцепочечные Fab, scFv и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. В результате расщепления антител папаином образуется два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab-фрагментами», каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный «Fc-фрагмент», название которого отражает его способность легко кристаллизоваться.

«**Fab-фрагмент**», «**Fab**», «**FAB**» является моновалентным фрагментом, который содержит переменные домены тяжелой и легкой цепи и также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен тяжелой цепи. В контексте настоящего описания транспортный элемент содержит аминокислотную последовательность Fab-фрагмента иммуноглобулина IgG, где иммуноглобулин IgG представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4. В частных (неограничивающих) вариантах осуществления настоящего изобретения иммуноглобулин IgG представляет собой IgG1. В конкретном воплощении транспортный элемент содержит аминокислотную последовательность Fab-фрагмента иммуноглобулина IgG1, состоящую из первой аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:2, 8, 9, 10 или 11, и второй аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3. В более конкретном воплощении транспортный элемент содержит аминокислотную последовательность Fab-фрагмента иммуноглобулина IgG1, состоящую из SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3.

В контексте настоящего описания термин «**линкер**» относится к химическому линкеру или одноцепочечному пептидному линкеру, который соединяет терапевтический фермент и транспортный элемент соединения, предлагаемого в настоящем изобретении. Линкер соединяет, например, одновалентный связывающий элемент содержит CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-домен Ig и sFab, мишенью которого является рецептор инсулина, т. е. линкер соединяет sFab с C-концом CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-домена Ig.

В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представляет собой химический линкер. Можно применять одноцепочечные пептидные линкеры, содержащие от

одной до двадцати аминокислот, сцепленных пептидными связями. В конкретных вариантах осуществления изобретения аминокислоты выбирают из двадцати встречающихся в естественных условиях (протеиногенных) аминокислот. В других конкретных вариантах осуществления изобретения одну или несколько аминокислот выбирают из глицина, аланина, пролина, аспарагина, глутамина и лизина. В частных (неограничивающих) вариантах осуществления настоящего изобретения, одну или несколько аминокислот выбирают из глицина, серина и лейцина.

В конкретных вариантах осуществления изобретения указанный линкер представляет собой одноцепочечный пептид, аминокислотная последовательность которого состоит по меньшей мере из 1 аминокислоты, предпочтительно, из 1-2 аминокислоты. В частных (неограничивающих) вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная последовательность линкера может состоять более чем из 1-2 аминокислот, например, из 3 или 15 аминокислот.

Соединение терапевтического фермента и транспортного элемента можно осуществлять с непосредственно или с использованием разнообразных химических линкеров, известных в уровне техники. В отдельных предпочтительных (неограничивающих) вариантах осуществления изобретения, соединение терапевтического фермента и транспортного элемента может быть осуществлено с использованием разнообразных бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), иминотиолан (IT), бифункциональных производных сложных имидоэфиров (таких как диметиладипимидат·HCl), активных сложных эфиров (таких как дисукцинимидилсуберат), альдегидов (таких как глутаровый альдегид), бисазидосоединений (таких как бис(пара-азидобензоил)гександиамин), производных бисдiazония (таких как бис(пара-дiazонийбензоил)этилендиамин), диизоцианатов (таких как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активных соединений фтора (таких как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Специалисту в данной области понятно также, что для целей настоящего изобретения могут быть использованы и другие известные из уровня техники химические и пептидные линкеры, не указанные явным образом в настоящем описании.

В отдельных предпочтительных вариантах осуществления изобретения линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», который облегчает высвобождение терапевтического фермента после транспортировки соединения в клетки и ткани. Например, можно применять неустойчивый в кислой среде линкер, чувствительный к действию пептидаз линкер, фотолабильный линкер, диметильный линкер или содержащий дисульфид линкер (Chari R. и др., *Cancer Res.* 52, 1992, сс. 127–131; US 5208020, Chari Ravi J. et al., 04.05.1993). Специалисту в данной области понятно также, что для целей настоящего изобретения могут быть использованы и другие известные из уровня техники расщепляемые

линкеры, облегчающие высвобождение терапевтического фермента после проникновения соединения в клетки и ткани центральной нервной системы.

Термин «эпитоп» представляет собой область антигена, которая связывается антигенсвязывающим белком, в том числе антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подгруппу структурных эпитопов и имеют те остатки, которые непосредственно способствуют аффинности взаимодействия. Эпитопы также могут быть конформационными, которые состоят из нелинейных аминокислот, другими словами, конформационные эпитопы состоят из непоследовательных аминокислот. Эпитопы могут включать детерминанты, которые являются химически активными поверхностными группировками молекул, такими как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорильные группы или сульфонильные группы, а также они могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. В контексте настоящего описания эпитоп представляет собой эпитоп в рецепторе инсулина, представленного последовательностью SEQ ID NO:1, описанный в работах Zhang B, Roth RA. (1991) Proc Natl Acad Sci U S A.; 88(21):9858-9862 и S A Prigent, K K Stanley, and K Siddle. (1990) J. Biol. 1991.

«Рецептор инсулина» (HIR) представляет собой трансмембранный гликопротеин (с молекулярной массой примерно 320000 Да), который состоит из двух  $\alpha$  субъединиц и двух  $\beta$  субъединиц, связанных дисульфидными мостиками ( $\alpha$  субъединицы расположены внеклеточно и содержат инсулин-связывающий домен) и участвует в регуляции всасывания и распределения глюкозы, а также синтезе и накоплении жиров, белков и углеводов в организме человека. Рецепторы инсулина и их внеклеточный инсулинсвязывающий домен (ECD) широко известны в данной области техники как структурно, так и функционально. Под локализацией рецепторов инсулина чаще всего понимают поверхности клеток инсулинчувствительных тканей, таких как клеток соединительных тканей, скелетных мышц, клеток жировой ткани, клеток печени и т.д. Смотри, например, Yip et al. (2003), J Biol. Chem. 278 (30): 27329-27332; и Whittaker et al. (2005), J Biol Chem, 280 (22): 20932-20936. В одном из воплощений HIR в данном документе является человеческим инсулиновым рецептором, содержащим аминокислотную последовательность, указанную в Kasuya et al. (Biochemistry 32 (1993) 13531-13536).

Рецептор инсулина экспрессируется практически повсеместно и использование подобного пути доставки может существенно увеличить биодоступность рекомбинантного фермента и увеличить эффективность терапии. Доставка в ткани мозга осуществляется за счет трансцитоза через капиллярный эндотелий ЦНС, посредством взаимодействия с рецептором инсулина человека.

В периферических тканях и тканях мозга (Hawkes C. et al., 2004), экспрессирующих М6Р, интернализация химерной молекулы может осуществляться обоими путями: взаимодействием антитело – НИР и фермент – М6Р. При этом адресная доставка в лизосомы происходит посредством взаимодействия с М6Р рецепторами. Интернализация посредством НИР (человеческого инсулинового рецептора) приводит к попаданию в эндосомы раннего порядка и последующего трансцитоза. Помимо доставки работоспособного фермента в ЦНС, при многих болезнях лизосомного накопления есть потребность в улучшенной интернализации определенными периферическими тканями (мышцы диафрагмы в болезни Помпе, печень и селезенка в болезни Хантера, почки в болезни Фабри и т.д.).

Термин «**специфичный**» обозначают то, что молекула, имеющая отношение к термину, может образовывать комплекс со специфическим участком другой молекулы. Связывание может быть выявлено методами анализа *in vitro*, как, например, методом плазмонного резонанса (BIAcore, GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Специфичное взаимодействие молекулы с сайтом связывания другой молекулы (аффинность образования комплекса) определяется по показателям  $k_a$  (константа скорости для ассоциации соединений с образованием комплекса),  $k_D$  (константа диссоциации, диссоциации комплекса) и  $K_D(k_D/k_a)$ . Связывание или специфичное связывание означает аффинность связывания ( $K_D$ ) примерно  $10^{-7}$  М или менее, в одном воплощении - от примерно  $10^{-8}$  М до примерно  $10^{-13}$  М, в другом воплощении - от примерно  $10^{-9}$  М до примерно  $10^{-13}$  М.

Термин «**лизосома**» обозначает клеточный органоид, один из видов везикул, который содержит ряд ферментов (кислых гидролаз), способных расщеплять макромолекулы либо самой клетки (например, когда перерабатываются структурные компоненты клетки), либо захваченные извне. Унаследованные дефекты или недостатки лизосомальных ферментов (или других лизосомальных компонентов) могут привести к накоплению недеградированных метаболитов. Гликозаминогликаны (ранее называвшиеся мукополисахаридами) являются обычными полисахаридами поверхности клеток и внеклеточного матрикса и структур. Дефициты ферментов, препятствующие разрушению гликозаминогликана, вызывают накопление фрагментов гликозаминогликана в лизосомах и вызывают обширные изменения костей, мягких тканей и ЦНС.

«**Активность**» фермента (ферментов) по изобретению может быть измерена с применением любого подходящего теста. Обычно определение рН и определение температуры может быть адаптировано к рассматриваемому ферменту. Примеры тестируемых величин рН составляют рН 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. Примеры тестируемых температур составляют 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 или 95°C. Предпочтительные величины рН и температуры находятся в физиологическом диапазоне,

таким как величины pH 4, 5, 6, 7 или 8 и температура 30, 35, 37 или 40°C. Например, протеазная активность может быть измерена с применением любого теста, в котором применяется субстрат, который включает пептидные связи, имеющие отношение к специфичности рассматриваемой протеазы.

Примеры подходящих тестов ферментов включены в экспериментальную часть, в частности, см. пример 2. Как используется в настоящем описании, под термином «**активность**» понимают «**ферментативная активность**», «**специфическая активность**», «**ферментативная специфическая активность**»; «**удельная активность**» в зависимости от контекста описания.

Термин «**гематоэнцефалический барьер**» или «**ГЭБ**» относится к физиологическому барьеру между периферическим кровотоком и головным мозгом и спинным мозгом, который формируется в результате плотных контактов в эндотелиальных плазматических мембранах капилляров головного мозга, создающих плотный барьер, который ограничивает транспорт молекул в головной мозг, даже очень малых молекул, таких как мочевины (60 Да). ГЭБ в головном мозге, барьер между кровью и спинным мозгом в спинном мозге и гематоретинальный барьер в сетчатке представляют собой непрерывные капиллярные барьеры в ЦНС и в настоящем описании они в целом обозначены как гематоэнцефалический барьер (далее также указывается как ГЭБ). ГЭБ включает также барьер между кровью и спинномозговой жидкостью.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть составлены в композицию, например, в фармацевтическую композицию, содержащую одно соединение или комбинацию соединений или его участок (участки) и фармацевтически приемлемый носитель.

«**Фармацевтическая композиция**» относится к смеси одного или более чем одного из соединений, описанных здесь, или их физиологически/фармацевтически приемлемых солей или пролекарств, с другими химическими компонентами, такими как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Целью фармацевтической композиции является облегчение введения соединения в организм.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей, антиоксидант, водные и неводные носители и/или адъюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергирующие средства.

Термин «**эффективное количество**» соединения, например, в фармацевтической композиции, относится к количеству, которое является эффективным в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата (эффекта) у субъекта, подвергаемого лечению, при разумном соблюдении польза/риск.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества (соединения, агента и т.д.), который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает (но, не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант. В частных (неограничивающих) вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтически приемлемый носитель вводят совместно с соединением.

Фармацевтические композиции, которые содержат соединения, применяемые согласно настоящему изобретению, приготавливают с целью хранения путем смешения с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд., под ред. Osol A., 1980), предпочтительно, в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для субъектов в применяемых дозах и концентрациях и они включают буферы, такие как фосфатный, цитратный буферы, а также буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и мета-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (содержащие менее приблизительно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поли(винилпирролидон); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; содержащие металл комплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит натрия хлорид, натрия дигидрофосфата дигидрат, натрия гидроксид, полисорбат.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит соединение HIR-Fab-IDS 5.3 мг, натрия хлорид в количестве 8,0 мг, натрия дигидрофосфата дигидрат в количестве 3,12 мг, натрия гидроксид для коррекции pH до pH6,0, полисорбат 20 в количестве 0,2 мг, вода для инъекций до 1,0 мл.

Фармацевтические композиции, применяемые в настоящем описании, при необходимости могут содержать также более одного действующего вещества (лекарственного средства), активного в отношении лизосомной болезни накопления, необязательно вещества с дополнительными видами активности, которые не оказывают

отрицательного воздействия друг на друга. Тип и эффективные количества таких лекарственных средств зависят, например, от количества соединения, содержащего терапевтический фермент и транспортный элемент, присутствующего в композиции, и клинических параметров субъектов.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем описании, можно вводить пациенту любым пригодным путем, например, внутривенно посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечно, внутривентриально, интрацереброспинально, трансдермально, подкожно, внутрисуставно, подъязычно, интрасиновиально, орально, путем ингаляции, местно или наружно. Предпочтительным является внутривенное введение.

В контексте настоящего описания понятие «доза» относится, например, к дозе, применяемой в том случае, когда фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем описании, вводят пациенту в первый раз «начальная доза», или когда фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем описании, вводят как дозу для постоянного приема «терапевтическая доза».

В целом, рассматриваются разовые дозы в пределах приблизительно от 0,3 до 30 мг/кг веса тела пациента, чаще в пределах от 1 до 12 мг/кг.

Обычно лечение начинают с малых доз соединения HIR-FAB-IDS. Например, начальную дозу антител вводят пациенту, например, путем инъекции или инфузии. Начальная доза должна содержать примерно от 3 до 12 мг/кг.

Начальная доза находится в пределах от 3 до 12 мг/кг и составляет, например, примерно 3 мг/кг, примерно 3,5 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 4,5 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 5,5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 6,5 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 7,5 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 8,5 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 9,5 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 10,5 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 11,5 мг/кг, примерно 12 мг/кг.

Поскольку доза для постоянного приема (терапевтическая) примерно равна начальной дозе или меньше ее, или больше ее, то дозу можно варьировать в указанных пределах и несколько доз в период постоянного приема не должны обязательно представлять собой одну и ту же дозу. Например, дозу можно постепенно снижать или можно произвольно повторно вводить различные дозы.

Терапевтическая доза находится в пределах от 1 до 12 мг/кг и составляет, например, примерно 1 мг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 2,5 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 3,5 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 4,5 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 5,5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 6,5 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 7,5 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 8,5 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 9,5 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 10,5 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 11,5 мг/кг, примерно 12 мг/кг.

В разных вариантах могут потребоваться и другие схемы лечения, например, терапевтическая доза может соответствовать 3 мг/кг, терапевтическая доза может соответствовать 6 мг/кг, терапевтическая доза может соответствовать 12 мг/кг и т. д.

Более предпочтительно, терапевтическая доза выбрана из группы, состоящей из 3 мг/кг, 6 мг/кг, 12 мг/кг соединения HIR-Fab-IDS.

Помимо указания величины дозы в мг/кг, величину дозы можно выражать в виде фиксированной дозы (мг/организм) и/или в виде дозы на единицу поверхности тела (мг/м), соответствующей указанной выше дозе на единицу массы тела.

