

SUMINISTRO DIRIGIDO DE ENZIMAS TERAPÉUTICAS

Campo técnico

La invención se refiere al campo de la biotecnología y, más particularmente, al suministro (transporte) de enzimas terapéuticas, que es aplicable en medicina. La presente invención se refiere a un compuesto que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte que están acoplados entre sí directamente o mediante un conector, siendo el elemento de transporte un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG específica de un epítopo del receptor de insulina, y al uso de dicho compuesto para producir una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades, así como al uso de dicho compuesto para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades, en particular enfermedades por almacenamiento lisosómico, entre otras, para el tratamiento y la profilaxis de la deficiencia enzimática característica de la respectiva enfermedad por almacenamiento lisosómico, tal como la mucopolisacaridosis, en particular la mucopolisacaridosis de tipos I y II.

Antecedentes de la técnica

El uso de enzimas en terapia se conoce en la técnica desde hace mucho tiempo. La medicina contemporánea utiliza ampliamente las enzimas terapéuticas en diversas ramas de la medicina debido a su alta actividad y especificidad. En la actualidad, han surgido las siguientes tendencias de la terapia enzimática (Kazanskaya NF *et al.*, 1984): 1) eliminación de la deficiencia enzimática para compensar la deficiencia funcional congénita o adquirida; 2) eliminación de estructuras desnaturalizadas inviables, fragmentos celulares y tisulares; 3) lisis de coágulos sanguíneos; 4) terapia compleja de

neoplasias malignas; 5) desintoxicación del organismo.

El uso de enzimas terapéuticas para eliminar la deficiencia enzimática con el fin de compensar una deficiencia funcional congénita o adquirida se practica desde hace mucho tiempo. El tratamiento de las deficiencias enzimáticas congénitas, de las que se han descrito más de 150, es un problema importante en la terapia de reemplazo. Las enfermedades hereditarias, tales como la glucogenosis, la lipidosis, la mucopolisacaridosis y otras enfermedades por almacenamiento lisosómico se tratan predominantemente mediante la administración intravenosa de análogos recombinantes de las correspondientes enzimas nativas.

Las enfermedades por almacenamiento lisosómico son un grupo de enfermedades metabólicas hereditarias raras (huérfanas) causadas por la ausencia o deficiencia de enzimas lisosómicas implicadas en la descomposición de moléculas complejas.

En la actualidad (Novikov P.V., 2014), se distinguen los siguientes grupos de enfermedades por almacenamiento lisosómico: 1) mucopolisacaridosis; 2) lipidosis (esfingolipidosis - gangliosidosis GM1 y GM2, enfermedad de Gaucher, galactosialidosis, granulomatosis de Farber, leucodistrofias, enfermedad de Niemann-Pick de tipos A y B, etc.); 3) mucolipidosis, 4) glucoproteinosis (fucosidosis, sialidosis, manosidosis, enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo II - enfermedad de Pompe, enfermedad de Danon, etc.); 5) ceroidolipofuscinosis neuronales; 6) otras enfermedades por almacenamiento (enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Wolman, enfermedad por almacenamiento de colesterol, cistinosis, enfermedad de Sal, picnodisostosis, etc.).

Las mucopolisacaridos (MPS) son un grupo que reúne nueve (I – IX, con formas intermedias - 14) enfermedades metabólicas causadas por más de 40 trastornos genéticos que conducen a la ausencia o deficiencia funcional de una serie de enzimas lisosómicas implicadas en la descomposición hidrolítica de los glucosaminoglucanos (mucopolisacáridos). Los glucosaminoglucanos son oligosacáridos que participan en la formación de los huesos, cartílago, ligamentos, córnea, piel, tejido conjuntivo y líquido sinovial (Burrow T. A. *et al.*, 2013).

En pacientes que padecen mucopolisacaridos, hay una deficiencia o ausencia de al menos una de las 11 enzimas del catabolismo de los glucosaminoglucanos, que con el tiempo conduce a la acumulación gradual de estos carbohidratos en las células y los líquidos corporales, incluido el tejido conjuntivo. Como resultado, la acumulación permanente de mucopolisacáridos conduce al daño celular, la disfunción de tejidos y órganos, con mayor frecuencia manifestada en el síndrome de hipertensión-hidrocefálico, hepatoesplenomegalia, insuficiencia cardiovascular, complicaciones osteoarticulares, trastornos funcionales del sistema nervioso central (SNC), que incluye trastornos cognitivos graves y demencia (tabla 1) (Burrow T. A. *et al.*, 2013).

Tabla 1. Características de diversos síndromes de MPS

Síndrome	Defecto enzimático	Cromosoma defectuoso, modo de herencia	Cuadro clínico, datos de laboratorio	Componente neurológico
Hurler (MPS-I-H)	α -L-iduronidasa	Cromosoma 4, autosómico recesivo	Los niños mueren con una edad de entre 6 y 10 años por descompensación cardíaca y pulmonar. Aumento de los niveles de sulfatos de heparano y dermatano en la orina (Connock <i>et al.</i> 2006)	Presente
Scheie (MPS-I-S)	α -L-iduronidasa (parcial)	Cromosoma 4, autosómico recesivo	Subtipo leve, inteligencia normal, estatura normal. Los pacientes viven hasta 30 años. Elevación de los niveles de sulfatos de heparano y dermatano en la orina (Connock <i>et al.</i> 2006, Pastores <i>et al.</i> 2007).	Ausente

Síndrome	Defecto enzimático	Cromosoma defectuoso, modo de herencia	Cuadro clínico, datos de laboratorio	Componente neurológico
Hunter (MPS II)	Iduronato-2-sulfatasa	Ligado al cromosoma X, tipo recesivo	La padecen los niños. El desarrollo mental se reduce. Los pacientes viven hasta 30-40 años. No hay opacidad corneal. No hay hipercifosis dorsolumbar. Caracterizada por sordera progresiva e hirsutismo. Aumento de los niveles de sulfatos de heparano y dermatano en la orina <u>(Wraith et al. 2008, da Silva et al. 2016, Burrow y Leslie 2008).</u>	Presente

Síndrome	Defecto enzimático	Cromosoma defectuoso, modo de herencia	Cuadro clínico, datos de laboratorio	Componente neurológico
Sanfilippo (MPS-III)	Tipo A - sulfamidasa. Tipo B - b-N-acetil-glucosaminidasa Tipo C - acetil-CoA-glucosamina-N-acetiltransferasa Tipo D - a-N-acetil-glucosamina-6-fosfatasa	Cromosomas 12 y 17, autosómico recesivo	Retraso grave de la inteligencia, macrocefalia, conducta muy agresiva. Cambios esqueléticos relativamente débiles. Aparece visceromegalia en la edad escolar. Clínicamente, los tipos no se pueden diferenciar. Sulfato de heparano en la orina - (Valstar <i>et al.</i> 2008).	Presente

Síndrome	Defecto enzimático	Cromosoma defectuoso, modo de herencia	Cuadro clínico, datos de laboratorio	Componente neurológico
Morquio (MPS-IV)	N-acetil-galactosamina-6-sulfatasa (tipo A) y b-galactosidasa (tipo B)	Cromosomas 3 y 16, autosómico recesivo	Inteligencia normal. Deformación esquelética grave. Opacidad corneal. Menor grado de daño al sistema nervioso central. Los primeros signos clínicos aparecen a la edad de 2 a 3 años. Los pacientes mueren a la edad de 20-35 años. Sulfato de queratano en la orina (<u>Northover, Cowie y Wraith 1996</u>).	Ausente

Síndrome	Defecto enzimático	Cromosoma defectuoso, modo de herencia	Cuadro clínico, datos de laboratorio	Componente neurológico
Maroteaux–Lamy (MPS-VI)	N-acetil-galactosamina-4-sulfatasa	Cromosoma 5, autosómico recesivo	Ligero retraso del crecimiento, hipercifosis pronunciada, inteligencia normal, anomalías faciales leves. Sulfato de dermatano en la orina (Garrido <i>et al.</i> 2008).	Ausente
Sly (MPS-VII)	b-glucoronidasa	Cromosoma 7, autosómico recesivo	Desarrollo mental variable, hipercifosis pronunciada, hepatoesplenomegalia, anomalías faciales leves. Sulfato de dermatano en la orina.	Presente

La mucopolisacaridosis de tipo I es causada por una deficiencia de la enzima lisosómica, α -L-iduronidasa. Esta deficiencia conduce a la acumulación de mucopolisacáridos, especialmente sulfato de dermatano, en tejidos y órganos. La acumulación de un exceso de sulfato de dermatano conduce al desarrollo gradual de numerosas anomalías morfológicas en tejidos y órganos. La mucopolisacaridosis de tipo I se caracteriza por un modo de herencia

autosómico recesivo.

Hasta la fecha, se han desarrollado dos métodos eficaces para tratar la MPS de tipo I: trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) y terapia de reemplazo enzimático (TRE).

5 El TCMH se utiliza solo para tratar formas graves de la MPS de tipo I -
síndrome de Hurler, lo que permite corregir la deficiencia de la enzima α -L-
iduronidasa y, a su vez, conduce a una mejora significativa en el estado del
paciente, aunque algunas complicaciones graves de la enfermedad no remiten
por completo. El TCMH debe realizarse lo antes posible, antes de la aparición
10 de trastornos neurológicos graves. A pesar de la mejora en el estado del
paciente, el TCMH va acompañado de un alto riesgo de complicaciones graves
después del trasplante y es un procedimiento complejo, de múltiples etapas y
alto coste.

Las TRE es segura, es bien tolerada por los pacientes, no causa
15 acontecimientos adversos graves y conduce a la descomposición del sustrato
no hidrolizado. Las posibles reacciones raras a la administración del fármaco
son causadas por la formación de anticuerpos contra la proteína inyectada,
pero no son permanentes y, en general, se alivian rápidamente con
medicamentos convencionales. El principio de la TRE se basa en restaurar el
20 nivel de actividad enzimática suficiente para hidrolizar los sustratos acumulados
y evitar su acumulación adicional.

El fármaco Aldurazyme (DCI: laronidasa) (Genzyme, EE. UU.) está
destinado a la TRE en pacientes con tres variantes clínicas de
mucopolisacaridosis de tipo I (tipos IH, IH/S e IS o síndromes de Hurler, Hurler-
25 Scheie y Scheie), así como niños con síndrome de Hurler en espera de un

TCMH (durante la búsqueda de un donante familiar/no familiar) y durante 3 a 6 meses después del TCMH hasta que se estabilice el estado del niño; Junto con esto, Aldurazym está indicado para pacientes que padecen síndrome de Hurler después de un TCMH en los casos en los que el nivel de la enzima donante α -L-iduronidasa permanece bajo.

La Laronidasa (Biomarin Pharmaceutical Inc., EE. UU.) es una forma recombinante de α -L-iduronidasa humana, producida mediante tecnología de ADN recombinante utilizando cultivo de células de ovario de hámster chino. Se ha establecido que, tras una administración intravenosa, la laronidasa abandona rápidamente la circulación sistémica y es absorbida por las células a través de los receptores de manosa-6-fosfato (M6PR), entrando en los lisosomas. El fármaco se administra por vía intravenosa (a una dosis de 100 unidades/kg de peso corporal), durante 3–4 horas, una vez a la semana.

La laronidasa es una proteína recombinante de 628 restos de aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 83 kDa. Su molécula contiene 6 secciones que se unen a través del grupo amino a oligosacáridos de diferentes estructuras, incluidos los que contienen restos de manosa-6-fosfato (M6P) (Rodney J.Y. Ho, Biotechnology and biopharmaceuticals: transforming proteins and genes into drugs. - Wiley-Blackwell, 2013, pág. 380). Se ha establecido que la molécula de laronidasa no atraviesa la barrera hematoencefálica (la barrera fisiológica entre la circulación periférica y el cerebro, que está formada por las uniones estrechas de las membranas plasmáticas de las células endoteliales de los capilares cerebrales, que crean una barrera estrecha que limita la transferencia de moléculas al cerebro, incluso moléculas muy pequeñas; en lo sucesivo en el presente documento

indicada como BHE) y, por lo tanto, no ralentiza ni previene la aparición de trastornos del sistema nervioso central (SNC) característicos de la mucopolisacaridosis de tipo I (Pastores G.M. *et al.*, 2007).

La mucopolisacaridosis de tipo II (MPS-II, síndrome de Hunter), a
5 diferencia de todas las demás formas de mucopolisacaridosis que tienen un modo de herencia autosómico recesivo, es la única forma de mucopolisacaridosis con un modo de herencia recesivo ligado al cromosoma X. La MPS II es patología heterogénea según las manifestaciones clínicas, progresiva de la acumulación lisosómica, que resulta de la deficiencia de la
10 enzima iduronato-2-sulfatasa (idursulfasa). Esta enzima normalmente participa en la degradación de los mucopolisacáridos sulfato de dermatano y sulfato de heparano debido a la eliminación hidrolítica del grupo sulfato ligado a O. En consecuencia, en el caso de la MPS II, el principal mecanismo patogénico está asociado con la acumulación progresiva de sulfatos de dermatano y heparano
15 en los lisosomas.

Los síntomas clínicos más comunes de la MPS-II son retraso mental, macroglosia, patologías características de los huesos de la cara, alopecia, anomalías dentales, enfermedad pulmonar restrictiva, hepatoesplenomegalia, patología de las válvulas cardíacas, patologías osteoarticulares, talla baja
20 grave. Igualmente, a menudo se observan trastornos neurológicos progresivos, acompañados de hidrocefalia y aumento de la presión intracraneal. La muerte se suele producir entre la segunda y la tercera década de la vida, más a menudo a causa de insuficiencia respiratoria y/o cardíaca. Es importante enfatizar que la enfermedad se produce con la participación del sistema
25 nervioso en el proceso patológico, incluido el deterioro cognitivo.

Hoy en día, existen dos métodos principales para tratar la MPS II: TRE y terapia sintomática (incluye el uso de hepatoprotectores, fármacos cardiovasculares y antiinflamatorios, vitaminas y fármacos que mejoran la protección antioxidante). El TCMH para el tratamiento de la MPS II, a diferencia
5 de la mucopolisacaridosis de tipo I, no es eficaz.

La Elaprased (DCI: idursulfasa) (Shayer, EE. UU.) es un producto médico que representa la iduronato-2-sulfatasa humana recombinante. Esta enzima es responsable de la hidrólisis de los enlaces de éster de sulfato C2 de los restos de ácido idurónico, que forman parte de los glucosaminoglucanos
10 (mucopolisacáridos) del sulfato de dermatano y del sulfato de heparano (Burrow T. A. *et al.*, 2013). La pauta posológica normal de Elaprased es 0,5 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana; la administración se realiza mediante infusión intravenosa durante 3 horas (el tiempo de infusión se puede reducir gradualmente a 1 hora).

