

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 833 937**

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)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2016 PCT/US2016/065647**
87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17100467**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2016 E 16829343 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020 EP 3386534**

54 Título: **Composiciones y métodos para internalizar enzimas**

30 Prioridad:

08.12.2015 US 201562264702 P
25.08.2016 US 201662379629 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.06.2021

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591 , US

72 Inventor/es:

BAIK, ANDREW y
CYGNAR, KATHERINE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 833 937 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para internalizar enzimas

5 **Campo**

Esta solicitud se refiere en general a composiciones y métodos para tratar enfermedades del almacenamiento lisosómico. Esta solicitud se refiere específicamente a complejos proteínicos dirigidos que contienen enzimas de

10

Antecedentes

Las enfermedades del almacenamiento lisosómico son una clase enfermedades infrecuentes que afectan a la degradación de una miríada de sustratos en el lisosoma. Esos sustratos incluyen esfingolípidos, mucopolisacáridos, glucoproteínas, glicógeno y oligosacáridos, que pueden acumularse en las células de aquellas con la enfermedad, dando lugar a muerte celular. Los órganos afectados por enfermedades del almacenamiento lisosómico incluyen el sistema nervioso central (SNC), el sistema nervioso periférico (SNP), los pulmones, el hígado, los huesos, el músculo esquelético y cardiaco, y el sistema reticuloendotelial.

15

20

Las opciones para el tratamiento de las enfermedades del almacenamiento lisosómico incluyen terapia de remplazo enzimático (ERT), terapia de reducción de sustrato, terapia farmacológica mediada por chaperonas, terapia de trasplante de células madre hematopoyéticas y genoterapia. Un ejemplo de la terapia de reducción de sustrato incluye el uso de Miglustat o Eliglustat para tratar la enfermedad de Gaucher de tipo 1. Estos fármacos actúan bloqueando la actividad sintasa, que reduce la posterior producción de sustrato. La terapia de células madre hematopoyéticas (HSCT), por ejemplo, se usa para mejorar y ralentizar el fenotipo negativo del sistema nervioso central en pacientes con algunas formas de MPS. Véase, R.M. Boustany, "Lysosomal storage diseases--the horizon expands", 9(10) Nat. Rev. Neurol. 583-98, oct. de 2013. La tabla 1 enumera algunas enfermedades del almacenamiento lisosómico y sus enzimas asociadas u otras proteínas.

25

30

Tabla 1: Enfermedades del almacenamiento lisosómico

Clase	Enfermedad	Enzima/proteína implicada
Esfingolipidosis	Enfermedad de Fabry	α -galactosidasa A
	Lipogranulomatosis de Farber	Ceramidasa
	Enfermedad de Gaucher de tipo I	β -glucosidasa
	Enfermedad de Gaucher de tipos II y III	Activador de saposina-C
	Enfermedades de Niemann-Pick tipos A y B	Esfingomielinasa
	Gangliosidosis de GM1	β -galactosidasa
	Gangliosidosis de GM2 (Sandhoff)	β -hexosaminidasa A y B
	Gangliosidosis de GM2 (Tay-Sachs)	β -hexosaminidasa A
	Gangliosidosis de GM2 (deficiencia del activador de GM2)	Proteína activadora de GM2
	Gangliosidosis de GM3	GM3 sintasa
	Leucodistrofia metacromática	Ariilsulfatasa A
Mucopolisacaridosis	Deficiencia de activador de esfingolípidos	Actividad de esfingolípidos
	MPS I (enfermedad de Scheie, Hurler-Scheie y Hurler)	α -iduronidasa
	MPS II (Hunter)	Iduronidasa-2-sulfatasa
	MPS IIIA (Sanfilippo A)	Heparano <i>N</i> -sulfatasa
	MPS IIIB (Sanfilippo B)	<i>N</i> -acetil- α -glucosaminidasa
	MPS IIIC (Sanfilippo C)	acetil-CoA; α -glucosamida <i>N</i> -acetiltransferasa
	MPS IIID (Sanfilippo D)	<i>N</i> -acetilglucosamina-6-sulfatasa
	MPS IVA (síndrome A de Morquio)	<i>N</i> -acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa
	MPS IVB (síndrome B de Morquio)	β -galactosidasa
	MPS VI (Maroteaux-Lamy)	<i>N</i> -acetilgalactosamina-4-sulfatasa (ariilsulfatasa B)
Enfermedad del almacenamiento de glucógeno	MPS VII (enfermedad de Sly)	β -glucuronidasa
	MPS IX	Hialuronidasa
Enfermedad del almacenamiento de glucógeno	Enfermedad de Pompe (enfermedad del almacenamiento de glucógeno de tipo II)	α -glucosidasa 2

(continuación)

Clase	Enfermedad	Enzima/proteína implicada
Metabolismo de lípidos	Deficiencia de lipasa ácida lisosómica (LAL-D; enfermedad de Wolman)	Lipasa ácida lisosómica

Dos de las LSD más comunes son la enfermedad de Pompe y la enfermedad de Fabry. La enfermedad de Pompe está causada por la enzima alfa-glucosidasa (GAA) lisosómica defectuosa, que provoca un procesamiento defectuoso del glucógeno lisosómico. La acumulación de glucógeno lisosómico se produce predominantemente en tejidos esqueléticos, cardíacos y hepáticos. La enfermedad de Pompe infantil causa cardiomegalia, hipotonía, hepatomegalia y muerte debido a insuficiencia cardiorrespiratoria, habitualmente antes de los 2 años de edad. La enfermedad de Pompe en adultos se produce tan tarde como de la segunda a la sexta década y habitualmente implica solamente al músculo esquelético.

La enfermedad de Fabry está causada por enzima alfa-galactosidasa A (GLA) lisosómica defectuosa, que provoca la acumulación de globotriaosilceramida dentro de los vasos sanguíneos y otros tejidos y órganos. Los síntomas asociados con la enfermedad de Fabry incluyen dolor por daño nervioso y/u obstrucción vascular pequeña, insuficiencia renal e insuficiencia permanente, complicaciones cardíacas tales como alta presión sanguínea y cardiomiopatía, síntomas dermatológicos tales como formación de angioqueratomas, anhidrosis o hiperhidrosis, y problemas oculares tales como córnea verticillata, cataratas de tipo radio y anomalías vasculares en la conjuntiva y la retina.

Los tratamientos actuales para enfermedades del almacenamiento lisosómico son menos que óptimas. Por ejemplo, ERT debe administrarse en general a una alta frecuencia y a una alta dosis, tal como cada dos semanas y hasta 40 mg/kg. Además, algunas enzimas remplazadas pueden tener reactividad cruzada inmunológica (CRIM), estimular la producción de IgG en el sujeto y, por tanto, impedir el suministro de la enzima al lisosoma mediante el receptor de manosa-6-fosfato (M6P). Las IgG podrían proteger los residuos M6P de la enzima de remplazo, y el complejo antígeno-IgG-anticuerpo puede captarse en los lisosomas celulares mediante el receptor de Fc, desviando de ese modo la enzima de remplazo preferentemente a los macrófagos.

El suministro de enzima de remplazo a los tejidos afectados apropiados también es ineficaz (véase la tabla 2 y Desnick y 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). Por ejemplo, los pacientes que experimentan terapia de remplazo enzimático a largo plazo para enfermedad de Pompe infantil aún pueden padecer habla hipernasal, debilidad muscular residual, ptosis, osteopenia, pérdida de audición, riesgo de aspiración, disfagia, arritmia cardíaca y dificultad al tragar. Las dosis de la enzima de remplazo a menudo deben aumentarse a lo largo del tiempo hasta 40 mg/kg a la semana o cada dos semanas.

Tabla 2: Dirección ineficaz a tejido de ERT

Enfermedad	Subtipo(s)	Fácil de alcanzar el tejido	Difícil de alcanzar el tejido
Enfermedad de Gaucher	Tipo 1	Bazo, hígado, médula ósea	Hueso
	Tipos 2 y 3	Bazo, hígado, médula ósea	Hueso, cerebro
Enfermedad de Fabry	Clásica y de aparición tardía	Endotelio vascular	Riñón, corazón
Mucopolisacaridosis	Todos	Bazo, hígado, médula ósea	Hueso, cerebro, cartílago
α -manosidosis	-	Bazo, hígado, médula ósea	Hueso, cerebro
Enfermedad de Niemann-Pick	Tipo B	Bazo, hígado, médula ósea	Macrófagos alveolares
Enfermedad de Pompe	Infantil	---	Corazón, músculo liso y esquelético
	Aparición tardía	---	Músculo liso y músculo esquelético respiratorio

El receptor de manosa-6 fosfato (MPR) endógeno media el transporte de la mayoría de enzimas recombinantes al lisosoma. Existen dos formas complementarias de MPR: independiente de cationes (CI-MPR) y dependiente de cationes (CD-MPR). Las inactivaciones de cualquier forma han desordenado las enzimas lisosómicas. Las hidrolasas lisosómicas se sintetizan en el retículo endoplasmático y se mueven a la red cis-Golgi, donde se modifican covalentemente por la adición de grupos manosa-6-fosfato (M6P). La formación de este marcador depende del efecto secuencial de dos enzimas lisosómicas: UDP-N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa (G1cNac-fosfotransferasa) y N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster- α -N-acetilglucosaminidasa (enzima desenmascaradora). La G1cNac-fosfotransferasa cataliza la transferencia de un residuo de G1cNAC-1-fosfato desde UDP-G1cNAC a las posiciones C6 de manosas seleccionadas en oligosacáridos de tipo de alto contenido de manosa de las hidrolasas. Después, la

enzima desenmascaradora elimina la G1cNAc terminal, exponiendo la señal de reconocimiento M6P. En la red trans-Golgi, la señal de M6P permite la segregación de hidrolasas lisosómicas de todos los demás tipos de proteínas a través de la unión selectiva a los receptores de M6P. Las vesículas recubiertas con clatrina producidas se desprenden de la red trans-Golgi y se fusionan con los endosomas tardíos. Al pH bajo del endosoma tardío, las hidrolasas se disocian de los receptores de M6P y los receptores vacíos se reciclan al aparato de Golgi para rondas adicionales de transporte.

Con la excepción de la β -glucocerebrosidasa, que se suministra mediante el receptor de manosa, las enzimas lisosómicas recombinantes comprenden glucosilación de M6P y se suministran al lisosoma principalmente mediante CI-MPR/IGF2R. El suministro de remplazo enzimático mediado por glucosilación/CI-MPR, sin embargo, no alcanza todos los tejidos clínicamente relevantes (tabla 2). La mejora a la terapia de remplazo enzimático se ha centrado en mejorar el suministro por CI-MPR (i) aumentando la expresión superficial de CI-MPR usando el β 2-agonista clenbuterol (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) aumentando la cantidad de residuos de M6P en la enzima (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) o (iii) fusionando un dominio IGF-II a la enzima (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).

Una gran cantidad de enfermedades del almacenamiento lisosómico se tratan inadecuadamente por terapia de remplazo enzimático o genoterapia principalmente debido a la pobre capacidad de dirigir la enzima de remplazo al tejido u órgano pertinente. Existe una necesidad de terapias de remplazo enzimático mejoradas que potencien y promuevan una mejor biodistribución en el tejido y captación lisosómica de la enzima. Los solicitantes han desarrollado una terapia de remplazo enzimático mejorada usando suministro de enzimas guiado por anticuerpo independiente de CI-MPR al lisosoma de tejidos afectados diana.

Sumario

Los solicitantes han descubierto que las enzimas de remplazo pueden suministrarse de manera eficaz al lisosoma de una célula diana específica cuando se asocian con una entidad de dirección de superficie celular. Esta combinación de enzima y entidad de dirección se denomina complejo bioterapéutico. Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona una composición, es decir, un complejo bioterapéutico que comprende una enzima y una proteína de unión a antígeno. La enzima está asociada con una enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD) y la proteína de unión a antígeno se une a un efector de internalización. El efector de internalización media la unión celular y la captación en un compartimento lisosómico.

En algunos casos, la enzima es una cualquiera de α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetil-galactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa y hialuronidasa. En algunos casos, la enzima es una isozima que tiene una actividad igual o similar a una cualquiera o más de las enzimas enumeradas anteriormente. En algunos casos, la actividad α -glucosidasa puede proporcionarse por una isozima tal como sacarasa-isomaltasa (SI), maltasa-glucoamilasa (MGAM), glucosidasa II (GANAB) o α -glucosidasa neutra (C GNAC). En otro caso, la actividad α -galactosidasa A puede proporcionarse por una isozima tal como α -N-acetilgalactosaminidasa que se genomanipla para que obtenga actividad GLA.

En algunos casos, la proteína de unión a antígeno es cualquier proteína que pueda unirse a uno o más efectores de internalización. En casos más específicos, la proteína de unión a antígeno es una cualquiera o más de una molécula de fusión con receptor, una molécula de retención, una molécula de fusión de Fc con receptor, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula Fv monocatenaria (scFv), un fragmento dAb, una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo de dominio eliminado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con CDR injertada, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un nanocuerpo, un nanocuerpo monovalente, un nanocuerpo bivalente, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), un anticuerpo de camélido (anticuerpo homodimérico de cadena pesada VHH), un dominio IgNAR variable de tiburón y similares. En un caso particular, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico que se une al efector de internalización y la enzima.

En algunos casos, el efector de internalización es una proteína receptora, o un ligando que se une a una proteína receptora, que se asienta en, sobre o a la membrana celular y puede endocitarse. En casos más específicos, el efector de internalización es uno cualquiera o más de CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína 2 similar a proteína precursora de amiloide (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR (receptor de prolactina), MAL (proteína mielina y de linfocitos, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H⁺ de tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica,

receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatión, receptor de leptina, receptor depurador, SCARA1-5, SCARB1-3 y CD36. En determinados casos, el efector de internalización es un internalizador específico de riñón, tal como CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de transportadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa) y UMOD (uromodulina). En otros determinados casos, el efector de internalización es un internalizador específico de músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de la proteína morfogenética ósea), cadherina M, CD9, MuSK (cinasa específica de músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad gama-1 del canal de calcio de tipo L), CACNAIS (subunidad alfa-15 del canal de calcio de tipo L), CACNG6 (subunidad gama-6 del canal de calcio de tipo L), SCN1B (subunidad beta-1 del canal de sodio), CHRNA1 (subunidad alfa del receptor de ACh), CHRND (subunidad delta del receptor de ACh), LRR14B (proteína 14B que contiene repetición rica en leucina) y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye). En algunos casos específicos, el efector de internalización es ITGA7, CD9, CD63, APLP2 o PRLR. En algunos casos específicos, el efector de internalización es un internalizador con preferencia de macrófagos, incluyendo, por ejemplo, VSIG4 (CRIG), MSR1 (CD204) y MMR1 (MCR1, CD206).

El complejo bioterapéutico puede tener uno cualquiera de varios formatos. En algunos casos, la enzima se une covalentemente a la proteína de unión a antígeno. En un caso particular, la proteína de unión a antígeno comprende un semianticuerpo (es decir, una sola cadena pesada y una sola cadena ligera), la enzima se une covalentemente a un dominio Fc de inmunoglobulina y el dominio Fc que se une covalentemente a la enzima se asocia con el dominio Fc de la proteína de unión a antígeno. En otro caso particular, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo y la enzima se une covalentemente al extremo C de la cadena pesada (o cadena ligera) de ese anticuerpo. En otro caso particular más, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo y la enzima se une covalentemente al extremo N de la cadena pesada (o cadena ligera) de ese anticuerpo.

En otros casos, la enzima no se une covalentemente a la proteína de unión a antígeno. En un caso, la proteína de unión a antígeno se une tanto al efector de internalización como a la enzima. En un caso específico, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico que se une al efector de internalización y la enzima.

En algunos casos, la enzima es GAA o una isozima que tiene actividad GAA, y el efector de internalización es CD9, ITGA7, CD63, APLP2 o PRLR. En otros casos, la enzima es GLA o una isozima que tiene actividad GLA, y el efector de internalización es CD9, ITGA7, CD63, APLP2 o PRLR.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD), que comprende la etapa de administrar al sujeto un complejo bioterapéutico (como se describe anteriormente), en el que el complejo bioterapéutico entra en un lisosoma de una célula del sujeto y proporciona una actividad enzimática ("enzima de reemplazo") que reemplaza la actividad enzimática que se está asociada con la LSD ("enzima endógena"). Las LSD incluyen esfingolipidosis, mucopolisacaridosis y enfermedad del almacenamiento de glucógeno. Más específicamente, la LSD tratable es una cualquiera o más de las enfermedades enumeradas en la tabla 1, y la enzima de reemplazo tiene la actividad de la enzima correspondiente enumerada en la tabla 1. En un caso específico, la LSD es enfermedad de Pompe y la enzima asociada es α -glucosidasa (GAA). En otro caso específico, la LSD es enfermedad de Fabry y la enzima asociada es α -galactosidasa A (GLA). En otro ejemplo específico más, la LSD es deficiencia de lipasa ácida lisosómica (LAL-D) y la enzima asociada es la lipasa ácida lisosómica (LIPA).

En un caso, la enzima de reemplazo no induce una reacción inmunológica en el sujeto. En algunos casos, la enzima de reemplazo es una isozima. Por ejemplo, cuando la enzima endógena es α -glucosidasa, la isozima es una proteína diferente que proporciona la misma actividad enzimática o similar que la α -glucosidasa, tal como sacarasa-isomaltasa (SI), maltasa-glucoamilasa (MGAM), glucosidasa II (GANAB) y α -glucosidasa neutra (C GNAC). Cuando la enzima endógena es α -galactosidasa A (GLA), la isozima es una proteína diferente que proporciona la misma actividad enzimática o similar que la α -galactosidasa A, tal como α -N-acetilgalactosaminidasa que se genomanipula para que obtenga actividad GLA.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para seleccionar o cribar un complejo bioterapéutico que contiene una enzima y una proteína de unión a antígeno que reemplaza de forma eficaz una enzima en un paciente que lo necesita. En un caso, el complejo bioterapéutico se administra a un sistema modelo y el sistema modelo se evalúa para la actividad de la enzima reemplazada. En un caso, el sistema modelo es un animal que carece de la expresión de la enzima y expresa un antígeno equivalente de la proteína de unión a antígeno. En un caso, el modelo animal es un ratón que expresa un equivalente humanizado de la proteína de unión a antígeno y con una inactivación del gen que codifica la enzima.

Específicamente, la presente invención proporciona una composición que comprende una enzima asociada con una enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD) y una proteína de unión a antígeno, en la que la enzima se selecciona del grupo que consiste en α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa (GAA), β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-

acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa y lipasa ácida lisosómica (LAL), en la que la proteína de unión a antígeno se une a un efector de internalización y en la que el efector de internalización es CD63.

La presente invención también proporciona específicamente un complejo bioterapéutico para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD), en el que el método comprende administrar al sujeto el complejo bioterapéutico y en el que el complejo bioterapéutico entra en un lisosoma de una célula del sujeto y proporciona una actividad enzimática ("enzima de remplazo") que reemplaza la actividad enzimática que está asociada con la LSD ("enzima endógena"), en el que el complejo bioterapéutico comprende: (a) la enzima de remplazo seleccionada del grupo que consiste en α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa (GAA), β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa y lipasa ácida lisosómica (LAL), y (b) una proteína de unión a antígeno que se une a un efector de internalización, en el que el efector de internalización es CD63.

Dibujos

La figura 1 representa esquemáticamente complejos bioterapéuticos. El panel A representa un complejo bioterapéutico que comprende un anticuerpo biespecífico (ii) y una enzima de remplazo (i). El panel B representa un polipéptido de fusión de enzima-Fc (i) que se asocia con un semicuerpo específico de efector de internalización (ii) para formar el complejo bioterapéutico. El panel C representa una enzima de remplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo antiefecto de internalización. El panel D representa una enzima de remplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo antiefecto de internalización. El panel E representa una enzima de remplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo C de la cadena ligera de un anticuerpo antiefecto de internalización. El panel F representa una enzima de remplazo (hexágono) unida covalentemente al extremo N de la cadena ligera de un anticuerpo antiefecto de internalización. Las líneas curvadas en los paneles C, D, E y F representan conectores.

La figura 2 representa una transferencia de Western no reducida antiHFc de sobrenadantes de células CHO que expresan la proteína de unión al efector de internalización (IE-BP) o proteína de remplazo para la enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD-RP). El carril 1 se cargó con IgG4 anti-CD63, el carril 2 con GAA-Fc(botón), el carril 3 con IgG4 anti-CD63 GAA y el carril 4 con GAA IgG4 anti-CD63.

La figura 3 representa gráficos de barra que representan la actividad GAA aproximada determinada usando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil- α -glucósido. El eje de ordenadas del panel A y el panel B son moles de sustrato hidrolizado por mol de proteína por hora. El eje de abscisas enumera cada proteína de fusión GAA.