Нет конкретного ограничения на количество введений дозы для постоянного приема, это количество составляет, например, один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 35 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 500 раз, 1000 раз и 10000 раз.

**«Интервал между введениями»** (интервал между отдельными введениями) представляет собой интервал между введением начальной дозы и введением первой дозы для постоянного приема и интервал между введением  $n$ -ой дозы для постоянного приема ( $n$  обозначает целое число от 1 или выше) и введением  $(n+1)$ -ой дозы для постоянного приема. Интервал между введениями может составлять один или несколько дней, например, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дня, 6 дня, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недели, 6 недели, 7 недели, 8 недели, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 21 неделю, 22 недели, 23 недели, 24 недели, 25 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 1 год. Интервал между введениями можно выражать и в других понятиях, таких как один раз в день, один раз каждые 2 дня, один раз каждые 3 дня, один раз каждые 4 дня, один раз каждые 5 дней, один раз каждые 6 дней, один раз в неделю, один раз каждые 2 недели, один раз каждые 3 недели, один раз каждые 4 недели, один раз каждые 5 недель, один раз каждые 6 недель, один раз каждые 7 недель, один раз каждые 8 недель, один раз каждые 9 недель, один раз каждые 10 недель, один раз каждые 11 недель, один раз каждые 12 недель, один раз каждые 13 недель, один раз каждые 14 недель, один раз каждые 15 недель, один раз каждые 16 недель, один раз каждые 17 недель, один раз каждые 18 недель, один раз каждые 19 недель, один раз каждые 20 недель, один раз каждые 21 неделю, один раз каждые 22 недели, один раз каждые 23 недели, один раз каждые 24 недели, один раз каждые 25 недель, один раз в месяц, один раз каждые 2 месяца, один раз каждые 3 месяца, один раз каждые 4 месяца, один раз каждые 5 месяцев, один раз каждые 6 месяцев, один раз каждые 7 месяцев, один раз каждые 8 месяцев, один раз каждые 9 месяцев, один раз каждые 10 месяцев, один раз каждые 11 месяцев или один раз в год. Кроме того, интервал между введениями можно выражать и в других терминах, таких как каждый день, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые

4 дня, каждые 5 дней, каждые 6 дней, каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждые 9 недель, каждые 10 недель, каждые 11 недель, каждые 12 недель, каждые 13 недель, каждые 14 недель, каждые 15 недель, каждые 16 недель, каждые 17 недель, каждые 18 недель, каждые 19 недель, каждые 20 недель, каждые 21 неделю, каждые 22 недели, каждые 23 недели, каждые 24 недели, каждые 25 недель, каждый месяц, каждые 2 месяца, каждые 3 месяца, каждые 4 месяца, каждые 5 месяцев, каждые 6 месяцев, каждые 7 месяцев, каждые 8 месяцев, каждые 9 месяцев, каждые 10 месяцев, каждые 11 месяцев или каждый год.

Интервал между введением начальной дозы и введением первой дозы для постоянного приема и интервал между введением  $n$ -ой дозы для постоянного приема ( $n$  обозначает целое число от 1 или выше) и введением  $(n+1)$ -ой дозы для постоянного приема могут быть одинаковыми; однако указанные интервалы не обязательно должны быть одинаковыми. Например, интервал между введением начальной дозы и введением первой дозы для постоянного приема может быть длиннее, чем интервал между введением  $n$ -ой дозы для постоянного приема и введением  $(n+1)$ -ой дозы для постоянного приема; или интервал между введением начальной дозы и введением первой дозы для постоянного приема может быть короче, чем интервал между введением  $n$ -ой дозы для постоянного приема и введением  $(n+1)$ -ой дозы для постоянного приема. Кроме того, интервал между введением  $n$ -ой дозы для постоянного приема и введением  $(n+1)$ -ой дозы для постоянного приема и интервал между введением  $m$ -ой дозы для постоянного приема ( $m$  обозначает целое число от 1 или выше) и введением  $(m+1)$ -ой дозы для постоянного приема могут быть одинаковыми; однако указанные интервалы не обязательно должны быть одинаковыми или различными. Например, с возрастанием количества раз введения дозы для постоянного приема интервал между введениями можно удлинять или укорачивать.

Более предпочтительно, интервал между введением составлял одну неделю (7 дней).

Интервал между введениями доз, также понимается как интервал между введениями фармацевтических композиций.

Схему введения определяют, например, исходя из соображений воздействий и безопасности. Кроме того, схему введения определяют, исходя из удобства для пациента, в диапазоне, который не ухудшает эффективность и безопасность.

В контексте настоящего изобретения понятие «почти одинаковый» означает, что различие составляет примерно 20% или менее, предпочтительно различие составляет 10% или менее, или более предпочтительно различие составляет 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее, 2% или менее или 1% или менее.

Введение доз заявляемого терапевтического соединения можно осуществлять любым пригодным для этого путем, хорошо известным специалисту в данной области, например, путем инъекций, таких как внутривенные, внутримышечные или подкожные инъекции. Выбор конкретного пути введения терапевтического соединения осуществляется специалистом в данной области и зависит, в частности, от того, является ли введение кратковременным или длительным. Специалисту в данной области понятно, что для введения доз заявляемого терапевтического соединения могут быть использованы и другие пути введения, известные из уровня техники, например (без ограничения), интратекальное введение, внутриартериальное введение, внутрибрюшинное введение, трансдермальное введение, ингаляционное введение, трансбуккальное введение, интраназальное введение, пероральное введение, сублингвальное введение или трансназальное введение (Felice B.R., Wright T.L., Boyd R.B. Safety Evaluation of Chronic Intrathecal Administration of Idursulfase-IT in Cynomolgus Monkeys. - Toxicol Pathol. 2011 Aug;39(5):879-9, WO 2011/044542 A1).

В контексте настоящего описания можно рассматривать различные схемы введения доз, включая, но не ограничиваясь только ими, одноразовые или многократные введения в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Для лечения эффективная доза соединения HIR-FAB-IDS варьирует в пределах от 1 мг/кг веса тела до 12 мг/кг веса тела, предпочтительно приблизительно от 3 мг/кг веса тела до 12 мг/кг веса тела, при еженедельном введении (один раз в неделю), предпочтительно путем внутривенного введения предпочтительно в течение 3 часов.

Каждый флакон препарата предназначен только для однократного применения и содержит 15 мг соединения HIR-FAB-IDS в 3 мл раствора. Перед внутривенным введением концентрат препарата необходимо развести 0,9% раствором натрия хлорида.

Термины «**примерно**», «**приблизительно**» обозначают все значения, которые выражены числами с одним и двумя знаками после запятой.

«**Субъект**», «**индивидуум**» или «**пациент**» является млекопитающим. Млекопитающие включают, но, не ограничиваясь ими, домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и приматов, таких как обезьяны, в частности, высшие обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент является человеком.

В контексте настоящего описания термин «**лечение**» (и его грамматические вариации, такие как «лечить» или «процесс лечения») относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики или в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но, не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических

последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления предлагаемые соединения применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

В контексте настоящего описания термин «**профилактика**» или «предотвращение» охватывает профилактическое введение и может снизить частоту или вероятность возникновения заболевания (например, МПС II типа с неврологической составляющей).

Доставка или транспортировка соединения HIR-FAB-IDS субъекту (например, путем прямого введения) и применения на практике других способов согласно настоящему описанию можно использовать для уменьшения, лечения, предотвращения или иного уменьшения интенсивности любого подходящего аспекта прогрессирования лизосомной болезни накопления (а именно прогрессирования МПС II типа с неврологической составляющей). Способы, которые снижают, предотвращают или иным способом уменьшают интенсивность подобных аспектов прогрессирования МПС II типа с неврологической составляющей, индивидуально или коллективно, представляют собой дающие преимущество признаки.

В другом аспекте предложен способ уменьшения риска прогрессирования МПС II типа с неврологической составляющей, снижения риска дальнейшего прогрессирования МПС II типа с неврологической составляющей, которые прошли инициацию, и/или обеспечения схемы лечения для уменьшения прогрессирования МПС II типа с неврологической составляющей у человека, который включает применение у пациента одной или более терапий первой линии в количестве и по схеме, достаточной для достижения ответа (частичного или полного ответа), а затем введения количества соединения HIR-FAB-IDS пациенту или включает применение у пациента в качестве терапии первой линии.

В дополнительном аспекте предложен способ стимулирования ремиссии МПС II типа с неврологической составляющей у субъекта, например, человека, включающий введение композиции, содержащей соединения HIR-FAB-IDS субъекту с целью индуцировать ремиссию МПС II типа с неврологической составляющей у него.

В еще одном дополнительном аспекте предложен способ уменьшения риска развития МПС II типа с неврологической составляющей, уменьшения времени до МПС II типа с неврологической составляющей, диагностированного на ранних стадиях, включающий введения пациенту профилактического эффективного количества соединения HIR-FAB-IDS.

В дополнительном аспекте предложен способ увеличения вероятности выживаемости в течение соответствующего периода у человека, у которого диагностировали МПС II типа. В другом аспекте предложен способ улучшения качества жизни МПС II типа субъекта, включающий введение пациенту композиции в количестве, эффективном для улучшения качества его жизни.

Термин «ЦНС» или «**центральная нервная система**» относится к комплексу нервных тканей, которые контролируют функцию организма, и включают головной мозг и спинной мозг.

В настоящем описании термин «**лизосомная болезнь накопления**» (LSD, от англ. "lysosomal storage disease"; также может указываться как «**лизосомальная болезнь накопления**») относится к редкому генетическому заболеванию, приводящему к потере лизосомных функций, описанных выше, вследствие частичной или полной утраты активности одного из лизосомных ферментов. В этом случае для восполнения фермента, активность которого полностью или частично утрачена, или недостающего фермента, необходима ФЗТ. В настоящем описании термин «**лизосомная болезнь накопления**» взаимозаменяемо используют с термином «**лизосомное расстройство накопления**» (также может указываться как «**лизосомальное расстройство накопления**»). Лизосомные болезни накопления можно классифицировать в зависимости от дефекта или дефицита фермента на: (i) сфинголипидоз, (ii) мукополисахаридоз, (iii) болезнь накопления гликогена, (iv) муколипидоз, (v) олигосахаридоз, (vi) липидоз, (vii) нарушение лизосомного транспорта и так далее.

Далее лизосомные болезни накопления будут описаны более подробно в соответствии с их классификацией.

В настоящем описании термин «**сфинголипидоз**» относится к генетически обусловленному синдрому недостаточности лизосомного фермента, гидролизующего боковые углеводные цепи или боковые холиновые цепи сфинголипидов. Заболевания классифицируют в зависимости от распределения каждого запасаемого липида, так, сюда входят болезнь Краббе, вызванная дефицитом галактоцереброзидазы, болезнь Фабри, вызванная дефицитом  $\alpha$ -галактозидазы А, болезнь Ниманна-Пика, вызванная дефицитом сфингомиелиназы, болезнь Гоше, вызванная дефицитом глюкоцереброзидазы, болезнь Тау-Сакса, вызванная дефицитом гексозаминидазы А и так далее, и они являются заболеваниями, которые наследуются по аутосомно-рецессивному типу, за исключением болезни Фабри, которая представляет собой генетическое заболевание, сцепленное с X-хромосомой.

В настоящем описании термин «**мукополисахаридоз**» (MPS) относится к синдрому с генетической недостаточностью гидролазы мукополисахаридов, вызванному дефицитом фермента, разлагающего углеводные цепи, сульфатазы, ацетилтрансферазы и так далее. Основным симптомом мукополисахаридоза (MPS) является избыточная секреция мукополисахаридов с мочой. В настоящее время MPS классифицируют на 6 типов, среди которых заболевание I типа включает синдром Гурлер и синдром Шейе, II тип включает синдром Хантера, III тип включает синдром Санфилиппо типов А, В, С и D; IV тип включает

синдром Моркио А и В; VI тип включает синдром Марото-Лами и VII тип включает синдром Слая.

В настоящем описании термин **«болезнь накопления гликогена»** (также известная под названием **«гликогеноз»**) относится к заболеванию с врожденным нарушением метаболизма углеводов, вызванному накоплением гликогена, и подразделяется на подтипы I-VII. Подтипами болезни накопления гликогена, ассоциированной с лизосомной болезнью накопления (LSD), являются типы II (болезнь Помпе) и III b (болезнь Данона).

Подробное описание лизосомных болезней накопления, приведенных в настоящем описании, а также раскрытых в таблице 1, приведено в: The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases (Scriver's OMMBID), Part 16 (David L. Valle, Stylianos Antonarakis, Andrea Ballabio, Arthur L. Beaudet, Grant A. Mitchell, McGraw-Hill Education, 2007).

**«Мукополисахаридоз типа I (МПС I)»** представляет собой наследственное метаболическое заболевание, вызванное дефектом фермента  $\alpha$ -L-идуронидазы (IDUA), функция которого заключается в том, чтобы расщеплять кислые мукополисахариды - гепарансульфат и дерматансульфат. Недостаточный уровень IDUA приводит к патологическому накоплению указанных мукополисахаридов в тканях и органах больного, например, в сердце, печени и центральной нервной системе. Симптомы, включая нейродегенерацию и задержку умственного развития, появляются в детстве и, из-за повреждения органов, может произойти ранняя смерть. Генетический дефицит расщепления углеводов, лизосомального фермента  $\alpha$ -L-идуронидазы вызывает лизосомную болезнь накопления, известную как мукополисахаридоз типа I (МПС I). МПС I (MPS I) в тяжелой форме широко известен как синдром Гурлер, и связанный с множеством проблем, такими как задержка умственного развития, помутнение роговицы, грубые черты лица, сердечные заболевания, заболевания дыхательных путей, увеличение печени и селезенки, грыж, и скованность суставов. Пациенты, страдающие от синдрома Гурлер, обычно умирают в возрасте до 10 лет. При средней форме, известной как синдром Гурлер-Шейе, как правило, психические функции сильно не затрагиваются, но и физические проблемы могут привести к смерти в подростковом возрасте или в возрасте от двадцати до двадцати девяти лет. Синдром Шейе представляет собой легкую форму МПС I. Он совместим с нормальной продолжительностью жизни, но скованность суставов, помутнение роговицы и болезни сердечных клапанов вызывают серьезные проблемы.

**«Мукополисахаридоз типа II (МПС II)»** или «синдром Хантера» представляет собой X-сцепленное наследственное метаболическое расстройство, обусловленное недостаточностью фермента идуронат-2-сульфатазы (I2S). I2S локализуется в лизосомах и играет важную роль в катаболизме гликозаминогликанов (ГАГ) гепаран- и дерматансульфата. В отсутствие фермента эти субстраты накапливаются в клетках, в конечном счете вызывая застой, а затем гибель клеток и разрушение тканей. В связи с

распространенной экспрессией фермента у пациентов с MPS II поражаются различные типы клеток, органов и систем. Характерной клинической особенностью этого заболевания является дегенерация центральной нервной системы (ЦНС), которая приводит к когнитивным нарушениям (например, снижению IQ). Кроме того, МРТ-сканирование больных выявило повреждения белого вещества, расширение периваскулярных пространств в паренхиме головного мозга, ганглиях, мозолистом теле и стволе мозга, атрофию и вентрикуломегалию (Wang et al. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2009). Болезнь обычно проявляется в первые годы жизни органомегалией и скелетными аномалиями. Некоторые больные испытывают прогрессирующую потерю когнитивных функций, причем большинство больных умирают от осложнений, связанных с заболеванием, в первом или втором десятилетии жизни (Raluu-Callado M. et al. *Orphanet J Rare Dis*. 2013; 8: 101;).