15 La idursulfasa contiene dos enlaces disulfuro y ocho sitios de glucosilación ligados a N ocupados por oligosacáridos complejos con alto contenido de manosa. La presencia de restos de M6P en las cadenas de oligosacáridos permite que la enzima recombinante se una a los receptores de M6P en la superficie de las células diana, lo que conduce a la internalización de
20 esta enzima en las células y su internalización en los lisosomas, donde garantiza la degradación de los mucopolisacáridos lisosómicos (Muenzer J., *et al.*, Genet Med agosto de 2006;8(8):465 – 473).

Al realizar la TRE, la esperanza de vida de los pacientes con síndrome de Hunter aumenta varias veces. A pesar de esto, la Elaprased tampoco
25 atraviesa la barrera hematoencefálica; como resultado, al realizar la TRE con

Elaprased, los pacientes mueren a la edad de 20 años por consecuencias neurodegenerativas y, en la segunda década de la vida, los pacientes que reciben Elaprased, en general, experimentan grandes dificultades de aprendizaje y necesitan ayuda incluso en la vida cotidiana (da Silva E. M. *et al.*, 2016; 5 Wraith J.E. *et al.*, 2008).

Por lo tanto, una desventaja común de todos los fármacos actualmente existentes utilizados para la TRE de la mucopolisacaridosis de tipos I y II es su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica hacia el sistema nervioso central, lo que limita la eficacia del uso de estos fármacos en 10 pacientes con daño del sistema nervioso asociado con la mucopolisacaridosis, incluidas las mucopolisacaridosis de tipos I y II.

Para muchas enfermedades por almacenamiento lisosómico, existe la necesidad de mejorar la internalización de la enzima en las células de determinados tejidos periféricos (músculos del diafragma en la enfermedad de 15 Pompe, hígado y bazo en la enfermedad de Hunter, riñones en la enfermedad de Fabry, etc.) (Hawkes C. *et al.*, 2004).

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar un compuesto terapéutico que pueda usarse para tratar una enfermedad por almacenamiento lisosómico, tal como MPS de tipo I o MPS de tipo II, y que conserve las 20 propiedades funcionales de la enzima terapéutica correspondiente, al tiempo que demuestra una alta actividad y una mayor capacidad para ser transportado a los lisosomas de las células tisulares de diversos órganos, incluidos los lisosomas de las células del tejido nervioso, y permite conseguir una mejora significativa de la calidad y esperanza de vida de los pacientes con MPS de 25 tipos I y II.

Ventajas de la invención

Los objetivos anteriores se resuelven con éxito en la presente invención, que se refiere a un compuesto destinado al tratamiento de la enfermedad por almacenamiento lisosómico, que contiene una enzima terapéutica y un
5 elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde el elemento de transporte especificado es un fragmento Fab de una inmunoglobulina IgG, específico de un epítipo del receptor de insulina. La invención se basa en el descubrimiento inesperado de que un elemento de transporte, que es un fragmento Fab de una inmunoglobulina IgG
10 específica de un epítipo del receptor de insulina, acoplado directamente o mediante un conector a una enzima terapéutica, conduce inesperadamente a una mejora de la capacidad de la enzima para ser transportada a los lisosomas de diversos órganos y tejidos, incluidos los lisosomas de las células del tejido nervioso y, al mismo tiempo, la actividad enzimática del compuesto se
15 mantiene en un nivel alto. Gracias a este efecto inesperado, se están logrando avances en el campo de la terapia de reemplazo enzimático para enfermedades por almacenamiento lisosómico, tales como mucopolisacaridosis de tipos I y II, y aumentando la duración y mejorando la calidad de vida de los sujetos que padecen enfermedades por almacenamiento lisosómico y que
20 requieren terapia. El compuesto de la presente invención también proporciona una ampliación del arsenal de agentes utilizados para el tratamiento y la prevención de enfermedades, en particular enfermedades por almacenamiento lisosómico tales como la mucopolisacaridosis, en particular la mucopolisacaridosis de tipos I y II.

25 Adicionalmente, se encontró un aumento inesperado de la actividad

enzimática de un compuesto que contiene un elemento de transporte, que es un fragmento Fab de una inmunoglobulina IgG específica para un epítipo del receptor de insulina, acoplado directamente o mediante un conector a una enzima terapéutica, en comparación con una enzima terapéutica sin elemento de transporte; y también que la introducción de un compuesto que contiene un elemento de transporte, que es un fragmento Fab de una inmunoglobulina IgG específica para un epítipo del receptor de insulina, acoplado directamente o mediante un conector a una enzima terapéutica proporciona un mayor grado de sustitución de la actividad de la enzima terapéutica en el cerebro humano en comparación con los compuestos que contienen un fragmento Mab.

Sumario de la invención

El presente sumario de la invención presenta una breve descripción de la presente invención para delinear brevemente la materia objeto y la esencia de la presente invención. El sumario de la invención se proporciona teniendo en cuenta que no debe utilizarse para interpretar o limitar el alcance o contenido de las reivindicaciones.

La primera materia objeto de la presente invención es un compuesto destinado al tratamiento de la enfermedad por almacenamiento lisosómico, que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde el elemento de transporte es un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG específica para un epítipo del receptor de insulina.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que comprende una enzima terapéutica y un elemento de

transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde el elemento de transporte es un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG específica para un epítipo del receptor de insulina y es capaz de transportar esta enzima a través de la barrera hematoencefálica.

5 En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte, en donde el elemento de transporte es un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG específica para un epítipo del receptor de insulina y es
10 capaz de transportar dicha enzima a través de la barrera hematoencefálica, en donde la enzima terapéutica y el elemento de transporte están acoplados entre sí mediante un conector. El conector puede ser un conector peptídico que contiene uno o más aminoácidos. El conector puede ser un conector peptídico que contiene uno o más aminoácidos seleccionados de glicina, serina y
15 leucina.

 En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde
20 el elemento de transporte es un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG, en donde la inmunoglobulina IgG es IgG1, IgG2 o IgG4.

 En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que comprende una enzima terapéutica y un elemento de
25 transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde

el elemento de transporte es un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG, en donde la inmunoglobulina IgG es IgG1.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento
5 lisosómico, que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde el elemento de transporte es un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG1 que consta de cadenas ligeras de inmunoglobulina IgG1 para el receptor de insulina (SEQ ID NO: 2, 8, 9, 10 y 11) y la cadena pesada (SEQ ID NO: 3). En una realización
10 particular, la materia objeto de la presente invención es un compuesto donde el elemento de transporte es un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG1, que consiste en una cadena ligera de una inmunoglobulina IgG1 para el receptor de insulina SEQ ID NO: 2 y una cadena pesada SEQ ID NO: 3.

En una realización específica, la presente invención es un compuesto
15 para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde la enzima terapéutica se usa para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, incluido el tratamiento de una deficiencia enzimática característica de esta
20 enfermedad por almacenamiento lisosómico.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde
25 la enzima terapéutica se usa para tratar una enfermedad por almacenamiento

lisosómico con un componente neurológico, incluido, para el tratamiento de deficiencia enzimática característica de esta enfermedad por almacenamiento lisosómico.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde la enzima terapéutica para una enfermedad por almacenamiento lisosómico con un componente neurológico se selecciona del grupo que consiste en iduronato-2-sulfatasas y α -L-iduronidasas.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde la enzima terapéutica para una enfermedad por almacenamiento lisosómico con un componente neurológico se selecciona del grupo que consiste en iduronato-2-sulfatasa, un fragmento de iduronato-2-sulfatasa que tiene actividad iduronato-2-sulfatasa o un análogo de iduronato-2-sulfatasa.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde la enzima terapéutica para una enfermedad por almacenamiento lisosómico con un componente neurológico se selecciona del grupo que consiste en α -L-iduronidasa, un fragmento de α -L-iduronidasa que tiene actividad α -L-

iduronidasa o un análogo de α -L-iduronidasa.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte
5 acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde dicho conector es un conector peptídico que contiene uno o más aminoácidos.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte
10 acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde dicho conector es un conector peptídico que contiene uno o más aminoácidos seleccionados de glicina, serina y leucina.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento
15 lisosómico que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde dicho elemento de transporte es capaz de transportar dicha enzima a lisosomas de células tisulares.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento
20 lisosómico que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, en donde dicho elemento de transporte es capaz de transportar dicha enzima a lisosomas de células de tejido neuronal.

25 Otra materia objeto de la invención es un compuesto para el tratamiento

o la prevención de una deficiencia enzimática (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa) en un sujeto que padece mucopolisacaridosis de tipo II, representado por la primera secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 8, 9, 10 u 11 y una segunda secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 4, 5, 12, 13, 14 o 15. En una realización particular, la presente invención proporciona un compuesto para el tratamiento o la prevención de una deficiencia enzimática (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa) en un sujeto que padece mucopolisacaridosis de tipo II, representado por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

10 Otra materia objeto de la invención es un compuesto para el tratamiento o la prevención de una deficiencia enzimática (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa) en un sujeto que padece mucopolisacaridosis de tipo II con un componente neurológico, representado por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

15 Otra materia objeto de la invención es un compuesto para el tratamiento o la prevención de una deficiencia enzimática (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa) en un sujeto que padece mucopolisacaridosis de tipo II con un componente neurológico, representado por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5.

20 Otra materia objeto de la invención es un compuesto para el tratamiento o la prevención de deficiencia enzimática (deficiencia de α -L-iduronidasa) en un sujeto que padece mucopolisacaridosis de tipo I, representado por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6.

Otra materia objeto de la invención es un compuesto representado por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, para el

25

tratamiento o la prevención de la deficiencia enzimática (deficiencia de α -L-iduronidasa) en un sujeto que tiene mucopolisacaridosis de tipo I.

Otra materia objeto de la invención es un compuesto representado por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, para el
5 tratamiento o la prevención de la deficiencia enzimática (deficiencia de α -L-iduronidasa) en un sujeto que tiene mucopolisacaridosis de tipo I con un componente neurológico.

Otra materia objeto de la invención es un compuesto representado por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 7, para el
10 tratamiento o la prevención de la deficiencia enzimática (deficiencia de α -L-iduronidasa) en un sujeto que tiene mucopolisacaridosis de tipo I con un componente neurológico.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados
15 entre sí directamente o mediante un conector para preparar una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de este compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados
20 entre sí directamente o mediante un conector para el tratamiento o prevención de un sujeto que padece una enfermedad por almacenamiento lisosómico, que comprende administrar a dicho sujeto dicho compuesto en una cantidad eficaz.

En una realización específica, la invención se refiere al uso de un compuesto que comprende una enzima terapéutica y un elemento de
25 transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector para el

tratamiento o la prevención de la deficiencia enzimática en un sujeto que padece una enfermedad por almacenamiento lisosómico, en donde la enfermedad por almacenamiento lisosómico es mucopolisacaridosis, en donde el compuesto se administra al sujeto en una cantidad eficaz, preferentemente
5 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización específica, la invención se refiere al uso de un compuesto que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, para el tratamiento o la prevención de la deficiencia enzimática (deficiencia de
10 iduronato-2-sulfatasa) en un sujeto que tiene una enfermedad por almacenamiento lisosómico, en donde la enfermedad por almacenamiento lisosómico es mucopolisacaridosis de tipo II con un componente neurológico, en donde el compuesto se administra al sujeto en una cantidad eficaz, preferentemente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable

15 En una realización específica, la invención se refiere al uso de un compuesto que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, para el tratamiento o la prevención de la deficiencia enzimática (deficiencia de α -L-iduronidasa) en un sujeto que tiene una enfermedad por almacenamiento
20 lisosómico, en donde la enfermedad por almacenamiento lisosómico es mucopolisacaridosis de tipo I con un componente neurológico, en donde el compuesto se administra al sujeto en una cantidad eficaz, preferentemente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto
25 que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados

entre sí directamente o mediante un conector, para el tratamiento o la prevención de la deficiencia enzimática (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa) en un sujeto que tiene una enfermedad por almacenamiento lisosómico, en donde la enfermedad por almacenamiento lisosómico es mucopolisacaridosis de tipo II, en donde el compuesto está representado por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, para la preparación de una composición farmacéutica que contiene dicho compuesto en una cantidad eficaz y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de un compuesto que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplados entre sí directamente o mediante un conector, para el tratamiento o la prevención de la deficiencia enzimática (deficiencia de iduronato-2-sulfatasa) en un sujeto que tiene una enfermedad por almacenamiento lisosómico, en donde la enfermedad por almacenamiento lisosómico es una mucopolisacaridosis de tipo II, en donde los compuestos están representados por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, para el tratamiento o la prevención de una deficiencia enzimática en un sujeto.

En otras realizaciones, el enfoque de la presente invención se puede utilizar para tratar otras enfermedades por almacenamiento lisosómico, en particular, para tratar otros tipos de mucopolisacaridosis, tales como la mucopolisacaridosis de tipo III (síndrome de Sanfilippo), incluidas las mucopolisacaridosis de tipo IIIA, tipo IIIB, tipo IIIC y tipo IIID; mucopolisacaridosis de tipo IV (síndrome de Morquio), incluidas las mucopolisacaridosis de tipo IVA y tipo IVB; mucopolisacaridosis de tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy), mucopolisacaridosis de tipo VII (síndrome de

Sly) y mucopolisacaridosis de tipo IX. En estos casos, en lugar de α -L-iduronidasa o iduronato-2-sulfatasa, se utiliza otra enzima terapéutica como enzima terapéutica adecuada, cuya deficiencia encuentran pacientes con la forma correspondiente de mucopolisacaridosis: sulfamidasa de heparano - para
5 mucopolisacaridosis de tipo IIIA, N-acetilglucosaminidasa - para mucopolisacaridosis de tipo IIIB, heparan- α -glucosaminidasa-N-acetiltransferasa - para mucopolisacaridosis de tipo IIIC, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa - para mucopolisacaridosis de tipo IIID, galactosa-6-sulfato sulfatasa - para mucopolisacaridosis de tipo IVA, β -galactosidasa - para mucopolisacaridosis de
10 tipo IVB, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa - para mucopolisacaridosis de tipo VI, β -glucuronidasa - para mucopolisacaridosis de tipo VII y hialuronidasa - para mucopolisacaridosis de tipo IX. Las secuencias de aminoácidos de estas enzimas terapéuticas se pueden obtener usando cualquiera de varios programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, BLAST o FASTA,
15 etc. Tanto BLAST como FASTA tienen capacidades de búsqueda en línea y fuera de línea (véase Ausubel *et al.*, 1999 misma referencia, páginas 7-58 - 7-60, sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos en el sitio web de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos).