La figura 4 representa gráficos lineales que representan la actividad GAA aproximada de construcciones GAA internalizadas por células HEK. Los ejes de ordenadas de los paneles A y B indican los nanomoles de sustrato hidrolizado por mg de lisado celular por hora. Los ejes de abscisas indican la concentración creciente de la construcción GAA. Panel A, los cuadrados (■) representan anti-CD63-GAA administrado a células HEK en presencia de manosa-6-fosfato (M6P) 5 mM, un competidor de la dirección lisosómica mediada por MPR, y los círculos (○) representan anti-CD63-GAA administrado a células HEK en solitario. Panel B, los círculos (○) representan anti-CD63-GAA administrado a células HEK, los cuadrados (■) representan un mutante anti-CD63-GAA, que no se une a CD63, administrado a células HEK y los triángulos (▲) representan anti-CD63-GAA administrado a células HEK, que no expresan CD63.

La figura 5 representa gráficos lineales que representan la actividad GAA aproximadamente de construcciones GAA que se internalizaron por mioblastos humanos (panel A) o murinos (panel B). Los ejes de ordenadas de los paneles A y B indican los nanomoles de sustrato hidrolizado por mg de lisado celular por hora. Los ejes de abscisas indican la concentración creciente de la construcción GAA, anti-CD63-GAA o mycGAA, en presencia o ausencia de M6P.

La figura 6 representa los niveles de GAA (panel A) y el contenido de glucógeno (panel B) de tres líneas celulares de Pompe (GM20089, GM20090 y GM20091) en comparación con los fibroblastos dérmicos humanos neonatales (NHDF) de tipo silvestre para GAA. El panel A es una transferencia de Western antiHFcGAA que representa la proteína GAA residual en líneas celulares de Pompe y los niveles de tipo silvestre de la proteína GAA en NHDF. El panel B es un gráfico de barras que representa el contenido de glucógeno como microgramos por millón de células después de privación de glucosa para reducir el glucógeno citoplasmático.

La figura 7 representa en forma de gráfico de barras el rescate de los defectos de acumulación de glucosa para líneas celulares de Pompe GM20089 (panel A), GM20090 (panel B) y GM20091 (panel C) por anti-CD63-GAA 200 nM o myc-GAA 200 nM. El eje de ordenadas representa el contenido de glucógeno en microgramos por miligramo de lisado celular.

La figura 8 representa una transferencia de Western no reducida antiFc de sobrenadantes de extracto celular CHO que contienen anti-CD63-GLA (carril 1), GLA-Fc(botón) (carril 2), GLA-anti-CD63 (carril 3), antimyc(botón) (carril 4), anti-CD63(ojal) (carril 5) y mezcla de sobrenadantes que contienen antimyc(botón) y anti-CD63(ojal) (carril 6).

5 La figura 9 representa en forma de gráfico de barras la actividad enzimática GLA (eje de ordenadas en nanomoles de sustrato hidrolizado por nanomoles de proteína de fusión por hora) de proteína de fusión que contiene GLA, incluyendo de izquierda a derecha en el eje de abscisas anti-CD63-GLA (la construcción del extremo C de la cadena pesada), GLA-Fc, GLA-anti-CD63 (la construcción del extremo N de la cadena pesada), GLA-myc-FLAG y GLA 6-his.

10 La figura 10 representa un gráfico lineal que representa la actividad GLA aproximada en contrada en extractos de células HEK que contienen construcciones GLA que se internalizaron por las células HEK. El eje de ordenadas indica la actividad GLA en nanomoles de sustrato hidrolizado por miligramos de lisado celular por hora. Los ejes de abscisas indican la concentración creciente de la construcción GAA. La línea superior representa GLA-anti-CD63, la línea central representa GLA-myc más anticuerpo biespecífico antimyc/anti-CD63 y la línea inferior representa GLA-myc.

15 La figura 11 representa gráficos lineales que representan la captación de proteínas marcadas con pHrodo en la fracción de pH inferior (es decir, fracción lisosómica) de células HEK (panel A), células PC-3 (panel B) y células HepG2 (panel 3). Los círculos (○) representan anticuerpo anti-CD63 marcado con pHrodo, los cuadrados (■) representan anticuerpo antiAPLP2 marcado con pHrodo y los triángulos (▲) representan GLA marcada con pHrodo.

20 La figura 12 representa transferencia de Western reducidas de lisados celulares que contienen anti-CD63-GAA internalizado. Cada carril representa todos los extractos preparados en días específicos después de la internalización de la proteína. El panel A es una transferencia de Western sondeada con un anticuerpo antiGAA. El anti-CD63-GAA de 150 kDa se visualiza en el marcador ← a. La forma activa de 76 kDa lisosómica de GAA se visualiza en el marcador ← b. El panel B es una transferencia de Western sondeada con un anticuerpo antiHlgG. El anti-CD63-GAA de 150 kDa se visualiza en el marcador c →. La cadena pesada del anticuerpo (50 kDa) se visualiza en el marcador d →. La cadena ligera del anticuerpo (23 kDa) se visualiza en el marcador e →.

25 La figura 13 representa una transferencia de Western del anticuerpo antiHlgG. La banda de 76 kDa representa GAA madura. El carril 1 contiene extractos hepáticos de un ratón CD63 humanizado al que se ha administrado anti-CD63-GAA, el carril 2 riñón, el carril 3 corazón, el carril 4 gastrocnemio, el carril 5 cuádriceps y el carril 6 diafragma.

30 La figura 14 representa una transferencia de Western de anticuerpo anti-hGAA de extractos de tejido de un ratón de tipo silvestre (+/+) y ratón humanizado para CD63 (hu/hu) 24 horas después de administrarle antiCD63-GAA a 50 mg/kg. Se visualiza la forma activa de 76 kDa lisosómica de GAA. El carril 1 y 2 son extractos de corazón de ratones de tipo silvestre y humanizados, respectivamente. El carril 3 y 4 son extractos de gastrocnemio de ratones de tipo silvestre y humanizados. El carril 5 y 6 son extractos de diafragma de ratones de tipo silvestre y humanizados.

35 La figura 15 es un histograma que representa la cantidad relativa de anticuerpo antiintegrina alfa 7, anticuerpo anti-CD9 y anticuerpo antidistroglucano encontrados en músculo gastrocnemio, músculo cuádriceps, diafragma, corazón, hígado, riñón y bazo, normalizada a los niveles encontrados en hígado.

40 La figura 16 es un histograma que representa la dirección lisosómica de anticuerpos marcados con pHrodo. El eje de ordenadas representa la fluorescencia vesicular normalizada. El de abscisas representa cada anticuerpo, de izquierda a derecha: antimyc, anti-CD63, antidistroglucano, anticaderina M, anti-CD9 y antiintegrina alfa 7.

45 La figura 17 es un diagrama de puntos que representa los niveles de glucógeno expresados en microgramos de glucógeno por miligramo de tejido. El tejido se representa en el eje de abscisas de izquierda a derecha como corazón, cuádriceps, gastrocnemio, diafragma y tríceps. Los círculos (○) representan niveles de glucógeno en ratones inactivados (KO) para GAA no tratados, los cuadrados (■) representan niveles de glucógeno en ratones GAA KO tratados con antiCD63-GAA, los triángulos hacia arriba (▲) representan niveles de glucógeno en ratones GAA KO tratados con hGAA y los triángulos hacia abajo (▼) representan los niveles de glucógeno en ratones de tipo silvestre no tratados. Los tratamientos se administraron por suministro hidrodinámico de construcciones de ADN.

50 La figura 18 es un diagrama de puntos que representa los niveles de glucógeno expresados en microgramos de glucógeno por miligramo de tejido. El tejido se representa en el eje de abscisas de izquierda a derecha como corazón, cuádriceps, gastrocnemio, diafragma y tríceps. Los círculos (○) representan niveles de glucógeno en ratones inactivados (KO) para GAA no tratados, los cuadrados (■) representan niveles de glucógeno en ratones GAA KO tratados con antiCD63-GAA, los triángulos hacia arriba (▲) representan niveles de glucógeno en

ratones GAA KO tratados con antiCD63-GAA y los triángulos hacia abajo (▼) representan los niveles de glucógeno en ratones de tipo silvestre no tratados. Los tratamientos se administraron por suministro hidrodinámico de construcciones de ADN.

5 La figura 19 es un histograma que representa la actividad lipasa expresada como nanomoles de sustrato (oleato de 4-metilumbeliferilo) hidrolizado por hora (eje de ordenadas) por anticuerpo antimyc, lipasa ácida lisosómica natural (LIPA), proteína de fusión antimyc-LIPA (fusión en el extremo C de la cadena pesada) y LIPA-antimyc (fusión en el extremo N de la cadena pesada).

10 La figura 20 es un diagrama de puntos que representa los niveles de glucógeno expresados en microgramos de glucógeno por miligramo de tejido. El tejido se representa en el eje de abscisas de izquierda a derecha como corazón, tríceps, cuádriceps, gastrocnemio y diafragma. Los círculos (●) representan los niveles de glucógeno en ratones inactivados (KO) para GAA no tratados, los cuadrados (■) representan niveles de glucógeno en ratones GAA KO tratados con antiCD63-GAA, los triángulos hacia arriba (▲) representan niveles de glucógeno en ratones GAA KO tratados con antiCD63-GAA y los triángulos hacia abajo (▼) representan los niveles de glucógeno en ratones de tipo silvestre no tratados. Los tratamientos se administraron por suministro hidrodinámico (HDD) de construcciones de ADN.

Descripción

20 Esta invención se define en las reivindicaciones. La terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

25 Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen algunos métodos y materiales preferidos. Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido normalmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

30 "Enfermedades del almacenamiento lisosómico" incluye cualquier trastorno resultante de un defecto en la función del lisosoma. Actualmente, se han identificado aproximadamente 50 trastornos, de los que los mejor conocidos incluyen enfermedad de Tay-Sachs, de Gaucher y de Niemann-Pick. La patogenia de las enfermedades se adjudica a la acumulación de productos de degradación incompleta en el lisosoma, habitualmente debido a pérdida de función proteínica. Las enfermedades del almacenamiento lisosómico están causadas por variantes de pérdida de función o
 35 atenuación en las proteínas cuya función normal es degradar o coordinar la degradación de los contenidos lisosómicos. Las proteínas implicadas en las enfermedades del almacenamiento lisosómico incluyen enzimas, receptores y otras proteínas transmembranarias (por ejemplo, NPC1), proteínas de modificación postraduccional (por ejemplo, sulfatasa), proteínas de transporte de membrana y cofactores no enzimáticos y otras proteínas solubles (por ejemplo, activador de gangliósido GM2). Por tanto, las enfermedades del almacenamiento lisosómico abarcan más de esos trastornos
 40 causados por las enzimas defectuosas *per se*, e incluyen cualquier trastorno causado por cualquier defecto molecular. Por tanto, como se usa en este documento, el término "enzima" pretende abarcar aquellas otras proteínas asociadas con enfermedades del almacenamiento lisosómico.

45 La naturaleza de la lesión molecular afecta a la gravedad de la enfermedad en muchos casos, es decir, la pérdida de la función completa tiende a estar asociada con aparición prenatal o neonatal e implica síntomas graves; la pérdida de la función parcial está asociada con enfermedad más leve (relativamente) y de aparición más tardía. En general, únicamente un pequeño porcentaje de la actividad tiene que restablecerse para corregir los defectos metabólicos en células defectuosas. La tabla 1 enumera algunas de las enfermedades del almacenamiento lisosómico más comunes y sus proteínas con pérdida de función asociadas. Las enfermedades del almacenamiento lisosómico en general se
 50 describen en Desnick y Schuchman, 2012.

Las enfermedades del almacenamiento lisosómico pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de producto que se acumula dentro del lisosoma defectuoso. Las esfingolipidosis son una clase de enfermedades que afectan al metabolismo de los esfingolípidos, que son lípidos que contienen ácidos grasos unidos a alcoholes alifáticos (revisado
 55 en S. Hakomori, "Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis", 50 Annual Review of Biochemistry 733-764, julio de 1981). Los productos acumulados de la esfingolipidosis incluyen gangliósidos (por ejemplo, enfermedad de Tay-Sachs), glucolípidos (por ejemplo, enfermedad de Fabry) y glucocerebrósidos (por ejemplo, enfermedad de Gaucher).

60 Las mucopolisacaridosis son un grupo de enfermedades que afectan al metabolismo de los glucosaminoglucanos (GAGS o mucopolisacáridos), que son cadenas no ramificadas largas de disacáridos repetitivos que ayudan a construir el hueso, el cartilago, los tendones, las córneas, la piel y el tejido conjuntivo (revisado en J. Muenzer, "Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses", 111(2) Mol. Genet. Metab. 63-72 (febrero de 2014); Sasisekharan *et al.*, "Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans", 8(1) Ann. Rev. Biomed. Eng. 181-231 (diciembre de 2014)). Los productos acumulados de las mucopolisacaridosis incluyen sulfato
 65 de heparano, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, diversas formas de sulfato de condroitina y ácido hialurónico.

Por ejemplo, el síndrome de Morquio A se debe a un defecto en la enzima lisosómica galactosa-6-sulfato sulfatasa, que provoca la acumulación lisosómica de sulfato de queratina y 6-sulfato de condroitina.

Las enfermedades del almacenamiento de glucógeno (también conocidas como glucogenosis) son el resultado de una incapacidad de las células de metabolizar (generar o descomponer) el glucógeno. El metabolismo del glucógeno está moderado por diversas enzimas u otras proteínas incluyendo la glucosa-6-fosfatasa, alfa-glucosidasa ácida, enzima desramificante del glucógeno, enzima ramificante del glucógeno, glucógeno fosforilasa muscular, glucógeno fosforilasa hepática, fosfofructocinasa muscular, fosforilasa cinasa, transportador de glucosa, aldolasa A, beta-enolasa y glucógeno sintasa. Una enfermedad de ejemplo del almacenamiento lisosómico/almacenamiento de glucógeno es la enfermedad de Pompe, en que la alfa-glucosidasa ácida defectuosa provoca que el glucógeno se acumule en los lisosomas. Los síntomas incluyen hepatomegalia, debilidad muscular, insuficiencia cardíaca y en el caso de la variante infantil, muerte antes de los 2 años de edad (véase DiMauro y Spiegel, "Progress and problems in muscle glycogenosis", 30(2) Acta Myol. 96-102 (octubre de 2011)).

"Complejo bioterapéutico" incluye (i) una sola proteína que contiene más de un dominio funcional, (ii) una proteína que contiene más de una cadena polipeptídica y (iii) una mezcla de más de una proteína o más de un polipéptido. Se acepta que el término polipéptido significa una sola cadena de aminoácidos unidos conjuntamente mediante enlaces peptídicos. El término proteína abarca el término polipéptido, pero también incluye estructuras más complejas. Es decir, un solo polipéptido es una proteína y una proteína puede contener uno o más polipéptidos asociados en una estructura de orden mayor. Por ejemplo, la hemoglobina es una proteína que contiene cuatro polipéptidos: dos polipéptidos de globina alfa y dos polipéptidos de globina beta. La mioglobina también es una proteína, pero contiene únicamente un solo polipéptido de mioglobina.

El complejo bioterapéutico comprende uno o más polipéptidos y al menos dos funciones. Una de esas funciones es el remplazo de una actividad proteínica defectuosa asociada con una enfermedad del almacenamiento lisosómico. La otra de esas funciones es la unión a un efector de internalización. Por tanto, un solo polipéptido que proporcione una actividad proteínica lisosómica (por ejemplo, una actividad enzimática o actividad transportadora; también conocida como actividad proteínica relacionada con enfermedad lisosómica (LSD-RP)) y la capacidad de unirse a un efector de internalización (también conocida como proteína de unión a efector de internalización (actividad IE-BP)) es un complejo bioterapéutico. Además, una mezcla de proteínas, en la que una proteína tiene la función proteínica lisosómica y otra proteína tiene la actividad de unión al efector de internalización, es un complejo bioterapéutico. La figura 1 representa diversos ejemplos de complejos bioterapéuticos. En un ejemplo (figura 1, panel A), el complejo bioterapéutico contiene una proteína de remplazo lisosómico (la LSD-RP representado por el hexágono) y un anticuerpo biespecífico (la IE-BP) que se une a la proteína de remplazo lisosómico (líneas discontinuas) y un efector de internalización (líneas continuas). Aquí, un brazo del anticuerpo biespecífico se une no covalentemente a la LSD-RP y el otro brazo se une no covalentemente al efector de internalización, posibilitando de ese modo la internalización de la proteína de remplazo (LSD-RP) en el lisosoma. En otro ejemplo (panel B), el complejo bioterapéutico comprende una sola proteína que contiene dos polipéptidos, teniendo un polipéptido función LSD-RP y teniendo el otro función IE-BP. Aquí, la LSD-RP se fusiona a un dominio Fc de inmunoglobulina o región constante de la cadena pesada, que se asocia con el dominio Fc del semianticuerpo LSD-RP para formar el complejo bioterapéutico bifuncional. El ejemplo representado en el panel B es similar al del panel A, excepto que la LSD-RP se fija covalentemente a uno de los semianticuerpos, en lugar de a través de la interacción de antígeno-anticuerpo en el dominio variable de inmunoglobulina del semianticuerpo.

En otros ejemplos, el complejo bioterapéutico consiste en la LSD-RP unida covalentemente (directa o indirectamente a través de un conector) a la IE-BP. En un caso, la LSD-RP se fija al extremo C de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, la cadena pesada o como alternativa la cadena ligera). En otro caso, la LSD-RP se fija al extremo N de la molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, la cadena pesada o como alternativa la cadena ligera). En estos ejemplos, la molécula de inmunoglobulina es la IE-BP.

"Proteína relacionada con enfermedad del almacenamiento lisosómico" o "LSD-RP" indica cualquier proteína asociada con la etiología o efecto fisiológico de una enfermedad del almacenamiento lisosómico. Una LSD-RP incluye la enzima real, proteína de transporte, receptor u otra proteína que es defectuosa y que se atribuye como lesión molecular que causó la enfermedad. Una LSD-RP también incluye cualquier proteína que pueda proporcionar una actividad bioquímica o fisiológica similar o suficiente que remplace o evite la lesión molecular de la enfermedad. Por ejemplo, puede usarse una "isozima" como una LSD-RP. Los ejemplos de proteínas relacionadas con enfermedad del almacenamiento lisosómico incluyen las enumeradas en la tabla 1 como "enzima/proteína implicada" y cualquier proteína conocida o descubierta posteriormente u otra molécula que evite el defecto molecular de la enfermedad del almacenamiento lisosómico.

En el caso de la enfermedad de Pompe, en que el defecto molecular es un defecto en la actividad α -glucosidasa, las LSD-RP incluyen alfa-glucosidasa humana e "isozimas" tales como otras alfa-glucosidasas, alfa-glucosidasa recombinante genomanipulada, otras glucosidasas, glucosidasas recombinantes, cualquier proteína genomanipulada para que hidrolice un residuo terminal de alfa-glucosa unido 1-4 no reductor para liberar una sola molécula de alfa-glucosa, cualquier enzima EC 3.2.1.20, carbohidrato hidrolasas naturales o recombinantes de bajo pH para el glucógeno o almidones y glucosil hidrolasas tales como sacarasa isomaltasa, maltasa glucoamilasa, glucosidasa II y alfa-glucosidasa neutra.

En las composiciones de la presente invención, la enzima asociada con una LSD se selecciona del grupo que consiste en: α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa (GAA), β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa y lipasa ácida lisosómica (LAL).

Asimismo, en los complejos bioterapéuticos proporcionados para su uso en la invención, la enzima de remplazo se selecciona del grupo que consiste en: α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa (GAA), β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa y lipasa ácida lisosómica (LAL).

Un "efector de internalización" incluye una proteína que puede internalizarse en una célula o que participa de otro modo en o contribuye a retroceder el tráfico de membrana. En algunos casos, el efector de internalización es una proteína que experimenta transcitosis; es decir, la proteína se internaliza en un lado de una célula y se transporta al otro lado de la célula (por ejemplo, de apical a basal). En muchos casos, la proteína efectora de internalización es una proteína expresada en la superficie celular o una proteína extracelular soluble. Sin embargo, la presente divulgación también contempla casos en que la proteína efectora de internalización se expresa dentro de un compartimento intracelular tal como el endosoma, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, el lisosoma, etc. Por ejemplo, las proteínas implicadas en el retroceso del tráfico de membrana (por ejemplo, rutas de endosomas iniciales/de reciclaje a la red transGolgi) pueden servir como proteínas efectoras de internalización en diversos casos de la presente divulgación. En cualquier caso, la unión de la IE-BP a una proteína efectora de internalización provoca que el complejo bioterapéutico completo y cualquier molécula asociada con el mismo (por ejemplo, LSD-RP), también quede internalizado en la célula. Como se explica a continuación, las proteínas efectoras de internalización incluyen proteínas que se internalizan directamente en una célula, así como proteínas que se internalizan indirectamente en una célula.

