

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491598** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.09.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.12.08**

(51) Int. Cl. *A61K 38/47* (2006.01)  
*A61K 38/46* (2006.01)  
*C12N 9/40* (2006.01)  
*C12N 9/42* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ**

---

(31) **62/264,702; 62/379,629**

(32) **2015.12.08; 2016.08.25**

(33) **US**

(62) **202292734; 2016.12.08**

(71) Заявитель:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Бейк Эндрю, Сиджнэр Кэтрин (US)**

(74) Представитель:  
**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова  
М.Ю. (RU)**

---

(57) Раскрыты композиции и способы для лечения лизосомных болезней накопления. Раскрыты биотерапевтические комплексы, содержащие домен, связывающий эффектор интернализации, и обладающие активностью лизосомального заместительного фермента. Биотерапевтические комплексы способны попадать в клетку, сегрегироваться по отношению к лизосоме и обеспечивать доставку активности заместительного фермента в лизосому.

---

**202491598**

**A2**

**A2**

**202491598**

**КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ**

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1] Настоящая заявка в целом относится к композициям и способам для лечения лизосомных болезней накопления. В частности, настоящая заявка относится к целевым белковым комплексам, которые содержат заместительные ферменты, и к их применению в лечении лизосомных болезней накопления.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] Лизосомные болезни накопления составляют класс редких заболеваний, которые влияют на разрушение многочисленных субстратов в лизосоме. Такие субстраты включают в себя сфинголипиды, мукополисахариды, гликопротеины, гликоген и олигосахариды, которые могут накапливаться в клетках больных людей, что приводит к смерти клеток. Органы, поражаемые лизосомными болезнями накопления, охватывают центральную нервную систему (CNS), периферическую нервную систему (PNS), легкие, печень, кость, скелетную и сердечную мускулатуру и высокоинтеллектуальную систему.

[3] Варианты лечения лизосомных болезней накопления включают заместительную ферментную терапию (ERT), субстрат-редуцирующую терапию, фармакологическую шаперон-опосредованную терапию, терапию с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток и генную терапию. Пример субстрат-редуцирующей терапии включает применение миглустата или элиглулата для лечения заболевания Гоше 1 типа. Эти лекарственные средства действуют путем блокирования активности синтазы, что снижает последующее продуцирование субстрата. Терапию с использованием гемопоэтических стволовых клеток (HSCT), например, используют для облегчения и замедления отрицательного фенотипа центральной нервной системы у пациентов с некоторыми формами MPS. См. R.M. Boustany, «Lysosomal storage diseases--the horizon expands», 9(10) Nat. Rev. Neurol. 583-98, Oct. 2013. В таблице 1 приводятся некоторые лизосомные болезни накопления и ассоциированные с ними ферменты или другие белки.

[4] Таблица 1. Лизосомные болезни накопления

Класс	Заболевание	Вовлеченный фермент / белок
Сфинголипидоз	Заболевание Фабри	$\alpha$ -галактозидаза А
	Липогранулематоз Фарбера	Церамидаза
	Заболевание Гоше I типа	$\beta$ -глюкозидаза
	Заболевание Гоше II и III типов	Активатор сапозина-С
	Заболевания Ниманна-Пика типов А и В	Сфингомиелиназа
	GM1-ганглиозидоз	$\beta$ -галактозидаза
	GM2-ганглиозидоз (заболевание Сандгоффа)	$\beta$ -гексозаминидаза А и В
	GM2-ганглиозидоз (заболевание Тея-Сакса)	$\beta$ -гексозаминидаза А
	GM2-ганглиозидоз (дефицит GM2-активатора)	Белок GM2-активатор
	GM3-ганглиозидоз	GM3-синтаза
	Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза А
	Дефицит активатора сфинголипида	Активатор сфинголипида
Мукополисахаридозы	MPS I (заболевание Шейе, Гурлера-Шейе и Гурлера)	$\alpha$ -идуронидаза
	MPS II (заболевание	Идуронидаза-2-

	Хантера)	сульфатаза
	MPS IIIA (заболевание Санфилиппо А типа)	Гепаран- <i>N</i> -сульфатаза
	MPS IIIB (заболевание Санфилиппо В типа)	<i>N</i> -ацетил- $\alpha$ -глюкозаминидаза
	MPS IIIC (заболевание Санфилиппо С типа)	Ацетил-СоА; $\alpha$ -глюкозамид- <i>N</i> -ацетилтрансфераза
	MPS IIID (заболевание Санфилиппо D)	<i>N</i> -ацетилглюкозамин-6-сульфатаза
	MPS IVA (синдром Моркио А типа)	<i>N</i> -ацетилгалактозамин-6-сульфат-сульфатаза
	MPS IVB (синдром Моркио В типа)	$\beta$ -галактозидаза
	MPS VI (заболевание Марото-Лами)	<i>N</i> -ацетилгалактозамин-4-сульфатаза (арилсульфатаза В)
	MPS VII (заболевание Слая)	$\beta$ -глюкуронидаза
	MPS IX	Гиалуронидаза
Болезнь накопления гликогена	Заболевание Помпе (болезнь накопления гликогена II типа)	$\alpha$ -глюкозидаза 2
Липидный	Дефицит лизосомальной	Лизосомальная

метаболизм	кислой липазы (LAL-D; заболевание Вольмана)	кислая липаза
------------	--	---------------

[5] Двумя наиболее распространенными LSD являются заболевание Помпе и заболевание Фабри. Заболевание Помпе вызвано дефективным лизосомальным ферментом альфа-глюкозидазы (GAA), что приводит к недостаточному процессированию псевдогемального гликогена. Накопление лизосомального гликогена происходит преимущественно в скелетной, сердечной и печеночной тканях. Раннее проявление заболевания Помпе вызывает кардиомегалию, гипотонию, гепатомегалию и смерть из-за кардиореспираторной недостаточности обычно в возрасте до 2 лет. Проявление заболевания Помпе во зрелом возрасте наблюдается только от двадцати до шестидесяти лет и обычно затрагивает только скелетную мускулатуру.

[6] Заболевание Фабри вызывается дефективным лизосомальными ферментом альфа-галактозидаза А (GLA), что проявляется в накоплении глоботриаозилцерамида в кровеносных сосудах и других тканях и органах. Симптомы, связанные с заболеванием Фабри, включают боль из-за повреждения нерва и/или обструкции небольших сосудов, почечную недостаточность и полное разрушение, сердечные осложнения, такие как высокое кровяное давление и кардиомиопатия, дерматологические симптомы, такие как образование ангиокератомы, ангидроз или гипергидроз, а также глазные проблемы, такие как воронковидная кератопатия, клиновидная катаракта и сосудистые нарушения конъюнктивы и сетчатки.

[7] Текущие методы лечения лизосомных болезней накопления не особо оптимальны. Например, ERT, как правило, должна вводиться с высокой частотой и при высокой дозе, например дважды в неделю и не менее 40 мг/кг. Также некоторые замещаемые ферменты могут быть иммунологически перекрестно реагирующими (CRIM), стимулирующими продуцирование IgG у субъекта и, таким образом, препятствующими доставке фермента в лизосому посредством манноза-6-фосфатного (M6P) рецептора. IgG может экранировать остатки M6P заместительный фермент, и комплекс

антиген-IgG-антитело может попадать в клеточные лизосомы посредством Fc-рецептора с шунтированием тем самым заместительного фермента преимущественно в макрофаги.

[8] Доставка заместительных ферментов в соответствующие пораженные ткани также неэффективна (см. таблицу 2 и Desnick & Schuchman, «Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges», 13 Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 307-35, 2012). Например, пациенты, подвергшиеся длительной заместительной ферментной терапии по поводу заболевания Помпе в младенческом возрасте, все равно могут страдать гиперназальной речью, остаточной мышечной слабостью, птозом, остеопенией, потерей слуха, риском аспирации, дисфагией, сердечной аритмией и затруднением при глотании. Дозы заместительного фермента часто должны увеличиваться со временем до 40 мг/кг раз в неделю или раз в две недели.

[9] Таблица 2. Неэффективное нацеливание ERT на ткани

<b>Заболевание</b>	<b>Подтип (-ы)</b>	<b>Легко достигает ткани</b>	<b>С трудом достигает ткани</b>
Заболевание Гоше	1 типа	Селезенка, печень, костный мозг	Кость
	2 и 3 типов	Селезенка, печень, костный мозг	Кость, головной мозг
Заболевание Фабри	Классическое и позднее проявления	Сосудистый эндотелий	Почка, сердце
Мукополисахар идозы	Все	Селезенка, печень, костный мозг	Кость, головной мозг, хрящ
$\alpha$ -маннозидоз	---	Селезенка, печень, костный мозг	Кость, головной мозг

Заболевание Ниманна-Пика	типа В	Селезенка, печень, костный мозг	Альвеолярные макрофаги
Заболевание Помпе	В младенческом возрасте	---	Сердце, гладкая и скелетная мышечная ткань
	Более позднее проявление	---	Гладкая мышечная ткань и респираторная скелетная мышечная ткань

[10] Эндогенный манноза-6-фосфатный рецептор (MPR)

опосредует транспорт большинства рекомбинантных ферментов в лизосому. Существуют две комплементарных формы MPR: катион-независимый (CI-MPR) и катион-зависимый (CD-MPR). У любой из нокаутных форм лизосомальные ферменты не секретируются. Лизосомальные гидролазы синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и перемещаются в цис-сеть Гольджи, где они ковалентно модифицируются путем добавления манноза-6-фосфатных (М6Р) групп. Образование этого маркера зависит от последовательного эффекта двух лизосомальных ферментов: UDP-N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы (GlcNAc-фосфотрансфераза) и N-ацетилглюкозамин-1-фосфодиэстер- $\alpha$ -N-ацетил-глюкозаминидазы (экспонирующий фермент). GlcNAc-фосфотрансфераза катализирует перенос GlcNAc-1-фосфатного остатка от UDP-GlcNAc к C6-положениям выбранных манноз в высокоманнозных олигосахаридах гидролаз. Затем экспонирующий фермент удаляет концевой GlcNAc, экспонируя сигнал распознавания М6Р. В транс-сети Гольджи сигнал М6Р обеспечивает сегрегацию лизосомальных гидролаз от всех других типов белков посредством селективного связывания с рецепторами М6Р. Покрытые клатрином везикулы давали отпочковывание от транс-сети Гольджи и сливались с поздними эндосомами. При низком pH в поздней эндосоме гидролазы диссоциируют от рецепторов М6Р, и пустые рецепторы возвращаются в аппарат Гольджи для следующих циклов

транспорта.

[11] За исключением  $\beta$ -глюкоцереброзидазы, которая доставляется посредством маннозного рецептора, рекомбинантные лизосомальные ферменты имеют М6Р-гликозилирование и доставляются в лизосому главным образом посредством CI-MPR/IGF2R. Однако опосредованная гликозилированием/CI-MPR доставка заместительного фермента не достигает всех клинически релевантных тканей (таблица 2). Улучшение заместительной ферментной терапии акцентировали на улучшении доставки CI-MPR с помощью (i) усиления экспрессии на поверхности CI-MPR с использованием  $\beta$ 2-агониста кленбутерола (Koeberl *et al.*, «Enhanced efficacy of enzyme replacement therapy in Pompe disease through mannose-6-phosphate receptor expression in skeletal muscle», 103(2) *Mol. Genet. Metab.* 107-12, 2011), (ii) повышения количества остатков М6Р в ферменте (Zhu *et al.*, «Conjugation of mannose-6-phosphate-containing oligosaccharides to acid alpha-glucosidase improves the clearance of glycogen in Pompe mice», 279(48) *J. Biol. Chem.* 50336-41, 2004) или (iii) слияния домена IGF-II с ферментом (Maga *et al.*, «Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid alpha-glucosidase enhances muscle glycogen clearance in Pompe mice», 288(3) *J. Biol. Chem.* 1428-38, 2013).

[12] Большое число лизосомных болезней накопления неправильно лечат с помощью заместительной ферментной терапии или генной терапии в основном из-за плохого нацеливания заместительного фермента на соответствующие ткань или орган. Существует потребность в улучшенных методах заместительной ферментной терапии, которые усилят и обеспечат лучшее биораспределение в тканях и лизосомальное поглощение фермента. Заявители разработали улучшенную заместительную ферментную терапию с использованием контролируемой антителом CI-MPR-независимой доставки ферментов в лизосому целевых пораженных тканей.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[13] Заявители выяснили, что заместительные ферменты могут быть эффективно доставлены в лизосому определенной целевой

клетки в случае ассоциации с объектом, нацеленным на клеточную поверхность. Комбинацию этого фермента и нацеливающего объекта называют биотерапевтическим комплексом. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, т. е. биотерапевтическому комплексу, которая содержит фермент и антигенсвязывающий белок. Фермент ассоциируется с лизосомной болезнью накопления (LSD), и при этом антигенсвязывающий белок связывается с эффектором интернализации. Эффектор интернализации опосредует связывание с клеткой и поглощение в лизосомном компартменте.

[14] В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой любой фермент из  $\alpha$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы,  $\alpha$ -глюкозидазы,  $\beta$ -глюкозидазы, активатора сапозина-С, церамидазы, сфингомиелиназы,  $\beta$ -гексозаминидазы, активатора GM2, GM3-синтазы, арилсульфатазы, активатора сфинголипида,  $\alpha$ -идуронидазы, идуронидаза-2-сульфатазы, гепарин-*N*-сульфатазы, *N*-ацетил- $\alpha$ -глюкозаминидазы,  $\alpha$ -глюкозамид-*N*-ацетилтрансферазы, *N*-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы, *N*-ацетилгалактозамин-6-сульфат-сульфатазы, *N*-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы,  $\beta$ -глюкуронидазы и гиалуронидазы. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой изозим, который обладает активностью, такой же или аналогичной активности любого одного или более из вышеперечисленных ферментов. В некоторых вариантах осуществления активность  $\alpha$ -глюкозидазы может быть обеспечена изозимом, таким как сахараза-изомальтаза (SI), мальтаза-глюкоамилаза (MGAM), глюкозидаза II (GANAB) или нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза (С GNAC). В других вариантах осуществления активность  $\alpha$ -галактозидазы А может быть обеспечена изозимом, таким как  $\alpha$ -*N*-ацетилгалактозаминидаза, которая сконструирована с обеспечением GLA-активности.

[15] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой любой белок, который может связываться с одним или более эффекторами интернализации. В более конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет

собой одну или более из слитой молекулы на основе рецептора, молекулы-ловушки, слитой молекулы на основе рецептора и Fc-фрагмента, антитела, Fab-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fd-фрагмента, Fv-фрагмента, одноцепочечной Fv (scFv) молекулы, dAb-фрагмента, выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), пептида CDR3, конформационно затрудненного пептида FR3-CDR3-FR4, домен-специфичного антитела, однодоменного антитела, антитела с делецией домена, химерного антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела, моновалентного нанотела, бивалентного нанотела, иммунофармацевтического средства на основе модульного белка малого размера (SMIP), верблюжьего антитела (гомодимерное антитело с тяжелой цепью VHH), вариабельного домена IgNAR акулы и т. п. В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с эффектором интернализации и ферментом.

[16] В некоторых вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой рецепторный белок или лиганд, который связывается с рецепторным белком, который расположен в, на или вблизи клеточной мембраны и может быть подвергнут эндоцитозу. В более конкретных вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой один или более из CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, трансферринового рецептора, LDL-рецептора, рецептор белка 1, родственного LDL, ASGR1, ASGR2, белка-2, подобного белку-предшественнику амилоида (APLP2), апельинового рецептора (APLNR), PRLR (пролактиновый рецептор), MAL (миелиновый и лимфоцитарный белок, также известный как VIP17), IGF2R, H<sup>+</sup> АТФазы вакуолярного типа, рецептора дифтерийного токсина, фолатного рецептора, глутаматных рецепторов, глутатионового рецептора, лептинового рецептора, скэвенджер-рецептора, SCARA1-5, SCARB1-3 и CD36. В определенных вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой специфичный по отношению к почке интернализатор, такой как CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (рецептор паратиреоидного гормона), SLC22A13 (семейство

транспортеров растворенных веществ 22 представитель 13), SLC5A2 (котранспортер натрия/глюкозы 2) и UMOD (уромодулин). В других определенных вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой специфичный по отношению к мышцам интернализатор, такой как BMPR1A (рецептор костного морфогенетического белка 1A), м-кадгерин, CD9, MuSK (киназа, специфичная по отношению к мышцам), LGR4/GPR48 (рецептор 48, сопряженный с G-белком), холинергический рецептор (никотиновый) альфа 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (интегрин альфа-7), CACNG1 (субъединица гамма-1 кальциевого канала L-типа), CACNA1S (субъединица альфа-15 кальциевого канала L-типа), CACNG6 (субъединица гамма-6 кальциевого канала L-типа), SCN1B (субъединица бета-1 натриевого канала), CHRNA1 (субъединица альфа ACh-рецептора), CHRND (субъединица дельта ACh-рецептора), LRRC14B (белок 14B, содержащий богатый лейцином повтор) и POPDC3 (белок 3, содержащий домен Poreye). В некоторых вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой ITGA7, CD9, CD63, APLP2 или PRLR. В некоторых вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой макрофаг-предпочтительный интернализатор, в том числе, например, VSIG4 (CRIG), MSR1 (CD204) и MMR1 (MCR1, CD206).

[17] Биотерапевтический комплекс может иметь любой из нескольких форматов. В некоторых вариантах осуществления фермент ковалентно связан с антигенсвязывающим белком. В одном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок содержит полуантитело (*т. е.* с одной тяжелой цепью и одной легкой цепью), фермент ковалентно связан с Fc-доменом иммуноглобулина, и Fc-домен, который ковалентно связан с ферментом, ассоциируется с Fc-доменом антигенсвязывающего белка. В другом конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, и фермент ковалентно связан с C-концом тяжелой цепи (или легкой цепи) этого антитела. В следующем варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, и фермент ковалентно связан с N-концом тяжелой цепи (или легкой цепи) этого антитела.

[18] В других вариантах осуществления фермент не связан

ковалентно с антигенсвязывающим белком. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок связывается и с эффектором интернализации, и с ферментом. В конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой биспецифическое антитело, которое связывается с эффектором интернализации и ферментом.

[19] В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой GAA или изозим, обладающий активностью GAA, и эффектор интернализации представляет собой CD9, ITGA7, CD63, APLP2 или PRLR. В других вариантах осуществления фермент представляет собой GLA или изозим, обладающий GLA-активностью, и эффектор интернализации представляет собой CD9, ITGA7, CD63, APLP2 или PRLR.

[20] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего лизосомной болезнью накопления (LSD), предусматривающему стадию введения субъекту биотерапевтического комплекса (описанного выше), при этом биотерапевтический комплекс попадает в лизосому клетки субъекта и обеспечивает ферментативную активность («заместительный фермент»), которая замещает ферментативную активность, ассоциированную с LSD («эндогенный фермент»). LSD включают в себя сфинголипидоз, мукополисахаридоз и болезни накопления гликогена. Более конкретно, LSD, подлежащее лечению, представляет собой любое одно или более из заболеваний, приведенных в таблице 1, и заместительный фермент обладает активностью соответствующего фермента, приведенного в таблице 1. В конкретном варианте осуществления LSD представляет собой заболевание Помпе, и ассоциированный фермент представляет собой  $\alpha$ -глюкозидазу (GAA). В другом конкретном варианте осуществления LSD представляет собой заболевание Фабри, и ассоциированный фермент представляет собой  $\alpha$ -галактозидазу А (GLA). В другом конкретном примере LSD представляет собой дефицит лизосомальной кислой липазы (LAL-D), и ассоциированный фермент представляет собой лизосомальную кислую липазу (LIPA).

[21] В одном варианте осуществления заместительный фермент

не индуцирует иммунологическую реакцию у субъекта. В некоторых случаях заместительный фермент представляет собой изозим. Например, в случае если эндогенный фермент представляет собой  $\alpha$ -глюкозидазу, то изозим представляет собой другой белок, который обеспечивает такую же или аналогичную ферментативную активность, как и  $\alpha$ -глюкозидаза, такую как у сахаразы-изомальтазы (SI), мальтазы-глюкоамилазы (MGAM), глюкозидазы II (GANAB) и нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы (C GNAC). В случае если эндогенный фермент представляет собой  $\alpha$ -галактозидазу A (GLA), то изозим представляет собой другой белок, который обеспечивает такую же или аналогичную ферментативную активность, как и  $\alpha$ -глюкозидаза A, такую как у  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидазы, которая сконструирована с обеспечением GLA-активности.

[22] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу отбора или скрининга биотерапевтического комплекса, содержащего фермент и антигенсвязывающий белок, который эффективно замещает фермент у пациента при необходимости этого. В одном варианте осуществления биотерапевтический комплекс вводят в модельную систему, и модельную систему оценивают на предмет активности замещенного фермента. В одном варианте осуществления модельной системой является животное, у которого отсутствует экспрессия фермента и которое экспрессирует антиген, родственной антигенсвязывающему белку. В одном варианте осуществления животной моделью является мышь, которая экспрессирует гуманизированного родственника антигенсвязывающего белка и содержит нокаутный ген, который кодирует фермент.

#### ГРАФИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ

[23] На фигуре 1 схематически представлены биотерапевтические комплексы. На панели А изображен биотерапевтический комплекс, содержащий биспецифическое антитело (ii) и заместительный фермент (i). На панели В изображен слитый полипептид фермент-Fc (i), ассоциирующийся со специфичным в отношении эффектора интернализации полутелом (ii) с образованием биотерапевтического комплекса. На панели С изображен заместительный фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с

С-концом тяжелой цепи антитела к эффектору интернализации. На панели D изображен заместительный фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с N-концом тяжелой цепи антитела к эффектору интернализации. На панели E изображен заместительный фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с С-концом легкой цепи антитела к эффектору интернализации. На панели F изображен заместительный фермент (шестиугольник), ковалентно связанный с N-концом легкой цепи антитела к эффектору интернализации. Кривые линии на панелях С, D, E и F представляют линкеры.

[24] На фигуре 2 представлен вестерн-блоттинг в невозстановливающих условиях антитела к hFc в супернатантах экстракта клеток CHO, экспрессирующих белок, связывающий эффектор интернализации (IE-VP), или заместительный белок лизосомной болезни накопления (LSD-RP). Дорожку 1 загружали антителом к CD63 IgG4, дорожку 2 - выступом GAA-Fc, дорожку 3 - антителом к CD63 IgG4 GAA, и дорожку 4 GAA - антителом к CD63 IgG4.

[25] На фигуре 3 изображены столбиковые графики, представляющие приблизительную GAA-активность, определяемую с использованием 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -глюкозидазы к флуоресцентному субстрату. По осям Y панели A и панели B представлены моли субстрата, гидролизованного на моль белка в час. По осям X представлен каждый слитый белок GAA.

[26] На фигуре 4 изображены линейные графики, представляющие приблизительную GAA-активность конструкций GAA, интернализированных клетками HEK. По осям Y панелей A и B представлены наномоли субстрата, гидролизованного на мг клеточного лизата в час. На X-осях указана повышающаяся концентрация конструкции GAA. На панели A квадраты (■) представляют антитело к CD63-GAA, вводимое в клетки HEK в присутствии 5 мМ манноза-6-фосфата (M6P), конкурента MPR-опосредованного лизосомального нацеливания, и круги (D) представляют антитело к CD63-GAA, вводимое в клетки HEK отдельно. На панели B круги (D) представляют антитело к CD63-GAA, вводимое в клетки HEK, квадраты (■) представляют мутантное

антитело к CD63-GAA, которое не связывается с CD63, вводимое в клетки НЕК, и треугольники (▲) представляют антитело к CD63-GAA, вводимое в клетки А CD63 НЕК, которые не экспрессируют CD63.

[27] На фигуре 5 изображены линейные графики, представляющие приблизительную GAA-активность конструкций GAA, которые были интернализированы миобластами человека (панель А) или мыши (панель В). По осям Y панелей А и В представлены наномоли субстрата, гидролизованного на мг клеточного лизата в час. На X-осях указана повышающаяся концентрация конструкции GAA, либо антитела к CD63-GAA, либо мусGAA в присутствии или отсутствии М6Р.

[28] На фигуре 6 представлены уровни GAA (панель А) и содержание гликогена (панель В) трех клеточных линий заболевания Помпе (GM20089, GM20090 и GM20091) по сравнению с GAA неонатальных человеческих кожных фибробластов дикого типа (NHDF). На панели А показан вестерн-блоттинг антитела к hGAA, изображающий остаточный белок GAA в клеточных линиях заболевания Помпе и уровни белка GAA в NHDF дикого типа. На панели В представлен столбчатый график, изображающий содержание гликогена в микрограммах на миллион клеток после глюкозного голодания со снижением содержания цитоплазматического гликогена.

[29] На фигуре 7 представлен в форме столбчатого графика риск дефектов накопления гликогена для клеточных линий заболевания Помпе GM20089 (панель А), GM20090 (панель В) и GM20091 (панель С) при 200 нМ антитела к CD63-GAA или 200 нМ мус-GAA. На оси Y представлено содержание гликогена в микрограммах на миллиграмм клеточного лизата.

[30] На фигуре 8 представлен вестерн-блоттинг в невозстанавливающих условиях антитела к hFc в супернатантах экстракта клеток CHO, содержащих антитело к CD63-GLA (дорожка 1), выступ GLA-Fc (дорожка 2), GLA-антитело к CD63 (дорожка 3), выступ антитела к мус (дорожка 4), впадину антитела к CD63 (дорожка 5) и смесь супернатантов, содержащих выступ антитела к мус и впадину антитела к CD63 (дорожка 6).

[31] На фигуре 9 представлена в форме столбчатого графика ферментативная активность GLA (на оси Y в наномоле субстрата,

гидролизуемого на наномоль слитого белка в час) слитого белка, содержащего GLA, в том числе слева направо на оси X антитело к CD63-GLA (С-концевая конструкция тяжелой цепи), GLA-Fc, GLA-антитело к CD63 (N-концевая конструкция тяжелой цепи), GLA-мус-FLAG и GLA 6-his.

[32] На фигуре 10 изображен линейный график, представляющий приблизительную GLA-активность, обнаруженную в экстрактах клеток НЕК, содержащих конструкции GLA, которые были интернализированы клетками НЕК. На оси Y показана GLA-активность в наномолях субстрата, гидролизованного на миллиграмм клеточного лизата в час. На X-осях указана повышающаяся концентрация конструкции GAA. Верхняя линия представляет GLA-антитело к CD63, средняя линия представляет GLA-мус плюс биспецифическое антитело к мус/антитело к CD63, и нижняя линия представляет GLA-мус.

[33] На фигуре 11 изображен линейный график, представляющий поглощение pHrodo-меченых белков во фракции с низким pH (т. е. лизосомальной фракции) клеток НЕК (панель А), клеток РС-3 (панель В) и клеток НерG2 (панель 3). Круги (○) представляют pHrodo-меченное антитело к CD63, квадраты (■) представляют pHrodo-меченное антитело к APLP2, и треугольники (▲) представляют pHrodo-меченую GLA.

[34] На фигуре 12 представлены вестерн-блоттинги в восстанавливающих условиях для клеточных лизатов, содержащих интернализированное антитело к CD63-GAA. Каждая дорожка представляет клеточных экстракты, полученные в определенные дни после интернализации белка. На панели А представлен вестерн-блот, зондированный антителом к GAA. Антитело к CD63-GAA размером 150 кДа визуализировано с помощью маркера ← а. Лизосомальная активная форма GAA размером 76 кДа визуализирована с помощью маркера ← б. На панели В представлен вестерн-блот, зондированный антителом к hIgG. Антитело к CD63-GAA размером 150 кДа визуализировано с помощью маркера с →. Тяжелая цепь антитела (50 кДа) визуализирована с помощью маркера d →. Легкая цепь антитела (23 кДа) визуализирована с помощью маркера e →.

[35] На фигуре 13 представлен вестерн-блоттинг антитела к hGAA. Полоса 76 кДа представляет зрелую GAA. Дорожка 1 содержит

печеночные экстракты от гуманизированной CD63 мыши, которая получила антитело к CD63-GAA, дорожка 2 - почку, дорожка 3 - сердце, дорожка 4 - икроножную мышцу, дорожка 5 - квадрицепс, и дорожка 6 - диафрагму.

[36] На фигуре 14 представлен вестерн-блоттинг антитела к hGAA на экстрактах ткани от мыши дикого типа (+/+) и гуманизированной CD63 (hu/hu) мыши через 24 часа после получения антитела к hCD63-GAA при 50 мг/кг. Визуализирована лизосомальная активная форма GAA размером 76 кДа. Дорожки 1 и 2 представляют соответственно экстракты сердца от мышей дикого типа и гуманизированных. Дорожки 3 и 4 представляют экстракты икроножной мышцы от мышей дикого типа и гуманизированных. Дорожки 5 и 6 представляют экстракты диафрагмы от мышей дикого типа и гуманизированных.

[37] На фигуре 15 представлена гистограмма, изображающая относительное количество антитела к интегрину альфа 7, антитела к CD9 и антитела к дистрогликану, найденных в икроножной мышце, четырехглавой мышце, диафрагме, сердце, печени, почке и селезенке, нормализованное к уровням, найденным в печени.

[38] На фигуре 16 представлена гистограмма, изображающая лизосомальное нацеливание pHrodo-меченых антител. На оси Y представлена нормализованная везикулярная флуоресценция. На оси X представлено каждое антитело слева направо: антитело к тус, антитело к CD63, антитело к дистрогликану, антитело к м-кадгерину, антитело к CD9 и антитело к интегрину альфа 7.

[39] На фигуре 17 представлен точечный график, изображающий уровни содержания гликогена, выраженные в микрограммах гликогена на миллиграмм ткани. Ткань показана на оси X слева направо как сердце, квадрицепс, икроножная мышца, диафрагма и трицепс. Круги (●) представляют уровни содержания гликогена у необработанных GAA нокаутных (KO) мышей, квадраты (■) представляют уровни содержания гликогена у мышей GAA KO, обработанных антителом к mCD63-GAA, треугольники вершиной вверх (▲) представляют уровни содержания гликогена у мышей GAA KO, обработанных hGAA, и треугольники вершиной вниз (▼) представляют уровни содержания гликогена у необработанных мышей дикого типа. Обработки

осуществляли с помощью гидродинамической доставки конструкций ДНК.

[40] На фигуре 18 представлен точечный график, изображающий уровни содержания гликогена, выраженные в микрограммах гликогена на миллиграмм ткани. Ткань показана на оси X слева направо как сердце, квадрицепс, икроножная мышца, диафрагма и трицепс. Круги (●) представляют уровни содержания гликогена у необработанных GAA нокаутных (KO) мышей, квадраты (■) представляют уровни содержания гликогена у мышей GAA KO, обработанных антителом к mCD63-GAA, треугольники вершиной вверх (▲) представляют уровни содержания гликогена у мышей GAA KO, обработанных антителом к hCD63-GAA, и треугольники вершиной вниз (▼) представляют уровни содержания гликогена у необработанных мышей дикого типа. Обработки осуществляли с помощью гидродинамической доставки конструкций ДНК.

[41] На фигуре фигура 19 представлена гистограмма, изображающая липазную активность, выраженную в наномолях субстрата (4-метилумбеллиферилолеата), гидролизованного в час (ось Y) с помощью антитела к мус, нативной лизосомальной кислой липазы (LIPA), слитого белка антитело к мус-LIPA (C-концевое слияние тяжелой цепи) и LIPA-антитело к мус (N-концевое слияние тяжелой цепи).

[42] На фигуре 20 представлен точечный график, изображающий уровни содержания гликогена, выраженные в микрограммах гликогена на миллиграмм ткани. Ткань изображена на оси X слева направо как сердце, трицепс, квадрицепс, икроножная мышца и диафрагма. Круги (●) представляют уровни содержания гликогена у необработанных GAA нокаутных (KO) мышей, квадраты (■) представляют уровни содержания гликогена у мышей GAA KO, обработанных антителом к mCD63-GAA, треугольники вершиной вверх (▲) представляют уровни содержания гликогена у мышей GAA KO, обработанных антителом к hCD63-GAA, и треугольники вершиной вниз (▼) представляют уровни содержания гликогена у необработанных мышей дикого типа. Обработки осуществляли с помощью гидродинамической доставки (HDD) конструкций ДНК.

[43] Настоящее изобретение не ограничено описанными конкретными вариантами осуществления, композициями, способами и условиями эксперимента, поскольку такие варианты осуществления, композиции, способы и условия могут варьировать. Терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена быть ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[44] Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, аналогичные описанным в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны лишь некоторые предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ с помощью ссылки во всей своей полноте. Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение.

[45] Термин «лизосомные болезни накопления» включает любое нарушение, возникшее в результате дефекта в лизосомальной функции. На данный момент идентифицировали приблизительно 50 нарушений, наиболее известные из которых включают заболевание Тея-Сакса, заболевание Гоше и заболевание Ниманна-Пика. Патогенез этих заболеваний объясняется накоплением продуктов неполного разрушения в лизосоме, обычно из-за утраты белковой функции. Лизосомные болезни накопления вызываются утратой функции или истощением вариантов в белках, чья нормальная функция заключается в разрушении или координации разрушения лизосомального содержимого. Белки, связанные с лизосомными болезнями накопления, предусматривают ферменты, рецепторы и другие трансмембранные белки (например, NPC1), посттрансляционные модифицирующие белки (например, сульфатазу), белки переноса через мембрану, а также неферментативные кофакторы и другие растворимые белки (например, GM2 ганглиозидный активатор). Таким образом, лизосомные болезни

накопления охватывают больше расстройств кроме тех нарушений, которые вызваны дефективными ферментами *per se*, и включают в себя любое нарушение, вызванное любым молекулярным дефектом. Таким образом, используемый в данном документе термин «фермент» охватывает те из других белков, которые ассоциированы с лизосомными болезнями накопления.

[46] Природа молекулярного повреждения влияет на тяжесть заболевания во многих случаях, т. е. полная утрата функции, как правило, ассоциирован с пренатальным или неонатальным проявлением и предусматривает тяжелые симптомы; частичная утрата функции ассоциирована со менее выраженным (относительно) и более поздним проявлением заболевания. Как правило, чтобы исправить метаболические дефекты в дефицитных клетках, требуется восстановить лишь небольшое процентное отношение активности. В таблице 1 перечисляются некоторые из более распространенных лизосомных болезней накопления и белки, ассоциированные с утратой функции при них. Как правило, лизосомные болезни накопления описаны у Desnick and Schuchman, 2012.

[47] Лизосомные болезни накопления могут быть систематизированы по типу продукта, который накапливается в дефективной лизосоме. Сфинголипидоз представляет собой класс заболеваний, которые поражают метаболизм сфинголипидов, которые являются липидами, содержащими жирные кислоты, соединенные с алифатическими аминспиртами (обзор в S. Nakomori, «Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis», 50 Annual Review of Biochemistry 733-764, July 1981). Накопленные продукты сфинголипидоза включают в себя ганглиозиды (например, заболевание Тея-Сакса), гликолипиды (например, заболевание Фабри) и глюкоцереброзиды (например, заболевание Гоше).

[48] Мукополисахаридоз представляет собой группу заболеваний, которые поражают метаболизм глюкозаминогликанов (GAGS или мукополисахаридов), которые представляют собой длинные неразветвленные цепи повторяющихся дисахаридов, которые помогают строить кость, хрящ, сухожилия, роговицу, кожу и соединительную ткань (обзор в Muenzer, «Early initiation of enzyme replacement

therapy for the mucopolysaccharidoses», 111(2) Mol. Genet. Metab. 63-72 (Feb. 2014); Sasisekharan *et al.*, «Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans», 8(1) Ann. Rev. Biomed. Eng. 181-231 (Dec. 2014)). Накопленные продукты мукополисахаридоза включают в себя гепарана сульфат, дерматана сульфат, кератина сульфат, различные формы хондроитина сульфата и гиалуроновую кислоту. Например, синдром Моркио А типа обуславливается дефектом в лизосомальном ферменте галактоза-6-сульфат-сульфатаза, который приводит к лизосомальному накоплению кератина сульфата и хондроитин-6-сульфата.

[49] Болезни накопления гликогена (также известные как гликогеноз) являются результатом неспособности клетки к метаболизму (к созданию или разрушению) гликогена. Метаболизм гликогена модулируется различными ферментами или другими белками, в том числе глюкоза-6-фосфатазой, кислой альфа-глюкозидазой, линейаризующим гликоген ферментом, разветвляющим гликоген ферментом, мышечной гликогенфосфорилазой, печеночной гликогенфосфорилазой, мышечной фосфофруктокиназой, киназой фосфорилазы, переносчиком глюкозы, альдолазой А, бета-энолазой и гликогенсинтазой. Типичная болезнь лизосомального накопления/накопления гликогена представляет собой заболевание Помпе, при котором дефективная кислая альфа-глюкозидаза вызывает накопление гликогена в лизосомах. Симптомы включают гепатомегалию, мышечную слабость, сердечную недостаточность, а в случае инфантильного варианта смерть в возрасте до 2 лет (см. DiMauro and Spiegel, «Progress and problems in muscle glycogenosis», 30(2) Acta Myol. 96-102 (Oct. 2011)).

[50] «Биотерапевтический комплекс» включает в себя (i) один белок, который содержит более чем один функциональный домен, (ii) белок, который содержит более чем одну полипептидную цепь, и (iii) смесь более чем одного белка или более чем одного полипептида. Как правило, термин «полипептид» означает отдельную цепь аминокислот, связанных вместе посредством пептидных связей. Термин «белок» охватывает термин «полипептид», но также включает более сложные структуры. То есть отдельный полипептид является

белком, и при этом белок может содержать один или более полипептидов, ассоциированных в структуру более высокого порядка. Например, гемоглобин является белком, содержащим четыре полипептида: два альфа-глобиновых полипептида и два бета-глобиновых полипептида. Миоглобин также является белком, однако он содержит только один миоглобиновый полипептид.

[51] Биотерапевтический комплекс содержит один или более полипептидов и имеет по меньшей мере две функции. Одна из этих функций заключается в замещении дефективной активности белка, ассоциированной с лизосомной болезнью накопления. Другой из этих функций является связывание с эффектором интернализации. Таким образом, один полипептид, который обеспечивает активность лизосомального белка (например, ферментативную активность или активность переносчика; также известную как активность белка, связанного с лизосомальным заболеванием (LSD-RP)) и способность связываться с эффектором интернализации (также известную как активность белка, связывающего эффектор интернализации (IE-BP)), представляет собой биотерапевтический комплекс. Также смесь белков, где один белок обладает функцией лизосомального белка, а другой белок обладает активностью связывания с эффектором интернализации, представляет собой биотерапевтический комплекс. На фигуре 1 изображены различные примеры биотерапевтических комплексов. В одном примере (фигура 1, панель А) биотерапевтический комплекс содержит лизосомальный замещающий белок (LSD-RP, представленный шестиугольником) и биспецифическое антитело (1E-BP), которое связывается с лизосомальным замещающим белком (пунктирные линии) и эффектором интернализации (жирные линии). В данном случае одно плечо биспецифического антитела нековалентно связывается с LSD-RP, а другое плечо нековалентно связывается с эффектором интернализации с обеспечением тем самым интернализации замещающего белка (LSD-RP) в лизосому. В другом примере (панель В) биотерапевтический комплекс содержит один белок, содержащий два полипептида, при этом один полипептид обладает функцией LSD-RP, а другой обладает функцией IE-BP. В данном случае LSD-RP слит с Fc-доменом иммуноглобулина или константной областью тяжелой цепи, которая ассоциируется с Fc-

доменом полуантитела к LSD-RP, с образованием бифункционального биотерапевтического комплекса. Вариант осуществления, изображенный на панели В, аналогичен таковому на панели А, за исключением того, что LSD-RP ковалентно присоединен к одному из полуантител, а не посредством взаимодействия антиген-антитело по переменному домену иммуноглобулина полуантитела.

[52] В других примерах биотерапевтический комплекс состоит из LSD-RP, ковалентно связанного (непосредственно или опосредованно через линкер) с IE-VP. В одном варианте осуществления LSD-RP присоединяется к С-концу молекулы иммуноглобулина (например, к тяжелой цепи или, в качестве альтернативы, к легкой цепи). В других вариантах осуществления LSD-RP присоединяется к N-концу молекулы иммуноглобулина (например, к тяжелой цепи или, в качестве альтернативы, к легкой цепи). В данных примерах молекулой иммуноглобулина является IE-VP.

[53] Термины «белок, связанный с лизосомной болезнью накопления» или «LSD-RP» означают любой белок, ассоциированный с этиологией или физиологическим эффектом лизосомной болезни накопления. LSD-RP предусматривает активный фермент, транспортный белок, рецептор или другой белок, который является дефективным и который характеризуется как молекулярное повреждение, вызывающее заболевание. LSD-RP также предусматривает любой белок, который может обеспечивать аналогичную или достаточную биохимическую или физиологическую активность, которая заменяет или обходит молекулярное повреждение при заболевании. Например, термин «изозим» может использоваться как LSD-RP. Примеры белков, связанных с лизосомной болезнью накопления, включают в себя белки, приведенные в таблице 1 как «вовлеченный фермент/белок», а также любой известный или открытый позже белок или другую молекулу, которые обходят молекулярный дефект при лизосомной болезни накопления.

[54] В случае заболевания Помпе, при котором молекулярным дефектом является дефект в  $\alpha$ -глюкозидазной активности, LSD-RP

предусматривает альфа-глюкозидазу человека и «изозимы», такие как другие альфа-глюкозидазы, сконструированная рекомбинантная альфа-глюкозидаза, другие глюкозидазы, рекомбинантные глюкозидазы, любой белок, сконструированный с возможностью гидролиза концевого нередуцирующего 1-4-связанного остатка альфа-глюкозы с высвобождением одной молекулы альфа-глюкозы, любой фермент ЕС 3.2.1.20, природные или рекомбинантные при низком рН углеводные гидролазы для гликогена или крахмалов, а также гликозилгидролазы, такие как сахараза-изомальтаза, мальтаза-глюкоамилаза, глюкозидаза II и нейтральная альфа-глюкозидаза,

[55] Термин «интернализующий эффектор» включает белок, который способен интернализироваться в клетку, или который в противном случае участвует в ретроградном мембранном транспорте или способствует ему. В некоторых случаях интернализующий эффектор представляет собой белок, который подвергается трансцитозу; т. е. белок интернализуется с одной стороны клетки и транспортируется на другую сторону клетки (*например*, от апикальной к базальной). Во многих вариантах осуществления интернализующий эффекторный белок представляет собой белок, экспрессируемый на клеточной поверхности, или растворимый внеклеточный белок. Однако в настоящем изобретении также рассматриваются варианты осуществления, в которых интернализующий эффекторный белок экспрессируется во внутриклеточном компартменте, таком как эндосома, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосома и *т. д.* Например, белки, участвующие в ретроградном мембранном транспорте (*например*, пути от ранних/рециркулирующих эндосом к транс-сети Гольджи), могут служить в качестве интернализующих эффекторных белков в различных вариантах осуществления настоящего изобретения. В любом случае связывание IE-VP с интернализующим эффекторным белком приводит к тому, что весь биотерапевтический комплекс и любые связанные с ним молекулы (*например*, LSD-RP), также интернализуются в клетку. Как объясняется ниже, интернализующие эффекторные белки включают белки, которые непосредственно интернализуются в клетку, а также

белки, которые опосредованно интернализуются в клетку.