20 El enfoque propuesto en la presente invención, en realizaciones alternativas de la invención, también se puede utilizar para el tratamiento de enfermedades por almacenamiento lisosómico no relacionadas con las mucopolisacaridosis, utilizando, en lugar de α -L-iduronidasa o iduronato-2-sulfatasa, otra enzima lisosómica, que es deficiente en pacientes que tienen la
25 correspondiente enfermedad por almacenamiento lisosómico. En determinadas

realizaciones no limitantes de la presente invención, el enfoque propuesto puede aplicarse, en particular, al tratamiento de trastornos del metabolismo de los aminoácidos, tales como la cistinosis; para el tratamiento de trastornos del metabolismo de los carbohidratos, tales como enfermedades por
5 almacenamiento de glucógeno, en particular la enfermedad de Pompe; trastornos del metabolismo de los esfingolípidos y otras enfermedades por almacenamiento de lípidos, en particular gangliosidosis GM₂, incluidas la enfermedad de Sandhoff y la enfermedad de Tay-Sachs; otras gangliosidosis, en particular gangliosidosis GM₁ y mucopolipidosis IV; otras esfingolipidosis, en
10 particular la enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Niemann-Pick, síndrome de Farber, leucodistrofia metacrómica y deficiencia múltiple de sulfatasa; lipofuscinosis de las neuronas, en particular, enfermedades de Batten, Bielschowsky-Jansky, Kufs, Spielmeyer-Vogt; otros trastornos por almacenamiento de lípidos, en particular
15 la enfermedad de Wolman, así como para el tratamiento de trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, incluidas la mucopolipidosis II (enfermedad de células I), mucopolipidosis III (pseudolipodistrofia de Hurler), y para el tratamiento de defectos en la degradación de glucoproteínas, incluidos la aspartilglucosaminuria, fucosidosis, mannosidosis y sialidosis.

20 En estos casos, en lugar de α -L-iduronidasa o iduronato-2-sulfatasa, la secuencia de aminoácidos de la enzima correspondiente, que es deficiente en pacientes con la correspondiente enfermedad por almacenamiento lisosómico, se acopla al elemento de transporte directamente o mediante un conector.

Las realizaciones más preferidas de la presente invención se describen
25 a continuación. Sin embargo, estas realizaciones preferidas se proporcionan

únicamente con fines ilustrativos de la presente invención y no para limitar el alcance de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La invención se ilustra mediante las siguientes figuras.

5 La figura 1 muestra un autorradiograma representativo de un macaco cangrejero macho registrado 2 horas después de una única administración intravenosa de [¹²⁵I]-HIR-Fab-IDS a un nivel de dosis nominal de 0,0020 mg/kg de peso corporal.

10 La figura 2 muestra un autorradiograma representativo de un macaco cangrejero macho registrado 2 horas después de una única administración intravenosa de [¹²⁵I]-HIR-Mab-IDS a un nivel de dosis nominal de 0,0015 mg/kg de peso corporal.

15 La figura 3 muestra un autorradiograma representativo de un macaco cangrejero macho registrado 2 horas después de una única administración intravenosa de [¹²⁵I]-IDS (control) a un nivel de dosis nominal de 0,0010 mg/kg de peso corporal.

Descripción detallada de la invención

20 A menos que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto normal en la materia (p. ej., genética molecular, química de ácidos nucleicos, química de proteínas, bioquímica, química orgánica, inmunología, microbiología, genética, etc.).

25 Como se usa en el presente documento, el término "**compuesto**" se entiende en su sentido más amplio como al menos una molécula que es un conjugado, proteína de fusión, construcción proteica, complejo proteico, etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**que contiene**" se refiere a un compuesto que contiene los elementos enumerados sin excluir otros.

En la presente memoria descriptiva, las expresiones "**enzima**
5 **terapéutica**" y "**enzima**" son sinónimos y se refieren a una enzima para el tratamiento de enfermedades resultantes de la ausencia, deficiencia, disfunción de la enzima, etc., en donde el sujeto que padece las enfermedades puede ser tratado mediante TRE, administración de la enzima, etc. En particular, la enzima puede ser una enzima para el tratamiento de enfermedades que
10 pueden producirse debido a, pero sin limitación, ausencia, deficiencia y disfunción de una enzima lisosómica.

La enzima terapéutica que se incluye en el compuesto de la presente divulgación incluye cualquier enzima que tenga un efecto terapéutico contra una enfermedad por almacenamiento lisosómico, incluidas, sin limitación, β -
15 glucosidasa, β -galactosidasa, galactosa-6-sulfatasa, ceramidasa ácida, esfingomielinasa ácida, galactocerebrosidasa, arilsulfatasa A, β -hexosaminidasa A, β -hexosaminidasa B, heparina-N-sulfatasa, α -D-manosidasa, β -glucuronidasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, lipasa ácida lisosómica, α -N-acetil-D-glucosaminidasa (NAGLU), glucocerebrosidasa,
20 butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato descarboxilasa, lipasa, uricasa, factor activador plaquetario acetilhidrolasa, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, acetil-CoA-glucosaminida-N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, galactosamina-6-sulfatasa (GALN), hialuronidasa, α -fucosidasa, β -manosidasa, α -neuraminidasa (sialidasa), N-acetil-glucosamina-1-fosfotransferasa,
25 mucolipina-1, α -N-acetil-galactosaminidasa, N-aspartil- β -glucosaminidasa,

LAMP-2 (proteína 2 de membrana asociada a lisosomas), cistinosina, sialina, ceramidasa, P-glucosidasa ácida, galactosilceramidasa, NPC1 (proteína de la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1), catepsina A, SUMF-1 (factor modificador de sulfatasa-1), lipasa ácida lisosómica (LIPA) y tripeptidil
5 peptidasa 1.

En particular, la enzima terapéutica incluye enzimas tales como agalcidasa, imiglucerasa, galsulfasa, iduronato-2-sulfatasa y α -L-iduronidasa. Más preferentemente, la enzima terapéutica es iduronato-2-sulfatasa o α -L-iduronidasa.

10 Sin embargo, la presente descripción también puede abarcar cualquier enzima terapéutica, sin limitación, independientemente del tipo u origen de la enzima.

En la presente divulgación, la expresión "**iduronato-2-sulfatasa**", así como "**idursulfasa**", "**IDS**", "**I2S**", significa un análogo recombinante de la
15 enzima lisosómica iduronato-2-sulfatasa, que normalmente hidroliza el grupo de mucopolisacáridos con sulfato ligado a O: sulfatos de dermatano y heparano. En la presente invención, la expresión "**iduronato-2-sulfatasa**" se puede utilizar indistintamente con el término "**idursulfasa**".

En el contexto de la presente divulgación, los términos "**HIR-Fab-IDS**"
20 así como "**rIDS-FAB-HI**", "**rHI-FAB-IDS**", "**rIDS-FAB-HIR**" y "**rHIR-FAB-IDS**" son sinónimos y se refieren a una proteína recombinante híbrida de iduronato-2-sulfatasa, unida covalentemente al fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal contra el receptor de insulina humana. Como se usa en el presente documento, "**HIR-Fab-IDS**" significa, pero sin limitación, iduronato-2-sulfatasa
25 con un fragmento de anticuerpo monoclonal contra el receptor de insulina

humana. En realizaciones particulares (no limitantes) de la presente invención, las variantes de HIR-Fab-IDS están representadas por una primera secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 8, 9, 10 u 11 y una segunda secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 4, 5, 12, 13, 14 o 15. En una realización particular de la presente invención, la HIR-Fab-IDS está representada por la primera secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y la segunda secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En el contexto de la presente divulgación, "**HIR-Mab-IDS**" es una proteína de fusión recombinante de iduronato-2-sulfatasa unida covalentemente a un anticuerpo monoclonal de longitud completa contra el receptor de insulina humana. En realizaciones particulares (no limitantes) de la presente invención, las variantes de HIR-Mab-IDS son variantes según el documento de patente de los EE. UU. US8834874 B2, 16.09.2014. En una realización específica de la presente invención, la HIR-Mab-IDS es la secuencia de aminoácidos del producto de ArmaGen Technologies Inc. según el proyecto AGT-182.

En la presente divulgación, el término " **α -L-iduronidasa**" así como "**iduronidasa**", "**laronidasa**", "**IDUA**" se refiere a una enzima implicada en la hidrólisis de glucosaminoglucanos tales como el sulfato de dermatano y el sulfato de heparano. Como se usa en el presente documento, el término " **α -L-iduronidasa**" puede usarse indistintamente con el término "**laronidasa**". La deficiencia (deficiencia determinada genéticamente) de iduronidasa, que se produce en la mucopolisacaridosis de tipo I, conduce a la acumulación gradual de glucosaminoglucanos (sulfato de heparano y sulfato de dermatano) en las células y tejidos del cuerpo.

"HIR-Fab-IDUA", así como "rIDUA-FAB-HI", "rHI-FAB-IDUA", "rIDUA-FAB-HIR", "rHIR-FAB-IDS", es una proteína recombinante de fusión α -L-iduronidasa, unida covalentemente al fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal contra el receptor de insulina humana. En realizaciones
5 particulares (no limitantes) de la presente invención, las variantes de HIR-Fab-IDUA están representadas por una primera secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 8, 9, 10 u 11 y una segunda secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 6, 7.

HIR-Mab-IDUA es una proteína de fusión recombinante de α -L-iduronidasa unida covalentemente a un anticuerpo monoclonal de longitud
10 completa contra el receptor de insulina humana.

Las enzimas terapéuticas que pueden incluirse en los compuestos de la presente invención pueden estar en su forma nativa, así como en forma de fragmentos que consisten en partes de enzimas o análogos de enzimas en los
15 que se ha producido una variación seleccionada del grupo que consiste en sustitución, adición, supresiones, modificaciones de determinados aminoácidos y combinaciones de los mismos, sin limitación, siempre que tengan la misma actividad enzimática que las formas nativas de las correspondientes enzimas terapéuticas. En realizaciones particulares (no limitantes) de la invención, se
20 pueden utilizar fragmentos enzimáticos que tienen la actividad de formas nativas de las enzimas correspondientes. Los análogos enzimáticos son, sin limitación, las enzimas que tienen diferentes características de glucosilación y grados de glucosilación debido a la expresión de la enzima conocida en diferentes hospedadores, así como diversos grados de sustitución de restos de
25 aminoácidos específicos de la enzima correspondiente con respecto a la

secuencia convencional, donde el grado de sustitución no es 100 % de sustitución. En realizaciones privadas (no limitantes) de la invención, se pueden usar análogos de α -L-iduronidasa, conocidos por las patentes US5932211 A, 03/08/1999, US6153188 A, 28/11/2006, y US6541254 B1, 01/04/2003, así
5 como análogos de iduronato-2-sulfatasa. Un experto normal en la materia entenderá que se pueden utilizar otros fragmentos y análogos de las enzimas α -L-iduronidasa e iduronato-2-sulfatasa, que tienen la actividad de formas nativas de las enzimas correspondientes que se conocen actualmente en la técnica o que se conocerán más adelante.

10 Las enzimas pueden producirse mediante métodos convencionales en la técnica, por ejemplo, mediante recombinación genética en células animales, *E. coli*, levadura, insectos, plantas y animales vivos, etc., utilizando diversos vectores de expresión bien conocidos por un experto en la materia. Los métodos de producción no se limitan a estos y también incluyen otros métodos
15 para producir enzimas conocidos por un experto en la materia. Para ejemplos no limitantes de dichos métodos para producir enzimas en las células de diversos organismos, así como ejemplos no limitativos de vectores de expresión, véase Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" - CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989, "Current Protocols in Molecular Biology,
20 John Wiley & Sons, Nueva York, 2001. En realizaciones preferidas de la invención, las enzimas se producen en células de mamíferos. En las realizaciones más preferidas de la invención, las enzimas se producen en células de ovario de hámster chino.

En determinadas realizaciones preferidas de la invención, las enzimas
25 pueden ser enzimas disponibles en el mercado. Adicionalmente, las enzimas

pueden incluir una secuencia de aminoácidos con una homología de al menos 80 %, más particularmente 90 % y aún más particularmente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más con las enzimas anteriores o análogos de las mismas, y las enzimas pueden obtenerse de microorganismos
5 usando tecnología recombinante o pueden adquirirse de fuentes comerciales, sin limitación.

En la presente divulgación, el término "**homología**" significa el grado de similitud con la secuencia de aminoácidos de una proteína natural o una secuencia de nucleótidos que codifica aminoácidos y abarca secuencias que
10 tienen el grado de similitud de secuencia anterior, expresadas como porcentaje, con las secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos de la presente invención. La homología se puede determinar comparando dos secuencias determinadas a simple vista o se puede determinar utilizando un algoritmo bioinformático que permite el análisis de homología alineando las secuencias
15 en cuestión para compararlas. La homología entre dos secuencias de aminoácidos dadas se puede indicar como porcentaje. Existen algoritmos automáticos eficaces que se pueden utilizar en los módulos de software GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del paquete de software Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI, EE. UU.). El algoritmo de alineación
20 automático en estos módulos incluye los algoritmos de alineación de secuencias de Needleman y Wunsch, Pearson y Lipman, y Smith y Waterman. Otros algoritmos que se pueden utilizar para la alineación de secuencias y la determinación de homología están automatizados en los programas FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST y CLUSTAL W. Se pueden obtener secuencias de
25 aminoácidos y secuencias de nucleótidos que codifican enzimas y sus

análogos de una base de datos bien conocida tal como, pero sin limitación, GenBank del NCBI.

En algunas realizaciones, el elemento de transporte compuesto comprende un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG1 que consiste en una
5 primera secuencia de aminoácidos al menos un 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % o más idéntica a la SEQ ID NO: 2.

En realizaciones específicas, el elemento de transporte compuesto comprende un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG1 que consiste en una
10 primera secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % o más idéntica a la SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, un compuesto representado por una primera secuencia de aminoácidos al menos un 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % o más idéntica a
15 la SEQ ID NO: 2 y una segunda secuencia de aminoácidos al menos idéntica a la SEQ ID NO: 4, utilizado para el tratamiento o la prevención de la deficiencia de enzimas lisosómicas en un sujeto con mucopolisacaridosis de tipo II.