Las proteínas efectoras de internalización que se internalizan directamente en una célula incluyen moléculas asociadas a membrana con al menos un dominio extracelular (por ejemplo, proteínas transmembranarias, proteínas ancladas a GPI, etc.), que experimentan internalización celular, y se procesan preferiblemente mediante una ruta intracelular de degradación y/o reciclado. Ejemplos no limitantes específicos de proteínas efectoras de internalización que se internalizan directamente en una célula incluyen, por ejemplo, CD63, MHC-I (por ejemplo, HLA-B27), Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína 2 similar a proteína precursora de amiloide (APLP2), receptor de apelina (APLNR), MAL (proteína mielina y de linfocitos, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H⁺ de tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatión, receptores de leptina, receptores depuradores (por ejemplo, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36) y similares.

En determinados casos, el efector de internalización es el receptor de prolactina (PRLR). Se descubrió que el PRLR no es solamente una diana para determinadas aplicaciones terapéuticas, sino también una proteína efectora de internalización eficaz basándose en su alta tasa de internalización y recambio. El potencial de PRLR como proteína efectora de internalización, por ejemplo, se ilustra en el documento WO2015/026907, donde se demuestra, entre otras cosas, que los anticuerpos antiPRLR se internalizan de manera eficaz por células que expresan PRLR *in vitro*.

En determinados casos, el efector de internalización es un internalizador específico de riñón, tal como CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de transportadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa) y UMOD (uromodulina). En otros determinados casos, el efector de internalización es un internalizador específico de músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), cadherina m, CD9, MuSK (cinasa específica de músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad gama-1 del canal de calcio de tipo L), CACNAIS (subunidad alfa-15 del canal de calcio de tipo L), CACNG6 (subunidad gama-6 del canal de calcio de tipo L), SCN1B (subunidad beta-1 del canal de sodio), CHRNA1 (subunidad alfa del receptor de ACh), CHRND (subunidad delta del receptor de ACh), LRRRC14B (proteína 14B que contiene repetición rica en leucina) y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye). En algunos casos específicos, el efector de internalización es ITGA7, CD9, CD63, ALPL2 o PPRLR. En la presente invención, el efector de internalización es CD63.

En aquellos casos en que el efector de internalización (IE) se internaliza directamente en una célula, la IE-BP puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente al IE, o un ligando o parte de un ligando que interactúa específicamente con el IE. Por ejemplo, si el IE es Kremen-1 o Kremen-2, la IE-BP puede comprender o consistir en un ligando de Kremen (por ejemplo, DKK1) o proteína de unión a Kremen de la misma. Como otro ejemplo, si el IE es una molécula receptora tal como ASGR1, la IE-BP puede comprender o consistir en un ligando específico para el receptor (por ejemplo, asialoorosomucoide [ASOR] o Beta-GalNAc) o parte de unión a receptor de la misma.

Las proteínas efectoras de internalización que se internalizan indirectamente en una célula incluyen proteínas y polipéptidos que no se internalizan por sí mismas, pero que quedan internalizadas en una célula después de su unión a o asociación de otro modo con una segunda proteína o polipéptido que se internaliza directamente en la célula. Las proteínas que se internalizan indirectamente en una célula incluyen, por ejemplo, ligandos solubles que pueden unirse a una molécula receptora expresada en la superficie celular de internalización. Un ejemplo no limitante de un ligando soluble que se internaliza (indirectamente) en una célula mediante su interacción con una molécula receptora expresada en la superficie celular de internalización es transferrina. En casos en los que el IE es transferrina (u otra proteína internalizada indirectamente), la unión de la IE-BP al IE, y la interacción del IE con el receptor de transferrina (u otra molécula receptora expresada en la superficie celular de internalización), provoca que la IE-BP completa, y cualquier molécula asociada con la misma (por ejemplo, la LSD-RP), quede internalizada en la célula simultáneamente con la internalización del IE y su compañero de unión.

En aquellos casos en que el IE se internaliza indirectamente en una célula, la IE-BP puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a IE, o un receptor o parte de un receptor que interactúa específicamente con la proteína efectora soluble. Por ejemplo, si el IE es una citocina, la IE-BP puede comprender o consistir en el receptor de citocinas correspondiente o parte de unión a ligando del mismo.

Un IE de ejemplo es CD63, que es un miembro de la superfamilia de tetraspanina de proteínas de superficie celular que abarca la membrana celular cuatro veces. CD63 se expresa en casi todos los tejidos y se cree que está implicada en la formación y estabilización de los complejos de señalización. CD63 se localiza en la membrana celular, la membrana lisosómica y la membrana endosómica tardía. Se sabe que CD63 se asocia con integrinas y puede estar implicada en la transición epitelial-mesenquimatoso. Véanse H. Maecker *et al.*, "The tetraspanin superfamily: molecular facilitators", 11(6) FASEB J. 428-42, mayo de 1997; y 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. En la presente invención, el efector de internalización es CD63.

Otro IE de ejemplo es la proteína 2 similar a precursor de amiloide beta (A4) ("APLP2"), un miembro expresado de forma ubicua de la familia APP (proteína precursora amiloide). La APLP2 es una proteína unida a membrana que se sabe que interactúa con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I (por ejemplo, Kd). Se une a Kd en la superficie celular y se internaliza de una manera dependiente de clatrina con Kd a remolque. Véase 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).

Otro IE de ejemplo es el receptor de prolactina (PRLR). El receptor de prolactina es un miembro de la familia de receptores de citocinas de tipo I y tras su unión al ligando y la posterior dimerización activa "las tirosina cinasas Jak2, Fyn y Tec, la fosfatasa SHP-2, el factor Vav de intercambio de nucleótidos de guanina y el supresor de señalización SOCS", (véase Clevenger y Kline, "Prolactin receptor signal transduction", 10(10) Lupus 706-18 (2001), resumen). El receptor de prolactina experimenta reciclado endocitótico y puede encontrarse en fracciones lisosómicas. Véanse 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); y Ferland *et al.*, "The effect of chloroquine on lysosomal prolactin receptors in rat liver", 115(5) Endocrinology 1842-9 (1984).

Como se usa en este documento, "reacción inmunológica" en general significa una respuesta inmunológica del paciente a una proteína externa o "no propia". Esta respuesta inmunológica incluye una reacción alérgica y el desarrollo de anticuerpos que impiden la eficacia de la enzima de remplazo. Algunos pacientes pueden no producir nada de la proteína que no funciona, haciendo, por tanto, que la enzima de remplazo sea una proteína "exógena". Por ejemplo, la inyección repetida de GLA recombinante (rGLA) a los pacientes con enfermedad de Fabry que carecen de GLA provoca frecuentemente una reacción alérgica. En otros pacientes, la producción de anticuerpos contra rGLA ha demostrado disminuir la eficacia de la enzima de remplazo en el tratamiento de la enfermedad. Véase, por ejemplo, Tajima *et al.* ("Use of a Modified α -N-Acetylgalactosaminidase (NAGA) in the Development of Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease", 85(5) Am. J. Hum. Genet. 569-580 (2009)), que analiza el uso de NAGA modificada como "isozima" para reemplazar GLA. La NAGA modificada no tiene reactividad cruzada inmunológica con GLA, y "no reacciona contra el suero de un paciente con enfermedad de Fabry tratado de manera recurrente con una GLA recombinante". *Id.*, resumen.

El término "proteína" significa cualquier polímero de aminoácidos que tenga más de aproximadamente 20 aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces amida. Las proteínas contienen una o más cadenas poliméricas de aminoácidos, en general conocidas en la técnica como "polipéptidos". Por tanto, un polipéptido puede ser una proteína y una proteína puede contener múltiples polipéptidos para formar una sola biomolécula que funcione. Puede haber puentes disulfuro (es decir, entre residuos de cisteína para formar cistina) presentes en algunas proteínas. Estos enlaces covalentes pueden estar dentro de una sola cadena polipeptídica o entre dos cadenas polipeptídicas individuales. Por ejemplo, los puentes disulfuro son esenciales para una estructura y función apropiadas de la insulina, inmunoglobulinas, protamina y similares. Para una revisión reciente de la formación de enlaces disulfuro, véase Oka y Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum", 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013).

Además de la formación de enlaces disulfuro, las proteínas pueden estar sometidas a otras modificaciones postraduccionales. Esas modificaciones incluyen lipidación (por ejemplo, miristoilación, palmitoilación, farnesoilación, geranilgeranilación y formación de anclajes de glucosilfosfatidilinositol (GPI)), alquilación (por ejemplo, metilación), acilación, amidación, glucosilación (por ejemplo, adición de grupos glucosilo en arginina, asparagina, cisteína, hidroxilisina, serina, treonina, tirosina y/o triptófano) y fosforilación (es decir, la adición de un grupo fosfato a serina, treonina, tirosina y/o histidina). Para una revisión reciente sobre la modificación postraduccionales de las proteínas producidas en eucariotas, véanse Mowen y David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling", 15(6) *Nat Immunol* 512-20 (2014); y Blixt y Westerlind, "Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)", 18 *Curr Opin Chem Biol.* 62-9 (2014).

Las inmunoglobulinas son proteínas que tienen múltiples cadenas polipeptídicas y amplias modificaciones postraduccionales. La proteína inmunoglobulina canónica (por ejemplo, IgG) comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro cistina, y las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante dos enlaces disulfuro cistina. Las inmunoglobulinas producidas en sistemas de mamífero también se glucosilan en diversos residuos (por ejemplo, en residuos de asparagina) con diversos polisacáridos y pueden diferir de una especie a otra, lo que puede afectar a la antigenicidad por anticuerpos terapéuticos (véase Butler y Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", 30 *Curr Opin Biotech* 107-112 (2014)).

Como se usa en este documento, "proteína" incluye proteínas bioterapéuticas, proteínas recombinantes usadas en investigación o tratamiento, proteínas de retención y otras proteínas de fusión de Fc, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpo, nanocuerpos, quimeras de anticuerpo recombinante, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Las proteínas pueden producirse usando sistemas de producción basados en células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de insectos, sistemas de levadura (por ejemplo, *Pichia* sp.), sistemas de mamífero (por ejemplo, células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). Para una revisión reciente que analiza las proteínas bioterapéuticas y su producción, véase Ghaderi *et al.*, "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation", 28 *Biotechnol Genet Eng Rev.* 147-75 (2012).

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de la cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de la cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3. La expresión anticuerpo "de alta afinidad" se refiere a aquellos anticuerpos que tienen una afinidad de unión a su diana de al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-10} M; al menos 10^{-11} M; o al menos 10^{-12} M, medida por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad en solución.

La expresión "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo que puede unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos comprenden en general dos cadenas pesadas diferentes, uniéndose específicamente cada cadena pesada a un epítipo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (por ejemplo, antígenos) o en la misma molécula (por ejemplo, en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico puede unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo en general será al menos uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud inferior a la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítipo, y viceversa. Los epítopos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o una diferente (por ejemplo, en la misma proteína o una diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de la cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno pueden fusionarse con secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes regiones constantes de la cadena pesada, y dichas secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas que tienen cada una tres CDR de la cadena pesada, seguidas de (extremo N a extremo C) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a antígeno, pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítopos unidos por las regiones de unión a antígeno de la cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y posibilitar la unión de una o las dos cadenas pesadas a uno o dos epítopos.

La expresión "cadena pesada", o "cadena pesada de inmunoglobulina" incluye una secuencia de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo y, salvo que se especifique de otro modo incluye un dominio variable de la cadena pesada. Los dominios variables de la cadena pesada incluyen tres CDR de la cadena pesada y cuatro regiones FR, salvo que se especifique de otro modo. Los fragmentos de las cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y combinaciones de las mismas. Una cadena pesada típica tiene, después del dominio variable (de extremo N a extremo C), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que puede reconocer específicamente un antígeno (por ejemplo, reconocer el antígeno con una KD en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que se puede expresar y secretar de una célula y que comprende al menos una CDR.

La expresión "cadena ligera" incluye una secuencia de la región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, salvo que se especifique de otro modo, incluye las cadenas ligeras kappa y lambda humanas. Los dominios variables de la cadena ligera (VL) típicamente incluyen tres CDR de la cadena ligera y cuatro regiones flanqueantes (FR), salvo que se especifique de otro modo. En general, una cadena ligera de longitud completa incluye, del extremo amino al extremo carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y un dominio constante de la cadena ligera. Las cadenas ligeras que pueden usarse incluyen, por ejemplo, aquellas que no se unen selectivamente al primer o segundo antígeno unido selectivamente por la proteína de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen las que pueden identificarse cribando las cadenas ligeras empleadas más habitualmente en las colecciones de anticuerpos existentes (colecciones líquidas o *in silico*), donde las cadenas ligeras no interfieren sustancialmente con la afinidad y/o selectividad de los dominios de unión a antígeno de las proteínas de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen aquellas que pueden unirse a uno o ambos epítomos que se unen por las regiones de unión a antígeno de la proteína de unión a antígeno.

La expresión "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o cadena pesada (modificada según se desee) de inmunoglobulina que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia, del extremo N al extremo C (salvo que se indique de otro modo): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos que puede plegarse en un dominio canónico (VH o VL) que tiene una estructura doble de lámina beta en la que las láminas beta se conectan por un enlace disulfuro entre un residuo de una primera lámina beta y una segunda lámina beta.

La expresión "región determinante de la complementariedad", o el término "CDR", incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de los genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparece entre dos regiones flanqueantes en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T). Una CDR puede estar codificada por, por ejemplo, una secuencia de la línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada y, por ejemplo, por un linfocito B virgen o maduro o un linfocito T. En algunos casos (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no están contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada), sino que son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de linfocitos B, por ejemplo, como resultado de corte y empalme o conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una CDR3 de la cadena pesada).

La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno). Ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión término "fragmento de anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo del anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 241:544-546), que consiste en un dominio VH, (vi) una CDR aislada y (vii) un scFv, que consiste en dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, unidos por un conector sintético para formar una sola cadena proteínica en que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes. Otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como diacuerpos también están incluidas en el término "anticuerpo" (véanse, por ejemplo, Holliger *et al.* (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123).

La expresión "proteína que contiene Fc" incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas y otras proteínas de unión que comprenden al menos una parte funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Una "parte funcional" se refiere a una región CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor de Fc (por ejemplo, un FcγR; o un FcRn, es decir, un receptor de Fc neonatal) y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene eliminaciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que lo hacen incapaz de unirse a algún receptor de Fc y también incapaz de activar el complemento, la región CH2 y CH3 no son funcionales.

Las proteínas que contienen Fc pueden comprender modificaciones en los dominios de inmunoglobulina, incluyendo donde las modificaciones afectan a una o más funciones efectoras de la proteína de unión (por ejemplo, modificaciones que afectan a la unión a FcγR, la unión a FcRn y, por tanto, la semivida, y/o actividad CDC). Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, las siguientes modificaciones y combinaciones de las mismas, con referencia a la numeración EU de una región constante de inmunoglobulina: 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 y 439.

5 Por ejemplo, y no a modo de limitación, la proteína de unión es una proteína que contiene Fc y muestra semivida en suero potenciada (en comparación con la misma proteína que contiene Fc sin la una o más modificaciones indicadas) y tiene una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en 428 y/o 433 (por ejemplo, L/R/SI/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en 250 y/o 428; o una modificación en 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En otro ejemplo, la modificación puede comprender una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 2591 (por ejemplo, V2591) y una 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una 434 (por ejemplo, 434Y); una 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

15 La expresión "proteína de unión a antígeno", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido o proteína (uno o más polipéptidos en complejo en una unidad funcional) que reconoce específicamente un epítipo en un antígeno, tal como un antígeno específico de célula y/o un antígeno diana. Una proteína de unión a antígeno puede ser multiespecífica. El término "multiespecífica" con referencia a una proteína de unión a antígeno significa que la proteína reconoce diferentes epítipos, en el mismo antígeno o en diferentes antígenos. Una proteína de unión a antígeno multiespecífica puede ser un solo polipéptido multifuncional o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que se asocian covalente o no covalentemente entre sí. La expresión "proteína de unión a antígeno" incluye anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden unirse a o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión génica, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares distintas, tal como una proteína o fragmento de la misma para producir una molécula de unión a antígeno biespecífica o multiespecífica con una segunda especificidad de unión.

30 Como se usa en este documento, el término "epítipo" se refiere a la parte del antígeno que se reconoce por el polipéptido de unión a antígeno multiespecífico. Un solo antígeno (tal como un polipéptido antigénico) puede tener más de un epítipo. Los epítipos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítipos funcionales en general son un subconjunto de epítipos estructurales y se definen como aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción entre el polipéptido de unión a antígeno y el antígeno. Los epítipos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos de aminoácidos no lineales. En determinados casos, los epítipos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en determinados casos, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Los epítipos formados por aminoácidos contiguos típicamente se retienen al exponerse a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden al tratarlos con disolventes desnaturizantes.

45 El término "dominio" se refiere a cualquier parte de una proteína o polipéptido que tiene una función o estructura particular. Preferiblemente, los dominios de la presente invención se unen a antígenos específicos de célula o diana. Los dominios de unión a antígeno específico de célula o antígeno diana y similares, como se usan en este documento, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o genomanipulado que se una específicamente a un antígeno.

50 El término "semicuerpo" o "semianticuerpo", que se usan indistintamente, se refiere a la mitad de un anticuerpo, que contiene esencialmente una cadena pesada y una cadena ligera. Las cadenas pesadas de anticuerpo pueden formar dímeros, por tanto, la cadena pesada de un semicuerpo puede asociarse con la cadena pesada asociada con una molécula diferente (por ejemplo, otro semicuerpo) u otro polipéptido que contiene Fc. Dos dominios Fc ligeramente diferentes pueden "heterodimerizar" como en la formación de anticuerpos biespecíficos u otros heterodímeros, -trímeros, -tetrámeros y similares. Véanse, Vincent y 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); y Shimamoto *et al.*, "Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies", 4(5) *MAbs* 586-91 (2012).

60 En un caso, el dominio variable del semicuerpo reconoce específicamente el efector de internalización y el dominio Fc del semicuerpo dimeriza con la proteína de fusión de Fc que comprende una enzima de remplazo (por ejemplo, un pepticuerpo) Id, 586.

65 "Ala-glucosidasa" (o "α-glucosidasa"), "actividad α-glucosidasa", "GAA" y "actividad GAA" se usan indistintamente y se refieren a cualquier proteína que facilite la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa de glucógeno y almidón en glucosa. GAA también se conoce entre otras cosas como EC 3.2.1.20, maltasa, glucoinvertasa, glucosidosacarasa, maltasa-glucoamilasa, alfa-glucopiranosidasa, glucosidoinvertasa, alfa-D-glucosidasa, alfa-glucósido hidrolasa, alfa-1,4-glucosidasa y alfa-D-glucósido glucohidrolasa. GAA puede encontrarse en el lisosoma y en el borde en cepillo del intestino delgado. Las proteínas que tienen enfermedad de Pompe carecen de α-glucosidasa lisosómica funcional.

Véanse, S. Chiba, "Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase", 61(8) Biosci. Biotechnol. Biochem. 1233-9 (1997); y Hesselink *et al.*, "Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II", 1637(2) Biochim. Biophys. Acta. 164-70 (2003).

5 "Alfa-galactosidasa A"(o "α-galactosidasa A"), "actividad α-galactosidasa A", "α-galactosidasa", "actividad α-galactosidasa", "GLA" y "actividad GLA" se usan indistintamente y se refieren a cualquier proteína que facilite la hidrólisis de restos α-galactosilo terminales de glucolípidos y glucoproteínas y también hidroliza α-D-fucósidos. GLA también se conoce entre otras cosas como EC 3.2.1.22, melibiasa, α-D-galactosidasa, α-galactosidasa A, α-galactósido galactohidrolasa, α-D-galactósido galactohidrolasa. GLA es una enzima lisosómica codificada por el gen
10 GLA ligado al X. Los defectos en GLA pueden dar lugar a enfermedad de Fabry, en que el glucolípido conocido como globotriaosil ceramida (también conocido como Gb3, GL-3 o trihexósido de ceramida) se acumula dentro de los vasos sanguíneos (es decir, vasculopatía prominente), provocando dolor y alteración en la función del riñón, el corazón, la piel y/o los tejidos cerebrovasculares y otros tejidos y órganos. Véase, por ejemplo, Prabakaran *et al.* "Mannose 6-phosphate receptor and sortilin mediated endocytosis of α-galactosidase A in kidney endothelial cells", 7(6) PLoS One
15 e39975 pág. 1-9 (2012).