[56] Интернализирующие эффекторные белки, которые непосредственно интернализуются в клетку, включают в себя связанные с мембраной молекулы по меньшей мере с одним внеклеточным доменом (например, трансмембранные белки, GPI-заякоренные белки и т. д.), которые подвергаются клеточной интернализации и предпочтительно обрабатываются посредством пути внутриклеточной деградации и/или рециркуляции. Конкретные неограничивающие примеры интернализирующих эффекторных белков, которые непосредственно интернализуются в клетку, включают, например, CD63, MHC-I (например, HLA-B27), Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, рецептор трансферрина, LDL-рецептор, рецептор белка 1, родственного LDL, ASGR1, ASGR2, белок-2, подобный белку-предшественнику амилоида (APLP2), апельсиновый рецептор (APLNR), MAL (миелиновый и лимфоцитарный белок, также известный как VIP17), IGF2R, H+ АТФазу вакуолярного типа, рецептор дифтерийного токсина, фолатный рецептор, глутаматные рецепторы, глутатионовые рецепторы, лептиновые рецепторы, скавенджер-рецепторы (например, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36) и т. д.

[57] В определенных вариантах осуществления интернализирующий эффектор представляет собой рецептор пролактина (PRLR). Было обнаружено, что PRLR представляет собой не только мишень для определенных терапевтических применений, но также является эффективным интернализирующим эффекторным белком на основании его высокой скорости интернализации и возобновления. Потенциал PRLR как интернализирующего эффекторного белка, например, проиллюстрирован в WO 2015/026907, где показано, *inter alia*, что антитела к PRLR эффективно интернализуются PRLR-экспрессирующими клетками *in vitro*.

[58] В определенных вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой специфичный по отношению к почке интернализатор, такой как CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (рецептор паратиреоидного гормона), SLC22A13 (семейство транспортеров растворенных веществ 22 представитель 13), SLC5A2 (котранспортер натрия/глюкозы 2) и UMOD (уромодулин). В других определенных вариантах осуществления

эффектор интернализации представляет собой специфичный по отношению к мышцам интернализатор, такой как BMPR1A (рецептор костного морфогенетического белка 1A), м-кадгерин, CD9, MuSK (киназа, специфичная по отношению к мышцам), LGR4/GPR48 (рецептор 48, сопряженный с G-белком), холинергический рецептор (никотиновый) альфа 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (интегрин альфа-7), CACNG1 (субъединица гамма-1 кальциевого канала L-типа), CACNA1S (субъединица альфа-15 кальциевого канала L-типа), CACNG6 (субъединица гамма-6 кальциевого канала L-типа), SCN1B (субъединица бета-1 натриевого канала), CHRNA1 (субъединица альфа ACh-рецептора), CHRND (субъединица дельта ACh-рецептора), LRRC14B (белок 14B, содержащий богатый лейцином повтор) и POPDC3 (белок 3, содержащий домен Poreye). В некоторых вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой ITGA7, CD9, CD63, ALPL2 или PPRLR.

[59] В вариантах осуществления, в которых эффектор интернализации (IE) непосредственно интернализуется в клетку, IE-ВР может представлять собой, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые специфически связываются с IE, или лиганд или часть лиганда, которые специфически взаимодействуют с IE. Например, если IE представляет собой Kremen-1 или Kremen-2, то E-ВР может содержать лиганд Kremen (например, DKK1) или его Kremen-связывающую часть или состоять из них. В качестве другого примера, если IE является рецепторной молекулой, такой как ASGR1, то IE может содержать лиганд, специфичный по отношению к рецептору (например, асиалоорозомукоида [ASOR] или бета-GalNAc), или его рецептор-связывающую часть или состоять из них.

[60] Интернализирующие эффекторные белки, которые опосредованно интернализуются в клетку, предусматривают белки и полипептиды, которые сами по себе не интернализуются, а интернализуются в клетку после связывания или иным образом ассоциации со вторым белком или полипептидом, который непосредственно интернализуется в клетку. Белки, которые опосредованно интернализуются в клетку, предусматривают, например, растворимые лиганды, которые способны связываться с

интернализующей рецепторной молекулой, экспрессируемой на клеточной поверхности. Неограничивающим примером растворимого лиганда, который (опосредованно) интернализуется в клетку посредством его взаимодействия с интернализирующей рецепторной молекулой, экспрессируемой на клеточной поверхности, является трансферрин. В вариантах осуществления, где IE представляет собой трансферрин (или другой опосредованно интернализуемый белок), связывание IE-ВР с IE и взаимодействие IE с рецептором трансферрина (или другой интернализирующей рецепторной молекулой, экспрессируемой на клеточной поверхности) приводит к тому, что весь IE-ВР и любые молекулы, связанные с ним (например, LSD-RP), интернализуются в клетку одновременно с интернализацией IE и его партнера по связыванию.

[61] В вариантах осуществления, в которых IE опосредованно интернализуется в клетку, IE-ВР может представлять собой, например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые специфически связываются с IE, или рецептор или часть рецептора, которые специфически взаимодействуют с растворимым эффекторным белком. Например, если IE представляет собой цитокин, то IE-ВР может содержать соответствующий рецептор цитокина или его лиганд-связывающую часть или состоять из них.

[62] Примером IE является CD63, который является представителем тетраспанинового суперсемейства белков клеточной поверхности, которые пересекают клеточную мембрану четыре раза. CD63 экспрессируется практически во всех тканях и, как полагают, вовлекается в формирование и стабилизацию комплексов передачи сигнала. CD63 локализуется в клеточной мембране, лизосомальной мембране и поздней эндосомальной мембране. Как известно, CD63 ассоциирует с интегринами и может быть вовлечен в эпителиальный-мезенхимальный переход. См. H. Maecker *et al.*, «The tetraspanin superfamily: molecular facilitators», 11(6) FASEB J. 428-42, May 1997, и M. Metzelaar *et al.*, «CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells», 266 J. Biol. Chem. 3239-3245, 1991.

[63] Другим примером IE является подобный предшественнику

амилоида-бета (A4) белок 2 («APLP2»), повсеместно экспрессируемый представитель семейства APP (белка-предшественника амилоида). APLP2 представляет собой связанный с мембраной белок, который, как известно, взаимодействует с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I (например, Kd). Он связывается с Kd на клеточной поверхности и интернализуется клатрин-зависимым образом вместе с Kd. См. Tuli *et al.*, «Mechanism for amyloid precursor-like protein 2 enhancement of major histocompatibility complex class I molecule degradation», 284 *The Journal of Biological Chemistry* 34296-34307 (2009).

[64] Другим примером IЕ является пролактиновый рецептор (PRLR). Пролактиновый рецептор является представителем семейства цитокиновых рецепторов I типа и при связывании с лигандом и последующей димеризации активирует «тирозинкиназы Jak2, Fyn и Tec, фосфатазу SHP-2, фактор обмена гуаниновых нуклеотидов Vav и супрессор передачи сигнала SOCS», (см. Clevenger and Kline, «Prolactin receptor signal transduction», 10(10) *Lupus* 706-18 (2001), реферат). Пролактиновый рецептор подвергается эндоцитотическому рециклингу и может быть найден в лизосомальных фракциях. См. Genty *et al.*, «Endocytosis and degradation of prolactin and its receptor in Chinese hamster ovary cells stably transfected with prolactin receptor cDNA», 99(2) *Mol. Cell Endocrinol.* 221-8 (1994); и Ferland *et al.*, «The effect of chloroquine on lysosomal prolactin receptors in rat liver», 115(5) *Endocrinology* 1842-9 (1984).

[65] Как используется в данном документе, «иммунологическая реакция» как правило, означает иммунологический ответ пациента на посторонний или «чужой» белок. Этот иммунологический ответ включает аллергическую реакцию и развитие антител, которые влияют на эффективность заместительного фермента. Некоторые пациенты не могут продуцировать какой-либо нефункционирующий белок, что делает таким образом заместительный фермент «чужеродным» белком. Например, повторная инъекция рекомбинантной GLA (rGLA) тем страдающим заболеванием Фабри пациентам, у которых отсутствует GLA, зачастую приводит к аллергической

реакции. У других пациентов, как было показано, продуцирование антител к rGLA снижает эффективность заместительного фермента в лечении заболевания. См., например, Tajima *et al.* («Use of a Modified  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase (NAGA) in the Development of Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease», 85(5) *Am. J. Hum. Genet.* 569-580 (2009)), в котором обсуждается применение модифицированной NAGA в качестве «изозима» для замещения GLA. Модифицированная NAGA не обладает иммунологической перекрестной реакционной активностью с GLA и «не реагирует с сывороткой крови от пациента с заболеванием Фабри, регулярно получающего лечение рекомбинантной GLA». *Id.*, реферат.

[66] Термин «белок» означает любой аминокислотный полимер, имеющий более чем приблизительно 20 аминокислот, ковалентно связанных посредством амидных связей. Белки содержат одну или более аминокислотных полимерных цепей, как правило известных из уровня техники как «полипептиды». Таким образом, полипептид может представлять собой белок, а белок может содержать несколько полипептидов с образованием одной функционирующей биомолекулы. В некоторых белках могут присутствовать дисульфидные мостики (*т. е.* между цистеиновыми остатками с образованием цистина). Такие ковалентные связи могут находиться в одной полипептидной цепи или между двумя отдельными полипептидными цепями. Например, дисульфидные мостики необходимы для надлежащей структуры и функции инсулина, иммуноглобулинов, протамина и *т. п.* Последний обзор по образованию дисульфидных связей см. в Oka and Bulleid, «Forming disulfides in the endoplasmic reticulum», 1833(11) *Biochim Biophys Acta* 2425-9 (2013).

[67] Кроме образования дисульфидных связей белки могут подвергаться другим посттрансляционным модификациям. Такие модификации включают в себя липидизацию (*например*, миристоилирование, пальмитоилирование, фарнезоилирование, геранилгеранилирование и образование гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря), алкилирование (*например*, метилирование), ацилирование, амидирование,

гликозилирование (*например*, добавление гликозильных групп по аргинину, аспарагинину, цистеину, гидроксизину, серину, треонину, тирозину и/или триптофану) и фосфорилирование (*т. е.* добавление фосфатной группы к серину, треонину, тирозину и/или гистидину). Для последнего обзора по посттрансляционной модификации белков, продуцируемых эукариотами, см. Mowen and David, «Unconventional post-translational modifications in immunological signaling», 15(6) Nat Immunol 512-20 (2014); and Blixt and Westerlind, «Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)», 18 Curr Opin Chem Biol. 62-9 (2014).

[68] Иммуноглобулины представляют собой белки с несколькими полипептидными цепями и экстенсивными посттрансляционными модификациями. Канонический иммуноглобулиновый белок (*например*, IgG) содержит четыре полипептидных цепи – две легких цепи и две тяжелых цепи. Каждая легкая цепь соединяется с одной тяжелой цепью посредством цистиновой дисульфидной связи, а две тяжелых цепи связываются друг с другом посредством двух цистиновых дисульфидных связей. Иммуноглобулины, продуцируемые в системах млекопитающих, также гликозилируются по различным остаткам (*например*, по аспарагиновым остаткам) с различными полисахаридами и могут отличаться у видов, что может влиять на антигенность терапевтических антител (см. Butler and Spearman, «The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering», 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014)).

[69] Используемый в данном документе термин «белок» включает биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследовании или терапии, белки-ловушки и другие Fc-слитые белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, антитела человека, биспецифические антитела, фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т. п. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных клеточных систем продуцирования, таких как система бакуловируса насекомых, дрожжевые системы (*например*, *Pichia sp.*), системы млекопитающих (*например*, клетки CHO и клетки CHO-K1, подобные производным CHO). Последний обзор

обсуждения биотерапевтических белков и их продуцирования см. в Ghaderi et al., «Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation», 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012).

[70] Используемый в данном документе термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена - CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен CL. VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на области гиперпеременности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи могут быть сокращены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR легкой цепи могут быть сокращены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Термин «высокоаффинное» антитело относится к тем антителам, которые характеризуются аффинностью связывания со своей целью, составляющей по меньшей мере  $10^{-9}$  M, по меньшей мере  $10^{-10}$  M; по меньшей мере  $10^{-11}$  M или по меньшей мере  $10^{-12}$  M, что измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, или определения аффинности в растворе посредством ELISA.

[71] Фраза «биспецифическое антитело» включает в себя антитело, способное селективно связывать два или более эпитопов. Как правило, биспецифические антитела содержат две различные тяжелые цепи, при этом каждая тяжелая цепь специфически связывается с отдельным эпитопом - либо на двух разных молекулах (например, антигенах), либо на одной и той же молекуле

(например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связываться с двумя разными эпитопами (первым эпитопом и вторым эпитопом), то аффинность первой тяжелой цепи по отношению к первому эпитопу, как правило, будет по меньшей мере на один, два, или три, или четыре порядка ниже аффинности первой тяжелой цепи по отношению ко второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на другой цепи (например, на одном и том же или на другом белке). Биспецифические антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие те переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелых цепи, каждая из которых содержит три CDR тяжелой цепи, а затем (от N-конца к С-концу) домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, и легкая цепь иммуноглобулина, либо та, которая не обеспечивает антигенсвязывающую специфичность, однако может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью, либо та, которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и может связываться с одним или более эпитопами, связанными с антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, либо та, которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание или одной, или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

[72] Фраза «тяжелая цепь» или «тяжелая цепь иммуноглобулина» включает последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает переменный домен тяжелой цепи. Переменные домены тяжелой цепи включают в себя три CDR тяжелой цепи и четыре области FR, если не указано иное. Фрагменты тяжелых цепей включают в себя CDR, CDR и FR, а также их

комбинации. Типичная тяжелая цепь после варибельного домена (от N-конца к С-концу) имеет домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3. Функциональный фрагмент тяжелой цепи включает в себя фрагмент, который способен специфически распознавать антиген (например, распознавать антиген с KD в микромолярном, наномолярном или пикомолярном диапазонах), который способен экспрессироваться и секретироваться клеткой и который содержит по меньшей мере одну CDR.

[73] Фраза «легкая цепь» включает последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает каппа и лямбда легкие цепи человека. Варибельные (VL) домены легкой цепи, как правило, включают в себя три CDR легкой цепи и четыре каркасных (FR) области, если не указано иное. Как правило, легкая цепь полной длины включает в себя, от amino-конца к карбоксильному концу, домен VL, который включает в себя FR1-CDR1- FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые могут быть использованы согласно настоящему изобретению, предусматривают например, те, которые не связываются селективно либо с первым, либо со вторым антигеном, селективно связываемым антигенсвязывающим белком. Подходящие легкие цепи предусматривают цепи, которые могут быть идентифицированы путем скрининга по наиболее часто используемым легким цепям в имеющихся библиотеках антител (библиотеках WET или *in silico*), при этом легкие цепи существенно не влияют на аффинность и/или селективность антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Подходящие легкие цепи предусматривают цепи, которые могут связываться с одним или обоими эпитопами, которые связываются антигенсвязывающими областями антигенсвязывающего белка.

[74] Фраза «варибельный домен» включает аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепей иммуноглобулина (модифицированных, если требуется), которые содержат следующие аминокислотные области, в последовательности от N-конца к С-концу (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «варибельный домен» включает аминокислотную

последовательность, способную сворачиваться в канонический домен (VH или VL), имеющий структуру двойных бета-складок, при этом бета-складки соединяются дисульфидной связью между остатками первой бета-складки и второй бета-складки.

[75] Фраза «область, определяющая комплементарность» или термин «CDR» включают аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты генов иммуноглобулина организма, которая в норме (т. е. у животного дикого типа) находится между двух каркасных областей в вариабельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или T-клеточного рецептора). CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии, или перегруппированной, или неперегруппированной последовательностью, и, например, наивной или зрелой B-клеткой или T-клеткой. В некоторых случаях (например, для CDR3) CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например, последовательностями зародышевой линии), которые не являются смежными (например, в неперегруппированной последовательности нуклеиновой кислоты), но являются смежными в B-клеточной последовательности нуклеиновой кислоты, например, как результат сплайсинга или соединения последовательностей (например, рекомбинация V-D-J с образованием CDR3 тяжелой цепи).

[76] Термин «фрагмент антитела» относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфического связывания с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «фрагмент антитела», включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward *et al.* (1989) *Nature* 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов Fv-фрагмента, VL и VH, связанных синтетическим линкером с образованием одной белковой

цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, таких как диатела, также охватываются термином «антитело» (см., например, Holliger *et al.* (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123).

[77] Фраза «Fc-содержащий белок» включает антитела, биспецифические антитела, иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат по меньшей мере функциональную часть областей CH2 и CH3 иммуноглобулина. «Функциональная часть» относится к CH2 и CH3 области, которая может связываться с Fc-рецептором (например, FcγR или FcRn, т. е. неонатальным Fc-рецептором) и/или которая может участвовать в активации комплемента. Если области CH2 и CH3 содержат делеции, замены, и/или вставки, или другие модификации, которые делают ее неспособной связываться с каким-либо Fc-рецептором, а также неспособной активировать комплемент, то области CH2 и CH3 не являются функциональными.

[78] Fc-содержащий белок может содержать модификации в доменах иммуноглобулина, в том числе если модификации нарушают одну или более из эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, которые нарушают связывание FcγR, связывание FcRn и, таким образом, время полужизни и/или активность CDC). Такие модификации предусматривают без ограничения следующие модификации и их комбинации, согласно нумерации EU константной области иммуноглобулина: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 и 439.

[79] Например, и без ограничения, связывающий белок представляет собой Fc-содержащий белок, демонстрирующий увеличенное время полужизни в сыворотке крови (по сравнению с таким же Fc-содержащим белком без указанной модификации(-й)) и

имеющий модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в 250 и/или 428; или модификацию в 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В другом примере модификация может предусматривать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

**[80]** Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий белок» относится к полипептиду или белку (один или более полипептидов, объединенных в функциональную единицу), который специфически распознает эпитоп на антигене, таком как специфичный по отношению к клетке антиген и/или целевой антиген в соответствии с настоящим изобретением. Антигенсвязывающий белок может быть полиспецифичным. Термин «полиспецифичный» в отношении антигенсвязывающего белка означает, что белок распознает разные эпитопы, либо на одном и том же антигене, либо на разных антигенах. Полиспецифичная антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению может представлять собой один многофункциональный полипептид или может представлять собой мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, ковалентно или нековалентно связанных друг с другом. Термин «антигенсвязывающий белок» включает антитела или их фрагменты по настоящему изобретению, которые могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или прочего) с одним или более другими молекулярными объектами, такими как белок или его фрагмент, с получением биспецифической или полиспецифической

антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания.

[81] Используемый в данном документе термин «эпитоп» относится к части антигена, которая распознается полиспецифичным антигенсвязывающим полипептидом. Один антиген (такой как антигенный полипептид) может иметь более чем один эпитоп. Эпитопы можно определить как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, составляют подгруппу структуральных эпитопов и определяются как такие остатки, которые непосредственно обуславливают аффинность взаимодействия между антигенсвязывающим полипептидом и антигеном. Также эпитопы могут быть конформационными, т. е. состоять из нелинейных аминокислот. В определенных вариантах осуществления эпитопы могут включать детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные структуры молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь специфические характеристики трехмерных структур и/или специфические характеристики заряда. Эпитопы, образованные непрерывными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующими растворителями, в то время как эпитопы, образованные с помощью укладки в третичную структуру, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями.

[82] Термин «домен» относится к любой части белка или полипептида, обладающего конкретной функцией или структурой. Предпочтительно, домены по настоящему изобретению связываются со специфичными по отношению к клетке или целевыми антигенами. Как используется в данном документе, специфичный по отношению к клетке антиген или целевые антигенсвязывающие домены и т. п. предусматривают какой-либо полипептид или гликопротеин, встречающиеся в природе, полученные ферментативным путем, синтетические или полученные с помощью методик генной инженерии, которые специфически связывают антиген.

[83] Термины «полутело» или «полуантитело», которые используются взаимозаменяемо, относятся к половине антитела, которая фактически содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь. Тяжелые цепи антитела могут формировать димеры так, что

тяжелая цепь одного полутела может ассоциироваться с тяжелой цепью, ассоциированной с другой молекулой (например, другим полутелом) или другим Fc-содержащим полипептидом. Два слегка отличающихся Fc-домена могут «гетеродимеризоваться» как при образовании биспецифических антител или других гетеродимеров, - тримеров, -тетрамеров и т. п. См. Vincent and Murini, «Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates», 7 Biotechnol. J. 1444-1450 (2012); и Shimamoto *et al.*, «Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies», 4(5) MAbs 586-91 (2012).

[84] В одном варианте осуществления переменный домен полутела специфически распознает эффектор интернализации, и Fc-домен полутела димеризуется с Fc-слитым белком, который содержит заместительный фермент (например, пептитело) Id, 586.