En realizaciones específicas, un compuesto que tiene una primera secuencia de aminoácidos al menos un 80 % o más idéntica a la SEQ ID NO: 2
20 y una segunda secuencia de aminoácidos al menos idéntica a la SEQ ID NO: 4, utilizado para el tratamiento o la prevención de la deficiencia de enzimas lisosómicas en un sujeto con mucopolisacaridosis de tipo II.

El término "**aminoácido**" se refiere a un grupo de carboxi- α -aminoácidos que se encuentran en la naturaleza, es decir, que pueden estar codificados por
25 un ácido nucleico directamente o en forma de precursor, o que no se

encuentran en la naturaleza. Los aminoácidos naturales individuales están codificados por ácidos nucleicos que constan de tres nucleótidos, denominados codones o triplete de bases. Cada aminoácido está codificado por al menos un codón.

- 5 El término "**aminoácidos**" como se usa en el presente documento se refiere a carboxi- α -aminoácidos naturales, incluidos los siguientes: alanina (código de tres letras: Ala, código de una letra: A), arginina (Arg, R), asparagina (Asn, N), ácido aspártico (Asp, D), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), ácido glutámico (Glu, E), glicina (Gly, G), histidina (His, H), isoleucina (Ile, I), leucina
- 10 (Leu, L), lisina (Lys, K), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), prolina (Pro, P), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), triptófano (Trp, W), tirosina (Tyr, Y) y valina (Val, V). Los ejemplos de aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza (aminoácidos no proteinógenos) incluyen, Aad (ácido alfa-aminoadípico), Abu (ácido aminobutírico), Ach (ácido alfa-
- 15 aminociclohexanocarboxílico), Acp (ácido alfa-aminociclopentanocarboxílico), Acpc (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), Aib (ácido alfa-aminoisobutírico), Aic (ácido 2-aminoindan-2-carboxílico; también denominado 2-2-Aic), 1-1-Aic (ácido 1-aminoindan-1-carboxílico), (ácido 2-aminoindan-2-carboxílico), alilglicina (alilGly), aloisoleucina (alo-Ile), Asu (ácido alfa-
- 20 aminosubérico, ácido 2-aminooctanodioico), Bip (ácido 4-fenil-fenilalanina-carboxílico), BnHP ((2S,4R)-4-hidroxiprolina), Cha (beta-ciclohexilalanina), Cit (citrulina), ciclohexilglicina (Chg), ciclopentilalanina, beta-ciclopropilalanina, Dab (ácido 1,4-diaminobutírico), Dap (ácido 1,3-diaminopropiónico, p-(ácido 3,3-difenilalanina-carboxílico), 3,3-difenilalanina, di-n-propilglicina (Dpg), 2-
- 25 furilalanina, homociclohexilalanina (HoCha), homocitrulina (HoCit),

homocicloleucina, homoleucina (HoLeu), homoarginina (HoArg), homoserina (HoSer), hidroxiprolina, Lys(Ac), (1) Nal (1-naftilalanina), (2) Nal (2-naftilalanina), 4-MeO-Ars (ácido 1-amino-4-(4-metoxifenil)-ciclohexano-1-carboxílico), nor-leucina (Nle), Nva (norvalina), omatina, 3-Pal (ácido alfa-amino-3-piridilalanina-carboxílico), 4-Pal (ácido alfa-amino-4-piridilalanina-carboxílico), 3,4,5,F3-Phe (3,4,5-trifluorofenilalanina), 2,3,4,5,6,F5-Phe (2,3,4,5,6-pentafluorofenilalanina), Pqa (ácido 4-oxo-6-(1-piperazinil)-3(4H)-quinazolina-acético (CAS 889958-08-1)), piridilalanina, quinolilalanina, sarcosina (Sar), tiazolilalanina, tienilalanina, Tic (ácido alfa-amino-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico), Tic(OH), Tle (*terc*-butilglicina) y Tyr(Me), pero no se limitan a ellos.

La expresión "**secuencia de aminoácidos**" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren en cierta medida del polipéptido con la secuencia nativa de la enzima terapéutica correspondiente.

Normalmente, las variantes de secuencias de aminoácidos tendrán al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia con un polipéptido con la secuencia nativa de la enzima terapéutica correspondiente. En una realización, la variante tiene aproximadamente un 80 % o más de identidad de secuencia con un polipéptido con la secuencia nativa de la enzima terapéutica correspondiente. En una realización, la variante tiene aproximadamente un 90 % o más de identidad de secuencia con un polipéptido con la secuencia nativa de la enzima terapéutica correspondiente. En una realización, la variante tiene aproximadamente un 95 % o más de identidad de secuencia con un polipéptido con la secuencia nativa de la enzima terapéutica correspondiente. En una realización, la variante tiene aproximadamente un 98 % o más de

identidad de secuencia con un polipéptido con la secuencia nativa de la enzima terapéutica correspondiente. Las variantes de secuencias de aminoácidos tienen sustituciones, supresiones y/o inserciones en posiciones específicas dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa de la enzima terapéutica correspondiente. Los aminoácidos se designan con nombres tradicionales, códigos de una y tres letras.

La expresión "primera secuencia de aminoácidos" como se usa en la presente invención se refiere a la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina IgG en general y a la cadena ligera de una inmunoglobulina IgG en particular. En realizaciones no limitantes específicas, la primera secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina IgG1, una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de inmunoglobulina IgG1, un fragmento de una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de inmunoglobulina IgG1 seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 8, 9, 10 u 11. En una realización particular, la primera secuencia de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de inmunoglobulina IgG - SEQ ID NO: 2.

La expresión "segunda secuencia de aminoácidos" como se usa en la presente invención se refiere a la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina IgG en general; a una cadena pesada de inmunoglobulina IgG, a un fragmento de cadena pesada de inmunoglobulina IgG, a un fragmento de cadena pesada de inmunoglobulina IgG acoplado a una secuencia enzimática directamente o mediante un conector, en particular. En realizaciones (no limitantes) específicas, la segunda secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina IgG1, una secuencia de

aminoácidos de un fragmento de cadena pesada - SEQ ID NO: 3, es un fragmento de cadena pesada de inmunoglobulina IgG1 acoplado a una secuencia de iduronato-2-sulfatasa seleccionada de SEQ ID NO: 4, 5, 12, 13, 14 o 15.

5 La expresión "**elemento de transporte**" como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que es capaz de portar, transportar, suministrar una enzima terapéutica a los lisosomas de células de diversos tejidos. En particular, pero sin limitación, el elemento de transporte interactuará específicamente con un epítopo, antígeno, receptor o diana de tal manera que
10 se garantice un suministro eficaz a los lisosomas de las células del tejido neural. Dicho epítopo, antígeno, receptor o diana en el contexto de la presente divulgación puede ser el receptor de la insulina humana o una parte del mismo, a través del cual se lleva a cabo el suministro de un fármaco, un péptido o una proteína, incluido a través de la BHC.

15 Una "**inmunoglobulina**" es una molécula tetramérica, la noción "**anticuerpo de longitud completa**" como se utiliza en el presente documento. En inmunoglobulinas de origen natural, cada tetrámero consiste en dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-
20 70 kDa). La parte N-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. La parte carboxilo de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora.

 En el contexto de la presente divulgación, el término "**anticuerpo**" se
25 utiliza en su sentido más amplio e incluye, pero sin limitación, anticuerpos

monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica necesaria.

5 Como se usa en el presente documento, los "**fragmentos de anticuerpos**" contienen una parte de un anticuerpo intacto que conserva la capacidad de unirse a un antígeno. Son ejemplos de fragmentos de anticuerpos los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; los anticuerpos diméricos (diacuerpo); los anticuerpos lineales; las moléculas de anticuerpos monocatenarios, tales como Fab monocatenario, scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La escisión de anticuerpos por la papaína produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, denominados "fragmentos Fab", que tienen cada uno un sitio de unión a antígeno y un "fragmento Fc" residual, nombre que refleja su capacidad para cristalizar con facilidad.

 El "**fragmento Fab**", "**Fab**", "**FAB**" es un fragmento monovalente que contiene dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene un dominio constante de cadena ligera y un primer dominio constante de cadena pesada. Como se usa en el presente documento, el elemento de transporte comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento Fab de una inmunoglobulina IgG, donde la inmunoglobulina IgG es IgG1, IgG2 o IgG4. En realizaciones particulares (no limitantes) de la presente invención, la inmunoglobulina IgG es IgG1. En una realización específica, el elemento de transporte comprende una secuencia de aminoácidos de un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG1 que consiste en una primera secuencia de aminoácidos

seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 8, 9, 10 u 11, y una segunda secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En una realización más específica, el elemento de transporte comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento Fab de inmunoglobulina IgG1 que consiste en la SEQ ID NO: 2 y la
5 SEQ ID NO: 3.

Como se usa en el presente documento, el término "**conector**" se refiere a un conector químico o conector peptídico monocatenario que acopla la enzima terapéutica y el elemento de transporte del compuesto de la presente invención. El conector acopla, por ejemplo, el elemento de enlace monovalente
10 que contiene el dominio CH2-CH3 de Ig y sFab, cuya diana es el receptor de insulina, es decir, un conector acopla el sFab al extremo C del dominio CH3-CH2 de Ig.

En algunas realizaciones, el conector es un conector peptídico. Se pueden utilizar conectores peptídicos monocatenarios que contienen de uno a
15 veinte aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. En realizaciones específicas, los aminoácidos se seleccionan entre veinte aminoácidos naturales (proteínogénicos). En otras realizaciones específicas, uno o más aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En realizaciones particulares (no limitantes) de la presente invención, uno o más
20 aminoácidos se seleccionan de glicina, serina y leucina.

En realizaciones específicas de la invención, dicho conector es un péptido monocatenario cuya secuencia de aminoácidos consiste en al menos 1 aminoácido, preferentemente 1-2 aminoácidos. En realizaciones particulares (no limitantes) de la presente invención, la secuencia de aminoácidos del
25 conector puede consistir en más de 1-2 aminoácidos, por ejemplo, 3 o 15

aminoácidos.

El acoplamiento de la enzima terapéutica y el elemento de transporte se puede lograr directamente o usando diversos conectores químicos conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones preferidas (no limitantes) de la invención, el acoplamiento de la enzima terapéutica y el elemento de transporte se puede lograr usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), imidioésteres bifuncionales (tales como dimetil adipimidato·HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bisazido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno y compuestos de bis-fluorina activa (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Un experto en la técnica también entenderá que para los fines de la presente invención se pueden usar otros conectores químicos y peptídicos conocidos en la técnica que no se mencionen expresamente en el presente documento.

En determinadas realizaciones preferidas de la invención, el conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación de la enzima terapéutica después del transporte del compuesto al interior de células y tejidos. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil frente a ácidos, un conector sensible a peptidasa, un conector fotolábil, un conector dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari R. *et al.*, Cancer Res. 52, 1992, págs. 127-131; documento US 5.208.020, Chari Ravi J. *et al.*, 04/05/1993). Un

experto en la materia también apreciará que para los fines de la presente invención se pueden usar otros conectores escindibles conocidos en la técnica para facilitar la liberación de la enzima terapéutica una vez que el compuesto ha entrado en las células y tejidos del sistema nervioso central.

5 El término "**epítopo**" es la región de un antígeno a la que se une una proteína de unión a antígeno, incluido un anticuerpo. Los epítopos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son generalmente un subconjunto de epítopos estructurales y tienen los restos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítopos también
10 pueden ser conformacionales, que están compuestos por aminoácidos no lineales, dicho de otra manera, los epítopos conformacionales están compuestos por aminoácidos no secuenciales. Los epítopos pueden incluir determinantes, que son fracciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos
15 fosforilo o grupos sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Como se usa en el presente documento, el epítopo es un epítopo del receptor de insulina representado por la SEQ ID NO: 1 descrita en Zhang B, Roth RA. (1991) Proc Natl Acad Sci U S A.; 88(21):9858-9862 y S A Prigent, K K Stanley y K Siddle.
20 (1990) J. Biol. 1991.

El "**receptor de insulina**" (HIR) es una glucoproteína transmembrana (con un peso molecular de aproximadamente 320.000 Da), que consiste en dos subunidades α y dos subunidades β unidas por enlaces disulfuro (las subunidades α están ubicadas extracelularmente y contienen un dominio de
25 unión a insulina) y participa en la regulación de la absorción y la distribución de

la glucosa, así como la síntesis y acumulación de grasas, proteínas y carbohidratos en el cuerpo humano. Los receptores de insulina y su dominio de unión a insulina extracelular (DEC) son ampliamente conocidos en la técnica, tanto estructural como funcionalmente. La localización de los receptores de insulina se refiere con mayor frecuencia a las superficies celulares de los tejidos sensibles a la insulina, tales como células del tejido conjuntivo, músculos esqueléticos, células del tejido adiposo, células hepáticas, etc. Véanse, por ejemplo, Yip *et al.* (2003), J Biol. Chem. 278 (30): 27329-27332; y Whittaker *et al.* (2005), J Biol Chem, 280 (22): 20932-20936. En una realización, el HIR del presente documento es un receptor de insulina humana que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en Kasuya *et al.* (Biochemistry 32 (1993) 13531-13536).

El receptor de insulina se expresa en casi todas partes y el uso de dicha vía de administración puede aumentar significativamente la biodisponibilidad de la enzima recombinante y aumentar la eficacia de la terapia. El suministro al tejido cerebral se realiza mediante transcitosis a través del endotelio capilar del sistema nervioso central, a través de la interacción con el receptor de insulina humana.

En tejidos periféricos y cerebrales (Hawkes C. *et al.*, 2004) que expresan M6PR, la internalización de la molécula quimérica puede producirse de ambas maneras: interacción anticuerpo-HIR e interacción enzima-M6PR. En este caso, el suministro dirigido a los lisosomas se produce mediante la interacción con los receptores M6P. La internalización a través del HIR (receptor de insulina humana) da lugar a la entrada en endosomas de orden temprano y la posterior transcitosis. Además de suministrar una enzima funcional al SNC,

muchas enfermedades por almacenamiento lisosómico requieren una mejor internalización por parte de determinados tejidos periféricos (músculos del diafragma en la enfermedad de Pompe, hígado y bazo en la enfermedad de Hunter, riñones en la enfermedad de Fabry, etc.).

5 El término "**específico**" significa que la molécula relacionada con el término puede formar un complejo con una región específica de otra molécula. La unión puede detectarse mediante ensayos *in vitro* tales como la resonancia de plasmones (BIAcore, GE-Healthcare, Uppsala, Suecia). La interacción específica de una molécula con el sitio de unión de otra molécula (afinidad de
10 formación de complejos) está determinada por los indicadores k_a (constante de velocidad para la asociación de compuestos para formar un complejo), k_D (constante de disociación, disociación del complejo) y $K_D(k_D/k_a)$. La unión o unión específica significa una afinidad de unión (K_D) de aproximadamente 10^{-7} M o menos, en una realización de aproximadamente 10^{-8} M a
15 aproximadamente 10^{-13} M, en una realización de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-13} M.