En un aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un paciente (o sujeto) que padece una enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD) administrando al paciente un "complejo bioterapéutico". El complejo bioterapéutico entra en las células del paciente y suministra a los lisosomas una enzima o actividad enzimática que
20 reemplaza (es decir, "enzima de reemplazo") la enzima o actividad enzimática que está asociada con la LSD (es decir, "enzima endógena").

En la presente invención, se proporciona un complejo bioterapéutico para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece una LSD, en el que el método comprende administrar al sujeto el complejo bioterapéutico y en el
25 que el complejo bioterapéutico entra en un lisosoma de una célula del sujeto y proporciona una actividad enzimática ("enzima de reemplazo") que reemplaza la actividad enzimática que está asociada con la LSD ("enzima endógena"), en el que el complejo bioterapéutico comprende: (a) la enzima de reemplazo seleccionada del grupo que consiste en α-galactosidasa, β-galactosidasa, α-glucosidasa (GAA), β-glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β-hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α-iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil-α-glucosaminidasa, α-glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β-glucuronidasa, hialuronidasa y lipasa ácida lisosómica (LAL), y (b) una proteína de unión a antígeno que se une a un efector de internalización, en el que el efector de internalización es CD63.

35 Las LSD incluyen esfingolipidosis, mucopolisacaridosis y enfermedades del almacenamiento de glucógeno. En algunos casos, la LSD es una cualquiera o más de enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher de tipo I, enfermedad de Gaucher de tipo II, enfermedad de Gaucher de tipo III, enfermedad de Niemann-Pick de tipo A, enfermedad de Niemann-Pick de tipo B, gangliosidosis de GM1, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Tay-Sachs, deficiencia de activador de GM2, gangliosidosis de GM3, leucodistrofia metacromática, deficiencia de activador de esfingolípidos, enfermedad de Scheie, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Hurler, enfermedad de Hunter, Sanfilippo A, Sanfilippo B, Sanfilippo C, Sanfilippo D, síndrome de Morquio A, síndrome de Morquio B, enfermedad de Maroteaux-Lamy, enfermedad de Sly, MPS IX y enfermedad de Pompe. En un caso específico, la LSD es enfermedad de Fabry. En otro caso, la LSD es enfermedad de Pompe.

45 En algunos casos, el complejo bioterapéutico comprende (a) la enzima de reemplazo y (b) una molecular que se une a un efector de internalización. En algunos casos, la enzima de reemplazo es una cualquiera o más de α-galactosidasa, β-galactosidasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β-hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α-iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil-α-glucosaminidasa, α-glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β-glucuronidasa y hialuronidasa.
50

En algunos casos, el paciente puede no generar suficiente proteína de modo que una enzima de reemplazo se reconoce por el paciente como "no propia" y deriva en una reacción inmunológica después de administrar una enzima de
55 reemplazo. Esto no es deseable. Por lo tanto, en algunos casos, la enzima de reemplazo se diseña o produce de manera que evite inducir una reacción inmunológica en el sujeto. Una de estas soluciones es usar una "isozima" como enzima de reemplazo. Una isozima es suficientemente próxima a una proteína "propia" del paciente, pero tiene la actividad suficiente de la enzima de reemplazo para mejorar los síntomas de la LSD.

60 En un caso particular, en que la LSD es enfermedad de Pompe y la enzima endógena es α-glucosidasa (GAA), la isozima puede ser una cualquiera de α-glucosidasa ácida, sacarasa-isomaltasa (SI), maltasa-glucoamilasa (MGAM), glucosidasa II (GANAB) y α-glucosidasa neutra (C GNAC). En otro caso particular, en que la LSD es enfermedad de Fabry y la enzima endógena es α-galactosidasa A (GLA), la isozima puede ser una α-N-acetilgalactosaminidasa genomanipulada para que tenga actividad GLA.
65

El complejo bioterapéutico tiene un componente de proteína de unión al efector de internalización que posibilita la

- captación de la enzima de remplazo en la célula. Por tanto, en algunos casos, el efector de internalización puede ser CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína 2 similar a proteína precursora de amiloide (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR (receptor de prolactina), MAL (proteína mielina y de linfocitos, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H⁺ de tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatión, receptor de leptina, receptor depurador, SCARA1-5, SCARB1-3 y CD36. En determinados casos, el efector de internalización es un internalizador específico de riñón, tal como CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de transportadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa) y UMOD (uromodulina). En otros determinados casos, el efector de internalización es un internalizador específico de músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), cadherina m, CD9, MuSK (cinasa específica de músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad gama-1 del canal de calcio de tipo L), CACNAIS (subunidad alfa-15 del canal de calcio de tipo L), CACNG6 (subunidad gama-6 del canal de calcio de tipo L), SCN1B (subunidad beta-1 del canal de sodio), CHRNA1 (subunidad alfa del receptor de ACh), CHRND (subunidad delta del receptor de ACh), LRRC14B (proteína 14B que contiene repetición rica en leucina) y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye). En algunos casos específicos, el efector de internalización es ITGA7, CD9, CD63, APLP2 o PRLR. En la presente invención, el efector de internalización es CD63.
- En algunos casos, la proteína de unión al efector de internalización comprende una proteína de unión a antígeno, que incluye, por ejemplo, una molécula de fusión con receptor, una molécula de retención, una molécula de fusión de Fc con receptor, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula Fv monocatenaria (scFv), un fragmento dAb, una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo de dominio eliminado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con CDR injertada, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un nanocuerpo, un nanocuerpo monovalente, un nanocuerpo bivalente, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), un anticuerpo de camélido (anticuerpo homodimérico de cadena pesada VHH) y un dominio IgNAR variable de tiburón.
- En un caso, la entidad molecular que se une al efector de internalización es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo u otra proteína de unión a antígeno. Por ejemplo, la entidad molecular puede ser un anticuerpo biespecífico, en que un brazo se une al efector de internalización (por ejemplo, ITGA7, CD9, CD63, PRLR, APLP2) y el otro brazo se une a la enzima de remplazo. Aquí, el complejo bioterapéutico comprende el anticuerpo biespecífico y la enzima de remplazo (fig. 1A). En un caso específico, la enfermedad tratada es enfermedad de Fabry y el complejo bioterapéutico comprende GLA y un anticuerpo biespecífico que se une a GLA y CD63. En otros casos específicos, la enfermedad tratada es enfermedad de Pompe y el complejo bioterapéutico comprende GAA y un anticuerpo biespecífico que se une a GAA y CD63.
- En otro caso, la entidad molecular que se une al efector de internalización comprende un semianticuerpo y la enzima de remplazo contiene un dominio Fc (polipéptido de fusión de enzima-Fc). En un caso, el dominio Fc del polipéptido de fusión de enzima-Fc se asocia con el dominio Fc del semicuerpo específico de efector de internalización para formar el complejo bioterapéutico (fig. 1B).
- En otros casos, la enzima de remplazo se une covalentemente a la proteína de unión al efector de internalización. El ejemplo de fusión enzima-Fc:semicuerpo descrito en el párrafo previo (véase también la fig. 1B) está dentro de esta clase, ya que el dímero de Fc puede fijarse mediante uno o más puentes disulfuro. El enlace covalente entre el dominio o polipéptido de actividad enzimática y el dominio o polipéptido de unión de internalización puede ser cualquier tipo de enlace covalente, es decir, cualquier enlace que implique compartir electrones. En algunos casos, el enlace covalente es un enlace peptídico entre dos aminoácidos, de modo que la enzima de remplazo y la proteína de unión al efector de internalización en su totalidad o en parte formen una cadena polipeptídica continua, como en una proteína de fusión. En algunos casos, la parte de enzima de remplazo y la proteína de unión al efector de internalización se unen directamente. En otros casos, se usa un conector para anclar las dos partes. Véase, Chen *et al.*, "Fusion protein linkers: propiedad, design and functionality", 65(10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013).
- En un caso particular, la enzima de remplazo se une covalentemente al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo antiefecto de internalización (véase la fig. 1C) o al extremo C de la cadena ligera (fig. 1E). En otro caso particular, la enzima de remplazo se une covalentemente al extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo antiefecto de internalización (véase la fig. 1D) o al extremo N de la cadena ligera (fig. 1F).
- En algunos casos, especialmente cuando la enzima de remplazo normalmente no se proteolíticamente en el lisosoma, se añade un conector escindible a esos casos del complejo bioterapéutico que comprenden una fusión de anticuerpo-enzima. En algunos casos, se inserta un conector escindible por catepsina entre el anticuerpo y la enzima de remplazo para facilitar la eliminación del anticuerpo en el lisosoma para a) posiblemente ayudar a conservar la actividad enzimática eliminando el anticuerpo estéricamente grande y b) posiblemente aumentar la semivida lisosómica de la enzima.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende una actividad enzimática y una proteína de unión a antígeno, en la que la enzima está asociada con una enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD) y proteína de unión al efector de internalización. Las enzimas (que incluyen proteínas que no son catalíticas por sí mismas) asociadas con enfermedades del almacenamiento lisosómico incluyen, por ejemplo, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina *N*-sulfatasa, *N*-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida *N*-acetiltransferasa, *N*-acetilglucosamina-6-sulfatasa, *N*-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, *N*-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa y similares. En la presente invención, se proporciona una composición que comprende una enzima asociada con una LSD y una proteína de unión a antígeno, en la que la enzima se selecciona del grupo que consiste en α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa (GAA), β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina *N*-sulfatasa, *N*-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida *N*-acetiltransferasa, *N*-acetilglucosamina-6-sulfatasa, *N*-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, *N*-acetilglucosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa y lipasa ácida lisosómica (LAL), en la que la proteína de unión a antígeno se une a un efector de internalización y en la que el efector de internalización es CD63.

Las proteínas de unión al efector de internalización, por ejemplo, incluyen una molécula de fusión a receptor, una molécula de retención, una molécula de fusión de Fc con receptor, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula Fv monocatenaria (scFv), un fragmento dAb, una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo de dominio eliminado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con CDR injertada, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un nanocuerpo, un nanocuerpo monovalente, un nanocuerpo bivalente, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), un anticuerpo de camélido (anticuerpo homodimérico de cadena pesada VHH), un dominio IgNAR variable de tiburón, otras proteínas de unión a antígeno y similares.

Los efectores de internalización incluyen, por ejemplo, CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína 2 similar a proteína precursora de amiloide (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR (receptor de prolactina), MAL (proteína mielina y de linfocitos, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H⁺ de tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatión, receptor de leptina, receptor depurador, SCARA1-5, SCARB1-3 y CD36. En determinados casos, el efector de internalización es un internalizador específico de riñón, tal como CDH16 (Cadheri-16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de transportadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa) y UMOD (uromodulina). En otros determinados casos, el efector de internalización es un internalizador específico de músculo, tal como BMPR1A (receptor 1A de proteína morfogenética ósea), cadherina m, CD9, MuSK (cinasa específica de músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad gama-1 del canal de calcio de tipo L), CACNAIS (subunidad alfa-15 del canal de calcio de tipo L), CACNG6 (subunidad gama-6 del canal de calcio de tipo L), SCN1B (subunidad beta-1 del canal de sodio), CHRNA1 (subunidad alfa del receptor de ACh), CHRND (subunidad delta del receptor de ACh), LRRC14B (proteína 14B que contiene repetición rica en leucina) y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye). En algunos casos específicos, el efector de internalización es ITGA7, CD9, CD63, ALPL2 o PPRLR. En las composiciones de la presente invención, el efector de internalización es CD63.

En algunos casos, la enzima se une covalentemente (es decir, electrones compartidos entre los átomos) a la proteína de unión a antígeno. En un caso particular, la proteína de unión al efector de internalización consiste en o contiene un semicuerpo; la enzima se fusiona a un dominio de fusión de Fc (por ejemplo, en el extremo C); y el dominio Fc que se une covalentemente a la enzima se asocia con el dominio Fc de la proteína de unión a antígeno, de modo que la asociación contiene uno o más puentes disulfuro. Este caso particular se representa esquemáticamente en la figura 1B.

En otro caso particular, la proteína de unión al efector de internalización (IE-BP) consiste en o contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, y la enzima se une covalentemente al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En un caso específico, la IEBP es un anticuerpo y la enzima se une covalentemente (directamente a través de un enlace peptídico o indirectamente mediante un conector) al extremo C de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo (figura 1C o 1E, respectivamente). En otro caso específico, la IEBP es un anticuerpo y la enzima se une covalentemente (directamente a través de un enlace peptídico o indirectamente mediante un conector) al extremo N de la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo (figura 1D o 1F, respectivamente).

En algunos casos, la enzima y la IEBP no se unen covalentemente, pero se combinan en una mezcla. La IEBP y la enzima pueden asociarse a través de fuerzas no covalentes para formar un complejo. Por ejemplo, en un caso particular, la IEBP es un anticuerpo biespecífico en que un brazo del anticuerpo se une al efector de internalización y el otro brazo se une a la enzima. Este caso se representa esquemáticamente en la figura 1A.

En algunos casos, la enzima es GAA o comprende actividad GAA (por ejemplo, una isozima con actividad GAA) y el

efector de internalización es ITGA7, CDH15, CD9, CD63, APLP2 o PRLR. En un caso particular, la enzima es GAA o comprende actividad GAA, el dominio de internalización es CD63 y la IEBP es un anticuerpo biespecífico con especificidad por CD63 y GAA.

- 5 En algunos casos, la enzima es GLA o comprende actividad GLA (por ejemplo, una isozima con actividad GAA) y el efector de internalización es ITGA7, CD9, CD63, APLP2 o PRLR. En un caso particular, la enzima es GLA o comprende actividad GLA, el dominio de internalización es CD63 y la IEBP es un anticuerpo biespecífico con especificidad por CD63 y GLA.
- 10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para seleccionar o cribar un complejo bioterapéutico que contiene una enzima y una proteína de unión a antígeno que reemplaza de forma eficaz una enzima en un paciente que lo necesita. En un caso, el complejo bioterapéutico se administra a un sistema modelo y el sistema modelo se evalúa para la actividad de la enzima reemplazada. En un caso, el sistema modelo es un animal que carece de la expresión de la enzima y expresa un antígeno equivalente de la proteína de unión a antígeno. En un caso, el modelo animal es un ratón que expresa un equivalente humanizado de la proteína de unión a antígeno y con una inactivación del gen que codifica la enzima.

En un caso, el ratón contiene una inactivación de una enzima lisosómica tal como α -galactosidasa A, ceramidasa, β -glucosidasa, activador de saposina-C, esfingomielinasa, β -galactosidasa, β -hexosaminidasa A y B, β -hexosaminidasa A, proteína activadora de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa A, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparano N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, acetil-CoA; α -glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B), β -glucuronidasa, hialuronidasa, α -glucosidasa 2 o lipasa ácida lisosómica. En un caso, el ratón con inactivación también expresa la versión humana o humanizada del efector de internalización (es decir, equivalente de la proteína de unión a antígeno). Los efectores de internalización humanos incluyen CD63, MHC-I, Kremen-1, Kremen-2, LRP5, LRP6, LRP8, receptor de transferrina, receptor de LDL, receptor de proteína 1 relacionada con LDL, ASGR1, ASGR2, proteína 2 similar a proteína precursora de amiloide (APLP2), receptor de apelina (APLNR), PRLR (receptor de prolactina), MAL (proteína mielina y de linfocitos, también conocida como VIP17), IGF2R, ATPasa H⁺ de tipo vacuolar, receptor de toxina diftérica, receptor de folato, receptores de glutamato, receptor de glutatión, receptor de leptina, receptor depurador, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36, CDH16 (Cadheri- 16), CLDN16 (Claudn-16), KL (Klotho), PTH1R (receptor de hormona paratiroidea), SLC22A13 (miembro 13 de la familia 22 de transportadores de solutos), SLC5A2 (cotransportador 2 de sodio/glucosa), UMOD (uromodulina), BMPR1A (receptor 1A de la proteína morfogenética ósea), cadherina M, CD9, MuSK (cinasa específica de músculo), LGR4/GPR48 (receptor 48 acoplado a proteína G), receptor colinérgico (nicotínico) alfa 1, CDH15 (Cadheri-15), ITGA7 (integrina alfa-7), CACNG1 (subunidad gama-1 del canal de calcio de tipo L), CACNAIS (subunidad alfa-15 del canal de calcio de tipo L), CACNG6 (subunidad gama-6 del canal de calcio de tipo L), SCN1B (subunidad beta-1 del canal de sodio), CHRNA1 (subunidad alfa del receptor de ACh), CHRND (subunidad delta del receptor de ACh), LRRC14B (proteína 14B que contiene repetición rica en leucina) y POPDC3 (proteína 3 que contiene dominio Popeye).

40 Los métodos de generación de ratones que expresan receptores humanos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Ma *et al.*, Drug Metab. Dispos. diciembre de 2008; 36(12):2506-12; y la patente de Estados Unidos n.º 8 878 001 B2. Los métodos de generación de ratones de eliminación enzimática también son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kuemmel *et al.*, Pathol. Res. Pract. 1997;193(10):663-71.

45 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente los métodos descritos en este documento. Estos ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplos

50 Ejemplo 1: Proteína de fusión de α -glucosidasa lisosómica

Se diseñaron sistemas de suministro guiados por anticuerpos independientes de CI-MPR para suministrar enzimas al lisosoma. La tabla 3 enumera las construcciones moleculares, junto con sus niveles de expresión en células CHO (véase la figura 2), la actividad GAA aproximada determinada usando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil- α -glucósido (véase la figura 3) y la dirección lisosómica, internalización y estado de actividad (véanse las figuras 4 y 5).

Ejemplo 2: Internalización de construcción de GAA

60 La internalización de las construcciones de GAA se determinó midiendo la actividad enzimática en lisados celulares. Se añadieron diversas construcciones de GAA recombinante (SEQ ID NO:1) a HEK293, mioblastos esqueléticos humanos (Lonza, Walkersville, MD) o mioblastos de ratón C2C12. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos 24 horas antes de la adición de las construcciones de enzima. Las construcciones de enzima se añadieron al medio de las células durante 18 horas. Las células entonces se lavaron ampliamente en PBS enfriado en hielo y se lisaron en NP-40 al 0,5 % enfriado en tampón de ensayo (acetato de sodio 0,2 M, cloruro de potasio 0,4 M, pH 4,3).

65 Los lisados se centrifugaron a 15.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y los sobrenadantes se incubaron con 4-metilumbeliferil alfa-D-glucósido, un sustrato de GAA, en tampón de ensayo durante 1 hora en placas de 96 pocillos.

Las reacciones se detuvieron usando tampón de glicina-carbonato a pH 10,7. La fluorescencia se leyó en un lector de placa a 360 nm de excitación y 450 nm de emisión. La concentración proteínica del lisado se ensayo usando un kit de ensayo de ácido bicinconínico. Se usó 4-metilumbeliferona como patrones. La actividad GAA se presentó como nmoles de 4-metilumbeliferona liberados por hora por mg de proteína purificada. Véase 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).

La internalización de la actividad GAA se evaluó en presencia o ausencia de manosa 6-fosfato (M6P) (fig. 4A) y en presencia o ausencia de CD63. Algunas enzimas lisosómicas se dirigen al lisosoma mediante un resto de M6P fijado que se une al receptor de manosa 6-fosfato (MPR). Por lo tanto, se evaluó la mejora de CI-MPR sobre la internalización de anti-CD63-GAA incluyendo M6P 5 mM, que compite por la unión a MPR, en el medio de cultivo de HEK durante la captación de anti-CD63-GAA. La inclusión de M6P no tuvo efecto sobre la captación de anti-CD63-GAA, como se determina por la detección de 4-metilumbeliferona en lisados celulares (figura 4A). Sin embargo, la captación de anti-CD63-GAA fue dependiente de la presencia de CD63 (figura 4B). Se captó anti-CD63 • GAA por células HEK que expresan CD63, pero no se captó por células HEK que portan una inactivación del gen CD63 (figura 4B).