В контексте настоящего описания термин **«неврологическая составляющая»** относится к заболеванию или нарушению, которое поражает ЦНС и/или этиология которого связана с ЦНС. Примерами заболеваний или нарушений ЦНС являются (но, не ограничиваясь только ими) невропатия, амилоидоз, рак, глазное заболевание или нарушение, вирусная или микробная инфекция, воспаление, ишемия, нейродегенеративное заболевание, эпилептический припадок, нарушения поведения и лизосомная болезнь накопления. Конкретными примерами неврологических нарушений являются (но, не ограничиваясь только ими) нейродегенеративные заболевания (включая, но, не ограничиваясь только ими, болезнь (диффузных) телец Леви, постмиелитический синдром, синдром Шая-Дрейджера, оливопонтocerebellарную атрофию, болезнь Паркинсона, мультисистемную атрофию, стриатонигральную дегенерацию), тауопатии (включая, но, не ограничиваясь только ими, болезнь Альцгеймера и супрануклеарный паралич), прионные заболевания (включая, но, не ограничиваясь только ими, бычью спонгиозную энцефалопатию, скрепи, синдром Крейтцфельдта-Якоба, куру, болезнь Герстманна-Штросслера-Шейнкера, хроническую изнуряющую болезнь и фатальную семейную бессонницу), бульварный паралич, болезнь двигательных нейронов и гетеродегенеративные нарушения нервной системы (включая, но, не ограничиваясь только ими, болезнь Канавана, болезнь Гентингтона, нейронный цероидный липофусциноз, болезнь Александра, синдром Туретта, синдром курчавых волос Менкеса, синдром Коккейна, синдром Галлервордена-Шпатца, болезнь Лафоры, синдром Ретта, гепатолентикулярную дегенерацию, синдром Леша-Найхана и синдром Унферрихта-Лундборга), деменцию (включая, но не ограничиваясь только ими, болезнь Пика и спиноцереbellарную атаксию), рак (например, рак ЦНС и/или головного мозга, включая метастазы в головной мозг, образующиеся от рака в какой-либо области организма).

В контексте данного описания термин **«неврологическая составляющая»** представляет собой **«нейропатическую (с нейрокогнитивными нарушениями)»**, «не

нейропатическую (без нейрокогнитивных нарушений)», «нейрокогнитивные эффекты», «нейропатические заболевания», «нейропатическая форма» и любые другие нарушения, в том числе периферические, которые отражают суть терапии с проникновением препарата в/через ЦНС.

Расстройства МПС связаны с широким спектром нейрокогнитивных эффектов, от легких проблем с вниманием и исполнительными функциями до прогрессирующих и дегенеративных нейропатических заболеваний.

Нейропатическая форма МПС II представляет собой сложную задачу из-за вариабельности течения заболевания с различиями во времени замедления развития и угасания. МПС II имеет наибольшую неопределенность в отношении нейрокогнитивного прогрессирования заболевания. Он подразделяется на две формы: тяжелая нейропатическая форма с большим влиянием на нейрокогнитивную функцию и ослабленная форма, которая, как считается, имеет незначительные нейрокогнитивные последствия или не имеет их вовсе (Shapiro, Elsa G., and Julie B. Eisengart. "The natural history of neurocognition in MPS disorders: a review." *Molecular Genetics and Metabolism* 133.1 (2021): 8–34).

Проблемы со стороны центральной нервной системы при МПС II, помимо нейрокогнитивных нарушений, включают поведенческие нарушения, сообщающуюся гидроцефалию, судороги, апноэ во сне и компрессию спинного мозга. Более высокий риск гидроцефалии и судорог на более поздних стадиях заболевания может усугубить ухудшение нейрокогнитивных функций (S. Al Sawaf, E. Mayatepek, B. Hoffmann, Neurological findings in Hunter disease: pathology and possible therapeutic effects reviewed, *J. Inherit. Metab. Dis.* 31 (4) (2008) 473–480; I.V. Schwartz, et al., A clinical study of 77 patients with mucopolysaccharidosis type II, *Acta Paediatr.* 96 (455) (2007) 63–70).

Соединения, предлагаемые в изобретении, можно применять в терапии либо индивидуально, либо в комбинации с другими средствами. Например, предлагаемое соединение, содержащее терапевтический фермент и транспортный элемент, соединенные линкером, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. В конкретных вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой терапевтическое средство, эффективное в отношении лечения того же самого неврологического нарушения, для которого применяют соединение, предлагаемое в изобретении, или другого неврологического нарушения. Примерами дополнительных терапевтических средств являются, без ограничения ими, различные описанные выше неврологические лекарственные средства, включая ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, галантамин, ровастигмин и такрин), антагонисты NMDA-рецептора (такие как мемантин), ингибиторы агрегации пептида амилоида бета, антиоксиданты, модуляторы  $\gamma$ -секретазы, имитаторы фактора роста нервной ткани (NGF) или агенты для генной терапии NGF,

агонисты PPAR $\gamma$ , ингибиторы HMG-CoA-редуктазы (статины), ампакины, блокаторы кальциевого канала, антагонисты ГАМК-рецептора, ингибиторы киназы - гликогенсинтазы, иммуноглобулин, предназначенный для внутривенного введения, агонисты мускаринового рецептора, модуляторы никотинового рецептора, средства активной или пассивной иммунизации против пептида амилоид бета, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты рецептора серотонина и антитела к пептиду амилоиду бета. Такие указанные выше комбинированные терапии включают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических средств включают в одну и ту же или в различные композиции) и отдельное введение, в этом случае введение соединения, содержащего терапевтический фермент и транспортный элемент, соединенных линкером, предлагаемого в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта.

Некоторые определенные выше термины могут встречаться более чем один раз, и в таком случае каждый термин должен определяться независимо от другого.

Далее подробно будут описаны приведенные в качестве примера осуществления настоящего изобретения. При этом каждое из объяснений и осуществлений, приведенных в качестве примера в данном документе, может быть справедливо и для других объяснений и приведенных в качестве примера осуществлений. Таким образом, все комбинации различных факторов, описанных в данном документе, входят в объем настоящего изобретения. Более того, объем настоящего изобретения не ограничивается конкретным описанием, приведенным ниже.

Специалисту в уровне техники ясно, что без затрат изобретательского творчества могут быть разработаны дополнения и изменения относительно раскрытого в ниже представленных примерах в рамках настоящего изобретения.

### **Примеры**

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно с отсылкой к следующим Примерам. Однако описанные ниже Примеры приведены исключительно в иллюстративных целях и не предназначены ограничивать это изобретение.

#### **Пример 1. Получение**

Для получения соединений культивировали и очищали клетки животных, в которые был введен экспрессирующий вектор для клеток животных.

Методы получения человеческих антител в настоящее время известны. Например, представляющее интерес человеческое антитело можно получать, осуществляя иммунизацию трансгенного животного, несущего полный спектр человеческих генов антител, представляющим интерес антигеном (см. публикации международных заявок на патент WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 и WO 96/33735).

Генетически модифицированные антитела также можно получать с помощью известных методов. Конкретным примером является химерное антитело, которое представляет собой антитело, которое содержит переменные области Н-цепи и L-цепи антитела иммунизированного животного и константные области Н-цепи, и L-цепи человеческого антитела. Химерные антитела можно получать путем связывания ДНК, кодирующих переменные области антитела, происходящего из иммунизированного животного, с ДНК, кодирующими константные области человеческого антитела, встраивания их в экспрессионный вектор и затем интродуцируя его в клетки-хозяева для получения антител.

Гуманизированное антитело представляет собой модифицированное антитело, которое часто называют также реконструированным человеческим антителом. Гуманизированное антитело конструируют путем переноса CDR антитела, происходящего из иммунизированного животного, в гипервариабельные участки человеческого антитела. Общие методы генетической рекомбинации для получения таких антител также известны (см. опубликованную заявку на европейский патент EP 239400; опубликованную международную заявку на патент WO 96/02576; Sato K. и др., Cancer Research, 53, 1993, сс. 851-856; опубликованную международную заявку на патент WO 99/51743).

#### *Конструирование экспрессирующих векторов*

Аминокислотные последовательности первая LC-HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO:2) и вторая HC-HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO:4)) для получения вариантов HIR-FAB-IDS, включая сигнальный пептид MDWTWRVFCLLAVAPGAHS, были конвертированы в нуклеотидные последовательности. Для синтеза гена с последующим клонированием в вектора pCLN-1 к 5'-концу последовательностей были добавлены: сайт рестрикции HindIII и последовательность Kozak. К 3'-концу последовательностей были добавлены 2 стоп-кодона и сайт рестрикции XbaI.

Оптимизацию нуклеотидной последовательности по кодонному составу для клеток китайского хомячка проводили с помощью ресурсов: <http://gcu.schoedl.de> и <http://www.kazusa.or.jp>. Синтез легкой и тяжелой цепи LC-HIR-FAB-IDS и HC-HIR-FAB-IDS был осуществлён в GenArt (США) и переданы в составе векторов pRA1675 и pRA1673 (содержащие гены LC-HIR-FAB-IDS и HC-HIR-FAB-IDS, соответственно).

Последовательности HC-HIR-FAB-IDS, LC-HIR-MAB из плазмид pRA1675 и pRA1673 клонировали в экспрессионный вектор pCLN-1 по сайтам HindIII/XbaI с получением векторов pGNR-055-007 (pCLN-1- HC-HIR-FAB-IDS) и pGNR-055-008 (pCLN-1- LC-HIR-FAB-IDS). Полученные вектора линеаризовали по сайтам BspHI/PvuI.

Векторы по настоящему изобретению конструировали в соответствии с методами молекулярной биологии, хорошо известными в данной области техники. Смотрите Brown T, "Gene Cloning" (Chapman & Hall, London, GB, 1995); Watson R, et al., "Recombinant DNA", 2nd

Ed. (Scientific American Books, New York, NY, US, 1992); Alberts B, et al., "Molecular Biology of the Cell" (Garland Publishing Inc., New York, NY, US, 2008); Innis M, et al., Eds., "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Academic Press Inc., San Diego, CA, US, 1990); Erlich H, Ed., "PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification" (Stockton Press, New York, NY, US, 1989); Sambrook J, et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, US, 1989); Bishop T, et al., "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press, Oxford, GB, 1987); Reznikoff W, Ed., "Maximizing Gene Expression" (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, US, 1987); Davis L, et al., "Basic Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., New York, NY, US, 1986), Schleef M, Ed., "Plasmid for Therapy and Vaccination" (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001).

#### *Получение моноклональной клеточной линии*

Родительская клеточная линия CHO-S. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 70% влажности, в среде BalanCD CHO Growth A (Invitrogen). Стабильную трансфекцию проводили на приборе NEON (Invitrogen) по стандартному протоколу для клеток CHO с использованием двух линейризованных плазмид pCLN-1-HC-HIR-FAB-IDS и pCLN-1-LC-HIR-FAB-IDS. Соотношение ДНК для проведения трансфекции использовали эквимольное.

Через 48 ч был проведен рассев трансфицированных пулов на минипулы в 96-луночные планшеты в среду BalanCD CHO Growth A, содержащую 600 мкг/мл селективного антибиотика неомицина. Минипулы культивировали в стационарных условиях 10 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 70% влажности, после чего был проведен ряд скринингов по продуктивности с помощью ИФА. Лидерный минипул был клонирован в полутвердую среду ClonaCell Flex (STEMCELL) для роста отдельных колоний, используя 6-ти луночные планшеты. Планшеты инкубировали 10 дней при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 70% влажности.

В ходе скрининга определялась концентрация целевого белка HIR-FAB-IDS, секретируемого в культуральную жидкость. Определение проводилось методом «сэндвич» ИФА, с использованием вместо первичных антител фрагмента рекомбинантного инсулинового рецептора человека (5 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6), в качестве вторых антител использовались конъюгированные с пероксидазой хрена крысиные антитела к идуронат-2-сульфатазе (в разведении к 1:10000). Проявляли раствором тетраметилбензидина, реакцию останавливали 0,5 М серной кислотой.

По результатам скрининга 6-ти лун. планшетов были выбраны 20 лидерных минипулов с продуктивностью от 0,4 до 2,1 мг/л, которые были перенесены в колбы для адаптации к суспензионному культивированию. Для адаптации к суспензионному культивированию, было проведено 3 пассажа, после чего 20 минипулов были заморожены.

Отбор клонов проводили в автоматическом режиме с помощью робота ClonePix (Molecular Devices) в 96-ти луночные планшеты. Полученные клоны подвергались скринингу.

Для этого моделировался 7-дневный процесс культивирования в режиме batch, в котором клоны оценивались по следующим параметрам динамики жизнеспособности культуры, динамики плотности жизнеспособных клеток, концентрация целевого HIR-FAB-IDS, зависимость волюметрической продукции от кумулятивной плотности клеток.

#### *Культивирование клеток продуцента*

Культивирование клеток продуцента, экспрессирующего HIR-FAB-IDS, проводилось в периодическом режиме с подпиткой (фед-батч) с использованием питательной среды BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific) и нутриентной добавки BalanCD CHO Feed 2 (Irvine Scientific) в течение 12 суток в биореакторе с верхнеприводной мешалкой при температуре 37°C и pH 6,9. После процесса культивирования культуральная жидкость осветлялась путём глубинной фильтрации и передавалась на выделение.

#### *Выделение и очистка*

Выделение и очистку проводят при помощи стандартных технологий выделения, очистки белков. Соединение можно выделить или очистить любым способом, известным в данном уровне техники, для выделения или очистки белка, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, высокоэффективной жидкостной хроматографии, с помощью аффинности, с использованием белка А и сортирующей по размеру колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или с помощью любой другой стандартной техники выделения или очистки белков.

#### **Пример 2. Определение уровня ферментативной активности Fab-фрагмента антитела к инсулиновому рецептору, соединенного с аминокислотной последовательностью идуронат-2-сульфатазы**

Специфическую активность HIR-FAB-IDS и HIR-MAB-IDS определяют флуориметрическим методом используя 4-мутилумбеллиферил-L-идуронид-2-сульфат (4-MUS) (Moscerdam Substrates, Нидерланды) (Voznyi YV et al., 2001; Tolun AA, et al., 2012; 9.