El término "**lisosoma**" se refiere a un orgánulo celular, un tipo de vesículas que contiene una serie de enzimas (hidrolasas ácidas) capaces de descomponer macromoléculas ya sea de la propia célula (por ejemplo, cuando
20 se procesan los componentes estructurales de la célula) o capturadas del exterior. Los defectos hereditarios o las deficiencias de las enzimas lisosómicas (u otros componentes lisosómicos) pueden provocar la acumulación de metabolitos sin degradar. Los glucosaminoglucanos (anteriormente denominados mucopolisacáridos) son polisacáridos comunes de las superficies
25 celulares y de la matriz y estructuras extracelulares. Las deficiencias

enzimáticas que dificultan la descomposición de los glucosaminoglucanos provocan la acumulación de fragmentos de glucosaminoglucanos en los lisosomas y cambios generalizados en el hueso, el tejido blando y el sistema nervioso central.

5 La "**actividad**" de la(s) enzima(s) de la invención se puede medir usando cualquier prueba adecuada. Normalmente, la determinación del pH y la determinación de la temperatura se pueden adaptar a la enzima en cuestión. Son ejemplos de valores de pH probados pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. Son ejemplos de temperaturas probadas 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70,
10 80, 90 o 95 °C. Los valores de pH y temperatura preferidos están en el intervalo fisiológico, tales como valores de pH de 4, 5, 6, 7 u 8 y temperaturas de 30, 35, 37 o 40 °C. Por ejemplo, la actividad proteasa se puede medir utilizando cualquier prueba que utilice un sustrato que incluya enlaces peptídicos relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

15 En la sección experimental se incluyen ejemplos de pruebas enzimáticas adecuadas, en particular, véase el ejemplo 2. Como se usa en el presente documento, el término "**actividad**" significa "**actividad enzimática**", "**actividad específica**", "**actividad enzimática específica**"; "**potencia específica**" dependiendo del contexto de la descripción.

20 La expresión "**barrera hematoencefálica**" o "**BHE**" se refiere a la barrera fisiológica entre el torrente sanguíneo periférico y el cerebro y la médula espinal, que está formada por uniones estrechas en las membranas plasmáticas endoteliales de los capilares cerebrales, que crean una barrera estrecha que limita el transporte de moléculas al cerebro, incluso moléculas
25 muy pequeñas tales como la urea (60 Da). La BHE en el cerebro, la barrera

hematomedular en la médula espinal y la barrera hematorretiniana en la retina son barreras capilares continuas en el SNC y generalmente se denominan en el presente documento barrera hematoencefálica (en lo sucesivo también denominada BHE). La BHE también incluye una barrera entre la sangre y el
5 líquido cefalorraquídeo.

"**Composición farmacéutica**" se refiere a una mezcla de uno o más de los compuestos descritos en el presente documento, o sales o profármacos fisiológica/farmacéuticamente aceptables de los mismos, con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes
10 fisiológica/farmacéuticamente aceptables. El objetivo de la composición farmacéutica es facilitar la administración del compuesto al organismo.

El término "cantidad eficaz" de un compuesto, por ejemplo, en una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad que es eficaz en dosis y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado (efecto) terapéutico o profiláctico deseado en un sujeto que se trata, respetando un
15 beneficio/riesgo razonable.

La expresión "**transportador farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un ingrediente de una composición farmacéutica, distinto del principio activo (compuesto, agente, etc.), que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo
20 farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante. En realizaciones particulares (no limitantes) de la presente invención, se administra un vehículo farmacéuticamente aceptable junto con el compuesto.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos usados
25 según la presente invención se preparan para su almacenamiento

mezclándolas con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a ed., ed. Osol A., 1980), preferentemente en forma de composiciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los excipientes, vehículos y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los sujetos a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros tampones ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol; alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y metacresol); polipéptidos de bajo peso molecular (que contienen menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como poli(vinilpirrolidona); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos que contienen metales (p. ej., complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en el presente documento también pueden contener opcionalmente más de una sustancia activa (fármaco) activa contra la enfermedad por almacenamiento lisosómico, opcionalmente sustancias con actividades adicionales que no se afectan negativamente entre sí. El tipo y las cantidades eficaces de dichos fármacos

dependen, por ejemplo, de la cantidad del compuesto que contiene enzima terapéutica y elemento de transporte presente en la composición y los parámetros clínicos de los sujetos.

La administración de dosis del compuesto terapéutico reivindicado se puede llevar a cabo mediante cualquier vía adecuada bien conocida por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante inyección, tal como inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. La elección de la vía específica de administración de un compuesto terapéutico la realiza un experto en la técnica y depende, en particular, de si la administración es a corto o largo plazo. Un experto en la materia apreciará que se pueden usar otras vías de administración conocidas en la técnica para administrar dosis del compuesto terapéutico reivindicado, tales como (pero sin limitación), administración intratecal, administración intraarterial, administración intraperitoneal, administración transdérmica, administración por inhalación, administración bucal, administración intranasal, administración oral, administración sublingual o administración transnasal (Felice B.R., Wright T.L., Boyd R.B. Safety Evaluation of Chronic Intrathecal Administration of Idursulfase-IT in Cynomolgus Monkeys. - Toxicol Pathol. agosto de 2011;39(5):879-9, documento WO 2011/044542 A1).

En el contexto de la presente divulgación, se pueden considerar diversas pautas posológicas, incluidas, pero sin limitación, administraciones únicas o múltiples en diferentes momentos, administración en embolada e infusión pulsátil.

El "**sujeto**", "**individuo**" o "**paciente**" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domésticos (p. ej., vacas, ovejas, gatos,

perros y caballos), primates (p. ej., seres humanos y primates tales como monos, en particular grandes simios), conejos y roedores (p. ej., ratones y ratas). En algunas realizaciones, el sujeto o paciente es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término "**tratamiento**" (y sus variaciones gramaticales, tales como "tratar" o "el proceso de tratamiento") se refiere a una intervención clínica con el objetivo de cambiar la evolución natural de una enfermedad en el individuo que se trata y puede llevarse a cabo ya sea para prevención o en el proceso de desarrollo de la patología clínica. Las acciones de tratamiento deseadas incluyen, pero sin limitación, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, reducción de la tasa de avance de la enfermedad, alivio o mejora temporal del estado del cuadro clínico y remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o frenar la progresión de una enfermedad.

La expresión "**SNC**" o "**sistema nervioso central**" se refiere al complejo de tejidos nerviosos que controlan la función corporal e incluye el cerebro y la médula espinal.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**enfermedad por almacenamiento lisosómico**" (LSD; también puede denominarse "**trastorno por almacenamiento lisosómico**") se refiere a un trastorno genético poco común que da lugar a la pérdida de las funciones lisosómicas descritas anteriormente debido a la pérdida parcial o completa de la actividad de una de las enzimas lisosómicas. En este caso, la TRE es necesaria para reponer una

enzima cuya actividad se ha perdido total o parcialmente, o una enzima ausente. Como se usa en el presente documento, la expresión "**enfermedad por almacenamiento lisosómico**" se utiliza indistintamente con la expresión "**trastornos por almacenamiento lisosómico**" (también puede denominarse

5 "**trastorno por almacenamiento lisosómico**"). Las enfermedades por almacenamiento lisosómico se pueden clasificar según el defecto o la deficiencia de la enzima en: (i) esfingolipidosis, (ii) mucopolisacaridosis, (iii) enfermedad por almacenamiento de glucógeno, (iv) mucolipidosis, (y) oligosacaridosis, (vi) lipidosis, (vii) trastorno del transporte lisosómico, etc.

10 A continuación, las enfermedades por almacenamiento lisosómico se describirán con más detalle según su clasificación.

Como se usa en el presente documento, el término "**esfingolipidosis**" se refiere a un síndrome de deficiencia determinado genéticamente de la enzima lisosómica que hidroliza las cadenas laterales de carbohidratos o las

15 cadenas laterales de colina de los esfingolípidos. Las enfermedades se clasifican según la distribución de cada lípido almacenado, tal como la enfermedad de Krabbe causada por la deficiencia de galactocerebrosidasa, enfermedad de Fabry causada por la deficiencia de α -galactosidasa A, enfermedad de Niemann-Pick causada por la deficiencia de esfingomielinasa,

20 enfermedad de Gaucher causada por la deficiencia de glucocerebrosidasa, enfermedad de Tay–Sachs, causada por la deficiencia de hexosaminidasa A, etc., y son las enfermedades que se heredan de forma autosómica recesiva, a excepción de la enfermedad de Fabry, que es una enfermedad genética ligada al cromosoma X.

25 En la presente divulgación, la expresión "**mucopolisacaridosis**" (MPS)

se refiere a un síndrome de deficiencia genética de la hidrolasa de mucopolisacáridos causado por la deficiencia de la enzima degradante de la cadena de carbohidratos, sulfatasa, acetiltransferasa, etc. El síntoma principal de la mucopolisacaridosis (MPS) es la secreción excesiva de mucopolisacáridos en la orina. En la actualidad, la MPS se clasifica en 6 tipos, entre las cuales la enfermedad de tipo I incluye el síndrome de Hurler y el síndrome de Scheie, el tipo II incluye el síndrome de Hunter, el tipo III incluye el síndrome de Sanfilippo de tipos A, B, C y D; el tipo IV incluye el síndrome de Morquio A y B; el tipo VI incluye el síndrome de Maroteaux-Lamy y el tipo VII incluye el síndrome de Sly.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**enfermedad por almacenamiento de glucógeno**" (también conocida como "**glucogenosis**") se refiere a un error congénito del metabolismo de los carbohidratos causado por el almacenamiento del glucógeno y se divide en los subtipos I-VII. Los subtipos de enfermedad por almacenamiento de glucógeno asociados con la enfermedad por almacenamiento lisosómico (LSD) son los tipos II (enfermedad de Pompe) y III b (enfermedad de Danon).

Una descripción detallada de las enfermedades por almacenamiento lisosómico descritas en el presente documento, así como las divulgadas en la tabla 1, se proporciona en: The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases (Scriver's OMMBID), parte 16 (David L. Valle, Stylianos Antonarakis, Andrea Ballabio, Arthur L. Beaudet, Grant A. Mitchell, McGraw-Hill Education, 2007).

La "**mucopolisacaridosis de tipo I (MPS I)**" es una enfermedad metabólica hereditaria causada por un defecto en la enzima α -L-iduronidasa

(IDUA), cuya función es descomponer los mucopolisacáridos ácidos sulfato de heparano y sulfato de dermatano. Los niveles insuficientes de IDUA provocan una acumulación patológica de estos mucopolisacáridos en los tejidos y órganos del paciente, por ejemplo, en el corazón, el hígado y el sistema nervioso central. Los síntomas, incluidas la neurodegeneración y el retraso mental, comienzan en la infancia y, debido al daño en los órganos, puede producirse una muerte prematura. Una deficiencia genética en la enzima de descomposición de carbohidratos α -L-iduronidasa causa una enfermedad por almacenamiento lisosómico conocida como mucopolisacaridosis de tipo I (MPS I). La MPS I grave se conoce habitualmente como síndrome de Hurler y está asociada con diversos problemas tales como retraso mental, opacidad corneal, rasgos faciales toscos, cardiopatía, enfermedad respiratoria, hepatomegalia y esplenomegalia, hernias y rigidez articular. Los pacientes que padecen el síndrome de Hurler normalmente mueren antes de los 10 años de edad. En la forma moderada, conocida como síndrome de Hurler-Scheie, la función mental generalmente no se ve muy afectada, pero los problemas físicos también pueden causar la muerte en la adolescencia o entre los veinte y veintinueve años de edad. El síndrome de Scheie es una forma leve de MPS I. Es compatible con una esperanza de vida normal, pero la rigidez articular, la opacidad corneal y la valvulopatía cardíaca causan problemas graves.

La "**mucopolisacaridosis de tipo II (MPS II)**" o "síndrome de Hunter" es un trastorno metabólico hereditario ligado al cromosoma X causado por una deficiencia de la enzima iduronato 2-sulfatasa (I2S). La I2S se localiza en los lisosomas y desempeña una función importante en el catabolismo de los glucosaminoglucanos (GAG) de sulfato de heparano y de dermatano. En

ausencia de la enzima, estos sustratos se acumulan en las células, causando finalmente estancamiento y después muerte celular y destrucción tisular. Debido a la expresión generalizada de la enzima, diferentes tipos de células, órganos y sistemas se ven afectados en pacientes con MPS II. Un rasgo clínico

5 característico de esta enfermedad es la degeneración del sistema nervioso central (SNC), lo que conduce a un deterioro cognitivo (p. ej., disminución del coeficiente intelectual). Adicionalmente, las resonancias magnéticas de los pacientes revelaron daños en la sustancia blanca, expansión de los espacios perivasculares en el parénquima cerebral, los ganglios, el cuerpo caloso y el

10 tronco encefálico, atrofia y ventriculomegalia (Wang *et al.* Molecular Genetics and Metabolism, 2009). La enfermedad suele manifestarse en los primeros años de vida con organomegalia y anomalías esqueléticas. Algunos pacientes experimentan una pérdida progresiva de la función cognitiva, y la mayoría de los pacientes mueren por complicaciones relacionadas con la enfermedad en la

15 primera o segunda década de vida (Raluy-Callado M *et al.* Orphanet J Rare Dis. 2013;8:101;).

Como se usa en el presente documento, la expresión "**componente neurológico**" se refiere a una enfermedad o trastorno que afecta al sistema nervioso central y/o cuya etiología está relacionada con el sistema nervioso

20 central. Los ejemplos de enfermedades o trastornos del SNC incluyen, pero sin limitación, neuropatía, amiloidosis, cáncer, enfermedad o trastorno ocular, infección vírica o microbiana, inflamación, isquemia, enfermedad neurodegenerativa, trastorno convulsivo, trastornos conductuales y enfermedad por almacenamiento lisosómico. Los ejemplos específicos de trastornos

25 neurológicos incluyen, pero sin limitación, enfermedades neurodegenerativas

(incluidas, pero sin limitación, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome posmielítico, síndrome de Shy-Drager, atrofia olivopontocerebelosa, enfermedad de Parkinson, atrofia multisistémica, degeneración estriatonígrica), tauopatías (incluidas, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), enfermedades priónicas (incluidas, pero sin limitación, encefalopatía espongiforme bovina, encefalopatía espongiforme ovina, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann-Strössler, enfermedad de Schenker, enfermedad consuntiva crónica e insomnio familiar letal), parálisis, enfermedad de la motoneurona y trastornos heterodegenerativos del sistema nervioso (incluidos, pero sin limitación, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, ceroidolipofuscinosis neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome de Menkes de pelo rizado, síndrome de Cockayne, síndrome de Hallerwarden-Spatz, enfermedad de Lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Unferricht-Lundborg), demencia (incluidas, pero sin limitación, enfermedad de Pick y ataxia espinocerebelosa), cáncer (p. ej., cáncer del sistema nervioso central y/o del cerebro, incluidas metástasis cerebrales de cáncer en cualquier área del cuerpo).