Tabla 3

Construcción	Expresión en CHO	Actividad GAA (<i>in vitro</i>)	Dirección			Colocalización lisosómica
			Actividad GAA	Dependiente de MPR	Dependiente de CD63	
IgG4 anti-CD63	++	NA	No	No	Sí	Sí
Fusión de GAA-Fc (véase la fig. 1B(i))	+	+	NA	NA	NA	NA
GAA-Fc•anti-CD63 (véase la fig. 1B)	NA	+	Sí	No	Sí	NP
Anti-CD63-GAA (véase la fig. 1C)	++	+	Sí	No	Sí	Sí
GAA-anti-CD63 (véase la fig. 1D)	+	+	Sí	No	Sí	NP
GAA	NP	+	Sí	Sí	No	NP
GLA	NA	-	NA	Sí	No	NP
•GLA•anti-CD63	NA	-	NA	No	Sí	NP

NA = No aplicable; NT = No ensayado

Ejemplo 3: Captación de construcción de GAA por mioblastos

La capacidad de los mioblastos esqueléticos, que son un tipo de tejido de interés en la enfermedad de Pompe, de captar diversas construcciones de GAA, se ensayó. Se cultivaron mioblastos esqueléticos humanos en presencia de diversas concentraciones (es decir, 25 nM, 50 nM y 200 nM) de (1) anti-CD63-GAA, (2) anti-CD63-GAA más M6P 5 mM, (3) myc-GAA y (4) myc-GAA más M6P 5 mM. La internalización de las construcciones de GAA se dedujo del nivel de actividad GAA detectado en lisados celulares, como se indica por la acumulación de 4-metilumbeliferona, se evaluó. La captación de anti-CD63-GAA 200 nM, que era independiente de MPR, fue más de cinco veces mayor que la captación de myc-GAA, que era dependiente de MPR (figura 5A).

Para determinar la localización subcelular de la construcción anti-CD63-GAA, los mioblastos esqueléticos humanos se tiñeron con anticuerpos anti-IgG humana (para detectar el resto anti-CD63 de la construcción anti-CD63-GAA) y anticuerpos anti-LAMP (para marcar los lisosomas). LAMP, o la glucoproteína de membrana asociada a lisosomas, incluye proteínas de membrana integradas que son específicas de los lisosomas. El experimento de marcaje conjunto demostró que el anti-CD63-GAA se colocalizada con anti-LAMP, lo que indica que anti-CD63-GAA se localiza en los lisosomas.

Asimismo, los mioblastos C2C12 de ratón se pusieron en contacto con las diversas concentraciones, es decir, 25 nM, 50 nM y 200 nM, de (1) anti-CD63-GAA, (2) anti-CD63-GAA más M6P 5 mM, (3) myc-GAA y (4) myc-GAA más M6P 5 mM. La internalización de las construcciones de GAA se dedujo del nivel de actividad GAA detectado en lisados celulares, como se indica por la acumulación de 4-metilumbeliferona, se evaluó. La captación de anti-CD63-GAA 200 nM, que no se vio afectada de forma adversa por M6P, fue más de aproximadamente seis veces a aproximadamente nueve veces mayor que la captación de myc-GAA (figura 5B).

Ejemplo 4: El efecto de anti-CD63-GAA sobre la acumulación de glucógeno

Se evaluó el efecto de anti-CD63-GAA sobre la acumulación de glucógeno en los lisosomas de tres líneas celulares de Pompe diferentes. Las líneas celulares de Pompe se derivaron de fibroblastos obtenidos de pacientes de enfermedad de Pompe infantil grave y contenían mutaciones de inactivación o atenuación en el gen GAA. Las líneas celulares usadas fueron GM20089 (eliminación del exón 18), GM20090 (heterocigoto compuesto en el exón 14 y 16) y GM20090 (heterocigoto compuesto en el exón 2). Estas líneas se obtuvieron de Coriell Institute, Camden, NJ. Véase

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) y; 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). Se usaron fibroblastos dérmicos humanos neonatales (NHDF, Lonza) como control. Todas las líneas celulares de Pompe mostraron acumulación lisosómica de glucógeno (después de 72 hours de privación de glucosa para reducir el glucógeno citoplasmático) aunque había actividad GAA residual (< 0,1 %) presente (figura 6, paneles A y B, respectivamente). El glucógeno se midió usando el kit de ensayo de glucógeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Las células se privaron de glucosa durante aproximadamente 96 horas antes de la lisis para eliminar el glucógeno citoplasmático (véase 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)). Las células se trataron con anti-CD63-GAA (200 nM) o myc-GAA (200 nM) durante 72 horas antes de la lisis. Para todas las líneas celulares de Pompe, el tratamiento con anti-CD63-GAA provocó reducción significativa en la acumulación lisosómica de glucógeno (figura 7), lo que indica que el anti-CD63-GAA dosificado de manera exógena alcanzó el lisosoma y era enzimáticamente activo.

Ejemplo 5: Isozimas de GAA

Para evitar posibles respuestas inmunitarias en pacientes con enfermedad de Pompe a GAA (es decir, material inmunológico de reacción cruzada o CRIM), se investigó el suministro de otras glucosidasas humanas para restablecer la actividad GAA. Se están investigando enzimas no lisosómicas con actividad de hidrólisis de glucógeno similar a GAA (también conocida como α -glucosidasa ácida). Esas enzimas incluyen sacarasa-isomaltasa (SI), maltasa-glucoamilasa (MGAM), glucosidasa II (GANAB) y α -glucosidasa neutra (C GNAC). Estas enzimas y diversas realizaciones recombinantes se describen en Dhital *et al.*, "Mammalian mucosal α -glucosidases coordinate with α -amylase in the initial starch hydrolysis stage to have a role in starch digestion beyond glucogenesis", 8(4) *PLoS One* e625462013 Abr 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); y 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).

Se prepararon las siguientes construcciones de isozima y se expresaron en células CHO: (1) anti-CD63, (2) anti-CD63-NIM-GAM (es decir, la subunidad del extremo N de la maltasa-glucoamilasa ligada al extremo C de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD63) y (3) anti-CD63-CtMGAM. Véase Dhital, 2013. También se genomanipuló otra construcción que expresa una cadena pesada anti-CD63 de ratón fusionada a la subunidad del extremo C de la maltasa-glucoamilasa de ratón (anti-mCD63-mctMGAM) para su uso en modelos de ratón (véase el ejemplo 11).

Ejemplo 6: Proteína de fusión de α -galactosidasa A (GLA) lisosómica

Se construyeron diversas proteínas de fusión que contenían GLA humana (SEQ ID NO:2) y se expresaron en células CHO. Esas construcciones incluían (i) GLA fusionada al extremo C de cadenas pesadas anti-CD63 (anti-CD63-GLA), (ii) GLA fusionada a un Fc de inmunoglobulina (por ejemplo, Fc "botón"), (iii) GLA-anti-CD63 (es decir, GLA fusionada al extremo N de cadenas pesadas anti-CD63) y (iv) fusión de GLA-myc (figura 8). También se genomanipularon proteínas de unión al efector de internalización (IEBP) sin un resto GLA y se expresaron. En un caso, la IEBP era un anticuerpo biespecífico con una mitad que tiene especificidad de unión por CD63 y con otra mitad que tiene especificidad de unión por myc. Se evaluó la actividad enzimática GLA (es decir, la hidrólisis de 4-metilumbeliferil- β -galactopiranosido) para cada proteína de fusión de GLA, cuyos resultados se presentan en la figura 9. Con la excepción de la fusión anti-CD63-GLA C terminal, todas las construcciones mostraron actividad α -galactosidasa (fig. 9). Se describen Fc(botón) en Ridgway *et al.*, "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization", 9(7) *Protein Eng.* 617-621 (1996).

La internalización de cada construcción (o combinación de IEBP y GLA-myc) en células HEK se determinó midiendo la formación de metilumbeliferona a partir de la hidrólisis catalizada por enzima de 4-metilumbeliferil- β -galactopiranosido. Las diversas construcciones se añadieron a células HEK293, que después se incubaron para permitir la endocitosis, después se lavaron y lisaron a pH 4. Se añadió el sustrato de GLA a cada lisado celular y se permitió que prosiguiera la reacción de α -galactosidasa. Los resultados se muestran en la figura 9, que muestra que la proteína de fusión de GLA-anti-CD63 se internalizaba en células HEK. GLA-myc en solitario, es decir, en ausencia de un elemento IEBP, no se captó por células HEK. Sin embargo, se captó en presencia de un anticuerpo biespecífico que se unió a CD63 y se unió al epítipo myc (figura 10).

Ejemplo 7: Captación de proteínas de unión al efector de internalización

La internalización de los anticuerpos anti-CD63 o anti-APLP2 en fracciones celulares de bajo pH se comparó con la

internalización de GLA humana recombinante (rhGLA), que tiene alto contenido de M6P, en fracciones de bajo pH. Cada uno de GLA, anti-CD63 y anti-APLP2 se marcó con el tinte sensible a bajo pH pHrodo® (Invitrogen, Calsbad, CA). Las células HEK, las células HepG2 (carcinoma hepático) y las células PC-3 (cáncer de próstata) se pusieron en contacto con las proteínas marcadas con pHrodo® y se incubaron durante una noche o durante aproximadamente 16 horas. Entonces se tomaron imágenes de las células y se contaron las vesículas fluorescentes. La fluorescencia producida se normalizó de acuerdo con el grado de marcaje para cada proteína. Las células HEK, PC-3 y HepG2 demostraron mayor captación de anti-CD63 y anti-APLP2 frente a rhGLA (figura 11).

Ejemplo 8: Procesamiento de proteína de fusión en lisosoma

Si la construcción de anti-CD63-GAA se procesa proteolíticamente en el lisosoma se ensayó por análisis de transferencia de Western de lisados celulares de Pompe. Se cultivaron células Pompe GM20089 en presencia de anti-CD63-GAA y los posteriores lisados celulares se sometieron a análisis de transferencia de Western reducido usando anticuerpos anti-GAA (figura 12, panel A) o anticuerpo anti-hlgG (figura 12, panel B).

La línea de fibroblastos de enfermedad de Pompe GM20089 de Coriell se sembró en placas de 6 pocillos y se incubó con anti-CD63-GAA durante 18 horas y después se lavó ampliamente con medio. Los pocillos se lisaron en tampón RIPA en diversos puntos temporales, es decir, 0, 24, 48, 72 horas después de la eliminación de anti-CD63-GAA. Los lisados se ensayaron para GAA por transferencia de Western usando un anticuerpo anti-GAA humana (ab113021, Abcam LTD, Cambridge, Reino Unido; figura 12). El anti-CD63-GAA completo e intermedios más pequeños se detectaron en puntos temporales iniciales, y la forma lisosómica madura de 76 kDa de GAA se detectó en todos los puntos temporales después de dosificar anti-CD63-GAA. Esto demuestra que anti-CD63-GAA se internaliza en las células de los pacientes y se procesa correctamente en la forma lisosómica madura de GAA. Además, la semivida de la forma de 76 kDa en las células coincide con otros estudios de internalización de GAA (Maga, J. A. *et al.* Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid α -glucosidase enhances muscle glycogen clearance in Pompe mice. *Journal of Biological Chemistry* 288, 1428-1438 (2013)).

Ejemplo 9: Distribución en tejidos y procesamiento de anti-CD63-GAA

A ratones humanizados en el locus CD63 (véase Valenzuela *et al.*, "High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis", 21 *Nature Biotechnology* 652 - 659 (2003)) se les administró anti-CD63-GAA. Se tomaron muestras de tejido y se evaluó GAA mediante análisis de transferencia de Western. Se detectó GAA en hígado, diafragma, riñón, corazón y los músculos cuádriceps y gastrocnemio (figura 13).

En resumen, se crearon ratones humanizados para CD63 metiendo el locus CD63 humano en el locus CD63 de ratón. Se administró anti-CD63-GAA o anti-CD63 por inyección en la vena de la cola a 50 mg/kg a ratones humanizados para CD63 de 2 meses de edad o ratones de tipo silvestre que carecen de CD63 humana. Se realizaron extracciones de sangre de la cola en diversos puntos temporales, por ejemplo, 0, 6, 24 horas después de la inyección. Se realizó un ELISA para anti-Fc humano para determinar la concentración sérica de anti-CD63-GAA. Anti-CD63-GAA se eliminó rápidamente del suero y fue más rápido que el anticuerpo anti-CD63 original. A los ratones inyectados se les sacrificó también en diversos puntos temporales y se diseccionaron los tejidos y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los tejidos se lisaron en tampón RIPA y se ensayaron para GAA por transferencia de Western. La forma lisosómica madura de 76 kDa estaba presente en la mayoría de tejidos ensayados, lo que demuestra la internalización de anti-CD63-GAA en las células dentro del tejido (figura 13). Los ratones humanizados para CD63 internalizaron anti-CD63-GAA en músculo esquelético (corazón, gastrocnemio, cuádriceps), pero los ratones de tipo silvestre no mostraron nada de captación. Esto demuestra que anti-CD63-GAA se internalizaba en células de músculo esquelético mediado por CD63.

A ratones humanizados para CD63 (CD63^{hu/hu}) y ratones de control (CD63^{+/+}) se les administró anti-CD63-GAA a 50 mg/kg mediante inyección en la vena de la cola. En el punto temporal de 24 horas, se extrajeron tejidos y se cargaron 200 μ g de lisado por carril. La transferencia de Western se sondeó con anticuerpo anti-hGAA y anti-GAPDH como control de carga. La figura 14 representa la transferencia de Western y demuestra que CD63 mediaba la captación de anti-hCD63-GAA en tejido muscular en ratones CD63^{hu/hu}, pero no en ratones WT CD63^{+/+}. El anti-hCD63-GAA se procesa en hGAA de 76 kDa madura.

Ejemplo 10: Efectores de internalización específicos de músculo

Anticuerpos biotinilados contra antígenos específicos de músculo, que incluían antiintegrina alfa 7, anti-CD9 y antidistroglucano, se administraron a ratones con inactivación de GAA. Las distribuciones en tejido de esos anticuerpos se determinaron por análisis de transferencia de Western. La figura 15 representa un histograma del nivel de anticuerpo encontrado dentro de músculo esquelético (gastrocnemio, cuádriceps y diafragma), músculo del corazón, hígado (que sirve como medida inicial para la normalización), riñón y bazo. Se encontraron anticuerpos antiintegrina alfa 7 (en niveles que exceden los niveles encontrados en hígado) en músculo esquelético y corazón. Se encontraron anticuerpos anti-CD9 (en niveles que exceden los niveles encontrados en hígado) en músculo esquelético y corazón, y en riñón y bazo también (figura 15).

Para determinar si esos anticuerpos específicos de músculo seleccionados pueden dirigirse a los lisosomas, los anticuerpos se marcaron con pHrodo-red y después se incubaron durante una noche a 10 µg/ml con mioblastos C2C12 murinos. Se cuantificó la fluorescencia vesicular y se normalizó al grado de marcaje del fluoróforo en el anticuerpo. Los resultados se representan en la figura 16, que muestra anti-CD63, antidiastroglicano, anticadherina M, anti-CD9 y antiintegrina alfa 7 dirigidos a la fracción lisosómica de bajo pH de los mioblastos C2C12.

Ejemplo 11: Restablecimiento de los niveles de glucógeno musculares

Ratones de 2-3 meses de edad con inactivación de GAA (KO) con expresión de CD63 de ratón natural se sometieron a suministro hidrodinámico (HDD) de construcciones plasmídicas que codifican α-glucosidasa humana (hGAA) de longitud completa, anti-mCD63-GAA (anti-CD63 de ratón) y su cadena ligera asociada, o anti-hCD63-GAA (anti-CD63 humano) y su cadena ligera asociada. Todas las construcciones usaron estructuras plasmídicas idénticas que consisten en el promotor de la ubiquitina y colas poliA de SV40. En resumen, se diluyeron 40 µg de cada plásmido (es decir, 40 µg de las cadenas pesada y ligera, o solamente hGAA) en 2-3 ml de solución salina estéril y se inyectaron rápidamente en la vena de la cola de ratones GAA KO. Extracciones de sangre de la coa cada 3 días demostraron niveles séricos de hGAA o construcciones de anticuerpo-GAA durante ~10 días. Los ratones se sacrificaron 3 semanas después de HDD, y los tejidos se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los tejidos se homogeneizaron en agua destilada, se hirvieron y se centrifugaron. Los sobrenadantes se ensayaron para el glucógeno usando un ensayo fluorescente de glucógeno (MAK016, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)

Los niveles de glucógeno en corazón, diafragma y músculo esquelético incluyendo tríceps, gastrocnemio y cuádriceps se determinaron en ratones de tipo silvestre, ratones GAA KO y ratones GAA KO tratados con hGAA o anti-mCD63-GAA suministrado hidrodinámicamente y expresado. Los resultados se representan en la figura 17, que muestra el restablecimiento del glucógeno a niveles casi de tipo silvestre en los ratones tratados con anti-mCD63-GAA. El efecto de restablecimiento del glucógeno fue más pronunciado con anti-mCD63-GAA, que mostró un restablecimiento cercano al 100 % de los niveles musculares de tipo silvestre del glucógeno, que con hGAA en solitario, que mostró una reducción únicamente de aproximadamente un 10 % a un 35 % en los niveles de glucógeno en músculo esquelético o diafragma en ratones GAA KO (véase la fig. 17).

Los niveles de glucógeno en corazón, diafragma y músculo esquelético incluyendo tríceps, gastrocnemio y cuádriceps se determinaron en ratones de tipo silvestre, ratones GAA KO y ratones GAA KO tratados con anti-hCD63-GAA, anti-mCD63-GAA o anti-mCD63-mctMGAM suministrado hidrodinámicamente (HDD) y expresado. Los resultados representados en la figura 18 muestran el restablecimiento del glucógeno a niveles casi de tipo silvestre en los ratones tratados con anti-mCD63-GAA. El efecto de restablecimiento del glucógeno fue más pronunciado con anti-mCD63-GAA, que mostró restablecimiento de los niveles musculares de glucógeno en un 20 % de los niveles de tipo silvestre, que con anti-hCD63-GAA en solitario, que mostró una reducción únicamente de aproximadamente un 20 % en los niveles de glucógeno en músculo esquelético o diafragma en ratones GAA KO (véase la fig. 18). Este resultado confirma además el efecto potenciado de GAA suministrada al lisosoma mediante internalización de CD63 específica de especie. Se examinó el tratamiento con anti-mCD63-mctMGAM mediante HDD en ratones GAA KO en comparación con ratones GAA KO de control (no tratados) 7 o 12 días después de HDD (véase la fig. 20). Se observó glucógeno reducido *in vivo* en los ratones GAA KO tratados con la construcción HDD de anti-mCD63-mctMGAM específica de ratón en ambos puntos temporales, mientras que los ratones no tratados de tipo silvestre por lo demás en las mismas condiciones, no muestran cambios en el almacenamiento del glucógeno (fig. 20).

Ejemplo 12: Lipasa ácida lisosómica

La lipasa ácida lisosómica (LAL o LIPA) es una enzima que descompone los ésteres de colesterol y los triglicéridos en el lisosoma. Una deficiencia en LIPA (por ejemplo, LAL-D o enfermedad de Wolman) da lugar a una acumulación de material graso en el hígado, el bazo y otros órganos. La prevalencia de LAL-D es entre 1 cada 40 000 y 1 cada 300 000 personas en todo el mundo. Los lactantes con deficiencias de LIPA si no se tratan mueren en 6-12 meses debido a insuficiencia multiorgánica. Niños más mayores pueden permanecer sin diagnosticar hasta que mueren de infarto de miocardio, apoplejía o insuficiencia hepática.

Para ensayar el efecto anclar el anticuerpo a LIPA sobre la actividad lipasa endógena, se prepararon dos construcciones de anticuerpo y LIPA: una fusión en el extremo C de la cadena pesada (anti-myc-LIPA); y una fusión en el extremo N de la cadena pesada (LIPA-anti-myc). Se clonó el ADNc de los aminoácidos 24-399 de la enzima lipasa ácida lisosómica humana (SEQ ID NO:3) en el extremo N o el extremo C de un plásmido de la cadena pesada de anticuerpo. Se usó una secuencia escindible por catepsina como conector entre la cadena pesada y la enzima. Las construcciones junto con una correspondiente cadena ligera se transfectaron en células CHO-K1. Se recogieron los sobrenadantes de las células CHO 5 días después de la transfección y se filtraron a esterilidad. Los sobrenadantes se sometieron a análisis de transferencia de Western y se sondearon con anticuerpo anti-LIPA y anticuerpo anti-hlgG. La expresión de LIPA, anti-myc-LIPA y LIPA-anti-myc en células CHO se confirmó.