[85] Термины «альфа-глюкозидаза» (или « $\alpha$ -глюкозидаза»), « $\alpha$ -глюкозидазная активность», «GAA» и «GAA-активность» используются взаимозаменяемо и относятся к любому белку, который облегчает гидролиз 1,4-альфа-связей гликогена и крахмала в глюкозе. GAA также известна *inter alia* как EC 3.2.1.20, мальтаза, глюкоинвертаза, глюкозидосахараза, мальтаза-глюкоамилаза, альфа-глюкопиранозидаса, глюкозидоинвертаза, альфа-D-глюкозидаза, альфа-глюкозидаза гидролаза, альфа-1,4-глюкозидаза и альфа-D-глюкозидаза глюкогидролаза. GAA может быть обнаружена в лизосоме и в щеточной кайме тонкого кишечника. У пациентов, страдающих заболеванием Помпе, отсутствует функционирующая лизосомальная  $\alpha$ -глюкозидаза. См. S. Chiba, «Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase», 61(8) Biosci. Biotechnol. Biochem. 1233-9 (1997); и Hesselink *et al.*, «Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II», 1637(2) Biochim. Biophys. Acta. 164-70 (2003).

[86] Термины «альфа-галактозидаза А» (или « $\alpha$ -галактозидаза А»), «активность  $\alpha$ -галактозидазы А», « $\alpha$ -галактозидаза», «активность  $\alpha$ -галактозидазы», «GLA» и «GLA-активность» используются взаимозаменяемо и относятся к любому белку, который

облегчает гидролиз терминальных  $\alpha$ -галактозильных фрагментов из гликолипидов и гликопротеинов, а также гидролизует  $\alpha$ -D-фукозиды. GLA также известна *inter alia* как EC 3.2.1.22, мелибиаза,  $\alpha$ -D-галактозидаза,  $\alpha$ -галактозидаза А,  $\alpha$ -галактозидгалактогидролаза,  $\alpha$ -D-галактозидгалактогидролаза. GLA представляет собой лизосомальный фермент, кодируемый геном GLA, связанным с X-хромосомой. Дефекты в GLA могут приводить к заболеванию Фабри, при котором гликолипид, известный как глоботриаозилцерамид (также известный как Gb3, GL-3 или церамидтригексозид) накапливается внутри кровеносных сосудов (т. е. выраженная васкулопатия), что приводит к боли и ухудшению в функционировании почки, сердца, кожи и/или цереброваскулярных тканей, а также в других тканях и органах. См., например, Prabakaran *et al.* «Mannose 6-phosphate receptor and sortilin mediated endocytosis of  $\alpha$ -galactosidase A in kidney endothelial cells», 7(6) PLoS One e39975 pp. 1-9 (2012).

**[87]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента (или субъекта), страдающего лизосомной болезнью накопления (LSD), путем введения пациенту «биотерапевтического комплекса». Биотерапевтический комплекс попадает в клетки пациента и доставляет в лизосомы фермент или ферментативную активность (т. е. «заместительный фермент»), которые замещают фермент или ферментативную активность, ассоциированные с LSD (т. е. «эндогенный фермент»).

**[88]** LSD включают в себя сфинголипидоз, мукополисахаридоз и болезни накопления гликогена. В некоторых вариантах осуществления LSD представляет собой любое одно или более из заболевания Фабри, заболевания Гоше I типа, заболевания Гоше II типа, заболевания Гоше III типа, заболевания Ниманна-Пика типа А, заболевания Ниманна-Пика типа BGM1-ганглиозидоза, заболевания Сандгоффа, заболевания Тея-Сакса, дефицита активатора GM2, GM3-ганглиозидоза, метахроматической лейкодистрофии, дефицита активатора сфинголипида, заболевания Шейе, заболевания Гурлера-Шейе, заболевания Гурлера, заболевания Хантера, Санфилиппо А, Санфилиппо В, Санфилиппо С, Санфилиппо D, синдрома Моркио типа

А, синдрома Моркио В типа, заболевания Марото-Лами, заболевания Слая, MPS IX и заболевания Помпе. В конкретном варианте осуществления LSD представляет собой заболевание Фабри. В других вариантах осуществления LSD представляет собой заболевание Помпе.

[89] В некоторых вариантах осуществления биотерапевтический комплекс содержит (а) заместительный фермент и (b) молекулярный объект, который связывается с эффектором интернализации. В некоторых случаях заместительный фермент представляет собой одно или более из  $\alpha$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозидазы,  $\alpha$ -глюкозидазы,  $\beta$ -глюкозидазы, активатора сапозина-С, церамидазы, сфингомиелиназы,  $\beta$ -гексозаминидазы, активатора GM2, GM3-синтазы, арилсульфатазы, активатора сфинголипида,  $\alpha$ -идуронидазы, идуронидаза-2-сульфатазы, гепарин-*N*-сульфатазы, *N*-ацетил- $\alpha$ -глюкозаминидазы,  $\alpha$ -глюкозамид-*N*-ацетилтрансферазы, *N*-ацетилглюкозамин-6-сульфатазы, *N*-ацетилгалактозамин-6-сульфат-сульфатазы, *N*-ацетилгалактозамин-4-сульфатазы,  $\beta$ -глюкуронидазы и гиалуронидазы.

[90] В некоторых случаях у пациента не может продуцироваться достаточно белка, так что заместительный фермент распознается пациентом как «чужой», и после введения заместительного фермента происходит иммунологическая реакция. Это является нежелательным. Поэтому, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, заместительный фермент разрабатывают или продуцируют таким образом, чтобы избежать индуцирования иммунологической реакции у субъекта. Одним таким решением является применение «изозима» в качестве заместительного фермента. Изозим достаточно близок «собственному» белку пациента, однако обладает активностью заместительного фермента, достаточной для облегчения симптомов LSD.

[91] В одном конкретном варианте осуществления, при котором LSD представляет собой заболевание Помпе, и эндогенный фермент представляет собой  $\alpha$ -глюкозидазу (GAA), изозим может представлять собой любое из кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, сахаразы-изомальтазы (SI), мальтазы-глюкоамилазы (MGAM), глюкозидазы II (GANAB) и нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы (С GNAC). В другом

конкретном варианте осуществления, при котором LSD представляет собой заболевание Фабри, и эндогенный фермент представляет собой  $\alpha$ -галактозидазу А (GLA), изозим может представлять собой  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидазу, сконструированную с возможностью получения GLA-активности.

[92] В биотерапевтическом комплексе имеется компонент белка, связывающего эффектор интернализации, который обеспечивает поглощение заместительного фермента клеткой. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффектор интернализации может представлять собой CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, трансферриновый рецептор, LDL-рецептор, рецептор белка 1, родственного LDL, ASGR1, ASGR2, белок-2, подобный белку-предшественнику амилоида (APLP2), апельсиновый рецептор (APLNR), PRLR (пролактиновый рецептор), MAL (миелиновый и лимфоцитарный белок, также известный как VIP17), IGF2R, H<sup>+</sup> АТФаза вакуолярного типа, рецептор дифтерийного токсина, фолатный рецептор, глутаматные рецепторы, глутатионовый рецептор, лептиновый рецептор, скэвенджер-рецептор, SCARA1-5, SCARB1-3 и CD36. В определенных вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой специфичный по отношению к почке интернализатор, такой как CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (рецептор паратиреоидного гормона), SLC22A13 (семейство транспортеров растворенных веществ 22 представитель 13), SLC5A2 (котранспортер натрия/глюкозы 2) и UMOD (уромодулин). В других определенных вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой специфичный по отношению к мышцам интернализатор, такой как BMPR1A (рецептор костного морфогенетического белка 1A), м-кадгерин, CD9, MuSK (киназа, специфичная по отношению к мышцам), LGR4/GPR48 (рецептор 48, сопряженный с G-белком), холинергический рецептор (никотиновый) альфа 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (интегрин альфа-7), CACNG1 (субъединица гамма-1 кальциевого канала L-типа), CACNA1S (субъединица альфа-15 кальциевого канала L-типа), CACNG6 (субъединица гамма-6 кальциевого канала L-типа), SCN1B (субъединица бета-1 натриевого канала), CHRNA1 (субъединица

альфа ACh-рецептора), CHRND (субъединица дельта ACh-рецептора), LRRC14B (белок 14B, содержащий богатый лейцином повтор) и POPDC3 (белок 3, содержащий домен Poreye). В некоторых вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой ITGA7, CD9, CD63, APLP2 или PRLR.

[93] В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий эффектор интернализации, содержит антигенсвязывающий белок, который включает в себя, например, слитую молекулу на основе рецептора, молекулу-ловушку, слитую молекулу на основе рецептора и Fc-фрагмента, антитело, Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, одноцепочечную Fv (scFv) молекулу, dAb-фрагмент, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), пептид CDR3, конформационно затрудненный пептид FR3-CDR3-FR4, домен-специфичное антитело, однодоменное антитело, антитело с делецией домена, химерное антитело, антитело с привитой CDR, диатело, триатело, тетратело, минитело, нанотело, моновалентное нанотело, бивалентное нанотело, иммунофармацевтическое средство на основе модульного белка малого размера (SMIP), верблюжье антитело (гомодимерное антитело с тяжелой цепью VH1), переменный домен IgNAR акулы.

[94] В одном варианте осуществления молекулярный объект, который связывается с эффектором интернализации, представляет собой антитело, фрагмент антитела или другой антигенсвязывающий белок. Например, молекулярный объект может представлять собой биспецифическое антитело, в котором одно плечо связывается с эффектором интернализации (например, ITGA7, CD9, CD63, PRLR, APLP2), а другое плечо связывается с заместительным ферментом. В данном случае биотерапевтический комплекс содержит биспецифическое антитело и заместительный фермент (фиг. 1A). В конкретном варианте осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой заболевание Фабри, и биотерапевтический комплекс содержит GLA и биспецифическое антитело, которое связывается с GLA и CD63. В другом конкретном варианте осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой заболевание Помпе, и биотерапевтический комплекс содержит GAA и биспецифическое антитело, которое

связывается с GAA и CD63.

[95] В других вариантах осуществления молекулярный объект, который связывается с эффектором интернализации, содержит полуантитело, и заместительный фермент содержит Fc-домен (слитый полипептид фермент-Fc). В одном варианте осуществления Fc-домен слитого полипептида фермент-Fc ассоциирует с Fc-доменом специфичного по отношению к эффектору интернализации полутела с образованием биотерапевтического комплекса (фиг. 1B).

[96] В других вариантах осуществления заместительный фермент ковалентно связан с белком, связывающим эффектор интернализации. Вариант осуществления слияния фермент-Fc:полутело, описанный в предыдущем параграфе (см. также фиг. 1B), попадает в этот класс, поскольку димер Fc может быть соединен посредством одного или более дисульфидных мостиков. Ковалентная связь между доменом активности фермента или полипептидом и доменом или полипептидом, связывающими эффектор интернализации, может представлять собой любой тип ковалентной связи, т. е. любую связь, которая предусматривает распределение электронов. В некоторых случаях ковалентная связь представляет собой пептидную связь между двумя аминокислотами, такую, что заместительный фермент и белок, связывающий эффектор интернализации, полностью или частично формируют непрерывную полипептидную цепь как в слитом белке. В некоторых случаях часть заместительного фермента и белок, связывающий эффектор интернализации, связываются непосредственно. В других случаях используется линкер для прикрепления двух частей. См. Chen et al., «Fusion protein linkers: property, design and functionality», 65(10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013).

[97] В конкретном варианте осуществления заместительный фермент ковалентно связан с С-концом тяжелой цепи антитела к эффектору интернализации (см. фиг. 1C) или с С-концом легкой цепи (фиг. 1E). В другом конкретном варианте осуществления заместительный фермент ковалентно связан с N-концом тяжелой цепи антитела к эффектору интернализации (см. фиг. 1D) или с N-концом легкой цепи (фиг. 1F).

[98] В некоторых случаях, особенно если заместительный

фермент нормально протеолитически не процессирован в лизосоме, добавляют расщепляемый линкер в такие варианты осуществления биотерапевтического комплекса, которые предусматривают слияние антитело-фермент. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый катепсином линкер вставляют между антителом и заместительным ферментом для облегчения удаления антитела в лизосоме для а) возможной помощи в сохранении ферментативной активности путем удаления стерически крупного антитела и б) возможного увеличения лизосомального времени полужизни фермента.

[99] В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, обладающей ферментативной активностью и содержащей антигенсвязывающий белок, при этом фермент ассоциирован с лизосомной болезнью накопления (LSD) и белком, связывающим эффектор интернализации. Ферменты (включающие в себя белки, которые не являются *per se* каталитическими), ассоциированные с лизосомными болезнями накопления, включают в себя, например,  $\alpha$ -галактозидазу,  $\beta$ -галактозидазу,  $\alpha$ -глюкозидазу,  $\beta$ -глюкозидазу, активатор сапозина-С, церамидазу, сфингомиелиназу,  $\beta$ -гексозаминидазу, активатор GM2, GM3-синтазу, арилсульфатазу, активатор сфинголипида,  $\alpha$ -идуронидазу, идуронидаза-2-сульфатазу, гепарин-*N*-сульфатазу, *N*-ацетил- $\alpha$ -глюкозаминидазу,  $\alpha$ -глюкозамид-*N*-ацетилтрансферазу, *N*-ацетилглюкозамин-6-сульфатазу, *N*-ацетилгалактозамин-6-сульфат-сульфатазу, *N*-ацетилгалактозамин-4-сульфатазу,  $\beta$ -глюкуронидазу, гиалуронидазу и т. п.

[100] Белки, связывающие эффектор интернализации, например, включают в себя слитую молекулу на основе рецептора, молекулу-ловушку, слитую молекулу на основе рецептора и Fc-фрагмента, антитело, Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, одноцепочечную Fv (scFv) молекулу, dAb-фрагмент, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), пептид CDR3, конформационно затрудненный пептид FR3-CDR3-FR4, домен-специфичное антитело, однодоменное антитело, антитело с делецией домена, химерное антитело, антитело с привитой CDR, диатело, триатело, тетратело, минитело, нанотело, моновалентное нанотело, бивалентное нанотело, иммунофармацевтическое средство на основе

модульного белка малого размера (SMIP), верблюжье антитело (гомодимерное антитело с тяжелой цепью V<sub>H</sub>H), переменный домен IgNAR акулы, другие антигенсвязывающие белки и т. п.

**[101]** [00096] Эффекторы интернализации включают в себя, например, CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, трансферриновый рецептор, LDL-рецептор, рецептор белка 1, родственного LDL, ASGR1, ASGR2, белок, подобный белку-предшественнику амилоида-2 (APLP2), аполиноновый рецептор (APLNR), PRLR (пролактиновый рецептор), MAL (миелиновый и лимфоцитарный белок, также известный как VIP17), IGF2R, H+ АТФазу вакуолярного типа, рецептор дифтерийного токсина, фолатный рецептор, глутаматные рецепторы, глутатионовый рецептор, лептиновый рецептор, скэвенджер-рецептор, SCARA1-5, SCARB1-3 и CD36. В определенных вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой специфичный по отношению к почке интернализатор, такой как CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (рецептор паратиреоидного гормона), SLC22A13 (семейство транспортеров растворенных веществ 22 представитель 13), SLC5A2 (котранспортер натрия/глюкозы 2) и UMOD (уромодулин). В других определенных вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой специфичный по отношению к мышцам интернализатор, такой как BMPR1A (рецептор костного морфогенетического белка 1A), м-кадгерин, CD9, MuSK (киназа, специфичная по отношению к мышцам), LGR4/GPR48 (рецептор 48, сопряженный с G-белком), холинергический рецептор (никотиновый) альфа 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (интегрин альфа-7), CACNG1 (субъединица гамма-1 кальциевого канала L-типа), CACNA1S (субъединица альфа-15 кальциевого канала L-типа), CACNG6 (субъединица гамма-6 кальциевого канала L-типа), SCN1B (субъединица бета-1 натриевого канала), CHRNA1 (субъединица альфа ACh-рецептора), CHRND (субъединица дельта ACh-рецептора), LRRC14B (белок 14B, содержащий богатый лейцином повтор) и POPDC3 (белок 3, содержащий домен Poreye). В некоторых вариантах осуществления эффектор интернализации представляет собой ITGA7, CD9, CD63, APLP2 или PRLR.

**[102]** В некоторых вариантах осуществления фермент

ковалентно связан (т. е. электроны распределяются между атомами) с антигенсвязывающим белком. В одном конкретном варианте осуществления белок, связывающий эффектор интернализации, состоит из полутела или содержит таковое; фермент слит с Fc-слитым доменом (например, на C-конце); и Fc-домен, который ковалентно связан с ферментом, ассоциируется с Fc-доменом антигенсвязывающего белка так, что ассоциация предусматривает один или более дисульфидных мостиков. Данный конкретный вариант осуществления схематически изображен на фигуре 1B.

[103] В другом конкретном варианте осуществления белок, связывающий эффектор интернализации (IE-BP), состоит из антитела или фрагмента антитела или содержит таковые, и фермент ковалентно связан с антителом или фрагментом антитела. В конкретном варианте осуществления IE-BP представляет собой антитело, и фермент ковалентно связан (непосредственно пептидной связью или опосредованно через линкер) с C-концом тяжелой цепи или легкой цепи антитела (соответственно фигура 1C или 1E). В другом конкретном варианте осуществления IE-BP представляет собой антитело, и фермент ковалентно связан (непосредственно пептидной связью или опосредованно через линкер) с N-концом тяжелой цепи или легкой цепи антитела (соответственно фигура 1D или 1F).

[104] В некоторых вариантах осуществления фермент и IE-BP не связываются ковалентно, а объединяются в смесь. IE-BP и фермент могут ассоциироваться посредством нековалентных сил с образованием комплекса. Например, в соответствии с одним конкретным вариантом осуществления IE-BP представляет собой биспецифическое антитело, в котором одно плечо антитела связывается с эффектором интернализации, а другое плечо связывается с ферментом. Данный вариант осуществления схематически изображен на фигуре 1A.

[105] В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой GAA или обладает GAA-активностью (например, изозим с активностью GAA), и эффектор интернализации представляет собой ITGA7, CDH15, CD9, CD63, APLP2 или PRLR. В конкретном варианте осуществления фермент представляет собой GAA или обладает GAA-активностью, домен интернализации представляет

собой CD63, и IEBP представляет собой биспецифическое антитело со специфичностью по отношению к CD63 и GAA.

[106] В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой GLA или обладает GLA-активностью (*например*, изозим с активностью GAA), и эффектор интернализации представляет собой ITGA7, CD9, CD63, APLP2 или PRLR. В конкретном варианте осуществления фермент представляет собой GLA или обладает GLA-активностью, домен интернализации представляет собой CD63, и IEBP представляет собой биспецифическое антитело со специфичностью по отношению к CD63 и GLA.

[107] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу отбора или скрининга биотерапевтического комплекса, содержащего фермент и антигенсвязывающий белок, который эффективно замещает фермент у пациента при необходимости этого. В одном варианте осуществления биотерапевтический комплекс вводят в модельную систему, и модельную систему оценивают на предмет активности замещенного фермента. В одном варианте осуществления модельной системой является животное, у которого отсутствует экспрессия фермента и которое экспрессирует антиген, родственный антигенсвязывающему белку. В одном варианте осуществления животной моделью является мышь, которая экспрессирует гуманизированного родственника антигенсвязывающего белка и содержит нокаутный ген, который кодирует фермент.

[108] В одном варианте осуществления мышь характеризуется нокаутом лизосомального фермента, такого как  $\alpha$ -галактозидаза А, церамидаза,  $\beta$ -глюкозидаза, активатор сапозина-С, сфингомиелиназа,  $\beta$ -галактозидаза,  $\beta$ -гексозаминидаза А и В,  $\beta$ -гексозаминидаза А, белок GM2-активатор, GM3-синтаза, арилсульфатаза А, активатор сфинголипида,  $\alpha$ -идуронидаза, идуронидаза-2-сульфатаза, гепаран-N-сульфатаза, N-ацетил- $\alpha$ -глюкозаминидаза, ацетил-CoA;  $\alpha$ -глюкозамид-N-ацетилтрансфераза, N-ацетилглюкозамин-6-сульфатаза, N-ацетилгалактозамин-6-сульфат-сульфатаза,  $\beta$ -галактозидаза, N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза (арилсульфатаза В),  $\beta$ -глюкуронидаза, гиалуронидаза,  $\alpha$ -глюкозидаза 2 или лизосомальная кислая липаза. В одном варианте осуществления нокаутная мышь

также экспрессирует человеческую или гуманизированную версию эффектора интернализации (т. е. когнатного антигенсвязывающего белка). Эффекторы интернализации человека включают в себя CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, трансферриновый рецептор, LDL-рецептор, рецептор белка 1, родственного LDL, ASGR1, ASGR2, белок-2, подобный белку-предшественнику амилоида (APLP2), апельиновый рецептор (APLNR), PRLR (пролактиновый рецептор), MAL (миелиновый и лимфоцитарный белок, также известный как VIP17), IGF2R, H<sup>+</sup> АТФазу вакуолярного типа, рецептор дифтерийного токсина, фолатный рецептор, глутаматные рецепторы, глутатионовый рецептор, лептиновый рецептор, скэвенджер-рецептор, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36, CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (рецептор паратиреоидного гормона), SLC22A13 (семейство транспортеров растворенных веществ 22 представитель 13), SLC5A2 (котранспортер натрия/глюкозы 2), UMOD (уромодулин), BMPRI1A (рецептор костного морфогенетического белка 1A), м-кадгерин, CD9, MuSK (киназа, специфичная по отношению к мышцам), LGR4/GPR48 (рецептор 48, сопряженный с G-белком), холинергический рецептор (никотиновый) альфа 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (интегрин альфа-7), CACNG1 (субъединица гамма-1 кальциевого канала L-типа), CACNA1S (субъединица альфа-15 кальциевого канала L-типа), CACNG6 (субъединица гамма-6 кальциевого канала L-типа), SCN1B (субъединица бета-1 натриевого канала), CHRNA1 (субъединица альфа ACh-рецептора), CHRND (субъединица дельта ACh-рецептора), LRRC14B (белок 14B, содержащий богатый лейцином повтор) и POPDC3 (белок 3, содержащий домен Poreye).