Los compuestos de la invención se pueden usar en terapia individualmente o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, un compuesto de la invención que comprende una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplado por un conector puede coadministrarse con al menos un agente terapéutico adicional. En realizaciones específicas, el agente terapéutico adicional es un agente terapéutico eficaz en el tratamiento del mismo trastorno neurológico para el que se usa el compuesto de la invención u

otro trastorno neurológico. Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales incluyen, pero sin limitación, los diversos fármacos neurológicos descritos anteriormente, incluidos inhibidores de la colinesterasa (tales como donepezilo, galantamina, rovastigmina y tacrina), antagonistas del receptor de NMDA (tales como memantina), inhibidores de la agregación del péptido beta amiloide, antioxidantes, moduladores de γ -secretasa, miméticos del factor de crecimiento nervioso (NGF) o agentes de terapia génica con NGF, agonistas de PPAR γ , inhibidores de la HMS-CoA reductasa (estatinas), ampakinas, bloqueantes de los canales de calcio, antagonistas de receptores de GABA, inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa, inmunoglobulina, destinada a la administración intravenosa, agonistas de receptores muscarínicos, moduladores de receptores nicotínicos, agentes de inmunización activos o pasivos contra el péptido beta amiloide, inhibidores de fosfodiesterasa, antagonistas del receptor de serotonina y anticuerpos contra el péptido beta amiloide. Dichas terapias combinadas como se han definido anteriormente incluyen la coadministración (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma composición o en composiciones separadas) y administración por separado, en cuyo caso la administración de un compuesto que contiene una enzima terapéutica y un elemento de transporte acoplado por un conector de la invención, se puede realizar antes, simultáneamente y/o después de la administración de un agente terapéutico y/o adyuvante adicional.

Algunas expresiones definidas anteriormente pueden aparecer más de una vez, en cuyo caso cada expresión debe definirse con independencia de las otras.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán en detalle

realizaciones ilustrativas de la presente invención. Por otra parte, cada una de las explicaciones e implementaciones proporcionadas como ejemplo en el presente documento puede ser válida para otras explicaciones e implementaciones proporcionadas como ejemplo. Por lo tanto, todas las combinaciones de los diversos factores descritos en el presente documento están dentro del alcance de la presente invención. Por otra parte, el alcance de la presente invención no se limita a la descripción específica proporcionada a continuación.

Realizaciones de la invención

A continuación, la presente invención se describirá en más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, los ejemplos descritos a continuación tienen únicamente fines ilustrativos y no se pretende que limiten la presente invención.

Ejemplo 1: Obtención

Para la obtención de los compuestos, se cultivaron y purificaron células animales en las que se introdujo un vector de expresión de células animales.

Construcción de vectores de expresión

Las secuencias de aminoácidos primera LC-HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 2, 8, 9, 10 y 11) y segunda HC-HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 4, 5, 12, 13, 14, 15)) para obtener variantes de HIR-FAB-IDS, que incluyen el péptido señal MDWTWRVFCLLAVAPGAHS, se convirtieron en secuencias de nucleótidos. Para la síntesis génica seguida de la clonación en el vector pCLN-1, se agregaron el siguiente sitio de restricción HindIII y la secuencia Kozak al extremo 5' de las secuencias. Se añadieron dos codones de terminación y un sitio de restricción XbaI al extremo 3' de las secuencias.

La optimización de codones de la secuencia de nucleótidos para células de hámster chino se llevó a cabo utilizando los recursos: <http://gcua.schoedl.de> y <http://www.kazusa.or.jp>. La síntesis de las cadenas ligera y pesada LC-HIR-FAB-IDS y HC-HIR-FAB-IDS se realizó en GenArt (EE. UU.) y se transfirieron
 5 como parte de los vectores pRA1675 y pRA1673 (que contienen los genes LC-HIR-FAB -IDS y HC-HIR-FAB-IDS, respectivamente).

Las secuencias HC-HIR-FAB-IDS, LC-HIR-MAB de los plásmidos pRA1675 y pRA1673 se clonaron en el vector de expresión pCLN-1 en los sitios HindIII/XbaI para obtener los vectores pGNR-055-007 (pCLN-1-HC-HIR-FAB-IDS) y pGNR-055- 008 (pCLN-1-LC-HIR-FAB-IDS). Los vectores
 10 resultantes se linealizaron en sitios BspHI/PvuI.

Los vectores de la presente invención se construyeron de acuerdo con técnicas de biología molecular bien conocidas en este campo. Véase Brown T, "Gene Cloning" (Chapman & Hall, Londres, GB, 1995); Watson R, *et al.*, "Recombinant DNA", 2.^a ed. (Scientific American Books, Nueva York, NY, EE. UU., 1992); Alberts B, *et al.*, "Molecular Biology of the Cell" (Garland Publishing Inc., Nueva York, NY, EE. UU., 2008); Innis M, *et al.*, eds., "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Academic Press Inc., San Diego, CA, EE. UU., 1990); Erlich H, ed., "PCR Technology. Principles and Applications for
 15 DNA Amplification" (Stockton Press, Nueva York, NY, EE. UU., 1989); Sambrook J, *et al.*, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU., 1989); Bishop T, *et al.*, "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press, Oxford, GB, 1987); Reznikoff W, ed., "Maximizing Gene Expression"
 20 (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, EE. UU., 1987); Davis L, *et al.*, "Basic
 25

Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, NY, EE. UU., 1986), Schleef M, ed., "Plasmid for Therapy and Vaccination" (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001).

Obtención de una línea celular monoclonal

5 Línea celular parental CHO-S. Las células se cultivaron a 37 °C, CO₂ al 5 %, 70 % de humedad, en medio BalanCD CHO Growth A (Invitrogen). Se llevó a cabo transfección estable en un dispositivo NEON (Invitrogen) según el protocolo convencional para células CHO utilizando dos plásmidos linealizados pCLN-1-HC-HIR-FAB-IDS y pCLN-1-LC-HIR-FAB-IDS. Se utilizó un cociente de
10 ADN equimolar para la transfección.

 Después de 48 horas, los conjuntos transfectados se sembraron en miniconjuntos en placas de 96 pocillos en medio BalanCD CHO Growth A que contenía 600 µg/ml del antibiótico selectivo neomicina. Los miniconjuntos se cultivaron en condiciones estacionarias durante 10 días a 37 °C, CO₂ al 5 %,
15 70 % de humedad, después de lo cual se llevaron a cabo una serie de evaluaciones de productividad utilizando EIA. El miniconjunto líder se clonó en medio ClonaCell Flex semisólido (STEMCELL) para el crecimiento de una sola colonia utilizando placas de 6 pocillos. Las placas se incubaron durante 10 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %, 70 % de humedad.

20 Durante la evaluación, se determinó la concentración de la proteína diana HIR-FAB-IDS secretada en el líquido de cultivo. La determinación se realizó mediante el método de EIA de tipo sándwich, utilizando en lugar de anticuerpos primarios un fragmento del receptor de insulina humana recombinante (5 µg/ml en un tampón de carbonato-bicarbonato pH 9,6); como
25 anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos de rata conjugados con

peroxidasa de rábano picante contra iduronato-2-sulfatasa (diluidos 1:10000). Revelada con una solución de tetrametilbencidina, la reacción se detuvo con ácido clorhídrico 0,5 M.

En función de los resultados del cribado de placas de 6 pocillos, se
5 seleccionaron 20 miniconjuntos principales con productividad de 0,4 a 2,1 mg/l, que se transfirieron a matraces para su adaptación al cultivo en suspensión. Para adaptarse al cultivo en suspensión, se realizaron 3 pases, tras lo cual se congelaron 20 miniconjuntos.

Los clones se seleccionaron automáticamente utilizando un robot
10 ClonePix (Molecular Devices) en placas de 96 pocillos. Se exploraron los clones resultantes. Con este fin, se simuló un proceso de cultivo de 7 días en modo discontinuo, en el que los clones evaluaron según los siguientes parámetros: la dinámica de la viabilidad del cultivo, la dinámica de la densidad de células viables, la concentración de la diana HIR-FAB-IDS y la dependencia
15 de la producción volumétrica de la densidad celular acumulada.

Cultivo de células productoras

El cultivo de células productoras que expresan HIR-FAB-IDS se llevó a cabo en un modo semicontinuo utilizando el medio de cultivo BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific) y el aditivo nutritivo BalanCD CHO Feed 2 (Irvine
20 Scientific) durante 12 días en un biorreactor con un agitador superior a una temperatura de 37 °C y pH 6,9. Después del proceso de cultivo, el líquido de cultivo se aclaró mediante filtración profunda y se transfirió para su aislamiento.

Aislamiento y purificación

El aislamiento y la purificación se llevan a cabo utilizando tecnologías
25 convencionales para el aislamiento y la purificación de proteínas. El compuesto

se puede aislar o purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para aislar o purificar proteínas, por ejemplo, mediante cromatografía (p. ej., intercambio iónico, cromatografía líquida de alto rendimiento, asistida por afinidad, cromatografía en columna de proteína A y de clasificación por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o cualquier otra técnica convencional de aislamiento o purificación de proteínas.

Ejemplo 2. Determinación del nivel de actividad enzimática del fragmento Fab de un anticuerpo contra el receptor de insulina acoplado a la secuencia de aminoácidos de la iduronato-2-sulfatasa

La actividad específica de HIR-FAB-IDS y HIR-MAB-IDS se determinó fluorimétricamente utilizando 4-mutilumbeliferil-L-iduronida-2-sulfato (4-MUS) (Moscerdam Substrates, Países Bajos) (Voznyi YV *et al.*, 2001; Tolun AA, *et al.*, 2012; 9. Johnson BA *et al.*, 2013; Azadeh M *et al.*, 2017). Durante el análisis, el sustrato es hidrolizado por la iduronato-2-sulfatasa para producir 4-mutilumbeliferil-L-iduronida (MUBI), que es hidrolizada por la iduronidasa (IDUA, Aldurazyme, Genzyme, EE. UU.) a 4-metilumbeliferil (4-MU), que se detecta fluorimétricamente, usando los siguientes parámetros del fluorímetro: excitación de fluorescencia a una longitud de onda de 450 nm y detección de fluorescencia a una longitud de onda de 365 nm. La curva de calibración se construye utilizando una solución convencional 4-MU (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Durante el análisis, la mezcla se incuba primero a 37 °C, pH = 4,5 durante 4 horas, a continuación se añade IDS en una cantidad de 12 µg y la mezcla se incuba adicionalmente a 37 °C durante 24 horas. La incubación se detiene añadiendo 0,2 ml de carbonato de sodio 0,5 M, pH = 10,3. HIR-FAB-IDS presenta actividad enzimática específica (iduronato-2-sulfatasa) hacia el

sustrato 4-MU- α ldoA-2S (4-metilumbeliferil α -L-idopiranosiduronato-2-sulfato).

Instrumentos y equipo

1. Agitador termostático PST-60 HL-4 (BioSan, Letonia o similar).
2. Lector multifuncional Spectra Max M3 (Molecular Devices, EE. UU. o
5 similar).
3. Software para lector multifuncional Soft Max Pro (Molecular Devices,
EE. UU. o similar).
4. Balanza analítica ML 204 (Mettler Toledo, Suiza o calidad similar).
5. Placa negra de 96 pocillos con superficie no absorbente (Corning,
10 EE. UU., cat. n.º 3916 o similar).

Reactivos

1. Sal sódica de 4-metilumbeliferona (Sigma-Aldrich, producto n.º M1508
o equivalente).
2. α -L-iduronidasa humana recombinante (R&D SYSTEM, producto n.º
15 4119-GH o calidad equivalente).
3. Sal sódica de 2-sulfato del ácido 4-metilumbeliferil α -L-
idopiranosidurónico, 0,5 mg/vial (USBiological, producto n.º 017551 o
equivalente).
4. Acetato de sodio anhidro (AppliChem Panreac, producto n.º
20 141633.1211 o calidad equivalente).
5. Ácido acético (Fluka, producto n.º 49199 o calidad similar).
6. Seroalbúmina bovina (Sigma, producto n.º A7030 o calidad
equivalente).
7. Carbonato de sodio (Sigma-Aldrich, producto n.º S7795 o calidad
25 equivalente).

8. Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, producto n.º S6297 o calidad equivalente).

9. Trihidrato de diacetato de plomo (Aldrich, producto n.º 467863 o calidad equivalente).

5 10. Fosfato de sodio dihidrato (Sigma-Aldrich, producto n.º 71643 o calidad equivalente).

11. Ácido cítrico anhidro (AppliChem Panreac, producto n.º 141808 o calidad equivalente).

Preparación de soluciones

10 Solución de dilución de muestra, pH ($5,5 \pm 0,2$). Se colocan aproximadamente 4,1 g de acetato de sodio anhidro y 0,5 g de albúmina sérica bovina en un vaso de precipitados de 1 litro y se disuelven en 700 ml de agua purificada. El pH de la solución se ajusta a un valor de ($5,5 \pm 0,2$) con ácido acético. La solución resultante se transfiere a un matraz aforado de 1 litro, el
15 volumen de la solución se ajusta a la marca con agua purificada, se mezcla y se filtra a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm .

La vida útil es de 3 meses a temperaturas de 2 a 8 °C.

20 Solución de dilución de sustrato, pH ($5,00 \pm 0,05$). Se colocan 4,1 g de acetato de sodio anhidro, 1,9 g de diacetato de plomo trihidrato en un vaso de precipitados con un volumen de capacidad de 500 ml, se añaden 450 ml de agua purificada, y la mezcla se agita hasta que se disuelve. El pH de la solución se ajusta a un valor de ($5,00 \pm 0,05$) con ácido acético (aproximadamente 1,1 ml). La solución resultante se transfiere a un matraz aforado de 500 ml, el volumen de la solución se ajusta a la marca con agua
25 purificada, se mezcla y se filtra a través de un filtro de membrana con un

diámetro de poro de 0,45 μm .