Diluciones de sobrenadantes en tampón de ensayo (acetato de sodio 0,2 M, cloruro de potasio 0,4 M, pH 4,3) se incubaron con oleato de 4-metilumbeliferilo, un sustrato de LIPA, durante 1 hora. Las reacciones se detuvieron usando tampón de glicina-carbonato a pH 10,7. La fluorescencia se leyó en un lector de placa a 360 nm de excitación y 450 nm

de emisión. Las dos construcciones de anti-myc-LIPA y LIPA-anti-myc mostraron actividad lipasa significativa con respecto al control de LIPA natural (figura 19).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
<120> Composiciones y métodos para internalizar enzimas
- 10 <130> 10109WO01
<150> US 62/264.702
<151> 08/12/2015
- 15 <150> US 62/379.929
<151> 25/08/2016
<160> 1
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 883
<212> PRT
- 25 <213> Homo sapiens
<400> 1

ES 2 833 937 T3

Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro
 1 5 10 15

Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu
 20 25 30

Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu
 35 40 45

Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr
 50 55 60

Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr
 65 70 75 80

Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu
 85 90 95

Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe
 100 105 110

Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr
 115 120 125

Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe
 130 135 140

Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg Gln Leu Asp Gly Arg
 145 150 155 160

ES 2 833 937 T3

Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe
165 170 175

Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala
180 185 190

Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr
195 200 205

Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly
210 215 220

Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly
225 230 235 240

Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser
245 250 255

Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile
260 265 270

Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val
275 280 285

Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu
290 295 300

Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu
305 310 315 320

Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu
325 330 335

Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe
340 345 350

Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg
355 360 365

Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly
370 375 380

Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr
385 390 395 400

Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr

ES 2 833 937 T3

				405						410						415
Ala	Phe	Pro	Asp	Phe	Thr	Asn	Pro	Thr	Ala	Leu	Ala	Trp	Trp	Glu	Asp	
			420					425						430		
Met	Val	Ala	Glu	Phe	His	Asp	Gln	Val	Pro	Phe	Asp	Gly	Met	Trp	Ile	
		435					440					445				
Asp	Met	Asn	Glu	Pro	Ser	Asn	Phe	Ile	Arg	Gly	Ser	Glu	Asp	Gly	Cys	
	450					455					460					
Pro	Asn	Asn	Glu	Leu	Glu	Asn	Pro	Pro	Tyr	Val	Pro	Gly	Val	Val	Gly	
465					470					475					480	
Gly	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	Thr	Ile	Cys	Ala	Ser	Ser	His	Gln	Phe	Leu	
				485					490					495		
Ser	Thr	His	Tyr	Asn	Leu	His	Asn	Leu	Tyr	Gly	Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	
			500					505					510			
Ala	Ser	His	Arg	Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Arg	Gly	Thr	Arg	Pro	Phe	Val	
		515					520					525				
Ile	Ser	Arg	Ser	Thr	Phe	Ala	Gly	His	Gly	Arg	Tyr	Ala	Gly	His	Trp	
	530					535					540					
Thr	Gly	Asp	Val	Trp	Ser	Ser	Trp	Glu	Gln	Leu	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	
545					550					555					560	
Glu	Ile	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Leu	Gly	Val	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	
				565					570					575		
Val	Cys	Gly	Phe	Leu	Gly	Asn	Thr	Ser	Glu	Glu	Leu	Cys	Val	Arg	Trp	
			580					585					590			
Thr	Gln	Leu	Gly	Ala	Phe	Tyr	Pro	Phe	Met	Arg	Asn	His	Asn	Ser	Leu	
		595					600					605				
Leu	Ser	Leu	Pro	Gln	Glu	Pro	Tyr	Ser	Phe	Ser	Glu	Pro	Ala	Gln	Gln	
	610					615					620					
Ala	Met	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Ala	Leu	Leu	Pro	His	Leu	
625					630					635					640	
Tyr	Thr	Leu	Phe	His	Gln	Ala	His	Val	Ala	Gly	Glu	Thr	Val	Ala	Arg	
				645					650					655		

ES 2 833 937 T3

Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp
660 665 670

His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln
675 680 685

Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr
690 695 700

Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro
705 710 715 720

Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val
725 730 735

Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly
740 745 750

Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg
755 760 765

Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala
770 775 780

Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu
785 790 795 800

Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile
805 810 815

Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu
820 825 830

Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu
835 840 845

Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys
850 855 860

Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val
865 870 875 880

Ser Trp Cys

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una enzima asociada con una enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD) y una proteína de unión a antígeno,
- 5 en la que la enzima se selecciona del grupo que consiste en α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa (GAA), β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa y lipasa ácida lisosómica (LAL),
- 10 en la que la proteína de unión a antígeno se une a un efector de internalización, y en la que el efector de internalización es CD63.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la enzima se selecciona del grupo que consiste en α -galactosidasa (GLA), β -galactosidasa (GLB) y α -glucosidasa (GAA).
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en molécula de fusión a receptor, una molécula de retención, una molécula de fusión de Fc con receptor, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd, un fragmento Fv, una molécula Fv monocatenaria (scFv), un fragmento dAb, una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de un solo dominio, un anticuerpo de dominio eliminado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con CDR injertada, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo, un nanocuerpo, un nanocuerpo monovalente, un nanocuerpo bivalente, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), un anticuerpos de camélido (anticuerpos homodimérico de cadena pesada VHH) y un dominio IgNAR variable de tiburón.
- 20 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la enzima se une covalentemente a la proteína de unión a antígeno, y opcionalmente en la que:
- 30 (i) la proteína de unión a antígeno comprende un semianticuerpo, la enzima se une covalentemente a un dominio Fc de inmunoglobulina y el dominio Fc que se une covalentemente a la enzima se asocia con el dominio Fc de la proteína de unión a antígeno; o
- (ii) la proteína de unión a antígeno comprende un anticuerpo, y la enzima se une covalentemente al extremo C de la cadena pesada del anticuerpo.
- 35 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la enzima no se une covalentemente a la proteína de unión a antígeno, y opcionalmente en la que:
- 40 (i) la proteína de unión a antígeno se une tanto al efector de internalización como a la enzima; y/o
- (ii) la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico que se une al efector de internalización y la enzima.
- 45 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la enzima es GAA o GLA o comprende actividad GAA o GLA.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que:
- 50 (i) la enzima es GAA o comprende actividad GAA, y la enzima comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1; o
- (ii) la enzima es GLA o comprende actividad GLA, y la enzima comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.
- 55 8. Un complejo bioterapéutico para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad del almacenamiento lisosómico (LSD), en el que el método comprende administrar al sujeto el complejo bioterapéutico y en el que el complejo bioterapéutico entra en un lisosoma de una célula del sujeto y proporciona una actividad enzimática ("enzima de remplazo") que reemplaza la actividad enzimática que está asociada con la LSD ("enzima endógena"), en el que el complejo bioterapéutico comprende:
- 60 (a) la enzima de remplazo seleccionada del grupo que consiste en α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa (GAA), β -glucosidasa, activador de saposina-C, ceramidasa, esfingomielinasa, β -hexosaminidasa, activador de GM2, GM3 sintasa, arilsulfatasa, activador de esfingolípidos, α -iduronidasa, iduronidasa-2-sulfatasa, heparina N-sulfatasa, N-acetil- α -glucosaminidasa, α -glucosamida N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa, hialuronidasa y lipasa ácida lisosómica (LAL), y
- 65 (b) una proteína de unión a antígeno que se une a un efector de internalización, en el que el efector de

internalización es CD63.

9. El complejo bioterapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la LSD:

- 5 (i) se selecciona del grupo que consiste en una esfingolipidosis, una mucopolisacaridosis y una enfermedad del almacenamiento de glucógeno;
- (ii) se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher de tipo I, enfermedad de Gaucher de tipo II, enfermedad de Gaucher de tipo III, enfermedad de Niemann-Pick de tipo A, enfermedad de Niemann-Pick de tipo B, gangliosidosis de GM1, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Tay-Sachs, deficiencia de activador de GM2, gangliosidosis de GM3, leucodistrofia metacromática, deficiencia de activador de esfingolípidos, enfermedad de Scheie, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Hurler, enfermedad de Hunter, Sanfilippo A, Sanfilippo B, Sanfilippo C, Sanfilippo D, síndrome de Morquio A, síndrome de Morquio B, enfermedad de Maroteaux-Lamy, enfermedad de Sly, MPS IX y enfermedad de Pompe; o
- 10 (iii) enfermedad de Fabry o enfermedad de Pompe.

15 10. El complejo bioterapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que:

- (i) la enzima de remplazo no induce una reacción inmunológica en el sujeto; y/o
- (ii) la enzima de remplazo es una isozima.

20 11. El complejo bioterapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enzima de remplazo es una isozima y en el que:

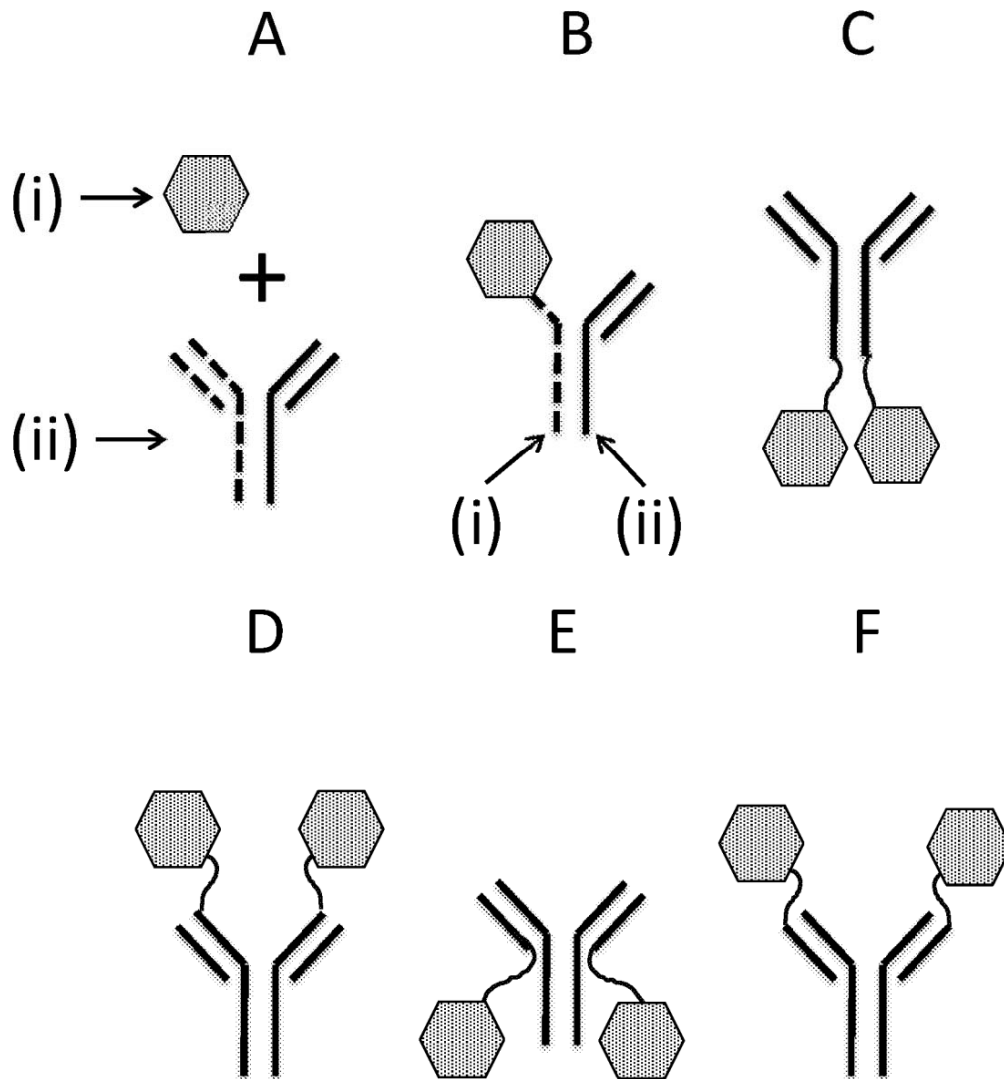
- 25 (i) la LSD es enfermedad de Pompe, la enzima endógena es α -glucosidasa (GAA) y la isozima se selecciona del grupo que consiste en α -glucosidasa ácida (GAA), sacarasa-isomaltasa (SI), maltasa-glucoamilasa (MGAM), glucosidasa II (GANAB) y α -glucosidasa neutra (C GNAC); o
- (ii) la LSD es enfermedad de Fabry, la enzima endógena es α -galactosidasa A (GLA) y la isozima es α -N-acetilgalactosaminidasa genomanipulada para obtener actividad GLA.

30 12. El complejo bioterapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que la proteína de unión a antígeno que se une al efector de internalización es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

13. El complejo bioterapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en el que:

- 35 (i) el complejo bioterapéutico comprende una enzima de remplazo y un anticuerpo biespecífico que se une a la enzima de remplazo y un efector de internalización, y opcionalmente en el que (a) el complejo bioterapéutico comprende GLA y un anticuerpo biespecífico que se une a GLA y CD63, y la LSD es enfermedad de Fabry, o (b) el complejo bioterapéutico comprende GAA y un anticuerpo biespecífico que se une a GAA y CD63, y la LSD es enfermedad de Pompe;
- 40 (ii) el complejo bioterapéutico comprende una proteína de fusión a Fc y un semicuerpo anti-efector de internalización;
- (iii) el complejo bioterapéutico comprende la enzima de reemplazo unida covalentemente al extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo anti-efector de internalización; o
- 45 (iv) el complejo bioterapéutico comprende la enzima unida covalentemente al extremo N de la cadena pesada de un anticuerpo anti-efector de internalización.

FIGURA 1



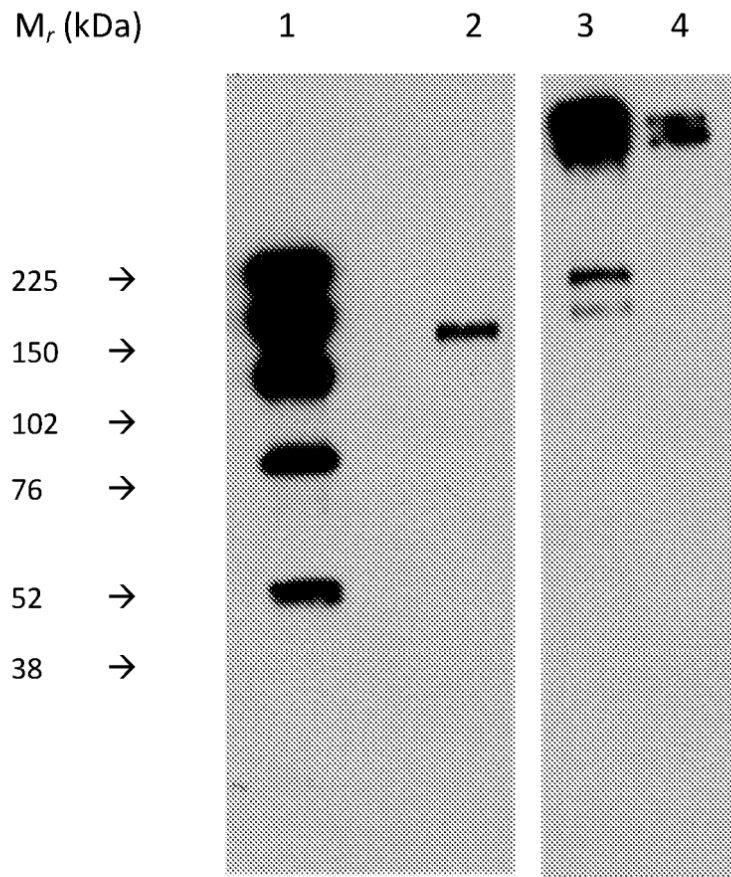


FIGURA 2

FIGURA 3

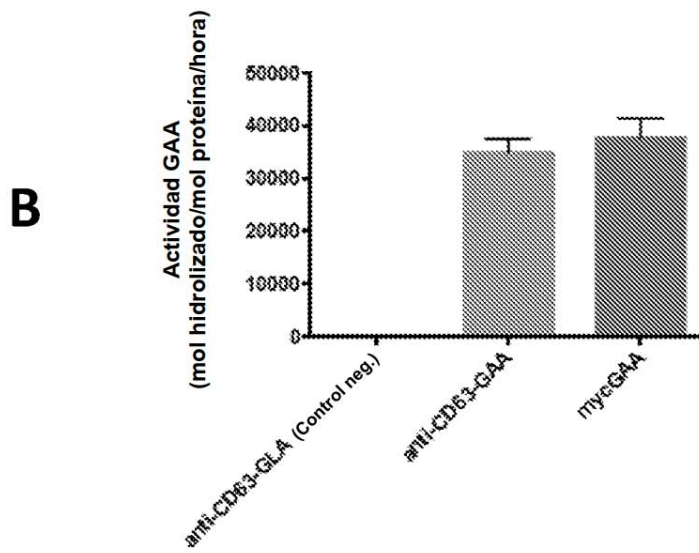
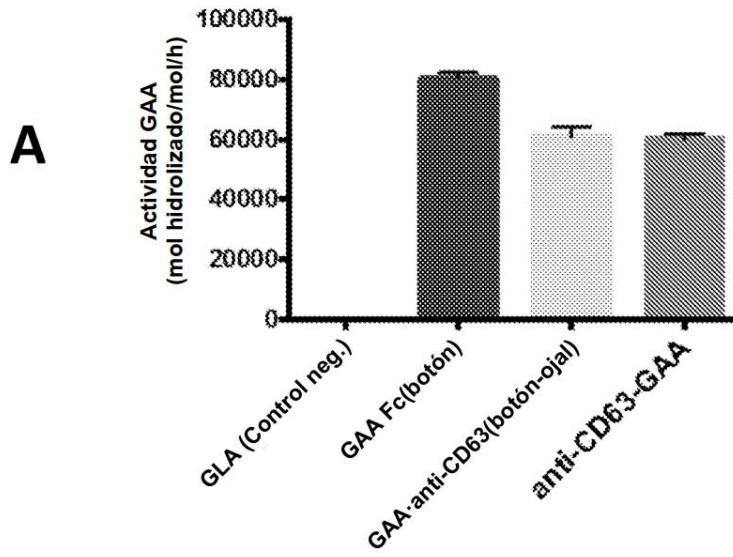


FIGURA 4

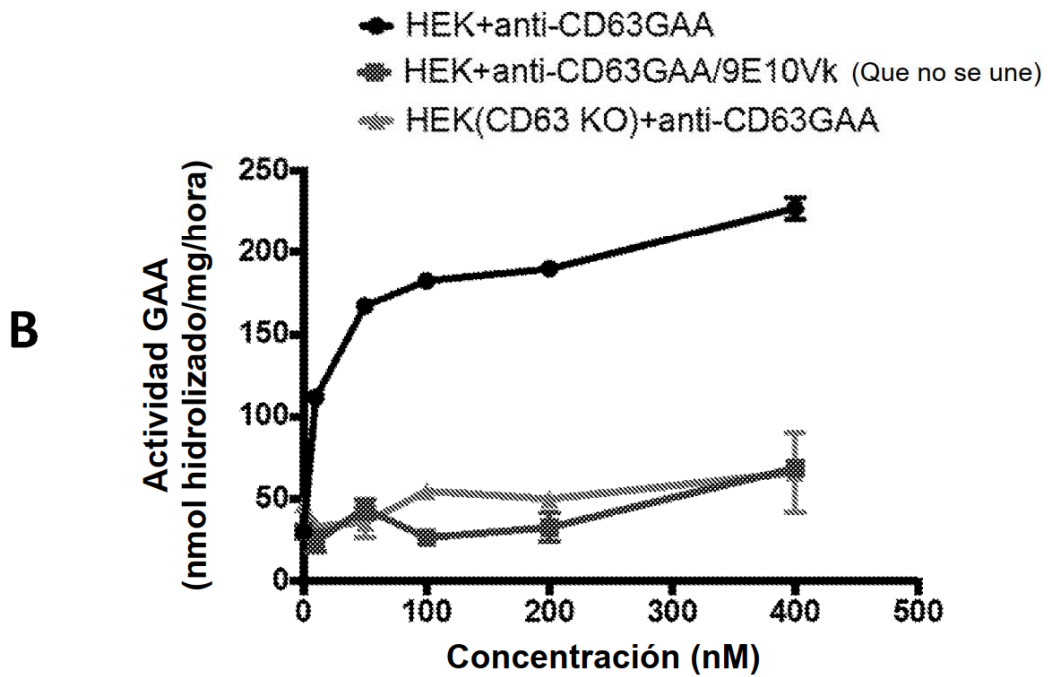
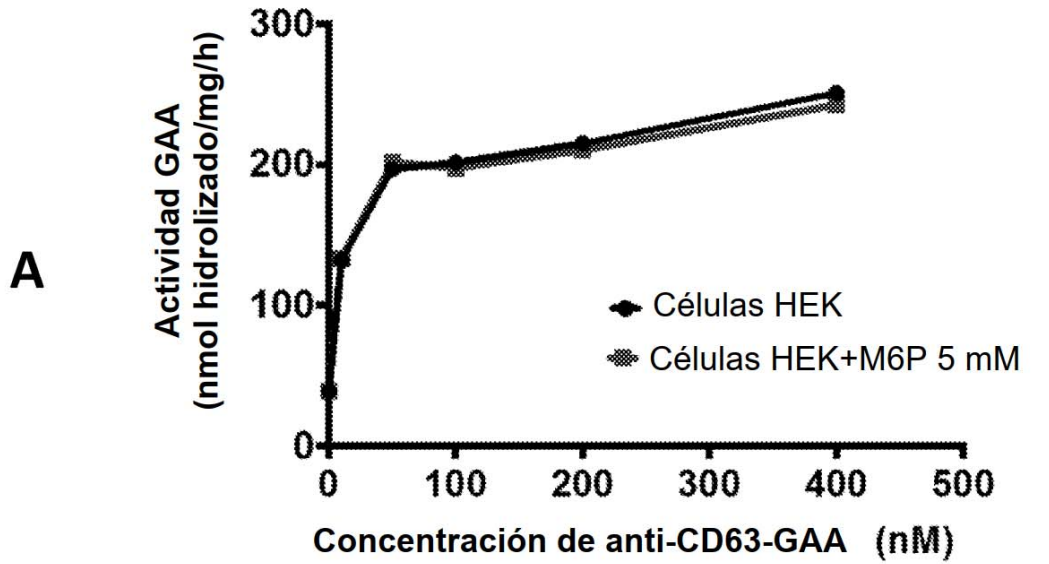