[109] Из уровня техники известны способы создания мышей, которые экспрессируют рецепторы человека. См, например, Ma et al., Drug Metab. Dispos. 2008 Dec; 36(12):2506-12; и патент США № 8878001 B2, которые включены в данный документ в отношении трансгенных мышей, экспрессирующих рецепторы человека. Также из уровня техники известны способы получения нокаутных по ферменту мышей. См., например, Kuemmel et al., Pathol. Res. Pract. 1997;193(10):663-71, которая включена в данный документ в отношении нокаута по ферменту лизосомального накопления мышцы.

[110] Следующие примеры представлены с целью дальнейшей иллюстрации способов согласно настоящему изобретению. Эти примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

#### ПРИМЕРЫ

##### Пример 1. Лизосомальный $\alpha$ -глюкозидазный слитый белок

[111] Для доставки ферментов в лизосому разрабатывали контролируемые антителом CI-MPR-независимые системы доставки. В таблице 3 приведены молекулярные конструкции вместе с их уровнями экспрессии в клетках CHO (см. фигуру 2), приблизительной активностью GAA, определяемой с использованием 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -глюкозидазы к флуоресцентному субстрату (см. фигуру 3), и статусом лизосомального нацеливания, интернализации и активности (см. фигуры 4 и 5).

##### Пример 2. Интернализация конструкции GAA

[112] Интернализацию конструкций GAA определяли путем измерения ферментативной активности в клеточных лизатах. Различные конструкции рекомбинантной GAA (SEQ ID NO:1) добавляли в HEK293, скелетные миобласты человека (Lonza, Walkersville, MD) или миобласты мыши C2C12. Клетки высевали в 24-луночные планшеты за 24 часа до добавления ферментативных конструкций. Ферментативные конструкции добавляли в среду клеток на 18 часов. Затем клетки тщательно промывали PBS, охлажденным льдом, и лизировали в 0,5% NP-40, охлажденным льдом, в аналитическом буфере (0,2 М натрия ацетата, 0,4 М калия хлорида, pH 4,3). Лизаты центрифугировали при 15000 x g в течение 15 минут при 4°C, и супернатанты инкубировали с 4-метилумбеллиферил-альфа-D-глюкозидазой, субстратом GAA, в аналитическом буфере в течение 1 часа в 96-луночных планшетах. Реакции останавливали с использованием глицинкарбонатного буфера при pH 10,7. Флуоресценцию считывали на устройстве для считывания планшетов при 360 нм возбуждении и 450 нм испускании. Концентрацию белка в лизате оценивали с использованием набора для анализа с использованием бицинхониновой кислоты. В качестве стандартов

использовали 4-метилумбеллиферон. GAA-активность представляли в нмоль 4-метилумбеллиферона, высвобожденного в час на мг очищенного белка. См. Fuller *et al.*, «Isolation and characterisation of a recombinant, precursor form of lysosomal acid alpha-glucosidase», 234(3) European Journal of Biochemistry 903-909 (1995).

[113] Интернализацию активности GAA оценивали в присутствии или отсутствии манноза-6-фосфата (М6Р) (фиг. 4А), а также в присутствии или отсутствии CD63. Некоторые лизосомальные ферменты нацеливались на лизосому посредством присоединенного фрагмента М6Р, связывающегося с рецептором манноза-6-фосфата (MPR). Таким образом, вовлечение CI-MPR в интернализацию антитела к CD63-GAA оценивали с помощью включения 5 мМ М6Р, который конкурирует за связывание с MPR, в культуральной среде НЕК в ходе поглощения антитела к CD63-GAA. Включение М6Р не оказывало эффекта на поглощение антитела к CD63-GAA, как определяли путем выявления 4-метилумбеллиферона в клеточных лизатах (фигура 4А). Однако поглощение антитела к CD63-GAA было зависимым от присутствия CD63 (фигура 4В). Антитело к CD63-GAA поглощалось клетками НЕК, которые экспрессируют CD63, но не поглощалось клетками НЕК, несущими нокаут по гену CD63 (фигура 4В).

[114] Таблица 3

Конструкция	Экспрессия СНО	GAA-активность ( <i>in vitro</i> )	Нацеливание			
			GAA-активность	MPR-зависимое	CD63-зависимое	Лизосомальная совместная локализация
Антитело к CD63 IgG4	++	NA	Нет	Нет	Да	Да
Слияние GAA-Fc (см. фиг. 1B(i))	+	+	NA	NA	NA	NA

GAA- Fc•антитело к CD63 (см. фиг. 1B)	NA	+	Да	Нет	Да	NT
Антитело к CD63-GAA (см. фиг. 1C)	++	+	Да	Нет	Да	Да
GAA-антитело к CD63 (см. фиг. 1D)	+	+	Да	Нет	Да	NT
GAA	NT	+	Да	Да	Нет	NT
GLA	NA	-	NA	Да	Нет	NT
•GLA• антитело к CD63	NA	-	NA	Нет	Да	NT

NA=не применимо; NT=не тестировали.

### Пример 3. Поглощение конструкции GAA миобластами

[115] Тестировали способность скелетных миобластов, которые являются представляющим интерес типом ткани при заболевании Помпе, поглощать разные конструкции GAA. Скелетные миобласты человека культивировали в присутствии различных концентраций (т. е. 25 нМ, 50 нМ и 200 нМ) (1) антитела к CD63-GAA, (2) антитела к CD63-GAA плюс 5 мМ М6Р, (3) мус-GAA и (4) мус-GAA плюс 5 мМ М6Р. Оценивали интернализацию конструкций GAA, которую определяли по уровню активности GAA, выявляемому в клеточных лизатах, на что указывало накопление 4-метилумбеллиферона. Поглощение 200 нМ антитела к CD63-GAA, которое было MPR-независимым, было не более чем в пять раз выше поглощения мус-GAA, которое было зависимым от MPR (фигура 5A).

[116] Для определения субклеточной локализации конструкции антитело к CD63-GAA, скелетные миобласты человека окрашивали антителами к IgG человека (для выявления фрагмента антитела к CD63 в конструкции антитело к CD63-GAA) и антителами к LAMP (для мечения лизосом). LAMP или мембранный гликопротеин, ассоциированный с лизосомой, включает в себя интегральные мембранные белки, которые являются специфичными по отношению к

лизосомам. Эксперимент совместного мечения продемонстрировал, что антитело к CD63-GAA совместно локализуется с антителом к LAMP, что указывает на то, что антитело к CD63-GAA локализуется в лизосомах.

[117] Аналогичным образом миобласты C2C12 мыши приводили в контакт с различными концентрациями, т. е. 25 нМ, 50 нМ и 200 нМ (1) антитела к CD63-GAA, (2) антитела к CD63-GAA плюс 5 мМ М6Р, (3) мус-GAA и (4) мус-GAA плюс 5 мМ М6Р. Оценивали интернализацию конструкций GAA, которую определяли по уровню активности GAA, выявляемому в клеточных лизатах, на что указывало накопление 4-метилумбеллиферона. Поглощение 200 нМ антитела к CD63-GAA, которое не подвергалось вредному воздействию М6Р, было более чем в приблизительно шесть - приблизительно девять раз больше поглощения мус-GAA (фигура 5B).

Пример 4. Эффект антитела к CD63-GAA в отношении накопления гликогена

[118] Оценивали эффект антитела к CD63-GAA в отношении накопления гликогена в лизосомах трех разных клеточных линий заболевания Помпе. Клеточные линии заболевания Помпе получали из фибробластов, полученных от тяжелобольных инfantильным заболеванием Помпе и содержащих нокаутные или нокдаунные мутации в гене GAA. Используемыми клеточными линиями были GM20089 (делеция экзона 18), GM20090 (сложная гетерозигота в экзоне 14 и 16) и GM20090 (сложная гетерозигота в экзоне 2). Эти линии получали из Coriell Institute, Camden, NJ. См. Huie *et al.*, «Increased occurrence of cleft lip in glycogen storage disease type II (GSDII): exclusion of a contiguous gene syndrome in two patients by presence of intragenic mutations including a novel nonsense mutation Gln58Stop», 85(1) *Am. J. Med. Genet.* 5-8 (1999); Huie *et al.*, «Glycogen storage disease type II: identification of four novel missense mutations (D645N, G648S, R672W, R672Q) and two insertions/deletions in the acid alpha-glucosidase locus of patients of differing phenotype», 244(3) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 921-7 (1998); и Nishiyama *et al.*, «Akt inactivation induces endoplasmic reticulum stress-independent autophagy in fibroblasts from patients with Pompe

disease», 107 *Molecular genetics and metabolism* 490-5 (2012). Неонатальные кожные фибробласты человека (NHDF, Lonza) использовали в качестве контроля. Все клеточные линии заболевания Помпе демонстрировали лизосомальное накопление гликогена (после 72 часов глюкозного голодания для снижения цитоплазматического гликогена), хотя присутствовала остаточная (<0,1%) GAA-активность (фигура 6, панели А и В, соответственно). Гликоген измеряли с использованием набора для анализа гликогена (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

[119] Клетки истощали по глюкозе в течение приблизительно 96 часов перед лизисом для удаления цитоплазматического гликогена (см. Umapathysivam *et al.*, «Correlation of acid alpha-glucosidase and glycogen content in skin fibroblasts with age of onset in Pompe disease», 361(1-2) *Clin Chim Acta.* 191-8 (2005)). Клетки обрабатывали антителом к CD63-GAA (200 нМ) или мус-GAA (200 нМ) в течение 72 часов перед лизисом. Для всех трех клеточных линий заболевания Помпе обработка антителом к CD63-GAA приводила в результате к значительному снижению лизосомального накопления гликогена (фигура 7), что указывало на то, что экзогенно дозированное антитело к CD63-GAA достигало лизосомы и было ферментативно активным.

#### Пример 5. Изозимы к GAA

[120] Во избежание возможных иммунных ответов у пациентов с заболеванием Помпе на GAA (*т. е.* перекрестнореагирующий иммунологический материал или CRIM) исследовали доставку других глюкозидаз человека для сохранения активности GAA. Исследованию подлежали нелизосомальные ферменты с аналогичной активностью гидролиза гликогена по отношению к GAA (также известной как кислая  $\alpha$ -глюкозидаза). Такие ферменты включают в себя сахаразу-изомальтазу (SI), мальтазу-глюкоамилазу (MGAM), глюкозидазу II (GANAB) и нейтральную  $\alpha$ -глюкозидазу (С GNAC). Эти ферменты и различные рекомбинантные варианты осуществления описаны в Dhital *et al.*, «Mammalian mucosal  $\alpha$ -glucosidases coordinate with  $\alpha$ -amylase in the initial starch hydrolysis stage to have a role in starch digestion beyond glucogenesis», 8(4) *PLoS One* e625462013

Apr 25 (2013); Sim *et al.*, «Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity», 375(3) *J. Mol. Biol.* 782-92 (2008); и Quezada-Calvillo *et al.*, «Luminal starch substrate «brake» on maltase-glucoamylase activity is located within the glucoamylase subunit», 138(4) *J. Nutr.* 685-92 (2008).

[121] В клетках CHO получали и экспрессировали следующие изозимные конструкции: (1) антитело к CD63, (2) антитело к CD63-NtMGAM (*т. е.* N-концевая субъединица мальтазы-глюкоамилазы, связанной с C-концом тяжелой цепи антитела к CD63), и (3) антитело к CD63-CtMGAM. См. Dhital, 2013. Также конструировали другую конструкцию, экспрессирующую тяжелую цепь антитела к CD63 мыши, слитую с C-концевой субъединицей мальтазы-глюкоамилазы мыши (антитело к mCD63-mCtMGAM) для применения в мышинных моделях (см. пример 11).

Пример 6. Лизосомальный слитый белок  $\alpha$ -галактозидазы A (GLA)

[122] Различные слитые белки, содержащие GLA человека (SEQ ID NO:2), конструировали и экспрессировали в клетках CHO. Такие конструкции включали в себя (i) GLA, слитую с C-концом тяжелых цепей антитела к CD63 (антитела к CD63-GLA), (ii) GLA, слитую с Fc иммуноглобулина (*например*, «выступом» Fc), (iii) GLA-антитело к CD63 (*т. е.* GLA, слитую с N-концом тяжелых цепей антитела к CD63), и (iv) слияние GLA-мус (фигура 8). Также конструировали и экспрессировали белки, связывающие эффектор интернализации (IEBP), без фрагмента GLA. В одном случае IEBP представлял собой биспецифическое антитело с одной половиной, обладающей специфичностью связывания по отношению к CD63, и другой половиной, обладающей специфичностью связывания по отношению к мус. Оценивали ферментативную активность GLA (*т. е.* гидролиз 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -галактопиранозида) для каждого слитого белка GLA, результаты чего представлены на фигуре 9. За исключением C-концевого слияния антитела к CD63-GLA все конструкции демонстрировали  $\alpha$ -галактозидазную активность (фиг. 9). Fc-

выступы описаны в Ridgway et al., «'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization», 9(7) Protein Eng. 617-621 (1996).

[123] Интернализацию каждой конструкции (или рекомбинации IEBP и GLA-мус) в клетки НЕК определяли путем измерения образования метилумбеллиферона из катализируемого ферментом гидролиза 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -галактопиранозида. Различные конструкции добавляли в клетки НЕК293, которые затем инкубировали для обеспечения эндоцитоза, затем промывали и лизировали при pH 4. Субстрат GLA добавляли в каждый клеточный лизат, и обеспечивали протекание  $\alpha$ -галактозидазной реакции. Результаты представлены на фигуре 9, которая показывает, что слитый белок GLA-антитело к CD63 был интернализован в клетки НЕК. GLA-мус отдельно, т. е. при отсутствии элемента IEBP, не поглощался клетками НЕК. Однако он поглощался в присутствии биспецифического антитела, которое связывало CD63 и связывало эпитоп мус (фигура 10).

Пример 7. Поглощение белков, связывающих эффектор интернализации

[124] Интернализацию антитела к CD63 или антител к APLP2 в клеточных фракциях с низким pH сравнивали с интернализацией рекомбинантной GLA человека (rhGLA), которая имела высокое содержание M6P, во фракции с низким pH. Каждые из GLA, антитела к CD63 и антитела к APLP2 метили чувствительным к низкому pH красителем pHrodo® (Invitrogen, Calsbad, CA). Обеспечивали контакт клеток НЕК, клеток HepG2 (карциномы печени) и клеток PC-3 (рака предстательной железы) с мечеными pHrodo® белками и инкубировали на протяжении ночи или в течение приблизительно 16 часов. Затем клетки визуализировали и подсчитывали флуоресцентные везикулы. Результат флуоресценции нормализовали в соответствии со степенью мечения для каждого белка. Клетки НЕК, PC-3 и HepG2 демонстрировали более высокое поглощение антитела к CD63 и антитела к APLP2 по сравнению с rhGLA (фигура 11).

Пример 8. Процессирование слитого белка в лизосоме

[125] Независимо от того, процессируется ли протеолитически

конструкция антитело к CD63-GAA в лизосоме, лизаты клеток заболевания Помпе тестировали с помощью анализа вестерн-блоттинга. Клетки GM20089 заболевания Помпе культивировали в присутствии антитела к CD63-GAA, а затем клеточные лизаты подвергали анализу вестерн-блоттинга в восстанавливающих условиях с использованием антител к GAA (фигура 12, панель А) или антител к hIgG (фигура 12, панель В).

[126] Линию фибробластов GM20089 заболевания Помпе от Coriell высевали в 6-луночные планшеты и инкубировали с антителом к CD63-GAA в течение 18 часов, а затем тщательно промывали средой. Содержимое лунок лизировали в буфере RIPA в различные моменты времени, т. е. через 0, 24, 48, 72 часа после удаления антитела к CD63-GAA. Лизаты анализировали на предмет GAA с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к GAA человека (ab113021, Abscam LTD, Кембридж, Великобритания; фигура 12). Полное антитело к CD63-GAA и более мелкие промежуточные соединения выявляли в ранние моменты времени, а зрелую лизосомальную форму GAA размером 76 кДа выявляли во все моменты времени после введения дозы антитела к CD63-GAA. Это продемонстрировало то, что антитело к CD63-GAA интернализуется в клетки пациента и корректно процессируется до зрелой лизосомальной формы GAA. Более того, время полужизни формы размером 76 кДа в клетках соответствовало другим исследованиям интернализации GAA (Maga, J. A. et al. Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid  $\alpha$ -glucosidase enhances muscle glycogen clearance in Pompe mice. *Journal of Biological Chemistry* 288, 1428-1438 (2013).)

Пример 9. Тканевое распределение и процессирование антитела к CD63-GAA

[127] Мышам, гуманизированным по локусу CD63 (см. Valenzuela et al., «High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis», 21 *Nature Biotechnology* 652-659 (2003)) вводили антитело к CD63-GAA. Отбирали образцы ткани, и оценивали GAA посредством анализа вестерн-блоттинга. GAA выявляли в печени, диафрагме, почке,

сердце, а также в квадрицепсе и икроножной мышце (фигура 13).

[128] Вкратце, гуманизированных по CD63 мышей создавали методом нокина локуса CD63 человека в локус CD63 мыши. Антитело к CD63-GAA или антитело к CD63 вводили с помощью инъекции в хвостовую вену при 50 мг/кг гуманизированным по CD63 мышам или мышам дикого типа возрастом 2 месяца без CD63 человека. Осуществляли хвостовой забор крови в различные моменты времени, например, через 0, 6, 24 часа после инъекции. Выполняли ELISA с использованием антитела к Fc для определения концентрации антитела к CD63-GAA в сыворотке крови. Антитело к CD63-GAA быстро удалялось из сыворотки крови, при этом быстрее чем исходное антитело к CD63. Мышей после инъекции также умерщвляли в различные моменты времени, из тканей готовили срезы и фиксировали замораживанием в жидком азоте. Ткани лизировали в буфере RIPA и анализировали на предмет GAA с помощью вестерн-блоттинга. Зрелая лизосомальная форма размером 76 кДа присутствовала в большинстве анализируемых тканей, что указывает на интернализацию антитела к CD63-GAA в клетки ткани (фигура 13). У гуманизированных по CD63 мышей антитело к CD63-GAA интернализировалось в скелетную мускулатуру (сердце, икроножную мышцу, квадрицепс), однако мыши дикого типа не демонстрировали никакого поглощения. Это указывало на то, что антитело к CD63-GAA интернализировалось в клетки скелетной мускулатуры при опосредовании CD63.

[129] Гуманизированным по CD63 мышам (CD63<sup>hu/hu</sup>) и контрольным мышам (CD63<sup>+/+</sup>) вводили антитело к CD63-GAA при 50 мг/кг посредством инъекции в хвостовую вену. Во момент времени 24 часа ткани экстрагировали, и на дорожку наносили 200 мкг лизата. Рассматривали вестерн-блоттинг с антителом к hGAA и антителом к GAPDH в качестве контрольного нанесения. На фигуре 14 изображен вестерн-блоттинг и показано, что CD63-опосредованное поглощение антитела к hCD63-GAA в мышечную ткань происходит у мышей CD63<sup>hu/hu</sup>, однако отсутствует у мышей CD63<sup>+/+</sup> WT. Антитело к hCD63-GAA процессировалось в зрелую hGAA размером 76 кДа.

Пример 10. Специфичные по отношению к мышце эффекторы

интернализации

[130] Нокаутным по GAA мышам вводили биотинилированные антитела к специфичным по отношению к мышце антигенам, которые предусматривали антитело к интегрину альфа 7, антитело к CD9 и антитело к дистрогликану. Тканевое распределение этих антител определяли с помощью анализа вестерн-блоттинга. На фигуре 15 изображена гистограмма уровня антитела, найденного в скелетной мускулатуре (икроножной мышце, квадрицепсе и диафрагме), сердечной мышце, печени (что служило исходным уровнем для нормализации), почке и селезенке. Антитела к интегрину альфа 7 находили (на уровнях, превышающих уровни, обнаруженные в печени) в скелетной мускулатуре и сердце. Антитела к CD9 находили (на уровнях, превышающих уровни, обнаруженные в печени) в скелетной мускулатуре и сердце, а также в почке и селезенке (фигура 15).

[131] Чтобы определить, могут ли эти выбранные специфичные по отношению к мышцам антитела нацеливаться на лизосомы, антитела метили pHrodo-red, а затем инкубировали на протяжении ночи при 10 мкг/мл с мышинными миобластами C2C12. Везикулярную флуоресценцию определяли количественно и нормализовали к степени мечения флуорофора на антителе. Результаты, представленные на фигуре 16, показывают, что антитело к CD63, антитело к дистрогликану, антитело к м-кадгерину, антитело к CD9 и антитело к интегрину альфа 7 нацеливались на лизосомальную фракцию при низком pH миобластов C2C12.