Johnson BA et al., 2013; Azadeh M et al., 2017). В процессе проведения анализа субстрат гидролизуется идуронат-2-сульфатазой с получением 4-мутилумбеллиферил-L-идуронид (MUBI), которая гидролизуется идуронидазой (IDUA, Альдуразим, Джензайм, США) до 4-метилумбеллиферила (4-MU), который детектируют флуориметрически, используя следующие настройки флуориметра: возбуждение флуоресценции при длине волны 450 нм и детекции флуоресценции при длине волны 365 нм. Калибровочную кривую строят по стандартному раствору 4-MU (Sigma-Aldrich, США). В ходе анализа смесь сначала инкубируют при 37 °С, значении водородного показателя pH 4,5 в течение 4 часов, затем добавляют IDS в количестве 12 мкг и дополнительно инкубируют смесь при 37°C в течение 24 ч. Инкубацию останавливают добавлением 0,2 мл 0,5 М карбоната натрия pH 10,3. HIR-FAB-IDS проявляет специфическую ферментативную (идуронат-2-сульфатазную)

активность в отношении субстрата 4-MU- $\alpha$ ldoA-2S (4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -L-идопиранозидуронат-2-сульфат).

#### *Приборы и оборудование*

1. Термостатируемый шейкер PST-60 HL-4 (BioSan, Латвия).
2. Многофункциональный ридер Spectra Max M3 (Molecular Devices, США).
3. Программное обеспечение для многофункционального ридера Soft Max Pro (Molecular Devices, США).
4. Весы аналитические ML 204 (Mettler Toledo, Швейцария)
5. 96-луночный черный планшет с несорбирующей поверхностью (Corning, США, кат. № 3916).

#### *Реактивы*

1. 4-метилумбеллиферона натриевая соль (Sigma-Aldrich, кат. № M1508).
2. Рекомбинантная  $\alpha$ -L-идуронидаза человека (R&D SYSTEM, кат. № 4119-GH).
3. 4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -L-идопиранозидуроновой кислоты 2-сульфат натриевая соль, 0,5 мг/флакон (USBiological, кат. № 017551).
4. Натрия ацетат безводный (AppliChem Panreac, кат. № 141633.1211).
5. Кислота уксусная (Fluka, кат. № 49199).
6. Бычий сывороточный альбумин (Sigma, кат. № A7030).
7. Натрия карбонат (Sigma-Aldrich, кат. № S7795).
8. Натрия бикарбонат (Sigma-Aldrich, кат. № S6297).
9. Свинца диацетата тригидрат (Aldrich, кат. № 467863).
10. Натрия фосфат двузамещенный дигидрат (Sigma-Aldrich, кат. № 71643).
11. Кислота лимонная безводная (AppliChem Panreac, кат. № 141808).

#### *Приготовление растворов*

Раствор для разведения образцов, pH ( $5,5 \pm 0,2$ ). Около 4,1 г натрия ацетата безводного и 0,5 г бычьего сывороточного альбумина помещают в химический стакан вместимостью 1 л, растворяют в 700 мл воды очищенной. Доводят pH раствора до значения ( $5,5 \pm 0,2$ ) кислотой уксусной. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок годности – 3 месяца при температуре от 2 до 8 °C.

Раствор для разведения субстрата, pH ( $5,00 \pm 0,05$ ). В химический стакан вместимостью 500 мл помещают 4,1 г натрия ацетата безводного, 1,9 г свинца диацетата тригидрата, прибавляют 450 мл воды очищенной, перемешивают до растворения. Доводят pH раствора до значения ( $5,00 \pm 0,05$ ) кислотой уксусной (около 1,1 мл). Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, объем раствора доводят водой очищенной до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Срок годности – 3 месяца при температуре от 2 до 8 °С.

Раствор субстрата (1,25 ммоль/л). 0,83 мл раствора для разведения субстрата вносят во флакон, содержащий субстрат (4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -L-идопиранозидуроново́й кислоты 2-сульфат натрия́евая соль), аккуратно перемешивают. Полученный раствор делят на аликвоты по 0,2 мл и замораживают.

Срок годности – 3 месяца при температуре не выше минус 70 °С.

Раствор рекомбинантной  $\alpha$ -L-идуронидазы человека. Во флакон, содержащий рекомбинантную  $\alpha$ -L-идуронидазу человека (10 мкг) прибавляют 400 мкл воды очищенной, перемешивают. Полученный раствор делят на аликвоты по 0,1 мл и замораживают.

Срок годности – 3 месяца при температуре не выше минус 70 °С.

0,1 М раствор кислоты лимонной. Около 19,2 г кислоты лимонной безводной помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в 900 мл воды очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки, фильтруют через мембранный фильтр 0,22 мкм.

Срок годности – 3 месяца при температуре от 15 до 25 °С.

0,2 М раствор натрия фосфата двузамещенного. Около 35,6 г натрия фосфата двузамещенного дигидрата помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в 900 мл воды очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки, фильтруют через мембранный фильтр 0,22 мкм.

Срок годности – 3 месяца при температуре от 15 до 25 °С.

Фосфатно-цитратный буферный раствор, рН (4,5  $\pm$  0,1). В мерной колбе вместимостью 100 мл смешивают 55,0 мл 0,1 М раствора кислоты лимонной и 45,0 мл 0,2 М раствора натрия фосфата двузамещенного и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Срок годности – 3 месяца при температуре от 15 до 25 °С.

0,5 М раствор натрия бикарбоната. Около 42,0 г натрия бикарбоната помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в 900 мл воды очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Срок годности – 6 месяцев при температуре от 15 до 25 °С.

0,5 М раствор натрия карбоната. Около 53,0 г натрия карбоната помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в 900 мл воды очищенной, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Срок годности – 6 месяцев при температуре от 15 до 25 °С.

Стоп-раствор, рН (10,8 ± 0,5). В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 900 мл 0,5 М раствора натрия карбоната и 100 мл 0,5 М раствора натрия бикарбоната, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Срок годности – 6 месяца при температуре от 15 до 25 °С.

Исходный раствор 4-метилумбеллиферона натриевой соли (100 мкмоль/мл). В мерную колбу объемом 50 мл помещают около 1,0 г (точная навеска) 4-метилумбеллиферона натриевой соли, прибавляют 30 мл воды очищенной, перемешивают, доводят водой очищенной до метки. Раствор делят на аликвоты по 2,0 мкл.

Срок годности – 6 месяца при температуре не выше минус 18 °С.

Рабочий стандартный раствор 4-метилумбеллиферона натриевой соли (50 нмоль/мл).

Аликвоту исходного раствора 4-метилумбеллиферона натриевой соли выдерживают в водяной бане в течение 5 минут при температуре 37 °С. Готовят последовательные разведения по следующей схеме:

№ раствора	Исходный р-р 4-MU*	Раствор №2	Стоп-раствор	Концентрация, нмоль/мл
1	100	-	9900	1000
2	-	500	9500	50

\* 4-MU – 4-метилумбеллиферона натриевой соли.

Разведения рабочего стандартного раствора 4-метилумбеллиферона натриевой соли. Готовят разведения рабочего стандартного раствора 4-метилумбеллиферона натриевой соли по следующей схеме:

№№ разведения	Объем рабочего стандартного раствора (50 нмоль/мл), мл	Объем стоп-раствора, мл	Концентрация, нмоль/мл
1	0	5,00	0,0
2	0,05	4,95	0,5
3	0,10	4,90	1,0
4	0,15	4,85	1,5
5	0,20	4,80	2,0
6	0,25	4,75	2,5
7	0,30	4,70	3,0
8	0,35	4,65	3,5
9	0,40	4,60	4,0

Разведения испытуемого образца. Испытуемый образец разбавляют раствором для разведения образцов до концентрации 1 мг/мл, исходя из фактического содержания HIR-FAB-IDS, указанного в сертификате. Затем готовят последовательные разведения по следующей схеме:

№ пробирок	Концентрация HIR-FAB-IDS, нг/мл	Раствор HIR-FAB-IDS (1 мг/мл)	Объем раствора, мкл							Раствор для разведения образцов
			№ пробирки							
			1	2	3	4	5	6	7	
1	100000	100	-	-	-	-	-	-	-	900
2	10000		100	-	-	-	-	-	-	900
3	1000			100	-	-	-	-	-	900
4	100				100	-	-	-	-	900
5	10					100	-	-	-	900
6	5						100	-	-	100
7	2,5							100	-	100

Все разведения хранят во льду до начала испытания.

В дальнейших исследованиях используют растворы из пробирок № 5-7.

#### *Проведение анализа*

##### 1-я ферментативная реакция

В лунки планшета вносят по 10 мкл каждого разведения испытуемого образца (в 2-х повторностях), в качестве раствора сравнения используют раствор для разведения образцов. Прибавляют по 20 мкл раствора субстрата (4-метилумбеллиферил  $\alpha$ -L-идопиранозидуроновой кислоты 2-сульфат натрияевая соль). Закрывают планшет пленкой, инкубируют в термостатируемом шейкере в течение 4 часов при температуре  $(37,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$  и скорости перемешивания 250 об/мин. Планшет должен быть защищен от света в течение всего времени инкубации.

##### 2-я ферментативная реакция

По окончании инкубации вносят в лунки планшета по 20 мкл фосфатно-цитратного буферного раствора для остановки 1-ой ферментативной реакции. Затем в каждую лунку добавляют по 10 мкл раствора рекомбинантной  $\alpha$ -L-идуронидазы, аккуратно перемешивают. Закрывают планшет пленкой, инкубируют в термостатируемом шейкере в течение 22-26 часов при температуре  $37 ^\circ\text{C}$  и скорости перемешивания 250 об/мин. Планшет должен быть защищен от света в течение всего времени инкубации.

Для остановки реакции в каждую лунку с инкубируемой смесью вносят 200 мкл стоп-раствора.

В пустые лунки планшета вносят по 260 мкл разведений рабочего стандартного раствора 4-метилумбеллиферона натриевой соли.

В лунках планшета измеряют сигнал флуоресценции при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны детекции 460 нм.

#### Оценка результатов

На основании результатов измерений сигнала флуоресценции в лунках с разведениями рабочего стандартного раствора 4-метилумбеллиферона натриевой соли, строят график линейной зависимости между сигналом флуоресценции и концентрацией 4-метилумбеллиферона натриевой соли (нмоль/мл). Используя уравнение линейной функции, рассчитывают концентрацию 4-метилумбеллиферона, наработанного в ходе реакции в лунках с разведениями испытуемых образцов и раствором сравнения (нмоль/мл).

Специфическую активность  $A$ , в ЕД/мкг, для каждого разведения испытуемых образцов рассчитывают по формуле:

$$A = 0,26 \times \frac{(m - m_0) \times 1000}{240 \times C \times 0,01}$$

где:  $m$  - концентрация 4-метилумбеллиферона, наработанного в ходе реакции в лунках с данным разведением испытуемого образца (среднее значение по 2-м повторностям), нмоль/мл;

$m_0$  - концентрация 4-метилумбеллиферона, наработанного в ходе реакции в лунках с раствором сравнения (среднее значение по 2-м повторностям), нмоль/мл;

0,26 - финальный объем разведений рабочего стандартного раствора и испытуемого образца, внесенных в лунки планшета для измерения сигнала флуоресценции, мл;

240 - время 1-й ферментативной реакции, мин;

$C$  - содержание HIR-Fab-IDS в каждом из приготовленных разведений испытуемого образца, нг/мл;

0,01 - объем разведений испытуемого образца, внесенного в 1-ю ферментативную реакцию, мл;

1000 - коэффициент пересчета нг в мкг.

Итоговое значение специфической активности для испытуемого образца вычисляют как среднее значение специфической активности, вычисленной по каждому разведению.

Полученные результаты определения ферментативной активности вариантов HIR-FAB-IDS и HIR-MAB-IDS в сравнении с препаратом «Элапраза®» представлены в таблице 2.

Таблица 2. Оценка идуронат-2-сульфатазной активности вариантов HIR-FAB-IDS и HIR-MAB-IDS против немодифицированного фермента идуронат-2-сульфатазы (Элапраза®)

Наименование образцов	Активность, ЕД (нмоль/мин)/мкг
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4)	27,0
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:5)	20,0
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:12)	25,2
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:13)	30,2
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:14)	27,5
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:15)	23,4
HIR-MAB-IDS	11,0
HIR-MAB-IDS (AGT-182)	0,85 (51,7+-7 нмоль/час/мкг)
(значение взято из патента US8834874 B2, раскрывающего препарат AGT-182 (см. Fig.12 пример 4, стр. 35)	US8834874 B2
«Элапраза®» (Шайер Хьюман Генетик Терапиз Инк., США)	14,6

Как видно из результатов, представленных в таблице 2, препарат HIR-FAB-IDS проявляет специфическую ферментативную (идуронат-2-сульфатазную) активность в отношении субстрата 4-MU- $\alpha$ IdoA-2S (4-метилумбелиферил  $\alpha$ -L-идопиранозидуронат-2-сульфат) 27,0 ЕД/мкг. При этом свободный рекомбинантный фермент идуронат-2-сульфатазы проявляет активность 14,6 ЕД/мкг. Полноразмерное антитело к инсулиновому рецептору, соединенного с аминокислотной последовательностью идуронат-2-сульфатазы (HIR-MAB-IDS), проявляет меньшую специфическую активность (11,0 ЕД/мкг), в сравнении с HIR-FAB-IDS.

В результате проведенных исследований было показано, что идуронат-2-сульфатаза в составе HIR-FAB-IDS сохраняет основные функциональные (ферментативные) свойства на уровне свободного рекомбинантного фермента. При этом удельная активность HIR-FAB-IDS выше, чем для препарата «Элапраза®» и HIR-MAB-IDS (AGT-182).

Таким образом, обнаружено увеличение ферментативной активности соединения, содержащее транспортный элемент, представляющий собой Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG, специфичный к эпитопу в рецепторе инсулина, соединенный непосредственно или при помощи линкера с терапевтическим ферментом, в сравнении с терапевтическим ферментом без транспортного элемента, и с терапевтическим ферментом с транспортным элементом, представленным MAB.

### **Пример 3. Исследование эффективности препарата HIR-Fab-IDS в периферических тканях мышей линии 24744: B6N.Cg-Idstm1Muen/J IDS KO**

В исследовании эффективности препарата соединения HIR-Fab-IDS, использовались шестьдесят (60) гемизиготных самцов мышей, нокаутных по гену идуронат-2-сульфатазы, B6N.Cg-Idstm1Muen/J (линия JAX № 024744) и двенадцать (12) животных дикого типа (C57BL/6NJ) в качестве контроля. Животным, распределенным по группам с учетом возраста на момент первого дозирования (11 недель), еженедельно вводили препарат соединения HIR-Fab-IDS в дозах 0,3, 1,0 и 3,0 мг/кг и физиологический раствор в качестве контроля в

течение 16 недель. В течение дозирования выполнялись отборы крови и мочи. Нокаутные мыши группы контроля продемонстрировали 4,7-кратное превышение уровня ГАГ в моче по сравнению с нормальными животными. Как показано на Фигуре 4, в группах дозирования препаратом HIR-Fab-IDS уровень ГАГ в моче снижался до уровня нормальных животных после первого введения препарата и сохранялся в течение всего периода дозирования.