FIGURA 5

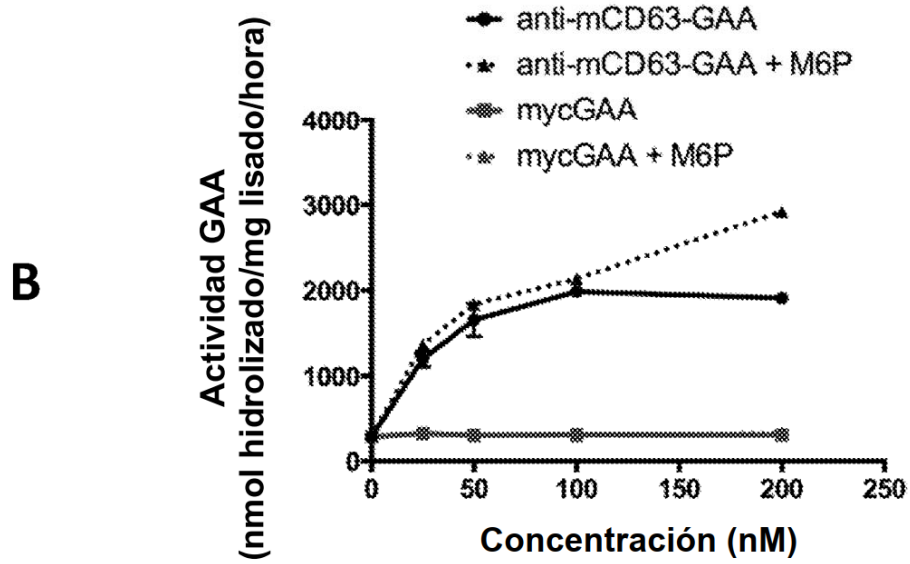
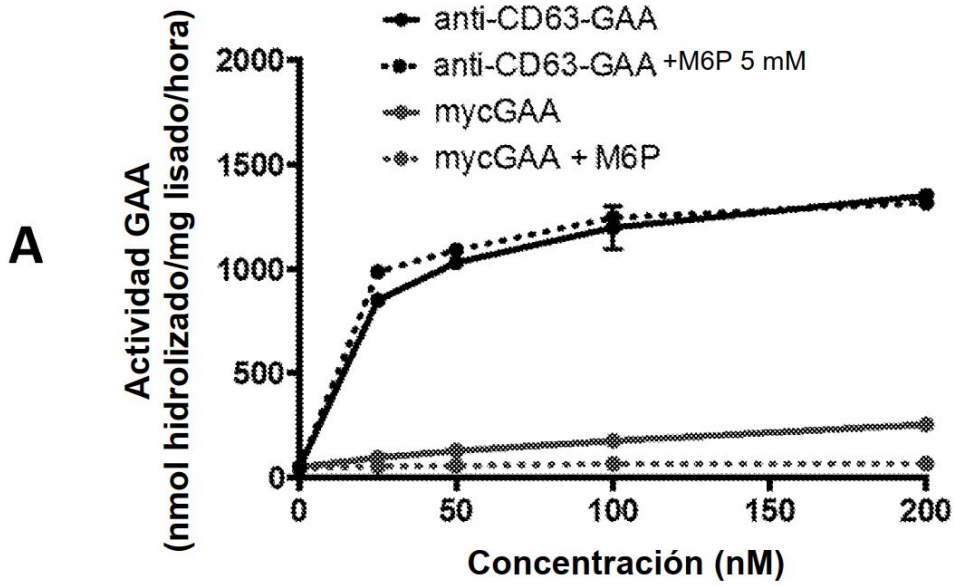


FIGURA 6

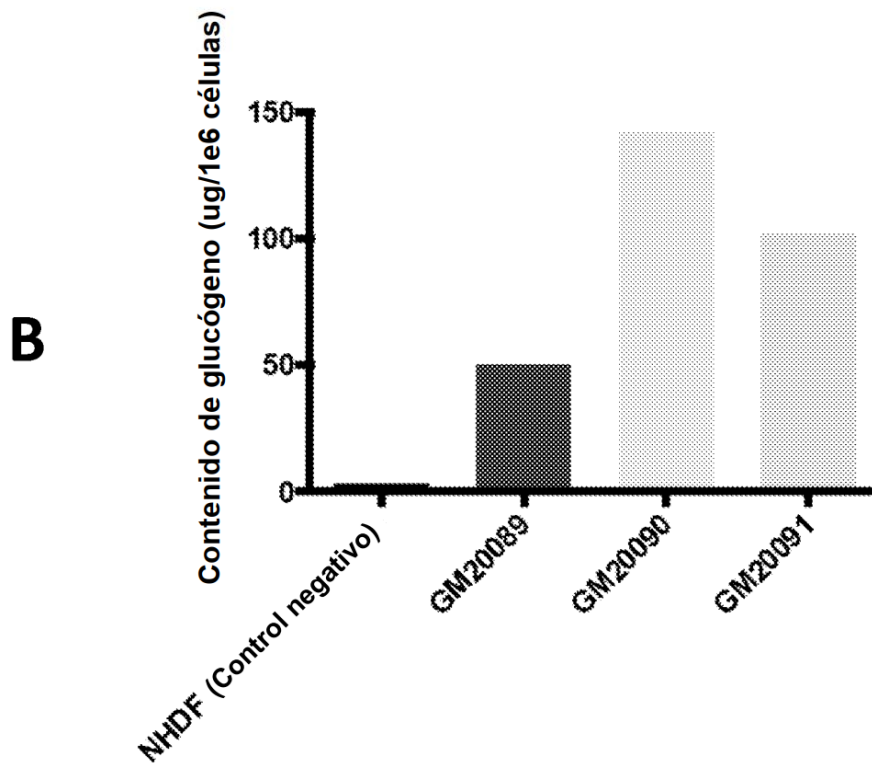
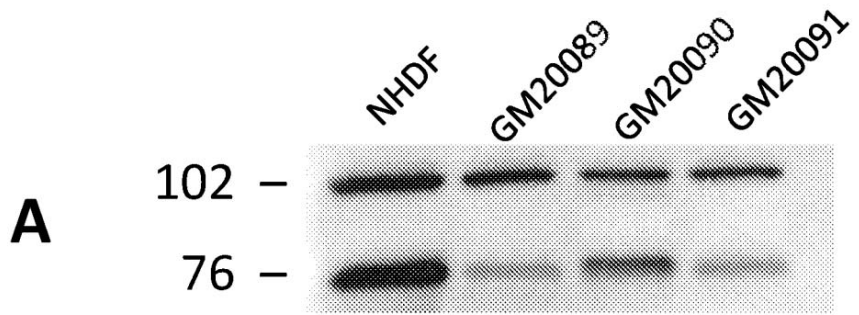


FIGURA 7

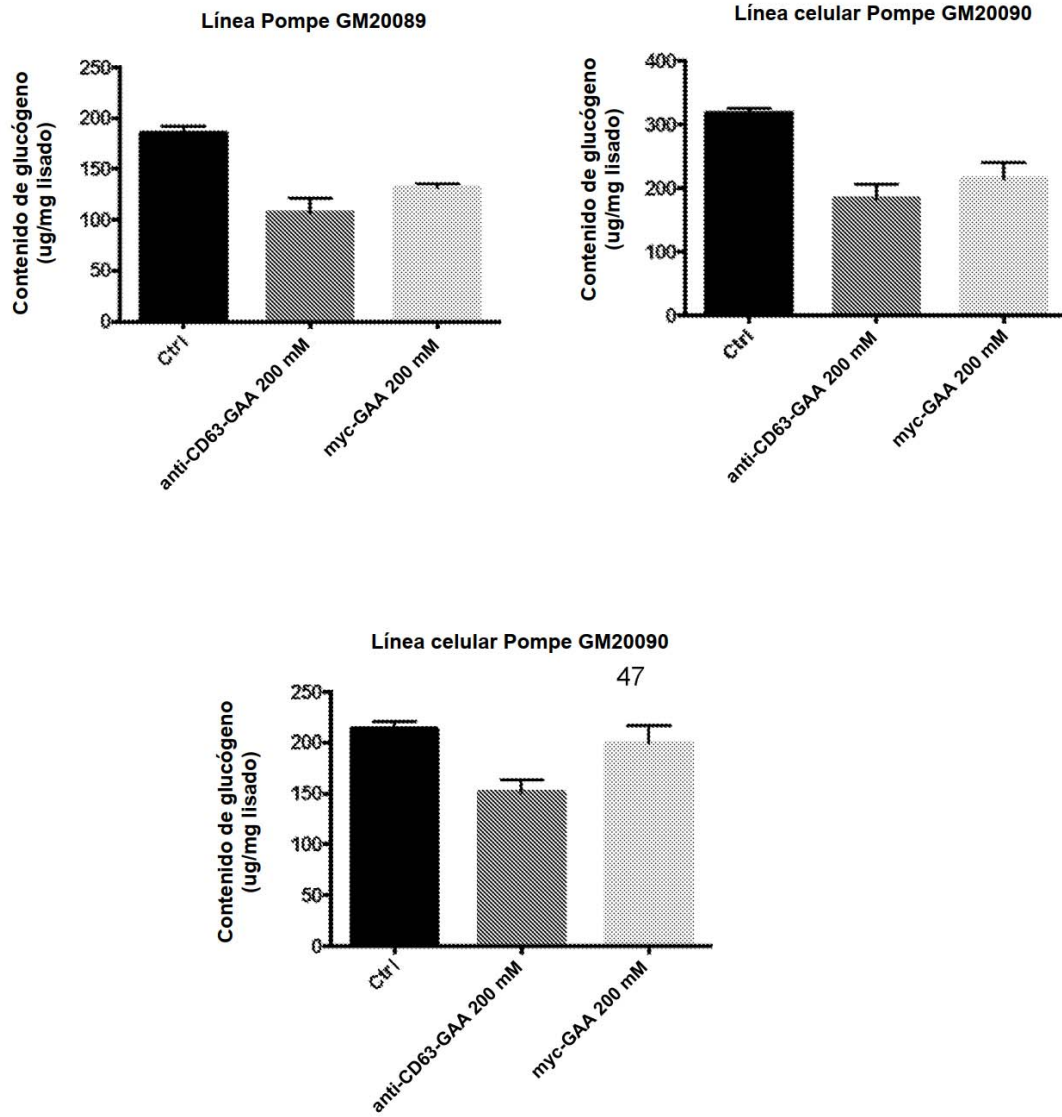


FIGURA 8

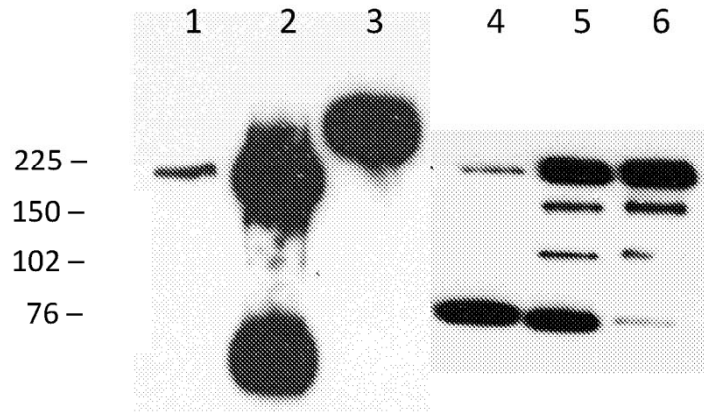
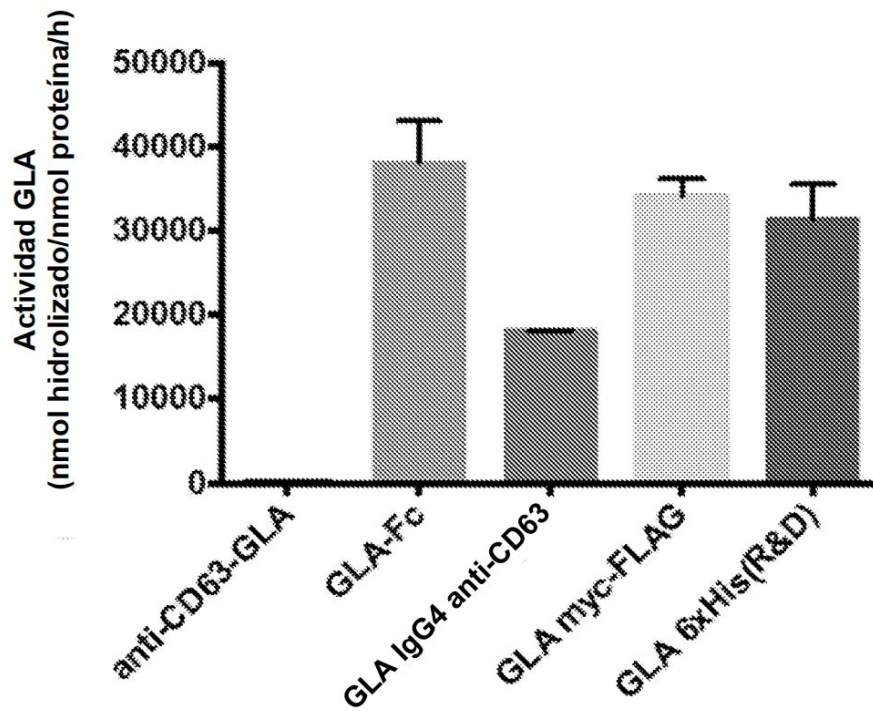