Пример 11. Восстановление уровней содержания гликогена в мышце

[132] Нокаутных по GAA мышей (KO) возрастом 2-3 месяца с экспрессией нативного CD63 мышши подвергали гидродинамической доставке (HDD) плазмидных конструкций, кодирующих человеческую  $\alpha$ -глюкозидазу полной длины (hGAA), антитело к mCD63-GAA (антитело к CD63 мышши) и ассоциированную с ним легкую цепь или антитело к hCD63-GAA (антитело к CD63 человека) и ассоциированную с ним легкую цепь. Во всех конструкциях использовали идентичные плазмидные скелеты, состоящие из убиквитинового промотора и polyA-хвостов SV40. Вкратце, 40 мкг

каждой плазмиды (т. е. 40 мкг тяжелой и легкой цепей или только hGAA) разбавляли 2-3 мл стерильного солевого раствора и быстро вводили в хвостовую вену мышам GAA KO. Забор крови из хвостовой вены каждые 3 дня демонстрировал уровни содержания hGAA или конструкций антитело-GAA в сыворотке крови в течение ~10 дней. Мышей умерщвляли через 3 недели после HDD, и ткани фиксировали замораживанием в жидком азоте. Ткани гомогенизировали в дистиллированной воде, кипятили и центрифугировали. Супернатанты анализировали на предмет гликогена с использованием набора для флуоресцентного анализа гликогена (MAK016, Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури).

[133] Определяли уровни содержания гликогена в сердце, диафрагме и скелетной мускулатуре, в том числе в трицепсе, икроножной мышце и квадрицепсе, у мышей дикого типа, мышей GAA KO и мышей GAA KO, обработанных гидродинамически доставленными и экспрессированными hGAA или антителом к mCD63-GAA. Результаты, представленные на фигуре 17, показывают, что восстановление гликогена почти до уровней дикого типа у мышей, обработанных антителом к mCD63-GAA. Эффект восстановления гликогена был более выражен с антителом к mCD63-GAA, которое демонстрировало почти 100% восстановление от уровней содержания гликогена в мышцах дикого типа, чем с hGAA отдельно, которая демонстрировала лишь приблизительно 10% - 35% снижение уровней содержания гликогена в скелетной мускулатуре или диафрагме мышей KO (см. фиг. 17).

[134] Определяли уровни содержания гликогена в сердце, диафрагме и скелетной мускулатуре, в том числе в трицепсе, икроножной мышце и квадрицепсе, у мышей дикого типа, мышей GAA KO и мышей GAA KO, обработанных гидродинамически доставленными (HDD) и экспрессированными антителом к hCD63-GAA, антителом к mCD63-GAA или антителом mCD63-mctMGAM. Результаты, представленные на фигуре 18, показывают, что восстановление гликогена почти до уровней дикого типа у мышей, обработанных антителом к mCD63-GAA. Эффект восстановления гликогена был более выражен с антителом к mCD63-GAA, которое демонстрировало восстановление уровней содержания гликогена в мышцах до 20% от уровней дикого типа, чем с антителом к hCD63-GAA отдельно,

которое демонстрировало лишь приблизительно 20% снижение уровней содержания гликогена в скелетной мускулатуре или диафрагме мышей KO (см. фиг. 18). Этот результат дополнительно подтверждает усиленный эффект GAA, доставленной в лизосому посредством видоспецифической интернализации CD63. Обработку антителом к mCD63-mctMGAM посредством HDD у мышей GAA KO по сравнению с контрольными (необработанными) мышами GAA KO исследовали через 7 или 12 дней после HDD (см. фиг. 20). Сниженное содержание гликогена наблюдали *in vivo* у мышей GAA KO, обработанных специфичной по отношению к мышце HDD конструкцией антитело к mCD63-mctMGAM в оба момента времени, тогда как необработанные мышцы дикого типа при прочих равных условиях не демонстрировали изменения в накоплении гликогена (фиг. 20).

Пример 12. Лизосомальная кислая липаза

[135] Лизосомальная кислая липаза (LAL или LIPA) представляет собой фермент, который разрушает сложные холестерилэфирные эфиры и триглицериды в лизосоме. Дефицит LIPA (например, LAL-D или заболевание Вольмана) приводит к накоплению жирового материала в печени, селезенке и других органах. Распространенность LAL-D составляет от 1 из 40000 до 1 из 300000 человек во всем мире. Младенцы с дефицитом LIPA, если их не лечить, умирают в течение 6-12 месяцев из-за полиорганной недостаточности. Дети более старшего возраста могут оставаться без диагноза до тех пор, пока они не умирают от сердечного приступа, инсульта или печеночной недостаточности.

[136] Для тестирования эффекта антитела, связанного с LIPA, в отношении активности эндогенной липазы, получали две конструкции LIPA-антитело: С-концевое слияние тяжелой цепи (антитело к мус-LIPA) и N-концевое слияние тяжелой цепи (LIPA-антитело к мус). cDNA аминокислот 24-399 из фермента лизосомальной кислой липазы человека (SEQ ID NO:3) клонировали в N-конец или С-конец плазмиды тяжелой цепи антитела. Расщепляемую катепсином последовательность использовали в качестве линкера между тяжелой цепью и ферментом. Конструкции вместе с соответствующей легкой цепью трансфицировали в клетки CHO-K1. Супернатанты клеток CHO собирали через 5 дней после трансфекции

и фильтровали в стерильных условиях. Супернатанты подвергали анализу вестерн-блоттинга и испытывали с антителом к LIPA и антителом к hIgG. Подтверждали экспрессию LIPA, антитела к мус-LIPA и LIPA-антитело к мус в клетках CHO.

[137] Разбавления супернатантов в аналитическом буфере (0,2 М натрия ацетата, 0,4 М калия хлорида, pH 4,3) инкубировали с 4-метилумбеллиферилолеатом, субстратом LIPA, в течение 1 часа. Реакции останавливали с использованием глицинкарбонатного буфера при pH 10,7. Флуоресценцию считывали на устройстве для считывания планшетов при 360 нм возбуждении и 450 нм испускании. Как и антитело к мус-LIPA, так и конструкции LIPA-антитело к мус проявляли значительную липазную активность в отношении контроля нативной LIPA (фигура 19).

[138] Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в данном документе будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая фермент, связанный с лизосомной болезнью накопления (LSD) и антигенсвязывающий белок,

где фермент представляет собой  $\alpha$ -глюкозидазу (GAA),

где антигенсвязывающий белок представляет собой фрагмент антитела, ковалентно связанный с ферментом,

где антигенсвязывающий белок связывает эффектор интернализации, и

где эффектор интернализации представляет собой трансферриновый рецептор.

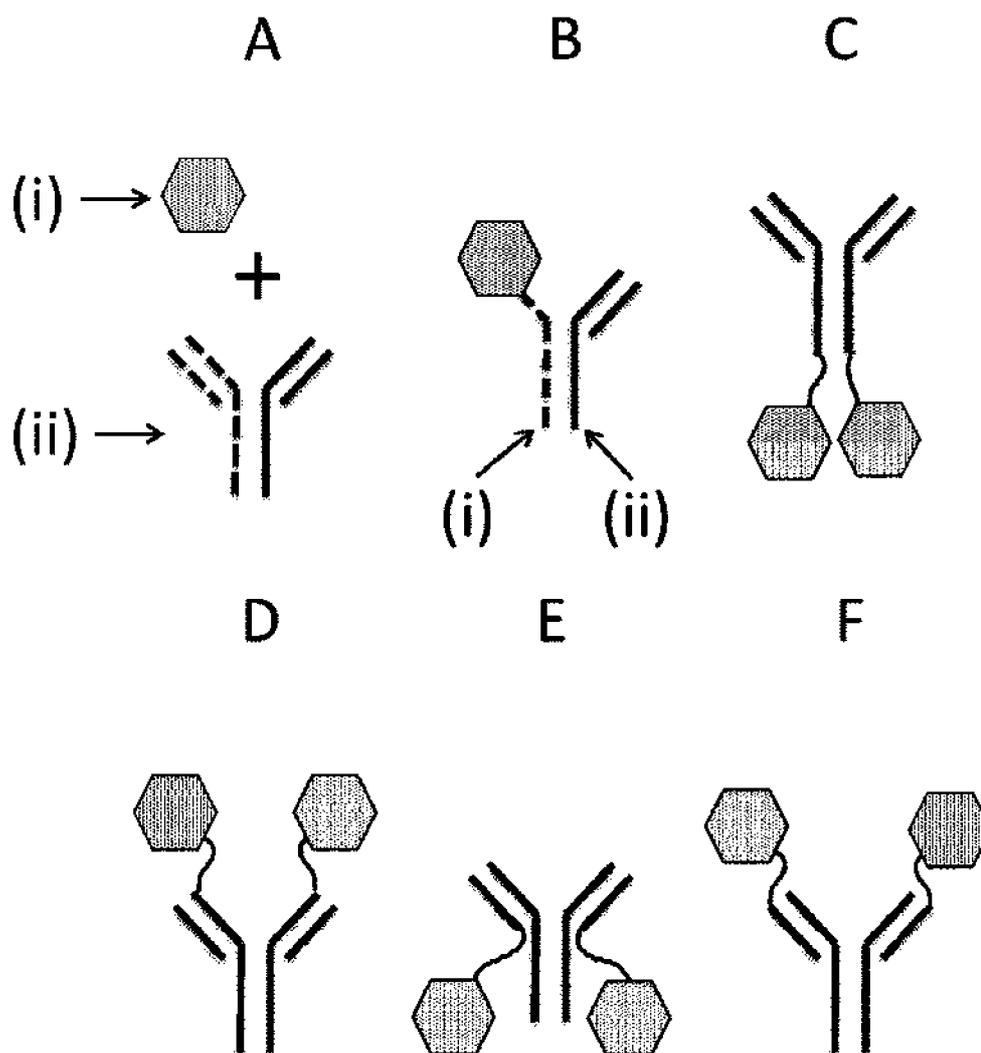
2. Композиция по п. 1, где фермент содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1.

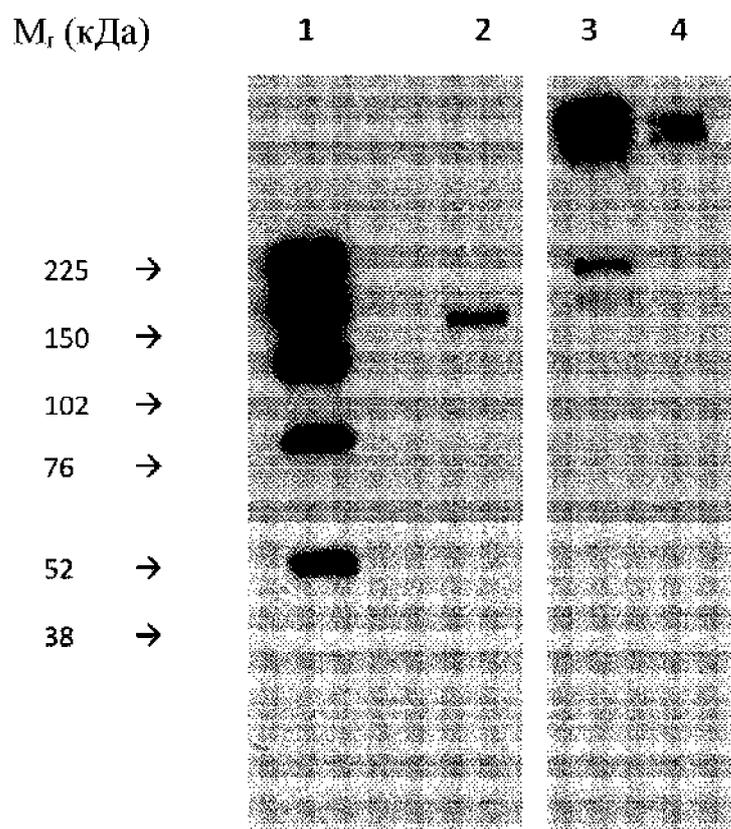
3. Применение биотерапевтического комплекса, содержащего (а) заместительный фермент, где заместительный фермент представляет собой  $\alpha$ -глюкозидазу (GAA), и (б) антигенсвязывающий белок, который связывается с эффектором интернализации, где антигенсвязывающий белок представляет собой фрагмент антитела, ковалентно связанный с заместительным ферментом, и при этом эффектор интернализации представляет собой рецептор трансферрина, при этом биотерапевтический комплекс попадает в лизосому клетки субъекта и обеспечивает ферментативную активность («заместительный фермент») которая замещает ферментативную активность, ассоциированную с лизосомной болезнью накопления (LSD) («эндогенный фермент»), где LSD представляет собой заболевание Помпе, для лечения лизосомной болезни накопления (LSD).

4. Применение по п.3, где фермент не индуцирует иммунологическую реакцию у субъекта.

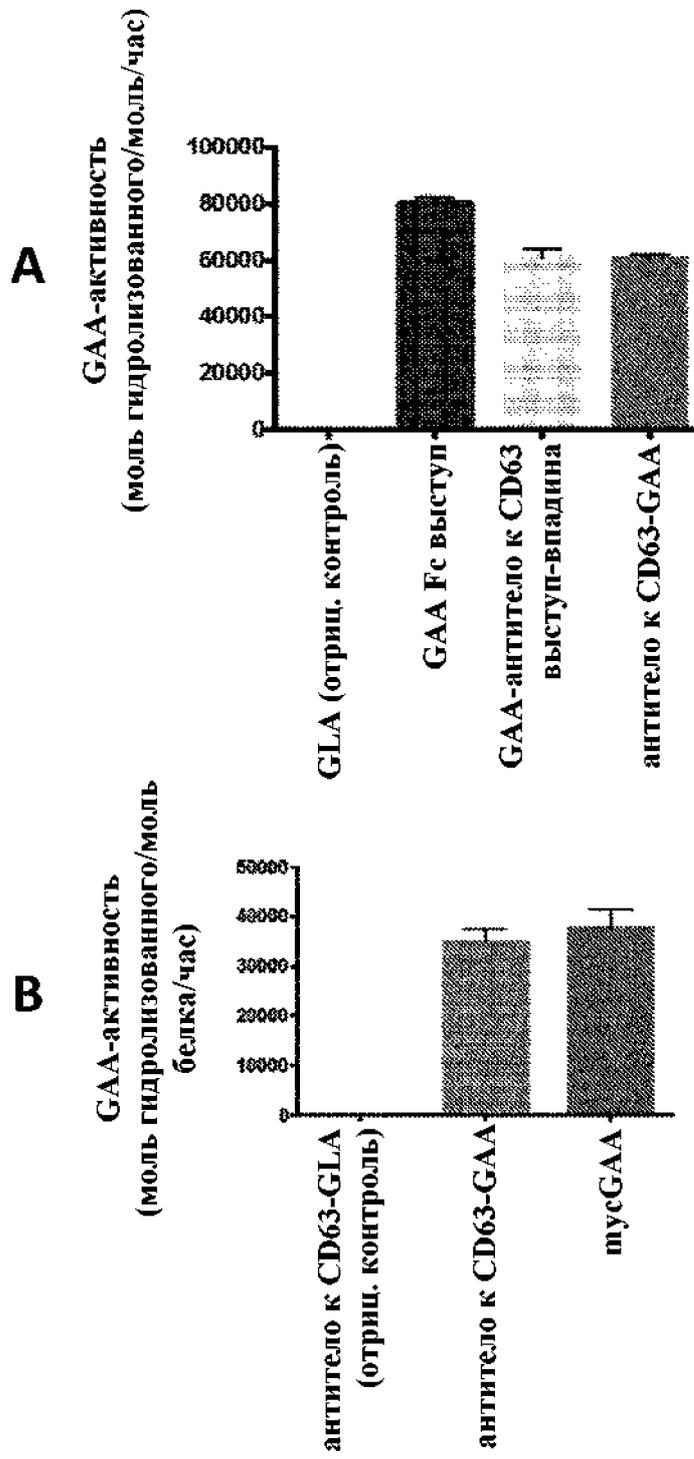
5. Применение по п. 4, где заместительный фермент содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:1.

ФИГУРА 1

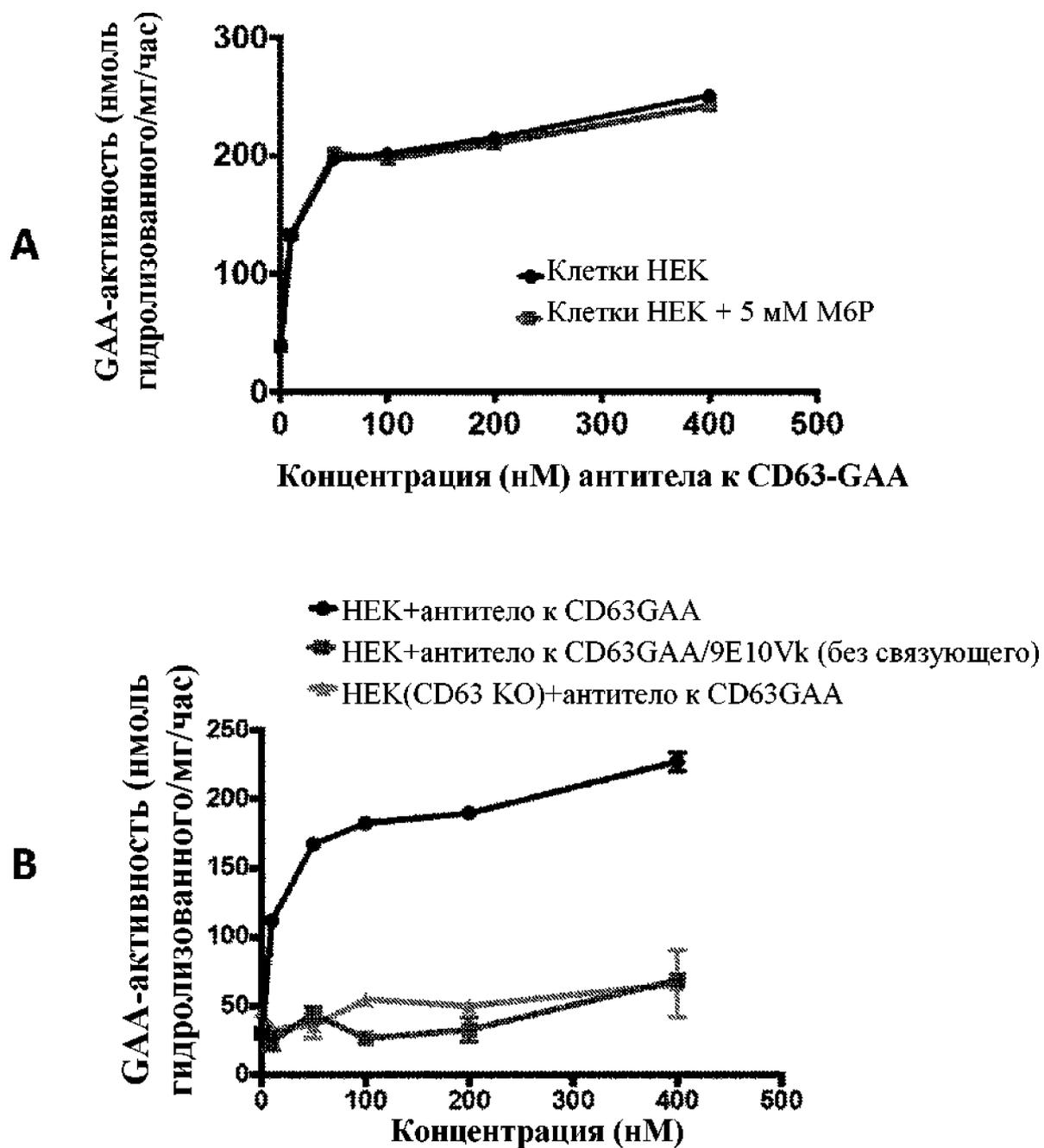


**ФИГУРА 2**

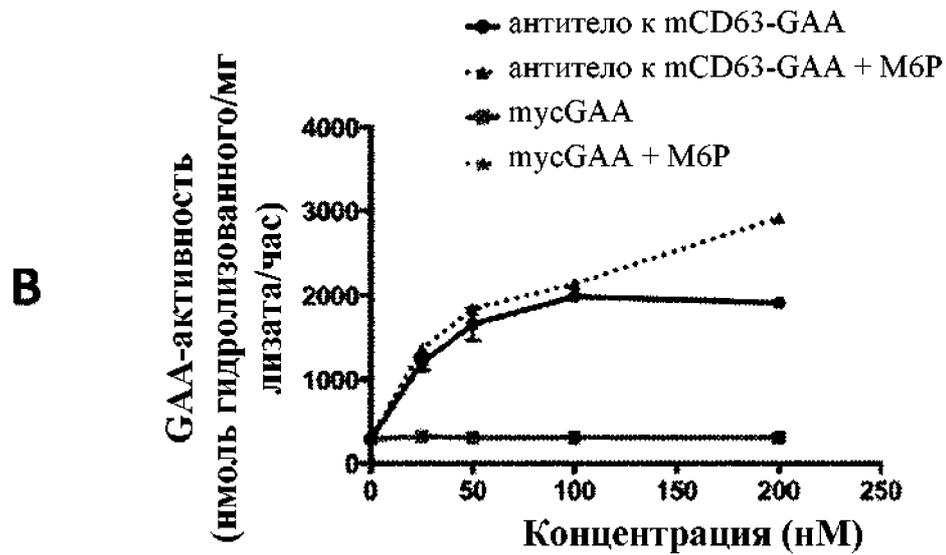
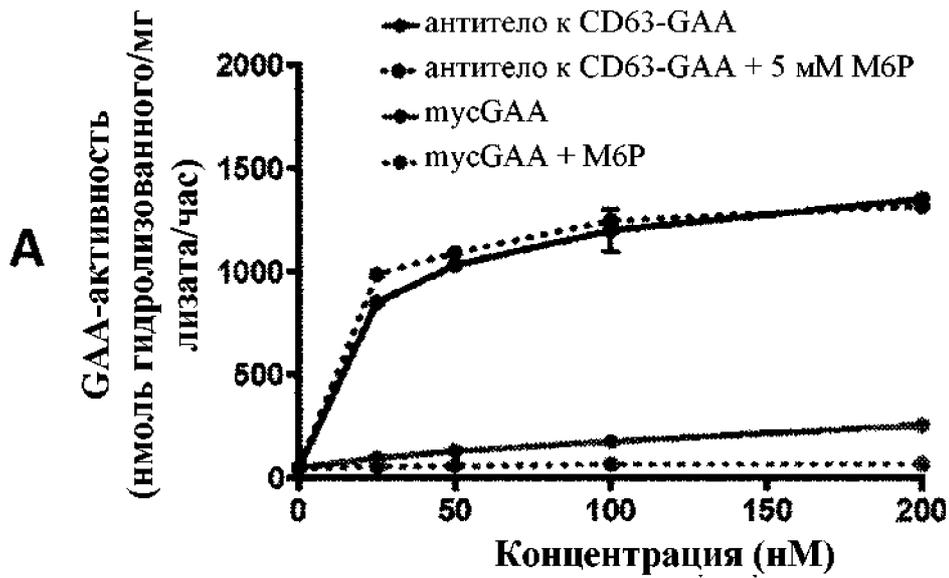
ФИГУРА 3