La vida útil es de 3 meses a temperaturas de 2 a 8 °C.

Solución de sustrato (1,25 mmol/l). Se añaden 0,83 ml de la solución de dilución del sustrato a un frasco que contiene el sustrato (sal de sodio de 2-
5 sulfato del ácido 4-metilumbeliferil α -L-idopiranosidurónico) y se mezcla suavemente. La solución resultante se divide en alícuotas de 0,2 ml y se congela.

La vida útil es de 3 meses a una temperatura que no supere los -70 °C.

Solución de α -L-iduronidasa humana recombinante. Se añaden 400 μl
10 de agua purificada a un frasco que contiene α -L-iduronidasa humana recombinante (10 μg) y se mezcla. La solución resultante se divide en alícuotas de 0,1 ml y se congela.

La vida útil es de 3 meses a una temperatura que no supere los -70 °C.

Solución 0,1 M de ácido cítrico. Se colocan aproximadamente 19,2 g de
15 ácido cítrico anhidro en un matraz de 1 litro de capacidad, se disuelven en 900 ml de agua purificada, el volumen de la solución se ajusta hasta la marca con agua purificada y se filtra a través de un filtro de membrana de 0,22 μm .

La vida útil es de 3 meses a temperaturas de 15 a 25 °C.

Solución 0,2 M de fosfato de sodio disustituido. Se colocan
20 aproximadamente 35,6 g de fosfato de sodio dihidrato en un matraz de 1 litro de capacidad, se disuelven en 900 ml de agua purificada, el volumen de la solución se ajusta hasta la marca con agua purificada y se filtra a través de un filtro de membrana de 0,22 μm .

La vida útil es de 3 meses a temperaturas de 15 a 25 °C.

25 Solución de tampón de fosfato-citrato, pH (4,5 $\pm$ 0,1). Se mezclan

55,0 ml de una solución de ácido cítrico 0,1 M y 45,0 ml de una solución de fosfato sódico dibásico 0,2 M en un matraz aforado de 100 ml de capacidad y se filtran a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,22 μm .

5 La vida útil es de 3 meses a temperaturas de 15 a 25 °C.

Solución de bicarbonato de sodio 0,5 M. Se colocan aproximadamente 42,0 g de bicarbonato de sodio en un matraz aforado de 1 litro, se disuelven en 900 ml de agua purificada, el volumen de la solución se ajusta hasta la marca con agua purificada y se mezcla y se filtra a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,22 μm .

10

La vida útil es de 6 meses a temperaturas de 15 a 25 °C.

Solución de carbonato de sodio 0,5 M. Se colocan aproximadamente 53,0 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 1 litro de capacidad, se disuelven en 900 ml de agua purificada, el volumen de la solución se ajusta hasta la marca con agua purificada y se mezcla y se filtra a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,22 μm .

15

La vida útil es de 6 meses a temperaturas de 15 a 25 °C.

Solución de parada, pH (10,8 $\pm$ 0,5). Se añaden 900 ml de solución de carbonato de sodio 0,5 M y 100 ml de solución de bicarbonato de sodio 0,5 M a un matraz aforado de 1 litro de capacidad, se mezcla y se filtra a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,22 μm .

20

La vida útil es de 6 meses a temperaturas de 15 a 25 °C.

Solución primaria de sal sódica de 4-metilumbeliferona (100 $\mu\text{mol/ml}$). Se colocan aproximadamente 1,0 g (pesado con exactitud) de sal sódica de 4-metilumbeliferona en un matraz aforado de 50 ml de capacidad, se añaden

25

30 ml de agua purificada, se mezcla y se ajusta a la marca con agua purificada.

La solución se divide en alícuotas de 2,0 µl.

La vida útil es de 6 meses a una temperatura que no supere los -18 °C.

Solución convencional de sal sódica de 4-metilumbeliferona
5 (50 nmol/ml).

Una alícuota de la solución primaria de sal sódica de 4-metilumbeliferona se mantiene en un baño de agua durante 5 minutos a una temperatura de 37 °C. Las diluciones en serie se preparan según el siguiente esquema:

N.º de solución	p-p 4-MU ^a de partida	Solución n.º 2	Solución de parada	Concentración, nmol/ml
1	100	-	9900	1000
2	-	500	9500	50

^a 4-MU – Sal sódica de 4-metilumbeliferona.

10 Diluciones de la solución convencional de sal sódica de 4-metilumbeliferona. Las diluciones de una solución convencional de trabajo de sal sódica de 4-metilumbeliferona se preparan según el siguiente esquema:

N.º de diluciones	Volumen de solución convencional (50 nmol/ml), ml	Volumen de solución de parada, ml	Concentración, nmol/ml
1	0	5,00	0,0
2	0,05	4,95	0,5
3	0,10	4,90	1,0
4	0,15	4,85	1,5
5	0,20	4,80	2,0
6	0,25	4,75	2,5

N.º de diluciones	Volumen de solución convencional (50 nmol/ml), ml	Volumen de solución de parada, ml	Concentración, nmol/ml
7	0,30	4,70	3,0
8	0,35	4,65	3,5
9	0,40	4,60	4,0

Diluciones de la muestra de prueba. La muestra de prueba se diluye con una solución de dilución de muestra a una concentración de 1 mg/ml según el contenido real de HIR-FAB-IDS indicado en el certificado. A continuación se preparan diluciones en serie según el siguiente esquema:

N.º de tubo	Concentración de HIR-FAB-IDS, ng/ml	Volumen de solución, µl								
		Solución de HIR-FAB-IDS (1 mg/ml)	N.º de tubo							Solución de dilución de muestra
			1	2	3	4	5	6	7	
1	100000	100	-	-	-	-	-	-	-	900
2	10000		100	-	-	-	-	-	-	900
3	1000			100	-	-	-	-	-	900
4	100				100	-	-	-	-	900
5	10					100	-	-	-	900
6	5						100	-	-	100
7	2,5							100	-	100

- 5 Todas las diluciones se almacenan en hielo hasta que comiencen las pruebas.

En estudios adicionales, se utilizan soluciones de los tubos de ensayo n.º 5-7.

Realización de análisis

1ª reacción enzimática

5 Se añaden 10 µl de cada dilución de la muestra de prueba (en 2 repeticiones) a los pocillos de la placa; la solución de dilución de muestra se utiliza como solución de referencia. Se añaden 20 µl de solución de sustrato (sal sódica de 2-sulfato del ácido 4-metilumbeliferil α -L-idopiranosidurónico). La placa se cubre con película y se incuba en un agitador termostático durante 4
10 horas a una temperatura de $(37,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ y una velocidad de agitación de 250 rpm. La placa debe protegerse de la luz durante todo el periodo de incubación.

2ª reacción enzimática

Al final de la incubación, se añaden 20 µl de solución de tampón de
15 citrato-fosfato a los pocillos de la placa para detener la primera reacción enzimática. A continuación, se añaden a cada pocillo 10 µl de solución de α -L-iduronidasa recombinante y se mezclan suavemente. La placa se cubre con película y se incuba en un agitador termostático durante 22-26 horas a una temperatura de $37 ^\circ\text{C}$ y una velocidad de agitación de 250 rpm. La placa debe
20 protegerse de la luz durante todo el periodo de incubación.

Para detener la reacción, se añaden 200 µl de solución de parada a cada pocillo con la mezcla incubada.

Se añaden diluciones de la solución convencional de sal sódica de 4-metilumbeliferona en cantidades de 260 µl a los pocillos vacíos de la placa.

25 La señal de fluorescencia se mide en los pocillos de la placa a una

longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de detección de 460 nm.

Evaluación de los resultados

En función de los resultados de medición de la señal de fluorescencia en los pocillos con diluciones de una solución convencional de sal sódica de 4-metilumbeliferona, se traza una relación lineal entre la señal de fluorescencia y la concentración de sal sódica de 4-metilumbeliferona (nmol/ml). Usando la ecuación de la función lineal, se calcula la concentración de 4-metilumbeliferona producida durante la reacción en pocillos con diluciones de muestras de prueba y una solución de referencia (nmol/ml).

La actividad específica A, en unidades/μg, para cada dilución de las muestras de prueba se calcula mediante la fórmula:

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

donde: m es la concentración de 4-metilumbeliferona acumulada durante la reacción en los pocillos con una dilución determinada de la muestra de prueba (valor medio de 2 repeticiones), nmol/ml;

m_0 es la concentración de 4-metilumbeliferona producida durante la reacción en pocillos con una solución de referencia (valor medio de 2 repeticiones), nmol/ml;

0,26 es el volumen final de diluciones de la solución convencional y la muestra de prueba añadida a los pocillos de la placa para medir la señal de fluorescencia, ml;

240 - tiempo de la 1ª reacción enzimática, min;

C es el contenido de HIR-Fab-IDS en cada una de las diluciones preparadas de la muestra de prueba, ng/ml;

0,01 es el volumen de diluciones de la muestra de prueba agregada a la 1ª reacción enzimática, ml;

1000 es el factor de conversión de ng a µg.

El valor de actividad específica final para la muestra de prueba se calcula como el promedio de la actividad específica calculada para cada dilución.

Los resultados obtenidos para determinar la actividad enzimática de las variantes HIR-FAB-IDS y HIR-MAB-IDS en comparación con el fármaco Elaprase se presentan en la tabla 2.

10 Tabla 2. Evaluación de la actividad iduronato-2-sulfatasa de las variantes HIR-FAB-IDS y HIR-MAB-IDS frente a la enzima iduronato-2-sulfatasa sin modificar (Elaprase)

Nombres de las muestras	Actividad, U (nmol/min)/µg
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4)	27,0
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5)	20,0
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 12)	25,2
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 13)	30,2
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 14)	27,5
HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15)	23,4
HIR-MAB-IDS	11,0
HIR-MAB-IDS (AGT-182) (el valor está tomado de la patente de AGT-182 US8834874 B2, fig. 12 ejemplo 4, pág. 35)	0,85 (51,7+- 7 nmol/hora/µg) US8834874 B2
Elaprase (Shire Human Genetic Therapies Inc., EE. UU.)	14,6

Como puede observarse a partir de los resultados presentados en la tabla 2, el fármaco HIR-FAB-IDS presenta actividad enzimática específica (iduronato-2-sulfatasa) hacia el sustrato 4-MU- α ldoA-2S (4-metilumbeliferil α -L-idopiranosiduronato-2-sulfato) 27,0 U/ μ g. En este caso, la enzima recombinate libre iduronato-2-sulfatasa presenta una actividad de 14,6 U/ μ g. El anticuerpo del receptor de insulina de longitud completa acoplado a la secuencia de aminoácidos de iduronato-2-sulfatasa (HIR-MAB-IDS) presenta una actividad específica más baja (11,0 U/ μ g) en comparación con HIR-FAB-IDS.

Como resultado de los estudios, se demostró que la iduronato-2-sulfatasa en la composición de HIR-FAB-IDS conserva las principales propiedades funcionales (enzimáticas) a nivel de la enzima recombinate libre. Al mismo tiempo, la actividad específica de HIR-FAB-IDS es mayor que la del fármaco Elaprased y HIR-MAB-IDS (AGT-182).

Por lo tanto, se detectó un aumento de la actividad enzimática de un compuesto que contiene un elemento de transporte, que es un fragmento Fab de una inmunoglobulina IgG específica para un epítipo del receptor de insulina, acoplado directamente o mediante un conector a una enzima terapéutica, en comparación con una enzima terapéutica sin elemento de transporte y con una enzima terapéutica con un elemento de transporte representada por MAB.

Ejemplo 3. Análisis de la interacción de fragmentos Fab modificados de anticuerpos contra el receptor de insulina con el receptor de insulina humana y de ratón.

Para realizar una evaluación cuantitativa de la interacción con el receptor

de insulina de anticuerpos monoclonales recombinantes de longitud completa, variantes de fragmentos Fab, así como sus modificaciones con IDS, se utiliza una técnica de ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), formato sándwich, (Kim C, Seo J, Chung Y *et al.*, 2017). El método se basa en la unión
 5 de las proteínas HIR-MAB (83-14 Mab), HIR-MAB-IDS y HIR-FAB-IDS con un fragmento proteico del receptor de insulina humana (fragmento proteico del receptor de insulina humana (Abcam n.º de cat. ab200510)) o receptor de insulina de ratón (mInsR, R&D Systems, Inc., n.º de cat. 7544-MR).

El proceso de detección se lleva a cabo después de la incubación del
 10 complejo del receptor de insulina humana y la proteína en estudio con anticuerpos secundarios: anticuerpos de cabra específicos de Fab conjugados con peroxidasa de rábano picante contra la inmunoglobulina humana (IgG anti-humana (específica de Fab) - peroxidasa (Sigma-Aldrich, n.º de cat. A0293)).

Se utilizaron anticuerpos de ratón previamente descritos contra el
 15 receptor de insulina humana (INSR/anticuerpo alfa del receptor de insulina 83-14 AHR0221 Life technologies, n.º de cat. AHR0221) y contra el receptor de insulina de ratón (mAb clon 83-14 de ratón anti-receptor de insulina humana Cell sciences) como control positivo, n.º de cat. MAI1). La detección se lleva a cabo utilizando anticuerpos policlonales de cabra conjugados con peroxidasa
 20 de rábano picante contra inmunoglobulina de ratón (pAb de cabra contra IgG Ms (HRP) Abcam, n.º de cat. ab97023).

Los resultados obtenidos para determinar la interacción de las moléculas probadas con el receptor de insulina humana y de ratón se presentan en las tablas 3 y 4.

25 Tabla 3. Unión de fragmentos Fab modificados de anticuerpos contra el

receptor de insulina con el receptor de insulina humana (Abcam n.º de cat. ab200510).

N.º	Nombre de la muestra	CE50, ng/ml	Unión al receptor del anticuerpo mAb 83-14, %
1	INSR/Anticuerpo 83-14 contra el receptor de insulina alfa (Life technologies, n.º de cat. AHR0221)	32,15	102
2	mAb clon 83-14 de ratón anti-receptor de insulina humano (Cell sciences, n.º de cat. MAI1)	33,10	100
3	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4)	24,31	136
4	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5)	50,25	66
5	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 12)	120,55	27
6	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 13)	60,35	55
7	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 14)	35,10	94
8	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15)	155,67	21
9	HIR-MAB-IDS	26,19	126

Tabla 4. Unión de fragmentos Fab modificados de anticuerpos contra el receptor de insulina al receptor de insulina de ratón (R&D Systems, Inc., n.º de cat. 7544-MR).