Через час после последнего введения животные эвтаназировались, выполнялся терминальный забор крови и тканей. Проводились гистологический анализ тканей, а также измерение уровня активности идуронат-2-сульфатазы и накопления ГАГ в тканях подопытных животных. Масса печени у нокаутных животных в группе контроля в 1,5 раза превышала аналогичные показатели у животных дикого типа. На фоне введения препарата нормализовался вес печени у нокаутных мышей групп дозирования (Фигура 5).

Уровень активности идуронат-2-сульфатазы в плазме нокаутных животных существенно (-70%) отличался от животных дикого типа. Через 1 ч после введения, все группы дозирования соединения HIR-Fab-IDS демонстрировали значительно более высокие значения данного показателя, чем нокаутные животные группы контроля (263–2408 раз), а также животные дикого фенотипа (80–730 раз). Мыши, получавшие 0,3 мг/кг соединения HIR-Fab-IDS, обладали в среднем 263-кратным превышением активности идуронат-2-сульфатазы по сравнению с нокаутными животными, получавшими физ. раствор. Результаты анализа активности идуронат-2-сульфатазы в плазме подопытных животных представлены на Фигуре 6.

Уровень активности идуронат-2-сульфатазы в тканях основных органов (селезенке, печени, почках и сердце) нокаутных животных, не получавших терапию препаратом, был существенно (в среднем на 76%) понижен по сравнению с нормальными животными. Нокаутные животные всех групп дозирования через час после введения препарата демонстрировали значительно более высокие (в среднем в 17–56 раз) значения ферментативной активности идуронат-2-сульфатазы по сравнению с группой животных, получавших физ. раствор, и в 2,6-10 раз превышали таковые у животных дикого типа. Препарат соединения HIR-Fab-IDS не оказывал значительного эффекта на уровень активности фермента в тканях мозга нокаутных животных при введении в низкой и средней дозе. В группе высокой дозы наблюдалось повышение активности идуронат-2-сульфатазы в тканях мозга нокаутных животных в среднем на 50% по сравнению с группой плацебо, но на 82% ниже по сравнению с животными дикого типа.

Измерение уровня ГАГ в тканях основных органов нокаутных животных, не получавших терапию препаратом, было существенно (в среднем в 12 раз) выше по сравнению с нормальными животными. Нокаутные животные всех групп дозирования демонстрировали значительно более низкие (в среднем на 70%) значения уровня ГАГ по сравнению с группой животных, получавших физ. раствор (в среднем -70% во всех тканях и дозовых группах) и

ненамного (в 1,0–1,5 раза во всех тканях и дозовых группах) превышали значения данного показателя у нормальных животных. Уровни ГАГ тканей мозга не отличались между нокаутными и нормальными животными, а также между нокаутными животными, получавшими препарат, и группой контроля (получавшие физ. раствор).

Таким образом, 16-недельное введение препарата нокаутным по гену идуронат-2-сульфатазы мышам в дозах 0,3–3 мг/кг скорректировало повышение уровней ГАГ в моче и тканях основных органов, в также нормализовало увеличение массы печени до уровня показателей животных дикого типа. Через час после дозирования, животные всех трех групп дозирования демонстрировали повышение уровня активности идуронат-2-сульфатазы в плазме и тканях основных органов (за исключение мозга) по сравнению с показателями нокаутных животных группы контроля (263–2408 кратное превышение). В тканях мозга нокаутных животных групп дозирования подобная коррекция не достигала значений, полученных для животных дикого типа. Эффективность препарата HIR-Fab-IDS была продемонстрирована во всех исследованных дозах на мышинной модели МПС II (синдрома Хантера).

**Пример 4. Анализ распределения в тканях радиоактивно меченых Fab-фрагментов антитела к инсулиновому рецептору, соединенного с аминокислотной последовательностью идуронат-2-сульфатазы [<sup>125</sup>I]-HIR-Fab-IDS (SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4), [<sup>125</sup>I]-HIR-Mab-IDS, [<sup>125</sup>I]-IDS (контроля) после внутривенного введения у яванского макака.**

Подопытным животным в левую бедренную вену однократно вводили соответствующую молекулу испытуемого вещества в дозе 2 мл/кг массы тела путем внутривенной болюсной инъекции в течение 1-2 минут (или 30 сек). Целевой уровень радиоактивной дозы составлял 1 МБк/кг массы тела животного для всех исследуемых молекул.

Животное, получившее испытуемое вещество, подвергали седации путем внутримышечной инъекции кетамина гидрохлорида перед внутривенным введением избыточной дозы Долетила (пентаборбитона натрия). Животных гуманно эвтаназируют через 2 часа после введения испытуемого вещества. Во время седации у каждого животного из цефалической вены отбирали 2 мл крови, которую центрифугировали для получения плазмы. Концентрация радиоактивности измерялась в плазме крови животных. После подтверждения наступления смерти каждое животное быстро замораживали в смеси твердого диоксида углерода в гексане. После полного замораживания тела помещали в форму, содержащую 2% (вес/объем) водной карбоксиметилцеллюлозной пасты. Выполняли несколько продольных сагиттальных срезов (номинально 30 мкм) не меньше, чем на 5 уровнях тела и, при необходимости, 3 уровнях головы для каждой особи.

Срезы, закрепленные на ленту Filmolux 610 (Neschan), лиофилизировали в настольной сублимационной сушилке GVD03 (Girovac Ltd) и накладывали на рентгенографические пластины FUJI (тип BAS-MS, Raytek Scientific Ltd). Стандарты крови, меченные изотопом [<sup>125</sup>I] с соответствующей активностью, также подготовленные в виде срезов с номинальной толщиной 30 мкм, накладывали на рентгенографические пластины.

После проявления в свинцовом ящике с медным покрытием в течение 7 дней рентгенографические пластины обрабатывали с помощью радиографической системы FUJI FLA-5000 (Raytek Scientific Ltd). Электронные изображения были проанализированы с использованием системы анализа изображений на базе ПК (программное обеспечение Seescan 2, LabLogic Ltd). Стандарты [<sup>125</sup>I], включенные в каждую автордиограмму, использовались для построения калибровочных кривых в диапазоне концентраций радиоактивности.

Концентрацию радиоактивности в плазме определяли методом гаммаметрии.

Данные концентрации в тканях регистрировались в виде нг эквивалентов [<sup>125</sup>I] HIR-Fab-IDS [<sup>125</sup>I] HIR-Mab-IDS и [<sup>125</sup>I]-IDS (контроль).

Результаты были выражены тремя значимыми числами с не более чем двумя знаками после запятой. Таблицы данных были созданы компьютером, и отдельные данные были надлежащим образом округлены.

[<sup>125</sup>I] HIR-Fab-IDS, [<sup>125</sup>I] HIR-Mab-IDS и [<sup>125</sup>I]-IDS (контроль) вводили самцам яванского макака однократно внутривенно с номинальным уровнем дозы 0,0020 мг/кг, 0,0015 мг/кг и 0,0010 мг/кг массы тела. Дозы были разные, так как во всех растворах был различный уровень радиоактивности, таким образом обеспечивался одинаковый уровень 0,0015 мг/кг массы тела. Эвтаназия животного выполнялась через 2 ч после введения каждого препарата, после чего животные были заморожены для исследований методом автордиографии всего тела.

После внутривенного введения препараты абсорбировались и широко распределялись по тканям организма, и на момент забоя все исследуемые ткани подверглись его воздействию. Нижний предел количественной оценки составлял 0,2, 0,03 и 0,097 нг эквивалента препарата/г для всех измерений концентрации в тканях животного, соответственно.

Концентрации радиоактивности в плазме и крови животного, получавшего [<sup>125</sup>I] HIR-Fab-IDS, составили 2,55 и 3,11 нг экв/г, соответственно (соотношение кровь: плазма 1,22). Количественно определяемые уровни радиоактивности присутствовали в некоторых областях мозга, включая продолговатый мозг (1,09 нг экв/г), кору головного мозга (1,03 нг экв/г), мозжечок (0,908 нг экв/г), гипоталамус (0,869 нг экв/г), древовидное вещество мозжечка (0,799 нг экв/г), мост (0,793 нг экв/г) и мозговое вещество (0,562 нг экв/г); соотношение ТП составляло от 0,22 до 0,43.

Концентрации радиоактивности в плазме и крови животного, получавшего [<sup>125</sup>I] HIR-Mab-IDS, составляли 2,13 и 1,86 нг экв/г, соответственно (соотношение кровь: плазма 0,87). Количественно определяемые уровни радиоактивности присутствовали в ряде областей мозга животного. Эти области включали продолговатый мозг (0,803 нг экв/г), древовидное вещество мозжечка (0,606 нг экв/г), мозжечок (0,494 нг экв/г), кору головного мозга (0,453 нг экв/г), мост (0,438 нг экв/г), мозговое вещество (0,288 нг экв/г) и гипоталамус (0,279 нг экв/г), соотношения концентрации ТР составляли от 0,13 до 0,38.

Концентрации в плазме и крови животного, получавшего [<sup>125</sup>I] IDS, составляли 0,910 и 0,753 нг экв/г, соответственно (соотношение кровь: плазма 0,83). Количественно определяемые уровни радиоактивности присутствовали во всем мозге (0,113 нг экв/г), но концентрации были ниже предела количественной оценки (0,097 нг экв/г) во всех исследованных областях: продолговатом мозге, коре головного мозга, мозжечке, гипоталамуса, древовидном веществе мозжечка, мосту и мозговом веществе. Концентрации в тканях ЦНС были значительно ниже, чем в плазме и крови.

Эти результаты свидетельствуют о том, что вещества, связанные с HIR-Fab-IDS, а также с HIR-Mab-IDS, по сравнению с веществом, связанным с IDS, проникали через гематоэнцефалический барьер, ткани ЦНС подвергались воздействию исследуемого вещества или его меченых метаболитов, и радиоактивность, передаваемая через кровь, незначительно влияла на определение концентрации в тканях ЦНС (фигуры 1 и 2). При этом HIR-Fab-IDS демонстрировал более широкое распределение в ткани организма по сравнению с молекулой HIR-Mab-IDS (таблица 5, фигура 3).

Необходимо отметить, что в примере 10 изобретения US8834874 B2 (AGT-182 или HIR-MAB-IDS) эффективность проникновения в головной мозг человека оценивают на уровне 1 % от введенной дозы на 1000 грамм мозговой ткани на основании экспериментальных данных проникновения AGT-182 (HIR-MAB-IDS) в мозг на макаках-резусах. При этом утверждается, что при таком уровне проникновения, ожидается достижение 20% от идуронат-2-сульфатазной (IDS) активности в мозге человека, что позволит элиминировать накопление гликозаминогликанов в мозге больного человека.

С учетом полученных данных по проникновению в мозг яванских макаков (таблица 5), можно сделать вывод о том, что настоящее соединение проникает почти в 2 раза лучше в мозг яванской макаки, чем HIR-MAB-IDS, так - 0,84 нг экв/г HIR-FAB-IDS против 0,43 нг экв/г для HIR-MAB-IDS. Это соответственно означает, что HIR-FAB-IDS проникает с 2% эффективностью в мозг человека. С учетом расчетов, указанных в примере 10 изобретения US8834874B2, ожидается достижение 40% от идуронат-2-сульфатазной активности в мозге человека, без учета увеличенной активности HIR-FAB-IDS в сравнении с HIR-MAB-IDS (AGT-182), см. таблицу 2.

Если учесть факт увеличения удельной активности HIR-FAB-IDS над HIR-MAB-IDS, показанный в примере 2, таблица 2 – 27 Ед/мкг для настоящего соединения и 11 Ед/мкг для противопоставляемого, а также большее проникновение в мозг:  $27/11=2,4$  удельная идуронат-2-сульфатазная активность выше,  $0,84/0,43=1,95$  в 1,95 раза большее проникновение в мозг, то получается 20% восстановление IDS активности в мозге больного при терапии HIR-MAB-IDS и  $20\% \cdot 2,4 \cdot 1,95=93,6\%$  восстановление идуронат-2-сульфатазной активности в мозге больного МПС II типа от уровня активности IDS в мозге здорового человека. Таким образом, настоящее изобретение позволит практически полностью восстановить ферментативную функцию IDS в мозге больного человека, в то время как противопоставляемое HIR-MAB-IDS только на 20% (93% vs 20%).

Таким образом, обнаружено, что введение соединения, содержащее транспортный элемент, представляющий собой Fab-фрагмент иммуноглобулина IgG, специфичный к эпитопу в рецепторе инсулина, соединенный непосредственно или при помощи линкера с терапевтическим ферментом, обеспечивает более высокую степень замещения активности терапевтического фермента в мозге человека в сравнении с соединениями, содержащими Mab.

Таблица 5. Концентрации радиоактивности в тканях яванского макака после однократного внутривенного введения [<sup>125</sup>I]- HIR- Fab-IDS

Ткань	Концентрации радиоактивности в тканях		
	[ <sup>125</sup> I] HIR-Fab-IDS (SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:4)	[ <sup>125</sup> I] HIR-Mab-IDS	[ <sup>125</sup> I]-IDS
Плазма	2,55	2,13	0,91
Кровь	3,11	1,86	0,75
Кора надпочечника	18,3	5,29	4,47
Мозговое вещество надпочечника	11,5	2,17	3,26
Стенка аорты	3,29	1,96	BLQ
Костный мозг	6,37	3,26	4,39
Периост	3,32	BLQ	0,95
Бурый жир	2,51	0,97	0,54
Бульбоуретральная железа	0,98	BLQ	0,60
Слизистая оболочка слепой кишки	1,72	0,19	0,25
Придаток яичка	3,09	0,31	0,53
Кора почки	10,1	4,25	4,33
Мозговое вещество почки	6,37	2,39	1,70
Слизистая оболочка толстой кишки	1,42	0,41	0,24
Печень	21,4	7,63	18,0
Легкое	4,15	1,10	2,35
Мышцы	0,51	0,09	0,28
Миокард	3,78	0,91	1,25
Слизистая оболочка носа	1,18	0,61	0,72

Стенка пищевода	1,53	0,51	0,48
Поджелудочная железа	2,68	0,70	0,69
Слизистая оболочка прямой кишки	1,15	0,39	0,27
Слюнные железы	1,01	0,23	0,82
Семенные железы	2,08	BLQ	BLQ
Кожа	1,20	0,20	0,39
Слизистая оболочка тонкой кишки	3,14	0,62	1,62
Спинальный мозг	0,57	0,41	0,17
Селезенка	17,9	10,4	11,6
Яички	1,34	0,18	0,41
Язык	0,92	0,30	0,64
Трахея	0,65	0,32	0,45
Стенка мочевого пузыря	7,30	3,49	4,18
Мозг (весь)	0,84	0,43	0,11
Кора мозга	1,03	0,45	BLQ
Мозговое вещество	0,56	0,29	BLQ
Мозжечок	0,91	0,49	BLQ
Гипоталамус	0,87	0,28	BLQ
Продолговатый мозг	1,09	0,80	BLQ
Мост	0,79	0,44	BLQ
Древовидное вещество мозжечка	0,80	0,61	BLQ
Эпифиз	1,03	0,39	BLQ
Гипофиз	0,80	0,60	BLQ

NA - Не применимо

BLQ - Концентрация ниже нижнего предела количественного определения

В настоящем описании представлены соединения, содержащие терапевтические ферменты, проявляющие свою специфическую ферментативную активность в указанных соединениях, и транспортные элементы, способные взаимодействовать с инсулиновым рецептором, при этом обладают способностью транспортировать терапевтические ферменты к лизосомам тканей, в том числе через ГЭБ к лизосомам нервной ткани. Таким образом, соединения проявляют высокую активность и улучшенную способность транспортироваться к лизосомам клеток тканей различных органов, в том числе к лизосомам клеток нервной ткани, что предполагает использование настоящего изобретения для ферментативной заместительной терапии для лечения или профилактики у субъекта с лизосомной болезнью накопления.