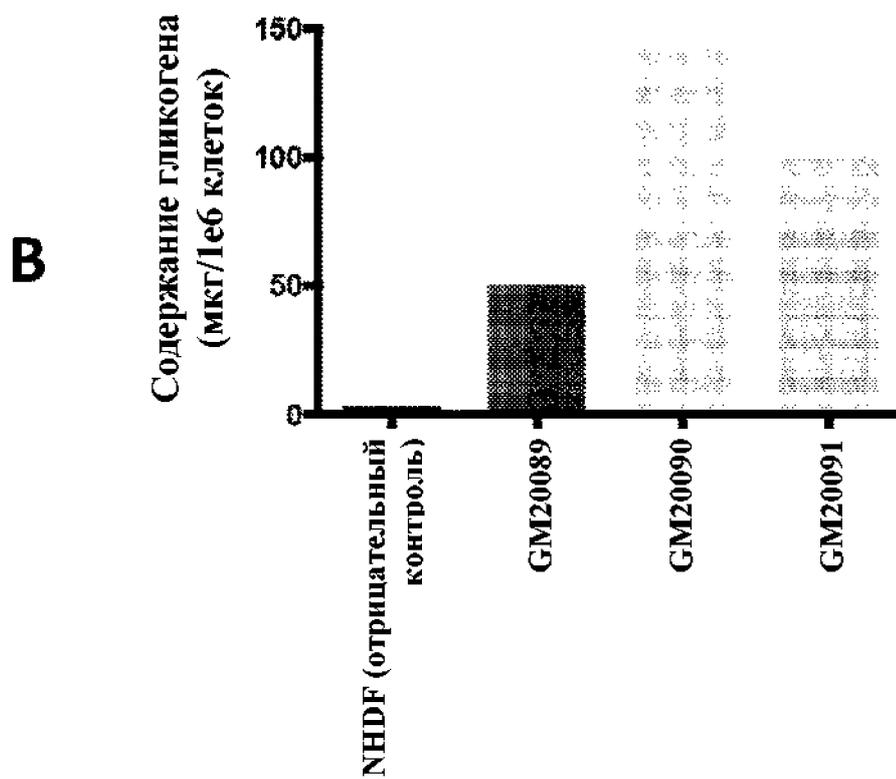
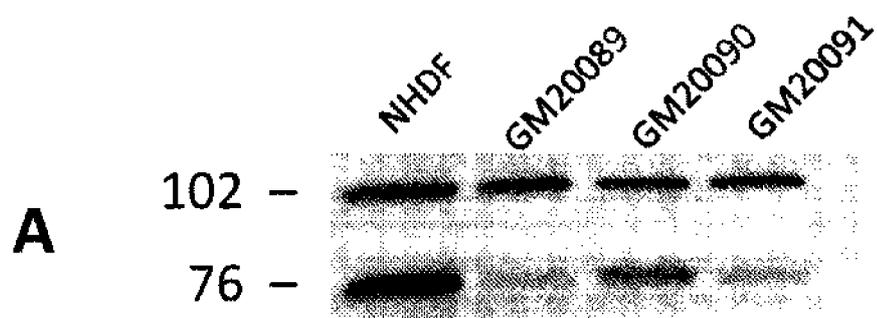
ФИГУРА 4