N.º	Nombre de la muestra	CE50, ng/ml	Unión al receptor, %
1	INSR/Anticuerpo 83-14 contra el receptor de insulina alfa	> 800	0
2	mAb clon 83-14 de ratón anti-receptor de insulina humano	> 800	0
3	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4)	> 800	0
4	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5)	> 800	0
5	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 12)	> 800	0
6	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 13)	> 800	0
7	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 14)	> 800	0
8	HIR-FAB-IDS (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15)	> 800	0
9	HIR-MAB-IDS	> 800	0

Por lo tanto, se demostró que HIR-FAB-IDS interactúa específicamente con el dominio extracelular de la subunidad alfa del receptor de insulina humano, pero no interactúa con el dominio extracelular del receptor de insulina

de ratón. La unión de fragmentos Fab de anticuerpos contra el receptor de insulina con el receptor de insulina humano es comparable a la del anticuerpo de control (mAb 83-14) y supera la unión con el anticuerpo similar de longitud completa contra el receptor de insulina (HIR-MAB-IDS).

- 5 La interacción de HIR-FAB-IDS con el receptor de insulina humana es fundamental para garantizar la transcitosis activa de la molécula a los lisosomas celulares, en general, a través de la BHE, en particular.

Ejemplo 4. Análisis de la distribución tisular de fragmentos Fab radiomarcados de un anticuerpo contra el receptor de insulina acoplado a la secuencia de aminoácidos de la iduronato-2-sulfatasa [¹²⁵I]-HIR-Fab-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4), [¹²⁵I]-HIR-Mab-IDS, [¹²⁵I]-IDS (control) después de la administración intravenosa en macacos cangrejeros.

10

A los animales de experimentación se les inyectó una vez en la vena femoral izquierda la molécula correspondiente de la sustancia de ensayo en una dosis diana de 2 ml/kg de peso corporal mediante inyección de embolada intravenosa durante 1-2 minutos. El nivel de dosis radiactiva diana fue de 1 MBq/kg de peso corporal del animal para todas las moléculas estudiadas.

15

El animal que recibió la sustancia de prueba fue sedado mediante inyección intramuscular de clorhidrato de ketamina antes de la administración intravenosa de una dosis excesiva de Doletil (pentaborbitona sódica). Los animales fueron sacrificados de forma humanitaria 2 horas después de la administración de la sustancia de prueba. Durante la sedación, se extrajeron 2 ml de sangre de cada animal de la vena cefálica y se centrifugaron para obtener plasma. La concentración de radiactividad se midió en el plasma sanguíneo de animales. Una vez confirmada la muerte, cada animal se congeló

20

25

rápidamente en una mezcla de dióxido de carbono sólido en hexano. Una vez completamente congelados, los cuerpos se colocaron en un molde que contenía pasta de carboximetilcelulosa acuosa al 2 % (p/v). Se tomaron varias secciones sagitales longitudinales (nominalmente de 30 µm) en al menos 5
5 niveles del cuerpo y, si fue necesario, 3 niveles de la cabeza para cada animal.

Las secciones unidas a la cinta Filmolux 610 (Neschan) se liofilizaron en un liofilizador de sobremesa GVD03 (Girovac Ltd) y se colocaron en placas de rayos X FUJI (tipo BAS-MS, Raytek Scientific Ltd). Se colocaron patrones de sangre marcados con el isótopo [¹²⁵I] con la actividad adecuada, también
10 preparados en forma de secciones con un espesor nominal de 30 µm, sobre placas radiográficas.

Después de revelar en una caja de plomo recubierta de cobre durante 7 días, las placas radiográficas se procesaron utilizando un sistema radiográfico FUJI FLA-5000 (Raytek Scientific Ltd). Las imágenes electrónicas se analizaron
15 utilizando un sistema de análisis de imágenes por PC (software Seescan 2, LabLogic Ltd). Se utilizaron patrones de [¹²⁵I] incluidos en cada autorradiograma para construir curvas de calibración en un intervalo de concentraciones de radiactividad.

Los datos de concentración tisular se registraron como equivalentes de
20 ng de [¹²⁵I]HIR-Fab-IDS [¹²⁵I]HIR-Mab-IDS y [¹²⁵I]-IDS (control).

Los resultados se expresaron con tres números significativos con no más de dos decimales. Las tablas de datos se generaron por ordenador y los datos individuales se redondearon de forma adecuada.

[¹²⁵I]HIR-Fab-IDS, [¹²⁵I]HIR-Mab-IDS y [¹²⁵I]-IDS (control) se
25 administraron a macacos cangrejeros macho como una dosis intravenosa única

a niveles de dosis nominales de 0,0020 mg/kg, 0,0015 mg/kg y 0,0010 mg/kg de peso corporal. Se realizó el sacrificio del animal 2 horas después de la administración de cada fármaco, después de lo cual los animales se congelaron para estudios utilizando autorradiografía de cuerpo entero.

5 Después de la administración intravenosa, los fármacos se absorbieron y distribuyeron ampliamente por todos los tejidos del cuerpo y, en el momento de la muerte, todos los tejidos estudiados habían estado expuestos a ellos. El límite inferior de cuantificación fue 0,2, 0,03 y 0,097 ng de equivalente de fármaco/g para todas las mediciones de concentración en tejido animal,
10 respectivamente.

 Las concentraciones de radiactividad en plasma y sangre del animal tratado con [¹²⁵I]HIR-Fab-IDS fueron 2,55 y 3,11 ng eq/g, respectivamente (cociente sangre:plasma 1,22). Estaban presentes niveles cuantificables de radiactividad en varias regiones del cerebro, incluido el bulbo raquídeo (1,09 ng
15 eq/g), la corteza cerebral (1,03 ng eq/g), el cerebelo (0,908 ng eq/g), el hipotálamo (0,869 ng eq/g)/g), la sustancia arborescente del cerebelo (0,799 ng eq/g), la protuberancia (0,793 ng eq/g) y la médula del cerebro (0,562 ng eq/g); la relación TP varió entre 0,22 y 0,43.

 Las concentraciones de radiactividad en plasma y sangre del animal
20 tratado con [¹²⁵I]HIR-Mab-IDS fueron 2,13 y 1,86 ng eq/g, respectivamente (cociente sangre:plasma 0,87). Estaban presentes niveles cuantificables de radiactividad en varias áreas del cerebro del animal. Estas áreas incluyeron el bulbo raquídeo (0,803 ng eq/g), la sustancia blanca cerebelosa (0,606 ng eq/g), el cerebelo (0,494 ng eq/g), la corteza cerebral (0,453 ng eq/g), la
25 protuberancia (0,438 ng eq/g). d), la médula del cerebro (0,288 ng eq/g) y el

hipotálamo (0,279 ng eq/g), Los cocientes de concentración de TP oscilaron entre 0,13 y 0,38.

Las concentraciones en plasma y sangre en el animal tratado con [¹²⁵I]IDS fueron 0,910 y 0,753 ng eq/g, respectivamente (cociente 5 sangre:plasma 0,83). Estaban presentes niveles cuantificables de radiactividad en todo el cerebro (0,113 ng eq/g), pero las concentraciones estuvieron por debajo del límite de cuantificación (0,097 ng eq/g) en todas las regiones examinadas: bulbo raquídeo, corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo, sustancia blanca cerebelosa, protuberancia y médula del cerebro. Las concentraciones 10 en los tejidos del SNC fueron significativamente menores que en el plasma y la sangre.

Estos resultados demuestran que las sustancias unidas a HIR-Fab-IDS, así como sustancias unidas a HIR-Mab-IDS, en comparación con las sustancias unidas a IDS, penetraron la barrera hematoencefálica, los tejidos del 15 SNC se expusieron a la sustancia de prueba o a sus metabolitos marcados y la radioactividad transmitida a través de la sangre tuvo poco efecto en la determinación de la concentración en los tejidos del SNC (figuras 1 y 2). Por otra parte, HIR-Fab-IDS mostró una distribución más amplia en el tejido corporal en comparación con la molécula HIR-Mab-IDS (tabla 5, figura 3).

20 Cabe señalar que en el ejemplo 10 de la invención US8834874 B2 (AGT-182 o HIR-MAB-IDS), la eficacia de penetración en el cerebro humano se estima en un 1 % de la dosis administrada por cada 1000 gramos de tejido cerebral basándose en datos experimentales sobre la penetración de AGT-182 (HIR-MAB-IDS) en el cerebro de macaco de la India. Se afirma que a este nivel 25 de penetración, se espera alcanzar el 20 % de la actividad iduronato-2-

sulfatasa (IDS) en el cerebro humano, lo que eliminará la acumulación de glucosaminoglucanos en el cerebro de una persona enferma.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos sobre la penetración en el cerebro de los macacos cangrejeros (tabla 5), se puede concluir que el presente compuesto penetra en el cerebro de los macacos cangrejeros casi 2 veces mejor que AGT-182 (HIR-MAB-IDS), es decir: 0,84 ng eq/g de HIR-FAB-IDS frente a 0,43 ng eq/g de HIR-MAB-IDS. En consecuencia, esto significa que HIR-FAB-IDS penetra en el cerebro humano con una eficiencia del 2 %. Según los cálculos mostrados en el ejemplo 10 del documento US8834874B2, se espera alcanzar el 40 % de la actividad iduronato-2-sulfatasa en el cerebro humano, excluyendo el aumento de actividad de HIR-FAB-IDS en comparación con HIR-MAB-IDS (AGT-182), consúltese tabla 2.

Si tenemos en cuenta el hecho del aumento de la actividad específica de HIR-FAB-IDS sobre HIR-MAB-IDS (AGT-182), que se muestra en el ejemplo 2, tabla 2 - 27 U/μg para el presente compuesto y 11 U/μg para el opuesto, así como una mayor penetración en el cerebro: $27/11 = 2,4$ veces mayor actividad iduronato-2-sulfatasa específica, $0,84/0,43 = 1,95$ veces mayor penetración en el cerebro, lo que da lugar a una restauración del 20 % de la actividad de IDS en el cerebro del paciente durante la terapia HIR-MAB-IDS (AGT-182) y una restauración del $20 \% * 2,4 * 1,95 = 93,6 \%$ de la actividad iduronato-2-sulfatasa en el cerebro de un paciente con MPS de tipo II del nivel de actividad de IDS en el cerebro de una persona sana. Por lo tanto, la presente invención restaurará casi por completo la función enzimática de IDS en el cerebro de una persona enferma, mientras que el opuesto AGT-182 (HIR-MAB-IDS) solo restaura un 20 % (93 % frente a 20 %).

Por lo tanto, se ha descubierto que la administración de un compuesto que contiene un elemento de transporte, que es un fragmento Fab de una inmunoglobulina IgG específica para un epítipo del receptor de insulina, acoplado directamente o mediante un conector a una enzima terapéutica, proporciona un mayor grado de sustitución de la actividad de la enzima terapéutica en el cerebro humano en comparación con los compuestos que contienen Mab.

Tabla 5. Concentraciones de radiactividad en tejidos de macaco cangrejero después de una única administración intravenosa de [¹²⁵I]-HIR-Fab-IDS a un nivel de dosis nominal de 0,0020 mg/kg de peso corporal

Tejido	Concentraciones de radiactividad en los tejidos		
	[¹²⁵ I] HIR-Fab-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4)	[¹²⁵ I] HIR-Mab-IDS (AGT-182)	[¹²⁵ I]-IDS
Plasma	2,55	2,13	0,91
Sangre	3,11	1,86	0,75
Corteza suprarrenal	18,3	5,29	4,47
Médula suprarrenal	11,5	2,17	3,26
Pared aórtica	3,29	1,96	BLC
Médula ósea	6,37	3,26	4,39
Periostio	3,32	BLC	0,95
Tejido adiposo pardo	2,51	0,97	0,54
Glándula bulbouretral	0,98	BLC	0,60
Membrana mucosa del ciego	1,72	0,19	0,25

Tejido	Concentraciones de radiactividad en los tejidos		
	[¹²⁵ I] HIR-Fab-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4)	[¹²⁵ I] HIR-Mab-IDS (AGT-182)	[¹²⁵ I]-IDS
Epidídimo	3,09	0,31	0,53
Corteza renal	10,1	4,25	4,33
Médula renal	6,37	2,39	1,70
Membrana mucosa del intestino grueso	1,42	0,41	0,24
Hígado	21,4	7,63	18,0
Pulmón	4,15	1,10	2,35
Músculos	0,51	0,09	0,28
Miocardio	3,78	0,91	1,25
Mucosa nasal	1,18	0,61	0,72
Pared esofágica	1,53	0,51	0,48
Páncreas	2,68	0,70	0,69
Membrana mucosa del recto	1,15	0,39	0,27
Glándulas salivales	1,01	0,23	0,82
Vesícula seminal	2,08	BLC	BLC
Derma	1,20	0,20	0,39
Membrana mucosa del intestino delgado	3,14	0,62	1,62
Médula espinal	0,57	0,41	0,17

Tejido	Concentraciones de radiactividad en los tejidos		
	[¹²⁵ I] HIR-Fab-IDS (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4)	[¹²⁵ I] HIR-Mab-IDS (AGT-182)	[¹²⁵ I]-IDS
Bazo	17,9	10,4	11,6
Testículo	1,34	0,18	0,41
Lengua	0,92	0,30	0,64
Tráquea	0,65	0,32	0,45
Pared de la vejiga	7,30	3,49	4,18
Cerebro (completo)	0,84	0,43	0,11
Corteza cerebral	1,03	0,45	BLC
Médula cerebral	0,56	0,29	BLC
Cerebelo	0,91	0,49	BLC
Hipotálamo	0,87	0,28	BLC
Bulbo raquídeo	1,09	0,80	BLC
Protuberancia	0,79	0,44	BLC
Sustancia arborescente del cerebelo	0,80	0,61	BLC
Glándula pineal	1,03	0,39	BLC
Hipófisis	0,80	0,60	BLC

NA: no aplicable

BLC: concentración bajo el límite inferior de cuantificación

La presente descripción presenta compuestos que contienen enzimas terapéuticas que presentan su actividad enzimática específica en estos

compuestos y elementos de transporte capaces de interactuar con el receptor de insulina, al tiempo que tienen la capacidad de transportar enzimas terapéuticas a los lisosomas tisulares, incluso a través de la BHE hasta los lisosomas del tejido nervioso. Por lo tanto, los compuestos presentan una alta actividad y una mayor capacidad para ser transportados a los lisosomas de las células tisulares de diversos órganos, incluidos los lisosomas de las células del tejido nervioso, lo que sugiere el uso de la presente invención para terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento o prevención de un sujeto con una enfermedad por almacenamiento lisosómico.