#### **Пример 5. Состав фармацевтической композиции**

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, которые применяют для терапевтических или профилактических целей, можно получать путем смешивания при необходимости с пригодными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями и т. п. и приготавливать их в виде высушенных

замораживанием препаратов или препаратов в виде раствора. Примеры пригодных фармацевтически приемлемых носителей и наполнителей включают стерилизованную воду, физиологический соляной раствор, стабилизаторы, эксципиенты, антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота), буферы (такие как фосфатный, цитратный, гистидиновый буфер или буферы на основе других органических кислот), антисептики, поверхностно-активные вещества (такие как ПЭГ и Твин), хелатирующие агенты (такие как ЭДТК) и связующие вещества. Они могут содержать также другие низкомолекулярные полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин и иммуноглобулины, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, метионин, аргинин и лизин, сахара и углеводы, такие как полисахариды и моносахариды, и сахарные спирты, такие как маннит и сорбит. При приготовлении водного раствора для инъекций можно применять, например, физиологический соляной раствор и изотонические растворы, содержащие глюкозу и другие адъюванты, такие как D-сорбит, D-манноза, D-маннит и хлорид натрия, и соответствующие стабилизаторы, такие как спирт (например, этанол), многоатомные спирты (такие как пропиленгликоль и ПЭГ) и неионогенные поверхностно-активные вещества (такие как полисорбат 80, полисорбат 20, полксамер 188 и HCO-50) в комбинации друг с другом. В том случае, когда с препаратом смешивают гиалуронидазу, можно вводить подкожно большие объемы жидкости (Expert Opin Drug Deliv., 4(4), июль 2007 г.; сс. 427–440). Кроме того, фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно предварительно загружать в шприц. Для этого можно получать препарат в виде раствора согласно методу, описанному в WO2011/090088.

При необходимости антигенсвязывающие молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно включать в микрокапсулы (например, состоящие из гидроксиметилцеллюлозы, желатина и поли(метилметакрилата)) или включать в коллоидные системы доставки лекарственного средства (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) (см., например, «Remington's Pharmaceutical Science, 16-е издание», изд-во Oslo, 1980). Методы получения фармацевтических средств в виде фармацевтических средств с контролируемым высвобождением также являются хорошо известными, и такие методы можно применять для антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в настоящем изобретении (Langer и др., J. Biomed. Mater. Res., 15, 1981, сс. 267-277; Langer, Chemtech., 12, 1982, сс. 98-105; US 3773919; публикация заявки на европейский патент EP 58481; Sidman и др., Biopolymers, 22, 1983, сс. 547-556; EP 133988).

Фармацевтическая композиция концентрата для приготовления раствора для инфузий:

Соединение HIR-FAB-IDS 5,3 мг

Натрия хлорид 8,0 мг

Натрия дигидрофосфата дигидрат 3,12 мг  
 Натрия гидроксид для коррекции pH до pH 6.0  
 Полисорбат 20—0,2 мг  
 Вода для инфузий до 1,0 мл

**Пример 6. Расчет и обоснование стартовой дозы для первого применения у человека**

Расчет и обоснование стартовой дозы для первого применения у человека проводились на основании подходов NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) - максимальная доза без наблюдаемого отрицательного эффекта (ВНТД) и MABEL (Minimal Anticipated Biological Effect Level; доза, оказывающая минимальное ожидаемое биологическое действие), поскольку в исследовании I фазы планировалось однократное введение препарата здоровым добровольцам в рамках ожидаемого терапевтического диапазона без титрации до максимально-переносимой дозы. Также была принята во внимание информация об эффективности и безопасности у человека препаратов со схожими механизмами действия.

Основные результаты оценки эффективности и безопасности в доклинических исследованиях, которые отражают критерий риск-польза, представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Экстраполяция для человека доз, полученных в результате исследования эффективности и общетоксического действия соединения HIR-FAB-IDS на взрослых животных.

Исследование	Доза соединения HIR-FAB-IDS для разных видов животных, мг/кг			Экстраполяция для человека с массой тела 70 кг, мг/кг*
	Мышь	Крыса	Яванский макак	Человек
Высшая нетоксическая доза при однократном введении (в/в)		30	30	30
Высшая нетоксическая доза при многократном введении (в/в, 1 раз в неделю, 8 недель) (NOAEL)		30	30	30
Минимальная фармакологически активная доза на мышинной модели МПС II (в/в, 1 раз в неделю, 16 недель)	0,3			0,3

\*экстраполяция доз на человека массой 70 кг проведена без использования коэффициентов межвидового переноса доз, основанных на площади поверхности тела.

В исследованиях безопасности препарата на основе соединения HIR-FAB-IDS было установлено, что у обезьян при еженедельном введении в течение 8-и недель в дозах 3, 10

и 30 мг/кг ни одна из доз не вызывала неблагоприятных последствий. У крыс при еженедельном введении в течение 8-и недель в дозах 3, 10 и 30 мг/кг также ни одна из исследованных доз не вызывала неблагоприятных последствий. Таким образом, высшей нетоксической дозой, подтвержденной при 8–9-кратном еженедельном применении на грызунах и негрызунах, является доза 30 мг/кг. Терапевтический индекс в доклинических исследованиях, определяемый как отношение наибольшей безопасной дозы (30 мг/кг) к эффективной дозе при многократном курсовом введении (0,3 мг/кг) для соединения HIR-FAB-IDS, составляет  $30 \text{ мг/кг} / 0,3 \text{ мг/кг} = 100$ .

Для экстраполяции доз, указанных в таблице, на человека не применялись коэффициенты межвидового переноса доз, основанных на площади поверхности тела, поскольку молекулярная масса соединения HIR-FAB-IDS превышает 100 кДа. В связи с этим человеческий эквивалент максимальной безопасной дозы (HED NOAEL) составляет 30 мг/кг. С точки зрения минимизации рисков в качестве стартовой дозы в клинических исследованиях следует принять дозу препарата 0,3 мг/кг, которая согласно результатам исследований *in vivo* вызывает минимальный фармакологический эффект и является безопасной.

Для повышения безопасности предсказания стартовой дозы у человека был также выполнен расчет на основе подхода MABEL. В результате проведенных нами исследований фармакодинамики *in vitro* наименьшая концентрация соединения HIR-FAB-IDS, оказывающая биологическое действие, выявляется в тесте определения активности идуронат-2-сульфатазы в фибробластах больного МПС II после обработки соединения HIR-FAB-IDS. В данном тесте пороговое увеличение активности идуронат-2-сульфатазы (~на 20%) выявляется при концентрации  $5 \cdot 10^{-9}$  М соединения HIR-FAB-IDS. Учитывая молекулярную массу соединения HIR-FAB-IDS (105 кДа) это соответствует концентрации соединения HIR-FAB-IDS равной  $5,25 \cdot 10^{-4}$  г/л. Данную концентрацию можно рассматривать в качестве стартовой для человека, для достижения которой в крови среднему человеку массой 70 кг и объемом жидкости в тканях 56 литров (80%) необходимо ввести  $56 \text{ л} \cdot 5,25 \cdot 10^{-4} \text{ г/л} = 294 \cdot 10^{-4}$  г препарата соединения HIR-FAB-IDS (что будет соответствовать  $4,2 \cdot 10^{-4}$  г/кг или 0,42 мг/кг). Следовательно, на основании данных *in vitro* подход MABEL позволил определить стартовую эффективную дозу соединения HIR-FAB-IDS у человека не менее 0,42 мг/кг.

В то же время результаты исследований фармакодинамики (ФД) *in vivo*, полученные на мышах B6N.Cg-Idstm1Muen/J (линия JAX № 024744) нокаутных по гену идуронат-2-сульфатазы, свидетельствуют о том, что наименьшая доза соединения HIR-FAB-IDS, которая вызывает фармакодинамический эффект (уменьшает содержание гликозаминогликанов в тканях), составляет 0,3 мг/кг.

Таким образом, на основании данных *in vitro* подход MABEL позволил определить стартовую дозу соединения HIR-FAB-IDS у человека не менее 0,42 мг/кг, а на основании данных *in vivo* подход MABEL определил стартовую дозу соединения HIR-FAB-IDS у человека не менее 0,3 мг/кг. В соответствии с существующими правилами в этом случае в качестве стартовой дозы следует принять меньшую из указанных величин, то есть стартовая эффективная доза соединения HIR-FAB-IDS при применении у человека должна составлять не менее 0,3 мг/кг.

Таким образом, выбор дозы для первого применения препарата у человека основывался на следующих положениях (Таблица 7):

Таблица 7. Важные данные и результаты доклинических исследований, определяющие выбор дозы для исследования у человека.

№	Собственные исследования и опубликованные материалы	Результаты
1	Рекомендованная терапевтическая доза препарата «Элапраза®»	0,5 мг/кг один раз в неделю.
2	Исследование специфической активности	Показана несколько превосходящая молярная активность (соотношение 1,26) по сравнению с идурсульфазой («Элапраза®»). Молекулярная масса идурсульфазы 59,3 кДа, HIR-FAB-IDS – 105 кДа.
3	Оценка сравнительной активности идуронат-2-сульфатазы в фибробластах большого мукополисахаридозом типа II после обработки соединения HIR-FAB-IDS и ЛП «Элапраза®»	Схожая биологическая активность соединения HIR-FAB-IDS и ЛП «Элапраза®». EC50 для соединения HIR-FAB-IDS в клетках фибробластов GM000690 составила 27,81±3,66 нМ, а для ЛП «Элапраза®» 26,33 нМ.
4	Исследование ФД препарата на мышах, нокаутных по гену идуронат-2-сульфатазы	ФД эффект продемонстрирован для доз 0,3, 1,0 и 3,0 мг/кг, при этом статистическая значимость достигалась в дозах 1,0 и 3,0 мг/кг. Минимальная фармакологически активная доза – 0,3 мг/кг.
5	<i>Ex vivo</i> исследование выброса цитокинов в цельной крови здоровых доноров	Из 12 проанализированных цитокинов регистрировалось повышение только IL-8. При этом в пределах предполагаемого терапевтического диапазона доз (0,3–3 мг/кг) уровень IL-8 статистически достоверно был ниже положительного контроля (ЛПС).
6	Исследования токсичности при многократном введении (крысы – 8 недель, яванские макаки – 9 недель)	NOAEL для обеих видов составила 30 мг/кг. Экстраполяция для человека максимальная безопасная доза 30 мг/кг.
7	Исследования токсичности при многократном введении (неполовозрелый яванский макак – 26 недель)	NOAEL для неполовозрелых животных составила 10 мг/кг. Экстраполяция на человека - 10 мг/кг.
8	Результаты исследования препарата валанафусп альфа (идуронидаза с IgG доменом к рецептору инсулина)	В ходе инфузий на всех дозовых уровнях наблюдалась транзиторная дозозависимая гипогликемия с частотой 6,4%, которая не ограничивала проведение терапии.

В ходе инфузий на всех дозовых уровнях наблюдалась транзиторная дозозависимая гипогликемия с частотой 6,4%, которая не ограничивала проведение терапии.

Исходя из вышеизложенного, терапевтическая доза у человека ожидается в диапазоне 1–3 мг/кг, минимальная эффективная доза, экстраполированная на человека, составляет 0,3 мг/кг, проникновение препарат через ГЭБ подтверждено для доз 0,0015 – 0,0020 мг/кг. Терапевтический индекс составляет 100.

Рассчитанные на основании доклинических данных по безопасности диапазоны безопасных доз препарата, достигающие максимально 30 мг/кг препарата для взрослых и 10 мг/кг для детей при многократном применении, включают в себя ожидаемый терапевтический диапазон доз с не менее чем 10-кратным коэффициентом безопасности. Фармакологически активная доза 0,3 мг/кг была принята в качестве стартовой дозы для первого применения у человека в клиническом исследовании I фазы IDB-MPS-I.

Препарат может вводиться только внутривенно в виде 3-часовой инфузии.

Введение препарата необходимо проводить под контролем врача или другого медицинского персонала, который имел опыт лечения пациентов с МПС II типа или другими наследственными нарушениями метаболизма. В ходе исследования будет проводиться тщательный мониторинг состояния пациентов с их обязательным нахождением в условиях исследовательского центра в течение как минимум 6-и часов после завершения первой инфузии для каждого нового дозового уровня соединения HIR-FAB-IDS и наблюдением на предмет развития у пациентов инфузионных реакций.

Подробная информация о дозе препарата, продолжительности инфузии, приготовлении инфузионного раствора и способе его применения, а также утилизации неиспользованного препарата предоставлена в Протоколе клинического исследования.

Обоснование выбора дозы для клинического исследования II–III фазы

На основании доклинических и токсикологических данных, результатов клинического исследования I фазы IDB-MPS-I, в котором была показана хорошая переносимость и благоприятный профиль безопасности исследуемого препарата соединения HIR-FAB-IDS при однократном введении в диапазоне доз от 0,3 мг/кг до 3 мг/кг (0,3 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг и 3 мг/кг), а также, учитывая короткий период полувыведения препарата стартовая доза препарата соединения HIR-FAB-IDS для первого применения у пациентов с МПС II может быть определена как < 3 мг/кг.

Выбор дозы в 1 мг/кг в качестве стартовой обусловлен также ожидаемым соматическим эффектом соединения HIR-FAB-IDS эквивалентным терапевтическому эффекту препарата «Элапраза®». соединения HIR-FAB-IDS не отличается от идурсульфазы по взаимодействию с M6PR, проникновению в M6PR-презентирующие клетки и ферментативной активностью в культурах клеток пациентов МПС II. Результаты исследований показывают, что плазменный клиренс соединения HIR-FAB-IDS происходит

преимущественно через взаимодействие с M6PR-рецептором, что обеспечит сопоставимую экспозицию в M6PR-клетках *in vivo*.

Соединение HIR-FAB-IDS снижает уровень ГАГ в фибробластах пациентов МПС II до уровня здоровых доноров в концентрации 120 нМ. Принимая во внимание объем крови у детей старше 3 лет около 75 мл/кг и у подростков около 70 мл/кг, эффективная концентрация в 120 нМ может быть достигнута при назначении соединения HIR-FAB-IDS в дозе 0,9–1,0 мг/кг.