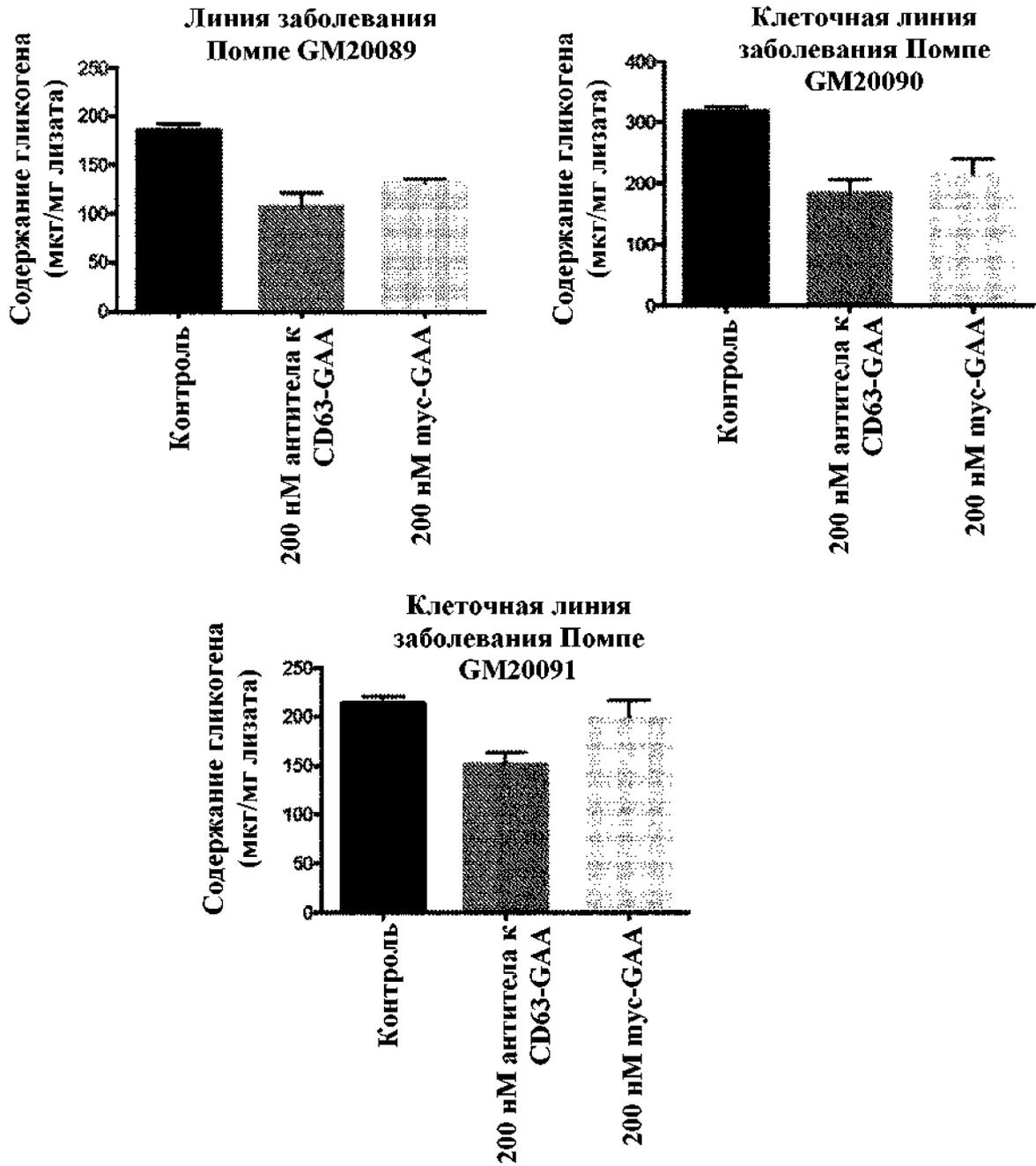
ФИГУРА 5



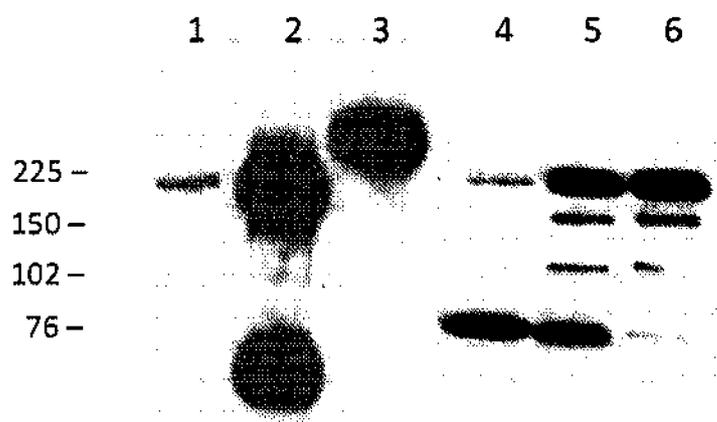
ФИГУРА 6



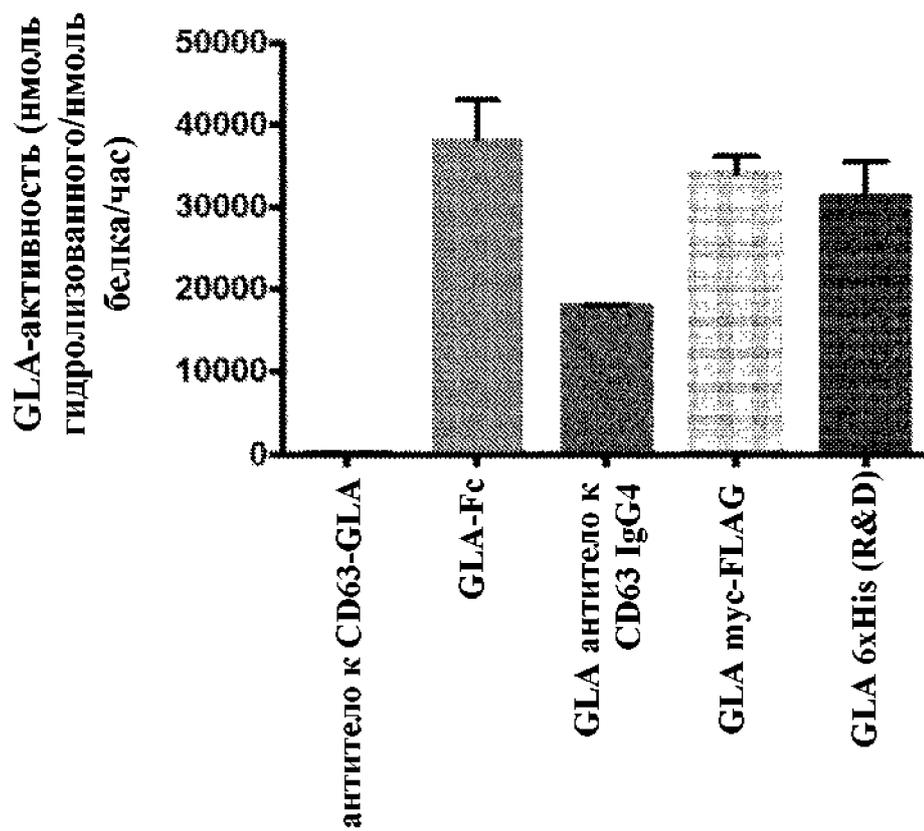
ФИГУРА 7

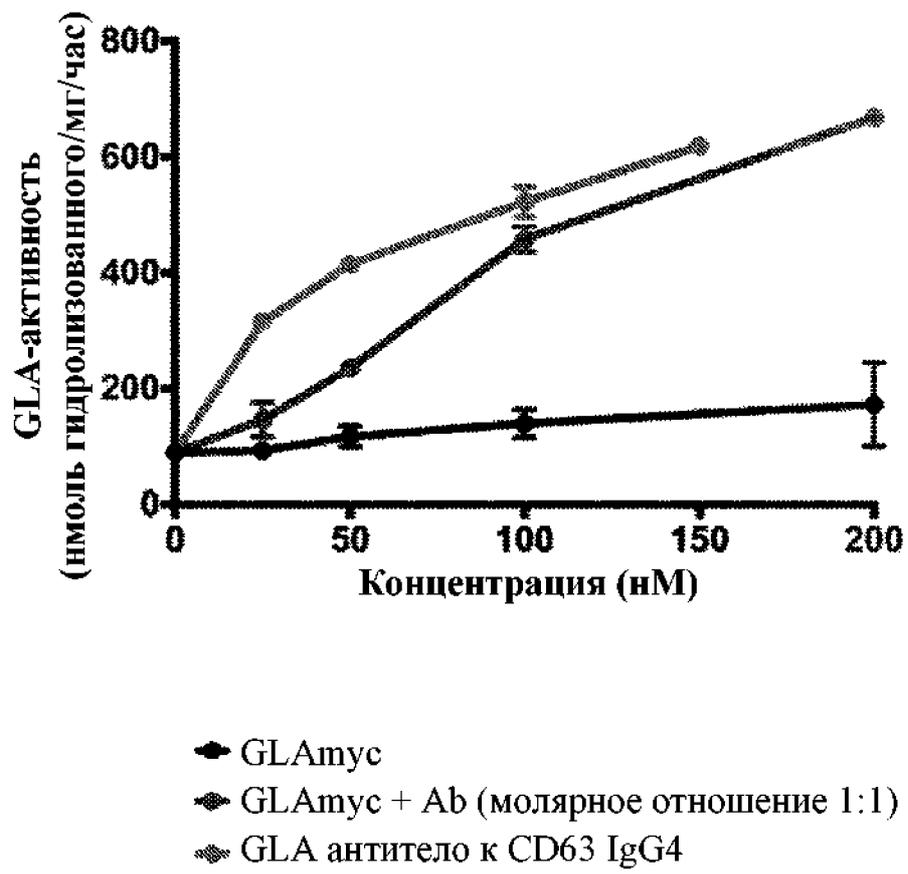


**ФИГУРА 8**



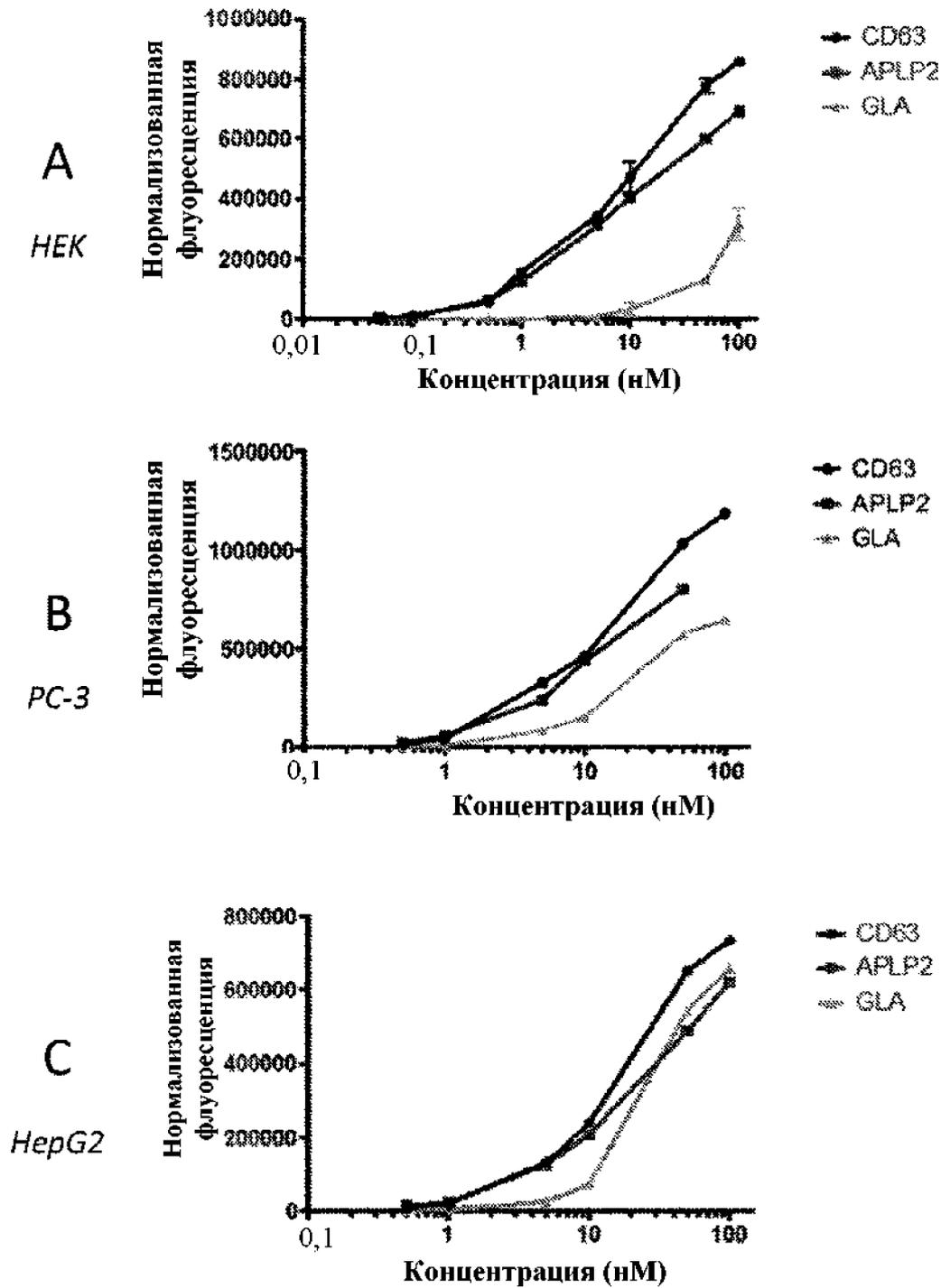
ФИГУРА 9



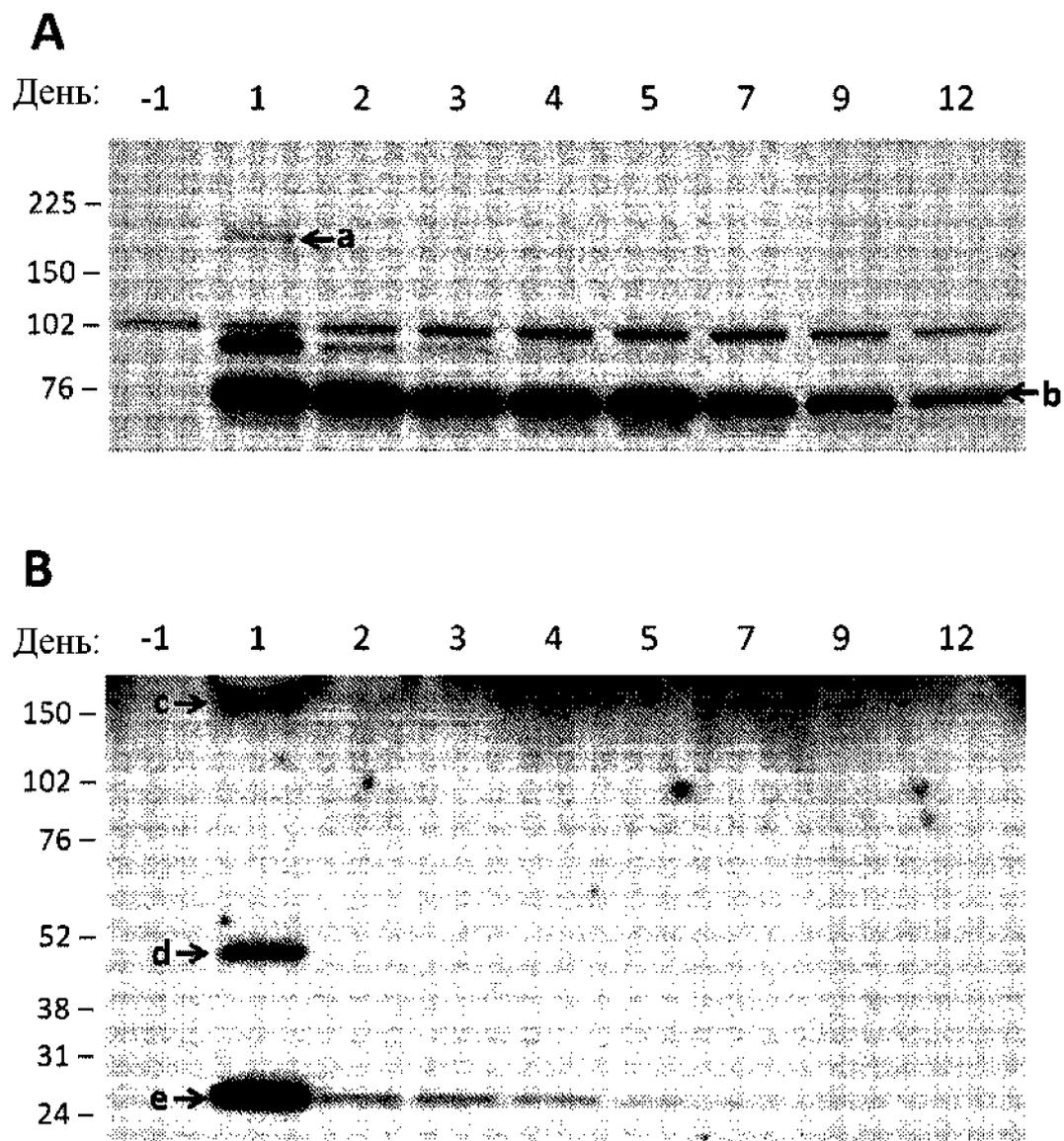


ФИГУРА 10

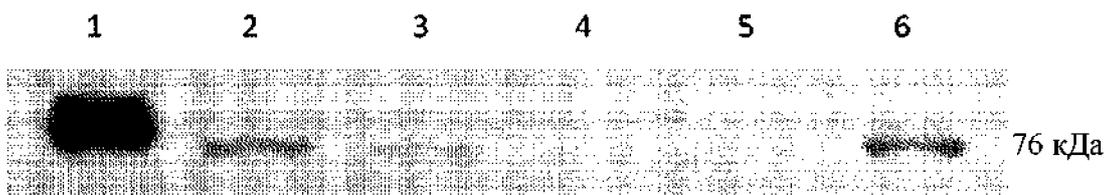
ФИГУРА 11



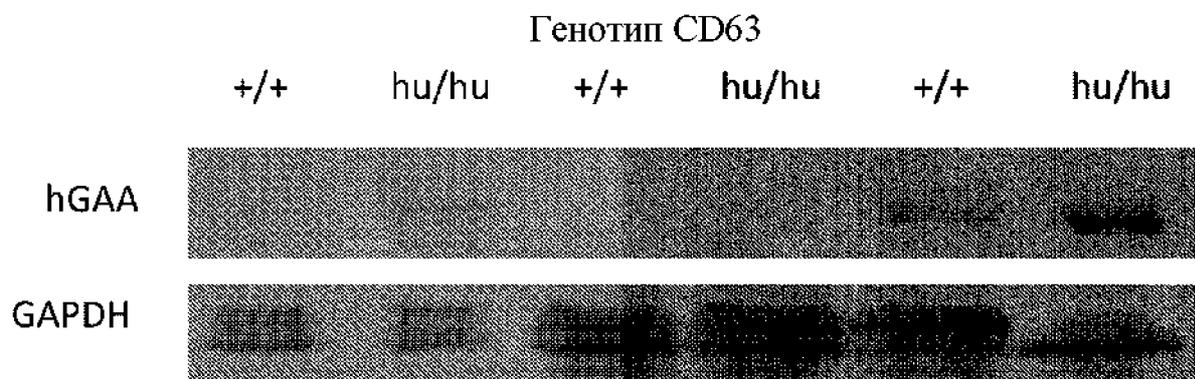
## ФИГУРА 12



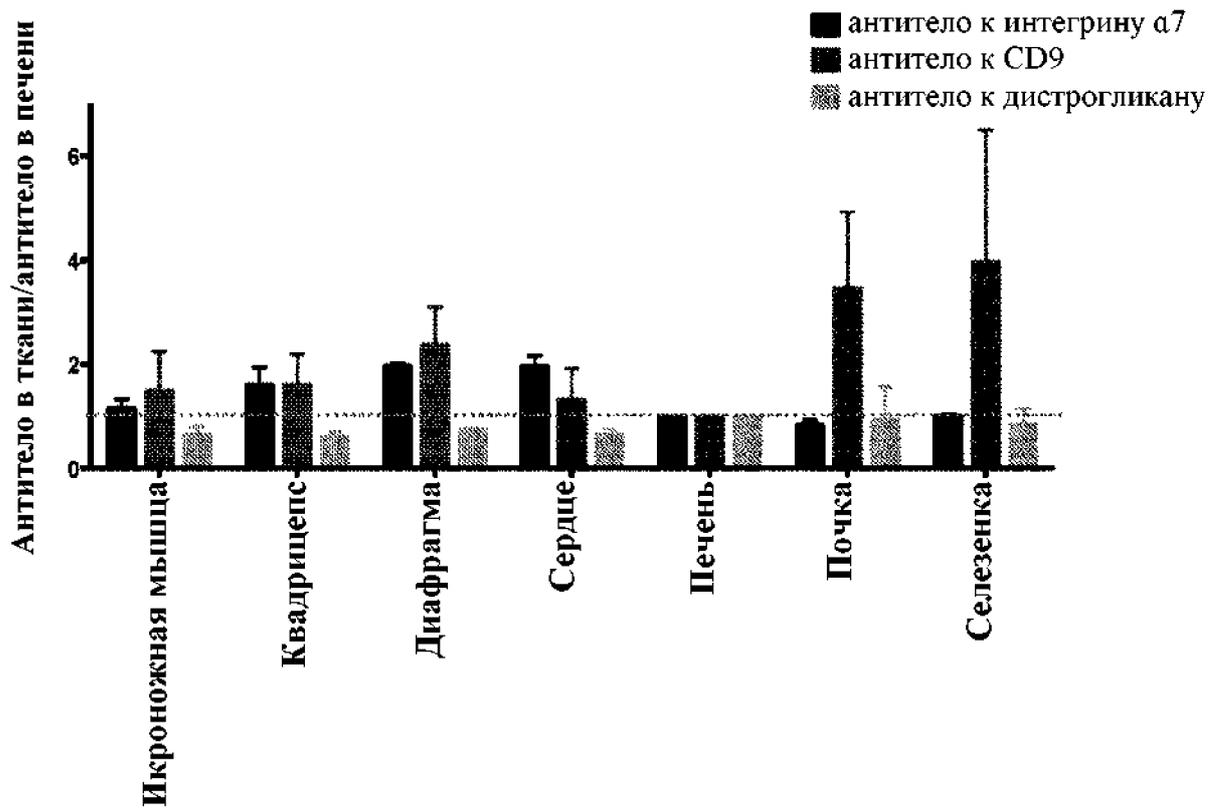
**ФИГУРА 13**



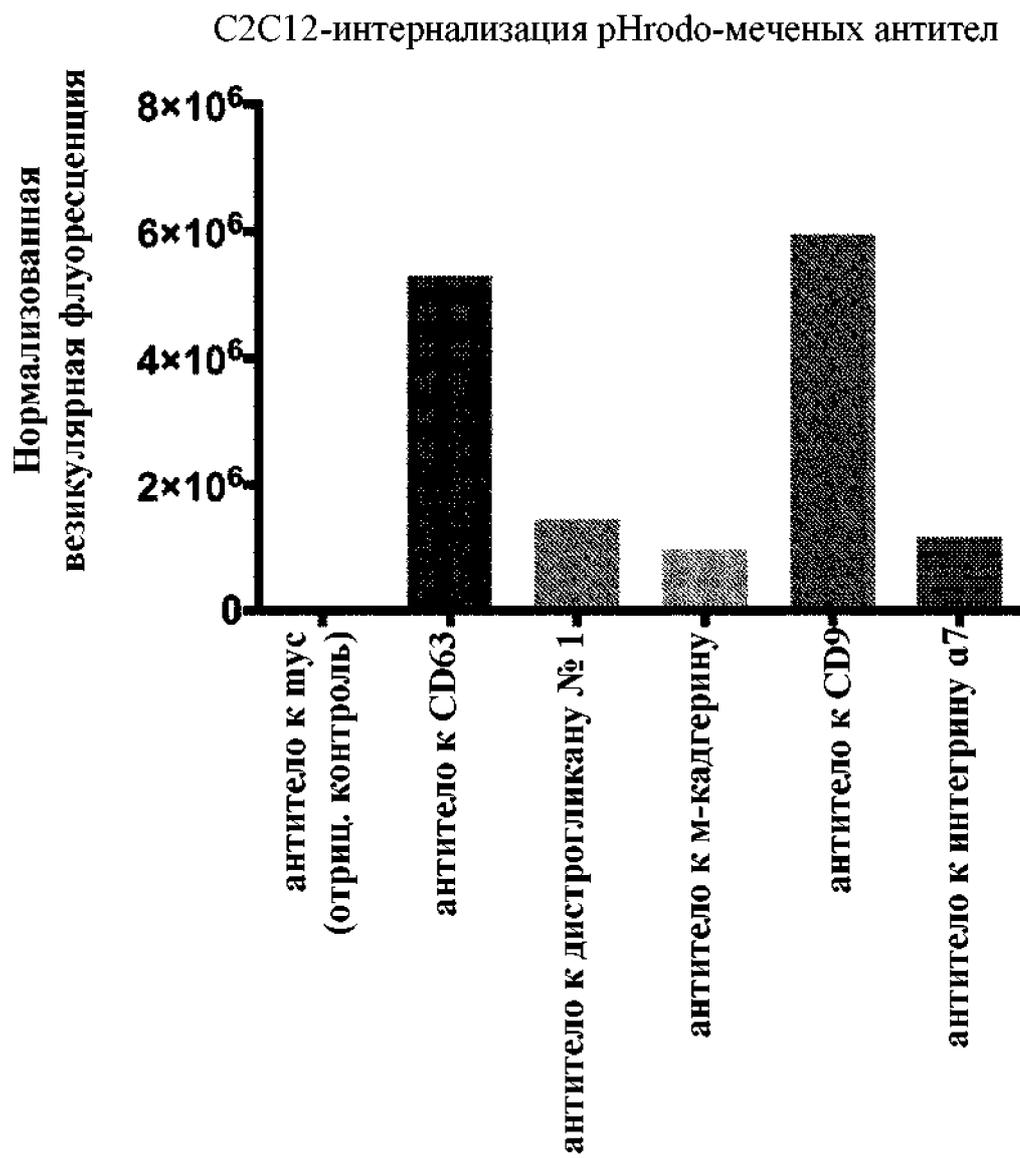
**ФИГУРА 14**

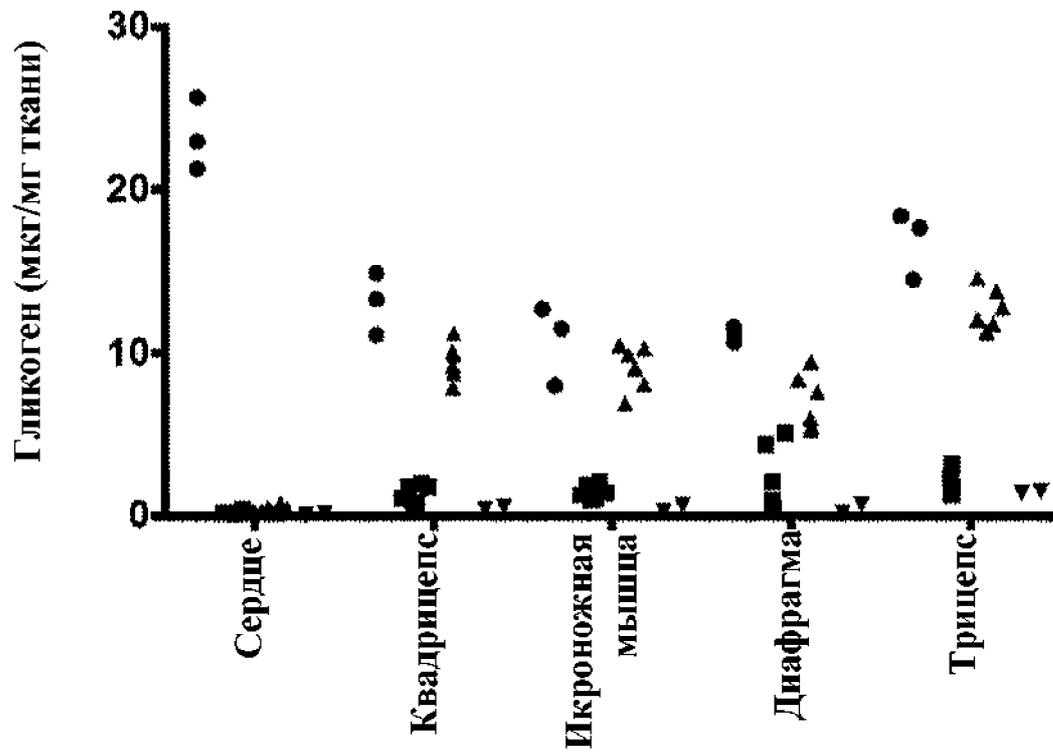


ФИГУРА 15

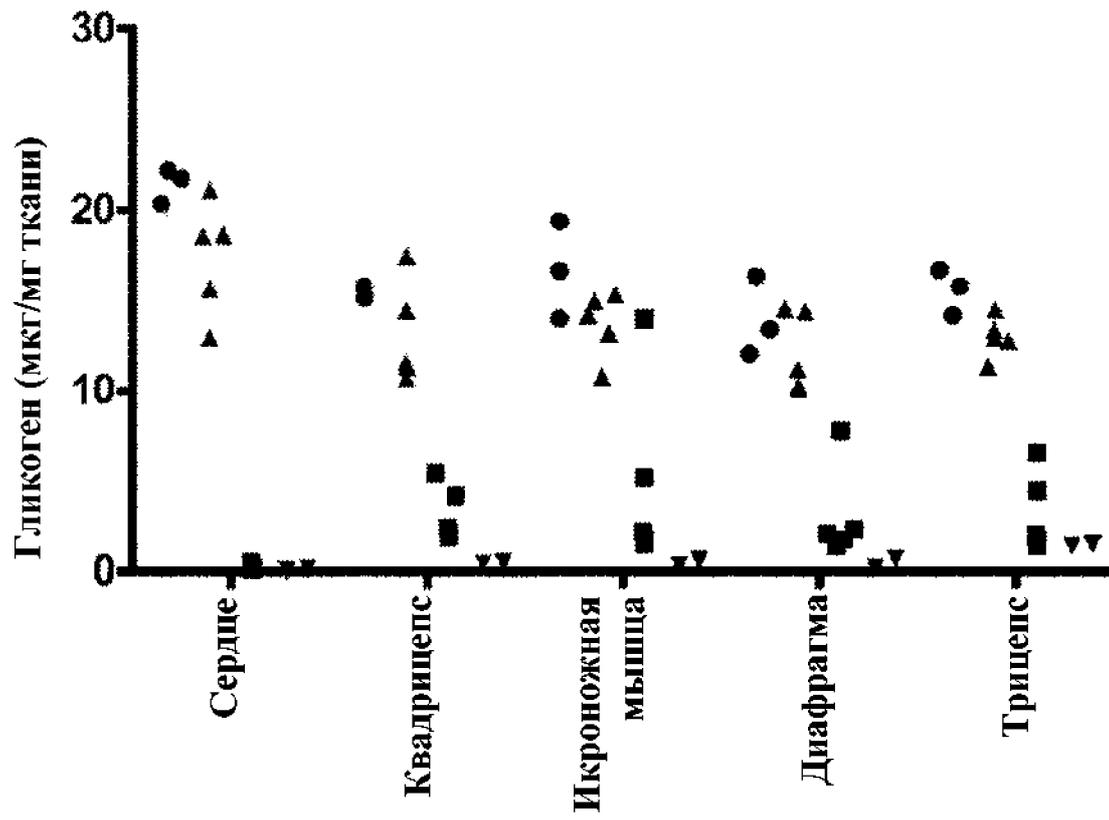


## ФИГУРА 16

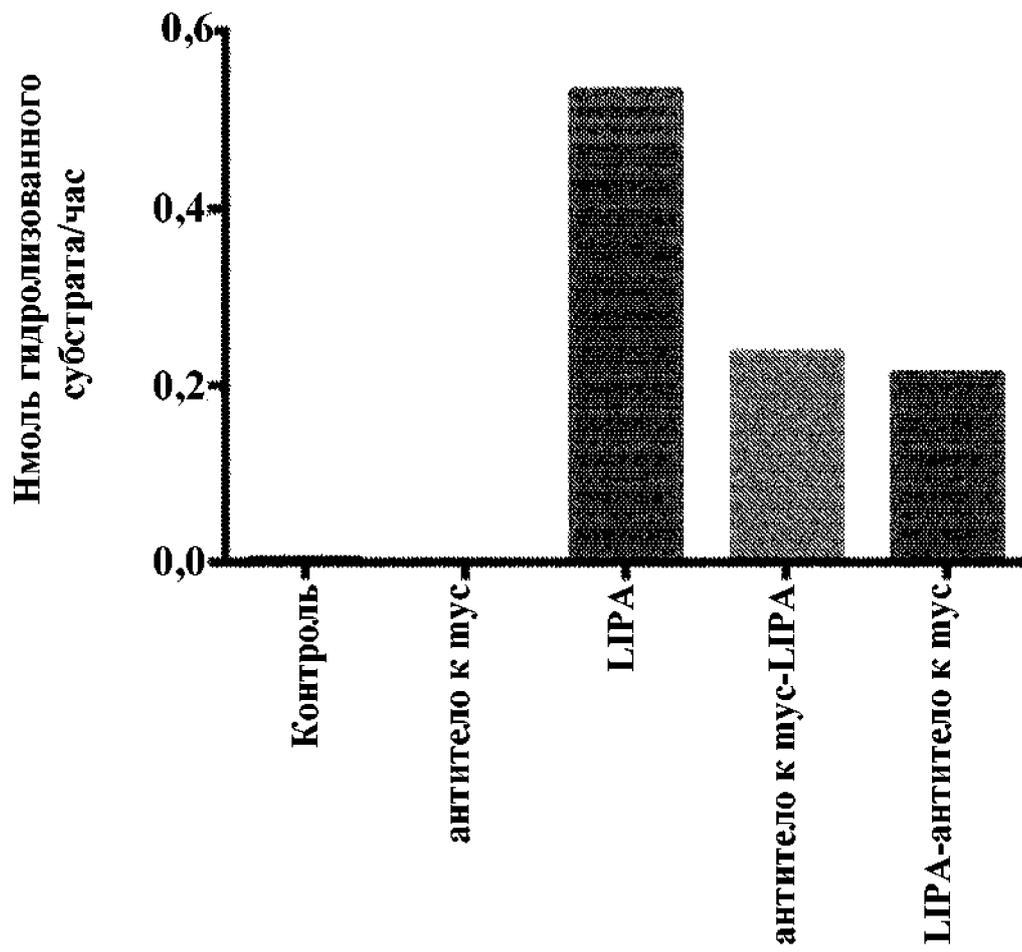




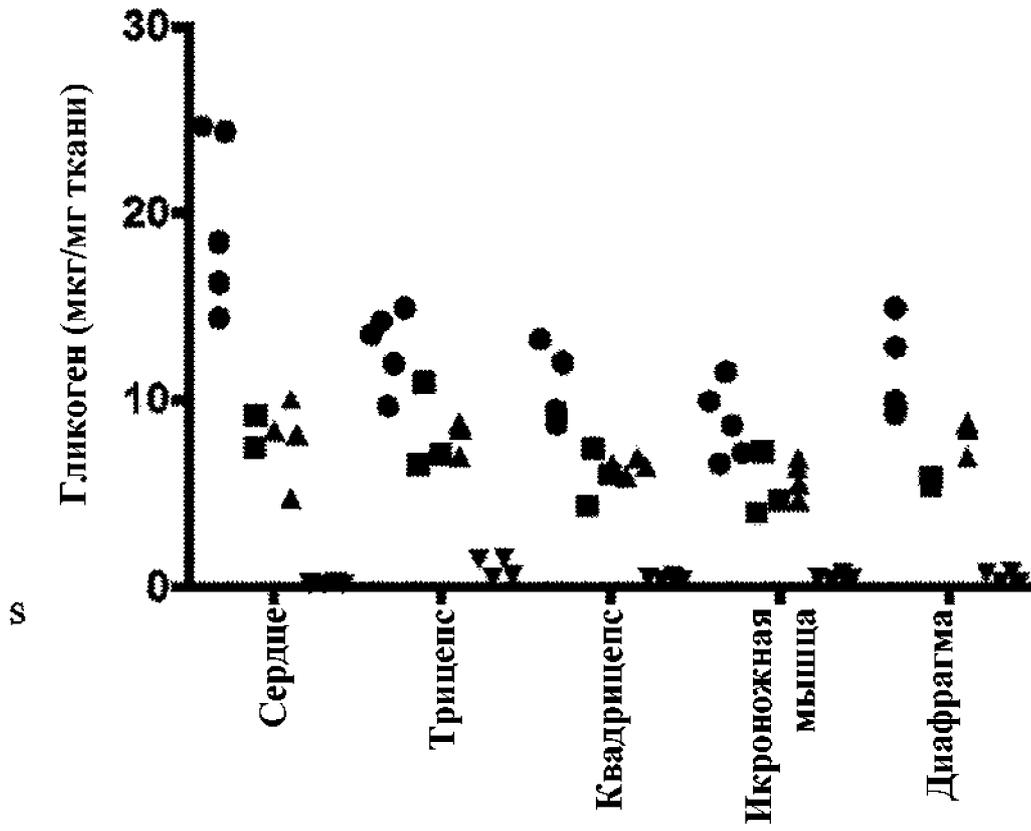
ФИГУРА 17



ФИГУРА 18



ФИГУРА 19



ФИГУРА 20