FIGURA 9



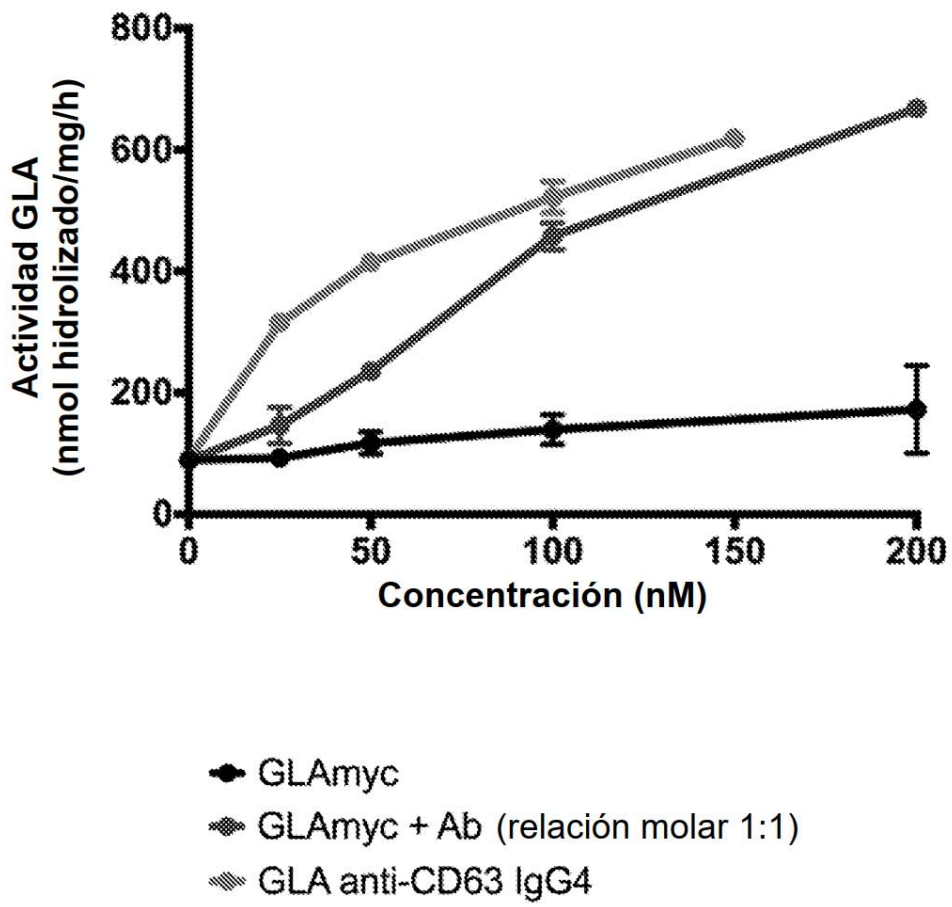


FIGURA 10

FIGURA 11

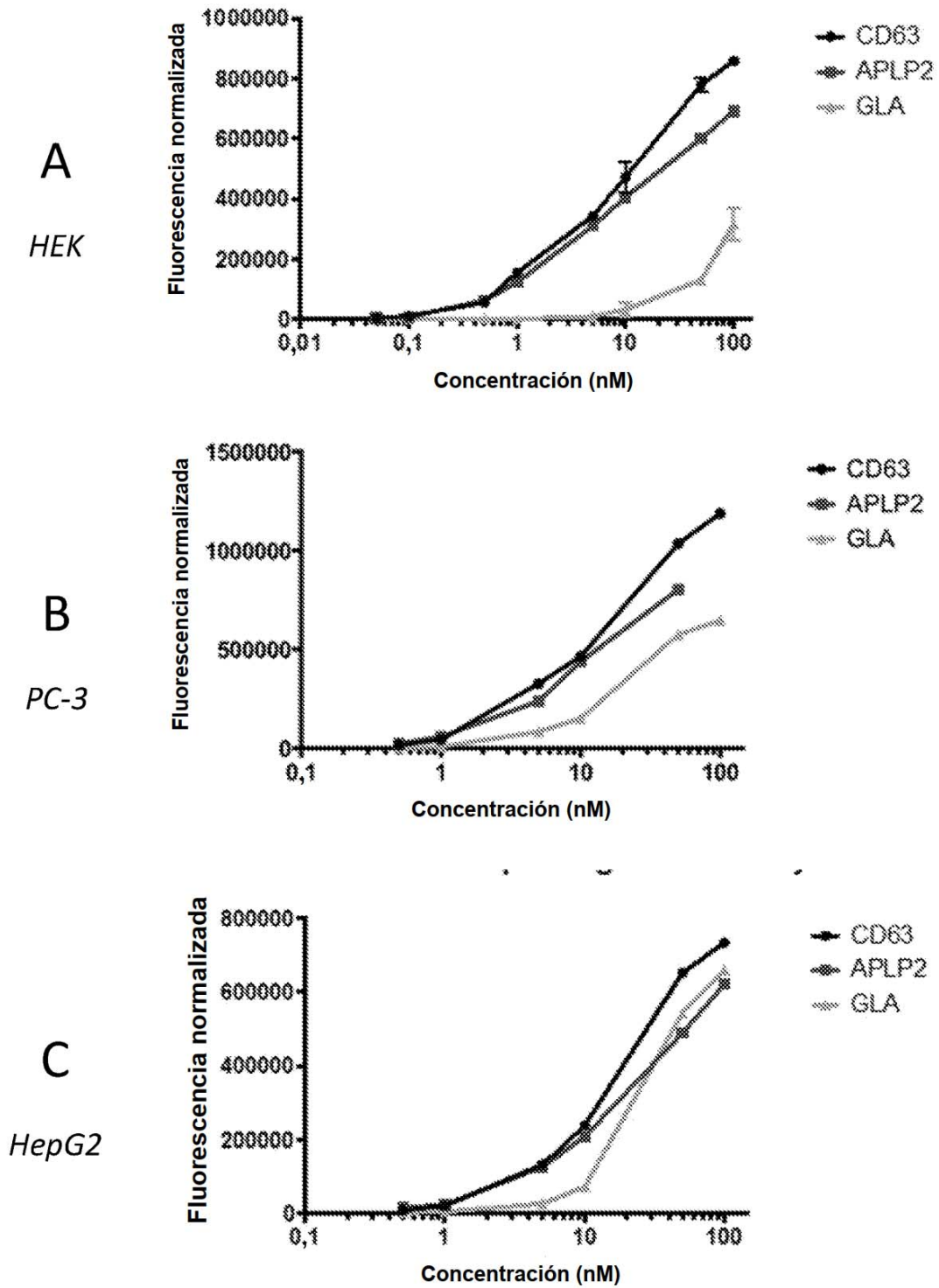


FIGURA 12

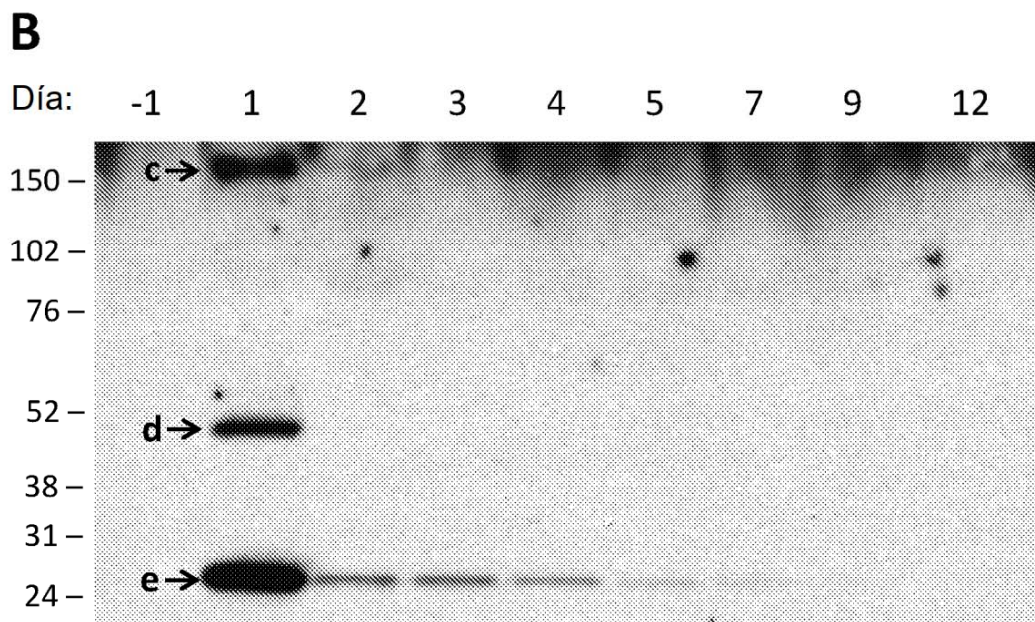
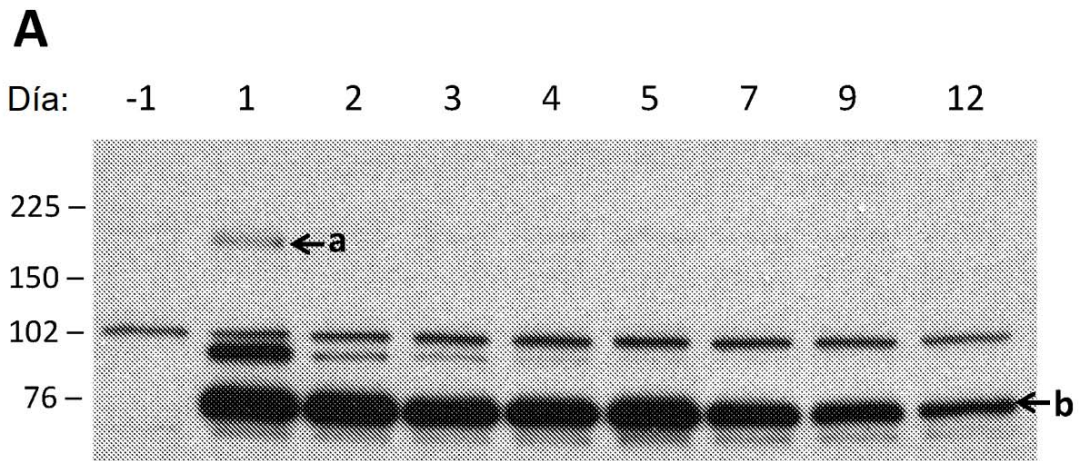


FIGURA 13



FIGURA 14

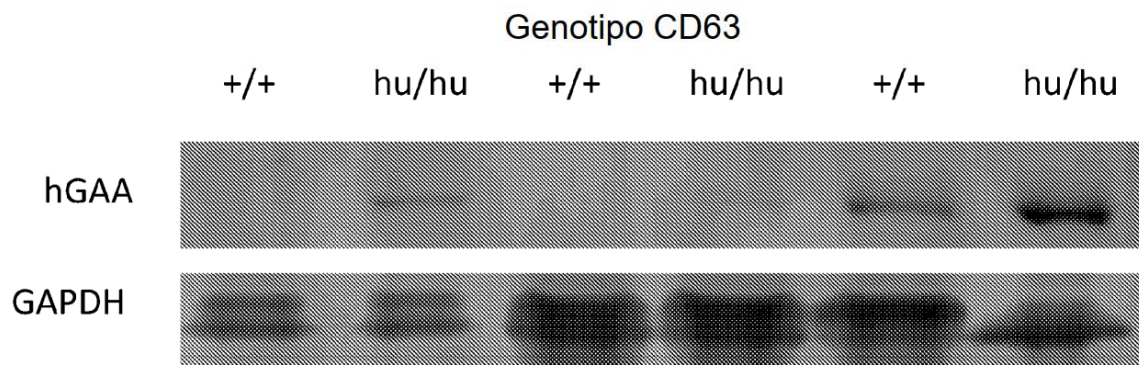


FIGURA 15

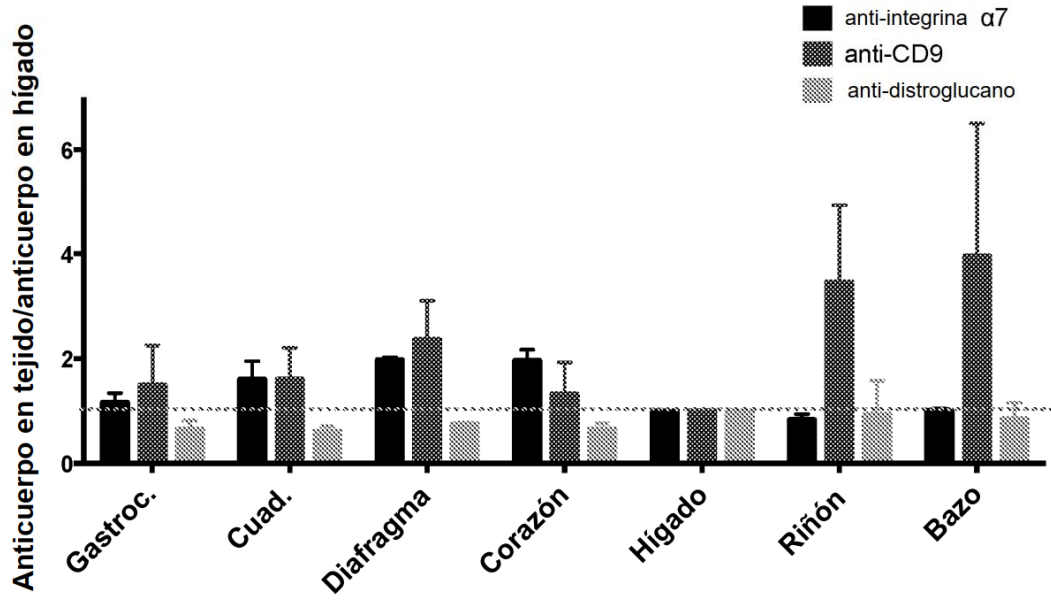
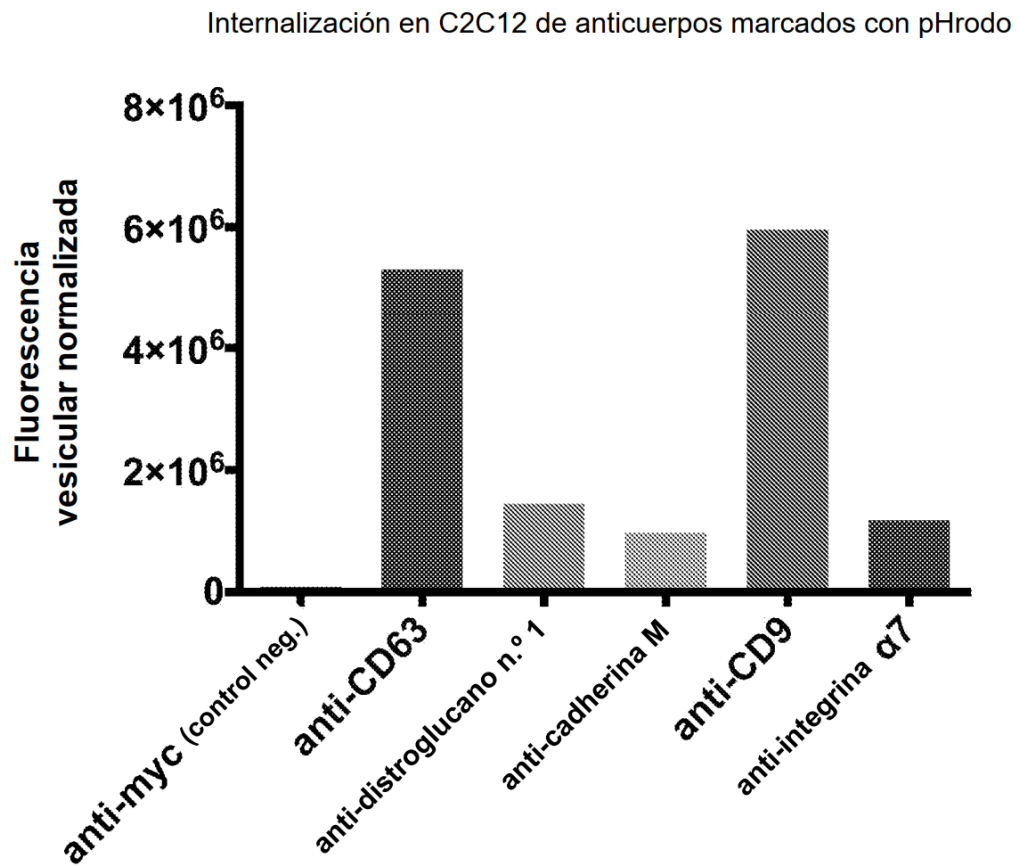


FIGURA 16



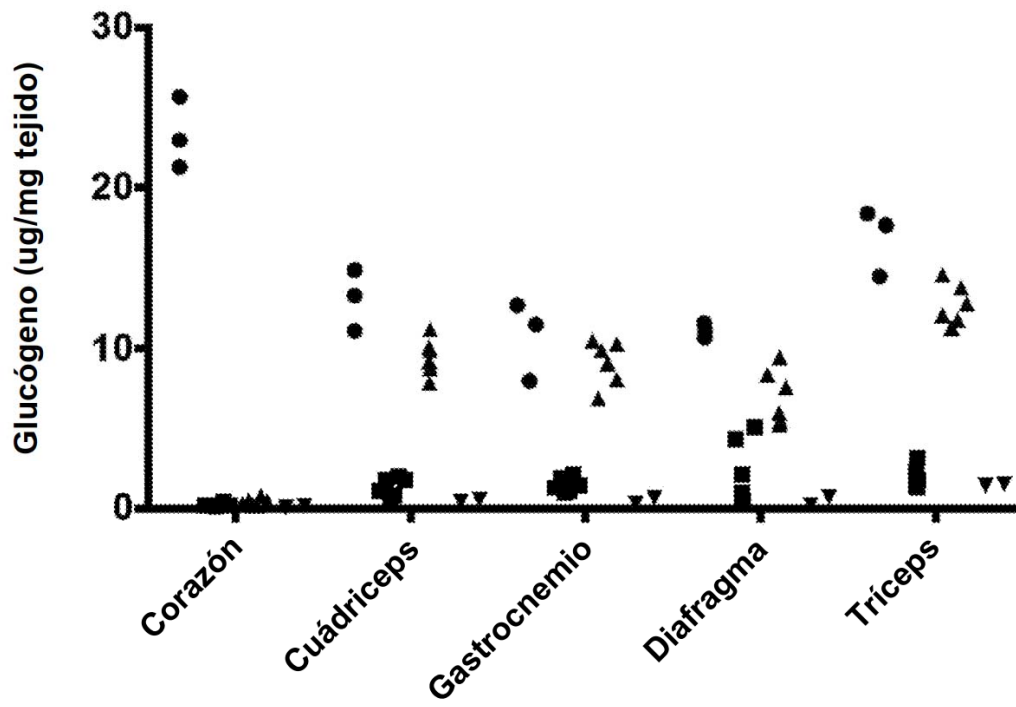


FIGURA 17

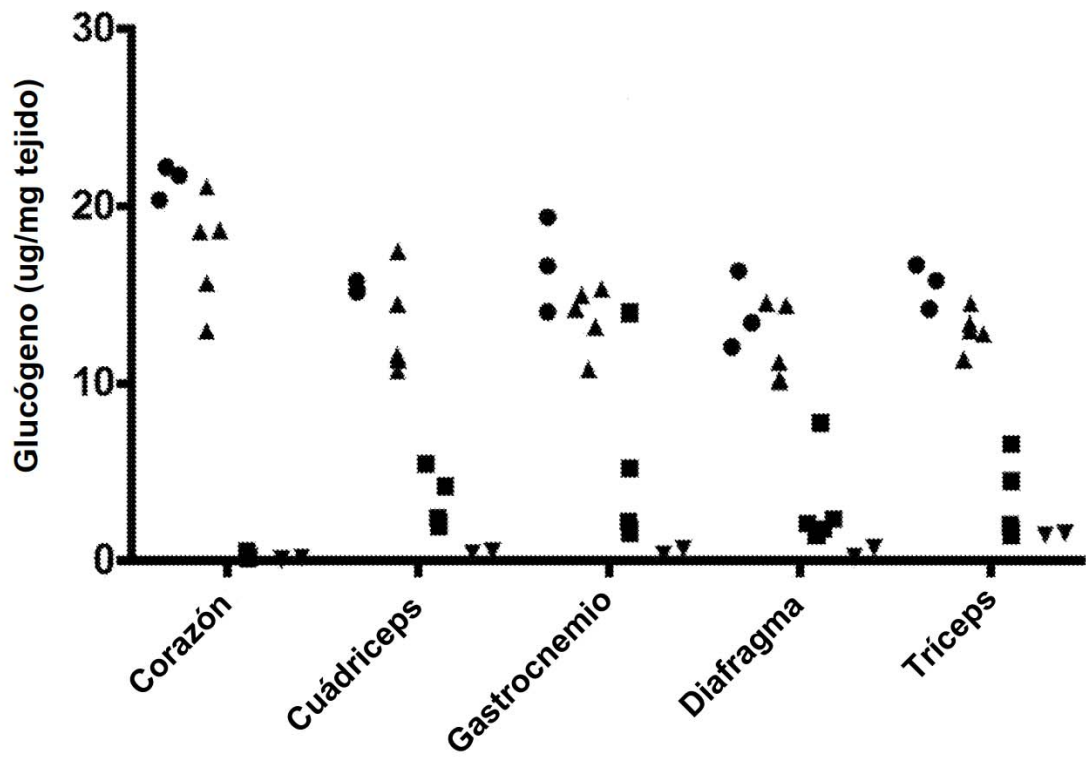


FIGURA 18

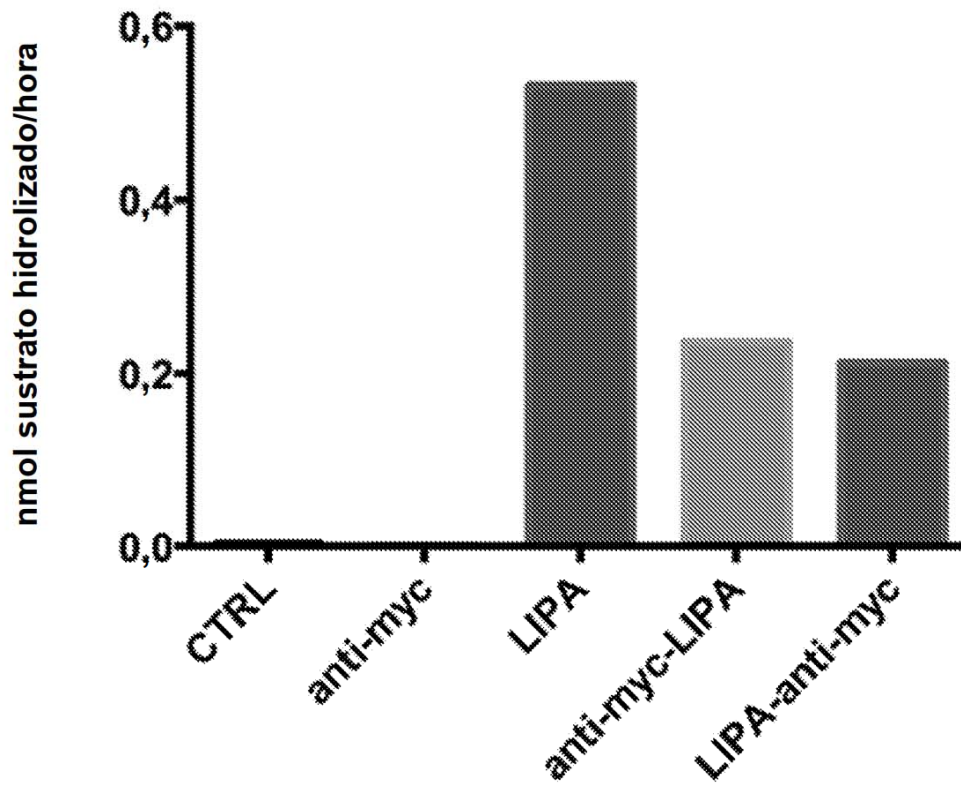


FIGURA 19

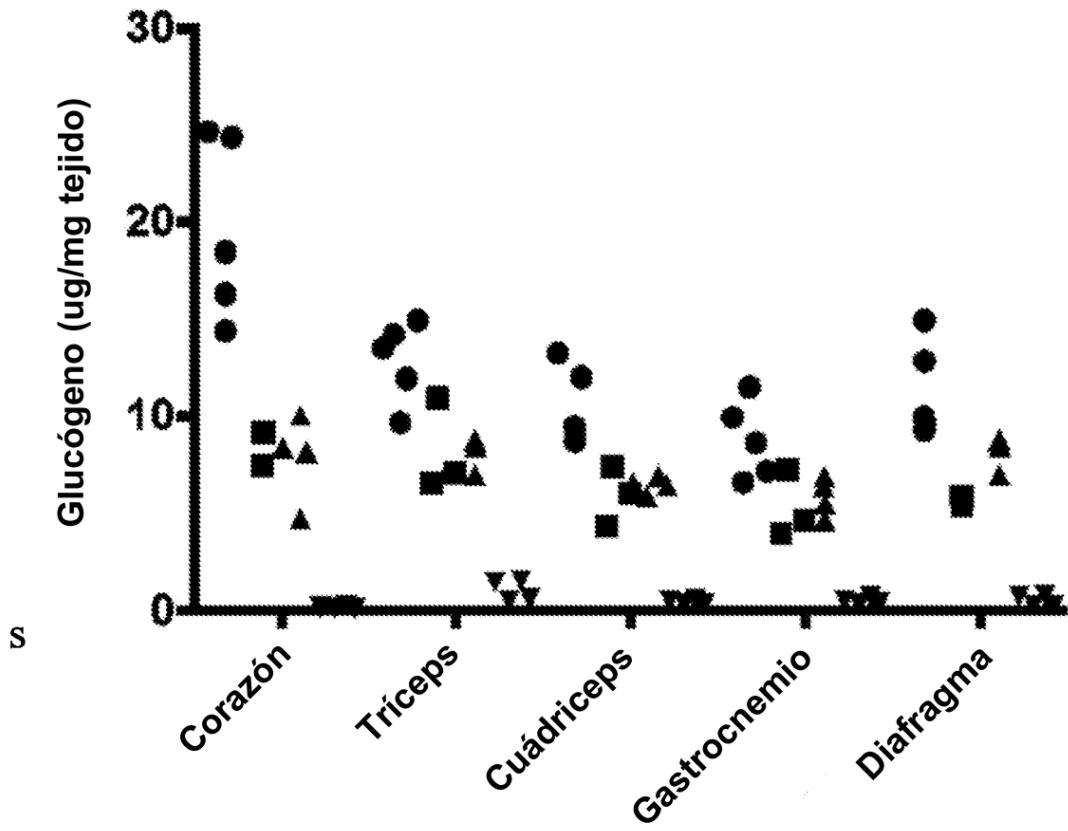


FIGURA 20