В 26-недельном исследовании токсичности NOAEL была определена как 10 мг/кг/нед на основании транзиторных эпизодов гипогликемии, которые являются предсказуемым и ожидаемым классовым эффектом. Гипогликемия была описана для других фьюжн-протеинов с использованием инсулинового рецептора (HIR) для обеспечения трафика препарата через ГЭБ, включая два препарата на основе МАТ к HIR, связанных с идуронидазой или идурсульфазой. Схожий профиль токсичности в доклинических исследованиях (развитие транзиторной гипогликемии при применении высоких доз до 30 мг/кг) и отдельные случаи дозозависимой гипогликемии у пациентов с МПС II в клинических исследованиях подтверждают безопасность выбранной стартовой дозы в 1 мг/кг у детей.

Стартовая доза в 1 мг/кг также обоснована с этической точки зрения, так как позволяет избежать назначения субтерапевтических доз и снижения уже достигнутого эффекта ФЗТ.

#### **Пример 7. Подтверждение принципа действия проникновения препарата соединения HIR-Fab-IDS через ГЭБ**

Подтверждение принципа действия было получено у пациента 1001, участника клинического исследования IDS-MPS-II/III.

Пациент 1001, мужчина 18 лет. Диагноз МПС II типа (болезнь Хантера) с неврологической составляющей /нейропатическая форма был подтвержден в 2010 году снижением содержания идуронат-2-сульфатазы в плазме до 3,18 нМ/4ч/мл (норма 297 – 705), и генотипически: в экзоне 09 гена IDS (OMIM 300823) выявлена нуклеотидная замена с.1327C>T в гемизиготном состоянии, приводящая к терминации трансляции p.R443. Нуклеотидная замена ранее не была описана, но по данным компьютерного анализа (Alamut Visual, версия 2.10) может являться патогенной. С 2011 года пациент получал ферментозаместительную терапию препаратом «Элапраза®» (МНН идурсульфазы).

До начала терапии препаратом соединения HIR-FAB-IDS экскреция гликозаминогликанов (ГАГ) с мочой у пациента приближалась к нормальным значениям ввиду получения ферментозаместительной терапии. В процессе лечения показатели экскреции ГАГ с мочой существенно не изменились, что подтверждает сопоставимую ферментативную активность препарата на периферии. Концентрация ГАГ в спинномозговой

жидкости (СМЖ) исходно была высокой: 3294,5 нг/мл гепарансульфата (ГС) и 3,5 нг/мл дерматансульфата (ДС). Экспериментально было показано, что при МПС II в центральной нервной системе (ЦНС) аккумулируется преимущественно ГС, и концентрация ГС в СМЖ коррелирует с его накоплением в тканях головного мозга (Tanaka N, Kida S, Kinoshita M, Morimoto H, Shibasaki T, Tachibana K, Yamamoto R. Evaluation of cerebrospinal fluid heparan sulfate as a biomarker of neuropathology in a murine model of mucopolysaccharidosis type II using high-sensitivity LC/MS/MS. Mol Genet Metab. 2018 Sep;125(1-2):53-58. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.07.013. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30064964).

В соответствии с протоколом пациент получал препарат соединения HIR-FAB-IDS в виде еженедельных внутривенных инфузий длительностью 3 ч. После 3 введений препарата в каждой дозе и оценке безопасности и переносимости доза постепенно повышалась от 1 до 3 мг/кг. В ходе каждого первого введения препарата в новой дозе отбирались образцы сыворотки крови для изучения фармакокинетики. Образцы спинномозговой жидкости для определения содержания препарата и концентрации ГАГ отбирались в ходе скрининга (исходно), а также через 3 недели введения препарата в дозах 2 и 3 мг/кг. Отбор СМЖ для оценки концентрации препарата проводился через 2,5 часа после окончания инфузии.

Фармакокинетика препарата носит нелинейный характер. Значения концентраций соединения HIR-FAB-IDS по времени представлены в Таблице 8 и на Фигуре 7.

Таблица 8. Значения концентраций соединения HIR-FAB-IDS в сыворотке крови при использовании различных доз препарата.

Доза /время	0 ч	3 ч	3,5 ч	4 ч	4,5	5 ч	7 ч	8 ч	27 ч
1 мг/кг	0,00	1919,10	1289,04	1041,31	844,10	705,89	401,08	251,93	0,00
2 мг/кг	0,00	4571,73	3184,31	2878,93	2480,03	2353,50	1975,85	1213,81	13,01
3 мг/кг	0,00	12139,96	8650,59	6259,27	5097,45	4217,29	2513,06	2029,04	63,75

После введения препарата в дозах 2 и 3 мг/кг через 2,5 часа после окончания инфузии, препарат определялся в СМЖ в концентрациях 25,939 и 272,569 пг/мл, соответственно, НПКО метода 100 пг/мл (Таблица 9).

Таблица 9. Концентрация соединения HIR-FAB-IDS в СМЖ и сыворотке крови после введения препарата в дозах 2 и 3 мг/кг.

Доза	Время	СМЖ, пг/мл*	Сыворотка нг/мл**
	Исходно, до начала терапии	(-)	(-)
2 мг/кг	Н6	25,936	Нет данных
3 мг/кг	Н10	272,569	1461,06

\* НПКО определения в СМЖ 100 пг/мл

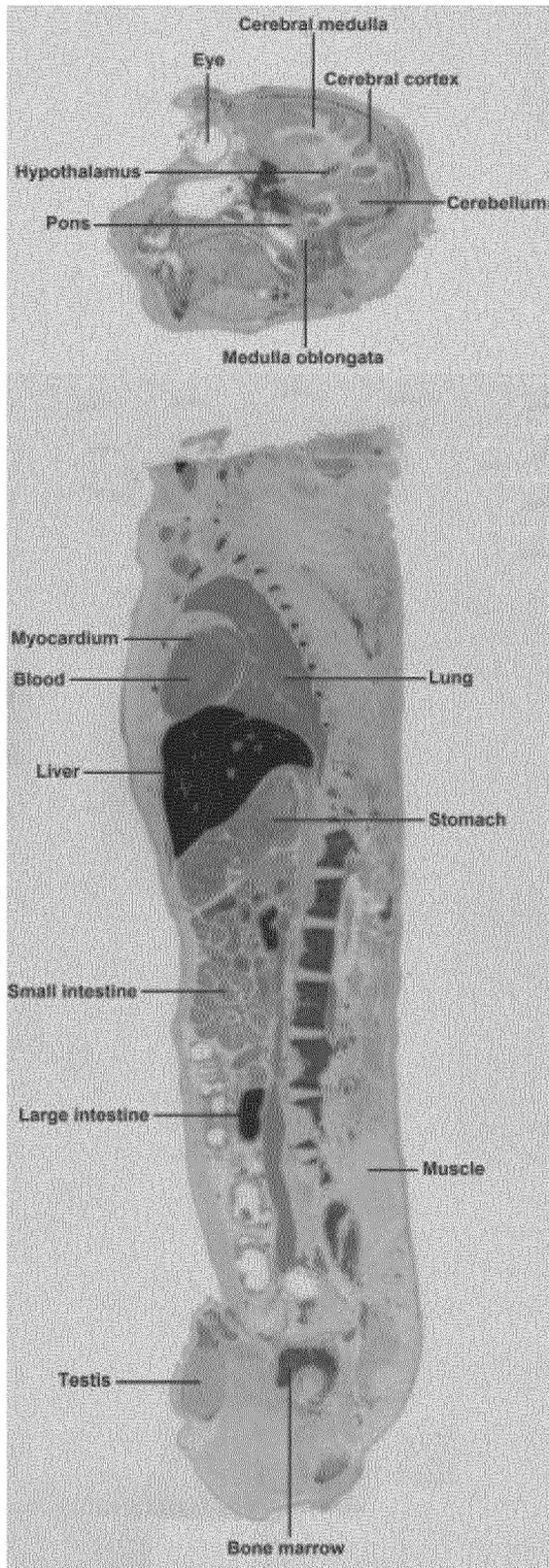
\*\* НПК определения в сыворотке крови 50 нг/мл.

Отмечалось также значительное снижение накопления гепарансульфата (ГС) в СМЖ (Фигура 8), что подтверждает наличие ферментативной активности препарата соединения HIR-FAB-IDS в тканях центральной нервной системы и, следовательно, свидетельствует об эффективности препарата при лечении пациента с невропатической формой МПС II типа.

### Формула изобретения

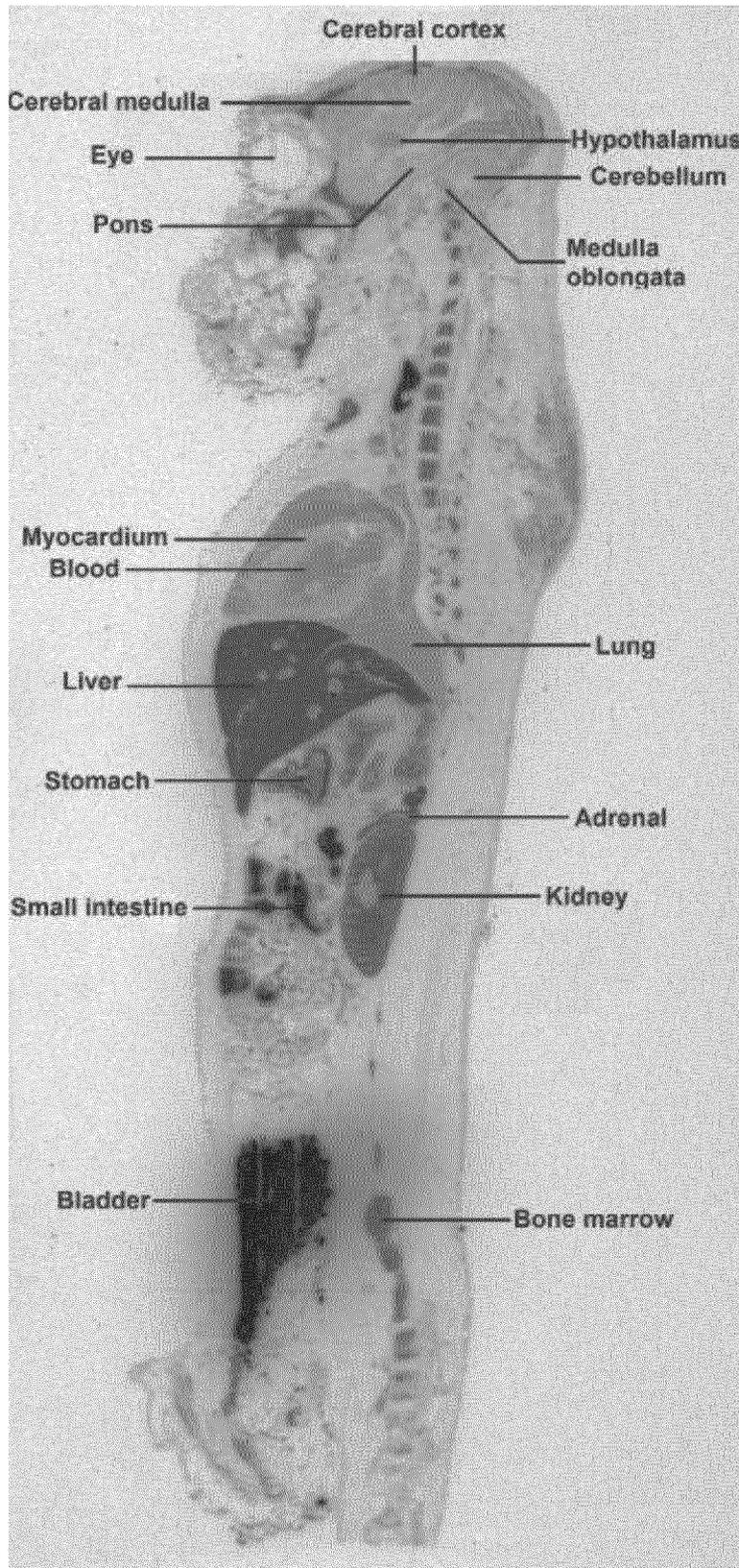
1. Соединение HIR-Fab-IDS для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, включающее первую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 и вторую аминокислотную последовательностью SEQ ID NO:4.
2. Соединение по п. 1, где лизосомная болезнь накопления представляет собой мукополисахаридоз II типа или мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей.
3. Соединение по п. 2, где неврологическая составляющая представлена нейропатической формой.
4. Соединение по п. 1-3, где субъектом является человек.
5. Применение соединения по п. 1 для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, причем субъекту вводят по меньшей мере одну дозу соединения HIR-Fab-IDS приблизительно от 1 до 12 мг/кг.
6. Применение по п.5, отличающееся тем, что доза выбрана из группы, состоящей из приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 12 мг/кг соединения HIR-Fab-IDS.
7. Применение по п. 5-6, где лизосомная болезнь накопления представляет собой мукополисахаридоз II типа или мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей.
8. Применение по п. 7, где неврологическая составляющая представлена нейропатической формой.
9. Применение по п. 5-8, где субъектом является человек.
10. Фармацевтическая композиция для применения для профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, где композиция содержит соединение HIR-Fab-IDS, представленное первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, при этом соединение HIR-Fab-IDS вводят субъекту по меньшей мере в одной дозе, выбранной из группы, состоящей из приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 12 мг/кг соединения HIR-Fab-IDS.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит натрия хлорид, натрия дигидрофосфата дигидрат, натрия гидроксид, полисорбат.
12. Фармацевтическая композиция по п. 11, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит соединение HIR-Fab-IDS 5.3 мг, натрия хлорид в количестве 8,0 мг, натрия дигидрофосфата дигидрат в количестве 3,12 мг, натрия гидроксид для коррекции рН до рН6,0, полисорбат 20 в количестве 0,2 мг, вода для инъекций до 1,0 мл.
13. Фармацевтическая композиция по пп.10-11, где лизосомная болезнь накопления представляет собой мукополисахаридоз II типа или мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей.
14. Фармацевтическая композиция по п. 13, где неврологическая составляющая представлена нейропатической формой.
15. Фармацевтическая композиция по пп.10-14, где субъектом является человек.
16. Способ профилактики или лечения недостаточности лизосомального фермента у субъекта, имеющего лизосомную болезнь накопления, включающий введение пациенту по меньшей мере одной дозы соединения HIR-Fab-IDS, представленного первой аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 и второй аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, при этом доза выбрана из группы, состоящей из приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 12 мг/кг соединения HIR-Fab-IDS.
17. Способ по п. 16, где соединение HIR-Fab-IDS в составе фармацевтической композиции вводят внутривенно в течение 3 ч 1 раз в неделю.
18. Способ по п. 16, где лизосомная болезнь накопления представляет собой мукополисахаридоз II типа или мукополисахаридоз II типа с неврологической составляющей.
19. Способ по п. 18, где неврологическая составляющая представлена нейропатической формой.
20. Способ по пп.16-19, где субъектом является человек.



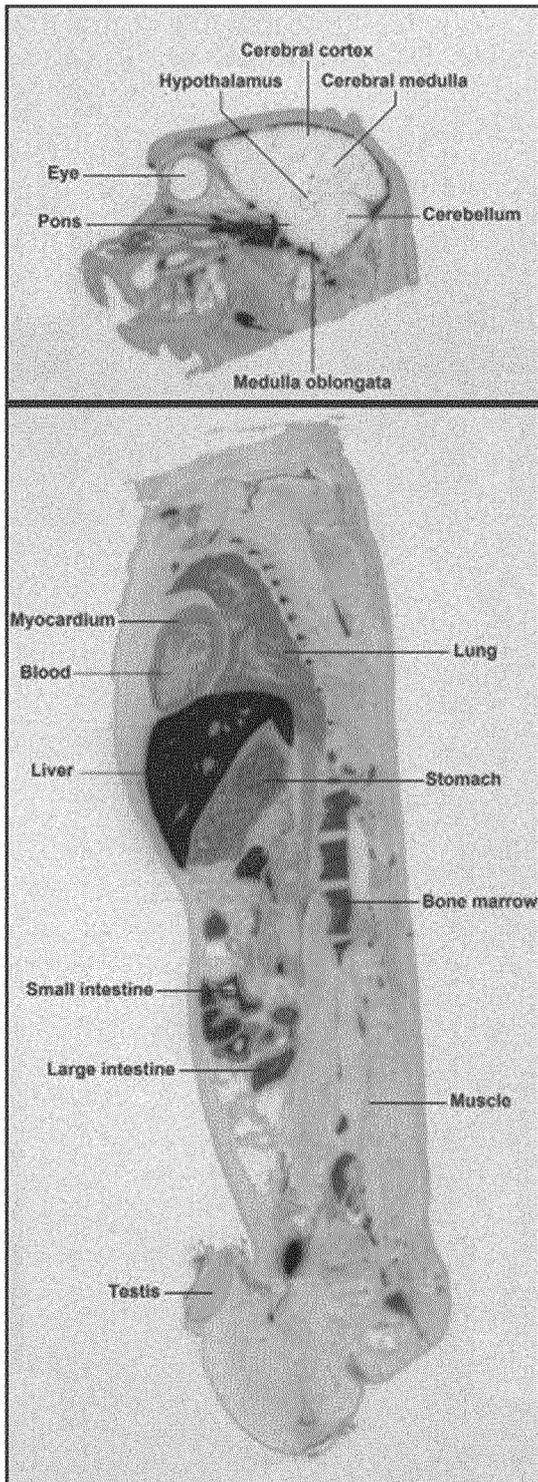
Cerebral cortex - кора головного мозга  
 Cerebral medulla - мозговое вещество  
 Eye - глаз  
 Hypothalamus - гипоталамус  
 Pons - мост  
 Cerebellum - мозжечок  
 Medulla oblongata - продолговатый мозг  
 Spinal cord - спинной мозг  
 Myocardium - миокард  
 Blood - кровь  
 Lung - легкое  
 Liver - печень  
 Stomach - желудок  
 Kidney - почка  
 Small intestine - тонкая кишка  
 Large intestine - толстая кишка  
 Muscle - мышцы  
 Testis - яички  
 Bone marrow - костный мозг

Фигура 1. Репрезентативная автордиограмма самца яванского макака, зарегистрированная через 2 часа после однократного внутривенного введения [ $^{125}$ I]-HIR-Fab-IDS с номинальным уровнем дозы 0,0020 мг/кг массы тела.



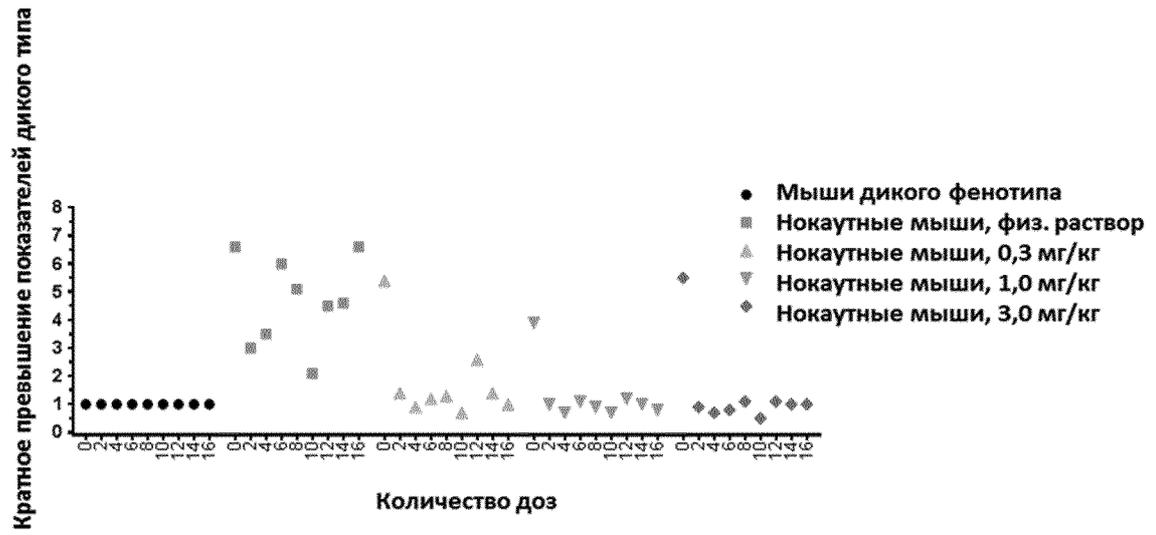
Cerebral cortex - кора головного мозга  
 Cerebral medulla - мозговое вещество  
 Eye - глаз  
 Hypothalamus - гипоталамус  
 Pons - мост  
 Cerebellum - мозжечок  
 Medulla oblongata - продолговатый мозг  
 Spinal cord - спинной мозг  
 Myocardium - миокард  
 Blood - кровь  
 Lung - легкое  
 Liver - печень  
 Stomach - желудок  
 Adrenal - надпочечник  
 Kidney - почка  
 Small intestine - тонкая кишка  
 Bladder - желчный пузырь  
 Bone marrow - костный мозг

Фигура 2. Репрезентативная автордиограмма самца яванского макака, зарегистрированная через 2 часа после однократного внутривенного введения  $[^{125}\text{I}]$ -HIR-Mab-IDS с номинальным уровнем дозы 0,0015 мг/кг массы тела.

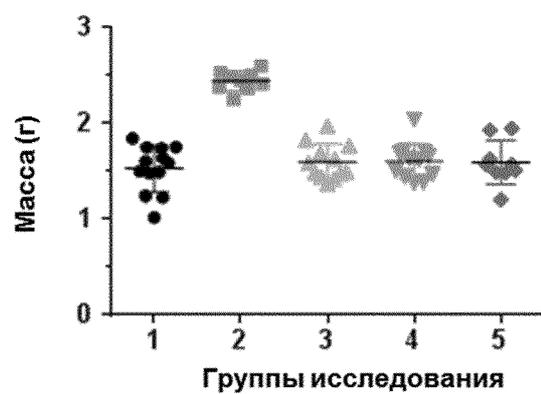


Cerebral cortex - кора головного мозга  
 Cerebral medulla - мозговое вещество  
 Eye - глаз  
 Hypothalamus - гипоталамус  
 Pons - мост  
 Cerebellum - мозжечок  
 Medulla oblongata - продолговатый мозг  
 Spinal cord - спинной мозг  
 Myocardium - миокард  
 Blood - кровь  
 Lung - легкое  
 Liver - печень  
 Stomach - желудок  
 Kidney - почка  
 Small intestine - тонкая кишка  
 Large intestine - толстая кишка  
 Muscle - мышцы  
 Testis - яички  
 Bone marrow - костный мозг

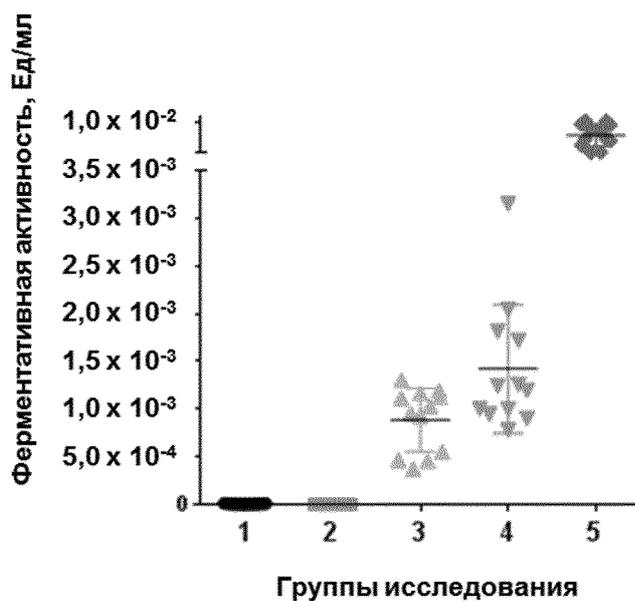
Фигура 3. Репрезентативная автордиограмма самца яванского макака, зарегистрированная через 2 часа после однократного внутривенного введения  $[^{125}\text{I}]\text{-IDS}$  (контроль) с номинальным уровнем дозы 0,0010 мг/кг массы тела.



Фигура 4. Уровень ГАГ в моче животных в течение исследования. Индивидуальные значения.

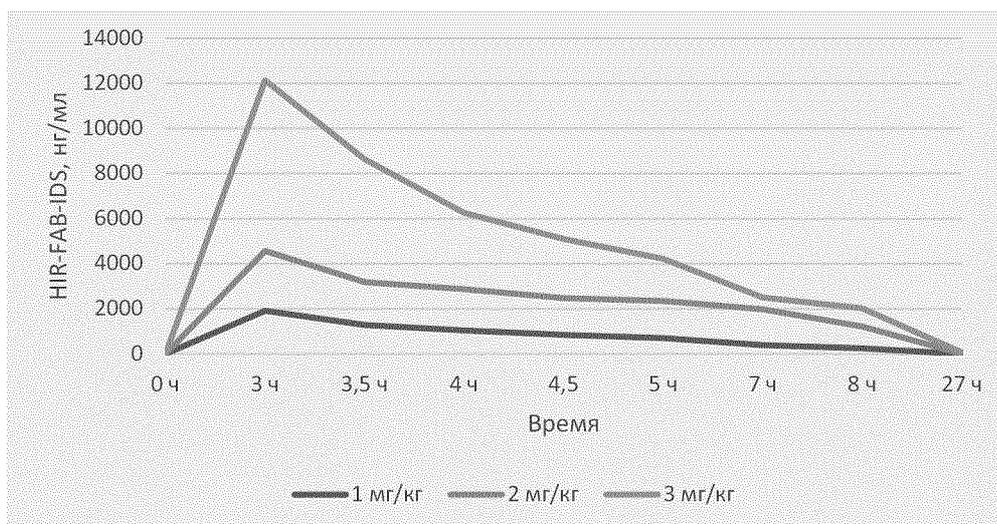


Фигура 5. Масса печени у животных групп исследования. 1- группа дикого типа, 2 – группа – нокаутные животные группы контроля, 3 – нокаутные животные, 0,3 мг/кг, 4 – нокаутные животные, 1,0 мг/кг, 5 – нокаутные животные, 3,0 мг/кг. Индивидуальные значения.

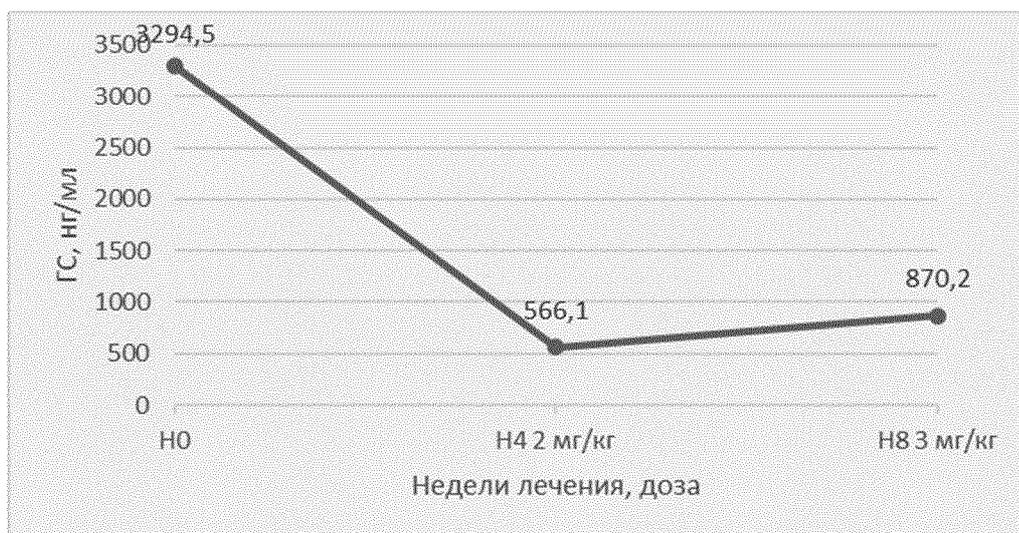


Фигура 6. Уровень активности идуронат-2-сульфатазы в плазме подопытных животных. 1- группа дикого типа, 2 – группа – нокаутные животные группы контроля, 3 – нокаутные животные, 0,3 мг/кг, 4 – нокаутные животные, 1,0 мг/кг, 5 – нокаутные животные, 3,0 мг/кг. Индивидуальные значения.

\*Масштаб графика не отражает разницу значений ферментативной активности между нокаутными животными контрольной группы и животными дикого типа.



Фигура 7. Концентрации препарата соединения HIR-FAB-IDS в сыворотке крови пациента 1001, определенные на этапе эскалации дозы. НПКО метода составляет 50 нг/мл.



Фигура 8. Динамика концентрации гепарансульфата в СМЖ при применении различных доз препарата.

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202390406**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
C07K 16/26, C12N 9/16, A61K 38/46, 39/395, A61P 37/04, 3/00, 25/28

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espascanet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	US 8834874 B2 (ARMAGEN TECHNOLOGIES, INC) 16.09.2014, формула, пример 4, фиг. 12, SEQ ID NO:10.	1-20
A	US 7741446 B2 (ARMAGEN TECHNOLOGIES, INC) 22.06.2010, реферат, формула, SEQ ID NO:29	1-20
A	RU 2673038 C2 (ООО "МЕЖДУНАРОДНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР "ГЕНЕРИУМ" ) 21.11.2018, реферат, формула	1-20
A	RUBEN J. BOADO et al., Insulin Receptor Antibody-Iduronate 2-Sulfatase Fusion Protein: Pharmacokinetics, Anti-Drug Antibody, and Safety Pharmacology in Rhesus Monkeys, Biotechnol Bioeng. 2014 November ; 111(11): 2317–2325, реферат doi:10.1002/bit.25289	1-20

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

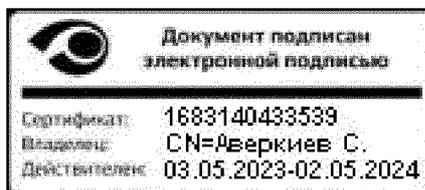
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 05 июля 2023 (05.07.2023)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202390406**

**КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)**

**C07K 16/26 (2006.01)**  
**C12N 9/16 (2006.01)**  
**A61K 38/46 (2006.01)**  
**A61K 39/395 (2006.01)**  
**A61P 3/00 (2006.01)**  
**A61P 25/28 (2006.01)**